

HETEROZYGOSITY AND ETHNIC VARIATION IN JAPANESE PLATELET PROTEINS

日本人の血小板蛋白質に見られたヘテロ接合型の
頻度と人種間における変異

JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. 浅川順一

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

NORIO TAKAHASHI, Ph.D. 高橋規郎

CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子

SATOMICHI KANEOKA 金岡里充

EIKO NISHIKORI 錦織栄子

MIKIO FUJITA, M.D. 藤田幹雄



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

A paper based on this report was published in the following journal.

本報に基づく論文は下記の雑誌に掲載された。

Human Genetics 78:1-8, 1988

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。

HETEROZYGOSITY AND ETHNIC VARIATION IN JAPANESE PLATELET PROTEINS

日本人の血小板蛋白質に見られたヘテロ接合型の
頻度と人種間における変異

JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. (浅川順一); JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.*;
NORIO TAKAHASHI, Ph.D. (高橋規郎); CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子);
SATOMICHI KANEOKA (金岡里充); EIKO NISHIKORI (錦織栄子);
MIKIO FUJITA, M.D. (藤田幹雄)

Biochemical Genetics Laboratory, Department of Genetics

遺伝学部遺伝生化学研究室

SUMMARY

Sixty-two polypeptides visualized on silver-stained two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) preparations of platelets from 85 Japanese subjects have been scored for genetic variation. Inherited variants of 11 of the polypeptides were recognized; the index of heterozygosity was $2.4 \pm 0.2\%$. Thus far, 10 genetic polymorphisms identified by 2-D PAGE of plasma, erythrocytes, or platelets have been identified in both Japanese and Caucasian subjects. A comparison of allele frequencies revealed four significant ethnic differences. We also observed four polypeptides exhibiting a low frequency polymorphism in one group but not in the other, as well as three polymorphisms in Caucasians for which no counterpart polypeptide has thus far been recognized in the Japanese and, vice versa, 11 such polymorphisms in Japanese. Although a similar comparison of seven enzyme polymorphisms studied with one-dimensional electrophoresis (1-D E) in the same populations revealed a relatively higher number of significant ethnic differences, evidence is presented that this is due primarily to the greater number of 1-D E observations entering into the calculation. It is argued that this similarity in the frequency of ethnic differences among the polypeptides studied

要 約

日本人85名の血小板蛋白質について2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動(2-D PAGE)後、銀染色を行い、62種のポリペプチドについて遺伝的変異の検討を行った。11種のポリペプチドに遺伝的変異型が認められた。ヘテロ接合型の頻度は $2.4 \pm 0.2\%$ であった。血漿、赤血球、血小板蛋白質の2-D PAGEで、日本人及び白人両集団に多型の頻度で認められた変異型は、これまでのところ10種である。対立遺伝子頻度を比較したところ、4種に有意な人種間差が認められた。更に、4種のポリペプチドは、一方のグループでは頻度は低いものの多型として検出されたが、他方では多型としては認められなかった。また、白人に多型の頻度で検出された3種のポリペプチドに相当するものは、日本人には認められなかったし、逆に日本人に多型の頻度で検出された11種のポリペプチドに相当するものは、白人には認められなかった。同一集団で1次元電気泳動法(1-D E)を用いた調査で多型を示した7種の酵素についても同様の比較を行った。その結果、2-D PAGEでの比較に比べ、より多くの酵素に有意の人種間差が認められたが、これは、まず計算に用いた1-D E法での観察例数がかかるに多かったことに起因するものと考えられる。2-D PAGEと1-D Eとを用いて調査したポリペプチドのうち、人種間差の認められた頻度は類似していたが、この

*RERF Consultant and Department of Human Genetics, University of Michigan School of Medicine

放影研顧問兼 Michigan 大学医学部人類遺伝学教室

by 2-D PAGE and by 1-D E is further evidence that the proteins revealed by 2-D PAGE are not greatly different in their response to the interplay of mutation, selection, and drift from those revealed by 1-D E studies of plasma proteins and erythrocyte enzymes.

INTRODUCTION

Recently we have been systematically exploring the kind and amount of genetic variation revealed by 2-D PAGE of various components of human blood, as a necessary preliminary to decisions concerning the usefulness of this technique in the study of mutation rates, ethnic classifications, human evolution, etc. Since, indirectly, the technique scans some hundreds of kilobases of exon DNA, it also has the potential of identifying functional genetic loci of unusual interest which with the appropriate techniques could become available for detailed molecular analysis. We have now extended our studies to the platelets of Japanese residing in Hiroshima. Following the presentation of these data we will review all the studies to date employing 2-D PAGE, with reference to ethnic differences in allele frequencies at what appear to be identical loci in Caucasians residing in Ann Arbor, Michigan, USA and Japanese from Hiroshima and/or Nagasaki, and compare the magnitude of these differences with the differences revealed by studies applying the more familiar technique of 1-D E to erythrocyte enzymes from these same two populations. Some apparent identities in the polymorphisms of platelets and lymphocytes will also be discussed.

MATERIALS AND METHODS

The 85 mother-father-child trios of platelet preparations included in this study were derived from blood samples collected in the course of a study on the genetic effects of the atomic bombs.¹ In each instance a rare plasma protein or erythrocyte isozyme variant had been encountered in a child in the study group, blood samples had then been obtained from the child's father and mother, to determine whether the variant was inherited or the result of a mutational event in one of the parents. At the time of the family studies, a repeat sample had also been obtained from the child.

Platelets were isolated from platelet-rich plasma by centrifugation and washed three times with phosphate-buffered saline. Cell pellets were solubilized by adding two volumes of a solution containing 9 M urea, 2% Nonidet P-40, 0.8% Ampholine

ことは突然変異，自然淘汰，遺伝子頻度の変動といったものを考える際に，2-D PAGE で検討したポリペプチドと，血漿蛋白質や赤血球酵素について1-D E で検討したものと大きく異なるものではないということの重ねての証拠である。

緒 言

最近我々は突然変異率，人種分類，ヒトの進化などの研究に2-D PAGE 技法が有益であるか否かを決定する上で，必要な予備的措置として，ヒトの血液の種々の成分について2-D PAGE により明らかにされた遺伝的変異の種類及び量を体系的に調査している。間接的にはあるが，この技法によって数百キロベースのエキソン DNA が調べられるので，適切な技法を用いれば詳細な分子解析に役立つと思われる非常に興味深い機能遺伝子座の確認も可能である。我々は今回研究範囲を拡大し，広島在住の日本人の血小板について調査を行った。我々はこれらのデータについて述べた後に，米国 Michigan 州 Ann Arbor 在住の白人と広島及び/又は長崎在住の日本人とで同一と思われる遺伝子座における対立遺伝子頻度の人種間差について2-D PAGE を用いて現在までに行われたすべての研究を検討し，これらの相違と，同一2集団の赤血球酵素について，2-D PAGE よりもなじみの深い1-D E 技法を用いた調査により明らかになった相違の度合いとを比較する。血小板及びリンパ球に見られた多型のうち，幾つかのものは明らかに同一であったことについても述べる。

材料及び方法

本研究で用いた85組の母・父・子より成るトリオの血小板試料は，原爆の遺伝的影響に関する調査¹で採取された血液標本から得た。調査グループの子供に血漿蛋白質又は赤血球アイソザイムのまれな変異型が検出された場合には，その都度子供の両親の血液標本を入手してその変異型が遺伝的なものなのか，それとも両親の一方における突然変異性事象の結果なのかを調べてきた。家族調査の際に，子供の血液標本も再び採取した。

血小板は，多血小板血漿より遠心分離し，リン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄した。9 M 尿素，2% Nonidet P-40，0.8% Ampholine (LKB, pH 3.5-10)，2%

(LKB, pH 3.5-10), 2% 2-mercaptoethanol, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Solubilized samples were centrifuged in a microfuge for two minutes and were stored at -80°C until used.

