

**INHERITED ELECTROPHORETIC VARIANTS DETECTED IN A JAPANESE
POPULATION WITH TWO-DIMENSIONAL GELS OF ERYTHROCYTE LYSATES**

赤血球溶血液の2次元電気泳動ゲルにより日本人集団に観察された
電気泳動上の遺伝的変異型

NORIO TAKAHASHI, Ph.D. 高橋規郎

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

YUKO SHIMOICHI 下市裕子

JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. 浅川順一

YOSHIKO TANAKA 田中芳子

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 are grateful to Mrs. Eiko Nishikori and Mr. Satomichi Kaneoka for their technical assistance with 2-D gel electrophoresis.

2次元ゲル電気泳動の技術的援助に対し錦織栄子氏と金岡里充氏に感謝する。

A paper based on this report was accepted for publication by:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に受理された。

Annals of Human Genetics (London)

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

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

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

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

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

INHERITED ELECTROPHORETIC VARIANTS DETECTED IN A JAPANESE
POPULATION WITH TWO-DIMENSIONAL GELS OF ERYTHROCYTE LYSATES赤血球溶血液の2次元電気泳動ゲルにより日本人集団に観察された
電気泳動上の遺伝的変異型NORIO TAKAHASHI, Ph.D. (高橋規郎); JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.*;
YUKO SHIMOICHI (下市裕子); JUN-ICHI ASAKAWA, M.S. (浅川順一);
YOSHIKO TANAKA (田中芳子); CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子)*Division of Biochemical Genetics, Department of Genetics*
遺伝学部遺伝生化学研究室

SUMMARY

Genetic variation has been studied in erythrocyte lysates from 100 Japanese children and their parents by means of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE). Fifty-five polypeptides selected without respect to variability were considered suitable for scoring. Genetic variation was encountered in 14 of these polypeptides. Family data show that the segregation of 13 variants is consistent with an autosomal codominant mode of inheritance; the remaining variant exhibits a sex-linked mode of inheritance. Of eight presumably identical polypeptides found to be variable in Japanese and/or Caucasians, differences in the occurrence or allele frequencies of polymorphisms were recognized for four. Contrary to the experience of some investigators, the amount of variation and the ethnic differences we are encountering indicate that 2-D PAGE is a sensitive tool for the study of genetic events.

INTRODUCTION

In a series of recent publications,¹⁻⁶ we have been exploring the usefulness of the 2-D PAGE technique in the study of genetic variation, with especial reference to adapting this technology to the study of mutation. In the course of this series, genetic variation has been studied in the polypeptides of plasma samples from three kinds of populations (Caucasoids, Amerindians, and Japanese).² Interethnic comparisons of the index of heterozygosity for the 11 polypeptides

要 約

2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(2-D PAGE)を用いて、100人の日本人の子供及びその両親より得られた赤血球溶血液について、遺伝的変異が調査された。変異型の有無を考慮せずに選定された55個のポリペプチドが、評価に使用可能であるとみなされた。これらのポリペプチドのうち、14種に遺伝的変異型が観察された。家族調査の結果は、13種の変異型の遺伝様式は常染色体共優性と考えて矛盾せず、また、残りの変異型は伴性遺伝様式を示した。日本人又は白人の少なくともいずれか一方に変異が発見された、多分同一である8種のポリペプチドのうち4種には、多形性の発現又は対立遺伝子頻度に差が認められた。若干の研究者の経験に反して、我々の観察した変異の量、及び人種差は、2-D PAGEが、遺伝的現象を調査するための感度の高い技法であることを示している。

緒 言

最近の一連の発表¹⁻⁶で、我々は遺伝的変異の研究における2-D PAGEの有用性を、特に突然変異の研究へのこの技法の応用について検討した。この一連の研究の過程において、3種類の集団(白人、アメリカインディアン、及び日本人)から得た血漿試料のポリペプチドにおける遺伝的変異が調査された。² 3集団すべてにおいて評価され、また遺伝的変異に

*Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, Ann Arbor
Michigan 大学医学部人類遺伝学教室

which could be scored in all three populations and which can be regarded as randomly selected with reference to genetic variability revealed the following: Caucasoids, $8.0 \pm 1.1\%$; Japanese, $5.7 \pm 0.7\%$; and Amerindians, $4.5 \pm 0.6\%$. In addition to the emerging differences in heterozygosity indexes, ethnic differences in allele frequencies appeared to characterize several of the variable polypeptides.

The present communication will report on the variation encountered in preparations of erythrocyte lysates from a Japanese population, compare these findings with the results of previous similar studies on a predominantly Caucasian population, and describe a battery of polypeptides suitable for studies of spontaneous and induced mutation rates. The findings in this study will in general confirm the results on Caucasoids regarding the levels of heterozygosity in erythrocyte lysate proteins but as with respect to the plasma proteins, ethnic differences appear to be emerging for several polypeptides.

MATERIALS AND METHODS

Technical Considerations. Samples were stored as packed red cells in liquid nitrogen. Cells were lysed by adding two volumes of distilled water to one volume of packed red cells. Lysates were centrifuged 20 minutes at $50,000 \times g$ in a Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments) to pellet the red cell membranes. Prior to electrophoresis, lysates were diluted with an equal volume of solubilization solution [0.8% Ampholine (pH 3.5-10) (LKB), 9 M urea, 4% Nonidet P40 (NP-40), 5% 2-mercaptoethanol] and kept at least 20 minutes at room temperature. Two-dimensional electrophoresis was carried out using the Iso-Dalt system (Electro-Nucleonics, Oak Ridge, TN) as described by Rosenblum et al⁶ with four modifications: 1) A series of different mixtures of Ampholine have been tested to obtain the pH gradient that gave the widest and sharpest distribution of lysate protein in the first dimension. A 3:1 ratio of pH 3.5-10 and pH 5-7 Ampholines to make a 2% Ampholine yielded the best result under our conditions. (Only one batch number of each Ampholine was used during the course of this work.) 2) An overlay buffer, containing 0.4% Ampholine (pH 3.5-10), 2 M urea, 2% NP-40, and 2% 2-mercaptoethanol, was used for protecting the proteins of erythrocyte lysates from denaturation caused by cathode

関して無作為に選択したと考えられる11種のポリペプチドについて、ヘテロ接合性指標の人種間比較を行ったところ、白人 $8.0 \pm 1.1\%$ 、日本人 $5.7 \pm 0.7\%$ 、アメリカインディアン $4.5 \pm 0.6\%$ という結果が得られた。このヘテロ接合性の差に加えて、対立遺伝子頻度の人種差は幾つかの変異性ポリペプチドに特徴的に見られるようである。

本報では、日本人集団の赤血球溶血液試料中に検出された変異について報告し、主に白人から成る集団について以前行われた同様の研究から得られた結果と今回の結果を比較する、そして自然及び誘発突然変異率の研究に適する一連のポリペプチドについて述べる。本研究の結果は、赤血球溶血液蛋白質のヘテロ接合性レベルに関しては白人集団の結果を一般的には確認したが、血漿蛋白質に関してみられたように、数種のポリペプチドに人種差が出現するようと思われる。

材料及び方法

技法的考察. 試料は赤血球として液体窒素中に保存されていた。細胞は赤血球細胞1容に対し2容の蒸留水を加えることにより溶解された。溶血液は Sorvall RC-5B 冷却高速遠心分離機 (Du Pont Instruments) により $50,000 \times g$ で20分間遠心分離され、赤血球細胞膜をペレットとした。電気泳動を行う前に溶赤血球液は等量の可溶化液 [0.8% Ampholine (pH 3.5-10) (LKB), 9 M 尿素, 4% Nonidet P40 (NP-40), 5% 2-メルカプトエタノール] で希釈され、室温で少なくとも20分間放置された。2次元電気泳動は Iso-Dalt 装置 (Electro Nucleonics, Oak Ridge, TN) を用い、Rosenblum ら⁶ により報告されている方法に4種の改良を加えて行われた。1) 1次元目泳動において、溶赤血球液蛋白質の分布が最も広くしかも明瞭に分散するための pH 勾配を得るために、Ampholine の混合比を変えた一連のテストが行われた。我々の条件では、pH 3.5-10 と pH 5-7 の Ampholine を 3:1 の割合で混合し2%の Ampholine を作成した場合に最良の結果が得られた。(この調査期間を通じてただ1種の製造番号の Ampholine が使用された)。2) 赤血球溶血液の蛋白質が陰極側の電極液により変性するのを防ぐために、0.4% Ampholine (pH 3.5-10), 2 M 尿素, 2% NP-40, 2% 2-メルカプトエタノールを含む重層緩衝液が用いられた。等電点電気泳動を

electrode solution. Following focusing, the gels were extracted from the tubes and equilibrated as described by Rosenblum et al.⁴ Gels were stored at -80°C until run in the second dimension. Second dimension sodium dodecyl sulfate (SDS) electrophoresis was performed as previously described.² 3) The protein patterns in the gels were visualized by the modified silver staining method of Wray et al.⁷ 4) Initially, the first-dimension isoelectric focusing (IEF) was performed at night at ambient temperature. Since the laboratory is unheated at night, there was considerable variation in the ambient temperature, which in fact influenced polypeptide migration (Figure 1). During the latter half of these studies, all first dimension gels were run in a constant-temperature room at 25°C . Molecular weight (MW) standards used were phosphorylase A (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,100), and lysozyme (14,400).

行った後, Rosenblum ら⁴の方法によりゲルはチューブから抜き出され, 平衡化された. ゲルは, 2次元目泳動が行われるまで -80°C で保存された. 以前述べた方法²により, 2次元目ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 電気泳動は行われた. 3) Wray ら⁷の銀染色法の改良法により, ゲル中の蛋白質の泳動像を出現させた. 4) 最初, 1次元目等電点電気泳動 (IEF) は夜間, 室温で行われた. 実験室は夜間は暖房されていないので室温にかなりの変化があり, 事実, それがポリペプチドの泳動に影響を与えた (図1). この研究の後半では, すべての1次元目ゲルは 25°C の恒温室中で泳動された. 使用した分子量 (MW) の標準は, phosphorylase A (94,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,100), lysozyme (14,400) であった.

