

ELECTROPHORETIC VARIANTS OF BLOOD PROTEINS IN JAPANESE
V. CERULOPLASMIN

日本人の血液蛋白質の電気泳動上の変異型
V. Ceruloplasmin

MIKIO FUJITA, M.D. 藤田幹雄
CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子
JUN-ICHI ASAKAWA, M.S. 浅川順一
YUKO NAGAHATA 長畑裕子
YOSHIKO TANAKA 田中芳子
RYUJI HAZAMA, M.D. 迫龍二
KAZUAKI GORIKI, M.D. 郷力和明



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION
財団法人 放射線影響研究所
A Cooperative Japan - United States Research Organization
日米共同研究機関

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

We are deeply indebted to Dr. James V. Neel and Dr. Howard B. Hamilton for invaluable support.

多大の御支援をいただいた Dr. James V. Neel と Dr. Howard B. Hamilton に心から感謝する。

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

放射線影響研究所(元 ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって運営されている。

**ELECTROPHORETIC VARIANTS OF BLOOD PROTEINS IN JAPANESE
 V. CERULOPLASMIN**

 日本人の血液蛋白質の電気泳動上の変異型
 V. Ceruloplasmin

 MIKIO FUJITA, M.D. (藤田幹雄)¹; CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子)¹;
 JUN-ICHI ASAKAWA, M.S. (浅川順一)¹; YUKO NAGAHATA (長畑裕子)¹;
 YOSHIKO TANAKA (田中芳子)¹; RYUJI HAZAMA, M.D. (迫龍二)²;
 KAZUAKI GORIKI, M.D. (郷力和明)*

 Departments of Clinical Laboratories (Biochemical Genetics Division)¹ and Medicine²
 臨床検査部(遺伝生化学室)¹及び臨床部²
SUMMARY

The plasma ceruloplasmin (CP) of 22,367 children of atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki was examined for variants by electrophoresis. The sample was composed of 14,964 unrelated children and 7,403 siblings of the unrelated persons. A total of seven types of electrophoretic variants were detected; four migrating anodally and three cathodally to the normal B band. We have reported two of these variants, CP_{ANG1} and CP_{CNG1}, previously but the other five, CP_{ANG2}, CP_{AHR1}, CP_{AHR2}, CP_{CHR1}, and CP_{CHR2}, are newly identified. The allelic frequency of CP**CNG1* was 0.00916, so that the variant is considered to be a polymorphic allele. Homozygosity for the CP**CNG1* allele was detected in five individuals. This is the first report of a homozygous phenotype for a CP variant in a Japanese population. Family study of the new five variants all demonstrated patterns of codominant inheritance.

INTRODUCTION

CP, first isolated from pig serum by Holmberg and Laurell in 1948, is a copper-containing protein which electrophoretically comigrates with the α_2 -globulin fraction. McAlister et al¹ reported the first electrophoretic variant of CP

要約

広島・長崎の原爆被爆者の子供22,367人の血漿 ceruloplasmin (CP) について、電気泳動法を用いて変異型を検査した。検査された子供は、14,964人の血縁関係のない子供と、それらの同胞7,403人から成り立っている。正常なBバンドよりも陽極側に移動する変異型を4種類、Bバンドより陰極側に移動する変異型を3種類、合計7種類の電気泳動変異型が確認された。これらの変異型のうち、CP_{ANG1}とCP_{CNG1}は既に報告しており、CP_{ANG2}、CP_{AHR1}、CP_{AHR2}、CP_{CHR1}、CP_{CHR2}の5種類が新たに見いだされたものである。CP**CNG1*の遺伝子頻度は0.00916となり、多型に近い頻度を示している。ホモ接合体 CP_{CNG1}が5人に検出されたが、これは日本人集団ではCP変異型のホモ接合体の初めての報告である。新しい5種類の変異型はすべて家族調査によって相互優性遺伝形式を示した。

緒言

1948年に Holmberg 及び Laurell によって豚血清から初めて分離された CP は、電気泳動上で α_2 グロブリン分画にある銅含有蛋白質である。McAlister ら¹ は、ヒトに初めて CP の電気泳動上の変異型を報告

