

ELECTROPHORETIC VARIANTS OF BLOOD PROTEINS IN JAPANESE
III. TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE

日本人の血液蛋白質の電気泳動上の変異型
Ⅲ. Triosephosphate isomerase

JUN-ICHI ASAKAWA, M.S. 浅川順一
CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子
NORIO TAKAHASHI, Ph.D. 高橋規郎
MIKIO FUJITA, M.D. 藤田幹雄
JUNKO KANEKO 金子順子
KAZUAKI GORIKI, M.D. 郷力和明
RYUJI HAZAMA, M.D. 迫龍二
TAKESHI KAGEOKA, M.D. 影岡武士



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. James V. Neel and Dr. Howard B. Hamilton for the advice and assistance in the preparation of this manuscript. We are also grateful to Dr. Harvey W. Mohrenweiser for kindly providing us the sample of TPI 1-Manchester. We are indebted to Mr. Yasuichi Kimura and Miss Naomi Masunari for their technical assistance on starch gel electrophoresis.

本稿の作成に当たり御助言及び御援助をいただいた James V. Neel 博士, Howard B. Hamilton 博士に感謝する。また, TPI 1-Manchester の試料を快く御提供くださった Harvey W. Mohrenweiser 博士に感謝する。澱粉ゲル電気泳動法に関して技術的御援助をいただいた木村康一氏, 増成直美氏に感謝の意を表す。

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。

Hum Genet 68:185-8, 1984

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, 日米研究職員, 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をもって運営されている。

ELECTROPHORETIC VARIANTS OF BLOOD PROTEINS IN JAPANESE III. TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE

日本人の血液蛋白質の電気泳動上の変異型

III. Triosephosphate isomerase

JUN-ICHI ASAKAWA, M.S. (浅川順一)¹; CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子)¹;
NORIO TAKAHASHI, Ph.D. (高橋規郎)¹; MIKIO FUJITA, M.D. (藤田幹雄)¹;
JUNKO KANEKO (金子順子)¹; KAZUAKI GORIKI, M.D. (郷力和明)*;
RYUJI HAZAMA, M.D. (迫龍二)²; TAKESHI KAGEOKA, M.D. (影岡武士)**

Departments of Clinical Laboratories (Biochemical Genetics Laboratory)¹ and Medicine²

放射線臨床検査部遺伝生化学研究室¹及び臨床部²

SUMMARY

A total of 15,387 individuals, of whom 10,864 are unrelated, living in Hiroshima and Nagasaki were examined for erythrocyte triosephosphate isomerase (TPI) by starch gel electrophoresis using TEMM buffer, pH 7.4. Four kinds of new variants, one having a cathodal migration and three having anodal migrations, were encountered in this population. These variants were further characterized by starch gel electrophoresis using tris-EDTA buffer, pH 9.3, and isoelectric focusing. An anodally migrating variant TPI 2_{HR1} exhibited markedly decreased enzyme activity, as evaluated by the staining intensity of the variant bands. The level of TPI activity in erythrocytes from this individual with the phenotype TPI 1-2_{HR1} was about 60% of the normal mean. Family studies confirmed the genetic nature of all the variants.

INTRODUCTION

Human triosephosphate isomerase (TPI; EC 5.3.1.1) (MW = 53,000), a dimeric enzyme of identical subunits,^{1,2} catalyzes the interconversion of two glycolytic intermediates, glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate. Electrophoretic variants of TPI are relatively rare. Peters et al³ described the two anodally migrating variants, one

要約

血縁関係のない者10,864名を含む広島・長崎在住者15,387名の赤血球 triosephosphate isomerase (TPI) について、TEMM 緩衝液、pH 7.4を用いた澱粉ゲル電気泳動法によって検査を行った。4例の新しい変異型がこの対象者集団に認められたが、そのうちの1例は陰極方向に移動するものであり、3例は陽極方向に移動するものであった。これらの変異型の特性について、tris-EDTA 緩衝液、pH 9.3を使用した澱粉ゲル電気泳動法及び等電点電気泳動法を用いて更に検討を行った。その変異型バンドの活性の強さより判定して、陽極方向に移動する変異型 TPI 2_{HR1} の酵素活性は著しく低かった。表現型 TPI 1-2_{HR1} を呈したこの対象者の赤血球中の酵素活性は、正常平均値の約60%であった。家族調査の結果、これらの変異型はすべて遺伝的なものであ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であるヒト triosephosphate isomerase (TPI; EC 5.3.1.1) (MW = 53,000)^{1,2} は2種の解糖中間体、グリセルアルデヒド3-リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸の相互転換を触媒する。TPIの電気泳動上の変異型は比較的まれである。Petersら³ は、

*Department of Internal Medicine, Mihara Medical Association Hospital

三原医師会病院内科

**Department of Clinical Pathology, University of Tsukuba, School of Medicine

筑波大学医学専門学群、臨床病理学教室

encountered once and the other twice, found among 2,477 individuals from several ethnic groups. These variants were in the heterozygous state and the variant allozymes were designated TPI 2 and TPI 3. A cathodally migrating variant was detected twice in a population of 1,949 individuals studied in Michigan.⁴ This was designated TPI Manchester,⁵ the proband having the phenotype TPI 1-Manchester. No variants were detected during a study of 3,888 Amerindians.⁶

A program studying the genetic effects of the atomic bombs at the protein level using electrophoresis has been in progress at RERF since 1972. Electrophoretic examinations have been done on 30 protein systems from the blood samples of two populations from Nagasaki and Hiroshima, i.e.; an 'Adult population' composed of A-bomb survivors and nonexposed, and a 'Child population' comprising children born to the proximally and distally exposed survivors.

