

佐 賀 大 学

農 学 彙 報

第 50 号

目 次

<i>Pycnopus cinnabarinus</i> の生産するキチナーゼとキトビアーゼの分離および 二, 三の性質.....大宝 明・泉 隆子・吉田 美穂・村上 元治	1
多良岳火山地の土石流について.....渡辺 潔・加来 研・大島 恒彦	15
淡塩 2 層界面における塩分ヤク層の形成と消滅に関する研究戸原 義男・加藤 治・長 裕幸	25
果実の共振様式および共振様相.....小島 孝之	41
静的コーン貫入試験による有明粘土地盤の原位置強度について.....甲本 達也・加来 研	55
雲仙のイモゴライトについて.....矢野 綱之	63
雲仙の火山性土に関する研究 (第 6 報) 粘土鉱物組成と作物生産力の関係 (続報)矢野 綱之・宮園誠一郎	75
ワケギの起源に関する細胞遺伝学的研究 (第 2 報) 四倍性ワケギおよび複二倍性雑種 (シャロット×ネギ) の稔性と減数分裂に ついて (英文)田代 洋丞	85

佐 賀 大 学 農 学 部

昭和 56 年 3 月

昭和56年3月25日 印刷
昭和56年3月30日 発行

編集兼 佐賀大学農学部
発行者

印刷者 増田 訓 清

印刷所 大学印刷株式会社
広島市中区十日市町二丁目1番15号
電話 広島 31-4231 (代表)

佐賀大学

農学彙報

第 50 号

目 次

<i>Pycnopus cinnabarinus</i> の生産するキチナーゼとキトビアーゼの分離および 二, 三の性質	大宝 明・泉 隆子・吉田 美穂・村上 元治	1
多良岳火山地の土石流について	渡辺 潔・加来 研・大島 恒彦	15
淡塩 2 層界面における塩分ヤク層の形成と消滅に関する研究	戸原 義男・加藤 治・長 裕幸	25
果実の共振様式および共振様相	小島 孝之	41
静的コーン貫入試験による有明粘土地盤の原位置強度について	甲本 達也・加来 研	55
雲仙のイモゴライトについて	矢野 綱之	63
雲仙の火山性土に関する研究 (第 6 報) 粘土鉱物組成と作物生産力の関係 (続報)	矢野 綱之・宮園誠一郎	75
ワケギの起源に関する細胞遺伝学的研究 (第 2 報) 四倍性ワケギおよび複二倍性雑種 (シャロット×ネギ) の稔性と減数分裂に ついて (英文)	田代 洋丞	85

佐賀大学農学部

昭和 56 年 3 月

AGRICULTURAL BULLETIN

OF

SAGA UNIVERSITY

Contents

Isolation of Chitinase and Chitobiase Produced by <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> and their Some Properties	Akira OHTAKARA, Takako IZUMI, Miho YOSHIDA and Motoharu MURAKAMI	1
On the Earth Flows of the Tara-Dake Volcano	Kiyoshi WATANABE, Ken KAKU and Tsunehiko OSHIMA	15
Growth and Breakout of the Density-cline of Salt at the Interface of Two Layered Flow	Yoshio TOHARA, Osamu KATO and Hiroyuki CHO	25
Modes and Phenomena of Vibration of Fruit and Vegetables at the Resonant Frequencies	Takayuki KOJIMA	41
Measurement of In-situ Shearing Strength of Ariake Clay Ground by Static Cone Penetration Test	Tatsuya KOUMOTO and Ken KAKU	55
Notes on Imogolite of Volcanogenous Soils of Unzen Volcano	Tsunayuki YANO	63
Studies on Volcanogenous Soils of the Unzen Volcano (Part 6) Relationships between the composition of clay minerals and plant productivity (Continued)	Tsunayuki YANO and Seiichiro MIYAZONO	75
Cytogenetic Studies on the Origin of <i>Allium wakegi</i> Araki II. Fertility and meiotic behavior of the tetraploid <i>A. wakegi</i> and the amphidiploid hybrid between <i>A. ascalonicum</i> L. and <i>A. fistulosum</i> L.	Yousuke TASHIRO	85

Published
by
FACULTY OF AGRICULTURE
SAGA UNIVERSITY
SAGA, JAPAN

Pycnopus cinnabarinus の生産するキチナーゼと キトビアーゼの分離および二、三の性質

大宝 明・泉 隆子・吉田美穂・村上元治*

(食品製造学研究室)

昭和 55 年 10 月 25 日 受理

Isolation of Chitinase and Chitobiase Produced by *Pycnopus cinnabarinus* and their Some Properties

Akira OHTAKARA, Takako IZUMI, Miho YOSHIDA
and Motoharu MURAKAMI*

(Laboratory of Food Technology)

Received October 25, 1980

Summary

The chitinolytic enzymes produced by *Pycnopus cinnabarinus* were separated into one fraction of chitobiase (EC 3.2.1.30) and two fractions of chitinase (EC 3.2.1.14), C I and C II, by DEAE-Sephadex A-50 chromatography. The two chitinases were partially purified to free from chitobiase by Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-Sephadex A-50 chromatography. The chitobiase was purified in an electrophoretically homogeneous state by CM-Sephadex C-50 chromatography and Sephacryl S-200 and Sephadex G-100 gel filtration.

The optimum pH of C I and C II was 3.0 and 5.0, respectively, and that of chitobiase was 2.3. C I and C II were stable in the range of pH 3-8 and pH 4-8, respectively, and they were inactivated completely at 60°C. The chitobiase was stable in acidic pH range of 2 to 4 and below 50°C, and it was inactivated completely at 70°C.

The chitinases hydrolysed colloidal chitin, glycol chitin and chitotetraose without formation of *N*-acetylglucosamine, but did not hydrolyse chitotriose and chitobiose. The chitobiase did not act on colloidal chitin and hydrolysed not only chitobiose but chitotriose and chitotetraose to form *N*-acetylglucosamine. Colloidal chitin was decomposed into *N*-acetylglucosamine by the joint action of chitinase and chitobiase produced by *Pycnopus cinnabarinus*.

