

ショウジョウバエにおける同一遺伝子座支配のアイソザイムの生化学的研究——クロショウジョウバエアロザイムの生化学的差異とその生物学的意義——

成瀬 澄子, 佐々木美枝子

緒 論

アイソザイムは同じ反応を触媒する活性タンパクで、その物理化学的性質の差異のため電気泳動により区別出来る酵素に与えられた名称である。アイソザイムには、遺伝的基礎からみるといくつかの種類のもが含まれているが、そのうち単一遺伝子座の複対立遺伝子によって支配されるものは特にアロザイムと呼ばれ、集団中の遺伝的変異を探索するために利用されている。

Lewontin & Hubby (1966) 以来、自然集団のアイソザイム多型に関する多くの研究により、集団内には遺伝的変異がかなり高く維持されていることが明らかにされた。Gillespie, Kojima ら(1968, 1970) はショウジョウバエの自然集団の分析から、その変異性はすべての酵素で同じ程度を示すのではなく、糖代謝に関連ある酵素群では比較的 low、他の酵素では高いことを発見し、次のように考察している。すなわち、糖代謝に関与する酵素の基質は、前の反応で生産された単一の分子であるが、糖代謝以外の酵素では、その基質が直接外界から導入されるものである。そのため、前者の基質は量的差異があっても質的差異は生じない。これに反し、後者の基質は量的にも質的にも変化に富んでいる。従って後者の高い多型はこのような環境の多様性に対応した結果である。この考えを支持する集団遺伝学的データも報告されている (Ayala and Powell 1972) が、その反論も多く出されている (Selander, 1976)。

Kojima らの考察は酵素の生理学的意義からも興味深い問題であるが、ショウジョウバエ・アロザイムの生化学的性質に関する研究は数少なく、アルカリ性ホスファターゼ (Harper & Armstrong 1972, 1973), エステラーゼ (Narise 1873), ADH (Vigue & Johnson 1973, Day et al 1974)

註1 本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (No. 134050, No. 154205) により遂行された。

註2 この報文では次の略号を用いる。ADH: アルコール脱水素酵素, α GPDH: α グリセロリン酸脱水素酵素, MDH: リンゴ酸脱水素酵素, NAD^+ : 酸化型ニコチンアデニンジヌクレオチド, NADH : 還元型ニコチンアデニンジヌクレオチド, α GP: α グリセロリン酸, DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸, OAA: オキサロ酢酸。

と MDH (Hay & Armstrong 1976) にすぎない。これらの結果を要約すると、キイロショウジョウバエ MDH 以外の酵素の精製アロザイム間では、至適 pH, 基質特異性, 阻害剤の影響, ミカエリス恒数, 温度抵抗性などは必ずしも一定でなく, 多少の差異がみられた。ADH については, 温度抵抗性のちがう 2 つのアロザイム遺伝子の頻度が, 緯度に対応した勾配をもって変化し (Vigue & Johnson 1973), アルコールに対する活性の異なる系統間でアルコール抵抗性にちがいがあることも報告されている (Briscoe et al. 1975, van Delden et al. 1978)。以上の結果から, 基質が直接的環境から由来する酵素においては, アロザイム間に差があり, 外的条件の多様性によって異った選択をうけているように思われる。

MDH は糖代謝系の酵素の一つであり, ショウジョウバエにおいても, 他の動物と同様に, 細胞質に存在するものと, ミトコンドリア内のものと 2 種類があり, これらは機能的, 免疫学的, 電気泳動的に区別出来, 別々の遺伝子座支配下にある (Kitto & Kaplan 1966, Kitto & Lewis 1967, McReynolds & Kitto 1970, O'Brien 1973)。キイロショウジョウバエの細胞質 MDH の 2 つのアロザイムについての報告 (Hay & Armstrong 1976) によれば, 精製酵素の生化学的性質に差は見出されていない。細胞質 MDH はミトコンドリア MDH と協調してリンゴ酸往復輸送系を構成しており, 解糖系で生じた細胞質 NADH を酸化し, その還元当量をミトコンドリア内へ移行してミトコンドリア内での酸化的リン酸化と結びつける上で重要な役割をもっている (Borst 1961, Kaplan 1963)。従って, アロザイム間で生化学的性質に差がみられるのは, 糖代謝以外の酵素の特徴であるかも知れない。しかしながら, キイロショウジョウバエの α GPDH では 2 つのアロザイム間で, 粗酵素ではあるが, 活性の温度依存度に違いがあり, 高温で活性の高いアロザイムを支配する遺伝子が, 平均気温の高い地域で高い頻度を示している (Johnson & Shaffer 1973, Miller et al. 1975)。この酵素はリンゴ酸往復輸送系と似た往復輸送系をつくっている酵素で, 特に昆虫の飛翔筋で重要な役割を果している (Sacktor 1970, White & Kaplan 1972, O'Brien & MacIntyre 1972)。このように糖代謝系酵素のアロザイムの生化学的性質については報告も少なく, 統一的結論が得られていない。この研究は糖代謝系にふくまれる酵素のアロザイムの性質について詳細な結果を得, これを基礎としてこれらの酵素のアロザイムの集団内変異の維持機構をさぐる手がかりとする目的で行われた。

クロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) は日本各地に生息し, ビール工場, 貯木場などに大集団を形成している上, 染色体逆位が存在しないという利点から, アロザイム分析に用いられている。大羽の報告 (1977) によれば, その細胞質 MDH 遺伝子座には 2 つの対立遺伝子 (MDH^f , MDH^s) があり, 日本集団の平均頻度はそれぞれ 0.9928, 0.0072 である。細胞質 α GPDH 遺伝子座には 3 つの複対立遺伝子 ($\alpha GPDH^f$, $\alpha GPDH^m$, $\alpha GPDH^s$) が見出され, 平均頻度はそれぞれ 0.0036, 0.9875, 0.0089 である。これらの遺伝子頻度は生息地域, 季節などで変化がみられない。以上のようにこの 2 つの酵素には, いくつかのアロザイム遺伝子は存在するが, その一つが

集団中に大多数をしめて、やや単型的である。ここではクロショウジョウバエの細胞質MDH及び α GPDHのアロザイム系統からアロザイムを抽出、精製し、アロザイム間で生化学的性質を比較し、併せて、生化学的差が示す生物学的意義について報告する。

材 料 と 方 法

(1) 系統と培養

実験に用いたクロショウジョウバエの細胞質MDHの2アロザイム(MDH^f, MDH^s)系統は1973年に、細胞質 α GPDHの3アロザイム(α GPDH^f, α GPDH^m, α GPDH^s)系統は1978年に御前崎の貯木場集団で採取され、実験室で維持された系統のうち、各アロザイム遺伝子に関して異型接合のものから新しく分離して得られたものである。