The present paper describes four electrophoretic variants of erythrocyte TPI, each encountered only once among some 15,000 individuals. Since all the variants are inherited, the question of a radiation effect does not arise.

MATERIALS AND METHODS

The populations, the circumstances under which samples were collected, the method of family studies, and the preparation of hemolysates were described in the first paper of this series.⁷ For routine study, 1/2 diluted hemolysates were used, but for the comparison of variants in the present study, partial purification of TPI was carried out using the chloroform-ethanol extraction method of Hashimoto and Yoshikawa,⁸ and the concentration of the samples was adjusted in such a manner that the same amount of enzyme activity was present.

Electrophoresis. For routine typing of TPI, vertical starch gel electrophoresis was carried out at 4°C and 7 V/cm for 20-23 hours using the tris-EDTA-maleic acid-MgCl₂ (TEMM) buffer system (pH 7.4) of Spencer et al.,⁹ as bridge buffer and at 1/15 dilution (pH 7.4) for the gel buffer. Comparison of variants was performed using both the TEMM buffer system and the tris-EDTA buffer system (pH 9.3) of Peters et al.³ TPI isozymes were stained using the method of Peters et al.³

幾つかの民族から構成される2,477名中に発見された2例の陽極方向に移動する変異型について述べているが、そのうち1例は1回、他の1例は2回検出されている。これらの変異型はヘテロ接合型であり、変異型アロザイムはTPI 2及びTPI 3と命名された。Michigan州で調査を行った1,949名の集団では、陰極方向に移動する変異型が2回検出された。⁴ これはTPI Manchesterと命名され、⁵ この発端者の表現型はTPI 1-Manchesterであった。アメリカンインディアン3,888名の調査では変異型は検出されなかった。⁶

蛋白質レベルでの原爆の遺伝的影響を、電気泳動法により調査するプログラムが1972年から放影研で実施されている。広島・長崎の2集団、すなわち原爆被爆者及び非被爆者より構成される'成人集団'、並びに近距離及び遠距離被爆者の子供より構成される'子供集団'、から得た血液標本の30種類の蛋白質について電気泳動法による検査を実施している。

本報告は、赤血球TPIの電気泳動上の変異型4例について述べるが、それらは約15,000名中各々1回だけ検出されたものである。これらの変異型はすべて遺伝的なものであるので、放射線の影響は問題にはならない。

材料及び方法

この一連の報告の第1報において、対象集団、標本の収集が行われた状況、家族調査の方法、溶血液の作成、について述べた。⁷ 通常の調査には1/2希釈溶血液を用いたが、本研究においては変異型の比較のため、橋本及び吉川⁸のクロロホルム-エタノール抽出法によりTPIの部分精製を行い、同量の酵素活性が存在するように試料の濃度を調整した。

電気泳動法. TPIの通常の型判定には、ブリッジ緩衝液としてSpencerら⁹のtris-EDTA-maleic acid-MgCl₂ (TEMM)緩衝液システム(pH 7.4)を、また、ゲル緩衝液にはその1/5希釈溶液(pH 7.4)を使用した垂直式澱粉ゲル電気泳動法を4°C、7 V/cmで20~23時間実施した。変異型の比較はTEMM緩衝液システム及びPetersら³のtris-EDTA緩衝液システム(pH 9.3)を用いて行った。TPIアインザイムの染色はPetersら³の方法により行った。

Isoelectric Focusing. For isoelectric focusing (IEF), a gel plate (120×110×1 mm) containing 4.7% acrylamide, 0.3% N-N' methylene-bisacrylamide, 2.5% Ampholine (LKB) mixture (1.1% pH 4-6, 1.1% pH 6-8, 0.3% pH 3.5-10), and 7% glycerol was prepared. IEF was performed on the LKB 2117 multiphor apparatus with a cooling plate at 10°C. The electrode solutions were 1N NaOH (cathode) and 1N N_3PO_4 (anode). Prefocusing was done for one hour at maximum limits of 1,000 V, 10 mA, and 10 W. Partially purified samples on pieces of Whatman 3MM paper (5×10 mm) were applied 2 cm from the cathode; focusing was carried out for one hour at maximum limits of 1,300 V, 10 mA, and 10 W. The pieces of filter papers were then removed, and the IEF was terminated after another three hours. TPI isozymes were stained for activity by a modification of the method of Scopes,¹⁰ using a cellulose acetate membrane instead of a filter paper. Isoelectric points (pI) were determined by the positions of marker proteins (pI calibration kit from Pharmacia).

Enzyme Assay. Our procedures in general followed the recommendations of Beutler¹¹ and the International Committee for Standardization in Haematology.¹² Enzyme activity was measured spectrophotometrically at 340 nm and at 30°C with an assay mixture containing 4 mM D-glyceraldehyde 3-phosphate, 0.2 mM NADH, and 1 IU/ml of α -glycerophosphate dehydrogenase in 100 mM triethanolamine-2 mM EDTA buffer (pH 7.6) using a 1/400 diluted hemolysate. Details of sample preparation, instruments, and data management were described by Satoh et al.¹³

RESULTS

Starch gel electrophoretic patterns for the variants as well as a normal TPI pattern (TPI 1), using both a TEMM buffer system at pH 7.4 (Figure 1A) and a tris-EDTA buffer system at pH 9.3 (Figure 1B) are shown. Schematic interpretation of the gels of Figure 1A and B is shown in Figure 2.

