

ELECTROPHORETIC VARIANTS OF BLOOD PROTEINS IN JAPANESE.

VI. TRANSFERRIN

日本人の血液蛋白質の電気泳動上の変異型

VI. Transferrin

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
TODOR KRASTEFF



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

ACKNOWLEDGMENTS

謝 辞

We are greatly indebted to Dr. James V. Neel and Dr. Howard B. Hamilton for the advice and assistance in preparation of this manuscript. Also, we are grateful to Dr. Goichi Ishimoto for kindly providing us the samples of variants found in Mie district. The senior author accomplished part of this work during 1980-81 at the University of Michigan on a fellowship funded by the US Department of Energy.

本報を作成するに当たり、御助言並びに御支援をいただいた Dr. James V. Neel 及び Dr. Howard B. Hamilton に心から感謝する。また、三重地区で検出された変異型の標本を提供していただいた石本剛一博士にも御礼を述べる。本研究の一部は、筆頭著者が、米国エネルギー省の資金供与によるフェローとして、Michigan 大学で研修中であった1980-81年の間に完了したものである。

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.

VI. TRANSFERRIN

日本人の血液蛋白質の電気泳動上の変異型

VI. Transferrin

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;
 TODOR KRASTEFF³

*RERF Departments of Clinical Laboratories (Biochemical Genetics Division)¹ and Medicine²; and
 Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School³*

放影研臨床検査部(遺伝生化学室)¹及び臨床部²; Michigan 大学医学部人類遺伝学教室³

SUMMARY

A multiplicity of transferrin variants have been detected in the course of the biochemical aspect of the study of the genetic effects of atomic bombs. Variants obtained from the studies of 19,770 individuals in Hiroshima and Nagasaki were compared by polyacrylamide slab gel electrophoresis using three kinds of buffer systems with different pH values and thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing. The variants were compared on the basis of their relative mobilities and isoelectric points; seven types of fast-moving variant (B-variant) and nine types of slow-moving variant (D-variant) were detected, involving a total of 154 and 273 individuals, respectively. All the variants were identified as genetic variants by family studies. No variant differed in allele frequency between the two cities. The variants detected in this study were compared with variants detected in residents of Mie district (another Japanese population), Caucasoids, American blacks, and Amerindians, and six additional types of B-variant and four additional types of D-variant, which had not been detected in Hiroshima and Nagasaki, were identified.

INTRODUCTION

Studies on blood proteins of A-bomb survivors and their offspring have been conducted since

要約

原子爆弾の遺伝的影響に関する調査の生化学的解析の過程で transferrin 変異型の多様性が証明された。広島・長崎在住者19,770人を調査して得られた変異型を、pHの異なる3種類の緩衝液を使用したポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法と、薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法を併用して相互比較を行った。変異型は相対移動度と等電点によって比較され、移動度の速い変異型(B-変異型)を7種類、154人に、移動度の遅い変異型(D-変異型)を9種類、273人に見いだした。すべての変異型は、家族調査によって遺伝的変異型であると確認された。両市間においては、どの変異型の対立遺伝子頻度にも差異は見られなかった。更に、三重地区の住人(他の日本人集団)、白人、アメリカの黒人、アメリカインディアンで見いだされた変異型と相互比較を行い、広島・長崎地区で見られなかった変異型をB-変異型で6種類、D-変異型で4種類確認した。

緒言

原爆の遺伝的影響を蛋白質レベルで究明するため、1972年以来、原爆被爆者とその子供の血液蛋白質に

1972 to determine genetic effects of A-bomb at the protein level. The accumulated data are now being reported. In the present paper, which is a part of the series, results regarding transferrin (TF) are described.

Since Smithies¹ detected genetic variants of TF by starch gel electrophoresis (SGE), electrophoretic variants of TF have been reported successively, and no less than 22 types have been identified to date, but the frequency of every one of them is low.²⁻⁴ In Japanese populations, Parker and Bearn,⁵ Matsumoto,⁶ Omoto and Harada,⁷ and Kirk et al⁸ have reported rare electrophoretic variants. Ferrell et al,⁹ examining 4,029 Japanese residing in Hiroshima and Nagasaki, reported three types of B-variant and five types of D-variant. However, in the studies reported thus far, accurate comparison of variants was difficult, because the preparation of the gels and the pH values of the buffers used differed by investigator and the kinds of gel-buffers used for mutual comparison of variants were limited.

Since Kühnl and Spielmann¹⁰ and Thymann¹¹ succeeded in separating subtypes of TF C, which cannot be separated by SGE, by employing polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAGIF), at least seven subtypes have been detected and all of them have been identified as allelic variants.¹²⁻¹⁵ However, there is only one report which compares variants detected by SGE using PAGIF.¹⁶ In the present paper, the authors report on variants detected by SGE and compared using polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) and PAGIF. Further, the results of comparisons with variants obtained in a Japanese population of another area and populations of Caucasoids, American blacks, and Amerindians studied by the same method are also discussed.

MATERIALS AND METHODS

Populations, Samples, and Family Studies in Hiroshima and Nagasaki

The first paper in this series¹⁷ describes the populations, the circumstances under which samples were collected, and the method of family studies and the preparation of samples. Briefly, data are obtained from two populations, i.e., the "Adult" composed of A-bomb survivors and controls, and the "Child" composed of children of A-bomb survivors. Since all the

関する調査を実施してきた。蓄積されたデータについて現在報告中である。一連の報告書の一部である本報では、transferrin (TF) の研究結果について述べる。

Smithies¹ が澱粉ゲル電気泳動法 (SGE) を用いて TF の遺伝的変異型を検出して以来、TF の電気泳動上の変異型が次々と報告され、現在までに少なくとも 22 種の変異型が確認されているが、それぞれの頻度は低い。²⁻⁴ 日本人集団においては、Parker 及び Bearn,⁵ 松本,⁶ 尾本及び原田,⁷ 並びに Kirk ら⁸ がまれな電気泳動上の変異型を報告した。Ferrell ら⁹ は、広島・長崎在住の日本人 4,029 人を調べ、3 種類の B-変異型及び 5 種類の D-変異型を報告した。しかし、これまで報告された研究では、ゲルの調整法及び使用された緩衝液の pH 値が研究者ごとに異なり、変異型の相互比較のために用いられたゲル-緩衝液の種類が限られていたため、変異型の正確な比較は困難であった。

