

# クロショウジョウバエ・ $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> アロザイム cDNA の塩基配列とそのアミノ酸変異

富 永 浩 子      成 瀬 澄 子

## Summary

Three cDNA clones coding for a variant  $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> enzyme of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila virilis* were isolated by screening an adult  $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> cDNA library constructed in the  $\lambda$ gt10 with  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA probe from the same species. The nucleotide and deduced amino acid sequences of these clones (a, b and c) were compared with those of  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA and  $\alpha$ GPDH genomic DNA. The sequences of the coding region and 5' and 3' flanking regions of the a clone showed a high homology to those of  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA; only a single substitution was found at 100 bp in the coding region, two substitutions at 1101 and 1115 bps in the 3' flanking, among the total 1560 bps. However, the single nucleotide substitution in the coding region resulted in a charge change of the amino acid from basic to acidic. The b clone was the same as the a clone except a long 3' flanking tail. This is caused by using the fourth polyadenylation signal out of the five signals in the 3' flanking region, while the a clone uses the first signal. These fact means that each signal can be randomly used when several polyadenylation signals are present in the 3' flanking sequences. In the case of the c clone, the sequences of the 5' flanking and the region encoding 1-349 amino acids were identical to those of the a clone, but afterward, 30 nucleotides encoding 10 amino acids, the TAA stop codon and the flanking sequences containing a polyadenylation signal follow, which sequences can not be found in the a clone. On the other hand, the a clone has the sequences coding for 350-352 amino acids and its 3' flanking region. It is apparent that the a clone is the transcript of exons 1-6 and exon 8, and the c clone, of exons 1-7 compared with the  $\alpha$ GPDH genomic sequences. Such a differential splicing of the primarily transcriptional products was discussed.

## 1. 緒 論

ク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 (*sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase, NAD<sup>+</sup> 2-oxidoreductase) は、これまで3つの対立遺伝子によってつくられるアロザイム ( $\alpha$ GPDH<sup>F</sup>,  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>,  $\alpha$ GPDH<sup>S</sup>) が知られている。この3つのアロザイムタンパ

ク質の生化学的性質 (Narise, 1980) 及びタンパク質の一次構造 (Arai et al., 1988; Tomimaga et al., 1989) についてはすでに報告されている。その研究結果から 3 アロザイム間では反応の至適 pH, 基質及び助酵素に対するミハエリス・メンテン定数 ( $k_m$ ) は正逆反応共に差異は認められないが温度抵抗性には違いがあり  $\alpha$ GPDH<sup>F</sup> は 35°C に対して最も抵抗性が低い。又, ジハイドロキシアセトンリン酸の濃度依存性にも差異があり,  $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> は最も阻害を受けやすいことなどが明らかになった。又, これらアロザイムタンパク質の一次構造の比較によって 352 残基のうちで一残基のアミノ酸の変化がアロザイム変異をひき起していることも明らかになっている。即ち  $\alpha$ GPDH<sup>F</sup> では  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> の 68 番リジンがアスパラギンに変異し, 結果として電荷が -1 となり, pH 7.2 の電気泳動により  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> より + 側に移動している。又  $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> では  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> の 127 番グリシンがアルギニンに変化しているため, 電気泳動上で  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> より一側に泳動されるのである。一方  $\alpha$ GPDH タンパク質の二次構造と, 基質及び補酵素との結合様式がウサギ骨格筋で推定されている (Otto et al., 1980)。これによるとアミノ酸番号 1-72 がアデニンと, 73-119 がニコチンアミドと, 119-348 が基質と結合する部位である。ウサギ骨格筋とクロシヨウジョウバエの  $\alpha$ GPDH には 37% のアミノ酸の変異はあるが, 二次構造はよく似ているのでその結合部位は同様であると考えられる。Chou & Fasman の方法 (Chou and Fasman, 1974) により  $\alpha$ GPDH のアミノ酸配列から二次構造を推定すると, 上述の 68, 127 変異のアミノ酸は共に irregular turn の部位に存在する。従ってタンパク質の表面に露出されている turn の部分にアミノ酸の置換が生ずれば, 何らかの生化学的性質が影響を受けることも考えられる。しかしその因果関係を知るには多くのアロザイム変異体のタンパク質の一次構造の差と生化学的性質の差との関連を明らかにしなければならないだろう。