*Department of Internal Medicine, Mihara Medical Association Hospital
 三原医師会病院内科

in humans, a fast (more anodally) migrating variant termed 1F. Shreffler et al² then identified various types of CP variants in American Negroes and Caucasians and showed that these variants could be explained if three kinds of alleles, *CP*A*, *CP*B*, and *CP*C*, associated respectively with a fast migrating, the normal, and a slow migrating phenotype, are presumed to exist. Subsequently, Shokeir and Shreffler,³ Tanis et al,⁴ Neel et al,⁵ and Mohrenwiser and Decker⁶ identified new variants. To date, nine types of variants which migrate anodally to normal CP B, namely, CP Michigan, CP A-MAC-1, CP A-YAN-1, CP A, CP A-CAY-1, CP A-WAP-1, CP Th, CP Bpt, and CP ANG1, and six which migrate cathodal to normal CP B, namely, CP NH, CP CAnnArbor-1, CP C-WAP-1, CP C, CP C-WAP-2, and CP CNG1, have been reported. Four of these alleles achieve polymorphic proportions, *CP*A* in Negroid, Caucasoid, and Indians,^{2,6-8} *CP*NH* in Negroids,^{3,6} *CP*Michigan* in Caucasoids and Negroids,⁶ and *CP*C* in Mongoloids.⁸

In an earlier study of 4,026 Japanese adults residing in Hiroshima and Nagasaki, we detected one case each of CP CNG1 and CP ANG1.⁹ In the present study, we extend this series, reporting on the findings in 22,367 children born to A-bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, as a part of a study whose purposes were described in detail in the first report of this series.¹⁰

MATERIALS AND METHODS

Population, Sample Preparation, Family Study, and Nomenclature of Variants. The general procedures employed in our study were described in detail in the earlier paper.¹⁰ Briefly, blood samples were obtained from a total of 22,367 children (Hiroshima: 11,996; Nagasaki: 10,371) including those born to proximally exposed survivors (one or both parents exposed to A-bomb within 2,000m from the hypocenter) and those born to distally exposed survivors (one or both parents exposed to A-bomb more than 2,500m from the hypocenter). So far, no measurable genetic effect due to A-bomb exposure of the parents has been observed.¹⁰ Therefore, in this report, data obtained from the children of the both groups are combined. About 30% of this sample consisted of siblings. When only one child was selected from one family using the same method described in the first

したが、それは移動度の速い(より陽極側)変異型で、1Fと命名された。その後、Shrefflerら²は米国の黒人及び白人に種々のCP変異型を確認し、それらの変異型は移動度の“速い”、“正常”、“遅い”表現型と対応する3種の対立遺伝子、*CP*A*、*CP*B*及び*CP*C*の存在を仮定するとよく説明できることを明らかにした。その後、Shokeir及びShreffler,³ Tanisら,⁴ Neelら⁵並びにMohrenwiser及びDecker⁶によって新しい変異型が検出された。現在までに、正常型CP Bよりも陽極側に移動する9種の変異型、すなわち、CP Michigan、CP A-MAC-1、CP A-YAN-1、CP A、CP A-CAY-1、CP A-WAP-1、CP Th、CP Bpt及びCP ANG1、並びに、正常型CP Bよりも陰極側に移動する6種の変異型、すなわち、CP NH、CP CAnnArbor-1、CP C-WAP-1、CP C、CP C-WAP-2及びCP CNG1が報告されている。これらの対立遺伝子のうち4種類、すなわち、ネグロイド、白人及び北米インディアンの*CP*A*、^{2,6-8}ネグロイドの*CP*NH*、^{3,6}白人及びネグロイドの*CP*Michigan*⁶並びにモンゴロイドの*CP*C*⁸は多型の頻度を示している。

広島・長崎在住の4,026人の日本人成人に関する初期の研究で、我々はCP CNG1及びCP ANG1を各1例ずつ検出した。⁹今回は、この研究シリーズを拡大し、研究の一環として広島・長崎の原爆被爆者の子供22,367人について得られた所見を報告する。なお、本研究の目的は、このシリーズの第1報に詳述している。¹⁰

材料及び方法

母集団、標本作製、家族調査及び変異型の命名。本研究で用いられた一般的方法については前報¹⁰で詳述したが、ここでも略述する。まず、血液標本は、近距離被爆者の子供(片親又は両親が爆心地から2,000m以内で被爆)及び遠距離被爆者の子供(片親又は両親が爆心地から2,500m以遠で被爆)合計22,367人(広島11,996人、長崎10,371人)から入手した。現在までのところ、両親の原爆被爆による、測定可能な遺伝的影響は観察されていない。¹⁰したがって、本報では両群の子供から得たデータを組み合わせた。研究対象者の約30%が同胞である。第1報で述べたものと同じ方法を用いて、1家族からただ

report of this series, the number of unrelated children accounted for 14,964 (8,548 for Hiroshima, 6,416 for Nagasaki). The frequency of alleles which code variant types was calculated for this latter population. Blood samples were collected using ammonium-potassium oxalate or acid citrate-dextrose (ACD) solution as anticoagulants, centrifuged at $1,500\times g$, and the plasma stored at -70°C or in liquid nitrogen. Variants have been named by mobility class (A, fast; C, slow), place (HR or NG), and sequence (1, 2 . . .) of discovery.