Kühnl 及び Spielmann¹⁰ 並びに Thymann¹¹ が、SGE 法では分離できない TF C の亜型を、ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法 (PAGIF) を用いて分離することに成功して以来、少なくとも七つの亜型が検出され、それらはすべて対立遺伝子によって支配されている変異型であることが確認されている。¹²⁻¹⁵ しかし、SGE 法によって検出された変異型を PAGIF 法を用いて比較している報告書は一つしかない。¹⁶ 本報では、SGE 法で検出し、ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法 (PAGE) と PAGIF を用いて比較した変異型について報告する。更に、日本の他地域の集団並びに白人、アメリカ黒人及びアメリカインディアンの集団から得られた変異型を同じ方法で比較した結果についても述べる。

材料及び方法

広島・長崎における対象集団、標本及び家族調査
本シリーズの第一報¹⁷ には、対象集団、標本収集の状況、並びに、家族調査の方法及び標本の調製について述べてある。ここで略述すると、データは二つの集団、すなわち、原爆被爆者と対照者から成る“成人”集団及び被爆者の子供から成る“子供”集団である。成人集団の対象者はすべて原爆以前に生まれ

subjects in the Adult population were born before the bombing, and their protein structure would not have been affected by radiation exposure, the data obtained from exposed and nonexposed individuals were combined.¹⁸ Furthermore, no measurable genetic effects due to parental exposure experience has been observed so far in the children of A-bomb survivors, so that data obtained from children of A-bomb survivors were combined regardless of their parental dose¹⁷; the "Representative" population was selected from unrelated individuals in the Adult and Child populations. The frequencies of alleles were calculated from the Representative population. Numbers of examinations for each population were as follows: Adult, 4,638 individuals, Child, 15,132, and Representative, 13,314. Ferrell et al.⁹ have already reported the results obtained from 4,020 of the 4,638 adults. At the first screening TF was typed using SGE, as described by Smithies¹ and modified by Weitkamp et al.¹⁹

Samples from Another Japanese Population, Caucasoids, American Blacks, and Amerindians

Ishimoto et al studied TF variation in plasma obtained from 3,411 students and nurses in Mie district by SGE. They found 74 TF variants which were classified into five types of B-variant and four types of D-variant (unpublished data). In the present study, comparison was made with 24 of these variants, including all nine types.

The samples of Caucasoids and American blacks were collected at the Women's Hospital, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, from 2,144 unrelated individuals including 1,764 Caucasoids, 155 American blacks, and 225 Orientals. By PAGE, B-variants were detected in 30 Caucasians and one Oriental, while D-variants were detected in two Caucasians, nine American blacks, and three Orientals. All were confirmed to be genetic variants by family studies. Among these, 18 B-variants (all of them from Caucasians) and eight D-variants (two from Caucasians and six from American blacks) were compared in this study.

The TF variants of Amerindians were detected in 3 of 21 tribes studied, the Baniwa, Guaymi, and Piaroa; the variants had been identified as TF D_{chi} and TF D_{GUA1}.¹⁸ In the present study, comparison studies were carried out with nine cases of TF D_{chi}, consisting of three

ており、蛋白質構造が放射線被曝の影響を受けたとは考えられないので、被爆者及び非被爆者から得たデータを組み合わせた。¹⁸ 更に、原爆被爆者の子供には、両親の被爆経験による遺伝的影響で測定可能なものは現在までのところ観察されていないので、被爆者の子供から得たデータは、両親の線量とは無関係に組み合わせた。¹⁷ また、"代表"集団は、成人集団及び子供集団中の血縁関係のない対象者から選定した。対立遺伝子の頻度はこの代表集団から算出した。各集団の対象者数は、成人集団:4,638人、子供集団:15,132人、代表集団:13,314人であった。Ferrellら⁹は、成人4,638人中4,020人から得た結果を既に報告している。最初のスクリーニングでは、Smithies¹が記述し、Weitkampら¹⁹が修正したSGE法を用いてTFの分類を行った。

その他の日本人集団、白人、アメリカ黒人及びアメリカインディアンからの標本

石本らは、三重地区の学生及び看護婦3,411人から得た血漿中のTF変異をSGE法を用いて調べた。彼らは74例のTF変異型を検出し、これらを5種類のB-変異型と4種類のD-変異型に分類した(未発表データ)。本研究では、これらのうち、9種類すべてを含む24例の変異型について比較を行った。

白人及びアメリカ黒人の標本はMichigan州Ann Arbor市Michigan大学Women's Hospitalにおいて、白人1,764人、アメリカ黒人155人、アジア人225人を含む血縁関係のない2,144人から収集した。PAGE法により、白人30人、アジア人1人にB-変異型が、白人2人、アメリカ黒人9人、アジア人3人にD-変異型が検出された。これらはすべて家族調査によって遺伝的変異型であることが確認された。今回は、これらのうち、B-変異型18例(すべて白人)及びD-変異型8例(2例は白人、6例はアメリカ黒人)を比較した。

アメリカインディアンのTF変異型は、調査した21部族のうち、Baniwa, Guaymi及びPiaroaの3部族に検出された。この変異型は、既に、TF D_{chi}及びTF D_{GUA1}であることが確認されている。¹⁸ 本研究では、各部族3例ずつ、合計9例のTF D_{chi}と2例

detected in each tribe, and two samples of TF D_{GUA1}.

