

# Candida albicans 由来のオキシドスクアレン-ラノステロール環化酵素の大腸菌における発現について

佐藤 努<sup>1\*</sup>・星野 力<sup>1</sup>

(平成15年12月24日受付)

**要約** 古くから、オキシドスクアレン-ラノステロール環化酵素 (OLC) の研究が成されてきているが、酵素アミノ酸残基レベルでの触媒機構については不明な点が数多く残されたままである。その解明には、異種細胞での高発現系の構築が必須であり、当面の課題となってきた。我々は、大腸菌における *Candida albicans* 由来 OLC の高発現系の構築を目的として実験を行った。まず、天然型の OLC を大腸菌で発現させた。しかし、不溶性であり、酵素活性も検出できなかった。次に、他の酵素の研究における可溶性の成功例やスクアレン-ホペン環化酵素の研究を通して得た知見を参考にして、Trx または Dsb 融合型、N 末端削除型、QW モチーフ改変型の合計 9 種類の OLC を大腸菌で発現させた。しかし、不溶性のままであり、酵素活性も検出できなかった。様々な方法によって OLC を大腸菌で発現させたにも関わらず、不溶性の問題を解決できなかったことから、OLC の発現宿主には酵母や昆虫細胞などの真核生物を利用する必要があることが示唆された。

## 緒 言

真核生物である真菌類や動物に存在するオキシドスクアレン-ラノステロール環化酵素 (OLC) [EC 5.4.99.7] は、(3S)-2,3-オキシドスクアレン 1 のラノステロール 2 への変換反応を触媒する (Scheme 1)。その反応は、一連のカルボカチオン中間体を経由した他段階反応・熱力学的に不利なアンチマルコフニコフ付加反応・厳密な一連のヒドリドとメチル基の転位反応が達成されており (Scheme 1)、現在知られている単一酵素による生合成反応として最も複雑なものの一つである<sup>1-3)</sup>。それ故、古くから 7 人のノーベル賞受賞者を含む数多くの有機化学者によって環化反応機構に洞察が加えられてきた<sup>1-3)</sup>。

我々は、既に一部の細菌 (原核生物) に存在する OLC の類縁酵素であるスクアレン-ホペン環化酵素 (SHC) (Scheme 1) の大腸菌における大量発現系を構築しており<sup>4)</sup>、基質と酵素アミノ酸残基との微細な相互作用を含めた詳細な触媒機構を解明してきている<sup>1)</sup>。OLC と SHC のタンパク質一次構造は、互いに約 30% の相同性があり、QW モチーフと呼ばれる特徴的な繰り返しの部分配列 [(K/R)(G/A)<sub>2-3</sub>(F/Y/W)(L/I/V)<sub>3</sub>QX<sub>2-3</sub>GxW] を持っている (Fig. 1)。グラム陽性細菌の SHC で 8 個、グラム陰性細菌の SHC で 7 個 (QW5b が欠如) が高度に保存されている (Fig. 1)。一方、OLC において QW5b は存在せず、QW4 と QW5a の保存性が低い (Fig. 1)。以前、QW モチーフは活性部位ではないかと提案されていたが、我々は部位特異的変異法によって全ての QW モチーフは活性部位ではないことを明らかにしている<sup>5)</sup>。それに加え、OLC において保存性が低い QW4 と QW5a のトリプトファン残基 (W) が熱に対するタンパク質構造の維持に非常に重要な役割を担っていることを見出している<sup>5)</sup>。また、OLC は SHC と比較して N 末端領域においてアミノ酸残基が 55 個長いことが特徴である [Fig. 1-(B)]。

現在、OLC については高発現系の構築が当面の課題となっており、触媒機構については不明な点が数多く残されたままである。今回、真菌類である *C. albicans* 由来 OLC の大腸菌における高発現系を構築することを目的として合計 10 種類のプラスミドを作製し、酵素の可溶性の増加と酵素活性の保持を検討した。

