

GENETIC HETEROGENEITY WITHIN AN ELECTROPHORETIC PHENOTYPE OF
GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASE IN A JAPANESE POPULATION

日本人集団中に発見されて、電気泳動では同じ表現型とされた Glucose
Phosphate Isomerase の中に認められた遺伝的な差異について

CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子
H. W. MOHRENWEISER, Ph.D.



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

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

We are indebted to many individuals who so generously donated their blood samples, and without whose cooperation this study would not have been possible. We are grateful to Drs. Kazuaki Goriki and Takeshi Kageoka for collecting blood samples of the GPI variants. We thank Dr. James V. Neel for helpful discussion of this work and Miss Marrianne Morrow for her excellent technical assistance for the electrophoretic studies.

血液標本を快く提供して下さった多くの方々に対して、心から謝意を述べたい。この方々の御協力無しには、本研究は遂行できなかったものである。GPI 変異型の血液標本を収集して下さった郷力和明、影岡武士両医師に心から感謝する。この研究に対して助言と検討をいただいた J. V. Neel 博士及び Miss Marrianne Morrow による卓越した電気泳動の技術援助に対して深く感謝する。

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 Department of Energy.

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、米国はエネルギー省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。



GENETIC HETEROGENEITY WITHIN AN ELECTROPHORETIC PHENOTYPE OF GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASE IN A JAPANESE POPULATION

日本人集団中に発見されて、電気泳動では同じ表現型とされた Glucose
Phosphate Isomerase の中に認められた遺伝的な差異について

CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子)¹; H. W. MOHRENWEISER, Ph.D.²

*RERF Department of Clinical Laboratories¹ and
Department of Human Genetics, The University of Michigan²*
 放射線臨床検査部,¹ Michigan 大学医学部人類遺伝学教室²

SUMMARY

The thermostability of the five kinds of electrophoretically variant phenotypes of glucose phosphate isomerase (GPI) which were found in Japanese in a previous study by Tanis et al was examined. The most frequently found variant phenotype, termed GPI 1-4_{HIR}, observed in 20 individuals could be divided into three distinct classes on the basis of thermostability characteristics. These classes were termed "stable", "labile", and "very labile". "Stable" lost approximately 20% and 60% of its original activity after heating 10 minutes and 30 minutes at 52.5°C, respectively, while normal GPI lost approximately 30% and 70% of its original activity. "Labile" lost approximately 40% and 80%, and "very labile" lost approximately 55% and 90% of its original activity under the same heating conditions. Electrophoresis showed that thermostability was a characteristic of the variant protein molecule but not of the electrophoretically normal molecule. The order of the stability of these three kinds of variants against 5M urea was the same as that of their thermostability. No difference against inhibition by 6-phosphogluconate was observed among the normal and the variant GPI. Family studies confirmed the genetic nature of the thermo- and urea-stability differences among the affected individuals.

INTRODUCTION

Human erythrocyte glucose phosphate isomerase (GPI), D-glucose-6-phosphate ketol isomerase (E.C.5.3.1.9), also referred to as phosphohexose

要約

Glucose phosphate isomerase (GPI) の5種類の電気泳動上の変異型について熱安定性を測定した。これらの変異型は、Tanis らによって以前に日本人中に発見されたものである。このうち最も高い頻度で発見された変異型で、表現型が GPI 1-4_{HIR} であるものの20例を、熱安定性を基準にして3クラスに分類することができた。それぞれ、「安定型」、「不安定型」、「非常に不安定な型」と名付けた。安定型は、52.5°Cで加熱した場合、10分後、30分後には、未処理のものに比べて20%及び60%の失活を示したが、正常型 GPI は、それぞれ30%及び70%の失活を示した。「不安定型」の失活は、同じ条件下で40%と80%であり、「非常に不安定な型」では、55%と90%に及んだ。電気泳動を行ってみると、(GPI 1-4_{HIR} を構成する正常型蛋白質と変異型蛋白質のうちで)熱安定性の違いは電気泳動上の変異蛋白質分子にあり、正常型蛋白質分子にはないことが明らかにされた。これら3種の変異型の5M-尿素に対する安定性の順位は、熱安定性の順位と同じであった。正常型と変異型の glucose phosphate isomerase において、6-phosphogluconate による阻害には差はなかった。変異型 GPI の熱安定性と、尿素に対する安定性の違いは、いずれも遺伝的なものであることが家族調査によって確認された。

緒言

ヒト赤血球中の glucose phosphate isomerase (GPI) は、正式名では D-glucose-6-phosphate ketol

isomerase or phosphoglucose isomerase, is a dimeric enzyme with a molecular weight of 132,000.¹ It catalyzes the interconversion of glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate in the glycolytic pathway. Detter et al.,² studying several populations, reported eight different variant phenotypes of human erythrocyte GPI in addition to the usual pattern detected by starch-gel electrophoresis. Fitch et al.,³ studying English and Asian populations, independently reported five kinds of variant phenotypes. Subsequently, the frequency of GPI variants was studied in a variety of populations.⁴⁻⁸ Although the incidence of these variants was in general rare, some ethnic populations showed comparatively high frequencies for these variant phenotypes.⁹⁻¹¹ In a study of Japanese residing in Hiroshima and Nagasaki, 5 electrophoretic variant phenotypes were observed in 35 unrelated individuals in a sample of 4,029 observations.¹¹ In the present paper, the thermostability of erythrocyte GPI from 27 individuals representing the 5 variant phenotypes will be described.

MATERIALS AND METHODS

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), NADP, dithiothreitol (DTT) were purchased from Calbiochem. Fructose-6-phosphate, 6-phosphogluconate, triethanolamine (TEA) and Triton X-100 were purchased from Sigma. Buffer grade HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethansulfonic acid) was purchased from Pierce, Rockford, Illinois. Hemolysates were prepared from washed, packed cells by the addition of four volumes of lysing buffer (HEPES 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 0.06%, pH 7.4) and centrifugation at 45,000 X g for 60 minutes.

GPI was assayed in the reverse direction (fructose-6-phosphate to glucose-6-phosphate) by coupling the product to glucose-6-phosphate dehydrogenase and measuring the rate of reduction of NADP at 340 nm at 30.0°C,¹² utilizing the Miniature Centrifugal Fast Analyzer made by Oak Ridge National Laboratory as described by Burtis et al.¹³ The assay mixture was composed of 1 mM F-6-P, 0.1 M TEA (pH 8.0), 1 mM NADP, and contained 1.0 IU/ml of G6PD. Hemoglobin (Hb) content was measured by a modified cyanmethemoglobin method.¹⁴ Levels of enzyme activity are expressed as μ M of product formed per gram Hb per hour.

isomerase (E. C. 5.3.1.9), 慣用名では, phosphohexose isomerase, 又は phosphoglucose isomerase として知られる酵素で, サブユニット 2 個からなり, 分子量は 132,000 である.¹ この酵素は解糖系において glucose-6-phosphate と fructose-6-phosphate の間の相互変換を触媒する. Detter ら² は, 澱粉ゲル電気泳動法を用いて, 幾つかの集団を調査し, ヒト赤血球 GPI には正常型のほかに, 8 種類の変異表現型の存在することを報告した. これは独立に, Fitch ら³ は, 英国人の集団とアジア人の集団を調査して, 5 種類の変異型を報告した. これらの報告に続いて, 種々の集団における GPI 変異型の頻度が調査された.⁴⁻⁸ これら変異型は, 一般的にはまれであるが, 特定の人種集団では, 比較的高い頻度で存在する.⁹⁻¹¹ 広島及び長崎に住む 4,029 人の日本人の調査では, 5 種類の電気泳動上の変異型を, 相互に関係のない 35 人中に発見した.¹¹ 本報では, 27 人中に発見された前述の 5 種類の変異型赤血球 GPI の熱安定性について述べる.

