

**CHARACTERIZATION OF TWO NEW ELECTROPHORETIC VARIANTS
OF HUMAN TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE:
STABILITY, KINETIC, AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES**

電気泳動で検出されたヒト triosephosphate isomerase の
二つの新しい変異型の特性について：
安定性，カイネティックス及び免疫学的特性

JUN-ICHI ASAKAWA, M.S. 浅川順一
HARVEY 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 grateful to Dr. Kazuaki Goriki for collecting blood samples of the Hiroshima variant and Dr. H. Gershowitz for assistance with the immunologic studies. The advice and assistance of Mr. S. Decker is also gratefully acknowledged. Financial support was derived from Department of Energy Contract EY-77-C-02-2828.

広島の変異体の血液標本を収集された郷力和明博士と免疫学的研究を援助された H. Gershowitz 博士に謝意を表す。S. Decker 氏の助言・援助に感謝する。本研究の資金援助は米国エネルギー省契約 EY-77-C-02-2828 によってなされた。

A paper based on this report was published in the following journal:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に掲載された。

Biochemical Genetics 20:59-76, 1982

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放射線影響研究報告書集

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 not intended to supplant regular journal publication.

放射線影響研究報告書は、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もので、その経費は日米両政府の平等分担により、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運営されている。



**CHARACTERIZATION OF TWO NEW ELECTROPHORETIC VARIANTS
OF HUMAN TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE:
STABILITY, KINETIC, AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES**

電気泳動で検出されたヒト triosephosphate isomerase の
二つの新しい変異型の特性について：
安定性、カイネティックス及び免疫学的特性

JUN-ICHI ASAKAWA, M.S. (浅川順一)¹; HARVEY W. MOHRENWEISER, Ph.D.²

*RERF Department of Clinical Laboratories¹; Department of Human Genetics,
University of Michigan Medical School²*

放射研臨床検査部¹ 及び Michigan 大学医学部人類遺伝学教室²

SUMMARY

Two new electrophoretic variants of human triosephosphate isomerase (TPI) have been partially purified and characterized. The TPI Manchester variant, a cathodally migrating electrophoretic allozyme identified in an individual with a phenotype TPI 1-Manchester is associated with a normal level of enzyme activity in erythrocytes and normal kinetic properties. It is very thermolabile at 55°C and 57°C, although it is not uniquely sensitive to either guanidine-HCl or urea denaturation.

The TPI Hiroshima 2 variant is an anodally migrating allozyme (phenotype of proband is TPI 1-Hiroshima-2) with normal activity and kinetic properties and also normal stability characteristics. It is inactivated less by antisera raised against normal human TPI than either the normal or the Manchester allozyme.

Dissociation-reassociation experiments utilizing these allozymes have confirmed that normal human red blood cell TPI isozymes are produced by a sequence of reactions (presumably deamidations) involving alternating subunits.

INTRODUCTION

Human triosephosphate isomerase (TPI: EC 5.3.1.1), a dimeric enzyme (MW=53,000) of identical subunits,¹ catalyzes the interconversion

要約

電気泳動法で検出された triosephosphate isomerase (TPI)の新しい二つの変異型を部分的に精製し、その特性を究明した。表現型 TPI 1-Manchester を有する 1 個人に確認された陰極方向に移動する電気泳動上の allozyme である TPI Manchester 変異型は赤血球中酵素活性値は正常であり、カイネティックスについても正常であった。この変異型は guanidine-HCl や尿素変性に対して特に不安定ではないが、55℃及び 57℃での熱変性では非常に不安定であった。

TPI Hiroshima 2 変異体は陽極方向に移動する allozyme で(発端者の表現型は TPI1-Hiroshima-2)、活性及びカイネティックスは正常であり、一連の安定性も正常であった。この変異型の正常型抗ヒト TPI 血清による非活性化では、正常及び Manchester allozyme のいずれに比べても非活性化が少なかった。

これらの allozyme を利用した解離-再会合実験によって、正常なヒト赤血球 TPI アイソザイムは、サブユニット構造の変化を伴う一連の反応(恐らくは、脱アミド化)によりもたらされることが確認された。

緒言

同一サブユニット 2 本から構成されるダイマー酵素 (MW = 53,000)¹ であるヒト triosephosphate

of glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate and is thus involved in both glycolysis and gluconeogenesis as well as glyceride synthesis. This enzyme is found in a wide variety of tissues in many different species²⁻⁴ and has been purified and characterized from many sources.⁵⁻⁸ The primary sequence of TPI has been extensively conserved through evolutionary time; the rate of acceptable amino acid substitutions is estimated at 2.8 mutations per 100 residues per 100 million years.⁹ Sequence studies of human, rabbit, and chicken TPI indicate a sequence homology of greater than 95%^{9,10} with almost complete homology in the region of the active site.¹¹ The kinetic properties of the enzyme isolated from different species are quite similar.⁵ The very high activity of this enzyme suggests that it should not represent a metabolically rate-limiting step. It is, therefore, surprising that severe metabolic consequences involving hemolytic anemia, growth retardation, neurological disorders, and early death are observed when the enzyme activity is reduced to 5%-20% of normal.¹²

Some 15 cases of TPI deficiency have been reported.¹³⁻¹⁵ Data obtained by Eber et al^{16,17} and Mohrenweiser¹⁸ indicate that null alleles associated with a significant reduction of TPI activity occur in one of every 100-200 newborns. It is, as yet, unclear whether a limited number of null alleles exist at relatively high frequencies or whether a large number of different alleles are segregating in this population. The latter situation would suggest that many amino acid substitutions adversely affect enzyme function.

In contrast to null variants, electrophoretic variants of TPI are relatively rare. Peters et al¹⁹ described the characteristics of two variants of TPI identified in three of 2,477 individuals screened. Four variants were identified during the screening of 10,245 Japanese,²⁰ one variant was detected in a population of 1,949 studied in Ann Arbor, Michigan by Neel et al,²¹ and no variants were detected during the study of 3,888 Amerindians.²²

The present paper describes the purification and characterization (electrophoretic as well as stability, immunological, and kinetic properties) of two TPI variants, one identified in Ann Arbor, Michigan by Neel et al,²¹ designated TPI Manchester,²³ the proband having a phenotype TPI 1- Manchester and the other identified in

isomerase (TPI:EC 5.3.1.1) は glyceraldehyde-3-phosphate と dihydroxyacetone phosphate の相互変換を触媒し, glyceride 合成のみならず, 解糖と糖新生の双方に関与している. この酵素は多種類の生物の広範な組織に見いだされ,²⁻⁴ 数多くの材料から精製され, その特性についても研究されている.⁵⁻⁸ TPI のアミノ酸一次配列は進化の期間を通して配列全般にわたり維持され, 受容できるアミノ酸置換率は1億年に付き100残基当たり2.8と推定されている.⁹ ヒト, ウサギ及びニワトリの TPI の一次構造についての研究では, 一次構造の類似性は95%以上で,^{9,10} 活性部位ではほぼ完全に一致する構造であることが認められた.¹¹ 異なる生物種から単離された酵素のカイネティックスはおおむね似ている.⁵ この酵素の活性が非常に高いことは, この酵素が律速段階に関与しているものではないことを示唆している. したがって, 酵素活性が正常の5%~20%に低下すると溶血性貧血, 成長遅滞, 神経障害及び早期死亡につながる重篤な代謝異常が見られるのは驚きである.¹²

TPI 欠損症は約15例報告されている.¹³⁻¹⁵ Eber ら^{16,17} 及び Mohrenweiser¹⁸ の資料では, TPI 活性の極度の減少を伴う null 対立遺伝子が新生児100~200人に1人の割合で発生することを示している. しかし, この集団に一定数の null 対立遺伝子がかかなり高い頻度で存在するのか, あるいは異なる多くの対立遺伝子が存在しているのかはまだ明らかではない. 後者の状態であるとする, アミノ酸置換の多くが酵素機能に良くない影響を及ぼすと考えられる.

null 変異体とは対照的に, TPI の電気泳動上の変異型は比較的まれである. Peters ら¹⁹ は, スクリーニングした2,477人のうち3人に見いだされた TPI の二つの変異型についてその特性を述べている. 日本人10,245人のスクリーニングで四つの変異型が見いだされ,²⁰ Michigan 州 Ann Arbor 市で Neel ら²¹ が調査した1,949人の集団中に一つの変異型が検出された. しかし, 3,888人のアメリカインディアンの調査では変異型は認められなかった.²²

本報では, Michigan 州 Ann Arbor 市で Neel ら²¹ によって見いだされ, TPI Manchester と命名された TPI 変異型(発端者の表現型は TPI 1-Manchester)²³ と日本で見いだされ, TPI Hiroshima 2 と命名された変異型(発端者の表現型は TPI 1-Hiroshima 2)²⁰ の

Japan²⁰ and designated TPI Hiroshima 2, the phenotype of the proband being TPI 1-Hiroshima 2.

