

NEW JAPANESE VARIANT OF
HUMAN ERYTHROCYTE CARBONIC ANHYDRASE

わが国最初のヒト赤血球炭酸脱水酵素の変異型

NAOKI UEDA, M.D. 上田尚紀

with the technical assistance of
技術的援助

EIKO ONISHI, M.T. 大西栄子

MIYOKO MASUMOTO, M.T. 升本美代子

KYOKO OZAKI, M.T. 尾崎恭子

AKIKO TAKETANI, M.T. 竹谷章子



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION

国立予防衛生研究所 - 原爆傷害調査委員会

JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

TECHNICAL REPORT SERIES

業 績 報 告 書 集

The ABCC Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, advisory groups, and affiliated government and private organizations. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

ABCC業績報告書は、ABCCの日米専門職員、顧問、諮問機関ならびに政府および民間の関係諸団体の要求に応ずるための日英両語による公式報告記録であって、業績報告書集は決して通例の誌上発表論文に代わるものではない。

NEW JAPANESE VARIANT OF HUMAN ERYTHROCYTE CARBONIC ANHYDRASE

わが国最初のヒト赤血球炭酸脱水酵素の変異型

NAOKI UEDA, M.D. 上田尚紀

with the technical assistance of
技術的援助

EIKO ONISHI, M.T. 大西栄子

MIYOKO MASUMOTO, M.T. 升本美代子

KYOKO OZAKI, M.T. 尾崎恭子

AKIKO TAKETANI, M.T. 竹谷章子

AECC JNIIH

ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION
HIROSHIMA AND NAGASAKI, JAPAN

A Cooperative Research Agency of
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL
and
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

with funds provided by
U.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

原 爆 傷 害 調 査 委 員 会

広島および長崎

米 国 学 士 院 一 学 術 会 議 と 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所

と の 日 米 共 同 調 査 研 究 機 関

米 国 原 子 力 委 員 会, 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所 お よ び 米 国 公 衆 衛 生 局 の 研 究 費 に よ る

HUMAN ERYTHROCYTE CARBONIC ANHYDRASE
NEW JAPANESE VARIANT OF

わが国最初のヒト赤血球炭酸脱水酵素の変異型

NAOKI UEDA, M.D., F.R.M.S.

with the technical assistance of

技術的援助

EIKO OHSUMI, M.T., 大工師

MIYOKO MASUMOTO, M.T., 井手

KYOKO OKAMI, M.T., 大工師

AKIKO TAKETANI, M.T., 井手

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

We thank Professor Susumu Shibata, Kawasaki Medical College, Dr. Robert J. Tanis, Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, and Dr. Howard B. Hamilton, ABCC Clinical Laboratories, Hiroshima, for comments on this manuscript, and Dr. Robert E. Ferrell for samples of CA Id Michigan and for anti-human CA I and CA II rabbit sera.

本稿のご校閲を賜った川崎医科大学柴田 進教授, Michigan 大学医学部人類遺伝学教室 Dr. Robert J. Tanis および ABCC 臨床検査部 Dr. Howard B. Hamilton に深く感謝する。CA Id Michigan の標本および抗ヒト CA I および CA II ウサギ血清の提供を頂いた Dr. Robert E. Ferrell に厚くお礼申し上げる。

JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

1973

U.S.A. NATIONAL CENTER FOR HUMAN GENETICS
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

会 員 委 員 会 報 告 書

第 1 号

東京大学医学部遺伝学教室

東京大学医学部遺伝学教室

東京大学医学部遺伝学教室

CONTENTS

目次

Summary	要約	1
Introduction	緒言	1
Material and Method	資料および方法	2
Results	成績	2
Discussion	考察	4
References	参考文献	6
Table 1.	World distribution of electrophoretic variants of carbonic anhydrase I		
表	炭酸脱水酵素 I 型の電気泳動的変異体の世界各地における分布	5
Figure 1.	Starch gel electrophoretic patterns of normal carbonic anhydrase and three variants, stained with amido black		
図	正常な炭酸脱水酵素と変異型 3 例の澱粉ゲル泳動像, amido black 染色	3
2.	Agar gel immunodiffusion		
	寒天ゲル免疫拡散	3

