

先天性リポ蛋白代謝異常症としての アポ蛋白変異種の検索

研究協力者 山 本 章
山 村 卓
(国立循環器病センター研究所・病因部)

目 的

リポ蛋白代謝におけるアポ蛋白の機能の重要性が理解され、リポ蛋白代謝異常症の病態解析にアポ蛋白分析の必要性が強調されている。なかでもアポ蛋白C (アポC) はリポ蛋白リパーゼ活性に影響を与え、またアポEはリポ蛋白の特異レセプターに結合するなどの機能を有している。近年、リポ蛋白代謝異常症のなかに、アポ蛋白の異常に基づく病態が明らかにされている。

アポ蛋白の先天異常には、すでに明らかにしたアポC-II欠損症¹⁾のようなアポ蛋白の欠損症だけでなく、構造異常アポ蛋白(アポ蛋白変異種)の存在することが知られている。欧米ではアポE、アポAを中心に多くのアポ蛋白変異種が報告されている²⁾。

そこで高脂血症・動脈硬化症の症例を中心にアポ蛋白の分析を行い、アポ蛋白異常について検討した。

方 法

空腹時血清から超遠心法によってリポ蛋白を分離した。血清を比重(d)=1.006で10,500 g×18h遠心し浮上したVLDLを分離後、d=1.063で10,500 g×20h遠心しLDLを、さらにd=1.21で10,500 g×40hの遠心によりHDLを順次分離した。また血清を直接d=1.21で40hr遠心し、全リポ蛋白分画(VLDL+LDL+HDL)を分離した。

各リポ蛋白分画を有機溶媒で脱脂しアポ蛋白を得、これを一般的なポリアクリルアミドゲル電気泳動法、SDS電気泳動法、さらに等電点電気泳動法によって分析した。異常アポ蛋白は等電点電気泳動法と免疫拡散法との組み合わせ、あるいは二次元電気泳動法によってアポ蛋白の同定を行い、その構造異常についても検討した。

結果ならびに考察

1. 各種電気泳動法を用いたアポ蛋白の電気泳動パターン

各リポ蛋白分画から得たアポ蛋白電気泳動パターンを図1に示す。アポ蛋白には現在10種類以上のものが同定されているが、各リポ蛋白分画別にみると、VLDLではアポB、C、Eが

