

<ミニ特集>

Lp(a)の遺伝子検査

安 部 彰

Detection for lipoprotein(a) [Lp(a)] gene assays

Akira Abe

Summary Lp(a) has been implicated with an increased risk of atherosclerosis and cardiovascular disease. Recently, considerable progress has been made toward understanding the genetics in the regulation of Lp(a) levels. In this article, I demonstrate molecular methods for detecting the heterogeneity of Lp(a) in blood. A variable number of transcribed kringle IV-2 repeats (K4-VNTR) explains 50% of the population variability in Lp(a) levels. And Met/Thr polymorphism in kringle IV-10 and a pentanucleotide repeat (PNR) polymorphism in the 5' control region affect Lp(a) level variability. These techniques provide the tools to solve the metabolism and atherogeneity of Lp(a).

Key words: Lp(a), kringle4, gene, polymorphism, phenotype

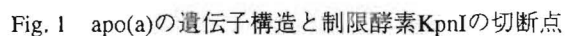
I. はじめに

Bergは1963年に抗LDL血清を作る実験において、Lp(a)リポ蛋白[Lp(a)]を発見した。Lp(a)はLDLに近似した脂質コアと、

アポリポ蛋白としてアポB-100にSS結合したアポリポ蛋白(a)[apo(a)]を持っている。Lp(a)は霊長類にのみ存在し、LDLとは独立したリポ蛋白である。血清濃度は遺伝により規定されており、約0.1～100mg/dl

岐阜医療技術短期大学衛生技術学科
〒501-32 岐阜県関市市平賀長峰795-1

Gifu College of Medical Technology
Seki Ichihiraga Nagamine, 795-1, Gifu 501-32, Japan



たが、KpnIが最も適す²⁾。電気泳動は巨大DNAを分画する手段として、PFGE法が利用される。KpnIによるDNA分画は約37kbから200kbに分布し、これはクリングルIVの11個から50個くらいの繰り返しに相当する。