Materials and Methods

Electrophoresis. Polyacrylamide gel electrophoresis was performed employing a miniaturized vertical gel apparatus²⁴ and the imidazole/HCl (pH 7.4) gel buffer - imidazole/asparagine (pH 7.0) electrophoresis buffer system of Maurer and Allen.²⁵ The isoelectric-focusing apparatus was from LKB Instruments, Inc., Rockville, MD and the focusing was carried out on thin-layer polyacrylamide gels. The pH was determined at 4°C. The technique of Decker and Mohrenweiser²³ was used for detecting enzyme activity following electrophoresis.

Enzyme Purification. TPI from erythrocytes of an individual with a normal electrophoretic pattern for TPI was purified as described by Gracy²⁶ and Yuan et al¹ except for the omission of the isoelectric-focusing step (Table 1). The final specific activity was 9,070 units/mg protein, consistent with specific activities previously reported for purified human TPI.^{1,8,27} Also, only a single band was detected on SDS gel electrophoresis, thus the enzyme was assumed to be homogeneous and was used for antibody production.

二つについて、その精製と、安定性、免疫学的特性、カイネティックス及び電気泳動上の特性について述べる。

材料及び方法

電気泳動. ポリアクリルアミド電気泳動は小型垂直式電気泳動装置²⁴を用い、imidazole/HCl (pH 7.4)をゲル緩衝液、imidazole/asparagine (pH 7.0)を電気泳動緩衝液とする Maurer と Allen²⁵のシステムを用いて行った。等電点電気泳動は Maryland 州 Rockville の LKB 社製の装置を用い薄層ポリアクリルアミドゲル上で行った。pH は 4°C で測定した。電気泳動を行った後酵素活性を検出するには Decker と Mohrenweiser²³の技法を用いた。

酵素の精製. 正常な TPI 電気泳動像を示す1個人の赤血球から Gracy²⁶と Yuan ら¹の方法のうち等電点電気泳動の段階を省略して TPI を精製した(表1)。最終的に得られた比活性は蛋白質 1 mg 当たり 9,070 単位で、精製したヒト TPI について先に報告された値^{1,8,27}と一致していた。また、SDS ゲル電気泳動では1本のバンドのみが検出されたことから、この酵素は均一と考えられ抗体産生に用いた。

TABLE 1 ISOLATION OF NORMAL TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FROM HUMAN ERYTHROCYTES

表1 ヒト赤血球中の正常 triosephosphate isomerase の単離

	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)
Hemolysate	125000	56800	2.1	100
Phosphocellulose filtration	118750	3392	35	95
Ammonium sulfate (55%-90%)	97000	1276	76	77
DEAE-cellulose chromatography (1)	82450	242	340	66
DEAE-cellulose chromatography (2)	73100	16.2	4500	58
Ammonium sulfate (60%-90%)	54800	8.4	6500	44
Sephadex G-100	49000	5.4	9070	39

Individual bands of allozyme were purified from erythrocytes of appropriate individuals (Manchester variant, Hiroshima 2 variant, and normal) by polyacrylamide gel electrophoresis of the enzyme fraction obtained from the first DEAE-cellulose fractionation. The specific

第1回目の DEAE-cellulose 分画で得られた酵素分画についてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、該当する個人 (Manchester 変異型, Hiroshima 2 変異型及び正常型)の赤血球から個々の allozyme の

activity of the partially purified samples before electrophoresis was 800-1,700 units/mg. The gel utilized in the purification was 30 cm × 8 cm × 0.27 cm. A reverse discontinuous concentration gradient of 4% (1 cm), 7% (8 cm), and 5% (21 cm) acrylamide was employed. The buffer system was as described above and electrophoresis was carried out for 26 hours at 350 V at 4°C. Following electrophoresis, the positions of the isozyme bands were identified as described above. The gel section corresponding to the position of the various individual bands of activity in each lane was cut into small pieces and the enzyme was extracted into a buffer composed of 50 mM triethanolamine (TEA), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, and 0.01% 2-mercaptoethanol (pH 7.6). The extracted enzyme was concentrated by dialysis against polyethylene glycol. The concentrated isolated enzyme fractions, with an estimated specific activity of 5,000 units/mg, were stored in liquid N₂ in the presence of 1 mg/ml of bovine serum albumin until used.

Antisera Production. Antisera against human TPI were produced by repeated injection of 0.1 mg of purified normal human TPI in 0.5 ml saline and 0.5 ml Freund's incomplete adjuvant, subcutaneously, into a rooster at 1, 2, and 4 weeks after the initial injection. Two days after the fourth injection, 0.05 mg TPI in saline was injected intravenously and four days later blood was collected, allowed to clot, and the serum was removed. The rooster serum was heated at 60°C for 60 minutes and the denatured protein was removed by centrifugation at 48,000×g for 30 minutes. No TPI activity was detectable in rooster serum after heating. The antisera appeared to be monospecific, because only a single precipitation band was observed on Ouchterlony double diffusion analysis with either purified or unpurified TPI, including crude hemolysate as the source of antigen.

Immunoinactivation. Experiments were conducted by incubating 3.75 units of purified TPI in 90 μl of extraction buffer containing 1 mg/ml bovine serum albumin with 10 μl of antiserum. After 5-hour incubation at 36°C and centrifugation at 48,000×g for 30 minutes, the supernatants were assayed for residual activity.

pH Stability. The stability of the allozymes to incubation at various pH's was examined by incubating 2.5 units of TPI in 100 μl of buffer, 100 mM TEA-HCl or TEA-NaOH, 1 mM EDTA,

バンドを精製した。電気泳動を行う前の部分精製した酵素の比活性は 800~1,700 単位/mg であった。精製に用いたゲルは 30 cm × 8 cm × 0.27 cm のものである。4% (1 cm), 7% (8 cm) 及び 5% (21 cm) の逆非連続濃度勾配アクリルアミドを用いた。前述の緩衝液システムを用い、4°C, 350 V で 26 時間電気泳動を行った。電気泳動後、アインザイムのバンドの位置は前述の方法で検出した。各レーンにおける活性バンドの位置に対応する部分のゲルを細かく切り、50 mM triethanolamine (TEA), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl 及び 0.01% の 2-mercaptoethanol から成る緩衝液 (pH 7.6) 中に酵素を抽出した。抽出した酵素は polyethylene glycol に透析することにより濃縮した。分離・濃縮した酵素 (推定比活性は 5,000 単位/mg) は使用するまで 1 mg/ml のウシ血清 albumin 存在下、液体窒素中に保存した。

抗血清産生. 0.1 mg の精製正常型ヒト TPI を 0.5 ml の生理食塩水に溶かし、この溶液と 0.5 ml の不完全フロインドアジュバントを混合したものを雄ニワトリに皮下注射し、最初の注射後 1, 2, 4 週間後に同じ皮下注射を繰り返し行うことにより、ヒト TPI に対する抗血清を産生した。4 回目の注射から 2 日後に TPI 0.05 mg を含む生理食塩水を静脈内注射し、4 日後に採血し、凝血の後、血清を分離した。この雄ニワトリの血清を 60°C で 60 分間加熱し、変性した蛋白質は 48,000×g で 30 分間遠心して除去した。加熱後の雄ニワトリ血清中には TPI 活性は見られなかった。Ouchterlony 二重拡散法において抗原として精製 TPI を用いた場合、また粗溶液液を含め精製していない TPI を用いた場合にも一本の沈降線しか観察されないことから、この抗血清は TPI に特異的であると考えられる。

抗血清による非活性化. 精製 TPI 3.75 単位をウシ血清 albumin 1 mg/ml 含有の抽出用緩衝液で 90 μl とし、10 μl の抗血清とインキュベーションすることにより実験を行った。36°C で 5 時間インキュベーションした後 48,000×g で 30 分間遠心分離し、上澄液の残存活性を測定した。

pH 安定性. TPI 2.5 単位を 1 mM EDTA と 5% サッカロースを含む 100 mM TEA-HCl 又は TEA-NaOH 緩衝液 100 μl 中で 36°C で 6 時間インキュベーション

and 5% sucrose for six hours at 36°C. After incubation the sample was diluted with 1ml buffer (100mM TEA, 1mM EDTA, and 0.01% 2-mercaptoethanol, pH 7.6) and assayed for activity.

Guanidine-HCl Denaturation. A 25 μ l TPI solution was mixed with an equal volume of 1.8 or 2.2 M guanidine-HCl in 50mM TEA buffer, pH 7.6. After incubation at 30°C for 30 minutes the solution was diluted with 0.5ml of dilution buffer (4°C) and the remaining activity was determined.