Two-dimensional electrophoresis was carried out using the Iso-Dalt system (Electro-Nucleonics, Oak Ridge, TN, USA) as described by Neel et al.² The supernatant (7 μl) of the solubilized platelet protein preparation was applied to the first-dimension gel. Isoelectric focusing was done at 800 V for 16 hours and 1,200 V for 2 hours in the presence of a 9 M urea and 2.0% Ampholine mixture (0.8% pH 3.5-10, 0.8% pH 5-7, and 0.4% pH 5-8). The first-dimension gels were run in a constant-temperature room at 25°C . Second-dimension electrophoresis was performed as previously described.³ The polypeptides in the gels were visualized by the simplified silver-staining method of Morrissey.⁴ In this procedure the usual glutaraldehyde step is omitted and the duration of exposure to the dithiothreitol solution was prolonged to 30 minutes. Hemoglobin charge standards, described by Anderson and Hickman,⁵ were prepared as previously.⁶ Molecular weight (MW) standards were obtained from BIO-RAD.

A preliminary set of 82 spots was selected for scoring on the basis of our standard criteria of relative isolation from other spots and a staining intensity such that a variant spot derived from any one of them, which presumably would usually exhibit about half the normal staining intensity, should be clearly visible. A further criterion was that in a series of gels, at least 95% of the representatives of any particular spot could be unambiguously scored. As the scoring progressed, this reduced the original battery of 82 spots to 63. Spot designations are based on area of occurrence in the gel and a sequential numbering system.

RESULTS

The polypeptides included in the final battery are designated in Figure 1. Genetic variation was encountered in 12 of the 63 polypeptides selected for final scoring. However, 16 of the blood samples on which this study is based had been collected for verification of a serum transferrin variant detected with 1-D starch gel electrophoresis. At the time the scoring for this study was initiated, we did not know the identity of any of the spots being scored. When in 13 preparations the phenotype

2-メルカプトエタノール及び1 mM フッ化フェニルメチルスルホニルを含む溶液を2容量加え細胞を溶解した。可溶化した試料はマイクロ遠心分離機で2分間遠心分離し、使用するまで -80°C で貯蔵した。

2次元電気泳動は Neel ら² の記述に従って、Iso-Dalt システム (米国 Tennessee 州 Oak Ridge, Electro-Nucleonics 社) を用いて行った。可溶化した血小板蛋白質試料の上澄 (7 μl) を1次元ゲルに添加した。等電点電気泳動は9 M 尿素と2.0% Ampholine 混液 (0.8% pH 3.5-10, 0.8% pH 5-7, 0.4% pH 5-8) の存在下で800 V 16時間, 1,200 V 2時間行った。1次元目のゲルは 25°C の常温室で泳動した。2次元目の電気泳動は先に述べた手順で行った。³ ゲル中のポリペプチドは Morrissey⁴ の方法を簡便化した銀染色法を用いて検出した。この方法では通常のグルタルアルデヒド処置を省略し、ジチオエリトリール溶液に標本を浸漬する時間を30分に延長した。Anderson 及び Hickman⁵ により報告されたヘモグロビンの電荷標準品は前報⁶ に従い作成した。分子量 (MW) 標準品は BIO-RAD のものを使用した。

他のスポットから比較的良好に分離されていること、またいずれの変異型スポットもはっきりと確認できるような染色濃度 (恐らく通常は正常型スポットの染色濃度の約半分) を示すことという我々の選択基準に基づいて、評価対象として予備的に82個のスポットを選択した。もう一つの選択基準は、特定スポットが一連のゲルにおいて少なくとも95%は明確に評価できることであった。評価が進むにつれて、最初の82個のスポットは63個に減少した。スポットはゲル上での位置に従い連続番号を付加し命名した。

結 果

最終的な評価を行ったポリペプチドを図1に示す。最終評価に選ばれた63種のポリペプチドのうち12種に遺伝的変異が検出された。しかし、本研究の基盤となった血液標本のうち16標本は1-D 澱粉ゲル電気泳動法で検出された血清トランスフェリン変異型を確認するために採取されたものであった。本研究で評価を開始した時点では、評価しているスポットのいずれについても、それが何であるか知らなかった。13の試料において、B-001の表現型が既知の血漿トランスフェリン変異型と同じように変異した時点で、

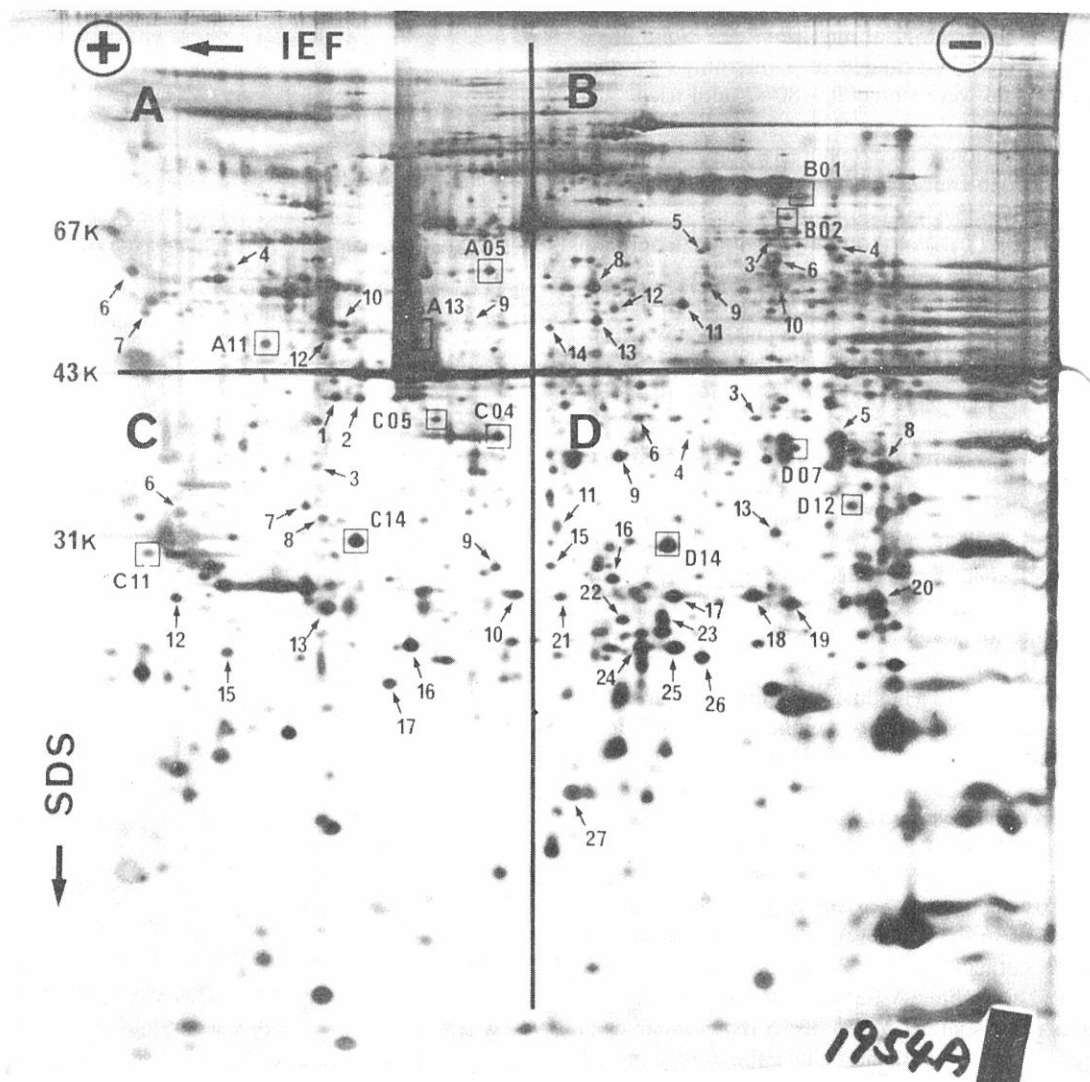


Figure 1 Silver stained 2-D PAGE pattern of platelet proteins. The gel pattern has been subdivided into four convenient regions (A-D), and the polypeptides suitable for scoring in each region numbered consecutively. The variable polypeptides are surrounded by squares.

