



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



Cp-Lip1 タンパク質の立体構造安定化に関する要因と機能の関連

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-05-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 興 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.15118/00009195

博士学位論文

Cp-Lip1 タンパク質の立体構造安定化に関する
要因と機能の関連

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

李 興

要 旨

匂い分子は嗅細胞に存在する七回膜貫通型の嗅覚受容体によって認識される。しかし、嗅繊毛はボウマン腺から分泌される親水性の粘液に覆われており、外界から鼻腔に侵入した疎水性の匂い分子は嗅覚受容体のある嗅受容膜まで到達しにくいと思われる。疎水性分子と結合する匂い分子結合タンパク質 (OBPs) が大量に粘液層に存在していることが知られている。両生類のアカハライモリ嗅上皮特異的に発現する二種類のOBPタンパク質(Cp-Lip1,-Lip2)が発見された。これらのタンパク質はリポカリンファミリータンパク質に属する。リポカリン類タンパク質は β -バレル (樽型) 構造を取り、疎水性の低分子の結合や輸送に関して水溶性タンパク質と考えられている。OBPタンパク質が匂い分子の認識メカニズム中で果たす役割はまだ明らかではないため、本研究ではCp-Lip1タンパク質の立体構造安定化に関する要因(ジスルフィド結合と外液のpH) と機能の関連を調べた。

Cp-lip1遺伝子のコーディング配列を発現ベクターに導入して大腸菌で発現し、NiカラムとQカラムを用いて精製した。精製したCp-Lip1の分子量をMALDI-TOFMSで測定したところ、分子量18604.563の位置に単一のピークが認められた。この分子量の値は計算分子量18604.42と極めてよく一致している。さらに、円偏光二色性分光法(CD)や蛍光色素結合の測定結果から、発現Cp-Lip1は β -シートを多く含む本来の構造をとり、蛍光色素結合能を有していることが示された。以上の結果より本来の二次構造を有し、蛍光色素結合能を持つCp-Lip1を大腸菌で発現することができたと考えられる。

Cp-Lip1は4つのシステイン残基を持つので、ジスルフィド結合の有無を調べた。精製したCp-Lip1を用いて2-メルカプトエタノール(2-ME)有無によるSDS-PAGEを行なったところ、添加の有無でCp-Lip1の移動度が異なっていた。この結果はCp-Lip1の分子内にジスルフィド結合があることを示唆している。また、DTTを用いて、分子内ジスルフィド結合がCp-Lip1の構造に及ぼす影響をCDとTrp由来の蛍光を測定して調べた。CD測定からは二次構造に大きな変化のないこと、しかし、蛍光測定からはTrp残基周辺での環境に変化が見られることが分かった。次に、システインの変異体を作成し、4つのシステインのどれがジスルフィド結合を作っているのか、また、DTT添加によって見られた構造の変化がジスルフィド結合の有無による変化であるかを調べた。その結果、Cys64とCys160が分子内ジスルフィド結合を作っていることを明らかにした。一方、リガンド結合や構造の変化については、ジスルフィド結合を作っていないCys27とCys114の変異の方が寄与していることが分かった。

次に、Cp-Lip1の周辺pHとの関連性を調べた。精製Cp-Lip1を異なるpHのバッファで透析し、種々のpHに調整してCDと蛍光測定を行なった。pH4.0のCp-Lip1の二次構造およびリガンド結合時にpH7.4のCp-Lip1では見られない変化が認められた。また、pHによってCp-Lip1のリガンド結合に伴うタンパク質部分の構造の違いを示す結果を得た。以上の結果より、おそらくCp-Lip1タンパク質は周辺のpH変化によって匂い分子の結合や放出を調整していると考えている。

PhD Thesis

**Studies on the factors affect the structure
and the function of Cp-Lip1**

Li Xing

Muroran Institute of Technology

ABSTRACT

Cp-Lip1 is a soluble protein found in the olfactory organ of Japanese common newt, *Cynops pyrrhogaster*. Cp-Lip1 belongs to the lipocalin superfamily proteins, has a β -barrel structure and can bind hydrophobic compounds, such as odorants and pheromones, transport them to their receptor and modify chemoreception process. The molecular mechanisms of the process, however, are not well elucidated. In order to investigate the functional connection between factors (disulfide bond and pH of the surroundings) on structural stabilization of Cp-Lip1, we expressed Cp-Lip1 in *E. coli*, and obtained Cp-Lip1 that has β -strand-rich secondary structure and can bind fluorescent probe.

Cp-Lip1 has four cysteine residues. By SDS-PAGE with or without 2-mercaptoethanol (2-ME), mobility of Cp-Lip1 was different depending on the presence of 2-ME, suggesting the presence of an intramolecular disulfide bond in Cp-Lip1. In addition, from the CD measurements of Cp-Lip1 with DTT, it was found that there was no significant change in the secondary structure, but the fluorescence measurements of it with DTT showed that the microenvironmental change of Trp residue occurred by DTT. A series of cysteine-replaced mutants was prepared and the involvement of them in the disulfide bond formation was tested by SDS-PAGE. As a result, Cys64 and Cys160 form an intramolecular disulfide bond in Cp-Lip1. Although the CD spectrum of the mutant Cys64 or Cys160 was almost same as that of wild-type, the microenvironment of Trp residue changed similar to the wild Cp-Lip1 with DTT. However, the binding constant (K_d) of the mutants to bis-ANS did not change. On the other hand, the mutant of Cys27 or Cys114, showed a change in the CD spectrum, not in the microenvironment of Trp residue and the K_d value to bis-ANS.

Next, the relationship between the structural stability of Cp-Lip1 and the surrounding pH was studied. Purified Cp-Lip1's at various pH were analysed with CD and fluorescence measurements. The CD spectrum of Cp-Lip1 at pH 4.0 showed obvious change upon ligand binding, although that at pH 7.4 did not. The K_d value of Cp-Lip1 to bis-ANS changed depend on the microenvironmental pH; that at pH 6.0 was smaller than that at pH 7.4 and pH 4.0, and that at pH 4.0 was the recovered between pH 7.4 and pH 6.0. Based on the above results, the Cp-Lip1 protein would control binding and release of odor molecules by the pH change of its surrounding.

