

## 5. Lp(a) アイソフォームの 決定法

安部 彰

1984年 Fless ら<sup>1)</sup>は密度勾配遠心法を用いて、Lp(a)を構成するアポ(a)のサイズ変異性を提唱した。すなわち、個人によってLp(a)の密度が異なり、また同一人血清中でも2種類のアポ(a)が存在することを報告した。

1987年には、Utermann ら<sup>2)</sup>によってアポ(a)のサイズ変異性すなわちアイソフォームの分類法が確立された。Lp(a)をメルカプトエタノールで還元処理して、遊離するアポ(a)をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によってアポ(a)のサイズを分離し、ウエスタンブロット法によって6種類のアイソフォームと16種類の表現型を報告した。時期を同じくして McLean ら<sup>3)</sup>はアポ(a)の蛋白一次構造を決定し、プラスミノゲンとのきわめて高い相同性をセンサーショナルに報告した。すなわちプラスミノゲンに共通なクリングル4および5からなるアポ(a)の蛋白一次構造の報告であった。

その後の研究でアポ(a)の分子サイズ変異性はアポ(a)を構成するクリングル4の繰り返し数に由来することが解明された<sup>4)</sup>。さらに高分離能の電気泳動法と検出法の組み合わせを応用して、Gaubatz<sup>5)</sup>、Kamboh<sup>6)</sup>、Kikuchi<sup>7)</sup>らによる多分画なアイソフォームが報告されるに至っている。

ここでは、Lp(a)アイソフォーム分類の基本である Utermann らによる決定法の実際を述べる。また、新しいアイソフォームの概念についてもふれる。

### I. アイソフォーム決定法

著者はアイソフォーム分離の技術<sup>8)</sup>とそのキャリブレーション<sup>9)</sup>について詳

しく報告しているので参照されたい。分離技術の基本は Utermann らの方法に準じているが、簡易に測定できるような分析器材を応用して測定できる。その測定法の概要を述べる。

①検体の前処理：

血清あるいは血漿検体を前処理して Lp(a) からアポ(a) を遊離させる。前処理液は0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) 1 ml, 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 4 ml を混ぜて調整する。検体 10 $\mu$ l に前処理液 40 $\mu$ l を加えて 95°C 10分間加熱する。

②電気泳動：

前処理した試料 10 $\mu$ l を 4% の SDS-ポリアクリルアミドゲル (8 × 8 cm, 10ウエル, 1 mm厚, テフコ社) を用いて電気泳動を行う。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) を用いる。プレート 1 枚について 20mA を 90分間通電する。

③ウエスタンプロット：

泳動後、セミドライ方式でニトロセルロース膜 (0.45 $\mu$ m, バイオラド社) に転写する。陽極電極板上に緩衝液に浸した濾紙を 3 枚重ねて置き、その上に膜を、つぎにゲルをのせる。さらに緩衝液に浸した濾紙を 3 枚のせ、陰極電極板をセットして 10V30分間通電する。転写用の緩衝液は 25mM トリス, 192M グリシン緩衝液 (pH8.3) にエタノール 20% を含む。

一次抗体として抗アポ(a) ウサギ抗体と、金コロイド標識イムノアッセイ試薬 (バイオラド, カタログ No.170-6510) を応用してアイソフォームを検出する。

④アイソフォーム解析：

ウエスタンプロット泳動像からアポ B の移動度を基準にして Lp(a) アイソフォームを分類する。すなわち著者の成績によると、各アイソフォームの Rf とアポ B の Rf の比はそれぞれ S<sub>4</sub> : 0.28, S<sub>3</sub> : 0.47, S<sub>2</sub> : 0.65, S<sub>1</sub> : 0.88, B : 1.03, F : 1.16 であるので判読の参考にされたい。アポ B と B はほぼ同じ位置であるが、Rf の比が 1.03 であるので B のバンドのほうがやや速く移動することになる。

この方法で検出できない “0” の頻度は 35.0% であり、B, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> の頻

表 I 4%SDS-PAGE によるアイソフォームの移動度, 頻度ならびに推測分子量

| アイソフォーム          | F    | B    | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>4</sub> |
|------------------|------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Rf アポ(a)/Rf アポ B | 1.16 | 1.03 | 0.88           | 0.65           | 0.47           | 0.28           |
| Rf アポ(a)         | 0.21 | 0.16 | 0.14           | 0.10           | 0.07           | 0.04           |
| 頻度(%)*           | —    | 1.7  | 5.6            | 24.5           | 39.2           | 29.0           |
| 分子量(kDa)         | 400  | 460  | 480            | 520            | 560            | 600            |

分子量はフェルマシアマーカー(17-0615-01)を基準にした推測値である。

\*"0" = 35.6%を除いた修正頻度である。

度はそれぞれ1.2, 4.1, 16.8, 25.2, 17.7%であった。“0”の頻度を除いた修正頻度は表Iのごとくになる。この方法をさらに簡易化したキットが市販されているので、その利用が勧められる。アイソフォーム頻度はわれわれの方法と比較して変わらない成績をえている<sup>10)</sup>。