Other Methods. Thermostability studies were conducted as described by Satoh and Mohrenweiser²⁸ except that when purified isozyme bands were studied, the thermodenaturation incubation buffer contained 1 mg/ml bovine serum albumin. Urea dissociation-reassociation experiments were conducted following the methodology described by Rubinson et al.²⁹ Enzyme activity was measured as described by Fielek and Mohrenweiser.³⁰ The Km values were determined by the unweighted nonlinear regression method of Wilkinson³¹ using the computer program described by Tiffany et al.³² Substrate was prepared as described by Gracy²⁶ and the concentration of D-glyceraldehyde-3-phosphate was determined enzymatically as described by Bergmeyer.³³

Materials. Ion exchange resins were from Whatman Inc., Clifton, NJ. Ammonium sulfate, urea, and guanidine-HCl were the "Ultra Pure" grade (Schwarz/Mann, Orangeburg, NY) and were used without further purification. Substrates, inhibitors, and cofactors for the enzyme assays were from Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, CA. Bovine serum albumin (Miles Laboratory, Elkhart, IN) was free of detectable TPI activity.³⁴ Rabbit muscle TPI was from Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN. All other chemicals were of analytical reagent grade.

RESULTS

Electrophoresis of TPI Variants

The polyacrylamide gel electrophoresis patterns for the two variants of TPI as well as a normal pattern are shown in Figure 1. The electrophoretic pattern of enzyme from an individual with a phenotype TPI 1-Manchester is in well 2. The TPI Manchester variant allozyme migrates cathodally, relative to the position of the normal

し, 種々の pH における allozyme の安定性を調べた。インキュベーション後検体を緩衝液 1 ml (100mM TEA, 1mM EDTA 及び 0.01% 2-mercaptoethanol, pH 7.6) で希釈し, 活性を測定した。

Guanidine-HCl 変性. 25 μ l の TPI 溶液と等量の 1.8M, あるいは 2.2 M の guanidine-HCl の 50 mM TEA 溶液 (pH 7.6) とを混合した。30°C で 30 分間 インキュベーションした後, 希釈緩衝液 0.5ml (4°C) で希釈し 残存活性を測定した。

その他の方法。熱安定性試験は佐藤と Mohrenweiser²⁸ の方法に従って行ったが, 精製アイソザイムバンドについては, ウシ血清 albumin 1 mg/ml を含む緩衝液を用いて熱変性試験を行った。尿素解離-再会合実験は Rubinson ら²⁹ の方法に従って行った。酵素活性の測定は Fielek と Mohrenweiser³⁰ の方法で行った。Km 値は Tiffany ら³² のコンピュータープログラムを用いて, Wilkinson³¹ の非加重非線形回帰法で求めた。基質は Gracy²⁶ の方法で作製し, D-glyceraldehyde-3-phosphate の濃度は Bergmeyer³³ の方法で酵素法を用いて決定した。

材料. イオン交換樹脂は New Jersey 州 Clifton 市の Whatman 社のものを用いた。硫酸アンモニウム, 尿素及び guanidine-HCl は "Ultra Pure" のもので (New York 州 Orangeburg 市の Schwarz/Mann 社製), それ以上の精製は行わずにそのまま用いた。酵素測定用の基質, 阻害剤及びコファクターは California 州 La Jolla 市の Calbiochem-Behring 社のものを用いた。ウシ血清 albumin (Indiana 州 Elkhart 市の Miles Laboratory 製) は TPI 活性を全く示さないものである。³⁴ ウサギ筋肉 TPI は Indiana 州 Indianapolis 市の Boehringer Mannheim Biochemicals 社のものを用いた。他の薬品はすべて分析用試薬を用いた。

結果

TPI 変異型の電気泳動

図 1 に二つの変異型 TPI 及び正常型のポリアクリルアミドゲル電気泳動像を示した。TPI 1-Manchester の表現型を有する 1 個人の酵素の電気泳動像は試料孔 2 に示した。TPI Manchester 変異型 allozyme は

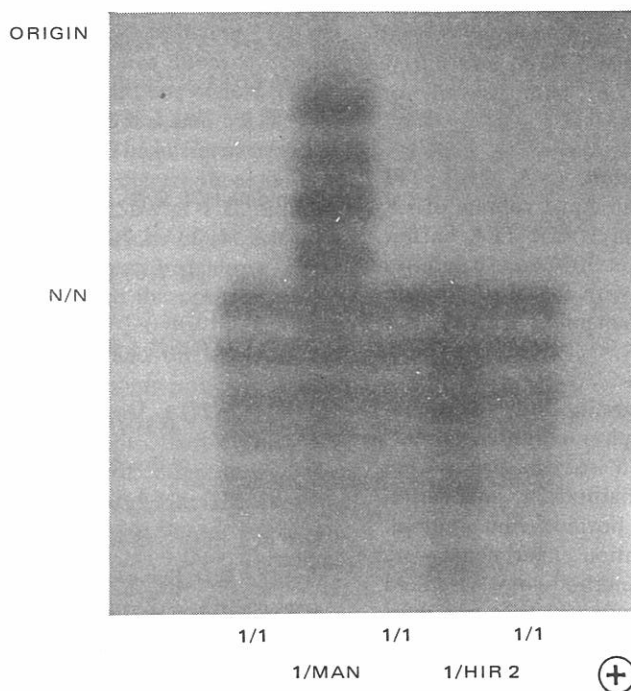


Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of normal and variant TPI. The hemolysates were fractionated on a phosphocellulose column before electrophoresis. The phenotypes are 1) TPI 1 (normal), 2) TPI 1-Manchester, 3) TPI 1, 4) TPI 1-Hiroshima 2, and 5) TPI 1. The gels were stained for TPI activity as described in the text. The position of the primary isozyme band in the normal phenotype is designated N/N.

図1. 正常型及び変異型 TPI のポリアクリルアミドゲル電気泳動像. 電気泳動前に溶血液をホスホセルローズカラムで分画した. 表現型は 1) TPI 1 (正常), 2) TPI 1-Manchester, 3) TPI 1, 4) TPI 1-Hiroshima 2, 5) TPI 1. 本文に述べた方法でゲルを TPI 活性染色した. 正常な表現型のプライマリーアイソザイム・バンドの位置を N/N とした.

allozyme band (wells 1, 3, and 5). The banding pattern is consistent with that expected for a dimeric enzyme with identical subunits. A similar electrophoretic pattern is observed in lymphocytes isolated from this individual²³ except that the degradation bands, presumably resulting from spontaneous deamidation,³⁵ are not as apparent in the electrophoretogram with enzyme from lymphocytes. The electrophoretic mobility is consistent with a charge change of approximately +2 units per subunit for the Manchester variant. The level of TPI activity in erythrocytes from this adult individual was 115,000 μ moles product formed per g Hb per h which is comparable to the value of 124,000 \pm 18,000 μ moles described by Mohrenweiser¹⁸ as expected for an adult population. This variant has been identified in a father and two children.

正常型 allozyme バンド(試料孔 1, 3及び5)の位置と比較して陰極方向に移動する. 電気泳動像は同一サブユニットからなるダイマー酵素に予測されるバンディングパターンを示した. 同様の電気泳動像がこの対象者のリンパ球にも見られるが,²³ リンパ球中の酵素の電気泳動像では, 恐らくは自然脱アミド化によるであろうと思われる³⁵ 分解産物のバンドが明瞭ではない. 電気泳動による移動度は Manchester 変異型の場合サブユニット当たり約+2単位の電荷量の変化に相当する. この成人対象者の赤血球の TPI 活性値は g Hb/h 当たり(産生量)115,000 μ moleであった. これは成人集団の期待値として Mohrenweiser¹⁸ のあげている 124,000 \pm 18,000 に当てはまる. この変異型は父親と2人の子供にも確認されている.

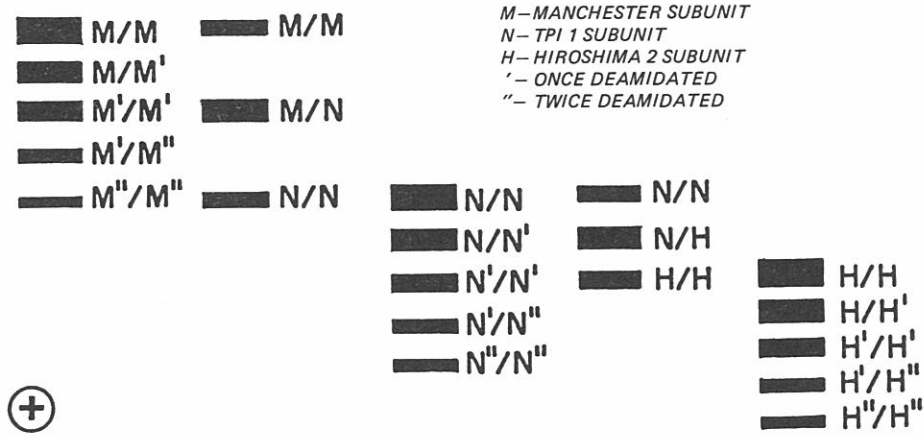


Figure 2. Schematic diagram of TPI allozyme electrophoretic patterns. Lanes 1 and 5 are the postulated patterns for the rare homozygous TPI Manchester and Hiroshima 2 individuals, respectively. Only the primary allozymes are indicated for the two heterozygous probands.