First Screening and Comparison of Variants. As the first screening, vertical starch gel electrophoresis, an improvement of the method of Weitkamp et al,¹¹ was conducted at 4°C using 0.0285 M boric acid-LiOH, pH 8.05, as bridge buffer and 0.061 M tris-citric acid and 0.0285 M boric acid-LiOH, pH 8.6, as gel buffer. Polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) was employed for confirmation and comparison of variants. PAGE was performed at 4°C with a gel composed of running gel (T; 7.2%, C; 2.8%) and stacking gel (T; 4.0%, C; 5%) and tank-gel buffer of 0.04 M tris-glycine, pH 8.5, employing the Pharmacia Mark II electrophoresis apparatus. Staining was conducted on the basis of oxidase activity of CP using dianisidine as a substrate following the method of Shreffler et al.²

Tests on Storage Effects on Migration Rate. Samples were stored at 4°C and -20°C , and one, two, three, and four weeks thereafter, PAGE was carried out. After dianisidine staining, the gel was examined to measure the concentration ratio of each band, using a densitometer. A second identically prepared gel underwent immunofixation as follows: 1) A cellulose acetate membrane was immersed in a solution containing an anticerculoplasmin antibody (Behring Inst.) diluted to 1/6 by 0.15% NaCl, and this membrane was put on the gel and allowed to react for five hours at room temperature. 2) Bands of precipitation with Coomassie blue staining were identified. Protein quantitation of CP was carried out by single radial immunodiffusion (SRID). As controls, dithiothreitol was added to the samples to make the final concentration 0.1 mM, incubated at 4°C for 30 minutes, stored at 4°C or -20°C , and electrophoresis was done one, two, three, and four weeks thereafter.

1人の子供を選定すると、血縁関係のない子供は14,964人(広島8,548人, 長崎6,416人)となった。変異の種類をコードする対立遺伝子の頻度はこの後者の集団を用いて算出した。血液標本は、シュウ酸アンモニウム-カリウム又はクエン酸-グルコース(ACD)溶液を抗凝固剤として用いて収集し、 $1,500\times g$ で遠心分離した。得られた血漿は -70°C 又は液体窒素中に保存した。変異型は、移動度(A 速い, C 遅い)、検出の場所(HR 又は NG)及び発見順序(1, 2 . . .)別に命名した。

第1スクリーニング及び変異型の比較。 最初のスクリーニングとしては、Weitkampら¹¹の方法を改良した垂直式澱粉ゲル電気泳動法を用いたが、これは、ブリッジ緩衝液として0.0285Mホウ酸-LiOH(pH 8.05)を、また、ゲル緩衝液として0.061Mトリス-クエン酸及び0.0285Mホウ酸-LiOH(pH 8.6)を用いて 4°C で行った。変異型の確認及び比較はポリアクリルアミドスラブ・ゲル電気泳動法(PAGE)を用いて行った。PAGEは、泳動ゲル(T 7.2%, C 2.8%)及び重層ゲル(T 4.0%, C 5%)から成るゲル及び0.04Mトリス-グリシンのタンクゲル緩衝液(pH 8.5)を用い 4°C で、Pharmacia Mark II電気泳動装置を使用して行った。染色はShrefflerら²の方法に従い、基質としてジアニシジンを用いて、CPのオキシダーゼ活性に基づいて行った。

移動度に対する保存の影響についての検査。 標本は 4°C 及び -20°C で保存し、1, 2, 3及び4週間後にPAGEを行った。ジアニシジン染色を行った後、各バンドの染色濃度をdensitometerで測定した。同様に調製した二つ目のゲルに対して、次のようなimmunofixationを行った。1)抗CP抗体(Behring Inst.)を0.15% NaClで1/6に希釈した溶液にセルロース・アセテート膜を浸し、次に、この膜をゲルに重層し、室温で5時間反応させた。2)クマシー・ブルー染色で沈降線のバンドを検出させた。CPの蛋白定量はsingle radial immunodiffusion(SRID)を用いて行った。対照標本は、最終濃度が0.1 mMになるようにジチオスレイトールを加え、 4°C で30分間インキュベートした後、 4°C 又は -20°C で保存した。1, 2, 3及び4週間後に電気泳動を行った。

