

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 cDNA のクローニングとその塩基配列

富永 浩子・成瀬 澄子

緒 論

グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase: NAD⁺ 2-oxidoreductase) は、解糖系によって生じた NADH を NAD⁺ に変換すると共に、NADH をミトコンドリアに運び ATP 生成系と連結させる一連の酵素系の一要員として重要であり (Borst, 1961; Kaplan, 1963), 又、脂質の代謝にも関与していることが知られている。ショウジョウバエのような双翅類では、飛翔筋における "グリセロリン酸サイクル" で必須な酵素である。これらの観点から古くから注目をあびている酵素であるが、酵素タンパク質の一次構造がわかったのは比較的最近のことである。即ち、Otto らはウサギの骨格筋グリセロール-3-リン酸脱水素酵素を精製しアミノ酸配列を決定した (Otto et al., 1980)。組織特異性を示すハツカネズミのこの酵素については、BALB/C 系統のゲノムライブラリーから抽出された DNA の塩基配列を決定し、それより推定したアミノ酸配列をウサギのそれと比較している (Ireland et al., 1986)。ショウジョウバエではクロショウジョウバエのアミノ酸配列 (Arai et al., 1988) とキイロショウジョウバエの塩基配列が決定されている (von Kalm et al., 1989)。キイロショウジョウバエでは α GPDH が発生の段階で異なるアイソザイムをもち、幼虫では GPDH-3 アイソザイムのみが存在し、成虫になると GPDH-3 アイソザイムが減少し、かわって GPDH-1 アイソザイムが主に存在する。このアイソザイムは部分アミノ酸配列の研究から C 末端側が特徴的であり、GPDH-1 は GPDH-3 よりアミノ酸が 3 残基長いことが確認された (Niesel et al., 1982)。塩基配列の決定から、このアイソザイム発現の調節が一つの α GPDH 遺伝子の転写後の未成熟 mRNA のスプライシングの違いによるものであることがわかった (Cook et al., 1988)。しかしそれがどのような遺伝子の働きによるものなのかはまだわかっていない。

キイロショウジョウバエ α GPDH 遺伝子から推定したアミノ酸配列は、我々が決定したクロショウジョウバエ α GPDH アミノ酸配列とあまり違いはなく 98% という高い相同性をもっている。しかし、クロショウジョウバエ成虫の電気泳動パターンには、キイロショウジョウバエにみられるような (Bewley, 1978) 3 本のアイソザイムはみられない。キイロショウジョウバエ成虫

型アイソザイム α GPDH-1 遺伝子座には2つのアロザイム遺伝子が存在し、それらは集団内で多型を示している(O'Brien and MacIntyre, 1969)が、クロシヨウジョウバエの成虫型 α GPDH 遺伝子座の3つのアレルは集団内でその一つに固定されている。又、ハツカネズミの α GPDH アイソザイムは異なる染色体上の遺伝子によって支配されていることが報告されている(Cook et al., 1988)。クロシヨウジョウバエは系統的にキイロシヨウジョウバエとはかなり異った位置を占めるので、タンパク質の構造のみでなく遺伝子の構造及び機能を比較することは重要である。塩基配列の決定は、そのタンパク質自身の情報のみでなくそれを調節するいくつかの情報をももたせてくれる。今回我々は、これらのことよりグリセロール-3-リン酸脱水素酵素遺伝子の塩基配列の決定を試みた。そしてここでは、その第一段階としてクロシヨウジョウバエの cDNA ライブラリーを作製し、 α GPDH cDNA のクローニングとその塩基配列について報告する。

材 料 と 方 法

材 料

クロシヨウジョウバエは、 α GPDH^M ホモ系統を用いた (Narise, 1980)。棒瓶内のエビオス(8%)とうもろこし(3%)、糖(5%)を含む寒天培地上に卵を産ませて25°Cで生育させ、羽化後2日のものを材料とした。

方 法

mRNA の調製と cDNA ライブラリーの作製

生きた成虫15gを4Mグアニジンチオンアネート存在下でホモジナイズし、塩化セシウム密度勾配遠心によって全RNAを分離した(Chirgwin et al., 1979)。ポリ(A⁺)RNAはオリゴ(dT)セルロース(ファルマシア, タイプ7)カラムクロマトグラフィーによって精製した(Aviv and Leder, 1972)。cDNA合成と λ gt10ライブラリーの作製はアマシャムのキットを使用した。まずポリ(A⁺)RNA 3 μ gにオリゴdTプライマーをアニールし、cDNAを合成した(Gubler and Hoffman, 1983)。合成したcDNAの内部EcoRI部位をメチル化しEcoRIリンカーをつけ λ gt10DNAにつなぎ、これをパッケージングイクストラクトでパッケージングした(Huynh et al., 1985)。反応条件及び実験手順はすべてキットの使用方法に従った。これにより 4.2×10^8 pfu/mlのcDNAライブラリーが作製された。

