

高感度測定法によるLp(a)フェノタイプの クリングル数による分類法

安 部 彰*¹ 高 島 美枝子*²

Number of Apolipoprotein(a) Kringle IV Repeats and Mobility of Isoforms in PAGE

Akira ABE*¹ and Mieko TAKASHIMA*²

Serum apo(a) isoform sizes were determined by SDS-polyacryl amide gel electrophoretic (PAGE) method, followed by a high sensitive immunoblotting. The relation between the number of apo(a) kringle IV encoding sequences in the apo(a) gene, as assessed by pulsed field gel electrophoresis and genomic blotting (genotype), and the apo(a) isoforms (phenotype) in SDS-PAGE was evaluated in 78 individuals. The correlation of apo(a) allele number between phenotype and genotype method was high ($r=0.513$) in 178 expressed apo(a) alleles. This nomenclature is achieved by using standard serum of kringle IV repeats. We conclude that this method is an approach to genotyping to designate the phenotypes by kringle IV repeats. [Jpn J Clin Pathol 46 : 283~288, 1998]

*¹Department of Clinical Chemistry, Gifu College of Medical Technology, Gifu 501-3892

【Key Words】 lipoprotein(a) (リポプロテイン(a)), phenotype (フェノタイプ), isoform (アイソフォーム), kringle IV (クリングルIV), immunoblotting (イムノブロット)

Lp(a)のアポ蛋白[apo(a)]は約40~80万のアイソフォームが存在し、Lp(a)フェノタイプとして分類される。Kraftら¹⁾によってF, B, S1~S4の6型の分類法が最初に報告されたが、この分類法は泳動支持体の種類によって移動度が微妙に異なること²⁾、またナル型が存在するなどの欠点がある。

apo(a)の遺伝子構造が解明されてから、分子サイズ変異性はクリングルIV構造の繰り返し数の変異であるとされた³⁾。クリングルIVの繰り返し数は遺伝により決定されており、Lp(a)血清濃度の大部分を規定している⁴⁾。Lp(a)は冠動脈疾患の発症因子として認められ⁵⁾¹⁰⁾、Lp(a)フェノタイプは遺伝学や冠動脈疾患を調査する上で極めて重要な因子である。

本論文では、Lp(a)フェノタイプのクリングル数による分類法を検討したので、genomic DNA分析によるジェノタイプ法と比較して報告する。

I. 対象および方法

フェノタイプの分離操作は既に報告したSDS-ポリアクリルアミドゲル(PAG)電気泳動法(SDS-PAGE)によるが⁹⁾、泳動バンドのイムノブロット操作はアビジン・ビオチン化アルカリフォスファターゼ(ALP)標識抗体法を応用してフェノタイプの検出感度を高めた。またフェノタイプ解析はクリングル数標準血清を用いてクリングル数で分類する方法に改良した。

対象にした検体は医療系短期大学生87名(女性、平均年齢20歳)である。

A. 電気泳動

フェノタイプの電気泳動操作はLp(a)フェノタイプキット(三和化学社)を用いた。

まず、血清検体を還元処理してLp(a)からapo(a)を

受付 1997 年 8 月 13 日・受理 1998 年 1 月 20 日

*^{1,2} 岐阜医療技術短期大学衛生技術学科(〒501-3892 関市市平賀字長峰 795-1)

遊離させるが、検体20 μ lに還元処理液80 μ lを加えて56℃ 10分間加温する。還元処理液は0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH6.8)1ml, 10% SDS溶液1.6ml, グリセロール0.8ml, 2-メルカプトエタノール0.4ml, 0.05%ブロムフェノールブルー溶液0.2mlおよび精製水4mlのそれぞれを混合して調整する。

前処理した試料5 μ lを4%のSDS-PAG(8 $\times$ 8cm, 12ウエル, 1mm厚, ACI社)に塗布して電気泳動を行う。ゲル両端のレーンに標準血清を塗布した。泳動用緩衝液は25mMトリス, 192mMグリシンにSDSを0.1%加えた緩衝液(pH8.3)である。プレート1枚について20mAを90分間通電する。