各アロザイム系統のハエはイースト・糖培地(5%蔗糖, 8%乾燥イースト, 0.8%寒天—以下通常培地という—)の管瓶中で25°Cで飼育され、羽化後1~2日の成虫を-25°C, 又は-70°Cに保存し、約50g集まった後酵素材料として用いた。体内リンゴ酸の測定には、同様の条件で飼育した羽化後1日の生きた成虫を材料とした。MDHアロザイム系統の成虫の生存率に及ぼす栄養条件の影響をしらべるには、上述の条件で羽化した1~2日目のハエを系統別にそれぞれイースト培地(8%乾燥イースト, 0.8%寒天)と通常培地の入った管瓶に入れ、25°Cで培養した。 α GPDHアロザイム系統の成虫の生存率に及ぼす飼育温度の影響をしらべる実験では、系統毎に通常培地で35°±1°C培養をした。

(2) 電気泳動

澱粉ゲル電気泳動はShaw & Prasad (1970)の方法に従った。電気泳動後、縦に薄い切片としMDH及び α GPDH活性を検出した。

(3) 酵素活性の測定

MDH及び α GPDH活性は25°Cにおいて日立分光光度計を用い、340 nmの吸収により測定した。活性は時間とともに低下するため、活性度の計算には初速度を用いた。活性の単位は1分間に1 μ moleのNADH又はNAD⁺を生成する酵素量で表わした。タンパク質の測定はLowry et al (1951)の方法に従い、牛血清アルブミンで標準曲線を描いた。標準測定条件は全量3 mlで下記の通りである。1) OAA還元反応では0.1 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中に0.33 mM OAA, 0.2 mM NADHと酵素をふくむ液。2) リンゴ酸酸化反応では0.1 M グリシン緩衝液(pH 9.3)中に33 mM リンゴ酸ナトリウム, 0.2 mM NAD⁺と酵素をふくむ液。3) DHAP還元反応は0.1 M トリス酢酸緩衝液(pH 6.75)中に0.1 mM DHAP, 0.1 mM NADHと酵素をふくむ液。4) α GP酸化反応では0.1 M グリシン緩衝液(pH 10.0)中に33 mM α GP, 0.1 mM NAD⁺と

酵素を含む液。以上の条件はそれぞれ酵素の至適 pH であり、阻害を起さない基質、助酵素の濃度である。

(4) リンゴ酸量の測定

成虫の体内リンゴ酸量は Gutmann & Wahlefeld (1974) の方法を用いた。この方法はハエの過塩素酸抽出液から K_2CO_3 の添加により過塩素酸を除いた全抽出液中のリンゴ酸を基質とし、ショウジョウバエ MDH を用いその脱水素反応によって生じた NADH 量を分光光度計ではかる酵素法である。緩衝液はヒドラジングリシン (pH 9.5) を用い、生じた OAA をヒドラゾンとして除き反応の完了を期した。

(5) アロザイムの温度抵抗性

精製したアロザイムを別々に一定量試験管にとり恒温槽中に保ち、一定時間後一定量の酵素をとり活性を測定した。この場合比較するアロザイムのタンパク質量をほぼ一定にして実験に供した。処理した温度は MDH では $45^{\circ}C$ 、 α GPDH では $35^{\circ}C$ と $45^{\circ}C$ である。

(6) 栄養条件の異なる培地における生存率の比較

MDH 2 系統 (MDH^f/MDH^f , MDH^s/MDH^s) とその雑種 (MDH^f/MDH^s) の羽化 1 ~ 2 日目のハエを 10 対ずつ通常培地とイースト培地を含む管瓶に別々に入れ、3 ~ 4 日毎に新しい餌の入った管瓶に移して $25^{\circ}C$ 、28 日間飼育した。新しい瓶に移す度に死んだり、エサの上に落ちたものを除き、生存数を数えた。各系統につき各培地の反復は 50 である。

(7) $35^{\circ}C$ における生存率の比較

羽化後 2 日の α GPDH アロザイム 3 系統を別々に 10 対ずつ通常餌の管瓶に入れ、 $35^{\circ}C$ の恒温器中で飼育した。この温度は親バエの生存にとってもきびしい条件であり、1 週間後には殆んどが死亡する。餌は 1 乃至 2 日毎に変え、各系統とも 30 反復実験を行った。

結 果

(1) 酵素の電気泳動ザイモグラム

1 匹のクロショウジョウバエの抽出液を pH 7.0 の澱粉ゲルで電気泳動すると、陽極へ走るものと陰極へ移動するものの 2 つの MDH がある。前者は細胞質 MDH で、後者はミトコンドリア MDH である。Fig. 1 (A) に示したように、細胞質 MDH 遺伝子の同型接合体 (MDH^f/MDH^f , MDH^s/MDH^s) はそれぞれ 1 本のバンドとして現われ、その異型接合体 (MDH^f/MDH^s) は各々の親のバンドと、その中央に 1 本の雑種酵素の 3 本のバンドを形成する。このことは他の多くの酵素で示されているように、この酵素が 2 量体であることを示唆している。

細胞質 α GPDH アロザイムホモ系統 (α GPDH^f/ α GPDH^f, α GPDH^m/ α GPDH^m,

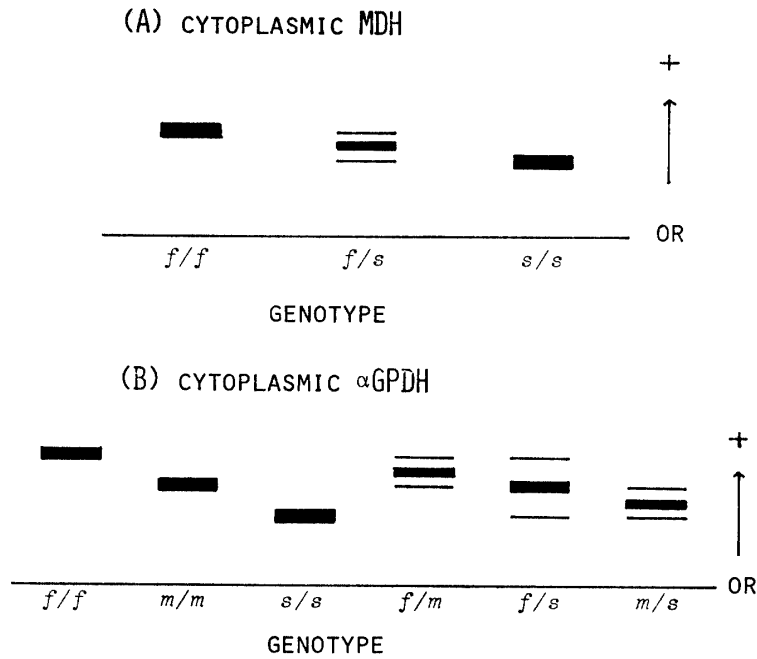


Fig. 1. Zymograms of cytoplasmic MDH and α GPDH phenotypes of *D. virilis*.

α GPDH^s/ α GPDH^s) はそれぞれ陽極へ移動する 1 本のバンドを現わす。そのおのおのの雑種第 1 代は親のバンドの中央に 1 本の雑種酵素を持ち、1 個体が 3 本のバンドを形成する (Fig. 1 (B))。この酵素も MDH と同様、2 量体であることが示唆されるが、精製酵素の分子量は 65,000 であり、そのサブユニットは 35,000 であることが確かめられた (Narise, in preparation)。

この実験に使用した細胞質 MDH アロザイム系統の α GPDH 遺伝子座について電気泳動でしらべた結果、MDH^f、MDH^s 系統とも α GPDH^f をホモに持つことを確認した。 α GPDH の 3 系統は MDH 遺伝子座については MDH^f の同型接合であった。

(2) アロザイムの抽出と精製

酵素の抽出、精製はその全過程を通じ 4 °C 前後の低温で行った。

Table 1. Purification of cytoplasmic MDH^s allozyme from *D. virilis*.

