



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



## クロオオアリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-12-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: ウェン, ドゥリガ メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.15118/00010330">https://doi.org/10.15118/00010330</a>

# 博士學位論文

題 目： クロオオアリの感覚子に発現する  
「化学感覚タンパク質」の構造と  
化学分子結合特性

氏 名： WEN DURIGE

提出年月日： 令和2年09月14日

# 博士学位論文

クロオオアリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性

2020年 9月 14日

室蘭工業大学大学院 工学研究科  
工学専攻先端生産システム工学コース  
博士後期課程

WEN DURIGE

## 要旨

アリやミツバチなどの社会性昆虫では、その社会を維持するために個体間の情報交換が重要な働きをしている。その様な情報交換は化学物質を介して行われ、同種間の情報交換を担う化学物質はフェロモンと呼ばれる。

クロオオアリ (*Camponotus japonicus*) は体表を大種固有のクチクラ炭化水素 (CHC) をフェロモンとして利用し、そのコロニー固有の混合パターンを錘状触角感覚子 (*S. basiconica*) を使用して感知し、巣仲間かどうかを判別し、巣仲間以外を排除する行動をとる。錘状触角感覚子の内部は、感覚神経リンパで満たされ、疎水性の CHC は化学感覚タンパク質 (CSP) に結合して、神経細胞受容体まで輸送されると考えられている。クロオオアリ触角の RNA 解析によって 12 種の CSP が発現していることがわかったが、本研究では、CHC の受容に必須である CjapCSP1 と、それと同様に働きアリの触角に多く発現し、CjapCSP1 と同一細胞で共発現している CjapCSP13 に注目して研究した。

まず、CjapCSP1 が CHC を結合し、運搬したのち、どの様にして神経細胞受容体に CHC を「渡す」のかについて調べた。この機構として、カイコガの運搬タンパク質では、pH 変化によってタンパク質の構造が変化し、結合しているフェ

ロモンを解離するという機構が提唱されている。そこで、CjapCSP1 の pH 4.0 および 7.0 での円二色性 (CD) および X 線溶液散乱を測定した。その結果、CD 測定から二次構造の違いは見られないが、X 線溶液散乱の結果から、pH 7.0 よりも pH 4.0 で回転半径 (Rg) が 5.3% (0.74Å 増加) 大きくなることがわかった。次に、CjapCSP1 と CjapCSP13 との関わりについて調べた。各タンパク質に特徴的な配列をもつペプチドを合成し、それを抗原として、特異的な抗血清を作成した。クロオオアリの触角、足、顎からの抽出物と、発現精製した CjapCSP1 と CjapCSP13 を用いたウエスタンブロット法により、抗体の特異性を確かめ、両タンパク質が触角にあることを確かめた。さらに、これらの特異的抗体を用いた蛍光免疫組織化学により、CjapCSP1 と CjapCSP13 が触角にあるが、タンパク質の存在場所が異なることを明らかにした。最後に、クロオオアリ CHC の一種である (z) -9- tricosene や他の 3 種類の化学物質への結合特性を調べた。両タンパク質ともに (z) -9-tricosene に結合したが、CjapCSP13 は CjapCSP1 よりも強く結合し、また他の 3 種類の化学物質に対し異なる結合特性を示した。

以上の結果より、CjapCSP1 と CjapCSP13 は触角の同じ細胞で生合成されるが、タンパク質局在と結合特性の違いにより、CHC 受容・運搬において異なる働きをしていることが示唆された。

**PhD Thesis**

**The structure-function relationships of  
chemosensory protein found in the sensillum of  
*Camponotus japonicus***

**WEN DURIGE**

**Division of Engineering**

**Muroran Institute of Technology**

**2020**

## Abstract

Social insects depend on complex communication systems to maintain their societies, in which individuals may exchange information through pheromones. Ants are one such example of social insects. In many species of ants, even if they are conspecific, nestmates are clearly able to distinguish non-nestmates, which they subsequently reject. This is accomplished with cuticular hydrocarbon (CHC) blends on the ant body that are used in social pheromone nestmate recognition.

The Japanese carpenter ant, *Camponotus japonicus*, uses basiconic antennal sensilla (s. basiconica) to sense colony-specific blends of species-specific CHCs, which are hydrophobic. Basiconic antennal sensilla are only observed in females and are filled with sensillar lymph. Chemosensory proteins have been shown to be major proteins that are expressed in ant antenna and are thus expected to transport CHCs to the receptor membranes of olfactory neurons. Twelve CSPs were found from the analysis of RNA expression in *C. japonicus* antennae. CSP1 in *C. japonicus* (CjapCSP1) was found to be highly expressed and has been shown to bind to 18 *C. japonicus*-specific CHCs.

We investigated whether CSP1 represents pH-dependent changes in structure and/or ligand-affinity. In addition, we studied CjapCSP13. Both CjapCSP1 and CjapCSP13 are abundantly expressed in worker ant antennae

and are coexpressed in some chemosensilla. To understand the functions of CjapCSP1 and CjapCSP13 based on their structures and their structural changes in the solution, X-ray solution scattering measurements, small angle X-ray scattering (SAXS), and wide angle X-ray scattering (WAXS) were performed.

The molecular basis of CSP1 function was evaluated from its structure in solution by CD and X-ray solution scattering measurements at pH 4.0 and 7.0. Although the secondary structure did not vary, the gyration radius ( $R_g$ ) was found to be 5.3% larger (0.74 Å increase) at pH 4.0 than at pH 7.0. The dissociation constant ( $K_d$ ) of a fluorescent probe, 1-N-phenyl-naphthylamine, for CjapCSP1 was larger at pH 4.0 than at pH 7.0, suggesting that this structural change could trigger ligand dissociation at acidic pH. In contrast to the CSP1, the  $R_g$  of CjapCSP13 was slightly smaller at pH 4.0 than at pH 7.0. Western blotting and immunohistochemistry with specific antisera revealed that both CjapCSP1 and CjapCSP13 were detected in antenna, but differed in location. The binding characteristics to four kinds of compounds, including the ant CHCs (z)-9-tricosene, were also examined. Although both CjapCSP1 and CjapCSP13 bound to (z)-9-tricosene, CjapCSP13 bound more strongly than CjapCSP1 and showed different binding properties. CjapCSP1 and CjapCSP13 are synthesized in the same cell of the antenna, but they function differently in the CHC reception due to differences in their localization and binding characteristics.

# 目次

1. 序論.....	11
1-1. 化学感覚タンパク質とは.....	17
1-2. CjapCSP タンパク質.....	19
1-3. CjapCSP1 と 13.....	22
1-4. 研究目的.....	24
2. 研究方法.....	25
2-1. CjapCSP タンパク質の発現精製.....	26
2-1-1. CjapCSP タンパク質の発現.....	26
2-1-2. 発現タンパク質の精製.....	27
2-1-3. タンパク質の定量.....	28
2-2. MALDI-TOFMS により発現された CjapCSP1 と CjapCSP13 の分子量を測定 .....	29
2-3. CjapCSP1、13 のアミノ酸配列アライメントと立体構造の予測.....	30
2-4. CjapCSP タンパク質の二次構造解析.....	31
2-5. CjapCSP1 と CjapCSP13 の局在.....	32
2-5-1. 抗体の調製.....	32
2-5-2. ウエスタンブロット.....	32
2-5-3. 免疫組織染色.....	34
2-6. タンパク質とリガンドの結合特性.....	36
2-6-1. 蛍光結合測定.....	36
2-6-2. CjapCSP1 の結合親和性に対する pH の影響.....	38
2-7. X線溶液散乱測定.....	39
3. 結果.....	41
3-1. 発現システムの構築.....	42
3-2. CjapCSP タンパク質の発現・精製.....	44
3-3. MALDI-TOFMS により CjapCSP1 と CjapCSP13 分子量の測定.....	47
3-4. CjapCSP1、13 のアミノ酸配列アライメントと立体構造の予測.....	50

3-5. CjapCSP タンパク質の二次構造解析.....	53
3-6. CjapCSP1 と CjapCSP13 の局在 .....	55
3-7. タンパク質蛍光結合特性.....	59
3-7-1. 蛍光結合測定.....	59
3-7-2. CjapCSP1 と 13 の匂い分子に対する蛍光競合的結合曲線.....	62
3-8. X線溶液散乱測定 .....	71
4. 結論 .....	81
5. 考察 .....	85
6. 参考文献 .....	89
7. 謝辞 .....	99
8. 研究業績 .....	103
9. 賞罰 .....	112

# 1.序論

昆虫や脊椎動物は嗅覚システムを使用して、匂い物質またはフェロモンのような環境情報化学物質を認識する。ほとんどの情報化学物質は揮発性であり、小分子で構成されている (Touhara and Vosshall. 2009)。情報化学物質は嗅覚受容体ニューロン (ORNs) の受容体タンパク質に結合し、匂い物質からの情報を含む電気信号は脳の触角葉に伝達される。これらの信号は脳で処理され、結果の出力信号は運動ニューロンに送られて行動が解放される。

脊椎動物と昆虫は匂いを認識するためのさまざまな匂い分子の溶解と受容メカニズムを発達させた。脊椎動物は、8つの $\beta$ ストランドと1つの $\alpha$ ヘリックスで構成されるベータバレル構造を示すリポカリンスーパーファミリーに属する匂い分子結合タンパク質 (OBP) を使用する (Reviews : Pelosi. 2001; Heydel et al. 2013)。昆虫は、一般に、触角に存在する感覚子で匂いを知覚する。アンテナの感覚器の内部はリンパ液で満たされ、ORN 樹状突起が存在する。ORN 細胞体は、OBP、フェロモン結合タンパク質 (PBP、Vogt et al. 1991)、および化学感覚タンパク質 (CSP、Steinbrecht et al. 1995; Shanbhag et al. 1999 および 2000; Campanacci et al. 2003) を分泌するアクセサリー細胞に囲まれている。匂い物質が OBP、PBP、および CSP の助けを借りて、ORN 受容体タンパク質に

輸送されると考えられている (Pelosi and Maida 1995; Pelosi et al. 2005)。昆虫の OBP と PBP は遺伝子グループを形成し、それらの中のいくつかの構造は X 線結晶構造解析 (Sandler et al. 2000; Lartigue et al. 2003; Kruse et al. 2003; Wogulis et al. 2006) または NMR 分光法によって決定されている (Horst et al. 2001; Lee et al. 2002; Zubkov et al. 2005)。OBP と PBP グループとは異なる別の遺伝子グループを作る CSP では四種類の分子の立体構造のみが報告されている: CSPMbraA6、CSPsg4、BmorCSP1。ガ *Mamestra Brassicae* に見られる CSPMbraA6 の立体構造は、X 線結晶構造解析と NMR 分光法によって決定されている (Lartigue et al. 2002; Mosbah et al. 2003; Campanacci et al. 2003)。砂漠バッタ *Schistocerca gregaria* の触角などの化学感覚器官に発現する CSPsg4 は、NMR 分光法のみで決定されている (Tomaselli et al. 2006)。昆虫由来の OBP と CSP は、折り畳まれた構造に関しては異なるが、それぞれ 6 または 4 つの保存されたシステイン残基を持つ非常にコンパクトで安定した  $\alpha$  ヘリックスドメインで主に構成される。両方のグループのタンパク質は、疎水性結合ポケットを特徴とし、いくつかの内因性リガンドに結合することが報告されている (Calvello et al. 2003; Ban et al. 2003)。

社会性昆虫は、社会を維持するために複雑な通信システムを持っており、その中で各個体はフェロモンを介して情報を交換している (Ali et al. 1990)。アリはそのような社会昆虫の例である。アリの社会は、働きアリ、オスアリ、および女王アリで構成されている。アリの多くの種では、たとえ同種であっても、巣仲間は明確に非巣仲間を区別することができ、その後は排除する。巣仲間認識には、アリの体表クチクラ炭化水素 (CHC) の混合物が利用され、それは社会的なフェロモンとして使用されている (Vander Meer 1998; Lahav et al. 1999; Akino et al. 2004; Ozaki et al. 2005; Brandstaetter et al. 2008)。

日本のクロオオアリ *Camponotus japonicus* は疎水性である種特異 CHCs のコロニー特定ブレンドを感知するために錘状感覚子 (*S. basiconica*) を使用する (Ozaki et al. 2005)。錘状感覚子はメスでのみ観察され (Nakanishi et al. 2009)、感覚器リンパ液で満たされている。

化学感覚タンパク質は、アリアンテナで発現する主要タンパク質であることが示されており (Ishida et al. 2002; Ozaki et al. 2005; González et al. 2009)、嗅覚ニューロンの受容体膜に CHCs を輸送すると考えられている。 *C. japonicus*

のアンテナの RNA 発現の解析から 12 個の CSPs が見つかった (Hojo et al. 2015)。特に、*C. japonicus* の CSP1 (CjapCSP1) は高度に発現することがわかり (Hojo et al. 2015)、18 の *C. japonicus* 固有の CHCs に結合することが示されている (Ozaki et al. 2005)。

昆虫の OBP、PBP、および CSP が疎水性化学物質に結合できることが *in vitro* の実験で示されているが、結合した化学物質が受容体タンパク質に渡される分子メカニズムは完全には解明されていない。たとえば、カイコガ (*Bombyx mori*) の PBP BmorPBP には、酸性 pH での構造変化に依存する分子メカニズムが提案されている。BmorPBP-ボンビコールの結晶構造は 6 つの  $\alpha$  ヘリックスで構成されており (Sandler et al. 2000)、pH 4.5 でのアポタンパク質の NMR 研究により、C 末端部分がボンビコール結合ポケットに入る 7 番目のヘリックスを構成していることがわかった。これらの結果に基づいて、酸性 pH による構造変化がボンビコールの放出を引き起こし、その後のボンビコールの受容体への転移を引き起こすことが提案された (Horst et al. 2001)。Wogulis et al. (2006) は蚊 *Anopheles gambiae* の OBP (AgamOBP1) でリガンド親和性の減少と関連した C 末端の pH 依存性構造変化を報告し、リガンド放出の一般的な

メカニズムを示唆した。しかし、酸性 pH 条件下で構造変化を引き起こす 7 番目のヘリックスに対応する C 末端部分は、ゴキブリの *Leucophaea maderae* の PBP、LmaPBP には存在しない (Lartigue et al. 2003)。彼らは C 末端の pH 依存性構造変化とは異なる LmaPBP の新しいリガンド結合放出メカニズムを提案した。これらの研究は OBP グループのタンパク質に焦点を合わせており、私たちの知る限り、CSP でのリガンド放出メカニズムの研究は行われていない。

本研究ではアリの巣仲間の認識に関与する CHCs の結合と輸送に関連する CSP1 が、BmorOBP および AgamOBP1 で見つかった pH 依存性の構造変化またはリガンド親和性の変化を示すかどうかを調べた。さらに、CjapCSP1 から多様化した CjapCSP13 も調べた。CjapCSP1 と CjapCSP13 は両方とも、働きアリのアンテナで豊富に発現し、一部の感覚子で共発現する (Hojo et al. 2015)。CjapCSP1 と CjapCSP13 のアミノ酸配列を、CjapCSP1 と最も高い相同性を示した CSPsg4 のアミノ酸配列に基づいて、アライメントを作成し、比較した。さらに、CSPsg4 の三次構造がすでに決定されているので、それを利用して、CjapCSP1 および CjapCSP13 の三次構造モデルを PyMol (米国ニューヨーク州 シュレーディンガー) で構築した (PDB : 2GVSM; Fig.3-4 B)。CjapCSP1 と

CjapCSP13 の機能を理解するには、それらが動作する溶液内での構造と構造の変化を評価することが重要である。この目的のために、X線溶液散乱測定、小角X線散乱（SAXS）および広角X線散乱（WAXS）を実施した。

### 1-1. 化学感覚タンパク質とは

感覚子内に侵入した疎水性の炭化水素が、リンパ液の親水環境を通過して嗅神経の樹状突起に自力で到達することは難しい。これは嗅覚器一般における受容器周辺問題として取りあげられてきたことである。概して揮発性の高い匂い物質は疎水的であり、リンパ液のような親水環境にはなじまない。一方で、嗅神経の樹状突起は直接空気に曝されている化学センサーとしての機能が損なわれてしまうので親水的な環境において保護する必要がある。このジレンマを乗り越えるために親油性物質の運搬役として登場してくるのが「匂い物質結合タンパク質、OBPないし「化学感覚タンパク質（chemosensory protein; CSP）」と呼ばれる水溶性低分子タンパク質である。これらのタンパク質は、昆虫の嗅覚器や味覚器内部のリンパ液に高濃度に溶存し、疎水性の匂い物質や味物質分子を結合して運搬する役割を果たすと考えられている。

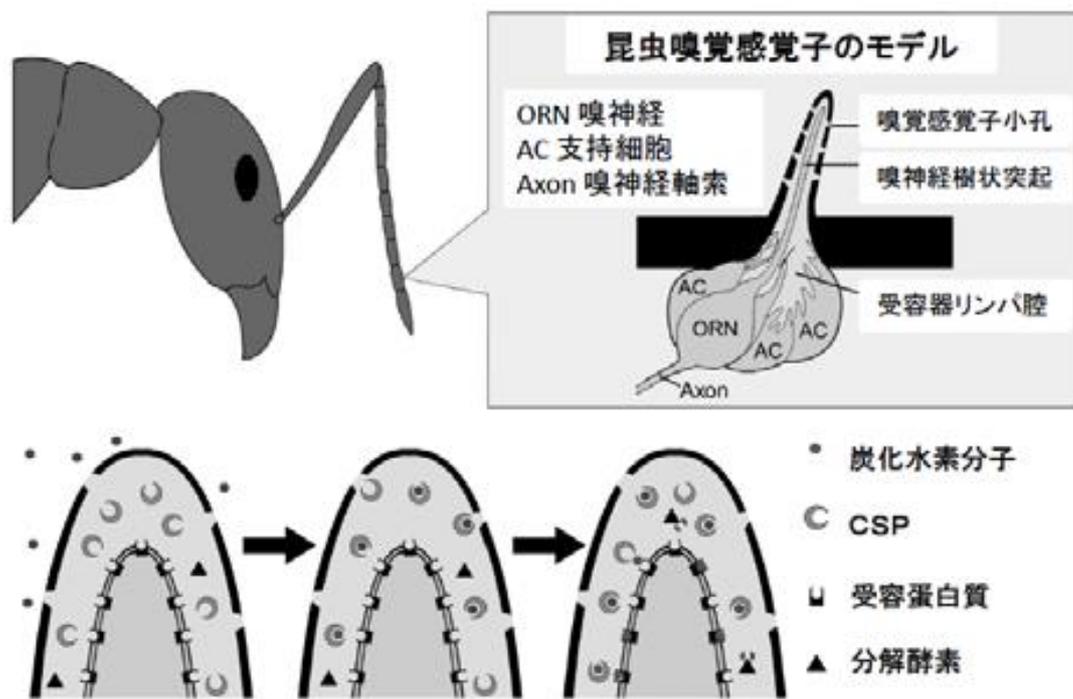


Fig. 1-1. 上段：アリ触角の嗅覚感子モデル、下段：感覚子内の受容器周辺環境

において炭化水素分子を運搬するCSP の働きのようす

出典(連載生物規範工学第八回アリの「敵・味方」識別フェロモンセンサーに学ぶ -“ 鼻 ”

