

THE RATE WITH WHICH SPONTANEOUS MUTATION ALTERS THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF POLYPEPTIDES

ポリペプチドの電気泳動上の移動度に変化を生じる
自然突然変異の頻度

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

CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子

KAZUAKI GORIKI, M.D. 郷力和明

MIKIO FUJITA, M.D. 藤田幹雄

NORIO TAKAHASHI, Ph.D. 高橋規郎

JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. 浅川順一

RYUJI HAZAMA, M.D. 迫 龍二



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:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に掲載された。

Proc Natl Acad Sci USA 83:389-93, 1986

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。

THE RATE WITH WHICH SPONTANEOUS MUTATION ALTERS
THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF POLYPEPTIDESポリペプチドの電気泳動上の移動度に変化を生じる
自然突然変異の頻度JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.*; CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子);
KAZUAKI GORI, M.D. (郷力和明); MIKIO FUJITA, M.D. (藤田幹雄);
NORIO TAKAHASHI, Ph.D. (高橋規郎); JUN-ICHI ASAKAWA, Ph.D. (浅川順一);
RYUJI HAZAMA, M.D. (迫龍二)*Biochemical Genetics Laboratory, Department of Genetics*
遺伝学部遺伝生化学室

SUMMARY

Studies of a Japanese population, involving a total of 539,170 locus tests distributed over 36 polypeptides, yielded three presumptive spontaneous mutations altering the electrophoretic mobility of the polypeptide. This corresponds to a mutation rate of 0.6×10^{-5} /locus/generation. The a priori probability that undetected discrepancies between legal and biological parentage might in our test system result in an apparent electrophoretic mutation in this population is calculated to be only 0.3×10^{-7} /locus/generation. Since electrophoresis only detects about half the amino acid substitutions due to mutations of nucleotides, the corrected rate for mutations causing amino acid substitutions in polypeptides is 1.2×10^{-5} /locus/generation. With allowance for synonymous mutations and those resulting in stop codons, the total mutation rate for nucleotide changes in the exons encoding a polypeptide becomes approximately 1.8×10^{-5} /locus/generation. When the present observations are combined with all the other available data concerning mutation resulting in electrophoretic variants, the electrophoretic rate drops to 0.3×10^{-5} /locus/generation, the total locus rate to roughly 1.0×10^{-5} , and the nucleotide rate to 1×10^{-8} . Even with this lower estimate, given approximately 3×10^9 nucleotides in the haploid

要 約

36種のポリペプチドにわたり、合計539,170遺伝子座テストの行われた日本人集団における調査の結果、ポリペプチドの電気泳動上の移動度に変化を生じさせる突然変異と考えられるもの3例が検出された。これは突然変異率が 0.6×10^{-5} /遺伝子座/世代に相当する。我々の検査法において、戸籍上の両親が、生物学上の両親ではないという食い違いが検出されなかったために、見かけ上は電気泳動上の移動度に変化を生じる突然変異であるとみなされる確率はこの集団において、わずか 0.3×10^{-7} /遺伝子座/世代であると計算されている。電気泳動法では、ヌクレオチドの突然変異によって生じたアミノ酸置換のうち、約半数しか検出されないため、ポリペプチド中にアミノ酸置換を引き起こす突然変異の頻度の補正値は、 1.2×10^{-5} /遺伝子座/世代である。同義突然変異及びストップコドンを生じる突然変異を考慮すると、ポリペプチドをコードするエクソン部分にヌクレオチド変異をもたらす総合突然変異率は、約 1.8×10^{-5} /遺伝子座/世代となる。本報で得られた結果を、電気泳動上の変異型を生じる突然変異に関して入手し得るすべてのほかのデータと一緒にすると、電気泳動法で検出される突然変異の頻度は 0.3×10^{-5} /遺伝子座/世代と低下し、遺伝子座当たりの総合突然変異率は、約 1.0×10^{-5} 、(エクソン中の)ヌクレオチド当たりの突然変異率は 1×10^{-8} となる。半数体ゲノム中には、約 3×10^9 個のヌクレオチドがあり、1個のポリペプチドをコードするエクソン

*RERF Consultant and Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School; Supported by US Department of Energy Contract AC-02-82-ER-60089.

放影研顧問及び Michigan 大学医学部人類遺伝学教室; 米国エネルギー省契約 AC-02-82-ER-60089 による支援。

genome and an average of 10^3 exon nucleotides per polypeptide encoded, the implication, if these exon rates can be generalized, is of approximately 30 nucleotide mutations per gamete per generation. This estimate of the frequency of "point" mutations does not include small duplications, rearrangements, or deletions resulting from unequal crossing over, transcription errors, etc.

INTRODUCTION

In a previous report¹ we have described the protocol and the preliminary results of a search for mutations altering the electrophoretic behavior of a series of proteins, in children of atomic bomb survivors and a suitable group of control children. This study has now been completed. In the present report we will describe the spontaneous mutation rate observed in the so-called control children of that study, i.e., children both of whose parents were more than 2,500 m from the hypocenter at the time of the bombings (ATB) or one of whose parents was at this distance and the other not in the city. These parents, referred to as the distally exposed, are presumed to have received either no radiation, or very negligible amounts (<1 rad) ATB. In a few instances, neither of the parents in the control group were in the city ATB. These data will be combined with other similar data available from the world literature, to obtain a best estimate of the rate with which mutation results in electrophoretic variants, and to infer both the total rate with which mutation results in an amino acid substitution in proteins and the nucleotide mutation rate to which this corresponds.

MATERIALS AND METHODS

Altogether, 10,609 children of distally exposed parents living in Hiroshima and Nagasaki have been examined with respect to the occurrence of rare electrophoretic variants of 30 proteins (i.e., variants not occurring in polymorphic proportions, allele frequency <0.01). The proteins examined, with abbreviations, are listed in Table 1. Most of the electrophoretic techniques employed have been referenced in our previous publications²⁻⁵; additional references for various proteins are as follows: ESA, ESB, ESD, CA1, and CA2⁶⁻¹⁰; GOT1¹¹, GPT¹², G6PD^{13,14}, and PGM3.^{15,16}

Whenever a rare variant was encountered, an effort was made to obtain a blood sample from both the father and the mother, to confirm the hereditary nature of the variant. On the few occasions

中のヌクレオチドは平均 10^3 個であるとし、更に、エクソンについて得られたヌクレオチド当たりの突然変異率を (DNA すべてに) 一般化し得るものならば、この低い方の推定値を用いてさえも、配偶子当たり、世代当たり約30個のヌクレオチド突然変異があることを意味する。この“点”突然変異の頻度に対する推定値には、小さな重複、再配列、不等交差によって生じる欠失、転写エラーなどは含まれていない。

緒言

我々は以前の報告書¹で、原爆被爆者の子供と適当な対照群の子供の一連の蛋白質の電気泳動上の動き方を変化させる突然変異を検出する研究計画とその予備的結果について述べた。今、この研究は終了した。本報では、この研究のいわゆる対照群の子供 (すなわち、両親が原爆時に爆心地から 2,500m 以遠にいたか、あるいは、片親がこの距離におり、片親は市内にいなかった場合) に観察された自然突然変異率について述べる。遠距離被爆者と呼ばれるこれらの両親は、原爆時に放射線に被曝していないか、極めて低線量 (<1 rad) を受けたにすぎないと考えられる。少数ながら、対照群の両親がいずれも原爆時に市内にいなかった例もある。これらのデータと諸外国の文献から得られる類似のデータを併せて検討することにより、電気泳動上の変異型を招来する突然変異率を正確に推定し、また、蛋白質中で生じるアミノ酸置換すべての原因となる総合突然変異率とそれに対応するヌクレオチド突然変異率の両方を推定する。