Steps	Total protein (mg)	Total activity* (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification
1) Crude extract	2,067	1,808	0.87	100	
2) Ammonium sulfate precipitate	1,637	1,746	1.07	96.6	
3) DEAE-cellulose (batch)	744	1,084	1.46	60.0	
4) CM-cellulose (batch)	365	198	0.54	11.0	1
5) DEAE-Sephadex (column)	18.8	132	7.02	7.3	13.1
6) Sephadex G-100 (column)	5.0	78	15.60	4.3	28.9
7) Hydroxylapatite (column)	0.9	48	53.33	2.7	98.8

* Enzyme activity was measured using malate as substrate.

a) MDHアロザイム。Table 1 にはここで用いた方法によって得た精製過程の結果を示した。表は MDH^s の結果を示してあるが、MDH^r も同じ方法によりほぼ同じ収量、精製度が得られた。アロザイム系統のハエ 50 g を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) 250 ml 中でホモジェネートし、13,000 回転、30 分間遠心した上清を粗抽出液とした。

この抽出液に硫酸を加え、その40~80%飽和の沈澱を集め、50 mM リン酸緩衝液に透析する。硫酸分画によって得られた酵素液は、予じめ 50 mM リン酸緩衝液で平衡化された DEAE-セルロースに吸着させ、バッチ法で、ミトコンドリアMDHの一部と夾雑タンパクの一部を除いた。滲液を集めて 5 mM リン酸緩衝液に透析し、同じ緩衝液で平衡化した CM-セルロースにバッチ法により吸着させた。吸引し、CM-セルロースを緩衝液で洗浄するとミトコンドリアMDHはこのセルロースに吸着して細胞質 MDH のみが滲液の中に出てくる。この処理でタンパク量も MDH 活性も低下するのは (Table 1)、細胞内の MDH 活性の 8 割以上を占めるミトコンドリア MDH (Hay & Armstrong 1976) を除いたため、この比活性を細胞質 MDH 活性の基盤とした。この液を 2 mM リン酸緩衝液で透析したのち、DEAE-セファデックスカラムに吸着させ、同緩衝液で洗浄後、0~0.2 M NaCl の直線勾配で溶出した。MDH 活性の高い分画を集めて飽和硫酸液に透析して液を濃縮し、5 mM リン酸緩衝液で平衡化したファデックス G-100 カラムにのせ、同緩衝液で溶出する。活性の高い分画を集めて 2 mM リン酸緩衝液で透析し、ヒドロキシアパタイトカラムにのせる。カラムを洗浄した後 30~200 mM リン酸緩衝液の直線勾配で溶出すると、MDH は 50~100 mM の間で殆んど溶出されてくる。この精製法により両アロザイムとも 100 倍及びそれ以上の標品が得られた。この酵素標品をディスク電気泳動にかけ、活性とタンパクを別々に染色すると、酵素活性と泳動度の一致する濃いタンパクバンドの外に、ごく薄い 1, 2 本のタンパクバンドが見られた。この夾雑タンパクを除くため、アフィニティークロマト法を用いたが、酵素の吸着条件下では活性の低下がいちじるしいため、この段階の標品を生化学実験に用いた。なお、ディスク電気泳動によって区別される夾雑タンパクは標品を凍結融解するとより濃く現れてくる。

b) α GPDH アロザイム。

3 種の α GPDH アロザイム系統の 1~2 日の親バエ 60 g からアロザイムを抽出、精製した。 α GPDH^s の精製過程の結果を Table 2 にまとめた。0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2 中でホモジェネートし、13,000 回転、30 分間の遠心により得られた上清を粗酵素とした。1%プロタミン硫酸を粗酵素液 1 ml 当り 0.2 ml 加え、生じた沈澱を遠心分離により除いた。上清に 80% 飽和になるように固形硫酸を加え、この時生ずる沈澱を集めて 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、バッチ法により DEAE-セルロース処理を行うと、かなりの夾雑タンパクが除かれる (Table 2)。この滲液を 10 mM トリス緩衝液 pH 7.6 で平衡化した DEAE-セルロースカラムにのせ、同緩衝液で洗浄後 0~0.2 M NaCl の直線勾配で溶出し、活性の高い画分を集める。この酵素液に硫酸

Table 2. Purification of cytoplasmic α GPDHs allozyme from *D. virilis*.

Steps	Total protein (mg)	Total activity* (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification
1) Crude extract	4,622	944.6	0.20	100	1
2) Protamine sulfate precipitate	2,454	940.5	0.38	99	1.9
3) Ammonium sulfate precipitate	1,864	861.0	0.46	91	2.3
4) DEAE-cellulose (batch)	1,414	827.4	0.59	88	2.9
5) DEAE-cellulose column (1)	243	655.8	2.70	69	13.5
6) Sephadex G-100 column	37.2	395.1	10.6	42	53.1
7) Hydroxylapatite column	12.4	305.1	24.6	32	123
8) DEAE-cellulose column (2)	8.0	245.7	30.7	26	154

* Enzyme activity was measured using α GP as substrate.

を加えてタンパクを沈澱させ、少量の 5 mM リン酸緩衝液 pH 7.2 に溶解したものをセファデフクス G-100 カラムに加え、その溶出液の活性の高い画分を集める。 α GPDH^m, α GPDH^s の場合はこの画分を 5 mM リン酸緩衝液 pH 7.2 で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに吸着させ 5~200 mM のリン酸緩衝液の直線勾配で溶出する。高い活性の画分のみを集め 10 mM トリス緩衝液 pH 7.6 の DEAE-セルロースカラムに吸着させ 0~0.2 M NaCl 直線勾配で溶出する。 α GPDH^r はヒドロキシアパタイトに吸着されないのでセファデフクス G-100 からの溶出液を 5 mM リン酸緩衝液 pH 7.2 で平衡化した DEAE-セルロースカラムに吸着させた後、0~0.2 M NaCl の直線勾配で溶出する。3 アロザイムとも 5 mM トリス塩酸 pH 7.2 に透析した後、凍結保存すると長期間にわたって活性は保持された。以上の方法で通常アロザイムは 150 倍以上に精製され、ディスク電気泳動の結果、活性に対応する単一なタンパクであることが確かめられた。

(3) アロザイムの生化学的性質

(a) MDH アロザイム。

MDH^r 及び MDH^s の pH 活性曲線を Fig. 2 に示した。リンゴ酸酸化の至適 pH は MDH^r の 9.75, MDH^s の 9.25 であるが、OAA 還元の場合はそれぞれ、6.75, 8.0 であった。生体 pH を 7.0 近辺と仮定すると、OAA 還元反応においては MDH^r は至適 pH の活性の 95% を示すが、MDH^s は 62% の活性を持つ。リンゴ酸酸化の至適 pH はともかなりアルカリ側に傾っていて、pH 7 近辺では至適 pH の活性のわずか 1/4 程の活性を示すだけであった。