図1 銀染色による血小板蛋白質の 2-D PAGE パターン。ゲルパターンは便宜上四つの領域 (A-D) に区分し、各領域で評価に適しているポリペプチドに連続番号をつけた。変異の認められたポリペプチドは四角で囲んでいる。

of B-001 varied concurrently with the known presence of a plasma transferrin variant, B-001 was assumed to be transferrin. Whether it should be regarded as a normal constituent of platelet cytosol or functioning membrane, or as a contaminant, is not clear. The three transferrin variants which were not detected with 2-D PAGE had already been found not to be distinguishable from normal with isoelectric focusing.⁷ Spot B-001 must accordingly

B-001はトランスフェリンであると考えられた。B-001を血小板の可溶性成分又は機能膜の正常構成成分とみなすべきか、あるいは血漿よりの混入物質とみなすべきかは明らかでない。2-D PAGE では検出されなかった3例のトランスフェリン変異型は等電点電気泳動法では正常型とは区別できないことが既に分かっていた。⁷したがって、スポット B-001は評価対象のポリペプチドに包含するとヘテロ接合型指数の算定に

be excluded from the battery of polypeptides scored, since its inclusion would introduce a bias into the calculation of the index of heterozygosity; this reduced the number of proteins scored to 62, of which 11 exhibited genetic variation, as summarized in Table 1 and pictured in Figure 2. The phenotypes for the variable spots were all in Hardy-Weinberg equilibrium.

Polypeptide D-012 was observed in the course of the study to vary in synchrony with the results of 1-D E typings for esterase D on these same samples, and was assumed to be esterase D. Since none of the samples studied had been selected because of the occurrence of an esterase D variant, the results of classifying this spot for variation have been allowed to remain in the series.

Our spot D-014 appeared to be identical to spot PL-3 of Hanash et al.⁸ PL-3 was found to be polymorphic in Caucasians and a similar variant was encountered in this series, but the most frequent gene product in the Japanese series (which appears to correspond to a similar product in Caucasoid lymphocytes; see below) appears to have been designated as 'variant' in the Caucasoid platelet series. Until this discrepancy can be clarified, we will not include this variant in our ethnic comparisons.

偏りが生ずるので、除外しなければならない。これによって評価した蛋白の個数は62に減少した。そのうち11種は遺伝的変異を示した。これらは表1に要約しその写真を図2に示した。変異の認められたスポットの表現型は、すべて Hardy-Weinberg の法則に一致していた。

本研究の途中で、ポリペプチド D-012 の変異は同一試料についての 1-D E 法を用いたエステラーゼ D の型判定結果と一致したので、D-012 はエステラーゼ D であると考えられる。調査試料のいずれもエステラーゼ D 変異型が出現したために選択されたわけではないので、このスポットの変異分類の結果はそのまま資料にとどめることにした。

我々のスポット D-014 は Hanash ら⁸ のスポット PL-3 と同一であるように思われた。PL-3 は白人では多型であることが認められ、同様の変異型が本研究においても検出されたが、日本人集団で最も頻繁に検出される遺伝子産物（白人集団のリンパ球における類似の産物に相当する）と思われる（下記参照）は白人集団の血小板調査では「変異型」と命名されているように思われる。この相違が明らかになるまでは、この変異型を我々の人種間比較には用いない。

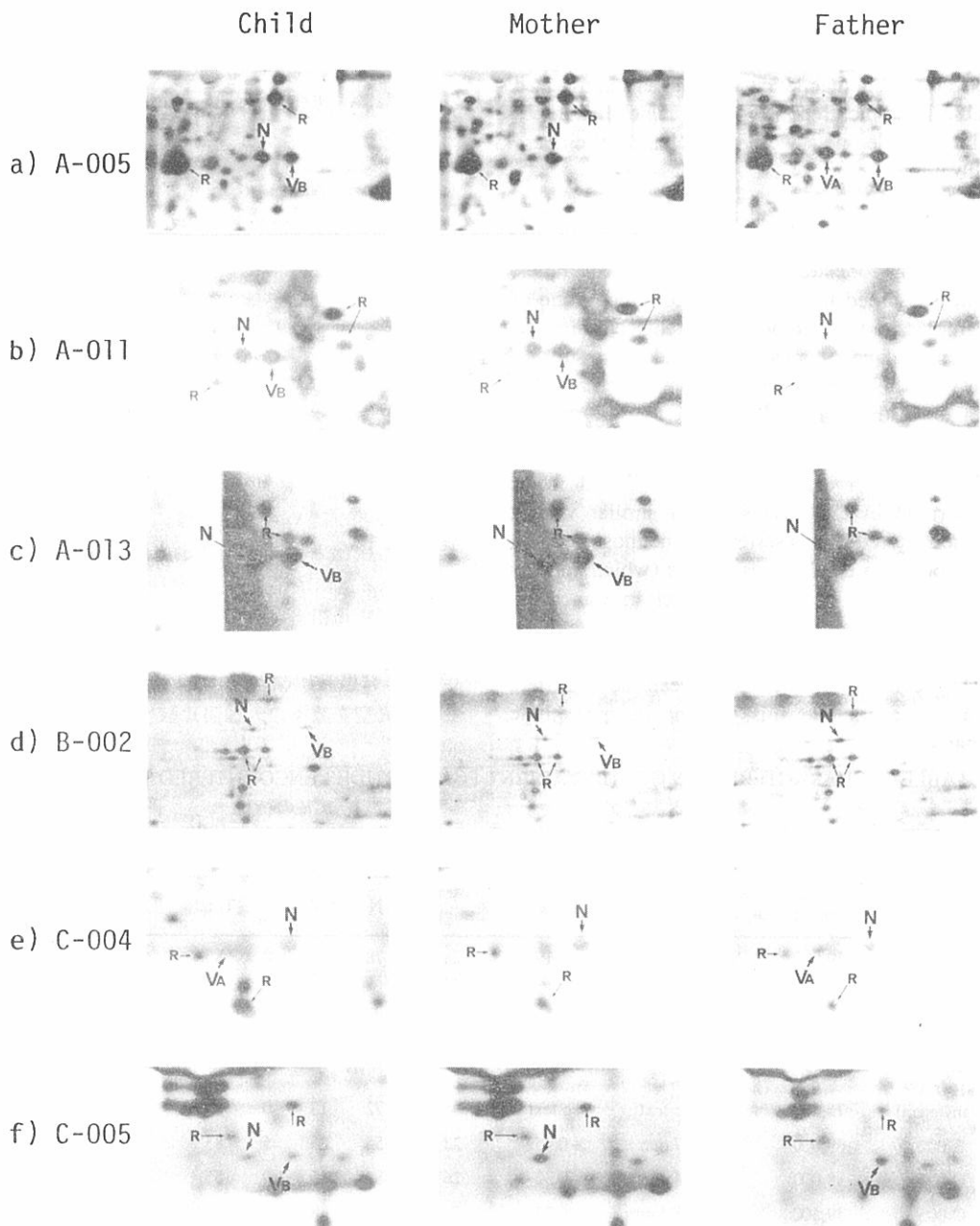
TABLE 1 CHARACTERISTICS OF THE VARIANT POLYPEPTIDES ENCOUNTERED IN THIS STUDY

表1 本調査で検出された変異型ポリペプチドの特性

Spot number	~ molecular weight	Shift in IEF axis	Calibrated charge change	Illustrated in figure	Phenotype frequencies				Allele frequencies		
					N	NV	V	Total	p	q _A	q _B
A-005	59,000	V _A -2 mm V _B +3 mm	-0.19 +0.23	2a 2a	78	5 2	0 0	85	.959	.029	.012
A-011	47,000	+2 mm	+0.34	2b	84	1	0	85	.994	-	.006
A-013	48,000	+3 mm	+0.20	2c	81	4	0	85	.976	-	.024
B-001 (transferrin)	75,000	see text	see text	-	72	13	0	85	see text		
B-002	69,000	+7 mm	+0.45	2d	55	25	5	85	.794	-	.206
C-004	38,000	-4 mm	-0.32	2e	80	5	0	85	.970	.030	-
C-005	39,500	+3.5 mm	+0.23	2f	76	8	1	85	.940	-	.060
C-011	30,000	+1.5 mm	off-scale	2g	81	4	0	85	.976	-	.024
C-014 ¹	31,000	+9 mm	+0.64	2h	72	12	1	85	.918	-	.082
D-007	38,000	+1.5 mm	+0.15	2i	82	3	0	85	.982	-	.018
D-012 (esterase D)	34,000	-8 mm	-0.85	2j	34	35	16	85	.606	.394	-
D-014	30,500	+10 mm	+1.40	2k	59	24	2	85	.835	.165	-

¹ This variant also is downwardly displaced in the molecular weight axis, by about 1 mm (cf Figure 2h).