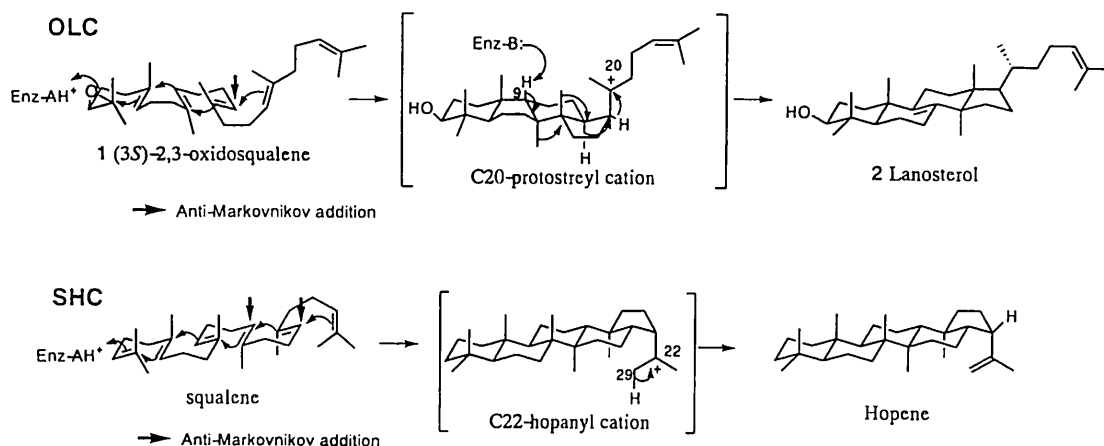
## 材料および方法

### 1. OLC の大腸菌発現プラスミドの構築

方法の概略を Fig. 2 に示した。*C. albicans* 由来の *olc* 遺伝子は、Texas A & M 大学の C.A. Roessner と A.I.

<sup>1</sup>新潟大学農学部

\*代表著者: Satot@agr.niigata-u.ac.jp



Scheme 1 オキシドスクアレンーラノステロール環化酵素 (OLC) およびスクアレンーホペン環化酵素 (SHC) が触媒する反応機構

OLC : (3S)-2,3-オキシドスクアレン 1 を *pre-chair-boat-chair* 型のコンフォメーションに折り畳み、エポキシ基のプロトン付加によって反応を開始し、一連のカルボカチオン中間体を経由した環化反応が進行し、C20-プロトステリルカチオン中間体における一連のヒドリドとメチル基の転位反応と C9 位での脱プロトン化によってラノステロール 2 を形成する。

SHC : スクアレンを all *pre-chair* 型のコンフォメーションに折り畳み、末端二重結合のプロトン付加によって反応を開始し、一連のカルボカチオン中間体を経由した環化反応が進行し、C22-ホパニルカチオン中間体における C29 位での脱プロトン化によってホペンを生成する。

(A)

<b>QW1</b>	OLC 672 RGIQFLMKRQLPTGEW 687	<b>QW5a</b>	OLC 410 KSYLFLVRSQFTENC 427
	SHC-P 576 RGVQYLVEVETQRPDGGW 591		SHC-P 335 KAGEWLLDRQI-TVPGDW 351
	SHC-N 595 KGINWLAQNQDEEGLW 610		SHC-N 350 SALSWLKPOQILDVKGDW 367
<b>QW2</b>	OLC 614 KGCDFLISKQLPDGGW 629	<b>QW5b</b>	OLC -
	SHC-P 518 KALDHWVQHQNPDPGGW 533		SHC-P 243 RALDNLRLERQAGDGSW 258
	SHC-N 536 KAVAWLKTIQNEDGGW 551		SHC-N -
<b>QW3</b>	OLC 562 SAIQYILDSQDNIDGSW 577	<b>QW5c</b>	OLC 126 EMIRYIVNTAHPVDGGW 141
	SHC-P 470 RAVEYLKREQKP-DGSW 485		SHC-P 63 KIRRYLLHEQRE-DGTW 78
	SHC-N 488 AAVDYLLKEQEE-DGSW 503		SHC-N 59 KIGRYLRRRIQGE-HGGW 74
<b>QW4</b>	OLC 482 DAVEYLLQIQNV-GEW 496	<b>QW6</b>	OLC 79 KGADFLKLLQLDNGIF 84
	SHC-P 402 KGRFWLVGMSSNGGW 417		SHC-P 17 RAVEYLLSCQKDEGYW 32
	SHC-N 420 RAMEWTIGMQSDNGGW 435		SHC-N 24 KATRALLEKQQQDGHW 29

