

大腸菌のペリプラズム空間で発現したマウス Chitotriosidase の特性解析

木村 将大 大学院 博士前期課程 / 小山 文隆 先進工学部 生命化学科 教授

キーワード: キトトリオシダーゼ, キチナーゼ活性, 大腸菌, 生理的条件下

概要

Chitotriosidase (Chit1) はゴーシェ病, 慢性閉塞性肺疾患, アルツハイマー病, 嚢胞性線維症などの様々な疾患に関わる酵素である。この研究で, N 末端側に Protein A を, C 末端側に V5-His タグを付加した Chit1 を大腸菌のペリプラズム空間に可溶性タンパク質として発現し, 精製することに成功した(図 1)。我々は組換え酵素のキチナーゼ活性を CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His と比較した(図 2)。大腸菌で発現した Chit1 は至適 pH が 5.0 で, 至適温度は 50° C であった(図 3A, B)。Chit1 は氷上で 1 時間インキュベーションすると, pH 5.0~11.0 で安定であったが, pH 2.0 では失活した(図 3C)。しかし, pH 2.0 でもキチンへの結合性は変化しなかった(図 3D)。キチナーゼ活性は, 生理的条件下である pH 7.0~8.0 においても強く認められた(図 4)。以上のことから, 組換え Chit1 が弱酸性のみならず, 生理的条件下でも各種キチン基質を分解することが分かった。

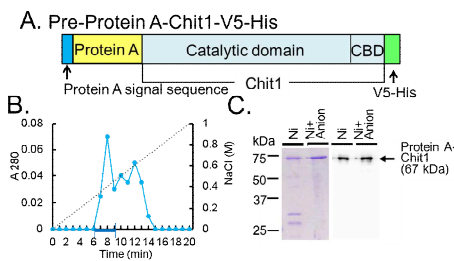


図 1 (A) 大腸菌で発現した pre-Protein A-Chit1-V5-His の模式図, (B) Hitrap Q HP columns での精製, (C) CBB 染色と Western blot.

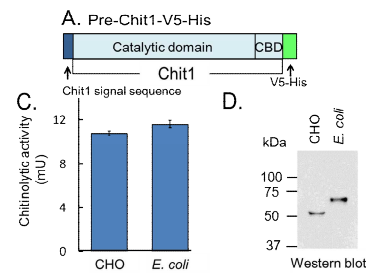


図 2 (A) CHO細胞で発現した pre-Chit1-V5-His の模式図, (B) 大腸菌と CHO 細胞で発現した酵素のキチナーゼ活性比較, (C) 調整した各酵素の Western blot.

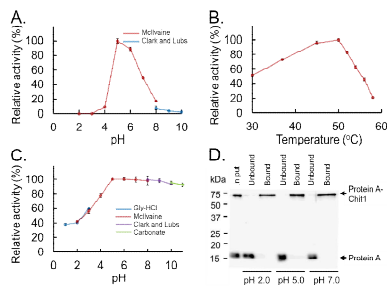


図 3 (A) 至適 pH, (B) 至適温度, (C) pH 安定性, (D) Protein A-Chit1-V5-His のキチンピーズへの親和性

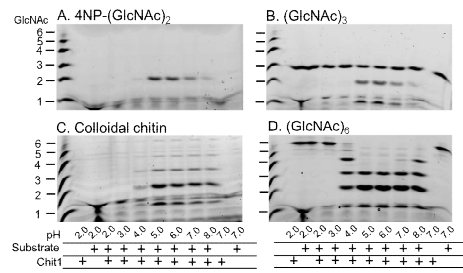


図 4. 4NP-(GlcNAc)₂ (A), (GlcNAc)₃ (B), コロイダルキチン (C), (GlcNAc)₆ (D) を基質とし, pH 2.0~8.0 でのキチナーゼ活性

アピールポイント

Chit1 は生理的条件下でキチン基質を分解し, 生体内で重要な病態生理学的な役割を持つ可能性がある。

利用・用途 応用分野

本研究結果から, 組換え Chit1 が, 病態生理学的な役割の研究に利用できる。

関連情報

● 関連論文

Kimura, M., Wakita, S., Ishikawa, K., Sekine, K., Yoshikawa, S., Sato, A., Okawa, K., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Sugahara Y., Yamanaka, D., Ohno, N., Bauer, P.O. and Oyama, F. (2016) Functional properties of mouse chitotriosidase expressed in the periplasmic space of *Escherichia coli*. **PLoS ONE** 11, e0164367.

● 関連 URL

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0164367>