

Vibrio proteolyticus 由来エンドキチナーゼの性状

鹿股悠奈・糸井史朗・門倉一成・西尾俊幸・
奥忠武・杉田治男(日大生物資源)

【目的】これまでの研究で、*Vibrio proteolyticus* 由来キチナーゼ A の一次構造解析の結果から、他の *Vibrio* 属細菌のキチナーゼ A の場合とは異なり、C 末端領域の 250 残基がプロセッシングされないことを明らかにした。そこで本研究では、この C 末端側約 250 残基が当該酵素の活性に及ぼす影響を調べるため、発現系を構築してキチン分解活性の違いを調べると共に、当該タンパク質の性状について検討した。

【方法】当該キチナーゼ A の全長(dhFULL)および C 末端側 250 アミノ酸残基を欠失するリコンビナント(dhR600)を、大腸菌 DH5 α で発現させた。キチナーゼ活性は、これらリコンビナントを基質であるコロイダルキチンおよび α -キチンに作用させた後、生成された還元糖を Schales 変法により定量することで測定した。また、修飾タンパク質の検出は、dhFULL、dhR600 および *V. proteolyticus* が分泌するキチナーゼ A を SDS-PAGE 分析に供した後、レクチンプロットングにより行った。

【結果】リコンビナント dhFULL の至適 pH は α -キチンおよびコロイダルキチンの両基質ともに pH 7、至適温度は α -キチンで 60 °C、コロイダルキチンでは 50 °C であった。また C 末端側 250 残基の活性への影響を調べるため、リコンビナント dhFULL および dhR600 の比活性を測定した結果、 α -キチンを基質とした場合、それぞれ 1.4 U/mg および 0.9 U/mg であった。また、コロイダルキチンを基質とした場合、dhFULL では 2.8 U/mg、dhR600 では 2.4 U/mg であった。さらに、リコンビナント(dhFULL および dhR600) および *V. proteolyticus* 由来キチナーゼに対してレクチンプロットングを行った結果、両コンストラクト、*V. proteolyticus* 由来キチナーゼおよび糖タンパク質であるヒトトランスフェリンで特異バンドが観察されたのに対し、糖タンパク質ではないウシ血清アルブミンではバンドが検出されなかった。