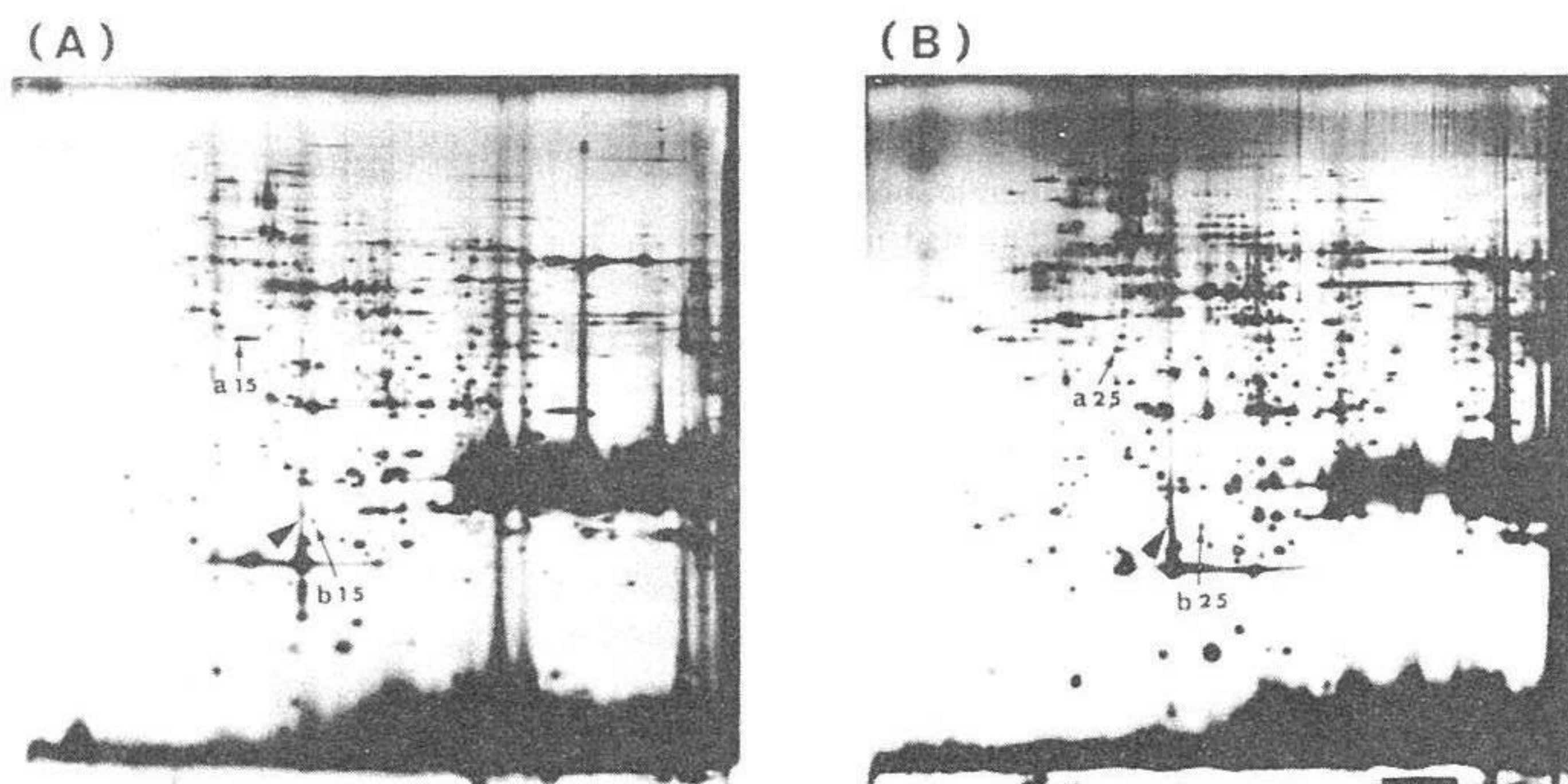


Figure 1. Effect of a 10°C difference in the temperature of first-dimension isoelectric focusing on polypeptide migration in 2-D gels. The first-dimension of gel A was run at 15°C and of gel B at 25°C . The positions and appearance of numerous polypeptides differ in the two gels, as illustrated by polypeptides C-007 and D-027 (Figure 2). C-007 consistently appears as a streak at 15°C (a15) but a discrete spot at 25°C (a25). D-027 at 15°C migrates 3 mm cathodally to the reference streak indicated by an arrow head (b15) but 7 mm cathodally at 25°C (b25).

図1 1次元目等電点電気泳動における 10°C の温度差が2次元ゲルのポリペプチド泳動に及ぼす影響. ゲルAは 15°C , ゲルBは 25°C で1次元目泳動が行われた. ポリペプチドC-007及びD-027 (図2)の例が示すとおり, 2種のゲルでは多数のポリペプチドの位置及び形状が異なっている. C-007は 15°C では常に線として現れるが(a15), 25°C では別々の点として現れる(a25). D-027は 15°C では矢印の先で示されたリファレンス線より3 mm陰極側に泳動するが(b15), 25°C では7 mm陰極側に泳動する(b25).

Source of Samples. Elsewhere we have described an extensive effort to determine whether exposure to the radiation of the atomic bombs has increased the frequency of mutations detectable with one-dimensional electrophoresis (1-DE) and enzyme activity measurement in the children of survivors.⁸⁻¹¹ The samples employed in the present study had been obtained when, in the course of the program just referenced, an examination of the nuclear family was necessary to determine if either a rare electrophoretic variant or enzyme activity variant was the result of mutation in the preceding generation. The packed erythrocytes of child, father, and mother had been stored in liquid nitrogen for from 0.5 to 4.5 years. We will base our tabulations in this paper on the findings in the children but confirm the genetic nature of any putative variant by an examination of the father and mother. The full sample of children consists of 56 males and 44 females. Although some of these parents had sustained significant radiation exposures at the time of the bomb detonations, all variants encountered proved to be inherited, so that the question of a radiation effect does not enter into these data.

RESULTS

Developing the Map. As the first step in developing a battery of highly reproducible polypeptides for scoring, an individual who had not previously examined these particular gels for genetic variation selected a battery of 72 spots as suitable for analysis. Our standard criteria are relative isolation of the spot and a density that would be clearly visible even if the intensity of the spot were reduced to half-normal. An attempt was then made to score these polypeptides for genetic variation. It developed that 17 of these spots could not be unambiguously scored with an accuracy $\geq 95\%$, and they were eliminated from the battery as unsuitable to the study of mutation.

The location of the remaining battery of 55 spots is shown in Figure 2. A principal focus of this paper is the question of ethnic differences in lysate variants between Japanese and predominantly Caucasoids; the latter as studied in Ann Arbor, Michigan.⁶ Although the differences in the techniques employed in the two locations involved were relatively small, only 27 of the 46 spots analyzed in Ann Arbor could, on the basis of the constellation of spots in which they participated, be identified with the necessary

試料の入手源. 1次元電気泳動(1-DE)及び酵素活性測定によって被爆者の子供に検出される突然変異の頻度が, 原爆放射線被曝によって増加しているかどうかを究明するために行った大規模な調査については, 別報で述べた.⁸⁻¹¹ 本研究で用いられた試料は, 上記のプログラムにおいて, まれな電気泳動上の変異型又は酵素活性変異型が直前の世代での突然変異の結果であるかどうかを決定するために被爆者の家族の検査が必要であったときに入手されたものである. 子-父-母の赤血球は, 液体窒素中に半年から4年半の間保存されていた. 本報では我々は子供の結果を基に集計を行うが, 変異型とみなされたものの遺伝的性質は, 父親と母親の検査によって確認する. 子供の全集団は男子56人, 女子44人からなる. その両親の幾人かは, 原爆炸裂時に高線量の放射線に被曝しているが, 検出された変異型はすべて遺伝的であることが判明したので, 放射線の影響に関する問題はこれらのデータには含まれていない.

結 果

遺伝地図の作成. 評価のために, 再現性の高い一群のポリペプチドを選定する第一段階として, これら特定のゲルによって遺伝的変異を調べた経験のない者が, 分析に適する72個からなる1群のスポットを選択した. 我々の選択基準は, スポットが相対的に他のスポットから離れていることと, スポットの強度が通常の半分に減少しても明確に見える強さであることである. その後, これらのポリペプチドについて遺伝的変異の評価が試みられた. これらのスポットのうち, 17個は95%以上の精度で明確な評価ができないことが明らかになったので, 突然変異の研究には不適当として群から除外された.

残り55個のスポットの位置を図2に示す. 本報の主な焦点は, 日本人集団と, 主として白人からなる集団における赤血球溶血液の変異型の人種差の問題である. 後者は Michigan 州 Ann Arbor で研究された.⁶ 二つの研究室で用いられた技法の差は比較的小さかったが, 彼らの用いたスポットの配置に基づくと, Ann Arbor で分析された46個中27個のスポットのみが, 必要な高い信頼水準で, 本研究において

high level of confidence in this study. The equivalences are (Ann Arbor designation given first): A-002, B-002; B-007, D-012; B-009, C-009; B-011, A-003; C-002, B-005; C-005, D-002; C-006, D-006; C-007, D-008; C-008, D-011; C-009, D-015; D-007, C-011; D-009 and D-010, C-012; D-013, D-027; D-014, C-022; D-015, D-030; D-019, C-017; E-001, D-017; E-002 and E-003, D-018; E-004, D-020; E-005, D-021; E-009, D-028; E-010, D-029; E-011, D-031; E-013, D-024; F-002, E-004.

確認された。同一スポットは下記のとおりである (Ann Arbor の名称を先に挙げる)。A-002, B-002; B-007, D-012; B-009, C-009; B-011, A-003; C-002, B-005; C-005, D-002; C-006, D-006; C-007, D-008; C-008, D-011; C-009, D-015; D-007, C-011; D-009 及び D-010, C-012; D-013, D-027; D-014, C-022; D-015, D-030; D-019, C-017; E-001, D-017; E-002 及び E-003, D-018; E-004, D-020; E-005, D-021; E-009, D-028; E-010, D-029; E-011, D-031; E-013, D-024; F-002, E-004.

