

Drosophila virilis の酸ホスファターゼ・アロザイムの遺伝生化学的研究 1

——精製と性質——

成瀬 澄子

緒 論

電気泳動技術の進歩によって生体内の多くの酵素にはアイソザイムが存在することがわかり、アイソザイムの遺伝的支配に関する研究と相まって、今日では生物は通常遺伝的支配の下にいくつかのアイソザイム型として酵素を生産しているとさえいえる。

ある単一遺伝子座の対立遺伝子支配下のアイソザイムは特にアロザイムとよばれ、多くの酵素について、同様にアロザイム変異が見出されている。これらの研究の過程で、2, 3の酵素についてアロザイムの示す酵素活性にちがいがあることが報告された。[Rasmuson et al. (1966), Gibson and Miklovich (1971), Kozak (1972), Day et al. (1974), Ward (1974), VandeBerg and Blohm (1977), Tejima and Ohba (1979), Tsuno (1979)]。これらの報告の多くは、電気泳動後のゲル上に染色されたあるアロザイムバンドが、他のものに比べて濃いもの、又は薄いものがあるというのであるが、対立遺伝子によって生産される酵素の間で活性の違いがあるのは何故であろうか。ある遺伝子座に突然変異が生じ、それによって生じた構造遺伝子の変化が、アミノ酸組成の変化を惹き起こし、ひいては酵素タンパクの活性のちがいを生じたのであろうか。キロショウジョウバエのアルコール脱水素酵素アロザイムの一連の研究はこの疑問にある程度解答を与えている。この遺伝子座の2つの対立遺伝子 (ADH^F と ADH^S) の場合では、 ADH^F のホモ個体 (ADH^F アロザイムを持つ) の活性が ADH^S のホモ個体 (ADH^S アロザイムを持つ) のその約2倍である [Rasmuson (1966), Ward and Helbert (1972)]。この高活性の ADH^F 系統は低活性の ADH^S 系統より培地中のアルコールに抵抗力を持っている [Briscoe et al. (1975), van Delden et al. (1978)]。McDonaldら [McDonald et al. (1977)] はこの高活性系統のアルコール耐性を利用し、アルコールを加えた培地でアルコール耐性について選抜した結果、活性の高低には、アルコール脱水素酵素遺伝子座は関係がないことを明らかにした。更に活性を支配する遺伝子系 (調節遺伝子) はアルコール脱水素酵素遺伝子の占める染色体以外の染色体上に存

在することを明らかにした [McDonald and Ayala (1978)]。しかし一方、ハツカネズミの 3-phosphoglycerate kinase では、活性の低いアロザイムは構造遺伝子の突然変異によって生じたアロザイムタンパクの変化に起因すると報告されている [Lee and Pegoraro (1979)]。

アイソザイムのような酵素の遺伝的変異が、酵素の物理的、生理的な性質に如何に影響を与えるかを解明することは、遺伝生化学の重要な研究課題であると同時に、酵素の構造遺伝子の進化に対するかかわりあいを論ずるための重要な基礎を提供する。

クロショウジョウバエの酸ホスファターゼ (EC 3.1.3.2) には 4 種類のアロザイムが見出されている [大羽(1977)]。日本集団におけるこれら 4 種の遺伝子 (*Acph-1*, *Acph-2*, *Acph-3*, *Acph-4*) の集団内平均頻度は、0.0041, 0.9899, 0.0004, 0.0056 で、*Acph-2* が圧倒的な頻度を占め、単型的とみなすことが出来る。これら対立遺伝子の生産するアロザイムのうち、*Acph-4* は他に比べて活性が高いことが、電気泳動を行ったゲル上でみとめられる。この研究は、この活性の高い *Acph-4* アロザイムがどんな原因によって生じたかを解明するために行なわれた。初段階としてこの報告では、*Acph-4* 系統の酸ホスファターゼ比活性を低活性の *Acph-1* 系統のそれと比較するとともに、*Acph-4* アロザイムを精製し、精製 *Acph-1* アロザイムと生化学的比較を行なった。又、ショウジョウバエの酸ホスファターゼは MacIntyre (1966) によってアイソザイムが発見されたが、遺伝学的な研究が多く、生化学的な研究は数が少ない。それ故に、ここではショウジョウバエ酵素の生化学的性質の特性についても論じる。

材料と方法

材料：実験に用いたクロショウジョウバエの *Acph-1* 系統と *Acph-4* 系統は、野外から採取した 1 雌系統から分離したもので、東京都立大学遺伝学教室から提供された。各系統を通常のイースト・砂糖の餌で 25°C で飼育し、羽化後 1 乃至 2 日の親バエを集めて -70°C に保存したものを酵素源とした。生体内の酸ホスファターゼ活性は、羽化後 1 日のハエを系統毎に約 1 g 集めて直ちに 5 倍量の 0.1M トリス (pH 7.0) 中ですりつぶし、20,000g, 30 分間遠心した上清を用いて測定した。

