

Drosophila virilis の酸性ホスファターゼ・ アロザイムの遺伝生化学的研究 2

—アロザイム活性の系統内変異—

成瀬 澄子 寺田 理枝

緒 論

クロショウジョウバエ (*D. virilis*) の自然集団内に、酸性ホスファターゼ (Acph)・アロザイムが存在し、その各々の間で活性の変異が見られる。この活性の変異が各々の構造遺伝子によって作られた酵素タンパク質の違いから生ずる生化学的性質の差に起因するのか、否かを知らべるために、この研究の第一報 [成瀬 (1981)] でアロザイム系統から酵素を精製し、その生化学的性質を比較した。その結果では、このアロザイムの生化学的性質は、活性の著しい差をもたらすとは考えられない程類似していた。従って、活性のちがいは調節遺伝子に起因することが示唆された。

しかし、実験に用いたアロザイムは、対立遺伝子支配であるので、活性の変異に構造遺伝子が全く関与しないと断言出来ない。Bewley ら (1980) はキイロショウジョウバエのグリセロール-3-リン酸脱水素酵素のある電気泳動の変異体から、薬剤などにより活性の低い、又は活性の全くない突然変異体を作り、生化学的、免疫学的及び遺伝学的解析の結果、この突然変異は構造遺伝子中の部分的欠損によることを明らかにした。又、Thatcher (1980) はキイロショウジョウバエのアルコール脱水素酵素の全アミノ酸配列を研究し、アロザイムは必ずしも電荷を左右する一個のアミノ酸の置換で生ずるのではないことを示した。すなわち、電荷に関係ないアミノ酸の置換がアロザイム間で見出されている。これらのことから、突然変異によって構造遺伝子支配のアミノ酸が変化し、電荷の変化は起こさないが、活性に影響を与える可能性も考えられる。これについては、Acph の全アミノ酸配列を知り、構造と活性の関係が明らかになるのを待たなければならない。

一方、調節遺伝子が関与するか否かは、集団遺伝学的見地から、自然集団内にある遺伝子支配のアロザイム間で活性の変異がみられるか否かを知ることによって判断される。クロショウジョウバエの Acph アロザイム遺伝子の集団内分布は、ほぼ単型的で、Acph-2 が圧倒的多数を占

める〔大羽 (1977)〕ので、*Acph-2* アロザイム間で活性の変異の程度をしらべることが出来る。幸いにも、城西歯科大学の津野博士が1980年に御前崎で採集した系統を提供して下さったので、その中から *Acph-2* ホモ接合体の約20系統を使い、活性の比較を行なった。

この報告では、*Acph-2* ホモ系統間で活性の変異が見出され、クロショウジョウバエの *Acph* 活性に調節遺伝子が関与することが示されたので、調節遺伝子の遺伝様式をしらべて、この遺伝子の関与するしくみについて考察する。

材料と方法

材料：この実験に用いたクロショウジョウバエの酸性ホスファターゼ・アロザイム系統のうち、*Acph-4* 系統は第一報に用いたものと同じである。*Acph-1*, *Acph-2* 系統は御前崎集団から採取し、研究室内で維持した系統から新たに分離した。このほか、1980年に御前崎から採取した系統のうち、*Acph-2* 遺伝子ホモの19系統を用いた。さらに、これら御前崎系統から、*Acph-2* 遺伝子を含む染色体領域をホモに持つ系統を作るため、Fig. 1 に示した交配を行なった。すなわち、各々の御前崎 *Acph-2* ホモ系統から雄を5~10匹とり、別々に *Acph-4* ホモの雌と交配する。得られた F_1 雄の10~15匹を別々に、*Acph-4* ホモの雌と一匹ずつ戻し交配し、各交配毎に生じた F_2 を一匹ずつ兄弟姉妹交配する。卵を生んだことを確かめてから、親を電気泳動にかけ、両親とも *Acph-2* ホモである交配をとると、特定の染色体の着目領域につきホモの系統を得ることが出来る。

方法：酸性ホスファターゼ活性の測定法は、すでに報告した〔成瀬 (1981)〕。この実験で、一匹のハエの活性を測定する時は、次のような変法を用いた。5mM P-ニトロフェニルリン酸と酵素

