

**A PHYLOGENY FOR THE PRINCIPAL
ALLELES OF THE HUMAN PHOSPHOGLUCOMUTASE-1 LOCUS**

ヒト phosphoglucomutase-1 座の主要対立遺伝子の系統樹

NORIO TAKAHASHI, Ph.D. 高橋規郎
JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.
CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子
JUNKO NISHIZAKI, B.S. Phar. 西崎淳子
NAOMI MASUNARI, B.S. Phar. 増成直美



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

The participation of Dr. James V. Neel was supported by US Department of Energy
Contract ACO-2-76-EV02828.

James V. Neel 博士は米国エネルギー省契約ACO-2-76-EV02828による援助によって本研究
に参加された。

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

本報に基づく論文は下記の雑誌に発表された：
Proc Natl Acad Sci USA 79:6636-40, 1982

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 not 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。

A PHYLOGENY FOR THE PRINCIPAL
ALLELES OF THE HUMAN PHOSPHOGLUCOMUTASE-1 LOCUS

ヒト phosphoglucomutase-1 座の主要対立遺伝子の系統樹

NORIO TAKAHASHI, Ph.D. (高橋規郎); JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.*;
CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子); JUNKO NISHIZAKI, B.S. Phar. (西崎淳子);
NAOMI MASUNARI, B.S. Phar. (増成直美)

Department of Clinical Laboratories

臨床検査部

SUMMARY

The results of phosphoglucomutase-1 (PGM₁) typings by starch gel electrophoresis and subtypings by isoelectric focusing are presented for a sample of Japanese. A distinction made on the basis of isoelectric focusing (termed “+” and “-”) is nonrandomly associated with each of the products of the four most common electrophoretic alleles (PGM₁¹, PGM₁², PGM₁³, and PGM₁⁷). The isoelectric trait cosegregates with the allele; the degree of nonrandomness of the association varies from allele to allele. Thus, the four alleles become eight. On the basis of these facts plus the additive nature of the pI differences between allele products and the geographical distribution of the alleles, an allele phylogeny can be constructed. This postulates that the eight alleles may be explained by three nucleotide substitutions involving the stem allele plus four intragenic recombinations between these substitutions. The potential of intragenic recombination as a cause of mutation has been insufficiently appreciated.

INTRODUCTION

Some six years ago, Bark et al¹ and Kühnl et al² reported that in Caucasoid populations the phenotypes associated with the two common electrophoretic alleles of phosphoglucomutase-1 (PGM₁¹ and PGM₁²) could be subdivided by

要約

日本人集団について、澱粉ゲル電気泳動法によって行った phosphoglucomutase-1 (PGM₁) のタイピングと等電点電気泳動法によるサブタイピングの結果を報告した。等電点電気泳動法に基づいて区別されたサブタイプ(“+”と“-”で表した)と、4種類の最もよく知られている電気泳動で区別される対立遺伝子 (PGM₁¹, PGM₁², PGM₁³及び PGM₁⁷) の産物である各酵素蛋白質には一定の関係があり、ランダムなものではない。等電点電気泳動法で分類される形質は対立遺伝子と結合して分離し、結合における非ランダム性の程度は対立遺伝子ごとに異なっている。かくして、4種の対立遺伝子は8種になった。これらの事実と、これら8種の対立遺伝子の産物の示す等電点の差の相加性と、これらの対立遺伝子の地理的分布とから、対立遺伝子の系統樹を作ることができる。この系統樹によると、8種の対立遺伝子は幹対立遺伝子に生じた3個のヌクレオチド置換と、これら置換によって生まれた遺伝子間における4種の遺伝子内リコンビネーションによって説明され得る。突然変異の原因となり得る遺伝子内リコンビネーションの重要性については、これまで十分に評価されていない。

緒言

約6年前、Barkら¹及びKühnlら²は白人集団においては、phosphoglucomutase-1の電気泳動で区別される2種のありふれた対立遺伝子 (PGM₁¹及び

*Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School

Michigan 大学医学部人類遺伝学教室

isoelectric focusing with thin-layer polyacrylamide gel as the supporting medium into two phenotypes, one migrating more cathodically than the other. These phenotypes were termed “+” and “-”. From the manner in which this property cosegregated with the two original phenotypes, it was intrinsic to the PGM_1 locus. Thus, they postulated four alleles, subsequently termed PGM_1^{1+} , PGM_1^{1-} , PGM_1^{2+} , and PGM_1^{2-} . Their data indicated that these two properties of the PGM_1 alleles (1 vs 2 and + vs -) were not associated at random.

In the present communication, we will confirm this finding for a Japanese population, but then extend this isoelectric subdivision to the products of two rarer alleles encountered in the Asia-Pacific area, PGM_1^3 and PGM_1^7 . Each of these latter alleles can also be subclassified as + or -, and again, these properties, although cosegregating, are not associated at random with reference to the electromorphs under study. This nonrandom association, taken in conjunction with the isoelectric focusing data, will be shown to permit the construction of a gene phylogeny for the eight alleles that must be postulated. In this phylogeny, presumed intragenic recombination events play a role equal to that of presumed nucleotide substitutions.

MATERIALS AND METHODS

Sample

The blood samples on which the PGM_1 typings were performed were obtained from individuals included in a study of the potential genetic effects of the atomic bombs being conducted in Hiroshima and Nagasaki,^{3,4} and from individuals in a preceding pilot study.⁵ Because no putative mutations involving the PGM_1 locus have as yet been encountered in this study, the samples have been analyzed without reference to the radiation histories of the parents of the individuals in question. Samples examined by isoelectric focusing had been kept in liquid nitrogen since aliquots of them had been typed by starch gel electrophoresis. The 184 samples whose phenotype was PGM_1 1-7 were drawn from both of the previously referenced studies.

Because of ambiguities in subtyping the PGM_1 7 electromorph when it occurs in combination with the PGM_1 2 electromorph, we present only the results of subtyping individuals with geno-

PGM_1^2)と一定の関係がある表現型は、支持体として薄層ポリアクリルアミドゲルを用いた等電点電気泳動法によって、更に2通りに分類されると報告した。その一方は他方より、より陰極側に移動する。これらの表現型は“+”と“-”で表された。この特性が本来の2種の表現型と結合して分離することから、これは PGM_1 の遺伝子座に固有であると考えられた。そこで彼らは4種の対立遺伝子を仮定し、 PGM_1^{1+} 、 PGM_1^{1-} 、 PGM_1^{2+} 及び PGM_1^{2-} と命名した。彼らのデータは、 PGM_1 対立遺伝子のこれら二つの特性(1対2、及び+対-)の関係はランダムなものではないことを示している。