材料及び方法

広島・長崎の遠距離被爆者の子供合計10,609人を調査し、30種の蛋白質の電気泳動上のまれな変異型 (多型の頻度では発生しない変異型、対立遺伝子頻度 <0.01) の発生を調べた。検査した蛋白質は表1に略語で示した。使用した電気泳動技法の多くは我々の以前の報告書²⁻⁵に示してある。更に種々の蛋白質について次の文献を挙げる: ESA, ESB, ESD, CA1 及び CA2⁶⁻¹⁰; GOT1¹¹; GPT¹²; G6PD^{13,14}; PGM3.^{15,16}

まれな変異型が検出された場合は、両親から血液標本を採取し、その変異型の遺伝的性質を確認した。両親共に当該変異型を示さず、養子又は考えられる

when neither parent exhibited the variant and no statement concerning adoption or paternity other than assumed was forthcoming from the parents, an effort was made to detect with the appropriate genetic typings any discrepancy between stated and biological parentage. To this end, determinations were carried out for the following useful blood types: A₁ and B of the ABO system; M, N, S, and s of the MNSs system; C, D, E, c, and e of the Rh system; and Fy^a of the Duffy system. In addition, among the 30 systems studied for the occurrence of mutation, polymorphisms useful for the detection of parentage discrepancies occur in the following: HP, ACP1, 6PGD, PGM1, PGM3, ADA, ESD, GPT, and GOT1. A type of α 1-antitrypsin (PI) was also used. Finally, histocompatibility (MHC) typings were obtained, involving 12 antigens of the A complex, 32 of the B complex, and four of the C complex. In each instance of putative mutation, the system in which the mutation occurred was excluded from the calculation.

RESULTS

The data base. Table 1 presents the number of rare variants of each protein encountered. The data on the common genetic polymorphisms are not included in the table. We also exclude from the table mention of two relatively high frequency rare variants, TF D_{CHI}, with an allele frequency of 0.006, and CP C_{NG1}, with a frequency of 0.009. For these two traits, as well as the common polymorphisms, the probability that a family study would reveal a mutation is much less than for a truly rare variant. Later we will consider the (small) error this omission might have introduced into our estimation of the mutation rate. The entry "Total loci screened" corresponds to the number of locus tests, i.e., for an autosomal trait, and a sex-linked trait in females, twice the number of electrophoretic determinations, but for a sex-linked trait in males, only the actual number of proteins typed for variation. Hemoglobin A1 and A2 are tetramers which share a common polypeptide, hemoglobin A1 having the composition $\alpha_2\beta_2$ and A2, the composition of $\alpha_2\delta_2$. However, there are two loci encoding for the α polypeptides. Accordingly, the numbers of β and δ locus tests are each twice the number of electrophoretic tests, but the number of α locus tests is four times the determinations of the system yielding the highest number of observations, namely, A1. No other locus among those studied is known to be duplicated in this fashion. LDH is a tetramer involving two independently coded units

親子関係について両親からの確認が得られないまれなケースにおいては、適切な遺伝学的検査法を用いて、戸籍上の両親と生物学上の両親の食い違いを調べた。このため、次の血液型について測定を行った：ABO 型の A₁ 及び B；MNSs 型の M, N, S 及び s；Rh 型の C, D, E, c 及び e；Duffy 型の Fy^a。更に、突然変異の発生について調べた30種のシステムのうち、HP, ACP1, 6PGD, PGM1, PGM3, ADA, ESD, GPT 及び GOT1 には、親子関係の食い違いの確認に有用な多型現象が存在する。 α 1-アンチトリプシン (PI) のタイプの一つもこの目的のために用いた。最後に、組織適合性 (MHC) タイプの検査を A 複合体の12種の抗原、B 複合体の32種の抗原及び C 複合体の4種の抗原を用いて行った。突然変異と考えられる各例において、突然変異が発生したシステムは計算に加えなかった。

結 果

データベース。検出したまれな変異蛋白質の数を表1に示した。この表には通常の遺伝的多型現象に関するデータは示していない。また、比較的高い頻度を示す2種のまれな変異型、すなわち、対立遺伝子頻度が0.006のTF D_{CHI}と0.009のCP C_{NG1}もこの表には含めていない。これら二つの形質並びに通常の多型性形質においては、家族調査で突然変異が探知される確率は、本当にまれな変異型の場合よりも極めて低い。これらを除外したことで突然変異率の推定に生ずると考えられる(小さな)誤差については後で検討する。“検査した遺伝子座の合計”は遺伝子座テスト数に相当するが、これは、常染色体形質及び女性の伴性形質では電気泳動テストの2倍であるが、男性の伴性形質では変異型探知のため検査した蛋白質の実際の数に相当する。ヘモグロビン A1 と A2 は共通のポリペプチドを有する四量体であり、前者の構造は $\alpha_2\beta_2$ 、後者の構造は $\alpha_2\delta_2$ である。しかし、 α ポリペプチドをコードする遺伝子座は二つある。したがって、 β 及び δ 遺伝子座テストの数はそれぞれ電気泳動テスト数の2倍であるが、 α 遺伝子座テスト数は最多観察数を示すシステム、すなわち、A1 の測定数の4倍である。検査した遺伝子座のうち、このように重複しているものはほかにない。LDH は別々にコードされた二つのユニットを

TABLE 1 THE RESULTS FROM EXAMINING 30 PROTEINS (36 POLYPEPTIDES) FOR THE OCCURRENCE OF SPONTANEOUS MUTATIONS ALTERING ELECTROPHORETIC MOBILITY IN A JAPANESE POPULATION

