

THE FREQUENCY IN JAPANESE OF GENETIC VARIANTS OF 22 PROTEINS

日本人における22種の蛋白質の遺伝的変異体とその頻度

IV. ACID PHOSPHATASE, NADP-ISOCITRATE DEHYDROGENASE,
PEPTIDASE A, PEPTIDASE B, AND PHOSPHOHEXOSE ISOMERASE

ROBERT J. TANIS, Ph.D.

NAOKI UEDA, M.D. 上田尚紀

CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子

ROBERT E. FERRELL, Ph.D.

SHINYA KISHIMOTO, M.D. 岸本真也

JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.

HOWARD B. HAMILTON, M.D.

NAOFUMI OHNO, M.D. 大野尚文



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION
財団法人 放射線影響研究所

A cooperative Japan - United States Research Organization
日米共同研究機関

A paper based on this report was accepted for publication by:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に受理された。

Annals of Human Genetics (London)

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

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

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は決して通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Energy Research and Development Administration.

放射線影響研究所(元 ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足した。その経費は日米両政府の平等分担とし、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー研究開発局との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって充てる。

THE FREQUENCY IN JAPANESE OF GENETIC VARIANTS OF 22 PROTEINS

日本人における22種の蛋白質の遺伝的変異体とその頻度

**IV. ACID PHOSPHATASE, NADP-ISOCITRATE DEHYDROGENASE,
 PEPTIDASE A, PEPTIDASE B, AND PHOSPHOHEXOSE ISOMERASE**

 ROBERT J. TANIS, Ph.D.¹; NAOKI UEDA, M.D. (上田尚紀)²;
 CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子)²; ROBERT E. FERRELL, Ph.D.¹;
 SHINYA KISHIMOTO, M.D. (岸本真也)²; JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.¹;
 HOWARD B. HAMILTON, M.D.²; NAOFUMI OHNO, M.D. (大野尚文)²

*Department of Human Genetics, University of Michigan. 1 **
Department of Clinical Laboratories, Radiation Effects Research Foundation 2
 Michigan 大学人類遺伝学教室¹ *および放射線影響研究所臨床検査部²

SUMMARY

This paper presents the results of an electrophoretic survey of approximately 4000 individuals from Hiroshima and Nagasaki for four erythrocyte enzymes: isocitrate dehydrogenase, peptidase A, peptidase B, and phosphohexose isomerase. Also reported are the results for erythrocyte acid phosphatase for a subset of these individuals. The frequencies for the ACP_1^A and ACP_1^B alleles of the ACP_1 locus are in agreement with previously reported results from Japanese populations. Rare variants of ICD_S , PEPA, PEPB, and PHI occur with frequencies varying from 0.25 to 7.2 per 1000 determinations. The relatively high frequency of the $PHI_{4_{HIR}1}$ variant and some unusual features involving the effect of reducing agent on the electrophoretic pattern behavior of some of the rare PHI variants detected during this study are discussed.

INTRODUCTION

This paper presents the results of surveying for electrophoretic variants the following five erythrocyte enzymes: acid phosphatase (ACP, EC 3.1.3.2), NADP-isocitrate dehydrogenase

要約

本報は、広島および長崎の約4000人を対象者として、4種の赤血球酵素、すなわち isocitrate dehydrogenase, peptidase A, peptidase B, および phosphohexose isomerase に関して行った電気泳動検査の結果を述べたものである。また、これらの対象者のうち一部についての赤血球酸性フォスファターゼ検査の結果をも報告した。 ACP_1 座位の ACP_1^A および ACP_1^B 対立遺伝子の頻度は、以前に日本人集団について報告された結果と一致するものである。 ICD_S , PEPA, PEPBおよびPHIのまれな変異体の認められた頻度は、検査例1000例あたり0.25から7.2までの変化があった。 $PHI_{4_{HIR}1}$ 変異体の頻度は比較的高いことと、本調査で検出されたいくつかのまれなPHI変異体の中には、還元剤によってその電気泳動像の形が変化するという通例とは異なる特徴を持つことが述べられている。

緒言

本報では、次の5種類の赤血球酵素の電気泳動上の変異体に関する調査結果を述べる。すなわち、acid phosphatase (ACP, EC 3.1.3.2), NADP-iso-

* Financial support derived from Contract E (11-1)-1552, Energy Research and Development Administration, Washington, D.C.
 Washington, D.C. のエネルギー研究開発庁との契約E (11-1) -1552号に基づく支援研究費による。

(ICD_S, EC 1.1.1.14), peptidase A (PEPA), peptidase B (PEPB), and phosphohexose isomerase (PHI, EC 5.3.1.9), utilizing blood samples collected from Japanese adults residing in Hiroshima and Nagasaki. Special emphasis is placed on the rare genetic variants we have observed, but data are given on the A-B polymorphism of ACP. For a more complete characterization of the nature of the population sampled and the circumstances under which the collections were made the reader is referred to the first paper in this series.¹ As before, the conversion in designating variants which do not clearly correspond to previously reported types will be by city and order of discovery, abbreviating Hiroshima as HIR and Nagasaki as NGS.

MATERIALS AND METHODS

All systems were studied by vertical starch gel electrophoresis, employing ElectroStarch (Electro-Starch Co., Madison, Wisconsin). PHI types were determined using the electrophoretic and staining methods of Detter et al.² A second slice of the PHI gel was used for the ICD_S studies, the enzyme being stained as described by Shaw & Prasad.³ The classifications of peptidase A and peptidase B were based on the method of Lewis & Harris,⁴ using the substrates L-valyl-L-leucine and L-leucylglycylglycine respectively; this choice of substrates was based upon the high degree of substrate specificity of the peptidase system. The acid phosphatase electrophoretic conditions are those described by Fildes & Harris⁵; the ACP bands were visualized using the phenolphthalein diphosphate method.⁶ The procedures of sample preparation and storage are described in an earlier paper in this series.⁷ During the course of this work a number of isoenzyme patterns, for a variety of reasons, did not yield patterns which could be typed with sufficient confidence. For this reason we have omitted these, designated "no types", from the final totals.

