

- 729 膜結合性PQQグルコース脱水素酵素の膜結合領域への部位特異的変異導入と酵素活性への影響 (東京農工大・工・生命工)  
○鈴木久皇、奥田順子、吉田裕美、早出広司

## 【目的】

膜結合型PQQGDHの膜結合領域は五本の膜貫通ヘリックスから構成され、この領域の機能はアンカーとして酵素を細胞膜に固定することであるとされている。一般に膜結合型の酵素は活性部位と膜結合領域が独立の機能を有していると考えられている。本研究では膜結合領域に部位特異的に変異を導入した変異酵素を構築し膜結合領域の酵素活性発現での役割について検討した。

## 【方法及び結果】

膜結合領域の三番目と四番目のヘリックスをつなぐループ上に存在する残基に対して部位特異的に変異を導入し変異酵素を構築した。この変異導入が本酵素の機能におよぼす影響を検討した。*in vivo*では酸素電極を用いて呼吸活性を測定し、*in vitro*では可溶化した変異酵素の酵素活性を測定した。その結果いくつかの変異酵素が *in vivo, in vitro*ともに酵素活性を大幅に低下させた。このことから膜結合領域におけるループ上の残基は活性部位の触媒機能に大きく影響を及ぼすことが考えられた。

The effect of site-directed mutagenesis into the membrane binding region of *Escherichia coli* PQQGDH on enzymatic activity.

○Kuno Suzuki, Junko Okuda, Hiromi Yoshida, Koji Sode  
(Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. and Technol.)

【KEY WORDS】 PQQGDH, membrane binding region, respiratory chain, ubiquinone

- 730 *Bacillus coagulans*由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の150-154ループ変異体の解析  
(いわき明星大・理工・基礎理、\*東工大・生命理工・生物工、\*\*東工大院・生命理工・分子生命科学)  
○高野史崇、中村聡\*、竹中章郎\*\*、関口武司

【目的】 *B. coagulans* 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (BcIPMDH) の150~154ループは *Thermus thermophilus* IPMDHのループに比較して3残基多い。そこで本研究では、BcIPMDHの150~154ループのアミノ酸を3残基欠失した4種類のループ変異体を作製し、各変異体の発現量、熱安定性などを比較、検討した。

【方法および結果】 150-G・P・G・E・N-154ループの3残基を欠失したG・P変異体およびP・A、G・GとG・Sループ変異体をKunkel法で作製し、発現ベクターpTZ19Uに挿入して大腸菌内で発現させた。P・A変異酵素の発現量は野生型酵素の約14%であったが、他の変異酵素の発現量は野生型酵素と同程度であった。55℃、10分間熱処理した後の残存活性で熱安定性を比較した結果、G・PとG・S変異酵素の安定性は向上した。示差走査熱量計(DSC)で測定した精製G・S変異酵素の変性に伴うDSC曲線のピーク温度は野生型に比較して1.7℃高温側にシフトした。

Mutational analysis on the 150-154 loop of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Bacillus coagulans*. ○Humitaka Takano, Satoshi Nakamura\*, Akio Takenaka\*\*, Takeshi Sekiguchi (Dept. Fundamental Science, Iwaki Meisei Univ., \*Dept. Bioengineering, Tokyo Institute of Technology, \*\*Dept. Life Science, Tokyo Institute of Technology)

【Key words】 3-isopropylmalate dehydrogenase, *Bacillus coagulans*, thermostability