オリゴヌクレオチドの合成とプローブの調製

図1に示したように、プローブ1としてクロシヨウジョウバエ α GPDH^M のアミノ酸配列(Arai et al., 1988)から塩基を推定し、その内塩基の組み合わせの少ない234—238アミノ酸残基に相当する14塩基の長さの混合物を合成した。プローブ2としては、クロシヨウジョウバエ

(1)	残基数	234						238	
	アミノ酸配列	Met	Glu	Met	Ile	Arg			
	mRNA	AUG	GAG	AUG	AUA	CGG			
				A		U	A		
						C	U		
							C		
							A	G	
								A	
	プローブ1	ATG	GAG	ATG	ATA	CG			
				A		T	A		
								C	
(2)	残基数	302						309	
	アミノ酸配列	Thr	Ala	Glu	Glu	Val	Asn	Tyr	Met
	mRNA	ACG	GCG	GAG	GAG	GUG	AAU	UAU	AUG
			A	A	A	A	A	C	C
			U	U			U		
			C	C			C		
	プローブ2	ACT	GCC	GAG	GAG	GTC	AAC	TAC	ATG

図1 オリゴヌクレオチドプローブは、クロシヨウジョウバエ α GPDH のアミノ酸配列のデータからデザインした。

- (1) 14ベースの混合オリゴヌクレオチドを、234—238残基のアミノ酸をコードする可能な塩基配列から合成して、プローブ1とした。
- (2) 24ベースのオリゴヌクレオチドは、アミノ酸302—309残基に相当する可能な塩基の中でキイロシヨウジョウバエの塩基配列 (Cook et al, 1988) と同じ塩基配列を合成した。

α GPDH^M のアミノ酸配列がキイロシヨウジョウバエのそれと全く等しい302—309残基のアミノ酸に対するキイロシヨウジョウバエの塩基配列 (Cook et al., 1988) 24塩基を合成した。これらは、北里大学衛生学部・生物科学科・細胞生物学研究室のアプライドバイオシステム DNA シンセサイザー380B合成装置により合成した。

合成オリゴヌクレオチドはT4ポリヌクレオチドキナーゼと [γ -³²P] ATP (>5000Ci/mmol, アマシャム) でラベルし、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。

λ gt10 cDNA ライブラリーのスクリーニング

λ gt10 cDNA ライブラリーを、宿主細胞大腸菌 NM514 に吸着させ、LB-プレート (バクトトリプトン, バクトイーストイストラクト, 塩化ナトリウム, バクトアガー) にまぎ、37°C一晩ブランクを形成させた。ブランクはニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell, 西ドイツ) に移し、0.5M水酸化ナトリウム-1.5M塩化ナトリウム溶液で変性したのち0.5Mトリス塩酸 pH8.0 -1.5M塩化ナトリウム溶液で中和し、風乾後80°C 2時間乾熱処理してDNAをフィル

ターに固定した。プレハイブリダイゼーションは $6\times\text{SSC}$ (0.9M 塩化ナトリウム, 0.09M クエン酸ナトリウム pH7.0), $5\times\text{Denhardt's}$ (0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% 牛血清アルブミン, 0.1% フィコール), 0.5% SDS, $100\mu\text{g/ml}$ tRNA 溶液にフィルターをそれぞれ入れ, プローブ 1 は室温, プローブ 2 は 47°C で 2 時間行った。ハイブリダイゼーションはプレハイブリダイゼーションと同様の溶液に ^{32}P でラベルしたプローブを 3 ng/ml になるように加え, プレハイブリダイゼーションと同温度で一晩行った。フィルターの洗浄は $6\times\text{SSC}-0.1\%$ SDS 溶液で, プローブ 1 は室温 1 時間を 2 回, 35°C 30 分を 2 回, プローブ 2 は室温 30 分を 2 回, 60°C 30 分を 2 回それぞれ行った。風乾後ニトロセルロースフィルターを増感紙を用いて X 線フィルムに一晩 -80°C で感光させた。これにより両プローブで感光したブランクを寒天培地からきりだし, 別々に新しい培地にまき, 同様の操作で第 2 スクリーニングすることによって単一なクローンに精製した。