Comparison of Variants

a) Polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) Electrophoresis was performed employing Pharmacia apparatus Mark II; a polyacrylamide gel (80 × 140 × 0.27 mm) was composed of running gel (T, 8.0%; C, 2.5%), stacking gel (T, 5.5%; C, 3.64%), and sampling gel (T, 3.5%; C, 4.3%). Three kinds of buffers with different pH values were used: 1) 0.04 M Tris-Glycine, pH 8.5, 2) 0.05 M Tricine-Tris, pH 7.5, and 3) 0.035 M TES-Tris, pH 6.5. Both tank and gel buffers were identical.

b) Thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAGIF)

All the samples were partially purified using 0.6% Rivanol and concentrated by adding Sephadex G-25 powder (Pharmacia). For PAGIF, a gel of 1.0 mm thickness was prepared (4.85% acrylamide, 0.15% bisacrylamide). A 2.0% Ampholine, pH 5-7 was chosen. The electrode strips were soaked with 1 M H₃PO₄ solution (anode) and 1 M monoethanolamine solution (cathode). For the focusing run on a multiphor LKB 2117, the power supply (LKB 7103) was set at 1,000 V, 12 mA, and 7.5 W. After a three-hour prerun, filter papers (5 × 10 mm, Wattman 3 MM) soaked in the purified samples were applied on the gel 2 cm apart from the cathodal strip and the run was continued for one hour. The filter paper was then removed and focusing was continued for two hours. The gel was fixed and stained according to the LKB application note 250.

For immunofixation, cellulose acetate strips were soaked in an anti-TF-immunoglobulin (Behring Inst.) mixed with 0.15 M NaCl (1:6). Incubation was carried out for one hour at room temperature and followed by washing overnight in 0.15 M NaCl.

Relative Mobility of Variants on PAGE

After electrophoresis, the distance between peaks of TF C and variants was measured by a densitometer. Regardless of the three kinds of buffers used, the distance between TF C and TF B_{HR2} (the most frequent B-variant in Hiroshima and Nagasaki, nomenclature described below) was regarded as the standard for the B-variants and the distance between TF C and TF D_{chi} as the

の TF D_{GUA1} との比較を行った。

変異型の比較

a) ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法 (PAGE) 電気泳動は Pharmacia 製 Mark II を用いて行った。ポリアクリルアミドゲル (80 × 140 × 0.27 mm) は、泳動ゲル (T, 8.0%; C, 2.5%), 重層ゲル (T, 5.5%; C, 3.64%) 及びサンプリングゲル (T, 3.5%; C, 4.3%) から成るものを使用した。また、pH 値の異なる 3 種類の緩衝液、すなわち、1) 0.04 M Tris-Glycine, pH 8.5, 2) 0.05 M Tricine-Tris, pH 7.5, 及び 3) 0.035 M TES-Tris, pH 6.5 を用いた。タンク緩衝液とゲル緩衝液は同一のものを用いた。

b) 薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法 (PAGIF)

標本はすべて 0.6% Rivanol を用いて部分精製し、Sephadex G-25 粉末 (Pharmacia) を加えて濃縮した。PAGIF を実施するため、厚さ 1.0 mm のゲルを作製した (4.85% アクリルアミド, 0.15% ビスアクリルアミド)。pH 5~7 の 2.0% Ampholine を選定し、電極板を 1 M H₃PO₄ 液 (陽極) と 1 M モノエタノールアミン液 (陰極) に浸した。等電点電気泳動は LKB 2117 multiphor 装置上で、LKB 7103 power supply を 1,000 V, 12 mA, 7.5 W にセットして行った。予備泳動を 3 時間行った後、精製標本に浸したフィルター用紙 (5 × 10 mm, Wattman 3 MM) を陰極板から 2 cm 離れたゲル上に置き、泳動を 1 時間継続して行った。その後フィルター用紙を除去し、泳動を 2 時間継続させた。LKB application note 250 に従って、ゲルを固定させ、染色した。

Immunofixation ではセルロース・アセテート膜を、抗 TF 免疫グロブリン (Behring Inst.) と 0.15 M NaCl の混合液 (1:6) に浸した。室温で 1 時間これをインキュベートし、0.15 M NaCl で一晩洗浄した。

PAGE 上における変異型の相対移動度

電気泳動を行った後、TF C と変異型の各ピーク間の距離を densitometer によって測定した。3 種の緩衝液のいずれを使用した場合でも、TF C と TF B_{HR2} (広島・長崎で最も高い頻度で検出された B-変異型、命名法については後述する) との距離を B-変異型の標準とし、TF C と TF D_{chi} との距離を D-変異型の

standard for the D-variants. Mobilities of other variants are shown as relative mobilities to these standards.

Nomenclature of Rare Variants

Rare variants were named by city in the order of their discovery according to the method of Ferrell et al⁹ except that the abbreviations for Hiroshima and Nagasaki were shortened to HR and NG, respectively. Variants detected in Mie district with mobility different from those detected in Hiroshima and Nagasaki were named ME, and those from Michigan, AA by the senior author (the Mie and Ann Arbor TF variants are hitherto unpublished).

RESULTS

1) Hiroshima and Nagasaki population

B-variants were detected in 34 adults and 120 children. These variants, involving a total of 154 individuals, were classifiable into seven types, i.e., TF B_{HR1}, TF B_{HR2}, TF B_{HR3}, TF B_{HR4}, TF B_{HR5}, TF B_{HR6}, and TF B_{NG1}. Except for one homozygous phenotype TF B_{HR2}, all the other variants encountered were heterozygous for a normal allele, TF*C, and variant alleles. TF B_{HR4} and TF B_{NG1} were detected only in one family in Hiroshima and in one family in Nagasaki, respectively, and TF B_{HR1} and TF B_{HR6} were observed only in Hiroshima (Table 1). Ferrell et al⁹ have reported earlier that in examinations of 4,020 adults, three variants, TF B₃, TF B_{HR2}, and TF B_{HR4}, were detected. However, the present authors reexamined TF B₃ using PAGE and PAGIF, and confirmed that it could be classified into two types of variants with different mobilities, which they named TF B_{HR1} and TF B_{HR5}. TF B_{HR5} is a unique variant in that its mobility in pH 6.5 PAGE and isoelectric point (pI) cannot be distinguished from those of TF C. Similarly, TF B_{HR2} could be subclassified into TF B_{HR2} and TF B_{HR3}, the difference between them being that when the relative mobility (RM) of the former in pH 8.5 PAGE was set at 1.0, the RM of the latter was 1.15. The RM of TF B_{NG1} in pH 8.5 PAGE was 1.17, a value only a little different from 1.15 for TF B_{HR3}, but the distinction between the two was clear in studies using pH 6.5 PAGE, where the respective RM values were 1.27 and 1.12. The RM of TF B_{HR6} in pH 8.5 and pH 7.5 PAGE was 1.40, the same value as that of TF B_{HR4}, but in pH 6.5 PAGE it was 1.27, a value different from 1.38 of