緒 言

担子菌 *Lycoperdon* sp. は強力なキチナーゼ (EC 3.2.1.14) を生産することが Tracey により初めて発見され¹⁾, その粗酵素液を用いたキチンの酵素的定量が報告されている²⁾. しかし, 他の微生物源キチナーゼに比べて, 担子菌キチナーゼに関する研究は極めて少なく^{3), 4)}, まだ精製酵素についての報告はなく, それらの酵素化学的性質も明らかにされていない. 一方, 川合^{5), 6)} は担子菌について広くキチナーゼの生産性を調べ, その分類群間における酵素生成のパターンを比

* 現在バイエル薬品株式会社

較し, *Aphyllphorales* においてキチナーゼ活性が強いことを報告している。

著者らはこれまで *Aspergillus niger*^{7),8),9)}, *Streptomyces griseus*¹⁰⁾ および *Vibrio* sp.^{11),12)} など各種の微生物源キチナーゼ系を分離精製し, それらによるキチンの分解機構を明らかにした。本報では, 川合⁵⁾ により最も活性が強いと報告された担子菌 *Pycnoporus* (*Trametes*) *cinnabarinus* を用いて, 本菌の生産するキチナーゼとキトビアーゼを分離し, それらの酵素的諸性質を調べ, キチンの分解について検討した結果について報告する。

実験方法

培養方法 使用した菌株は *Pycnoporus cinnabarinus* IFO 6139 である。本菌はバレイショ抽出液25%およびグルコース1%を含む斜面培地で25°C, 10日間培養した。菌糸約5mm²を種培養培地(シュクロース4%, ペプトン2%, 酵母エキス1%, KH₂PO₄ 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, pH 5.5) 50 ml を含む200 ml 三角フラスコに接種し, 30°C で6日間振とう培養した。この培養液1 ml を酵素生産培地(グルコース2%, ペプトン3%, 酵母エキス0.5%, (NH₄)₂SO₄ 1%, KH₂PO₄ 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, pH 5.5) 50 ml を含む200 ml 三角フラスコに接種し, 30°C で6日間振とう培養した。この培養ろ液を粗酵素液として使用した。

試薬 コロイダルキチンおよびグライコールキチンは, Sigma 社製キチンから Jeuniaux の方法¹³⁾ および千手・沖増の方法¹⁴⁾ によりそれぞれ調製した。キトサンは生化学工業社製を使用し, *N,N*-ジアセチルキトビオース(キトビオース), *N,N,N*-トリアセチルキトトリオース(キトトリオース) および *N,N,N,N*-テトラアセチルキトテトラオース(キトテトラオース) は, キチンの酸加水分解後 Sephadex G-25 によるゲルろ過¹⁵⁾ を用いて分離調製した。*p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル-β-D-グルコサミニド(pNPGlcNAc) は Koch-Light 社製である。カラムクロマトグラフィーには Pharmacia 社製の DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50, Sephadex G-100 および Sephacryl S-200 を使用した。

キチナーゼ活性の測定 0.5%コロイダルキチン1 ml, McIlvaine 緩衝液(pH 4.25) 2 ml および酵素液1 ml を含む反応液を37°C で20分間振とう反応後, 3分間煮沸して反応を停止した。遠心分離後(9,000 rpm, 10 min), 反応液1.5 ml 中の全還元糖量を Schales 法の変法¹⁶⁾ を用いて測定し, *N*-アセチルグルコサミン量で表わした。この条件で毎分1 μmole の *N*-アセチルグルコサミンに相当する還元糖を生成する酵素量を1単位とした。

キトビアーゼ活性の測定 基質としてキトビオースまたは pNPGlcNAc を用いて測定した。キトビオースを基質とする場合は, 4 mM キトビオース 0.1 ml, 0.1 M クエン酸・塩酸緩衝液(pH 2.3) 0.2 ml と酵素液 0.1 ml を 37°C で10分間反応後, 生成する *N*-アセチルグルコサミン量を Reissig らの方法¹⁷⁾ で定量し, 基質の分解を測定した。この活性測定法は酵素の性質を調べる実験に用いた。

pNPGlcNAc を基質とする場合は, 4 mM pNPGlcNAc 0.2 ml, 0.1 M クエン酸・塩酸緩衝液(pH 2.3) 0.2 ml と酵素液 0.1 ml を 37°C で10分間反応後, 0.2 M Na₂CO₃ 2 ml を加えて反応を停止し, 遊離した *p*-ニトロフェノール量を 420 nm で比色定量した。この条件で毎分1 μmole の *p*-ニトロフェノールを遊離する酵素量を1単位とした。この活性測定法は酵素の精製の実験に使用した。

タンパク質の定量 タンパク質は Hartree の方法¹⁸⁾ により牛血清アルブミンを標準として定量した。また, カラムクロマトグラフィーにおいては 280 nm の吸光度を測定しタンパク質量を表わした。

ディスク電気泳動¹⁹⁾ 7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、pH 8.3 でディスク電気泳動を行った。電流はゲル1本当たり 2 mA とし、室温で2時間通電させた。泳動後ゲルは12.5%トリクロロ酢酸に溶かした 0.05% Commassie Brilliant Blue R 250 で 50°C、3時間染色し、7%酢酸で脱色した。

ペーパークロマトグラフィー²⁰⁾ 東洋ろ紙 No. 51 を使用し、*n*-ブタノール：エタノール：水：アンモニア (40：10：49：1、上層) を溶媒とし、室温で上昇法により二重展開を行った。ろ紙は風乾後、ジフェニルアミン・アニリン試薬を噴霧し、80°C で5分間加熱して発色させた。

