

## 海洋細菌 *Vibrio proteolyticus* 由来キチナーゼの pH 依存性に及ぼす C 末端領域の影響

鹿股悠奈・糸井史朗・内田晋輔・門倉一成・西尾俊幸・  
奥忠武・杉田治男 (日大生物資源)

【目的】*Vibrio proteolyticus* の産するキチナーゼ A は 825 アミノ酸残基からなり、高いキチナーゼ活性を有する。当該キチナーゼは他の *Vibrio* 属細菌のキチナーゼ A とは異なり、C 末端側約 250 残基がプロセッシングされない。演者らはこれまでに *V. proteolyticus* 由来キチナーゼ A の全長および C 末端側を欠損したリコンビナントを作製し、C 末端側欠損型の比活性が低いことを報告した。そこで本研究では、この C 末端側 250 残基が当該酵素の性状に及ぼす影響を調べるため、両リコンビナントにおける pH 依存性について検討した。

【方法】*V. proteolyticus* 由来キチナーゼ 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 $\alpha$  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、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。得られた酵素をコロイダルキチンおよび  $\alpha$ -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リコンビナントキチナーゼの比活性を測定した。また pH 依存性は、pH 5~10 の緩衝液中で同様に測定した。

【結果】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、 $\alpha$ -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。また pH 依存性に与える影響を調べるため、完全長および C 末端側を欠失するリコンビナントの各 pH における相対比活性を測定した結果、完全長リコンビナントでは  $\alpha$ -キチン、コロイダルキチン共に pH 8 で最も活性が高く、一方、C 末端側欠失リコンビナントでは両基質において pH 6 で最も高い活性を示した。この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 *V. proteolyticus* 由来のキチナーゼ活性の pH 依存性に大きく影響していると考えられた。