## II. 新しいアイソフォームの概念

Kraftら<sup>11)</sup>は血液からDNAを抽出して、Kpn I制限酵素で切断処理してえたDNA断片をパルスフィールド電気泳動で分離して、プラスミドからえたクリンクル構造とハイブリダイゼーションしてジェノタイプを決定する方法を報告した。この操作はきわめて複雑であるし、ハイブリダイゼーションに用いるプローブが容易に入手できない問題を残している。Gaubatzら<sup>5)</sup>は1.5%アガロース支持体を用いるきわめて高分解能の電気泳動を応用してアイソフォームをアリアル No. で分類している。将来、このような高分解能の泳動法の利用とクリンクル数表示の標準血清を応用する測定法が勧められる。すでにイムノ社からはクリンクル数を表示した標準血清が提供されている。

高感度検出法を用いてクリンクル4の繰返し数に由来するアリアル No. として表現する方法について述べる。

電気泳動はLp(a)フェノタイプ分析キット(株三和化学)を、ウエスタンブロットはAmplified Alkaline Phosphatase Immune Blot Kits(カタログNo. 170-6412, バイオラド社)をそれぞれ用いる。アイソフォームの解析はPower Macintosh 8100/80AVにオンラインしたFASシステム(東洋紡社)で解析する。泳動像を撮影し、その像を泳動像解析プログラムQuantity One(Pdi, 東洋紡社)を応用してアリアル No. を読みとる。

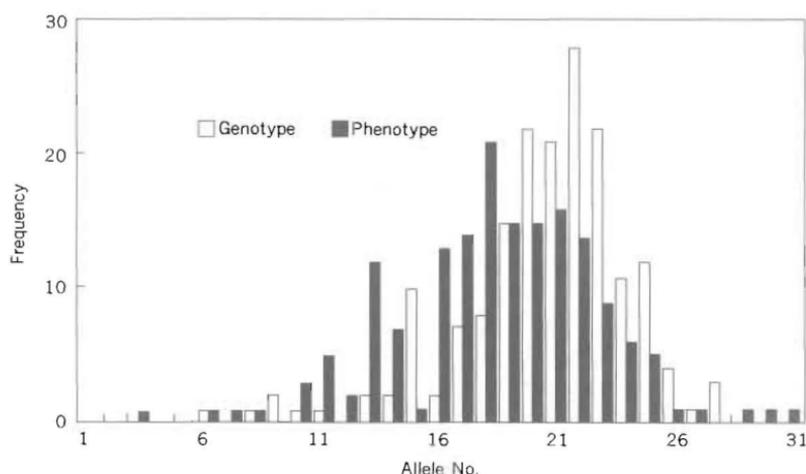


図1 アポ(a)の Allele No. 頻度

健常人のアリール No.頻度を高感度アイソフォーム法(フェノタイプ法)とジェノタイプ法を比較した。分布は2峰性を示し、その頻度はアリール No.20(クリングル4の繰り返し数30)を中心に集中する。

アイソフォーム標準血清(株三和化学)はF, B, S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>のアイソフォームを含む。これらのアイソフォームはイム社の標準血清から検定すると、クリングル4の繰り返し数はそれぞれ16, 19, 22, 29である。これらのアイソフォームはアリール No.として、それぞれ6, 9, 12, 19に相当する<sup>12)</sup>ことを標準にする。

87人の健常者を対象にして、この高感度フェノタイプ法と、血液からDNAを抽出してジェノタイプを決定する方法を比較した。フェノタイプ法の“0”の頻度は高感度検出法によって0%となった。ヘテロ型の頻度は79.5%であったが、ジェノタイプ法で88.6%であった。両法のアリール No.の頻度は図1に示すごとくきわめて近似している。ヒストグラムは2峰性を示しチロル人の頻度にも近似しており<sup>11), 13)</sup>、この決定法の価値は高いと考える。

フェノタイプ分類とアリール No.との関連性についてはKraft<sup>11)</sup>らが報告しているが、著者のフェノタイプ法と少し差がみられる(図2)。これは、電気

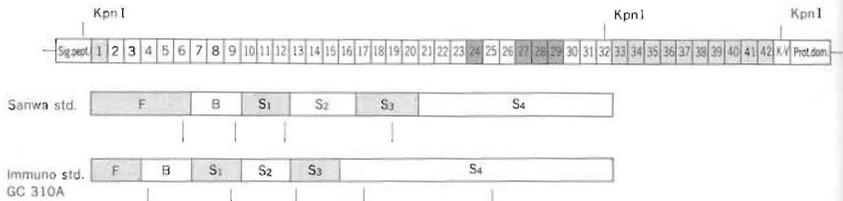


図2 アポ(a)のクリングル4構造とアイソフォーム標準血清のパターンモデル

アポ(a)はシグナルペプチド、クリングル4、クリングル5、プロテアーゼ領域から構成される。制限酵素 Kpn I による主な切断箇所を示す。クリングル4の2~23, 25~26は342個のヌクレオチドからなり、繰り返し数による変異性を示す。黒とシャドウのクリングル4は異なる性質を示すと考えられる。