材料及び実験法

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), NADP, dithiothreitol (DTT) は, Calbiochem 社から, fructose-6-phosphate, 6-phosphogluconate, triethanolamine (TEA), Triton X-100 は, Sigma 社からそれぞれ購入した. 緩衝液用 HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethansulfonic acid) は, Illinois 州 Rockford の Pierce 社から購入した. 洗浄済みの赤血球に溶血用緩衝液 (HEPES 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 0.06%, pH 7.4) を 4 倍量加えて, 60 分間 45,000 X g で遠心分離を行い溶血液を得た.

GPI の活性測定は, 逆反応 (fructose-6-phosphate から glucose-6-phosphate の方向) の反応生産物に, glucose-6-phosphate dehydrogenase をカップルさせ, その反応で NADP が還元される速度を, 小型遠心式高速分析装置を用いて 30.0°C, 340nm で測定することによって行った.¹² なお, この小型遠心式高速分析装置は, 米国の Oak Ridge 研究所で製作されたものであり, その詳細については, Burtis ら¹³ の報告がある. 酵素活性測定は, 1 mM F-6-P, 0.1 M TEA (pH 8.0), 1 mM NADP, 1.0 IU/ml G6PD の濃度で行った. ヘモグロビン (Hb) の定量は, シアンメトヘモグロビンの変法¹⁴ を用いて行った. 酵素活性は 1 g の Hb を含む溶血液中の酵素が, 1 時間当たり生成する反応物の量として μ M の単位で表した.

Thermostability of GPI was measured by heating the hemolysate diluted with 25 mM-TEA buffer, pH 8.2 (the ratio of packed cells to buffer was 1:29) in glass tubes in a heating block filled with mineral oil for the indicated period, cooling it immediately in an ice-water bath, and assaying 10 μ l of it for the remaining activity. As precipitation of denatured hemoglobin was not observed except for the experiment with added 2-mercaptoethanol, heated hemolysates were usually directly assayed for GPI activity.

Denaturation by urea was performed by incubating a mixture of an equal volume of original hemolysate (ratio of packed cells to lysing solution was 1:4) and 10 M urea solution at 30.0°C. At the end of indicated period, the mixture was diluted with three volumes of 25 mM-TEA buffer, pH 8.2 so that no further denaturation occurred in the diluted mixture. No loss of GPI activity was detectable when it was incubated in the presence of 1.25 M urea for several hours.

Inhibition by 6-phosphogluconate was carried out at a fructose-6-phosphate concentration of 1 mM. Starch-gel electrophoresis was performed according to the method of Detter et al.²

The 35 proposti demonstrating the variant phenotypes were ascertained through a population survey reported previously.¹¹ For this study, specimens from first degree relatives whose electrophoretic phenotypes of GPI were the same as those of the proposti were available for 10 of 27 variants. Washed packed cells which had been stored in liquid nitrogen at RERF in Hiroshima for a half to 4 years, were shipped in dry ice to the Department of Human Genetics, University of Michigan. Some of the red blood cells containing variant phenotypes and those of nine Japanese individuals whose GPI are electrophoretically normal, collected shortly before the experiment, were frozen and included among those samples described above. No effect of length of storage period could be ascertained on either level of enzyme activity, heat stability profile, or electrophoretic pattern when duplicate samples from the same individual, or samples from first degree relatives sampled at different times were studied.

RESULTS

Heat Denaturation. The thermostability of

GPI の熱安定性は、溶血液を pH 8.2 の 25 mM-TEA 緩衝液を用いて希釈し (赤血球と全緩衝液との割合は 1:29 となる), ガラス管に入れたものを一定時間鉱油を満たした加熱装置中に浸して加熱し, 直ちに氷水中で冷却し, その 10 μ l を用いて残存活性を測定することによって求めた. 2-mercaptoethanol を加えて実験を行った場合を除いては, 加熱後にヘモグロビンの沈澱は生じなかったため, 溶血液の GPI 活性は加熱終了後直ちに測定した.

尿素による変性の実験では, 最初の溶血液 (赤血球と溶血用緩衝液の割合が 1:4 のもの) に, 等量の 10 M 尿素を加えたものを 30.0°C に保温し, 一定時間後, 3 倍量の pH 8.2 の 25 mM-TEA 緩衝液で希釈したが, この希釈によって変性はもはや進行することはない. 希釈後, 1.25 M 尿素溶液となったものを数時間放置したが, GPI 活性の減少は観察されなかった.

6-phosphogluconate による阻害は, 1 mM fructose-6-phosphate 存在下で行われた. 澱粉ゲル電気泳動は, Detter ら² の方法で行った.

変異表現型を示した 35 人の発端者は, 先に報告した集団調査¹¹ で確認したものである. 本研究で対象とした 27 人中 10 人については, 発端者と同一の電気泳動上の GPI 変異型を示した第 1 親等から, 血液を得ることができた. 広島放影研で液体窒素中に, 半年から 4 年にわたって保存されていた洗浄赤血球は, Michigan 大学の人類遺伝学教室にドライアイス詰めで送られた. GPI が電気泳動上変異型を示した対象者の一部と, 正常型を示した 9 人の日本人についても, 実験の直前に採血が行われて, その赤血球は凍結され前記の試料と共に送付された. 対象者とその第 1 親等から, 異なった時に採血された試料について, 酵素活性, 熱安定性, 電気泳動上の型について調べたが, 液体窒素中での保存期間による差は認められなかった.