実験結果

キチナーゼ系の分離

粗酵素液に0.75飽和になるように粉末硫酸を加え、48時間放置後、遠心分離 (7,000 rpm, 30 min) した。沈殿は脱イオン水に溶かし、0.02 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-25 カラム (5.0×50 cm) を通して脱塩した。脱塩酵素液は上記リン酸緩衝液で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラムに吸着させ、同じ緩衝液で洗浄した後、0~1 M NaCl で直線濃度勾配溶出を行った。その結果は Fig. 1 に示した。キチナーゼは 0.3 M および 0.5 M の NaCl 濃度で、キトビアーゼは 0.1~0.15 M の NaCl 濃度でそれぞれ溶出された。キチナーゼ画分を CI および C II、キトビアーゼ画分を CB とし、さらに精製を行った。

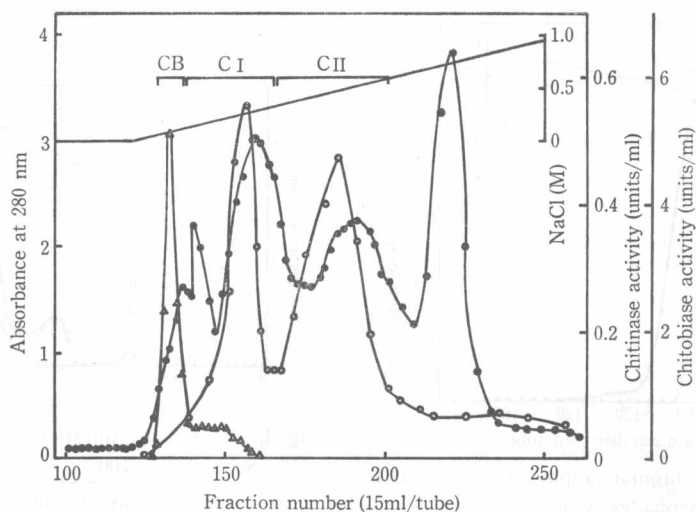


Fig. 1. Separation of chitinases and chitinase by DEAE-Sephadex A-50 column chromatography.

Protein (1,679 mg) was applied to a DEAE-Sephadex A-50 column (50×400 mm). The column was washed with 0.02 M phosphate buffer, pH 6.0 and eluted with a linear NaCl gradient (0 to 1 M) in the same buffer at a flow rate of 65 ml/hr. Brackets C I, C II and CB indicate the fractions of two chitinases and chitinase which were pooled. —●—, absorbance at 280 nm; —○—, chitinase activity; —△—, chitinase activity.

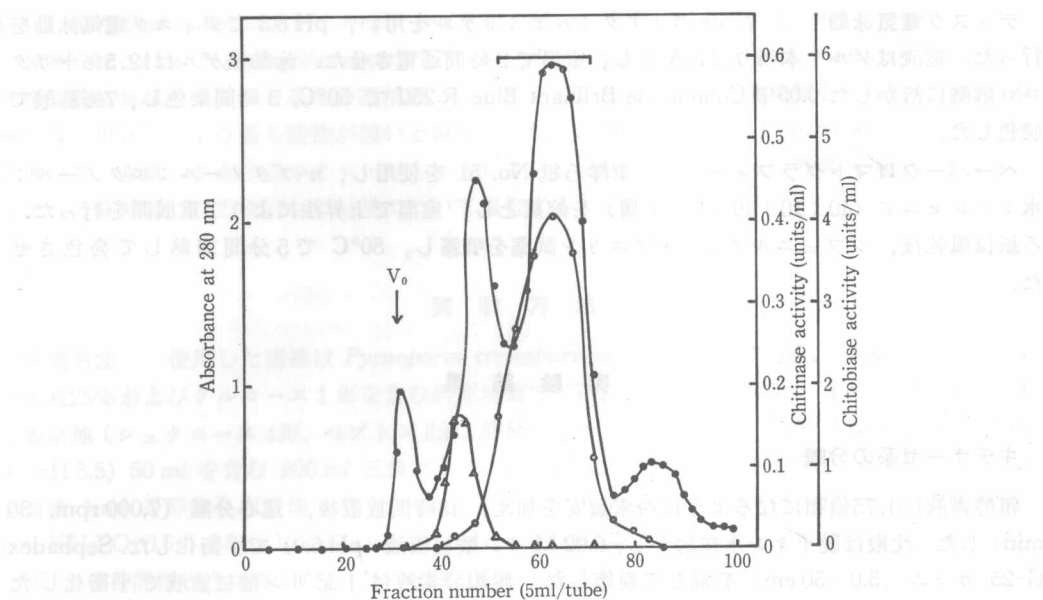


Fig. 2. First gel filtration of chitinase C I on Sephadex G-100.

The chitinase fraction C I (Fig. 1) containing 141 mg of protein was applied to a Sephadex G-100 column (26×830 mm). The column was eluted with 0.02 M phosphate buffer, pH 6.0, at a flow rate of 20 ml/hr. [—], fraction pooled; —●—, absorbance at 280 nm; —○—, chitinase activity; —△—, chitinase activity.

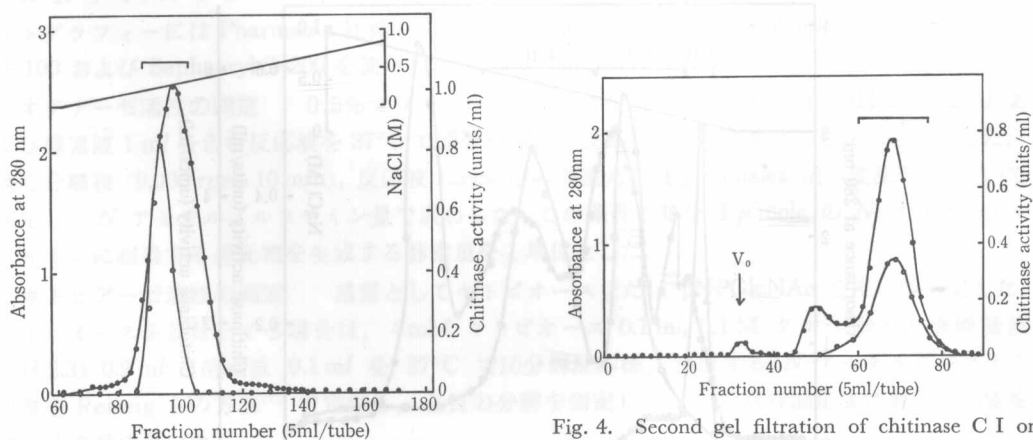


Fig. 3. Column chromatography of chitinase C I on DEAE-Sephadex A-50.