この変異型は分子量軸の下方に約1mm変位している(図2h参照)。

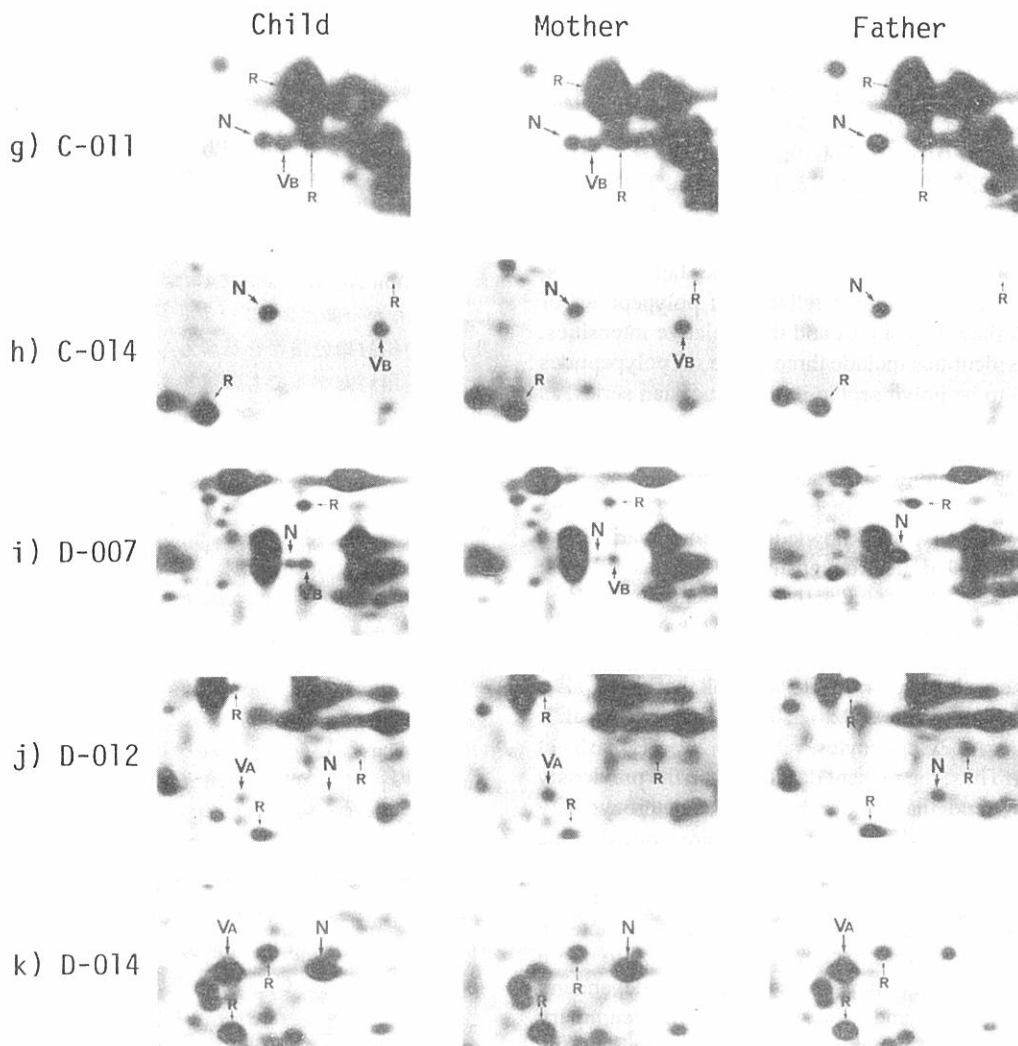


(Continue 続く)

Figure 2 Close-ups of trio gels showing the genetic variants observed in this study. Designations are as follows: N, normal polypeptides; V_A, acidic variant; V_B, basic variant; R, reference spot.

図2 本調査で認められた遺伝的変異を示すトリオゲルの拡大図。図中の略字の意味は次のとおりである：N, 正常型, V_A, 酸性の変異型; V_B, 塩基性の変異型; R, 基準スポット

Figure 2 Continued 続き



DISCUSSION

Among the 62 platelet polypeptides selected in as unbiased fashion as possible for scoring for genetic variability, 11 (18%) exhibited such variation; the index of heterozygosity for the total material by direct count was $2.4 \pm 0.2\%$ (128/5252). In similar studies on Caucasian platelets, only 33 spots were scored, of which 3 (9%) exhibited genetic variation; the index of heterozygosity was $2.6 \pm 0.4\%$.⁸ However, in the Caucasian material an additional three spots not included in the "official" battery were also observed to be polymorphic. As is well known, although in any one laboratory with well-

考 察

遺伝的変異の評価のため、できるだけ偏りのない方法で選んだ62種の血小板ポリペプチドのうち、11種(18%)は遺伝的変異を示した。直接計算によると、血小板全体でのヘテロ接合型指数は $2.4 \pm 0.2\%$ (128/5252) であった。白人の血小板についての同様な調査では、わずか33個のスポットしか評価されなかったが、そのうち3個(9%)が遺伝的変異を示し、ヘテロ接合型指数は $2.6 \pm 0.4\%$ であった。⁸ しかし、白人集団においては「公式な」もの以外に3個のスポットも多型であると認められた。周知のとおり、十分標準化

standardized techniques the gel patterns are quite reproducible, even minor differences in technique between laboratories can render inter-laboratory comparisons difficult. In this instance, among the total of 36 spots scored in Ann Arbor, we feel reasonably secure only in the following 18 identities (Ann Arbor designation first): 2, C-009; 3, D-014; 4, D-012; 5, C-014; 9, D-013; 10, C-012; 11, C-013; 13, D-016; 15, D-019; 16, C-015; 18, C-016; 20, D-022; 21, D-023; 22, D-025; 23, D-026; 25, C-017; 32, D-027, and PLA 2, C-005. Thus, about half the polypeptides scored in Ann Arbor could be recognized with confidence on the Japanese gels, on the basis of the constellation of polypeptides of which they were a part and their relative intensities. These identities include three of the six polypeptides found to be polymorphic in the Caucasian series, as shown in Table 2.