(B)

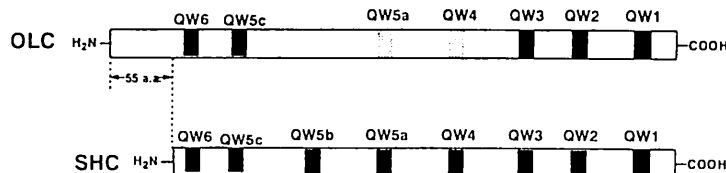


Fig. 1 OLC と SHC のタンパク質一次構造の比較

(A) QW モチーフ [(K/R)(G/A)<sub>X2-3</sub>(F/Y/W)(L/I/V)<sub>X3</sub>QX<sub>2-5</sub>GxW] の比較。 *C. albicans* 由来の OLC、グラム陽性細菌である *Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来の SHC (SHC-P) としてグラム陰性細菌である *Zymomonas mobilis* 由来の SHC (SHC-N) が示されている。黒の網掛けで白抜きの文字は、本研究で OLC の QW モチーフを改変するためにターゲットにしたアミノ酸残基である。

(B) OLC と SHC のタンパク質一次構造の概略図。OLC の N 末端は SHC と比較して、アミノ酸残基が 55 個長いことが描かれている。また、QW モチーフの相対的な位置も示されている。

Scott のグループによってクローニングされているプラスミド pML19<sup>6)</sup> を鋳型にして、PCR によって増幅した。プライマーは、pET-3a 挿入用に *Nde* I 部位を付加した S1 と *Bam* HI 部位を付加した A1、pET-32b および pET-39b 用に *Bam* HI 部位を付加した S2 と *Xho* I 部位を付加した A2 を用いた。配列を以下に示す (下線は挿入した制限酵素部位) :

S1, 5' -CATTGACATATGTATTATTTCAGCGGAAATTGG-3'  
 A1, 5' -CATGCACGGATCCTTAAACTAACACTTTATCACC-3'  
 S2, 5' -GGAACAGGATCCAATGTATTATTTCAGAGGAAATTGG-3'  
 A2, 5' -CATGCACCTCGAGTTAAACTAACACTTTATCACC-3'.

反応液の組成は以下のものである : 100 ng pML19, 0.5 μM センスプライマー, 0.5 μM アンチセンスプライマー, 200 μM dNTPs, 2.5 U *Pfu* DNA polymerase (STRATAGENE 社製)。反応条件は以下のものである : 98°C で 3 分後、95°C で 1 分と 60°C で 1 分と 72°C で 4 分を 30 サイクル、そして 72°C で 10 分。3 種類の PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動によって確認したが、全てはほぼシングルバンドであった。Fig. 2 に示したように、PCR 産物を制限酵素 (*Nde* I - *Bam* HI または *Bam* HI - *Xho* I) によって切断後、ライゲーション反応 (TAKARA 社製 DNA Ligation Kit Ver. 2) によって pET-3a (Novagen 社製)、pET-32b (Novagen 社製) および pET-39b (Novagen 社製) に挿入した。それぞれのプラスミドを pETOLC1, pETOLC2 および pETOLC3 と名付けた。*olc* の配列は、DNA シーケンサー (LI-COR 社製 LIC-4000) によって確認した。pETOLC1 と pETOLC3 は大腸菌 BL21 (DE3) へ pETOLC2 は AD494 (DE3) へエレクトロポレーション法 (BIO-RAD 社製 *E. coli* Pulser) によって導入した。