表1 日本人集団における電気泳動上の移動度を変化させる自然突然変異の発生頻度について30種類の蛋白質(36種類のポリペプチド)を検査した結果

Protein	EC No.	Symbol	Total loci screened	No. of rare variants	Variants both parents examined	Equivalent locus tests	Exceptional children
Haptoglobin		HP	20922	15	12	16738	1
Transferrin		TF	21210	92	62	14294	
Ceruloplasmin		CP	21196	10	8	16957	
Albumin		ALB	21212	33	25	16070	1 [†]
Hemoglobin A1		HBA1	63612	1	0	42408	
Hemoglobin A2		HBA2	21190	0	0	21190	
Adenosine deaminase	3.5.4 .4	ADA	21204	9	8	18848	1
6-Phosphogluconate dehydrogenase	1.1.1 .44	6PGD	21208	9	5	11782	1
Adenylate kinase 1	2.7.4 .3	AK1	21066	3	3	21066	
Phosphoglucomutase 1	2.7.5 .1	PGM1	21144	60	43	15153	
Phosphoglucomutase 2	2.7.5 .1	PGM2	21152	14	10	15109	
Phosphoglucomutase 3	2.7.5 .1	PGM3	6900	0	0	6900	
Acid phosphatase 1	3.1.3 .2	ACP1	20370	0	0	20370	
Triosephosphate isomerase	5.3.1 .1	TPI	18452	4	4	18452	
Nucleoside phosphorylase	2.4.2 .1	NP	20530	18	11	12546	
Esterase A	3.1.1 .1	ESA	80264	20	17	68224	
Esterase B	3.1.1 .1	ESB	19420	0	0	19420	
Esterase D	3.1.1 .1	ESD	20362	1	1	20362	
Peptidase A	3.4.11.-	PEPA	21152	11	7	13460	
Peptidase B	3.4.11.-	PEPB	21218	11	4	7716	
Glucophosphate isomerase	5.3.1 .9	GPI	21218	75	63	17823	1 [†]
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1 .42	ICD	21176	18	15	17647	
Lactate dehydrogenase	1.1.1 .27	LDH	42392	2	2	42392	
Malate dehydrogenase	1.1.1 .37	MDH	21212	3	1	7071	
Carbonic anhydrase 1	4.2.1 .1	CA1	21118	3	3	21118	
Carbonic anhydrase 2	4.2.1 .1	CA2	21172	2	0	0	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.1.1 .49	G6PD M F	1794 4164	1 8	0 7	0 3644	
Glutamate-oxaloacetate transaminase (soluble)	2.6.1 .1	GOT1	16346	56	43	12551	
Glutamate-pyruvate transaminase	2.6.1 .2	GPT	16334	51	40	12811	
Phosphoglycerate kinase	2.7.2 .3	PGK M F	2218 4830	0 0	0 0	2218 4830	
Total			697,758	530	394	539,170	5

† Parentage exclusion

and so must be double weighted. Finally, the series of isozymes termed esterase A are thought to be the product of four loci, so that for this system the locus tests are eight times the number of determinations.

Unfortunately, because of death or lack of cooperation, it was not always possible to test both parents of a child with a rare variant. It is only when both parents of a child with a variant can be examined that the data permit a rigorous treatment of mutation. Table 1 lists the number of times, by system, in which both parents of a child with a variant could be examined. We estimate for each system the number of alleles which have been effectively screened for mutation by multiplying the fraction of variants for which family studies are complete by the total number of determinations. This convention requires that all the determinations of a polypeptide for which no variants have been encountered are credited as contributing to locus tests. With these conventions, we can calculate that the series provides 539,170 "equivalent locus tests."

The putative mutations. There were in this series five children with a variant not observed in either parent, the presence of the variant confirmed by duplicate, independent tests. In two of these five children, the serological typings described earlier revealed a discrepancy between stated and biological parentage, and these children are excluded from further consideration. We are thus left with three putative mutants, as follows:

1. A rapidly migrating variant of haptoglobin was encountered in a female child of parents who were distally exposed in Nagasaki. The abnormal phenotype consisted of the set of bands associated with the Hp 2 phenotype and a set of bands with a slightly faster mobility than the Hp 2 bands. The variant will be further characterized and pictured by J. Asakawa (in preparation). Neither of the parents nor four siblings exhibited the unusual bands on repeated determinations, and the bands do not correspond to any variant encountered in the course of the study. No parentage discrepancy was revealed by the battery of tests enumerated earlier.
2. A slowly migrating variant of 6-phosphogluconate dehydrogenase was detected in a male child of distally exposed, Hiroshima parents, neither of whom exhibited the trait. This enzyme is a dimer. The abnormal phenotype consisted of three

有する四量体であるので、通常の2倍に計算する必要がある。最後に、エステラーゼAと呼ばれる一連のアイソザイムは四つの遺伝子座の産物と考えられるため、このシステムに対する遺伝子座テストは測定回数の8倍である。

残念ながら、死亡のため、又は協力が得られなかったため、まれな変異型を有する子供の両親を検査することが常に可能であったわけではない。変異型を有する子供の両親を検査できる場合にのみ、突然変異について厳密な判断ができる。変異型を有する子供の両親を検査することができた回数をシステム別に表1に示した。家族調査が終了している変異型の割合に総測定数を乗ずることにより、各システムごとに、突然変異探知のために有効に検査した対立遺伝子の数を推定した。この方法では、変異型が検出できなかったポリペプチドの測定がすべて遺伝子座テストに寄与するものと考えなければならない。このような方法を用いると、本研究における“遺伝子座相当テスト”数は539,170と算定される。

突然変異と考えられるもの。本研究では変異型の存在が個別に行われた反復テストにより確認されたが、両親には同じ変異型を確認できなかった子供が5人あった。これらの5人の子供のうち2人においては、前述の血清学的検査により戸籍上の両親と生物学上の両親に食い違いが認められたため、この2人は以後の検討対象からははずした。したがって、突然変異と考えられるのは以下の3例となった。

1. 長崎の遠距離被爆者の子供(女)に、移動度の速いハプトグロビン変異型が検出された。この異常表現型は、Hp 2 表現型を示す1組のバンドとHp 2 バンドよりも若干移動度が速い1組のバンドから成る。この変異型については、浅川がその特徴を更に調べ、詳細を報告する予定である(報告書作成中)。何度検査しても両親及び4人の同胞は、異常バンドを示さなかったし、また、これらの異常バンドは本研究中に検出されたいずれの変異型にも相当しない。先に挙げた一連のテストでは、親子関係の食い違いは認められなかった。
2. 広島 of 遠距離被爆者の子供(男)に、移動度の遅い6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ変異型が検出された。両親共にこの形質を示さなかった。この酵素は二量体である。この異常表現型は、正常な

bands, interpreted as corresponding to the normal homodimer, a heterodimer of one normal and one mutant polypeptide, and the homodimer of the mutant polypeptide. The mutant isozyme migrates more slowly than the type C isozyme which occurs in 19% of the population, and it migrates more slowly than any other variant isozyme encountered in the study. The variant will be described in greater detail by N. Takahashi (in preparation). There was no parentage exclusion with the complete battery of tests.

3. This putative mutation is a rapidly migrating variant of adenosine deaminase detected in a male offspring of parents neither of whom were in Nagasaki ATB. The normal phenotype of this isozyme under our electrophoretic condition consists of three bands. The mutant phenotype consists of five bands. The two more anodal bands are variant, the two more cathodal bands correspond to ADA phenotype type 1. The central band is interpreted as an overlap of the third band of type 1 with the first band of the variant. The phenotype thus far in our hands appears identical to that of the rare type 1-6 variant. There was no exclusion of paternity with the full battery of test systems.

These three mutations among 539,170 equivalent locus tests yield a crude mutation rate for electromorphs of 0.6×10^{-5} /locus/generation. The error in this estimate is substantial, at the 95% confidence interval the lower and upper bounds being respectively 0.1×10^{-5} and 1.6×10^{-5} . (This and subsequent confidence intervals are found by first treating the number of mutations as approximately distributed as a Poisson variate with parameter λ . Upper and lower 95% confidence limits for this parameter are obtained and then divided by the sample size to yield a confidence interval for the mutation rate.)