最近富山集団から採取された一雌系統の中に新しい対立遺伝子を発見した。それは  $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> より一段階移動のおそいものでこれを  $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup> と命名し, そのホモ系統を作製した。これを用いてタンパク質の一次構造及び酵素の性質の変異との関係を見る目的でこの実験は始められた。

この研究では  $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup> 系統の成虫より cDNA ライブラリーを作成し,  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> 系統の成虫の cDNA でスクリーニングして  $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup> の cDNA をクローニングした。更にその塩基配列を決定し, それより推定されるアミノ酸の配列を今までわかっている 3 種のアロザイムの一次構造と比較した。この論文では, 翻訳される部位の塩基 1056 bp のうち一塩基のみの置換が見出され, その結果, アミノ酸の電荷の変化が 2 段階起り新しいアロザイムが生じたことが明らかになったことを報告する。

## 2. 材料と方法

### (1) 材料

クロショウジョウバエ,  $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> の同型接合体は, 富山集団から1988年採集した一雌系統から分離し作製した。この系統は, エビオス, とうもろこし, 糖を含む寒天の餌上に卵を産ませ, 25°C で生育させた。羽化後2~4日のハエを集め -80°C で保存したものを材料とした。

### (2) 方法

#### (a) mRNA の調製と cDNA ライブラリーの作製

mRNA の調製と cDNA ライブラリーの作製は Tominaga and Narise (1990) の方法に従って行っているが, 一部次の様に変更した。即ち, mRNA の調製は凍結試料 8 g を用いて行い, cDNA の合成は mRNA 5  $\mu$ g で行った。又, 合成した cDNA のうち 1~3 kbp の cDNA を分画するためにショ糖密度勾配遠心分離を行った。まず合成した cDNA は EcoRI リンカーをつけたのち, エタノール沈澱を行い, 乾燥後 20  $\mu$ l の 1 M 塩化ナトリウム, 5 mM EDTA (pH 8.0) を含む 20 mM トリス塩酸 (pH 8.0) に溶かした。遠心用チューブ (13 PA) に 20 %ショ糖を 9 ml 入れ -80°C で凍らし, 4°C で溶解させる操作を3回行うことによってチューブ内にショ糖の濃度勾配を作製した。これに先の cDNA 試料 20  $\mu$ l をのせ, 日立超遠心機 SCP-70 H で 35,000 rpm, 15 時間遠心分離した。遠心後液を 0.3 ml ずつ分画し, それぞれの分画について DNA の大きさを 0.7% アガロースゲル電気泳動で確認した。これによって分画された cDNA を  $\lambda$ gt10 ベクターにつなぎ, ギガパックゴールド (stratagene) でパッケージングした。この結果,  $8.0 \times 10^5$  pfu/ml の cDNA ライブラリーが作製された。

#### (b) プローブの調製とライブラリーのスクリーニング

プローブ DNA は  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA 829 bp のものを用いた (Tominaga and Narise, 1990)。この DNA 20 ng を 100°C に 2 分間おき, 急冷することによって一本鎖 DNA を調製した。これに dATP, dGTP, TTP, 塩化マグネシウム, 2-メルカプトエタノールを含むトリス塩酸 (pH 7.2) 溶液, ランダムヘキサヌクレオチド, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP ( $\sim 3,000$  Ci/m mol) (アマシャムジャパン) を加え, klenow 断片 2 ユニットで 37°C, 30 分間反応させた (Feinberg and Vogelstein, 1984)。これを -20°C で保存し, 使用時に 100°C, 2 分加熱し, 急冷後用いた。