目次

1 . 序論	7
1-1 . 嗅覚	8
1-2 . 匂い受容・伝達システム	9
1-3 . 匂い分子結合タンパク質	11
1-4 . Cp-Lip1タンパク質	12
1-5 . 研究目的	13
2 . 実験材料と方法	15
2-1 . Cp-Lip1タンパク質発現・精製系の確立	16
2-1-1 . 発現システムの構築	16
2-1-2 . Cp-Lip1の発現	18
2-1-3 . Cp-Lip1の精製	19
2-1-4 . Cp-Lip1の定量	24
2-2 . MALDI-TOFMSによりCp-Lip1分子量の確定	25
2-3 . タンパク質の二次構造解析: CDスペクトル測定	26
2-4 . タンパク質とリガンドの結合特性: 蛍光測定	27
2-5 . システイン残基一残基置換体作製	28
2-6 . 還元剤有無によりSDS-PAGE	32
2-7 . 測定サンプルの調製	32
3 . 結果	33
3-1 . 発現精製したCp-Lip1の構造と機能	34
3-1-1 . 発現システムの構築	35
3-1-2 . Cp-Lip1の発現	36
3-1-3 . Cp-Lip1の精製	37
3-1-4 . Cp-Lip1分子量の確定	39
3-1-5 . Cp-Lip1の二次構造	40
3-1-6 . リガンドとの結合特性	42

3-2 . ジスルフィド結合	44
3-2-1 . 還元剤2-ME有無により野生型Cp-Lip1のSDS-PAGE解析	44
3-2-2 . 野生型Cp-Lip1のSS結合の還元による二次構造の変化	45
3-2-3 . 野生型Cp-Lip1のSS結合の還元による蛍光色素との結合変化	46
3-2-4 . 一残基置換体の発現・精製	49
3-2-5 . 還元剤2-ME有無により一残基置換体のSDS-PAGE解析	50
3-2-6 . Cp-Lip1のSS結合の有無による二次構造の変化	51
3-2-7 . Cp-Lip1のSS結合の有無によるTrp由来の蛍光の変化	52
3-2-8 . Cp-Lip1のSS結合の有無による蛍光色素との結合変化	53
3-3 . pH依存性	55
3-3-1 . pHによるCp-Lip1の二次構造変化	56
3-3-2 . 異なるpHでのCp-Lip1のTrp由来蛍光	57
3-3-3 . pHによるCp-Lip1と bis-ANSとの結合変化	58
3-3-4 . 各pHのCp-Lip1のbis-ANS結合に伴うCD強度の変化	59
4 . 結論と考察	60
5 . 付録	64
Cp-Lip1の変性剤 (Urea) 濃度依存	65
Cp-Lip2タンパク質発現・精製系の確立	69
タンパク質の構造解析：X線散乱測定	74
タンパク質の構造と機能解析：熱測定	75
参考文献	76
謝辞	78
研究業績	80

1 . 序論

1-1 . 嗅覚

動物や人が外界からの情報を基にそれに適切に応答することによって感知し、生命を保っている。古来からの分類による視覚、聴覚、触覚、味覚、嗅覚の5種類である。このうち、視覚、聴覚、触覚においては適刺激が物理刺激であり、一方、味覚、嗅覚は適刺激が化学物質であり、その刺激受容、信号処理についての理解は上記の物理刺激を適刺激とする感覚よりも遅れていたが、近年の味覚受容体や嗅覚受容体遺伝子の実体の解明と共に急速に理解が進んで来ている。一般的、嗅覚とは匂いの感覚で、大気の中に浮遊する有機・無機の化合物の分子の一部が鼻腔より吸入され、鼻腔の最上部にある嗅上皮に嗅細胞の一部に吸着されるとその細胞が興奮し、分子のもつ化学的情報が電気信号に変換されて、脳に送りこまれ、大脳の嗅覚領に到達すると、そこに匂いの感覚が起こることになる。¹⁾

ここで、空気中を漂ってきて嗅覚を刺激するのは「匂い」と定義されている。「匂い」を示す物質は、硫化水素やアンモニアなど、ごく簡単な無機化合物を除けばほとんどが有機化合物である。匂いをもつ化合物は20万とも40万ともいわれているが、これは炭素骨格を基本構造とする有機物が極めて多種多様な化学構造を持っているとことを意味する。しかし、日常的にわれわれが感じ、化学構造と関連づけられている「匂い」物質は約5000種程度と考えられている。ヒトはこの膨大な種類がある「匂い」を識別できると言われている。²⁾

1- 2 . 匂い受容・伝達システム

人間などの動物は匂い受容・情報伝達システムにより匂いを認識する。まず、匂い分子が鼻腔内に入り、嗅上皮の嗅細胞が匂い分子を受容し、電気信号が発生する。匂い分子の受容によって発生した電気信号は嗅神経と嗅球を通して脳に伝わり、脳に到達した信号によって、私たちは匂いを認識する。

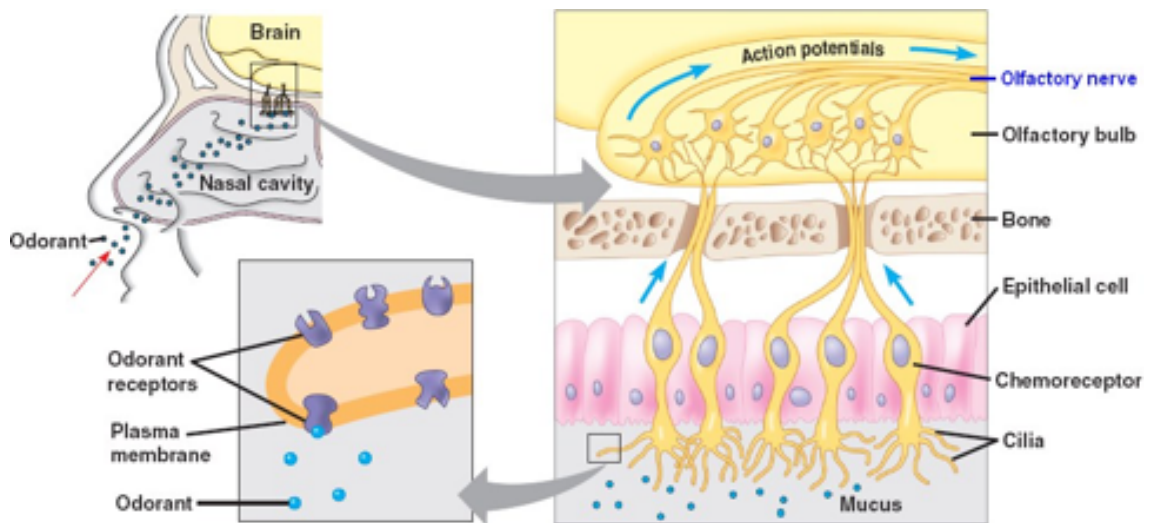


図 1-1 . 匂い受容・伝達システムの模式図

匂い受容・情報伝達システムのメカニズムとは(図1-1)：

1. 匂い分子は嗅上皮の嗅細胞の嗅繊毛に局在する嗅覚受容体に結合する。
2. 嗅覚受容体を含む嗅覚受容経路は活性化し、活動電位を引き起こす。
3. 匂いの信号が嗅細胞の軸索により第一次の嗅覚中枢である嗅球の糸球体へ向けて伝えられる。
4. 匂いの情報は、嗅球からさらに大脳の奥深いところに送られて、最終的に脳の神経細胞に達し、我々はどんな匂いで、どんな強さであるのかを感じることになる。

