

# D119 白ゴマ種子由来キチン分解酵素の精製とその酵素反応機構の解析

(同志社大理工) ○(学)桂 啓子・(正)松本道明・(正)近藤和生\*

## 1. 緒言

キチンオリゴ糖は抗菌作用や抗癌作用など様々な有用性を有するため、近年注目されている物質である。酵素法によるキチンオリゴ糖の生成を目的として、キチン分解酵素を白ゴマ種子より精製した。得られた精製酵素を用いて、酵素反応特性の評価を種々の観点から行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 酵素の精製

白ゴマ種子 20.0 g をホモジナイズし、得られた粗酵素溶液をイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーの三段階を経て精製を行った。

### 2.2 反応速度の基質濃度依存性

至適 pH に調整したリン酸水素二ナトリウムクエン酸緩衝液に、4 種の所定濃度になるようにグリコールキチンを溶解させた。その基質溶液 2.0 ml と精製酵素溶液 (Chit-1~Chit-3) 0.5 ml を混合し、37 °C で反応させた。所定時間毎に反応を停止させた後、Schales 変法により酵素活性を測定した。

### 2.3 反応生成物の分析

pH 3.0 に調整した酢酸酢酸ナトリウム緩衝液にキチンオリゴ糖、 $\alpha$ -キチン、 $\beta$ -キチンおよびコロイダルキチンを溶解または懸濁させ、これらを基質溶液とした。この基質溶液 4 ml と酵素溶液 2 ml とを混合し 37 °C にて反応させた。所定時間ごとに試料を採取し、HPLC を用いて、反応生成物の分析を行った。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 酵素の精製

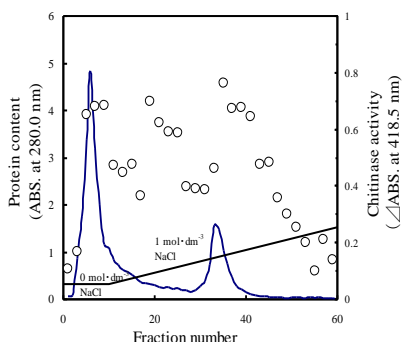


Fig.1 Ion-exchange column chromatography of crude enzyme  
○; Chitinase activity —; Protein content

Fig.1 にイオン交換クロマトグラフィーの結果を示した。酵素活性の高い分画を f1~f3 として回収した。これらについてアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、精製酵素 Chit-1~Chit-3 を得た。

### 3.2 反応速度の基質濃度依存性

酵素反応が以下に示す Michaelis-Menten 式に従うものとして解析を行った。

$$V = \frac{k_{+2}[E]_0[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

$[E]_0$  は全酵素濃度、 $[S]$  は基質濃度、 $K_m$  は  $(k_{-1}+k_{+2})/k_{+1}$  で表される Michaelis 定数である。また  $V_{max}$  は最大反応速度を示す。各基質濃度  $[S]_0$  に対して反応初速度  $V_0$  を求め、Lineweaver-Burk plot を行い、切片と傾きから  $K_m$  および  $V_{max}$  を求めた。その結果、Chit-1~Chit-3 について  $K_m$  はそれぞれ 0.0304, 0.146, 0.0226 mol·m<sup>-3</sup> であり、 $V_{max}$  は 0.0339, 0.139, 0.112 mol·m<sup>-3</sup>·min<sup>-1</sup> であった。これより Chit-3 が、最も基質との親和性が高いことがわかった。

### 3.3 反応生成物の分析

コロイダルキチンおよび  $\beta$ -キチンを基質として用いたときの結果を Fig.2 および Fig.3 に示した。生成物の分布より、コロイダルキチンの主生成物は GlcNAc<sub>3</sub> であるが、より長鎖の基質である  $\beta$ -キチンの場合は、GlcNAc<sub>1~3</sub> が等モル生成した。これより、分子量が大きくなることによって、酵素の糖認識力が甘くなったと考えられる。また、酵素濃度を変化させて実験を行ったところ、Chit-1 は糖鎖の長いものを優先的に基質として認識し、分解することがわかった。この結果は、キチンオリゴ糖を基質として用いたときの結果とも一致した。

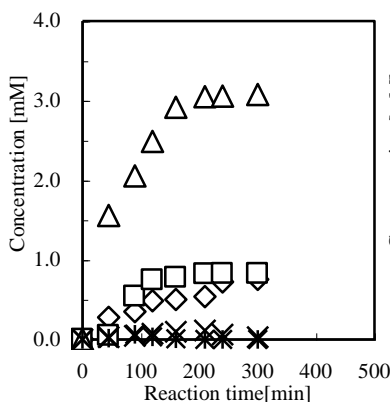


Fig.2 Time course of Colloidal chitin hydrolysis by Chit-1(0.60 U)

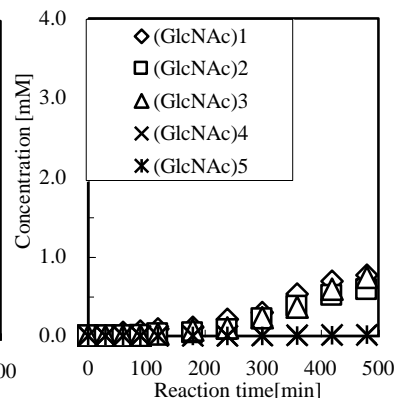


Fig.3 Time course of  $\beta$ -chitin hydrolysis by Chit-1(0.60 U)

## 4. 結言

白ゴマ種子より、3 種のキチン分解酵素を精製することに成功した。さらに精製酵素による反応機構を解析した。

\*TEL/FAX 0774-65-6656

E-mail: kkondo@mail.doshisha.ac.jp