

**TWO-DIMENSIONAL GEL STUDIES OF GENETIC VARIATION IN THE  
PLASMA PROTEINS OF AMERINDIANS AND JAPANESE**

2次元電気泳動法を用いたアメリカインディアン及び  
日本人血漿蛋白質の遺伝的変異についての研究

JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. 浅川順一

NORIO TAKAHASHI, Ph.D. 高橋規郎

BARNETT B. ROSENBLUM, Ph.D.

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



**RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION**

財団法人 放射線影響研究所

**A Cooperative Japan - United States Research Organization**

日米共同研究機関

## ACKNOWLEDGMENT

### 謝 辞

This study was supported through a contract of the US Department of Energy with the University of Michigan, as well as by the Radiation Effects Research Foundation. We thank Dr. S. Koga of Kyushu University Faculty of Medicine for a sample of antiserum against human apolipoprotein A-IV.

本研究は米国エネルギー省との契約を通じて Michigan 大学と放影研の協力により実施された。ヒト・アポリポ蛋白 A-IV に対する抗血清を御提供いただいた九州大学医学部の古賀俊一博士に感謝する。

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掲載された。

*Human Genetics* 70:222-30, 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。


**TWO-DIMENSIONAL GEL STUDIES OF GENETIC VARIATION IN THE  
 PLASMA PROTEINS OF AMERINDIANS AND JAPANESE**

 2次元電気泳動法を用いたアメリカインディアン及び  
 日本人血漿蛋白質の遺伝的変異についての研究

 JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. (浅川順一); NORIO TAKAHASHI, Ph.D. (高橋規郎);  
 BARNETT B. ROSENBLUM, Ph.D.\*; JAMES V. NEEL, M.D., Ph.D., Sc.D.\*

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

**SUMMARY**

Genetic variation has been studied in plasma samples from 107 Amerindian children and their parents and 110 Japanese children and their parents by means of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Twenty-three polypeptides were scored; the identity of nine of these is at present still unknown. Genetic variation was encountered in 11 of these polypeptides. We have previously reported that the index of heterozygosity was  $6.2 \pm 0.7\%$  for 20 'randomly selected', silver-stained polypeptides scored for genetic variation in Caucasoids. For technical reasons only 11 of these 20 polypeptides could be routinely scored in preparations from the Amerindian samples. For these 11 polypeptides, the indexes of heterozygosity in the three populations were: Amerindians,  $4.5 \pm 0.6\%$ ; Japanese,  $5.7 \pm 0.7\%$ ; and Caucasoids,  $8.0 \pm 1.1\%$ . Even with these relatively small numbers some striking ethnic differences as regards individual polypeptides are apparent.

**INTRODUCTION**

Recently, employing two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) and a combination of Coomassie Blue staining and the sensitive silver stain developed by Sammons et al,<sup>1</sup> we have reported on the genetic variation encountered in the polypeptides of plasma samples from a predominantly Caucasoid population.<sup>2</sup> For a series of 20 polypeptides best visualized after silver staining, whose identity was unknown at the time they were selected for study, and which were selected solely because

**要約**

ポリアクリルアミドゲル2次元電気泳動法を用いて、アメリカインディアンの子供107人とその両親及び日本人の子供110人とその両親より得た血漿の遺伝的変異について研究を行った。23種のポリペプチドについて検討したが、そのうちの9種については現在でも同定されていないものである。検討を行ったペプチドのうち11種に遺伝的変異が認められた。無作為に選んだ銀染色法で検出される20種のペプチドの遺伝的変異について検討した結果、白人集団での heterozygosity が  $6.2 \pm 0.7\%$  であったことを以前に報告した。アメリカインディアンの試料についての通常検査では、技術的な理由によりこれら20種のポリペプチドのうち11種しか検討し得なかった。これら11種のポリペプチドに対して3集団での heterozygosity は：アメリカインディアン、 $4.5 \pm 0.6\%$ ；日本人、 $5.7 \pm 0.7\%$ ；白人、 $8.0 \pm 1.1\%$ であった。これらの比較的少ない数からさえも、個々のポリペプチドに関して幾つかの著しい人種間差のあることが明らかとなった。

**緒言**

最近我々は、2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(2-D PAGE)にクマシーブルー染色法と Sammons<sup>1</sup>が開発した高感度銀染色法を組み合わせさせた検出法を用いて、白人を主とする集団の血漿ポリペプチドに検出された遺伝的変異について報告した。<sup>2</sup> 銀染色法により最も良く染色される20種の一連のポリペプチドは、研究のために選び出された時点では未知のものであった。これらのペプチドは、もし変異型が存在する場合にはその変異型が容易に検出されるであろうという理由のみから選出されたものであるが、

\*Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School

Michigan 大学医学部人類遺伝学教室

it appeared variants, if present, could be readily detected, the heterozygosity index was  $6.2 \pm 0.7\%$ . For a different series of polypeptides best scored after Coomassie Blue staining, but whose selection for various reasons cannot be regarded as unbiased with reference to variability, the heterozygosity index was variously  $5.1 \pm 0.9\%$ <sup>3</sup> or  $8.7 \pm 1.1\%$ ,<sup>2</sup> depending on the polypeptides scored. All variants were confirmed as genetic in nature by the occurrence of the same variant in one parent or the other. For a series of 46 erythrocyte lysate polypeptides selected without reference to variability, we encountered a heterozygosity index of  $3.1 \pm 0.5\%$ .<sup>4</sup>

These results are in marked contrast to the findings of earlier investigators who, examining human fibroblasts, and kidney and brain tissue, reported heterozygosity indexes which averaged less than 1%.<sup>5-8</sup> More recently, several investigators have reported a level of genetic variability in lymphocytes approximately intermediate between the early findings and our own.<sup>9-13</sup> The striking difference in the results of the various studies could be due to three, not mutually exclusive explanations, namely, differences in the types of preparations under consideration, differences in the techniques used to identify the presence of the polypeptides, or more rigorous selection of polypeptides for scoring by ourselves.

In the present communication we will extend our observations on variation in plasma proteins to two additional, Mongoloid populations, namely, Amerindians from Central and South America, and Japanese from Hiroshima and Nagasaki. The findings in these two populations will in general confirm the findings on Caucasoids regarding the levels of heterozygosity in plasma proteins although, not unexpectedly, ethnic differences are beginning to emerge. A preliminary report on this material has been published.<sup>14</sup>

## MATERIALS AND METHODS

**Subjects.** At this stage in the evolution of the 2-D PAGE technology, we find it convenient—indeed, indispensable—to prepare the gels in trios derived from a child and his/her father and mother. This not only permits the immediate verification of an apparent genetic variant in a child but, as we will see, reveals the presence of null variants which would otherwise be very difficult to detect. The 107 Amerindian trios

その heterozygosity は  $6.2 \pm 0.7\%$  であった。クマシーブルー染色法により最良の評価ができた別の一連のポリペプチドの場合、これらについては様々な理由により、変異性に関して偏りなく選び出されたとは考えられないが、その heterozygosity は評価を行ったポリペプチドにより異なり、 $5.1 \pm 0.9\%$ <sup>3</sup> 又は  $8.7 \pm 1.1\%$ <sup>2</sup> であった。すべての変異型は、親のどちらか片方に同じ変異型が検出され、遺伝的なものであることが確認された。変異性に関係なく選び出された46種の一連の赤血球溶血液ポリペプチドについての heterozygosity は、 $3.1 \pm 0.5\%$  であった。<sup>4</sup>

これらの結果は、ヒトの線維芽細胞、腎及び脳組織について検討を行い、平均すると1%未満の heterozygosity index を報告した初期の研究者の所見<sup>5-8</sup> とは著しい対照をなす。最近、数人の研究者はリンパ球についての遺伝的変異を報告しているが、その値は初期の所見と我々の所見のほぼ中間レベルのものである。<sup>9-13</sup> これらの研究結果が著しく異なっているのは、検討した試料の種類の違い、ポリペプチドの検出方法の違い、評価を行うポリペプチドの選択に関する厳密さの違いという互いに関連する三つの理由によると考えられる。

本報では2種の黄色人集団、すなわち中央及び南アメリカ在住のアメリカインディアン集団と広島・長崎在住の日本人集団の血漿蛋白質の変異について検討を行う。この二つの集団についての調査で得られる所見は、概して、白人集団の血漿蛋白質における heterozygosity についての所見を裏付けるであろうが、一方では、人種間差が明らかになることも予想される。これらの集団に関する予備報告については既に発表した。<sup>14</sup>