サブクローニングと配列決定

ポジティブクローンは制限酵素 *EcoRI* (東洋紡) で 37°C , 3 時間切断した後, 0.7% アガロースゲルで電気泳動してインサート DNA の部分を切り出し, ジーンクリーン (バイオ101) で精製した (Vogelstein and Gillespie, 1979)。これを *EcoRI* で切断した pBluescript II プラスミド (stratagene) に結合し, 塩化カルシウム処理した大腸菌 JM83 に導入した。又, 組換え体プラスミドはエキソスクレアーゼ III/マングビーンスクレアーゼシステム (stratagene) を使用してデレーションプラスミドを調製した。DNA シーケンスは, dCTP と 7-デアザー dCTP (Tabor and Richardson, 1987) シークアナーゼ™ シーケンスキット (東洋紡) を用いてジデオキシ法 (Sanger et al., 1977) で行った。

結果と考察

我々は, クロジョウジョウバエ α GPDH 遺伝子のクローニングの第一段階として mRNA より cDNA ライブラリー (λ gt10) を作製し, α GPDH cDNA クローンを分離した。この λ gt10 ライブラリー (4.2×10^5 pfu/ml) を ^{32}P でラベルした 2 つの合成オリゴヌクレオチド (図 1) を用いてスクリーニングした。その結果 2.5×10^4 ブランクの中から 5 つのブランクが感光し, これらを第 2 スクリーニングで精製した。単一なクローン (a~e) が得られ, これらから塩化セシウム密度勾配遠心分離によって組換え体 DNA のみを抽出した。この組換え体 DNA 中(a~e) に挿入された cDNA のサイズを調べるために, 制限酵素 *EcoRI* で消化し 0.7% アガロースゲルで電気泳動を行った。その結果, 図 2 に示すように a : 1.5Kbp, b : 1.3Kbp, c : 0.8Kbp, d : 0.7Kbp, e : 0.5Kbp, とそれぞれ違う長さのインサート cDNA が得られた。

ヌクレオチド配列分析

5 つのポジティブクローンは pBluescript II プラスミドにサブクローニングし, 配列分析をした。

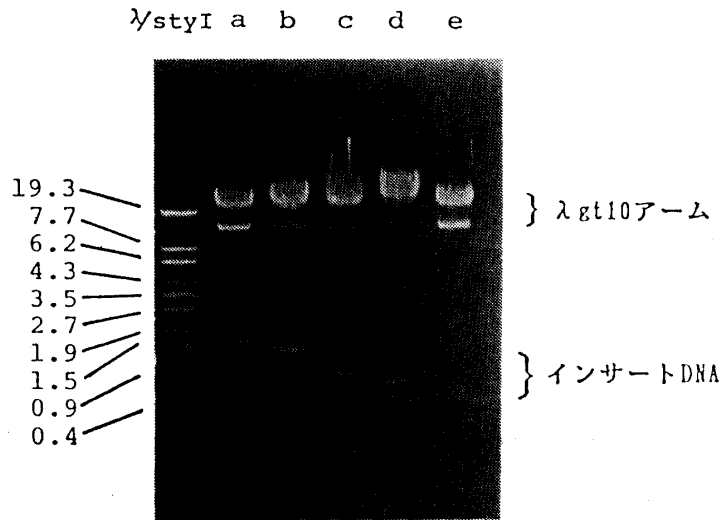


図 2 λgt10 ライブラリーより得た αGPDH クローンのインサートの確認。クローンは、EcoRI で切断し 0.7% アガロースゲル電気泳動によって泳動した。コントロール DNA として λ/Sty を同時に泳動した。
a : 1.5Kbp b : 1.3Kbp c : 0.8Kbp c : 0.7Kbp e : 0.5Kbp