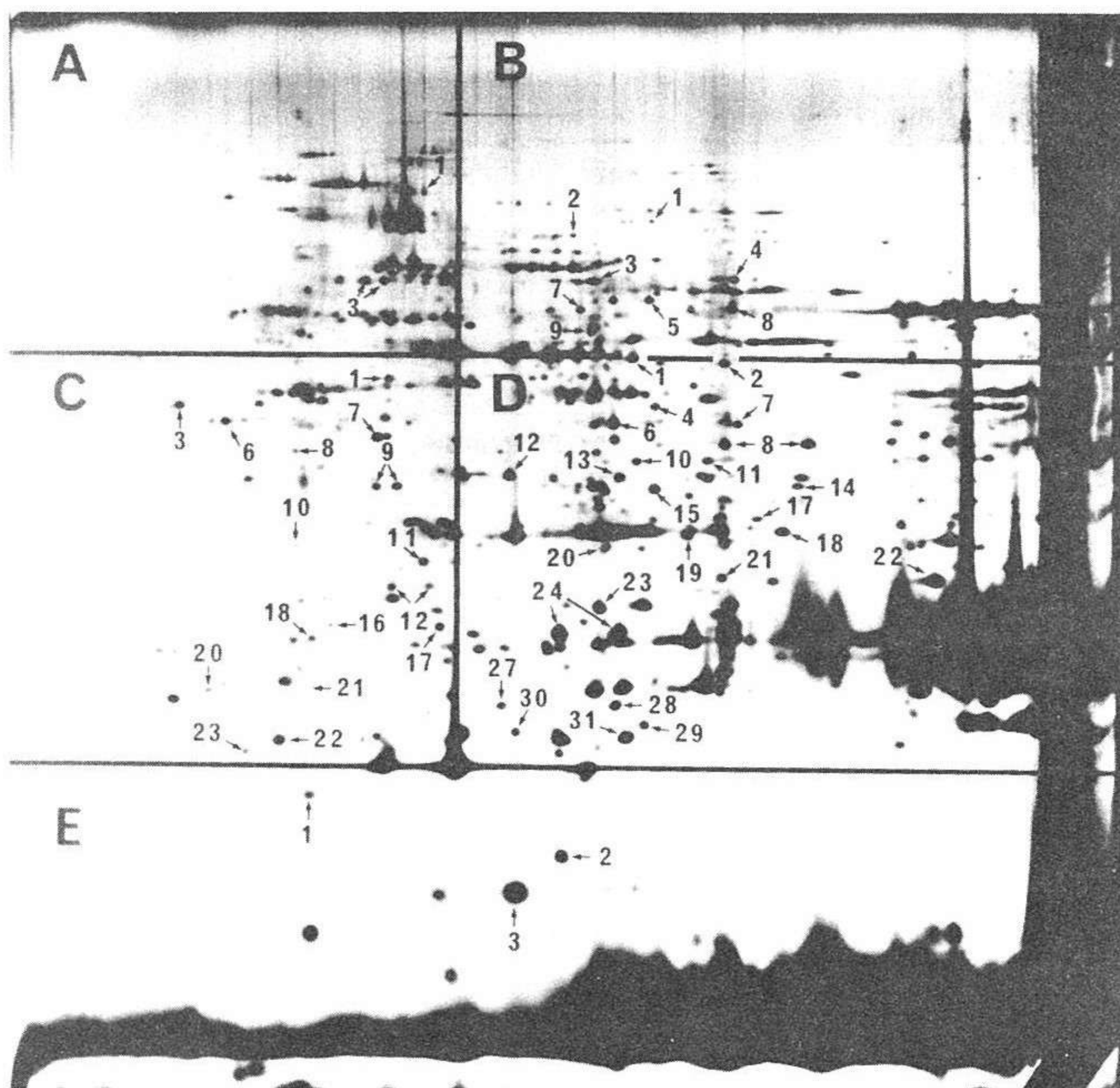


Figure 2. Designation of the red cell lysate polypeptides scored in this study. The gel pattern has been subdivided into five convenient regions, and the polypeptides suitable for scoring in each region numbered consecutively. The pattern is oriented with acidic side to the left and basic side to the right.

図2 本研究で評価された赤血球溶血液ポリペプチドの名称。泳動像は五つの適切な部分に分割され、評価に適するポリペプチドに各部分ごとに連続番号を付けた。この泳動像では酸性側が左、塩基側が右である。

Genetic Variation. Table 1 presents the findings with reference to the 14 polypeptides exhibiting genetic variation. In general, the occurrence of a variant was accompanied by an obvious decrease in the intensity of the spot occupying the normal position. Eight of the variable polypeptides had been identified in the Ann Arbor gels; their designations and the findings are also shown in Table 1. Of the six variable polypeptides in Japanese for whom no Caucasoid counterpart has been identified, none of them is found in a position which makes it likely to correspond to the one remaining unmatched variable polypeptide in Caucasoids (C-004).

遺伝的変異. 表1は、遺伝的変異を示すポリペプチド14種に関する結果を示したものである。一般的には、変異型の出現は正常な位置を占めるスポットの強度の明らかな減少を伴っていた。変異性ポリペプチドのうち8種は Ann Arbor のゲルで同定されており、それらの名称と結果も表1に示されている。白人集団での対応例が確認されていない日本人の変異性ポリペプチド6種はいずれも、白人集団における残り1種の対応しない変異性ポリペプチド(C-004)に相当する位置には認められなかった。

TABLE 1 PHENOTYPE AND ALLELE FREQUENCIES FOR THE VARIABLE POLYPEPTIDES ENCOUNTERED IN JAPANESE AND CAUCASIANS. χ^2 TESTS HAVE BEEN PERFORMED FOR AGREEMENT WITH HARDY-WEINBERG PROPORTIONS AND ETHNIC DIFFERENCES. ALL TESTS HAVE ONE DEGREE OF FREEDOM

表1 日本人集団及び白人集団で検出された変異性ポリペプチドの表現型及び対立遺伝子頻度。 χ^2 テストは Hardy-Weinberg 比率との一致性及び人種差を調査するために行われた。すべてのテストで自由度は1であった。

Japanese	Polypeptides													
	A-003	C-006	C-009	C-012	C-016	C-021	C-022	C-023	D-017	D-018	D-022	D-024	D-027	D-030
N*	91	65	77	89	90	99	83	86	94	93	39	81	54	99
NV**	6	29	21	11	8	1	16	14	5	7	45	17	38	1
V*	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	13	2	8	0
T	97	96	100	100	98	100	100	100	99	100	97	100	100	100
P	0.969	0.828	0.875	0.945	0.959	0.995	0.910	0.930	0.975	0.965	0.634	0.895	0.730	0.993
Q	0.031	0.172	0.125	0.055	0.041	0.005	0.090	0.070	0.025	0.035	0.366	0.105	0.270	0.007
χ^2	-	0.35	0.14	-	-	-	0.06	-	-	-	0.00	0.91	0.13	-

Caucasians	B-011	B-009	D09-10	D-014	E02-03	E-013	D-013	D-015
N	20	19	26	2	26	13	16	26
NV	4	7	0	21	0	10	8	0
V	0	0	0	2	0	3	2	0
T	24	26	26	25	26	26	26	26
P	0.917	0.865	1.000	0.500	1.000	0.692	0.769	1.000
Q	0.083	0.135	0.000	0.500	0.000	0.308	0.231	0.000
χ^2	-	-	-	11.56	-	0.246	0.462	-

χ^2 Ethnic	2.67	0.03	47.21	13.54	0.33
-----------------	------	------	-------	-------	------

*Homozygous for either normal (N) or variant (V). 正常型(N)又は変異型(V)のホモ接合

**Heterozygous for normal and variant (NV), but hemizygous for NV in D-030.

正常型及び変異型(NV)のヘテロ接合体, しかし D-030 においては NV はヘミ接合体である。

Allele frequencies are also presented in Table 1. For none of the variable polypeptides in Japanese does the distribution of phenotypes differ significantly from Hardy-Weinberg equilibrium proportions. This includes polypeptide C-022, whose counterpart in the Ann Arbor gels, D-014, did show such a departure (supported by genetic data). The validity of all the Japanese variants entered in Table 1 has been confirmed by the presence of the variant in the father and/or mother. Out of a possible total of 5,500 spots, only 52 could not be scored (0.9%). A total of 219 polypeptides exhibited heterozygosity for a genetic variant, yielding an index of heterozygosity of $4.0 \pm 0.3\%$.

At this writing, only 2 of these 55 spots have been identified, C-007 as actin, and D-022 as esterase D (ESD). The erythrocyte lysates of every individual sampled for this study have also been typed by 1-DE for variants of the following polymorphic systems: Adenosine deaminase, esterase D, acid phosphatase-1, cytoplasmic glutamate-oxaloacetate transaminase, glutamate-pyruvate transaminase, phosphoglucosmutase-1, phosphoglucosmutase-3, and 6-phosphogluconate dehydrogenase. With the exception of esterase D, none of the variation observed in these systems synchronizes with the variation observed in the 2-D PAGE preparations. In addition, rare electrophoretic variants of the nonpolymorphic enzymes, esterase A (ESA), phosphohexose isomerase (PHI), peptidase A (PEPA), adenylate kinase (AK), lactate dehydrogenase (LDH), carbonic anhydrase-1 (CA1), and phosphoglucosmutase-2 (PGM2) had been demonstrated in 20 of the individuals (ESA, 2 individuals; PHI, 7; PEPA, 4; AK, 1; LDH, 2; CA1, 3; PGM2, 1, respectively) among the 100 examinees; no corresponding variation was seen in the 2-D PAGE preparations. (The high frequency of these variants reflects the fact that many of the mother-father-child erythrocyte lysate combinations used had been specifically collected because of the occurrence of an electrophoretic variant in the child.)