高等動物の細胞質 MDH は高濃度の OAA で阻害されにくい、リンゴ酸の阻害を受けやすいという報告 (Kitto & Kaplan 1966) があるので基質濃度の影響をしらべた。両アロザイムともに、OAA の 1.0~1.5 mM で最大活性となるが、3.0 mM でも最大の 80% の活性を示した。又リンゴ酸の 30~40 mM で活性は最大に達し、それ以上の濃度で多少減少するが、300 mM でも最大

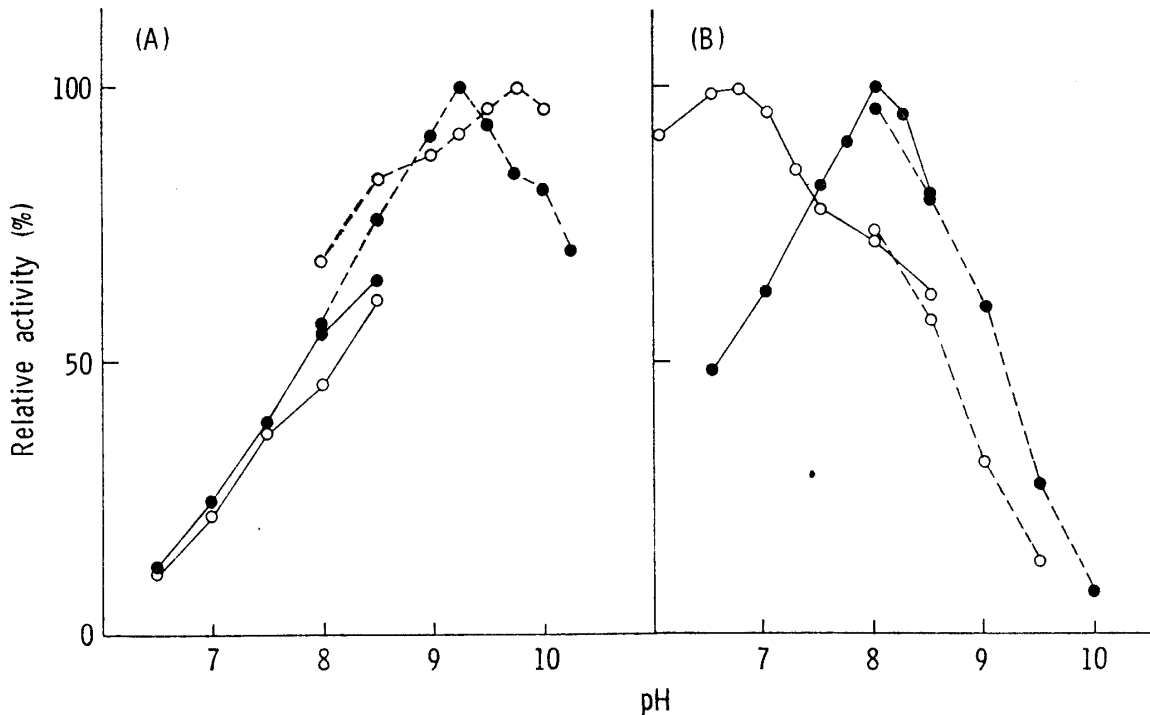


Fig. 2. The effect of pH on the activity of cytoplasmic MDH allozymes.

(A) Malate oxidation (B) Oxaloacetate reduction.

Solid line, 0.1 M phosphate buffer; Dashed line, 0.1 M glycine-NaOH buffer.

○ : MDH^f ● : MDH^s

の80%を示した。これらの結果はキイロショウジョウバエで得られた結果 (Hay & Armstrong 1976) と類似しており、昆虫の細胞質MDHの特性と思われる。基質の高濃度の影響には2つのアロザイム間で差がみられなかった。

次に基質及び助酵素の K_m 値をアロザイム間で比較した。 K_m 値は酵素活性を阻害しない基質及び助酵素の濃度範囲で測定し、Lineweaver-Burk plot から決定した。Table 3 にみられるように、リンゴ酸に対する K_m は MDH^f が 2.1 mM, MDH^s が 2.0 mM であり、OAA に対する K_m 値はそれぞれ 0.065 mM, 0.126 mM であった。これらの値は実験毎に差があるが、

Table 3. Apparent Michaelis constants for cytoplasmic MDH allozymes from *D. virilis*.

Substrates or coenzymes	pH	K_m (mM)	
		MDH ^s	MDH ^f
Malate	9.3	2.0	2.1
NAD ⁺	9.3	0.176	0.141
Oxaloacetate	7.5	0.126	0.065
NADH	7.5	0.034	0.032

Buffer used for malate oxidation and oxaloacetate reduction were 0.1 M Tris and 0.1 M phosphate, respectively.

MDH^f では 0.051~0.080 mM, MDH^s では 0.096~0.180 mM の範囲で反復結果が得られたので、この Km 値のちがいは有意であると思われる。すなわち、MDH^f の OAA に対する親和力が MDH^s のそれに優っていることを示している。NAD⁺ は 0.8 mM, NADH は 0.3 mM を最大濃度としてそれぞれの Km 値を測定したがこの濃度は酵素阻害を起さなかった。得られた値は MDH^f, MDH^s の間で類似している (Table 3)。

酵素の温度による失活は酵素特性の一つであるのでアロザイムの温度感受性をしらべた。MDHアロザイムは pH 7.5 のリン酸緩衝液中で 40°C 処理を行うとき、5 分間では何ら活性の変化がみられなかった。しかし 50°C では 5 分間にほぼ半分に低下した。このため、45°C 処理を 45 分間つけ、その間の活性の変化を追跡した。2つのアロザイム間でちがいはなく、45 分後の活性はともに始めの 60% 位である。

(b) αGPDH アロザイム。

αGPDH アロザイムの αGP 酸化の至適 pH は 10 付近にあり、体内 pH と思われる中性付近では活性が殆んどみられなかった。一方、DHAP 還元 of 至適 pH は 6.5 近辺にあり、pH 6 及び 7 では最大活性の約 80% と、中性付近で比較的高い活性を保っている。Table 4 に 3 アロザイムの 3 回の測定 of 平均値を示したが、至適 pH は 3 者の間でいちぢるしい差はみられなかった。Table 4 には同アロザイムの基質に対する Km 値をも示してある。Km 値は、αGP 酸化では基質濃度 0.2~25 mM, DHAP 還元では 0.01~0.4 mM の濃度範囲で測定された。この濃度による酵素阻害はみられていない。この表には 3~5 回の測定 of 平均値と、標準偏差を示した。3 アロザイムの αGP に対する Km 値には差はみられないが、DHAP に対する Km 値は、αGPDH^f と αGPDH^m の間に差はなく、αGPDH^s は前者に比べて小さかった。

αGPDH 活性も高濃度基質により阻害をうける。αGP 酸化反応では 3 アロザイムとも αGP 濃度 20~30 mM で最高活性を示すが、濃度の上昇につれて活性が低下し、170 mM では αGPDH^f 及び αGPDH^s は最大活性の 90% となるが、αGPDH^m は 70% にも低下する。逆反応の DHAP 還元では、最大活性を示す濃度範囲が比較的広く (0.4~0.9 mM)、濃度の上昇に従って活性は低下

Table 4. Optimum pH and apparent Michaelis constants of three cytoplasmic αGPDH allozymes of *D. virilis*.

