

クロショウジョウバエ・グリセロール3リン酸 脱水素酵素アロザイムの遺伝生化学的研究

3. 生化学的比較

富永浩子 成瀬澄子

クロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) のグリセロール3リン酸脱水素酵素 (α GPDH) には, α GPDH 遺伝子座の少くとも3つの対立遺伝子によって作られるアロザイムが存在する (Narise 1980)。日本の自然集団におけるこれらのアロザイム遺伝子の頻度を調べると, α GPDH^F は0.0036, α GPDH^M は0.9875, α GPDH^S は0.0089であり, 殆んどが α GPDH^M であった (大羽, 1977)。アロザイムの多くは自然選択に中立であると報告されている (Kimura and Ohta, 1971) が, この酵素は昆虫のエネルギー代謝及び脂質合成に重要な役割を演じているので, この酵素の変異型はこれらの生体機能を異常にし, 延いては個体の生存能力を低下させるのではないかと予想される。成瀬 (1980) はこのことを確かめるために酵素を単一なタンパク質として精製し, アロザイム間で生化学的性質を比較した。その結果, 多くの類似点のある中で, 35°C に対する温度抵抗性及び過剰な基質による活性阻害度については必ずしも一定でなく, α GPDH^F は温度抵抗性が比較的 low, 又, α GPDH^S は基質阻害を受けやすいという結果が得られた。これらの生化学的性質の違いは一般的に, 酵素タンパク質のアミノ酸配列の変化によると考えられている。クロショウジョウバエ α GPDH アロザイムは, キイロショウジョウバエの ADH アロザイムで報告されているように (Fletcher et al., 1978; Thatcher, 1980), 多分1アミノ酸が電荷の異なるアミノ酸へ置換することによって電気泳動的に区別されるのであろう。しかし, このような1置換だけによって上述の生化学的変化が生ずるのであろうか。この問題を明らかにするためには, 一次構造の差異を含めた種々の面からアロザイムタンパク質の構造について調べることが必要である。

この研究では, 3つのアロザイム間で, 免疫学的性質, 等電点, アミノ酸組成等を比較し, 更に, 酵素消化によって生じるペプチドをフィンガープリント法によって比較検討した。

材料と方法

材料と酵素の精製

クロシヨウジョウバエの3種類のアロザイム系統 (α GPDH^F, α GPDH^M, α GPDH^S) と、酵素の精製については成瀬の報告 (Narise, 1980) に従った。しかしこの研究に用いた酵素精製法は、アフィニティークロマトグラフィーを用い、下記のように一部変更された。即ち、1980年 (Narise) に報告した精製過程4の DEAE 処理8及び9の DE-52 カラムクロマトグラフィーを除き、精製過程6のセファデックスカラムの次にマトリックスゲル・オレンジA (Amicon) カラムを使用した。セファデックスG-100 カラムから溶出された酵素標品を 5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) でオレンジAカラム (2.6×17 cm) に吸着させ、0—0.4 M 塩化カリウムの直線勾配液 600 ml によって溶出した。この方法で精製した酵素は、前報で精製したものと同一のものであることが、ディスク電気泳動により判定された。又、この方法により精製時間が短縮された。

酵素抗体の作成と抗体による阻害

酵素抗体は、 α GPDH^M と α GPDH^F の精製酵素 200~500 μ g を別々に完全 Freund's アジュバンドと混合して、2週間毎に3回、ウサギに注射して作らせた。最後の注射後7日目に採血し、血清を集め実験に使用するまで -70°C に保存した。Ouchterlony 法は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かした1%アガロースゲル上で4°C, 24時間及び48時間密閉容器内で行った。抗 α GPDH^M 及び抗 α GPDH^F の3種のアロザイムに対する反応性を調べるために、一定量の精製酵素を種々の濃度の抗体と、0.1%牛血清アルブミンを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 100 μ l 中で 25°C, 20分間反応させた後、基質 (α GP) を含んだ緩衝液 (pH 10.0) 2.9 ml を加え、残存活性を測定した。酵素活性測定の方法は Narise の方法 (1980) を用いた。4, 5回の反復実験によって得られた結果は、%であらわし、その平均値をプロットし、最小二乗法により直線を引いた。

等電点の測定

アロザイムタンパク質の等電点はディスクゲルを用いた Kenrick and Margolisの方法 (1970) を一部改良して測定した。4%ポリアクリルアミドゲルにはアンフォライン (LKB Instruments) pH 5—7 と pH 3.5—10 を4:1の割合で混合したもの (この条件下での測定範囲は pH 5.3—6.7である) を2%になるように加え、4%水酸化ナトリウムを陽極 (下槽) にし、0.2% リン酸を陰極 (上槽) にして6時間、250 V で泳動した。なお、サンプルを添加する前に1時間、300 V で予備通電を行った。マーカーとしては、オリエンタル社製の pI マーカーを用いた。