Approved 承認 16 November 1973

NEW JAPANESE VARIANT OF HUMAN ERYTHROCYTE CARBONIC ANHYDRASE

わが国最初のヒト赤血球炭酸脱水酵素の変異型

NAOKI UEDA, M.D. (上田尚紀)

with the technical assistance of
技術的援助EIKO ONISHI, M.T. (大西栄子); MIYOKO MASUMOTO, M.T. (升本美代子); KYOKO OZAKI, M.T. (尾崎恭子);
AKIKO TAKETANI, M.T. (竹谷章子)

Department of Clinical Laboratories

臨床検査部

SUMMARY

In a study of 1200 members of the ABCC-JNIH Adult Health Study living in Hiroshima, two individuals were found to have a variant of carbonic anhydrase I; it was not possible to distinguish one from the other. These are the first reported instances of variants of the enzyme in Japan. Each propositus was a middle-aged asymptomatic female having no other unusual laboratory findings. The frequency of the variant in this study is 167 per 10,000, which is higher than that reported for Caucasian and Black populations, but lower than in some other populations in this part of the world. Both variants are tentatively designated CA 1h Hiroshima until the exact nature of the amino acid substitutions are determined.

INTRODUCTION

Carbonic anhydrase (carbonate hydro-lyase, EC 4.2.1.1), an enzyme which reversibly catalyzes the reaction $H_2CO_3 \rightleftharpoons CO_2 + H_2O$, occurs throughout the human body in erythrocytes, gastric mucosa, kidney, etc. The concentration of carbonic anhydrase in erythrocytes is higher than any other non-hemoglobin protein.¹ Electrophoretically, it is observed as two isozymes determined by independent genetic loci.² One, normally migrating towards the anode on a pH 8.6 starch gel, is designated carbonic anhydrase I (CA I or CA B), and the other which migrates to the cathodal side, is designated carbonic anhydrase II

要 約

ABCC一予研成人健康調査対象者のうち広島に居住する1200人を調査した結果、2人に炭酸脱水酵素I型の変異体を発見した；電気泳動で両者を区別することはできなかった。これはわが国最初の報告例で、発端者はいずれも中年の婦人であり、臨床的には無症状で、その他にも異常な検査所見はなかった。本調査におけるこの変異体の出現頻度は10,000人当たり167例であった。これは白人や黒人の集団での報告における変異体出現頻度よりも高いが、その他のアジア地域における住民での頻度よりも低い。そのアミノ酸置換の性状が明らかにされるまで、かりにこれらをCA 1h Hiroshimaと命名した。

緒 言

炭酸脱水酵素 (carbonate hydro-lyase, EC 4.2.1.1) は $H_2CO_3 \rightleftharpoons CO_2 + H_2O$ の反応を可逆的に触媒する酵素で、赤血球、胃粘膜、腎臓など生体内に広く分布している。赤血球中では非色素蛋白のうちで炭酸脱水酵素が最も多量に含まれている。¹ 電気泳動的には、独立した遺伝子座に由来する二つのアイソザイムとして認められる。² 通常、pH 8.6の澱粉ゲル上で陽極側に移動するものを炭酸脱水酵素I型 (CA IあるいはCAB)、陰極側に移動するものを炭酸脱水酵素II型 (CA IIあるいは

(CA II or CA C).^{2,3} Both are single polypeptide chains with molecular weights of approximately 30,000, and each contains one atom of zinc per molecule of enzyme. They differ, however, in their enzymatic activity and concentration in erythrocytes. CA II has a CO₂ hydration activity 20 to 30 times greater than CA I, but its concentration in erythrocytes is only approximately one-fifth that of CA I.³

Variants of CA I are very rare, and only fourteen have been reported to date in American caucasians⁴ and blacks,² British caucasians,⁵ Philippine residents in San Francisco,⁶ and Micronesians.⁷ The only variant of CA II thus far known, was found to exist at polymorphic levels in American blacks.⁸

We describe here two examples of CA I variants, discovered for the first time in a Japanese population.

