

**INHERITED THERMOSTABILITY VARIANTS OF SEVEN ENZYMES
IN A JAPANESE POPULATION**

日本人集団における7種の酵素の遺伝的熱安定性変異型

CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子

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

AKIKO MIURA 三浦昭子

CHIEMI UENO 上野知恵美

HIROKO ARAKAWA 荒川裕子

HIDEO OMINE 大峰秀夫

KAZUAKI GORIKI, M.D. 郷力和明

MIKIO FUJITA, M.D. 藤田幹雄



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION

財団法人 放射線影響研究所

A Cooperative Japan - United States Research Organization

日米共同研究機関

A paper based on this report was 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。

Annals of Human Genetics 49:11-22, 1985

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とをもって運営されている。


**INHERITED THERMOSTABILITY VARIANTS OF SEVEN ENZYMES
 IN A JAPANESE POPULATION**

日本人集団における7種の酵素の遺伝的熱安定性変異型

CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子); JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.*;
 AKIKO MIURA (三浦昭子); CHIEMI UENO (上野知恵美);
 HIROKO ARAKAWA (荒川裕子); HIDEO OMINE (大峰秀夫);
 KAZUAKI GORIKI, M.D. (郷力和明)**; MIKIO FUJITA, M.D. (藤田幹雄)

Division of Biochemical Genetics, Department of Clinical Laboratories
 臨床検査部遺伝生化学室

SUMMARY

The frequency of inherited variations in thermostability was investigated in a series of seven enzymes in a Japanese population. Among a total of 5,930 determinations, nine variants were encountered. In each instance one parent exhibited a similar finding. It is suggested that this procedure should detect a high proportion of the variants of these enzymes characterized by amino acid substitutions not altering molecular charge. Failure to detect more such variants is interpreted to mean that electrophoresis detects not only amino acid substitutions altering molecular charge but also a considerable proportion of those that do not alter charge.

INTRODUCTION

The first studies of the genetic consequences of exposure to the atomic bombs were, as necessitated by the state of the art at that time, morphological in nature.¹ Since 1972, however, a major effort to detect mutations affecting protein structure/function has been in progress. In this effort, the application of the technique of electrophoresis to some 30 different proteins has been the principal tool,²⁻⁴ but a subset of these proteins is also being examined for variation characterized by an alteration in the activity or thermostability of the protein. These latter studies are restricted to proteins functioning as enzymes. A report on the

要約

日本人集団において、7種類の酵素の熱安定性の遺伝的変異の頻度を調査した。合計5,930例の検査を行い、変異型9例を検出した。どの変異型の場合にも、片親に同様な変異型が認められた。これらの変異型酵素は、アミノ酸置換があっても分子の電荷に変化が生じないことをその特徴としているが、この熱安定性をみる方法は、これら変異型のかかり多くを検出するものであることを示唆している。この種の変異型がもっと多く検出されなかったことは、電気泳動法が分子の電荷を変化させるアミノ酸置換だけでなく、分子の電荷に変化を生じないアミノ酸置換のかかりの部分をも検出していることを意味するものと解釈される。

緒言

原爆被爆の遺伝的影響に関する最初の調査¹は、当時の技術の状態からやむをえず、形態学的な性格のものとなった。しかし1972年以後は、蛋白質の構造・機能に影響を及ぼす突然変異を探知する主要な調査が進行中である。この調査²⁻⁴では、約30種の蛋白質に電気泳動法の技術を応用することが主要な手段であるが、これらの蛋白質の一部については、その活性や熱安定性が変化することを特徴とする変異をも調べている。活性及び熱安定性に関する調査は、酵素蛋白質に限定される。最近、11種の

*Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School Michigan 大学医学部人類遺伝学教室
 **Department of Internal Medicine, Mihara Medical Association Hospital 三原医師会病院内科

frequency of activity variants of 11 enzymes has been recently published.⁵ In the present communication we report on the occurrence of inherited variants in thermostability in a subset of seven of the enzymes studied for frequency of activity variants. Normative data resulting from 5,930 determinations will be presented, after which we will discuss the potential of this approach in a monitoring program. In addition, we will consider the total frequency of variants revealed by a combination of these three approaches in a Japanese population, arguing that electrophoresis is detecting a considerable proportion of so-called 'silent' amino acid substitutions.

MATERIALS AND METHODS

Population. The blood samples used for this study were obtained from children of parents proximally exposed to the A-bomb in Hiroshima (one or both parents exposed within 2,000 m from hypocenter) and from children of parents distally exposed (one or both parents exposed beyond 2,500 m from hypocenter). The latter were sex and age matched to the former children. About 30% of the population is composed of siblings. Further details concerning the two groups of children are given elsewhere.^{2,6} Inasmuch as all the thermostability variants which were encountered were inherited, the complication of a radiation effect does not enter into this study and the results from the two sets of children will be combined.

Systems. The seven enzyme systems examined for heat denaturation characteristics were as follows: glutamate-oxaloacetate transaminase, soluble (GOT1, E.C. 2.6.1.1), lactate dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27), phosphoglycerate kinase (PGK, E.C. 2.7.2.3), glucose phosphate isomerase (GPI, E.C. 5.3.1.9), pyruvate kinase (PK, E.C. 2.7.1.40), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD, E.C. 1.1.1.44), and adenylate kinase-1 (AK1, E.C. 2.7.4.3).

Samples. The samples used in the heat denaturation experiments were the same 1:20 diluted hemolysates as those used in the screening for deficiency variants of these same enzymes. As described previously,⁵ samples were processed within 12-36 hours of collection. Leukocytes were excluded by passing whole blood through a column composed of α -cellulose and Sigmacell (R) type 50, and thrice-washed packed cells

酵素の活性変異型の頻度について報告した。⁵ 今回の論文では、活性変異型の頻度を調べた酵素のうち7種の酵素において熱安定性に遺伝的変異がみられたことを報告する。また、測定した5,930例から得た正常値を報告し、次いでモニタープログラムにおけるこの種のアプローチのもつ可能性を検討する。加えて、これら三つのアプローチの組み合わせによって、日本人集団に認められた変異型の合計頻度を考慮し、電気泳動法が、いわゆる'サイレント'アミノ酸置換を相当な率で検出していることに論及したい。

材料及び方法

集団. 本調査に用いた血液標本は、広島で原爆に近距離で被爆した親(両親の一方又は双方が爆心地から2,000 m未満で被爆した場合)に生まれた子供、並びに遠距離で被爆した親(両親の一方又は双方が爆心地から2,500 m以遠で被爆した場合)に生まれた子供から入手したものである。遠距離被爆者の子供はその性及び年齢が、近距離被爆者の子供とマッチするようになっている。この集団の約30%は同胞である。この二つの子供集団に関しては、他の論文に詳細に記述されている。^{2,6} 検出された熱安定性にかかわる変異型はすべて遺伝されたものであるため、本調査においては放射線の複合的影響は考慮する必要はない。そこでこれら二つの集団から得た結果をまとめて報告する。

酵素. 熱変性の特徴について調べた7種の酵素は次のものであった: 可溶性画分 glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT1, E.C. 2.6.1.1), lactate dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27), phosphoglycerate kinase (PGK, E.C. 2.7.2.3), glucose phosphate isomerase (GPI, E.C. 5.3.1.9), pyruvate kinase (PK, E.C. 2.7.1.40), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD, E.C. 1.1.1.44) 及び adenylate kinase-1 (AK1, E.C. 2.7.4.3)。

標本. 熱変性実験に用いた標本は、活性減少変異型のスクリーニングに用いたものと同じ1:20に希釈した溶血液であった。以前に述べたように、⁵ 標本は採血後12~36時間以内に処理した。全血液を、 α -cellulose及び Sigmacell (R) 50型混合物のカラムに通して白血球を除去し、赤血球層を0.154 M NaCl 溶液で3回

with 0.154 M NaCl solution were then either immediately stored in liquid nitrogen (Nitrogen Preserved, NP) or used for analysis within three days of collection (Fresh samples, FR), depending on the laboratory schedule. NP samples were used in two days to two months. (Thermostability of these seven enzymes did not change for four years as far as packed cells were preserved in liquid nitrogen.) Hemolysates were made from 150 μ l of packed cells and 2.85 ml of the stabilizing solution described by Beutler⁷ or Beutler et al,⁸ composed of β -mercaptoethanol (0.7 mM) and EDTA (2.7 mM), pH 7.0.