## 2. 55個の N 末端アミノ酸残基を削除した OLC の大腸菌発現プラスミドの構築

55 個の N 末端アミノ酸残基を削除した *C. albicans* 由来 OLC の大腸菌発現プラスミドは、PCR を利用した方法によって行った (Fig. 2)。アンチセンスプライマーは A1 を使い、センスプライマーは以下に示すものを用いた (下線は挿入した制限酵素部位、太字は新たに挿入された開始コドン) :

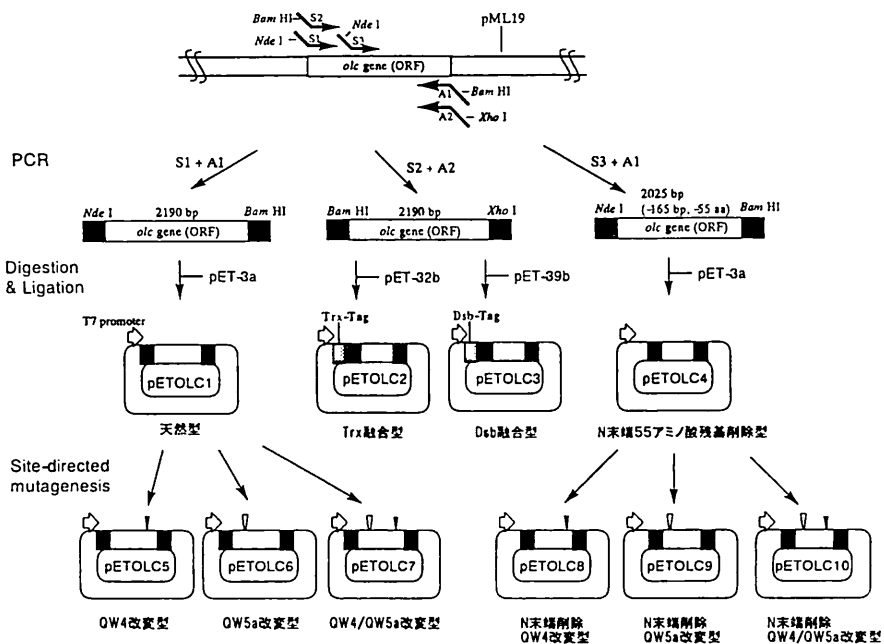


Fig. 2 OLC 発現プラスミドの構築のストラテジー

PCR または部位特異的変異法によって pETOLC1 ~ pETOLC10 の 10 種類のプラスミドを構築した。pETOLC1 ~ pETOLC10 上にある白抜き矢印は、T7 プロモーターを意味する。PETOLC5 ~ pETOLC10 上の ▼ と ▽ は、それぞれ QW4 と QW5a の改変を示している。方法の詳細は「材料と方法」に記述した。

S3, 5'-CCAGATCATATGCTCTCCGCCATCGTCAGATATTC-3'

その他の操作は「材料と方法 2」と同様に行った。得たプラスミドを pETOLC4 と名付けた。pETOLC4 は大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。

### 3. QW モチーフ 4 と 5a を SHC 型に改変した OLC の大腸菌発現プラスミドの構築

QW4 の SHC 型への改変 (V486W) と QW5a の SHC 型への改変 (V425G/G427W) は、Unique Site Elimination Kit (Pharmacia 社製) を用いた部位特異的変異法によって行った (Fig. 2)。使用したプライマーの配列を以下に示す：

V486W, 5'-pd[GATGCTGTTGAAATGGTTGCTGCAGATTCAAATGTG]-3' (*Pst* I)

V425G/G427W, 5'-pd[CAATTTACAGAGAATTCTGGCGATTGGAGTTTCAGAG]-3' (*Eco* RI)