MATERIAL AND METHOD

Peripheral blood samples for analysis were obtained from 1200 residents of Hiroshima, Japan, 444 males and 756 females who, as voluntary participants in a biennial health surveillance program,⁹ visited the outpatient clinic of the ABCC in Hiroshima in a 1 year interval beginning 8 August 1972. Radiation dose, if any from exposure to the atomic bomb in 1945, is not considered here, since it would not be related to the occurrence of CA variants.

Hemolysates were processed according to the method of Tashian.¹⁰ Vertical starch (Electrostarch Co., Madison, Wisc., lot number 146) gel electrophoresis was based on the method of Smithies,¹¹ under conditions described by Tashian.¹² Electrophoresis was carried out at 250V, 20mA/2 gels for 18 hours at 4 ± 0.5°C. Following electrophoresis, the gel was sliced horizontally. One slice was stained for protein with amido black, and the other was stained for esterase activity of carbonic anhydrase¹² with Blue RR salt using α -naphthol acetate as substrate. After separating the variant band on starch gel, its immunoreactivity with anti-human CA I rabbit sera and anti-human CA II rabbit sera was tested on agar plates. Plugs of gel, containing the normal and variant enzyme, were used directly.

RESULTS

Among the 1200 residents of Hiroshima, two genetically unrelated subjects, both female, were found to have a carbonic anhydrase I component with altered electrophoretic mobility. The patterns for these two cases are shown in Figure 1, compared with normal CA and another known variant, CA Id

CA C)と呼んでいる。^{2,3} 両者とも酵素1分子当たり1原子の亜鉛を含む分子量約30,000の単一鎖ポリペプチドであるが、その酵素活性および赤血球中の濃度は異なっている。すなわち、CA IIは、CO₂水和活性がCA Iの20ないし30倍も高いが、赤血球中にはCA Iの約5分の1量しか含まれていない。³

CA Iの変異体は非常にまれで、今日までに米国白人、⁴ 米国黒人、² 英国人、⁵ San Francisco 在住フィリピン人、⁶ およびマイクロネシア人⁷ に14例報告されているにすぎない。CA IIの変異体は、米国黒人に多型レベルの頻度で存在することが報告されているにすぎない。⁸

われわれは、わが国最初のCA Iの変異体2例を発見したので、ここに報告する。

資料および方法

2年ごとの定期検診に基づく健康調査プログラム⁹の対象として1972年8月8日からの1年間に広島原爆傷害調査委員会(ABCC)の外来で自発的に受診した男子444人、女子756人、合計1200人の広島居住者から末梢血液を求めて試料とした。1945年の原爆被爆による放射線量がいかなる程度であっても炭酸脱水酵素の変異体出現とは関係がないので、ここでは考慮を払わなかった。

溶血液はTashian¹⁰の方法に準じて処理した。垂直方式の澱粉(Electrostarch Co., Madison, Wisc., lot number 146)ゲル電気泳動をSmithies¹¹の方法に準じて行ない、泳動条件はTashian¹²の方式に従った。すなわち4 ± 0.5°Cの範囲において、250V, 20mA/2 gelで18時間泳動した。泳動後にゲルを水平に切り、1枚はamido blackで蛋白染色を施し、他の1枚には、炭酸脱水酵素のエステラーゼ活性¹²を利用して α -naphthol acetateを基質としてBlue RR saltを用いて染色を施した。澱粉ゲル上で変異体を分離した後に、寒天平板上で抗ヒトCA Iウサギ血清および抗ヒトCA IIウサギ血清との免疫反応を調べた。これには、正常および異常な酵素を含むゲルを穿孔して直接使用した。

成績

広島地区住民1200人の検索において姻戚関係のない2人の婦人に電気泳動的易動度の異常なCA I成分が発見された。この2例のパターンと正常な炭酸脱水酵素および既知の変異体であるCA Id Michiganとの比較を図1に示した。MF番号第333701(47歳)およびMF番号第