Previous studies by ourselves of polypeptides selected only for their suitability for scoring (i.e., with no prior knowledge of their variability) have revealed heterozygosity indexes as follows: Caucasian plasma, $6.2 \pm 0.7\%$ (Rosenblum et al¹⁰); Japanese plasma, $5.7 \pm 0.7\%$ (Asakawa et al³); Caucasian lysate, $3.1 \pm 0.5\%$ (Rosenblum et al¹¹); Japanese lysate, $4.0 \pm 0.3\%$ (Takahashi et al⁹); Caucasian platelets, $2.6 \pm 0.4\%$ (Hanash et al⁸); Caucasian lymphocytes, $3.1 \pm 0.2\%$ (Hanash et al¹²). Thus, the present data continue the previously noted trend that in our hands, the heterozygosity indexes yielded by 2-D PAGE are roughly one half to two thirds the indexes based on 1-D E of serum proteins and erythrocyte enzymes (cf Harris and Hopkinson¹³; Harris¹⁴). We note in passing, however, a certain arbitrariness to these indexes, in that they are so technique-dependent. On the one hand, the widely quoted summary of Harris and Hopkinson¹³ does not reflect the additional variation revealed by the relatively recent application of isoelectric focusing to a number of proteins but, on the other hand, does reflect an effect to optimize for each protein the 1-D gel conditions, most appropriate to the resolution of variants (whereas 2-D PAGE applies a uniform set of conditions to all polypeptides). However, we believe the fact that we (see also Goldman and Merril¹⁵; Goldman et al¹⁶) find a greater amount of genetic variation in 2-D PAGE preparations than did many of the earlier investigators primarily reflects the result of improving gel techniques, care in spot selection (cf Neel et al¹⁷), and the use of family material.

された技法を有する研究室ではゲルパターンの再現性は極めて良いが、各研究室間の技法のわずかな相違でさえも研究室間の比較を困難にすることもあり得る。本研究において、Ann Arbor で評価された合計36個のスポットのうち、以下の18のスポット (Ann Arbor における名称を最初に示した) だけは確実に同一であると考ええる: 2, C-009; 3, D-014; 4, D-012; 5, C-014; 9, D-013; 10, C-012; 11, C-013; 13, D-016; 15, D-019; 16, C-015; 18, C-016; 20, D-022; 21, D-023; 22, D-025; 23, D-026; 25, C-017; 32, D-027及びPLA 2, C-005。このように、Ann Arbor で評価されたポリペプチドの約半分は、それらが一部となっているポリペプチドの分布位置及びその相対染色強度を基準として見ると、日本人の試料を用いたゲルでも確信をもって認めることができた。これらのポリペプチドには、表2に示すように白人の調査で多型であることが明らかとされている6種のポリペプチドのうちの3種が含まれる。

我々の今までの研究により、評価に適しているという条件でのみ選んだ (すなわち、変異性についての予備知識はない) ポリペプチドについてのヘテロ接合型指数は次のとおりであることが分かった。白人の血漿 $6.2 \pm 0.7\%$ (Rosenblum ら¹⁰) ; 日本人の血漿 $5.7 \pm 0.7\%$ (浅川ら³) ; 白人の溶血液 $3.1 \pm 0.5\%$ (Rosenblum ら¹¹) ; 日本人の溶血液 $4.0 \pm 0.3\%$ (高橋ら⁹) ; 白人の血小板 $2.6 \pm 0.4\%$ (Hanash ら⁸) ; 白人のリンパ球 $3.1 \pm 0.2\%$ (Hanash ら¹²)。したがって今回のデータも、2-D PAGE を用いて得られるヘテロ接合型指数は、血清蛋白質及び赤血球酵素について1-D E法を用いて得られた指数 (Harris 及び Hopkinson,¹³ Harris¹⁴ 参照) の約 $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{2}{3}$ であるという我々が以前に観察した傾向を示している。しかし、これらの指数は技法によりかなり異なるので、多少の恣意性を認めている。Harris 及び Hopkinson¹³ の広く引用されている要約は、比較的最近等電点電気泳動を幾つかの蛋白質に適用した結果確認された新たな変異については反映していないが、変異型の分離に最も適切な1-Dゲル条件を各蛋白質について最適化した影響については反映している (2-D PAGE では均一の条件が全ポリペプチドに適用されている)。しかし、以前の多くの研究者よりも我々 (Goldman 及び Merril¹⁵; Goldman ら¹⁶ も参照) の方が2-D PAGE 試料に多くの遺伝的変異を見いだしている事実は、主として、ゲル泳動技法の改良、スポット選択上の注意 (Neel ら¹⁷ 参照) 及び父・母・子の家族試料の使用によるものであると考える。

TABLE 2 A $2 \times 2 \chi^2$ CONTRAST OF ALLELE FREQUENCIES FOR THE 10 POLYPEPTIDES IDENTIFIED IN 2-D PAGE PREPARATIONS WHICH ARE POLYMORPHIC IN BOTH JAPANESE AND CAUCASIANS

表 2 2-D PAGE 試料において日本人及び白人の両集団で多型を示した10種のポリペプチドの対立遺伝子頻度の $2 \times 2 \chi^2$ 法による比較

Material	Japanese				Caucasian				χ^2		
	Spot designation	N	n	p	Reference	Spot designation	N	n		p	Reference
Plasma	C-014	220	196	0.89	Asakawa et al ³	C-014	124	100	0.81	Rosenblum et al ¹⁰	4.71*
	D-005	218	116	0.53	"	D-005	108	62	0.57	"	0.51
Lysate	A-003	194	188	0.97	Takahashi et al ⁹	B-011	48	44	0.92	Rosenblum et al ¹¹	2.67
	C-009	200	175	0.88	"	B-009	52	45	0.87	"	0.03
	C-022	200	182	0.91	"	D-014	50	25	0.50	"	47.21***
	D-024	200	179	0.90	"	E-013	52	36	0.69	"	13.54***
	D-027	200	146	0.73	"	D-013	52	40	0.77	"	0.33
Platelet	C-005	170	160	0.94	This paper	PLA 2	88	77	0.88	Hanash et al ⁸	3.40
	C-014	170	156	0.92	"	PL-5	88	86	0.98	"	3.54
	D-012	170	103	0.61	"	PL-4	88	71	0.81	"	10.66***

* $0.01 < p < 0.05$ *** $p < 0.001$

N designates the number of alleles whose products were scored, n the number of normal alleles, and p the frequency of the normal allele.

N は遺伝子産物の評価を行った対立遺伝子の数, n は正常対立遺伝子数, p は正常対立遺伝子頻度を示す.

The identities of the spots where known are: plasma C-014; apolipoprotein E, lysate C-022; glyoxalase 1 and platelet PL-4 (D-012); esterase D 同定されているスポットの名称: 血漿 C-014; アポリポ蛋白質E; 溶血液 C-022; グリオキザレーズ1及び血小板 PL-4 (D-012); エステラーゼ D

By now our studies with 2-D PAGE of plasma, erythrocyte lysate, and platelets have revealed a total of 13 polymorphic polypeptides in Caucasians and 24 in Japanese, 10 of which appear to involve identical polypeptides in the two populations. The data are now sufficient to render a preliminary systematic consideration of ethnic differences of interest. Furthermore, seven of the erythrocyte enzymes studied with 1-D E in the course of mutation rate studies in Japan¹ and Ann Arbor¹⁸ are polymorphic in both populations; we may ask how well the "traditional" picture of ethnic variation revealed by these enzymes agrees with the findings from 2-D PAGE.

In comparing ethnic variation, a standard problem has been that the data on the various genetic systems under consideration must usually be assembled from a mosaic of populations, any one of which may or may not be representative of the remainder. We are fortunate in the present setting that all the results to be compared were obtained on the same two populations, the one, Caucasians residing in Ann Arbor, the other, Japanese from Hiroshima and Nagasaki. Furthermore, because so many of the techniques have been coordinated between the Ann Arbor and the Hiroshima laboratories, there was an unusual degree of comparability in the techniques in the two laboratories.

Table 2 presents the results of a simple 2×2 χ^2 comparison between the frequency of the normal allele of the 10 polypeptides thus far found polymorphic in 2-D PAGE preparations in both Ann Arbor and Hiroshima-Nagasaki. Because of the small numbers involved in some series, a single variant can result in an allele frequency $\geq 1.0\%$, the traditional definition of a polymorphism. For the present, we consider a system as polymorphic only if at least two variant (unrelated) individuals have been observed. We also present in Table 3 the same type of contrast for the seven enzymes polymorphic in both populations among the 24 enzymes studied by 1-D E by ourselves both in Caucasian children in Ann Arbor and Japanese children in Hiroshima and Nagasaki. The former sample was assembled in the course of a pilot study on the strategy of a genetic monitoring study utilizing placental cord blood samples from newborn infants; the detailed data are in press.¹⁸ The latter data set derives from a study of the potential genetic effects of the atomic bombs¹; a detailed description of the data is in preparation.