## 対象及び方法

**対象.** 2-D PAGE 技法が開発されつつある現時点では、子供及びその両親より成るトリオのゲルを作成することが好都合であり、実際不可欠であると考えられる。親子について同時に実験を行うことにより、子供に検出される変異型が明らかに遺伝的なものであることが即座に確認されるだけでなく、後述するとおり、トリオの試料を用いない場合には検出困難なヌル変異型の存在を明らかにすることが可能である。本研究で検査した107のアメリカインディアン

examined in this study were drawn from nine tribes, as follows: Yanomama, 30; Makiritare, 22; Piaroa, 12; Macushi, 9; Wapishana, 10; Guaymi, 9; Ticuna, 4; Baniwa, 10; and Cashinawa, 1. References to the studies in the course of which the necessary blood samples were obtained will be found in Neel,<sup>15</sup> Neel et al,<sup>16</sup> and Barrantes et al.<sup>17</sup> These blood samples had usually been 5-7 days in transit from the field, not always under ideal conditions. In addition, unacculturated, indigenous, tropical dwelling populations, including Amerindians, characteristically exhibit elevated gamma globulin levels<sup>18</sup>; the gamma globulins migrate as diffuse spots on 2-D PAGE and, given the amphoteric nature of protein, may influence the positions assumed in the gel by other nearby proteins. As we shall see, these facts introduced difficulties into the scoring of certain polypeptides which had been readily scored in a Caucasian population. The samples had been processed immediately on receipt in the laboratory and aliquots of serum or plasma, as the case may be, have been stored in liquid nitrogen for 6 to 14 years. In this study, 65 of the Amerindian trios were analyzed on the basis of serum samples and 42 on the basis of plasma samples. In the case of the latter, acid-citrate-dextrose (ACD) solution had been the anticoagulant.  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -fibrinogen (see below) could of course not be scored in the preparations from serum samples.

The 110 trios of Japanese blood samples were obtained in the course of the study of the genetic effects of the atomic bombs in Hiroshima and Nagasaki, one aspect of which involved the examination of some 30 proteins by one-dimensional electrophoresis (1-DE),<sup>19</sup> and had been immediately refrigerated and usually processed within 72 hours of collection. ACD solution was used as anticoagulant. Aliquots of the plasma samples used in this study had been stored in liquid nitrogen for 2 to 24 months. Mother-father-child samples were available in storage because a family study had been conducted in connection with the demonstration of a rare variant in the child<sup>19</sup>; this introduced an ascertainment bias with reference to transferrin (see below).

**Methodology.** The conditions under which the 2-D PAGE was performed were as described in Neel et al,<sup>3</sup> with one minor difference; the second dimension was run at 100 V for approxi-

のトリオは、下記の9種族から得たものである: Yanomama, 30; Makiritare, 22; Piaroa, 12; Macushi, 9; Wapishana, 10; Guaymi, 9; Ticuna, 4; Baniwa, 10; 及び Cashinawa, 1. 必要とした血液標本の採取に関しては, Neel,<sup>15</sup> Neel ら,<sup>16</sup> Barrantes ら<sup>17</sup>の報告に述べられている。これらの血液標本は現地からの輸送に通常5~7日要しており、その間常に理想的な状態に保たれていたとは限らない。更にアメリカインディアンを始めとする近代文明と接触していない土着の熱帯地域居住集団は、高ガンマグロブリン値を示す特徴がある。<sup>18</sup> 2-D PAGE ではガンマグロブリンは、1個のスポットではなく広い範囲に分布し、蛋白質が両性的なものであるために、近接する他の蛋白質のゲル上の位置に影響を与える可能性がある。後述するとおり、こういった理由によって白人集団では容易に判定できたある種のポリペプチドの検討が、アメリカインディアンの試料では困難であった。標本は受け取った直後に実験室で処理した。血清又は血漿は、いずれの場合も6~14年間液体窒素中に保存されていたものである。本研究で用いたアメリカインディアンの血液標本のうち65トリオ分は血清であり、42トリオのものは血漿である。後者の場合には、クエン酸-ブドウ糖(ACD)溶液を抗凝固剤として用いた。言うまでもなく、血清を試料とした場合には $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -フィブリノーゲン(下記参照)について評価することはできなかった。

110トリオの日本人の血液標本は、広島・長崎に投下された原子爆弾の遺伝的影響に関する調査の一過程として、1次元電気泳動法(1-DE)を用いて約30種の蛋白質について検査を行った際に採取されたものである。<sup>19</sup> これらの血液標本は直ちに冷凍し、通常採血後72時間以内に処理した。抗凝固剤としてACD溶液を使用した。本研究に使用した血漿標本は、2~24か月間液体窒素中に保存されていたものである。子供にまれな変異型が認められた場合、その遺伝性を明らかにするために家族調査を行っていたので、母一父一子の保存標本が利用可能であった。<sup>19</sup> まれな変異型の家族調査標本を用いたことによって、トランスフェリン変異型の確認に偏りが生じた(下記参照)。

方法。2-D PAGE を行った条件は、以下に述べる1条件を除き Neel ら<sup>3</sup> が報告しているとおりである。本研究で用いた方法では、2次元目の泳動を

mately 18 hours, the exact timing determined by the position of the gel front. Where contrasts with the results of 1-DE are drawn, the methods are referenced in the papers cited.

**Choice of Polypeptides for Scoring.** In general, the polypeptides selected for the study of genetic variation were as described in Rosenblum et al.<sup>2,20</sup> There were thus two groups of polypeptides. The first set was selected for study from inspection of silver-stained gels, on the basis of certain desirable characteristics: reproducibility, relative isolation on the gel, and a density such that were a variant to occur (with approximately half the normal density), it would be readily recognized. The identity of these polypeptides was unknown at the time to the individual who selected them and insofar as possible, selection for study was without reference to variability. The second set was a group of generally more abundant polypeptides, readily visualized with the Coomassie Blue stain, many of known identity and previously studied with respect to genetic variation, some located in "crowded" portions of the gels. They were also scored for variation but in contrast to the first set, we do not regard them as randomly selected and suitable for inclusion in the data base for an Index of Heterozygosity. The system of nomenclature for the polypeptides judged as suitable for scoring is identical with that employed previously, being an essentially arbitrary designation based on position on the gel.<sup>3</sup> To this arbitrary designation is coupled the identity of the polypeptide when known.

Certain of the polypeptides visualized after silver staining and deemed suitable for scoring in the earlier study could not be reliably scored in the preparations from the Amerindians (A-01, C-08, C-09, D-07, D-08, D-09, D-10, D-11), perhaps for the reasons mentioned earlier (most of these polypeptides migrate adjacent to but at a lower molecular weight than gamma globulin). In addition, the fibrinogens are absent from the Amerindian preparations utilizing serum. We are thus left with 23 polypeptides which can be compared across the three ethnic groups for the occurrence of genetic variants. The positions on the gel of the polypeptides scored in this study are indicated in Figure 1, the nomenclature identical with that employed earlier. Approximate molecular weights of the proteins under consideration are also shown in Figure 1. Variable

100Vで約18時間行った。泳動終了の正確なタイミングはゲル先端の位置により決定した。1-DEの結果との比較対照を行った場合、その方法は引用した論文中のものを用いた。

評価の対象とするポリペプチドの選択。遺伝的変異を調べるために選択したポリペプチドは、概して、Rosenblumら<sup>2,20</sup>が述べているとおりである。したがって2群のポリペプチドに大別される。第1群は、銀染色したゲルにおいてある一定の望ましい特性、すなわち一再現性、ゲル上の相対的分離、及び変異が生じた場合でもそれが容易に確認できるような濃度(正常濃度の約半分)一であることを基準にして調査の対象として選択したものである。選択を行った当時には、その時点ではこれらのポリペプチドがどういったものであるかは分からないようになっており、可能な限り変異性に関係なく選択を行った。第2群は、クマシーブルー染色法により容易に染色される。全般に、より量に富むポリペプチド群であり、その多くは同定されており遺伝的変異に関して既に研究されているものである。その幾つかはゲルのスポットが密集した部分に位置する。第2群のポリペプチドの変異性についても検討したが、第2群は第1群に比べ無作為に選択されているとは考えられず、heterozygosityのデータベースに含めることは適当とは思われない。評価するのに適すると考えられるポリペプチドの命名法は、以前使用したものと同じであり、<sup>3</sup>本質的にはゲル上の位置に基づき任意に行ったものである。ポリペプチドの同定が行われた場合には、その結果をこの任意に行った命名に付け加えるものとする。

銀染色法により検出され、前回の研究では評価に適切と考えられたポリペプチド(A-01, C-08, C-09, D-07, D-08, D-09, D-10, D-11)の幾つかは、アメリカインディアンの試料では確実に評価することができなかったが、それは前述した理由によるものと考えられる(これらのポリペプチドの大部分はガンマグロブリンの位置の近傍でより小さな分子量の位置に移動する)。また、アメリカインディアンの血清を使用した試料ではフィブリノーゲンが欠如している。したがって、遺伝的変異型の出現に関して三つの人種間での比較が可能なポリペプチドは23種となる。本研究で評価したポリペプチドのゲル上の位置を図1に示す。命名法は以前に使用したものと同じである。検討した蛋白質のおおよその分子量についても図1に示す。ペプチドの種類によって評価

numbers from system to system are due to the occurrence of preparations in which a specific polypeptide could not be scored unambiguously, usually because of faintness of staining. Finally, the spot C-15, scored earlier, has now been shown to be a derivative of C-16 (Apolipoprotein A-I); to score it separately would be redundant.