RESULTS

Acid Phosphatase

Population screening for the acid phosphatase polymorphism in Japan has been carried out on a large scale and the work has recently been reviewed.⁸ The results of our screening of 2790 individuals are shown in Table 1. In both cities there is agreement with Hardy-Weinberg proportions. The observed frequencies of the ACP_1^A and ACP_1^B alleles fall well within the

citrate dehydrogenase (ICD_S, EC 1.1.1.14), peptidase A (PEPA), peptidase B (PEPB), および phosphohexose isomerase (PHI, EC 5.3.1.9)で、検体は、広島と長崎に居住する日本人成人から採取したものである。重点は、検出されたまれな(頻度の少ない)遺伝的変異体にあるが、ACPのA-Bの間に見られる多型性に関しても資料を示した。対象集団の性質および資料収集の状況の詳細に関しては本シリーズの第1報¹を参照されたい。前報と同じく、以前に報告されている型とあきらかには合致していない変異体の命名は、都市別および発見順序別に行い、広島には HIR、長崎には NGSの略称を付した。

材料および方法

すべての酵素は、ElectroStarch (Electro-Starch Co., Madison, Wisconsin)を用いた。垂直式澱粉ゲル電気泳動法によって検査した。PHIの型の決定は Detter ら²の電気泳動条件と染色法を用いて行った。1枚のゲルを2枚のスライスに切り一方をPHI用に染色した後、他方のスライスをICD_Sの検査のために Shaw と Prasad の方法³で染色した。Peptidase AとBの分類は Lewis と Harris の方法⁴に基づき、L-valyl-L-leucine および L-leucylglycylglycine をそれぞれの基質として行った。これらの基質は、2種の peptidase の高度な基質特異性に基づいて選ばれたものであった。Acid phosphatase の電気泳動条件は、Fildes と Harris⁵が述べているものである。ACPバンドは phenolphthalein diphosphate 法⁶を用いて検出した。試料の調製と保存の方法については、本シリーズの第2報⁷で述べた。本調査実施中、いろいろな理由で、いくつかのアイソザイムのパターンについては、十分な確信をもって型の決定ができなかった。このため、最終合計からはこれらの“型の決定ができないもの”は削除した。

結果

Acid Phosphatase

日本人における acid phosphatase の多型については、集団調査がすでに大規模に行われており、そのレビューが出されている。⁸ 2790人について我々の行った調査の結果を表1に示す。広島・長崎両市とも、Hardy-Weinberg の法則から得られる理論値と一致していた。観察された ACP_1^A と ACP_1^B の対立

TABLE 1 PHENOTYPE AND GENE FREQUENCIES FOR THE ERYTHROCYTE ACID PHOSPHATASE POLYMORPHISM IN HIROSHIMA AND NAGASAKI

表1 広島および長崎における多型を示す赤血球 acid phosphatase の表現型および遺伝子頻度

City	Phenotype				Gene Frequency		χ^2	P
	A	AB	B	Total	p ^A	p ^B		
Hiroshima	81	701	1513	2295	0.188	0.812	0.0003	.98 < P < .99
Nagasaki	32	173	290	495	0.239	0.761	0.8064	.30 < P < .50
Total	113	874	1803	2790	0.197	0.803		

range reported for other Japanese populations, and our findings are very similar to those previously reported for Hiroshima and Nagasaki Prefectures.^{9,10} There is no significant difference between the frequency of the ACP_1^A allele in Hiroshima and Nagasaki. Although a few isolated cases of acid phosphatase patterns resembling the C-A and C-B types have been reported by Ishimoto,⁸ the apparent absence of the C type in this study is in agreement with the reports of others showing the extreme rarity of this type in Japanese populations.

Isocitrate Dehydrogenase

We have encountered a single variant of isocitrate dehydrogenase, in a Hiroshima resident, in a sample of 3993 individuals typed. An additional 36 individuals could not be typed because of low or absent ICD_S activity in the standard preparation. The one ICD_S variant has been designated 1-2_{HIR 1}; the electrophoretic pattern of this sample is shown in Figure 1A. This pattern appears to be the same as that of the type 1-2 reported by Chen et al¹¹ in one of 184 Japanese-Americans residing in Seattle, Washington. The genetic basis of the variant encountered in this study has been established by the family study shown in Table 2. The type 1-2 ICD_S phenotype has been reported in Japan by Ishimoto & Kuwata,¹⁰ who observed two examples in 606 blood donors from Nagasaki Prefecture. Shinoda et al¹² have reported an unspecified electrophoretic variant of ICD_S in a study of tissue enzymes from 98 individuals, and from the information given by Ishimoto⁸ it is assumed that this variant also exhibits the 1-2 pattern. Thus far the type 2 ICD_S variant has not been encountered in non-Mongoloid populations.

Peptidase A

A total of six electrophoretically identical

遺伝子の頻度は、ほかの日本人集団について報告された値の範囲内に十分入るものであり、また以前広島県⁹および長崎県¹⁰の調査で報告された値とほとんど同じであった。広島と長崎の間には ACP_1^A 対立遺伝子の頻度について有意な差は認められない。C-A および C-B 型に似た acid phosphatase 像を示す例が二・三報告⁸されてはいるが、本調査では C 型が存在しなかった。これは、日本人集団には C 型が極めてまれであるという他の調査の報告所見と一致している。

Isocitrate Dehydrogenase

本調査では、型の決定を行った 3993 人の対象者中、広島の 1 例に、isocitrate dehydrogenase の変異体が認められた。そのほか 36 人は、通常の試料調製法では ICD_S の活性が低いかまたは欠除していたため型の決定ができなかった。この ICD_S 変異体は 1-2_{HIR 1} と命名され、その電気泳動像を図 1A に示す。このパターンは Chen ら¹¹が Washington 州 Seattle 市に居住する日系米人 184 人中の 1 人に認めた 1-2 型のものと同じようである。本調査で認められたこの変異体が遺伝的なものであることが、表 2 に示された家族調査によって確認されている。日本では Ishimoto および Kuwata¹⁰が長崎県の献血者 606 人中 2 例に 1-2 ICD_S 表現型を認め報告している。Shinoda ら¹²は、98 人を対象者とする組織中の酵素に関する調査で、型の確認はしていないが電気泳動上の ICD_S 変異体を認めたことを報告しており、Ishimoto⁸によると、この変異体も 1-2 型を示すものと推測される。これまでのところ ICD_S 2 型の変異体は黄色人種以外の集団には認められていない。