The chitinase fraction C I (Fig. 2) containing 189 mg of protein was applied to a DEAE-Sephadex A-50 column (16×200 mm). The column was washed with 0.02 M phosphate buffer, pH 6.0 and eluted with a linear NaCl gradient (0 to 1 M) in the same buffer at a flow rate of 30 ml/hr. [—], fraction pooled; —●—, absorbance at 280 nm; —○—, chitinase activity.

Fig. 4. Second gel filtration of chitinase C I on Sephadex G-100.

The chitinase fraction C I (Fig. 3) containing 90 mg of protein was applied to a Sephadex G-100 column (26×980 mm). Elution was carried out with 0.02 M phosphate buffer, pH 6.0, at a flow rate of 18 ml/hr. [—], fraction pooled; —●—, absorbance at 280 nm; —○—, chitinase activity.

キチナーゼの部分的精製

Fig. 1 で得られたキチナーゼ画分 CI は限外ろ過 (Amicon 社製メンブランフィルター UM-10) で濃縮後, Sephadex G-100 によるゲルろ過を行った。その結果は Fig. 2 のようになり, ゲルろ過によりキチナーゼ画分から大部分のキトビアーゼ活性を除くことができた。キチナーゼ活性の強い部分を集めて濃縮後, 再び DEAE-Sephadex A-50 によるカラムクロマトグラフィーを Fig. 1 と同様な条件で行った。その結果は Fig. 3 に示した。CI は Fig. 1 の場合と同様に 0.3 M 付近の NaCl 濃度で溶出された。活性の強い部分を集めて濃縮後, Sephadex G-100 で再ゲルろ過を行うと Fig. 4 の結果が得られた。CI はこの段階でキトビアーゼ活性を含まなかったため, 精製酵素として以下の実験に使用した。

C II も C I と同様な過程で精製を行った。Sephadex G-100 によるゲルろ過では C II も C I とほぼ同じ位置に溶出されたが, DEAE-Sephadex A-50 によるクロマトグラフィーにおいては, Fig. 1 の場合と同様に C II は 0.5 M 付近の NaCl 濃度で溶出された。

キチナーゼの精製の結果は Table 1 に示すように, C I は収量3.2%で比活性が7.4倍に, C II は収量8.3%で比活性が45.9倍になった。

Table 1. Purification of chitinase from *Pycnoporus cinnabarinus*

Step		Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture filtrate		15,500	651	0.042	100	1.0
Ammonium sulfate precipitation		2,600	410	0.158	63.0	3.8
1st DEAE-Sephadex A-50	C I	393	52	0.132	8.0	3.1
	C II	310	135	0.435	20.7	10.4
1st Sephadex G-100	C I	269	42	0.156	6.5	3.7
	C II	101	129	1.277	19.8	30.4
2nd DEAE-Sephadex A-50	C I	125	33	0.264	5.1	6.3
	C II	50	88	1.760	13.5	41.9
2nd Sephadex G-100	C I	68	21	0.309	3.2	7.4
	C II	28	54	1.929	8.3	45.9

キトビアーゼの精製

キトビアーゼの精製では, 別に培養を行った培養ろ液を粗酵素液とし, キチナーゼの場合と同様に硫酸塩析, Sephadex G-25 による脱塩, DEAE-Sephadex A-50 によるカラムクロマトグラフィーを行い, キトビアーゼ画分 CB を得た。CB は濃縮後, Sephacryl S-200 を用いてゲルろ過を行った。Fig. 5 はその結果を示したもので, キトビアーゼは void volume の約1.3倍の位置に溶出された。活性の強い部分を集めて濃縮後, 0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 4.2) で平衡化した CM-Sephadex C-50 カラムに吸着させ, 未吸着のタンパク質を溶出後, 0~0.5 M の NaCl で直線濃度勾配溶出を行った。Fig. 6 に示すように, キトビアーゼは 0.3 M 付近の NaCl 濃度で溶出された。この活性部分を集めて濃縮後, Sephadex G-100 によるゲルろ過を行い, 精製キトビアーゼ標品とした。精製酵素はディスク電気泳動的に均一であった。(Fig. 7)

キトビアーゼの精製の結果は Table 2 に示すように, 収量 13.7% で比活性が約 1,260 倍になった。

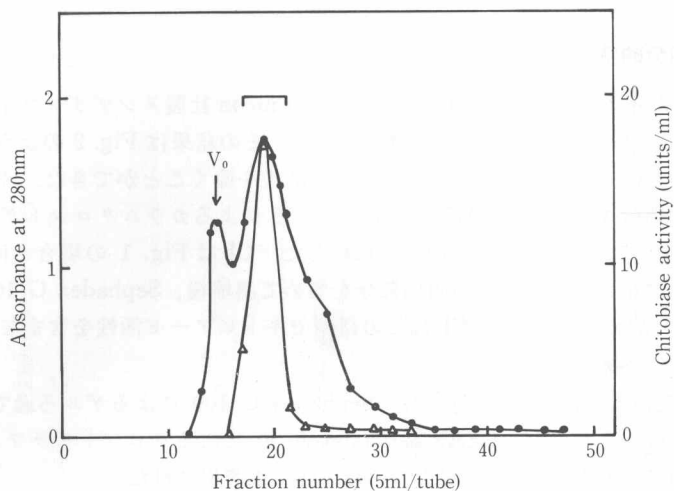


Fig. 5. Gel filtration of chitinase CB on Sephacryl S-200.

The chitinase fraction CB containing 76 mg of protein was applied to a Sephacryl S-200 column (16×950 mm). The column was eluted with 0.05 M citrate buffer, pH 4.2, at a flow rate of 5 ml/hr. [] fraction pooled; —●—, absorbance at 280 nm; —△—, chitinase activity.