	αGPDH ^f	αGPDH ^m	αGPDH ^s
Optimum pH for αGP	9.90	10.20	10.20
Optimum pH for DHAP	6.65	6.25	6.20
Km (mM) for αGP (± S. D.)**	1.90±0.025	1.77±0.17	1.89±1.17
Km (mM) for DHAP (± S. D.)***	0.303±0.055	0.309±0.077	0.214±0.022*

* Significantly different from αGPDH^f (at the 1% level) and αGPDH^m (at the 5% level).

** Measured at 25°C in 0.1 M glycine NaOH buffer (pH 10.0).

*** Measured at 25°C in 0.1 M Tris acetate buffer (pH 6.75).

するが、3アロザイム間で異った影響のうけ方を示した。すなわち αGPDH^s は 0.9 mM 以上の濃度で阻害をうけ、1.8 mM では最大の 60% に減ずる。 αGPDH^f は 1.1 mM をこえる濃度により阻害をうけ、1.8 mM では 70% に低下し、 αGPDH^m は 1.2 mM までは阻害をうけず、1.8 mM では最高の 80~90% の活性を保持していた。

αGPDH の反応速度と温度の関係をあらわす Arrhenius plot をとると、3アロザイムとも 30°C 以上の温度では直線関係が得られず、かつ 3者の中で異なる影響をうける結果が得られたので、アロザイムの温度による失活を比較した。アロザイムを中性付近で 35°C で処理し、時間を追って酵素の活性を測定した結果を Fig. 3 に示した。図からわかるようにこの温度により、酵素の活性はいずれも指数カーブを描いて低下し、その低下の度合は αGPDH^f が最も大きく、 αGPDH^m が最も小さい。 αGPDH^s は αGPDH^m に比較し、やや不安定であるといえる。同様の実験を 45°C で行くと、 αGPDH^f は 1 時間で最初の活性の 30% にまで下り、2 時間で消失するが、 αGPDH^m 、 αGPDH^s は 2 時間でそれぞれ 60%、40% に低下するという結果を得、温度による失活は αGPDH^f が一番うけやすく αGPDH^m が一番うけにくいことが確かめられた。

(4) アロザイムの生化学的差異に起因する生物学的差異

前節で精製した細胞質 MDH, αGPDH アロザイム間の生化学的差異についてのべたが、前者では至適 pH と OAA に対する K_m 値に、後者では高濃度基質による阻害と温度抵抗性に明らかな差が認められた。これらの差は生体にとって何を意味するのであろうか。MDH の場合そ

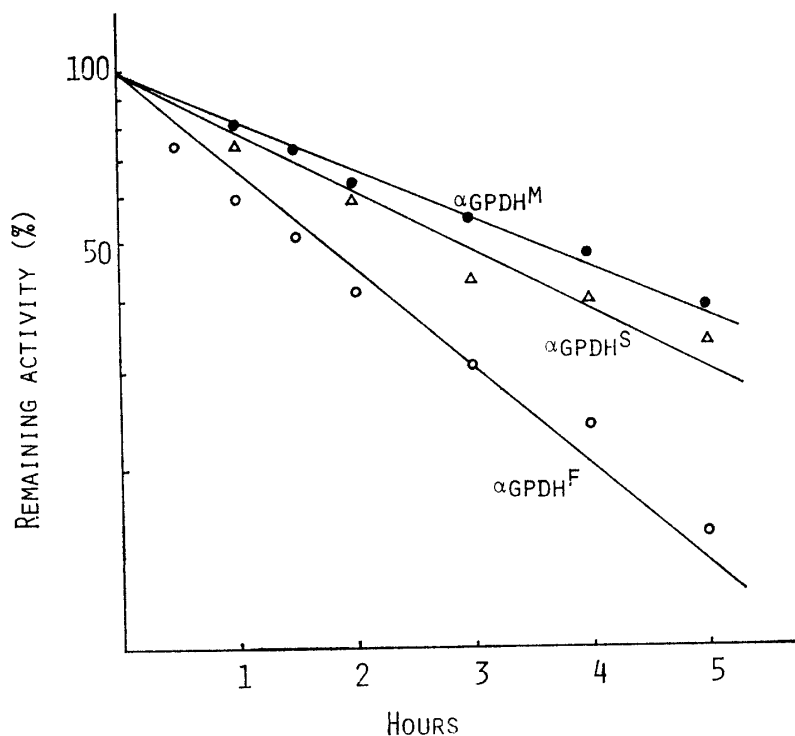


Fig. 3. Rates of thermal inactivation of cytoplasmic αGPDH allozymes at 35°C.

の基質がリンゴ酸であれ、OAAであれ、糖から生成されるのであるから、糖を極端に制限した餌を与えれば体内に存在する基質が減少するかも知れない。生化学的性質の比較から、OAAに対する親和性がMDH^fはMDH^sより高いのであるから、OAAの生体内量が極端に低下すれば、この条件で飼育されたMDH^fとMDH^s系統間でエネルギー代謝で差を生じ、OAAに対する親和力の低い酵素をもつMDH^s系統が先に生存をおびやかされるであろう。この予想のもとに、先ず糖を除いた餌で飼育された時、ハエの体内基質が低下するか否かをしらべた。測定する基質としてはOAAの体内プール量が極めて小さい(Williamson & Brosnon 1974)ので、且つ、この反応の平衡がリンゴ酸生成に傾いているのでリンゴ酸を測定した。Table 5はイースト餌で飼育した成虫の体内リンゴ酸量を、通常餌のそれと比較した結果である。2~3gのハエを正確に測り、g当りのリンゴ酸量をμmoleであらわした。実験に使用したハエの飼育日数は20日から30日の間であるが、同一実験に用いたハエの日数は同じである。又飼育日数10日、14日の体内リンゴ酸量は対照と比べて差はなかった。表から明らかに、イースト餌で飼育されたハエの体内リンゴ酸量は対照に比べて、両系統ともほぼ60%に低下していることがわかる。このことは体内にリンゴ酸がプールされる機構は不明ではあるが、この条件下で、2系統とも同じ程度にプール基質の減少が起っていることをしめしている。前述したようにMDH^f、MDH^sアロザイムのKm値のちがいがこの条件下で意味をもつならば、2系統間で生存率の差が生ずるであろう。これを確かめるため、両系統のハエ及びF₁雑種のハエを2種類の培地で飼育し、その生存率を比較した。この実験では培地を3~4日に一度変えるため、培地の表面に細菌が生えたり、表面が幼虫に荒されて餌の表面に翅をとられて死ぬハエもあり、通常の餌育に比べて生存率が低くなった。しかしFig. 4に示したように、MDH^f系統と雑種では、28日までの生存率は培地中の糖の有無に拘らず、ほぼ同じ傾向を示しながら、前者は70%、後者は80%にまで低下するが、MDH^s系統ではイースト餌の生存率が20日すぎて急に低下し最終には50%を割るが、対照の生存率は他の2系統と差はなかった。MDH^s系統の生存率の低下が体内基質の減少が明らかになる20日餌育

Table 5. Malate content of flies of two cytoplasmic MDH strains fed on media with or without sugar.