その頻度分布はコーカサス地方アメリ

カ人、中国人、アフリカ地方黒人、チロル人、デンマーク人、日本人 (Fig. 2) などの人種について報告された^{3, 4, 5, 6)}。

クリングル数に相当する対立遺伝子はホモ型、ヘテロ型の表現型で現されメンデルの法則に従って遺伝する。ホモ型の頻度は小さく、約10%である。クリング

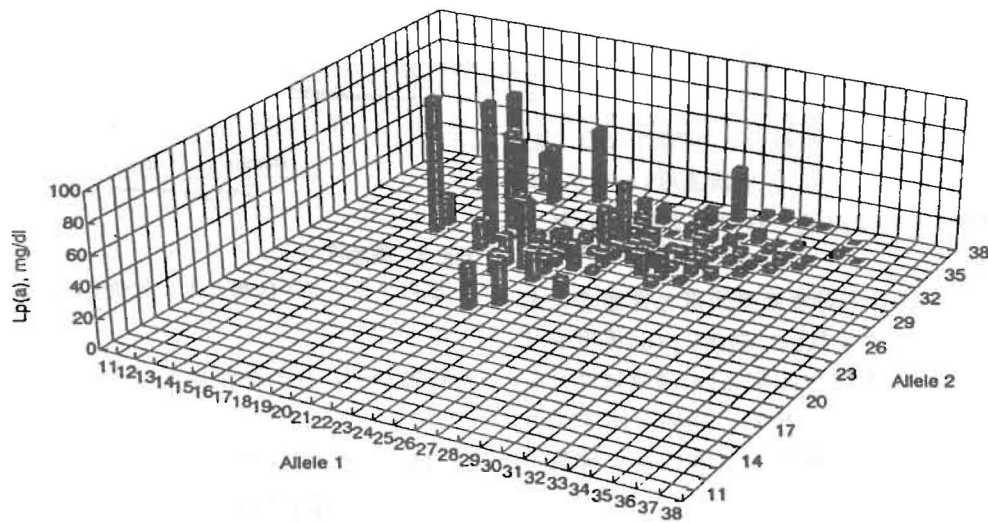


Fig. 2 (上) 2つの対立遺伝子・血清濃度の3次元図

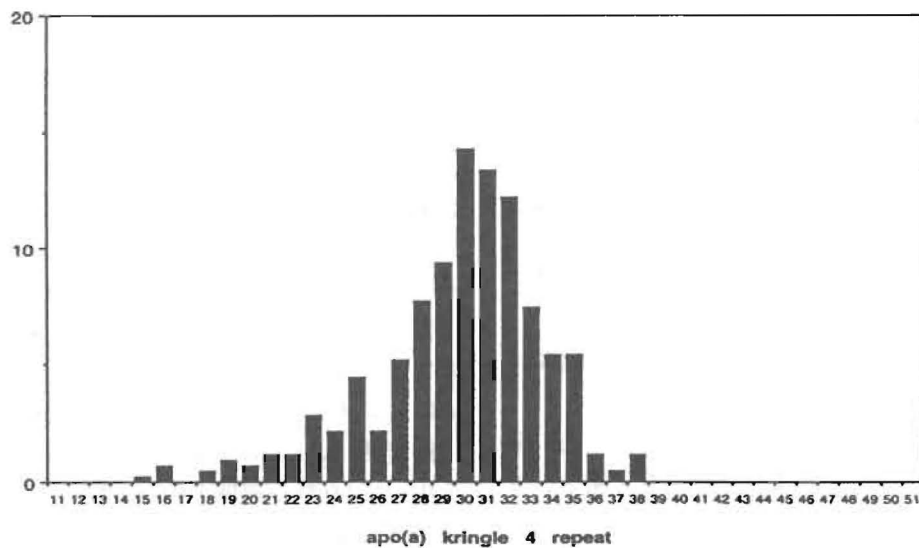


Fig. 2 (下) 本邦人 (n=213) のクリングル繰り返し数頻度

ル数は11個から最大52個まで報告されており、その頻度分布のパターンに人種差はあまり見られない。

血清濃度とクリングル数との関係は、チロル人血縁者において相関係数は0.91と高いが、非血縁者で低い³⁾。アフリカ黒人において他の人種より低い相関関係にある⁴⁾。これは黒人の血清濃度の平均値は高値であり、その分布は正規分布に近く他の人種と異なるからである。

これらの結果やフェノタイプの「ナル」とクリングル数との相関性は全く認められないので^{4,6)}、血清濃度はクリングル数だけでは決定されないと考えられている。

Kraftら⁷⁾は冠動脈疾患患者と健康者においてクリングル数別に血清Lp(a)濃度を比較した。疾患群の血清Lp(a)濃度はクリングル数20以下で極めて高値を示すようになり、冠動脈疾患の危険性は一層高くなると予想する。

一方、Moliternoら⁸⁾はアフリカ黒人の冠動脈疾患患者を調査しており、クリングル数と血清Lp(a)濃度の分布は健康者と同じであった。この成績は血清Lp(a)の危険因子性を否定するかのようである。

フェノタイプ分類法は操作が簡易であるので、実用であるが検出感度に劣る。著者は検出法を改善して、フェノタイプのクリングル数表現法を試みた。ホモ型の頻度は約20%であり、ジェノタイプ分類法に近似する結果を得ている⁹⁾ (Fig. 3)。

Marcovinaら¹⁰⁾もSDS-アガロース支持体の高分離能法でジェノタイプとフェノタイプを比較したところ両者は完全に相関することを報告している。

Manciniら¹¹⁾は制限酵素DraIIIを用いるジェノタイプ法(K4-D repeat)を考案し、クリングルIV-2型に存在する微少変異を報告した。血清濃度が0.1mg/dl以下を示す3種