イムノ社と株式会社三和化学の標準血清についてアリアル No. に対応するアイソフォームを示す。

表2 高感度アイソフォーム決定法による頻度

| アイソフォーム     | F   | B     | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>4</sub> |
|-------------|-----|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| クリングル4繰り返し数 | <16 | 17~19 | 20~22          | 23~26          | 27~30          | >31            |
| アリアル No.    | < 6 | 7~9   | 10~12          | 13~16          | 17~20          | >21            |
| 頻度(%)       | 1.1 | 1.1   | 5.7            | 23.9           | 36.9           | 31.3           |

泳動条件の違いから生じたものと想像される。この分類法におけるフェノタイプ、対応するアリアル No. ならびに頻度は表2のごとくである。この頻度は表1の場合と近似するが、対象を異にするのでF型が1.1%検出されている。

### おわりに

Lp(a)の血中濃度は常染色体優先遺伝すること、その血清濃度はクリングル4の数の繰り返し数ときわめて高い逆相関性があること、などの事実から、アイソフォーム決定に関心が寄せられているが、クリングル繰り返し数が血中濃度に寄与する率は55%とされる。最近、Trommsdorffら<sup>13)</sup>は、アポ(a)遺伝子の5'領域の5つの塩基配列繰り返し数の変異が血中濃度に14.3%寄与することを報告した。将来、これらの変異と併せての研究が重要になってくると思う。

〔文 献〕

- 1) Fless, G. M., Rolih, C. A., Scanu, A. M. : Heterogeneity of human plasma lipoprotein(a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins, *J. Biol. Chem.* 259 : 11470—11478, (1984).
- 2) Utermann, G., Menzel, H. J., Kraft, H. G., Duba, H. C., Kemmler, H. G., Seitz, C. : Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J. Clin. Invest.* 80 : 458—465, (1987).
- 3) Mclean, J. W., Tomlinson, J. E., Kuang, W. -J., Eaton, D. L., Chen, E. Y., Fless, G. M., Scanu, A. M., Lawn, R. M. : cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330 : 132—137, (1987).
- 4) Lackner, C., Boerwinkle, E., Leffert, C. C., Rahming, T., Hobbs, H. H. : Molecular basis of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity as revealed by pulse-field gel electrophoresis. *J. Clin. Invest.* 87 : 2153—2161, (1991).
- 5) Gaubatz, J. W., Ghanem, K. I., Guevara, J. Jr., Nava, M. L., Patsch, W., Morrisett, J. D. : Polymorphic forms of human apolipoprotein(a) : inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J. Lipid Res.* 31 : 603—613, (1990).
- 6) Kamboh, M. I., Ferrell, R. E., Kottke, B. A. : Expressed hypervariable polymorphism of apolipoprotein(a). *Am. J. Hum. Genet.* 49 : 1063—1074, (1991).
- 7) Kikuchi, S., Nakagawa, A., Kobayashi, K., Li, L., Yanagi, H., Arinami, T., Kozu, Y., Miyazaki, R., Tsuchiya, S., Hamaguchi, H. : High degree of genetic polymorphism in apolipoprotein(a) associated with plasma lipoprotein(a) levels in Japanese and Chinese populations. *Hum. Genet.* 92 : 537—544, (1993).
- 8) Abe, A., Noma, A. : Studies on apolipoprotein(a) phenotypes. Part 1. Phenotype frequencies in a healthy Japanese population. *Atherosclerosis* 96 : 1—8, (1992).
- 9) Abe, A., Noma, A., Itakura, H. : Lipoprotein(a) phenotyping using a computerized micro scale and phenotype frequencies in a healthy Japanese population. *Clin. Chim. Acta* 219 : 149—157, (1993).
- 10) 安部 彰, 福井加代子, 野間昭夫 : Lp(a)フェノタイプ分析キットの検討. *臨床検査機器・試薬* 18 : 185—190, (1995).
- 11) Kraft, H. G., Köchl, S., Menzel, H. J., Sandholzer, C., Utermann, G. : The apolipoprotein(a) gene : a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein(a) concentration. *Human Genet.* 90 : 220—230, (1992).
- 12) Dr. Utermannからの私信
- 13) Trommsdorff, M., Köchl, S., Lingenhel, A., Kronenberg, F., Delport, R., Vermaak, H., Lemming, L., Klausen, I. C., Faergeman, O., Utermann, G., Kraft, H. -G. : A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma concentrations in Caucasian. *J. Clin. Invest.* 96 : 150—157, (1995).