Procedures. Heat denaturation experiments were performed as follows: 1) Three or four 100 μ l aliquots of the hemolysates were prepared, the number depending on the system under study. The first aliquot was maintained in an ice-water bath and served as the initial control. The second to the fourth aliquots were heated in thermistor-regulated water baths set at an appropriate temperature, with $\pm 0.1^\circ\text{C}$ accuracy, for times as shown in Table 1. 2) Following heating, the tubes were quickly cooled in an ice-water bath and then centrifuged at 3,000 rpm (1,200 \times g) for 10 minutes to precipitate denatured proteins. 3) The enzyme activity (IU/liter) remaining in the supernatant of the heated hemolysates and in the untreated hemolysates was determined following the method of Beutler⁷ and Beutler et al,⁸ using an Aminco Rotochem II a/36 centrifugal analyzer, set at 340 nm and 30°C. The volume of the samples, lag time, number of reading points, and reading intervals are shown in Table 1.

洗浄した後、実験室のスケジュールに従って、直ちに液体窒素中に保存する(窒素保存標本, NP)か、又は採血後3日以内(新鮮標本, FR)に検査した。NP標本は2日から2か月後までに用いた(赤血球のみを液体窒素中に保存する限り、これら7種の酵素の熱安定性は4年間変わらなかった)。150 μ lの赤血球と、Beutler⁷又はBeutlerら⁸が記述した β -mercaptoethanol (0.7 mM)及びEDTA (2.7 mM), pH 7.0からなる安定化液2.85mlを用いて溶血液を作製した。

熱変性法. 熱変性実験は次のように実施した。

1) 溶血液100 μ l ずつを含む検査用標本を、3本又は4本作った。その数は、検査する酵素によって異なった。1本目は氷水浴中に保ち、零時間のコントロールとした。第2から第4の標本は、酵素ごとに適当とされる温度にサーミスターを用いて $\pm 0.1^\circ\text{C}$ の精度で調節された水浴中で、表1に示した時間加熱した。2) 加熱後、試験管を氷水中で急速に冷却し、次いで3,000 rpm (1,200 \times g)で10分間遠心し、変性した蛋白質を沈澱させた。3) Beutler⁷及びBeutlerら⁸の方法に従い、340 nm, 30°Cで、Aminco Rotochem II a/36遠心式分析機を用いて、加熱溶血液の上清中の残存酵素活性及び未処理の溶血液中の酵素活性 (IU/ ℓ)を測定した。表1には、標本の量、ラグタイム、測定数、測定間隔を示してある。4) 加熱標本それぞれの

TABLE 1 CONDITIONS EMPLOYED IN THE EXPERIMENTS TO DETERMINE THERMOSTABILITY OR THERMOLABILITY OF ENZYMES

表1 酵素の熱安定性又は熱不安定性を測定する実験に用いた条件

Enzyme	Heating condition			Activity determination				
	Temperature ($^\circ\text{C}$)	Time 1	Time 2 (min)	Time 3	Sampling volume (μ l)	Lag time (sec)	Reading points	Reading interval (sec)
GOT1	60	10	20		10	600	10	60
LDH	60	10	20		5	14	10	5
PGK	52.5	20	30		5	30	20	5
GPI	52.5	10	20	30	5	120	10	20
PK	52.5	20	30		20	30	15	60
6PGD	52.5	20	30		20	30	10	30
AK1	50	20	30		5	80	30	5

4) The activity remaining in the supernatant of each of the incubated aliquots was compared with that of the appropriate untreated hemolysate, and the results expressed as percent remaining activity.

As the heat denaturation experiments were conducted on the same day as the enzyme activity measurements screening for deficiency variants, in order to reduce the complexity of the procedure, no special buffer was employed for the heat denaturation experiments, and the conditions were chosen to be applicable to as many enzyme systems as possible. As AK1 was relatively more labile and GOT1 and LDH relatively more stable than the other enzymes, they were incubated at 50°C and 60°C, respectively. Since LDH is a tetramer composed of A- and B-subunits, over 80% of its activity being derived from the B-subunit. It is accordingly assumed that there is some bias against the detection of thermostability variants of this enzyme and that any variants detected are referable to the B-subunit.

Data Selection. As described in the previous paper on deficiency variants,⁵ a set of operating rules was adopted in order to minimize the contribution of technical errors or extraneous biological factors. Based on these rules, certain determinations were excluded not only from the data on enzyme activity but also from the data on heat denaturation. When the activities of duplicate determinations did not agree within 5%, or when for a given individual the activity values of four or more enzymes were 20% above or below the mean values for that day, or when on a given day the mean value for a certain enzyme was above or below the cumulative mean by one standard deviation (SD), those values were used neither to calculate the final cumulative mean nor to select thermostability variants. In addition, in the heat denaturation experiment, one more basis for excluding a result was adopted: if the daily mean of the 'percent remaining activity' of a specific enzyme was above or below the cumulative mean by 2 SD, or 15%, at two conditions, the results were deemed spurious and excluded from consideration.

Definition of a Thermostability Variant. With these procedures and constraints, we arbitrarily define a thermostability variant as one in which

上清中の残存活性と、それに対応する未処理溶血液中の活性とを比較し、その結果を残存活性百分率として表示した。

低活性変異型を求めて行った酵素活性測定スクリーニングと熱変性実験は、同じ日に行われたので、実験の煩雑さを少なくするために、熱変性実験には特別の緩衝液は用いなかった。また加熱条件は、できるだけ多くの酵素系に適用できるものを選んだ。AK1はその他の酵素に比べて比較的に不安定であり、GOT1とLDHは比較的に安定だったので、それぞれ50°C及び60°Cで加熱した。LDHはA-及びB-サブユニットからなる四量体であり、その活性の80%以上はB-サブユニットに由来する。したがって、この酵素の熱安定性変異型の検出にはある程度の偏りがあり、検出された変異型はB-サブユニットに由来するものと想定される。

データの選択. 低活性変異型に関する以前の論文⁵で述べたように、技術上の誤差又は標本固有のものではない外因性の生物学的因子の寄与を最小限にするために、一連の作業規則を採用した。これらの規則に基づき、酵素活性に関するデータからばかりではなく、熱変性に関するデータからも特定の測定結果を除外した。同一標本について2回測定した活性値が5%以内で一致しなかった場合、又はある対象者について4種以上の酵素の活性値が当日の平均値より20%以上高いか又は低い場合、あるいはある一日における特定の酵素の平均値が累積平均値よりも1標準偏差だけ高いか又は低い場合は、これらの値は、最終累積平均値の算定にも、熱安定性変異型の選定にも用いなかった。更に熱安定性実験では、データ除外のためにもう一つの基本条件を用いた。すなわち、特定の酵素の'残存活性百分率'のある日の平均値が、二つの測定条件において、累積平均値より2標準偏差分、ないしは、15%だけ高いか、又は低い場合は、結果は疑わしいものとみなされ、考慮すべきデータからは除外した。

熱安定性変異型の定義. これらの実験法とデータ選択のための制限に基づき、我々は熱安定性変異型

the percent remaining activity after heating is more than 2.5 SD below or above the cumulative mean at two heating times and, at the same time, the other six enzymes of the individual exhibiting the variant are of normal stability. In addition, these criteria must be met in two independent samples. This practice guards against false positives as a result of deteriorated samples.