電気泳動：電気泳動は 14% 加水分解澱粉 (Connaught 製と Electrostarch 製を 1:1 の割合) ゲルを用い、Shaw & Prasad (1970) の方法により水平に泳動した。泳動は トリス・クエン酸 (pH 7.0) の不連続緩衝液で 3 時間乃至 5 時間の定電流で行ない、泳動後、ゲルを 2 枚にうすく切り、pH 5.0 の 0.1M 酢酸緩衝液に浸してゲルの pH を下げたのち、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中に 0.06% Na- α -ナフチルリン酸、0.04% フェーストブルーを含む液につける。切断面にホスファターゼ活性がバンドとしてあらわれるので、液を捨てて水で洗滌した後、90% エタノールに 1 時間浸

し、ベンジルアルコールとグリセリンを7:3の割合に混じた液にゲルが透明になるまで浸しておく。ホスファターゼ・アロザイムは原点から陰極への易動度の大きいものから順に番号をつけた。ゲル上のホスファターゼ活性の強さを比較するためには、ハエの同濃度のホモジェネートを一定量ろ紙につけて泳動し、染色後、透明化したゲルを550nmのデンシトメーターで測定した。

酸ホスファターゼ活性の測定：通常 の 酵素活性測定には、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質とし、反応後遊離される *p*-ニトロフェノールを420nmで比色した [Horgan et al. (1974)]。5 mM *p*-ニトロフェニルリン酸と酵素液 0.1ml を含む 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2.0ml 中で37°C, 5分乃至10分間反応を行なわせた後、0.5N NaOH を 1.0ml 加えて反応を停止し、この時生ずる黄色の量を比色する。活性の単位は 37°C 1時間に遊離される *p*-ニトロフェノール量を mg であらわした。

タンパク質量は Lowry et al. (1951) の方法に従って牛血清アルブミンを標準として測定した。

基質特異性に関する実験では、生産される無機リン酸の量を基にして活性を示した [大村 (1957)]。反応液は 2.0ml 全量中に 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0), 10mM 基質, 0.1ml 酵素液を含んでいる。37°C, 20分間インキュベートした後、15% H₂SO₄ 1ml を加えて反応を停止し、アミドール試薬、モリブデン酸アンモニウム液を加えて無機リン酸を発色させ、700nm で測定した。

酵素の精製：この過程はすべて 0~4°C の冷蔵室内で行なわれた。Acph-4 系統の凍結ハエ約 50g を 5 倍量の 1mM エチレンジアミン四酢酸 (以下 EDTA と略す) を含む 0.1M トリス塩酸 (pH 7.2) でホモジナイズし、13,000rpm, 30分遠心分離し、上清を粗酵素とした。

粗酵素 1 に対し 1% プロタミン硫酸 $\frac{1}{6}$ 量をゆっくり加え、30分攪拌した後、同様に遠心分離した。この段階で多くの核酸とともに不要のタンパク質が沈殿するので、この上清を集め、硫酸アンモニウムを加えて 85% 飽和にして 30分攪拌した後遠心分離し、得られた沈殿を 1mM EDTA を含む 50mM トリス塩酸 (pH 7.5) で一晚透析する。透析後沈殿を除いた上清と、同じ緩衝液で平衡化してある ED4E セルロースを約 2:1 の割合で混じ、時々攪拌して約 1 時間放置する。この操作で夾雑タンパクの一部がセルロースに吸着するので、通過した液に硫酸アンモニウム 35% を飽和になるように加え、1N HCl で pH を 4.2 にし、5分間酸処理する。生じた沈殿を遠心分離してのぞき、上清に 0.5N KOH を加えて pH 7.0 にし、硫酸を加えて 85% 飽和にし、攪拌しながら 2~3 時間後、沈殿を集める。この沈殿を 1mM EDTA を含む 20mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) にとかし、同じ緩衝液で平衡化したセファデックス G-100 カラム (5×50cm) の上へのせ、1時間当り 45ml の速度で溶出する。活性の高い分画を集め、同じ緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (2.2×20cm) の上にのせる。このアロザイムはこの条件下でヒドロキシアパタイトに吸着するので、このカラムを洗滌後、1mM EDTA を含む 0.02~0.30M 濃度勾配のリン酸緩衝液で溶出すると、リン酸濃度約 0.1~0.15M の間に強い活性を示す分画が得られた。

この分画を集めて50mMトリス塩酸(pH 7.2)に透析後、実験に用いた。Acph-1アロザイムについても、Acph-1系統のハエ50gから同様の精製過程で得られた標品を用いて実験を行なった。