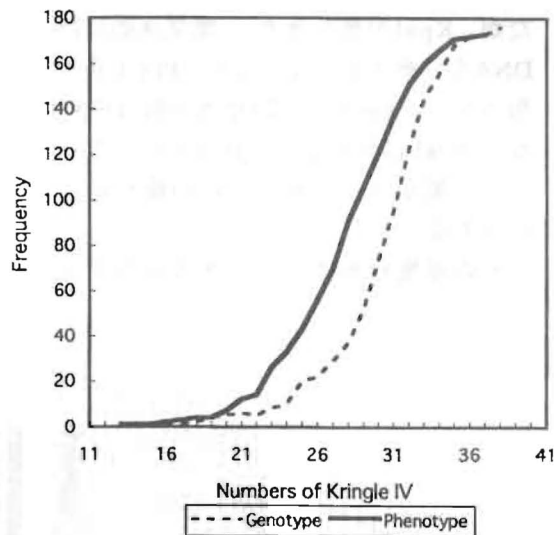


Fig. 3 高感度フェノタイプ法とジェノタイプ法のクリングルIV繰り返し数頻度の比較

の特異パターンの存在を示している。

IV. クリングルIV-10型のMet/Tyr変異

クリングルIVの1および3~10型は全ての人に存在すると考えられている。いずれのクリングルにも6個のシステイン残基があるが、9型にはアポB-100のシステイン残基と結合する特別なシステイン残基をもつ。Lp(a)のapo(a)とアポB-100の結合比は1:1あるいは2:1とも考えられているが、最近Albersら¹²⁾はアミノ酸分析の結果から1:1を主張している。

クリングルIVの10型はリジン基と結合する性質があるので組織細胞との親和性に関心が寄せられており、4168番目のアミノ酸残基がメチオニン(Met)かあるいはスレオニン(Thr)の変異が発見された。

測定法はgenomicDNAに特異プライマーを用いて10型の領域をPCR増幅する。制限酵素KspIで分解した分画を3%アガロース支持体を用いて電気泳動をする。131bp

と104bpのバンドをエチジウムブロミドで染色して変異を決定する。

チロル人¹³⁾でMet/Met: Met/Thr: Thr/Thr=9:51:40であり、MetとThrの対立遺伝子頻度は34:66であった。この変異と血清濃度や冠動脈疾患との間に有意な関係は認められていない。Met/Thr比は人種によって極めて特徴的である。著者らは日本人2.2、中国人1.4、チロル人0.5、アフリカ黒人0.1などの成績を得ており、人類のルーツを研究するに極めて重要な遺伝子マーカーと思われる (Table I)。

クリングル10型のTrp/Arg変異は2%くらいの頻度で出現するが、血清Lp(a)濃度は極めて低い。Klezovitchら¹⁴⁾はこの遺伝子を大腸菌とハムスターの細胞に表現させて、リジン結合性が欠損している善玉apo(a)を述べている。

V. 5'コントロール領域の5ヌクレオチド繰り返し変異

apo(a)遺伝子の5'末端側のシグナルペプチドから、さらに上流1373bpの位置に5個のヌクレオチドTTTTAの繰り返し配列(PNR; pentanucleotide repeat)がある。いわゆるプロモーター領域の転写活性と血清濃度の関係に注目されている。

測定法はgenomicDNAに特異プライマーを作用させて、PCR法によって5'コントロール領域のPNRを増幅する。増幅したDNAを10%PAGで電気泳動を行い、エチジウムブロミド染色をして1442~1342bpに存在するバンドを検出する。PNRは6~11個分布し、その数字は対立遺伝子として表現される。いろんな人種について検討されているが、いずれの人種においてもPNR8の頻度が約60%と最も高い^{15, 15)}。

クリングル数との間に強い相関性を認めなく、PNRは血清濃度と負の相関を示

Table I クリングルIV-10のMet/Thr変異

Population	n	Met (%)	Thr (%)
Japanese	208	69	32
Chinese	191	58	42
Tyroleans	261	34	66
African-Blacks	113	11	89

す遺伝子シーケンス変異である。

Mooserら¹⁵⁾はPNR11は血清濃度3mg/dl以下と極めて低いことを報告した。Amemiyaら¹⁶⁾は冠動脈疾患の原因予測として、PNRは血清濃度とクリングル繰り返し変異の因子に加えて意義のあることを述べている。

VI. おわりに

ドイツ・ゲッティンゲンの40~60歳の住民約6000人を5年間追跡調査したところ (GRIPS)、Lp(a)は冠動脈疾患に影響を及ぼすことが明らかにされた¹⁷⁾。危険因子の最も強い項目はLDLコレステロールであり、Lp(a)の順位は5番目であった。しかしLDLコレステロールを含めて3項目を組み合わせると最も高い危険因子性が認められた。