Peptidase A

4009 人からなる本調査集団中に、電気泳動像が同一

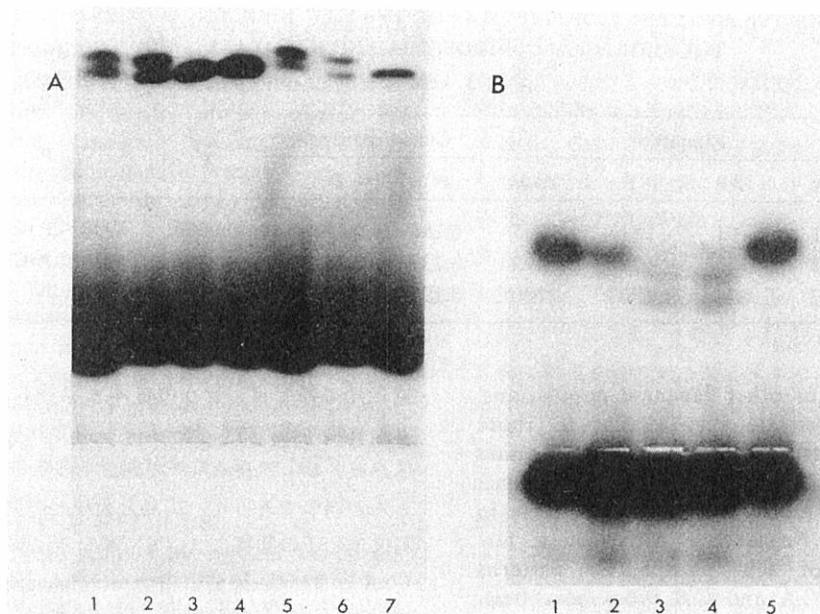


Figure 1. A. Starch gel electrophoresis patterns of $ICD_S 1-2_{HIR_1}$: wells 1, 2, 5, & 6 contain the $ICD_S 1-2_{HIR_1}$ variant; wells 3, 4, & 7 contain normal controls. B. Starch gel electrophoresis patterns of the peptidase A type $1-4_{HIR_1}$ variant: wells 1 & 5 represent the normal peptidase A pattern; well 2, a daughter of the propositus showing a normal pattern; well 3, a daughter of the propositus showing the variant pattern; well 4, propositus (MF [redacted]).

図1. A. $ICD_S 1-2_{HIR_1}$ の澱粉ゲル電気泳動像: 試料溝1, 2, 5および6, $ICD_S 1-2_{HIR_1}$ 変異体; 試料溝3, 4, および7, 正常な対照例. B. Peptidase A $1-4_{HIR_1}$ 型変異体の澱粉ゲル電気泳動像: 試料溝1および5は正常な peptidase A像を示す; 試料溝2 (発端者の娘)は正常像を示す; 試料溝3 (発端者の娘)は変異体像を示す. 試料溝4は発端者 (MF [redacted]).

variants of PEPA, designated $1-4_{HIR_1}$, were seen in our sample of 4009 individuals; three among 2638 specimens from Hiroshima and three among 1371 from Nagasaki. No genetic relationship between the six persons could be established. An additional 20 individuals gave an electrophoretic pattern for PEPA which was too weak to type accurately. In addition to those patterns too weak to be typed, a number of specimens exhibited normal electrophoretic patterns but with a substantially reduced staining intensity. It is possible that this was due to the presence of the quantitative variant of PEPA described by Lewis¹³, but the studies necessary to establish this point were not carried out. Omoto & Harada¹⁴ have also reported the presence of quantitative variation in PEPA, in a sample of 125 Ainu.

The electrophoretic pattern of the PEPA variant resembles that of a phenotype designated as 1-4 by Lewis & Harris.⁴ The pattern is shown in Figure 1B, wells 3 & 4; the observed pattern is

で $1-4_{HIR_1}$ と命名された PEPA の変異体が合計6例認められた. 3例は広島県の2638検体中に, 残り3例は長崎の1371検体中にあった. 変異体の検出された6人の間に遺伝的関係を認めることはできなかった. その他の20人では, 活性が弱すぎて電気泳動上の型を正確に決定できなかった. このほかにいくつかの検体では正常な電気泳動像を示したものの活性はかなり減退していた. これは, Lewis¹³ が記述した PEPA の量的変異体の存在に基づく可能性があるが, この点を確認するために必要な調査は行われなかった. Omoto と Harada¹⁴ も, 125人のアイヌ集団中に PEPA の量的変異体を認めたことを報告している.

PEPA 変異体の電気泳動像は, Lewis および Harris⁴ が1-4と命名した表現型の像と似ている. この像は, 図1B, 試料溝3および4にみられる. 観察された

consistent with the dimeric properties of this enzyme. Limited family studies were possible for four of the six cases, and the variant phenotype was observed in additional family members in three of these cases. The family studies are summarized in Table 2, and the starch gel results of one family study are presented in Figure 1B.

The peptidase A type 1-4 appears to be quite rare in all populations tested to date. This or a very similar phenotype was first reported in a sample of 2283 Europeans by Lewis & Harris,⁴ Ishimoto & Kuwata¹⁵ have reported one example of the 1-4 phenotype in 1070 Japanese blood donors from Mie Prefecture.

Peptidase B

We have examined 4028 individuals for red cell PEPB variation (2652 from Hiroshima and 1376 from Nagasaki). In addition, one Hiroshima specimen could not be typed. Two examples (1 from Hiroshima and 1 from Nagasaki) were observed of a variant designated PEPB 1-2_{NGS 1}, and six individuals, three from each city, were encountered with a pattern designated PEPB 1-3_{HIR 1}. The electrophoretic patterns for the normal and variant PEPB phenotypes are shown in Figure 2. The electrophoretic patterns of the two individuals with the 2_{NGS 1} variant closely resemble the 1-2 phenotype reported by Lewis & Harris,⁴ while our 1-3_{HIR 1} phenotype appears comparable to the 1-3 phenotype demonstrated by the same authors, who encountered these phenotypes in a sample of 2197 Europeans. Ishimoto & Kuwata¹⁵ have reported two examples of the PEPB 1-2 phenotype in a sample of 1070 blood donors from Mie Prefecture in central Japan. To our knowledge the PEPB 1-3 phenotype, or anything closely resembling it, has not been previously reported in Japan. We have conducted limited family studies for these two variants and the genetic nature of the 2_{NGS 1} variant has been verified in both cases. In two of three cases of the type 1-3_{HIR 1} the variant was detected in another family member. In the third case, only a single child was available for study; he exhibited a normal pattern. These results are summarized in Table 2, and the starch gel patterns of a family study for each electrophoretic type are included in Figure 2.