活性に及ぼす pH の影響：酸ホスファターゼ pH 曲線は 0.1M 酢酸緩衝液を用い、pH 3~7 の範囲でしらべ、最大活性を 100 とした比較値であらわした。

分子量の測定：分子量はセファデックス G-100 カラムを用い、Anderws (1964) の方法に従って推定した。標準曲線を描くために用いたタンパク質は、チトクロム C (12,400)、キモトリプシノゲン A (25,000)、卵アルブミン (45,000)、牛血清アルブミン (68,000) と γ グロブリン (160,000) であった。

K_m 値の測定：ミカエリス恒数は至適 pH 5.0 で *p*-ニトロフェニルリン酸を基質として測定した。基質濃度は $\frac{1}{v}$, $\frac{1}{S}$ の Lineweaver-Burk plots が直線を与える範囲 (0.05~1.0mM) が用いられた。リン酸による阻害恒数 K_i は 500 μ M 無機リン酸の存在下、0.075~1.0mM の基質濃度範囲で測定し、Lineweaver-Burk plots から推定した。

結 果

1. 酸ホスファターゼの電気泳動パターン

1 匹のハエをすりつぶし電気泳動を行なうと、酸ホスファターゼは原点から陰極へ移動する。各対立遺伝子のホモ団体では酸ホスファターゼ活性は 1 本のバンドとしてあらわれるが、ヘテロ団体では 2 乃至 3 本のバンドとしてあらわれる (Fig. 1)。Acph-4 ホモ個体のバンドは Acph-1 及び Acph-2 ホモ個体のそれらに比べてかなり強く染色される。Acph-1/Acph-4 及び Acph-2/Acph-4 ヘテロ団体では、Acph-4 バンドとそれぞれの雑種酵素バンドは強く染色されるが、

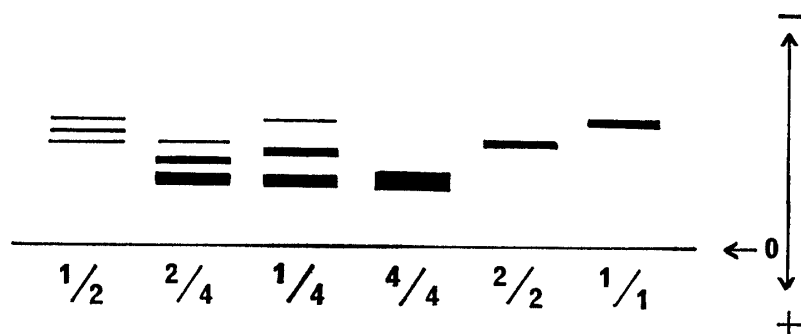


Fig. 1. Electrophoretic patterns for the acid phosphatase in homogenates of single flies of *D. virilis*. 1/2, *Acph-1/Acph-2* heterozygote; 2/4, *Acph-2/Acph-4* heterozygote; 1/4, *Acph-1/Acph-4* heterozygote; 4/4, *Acph-4* homozygote; 2/2, *Acph-2* homozygote; 1/1, *Acph-1* homozygote.

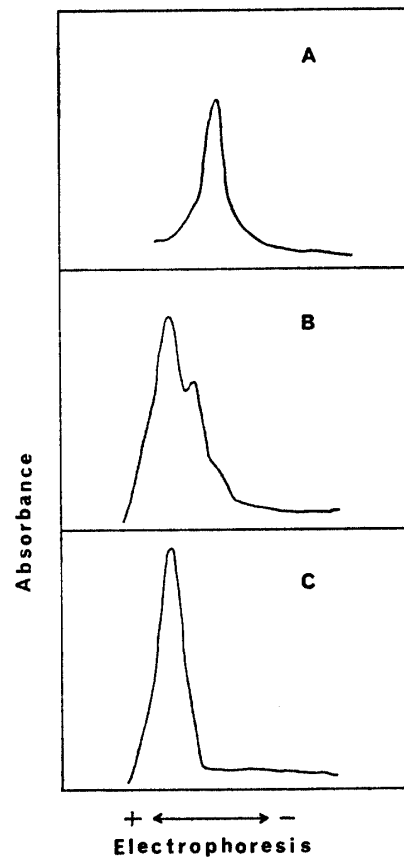


Fig. 2. Densitometric tracing of acid phosphatase from *D. virilis* on gel electrophoresis.
 A. *Acph-1* homozygote; B. *Acph-1/Acph-4* heterozygote;
 C. *Acph-4* homozygote.