アミノ酸組成

アロザイムのアミノ酸分析は、Hirs (1967) の方法に従い、カルボキシメチル化した精製アロ

ザイムを用いた。カルボキシメチル化したアロザイム(約1 mg)を3%チオグリコール酸を含む6 N 塩酸 0.2 ml で110°C, 24時間及び48時間加水分解した後, この分解物を真空乾燥し, 0.2 Mクエン酸緩衝液(pH 2.2)に溶かし, JEOL-JLC 5 AH アミノ酸分析機にかけて分析した。酸加水分解において, こわれやすいアミノ酸である Ser, Thr は24時間分解の値を, 又, 分解しにくいアミノ酸である Val, Ile は48時間分解の値をそれぞれ用いた。

N末端アミノ酸の検出

N末端アミノ酸の検出は, ダンシルクロリド法(Gray, 1972)によって行い, ダンシル化したアミノ酸は二次元ポリアミド薄層クロマトグラフィーで同定した。

トリプシン消化物のペプチドマップ

アロザイムタンパク質のトリプシン消化物の分離は2つの方法によって行った。その第1の方法は, フィンガープリント法(Ingram, 1958)である。カルボキシメチル化したアロザイムタンパク質を1 mg/mlの割合で0.1 M リン酸二水素カリウム-0.05 M ホウ素液(pH 8.0)に溶かし DPCC 処理したトリプシンを基質に対し1/100の割合で加え 37°C, 4時間分解後, セファデックス G-10により脱塩してから凍結乾燥した。この試料を50%ピリジンに溶かし, ワットマン3 MM 濾紙(45×60 cm)上で二次元展開した。即ち, 最初10%ピリジン液(pH 6.5)中で1,500 V, 60~100 mA で3時間一次元の電気泳動を行ない, 乾燥後, n-ブタノール/酢酸/ピリジン/水(15/3/10/12)の溶媒中で一次元と直角の方向にクロマトグラフィーを行った。濾紙上に分離したペプチドは0.001%のフルオレッサミンのアセトン液に浸し, 乾燥後, 紫外線ランプを照射して生ずるスポットを記録した。

第2の方法は逆相液体クロマトグラフィー(HPLC)と蛍光検出器によるペプチドマップ法である(Rubinstein et al., 1979)。フィンガープリント法に用いられたと同じ処理をしたアロザイム試料を0.02Mピリジン-ギ酸 pH 3.0, 又は0.3%トリエチルアミン-ギ酸 pH 3.3に溶解し, それぞれメンブランフィルター(ミリポア 0.22 µm)により濾過した。HPLCは, 濃度勾配作成装置を備えた Shimadzu LC 2 A 型を用い, 逆相系 Zorbax ODS カラムで行った。溶出液は自動フルオレッサミン-ペプチドモニターシステム(Böhlen et al., 1975)によって検出した。

結 果

精製した α GPDH^M 及び α GPDH^F を別々にウサギに注射して得られた抗体は, Ouchterlony 法によって他の2種の酵素抗原に対し, 連続した沈降線を作った(Fig. 1)。この沈降線は酵素活性を示さないで, 抗体は抗原酵素の活性を阻止することが示された。それ故, 抗体による酵素活性の阻害を各々の抗体について調べた。その結果 Fig. 2 に示したように, α GPDH^M 抗体は α GPDH^M アロザイムに対して他の2つのアロザイムよりいくらか強い阻害を示した。Fig. 3