で省エネ危機管理; 神戸大学大学院理学研究科生物学専攻: 尾崎まみこ)

## 1-2. CjapCSP タンパク質

クロオオアリ (Fig. 1-2-1) のゲノム情報を他のアリや昆虫のゲノム情報を参考に解析し、12 個のクロオオアリ CSP 遺伝子(CjapCSP1~10, 12, 13)が見出された (Hojo et al. 2015)。この 12 種の中で CjapCSP1 が触角の錐状感覚子 (Fig. 1-2-2) 感覚子に存在し、巣仲間識別にかかわる炭化水素受容に必須であることが 2005 年尾崎らにより報告されている。また、他の 11 種類のうち CjapCSP13 が CjapCSP1 から多様化した系統アリの特異的遺伝子であることが 2015 年 Hojo 等によって明らかにされた (Fig. 1-2-3)。

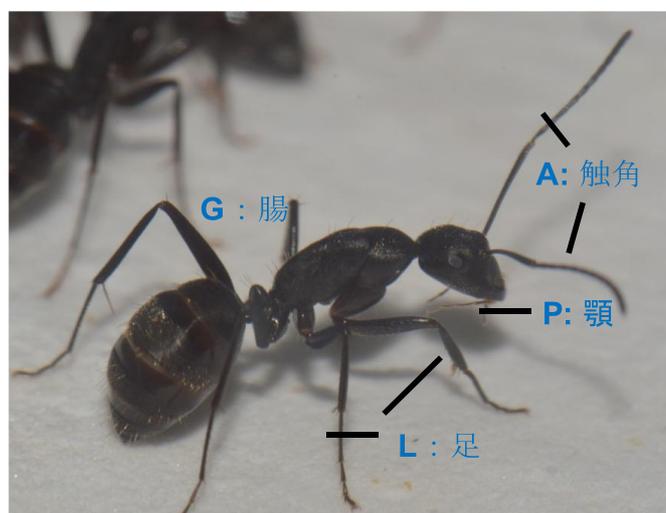


Fig. 1-2-1. クロオオアリ (*Camponotus japonicus*) : 日本列島に分布するアリ  
の中では最大となる大型のアリ。

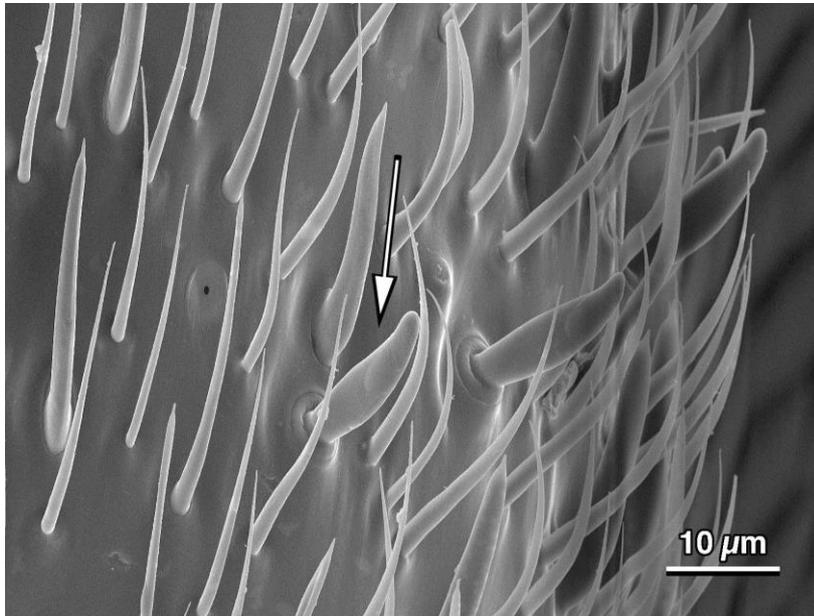


Fig. 1-2-1. クロオオアリの触角表面の走査型電子顕微鏡写真。矢印：**錐状感覚子** (s. basiconica)。錐状感覚子は他の感覚子より触角基部側に傾いている。

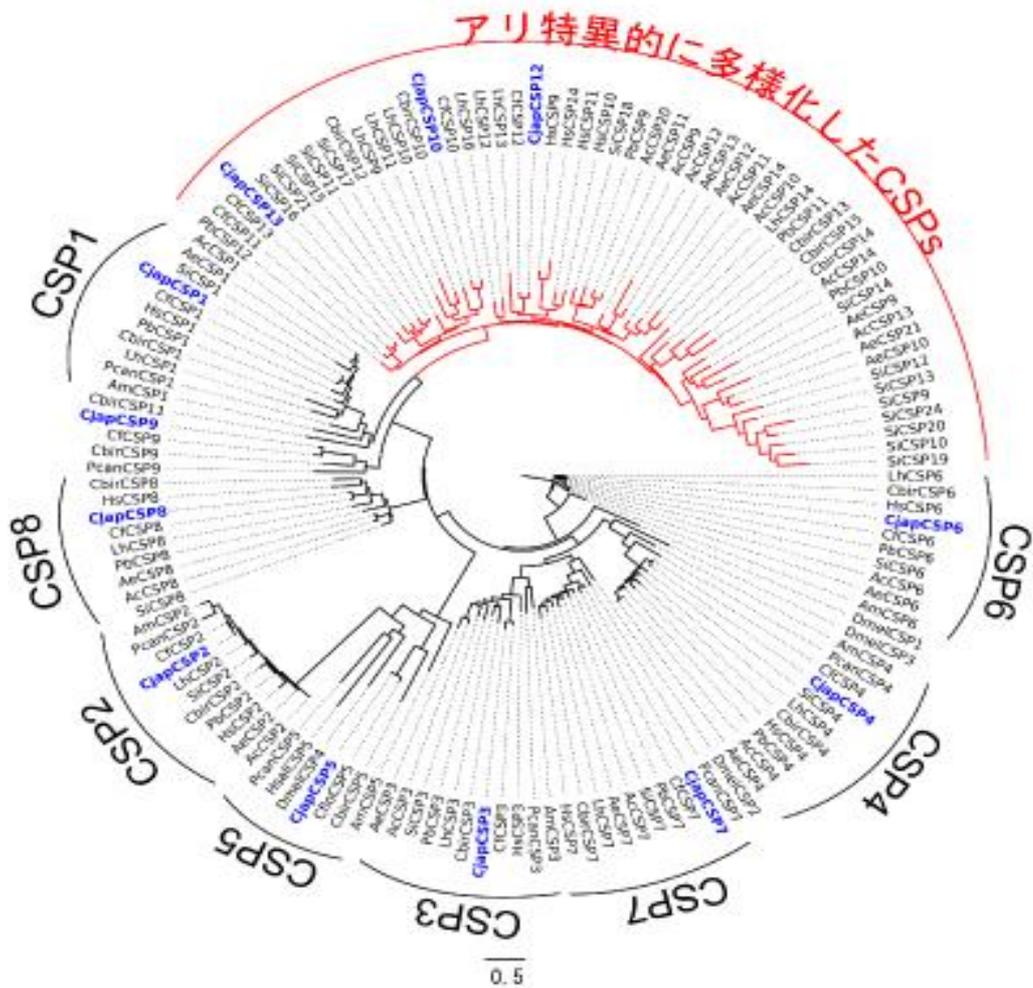


Fig. 1-2-3. CSPs 分子系統樹。赤で示しているのはアリで特異的に多様化している CSP 遺伝子群。オオクロアリで見つかった CjapCSP は青字で示している。

出典：Hojo, M. K. et al., Sci. Rep. 5, 13541.2015

### 1-3. CjapCSP1 と 13

2種のプローブを用いたin situハイブリダイゼーション分析から、蝨角において、CSP1とCSP13遺伝子を同時に発現している感覚細胞が見つまっている (Fig.1-3-1)。CjapCSP1とCjapCSP13は両方ともアリの触角に特異的に発現して (Fig.1-3-2)、CjapCSP1は働きアリで発現量が多く、CjapCSP13はアリの雌 (女王と働きアリ) で発現が高い (Fig.1-3-3)。

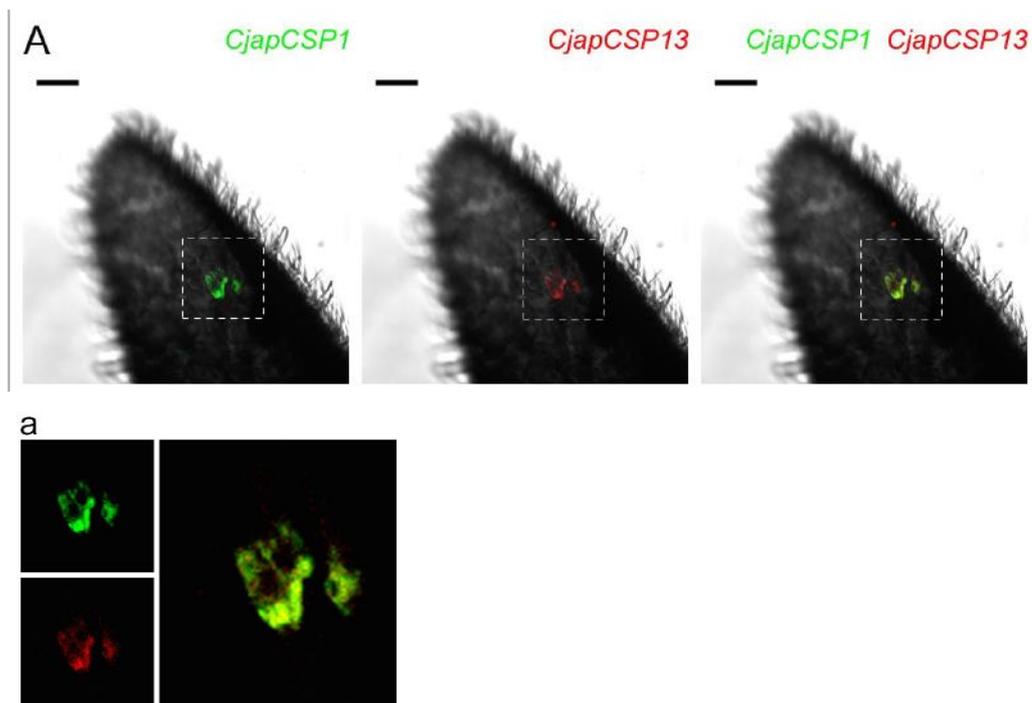


Fig.1-3-1. 2 種のプローブによる in situ ハイブリダイゼーション分析。

CjapCSP1(緑)と CjapCSP13(赤)の発現部位。(a) は図 A 中の点線で囲んだ領域の拡大画像。黄色で示された領域は二つの遺伝子が同じ部位に共発現していることを示している。出典：Hojo, M. K. et al., Sci. Rep. 5, 13541.2015

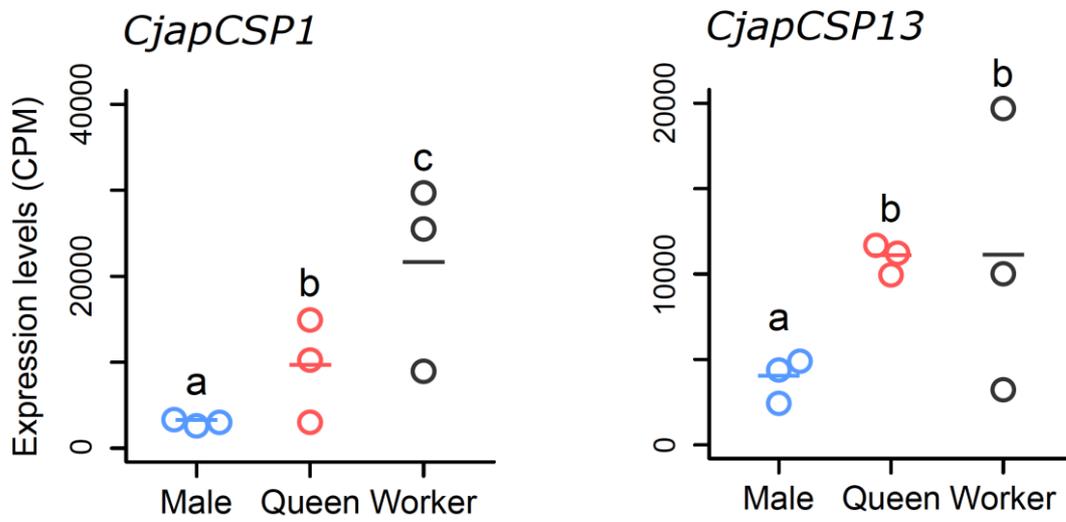


Fig.1-3-2. クロオオアリの雄、女王、働きアリの触角でのCSP1と13の発現

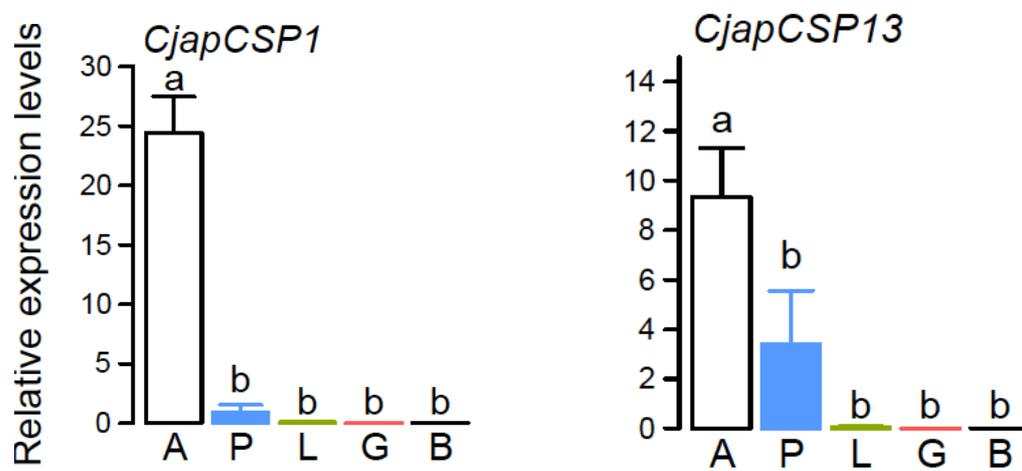


Fig.1-3-3. 働きアリの様々な組織でのCSP1と13の発現量

出典：Hojo, M. K. et al., Sci. Rep. 5, 13541.2015

#### 1-4. 研究目的

昆虫の OBP、PBP、および CSP が疎水性化学物質に結合できることが *in vitro* の実験で示されているが、結合した化学物質が受容体タンパク質に渡される方法の分子メカニズムは完全には解明されていない。リガンド及び C 末端の pH 依存性構造変化とは異なる LmaPBP の結合放出メカニズムも提案されている。しかし、これらの研究は OBP グループのタンパク質に焦点を合わせており、私たちの知る限り、CSP でのリガンド放出メカニズムの研究は行われていない。

本研究ではアリの巣仲間の認識に関与する炭化水素の結合と輸送に関連する CjapCSP1 と CjapCSP1 から多様化した CjapCSP13 が結合したリガンドを神経細胞受容体に渡す機構とそれらの関わりを解明することを目的として、それらのタンパク質を大腸菌で発現・精製し、精製したタンパク質を用いて、局在、リガンド結合特性、溶液中での立体構造について調べた。

## 2.研究方法

## 2-1. CjapCSP タンパク質の発現精製

### 2-1-1. CjapCSP タンパク質の発現

単離したCjapCSP1、2、3、12、13遺伝子のコーディング配列をpGEX-4T-2ベクターのBamHIとXhoIサイトに挿入し、Glutathione S-transferase (GST)-CjapCSP融合タンパク質発現ベクター(pGEX-4T-2-GST-CjapCSP)を作製した。GSTタグとタンパク質の間にトロンビン切断サイトを設け、GSTタグを分離できるようにした(関西学院大学北条賢准教授恵与)。構築したCjapCSP1、2、3、12、13の発現ベクターを大腸菌BL21(DE3)に導入した。50 mlファルコンで50  $\mu$ g/mlアンピシリンを加えたLB培地に植菌して、振とう培養器にて175 rpm、37°Cで600 nmにおける吸光度が0.6までに培養した。引き続き1 L LB/Amp培地に全量を移して、吸光度が0.6になるまで培養した。次に、終濃度0.1 mMとなるようにIPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)を添加し、16°C、175 rpmで24時間振とうして、CSPタンパク質の発現を誘導した。誘導した菌を5000  $\times$ g、15 min、4°Cの遠心で集菌して、1 $\times$ PBS バッファー(137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) 300 mlで懸濁した。さらに、回収

した試料を15% SDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動) を用いてタンパク質発現を確認した。

#### 2-1-2. 発現タンパク質の精製

CjapCSP1とCjapCSP13を発現した菌を回収し、ガラスビーズ( $\phi$  0.1、72 g /120 ml菌懸濁液)で破碎 (MS-100、TOMY DIGITAL BIOLOGY, Japan) した。破碎した菌液を1000×g、30 min、4°Cで遠心分離し、上清を可溶性画分、沈殿を不溶性画分としてPBSで懸濁した。次に、5 ml のGST resin (GE Healthcare、SWEDEN) を用いてGSTタグカラムとした。まず、10 ml Binding Buffer (NaCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、KCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH7.4) で三回洗ったのち、発現融合タンパク質GST-CjapCSPの可溶性画分を試料として、カラムにかけた。10 ml Binding Bufferでカラムを10回洗った後、吸着しているタンパク質をカラム内でトロンビン (GE Healthcare、UK) を用いて切断した。消化反応 (100 unit トロンビン/カラム、24 h、24°C、100 rpm で振盪) させた後、タンパク質を溶出し、画分TF(Thrombin Flowthrough)として回収した。さらに、SDS-PAGEにより各分画のタンパク質を分析した。