Correction for undetected discrepancies between legal and biological parentage. The available tests will not detect all instances of a discrepancy between stated and biological parentage. Earlier¹⁷ we have suggested that the frequency with which undetected discrepancies between stated and actual paternity contribute to the apparent mutation rate can be estimated by the expression

ホモダイマーに相当すると考えられるもの、一つの正常ポリペプチドと一つの突然変異ポリペプチドとのヘテロダイマー、及び突然変異ポリペプチドのホモダイマーの3種のパンドから成る。この突然変異アイソザイムの移動度は全対象者の19%に見られるC型アイソザイムよりも遅く、また、本研究で検出した他のいずれの変異型アイソザイムよりも遅い。この変異型については高橋がより詳しく報告する予定である(報告書作成中)。すべてのテストを行っても、親子関係に問題はなかった。

3. この突然変異と考えられる例は、原爆時に長崎にいなかった両親の子供(男)に検出された、移動度の速いアデノシンデアミナーゼ変異型である。我々の電気泳動条件におけるこのアイソザイムの正常な表現型は三つのパンドからなるが、この突然変異表現型は五つのパンドからなる。陽極側に移動する二つのパンドは変異型であり、陰極側に移動する二つのパンドはADA表現型1型に相当する。中央のパンドは、1型の3番目のパンドと変異型の最初のパンドが重なり合ったものと考えられる。現在までのところ、この表現型は、まれな1-6型変異型の表現型と同一であると思われる。すべてのテストを行ったが、親子関係に問題はなかった。

539,170件の遺伝子座テストで3件の突然変異が検出されたので、electromorphの粗突然変異率は 0.6×10^{-5} /遺伝子座/世代となる。この推定における誤差は極めて大きく、95%信頼区間の上下限はそれぞれ 0.1×10^{-5} と 1.6×10^{-5} である。(この信頼区間及び以後の信頼区間は、まず、突然変異数がほぼパラメータ λ を有するPoisson変量として分布するものとして計算した。このパラメータの95%信頼上下限界を算出し、サンプルの大きさで割って突然変異率の信頼区間を得た。)

戸籍上の両親と生物学上の両親の食い違いのうち検出されなかったものに対する補正。現在利用可能なテストでは、戸籍上の両親と生物学上の両親の食い違いのすべてを検出することはできない。以前¹⁷我々は、このような父性の食い違いが見かけ上突然変異率に寄与する頻度は次の式から推定できると示唆した。

$$IW(1 - D) \quad ,$$

where I = the frequency of nonpaternity in the population under consideration; W = the average frequency in the population under consideration of the alleles scored as rare variants; and D = probability of detecting nonpaternity with the battery of exclusion tests employed. A corrected estimate of the mutation rate (μ_{EST}) is derived from the apparent mutation rate (μ_{OBS}) by subtracting the value of the above term, i.e.,

$$\mu_{EST} = \mu_{OBS} - IW(1 - D)$$

We are fortunate that Dr. Howard B. Hamilton of RERF has been responsible for a program that typed a significant fraction of the children and parents who entered into this study with respect to the ABO blood groups (Hamilton, in preparation). Among 3,295 mother-father-child trios typed with respect to this system, there were three paternity exclusions, i.e., a frequency of 0.0009. Given the allele frequencies of the ABO system in Japanese, the probability of detecting nonpaternity with this system is 0.20.¹⁸ The corrected frequency of paternity discrepancies in our series (I) thus becomes 0.0045.

The allele frequency of rare variants in this series (W), variants which would be considered as candidates for mutation, can be seen from Table 1 to be 0.0008. It should be noted that simply employing the average frequency in this calculation is a conservative procedure. It is intuitively obvious that if the putative mutant is a unique electromorph in the series (as is the case for two of the putative mutants), the probability that it is a true mutation is enhanced over the probability if it had already been encountered several times.

Finally, the average probability of detecting a discrepancy between legal and biological paternity can be calculated to be 0.859 from the allele frequencies of the population with respect to the 13 useful blood types, serum proteins, and erythrocyte enzymes for which we have data (excluding in each case the system thought to be contributing the mutation). In this calculation we have employed the probabilities supplied by Chakraborty et al,¹⁸ plus those calculated by ourselves for the ESD system. With respect to the MHC system, we are indebted to Dr. Norikazu Yasuda of the Japanese National Institute of Radiological Sciences for the calculation that for Japanese, the probability of an

ここで、 I = 調査対象集団における非父性の頻度、 W = 調査対象集団における、まれな変異型と判定された対立遺伝子の平均的頻度、 D = 使用した食い違い検出テストで非父性を確認する確率。突然変異率の補正推定値は、見掛けの突然変異率 (μ_{OBS}) から上述の項の値を引くことで得られる。すなわち、次の式となる。

幸運にも、放影研の Dr. Howard B. Hamilton が、本研究の対象である子供及び両親の大部分について ABO 血液型を決定するプログラムを担当していた (Hamilton, 報告書作成中)。この血液型決定が行われた 3,295 組の母親-父親-子供のトリオのうち、親子関係の食い違いが 3 件認められ、頻度は 0.0009 であった。日本人における ABO 型の対立遺伝子頻度を考慮すると、この血液型で非父性関係を探知できる確率は 0.20 である。¹⁸ したがって、本研究における父性の食い違いの補正頻度 (I) は 0.0045 となる。

本研究におけるまれな変異型、すなわち、突然変異をもたらすと考えられる変異型の対立遺伝子頻度 (W) は表 1 から 0.0008 であることがわかる。この計算で単に平均頻度を用いているのは少なめに見積っているのだということに注意すべきである。この突然変異と考えられる例が (2 例の突然変異と考えられるものと同じように) 本研究で検出された *electromorph* の中で特異なものであれば、それが真の突然変異である確率は、それが既に数回確認されているものの場合の確率よりも高くなることは極めて明瞭である。

最後に、我々がデータを保持している 13 種類の有用な血液型、血清蛋白及び赤血球酵素について得られた対象者の対立遺伝子頻度から (各例において、突然変異に寄与すると考えられるシステムは除外する)、戸籍上の両親が生物学上の両親ではないという食い違いが確認される平均的確率は 0.859 と算定される。この計算においては、Chakraborty ら¹⁸ が報告した確率と我々が ESD システム用に算出した確率を用いた。MHC システムに関しては、放射線医学総合研究所の安田徳一博士の算定により、日本人では、我々

exclusion with the battery of specificities employed in our testing is 0.943. The combined probability of an exclusion is therefore 0.992. (All of these calculations assume that the nonlegal father would be drawn at random with respect to the genetic systems on which the exclusion probabilities are calculated. Any tendency for such fathers to be relatives of the husband would alter the calculation substantially.)

Under the circumstances, the a priori probability that an undetected parentage discrepancy (essentially, discrepancy between legal and biological paternity) is the cause of the apparent mutation becomes $0.0045 \times 0.0008 \times 0.008$, or 0.3×10^{-7} . Thus, in the study of mutation under these circumstances, undetected discrepancies between legal and biological parentage should not inflate the mutation rate to the extent that an adjustment is indicated. Incidentally, the frequency with which our procedures detected discrepancies between legal and biological parentage as a cause of apparent mutations was 2/539,170 locus tests, or 0.37×10^{-5} , with the 95% confidence bounds being 0.04 and 1.3×10^{-5} . The theoretical expectation from the above is $0.0045 \times 0.0008 \times 0.992 = 0.36 \times 10^{-5}$. The fact that observation and expectation agree so well provides some support for the validity of the procedures employed.