標準とした。その他の変異型の移動度は、これらの標準に対する相対移動度として示した。

まれな変異型の命名法

まれな変異型は、Ferrellら⁹の方法に従い、都市別及び検出順に命名したが、広島と長崎の略称はそれぞれHRとNGに省略した。広島・長崎で検出された変異型とは異なる移動度を示す三重地区で検出された変異型はME, Michiganで検出されたものはAAと筆頭著者により命名された(三重とAnn ArborのTF変異型はこれまで未発表である)。

結 果

1) 広島及び長崎の対象集団

成人34人と子供120人にB-変異型が検出された。合計154人に検出されたこれらの変異型は次の7種類、すなわち、TF B_{HR1}, TF B_{HR2}, TF B_{HR3}, TF B_{HR4}, TF B_{HR5}, TF B_{HR6}及びTF B_{NG1}に分類できた。1例のホモ接合表現型TF B_{HR2}を除き、検出されたその他の変異型はすべて、正常対立遺伝子TF*C及び変異対立遺伝子のヘテロ接合を示した。TF B_{HR4}及びTF B_{NG1}は広島・長崎でそれぞれ1家族ずつに検出され、TF B_{HR1}とTF B_{HR6}は広島でのみ検出された(表1)。Ferrellら⁹は、以前に、成人4,020人を検査し、TF B₃, TF B_{HR2}及びTF B_{HR4}の三つの変異型を検出したと報告している。しかし、今回の研究では、PAGE法とPAGIF法を用いてTF B₃を再検査し、これが、異なる移動度を示す2種の変異型に分類できることを確認し、これらをTF B_{HR1}並びにTF B_{HR5}と命名した。TF B_{HR5}は、pH 6.5のPAGEと等電点(pI)における移動度がTF Cと識別できない特異な変異型である。同様に、TF B_{HR2}はTF B_{HR2}とTF B_{HR3}に細分類できたが、その差は、pH 8.5のPAGEにおける前者の相対移動度(RM)が1.0の場合、後者のRMは1.15になるというものであった。pH 8.5のPAGEにおけるTF B_{NG1}のRMは1.17であり、TF B_{HR3}の1.15とわずかに異なるのみであったが、pH 6.5のPAGEを用いた場合、両者の差は明白になり、それぞれのRM値は1.27と1.12であった。pH 8.5とpH 7.5のPAGEにおけるTF B_{HR6}のRMは1.40で、TF B_{HR4}と同様の値を示したが、pH 6.5のPAGEではRMは

TABLE 1 TRANSFERRIN PHENOTYPES OBSERVED IN THE ADULT, CHILD, AND REPRESENTATIVE POPULATIONS^{§1} AND ALLELE FREQUENCIES AMONG THE REPRESENTATIVE POPULATION
 表1 成人集団, 子供集団及び代表集団^{§1}に観察されたTF表現型並びに代表集団における対立遺伝子の頻度

Phenotype	Adult	Child	Representative			Allele	Combined	HR	NG
			Combined	HR ^{§2}	NG ^{§2}				
TF C	4539	14804	13033	7788	5245	<i>TF*C</i>	.98937	.9882	.9910
TF C/BHR1	3	7	5	5	0	<i>TF*BHR1</i>	.00013	.0003	0
TF C/BHR2	13	77	64	44	20				
TF BHR2	0	1	1	1	0	<i>TF*BHR2</i>	.00247	.0028	.0019
TF C/BHR3	8	19	22	12	10	<i>TF*BHR3</i>	.00083	.0008	.0009
TF C/BHR4	1	1	1	1	0	<i>TF*BHR4</i>	.00003	.0001	0
TF C/BHR5	9	11	12	6	6	<i>TF*BHR5</i>	.00045	.0004	.0006
TF C/BHR6	0	3	1	1	0	<i>TF*BHR6</i>	.00003	.0001	0
TF C/BNG1	0	1	1	0	1	<i>TF*BNG1</i>	.00003	0	.0001
TF C/DHR1	2	8	7	2	5	<i>TF*DHR1</i>	.00026	.0001	.0005
TF C/DHR2	1	0	1	1	0	<i>TF*DHR2</i>	.00003	.0001	0
TF C/DHR3	1	4	3	3	0	<i>TF*DHR3</i>	.00011	.0002	0
TF C/DHR4	3	2	4	4	0	<i>TF*DHR4</i>	.00015	.0003	0
TF C/DHR5	0	8	3	3	0	<i>TF*DHR5</i>	.00011	.0002	0
TF C/DHR6	2	1	2	1	1	<i>TF*DHR6</i>	.00007	.0001	.0001
TF C/DNG1	1	0	1	0	1	<i>TF*DNG1</i>	.00003	0	.0001
TF C/DNG2	0	1	1	0	1	<i>TF*DNG2</i>	.00003	0	.0001
TF C/D _{chi}	55	183	151	100	51				
TF D _{chi}	0	1	1	1	0	<i>TF*D_{chi}</i>	.00573	.0064	.0048
Total	4638	15132	13314	7973	5341				

§1 See text for definition of populations 集団の定義については本文を参照.

§2 HR and NG are abbreviations for Hiroshima and Nagasaki, respectively

HRとNGは、それぞれ広島と長崎の略称である.

TF B_{HR4} but the same as the RM of TF B_{NG1}, and these three variants showed different pI (Table 2 and Figure 1).

The allele frequencies of the B-variants are shown in Table 1. The frequency of *TF*BHR2* was relatively high, but there was no difference between Hiroshima and Nagasaki. Neither was any difference observed between the cities in the frequency of any of the other B-variants. In Hiroshima a homozygous phenotype of TF B_{HR2} was encountered in a child of unrelated parents.