Description of Variants. The variants encountered in this study can be briefly characterized as follows:

A-003. This polypeptide (MW ~70,000) appears to be identical with the B-011 of Rosenblum et al⁶; the variant, encountered in six persons,

対立遺伝子頻度も表1に示されている。日本人の変異性ポリペプチドで表現型の分布が Hardy-Weinberg 平衡式の比率より有意に異なるものはない。この中には、Ann Arbor のゲルにおける D-014 に対応する C-022 も含まれている。このペプチド D-014 は Hardy-Weinberg の平衡式の比率よりはずれている (遺伝的データに裏付けられた)。表1に示されているすべての日本人変異型の妥当性は、父親又は母親の少なくともいずれか一方に変異型が存在することにより確認されている。合計5,500個の評価可能なスポットのうち、52個(0.9%)のみが評価されなかった。合計219個のポリペプチドが遺伝的変異型のヘテロ接合型を示し、ヘテロ接合性指標は $4.0 \pm 0.3\%$ であった。

この論文を執筆している時点で、これら55個のスポットのうち2種類のみが同定された。すなわち C-007 が actin であり、D-022 が esterase D (ESD) である。本研究のための試料とされた対象者の赤血球溶血液は1次元電気泳動法により下記の多形系の変異型に関して型判定が既に行われている。Adenosine deaminase, esterase D, acid phosphatase-1, cytoplasmic glutamate-oxaloacetate transaminase, glutamate-pyruvate transaminase, phosphoglucosmutase-1, phosphoglucosmutase-3, 6-phosphogluconate dehydrogenase. Esterase D を除いては、これらのシステムで観察された変異のいずれも 2-D PAGE で観察された変異とは一致しない。更に、非多形性酵素である esterase A (ESA), phosphohexose isomerase (PHI), peptidase A (PEPA), adenylate kinase (AK), lactate dehydrogenase (LDH), carbonic anhydrase-1 (CA1), phosphoglucosmutase-2 (PGM2) のまれな電気泳動上の変異型が、被検者100人のうち20人に検出された (ESA 2人, PHI 7人, PEPA 4人, AK 1人, LDH 2人, CA1 3人, PGM2 1人)。これらに対応する変異は 2-D PAGE 上においては観察されなかった。(これらの変異型の頻度が高いことは、使用した母-父-子の赤血球溶血液の多くが、子供に電気泳動上の変異体が検出されたため特に集められたものであるという事実を反映している。)

変異型の特徴. 本研究で検出された変異型の特徴を簡単に述べると下記のとおりになる。

A-003. このポリペプチド (MW ~70,000) は Rosenblum ら⁶ の B-011 と同一のものであると思わ

appears to be the same as the previously identified polymorphism of B-011 (Figure 3a). Approximately 3 mm anodally is a second spot which varies in a coordinate fashion; this coordinate variation was not reported by Rosenblum et al.⁶ The frequency of the variant allele does not differ in the two populations.

れる。すなわち6人に検出されたこの変異型は、以前同定されたB-011の多形現象と同じもののようである(図3a)。約3mm陽極側に連動して変異している第2のスポットがある。Rosemblumら⁶はこの連動して起こる変異については報告していない。変異型対立遺伝子の頻度は両集団で差がない。

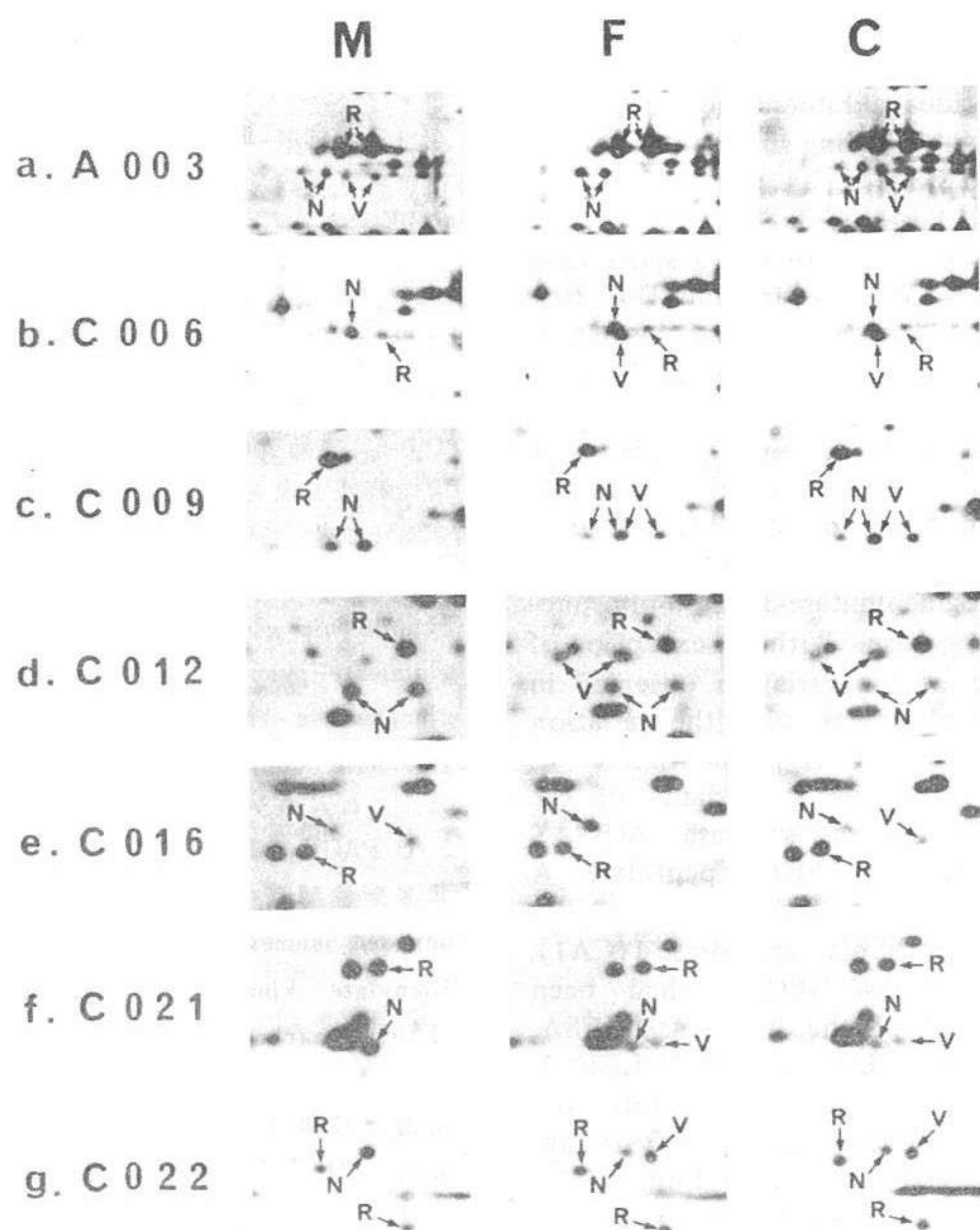


Figure 3. Photographs of the genetic variants observed in this study. The various variants are designated as V and the corresponding normal polypeptides as N. In all photos, a convenient reference spot (R) has been designated. In rows a, c, and d, both the normal and variant phenotypes are characterized by a set of two spots. A detailed description of the findings is in the text.

図3 本研究で観察された遺伝的変異型の写真。種々の変異型はVと命名され、対応する正常型ポリペプチドはNと命名された。いずれの写真においても適切なリファレンススポット(R)を定めた。a, c, dでは、正常及び変異型の表現型は2個のスポットが1組になっているのが特徴である。結果の詳細は本文を参照。

C-006. This polypeptide (MW ~44,000) has the lowest isoelectric point of any of the variant polypeptides. A single type of variant was seen in 31 persons (Figure 3b). It migrates slightly cathodal to and below the normal spot, sometimes not separating clearly from the normal spot. About 1 mm to the left of C-006 is a faint spot which appears to vary coordinately. This is one of the more frequent variants encountered in this study; its counterpart was not observed to vary in Caucasoids.

C-009. This polypeptide (MW ~39,000) appears to be identical with B-009 of Rosenblum et al.⁶; the single type of variant encountered in 23 persons appears the same as the polymorphism of B-009 in Caucasoids and has virtually the same allele frequency (Figure 3c). Approximately 3 mm anodally is a second spot which varies in a coordinate fashion; confusion may arise because the more anodal variant spot may be superimposed on the more cathodal normal spot.

C-012. This polypeptide (MW ~33,000) was observed to vary in 11 persons. In these persons a second spot 5 mm anodally varied coordinately (Figure 3d). The variant spots migrate 5 mm anodally and 3 mm above the normal. As the more cathodal spot of this variant partially overlaps with a faint spot representing an independent gene product, this variant spot appears to stain more intensely than normal in heterozygotes. The two normal spots of this system appear to correspond to spots D-009 and D-010 of Rosenblum et al.⁶; no variation was observed in this pair of polypeptides in Caucasoids.

C-016. This polypeptide (MW ~31,000) exhibited in eight persons a variant which migrated 9 mm cathodal and 1 mm below the normal position (Figure 3e).

C-021. This polypeptide (MW ~28,000) was observed to vary in a single individual, who exhibited a spot 2 mm cathodally and slightly higher in the MW axis (Figure 3f). This spot was also present in the father and one sibling, so that the genetic nature of the spot is confirmed. The variant in heterozygotes appears of equal intensity to the normal polypeptide.