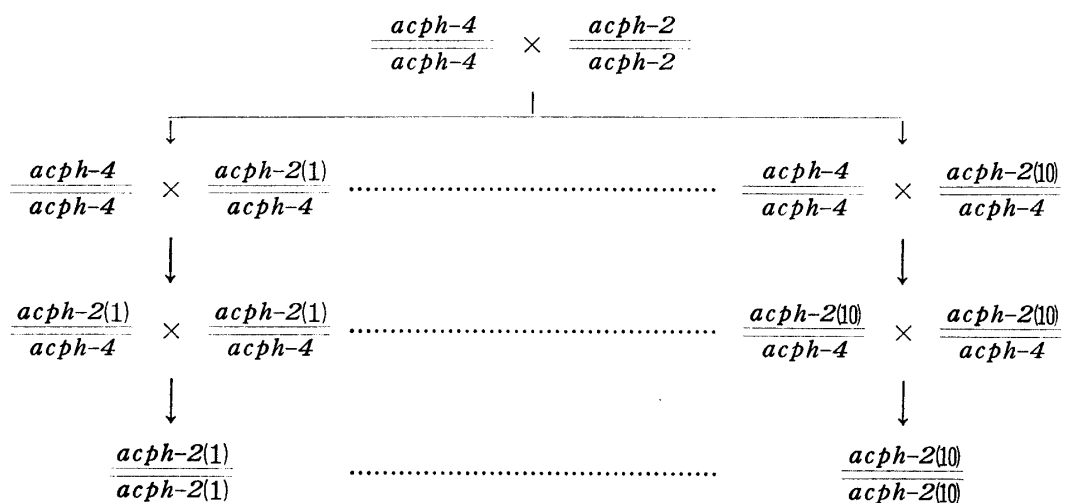


Fig. 1 Mating scheme used to obtain strains homozygous for a chromosome from different original strains.

液 25 μ l をふくむ 0.5 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で 37°C, 一定時間反応させ, 0.25 ml の 0.5 N NaOH を加えて反応を停止させたのち, 1 ml のキューベットを用いて吸光度を測定する。活性の単位は 37°C, 1時間に遊離される P-ニトロフェノールの量を mg であらわした。タンパク質の量は Lowry ら (1951) の方法に従って測定した。

実験には, 単数のハエを用いる場合と複数を用いる場合がある。一匹のホモジェネートを用いるときは, ハエをエッペンドルフ製の 400 μ l プラスチック製遠沈管に入れ, 0.1 ml の 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) を加え, 遠沈管にあわせて作った乳棒を手で上下してすりつぶした。実験にはホモジェネートをエッペンドルフ小型遠心器 5412で 12,000 rpm, 2分間遠心した上清を用いた。複数のハエの活性は, 30 mg 前後のハエを集め, ハエの重さの約40倍量の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 中でガラスホモジェナイザーを用いてすりつぶし, 13,000 rpm, 30分遠心した上清を用いて測定した。いずれの場合も 0~4°C で操作を行なった。

結 果

1) 発育に伴う Acph 活性の変化。

酵素の体内における活性は, 個体の発育段階に伴なって変化することが多い。Fig. 2にクロソウジョウバエの発育過程における Acph 活性の変化をしらべた結果を示した。この実験には