Other sources of data; a combined estimate. Table 2 summarizes the results of those various other studies of electrophoretic variants in which the data have been presented in such a fashion that they can be used to estimate mutation rates. These other studies yielded one putative mutation, in a series from West Germany.²⁰ The efforts to detect a paternity discrepancy in this instance included HLA typings as well as the more standard markers. Since a baseline rate for paternity discrepancies does not seem to be available for the sample on which this study was based, we are unable to estimate the probability that the apparent mutation resulted from an undetected parentage discrepancy. Although ethnic differences in mutation rates are a theoretical possibility, at this stage of the data we will assume homogeneity in the series. There are four putative mutations in a total of 1,255,296 locus tests, for a rate of 0.3×10^{-5} /locus/generation, with 95% confidence limits of 0.1×10^{-5} and 0.8×10^{-5} .

のテストで食い違いが発見される確率は0.943であることがわかり、これを使用させていただいた。したがって、食い違いが発見される総合確率は0.992である。(これらすべての計算においては、食い違い検出の確率を算定する各遺伝システムについて、戸籍上父親でない者を無作為に選ぶことを前提としている。このような父親が夫の親戚であれば、計算の結果が大幅に変わる。)

以上の結果から、親子関係の食い違い(主に、戸籍上の父親が生物学上の父親ではないという食い違い)が検出されなかったことが見掛け上の突然変異の原因となる確率は $0.0045 \times 0.0008 \times 0.008$ すなわち、 0.3×10^{-7} である。したがって、このような突然変異研究においては、戸籍上の両親が生物学上の両親ではないという食い違いが検出されなかったことが、補正が必要なほど突然変異率を上昇させることはないと考えられる。ついであるが、戸籍上の両親と生物学上の両親との間の食い違いが見掛け上の突然変異の原因となっていたことを、我々の方法で検出した頻度は 2/539,170 遺伝子座テスト、すなわち、 0.37×10^{-5} であり、95%信頼限界は 0.04×10^{-5} と 1.3×10^{-5} であった。上述の理論的期待値は $0.0045 \times 0.0008 \times 0.992 = 0.36 \times 10^{-5}$ となると考えられる。観察値と期待値の一致度が極めて高いことから、使用した方法が妥当なものであったことが示唆される。

その他のデータ源; 総合推定値. 電気泳動上の変異型に関する研究のうちでデータが突然変異率の推定に使用できるような状態で提示されている他の様々な研究の結果を表2に要約した。これらの研究のうち、西独の研究²⁰で突然変異と考えられるものが1例認められている。この研究では、親子関係の食い違いを調べるために、HLA タイピング及びより標準的なマーカーを使用している。この研究の対象者については、親子関係の食い違いの基準率が得られないようなので、見掛け上の突然変異が親子関係の食い違いが確認できなかったことに起因する確率を推定することはできない。突然変異率の民族的差異が理論的には考えられるが、現在までに得られたデータから判断すると、一連の研究においてこのような差異はないと考えられる。合計1,255,296遺伝子座テストで突然変異と考えられるものが4件確認され、突然変異率は 0.3×10^{-5} /遺伝子座/世代であり、95%信頼限界は 0.1×10^{-5} 及び 0.8×10^{-5} であった。

TABLE 2 THE RESULTS OF DIRECT TESTS FOR THE OCCURRENCE OF MUTATIONS RESULTING IN ELECTROPHORETIC VARIANTS

表2 電気泳動上の変異型をもたらす突然変異の発生に関する直接テストの結果

Locate	Population	Locus tests	Mutations	Reference
Japan	Japanese	539,170	3	This paper
United Kingdom	Caucasians	133,478	0	19
West Germany	Caucasians	~225,000	1	20
United States	Caucasians	218,376		Mohrenweiser et al in preparation
	American blacks	18,900		"
Central and South America	Amerindians	118,475	0	Neel et al in preparation
Marshall Islands	Micronesians	1,897	0	21
		1,255,296	4	

DISCUSSION

Sources of error in the estimates. As noted earlier, the most obvious source of error in such studies is a discrepancy between legal and biological parentage. Operationally this category of error can include a confusion of samples at some time during collection and processing. Our experience indicates that under the conditions of this study, this was a minor problem. Two additional sources of error must be mentioned. 1) In the formal sense, none of these mutations is as yet proven on the basis of genetic transmission or a demonstrated alteration of the DNA. We accept these variants as resulting from mutation because in this study they have a phenotypic validity comparable to the numerous other variants whose genetic nature was proven. Evidence to the effect that these or comparable variants are transmitted in a codominant fashion, which should in due time become available, is obviously highly desirable. In animal systems where similar electrophoretic variants have been induced, they have had a high transmissibility.²²⁻²⁵ 2) Whenever the phenotype of a common polymorphism was encountered, that phenotype was not investigated for a mutational origin. We have shown that the potential underestimate of the mutation rate introduced by this omission is of the order of 10%.²¹ An adjustment for so minor an error scarcely seems indicated at this time.

考 察

推定値の誤差源. 前述のように、このような研究における最も顕著な誤差源は戸籍上の両親と生物学上の両親の食い違いである。作業手順の面から見ると、この種の誤差には、標本の採取及び処理のある時期に起こった取り違いも含まれていると考えられる。我々の経験によれば、本研究の条件ではこれは小さな問題にすぎない。更に二つの誤差源について述べなければならない。1) 正式な意味からすれば、これらの突然変異のいずれも遺伝学的には確認されておらず、DNAの明瞭な変異も証明されてはいない。我々はこれらの変異型を突然変異の結果生じたものとするが、それは、本研究で、これらの変異型が、遺伝学的特徴が確認されている多くの他の変異型と同様に表現型として妥当と考えられる性質を示すからである。これらの変異型か又は類似の変異型が共優性的に遺伝することを示す証拠は、そのうちに得られるであろうが、これは明らかに極めて望ましいことである。電気泳動上で同様の変異型が認められた動物においては、それらの変異型が遺伝する比率は高い。²²⁻²⁵ 2) 通常の多型性変異表現型が確認された場合には、その表現型が突然変異によるものかどうかを調べたことはなかった。このように多型性変異を除外することによって生ずると思われる突然変異率の低下は10%程度と考えられる。²¹ 今回、このように小さい誤差を補正する必要はないと思われる。

To what rate for amino acid and nucleotide substitutions does this observed rate correspond? Roughly one third of all possible amino acid substitutions in a polypeptide should alter molecular charge and be detected by electrophoresis. However, there is also evidence that electrophoresis is sensitive to molecular configuration, and in a recent review of the literature we have suggested that electrophoresis detects about half of all amino acid substitutions.²⁶ The rate reported in this paper when combined with other data sets thus indicates a mutation rate resulting in amino acid substitutions of 0.6×10^{-5} /locus/generation.