B. 転写

泳動後、セミドライ方式でニトロセルロース膜(0.45 μ m)にapo(a)のアイソフォームを転写する。すなわち陽極板上に、緩衝液に浸した厚手濾紙を2枚重ねて置き、その上に膜とゲルをのせる。さらに緩衝液に浸した薄手濾紙1枚と厚手濾紙2枚をのせ、陰極板をかぶせて10V 30分間通電する。転写用の緩衝液は25mMトリス, 192mMグリシンの緩衝液(pH8.3)にエタノール20%を含む。

C. イムノブロット

Amplified Alkaline Phosphatase Immune-Blot Kits(パイオラド社)を用いた。

1. トリス緩衝生理的食塩水(TBS)

保存用の10 $\times$ TBS 100mlに900mlの精製水を加えて10倍に希釈溶解する。希釈後のTBSの濃度組成は20mM トリス, 500mM NaCl, pH7.5である。

2. 洗浄液(TTBS)

900mlのTBSに450 μ lのTween-20を加える。

3. ブロッキング液

100mlのTTBSに5gのスキムミルクを溶解する。

4. 一次抗体および二次抗体

一次抗体は抗ヒトapo(a)抗体(ウサギ; ダコ社)20 μ lを20mlのTTBSに溶解する。二次抗体はビオチン化抗ウサギIgG抗体(ヤギ)20 μ lを20mlのTTBSに溶解する。

なお、抗ヒトapo(a)抗体(ウサギ)が入手困難である場合、Lp(a)フェノタイプキットに添付されているヤギ由来の抗体とビオチン化抗ヤギIgG抗体(Vector社)を組み合わせる操作する。

5. ストレプトアビジン・ビオチン化ALP(アビジン液)

使用1時間前に調整し、30mlのTTBSに15 μ lのス

トレプトアビジンと15 μ lのビオチン化ALPを加え室温に放置しておく。

6. 発色液

使用直前に調整する。30mlの緩衝液(0.1Mトリス, pH9.5)に発色液(NBT液: ニトロブルーテトラゾリウム, 0.3mg/ml)300 μ lと基質液(BCIP液: 5-Br-4-Cl-3-indolyl phosphate, 0.15ml/ml) 300 μ lを加える。

apo(a)が転写された膜をブロッキング液10mlに30分間振とうする。次に一次抗体の溶液に60分間振とうする。TTBSで3回洗浄後、二次抗体の溶液に60分間振とうする。さらにTTBSで3回洗浄後アビジン液に60分間振とうする。その後、TTBSで3回洗浄して発色液に30分間振とうする。

この反応はストレプトアビジン・ビオチン化ALPによる増幅反応であり、標識ALPの活性を基質BCIPを用いて反応させて、遊離したインドールをNBTで発色させる原理である。

D. 標準血清

標準血清(三和化学社)に含まれる4種のフェノタイプをイムノ社のLp(a)標準血清(Lot No.: GC310A)を標準にしてSDS-PAGE法でクリングル数を決定した。この成績はDr. Utermannによって確認されたが、Allele No.(対立遺伝子ナンバー)は6, 9, 12, 19の4分画であり、クリングルIVの繰り返し数としてそれぞれ16, 19, 22, 29である。

E. フェノタイプの解析

フェノタイプの解析はコンピュータを利用した。すなわち、ハードウェアはマイクロコンピュータ(Power PC 8100/80AV, メモリ65MB, Macintosh社)にスキャナー(GT8500ART, エプソン社)を接続した構成である。ソフトウェアはフォトショップLE(アドビ社)と泳動解析プログラム(Quantity One, 米国PDI社)である。

泳動像をスキャナーでTIFFファイルとして取り込み、泳動解析プログラムにより対立遺伝子ナンバーを解読する。すなわち、各レーンのフェノタイプバンドのRf値を計測する。両端レーンの標準血清の対立遺伝子ナンバーとRf値との検量線から検体のクリングル数を求める。

F. ジェノタイプ法

ジェノタイプの測定は、血液リンパ球からgenomic DNAを抽出して、制限酵素KpnIによるDNAフラグメントをパルスフィールド電気泳動した。次にジゴキシンゲニンを標識したクリングルIV特異的プロ

ープでハイブリダイズして化学発光法で検出した⁷⁾。

G. 統計

相関係数の有意性の判定はt分布表によった。

II. 結果

本法による解析例をFig. 1に示す。本法は極めて高感度な発色法であり、apo(a)抗血清の非特異反応と思われるバンドが一部に観察されるので、ホモ型・ヘテロ型フェノタイプのバンドとして選択する。