本研究ではこの結果を日本人集団で確認し、この等電点電気泳動法によるサブタイピングを、アジア太平洋地域で発見された2種の比較的まれな対立遺伝子 PGM_1^3 及び PGM_1^7 の産物にまで拡大した。これらの対立遺伝子もそれぞれ+又は-に更に細かく分類され、この場合もまた、これらの特性は結合して分離するものの、それぞれの電気泳動表現型に対してランダムな関係を示すことはない。この非ランダム性の関係を、等電点電気泳動法のデータと合わせて示し、仮説ではあるが8種の対立遺伝子の遺伝子系統樹の確立を試みる。この系統樹においては、仮定された遺伝子内リコンビネーションは、ヌクレオチド置換に匹敵する役割を果たしている。

材料及び方法

検体

PGM_1 のタイピングを行った血液は、広島・長崎で行われている原爆の遺伝的影響の可能性を研究する調査^{3,4}に含まれている者、並びに先に行われた試験的調査⁵の対象者から得た。この研究では、 PGM_1 遺伝子座に突然変異と推定されるものはまだ発見されていないので、検体の分析に際して対象者の両親の被曝歴は参考にしなかった。等電点電気泳動を行った検体は、その一部を澱粉ゲル電気泳動法でタイピングを行って以来、液体窒素中で保存しておいたものである。表現型が PGM_1 1-7を示した184の検体は、上述した両研究から得た。

表現型 PGM_1 7が、表現型 PGM_1 2と同時に存在する場合、前者のサブタイピングがあいまいなものになるので、遺伝子型 PGM_1^1/PGM_1^7 を示す人々の

types PGM_1^1/PGM_1^7 . The 28 samples with phenotype either PGM_1 1-3 or PGM_1 2-3 were drawn only from the study of the genetic effects of the A-bombs.^{3,4} In the pilot study,⁵ an allozyme whose mobility was similar to that of the PGM_1 3 reported by Hopkinson and Harris⁶ was named as PGM_1 3_{NGS1}, because, given the existence of the heterogeneity in PGM_1 3 as detected in studies using starch gel electrophoresis in the different populations in the world,⁷ its identity with the original PGM_1 3 could not be assured.⁸ Therefore, the phenotypes of the PGM_1 3 samples subtyped by isoelectric focusing in this report would have been referred to either as PGM_1 1-3_{NGS1} or PGM_1 2-3_{NGS1} in our first report. For the sake of simplicity, however, in this paper we will use the term PGM_1 3 as synonymous with PGM_1 3_{NGS1}.

Method

Hemolysates were prepared from frozen packed erythrocytes that had been stored in liquid nitrogen as described by Ueda et al.⁹ Starch gel electrophoresis was conducted as described by Satoh et al.⁵ For the isoelectric focusing, an Ampholine-containing polyacrylamide gel plate [acrylamide in gel = 5% (wt/vol); N, N'-methylenebisacrylamide in total acrylamide = 3% (wt/wt)] with a dimension of 12×11×0.1 cm was prepared by the method in LKB application note 250 with slight modifications. Riboflavin and N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) were used instead of ammonium persulfate, and polymerization was carried out under an ultraviolet light. Final concentrations of the components in this gel were as follows: riboflavin, 0.0005% weight(wt)/volume(vol); glycerol, 10% (vol/vol); Ampholine (pH 5-7), 2% (wt/vol); TEMED, 0.056% (vol/vol). Isoelectric focusing was performed on the LKB 2117 Multiphor apparatus with the LKB 2103 power supply at 4°C. The electrode solutions were 0.01 M NaOH (cathode) and 1% aqueous acetic acid (anode). Prefocusing was of 1-hour duration at the maximum limits of 1,200 V, 10 W, and 10 mA. Hemolysates were applied 3 cm from the anodal electrode strip using a 5×5 mm piece of Whatman 3 MM filter paper; focusing was carried out for two hours at the maximum limits of 10 mA and 2,000 V. The application strips of filter paper were then removed, and the electrofocusing was terminated after another three hours at the maximum limits.

サブタイピングの結果のみを報告する。表現型が PGM_1 1-3 あるいは PGM_1 2-3 のいずれかである 28個の検体は、原爆の遺伝的影響の研究^{3,4}のみから得た。試験的調査⁵では、Hopkinson 及び Harris⁶により報告された PGM_1 3 の移動度と類似の移動度をもつアロ酵素は、 PGM_1 3_{NGS1}と命名された。なぜなら、澱粉ゲル電気泳動法を用いた研究で世界中の様々な集団で発見されているように、⁷ PGM_1 3 に異質性があると仮定すると、本来の PGM_1 3 との同一性が保障されないからである。⁸ このため、この論文での等電点電気泳動法でサブタイピングされた PGM_1 3 の検体の表現型は、我々の最初の報告では PGM_1 1-3_{NGS1}、あるいは PGM_1 2-3_{NGS1} のいずれかで表されていたものである。しかしながら、簡便にするため本報では、 PGM_1 3 を PGM_1 3_{NGS1} と同義に用いることにする。

方法

溶血液は上田ら⁹の報告に従って、液体窒素中に保存していた凍結赤血球から作成した。澱粉ゲル電気泳動は、佐藤ら⁵が報告した方法で行った。等電点電気泳動法では、12×11×0.1cmの大きさの Ampholine 含有ポリアクリルアミドゲルプレート〔ゲル中アクリルアミド濃度=5% (wt/vol); 全アクリルアミド中の N, N'-メチレンビスアクリルアミド濃度=3% (wt/wt)〕を LKB アプリケーションノート 250 に多少変更を加えた方法で作成した。過硫酸アンモニウムの代わりにリボフラビン及び N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を用い、紫外線下で重合させた。このゲル中の成分の最終濃度は次のとおりであった: リボフラビン, 0.0005% 重量 (wt)/体積 (vol); グリセリン, 10% (vol/vol); Ampholine (pH 5-7), 2% (wt/vol); TEMED, 0.056% (vol/vol)。等電点電気泳動は LKB 2117 Multiphor 装置上で、LKB 2103 power supply を用いて 4°C で行った。電極液は 0.01 M の NaOH (陰極) 及び 1% の酢酸 (陽極) であった。プレフォーカシングは最大限 1,200 V, 10 W 及び 10 mA で 1 時間行った。5×5 mm 大の Whatman 3 MM 濾紙を用いて、溶血液を陽極から 3 cm の場所に添加し、最大限 10 mA, 2,000 V で 2 時間泳動を行った。その後サンプル添加用濾紙を取り除き、泳動を最大限度で更に 3 時間行って終了した。

For the population survey, the methods mentioned above were used with slight modification. Gel plates with a dimension of $24 \times 11 \times 0.1$ cm were used. Prefocusing was done at the maximum limits of 1,200 V, 20 W, 20 mA, and focusing was done at 2,000 V, 20 mA.

Staining solution was prepared as described by Spencer et al.¹⁰ and applied to the gel surface with a brush; the gel was incubated in the dark for one hour at 37°C. A micro combination electrode, type DE 103 (Toko Chemical Laboratories, Tokyo) connected to a Hitachi-Horiba digital pH meter, F-7 AD (Horiba Ltd, Kyoto), was used for the pH measurements. Before measuring each gradient, the pH electrode was calibrated with standard buffers (pH 4 and pH 7) at 4°C. For the pH measurements, the polyacrylamide gels were cut into segments ($15 \times 5 \times 1$ mm), and the segments eluted in 0.5 ml of deionized water overnight at 4°C.