It is also possible from the present study to reach some preliminary inferences concerning the rate with which mutation results in nucleotide substitutions. Within exons, between 1/4 and 1/3 of all nucleotide mutations should be synonymous or result in stop codons, the exact frequency depending on the gene under consideration. These types of mutation will of course not be detected by the techniques employed in this study. Thus electrophoresis should detect about one third of all nucleotide substitutions in exons. Let us assume the average protein entering into these mutation rate studies required 1,000 nucleotides for its specification. Then the observed electrophoretic rate corresponds to a nucleotide rate of $(0.3 \times 10^{-5} \times 3)/1000$, or approximately 1.0×10^{-8} /nucleotide/generation. In addition to primary alterations in nucleotides, this "nucleotide rate" can reflect the result of allelic conversion or intragenic recombination, such as we have discussed in connection with the *PGM1* locus.²⁷ The error term for this estimate must be large but cannot be estimated with any precision at present.

There have been several previous efforts to estimate nucleotide mutation rates. On the basis of the observed frequency of the hemoglobin variants in population surveys Motulsky²⁸ and Kimura and Ohta²⁹ estimated by an indirect approach nucleotide rates per generation of 2.5×10^{-9} and 2.8×10^{-8} , respectively, the difference between the estimates being primarily due to their assumptions concerning the proportion of the variants due to mutation in the preceding generation. Nute and Stamatoyannopoulos³⁰ surveyed the world literature for case reports concerning the origin of an unstable hemoglobin or a hemoglobin M through mutation, collecting 40 examples from 10 countries. As they

観察された突然変異率がアミノ酸及びヌクレオチド置換とどの程度対応しているか。1個のポリペプチド中に生じたすべてのアミノ酸置換のうち約1/3が分子の電荷を変化させ、電気泳動法により検出される。しかし、電気泳動法は分子構造の変化をも検出できるという証拠もある。最近の文献研究で我々は、電気泳動法によりすべてのアミノ酸置換の約1/2が検出されると報告した。²⁶ この論文で報告した突然変異率と他のデータを合わせると、アミノ酸置換を引き起こす突然変異率は 0.6×10^{-5} /遺伝子座/世代 となる。

また、本研究から、突然変異がヌクレオチド置換を引き起こす比率に関して予備的な推論を立てることもできる。エクソンにおいては、すべてのヌクレオチド突然変異の1/4~1/3が同義突然変異であるか又はストップコドンを生じるものであるが、正確な頻度は当該遺伝子に依存する。このような種類の突然変異は本研究で用いた技法では当然検出されない。したがって、電気泳動法では、エクソン中のすべてのヌクレオチド置換の約1/3が検出される。このような突然変異率研究の対象となる平均的蛋白質は、その特定化のために1,000個のヌクレオチドを必要とするものと仮定すると、電気泳動法で観察された突然変異率はヌクレオチド当たりの突然変異率としては $(0.3 \times 10^{-5} \times 3)/1,000$ すなわち約 1.0×10^{-8} /ヌクレオチド/世代 に相当する。ヌクレオチドにおける第一次の変異に加えて、この“ヌクレオチド率”が、*PGM1* 遺伝子座について述べたような、²⁷ 対立遺伝子交換又は遺伝子内組換えの結果を反映し得る。この推定値の誤差は大きいであろうが、現在のところ正確には推定できない。

ヌクレオチドの突然変異率を推定する試みがこれまでに何回かなされた。集団調査におけるヘモグロビン変異型の観察頻度に基づいて、Motulsky²⁸ と木村及び大田²⁹ は間接的方法を用いて世代当たりのヌクレオチド突然変異率をそれぞれ 2.5×10^{-9} 及び 2.8×10^{-8} と推定した。両推定値間の差異は、主に、前世代における、突然変異による変異型の割合についての仮定の差によるものである。Nute 及び Stamatoyannopoulos³⁰ は、世界各国の文献を検討して不安定型ヘモグロビンの起源又は突然変異に由来するヘモグロビンMを示す症例報告を調べ、10か国から40例を収集した。彼らが指摘するように、これ

point out, neither the population base from which these reports are drawn nor the completeness of ascertainment can be precisely estimated. Only a subset of the possible nucleotide mutations will result in a hemoglobin M-type mutation or an unstable hemoglobin. Taking this factor into consideration, they estimate a nucleotide rate (averaging α and β locus rates) of 0.59×10^{-8} /nucleotide/generation on the basis of the unstable hemoglobins and 1.45×10^{-8} /nucleotide/generation on the basis of the hemoglobin M's. The unweighted average of these estimates, 1.0×10^{-8} , is identical with our own estimate.

A nucleotide rate of 1.0×10^{-8} per generation represents an amazing fidelity of replication. Even so, if such exon rates are characteristic of the DNA as a whole, then, with approximately 3×10^9 nucleotides comprising the haploid human genome, a nucleotide rate of 1.0×10^{-8} leads to the expectation of some 30 mutations involving nucleotide substitutions in each gamete! The error in this estimate is of course large, but we believe the estimate to be somewhat conservative, because for any given enzyme, only a single type of electrophoretic screening was employed, and experience has demonstrated that no one screening system will detect all the electrophoretic variants of a given protein. Thus some electrophoretic variants resulting from mutation may have been missed. On the other hand, even if the estimate were too high by a factor of 2, an estimate of 15 nucleotide mutations per gamete is still a major departure from past estimates of human mutation rates.

There are at present only very limited data from which to estimate the additional frequency in humans of spontaneous mutation characterized by submicroscopic duplications, deletions, and rearrangements of the DNA. Analysis of a series of individuals with the sex-linked hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) deficiency (Lesch-Nyhan syndrome) revealed that 5 among 28 exhibited Southern blot patterns suggestive of major gene alterations.³¹ These findings do not provide an unbiased view of mutational events at this locus because, on the one hand, selection has already to some extent influenced which mutations are still in the population and, on the other hand, since ascertainment was through a functional test (Lesch-Nyhan syndrome) nucleotide substitutions resulting in little or no functional impairment will be underrepresented. Studies of somatic cell mutations

らの報告書が基盤としている集団及びこれが突然変異であることをどの程度完全に確認しているかを詳しく推定することはできない。ヌクレオチド突然変異の一部分のみがヘモグロビンM型突然変異又は不安定型ヘモグロビンを引き起こすと考えられる。この事実を考慮に入れて、彼らは、ヌクレオチド突然変異率(α 遺伝子座及び β 遺伝子座の率の平均)を不安定型ヘモグロビンに基づいて 0.59×10^{-8} /ヌクレオチド/世代、ヘモグロビンMに基づいて 1.45×10^{-8} /ヌクレオチド/世代と推定した。これらの推定値の非加重平均 1.0×10^{-8} は我々の推定値と同一である。

世代当たりのヌクレオチド突然変異率が 1.0×10^{-8} であることは、複製が極めて正確に行われていることを示す。たとえそうであっても、このようなエクソンにおける突然変異率が全体としてDNAに特徴的なものであるとすれば、ヒト半数体ゲノムを構成する約 3×10^9 個のヌクレオチドに対してヌクレオチド突然変異率が 1.0×10^{-8} であるということから、各配偶子においてヌクレオチド置換を伴う約30個の突然変異が発生すると考えられる。この推定値における誤差は当然大きいであろうが、これは控え目な値だと思われる。なぜなら、特定の酵素について単一の電気泳動法のみを用いてスクリーニングを行ったが、経験から判断して、単一のスクリーニング法では、特定の蛋白質の電気泳動上の変異型をすべて検出することはできないと考えられるからである。したがって、突然変異による電気泳動上の変異型の幾つかは見落とされている可能性がある。一方、この推定値は2倍も高く見積つたもので、実際の値はその半分であるとしても、配偶子当たりヌクレオチド突然変異が15個あるという推定はやはりヒト突然変異率の過去の推定値から大きくかけ離れたものである。