### 2-1-3. タンパク質の定量

試料のタンパク質濃度は、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC、IL)を用い、562 nm の吸光度を測定することで決定した。検量線作成には 0.1 % BSA 溶液(Standard Solution、TAKARA、Japan)を用いた。手順は kit の推奨手順に従った。

タンパク質溶液を希釈したもの、基準となる各濃度の BSA タンパク質溶液を 25  $\mu$ l 用意。(標準偏差を求めるため 3 回分)

番号	BSA 濃度 ( $\mu$ g/mL)
1	0
2	6.25
3	12.5
4	25
5	50
6	100
7	200
8	400

## 2-2. MALDI-TOFMS により発現された CjapCSP1 と CjapCSP13

### の分子量を測定

得られた精製タンパク質 CjapCSP1 と CjapCSP13 を試料として MALDI-TOFMS (New ultrafleXtreme、Bruker、MA) を用いて質量分析を行った。

まず、精製したタンパク質を 1 L PBS バッファー (pH 7.4) に対してタンパク質溶液 10 ml (透析膜 : 6-8 kDa Spectra/Por1, Spectrumlabs, CA) を 4°C、3 h、3 回透析を行なった後、凍結乾燥 VA-140S (Taitec, Japan) をかけた。次に、CjapCSP1 タンパク質を 1 から 20  $\mu\text{M}$  の間に調整、タンパク質溶液 0.5  $\mu\text{l}$  と DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) 0.5  $\mu\text{l}$  を混合して共結晶させ、MALDI-TOFMS を用いて質量分析を行なった。最後、CjapCSP1 と CjapCSP13 の測定分子量と計算分子量 (ExPASy, [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) を比較した。

## 2-3. CjapCSP1、13 のアミノ酸配列アライメントと立体構造の予測

CjapCSP1 と CjapCSP13 アミノ酸配列を解析ソフト Phyre2 (Structural Bioinformatics Group, Imperial College, UK) を用いて相同性検索にかけた。最も相同性の高かった砂漠バッタの化学感覚タンパク質 CSPsg4 (chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*; CSPsg4; GenBank: AF070964)のアミノ酸配列と、CjapCSP1 と CjapCSP13 アミノ酸配列のアライメントを作成した。アライメントの作成は GENETYX (Ver.10、GENETYX、Japan)を用いた。CSPsg4 の立体構造データ (PDB:2GVS)を鋳型として、PyMOL (Schrödinger、NY)を利用して、CjapCSP1 と CjapCSP13 の 3D モデルを構築した。

## 2-4. CjapCSP タンパク質の二次構造解析

精製した CjapCSP タンパク質の 195 nm から 260 nm までの円偏光二色性 (CD) スペクトルを円偏光二色性分光計(J-720WI、Jasco、Japan)で測定した。

CjapCSP1 と CjapCSP13 のタンパク質溶液 (0.12 mg/ml ; 10 mM HEPES 緩衝液 :  $C_8H_{18}N_2O_4S$ 、NaOH、pH 7.0) を光路長 1 mm のセルに入れて測定した。CjapCSP1 については pH 4.0 の試料 (10 mM 酢酸緩衝液 :  $CH_3COOH$ 、 $CH_3COONa$ 、pH 4.0) も測定した。ベースラインは各緩衝液で記録した。

すべての CD 信号について、以下の式を用いて、 $[\theta]_{obs}$  (楕円率) から平均残基モル楕円率 $[\theta]$ へ変換し、濃度の影響を除いた。

$$[\theta] = [\theta]_{obs} / (l \cdot C)$$

$[\theta]$  : 平均残基モル楕円率 [deg · cm<sup>2</sup>/d mol]

$[\theta]_{obs}$  : 測定された楕円率 [deg]

l : セル長 [m]

C : 残基モル濃度 [M]

$$[\text{残基モル濃度}] = [\text{タンパク質のモル濃度}] \times [\text{タンパク質の残基数}] \text{ ---- 式 1}$$

## 2-5. CjapCSP1 と CjapCSP13 の局在

### 2-5-1. 抗体の調製

CjapCSP1 (Pos: 55-66; KCRKCTEVQKKN) と CjapCSP13 (Pos: 55-72; KCKRCTEKQKEIIDAVVD) のアミノ酸配列を持つペプチドを合成して、それぞれ抗原とした。ラビットに免疫し、抗体ができていることを ELISA で確認したのち後、採血して抗血清を得た。抗原ペプチドの合成、抗体の調製は、コスモバイオに外注した。

### 2-5-2. ウェスタンブロット

クロオオアリの働きアリより分離した触角 (5 ants 分)、顎 (10 ants 分)、足 (0.4 ants 分) のタンパク質、及び CjapCSP1 (10 ng) と CjapCSP13 (10 ng) を SDS-PAGE によって分離した。電気泳動終了後、ゲルを取り出し、Buffer B (25 mM Tris base-10%メタノール) に浸して 15 間分振とうした。PVDF 膜 (85 × 90 mm、ATTO) は 100%メタノールに浸した後、Buffer B に入れ 10 分以上振とうして前処理を行なった。ゲルサイズに切ったろ紙を Buffer A (300 mM

Tris base-10%メタノール)に2枚、Buffer Bに1枚、Buffer C (25 mM Tris base-10%メタノール-40 mM 6-アミノカプロン酸)に3枚入れた。ブロッキング装置の電極板(AF6677、ATTO、Japan)に陰極(-)からろ紙2枚、PVDF膜、ゲル、ろ紙3枚の順番で重ね、ゲルの面積(cm<sup>2</sup>)×2.5 mAの電流で、20分間ブロッキングを行った。転写終了後、タンパク質が転写された側を上にして、PVDF膜をWashing buffer (TBS +0.1% Tween 20)に入れ洗浄した。その後、約50 mlのBlocking buffer (5% スキムミルク in Washing buffer, 用時調製)に入れて、室温で5分間振盪してブロッキングとした。同操作を、Blocking bufferを入れ替えて合計3回繰り返した後、膜をWashing bufferで洗浄した。次に、Washing bufferを捨て、ラビットの抗CjapCSP血清を10 μl添加した10 mlのBlocking bufferを入れて、室温にて45分間シェーカー上で振とうした。さらに、Blocking bufferを捨て、約50 mlのWashing bufferを入れて手で軽く振り膜を洗浄した後、二次抗体 (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alkaline phosphatase、Thermo Fisher Scientific、USA) を1000倍希釈した溶液に膜を入れて二次抗体の結合を行なった。最後に、膜を洗浄して、BCIP-NBT溶

液(BCIP; Bromochloroindolyl phosphate :  $C_8H_6NO_4BrCIP$ 、NBT: Nitro Blue Tetrazolium Chloride :  $C_{40}H_{30}C_{12}N_{10}O_6$ )で染色した。

### 2-5-3. 免疫組織染色

#### (1) 切片作成

アリ触角を切断した後クールブロック上でアリ触角を固定した。固定液(18.4 mM  $ZnCl_2$ 、1% Polyoxymethylene、127 mM NaCl、3.5 mM sucrose)中でクチクラを割った後、4°Cで一夜固定した。30% sucrose/ant ringer(4.8 mM TES, 127 mM NaCl, 6.7 mM KCl, 2 mM  $CaCl_2$ , 3.5mM Sucrose, pH 7.0)に液を置換、数回液交換後一夜置いた。

固定した触角を凍結切片メディア(FSC22, Leica Surgipath)包埋コンパウンドに包埋し、切片(8 $\mu$ m厚)を作成した。作成したスライドは使用時まで冷凍保存した。使用時には、一時間以上ドライヤーの冷風で乾燥後、-20°Cアセトンで30 min、3回洗った後、賦活化(70°C、20 min)した。さらに、ant ringer +0.1%

Triton で 3 回洗い、パップペンで組織を囲み、3 時間ブロッキング(Blocking one, Nacalai Tesque、Japan)した。

## (2) 免疫染色

一次抗体として、1/100 抗 CjapCSP1、または 1/100 抗 CjapCSP13 を使用し、4°C, で一夜結合させた。

二次抗体として、1/800 anti-Rabbit alexa 594 を使用し、4°C, で一夜放置した。核を染色するために、1/1000 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)/ ant ringer で 20 分間保った。共焦点顕微鏡 FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan)で観察した。

## 2-6. タンパク質とリガンドの結合特性

### 2-6-1. 蛍光結合測定

CjapCSP タンパク質溶液 ( $2\mu\text{M}$  のタンパク質溶液は pH 7.0 の 10 mM HEPES 緩衝液で作成) をマイクロ蛍光石英セル ( $3\text{mm}\times 3\text{mm}$ ) に入れた。蛍光プローブ、1-NPN (1-N-phenyl naphthylamine) を加えたのち、280 nm での励起による 350~650 nm の蛍光発光スペクトルを FP-6200 蛍光分光光度計 (Jasco, Japan) で記録した。結合実験でヘキサソに可溶化された (z) -9-トリコセンを除いて、使用されたすべてのリガンド (1-NPN、匂い分子等) はメタノールに可溶化した。CjapCSP タンパク質溶液 ( $50\mu\text{L}$ ,  $2\mu\text{M}$ ) を 1-NPN で滴定して、最終濃度を 2.5、5、15、25、35、45、 $55\mu\text{M}$  とし、それぞれの蛍光発光スペクトルを測定した。結合データは、3つの独立した測定から収集した。1-NPN に対する CjapCSP の解離定数 ( $K_d$ ) は、結合データのスキッチャードプロットから計算した (Yang et al. 2012)。

匂い分子に対する CjapCSP の親和性は、以下のように「蛍光競合結合」アッセイで測定した。CjapCSP と 1-NPN の混合物 (それぞれ  $50\mu\text{L}$ ,  $2\mu\text{M}$ ) をメ

タノール中の各匂い分子で最終濃度  $20\mu\text{M}$  まで滴定し、各滴定後の蛍光強度を記録した。添加したリガンドの濃度を X 軸にプロットし、匂い分子が存在しない場合の蛍光強度に対する割合として、 $408\text{ nm}$  での相対蛍光強度を Y 軸にプロットした。滴定曲線に基づいて、匂い物質に対する CjapCSP の見かけの結合親和性 ( $K_i$ ) は、CSP タンパク質が 100% 活性であり、CSP の 1-NPN または匂い物質への結合化学量論が飽和状態で 1 対 1 と仮定して、次の式に従って計算した。

$$K_i = [\text{IC}_{50}] / (1 + [1\text{-NPN}] / K_d^{1\text{-NPN}}) \text{ ----式 2}$$

ここで、 $[1\text{-NPN}]$  は結合していない 1-NPN の濃度、 $K_d^{1\text{-NPN}}$  は CSP 分子の 1-NPN に対する解離定数を示す (Wei Y et al. 2008)。

さらに、CjapCSP の (z) -9-トリコセンへの結合を以下のように調査した。ヘキサンの溶解した (z) -9-トリコセンを CjapCSP ( $10\mu\text{M}$ ;  $5.0 \times 10^{-10}\text{ mole}$ ) と 1-NPN ( $16\mu\text{M}$ ;  $8.0 \times 10^{-10}\text{ mole}$ ) の混合物 ( $50\mu\text{L}$ ) に加えて、蛍光強度の変化を測定した。。 $408\text{ nm}$  での相対蛍光強度を Y 軸にプロットし、添加したリガンドの最終濃度の代わりに、添加したリガンド (z) -9-トリコセンの物質量を X 軸にプロットした。

## 2-6-2. CjapCSP1 の結合親和性に対する pH の影響

CjapCSP1 の 1-NPN への結合親和性に対する pH の影響を 2 つの異なる pH 値（10 mM 酢酸緩衝液、pH 4.0 および 10 mM HEPES 緩衝液、pH 7.0）で測定することにより評価した。測定値は、3 回の独立した測定から収集した。

## 2-7. X線溶液散乱測定

SAXS (Small Angle X-ray Scattering)、WAXS (Wide Angle X-ray Scattering) 測定に高エネルギー加速器研究機構 (KEK, つくば, 課題番号 2016A1487、2016G683) の BL10C と SPring8 (課題番号 2015G518) 構造生物 BL-40B2 を利用した。CjapCSP1 の溶媒の pH を変化させ、散乱パターンを測定し、リガンドとの結合・非結合状態での構造変化を検討した。SAXS 測定は、1.35 Å の X 線波長および 28.9 cm のカメラ長で実施された。WAXS 測定は、1.7 Å の X 線波長および 203.7 cm のカメラ長で行われた。両方の測定において曝露時間は 180 秒であった。各試料溶液を、1 mm セルに入れて、温度は 25°C に制御した。

散乱データ解析は WAXS データのバックグラウンド補正 (Hirai M et al., 2002) を行い、観測された散乱強度  $I(q)$  をフーリエ変換することにより距離分布関数  $p(r)$  を、散乱曲線の傾き (Guinier Plot :  $\ln I(q)$  vs.  $q^2$ ) から回転半径  $R_g$  (Guinier 領域 : 0.055-0.080 Å) をもとめた (Hirai M. et al. 1998)。

CjapCSP1 の 3D 構造はまだ決定されていないため、CjapCSP1 のモデル 3D 構造は、CSPsg4 (PDB : 2GVS) の 3D 構造データをテンプレートとして使用して、PyMOL (Schrödinger, New York, USA) によって構築した。この構造を使

用して、溶液散乱シミュレーションプログラム CRY SOL (Svergun et al., 1995)

によって理論モデルの散乱曲線が得られ、実験散乱データと比較した。

### 3.結果

### 3. 結果

#### 3-1. 発現システムの構築

PCRにより目的遺伝子（CjapCSP）を増幅させ、pGEX-4T-2ベクターへ導入した。Fig.3-1は今回の研究に使用したpGEX-4T-2発現ベクターの模式図。CSP1の配列のN末端にGSTカラム精製に使われるGSTタグをつけた。また、CSPのみを精製するため、GSTタグとタンパク質の配列の間にThrombin切断サイトを導入した。Thrombinを用いて切断し、CSPとGSTタグを分離できます。

プライマー：

Forward primer: (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3')

Reverse primer: (5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3')

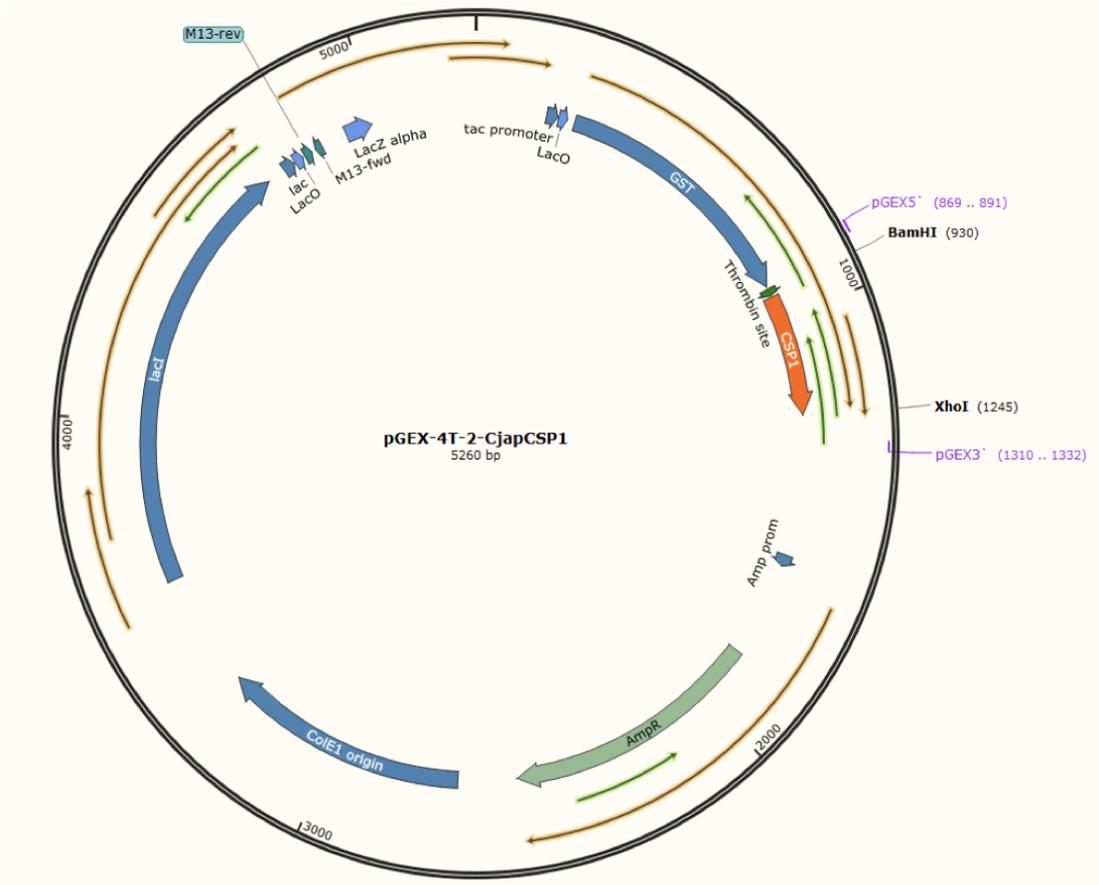


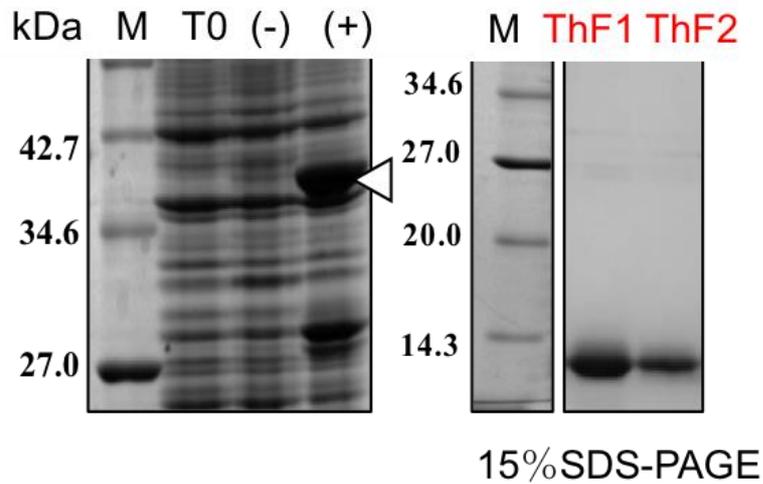
Fig.3-1: pGEX-4T-2-CSP のベクターの模式図

### 3-2. CjapCSP タンパク質の発現・精製

発現ベクター pGEX-4T-2-GST-CjapCSP1 または、pGEX-4T-2-GST-CjapCSP13 を大腸菌に導入し、タンパク質を発現させた。IPTG で発現誘導する前の大腸菌全タンパク質 (T0)、IPTG で発現誘導し 16 時間培養後の大腸菌の全タンパク質(+)と、IPTG を加えずに 16 時間培養後の大腸菌の全タンパク質(-)を 15%SDS-PAGE で泳動したものを図に示した (Fig. 3-2)。発現誘導した菌では 34.6 - 42.7 kDa の間に明確なバンドが認められた。(Fig. 3-2、(+), 矢印参照)。目的タンパク質である CjapCSP1 (計算分子量: 12.2 k) または CjapCSP13 (計算分子量: 11.9 k) と GST タグ (26.3 k) によって形成された融合タンパク質の発現を示していると思われる。次に、発現菌 (Fig. 3-2、(+)) を破碎し、遠心によって可溶性画分と不溶性画分に分けた。可溶性画分を GST カラムにかけ、夾雑タンパク質を洗い流したのち、カラムに結合した融合タンパク質から GST タグを除去するためにカラム内でトロンビン消化した (ThF, Thrombin Flow Through)。Fig. 3-2 で示した SDS-PAGE で解析した結果では、カラム内消化により得られた CjapCSP (レーン ThF) は、GST タグの

