

アポ(a), Lp(a)の 遺伝子診断

岐阜医療技術短期大学衛生技術学教授

安部 彰

[Summary]

ゲッティンゲン・スタディで 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。血清 Lp (a) 濃度は遺伝子によって規定されている。最も影響力の強い因子はクリングル繰り返し数の変異である。クリングル数と血清濃度は逆相関関係にあるが、この遺伝子だけで血清濃度は決定されない。5'コントロール領域の TTTTA 繰り返し変異の影響も強い。これまで研究されている遺伝子変異を組み合わせると膨大な数の表現型が存在する。将来、血清濃度と遺伝子検査との組み合わせによる病態解析の成績が期待される。

はじめに

Berg は 1963 年に抗 LDL 血清を作る実験において、Lp (a) リポ蛋白を発見した。Lp (a) は LDL に近似した脂質コアと、アポ蛋白としてアポ B-100 に SS 結合したアポ (a) をもっている。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 0.1~100 mg/dl と幅広く分布して低値領域に偏る。遺伝学者は遺伝マーカーに、また臨床家は動脈硬化の危険因子性にそれぞれ注目した研究がなされている。

診断に直接関与する決定的なアポ (a) の遺伝子検査はまだ報告されていないが、将来臨床診断につながる遺伝子変異性について概説する。

アポ (a) の遺伝子構造

その遺伝子は第 6 染色体長腕部分 (6q2.7) に配座されており、プラスミノゲンの遺伝子に近接して存在するが、進化の途中にプラスミノゲン遺伝子から派生したとも想像されている。

1987 年に McLean ら¹⁾は cDNA のクローニングを通

Key Words :

アポ (a) □ Lp (a) □ クリングル繰り返し変異 □ Met/Thr 変異 □ PNR 変異

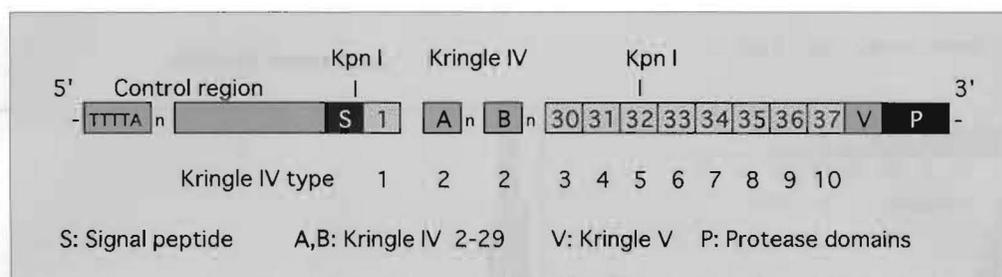


図1 アポ (a) の遺伝子構造と制限酵素 Kpn I の切断点

してアポ (a) の構造を明らかにしたが、プラスミノゲンときわめて高い相同性の報告はセンセーショナルであった。すなわち、5'側にプラスミノゲンに100%相同性あるシグナルペプチドと、3'側にプロテアーゼ部分をもつ。プロテアーゼ部分はアミノ酸が置換されているのでプラスミンのような活性を示さない。さらに、プラスミノゲンに相同性の高い2種のクリンクル IV と V から構成される。クリンクル IV は最大37個あり、1から37番目まで付番される。2~29番目までのクリンクルは同じアミノ酸配列を示す342個の塩基からなる。そのうち、24および27~29番目の4個のクリンクルは、アミノ酸配列は同じであるが、3カ所の塩基配列が異なるのでB型として区別し、残りのクリンクルをA型として分類する。

一方、1および30~37番目に位置する9個のクリンクルの塩基配列はそれぞれ特徴をもった構成である。

最近、クリンクル IV は37個以上発見されており10種に分類されるので、ここでも新しい表現法を用いる(図1)。

クリンクル IV-2型の
クリンクル繰り返し変異

アポ (a) には分子量約40~80万のアイソフォームが存在する。蛋白またはDNAの面から測定が可能であり、それぞれフェノタイプ、ジェノタイプとして分類されて

いる。

フェノタイプ法はSDS-PAGE電気泳動法によって6つのタイプのアイソフォームが定義されたが、その後高分離能のSDS-アガロースを支持体にした30分画以上の分類法も利用される。

ジェノタイプ分類法はK4-VNTR (variable number of transcribed kringle 4 repeats) と称され、クリンクル2型 A/B ユニットの繰り返し数を直接測定するものである。測定法はリンパ球から得た genomic DNA を Kpn I 制限酵素で処理して、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を応用してクリンクル1個約5.6 kb ごとの変異を分類する。