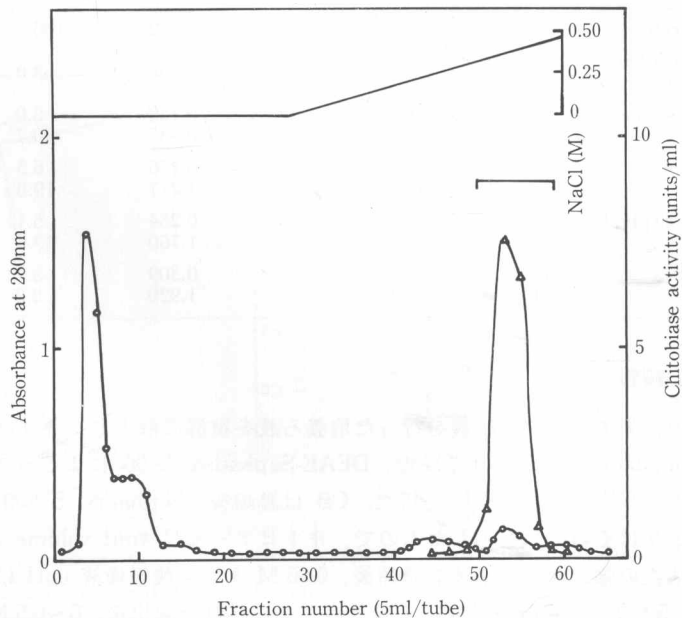


Fig. 6. Column chromatography of chitinase CB on CM-Sephadex C-50.

The chitinase fraction CB containing 18 mg of protein was applied to a CM-Sephadex C-50 column (16×190 mm). The column was washed with 0.05 M citrate buffer, pH 4.2 and eluted with a linear NaCl gradient (0 to 0.5 M) in the same buffer at a flow rate of 9.5 ml/hr. [] fraction pooled; —●—, absorbance at 280 nm; —△—, chitinase activity.

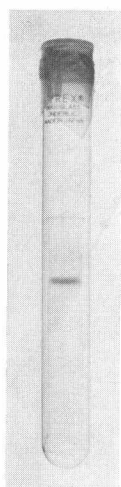


Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of chitobiase.

The purified chitobiase (about 3.5 μ g as protein) was used. Details are described in the text.

酵素の性質

最適 pH キチナーゼおよびキトビアーゼ活性に対する pH の影響は Fig. 8 に示した。CI は pH 3.0 付近，C II は pH 5.0 付近にそれぞれ最適 pH があり，キトビアーゼの最適 pH は 2.3 の強酸性側にあり，pH 1.8 でも最適 pH の約60%の活性があった。

pH 安定性 酵素液を各種 pH の緩衝液中で 25°C，3 時間保温後，それぞれの酵素の残存活性を測定した結果が Fig. 9 である。CI は pH 3~8，C II は pH 4~8 の範囲で安定であった。CB は pH 2-4 の酸性側で安定であったが，pH 1.5 付近では急激に失活した。

熱安定性 酵素液をそれぞれの酵素の最適 pH で各温度に 15 分間放置し，残存活性を測定した結果が Fig. 10 である。キチナーゼは CI，C II ともに 40°C 以上で活性が低下し，60°C で完全に失活し，C II が熱に対してやや不安定であった。これに対してキトビアーゼは 50°C までは活性の低下が認められなかったが，70°C で完全に失活した。

Table 2. Purification of chitobiase from *Pycnoporus cinnabarinus*

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture filtrate	16,808	564	0.034	100	1
Ammonium sulfate precipitation	2,109	727	0.360	129	11
DEAE-Sephadex A-50	106	298	2.81	51.2	83
Sephacryl S-200	23	226	9.62	40.0	283
CM-Sephadex C-50	2.8	138	49.29	24.5	1,450
Sephadex G-100	1.8	77	42.78	13.7	1,258

基質特異性 キチナーゼによるキチン，キトサンとその誘導体，およびキトオリゴ糖類の分解を調べた結果が Table 3 である。CI および C II ともにコロイダルキチンと水溶性誘導体のグライコールキチンをよく分解し，C II はキチンとともにキトサンも僅かに分解した。また，両酵素ともキトテトラオースを分解したが，キトトリオースやキトビオースには作用しなかった。キチナーゼによるこれら基質の分解において，N-アセチルグルコサミンの生成は全く認められなかった。キトビアーゼによるキトオリゴ糖類の分解を比較した結果は Table 4 に示した。キトビアーゼはキトビオースを最もよく分解し，またキトトリオースやキトテトラオースを分解して N-アセチルグルコサミンを生成した。

キチナーゼ系によるキチンの分解

コロイダルキチンをキチナーゼまたはキトビアーゼ単独，およびキチナーゼとキトビアーゼを含むキチナーゼ系と反応させ，生成した全還元糖量および N-アセチルグルコサミン量を測定し

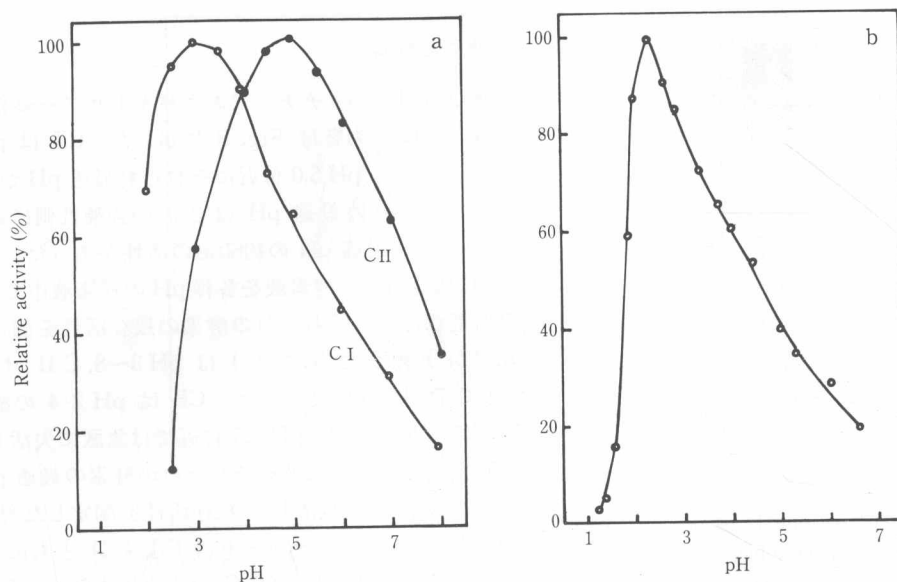


Fig. 8. Effect of pH on chitinase (a) and chitobiase (b) activities.