## RESULTS

**Variable Polypeptides.** Phenotype and genotype frequencies for the polypeptides found to be variable in this study or the preceding similar study on Caucasoids are given in Tables 1 and 2. Table 2 also presents the results of tests for agreement with Hardy-Weinberg equilibrium for systems where homozygotes for variants were observed. Although the numbers for any particular system are still relatively small, some noteworthy ethnic differences seem to be emerging, best treated on a system-by-system basis, first those analyzed after silver staining, then those analyzed after staining with Coomassie Blue.

した例数が異なるのは、特定のポリペプチドが明確に評価できない試料があったためであり、通常は染色が薄かったことによるものである。最後に、以前に評価の対象としたスポット C-15 は C-16 (アポリポ蛋白 A-I) の誘導体であり、別々に評価する必要はないものと思われる。

## 結果

変異が認められたポリペプチド。本研究又は白人集団についての同様の研究で変異が認められたポリペプチドについて、その表現型及び遺伝子型の頻度を表 1 及び 2 に示す。また表 2 には、変異型にホモ接合型を認めた系について Hardy-Weinberg の式に一致するかどうかをテストした結果も示す。いずれの系においても、まだ検討例が比較的小さいにもかかわらず幾つかの注目すべき人種間差が明らかになりつつあるものと思われる。これらの結果について、最良の状態で処理されたものについてシステムごとに分類し、最初に銀染色法で解析したもの、次いでクマシーブルー染色法で解析したものについて以下に述べる。

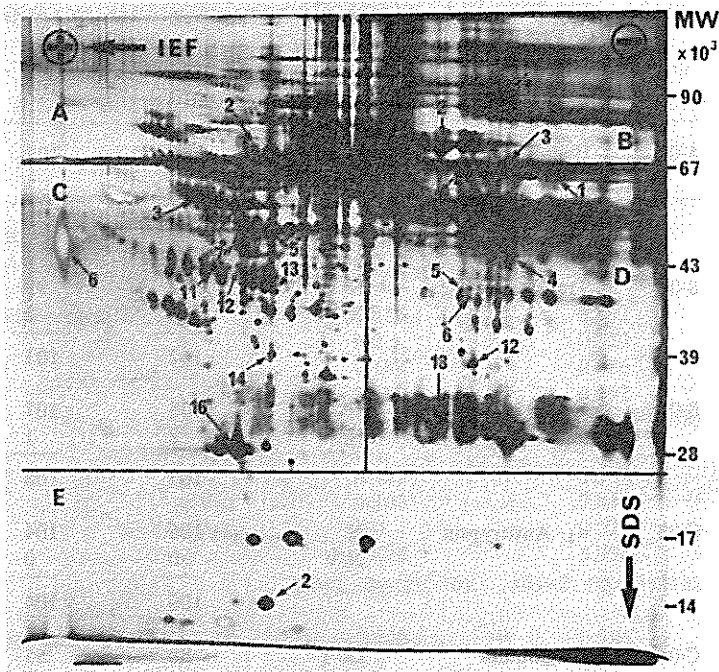


Figure 1. Silver-stained 2-D PAGE pattern of plasma proteins. The gel has been subdivided into five convenient regions and the polypeptides analyzed for this study designated as described by Rosenblum *et al.*<sup>2</sup> and Neel *et al.*<sup>3</sup> Tables 1 and 2 provide designations for these proteins where known.

図 1 銀染色法による血漿蛋白質の 2-D PAGE 銀染色像。ゲルは便宜的に 5 領域に分割し、本研究で分析したポリペプチドは Rosenblum ら<sup>2</sup> 及び Neel ら<sup>3</sup> の記述に従い命名した。これらの蛋白質のうち既知のもの名称を表 1 及び 2 に示す。

TABLE 1 PHENOTYPIC FREQUENCIES FOR THE POLYPEPTIDES SCORED IN ALL THREE ETHNIC GROUPS AND FOUND VARIABLE IN ONE OR MORE OF THE GROUPS

表1 三つの人種集団すべてで評価し、一つ以上の集団で変異があると認められた  
ポリペプチドの表現型頻度

Stain	Our designation	Identity	Phenotypic classification	Ethnic group		
				Amerindian	Japanese	Caucasoid
Sammon's silver stain	C-01	Antithrombin III	N	103	110	59
			N/V	0	0	3
				103	110	62
	C-14	Apolipoprotein E	3	66	87	40
			2-3	0	5	6
			3-4	23	17	14
			2-4	0	0	1
			2	0	0	1
			4	6	1	0
			95	110	62	
D-05	?	N	71	37	17	
		N/V <sub>1</sub>	26	40	28	
		N/V <sub>2</sub>	0	2	0	
		V <sub>1</sub> /V <sub>2</sub>	0	4	0	
		V <sub>1</sub>	1	26	9	
		98	109	54		
Coomassie blue	A-02	Hemopexin	N	106	103	51
			N/V	0	3	0
				106	106	51
	B-02	Transferrin	N	102	99	47
			N/V	0	2	3
				102	101	50
	B-03	?	N	105	107	36
			N/V	2	1	18
				107	108	54
	C-03	α <sub>1</sub> -Antitrypsin	N	106	104	48
			N/V	0	0	5
				106	104	53
	C-04	Gc-globulin	Gc 1	80	55	29
			Gc 1-2	23	40	20
Gc 1-V			0	1	0	
Gc 2			4	14	6	
			107	110	55	

(Continue 続く)



TABLE 1 Continued 表1 続き

Stain	Our designation	Identity	Phenotypic classification	Ethnic group		
				Amerindian	Japanese	Caucasoid
	C-05	$\gamma$ -Fibrinogen	N	41	109	54
			N/V <sub>1</sub>	0	0	1
			N/V <sub>2</sub>	1	0	0
				42	109	55
	C-11	Apolipoprotein A-IV	N	98	107	48
			N/V <sub>1</sub>	7	3	0
			N/V <sub>2</sub>	0	0	8
				105	110	56
	E-02	Prealbumin	N	107	108	55
			N/V <sub>1</sub>	0	0	1
			N/V <sub>2</sub>	0	1	0
				107	109	56

TABLE 2 ALLELE FREQUENCIES FOR THE VARIABLE POLYPEPTIDES ENCOUNTERED IN AMERINDIANS, JAPANESE, AND CAUCASIANS. A  $\chi^2$  TEST FOR AGREEMENT WITH HARDY-WEINBERG PROPORTIONS IS PERFORMED

表2 アメリカインディアン, 日本人, 白人で検出した変異の認められたポリペプチドの対立遺伝子頻度. Hardy-Weinberg の法則に一致しているか  $\chi^2$  検定を行った

Our designation	Identity	Allele	Amerindian	Japanese	Caucasian
C-01	Antithrombin III	p	1.000	1.000	0.976
		q	0.0	0.0	0.024
C-14	Apolipoprotein E	p <sub>3</sub>	0.816	0.891	0.806
		q <sub>2</sub>	0.0	0.023	0.073
		q <sub>4</sub>	0.184	0.086	0.121
		$\chi^2$	3.599	0.592	2.806
			(df=1, .05 < P < .10)	(df=2, .70 < P < .08)	(df=2, .30 < P < .50)
D-05	?	p	0.857	0.532	0.574
		q(V <sub>1</sub> )	0.143	0.440	0.426
		r(V <sub>2</sub> )	0.0	0.028	0.0
		$\chi^2$	0.679	5.954	0.196
			(df=1, .30 < P < .50)	(df=2, .05 < P < .10)	(df=1, .50 < P < .70)
A-02	Hemopexin	p	1.000	0.986	1.000
		q	0.0	0.014	0.0
B-02	Transferrin	p	1.000	0.990	0.970
		q*	0.0	0.010	0.030
B-03	?	p	0.991	0.995	0.833
		q	0.009	0.005	0.167

(Continue 続く.)