図2. TPI allozyme の電気泳動模式図。レーン1はまれなホモ接合 TPI Manchester の予測像、レーン5は Hiroshima 2 の予測像である。二つのヘテロ接合の発端者の場合は primary allozyme のみを示した。

The pattern for the proband with a phenotype TPI 1-Hiroshima 2 is in lane 4. The TPI Hiroshima 2 variant allozyme has an anodal mobility, the presumptive homodimer having a mobility similar but not identical to the second deamidation band of the normal isozyme or the "c" band of Peters et al,¹⁹ although this distinction cannot be made when starch is utilized as the support, rather than polyacrylamide. It would appear, though, that this variant is not identical to the TPI 2 variant described by Peters et al¹⁹ although direct comparisons were not made. The mobility of this variant is consistent with a net charge change of approximately -1 unit per subunit. The TPI activity in erythrocytes from this adult individual was 138,000 μ moles per g Hb per h, again well within the normal range of activity. The inheritance of this variant has also been confirmed via family studies.

A simplified schematic diagram of the electrophoretic pattern is shown in Figure 2. The patterns in lanes 1 and 5 are those postulated for the rare TPI Manchester and TPI Hiroshima 2 homozygotes, respectively. M, N, and H refer

表現型 TPI 1-Hiroshima 2 の発端者の電気泳動像はレーン4に示した。TPI Hiroshima 2 変異型 allozyme は陽極方向へ移動し、ホモダイマーと推定されるバンドは正常アインザイムの第2脱アミド化バンド、すなわち Peters ら¹⁹ の「c」バンドと同一ではないが類似した移動度を示す。ただし、これはポリアクリルアミドの代わりに澱粉を支持体として用いた場合には区別できない。しかしながら、直接比較は行っていないものの、この変異型は Peters ら¹⁹ の示した TPI 2 変異型と同一ではないようである。この変異型の移動度はサブユニット当たり約-1 単位の総電荷量変化に相当する。この成人対象者の赤血球の TPI 活性値は g Hb/h 当たり 138,000 μ mole で、これも正常活性範囲内であった。この変異型についても遺伝によるものであることが家族調査で確認された。

図2に電気泳動像の簡略化した模式図を示した。レーン1及びレーン5のパターンは各々まれな TPI Manchester 及び TPI Hiroshima 2 のホモ接合体を仮定したものである。M は Manchester サブユニット、

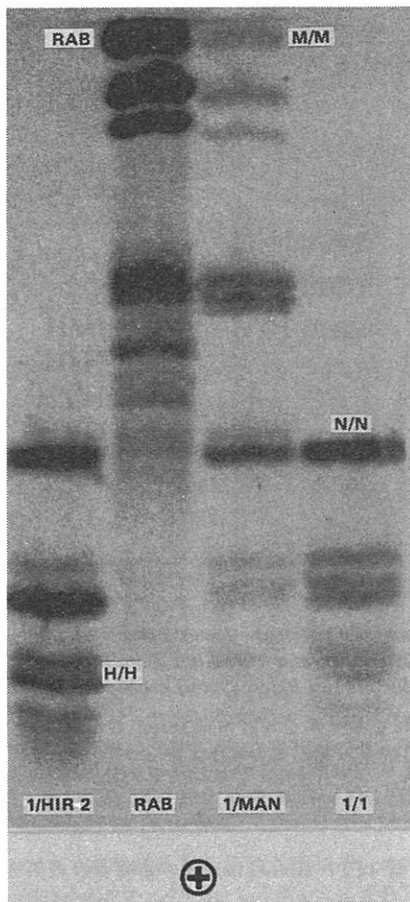


Figure 3. Isoelectric-focusing pattern of TPI variants. The phenotypes are 1) TPI 1-Hiroshima 2, 3) TPI 1-Manchester, and 4) TPI 1. The sample in lane 2 is rabbit muscle TPI. The gels were stained for TPI activity as described in the text. The position of the primary allozymes are designated according to the nomenclature in Figure 2.

図3. TPI 変異体の等電点電気泳動像。表現型は 1) TPI 1-Hiroshima 2, 3) TPI 1-Manchester, 4) TPI 1. レーン 2 の検体はウサギ筋肉 TPI. 本文に述べた方法でゲルを TPI 活性染色した. Primary allozyme の位置は図 2 の名称に従って示した.

to the Manchester, Normal, and Hiroshima 2 subunits, respectively, while M' and M'', N' and N'', and H' and H'' refer to the secondary isozyme bands generated from M, N, or H, presumably via sequential deamidation³⁵ (M' being one and M'' being 2 deamidations per subunit) or possibly some other posttranslational modification. H/N and M/N indicate the heterodimer bands composed of undeamidated normal and variant subunits. For simplicity, only the positions of the primary allozymes have been indicated in the schematic for the TPI 1-Manchester phenotype (lane 2) and the TPI 1-Hiroshima 2 phenotype (lane 4). The activity staining pattern following analytical isoelectric-focusing is consistent with the pattern observed following polyacrylamide gel electrophoresis (Figure 3). The isoelectric points (determined at 4°C) of the normal human and rabbit isozymes were 5.9 and 7.4, respectively. The isoelectric points of the Manchester and Hiroshima 2 variant homodimers were 7.4 and 5.2, respectively.

N は正常サブユニット, H は Hiroshima 2 サブユニットを示し, M' と M'', N' と N'', H' と H'' はそれぞれ M, N, H から恐らくは構成アミノ酸の脱アミド化 (M' はサブユニット当たり一つの脱アミド, M'' は二つの脱アミド)³⁵ 又は他のポストトランスレイショナルな修飾によって生じた二次的アイソザイム・バンドを示す. H/N 及び M/N は脱アミド化されていない正常型サブユニット及び変異型サブユニットからなるヘテロダイマー・バンドである. 簡略化するために, TPI 1-Manchester 表現型 (レーン 2) 及び TPI 1-Hiroshima 2 表現型 (レーン 4) については分解していない元の allozyme の位置のみを図示した. 分析等電点電気泳動後の活性染色像は, ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に見られる像と一致している (図 3). 正常なヒトのアイソザイムの等電点 (4°C で測定) は 5.9, ウサギの等電点は 7.4 であった. また, Manchester 変異型の等電点は 7.4, Hiroshima 2 変異型は 5.2 であった.

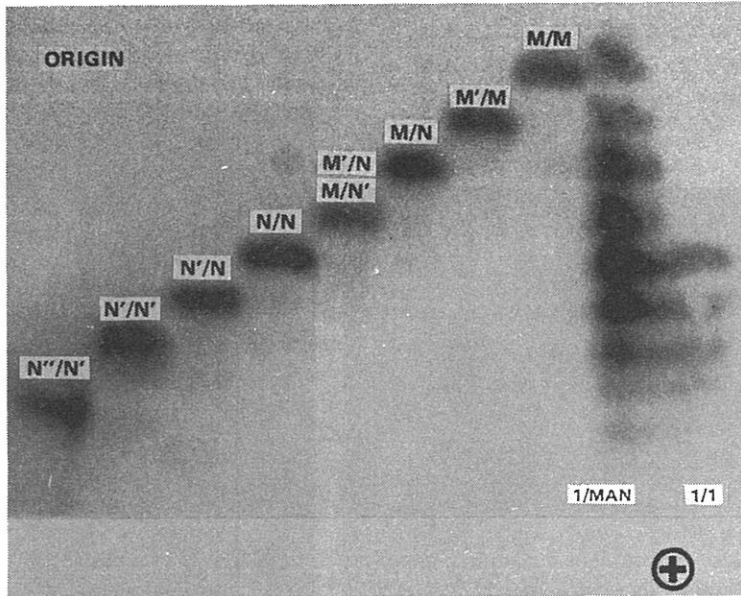


Figure 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of isolated isozyme fractions from TPI-1 and TPI 1-Manchester. The separated isozyme bands were reelectrophoresed after purification. Utilizing the subunit designations from Figure 2, the samples are N''/N', N'/N', N'/N, N/N, M'/N and M/N', M/N, M'/M, M/M, TPI 1-Manchester, and TPI 1. The gels were stained for TPI activity as described in the text.