太字は変えた塩基、斜体はターゲットにしたコドン、下線は容易にスクリーニングするためにサイレント変異を入れた制限酵素部位 (V486W : *Pst* I, V425G/G427W : *Eco* RI) を意味している。QW4 と QW5a 両者の SHC 型への改変 (V425G/G427W/V486W) は、2つのプライマーを反応系に加えることによって行った。詳細な操作法は省略するが、Kit のプロトコールに従った。pETOLC1 を鋳型にして作製した QW4 改変型、QW5a 改変型そして QW4/QW5a 改変型をそれぞれ pETOLC5, pETOLC6 および pETOLC7 と名付けた (Fig. 2)。また、pETOLC4 を鋳型にして作製した N 末端削除 QW4 改変型、N 末端削除 QW5a 改変型そして N 末端削除 QW4/QW5a 改変型、をそれぞれ pETOLC8, pETOLC9 および pETOLC10 と名付けた (Fig. 2)。全てのプラスミドは、個々に大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。

### 4. 大腸菌における OLC の発現および無細胞抽出液の作製

20%グリセロール凍結保存菌 (10  $\mu$ l) を 50 mg/L のアンピシリンを含む LB 培地 (1% ポリペプトン, 0.5% 酵母エキス, 0.5% NaCl) (100 ml) に植菌し、OD<sub>600</sub> が約 0.5 になるまで 37°C で振とう培養した。最終濃度 0.1 mM になるように IPTG を加え、15°C, 20°C, 25°C, 30°C または 37°C で 3 時間インキュベーションした。遠心分離 (6000 rpm, 10分, 4°C) によって集菌し、0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.4) で 2 回洗浄後、緩衝液 [0.2% Triton X-100, 20% グリセロール, 3 mM DTT, 1 mM EDTA および 10 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 0.1M リン酸カリウム (pH 6.4)] (10 ml) に懸濁した。超音波破砕処理 (10秒 × 8回, 4°C) によって溶菌し、遠心分離 (12000 rpm, 15分, 4°C) した。上清を可溶性画分 (無細胞抽出液)、沈殿物を不溶性画分とした。

### 5. 大腸菌において発現した OLC の酵素活性検定

無細胞抽出液 (4 ml) に 1 (0.5 mg) と Triton X-100 (10 mg) を加え、20°C で 16 時間インキュベーションした。15% メタノール性 KOH (6 ml) を加えてケン化処理 (80°C で 30分) した後、*n*-ヘキサン (4 ml) で 3 回抽出した。抽出物を GC によって分析した。GC 分析は、DB-1 キャピラリーカラム (0.53 mm × 30 m, J & W 社製) を用いて Shimadzu 社製 GC-8A によって以下の条件で行った：インジェクション温度 290°C, カラム温度 270°C, N<sub>2</sub> キャリアーガス 1.0 kg/cm<sup>2</sup>。

## 結果と考察

### 1. 大腸菌において発現した天然型 OLC の可溶性と酵素活性

PCR によって増幅した *olc* 遺伝子を pET-3a に挿入した pETOLC1 を大腸菌 BL21(DE3) に導入し、OLC を発現させた (Fig. 2)。SDS-PAGE 解析において OLC は高い発現量であることを確認できた (Fig. 3)。しかし、OLC の大部分は不溶性画分であり、可溶性画分には殆どなかった。可溶性を増加させるため、IPTG によって OLC を発現誘導させる時の温度を 15, 20, 25, 30, または 37°C に変えてみたが、可溶化状態に変化はなかった。SDS-PAGE 上で可溶性画分のバンドとして OLC を確認できなかったが (Fig. 3)、一部可溶化している可能性もあると考え、酵素活性を調べた。Fig. 4 に示したように、GC 分析において基質 1 と Triton X-100 のピークのみが確認でき、生成物 2 のピークは検出できなかった。大腸菌におけるタンパク質の発現は、酵母や昆虫細胞などの他の生物種宿主に比べ、発現量が多く、また扱いやすいことから遺伝子操作の宿主として最も一般的に使用されてきている。その一方で、真核生物由来のタンパク質は、原核生物である大腸菌で発現させると不溶性となる例が数多く報告されてきている。その理由としては、アセチル化、リン酸化、糖鎖付加、イソプレニル化などの翻訳後修飾の欠如やタンパク質を正常にフォールディングさせるためのシャペロンの欠如が考えら