D-variants were detected in 65 adults and 208 children. These variants were classifiable into nine types, i.e., TF D_{chi}, TF D_{HR1}, TF D_{HR2}, TF D_{HR3}, TF D_{HR4}, TF D_{HR5}, TF D_{HR6}, TF D_{NG1}, and TF D_{NG2}. Except for one homozygous phenotype TF D_{chi}, all the other variants were heterozygous for a normal allele,

1.27となり、TF B_{HR4}の1.38とは異なるが、TF B_{NG1}とは同じ値となった。これら三つの変異型は異なるpIを示した(表2及び図1)。

B-変異型の対立遺伝子頻度を表1に示した。*TF*BHR2*の頻度は相対的に高かったが、広島と長崎で差はなかった。また、その他のいずれのB-変異型の頻度にも両市間の差は認められなかった。広島では、ホモ接合表現型TF B_{HR2}は、血縁関係のない両親の子供1人に検出された。

D-変異型は、成人65人、子供208人に検出された。この変異型は次の9種類、すなわち、TF D_{chi}, TF D_{HR1}, TF D_{HR2}, TF D_{HR3}, TF D_{HR4}, TF D_{HR5}, TF D_{HR6}, TF D_{NG1}及びTF D_{NG2}に分類できた。1例のホモ接合表現型TF D_{chi}を除き、その他の変異型はすべて、正常対立遺伝子*TF*C*及び

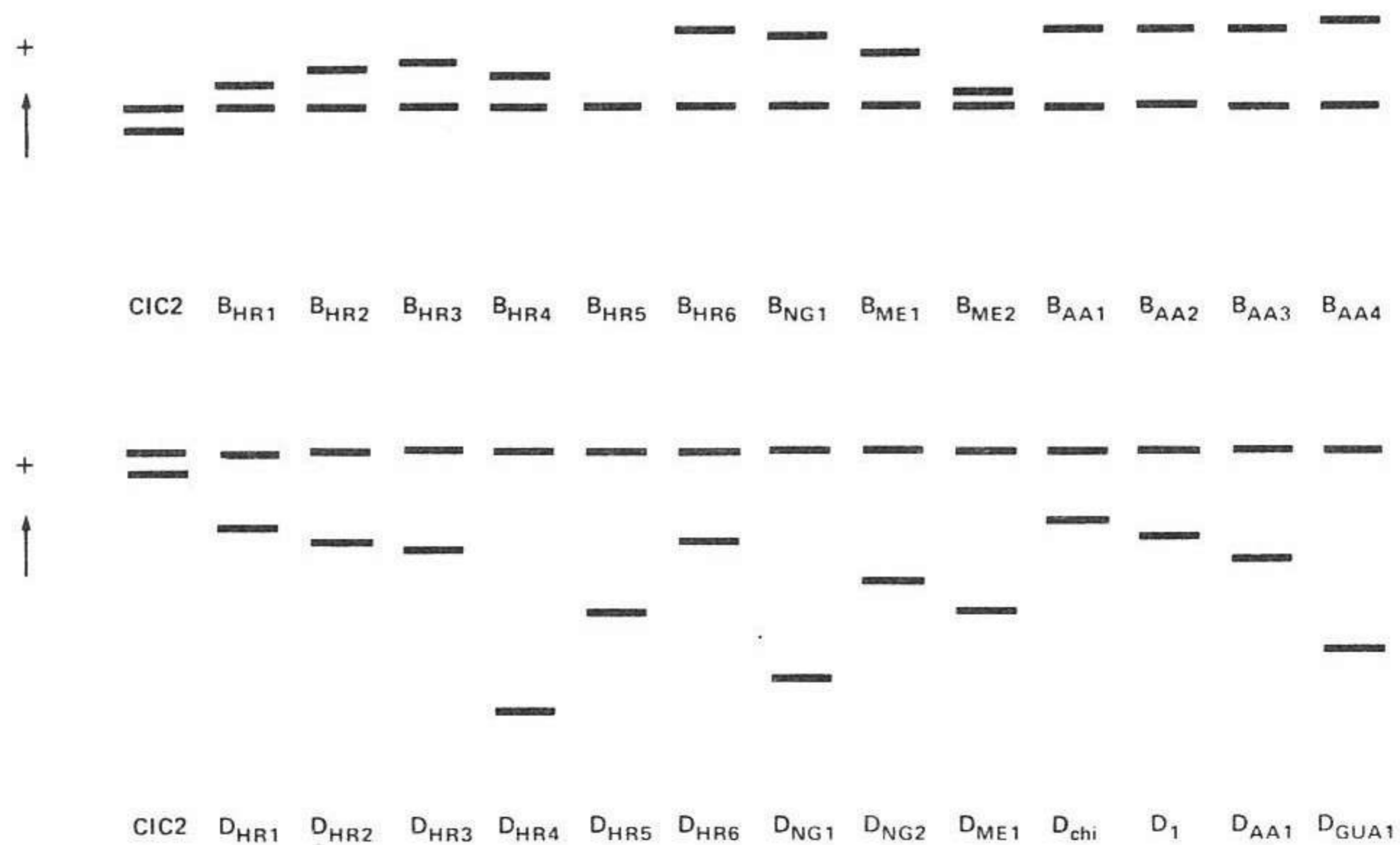
TABLE 2 RELATIVE MOBILITIES OF TRANSFERRIN VARIANTS ON POLYACRYLAMIDE SLAB GEL ELECTROPHORESIS WITH THREE BUFFER SYSTEMS

表2 3種の緩衝液を用いて行ったポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動上のTF変異型の相対移動度