Chitinase and chitobiase activities were measured at various pH values and the activities were expressed as a percentage of the maximum activity.

C I and C II: pH 2.00–2.50, sodium citrate-HCl buffer; pH 3.00–8.00, McIlvaine buffer.

CB: pH 1.25–2.00, glycine-HCl buffer; pH 2.33–4.36, sodium citrate-HCl buffer; pH 4.95–6.58, sodium citrate-NaOH buffer.

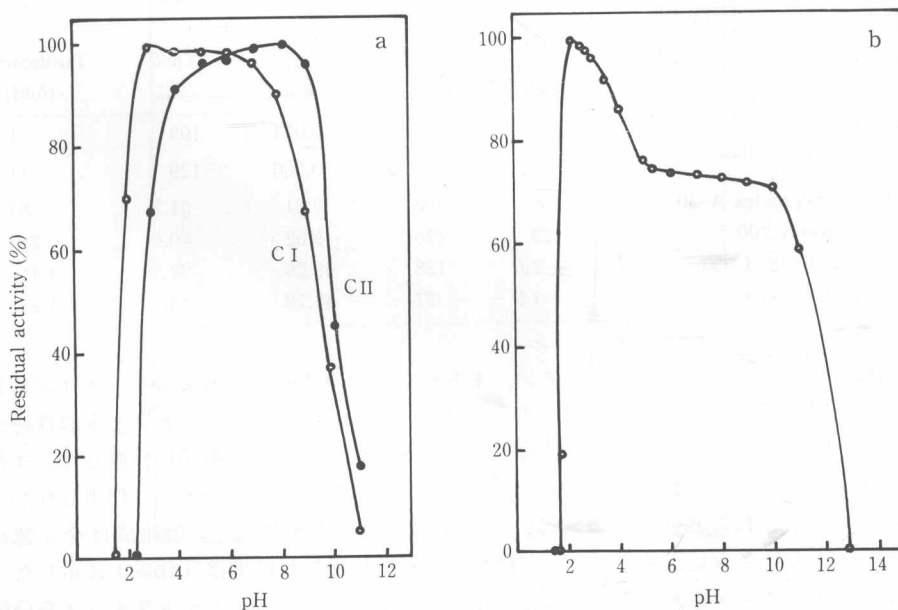


Fig. 9. Effect of pH on the stability of chitinase (a) and chitobiase (b).

Enzymes were preincubated at 25°C for 3 hr in buffers of various pH values and the residual activities were measured under the standard conditions.

C I and C II: pH 1.40–2.20, sodium citrate-HCl buffer; pH 3.00–8.00, McIlvaine buffer; pH 9.00–11.00, Atkins and Pantin buffer.

CB: pH 1.23–4.02, sodium citrate-HCl buffer; pH 4.89–7.12, McIlvaine buffer; pH 8.00–9.00, Tris-HCl buffer; pH 10.09–12.81, glycine-NaOH buffer.

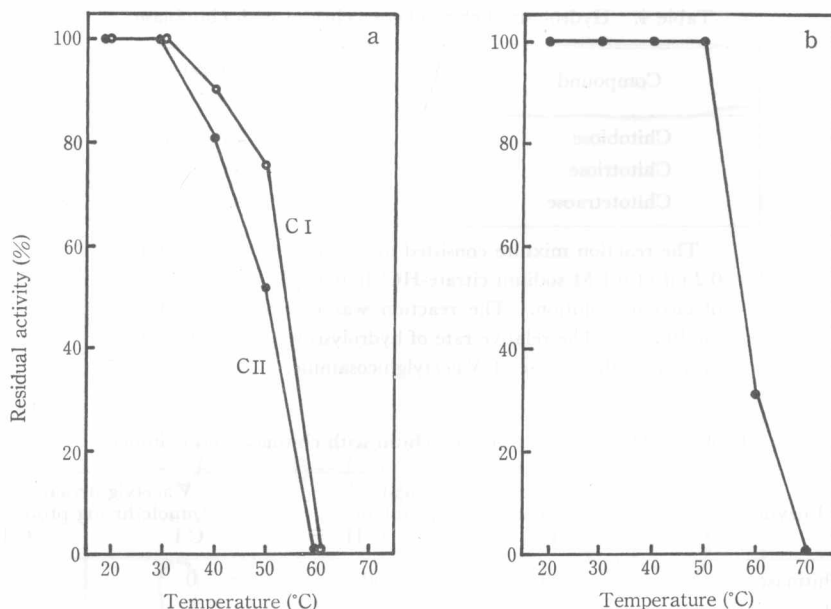


Fig. 10. Effect of temperature on the stability of chitinase (a) and chitobiase (b).

Chitinase C I and C II were preincubated in McIlvaine buffer of pH 3.0 and pH 5.0, respectively, at various temperatures for 15 min and chitobiase was preincubated in sodium citrate-HCl buffer of pH 2.3. The residual activities were measured under the standard conditions.