最近、クリングルIV型はDNA塩基配列の違いから1～10の型に、さらに2型はAとB型に分類される。フェノタイプはクリングルIV2型の繰り返し変異の表現型である。Kraftら⁸⁾はクリングル繰り返し数の11～52個を検出している。1型と3～10型の1個ずつは全てのヒトに存在すると考えられているので、2型の最小クリングル数は2個である。

6分画フェノタイプとクリングル繰り返し数、対立遺伝子ナンバーならびに頻度の関係はTable 1のごとくなる。6分画フェノタイプの頻度は既に報告した頻度⁹⁾に近似している。Fig. 2にapo(a)のクリングル構造を模式化して、クリングルIVの10型分類と6型フェノタイプとの対応を示した。

87人の健常者を対象にして、本法のフェノタイプ法(y)とジェノタイプ法のそれぞれの方法から求めた対立遺伝子ナンバーを比較してFig. 3に示した。総フラグメント数n=178, r=0.513, y=0.61x+5.6であった。両法の対立遺伝子ナンバーは有意に相関(p<0.001)したが、15以上で乖離する傾向を認めた。両法のナル型の頻度は0%であった。ヘテロ型(ダブルバンド)の頻度は本法で79.5%であり、ジェノタイプ法で88.6%であった。

両法のクリングルIVの繰り返し数の頻度をFig. 4

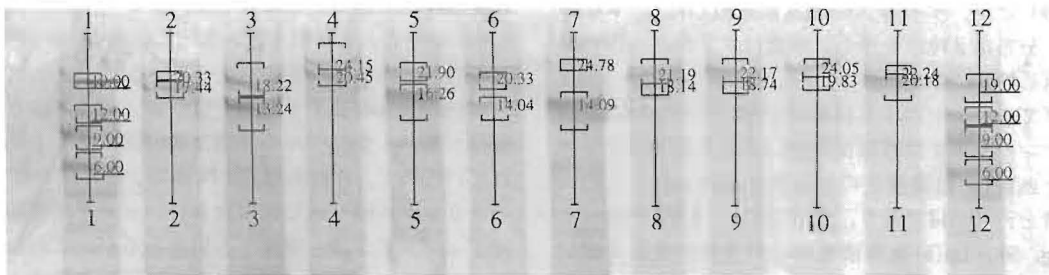


Figure 1 Detection of isoforms by this method.

This is automatically achieved by using computerized scanner. Lane number 1 and 12 are standard serum contained allele number 19, 12, 9 and 6.

Table 1 Relationship between apo(a) isoform and alleles

Isoform	F	B	S1	S2	S3	S4
Numbers of Kringle	<16	17~19	20~22	23~26	27~30	>31
Numbers of Allele	<6	7~9	10~12	13~16	17~20	>21
% of Isoform	1.1	1.1	5.7	23.9	36.9	31.3

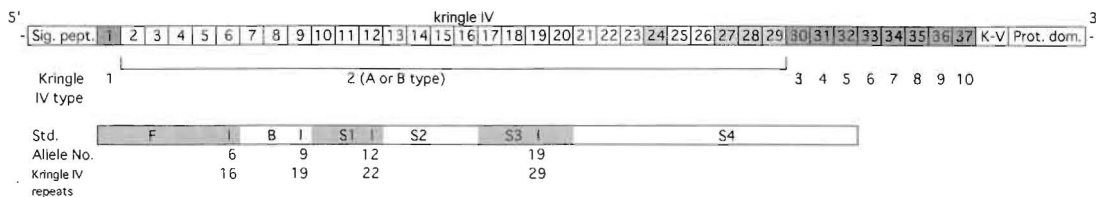


Figure 2 Relationship between an original nomenclature by six types and new nomenclature by allele numbers in apo(a) phenotyping.

Blocks of 24, 27~29 are B type and the nucleotides differ from another repeats in kringle IV2 type. Vertical lines in the box of phenotypes express standard isoforms(allele No. : 6, 9, 12, 19).