結 果

熱変性. 電気泳動上の正常型 GPI (表現型 1) と,

TABLE 1 PERCENT REMAINING ACTIVITY OF ELECTROPHORETICALLY NORMAL GPI FROM NINE JAPANESE SAMPLES AFTER HEATING

表1 電気泳動では正常型を示した GPI で、9 人の日本人から得られたものが、加熱後に示した残存活性の百分率

| Temperature * | Time | Remaining Activity* |
|---------------|----------|---------------------|
| 47.0 (C) | 10 (min) | 99.5 ± 0.3 (%) |
| 47.0 | 30 | 97.2 ± 0.4 |
| 49.5 | 10 | 95.4 ± 0.5 |
| 49.5 | 30 | 85.3 ± 0.6 |
| 52.5 | 10 | 74.3 ± 0.5 |
| 52.5 | 30 | 45.7 ± 0.5 |

*Each of the nine samples was assayed in duplicate at each temperature, and the mean was calculated from the data pooled for all samples. Mean of total GPI activities of nine Japanese samples before heating was $1,979 \pm 45.5 \mu\text{M/g Hb/hr}$ (c.v.=7.2)

9 人から得られた検体のそれぞれを、各温度ごとに 2 本ずつ加熱後測定し、全部のデータを一括して平均値を算出した。日本人 9 人の GPI の加熱前活性値の平均値は、 $1,979 \pm 45.5 \mu\text{M/g Hb/hr}$ (c.v. = 7.2) であった。

electrophoretically normal GPI (phenotype 1) and five variant phenotypes detected by the starch-gel electrophoresis in the previous population study of Japanese¹¹ were examined. Duplicate aliquots of the samples were heated at 47.0 C, 49.5 C, and 52.5 C for 10 minutes and 30 minutes and the activities remaining were determined as percentages of the original activity of the unheated sample. The means of the remaining activities at each of the six points measured for normal GPI, phenotype 1, in hemolysates of nine Japanese are shown in Table 1 and Figure 1. The mean level of GPI activity in these individuals before heating was $1,979 \pm 45.5 \mu\text{M/g Hb/hr}$. Heat denaturation curves of normal GPI obtained from hemolysates of individuals whose enzymes seemed to be the most stable or the most labile of the nine individuals and that obtained from a hemolysate (H) which was subsequently utilized as a normal control for all the heat denaturation experiments are also shown in Figure 1.

The thermostability of GPI in 20 unrelated individuals who showed an identical electrophoretic phenotype, named GPI 1-4_{HIR} 1 by Tanis et al¹¹ were examined. GPI 1-4_{HIR} 1 is electrophoretically similar to a phenotype named 1-4 by Detter et al.² Examples of the heat stability profiles for selected individuals with those of normal controls (H and I) are presented in Table 2 and Figure 2. Three distinctly different profiles are observed. Two individuals (No. 1 and No. 2) had a variant GPI which exhibited a thermostability profile very similar

既に報告した日本人集団での調査¹¹において、澱粉ゲル電気泳動法によって発見された 5 種類の変異表現型 GPI について、熱安定性を測定した。試料は、47.0°C, 49.5°C, 52.5°C で 10 分及び 30 分間、いずれも 2 本ずつ加熱した後、残存活性を測定し、加熱しない試料の示す活性に対する百分率で表した。日本人 9 人の溶血液中の正常型 GPI (表現型 1) について、上記 6 点で測定したそれぞれの残存活性の平均値を、表 1 と図 1 に示した。これら 9 人の加熱前の GPI 活性は、 $1,979 \pm 45.5 \mu\text{M/g Hb/hr}$ であった。この 9 人の溶血液中の正常型 GPI の熱変性テストを行った際に得られた最も安定な熱変性曲線と、最も不安定な熱変性曲線を図 1 に示した。同時に、今後すべての熱変性テストにおいて、その溶血液を正常型 GPI コントロールとして用いることにした者 (H) の GPI の熱変性曲線をも図 1 に示してある。

Tanis ら¹¹ が、GPI 1-4_{HIR} 1 と命名した電気泳動上の変異表現型を示した血縁的に関係のない 20 人について、それぞれの GPI の熱安定性を調べた。電気泳動上 GPI 1-4_{HIR} 1 は、Detter ら² の報告した 1-4 表現型とよく似ている。これら変異型 GPI が熱安定性テストで示した結果の一部を、コントロールとして用いた正常型 GPI (H, I) について得られた結果と共に、表 2 及び図 2 に示した。熱安定性は明らかに異なる 3 種の型に分類できる。2 例 (No. 1 と No. 2) では、変異型 GPI が正常型 GPI とほとんど同じ熱安

TABLE 2 PERCENT REMAINING ACTIVITY OF NORMAL AND GPI 1-4_{HR 1} PHENOTYPES AFTER HEATING表2 正常型 GPI と GPI 1-4_{HR 1} 表現型の、加熱後の残存活性の百分率

| Sample | Thermostability | Remaining Activity | | | Total GPI Activity ($\mu\text{M/g Hb/hr}$) |
|-------------------------|-----------------|--------------------|------------------|------------------|---|
| | | 49.5 C 30 min | 52.5 C 10 min | 52.5 C 30 min | |
| | | (%) | (%) | (%) | |
| Normal GPI (GPI 1) | | | | | |
| H | stable | 83 | 73 | 33 | 1920 |
| I | stable | 80 | 69 | 30 | 1745 |
| GPI 1-4 _{HR 1} | | | | | |
| No. 1 | stable | 86 | 78 | 39 | 1816 |
| 2 | stable | 89 | 76 | 39 | 1876 |
| 2 - Brother | stable | 87 | 79 | 41 | 1827 |
| 3 | labile | 65 | 58 | 19 | 1510 |
| 4 | labile | 73 | 62 | 23 | 1779 |
| 5 | labile | 65 | 53 | 22 | 1866 |
| 5 - Son | labile | 64 | 47 | 15 | 1804 |
| 6 | labile | 66 | 60 | 17 | 1756 |
| 6 - Son | labile | 62 | 57 | 15 | 1605 |
| 6 - Daughter | labile | 66 | 53 | 17 | 1839 |
| 7 | labile | 72 | 56 | 18 | 1949 |
| 7 - Daughter | labile | 63 | 52 | 15 | 1528 |
| 8 | labile | 65 | 52 | 14 | 1540 |
| 8 - Daughter | labile | 70 | 64 | 21 | 1425 |
| 9 | labile | 72 | 65 | 23 | 1401 |
| 9 - Daughter | labile | 69 | 56 | 18 | 1433 |
| 19 | very labile | 53 | 41 | 10 | 1577 |
| 19 - Son 1 | very labile | 54 | 47 | 12 | 1617 |
| 19 - Son 2 | very labile | 51 | 44 | 11 | 1664 |
| 19 - Daughter | very labile | 53 | 44 | 10 | 1594 |
| 20 | very labile | 52 | 46 | 11 | 1887 |
| 20 - Son | very labile | 53 | 46 | 11 | 1699 |

to that observed for normal GPI. In 16 samples (No. 3 and No. 4), the means of the activities remaining after heating at 49.5 C for 30 minutes and at 52.5 C for 10 minutes were $67.4 \pm 1.0\%$ and $59.5 \pm 1.3\%$, respectively, less than those observed in the control samples. The other two samples (No. 19 and No. 20) were much more labile than the intermediate group. Accordingly, the 20 samples of GPI 1-4_{HR 1} phenotype (electrophoretically homogeneous) can be divided in three classes based on their thermostability, that is, stable, labile, and very labile, respectively.

