

- 411 サブユニット間架橋による好熱性細菌由来グルコース脱水素酵素の高度耐熱化  
(東京農工大・工・生命工) 早出 広司、○山崎 智彦、津川 若子

【目的】本研究室では温泉付近の土壌より単離したグラム陰性中度好熱性細菌(SM4株)より膜結合で補酵素結合型である耐熱性グルコース脱水素酵素(GDH)を発見しその特性の解析を行っている。本酵素について活性の温度依存性を検討したところ45℃と75℃付近に2つのピークを示し、また熱処理後では75℃付近に単一のピークのみを示した。これは本酵素の会合状態の差に起因すると考えられた。そこで本研究では本酵素の高分子量体と低分子量体のサブユニット構造について検討するとともに、サブユニット間の架橋による本酵素高分子量体の熱安定性の向上を検討した。

【方法】酵素は膜画分から抽出し、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。また膜画分を様々な濃度のグルタルアルデヒド(GA)で処理し、酵素活性を測定した。酵素活性は電子メディエータとしてフェナジンメトサルフェート(PMS)と2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を用い、DCIPの退色速度を指標とした。

【結果】本酵素をSDS-PAGEで展開したところ高分子量体は67kDaと43kDaのサブユニットから構成され、また本酵素を熱処理して得た低分子量体は67kDaのサブユニットからのみ構成されることが分かった。次に基質であるグルコースと電子メディエータであるPMSに対する反応性を比較した結果、低分子量体はPMSとの反応性が低下していた。以上から約43kDaのサブユニットは電子授受に関与していると予想され、43kDaのサブユニットが解離することで電子授受が行われにくくなり45℃の活性のピークが無くなると考えられた。そこで高分子量会合体の構造を維持することにより本酵素を高度耐熱化できると考えた。本酵素をGAで処理しサブユニット間を架橋させたところ反応至適温度が45℃から65℃に向上し、高分子量体の四次構造が安定化されたと考えられた。

Enhanced thermostability of glucose dehydrogenase by inter-subunit cross linking.

Koji Sode, ○Tomohiko Yamazaki, Wakako Tsugawa  
(Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. of Agric. & Technol.)

【Key Word】 Thermostability, Glucose dehydrogenase, Cross linking, moderate thermophilic bacterium, glutaraldehyde

- 412 低温細菌由来低温L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼの特性評価  
(北陸先端科技大・材料) ○山村晃、村上裕二、横山憲二、民谷栄一

【目的】低温菌から得られる低温酵素は、中温菌のものに比べて低温でも高い活性を有する機能性酵素であり、低温での物質生産やバイオセンサーなどへの応用が期待できる。しかし、低温酵素は十分に研究されておらず、特にNAD非依存性の低温酸化還元酵素は報告されていない。本研究では、酸化還元色素で選抜した電子受容体依存性の低温L-グルタミン酸：アクセプターオキシドリダクターゼの特性を評価した。

【方法及び結果】サケ・カニの内臓や土壌に生息している低温細菌から、L-グルタミン酸とニトロブルーテトラゾリウムによって、L-グルタミン酸酸化酵素を多く生産するものを選抜し、ゲル濾過、陰イオン交換・疎水性クロマトグラフィーによって酵素を精製した。この酵素の温度特性は、中温酵素である牛肝臓由来L-グルタミン酸デヒドロゲナーゼに比べて低温側に移行していた。この酵素の基質特異性は、グルタミン酸が最も高く、次にアスパラギン酸・グルタミンがグルタミン酸の10%ほど反応した。一方、電子受容体としては、多くの酸化還元色素と反応するが、NAD、NADP、酸素とは反応しない新奇のL-グルタミン酸デヒドロゲナーゼであることが分かった。また、フェロセン誘導体も電子受容体となり、サイクリックボルタンメトリーによって酵素の触媒電流を確認できた。

Characterization of cold-active L-glutamate dehydrogenase from psychrotrophic bacterium.

○Akira Yamamura, Yuji Murakami, Kenji Yokoyama, Eiichi Tamiya (Materials Science, JAIST)

【Key Word】 psychrotrophic bacteria, cold-active enzyme, L-glutamate: acceptor oxidoreductase