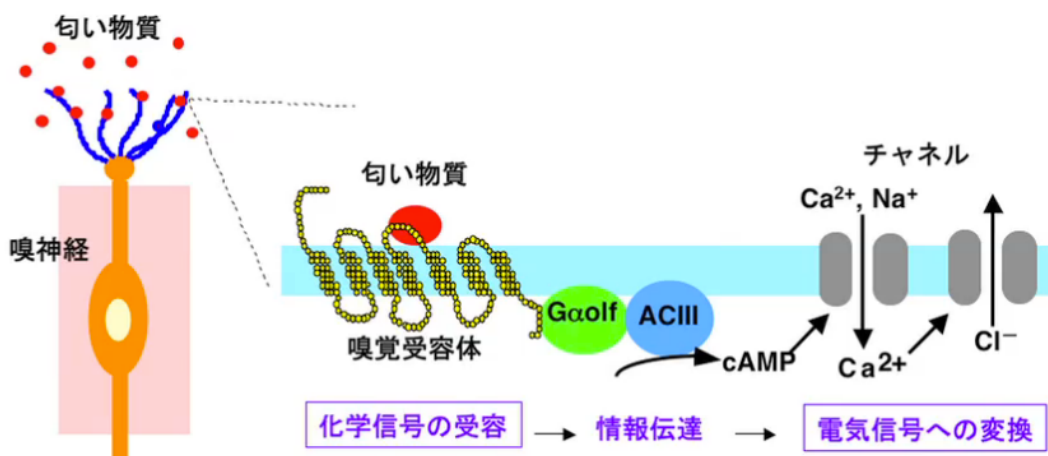


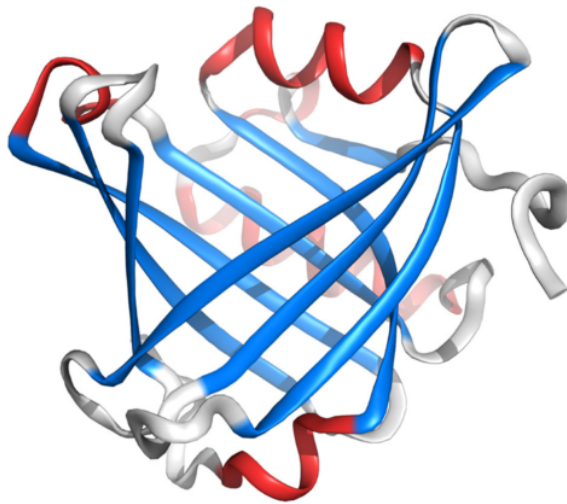
図 1-2 . 嗅神経繊毛上の嗅覚受容体を介した匂い情報伝達経路

図 1-2 に嗅細胞での情報変換過程をまとめた。匂い物質が受容体と結合すると GTP 結合蛋白質を介して、アデニル酸シクラーゼ(cAMP合成酵素、ACIII)あるいはホスホリポーゼC(IP3合成酵素)が活性化される。細胞内で生じたサイクリックAMP(cAMP)あるいはイノシトールトリスリン酸(IP3)は、それぞれに対応するイオンチャネル(CNG)を開口し、嗅細胞の電氣的な興奮を引き起こす。また、これらのセカンドメッセンジャーを介さない経路も、匂い応答の発現に重要な役割を演じている。

しかし、嗅繊毛はボウマン腺から分泌される親水性の粘液に覆われており、一般的、匂い分子は疎水性分子であり、親水性の粘液を通して嗅覚受容体のある嗅繊毛膜まで到達しにくいと思われる。粘液層には疎水性分子を結合できる匂い分子結合タンパク質(OBPs)が大量に存在している。匂い分子結合タンパク質(OBPs)はリポカリン類タンパク質であり、疎水性の低分子の結合や輸送に関する水溶性タンパク質と考えられている。しかし、匂い分子結合タンパク質(OBPs)は疎水性分子と結合し、親水性の粘液層を通して嗅覚受容体まで運んであげると考えられていますが、詳しい仕組みはまだ解明されていない。

1- 3 . 匂い分子結合タンパク質

匂い分子結合タンパク質 (odorant-binding protein、OBP) は、ボウマン腺から分泌される親水性の粘液に存在しており、疎水性の低分子の結合、輸送や放出に関する水溶性タンパク質と知られている。脊椎動物の OBP はリポカリンのスーパーファミリーに属し、レチノール結合タンパク質や β -ラクトグロブリンのようなリガンド結合タンパク質であり、8つの逆平行 β -ストラントとC末端に1本 α -ヘリックスで構成され、 β -バレル構造をしており、疎水性の内腔を持つ、構造による保存性の高いタンパク質である。リポカリン類タンパク質は脳や肝臓、腎臓など多くの組織で発現・分布し、機能し、温度、有機溶媒およびタンパク質分解消化に対して極めて安定している。³⁾



Crystal structure of human L-PGDS (PDB ID: 3O2Y)

1- 4 . Cp-Lip1 タンパク質

嗅覚には匂いの認識に関与する主嗅覚系と、フェロモンの認識に関与する副嗅覚系(鋤鼻系)が存在する。魚類の嗅組織においてはこのように主嗅覚系と副嗅覚系に分かれておらず、両生類以降で初めて分離したと考えられている。両生類アカハライモリは繊毛タイプと微絨毛タイプの神経細胞を嗅上皮に持ち、魚類の特徴を残している⁴⁾。鋤鼻上皮には微絨毛タイプの神経細胞のみを持ち、四肢動物の特徴も持つ。アカハライモリは進化的側面から研究するには優れたモデル生物であると言える。魚類ではOBPの存在は報告されていないが、魚類以降でOBPが見つかった。

我々研究室は両生類のアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を対象に嗅覚関連タンパク質を研究し、イモリ嗅上皮特異的に発現する「匂い分子結合タンパク質」と考えられる二種類の遺伝子(*Cp-lip1, -lip2*)を見出した⁵⁾。これらはリポカリンファミリータンパク質に所属するタンパク質である。

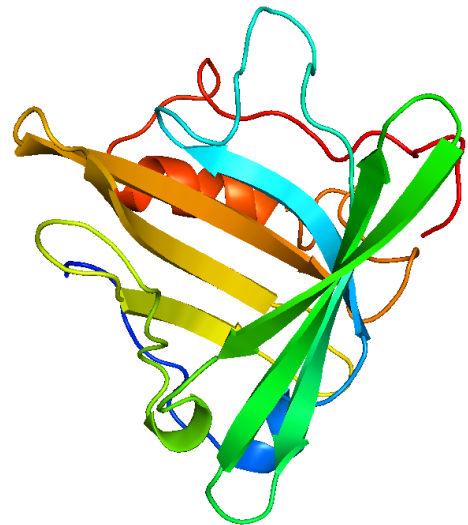


図 . 左はアカハライモリ、右は Cp-Lip1 の予想立体構造モデル (PHYRE V 2.0.を用いて構築した)

1- 5 . 研究目的

匂い分子は嗅細胞に存在する七回膜貫通型の嗅覚受容体によって認識される。しかし、嗅繊毛はボウマン腺から分泌される親水性の粘液に覆われており、外界から鼻腔に侵入した疎水性の匂い分子は嗅覚受容体のある嗅受容膜まで到達しにくいと思われる。疎水性分子と結合する匂い分子結合タンパク質（OBPs）が大量に粘液層に存在していることが知られている。両生類のアカハライモリ嗅上皮特異的に発現する二種類のOBPタンパク質(Cp-Lip1,-Lip2)が発見された。これらのタンパク質はリポカリンファミリータンパク質に属する。リポカリン類タンパク質は β -バレル（樽型）構造を取り、疎水性の低分子の結合や輸送に関する水溶性タンパク質と考えられている。OBPタンパク質が匂い分子の認識メカニズム中で果たす役割はまだ明らかではないため、本研究ではCp-Lip1タンパク質の立体構造安定化に関する要因（ジスルフィド結合と外液のpH）と機能の関連に注目して研究を行った。

