

CHARACTERIZATION OF THREE ELECTROPHORETIC VARIANTS OF HUMAN
ERYTHROCYTE TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FOUND IN JAPANESE

電気泳動で日本人に検出されたヒト赤血球 triosephosphate isomerase
の3例の新しい変異型の特性について

JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. 浅川順一
CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子



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 thank Dr. James V. Neel and Dr. Harvey W. Mohrenweiser (University of Michigan) for helpful discussion and criticism. We are also grateful to Dr. Howard B. Hamilton for his encouragement throughout this study.

有益な御考察，御批評をいただいた Dr. James V. Neel と Dr. Harvey W. Mohrenweiser (Michigan 大学) に感謝の意を表す。また，本研究中終始激励をいただいた Dr. Howard B. Hamilton にも謝意を表す。

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。

Biochem Genet 24:131-48, 1986

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放射線影響研究業績報告書集

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.

放射線影響研究業績報告書は，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。

CHARACTERIZATION OF THREE ELECTROPHORETIC VARIANTS OF HUMAN ERYTHROCYTE TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE FOUND IN JAPANESE

電気泳動で日本人に検出されたヒト赤血球 triosephosphate isomerase の3例の新しい変異型の特性について

JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. (浅川順一); CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子)

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

SUMMARY

Three new electrophoretic variants of human erythrocyte triosephosphate isomerase (TPI) have been partially purified and compared with the normal isozyme with respect to stability, kinetics, and immunologic properties. TPI 2HR1 is an anodally migrating variant associated with markedly decreased enzyme activity. The level of enzyme activity in erythrocytes from the proband with the phenotype TPI 1-2HR1 was about 60% of the normal mean. The variant allozyme was less stable than normal in guanidine denaturation tests, although it exhibited normal kinetic properties. TPI 2NG1, an anodally migrating allozyme associated with normal activity, was very thermolabile at 55°C and 57°C. It was also much more labile than normal in stability tests in buffers at pH 5 and pH 10, although it exhibited normal kinetic and immunologic properties. TPI 4NG1, a cathodally migrating variant associated with normal activity and normal kinetic as well as immunologic properties, was more stable than normal in pH 5 buffer. Family studies demonstrated that the unique characteristics of these variants are genetically transmitted. In two-dimensional electrophoresis of purified isozymes there is no difference between the variants and normal in the molecular weight axis, suggesting the variants result from single amino acid substitutions.

INTRODUCTION

Human triosephosphate isomerase (TPI; EC 5.3.1.1), a dimeric enzyme with a molecular weight of 53,500,¹ catalyzes the interconversion

要約

電気泳動で検出されたヒト赤血球 triosephosphate isomerase (TPI) の3例の新しい変異型を部分精製し、その安定性、カイネティックス及び免疫学的特性について、正常型アイソザイムと比較を行った。TPI 2HR1 は陽極方向に移動する変異型であるが、その酵素活性は著しく低かった。表現型 TPI 1-2HR1 を呈する発端者の赤血球中での酵素活性値は、正常平均値の約60%であった。この変異型アロザイムは、グアニジン変性試験において正常型に比べ、より不安定であったがカイネティックスについては正常であった。TPI 2NG1 は正常な酵素活性を伴った陽極方向に移動するアロザイムであるが、55°C及び57°Cにおいて非常に熱不安定であった。このアロザイムは pH 5 及び pH 10 緩衝液中での安定性試験において正常型に比べ非常に不安定であったが、そのカイネティックス及び免疫学的特性は正常であった。陰極方向に移動する変異型 TPI 4NG1 の酵素活性、カイネティックス及び免疫学的特性は正常であったが、pH 5 緩衝液中では正常型に比べ、より安定であった。これら変異型の個々の特性は、遺伝的なものであることが家族調査により明らかとなった。精製したアイソザイムについて2次元電気泳動を行った結果、変異型と正常型の間に分子量方向の差は認められず、このことは、これら変異型は単一アミノ酸置換により生じたものであることが示唆される。

緒言

分子量 53,500 のダイマー酵素であるヒト triose-

of glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate and is thus involved in both glycolysis and gluconeogenesis as well as glyceride synthesis. This enzyme is widely distributed,^{2,3} and there is a similarity in the kinetic properties of the enzyme from a wide range of tissues and organisms.⁴⁻⁷ The sequence homology observed in enzymes from divergent species is striking,^{1,8-11} especially in the region of the active site.¹²

About 15 cases of TPI deficiency resulting in severe neuromuscular dysfunction, hemolytic anemia, and early death have been described.¹³⁻¹⁵ The disease has generally been regarded as rare, but a recent report by Mohrenweiser and Fielek¹⁶ indicates that the frequency of heterozygous carriers of TPI deficiency is approximately 5% in American blacks. Neither the homozygote nor the heterozygote deficiency variants showed electrophoretic abnormality.

Electrophoretic variants of TPI are rare. Peters et al¹⁷ identified three variants of two different types among 2,477 individuals from several ethnic groups. One variant was detected twice in 1,949 individuals studied in Michigan¹⁸ and characterized by Asakawa and Mohrenweiser.¹⁹ No variants were detected during a study of 3,888 Amerindians.²⁰ Four variants were identified in the screening of 15,387 Japanese, of whom 10,864 were unrelated individuals,²¹ and one of them was previously characterized by Asakawa and Mohrenweiser.¹⁹

The present paper extends the previous study of Asakawa and Mohrenweiser,¹⁹ describing the electrophoretic as well as stability, kinetic, and immunologic properties of the three remaining Japanese variants - a cathodally migrating variant TPI 4NG1 and two anodally migrating variants TPI 2HR1 and TPI 2NG1.

MATERIALS AND METHODS

All procedures were carried out at 0-4°C unless otherwise stated. Buffer pH adjustments were made at 22-25°C.

Chemicals. DL-glyceraldehyde 3-phosphate (DL-GAP), reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH), triethanolamine (TEA), and α -glycerophosphate dehydrogenase (GDH) were purchased from Boehringer Mannheim. GDH was used for enzyme assay after removal

phosphate isomerase (TPI; EC 5.3.1.1)¹ は、グリセルアルデヒド3 燐酸とジヒドロキシアセトン燐酸の相互変換を触媒し、グリセライドの合成のみならず、解糖と糖新生の双方にも関与している。この酵素は広く分布し、^{2,3} 多種類の組織及び生物から得られた同酵素のカイネティックスには類似性が見られる。⁴⁻⁷ 異なる生物の酵素に認められるアミノ酸配列の相同性は著しく、^{1,8-11} 特に活性部位において顕著である。¹²

重度の神経筋機能不全、溶血性貧血及び早期死亡へと進行した TPI 欠損例が、約 15 例報告されている。¹³⁻¹⁵ この疾患は一般的にはまれであると考えられているが、Mohrenweiser 及び Fielek¹⁶ の最近の報告によれば、アメリカ黒人における TPI 欠損のヘテロ接合型保因者の頻度は約 5% である。ホモ接合型、ヘテロ接合型のどちらの欠損変異型にも電気泳動上の異常は認められなかった。

TPI の電気泳動上の変異型はまれである。Peters ら¹⁷ は、幾つかの民族から構成される 2,477 名中に、2 種類の異なる変異型を 3 例検出した。Michigan の調査¹⁸ では、1 例の変異型が対象者 1,949 名中の 2 名に検出され、浅川及び Mohrenweiser¹⁹ によってその特性が明らかにされている。アメリカインディアン 3,888 名についての調査²⁰ では、変異型は確認されなかった。血縁関係のない者 10,864 名を含む、日本人 15,387 名のスクリーニングでは、4 例の変異型が検出されたが、²¹ そのうちの 1 例については、浅川及び Mohrenweiser¹⁹ が以前に特性を明らかにしている。

本報では、浅川及び Mohrenweiser¹⁹ の以前の研究を拡大し、日本人に検出された残り 3 例の変異型、すなわち、1 例の陰極方向に移動する変異型、TPI 4NG1 並びに 2 例の陽極方向に移動する変異型、TPI 2HR1 及び TPI 2NG1 の電気泳動上の特性、並びに安定性、カイネティックス及び免疫学的特性について述べる。

材料及び方法

特に断っていないかぎり、すべての操作は 0~4°C で行った。また、緩衝液の pH 調整は 22~25°C で行った。

化学薬品. DL-グリセルアルデヒド 3 燐酸 (DL-GAP)、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)、トリエタノールアミン (TEA) 及び α -グリセロ燐酸デヒドロゲナーゼ (GDH) は Boehringer Mannheim 社から購入した。GDH には微量ではある

of trace contamination with TPI by treatment of the enzyme with chlorohydroxyacetone phosphate (synthesized as described by Hartman²²). Fraction V of bovine serum albumin (BSA) was obtained from Sigma, urea and guanidine-HCl from Schwarz/Mann, Affigel-15 from Bio-Rad, and Protein A Sepharose from Pharmacia. 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) and 3-(cyclohexylamino)-propane sulfonic acid (CAPS) were from Calbiochem. All other chemicals were analytical/reagent grade.