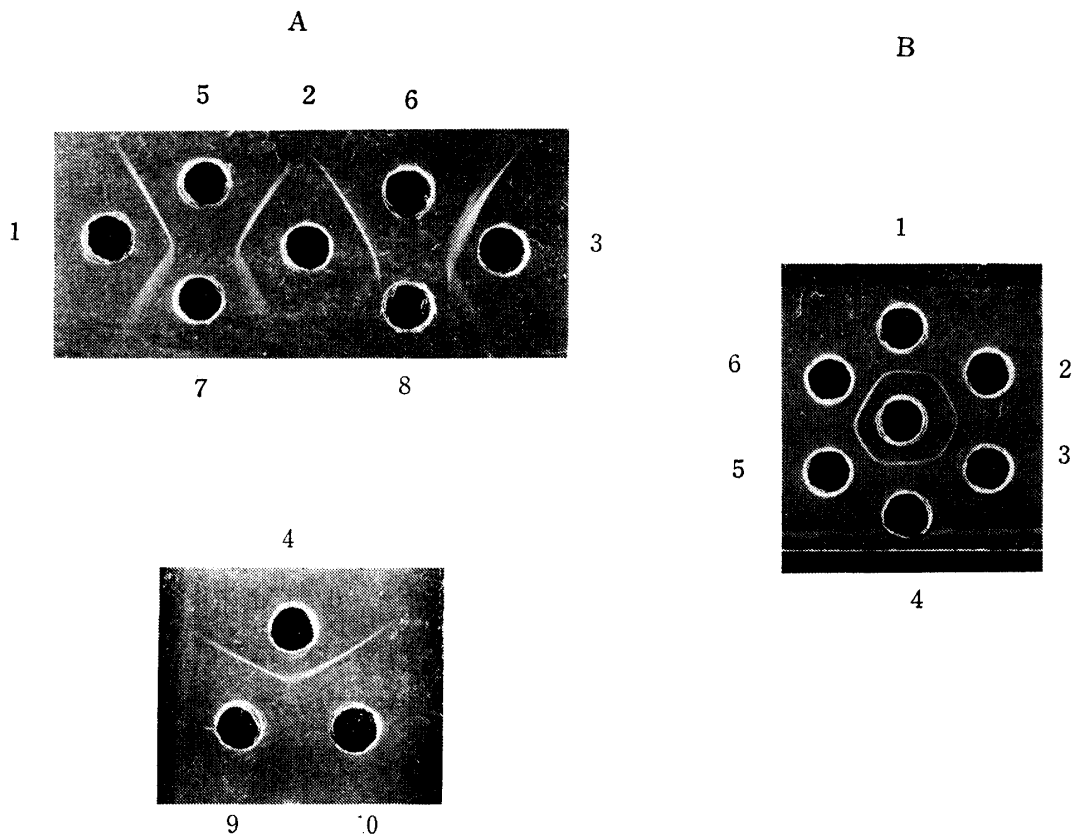


Fig. 1 Ouchterlony double-diffusion plates of α GPDH allozymes

- A) Wells 1, 2, 3 and 4; anti- α GPDH^M, wells 5 and 10; α GPDH^S, wells 6 and 7; α GPDH^M, wells 8 and 9; α GPDH^F
- B) The center well contains 5 μ l of anti- α GPDH^F. Outer wells 1 and 2; α GPDH^F, 3 and 4; α GPDH^M, 5 and 6; α GPDH^S

は α GPDH^F 抗体を用いて同様な実験を行なった結果であるが、ここでも α GPDH^F 抗体は α GPDH^F アロザイムに対して他の2つのアロザイムより強い阻害を示している。これらのことは、3つのアロザイムが構造上わずかながら異なっていることを示している。

ディスクゲルの等電点フォーカシング法によって行ったアロザイムの等電点分離では2本及び3本のタンパク質バンドが検出された (Fig. 4)。Fig. 4 のゲル上の3本のバンドの間隔は等しくないように見えるが、この間隔は常に一定ではなかった。又、多くの場合バンドの濃さも一定でなく、中央のバンド2が最も濃いものが多かった。これらバンドの泳動距離を pH 勾配と対応させて pH を測定した結果を Table 1 に示した。 α GPDH^S と α GPDH^F ではしばしばバンド1が検出されない場合があるので表中標準偏差を示さなかった。精製した酵素はゲル電気泳動により1本のタンパク質バンドとして検出され、又、SDS ディスク電気泳動でも単一バンドとしてあらわれるので (Narise, 1980)、用いた試料は単一なものと思われる。このように、一つの構造遺伝子で作られる単一のタンパク質が電気泳動的に多型を示す例は、キイロショウジョウバエのアルコール脱水素酵素で報告されている (Jacobson et al., 1972)。アルコール脱水素酵素は分子