血清Lp(a)濃度の約90%は遺伝子によって規定され则认为られている。最も大きく影響するのはクリングル繰り返し変異であり、次に5'ヌクレオチド繰り返し変異のごとくシーケンス変異である。

Lp(a)血清濃度の測定に、apo(a)の遺伝子検査の情報を併せることは、心臓病など生活習慣病 (成人病) としての対策に意義あると考える。

文 献

- 1) McLean JW, Tomlinson JE, Kuang W-J, et al: cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is

- homologous to plasminogen. *Nature* 330:132-137, 1987
- 2) Lackner C, Boerwinkle E, Leffert CC, et al: Molecular Basis of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* 87: 2153-2161, 1991
 - 3) Kraft HG, Köchl S, Menzel HJ, et al: The apolipoprotein(a) gene: a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein(a) concentration. *Hum Genet* 90: 220-230, 1992
 - 4) Gaw A, Boerwinkle E, Cohen JC, et al: Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups: evidence for no common "null" allele at the apo(a) locus. *J Clin Invest* 93: 2526-2534, 1994
 - 5) Trommsdorff M, Köchl S, Lingenhel A, et al: A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma concentrations in Caucasians. *J Clin Invest* 96: 150-157, 1995
 - 6) 安部 彰、野間昭夫、板倉弘重：本邦人の apo(a) クリンゲル 4 遺伝子型の頻度分布. *脂質生化学研究* 38: 3-6, 1996
 - 7) Kraft HG, Lingenhel A, Köchl S, et al: Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 713-719, 1996
 - 8) Moliterno DJ, Jokinen EV, Miserez AR, et al: No association between plasma lipoprotein(a) concentrations and the presence or absence of coronary atherosclerosis in African-Americans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 850-855, 1995
 - 9) 安部 彰：リポ蛋白 Lp(a) - 基礎と臨床 -、リポ蛋白 Lp(a) アイソフォームの決定法、東京、協和企画 (印刷中)
 - 10) Marcovina SM, Hobbs HH, Albers JJ: Relation between number of apolipoprotein(a) kringle 4 repeats and mobility of isoforms in agarose gel: basis for a standardized isoform nomenclature. *Clin Chem* 42: 436-439, 1996
 - 11) Mancini FP, Mooser V, Guerra R, et al: Sequence microheterogeneity in apolipoprotein(a) gene repeats and the relationship to plasma Lp(a) levels. *Hum Mol Genet* 4: 1535-1542, 1995
 - 12) Albers JJ, Kennedy H, Marcovina SM: Evidence that Lp(a) contains one molecule of apo(a) and one molecule of apoB: evaluation of amino acid analysis data. *J Lipid Res* 37: 192-196, 1996
 - 13) Kraft HG, Haibach C, Lingenhel A, et al: Sequence polymorphism in kringle IV 37 in linkage disequilibrium with the apolipoprotein (a) size polymorphism. *Hum Genet* 95: 275-282, 1995
 - 14) Klezovitch O, Scanu AM: Lys and fibrinogen binding of wild-type(Trp72) and mutant(Arg72) human apo(a) kringle IV-10 expressed in E coli and CHO cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 392-398, 1996
 - 15) Mooser V, Mancini FP, Bopp S, et al: Sequence polymorphisms in the apo(a) gene associated with specific levels of Lp(a) in plasma. *Hum Mol Genet* 4: 173-181, 1995
 - 16) Amemiya H, Arinami T, Kikuchi S, et al: Apolipoprotein(a) size and pentanucleotide repeat polymorphisms are associated with the degree of atherosclerosis in coronary heart disease. *Atherosclerosis* 123: 181-191, 1996
 - 17) Cremer P, Nagel D, Labrot B, et al: Lipoprotein Lp(a) as predictor of myocardial infarction in comparison to fibrinogen, LDL cholesterol and other risk factors: results from the prospective Göttingen risk incidence and prevalence study (GRIPS). *Eu J Clin Invest* 24: 444-453, 1994