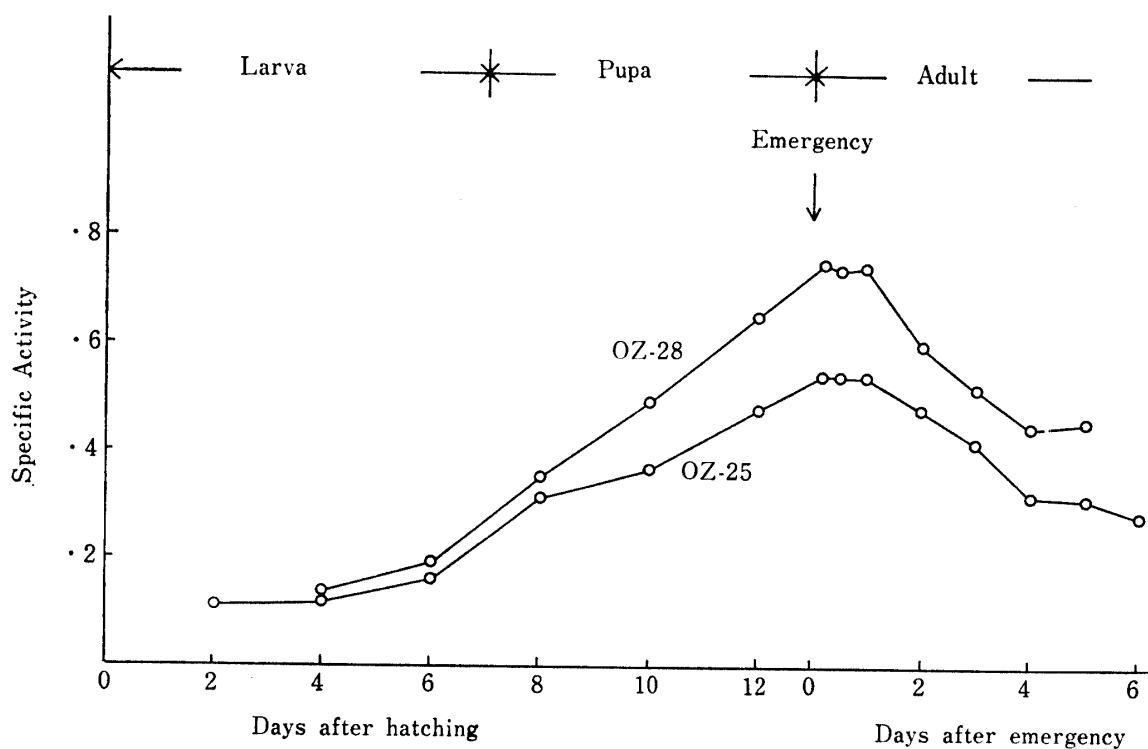


Fig. 2 Changes in Acph activity during development.

比較的低活性をもつ御前崎25系統 (OZ-25) と比較的高活性を示す28系統 (OZ-28) を用いた。新しい餌上に生ませた卵が孵化したのを確認し、この日を0日とし、それ以後2日毎にサンプルを集めて活性を測定した。活性の弱い、且つ小さい幼虫は一匹では測定不可能であるので、全過程を通して複数の個体をサンプルとした。Fig. 2 に示したように、幼虫期に少ない活性は蛹化に伴って増加し、羽化後1日までは高活性を維持しているが、親バエの年齢と共に低下して4日以後はほぼ一定となる。AcpH 活性のこの変動は、高活性系統にも、低活性系統にも同様にみられるものであった。このため、活性を比較するハエは、羽化後24時間までのものを使用した。又、この結果は AcpH が蛹から成虫への変態時に役割を果していることを示している。

多くの変態を起こす動物において、変態時にはリソゾームが関与することが知られており、クロショウジョウバエの細胞分画によってもリソゾーム・ミトコンドリア分画に AcpH 活性が高いこと (未発表) から、AcpH アロザイムはリソゾーム由来することが明らかである。クロショウジョウバエの AcpH アロザイムを发育過程を追って電気泳動でしらべる時、全過程を通して易動度及びパタンの変化を示さなかった。これらのことから成虫時と幼虫時の酵素は同一遺伝子支配であると考えられる。

酵素の活性が雌雄の間でことなることがしばしばみられるので、AcpH アロザイム系統の雌雄の活性を比較した。Table 1 に複数のハエで測定した結果を示した。この表から明らかなよう

Table 1. AcpH activity in adult flies of three allozyme strains.

Strains	Activity (mg substrate/mg protein/hr)		
	Female	Male	t
<i>AcpH-1</i>	0.4034±0.0405*	0.4325±0.0586	1.938
<i>AcpH-2</i>	0.5660±0.0292	0.5322±0.0703	1.989
<i>AcpH-4</i>	0.9015±0.0431	0.8757±0.0444	1.909

* Mean ± S.E. of 22 replications for female and male of each strain.

Table 2 AcpH activity in single flies of different strains from OZ strains.

Strains	Activity (Mean±S.E.)	Strains	Activity (Mean±S.E.)
OZ- 1	0.6597±0.0651	OZ-36	0.7126±0.1574
2	0.6118±0.0605	37	0.6237±0.0539
10	0.6466±0.0616	41	0.5536±0.0663
14	0.7757±0.1213	45	0.7518±0.0715
18	0.6512±0.0915	103	0.5916±0.0375
20	0.6785±0.1075	105	0.6104±0.0476
25	0.4297±0.0696	106	0.6891±0.0859
28	0.7591±0.0609	111	0.7265±0.0867
29	0.6442±0.0421	119	0.5383±0.0479
35	0.5365±0.0399		

Table 3 Analysis of variance of AcpH activities in OZ *AcpH-2* strains.