RESULTS

Five rare variants were detected among a total of 22,367 children in addition to the two variants reported by Ferrell et al.⁹. The order of the migration rate of these variants including CP_{ANG1} and CP_{CNG1} and normal type B is as follows (Figure 1): $C_{HR1} < C_{HR2} < C_{NG1} < B < A_{NG2} < A_{HR1} < A_{HR2} < A_{NG1}$. Except for five cases of the homozygous phenotype CP_{CNG1}, all the other variants encountered were heterozygous for the normal allele, CP*B, and a variant allele. Table 1 shows the frequencies of each of these CP phenotypes and alleles by city for the populations composed only of unrelated children. The frequency of CP*CNG1 was 0.0095 in Hiroshima and 0.0087 in Nagasaki, each being almost in polymorphic proportions. The allelic frequency of all of the other six variants was less than 0.001, with no significant difference between the cities. CP*AHR2 and CP*CHR2 were detected in only one family. As a result of family studies, the five new types were all confirmed as genetic variants (Table 2).

結果

合計22,367人の子供から、Ferrellら⁹が報告した二つの変異型のほかに、五つのまれな変異型が検出された。CP_{ANG1}とCP_{CNG1}、並びに正常型Bを含めたこれらの変異型の移動度の順序は次のとおりである(図1): $C_{HR1} < C_{HR2} < C_{NG1} < B < A_{NG2} < A_{HR1} < A_{HR2} < A_{NG1}$ 。ホモ接合表現型CP_{CNG1}の5例を除いて、検出された他のすべての変異型は、正常対立遺伝子CP*B及び変異対立遺伝子とのヘテロ接合を示した。表1は、血縁関係のない子供のみから成る集団におけるCP表現型及び対立遺伝子の各々の頻度を都市別に示したものである。CP*CNG1の頻度は、広島で0.0095、長崎で0.0087であり、いずれにおいても多型に近い頻度であった。他の6種の変異型の対立遺伝子の頻度はすべて0.001以下で、両市間に有意な差は認められなかった。CP*AHR2及びCP*CHR2は1家族のみに検出された。家族調査の結果、この5種の新しい変異型はすべて遺伝的変異型であると確認された(表2)。

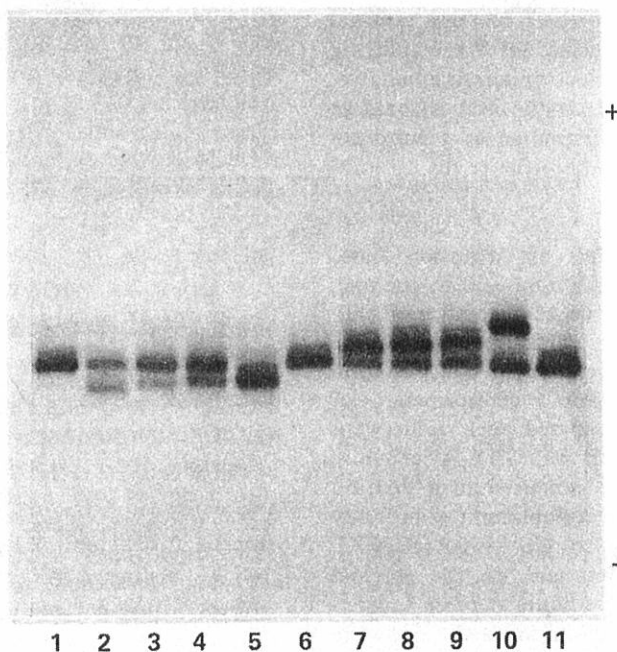


Figure 1. Ceruloplasmin variants encountered in the present study on polyacrylamide slab gel electrophoresis.

図1 本研究で、ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法により検出された ceruloplasmin 変異型

1, 6 & 11, CP B; 2, CP B/CHR1; 3, CP B/CHR2; 4, CP B/CNG1; 5, CP CNG1; 7, CP B/ANG2; 8, CP B/AHR1; 9, CP B/AHR2; 10, CP B/ANG1.