Family Studies. Whenever the presence of a variant in a child was confirmed by a repeated determination using a newly obtained sample, an effort was made to analyze samples from both parents and as many siblings as possible, not only with respect to the enzyme in question but for all the enzymes under study. This analysis included the complete battery of electrophoretic and enzyme activity determinations.

RESULTS

Normative values for the heat stability of the seven enzymes studied, including values for both the genetic polymorphisms and the rare electromorphs included in the series, are given in Table 2. It will be apparent that conditions of processing and/or storage affect the apparent thermostability and that the various electrophoretic variants often have altered thermostabilities (although for some phenotypes the numbers are too small for definite conclusions). All departures from normality (i.e., variants) have been defined both with reference to the conditions under which the sample was processed (FR or NP) and the phenotype. In calculating the frequency of thermostability variants and, later, total variant frequencies, we will, to avoid double counting, not score an abnormal electromorph also as a thermostability variant.

Table 3 presents an accounting of the number of presumptive variants encountered in the study and the disposition of these variants on further studies. It will be noted that of the 38 apparent variants on the first screening, 22 (58%) were not confirmed on a repeat determination on a second sample, and were excluded from further studies. These 'failures to repeat' with a second sample were usually not borderline, but rather well within the normal range and so these false positives are not 'borderline' thermostability variants. For seven presumptive variants we have been unable to obtain the second sample necessary to confirm the findings with the

を便宜的に次のように定義する。すなわち加熱後の残存活性百分率が2種の加熱時間において、累積平均値よりも2.5標準偏差以上高いか又は低い値を示すものであり、同時にその変異型をもつ対象者が他の6種の酵素においては、正常な安定性を示す場合である。その上、これらの基準は、同一人から別の機会に採血された二標本のそれぞれにおいてみたまわれなければならない。この方法によって、変性により劣化した標本を変異型であるとする間違いから免れることができる。

家族調査. 新たに入手した標本を用いて再測定することにより、子供に変異型の存在が確認されたときは、常に両親並びにできる限り多くの同胞から標本を得て、問題の酵素のみならず調査中のすべての酵素について分析を行うよう努力した。すなわち家族調査においては、電気泳動法による検査も、酵素活性測定による検査も、すべての蛋白質、酵素について行ったということである。

結 果

表2には、調査中に検出された遺伝的多型性変異型及びまれな電気泳動変異型も含めて、調査した7種の酵素の熱安定性の正常値を示した。標本の処理法及び保存方法の両方又は一方の条件の違いが見掛け上熱安定性に影響を及ぼすであろうことも、電気泳動上の変異型がしばしば異なった熱安定性を示すことも明らかであろう(幾つかの表現型については、数が少な過ぎて明確な結論が出せないが)。正常から逸脱したもの(すなわち変異型)は、標本の処理条件(新鮮標本か窒素保存標本か)及び表現型を考慮して決定した。熱安定性変異型の頻度の計算においても、また後で、全変異型の頻度を計算するときにも、同一物を2回計算することを避けるために、熱安定性が正常とは異なっても、電気泳動上の変異型は熱安定性の変異型としては数えない。

表3には、この調査で検出された、変異型と推定されるものの数と、その後の検査で、これらがどのような結果になったかを示してある。最初のスクリーニングにおける38例の見掛け上の変異型のうち、22例(58%)は2回目に得た標本を用いた再測定では変異型であると確認されず、それ以後の調査(家族調査など)は行わなかった。第2の標本を用いて'前回と同じ結果が得られなかった'これらの値は、大低境界線上にあるような値ではなくて、むしろ十分に正常範囲内にある値であった。したがってこれらの後で正常型と分かった変異型の例では、安定性が正常値と異常値の'境界領域にあるような'熱安定性変異型を検出した

TABLE 2 THERMOSTABILITY PROFILES OF SEVEN ERYTHROCYTE ENZYMES FOR FRESH (FR) AND NITROGEN-PRESERVED (NP) SAMPLES

表2 新鮮標本 (FR) 及び窒素保存標本 (NP) を用いた場合の7種の赤血球酵素の熱安定性の概要

Enzyme	Electrophoretic phenotype	FR			NP				
		No. of determinations	Remaining activity (%)			No. of determinations	Remaining activity (%)		
			Time 1	Time 2	Time 3		Time 1	Time 2	Time 3
			(Mean \pm SD)				(Mean \pm SD)		
GOT1	1	260	78 \pm 8	75 \pm 8		732	82 \pm 8	81 \pm 10	
	1-2HR1	9	77 \pm 7	75 \pm 6		33	91 \pm 8	91 \pm 13	
	1-3NG1	1	73	64		4	86 \pm 8	86 \pm 14	
	1-4NG1	3	89 \pm 2	86 \pm 4		6	93 \pm 2	94 \pm 8	
	2HR1	0				1	80	86	
LDH	Normal	251	57 \pm 5	42 \pm 6		376	61 \pm 5	46 \pm 7	
PGK	1-Male	113	56 \pm 6	46 \pm 6		101	52 \pm 10	42 \pm 10	
	1-Female	135	58 \pm 5	47 \pm 5		112	55 \pm 6	44 \pm 6	
GPI	1	341	60 \pm 3	38 \pm 4	24 \pm 3	1031	62 \pm 4	40 \pm 4	27 \pm 4
	1-3HR1	0				4	61 \pm 1	39 \pm 1	26 \pm 2
	1-4HR1	2	50 \pm 4	29 \pm 4	18 \pm 2	2	46 \pm 1	25 \pm 1	15 \pm 0
	1-5HR1	1	62	39	25	0			
	1-5NG1	0				2	63 \pm 3	40 \pm 2	26 \pm 2
PK	1	237	56 \pm 6	54 \pm 6		737	52 \pm 6	51 \pm 6	
6PGD	A	281	89 \pm 4	84 \pm 4		565	86 \pm 5	81 \pm 5	
	AC	63	65 \pm 7	59 \pm 7		114	61 \pm 6	54 \pm 6	
	C	5	37 \pm 9	30 \pm 5		8	34 \pm 7	27 \pm 6	
	VSA*	0				1	56	51	
AK1	1	173	43 \pm 5	38 \pm 5		226	37 \pm 4	32 \pm 4	

*A heterozygous slow variant with type A.

A型を伴うヘテロ接合性の移動度の遅い変異型.

Description of phenotypes of GOT1 and GPI are shown by Kimura et al,⁹ and Tanis et al,¹⁰ respectively.GOT1 及び GPI の表現型については、木村ら⁹ 及び Tanis ら¹⁰ によってそれぞれ記述されている。

TABLE 3 NUMBER OF THERMOSTABILITY DETERMINATIONS AND FINDINGS IN HIROSHIMA CHILDREN

(Further explanation in text)
 表3 広島の子供における熱安定性に関する測定件数及び所見 (詳細は本文参照)

System	No. of determination	Presumptive variants	False positive	Not yet confirmed	Confirmed and family study positive	Correction factor for variants ¹⁾	Frequency of variants/1000
GOT1	FR 273 NP 776 } 1049	5	5	0	0	0.00	0.00
LDH	FR 251 NP 376 } 627	6	4	1	1	0.20	1.91
PGK	FR Male 113 Female 135 } 251 male ³⁾	4	1	0	3	0.00	6.51
	NP Male 101 Female 112 } 214 female ⁴⁾	0	0	0	0	0.00	
GPI	FR 344 NP 1039 } 1383	7	3	1	3	0.50	2.53
PK	FR 237 NP 737 } 974	1	1	0	0	0.00	0.00
6PGD	FR 349 NP 688 } 1037	10	6	3	1	0.43	1.38
AK1	FR 173 NP 226 } 399	5	2	2	1	0.67	4.18
Total	FR 1875 NP 4055 } 5930	38	22	7	9	1.80	2.36 (1.82) ²⁾

1) Correction factor for variants is calculated on the assumption that of the 'not yet confirmed,' the proportion of true variants would be as the ratio of confirmed : (confirmed + false positive).