TPI 1. Freshly prepared samples from a normal healthy individual exhibit five TPI isozymes, all migrating towards the anode, on the TEMM buffer gel (Figure 1A, lanes 1 and 5). Peters et al.³ referred to these isozymes as *a*, *b*, *c*, *d*, and *e*, in the order of their anodal mobilities; they also recognized even more anodal bands,

等電点電気泳動法. 等電点電気泳動 (IEF) には, 4.7% アクリルアミド, 0.3% N-N' メチレン-ビスアクリルアミド 2.5% Ampholine (LKB) 混液 (1.1% pH 4~6, 1.1% pH 6~8, 0.3% pH 3.5~10) 及び 7% グリセロールを含むゲルプレート (120×110×1 mm) を作成した. IEF は冷却プレート付 LKB 2117 multiphor 装置を用い 10°C で実施した. 電極液には 1N NaOH (陰極) 及び 1N H_3PO_4 (陽極) を用いた. 予備電気泳動は 1,000 V, 10 mA 及び 10 W を最大限として 1 時間行った. 部分精製した試料は Whatman 3 MM (5×10 mm) 濾紙に塗布し, 陰極から 2 cm の所に置き, 最大限 1,300 V, 10 mA 及び 10 W で等電点電気泳動を 1 時間行った. その後濾紙を除去し, 更に 3 時間通電した後 IEF を終了した. TPI アイソザイムは濾紙の代わりにセルロースアセテート膜を用いた Scopes¹⁰ の修正法を用いて活性染色を行った. マーカー蛋白質 (Pharmacia 社製 pI calibration kit) の位置により等電点 (pI) を決定した.

酵素活性測定. 本測定では一般に, Beutler¹¹ 及び血液学の標準化のための国際委員会¹² の勧告に基づく手順に従った. 4 mM D-グリセルアルデヒド 3 リン酸, 0.2 mM NADH, 及び α -グリセロリン酸脱水素酵素 (1 IU/ml) を含む 100 mM トリエタノールアミン-2 mM EDTA 緩衝液を活性測定溶液 (pH 7.6) とし, 1/400 希釈溶血液を使用し, 340 nm, 30°C で分光光度計により酵素活性を測定した. 試料の調製, 使用機器及びデータ管理に関する詳細については佐藤ら¹³ が述べている.

結果

pH 7.4 の TEMM 緩衝液システム (図 1A) 及び pH 9.3 の tris-EDTA 緩衝液システム (図 1B) を使用した変異型及び正常型 TPI (TPI 1) の澱粉ゲル電気泳動パターンを示す. 図 1A 及び B のゲルを図解化したものを図 2 に示す.

TPI 1. TEMM 緩衝液ゲルでは, 正常な健康人から新しく調製した試料は 5 種の TPI アイソザイムを示し, そのすべてが陽極方向に移動する (図 1A, 第 1 及び第 5 列). Peters ら³ は, これらのアイソザイムを陽極方向への移動度の順に *a*, *b*, *c*, *d*, *e* としている. 彼らはまた骨格筋において, 更により陽極側のバンド *f*, *g*, *h*, *i* を認めている. 移動度の遅い

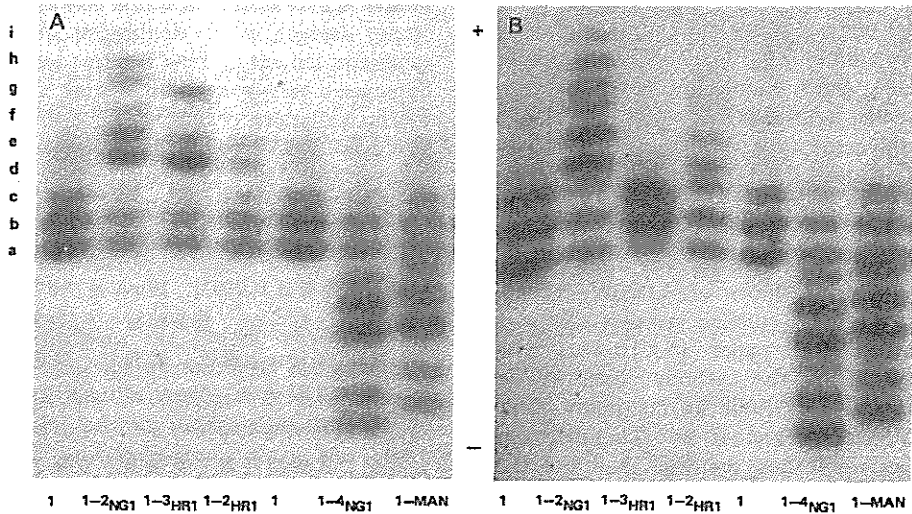


Figure 1. Starch gel electrophoresis of human erythrocyte TPI. The gels were stained for TPI activity. A. Pattern of TEMM buffer gel, pH 7.4. B. Pattern of tris-EDTA gel, pH 9.3.

図1. ヒト赤血球 TPI の澱粉ゲル電気泳動法. ゲルは TPI 活性染色を行った. A. TEMM 緩衝液ゲル, pH 7.4 のパターン. B. tris-EDTA ゲル, pH 9.3 におけるパターン.