TABLE 1 CERULOPLASMIN PHENOTYPES OBSERVED AMONG CHILDREN OF HIROSHIMA (HR) AND NAGASAKI (NG) AND ALLELIC FREQUENCIES AMONG THE UNRELATED CHILDREN

表1 広島 (HR) 及び長崎 (NG) の子供に観察された ceruloplasmin 表現型並びに血縁関係のない子供における対立遺伝子頻度

Phenotype	Total	Unrelated children §1			Allele	Combined	HR	NG
		Combined	HR	NG				
CP B	21917	14678	8380	6298	<i>CP*B</i>	.99034	.9901	.9907
CP B/ANG1	16	10	3	7	<i>CP*ANG1</i>	.00033	.0002	.0006
CP B/ANG2	2	1	0	1	<i>CP*ANG2</i>	.00003	0	.0001
CP B/AHR1	2	2	2	0	<i>CP*AHR1</i>	.00007	.0001	0
CP B/AHR2	2	0§2	0	0	<i>CP*AHR2</i>	0§2	0	0
CP B/CNG1	419	268	159	109				
CP CNG1	5	3	2	1	<i>CP*CNG1</i>	.00916	.0095	.0087
CP B/CHR1	3	1	1	0	<i>CP*CHR1</i>	.00003	.0001	0
CP B/CHR2	1	1	1	0	<i>CP*CHR2</i>	.00003	.0001	0
Total	22367	14964	8548	6416				

§1 The population of unrelated children was composed of children without siblings and those who received the first test among their siblings.

血縁関係のない子供の集団は、同胞のいない子供、及び同胞の中で最初に検査を受けた子供から成る。

§2 According to the above-described rule, the brother with normal phenotype (CP B) who fulfilled the condition was selected as a member of the population and the propositus having variant phenotype was excluded.

上記の原則により、この条件を満たす正常表現型 (CP B) を有する者をこの集団の一員として選んだが、その同胞で変異表現型を有する発端者は除外した。

TABLE 2 FAMILY STUDIES OF NEW CERULOPLASMIN VARIANTS ENCOUNTERED IN THIS STUDY

表2 本研究で検出された新しい ceruloplasmin 変異型の家族調査

MF No.	City	Propositus	Mother	Father	Siblings
	NG	● B/ANG2	○	■	
	HR	● B/ANG2	●	□	
	HR	● B/AHR1	●	□	○
	HR	● B/AHR1	NT	NT	
	HR	■ B/AHR2	●	□	○ † ●
	HR	■ B/CHR1	○	■	○ ■
	HR	■ B/CHR1	●	□	
	HR	■ B/CHR2	○	■	

●■, Heterozygote; ○□, Normal; †, Deceased; NT, Not tested

When plasma samples containing a CP variant were stored under various conditions, the electrophoretic pattern changed over time in some cases. Figure 2 shows the result of PAGE of plasma samples containing homozygous CP C_{NG1} which had been stored at 4°C for four weeks. After two weeks of storage, in addition to the CP C_{NG1} band, a new band both dianisidine- and immunofixation-positive appeared anodal to normal B band. At the same time, the staining intensity of CP C_{NG1} decreased almost to the same level as that of the new band. With further elapse in time, the staining intensity of the new band increased, and two weeks thereafter, the pattern was similar to phenotype CP A/ C_{NG1} . As for heterozygous CP B/ C_{NG1} , the staining intensity of the CP B band was always stronger than the CP C_{NG1} band. The difference in staining intensity of the two bands became greater with time, and three or four weeks later, CP C_{NG1} band became undetectable by either dianisidine staining or immunofixation. On the other hand, the width of the CP B band became broader on the anodal side, but the pattern was scored as phenotype CP B.

CP 変異型を含む血漿標本を種々の条件で保存すると、数例の電気泳動パターンに経時的变化が認められた。図2は、4°Cで4週間保存されたホモ接合 CP C_{NG1} を含む血漿標本に PAGE を行った結果を示したものである。保存開始後2週間で、この CP C_{NG1} バンドのほかに、ジアニシジン及び immunofixation が共に陽性である新しいバンドが正常の B バンドより陽極側に現れた。それと同時に、CP C_{NG1} の染色濃度は新しいバンドとほぼ同じレベルにまで低下した。更に時間が経過すると、新しいバンドの染色濃度は上昇し、2週間後になると、そのパターンは表現型 CP A/ C_{NG1} と同様な型を示した。ヘテロ接合 CP B/ C_{NG1} の場合、CP B バンドの染色濃度は常に CP C_{NG1} バンドより高かった。これら二つのバンドの染色濃度の差は時間とともに拡大し、3~4週間後には、CP C_{NG1} バンドは、ジアニシジン染色及び immunofixation のいずれによっても検出不可能になった。一方、CP B バンドの幅は陽極側で広がったが、そのパターンは表現型 CP B と判定された。