切断により分子量が減少した。したがって、GST タグフリーの CjapCSP が ThF  
画分として得られたと結論した。

## CjapCSP13



## CjapCSP1

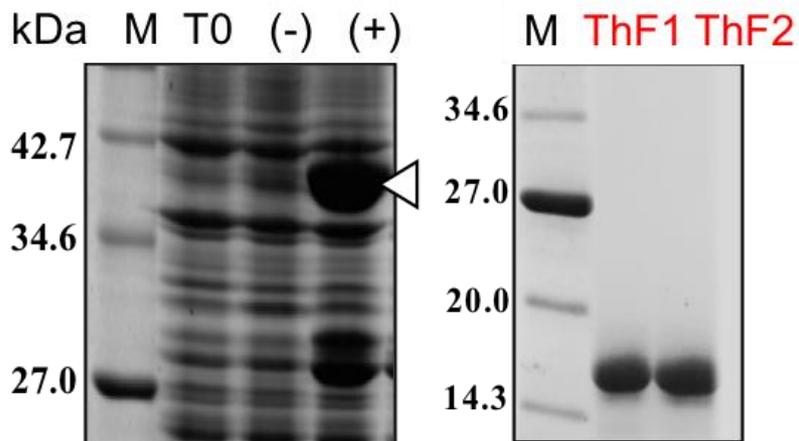


Fig. 3-2. CjapCSP1 と 13 の精製過程の各画分の SDS-PAGE(15%)。M: マーカー ; T0: A600=0.6 時の大腸菌全タンパク質; (-): IPTG 未添加 16 h; (+): IPTG 添加後 16 h。矢印は GST-CjapCSP 融合タンパク質。 ThF1、ThF2: Thrombin で切断後の画分。

### 3-3. MALDI-TOFMS により CjapCSP1 と CjapCSP13 分子量の測定

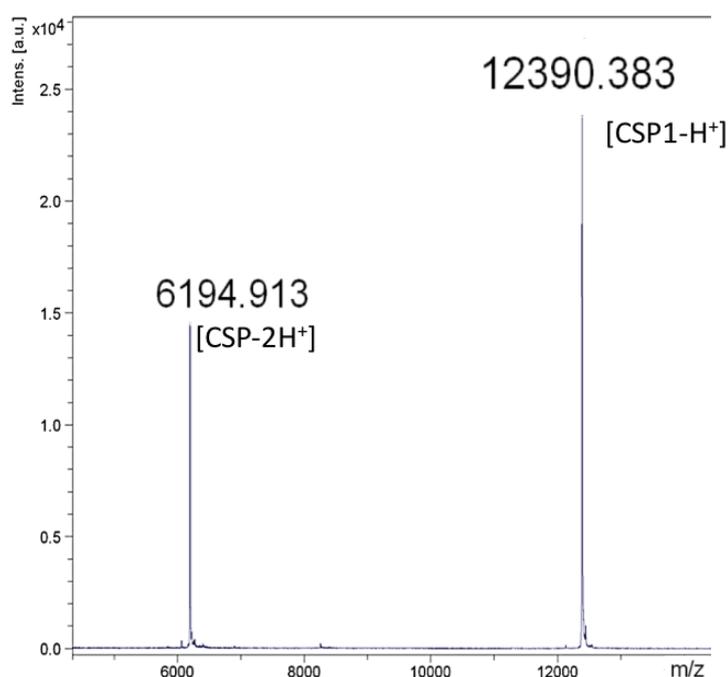
カラム精製後の CjapCSP1 および CjapCSP13 タンパク質の分子量と純度を決定するために、MALDI-TOFMS を実施した。Fig. 3-3-1 は、 $m/e$  値が 12390.383 と 6194.913 の 2 つのピークを示していた。これらが CjapCSP1 の一価および二価イオンに由来すると考えると、測定された分子量は、それぞれ一価および二価イオンのピークで 12389.376 および 12387.811 です。CSP タンパク質には 4 つのシステイン残基があり、近傍の 2 つが分子内ジスルフィド結合を形成していることが報告されている (Angeli et al. 1999)。また、発現した CjapCSP1 の N 末端にはトロンビン消化による 2 つのアミノ酸 (GS) が追加されている。したがって、予想される分子量は 12388.948 で、1 価イオンから得られた値よりも 0.428 小さく、2 つの測定値の間の値になります。また、CjapCSP1 の 1 価および 2 価イオンに由来すると考えられるピーク以外のピークは観察されなかったため、他のタンパク質による汚染はほとんどなかったと結論付けることができます。

精製された CjapCSP13 を MALDI-TOFMS にかけて、 $m/e$  値 12089.227 および 6045.882 で 2 つのピークが観察されました (Fig. 3-3-2)。CjapCSP1 と同様

に、CjapCSP13にも4つのシステイン残基がある。CjapCSP13にも2つの分子内ジスルフィド結合があると仮定すると、予想される分子量は12087.498です。この値は、測定された分子量12088.220および12089.749とほぼ一致していた。

Fig. 3-3-1. 精製CjapCSP1のMALDI-TOFMSスペクトラム。

精製CjapCSP1をMALDI-TOFMSにかけたところ、分子量12390.383の位置と



6194.913の位置にピークが認められた。これらがCSP1の1価イオンと2価イオンに由来すると考えると、測定された分子量は、1価イオンのピークからは12389.383、2価イオンのピークからは12387.826という値が得られる。

CjapCSP1計算分子量は12392.98である。

(ExPASy,[http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))

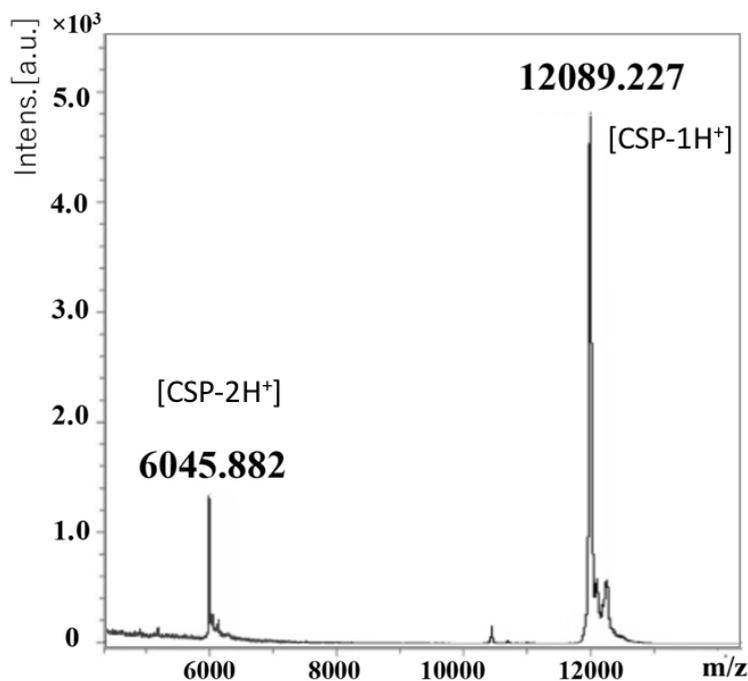


Fig. 3-3-2. 精製 CjapCSP13 の MALDI-TOFMS スペクトラム。

精製CjapCSP13をMALDI-TOFMSにかけたところ、分子量12089.227の位置にピークが認められた。CjapCSP13もCjapCSP1と同様に4個のCys残基を有しているので、2個のS-S結合を有しているとする、計算される測定値は12091.53となる。この値は測定値より得られる分子量12089.227 とほぼ一致していた。CjapCSP13計算分子量は12091.53。

(ExPASy,[http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))

### 3-4. CjapCSP1、13 のアミノ酸配列アライメントと立体構造の予測

CjapCSP1 と CjapCSP 13 のアミノ酸配列をそれらに最も高い相動性を示した砂漠飛びバッタの CSPsg4 のアミノ酸配列を基にアライメントした (Fig. 3-4. A)。また、CSPsg4 の立体構造をもとに CjapCSP1 と 13 の立体構造モデルを作成した (Fig. 3-4. B) 両タンパク質は CSPsg4 と同様に  $\alpha$  ヘリックスリッチであり、6本の  $\alpha$  ヘリックスからなる。それらの  $\alpha$  ヘリックスは (Fig. 3-4. A) ではアライメント上部に赤線 ( $\alpha 1 - \alpha 6$ ) で示した。また、立体構造モデルにも  $\alpha 1 - \alpha 6$  で記載した。

この構造は、リガンド結合に寄与す可能性がある疎水性ポケットを含む (M. Tegoni et al. 2004)。CjapCSP1 (Fig. 3-4. B) と CjapCSP13 (Fig. 3-4. C) の6つの  $\alpha$  ヘリックスは同一の折り畳みを示すが、重ね合わせると CjapCSP13 のヘリックス3が CjapCSP1 よりも V字型構造の近くに配置されていて、CjapCSP1 の形状が CjapCSP13 より少し開いていることがわかった (Fig. 3-4. D)。

CSPCjap1:  $\alpha 1$  (Pro13-Lev17)、 $\alpha 2$  (Asp20-Thr33)、 $\alpha 3$  (Gly39-Ala53)、 $\alpha 4$  (Lys64-Asn77)、 $\alpha 5$  (Pro79-Leu89)、および  $\alpha 6$  (Lys9-Phe100) ;

CSPCjap13:  $\alpha 1$  (Val13-Lev17)、 $\alpha 2$  (Asp20-Thr33)、 $\alpha 3$  (Ala39-Gln53)、  
 $\alpha 4$  (Lys64-Asn77)、 $\alpha 5$  (Pro79-Ser89)、および $\alpha 6$  (Lys94-Gln100)。

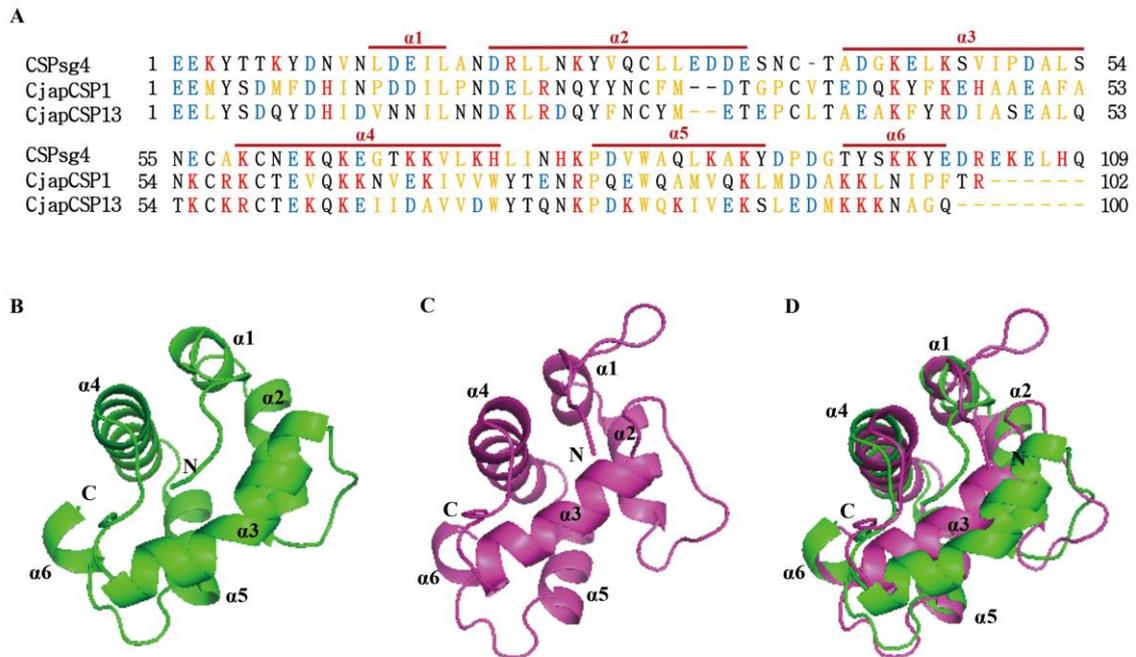


Fig. 3-4: CjapCSPの立体構造。(A): CjapCSP1とCjapCSP13、CSPsg4のアミノ酸配列のアライメント。疎水性アミノ酸 (黄色)、ポジティブチャージを持つアミノ酸 (赤)、ネガティブチャージを持つアミノ酸 (青)、赤線: 予測された6つの $\alpha$ ヘリックス; シグナルペプチドを除去した。(B): CjapCSP1の3D構造モデル。(C): CjapCSP13の3D構造モデル。(D): CjapCSP1とCjapCSP13の構造モデルの重ね合わせ。緑色とピンク色はそれぞれCjapCSP1とCjapCSP13の3D

構造モデルを示す。C、C末端;N、N末端。 $\alpha 1 - \alpha 6$  : 予測された6つの $\alpha$ ヘリックス。

### 3-5. CjapCSP タンパク質の二次構造解析

pH 4.0 での CjapCSP1 の CD スペクトルも測定した (Fig. 3-5 上, 点線)。

pH 4.0 での CjapCSP1 の CD スペクトルの形状と信号強度は、pH 7.0 でのそれとほぼ同じであり、周辺環境の溶液の酸性化が CjapCSP1 の二次構造に影響を与えなかったことを示唆している。

CjapCSP1 と CjapCSP13 の円偏光二色性分光の結果を Fig. 3-5 に示した。

CjapCSP 1 と CjapCSP13 は 208 nm と 222 nm に負のピークを示した、これは両方のタンパク質が  $\alpha$  ヘリックスに富んでいることを示している (Kem et al. 1999)。したがって、これらのスペクトルは、CSPsg4 とのアミノ酸相同性に基づいたモデル構造と一致していると言える (Fig. 3-5)。

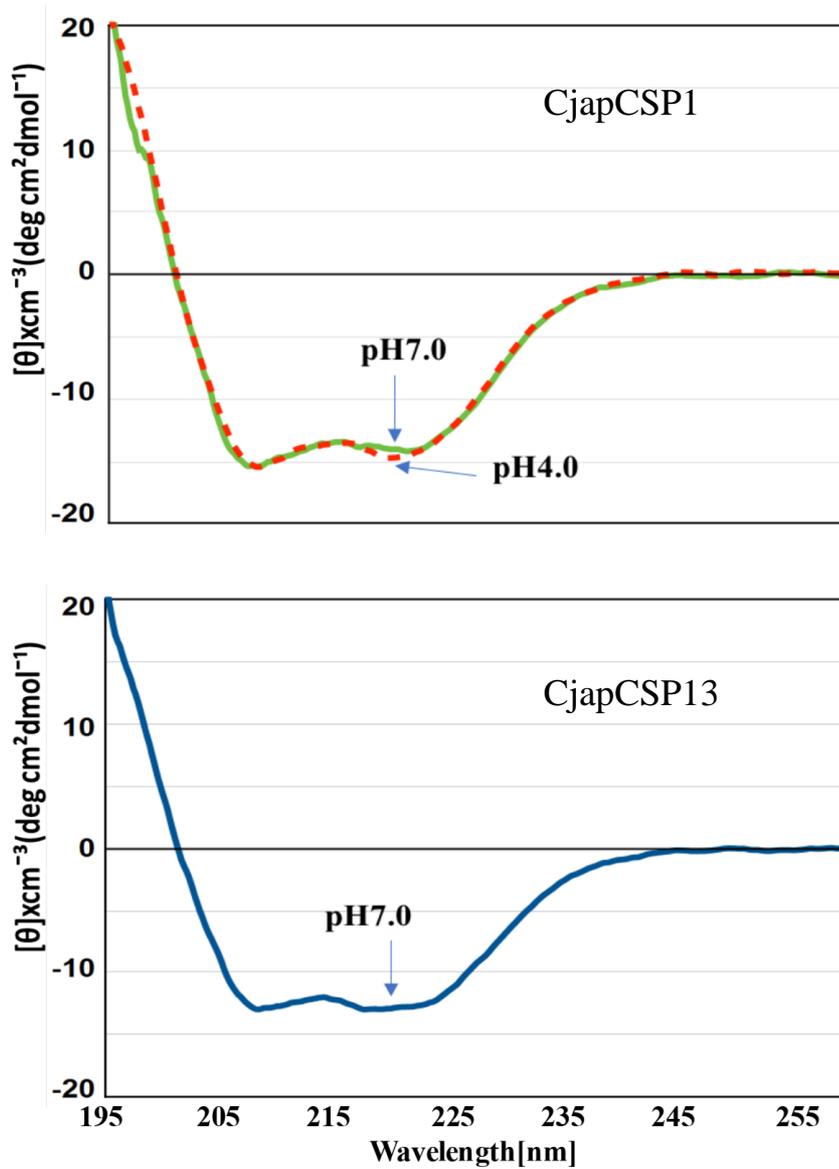


Fig. 3-5. CjapCSP1とCjapCSP13のCDスペクトル測定。CjapCSP1: pH 7.0での信号は実線、pH 4.0での信号は点線で示した。CjapCSP13はpH 7.0で測定した。