そのシーケンスストラテジーを図 3 A に示す。これによってクローン a が -101 ~ +1431, クローン b が +132 ~ +1431, クローン c が +285 ~ +1114, クローン d が +444 ~ +1114, クローン e が +581 ~ +1118 をコードしているがわかった。そしてクローン a だけが 5'-非コード領域を含んだクローンで, クローン b ~ e は 5' 側が不完全なクローンであった。これは合成したプローブが 2 つともアミノ酸配列の c 末端に近いものであったためであろう。図 4 は, 5'-非コード領域 101bp, コード領域 1056bp, 3'-非コード領域 375bp からなる α GPDH cDNA の塩基配列である。転写における RNA ポリメラーゼ結合部位である 5'-非コード領域には, プロモーターに特有のコンセンサス配列はみつからなかった。しかし mRNA のプライマーエクステンションや SI スクレアーゼ・プロテクション分析などによって, そのプロモーターの特徴は把握できるであろうと思われる。開始コドン ATG から始まるコード領域は, 図 4 に示すように 352 のアミノ酸をコードしており, 終止コドン TAA で終わっている。すでに決定されているクロシヨウジヨウバエの α GPDH のアミノ酸配列 (Arai et al., 1988) と今回 cDNA から推定したアミノ酸配列を照し合わせたところ, 推定したアミノ酸配列の 14 番目のトリプトファンは, アミノ酸配列分析ではアスパラギンであった。塩基配列からいえば, この部分はキイロシヨウジヨウバエではトリプトファン (TGG) であると報告されている (von Kalm et al., 1989)。これについては今回クローニングされた 5 つの cDNA 断片のうちただ一個のみがこの部分を含んだものであり, 更に検討しなければならないと思われる。アミノ酸配列からいえば, ハツカネズミ, ウサギともにトリプトファンである (Otto et al., 1980; Ireland et al., 1986)。トリプトファンの同定は問題点もあるので, 我々は同定法の改良 (Yokote et al., 1986) を行い, 試料量を考慮するなどして