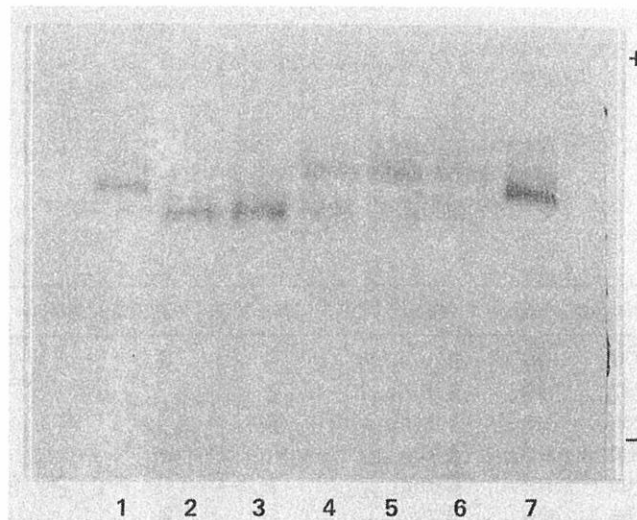


Figure 2. Storage effects at 4°C on a ceruloplasmin variant (CP C_{NG1}) shown by polyacrylamide slab gel electrophoresis.

図2 ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法での ceruloplasmin 変異型 (CP C_{NG1}) における 4°C 保存の及ぼす影響

1 & 7, control fresh CP B; 2, fresh CP C_{NG1} ; 3, CP C_{NG1} after 1 week; 4, CP C_{NG1} after 2 weeks; 5, CP C_{NG1} after 3 weeks; 6, CP C_{NG1} after 4 weeks.

1及び7, 対照用の新鮮な CP B; 2, 新鮮な CP C_{NG1} ; 3, 1週間後の CP C_{NG1} ; 4, 2週間後の CP C_{NG1} ; 5, 3週間後の CP C_{NG1} ; 6, 4週間後の CP C_{NG1}

In the electrophoretic pattern of heterozygous CP B/ANG₁, the staining intensity of the CP ANG₁ band was slightly stronger than that of CP B band and no change of migration rate with time was observed. The band pattern of homozygous CP B also showed no change over time. At the same time, the protein concentration of CP C_{NG1}, CP B/C_{NG1}, CP B/ANG₁, and CP B quantitated by SRID showed no change over time. When samples were stored at -20°C, change of migration rate was not apparent four weeks later, and those stored in liquid nitrogen showed no change in migration rate for at least six years. Storage of samples at 4°C after dithiothreitol processing prevented a part (not all) of storage effects on the migration rate of the CP C_{NG1} band.

DISCUSSION

The variant designated as CP C_{NG1} which migrates cathodal to normal CP B band was identified in 268 individuals as the heterozygous phenotype CP B/C_{NG1} and in three as the homozygous phenotype CP C_{NG1} among 14,964 unrelated children studied. Therefore, the frequency of the *CP*CNG1* allele was 0.00916. However, our previous study conducted on 4,026 subjects in Hiroshima and Nagasaki, the same cities of the present study, which included many parents of these children, identified only one case of this variant.⁹ This apparent disparity between the two investigations merits further comment. There seems to be essentially no difference in the character of the previous and present study populations. Furthermore, conditions of starch gel electrophoresis were basically the same. We have experienced a difference between starch lots in the ability to separate CP variants. In the starch gel electrophoresis of the present study, even when separation of variants was poor, confirmation could be made by PAGE. A second important factor is judged to be the effect of freeze-thawing conducted on samples used for the confirmation studies of variants. Since the storage effect observed in CP C_{NG1} (Figure 2) became apparent after freeze-thawing, it is thought that, of the two bands of the heterozygote, CP C_{NG1} band showed remarkable decrease of staining intensity as well as its change of migration rate, and it could be mistaken for the CP B. In the detection of CP variants, full consideration should be given to the selection of the supporting gel and the storage and treatment of samples.

ヘテロ接合 CP B/ANG₁ の電気泳動パターンにおいて、CP ANG₁ の染色濃度は CP B バンドより若干高く、移動度の経時変化は観察されなかった。ホモ接合 CP B のバンドパターンも経時変化を示さなかった。同時に、SRID で定量された CP C_{NG1}, CP B/C_{NG1}, CP B/ANG₁ 及び CP B の蛋白濃度には経時変化は観察されなかった。標本を -20°C で保存した場合、4 週間後に移動度の変化は現れなかったし、液体窒素に保存した標本では、少なくとも 6 年間は移動度に変化が認められなかった。ジチオスレイトールで処理した後 4°C で標本を保存すると、保存が CP C_{NG1} バンドの移動度に及ぼす保存の影響をある程度 (完全にはない) 防ぐことができた。

