

# SEC-MALS による多蛋白質複合体の同定

Bradford Powell, Jeffrey Enama, and Jeffrey Adamovicz, USAMRIID

日本語訳：昭光サイエンス株式会社

## 序論

ペスト菌のインジェクトソームはバクテリアの毒性因子を宿主の食細胞内に転送する蛋白質複合体器官です。これは疫病の病原因子の必須な部分で、哺乳類の免疫防御の回避に寄与します。ペスト菌のインジェクトソームはバクテリアのエンベロープの両膜をまたぐ III 型分泌系 (T3SS) の基盤構造からなり、その上に中空の針状の構造が集合しています。食細胞への特異的な吸着とドッキングに伴って、インジェクトソームはペスト菌外蛋白質 (Yops) と呼ばれる分泌性抗宿主エフェクター蛋白質の一セットを直接宿主細胞に転送します。その蛋白質のうちのいくつかは、バクテリアが食細胞に飲み込まれるのを防ぎ、前炎症性サイトカインの正常な産生を阻止します。これらの毒性因子の遺伝的な制御は熱誘導性およびカルシウム抑制性の経路を含むことが知られており、その産生は 37°C で溶液のカルシウム濃度をミリモル以下に希釈することによって増加します。即ち、低カルシウム応答 (lcr) になります。遺伝子産物 LcrG および LcrV は分子ゲートとして提唱されている重要な部分を構成し、Yops の放出を制御し、宿主細胞とのドッキングに成功して初めて放出されます。Yops の転送のゲーティングの生化学的な機構はまだ解明されていませんが、これもカルシウムが関与することが示唆されています。

このアプリケーションノートでは、絶対分子量測定が可能な [多角度光散乱検出器 DAWN](#) とサイズ排除クロマトグラフィーを接続した [SEC-MALS](#) により、これらの構成蛋白質が 37°C において予想された分子量を持つピークとして存在し、LcrV はモノマーとダイマーの分子種として存在することが示された例を紹介します (図 1)。

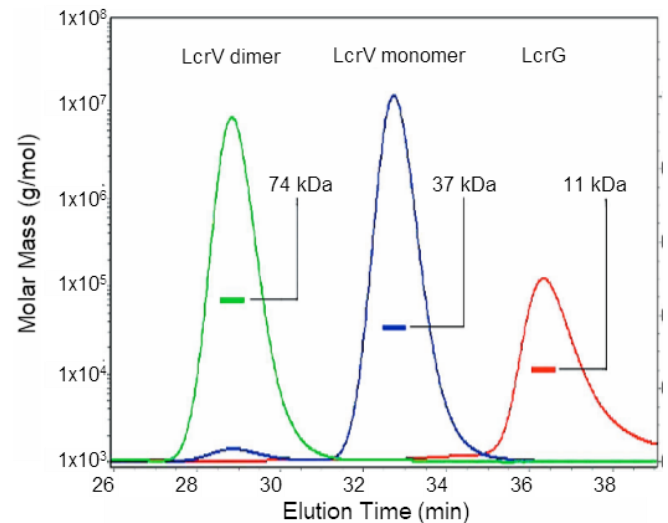


図 1. 個々の精製された毒性因子蛋白質の SEC-MALS の結果の重ね書き。クロマトは RI 検出器 (試料濃度) 赤：精製された LcrG、青：LcrV モノマー；緑：生成された 2 量体 LcrV。左の y 軸：分子量。x 軸：溶出時間。太線：各ピークの測定された分子量。

## 結果

等しい重量濃度の LcrG および 2 量体 LcrV を混合してから行った SEC-MALS の結果、個々の構成蛋白質 (ピーク 2 および 4) に比べて 48kDa の LcrV-LcrG ヘテロダイマー (図 2、青曲線ピーク 3) が多く検出されました。LcrG は明らかに LcrV ダイマー (ピーク 2) を解離させていますが、単量体の LcrV は検出できておらず、過剰な LcrV は 3 量体複合体に会合するようです (ピーク 1)。興味深いことに、5 mM CaCl<sub>2</sub> が存在すると、LcrV-LcrG ヘテロダイマーの形成は阻害されます (赤の曲線対青の曲線、ピーク 2 と 3)。LcrG が過剰に存在している場合 (ピーク 4) でも、LcrV の相当な部分は 2