In order to confirm the genetic nature of the heat stability differences, family studies were

定性を示した。他の16例(例えばNo. 3とNo. 4)では、49.5°Cで30分間加熱した場合と、52.5°Cで10分間加熱した場合の残存活性の平均値は、それぞれ $67.4 \pm 1.0\%$ と $59.5 \pm 1.3\%$ で、正常型 GPI で得られた値よりも低かった。他の2例(No. 19とNo. 20)では、上記の中間型よりも、更に不安定であった。したがって20例の GPI 1-4_{HR 1} 表現型は、電気泳動では同一の移動度を示すが、熱安定性に基づいてそれぞれ3種、すなわち安定型、不安定型、非常に不安定な型に分類することができる。

熱安定性の差異が遺伝的特質であることを確認する

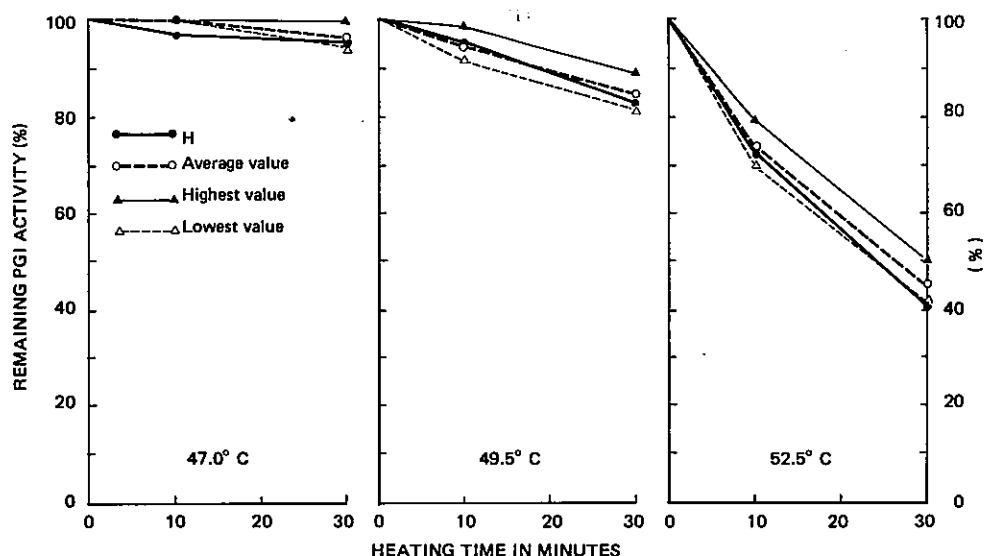


Figure 1. Percent remaining enzyme activities of samples of electrophoretically normal GPI (phenotype 1) after heating at various temperatures. The average, the highest, and the lowest values from duplicate determinations of nine normal GPI samples are shown. H is a sample used as a normal control throughout the study.

図1 種々の温度で加熱した後、電気泳動上の正常型 GPI (表現型 1) が示した残存活性の百分率。9 例の正常型 GPI を、それぞれ 2 本ずつ測定して得られた値の平均値、最高値、最低値を示したものについて図示した。H は、本研究で常に正常型コントロールとして用いた検体である。

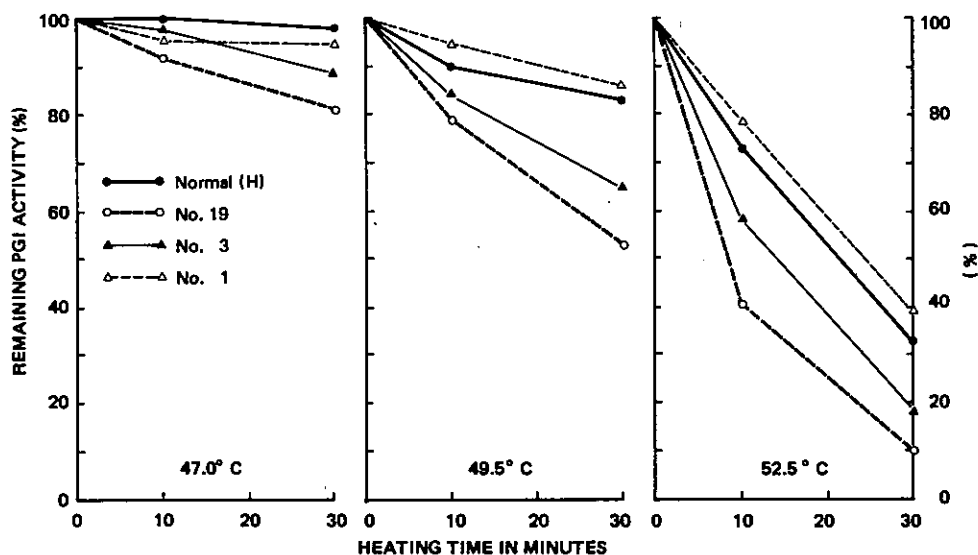


Figure 2. Percent remaining enzyme activities of three classes of GPI 1-4_{HIR 1} phenotype after heating at various temperatures, compared with a normal control (H).

図2 種々の温度で加熱した後、3 種の GPI 1-4_{HIR 1} 表現型が示した残存活性の百分率を、正常型コントロール (H) と比較した。

carried out for these three classes of GPI. The remaining activities of variant GPI phenotypes of the family members which were electrophoretically identical with those of the *propositi* are shown in Table 2. The heat denaturation profile of the enzyme (stable phenotype) in the No. 2 family is consistent with a genetic trait. Two sons and one daughter of No. 19 (very labile phenotype) showed similar denaturation profiles to that of the *propositus*. The denaturation curve of the son of No. 20 was very similar to that of the *propositus*. The thermostability profiles of the enzymes obtained from the family studies for the labile GPI 1-4_{HHR} 1 phenotype were also similar to those obtained from the *propositi*. Accordingly, the genetic nature of the differences in thermostabilities was confirmed. The range of thermolability of the "labile" class may suggest the possibility of additional heterogeneity in the protein molecules within this large group, although it may be within the range of normal variation for the methodology.