ジスルフィド結合は、タンパク質の立体構造を安定化する要因の1つとして知られている。システイン残基の間にジスルフィド結合し、SS結合とも呼ばれている。一般的にジスルフィド結合を有するタンパク質を還元すると、その立体構造の安定性が大幅に低下することから、ジスルフィド結合は立体構造を大きく安定化すると考えられている。リポカリン類タンパク質はアミノ酸レベルで相当性が低く、二次構造と三次構造（特に β バレル構造）がよく保存されている。その中にSS結合が特に保存されている。リポカリン類タンパク質は一般的に分子内でSS結合を形成している。今回の研究対象Cp-Lip1は4つのシステイン残基（Cys27, Cys64, Cys114, Cys160）を持っているので、SS結合が形成しているところを決定し、さらにシステイン残基の変異体を用いて立体構造に及ぼす影響、また機能との関連を調べた。

今までの研究では、匂い分子タンパク質による匂い分子運搬は二つ仮説があります。一つは、OBPタンパク質が匂い分子と結合し、粘液層を通り、膜表面の嗅覚受容体までに到達し、匂い分子を放出する。もう一つの仮説は、匂い分子と結合しているままで嗅覚受容体と反応すると言うものである。そこでタンパク質はpHの変化により、立体構造も変化することに注目した。他の研究では膜表面の負電基が高密度であると、局所的

な酸性pH環境になる、表面pHは1.6—2.4単位低いことが示されている⁶⁾。また同じリポカリン類タンパク質RBP (Retinol Binding Protein) がpH4.5までになるとリガンドを放出すると指摘している⁷⁾。おそらく匂い分子の認識メカニズム中に、粘液層のpH環境と膜表面の嗅覚受容体の周辺が局所的な酸性環境で、匂い分子の結合や放出を調整していると考えられる。我々はCp-Lip1タンパク質の周辺pHによって、構造の変化と機能との関連を調べた。

2 . 実験材料と方法

一般的な分子生物学実験手法

本論文に未記載の一般的な実験手法に関しては、室蘭工業大学生体分子科学研究室(岩佐研究室)のプロトコル集に従った。

2- 1 . Cp-Lip1タンパク質発現・精製系の確立

2- 1- 1 . 発現システムの構築

当研究室の在庫 pGEX-4T-2 発現ベクターと Cp-Lip1 遺伝子を組み合わせプラスミド(図 2-1-1 .)が PCR 法によって、NdeI と XhoI 酵素導入及びターミネーターを除くプライマーを用い、野生型 Cp-Lip1 遺伝子を増幅した。

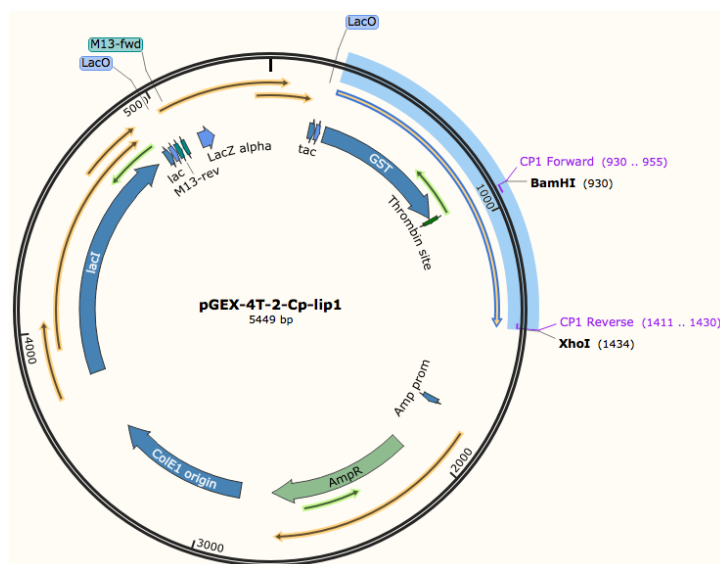
プライマー：

Cp-Lip1 Forward-NdeI : 5' - GC CAT ATG ATG GAG ATT CCA GTG ATG AG -3'

NdeI

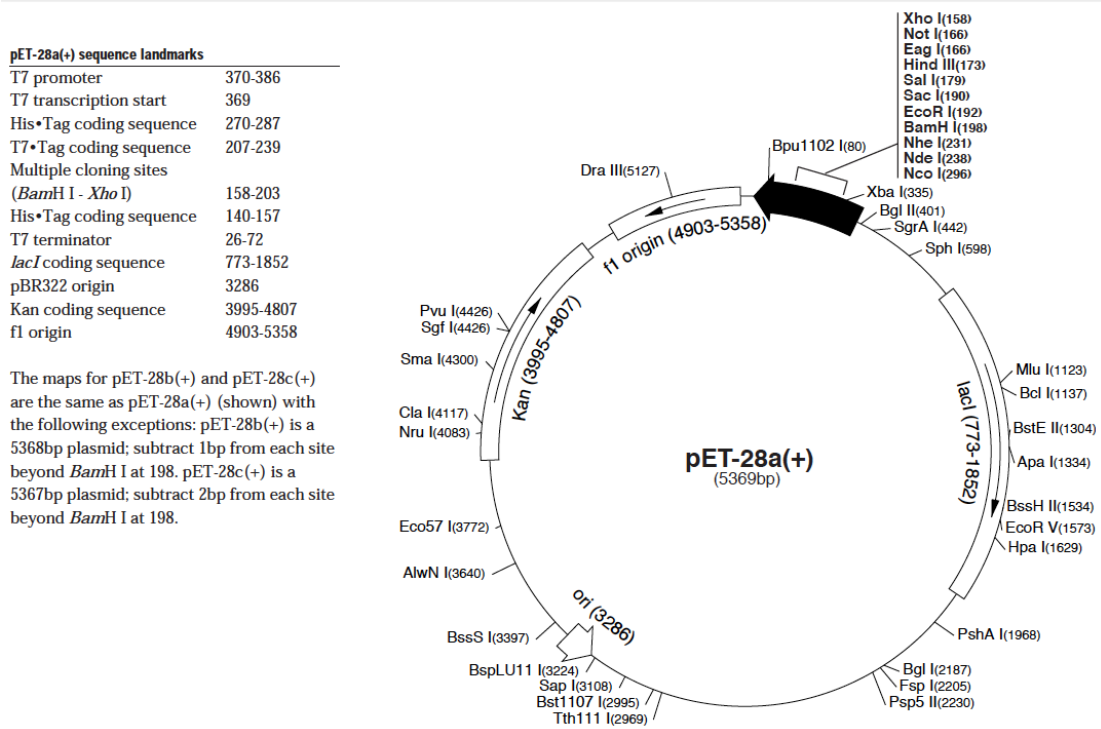
Cp-Lip1 Reverse-Addstop : 5' - GC CTC GAG CTA AAA CTC TCC AGG GAC AC -3'