TABLE 2 Continued 表2 続き

Our designation	Identity	Allele	Amerindian	Japanese	Caucasian
C-03	$\alpha_1$ -Antitrypsin	p	1.000	1.000	0.953
		q	0.0	0.0	0.047
C-04	Gc-globulin	p(Gc1)	0.855	0.686	0.709
		q(Gc2)	0.145	0.309	0.291
		$\gamma$ (GcV)	0.0	0.005	0.0
		$\chi^2$	1.872	2.733	0.773
		(df=1, .10<P<.20)	(df=2, .20<P<.30)	(df=1, .30<P<.50)	
C-05	$\gamma$ -Fibrinogen	p	0.988	1.000	0.991
		q <sub>1</sub>	0.0	0.0	0.009
		q <sub>2</sub>	0.012	0.0	0.0
C-11	Apolipoprotein A-IV	p	0.967	0.986	0.929
		q <sub>1</sub>	0.033	0.014	0.0
		q <sub>2</sub>	0.0	0.0	0.071
E-02	Prealbumin	p	1.000	0.995	0.991
		q <sub>1</sub>	0.0	0.0	0.009
		q <sub>2</sub>	0.0	0.005	0.0

\*q' = several alleles 数個の対立遺伝子

*C-01 (Antithrombin III).* No variants of this polypeptide were encountered in either of the two populations, in contrast to the finding of a low-frequency polymorphism in Caucasoids. Kera et al,<sup>21</sup> employing analytical agarose gel isoelectric focusing followed by immunofixation, encountered one instance each of three different antithrombin III variants in 370 Japanese samples. The studies necessary to determine if these variants would be detected in our system have not been performed.

*C-14 (Apolipoprotein E).* The ability of 2-D PAGE to detect variants of this system has been demonstrated by Børresen and Berg,<sup>22</sup> Zannis et al,<sup>23</sup> and Utermann et al.<sup>24</sup> In Japanese there are both an anodally (Apo E 2) and cathodally (Apo E 4) migrating variant, which show the same mobilities as the correspondingly designated variants in Caucasoids. The Amerindians thus far lack the Apo E 2 variant.

*D-05.* We have observed in both the Amerindian and Japanese samples a second polypeptide about 10 mm cathodal to the polypeptide originally designated D-05, which varies concurrently with D-05. Both Amerindian and Japanese

*C-01 (アンチトロンビンⅢ).* 白人集団に低頻度ではあるが多型が認められたのとは対照的に、このポリペプチドの変異型は両集団のいずれにも検出されなかった。Kera ら<sup>21</sup> は分析用アガロースゲル等電点電気泳動を行った後、免疫固定法を用いて、370人の日本人集団に3種の異なるアンチトロンビンⅢ変異型を1例ずつ検出している。これらの変異型が我々の系で検出可能か否かを決定するために必要な検討は、まだ実施されていない。

*C-14 (アポリポ蛋白E).* Børresen 及び Berg,<sup>22</sup> Zannis ら<sup>23</sup> 及び Utermann ら<sup>24</sup> は、この蛋白質の変異型が2-D PAGEにより検出できることを明らかにしている。日本人には陽極方向に移動する変異型(Apo E 2)も陰極方向に移動する変異型(Apo E 4)も双方ともに存在するが、それらは白人集団で命名されている各対応する変異型と同じ移動度を示す。検討を行った限りでは、アメリカインディアンにはApo E 2 変異型は検出されていない。

*D-05.* 我々はアメリカインディアン及び日本人集団の試料に、当初D-05と命名したポリペプチドの約10mm陰極側に、D-05と同時に変化する第2のポリペプチドを認めている。このペプチドは未知の

populations possess an anodally migrating variant of this pair of unidentified polypeptides, of which the anodal one may be identical with that of Caucasians described by Rosenblum et al.<sup>2</sup> We designate these variants of D-05 as  $V_1$  and  $V_1'$ . The findings in an individual heterozygous for the variant mentioned above are illustrated in Figure 2. It is not clear which of these polypeptides is the primary gene product; arbitrarily we will assign this status to the more anodal, designating it N, and the companion polypeptide as  $N'$ . In general,  $N'$  and  $V_1'$  appear to have slightly greater molecular weights than N and  $V_1$ .

ものであるが、アメリカインディアンと日本人集団には陽極方向に移動する一組の変異型が検出された。この2個の変異型ポリペプチドのうち、陽極側に位置するものは Rosenblum ら<sup>2</sup> が報告した白人集団のものと同じであると考えられる。我々はこれらの D-05 変異型を  $V_1$  及び  $V_1'$  と命名した。上記の変異型のヘテロ接合型についての知見を図2に示す。これらのポリペプチドのうち、どちらが遺伝子の一次産物であるかは明らかでないが、陽極側のポリペプチドを N, もう一つのポリペプチドを  $N'$  と仮に命名した。概して、 $N'$  と  $V_1'$  の分子量は N と  $V_1$  より少し大きいように思われる。

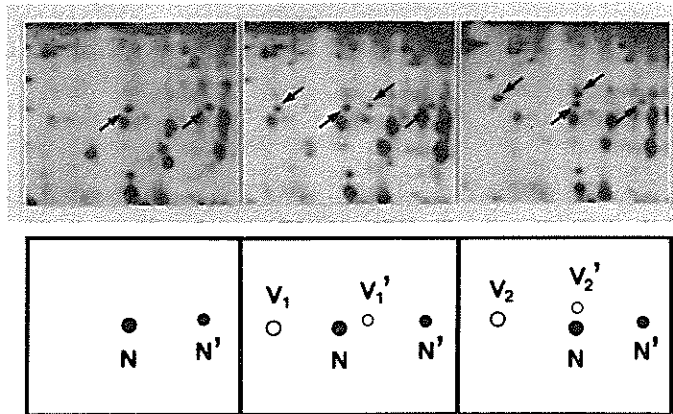


Figure 2. Photographs and diagrammatic representations of genetic variation involving (unidentified polypeptide) D-05. A detailed description of the findings is in the text.

図2 D-05 についての遺伝的変異の写真及び図解 (D-05 は同定されていないポリペプチドである)。この所見についての詳細は本文に記述した。

In addition, the Japanese possess in polymorphic proportions a previously undescribed variant of N and  $N'$ , characterized by altered mobility in both the molecular weight and IEF axes, migrating about 1 mm above the normal position, as well as about 13 mm anodally (Figure 2). In heterozygotes the normal and variant polypeptides have about the same staining intensity. We designate this variant  $V_2$  and  $V_2'$ . In the Japanese sample there is a near-significant departure from the Hardy-Weinberg phenotypic equilibrium proportions expected on the basis of a 3-allele system (Table 2). The reason for this will become apparent later.

*A-02 (Hemopexin).* Three Japanese exhibited an identical, previously undescribed variant about 1 mm anodal to the normal position and

更に、日本人には従来報告されていない N と  $N'$  の変異型が多型の頻度で認められた。この変異型は、分子量方向、IEF 方向の双方において正常とは異なる移動度を示し、正常の位置の約 1 mm 上側で約 13mm 陽極側に認められた (図2)。ヘテロ接合型における正常型と変異型のポリペプチドはほぼ同じ染色強度を示した。我々はこの変異型を  $V_2$  及び  $V_2'$  と命名した。このポリペプチドに三つの対立遺伝子が存在するものとして、日本人集団に見られた表現型を Hardy-Weinberg の法則にあてはめた場合、そこには有意に近いずれが認められる (表2)。この理由については後に明らかとなる。

A-02 (ヘモペキシン)。日本人集団のうちの3人に従来報告されていない変異型が検出されたが、それらは同じものであった。この変異型は正常位置の約 1 mm 陽極側に位置し、ヘテロ接合型に見られる変異

slightly more intensely staining than the normal polypeptide in a heterozygote (Figure 3A). Both polypeptides were absent from a gel prepared following treatment of the plasma with an antihemopexin antiserum (Dakopatts/Denmark).

型ポリペプチドは、正常型に比べ幾分強く染色された(図3A)。抗ヘモペキシン抗血清(Dakopatts/Denmark)により血漿を処理した後に泳動したゲルでは、変異型、正常型双方ともに検出されなかった。

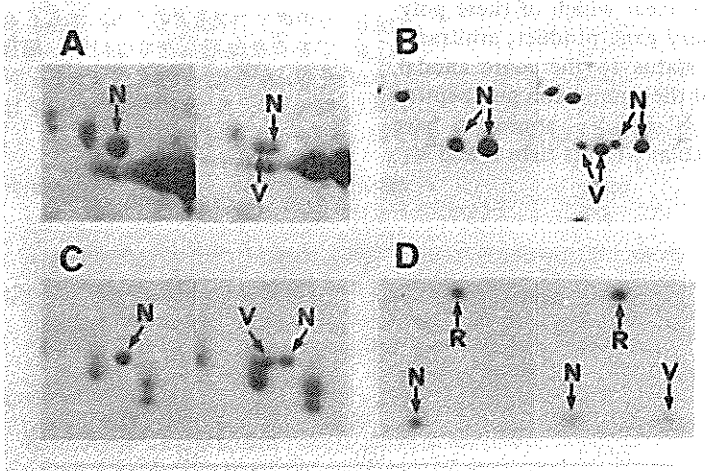


Figure 3. Four new genetic variants of plasma proteins. A: A-02, Hemopexin; B: C-05, Fibrinogen  $\gamma$ -chain; C: C-11, Apolipoprotein A-IV; D: E-02, Prealbumin; N: Normal; V: Variant; R: Reference spot.