Exp.	MDH ^s		MDH ^f	
	With sugar	Without sugar	With sugar	Without sugar
1	0.483	0.534
2	0.588	0.387	0.522	0.294
3	0.687	0.492	0.516	0.303
4	0.627	0.291	0.429	0.276
5	0.459	0.291	0.336	0.204
Mean	0.569±0.096*	0.365±0.096*	0.467±0.084*	0.269±0.045*

* Standard deviation.

Unit; μmoles/g of fresh flies.

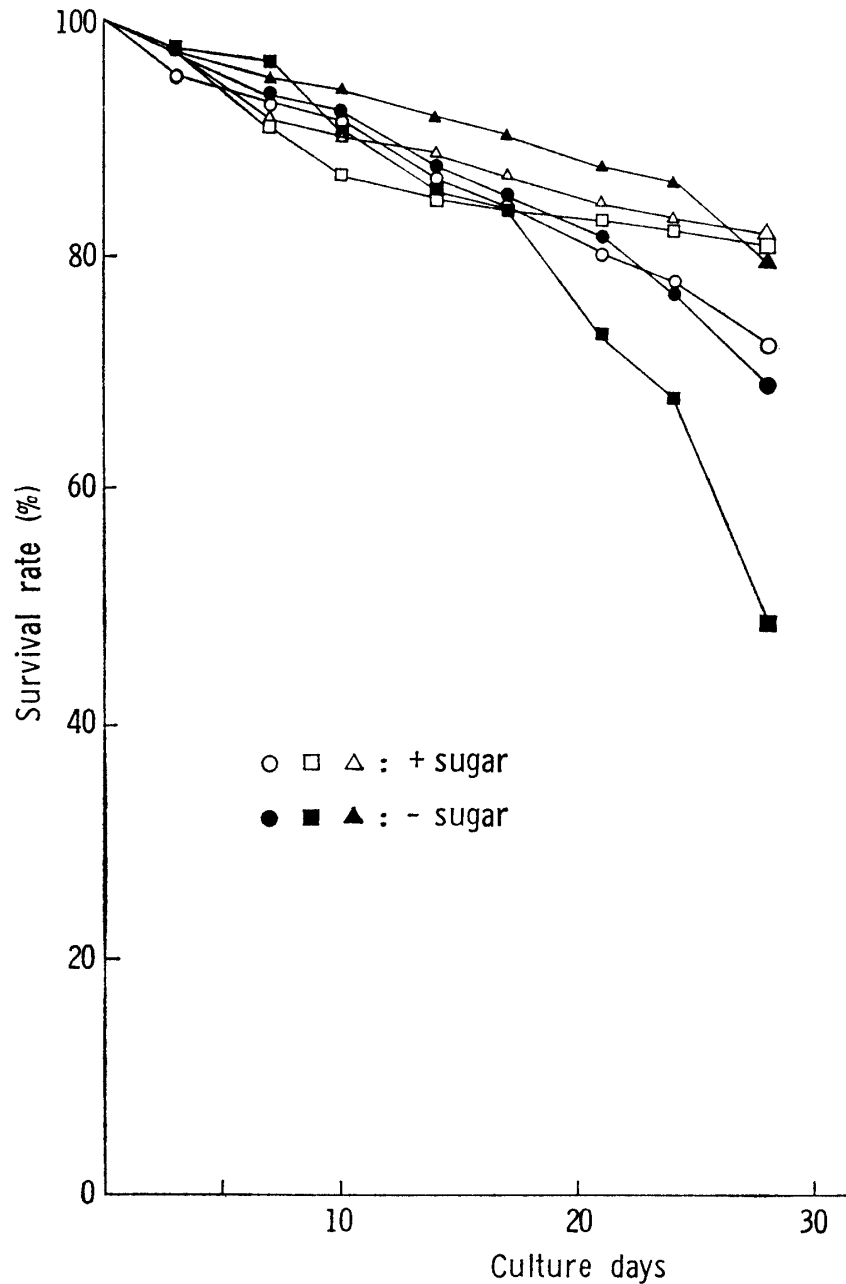


Fig. 4. Survival rates of flies of three genotypes under different food conditions.

Circle, MDH^f/MDH^f ; Square, MDH^s/MDH^s ; Triangle, MDH^f/MDH^s .

から始まるのは特に重要な現象であろう。これらの結果を分散分析すると系統間、培地間、日数間で1%水準で有意の差があり、二次、三次の相互作用においても同様に有意差が認められた。

α GPDH アロザイムの温度抵抗性の実験から、 α GPDH^f が35°C 処理によりいちぢるしく失活するという結果を得た (Fig. 3)。この酵素が昆虫の飛翔筋及び他の細胞のエネルギー代謝に深くかかわっているならば、 α GPDH^f 系統の活動及び生存がこの温度によって何らかの影響をうけることが考えられる。ハエの行動を量的に表現することは困難が伴うので、この実験では高温にお

ける成虫の生存数を比較した。35°Cという温度はショウジョウバエの成虫にとって厳しい高温であり、数時間後に α GPDH^f 系統は既に餌の上に静止しているものが多くみられるが、 α GPDH^m 系統は飼育瓶の中を歩きまわっているのが観察された。雄雌10対ずつの成虫を通常餌の入った飼育瓶に入れ 35°C で6日間飼育した結果を Table 6 に掲げた。表から明らかなように6日までに成虫の殆んどが死亡するが、系統間で違いがみられる。すなわち、 α GPDH^m 系統の生存数は2日までは殆んど変化しないが、4日目から減少してくる。 α GPDH^f 系統の生存数は2日培養で既に低下し、日数と共に急激に減少する。 α GPDH^s 系統の生存数は2日培養では α GPDH^m 系統のそれと変わらないが、それ以後は急激に減少する。なお、実験値は大きな標準偏差を持っている (Table 6) が、分散分析の結果は、系統間、日数間、及びその相互作用に 1%水準で有意の差がみられた。以上の結果は 35°C におけるこの酵素の失活の程度と対応し、失活のいちぢるしい α GPDH^f 酵素をもつ系統の生存率が最も低く、失活の少ない α GPDH^m 酵素の系統のそれが高く、失活の度合が両酵素の間にある α GPDH^s の系統は生存率も両者の間にあった。

Table 6. Mean survival of flies of three α GPDH allozyme strains at 35°C culture.

Strains	Culture days		
	2	4	6
α GPDH ^f	16.65±3.49*	6.17±4.49*	0.38±1.05*
α GPDH ^m	19.83±0.38*	16.40±4.29*	6.40±6.01*
α GPDH ^s	19.25±1.03*	11.21±6.01*	1.83±2.99*

* Standard deviation.