C-022. This polypeptide (MW ~26,000) appears to be identical with D-014 of Rosenblum et al.⁶

C-006. このポリペプチド (MW ~44,000) は変異型ポリペプチドのうちで最も低い等電点をもつ。単一種類の変異型が31人に観察された(図3b)。この変異型は正常型スポットより少し陰極側で下側に泳動するが、正常型のスポットから完全に分離していないこともある。C-006の約1 mm 左側には、C-006に連動して変異していると思われる弱いスポットがある。これは本研究において非常に高い頻度で検出された変異型の一つである。これに対応する変異は白人集団では観察されなかった。

C-009. このポリペプチド (MW ~39,000) は Rosenblum ら⁶ の B-009 と同一のものと思われる。23人に検出された単一種類の変異型は白人集団の B-009 の多形現象と同じであると思われ、実際的には同じ対立遺伝子頻度を示した(図3c)。約3 mm 陽極側には連動して変異する第2のスポットがある。より陽極側の変異型のスポットはより陰極側の正常型のスポットに恐らくは重なっているので誤認が起きるかもしれない。

C-012. このポリペプチド (MW ~33,000) は11人に変異が観察された。これらの対象者では、5 mm 陽極側に存在する第2のスポットが連動して変異していた(図3d)。変異型のスポットは正常型の5 mm 陽極側で3 mm 上側に泳動する。この変異型のより陰極側のスポットは別の遺伝子産物の弱いスポットに部分的に重なるので、ヘテロ接合体においてこの変異型スポットは正常型スポットより濃く染色されると思われる。このシステムの2個の正常型スポットは Rosenblum ら⁶ のスポット D-009 及び D-010 に相当すると思われる。白人集団では、この一対のポリペプチドに変異は観察されなかった。

C-016. このポリペプチド (MW ~31,000) については、正常型の位置より9 mm 陰極側で1 mm 下側に泳動する変異型が8人に観察された(図3e)。

C-021. このポリペプチド (MW ~28,000) は1人に変異が観察され、その対象者は2 mm 陰極側かつ分子量方向に少し高いスポットを示した(図3f)。このスポットは父親及び同胞1人にも存在したので、このスポットの遺伝的性質は確認されている。ヘテロ接合体の変異型は、正常型ポリペプチドと同じ染色強度をもつように思われる。

C-022. このポリペプチド (MW ~26,000) は Rosenblum ら⁶ の D-014 と同一のものと思われる。

The single type of variant observed in 17 persons, migrating 3 mm cathodally and slightly below the normal position (Figure 3g), corresponds to the polymorphism of this polypeptide observed in Ann Arbor but the allele frequencies differ significantly ($\chi^2=47.2$, $df=1$, $p<0.001$). The variant usually stains more intensely than normal in heterozygotes.

C-023. This polypeptide (MW ~25,000) exhibited a variant in the MW axis in 14 persons (Figure 4a). The variant is found about 1 mm below the normal position, and in heterozygotes is of similar staining intensity.

17人に観察された単一種類の変異型は、正常型の位置の3 mm 陰極側かつ少し下側に泳動し(図3g), Ann Arbor で観察されたこのポリペプチドの多形現象に相当するが、対立遺伝子頻度は有意に異なる($\chi^2=47.2$, $df=1$, $p<0.001$). ヘテロ接合体では、この変異型は普通正常型より濃く染色される。

C-023. このポリペプチド(MW ~25,000)は14人について分子量方向の変異型を示した(図4a). この変異型は正常型の位置の約1 mm 下側に認められ、ヘテロ接合体においては同様の染色強度を示す。

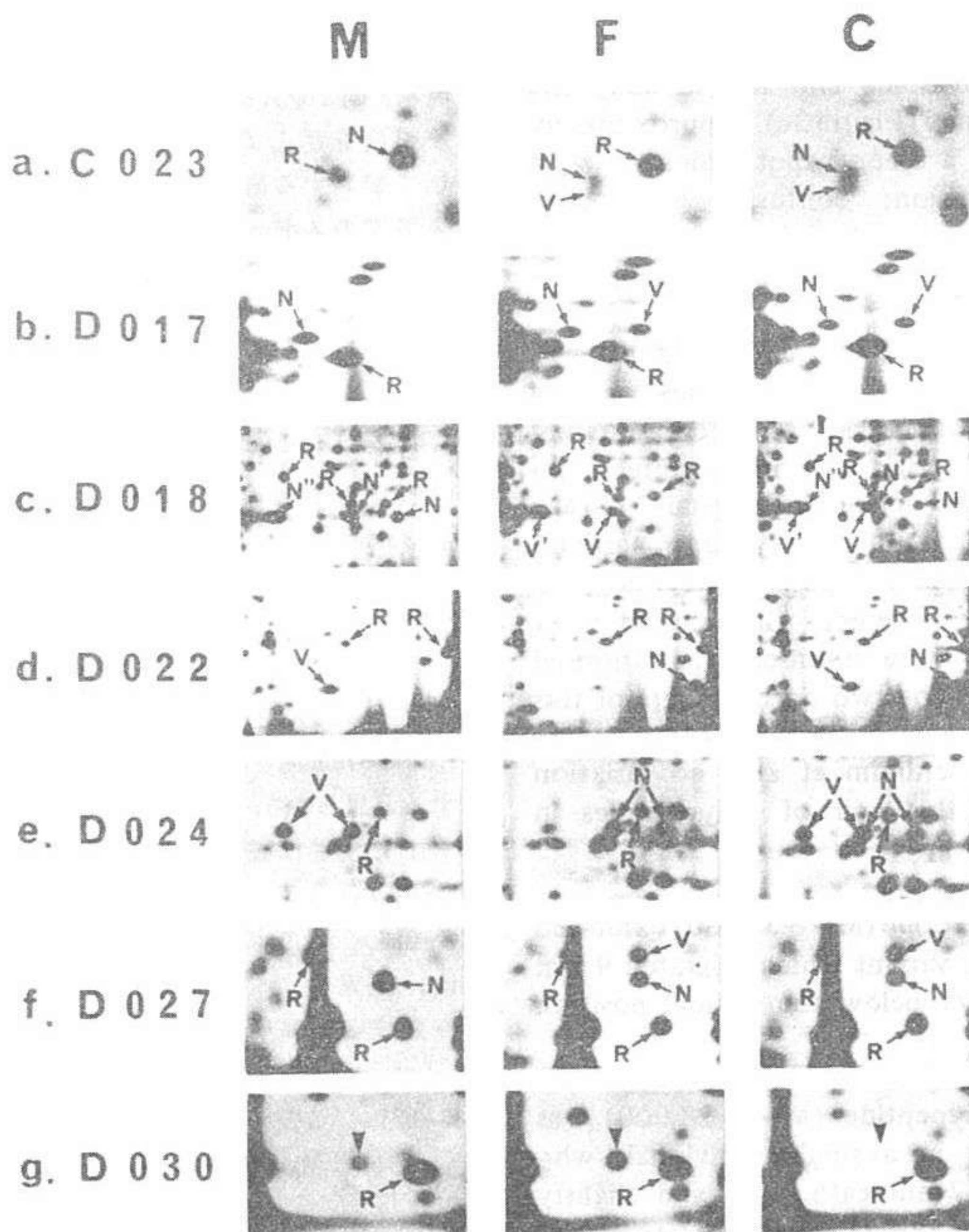


Figure 4. Further photographs of the genetic variants observed in this study. The system of designation is the same as in Figure 3. In rows c and e, the phenotype is a set of two or three spots which vary concordantly. Row g illustrates a sex-linked null variant. A detailed description of the findings is in the text.

図4 本研究で観察された遺伝的変異型の写真。命名法は図3の場合と同じである。c及びeでは表現型は連動して変化する2個又は3個のスポットが1組となっている。gは伴性スル変異型を示す。結果の詳細は本文を参照。

D-017. This polypeptide (MW ~37,000) exhibited the same type of variant in five persons. The variant migrates 5 mm cathodally to normal and in heterozygotes appears of equal intensity to the normal spot (Figure 4b).

D-018. This polypeptide (MW ~36,000) was observed to vary in seven persons. Figures 4c and 5 illustrate the findings in a heterozygous child whose mother was homozygous for the normal allele and father homozygous for the variant allele. In individuals with the variant, two other spots, arbitrarily designated as N' and N'' according to their relative distance from the cathodal side, varied coordinately with N. N' and N'' respectively migrate about 10 and 22 mm anodally to D-018. The variant (V) of D-018 migrates 12 mm anodally to N and slightly anodal to N', sometimes partially overlapping N'. The second variant spot (V') appears to overlap with a spot representing an independent gene product, so that this spot appears to stain more intensely than the second normal spot (N') in heterozygotes. A postulated third variant spot (V'') could not be identified; its expected position corresponds to a very congested region of the gel. Two of the normal spots (N and N') of this system appear to correspond to spots E-002 and E-003 of Rosenblum et al⁶; no variation was observed in this pair of polypeptides in Caucasoids.

D-017. このポリペプチド (MW ~37,000) は 5 人について単一種類の変異型を示した。この変異型は正常型より 5 mm 陰極側に泳動し、ヘテロ接合体においては正常型のスポットと同じ強さであると思われる (図4b)。

D-018. このポリペプチド (MW ~36,000) は 7 人に変異が観察された。図4C 及び 5 は、正常型対立遺伝子のホモ接合体を示す母親と変異型対立遺伝子のホモ接合体を示す父親との間のヘテロ接合体の子供に関する結果を示す。この変異型をもつ対象者においては、陰極からの相対的距離により任意に N' 及び N'' と名付けた他の 2 個のスポットが N と連動して変異していた。N' 及び N'' はそれぞれ D-018 より約 10mm 及び約 22mm 陽極側に泳動する。D-018 の変異型 (V) は N より 12mm 陽極側、また N' より少し陽極側に泳動し、ときどき部分的に N' に重なることもある。変異型の第 2 スポット (V') は別の遺伝子産物のスポットと重なると考えられるので、ヘテロ接合体でこのスポットは正常型の第 2 のスポット (N') より強く染色されると思われる。存在すると思われる変異型第 3 のスポット (V'') は確認されなかった。その予想位置はゲルの極度にスポットが凝集している部分と一致する。このシステムの正常型スポットのうち 2 個 (N 及び N') は Rosenblum ら⁶ のスポット E-002 及び E-003 に対応するようである。白人集団では、これら一対のポリペプチドに変異は観察されなかった。