変異型に関する補正係数は次の仮定のもとに計算された。すなわち、'未確認の変異型'中の真の変異型の割合は、確認された変異型：確認された変異型+後で正常型と分かった変異型。

2) Unweighted mean and weighted mean in parentheses. 非加重平均値及び括弧内は加重平均値。

3) Combined number of male samples examined as FR and NP. 新鮮標本及び莖葉保存標本として調べた男性対象例の合計数。

4) Combined number of female samples examined as FR and NP. 新鮮標本及び莖葉保存標本として調べた女性対象例の合計数。

first. Nine variants have been confirmed by a second sample; family studies (minimum of father and mother) have been carried out on each and in each case one parent or the other exhibited a similar thermodenaturation profile (Table 4). In the last column of Table 3, variant frequencies have been calculated not only on the basis of the confirmed variant(s) but also on the assumption that of the 'not yet confirmed', the proportion of true variants would be as the ratio of confirmed: (confirmed + false positive). Only one of the nine confirmed variants exhibited increased thermostability, so that variants with decreased thermostability are relatively much more common than those with increased thermostability.

There follows a brief discussion of the findings with respect to each system:

GOT1 - This series of 1,049 determinations included 57 electrophoretic variants of four types.⁹ Although the enzymatic activities associated with these variants tend to be low at 30°C (approximately 80% of that of GOT1 1),⁵ the gene products do not appear to be less stable than normal and one of them (GOT1 4NG1), indeed, appears to exhibit an increased thermostability. Otherwise, no abnormalities of thermostability were encountered among the 1,049 tests.

LDH - Among a total of 627 determinations, a single variant was encountered, characterized by increased thermostability. The father of this girl showed similar findings; the mother was normal (Table 4). This is the only example of a hereditary variant with increased thermal stability encountered in the 5,930 determinations. Electrophoretic patterns of the propositus and her father suggested the variant involved the A-subunit, since the intensity of the LDH3 and LDH4 bands was weak. Among the 3,121 samples subjected to electrophoretic screening between 15 October 1979 and 28 September 1981, nine additional cases of similar A-subunit deficiency were encountered. Family studies could be performed on seven of these nine cases. Two of these seven had been included in the thermostability series and found to be within normal limits, as were their parents, but both the affected parents and children had values 2 SD above normal. In the other five cases, the values for the propositi (NP samples) were $75 \pm 5\%$ and $62 \pm 6\%$ after heating at 10 and

わけではない。変異型と考えられた7例については、第1標本による所見の確認に必要な第2標本を入手することができなかった。第2標本によって9種の変異型が確認されている。各例について家族調査(最小限父母)が行われており、その各例において両親のいずれかが同様な熱変性の型を示した(表4)。表3の最後の欄の変異型の頻度は、確認された変異型だけではなく、'まだ確認されていない'変異型の中にもある割合で真の変異型が存在するという仮定によっても計算されている。この割合とは、確認された変異型の数と、後に正常型と判明した間違った変異型の数の和に対する確認された変異型の数として計算できるものである。確認された9種の変異型のうち、1種のみが熱安定性の増加を示したので、熱安定性の減少した変異型は熱安定性の増加したものよりはるかに一般的である。

以下は酵素別に所見を略述したものである:

GOT1 - 1,049の測定例の中には、4種57例の電気泳動上の変異型の測定例が含まれていた。⁹これらの変異型の酵素活性値は30°Cではやや低かったが、(GOT1 1の活性値の約80%)⁵それらは正常型より不安定のように思われず、実際にそれらの一つ(GOT1 4NG1)は熱安定性が増加しているように思われる。その他の点では、1,049件の検査例中に熱安定性の異常は認められなかった。

LDH - 合計627件の測定中、熱安定性の増加を特徴とする変異型が1例認められた。この少女の父も同様の所見を示したが、母親は正常であった(表4)。これは、5,930件の測定中に検出された唯一の熱安定性が増加している遺伝的変異型である。発端者とその父親の電気泳動のパターンから見ると、LDH3及びLDH4バンドの濃度が薄かったので、A-サブユニットの変異型であることが示唆された。1979年10月15日から1981年9月28日までの間に電気泳動法のスクリーニングを受けた3,121例の標本中には、このほかに9例のA-サブユニットの活性減少を示すものが認められた。これら9例中の7例について家族調査を行うことができた。これら7例中の2例は熱安定性を測定した標本中に含まれており、正常範囲内に入る熱安定性を示し、その両親も同様であった。しかしA-サブユニットの活性減少を示した親と子供の熱安定性は、いずれも正常値よりも2標準偏差高い値を示した。その他の5例においては、発端者(窒素保存の標本)の値は、10分及び20分加熱

TABLE 4 FAMILY STUDIES OF THERMOSTABILITY VARIANTS

表4 熱安定性変異型の家族調査

Enzyme	Variant MF No.	Family member	Initial activity (IU/gHb)	Percent remaining activity after heating			
				Time 1	Time 2	Time 3	
LDH	Normal		170.5 ± 12.8	61 ± 5	46 ± 7		
	[Redacted]	Child	177.8	80 (3.6SD)	69 (3.2SD)		
		Mother	165.1	68 (1.3SD)	53 (1.0SD)		
		Father	157.7	76 (2.8SD)	66 (2.8SD)		
PGK	1-Male		259.8 ± 15.0	52 ± 10	42 ± 10		
	1-Female		266.6 ± 15.6	55 ± 6	44 ± 6		
	[Redacted]	Child	252.7	23(-2.9SD)	12(-3.2SD)		
		Mother	278.6	40(-2.6SD)	28(-2.8SD)		
		Father	263.7	54 (0.2SD)	42 (0SD)		
	[Redacted]	Child	253.6	8(-4.4SD)	4(-4SD)		
		Mother	228.7	35(-3.5SD)	25(-3.3SD)		
		Father	251.1	59 (0.7SD)	46 (0.4SD)		
	[Redacted]	Child	279.2	19(-3.3SD)	11(-3.3SD)		
		Mother	289.9	35(-3.5SD)	27(-2.9SD)		
		Father	-	-	-		
	GPI	1		51.5 ± 4.6	62 ± 4	40 ± 4	27 ± 4
[Redacted]		Child	39.4	42(-5.4SD)	20(-4.8SD)	11(-4.1SD)	
		Mother	50.8	65 (0.8SD)	43 (0.7SD)	30 (0.8SD)	
		Father	46.3	48(-3.8SD)	26(-3.3SD)	15(-3.1SD)	
		Aunt 1	40.5	47(-4.1SD)	26(-3.3SD)	15(-3.1SD)	
		Uncle	41.2	45(-4.6SD)	24(-3.8SD)	13(-3.6SD)	
		Brother	49.2	65 (0.8SD)	43 (0.7SD)	29 (0.8SD)	
[Redacted]		Aunt 2	52.6	64 (0.5SD)	44 (1.0SD)	29 (0.5SD)	
		Child	47.2	47(-4.1SD)	25(-3.6SD)	14(-3.3SD)	
[Redacted]		Mother	49.5	64 (0.5SD)	42 (0.5SD)	29 (0.5SD)	
		Father	47.9	49(-3.5SD)	27(-3.1SD)	16(-2.8SD)	
[Redacted]		Child	41.5	47(-4.1SD)	25(-3.6SD)	16(-2.8SD)	
		Mother	50.5	46(-4.3SD)	29(-2.6SD)	16(-2.8SD)	
		Father	-	-	-	-	
6PGD		A		6.0 ± 0.5	86 ± 5	81 ± 5	
		[Redacted]	Child	6.48	58(-5.6SD)	52(-5.8SD)	
	Mother		-	-	-		
	Father		6.10	50(-7.2SD)	43(-7.6SD)		
AK1	1		202.4 ± 16.9	37 ± 4	32 ± 4		
	[Redacted]	Child	135.2	24(-3.4SD)	20(-3.1SD)		
		Mother	134.1	26(-2.9SD)	21(-2.8SD)		
		Father	208.9	36(-0.2SD)	30(-0.5SD)		

1) Mean ± SD for the normal phenotype (or type 1, or type A) is shown on the first line for each of the enzymes and data of the family members continued.

