

微生物によるスクアレン高生産系構築を目指した糸状菌 *Rhizopus oryzae* 由来スクアレンエポキシダーゼ(SQE)遺伝子クローニング

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 阿部 碧

1. はじめに

スクアレン($C_{30}H_{50}$)は、トリテルペンに属する油性物質であり、抗酸化、殺菌、保湿効果があることから化粧品原料や医薬品基剤として利用される。スクアレンは、微生物、植物、動物細胞に含まれているが、植物に含まれる量は微量であるためその供給源は深海鮫の肝油に依存している。しかし、深海鮫は自然界より捕獲されることから、その供給源は極めて不安定であり、さらに生物資源保護の観点からも、新規スクアレン供給源の探索・開発が強く望まれている。これまでに、酵母、微細藻類などの微生物を用いたスクアレン生産系が検討されているものの、現時点では実用化には至っていない。当研究室の池田によってスクアレン代謝酵素スクアレンエポキシダーゼ (SQE) 阻害剤であるブテナフィン添加により、スクアレンを高蓄積する *Rhizopus oryzae* が分離されていることから、本研究では、新たな供給源として *Rhizopus* 属糸状菌に着目し、スクアレン代謝の鍵酵素である SQE 遺伝子のクローニングと SQE 酵素活性解析のためのタンパク質大量発現系構築を目指した。

2. 材料・方法

R. oryzae NBRC9364 株 (R09364) の SQE 遺伝子情報は未報告であったため、*Rhizopus* 属や酵母を含む6種の真菌 SQE 遺伝子情報を元にアミノ酸配列の保存領域から縮重プライマーおよびフォワード3種、リバーズ4種の特異的プライマーを作成した。これらのプライマーを用い R09364 ゲノム DNA SQE 遺伝子の増幅を試みたところ、複数の組合せで予想増幅サイズ (600 bp) のバンドが検出された。この増幅領域の DNA 配列を決定し相同性検索した結果、*R. oryzae* RA 99-880 (R099-880) の Hypothetical protein CH474632.1 と 98 %の非常に高い相同性を示した。そこで、R099-880 株の SQE cDNA 配列から開始コドンと終止コドンを含む全長クローニング用プライマーを作成した。

R09364 株の菌糸より精製した全 RNA から oligo-dT/random 6 mer 混合プライマーを用いて cDNA を調製し、全長クローニング用プライマーを用いて、SQE 全長約 1.4 kbp を増幅した。この SQE 断片を In-Fusion クローニングキット (タカラバイオ) を用いてタンパク質発現用ベクター pET151/D-TOPO に導入した。さらに、pET151/D/SQE ベクターをタンパク質発現用宿主大腸菌 BL21 株に形質転換した。

3. 結果・考察

R. oryzae SQE の全長クローニングプライマーを用い、R09364 株より SQE 遺伝子のゲノム DNA 配列と cDNA 配列を得た。両者の DNA 配列を比較したところ、cDNA 配列には 189 -241 番目の塩基が欠損していたことから、53 bp のイントロンの存在が示された。また、1361 bp の R09364 SQE cDNA 配列から予想されたアミノ酸配列には前半部分に複数の終止コドンが含まれていたため、R09364 SQE の ORF は 307-309 番目の ATG を開始コドンとした全長 1053 bp で、351 アミノ酸からなるタンパク質である可能性が示された。R09364 の SQE は、ラット、酵母、および糸状菌の SQE アミノ酸配列と比較したところ、100 アミノ酸以上短いものの SE (squalene epoxidase) ドメインを有していたことから、酵素活性は保持している可能性が示唆された。