図3 血漿蛋白質の新しい遺伝的変異型4例 A: A-02, ヘモペキシン; B: C-05, フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖; C: C-11, アポリポ蛋白A-IV; D: E-02, プレアルブミン; N: 正常型; V: 変異型; R: Reference スポット.

**B-02 (Transferrin).** The ability of 2-D PAGE to distinguish transferrin variants has been demonstrated by Anderson and Anderson.<sup>25</sup> Nine of the Japanese trios in the total sample of 110 had been assembled for family studies of a transferrin variant encountered in that portion of the study of the genetic effects of the A-bombs which employs 1-DE. They are excluded from consideration with respect to this system (all nine variants were detected with 2-D PAGE). In the remaining scorable 101 samples, one cathodally migrating and one anodally migrating transferrin variant were detected in Japanese and none in Amerindians. These variants had also been detected by 1-DE in the above referenced study and classified as Tf D<sub>chi</sub> and Tf B<sub>HR3</sub>, respectively (Fujita M. private communication).

B-02(トランスフェリン). Anderson 及び Anderson<sup>25</sup> は、2-D PAGE によってトランスフェリン変異型が区別可能であることを示している。合計110の日本人標本のうち9組のトリオのものは、1-DEを用いた原爆の遺伝的影響に関する調査で検出されたトランスフェリン変異型の家族調査の際に得られたものである。それらはトランスフェリンの系に関する考察からは除外した(9例の変異型はすべて2-D PAGEにより検出された)。残りの101の評価可能な標本のうち、日本人集団においては、陰極側に移動するトランスフェリン変異型1例、陽極側に移動するトランスフェリン変異型1例を検出したが、アメリカインディアンにおいては検出されなかった。これらの変異型は上記の研究において1-DEによっても検出され、各々 Tf D<sub>chi</sub> 及び Tf B<sub>HR3</sub> として分類されている(藤田幹雄研究員との私信による)。

**B-03.** A single type of anodally migrating variant was encountered in two Amerindians and one Japanese which was apparently identical to a variant encountered with a much higher frequency in Caucasians.<sup>20</sup>

B-03. 1種類の陽極方向に移動する変異型が検出されたが、アメリカインディアンでは2例、日本人では1例検出された。この変異型は、白人集団においてより高頻度で検出されている変異型と明らかに同一のものであった。<sup>20</sup>

**C-03 ( $\alpha_1$ -Antitrypsin).** This polypeptide appeared invariant in the two populations. We had earlier observed in 2-D gels from Caucasoids the polymorphisms for which this systems is well known,<sup>3</sup> but unlike Brown,<sup>26</sup> we do not feel we can subtype accurately.

**C-04 (Gc-globulin).** Tracy et al<sup>27</sup> demonstrated that 2-D PAGE would distinguish between the common allelic forms of Gc, namely Gc 1 and Gc 2. In this study, these alleles were encountered in both populations, in the proportions reported in the literature.<sup>28</sup> Subtypings of the Gc 1 and Gc 2 phenotypes were not attempted. In addition, a single new variant was encountered, of apparently greater molecular weight than Gc 1, in combination with Gc 2. As Figure 4 shows, the mother was Gc 1-V, the father type Gc 2. The variant as well as the polypeptides identified as Gc 1 and Gc 2 were absent from gels prepared following treatment of the plasma with anti-Gc-globulin antiserum (Dakopatts/Denmark).

C-03 ( $\alpha_1$ -アンチトリプシン). 両集団においてこのポリペプチドには変異がないようであった。我々は以前白人集団での2-Dゲルにおいて、この系によく見られる多型を観察したが、<sup>3</sup> Brown<sup>26</sup>とは違い、正確なサブタイプができるとは考えられない。

C-04 (Gc-グロブリン). Tracyら<sup>27</sup>は2-D PAGEにより、Gcの通常の対立遺伝子型、すなわちGc 1とGc 2の区別が可能であることを明らかにしている。本研究では両集団において、これらの対立遺伝子を文献<sup>28</sup>に報告されているのと同じ比率で検出した。表現型Gc 1とGc 2のサブタイプは試みなかった。更に、Gc 2とともに、分子量がGc 1より明らかに大きい新しい変異型を1例検出した。図4に示すとおり、母親はGc 1-Vであり、父親の型はGc 2であった。Gc 1及びGc 2と同定されたポリペプチドと変異型は、抗Gcグロブリン抗血清(Dakopatts/Denmark)を用いて処理した血漿について作成したゲルでは、欠如していた。

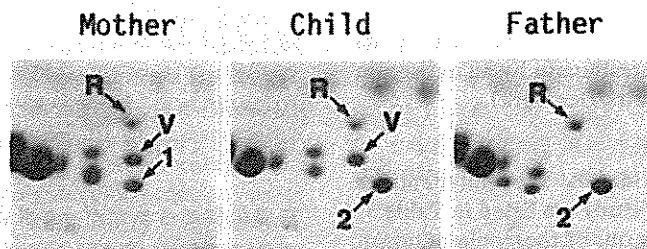


Figure 4. A new genetic variant of Gc-globulin. 1: Gc 1, 2: Gc 2, V: Gc V, R: Reference spot.

図4 Gc-グロブリンの新しい遺伝的変異型。1: Gc 1, 2: Gc 2, V: Gc V, R: Reference スポット。

**C-05 ( $\gamma$ -Fibrinogen).** Variants of this system have been demonstrated with 2-D PAGE by Olaisen et al<sup>29</sup> and Rosenblum et al.<sup>20</sup> A single previously undescribed variant was encountered in an Amerindian.  $\gamma$ -Fibrinogen presents on a 2-D gel as a pair of major and a pair of minor spots (Figure 3B). The variant presented as a pair of major spots anodal to the normal position plus a similar faintly staining pair of minor spots. This variant appears to differ from one described by Olaisen et al,<sup>29</sup> but our electrophoretic conditions differed slightly from theirs. The identity of our variant as  $\gamma$ -fibrinogen was established with an anti- $\gamma$ -fibrinogen antiserum (Dakopatts/Denmark).

C-05 ( $\gamma$ -フィブリノーゲン). この系の変異型については、Olaisenら<sup>29</sup>及びRosenblumら<sup>20</sup>が2-D PAGEを用いて示している。従来報告されていない変異型1例をアメリカインディアンに検出した。 $\gamma$ -フィブリノーゲンは、2-Dゲルでは一対の大きなスポットと一対の小さなスポットを呈する(図3B)。この変異型は、通常的位置より陽極側に一対の大きなスポットと、同程度に弱く染色される一対の小さなスポットを呈した。この変異型はOlaisenら<sup>29</sup>が報告したものと別のもと考えられるが、我々と彼らの電気泳動の条件は少し異なっていた。我々の変異型は、抗- $\gamma$ -フィブリノーゲン抗血清(Dakopatts/Denmark)を用いて $\gamma$ -フィブリノーゲンであると同定した。

*C-11 (Apolipoprotein A-IV).* Variation with respect to this polypeptide in 2-D PAGE preparations has been described by Tracy et al.<sup>27</sup> and Rosenblum et al.,<sup>20</sup> at a time when the identity of the spot was unknown. We have now identified it as apolipoprotein A-IV through the immunosubtraction technique, employing an anti-apolipoprotein A-IV antiserum kindly provided by Dr. S. Koga of Kyushu University. Both the Amerindian and Japanese samples failed to exhibit the variant encountered in Caucasoids, but were found to have a previously undescribed variant in the IEF axis, migrating anodally about 2 mm from the normal position (Figure 3C).

*E-02 (Prealbumin).* A variant of prealbumin in the molecular axis of a 2-D PAGE gel was recognized by Rosenblum et al.<sup>20</sup> A single apparently different and undescribed variant was encountered in a Japanese (Figure 3D). It migrates about 12 mm cathodal to the normal position, appears to have a slightly higher molecular weight than the normal polypeptide, and stained slightly less intensely than the normal spot in the heterozygote. Proof of the identity of the variant is provided by its coprecipitation with prealbumin by an antiserum to prealbumin (Dakopatts/Denmark).

**Nonvariable Polypeptides.** The polypeptides found invariant in this study are listed in Table 3. To our knowledge, only one of these, plasminogen, has been found to exhibit a genetic polymorphism by other investigators.<sup>30</sup> It seems very possible that 2-D PAGE failed to detect this variant.

