

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来セリンラセマーゼの精製と性質Purification and characterization of serine racemase derived from a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*白井健太<sup>1</sup>, 安田悠<sup>1</sup>, 小池美弥<sup>2</sup>, 谷川実<sup>2</sup>, 西村克史<sup>2,3</sup>  
Kenta Shirai<sup>1</sup>, Yuu Yasuda<sup>1</sup>, Miya Koike<sup>2</sup>, Minoru Tanigawa<sup>2</sup>, Katsushi Nishimura<sup>2,3</sup>

Abstract: A unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) has served as a model system to study many fundamental biological processes. We demonstrated that some D-amino acids have no inhibitory effect on the growth of *C. reinhardtii* and the green alga has alanine racemase and D-threonine aldolase. A homologous gene of serine racemase of plants was found on the genome sequence of *C. reinhardtii*. In this study we report expression of serine racemase gene and enzymatic characterization in order to investigate the role of enzymes relevance to D-amino-acid-metabolism in *C. reinhardtii*.

## 1. 緒言

*Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) のゲノム配列上に植物のセリンラセマーゼと相同性が高い遺伝子 (*ser*) が見出された。イネ由来のセリンラセマーゼはセリンのラセミ化を触媒するセリンラセマーゼ活性の他、セリンをピルビン酸とアンモニアに分解するセリンデヒドラターゼ活性を有していることが報告されている。本研究では、*C. reinhardtii* 由来セリンラセマーゼの立体構造と酵素学的諸性質を解明することを目的とし、大量発現株の構築を行い、精製と性質決定を試みた。

## 2. 方法

## 2.1 生育に対するアミノ酸の影響

*C. reinhardtii* は TAP 培地を用いて、*Volvox carteri* (*V. carteri*) は SV 培地を用いて、それぞれの培地に 10 mM のアミノ酸を添加し培養 (25°C, 16 h (明) – 8 h (暗), 4 days) した。

2.2 *C. reinhardtii* のセリンデヒドラターゼ活性

*C. reinhardtii* を TAP 培地に 10 mM D-Ser または L-Ser を加えた培地を用いて培養した。培養後、集めた細胞を超音波破碎して得られた無細胞抽出液を透析し、セリンデヒドラターゼ活性を測定した。

2.3 *C. reinhardtii* の推定セリンラセマーゼ遺伝子の塩基配列

*C. reinhardtii* を TAP 培地を用いて 25°C で培養した。得られた *C. reinhardtii* 細胞から抽出した totalRNA を鋳型として、RT-PCR により推定セリンラセマーゼ遺伝子 (*ser*) を増幅した。これをプラスミド pUC18 に挿入し、大腸菌 JM109 に導入した。得られた形質転

換体からプラスミド (pUC18/*ser*) を抽出し、塩基配列を解析した。

## 2.4 セリンラセマーゼの大量発現株の構築

*C. reinhardtii* 由来推定セリンラセマーゼ遺伝子の配列情報を基に、コドン *E. coli* に対して最適化した遺伝子 (*ser*) を合成し、pET24b に組み込み大腸菌に導入した。

## 2.5 セリンラセマーゼの精製

カナマイシンを含む LB 培地を用いて組換え大腸菌 (pET24b/*ser*) を 37°C で培養し、IPTG を添加しタンパク質発現を誘導した。培養後、遠心分離によって集菌した。得られた菌体を Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) を含む Tris-HCl buffer (pH 8.0) に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離を行い無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を超遠心分離し、得られた可溶性画分を硫酸アンモニウム (硫安) 分画した。硫安画分を DEAE-Sephrose カラムクロマトグラフィーに供し、精製酵素画分を得た。

## 2.6 酵素活性

酵素サンプル、基質 (L-セリン)、Tris-HCl buffer (pH 8.0)、PLP を加えラセマーゼ反応 (30°C, 30 min) させた後、D-アミノ酸酸化酵素 (DAO)、ペルオキシターゼ発色試薬を添加し呈色 (室温, 10 min) させ Sodium borate buffer を加え反応停止後、492 nm の吸光度を測定することにより、セリンラセマーゼ活性を測定した。

セリンデヒドラターゼ活性は、酵素サンプル、PLP、Tris-HCl buffer (pH 8.0)、基質 (D-セリン、L-セリン) を加えセリンデヒドラターゼ反応 (30°C, 30 min) を行い、

1 : 日大理工・学部 2 : 日大理工・教員 3 : 日大短大・教員

次に 2, 4-Dinitrophenylhydrazine を添加し反応 (室温, 20 min) させた後, 水酸化ナトリウムと酒石酸ナトリウムカリウムの混合液を加え, 525 nm の吸光度を測定することによりセリンデヒドラターゼ活性を測定した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 生育に対するアミノ酸の影響