Phosphohexose Isomerase

During the course of typing 4027 individuals for red cell PHI, we have encountered 35

例は、この酵素が二量体であるという特性と一致している。6例のうち4例については、ある程度の家族調査を行うことができて、4例中3例では、他の家族員に変異型が認められた。家族調査の結果は表2に要約されており、図1Bは1例の家族調査で得られた澱粉ゲル電気泳動の結果を示している。

Peptidase Aの1-4型は、今日まで調査されたすべての集団中で非常にまれのようなものである。1-4表現型あるいはこれと非常によく似た表現型は、Lewis および Harris⁴ が2283人の西欧人中に初めて報告したものである。石本および鍛田¹⁵ は、三重県の献血者1070人に1-4表現型を1例報告している。

Peptidase B

今回は、赤血球のPEPB変異体について、4028人の対象者を調べた(広島2652人、長崎1376人)。このほかに広島1例、長崎1例の合計2例には、PEPB 1-2_{NGS 1}と命名した変異体が認められ、両市それぞれ3例ずつ、計6例にはPEPB 1-3_{HIR 1}と命名した変異型が認められた。図2は、正常型および変異型のPEPBの電気泳動像を示したものである。2_{NGS 1}変異体を有する2例の電気泳動像は、Lewis および Harris⁴ が報告した1-2の表現型に非常に似ており、さらに1-3_{HIR 1}表現型は、同著者らが2197人の西欧人集団中に認めた1-3表現型に匹敵するように思われる。石本および鍛田¹⁵ は、三重県下の献血者1070人中にPEPB 1-2表現型を2例報告している。我々の知るところでは、PEPB 1-3表現型、あるいはそれによく似たものは、これまで日本では報告されていない。今回の調査では、これら2種類の変異体について限られた範囲の家族調査を行っており、2例の2_{NGS 1}変異体はいずれも、遺伝性のあることが確認されている。1-3_{HIR 1}型の3例中2例では他の家族員にも変異体が検出された。第3の例では、子供1人の調査だけしかできなかったがそのパターンは正常であった。これらの結果を表2に要約し、各変異型についての家族調査で得られた澱粉ゲル電気泳動像を図2に示す。

Phosphohexose Isomerase

対象者4027人について赤血球PHIの型の決定をする過程で、5種類の異なった電気泳動型を有する変異

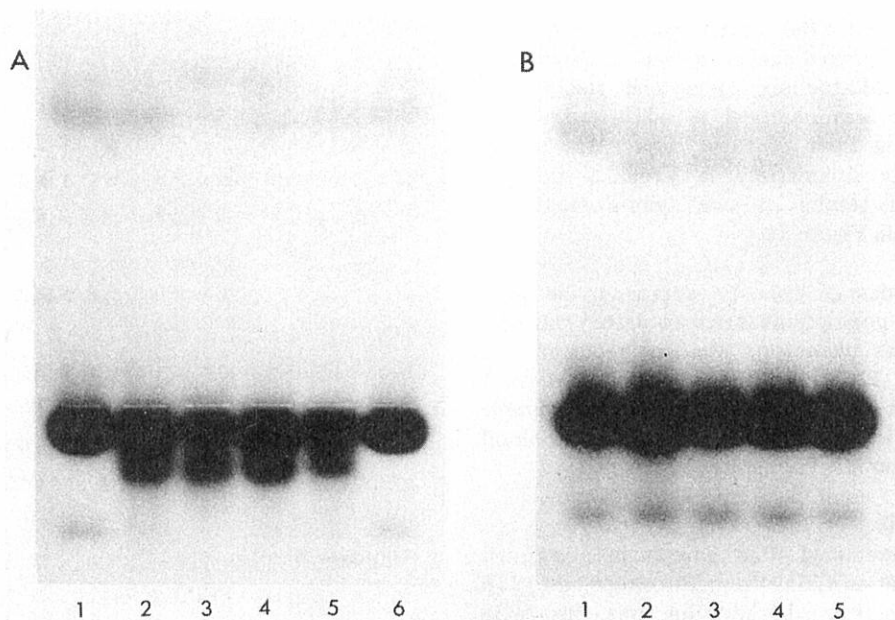


Figure 2. Starch gel electrophoresis patterns obtained during family studies of the peptidase B variants. A. Peptidase B type 1-3_{HIR 1}: wells 1 & 6, normal controls; wells 2 & 5, two sons showing the normal PEPB pattern; well 3, propositus (MF [redacted]) showing the variant pattern; well 4, daughter of the propositus. B. Peptidase B type 1-2_{NGS 1}: wells 1 & 5, normal controls; well 2, propositus (MF [redacted]); wells 3 & 4, two sons of propositus showing the variant pattern.

図2. Peptidase B 変異体の家族調査で得られた澱粉ゲル電気泳動像。A. Peptidase B 1-3_{HIR 1}型: 試料溝1および6, 正常な対照例; 試料溝2および5, 正常なPEPB像を示す2人の息子; 試料溝3は変異像を示す発端者(MF [redacted]); 試料溝4は発端者の娘。B. Peptidase B 1-2_{NGS 1}型: 試料溝1および5, 正常な対照例; 試料溝2は発端者(MF [redacted]); 試料溝3および4は, 発端者の2人の息子で変異体像を示す。

variants, comprising five distinct electrophoretic types. The patterns of two additional persons could not be typed. The most commonly encountered variant, designated PHI 1-4_{HIR 1}, is electrophoretically similar to the type 1-4 first reported by Detter et al² in two of 441 samples from Thailand. We have seen 26 examples of the 1-4_{HIR 1} phenotype in our survey, 11 from Hiroshima and 15 from Nagasaki. The genetic transmission of the 4_{HIR 1} variant was confirmed in 12 of 19 limited family studies; these 19 family studies are summarized in Table 2. An electrophoretic comparison of this and the other PHI variants encountered in this study is shown in Figure 3, and summarized in Table 3. We have also detected, in a single individual from Hiroshima, a phenotypic pattern which we have designated 1-3_{HIR 1}. The mobility and intensity pattern of this variant are indistinguishable from a standard

体合計35例を認めた。型の決定のできないものが他に2例あった。最も多く認められたものはPHI 1-4_{HIR 1}と命名した変異体であったが、これは Detter ら²がタイ国における441人の集団中2人に発見し、初めて報告した1-4型と電気泳動像が近似している。今回の調査では、1-4_{HIR 1}の表現型を26例(広島11例, 長崎15例)認めている。限られた範囲の家族調査が行われた19件のうち12件で4_{HIR 1}変異体の遺伝性が確認された。これら19件の家族調査については表2に要約した。この変異体と本調査で認めたその他のPHI変異体の電気泳動像を比較して図3に示し、検出頻度を表3に要約した。広島1例に、1-3_{HIR 1}と命名した表現型も検出している。この変異体の移動度および濃度のパターンは、Dr. Eloise Giblett から提供された標準PHI 1-3型と

PHI type 1-3 provided by Dr. Eloise Giblett. A limited family study confirmed the genetic nature of this variant (Table 2).