All the GPI were examined in the hemolysates heterozygous for normal and variant enzymes and the existence of three kinds of dimers, that is, the normal homodimer, a heterodimer, and the variant homodimer, were observed as three bands in starch-gel electrophoresis.¹¹ The remaining activities of GPI after heating are the sum of the remaining activities of these three dimers. Starch-gel electrophoretic examination of the remaining GPI after heating was carried out for all the samples of GPI 1-4_{HHR} 1 phenotypes. As shown in Figure 3, No. 1, whose GPI is thermostable, showed a variant homodimer and a heterodimer which were more intensely stained than the normal homodimer before heating. After heating for 30 minutes at 52.5°C, moderate activity was observed in the variant homodimer and heterodimer, only a slight activity being observed in a normal homodimer. The same result was obtained for No. 2. On the contrary, the very labile GPI of No. 19 (Figure 3) or No. 20 showed a variant homodimer which stained less intensely than the normal homodimer before heating. The variant homodimer almost disappeared after heating for 10 minutes at 52.5°C, when the remaining activity was about 40%. The staining intensities of the normal homodimer and of the variant homodimer of the "labile" GPI class (No. 3 and No. 4) were almost equal before heating; a decrease in intensity was observed in the variant

ために、上記3種のGPIに対して家族調査を行った。電気泳動法では発端者と同じ変異表現型を示した家族員のGPIについて、加熱後の残存活性を表2に示した。No. 2の家族員のGPI(安定型)の熱変性曲線は、それが遺伝形質であると考えるとつじつまが合う。No. 19(非常に不安定な型のGPIを示す)の息子2人と娘のGPIは、加熱による変性の起こり方が、発端者であるNo. 19のGPIの場合と非常によく似ていた。No. 20の息子の場合もそのGPIの熱変性の型は、No. 20とほとんど同じであった。不安定型GPI 1-4_{HHR} 1について家族調査を行った場合にも、その家族のGPI 1-4_{HHR} 1は発端者のものと類似の熱変性型を示した。以上の結果から熱安定性の差異は、遺伝的なものであることが確認された。"不安定"な型として分類されたGPIの示した熱に対する不安定性には、かなりの幅がみられたことから、この数の多いグループ内には、蛋白質としては互いに異なるものがまだ含まれている可能性が考えられる。もっともこの幅は、用いた方法に由来する実験誤差によるものかもしれない。

今回の実験では、glucose phosphate isomeraseの正常型と変異型の両酵素を共に含み、異型接合を示した溶血液を用いた。これら溶血液中には正常型のみからできている2量体、正常型と変異型からできている混合型2量体、変異型からだけできている2量体と、合計3種の2量体の存在することが、澱粉ゲル電気泳動で3本のバンドとして観察された。¹¹ 加熱後のGPI残存活性はこれら3種の2量体の残存活性の和である。GPI 1-4_{HHR} 1表現型を示した検体は、加熱後すべて澱粉ゲル電気泳動を行い、残存したGPIの型を調べた。図3に見られるように、熱に安定なNo. 1では、加熱前にも変異型の2量体と混合型2量体のバンドは、正常型2量体よりも強く染色された。52.5°Cで30分加熱後、変異型2量体と混合型2量体にはかなりの活性が認められたが、正常型2量体にはわずかな活性しか認められなかった。No. 2についても同じ結果が得られた。これに反し熱に対して非常に不安定なGPIであるNo. 19(図3)とNo. 20では、加熱前にも、変異型2量体は正常型2量体よりもバンドの染色が弱かった。52.5°Cで10分間加熱すると残存活性は40%となり、変異型2量体のバンドは消失してほとんど認められなかった。"不安定型" GPI(例えばNo. 3とNo. 4)では、加熱前には、正常型2量体と変異型2量体はほぼ同じ

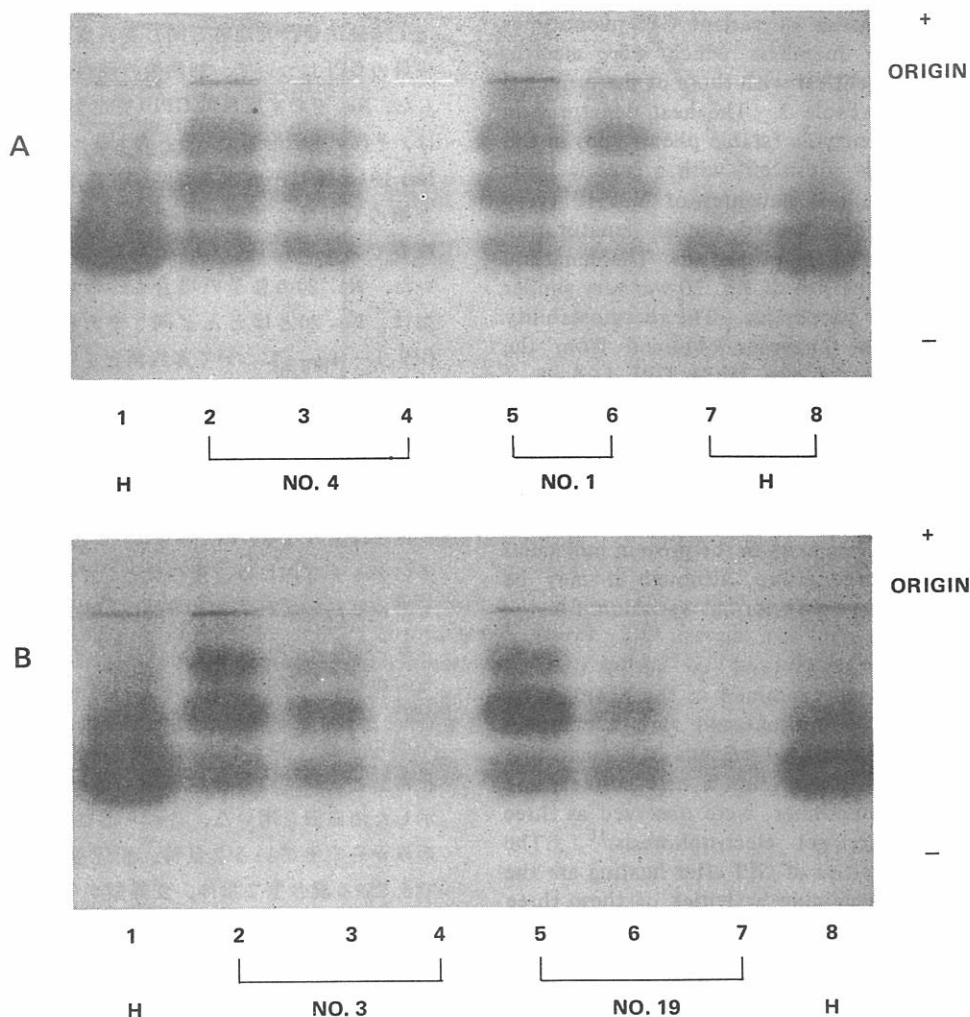


Figure 3. Starch-gel electrophoresis patterns of normal and three kinds of GPI 1-4_{HIR 1} variants before and after heating. A: Wells 1 and 8, unheated normal GPI (H); well 2, unheated No. 4 (labile class GPI 1-4_{HIR 1}); well 3, same at 52.5 C for 10 minutes; well 4, same at 52.5 C for 30 minutes; well 5, unheated No. 1 (stable class GPI 1-4_{HIR 1}); well 6, same at 52.5 C for 30 minutes; well 7, normal GPI (H) at 52.5 C for 30 minutes.

B: Wells 1 and 8, unheated normal GPI (H); well 2, unheated No. 3 (labile class GPI 1-4_{HIR 1}); well 3, same at 52.5 C for 10 minutes; well 4, same at 52.5 C for 30 minutes; well 5, unheated No. 19 (very labile class GPI 1-4_{HIR 1}); well 6, same at 52.5 C for 10 minutes; well 7, same at 52.5 C for 30 minutes.