Acph-1 及び *Acph-2* バンドは非常に薄いか、又は見えないで他の2本のバンドのみ現れるときがある。ゲル上の雑種酵素の活性はそれぞれの *Acph-4* バンドのそれよりやや低くみえるが、デンストメーターで測定すると、Fig. 2Bに示したように、*Acph-4* バンドの活性より低いことがわかる。又、ヘテロ個体の *Acph-1* バンドは肩としてのみあらわれている。

Acph-1 及び *Acph-4* 系統の酸ホスファターゼ活性の比較を正確に行なうため、羽化後1日の3系統の生きたハエを使って酵素活性を測定した。Table 1に示したように、ハエの示す活性を

Table 1. Acid phosphatase activities and inorganic phosphate contents of intact flies carrying different alleles at *Acph* locus.

Strains	Specific activity (unit/mg protein)	Concentration of Pi (mM)
<i>Acph-1</i>	0.283±0.065*(5)	1.72±0.58*(4)
<i>Acph-2</i>	0.332±0.115*(4)	1.83±0.29*(4)
<i>Acph-4</i>	0.950±0.114*(4)	2.04±0.352*(4)

Numbers in parentheses show number of replication.

* Standard deviation

全タンパク mg 当りの比活性としてあらわすと, *Acph-4* 系統は *Acph-1* 系統の約 3 倍の高活性をもち, *Acph-1* 系統と *Acph-2* 系統の間ではいちじるしい差はみられなかった。

2. 酵素の精製

Acph-4 アロザイムの精製の過程と精製度の 1 例を Table 2 に示した。50 g のハエからこの精製法により約 2 mg の酸ホスファターゼタンパクが得られ, 比活性は約 200 倍であった。凍結したハエを使うこの方法では, 実験毎に 50 g のハエから得られる粗酵素の比活性にかなりの差があり, *Acph-4* では 0.5~1.1 の間であり, *Acph-1* では 0.2~0.5 の間であった。しかし精製した

Table 2. Purification of acid phosphatase allozyme (*Acph-4*) from *Drosophila virilis*

Steps	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Fold
Crude extract	2,440	2,388	0.98	1
Protamine sulfate treatment	1,140	2,023	1.77	1.8
Ammonium sulfate precipitation	891	2,055	2.31	2.4
DEAE cellulose treatment	258	1,727	6.69	6.8
Acid treatment	170	1,552	9.13	9.3
Sephadex G-100 column	124	1,308	10.55	10.8
Hydroxyapatite column	2.2	508	230.91	235.6

Table 3. Substrate specificity of purified acid phosphatase allozymes

Substrates	Relative activity	
	<i>Acph-1</i>	<i>Acph-4</i>
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	100	100
α -Naphthyl phosphate	78.2	81.1
Phenylphosphate	89.0	93.0
α -Glycerophosphate	9.1	19.4
β -Glycerophosphate	27.3	40.5
Glucose-6-phosphate	15.9	41.9
Glucose-1-phosphate	0	0
Fructose-6-phosphate	4.5	15.8
Fructose-1-phosphate	8.2	14.4
Fructose-1,6-phosphate	85.9	86.9
Ribose-5-phosphate	11.8	11.3
ATP	0	0
5'-AMP	45.9	50.2
UTP	0	0
5'-UMP	25.2	28.0
CTP	0	0
5'-CMP	25.9	25.3
Flavin mononucleotide	37.0	30.2
Sodium pyrophosphate	0	0

Substrate: 10mM

アロザイムの比活性は両者の間でいちぢるしい差はなく、190~230の間であった。精製過程に用いたリン酸により、この酵素は阻害される (Table 4) ので、真の比活性は上記の値より高いことは明らかである。すなわち、測定条件下のリン酸濃度は最終のヒドロキシアパタイトカラムの段階で約 0.5mM であるので、真の比活性はこの値のほぼ 2 倍と予想される。精製した酵素標品は、ディスク電気泳動によれば、活性と対応するタンパク質がその殆んどを占めているが、わずかの夾雑タンパクも含まれていた。その量は 5% 以下と思われる。

3. 生化学的性質

Table 3 にこの酵素の基質特異性を示した。これらアロザイムは *p*-ニトロフェニルリン酸に対する活性が非常に高いので、これを 100 とした比較値で他の基質に対する活性をしめした。この酵素は通常用いられる人工基質 (ナフチルリン酸、フェニルリン酸) には強く反応するが、生体内リン酸エステルに対しては果糖二リン酸を例外として一般に低い。 β -グリセリン酸に対する活性は α 型に対する活性より強く、Acph-1 で約 3 倍、Acph-4 で約 2 倍であった。又クレオチドに関しては 3 リン酸エステルには全く反応しないが、モノリン酸には反応し、AMP にはかなり強く反応した。ピロリン酸には全く働かない。2 種のアロザイム間を比較すると糖のリン酸エステルに対する Acph-4 活性が Acph-1 のそれよりいくらか高いようにみられた。