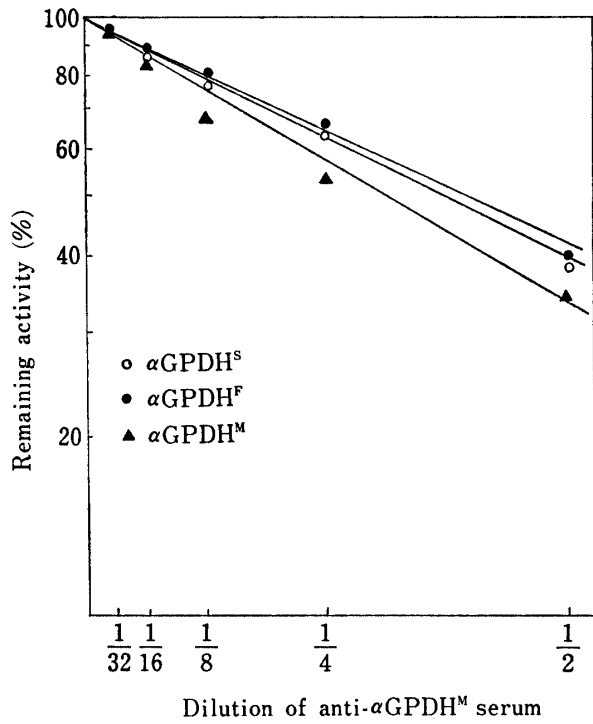


Fig. 2 Inactivation of α GPDH allozyme activity by the antiserum to α GPDH^M

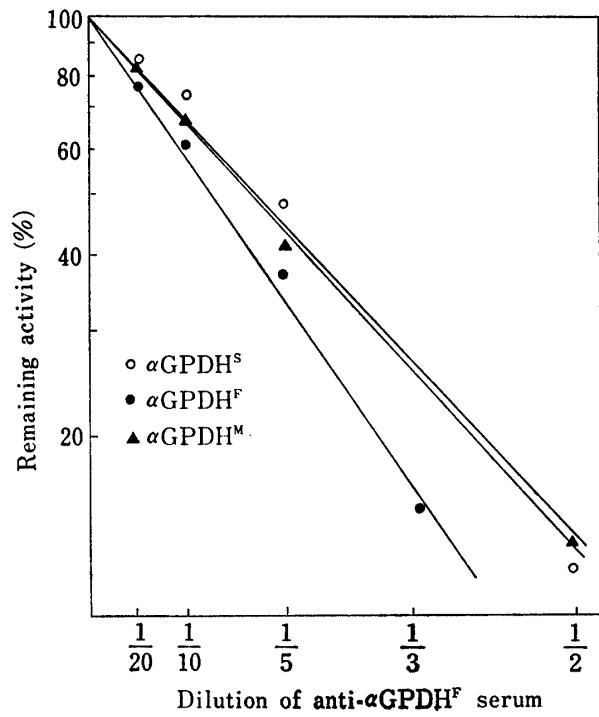


Fig. 3 Inactivation of α GPDH allozyme activity by the antiserum to α GPDH^F

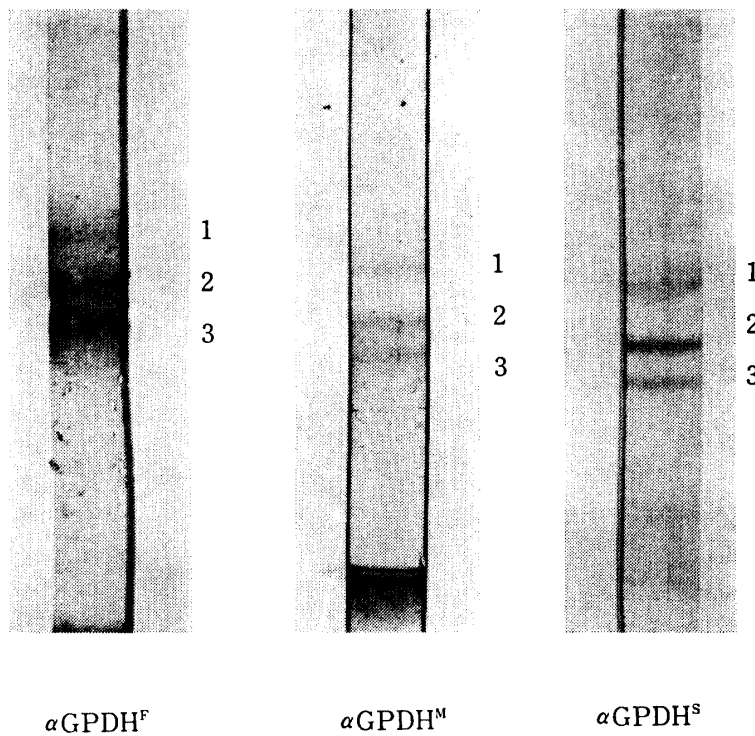


Fig. 4 Gel electrofocusing patterns of α GPDH allozymes

Table 1 Isoelectric points of α GPDH allozymes determined by Gel electrofocusing

	α GPDH ^S	α GPDH ^M	α GPDH ^F
No. of Exp.	11	10	7
pI			
1	6.12	5.95 \pm 0.04	5.67
2	6.30 \pm 0.03	6.15 \pm 0.11	5.91 \pm 0.02
3	6.41 \pm 0.5	6.40 \pm 0.06	6.13 \pm 0.03

Values are pIs estimated from relative mobility on gel electrofocusing and their mean \pm S.D. Details are shown in the text.

量54,800ダルトンの二量体 (Thatcher, 1980) であるが, ゲル電気泳動上では ADH₁ から ADH₅ までの5本のバンドとしてあらわれる。Jacobson ら (1972) は ADH₅ をアセトン及び NAD とインキュベートすることによって ADH₃ を経て ADH₁ へと変換させることに成功した。これらの結果から, ある条件下では主として酵素に結合する NAD 量の変化を生じ, 5本のバンドとしてあらわれるのだと推定している。 α GPDH も NAD 依存の酵素であるので, 等電点電気泳動の条件下で, 同様のことが起ったと考えられる。しかしなお, アロザイム間の等電点には差が認められた。即ち, α GPDH^F, α GPDH^M, α GPDH^S の順に等電点がわずかずつ高くなる傾向が認められた。このことは, キイロシヨウジョウバエの ADH アロザイムやヘモグロビンの変異

Table 2 Amino acid composition of α GPDH allozymes

Residue	α GPDH ^{Fa)}	α GPDH ^{Ma)}	α GPDH ^{Sb)}
Lysine	24	26	26
Histidine	8	8	8
Arginine	11	10	10
Cm-Cysteine	9	8	9
Aspartic acid	36	35	36
Threonine	17	17	16
Serine	12	11	10
Glutamic acid	32	34	31
Proline	15	13	13
Glycine	28	27	27
Alanine	27	27	28
Valine	26	26	29
Methionine	8	7	8
Isoleucine	22	22	24
Leucine	29	29	29
Tyrosine	8	8	6
Phenylalanine	14	15	15
Tryptophan	0	0	0

All values were obtained from analyses of 24 and 48-h hydrolysis of carboxymethylated enzymes.

a) Based on 27 alanine residues per subunit.

b) Based on 28 alanine residues per subunit.