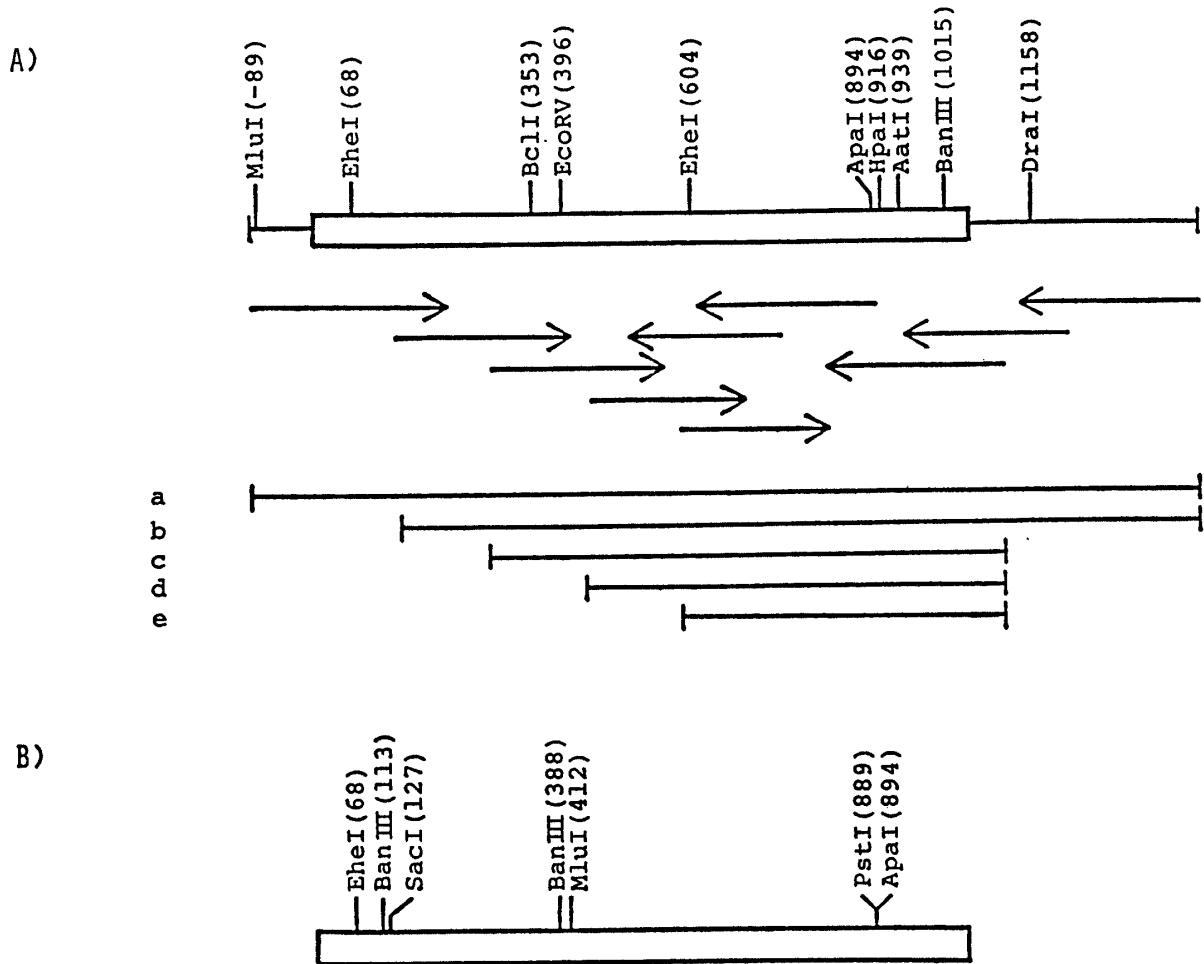


図3 A) クロショウジョウバエ α GPDH cDNA の制限酵素地図とシーケンスストラテジー。
制限酵素地図中、コード領域は箱形で囲み5'と3'の転写されない部位は線で示してある。矢印は、ジデオキシ法で行った配列分析の方向と長さを示してある。
B) キイロショウジョウバエ α GPDH コード領域の制限酵素地図。

正確さを期している。この方法で今までに矛盾を生じたことはなかったが、更に検討を要すると思われる。3'-非コード領域は、その特徴であるポリAとそのシグナル配列であるAATAAAがポリAの9塩基手前に存在していた。

シーケンス・ホモロジー

図3 Aに今回決定したクロショウジョウバエ α GPDH cDNA の制限酵素地図を示した。更に


```

          920                940                960
CCCACTGCCGAGGAGGTTAACTATATGTTGAAAAACAAAGGCCTGGAGGATAAATTCCCATTGTTCCACCGCCATA
  P T A E E V N Y M L K N K G L E D K F P L F T A I325
 980                1000                1020                1040
CACAAAATTTGCACAAATCAGCTTAAGCCTAAAGATTTAATCGATTGCATACGCAATCATCCCGAGCATATGCAA
  H K I C T N Q L K P K D L I D C I R N H P E H M Q350
  ***                1080                1100                1120
ACTTTGTAAAATATATATATAAACAACAAATTTCTAAACGTTTTTTATGCACAAAAAACAAAAAACCAAAAAAAAAA
  T L
          1140                1160                1180                1200
ACCAAAACACAAGCAAATAGTCATTTTTTTTTTAGCACACATTTTAAATCCTCAATACGCCAGCCAACGACAAGAATG
          1220                1240                1260
GCATATACATAGGTTGTTAATTTATTGTTAAATCCAACGCATATCCAGCGAACCCACAGAAACGAACAAAAACCA
 1280                1300                1320                1340
ATCTTGAAGTCTGCTTTTGTMTTAACTTAGTTTATAAACGATAAATTAGCAAATGAAATTGTGCGCATGTACCTA
          1360                1380                1400                1420
AAGACAATTGTAAATCAATTTTACAATTACAATTAAAAACAACAGAAGAGGCGTAATAAACCGGAAAAAAAAAAAAA
 1431
AAAAAA

```

図 4 クロシヨウジヨウバエ α GPDHcDNA のヌクレオチド配列とそれより推定したアミノ酸配列。塩基の上にはヌクレオチド数、アミノ酸の右側にアミノ酸数を記してある。開始コドン (ATG) と終止コドン (TAA) の上には、★印がついている。ポリAのシグナルは、下線で示してある。

キイロシヨウジヨウバエと比較するためにキイロシヨウジヨウバエ α GPDH 遺伝子のコード領域における制限酵素地図を図 3 Bに示した。図 3 A, Bより明らかなように, Ehe I (68), Apa I (894) 切断部位は兩種に保存されているが, クロシヨウジヨウバエのコード領域にある Bcl I (353), EcoRV (396), Ehe I (604), Hpa I (916), Aat I (939), Ban III (1015)切断部位がキイロシヨウジヨウバエにはなく, かわりに Ban III (113, 388), Sac I (127), Mlu I (412), Pst I (889) 切断部位が存在した。この制限酵素部位の変異は, これらの部位での塩基の置換がおこっていることを示し, その変異部位は集中しておらず配列全体にわたっていることがわかる。そしてこのコード領域の塩基配列を比較し, その相同性を調べると84.7%であった。しかしこのような変異が直接アミノ酸即ちタンパク質には反映しておらず, この2種のアミノ酸配列は98.0%という高い相同性があった(データは示していない)。