RESULTS

The Standard PGM_1 Alleles in Japanese

Table 1 presents our experience thus far with this population in typing PGM_1 with starch gel electrophoresis. We refer to the phenotypes recognized by this approach as "standard." The appellation "other" embraces at least 10 different phenotypes in which a very rare allele occurs in combination with one of the four more common alleles, as well as two examples of homozygosity for the PGM_1^4 allele. Table 1 also presents the allele frequencies which were calculated not only on the basis of the eight phenotypes shown but also from the number of the common and rare alleles observed in other rare phenotypes. These frequencies are similar to those previously reported from Japan by others⁷ and ourselves.⁵

Isoelectric Focusing of a Random Subsample of the Population

Table 2 presents phenotype and allele frequencies on the basis of subtyping by isoelectric focusing, a random subsample of the individuals contributing to Table 1. All of these samples had been typed previously by starch gel electrophoresis. Note that the number of persons with the standard PGM_1^7 allele who were subtyped was quite small, and that no persons having the standard PGM_1^3 allele were included in this particular subsample. Considering only the

集団調査においては、上記の方法に若干変更を加えた方法を用いた。ゲルプレートは $24 \times 11 \times 0.1$ cm大のものを用いた。プレフォーカシングは最大限1,200 V, 20 W, 20 mAで行い、泳動は2,000 V, 20 mAで行った。

Spencer ら¹⁰ が報告している方法で染色液を作成し、はけでゲルの表面に塗布し、そのゲルを37°Cで1時間暗室で加温した。pH測定には日立-堀場デジタル式pHメーター F-7 AD(堀場株式会社, 京都)に複合微小電極 DE 103型(東光化学研究所, 東京)を連結したものをを用いた。各勾配を測定する前に、標準緩衝液(pH 4及びpH 7)を用いて4°CでpH電極の校正を行った。pH測定のため、ポリアクリルアミドゲルを小片($15 \times 5 \times 1$ mm)に切断し、0.5 mlの脱イオン水の中に4°Cで1晩溶離させた。

結果

日本人における標準 PGM_1 対立遺伝子

表1は、我々がこれまでに行った澱粉ゲル電気泳動法を用いた日本人集団の PGM_1 タイピングの結果を示したものである。この方法で認められた表現型を“標準型”とする。“その他”の範ちゅうには少なくとも10種の異なる表現型が含まれ、その中には極めてまれな対立遺伝子と、よりありふれた4種の対立遺伝子のうちのひとつとの組み合わせが、また、 PGM_1^4 対立遺伝子のホモ接合体2例が見られる。表1は、その中で示された8種の表現型だけでなく、その他のまれな表現型に認められたありふれた対立遺伝子、及びまれな対立遺伝子の数に基づいて計算した対立遺伝子頻度も示している。これらの頻度は他の日本人研究者⁷ や我々⁵ が以前報告したものと類似している。

上記集団のランダムサブサンプルの等電点電気泳動の結果

表2は、表1で用いた対象者のランダムサブサンプルについて行った等電点電気泳動法によるサブタイピングに基づく表現型と対立遺伝子の頻度を示したものである。これらのサンプルはすべて以前に澱粉ゲル電気泳動法でタイピングされていたものである。サブタイピングされた対象者のうち、標準 PGM_1^7 対立遺伝子をもつ者の数はかなり少なく、標準 PGM_1^3 対立遺伝子をもつ者はこの特定されたサブサンプルの

TABLE 1 THE PGM₁ PHENOTYPES AND ALLELE FREQUENCIES IN A SAMPLE OF 14,575 JAPANESE FROM HIROSHIMA AND NAGASAKI

表1 広島・長崎の日本人14,575人から成る集団の PGM₁ 表現型
及び対立遺伝子頻度

Phenotype	No.	Percent	Allele	Frequencies
1	8,477	58.16		
1-2	4,919	33.75		
2	693	4.75		
1-7	316	2.17		
2-7	76	0.52	PGM ₁ ¹	0.7633
7	8	0.05	PGM ₁ ²	0.2196
1-3	34	0.23	PGM ₁ ⁷	0.0140
2-3	9	0.06	PGM ₁ ³	0.0015
Other rare phenotypes	43	0.30	Other	0.0015
	14,575	99.99		0.9999

TABLE 2 THE PGM₁ PHENOTYPES AND ALLELE FREQUENCIES IN A SUBSAMPLE OF 788 UNRELATED JAPANESE FROM HIROSHIMA AND NAGASAKI, AS REVEALED BY ISOELECTRIC FOCUSING

表2 血縁関係のない広島・長崎の日本人788人から成るサブサンプル
における、等電点電気泳動法による PGM₁ 表現型と対立遺伝子頻度

Phenotype	Number observed	Number expected	Gene frequencies*
1+	359	359.88	
1+, 1-	120	121.63	PGM ₁ ¹⁺ , 0.6758
1-	13	10.28	PGM ₁ ¹⁻ , 0.1142
1+, 2+	151	152.73	PGM ₁ ²⁺ , 0.1434
1+, 2-	70	64.22	PGM ₁ ²⁻ , 0.0603
1-, 2+	25	25.81	PGM ₁ ⁷⁺ , 0.0057
1-, 2-	6	10.85	PGM ₁ ⁷⁻ , 0.0006
2+	19	16.20	
2+, 2-	12	13.63	
2-	3	2.87	
1+, 7+	6	6.07	
1-, 7+	3	1.03	
2-, 7-	1	0.06	
Others	0	2.76	
Total	788	788.02	

Phenotypes with n(expected) below 3 were combined for χ^2 calculation.

* $\chi^2 = 4.1683$, $0.50 < p < 0.75$, (df=5)

n(期待値)が3以下の表現型は合計して χ^2 計算を行った。

results of subtyping of the standard PGM_1^1 and PGM_1^2 alleles, we note that the nonrandom association of the + and - attributes with the electrophoretic classification is quite similar to that already reported for Caucasoid populations.¹¹ Extensive pedigree data (not presented) demonstrated that the isoelectric trait cosegregates with the PGM_1 type classified by starch gel electrophoresis, thus indicating an intrinsic property of the gene. In consequence, 85.5% of the PGM_1^1 alleles would be classified as PGM_1^{1+} , and 70.4% of the PGM_1^2 as PGM_1^{2+} . The frequency of the observed isoelectric phenotypes is in good agreement with the expectation predicted from the allele frequencies on the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium.

Isoelectric Focusing of a Selected Subsample of Products of the Standard PGM_1^3 and PGM_1^7 Alleles

The results of subtyping by isoelectric focusing the allelic products of the PGM_1^3 and PGM_1^7 alleles thus far encountered in our laboratory are seen in Table 3. Of the 28 PGM_1^3 gene products subjected to isoelectric focusing, 23 (82.1%) were + in type, whereas of the 184 PGM_1^7 gene products typed by such focusing, 176 (95.7%) were +. This difference is significant ($\chi^2 = 7.71$, $df = 1$, $0.01 > p > 0.005$); intragenic disequilibrium is more marked for the + and - forms of PGM_1^7 .

