

# オキシドスクアレン-ラノステロール環化酵素欠損型の酵母変異株の取得

佐藤 努<sup>1\*</sup>・星野 力<sup>1</sup>

(平成15年12月24日受付)

**要約** 我々はオキシドスクアレン-ラノステロール環化酵素 (OLC) の触媒機構を解明するため、酵母の発現系を構築することを計画した。しかし、野生型の酵母は自身の OLC を持っていることから、そのまま発現宿主として用いることはできない。したがって、OLC 欠損型の酵母変異株を取得することを目的に実験を行った。酵母 OLC 欠損型二倍体から孢子形成を経て一倍体を分離した。得られた株 (3-5-1) について、抗生物質に対する抵抗性の調査や脂質成分の分析そして OLC の酵素活性の検定を行った。全ての結果は、3-5-1 株が OLC 欠損型一倍体であることを示唆していた。今後、3-5-1 株は外来 OLC の発現宿主として利用できると考えられる。

## 緒 言

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)<sup>1-3)</sup>。OLC は細胞膜の必須成分である真菌類のエルゴステロール 3 や動物のコレステロール 4 の生合成経路において環状骨格を形成する鍵段階を担っている (Scheme 1)<sup>4)</sup>。それ故、華麗な環化反応機構の解明の研究だけでなく、抗真菌剤やコレステロール低下剤などの薬剤開発のターゲットとしても多くの研究が行われてきている<sup>1,4)</sup>。

我々は OLC の触媒機構を解明するため、OLC の異種細胞での発現系を構築することを目指した研究を行ってきている。前報に報告したように、大腸菌における OLC の発現は不溶化してしまい、真核生物を発現宿主として利用する必要があることが示唆された。したがって、大腸菌に次いで一般的に使用されてきている酵母の発現系を構築することを計画した。しかし、酵母は自身の OLC を持っていることから、そのまま発現宿主として用いることはできない。したがって、今回、OLC 欠損型の酵母変異株を取得することを目的に実験を行った。

## 材料および方法

### 1. 機器分析

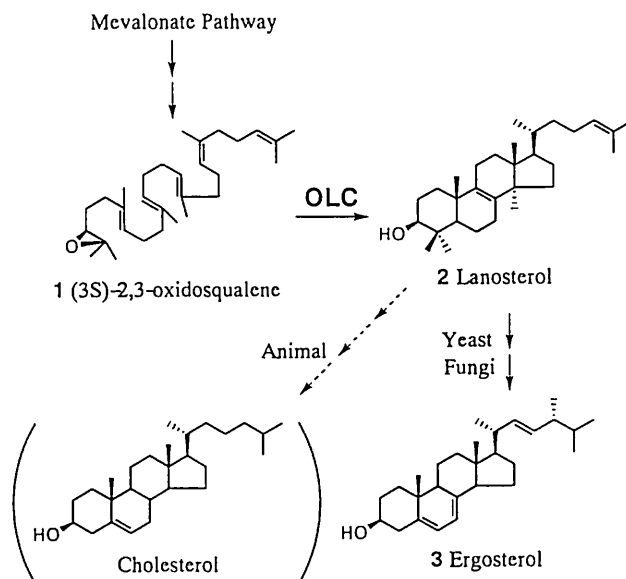
GC 分析は、DB-1 キャピラリーカラム (0.53 mm×30 m, J & W 社製) を用いて Shimadzu 社製 GC-8A によって以下の条件で行った：インジェクション温度 290°C, カラム温度 270°C, N<sub>2</sub> キャリアーガス 1.0 kg/cm<sup>2</sup>。GC-MS 分析は、DB-1 キャピラリーカラム (0.32 mm×30 m, J & W 社製) を用いて SX 102 (JEOL 社製) によって以下の条件で行った：インジェクション温度 290°C, カラム温度 270°C, He キャリアーガス 20.0 ml/min。

### 2. 酵母 OLC 欠損型二倍体株 BY4743-YHR072W から一倍体株の取得

酵母 OLC 欠損型二倍体株 *Saccharomyces cerevisiae* BY4743-YHR072W (*MATa/MATα his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/met15Δ0 ura3Δ0/ura Δ0*)<sup>5)</sup> は、ATCC から購入した。各操作段階において酵母細胞の状態を倒立型システム顕微鏡 (OLYMPUS 社製 IMT-2) によって観察した。3 (最終濃度 20 mg/L) を含む YEPD 寒天培地 (1% 酵母エキス, 2% ポリペプトン, 2% D-グルコース, 2% 寒天) にて OLC 欠損型二倍体株を 30°C で 2 日間培養した。次に、3 (最終濃度 20 mg/L) を含む GNA presporulation 寒天培地 (1% 酵母エキス, 3% Difco nutrient broth, 5% D-グルコース, 2% 寒天) にて 30°C で 24 時間培養した (この操作を 2 回繰り返した)。さらに、3 (最終濃度 20 mg/L) を含む孢子形成用寒天培地 (1% 酢酸カリウム, 50 mg/L 酢酸亜鉛, 20 mg/L ウラシル, 20 mg/L ヒスチジン, 30 mg/L ロイシン) にて 30°C で 4 日間培養し、孢子を形成させた。一白