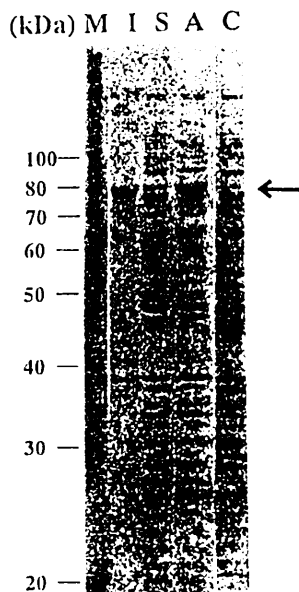
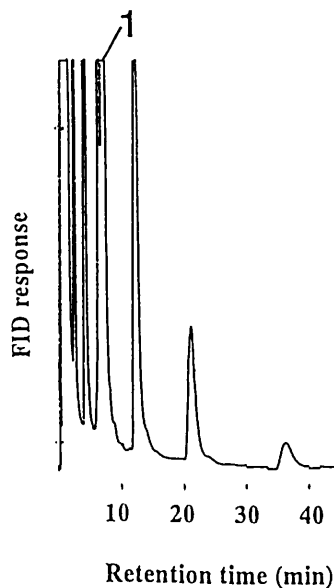


Fig. 3 大腸菌で発現した OLC の SDS-PAGE 解析

代表して pETOLC1 を導入した大腸菌 BL21(DE3) の試料を示した。左のレーンから分子量マーカー (M)、不溶性画分 (I)、可溶性画分 (S)、大腸菌全タンパク質 (A) そしてコントロールとして pET-3a を導入した (*olc* 遺伝子を導入していない) 大腸菌 BL21(DE3) の全タンパク質 (C) が示されている。矢印の位置が OLC (77,132 Da) である。pETOLC2 ~ pETOLC10 の試料も類似の結果であった。

Fig. 4 大腸菌で発現した OLC の酵素活性の GC による分析

pETOLC1 を導入した大腸菌の無細胞抽出液 (4 ml) に 1 (0.5 mg) と Triton X-100 (10 mg) を加え、20°C で 16 時間インキュベーションした後、*n*-ヘキサン抽出物を GC によって分析した。基質の (3S)-2,3-オキシドスクアレン 1 以外のピークは Triton X-100 のピークであり、生成物のラノステロール 2 のピークは確認できなかった。Authentic 試料の 2 の保持時間は、15.06 分であった。pETOLC2 ~ pETOLC10 の試料も同様な結果であった。



れてきている。我々は、可溶化の成功例が報告されている<sup>7a)</sup> 融合型 OLC の発現や他のステロール生合成酵素で成功例が報告されている<sup>9,10)</sup> N 末端削除型 OLC の発現そして SHC の研究を通して得た知見に基づいた QW モチーフ改変型 OLC の発現を試みたので以下に述べる。

## 2. 大腸菌において発現した Trx または Dsb 融合型 OLC の可溶性と酵素活性

大腸菌における単独発現で不溶性となるタンパク質を Trx (チオレドキシシン) または Dsb との融合タンパク質として発現させると可溶性となるのが、他のタンパク質の研究で報告されてきている<sup>7a)</sup>。Trx と Dsb はそれぞれ cytoplasm 表層とペリプラズム内に存在し、両者ともジスルフィド結合を促すタンパク質である。Fig. 2 に示したストラテジーで得た pETOLC2 と pETOLC3 を大腸菌で発現させた後、SDS-PAGE 解析した。その結果、高発現量を確認できたが、不溶性のままであった (Fig. 3 と類似結果)。また、酵素活性も検出できなかった (Fig. 4 と類似結果)。さらに、IPTG による OLC 発現誘導温度を 15, 20, 25, 30, または 37°C に変えてみたが、可溶化状態に変化はなかった。*C. albicans* 由来 OLC は、Trx または Dsb との融合発現でも可溶性は増加しないことが解った。