Subjects. Blood samples were obtained from heterozygotes for the variants as well as their parents, who showed the same variant pattern as the propositus, and nine normal healthy individuals. The blood sample of TPI 1-Manchester was kindly provided by Dr. H.W. Mohrenweiser of the University of Michigan.

Enzyme Assay. Enzyme activity was measured using a 36-cuvette centrifugal fast analyzer (the Aminco Rotochem IIa/36) at 340 nm and at 30°C with an assay mixture containing 4 mM D-GAP, 0.2 mM NADH, and 1 IU/ml of GDH in 100 mM TEA-HCl buffer at pH 7.6. Hemoglobin (Hb) content was measured as previously described by Satoh et al.²³ To prevent inactivation, the isolated isozymes were diluted in 100 mM TEA-HCl/1 mM EDTA buffer, pH 7.6, containing 0.01% 2-mercaptoethanol and 0.1% BSA (the dilution buffer). All determinations were at least in duplicate unless otherwise stated.

Antibody Preparation. Normal human TPI was purified as previously described.¹⁹ A half milliliter saline containing 1 mg of TPI was mixed with 0.5 ml Freund's complete adjuvant and injected intramuscularly into two parts of the rabbit foot pad. Repeated injection of 0.2 mg TPI in 0.5 ml saline and 0.5 ml Freund's complete adjuvant was done at 1, 2, and 3 weeks after the initial injection. Blood was collected a week after the final injection, allowed to clot and the serum was removed. Specific antibody was isolated from the rabbit serum by affinity chromatography: 2 mg of pure enzyme was bound to Affigel-15 (0.5 ml) and 2 ml of anti-serum passed through the column. The antibody was eluted with 0.2 M acetic acid, and stored in aliquots at -80°C after the pH was adjusted to 7.6.

が TPI が混入しているので、酵素活性測定には、chlorohydroxy acetone phosphate (Hartman²² の記述に従い合成した) で酵素処理を行い、TPI を除去した GDH を使用した。牛血清アルブミン (BSA) は Sigma 社の Fraction V を、尿素と塩酸グアニジンは Schwartz/Mann 社から、Affigel-15 は Bio-Rad 社から、また、Protein A Sepharose は Pharmacia 社から入手した。2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) と 3-(cyclohexylamino)-propane sulfonic acid (CAPS) は Calbiochem 社から入手した。その他の薬品はすべて分析用試薬である。

対象. 血液標本はヘテロ接合変異型を示した対象者及びそれと同じ変異型パターンを示した親、並びに、9名の健常者から採取した。TPI 1-Manchester の血液標本は、Michigan 大学の Dr. H. W. Mohrenweiser から譲与されたものである。

酵素活性の測定. 酵素活性の測定には 36 キュベットの高速遠心式測定機 (Aminco Rotochem II a/36) を用い、340 nm, 30°C で、4 mM D-GAP, 0.2 mM NADH 及び 1 IU/ml の GDH を含む pH 7.6 の 100 mM TEA-HCl 緩衝液を酵素活性反応液として活性を測定した。ヘモグロビン (Hb) 含量は、Satoh らの報告²³ に従って測定した。分離したアイソザイムは失活を防ぐために、0.01% の 2-メルカプトエタノールと 0.1% の BSA を含む、pH 7.6 の 100 mM TEA-HCl/1 mM EDTA 緩衝液 (希釈緩衝液) で希釈した。特に断っていないかぎり、すべての測定は、少なくとも duplicate で行った。

抗体の作製. 正常ヒト TPI は前回述べた方法¹⁹ で精製した。1 mg の TPI を含む 0.5 ml の生理食塩水と 0.5 ml の Freund のコンプリートアジュバントを混合したものを、ウサギの足蹠の 2 か所に筋肉内注射した。0.2 mg の TPI と、0.5 ml の生理食塩水及び 0.5 ml の Freund のコンプリートアジュバントの混液を、最初の注射から 1, 2, 3 週間後に繰り返して注射した。最後の注射を行った 1 週間後に採血し、凝血後、血清を分離した。このウサギ血清からアフィニティークロマトグラフィーを用いて、特異抗体を分離した。すなわち、精製酵素 2 mg を Affigel-15 (0.5 ml) に結合させ、このカラムに 2 ml の抗血清を通過させた。吸着した抗体を 0.2 M の酢酸を用いて溶出し、pH を 7.6 に調整した後、分注して -80°C で保存した。

Electrophoresis. Nondenaturing electrophoresis was performed on 6.2% polyacrylamide slab gel in a continuous 0.04 M Tris-0.2 M glycine buffer system at pH 8.5. The concentration of the samples was adjusted in such a manner that the same amount of enzyme activity was present in all samples. Gels were stained for TPI activity by a modification of the method of Scopes,² using a cellulose acetate membrane instead of a filter paper.

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) - isoelectric focusing in the presence of 9 M urea, followed by electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) in the second dimension - was done with the ISO-DALT system as described by Neel et al.²⁴ The anti-TPI immunoglobulins (400 μ g) bound to Protein A Sepharose (50 μ l) were cross-linked with dimethylsuberimidate as described by Reeves et al.²⁵ About 5 μ l of the immunoabsorbents and erythrocyte lysates containing 50 units of TPI were mixed overnight at 4°C. The mixtures were transferred to microcolumns made with Eppendorf yellow tips. The columns, in microcentrifuge tubes, were centrifuged to drain off the immunoabsorbents. After the columns were washed five times with 100 μ l of 50 mM TEA buffer (pH 7.6) containing 0.15 M NaCl, the bound TPI enzymes were eluted with 30 μ l of 9 M urea containing 2% 2-mercaptoethanol and 2% NP-40 by centrifugation. The elutes (2~4 μ l) were analysed by 2-D PAGE, and the gels were stained by a modification of the silver staining method of Wray et al.²⁶

Isolation of Isozyme Bands. Each isozyme band of TPI was isolated essentially as previously described,¹⁹ except that gel filtration on Sephadex G-75 was used instead of the diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose chromatography before the preparative polyacrylamide gel electrophoresis. Each enzyme fraction from the isolated and concentrated isozyme band (about 400 IU/ml), divided into microtubes (50 μ l each) in the presence of 0.1% BSA, was stored in liquid N₂ until use. Each fraction, corresponding to the primary isozyme band of either normal or variant homodimer, was used for the characterization.

pH Stability. The stability of the allozymes in buffers at pH 5 and pH 10 was examined by

電気泳動. 変性剤を用いない電気泳動は、6.2% ポリアクリルアミドゲルを用い、pH 8.5の0.04 M Tris-0.2 M glycine 連続緩衝液系を使用して行った。試料の濃度はすべての試料中の酵素活性値が同量になるように調整した。ゲルは Scopes² の方法を改変した方法で TPI 活性染色を行ったが、濾紙の代わりにセルロースアセテート膜を用いた。

9 M 尿素の存在下に等電点電気泳動を行った後、2次元目にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 存在下に泳動を行う 2次元電気泳動 (2-D PAGE) は、ISO-DALT システムを用いて、Neel ら²⁴ の記述に従って行った。Protein A Sepharose (50 μ l) に結合させた抗 TPI 免疫グロブリン (400 μ g) は、Reeves ら²⁵ の報告に従い dimethylsuberimidate を用いて架橋させた。この免疫吸着体 5 μ l と TPI 50 単位を含む赤血球溶血液を 4°C で一晩混和した。この混合物を、Eppendorf yellow tip を用いて作成したマイクロカラムに移した。マイクロチューブにこのカラムを入れ、免疫吸着体の溶液部分を遠心除去した。0.15 M NaCl を含む 50 mM TEA 緩衝液 (pH 7.6) 100 μ l でこのカラムを 5 回洗浄した後、結合している TPI は 2% 2-メルカプトエタノールと 2% NP-40 を含む 9 M 尿素液 30 μ l を用い、遠心によって溶出させた。この溶出液 (2~4 μ l) を 2-D PAGE で分析した。ゲルは Wray ら²⁶ の方法を改変した銀染色法を用いて染色を行った。