The pI from Isoelectric Focusing of these Eight Phenotypes

Table 4 presents the pI values in our system of the eight primary allozymes produced by the alleles under consideration, and the average pI differences between them. These values are based on 16 determinations for the 2+, 7+ phenotype (3 persons), 17 determinations for the 2+, 2- phenotype (2 persons), 11 determinations on a 1-, 7- individual, 11 determinations on a 1-, 3- individual, 11 determinations on a 1+, 3+ individual, 6 determinations on a 1+, 7+ individual, 6 determinations on a 1-, 7+ individual, and 2 determinations on a 3+, 7+ individual, for a total of 80 determinations. Figure 1 shows the various PGM_1 phenotypes of human hemolysates examined by isoelectric focusing. Figure 2 is a schematic of the data of Table 4 for an idealized focusing gel. With the PGM_1^1 pattern as a reference, for either the + or the - subtype, the pI difference between PGM_1^1 and PGM_1^3 is close to the sum

中には含まれていないことに注意されたい。標準 PGM_1^1 及び PGM_1^2 対立遺伝子のサブタイピングの結果だけを見ると、+及び-という属性と、電気泳動分類とのランダムでない関連性は、既に報告されている白人集団についての所見¹¹と非常に類似していることが注目される。広範な家系調査データ(記載していない)により、等電点電気泳動法で分類される形質は澱粉ゲル電気泳動で分類された PGM_1 の型と結合して分離することが示された。これは、この遺伝子が本来所有している特性の一つであることを示している。結果として、 PGM_1^1 対立遺伝子の85.5%は PGM_1^{1+} と分類され、 PGM_1^2 の70.4%は PGM_1^{2+} と分類される。等電点電気泳動法により観察された表現型の頻度は、Hardy-Weinbergの平衡式が成立することを前提として対立遺伝子頻度から予測した期待値とよく一致している。

選択サブサンプルの標準 PGM_1^3 及び PGM_1^7 対立遺伝子産物の等電点電気泳動

これまでに当研究室で確認された PGM_1^3 及び PGM_1^7 対立遺伝子産物を等電点電気泳動法を用いてサブタイピングした結果を表3に示す。等電点電気泳動を行った28個の PGM_1^3 遺伝子産物のうち、23個(82.1%)が+型であり、同様に泳動を行った184個の PGM_1^7 遺伝子産物のうち176個(95.7%)が+型であった。この相違は有意である($\chi^2 = 7.71$, $df = 1$, $0.01 > P > 0.005$)。より顕著な遺伝子内不平衡が PGM_1^7 の+及び-型について見られる。

8種の表現型の等電点電気泳動により得られた等電点

表4に、上述の対立遺伝子から作られる8種の主要アロ酵素系について我々のシステムで得られた等電点値及びそれらの間の等電点値の差の平均を示す。これらの値は、表現型2+, 7+(3人)の16回の測定、表現型2+, 2-(2人)の17回の測定、1-, 7-の人(1人)の11回の測定、1-, 3-の人(1人)の11回の測定、1+, 3+の人(1人)の11回の測定、1+, 7+の人(1人)の6回の測定、1-, 7+の人(1人)の6回の測定及び3+, 7+の人(1人)の2回の測定、合計80回の測定に基づくものである。等電点電気泳動を行ったヒト溶血液の種々の表現型 PGM_1 を図1に示す。図2は、表4のデータを理想的等電点電気泳動ゲルを用いたと想定して図式化したものである。 PGM_1^1 型を参考にする、+あるいは-のサブタイプのどちらも PGM_1^1 と PGM_1^3 間の

TABLE 3 RESULTS OF SUBTYPING BY ISOELECTRIC FOCUSING A SELECTED SAMPLE OF PERSONS HAVING THE PGM_1^3 OR PGM_1^7 ALLELES

表3 PGM_1^3 又は PGM_1^7 対立遺伝子をもつ選択された集団の等電点電気泳動法によるサブタイピングの結果

PGM_1^3		PGM_1^7	
Phenotype	No.	Phenotype	No.
1+, 3+	19	1+, 7+	143
1-, 3+	1	1-, 7+	33
1+, 3-	3	1+, 7-	6
1-, 3-	1	1-, 7-	2
2+, 3+	2		184
2-, 3+	1		
2+, 3-	1		
	28		

Because of difficulties in subtyping PGM_1^7 electromorphs in the presence of the PGM_1^2 electromorph, only individuals whose genotypes are PGM_1^1/PGM_1^7 have been subtyped.

電気泳動表現型 PGM_1^2 の存在下では PGM_1^7 のサブタイピングが困難なので、遺伝子型が PGM_1^1/PGM_1^7 の者についてのみサブタイピングを行った。

TABLE 4 THE pI VALUES OF THE PRODUCTS OF THE EIGHT ALLELES UNDER CONSIDERATION IN THE STUDY, WITH AN ANALYSIS OF THE COMPLEMENTARITY OF THE OBSERVED DIFFERENCES

表4 本研究で検討した8種の対立遺伝子産物の等電点値及び観察された差異の相補性の分析

Isoelectric type	pI value	Isoelectric type	pI value
1+	6.3	1-	6.4
2+	6.1	2-	6.2
7+	6.0	7-	6.1
3+	5.8	3-	5.9
Differences			
1+ - 2+ = 0.2	} 0.5	1- - 2- = 0.2	} 0.5
1+ - 7+ = 0.3		1- - 7- = 0.3	
1+ - 3+ = 0.5		1- - 3- = 0.5	

of the differences between PGM_1^1 and PGM_1^7 and between PGM_1^1 and PGM_1^2 . Conversely, of course, the pI difference between PGM_1^1 and PGM_1^7 is obtained by subtracting the difference between PGM_1^1 and PGM_1^2 from the difference between PGM_1^1 and PGM_1^3 . As will shortly become apparent, we do not believe this finding to be a coincidence.