上記作製した cDNA ライブラリーを LB (1% バクトトリプトン, 0.5% バクトイーストエキストラクト, 1% 塩化ナトリウム) 寒天培地 1 枚につき  $2 \times 10^2$  pfu になるように SM バッフ

ァー (0.1 M 塩化ナトリウム, 1.6 mM 硫酸マグネシウム, 50 mM トリス塩酸 pH 7.5, 2%ゼラチン) で希釈した。これを NM 514 宿主大腸菌に 37°C 15分間吸着させ、溶解しているトッパアガロース (0.7%アガロースを含む LB 培地) を用いて LB 寒天培地に播き、37°C 一晚プラークを形成させた。このプラークをニトロセルロースフィルター (S & S) に移し、このフィルターを 0.5 M 水酸化ナトリウム-1.5 M 塩化ナトリウム溶液に 2分, 0.5 M トリス塩酸 pH 8.0-1.5 M 塩化ナトリウム溶液に 2分をそれぞれ 2回, 6×SSC (0.9 M 塩化ナトリウム, 0.09 M クエン酸ナトリウム pH 7.0) に 1分の順につけたのち風乾し、80°C 2時間乾熱処理した。次にフィルターを 6×SSC, 0.5% SDS, 5×Denhardt's, 1.5 mg 変性サケ DNA の入った溶液に入れ、65°C, 2時間プレハイブリダイゼーションを行った。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、先に調製した <sup>32</sup>p でラベルしたプローブを加え 65°C 一晚行った。フィルターの洗浄は 2×SSC-0.1% SDS の溶液に入れ室温で30分を 2回行った後、0.1×SSC-0.1% SDS の溶液に入れ 68°C で1時間を 2回行った。風乾後、フィルターをX線フィルムに一晚室温で感光させた後現像した。これにより感光していたプラークを寒天培地からきりだし、別々に新しい LB 寒天培地に 30 pfu ずつ播き、更に同様の操作でスクリーニングすることにより単一のクローンを得た。

### (c) サブクローニングと配列決定

Tominaga and Narise (1990) の方法に従って行った。要約すれば、クローンに制限酵素を作用させインサート DNA を切り出し、精製した後、pBluescript II に結合し、大腸菌 JM 83 に形質転換した。DNA シーケンスはエキソヌクレアーゼⅢ/マングビーンヌクレアーゼシステムを用いてデレションプラスミドを作成した後、ジデオキシ法で行った。

## 3. 結果と考察

クロシヨウジョウバエ  $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> アロザイムの構造的差異を明らかにするために、その cDNA ライブラリーを作製し、 $\alpha$ GPDH<sup>S</sup> cDNA のクローニングを行った。このライブラリー ( $8 \times 10^5$  pfu/ml) のうち  $3 \times 10^4$  pfu について  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA プローブを用いてスクリーニングした結果、3つのポジティブクローンを分離した。この3つのクローンはそれぞれ a, b, c と命名した (図1)。それらを Eco RI で消化後大きさをアガロースゲル電気泳動で調べた所、a クローンが 2.3 kbp, b クローンが 1.4 kbp, c クローンが 2.3 kbp であることがわかった。この3つのクローンについて3つの制限酵素 (Mlu I, Apa I, Ban III) で消化を行った。この3つの制限酵素を  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA に用いた時には、その切断部位はそれぞれ開始コドンより Mlu I が -89 bp, Apa I が +894 bp, Ban III が +1015 bp にあることが確認されている。

