

N-5

Chlamydomonas から *Volvox* への進化過程におけるアラニンラセマーゼ遺伝子の変化 Change of Alanine Racemase Gene through the Evolution Process from *Chlamydomonas* to *Volvox*

○正井三貴¹, 森田博之², 西村克史^{3,4}, 長田洋子⁴○Miki Masai¹, Hiroyuki Morita², Katsushi Nishimura^{3,4}, Yoko Nagata⁴

Abstract: The unicellular green alga *Chlamydomonas* and its multicellular relatives can be arranged in a conceptual lineage sequence; *Chlamydomonas*, *Gonium*, *Pandorina*, *Eudorina*, and *Volvox*. These algae are well suited for the investigation of the evolution of multicellularity. We found that D-alanine had no inhibitory effect on growth of the green algae, except *Volvox*. Partially purified alanine racemase of *Chlamydomonas augasta* exhibited almost the same properties as that of *C. reinhardtii*, whereas that of *Gonium* exhibited different substrate specificity and molecular mass from that of *C. reinhardtii*. PCR analysis using the sequence of alanine racemase gene from *C. reinhardtii* indicated that no homologous gene existed in the genomes of *C. augasta* and *Gonium*.

1. 目的

Volvox 目の緑藻は、単細胞で生活する *Chlamydomonas* 属から、*Gonium* 属、*Pandorina* 属、*Eudorina* 属、*Pleodorina* 属を経て、細胞数 2000 の群体を形成する *Volvox* 属に進化したと考えられている。われわれは、*Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) が D-アラニンに対して耐性を示し、アラニンラセマーゼを持つこと、一方、*Volvox carteri* (*V. carteri*) には D-アラニン耐性がないことを発見した (Amino Acids, 32, 59-62, 2007, Nishimura *et al.*).

本研究では、単細胞の *Chlamydomonas* 属から群体の *Volvox* 属への進化に伴って、D-アミノ酸に対する耐性やアラニンラセマーゼ活性がどのように変化したかを、ゲノム DNA の変化と併せて考察することを目的とし、*Chlamydomonas augasta* (*C. augasta*), *Gonium pectorale* (*G. pectorale*), *Pandorina morum* (*P. morum*), *Eudorina elegans* (*E. elegans*), *V. carteri* の D-アラニン耐性とアラニンラセマーゼ活性を調べ、さらに *C. reinhardtii* のアラニンラセマーゼ遺伝子のクローニングを行いその遺伝子配列を確認するとともに、この遺伝子が、*C. augasta*, *G. pectorale*, *V. carteri* のゲノム上に存在するかどうかを検討した。

2. 方法

Chlamydomonas 属 (*C. reinhardtii* と *C. augasta*) と *G. pectorale* は D-アラニンを含む TAP 培地を、*P. morum* と *E. elegans* と *V. carteri* は D-アラニンを含む標準ボルボックス培地を用い、培養を行った。それぞれの緑藻細胞を遠心分離によって集め超音波破碎をした。遠心分離により得られた無細胞抽出液から硫酸アンモニウム分画と陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いてアラニンラセマーゼの精製を行い、酵素試料とした。それぞれの酵素の最適温度、最適 pH、基質特異性を調べた。さらに酵素試料をゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供し、分子質量の測定を行った。

C. reinhardtii 細胞から抽出した mRNA を鋳型として、RT-PCR によるアラニンラセマーゼの構造遺伝子の増幅を試みた。これを pUC118 に挿入し、*E. coli* JM109 に導入した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、塩基配列を解析した。

次に、*C. augasta*, *G. pectorale*, *V. carteri* からゲノム DNA を抽出した。これらの緑藻のゲノム上に *C. reinhardtii* のアラニンラセマーゼ遺伝子の homologue が存在するかどうかを PCR を用いて分析した。また *C. augasta* については *C. reinhardtii* の mRNA の homologue が存在するかどうか RT-PCR により分析を行った。

3. 結果と考察

V. carteri は、D-アラニンを含む標準ボルボックス培地中では生育しなかったのに対して、*Chlamydomonas* 属 (*C. reinhardtii* と *C. augasta*) と *G. pectorale* は D-アラニンを含む TAP 培地中で、*P. morum* と *E. elegans* は D-アラニンを含む標準ボルボックス培地中で良好に生育した。

C. augasta と *G. pectorale* から酵素試料を抽出し、アラニンラセマーゼ活性を調べた結果、活性を示した。*C. reinhardtii* の酵素とそれぞれの酵素の性質を比較したところ、*C. augasta* の酵素はほぼ同じ性質を示したが、*G. pectorale* の酵素は

