

9. Isoamyl alcohol/Chloroform を 1.0ml 加える。
10. 4-5 を繰り返す。
11. 上清を取り除く。
12. 3M Sodium acetate PH4.6 を 100 $\mu$ l、100% ethanol を 2.0ml 加える。

### 3.3. PCR

HV1 及び HV2 の PCR を GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Network, CT) を用い、テンプレート DNA 1ng と反応液 (10mM Tris-HCl (pH8.4)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM each dNTP、0.25 $\mu$ M each primer、0.75U Taq Polymerase) で 50 $\mu$ l とし、温度条件を 94 $^{\circ}$ C 45 秒 (denaturation)、55 $^{\circ}$ C 30 秒 (annealing)、72 $^{\circ}$ C 30 秒 (extension) を 30 サイクルの後、72 $^{\circ}$ C 7 分 (Final extension) として行った。Primer は以下のとおりである。

HV1 : F 15996 (5' CCACCATTTATGCACCCAAAGC 3')

R 16401 (5' TGATTTTCACGGAGGATGGTG 3')

HV2 : F 29 (5' TCTATCACCCCTATTAACCAC 3')

R 408 (5' GTTAAAGTGCATACCGCCA 3')

### 3.4. サイクルシーケンス法

PCR 増幅された mtDNA を QIA Quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) にて調整したのち、4 $\mu$ l の PCR 産物を ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit の添付書類に従い、PCR と同様の Primer を用いて温度設定 96 $^{\circ}$ C 3 分、96 $^{\circ}$ C 10 秒、55 $^{\circ}$ C 5 秒、70 $^{\circ}$ C 1 分を 15 サイクル、96 $^{\circ}$ C 10 秒、70 $^{\circ}$ C 1 分を 15 サイクルとしてシーケンス反応を行った。反応終了後、ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, City, CA) を用いて 18-21mA、980-2500V、50 $^{\circ}$ C 8 時間で泳動した。シーケンス反応を行ったデータは Apple Computer ソフト、Sequencher software (Version 3.1 Gene Codes Corporation) にて HV1 は 16091-16380 まで、HV2 は 33-393 まで解析した。

尚、核内のミトコンドリア pseudogenes のエラー増幅や、DNA polymerase の slipping を排除するよう、解析は順方向・逆方向双方から行った。

## 4. 結果

### 4.1. mtDNA コントロール領域の多型

mtDNA コントロール領域の HV1、HV2 における SNPs をそれぞれ Table 2、Table 3 に示す。N は解析不能部位を示す。HV1 においては 120 例中 117 種類の塩基配列を認めた。同一配列を示したのは変異なしの 3 例と、5 塩基変異の 2 例であった。すなわち、残り 115 例は全て異なる塩基配列を示したことになる。HV2 においては 63 例中 63 種類の塩基配列が認められた。すなわち、同一のものは存在しなかった。一人当たりの SNPs の平均数は HV1 において 5.81 塩基(2.0%)、HV2 において 6.46 塩基(2.0%)であった。最も変異数が多かった例は HV1 領域で 26 塩基 (9.0%)、HV2 領域で 15 塩基(4.2%)であった (Figure 6)。

SNPs の多かった塩基部位を Table 4 に示す。HV1 において 16223 で 43.3%、16183 で 26.7%、16129 で 22.5%、HV2 において 73 と 263 で 87.3%の塩基置換が認められた。また、今まで報告がなかった塩基置換が HV1 にて 85 塩基、105 種類、HV2 にて 77 塩基、96 種類確認された (Table 5、6)。このなかでも、HV1 で 16091 13.3%、16362 11.7%、16320 10.0%、HV2 で 330 44.4%、324 39.7%、381 27.0%等高率に塩基置換が認められる部位も確認された。

#### 4.2. Klinefelter 症候群における mtDNA 多型

Table 7 に Klinefelter 症候群及びその母の mtDNA コントロール領域の塩基配列と Anderson の塩基配列との比較を示す。Klinefelter 症候群とその母の塩基配列を比較すると、HV1 において 16060、16089、16208、16384 の 4 塩基、HV2 において 80、120、126、223、227、254、299 の 7 塩基の計 11 塩基も母子間でその配列が異なっていることが判明した。さらに母子それぞれの塩基配列と Anderson の塩基配列とを比較すると、Klinefelter 症候群の子の 16042 G→A、16060 G→G/T、16089 G→G/T、16208 G→T、16384 G→A、80 C→G、126 A→C、263 A→G、その母親の 16042 G→A、16060 G→T、16089 G→T、16384 G→C、80 C→T、120 C→G、223 T→G、227 A→G、254 T→G、263 A→G、299 C→G と多数の SNPs が認められた。しかもこの変異は 263 A→G を除くと、ほとんど報告のないまれな SNPs であることも判明した<sup>75</sup>。

#### 4.3. Turner 症候群における mtDNA 多型

Figure 7 に Turner 症候群の親子における mtDNA コントロール領域のシーケンスを示す。父子間においては明らかに異なる塩基配列を示し、母系遺伝していることが確認できた。しかし、母に観察される 16095.1G、16110.1A、16129.1G、16150.1C の 4 箇所での塩基挿入は子には認められず、厳密な意味での母系遺伝が成立していないことが判明した (Table 8)。