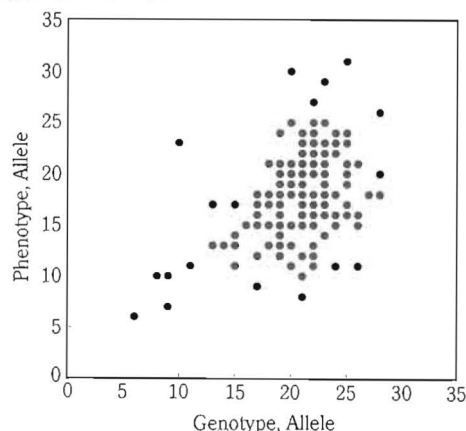


Figure 3 Relationship for number of apo(a) kringle IV repeats between this method and genotype ($n=178$, $r=0.513$, $y=0.61x+5.6$).

に示したが、チロル人の頻度に近似した⁹⁾。すなわち、分布は2峰性を示し、頻度はクリングルIVの繰り返し約30に多く占めた。

ダブルバンドのうち移動度の遅い大分子対立遺伝子ナンバーまたは移動度の速い小分子遺伝子ナンバーと血清Lp(a)濃度との相関性を検討したところ、前者と $r=0.044$ であり、後者と $r=-0.383$ であった(Fig. 5)。Lp(a)血清濃度は小分子対立遺伝子ナンバーと有意な逆相関性($p<0.001$)を示した。

III. 考 察

Lp(a)の臨床的意義に関する報告として、ドイツのゲッティンゲン地方の40～60歳の住民約6,000人を5年間にわたる大規模な調査がなされた。その結果、冠動脈疾患に対する危険因子として、LDLコレステロールが最も有力であり、Lp(a)は5番目の順位であった。しかし、Lp(a)にLDLコレステロールとHDLコレステロールの3項目を組み合わせると心筋梗塞発症率に最も高い相関性を示した¹⁰⁾。Kraftら⁹⁾は冠動脈疾患患者はクリングルの繰り返し数22以下のフェノタイプに多いことを報告している。

著者ら⁷⁾は従来の分類法によるナル型10例をジェノタイプ法で確認したところ、クリングル繰り返し数は19から34まで分布しており、ナル型は必ずしも高分子型フェノタイプであると限らなかった。血清濃度はapo(a)遺伝子の転写と小胞体から蛋白分泌の2つの効率によって規定されることを、Whiteら¹¹⁾はヒトの肝細胞培養の実験で述べている。

本法の対立遺伝子ナンバーはジェノタイプ法と相関性が高い。またゲルや標準血清は既にキット化されているので、比較的容易に実施できる特徴を有す。

クリングル繰り返し数の大きいフェノタイプ領域でジェノタイプ法と乖離する例があるが、これは本法が大分子フェノタイプの分離能に問題を残すと思われる。Marcovina⁹⁾はSDS-アガロース電気泳動によ

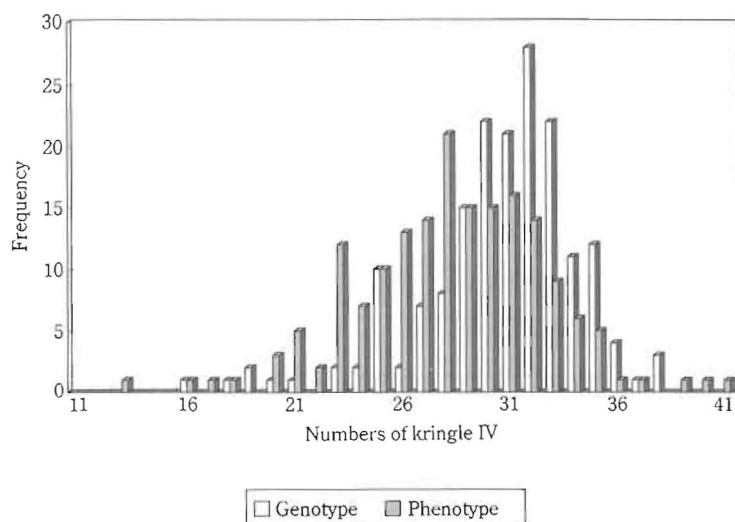


Figure 4 Frequency of kringle IV repeats in phenotype and genotype method.