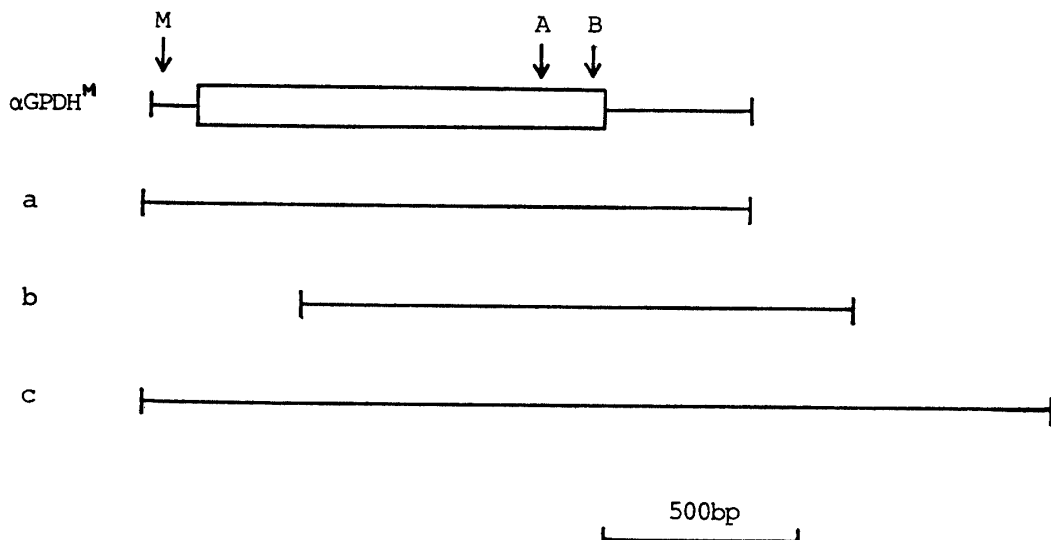


図 1  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA クローンと 3 つの  $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup> クローン (a, b, c) の制限酵素地図。  
ボックスはコード領域を示す。制限酵素 M は Mlu I を, A は Apa I を, B は Ban III  
をそれぞれ示す。

図 1 に示したように, Mlu I での消化では b クローンだけ切断されなかった。これは b クローンは完全な長さの cDNA ではなく, 5' 側がすでにけずられているためだと思われる。又, Apa I, Ban III での消化では, クローン b 及び c が  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> クローンに比べて 3' 側が長いことが確認された。なおクローン a の 3' 側の長さは  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> クローンのそれと等しかった。以上の結果を考慮し, 3 つすべてのクローンの配列分析を行った。3 つのクローンは  $\lambda$ gt 10 アームから切断し, それぞれのインサート DNA を pBluescript KS<sup>+</sup> プラスミドに組み込んだ。pBluescript 組換え体はエクソヌクレアーゼ-マングビーンヌクレアーゼシステムによってデレーションプラスミドを作製し, これを用いて全配列を調べた。

a クローンについての全配列を図 2 に示した。a クローンは全長 1,560 bp で 5'-非コード領域 127 bp, コード領域 1,056 bp, 3'-非コード領域 377 bp からなっていた。これを  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA (Tominaga and Narise, 1990) と比較した。まず 5'-非コード領域については,  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA より 26 bp 長かったが  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> ゲノム DNA をプライマーエクステンションにより調べた転写開始部位は  $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup> cDNA のものより 14 bp 上流にあることが確認されている (Tominaga et al., in preparation)。 $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup> cDNA の場合も同じ転写開始部位をもつと思われるが, 今回スクリーニングした 3 つの中にはその長さのものは得られなかった。現在得られた 5'-非コード領域の塩基配列は  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> とまったく同じであったので, スクリーニングをやりなおせば 5' 領域の完全なクローンが見つかると思われる。