XhoI



図： pGEX-4T-2-Cp-Lip1-Wild のベクターの模式図

増幅したDNA断片を回収してpMD19ベクターへクローニングした。プラスミドを取ってDNA配列を決定し、得られたプラスミドをBamHIとXhoI酵素で切断し、同時にpETタンパク質高発現量ベクターpET28a(+)(図2-1-2)も同じ酵素で切断し、最後にライゲーションしてプラスミドを取ってDNA配列を確認した。



図：pET28a(+)ベクターの模式図

2-1-2 . Cp-Lip1 の発現

Cp-Lip1を導入した発現ベクターを発現用の大腸菌BL21(DE3)に導入し、IPTGによる発現誘導を行った。

発現方法：

- (1) . 前日にTransformationを行ない、発現ベクターを発現用の大腸菌BL21(DE3)に導入する。
- (2) . フレートからシンクルコロニーをつき、50 mL ファルコンに 11 mL の LB/Kan を入れたものに植菌する。
- (3) . 振とう培養器にて激しく振とうし(175 rpm)、37°Cで 培養する。
- (4) . 600nmにおける吸光度が約0.6に達したら培養を止め直ちに氷水中にて約30分間冷却する。(Sample:T0)
- (5) . 10 mL 菌液に100 mM IPTGが 100 μ Lを入れ、最終濃度が 1 mMになる。
- (6) . 1 mL 菌液(Sample: (-))とIPTG入り10 mL 菌液(Sample: (+))を振とう培養器にて激しく振とうし(175 rpm)、37°Cで 一晚培養する。
- (7) . Sample: T0, (-), (+)を1 mLずつ取り、4°Cにて3500rpm, 3min 遠心し、菌体を回収する。

可溶性チェック方法：

- (8) . 一晚培養した菌を5000g、5min、4°Cで遠心し、集菌する。
- (9) . 5 mLのPBSバッファーで懸濁する。
- (10) . また、5000g、5min、4°Cで遠心し、集菌する。
- (11) . 上清を捨て、菌体にPBSバッファーを1mL加え、懸濁する。
- (12) . ガラスビーズ (0.1、3g) で破碎する (4000rpm、45sec、Stop 45sec、10 times) 、破碎した菌液を6000rpm、2min、4°Cで遠心し、ガラスビーズを落とす。
- (13) . 破碎した菌液の上清を回収し、10000g、30min、4°Cで遠心分離し、その上清を可溶性画分(sup)、沈殿物を不溶性画分(ppt)としてサンプル回収する。
- (14) . SDS-PAGE でタンパク質を確認する。

2-1-3 . Cp-Lip1 の精製

精製方法：

前日にTransformationを行ない、発現ベクターを発現用の大腸菌BL21(DE3)に導入する。

前培養

- 1) プレートからシングルコロニーをつき、50 mL ファルコンに 10 mL の LB/Kan を入れたものに植菌する。
- 2) 振とう培養器にて激しく振とうし(175 rpm)、37°Cで一晩培養する。

本培養

- 1) 前培養の10 mL菌を全部1 LのLB/Kan液体培地に入れる。
- 2) 振とう培養器にて激しく振とうし(175 rpm)、37°Cで培養する。
- 3) 600nmにおける吸光度が約0.6に達したら培養を止め直ちに氷水中にて約30分間冷却する。(Sample:T0)
- 4) 1L 菌液に1M IPTGが 1 mLを入れ、Final濃度が1 mMになる。
- 5) 1 mL 菌液(Sample: (-))とIPTG入り1L 菌液(Sample: (+))を振とう培養器にて激しく振とうし(175 rpm)、37°Cで一晩培養する。
- 6) Sample: T0, (-), (+)を1 mLずつ取り、4°Cにて3500rpm, 3min 遠心し、菌体を回収する
- 7) 一晩培養した菌を5000g、5min、4°Cで遠心し、集菌する。
- 8) 500 mLのPBSバッファで懸濁する。
- 9) また、5000g、15min、4°Cで遠心し、集菌する。
- 10) 250 mLのPBSバッファで懸濁する。また、5000g、15min、4°Cで遠心し、集菌する。
- 11) 上清を捨て(すぐ精製しない場合は菌を-30°Cで保存する)、200 mLのNi-カラム Binding Bufferで懸濁する。

- 12) ガラスビーズ (0.1、3g) で破碎する (4000rpm、45sec、Stop 45sec、10 times) 、破碎した菌液を6000rpm、2min、4C°で遠心し、ガラスビーズを落とす。
- 13) 破碎した菌液の上清を回収し、10000g、30min、4C°で遠心分離し、その上清を可溶性画分(sup)、沈殿物を不溶性画分(ppt)としてサンプル回収する。
- 14) SDS-PAGEでタンパク質を確認する。

Niカラム精製

アフィニティークロマトグラフィー、生体高分子 (タンパク質や核酸) 同士または低分子物質とのアフィニティー (親和性) によって物質を分離する方法である。

担体 : Profinity IMAC Ni-charged Resin (BioRad)

バッファー調製 :

Binding Buffer : pH=8.0

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

10 mM imidazole

Wash Buffer : pH=8.0

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM imidazole

Elution Buffer : pH=8.0

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

250 mM imidazole

手順：

- 3) 2 mLのNi担体に30 mL Binding Bufferを入れ、Ni担体が落ちるまで放置する。
- 4) 上清を捨て、20 mL可溶性画分を入れ、振とう培養器にて振とうし(100 rpm)、4°Cで 2時間から一晩結合させる。
- 5) 全ての液体をカラムに移し、Ni担体が落ちるまで放置する。
- 6) Flow throughを回収する(Sample:Ub)、20 mL Binding Bufferを入れ、もう一回Flow throughを回収する(Sample:Ub)。
- 7) 20 mL Wash Bufferを入れ、カラムを清浄する。6回くらい清浄する(Sample:W)。
- 8) 5 mL Wash Bufferを入れ、また100U Thrombinを加え、振とう培養器にて振とうし(100 rpm)、24°Cで 20- 30時間結合させる。
- 9) Flow throughを回収する(Sample:TF)、10 mL Wash Bufferを入れ、もう一回Flow throughを回収する(Sample:TF)。二回を行う。
- 10) 10 mL Elution Bufferを入れ、カラムを清浄する。二回を行う。(Sample:E)
- 11) SDS-PAGEでタンパク質を確認する。

Qカラム精製 (FPLC)

