



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



## 嗅覚センサーの開発と匂い分子とその結合タンパク質の作用機構の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 室蘭工業大学SVBL 公開日: 2007-12-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 司, 満, 都拉, 高島, 大貴, 澤田, 研, 岩佐, 達郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10258/316">http://hdl.handle.net/10258/316</a>

## 嗅覚センサーの開発と匂い分子とその結合タンパク質の作用機構の解析

著者	高橋 司, 満 都拉, 高島 大貴, 澤田 研, 岩佐 達郎
雑誌名	サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー年報
巻	7
ページ	72-74
発行年	2005
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10258/316">http://hdl.handle.net/10258/316</a>

## 「嗅覚センサーの開発と匂い分子とその結合タンパク質の作用機構の解析」

材料物性工学科 高橋司(M2)、満都拉(D2)、高島大貴(M2)、澤田研、岩佐達郎

### 1. 目的

匂いの感覚は餌の探索や危険の察知、同種間での特異的な行動の誘発や個体の認識など動物の行動に重要な役割を果たしている。しかし、嗅覚情報の受容・伝達システムの全体像は未だ明らかでない部分が多いのが現状であり、その詳細を明らかにするためには嗅覚情報の受容・伝達に關与するタンパク質の詳細を知ることが必要である。

当研究室ではアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を対象に解析を進めており、嗅上皮から作製した cDNA ライブラリーの網羅的解析を行っている。現在までに 484 クローンの解析を行い、全てのクローンに対して相同性検索を行った。その結果、嗅覚に特異的と思われるクローンがいくつか得られており、中でもイモリの嗅上皮 cDNA ライブラリーにおいて高頻度で発現がみられる 2 タイプのクローンに着目して解析している。我々はこれらをアカハライモリの学名及び、最も相同性が高かったタンパク質の名前にちなみ、Olfactory specific protein 類似クローンを Cp-OSP (9 クローン)、lipocarin 類似クローンを Cp-Lip (3 クローン) と名付けた。我々は Cp-OSP、Cp-Lip がどのような特徴、生理機能を有しているのかを知ることを目的に、各クローンの配列比較や生理機能の予測 (①)、生理機能解析に用いるタンパク質を得るため、大腸菌を用いた組み換えタンパク質の発現 (②) を進めた。

### 2. 実験方法

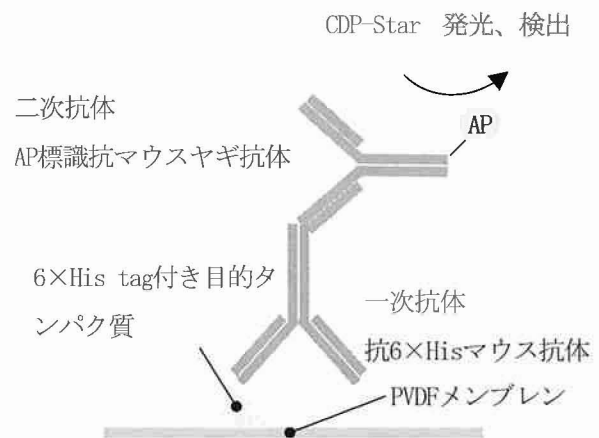
#### 【アミノ酸配列の比較】

相同性検索の結果から cDNA ライブラリーに

おいて高頻度で見いだされる Cp-OSP、Cp-Lip の各クローン間で核酸配列及びアミノ酸配列の比較を行った。核酸配列の比較から変異が確認された箇所に丸印を付け、クラス分けを行った。また、相同性が高かったタンパク質を含めて分子系統樹を作製し、Cp-OSP、Cp-Lip タンパク質のもつ機能の推測を行った。

#### 【大腸菌によるタンパク質発現】

Cp-OSP、Cp-Lip の生理機能の解明を目的として、大腸菌を用いた組み換えタンパク質の発現を行った。大腸菌で目的タンパク質を発現させるために、タンパク質発現用プラスミドベクターを作製し、形質転換させた大腸菌を用いて目的タンパク質を発現させる。電気泳動にてタンパク質を分子量ごとに分離し、メンブレンにタンパク質を転写する。一次抗体 (抗 6×His マウス抗体) 及び、二次抗体 (AP 標識抗マウスヤギ抗体) を反応させ、CDP-Star (基質) が分解される時に生じる発光を検出する (Fig. 1)。