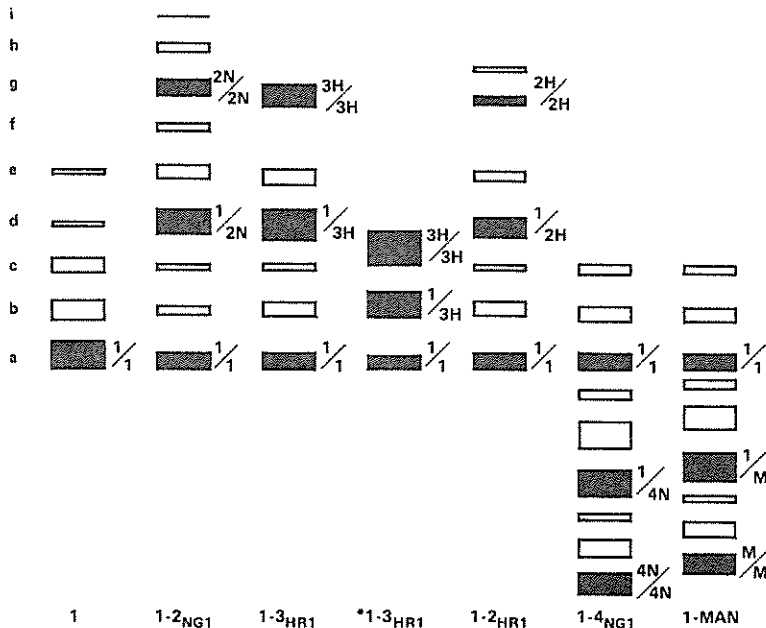


Figure 2. Schematic diagram of the gels of Figure 1A and B(*). Isozyme designations (a-i) of Peters et al³ are on the left. Designations of postulated subunit compositions are as follows: 1, normal subunit; 2N, 2_{NG1} subunit; 3H, 3_{HR1} subunit; 2H, 2_{HR1} subunit; 4N, 4_{NG1} subunit; M, Manchester subunit. , primary allozymes. , secondary deamidation products.

図2. 図1 A 及び B(*) のゲルの図解. Peters ら³ によるアイソザイムの名称 (a~i) を左に示す. 仮定サブユニット構造は次のとおりである: 1, 正常サブユニット; 2N, 2_{NG1} サブユニット; 3H, 3_{HR1} サブユニット; 2H, 2_{HR1} サブユニット; 4N, 4_{NG1} サブユニット; M, Manchester サブユニット. 脱アミド化していないアロザイム, 脱アミド化により二次的に生じたアイソザイム.

f, *g*, *h* and *i*, in skeletal muscle. The slower isozymes *a*, *b*, and *c* were much more prominent than isozymes *d* and *e*. On the TEMM buffer gel, isozyme *a* was generally the most active and *b* was slightly less active, while on the tris-EDTA buffer gel (Figure 1B, lanes 1 and 5), *a* and *b* were equally intense. The isozymes *d* and *e*, usually visible after a prolonged staining time, often did not appear as distinct bands especially on the tris-EDTA buffer gel. The isozymes *b-e* have been recognized to arise as the consequence of postsynthetic alteration(s), presumably spontaneous deamidation(s), of primary isozyme *a*.^{2,14-16} The IEF pattern is shown in Figure 3, lanes 1 and 5. The pI, obtained under the conditions described above, for the major band of normal TPI was 5.6.

アイソザイム *a*, *b*, *c* は、アイソザイム *d*, *e* に比べ非常に顕著であった。TEMM 緩衝液ゲルにおいては、一般にアイソザイム *a* の活性が最も強く、*b* の活性は *a* より少し弱かったが、tris-EDTA 緩衝液ゲルでは (図1B, 第1及び第5列), *a* と *b* の活性の強さは同じであった。アイソザイム *d* 及び *e* は通常染色時間を長くした場合に認められ、特に tris-EDTA 緩衝液ゲルでは、しばしば明確なバンドとしては認められなかった。アイソザイム *b-e* は、プライマリーアイソザイム *a* の生成後の変化、恐らく自然脱アミド化の結果として生じることが認められている。^{2,14-16} IEF パターンを図3の第1及び第5列に示す。上記の条件下で得た正常型 TPI の主要バンドの pI は 5.6 であった。

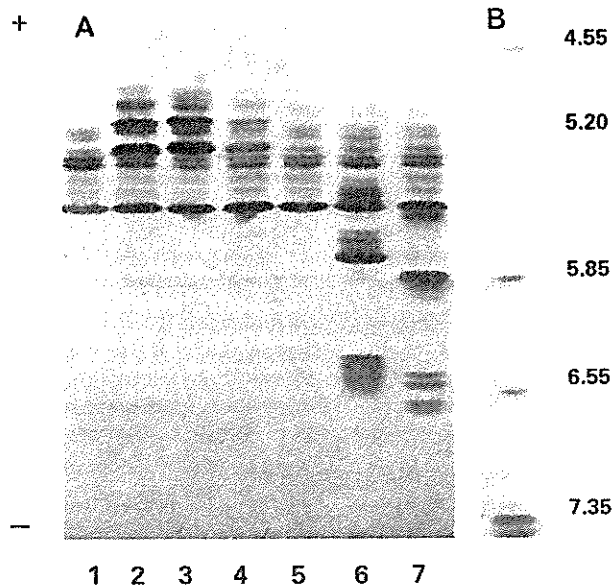


Figure 3. Isoelectric focusing pattern of TPI variants. TPI was stained for enzyme activity. 1, normal; 2, 1-2_{NGI}; 3, 1-3_{HR1}; 4, 1-2_{HR1}; 5, normal; 6, 1-4_{NGI}; 7, 1-MAN. The marker proteins for pI values, stained by Coomassie Blue, are on the right. pI 7.35, myoglobin-basic band; pI 6.55, human carbonic anhydrase B; pI 5.85, bovine carbonic anhydrase B; pI 5.20, lactoglobulin A; pI 4.55, soybean trypsin inhibitor.