### 3-6. CjapCSP1 と CjapCSP13 の局在

HojoらはクロオオアリのRNA配列分析で、CjapCSP1とCjapCSP13遺伝子が働きアリの触角で特異的に発現されることを示し、さらに、in situハイブリダイゼーション分析によって各タンパク質の遺伝子が触角の同じ細胞で発現されることを示した (Hojo et al. 2015)。CjapCSP1タンパク質は、錐状感覚子 (basiconic sensillum) に豊富に存在することが報告されている (Ozaki et al. 2005) が、CjapCSP13タンパク質の局在はこれまで報告されていない。そこで、CjapCSP13タンパク質の局在を明らかにし、CjapCSP1のそれと比較するために、各タンパク質に特徴的なペプチドを合成し、ウサギを免疫し、抗血清を得た。

最初に、抗血清の特異性と組織レベルでの両タンパク質の局在をウエスタンブロット分析で調べた (Fig. 3-6-1)。 *C. japonicus* 働きアリの触角 (レーンA)、顎 (レーンP)、および脚 (レーンL) からの抽出物、および精製されたCjapCSP1 (レーン1) およびCjapCSP13 (レーン13) を、15%SDS- ポリアクリルアミドゲルに泳動して、CBBで染色した (Fig. 3-6-1, 左)。次に、抗CjapCSP1抗血清 (Fig. 3-6-1, 中) または抗CjapCSP13抗血清 (Fig. 3-6-1, 右) のいずれかを使用して、ウエスタンブロット分析を実施した。抗CjapCSP1抗血清では、バン

ドはレーンA（触角）とレーン1（精製CjapCSP1）でのみ観察された。一方、抗CjapCSP13抗血清では、レーンAおよびレーン13（精製CjapCSP13）にバンドが観察された。これらの結果は、使用された抗血清が各タンパク質に特異的であり交差反応を伴わないこと、また、両タンパク質が触角に豊富であることを示している。RNAの発現解析では、両タンパク質は顎でも発現している（Hojo et al. 2015）。

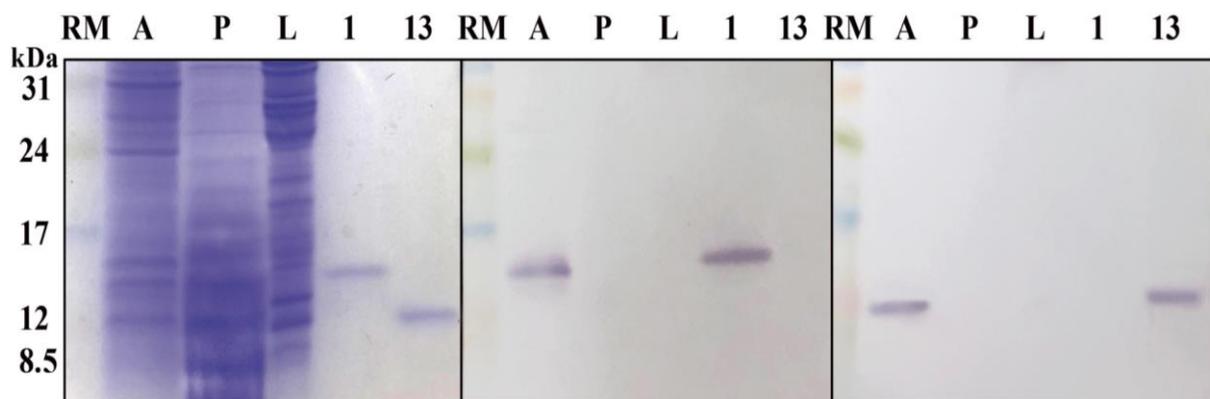


Fig. 3-6-1. CjapCSP1 と CjapCSP13 の局在。

各分画を SDS-PAGE で分離した。RM：レインボーマーカー。レーン A：アンテナから抽出されたタンパク質（アリ 20 匹相当）。レーン P：歯髄から抽出したタンパク質（アリ 10 匹相当）。レーン L：脚から抽出したタンパク質（アリ 0.4 匹相当）。レーン 1 および 13：精製大腸菌発現 CjapCSP1（100 ng、レーン 1） および CjapCSP13（100 ng、レーン 13）。

次に、免疫組織化学の手法を用いて、CjapCSP1 と CjapCSP13 の触角内の局在を調べた。抗 CjapCSP1 抗血清による免疫染色の結果(Fig. 3-6-2. B)では触角にある錐状感覚子の先端が染まっていた。錐状感覚子の内部の染色は、Ozaki et al. (2005)の錐状感覚子の内部全体に蛍光シグナルを示した結果と一致していた。しかし、本研究では、錐状感覚子の先端が強い蛍光を示した。この空間は、樹状突起が到達できない無細胞空間の存在を示した Takeichiet et al. (2018) による最近の観察と一致している。CjapCSP13 の免疫染色の結果(Fig. 3-6-2. D)では触角内のいくつかの細胞が染色された。特に右下側は神経細胞の周りにある支持細胞が染まっていることを示した。また、右矢印の上の染色は嗅覚感覚子らしき大きな穴と対応しているように見える。

これらの結果は、CjapCSP1 遺伝子と CjapCSP13 遺伝子が同じ細胞で発現している (Hojo et al. 2015) にもかかわらず、CjapCSP1 タンパク質と CjapCSP13 タンパク質の局在が異なることを示している。

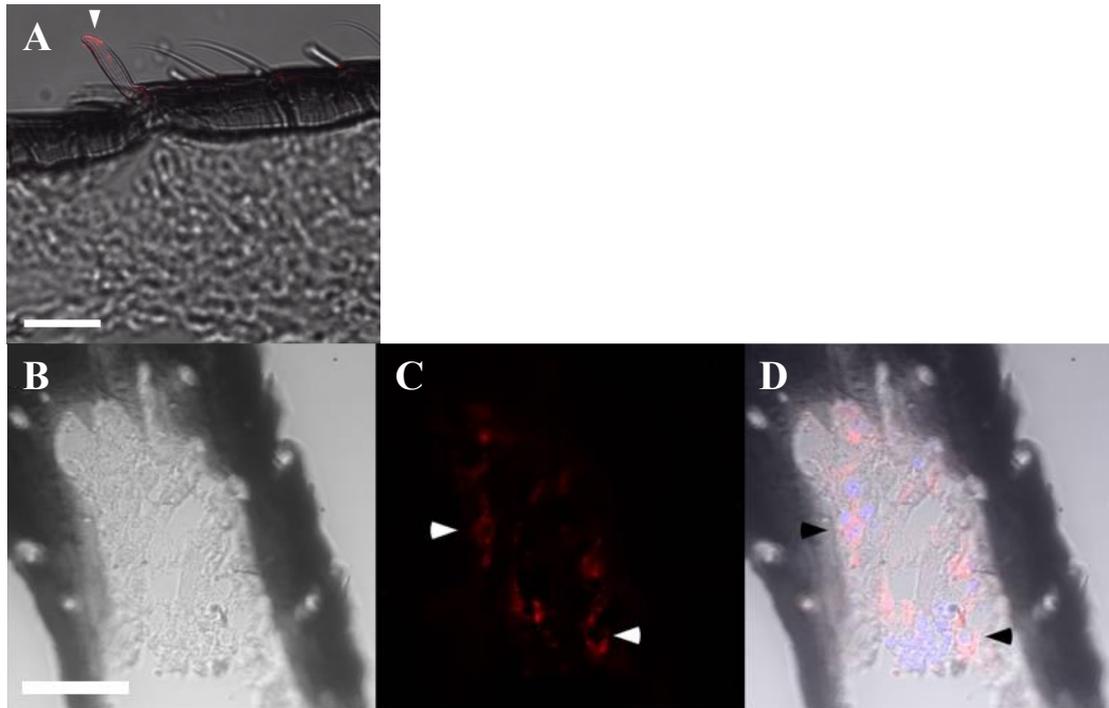


Fig. 3-6-2. クロオオアリの触角切片の免疫染色。

(A) 触角縦断面の抗 CjapCSP1 抗血清による免疫蛍光染色像と微分干渉コントラスト (DIC) 像の重ね合わせ画像。矢印：錘状感覚子の先端。アレクサからの蛍光が赤信号として観察されている。スケールバー：20  $\mu$ m。 (B) 触角の縦断面の DIC 画像。 (B)、(C)、および (D) に共通のスケールバー：30  $\mu$ m。 (C) 抗 CjapCSP13 抗血清による免疫蛍光画像。矢印：抗 CjapCSP13 抗血清で染色された細胞。 (D)：(B)、(C) と DAPI で染色した同じ切片の重ね合わせ画像。矢印は (C) と同じ部位を示している。

### 3-7. タンパク質蛍光結合特性

#### 3-7-1. 蛍光結合測定

まず、蛍光プローブ1-NPNをCjapCSP1またはCjapCSP13と混合すると、発光スペクトルのピークは408 nmへブルーシフトを示し、蛍光強度は1-NPN単体の蛍光強度と比較して大幅に増加した。1-NPNがCjapCSPの疎水性ポケットに結合したことを示している。CjapCSP1およびCjapCSP13の1-NPNへの結合親和性を測定し、Fig. 3-6-1に示した。

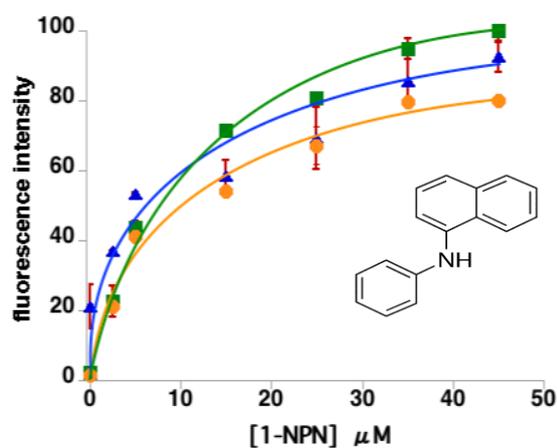


Fig. 3-7-1-1. 1-NPNとの結合親和性の測定。pH 7.0（緑色の四角）およびpH 4.0（オレンジ色の円）でのCjapCSP1およびpH 7.0（青の三角形）でのCjapCSP13の滴定曲線。1-NPNの化学構造を図に示した。

次に、pH 7.0での1-NPNのCjapCSP1およびCjapCSP13への解離定数 (Kd) を、スキッチャードプロット (Fig. 3-7-1-2) から、それぞれ $3.22 \pm 0.64 \mu\text{M}$  (Fig. 3-7-1-2, 上) および $6.99 \pm 2.30 \mu\text{M}$  (Fig. 3-7-1-2, 下) と算出した。pH 4.0で、CjapCSP1のKd値が $6.69 \pm 1.47 \mu\text{M}$ であったことは注目に値する (Fig. 3-7-1-2, 中央)。これは、pH 7.0と比較して結合親和性が小さいことを示している。

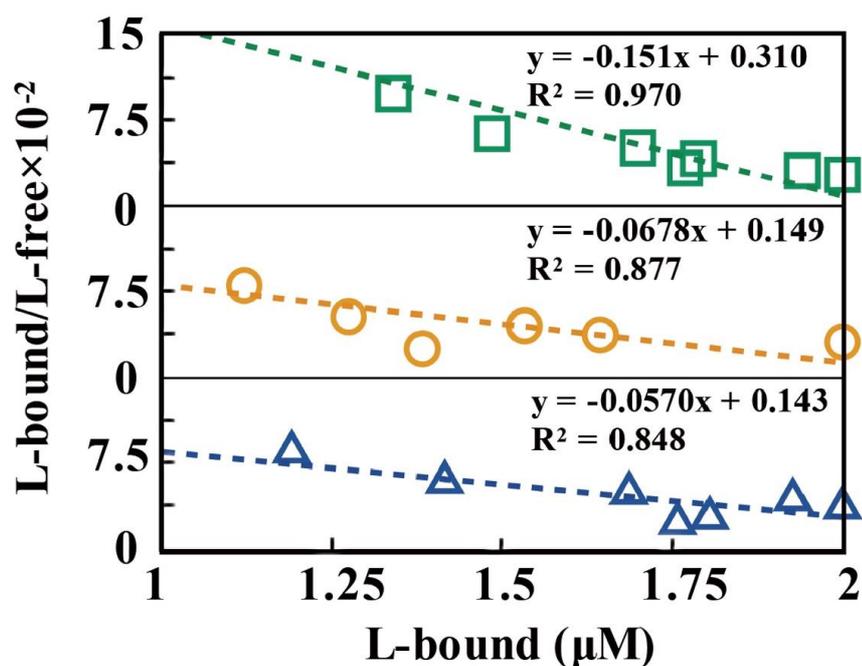


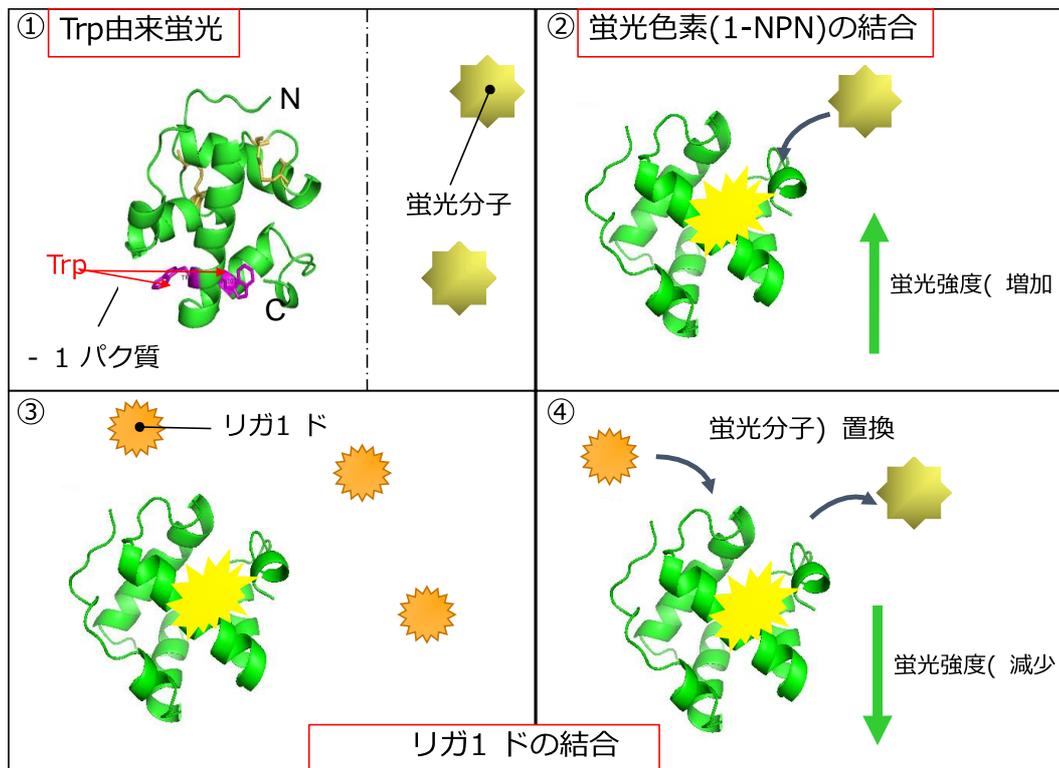
Fig. 3-7-1-2. CjapCSP1 と 13 の 1 - NPN との結合のスキッチャードプロット。正方形 (上)、円 (中央) はそれぞれ pH 7.0、pH 4.0 の CjapCSP1 を、三角形 (下) は pH 7.0 の CjapCSP13 を表す。最小二乗法で求めた直線の方程式と決定係数を図に示した。算出された Kd 値は、pH 7.0 の CjapCSP1 で  $3.22$

$\pm 0.64 \mu\text{M}$  (四角)、pH 4.0 (円) で  $6.69 \pm 1.47 \mu\text{M}$ 、CjapCSP13 は pH 7.0 (三角) で  $6.99 \pm 2.30 \mu\text{M}$ 。

## 3-7-2. CjapCSP1 と 13 の匂い分子に対する蛍光競合的結合

### 3-7-2-1. 蛍光競合結合解析原理

#### 蛍光競合結合解析

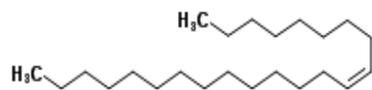


アミノ酸の一種であるトリプトファンには特有の蛍光性があるため蛍光分析の有用なツールとなる。本研究では、トリプトファンの蛍光を利用して解析を行った。最初に、280nm で励起されたトリプトファンは固有の蛍光を示す。蛍光プローブの添加により、タンパク質はプローブと結合し、トリプトファン蛍

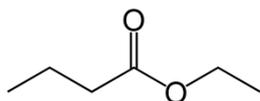
光は消光し、プローブの強い蛍光が現れる。これはタンパク質内在性のトリプトファン側鎖と蛍光分子間で蛍光共鳴エネルギー移動を起こし、蛍光強度が増加する。さらに匂い分子を添加すると、蛍光分子と置換して匂い分子による蛍光強度が減少する。

3-7-2-2. 結合測定に用いた低分子化合物

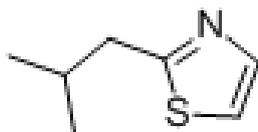
- ① (z)-9-Tricosene (トリコセン)



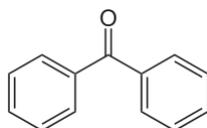
- ② Ethyl butyrate (酪酸エチル)



- ③ 2-Isobutylthiazole (イソブチルチアゾール)



- ④ Benzophenone (ベンゾンフェノン)