現在までのところ、2-D PAGE を用いた血漿、赤血球溶血液及び血小板の調査により、多型を示すポリペプチドが白人には合計13種、また日本人には24種検出されているが、そのうち10種は両集団において同一のポリペプチドであるように思われる。これらのデータは、人種間差について予備的な体系的検討を行うのに十分である。更に、日本¹及びAnn Arbor¹⁸における突然変異率の研究において1-D Eを用いて調査した赤血球酵素のうち、七つは両集団において多型の頻度を示す。各人種にみられるこれらの酵素の変異の「従来の」特徴は、2-D PAGE から得られた所見にどの程度合致しているのだろうか。

各人種にみられる変異を比較する際よく問題となるのは、研究対象となる多くの遺伝システムに関するデータを通常、一つの集団が残りの集団を代表するかが不明であるようなモザイクな集団から集めなければならないという点である。幸運なことに、本研究では、比較すべき結果はすべてAnn Arbor 在住の白人集団と広島・長崎在住の日本人集団という同一の2集団から得ている。更に、非常に多くの技法をAnn Arbor の研究室と広島の実験室の間で調整してきたので、二つの研究室の技法はかなり一致している。

表2はAnn Arbor及び広島・長崎両市の2-D PAGE 試料において、現在まで多型であることが判明している10種のポリペプチドの正常対立遺伝子の頻度について単純な 2×2 χ^2 法による比較を行った結果を示している。幾つかの調査シリーズでは扱った試料が少なく、たった一つの変異型でも従来の多型の定義どおり、対立遺伝子頻度が1.0%以上になることもある。今回は少なくとも2名の変異型をもつ血縁でない個人が認められるシステムのみを多型と考える。また、1-D Eを用いて調査したAnn Arbor 在住の白人の子供と広島・長崎在住の日本人の子供の24種の酵素のうち、両集団において多型を示した7種の酵素について同じような比較を行った結果を表3に示す。前者の標本は新生児の胎盤臍帯血標本を利用した遺伝モニター研究方法に関する予備調査の際に収集された。詳細なデータは印刷中である。¹⁸ 後者のデータは原爆の遺伝的影響調査¹から得たものである。データの詳細な報告書は作成中である。

TABLE 3 A χ^2 CONTRAST OF ALLELE FREQUENCIES FOR SEVEN POLYMORPHIC SYSTEMS OF ERYTHROCYTE ENZYMES STUDIED IN BOTH CAUCASIANS AND JAPANESE WITH 1-D E IN OUR LABORATORIES

表3 我々の研究室で1-D E法を用いて調査した白人及び日本人集団における赤血球酵素の七つの多型システムの対立遺伝子頻度の χ^2 法による比較

Enzyme	Adjustment factor	Caucasian obs.	Japanese		Total ¹	χ^2
			Obs.	Adj.		
Phosphoglucumutase 1	0.807	N 4352	(35293)	28471	32823	0.847
		T 5654	(46190)	37262	42916	
		p 0.770		0.764		
Acid phosphatase 1	0.808	N 3429	(35953)	29045	32474	941.8***
		T 5650	(45384)	36664	42314	
		p 0.607		0.792		
Glutamate-pyruvate transaminase	0.832	N 1246	(19941)	16597	17843	28.8***
		T 2324	(33616)	27979	30303	
		p 0.536		0.593		
Adenosine deaminase	0.806	N 5352	(45952)	37034	42386	54.6***
		T 5614	(47296)	38117	43731	
		p 0.953		0.972		
Adenylate kinase 1	0.807	N 5374	(46227)	37323	42697	1519.2***
		T 5604	(46230)	37325	42929	
		p 0.959		1.000		
6-phosphogluconate dehydrogenase	0.806	N 5471	(42642)	34372	39843	320.1***
		T 5612	(47262)	38096	43708	
		p 0.975		0.902		
Esterase D	0.806	N 4698	(28156)	22699	27397	1232.4***
		T 5366	(44488)	35865	41231	
		p 0.876		0.633		

*** $p < 0.001$

T designates the number of alleles whose products were scored, N the number of normal alleles, and p the frequency of the normal allele. Data on the Caucasian material will be found in Mohrenweiser et al.¹⁸ and on the Japanese material in Neel et al.¹⁹

Tは遺伝子産物の評価を行った対立遺伝子の数、Nは正常対立遺伝子数、pは正常対立遺伝子頻度を示す。

白人集団のデータは Mohrenweiser ら,¹⁸ 日本人集団のデータは Neel ら¹⁹ がまとめている。

¹ Total is based on Caucasian-observed plus Japanese-adjusted value (see text).

総数は白人集団における観察値に日本人集団の調整値を加えたもの(本文参照)

For the 2-D PAGE data, 4 of the 10 polymorphisms present significantly different allele frequencies. For the 1-D E polymorphisms, a complication in the data is the occurrence of siblings in the Japanese study. Since, however, the sibling distribution is known, we can estimate the number of independent alleles in the sample by the procedure suggested by Chakraborty.²⁰ This procedure results in an 'adjust-

2-D PAGE データについては、10種の多型のうち四つは有意に異なる対立遺伝子頻度を示す。1-D E 多型については、データが複雑なのは日本人の調査に同胞が含まれているからである。しかし、同胞の分布は分かっているので、Chakraborty²⁰ の提唱した方法を用いて標本中の独立した対立遺伝子数を推定できる。この方法で '補正係数' が得られ、これに総対立

ment factor' which when multiplied by total alleles leads to an estimate of the number of independent alleles in the sample. Both the observed and the adjusted numbers are given in Table 3, but the χ^2 is based upon the number of independent alleles. Six among these seven contrasts present statistically significant ethnic differences. With respect to the results of both these procedures, this is of course the statistically simplest contrast possible, since it fails to take into consideration differences in allele structure in the two populations.

A major difficulty in comparing the results of 2-D PAGE with those from 1-D E is the enormous differences in sample size. In this situation, a difference of comparable magnitude will be significant in one series but not in the other. We note that the average ethnic difference between the frequency of the normal allele for the 10 polymorphisms detected by 2-D PAGE was 0.12 whereas for the 7 studied with 1-D E it was 0.10. This contrast suggests very little difference in the ethnic variability of the polymorphisms revealed by the two approaches.

The foregoing analysis presents only a partial picture of the ethnic differences. Thus there are four apparently corresponding polypeptides which present a low frequency polymorphism in one ethnic group but not the other (Japanese plasma C-001, Caucasian plasma C-001; Japanese plasma D-008, Caucasian plasma D-008; Japanese lysate C-012, Caucasian lysate, D-009; Japanese lysate D-018, Caucasian lysate E-002-3). It should also be noted that three polypeptides found polymorphic in Caucasian populations (lysate C-004, platelet PLA-1, and PLA-3) have not been found to have an identifiable counterpart in Japanese populations and, vice versa, 11 polymorphic polypeptides of the Japanese populations (lysate C-006, C-016, C-023, D-017, D-002 and platelet A-005, A-013, B-002, C-004, C-011, D-007) have not thus far been found to have a Caucasian counterpart. Further studies are in progress to determine the validity of these apparent differences. (The polypeptide designated C-008 in studies of plasma from Caucasoids, an apparent variant of which was suspected of presenting technical problems in scoring because of a departure from Hardy-Weinberg proportions, also appeared to behave anomalously in Japanese plasma, and is omitted from consideration, as is the D-014 and PL-3 comparison mentioned earlier.) It is not clear to what extent these findings constitute

遺伝子数を乗ずると標本中の独立した対立遺伝子数が推定できる。観察した数及び補正した数を表3に示すが、 χ^2 は独立した対立遺伝子数に基づいている。これら七つの比較のうち六つは統計学的に有意な人種間差を示している。これら両方法の結果に関しては、2集団の対立遺伝子の構造の相違を考慮していないので、もちろんこの結果は統計学的に最も単純な比較である。