考 察

タンパク質の集団内変異の維持機構については中立説と自然選択説の間で論争が続けられている。機能的タンパク質であるアロザイムについてこの問題を論ずる時は、アロザイムの生化学的性質及び生体機能についての知見を得ることが先決である。アロザイム間で生化学的性質を可能な限り比較した結果、全く差が認められない時、それらは生体内機能が全く同一であることが予想される。しかし体外に取り出された精製酵素の性質がそのまま生体機能としてあてはまらない場合も多い。たとえば、pH 10 における Km 値が比較されたり (当該酵素の至適 pH が 10 であるとき、pH 10 で Km 値を決定するのは生化学的には常識である)、50°C 以上の温度における酵素の抵抗性が比較されるような場合である。又非特異的エステラーゼ及びホスファターゼのように人工基質を用いて生化学的性質をしらべる場合も同じことがいえる。「緒言」で述べたように、非グルコース代謝系の多くの酵素のアロザイム間では生化学的性質のちがいが見出されているが、この生

化学的差が系統間の適応度の差と一致する実験的証拠はキイロショウジョウバエ *ADH* 座位以外では得られていない。*ADH* アロザイムに関する一連の研究 (Vigue & Johnson 1973, Day et al. 1974, Briscoe et al 1975, van Delden et al. 1975, 1978) から次のような結果を得ている。すなわち、*ADH* 座位の2つのアロザイムは比活性、温度抵抗性が異なり、アルコール類を加えた培地でハエを飼育すると、比活性の低いアロザイム系統は比活性の高い系統より死亡率が高く、実験集団でも高い比活性のアロザイム遺伝子頻度は、アルコールを添加しない培地よりもアルコールを添加した培地の方が高くなる。また 40°C の温度に安定なアロザイムの遺伝子頻度は常温 (25°C) 飼育より高温 (30°C) 飼育によって高く保たれる。以上の結果は、キイロショウジョウバエの *ADH* は直接外界から取るアルコール類を分解し、その毒性を除く役割を演じており、それ故にアロザイム間の生化学的差異が生理的意味をもち外的環境により選択をうけるようになったためと思われる。グルコース代謝系の酵素は直接外界からとり入れる物質ではなく、糖質の分解により生成されてくる物質を基質とする。これらの物質は細胞内において一定の濃度を保ち、定常的にエネルギー代謝が遂行されるよう制御されている。従って、グルコース代謝系の酵素を用い、アロザイムの差が生体反応と対応する実験的結果を得ることは困難かも知れない。つまり、もしアロザイム間で性質の差が検出されたとしても、その差が生体反応に直接かかわりを持つような条件がととのわない限り、検出不可能であるからである。本研究で用いた細胞質 *MDH* 及び細胞質 α *GPDH* は、細胞質とミトコンドリアの間で還元当量を移行させる往復輸送系を別々に形成し、動物では α *GP* サイクルの活性の低い時にリンゴ酸往復輸送系が働く (Kaplan 1963) など、両者は密接な関係をもつグルコース代謝系の酵素である。以上のことを考慮する時、これら2つの酵素においても、もしアロザイム間で性質の差があるときは、適当な外的条件が与えられれば、その差が適応度に影響を与える場合もあるのではなからうか。

この研究は先づ第一にアロザイム間の生化学的性質を比較する目的で酵素の精製が行われた。クロショウジョウバエの *MDH* の精製は McReynolds & Kitto (1970) によって報告されている。彼等はミトコンドリア *MDH* を精製度の高い標品として得ているが、細胞質 *MDH* はかなりの夾雑タンパク (彼等は10%と記している) を含んだ標品を得たにすぎない。ここでは彼等の方法とは異なった方法 (Table 1) で精製を試みたが、得られた標品は単一タンパクではなく、わずかの夾雑タンパクがディスク電気泳動でみとめられた。しかしこの夾雑タンパクは「結果」に述べたように、酵素液の凍結融解後にディスクゲル上に濃くあらわれるので、精製過程に変性した *MDH* タンパクではないかと思われる。 α *GPDH* はここで用いた方法により、回収率もよく、比活性の高い単一タンパクとして得られた (Table 2)。

精製した細胞質 *MDH* アロザイムの比較実験から、*MDH*^r の *OAA* に対する親和性は *MDH*^s のその約2倍であることが見出された (Table 3)。前述したように糖代謝系の酵素の基質は体内プールがあるので、通常条件では基質量のいちぢるしい減少はあり得ない。しかし、もし体

内基質のプールが消費されるような条件が与えられれば、このアロザイム間に活性の差が生じ、結果として活性の低いものはエネルギー供給が低下し、低い基質濃度で高い活性をもつ系統より生存度が減ずるのではないか。通常のショウジョウバエの餌から糖を除いたものを成虫に与えて飼育すると、約20日の間で体内基質量が約60%に低下した (Table 5)。そしてこの条件で2つのアロザイム系統を飼育すると、生体内基質量の低下があきらかになる20日以降に、基質に対する親和力の低い MDH^s アロザイム系統の生存率は急に減少するが、親和力の高い MDH^f 系統では対照に比べて差がないことが示された (Fig. 4)。この結果は上にのべた可能性を支持するものである。

α GPDH アロザイム間の顕著な生化学的差異は、35°Cにおける酵素の失活度にみられた (Fig. 3)。すなわち、 α GPDH^f は35°Cで急激に失活し、 α GPDH^m は比較的抵抗性が強く、 α GPDH^s は両者の間の失活度を示した。ここにおいても、この酵素がエネルギー代謝に必須な酵素であるため、35°Cに各アロザイム系統の成虫を保存すれば、各酵素はこの温度で異なった失活度をしめし、異なった生存度が期待されるのではないか。Table 6に掲げた生存率の結果は、 α GPDH^f の生存数は急激に減少し、 α GPDH^m の生存度は比較的なだらかに低下し、 α GPDH^s のそれは両者の中間となり、酵素の性質の差と対応している。

以上の2つの事実はある酵素のアロザイムの生化学的差はその酵素の機能が生体の生存度に直接関与出来るような条件下でのみ生体反応として現れることを示している。このような結果は、この一つの遺伝子座ではなく、他の遺伝子座または遺伝的背景の影響で得られたのではないかという疑いがしばしば持たれるが、実験に用いた系統は一つの集団から採取され、この実験のために新たに作られた系統であるから、遺伝的背景は均一であろうと思われる上、生体内で同じような反応にあずかる酸素系については MDH アロザイム系統は α GPDH に関して同じ α GPDH^f 遺伝子を持ち、 α GPDH アロザイム系統はともに MDH^f の同型接合体であることが確認されており、これらの生体反応は一つのアロザイム遺伝子の差に起因していると思われる。

自然集団中の MDH アロザイム遺伝子の頻度は MDH^f がその大部分を占め、 α GPDH アロザイム遺伝子では α GPDH^m が大部分を占めていることは「緒論」でのべた。野外の環境は複雑なものであろうが、MDHの実験結果にみられたように MDH^f の OAA 還元のに至適 pH は生体に近いため、MDH^s より生体内で有利に働きうること、野外では栄養が非常に乏しくなる条件がしばしば起りうることを予測されるため、この条件下では MDH^f が MDH^s より有利となり、MDH^f が集団内に多く存在する原因の一つになっているのではなかろうか。 α GPDH については、アロザイムの温度抵抗性の差異が生体の生存度に影響を与えているならば、日本の集団内の α GPDH アロザイム遺伝子の頻度が、緯度に伴って勾配をしめすはずだという反論があるかも知れない。この実験から、DHAP の高濃度による阻害は α GPDH^m が最もうけにくく、 α GPDH^s が最も強くうけることが明らかであり、この差や、あるいはここでは明らかにされていない生化学