コード領域は開始コドン ATG から始まり, 352 のアミノ酸をコードし, 終止コドン TAA で終わっていた。コード領域における  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA との違いは +100 bp の塩基, A, 1 ヶ所のみであり, 他の塩基置換はまったくみられなかった。そして  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> cDNA でのこの部位

```

-132      TAATTCGCTGTGCTAGTCGCATATACCAAGAGTCTGACACGCGTACAAATCAATCGACAGA
-66 GTTGAAAACACTTTGCCATACAACAACAGCAACAACGAAAACAACAATTAATACAGCAGCATG
                                     ***

1  GCGGAAAAAGTAAATGTTTGCATCGTGGGCTCTGGCAACTGGGGTTCGGCCATAGCGAAAATCGTG
   A E K V N V C I V G S G N W G S A I A K I V      22
                               αM(G)[E]
67  GCGCCAATGCGGCCGCGCTGCCCGAGTTTGAGAAAGCGCGTCACAATGTTTGTCTACGAGGAGATG
   G A N A A A L P E F E K R V T M F V Y E E M      44
133 ATTGATGGCAAGAAGTTAACGGAAATTATCAATGAAACGCACGAGAATGTTAAATACCTGAAGGGA
   I D G K K L T E I I N E T H E N V K Y L K G      66
                               αF(T/C)[N]
199 CACAACTGCCAACAAATGTGGTTGCTGTACCTGATCTGTTGAGGCTGCCAAGAATGCCGATATA
   H K L P T N V V A V P D L V E A A K N A D I      88
265 CTAATCTTTGTGGTGCCACATCAATTTATACCAAAATTTCTGCAAGCAATTGCTGGGCAAGATCAAG
   L I F V V P H Q F I P N F C K Q L L G K I K      110
                               αS(C)[R]
331 CCAAATGCCATTGCCATATCCCTGATCAAGGGCTTCGATAAGGCCGAGGGCGGCGGCATTGATCTG
   P N A I A I S L I K G F D K A E G G G I D L      132
397 ATATCGCACATTATTACCGCCATTTGAAGATACCATGCGCCGTGCTGATGGGCGCTAATCTGGCC
   I S H I I T R H L K I P C A V L M G A N L A      154
463 AACGAGGTGGCCGAGGGCAACTTTTGCAGACGACAATCGGCTGCACGGACAAAAAGTACGGCAAG
   N E V A E G N F C E T T I G C T D K K Y G K      176
529 GTGCTGCGTGATCTCTTCCAGGCAAAATCATTTTCGTGTGCTGGTTCGTTGAGGATGCCGATGCCGTT
   V L R D L F Q A N H F R V V V V E D A D A V      198
595 GAGGTTTGGCGCGCCCTGAAGAACATTGTGGCCTGTGGTGGGGCTTTGTCGATGGTCTCAAGCTG
   E V C G A L K N I V A C G A G F V D G L K L      220
661 GCGGATAATACTAAGGCAGCGGTCATTTCGTTTGGGTCTCATGGAATGATACGCTTTGTCGATGTC
   G D N T K A A V I R L G L M E M I R F V D V      242
727 TTCTATCCGGGCGAGCAAAATTGTCCACATTCTTTGAGAGCTGCGGTGTTGCGGATCTCATCACGACA
   F Y P G S K L S T F F E S C G V A D L I T T      264
793 TGTTACGGTGCTCGCAATCGTCGTGTCTCAGAGGCTTTTGTACATCGGGCAAGACAATCGAAGAT
   C Y G G R N R R V S E A F V T S G K T I E D      286
859 CTGGAGAAAGAGATGCTCAATGGCCAAAAATTGCAGGGCCCGCCACTGCCGAGGAGGTAACTAT
   L E K E M L N G Q K L Q G P P T A E E V N Y      308
925 ATGTTGAAAAACAAAGGCCTGGAGGATAAAATCCCATTTGTTACCGCCATACACAAAATTTGCACA
   M L K N K G L E D K F P L F T A I H K I C T      330
991 AATCAGCTTAAGCCTAAAGATTTAATCGATTGCATACGCAATCATCCCGAGCATATGCAAACCTTG
   N Q L K P K D L I D C I R N H P E H M Q T L      352
                               (A)      (C)
1057 TAAAATATATATTA AAAACACAAATTTCTAAACGTTTTTATGCACCAAAAACAAAAAAGCAAAAAA
   ***
1123 AAAACCAAACACAAGCAAATAGTCATTTTTTTTTAGCACACATTTTTAAATCCTCAATACGCCAGCC
1189 AACGACAAGAATGGCATATACATAGTTGTTAATTTATTGTTAAAAATCCAACGCATATCCAGCGAA
1255 CCACAGAAACGAACAAAAACCAATCTTGAAGTCTGCTTTTTGTTTTAACTTAGTTTATAAACGATA
1321 AATTAGCAAAATGAAATTGTGCGCATGTACCTAAAGACAATTGTAATCAATTTTACAATTACAATT
1387 AAAAAACAACAGAAGAGGCGTAATAAAACGGAAAAA AAAAAAAAAAAAAA