<sup>1</sup>新潟大学農学部

\*代表著者: Satot@agr.niigata-u.ac.jp



Scheme 1 ステロール生合成経路の簡略図

細胞膜の必須成分であるエルゴステロール3 (酵母を含む真菌類) やコレステロール4 (動物) は、メバロン酸経路から生合成される。オキジドスクアレンーラノステロール環化酵素 (OLC) は、その中間段階の (3S)-2,3-オキジドスクアレン1 からラノステロール2 への変換反応を触媒する。OLC は、ステロール生合成経路において環状骨格を形成する鍵段階を担っている。

金耳の胞子を50 mM リン酸カリウム (pH 7.0) 緩衝液 (1 ml) に懸濁した後、0.1 mg の Zymolyase-20T (生化学工業社製) と30°Cで1時間インキュベーションし、加熱処理 (60°Cで10分) で反応を止めた。超音波洗浄機で5分間処理した後、3 (最終濃度20 mg/L) を含む最少完全培地 [0.67% Yeast Nitrogen Base without amino acid (Difco), 2% D-グルコース, 20 mg/L ウラシル, 20 mg/L ヒスチジン, 30 mg/L ロイシン, 30 mg/L リジン, 20 mg/L メチオニン] にまき、30°Cで3日間培養した。二倍体株と比較して小さいコロニー (顕微鏡観察で細胞も二倍体より小さい) を選び、3回のプレート培養による分離を繰り返し、得られたシングルコロニーの一つを3-5-1株と名付けた。

### 3. 酵母の脂質成分の分析

3 (最終濃度20 mg/L) を含む YEPD 液体培地 (5 ml) に酵母の20% グリセロール凍結保存菌 (10  $\mu$ l) を植菌し、30°Cで3日間振とう培養した。遠心分離 (6000 rpm, 10分間, 4°C) によって集菌し、生理食塩水で2回洗浄後、脱塩水 (5 ml) に懸濁した。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。*n*-ヘキサン (5 ml) で3回抽出した後、GC および GC-MS によって分析した。

### 4. 酵母の無細胞抽出液による OLC の酵素活性検定

3 (最終濃度20 mg/L) を含む YEPD 液体培地 (5 ml) に酵母の20% グリセロール凍結保存菌 (10  $\mu$ l) を植菌し、30°Cで2日間振とう培養した。その前培養菌 (5 ml) を3 (最終濃度20 mg/L) を含む YEPD 液体培地 (2 L) に植え、30°Cで2日間振とう培養した。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)] (50 ml) に懸濁した。超音波破碎処理 (5分×8回, 4°C) によって溶菌し、遠心分離 (12000 rpm, 15分, 4°C) した。上清を無細胞抽出液 (45 ml) とした。無細胞抽出液 (4 ml) に1 (0.5 mg) と Triton X-100 (10 mg) を加え、25°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。

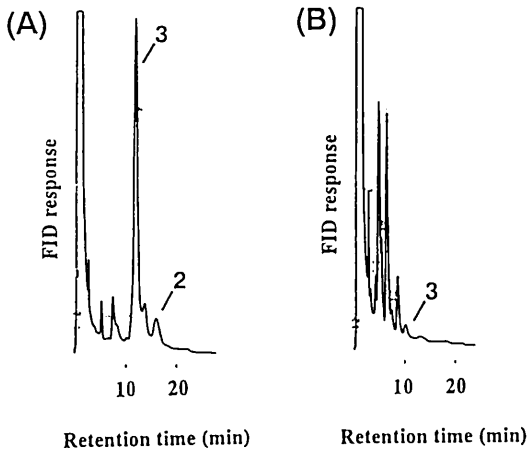


Fig. 1 酵母 OLC 欠損型二倍体株および 3-5-1 株の脂質成分の GC による分析

- (A) 酵母 OLC 欠損型二倍体の菌体をヘキサン抽出し、GC によって分析した。多量の 3 と微量の 2 を確認できた。その他のピークは、GC-MS 分析したが、同定できていない。
- (B) 3-5-1 株の菌体をヘキサン抽出し、GC によって分析した。微量の 3 を確認できたが、2 を検出できなかった。おそらく 3 は培地から菌体に取り込まれたものと考えられた。その他のピークは、GC-MS 分析したが、同定できていない。