## 3. 大腸菌において発現した N 末端削除型 OLC の可溶性と酵素活性

ステロール生合成経路において OLC のすぐ上流に位置するスクアレン合成酵素やスクアレンエポキシダーゼは、N 末端領域を削除させると大腸菌における可溶性が増加することが報告されている<sup>9,10)</sup>。その理由は定かではないが、膜結合ドメインが可溶化を阻害していると考えられている。Fig. 1-(B) に示したように、OLC と SHC の一次構造を比較すると N 末端側でアミノ酸が 55 個長い。SHC は大腸菌における発現で可溶性であることから、OLC の N 末端を SHC と同じ長さまで削除 (55 個削除) させれば可溶性が増加するのではないかと考え、

Fig. 2 に示したストラテジーで pETOLC4 を構築した。しかし、Fig. 3 と 4 に示した結果と同様であり、可溶性は増加せず、酵素活性も検出できなかった。また、IPTG による OLC 発現誘導温度を 15, 20, 25, 30, または 37°C に変えてみたが、可溶化状態に変化はなかった。*C. albicans* 由来 OLC は、スクアレン合成酵素やスクアレンエポキシダーゼのように N 末端を削除させても可溶性は増加しないことが解った。

#### 4. 大腸菌において発現した QW モチーフ改変型 OLC の可溶性と酵素活性

我々は、SHC に高く保存されている QW4 と QW5a のトリプトファン残基 (W) がタンパク質構造の維持に極めて重要な役割を担っていることを明らかにしている<sup>5)</sup>。Fig. 1-(A) に示したように、*C. albicans* 由来 OLC の QW4 と QW5a において W が他のアミノ酸残基に置き換わっている (486 番目のアミノ酸残基は V、427 番目のアミノ酸残基は G)。また、QW5a の V425 も QW モチーフの共通配列の G と異なる。したがって、QW4 と QW5a を SHC と類似の配列 (それぞれ V486W と V425G/G427W) に改変すれば、酵素の正常なフォールディング形成が促され、可溶性も増加するのではないかと考え、実験を行った。Fig. 2 に示したように、鑄型として pETOLC1 を用い、部位特異的変異法によって pETOLC5 (QW4 改変型)、pETOLC6 (QW5a 改変型) および pETOLC7 (QW4/QW5a 改変型) を得た。また、pETOLC4 (N 末端削除型) の鑄型からも QW モチーフ改変型を作製し、pETOLC8 (N 末端削除 QW4 改変型)、pETOLC9 (N 末端削除 QW5a 改変型) および pETOLC10 (N 末端削除 QW4/QW5a 改変型) を構築した。しかし、Fig. 3 と 4 に示した結果と同様であり、可溶性は増加せず、酵素活性も検出できなかった。また、IPTG による OLC 発現誘導温度を 15, 20, 25, 30, または 37°C に変えてみたが、可溶化状態に変化はなかった。*C. albicans* 由来 OLC は、QW モチーフを SHC 型に改変しても可溶性は増加しないことが解った。結果として、OLC の一次構造を SHC に近づけることを試みたが成功しなかった。

### ま と め

酵素アミノ酸残基レベルでの SHC の触媒機構の解明は、大腸菌における大量発現系の構築<sup>4)</sup>を契機に、X-線結晶構造解析<sup>10)</sup> や部位特異的変異法による機能解析<sup>11)</sup> によって飛躍的に進んできている。したがって、OLC も大腸菌における大量発現系を構築できれば、その後の研究の進展を多に期待できる。しかし、様々な方法によって OLC を発現させたにも関わらず、不溶性の問題を解決できなかった。その理由は定かではないが、酵素活性を持つ可溶性の OLC を発現させるには、翻訳後修飾や他のタンパク質との相互作用など大腸菌 (原核生物) に欠如している真核生物特有の必須なファクターがあるのかもしれない。結論として、OLC の発現宿主には、酵母や昆虫細胞などの真核生物を利用する必要があることが示唆された。