分析には各種類の制限酵素が検討されたが、Kpn I 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。Kpn I によるDNA分画は約37 kb から200 kb に分布し、これはクリンクル 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、日本人などの人種について報告された³⁻⁶⁾。

クリンク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。クリンクル数は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は血清濃度分布のような人種差はあまりみら

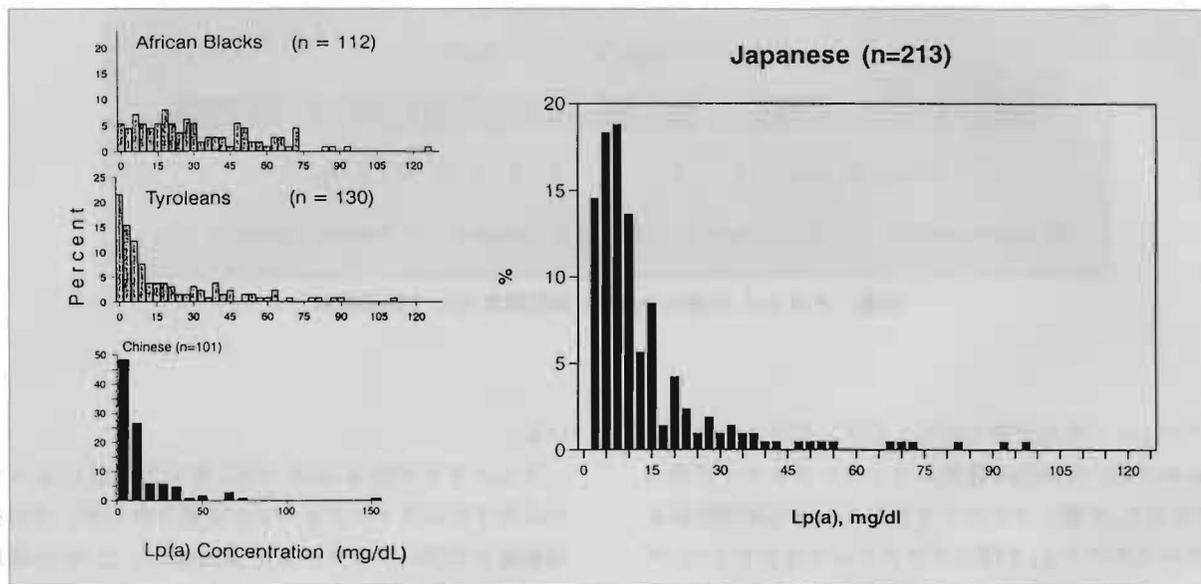


図2-A 血清 Lp (a) 濃度分布の各人種での比較

(文献4~6より引用)