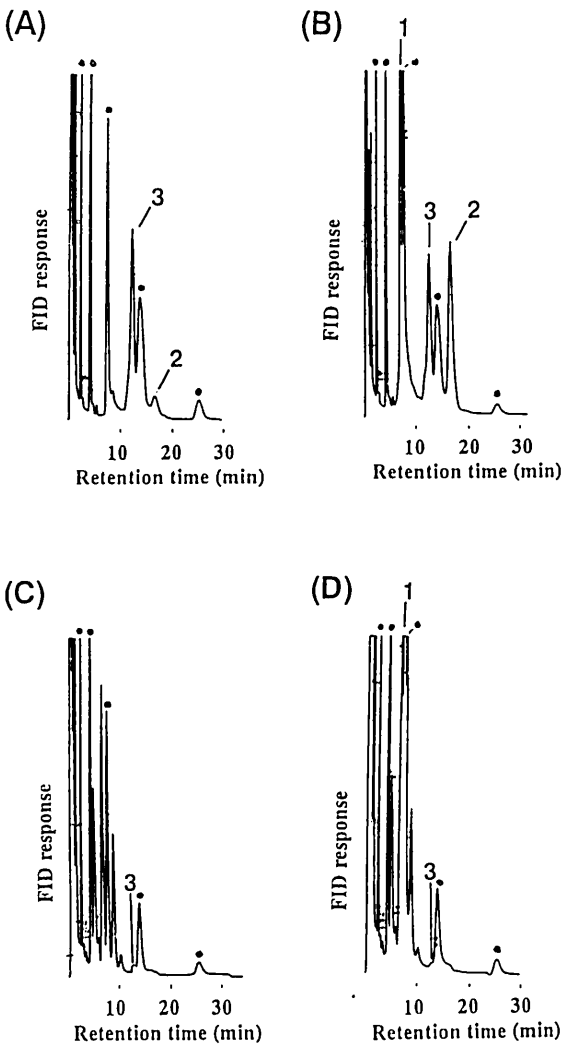


Fig. 2 酵母 OLC 欠損型二倍体株および 3-5-1 株の OLC 酵素活性の検定

- (A) 酵母 OLC 欠損型二倍体の無細胞抽出液のヘキサン抽出物（インキュベーションなしのコントロール）を GC によって分析した。内在性の 2 と 3 の他に、緩衝液に加えた Triton X-100 のピーク (●) を確認できた。
- (B) 酵母 OLC 欠損型二倍体の無細胞抽出液 (4 ml) に 1 (0.5 mg) と Triton X-100 (10 mg) を加え、25°C で 16 時間インキュベーションした後、ヘキサン抽出物を GC によって分析した。Fig. 2-(A) に示した内在性の 2 より増加しており、OLC の酵素活性を確認することができた。未反応の基質 1、内在性の 3 および Triton X-100 (●) のピークも確認できた。
- (C) 3-5-1 株の無細胞抽出液のヘキサン抽出物（インキュベーションなしのコントロール）を GC によって分析した。微量の 3 と緩衝液に加えた Triton X-100 のピーク (●) の他に、内在性の未同定物質 [Fig. 1-(B) 参照] が確認できた。内在性の 2 は確認できなかった。
- (D) 3-5-1 株の無細胞抽出液 (4 ml) に 1 (0.5 mg) と Triton X-100 (10 mg) を加え、25°C で 16 時間インキュベーションした後、ヘキサン抽出物を GC によって分析した。多量の未反応の基質 1 を確認でき、生成物 2 を検出できなかった。したがって、OLC 活性はないことが判明した。また、微量の 3 と緩衝液に加えた Triton X-100 のピーク (●) も確認できた。

## 結果と考察

### 1. 酵母 OLC 欠損二倍体株 BY4743-YHR072W から一倍体株の取得

酵母 OLC 欠損型二倍体株 BY4743-YHR072W は、野生型一倍体と OLC 欠損型一倍体の接合型であることから、酵母自身の OLC を発現する。したがって、外来 OLC の導入による遺伝子操作の宿主として用いるためには、OLC 欠損型の一倍体を取得する必要がある。定法<sup>9)</sup>に従って、二倍体から子嚢胞子を形成させた。ただし、酵母にとって 3 は必須であることから、3 を生合成できない一倍体を得るために 3 を培地に添加して行った。子嚢を酵母細胞壁溶解酵素である Zymolyase-20T で処理して子嚢壁を破りやすくしておき、3 を含む最少完全培地にまいたところ、二倍体よりも小さなコロニーが数多く確認できた。それぞれの細胞を顕微鏡でも観察したが、二倍体とは明らかに形状が異なっていた(二倍体よりも小さかった)。その後、3 回のプレート培養による分離によって得られたシングルコロニーの一つを 3-5-1 株と名付けた。