Variant	PAGE			Variant	PAGE		
	pH 8.5	pH 7.5	pH 6.5		pH 8.5	pH 7.5	pH 6.5
TF B _{HR} 1	0.71	0.76	0.66	TF D _{HR} 1	0.48	0.71	0.81
TF B _{HR} 2	1.00	1.00	1.00	TF D _{HR} 2	0.67	0.81	0.81
TF B _{HR} 3	1.15	1.12	1.12	TF D _{HR} 3	1.08	1.04	0.94
TF B _{HR} 4	1.40	1.40	1.38	TF D _{HR} 4	1.18	1.19	1.55
TF B _{HR} 5	0.69	0.68	0.00	TF D _{HR} 5	1.87	1.94	1.97
TF B _{HR} 6	1.40	1.40	1.27	TF D _{HR} 6	0.90	0.90	0.94
TF B _{NG} 1	1.17	1.20	1.27	TF D _{NG} 1	0.67	0.84	0.61
TF B _{ME} 1	0.85	0.87	0.66	TF D _{NG} 2	1.18	1.13	1.23
TF B _{ME} 2	1.20	1.22	0.89	TF D _{chi}	1.00	1.00	1.00
TF B _{AA} 1	0.90	0.90	0.80	TF D _{ME} 1	1.58	1.60	1.55
TF B _{AA} 2	1.00	0.95	0.90	TF D ₁	1.04	1.03	1.00
TF B _{AA} 3	1.00	1.05	1.05	TF D _{AA} 1	1.06	1.04	1.00
TF B _{AA} 4	1.47	1.47	1.45	TF D _{GUA} 1	1.23	1.25	1.05

FIGURE 1 DIAGRAM OF HETEROZYGOUS TRANSFERRIN VARIANTS IN THIN LAYER POLYACRYLAMIDE GEL ISOELECTRIC FOCUSING

図1 薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動におけるヘテロ接合TF変異型の図解



Only the name of variants are shown in the diagram though it is drawn on the basis of phenotypes heterozygous with C1.

ここには、変異型の名称のみを示したが、この図は、C1とヘテロ接合を示す表現型を基に作成したものである。

*TF**C**, and variant alleles. *TF D_{HR2}* was detected only in one family in Hiroshima and *TF D_{NG1}* and *TF D_{NG2}* each only in one family in Nagasaki. *TF D_{HR3}*, *TF D_{HR4}*, and *TF D_{HR5}* were observed only in Hiroshima (Table 1). Earlier, Ferrell et al⁹ reported *TF D_{chi}*, *TF D_{HIR1}*, *TF D_{HIR2}*, *TF D_{HIR3}*, and *TF D_{NGS1}*. However, the authors' reexaminations revealed that *TF D_{HIR3}* could be classified into two different types of variant, i.e., *TF D_{HR3}* and *TF D_{HR4}*. The RM values of *TF D_{HR3}* and *TF D_{HR4}* were 1.08 and 1.18, respectively, in pH 8.5 PAGE, but were 0.94 and 1.55 in pH 6.5 PAGE and their pI clearly differed from one another. The pI of *TF D_{HR6}* was the same as that of *TF D_{HR2}*, but the RM values of the two were different in PAGE at any pH level. *TF D_{NG2}* showed the same RM as *TF D_{HR4}* in pH 8.5 PAGE, but the former showed an RM of 1.23 and the latter 1.55 in pH 6.5 PAGE. Also, the pI definitely differed (Table 2 and Figure 1).

The frequency of *TF*D_{chi}*, which varied widely in Mongoloids, was 0.0064 in Hiroshima and 0.0048 in Nagasaki, an insignificant difference; nor was there any significant difference in the frequency of any of the other D-variants between the two cities (Table 1).

The new nine variants encountered in this study, i.e., *TF B_{HR1}*, *TF B_{HR3}*, *TF B_{HR5}*, *TF B_{HR6}*, *TF B_{NG1}*, *TF D_{HR4}*, *TF D_{HR5}*, *TF D_{HR6}*, and *TF D_{NG2}*, were confirmed to be inheritable by family studies. Even though the differences that distinguish one variant from another are small, they are evident on either PAGE or PAGIF, in samples from carrier parent.

2) Comparison with TF variants detected in another Japanese population, Caucasoids, American blacks, and Amerindians

The variants discovered in Mie district were compared in the same gels with those of Hiroshima and Nagasaki. Of nine from Mie, three had different mobilities from any of Hiroshima and Nagasaki variants, being named *TF B_{ME1}*, *TF B_{ME2}*, and *TF D_{ME1}*. Six of these were identical with *TF B_{HR1}*, *TF B_{HR4}*, *TF B_{HR5}*, *TF D_{HR5}*, *TF D_{NG1}*, and *TF D_{chi}*. Among the variants in Japanese population, *TF B_{HR5}* and *TF D_{chi}* were observed in the three districts, while *TF B_{HR2}* which was found with relatively high frequencies in Hiroshima and Nagasaki was not found in Mie.

変異対立遺伝子のヘテロ接合を示した。*TF D_{HR2}*は広島のみ1家族のみに検出され、*TF D_{NG1}*と*TF D_{NG2}*は長崎でそれぞれ1家族ずつに検出された。*TF D_{HR3}*, *TF D_{HR4}*及び*TF D_{HR5}*は広島のみで観察された(表1)。以前にFerrellら⁹は*TF D_{chi}*, *TF D_{HIR1}*, *TF D_{HIR2}*, *TF D_{HIR3}*及び*TF D_{NGS1}*を報告している。しかし、著者らの再検討により、*TF D_{HIR3}*は二つの異なる変異型、すなわち、*TF D_{HR3}*と*TF D_{HR4}*に分類できることが分かった。pH 8.5のPAGEにおいては、*TF D_{HR3}*と*TF D_{HR4}*のRM値はそれぞれ1.08と1.18であったが、pH 6.5のPAGEでは0.94と1.55であり、また両者のpIは明らかに異なっていた。*TF D_{HR6}*のpIは*TF D_{HR2}*のpIと同じであったが、両者のRM値はいずれのpHレベルのPAGEにおいても異なっていた。pH 8.5のPAGEでは、*TF D_{NG2}*は*TF D_{HR4}*と同じRM値を示したが、pH 6.5のPAGEでは、前者のRMは1.23であり、後者のそれは1.55であった。また、pIも明らかに異なっていた(表2及び図1)。