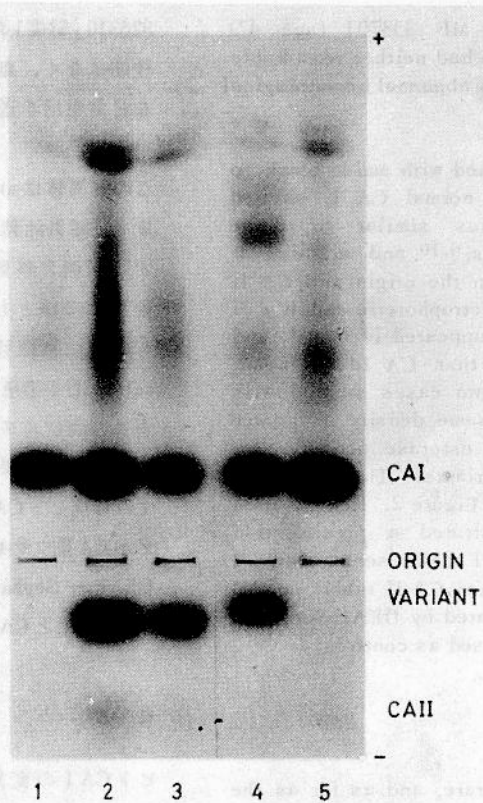


Figure 1 Starch gel electrophoretic patterns of normal carbonic anhydrase and three variants, stained with amido black. Slots 1 and 5, normal CA; slots 2 and 3, CA 1h Hiroshima from NK and SI respectively; slot 4, CA 1d Michigan.

図1 正常な炭酸脱水酵素と変異型3例の澱粉ゲル電気泳動像, amido black 染色. 第1および第5は正常炭酸脱水酵素; 第2および第3はそれぞれNKおよびSIから得たCA 1h Hiroshima; 第4はCA 1d Michigan.

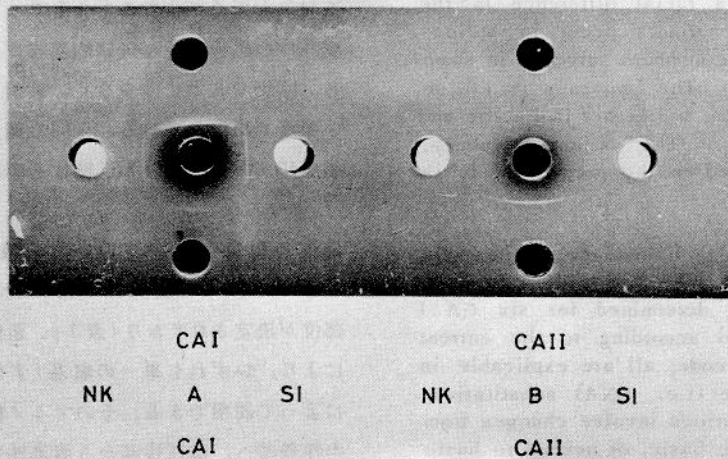


Figure 2 Agar gel immunodiffusion. The central wells contain anti-human CA I rabbit serum (left, A) and anti-human CA II rabbit serum (right, B). Wells labelled CA I and CA II contain, respectively, normal carbonic anhydrase I or II; those labelled NK and SI contain the Hiroshima variant CA 1h, from the two Japanese propositi.

図2 寒天ゲル免疫拡散. 中央の孔には抗ヒトCA I 家兎血清(左側, A)および抗ヒトCA II 家兎血清(右側, B)を入れた. CA I およびCA II と表示した孔にはそれぞれ正常なCA I およびCA II およびNK およびSI と表示した孔には2人の発端者から求めたCA 1h Hiroshima 変異体を入れた.

Michigan. Both propositi, MF 333701 (age 47) and MF 326310 (age 53), who had neither remarkable past history of disease nor any abnormal hematological findings, lead normal lives.