図3. TPI 変異型の等電点電気泳動法パターン。TPI は酵素活性により染色した。1, 正常型; 2, 1-2_{NGI}; 3, 1-3_{HR1}; 4, 1-2_{HR1}; 5, 正常型; 6, 1-4_{NGI}; 7, 1-MAN. Coomassie Blue により染色した pI マーカー蛋白質を右側に示す。pI 7.35, ミオグロビン塩基性バンド; pI 6.55, ヒト炭酸脱水素酵素B; pI 5.85, ウシ炭酸脱水素酵素B; pI 5.20, ラクトグロブリンA; pI 4.55, 大豆トリプシン抑制因子。

TPI 2_{NG1}. This enzyme variant was from a Nagasaki female child. The pattern on the TEMM buffer gel is shown in Figure 1A, lane 2. Two new sets of three prominent isozyme bands each were recognized in addition to the usual set of isozymes *a*, *b*, and *c*. The intermediate set of isozymes migrated to the *d*, *e*, and *f* isozyme region and the most anodal set had similar mobilities to isozyme bands *g*, *h*, and *i* of skeletal muscle. A family study confirmed that the variation was genetically determined (Figure 4A). A similar variant pattern was also observed on the tris-EDTA buffer gel (Figure 1B, lane 2). The intermediate set of isozymes (the heterodimer) appeared twice as intense as either homodimer set, indicating that the abnormal isozymes had essentially the same activity as the normal. This differed from the staining pattern observed by Peters et al,³ so that although the mobility of this variant appears to be the same as Peters', on the basis of the activity ratio of its bands, we believe the two variants differ and have designated this one 2_{NG1}, abbreviating Nagasaki to NG.⁷ We propose that the slowest band of the most anodal set of bands represents the 2_{NG1} variant homodimer, and the slowest one of the intermediate set represents the normal/variant heterodimer. The other more anodally migrating isozymes of each set are recognized as the secondary products generated from the slowest one, presumably via sequential deamidation(s).¹⁴⁻¹⁶ A diagrammatic interpretation of the variant pattern is given in Figure 2, lane 2.

TPI 2_{NG1}. この酵素変異型は長崎の女子に検出されたものである。TEMM緩衝液ゲルにおけるパターンを図1Aの第2列に示す。通常見られる*a*, *b*, *c*のアイソザイムセットに加え、3本のはっきりしたアイソザイムバンドより構成される2群の新しいアイソザイムが認められた。中間のアイソザイム群は、アイソザイム領域*d*, *e*, *f*へ移動し、最も陽極側の群は骨格筋のアイソザイム・バンド*g*, *h*, *i*と同様の移動度を示した。この変異は遺伝的に決定されたものであることが家族調査により確認された(図4A)。同様の変異型パターンがtris-EDTA緩衝液ゲルにおいても認められた(図1B, 第2列)。中間のアイソザイム群(ヘテロダイマー)の活性はどちらのホモダイマーセットと比べても2倍の強さに観察され、この変異型アイソザイムが正常型と本質的に同じ活性を有することが示唆された。これはPetersら³によって観察された染色パターンとは異なっているので、この変異型の移動度はPetersらのものと同じであるように思われるが、我々はそのバンドの活性比という点で二つの変異型が異なるものであると確信し、長崎をNGと略しこれを2_{NG1}と命名した。⁷最も陽極側の1群のバンドのうち最も遅いバンドが2_{NG1}変異型ホモダイマーを表し、中間群の最も遅いバンドが正常型/変異型ヘテロダイマーを表すものと推定する。各群に見られるほかのより陽極側に移動するアイソザイムは、恐らくは一連の脱アミド化を経て、各群のうち最も移動度の遅いバンドから生じた第二次産物であると考えられる。¹⁴⁻¹⁶この変異型パターンを図解化したものを図2の第2列に示す。

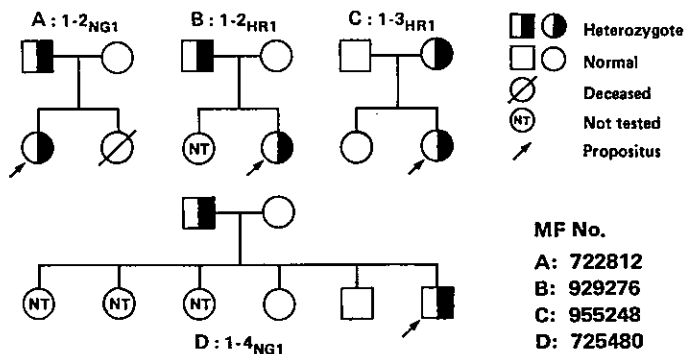


Figure 4. Pedigrees of the TPI variants.
 図4. TPI変異型の家系図。

The IEF pattern is shown in Figure 3, lane 2. In addition to the normal isozyme bands, two sets of anodally migrating isozymes were observed as prominent bands. Each major band of the most anodal and the intermediate set is presumed to be the 2_{NG1} variant homodimer and the normal/variant heterodimer, respectively. The pI of the presumptive 2_{NG1} homodimer band was 5.2.

TPI 2_{HR1} . A heterozygous variant pattern with markedly reduced enzyme activity was observed in a sample from a Hiroshima female child. The TPI activity in erythrocytes from this individual was 1,295 IU/gHb; the normal level of enzyme activity was $2,234 \pm 217$ IU/gHb (mean \pm SD, $n=310$).¹³ In a 1/2 diluted hemolysate, variant isozymes were not observed as distinct bands. But with the partially purified and concentrated sample, in addition to the usual *a*, *b*, and *c* isozymes, somewhat weaker than in the normal pattern, two unusually prominent isozymes were recognized in the *d* and *e* isozyme region, and very faint isozymes were visible in the *g* and *h* isozyme region (Figure 1A, lane 4). A similar pattern was also observed on the tris-EDTA gel (Figure 1B, lane 4), and the pattern was similar to that of the 1-2 variant of Peters et al.³ The locations of the variant isozymes were similar, but slightly cathodal, to the 2_{NG1} isozymes. The variant allozyme was named 2_{HR1} , abbreviating Hiroshima to HR, the proband having the phenotype 1- 2_{HR1} . The IEF pattern is shown in Figure 3, lane 4. The pI of the 2_{HR1} variant was 5.2. The genetic nature of the variant was confirmed via a family study (Figure 4B). The variant phenotype 1- 2_{HR1} was detected in the father, whose TPI activity was also approximately half normal (1,139 IU/gHb), whereas the mother showed a normal electrophoretic pattern with a normal level of enzyme activity.