イオン交換クロマトグラフィーは、タンパク質表面に露出されている電荷（有効表面電荷）の特性にしたがって生体分子を分離する手法である。

バッファー調製：

Q Buffer A： pH=8.0

20.0 mM Tris

1.0 mM EDTA

5% Glycerol

Q Buffer B： pH=8.0

20.0 mM Tris

1.0 mM EDTA

5% Glycerol

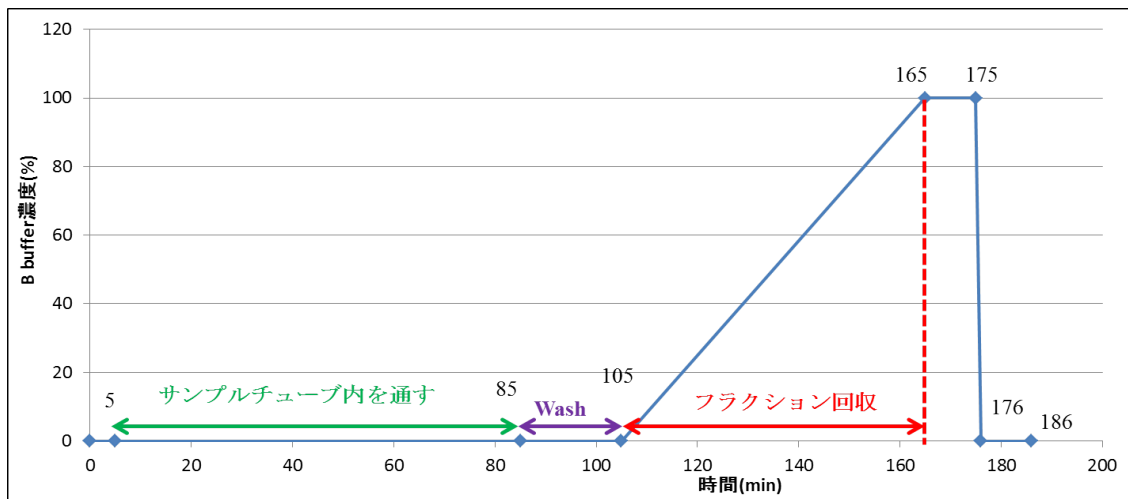
1.0 M NaCl

カラムの平衡化 (Bio-Scale Mini macro-Prep High Q Cartridge, 5mL)

- 1) Biologic LP Core Systemを用いて精製するので、
まず、回路が純水で洗う。(5 mL/min, 5 min)
- 2) カラム (High Q Cartridge, 5mL) を固定し、dH₂Oで洗う。(5 mL/min, 5 min)
- 3) Buffer Aでカラムを平衡化する。(5 mL/min, 5 min) (サンプルチューブは40mLのものを使用)
- 4) C線路からサンプルを流し、カラムと結合させる。(1 mL/min)
- 5) Buffer Aでカラムを洗う。(5 mL/min, 20 min)
- 6) 清浄後、Programを制定し、目的タンパク質を溶出する。
- 7) Program：
 - 1 . Buffer A, 100 %, 1 mL/min, 5 min
 - a) 2 . Buffer A + B Mix, 0~100 %, 1 mL/min, 60 min
 - b) 3 . Buffer B, 100 %, 1 mL/min, 10 min
 - c) 4 . Buffer A, 100 %, 1 mL/min, 20 min
- 8) 純水で回路とカラムを洗う。(1 mL/min, 20 min)
- 9) 20 %エタノールで回路とカラムを洗う。(5 mL/min, 5 min)

10) カラムを外し、保存する。

11) SDS-PAGEでタンパク質を確認する。



※5~85minでのタンパクをColumnに吸着させる時間はタンパク質溶液の量により変更

※サンプルチューブ内を通す所以外は、Bufferはサンプルチューブ内を通さない。

2-1-4 . Cp-Lip1 の定量

BCA Protein Assay Reagent Kitを用いてタンパク定量

BCA Protein Assay Reagentは、ピシンコニン酸（BCA）溶液と硫酸銅溶液からなる。2液を混合すると澄んだ黄緑色の試薬が生成され、最低1週間安定である。タンパク質の存在下で試薬中の第二銅イオンは還元されて第一銅イオンになる。次いで、第一銅イオンはBCA 2分子とキレート化する。キレート化に伴って試薬は黄緑色から紫色に変化し、タンパク質濃度に依存して紫色が濃くなる。562 nmの吸光度を測定し、標準曲線と比較して水溶液中のタンパク質濃度を決定する。

1. タンパク質溶液を適当に希釈したもの、基準となる各濃度のBSAタンパク質溶液を25 μ L用意。(標準偏差を求めるため3回分)

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

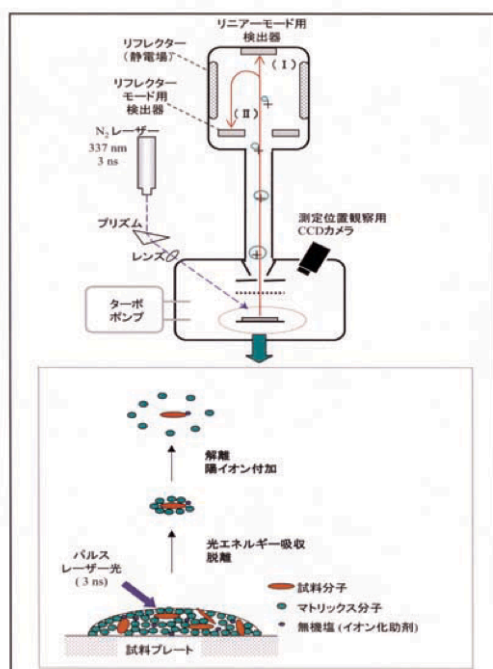
2. Reagent A:B=50:1で混ぜ合わせたWA溶液を200 μ Lずつ加える。
3. 37 $^{\circ}$ C、30min保温
4. OD562で各溶液の吸光度を測定(10min以内)
5. BSAタンパク質を基準に目的タンパク質の濃度を算出する

2-2 . MALDI-TOFMS により Cp-Lip1 分子量の確定

MALDI-TOFMS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法)

MALDI とは、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法) の略称である。TOFMS とは、Time of Flight Mass Spectrometry(飛行時間型質量分析法) の略称である。図に示されるように、様々の大きさの正イオンがサンプルスライド(Sample Slide)上で発生する。サンプルスライドと接地グラウンド(Ground)の間には V_0 の電位差があるので、イオンは図の方向に引き出される。引き出し後の各イオン速度 v は、エネルギー保存の法則より求められる。ここで電位差 V_0 は、どのイオンに対しても一定なので、 m/z 値が小さい(軽い)イオンほど高速でドリフト空間(Drift Space)を飛行し、検出器(Detector)に到着する。このように、質量電荷比 m/z 値の違いでイオンの飛行時間が異なることを利用して質量分析を行う方法を「飛行時間型質量分析法」(TOFMS)と呼び。

得られた精製タンパク質(0.5 μg)と DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を混合して共結晶させ、MALDI-TOFMS (New ultrafleXtreme、Bruker) を用いて質量分析を行った。