標本の大きさに大きな違いがあることが、2-D PAGEの結果と1-D Eの結果とを比較する上で大きな困難となっている。こういった状況では、比較可能な程度の相違が一方では有意であるが他方では有意ではない。本研究では、2-D PAGEを用いて検出した10種の多型の正常対立遺伝子頻度の平均人種間差は0.12であり、1-D Eを用いて調査した7種の多型のそれは0.10であった。この比較結果は、二つの方法が示した多型の両人種における変異には、ほとんど差がないことを示唆している。

前述の解析は人種間差のほんの一部を示しているにすぎない。一方の人種グループでは頻度が低いものの多型を示すが、他方のグループでは多型を示さない明らかに対応する4種のポリペプチドがある(日本人血漿 C-001, 白人血漿 C-001; 日本人血漿 D-008, 白人血漿 D-008; 日本人溶血液 C-012, 白人溶血液 D-009; 日本人溶血液 D-018, 白人溶血液 E-002-3)。白人集団に多型として認められた3種のポリペプチド(溶血液 C-004, 血小板 PLA-1及び PLA-3)に相当するものは日本人集団では認められていないし、逆に日本人集団で認められた11種の多型ポリペプチド(溶血液 C-006, C-016, C-023, D-017, D-002及び血小板 A-005, A-013, B-002, C-004, C-011, D-007)は白人集団ではこれまでのところ認められていないことにも注目すべきである。このような相違の妥当性を決定するために、更に調査を行っている。(白人集団の血漿の調査において C-008と命名されたポリペプチドは、その変異型が Hardy-Weinberg 法則から逸脱しているため、評価する際に技術的問題を提起する恐れがあり、日本人集団の血漿でも変則的な動きを示すように考えられたので、先に述べた D-014及び PL-3の比較の場合と同様考慮に入れていない)。これらの所見が人種間差に更にとどの程度寄与するのか、また二つの異なる研究室で作成されたゲルのスポットの同定を確実な

further ethnic differences, and to what extent they reflect the difficulty in being absolutely certain of spot identity in gels prepared in two different laboratories. However, from the gel position, we suspect that three platelet polymorphisms encountered in Japanese (A-013, C-004, and D-007), are not present in Caucasians.

There appears to be significant overlap between the platelet polymorphisms encountered in this study and certain of the recently reported lymphocyte polymorphisms. The identities in which we have confidence are shown in Table 4. These identities are based primarily on gel position and similarities in the configuration of the surrounding spots. There are no statistically significant differences between the allele frequencies for corresponding polypeptides in the Japanese platelet and the Japanese lymphocyte series. Furthermore, the two Caucasian series appear homogeneous. [NB: The lymphocyte samples studied by Hanash et al¹² were derived from the population of Nancy, France.] When, however, we contrast the allele frequencies for the four platelet polymorphisms of Japanese with the allele frequencies in the corresponding lymphocyte polymorphisms in Caucasians, three of the four contrasts are significant, one of these involving the esterase D polymorphism found to be significant in the contrasts of Table 2.

By now there is a sufficient experience with protein variants studied both by 1-D E and 2-D PAGE that some tentative generalizations concerning the relative efficiency of the two approaches seem appropriate. As of this writing, we are aware of studies on the resolution in a 2-D PAGE system of 34 variants, involving 8 proteins, first detected by 1-D E (Asakawa, unpublished).^{7,24,25} Eleven of the 34 variants detected with 1-D E were not detected with 2-D PAGE. The reasons for failure are not only inadequate or inconstant resolution, but also 'technical,' as when the Hb variant "runs off" the basic end of the focusing gel. This still early finding suggests that the results of 2-D PAGE should underestimate heterozygosity by almost 30%. On the assumption that in our various studies undetected variants have the same numerical representation as in the above quoted series, the appropriate correction of our own studies on plasma, erythrocyte, and platelet proteins, where the observed average index was 3.9%, would raise the index to approximately 5.1%. This fact, together with the ethnic variability described in this

ものとも考えることの困難さをどの程度反映するのかは明らかでない。しかし、ゲル上の位置から、日本人集団に検出された三つの血小板に認められた多型 (A-013, C-004 及び D-007) は白人集団には存在しないと考えている。

本調査で検出された血小板での多型と最近報告されたリンパ球での多型の幾つかは、かなり重複しているように思われる。そのうち確信のもてるものの名称を表4に示す。これらは主にゲル上の位置と周辺スポットの配置の類似点に基づいて同定したものである。日本人の血小板とリンパ球におけるポリペプチドの対立遺伝子頻度には、統計学的に有意な差はない。更に、白人での二つの調査試料は均一のように思える。〔注意: Hanash ら¹²が調査したリンパ球標本はフランスの Nancy の集団から得た〕。しかしながら、日本人の血小板にみられた四つの多型の対立遺伝子頻度を白人のリンパ球にみられる四つの多型の対立遺伝子頻度と比較すると、四つの比較結果のうち三つは有意である。そのうちの一つには、表2の比較で有意であることが判明している多型性のエステラーゼDが含まれている。

1-D E 及び 2-D PAGE の両方を用いた蛋白質変異型の研究については、現在までに十分経験があるので、二つの泳動技法の相対的有効性に関して暫定的な一般化を行うことが妥当と思われる。この原稿を執筆中に、1-D E により最初に検出された8種の蛋白質にわたる34種の変異型の、2-D PAGE システムでの分離について検討結果に気付いた(浅川, 未発表)。^{7, 24, 25} 1-D E で検出された34種の変異型のうち11種は2-D PAGE では検出されなかった。検出できなかった理由には、分離能が不十分又は一定していなかったことばかりでなく、Hb 変異型が等電点電気泳動ゲルの塩基性末端より流れ出てしまった場合などのように技術的な問題もある。この所見はまだごく初期のものであるが、2-D PAGE の結果ではヘテロ接合型を約30%ほど低く評価しているに違いないことを示唆している。我々の種々の調査では検出されなかった変異型が、上記の検討結果の場合と同じ数字で示されると仮定すると、血漿、赤血球及び血小板蛋白質に関する我々の調査で得られたヘテロ接合型指数の平均値3.9%は、適切に修正されれば約5.1%まで上がると考えられる。この事実と本報で述べた人種間の変異性とは、初期の幾つかの

TABLE 4 A COMPARISON OF ALLELE FREQUENCIES IN JAPANESE AND CAUCASIANS FOR THE FOUR POLYMORPHISMS IDENTIFIED IN BOTH PLATELETS AND LYMPHOCYTES

表4 血小板及びリンパ球の両方に確認された4種の多型についての日本人及び白人集団における対立遺伝子頻度の比較

Designation	Author	Source ¹	Ethnic ²	Allele count			Inter ethnic χ^2
				N	V	Total	
C-005	This paper	P	J	160	10	170	15.44***
C-38k	Kondo et al ²¹	L	J	313	35	348	
NIMH-1	Goldman & Merrill ¹⁵	L	C	63	19	82	
Ly-34	Hanash et al ¹²	L	C	66	14	80	
C-014	This paper	P	J	156	14	170	2.35
C-31k	Kondo et al ²²	L	J	391	25	416	
NIMH-16	Goldman & Merrill ¹⁵	L	C	64	4	68	
Ly-59	Hanash et al ¹²	L	C	78	2	80	
D-012 (Es-D)	This paper	P	J	103	67	170	31.03***
C-33k	Kondo et al ²³	L	J	115	69	184	
NIMH-10	Goldman & Merrill ¹⁵	L	C	50	6	56	
Ly-70	Hanash et al ¹²	L	C	71	9	80	
D-014	This paper	P	J	142	28	170	16.30***
NIMH-6	Goldman & Merrill ¹⁵	L	C	44	28	72	
Ly-67	Hanash et al ¹⁵	L	C	53	27	80	

¹P = platelet 血小板, L = lymphocyte リンパ球

*** $p < 0.001$

²J = Japanese 日本人, C = Caucasian 白人

paper, persuades us that contrary to some earlier surmises,^{26,27} the proteins revealed by 2-D PAGE differ little if at all in the amount and patterning of their genetic variation from the proteins studied by 1-D E.