**Evidence for the Genetic Nature of the Variants; Null Alleles in Two of the Systems.** As noted earlier, gels were run as mother-father-child trios. Each time a child's gel was scored, the gels of the parents were also scored. A total of 254 variants in the homozygous or heterozygous state have been encountered in the subjects of this study. The genetic pattern of codominant inheritance was observed with respect to 251 of these variants. There were, however, three apparently exceptional genetic patterns revealed when the child was compared with its parents, plus six exceptional patterns which became apparent only when the pattern of the parents was compared with that of their child. These findings are distributed over two systems, as follows:

*C-11 (アポリポ蛋白 A-IV).* 2-D PAGE 試料におけるこのポリペプチドの変異については、そのスポットが同定されていなかった時点で Tracy ら<sup>27</sup> 及び Rosenblum ら<sup>20</sup> により報告されている。我々は九州大学の古賀俊一博士より提供していただいた抗アポリポ蛋白 A-IV 抗血清を使用し、免疫吸収法により、これをアポリポ蛋白 A-IV と同定した。アメリカインディアン及び日本人の集団では、白人集団で検出された変異型は検出されなかったが、IEF 方向に通常的位置の約 2 mm 陽極側に移動する従来報告されていない変異型が存在することが明らかになった (図3C)。

*E-02 (プレアルブミン).* 2-D PAGE ゲルの分子量方向におけるプレアルブミンの変異型が Rosenblum ら<sup>20</sup> によって検出されている。従来報告されていない明らかに異なる変異型 1 例を日本人に検出した (図3D)。この変異型は通常的位置より約 12mm 陰極側に移動し、通常のポリペプチドより若干分子量が大きいように思われた。ヘテロ接合型において変異型スポットは正常型スポットに比べやや弱く染色された。プレアルブミンに対する抗血清 (Dakopatts/Denmark) を用いてプレアルブミンと共沈させることにより、この変異型の同定を行った。

変異の認められなかったポリペプチド。本研究で変異が認められなかったポリペプチドを表3に示す。我々の知る限りでは、このうちプラスミノゲンだけは遺伝的多型を示すことが他の研究者<sup>30</sup> によって明らかになっている。2-D PAGE が、この変異型を検出できなかった可能性が強いものと考えられる。

変異型が遺伝的なものであることを示す証拠; 二つの系におけるヌル対立遺伝子。先に述べたとおり、母一父一子のトリオでゲルを泳動した。子供のゲルを評価する度ごとに、両親のゲルについても評価した。本研究の対象者ではホモ接合又はヘテロ接合の変異型計254例を検出した。これらの変異型のうち251例については、共優性遺伝の遺伝様式が観察された。しかし、子供を両親と比較した場合、明らかに例外的な遺伝的パターンが3例、更に、両親のパターンを子供のものと比べたときのみ明確になった6例の例外的パターンが存在した。これらの所見は下記の二つの系で認められた。

TABLE 3 SYSTEMS, AND NUMBERS EXAMINED, FOR WHICH ALL THREE POPULATIONS HAVE BEEN INVARIANT TO DATE

表3 3集団のいずれにおいても、現在まで変異が認められていない系及び検査数

Stain	Our designation	Identity	Ethnic group		
			Amerindian	Japanese	Caucasian
Sammon's silver stain	C-07	?	97	110	61
	C-12	?	103	109	62
	C-13	?	102	108	62
	C-16	Apolipoprotein A-I	107	110	62
	D-04	?	104	109	62
	D-06	?	104	102	58
	D-12	?	99	109	61
	D-13	?	86	110	55
	Coomassie blue	B-01	Plasminogen	95	108
C-06		$\alpha_1$ Acid glycoprotein	106	107	56
D-01		$\alpha$ -Fibrinogen	22	101	56
D-02		$\beta$ -Fibrinogen	41	109	55

*C-04 (Gc-globulin)*. Three exceptional patterns were encountered in Japanese: two instances of a Gc 1 × Gc 2 mating resulting in a Gc 1 child, and one instance of a Gc 1 × Gc 1-2 mating with a Gc 2 child. The possibility of a discrepancy between legal and biological parentage was investigated with 17 polymorphic genetic systems (ABO, Rh, MNSs, P, Kell, Duffy, haptoglobin, adenosine deaminase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglucomutase-1, phosphoglucomutase-3, acid phosphatase, esterase D, glutamate oxalate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, and plasma proteins C-14 and D-05). No evidence for questioning parentage as stated was found. We attribute the findings to the occurrence of a deficiency or null variant.<sup>31</sup>

*D-05*. In this system, six exceptional mother-father-child combinations were encountered in the Japanese sample. They were of the same type encountered for C-04, and are susceptible to the same explanation. Again there were no parentage exclusions in the families, with the same battery of test systems as previously, but substituting C-04 for D-05 in the battery. We have determined what allele frequencies would account for the observed phenotype proportions, on the assumption of the presence of a silent allele. Because the  $V_2$  type was only encountered

*C-04 (Gc-グロブリン)*. 日本人集団で3例の例外的パターンを認めた。2例は Gc 1 × Gc 2 の親の組み合わせで子供は Gc 1 となったもので、1例は Gc 1 × Gc 1-2 の組み合わせで子供は Gc 2 となったものである。遺伝的多型を示す17の系 (ABO, Rh, MNSs, P, Kell, Duffy, ハプトグロビン, アデノシンデアミナーゼ, 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ, ホスホグルコムターゼ-1, ホスホグルコムターゼ-3, アシドホスファターゼ, エステラーゼ D, グルタミン酸オキサレートトランスアミナーゼ, グルタミン酸ビルビン酸トランスアミナーゼ, 血漿蛋白 C-14 及び D-05) について、法的及び生物学的親子関係の不一致の可能性を検討した。親子関係を疑う特記すべき根拠は何も認められなかった。上記の知見は、欠損又はヌル変異型の出現に帰因するものと考えられる。<sup>31</sup>

*D-05*. この系では、日本人集団において母-父-子の組み合わせに6例の例外を認めた。これらの例外は C-04 について検出したものと同じタイプのもので、同様の説明が適用される。この場合も、D-05 を C-04 と置き換えたほかは、以前と同じテストシステムを用いて親子鑑定を行ったが、やはり親子関係に何らの矛盾も認められなかった。サイレント対立遺伝子が存在すると仮定し、どのような対立遺伝子頻度が観察された表現型の比率の原因となるのかを決定した。 $V_2$  型はヘテロ接合型としてののみ

as a heterozygote, the corresponding allele frequency remains the same, and the adjustment is at the expense of  $p$  and  $q_{v1}$ . The iterative solution of this problem which most closely approximated the observed phenotype frequencies was:  $p=0.50$ ,  $q=0.41$ ,  $r=0.03$ , and  $s$  (silent)=0.06.

## DISCUSSION

**Nature of Variants.** Several general points may be made concerning the nature of the six previously undescribed electrophoretic variants encountered in this study. Five are predominantly in the IEF axis, and one in the molecular weight axis. When these numbers are combined with those available from previous studies under identical conditions on plasma<sup>2,20</sup> and lysate,<sup>4</sup> we find that about 20% of our variants are in the molecular weight axis. It is not clear whether variants of this type would be detected with 1-DE. For a similar proportion of the variants described thus far, coordinate variation in two or more polypeptides has been observed, the exact fraction depending on how such variation is defined. The reasons for this coordinate variation are undoubtedly as diverse as the various explanations for multiple bands in isozyme patterns.

With respect to the 34 different variants involving primarily shifts in the IEF axis encountered in our five technically similar studies,<sup>2,20,32,33</sup> we have plotted in Figure 5 the distance between the position assumed by the variant and the

検出されたので、これに相当する対立遺伝子頻度はその残りであり、 $p$ と $q_{v1}$ の収支によって調整が行われる。この問題について繰り返し解答していくと、観察した表現型頻度に最も近いものは、 $p=0.50$ ,  $q=0.41$ ,  $r=0.03$ ,  $s$ (サイレント)=0.06であった。

## 考 察

**変異型の性質.** 従来報告されておらず本研究で検出された電気泳動上の変異型6例について、幾つかの一般的な性質について述べる。5例は主にIEF方向、1例は分子量方向の変異型である。以前血漿<sup>2,20</sup>及び溶血液<sup>4</sup>について同じ条件で行った研究から得られる数とこれらの数を合わせると、我々の変異型の約20%が分子量方向のものであることが判明した。この種の変異型が1-DEによって検出されるかどうかは明らかでない。異なる分子量を有するような変異型が2ないし、それ以上のポリペプチドに認められており、その割合はここに述べたものと類似しているが、変異をどのように定義するかによって変異型の正確な分画が規定される。この分子量方向の変異の原因は、アイソザイム・パターンに見られる多数のバンドについて様々の解釈がされるのと同じように多種多様であることは疑いもない。

我々は技術的に類似する5例の研究において、主にIEF方向における移動度が変化する変異型34種を検出したが、<sup>2,20,32,33</sup> 変異型の位置と、推定される

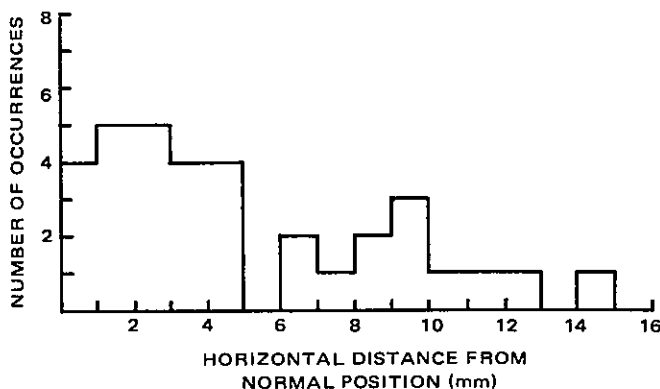


Figure 5. Horizontal gel distance separating the 34 variant polypeptides encountered in our various studies from the normal position. Further explanation in text.