各酵素の第1行に正常な表現型(すなわち1型, 又はA型)に関する平均値 ± 標準偏差を示し, それに続いて家族構成員のデータを示した。

2) Data for children were those obtained from the second new NP samples since all their parents were examined on NP samples and mean ± SD shown is for NP samples.

親は全員, 窒素保存標本を用いて検査したので, 子供に関するデータは, 2回目に入手した新しい窒素保存標本について得たものであり, また平均値 ± 標準偏差は窒素保存標本に関するものである。

3) Number in parentheses shows departure from the mean by SD unit.

括弧内の数字は, 平均値から標準偏差単位でどれぐらい差があるかを示す。

20 minutes, respectively. In each case, one parent showed the electrophoretic A-subunit deficiency. The thermostability values were $75 \pm 3\%$ and $62 \pm 4\%$ for the five affected parents and $66 \pm 3\%$ and $50 \pm 4\%$ for the five normal parents. The values of the affected children and parents are elevated values, but technically do not meet our criteria for a thermostability variant. We conclude that we have identified among the above-mentioned electrophoretic series of 3,121 determinations at least one and possibly several deficiencies of the A-subunit of LDH in consequence of which the remaining B-subunits exhibit increased thermostability, although in general not to a degree that fulfilled the criteria for a thermostability variant as used in this paper.

PGK - This enzyme is the only sex-linked trait in the series. The thermostability profiles of males and females are identical. Among the 214 determinations on males, there were 3 exhibiting increased lability (Table 3). In each instance, as expected with a sex-linked trait, the mother's enzyme exhibited increased thermostability but the father's was normal. No thermostability variants were encountered among the 247 females who were screened.

We have previously reported that this series includes three male siblings exhibiting significantly decreased enzyme activity at 30°C (approximately 40% of normal).⁵ The enzyme of these three males (Master File Numbers [redacted], [redacted], and [redacted]) also exhibited increased thermostability, as did that of the mother. Since, however, these variants have already been included in a tabulation of activity variants, they are not included in Table 3.

GPI - Four different types of rare electrophoretic variants of this enzyme¹⁰ were represented in the sample of 1,383 examinations. As shown in Table 2, three of these exhibited normal thermostability but all four individuals with the 1-4HR1 phenotype exhibited increased lability, of about the same degree, confirming the earlier observations of Satoh and Mohrenweiser¹¹ concerning the thermostabilities of electrophoretic variants of this enzyme.

Three thermostability variants have been encountered in this enzyme series, all confirmed by family studies. In one instance (Table 4), in

後はそれぞれ $75 \pm 5\%$ 及び $62 \pm 6\%$ であった。各例とも、片親は電気泳動法によってA-サブユニットの活性減少を示した。A-サブユニットの減少している5人の親の熱安定性の値は、 $75 \pm 3\%$ 及び $62 \pm 4\%$ 、正常な5人の親では $66 \pm 3\%$ 及び $50 \pm 4\%$ であった。変異型をもつ子供と親の値は、上昇してはいるが、技術的には、熱安定性変異型に関する我々の基準をみたしてはいない。我々は上に述べたように、電気泳動法で検査した3,121例の中に、おおむね本報で熱安定性変異型の決定に用いている基準をみたすほど十分な安定性は示さなかったものの、A-サブユニットの活性が減少した結果として、残ったB-サブユニットが熱安定性の増加を示した変異型を少なくとも1例、恐らくは数例確認したと考えている。

PGK - この酵素は熱安定性を測定した酵素中唯一の伴性遺伝形質である。酵素の熱安定性は男女で同じである。男性を214例検査した中で、3例が不安定性の増加を示した(表3)。いずれの場合にも、伴性遺伝型質として期待されるように、母親の酵素は熱に対する不安定性の増加を示したが、父親のそれは正常であった。スクリーニングを行った247例の女性中、熱安定性変異型は認められなかった。

以前に我々は、この子供集団中には、 30°C で酵素活性の有意な減少を示す男性同胞が3例(正常例の約40%)含まれていることを報告した。⁵ この3例の男性(MF番号 [redacted])の酵素は、母親のそれと同様、熱不安定性の増加を示した。ただし、これらの変異型は既に活性変異型として登録されているので、表3の熱安定性変異型には含めなかった。

GPI - この酵素の電気泳動上の4種のまれな変異型¹⁰は、1,383件の測定を行った集団に認められたものである。表2に示すように、これらのうちの3種は正常な熱安定性を示したが、表現型が1-4HR1である4例すべてはほぼ同じ程度に不安定性が増加していた。これはこの酵素の電気泳動法による変異型の熱安定性に関する佐藤及びMohrenweiser¹¹の以前の観察結果を確認したものである。

この酵素の熱安定性の測定では、3例の熱不安定性変異型が認められているが、これらはすべて家族調査によって確認された。父親も変異型をもっていたある

which the father was also affected, the family studies were extended to include a brother, two paternal aunts, and one paternal uncle; the uncle and one of the aunts were also trait carriers. This particular variant exhibited 77% of normal activity at 30°C, and is mentioned in our previous paper on activity variants,⁵ but not scored as an activity variant. With respect to the other two variants, in both cases one parent exhibited the trait, so that the genetic nature of the variant is confirmed even though the father of one child refused examination.

PK - No thermostability variants of this enzyme were detected in the course of 974 determinations. This seems surprising in view of the high frequency of variants of this enzyme with low activity (13.8/1,000 determinations).⁵ This series included nine persons heterozygous for a low activity variant; none of these showed increased thermostability, a finding to be expected since it is the thermostability of the product of the normal allele which is being measured.

6PGD - In contrast to the enzymes discussed thus far, this system is characterized by a relatively common polymorphism, so that the 1,037 determinations include homozygotes as well as heterozygotes for this variant allele (PGD*C). The heterozygote (type AC) shows marked thermostability and the homozygote (type C), very marked lability. Within the limits of error, the loss in the homozygote is twice that in the heterozygote. The activities of these three phenotypes at 30°C (NP samples) differed only slightly (A: 6.0 ± 0.5 IU/gHb, AC: 5.6 ± 0.5 IU/gHb, C: 5.4 ± 0.6 IU/gHb).

Aside from the above, two thermostability variants were encountered. The loss of activity in the first variant (MF No. [redacted]) was similar to that in type AC samples though it was type A and its activity was normal (6.48 IU/gHb) for its type. His father who was type A also showed the same degree of thermostability (Table 4). The second variant (MF No. [redacted]) had already been identified as a slowly-migrating enzyme band and so in our treatment of variant frequencies (below) will be tabulated with the electromorphs.