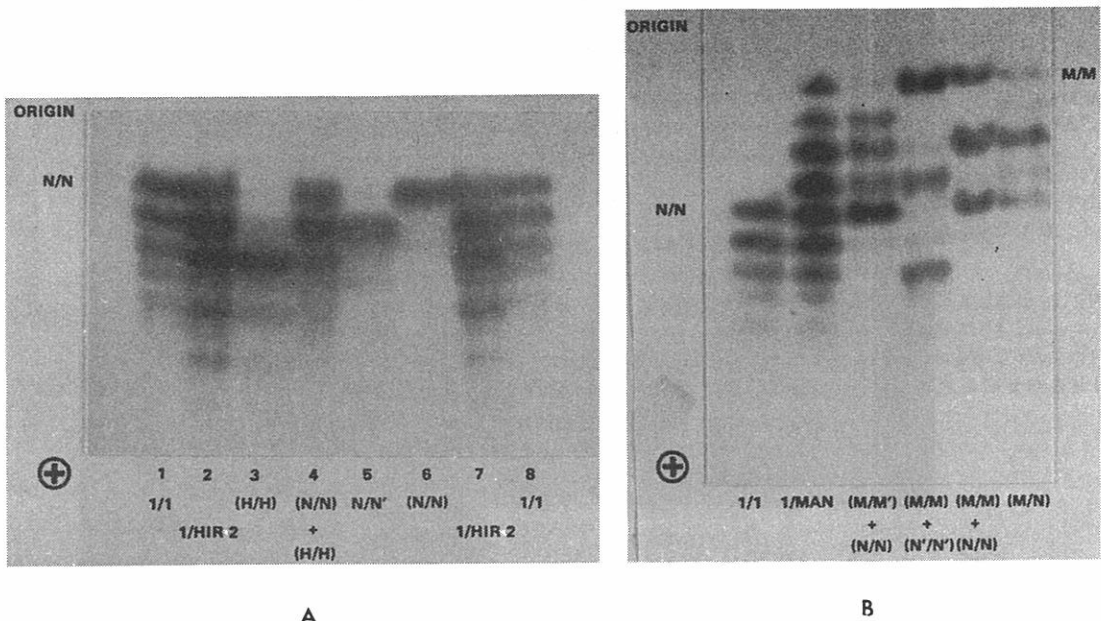
図4. TPI-1 及び TPI 1-Manchester から単離したアイソザイム分画のポリアクリルアミドゲル電気泳動像。分離したアイソザイム・バンドは精製後再度電気泳動を行った。サブユニットの名称は図2のものを使用。検体は N''/N', N'/N', N'/N, N/N, M'/N, M/N', M/N, M'/M, M/M, TPI 1-Manchester, TPI 1. 本文に述べた方法でゲルを TPI 活性染色した。

Studies of Subunit Composition

As seen in Figure 4 the partially purified isolated TPI allozyme fractions exhibited only a single band of enzyme activity upon reelectrophoresis. Similar purity was observed when fractions containing the Hiroshima 2 variant were reelectrophoresed. The purity of various fractions was further examined by dissociating the isolated enzyme to subunits with 8.0M urea and then electrophoresing the reassociated enzyme(s). The normal homodimer allozyme fraction (N/N) yielded only a single band following dissociation and reassociation and thus was presumably composed of a single isozyme with identical subunits (Figure 5, well A6). The multiple banded electrophoretic pattern (Figure 5, well A3) of the reassociated Hiroshima 2 variant suggests that the homodimer variant band (H/H) is contaminated with some deamidated (or otherwise modified) normal subunits. This is not unexpected considering that the electrophoretic

サブユニット構成について

図4から明らかなように、部分精製し単離された TPI allozyme は再電気泳動によって1本の酵素活性バンドしか示さなかった。Hiroshima 2 変異型を含む分画を再度電気泳動した場合も同様の純度が認められた。単離した酵素を8.0Mの尿素でサブユニットに解離した後再会合した酵素を電気泳動して、種々の分画の純度を検討した。正常なホモダイマー allozyme 分画 (N/N) は解離-再会合後1本のバンドしか示さず、恐らく同一サブユニットを有する単一の酵素から構成されているものと思われる(図5, 試料孔 A 6)。再会合した Hiroshima 2 変異型が電気泳動で複数のバンドを示す(図5, 試料孔 A 3)のは、ホモダイマー変異型バンド (H/H) には脱アミド化が起こった(若しくは修飾された)正常型サブユニットが混入していることを示唆している。Hiroshima 2 変異型の電気泳動による移動度が正常酵素の2番目



(): Sample dissociated in 8 M urea and reassociated

試料は濃度8Mの尿素で解離-再会合したもの

Figure 5. Electrophoretic analysis of urea dissociated-reassociated TPI. The samples in A are 1) TPI 1 untreated, 2) TPI 1-Hiroshima 2 untreated, 3) Hiroshima 2 homodimer (H/H band) dissociated and reassociated, 4) normal undeamidated (N/N band) + Hiroshima 2 (H/H band) dissociated and reassociated, 5) normal deamidated (N/N' band) untreated, 6) normal homodimer (N/N band) dissociated and reassociated, 7) TPI 1-Hiroshima 2 untreated, and 8) TPI 1 untreated. The samples in B are 1) TPI 1 untreated, 2) TPI 1-Manchester untreated, 3) Manchester deamidated heterodimer (M/M' band) mixed with normal undeamidated (N/N band) before dissociation and reassociation, 4) Manchester undeamidated homodimer (M/M band) mixed with normal twice deamidated (N'/N' band) before dissociation and reassociation, 5) Manchester undeamidated (M/M band) and normal undeamidated homodimers (N/N band) mixed before dissociated and reassociated, and 6) Heterodimer of TPI Manchester and normal (M/N band) dissociated and reassociated (the Manchester twice deamidated molecule would be a contaminant).

図5. 尿素で解離-再会合したTPIの電気泳動による分析。Aの検体は1)未処理TPI 1, 2)未処理TPI 1-Hiroshima 2, 3)解離-再会合したHiroshima 2ホモダイマー(H/Hバンド), 4)正常型の脱アミド化していない(N/Nバンド)+Hiroshima 2(H/Hバンド)解離-再会合したもの, 5)未処理の正常型脱アミド化(N/N'バンド), 6)正常型ホモダイマー(N/Nバンド)解離-再会合したもの, 7)未処理のTPI 1-Hiroshima 2, 8)未処理TPI 1。Bの検体は1)未処理TPI 1, 2)未処理TPI 1-Manchester, 3)正常型TPI(N/Nバンド)と脱アミド化Manchesterヘテロダイマー(M/M'バンド)とを混合し解離-再会合したもの, 4)2回脱アミド化した正常型TPI(N'/N'バンド)と脱アミド化していないManchesterホモダイマー(M/Mバンド)とを混合し解離-再会合したもの, 5)脱アミド化していないManchesterホモダイマー(M/Mバンド)と脱アミド化していない正常型ホモダイマー(N/Nバンド)とを混合し解離-再会合したもの, 6)解離-再会合を行ったTPI Manchesterと正常型とのヘテロダイマー(M/Nバンド)(Manchester型の2回脱アミド化した分子も混入しているであろう)。

mobility of the Hiroshima 2 variant is very similar to the second deamidation product of the normal enzyme. Additionally, the banding pattern suggests the deamidated subunits are identical rather than nonidentical.

It has been proposed that specific deamidation steps occur, involving first a site on one TPI subunit (e.g., Asn 15) and then a juxtaposed (e.g., Asn 71) site of the other subunit before the second deamidation occurs on the first subunit.³⁵ This hypothesis was examined by mixing the undeamidated Manchester variant (M/M) and the normal allozyme band corresponding to a loss of two amide groups per dimer (N'/N', or N''/N) prior to urea dissociation-reassociation. The 3-banded electrophoretic pattern observed following dissociation and reassociation (Figure 5, well B4) is consistent with the hypothesis of sequential steps of deamidation; that is, both subunits of the dimeric molecule must have identical charge (N'/N'), each presumably having lost a single amide group. A subunit composition of N/N'' would yield a 5-banded pattern. A second experiment involved mixing the singly deamidated Manchester variant (1 deamidation/dimer-M'/M) and undeamidated normal allozyme (N/N). As three types of subunits are involved, a 6-banded pattern should be expected except that M'/M' and M/N have the same electrophoretic mobility. This pattern is seen in Figure 5, well B3 and confirms that the expected banding pattern will be observed. A similar pattern is observed in Figure 5, well B6, when the M/N heterodimer, which comigrates with the M'/M' homodimer is dissociated and reassociated; again this pattern is consistent with reassociation of three types of subunits. More important, the position of the bands is consistent with the existence of M' subunits while there is no indication of M'' subunits. Thus, the results of these experiments are consistent with the mechanism proposed by Gracy and Yuan³⁵ and indicate the subunit composition of the allozymes suggested in Figure 2 is correct.