型で認められているように、あるアミノ酸が電荷の異なる他のアミノ酸に変化することによって生じたものと考えられるので、タンパク質の一次構造の比較を行った。

Table 2 は3種の α GPDH アロザイムのアミノ酸組成を比較したものである。表からわかるように3種のアロザイム間で非常に類似した値が得られ、この方法でアロザイム間の差を見出すことは不可能である。

タンパク質の一次構造を比較するためのより感度の高い方法はペプチドのフィンガープリントであるので、 α GPDH アロザイムをトリプシン消化して得られたペプチドを用いて、これを行った。その結果 Fig. 5 に示したように、最低32から33のペプチドのスポットが検出された。この酵素タンパク質は、25コのリジン、10コのアルギニンを含んでいるので、この部位で切断された

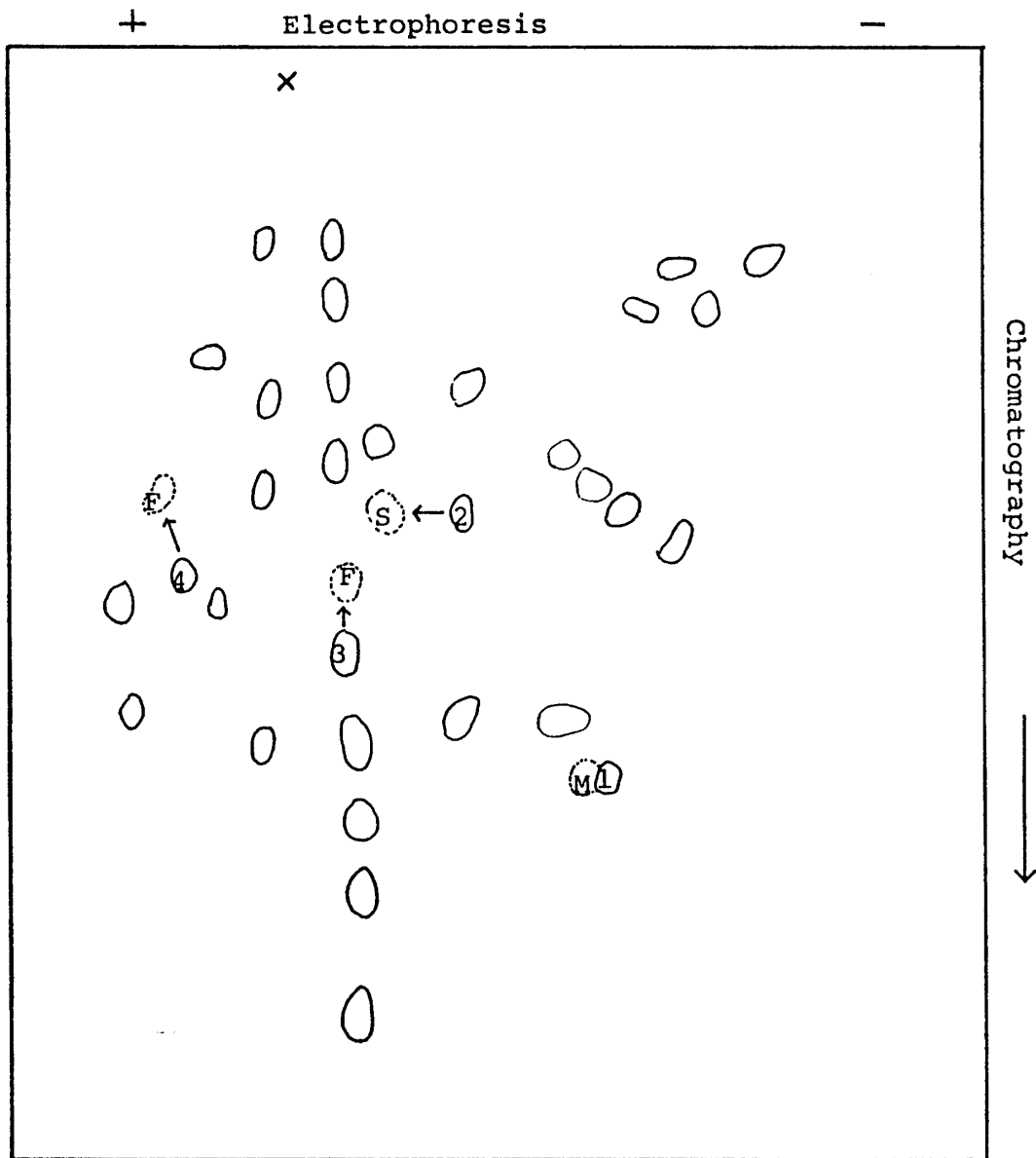


Fig. 5 Fingerprint of tryptic digests of carboxymethylated α GPDH^S, α GPDH^M and α GPDH^F