一方, キイロシヨウジヨウバエの近縁種であるオナジシヨウジヨウバエは, アミノ酸配列においてキイロシヨウジヨウバエとまったく同じであった。又, コード領域のイントロン及びエクソンの同義置換塩基についてもそれほどの違いはみつからなかったことが報告されている (Takano et al., 1989)。これらに対する情報は, クロシヨウジヨウバエ α GPDH ゲノム遺伝子を調べることによりさらにくわしくわかるであろう。そして今後, クロシヨウジヨウバエグループ (virilis group) における α GPDH 遺伝子の解析は, このグループ内の種の分化に有効な情報を加える

ことであろう。

謝 辞

この論文の作成にあたって、遺伝子操作の基本から懇切丁寧な御指導をいただき、かつ、研究の伸展についての御助言をいただきました北里大学、衛生学部、柴教授及び細胞生物学研究室の先生及び学生の皆様に心から感謝致します。

要 約

我々は、クロショウジョウバエ成虫よりメッセンジャー RNA を抽出し、 λ gt10 cDNA ライブラリーを作製した。そのライブラリーより合成オリゴヌクレオチド(14bp 混合物と24bp) プローブを用いて α GPDH (グリセロール-3-リン酸脱水素酵素) をコードする cDNA クローンを分離した。5つのポジティブクローン (a ~ e) が分離され、その塩基配列をきめた。クローン a は全長 1532bp で 101bp からなる5'-非コード領域 1056bp からなるコード領域、そしてポリアデニレーションシグナルをもつ 375bp の 3'-非コード領域よりなっていた。

今回決定した cDNA の塩基配列のコード領域についてのみキイロショウジョウバエ α GPDH 遺伝子 (von Kalm et al., 1989) と比較すると、アミノ酸レベルでは98.0%と高い相同性があるのに対して、塩基レベルでは84.7%と約13%も低くなっていることがわかった。

参 考 文 献

1. Arai, K., Tominaga, H., Yokote, Y. and Narise, S. (1988) The complete amino acid sequence of cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Drosophila virilis*. Biochim. Biophys. Acta. 953, 6-13.
2. Aviv, H. and Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 1408-1412.
3. Bewley, G. C. (1978) Heat stability studies at the α -glycerophosphate dehydrogenase locus in populations of *Drosophila melanogaster*. Biochem. Genetics. 16, 769-775.
4. 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.
5. Chirgwin, J. J., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry. 18, 5294-5299.
6. Cook, J. L., Bewley, G. C. and Shaffer, J. B. (1988) *Drosophila sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozymes are generated by alternate pathways of RNA processing resulting in different carboxyl-terminal amino acid sequence. J. Biol. Chem. 263, 10858-10864.
7. Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) A simple and very efficient method for generating

- cDNA libraries. *Gene*. 25, 263-269.
8. Huynh, T. V., Young, R. A. and Davis, R. W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In: DNA cloning, a practical approach (ed. : Glover, D) Vol. I, pp. 49-78. IRL press, Oxford.
 9. Ireland, R. C., Kotarski, M. A., Johnston, L. A., Stadler, U., Birkenmeier, E. and Kozak, L. P. (1986) Primary structure of the mouse glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* 261, 11779-11785.
 10. Kaplan, N. O. (1963) Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanisms. 1, Multiple forms of enzymes. *Bacteriol. Rev.* 27, 155-169.
 11. 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.
 12. Niesel, D. W., Pan, Y.-C. E., Bewley, G. C., Armstrong, F. A. and Li, S. S.-L. (1982) Structural analysis of adult and larval isozymes of *sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 257, 979-983.
 13. O'Brien, S. J. and MacIntyre, R. J. (1969) An analysis of gene-enzymes variability in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. Simulans*. *Amer. Natur.* 103, 97-113.
 14. Otto, J., Argos, P. and Rossman, M. G. (1980) Prediction of secondary structural elements in glycerol-3-phosphate dehydrogenase by comparison with other dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 109, 325-330.
 15. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
 16. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 4767-4771.
 17. Takano, S. T., Kusakabe, S., Baba, M. and Mukai, T. (1989) Rate of nucleotide substitution in the *Drosophila sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase region. *Jap. J. Genetics.* 64, 486.
 18. Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 615-619.
 19. von Kalm, L., Weaver, J., DeMarco, J., MacIntyre, R. J. and Sullivan, D. T. (1989) Structural characterization of the α -glycerol-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5020-5024.
 20. Yokote, Y., Arai, K. M. and Akahane, K (1986) Recovery of tryptophan from 25-minute acid hydrolysates of protein. *Anal. Biochem.* 152, 245-249.