Stability

Thermodenaturation studies were conducted at 55°C and 57°C. The Manchester variant is significantly more thermolabile at both temperatures (Figure 6), retaining approximately 20 percentage points less activity after incubation at 55°C for 20 or 30 minutes and at 57°C for 20 minutes than any of the other samples. The $t_{1/2}$ at 55°C and 57°C for the Manchester variant

の脱アミド化産生物と非常に類似していることを考えると、これは意外なことではない。更に、電気泳動像のパターンは脱アミド化が起こったサブユニットが非同一というよりは同一であることを示唆している。

特異的な脱アミド化は、まず一つの TPI サブユニットのある部位 (例えば Asn 15) に起こり、次に第 2 の脱アミド化が同じサブユニットに起こる前に他のサブユニットの隣接部位 (例えば Asn 71) に起こるとされてきた。³⁵ この仮説について、脱アミド化していない Manchester 変異型 (M/M) と、正常型 allozyme のダイマー当たり二つのアミド基の欠損に対応するバンド (N'/N' あるいは N''/N) を尿素解離-再会合の前に混合して検討を行った。解離-再会合後に見られる 3 本のバンドを示す電気泳動像 (図 5, 試料孔 B 4) は、ダイマー分子のサブユニットがいずれも同じ荷電量を持ち (N'/N'), それぞれが恐らく一つのアミド基を欠損しているという段階的脱アミド化仮説と一致する。N/N'' のサブユニット構成は、5 本のバンドを示すであろう。第 2 の実験では単一脱アミド化 Manchester 変異型 (1 脱アミド化/ダイマー-M'/M) と脱アミド化していない正常型 allozyme (N/N) を混合した。3 種類のサブユニットがあるので、6 本のバンドをもつ電気泳動像が予測されるが、M'/M' と M/N の電気泳動上の移動度は等しい。この泳動像は図 5 の試料孔 B 3 に見られ、予測されたバンド様式が見られることを確認している。M'/M' ホモダイマーと移動度の等しい M/N ヘテロダイマーを解離-再会合すると、よく似た泳動像が図 5 の試料孔 B 6 に見られる。この泳動像も 3 種のサブユニットの再会合に一致している。更に重要なことは、バンドの位置がサブユニット M' の存在と一致しているが、サブユニット M'' についてはその存在が示されていないということである。したがって、これらの実験結果は Gracy と Yuan³⁵ の提唱した機序と一致しており、図 2 で示唆される allozyme のサブユニット構成が正しいことを示している。

安定性

熱変性実験は 55°C と 57°C で行った。どちらの温度においても Manchester 変異型は明らかにより熱不安定であり (図 6)、55°C で 20 分あるいは 30 分、57°C で 20 分インキュベーションした後の活性は他のどの検体と比較しても約 20% 低い活性を示した。Manchester 変異型の 55°C 及び 57°C における $t_{1/2}$ はそれぞれ 16 分、

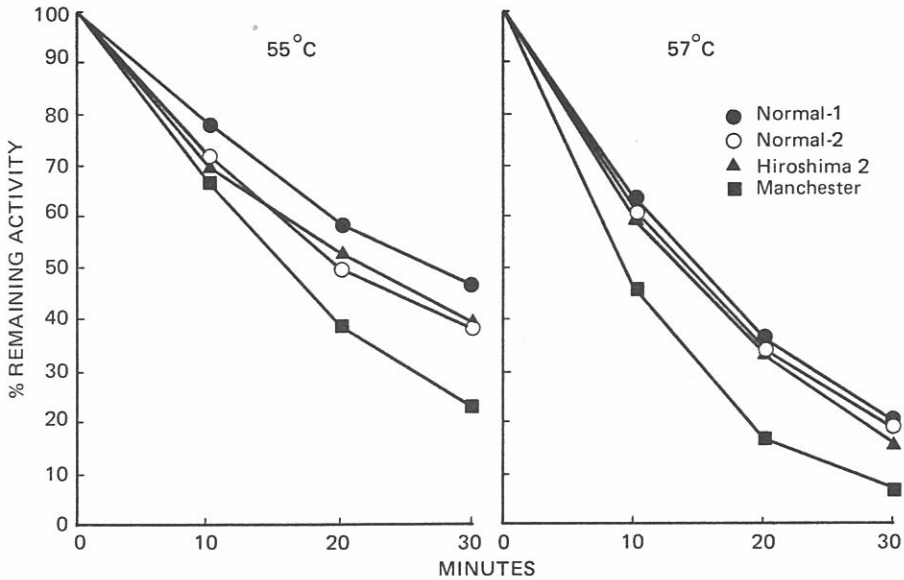


Figure 6. Percent remaining TPI activity after heating for various times at 55°C and 57°C. Incubations and assays were as described in the text.

図6. 55°C (左) 及び 57°C (右) で各々の時間加熱した後の TPI の残存活性 (%). インキュベーション及び測定は本文に記述したとおり.

was 16 and 9 minutes while it was 26 and 15 minutes, respectively, for the normal samples. The Manchester variant was also more labile when the studies were conducted with the crude hemolysate fraction or the enzyme preparation following the phosphocellulose fractionation step. In both later experiments, the unseparated allozymes, normal plus variant, are being studied together, thus, the differences are only 6-8 percentage points rather than 20 percentage point differences observed with purified allozymes. This smaller difference is as expected, if the lability is a characteristic of the lability of the variant subunits.

No differences among the allozymes in stability to guanidine-HCl denaturation were evident. All samples retained approximately 70% and 40% activity after being incubated at 30°C for 30 minutes in the presence of 0.9 M or 1.1 M guanidine-HCl.

The stability of the normal allozyme to incubation for six hours at 36°C at various pH's ranging

9分であり、正常検体では26分、15分であった。粗溶血液分画あるいはphosphocellulose分画の酵素を用いて実験を行っても、Manchester変異型はより不安定であった。後の実験では分離していないallozyme, すなわち正常型と変異型を合わせたものについて調べたので、分離精製されたallozymeを用いた場合の差20%に比べ、差はわずか6%~8%であった。この不安定性が変異型サブユニットの特性の一つであるとするならば、この差の少なさは予測されるものである。

guanidine-HCl変性に対する安定性ではallozymeによる差は見られなかった。すべての検体が0.9M若しくは1.1Mのguanidine-HCl中で30°Cで30分間インキュベーションした後、約70%及び40%の残存活性を示した。

2.0から11.0までの種々のpHで36°Cで6時間インキュベーションした場合の正常型allozymeの安定性を

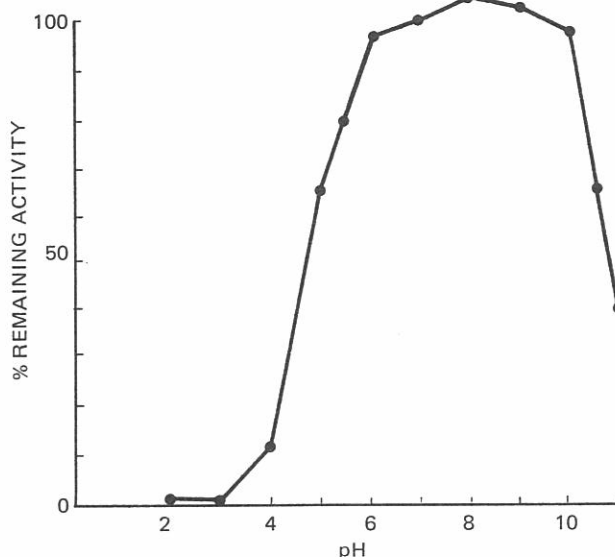


Figure 7. Percent remaining TPI activity after incubation of the normal allozyme at various pH's for six hours.

図7. 正常型 Allozyme を色々な pH で 6 時間インキュベーションした後の TPI 残存活性 (%)。

from 2.0-11.0 was studied (Figure 7). The normal allozyme retained approximately 40% of the initial activity at pH 4.5 and 11.0 and 90%-100% of initial activity was retained when the allozyme was incubated at a pH between 6.0 and 10.0. Both of the variant allozymes had the same pH stability characteristics as the normal allozymes.

Kinetic Studies

The normal isozyme has a K_m for D-glyceraldehyde-3-phosphate of 0.415 ± 0.012 mM while the K_m values for the Manchester and Hiroshima 2 variants were 0.403 mM and 0.415 mM, respectively, not significantly different from the normal allozyme.

The effects of structurally dissimilar inhibitors of TPI (α glycerophosphate, inorganic phosphate, 2-phosphoenolpyruvate and fructose-1,6-diphosphate) were studied, in each case with D-glyceraldehyde-3-phosphate (0.42 mM) as substrate (Table 2). The inhibitor concentrations

調べた (図7). 正常型 allozyme は pH 4.5 及び 11.0 で最初の活性の約 40% の残存活性を示し, pH 6.0 から 10.0 の範囲でインキュベーションすると最初の活性の 90% ~ 100% の残存活性を示した. 変異型 allozyme はいずれも正常型 allozyme と同様の pH 安定性を有していた.

カイネティックスについて

正常型アインザイムの D-glyceraldehyde-3-phosphate に対する K_m 値は 0.415 ± 0.012 mM であるが, Manchester 変異型は 0.403 mM, Hiroshima 2 変異型は 0.415 mM で, 正常型 allozyme と有意差はなかった.