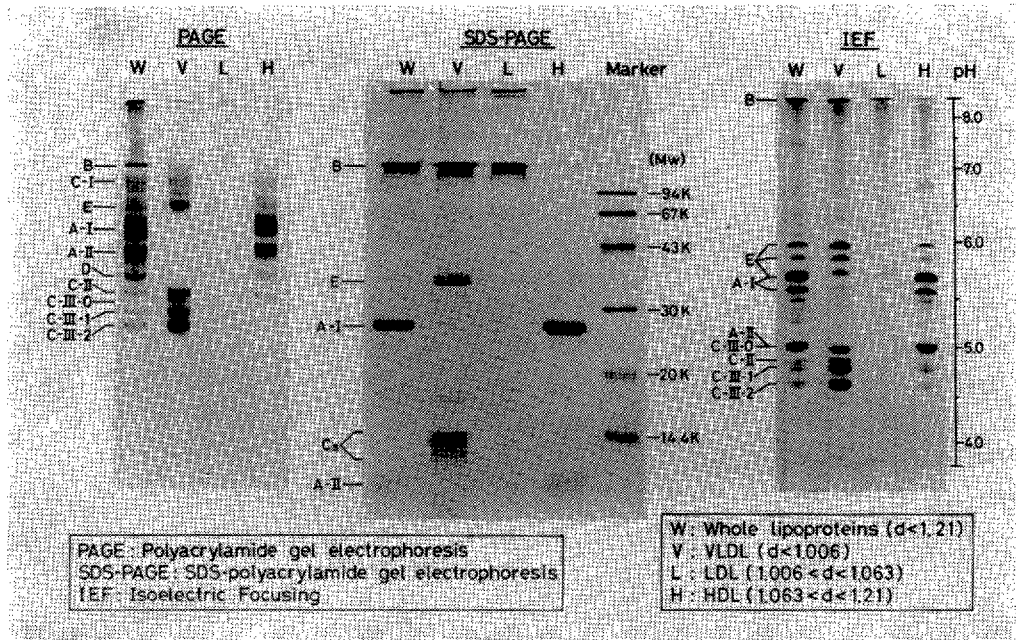


図1 種々の電気泳動法による血清リポ蛋白分画のアポ蛋白電気泳動パターン

主要成分となっており、LDL はほとんどがアポBで、また HDL はアポA-Iと少量のアポCが認められる。このうち、アポCやアポEは SDS 電気泳動で単一またはブロードなバンドとなるが、通常の電気泳動 (PAGE) でアポCが、さらに等電点電気泳動ではアポE、A-Iもいくつかの成分に分離泳動される (図1)。

2. アポEの多様性とアポE変異種の分析

一般人口中に認められるアポEにはアミノ酸残基の置換した3種類の遺伝的変異 (E-4, E-3, E-2) が存在し、それぞれ等電点電気泳動法によって異なった位置に泳動される。等電点電気泳動によって分離されるアポEバンドはポリペプチドのアミノ酸組成の置換に加え、一部のアポEポリペプチドには1ないし数分子のシアル酸を付加されることによってさらに電荷が変化し、その陽極側へと微量成分として泳動される。

図2は等電点電気泳動と SDS 電気泳動とを組み合わせた二次元電気泳動で (VLDL+HDL) アポ蛋白を分析したものである。アポEは pH 5.5~6、分子量約35,000の位置へいくつかのスポットとして泳動される。図2のアポEは E-3 ポリペプチドであるが、陰極側の大きなスポットがシアル酸を持たない E-3 ポリペプチドで (等電点方向で E-III の位置に相当)、これにシアル酸を付加された E-3 ポリペプチドはその分子数に応じて等電点電気泳動方向で陽極側へ、また SDS 電気泳動で分子量の大きい方へ順に泳動される。先に述べた一般人口中に認められる遺伝的変異アポE (E-2, E-3, E-4) は、シアル酸のない主要スポットが等電点方向でそれぞれ E-IV, E-III, E-II の位置に1単位ずつ偏位するが、二次元電気泳動で同様の分布様式で泳動される。

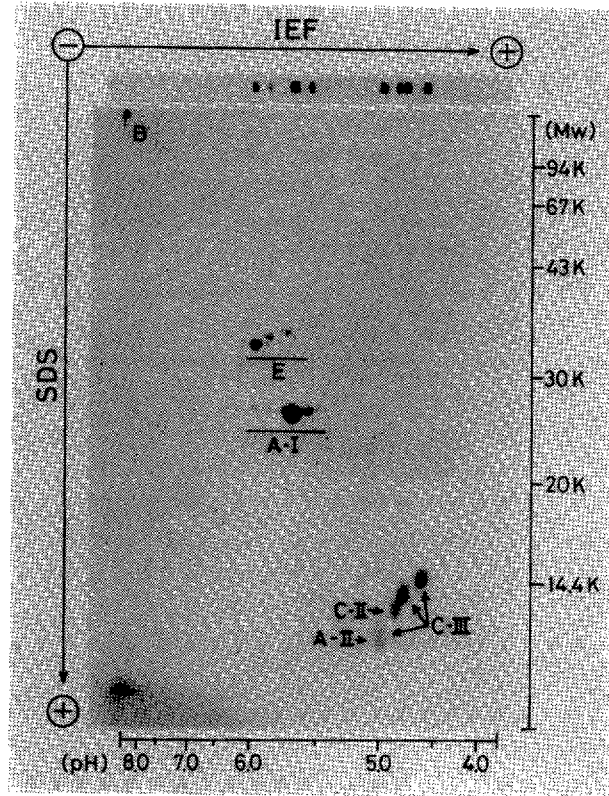


図2 (VLDL+HDL) アポ蛋白の二次元電気泳動パターン

高脂血症，動脈硬化症の多数の症例について VLDL アポ蛋白を等電点電気泳動法で分析したところ，通常とは異なる泳動パターンを呈する症例が認められた。図3-A に示す症例の二次元電気泳動パターンは，正常のE-IIIの主要スポットに加え，E-Vの位置にも主要スポットが認められ，また図3-Bの症例ではE-IIIとE-VIIの位置に主要スポットが認められる。

