

*Aeromonas sobria*セリンプロテアーゼの活性構造構築過程の解析

野村知彦¹、○小林秀丈¹、藤木博太¹、岡本敬の介²

¹徳島文理大・薬・生化学、²岡山大・薬・分子細胞薬品科学

【目的】私達は*A. sobria*が菌体外へ産生するセリンプロテアーゼ(ASP)がいかなる過程を経て活性構造を構築するのかについて調べている。ASPは生合成後、同一オペロン内にコードされているタンパク、ORF2(シャペロン)の作用によりfoldingが促進され活性構造を構築する。この時、ORF2が機能を発揮するためにはそのC末端アミノ酸が重要な役割を果たしていることを明らかにした。しかし、これらの事実は*in vitro*、または大腸菌をhostとした実験より導かれた結果であるため、*A. sobria*で産生時にいかなる過程を経るのかは不明である。そこで今回、*A. sobria*で*asp*、*orf2*、または変異*orf2*を発現させASPの成熟化およびORF2C末端の機能を解析した。【方法および材料】*asp*及び、*orf2*の両遺伝子が欠損した*A. sobria* T94株での*asp*、*orf2*の発現はシャトルベクター-pSA19CPを用いて行った。発現されたASP、ORF2の性状をセリンプロテアーゼ活性測定、western blotting等で解析した。ORF2C末端アミノ酸の機能解析は*in vitro*で合成されたASPの性状を調べることで行った。【結果および考察】*A. sobria* T94でORF2と共に発現したASPは活性のある形で菌体外へ分泌されたが、ORF2の非存在下ではASP活性を示さず分解されていた。また、ORF2のみを発現させORF2の局在を調べた結果、ペリプラスム画分からORF2は検出された。さらに、C末端のアミノ酸が欠損した変異ORF2はASPを活性体へ変換できないことが判った。以上の結果は、ORF2はペリプラスムで未成熟なASPIに作用し、活性構造の構築を促進していること、およびORF2の機能の発揮にはC末端アミノ酸が重要であることを示している。次いで、C末端アミノ酸の機能を調べるためにASPと変異ORF2との作用を*in vitro*の実験で解析した。*In vitro*転写翻訳後のASP、及びORF2(野生型、または変異型)をASP抗体で免疫沈降した結果、ASPと共にORF2(野生型、および変異型)も回収された。従って、変異ORF2は野生型と同じくASPIに対しての結合能を有しているが、ASPの活性構造構築を促進できないと考えられた。以上の結果から、ORF2のC末端アミノ酸は、ASPのfoldingを促進する部位であると考えられた。