```

図2 αGPDH<sup>S-</sup> cDNA a クローンの塩基配列とそれより推定したアミノ酸配列。右側にアミノ酸数，左側に塩基数を記した。開始コドンと終止コドンの下には\*印がついており，ポリAシグナルは下線で示した。置換塩基は( )で，置換アミノ酸は[ ]で示した。

の塩基はGであった(図2)。これによりタンパク質のアミノ酸をコードするコドンが $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>ではGAGであったのに対し、 $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup>ではAAGとなり、その結果アミノ酸はグルタミンからリジンへと変わることがわかった。図2には現在まで調べられた $\alpha$ GPDHの3種のアロザイムにおける置換塩基とその置換アミノ酸について示してある(Tominaga et al., 1989)。図中から $\alpha$ GPDH<sup>F</sup>や $\alpha$ GPDH<sup>S</sup>は $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>と一アミノ酸の置換により電荷の変化が一起ったことが明らかである。即ち、 $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>の塩基204 bp (A)が $\alpha$ GPDH<sup>F</sup>においてはT又はCに変異したために68番アミノ酸がリジンからアスパラギンに変化している。又、 $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>の塩基379 bp (G)が、 $\alpha$ GPDH<sup>S</sup>においてはCに変異したために127番アミノ酸がグリシンからアルギニンになっている。もし $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup>が $\alpha$ GPDH<sup>S</sup>から起因したとするならば、127番のアミノ酸がアルギニンであるので、もう1ヶ所他の部位での置換が起っていると考えられるが、この場合127番のアミノ酸は $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>と同じであり、 $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup>は $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>の34番のグルタミン酸がリジンに変異していたので、 $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup>が $\alpha$ GPDH<sup>S</sup>に起因したのではなく、 $\alpha$ GPDH<sup>F</sup>や $\alpha$ GPDH<sup>S</sup>同様に $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>と一アミノ酸の置換、即ち酸性アミノ酸から塩基性アミノ酸への置換により電荷の変異が2生じたことがわかった。又 $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup>での変異部位は34番目と比較的N末端に近い方にあり、 $\alpha$ GPDH<sup>F</sup>同様にアデニン結合部位に相当する。もしアデニンとの結合様式が $\alpha$ GPDH<sup>F</sup>での性質の差異、即ち35°Cにおける温度抵抗性の低さに関連しているとするならば、 $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup>の場合も温度抵抗性に対してなんらかの変化が生じるのではないかと考えられる。又これ以外に、NAD<sup>+</sup>との結合の強弱にも変化が起ることも予想される。何故ならば基質及び助酵素との結合はもちろん、温度抵抗性なども一アミノ酸の変異によって変ることが報告されているからである(Alber et al., 1987)。この $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup>タンパク質の生化学的性質については今後の課題だが、それを調べることによりそのタンパク質の構造と性質の関係がより明らかになるであろう。

次に3'-非コード領域(図2)は371 bpからなり、その特徴であるポリAとシグナル配列AATAAAが存在した。この3'-非コード領域は $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>cDNAと長さは等しいが2ヶ所の置換がみられた。それは1,101 bpのC及び1,115 bpのGが $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>でそれぞれA及びCに変わっていた(図2)。これらのことより $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup>cDNA全体を $\alpha$ GPDH<sup>M</sup>cDNAと比べてみると、5'-非コード領域での置換やコード領域におけるサイレントミューテーションはなく、3'-非コード領域にのみ置換がみられたことになる。一方、キイロショウジョウバエの $\alpha$ GPDHアロザイム遺伝子間ではコード領域にサイレントミューテーションがあり、その置換率の方がイントロンを合わせた非コード領域より高いことを示している(Takano et al., 1990)。クロショウジョウバエ $\alpha$ GPDH遺伝子はキイロショウジョウバエより1,000 bp以上長いイントロンを持っているので非コード領域における置換は多いと推定されるので、キイロショウジョウバエとは逆の傾向を示すであろう。