Source of variation	d. f.	Mean square
Between strains	18	0.0749**
Error	170	0.0081

** Significant at the 1% level.

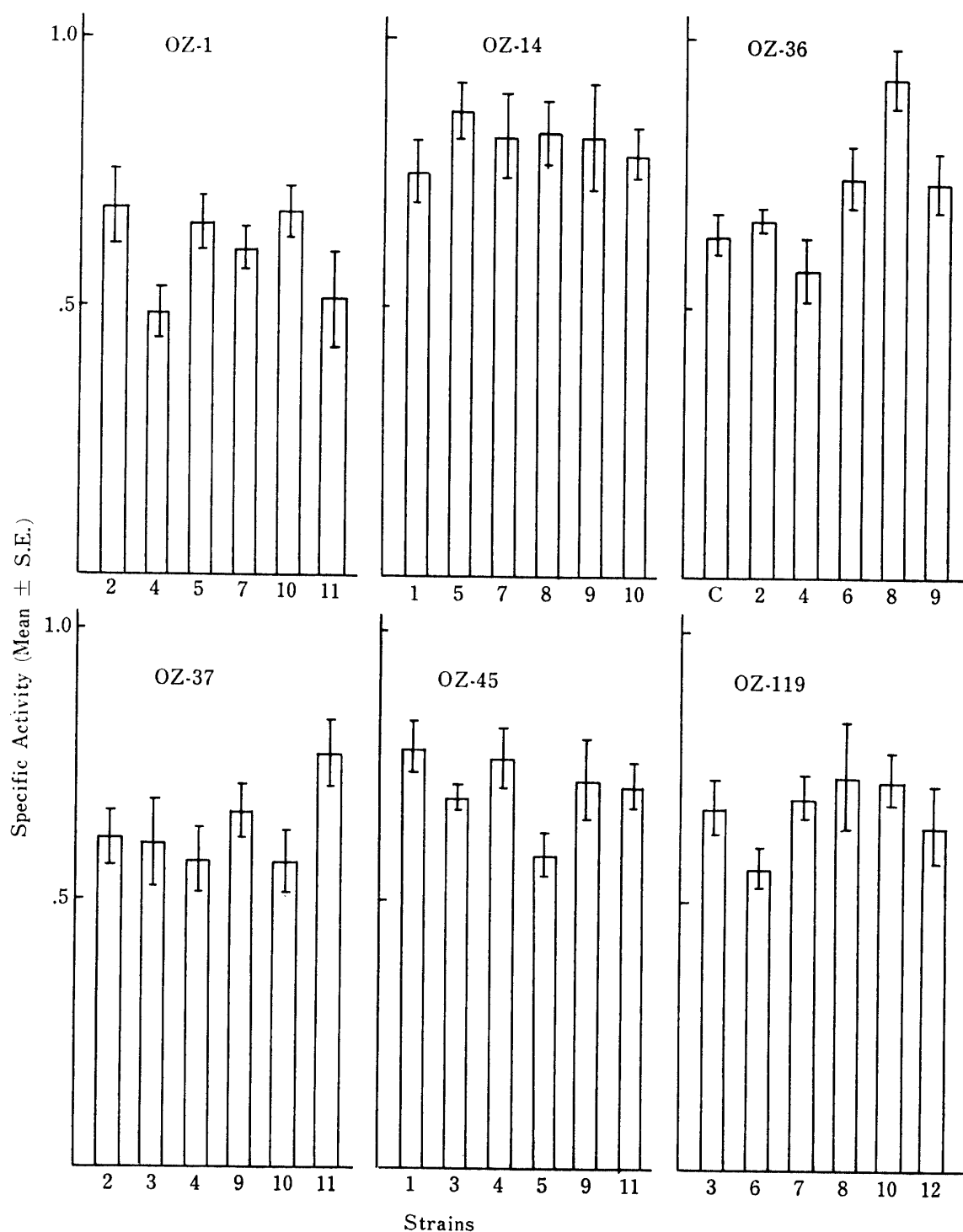


Fig. 3 Variations of AcpH activity in single flies of strains homozygous for *AcpH-2*. Enzyme was assayed individually with ten flies.