TPI 3_{HR1} . The variant pattern was detected in a Hiroshima female child. Markedly prominent isozymes were recognized in the *d*, *e*, and *g* isozyme region together with somewhat weak *a*, *b*, and *c* isozymes (Figure 1A, lane 3). The variant isozymes migrated to the same position as the 2_{HR1} isozymes but slightly cathodal to the 2_{NG1} on the TEMM buffer gel. On the tris-EDTA gel (Figure 1B, lane 3), the variant isozymes migrated to the usual *b* and *c* isozyme region. Since this pattern was similar to that

IEFパターンを図3の第2列に示す。正常型アイソザイム・バンドに加え、陽極方向へ移動する2群のアイソザイムが顕著なバンドとして認められた。最も陽極側の群と中間群の主要バンドは、各々 2_{NG1} 変異型ホモダイマー及び正常型/変異型ヘテロダイマーと考えられる。 2_{NG1} ホモダイマーと考えられるバンドのpIは5.2であった。

TPI 2_{HR1} . 酵素活性が著しく減少したヘテロ接合変異型パターンが、広島の子供から得た試料に認められた。この子供の赤血球中のTPI活性は1,295 IU/gHbであった。酵素活性の正常レベルは $2,234 \pm 217$ IU/gHb (平均 \pm SD, $n=310$)であった。¹³ 1/2希釈溶血液中では、変異型アイソザイムは明確なバンドとしては認められなかった。しかし、部分精製し、濃縮した試料では正常パターンに見られるよりは幾分弱い通常のアイソザイム*a*, *b*, *c*に加え、二つの異常なアイソザイムが*d*及び*e*のアイソザイム領域に認められ、非常に弱いアイソザイムが*g*及び*h*のアイソザイム領域に認められた(図1A, 第4列)。tris-EDTAゲルにおいても同様のパターンが認められ(図1B, 第4列)、そのパターンはPetersら³の1-2変異型のパターンに類似していた。これらの変異型アイソザイムの位置は 2_{NG1} アイソザイムに類似していたが、少し陰極側に位置していた。広島をHRと略し、この変異型アロザイムを 2_{HR1} と命名した(発端者の表現型は1- 2_{HR1} となる)。IEFパターンを図3の第4列に示す。変異型 2_{HR1} のpIは5.2であった。家族調査によりこの変異型は遺伝的なものであることが確認された(図4B)。表現型1- 2_{HR1} 変異型が父親に検出されたが、その父親のTPI活性も正常の約半分(1,139 IU/gHb)であった。一方母親は正常レベルの酵素活性を示す正常な電気泳動パターンを呈した。

TPI 3_{HR1} . この変異型パターンは広島の子供に検出された。幾分弱いアイソザイム*a*, *b*, *c*とともに非常に顕著なアイソザイムが*d*, *e*, *g*のアイソザイム領域に認められた(図1A, 第3列)。TEMM緩衝液ゲルにおいて、これらの変異型アイソザイムは 2_{HR1} アイソザイムと同じ位置であったが、 2_{NG1} に比べ少し陰極側に移動した。tris-EDTAゲル(図1B, 第3列)においては、これらの変異型アイソザイムは通常の*b*及び*c*のアイソザイム領域に移動した。このパターンは

of the 1-3 variant, detected by Peters et al,³ this variant was renamed 1-3_{HR1} (previously reported as TPI 1-Hiroshima-2 by Asakawa and Mohrenweiser¹⁶). The 3_{HR1} isozymes seemed to be much more intense than the 3 variant. The 3_{HR1} allozyme was observed as a single band and the secondary isozymes, presumably deamidation products, were not observed. A diagrammatic interpretation is given in Figure 2, lanes 3 and 4. The subunit compositions were confirmed by dissociation-reassociation studies using normal and variant allozymes isolated from erythrocytes.¹⁶ The IEF pattern of the proband having the phenotype 1-3_{HR1} is shown in Figure 3, lane 3. The pI of the 3_{HR1} allozyme was 5.2. The result of a family study is shown in Figure 4C.

TPI 4_{NG1}. The variant pattern was identified in a Nagasaki male child. Similar banding patterns were observed on both the TEMM buffer gel and the tris-EDTA buffer gel (Figure 1A and B, lane 6). In addition to the usual set of isozymes, of somewhat weak intensity, two sets of cathodally migrating isozymes were recognized as prominent bands. The two sets of variant isozymes were much more intense than the usual set and the intermediate set was the most intense. Since the position of each variant isozyme was similar to, but slightly cathodal to, that of the TPI 1-Manchester variant (Figure 1A and B, lane 7), reported by Decker and Mohrenweiser⁵ and characterized by Asakawa and Mohrenweiser,¹⁶ this variant allozyme was named 4_{NG1}. In each set, the most cathodal band was presumed to be the primary isozyme and the others to be the secondary isozymes. We propose that the most cathodal set represents the variant homodimer and the intermediate set represents the normal/variant heterodimer (Figure 2, lane 6). The transmission of this variant from the father was confirmed via a family study (Figure 4D). The IEF patterns for 1-4_{NG1} and 1-Manchester are shown in Figure 3, lanes 6 and 7, respectively. As was expected for both slow variants, two sets of cathodally migrating isozymes were observed together with normal isozymes. We propose that for both the Manchester and the 4_{NG1} variants, the slowest bands of the most cathodal set and of the intermediate set represent the variant homodimer and normal/variant heterodimer, respectively. The pI values of the 4_{NG1} and Manchester variant homodimer were