AP : alkaline phosphatase

Fig.1 : ウェスタンブロット解析の原理

### 3. 結果と考察

#### 3-①：配列比較及び生理機能の予測

我々はCp-OSP、Cp-Lipについて各々複数のクローンを得ている。それらのクローン間で核酸配列及びアミノ酸配列の比較を行ったところ、クローン間で局所的な変異が確認できた。変異にはいくつかの類似したパターンがあり、Cp-OSPはNo. 75-276、No. 301-313-327、no. 333-341-353、No. 210の4つのグループに分類した。Cp-Lipは核酸配列、アミノ酸配列共に変異の数が少なく、1つのグループであると推測している (Fig. 2)。これらのクローン間の違いがイモリの個体差に由来するのか異なる遺伝子に由来するのかは、今のところ結論出来ていない。また、Cp-OSP、Cp-Lipの各クローンの内、最初に単離されたクローンNo. 75及びNo. 89及びこれらと相同性が高いタンパク質を用いて分子系統樹を作製したところ、Cp-OSP、Cp-Lipは互いに近い関係にあり、これらのアイデンティティーは43.6%と高い値を示した。Cp-OSP、Cp-Lipと相同性が高いタンパク質の多くはlipocalin super familyに属しており、Cp-OSP、Cp-Lipがlipocalinタンパク質であると考えられる。Lipocalin super familyに属するタンパク質は生体内において脂溶性の低分子と結合するという機能を有していることやUp and down  $\beta$ -barrel構造という籠状のポケットをもち、この空間に低分子を結合すること、立体構造での保存系が高いことなどが知られている。当研究室でこれまでに行われた解析から、Cp-OSP、Cp-Lipが嗅上皮のボーマン腺を構成する細胞で発現していることが明らかとなっている。現在、ボーマン腺は嗅上皮上を覆う粘液を分泌していることが知られている。このようにCp-OSP、Cp-Lipはlipocalin super familyに属することやボーマン腺に特異的に

発現していること、また、多くの匂い分子が揮発性の低分子であることをふまえると、Cp-OSP、Cp-Lipはイモリの嗅上皮において匂い分子を結合し、何らかの機能をしていることが期待される。

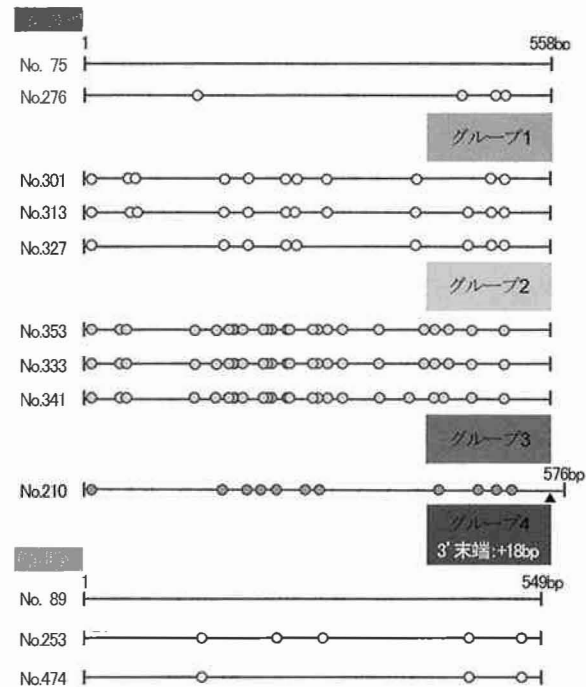


Fig.2 : Cp-OSP、Cp-Lip クローン間の核酸配列比較

#### 3-②：タンパク質発現

発現誘導前及び発現誘導後2、4時間後の大腸菌全タンパク質を電気泳動した結果、発現誘導後に各々予想される位置で増加しているバンドを確認する事が出来た。またウェスタブロットによる目的タンパク質の発現チェックの結果、特異的に発現が誘導されていた箇所シグナルを得ることが出来た (Fig. 3)。今後、Cp-OSP、Cp-Lipタンパク質の生理機能解析を目的に目的タンパク質の精製、抗体作製を行う予定である。

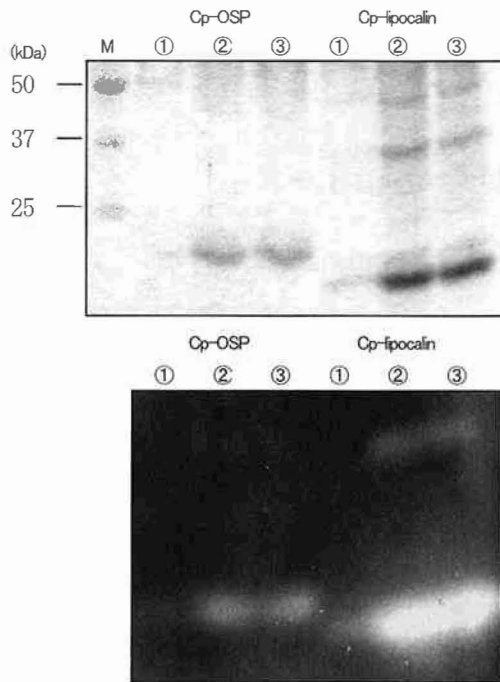


Fig.3 : 大腸菌による発現タンパク質の電気泳動パターンと発現チェック

#### 4. 参考文献

- (1) Katherine G Hamil, Qiang Liu, P Sivashanmugam:LCN6, a novel human epididymal lipocalin:<http://www.rbej.com/content/1/1/1>  
12
- (2) Benjamin lewin:遺伝子 第7版:東京化学同人