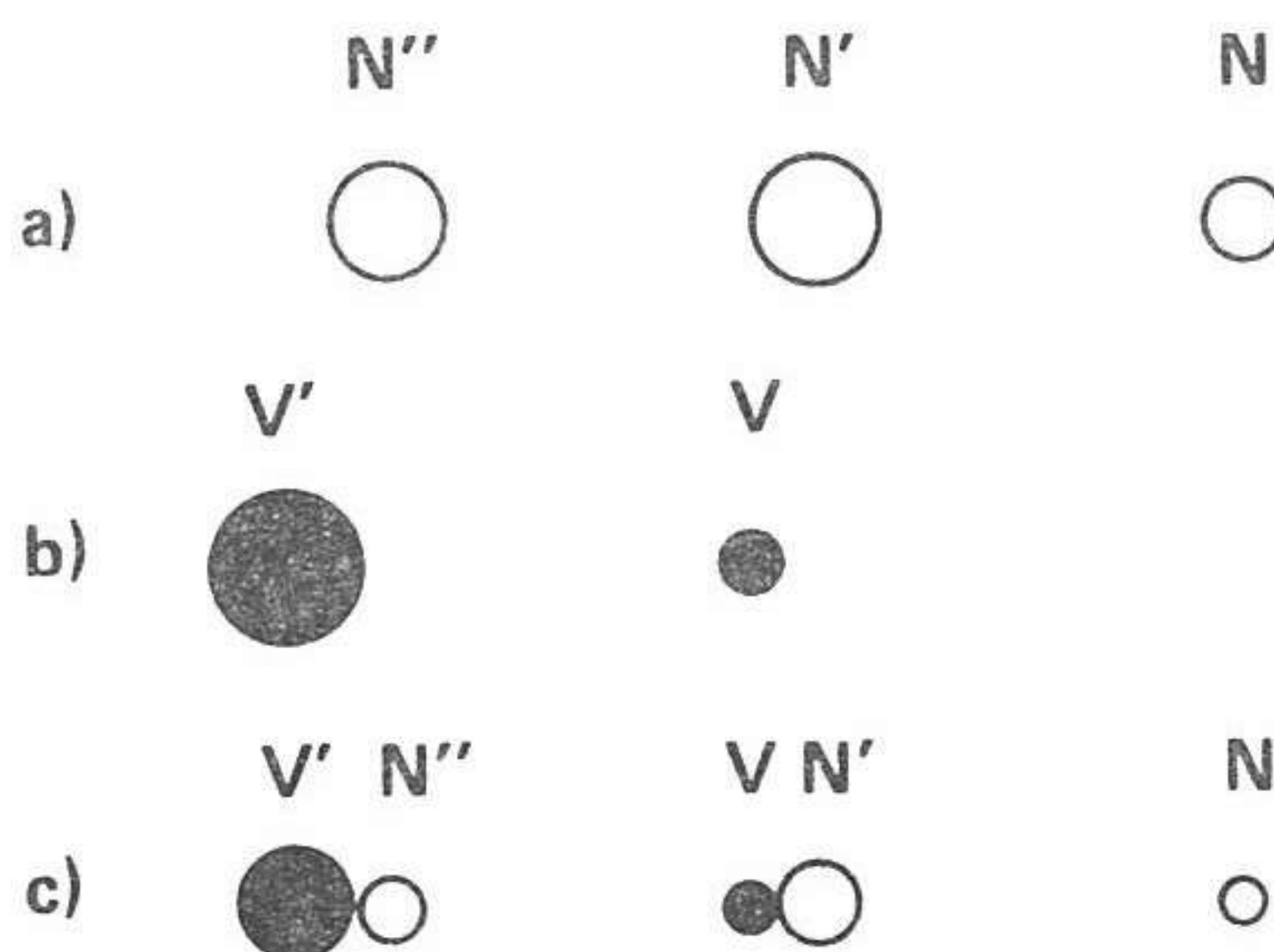


Figure 5. Diagrammatic representations of genetic variation involving D-018. a) Mother; Normal homozygote. b) Father; Variant homozygote. c) Child; Heterozygote. A detailed description of the findings is in the text.

図5 D-018に関する遺伝的変異の図示。a) 母親；正常型のホモ接合体。b) 父親；変異型のホモ接合体。c) 子供；ヘテロ接合体。結果の詳細は本文を参照。

D-022. This polypeptide is ESD, MW 33,000 in 2-D PAGE gels.¹² The single type of variant encountered consistently migrates 20 mm anodally to the normal position in our system (Figure 4d, but see Kondo et al¹²). Approximately 20 mm anodally is a second faint spot which varies in a coordinate fashion; the more anodal normal spot may in some gels be superimposed on the main spot of the variant. The classification of 2-D gels as heterozygous or homozygous for the variant corresponded in every case to the classification with 1-DE.

D-024. This polypeptide (MW ~30,000) exhibited in 19 persons, a single type of variant migrating 8 mm anodally to normal (Figure 4e). A second polypeptide, 8 mm anodally to D-024, exhibited coordinate variation. The more cathodal of the variant spots thus corresponds to the more anodal of the two polypeptides comprising D-024. An apparently identical variant was observed in the Caucasoid series but the coordinate variation was not detected. The allele frequencies differ significantly in Japanese and Caucasoids ($\chi^2=13.54$, $df=1$, $p<0.001$).

D-027. This polypeptide (MW ~27,000) exhibited a MW variant identical with one detected in the Ann Arbor series (D-013). The single type variant, present in 46 persons, migrated about 1 mm above the normal position and was often of lesser intensity (Figure 4f). The frequency of the variant allele did not differ significantly from the findings in Rosenblum et al.⁶

D-030. This polypeptide (MW ~26,000) was lacking in a single male. The mother exhibited approximately half the normal spot intensity (Figure 4g). The study of four additional siblings exhibited the situation diagramed in Figure 6. We interpret these patterns as the result of sex-linkage, the mother and one sister being heterozygous for a null variant, the proband and one brother being hemizygous for the null. This polypeptide does not seem to correspond to any of the five polypeptides whose locus was assigned to the human X by cell hybridization experiments.¹³

In addition to these 14 polypeptides in which the case for genetic variation is clear, we have encountered in two subjects possible genetic variation involving D-008. The apparent variant pattern is complex, and a description is delayed pending further studies.

D-022. このポリペプチドは ESD であり, 2-D PAGE ゲルで分子量33,000である。¹² 検出された単一種類の変異型は, 我々のシステムでは一貫して正常型の位置よりも 20mm 陽極側に泳動する(図4d, しかし近藤ら¹²も参照)。約 20mm 陽極側には連動して変異する第2の弱いスポットがある。幾つかのゲルではより陽極側に位置する正常型スポットは変異型の主要スポットに重なることもある。変異型のヘテロ接合であるかホモ接合であるかについての2次元ゲルの分類は, いずれの場合も1次元電気泳動による分類と一致した。

D-024. このポリペプチド(MW~30,000)は19人について正常型より8mm 陽極側に泳動する単一種類の変異型を示した(図4e)。D-024より8mm 陽極側の第2のポリペプチドも連動した変異を示した。したがって, 変異型スポットのうちより陰極側のものは, D-024(正常型)の2個のポリペプチドのうちより陽極側のスポットに一致する。白人集団においても同一と思われる変異型が観察されたが, 連動して起こる変異は検出されなかった。対立遺伝子頻度は日本人と白人では有意に異なる($\chi^2=13.54$, $df=1$, $p<0.001$)。

D-027. このポリペプチド(MW~27,000)は Ann Arbor の研究で検出されたもの(D-013)と同一の分子量の変化した変異型を示した。46人に存在した単一種類の変異型は正常型の位置の約1mm 上側に泳動し, 多くの場合染色濃度は劣っていた(図4f)。変異型対立遺伝子の頻度は, Rosenblum ら⁶の結果とは有意に異なっていた。

D-030. 男性1人にはこのポリペプチドが欠損していた。母親は正常型スポットの約半分の濃度を示した(図4g)。他の4人の同胞を調査したところ, 図6に示された状態が認められた。我々はこのパターンを伴性遺伝の結果と解釈した。すなわち母親と姉妹1人がヌル変異型のヘテロ接合を示し発端者と兄弟1人がヌル変異のヘミ接合を示した。このポリペプチドは, 細胞雑種形成実験¹³によってヒトX染色体上にその遺伝子座が存在することが指摘されている5種のポリペプチドのいずれにも相当しないように思われる。

遺伝的変異の明確なこれら14種のポリペプチドに加えて, 我々は D-008 に遺伝的変異と思われるものを対象者2人に検出した。明確な変異型パターンは複雑であり, 今後の調査の課題とする。