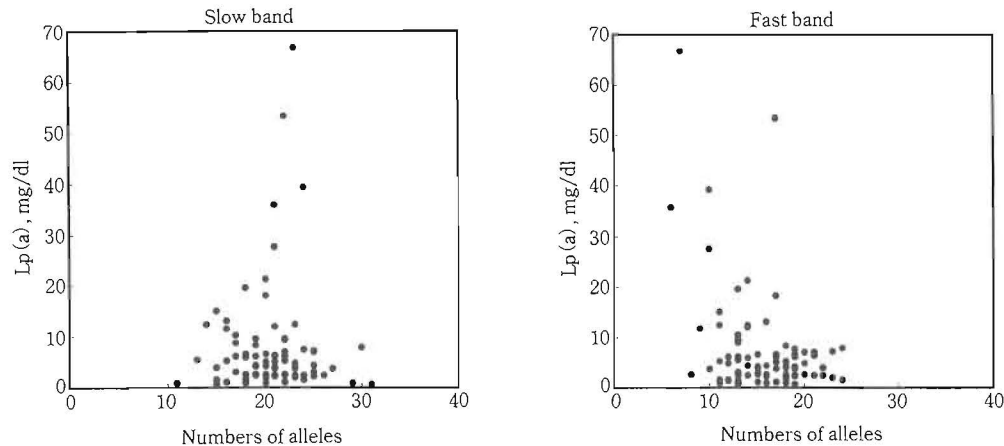


Figure 5 Relationship between the number of alleles and Lp(a) serum concentration in 78 individuals.
left : slow band allele, $r=0.044$; right : fast band allele, $r=-0.383$

よるアイソフォーム分類法を報告している。1.5%アガロースを用いて18時間のサブマリン電気泳動を行う方法であるが、さらにこの方法への応用を検討したい。

IV. 結 語

Lp(a)のフェノタイプは冠動脈疾患の研究において血清濃度の測定と併せて重要である。アガロース電気泳動法に比較して操作の簡易なSDS-PAGEによるクリングル数表現によるフェノタイプ分類法を検討したところ、ジェノタイプ法に有意に相関する分類が可能であった。フェノタイプ分類法の標準化案として提示できると思われる。

標準血清の検定はDr. G. UtermannならびにDr. H.G. Kraft(オーストリア・インスブルク大学)の好意によるものであり感謝いたします。

文 献

- 1) Kraft HG, et al : Lp(a) phenotyping by immunoblotting with polyclonal and monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis* 8 : 212~216, 1988
- 2) Kraft HG, et al : The relative electrophoretic mobility of apo(a) isoforms depends on the gel system : proposal of a nomenclature for apo(a) phenotypes. *Atherosclerosis* 125 : 53~61, 1996
- 3) McLean JW, et al : cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330 : 132~137, 1987
- 4) Utermann G, et al : Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest* 80 : 458~465, 1987
- 5) Kraft HG, et al : Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 : 713~719, 1996
- 6) Abe A, et al : Lipoprotein(a) phenotyping using a computerized micro scale and phenotype frequencies in a healthy Japanese population. *Clin Chim Acta* 219 : 149~157, 1993
- 7) 安部 彰, 他 : 本邦人のapo(a)クリングル4遺伝子型の頻度分布. *脂質生化学研究* 38 : 3~6, 1996
- 8) Kraft HG, et al : The apolipoprotein(a) gene : a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein(a) concentration. *Hum Genet* 90 : 220~230, 1992
- 9) Marcovina SM, et al : 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
- 10) Cremer P, 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

- 11) White AL, et al : Molecular basis for "Null" lipoprotein(a) phenotypes and the influence of apolipoprotein(a) size on plasma lipoprotein(a) level in the Baboon. J Biol Chem 269 : 9060~9066, 1994

 刊 行 の お 知 ら せ

日本臨床病理学会では「日常初期診療における臨床検査の使い方」小委員会で臨床検査の効率的な利用法について検討を重ね、現在下記の小冊子を発刊致しております。

日常初期診療における臨床検査の使い方

基本的検査(案)	定価 500 円(税込)
----------	--------------

—臓器系統・病態別検査—

膠原病・自己免疫疾患(改訂第2版)	定価 800 円
肝・胆・膵疾患(案)	定価 650 円
内分泌疾患(案)	定価 900 円
血液・造血器疾患(案)	定価 800 円
腎疾患(案)	定価 850 円
循環器疾患(案)	定価 600 円
糖尿病(案)	定価 650 円
呼吸器疾患(案)	定価 650 円
血清脂質異常と痛風(案)	定価 650 円

購入ご希望の方は下記までご連絡下さい。

〒104-0042 東京都中央区入船3-3-3

臨床病理刊行会

TEL 03-3552-0931・FAX 03-3552-0770