Table 4 Analysis of variance of *Acph* activities in strains homozygous for *Acph-2*.

Source of variation	d. f.	Mean square
Between strains	5	0.2595**
Between lines within strain	31	0.0965**
Error	333	0.0054

** Significant at the 1% level.

に、すべての系統で雌雄の間で活性に有意な差がみられなかったので、今後の研究は雌雄の別なく使用した。

2) *Acph-2* アロザイム系統内の活性変異

御前崎集団の *Acph-2* アロザイム系統の活性は、19の系統毎に1匹ずつ10匹測定し、その平均値と標準誤差であらわした (Table 2)。この表に示したように活性は系統内でかなりの変異があり、分析分散の結果、この変異は統計的に有意であった (Table 3)。

Table 2 に示した値は、系統毎に複数のハエを用いて測定した活性値と同じであった。このことから微量測定による技術的な差はないものと判定された。

Table 2, 3 から *Acph* 活性には構造遺伝子の働きに影響を与える調節遺伝子の関与が推察される。自然集団から得た系統は遺伝的にかなり不均一であるため、Fig. 1 に記した方法により、*Acph-2* が位置する染色体領域をホモに持つ系統をつくって活性を比較した。実験は御前崎系統19系統のうちの6系統をえらび、各系統毎に6ホモ系統を作って行なった。Fig. 3に結果を示した。図からわかるように、染色体ホモ系統内で活性の変異が見られ、OZ-14 及び OZ-119 のように系統内変異の比較的少ないものもあるが、かなり大きな変異があることがわかる。これらの変異は分散分析により御前崎系統間でも、染色体ホモ系統間 (系統内) でも、統計的に有意の差のあることが示された (Table 4)。

3) 活性を支配する遺伝的要因

Acph 活性にはどんな遺伝的要因が関与しているかを知るため、*Acph-2* 系統の中で活性の低い OZ-25 と活性の高い OZ-28 を用いて交配実験を行なった。用いた両系統は Fig. 1 で示した交配で得られたホモ系統である。Fig. 4 に一連の交配実験の結果をしめした。得られた F₁ の活性の平均値は、両親の平均活性の中間より低く、正逆交配間で有意とみとめられる差があった。とくに25×28の F₁ の活性の平均は母親の平均値と差がなく、雌の影響のみが現われるように思えるが、逆交配の28×25では雌に用いた28の影響がないようである。この傾向はもどし交配にもあらわれ、F₁ (28×25) を25でもどし交配するとき、平均値は低活性にかたよるが、28でもどし交配するとき、平均値は F₁ のそれと同じであった。これらのことは、活性を支配する要因は細胞質にも存在することを示唆し、又、低活性に導く遺伝的要因は高活性のそれに対し、