考 察

正常型 CP B バンドよりも陰極側に移動する CP C_{NG1} と命名された変異型では、調査した 14,964 人の血縁関係のない子供のうち、268 人にヘテロ接合表現型 CP B/C_{NG1} が、また 3 人にホモ接合表現型 CP C_{NG1} が確認された。したがって、*CP*CNG1* 対立遺伝子の頻度は 0.00916 であった。しかし、この子供らの親を多く含む広島及び長崎の 4,026 人を検査した我々の以前の調査においては、この変異型が確認されたのはわずか 1 例であった。⁹ 両調査間のこの明瞭な差については、更に説明を加える必要がある。まず、前回と今回の調査集団の性質には本質的な差はないように思われる。その上、澱粉ゲル電気泳動の条件は基本的に同じであった。我々は、澱粉のロットによって、CP 変異型の分離能に差があることを認めている。今回の澱粉ゲル電気泳動では、変異型の分離状態が悪い場合でも、PAGE によって確認を行うことができた。次に重要な要因は、変異型の確認に用いた標本に対して行った凍結融解の影響であると考えられる。CP C_{NG1} に観察された保存の影響 (図 2) は凍結融解後に明らかになっているので、このヘテロ接合体の二つのバンドのうち、CP C_{NG1} バンドは染色濃度の顕著な低下並びに移動度の変化を示し、そのため、CP B と間違えられ得たと考えられる。CP 変異型の検出の際には、支持ゲルの選択並びに標本の保存及び処理に細心の注意を払う必要がある。

The polymorphic allele of CP, CP^*A was observed in American and African Negroid populations in a frequency of 0.041-0.147 and in Caucasoid populations (Greeks, Germans, and Irish) in a frequency of 0.01-0.068.⁷ However, Mohrenweiser and Decker,⁶ in a detailed examination on 1,853 Caucasians and 199 Blacks in the United States by PAGE using a combination of three types of buffers and gradient gel, reported that the Negroid population had two types of variants with migration rate faster than CP B, CP A and CP Michigan, with the allele coding for each variant being in polymorphic frequencies of 0.033 and 0.010. In the Caucasoid population, the CP A phenotype which was detected in Blacks was not identified, and only CP Michigan was observed, the allelic frequency being 0.012. They suggested that as the frequency of the CP Michigan was quite similar to that reported for CP^*A in European Caucasian populations by Kellermann and Walter,⁷ the CP A variant which had been previously reported in the Caucasoid population was actually CP Michigan. Its migration rate is slightly slower (more cathodal) than that of CP A, the variant of Blacks. CP Michigan was thought to be the more ancient of the two because it was common to both populations.

Fast migrating variants present in polymorphic frequencies have not been identified in Japanese and Korean populations. On the other hand, in addition to CP C_{NG1} reported here, the CP C variant was reported as polymorphic in a Korean population.⁸ They examined 115 Koreans using horizontal starch gel electrophoresis and detected one homozygote CP C and one heterozygote CP B/C. The frequency of the CP^*C allele was thus 0.013. Unfortunately we have not had the opportunity to compare CP C_{NG1} and the Korean CP C variant on the same gel. However, it seems possible that these variants may be identical. If this is so, as is the case with TF D_{chi} , these CP variants may be useful markers for Mongoloid populations. Therefore, identification of these variants is of more than routine interest.

We already reported that on PAGE when the CP A_{NG1} and CP C_{NG1} variants detected in our population were compared with the CP A and CP C variants detected in a Negroid population, the order of the migration rates was CP A_{NG1} > CP A and CP C_{NG1} > CP C.⁹ However, comparison between the newly detected five

CP の多型性対立遺伝子 CP^*A は、北米及びアフリカのネグロイド集団では0.041~0.147の頻度で、また、白人集団(ギリシア人、ドイツ人及びアイルランド人)では0.01~0.068の頻度で観察された。⁷しかし、Mohrenweiser 及び Decker⁶ は、3種類の緩衝液と勾配ゲルを組み合わせたPAGEを用いて、米国の白人1,853人及び黒人199人に対して詳しい検査を行い、ネグロイド集団では、CP Bよりも移動度の速い2種類の変異型、CP A及びCP Michiganがあり、それらをcodeする対立遺伝子は多型頻度0.033と0.010であることを報告した。白人集団では、黒人に検出されたCP A型は検出されず、CP Michiganのみが観察され、その対立遺伝子頻度は0.012であった。彼らは、CP Michiganの頻度がKellermann及びWalter⁷によって報告された欧州白人の CP^*A の頻度と酷似しているため、以前白人集団について報告されたCP A変異型は実際はCP Michiganであろうと示唆した。CP Michiganの移動度は、黒人の変異型であるCP Aの移動度よりやや遅い(より陰極側に移動)。CP Michiganは両集団に共通して認められたので、二つの変異型のうちでは、古くから存在するものであると考えられた。