The variant band, which stained with amido black to about the same density as normal CA I, showed electrophoretic characteristics similar to those described in previous reports,^{6,10} and migrated at pH 8.6 to a position between the origin and CA II on the cathode side. The electrophoretic mobility of the variant in both subjects appeared identical, and was slightly more cathodal than CA Id Michigan. The variant band in these two cases stained with Blue RR salt to about the same density as normal CA I, and no difference in esterase activity was apparent between the two variants. The results of immunodiffusion are shown in Figure 2. Hemolysates from both subjects demonstrated a precipitation reaction with anti-human CA I rabbit serum, but did not react at all with anti-human CA II rabbit serum. Normal CA I and CA II separated by DEAE-Sephadex column chromatography were used as controls.

DISCUSSION

Variants of human CA I are rare, and as far as the author is aware, a total of 16 (see Table 1), including the two described here, are known. All cases are heterozygous for normal CA I and the variant. The male-female ratio for those cases where sex was reported is 5:7 (of the 16 reported cases, 4 are sex unknown). Transmission is consistent with autosomal codominant inheritance.⁷ There appears to be a racial difference in the frequency with which variants occur in various populations, although the numbers surveyed in some groups are quite small. The frequency is low in Europe and North America, and higher in Pacific and East Asian populations. The variant frequency, 166 per 10,000, observed in the present study is intermediate.

Recent reports have established the amino acid sequence of CA I.¹³⁻¹⁵ The site and amino acid substitution have been determined for six CA I variants (Table 1), and according to the current concept of the genetic code, all are explicable in terms of a single base (i.e., DNA) substitution. The amino acid substitutions involve changes from acid to neutral, acidic to basic, or neutral to basic residues; hence these variants all have an increased net positive charge. The electrophoretic mobilities of the other variants, whose amino acid substitutions have not been determined, suggest an increased net positive charge, inasmuch as they all exhibit greater cathodal migration than normal CA I at pH 8.6.

326310 (53歳)の2人の発端者は、いずれも特記すべき既往症はなく、血液学的にも異常所見は認められず、健康な日常生活を送っていた。

この変異体は amido black 染色で正常な CA I とほぼ同濃度で、電気泳動的には今までの報告^{6,10}と同じく pH 8.6 で陰極側に移動して原点と CA II との間に出現した。易動度は2例とも同じで、CA Id Michigan よりはいずれも陰極よりに移動した。この2例の変異体は Blue RR salt による染色で正常な CA I とほぼ同じ濃度に染まり、両者の間にエステラーゼ活性の差はみられなかった。免疫拡散法の結果は図2に示した。この2例の溶血液はいずれも抗ヒト CA I ウサギ血清と沈降反応を示したが、抗ヒト CA II ウサギ血清とは全く反応しなかった。対照には DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィで分離した正常 CA I と CA II を使用した。

考 察

ヒト CA I の変異体は非常にまれで、著者の調べた限りでは、今回の2例を含めても現在までに合計16例判明しているにすぎない(表1)。いずれも正常な CA I と変異体との異種接合であり、性別の記載があった症例の男女比は5:7である(報告されている16例中4例は性別不明)。変異体は常染色体性共優性遺伝の形式をとる。⁷ 調査対象が極めて少数のものもあったが、各集団における変異体の出現頻度に民族的差異がうかがわれる。すなわち、欧州や北米には少なく、東南アジアの住民により高い頻度で出現している。今回の調査における変異体出現頻度10,000人当たり166例はそのほぼ中間に位置する。

最近の報告では CA I のアミノ酸配列が決定されている。¹³⁻¹⁵ CA I の変異体6種についてはアミノ酸の置換部位が決定されており(表1)、遺伝コードの現在の概念により、いずれも単一の塩基(すなわち、DNA)の置換によって説明できる。そのアミノ酸置換は酸性残基から中性残基へ、酸性残基から塩基性残基へ、または中性残基から塩基性残基への置換である;したがって、いずれの変異体も陽性荷電の増加がある。アミノ酸置換が未決定のその他の変異体も電気泳動的には pH 8.6 で正常な CA I よりも陰極側への易動度が早いことが認められて