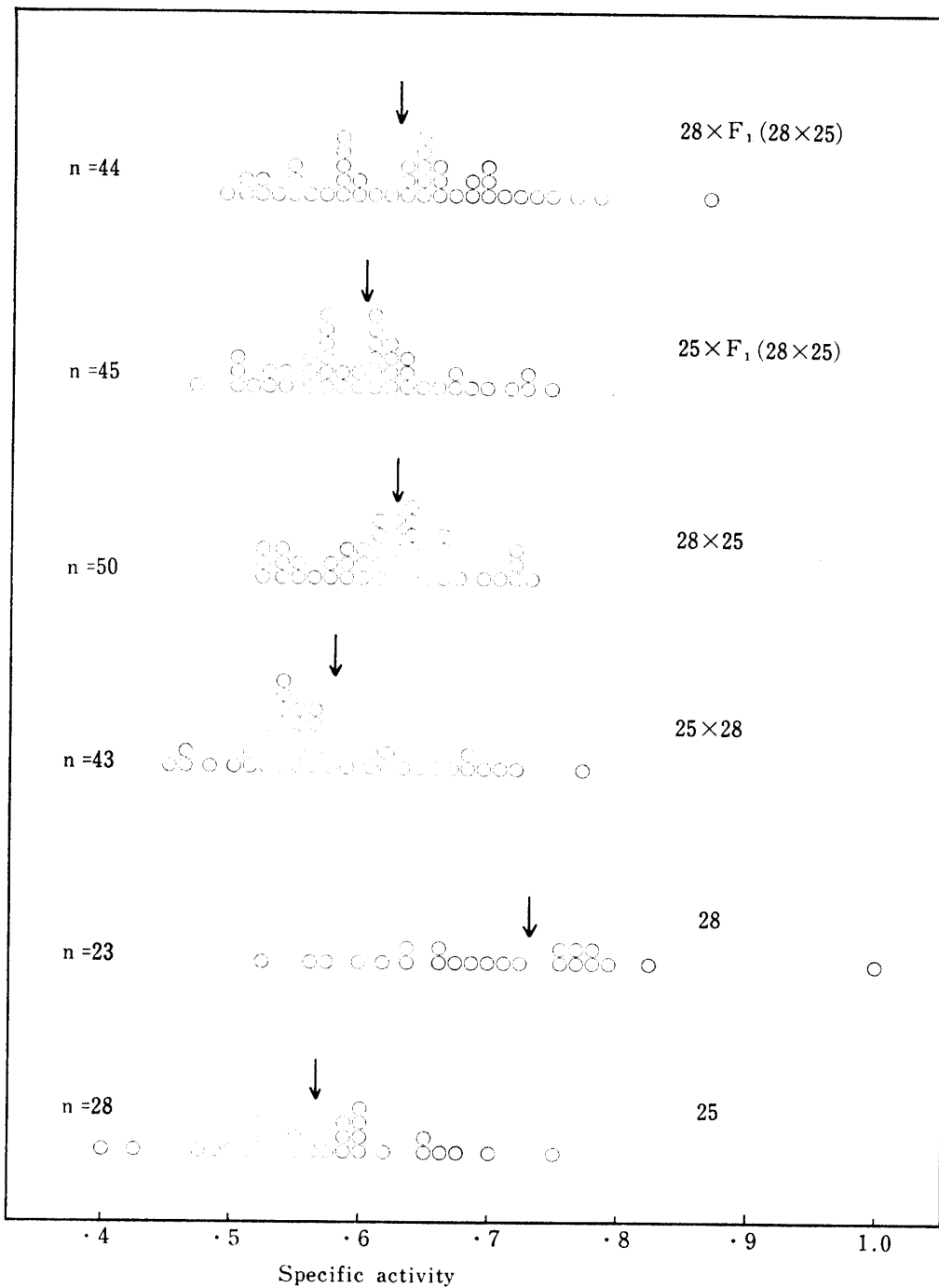


Fig. 4 Frequency distribution of Acph activity in parental strains (25, 28), in F₁ (25×28, 28×25) and in the backcross progeny. One circle represents one individual and n represents total number of flies. Arrow shows mean value.

部分的に優性を示すように思われる。細胞質性因子については、前報で報告したように、低活性系統のホモジェネート中に高活性系統の活性を阻止する物質が含まれていなかったため、細胞質に含まれる物質でなく、転写前の因子であろうと思われる。御前崎 *Acph-2* 系統間で得られた上のような結果は、アロザイム系統間でも認められた。すなわち、*Acph-4* と *Acph-2* 系統の交配では、F₁ の平均活性は両親の中間の値より低く、*Acph-2*×*Acph-4* の F₁ の活性は *Acph-2*

の活性と有意な差はみとめられず、正逆交配の間で F_1 の平均値に差がみられた。*Acph-1* × *Acph-4* の交配でも、測定数が少ないが同じような傾向がみとめられた。

考 察

この実験は前報にのべた実験から導き出された推定、すなわち *Acph* 活性は構造遺伝子以外の遺伝的要因—調節遺伝子—によって支配をうけるという推定に対し、具体的な証拠をうるために計画されたが、調節遺伝子の関与を支持する結果が得られた。その一つは、*Acph* 活性が発生過程で変動することである。活性は蛹期から増加し、羽化と共に最高に達し、その後低下して一定となる。幼虫から成虫までの *Acph* は少なくとも電気泳動的には同一の型を示すことから、幼虫と成虫の *Acph* を支配する遺伝子は同一であり、活性の変化は構造遺伝子以外の因子に依存すると考えられる。高活性系統の活性が *Acph* 活性が高くなる蛹期から羽化にかけて特に上昇することもこの考えを支持するものである。