等電点値の差は、 PGM_1^1 と PGM_1^7 及び PGM_1^1 と PGM_1^2 間の差の合計に近似している。もちろん逆に言えば PGM_1^1 と PGM_1^7 間の等電点値の差は、 PGM_1^1 と PGM_1^3 間の差から PGM_1^1 と PGM_1^2 間の差を引くことにより得られる。遠からず明白になるであろうが、この所見は偶発的なものではないと考える。

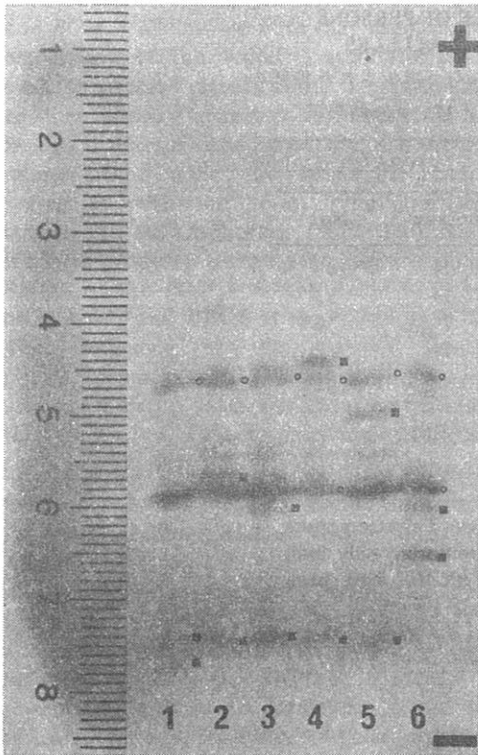


Figure 1. Isoelectric patterns of six PGM₁ isoenzymes from hemolysates. Phenotypes: 1+, 1- (lane 1); 1+, 7+ (lane 2); 1+, 7- (lane 3); 1+, 3+ (lane 4); 1+, 3- (lane 5); and 2+, 2- (lane 6). The main PGM₁ bands are marked with closed squares; and the PGM₂ 1 bands are marked with open circles.

図1 溶血液の6種のPGM₁アイソザイム型の等電点分離パターン。表現型：1+, 1- (レーン1); 1+, 7+ (レーン2); 1+, 7- (レーン3); 1+, 3+ (レーン4); 1+, 3- (レーン5); 及び2+, 2- (レーン6)。PGM₁主要バンドは塗りつぶした四角で、PGM₂ 1バンドは白い丸で印した。

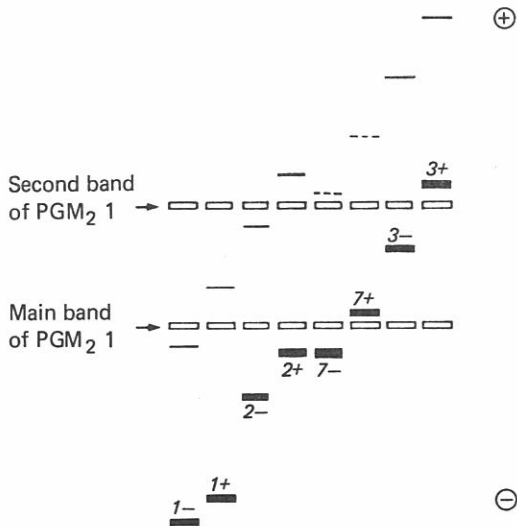


Figure 2. Position after isoelectric focusing of the two PGM₁ bands in the eight phenotypes described in this paper. For references, the position of the two PGM₂ 1 bands (which also appear in these preparations) is shown.

図2 本報で述べた8種の表現型のうち2個のPGM₁バンドの等電点電気泳動後の位置。参考までに、2個のPGM₂ 1バンドの位置(溶血液を用いた場合、これらも現れる)を示す。

DISCUSSION

Shortly after the subdivision of the $PGM_1 1$ and $PGM_1 2$ phenotypes by isoelectric focusing,^{1,2} Carter et al.¹¹ recognized that the intragenic nonrandom association of the + and - attributes with the previously recognized alleles permitted the construction of a probable allele phylogeny, i.e., a reconstruction of the sequence in which the four alleles (PGM_1^{1+} , PGM_1^{1-} , PGM_1^{2+} , and PGM_1^{2-}) could have arisen by a combination of two mutations and one subsequent intragenic recombination. Their observations included a series of 14 higher primates [Hominoidea: *Pan* (7), *Gorilla* (4), and *Pongo* (3)]; in typings by starch gel electrophoresis and isoelectric focusing, all samples appeared identical and similar to the $PGM_1 1+$ phenotypic pattern. This observation suggested that their phylogeny be rooted in the PGM_1^{1+} gene, with a time depth of no more than 6-10 million years, as estimated from the antiquity of the evolutionary divergence of the lines leading to *Homo* and to the other Hominoidea. Given this root and the observed allele frequencies, they postulated that two independent mutations resulted in the PGM_1^{1-} and PGM_1^{2+} alleles, with the PGM_1^{2-} allele the result of an intragenic crossover.

The present data, in conjunction with the known facts concerning the geographic distributions of these alleles, suggest a considerable extension of that 4-allele phylogeny. The existing data on the distribution of the PGM_1^3 and PGM_1^7 alleles in the Asia-Pacific area, based on the summary of Blake and Omoto,⁷ are schematically presented in Figure 3. Although scattered instances of these two electromorphs have been encountered all over the world, both these electromorphs (which on closer analysis are everywhere proving to be heterogeneous), on the basis of current information, show local (but different) maxima in the Asia-Pacific area, with overlapping distributions. The $PGM_1 3$ localization principally involves Melanesians, whereas the (partially overlapping) $PGM_1 7$ localization extends to Malaysians, Thais, Chinese, and Japanese. Large areas remain to be explored in this respect, as does the question of the subtypes of $PGM_1 3$ in the areas already studied. Thus, on the basis of a single sample from New Guinea, the $PGM_1 3$ phenotype encountered there is reported to differ slightly from the $PGM_1 3$ of Okinawans⁷ and from Japanese on

考 察

表現型 $PGM_1 1$ と $PGM_1 2$ の等電点電気泳動法によるサブタイピング^{1,2} が行われて間もなく、Carter ら¹¹ は、+と-の特性と既に確認されていた対立遺伝子との間に見られる遺伝子内のランダムでない関連性を利用すれば、対立遺伝子系統樹を作ること、すなわち4種の対立遺伝子 (PGM_1^{1+} , PGM_1^{1-} , PGM_1^{2+} 及び PGM_1^{2-}) が、2個の突然変異のコンビネーション及びそれに続いて起こる1個の遺伝子内リコンビネーションによって再構成することができると考えた。彼らは14種の高等霊長類〔類人上科: チンパンジー(7), ゴリラ(4), オランウータン(3)]を観察した。澱粉ゲル電気泳動法及び等電点電気泳動法によるタイピングでは、すべての検体が表現型 $PGM_1 1+$ と同一かあるいは類似していると思われた。この結果から、これらの系統樹は PGM_1^{1+} 遺伝子を出発点とし、人属及び他の類人上科に至る系統の進化上の分化の歴史から推定されるように、わずか600~1,000万年間に起こったものであることが示唆された。この由来と対立遺伝子観察頻度から、彼らは、2個の独立した突然変異の結果 PGM_1^{1-} 及び PGM_1^{2+} 対立遺伝子ができ、また、 PGM_1^{2-} は遺伝子内交叉の結果であると考えた。