These data also contribute to another consideration of some importance to population genetics. Several years ago we argued that the restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) defined by the various nucleases were not uniformly distributed through the genome, being less common in the exon DNA than in the remainder of the genome. The argument was somewhat indirect, and based in part on the frequency with which electrophoretic variants had been identified with 1-D E in serum proteins and erythrocyte enzymes.²⁸ Since that time, Cooper et al²⁹ have strengthened the argument by demonstrating that in 19 cloned DNA segments selected at random with respect to their coding potential, the heterozygosity of single copy DNA sequence was 0.0037, approximately an

推測^{26,27}とは逆に, 2-D PAGE を用いて検査した蛋白質と 1-D E を用いて検査した蛋白質とは, 遺伝的変異の量及びパターンにはほとんど差がないと我々に説きつけている。

これらのデータは集団遺伝学にとって重要な別の問題を検討する際にも役立つ。数年前我々は種々のスクレーパーゼによって明らかにされた制限酵素断片の長さの多型性 (RFLP) はゲノムに一樣に分布しておらず, エキソン DNA ではゲノムの残りの部分と比べてまれであることを議論した。この議論は多少間接的なものであり, 部分的には, 1-D E を用いて血清蛋白質及び赤血球酵素中に検出した電気泳動変異型の頻度に基づいている。²⁸ Cooper ら²⁹は, この後, 蛋白質をコードするしなにかかわらず任意抽出した19のクローン化 DNA セグメントでは, 単一コピー DNA 配列のヘテロ接合型頻度は0.0037であり, これは, Nei³⁰による蛋白質データから予想された値の約10倍であることを実証して上記の議論の論拠を強固な

order of magnitude higher than predicted from the protein data by Nei.³⁰ The data summarized in this paper reinforce the earlier inference concerning a relatively low frequency of RFLPs in exons, in this case presumably predominantly not those coding for enzymes, and strengthen the inference of much heavier selection against exon RFLPs than against the remainder of the DNA (or, less likely, lower mutation rates in the former).

ものにした。本報で要約したデータは、エキソン（この場合恐らく主要なものは酵素のようなものをコードするエキソンではない）の RFLP の頻度が比較的低いという初期の推論を支持し、また、エキソン RFLP に対して、残りの DNA に対するよりも大きな自然淘汰が働くという推論（あるいは、これは可能性は低い、前者での突然変異率が低いという推論）を強化するものである。

REFERENCES

参考文献

1. 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)
2. NEEL JV, ROSENBLUM BB, SING CF, SKOLNICK MM, HANASH SM, STERNBERG S: Adapting two-dimensional gel electrophoresis to the study of human germ-line mutation rates. In *Methods and applications of two-dimensional gel electrophoresis of proteins*. Ed by Celis JE, Bravo R. New York, Academic Press, 1984. pp259-306
3. 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)
4. MORRISSEY JH: Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117:307-10, 1981
5. ANDERSON NL, HICKMAN BJ: Analytical techniques for cell fractions. XXIV. Isoelectric point standards for two-dimensional electrophoresis. *Anal Biochem* 93:312-20, 1979
6. ASAKAWA J, SATOH C: Characterization of three electrophoretic variants of human erythrocyte triosephosphate isomerase found in Japanese. *Biochem Genet* 24:131-48, 1986 (RERF TR 12-85)
7. FUJITA M, SATOH C, ASAKAWA J, NAGAHATA Y, TANAKA Y, HAZAMA R, KRASSTEFF T: Electrophoretic variants of blood proteins in Japanese. VI. Transferrin. *Jpn J Hum Genet* 30:191-200, 1985 (RERF TR 5-85)
8. HANASH SM, NEEL JV, BAIER LJ, ROSENBLUM BB, NIEZGODA W, MARKEL D: Genetic analysis of thirty-three platelet polypeptides detected in two-dimensional polyacrylamide gels. *Am J Hum Genet* 38:352-60, 1986
9. TAKAHASHI N, NEEL JV, SHIMOICHI Y, ASAKAWA J, TANAKA Y, SATOH C: Inherited electrophoretic variants detected in a Japanese population with two-dimensional gels of erythrocyte lysates. *Ann Hum Genet* 50:313-25, 1986 (RERF TR 21-85)
10. 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
11. 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

12. HANASH SM, BAIER LJ, WELCH D, KUICK R, GALTEAU M: Genetic variants detected among 106 lymphocyte polypeptides observed in two-dimensional gels. *Am J Hum Genet* 39:317-28, 1986
13. HARRIS H, HOPKINSON DA: Average heterozygosity per locus in man: An estimate based on the incidence of enzyme polymorphisms. *Ann Hum Genet* 36:9-20, 1972
14. HARRIS H: The principles of human biochemical genetics. 3rd edition. Amsterdam, Elsevier/North-Holland, 1980
15. GOLDMAN D, MERRIL CR: Human lymphocyte polymorphisms detected by quantitative two-dimensional electrophoresis. *Am J Hum Genet* 35:827-37, 1983
16. GOLDMAN D, GOLDIN LR, RATHINAGIRI P, O'BRIEN SJ, EGELAND JA, MERRIL CR: Twenty-seven protein polymorphisms by two-dimensional electrophoresis of serum, erythrocytes, and fibroblasts in two pedigrees. *Am J Hum Genet* 37:898-911, 1985
17. NEEL JV, BAIER LJ, 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
18. MOIRENWEISER HW, WURZINGER KH, NEEL JV: Frequency and distribution of rare electrophoretic mobility variants in the population of Ann Arbor, Michigan. (*Ann Hum Genet*, submitted)
19. NEEL JV, SATOH C, ASAKAWA J, TAKAHASHI N, FUJITA M, GORIKI K: The pattern of genetic variation in some erythrocyte and serum proteins of Japanese. (in preparation)
20. CHAKRABORTY R: Appendix to Ferrell et al: Number of independent genes examined in family surveys and its effect on gene frequency estimation. *Am J Hum Genet* 30:550-2, 1978
21. KONDO I, YAMAMOTO T, YAMAKAWA K, SHIBASAKI M, HAMAGUCHI II: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis. VII. Genetic polymorphism of cytosol polypeptide with molecular weight of 38,000. *Hum Genet* 70:328-32, 1985
22. KONDO I, YAMAKAWA K, SHIBASAKI M, YAMAMOTO T, HAMAGUCHI II: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis. V. Genetic polymorphism of cytosol 31^k polypeptide. *Hum Genet* 66:244-47, 1984
23. KONDO I, YAMAMOTO T, YAMAKAWA K, HARADA S, OISHI H, NISHIGAKI I, HAMAGUCHI II: Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis pattern of cellular proteins. VI. Identification of esterase D in the two-dimensional gel electrophoresis pattern of cellular proteins. *Hum Genet* 66:248-51, 1984
24. WANNER LA, NEEL JV, NEISLER MI: Separation of allelic variants by two-dimensional electrophoresis. *Am J Hum Genet* 34:209-15, 1982
25. 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)
26. McCONKEY EII, TAYLOR BJ, PHAN D: Human heterozygosity: A new estimate. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6500-4, 1979
27. WALTON KE, STYER D, GREENSTEIN EI: Genetic polymorphisms in normal human fibroblasts as analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Biol Chem* 254:7951-60, 1979
28. NEEL JV: A revised estimate of the amount of genetic variation in human proteins: Implications for the distribution of DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 36:1135-48, 1984
29. COOPER DN, SMITH BA, COOKE HJ, NIEMANN S, SCHMIDTKE J: An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet* 69:201-5, 1985
30. NEI M: Molecular population genetics and evolution. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1979