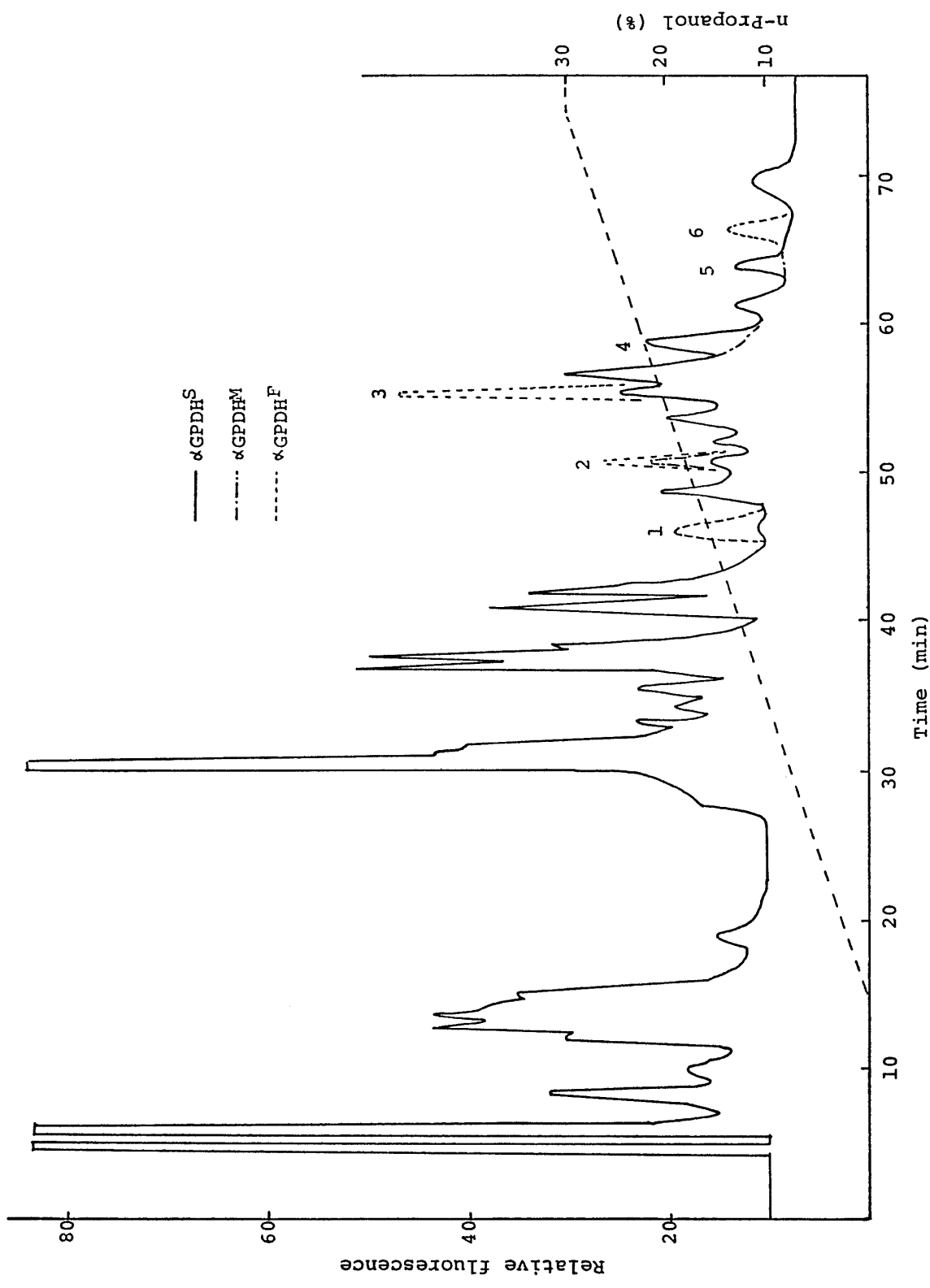


Fig. 6 Tryptic digest pattern of α GPDH allozymes on reversephase HPLC

ペプチドの大部分は回収されたと思われる。破線で囲んだ部分は3種のアロザイムで得られたスポットのうち1種のみが変化していたものを示している。例えばスポット1は α GPDH^Sと α GPDH^Fのフィンガープリントではこの位置にあるが、 α GPDH^Mではわずかに陽極側に偏っていることを示した。Fig. 5から明らかなように、 α GPDH^Sと α GPDH^Mでは他の2つのアロザイムと比べてただ1個の電荷の異なるペプチドがあらわれた。 α GPDH^Fでは2個のペプチドが他の2者と異なっていた。スポット3は電荷は等しいが組成の異なるものであることを示し、スポット4では電荷と組成が変化したペプチドを示している。