た結果は Table 5 に示す通りである。キチナーゼ単独では還元糖の生成のみが認められ、キトビアーゼ単独ではコロイダルキチンを全く分解しなかった。これに対してキチナーゼ系では、還元糖とともに *N*-アセチルグルコサミンが生成し、生成物の大部分は *N*-アセチルグルコサミンであると考えられた。

さらにコロイダルキチンをキチナーゼ単独またはキチナーゼ系と反応させ、分解生成物をペーパークロマトグラフィーによって同定した。その結果を Fig. 11 に示した。キチナーゼによるコ

Table 3. Hydrolysis of chitin and its related compounds with chitinase

Compound	Concentration (%)	Reducing sugar produced (μ mole/hr/mg protein)	
		C I	C II
Chitin	0.250	0	3.9
Colloidal chitin	0.125	9.1	51.8
Glycol chitin	0.125	15.7	60.3
Chitosan	0.250	0	3.4
Glycol chitosan	0.125	0	0
Chitotetraose	0.250	1.7	8.2
Chitotriose	0.250	0	0
Chitobiose	0.250	0	0

The reaction mixture consisting of 1 ml of various compounds, 2 ml of McIlvaine buffer of pH 3.0 (C I) and pH 5.0 (C II), and 1 ml of enzyme solution was incubated with shaking at 37°C for 1 hr.

The amounts of reducing sugar and *N*-acetylglucosamine produced in 4 ml of the reaction mixture were determined with *N*-acetylglucosamine as a reference compound.

Table 4. Hydrolysis of chito-oligosacchrides with chitobiase

Compound	Relative rate (%)
Chitobiose	100
Chitotriose	46
Chitotetraose	28

The reaction mixture consisted of 0.1 ml of 4 mM substrate, 0.2 ml of 0.1 M sodium citrate-HCl buffer, pH 2.3 and 0.1 ml of enzyme solution. The reaction was carried out at 37°C for 10 min. The relative rate of hydrolysis was determined by measuring the release of *N*-acetylglucosamine.

Table 5. Hydrolysis of colloidal chitin with chitinase and chitobiase

Enzyme	Reducing sugar (μ mole/hr/mg protein)		<i>N</i> -acetylglucosamine (μ mole/hr/mg protein)	
	C I	C II	C I	C II
Chitinase	9.4	50.7	0	0
Chitinase + Chitobiase	12.9	69.7	11.2	58.3
Chitobiase	0	0	0	0

The reaction mixture consisting of 1 ml of 0.5% colloidal chitin, 2 ml of McIlvaine buffer, pH 4.25 and 1 ml of enzyme solution was incubated with shaking at 37°C for 1 hr. The amounts of reducing sugar and *N*-acetylglucosamine produced in 4 ml of the reaction mixture were determined with *N*-acetylglucosamine as a reference compound.

ロイダルキチンの分解生成物は主にキトビオースであり、C II でキトテトラオース、C I の5時間反応後 *N*-アセチルグルコサミンの生成が認められた。これに対してキチナーゼ系によるコロイダルキチンの分解では、*N*-アセチルグルコサミンのみが生成した。

考 察

Pycnoporus cinnabarinus の生産するキチン分解酵素を DEAE-Sephadex A-50 によるクロマトグラフィーを用いて、キチナーゼ画分 C I および C II とキトビアーゼ画分に分離し、C I および C II はさらに Sephadex G-100 や DEAE-Sephadex A-50 を用いてキトビアーゼを完全に除き精製した。これまで Hydroxylapatite によるクロマトグラフィーは、*Aspergillus niger*²¹⁾, *Streptomyces* sp.²²⁾ および *Vibrio* sp.¹¹⁾ など微生物源キチナーゼの精製において有効であると報告されている。この方法は酵素の収量の低下が著しく本酵素の精製に応用できず、また二、三の試みた方法も精製に効果がなかったので、本研究では均一なキチナーゼ標品は得られなかった。本菌のキチナーゼは C I と C II に分離され、両酵素は Sephadex G-100 によるゲルろ過ではほぼ同一位置に溶出されたが、DEAE-Sephadex A-50 によるクロマトグラフィーでは異なった食塩濃度で溶出され、また酵素の性質において両者の間には相違が認められた。これら二種のキチナーゼはアイソザイムであることも考えられるが、さらに酵素の精製を行って明らかにしたい。

キトビアーゼは合成基質 pNPGlcNAc を用いて活性を測定し、酵素の精製を行い均一な酵素標品を得ることができた。この酵素標品は *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- β -D-ガラクトサミニ

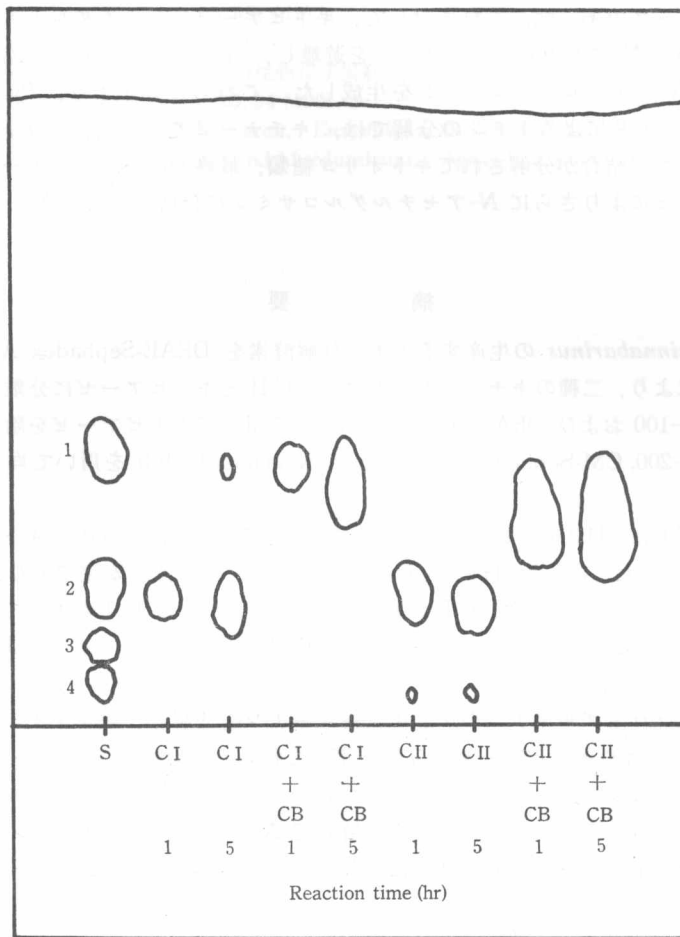


Fig. 11. Paper chromatogram of the hydrolysis products of colloidal chitin.

