

N-12

## 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の Alanine racemase の遺伝子クローニング Gene cloning of alanine racemase of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

○大塚健起<sup>1</sup>, 小池美弥<sup>2</sup>, 谷川実<sup>2</sup>, 西村克史<sup>2,3</sup>\*Takeki Otsuka<sup>1</sup>, Miya Koike<sup>2</sup>, Minoru Tanigawa<sup>2</sup>, Katsushi Nishimura<sup>2,3</sup>

Abstract: The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is a unicellular organism inhabiting the freshwater area and is a model organism whose genome analysis has been completed. This study aims to investigate the enzymatic properties and structure-activity relationships of alanine racemase of *C. reinhardtii* and the significance of the existence of alanine racemase in *C. reinhardtii*. The alanine racemase activity measurement, total RNA isolation, and RT-PCR for AlaRac gene were performed. The highest activity was observed when cultured in L-Alanine-added TAP medium. The results of electrophoresis indicated a successful extraction of 28S and 18S rRNA, which are indicators of extraction of total RNA.

### 1. 目的

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は、ゲノム解析が終了したモデル生物である。*C. reinhardtii* は Alanine racemase (AlaRac) 活性と D-Alanine 耐性を示すことが当研究室の先行研究により明らかにされている。

本研究は、*C. reinhardtii* の AlaRac の酵素学的諸性質や構造活性相関、また *C. reinhardtii* における AlaRac の存在意義を調べることを目的としている。ここでは遺伝子クローニングの前段階として、*C. reinhardtii* における AlaRac 遺伝子の発現誘導を調べた。RNA を調製し RT-PCR を行い、AlaRac 遺伝子の増幅を試みた。

### 2. 方法

#### 2-1 培養

*C. reinhardtii* を TAP 培地、D-Alanine 添加 TAP 培地、L-Alanine 添加 TAP 培地に植え、4 日間培養 (25°C, 16 h 明, 8 h 暗, 9000 lx) した。

#### 2-2 無細胞抽出液の調製

遠心分離によって集めた *C. reinhardtii* 細胞を超音波破碎 (20 W, 20 min, on ice) し、遠心分離 (14,500 g, 4°C, 30 min) 後の上清を透析 (2 h) したものを無細胞抽出液とした。

#### 2-3 タンパク質の定量

Bradford 法を用いて行った。

#### 2-4 活性測定 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 法)

L-Alanine を基質としてラセマーゼ反応を行った後、生成した D-Alanine を、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 法を用いて定量することにより AlaRac 活性を算出した。

#### 2-5 RNA 抽出

D-Alanine 添加 TAP 培地を用いて培養をした *C. reinhardtii* をホモジナイズし、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出し、抽出物をアガロースゲル電気泳動に供した。

#### 2-6 逆転写

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて、抽出した Total RNA を鋳型として逆転写反応 (mix primer) を行い、cDNA を得た。

#### 2-7 PCR

cDNA を鋳型とし、AlaRac 遺伝子と予測した Cre03.g151500.t1.1 の情報を基に作成したプライマーを用いて KODFX (東洋紡) で PCR を行い、産物をアガロースゲル電気泳動に供した。

#### 2-8 PCR 産物の精製

得られた PCR 産物を Amicon® Ultra - 0.5 遠心式限外濾過フィルター (Merck Millipore) を用いて精製した。

### 3.結果及び考察

#### 3-1 *C. reinhardtii* の Alanine racemase 活性

AlaRac の比活性と全活性およびタンパク質量を Table 1. に示す.

3 回目の活性が最も高かった. 先行研究では, D-Alanine 添加 TAP 培地で培養を行ったものが最も活性が高かったが, 今回は L-Alanine 添加 TAP 培地で培養したものが最も活性が高かったため, さらなる検証が必要である.

Table 1. *C. reinhardtii* の活性測定

	全タンパク質量 (mg)	比活性 (nmol/min/mg)	全活性 (nmol/min)	
Control	1回目	3.45	0.74	2.55
	2回目	3.23	0.52	1.67
	3回目	3.45	3.79	10.54
D-Ala 添加	1回目	3.53	0.24	0.94
	2回目	3.19	0.63	2.01
	3回目	3.54	2.67	14.40
L-Ala 添加	1回目	3.52	0.23	0.81
	2回目	3.15	1.98	6.22
	3回目	3.53	4.08	13.07

#### 3-2 RNA 抽出

*C. reinhardtii* より Total RNA を抽出し, アガロースゲル電気泳動に供した結果を Figure 1. に示す.

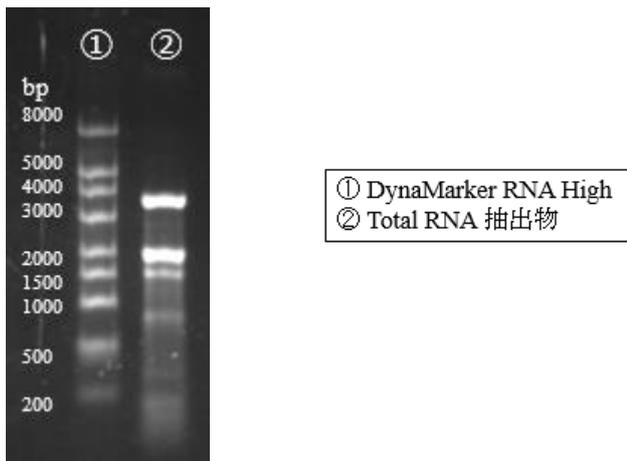


Figure 1. *C. reinhardtii* から抽出した Total RNA の電気泳動

RNA 抽出時に *C. reinhardtii* のアプライ量を 100 mg にして行ったところ, 過剰であったことが分かり, アプライ量を 50mg にした. 電気泳動の結果から, Total RNA の抽出の指標である 28S と 18S rRNA が抽出されていることが分かった.

#### 3-3 Cre03.g151500.t1.1 の PCR による増幅

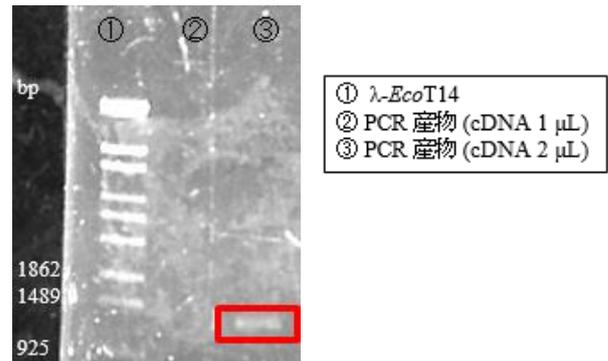


Figure 2. PCR 産物の電気泳動

cDNA を 2  $\mu$ L 供試した電気泳動において目的の 1244 bp 付近のバンドの増幅が確認された. 現在, シークエンスの解析中である.

#### 4.参考文献

- [1] 佐久田 綾, 2012 年度修士論文