アイソザイムバンドの分離. TPI の各アイソザイムバンドの分離は、基本的には以前述べた方法¹⁹ で行ったが、プレパラティブポリアクリルアミドゲル電気泳動の前工程には、ジエチルアミノエチル (DEAE)-セルロースクロマトグラフィの代わりに、Sephadex G-75 を用いたゲル濾過を行った。分離・濃縮したアイソザイムバンドの酵素画分 (約 400 IU/ml) は、0.1% BSA の存在下でマイクロチューブに分注 (各々 50 μ l) し、使用するまで液体窒素中に保存した。正常型又は変異型ホモダイマーの primary アイソザイムバンドに相当する各画分を用いて特性を調べた。

pH 安定性. TPI 2.5 単位を、pH 5 の 200 mM MES-NaOH 緩衝液 100 μ l、又は pH 10 の 200 mM CAPS-

incubating 2.5 units of TPI in 100 μ l of 200 mM MES-NaOH buffer at pH 5 or 200 mM CAPS-NaOH buffer at pH 10, both containing 5% sucrose. After incubation at 36°C for six hours, the sample was diluted with 1 ml of the dilution buffer and assayed for the residual activity.

Other Methods. Thermostability, guanidine-HCl denaturation, immunoinactivation, and kinetic studies were conducted as previously described.¹⁹

RESULTS

Electrophoresis. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns for the three variants and normal TPI are shown in Figure 1A. The observed patterns were very similar to those on the starch gels.²¹ A diagrammatic interpretation of the gel pattern is shown in Figure 1B. The subunit compositions were confirmed by dissociation-reassociation studies using the isolated allozyme bands as previously described.¹⁹

NaOH 緩衝液 100 μ l (両緩衝液共に 5% スクロースを含む) でインキュベーションし, pH 5 及び pH 10 の緩衝液におけるアロザイムの安定性を調べた. 36°C で 6 時間インキュベーションを行った後, 検体を希釈緩衝液 1 ml で希釈し, 残存活性を測定した.

その他の方法. 熱安定性, 塩酸グアニジンによる変性, 抗血清による不活性化及びカイネティックスについては, 以前述べた方法で行った.¹⁹

結果

電気泳動. 3例の変異型及び正常型 TPI のポリアクリルアミドゲル電気泳動像を図 1 A に示した. 観察された泳動像は, 澱粉ゲルを使用したときのものと酷似していた.²¹ 電気泳動像の模式図を図 1 B に示した. サブユニット構成は, 以前述べたように,¹⁹ 分離したアロザイムバンドを用いた解離-再会合実験で確認した.

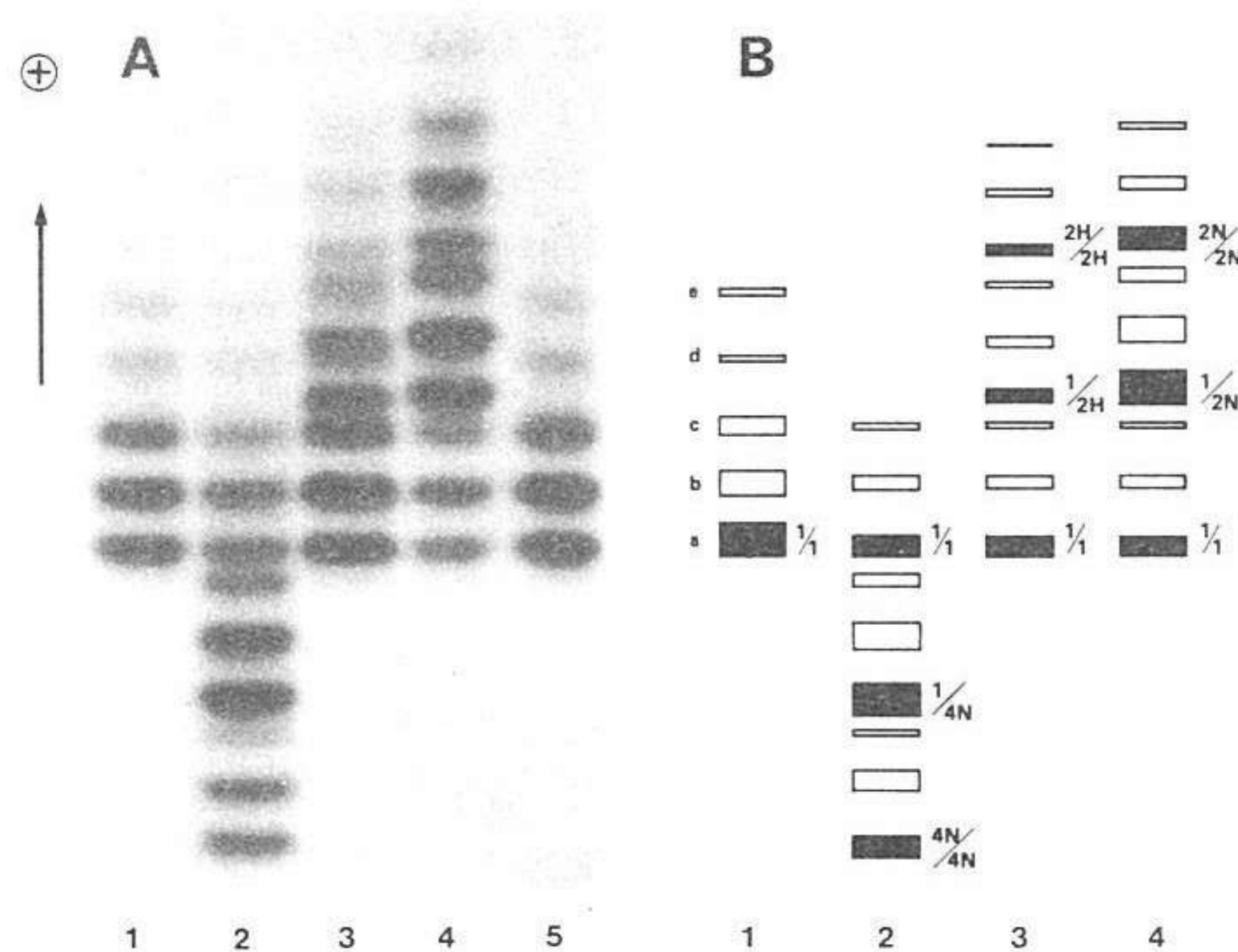


Figure 1. A. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of human erythrocyte TPI. The gel was stained for TPI activity. 1) TPI 1 (normal), 2) TPI 1-4NG1, 3) TPI 1-2HR1, 4) TPI 1-2NG1, 5) TPI 1. B. Schematic diagram of the gel of Figure 1A. Isozyme designations (a-e) of Peters et al¹⁷ are on the left. Designations of postulated subunit compositions are as follows: 1, normal subunit; 4N, 4NG1 subunit; 2H, 2HR1 subunit; 2N, 2NG1 subunit. ■, primary allozymes. □, secondary deamidation products.

図1. A. ヒト赤血球 TPI のポリアクリルアミドゲル電気泳動像. ゲルは TPI 活性染色を行った. 1) TPI 1 (正常型), 2) TPI 1-4NG1, 3) TPI 1-2HR1, 4) TPI 1-2NG1, 5) TPI 1. B. 図1 A のゲルの模式図. Peters ら¹⁷ によるアイソザイムの名称 (a~e) を左側に示した. 推定サブユニット構成の名称は次のとおりである: 1, 正常型サブユニット; 4N, 4NG1 サブユニット; 2H, 2HR1 サブユニット; 2N, 2NG1 サブユニット. ■ 1 次アロザイム, □ 脱アミド化による 2 次産物.