AK1 - A single thermostability variant was encountered in 399 determinations. This individual

1例(表4)では、家族調査を拡大して、兄1例、父方の伯母2例、及び父方の伯父1例をも検査した。この伯父と伯母の1例にも変異型が認められた。この特別の変異型こそ、30°Cで正常活性の77%を示し、活性変異型に関する以前の論文⁵に述べられてはいるが、活性変異型としては採用されなかった例である。その他の二つの変異型は、いずれの例においても片親が変異型を示したので、そのうち1例では父親が検査を拒否したけれども、変異型が遺伝的形質であることは確認されていることになる。

PK - 974件の測定中には、この酵素の熱安定性変異型は検出されなかった。この酵素では、低活性変異型の頻度が高い(13.8/1,000測定)⁵ことを考えると、この現象は驚くべきことと思われる。熱安定性について測定した人の中には、低活性変異型をヘテロ接合体としてもつ者が9人いた。これらの人たちのうち、だれも熱不安定性の増加を示さなかったが、測定しているのは(活性の)正常な対立遺伝子の産物の熱不安定性であるから、このことは予期された所見である。

6PGD - これまで述べてきた酵素とは対照的に、この酵素は比較的頻度の高い多型現象を特徴とするので、1,037件の測定例中には、この多型性変異型対立遺伝子(PGD*C)に対するホモ接合体並びにヘテロ接合体の人々が含まれている。ヘテロ接合体(AC型)は著しい熱不安定性を示し、ホモ接合体(C型)は極めて著しい不安定性を示した。誤差の範囲内では、ホモ接合体における(熱による)活性の消失の度合はヘテロ接合体の場合の2倍である。30°Cにおけるこれら三つの表現型の活性(窒素保存標本)にはほとんど差がなかった(A: 6.0 ± 0.5 IU/gHb, AC: 5.6 ± 0.5 IU/gHb, C: 5.4 ± 0.6 IU/gHb)。

上記とは別に、二つの熱不安定性変異型が認められた。最初の変異型(MF番号 [redacted])は電気泳動上のタイプはA型であり、その活性はその型にしては正常であったが(6.48 IU/gHb)、その活性の(熱による)消失はAC型標本のそれと同様であった。A型であった彼の父親も同程度の熱不安定性を示した(表4)。第2の変異型(MF番号 [redacted])は、既に遅い移動度酵素バンドを示す変異型として確認されていたので、次項の変異型の頻度に関する記述においては、電気泳動の変異型として扱うことにする。

AK1 - 399件の測定中、熱不安定性変異型が1例認められた。この対象者については以前の報告中で、

had previously been noted to have a low activity at 30°C, but the percent normality (67%) was one percentage point above our arbitrary cut-off level for activity variants.⁵ The carrier mother of this person also exhibited a low initial activity (66% of normal). Rather arbitrarily, we score this as a thermostability variant.

Although we do not feel the data are sufficiently extensive to permit across-locus comparisons as to types of variants, we note that less genetic variation has been encountered with respect to this enzyme than any other so far studied: no electrophoretic variant in 10,817 electrophoretic examinations, and no activity variants in 2,863 determinations other than the borderline case mentioned above (which fully qualifies as a thermostability variant).

DISCUSSION

This study confirms the demonstration of Mohrenweiser and Neel¹² that, under survey conditions, it is possible to identify a class of inherited biochemical variants solely by alterations in thermostability. Their frequency of 0.0018 in this study, with 95% confidence interval of 0.0008-0.003, is in agreement with the frequency of 0.0038, with 95% confidence interval of 0.0008-0.0110, encountered in the predominantly Caucasoid population in Ann Arbor, Michigan. For reasons detailed earlier, this is thought to be a minimal estimate of the frequency of such variants. Given the invariable occurrence in one parent of a finding similar to that in the proband, a finding lying outside the normal distribution, we conclude we are recognizing a qualitative trait exhibiting monogenic inheritance.

Six enzymes have now been studied in Japanese and Caucasians for the frequency of three kinds of variants, namely, electrophoretic, activity, and thermostability variants. The results are summarized in Table 5. For these purposes, an activity variant has been arbitrarily defined as one which in a heterozygote results in enzyme levels 66% of normal. The basis and empirical justification for that designation has been discussed in detail elsewhere.¹³ There is potential overlap in this classification, i.e., there are many examples of an electrophoretic variant also exhibiting reduced activity and/or decreased thermostability¹⁴⁻¹⁶; to prevent 'double counting', precedence in classification is given to electro-

30°Cで活性が低いと記述されているが、正常値に対する活性値の百分率(67%)は、活性変異型を定めるために、我々が任意に定めた値よりも1%だけ高かった。⁵ 同じ変異型を有するこの対象者の母親の熱処理前の酵素活性は低かった(正常値の66%)。この変異型は、熱安定性の変異型として分類しておくことにする。

この熱安定性に関するデータは、遺伝子座と遺伝子座の間で変異型の種類について比較ができるほど十分に大規模なものとは思われないが、この酵素について認められている遺伝的変異は、これまで調査されてきた他のいかなる酵素よりも少ないことに注目している。すなわち、10,817件の電気泳動検査では電気泳動上の変異型は全く認められず、また2,863件の活性測定においても、上記の活性変異型としての境界線上にあるような例以外の変異型は認められなかった(しかし、この例は熱安定性変異型としての資格は十分にある)。

考 察

今回の調査では、集団調査という条件のもとでも、熱安定性の変化のみを指標として、一群の遺伝性の生化学的変異型を確認できるとするMohrenweiser及びNeel¹²の報告を確認した。本調査で認められた遺伝的な熱安定性変異型の頻度は0.0018で、95%信頼区間は0.0008から0.003であるという所見は、Michigan州Ann Arbor市で主として白人集団に認められた頻度0.0038、95%信頼区間は0.0008から0.0110であるという所見と一致する。先に示した詳細な理由によって、この頻度は、そのような変異型の頻度の最小推定値と考えられる。発端者の示したと同様な性質、すなわち熱安定性が正常値の分布する領域からはずれているという性質が、片親に必ず見られたことから、我々は(この調査において)単一遺伝子に支配されている定性的形質を検出しているのだという結論を得ている。

現在までに、日本人及び白人集団について、6種の酵素の3種の変異型、すなわち、電気泳動、活性、及び熱安定性の変異型の頻度を調べたことになる。その結果を表5に要約した。この調査では、活性変異型とは、ヘテロ接合体においては酵素活性値が正常値の66%になるものであるという我々の考え方によって定義されている。この定義の理論的根拠及び実験によって得られた正当性については、他の論文¹³で詳しく考察されている。この3種の変異型の分類には重複の可能性がある。すなわち、電気泳動上の変異型が同時に活性の減少及び又は熱安定性の減少をも示す例も多い。¹⁴⁻¹⁶ '同一物を2回数えること'を防ぐため、

morphs (regardless of other properties), then to activity variants, and finally to thermostability variants. We have limited the Caucasoid sample of Table 5 to a predominantly Caucasoid population from Ann Arbor, Michigan, because the techniques for detecting these three types of variants were introduced into the Japanese study from Ann Arbor, thus ensuring maximum comparability. The technique for determining thermostability variants, however, differed slightly in the two laboratories, the Ann Arbor study holding the samples at each of three different temperatures for 20 minutes. The simpler approach adopted in the present study seems more appropriate to large-volume screening. (Failure of these frequencies per 1,000 to agree precisely with those published earlier is due to the fact that here we express the results with a weighted mean.)