逆相系液体クロマトグラフィーによるトリプシン分解物のペプチドの分離は、方法の項に記したように2種類の条件で行ったが、共に類似したパターンが得られた。Fig. 6は0.3%トリエチルアミン-ギ酸 pH 3.3を用いたクロマトグラムである。実線は α GPDH^Sのパターンを示し、破線は α GPDH^M、点線は α GPDH^Fのそれぞれ α GPDH^Sのパターンと異なる部分を示している。約30のピークのうち、 α GPDH^Mで2つのピーク（ピーク4, 5）が欠け、 α GPDH^Fで2つの新しいピーク（ピーク1, 6）が見られた以外は似かよった結果が得られた。

タンパク質構造の比較には、一次構造の全アミノ酸配列を決定することが最も望ましいが、この実験では α GPDH^Mアロザイムを用いN末端の同定を行った。DNS化したアミノ酸をポリアミドレーで展開した結果、2次展開によって塩基性アミノ酸と思われる位置にスポットがあらわれた。次いで4次展開まで行った所、これは側鎖の ϵ -ダンシルリジンであった。このことから、この酵素のN末端はブロックされていることがわかった。

考 察

遺伝子座の3つの対立遺伝子によって支配されているアロザイムの構造に関する知見を得ることを目的としたこの研究から、Narise (1980)によって報告されたこれらアロザイムの生化学的性質についての研究を支持するような結果を得た。

3つのアロザイムは Oucetrlony 法によって完全に連続した沈降線を得たが、抗体による活性阻害を調べると3種のアロザイム間で差があることが認められた。即ち Fig. 2・3で示したように、あるアロザイムに対する抗体は当該酵素に対して、他の2つの酵素に対するより強い阻害作用を示し、かつ他の2酵素に対する阻害度には差がなかった。酵素が抗体によって活性を阻害されるのは、少なくとも部分的に立体障害が関与していると考えられている。酵素の活性中心そのものではないが、その周辺部に抗体が結合し、その結果として酵素と基質との反応が不可能になる。従って、3つのアロザイムは少なくとも活性部位周辺では構造上差異があると考えられる。その差異が微少であるということは、先に報告したように (Narise, 1980) 3つのアロザイム間の酵素化学的性質の差が微少であることと一致している。

α GPDH のアミノ酸組成に関するデータは、2,3の生物において報告されている。キイロシヨウジヨウバエ α GPDH (Bewley and Miller, 1979) はサブユニット 32,000 ダルトンの二量体で、クロシヨウジヨウバエの分子量 (サブユニット 35,500) とよく類似している。ウサギ (Otto et al., 1980), マウス (Kozak and Burkart, 1981) では 37,000 ダルトンのサブユニットをもつ二量体と報告されている。そのサブユニットあたりのアミノ酸組成は、キイロシヨウジヨウバエとクロシヨウジヨウバエの類似性は高く、前者はグリシンが4~5残基後者より多いほかは、スレオニン, プロリン, バリン, イソロイシン, ロイシンなどが各々2, 3残基少なく、分子量の差を反映している。クロシヨウジヨウバエには、トリプトファンは見出されていないが、キイロシヨウジヨウバエではサブユニット当たり2残基あると報告している。ウサギとマウス筋肉の α GPDHのアミノ酸組成の類似性は高く、スレオニン, セリン, グルタミン酸などで2~3残基の違いが見られたにすぎない。しかし、これらとシヨウジヨウバエを比較すると、哺乳類ではアスパラギン酸が10残基少ないが、グルタミン酸, グリシンが10残基多いなどその違いの著しいものもみられた。全体としては電荷に関係あるアミノ酸量はクロシヨウジヨウバエと変りはないが、等電点はクロシヨウジヨウバエに比べてやや高い (クロシヨウジヨウバエ5.9~6.4, ウサギ6.5, マウス6.7)。これはクロシヨウジヨウバエが、ウサギ, マウスに比べてグルタミン, アスパラギン含量が少ないためと思われる。

一次構造を比較するためトリプシン分解によって生ずるペプチドのフィンガープリントを行ったが、この結果からは単一のアミノ酸が電荷の異なるアミノ酸へ変化したとは考えられない。アロザイムの等電点は、 α GPDH^F, α GPDH^M, α GPDH^S の順に 5.9, 6.1, 6.3 と高くなり pH 8.3 におけるディスク電気泳動の移動度は反対の順に同じような差をもって低くなることから、3つのアロザイム間で置換されるアミノ酸は一つの電荷の違うアミノ酸であろうと予想された。しかし、得られた結果では電荷の違うペプチド以外にアミノ酸組成の異なると思われるペプチドが生じた上、 α GPDH^S に示されるように等電点の差から予想される方向と反対に移動したペプチドを検出した。トリプシンの作用はリジン及びアルギニンのC末端を切断するので、これらのアミノ酸が置換されるような変化があれば切断部位が変わり、異なったペプチドが分離されるのは当然である。従って上に述べたような結果になったのであろう。このことは逆相系のクロマトグラフィーを用いてトリプシン分解物の分離を行った実験の結果にも示されている (Fig. 6)。この系ではペプチドの疎水性によって分離が行なわれるもので、ペプチドの疎水基が多いほど溶出されにくい。一般に大きいペプチドほど多くの疎水基をもつので、溶出時間が長くなる (Rubinstein et al., 1979)。又、この研究に用いた蛍光による検出では同じ組成であれば短いペプチドの方が蛍光度が高い。これらを考慮に入れて Fig. 6 を見るとき、次のように結論づけられる。 α GPDH^M ではピーク4及び5に現われるべき大きいペプチドが分割されてピーク2となったと考えられる。以上の2つのペプチドマップではクロシヨウジヨウバエ α GPDH アロザイ