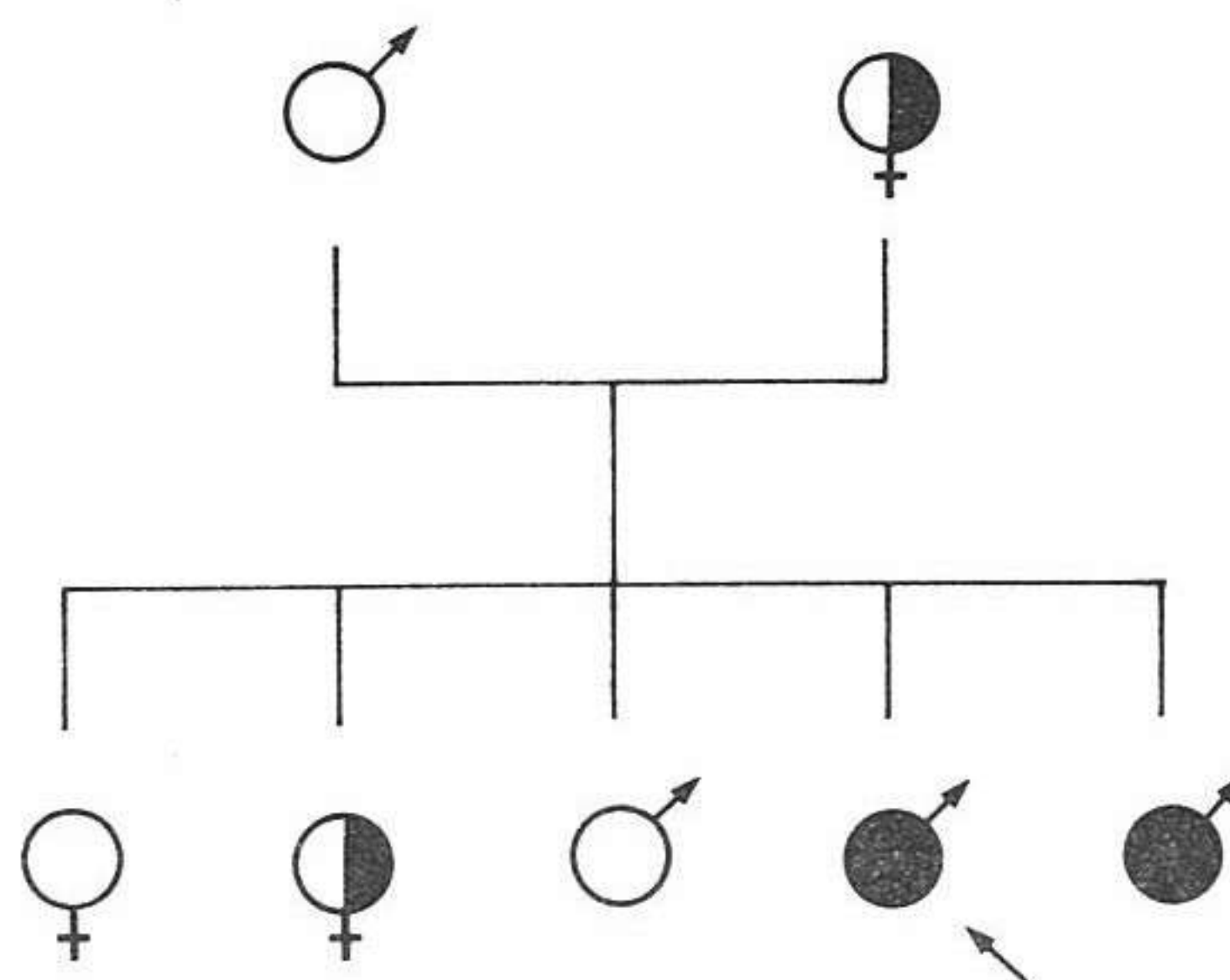


Figure 6. Pedigree of the family illustrating segregation of a sex-linked variant of D-030 characterized by absence of gene product. ♀, ♂; Normal female and male. ♂; Hemizygous male. ♀; Heterozygous female. ↑; Propositus.

図6 遺伝子産物の欠損が特徴であるD-030の伴性変異型の家系図。♀, ♂; 正常型を示す女性及び男性。♂; ヘミ接合型を示す男性。♀; ヘテロ接合型を示す女性。↑; 発端者。

DISCUSSION

Fourteen of the 55 polypeptides scored exhibited genetic variation. Two of these 14 were variable in a single individual, so that this variation may not yet be termed polymorphic. It may, rather, correspond to the "rare" (i.e., nonpolymorphic) variants encountered with a frequency of 1-2 per 1,000 in 1-DE. Conservatively, then, 22% of these polypeptides were characterized by genetic polymorphisms; the corresponding figure emerging from 1-DE studies of a variety of proteins, the products of 104 different genetic loci, is 23%.¹⁴ For the latter, the index of heterozygosity was 6.3%. Our observed index of heterozygosity for these lysate proteins is $4.0 \pm 0.3\%$; the corresponding figure for the only other study of this nature, on Caucasoids, was $3.1 \pm 0.5\%$.⁶ This is significantly less than the amount of variation observed in 2-D PAGE preparations of plasma by ourselves,¹⁻⁵ but significantly more than that observed by others examining a variety of other types of preparations.¹⁵⁻¹⁹ We have previously pointed out that there is an inverse relationship between the number of polypeptides scored by the investigator and the index of heterozygosity reported, and suggested that the efforts made to score more polypeptides than the preparations warrant, especially in the absence of family material, are a major reason for the lower indexes reported by many other investigators.²⁰

考 察

評価されたポリペプチド55種のうち14種が遺伝的変異を示した。これら14種のうち2種は1人の対象者においてのみ変異していたので、この変異はまだ多形とは言えないかもしれない。むしろ、これは1次元電気泳動法により1,000当たり1~2の頻度で検出された「まれな」（すなわち非多形の）変異型に相当する。したがって、控え目に見積もって、これらのポリペプチドの22%は遺伝的多形性の特徴を示したことになる。104種の異なった遺伝子座の産物である様々な蛋白質に関する1次元電気泳動調査で得られたこれに相当する値は23%である。¹⁴ 後者に関しては、ヘテロ接合性指標は6.3%であった。我々の観察したこれら溶赤血球液蛋白質のヘテロ接合性指標は $4.0 \pm 0.3\%$ である。他の唯一のこの種の調査で白人に得られた対応する値は $3.1 \pm 0.5\%$ であった。⁶ これは、我々により血漿の2-D PAGEで観察された変異量¹⁻⁵よりも有意に少ないが、他の研究者により各種試料を検査することにより観察された結果¹⁵⁻¹⁹より有意に多い。以前に我々は研究者によって評価されたポリペプチドの数と報告されたヘテロ接合性指標の値との間に逆の関係があることを指摘し、更に、特に家族資料がない場合に試料が保証する以上のポリペプチドを評価しようとする試みが、他の多くの研究者²⁰により報告された低い指標の主な原因になっていることを示唆した。

On the other hand, there may indeed be differences between tissues, cell types, and plasma in the frequency with which genetic variants are encountered. The index of heterozygosity of 6.1% from 1-DE is dominated by plasma and erythrocyte lysate proteins. In Japanese our index from 2-D PAGE for plasma and lysate preparations combined is $4.3 \pm 0.2\%$. We have not yet examined some of the human tissues (brain, kidney) and cell types (lymphocytes, fibroblasts) examined by others, and would not exclude the possibility of some real differences, albeit, we suspect, not as great as these earlier reports suggest.

For 7 of the 14 polypeptides exhibiting genetic variation in this study, coordinate variation was observed in a second (or third) nearby polypeptide; presumably one of the two (or three) polypeptides is primary and the other(s) derivative. Two of the variant polypeptides are in the molecular weight axis. These findings correspond to our previous experience that about 20% of polypeptide variants in 2-D gels are primarily in the molecular weight axis.²

Of the eight presumably identical polypeptides that were variable either in these gels or the gels from Caucasoids scored in Ann Arbor, C-012 and D-018 were polymorphic in Japanese but not in Caucasoids, and there were significant allele frequency differences for C-022 and D-024. If the present data are combined with the data on plasma proteins, ethnically significant differences in allele frequencies have been observed in 4 of the 10 polymorphic systems which have been identified in 2-D gels in both populations. These differences are based on small numbers, and some may not persist, but it seems clear these systems will be of great anthropological interest.

In our opinion, the gels now have the reproducibility that an appropriately chosen battery of polypeptides could be used for studies of the rate with which mutation results in electromorphs, an application of the 2-D PAGE technique, which, of course, demands a greater degree of technical reliability than studies of genetic variation. However, further improvements are in sight. For those preparations which cannot be isotopically labeled, the chief possibility would appear to be the use of multiple pH gradients, as a means of achieving not only

一方、組織、細胞の種類、血漿では、遺伝的変異型が検出される頻度に実際に差があるかもしれない。1次元電気泳動法によって得た6.1%というヘテロ接合性指標の大部分は、血漿及び赤血球溶血液蛋白質によるものである。日本人集団に関して、血漿及び溶赤血球試料について行われた2-D PAGEにより得られた指標を合わせた値は $4.3 \pm 0.2\%$ である。他の研究者により検査された幾つかのヒト組織(脳、腎)及び細胞(リンパ球、線維芽細胞)については、まだ検査していないので、事実上の差がある可能性は否定できない。しかし我々はこれらが以前の報告が示唆するほど大きな差ではないように思う。

本研究で遺伝的変異を示したポリペプチド14種のうち7種に関しては、近接する第2(又は第3)のポリペプチドに連動して生ずる変異が観察された。恐らくそれら2種(又は3種)のポリペプチドのうち1種が遺伝子の第1次産物であり、他はそれらの誘導体であろう。変異型ポリペプチドのうち2種は分子量方向にある。これらの結果は、2次元ゲルにおいてはポリペプチド変異型の約20%が主に分子量方向の変異であるという我々の以前の結果²に一致する。

本研究で使用したゲル又はAnn Arborで評価された白人のゲルのいずれかにおいて変異性を示した恐らく同一の8種のポリペプチドのうち、C-012及びD-018は日本人集団では多形であったが白人集団では多形でなく、C-022及びD-024に関しては対立遺伝子頻度に有意な差があった。本研究のデータと血漿蛋白質に関するデータを合わせると、両集団において2次元ゲルで確認された10個の多形系のうち4個において対立遺伝子頻度に有意な人種間差が観察されたことになる。これらの差は少数の検査に基づくものであり、永続的には正しくないものがあるかもしれないが、これらの系が人類学的に極めて興味深いことは明らかであると思われる。

我々の意見では、ゲルは現在高い再現性をもっているため、適切に選択された一連のポリペプチドは、electromorphとして見られる突然変異率の調査には使用可能である。勿論突然変異調査への2-D PAGEの応用は、遺伝的変異の研究より当然より高度な技術的信頼性を必要とする。しかし、一層の改良がまもなく行われるであろう。同位元素による標識が不可能な試料に関しては、主な可能性は種々のpH勾配

better separation of spots but also better visualization of some of the proteins at the current upper and lower IEF bounds. For samples that can be labeled isotopically, such as cultured lymphocytes or fibroblasts, the use of electronic autofluorography to impart a greater dynamic range to quantification of polypeptide spots²¹ should be especially useful in the search for null variants characterized by lack of polypeptide formation.

There is an urgent need for standardization of procedures between laboratories. Without this, appropriate comparisons are impossible. For instance, as a result of the relatively minor technical differences between the procedures used in the present study and in the University of Michigan study, only 27 of the 46 polypeptides scored in the Michigan study could be unequivocally identified by ourselves. In time, as the various polypeptides are specifically identified, this problem will decrease. For the present, with the techniques evolving so rapidly, it is probably premature to attempt a standardization.