本研究のデータは、これらの対立遺伝子の地理的分布に関して確認されている事実と併せて考えると、4対立遺伝子系統樹をかなり拡大させる必要性を示唆している。Blake 及び尾本⁷ の要約に基づくアジア-太平洋地域における PGM_1^3 、及び PGM_1^7 対立遺伝子分布に関する既存のデータを図3に図式化して示す。これら二つの電気泳動的表現型は世界中の至る所に分散して見られるが、現在の資料に基づくところこれら二つの表現型(より詳しい分析では至る所にあり、それは一種のみではないことが分かっている)ともアジア-太平洋地域で地域(差異はあるものの)としては、最大の値を示し、その分布には重複が見られる。 $PGM_1 3$ は主にメラネシア人に見られ、(部分的に重複しているが) $PGM_1 7$ の分布はマレーシア人、タイ人、中国人及び日本人にも広がっている。この点に関しての研究が広い地域で残されているし、また研究済みの地域の $PGM_1 3$ のサブタイプの問題も同様にその研究が待たれる。例えばニューギニアの集団で得られたただ一つの検体より得られたデータであるが、そこで発見された表現型 $PGM_1 3$ は沖縄住民⁷ や九州及び本州の日本人(未発表のデータ)の $PGM_1 3$ とは若干異なっていると報告

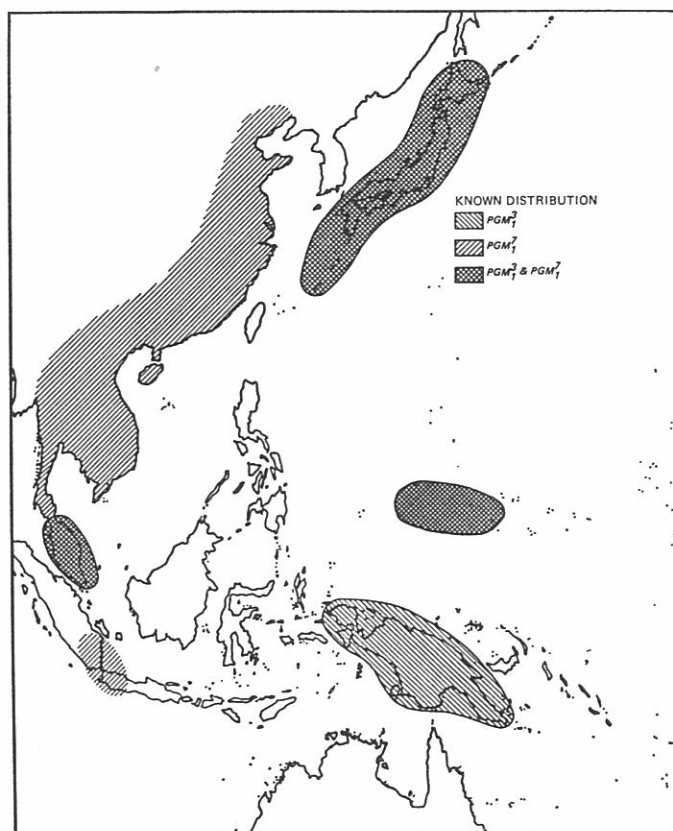


Figure 3. The known distribution of the PGM_1^3 and PGM_1^7 alleles in the Asia-Pacific area.

図3 アジア太平洋地域の PGM_1^3 及び PGM_1^7 対立遺伝子の確認されている分布

Kyushu and Honshu (unpublished data); clearly a much more extensive comparison is called for.

In an extension of the phylogeny, the chief constraint is the need to observe the additive (or subtractive) pI relationships between alleles as described in Table 4. There are a number of different solutions to this phylogeny problem. We will, to begin with, accept the phylogenetic relationships of PGM_1^{1+} , PGM_1^{1-} , PGM_1^{2+} , and PGM_1^{2-} as proposed by Carter et al,¹¹ although, as these authors point out, other interpretations are possible. The other four alleles (PGM_1^{3+} , PGM_1^{3-} , PGM_1^{7+} , and PGM_1^{7-}) can then be explained by one additional nucleotide substitution and three intragenic recombinational events. These latter can in each instance result from at least two types of intragenic recombinations. The resulting

されており、より広範な比較が必要であることは明らかである。

系統樹を拡大する際の主な制約は、表4に示すように対立遺伝子間の等電点の関係が相加的(あるいは減法的)である必要があることである。この系統樹の問題を解決するには幾つかの異なる方法が存在する。Carterら¹¹が指摘するように、他の解釈も可能であるが、第一段階として彼らが提案した PGM_1^{1+} , PGM_1^{1-} , PGM_1^{2+} 及び PGM_1^{2-} の系統樹上での関係を認めるとする。他の4個の対立遺伝子 (PGM_1^{3+} , PGM_1^{3-} , PGM_1^{7+} 及び PGM_1^{7-}) は、もう1個別のヌクレオチド置換と3個の遺伝子内リコンビネーションから説明できる。後者(遺伝子内リコンビネーション)は、それぞれの場合で少なくとも2種のタイプの遺伝子内リコンビネーションから

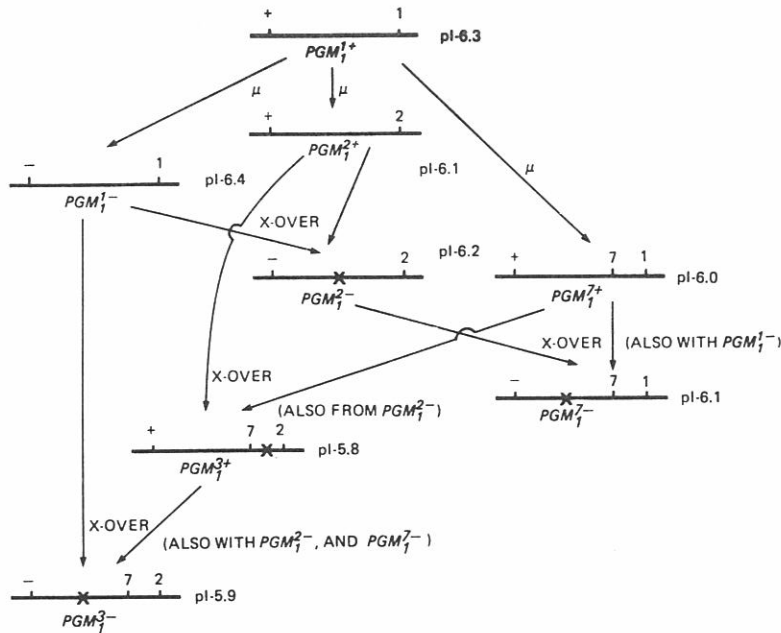


Figure 4. A proposed phylogeny relating eight alleles in the PGM_1 system. The symbol μ indicates origin through mutation. The position of the postulated crossover is in each instance indicated by an X.

図4 PGM₁系の8種の対立遺伝子の関係を示す想定系統樹. 記号 μ は突然変異からの由来を示す. 仮定された遺伝子交叉の位置はそれぞれXで示す.

phylogeny is shown in Figure 4. A very approximate site for the postulated intragenic recombination is indicated for each of the recombination events.