b クローンの配列を調べた所、b クローンは +280 からの配列であり、先に予想したように 5' 側の削除されたものであった。又、3' 側は a クローンの 3'-非コード領域より 150 bp 長いものであった（データは示していない）。

$\alpha$ GPDH 遺伝子には、エクソン 8 終了後に 5つのポリ A シグナルがあることがわかっている（Tominaga et al., in preparation）。a クローンでは 1 番目のポリ A シグナルが使われていたが b クローンでは 4 番目のポリ A シグナルが使われていることが確認された。このことはいくつかのポリ A シグナルがあった場合に、1つのものだけが使われているわけではないことを示している。そしてそれらの中でのシグナルとしての使いやすさ、つまり使用頻度には差があるのかもしれないが、すべてのポリ A シグナルがその役割をはたしていると考えられる。

c クローンの配列分析の結果、5'-非コード領域 127 bp、コード領域 1,077 bp、3'-非コード領域 379 bp からなっており、a 及び b クローンとはコード領域の 1,048 bp から下流の配列すべてが違っていた。図 3 には図 2 の a クローンの塩基番号 955、アミノ酸番号 319 から 3' 側に相当する c クローンの塩基配列とそのアミノ酸配列を示した。図 3 と図 2 を比較すると塩基 1,047、アミノ酸 349 までの配列は全く同じであるが、それより 3' 側が違っていることは明らかである。クロシヨウジョウバエ  $\alpha$ GPDH 遺伝子の解析（Tominaga et al., in preparation）によれば、コード領域は 7 つのイントロンにより分画される 8 エクソンより成っている。シヨウジョウバエの  $\alpha$ GPDH 酵素タンパク質の一次構造及び遺伝子の研究から（Niesel et al., 1982; Cook et al., 1988; Arai et al., 1988）、成虫の  $\alpha$ GPDH は 1 ~ 6 エクソンと 8 エクソンが翻訳されたものであり、幼虫のそれは 1 ~ 6 エクソンの翻訳されたものであることが明らかにされている。しかし、 $\alpha$ GPDH 遺伝子には 7 エクソンが存在し、1 ~ 7 エクソンの転写物が見出されている（von Kalm et al., 1989）。図 3 の下線の部分は 10 アミノ酸残基をコードし、終止コドンを備えた 7 エクソンであり、それに続くクローン a, b と異なる塩基配列は 7 エクソンに続く 3'-非

```

955 TTCCCATTGTTCCACGCCATACACAAAATTTGCACAAATCAGCTTAAGCCTAAAGATTTAATCGAT
    F P L F T A I H K I C T N Q L K P K D L I D      340
1021 TGCATACGCAATCATCCCGAGCATATGGATACGTTTCATCATGCCGTCGCCAAACTCTAAACTGTG
    C I R N H P E H M D T F I M P S P K L ***      359
1087 TTAAACCAAAACAAAAAATGTTCTAAAAGCTTAATTCGATTGTAAATACTATTTGTTTATATATC
1153 AAGTCAAGTCAAGTCAAGTCCAGTCATACACACACAAAATATTATCATGCACATCCACACACGCAT
1219 TTGCAACCGATACGTATTTCGAAAATCGTTTCCTTCGCCAGCTCAACACGCATTTTATAATACAAC
1285 CGATTCTATTTAAATGGTTTTCAAAAACCAATGTATGTGTGCATAGGTGAAAATGTCAGTGTCTATA
1351 TTTGTTAAACCAAAATCAGTTTTGTTAAACACGAATAAAAGTATTTAAATATTGTTTTTGTCTCTGTA
1417 CATATCAAAAGAAAAACGCATAATTAGCAAAAAAAAAAAAA