これら主要スポットおよび等電点方向で陽極側に付随した小スポットはいずれも通常のアポE (E-4～E-2) に対する抗アポE抗体と交叉反応を示し，免疫学的に通常のアポEと同等のものであることが明らかにされた³⁾⁴⁾。さらにシアリダーゼ処理による成績から，E-IIIのスポットがシアル酸のないアポE-3であると同様に，E-V (図3-A) および E-VII (図3-B) のスポットがシアル酸のないアポEポリペプチドであることが示された。前者の異常アポEポリペプチドをE-5，後者をE-Suitaと呼ぶことにした。E-SuitaポリペプチドはSDS電気泳動で正常のE-3と同じ位置に泳動されるが，E-5ポリペプチドはE-3よりも少し先端寄りに泳動される (図3)。分子量マーカーから算出すると，E-5は他のアポEポリペプチドに比べ1,500～2,000程度分子量の小さいことが示された⁴⁾。

通常のアポE-4，E-3，E-2ポリペプチドには1分子にシステイン残基がそれぞれ，0，1，2残基存在する。E-5，E-Suitaポリペプチドにはいずれもシステインが1残基存在することが

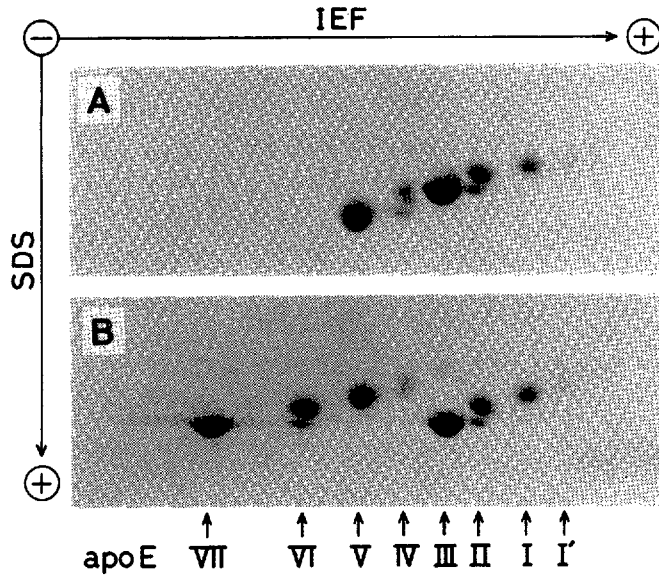


図3 二次元電気泳動法による変異アポEの泳動パターン
(アポE部分のみを示す)。
A) E5/3 表現型, B) E3/Suita 表現型

示された。以上のことより、E-5, E-Suita 異常アポ蛋白は E-3 ポリペプチドを基にそれぞれ、2単位および4単位正電荷が相対的に増加するようなアミノ酸変異が起こっているものと考えられる。この場合、アポ E-5 では分子量の小さいことより、アミノ酸残基数そのものが減少していることも示唆される。

図1に示す通常の電気泳動法や SDS 電気泳動法ではこのような変異アポ蛋白を検出することは困難であり、この点から蛋白の電荷がわずか1単位異なる異常蛋白を鋭敏に検出できる等電点電気泳動法は変異アポ蛋白同定のためのスクリーニングとして有力な手段であると考えられる⁹⁾。

これら異常アポ E は高脂血症、動脈硬化症症例の127例中7例 (5.5%) において認められた (E-5; 3例, E-Suita; 4例) が、一般健常者100例には1例も存在せず、異常アポ E と高脂血症・動脈硬化症との関連性が示唆された。

異常アポ E 症例の家系調査による成績から、アポ E-5 およびアポ E-Suita はこれまでのアポ E 遺伝子と同格に作用する新たな対立遺伝子によって遺伝していることが確認された³⁾⁴⁾。図5-Aの症例ではE-5とE-3の、また図5-Bの症例では E-Suita とE-3のヘテロ接合体と判断される。その後の分析から発見された症例を含め、すべてヘテロ接合体ではあるが異常アポ E は合計10家系において認められており、かなり高頻度に存在しているものと考えられる。