ヒトの自然突然変異のうちで顕微鏡では見えない程度に小さなDNAの重複、欠失及び再配列の頻度を更に推定するには、現在のところ極めて限られたデータしかない。伴性ヒポキサンチン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ(HPRT)欠損症(Lesch-Nyhan症候群)の解析が行われ、28例中5例において遺伝子の大きな変化を示唆するSouthern blotパターンが見られることがわかった。³¹ これらの所見から、この遺伝子座における突然変異について偏りのない見解は得られない。なぜなら、どの突然変異が集団内になお存在するかについては、選択が既にある程度の影響を及ぼしており、他方、変異の確認は機能テストによって行われたため(Lesch-Nyhan症候群)、ヌクレオチド置換のうちで機能障害をほとんど、あるいは全く生じさせないものは、実際よりも低い割合でしか確認できないからである。生殖細胞突然変異

at this same locus—which may not have the same spectrum as germ line mutations—revealed that 12 of 21 human, male-derived lymphocyte clones selected for spontaneous loss of HPRT activity exhibited substantial gene alterations.³² Analysis of malignant tissue in retinoblastoma³³ and Wilm's tumor^{34–37} reveals evidence for a wide variety of chromosomal events in the "second mutation" that precipitates the tumor. Thus, chromosomal mutations have been detected in 12 of 22 independently derived specimens of Wilm's tumor studied by molecular techniques. In principle the basis for these events may vary from mitotic recombination or loss of a substantial portion of a chromosome to small DNA lesions. For these somatic mutations, as for the germinal, a functional test has been superimposed on the primary event, and nucleotide substitutions associated with little functional impairment may be underrepresented. In addition to these uncertainties, it is unlikely that mutation resulting in duplication events such as those characterizing the α -hemoglobin locus^{38,39} or the β -interferon locus⁴⁰ would come to attention in these studies. To a first approximation, we suggest that on a per locus basis, mutational events characterized by other-than-nucleotide substitutions are roughly half as common as nucleotide substitutions. If this approximation is correct, then gamete rates for "point" mutations become of the order of 40–50 per generation. The error of this estimate is large and somewhat indeterminate, but at this stage in our study of mutation rates at the molecular level we are still confronted with fixing orders of magnitude.

The implications of mutation rates of this magnitude for population genetics and evolutionary theory are profound. The first response of many population geneticists is to suggest that most of these occur in 'silent' DNA and are of no real biological significance. Unfortunately for that line of reasoning, the detailed studies of the globin loci have abundantly documented the adverse effects of mutations in introns and the sequences 5' and 3' to the exons, as well as the consequences of unequal crossing over resulting from gene duplications.^{41–44} The amount of silent DNA is steadily shrinking. The question of how our species accommodates such mutation rates is central to evolutionary thought.

とは同じスペクトルをもたないと考えられる、同一遺伝子座の体細胞突然変異について研究が行われ、HPRT 活性の自然欠損を示す21個のヒト男性由来リンパ球クローンのうち12個が大幅な遺伝子変化を示すことが確認された。³² 網膜芽腫³³ 及びウィルムス腫瘍^{34–37} における悪性組織の解析により、腫瘍化をもたらす“第二次突然変異”に多種多様な染色体事象が関与していることがわかった。由来の異なる22個のウィルムス腫瘍標本が分子生物学上の技法で調べられ、このうち12個に染色体突然変異が検出された。大体において、これらの事象の原因は、体細胞分裂における組換え又は染色体の大部分の欠損から小さなDNAの傷害まで様々である。これらの体細胞突然変異の場合、生殖細胞突然変異の場合と同様に、機能テストは一次事象に対して行われるので、機能障害のほとんどないようなヌクレオチド置換は実際よりも低い割合でしか表れないかもしれない。これらの不確定要素に加えて、 α -ヘモグロビン遺伝子座、^{38,39} 又は β -インターフェロン遺伝子座⁴⁰ に特徴的な重複を引き起こす突然変異がこれらの研究で注目されるとは考えられない。概算すると、一つの遺伝子座について、ヌクレオチド置換以外の突然変異は、ヌクレオチド置換の約半分と考えられる。この概算が正しいとすれば、配偶子当たりの“点”突然変異は世代当たり40～50である。この推定値の誤差は大きく、幾分不明確であるが、分子レベルにおける我々の突然変異率研究の現段階においては、我々は依然として突然変異の程度を決定することができない。

このような規模の突然変異率の集団遺伝学及び進化理論における意味は深甚である。多くの集団遺伝学者の最初の反応は、これらの突然変異の大部分は機能をもたない‘沈黙’DNA部分に発生しており、実際の生物学的意義はないというものである。このような意見にとっては残念なことであろうが、グロビン遺伝子座に関する詳細な研究により、イントロン及びエクソンの5'側、3'側配列中に生じた突然変異が及ぼす悪影響並びに遺伝子重複によって生ずる不等交差の結果が十分に報告されている。^{41–44} 機能をもたない沈黙DNA部分の量は着実に少なくなっている。ヒトがこのような突然変異率にどのように適応しているのかということは進化の概念における中心の問題である。

REFERENCES

参考文献

1. NEEL JV, SATOH C, HAMILTON HB, OTAKE M, GORIKI 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. FERRELL RE, UEDA N, SATOH C, TANIS RJ, NEEL JV, HAMILTON HB, INAMIZU T, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. I. Albumin, ceruloplasmin, haptoglobin, and transferrin. *Ann Hum Genet* 40:407-18, 1977 (RERF TR 3-76)
3. UEDA N, SATOH C, TANIS RJ, FERRELL RE, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. II. Carbonic anhydrase I and II, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, nucleoside phosphorylase, triose phosphate isomerase, haemoglobin A and haemoglobin A₂. *Ann Hum Genet* 41:43-52, 1977 (RERF TR 4-76)
4. SATOH C, FERRELL RE, TANIS RJ, UEDA N, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. III. Phosphoglucomutase-1, phosphoglucomutase-2, 6-phosphogluconate dehydrogenase, adenylate kinase, and adenosine deaminase. *Ann Hum Genet* 41:169-83, 1977 (RERF TR 5-76)
5. TANIS RJ, UEDA N, SATOH C, FERRELL RE, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, OHNO N: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. IV. Acid phosphatase, NADP-isocitrate dehydrogenase, peptidase A, peptidase B and phosphohexose isomerase. *Ann Hum Genet* 41:419-28, 1978 (RERF TR 6-76)
6. TASHIAN RE: The esterases and carbonic anhydrases of human erythrocytes. In *Biochemical Methods in Red Cell Genetics*. Ed by J. J. Yunis. New York, Academic Press, 1969. pp307-36
7. HOPKINSON DA, MESTRINER MA, CORTNER J, HARRIS H: Esterase D: A new human polymorphism. *Ann Hum Genet* 37:119-37, 1973
8. HOPKINSON DA, COPPOCK JS, MÜHLEMANN MF, EDWARDS YH: The detection and differentiation of the products of the human carbonic anhydrase loci, CA_I and CA_{II}, using fluorogenic substrates. *Ann Hum Genet* 38:155-62, 1973
9. EDWARDS YH, HOPKINSON DA, HARRIS H: Inherited variants of human nucleoside phosphorylase. *Ann Hum Genet* 34:395-408, 1971
10. FILDES RA, HARRIS H: Genetically determined variation of adenylate kinase in man. *Nature* 209:261-3, 1966
11. CHEN SH, GIBLETT ER: Genetic variation of soluble glutamic-oxaloacetic transaminase in man. *Am J Hum Genet* 23:419-24, 1971
12. CHEN SH, GIBLETT ER: Polymorphism of soluble glutamic-pyruvic transaminase: A new genetic marker in man. *Science* 173:148-9, 1971
13. MATHAI CK, OHNO E, BEUTLER E: Sex-linkage of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in equidae. *Nature* 210:115-6, 1966
14. WHO SCIENTIFIC GROUP: Standardization of procedure for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *WHO Tech Rep Ser* 366:1-53, 1967
15. SPENCER N, HOPKINSON DA, HARRIS H: Phosphoglucomutase polymorphism in man. *Nature* 204:742-5, 1964
16. SIEBERT G, RITTER H, KOMPFF J: Substrate affinity in PGM₁, PGM₂, and PGM₃ isozymes. *Hum Genet* 56:213-5, 1980