ム間は単一なアミノ酸の変化による差以上の変化があるように思われる。Ingram (1958) のヘモグロビン変異型の解析に始まったこの方法によって、野性型に対する変異型の酵素を比較する時に、単一ペプチドの電荷の変化としてとらえられた例がある (Bewley and Miller, 1979)。キイロシヨウジヨウバエのアルコール脱水素酵素 (ADH) アロザイムのアミノ酸配列の決定は (Fletcher et al., 1978; Thatcher, 1980) これらの関係を明らかにした。ADH^S をトリプシン消化して得られたペプチドをペプチドマップにすると、ADH^F を同様に処理したときに得られたペプチドマップ上に現われないペプチドのスポットが1個生じてくる (Bewley and Miller, 1979; Fletcher et al., 1978)。ADH^F では1個のペプチドとして出てくるものが、ADH^S では2個のペプチドとして生じ、この内の1個はADH^F と電荷の差があるために検出されたものであった。ADHの全アミノ酸配列決定の結果で (Thatcher, 1980) このペプチドは配列187—192の部分であることが明らかになった。更にアミノ酸の置換はある特定の部位で起こっているのではなく、また電荷に関係のないアミノ酸同志の置換も起こっていることも明らかになった。DNAのクローニングによってADH遺伝子の塩基配列を調べた研究 (Benyajati et al., 1981) によれば、第三塩基の置換が起こっていてもアミノ酸の変化が生じない、いわゆるサイレントミューテーションがADH^S とADH^F の間で6ヶ所見出された。この実験においても全アミノ酸配列の結果が待たれるが、これについては現在進行中である。

引用文献

- Benyajati, C., A.R. Place, D.A. Powers and W. Sofer (1981) Alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*: Relationship of intervening sequences to functional domains in the protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2717-2721.
- Bewley, G.C. and S. Miller (1979) Origin and differentiation of the soluble α -glycerolphosphate dehydrogenase isozymes in *Drosophila melanogaster*. In Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research (Edited by Rattazzi, M.C., J.G. Scandalios and G.S. Whitt), Vol 3, pp. 23-52. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Böhlen, P., S. Stein, J. Stone and S. Udenfriend (1975) Automatic monitoring of primary amines in preparative column effluents with fluorescamine. Anal. Biochem. 67, 438-445.
- Fletcher, T.S., F.J. Ayala, D.R. Thatcher and G.K. Chambers (1978) Structural analysis of the ADH^S electromorph of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5609-5612.
- Gray, W.R. (1972) End-group analysis using dansyl chloride. In Methods in Enzymology (Edited by Hirs C.H.W. and S.N. Timasheff) vol 25, pp. 121-138. Academic Press, New York.
- Hirs, C.H.W. (1967) Reduction and S-carboxymethylation of proteins. In Methods in Enzymology (Edited by Hirs C.H.W.) Vol 11, pp. 199-203. Academic Press, New York.
- Ingram, V.M. (1958) Abnormal human hemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell hemoglobins by "Fingerprinting." Biochim. Biophys. Acta 28, 539-545.
- Jacobson, K.B., J.B. Murphy, J.A. Knopp and J.R. Ortiz (1972) Multiple forms of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. III. Conversion of one form to another by nicotinamide adenine dinucleotide or acetone. Arch. Biochem. Biophys. 149, 22-35.

- Kenrick, K.G. and J. Margolis (1970) Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: A two dimensional technique. *Anal. Biochem.* 33, 204—207.
- Kimura, M and T. Ohta (1971) Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature* 229, 467—469.
- Kozak, L.P. and D. Burkart (1981) Immunoisolation and the structural analysis of the *sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozymes in mouse brain. *J. Biol. Chem.* 256, 5162—5189.
- Narise, S. (1980) Purification and biochemical properties of allelic forms of cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Drosophila virilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 615, 289—298.
- 大羽 滋 (1977) 集団の遺伝。UP バイオロジーシリーズ, 東京大学出版会。99—104.
- Otto, J., P. Argos and M.G. Rossmann (1980) Prediction of secondary structural elements in glycerol-3-phosphate dehydrogenase by comparison with other dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 109, 325—330.
- Rubinstein, M., S. Chen-Kiang, S. Stein and S. Udenfriend (1979) Characterization of proteins and peptides by high-performance liquid chromatography and fluorescence monitoring of their tryptic digests. *Anal. Biochem.* 95, 117—121.
- Thatcher, D.R. (1980) The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (Adh^{N-11} , Adh^S and Adh^{VF}) from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 187, 875—886.