他の一つは *Acph-2* 遺伝子ホモ系統間で活性に大きな変異がみられることである。*Acph-2* ホモ系統内で最低を示す系統の活性は0.481、最高の系統の活性は0.921であった (Fig. 3)。以上のような結果を総合すると、*Acph-1*、*Acph-4* 系統の活性が *Acph-2* 系統に比べて前者で低く後者で高いのは、これらの系統内に、*Acph-2* 系統でみられたものと同様に調節遺伝子による活性の大きな変異があり、*Acph-1* 系統はたまたま調節遺伝子が低活性に固定されたものであり、*Acph-4* 系統はたまたま高活性に固定されたものである可能性が強いことになる。したがってアロザイム系統間の活性の差異は、構造遺伝子による原因も全く除くことは出来ないにしても、調節遺伝子の働きによるものと考えられる。この結論は *Acph* アロザイムの全アミノ酸配列から明らかにされるであろう。

Acph 活性の遺伝様式をしらべるために行なった交配実験は、興味深い結果を示している。

F_1 活性は両親の平均値より低い方にかたより、かつ、雌親の影響が部分的に現われ細胞質性因子の関与が示唆されたことである。調節遺伝子間の優劣はキイ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場合でも報告されている [McDonald and Ayala (1978)]。また、一方では *Acph* 遺伝子の存在する染色体をホモにした系統では、活性値のばらつきが自然集団からのホモ系統のそれより小さくなっているので、*Acph* 遺伝子座近辺に調節遺伝子の存在が示されたが、これらについては更にくわしい検討がなされなければならない。

Wilson (1976) は生物の進化は構造遺伝子の突然変異より、遺伝子発現の型を変えるような調節遺伝子の突然変異に強く依存していると主張している。キイロショウジョウバエの酵素に関する調節遺伝子の遺伝学的研究では、キサンチン脱水素酵素の調節遺伝子は構造遺伝子に接近して存在し [Chovnick ら(1976)]、アミラーゼでは同一染色体上に [Abraham and Doane (1978)]、

そしてアルコール脱水素酵素では異った染色体上にある [McDonald and Ayala (1978)] と報告している。少ないデータではあるが、調節遺伝子の構造遺伝子に対する位置は様々であり、このことがこの種特有の形態形成を行っているのかも知れない。

要 約

クロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) の自然集団から得られた *Acph-2* 系統の間で、酸性ホスファターゼ (Acph) 活性に大きな変異が見出された。さらに、*Acph-2* 遺伝子座領域をホモにした系統を作って比較した結果、これらの系統間でも活性に変異があることが明らかになった。高活性系統と低活性系統の交配実験では、F₁ 活性は両親の活性の平均値より低く、かつ、部分的にはあるが、低活性の母親の影響が強くあらわれることが示された。これらの結果は、Acph の活性は *Acph* 遺伝子以外の細胞質又は染色体上の因子によって調節されていることを示唆しているが、因子の本体については不明である。

Acph 活性は蛹化に伴って顕著になり、羽化直後に最高に達し、再び低下する。発生過程のこの変動は高活性系統につよくあらわれるので、調節遺伝子は変態に伴って Acph 分子の生成に影響を与えることによって、Acph 活性を調節していると思われる。

引用文献

- Abraham, I. and W. W. Doane (1978) Genetic regulation of tissue-specific expression of *Amylase* structural genes in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 4446-4450.
- Bewley, G. C., J. M. DeZurik and G. Pagelson (1980) Analysis of L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants in *Drosophila melanogaster*: Complementation for intracellular degradation of the mutant polypeptide. Molec. gen. Genet. 178 301-308.
- Chovinick, A., W. Gelbart, M. McCarron and B. Osmond (1976) Organization of the rosy locus in *Drosophila melanogaster*: Evidence for a control element adjacent to the xanthine dehydrogenase structural element. Genetics 84 233-255.
- 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.
- McDonald, J. F. and F. J. Ayala (1978) Genetic and biochemical basis of enzyme activity variation in natural populations. 1. Alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. Genetics 89 371-388.
- 成瀬澄子 (1981) *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—. 城西大学研究年報 5 123-135.
- 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.
- Thatcher, D. R. (1980) The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (Adh^{N-11} , Adh^S and Adh^{UF}) from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. Biochem. J. 187 857-886.

Wilson, A. C. (1976) Gene regulation in evolution. In molecular evolution (ed. F. J. Ayala)
p. 225–234. Sinauer Assoc. Sunderland, Massachusetts.