p-ニトロフェニルリン酸を基質とした時のアロザイム活性に及ぼす pH の影響をしらべた。

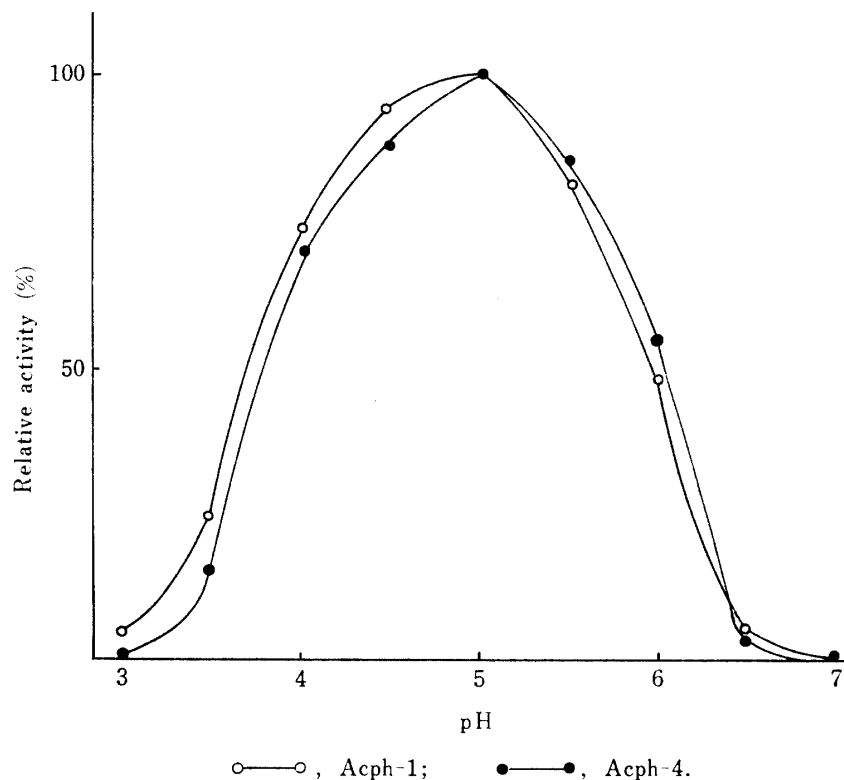


Fig. 3. The effects of pH on activities of acid phosphatase allozymes from *D. virilis*.

図示したように (Fig 3), 両アロザイムとも中性付近では殆んど活性を示さず, 最高活性は pH 5 で得られた。AcpH-1 の活性 pH 曲線は AcpH-4 のそれより多少酸性に傾いているが, 大差はなかった。至適 pH におけるアロザイムの *p*-ニトロフェニルリン酸に対する K_m 値を測定した (Fig. 4)。 K_m 値はリン酸無添加の Lineweaver-Burk プロットから求められ, AcpH-1 では $2.0 \times 10^{-4} M$, AcpH-4 では $2.2 \times 10^{-4} M$ で差はなかった。Table 4 には精製酵素に及ぼす阻害剤の影響を示した。表から明らかなように, 1 mM 無機リン酸でかなり強い阻害をうける。デオキシコール酸, ラウリル硫酸などの陰イオン系界面活性剤では阻害をうけるが, Tween 20, Triton X-100 など非イオン系界面活性剤ではかなり高い濃度でも阻害をうけない。重金属類は強い阻害作用をもち, 特にモリブデンが強い阻害作用をもっている。PCMB (パラクロルメルクリ安息香酸) による阻害は水銀によるもので, SH 基による作用ではない。この酵素は PCMB と同濃度の

