

オーランチオキトリウムのメバロン酸経路を律速する HMG-CoA レダクターゼの解析

藤原 直倫 (筑波大学 生物学類)

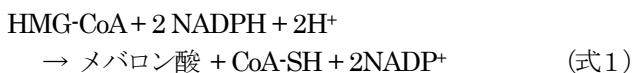
指導教員：鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

[背景・目的]

Aurantiochytrium は従属栄養性の卵菌類であり、ラビンラチュラ類に属している。中でも 18W-13a 株は炭化水素 (スクワレン) の含有量が高く、細胞の全脂質中の約 70% がスクワレンである[1]。スクワレンは、抗炎症性・免疫亢進性など様々な効果を有し、化粧品やワクチンの基材など多様な用途がある。従来深海ザメの肝油がその供給源とされてきたが、近年深海ザメの絶滅が危惧されており、この代替源として *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株が注目されている。また、スクワレンは炭化水素系のバイオ燃料としても利用可能であることから、効率的な生産系の構築が期待されている。

先行研究により、*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株のスクワレン生産性は、最適な通気量を供給して培養することが重要であることが知られている。

スクワレンはステロールの中間代謝産物であり、*Aurantiochytrium* においてはメバロン酸経路を経て合成されることが知られている。他の多くの生物同様、ステロール合成の律速段階はメバロン酸経路における、メバロン酸を合成する酵素 HMG-CoA レダクターゼ (HMGR; 式 1) の反応であると考え、培養における通気量と HMGR の酵素活性の関連を解析することにした。



[材料と方法]

・【培養条件】*Aurantiochytrium* sp. 18W-13a 株を用い、GTY 培地 (2% グルコース、1% Bacto Tryptone、0.5% Bacto Yeast Extract、50% 人工海水) で培養した。前培養は 500 mL の坂口フラスコに GTY 培地を 300 mL 入れ、25°C、100 rpm、72 時間の振盪培養を行った。本培養は 500 mL の三角フラスコに GTY 培地を 200 mL、300 mL、400 mL を入れ、72 時間目の細胞を 0.1% の濃度になるように添加した。

・【細胞抽出液の調整】培養開始から 48 時間後、72 時間後、96 時間後の時点で 20 mL の培養液を採取した。細胞を遠心分離 (1,500 × g、5 分、4°C) により回収し、抽出液 (0.1 M リン酸バッファー、1 mM DTT、1 mM EDTA、10% (w/w) グリセロール) で一度リンスを行い、4 mL の抽出液を加えた後、超音波ホモジナイザーで 10 分間破碎し、遠心分離 (15,000 × g、15 分、4°C) で粗抽出液を回収した。さらに、上清 3 mL を超遠心 (100,000 × g、60 分、4°C) を行い、可溶性画分と膜画分を回収した。

・【酵素活性の測定】石英キュベットに 100 μL の細胞抽出液と 800 μL の反応液 [180 mM リン酸バッファー (pH 7.0)、0.03 mM DTT、0.03 mM NADPH] を加え、約 3 分後に 100 μL の基質である HMG-CoA (0.3 mM) を加え反応を開始させ、340 nm の吸光度の変化を測定した。さらに、細胞抽出液のタンパク質濃度

の測定は、Bradford 法にて BSA を標品に用いて行った。

・【阻害剤の効果の検定】HMGR の阻害剤としてコンパクチンの濃度を変えて反応液に添加し、コンパクチン無添加と比較して酵素活性に及ぼす影響を調べた。

[結果・考察]

可溶性画分と膜画分の酵素活性を測定したところ、可溶性画分にはのみ活性が見られた。ヒトを含む多くの種で報告されている HMGR のほとんどは小胞体 (ER) 膜画分に局在している[2]。しかし、本研究により可溶性画分においてのみ活性が見られたことは、*Aurantiochytrium* の HMGR のユニークな特徴であった。

Aurantiochytrium の HMGR の粗抽出液における比活性は、4~10 nmol/min/mg protein であった。この値は、ハトの肝細胞やゴールデンハムスターの肝細胞の 0.047 nmol/min/mg protein [3] や 0.037 nmol/min/mg protein [4] と比較して、およそ 100 倍高かった。この高い比活性が *Aurantiochytrium* における多量のスクワレン蓄積に関与しているものと思われた。

また、今回検出した活性が HMGR によるものであることを示す 1 つの傍証として、HMGR の阻害剤であるコンパクチンを 130 μM 添加すると活性が阻害されることを見出した。

Pseudomonas などある種の生物では HMGR は、NADPH ではなく NADH を基質に用いることが知られているが[5]、*Aurantiochytrium* の HMGR は NADPH のみを利用することがわかった。

[今後の展望]

一般に HMGR は膜タンパク質として知られており、超遠心で細胞破碎液を回収した際に、膜画分の方に活性が見られる[2]。しかし、*Aurantiochytrium* においては、可溶性画分に酵素活性がみられ、他の多くの種とは異なり、可溶性である可能性が示唆された。今後は、*Aurantiochytrium* の mRNA から、逆転写酵素を用いて cDNA を作り、他の HMGR とは異なり N 末端側に膜貫通ドメインが無いことを示し、cDNA を大腸菌または酵母細胞に発現させ、可溶性画分に活性があることを確認するつもりである。また、通気量と HMGR 活性の変化についても詳細に解析を行いたい。

[参考文献]

- [1]. Kaya et al. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 2246-2248
- [2]. Friesen et al. (2004) *Genome Biol.* 5: 248.1-248.5
- [3]. Kenneth et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 11478-11483
- [4]. Takahashi et al. (1998) *J. Bacteriol.* 184: 1256-1263
- [5]. Kenneth et al. (1997) *Biochem. Mol. Med.* 61: 114-120