The normal and variant allozymes were compared by 2-D PAGE with particular regard to molecular weight. The silver-stained gel patterns of TPI isozymes, purified from the erythrocytes of a normal and the three variant individuals by immunoaffinity microchromatography, are shown in Figure 2. With our gel conditions, TPI 1 (normal) appeared as a complex of six spots; four clear spots, temporarily designated 1, 2, 3, and 4 in order of their cathodal migrations, and two scarcely visible spots beneath spot 1 and spot 2 (Figure 2A). We interpret the largest, most cathodal spot (spot 1) as the primary product and the others as derivative. The pattern for a cathodally migrating variant with a phenotype TPI 1-4NG1 is shown in Figure 2B. In addition to the complex of normal spots two more cathodal spots were observed. However, there was no apparent difference between the molecular weight of variant and normal spots. The two most abundant spots of the variant pattern, observed at positions of spot 1 and spot 2, seemed somewhat elongated in the molecular weight axis. This can be explained if the minor spots of the 4NG1 variant and the normal spots (spot 1 and spot 2) overlap each other. We indicate the presumptive primary product of the variant by a large arrow and the degradation product by a small one. The 2-D PAGE patterns of 1-2HR1 and 1-2NG1 variants are shown in Figure 2C and D. No abnormal spots in the molecular weight axis were detected. The positions of the variant spots are indicated by arrows. The major spots of both variants, which appear to comigrate with spot 3 of normal, were unusually heavily stained. This is not unexpected considering that the isoelectric points of the 2HR1 and 2NG1 variants were very similar to those of the degradation products of the normal enzyme.²¹ The 2HR1 variant bands of erythrocyte TPI were markedly reduced in intensity with an activity stain on the polyacrylamide gel electrophoresis (Figure 1A, lane 3); the variant spots on 2-D PAGE visualized with the silver stain were also less abundant than the normal and 2NG1 variant spots.

Activity. The level of TPI activity in erythrocytes from normal and variant individuals is shown in Table 1. The enzyme activity in erythrocytes from the proband and her carrier father in the instance of the phenotype TPI 1-2HR1, were 58% and 51% of the normal mean, respectively,

正常型と変異型アロザイムとを2-D PAGE を用いて、特に分子量について比較した。正常型及び3例の変異型の赤血球から免疫アフィニティーマイクロクロマトグラフィー法を用いて精製したTPIアイソザイムの銀染色ゲル像を図2に示した。今回用いたゲルの条件では、TPI 1 (正常型)は六つのスポットの複合体として現われた。すなわち、陰極方向への移動度の順に仮にスポット1, 2, 3, 4と命名した四つの明瞭なスポットと、スポット1及び2の下にかすかに認められる二つのスポットである(図2A)。我々は、最も大きい、最も陰極寄りのスポット(スポット1)を1次産物、その他を誘導体と解釈した。表現型TPI 1-4NG1を呈する陰極方向に移動する変異型の泳動像を図2Bに示した。正常スポット群に加えて、2個のより陰極寄りのスポットが観察された。しかし、変異スポットと正常スポットの分子量に明瞭な差は認められなかった。スポット1及び2の位置に観察されたこの変異型の最も大きな2個のスポットは、分子量方向に若干長くなっているように思われた。このことは、4NG1変異型のマイナースポットと正常型スポット(1及び2)が互いに重なり合うとすれば説明できる。この変異型の1次産物と思われるものを大きい矢印で、分解産物を小さい矢印で示した。変異型1-2HR1と1-2NG1の2-D PAGEパターンを図2C及びDに示した。分子量方向には何らの異常スポットも検出されなかった。変異スポットの位置を矢印で示した。両変異型の主要スポットは正常型のスポット3と同じ位置に移動すると思われるが、異常に濃く染色された。変異型2HR1と2NG1の等電点が、正常酵素の分解産物の等電点と酷似していた²¹ことを考慮すれば、これは予想外の事象ではない。赤血球TPIの2HR1変異バンドはポリアクリルアミドゲル電気泳動の活性染色においてその濃度が著しく減少していた(図1A, レーン3)。この変異型のスポットは、銀染色法で検出された2-D PAGE像においても、正常型及び2NG1変異型のスポットに比べ減少していた。

活性。正常型及び変異型対象者の赤血球TPIの活性値を表1に示した。表現型TPI 1-2HR1の場合、発端者と保因者であるその父親の赤血球での酵素活性は、それぞれ、正常平均値の58%及び51%で

whereas the mother showed a normal electrophoretic pattern with a normal level of enzyme activity. Thus TPI 2HR1 is also an enzyme deficiency variant. The other two variants showed normal levels of enzyme activity.

あった。一方、母親の電気泳動パターンは正常で、酵素活性も正常値を示した。したがって、TPI 2HR1は酵素欠損変異型でもある。他の2例の変異型は正常な酵素活性値を示した。

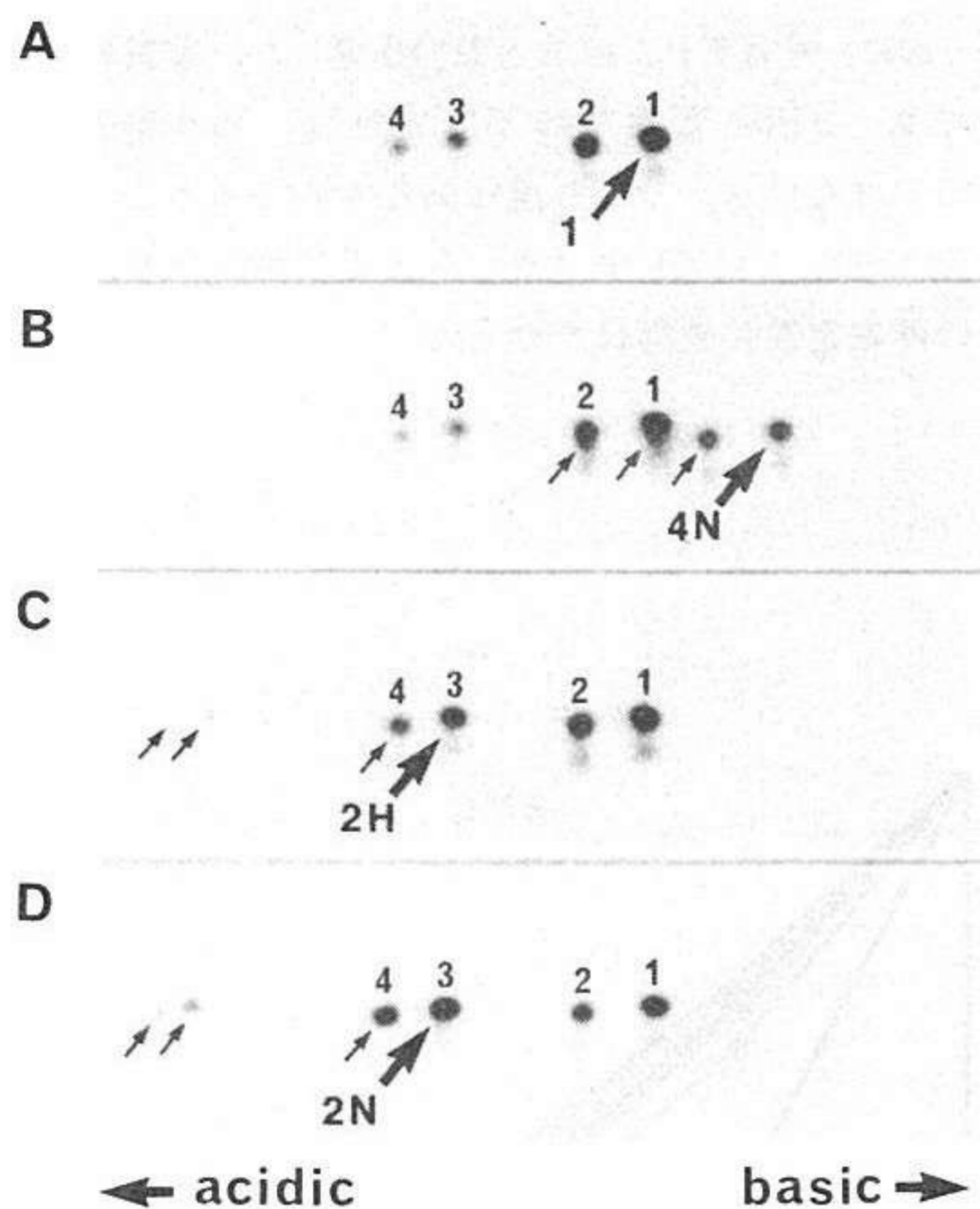


Figure 2. Silver-stained 2-D PAGE pattern of human erythrocyte TPI. TPI isozymes were purified as described in Materials and Methods. Sections through the TPI region of four gels. A) TPI 1 about 0.2 μ g, B) TPI 1-4NG1 0.4 μ g, C) TPI 1-2HR1 0.4 μ g, D) TPI 1-2NG1 0.4 μ g. Isoelectric focusing is in equilibrium with LKB Ampholine, 80% pH 3.5-10 and 20% pH 5-7. Larger molecular mass range is at the top of the gel. Normal spots are shown with numbers (1-4) and variant spots are indicated by arrows. The spots indicated by 1 and larger arrows are the postulated primary products. Subunits designations (4N, 2H, and 2N) are from Figure 1.