17. NEEL JV: The detection of increased mutation rates in human populations. *Perspect Biol Med* 14:522-37, 1971
18. CHAKRABORTY R, SHAW M, SCHULL WJ: Exclusion of paternity: The current state of the art. *Am J Hum Genet* 26:477-88, 1974
19. HARRIS H, HOPKINSON DA, ROBSON EB: The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: Data on 43 enzyme loci in man. *Ann Hum Genet* 37:237-53, 1974
20. ALTLAND K, KAEMPFER M, FORSSBOHM M, WERNER W: Monitoring for changing mutation rates using blood samples submitted to PKU screening. *Proc 6th Int Congr Hum Genet. Human Genetics, Part A: The Unfolding Genome*. New York, Alan R. Liss, 1982. pp 277-87
21. NEEL JV et al: Biochemical approaches to monitoring human populations for germinal mutation rates: I. Electrophoresis. In *Utilization of Mammalian Specific Locus Studies in Hazard Evaluation of Genetic Risk*. Ed by F. J. de Serres and W. Sheridan. New York, Plenum Press, 1983. pp 71-93
22. SOARES ER: TEM-induced gene mutations at enzyme loci in the mouse. *Environ Mutagen* 1:19-25, 1979
23. JOHNSON FM, ROBERTS GT, SHARMA RK, CHASALOW F, ZWEIDINGER R, MORGAN A, HENDREN RW, LEWIS SE: The detection of mutants in mice by electrophoresis: Results of a model induction experiment with procarbazine. *Genetics* 97:113-24, 1981
24. JOHNSON FM, LEWIS SE: Electrophoretically detected germinal mutations induced in the mouse by ethylnitrosourea. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3138-41, 1981
25. JOHNSON FM, LEWIS SE: The detection of ENU-induced mutants in mice by electrophoresis and the problems of evaluating the mutation rate increase. In *Utilization of Mammalian Specific Locus Studies in Hazard Evaluation and Estimation of Genetic Risk*. Ed by F. J. de Serres and W. Sheridan. New York, Plenum Press, 1983. pp 95-108
26. 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
27. TAKAHASHI N, NEEL JV, SATOH C, NISHIZAKI J, MASUNARI N: A phylogeny for the principal alleles of the human phosphoglucosmutase-1 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6636-40, 1982
28. MOTULSKY AG: Some evolutionary implications of biochemical variants in man. *Proc 8th Int Congr Anthropol Ethnol Sci, Vol. I*. Tokyo, Japanese Science Council, 1968. pp 364-5
29. KIMURA M, OHTA T: Mutation and evolution at the molecular level. *Genetics (Suppl)* 73:19-35, 1973
30. NUTE PE, STAMMATOYANOPOULOS G: Estimates of mutation rates per nucleotide in man, based on observations of *de novo* hemoglobin mutants. In *Population and Biological Aspects of Human Mutation*. Ed by E. Hook and I. Porter. New York, Academic Press, 1981. pp 337-47
31. YANG TP, PATEL PI, CHINAULT AL, STOUT JT, JACKSON LG, HILDEBRAND BM, CASKEY CT: Molecular evidence for new mutation at the hprt locus in Lesch-Nyhan patients. *Nature* 310:412-4, 1984
32. TURNER DR, MORLEY AA, HALIANDROS M, KUTLACA R, SANDERSON BJ: In vivo somatic mutations in human lymphocytes frequently result from major gene alterations. *Nature* 315:343-5, 1985
33. CAVENEE WK, DRYJA TP, PHILLIPS RA, BENEDICT WF, GODBOUT R, GALLIE RL, MURPHREE AL, STRONG LC, WHITE RL: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305:779-84, 1983
34. KOUFOS A, HANSEN MF, LAMPKIN BC, WORKMAN ML, COPELAND NG, JENKINS NA, CAVENEE WK: Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumour. *Nature* 309:170-2, 1984

35. ORKIN SH, GOLDMAN DS, SALLAN SE: Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumour. *Nature* 309:172-4, 1984
36. REEVE AE, HONSIANX PJ, GARDNER RJM, CHEWINGS WE, GRINDLEY RM, MILLOW LJ: Loss of a Harvey ras allele in sporadic Wilms' tumour. *Nature* 309:174-6, 1984
37. FEARON ER, VOGELSTEIN B, FEINBERG AP: Somatic deletion and duplication of genes on chromosome 11 in Wilms' tumours. *Nature* 309:176-8, 1984
38. MANIATIS T, FRITSCH EF, LAUER J, LAWN RM, PROUDFOOT NJ, SHANDER MHM, SIEN C-KJ: The structural and chromosomal arrangement of human globin genes. In *Organization and Expression of Globin Genes*. Ed by G. Stamatoyanopoulos and A. W. Nienhuis. New York, Alan R. Liss, 1981. pp 15-31
39. HIGGS DR, WEATHERALL DJ: Alpha thalassemia. In *Current Topics in Hematology*, Vol. 4. Ed by S. Piomelli and S. Yachnin. New York, Alan R. Liss, 1983. pp 37-97
40. OHLSSON M, FEDER J, CAVALLI-SFORZA LL, von GABAIN A: Close linkage of α and β interferons and infrequent duplication of β interferon in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4473-6, 1985
41. MANIATIS T, FRITSCH EF, LAUER J, LAWN RM: The molecular genetics of human hemoglobins. *Annu Rev Genet* 14:145-78, 1980
42. LEDER P: The organization and expression of cloned globin genes. *Harvey Lect* 74:81-100, 1980
43. WEATHERALL DJ, CLEGG JB: *The Thallassaemia Syndromes*, 3rd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publishers, 1981. pp xii, 875
44. ORKIN SH, KAZAZIAN III Jr: The mutation and polymorphism of the human beta-globin gene and its surrounding DNA. *Annu Rev Genet* 18:131-71, 1984