さらに、蛍光競合結合アッセイを行って、CjapCSP1 または CjapCSP13 の酪酸エチル、2-イソブチルチアゾール、およびベンゾフェノンへの結合親和性を測定しました (Fig. 3-7-2-1)。 Fig. 3-7-2-1 で観察できるように、両方のタンパク質は化学物質に対して異なる結合親和性を示した。 CjapCSP1 は 2-イソブチルチアゾールとベンゾフェノンを異なる親和性で結合したが (Fig. 3-7-2-1 の白抜き記号と点線)、CjapCSP13 は調べた 3 つの化学物質すべてと結合しなかった (Fig. 3-7-2-1 の塗りつぶし記号と実線)。 2-イソブチルチアゾールとベンゾフェノンの  $K_i$  値はそれぞれ  $16.9 \pm 4.22 \mu\text{M}$  と  $10.9 \pm 2.73 \mu\text{M}$  であり、CjapCSP1 の 1-NPN への結合親和性の方が 2 つの化学物質への結合親和性よりわずかに高かった。

クロオオアリの働きアリに特有の 18 個の CHC の 1 つである (z) -9-トリコセンへの CjapCSP の結合を蛍光競合結合アッセイで使用された方法と同様の方法で調査した。(z) -9-トリコセンの水への溶解度は非常に低い (20 °C で  $7 \times 10^{-6} \text{ g/L}$  未満; 20 nM, Standing Committee on Biocidal Products, 2012)、蛍光強度の低下は CjapCSP が (z) -9-トリコセンに結合し、1-NPN と交換できることを示す。 Fig. 3-7-2-2 に示した結果は、CjapCSP1 (点線) と CjapCSP13 (実

線)の両方が(z)-9-トリコセンに結合することを示唆している。しかし、(z)-9-トリコセンの添加量に対する蛍光強度の減少の依存性は異なっていた。(z)-9-トリコセンの水への溶解度が非常に低いため、蛍光強度の低下を引き起こした正確なメカニズムを知ることはできない。おそらくヘキサン中の(z)-9-トリコセンのCjapCSPへの移動と1-NPNと(z)-9-トリコセンの交換が起こると思われる。CjapCSP13は、調べた4種の低分子化合物では(z)-9-トリコセンのみに結合した(黒塗りの実線; Fig. 3-7-2-1 および Fig. 3-7-2-2)。CjapCSP1は、生理学的な比率を維持しながら18種類のCHCの輸送に関与しているため(Ozaki et al. 2005)、幅広い結合スペクトルを持つことが期待される。

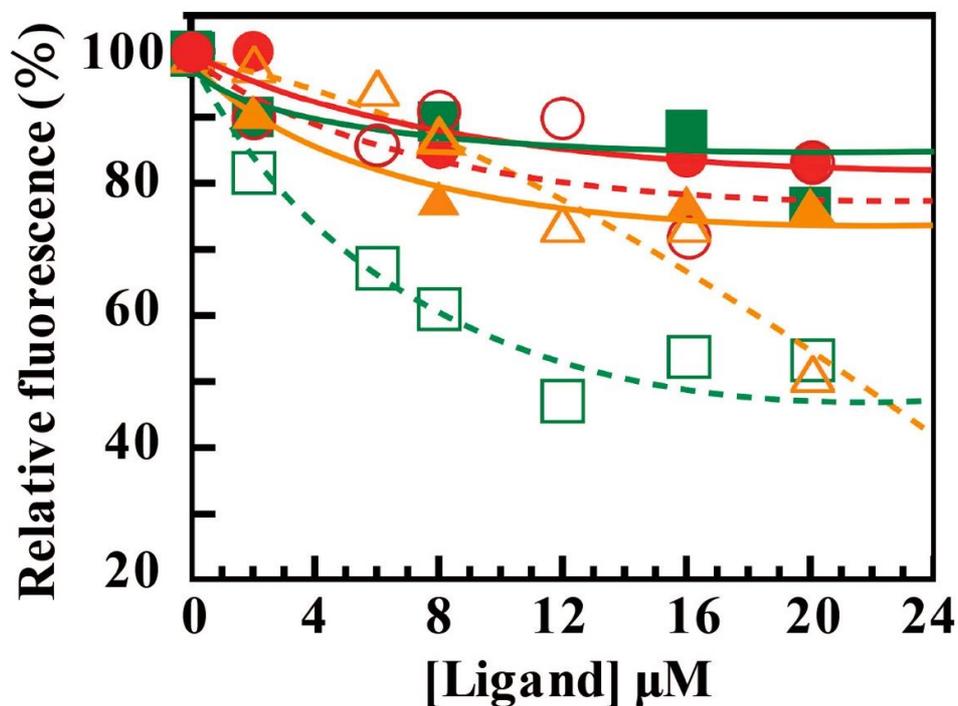


Fig. 3-7-2-1. CjapCSP1 (開いた記号のある破線) および CjapCSP13 (塗りつぶされた記号のある実線) の匂い物質の競合的結合曲線。2 μM タンパク質と 2 μM 1-NPN の混合物を、メタノール中の各物質の 1 mM 溶液で滴定した。3 種の物質は次のとおり：酪酸エチル (円)、2-イソブチルチアゾール (三角形) およびベンゾフェノン (正方形)。各データポイントは、3 回の測定値の平均を表す。

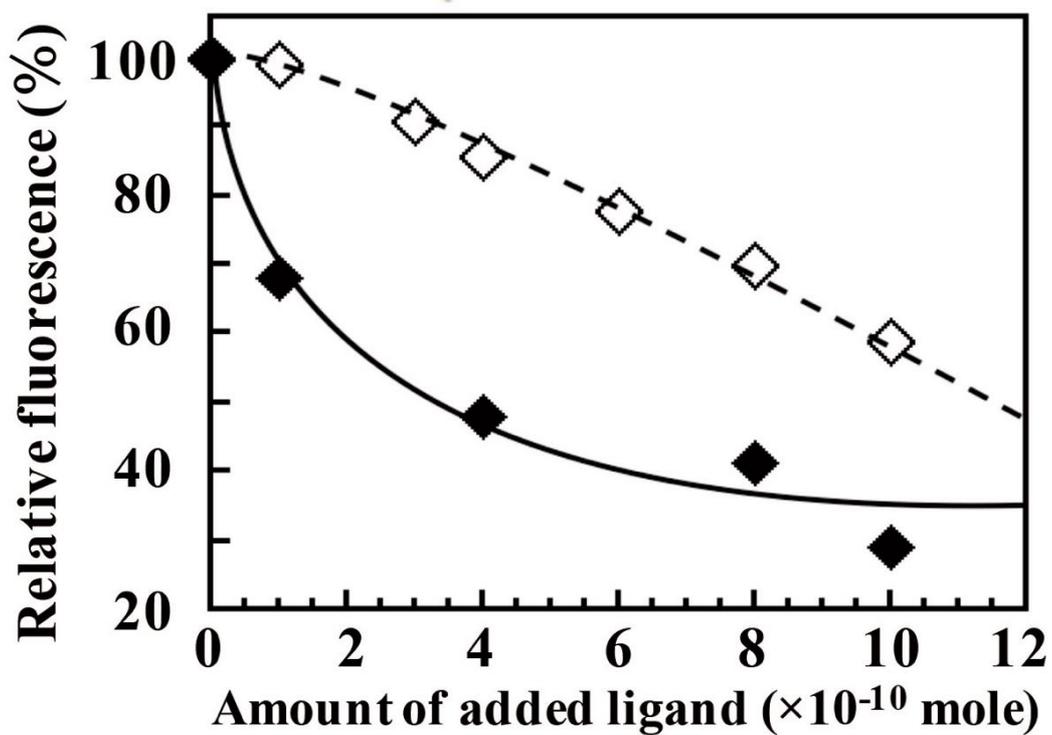


Fig. 3-7-2-2. (z) -9-トリコセンの CjapCSP1 (破線) および CjapCSP13 (実線)

への競合結合曲線。クロオオアリの働きアリに特有の 18 個の CHC の 1 つで

ある (z) -9-トリコセンを加えたときの蛍光強度の変化を調べた。

Ligands	CAS No.	CjapCSP1		CjapCSP13	
		IC <sub>50</sub> (μM)	Ki* (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	Ki* (μM)
Benzophenone	119-61-9	14.3	10.9 ± 2.73	n.d.	n.d.
2-Isobutylthiazole	18640-74-9	22.1	16.9 ± 4.22	n.d.	n.d.
Ethyl butyrate	105-54-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

表 1. CjapCSP1 および CjapCSP13 の競合リガンド結合アッセイ

\* Ki 値は次の式に従って算出された： $K_i = [IC_{50}] / (1 + [1-NPN] / K_d^{1-NPN})$ ；

ここで、 $K_{d1-NPNCjapCSP1} = 3.22 \pm 0.64 \mu M$ 、 $K_{d1-NPNCjapCSP13} = 6.99 \pm 2.30 \mu M$ 。 nd;

決定できず。

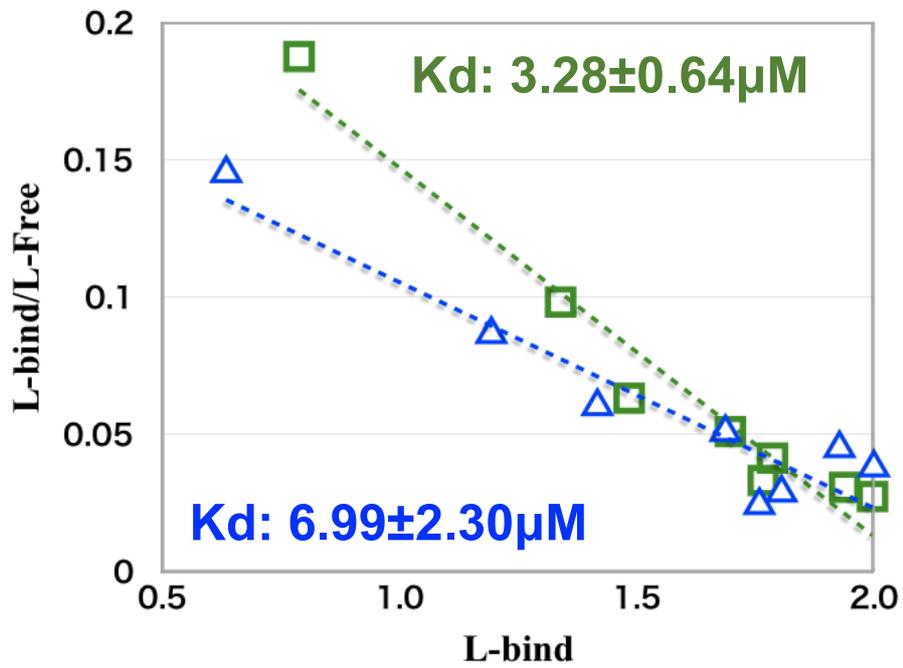


Fig. 3-7-2-2. pH 7.0 での 1-NPN の CjapCSP1 および CjapCSP13 への解離定

数 ( $K_d$ )。  $K_{d1-NPNCjapCSP1} = 3.22 \pm 0.64 \mu\text{M}$ 、  $K_{d1-NPNCjapCSP13} = 6.99 \pm 2.30 \mu\text{M}$ 。

### 3-8. X線溶液散乱測定

X線溶液散乱 (SAXS および WAXS) は、タンパク質の構造の詳細をさまざまなレベルで測定できる。 $q < \sim 0.2 \text{ \AA}^{-1}$  分子の形状(四、三次構造)、 $\sim 0.25 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.5 \text{ \AA}^{-1}$  構造ドメイン間相関、 $\sim 0.5 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 0.8 \text{ \AA}^{-1}$  構造ドメイン内のヘリックスやシートの配列、 $\sim 1.1 \text{ \AA}^{-1} < q < \sim 1.9 \text{ \AA}^{-1}$   $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートの含量及び近接する側鎖のパッキングの情報を与える (Hirai M et al. 2004)。本研究では CjapCSP1 溶媒の pH を変化させ、リガンドとの結合・非結合状態での構造変化を SAXS 測定により調べた。CjapCSP1 の pH 7.0 (緑色の実線) および pH 4.0 (赤色の破線) での散乱曲線を (Fig. 3-8-1. 上) に示した。距離分布関数  $P(r)$  を (Fig. 3-8-1, 下) に示した。これらの散乱曲線は、0.33 および  $1.30 \text{ \AA}^{-1}$  のピークと、 $0.59 \text{ \AA}^{-1}$  付近の小さな肩を示した。CRY SOL によって得られた CjapCSP1 の理論的な散乱曲線 (Fig. 3-8-2, CSP1) では、pH 7.0 で測定された散乱曲線で見られた  $0.33$  および  $1.30 \text{ \AA}^{-1}$  のピークと  $0.59 \text{ \AA}^{-1}$  の小さな肩がはっきりと見えた。したがって、CjapCSP1 (Fig. 3-8-1, 上) で観察された  $0.33$ 、 $0.59$ 、および  $1.30 \text{ \AA}^{-1}$  の散乱プロファイルは、それぞれドメイン間相関、ドメイン内構造、および隣接する側鎖のパッキングに対応していると考えられる。理論的な散

乱曲線で明らかに見られる  $0.22 \text{ \AA}^{-1}$  と  $0.85 \text{ \AA}^{-1}$  の負のピークの強度と明瞭さに違いがあるが、CjapCSP1 の測定された散乱ピークは理論的な散乱曲線に対応する位置にあった。つまり、溶液中の CjapCSP1 は 3D モデル (Fig. 3-4. B) と同様の構造を持つことを示唆している。溶液中のタンパク質はより柔軟であると考えられるので、理論的散乱曲線と測定された散乱曲線の違いが生じたと思われる。

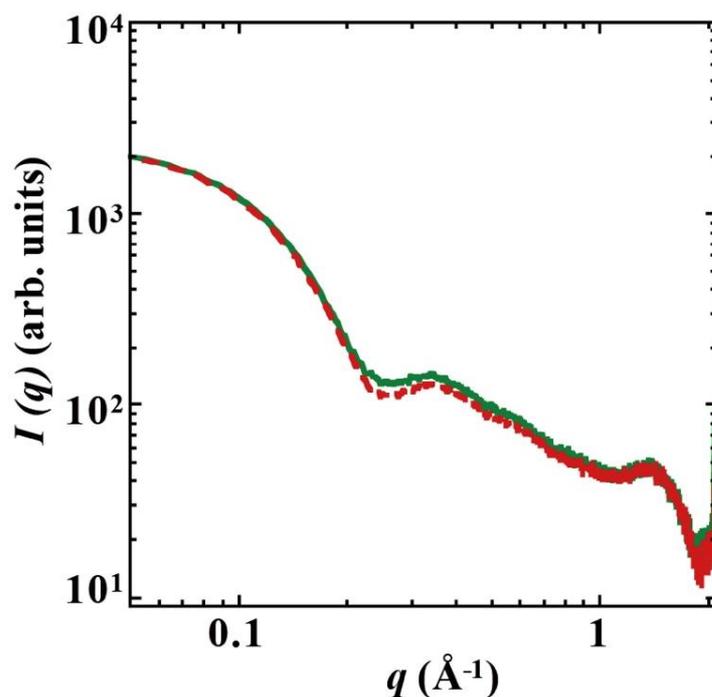


Fig. 3-8-1. X線溶液散乱測定。pH 4.0 (赤い破線) および pH 7.0 (緑の実線) での CjapCSP1 の散乱曲線 ( $I(q)$  vs  $q$ )。

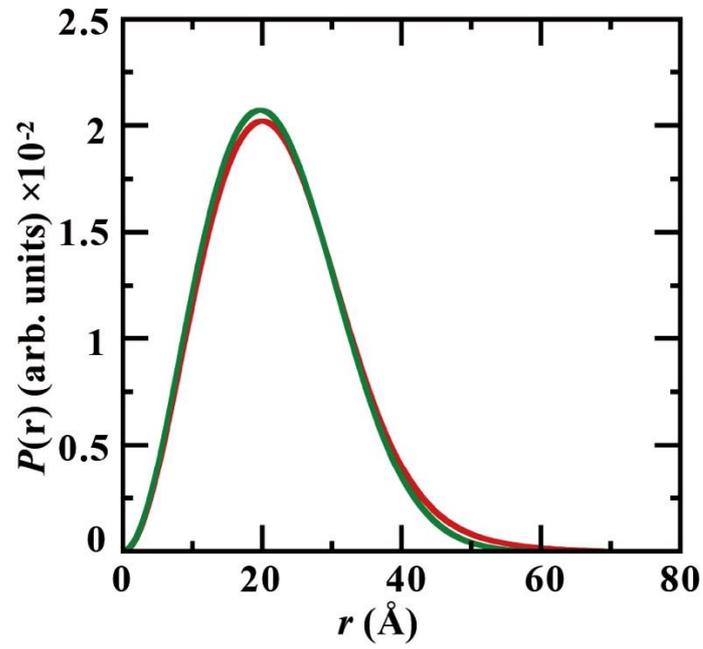


Fig. 3-8-2. CjapCSP1 の距離分布関数； $p(r)$ 。pH 4.0 (赤) および pH 7.0 (緑色)。

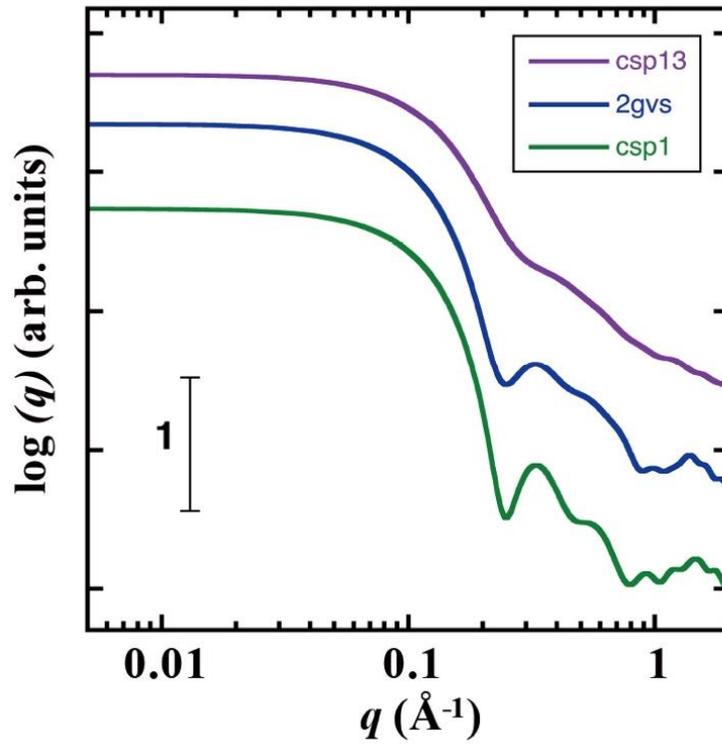


Fig. 3-8-3. CSPsg4 の 3 次元構造データ (PDB : 2GVS) をテンプレートとして得た三次元構造データから CRY SOL を使用して得られた理論散乱曲線を示す。CjapCSP1(緑)、CSPsg4 (青) 、CjapCSP13 (紫) 。