見分けがつかない。限られた範囲の家族調査が行われ、この変異体の遺伝性が確認された(表2)。

TABLE 2 SUMMARY OF THE FAMILY STUDIES FOR THE RARE ELECTROPHORETIC VARIANTS OF ICD_S, PEPA, PEPB, AND PHI

表2 まれな電気泳動変異体 ICD_S, PEPA, PEPB および PHI についての家族調査の要約

System	Variant	City	Propositus MF No.	Sex	Family Studies			
					Mother	Father	Sibs	Children
Isocitrate Dehydrogenase	2 _{HIR} 1	H	[REDACTED]	M	-	-	-	* ●
Peptidase A	4 _{HIR} 1	H	[REDACTED]	F	-	-	-	* ●●
		N	[REDACTED]	F	-	-	-	* ○○●□
		N	[REDACTED]	F	-	□	* ●	○○●□
Peptidase B	2 _{NGS} 1	H	[REDACTED]	F	-	-	-	* ○
		N	[REDACTED]	M	-	-	-	* ●●
	3 _{HIR} 1	H	[REDACTED]	M	-	-	-	* □□
		N	[REDACTED]	F	-	-	-	* □
Phosphohexose Isomerase	2 _{NGS} 1	N	[REDACTED]	M	●	□	□	* ○
		H	[REDACTED]	M	●	-	-	* ●□
	4 _{HIR} 1	N	[REDACTED]	M	-	-	-	* ●
		N	[REDACTED]	F	-	-	○	* ●□
		H	[REDACTED]	F	-	-	□	* ○
		H	[REDACTED]	M	-	-	-	□
		H	[REDACTED]	F	-	-	-	* ●●
		H	[REDACTED]	M	-	-	-	* □□
		N	[REDACTED]	F	-	-	* ●□	-
		H	[REDACTED]	F	-	-	-	* □
		N	[REDACTED]	F	-	-	* ●	□
		H	[REDACTED]	F	-	-	-	* ○
		H	[REDACTED]	F	-	-	-	* ○
		N	[REDACTED]	M	-	-	-	* □□●○
		N	[REDACTED]	F	-	-	-	* ●○
		N	[REDACTED]	F	-	-	-	* ●○
		N	[REDACTED]	F	-	-	* □	□□○○○
		N	[REDACTED]	M	-	-	* ○○	□□○
		N	[REDACTED]	F	-	-	-	* □□○
		N	[REDACTED]	M	-	-	-	* ○□
5 _{HIR} 1	H	[REDACTED]	F	†	-	-	* ●	-
		[REDACTED]	M	-	-	-	* ●	
		[REDACTED]	F	-	-	-	* □	
		H	[REDACTED]	F	-	-	-	* ○○

* First family member tested. 家族調査で調べた最初の1親等親族を示す。○- No variant, ●- Variant.
 † [REDACTED] is the elder sister of [REDACTED] は [REDACTED] の姉である。
 †† [REDACTED] is the younger sister of [REDACTED] は [REDACTED] の妹である。

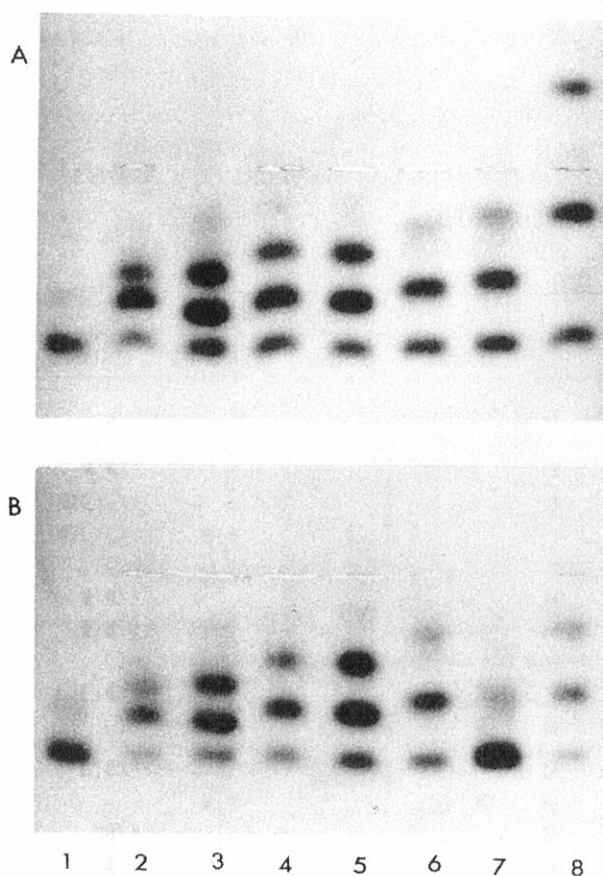


Figure 3. Starch gel electrophoresis of the phosphohexose isomerase variants showing the effect of 2-mercaptoethanol. A. Without the addition of 2-mercaptoethanol to the samples. B. After the addition of 2-mercaptoethanol: well 1, normal PHI type 1 control; well 2, 1-2-like variant obtained from the Department of Human Genetics, University of Michigan; well 3, type 1-2_{NGS 1}; well 4, type 1-3 standard (see text); well 5, type 1-3_{HIR 1}; well 6, type 1-4_{HIR 1}; well 7, type 1-5_{NGS 1}; well 8, type 1-5_{HIR 1}.

図3. Phosphohexose isomerase 変異体の澱粉ゲル電気泳動像に対する、2-メルカプトエタノールの影響。A. 検体に2-メルカプトエタノールを加えない場合。B. 2-メルカプトエタノールを加えた場合：試料溝1, 正常なPHI 1型対照例；試料溝2, Michigan 大学人類遺伝学教室から入手した1-2様変異体；試料溝3, 1-2_{NGS 1}型；試料溝4, 1-3標準型(本文を比較参照)；試料溝5, 1-3_{HIR 1}型；試料溝6, 1-4_{HIR 1}型；試料溝7, 1-5_{NGS 1}型；試料溝8, 1-5_{HIR 1}型。

Furthermore, we have seen three examples, all from Nagasaki, of a variant, designated 1-2_{NGS 1}, which has an electrophoretic pattern similar to the type 1-2 first reported by Detter et al² in a single sample of the 441 Thai bloods which they examined. This pattern is shown in Figure 3 and the result of the single family study that was possible is included in Table 2. In addition, we have encountered three examples (2 in Hiroshima and 1 in Nagasaki) of a variant which, when the hemolysate is very fresh, has an electrophoretic pattern resembling the type 1-5 phenotype shown by Detter et al.² However, our variant has properties which may distinguish it from the previously reported PHI 1-5 type, and we shall term this variant 1-5_{HIR 1}. The genetic nature of the variant has been confirmed in a family study (Table 2). In their original report of the PHI phenotypes, Detter et al² noted that the 1-5 pattern seen in a fresh hemolysate was difficult to distinguish from that usually seen in the most frequent PHI 1 phenotype; the typical PHI 1-5 pattern appeared after 1 to 2 weeks of