モンゴロイド内で広く認められている*TF*D_{chi}*の頻度は、広島では0.0064、長崎では0.0048で、大きな差はなかった。また、その他のいずれのD-変異型の頻度でも両市間に有意な差は認められなかった(表1)。

本調査で検出された九つの新しい変異型、すなわち、*TF B_{HR1}*, *TF B_{HR3}*, *TF B_{HR5}*, *TF B_{HR6}*, *TF B_{NG1}*, *TF D_{HR4}*, *TF D_{HR5}*, *TF D_{HR6}*及び*TF D_{NG2}*は、家族調査により遺伝性であることが確認された。各変異型の鑑別を可能にする差は小さいが、キャリアーである親の標本では、PAGE法とPAGIF法のいずれによっても、その差は明白に認められる。

2) 他の日本人集団、白人、アメリカ黒人及びアメリカインディアンに検出されたTF変異型との比較
三重地区で検出された変異型と広島・長崎の変異型を同一のゲル上で比較した。三重で検出された9種の変異型のうち3種は、広島・長崎の変異型のいずれとも異なる移動度を示し、*TF B_{ME1}*, *TF B_{ME2}*及び*TF D_{ME1}*と命名された。他の6種の変異型は、*TF B_{HR1}*, *TF B_{HR4}*, *TF B_{HR5}*, *TF D_{HR5}*, *TF D_{NG1}*及び*TF D_{chi}*と同一のものであった。日本人集団で検出された変異型のうち、*TF B_{HR5}*と*TF D_{chi}*は3地区で観察されたが、広島・長崎で比較的高頻度で検出された*TF B_{HR2}*は、三重では認められなかった。

Six types of TF variant, i.e., TF B_{AA1}, TF B_{AA2}, TF B_{AA3}, TF B_{AA4}, TF D₁, and TF D_{AA1} were identified in samples from Ann Arbor. TF D₁ was detected in Caucasians and American blacks, while TF D_{AA1} was only detected in Caucasians. TF B_{AA1}, TF B_{AA2}, and TF B_{AA3} showed the same pI as TF B_{HR6}, while TF B_{AA2} and TF B_{AA3} showed the same RM as TF B_{HR2} in pH 8.5 PAGE. However TF B_{AA2} and TF B_{AA3} were distinguishable in pH 7.5 or 6.5 PAGE (Table 2 and Figure 1). None of Ann Arbor variants corresponded to any of those found in Japanese population.

TF D_{chi} found in Amerindians had the same mobility as the one detected in Japanese population on PAGE or PAGIF. TF D_{GUA1} differed in its mobility from those detected in other populations.

DISCUSSION

The present study has demonstrated, in a sample of 19,770 persons from two Japanese cities, 16 different TF variants. This figure approximates the total number of such variants that have thus far been differentiated by SGE and PAGE, and reported from all over the world, as illustrated by the summaries of Giblett³ (17 variants) and Sutton and Jamieson⁴ (20 variants) excluding those subtypes detected by PAGIF. The question immediately arises whether the Japanese are unusually variable in this respect or whether any carefully conducted study of this magnitude on a civilized population with great internal mobility would yield similar findings. The answer is not known, but the fact that the average indexes of heterozygosity for some 23 proteins scored in US Caucasians and Japanese were 0.078 and 0.077, respectively,¹⁸ does not suggest unusual genetic variability in Japanese.

It is in this connection important that the validity of the variants we are reporting is in all instances backed up by family studies indicating a variant of identical mobility in some other member of the propositus' family, and also by repeated, direct comparisons of fresh or well-preserved samples of the various variants. Thus we doubt that any of the small differences on which the distinctions between certain variants are based are artifactual in nature.

Ann Arbor 市からの標本では、6種のTF変異型、すなわち、TF B_{AA1}, TF B_{AA2}, TF B_{AA3}, TF B_{AA4}, TF D₁及びTF D_{AA1}が認められた。TF D₁は白人とアメリカ黒人に検出され、TF D_{AA1}は白人にのみ検出された。TF B_{AA1}, TF B_{AA2}及びTF B_{AA3}はTF B_{HR6}と同じpIを示し、TF B_{AA2}とTF B_{AA3}は、pH 8.5のPAGEで、TF B_{HR2}と同じRMを示した。しかし、TF B_{AA2}とTF B_{AA3}はpH 7.5又はpH 6.5のPAGEで鑑別可能であった(表2及び図1)。Ann Arbor変異型の中には、日本人集団で検出された変異型に相当するものは全くなかった。

アメリカインディアンに検出されたTF D_{chi}は、PAGE又はPAGIF上のいずれにおいても、日本人集団で検出されたものと同じ移動度を示した。TF D_{GUA1}は他のどの集団で検出された変異型の移動度とも異なっていた。

考 察

本調査では、日本の二つの都市の在住者19,770人から成る集団に、16種のTF変異型を検出した。この数値は、これまでSGE法及びPAGE法により鑑別され、世界中から報告された変異型の総数に近い。例えば、PAGIF法によって検出された亜型を除き、Giblett³(17種)、並びにSutton及びJamieson⁴(20種)の要約に示されているとおりである。ここから直ちに生ずる疑問は、日本人の遺伝変異性は高いものであるかどうか、また、人口移動率が高い先進国の集団に、この規模の調査を慎重に行えば、同様の結果が得られるかどうかということである。その答は不明であるが、米国白人と日本人に確認された約23個の蛋白質のヘテロ接合性の平均指標はそれぞれ0.078と0.077であるということから、¹⁸日本人の遺伝変異性は異常に高くないことが示唆される。

この点で重要なことは、我々が報告している変異型の妥当性は、いずれの場合でも、家族調査を通じて発端者の家族のメンバーの中に同じ移動度の変異型を検出することにより、また、これら種々の変異型の新鮮な又はよく保存された標本を繰り返し直接比較することによって、裏付けられるということである。したがって、特定の変異型を鑑別する基礎となった小さな差異はいずれも人為的にもたらされたものであるとは信じかねる。

None of the variants reported here achieve polymorphic proportions, but the *TF*Dchi* allele, polymorphic in many Mongoloid populations, does have an allele frequency of 0.0057. The next highest allele frequency is that of *TF*BHR2*, of 0.0024. Most of the remaining variants are quite rare, five having been thus far encountered in only a single family. Among the variable loci in Japanese, the TF 'variant profile' thus appears intermediate between a locus such as phosphoglucomutase-1, with relatively many rare variants but also two polymorphisms,²¹ and the glucose-6-phosphate dehydrogenase locus,²² with many rare variants but all in very low frequencies, even lower than the TF variants.