In theory, additional evidence concerning the most probable sequence of events is provided by allele frequencies and the extent of the "linkage disequilibrium." It is appropriate that the most common of the four Asia-Pacific alleles (PGM_1^{7+}) is shown as the oldest, although, because of the possible roles of selection and drift in establishing allele frequency, we do not regard the frequency criterion as particularly compelling. Another criterion in setting the sequence of events could be the amount of intragenic linkage disequilibrium. Other factors equal, the more recent recombinational possibilities should present the greatest disequilibrium. However, the precise time curve for the decay of the disequilibrium depends on the relative nucleotide distances between the three

なる. 結果としてできた系統樹を図4に示す. 生じたりコンビネーションの各々について, 仮定された遺伝子内リコンビネーションのおおよその位置を示す.

理論的には, 可能性の最も高いこの事象についての順序に関する別の証拠を与えるのは, 対立遺伝子頻度及び"連鎖不平衡"の程度である. アジア太平洋地域の4種の対立遺伝子のうち, 最もありふれた種類(PGM_1^{7+})を最古と表すのが適当であろうが, 対立遺伝子頻度を決定する際の淘汰及び浮動のため, この頻度基準を特に優れたものとは思わない. 事象の順序を決める際の別の基準は, 遺伝子内の連鎖不平衡の程度であろう. 他の要因が等しければ, 最新のリコンビネーションが最大の不平衡を示すであろう. しかしながら, 不平衡の崩壊の正確な時間曲線は想定された3種のヌクレオチド置換の間の相対的ヌクレオチド距離に依存する. この距離は不明である

postulated nucleotide substitutions; because these are unknown, no firm use can be made of the decay function, the more so because genetic selection and drift intervene between recombination frequency and the observed phenotypes.

This phylogeny must be recognized as only a beginning for the alleles of this locus. Thus, there are at least eight other alleles (unpublished data) not yet studied with respect to their subdivision by isoelectric focusing, and, in addition, Scozzari et al¹² have reported a common polymorphism affecting the thermostability of the products of the PGM_1^{1+} , PGM_1^{1-} , PGM_1^{2+} , and PGM_1^{2-} alleles, the site for which, from its segregation pattern, must be intragenic to the PGM_1 locus. In principle, most of the alleles waiting to be defined with respect to isoelectric focusing can be fitted into the present phylogeny by the type of logic we have employed.

An attraction of this phylogeny is that it is ultimately subject to verification or disproof by DNA sequence determination. When a probe becomes available for the PGM_1 locus, not only will the postulates of the phylogeny be subject to empirical testing, but the prevalence of DNA restriction enzyme-site polymorphisms should provide additional markers within and near both ends of the gene. Indeed, the opportunities for sophisticated evolutionary biology should provide a stimulus to develop a probe for this locus. In this connection it should be borne in mind that, in the present context, the important issue is not the correctness in detail of the phylogeny of Figure 4, but the principle that intragenic recombination has been as important as nucleotide substitution in the genesis of the alleles encountered at this locus. It is very likely that DNA sequencing of the PGM_1 locus will result in some revisions in the phylogeny.

The possibility that intragenic recombination could be a cause of "point" mutation in higher eukaryotes has been apparent ever since the nature of the genetic code was established; the nature of the products of the human haptoglobin alleles provided an example of the consequences of an error in such recombination some 20 years ago.¹³ The recognition of intervening sequences (introns) in genes increases the potential role for this type of event. In this

ので、崩壊関数を確実に使用することはできない。このことは遺伝子淘汰及び浮動が、リコンビネーション頻度と観察された表現型間に介在することから一層顕著になる。

この系統樹は、この遺伝子座の対立遺伝子にとっては始まったばかりにすぎないと理解されねばならない。つまり、等電点電気泳動法によるサブタイピングに関して未研究の対立遺伝子が他に少なくとも8種あり(データは未発表)、加えて、Scozzariら¹²は、 PGM_1^{1+} 、 PGM_1^{1-} 、 PGM_1^{2+} 及び PGM_1^{2-} 対立遺伝子の産物の熱安定性に影響を与える因子が多型で存在し、それらの分離の様式から考え、その部位は PGM_1 遺伝子座に位置しているという報告をした。理論的には、等電点電気泳動法を用いて分類されるべき対立遺伝子の大部分は、我々が用いた論理でこの系統樹に適合し得る。

この系統樹の長所は、最終的にはDNA配列決定によって証明又は反証できる点である。 PGM_1 遺伝子座のプロープが入手できるようになれば、系統樹に関する推論を経験に即してテストできるようになるだけでなく、DNA制限酵素部位多型現象の発現率がその遺伝子の内及び両端の周辺部に新たな標識を提供するに違いない。実際に、高度に進歩した進化生物学の機会が、この遺伝子座のプロープを開発する刺激となるであろう。したがって、ここで重要なのは、図4の系統樹の細部が正確であることではなく、この遺伝子座で発見された対立遺伝子の発生においては、遺伝子内リコンビネーションはヌクレオチド置換と同様に重要であるという原則であることを念頭におくべきである。 PGM_1 遺伝子座のDNA配列が決定されれば、系統樹に若干変更が生ずることは大いに考えられる。

遺伝子内リコンビネーションが高等真核生物の“点”突然変異の原因の一つである可能性は、遺伝コードの性質が確立されて以来明瞭なものであると考えられている。約20年前にヒトハプトグロビン対立遺伝子の産物の性質が研究され、その種のリコンビネーションの誤りの結果の1例が示された。¹³ 遺伝子に介在配列(イントロン)の存在を考えると、この種の

context it is worth noting that intragenic recombination imparts a self-generating aspect to mutation: if three or four nucleotide substitutions (n) resulting from mutation become established in any substantial frequency in a population, intragenic recombinational events create the opportunity for a much larger number of alleles, the total number of possible alleles (nucleotide substitutions plus subsequent recombinational events) increasing as 2^n . Thus, it is not surprising that our phylogeny is based on three nucleotide substitutions (which have polymorphic frequencies) but four crossover events. We have suggested on the basis of the number of different alleles that the PGM_1 locus appeared more mutable in a Japanese than in an English population¹⁴; the present analysis provides a mechanism for the phenomenon. Other human loci with complex allelic structures which with further data should lend themselves to a treatment similar to that presented in this paper are those responsible for the MNSs and Rh blood groups,¹⁵ and the HLA-A and HLA-B histocompatibility factors. The present findings suggest that the appearance of a new property at these loci (i.e., mutation) is as likely to result from intragenic recombination as nucleotide substitution.

Some might prefer to refer to the consequences of the postulated crossover events as the evolution of haplotypes rather than as mutations. We use the term point mutation in the classical sense—as the appearance in an offspring of an inherited phenotype not present in either parent, the genetic basis for which can be localized to a specific point on a chromosome, as would be the case if phenotype $PGM_1 3+$ appeared for the first time in a child of a $PGM_1 2^+/PGM_1 7^+$ heterozygote.