以上のほかに、本調査では、Detter ら² が441人のタイ国人に関する調査で、1検体に初めて認めて報告した1-2型とよく似た電気泳動像を示す1-2_{NGS 1}変異体3例をいずれも長崎の検体中に認めた。このパターンは図3に示され、実施できた1件の家族調査の結果は表2に示されている。さらに、溶血液が非常に新鮮である場合には、電気泳動像がDetter ら² が示した1-5表現型と酷似する変異体を3例(広島2例、長崎1例)認めている。しかし、本調査で認めた変異体には、以前に報告されたPHI 1-5型と区別できる特性があり、この変異体を1-5_{HIR 1}と命名する。この変異体が遺伝性のものであることは家族調査で確認されている(表2)。Detter ら² は、PHI 表現型に関する最初の報告において、1-5型と命名した変異体は新鮮な溶血液中では、通常最も多く認められるPHI 1表現型との識別が困難であるとしている。典型的なPHI 1-5パターンは1-2週間保存の後に認められたと述べているが温度の規定は

TABLE 3 SUMMARY OF PHOSPHOHEXOSE ISOMERASE VARIANTS
IN HIROSHIMA AND NAGASAKI

表3 広島および長崎における phosphohexose isomerase 変異体の要約

Type	Hiroshima	Nagasaki	Combined
1	2637	1355	3992
1-2 _{NGS 1}	0	3	3
1-3 _{HIR 1}	1	0	1
1-4 _{HIR 1}	11	15	26
1-5 _{NGS 1}	0	2	2
1-5 _{HIR 1}	2	1	3
No types*	2	0	2
Total	2653	1376	4029

*These samples gave patterns which stained too weakly to be typed accurately.

これらの検体を示したパターンは、染色が弱すぎて正確な型の決定ができなかった。

storage at an unspecified temperature. They were able to reverse this storage-dependent change in electrophoretic pattern by the addition of 2-mercaptoethanol to the sample. Hopkinson¹⁶ has also reported detailed experiments which show that the PHI 1-5 pattern can be generated by the reaction of oxidized glutathione with a free sulphhydryl group in the variant through the formation of a disulfide bond.

Our three samples, exhibiting the PHI 1-5-like phenotypic pattern when a fresh hemolysate is used, also demonstrate an aging affect; after storage the pattern closely resembles the PHI 1-6 pattern reported by Detter et al.² Storage of the sample for 1 to 2 weeks at 4C is sufficient to produce the effect. This storage-generated 1-6 pattern can be restored to the original 1-5-like pattern by treatment of the sample with 0.02M 2-mercaptoethanol, as shown in Figure 3. Following the argument of Hopkinson¹⁶ this suggests that, in this variant, a positively charged amino acid has been replaced by a cysteine, and that the 1-6 pattern arises from the reaction of that cysteine with oxidized glutathione in a manner analogous to the PHI 1-5 reported by Detter et al. The effect of this would be to give the variant molecule a negative charge increase relative to the normal molecule. This proposal is completely consistent with the starch gel patterns shown in Figure 3. Ishimoto & Kuwata¹⁷ have recently reported a single example of a PHI variant which shows the same pattern and behavior towards thiol reagents as 1-5_{HIR 1}, and we presume it to be the same variant. Regrettably

ない。彼らは、検体に 2-メルカプトエタノールを添加することにより保存によって変化した電気泳動像を新鮮な時の型にもどすことができた。Hopkinson¹⁶も、変異体中の遊離 sulphhydryl 基が酸化グルタチオンと反応して disulfide 基が生成することにより、PHI 1-5 型(貯蔵型)が生じることを詳細に実験して報告している。

本調査の3検体は新鮮な溶血液を用いた場合にも貯蔵型の PHI 1-5 様表現型の像を示すが、その型は、さらに貯蔵によって変化した。すなわち Detter² が報告した PHI 1-6 パターンに非常によく似た型を示すようになった。この貯蔵による影響は検体を 4℃で 1-2 週間保存するだけで現われる。この貯蔵によって生じた 1-6 パターンは、検体を 0.02 M 2-メルカプトエタノールで処理すると、図 3 に示しているように最初の 1-5 様パターンにもどすことができる。先に述べた Hopkinson¹⁶ が実験によって得た結果を、この変異体に適用すると、このことは、この変異体では陽性に荷電したアミノ酸がシステインと置換されており、そのシステインが Detter らが報告した PHI 1-5 で生じた反応と同じように、酸化グルタチオンと反応して、1-6 パターンが生じることを示唆している。このようなアミノ酸置換があると変異型の分子は正常型の分子より陰性荷電が増大することになる。このような考え方は、図 3 にみられる澱粉ゲル像と完全に一致している。最近、Ishimoto および Kuwata¹⁷ は、チオール試薬に対して 1-5_{HIR 1} と同じように反応し、同じような型の変化を示す PHI 変異体を 1 例報告しており、我々は、それを 1-5_{HIR 1} と同じ変異体であると考える。還元剤(2-

it is not known what the effect of reducing agents might be on the original sample Detter et al designated as a type 1-6.

Finally, two individuals, both from Nagasaki, showed a PHI gel pattern essential identical to the 1-4_{HIR 1} discussed above. However, further experimentation revealed this pattern occurred only in the absence of 2-mercaptoethanol; when 2-mercaptoethanol was added to the hemolysate there was a considerable difference in the subsequent electrophoretic behavior of the two Nagasaki samples relative to the other 1-4_{HIR 1} samples. These differences are clearly illustrated in Figure 3 where it is shown that the pattern in these two samples reverts to a normal type 1 pattern in the presence of thiol while the 1-4_{HIR 1} pattern remains unaltered. Based on the electrophoretic shift in the presence of the reducing agent we have designated this variant type as 1-5_{NGS 1}. During such comparisons only fresh samples were employed in making this distinction between the 1-4_{HIR 1} and 1-5_{NGS 1} patterns since we have observed that hemolysates which initially showed the shifting of the patterns failed to respond to reducing agent following long-term storage.

The occurrence of PHI variants has been reported in a number of studies of Japanese populations, but their distribution seems variable.⁸ Ishimoto et al⁹ have reported results from the screening of 526 hospital outpatients in Hiroshima. They observed six examples of a phenotype resembling the PHI 1-4 and two cases resembling the PHI 1-6. It would be of interest to determine the effect of reducing reagents on this reported 1-6 pattern; no pattern resembling the PHI 1-3 phenotype was encountered. Ishimoto & Kuwata^{10,18} have also reported the presence of the PHI 1-4 and the absence of the PHI 1-3 in Nagasaki and Kagoshima Prefectures.