We note that only one of the eight variants from Amerindians, and Caucasoids and American blacks from the Ann Arbor collection corresponds in mobility to a Japanese variant, this being the polymorphic *TF D_{chi}* encountered in Amerindians. This finding further attests to the multiplicity of low frequency variants at this locus. (Apparently identical electrophoretic behaviors would not of course assure variant identity, but clear differences in well-preserved samples do establish nonidentity.)

ここに報告した変異型で多型の頻度を示すものはなかったが、多くのモンゴロイド集団に多型で認められる対立遺伝子 *TF*Dchi* の頻度は0.0057である。次に高い対立遺伝子頻度は *TF*BHR2* の0.0024である。残りの変異型のほとんどは極めてまれで、これまでに、5例が単一家族に検出されたにすぎない。したがって、日本人の変異遺伝子座のうち、TF“変異型プロフィール”は、比較的多くのまれな変異型を有するが多型は二つである phosphoglucomutase-1 のような座位²¹ と、まれな変異型は多いがそのいずれも頻度が極めて低い (TF 変異型よりも更に低い) glucose-6-phosphate dehydrogenase の座位²² との中間に位置することになる。

アメリカインディアン及び Ann Arbor 市で収集された白人及びアメリカ黒人の8種の変異型のうちでは、ただ1種、すなわち、アメリカインディアンに検出された多型の *TF D_{chi}* のみが、移動度において、日本人の変異型と一致していることが認められた。この所見は更に、この座位における低頻度の変異型の多様性をも証明するものである。(電気泳動上の移動度が一見して同一であることが変異型の同一性を保証するものでないことはもちろんであるが、よく保存された標本で明瞭な差が認められれば、非同源性は確立される。)

REFERENCES

参考文献

1. SMITHIES O: Variations in human serum beta-globulins. *Nature* 180:1482-3, 1957
2. KIRK RL: The world distribution of transferrin variants and some unsolved problems. *Acta Genet Med Gemellol* 17:613-40, 1968
3. GIBLETT ER: Genetic marker in human blood. Ed by Blackwell. Oxford & Edinburg, 1969. pp 126-59
4. SUTTON HE, JAMIESON GA: Transferrin, haptoglobin and ceruloplasmin. In *The Glycoproteins*, 2nd ed. Ed by A. Gottschank. Amsterdam, Elsevier, 1972. pp 653-98
5. PARKER WC, BEARN AG: Haptoglobin and transferrin variation in humans and primates: Two new transferrins in Chinese and Japanese populations. *Ann Hum Genet* 25:227-41, 1961
6. MATSUMOTO H: Distribution and inheritance of haptoglobin and transferrin types in Japanese population and families. *Jpn J Legal Med* 18:380-4, 1964

7. OMOTO K, HARADA S: The distribution of polymorphic traits in the Hidaka Ainu. II. Red Cell enzyme and serum protein groups. *J Fac Sci Uni Tokyo* 5:171-211, 1972
8. KIRK RL, MATSUMOTO H, KATAYAMA K: Transferrin variants in Korea and Japan. *Jpn J Hum Genet* 23:1-7, 1978
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. KÜHNEL P, SPIELMANN W: Transferrin: Evidence for two common subtypes of the Tf^C allele. *Hum Genet* 43:91-5, 1978
11. THYMANN M: Identification of a new serum protein polymorphisms as transferrin. *Hum Genet* 43:225-9, 1978
12. CONSTANS J, KÜHNEL P, VIAU M, SPIELMANN W: A new procedure for the determination of transferrin^C (Tf^C) subtypes by isoelectric focusing. *Hum Genet* 55:111-4, 1980
13. DYKES DD, DeFURIO CM, POLESKY HF: Transferrin (Tf) subtypes in US Amerindians, Whites and Blacks using thin-layer agarose gels: Report on a new variant Tf^{C8}. *Electrophoresis* 3:162-4, 1982
14. KAMBOTH M, KIRK RL: Distribution of transferrin (Tf) subtypes in Asians, Pacific and Australian aboriginal populations: Evidence for the existence of a new subtype Tf^{C6}. *Hum Hered* 33:237-43, 1983
15. PASCALI VL, AUCONI P: Transferrin: Common and rare variants in Italy. Evidence for the existence of the rare Tf^{C6} among Caucasians. *Hum Genet* 64:232-4, 1983
16. KÜHNEL P, SPIELMANN W, WEBER W: Isoelectric focusing of rare transferrin (Tf) variants and common Tf^C subtypes. *Hum Genet* 46:83-7, 1979
17. 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)
18. 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)
19. WEITKAMP LR, ARENDS T, GALLANGO ML, NEEL JV, SCHULTZ J, SHREFFLER DC: The genetic structure of a tribal population, the Yanomama Indians. III. Seven serum protein systems. *Ann Hum Genet* 35:271-9, 1972
20. NEEL JV: Rare variants, private polymorphisms, and locus heterozygosity in Amerindians population. *Am J Hum Genet* 30:465-90, 1978
21. SATOH C, TAKAHASHI N, KANEKO J, KIMURA Y, FUJITA M, ASAKAWA J, KAGEOKA T, GORIKI K, HAZAMA R: Electrophoretic variants of blood proteins in Japanese. II. Phosphoglucomutase-1 (PGM1). *Jpn J Hum Genet* 29:287-310, 1984 (RERF TR 14-84)
22. KAGEOKA T, SATOH C, GORIKI K, FUJITA M, NERIISHI S, YAMAMURA K, KANEKO J, MASUNARI N: Electrophoretic variants of blood proteins in Japanese. IV. Prevalence and enzymological characteristics of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Hiroshima and Nagasaki. RERF TR 3-85