図2. ヒト赤血球 TPI の 2-D PAGE 銀染色像. TPI アイソザイムの精製は、材料及び方法に述べたとおりである。四つのゲルの TPI 領域の部分。A) TPI 1, 約 0.2 μ g, B) TPI 1-4NG1, 0.4 μ g, C) TPI 1-2HR1, 0.4 μ g, D) TPI 1-2NG1, 0.4 μ g. 等電点電気泳動は、LKB 社の Ampholine で pH 3.5~10 のものを 80%, pH 5~7 のものを 20% の割合で用いて行った。高分子量のものがゲル上部に位置する。正常スポットは番号(1~4)で示し、変異スポットは矢印で示した。1 及び大きい矢印で示したスポットは、一次産物と考えられる。サブユニットの名称(4N, 2H 及び 2N)は、図 1 に準じた。

TABLE 1 THE LEVEL OF TPI ACTIVITY IN ERYTHROCYTES FROM NORMAL AND VARIANT INDIVIDUALS

表 1 正常型及び変異型対象者の赤血球 TPI 活性値

| Subject | Phenotype | Activity (IU/gHb) | % of normal mean |
|-------------------------------------|-----------|-------------------|------------------|
| I | 1-4NG1 | 2081 | 93 |
| II | 1-2HR1 | 1295 | 58 |
| II-Mother | 1 | 2100 | 94 |
| II-Father | 1-2HR1 | 1139 | 51 |
| III | 1-2NG1 | 2259 | 101 |
| Normal* (mean \pm SD, n = 310) | 1 | 2234 \pm 217 | 100 \pm 9.7 |

*Data from Satoh et al²³ 佐藤ら²³ のデータ

Stability. Thermodenaturation studies were conducted at 55°C and 57°C (Figure 3). The 2NG1 allozyme from the proband is significantly more thermolabile at both temperatures than normal allozymes. The normal allozyme required 52 ± 1.7 and 25 ± 1.6 minutes (mean \pm SD, $n=9$) to lose 50% activity at 55°C and 57°C, while this variant required 26 and 13 minutes, respectively. The variant allozyme from the father showed the same instability. The 2HR1 allozyme is slightly more thermolabile than normal, this variant requiring 44 and 21 minutes to lose 50% activity at 55°C and 57°C, respectively. Family study confirmed that the instability of the 2HR1 variant, although not so significant, was also genetically transmitted. There was no difference in heat stability between the 4NG1 allozyme and the normal allozyme.

安定性. 熱変性実験は55°Cと57°Cで行った(図3). 発端者の2NG1 アロザイムは, いずれの温度においても, 正常型アロザイムに比べ極めて熱不安定である. 正常型アロザイムが55°Cと57°Cで活性を50%失うのに要する時間は 52 ± 1.7 分と 25 ± 1.6 分(mean \pm SD, $n=9$)であったが, この変異型の場合は, それぞれ, 26分と13分であった. 父親由来の変異型アロザイムも同様の不安定性を示した. 2HR1 アロザイムは正常型に比べやや熱不安定であり, 55°Cと57°Cで活性を50%失うのに, それぞれ, 44分と21分を要した. 家族調査の結果, 2HR1 変異型の不安定性は, 余り顕著なものではないが, やはり遺伝的なものであることが確認された. 4NG1 アロザイムと正常型アロザイムとの熱安定性に差異はなかった.

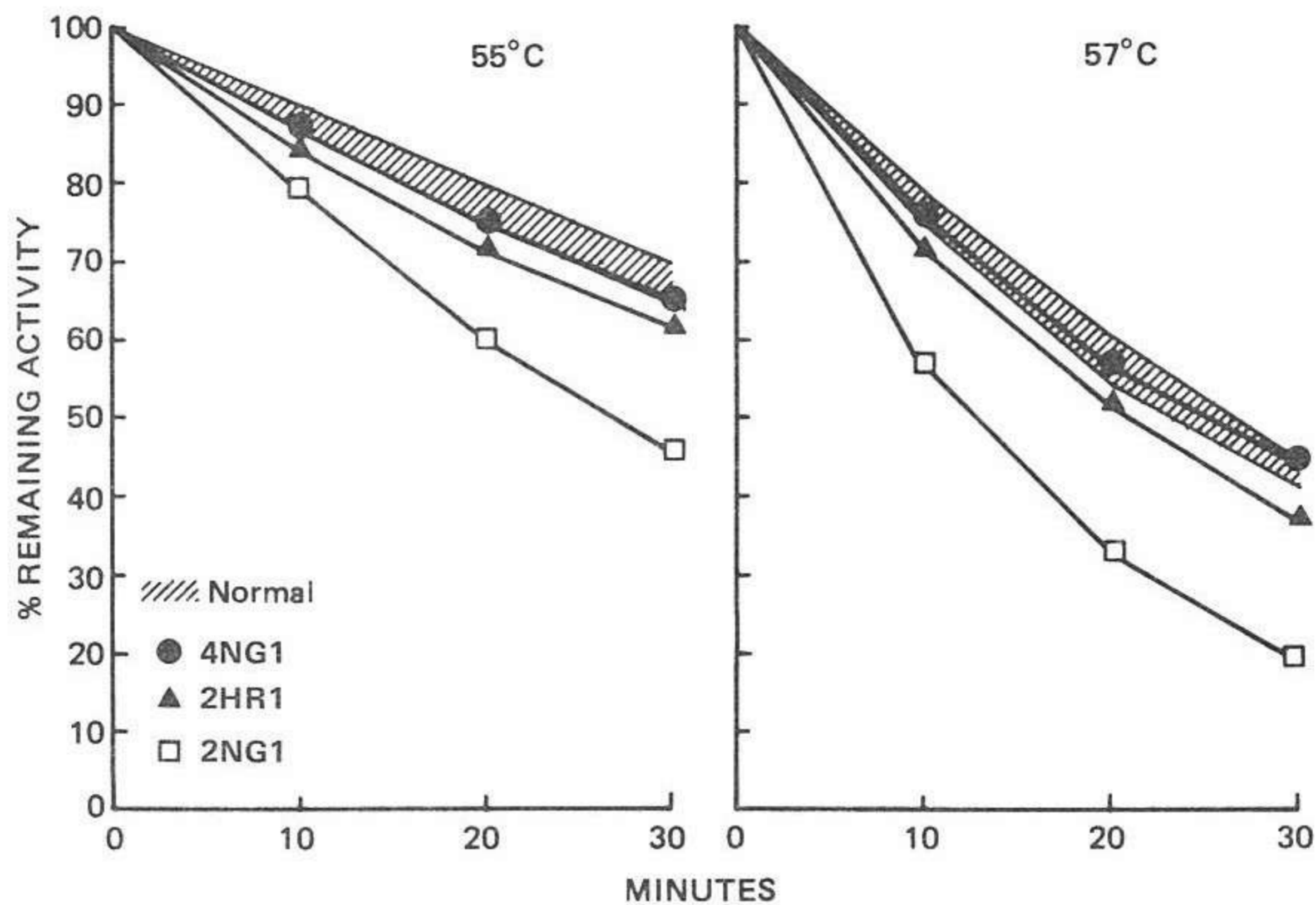


Figure 3. Percentage remaining TPI activity after heating for various times at 55°C and 57°C. Three 100 μ l aliquots of each allozyme were heated in thermistor-controlled water bath ($\pm 0.1^\circ\text{C}$ accuracy) for 10, 20, and 30 minutes. After incubation they were placed on ice, and remaining TPI activity was determined. Mean \pm SD for the nine normal is shown with shaded lines.