図3 正常型 GPI と、3 種類の GPI 1-4_{HIR 1} 変異型の加熱前後における、澱粉ゲル電気泳動像。A. 試料溝 1 と 8, 加熱前の正常型 GPI (H); 試料溝 2, 加熱前の No. 4 (GPI 1-4_{HIR 1} の不安定型); 試料溝 3, No. 4 を 52.5°C で 10 分間加熱したもの; 試料溝 4, No. 4 を 52.5°C で 30 分間加熱したもの; 試料溝 5, 加熱前の No. 1 (GPI 1-4_{HIR 1} の安定型); 試料溝 6, No. 1 を 52.5°C で 30 分間加熱したもの; 試料溝 7, 正常型 GPI (H) を 52.5°C で 30 分間加熱したもの。B. 試料溝 1 と 8, 加熱前の正常型 GPI (H); 試料溝 2, 加熱前の No. 3 (GPI 1-4_{HIR 1} の不安定型); 試料溝 3, No. 3 を 52.5°C で 10 分間加熱したもの; 試料溝 4, No. 3 を 52.5°C で 30 分間加熱したもの; 試料溝 5, 加熱前の No. 19 (GPI 1-4_{HIR 1} の非常に不安定型); 試料溝 6, No. 19 を 52.5°C で 10 分間加熱したもの; 試料溝 7, No. 19 を 52.5°C で 30 分間加熱したもの。

TABLE 3 PERCENT REMAINING ACTIVITY OF VARIOUS GPI PHENOTYPES AFTER HEATING

表3 各種 GPI 表現型の、加熱後の残存活性の百分率

| Sample | Electrophoretic Phenotype | Remaining Activity | | | Total GPI Activity |
|---------------|---------------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|
| | | 49.5 C 30 min | 52.5 C 10 min | 52.5 C 30 min | |
| | | (%) | (%) | (%) | (μ M/g Hb/hr) |
| Normal (H) | 1 | 83 | 73 | 33 | 1920 |
| No. 21 | 1-2 _{NGS} 1 | 83 | 71 | 46 | 2165 |
| 22 | 1-2 _{NGS} 1 | 85 | 73 | 43 | 2126 |
| 22 - Daughter | 1-2 _{NGS} 1 | 86 | 76 | 41 | 2031 |
| 23 | 1-3 _{HIR} 1 | 79 | 69 | 33 | 1926 |
| 24 | 1-5 _{NGS} 1 | 78 | 66 | 27 | 2461 |
| 25 | 1-5 _{HIR} 1 | 78 | 63 | 17 | 2041 |
| 26 | 1-5 _{HIR} 1 | 73 | 62 | 23 | 1806 |
| 27 | 1-5 _{HIR} 1 | 85 | 74 | 34 | 1432 |
| 27 - Daughter | 1-5 _{HIR} 1 | 83 | 74 | 34 | 1635 |

homodimer after 30 minutes at 49.5 C or after 10 minutes at 52.5 C, when the remaining activity was approximately 60%. The variant homodimer could not be seen after heating 30 minutes at 52.5 C, when the remaining activity was about 20%. These observations coincide with the results obtained in the heat denaturation experiments and indicate that thermostability is a characteristic of the variant GPI and not the normal GPI.

The other four variant phenotypes detected by starch-gel electrophoresis in this population were also examined for thermostability and the results are shown in Table 3. Phenotype 1-2_{NGS} 1 in two individuals and a family member of one of them was more stable than the normal GPI. After 30 minutes at 52.5 C, the remaining activity was approximately 10% higher in the GPI 1-2_{NGS} 1 phenotype than that in normal GPI. GPI phenotypes 1-3_{HIR} 1 and 1-5_{NGS} 1 seemed to be as stable as the normal GPI. When three samples of the GPI 1-5_{HIR} 1 phenotype were examined, enzymes in two of them (No. 25 and No. 26) showed almost the same pattern of heat denaturation as that of the labile GPI 1-4_{HIR} 1, while the enzymes in the third individual (No. 27) and his daughter showed almost the same denaturation curves as that of the normal GPI. Because GPI 5_{NGS} 1 and GPI 5_{HIR} 1 have different electrophoretic mobilities in the presence or absence of added 2-mercaptoethanol,¹¹ their thermostability was determined with and without 0.1% of 2-

強さで染色されたが、49.5°Cで30分間加熱した場合又は52.5°Cで10分間加熱した場合には、残存活性は約60%となり、変異型2量体の活性低下が認められた。52.5°Cで30分間の加熱後は残存活性は20%となり、変異型2量体のバンドはもはや認められなかった。電気泳動によって観察されたこれらの事象は、熱変性実験で得られた結果とよく一致し、更に GPI の示した熱安定性は正常型 GPI の特性ではなく、変異型 GPI に特有な性質であることを明らかにしている。

今回扱った集団中に澱粉ゲル電気泳動法で発見された変異型で、GPI 1-4_{HIR} 1 以外の表現型のもの4種についても、熱安定性を測定し結果を表3に示した。1-2_{NGS} 1 表現型は2人の発端者とそのうち1人の家族に発見されたが、正常型 GPI よりも熱に対して安定であって、52.5°Cで30分間加熱後その残存活性は、正常型の残存活性よりも10%高かった。GPI 1-3_{HIR} 1 表現型と GPI 1-5_{NGS} 1 表現型は、正常型とほぼ同じ安定性を示した。GPI 1-5_{HIR} 1 表現型の3例について熱安定性を調べたところ、2例 (No. 25と No. 26) は GPI 1-4_{HIR} 1 の不安定型とほとんど同じような熱変性の型を示したが、3例目 (No. 27) とその娘の場合には、正常型とほとんど同じ熱変性の型を示した。GPI 5_{NGS} 1 と GPI 5_{HIR} 1 は、2-mercaptoethanol の存在するときとしないときで移動度が異なる¹¹ ので、熱安定性についても0.1%の2-mercaptoethanol のある場合とない場合

mercaptoethanol. Although a small amount of precipitation of denatured hemoglobin was observed when 2-mercaptoethanol was added and it was excluded from heated samples by centrifugation and their electrophoretic patterns showed the effect of the added reducing reagent, no difference was observed in their heat denaturation curves. At present, there are no other data which clearly confirm that the observed difference of thermostability within GPI 1-5_{HIR} 1 phenotype is real, because not enough packed cells of the first two individuals remained to carry out other experiments. The starch-gel electrophoresis of the heated hemolysates again confirmed that stability against heat is a characteristic intrinsic to the electrophoretically variant proteins.