1 : 日大理工・院・応化 2 : 日大理工・学部・応化 3 : 日大短大・教員・応化 4 : 日大理工・教員・応化

Chlamydomonas 属のものとは異なる性質を示した。以上の結果から、*Chlamydomonas* 属と *Gonium* 属の緑藻は D-アラニンに対して耐性があり、アラニンラセマーゼを持つことが示され、また、*Chlamydomonas* 属と *Gonium* 属のアラニンラセマーゼには違いがあることが示唆された。

RT-PCR により *C. reinhardtii* アラニンラセマーゼ遺伝子を増幅した。約 1.3 kbp の断片が得られ、配列を解析したところ、1323 bp のオープンリーディングフレームが見出され、440 残基のアミノ酸をコードしていることが明らかとなった。*C. reinhardtii* のゲノム情報サイトのアラニンラセマーゼの mRNA と比較したところ、本構造遺伝子は 913 bp~948 bp が欠如していることがわかった。また、*C. augasta*, *G. pectorale*, *V. carteri* のゲノム上に *C. reinhardtii* のアラニンラセマーゼ遺伝子の homologue が存在するかどうかを PCR により分析した結果、*G. pectorale*, *V. carteri* には存在しないことが示唆された。さらに、*C. augasta* 由来の mRNA を用いて RT-PCR を行った結果、*C. reinhardtii* と同じ約 1.3 kbp の遺伝子断片が増幅された。

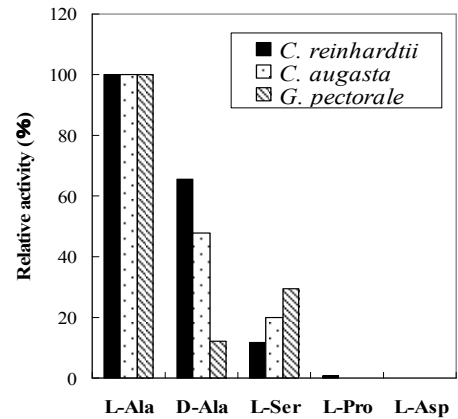


Fig. 1. Substrate specificity of alanine racemase activity

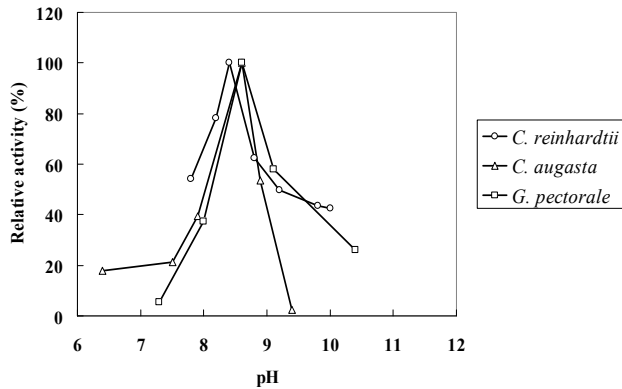


Fig. 2. Optimum pH of alanine racemase activity

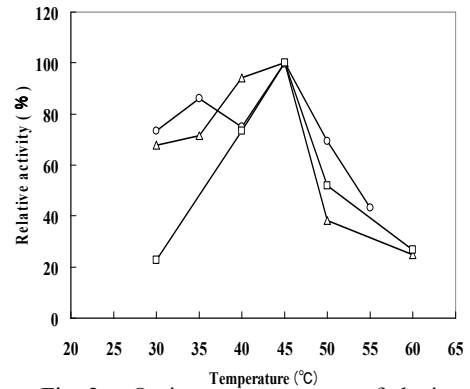


Fig. 3. Optimum temperature of alanine racemase activity

4. まとめ

D-アラニンに対する耐性は *Pleodrina* 属または *Volvox* 属へ進化するところで変化していることがわかった。また、*Chlamydomonas* 属の 2 種は同じアラニンラセマーゼ遺伝子を持つこと、*Gonium* 属への進化に伴いアラニンラセマーゼ遺伝子は少し変化している可能性があることが示された。

Table 1. Summarized Data

	<i>Chlamydomonas</i>		<i>Gonium</i>	<i>Pandorina</i>	<i>Eudorina</i>	<i>Volvox</i>
	<i>reinhartii</i>	<i>augasta</i>				
Cell number /colony	1	1	8-16	32-64	64-128	2000
Tolerance to D-alanine	+	+	+	+	+	-
Substrate specificity	D-Ala>>L-Ser	D-Ala>L-Ser	D-Ala<L-Ser	N.D.	N.D.	-
Optimum temperature	45°C	45°C	45°C	N.D.	N.D.	-
Optimum pH	8.4	8.6	8.6-8.7	N.D.	N.D.	-
Molecular mass	91 kDa	N.D.	250 kDa	N.D.	N.D.	-
Homologue in genome	(5729 bp)	-	-	N.D.	N.D.	-
Homologue in mRNA	(1323 bp)	±	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : not determined

5. 謝辞

遺伝子組み換え実験に協力して戴いた中央大学理工学部応用化学科の石塚盛雄教授に深謝致します。