TPI に対する構造的に異なる阻害剤 (α glycerophosphate, 無機リン酸, 2-phosphoenolpyruvate 及び fructose-1,6-diphosphate) の影響を, D-glyceraldehyde-3-phosphate (0.42 mM) を基質として調べた (表2). 正常型 allozyme 活性の約 30% 及び

TABLE 2 EFFECT OF VARIOUS INHIBITORS ON THE ACTIVITY OF NORMAL TPI ISOLATED FROM HUMAN ERYTHROCYTES

表2 種々の阻害剤がヒト赤血球から単離した正常型 TPI の活性に及ぼす影響

Inhibitor		% remaining activity
α glycerophosphate	1.12 mM	67±0.5
	4.93 mM	26±0.4
Inorganic phosphate	1.73 mM	80±1.0
	5.21 mM	57±1.2
2-phosphoenolpyruvate	0.09 mM	83±0.6
	0.45 mM	45±1.2
Fructose-1, 6-diphosphate	7 mM	72±1.5
	35 mM	35±0.4

Assays were conducted as described in the text except that the D-glyceraldehyde-3-phosphate concentration was 0.42 mM. The inhibitor concentration refers to the final concentration present in the assay. 100% activity was the level of activity determined in the absence of added inhibitor.

測定法は本文中に記述したとおりである。ただし、D-glyceraldehyde-3-phosphate 濃度は 0.42 mM である。阻害剤の濃度は反応液中の最終濃度である。阻害剤の添加されていないときの活性値を活性100%とする。

were selected in order to inhibit approximately 30% and 70% of the activity of the normal allozyme, respectively.³⁶ Neither variant was more or less sensitive to inhibition than was the normal allozyme fraction. Preincubation of the enzyme with the inhibitor changed the extent of inhibition but again no allozyme specificity was observed.

Immunological Studies

Immunoinactivation studies to detect differences in sequence and/or conformation were conducted using antisera produced in roosters against normal human TPI. As seen in Figure 8, the Hiroshima 2 variant is less inhibited by equivalent quantities of antisera than were the other two allozymes. The Hiroshima 2 variant is associated with normal levels of enzyme activity in the original hemolysate, and has normal kinetic parameters, and the specific activity at each of the steps during purification was similar to both the normal and Manchester enzymes; thus, it is suggested that the difference in inactivation between the Hiroshima 2 variant and the other allozymes reflects differences in the avidity of the antibody-enzyme complex, although the possibility that the Hiroshima 2 variant has a lower specific activity cannot be conclusively excluded.

70%を阻害するように阻害剤の濃度を選定した。³⁶ 両変異体とも正常型 allozyme 分画に比べ阻害の程度に差は見られなかった。酵素を阻害剤とブレインキューベーションすると阻害の程度は変化した、やはり allozyme の特異性については何も認められなかった。

免疫学的考察

一次構造若しくは高次構造の差を探知するために、正常なヒト TPI に対して雄ニワトリに産生された抗血清を用いて免疫非活性化実験を行った。図8に見られるように、Hiroshima 2 変異型は他の二つの allozyme と比較して、同量の抗血清では、非活性化が少ない。Hiroshima 2 変異型は元の溶血液中の酵素活性は正常範囲であり、正常なカイネティック・パラメーターを示している。また、精製の各過程での比活性は正常酵素及び Manchester 酵素に類似していた。したがって、Hiroshima 2 変異型の比活性が低いという可能性を完全に除外できないとしても、Hiroshima 2 変異型と他の allozyme との非活性化の差は、抗体-酵素複合体の結合性の差を反映しているものと示唆される。

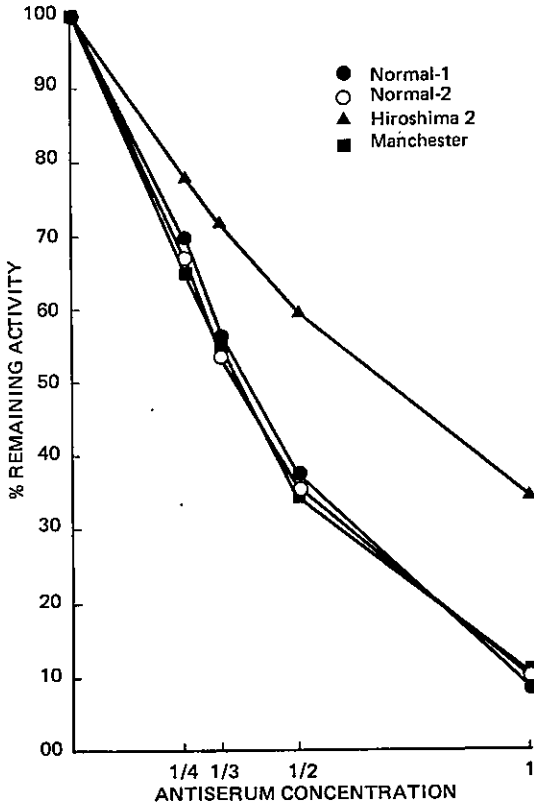


Figure 8. Percent remaining TPI activity after incubation of the partially purified allozyme with human TPI antiserum. Incubation and assays were as described in the text.

図8. 部分精製した allozyme をヒト TPI 抗血清をインキュベーションした後の TPI の残存活性(%). インキュベーション及び測定は本文に記述したとおり。

DISCUSSION

Extensive studies of the structure and kinetic properties of TPI from a wide variety of sources have been published. Insights into the important structural constraints on the catalytic mechanism have come from sequence comparisons of the enzyme from different sources,³⁷ while only limited characterization of genetic variants has been reported by Peters et al.¹⁹

The two variants described here, TPI Manchester and TPI Hiroshima 2, are unique electrophoretic variants associated with normal levels of enzyme activity in the hemolysates of the affected individuals. Each variant has a K_m for D-glyceraldehyde-3-phosphate which is similar to the K_m obtained for electrophoretically normal enzyme. Also the sensitivity to inhibition by four different inhibitors was similar to that observed for the normal enzyme. It seems unlikely that either amino acid substitution significantly alters the conformation of the active site.

考 察

多種類の材料から得られた TPI の構造及びカイネティックスに関する広範な研究が報告されている。異なる材料から得られた酵素のアミノ酸一次構造の比較によって構造が触媒機序に及ぼす束縛度に関する重要な所見が得られているが、³⁷ 遺伝的変異型の特性については Peters ら¹⁹ による限られた報告しかない。

本報で述べた二つの変異型, TPI Manchester 及び TPI Hiroshima 2 は非常にまれな電気泳動の変異型であり, 被検出者の溶血液中では正常な酵素活性値を示す。各変異型の D-glyceraldehyde-3-phosphate に対する K_m 値は電気泳動上正常な酵素の K_m 値と等しい。また, 四種の異なる阻害剤に対する鋭敏さも正常型酵素と等しかった。アミノ酸置換が活性部位の高次構造を大きく変えることはないように思われる。

The unique characteristic of the Manchester variant, in addition to an electrophoretic mobility consistent with net charge change of +2 units per subunit, is the thermolability of the enzyme. This conformational alteration associated with increased thermolability is not reflected in an increased sensitivity to guanidine hydrochloride denaturation or inactivation by incubation at either acid or basic pH. The thermolability does not appear to be associated with *in vivo* lability in that the affected individuals have normal levels of enzyme activity.

The unique antigenic character of the Hiroshima 2 variant indicates that this amino acid substitution or deletion either may be on the surface of the molecule or causes a conformational change in the region of the antibody-binding site(s). As with the Manchester variant, this structural change does not affect the active site region of the enzyme, at least to the extent that it alters the kinetic properties of the molecule.

Labile asparagine residues have been identified at positions 15 and 71 of the rabbit isozyme³⁸ and crystallographic data suggest that residue 15 of one subunit is located proximal to residue 71 of the other subunit.³⁷ It has also been reported by Gracy and Yuan³⁵ that loss of one amide group increases the lability of the juxtaposed amide group in the human isozyme. Dissociation-reassociation experiments involving various combinations of normal and variant subunits are consistent with this sequential deamidation hypothesis. The sequence of the enzyme from the human has recently been determined and found to be very similar to that observed in other species.¹⁰ Accordingly, it should be possible to relate the characteristics of genetic variants to specific structural alterations. Identification of the change in primary sequence of the variant enzymes should provide additional data regarding the apparently severe conformation constraints on the catalytic and subunit interaction sites of an enzyme, which could be associated with its slow rate of evolution. It is possible that these constraints are also related to the existence of null alleles in unexpected high frequency.