Urea Denaturation. Two samples from each of the three classes of GPI 1-4_{HIR} 1 phenotypes with different thermostability and two with normal GPI were examined for the loss of activity of the GPI by 5M urea denaturation. The denaturation procedures were carried out in three replicates and GPI was assayed three times for each replicate. The possibility of heat denaturation at 30.0°C was excluded since no difference in activity of GPI was observed in a mixture of a hemolysate and water and a hemolysate in 1.25 M urea solution at 0°C and at 30.0°C for 45 minutes (Table 4). The order of the remaining activities at 15 minutes and at 45 minutes is the same as that which obtained for thermostability. Nevertheless, when the values obtained from two persons with normal GPI phenotype were compared with those obtained from variant GPI phenotypes, one normal GPI (H) was similar to stable GPI 1-4_{HIR} 1 phenotype and the other (I) was similar to labile GPI 1-4_{HIR} 1. When nine phenotype GPI 1 samples (including those of H and I) were examined for the denaturation of their GPI by urea, remaining activities at 45 minutes were observed to be in a range of 47% to 61%. GPI of H, which retained 61% of original activity in the previous experiment, again retained 61% of the original activity, while GPI of I, which retained 51% of original activity in the previous experiment, retained 55%. When the remaining activities of these two normal GPI samples (H and I) after heat denaturation were compared, the values of H were usually higher than those of I, but the differences were 3% to 4% of the original activity at 52.5°C, and they seemed to be in the

の両方で測定した。2-mercaptoethanolを添加すると少量の変性ヘモグロビンが観察されたが、これは遠心分離して除いた。加熱後に行った電気泳動で認められた型には、加えた還元剤の効果が現れていたが、熱変性に対しては相違は認められなかった。GPI 1-5_{HIR} 1表現型の中に認められた熱安定性の違いが真実であることを立証できるようなデータは、現在のところほかにはない。というのは、最初の2例については他の実験を行うに十分な赤血球が、もはや残っていないからである。これらの変異型GPIを含んだ溶血液について、加熱後に行った澱粉ゲル電気泳動によって、熱安定性の違いは変異型蛋白質の特質であることが再び確認された。

尿素による変性。 GPI 1-4_{HIR} 1表現型を熱安定性の違いによって3種に分類したが、これら3種のグループと、正常型GPIの中から各々2例ずつを選び、5M-尿素中での変性によるGPIの失活を測定した(表4)。尿素による失活の実験は1検体につき3本の試験管中で行い、1本につき3回ずつGPI活性の測定を行った。溶血液を水と混合した場合と、溶血液を1.25M-尿素溶液とした場合に、それぞれ45分間0°Cと30.0°Cに保ちGPI活性を測定したが、変化がなかったもので、30.0°Cにおいて(活性測定の際に)熱変性が起こる可能性はない。15分後と45分後の残存活性の大きさの順序と熱安定性の順序とは同じであった。しかしながら正常型のGPIを示した2例と、変異表現型を示した例とで、得られた残存活性の値を比較してみると、正常型のうちの1例(H)の残存活性は安定型のGPI 1-4_{HIR} 1の値とほぼ等しく、他の1例(I)の場合には、不安定型GPI 1-4_{HIR} 1とほぼ同じであった。更に、GPI 1表現型の9例(HとIを含めて)について、尿素中での変性実験を行ったところ、45分後の残存活性は47%から61%を示した。前回の実験で61%の残存活性を示したHは、今回の実験でも61%を示したが、Iの残存活性は前回の実験では51%、今回は55%であった。これら正常型GPI 2例(HとI)の熱変性後の残存活性を比較してみると、常にHの方が高い値を示したが、その差は52.5°Cの条件で、加熱前の活性の3%から4%に

TABLE 4 PERCENT REMAINING ACTIVITY OF NORMAL AND GPI 1-4_{HIR} 1 PHENOTYPES AFTER TREATMENT WITH 5M UREA AT 30°C表4 正常型 GPI と GPI 1-4_{HIR} 1 表現型を、30°Cで尿素と処理した後の残存活性の百分率

| Samples | Thermostability | Remaining Activity | |
|------------|-----------------|--------------------|--------|
| | | 15 min | 45 min |
| Normal (H) | stable | 81 (%) | 61 (%) |
| Normal (I) | stable | 76 | 51 |
| No. 1 | stable | 82 | 62 |
| 2 | stable | 81 | 62 |
| 3 | labile | 77 | 52 |
| 4 | labile | 76 | 48 |
| 19 | very labile | 64 | 30 |
| 20 | very labile | 66 | 40 |

range of experimental error. All of these results indicate that the stability of the enzymes to denaturation with 5M urea in the conditions we used, was similar to the heat stability profile of the various proteins.

Inhibition by 6-phosphogluconate. GPI of the same eight individuals whose samples were examined for denaturation by urea were assayed in the presence of various concentrations of 6-phosphogluconate. No differences were observed in the percent inhibition among the normal and the three classes of the GPI 1-4_{HIR} 1 phenotype.

DISCUSSION

Although the electrophoretic approach has represented a very major step in the detection of variability at the protein level, its limitations are well known. The major constraint is the necessity for the amino acid substitution to involve a charge alteration, a constraint which is estimated to occur in only one of four amino acid changes. Hemoglobin is an excellent example of single electromorphs concealing many different amino acid substitutions. Until recently, variation within an electromorph was detected almost exclusively by fingerprinting and sequencing techniques which are only useful when purified protein is available in relatively large amounts.

The present study on identification of previously undetected variation within a single electrophoretic class of GPI variants demonstrates the utility of heat stability studies in detecting

すぎず、実験の誤差範囲内の値と考えられた。これら得られた結果をみると、我々の用いた条件での5M-尿素による酵素の安定性は、熱安定性の型とほぼ同じと言える。

6-phosphogluconateによる阻害。尿素による変性の実験に用いられた8例のGPIについて、各種濃度の6-phosphogluconateの存在下での活性を調べた。正常型GPIと、GPI 1-4_{HIR} 1表現型の3クラスの間に、(6-phosphogluconateによる)阻害率に差は認められなかった。

考 察

電気泳動法は、蛋白質レベルでの変異を発見する際に大きな進歩をもたらしたが、その限界もよく知られている。電気泳動法で変異が発見されるためには、アミノ酸置換によって電荷の変化が生じなければならないが、そのような現象は起こり得るアミノ酸置換4回につき1回であると計算されている。電気泳動では同一の移動度を示す蛋白質のグループの中に、アミノ酸置換の異なるものが隠されている例としては、ヘモグロビンは絶好の例である。最近までは、電気泳動上同一の移動度を示す蛋白質間の差異を発見するためには、ほとんど例外なく、フィンガープリント法とアミノ酸配列決定法が用いられてきているが、この方法を行うためには比較的大量の精製蛋白質を必要とする。

電気泳動上は同一の移動度を示すGPI変異体のグループの中に、従来ならば発見できなかったような差異を、本報では発見することができたので、変異蛋白質の電気泳動上の移動度を変化させることがない

amino acid substitutes which do not alter the electrophoretic mobility of the variant protein. The demonstration of three classes of variants within the GPI 1-4_{HIR 1} group and the suggestion of two classes within the GPI 1-5_{HIR 1} group is similar to the results obtained by others who utilized heat stability techniques to subdivide electromorphs in other enzyme systems in *Drosophila*.¹⁵⁻¹⁹

The susceptibility to 5M urea of the various GPI 1-4_{HIR 1} variants parallels their susceptibility to heat denaturation, although the magnitude of the differences are not as large. The data on urea and heat stability would indicate that the amino acid substitutions, although conferring similar charge changes to each of the variant proteins, results in altered conformation of the protein molecule in each instance. The difference in stability was always manifested in the variant protein band when treated samples were examined by electrophoresis. The lack of effect on the kinetic properties of the enzyme would indicate the structural alteration does not affect the active sites of the enzyme. Similarly, others have reported that no changes in the kinetic properties were observed in GPI variants detected by electrophoresis although these individuals were characterized by GPI deficiency and non-spherocytic hemolytic anemia.²⁰⁻²²

This study demonstrates that stability studies designed to detect structural alterations manifested by changes in protein conformation are helpful in determining further variation within electrophoretic classes of proteins.