TABLE 1 WORLD DISTRIBUTION OF ELECTROPHORETIC VARIANTS OF CARBONIC ANHYDRASE I

表1 炭酸脱水酵素I型の電気泳動的変異体の世界各地における分布

Population & Location	Number		Frequency ($\times 10^5$)	Variant Name	Amino Acid Substitution*	Reference
	Tested	Found				
USA White	2714	2	74	Ib Michigan		4,13
				Pmutt**	235 Asp \rightarrow Val	15
USA Black	923	1	108	Id Michigan	100 Thr \rightarrow Lys	2,6,16
USA American Indian	366	0				2
British White	8500	3	35	Ie Portsmouth	254 Thr \rightarrow Arg	5
				Ie Hull	224 Glu \rightarrow Lys or Arg	5
				If London	102 Glu \rightarrow Lys	17
Filipino	120	2	1667	Ic Filipino		6
Indonesian	375	2	533	Ic		18
Chinese in Indonesia	87	0				18
Micronesian (Chamorro & Carolinian)	490	4	815	Ic Guam	252 Gly \rightarrow Arg	7
Japanese Hiroshima	1200	2	167	Ih Hiroshima		This Report

* Residue number; standard abbreviations for amino acids used

** Notation of Funakoshi (ref. 15)

Similarly, although the substitution in our variants is not yet known, their behavior on starch gel, on which they move more rapidly towards the cathode than CA Id Michigan, also suggests a positive charge increase. Until the chemical structure has been determined, both variants are tentatively termed CA Ih Hiroshima. Family studies of the variants are now in progress.

The concentration of carbonic anhydrase in erythrocytes, gastric mucosa and kidney is higher than elsewhere in the human body, presumably indicating an important function of the enzyme in those tissues. Nonetheless, to date there is no evidence relating CA variants with specific disease. Though such a relationship might be more likely to occur in an individual homozygous for a CA variant, as is often true for the hemoglobinopathies, no cases of homozygosity in the CA system are known. Further, of the known CA variants that have been studied in some detail, none have substitutions that appreciably effect their enzyme activity. Tashian^{7,10} and Lie-Injo⁶ report no difference in CO₂ hydration or esterase activity between normal CA I and CA Ic Guam, CA Ie Hull or CA Ic Filipino. Although we have not estimated precisely the enzyme activity of our variants, staining with α -naphthol acetate as substrate demonstrates no apparent difference between them and normal CA I. Moreover, our variants show a precipitation reaction only with anti-human CA I rabbit serum (but not with anti-CA II), an indication that, aside from their altered electrophoretic

いるので、陽性荷電の増加があると思われる。われわれの変異体2例も、アミノ酸置換部位はまだ決定されていないが、澱粉ゲル上の動態はCA Id Michiganよりも陰極側への移動が早いので、陽性荷電の増加があるものと推測される。その化学的構造が明らかにされるまで、かりに、両者をCA Ih Hiroshimaと命名した。この変異体についての家族調査は目下進められている。

人体の中で炭酸脱水酵素の濃度が最も高いのは赤血球、胃粘膜および腎臓であり、これらの組織ではこの酵素は重要な機能をもつものであろう。しかし、今日までの報告では、炭酸脱水酵素の変異体と特殊な疾患との間の関係を示す所見はない。この種の関係は、異常ヘモグロビンの場合と同じく、変異体の同種接合個体において最も容易に起こることが予想されるが、炭酸脱水酵素系における変異体の同種接合はまだ発見されていない。既知の炭酸脱水酵素変異型についての今日までの検討では、いずれにもアミノ酸置換のための酵素活性への、認められるような影響はない。Tashian⁷⁻¹⁰およびLie-Injo⁶によれば、CA Ic Guam, CA Ie HullやCA Ic FilipinoのCO₂水和活性とエステラーゼ活性は正常なCA Iと差を示さない。われわれの例でも、酵素活性は測定していないが、 α -naphthol acetateを基質とした染色で正常なCA Iとこの変異体との間に差はみられなかった。しかも、この変異体は抗ヒトCA Iウサギ血清のみと沈降反応を形成した(抗ヒトCA II血清とは全く反応しなかった)。すなわち、電気泳動的に易動度の変化があることを除けば、この変異体は恐らくは正常なCA I

mobilities, our variants probably do not differ greatly from normal CA I. However, until the physiological function is better understood, and the three dimensional structure, including side-chain orientation, is fully worked out for carbonic anhydrase, further speculation about the possible effects of amino acid substitutions on the properties of the enzyme are clearly premature.