Each of the alleles postulated to arise through intragenic recombination has a substantially higher probability of multiple origins than an allele resulting from a specific nucleotide substitution. From its molecular weight, PGM_1 should consist of approximately 510 amino acids, thus requiring for its coding 1,530 nucleotides in exons, these probably interrupted by a considerable number of nucleotides in intervening sequences. In the so-called complex loci of *Drosophila*, the frequency of “within-locus” recombination varies from about 10^{-4} to 10^{-5} /locus/generation, depending on which character-

事象の役割の可能性は増大する。このような関係において、遺伝子内リコンビネーションが突然変異に対して自然発生的な側面を付与することは注目値する。突然変異に由来する3個か4個のヌクレオチド置換(n)が集団の中かなりの頻度で確認されると、遺伝子内リコンビネーションは、はるかに多種類の対立遺伝子を作り出す可能性が生じ、生じ得る対立遺伝子(ヌクレオチド置換とそれに続いて起こるリコンビネーションの合計)の総数は 2^n の割合で増加する。したがって、我々の作った系統樹が3個のヌクレオチド置換(多型の頻度を有する)と4個の遺伝子交叉に基づくことは驚くに当たらない。我々は、幾つかの異なる対立遺伝子の結果に基づいて、 PGM_1 遺伝子座は英国人集団でよりも日本人集団での方が突然変異を起こしやすいと思われること示唆したが、¹⁴ 今回の解析はその現象の機序を示すものである。複雑な対立遺伝子構造をもつ人間の遺伝子座で、より研究が進めば、この論文に発表したのと同様な考え方が成り立つのは、MNSs及びRh血液型¹⁵を示す要因物資並びにHLA-A及びHLA-B組織適合因子である。本研究の知見から、これらの遺伝子座の新しい特性(例えば突然変異)はヌクレオチド置換と同様、遺伝子内リコンビネーションからも生じやすいことが示唆される。

仮定した遺伝子交叉の結果を突然変異というよりもハプロタイプの進化と考えるのを好む人もいるかもしれない。我々は点突然変異という語を古典的な意味で用いている。すなわちいずれの両親にも見られない遺伝的表現型(遺伝学的には、それらは染色体の特定の場所に存在する)が子供に現れることである。つまり $PGM_1 2^+/PGM_1 7^+$ のヘテロ接合体の子供に初めて、表現型 $PGM_1 3+$ が現れるような場合である。

遺伝子内リコンビネーションから生まれると仮定されるそれぞれの対立遺伝子は、特定のヌクレオチド置換から生まれる対立遺伝子よりも、複数の起源をもつ可能性がかなり高い。 PGM_1 はその分子量から約510残基のアミノ酸から構成されていると推定されるので、コード化する際、構造配列に1,530個のヌクレオチドを必要とするが、これらは恐らく介在配列として存在するかなり多数のヌクレオチドにより切れ切れになっているであろう。ショウジョウバエのいわゆる複雑な遺伝子座においては、“遺伝子座内”リコンビネーションの頻度は、遺伝子座のどの特性を検討するかによって約 10^{-4} ~ 10^{-5} /遺伝子座/世代と

REFERENCES

参考文献

1. BARK JE, HARRIS MJ, FIRTH M: Typing of the common phosphoglucomutase variants using isoelectric focussing – A new interpretation of the phosphoglucomutase system. *J Forensic Sci Soc* 16: 115-20, 1976
2. KÜHNEL P, SCHMIDTMANN U, SPIELMANN W: Evidence for two additional common alleles at the PGM₁ locus (phosphoglucomutase – E.C.:2.7.5.1). A comparison by three different techniques. *Hum Genet* 35:219-23, 1977
3. 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 USA* 77:4221-5, 1980 (RERF TR 5-80)
4. SATOH C, AWA AA, NEEL JV, SCHULL WJ, KATO H, HAMILTON HB, OTAKE M, GORIKI K: Genetic effects of atomic bombs. In 6th International Congress of Human Genetics. New York, Alan R. Liss Inc. in press
5. SATOH C, FERRELL RE, TANIS RJ, UEDA N, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. III. Phosphoglucomutase-1, phosphoglucomutase-2, 6-phosphogluconate dehydrogenase, adenylate kinase, and adenosine deaminase. *Ann Hum Genet* 41:169-83, 1977 (RERF TR 5-76)
6. HOPKINSON DA, HARRIS H: Rare phosphoglucomutase phenotypes. *Ann Hum Genet* 30:167-81, 1966
7. BLAKE NM, OMOTO K: Phosphoglucomutase types in the Asian-Pacific area: A critical review including new phenotypes. *Ann Hum Genet* 38:251-73, 1975
8. FERRELL RE, UEDA N, SATOH C, TANIS RJ, NEEL JV, HAMILTON HB, INAMIZU T, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. I. Albumin, ceruloplasmin, haptoglobin, and transferrin. *Ann Hum Genet* 40:407-18, 1977 (RERF TR 3-76)
9. 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 and II, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, nucleoside phosphorylase, triose phosphate isomerase, haemoglobin A and haemoglobin A₂. *Ann Hum Genet* 41:43-52, 1977 (RERF TR 4-76)
10. SPENCER N, HOPKINSON DA, HARRIS H: Phosphoglucomutase polymorphism in man. *Nature* 204: 742-5, 1964
11. CARTER ND, WEST CM, EMES E, PARKIN B, MARSHALL WH: Phosphoglucomutase polymorphism detected by isoelectric focusing: Gene frequencies, evolution and linkage. *Ann Hum Biol* 6:221-30, 1979
12. SCOZZARI R, TRIPPA G, SANTACHIARA-BENERECETTI AS, TERRENATO L, IODICE C, BENINCASA A: Further genetic heterogeneity of human red cell phosphoglucomutase-1: A non-electrophoretic polymorphism. *Ann Hum Genet* 45:313-22, 1981
13. SMITHIES O, CONNELL GE, DIXON GH: Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. *Nature* 196:232-6, 1962
14. NEEL JV, UEDA N, SATOH C, FERRELL RE, TANIS RJ, HAMILTON HB: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. V. Summary and comparison with data on Caucasians from the British Isles. *Ann Hum Genet* 41:429-41, 1978 (RERF TR 7-76)

15. RACE RR, SANGER R: Blood Groups in Man, fifth edition. Philadelphia, F. A. Davis Co., 1968. pp xxviii and 599
16. CARLSON EA: Comparative genetics of complex loci. Q Rev Biol 34:33-67, 1959
17. NEEL JV: J Hered, in press
18. THOMPSON EA, NEEL JV: Probability of founder effect in a tribal population. Proc Natl Acad Sci USA 75;1442-5, 1978
19. GIBLETT ER: Genetic Markers in Human Blood. Oxford and Edinburgh, Blackwell Scientific Publications, 1969. pp xxvii and 629
20. OMOTO K, HARADA S: The distribution of polymorphic traits in the Hidaka Ainu. II. Red cell enzyme and serum protein groups. J Fac Sci Univ Tokyo 4:171-211, 1972