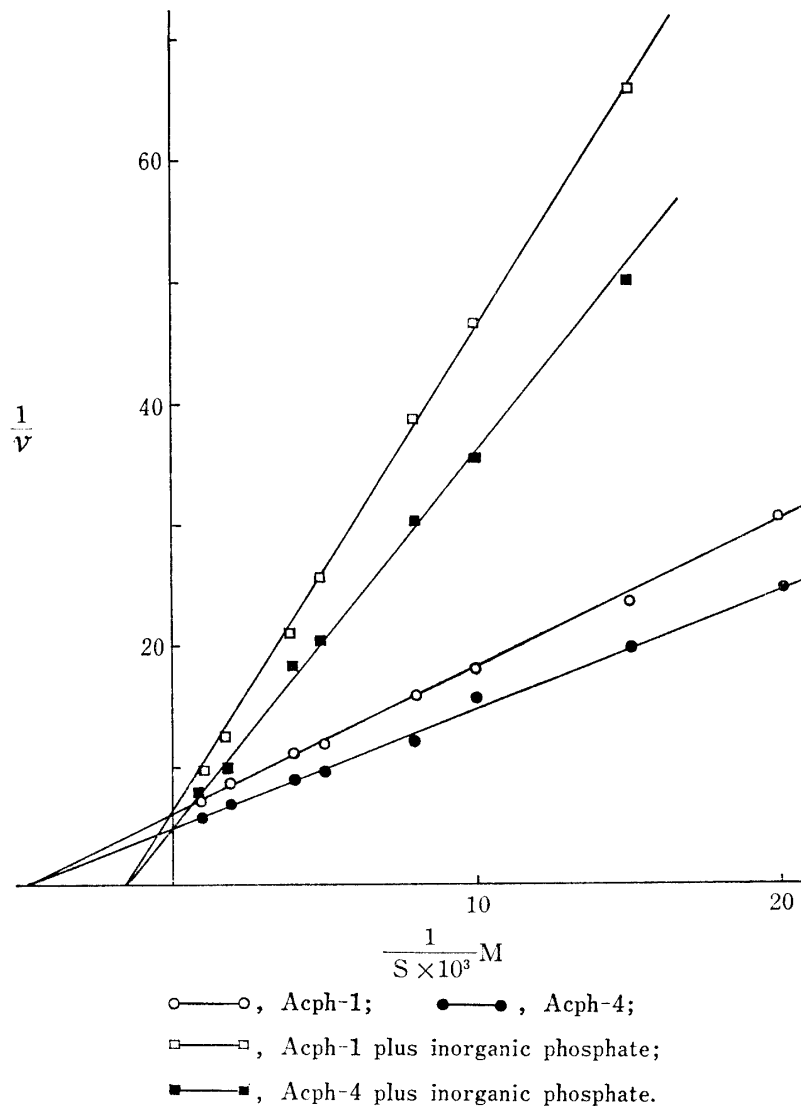


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of acid phosphatase allozymes measured in the presence and absence of inorganic phosphate.

Table 4. Effects of inhibitors on acid phosphatase allozymes.

Inhibitors	Concentration	% Inhibition	
		Acph-1	Acph-4
Inorganic phosphate	0.1 mM	13.7	14.8
Inorganic phosphate	1.0 mM	79.4	79.2
Sodium deoxycholate	1 %	44.5	62.0
Sodium lauryl sulfate	0.001 %	15.4	11.5
Sodium lauryl sulfate	0.01 %	56.2	59.2
Tween 20	1 %	0	0
Triton X-100	1 %	0	0
Molybdate	0.01mM	93.8	95.1
Arsenate	1.0 mM	46.0	45.7
Ferric chloride	0.1 mM	21.6	38.2
Ferric chloride	1.0 mM	54.0	73.3
Mercury chloride	1.0 mM	21.4	21.2
<i>p</i> -Chlormercuribenzoate	1.0 mM	30.1	40.8
<i>N</i> -Ethylmaleimide	10.0 mM	0.7	4.2
Monoiodoacetate	1.0 mM	0	3.9
Potassium fluoride	0.1 mM	23.0	45.5
Potassium fluoride	1.0 mM	96.3	96.7
Adenine	1.0 mM	0	0
Adenosine	10.0 mM	0	6.5

Substrate: *p*-Nitrophenyl phosphate

HgCl₂ により同程度の阻害をうける一方、他の SH基阻害剤によって阻害をうけないからである。アデニン、アデノシンによる阻害はみられなかった。弗化物は強い阻害剤である。この実験で Acph-1 と Acph-4 の間に差がみられたのは、デオキシコール酸と三価鉄の場合で、いずれも Acph-4 が多少多く影響をうけているように見える。無機リン酸は強い阻害作用をもつが、無機リン酸は体内に多く存在するため、酸ホスファターゼの体内機能に重要な意味をもつと考えられる。Fig. 4 から明らかであるが、無機リン酸による阻害は拮抗的阻害であり、阻害恒数は Acph-1 と Acph-4 は同じで $1.6 \times 10^{-4} M$ あった。この結果は、ハエの生体内無機リン酸量が系統によって差がない (Table 1) ことと共に、2 系統の Acph 活性の差は体内の無機リン酸に起因しているのではないことを明らかにした。セファデフクス G-100 カラムによって測定した分子量は Acph-1, Acph-4 とともに約 55,000 と推定された。*F*₁ 雑種の電気泳動パターンにおいて、雑種酵素があらわれる (Fig. 1, Fig. 2) ことから、この酵素は 2 サブユニットから成っていると考えられる。

