

超長鎖脂肪酸合成阻害剤を用いた円石藻による Alkenone 合成経路の探索

渡邊 祐太 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 白岩 善博 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

円石藻 *Emiliania huxleyi* はハプト藻類に属する微細藻類で、円石と呼ばれる炭酸カルシウム結晶構造体を有する単細胞の植物プランクトンである。さらに、超長鎖の脂肪酸鎖を持つ多価不飽和ケトン (アルケノン) を産生することが知られている。これまでに *E. huxleyi* を含む 5 種のハプト藻 (*Chrysothila lamellosa*, *Emiliania huxleyi*, *Gephyrocapsa oceanica*, *Isochrysis galbana*, *Pseudoisochrysis paradoxa*) でのみ産生されることが知られ、有機地球化学ではバイオマーカー分子として古海洋温度復元に利用されている。アルケノンは C₃₇₋₃₉ といった非常に長い直鎖状の炭素鎖に trans 型の不飽和結合をもつ。さらに C₂₉-C₃₃ のアルケン分子も存在する。しかし、それら分子の合成系や細胞内の局在、生理学的役割に不明な点が多く、その解明が待たれている[1]。

先行研究ではアルケノンの超長鎖は、真核生物が普遍的に有する脂肪酸伸長経路を経て伸長されると予想されてきた[2][3]。しかし、代謝生化学的な手法によりこれを検証した報告はなく、本研究ではアルケノンの炭素鎖伸長過程の仕組みの解明を目的とした。

Alachlor は陸上植物における研究から、植物型超長鎖脂肪酸 CoA 縮合酵素(KCS)の阻害剤として機能することが報告されている[4]。そこでシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の KCS のアミノ酸配列を用いて相同性検索を行ったところ、円石藻 *E. huxleyi* も植物型 KCS を持つ可能性を得た (未発表)。そこで本研究では、Alachlor の阻害作用を利用して、植物型 KCS による超長鎖脂肪酸伸長経路がアルケノン合成と連結しているか否かについて解析した。

さらに、Alachlor がアルケノン・アルケンの蓄積器官と考えられる脂質体 (lipid body: LB) の形態に影響するか否かを、光学顕微鏡を用いた蛍光観察により行った。その際、アルケノン合成を阻害することが明らかとなっている脂肪酸合成酵素 (KAS) の阻害剤 Cerulenin [3] を比較のために用いた。

材料および方法

本研究ではハプト植物門円石藻 *Emiliania huxleyi* CCMP2090 株 (draft の塩基配列が公開され、Blast 検索が可能) を実験に用い、以下の方法で実験した。

(1) 培養: 増殖の飽和強度の連続光照射および 20°C で、静置培養もしくは通気培養を行った。(2) 脂質分析: GC/MS を用いて定量的に解析した。(3) 脂質体の観察: 細胞をナイルレッドで染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。

結果

(1) Alachlor が脂質蓄積量に与える影響

Alachlor 処理後 6 日目では、細胞増殖の抑制は細胞濁度変化で 20% 程度、クロロフィル濃度変化では約 40% であった。ただし、クロロフィル a/c 比には影響がなかった。さらに、アルケノ

ンとアルケンの蓄積量に Alachlor による影響は見られなかった。また、脂肪酸総量にも大きな差は見られなかった。炭素数 20 以上の超長鎖脂肪酸 (ドコサヘキサエン酸 DHA など) の量についても顕著な変化はなかった。

次に、0-20 μM Alachlor 処理において、12 日間にまで培養を長期化した結果、6 日目以降、濃度依存的な細胞増殖の阻害が観察された。またクロロフィル量も Alachlor 濃度依存的に減少していた。このとき、合成されるアルケノンや超長鎖アルケンの蓄積量や組成には大きな差はなかった。一方、Alachlor により C₁₄₀、C₁₈₀、C₁₈₄、C₁₈₅ 脂肪酸の量が減少していることが分かった。特に、C₁₈₄ や C₁₈₅ の多価不飽和脂肪酸の蓄積量の減少が大きく見られた。ただし、C₂₂₆ (DHA) 量の変化に大きな影響はなかった。

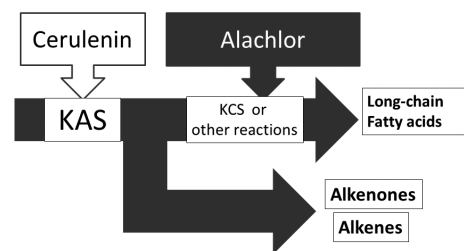
(2) Alachlor が LB の形態に与える影響

クロロフィルの自家蛍光は正常に見られ、細胞が死滅しなかった 0-40 μM Alachlor による処理細胞では、顕微鏡による形態観察の結果、LB の形状や大きさに顕著な変化は認められなかった。

考察

脂肪酸合成酵素の阻害剤を用いた実験から、Cerulenin は長鎖脂肪酸合成とアルケノン・アルケン合成のすべてを抑制し、Alachlor は長鎖脂肪酸合成と C18 脂肪酸の不飽和過程を抑制することを明らかにした。この結果から、アルケノン・アルケン合成は Alachlor 阻害部位の上流で分岐すると推測した (図)。

また、円石藻類における長鎖不飽和脂肪酸合成や不飽和化酵素群の Alachlor に対する応答の特性は、陸上植物のそれとは違いがある可能性も示唆された。脂質種ごとの構成脂肪酸種の更なる詳細な解析による全容解明が期待される。



参考文献

- [1] M. L. Eltgroth et al., *J. Phycol.*, 2005.
- [2] J. F. Rontani et al., *J. Phycol.*, 2006.
- [3] Y. Shiraiwa et al., *Recent Advances in Marine Science and Technology*, 2004.
- [4] S. Trenkamp et al., *PNAS*, 2004.