回転半径 ( $R_g$ ) は、各散乱曲線のプロット (Fig. 3-8-3) から決定され、Fig. 3-7-4 および表 1 に示した。同じギニエ範囲 ( $0.05 - 0.08 \text{ \AA}^{-1}$ ) を使用していて、リガンド結合していない空の CjapCSP1 の散乱曲線から算出された  $R_g$  値 (pH 4.0 および pH 7.0 でそれぞれ  $14.75 \pm 0.13$  および  $14.01 \pm 0.19 \text{ \AA}$ ) は、CRY SOL プログラムを使用した理論散乱曲線によって得られた  $14.61 \text{ \AA}$  に類似していた (表 2) 。CSP1 の  $R_g$  は CjapCSP13 の  $R_g(13.15 \pm 0.10 \text{ \AA})$  よりも大きかった。

(z) -9-トリコセンの CjapCSP1 への結合により、両方の pH 条件下で  $R_g$  がわずかに増加した (pH 7.0 で  $0.29 \text{ \AA}$  の増加、pH 4.0 で  $0.22 \text{ \AA}$  の増加) 。 リガンド結合による  $R_g$  の変化は小さいものだが、 $R_g$  は両方の pH で増加するようであり、リガンド結合時にタンパク質がわずかに拡張したことを示唆している。

pH の変化は、CjapCSP の  $R_g$  値の変化も引き起こした。 2つの pH 間の  $R_g$  値の変化は、CjapCSP1 と CjapCSP13 で異なっていた。リガンド結合していない空の CjapCSP1 の場合、pH 4.0 での  $R_g$  値は pH 7.0 での値より 5.3% ( $0.74 \text{ \AA}$  増加) 大きかった。 この  $R_g$  の増加は、リガンド結合 CjapCSP1 ではわずかに小さく、4.7%増加であった ( $0.67 \text{ \AA}$  増加) 。 一方、CjapCSP13 では、 $R_g$  値は pH 4.0 でわずかに減少した (1.8%、 $0.24 \text{ \AA}$  の減少) 。

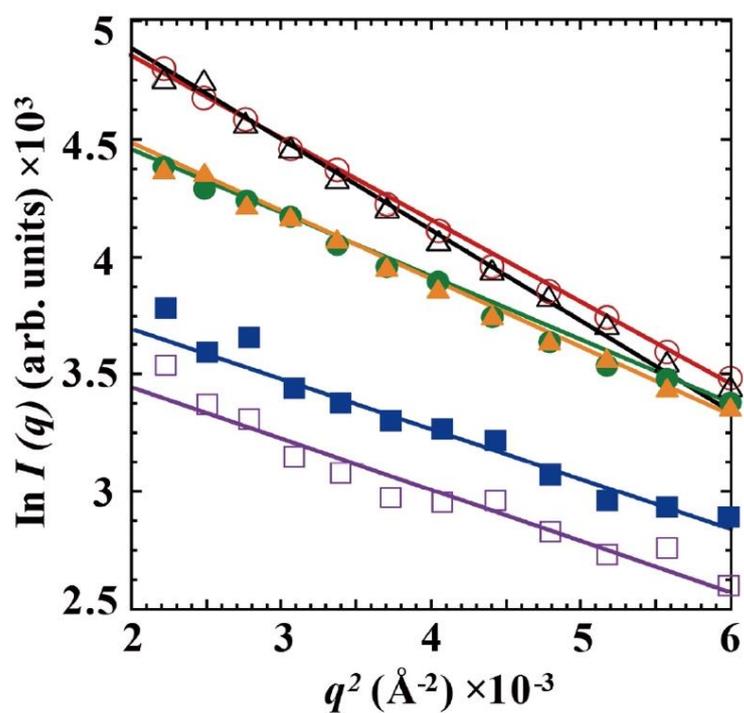


Fig. 3-8-3. 各試料から得られたギニエプロット。CjapCSP1のpH 4.0（赤白丸）およびpH 7.0（緑黒丸）CjapCSP1と(z)-9-トリコセンの混合試料pH 4.0（黒い三角形）、およびpH 7.0（オレンジ色の閉じた三角形）。CjapCSP13のpH 4.0（開いた紫色の正方形）とpH 7.0（青い閉じた正方形）のギニエプロット。

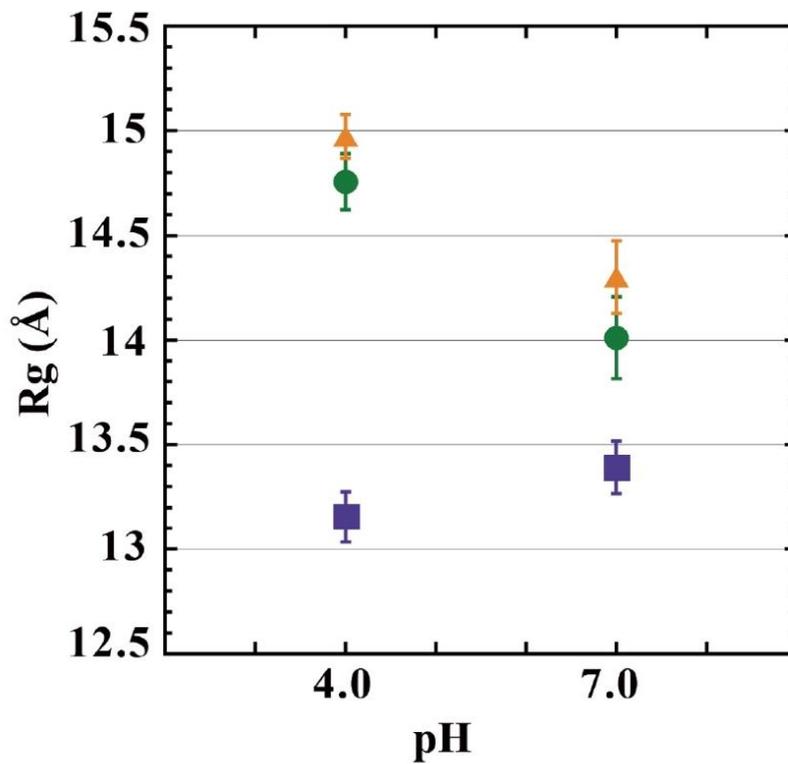


Fig. 3-8-4. pH 4.0 および 7.0 での各試料の回転半径( $R_g$ )。 CjapCSP1 (緑色の円)、CjapCSP1 と (z)-9-トリコセンの混合サンプル (オレンジ色の三角形)、および CjapCSP13 (青い正方形)。

Fig. 3-8-4 は、pH 4.0 および 7.0 での CjapCSP1 の散乱曲線（赤と緑の曲線、Fig. 3-8-1）、および (z) -9-トリコセンの存在下で記録された CjapCSP1 散乱曲線の Kratky プロット ( $q^2I(q)$  vs  $q$ ) を示している。Kratky プロットは、ポリマー鎖内（重合体）の柔軟性の程度を表す (Kriszte and Oberthur, 1982)。0.2  $\text{\AA}^{-1}$  未満の  $q$  領域の曲線の形状は、コンパクトな折り畳み構造の存在を反映しているが、0.25  $\text{\AA}^{-1}$  を超える  $q$  領域の変化は、タンパク質内の柔軟性の増加を示している (Kataoka et al. 1993)。図の中の 0.2  $\text{\AA}^{-1}$  未満の  $q$  領域のベル形のプロファイルは、pH 4.0 よりも pH 7.0 でより平坦になり、球状のコンパクトな三次構造が pH 4.0 でより硬かったことを示唆しています。0.25  $\text{\AA}^{-1}$  を超える  $q$  領域の散乱曲線は、曲線の変調プロファイルの変化を示し、pH 7.0 でポリペプチド鎖の剛性が低下することを示している。

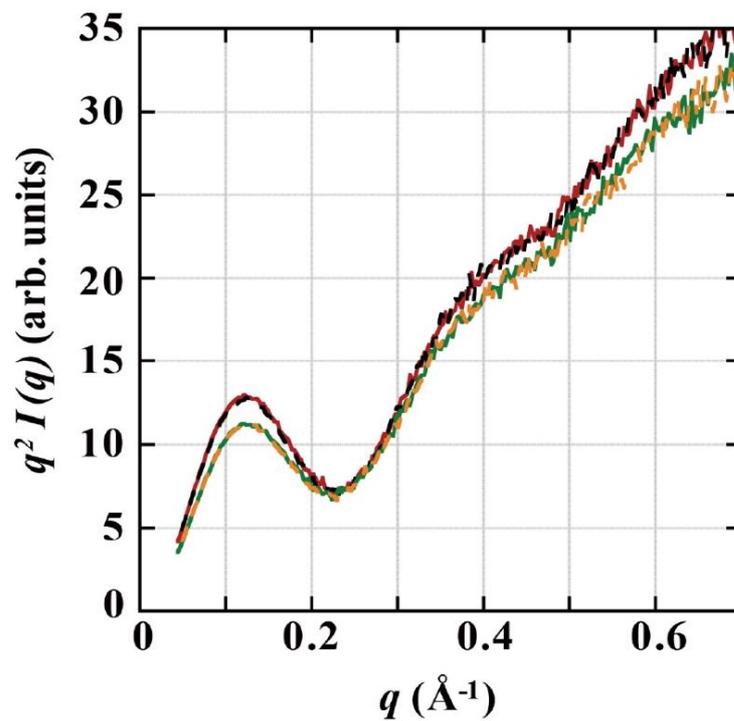


Fig. 3-8-4. 各散乱曲線の Kratky プロット。CjapCSP1 の pH 4.0 (赤線)、pH 7.0 (緑線)、および CjapCSP1 と (z)-9-トリコセンの混合サンプル pH 4.0 (黒線) と pH 7.0 (オレンジ色の線)。0.2  $\text{\AA}^{-1}$  以下および 0.25  $\text{\AA}^{-1}$  以上の  $q$  領域の曲線は、それぞれ球状の三次構造とポリペプチド鎖の柔軟性を反映している。

表 2. X 線溶液散乱測定

			$D_{\max}$ (Å)	$P_{\max}$ (r) (Å)	$R_g$ (Å)
Theoretical data of CjapCSP1*			51.07	19.99	14.61
CjapCSP1	pH 4.0	(-)**	70.89	20.50	$14.75 \pm 0.13$
		(+)**	71.59	20.50	$14.97 \pm 0.10$
	pH 7.0	(-)**	60.07	20.00	$14.01 \pm 0.19$
		(+)**	66.10	20.50	$14.30 \pm 0.17$
CjapCSP13	pH 4.0	(-)**	33.71	13.99	$13.15 \pm 0.10$
	pH 7.0	(-)**	33.44	13.99	$13.39 \pm 0.10$

\* CRYSOLE を使用したプログラムフィッティングにより得られた CjapCSP1 の 3D モデルの理論散乱曲線から得られたデータ。 CjapCSP1 の 3D モデルは、CSPsg4 (PDB : 2GVS) の 3 次元構造データをテンプレートとして使用して、PyMOL (Schrödinger, New York, USA) によって構築された。 \*\* (-) および (+) ; CSP のみ、およびリガンド ( (z) -9-トリコセン) を含む CSP。

## 4. 結論

本研究ではクロオオアリのフェロモン分子を運ぶと考えられている化学感覚タンパク質の作用機構を、最初にクロオオアリの感覚子で見つかった CjapCSP1 と同じ触角内で発現していて触角において協力的に働いていると考えられる CjapCSP13 の比較から検討した。また、働きアリの巣仲間識別行動に関与していることが明らかになっている CjapCSP1 はどのようにして、匂い分子と結合し、匂い分子を結合した CSP が受容タンパク質を見出し、相互作用して、匂い分子を受容体タンパク質に渡すのか、その一連分子機構をタンパク質溶液の周辺環境 pH を変化させ、リガンドとの結合・非結合状態での構造変化の視点から調べた。

まず、溶液中の CjapCSP1 の構造とその pH 依存構造変化を調査した。組換え CjapCSP1 および 13 の遠紫外 CD スペクトルは、209 および 221 nm で2つの特徴的な負のピークを示し、CjapCSP1 の二次構造は  $\alpha$  ヘリックスに富んでおり、pH 4.0 での CjapCSP1 の CD スペクトルは、pH 7.0 での CD スペクトルとほぼ同じであり、タンパク質の二次構造が pH の変化による大きな影響を受けなかったことを示している。

空およびリガンド結合 CjapCSP の X 線溶液散乱測定、SAXS および WAXS は、SPring-8 (課題番号 2015G518) および KEK (課題番号 2016A1487) で実行された。 SAXS と WAXS の測定により、pH に依存する CjapCSP1 の Rg の変化が見つかった。 Rg 値を(Fig. 3-8-3, 右)に示し、また表 1 にまとめた。 pH 4.0 での空の CjapCSP の Rg は  $14.75 \pm 0.13 \text{ \AA}$  で、pH 7.0 ( $14.01 \pm 0.19 \text{ \AA}$ ) の 5.3% ( $0.74 \text{ \AA}$  の増加) 増加した。これは、酸性 pH が CjapCSP1 の二次構造の顕著な変化なしに三次構造変化を引き起こしたことを示唆している。 リガンド (z) -9-トリコセンの CjapCSP1 への結合により、両方の pH で Rg がわずかに増加した。 具体的には、pH 7.0 で  $0.29 \text{ \AA}$  増加し、pH 4.0 で  $0.22 \text{ \AA}$  増加した。 実験条件下では、タンパク質の濃度が高いため、タンパク質に十分な量のリガンドを加えることができなかった。したがって、測定されたサンプルは、空の CjapCSP とリガンド結合 CjapCSP の混合物であり、リガンド結合による実際の Rg の増加は、測定で観察されたものよりも大きい可能性がある。 最近、Mazumder et al ら (2018) は SAXS を使用して溶液中の OfurPBP2 の構造を研究した、pH 6.5 で空の OfurPBP2 のみを測定し、Rg を  $16.96 \text{ \AA}$  と推定した。 私の知る限り、本研究は、CSP を研究するために SAXS と WAXS を使用した最

初の研究である。脊椎動物 OBP（リポカリン）の場合、リポカリン型プロスタグランジン D シンターゼ（L-PGDS）の SAXS 分析により、L-PGDS の親油性リガンドの 1 つであるビリベルジンとの結合により、L-PGDS の  $R_g$  が  $1.3 \text{ \AA}$  減少することが示され、タンパク質はリガンド結合によりコンパクトになった（Miyamoto et al. 2010）。タンパク質の立体構造変化の方向は、CSP で観察される方向とは異なっている。

次に、酸性の pH によって誘発される、蛍光色素分子 1-NPN への結合親和性のわずかな減少を伴う CjapCSP1 の立体構造の変化、分子の拡張を見出した。酸性 pH での構造変化に依存するリガンド放出の分子メカニズムは、BmorPBP（Horst et al. 2001）および蚊 *Anopheles gambiae* からの OBP（AgamOBP1）（Wogulis et al. 2006）で提案されている。これらの報告は OBP / PBP に関するものであるが、CjapCSP1 で今回得られた結果はこれらの報告と一致しており、酸性 pH での立体構造変化による CSP1 のリガンド放出のメカニズムを示唆している可能性がある。

## 5. 考察

CjapCSP1 はクロオオアリの働きアリの錘状感覚子で最初に観察された (Ozaki et al. 2005)。クロオオアリのトランスクリプトーム解析により、12 個の CSP 遺伝子が見つかり、そのうち 3 個が CjapCSP1 から多様化した系統特異的遺伝子であることが明らかになっている。それらのうちの 2 つ (CjapCSP12 と CjapCSP13) は、主に働きアリの化学感覚器官 (触角と顎) で発現しているが、CjapCSP12 はオスで高発現している。CjapCSP1 と CjapCSP13 はどちらも雌カースト (alate queens と worker) で高度に発現しており、2 種のプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション分析により、両方の遺伝子と CSP1 の共発現が明らかになった (Hojo et al. 2015)。CjapCSP12 は CjapCSP1 と触角で共発現したが、カースト固有の発現が CjapCSP1 と違うため、本研究では CjapCSP12 ではなく CjapCSP13 を評価した。

また、PyMol によって作成された CjapCSP1 および CjapCSP13 の 3D モデルは、CSPMbraA6 の結晶構造解析によって解明されたものと同様の結合ポケットを示した (Lartigue et al. 2002)。結合ポケットは 2 つの V 字型構造で形成され、その 1 つはヘリックス 1 と 2 で構成され、もう 1 つはヘリックス 4 と 5 で構成される。ヘリックス 3 は両方の V 字型構造に垂直であり、2 つの V 字構造

が作る溝の上に天井を形成する (Lartigue et al. 2002)。CjapCSP1 と 13 のモデル構造を比較すると、CjapCSP13 のヘリックス 3 は CjapCSP1 よりも V 字型構造の近くに配置されているように見える (Fig. 3-4)。したがって、CjapCSP13 は CjapCSP1 よりも狭い結合ポケットと、全体的によりコンパクトなタンパク質構造を持っているように思われる。蛍光競合結合アッセイの結果から、CjapCSP13 は調べた 4 種の化学分子の中では (z) -9-トリコセンにのみ強く結合し、狭い結合選択性を示すと考えられる (Fig. 3-7-2-1 と Fig. 3-7-2-2)。この結果は、CjapCSP13 の結合ポケットが小さいことを示唆している。

さらに、免疫組織化学的結果は、CjapCSP1 と 13 の遺伝子が同じ細胞で発現されているが (Hojo et al. 2015)、タンパク質の局在が異なることを示した。CjapCSP1 は錘状感覚子の先端部分の細胞のない空間 (フリースペース) に豊富にあった。しかし CjapCSP13 はそうではなかった。CSP1 でこの分子局在の結果と幅広い匂い物質結合選択性を持っているという結果は、尾崎等による提案 (Ozaki et al. 2005) : CSP1 は、比率を維持しながら 18 種類の CHC を受容体タンパク質に運ぶと矛盾する結果ではなかった。