```

図 3  $\alpha$ GPDH<sup>S-</sup> cDNA c クローンの部分塩基配列とそれより推定したアミノ酸配列。右側にアミノ酸数、左側に塩基数を記した。終止コドンの下には \* 印がついており、ポリ A シグナルは太線で示した。下線を引いたコード領域はエクソン 7 に相当する。詳細は本文参照。

コード領域であった。クロシヨウジヨウバエ  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> ゲノム DNA の塩基配列が明らかになっているが (Tominaga et al., in preparation), クローン c のこの部分の塩基配列は  $\alpha$ GPDH<sup>M</sup> ゲノム DNA と全く同じであった。キイロシヨウジヨウバエの研究から,  $\alpha$ GPDH 遺伝子は同一の転写開始部位から一種類の mRNA が転写されるが, 発生段階により, 又組織特異的に独特なスプライシングが起って3つのアイソザイムが生成される。それらは幼虫の  $\alpha$ GPDH として1~6エクソンの転写物, 成虫の  $\alpha$ GPDH として1~6エクソン及び8エクソンの転写物, 他の1つはタンパク質としては捕えられていないが1~6及び7エクソンの転写物で成虫に見出されるという。その理由の1つとして, 6~8エクソンのコーディング領域の3'末端に終止コドンがあること, その3'側にポリAのシグナル AATAAA があることをあげ, 6及び7イントロンはむしろ3'-非コード領域とよぶべきであるとしている。我々の行ったクロシヨウジヨウバエのタンパク質の一次構造の解析からでも第3のタンパク質は見出されていないが, キイロシヨウジヨウバエと同様1~7エクソンの転写物があることが確認された。そしてcクローンは完全な形でみついているので, タンパク質に翻訳されている可能性は高いように思われるが, このタンパク質の存在や, その機能については今後の課題となるであろう。

今回行った  $\alpha$ GPDH アロザイム cDNA の塩基配列の決定はアロザイム間の構造的差異を確かめただけでなく, ポリAシグナルの使われ方や新しいアイソザイムの転写物の発見という結果をもたらした。これらの結果はこれから行うゲノム DNA の解析やタンパク質の解析におおいに役立つと思われる。

#### 参 考 文 献

- 1) Alber, T., Dao-pin, S., Wilson, K., Wozniak, J. A., Cook, S. P., and Matthews, B.W. (1987) Contributions of hydrogen bonds of Thr 157 to the thermodynamic stability of phage T4 lysozyme. *Nature*. 330, 41-46.
- 2) 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.
- 3) Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974) Conformational parameters for amino acids in helical,  $\beta$ -sheet and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry*. 13, 211-222.
- 4) Cook, J. L., Bewley, G. C. and Shaffar, 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.
- 5) Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- 6) Narise, S. (1980) Purification and biochemical properties of allelic form of cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Drosophila virilis*. *Biochim. Biophys. Acta*. 615, 289-298.
- 7) 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.
- 8) Otto, J., Argos, P. and Rossman, M. G. (1980) Prediction of secondary structural elements in glycerol-3-phosphate dehydrogenase by comparison with other dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 109, 325-330.
  - 9) Takano, T., Kusakabe, S. and Mukai, T. (1990) DNA polymorphism of the *Drosophila GPDH* gene. Jap. J. Genetics. 65, 463.
  - 10) Tominaga, H., Arai, K. and Narise, S. (1989) Single amino acid substitution in *sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase allozymes from *Drosophila virilis*. Experientia. 45, 312-314.
  - 11) Tominaga, H., and Narise, S (1990) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Drosophila virilis*. Josai Univ. Bulletin, Liberal Arts. 14, 9-18.
  - 12) von Kalm, L., Weaver, J., DeMarco, J., MacIntyre, R.J. and Sullivan, D. T. (1989) Structural characterization of the  $\alpha$ -glycerol-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 5020-5024.