Petersら³が検出した1-3変異型に類似していたので、この変異型を1-3_{HR1}と命名し直した(以前、浅川及びMohrenweiser¹⁶によりTPI 1-Hiroshima-2として報告された)。アインザイム3_{HR1}の活性は変異型3に比べ非常に強いように思われた。3_{HR1}アロザイムは単一バンドとして認められ、脱アミド化物と考えられる第2次アインザイムは認められなかった。図解を図2の第3及び第4列に示す。サブユニット構成は、赤血球から分離した正常型及び変異型アロザイムを用いた解離-再会合実験により確認されている。¹⁶表現型1-3_{HR1}を呈した発端者のIEFパターンを図3の第3列に示す。3_{HR1}アロザイムのpIは5.2であった。家族調査の結果を図4Cに示す。

TPI 4_{NG1}. この変異型パターンは、長崎の男子に確認された。TEMM緩衝液ゲル及びtris-EDTA緩衝液ゲル双方において、同様のバンディングパターンが認められた(図1A及びBの第6列)。幾分弱い通常のアインザイム群に加えて、陰極方向へ移動する2群のアインザイムが顕著なバンドとして認められた。この2群の変異型アインザイムの活性は、通常群より非常に強く、中間群が最も強かった。各変異型アインザイムの位置は、Decker及びMohrenweiser⁵が報告し浅川及びMohrenweiser¹⁶により特性が検討されたTPI 1-Manchester変異型(図1A及びB,第7列)の位置に近いが少し陰極側であったので、この変異型アロザイムを4_{NG1}と命名した。各群において、最も陰極側のバンドは第1次アインザイムと考えられ、その他のバンドは第2次アインザイムと考えられる。最も陰極側の群は変異型ホモダイマー、中間群は正常型/変異型ヘテロダイマーであると推定する(図2,第6列)。家族調査により、この変異型は父親から継承されたものであることが確認された(図4D)。1-4_{NG1}及び1-ManchesterのIEFパターンを各々図3の第6及び第7列に示す。二つの遅い変異型には、予想どおり正常なアインザイムとともに2群の陰極方向に移動するアインザイムが認められた。Manchester及び4_{NG1}変異型において、最も陰極側の群及び中間群の最も遅いバンドは、各々変異型ホモダイマー及び正常型/変異型ヘテロダイマーであると推定する。4_{NG1}及びManchester変異型ホモダイマーのpIは各々6.6及び6.8であった。

6.6 and 6.8, respectively. The order of cathodal mobility on the IEF between 4_{NG1} and Manchester variant was not consistent with that on the starch gels, repeated testing showing the same results.

Four electrophoretic variants were encountered in this screening, two in Hiroshima and two in Nagasaki. Hematologic data of the propositi as well as the affected parents were normal.

DISCUSSION

Electrophoretic variants of TPI are rare; population studies^{3,4,6} yielded only five variants of three different types in a total of 8,314 individuals. In this study, four variants were encountered in a total of 15,387 examinations, in which some kinships were included so the number of unrelated individuals was 10,864 (0.37/1,000). On the other hand, Eber et al¹⁷ reported three inherited heterozygote carriers of TPI deficiency in 3,000 Caucasoids. If three standard deviations were taken as the limit of normal activity and the inheritances were not considered, 12 additional blood samples would have been classified as deficiencies. Thus a frequency of at least 1/1,000 and a maximum of 5/1,000 is indicated. Recent data of Mohrenweiser and Fielek¹⁸ suggest that heterozygote carriers of a nearly complete deficiency of this enzyme occur with a frequency of 5/1,048 in Caucasoids and 7/146 (48/1,000) in Blacks. In a Japanese population, such a variant frequency was 1/310 (3/1,000).¹³ TPI thus shows a quite different patterns of variant frequencies from most enzymes studied in this respect, in that deficiency variants appear to occur more frequently than electrophoretic variants.

Of the four variants of TPI described in this paper, one (2_{HR1}) exhibits markedly decreased enzyme activity, as evaluated by the staining intensity of the variant bands. One other (2_{NG1}), although exhibiting normal staining activity at standard temperatures, is markedly heat labile (Asakawa, unpublished). The Manchester electrophoretic variant of TPI shown in Figure 1A and B, lane 7 is also very heat labile.¹⁶ We must accordingly, in seeking an explanation for the low frequency of electrophoretic variants in this system, consider the possibility of functional impairment of some heterozygotes for electrophoretic variants of this enzyme.

4_{NG1} と Manchester 変異型を比較すると、IEFでの陰極方向への移動度の順序は澱粉ゲルにおける場合とは一致しなかった。繰り返し行った検査においても同じ結果が得られた。

今回のスクリーニングにおいては、広島で2例、長崎で2例、計4例の電気泳動上の変異型が検出された。発端者及びその両親の血液学的検査の結果は正常であった。

考 察

TPIの電気泳動上の変異型は稀であり、集団調査^{3,4,6}によって、合計8,314名から三つの異なるタイプの変異型5例が検出されたにすぎない。本調査では4例の変異型が合計15,387名中に検出されたが、検査を行ったもののうち血縁関係のない対象者数は10,864名であった(0.37/1,000)。一方Eberら¹⁷は3,000名の白人のうちTPI欠損症の遺伝的ヘテロ接合体保因者を3例報告している。正常な活性範囲を3標準偏差内に設定し、遺伝性を考慮しなければ、更に12の血液試料を欠損症として分類できたであろうと報告されている。したがって少なくとも1/1,000、最高5/1,000の頻度が示唆される。Mohrenweiser及びFielek¹⁸の最近のデータは、この酵素がほとんど完全に欠損する欠損症のヘテロ接合体保因者が、白人において5/1,048、黒人において7/146(48/1,000)の頻度で存在することを示唆している。日本人集団においては、このような変異型の頻度は1/310(3/1,000)であった。¹³このようにTPIでは、酵素活性欠損変異型が電気泳動上の変異型より高い頻度で現れると考えられる。この点に関して、調査が行われた酵素のほとんどとは全く異なる変異型頻度のパターンを示す。