と大素ないと思われる。しかしながら、炭酸脱水酵素の生理的機能が十分に解明され、その側鎖配向などの立体構造が確立されるまでは、アミノ酸置換のためにこの酵素の特性にいかなる影響が起こりうるかということについてこれ以上推測することは明らかに早計であろう。

REFERENCES

参考文献

1. HAUT A, TUDHOPE CR, CARTWRIGHT GE, WINTROBE MM: The nonhemoglobin erythrocytic proteins, studied by electrophoresis on starch gel. *J Clin Invest* 41:579-87, 1962
2. TASHIAN RE: Genetic variation and evolution of the carboxylic esterase and carbonic anhydrases of primate erythrocytes. *Am J Hum Genet* 17:257-72, 1965
3. TICKLI EE, GAZANFAR SAS, GIBBONS BH, EDSALL JT: Carbonic anhydrases from human erythrocytes: Purification and properties of two enzymes. *J Biol Chem* 239:1065-78, 1964
4. SHAW CR, SYNER FN, TASHIAN RE: New genetically determined molecular form of erythrocyte esterase in man. *Science* 138:31-2, 1962
5. CARTER ND, TASHIAN RE, HUNTSMAN RG, SACKER L: Characterization of two new variants of red cell carbonic anhydrase in the British population: CA 1e Portsmouth and CA 1e Hull. *Am J Hum Genet* 24:330-38, 1972
6. LIE-INJO LE: Red cell carbonic anhydrase 1c in Filipinos. *Am J Hum Genet* 19:130-32, 1967
7. TASHIAN RE, PLATO CC, SHOWS TB: Inherited variant of erythrocyte carbonic anhydrase in Micronesians from Guam and Saipan. *Science* 140 (5):53-5, 1963
8. MOORE MJ, FUNAKOSHI S, DEUTSCH HF: Human carbonic anhydrases. 7. A new C type isozyme in erythrocytes of American Negroes. *Biochem Genet* 5:497-504, 1971
9. TASHIAN RE, RIGGES SK, YU Y-SL: Characterization of a mutant human erythrocyte carbonic anhydrase: Carbonic anhydrase 1c Guam. *Arch Biochem Biophys* 117:320-27, 1966
10. SMITHIES O: An improved procedure for starch-gel electrophoresis: Further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem J* 71:585-87, 1959
11. TASHIAN RE: The esterases and carbonic anhydrases of human erythrocytes. In *Biochemical Methods in Red Cell Genetics*, Ed by YUNIS JJ. New York, Academic Press, 1969. Chpt 12
12. NYMAN PO, LINDSKOG S: Amino acid composition of various forms of bovine and human erythrocytes carbonic anhydrase. *Biochem Biophys Acta* 85:141-51, 1964
13. ANDERSON B, NYMAN PO, STRID L: Amino acid sequence of human erythrocytes carbonic anhydrase B. *Biochem Biophys Res Comm* 48:670-77, 1967
14. LIN K-TD, DEUTSCH HF: Human carbonic anhydrase: The complete primary structure of carbonic anhydrase B. *J Biol Chem* 248: 1885-93, 1973
15. FUNAKOSHI S, DEUTSCH HF: Human carbonic anhydrase. 4. Properties of a mutant B type. *J Biol Chem* 245:4913-19, 1970
16. TANIS RJ, FERRELL RE, TASHIAN RE: Substitution of lysine for threonine at position 100 in human carbonic anhydrase 1d Michigan. *Biochem Biophys Res Comm* 51:699-703, 1973
17. CARTER ND, TANIS RJ, TASHIAN RE, FERRELL RE: Characterization of a new variant of human red cell carbonic anhydrase I, CA 1f London (102 Glu Lys). *Biochem Genet* (In press)
18. LIE-INJO LE, POEY-OEY HG: Phosphoglucomutase, carbonic anhydrase and catalase in Indonesians. *Hum Hered* 20:215-19, 1970