The limited data available suggest some local differences in the frequency of occurrence of rare PHI phenotypes in Japan. A phenotype similar to the PHI 1-4 is seen in Kyushu and southern Honshu, but not the PHI 1-3 type.^{9,10,18} The PHI 1-3 and 1-4 phenotypes appear together in populations from central Honshu,^{12,17,19} and the PHI 1-3, but not the 1-4, phenotype is seen in northern Honshu.²⁰

The PHI 1-2 phenotype seems to be very rare in

メルカプトエタノール)が, Detter らが最初に1-6型と命名した検体に対していかなる影響を及ぼすかは残念ながら不明である.

最後に, いずれも長崎で得られた2例で, 前述の1-4_{HIR 1}と全く同様な泳動像を澱粉ゲル上に示すものがあった. しかし, さらに実験を重ねたところこのパターンは, 2-メルカプトエタノールがない場合にのみ生じることが認められた. すなわち, 2-メルカプトエタノールを溶血液に加えて泳動を行うと, これら2例の長崎からの検体はその他の1-4_{HIR 1}の検体に比べて非常に異なった動きを示した. この違いについては図3を見れば明らかである. すなわち, この2例の長崎の検体では, チオール試薬があると正常の1型像に戻るが, その他の1-4_{HIR 1}の像は変化しない. 還元剤がある場合に, このように電気泳動像が変化することを考えて, この変異型を1-5_{NGS 1}と命名した. 最初は, 還元剤によって電気泳動像が変化した1-5_{NGS 1}の溶血液が長期の貯蔵後には還元剤に対して反応しなくなったことを観察しているので, 1-4_{HIR 1}と1-5_{NGS 1}を区別するためには新鮮な試料のみを用いた.

PHIの変異体は, 今までに行われた多くの日本人集団に関する調査⁸で報告されているが, その分布は一樣ではない. Ishimoto ら⁹は, 広島における病院外来患者526例の調査結果を報告している. 彼らは, PHI 1-4に類似する表現型6例とPHI 1-6に類似する2例を観察した. 報告されたこの1-6パターンに及ぼす還元剤の影響を調べることは興味のあることである. PHI 1-3表現型に類似するパターンは認められなかった. Ishimoto および Kuwata^{10, 18}は, 長崎県および鹿児島県には, PHI 1-4は認められたがPHI 1-3は認められなかったことを報告している.

入手した限られた資料から, 日本におけるまれなPHI表現型の発生頻度には, いくらかの地域差のあることが示唆される. 九州および本州南部ではPHI 1-4に類似する表現型は認められたが, PHI 1-3型^{9, 10, 18}に類するものは認められていない. 本州中央部の集団では, PHI 1-3と1-4表現型が共にみられるが,^{12, 17, 19} 本州北部ではPHI 1-3のみで, 1-4はみられない.²⁰

PHI 1-2表現型は日本人集団ではごくまれなようで

Japanese populations, having been seen in only two other studies.^{10,17} Shinoda & Matsunaga²¹ have also reported an unusual phenotype which they designated 6-1J, but its behavior upon treatment with 2-mercaptoethanol seems to distinguish it from the 1-5_{HIR 1} type described here. Other reports of the 1-5-like phenotype in Japan are available, but with the exception of the case reported by Ishimoto & Kuwata,¹⁷ the effect of treatment with 2-mercaptoethanol on pattern alteration has not been described.

DISCUSSION

We have presented data on the occurrence of 49 examples of rare electrophoretic variants of four erythrocyte enzymes in a survey of 4029 individuals from Hiroshima and Nagasaki, Japan. Perhaps the most interesting aspect of this report is the occurrence of 35 variants of 5 distinct types in the PHI system. One of these types, an unusual PHI 1-5-like variant, presumably was previously seen in a single individual by Ishimoto & Kuwata.¹⁷ It has properties which seem to distinguish it from the PHI 1-6 originally encountered in a single Negro individual by Detter et al.² In fresh samples this variant, designated 5_{HIR 1}, has an electrophoretic pattern similar to the previously reported PHI 1-5, and the 1-6-like pattern appears only after storage. A recent review has summarized the rather widespread occurrence of PHI 1-5-like phenotypes in Japanese populations; in some of these populations the PHI 1-6 phenotype was also observed.⁸ In order to gain a clear understanding of the distribution of the unusual 1-5 type variants, it is of great importance to determine the response to storage in the presence and absence of reducing agent prior to electrophoresis.

The distribution of PHI variants in Asia and Oceania has been discussed by Omoto & Blake²² and in Micronesia by Blake et al.²³ and Neel et al.²⁴ The reported results suggest that the PHI 1-4 phenotype may be widespread among Mongoloid populations, but is absent in neighboring Asian and in Micronesian populations. Our findings of 26 cases of a PHI 1-4-like phenotype in 4029 individuals substantiates the widespread occurrence of this phenotype in the Japanese. This work and the reports of others suggests an uneven distribution of the PHI 1-4 and 1-3 types within the Japanese Islands.

あり、ほかの二つの調査^{10,17}で認められているだけである。Shinoda と Matsunaga²¹は、6-1Jと名付けた変わり型の表現型を報告しているが、2-メルカプトエタノールに対する反応性によって本報で述べた 1-5_{HIR 1}型と区別できるようである。ほかにも日本において 1-5型に似た表現型に関する報告はあるが、Ishimoto および Kuwata¹⁷が報告した例を除けば、2-メルカプトエタノール処理がパターンに及ぼす影響については述べられていない。

考 察

本報では広島および長崎の対象者 4029人についての調査で、4種類の赤血球酵素の電気泳動上のまれな変異体を合計 49例認めたデータを発表した。本報告中で最も興味深い点は、おそらく、PHI に明らかに異なった 5種類の変異体を 35例認めたことであろう。これらの変異型の 1種は、通例の 1-5型とは異なる 1-5型で、これと同じ型の変異体を Ishimoto および Kuwata¹⁷が以前に 1例認めたようである。その性質は、Detter ら²が 1人の黒人対象者に認めた PHI 1-6と異なるようである。5_{HIR 1}と命名されたこの変異体は、検体が新鮮な場合は以前に報告された PHI 1-5と同様な電気泳動像を示し 1-6様のパターンは貯蔵後にはじめて認められる。最近のレビュー⁸によると、PHI 1-5様の表現型は日本人集団中にかなり広く認められるようである。これらの集団の一部には、PHI 1-6表現型も認められた。この通例とは異なる 1-5型の変異体の分布を明確に理解するためには、検体を保存したことによる電気泳動上の変化を、還元剤のある場合とない場合について調べることがきわめて肝要である。