変異型バンドの染色強度より判定して、本報告で述べたTPIの変異型4例のうち、1例(2_{HR1})が著しく低い酵素活性を示した。他の1例(2_{NG1})は、通常の温度では正常な染色活性を示すが、熱に対して著しく不安定である(浅川、未発表)。図1A及びBの第7列に示す電気泳動上の変異型TPI Manchesterも熱に対して非常に不安定である。¹⁶したがって、このシステムにおける電気泳動上の変異型の頻度が低い理由を考察する上で、この酵素の電気泳動上の変異型の幾つかのヘテロ接合体に結合機能障害が存在する可能性を考慮することが必要である。

About 15 cases of TPI deficiency resulting in severe hemolytic anemia have thus far been described in the medical literature.¹⁹⁻²¹ Nevertheless, the relatively high frequency of heterozygous carriers in American Blacks would lead one to expect more numerous case reports. This has led to the suggestion that the homozygous state may often result in prenatal lethality. By extrapolation, one may speculate that there is also strong selection against the homozygotes (and, to a lower degree, as just mentioned, against the heterozygotes) for the electrophoretic variants of this enzyme in the glycolytic cycle, this leading to the near-equality in the two kinds of defects.

結果的に溶血性貧血を引き起こす TPI の欠損症約15例がこれまで医学文献に報告されている。¹⁹⁻²¹ しかしながら、米国の黒人においてヘテロ接合型保因者の頻度が比較的高いことから、更に多くの症例報告が予測される。このことは、ホモ接合型では多くの場合出生前に死亡しているのではないかということを示唆している。外挿法的に推察し、解糖系に位置するこの酵素の電気泳動上の変異型のホモ接合体に対し(また、先に述べたとおり、ヘテロ接合型に対し頻度は少ないが)強い淘汰が作用し、これが2種の欠損におけるほぼ完全な均等性を導くと考えることも可能である。

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* 198:42-52, 1979
2. 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
3. PETERS J, HOPKINSON DA, HARRIS H: Genetic and non-genetic variation of triose phosphate isomerase isozymes in human tissues. *Ann Hum Genet* 36:297-312, 1973
4. NEEL JV, MOHRENWEISER HW, MEISLER MM: Rate of spontaneous mutation at human loci encoding protein structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6037-41, 1980
5. DECKER RS, MOHRENWEISER HW: Origin of the triosephosphate isomerase isozymes in humans: Genetic evidence for the expression of a single structural locus. *Am J Hum Genet* 33:683-91, 1981
6. NEEL JV: Rare variants, private polymorphisms, and locus heterozygosity in Amerindian populations. *Am J Hum Genet* 30:465-90, 1978
7. SATOH C, TAKAHASHI N, ASAKAWA J, MASUNARI N, FUJITA M, GORIKI K, HAZAMA R, IWAMOTO K: Electrophoretic variants of blood proteins in Japanese. I. Phosphoglucomutase-2 (PGM 2). *Jpn J Hum Genet* 29:89-104, 1984 (RERF TR 11-84)
8. HASHIMOTO T, YOSHIKAWA H: Human erythrocyte adenosine triphosphate D-3-phosphoglycerate 1-phosphotransferase. *J Biochem* 56:279-84, 1964
9. SPENCER N, HOPKINSON DA, HARRIS H: Phosphoglucomutase polymorphism in man. *Nature* 204:742-5, 1964
10. SCOPES RK: Methods for starch-gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. *Biochem J* 107:139-50, 1968

11. BEUTLER E: Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods, 2nd ed. New York, Grune & Stratton, 1975
12. INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY: Recommendations for haemoglobinometry in human blood. *Br J Haematol* 13:71, 1967
13. SATOH C, NEEL JV, YAMASHITA A, GORIKI K, FUJITA M, HAMILTON HB: The frequency among Japanese of heterozygotes for deficiency variants of 11 enzymes. *Am J Hum Genet* 35:656-74, 1983 (RERF TR 2-83)
14. GRACY RW, YUAN PM: Spontaneous deamidation of two asparagines within the subunit contact sites of human triosephosphate isomerase. *Fed Proc* 39:1690, 1980
15. YUAN PM, TALENT JM, GRACY RW: Molecular basis for the accumulation of acidic isozymes of triosephosphate isomerase on aging. *Mech Ageing Dev* 17:151-62, 1981
16. ASAKAWA J, MOHRENWEISER HW: Characterization of two new electrophoretic variants of human triosephosphate isomerase: Stability, kinetic, and immunological properties. *Biochem Genet* 20:59-76, 1982 (RERF TR 2-82)
17. 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
18. MOHRENWEISER HW, FIELEK S: Elevated frequency of carriers for triosephosphate isomerase deficiency in newborn infants. *Pediatr Res* 16:960-3, 1982
19. SCHNEIDER AS, VALENTINE WN, HATTORI M, HEINS HL: Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. *N Engl J Med* 272:229-35, 1965
20. SKALA H, DREYFUS JC, VIVES-CORRONS JL, MATSUMOTO F, BEUTLER E: Triose phosphate isomerase deficiency. *Biochem Med* 18:226-34, 1977
21. VIVES-CORRONS JL, RUBINSON-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* 42:171-80, 1978