図5 これまでの研究で検出された変異型ポリペプチド34例と正常位置とのゲル上の水平距離。詳細な説明は本文に記述した。



presumed normal position. Earlier we have demonstrated that in the case of relatively small polypeptides known to differ from the normal by a gain or loss of one or two molecular charges, such as several of the  $\beta$ -chain hemoglobin or carbonic anhydrase variants, in a modification of this system, a one-charge change induced a shift of 5-7 mm in the IEF axis.<sup>34</sup> The distribution of Figure 5 departs significantly from the Poisson ( $\chi^2=254.2$ ,  $df=13$ ,  $p<0.001$ ). It is tempting to see in this distribution a bimodality, with one outlier to the right, and a curtailed distribution to the left. It remains for the future to determine the precise kinds of genetic events that contribute to this unusual distribution. But with all due caution, given that most of the variants we have thus far encountered involve larger polypeptides than those with which the effect of a charge-change on mobility was standardized, we suggest that the first mode is predominantly the result of variants resulting from amino acid substitutions characterized by one-charge changes (plus some "neutral" amino acid substitutions which alter molecular configuration even under these denaturing conditions). Amino acid substitutions resulting in two-charge changes would then be an important contributor to the second mode.

**Heterozygosity Indexes.** Rosenblum et al<sup>2</sup> found a heterozygosity index of  $6.2 \pm 0.7\%$  for the 20 'randomly selected' silver-stained polypeptides which they scored for genetic variation in Caucasoids. Only 11 of these polypeptides could be routinely scored in Amerindians. If we limit the interethnic comparisons of heterozygosity to these 11 polypeptides, the resulting heterozygosity indexes are as follows: Amerindians,  $4.5 \pm 0.6\%$ ; Japanese,  $5.7 \pm 0.7\%$ ; and Caucasians,  $8.0 \pm 1.1\%$ . For the 12 polypeptides scored after Coomassie Blue staining, not in any sense a random sample, the results were: Amerindians,  $3.2 \pm 0.5\%$ ; Japanese,  $4.0 \pm 0.5\%$ ; and Caucasians,  $8.6 \pm 1.1\%$ . We have previously reported that for a series of 28 erythrocyte enzymes and serum proteins scored for genetic variability by 1-DE in Amerindians, Japanese, and Caucasians, the determinations all performed with comparable techniques, the heterozygosity indexes were 5.4%, 7.7%, and 7.8%, respectively.<sup>15</sup> The present results confirm the somewhat higher index of the Caucasoids, and lower of the Amerindians, but now the Japanese are more

正常位置との距離を図5に示す。以前我々は、幾つかの $\beta$ -鎖ヘモグロビン変異型又は炭酸脱水酵素変異型のように、正常型と比べ分子の電荷に1ないし2の増減があることが知られている比較的小きなポリペプチドの場合には、この種の変異において電荷が変化するとIEF方向に5~7mm移動することを明らかにした。<sup>34</sup> 図5に示した分布はポアソン分布とは有意に異なる ( $\chi^2=254.2$ ,  $df=13$ ,  $p<0.001$ )。この分布には、右側に離れて分布するものと、左側に短縮されて分布するものが認められ、二峰性分布と考えたい。この異常な分布に寄与する遺伝的事象の正確な種類を決定するのは将来の課題である。しかし我々がこれまで検出した変異型のほとんどが、電荷の変化が移動度に与える影響が既に標準化されたようなものより大きなポリペプチドを含んでいることを十分に考慮するならば、第1峰は主に一つの電荷の変化がアミノ酸置換(及びこれらの変性剤を用いた条件下でも分子の立体構造に変化を与えるような「中性の」アミノ酸置換)によって生じた変異型によるものであると示唆される。したがって二つの電荷の変化をもたらすアミノ酸置換は、第2峰に大きく寄与していると思われる。

**Heterozygosity index.** Rosenblum ら<sup>2</sup> は白人集団における遺伝的変異調査のため、無作為に選んだ銀染色されたポリペプチド20種を評価し、その heterozygosity が  $6.2 \pm 0.7\%$  であると認めた。アメリカンディアンについては、通常これらのポリペプチドのうち11種しか評価し得なかった。Heterozygosity の人種間比較をこれら11種のポリペプチドについてのみ行うならば、heterozygosity はアメリカンディアン  $4.5 \pm 0.6\%$ ; 日本人  $5.7 \pm 0.7\%$ ; 白人  $8.0 \pm 1.1\%$  となる。無作為標本では全くないが、クマシーブルー染色後に評価したポリペプチド12種についての結果は、アメリカンディアン  $3.2 \pm 0.5\%$ ; 日本人  $4.0 \pm 0.5\%$ ; 白人  $8.6 \pm 1.1\%$  となった。以前我々は、1-DE によりアメリカンディアン、日本人及び白人の遺伝的変異を調査するため、28種の一連の赤血球酵素及び血清蛋白質について同様の比較し得る技法を用いて評価した。その heterozygosity は各々 5.4%, 7.7%, 7.8% であった。<sup>15</sup> 本研究で得た結果は白人の指数が幾分高く、アメリカンディアンの指数は低いことを裏付けているが、以前より日本人の値がアメリカンディアンに近いものになって

similar to the Amerindians than previously. These results also confirm in general our previous finding with the 2-D PAGE technique, of more genetic variability in plasma proteins than reported by a variety of other investigators for different types of preparations. As previously noted, we have also reported heterozygosity indexes, using the 2-D PAGE technique, of  $3.1 \pm 0.5\%$  in "randomly selected" polypeptides of erythrocyte lysates.<sup>4</sup> Although we have yet to examine the precise materials studied by the earlier investigators, we are increasingly inclined to suspect that our demonstration of greater amounts of genetic variation rests as much on technical factors as on differences in the nature of the material studied.

**Ethnic Differences with Respect to Variants of Specific Polypeptides.** In addition to the emerging differences in heterozygosity indexes, the present data point to a number of other potential differences of anthropological and genetic interest. The numbers are still relatively small, and all conclusions are tentative. In this spirit, we draw attention to the absence from both these groups of a variant of C-01 encountered in polymorphic frequencies in Caucasoids but the presence in both groups of a variant of C-11 (apolipoprotein A-IV) different from the variant commonly encountered in Caucasoids. For A-02 and D-05, the Japanese possess in polymorphic proportions variants not detected in either of the other two groups. For B-03 there appear to be major differences in the frequency of a variant allele between Caucasoids and the two mongoloid groups. Finally, for C-03 ( $\alpha_1$ -antitrypsin), the data appear to confirm the known higher frequency of variants of this protein in Caucasoids than Japanese.<sup>35</sup>

**2-D PAGE: The Broader Context.** It is apparent from the emerging ethnic differences—which we propose shortly to study further with examinations of 2-D PAGE preparations of erythrocyte lysates, platelets, and lymphocytes—that an important new tool in the study of evolutionary relationships is at hand. Further, we expect, now that the usefulness of 1-DE in the study of mutation has been demonstrated,<sup>36</sup> that the 2-D PAGE approach will become 'second generation' technology in that context; studies such as the present are part of the necessary familiarizations. Finally, given the number of

いる。またこれらの結果は、概して種々の試料について、他の多くの研究者が報告しているものよりも高い頻度の遺伝的変異が血漿蛋白質にあるという、2-D PAGE 技法によって我々が以前得た所見を裏付けている。先に示したとおり、我々は 2-D PAGE 技法を用いた場合、赤血球溶血液の「無作為に選んだ」ポリペプチドでは heterozygosity が  $3.1 \pm 0.5\%$  であることも報告した。<sup>4</sup> 以前の研究者が使用した材料を正確に調べることが必要であるが、我々が示した遺伝的変異が多かった原因は、使用した材料の性質の違いにあると同時に技術的要因にあるという考えを強めている。