学的差が原因となり、色々の条件下で α GPDH^m が最も安定しているため、 α GPDH^m がどの集団でも大多数を占めているのではなからうか。

要 約

クロシヨウジョウバエの細胞質リンゴ酸脱水素酵素の2つのアロザイム (MDH^f, MDH^s) 及び細胞質の α グリセロリン酸脱水素酵素の3つのアロザイム (α GPDH^f, α GPDH^m, α GPDH^s) を精製し、その生化学的性質を比較した。リンゴ酸脱水素酵素では、至適 pH, オキザロ酢酸に対する Km 値に違いがみられたが、温度抵抗性, リンゴ酸及び助酵素に対する Km 値には差がみとめられなかった。 α グリセロリン酸脱水素酵素では、温度抵抗性に3者の間でいちぢるしい差異があり、基質及び助酵素に対する Km 値, 至適 pH にはいちぢるしい違いがみとめられなかった。リンゴ酸脱水素酵素のアロザイム系統を糖を除いた培地で25°Cで飼育すると、オキザロ酢酸に対する親和力の強い MDH^f をもつ系統は通常培地に比べて差はないが、その親和力の弱い MDH^s を持つ系統は生体内基質量が低下する20日以後から生存率が減少する。 α グリセロリン酸脱水素酵素のアロザイム系統のハエを35°Cで飼育すると、 α GPDH^f 系統の死亡率は α GPDH^m 系統のそれに比べて高く、 α GPDH^s の死亡率は2系統の間であり、精製酵素の温度抵抗性の結果と一致した。これらの結果から、クロシヨウジョウバエの糖代謝系に属する2つの酵素のアロザイム間で生化学的性質の違いがあり、ある条件下で、この差異が生物の生存の差に結びつくことが示唆された。

引用文献

- Ayala, F. J., and Powell, J. R. (1972) Enzyme variability in the *Drosophila millistoni* group. VI. Levels of polymorphism and the physiological function of enzymes. *Biochem. Genetics* 7 : 331-345.
- Borst, P. (1961) Interrelations between cytoplasmic and mitochondrial diphosphopyridine nucleotide in Ehrlich ascites tumour cells. In Vth Proc. Congr. Biochem., II. Functional Biochem. Cell Structure 2 : 233-247.
- Briscoe, D. A., Robertson, A., and Malpica, J. M. (1975) Dominance at the alcohol dehydrogenase locus in response of adult *Drosophila melanogaster* to environmental alcohol. *Nature* 255 : 148-149.
- Day, T. H., Hiller, P. C., and Clarke, B. (1974) Properties of genetically polymorphic isozymes of alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genetics* 11 : 141-153.
- Delden, W. van, Boerema, A. C., and Kamping, A. (1978) The alcohol dehydrogenase polymorphism in populations of *Drosophila melanogaster*. 1. Selection in different environments. *Genetics* 90 : 161-191.

- Delden, W. van, Kamping, A., and Dijk, H. van (1975) Selection at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia* 31 : 418-419.
- Gillespie, J., and Kojima, K. (1968) The degree of polymorphism in enzymes involved in energy production compared to that in nonspecific enzymes in two *Drosophila ananassae* populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61 : 582-585.
- Gutmann, I., and Wahlefeld, A.W. (1974) L-(-)-Malate determination with malic dehydrogenase and NAD. In Bergmeyer, H.U. (ed.) *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 3, Academic Press, New York and London, pp. 1585-1589.
- Harper, R. A., and Armstrong, F. B. (1972) Alkaline phosphatase of *Drosophila melanogaster*. I. Partial purification and characterization. *Biochem. genetics* 6 : 75-82.
- Harper, R. A., and Armstrong, F. B. (1973) Alkaline phosphatase of *Drosophila melanogaster*. II. Biochemical comparison among four allelic forms. *Biochem. genetics* 10 : 29-38.
- Hay, R. E., and Armstrong, F. B. (1976) Biochemical characterization of allelic forms of soluble malate dehydrogenase of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* 6 : 367-376.
- Johnson, F., and Schaffer, H. (1973) Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. VII. Genotype-environment relationships in populations of *Drosophila melanogaster* from the eastern U.S. *Biochem. Genetics* 10 : 149-163.
- Kaplan, N.O. (1963) Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanisms. 1. Multiple forms of enzymes. *Bacteriol. Rev.* 27 : 155-169.
- Kitto, G. B., and Kaplan, N.O. (1966) Purification and properties of chicken heart mitochondrial and supernatant malic dehydrogenases. *Biochemistry* 5 : 3966-3980.
- Kitto, G. B., and Lewis, R.G. (1967) Purification and properties of tuna supernatant and mitochondrial malate dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* 139 : 1-15.
- Kojima, K., Gillespie, J., and Tobar, Y.N. (1970) A profile of *Drosophila* species' enzymes assayed by electrophoresis. I. Number of alleles, heterozygosities, and linkage disequilibrium in glucose metabolizing systems and some other enzymes. *Biochem. Genetics* 4 : 627-637.
- Lewontin, R. C., and Hubby, J.L. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54 : 595-609.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- McReynolds, M.S., and Kitto, G. B. (1970) Purification and properties of *Drosophila* malate dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* 198 : 165-175.
- Miller, S., Percy, R.W., and Berger, E. (1975) Polymorphism at the α -glycerophosphate dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. I. Properties of adult allozymes. *Biochem. Genetics* 13 : 175-188.
- Narise, S. (1973) Esterase isozymes of *Drosophila virilis*: Purification and properties of α - and β -esterase isozymes. *Japan. J. Genetics* 48 : 119-132.
- O'Brien, S.J. (1973) Comparative analysis of malate dehydrogenases of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genetics* 10 : 191-205.
- 大羽 滋 (1977) 集団の遺伝。UPバイオロジー 19 101頁 東京大学出版会
- Sacktor, B. (1970) Regulation of intermediary metabolism, with special reference to the control mechanisms in insect flight muscle. *Adv. Insect Physiol.* 7 : 267.
- Selander, R.K. (1976) Genic variation in natural populations. In Ayala, F.J. (ed.) *Molecular*

- evolution, Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 21-45.
- Shaw, C. R., and Prasad, R. (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes—A compilation of recipes. *Biochem. Genetics* 4 : 297-320.
- Vigue, C. L., and Johnson, F. M. (1973) Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. VI. Frequency-property-environment relationships of allelic alcohol dehydrogenases in *D. melanogaster*. *Biochem. Genetics* 9 : 213-227.
- White, H. B. III, and Kaplan, N. O. (1972) Separate physiological roles for two isozymes of pyridine nucleotide-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in chicken. *J. Molec. Evol.* 1 : 158-172.
- Williamson, D. H., and Brosnan, J. T. (1974) Concentrations of metabolites in animal tissues. In Bergmeyer, H. U. (ed.) *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 4, Academic Press, New York and London, pp. 2266-2302.