図3. 55°C及び57°Cで各々の時間加熱した後のTPIの残存活性(%). サーミスター制御の水槽(精度: $\pm 0.1^\circ\text{C}$)で, 各アロザイム100 μ lずつをそれぞれ, 10, 20, 30分間熱した. 加熱後, 各試料を氷上に移し, 残存TPI活性を測定した. 9例の正常型のmean \pm SDを斜線で示した.

The stability of the allozymes to guanidine-HCl was examined by incubation with 0.9 and 1.1 M guanidine-HCl in the dilution buffer at 30°C for 30 minutes (Table 2). Both the 2HR1 and 2NG1 variant allozymes were less stable than the normal allozymes, but the 2HR1 variant was much more sensitive to guanidine-HCl denaturation than the 2NG1 variant. No difference was observed between 4NG1 variant and the normal allozymes in the denaturation test.

塩酸グアニジンに対するアロザイムの安定性は0.9M及び1.1Mの塩酸グアニジン希釈緩衝溶液中で、30°C、30分間インキュベーションを行うことにより検討した(表2)。2HR1及び2NG1変異型アロザイムが正常型アロザイムに比べ不安定であったが、2HR1変異型の方が2NG1変異型に比べ塩酸グアニジン変性に対してより鋭敏であった。この変性試験において、4NG1変異型と正常型アロザイムとの間に差は認められなかった。

TABLE 2 PERCENTAGE REMAINING ACTIVITY OF TPI AFTER INCUBATION IN 0.9 AND 1.1 M GUANIDINE-HCl SOLUTION*

表2 0.9 M 及び1.1 M の塩酸グアニジン溶液中でインキュベーション後のTPIの残存活性%*

| Subject | Allozyme | Remaining activity (%) | |
|--------------------------------|----------|------------------------|----------------|
| | | 0.9 M | 1.1 M |
| I | 4NG1 | 51.7 | 32.0 |
| II | 2HR1 | 41.7 | 16.4 |
| II-Father | 2HR1 | 40.9 | 15.5 |
| III | 2NG1 | 45.6 | 20.0 |
| III-Father | 2NG1 | 46.9 | 20.7 |
| Normal (mean \pm SD, n=9) | 1 | 52.8 \pm 1.0 | 28.6 \pm 1.8 |

*TPI allozyme was incubated at 30°C for 30 minutes in the dilution buffer containing 0.9 or 1.1 M guanidine-HCl. 100% activity was the level of activity after incubation in the absence of guanidine-HCl.

0.9 M 又は1.1 M の塩酸グアニジンを含む希釈緩衝液中で、TPI アロザイムを30°Cで30分間インキュベーションした。塩酸グアニジンを加えないでインキュベーションした後の活性値を100%とした。

The results of stability tests in buffers at pH 5 and pH 10 are shown in Table 3. The 2NG1 allozyme was significantly labile in pH 5 buffer. The remaining activity of the 2NG1 allozymes, isolated from the erythrocytes of the proband and the father, after incubation in pH 5 buffer at 36°C for six hours was about 40% less than that of the normal. This variant was also more labile in pH 10 buffer, the remaining activity being 15% less than the normal mean. The 2HR1 was slightly more labile than normal in pH 5 buffer. On the other hand, the 4NG1 allozyme was more stable in pH 5 buffer, the remaining activity being about 20% greater than the normal mean.

pH 5 及び pH 10 の緩衝液中での安定性試験の結果を表3に示した。2NG1 アロザイムは、pH 5 緩衝液中では著しく不安定であった。発端者とその父親の赤血球から分離した2NG1 アロザイムを、pH 5 緩衝液中で36°Cで6時間インキュベーションした後の残存活性は、正常型より約40%低かった。この変異型はpH 10 緩衝液中でも不安定であり、その残存活性は正常型の平均値より15%低かった。2HR1 は、pH 5 緩衝液中で正常型に比べやや不安定であった。一方、4NG1 アロザイムはpH 5 の緩衝液でより安定であり、その残存活性は正常型の平均値より約20%高かった。

TABLE 3 PERCENTAGE REMAINING ACTIVITY OF TPI AFTER INCUBATION IN BUFFERS AT pH 5 AND pH 10*

表3 pH 5 及び pH 10の緩衝液中でインキュベーション後の TPI の残存活性%*

| Subject | Allozyme | Remaining activity (%) | |
|--------------------------------|----------|------------------------|----------------|
| | | pH 5 | pH 10 |
| I | 4NG1 | 80.6 | 79.9 |
| I-Father | 4NG1 | 83.4 | 80.3 |
| II | 2HR1 | 54.8 | 75.3 |
| II-Father | 2HR1 | 56.3 | 73.5 |
| III | 2NG1 | 25.9 | 65.9 |
| III-Father | 2NG1 | 22.1 | 68.8 |
| Normal (mean \pm SD, n=9) | 1 | 65.8 \pm 2.5 | 80.0 \pm 1.7 |

*Assays were conducted as described in Materials and Methods. 100% activity was the level of activity after incubation in the dilution buffer; no differences were observed before and after incubation in the dilution buffer.

活性測定は、材料及び方法の項で述べた方法で行った。希釈緩衝液中でのインキュベーション後の活性を100%としたが、インキュベーションの前後で差は認められなかった。

Kinetic Properties. With duplicate or triplicate determinations for each point on the kinetic curve, the normal allozyme had a Michaelis constant (K_m) for D-GAP of 0.35 ± 0.01 mM (mean \pm SD, n=9), while the K_m values for the 4NG1, 2HR1, and 2NG1 variants were 0.39, 0.33, and 0.34 mM, respectively.

The effects of structurally dissimilar inhibitors of TPI (α -glycerophosphate, 2-phosphoenolpyruvate, and fructose 1, 6-diphosphate) were studied. The concentration of the inhibitors was selected in order to inhibit about 30% and 70% of the normal allozyme. None of the variants was more or less sensitive to the inhibition than was the normal allozyme (Table 4).

Immunologic Properties. The rabbit antibody prepared as described in Materials and Methods seemed to be monospecific, since only a single precipitin line was observed on the Ouchterlony double diffusion test with either purified or unpurified normal human TPI. None of the variants showed abnormality in cross-reactivity, as a single continuous precipitin line equidistant from the antibody well was observed between the normal and the variant allozymes. TPI is inactivated by association with antibody. The immunoinactivation profiles of the normal and the variant allozymes were almost identical.

カイネティック特性。各ポイントに対して duplicate 又は triplicate の測定を行いカイネティック曲線を作成した。正常型アロザイムの D-GAP に対する Michaelis 定数 (K_m) は 0.35 ± 0.01 mM (mean \pm SD, n=9) であったが、変異型 4NG1, 2HR1 及び 2NG1 の K_m 値は、それぞれ、0.39 mM, 0.33 mM 及び 0.34 mM であった。

TPI に対する構造的に異なる阻害剤 (α -グリセロリン酸, 2-ホスホエノールピルビン酸, 及びフルクトース 1, 6-2 リン酸) の影響を調べた。正常型アロザイム活性の約 30% 及び 70% を阻害するように阻害剤の濃度を選定した。いずれの変異型も、正常型アロザイムに比べ、阻害の程度に差は認められなかった (表 4)。

免疫学的特性。Ouchterlony 二重拡散試験では、精製した正常型ヒト TPI を用いた場合も、精製していないヒト TPI を用いた場合も、一本の沈降線しか観察されなかったため、材料及び方法の項で述べたように作製したウサギ抗体は monospecific であると思われた。正常型アロザイムと変異型アロザイムの間に、抗体を入れた試料穴から等距離に、しかも一本の連続する沈降線が観察され、いずれの変異型も交差反応性において異常を示さなかった。TPI は、抗体と結合することにより不活性化される。正常型と変異型アロザイムの抗体による不活性化のプロフィールはほぼ同じであった。

TABLE 4 EFFECT OF VARIOUS INHIBITORS ON THE ACTIVITY OF NORMAL TPI ALLOZYMES FROM HUMAN ERYTHROCYTES*

表4 種々の阻害剤がヒト赤血球の正常型 TPI アロザイムの活性に及ぼす影響*

| Inhibitor | Remaining activity (%) (mean \pm SD, n=9) |
|----------------------------|--|
| α -Glycerophosphate | |
| 0.72 mM | 63.7 \pm 0.7 |
| 3.0 mM | 30.2 \pm 0.4 |
| 2-Phosphoenolpyruvate | |
| 0.1 mM | 77.0 \pm 0.9 |
| 0.5 mM | 41.0 \pm 1.0 |
| Fructose 1, 6-diphosphate | |
| 7.0 mM | 71.7 \pm 1.1 |
| 35.0 mM | 36.9 \pm 0.5 |

*Assays were conducted as described in Materials and Methods except that the D-glyceraldehyde 3-phosphate concentration was 0.4 mM. The inhibitor concentration refers to the final concentration present in the assay. 100% activity was the level of activity determined in the absence of added inhibitor.