PHI 変異体の分布については、アジアおよび太平洋州では、Omoto と Blake²²が、またミクロネシアでは Blake ら²³および Neel ら²⁴が、それぞれ検討している。報告された結果によれば、PHI 1-4表現型は蒙古系集団では広く認められるが、これらの集団に近接した他のアジア人およびミクロネシア人にはみられないということが示唆される。4029人の対象者に PHI 1-4に類似した表現型 26例を認めた本調査の所見は、日本人にこの表現型が広範囲に認められることを実証している。この調査と他の研究報告から、日本列島内における PHI 1-4と 1-3型の分布に差があることが示唆される。

Although variants of ICD_S, PEPA, and PEPB were also encountered in this study, they were significantly less frequent than PHI variants. Among these variants, those of PEPB were more frequent. However, there are only a few preliminary reports of variation in the peptidase system in the Japanese. This study and the work of others suggests that none of the loci determining red cell peptidase in the Japanese are polymorphic. Thus, this PEPB variant may be widespread, though at a low frequency, throughout Japan.

本調査では、ICD_S、PEPA および PEPB の変異体も認められているが、それらの頻度は PHI 変異体の頻度よりも有意に少なかった。これらの変異体のうちでは、PEPB のものが最も多かった。しかし、日本人における Peptidase の変異体については、二、三の予備的報告があるにすぎない。本調査もほかの調査も、日本人の赤血球 peptidase を決定する座位は、多型ではないことを示唆する。したがって、この PEPB 変異体は頻度は低いけれども日本全国に広範囲に認められる可能性がある。

REFERENCES

参考文献

1. FERRELL RE, UEDA N, SATOH C, TANIS RJ, NEEL JV, HAMILTON HB, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. I. Albumin, ceruloplasmin, haptoglobin, and transferrin. *Ann Hum Genet* 40:407, 1977 (RERF TR 3-76)
2. DETTER JC, WAYS PO, GIBLETT ER, BAUGHAN MA, HOPKINSON DA, POVEY S, HARRIS H: Inherited variations of human phosphohexose isomerase. *Ann Hum Genet* 31:329, 1968
3. SHAW CR, PRASAD R: Starch gel electrophoresis of enzymes - A compilation of recipes. *Biochem Genet* 4:297, 1970
4. LEWIS WHP, HARRIS H: Human red cell peptidase. *Nature* 215:351, 1967
5. FILDES RA, HARRIS H: Genetically determined variation of adenylate kinase in man. *Nature* 209:261, 1966
6. HOPKINSON DA, SPENCER N, HARRIS H: Genetical studies on human red cell acid phosphatase. *Am J Hum Genet* 16:141, 1964
7. UEDA N, SATOH C, TANIS RJ, FERRELL RE, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. II. Carbonic anhydrase I, Carbonic anhydrase II, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, nucleoside phosphorylase, triose phosphate isomerase, hemoglobin A, and hemoglobin A₂. *Ann Hum Genet* 41:43, 1977 (RERF TR 4-76)
8. ISHIMOTO G: Red cell enzymes. Chap. 3 in *Human Adaptability*, Vol. 2: Anthropological and Genetic Studies on the Japanese, Ed by S. Watanabe, S. Kondo & E. Matsunaga, Tokyo, University of Tokyo Press, 1975. p 109
9. ISHIMOTO G, KUWATA M, KUBOTA S: Red cell enzyme polymorphisms in Japanese populations: A study on distribution of the phenotypes and forensic use in paternity cases. *Jpn J Legal Med* 27:134, 1973
10. ISHIMOTO G, KUWATA M: Studies on the polymorphic types of ten blood proteins in Kyushu district, southern part of Japan. *Jpn J Legal Med* 27:346, 1973
11. CHEN S, FOSSUM BLG, GIBLETT ER: Genetic variation of the soluble form of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in man. *Am J Hum Genet* 24:325, 1972
12. SHINODA T, MATSUNAGA E, KOSHINAGA J: Isozyme variation in man. *Jpn J Hum Genet* 19:57, 1974

13. LEWIS WHP: Common polymorphism of peptidase A. Electrophoretic variants associated with quantitative variation of red cell levels. *Ann Hum Genet* 36:267, 1973
14. OMOTO K, HARADA S: The distribution of polymorphic traits in the Hidaka Ainu. 2. Red cell enzymes and serum protein groups. *J Fac Sci Univ Tokyo, Sect. VI*, 4(2):171, 1972
15. ISHIMOTO G, KUWATA M: Inherited variation of some red cell enzymes in Japan (2nd report). *Jpn J Legal Med* 27:488, 1973
16. HOPKINSON DA: The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch-gel electrophoresis: Studies on the human phosphohexose isomerase variant PHI 5-1. *Ann Hum Genet* 34:79, 1970
17. ISHIMOTO G, KUWATA M: Electrophoretic variants of red cell phosphohexose isomerase in Japan. *Jpn J Hum Genet* 18:356, 1974
18. ISHIMOTO G, KUWATA M: A survey of inherited blood protein variations in Amami Oshima Island, southernmost part of Japan. *J Anthropol Soc Nippon* 81:153, 1973
19. SHINODA T: Inherited variations in red cell phosphoglucose isomerase among Japanese. *Jpn J Hum Genet* 15:159, 1970
20. HARADA S, AKAISHI S, KUDO T, OMOTO K: Distribution of phenotypes and gene frequencies of six red cell enzymes in the district of Tohoku, northern part of Japan. *J Anthropol Soc Nippon* 79:356, 1971
21. SHINODA T, MATSUNAGA E: Frequencies of polymorphic types of several red cell enzymes in a Japanese population. *Jpn J Hum Genet* 15:133, 1970
22. OMOTO K, BLAKE NM: Distribution of genetic variants of erythrocyte phosphoglycerate kinase (PGK) and phosphohexose isomerase (PHI) among some population groups in southeast Asia and Oceania. *Ann Hum Genet* 36:61, 1972
23. BLAKE NM, OMOTO K, KIRK RL, GAJDUSEK DC: Variation in red cell enzyme groups among populations of the western Caroline Islands, Micronesia. *Am J Hum Genet* 25:413, 1973
24. NEEL JV, FERRELL RE, CONARD R: The frequency of "rare" protein variants in Marshall Islanders and other Micronesians. *Am J Hum Genet*, in press.