多型の頻度で認められる速い変異型は、日本及び韓国の集団には観察されなかった。一方、ここで報告したCP C_{NG1} に加えて、韓国人集団ではCP C変異型が多型として報告されている。⁸この場合は、水平澱粉ゲル電気泳動法を用いて115人の韓国人について検査を行い、ホモ接合体CP C 1例とヘテロ接合体CP B/C 1例を検出している。したがって、 CP^*C 対立遺伝子の頻度は0.013であった。残念ながら我々には、CP C_{NG1} と韓国のCP C変異型を同一ゲル上で比較する機会は無かった。しかし、これらの変異型が同じものである可能性はあると思われる。もしそうであれば、TF D_{chi} のように、これらのCP変異型は、モンゴロイド集団にとって有用なマーカーかもしれない。したがって、これらの変異型の鑑別は極めて興味深いものである。

我々の調査集団で検出されたCP A_{NG1} 及びCP C_{NG1} と、ネグロイド集団で検出されたCP A及びCP CとをPAGEによって比較した場合、移動度の順序がCP A_{NG1} > CP A及びCP C_{NG1} > CP Cとなることは既に報告した。⁹しかし、新たに検出された

variants and those detected in other populations was not possible. Since CP is a large molecule composed of 1,046 amino acids,¹² the probability that electrophoretically identical rare variants detected in only two or three families result from the same type of amino acid substitution at the same site appears to be quite small.

五つの変異型と他の集団に検出された変異型の比較を行うことはできなかった。CPは1,046個のアミノ酸から成る大きな分子であるから、¹²二、三の家族にのみ検出された電気泳動的に同じまれな変異型が、同じ部位の同種のアミノ酸置換から起こる確率は極めて小さいと思われる。

REFERENCE

参考文献

1. McALISTER R, MARTIN GM, BENDITT EP: Evidence for multiple caeruloplasmin components in human serum. *Nature* 190:927-9, 1961
2. SHREFFLER DC, BREWER GJ, GALL JC, HONEYMAN MS: Electrophoretic variation in human serum ceruloplasmin: A new genetic polymorphism. *Biochem Genet* 1:101-15, 1967
3. SHOKEIR MHK, SHREFFLER DC: Two new ceruloplasmin variants in Negroes - Data on three populations. *Biochem Genet* 4:517-28, 1970
4. TANIS RJ, NEEL JV, DOVEY H, MARROW M: The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. IX. Gene frequencies for 18 serum protein and erythrocyte enzyme systems in Yanomama and five neighboring tribes; nine new variants. *Am J Hum Genet* 25:655-76, 1973
5. NEEL JV, TANIS RJ, MIGLIAZZA EC, SPIELMAN RS, SALZANO FM, OLIVER WJ, MORROW M, BACHOFER S: Genetic studies of the Macushi and Wapishana Indians. I. Rare genetic variants and a "private polymorphism" of esterase A. *Hum Genet* 36:81-107, 1977
6. MOHRENWEISER HW, DECKER RS: Identification of several electrophoretic variants of human ceruloplasmin including Cp^{Michigan}, a new polymorphism. *Hum Hered* 32:369-73, 1982
7. KELLERMANN G, WALTER H: On the population genetics of the ceruloplasmin polymorphism. *Humangenetik* 15:84-6, 1972
8. BAJATZADEH M, WALTER H: Studies on the population genetics of the ceruloplasmin polymorphism. *Humangenetik* 8:134-6, 1969
9. 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)
10. SATOH C, TAKAHASHI N, ASAKAWA J, MASUNARI N, FUJITA M, GORIKI K, HAZAMA R, IWAMOTO K: Electrophoretic variants of blood proteins in Japanese. I. Phosphoglucomutase-2 (PGM2). *Jpn J Hum Genet* 29:89-104, 1984 (RERF TR 11-84)
11. WEITKAMP LR, ARENDS T, GALLANGO ML, NEEL JV, SCHULTZ J, SHREFFLER DC: The genetic structure of a tribal population, Yanomama Indians. III. Seven serum protein systems. *Ann Hum Genet* 35:271-9, 1972
12. TAKAHASHI N, ORTEL TL, PUTNAM FW: Single-chain structure of human ceruloplasmin: The complete amino acid sequence of the whole molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:390-4, 1984