電気泳動上の移動度がサブユニット当たり+2単位の総電荷量の変化に一致するという点のほかに、酵素が熱不安定であることも Manchester 変異型の独特の特性である。熱不安定性の増加を伴う高次構造の変化はグアニジン塩酸による変性や、酸性pH若しくは塩基性pHでのインキュベーションによる不活性化の度合いには反映されていない。被検出者に正常な酵素活性値が認められることから、この熱不安定性は生体内の不安定性とは関連していないようである。

Hiroshima 2 変異型のまれな抗原特異性は、この変異体に起きたアミノ酸置換あるいはアミノ酸欠失というものが分子の表面上で起こっているか、あるいは抗体結合部位に高次構造の変化を引き起こしているのかもしれないということを示している。Manchester 変異型と同様に、この構造変化は少なくとも分子のカイネティクス変化を引き起こす程の影響を酵素の活性部位に与えてはいない。

不安定な asparagine 残基がウサギアイソザイムの15番及び71番の位置で確認されており、³⁸ 結晶解析学資料から、一方のサブユニットの15番目の残基が他方のサブユニットの71番目の残基の近くに位置していることが示唆される。³⁷ また、Gracy と Yuan³⁵ は、ヒト TPI 酵素では一つのアミド基の欠損が隣接するアミド基の不安定性を増加させることを報告している。正常サブユニットと変異型サブユニットの種々の組み合わせによる解離-再会合実験の結果は、一次構造上の脱アミド化仮説と一致している。ヒト TPI の一次構造が最近確認され、他の生物由来の TPI の一次構造と非常に類似していることが分かった。¹⁰ これに伴い、遺伝学的変異物の特質と特定の構造変化とを関係付けることができるであろう。変異型酵素の一次構造の変化を確認すれば、進化速度の遅さと関連しているかもしれない酵素の触媒部位と、サブユニット相互作用部位に関する立体構造上の厳密な束縛度についての資料が更に得られるであろう。また、これらの束縛度は意外に高い頻度の null 対立遺伝子の存在と関連していることも考えられる。

REFERENCES

参考文献

1. YUAN PM, DEWAN RN, ZAUN M, THOMPSON RE, GRACY RW: Isolation and characterization of triosephosphate isomerase isozymes from human placenta. *Arch Biochem Biophys* 198:42, 1979
2. SCOPES RK: Methods for starch gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. *Biochem J* 197:139, 1968
3. GRACY RW: Nature of the multiple forms of glucosephosphate and triosephosphate isomerase. In *Isozymes. I. Molecular Structure*. Ed by C. L. Markert, New York, Academic Press, 1974, p 471
4. SNAPKA RM, SAWYER TH, BARTON RA, GRACY RW: Comparison of electrophoretic properties of triosephosphate isomerase of various tissues and species. *Comp Biochem Biophys (B)* 49:733, 1974
5. KRIETSCH WKG, PENTCHEV PG, KLINGENBÜRG H, HOFSTÄTTER T, BÜCHER T: The isolation and crystallization of yeast and rabbit liver triosephosphate isomerase and a comparative characterization with the rabbit muscle enzyme. *Eur J Biochem* 14:289, 1970
6. PUTMAN SJ, COULSON AFW, FARLEY IRT, RIDDLESTON B, KNOWLES JR: Specificity and kinetics of triosephosphate isomerase from chicken muscle. *Biochem J* 129:301, 1972
7. SAWYER TH, TILLEY BE, GRACY RW: Studies on human triosephosphate isomerase. II. Nature of the electrophoretic multiplicity in erythrocytes. *J Biol Chem* 247:6499, 1972
8. EBER SW, KRIETSCH WKG: The isolation and characterization of the multiple forms of human skeletal muscle triosephosphate isomerase. *Biochem Biophys Acta* 614:173-84, 1980
9. DAYHOFF MO: Survey of new data and computer methods of analysis. In *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Vol. 5. Ed by M. O. Dayhoff. Silver Spring, Md., National Biomedical Research Foundation, 1978. p3
10. YUAN PM, TALENT JM, GRACY RW: Elucidation of the sequence of human triosephosphate isomerase by homology peptide mapping. *Biochem Biophys Acta* (in press)
11. HARTMAN FC, GRACY RW: An active-site peptide from human triosephosphate isomerase. *Biochem Biophys Res Comm* 52:388, 1973
12. SCHNEIDER AS, DUNN I, IBSEN KH, WEINSTEIN IW: Triosephosphate isomerase deficiency. Inherited triosephosphate deficiency. Erythrocyte carbohydrate metabolism and preliminary studies of the erythrocyte enzyme. In *Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism*, City of Hope Symposium Series, Vol. 1. Ed by E. Beutler. New York, Grune and Stratton, 1968. p273
13. SCHNEIDER AS, VALENTINE WN, HATTORI M, HEINS HL: Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. *N Engl J Med* 272:229, 1965
14. SKALA H, DREYFUS JC, VIVES-CORRONS JL, MATSUMOTO F, BEUTLER E: Triosephosphate isomerase deficiency. *Biochem Med* 18:226, 1977
15. VIVES-CORRONS JL, ROBINSON-SKALA H, MATEO M, ESTELLA J, FELIU E, DREYFUS JC: Triosephosphate isomerase deficiency with hemolytic anemia and severe neuromuscular disease. Familial and biochemical studies of a case found in Spain. *Hum Genet* 42:171, 1978
16. EBER SW, DÜNNWALD M, BELOHRADSKY BH, BIDLINGMAIER F, SCHIEVELBEIN H, WEINMANN HM, KRIETSCH WKG: Hereditary deficiency of triosephosphate isomerase in four unrelated families. *Eur J Clin Invest* 9:195-202, 1979

17. EBER SW, BELOHRADSKY BH, KRIETSCH WKG: A case for triosephosphate isomerase testing in congenital non-spherocytic hemolytic anemia. *J Pediat* (in press)
18. MOHRENWEISER HW: Frequency of enzyme deficiency variants in erythrocytes of newborn infants. *Proc Natl Acad Sci* (in press)
19. PETERS J, HOPKINSON DA, HARRIS H: Genetic and non-genetic variation of triosephosphate isomerase isozymes in human tissues. *Ann Hum Genet* 36:297, 1973
20. NEEL JV, SATOH C, HAMILTON HB, OTAKE M, GORIKI K, KAGEOKA T, FUJITA M, NERIISHI S, ASAKAWA J: Search for mutations affecting protein structure in children of atomic bomb survivors: Preliminary report. *Proc Natl Acad Sci* 77:4221-5, 1980 (RERF TR 5-80)
21. NEEL JV, MOHRENWEISER HW, MEISLER MM: Rate of spontaneous mutation at human loci encoding protein structure. *Proc Natl Acad Sci* 77:6037-41, 1980
22. NEEL JV: Rare variants, private polymorphisms, and locus heterozygosity in Amerindian populations. *Am J Hum Genet* 30:465, 1978
23. DECKER RS, MOHRENWEISER HW: Origin of the triosephosphate isomerase isozymes in human: Genetic evidence for the expression of a single structural locus. *Am J Hum Genet* (in press)
24. OGITA Z, MARKERT CL: A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 99:233, 1979
25. MAURER HR, ALLEN RC: Useful buffer and gel systems for polyacrylamide gel electrophoresis. *Z Klin Chem Klin Biochem* 10:220, 1972
26. GRACY RW: Triosephosphate isomerase from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 41:442, 1975
27. ROZACKY EE, SAWYER TH, BARTON RA, GRACY RW: Studies on human triosephosphate isomerase. I. Isolation and properties of the enzyme from erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 146:312, 1971
28. SATOH C, MOHRENWEISER HW: Genetic heterogeneity within an electrophoretic phenotype of phosphoglucose isomerase in a Japanese population. *Ann Hum Genet* 42:283-92, 1979 (RERF TR 2-78)
29. RUBINSON H, MEIENHOFER MC, DREYFUS JC: A new isozymes of triosephosphate isomerase specific to Hominoids. *J Mol Evol* 2:243, 1973
30. FIELEK S, MOHRENWEISER HW: Erythrocyte enzyme deficiencies assessed with a miniature centrifugal analyzer. *Clin Chem* 25:384, 1979
31. WILKINSON GN: Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem J* 80:324, 1961
32. TIFFANY TO, CHILCOTE DD, BURTIS CA: Evaluation of kinetic enzyme parameters by use of a small computer interfaced 'Fast Analyzer' -- an addition to automated clinical enzymology. *Clin Chem* 19:908, 1973
33. BERGMAYER HU: In *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed by H. U. Bergmeyer. New York, Academic Press, 1974. p1314
34. PORTER DW, HARRIS BG, GRACY RW: Removal of triosephosphate isomerase from albumins. *Prep Biochem* 3:149, 1973

35. GRACY RW, YUAN PM: Spontaneous deamidation of two asparagines within the subunit contact sites of human triosephosphate isomerase. *Fed Proc* 39:1960, 1980
36. BURTON PM, WALEY SG: Kinetics of triosephosphate isomerase. *Biochem Biophys Acta* 151:714, 1968
37. BANNER DW, BLOOMER AC, PETSKO GA, PHILLIPS DC, POGSON CI, WILSON IA, CORRAN PH, FURTH AJ, MILMAN JD, OFFORD RE, PRIDDLE JD, WALEY SG: Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5Å^o resolution using amino acid sequence data. *Nature* 255:609, 1975
38. CORRAN PH, WALEY SG: The tryptic peptides of rabbit muscle triosephosphate isomerase. *Biochem J* 139:1, 1974