分類にあたっては(他の性質を無視して)電気泳動上の変異型をまず第一に選び、次に活性変異型、最後に熱安定性変異型を選んだ。表5の白人集団としては、Ann Arborの白人を主とする集団に限定した。その理由は、これら3種の変異型を検出する技術はMichigan州Ann Arbor市の集団に用いられたものを日本の調査へと導入したので、日本人集団と比較するものとしては、この集団が最適だからである。しかし、熱安定性変異型検出のための測定技法は両研究室でやや異なっており、Ann ArborのMichigan大学による調査では標本を三つの異なる温度でそれぞれ20分間加熱した。本調査で用いた方法はもっと簡単な実験法で、多数の標本を扱うスクリーニングにはより適しているように思われる。(1,000検査数あたりのこれら変異型の頻度が、以前に発表した文献の頻度と完全に一致していない理由は、本報では結果を述べる場合、加重平均を用いたことによる)。

TABLE 5 FREQUENCY OF 'RARE' VARIANTS OF SIX ENZYMES PER 1,000 DETERMINATIONS IN A JAPANESE POPULATION (HIROSHIMA AND NAGASAKI) AND IN A US PREDOMINANTLY CAUCASOID POPULATION. THE ENZYMES ARE GOT1, LDH, PGK, GPI, PK, AND AK1

表5 日本人集団(広島・長崎)及び米国の主として白人の集団における6種の酵素の'まれな'変異型の1,000測定数あたりの頻度。酵素はGOT1, LDH, PGK, GPI, PK, 及びAK1である

Type of variant	Group	Number of determinations	Number of variants	Frequency /1000	95% confidence interval	Reference
Electrophoretic ¹⁾	Japanese	38087	117	3.07	2.5 - 3.6	Neel et al ²
	Caucasoid	8484	21	2.47	1.5 - 3.8	Neel et al ²⁴
Activity	Japanese	18232	54 (60.8) ²⁾	3.33 ³⁾	2.5 - 4.2	Satoh et al ⁵
	Caucasoid	6428	6	0.93	0.3 - 2.0	Mohrenweiser ^{13,25}
Thermostability	Japanese	4893	8 (9.37) ²⁾	1.91 ⁴⁾	0.8 - 3.5	This paper
	Caucasoid	500 ⁵⁾	2	4.00	0.5 - 14.4	Mohrenweiser & Neel ¹²

1) Electrophoretic screening for PK and PGK were not performed. Numbers of determinations and variants were based on the other four enzymes. The frequency/1,000 is a mean for the four enzymes.

PK及びPGKに関する電気泳動法によるスクリーニングは行わなかった。測定及び変異型の数はその他4種の酵素によった。頻度/1,000は4種の酵素の平均値。

2) Number of variants in parentheses are calculated on the same assumption used to calculate the frequency of variants/1,000 in Table 3 of this paper.

括弧内の変異型例数は、本報の表3における変異型/1,000の頻度の算定に用いたものと同じ仮定に基づいて算定したものの。

3) Mean calculated with the frequencies in Table 5 of Satoh et al.⁵

佐藤ら⁵の表5の頻度によって算定した平均値。

4) Mean calculated with the frequencies in Table 3 of this paper.

本報の表3の頻度によって算定した平均値。

5) GOT1 not screened for Caucasoid.

GOT1は、白人についてはスクリーニングを行わなかった。

Previous studies^{10,17-19} have established that among the 22 proteins then being studied in this laboratory, the frequency of electrophoretic variants in the enzymes not studied for activity is somewhat higher than in those which were so studied. If, as seems probable, there is intralocus correlation in the frequencies of these three types of variants, then our estimates of the frequency of activity and thermostability variants could be on the low side.

The data on activity and thermostability variants have not yet reached the point where specific locus-type comparisons across ethnic groups seem indicated. On the other hand, the data are sufficient for a comparison by type of variant. Because of the smallness of some of the numerators, we have calculated confidence intervals based on the expectation of a Poisson variable for numerators below 50. With this procedure, there appears to be a significant difference between the two populations only with respect to the frequency of activity variants. An analysis of Table 5 for heterogeneity, which would usually be the next step, is precluded by the overlapping nature of the samples on which the frequencies are based. The total frequency of these three types of variants in the two populations is quite similar, 8.3/1,000 in the Japanese and 7.4/1,000 in the Ann Arbor Caucasoids.

These data bear importantly on the issue of average locus heterozygosity in human populations. In estimating this heterozygosity, it has often been assumed that electrophoresis detects only variants in which an amino acid substitution has altered molecular charge. Since it can be readily calculated that only about one-third of mutations resulting in an amino acid substitution will alter molecular charge, and since selection against mutations resulting in uncharged amino acid substitutions should not be greater than against charged, and possibly less, it is generally assumed there is a large pool of 'silent' genetic variation awaiting discovery. The present study raises questions as to the size of this pool. As we have noted, the enzymes examined in this study are electrophoretically less variable than most proteins examined by one-dimensional electrophoresis. Thus, whereas the average Index of Heterozygosity for a series of 23 proteins in Japanese (including those covered by this report; Neel et al,²⁰ Table 2)

以前の調査^{10,17-19}によれば、当時我々の研究室で調査していた22種の蛋白質のうち、活性測定をしなかった酵素では、活性測定を行った酵素に比べて電気泳動上の変異型の頻度が幾らか高い。これはありうることと思われるのだが、もし、これら3種の変異型の頻度に座位内で相関性があるとすれば、活性及び熱安定性の変異型の頻度に関する我々の推定値は低い方にあると考えられる。

活性及び熱安定性変異型に関するデータは、民族集団間で特定の座位ごとに変異型を比較することができると思われる程には十分に集まってはいない。しかし、このデータは変異型の種類別比較を行うには十分なものである。幾つかの分子は値が小さいので、50未満の分子のPoisson変数の期待に基づく信頼区間を算定してきた。この方法によれば、活性変異型の頻度に関してのみ二集団間に有意な差があるように思われる。普通は次の段階となる異質性に関する表5の解析は、頻度の基礎である標本の重複性によって妨げられる。この二集団におけるこれら3種の変異型の合計頻度はかなり近似しており、日本人集団では8.3/1,000、Ann Arborの白人集団では7.4/1,000である。

これらのデータは、人間集団における平均座位ヘテロザイゴシティ(異型接合性)の問題と重大な関係がある。このヘテロザイゴシティの推定に際しては、電気泳動法はアミノ酸置換の結果、分子の電荷が変化しているような変異型のみを検出するものであるとしばしば想定している。アミノ酸置換の原因となる突然変異の約1/3のみが分子の電荷を変えることが容易に計算できること、及び分子の荷電状態を変化させないようなアミノ酸置換の原因となる突然変異に対する選択は、荷電状態を変化させるようなアミノ酸置換の原因となる突然変異に対する選択よりも大きくはなく、むしろ小さいと考えられるので、電気泳動では検出されないような、いわゆる「サイレント」の遺伝的変異の大きなプールが検出されないまま、残っていると一般的に考えられている。本調査は、このプールの規模について問題を提起する。これまで述べてきたように、本調査で検査した酵素は、一次元電気泳動法によって検査した蛋白質の大部分よりも、電気泳動上の変異が少ない。したがって、日本人集団における23種の蛋白質(本報で扱ったものを含む; Neelら²⁰, 表2)におけるヘテロザイゴシティの平均値は7.7%であったが、これら7種の酵素の平均ヘテロザイゴシティは3.3%である。この調査で扱った蛋白質から平均的

was 7.7%, for these seven enzymes the Index is 3.3%. Generalization from this series to the average should proceed cautiously. Of the 245 heterozygotes for electromorphs included in Table 2, 196 (80%) exhibited increased thermolability. Thus assuming electrophoresis detects only charged substitutions, thermostability studies would have detected 80% of the charged amino acid substitutions. This small series, however, is dominated by the C variant of 6PGD. It is an interesting coincidence that in a review of the literature on experimental organisms we have suggested that 'at least two-thirds and possibly three-quarters of the variants recognized by electrophoresis exhibit easily detected thermolability...'.²¹ While it is possible that charged amino acid substitutions are more likely to alter thermostability than uncharged, let us assume this is not so. Then our thermostability studies should be detecting the majority of the uncharged substitutions not detected by electrophoresis. This increment, of 0.2%, is a much smaller increment than anticipated. At least a partial explanation may be found in the growing body of opinion that electrophoresis is also detecting some portion of the uncharged amino acid substitutions, presumably because of conformational changes in the molecule (cf Bonhomme and Selander²² and Ayala²³). The pool of genetic variation characterized by 'silent' amino acid substitutions which was presumed to be awaiting discovery is almost certainly substantially less than projected from the 1 charged:2 uncharged ratio mentioned earlier.