特定のポリペプチドの変異型に関する人種間差。Heterozygosity における差異は明らかになりつつあるが、それに加え、今回のデータはその他幾つかの人類学的及び遺伝学的に興味深い差異が存在する可能性を示している。例数が依然として比較的少ないので、結論はすべて暫定的なものである。このような見地から、白人集団において多型の頻度で検出された C-01 の変異型が黄色人種の両群には認められないが、白人集団で通常検出される変異型とは異なる C-11 (アポリポ蛋白 A-IV) の変異型が黄色人種の両群に存在することに注目している。A-02 及び D-05 に関して、日本人集団では他の 2 集団には検出されていない変異型が多型の頻度で認められた。B-03 に関しては、白人集団と二つの黄色人種集団の変異型の対立遺伝子頻度に大きな差異があると考えられる。最後に C-03 ( $\alpha_1$ -アンチトリプシン) について、白人集団では日本人集団よりこの蛋白質の変異型の頻度が高いという既知の事象<sup>35</sup> を今回のデータが裏付けている。

**2-D PAGE: 一般的意義。** 我々は赤血球溶血液、血小板、リンパ球を試料とした 2-D PAGE を用いた検査により、更に調査を進めることを間もなく提案することになっているが、人種間差について、その差が現在明らかになりつつあることから、進化との相関における研究において、重要な新しい方法が利用可能になったことは明らかである。更に、突然変異の研究における 1-DE の有効性については既に示されているが、<sup>36</sup> 2-D PAGE 法はその分野における「第 2 世代」技法となると考えられる。現在行われているような研究は、この技法に習熟するための一つの段階である。最後に、2-D PAGE で評価できる

exon products which can be evaluated with 2-D PAGE, it will in time be of great interest to contrast the results of studies such as this with the data becoming available on nucleotide substitutions in exons as determined by the direct approach.

エクソン生成物の数が明らかになれば、本研究等の結果と直接技法によって決定され、利用可能になるであろうエクソンにおけるヌクレオチド置換に関するデータを比較対照することが、将来大きな関心事となるであろう。

## REFERENCES

### 参考文献

1. SAMMONS DW, ADAMS LD, NISHIZAWA EE: Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2:135-41, 1981
2. ROSENBLUM BB, NEEL JV, HANASH SM: Two-dimensional electrophoresis of plasma polypeptides reveals "high" heterozygosity indices. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5002-6, 1983
3. NEEL JV, ROSENBLUM BB, SING CF, SKOLNICK MM, HANASH SM, STERNBERG S: Adapting two-dimensional gel electrophoresis to the study of human germ-line mutation rates. In *Methods and Applications of Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins*, ed by Celis JE, Bravo R. New York, Academic Press, 1984. pp259-306
4. ROSENBLUM BB, NEEL JV, HANASH SM, JOSEPH JL, YEW N: Identification of genetic variants in erythrocyte lysate by two-dimensional gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 36:601-12, 1984
5. McCONKEY EH, TAYLOR BJ, PHAN D: Human heterozygosity: A new estimate. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6500-4, 1979
6. WALTON KE, STYER D, GRUENSTEIN EI: Genetic polymorphism in normal human fibroblasts as analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 254:7951-60, 1979
7. SMITH SC, RACINE RR, LANGLEY CH: Lack of genic variation in the abundant proteins of human kidney. *Genetics* 96:967-74, 1980
8. COMINGS DE: Two-dimensional gel electrophoresis of human brain proteins. III. Genetic and non-genetic variations in 145 brains. *Clin Chem* 28:798-804, 1982
9. HAMAGUCHI H, OHTA A, MUKAI R, YABE T, YAMADA M: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis. 1. Detection of genetic variant polypeptides in PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Hum Genet* 59:215-20, 1981
10. HAMAGUCHI H, YAMADA M, NOGUCHI A, FUJII K, SHIBASAKI M, MUKAI R, YABE T, KONDO I: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: 2. Genetic polymorphism of lymphocyte cytosol 64K polypeptide. *Hum Genet* 60:176-80, 1982
11. HAMAGUCHI H, YAMADA M, SHIBASAKI M, MUKAI R, YABE T, KONDO I: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: 3. Frequent occurrence of genetic variants in some abundant polypeptides of PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Hum Genet* 62:142-7, 1982
12. HAMAGUCHI H, YAMADA M, SHIBASAKI M, KONDO I: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: 4. Genetic polymorphism of cytosol 100K polypeptide. *Hum Genet* 62:148-51, 1982

13. GOLDMAN D, MERRIL CR: Human lymphocyte polymorphisms detected by quantitative two-dimensional electrophoresis. *Am J Hum Genet* 35:827-37, 1983
14. ASAKAWA J, TAKAHASHI N, ROSENBLUM BB, NEEL JV: Analysis of genetic variation in Amerindian sera by 2-D PAGE. In *Electrophoresis '83*, ed by Hirai H. Berlin-New York, Walter de Gruyter, 1984. pp271-4
15. NEEL JV: Rare variants, private polymorphisms, and locus heterozygosity in Amerindian populations. *Am J Hum Genet* 30:465-90, 1978
16. NEEL JV, GERSHOWITZ H, MOHRENWEISER HW, AMOS B, KOSTYU DD, SALZANO FM, MESTRINER MA, LAWRENCE D, SIMOES AL, SMOUSE PE, OLIVER WJ, SPIELMAN RS, NEEL JV Jr: Genetic studies on the Ticuna, an enigmatic tribe of Central Amazonas. *Ann Hum Genet* 44:37-54, 1980
17. BARRANTES R, SMOUSE PE, NEEL JV, MOHRENWEISER HW, GERSHOWITZ H: Migration and genetic infrastructure of the Central American Guaymi and their affinities with other tribal groups. *Am J Phys Anthropol* 58:201-14, 1982
18. NEEL JV, SALZANO FM, JUNQUEIRA PC, KEITER F, MAYBURY-LEWIS D: Studies on the Xavante Indians of the Brazilian Mato Grosso. *Am J Hum Genet* 16:52-140, 1964
19. 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)
20. ROSENBLUM BB, HANASH SM, NEEL JV: High-resolution separation of plasma proteins, applications to genetic analysis. In *Biologie Prospective 5<sup>e</sup> Colloque International de Pont-a-Mousson, Masson*, ed by Galteau M-M, Siest G, Henny J. Paris, 1983. pp 85-90
21. KERA Y, YAMASAWA K, KIMURA S: Phenotypic variation of human antithrombin III in normal plasma: Detection by isoelectric focusing. *Jpn J Hum Genet* 28:249-53, 1983
22. BØRRESEN A-L, BERG K: The apoE polymorphism studied by two-dimensional high-resolution gel electrophoresis of serum. *Clin Genet* 20:438-48, 1981
23. ZANNIS VI, JUST PW, BRESLOW JL: Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* 33:11-24, 1981
24. UTERMANN G, STEINMETZ A, WEBER W: Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: Comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum Genet* 60:344-51, 1982
25. ANDERSON L, ANDERSON NG: High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5421-5, 1977
26. BROWN WT:  $\alpha_1$ -Antitrypsin: Apparent molecular weight heterogeneity shown by two-dimensional electrophoresis. *Am J Hum Genet* 34:195-208, 1982
27. TRACY RP, CURRIE RM, YOUNG DS: Two-dimensional gel electrophoresis of serum specimens from a normal population. *Clin Chem* 28:890-9, 1982
28. MOURANT AE, KOPEC AC, DOMANIEWSKA-SOBCZAK K: *The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms*, 2nd Ed. London, Oxford University Press, 1976
29. OLAISEN B, TEISBERG P, GEDDE-DAHL T: Fibrinogen  $\gamma$  chain locus is on chromosome 4 in man. *Hum Genet* 61:24-6, 1982
30. HOBART MJ: Genetic polymorphism of human plasminogen. *Ann Hum Genet Lond* 42:419-23, 1979

31. VAVRUSA B, CLEVE H, CONSTANS J: A deficiency mutant of the Gc system. *Hum Genet* 65: 102-7, 1983
32. BAIER LJ, HANASH SM, ERICKSON RP: Mouse liver protein variants detected by two-dimensional electrophoresis. In *Electrophoresis '83*, ed by Hirai H. Berlin-New York, Walter de Gruyter, 1984. pp189-94
33. HANASH SM, ROSENBLUM BB, NEEL JV, BAIER LJ, MARKEL D, NIEZGODA W: Genetic analysis of fifty-two platelet polypeptides detected in two-dimensional polyacrylamide gels. (in manuscript)
34. WANNER LA, NEEL JV, MEISLER MH: Separation of allelic variants by two-dimensional electrophoresis. *Am J Hum Genet* 34:209-15, 1982
35. ASHLEY MJ, CHAN-YEUNG M, COREY PN: P<sub>i</sub> phenotypes in North American workers: Racial differences and comparisons with reported frequencies. *Hum Hered* 30:107-11, 1980
36. NEEL JV: Frequency of spontaneous and induced "point" mutations in higher eukaroytes. *J Hered* 74:2-15, 1983