量体のままであり（ピーク 2）、これらのいずれの条件下でも反応しないことが判明しました。このことは構成成分の平衡状態では制御が数居値の変化を介して行われているか、またはこれらの実験で存在していない因子または条件の関与があることを示唆しています。

この研究は、SEC-MALS システムによって、測定の温度、溶媒の化学組成および蛋白質の濃度を変えつつ直接絶対分子量を測定できることによって促進されました。これらの結果はペスト菌インジェクトソームのゲーティング機構の解明に役立ち、SEC-MALS の同様なアプリケーションによって他の可溶性蛋白質間の会合の理解にも重要な洞察が与えられました。

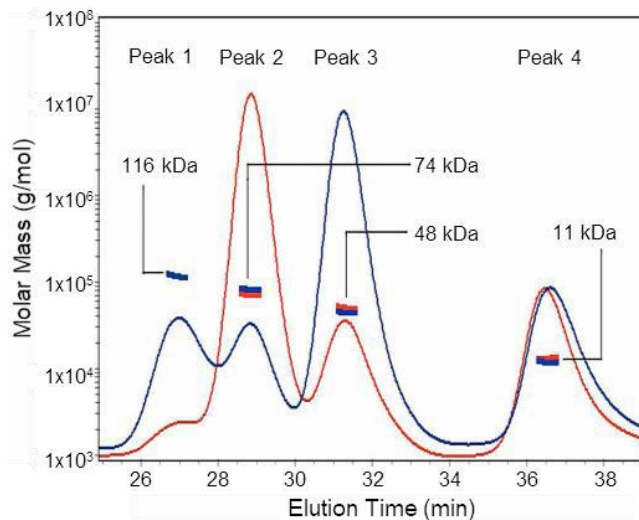
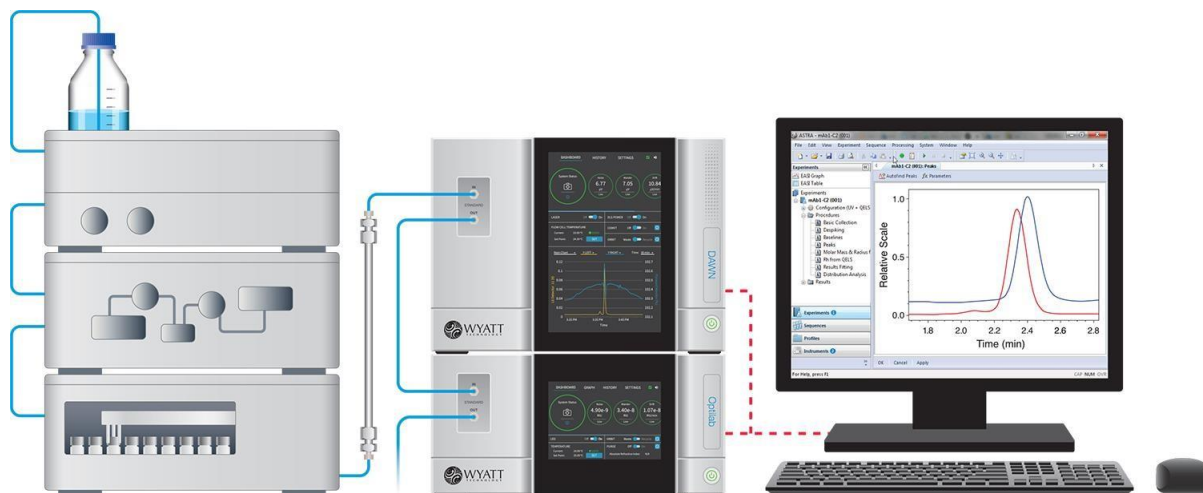


図 2. 蛋白質複合体形成の SEC-MALS 測定結果の比較。

青：緩衝液に CaCl<sub>2</sub> を含まない、赤：緩衝液に 5 mM の CaCl<sub>2</sub> を含む。クロマトグラフのピークは順番に番号を振っており、光散乱法による分子量測定値を示している。



本アプリケーションノートは、Wyatt Technology Corporation が全著作権所有しています。Wyatt Technology 社による書面での事前許可なく、電子的、機械的、コピー、記録、またはいかなる手段を問わず、本アプリケーションノートの一部を複製したり、検索システムに保存したり、変換することはできません。