There is currently considerable interest in the possibility that the study of mutation can be carried to the DNA level.²² This is an exciting prospect. We suggest that in the context of population monitoring, the experience with 2-D PAGE can provide an important standard of comparison. Perhaps the most appropriate way to proceed is in terms of output per technician year. In such a calculation there are two considerations. Firstly, a certain fraction of gels will for various reasons be substandard and have to be repeated; we estimate about 10% or less. Secondly, up to this point in time we have routinely run preparations from both parents together with the individual's preparation, to have an immediate check available on the genetic nature of any apparent variant. Our familiarity with the lysate patterns has now reached the point where we feel parental gels need not be run routinely, but only in the event of an unusual finding, i.e., a rare variant rather than a common polymorphism. Let us estimate that for the present, an examination of the corresponding gels from the parents will be necessary for 30% of the primary gels. Thus of each 100 gels, roughly 56 will be primary gels, 34 parental gels, and 10 repeats. In our experience, a team of two technicians should, with allowance for reruns, family studies, scoring, etc., completely

の使用であると思われる。これは現在の IEF の上限及び下限にある幾つかのスポットのより明確な分離だけでなく、幾つかの蛋白質をより良く検出することである。培養リンパ球や線維芽細胞など、同位元素による標識が可能な試料に関しては、ポリペプチドのスポットの定量化に有効な方法であるエレクトロニックオートフルオログラフィー法²¹の使用が、特にポリペプチド形成能の欠如を特徴とするヌル変異型の検出に役立つはずである。

早急に研究室間で方法を統一する必要がある。そうしなければ適切な比較は不可能である。例えば、本研究と Michigan 大学の研究で用いた方法に比較的小さいとはいえ、技術的な差があるため、Michigan の調査で評価された46種のポリペプチドのうち27種のみが我々により明確に同定された。様々なポリペプチドが明確に同定されているので、やがてこの問題も減少するであろう。現在のところ技術は急速に発達しつつあり、恐らく統一を試みるには時期尚早であろう。

突然変異の研究が DNA レベルにまで進められる可能性に現在大きな関心が寄せられている。²² これは興味深い展望である。我々は集団調査では、2-D PAGE を用いた調査の経験が比較のための重要な基準を提起できると考えている。恐らく議論を進めるうえでの最適の方法は、技術員の年あたりの産出力の観点から考えることであろう。このような計算においては二つのことを考慮に入れなければならない。第1に、様々な理由により、ゲルのある部分は標準以下となり、再泳動されねばならない。我々はこれを約10%以下と見積もっている。第2に、これまで我々は、変異型と思われるものの遺伝的性質を早急に検査するために、個人の試料と共に両親の試料についても常時電気泳動を行ってきた。我々は赤血球溶血液の泳動像に精通してきたので、両親のゲルの電気泳動は常に行う必要はなく、異常結果、すなわち一般的な多形現象を示す変異型よりむしろまれな変異型の場合にのみ行う必要があると考えるようになった。現時点では両親から得た対応ゲルの検査は第1次検査ゲルの30%について必要であると見積もっている。100枚のゲルのうち約56枚が第1次調査用(子供)のゲル、34枚が両親のゲル、10枚が再泳動用ゲルとなる。我々の経験によると再泳動、家族調査、評価などを行うことを考慮に入れても、1組2名の技術員は1週間当たり少なくとも25枚に相当

process the equivalent of at least 25 test gels per week, each gel yielding information on some 50 polypeptides. This amounts to some 125,000 locus tests per year for mutations resulting in electromorphs. Let us assume that electrophoresis detects 1/3 of the nucleotide substitutions in exons and that the average polypeptide requires 1,200 nucleotides for its specification. Then the number of nucleotides effectively scanned per year by two technicians is $(1,200/3) \times 125,000 = 50,000,000$, at a relatively low cost for supplies. The 2-D methodology should thus be relatively effective as compared with current DNA technologies²³ in screening for mutations resulting in nucleotide substitutions. This would recommend the 2-D technique for studies of chemical mutagenesis, where nucleotide substitutions appear to be a major type of lesion. On the other hand, a principal current drawback of the 2-D approach to the study of mutation is the inability to detect heterozygotes for gene-inactivation mutations with the necessary accuracy, and the technique would not be as powerful, relatively speaking, in studies of radiation mutagenesis, where loss-of-activity mutations appear to predominate.

する調査用ゲルを完全に処理できるはずである。その各々のゲルは約50種のポリペプチドに関する情報を提供する。したがって、electromorphの原因となる突然変異については1年間に約125,000の遺伝子座をテストすることになる。我々は電気泳動は、exonにおけるヌクレオチド置換の1/3を検出し、また平均的ポリペプチドは、その特性を示すためには1,200個のヌクレオチドが必要であると仮定した。そこで、技術員2人により、比較的低い消耗品の費用で効果的に調査されるヌクレオチドの数は1年当たり $(1200/3) \times 125,000 = 50,000,000$ となる。したがって、ヌクレオチド置換をもたらす突然変異のスクリーニングには、2次元電気泳動法が現行のDNA技法²³よりも比較的有効であるはずである。ヌクレオチド置換がその損傷の主なタイプと考えられる化学物質誘発突然変異の研究には、2次元電気泳動法が望ましい。一方、突然変異の研究における2次元電気泳動法の現在の主な欠点は、遺伝子不活性化突然変異のヘテロ接合体を十分正確に検出できないことであり、活性が欠如する突然変異が優勢を占めると思われる放射線誘発突然変異の研究においてもこの技法は、相対的に言えばさほど効果的とは思われない。

REFERENCES

参考文献

1. ASAKAWA J, TAKAHASHI N, ROSENBLUM BB, NEEL JV: Analysis of genetic variation in Amerindian sera by 2-D PAGE. In *Electrophoresis '83*, ed by H. Hirai. Berlin, New York, Walter de Gruyter, 1984. pp271-4
2. ASAKAWA J, TAKAHASHI N, ROSENBLUM BB, NEEL JV: Two-dimensional gel studies of genetic variation in the plasma proteins of Amerindians and Japanese. *Hum Genet* 70:222-30, 1985 (RERF TR 24-84)
3. NEEL JV, ROSENBLUM BB, SING CF, SKOLNICK MM, HANASH SM, STERNBERG S: Adapting two-dimensional gel electrophoresis to the study of human germ-line mutation rates. In *Methods and Applications of Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins*, ed by J.E. Celis and R. Bravo. New York, Academic Press, 1984. pp259-306
4. ROSENBLUM BB, NEEL JV, HANASH SM: Two-dimensional electrophoresis of plasma polypeptides reveals "high" heterozygosity indices. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5002-6, 1983
5. ROSENBLUM BB, HANASH SM, NEEL JV: High-resolution separation of plasma proteins, applications to genetic analysis. In *Biologie Prospective, 5^e Colloque International de Pont-à-Mousson*, ed by M-M. Galteau, G. Siest, & J. Henny. Paris, Masson, 1983. pp85-90
6. ROSENBLUM BB, NEEL JV, HANASH SM, JOSEPH JL, YEW N: Identification of genetic variants in erythrocyte lysate by two-dimensional gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 36:601-12, 1984
7. WRAY W, BOULIKAS T, WRAY VP, HANCOCK R: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 118:197-203, 1981
8. NEEL JV, SATOH C, HAMILTON HB, OTAKE M, GORI KI K, KAGEOKA T, FUJITA M, NERIISHI S, ASAKAWA J: Search for mutations affecting protein structure in children of atomic bomb survivors: Preliminary report. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4221-5, 1980 (RERF TR 5-80)
9. SATOH C, AWA AA, NEEL JV, SCHULL WJ, KATO H, HAMILTON HB, OTAKE M, GORI KI K: Genetic effects of atomic bombs. In *Human Genetics, Part A: The Unfolding Genome*, ed by B. Bonne-Tamir, T. Cohen, & R.M. Goodman. New York, Alan R. Liss, Inc., 1982. pp267-76
10. SATOH C, NEEL JV, YAMASHITA A, GORI KI 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)
11. SATOH C, NEEL JV, MIURA A, UENO C, ARAKAWA H, OMINE H, GORI KI K, FUJITA M: Inherited thermostability variants of seven enzymes in a Japanese population. *Ann Hum Genet* 49:11-22, 1985 (RERF TR 18-84)
12. KONDO I, YAMAMOTO T, YAMAKAWA K, HARADA S, OISHI H, NISHIGAKI I, HAMAGUCHI H: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: VI. Identification of esterase D in the two-dimensional gel electrophoresis pattern of cellular proteins. *Hum Genet* 66:248-51, 1984
13. MILLER OJ, DRAYNA D, GOODFELLOW P: Report of the committee on the genetic constitution of the X and Y chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 37:176-204, 1984
14. HARRIS H: *The Principles of Human Biochemical Genetics*. 3rd Edition. Amsterdam, Elsevier/North-Holland, 1980
15. COMINGS DE: Two-dimensional gel electrophoresis of human brain proteins. III. Genetic and non-genetic variations in 145 brains. *Clin Chem* 28:798-804, 1982

16. McCONKEY EH, TAYLOR BJ, PHAN D: Human heterozygosity: A new estimate. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6500-4, 1979
17. SMITH SC, RACINE RR, LANGLEY CH: Lack of genic variation in the abundant proteins of human kidney. *Genetics* 96:967-74, 1980
18. WALTON KE, STYER D, GRUENSTEIN EI: Genetic polymorphism in normal human fibroblasts as analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 254:7951-60, 1979
19. GOLDMAN D, MERRIL CR: Human lymphocyte polymorphisms detected by quantitative two-dimensional electrophoresis. *Am J Hum Genet* 35:827-37, 1983
20. NEEL JV, BAIER L, HANASH SM, ERICKSON RP: The frequency of polymorphisms for alleles encoding for proteins of the liver of domesticated mice. *J Hered* 76:314-20, 1985
21. DAVIDSON JB, CASE AL: Rapid electronic autofluorography of labeled macromolecules on two-dimensional gels. *Science* 215:1398-400, 1982
22. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Report of WHO Task Group on Prevention of Avoidable Mutational Disease (HMG/TG/84.3). Geneva, WHO, 1985 (in press)
23. DELEHANTY J, WHITE RL, MENDELSON ML et al: Approaches to determining mutation rates in human DNA: ICPEMC Meeting Report No. 1. *Mutat Res* (in press)