

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-Threonine aldolase の精製と結晶化 Purification and crystallization of D-Threonine aldolase of a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

○菅野裕司¹, 平戸祐喜², 徳久真弓³, 谷川実³, 西村克史^{3,4}Yuji Kanno¹, Yuki Hirato², Mayumi Tokuhisa³, Minoru Tanigawa³, Katsushi Nishimura^{3,4}

Abstract: *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) is a unicellular green alga belonging to the Volvocales, is a model organism of basic biological process analysis. We revealed that D-threonine aldolase (DTA) activity was induced by adding D-threonine to the culture medium. In this study, we tried to purify and crystallize recombinant DTA of *C. reinhardtii*.

1. 緒言

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は、Volvox 目に属する単細胞生物であり、全ゲノム配列が解明されている基礎的な生物学的プロセス解析のモデル生物である。われわれは、*C. reinhardtii* を D-Threonine 添加培地で培養すると D-Threonine aldolase (DTA) 活性が誘導されることを明らかにした。^[1] 本研究では、*C. reinhardtii* 由来 DTA の性質を解明することを目的として、DTA の精製と結晶化を試みた。また、本酵素を用いた β-ヒドロキシアミノ酸の合成反応についても調べた。

2. 方法

2-1. 培養

推定 DTA 遺伝子の配列情報を基にコドンは大腸菌に最適化した遺伝子 *dtat'* を合成し、pET41b(+) に組み込み大腸菌に導入した。組換え大腸菌を 30 μg/mL Kanamycin を含む LB 培地で培養した。

2-2. DTA の精製

2-1 より得られた組換え大腸菌から超音波破碎と遠心分離によって無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液から硫酸アンモニウム分画、DEAE-Sepharose カラムクロマトグラフィーによって DTA を精製した。

2-3. DTA の結晶化

DTA の結晶化にはハンギングドロップ蒸気拡散法を用いた。結晶化のリザーバーに、40% ポリエチレングリコール 1540, 0.2 M Mg(NO₃)₂, 10% メチルプロパンジオールを用いた (Fig 1)。また、36% ポリエチレングリコール 1540, 0.2 M Mg(NO₃)₂, 10% メチルプロパンジオールを用いた (Fig 2)。

2-4. DTA によるアミノ酸の合成反応

DTA による合成反応の活性測定を HPLC を用いて行った。^[2] 100 mM HEPES buffer (pH 8.1), 10 μM

pyridoxal 5'-phosphate, 1 mM MnCl₂, 100 mM Glycine, 350 mM Acetaldehyde, 酵素サンプルを含む反応溶液を反応温度 50°C, 反応時間 0~60 min で反応させた。

3. 結果

3-1. DTA の精製

硫酸アンモニウム分画における比活性は >60% 飽和画分が最大値 (68.8 nmol/min/mg) を示した (Table 1)。DEAE-Sepharose カラムに供したところ、106-165 min に活性のピークが検出されたため、106-124 min と 125-165 min の二つの画分に分けて回収した。

Table 1. Purification of D-threonine aldolase

	タンパク質量 (mg)	比活性 (nmol/min/mg)	全活性 (μmol/min)
0-25% 硫酸画分	505	28.9	14.6
25-60% 硫酸画分	1310	6.81	8.92
>60% 硫酸画分	170	68.8	11.7
106-124 min	27.8	99.1	2.75
125-165 min	16.8	78.6	1.32

3-2. DTA の結晶化

Fig 1 と Fig 2 に示す結晶が得られた。

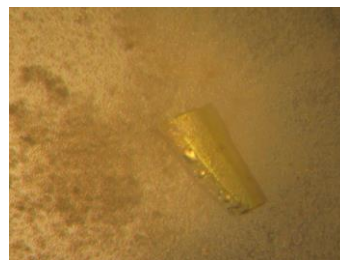


Fig 1 Crystal of DTA of *C. reinhardtii*



Fig 2 Crystal of DTA of *C. reinhardtii*

4. 考察

Table 1 より、硫酸アンモニウム分画後の活性が先行研究とは異なり、各画分に活性が分散したので、硫酸アンモニウム分画の操作を見直す必要があると考えられた。

5. 参考文献

- [1] 二重作 和宏, 2015 年度修士論文
- [2] 平戸 祐喜, 2016 年度日本農芸化学会