### 謝 辞

*C. albicans* 由来の *olc* 遺伝子を提供して頂いた Texas A & M 大学の C.A. Roessner 博士と A.I. Scott 教授に感謝致します。本研究の一部は新潟大学プロジェクト推進経費 (若手研究者奨励研究) および科学研究費補助金若手研究 (B) (No. 15780083) の助成によって行われた。

### 引用文献

- 1) Hoshino, T. and Sato, T. Squalene-hopene cyclase: catalytic mechanism and substrate recognition (Feature Article), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 291-301 (2002).
- 2) Wendt, K.U., Schulz, G.E., Corey, E.J., and Liu, D.R., Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 2812-2833 (2000).
- 3) Abe, I., Rohmer, M., and Prestwich, G.D., Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.*, **93**, 2189-2206 (1993).
- 4) Sato, T., Kanai, Y., and Hoshino, T., Overexpression of squalene-hopene cyclase by the pET vector in *Escherichia coli* and first identification of tryptophan and aspartic acid residues inside the QW motif as active sites. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 407-411 (1998).
- 5) Sato, T., and Hoshino, T., Kinetic studies on the function of all the conserved tryptophans involved inside and outside the QW motifs of squalene-hopene cyclase: stabilizing effect of the protein structure against

- thermal denaturation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1171-1180 (1999).
- 6) Roessner, C.A., Min, C., Hardin, S.H., Harris-Haller, L.W., McCollum, J.C., and Scott, A.I., Sequence of the *Candida albicans* *erg7* gene. *Gene*, **127**, 149-150 (1993).
  - 7) LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., and McCoy, J.M., A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*, **11**, 187-193 (1993).
  - 8) Missiakas, D., Georgopoulos, C., and Raina, S., The *Escherichia coli* *dsbC* (*xprA*) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.*, **13**, 2013-2020 (1994).
  - 9) Shechter, I., Klinger, E., Rucker, M.L., Engstrom, R.G., Spirito, J.A., Islam, M.A., Boettcher, B.R., Weinstein, D.B., Solubilization, purification, and characterization of a truncated form of rat hepatic squalene synthetase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8628-8635 (1992).
  - 10) Nagumo, A., Kamei, T., Sakakibara, J., and Ono, T., Purification and characterization of recombinant squalene epoxidase. *J Lipid Res.*, **36**, 1489-1497 (1995).
  - 11) Wendt, K.U., Poralla, K., and Schulz, G.E., Structure and function of a squalene cyclase. *Science*, **277**, 1811-1815 (1997).

## On the Expression of Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase from *Candida albicans* in *Escherichia coli*

Tsutomu SATO<sup>1\*</sup> and Tsutomu HOSHINO<sup>1</sup>

(Received Dec. 24, 2003)

### summary

In order to investigate the catalytic mechanism of oxidosqualene-lanosterol cyclase (OLC), we have tried to construct the overexpression system of OLC from *C. albicans* in *E. coli*. First, a natural type of OLC was expressed in *E. coli*. However, it was insoluble in *E. coli* cell and had no enzymatic activity. Therefore, nine kind of altered OLCs were constructed on the basis of successful methods for other enzymes to increase the solubility or the suggestion from our experimental results for the squalene-hopene cyclase: a fused OLC with Trx or Dsb, a OLC deleted N-terminal domain and mutant OLCs having squalene-hopene cyclase types of QW motif. However, all types of OLC were insoluble and had no enzymatic activity. These results suggested that the expression host of OLC must be eucaryotic cells such as yeast and insect.

---

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Niigata University

\* Corresponding author : satot@agr.niigata-u.ac.jp