N-21

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* からの D-スレオニンアルドラーゼの精製

Purification of D-threonine aldolase from Green algae *Chlamydomonas reinhardtii*

○石村駿[1], 平戸祐喜[2], 徳久真弓[3], 谷川実[3], 西村克史[3,4]
Shun Ishimura[1], Yuki Hirato[2], Mayumi Tokuhisa[3], Minoru Tanigawa[3], Katsushi Nishimura[3,4]

Abstract: *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) is a unicellular green alga and belongs to volvocales. D-Threonine aldolase (DTA) catalyzes cleavate of D-form of β hydroxy amino acids into glycine and the corresponding aldehydes. DTA from *C. reinhardtii* was discovered and characterized, representing the first report to describe the existence of eukaryotic DTA. In this study, we tried to purify DTA from *C. reinhardtii* cells.

1. 研究目的

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は D-スレオニンに対して耐性を持つ Volvox 目の単細胞生物である. D-スレオニンアルドラーゼ (DTA) は, ピリドキサール 5'-リン酸を補酵素として D-スレオニンをグリシンとアセトアルデヒドに分解する反応を触媒する酵素である. 本酵素が *C. reinhardtii* に見出されたのは真核生物としては初めてであり, D-アミノ酸代謝に関与する酵素の一つとして興味が持たれる. 昨年度の研究において, アラニンラセマーゼライクドメインをもつ遺伝子を recombinant タンパク質として *E. coli* に発現させたところ, 粗抽出液中に DTA 活性が検出されたため, これを精製して DTA の諸性質が調べられた [1].

本研究では *C. reinhardtii* において DTA の遺伝子がどの様な条件で発現するのか, また, 酵素活性を示すタンパク質が DTA の遺伝子産物と一致するのかどうか明らかにすることを目的として, *C. reinhardtii* 細胞より DTA の精製を試みた.

2. 方法

2-1. DTA 遺伝子の転写

C. reinhardtii より抽出した mRNA を鋳型として, RT-PCR により推定 DTA 遺伝子中の 160 塩基に対応する Firrst strand cDNA を合成した. これを鋳型として PCR を用いて目的の断片を増幅し, アガロースゲル電気泳動によって DNA の長さを分析した.

2-2. DTA の活性測定

アルコールデヒドロゲナーゼを用いたカップリング法により活性を測定した. 酵素サンプル, 50 μM ピリドキサール 5'-リン酸, 100 μM 塩化マンガン, 5 μM D-スレオニン, 26.6 U アルコールデヒドロゲナーゼ, 200 μM NADH, 100mM HEPES buffer (pH 8.1) を含む反応溶液を 50℃で 3 分間反応させ, NADH 由来の 340nm の吸光度の減少を継時的に測定し, 活性を算出した.

2-3. D-, L-スレオニンによる DTA の誘導

D-スレオニンまたは L-スレオニンを添加した培地で培養した *C. reinhardtii* を用いて, DTA 活性が誘導されているかどうかを調べた.

2-4. DTA の精製

C. reinhardtii 細胞を Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中で超音波破砕し、ホモジネートを超遠心分離にかけ上清を可溶性画分とした. 可溶性画分を硫酸アンモニウム分画に供し, 0-20% と >20% 飽和の画分で分離した. 比活性･全活性の高かった >20% 飽和画分を回収した.

透析・濃縮した >20% 画分を Hi Trap™ DEAE FF に供した. 1 mM PLP を含む 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を用いて平衡化した後, 0-700 mM NaCl のリニアグラジエントを用いて溶出した. 溶出画分の活性を ADH 法で, タンパク質濃度を Lowry 法で測定した.

3. 結果と考察

3-1. DTA 遺伝子の転写

電気泳動の結果, 120 bp のバンドが検出されたため DTA 遺伝子が転写されていることが分かった. D-, L-どちらのスレオニンも DTA 活性に影響を与えなかった.

3-2. DTA の精製

DTA の精製により, 比活性 18.97 (nmol/min/mg), 全活性 73.19 (nmol/min) の酵素標品を得た.

今後は先行研究の recombinant DTA と精製した DTA が同一であるかどうかを調べるために, recombinant DTA に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い, 検出されたタンパク質の N 末端配列を解析する予定である.

参考文献

[1] 平戸祐樹, 2016 年度日本農芸化学会