測定法は、D-グリセルアルデヒド3 燐酸の濃度を0.4mM としたほかは、材料及び方法の項で記述したとおりである。阻害剤の濃度は、反応液中の最終濃度である。阻害剤を添加しないで測定した活性値を100%とした。

DISCUSSION

Electrophoretic variants of TPI are rare; population studies yielded only nine variants of seven different types in a total of 23,701 individuals.^{17,18,20,21} The present study characterized the three variants found in Japanese. Each variant had a K_m for D-GAP which was similar to the K_m obtained for electrophoretically normal allozyme. Also, the sensitivity to inhibition by three different inhibitors was similar to that observed for the normal allozyme. The structural change associated with altered electrophoretic mobility does not affect the active-site region of the enzyme, at least to the extent that it does not alter the kinetic properties of TPI molecule. A summary of the unique characteristics of the five variants including the two variants (TPI 3HR1 and TPI Man), previously studied by Asakawa and Mohrenweiser,¹⁹ is shown in Table 5.

The level of TPI activity in erythrocytes from an individual with the phenotype TPI 1-2HR1 was about 60% of the normal mean. As evaluated by both TPI activity staining and silver-based protein staining, the amount of the 2HR1 allozyme in erythrocytes was markedly reduced.

考 察

TPI の電気泳動上の変異型はまれであり、過去の集団調査でも、合計23,701名から7種類の変異型が9例確認されたにすぎない。^{17,18,20,21} 今回の研究では、日本人に検出された3例の変異型の特性について調べた。各変異型のD-GAPに対する K_m 値は、電気泳動上正常なアロザイムの K_m 値と同様のものであった。また、3種の異なる阻害剤に対する感受性も正常型アロザイムに認められたものと同様であった。電気泳動上の移動度の変化を伴うような構造上の変化は、酵素の活性部位に対して、少なくとも、TPI分子のカイネティックスを変化させる程の影響を与えていない。以前浅川及びMohrenweiser¹⁹が検討を行った2種の変異型(TPI 3HR1及びTPI Man)を含めた5種類の変異型の個々の特性を表5にまとめた。

表現型がTPI 1-2HR1である対象者の赤血球TPIの活性値は、正常型平均値の約60%であった。TPI活性染色及び銀染色法を用いた蛋白染色から判断すると、赤血球中の2HR1アロザイムの量は著しく減少していた。更に、抗体を用いた不活性化実験において、

TABLE 5 CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTE TPI VARIANTS
表5 赤血球 TPI 変異型の特性

| Allozyme | pI* | Activity | Stability | | | |
|-------------------------|-----|----------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|
| | | | Heat | Guanidine | pH 5 | pH 10 |
| 1 | 5.6 | N | N | N | N | N |
| 4NG1 | 6.6 | N | N | N | Stable | N |
| 2HR1 | 5.2 | Reduced | Slightly labile | Labile | Slightly labile | N |
| 2NG1 | 5.2 | N | Very labile | Slightly labile | Very labile | Labile |
| 3HR1 ^{†,‡} | 5.2 | N | N | N | N | N |
| Manchester [†] | 6.8 | N | Very labile | N | N | N |

* Data from Asakawa et al²¹
浅川ら²¹のデータ

† Data from Asakawa and Mohrenweiser¹⁹
浅川及び Mohrenweiser¹⁹のデータ

‡ Hiroshima-2 variant (Asakawa and Mohrenweiser¹⁹) was renamed 3HR1 (Asakawa et al²¹)
変異型 Hiroshima-2 (浅川及び Mohrenweiser¹⁹) は、3HR1 と改名した (浅川ら²¹) .

Moreover, in immunoinactivation experiments no extra cross-reacting protein was detected. Thus, one can speculate that the low level of TPI activity in erythrocytes of this variant is not due to the decreased specific activity of the variant enzyme but is due to the diminished protein concentration of the variant molecules. In contrast, the variant bands observed in patterns of peripheral lymphocytes, mitogen-stimulated lymphocytes, and hair root cell extracts from the same individual showed normal activity, as evaluated by the staining intensity.²⁷ On the other hand, 2HR1 variant is much more sensitive than normal and the other variants to guanidine-HCl which dissociate enzymatically active dimeric molecules into inactive monomers. Accordingly, we presume that though the 2HR1 molecules with normal specific activity are synthesized in normal quantity, nevertheless, the variant molecules, which have a defect in the function of holding the dimeric structure, unfold and degrade during aging of erythrocytes.

The 2NG1, an anodally migrating allozyme, was very thermolabile at 55°C and 57°C. This variant allozyme was also very labile in buffers at pH 5 and pH 10. The structural change associated with increased lability in the stability tests was not extended to its in vivo lability in which the affected individuals had normal levels of enzyme activity. Peters et al¹⁷ reported that

特別な cross-reacting protein は検出されなかった。したがって、この変異型の赤血球における TPI 活性が低いのは、変異酵素の比活性の低下によるのではなく、変異分子の蛋白濃度の低下によるものと考えられる。これに対して、同じ対象者から得た末梢リンパ球、幼若リンパ球、毛根細胞抽出物のパターンに観察された変異型バンドは、染色濃度から判断して正常な活性を示した。²⁷ 一方、2HR1 変異型は、酵素として活性を有するダイマー分子を不活性なモノマー分子に解離する塩酸グアニジンに対して、正常型及びその他の変異型よりも高い感受性を示す。したがって、正常な比活性を有する 2HR1 分子は正常量合成されるにもかかわらず、ダイマー構造を維持する機能に欠陥を有する変異分子は、赤血球の加齢と共に変性し、分解すると考えられる。

陽極方向に移動するアロザイムである 2NG1 は、55°C 及び 57°C において、極めて熱不安定であった。この変異型アロザイムは、pH 5 及び pH 10 の緩衝液内でも極めて不安定であった。安定性試験において高い不安定性をもたらした構造上の変化は、変異型の生体内での不安定性を導くまでには至っておらず、この変異型対象者の酵素活性は正常であった。Peters ら¹⁷ は、TPI 1-2 変異型と正常型の Km 値、pH 活性

they found no significant differences between the TPI 1-2 variants and normal in the K_m values, pH activity curves, and heat stability. Although the electrophoresis pattern of the TPI 1-2NG1 phenotype is very similar to that of 1-2 variant of Peters', we distinguish the two variants from each other with respect to heat and pH stability.

TPI Manchester, a cathodally migrating variant found in Caucasians,¹⁸ was very thermolabile.¹⁹ The thermodenaturation profiles of the Manchester variant at 55°C and 57°C, reexamined in the same condition, were almost identical to that of 2NG1 variant. In contrast, TPI 4NG1, also a cathodally migrating variant associated with normal activity, kinetic, as well as immunologic properties, was more stable than normal in a stability test with pH 5 buffer. It seems possible that unique conformational alternations, one associated with decreased thermostability and the other with increased stability in acid, are reflected in electrophoretic mobility, in consequence of which the order of cathodal migration on the isoelectric focusing between the 4NG1 and Manchester variants was not consistent with that on the starch gels.²¹

TPI isozymes were purified in only one step by immunoaffinity microchromatography from small amounts of limited samples with a high recovery, while conventional purification required a large quantity of enzyme source and long purification periods. The purified TPI isozymes were analyzed on 2-D PAGE in combination with silver-staining. The variants and normal molecules exhibited almost the same molecular weight, indicating the variants most likely result from single amino acid substitutions.