培地にアミノ酸を加えずに生育した Control と比べて培地中にセリンが存在するとき *C. reinhardtii* の生育は促進されたが, *V. carter* の生育は阻害された。(Table 1.) このことから緑藻は単細胞生物から多細胞生物に進化する過程でセリンに対する耐性が減少していることが分かった。

Table 1. Effect of Ser and Thr on the growth of algae

	<i>C. reinhardtii</i>	<i>V. carteri</i>
Control	+++	+++
10 mM D-Ser	++++	-
10 mM L-Ser	++++	++
10 mM D-Thr	++++	+++
10 mM L-Thr	++++	+++

#### 3.2 *C. reinhardtii* のセリンデヒドラターゼ活性

セリンを含む TAP 培地で培養した *C. reinhardtii* を用いてセリンデヒドラターゼ活性を測定したところ, 活性は検出されなかった。セリンを含む培地で培養した場合, 生育が阻害されなかったことから, 他の酵素で D-アミノ酸を代謝していることが示唆された。

#### 3.3 他の生物種由来セリンラセマーゼとの相同性

他の生物の持つセリンラセマーゼと相同性を比較したところ, fold-type II のセリンラセマーゼと高い配列相同性を示したため, 本酵素は fold-type II に属する PLP 依存性酵素であることが示唆された。

#### 3.4 精製及び分子量

SDS-PAGE より 精製酵素画分に単一バンドが確認された。このタンパク質バンドの分子量は約 37 kDa であった (Fig. 1.)。またゲル濾過カラムクロマトグラフィーの結果 2 個のピークが現れた (分子量は約 62.3 kDa, 35.7 kDa) (Fig. 2.)。

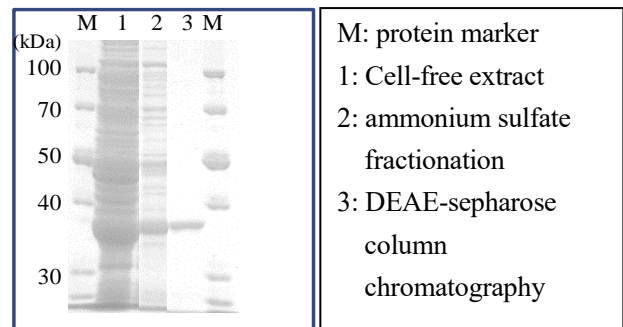


Fig. 1. SDS-PAGE

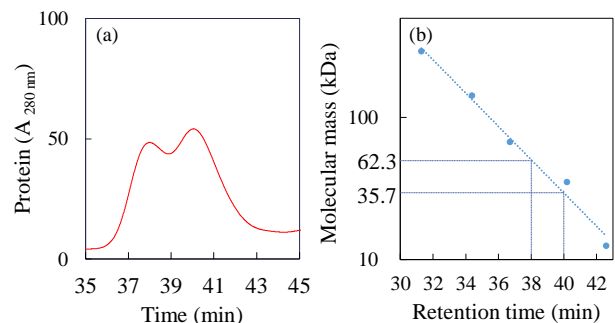


Fig. 2. Superose 12 column chromatography

(a) Chromatogram

(b) Calibration curve

#### 3.5 セリンラセマーゼの性質

最適 pH と最適温度を求めた結果, 最適 pH は 6.8 であり, 最適温度は 30°C であった (Fig. 3. 4.)。

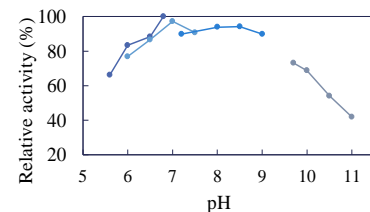


Fig. 3. Effect of pH on ser racemase activity.

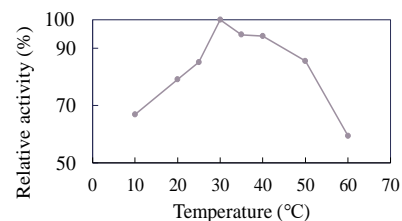


Fig. 4. Effect of temperature on ser racemase activity

### 4. 参考文献

- [1] 郷上佳孝, 伊藤克佳, 老川典夫, Trace Nutrients Research, No.24, pp110-112, 2007
- [2] 2015 年度卒業論文, 二重作和宏
- [3] 2017 年度卒業論文, 安田悠