

魚類腸内細菌 *Vibrio proteolyticus* 由来エンドキチナーゼの精製

および活性におよぼす C 末端領域の影響

○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】一般的に *Vibrio* 属細菌は高いキチナーゼ活性を有することが知られている。これまでの研究で、*Vibrio proteolyticus* 由来キチナーゼ A の一次構造を明らかにし、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が示された。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、発現系を構築して両リコンビナントタンパク質の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 の全長および C 末端側 250 アミノ酸残基を欠失する DNA 断片を pCold ベクターに組み込んで大腸菌 DH5 α 株で発現させ、培養上清中に分泌されたリコンビナントを回収した。これらを硫酸塩析後、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。これらリコンビナントを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キチナーゼ活性を測定した。

【結果】C 末端側 250 残基の活性への影響を調べるため、完全長および C 末端側を欠失するリコンビナント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 2.37 U/mg および 0.20 U/mg であった。またコロイダルキチンを基質とした場合、完全長リコンビナントでは 2.92 U/mg および C 末端側欠失リコンビナントでは 0.20 U/mg であった。いずれの基質を用いた場合でも完全長リコンビナントの比活性は、C 末端側欠失リコンビナントのそれよりも高かったことから、プロテアーゼ切断サイト以降の C 末端側の配列が当該タンパク質の活性制御に関与していることが示唆された。