The evolutionary conservatism of TPI plus the paucity of variants suggest that this molecule is under strong selective pressure. This impression is confirmed by the present and other studies on the properties of such variants as have been detected. Three of the five variants characterized thus far exhibit properties which could to some extent impair their *in vivo* effectiveness. One appears functionally normal. The fifth, however, in one property "exceeds" normal. Whether this would constitute a selective advantage or not is unclear.

曲線及び熱安定性に有意な差は認められないと報告した。TPI 1-2NG1 表現型の電気泳動パターンと Peters の 1-2 変異型のパターンは酷似しているが、両者は、熱安定性と pH 安定性の点で分別できる。

白人に検出された、陰極方向へ移動する変異型である TPI Manchester は、¹⁸ 極めて熱不安定であった。¹⁹ 55°C と 57°C における Manchester 変異型の熱変性プロフィールは、同じ条件下で再検査したところ、2NG1 変異型のものとほとんど同じであった。これに対して、陰極方向に移動する変異型である TPI 4NG1 の活性、カインेटックス及び免疫学的特性は正常であったが、この変異型は pH 5 の緩衝液を用いた安定性テストでは正常型に比べより安定であった。一方は熱安定性の低下、もう一方は酸性状態における安定性の上昇を伴うような個々の高次構造の変化は、電気泳動上の移動度に反映され得るように思われる。その結果、4NG1 変異型と Manchester 変異型の間の、等電点電気泳動における陰極方向への移動の順序は、澱粉ゲルを用いた場合とは一致しなかった。²¹

従来 of 精製法では、大量の酵素原料と長期にわたる精製期間を必要としたが、今回、TPI アイソザイムは、免疫吸着体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて限りのある少量の試料から高い回収率でわずか 1 工程で精製することができた。精製された TPI アイソザイムは、銀染色法と組み合わせた 2-D PAGE で分析した。変異型と正常型分子はほとんど同じ分子量を示したが、このことは、これらの変異型が単一アミノ酸置換により生じた可能性の高いことを示唆している。

TPI の進化速度が遅いことと、変異型が少ないことは、この分子が厳しい淘汰を受けていることを示唆する。この印象は、現在までに検出されたこの種の変異型の特性に関する今回の研究及び他の研究により確認された。これまでに特性が明らかにされた 5 例の変異型のうち、3 例は、生体内における自身の有効性をある程度損なうような特性を示している。1 例の変異型は機能的に正常であるように思われる。しかし、第 5 例目の変異型は、一つの特性において、正常型より "優れて" いる。これが、淘汰における有利性を示すものかどうかは明らかではない。

REFERENCES

参考文献

1. LU HS, YUAN PM, GRACY RW: Primary structure of human triosephosphate isomerase. *J Biol Chem* 259:11958-68, 1984
2. SCOPES RK: Methods for starch-gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. *Biochem J* 107:139-50, 1968
3. SNAPKA RM, SAWYER TH, BARTON RA, GRACY RW: Comparison of the electrophoretic properties of triosephosphate isomerase of various tissues and species. *Comp Biochem Physiol (B)* 49:733-41, 1974
4. KRIETSCH WKG, PENTCHEV PG, KLINGENBÜRG H, HOFSTÄTTER T, BÜCHER T: The isolation and crystallization of yeast and rabbit liver triose phosphate isomerase and a comparative characterization with the rabbit muscle enzyme. *Eur J Biochem* 14:289-300, 1970
5. PUTMAN SJ, COULSON AFW, FARLEY IRT, RIDDLESTON B, KNOWLES JR: Specificity and kinetics of triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochem J* 129:301-10, 1972
6. YUAN PM, DEWAN RN, ZAUN M, THOMPSON RE, GRACY RW: Isolation and characterization of triosephosphate isomerase isozymes from human placenta. *Arch Biochem Biophys* 198:42-52, 1979
7. EBER SW, KRIETSCH WKG: The isolation and characterization of the multiple forms of human skeletal muscle triosephosphate isomerase. *Biochem Biophys Acta* 614:173-84, 1980
8. CORRAN PH, WALEY SG: The tryptic peptides of rabbit muscle triose phosphate isomerase. *Biochem J* 139:1-10, 1974
9. FURTH AJ, MILMAN JD, PRIDDLE JD, OFFORD RE: Studies on the subunit structure and amino acid sequence of triose phosphate isomerase from chicken breast muscle. *Biochem J* 139:11-22, 1974
10. KOLB E, HARRIS JI, BRIDGEN J: Triose phosphate isomerase from the coelacanth: An approach to the rapid determination of an amino acid sequence with small amount of material. *Biochem J* 137:185-97, 1974
11. ARTAVANIS-TSAKONAS S, HARRIS JI: Primary structure of triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur J Biochem* 108:599-611, 1980
12. HARTMAN FC, GRACY RW: An active-site peptide from human triose phosphate isomerase. *Biochem Biophys Res Commun* 52:388-93, 1973
13. SCHNEIDER AS, VALENTINE WN, HATTORI M, HEINS HL: Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. *N Engl J Med* 272:229-35, 1965
14. SKALA H, DREYFUS JC, VIVES-CORRONS JL, MATSUMOTO F, BEUTLER E: Triose phosphate isomerase deficiency. *Biochem Med* 18:226-34, 1977
15. VIVES-CORRONS JL, RUBINSON-SKALA H, MATEO M, ESTELLA J, FELIU E, DREYFUS JC: Triosephosphate isomerase deficiency with hemolytic anemia and severe neuromuscular disease. Familial and biochemical studies of a case found in Spain. *Hum Genet* 42:171-80, 1978
16. MOHRENWEISER HW, FIELEK S: Elevated frequency of carriers for triosephosphate isomerase deficiency in newborn infants. *Pediatr Res* 16:960-3, 1982
17. PETERS J, HOPKINSON DA, HARRIS H: Genetic and non-genetic variation of triose phosphate isomerase isozymes in human tissues. *Ann Hum Genet* 36:297-312, 1973
18. NEEL JV, MOHRENWEISER HW, MEISLER MM: Rate of spontaneous mutation at human loci encoding protein structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6037-41, 1980

19. ASAKAWA J, MOHRENWEISER HW: Characterization of two new electrophoretic variants of human triosephosphate isomerase: Stability, kinetic, and immunological properties. *Biochem Genet* 20:59-76, 1982 (RERF TR 2-82)
20. NEEL JV: Rare variants, private polymorphism, and locus heterozygosity in Amerindian populations. *Am J Hum Genet* 30:465-90, 1978
21. ASAKAWA J, SATOH C, TAKAHASHI N, FUJITA M, KANEKO J, GORIKI K, HAZAMA R, KAGEOKA T: Electrophoretic variants of blood proteins in Japanese. III. Triosephosphate isomerase. *Hum Genet* 68:185-8, 1984 (RERF TR 17-84)
22. HARTMAN FC: Site-specific reagents for triose phosphate isomerase and their potential applicability to aldolase and glycerol phosphate dehydrogenase. *Methods Enzymol* 41:661-71, 1975
23. SATOH C, NEEL JV, YAMASHITA A, GORIKI K, FUJITA M, HAMILTON HB: The frequency among Japanese of heterozygotes for deficiency variants of 11 enzymes. *Am J Hum Genet* 35:656-74, 1983 (RERF TR 2-83)
24. 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 Application of Two Dimension Gel Electrophoresis of Proteins*. Ed by Cellis JE and Bravo R. New York, Academic Press, 1984. pp259-306
25. REEVES HC, HEEREN R, MALLOY P: Enzyme purification using antibody crosslinked to Protein A agarose: Application to *Escherichia coli* NADP-isocitrate dehydrogenase. *Anal Biochem* 115:194-6, 1981
26. WRAY W, BOULIKAS T, WRAY VP, HANCOCK R: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 118:197-203, 1981
27. ASAKAWA J, IIDA S: Origin of human triosephosphate isomerase isozymes: Further evidence for the single structural locus hypothesis with Japanese variants. *Hum Genet* 71:22-6, 1985 (RERF TR 8-85)