

氏 名 PANPOOM, SAYAMRAT

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第297号

学位授与の日付 平成9年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 **Biochemical characterization of the $\Delta 12$
acyl-lipid desaturase of *Synechocystis* sp.
PCC 6803 after its overexpression in *Escherichia coli***

論文審査委員 主 査 教 授 西村 幹夫
教 授 村田 紀夫
助 教 授 渡辺 正勝
助 教 授 和田 元 (九州大学)

論文内容の要旨

The $\Delta 12$ acyl-lipid desaturase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 was overexpressed in *Escherichia coli* in the enzymatically active form. The overexpressed protein did not form cytoplasmic inclusion bodies but was apparently associated with the membrane and represented about 10% of the total cellular proteins or 25% of the total membrane proteins. The protein could be solubilized only by a detergent, but not by alkaline pH or urea, suggesting that it was integrally bound to the cytoplasmic membrane. The overexpressed protein in the membrane exhibited a markedly high activity of fatty-acid desaturase. The activity of the desaturase in salt-washed membranes was stabilized by 2 M sorbitol for at least 6 days at 4°C and at pH of 7-8. Several catalytic properties of the overexpressed desaturase were similar to those of $\Delta 12$ desaturases of other organisms. In particular, the enzyme exhibited an absolute requirement of iron for its activity.

論文の審査結果の要旨

アシル脂質不飽和化酵素は生体膜の流動性を調節し、膜結合性酵素の活性や遺伝子の発現等の制御に重要な役割を演じている。この一群の酵素に関しては、多くの分子生物学的研究がなされているにもかかわらず、その生化学的な研究はほとんどおこなわれていない状態にあった。その理由は、この酵素が疎水性の膜貫通型の膜タンパク質であり、しかも活性中心の鉄イオンが比較的容易に遊離して失活する性質をもっているためである。学位申請者Panpoom Sayamratは脂肪酸不飽和化酵素の一種、 $\Delta 12$ アシル脂質不飽和化酵素の遺伝子(ラン藻 *Synachocystis* sp. PCC 6803 より単離)を *E. coli* で活性を安定に保持した状態で大量発現させることに世界で初めて成功した。研究成果の重要な点は以下の通りである。(1) 最適条件下で誘導発現させると、発現酵素は細胞膜に結合した状態で回収され、酵素の発現量は全細胞膜タンパク質の25%に達した。この高い発現量は膜タンパク質としては驚異的に高い価であり、従来の不飽和化酵素の *E. coli* を用いた発現量の5倍に相当した。(2) 細胞膜を塩処理しさらにソルビトールを添加することにより、酵素活性を著しく安定化する方法を確立した。この安定度は従来から報告されているものの約100倍に達した。(3) 酵素活性の温度依存性をしらべ、この酵素活性は正の温度依存性を示すことを明らかにした。この結果は「不飽和化酵素は負の温度依存性を示す」とする従来の説をくつがえすものであり、膜脂質の不飽和化の低温誘導が不飽和化酵素そのものの性質によるものではなく、不飽和化酵素の遺伝子発現の調節によることを強く示唆するものである。

以上記したように、本申請論文の内容は、生体膜、脂質、膜結合型タンパク質、環境適応の研究分野に著しく貢献するものであり、よって本申請論文としてふさわしく、合格と判定した。

申請論文及びその関連分野等に関して、口頭で試験をおこない、十分な学力を備えていることを確認し、合格と判定した。

英語の読解力、記述力、会話力について試験をおこない、高い英語力を備えていることを確認し、合格と判定した。