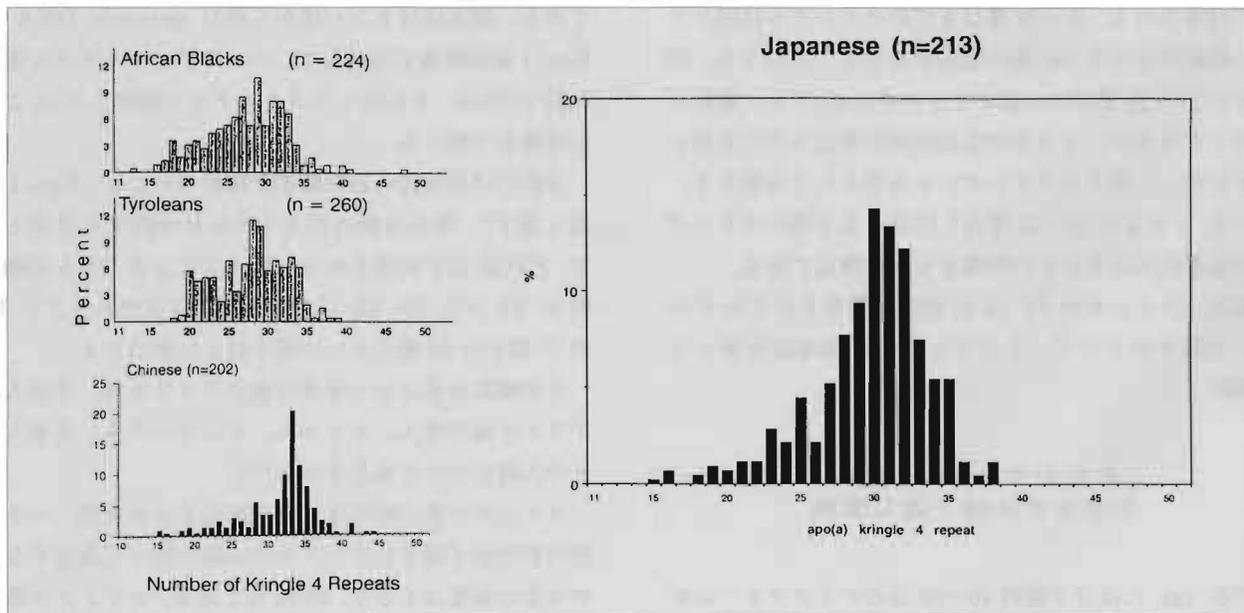


図2-B クリングル繰り返し数頻度の各人種での比較

(文献4~6より引用)

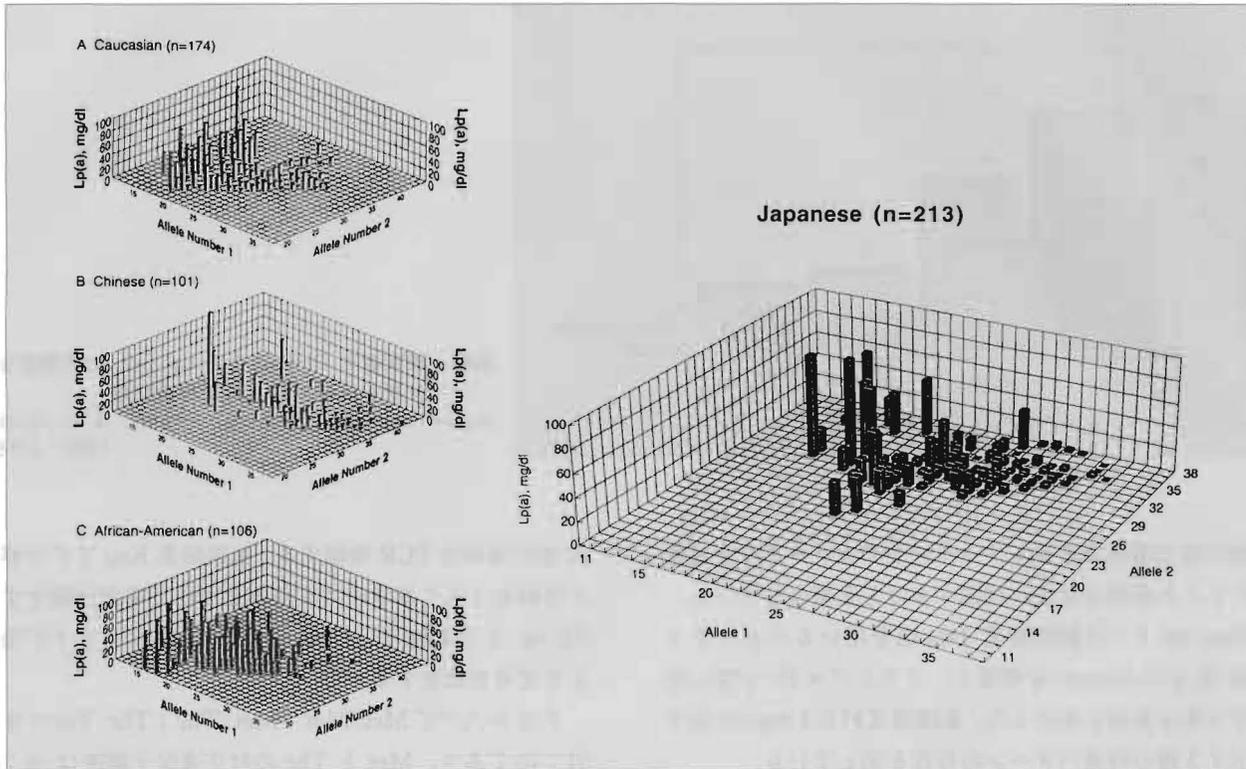


図2-C 2つの対立遺伝子と血清濃度を3次元図に表す各人種での比較

(文献4～6より引用)

れない(図2-A, B)。

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³⁾、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(図2-C)。