3. HDL アポ蛋白異常のスクリーニング

アポ E 変異種の他に、欧米では多くのアポ A の遺伝的変異が報告されている。しかしなが

ら、アポAを含有するリポ蛋白であるHDLの分離は時間と手間を要するため、わが国においては広範なアポAの分析はこれまでほとんど行われていない。そこでアポAの簡易分析法について検討した。

超遠心法によって各リポ蛋白を順次分離する場合、「方法」に述べたように一般的にはHDLを得るまでに3回(合計4日間)の超遠心操作が必要である。しかし血清中に占める各リポ蛋白分画のアポ蛋白量はVLDLに比べLDLとHDLで圧倒的に多い。一方LDLのアポ蛋白はほとんどがアポBであり、これは分子量が数十万と大きく、通常の濃度のポリアクリルアミド電気泳動ゲル中には入らない。したがって、血清中の全リポ蛋白分画($d < 1.21$)のアポ蛋白電気泳動パターンはHDLアポ蛋白のそれと非常に類似している³⁾(図1)。全リポ蛋白分画は40時間、1回の超遠心で得られ、そのアポ蛋白を等電点電気泳動することにより、アポA-I、A-II、さらに濃度はやや低いがアポC-II、C-IIIの分析も可能である(図1)。しかし、アポEについてはその主要成分とアポA-Iの微量成分(アポA-I全体の数%にすぎないが、アポE濃度と比較すれば無視できない)とがほぼ同一の等電点を有するため(図2)、一次元の等電点電気泳動法では同定が困難である。

HDLアポ蛋白は血中に比較的高濃度にあるため、K-ファクターの小さな小容量の卓上形分離用超遠心機を用いることによって、さらに遠心時間も短縮でき、多数検体の分析が可能になるものと思われる。

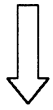
文 献

- 1) Yamamura, T., Sudo, H., Ishikawa, K. and Yamamoto, A.: Familial type I hyperlipoproteinemia caused by apolipoprotein C-II deficiency. *Atherosclerosis*, **34**: 53~65, 1979.
- 2) 山村 卓: リポ蛋白代謝異常, 最近の一つの話題—アポ蛋白遺伝変異の様々—. *Pharma Medica*, **2**(8): 27~36, 1984.
- 3) Yamamura, T., Yamamoto, A., Hiramori, K. and Nambu, S.: A new isoform of apolipoprotein E—apo E-5—associated with hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **50**: 159~172, 1984.
- 4) Yamamura, T., Yamamoto, A., Sumiyoshi, T., Hiramori, K., Nishioeda, Y. and Nambu, S.: New mutants of apolipoprotein E associated with atherosclerotic diseases but not to type III hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.*, **74**: 1229~1237, 1984.
- 5) 山村 卓: 電気泳動法によるアポ蛋白異常症の解析—等電点電気泳動法を中心に—. *生物物理化学*, **29**: 35~41, 1985.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



目的

リポ蛋白代謝におけるアポ蛋白の機能の重要性が理解され、リポ蛋白代謝異常症の病態解析にアポ蛋白分析の必要性が強調されている。なかでもアポ蛋白 C(アポ C)はリポ蛋白リパーゼ活性に影響を与え、またアポ E はリポ蛋白の特異レセプターに結合するなどの機能を有している。近年、リポ蛋白代謝異常症のなかに、アポ蛋白の異常に基づく病態が明らかにされている。

アポ蛋白の先天異常には、すでに明らかにしたアポ C-1 欠損症¹⁾のようなアポ蛋白の欠損症だけでなく、構造異常アポ蛋白(アポ蛋白変異種)の存在することが知られている。欧米ではアポ E、アポ A を中心に多くのアポ蛋白変異種が報告されている²⁾。

そこで高脂血症・動脈硬化症の症例を中心にアポ蛋白の分析を行い、アポ蛋白異常について検討した。