### 2. 3-5-1 株の抗生物質に対する抵抗性

得られた 3-5-1 株が酵母 OLC 欠損型一倍体であることを確認するため、抗生物質に対する抵抗性を調べた。抗生物質としてジェネティシン、アンピシリンおよびカナマイシンを用いた。ジェネティシンは、細菌・酵母・高等植物・ほ乳動物など広範囲の生物種に毒性を示すが、ATCC から購入した OLC 欠損型二倍体は遺伝子工学的に *olc* 遺伝子とジェネティシン耐性遺伝子が置換されているため、OLC 欠損型一倍体はジェネティシン耐性である<sup>9)</sup>。最少完全培地に最終濃度 0.15 mg/L になるようにジェネティシンを加えて培養したが、3 日後に生育した。また、細菌に抗菌性を示し酵母に示さないアンピシリンとカナマイシンをそれぞれ最終濃度 50 mg/L と 70 mg/L で加えた最少完全培地で培養したが、3 日後に生育した。以上の抗生物質に対する抵抗性の結果は、得られた 3-5-1 株が酵母 OLC 欠損型一倍体である可能性が高いことを示唆していた。

### 3. 3-5-1 株の脂質成分の分析

得られた 3-5-1 株が酵母 OLC 欠損型一倍体であることをさらに確認するため、脂質成分を GC によって分析した。Fig. 1-(A) に示したように、OLC 欠損型二倍体は多量の 3 と微量の 2 を蓄積していた。それに対し、Fig. 1-(B) に示したように、3-5-1 株は微量の 3 は検出されたものの 2 は全く見出せなかった。もし、酵母 OLC 欠損型一倍体ならば生合成されないはずの 3 が 3-5-1 株から検出されたのは、おそらく培地に添加した 3 を細胞内に取り込んだためであると考えられた。また、2 と 3 は GC-MS による authentic 試料との比較によって同定できたが、その他のピークは同定できなかった。我々は、OLC 欠損型一倍体において前駆体の 1 が蓄積されるのではないかと予想していたが、1 の存在を GC および GC-MS 分析において確認することができなかった。その理由は分からないが、未同定物質が 1 よりも前段階の生合成中間体であり、それが蓄積したのではないかと推論している。興味深い疑問点は残ったものの、脂質成分として 2 が全く検出されなかった事実は、3-5-1 株が酵母 OLC 欠損型一倍体であること強く支持する結果であった。

### 4. 3-5-1 株の無細胞抽出液による OLC の酵素活性検定

3-5-1 株が酵母 OLC 欠損型一倍体であることの更なる確証を得るため、OLC の酵素活性の検定を行った。Fig. 2-(A) と (B) に示したように、OLC 欠損型二倍体の無細胞抽出液に 1 を加えてインキュベーションすると 2 の増加が見られ、OLC の酵素活性を確認することができた。それに対し、Fig. 2-(C) と (D) に示したように、OLC 欠損型一倍体の無細胞抽出液に 1 を加えてインキュベーションしても 2 を全く検出できなかった。このことから、3-5-1 株は OLC を発現していないことが判明し、3-5-1 株が OLC 欠損型一倍体であることを強く支持していた。

## ま と め

酵母 OLC 欠損型二倍体から孢子形成を経て一倍体を分離し、得られた株 (3-5-1) について抗生物質に対する抵抗性の調査や脂質成分の分析そして OLC の酵素活性の検定を行った。全ての結果は、3-5-1 株が OLC 欠損型一倍体であることを強く示唆していた。今後、3-5-1 株を外来 OLC の発現宿主として利用し、詳細な OLC の触媒機構の解明を行っていきたいと考えている。

## 謝 辞

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) Lees, N.D., Bard, M., and Kirsch, D.R., Biochemistry and molecular biology of sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **34**, 33-47 (1999).
- 5) Winzeler, W.A., 他51名, Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis., *Science*, **285**, 901-906 (1999).
- 6) 大嶋泰治編「酵母分子遺伝学実験法」学会出版センター、(1996).

## Acquisition of Yeast Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase Deficient Mutant

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 planned to construct the expression system of OLC in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However, wild-type yeast can not be used as the expression host of OLC from other organism, because yeasts naturally have its own OLC. Therefore, we made experiments to obtain the yeast OLC deficient mutant. The OLC deficient haploid was separated from the OLC deficient diploid after the sporulation. The obtained microorganism, named 3-5-1, was confirmed to be OLC deficient haploid by checking the resistance for antibiotics, analyzing the components of lipid and assaying the OLC activity. The strain, named 3-5-1, may be able to be used as the expression host of OLC from other organism in future.

---

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

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