ような種類のアミノ酸置換を検知するために、熱安定性を調べることは有用な手段であることが明らかにされた。本報では、電気泳動上は GPI 1-4_{HIR 1} とされたグループの中に、3種類の変異が存在することを示し、GPI 1-5_{HIR 1} の中にも2種類の変異が存在する可能性を示唆したが、同様な実験が他にもあり、¹⁵⁻¹⁹ ショウジョウバエの酵素で、GPI ではないが電気泳動上は同一移動度を示すグループを、熱安定性の違いによって更に細かく分類している。

GPI 1-4_{HIR 1} 変異型それぞれの5M-尿素に対する感受性は、熱に対する感受性と平行しているが、差異は後者ほど大きくはない。熱安定性と尿素に対する安定性について得られたデータによって、アミノ酸置換が異なれば、その結果生じる変異蛋白質分子全体の電荷の変化は同じであっても、三次元構造には、それぞれ変化をもたらすことが示されていると考えられる。加熱後の酵素標本について電気泳動を行ってみると、熱に対する安定性の違いは常に、変異蛋白質のバンドの変化として表れていた。反応速度上の恒数には変化がなかったので、酵素の活性部位には、立体構造上の変化は影響しなかったものと考えられる。このような例は他の研究者も報告しており、GPI 欠乏症と非球状赤血球形溶血性貧血の症状を示した人々から得られた電気泳動上の GPI 変異型が、反応速度上の恒数には変化を示さなかったという例が知られている。²⁰⁻²²

蛋白質の構造上の変化(アミノ酸配列の変化)は、蛋白質の三次元構造の変化として反映されるので、これを発見するために計画された安定性を指標とする研究は、電気泳動上同一の移動度を示す一群の蛋白質の中に、更に多くの変異を発見するために有用な手段であることが、本報によって明らかとなった。

REFERENCES

参考文献

1. TILLEY BE, GRACY RW, WELCH SG: A point mutation increasing the stability of human phosphoglucose isomerase. *J Biol Chem* 249:4571, 1974
2. DETTER JC, WAYS PO, GIBLETT ER, BAUGHAN MA, HOPKINSON DA, POVEY S, HARRIS H: Inherited variations in human phosphohexose isomerase. *Ann Hum Genet* 31:329, 1968
3. FITCH LI, PARR CW, WELCH SG: Phosphohexose isomerase variation in man. *Biochem J* 110:56, 1968
4. SHINODA T: Inherited variations in red cell phosphoglucose isomerase among Japanese. *Jpn J Hum Genet* 15:159, 1970
5. TARIVERDIAN G, OBRACAJ H, RITTER H, WENDT GG: Zur populationsgenetik der phosphoglucose isomerase. *Humangenetik* 11:169, 1971

6. TERRENATO L, SANTOLAMAZZA C, PIACENTINI E, ULIZZI L, STIRATI G: Two human red cell phosphohexose isomerase variants in a sample from the population of Rome. *Humangenetik* 14:162, 1971
7. OMOTO K, BLAKE NM: Distribution of genetic variants of erythrocyte phosphoglycerate kinase (PGK) and phosphohexose isomerase (PHI) among some population groups in south-east Asia and Oceania. *Ann Hum Genet* 36:61, 1972
8. ISHIMOTO G, KUWATA M: Electrophoretic variants of red cell phosphohexose isomerase in Japan. *Jpn J Hum Genet* 18:356, 1974
9. WELCH SG: Qualitative and quantitative variants of human phosphoglucose isomerase. *Hum Hered* 21:467, 1971
10. ISHIMOTO G: Red cell enzymes. In *Human Adaptability, Vol 2*, Ed by Watanabe S, Kondo S, Matsunaga E. Tokyo, University of Tokyo Press 1975. p 109
11. TANIS RJ, UEDA N, SATOH C, FERRELL RE, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, OHNO N: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. IV. Acid phosphatase, NADP-isocitrate dehydrogenase, peptidase A, peptidase B and phosphohexose isomerase. *Ann Hum Genet* 41:419-28, 1978 (RERF TR 6-76)
12. NOLTMAN EA: Isolation of crystalline phosphoglucose isomerase from rabbit muscle. *J Biol Chem* 239:1545, 1964
13. BURTIS CA, JOHNSON WF, MAILEN JC, OVERTON JB, TIFFANY TO, WATSKY MB: Development of an analytical system around a miniature fast analyzer. *Clin Chem* 19:895, 1973
14. FIELEK S: Personal communication
15. BERNSTEIN SC, THROCKMORTON LH, HUBBY JL: Still more genetic variability in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3928, 1973
16. SINGH RS, HUBBY JL, LEWONTIN RC: Molecular heterosis for heat-sensitive enzyme alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1808, 1974
17. SINGH RS, HUBBY JL, THROCKMORTON LH: The study of genetic variation by electrophoretic and heat denaturation techniques at the octanol dehydrogenase locus in members of the *Drosophila Virilis* group. *Genetics* 80:637, 1975
18. SINGH RS, LEWONTIN RC, FELTON AA: Genetic heterogeneity within electrophoretic 'alleles' of xanthin dehydrogenase in *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics* 84:609, 1976
19. THÖRIG GEW, SCHOONE AA, SCHARLOO W: Variation between electrophoretically identical alleles at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet* 13:721, 1975
20. VIVES-CORRONS JL, ROZMAN C, KAHN A, CARRERA A, TRIGINER J: Glucose phosphate isomerase deficiency with hereditary hemolytic anemia in a Spanish family: Clinical and familial studies. *Humangenetik* 29:291, 1975
21. VAN BIERVLIET JPGM, VAN MILLIGEN-BOERSMA L, STAAL GEJ: A new variant of glucose phosphate isomerase deficiency (GPI-UTRECHT). *Clin Chim Acta* 65:157, 1975
22. VAN BIERVLIET JP, VLOG A, BARTSTRA H, ROTTEVEEL JJ, DE VAAN GAM, STAAL GEJ: A new variant of glucose phosphate isomerase deficiency. *Humangenetik* 30:35, 1975