考 察

クロショウジョウバエの酸ホスファターゼアロザイム系統間で活性の差が見出され、*Acph-4*

系統は他に比べて特に高い活性をもっている。しかるに *Acph-4* 系統より *Acph-4* アロザイムを抽出し、かなり高い精製度の標品を *Acph-1* 系統 (低活性) より同様にして精製したアロザイムと比較すると、生化学的性質は極めて類似していた。このことから *Acph-4* 系統の示す高い活性は、突然変異による構造遺伝子の変化に伴う酵素タンパクの変異に起因するものではないことが示唆された。又両系統の精製酵素の比活性が互いに類似していることから、*Acph-4* 系統はこの酵素タンパクを *Acph-1* 系統より多く生産していることが予想される。更にこれは、*Acph-1*/*Acph-4* ヘテロ接合体において *Acph-1* の活性が見えなくなることから推定出来る。即ち、酵素タンパクが2つのサブユニット (A, B) から成る2量体のとき、サブユニットAの2量体として酵素Aが生成され、サブユニットBの2量体として酵素Bが作られる。サブユニットAとBが構造的に類似している時は、AとBのヘテロ2量体が生成され、これが F_1 個体における中間の易動度をもつ雑種酵素の出現となる。サブユニットの量比が等しいときはAA, AB, BBの比は1:2:1となつて雑種酵素の量が多くなる。サブユニットAとBの比が3:1のときはAA, AB, BBの比が9:6:1となり、BBは他の2つに比して極めて微量になる。又、雑種酵素ABはAAに比して活性が低くなる。*Acph-4* と *Acph-1* 系統の F_1 のバンドの濃さが第1図に示した比率になるのは、*Acph-4* と *Acph-1* の比が約3:1であり (Table 1), 上述のようなサブユニットの組合せが起つた結果と考えられる。酵素生成の調節は調節遺伝子の働きによるところが多いので、この場合も調節遺伝子の影響について実験を進めなければならない。予備実験の結果では、各系統のホモジネートを加えて測定した活性は相加的になるが、おのおの F_1 のホモジネートでは相加的にならないことが多いので、調節遺伝子の関与が考えられる。ネズミの α -グリセロリン酸脱水素酵素の高活性アロザイム系統においてもこの実験と同じような結論が得られたが、調節遺伝子であるという確証はない [Kozak (1974)]。

酸ホスファターゼは下等から高等の多くの生物にその存在がみとめられ、精製酵素について性質がしらべられている。いずれの場合でも、種々のリン酸モノエステルを分解するいわゆる基質特異性の低い酵素である。一般的にいえば、動物の酸ホスファターゼは *p*-ニトロフェニルリン酸に非常に強く反応するが、ピロリン酸は分解出来ないものが多い。一方植物からの酵素は両方の基質に同じ速度で反応する。しかし微生物では色々あり、大腸菌のそれはピロリン酸を分解する能力を欠き、[Yoshida and Tamiya (1971)], チオバチルスでは、両基質を同じ程度に分解する [Tominaga and Mori (1974)]。ある種のカビのそれはピロリン酸をかなり強く分解する [Yoshida and Tamiya (1971)]。昆虫ではイエバエでの研究 [Terranova and Leopold (1973)] があり、*p*-ニトロフェニルリン酸の分解速度の約40%の速度でピロリン酸を分解する。しかし、ここで用いているのは全くの粗酵素であり、酸ホスファターゼには種々の分子型があるので単純な比較は出来ないが、ショウジョウバエの結果とは一致しない。即ち、ショウジョウバエの酵素は動物のそれと同様に、ピロリン酸を全く分解出来ない。

ショウジョウバエ酵素の K_m 値, 金属や弗化物による阻害などは他の生物のそれと類似しているが, 分子量はかなり小さい。即ち, 哺乳類組織では, 90,000~100,000の2量体[Luchter-Wasył and Ostrowski (1974), Saini and van Etten (1978)] であり, 植物においては, サツマイモでは100,000~110,000の2量体 [Uehara et al. (1974)], 小麦では59,000の一量体 [van Etten and Hickey (1977)] であるという報告がある。微生物では130,000~150,000 [Horgan et al. (1974), Tominaga and Mori(1974)] である。クロショウジョウバエ酵素の分子量はセファデックスカラムで測定すると 55,000であった。 F_1 の電気泳動パターンとキイロショウジョウバエの研究 [MacIntyre (1971)] からサブユニットは分子量の約半分と考えられるので他の生物の半分の分子量であることがわかる。

要 約

クロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) の *Acph-4* アロザイム系統の酸ホスファターゼ (EC 3.1.3.2) は *Acph-1* 及び *Acph-2* 系統のそれらと比較すると約3倍高い比活性を持つ。この高活性の原因を探究するために, *Acph-1* 及び *Acph-4* アロザイムを各ホモ系統より抽出し, ほぼ単一にまで精製し, 比活性, 基質特異性, 至適 pH, K_m 値, 阻害剤の影響, 無機リン酸の阻害恒数, 分子量などについて比較した結果, 両アロザイム間でいちぢるしい差はみられなかった。これらの結果から, 酸ホスファターゼの性質がクロショウジョウバエのアロザイム系統の個体間にみられる活性の差を支配する要因ではないことが明らかとなった。なお, 分子量は55,000の2量体と推定されたが, これは他の多くの動植物の酸ホスファターゼの約半分の大きさである。