With reference to the usefulness of thermostability variants in a study of mutation rates, we estimate that the effort involved in identifying a thermostability variant in our hands (including exclusion of false positives as well as routine laboratory procedures) is approximately four times that involved in detecting an electromorph and two times that involved in detecting an activity variant. Given the evidence above that electrophoresis is detecting a higher proportion of all amino acid substitutions than usually assumed, we conclude that this approach is substantially less efficient than the search for mutations altering electrophoretic or activity characteristics.

Elsewhere²¹ we have discussed the paradox that as estimates of protein variability are being

蛋白質に対して普遍化を行う作業は慎重に進めなければならない。表2に含まれる電気泳動上の変異型のヘテロ接合体245例のうち、196例(80%)は熱不安定性が増加した。したがって、電気泳動法は置換の前後で電荷の変化したアミノ酸置換のみを検出すると仮定すれば、熱安定性調査は電荷の変化したアミノ酸置換の80%を検出していることになる。ただし、今回の小例数の調査においては、6PGDのC変異型のヘテロ接合体が大部分を占めている。実験物に関する文献の総説において、「電気泳動によって認められた変異型の少なくとも2%, 恐らくは3/4は容易に検出される熱不安定性を示す...」²¹と示唆されていることと、本調査で得た結果が一致したことは興味深い。分子の電荷を変化させるアミノ酸置換は、変化させないアミノ酸置換に比べて熱安定性の変化を起こしそうな可能性があるが、今回はそうならないものと仮定しよう。次に、今回の熱安定性調査では、電気泳動法で検出されなかった電荷変化を起こさない置換の大半が検出されつつあるはずである。この0.2%の増加は、予想したものよりはるかに小さい。恐らくは分子構造の変化のゆえに、電荷に変化の生じないアミノ酸置換のある部分をも電気泳動法は検出しているという意見が増大しているが、そこに少なくとも部分的な説明がみられるかもしれない(Bonhomme及びSelander²², 並びにAyala²³と比較参照)。電気泳動法では検出されないで、他の方法で検出されるときを待っているものと考えられた'サイレントの'アミノ酸置換を特性とする遺伝的変異のプールは、先に述べた電荷変化のあるもの1:電荷変化のないもの2の比率から推定されるものより事実上少ないことはほとんど確実である。

突然変異率の調査における熱安定性変異型の有用性については、我々の手元において熱安定性の確認に支払う努力(熱安定性を測定するために、実験室で行われる通常の作業、並びに正常型であるのに間違っただけの変異型とされたものを取り除く作業を含む)は、電気泳動上の変異型の検出に必要な努力の約4倍、活性変異型の検出に必要な努力の2倍と推定される。電気泳動法はすべてのアミノ酸置換のうち、普通に考えられているよりも多くの部分を検出しているという上述したような事実があるので、このアプローチは、電気泳動上の特性や活性の特徴を変えるような突然変異の調査に比べて、実質的に有効ではないと結論される。

本調査で示したような結果のみならず、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による調査によつ

revised downwards, not only because of results such as presented by the present study but because of studies with two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, estimates of variability at the DNA level are escalating rapidly. We suggested that the resolution is to be found in a very nonrandom distribution of DNA restriction fragment length polymorphisms, for which there is already some evidence. The next decade will witness rapid progress in this arena of inquiry, with its associated implications regarding the relative roles of mutation and selection in the origin of this nonrandomness. As probes for more and more structural genes are developed, this decade will also witness the ability at the DNA level not only to confirm the correctness of the conclusions from the analysis of Table 5, but, in addition, to test to what extent the numerical similarities are the result of the same or of different mutations.

ても、蛋白質の変異性に対する推定値は従来の値より低く改訂されているにもかかわらず、DNAの変異性に関する推定値は急上昇中であるというパラドクスについて、我々は他の論文²¹で考察した。DNAの制限酵素断片の長さの多型現象は、決して無作為的に分布しているのではないというところに解答が得られるであろうと示唆したが、これについては既にある程度の証拠がある。次の10年間には、変異の種類や頻度に関して急速に理解が進むとともに、突然変異と選択がどのような相対的役割を果たしたために、このような非無作為性が生じるようになったかということが明らかにされるであろう。更にこの10年間には、ますます多くの構造遺伝子のプローブが開発されるので、表5の解析から得られた結論の正しさを確認する能力ばかりでなく、表5に見られる数値上の類似性がどの程度まで同一又は相異なる突然変異の結果であるかを検定する能力がDNAレベルで立証されることにもなる。

REFERENCES

参考文献

1. NEEL JV, SCHULL WJ: The effect of exposure to the atomic bombs on pregnancy termination in Hiroshima and Nagasaki. Washington, D.C., NAS-NRC Publ. No. 461, 1956
2. 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)
3. SATOH C, AWA AA, NEEL JV, SCHULL WJ, KATO H, HAMILTON HB, OTAKE M, GORIKI K: Genetic effects of atomic bombs. In *Human Genetics, Part A: The Unfolding Genome, Proceedings of the Sixth International Congress of Human Genetics, September 1981, Jerusalem*. Ed by B. Bonnè-Tamir, T. Cohen and R.M. Goodman. New York, Alan R. Liss Inc., 1982. pp267-76
4. SATOH C, GORIKI K, HAMILTON HB, NEEL JV: Search for mutations affecting protein structure in children of atomic bomb survivors. Jpn J Genet 57:702, 1982
5. 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)
6. SCHULL WJ, OTAKE M, NEEL JV: Genetic effects of the atomic bombs: A reappraisal. Science 213:1220-7, 1981 (RERF TR 7-81)
7. BEUTLER E: Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods, 2nd ed. New York, San Francisco, London, Grune & Stratton, 1975
8. BEUTLER E, BLUME KG, KAPLAN JC, LÖHR GW, RAMOT B, VALENTINE WN: International Committee for Standardization in Hematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. Br J Haematol 35:331-40, 1977

9. KIMURA Y, KANEKO J, MASUNARI N, TAKAHASHI N, FUJITA M, HAZAMA R, GORIKI K, SATOH C: Genetic variants of erythrocyte glutamate-oxaloacetate transaminase (soluble GOT, GOTs) in Japanese populations (Hiroshima, Nagasaki). *Jpn J Hum Genet* 26:155, 1980
10. TANIS RJ, UEDA N, SATOH C, FERRELL RE, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, OHNO N: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. IV. Acid phosphatase, NADP-isocitrate dehydrogenase, peptidase A, peptidase B and phosphohexose isomerase. *Ann Hum Genet* 41:419-28, 1978 (RERF TR 6-76)
11. 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)
12. MOHRENWEISER HW, NEEL JV: Frequency of thermostability variants: Estimation of total 'rare' variant frequency in human populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5729-33, 1981
13. MOHRENWEISER HW: Frequency of enzyme deficiency variants in erythrocytes of newborn infants. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5046-50, 1981
14. SPENCER N, HOPKINSON DA, HARRIS H: Quantitative differences and gene dosage in the human red cell acid phosphatase polymorphism. *Nature* 201:299-300, 1964
15. YOSHIDA A, BEUTLER E, MOTULSKY AG: Table of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Bull WHO* 45:243-53, 1971
16. MILKMAN R: Further evidence of thermostability variation within electrophoretic mobility classes of enzymes. *Biochem Genet* 14:383-7, 1976
17. 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)
18. 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)
19. 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)
20. 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)
21. NEEL JV: A revised estimate of the amount of genetic variation in human proteins: Implications for the distribution of DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 36:1135-48, 1984
22. BONHOMME F, SELANDER RK: Estimating total genetic diversity in the house mouse. *Biochem Genet* 16:287-97, 1978
23. AYALA FJ: Genetic variation on natural populations: Problem of electrophoretically cryptic alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:550-4, 1982
24. NEEL JV, MOHRENWEISER HW, MEISLER MH: Rate of spontaneous mutation at human loci encoding protein structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6037-41, 1980
25. MOHRENWEISER HW: Enzyme deficiency variants: Frequency and potential significance in human populations. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 10:51-68, 1983