The reaction mixture consisting of 1 ml of 0.5% colloidal chitin, 2 ml of McIlvaine buffer, pH 4.25 and 1 ml of enzyme solution was incubated with shaking at 37°C for 1 hr or 5 hr. Chromatography was carried out on Tōyō Roshi No. 51 paper with the solvent system *n*-butanol: ethanol: water: ammonia (40: 10: 49: 1, upper layer) and the spots were detected with diphenylamine-aniline reagent. S, standard; 1, N-acetylglucosamine; 2, chitobiose; 3, chitotriose; 4, chitotetraose.

ドにも作用する β -N-アセチルヘキソサミニダーゼであることがわかったので、これら合成基質およびキトビオースの分解活性を測定して酵素の精製を行い、別に報告した。²³⁾ その結果、キトビアーゼ活性と合成基質に対する β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性とは同一酵素によって触媒されることが明らかにされている。また、本報のキトビオースに対する最適 pH、熱および pH 安定性は、pNPGlcNAc に対する β -N-アセチルヘキソサミニダーゼのそれらの性質²³⁾ に類似していた。本菌のキトビアーゼは *Streptomyces griseus*¹⁰⁾ や *Vibrio* sp.¹²⁾ のキトビアーゼで報告されているように、キトビオースのみでなく、キトトリオースやキトテトラオースに対しても作用し N-アセチルグルコサミンを生成した。

本菌のキチナーゼはコロイダルキチン、グライコールキチンおよびキトテトラオースを分解して還元糖を生成したが、N-アセチルグルコサミンは長時間の反応後少量検出されたにすぎず、主

生成物はキトビオースであった。これに対して、キトビアーゼはコロイダルキチンに作用せず、キトオリゴ糖類から *N*-アセチルグルコサミンを遊離し、またキチナーゼとの協同作用でコロイダルキチンから *N*-アセチルグルコサミンを生成した。これらの結果より、*Pycnoporus cinnabarinus* のキチナーゼ系によるキチンの分解では、キチナーゼによりキチン分子内部の β -*N*-アセチルグルコサミニド結合が分解されてキトオリゴ糖類、最終的にはキトビオースを生成し、これらはキトビアーゼによりさらに *N*-アセチルグルコサミンに分解されると考えられる。

摘 要

- 1) *Pycnoporus cinnabarinus* の生産するキチン分解酵素を DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーにより、二種のキチナーゼ C I および C II とキトビアーゼに分離した。キチナーゼは Sephadex G-100 および DEAE-Sephadex A-50 を用いてキトビアーゼを除き、キトビアーゼは Sephacryl S-200, CM-Sephadex C-50 および Sephadex G-100 を用いて均一な標品に、それぞれ精製した。
- 2) キチナーゼ C I は pH 3.0, C II は pH 5.0 にそれぞれ最適 pH があり、キトビアーゼは pH 2.3 に最適 pH があった。C I は pH 3~8, C II は pH 4~8 の範囲で安定であり、キトビアーゼは pH 2~4 の範囲で安定であった。C I および C II とともに 40°C 以上の加熱で徐々に失活し、60°C で完全に失活した。また、キトビアーゼは 50°C までは熱に対して安定であったが 70°C で完全に失活した。
- 3) キチナーゼはコロイダルキチンやグライコールキチンを分解し、キトテトラオースに作用したが、キトトリオースやキトビオースを分解せず、これらの化合物から *N*-アセチルグルコサミンをほとんど生成しなかった。キトビアーゼはコロイダルキチンに作用せず、キトビオースのみでなくキトトリオースやキトテトラオースを分解して *N*-アセチルグルコサミンを生成した。また、キチナーゼとキトビアーゼの協同作用により、コロイダルキチンは *N*-アセチルグルコサミンに分解された。

文 献

- 1) M. V. Tracey, *Biochem. J.*, **61**, 579 (1955).
- 2) M. V. Tracey, *Modern Methods of Plant Analysis*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, p. 264 (1955).
- 3) L. Claus, *Arch. Mikrobiol.*, **40**, 17 (1961).
- 4) W. Iten and P. Matile, *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 301 (1970).
- 5) 川合正充, 農化, **47**, 437 (1973).
- 6) 川合正充, 農化, **47**, 633 (1973).
- 7) A. Ohtakara, *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 454 (1963).
- 8) A. Ohtakara, *ibid.*, **28**, 745 (1964).
- 9) A. Ohtakara, *ibid.*, **28**, 811 (1964).
- 10) A. Ohtakara, *Bull. Hiroshima Women's Univ.*, **6**, 1 (1971).
- 11) A. Ohtakara, M. Mitsutomi and Y. Uchida, *J. Ferment. Technol.*, **57**, 169 (1979).
- 12) 大宝 明, 十時理哲, 光富 勝, 内田 泰, 佐賀大農彙, **48**, 65 (1980).
- 13) C. Jeuniaux, *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, **66**, 408 (1958).
- 14) 千手諒一, 沖増 哲, 農化, **23**, 432 (1950).
- 15) R. C. W. Berkeley, S. J. Brewer and J. M. Ortiz, *Anal. Biochem.*, **46**, 687 (1972).
- 16) T. Imoto and K. Yagishita, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1154 (1971).
- 17) R. L. Reissig, J. L. Strominger and L. F. Leloir, *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955).

- 18) E. F. Hartree, *Anal. Biochem.*, **48**, 422 (1972).
- 19) 菊谷元資, 化学と生物, **7**, 545 (1969).
- 20) 友田正司, 蛋白質・核酸・酵素, 別冊生物化学実験法 XI, p. 33 (1968).
- 21) A. Ohtakara, *Agric. Biol. Chem.*, **25**, 54 (1961).
- 22) J. Skujins, A. Pukite and A. D. McLaren, *Enzymologia*, **39**, 353 (1970).
- 23) A. Ohtakara, M. Yoshida, T. Izumi and M. Murakami, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 239 (1981).