引用文献

- Andrews, P. (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91, 223-233.
- Briscoe, D. A., A. Robertson and J. M. Malpica (1975) Dominance at *Adh* locus in response of adult *Drosophila melanogaster* to environmental alcohol. *Nature* 255, 148-149.
- Day, T. H., P. C. Hillier and B. Clarke (1974) The relative quantities and catalytic activities of enzymes produced by alleles at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genetics* 11, 155-165.
- Gibson, J. B. and R. Miklovich (1971) Modes of variation in alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia* 27, 99-100.
- Horgan, I. A., P. A. Horgan and D. H. O'Day, (1974) Purification and properties of acid phosphatase I from the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. *Can J. Biochem.* 52, 126-136.
- Kozak, L. P. (1972) Genetic control of α -glycerophosphate dehydrogenase in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 3170-3174.

- Kozak, L. P. (1974) Purification and characterization of two allelic forms of L-glycero 3-phosphate dehydrogenase from inbred strains of mice. *Biochem. Genetics* 12, 69-79.
- Lee, Chi-Yu and B. Pegoraro (1979) Biochemical and immunological studies of three genetic variants of 3-phosphoglycerate kinase 2 from the mouse. *Biochem. Genetics* 17, 631-644.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Luchter-Wasył, E. and W. Ostrowski (1974) Subunit structure of human prostatic phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 365, 349-359.
- MacIntyre, R. J. (1966) The genetics of acid phosphatase in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics* 53, 461-474.
- MacIntyre, R. J. (1971) A method for measuring activities of acid phosphatases separated by acrylamide gel electrophoresis. *Biochem. Genet.* 5, 45-56.
- McDonald, J. F., G. K. Chambers, J. R. David and F. J. Ayala (1977) Adaptive response due to changes in gene regulation: a study with *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 4562-4566.
- McDonald, J. F. and F. J. Ayala (1978) Genetic and biochemical basis of enzyme activity variation in natural populations. I. Alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 89, 371-388.
- 大村京生 (1957) リン酸化合物の定量法。実験化学講座23, 532-537 日本化学会編 丸善
- 大羽滋 (1977) 集団の遺伝。UPバイオロジー-19, 101 東京大学出版会
- Rasmuson, B., L. R. Nilson, M. Rasmuson and E. Zeppezauer (1966) Effects of heterozygosity on alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 56, 313-316.
- Saini, M. S. and R. L. van Etten (1978) Dimeric nature and amino acid compositions of homogeneous canine prostatic, human liver and rat liver acid phosphatase isoenzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 526, 468-478.
- Shaw, C. R. and R. Prasad (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes-A compilation of recipes. *Biochem. Genetics* 4, 297-320.
- Suketa, Y., E. Okaya, R. Takahashi and T. Yamamoto (1974) Purification and characterization of acid phosphatase in *Gladiolus* bulbs. *農芸化学会誌* 48, 537-542.
- Tejima, T. and S. Ohba (1979) Regulation of amylase activity in *Drosophila virilis*. I. activity in adult. *Jap. J. Genetics* 54, 470.
- Terranova A. C. and R. A. Leopold (1973) Soluble acid phosphatases from the posterior reproductive system of the female housefly. *J. Insect Physiol.* 19, 1129-1145.
- Tominaga, N. and T. Mori (1974) A sulfate-dependent acid phosphatase of *Thiobacillus thiooxidans*. Its partial purification and some properties. *J. Biochem.* 76, 397-408.
- Tsuno, K. (1979) Studies on low esterase genes in *Drosophila virilis* population I. *Jap. J. Genetics* 54, 472.
- Uehara, K., S. Fujimoto and T. Taniguchi (1974) Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato. I Purification and some physical properties. *J. Biochem.* 75, 627-638.
- VandeBerg, J. L. and S. V. Blohm (1977) An allelic isozyme of mouse PGK-2 with low activity. *J. Exp. Zool.* 201, 479-483.
- van Delden, W., A. C. Boerema and A. Kamping, (1978) The alcohol dehydrogenase polymorphism in populations of *Drosophila melanogaster* I. Selection in different environments. *Genetics* 90, 161-191.
- van Etten, R. L. and M. E. Hickey (1977) Phosphohistidine as a stoichiometric intermediate in reaction catalyzed by isoenzymes of wheat germ acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*

183, 250-259.

Ward, R. D. and P. D. N. Helbert (1972) Variability of alcohol dehydrogenase activity in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 236, 243-244.

Ward, R. D. (1974) Alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*: Activity variation in natural populations. *Biochem. Genetics* 12, 449-458.

Yoshida, H. and N. Tamiya (1971) Acid phosphatase from *Fusarium moniliforme*. Purification and enzymatic properties. *J. Biochem.* 69, 525-534.