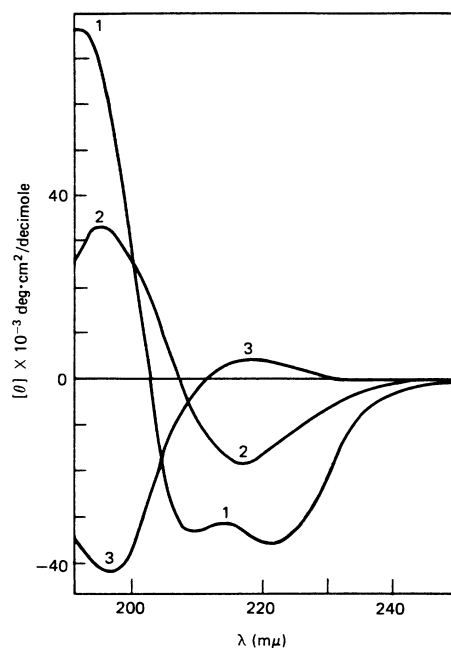
図：MALDI-TOFMS の模式図

2-3 . タンパク質の二次構造解析：CD スペクトル測定

円二色性（Circular dichroism, CD）スペクトル右円偏光と左円偏光の吸収の差を測定する方法である。キラリティ（旋光性）をもつ分子の測定においてよく用いられる。タンパク質の場合、アミノ酸の旋光性よりもむしろ二次構造のペプチド鎖に由来する旋光性の観測に用いられる。実験条件も含め測定が容易であるため、熱や溶媒などによるタンパク質の変性状態を調べるのに有効な手段である。構成されるアミノ酸の種類や溶媒によって若干の違いはある。

精製 Cp-Lip1 を円偏光二色性分光計（J-720WI、日本分光）で 190 nm から 650 nm まで CD スペクトルを測定した。

二次構造	CDスペクトルの特徴
α ヘリックス	196nm付近に大きな正の、207と222nm付近に二つの負の極大を持つ
β ストランド	197nm付近と216nm付近にそれぞれ正と負の極大を持つ
ランダムコイル	196nm付近に大きな負の極大を持つ



図：CD spectra of poly-L-lysine in various conformations. Curve 1: 100% α -helix; Curve 2: 100% β -strand; Curve 3: 100% random coil.⁸⁾

2-4 . タンパク質とリガンドの結合特性：蛍光測定

精製させた組み換えタンパク質は匂い分子及びリガンドを結合することができるかどうかを、蛍光色素と共存させて、内在性トリプトファンの蛍光消光を測定することによって調べられる。

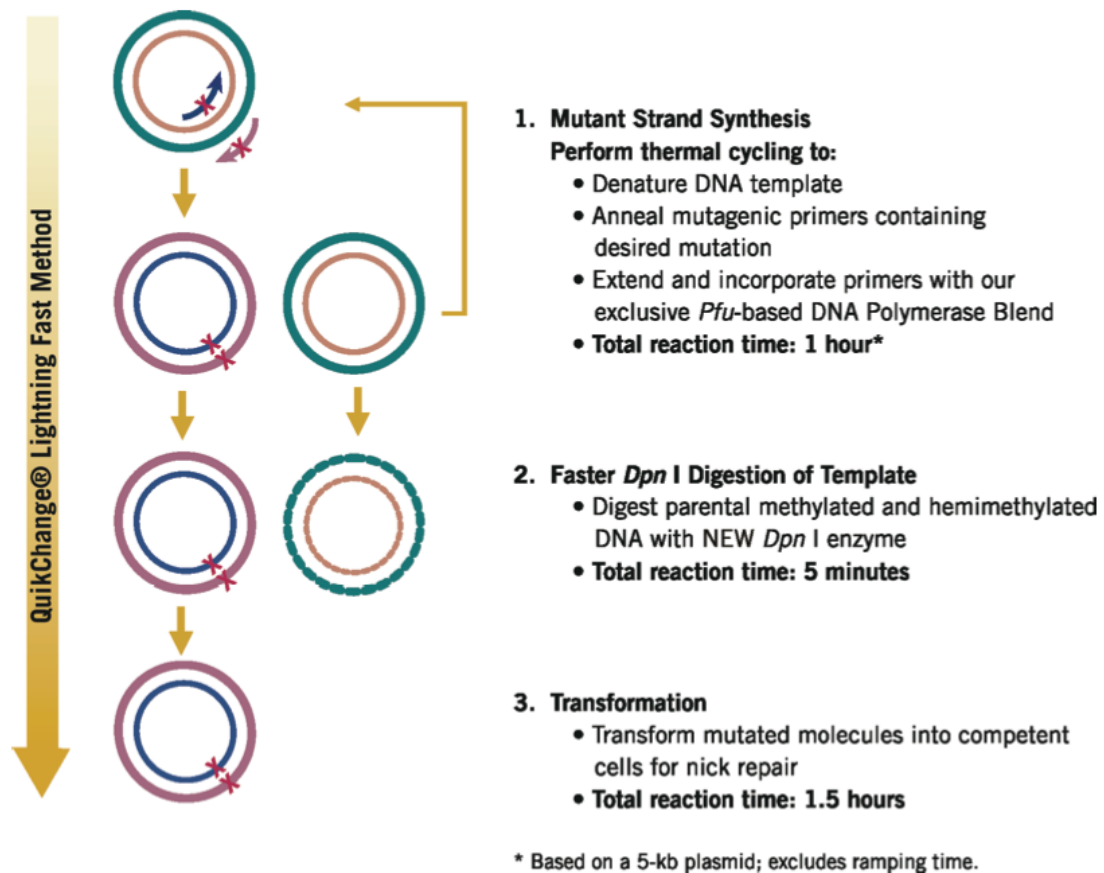
精製した Cp-Lip1 タンパク質に蛍光色素 bis-ANS[®]を加え、275 nm 励起による蛍光を FP-6200 分光蛍光光度計（日本分光）で測定した。さらに、匂い分子が精製した Cp-Lip1 タンパク質に結合するかどうかを検討するため、Cp-Lip1 タンパク質と bis-ANS を混合したところに匂い分子 IBMP を加え、bis-ANS 由来の蛍光の消光を調べた。

2-5 . システイン残基一残基置換体作製

構築したpET28a(+)発現ベクターとCp-Lip1遺伝子を組み合わせプラスミドがQuickChange法によって、システイン残基一残基置換体を作製した。

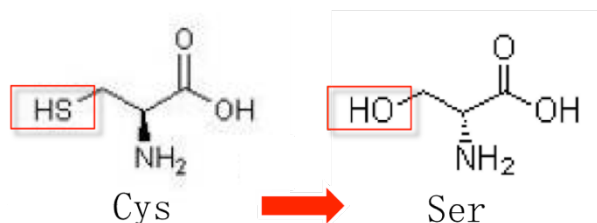
QuickChange法

今回のQuickChange法はQuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent Technologies)を用いて実験を行った。QuickChange法の原理は図に示す。



プライマー設計

Cp-Lip1の4ヶ所(C27S,C64S,C114S,C160S)のシステイン残基をそれぞれ高い相同性構造を持つセリン残基に置換した7種類のプライマーを設計した。



図：システイン残基をセリン残基に置換

Mutagenic primer :

CP1-C27S-F : 5' - AGT GGC ATC AAA CAG TCC AGA ATT TGT TC -3'

CP1-C27S-R : 5' - GAA CAA ATT CTG GAC TGT TTG ATG CCA CT -3'

CP1-C64S-F : 5' - AGG ACC TTC AGG AAG CAT GAC GAT GGA TA -3'

CP1-C64S-R : 5' - TAT CCA TCG TCA TGC TTC CTG AAG GTC CT -3'

CP1-C114S-F : 5' - AAG CGG TGA TGC CAG CAA GAT GGT GAA AC -3'