最後、CjapCSP1とCjapCSP13の間にいくつかの違いが見つかった。

CjapCSP13の(z)-9-トリコセンへの結合親和性は、CjapCSP1の結合親和性よりわずかに大きいと思われる(Fig. 3-7-2-2)。CjapCSP1では、酸性pHでRg値が増加し、蛍光色素1-NPNとの結合のKd値が増加した。一方、CjapCSP13では、酸性pHでRg値がわずかに低下した。両方のタンパク質間のこれらの違いは、CjapCSP1と13が触角でCHCを受容および/または輸送することに関連する異なる機能を実行することを示唆している。最近、昆虫のOBP、PBP、およびCSPが非化学感覚機能を有しているという報告がある(Liu et al. 2016; Perosi et al. 2018; Picimbon. 2019)。クロオオアリの触角内のCjapCSP13の機能を解明するには、触角でCjapCSP1と共発現することが報告されているCjapCSP12を含めた更なる研究が必要である。

## 6.参考文献

## Reference

1. Akino T, Yamamura K, Wakamura S, Yamaoka R (2004) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as nestmate recognition cues in *Formica japonica* (Hymenoptera: Formicidae). *Appl Entomol Zool* 39: 381-387
2. Ali MF, Morgan ED (1990) Chemical communication in insect communities: a guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65: 227-247
3. Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, et al. (1999) Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem* 262: 745-754
4. Brandstaetter AS, Endler A, Kleineidam CJ (2008) Nestmate recognition in ants is possible without tactile interaction. *Naturwissenschaften* 95: 601-608
5. Campanacci V, Lartigue A, Hallberg BM, Jones TA, Giudici-Ortoni MT, Tegoni M, et al. (2003) Moth chemosensory protein exhibits drastic conformational changes and cooperativity on ligand binding. *Proc Nat Acad Sci* 100: 5069-5074

6. Flower DR, North ACT, Sansom CE (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 1482: 9-24
7. González D, Zhao Q, McMahan C, Velasquez D, Haskins WE, Sponsel V, et al. (2009) The major antennal chemosensory protein of red imported fire ant workers. *Insect Mol Biol* 18: 395-404
8. Grzyb J, Latowski D, Strzaika K (2006) Lipocalins - a family portrait. *J Plant Phys* 163: 895-915
9. Heydel JM, Coelho A, Thiebaud N, Legendre A, Bon AML, Faure P, et al. (2013) Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anatomical Rec* 296: 1333-1345
10. Hirai M, Arai S, Iwase H, Takizawa T (1998) Small angle X-ray scattering and calorimetric studies of thermal conformational change of lysozyme depending on pH. *J Phys Chem B* 102: 1308-1313
11. Hirai M, Iwase H, Hayakawa T, Miura K, Inoue K (2002) Structural hierarchy of several proteins observed by wide-angle solution scattering. *J Synchrotron Rad* 9: 202-205

12. Hojo MK, Ishii K, Sakura M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ozaki M (2015)  
Antennal RNA-sequencing analysis reveals evolutionary aspects of chemosensory proteins in the carpenter ant, *Camponotus japonicus*. *Sci Rep* 5: 13541
13. Horst R, Damberger F, Luginbuhl P, Guntert P, Peng G, Nikonova L, et al. (2001)  
NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release. *Proc Natl Acad Sci* 98: 14374-14379
14. Ishida Y, Chiang V, Leal WS (2002) Protein that makes sense in the Argentine ant. *Naturwissenschaften* 89: 505-507
15. Kataoka M, Hagihara Y, Mihara K, Goto Y (1993) Molten globule of cytochrome c studied by small angle X-ray scattering. *J Mol Biol* 229: 591 – 596
16. Kem WR, Tu CK, Williams RW, Toumadje A, Johnson WC (1999) Circular dichroism and laser Raman spectroscopic analysis of the secondary structure of *Cerebratulus lacteus* toxin B-IV. *J Prot Chem* 9: 433-443
17. Kriste RG, Oberthur RC (1982) Synthetic Polymers in Solution. In *Small Angle X-ray Scattering*; Glatter, G., Kratky, O., Eds.; Academic Press: New York: 387–431.

18. Lahav S, Soroker V, Hefetz A, Vander Meer RK (1999) Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* 86: 246-249
19. Lartigue A, Campanacci V, Roussel A, Larsson AM, Jones TA, Tegoni M, et al. (2002) X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *J Biol Chem* 277: 32094-32098
20. Liu GX, Ma HM, Xie YN, Xuan N, Xia G, Fan ZX, et al. (2016) Biotype characterization, developmental profiling, insecticide response and binding property of *Bemisia tabaci* chemosensory proteins: role of CSP in insect defense. *PLoS One* 11: e0154706
21. Mazumder S, Dahal SR, Chaudhary BP, Mohanty S (2018) Structure and function studies of asian corn borer *Ostrinia furnacalis* pheromone binding protein<sup>2</sup>. *Sci Rep* 8: 17105
22. Miyamoto Y, Nishimura S, Inoue K, Shimamoto S, Yoshida T, Fukuhara A, et al. (2010) Structural analysis of lipocalin-type prostaglandin D synthase complexed

with biliverdin by small-angle X-ray scattering and multi-dimensional NMR. *J*

*Struct Biol* 169: 209-218

23. Mosbah A, Campanacci V, Lartigue A, Tegoni M, Cambillau C, Darbon H. (2003)

Solution structure of a chemosensory protein from the moth *Mamestra brassicae*.

*Biochem J.* 369(5): 39-44.

24. Nakanishi A, Nishino H, Watanabe H, Yokohari F, Nishikawa M (2009) Sex-

specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and

distribution of sensilla on the flagellum. *Cell Tissue Res.* 338: 79-97

25. Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, et al.

(2005) Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory

sensillum. *Science.* 309: 311-314

26. Pelosi P (2001) The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. *Cell Mol L*

*ife Sci* 694: 503-509

27. Pelosi P, Calvello M, Ban L (2005) Diversity of odorant binding proteins and

chemosensory proteins in insects. *Chem Senses.* 30: 291-292

28. Pelosi P, Iovinella I, Zhu J, Wang G, Dani FR (2018) Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. *Biol Rev* 93: 184-200
29. Pelosi P, Maida R (1995) Odorant binding proteins in insects. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 111: 503-514
30. Picimbon JF (2019) Evolution of protein physical structures in insect chemosensory systems. In “Olfactory Concepts of Insect Control – Alternative to Insecticides” Ed by J.-F. Picimbon, Springer Nature Switzerland. 231-263
31. Shanbhag SR, Muller B, Steinbrecht RA (1999) Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *Int J Insect Morphol Embryol* 28: 377-397
32. Shanbhag SR, Muller B, Steinbrecht RA (2000) Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 2. Internal organization and cellular architecture of olfactory sensilla. *Arthropod Struct Dev* 29: 211-229
33. Steinbrecht RA, Laue M, Ziegelberger G (1995) Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res* 282: 203-217

34. Svergun D, Barberato C, Koch MHJ (1995) CRY SOL - a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Cryst* 28: 768-773
35. Takeichi Y, Uebi T, Miyazaki N, Murata K, Yasuyama K, Inoue K, et al. (2018) Putative neural network within an olfactory sensory unit for nestmate and non-nestmate discrimination in the Japanese carpenter ant: The ultra-structures and mathematical simulation. *Front Cell Neurosci* 12: Article 310
36. Tomaselli S, Crescenzi O, Sanfelice D, AB E, Wechselberger R, Sergio A, Boelens R, Tancredi T, Pelosi P, Picone D. 2006. Solution structure of a chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*. 45(35): 10606-10613.
37. Touhara K, Vosshall LB (2009) Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu Rev Physiol*. 71: 307-332.
38. Vander Meer RK (1998) Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites. Boulder, CO: Westview Press.

39. Vogt RG, Prestwich GD, Lerner M (1991) Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J Neurobiol* 22: 74-84.
40. Wei Y, Brandazza A, Pelosi P (2008) Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutants of odorant-binding protein: a first step towards biosensors for environmental monitoring. *Biochim Biophys Acta* 1784: 666–671.
41. Wogulis M, Morgan T, Ishida Y, Leal WS, Wilson DK (2006) The crystal structure of an odorant binding protein from *Anopheles gambiae*: Evidence for a common ligand release mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 157-164.
42. Wojtasek H, Leal WS. 1999. Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. *J Biol Chem.* 274(43): 30950-30956.
43. Yang S, Rodgers VG, Schultz JS, Liao J (2012) Protein interaction affinity determination by quantitative FRET technology. *Biotechnol Bioeng* 109: 2875-2883.

44. Zubkov S, Gronenborn A. M, Byeon IJ, Mohanty S (2005) Structural consequences of the pH-induced conformational switch in *A. polyphemus* pheromone-binding protein: mechanisms of ligand release. *J Mol Biol.* 354(5): 1081-1090.

## 7.謝辭

指導教官である岩佐達郎教授には私が室蘭工業大学の研究生、修士課程に入学した際から、約 6 年に渡りお世話になってまいりました。留学生の私に日本語、英語論文の書き方をご指導いただくことや、研究内容・考察について鋭いご指摘をいただくことが何度もありました。特に博士の間は休日であるにも関わらず、私に実験を指導するか私との研究議論に多くのお時間を割いていただきました。深夜まで時間と戦って論文を直したこと、厚意により様々な発表の機会を与えて頂いたこと、留学生活までに助けたことにつきましての深く感謝致します。

群馬大学の平井教授には、X線溶液散乱の実験手法などに関して、多くのご助言をいただきました。私がタンパク質溶液散乱の研究を始めたばかりの頃、X線溶液散乱実験、データ処理する方法とかを朝まで教えていただいたことは、非常によい思い出であります。そのおかげで納得のいく論文を作成することができました。ありがとうございました。

神戸大学の尾崎教授にはアリの実験手法などに関して、多くのご助言とご指導をいただきました。本当にありがとうございました。

本学 戎教授には 1 年半お世話になってまいりました、いろいろな申請書の手続きから博士論文発表まで詳細なご指導と配慮いただきましたこと、心から感謝いたします。

本学 澤田研准教授には、修士の頃から研究のご指導いただき、宮永教授から貴重なご助言をいただきました。皆さんに大変お世話になりました。長い間本当にありがとうございました。

本学 国際交流センターメンバーたちには留學生活に助けたこと、国際活動に参加させたことに心より感謝いたします。

在日生活に大変お世話になり、いつも温かい激励を頂きました三津谷様、船森様、西山先生から始めたたくさんの友人たち、留学生同士に心より感謝致します。

外国人留学生として「ロータリー米山奨学金」を付与された日本ロータリー米山記念奨学会と知識で育てくれた室蘭工業大学に厚く礼を申し上げます。

最後にここまで私を支えてくれた家族には、感謝の気持ちでいっぱいです。特に、両親は私と妹二人共に留学させ、様々な経験をさせてもらいました。深く感謝の意を表します。また、夫には、研究に深い理解を示してくれたのみならず、常日頃温かくサポートをしてもらいました。本当に感謝しております。これからは、みなさまに少しでも恩返しができるよう、今後も努力したいと思います。そして、ここに名前を挙げさせていただいた方々だけではなく、私を支えてくださったすべての方に、心よりの感謝の意を込めて謝辞とします。

## 8.研究業績

## 学術雑誌（査読あり）

### 論文、著書

1. **Durige Wen**, Xing Li, Xiong Geng, Mitsuhiro Hirai, Satoshi Ajito, Kosuke Takahashi, Mamiko Ozaki, Masaru K. Hojo, Tatsuya Uebi, Tatsuo Iwasa. Characterization of localization, ligand affinity, and pHdependent conformational changes of two chemosensory proteins expressed in the antennae of the Japanese carpenter ant *Camponotus japonicas*. **Zoological Science.**, 37(4). August. (2020)
2. **Wendurige**, X. Li, M. Hojo, M. Ozaki and T. Iwasa, “Study on the structure and binding properties of CSP1 and CSP3 from *Camponotus japonicas*”, **refereed, Jpn. J. Taste Smell Res.**, 22. (2015)
3. **Wendurige**, X. Li, M. Hojo, M. Ozaki and T. Iwasa, “The suructure-function studies on chemosensory protein found in the sensillum of *Camponotus japonicus*”, **refereed, Jpn. J. Taste Smell Res.**, 21. (2014)
4. Mitsuhiro Hirai, Satoshi Ajito, Tatsuo Iwasa, **Durige Wen**, Noriyuki Igarashi, and Nobutaka Shimizu. Short-Distance Intermolecular Correlations of Mono- and

- Disaccharides in Condensed Solutions: Bulky Character of Trehalose. **ACS Omega**.  
May. (2020)
5. Gang Dai, **Durige Wen**, Xiong Geng, luomeng Chao, Tatsuo Iwasa. Fluorite  
Dissolution by a Phosphate-Solubilizing Bacterium. Isolated from Groundwater of  
Xianghuangqi County, Inner Mongolia, China. **The Journal of Geomicrobiology**.  
Aug. (2019)
6. Tadashi Nakamura, Yoshihiro Noumi, Hiroyuki Yamakawa, Atushi Nakamura,  
**Durige Wen**, Xing Li, Geng Xiong, Ken Sawada, Tatsuo Iwasa. Enhancement of the  
Olfactory Response by Lipocalin Cp-Lip1 in Newt Olfactory Receptor Cells: An  
Electrophysiological Study. **Chemical Senses**. Sep. (2019)
7. Hirai, Mitsuhiro; Ajito, Satoshi; Takahashi, Kosuke; Iwasa, Tatsuo; Li, Xing; **Wen,**  
**Durige**; Kawai-Hirai, Rika; Ohta, Noboru; Igarashi, Noriyuki; Shimizu, Nobutaka.  
Structure of Ultra-Fine Bubbles and Its Effect on Protein and Lipid Membrane  
Structures Studied by Small- and Wide-Angle X-ray Scattering. **The Journal of  
Physical Chemistry B**. Mar. (2019)

8. Xiong Geng, Gang Dai, luomeng Chao, **Durige Wen**, Takashi Kikukawa Tatsuo Iwasa. Two Consecutive Polar Amino Acids at the End of Helix E are Important for Fast Turnover of the Archaerhodopsin Photocycle. **Photochemistry and Photobiology**. Dec. (2018)
9. X. Li, **Wendurige**, K. Sawada, and T. Iwasa, “The effect of structural on the ligand-binding property of odorant-binding protein of Japanese common newt”, **refereed, Jpn. J. Taste Smell Res.**, 22. (2015)
- X. Li, **Wendurige**, K. Sawada, and T. Iwasa, “The study on the structural changes and ligand binding of Cp-Lip1”, **refereed, Jpn. J. Taste Smell Res.**, 21. (2014)

## 国内学会・シンポジウム等における発表

1. 温都日格、李 興、北條 賢、尾崎 まみこ、岩佐 達郎. 「アリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造機能解析」. 日本味と匂学会第 48 回大会 Vol.21 Oct.2014 ポスター発表
2. 温都日格、李 興、北條 賢、尾崎 まみこ、岩佐 達郎. 「クロオオアリの 2 種の「化学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性の比較」. 日本味と匂学会第 49 回大会 Vol.22 Dec.2015 ポスター発表
3. Xing Li, Durige Wen, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: Expression and Structural Analysis of Two Kinds of Perireceptor Proteins (PRPs), The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 1P-019, Sapporo, Japan. Sept (2014)
4. Xing Li, Durige Wen, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: The Structural Changes of the Peri-receptor protein(PRP) on the Odorant-binding Process. The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Tsukuba, Japan. (2016)
5. Durige Wen, Xing Li, Mitsuhiro Hirai, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: The structure-function (and Ligand Binding Properties) relationships of

the chemosensory protein found in the sensillum of *Camponotus japonicus*. 34th

Symposium on Photon Factory. Mar. (2017)

6. Durige Wen, Xing Li, Mituhiro Hirai, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: Study on the pH-Dependent Changes in the Structure and Ligand-binding Properties of the Perireceptor Proteins. The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Tsukuba, Japan. (2017)
7. 温都日格、李 興、尾崎 まみこ、平井 光博、岩佐 達郎 「クロオオアリ  
の感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性」 日  
本味と匂学会第 51 回大会 Proceeding 集 103-106 頁 (2017 年 9 月)

## 国際会議, シンポジウム等における発表

1. Xing Li, Wendurige, Tatsuo Iwasa. Study on the Perireceptor Protein (PRP) as the Sensor Element of a Bioinspired Electricnose. Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research. Mar. (2014) Poster
2. Wendurige, Xing Li, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa. The structure-function relationships of chemosensory protein found in the sensillum of *camponotus japonicas*. Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research. Mar. (2016) Poster
3. Xing Li, Wendurige, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: The Structural Change of the Perireceptor Proteins, OBP and CSP, upon Ligand Binding., The 9th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2016, pp105, Krakow, Poland. Aug. (2015)
4. Wendurige, Xing Li, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: The study on the binding of small chemicals (odorant) to chemosensory protein. The 7th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in Asian Mega-cities Sep. (2016)

5. Xing Li, Wendurige, Tatsuo Iwasa: Structure changes of the newt odorant binding protein, Cp-lip1, on ligand-binding.; The 7th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in Asian Mega-cities Sep. (2016)
6. Wendurige, Xing Li, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa. The structure-function relationships of chemosensory protein found in the sensillum of *Camponotus japonicus*. Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research. pp70-71, Muroran, Japan Mar. (2016)
7. Wendurige, Xing Li, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: Structure-function relationship of two soluble proteins involved in chemoreception. 17th International Symposium on Olfaction and Taste, pp63, yokohama, Japan (2016)
8. Xing Li, Wendurige, Tatsuo Iwasa: pH dependence of a ligand binding property of the newt odorant binding protein, Cp-Lip1. Environmental sensing and Animal Behaviour, Tokyo, Japan. (2016)
9. Durige Wen, Xing Li, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: The structure-function relationships of chemosensory protein found in the sensillum of *Camponotus japonicus*. the 22nd International Congress of Zoology and the 87th

Meeting of Zoological Society of Japan Joint Events in Okinawa, Japan November.

(2016)

10. Wendurige, Xing Li, Mituhiro Hirai, Tatsuo Iwasa: Study on the pH-Dependent Changes of the Structure and Ligand Binding Properties of the Perireceptor Proteins. Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research. Mar. (2017)

## 9.賞罰

## 賞 罰

1. 2015年度味と匂学会論文賞受賞。論文：「アリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造機能解析」。
2. 2016年3月：室蘭工業大学優秀学生表彰。
3. 2018年4月：室蘭工業大学外国人留学生として「ロータリー米山記念奨学金」を付与された。