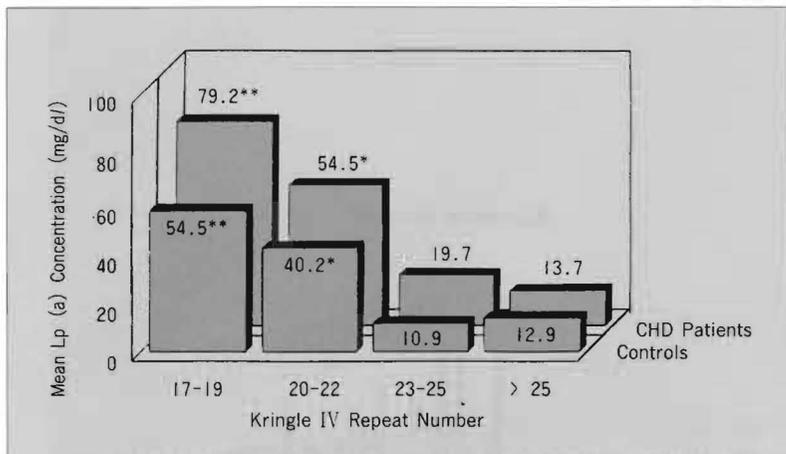
これらの結果やフェノタイプの「ナル」とクリングル数との相関性は全く認められないので^{4,6)}、血清濃度はクリングル数だけでは決定されないと考えられている。

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以下できわ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(図3)。

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、実用的であるが検出感度に劣る。著者ら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⁾。Marcovinaら¹⁰⁾もSDS-アガロース支



図③ 健常者と CHD 患者の Lp (a) 血清濃度をクリングルIV繰り返し数別群の比較
Wilcoxon-Mann-Whitney 検定 ** : P = 0.011, * : P = 0.009
(文献 7 より引用)

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 Dra IIIを用いるジェノタイプ法 (K 4-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 0.1 mg/dl 以下を示す 3 種の特異パターンの存在を示している。

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 型はすべ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) のアポ (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 genomic DNA 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 Ksp I 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。131 bp と 104 bp 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 比は人種によってきわめて特徴的である。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きわめて重要な遺伝子マーカーと思われる。

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) 濃度はきわめて低い。Klezovitch ら¹⁴⁾はこの遺伝子が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アポ (a) を述べている。

5'コントロール領域の 5ヌクレオチド繰り返し変異

アポ (a) 遺伝子の 5'末端側のシグナルペプチドから、

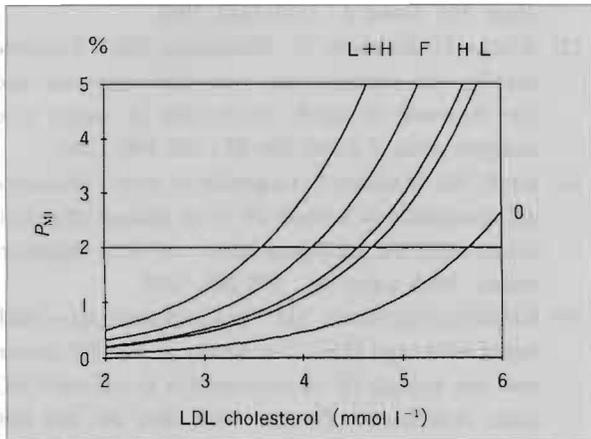


図4 5年間のゲッティンゲン・スタディによる LDL コレステロール値と心筋梗塞発症率

LDL コレステロールと他の因子を組み合わせた場合の発症率の変化を示す

0: LDL コレステロールのみ, L: Lp (a) > 30 mg/dl,

F: 心筋梗塞発症の家族, H: HDL コレステロール < 0.9 mmol/l

(文献 17 より引用)

さらに上流 1373 bp の位置に 5 個のヌクレオチド TTTTA の繰り返し配列 (PNR: penta nucleotide 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 genomic DNA 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 1442~1342 bp 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。いろいろ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 PNR 8 の頻度が約 60% と最も高い^{5,15)}。

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す遺伝子シーケンス変異である。

Mooser ら¹⁵⁾ は PNR 11 は血清濃度 3 mg/dl 以下と きわ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。

おわりに

ドイツ・ゲッティンゲンの 40~60 歳の住民約 6,000 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 HDL 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 (図 4)。

血清 Lp (a) 濃度の約 90% は遺伝子によって規定されると考えられている。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。

将来、これらの遺伝子検査と組み合わせた診断の成果が期待される。

■ 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, Kochl 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, Kochl 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) クリングル 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, Kochl 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 Gottingen risk incidence and prevalence study (GRIPS). *Eu J Clin Invest* **24** : 444-453, 1994