CP1-C114S-R : 5' - GTT TCA CCA TCT TGC TGG CAT CAC CGC TT -3'

CP1-C160S-F : 5' - AAG AGA CAT CGA CAG TGT CCC TGG AGA GT -3'

CP1-C160S-R : 5' - ACT CTC CAG GGA CAC TGT CGA TGT CTC TT -3'

```

ATG GAG ATT CCA GTG ATG AGC AAC TTT GAC CCT CAG AAG ATT CTA GGG AAG TGG TAT GCT GTT GCA GTG GCA TCA AAC TGT CCA GAA TTT < 90
M E I P V M S N F D P Q K I L G K W Y A V A V A S N C P E F
10 20 30 40 50 60 70 80

GTT CAG ATG AAG TCA GTG ATG AAG ATG CCC ATC ACC ATA TTC AGT GTA CTT GAC GAC GGG GAC CTG TAT GCT GCC ACA GGC GTC GCA GGA < 180
V Q M K S V M K M P I T I F S V L D D G D L Y A A T G V A G
100 110 120 130 140 150 160 170

CCT TCA GGA TGC ATG ACG ATG GAT ATG GTA TAC CAT ACA GCC AAA CAC GGT CAA TAC ACT CAA AGT GTT CTC GAC AAC AGT GAC ATC CGA < 270
P S G C M T M D M V Y H T A K H G Q Y T Q S V L D N S D I R
190 200 210 220 230 240 250 260

TTT GTT GAT GGG GAC TTT GAT CAT AGT GTC TTG GAG TAC ACC CAA AAT GTC TCA GAA AGC GGT GAT GCC TGC AAG ATG GTG AAA CTG TTA < 360
F V D G D F D H S V L E Y T Q N V S E S G D A C K M V K L L
280 290 300 310 320 330 340 350

GCC AGA CAG CCA GAA GTC GCT GAA ATC CCT GCT TTA GCC ATA GAA CAC TTC AAG ATG CTG ATA CCG GTA GTT GGG CTA TCA ATG GAA GAC < 450
A R Q F E V A E I P A L A I E H F K M L I P V V G L S M E D
370 380 400 410 420 430 440

GTC ACA CAC CTG CCA AGA GAC ATC GAC TGT GTC CCT GGA GAG TTT TAG < 498
V T H L P R D I D C V P G E F *
460 470 480 490
    
```

QuickChange反応

先ほど設計したプライマーを用いてQuickChange反応を行った。

PCR反応液調製

5 μ l of 10 \times reaction buffer

3 μ l (10–100 ng) of dsDNA template (Cp-Lip1,-Lip2-Wild)

2 μ l (125 ng) of oligonucleotide primer #1

2 μ l (125 ng) of oligonucleotide primer #2

1 μ l of dNTP mix

1.5 μ l of QuikSolution reagent

ddH₂O to a final volume of 50 μ l

Add 1 μ l of QuikChange Lightning Enzyme to sample reaction

PCR反応

Segment	Cycles	Temperature	Time
1	1	95°C	2 minutes
2	18	95°C	20 seconds
		60°C	10 seconds
		68°C	30 seconds /kb of plasmid length
3	1	68°C	5 minutes

Dpn I制限酵素処理

1. Add 2 μ l of the Dpn I restriction enzyme
2. Gently and thoroughly mix each reaction, microcentrifuge briefly, then immediately incubate at 37°C for 5 minutes to digest the parental dsDNA.

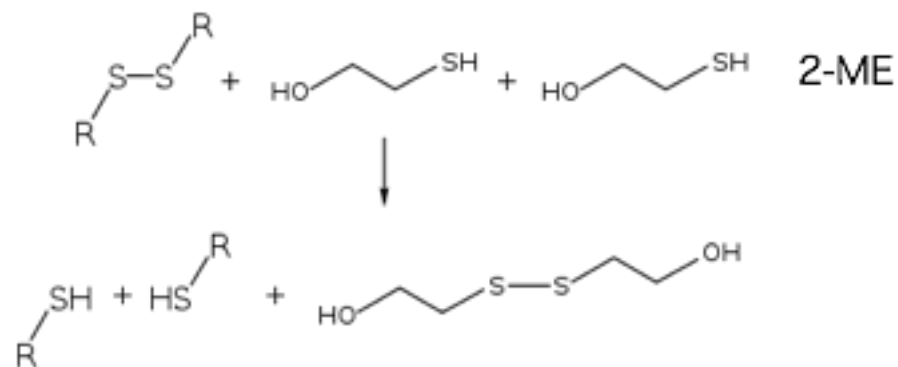
スクリーニング

形質転換によって酵素処理産物を大腸菌JM109に導入し、寒天培地にコロニーを作らせる。得られたコロニーを培養し、菌中のプラスミドを単離する。精製したプラスミドの濃度を測定し、DNAシーケンスを行って構築した発現ベクターを確認する。

システイン残基一残基置換体を導入した発現ベクターを発現用の大腸菌BL21(DE3)に導入し、IPTGによる発現誘導を行った。方法は2-1-2 . Cp-Lip1の精製と同様に行なった。

2-6. 還元剤有無により SDS-PAGE

還元剤2-メルカプトエタノール (2-ME) はSS結合を還元することができる。2-メルカプトエタノール有無によるSDS-PAGE解析を行った。



2-7. 測定サンプルの調製

還元剤DTTによりサンプルの調製

精製Cp-Lip1に対して1000倍濃度のDTT (和光) を添加し、37°Cで一晩分子内ジスルフィド結合を還元させた。

変性剤Ureaによりサンプルの調製

精製Cp-Lip1に10 M Urea溶液を加え、Ureaの最終濃度1、2、4、6、8 Mになって測定に用いた。

各pHのサンプルの調製

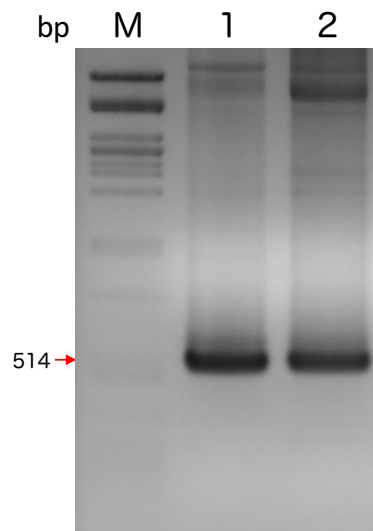
得られた精製Cp-Lip1は異なるpHのバッファー (10 mM HEPESバッファー、pH9.0 ; 10 mM 酢酸バッファー、pH4.0 ; 10 mM 酢酸バッファー、pH6.0 ; 10 mM HEPESバッファー、pH7.4) で透析し、pHを調整した。

3 . 結果

3- 1 . 発現精製した Cp-Lip1 の構造と機能

3- 1- 1 . 発現システムの構築

発現ベクターpGEX-4T-2-Cp-Lip1プラスミドがPCR法によって、NdeIとXhoI酵素導入及びターミネーターを除くプライマーを用いて増幅した。結果は右の図に示しているように、増幅したDNA配列は514bpのところにもバンドが見られた。増幅されたいDNA配列のサイズも同じ514bpである。この結果から、目的配列を増幅できた。



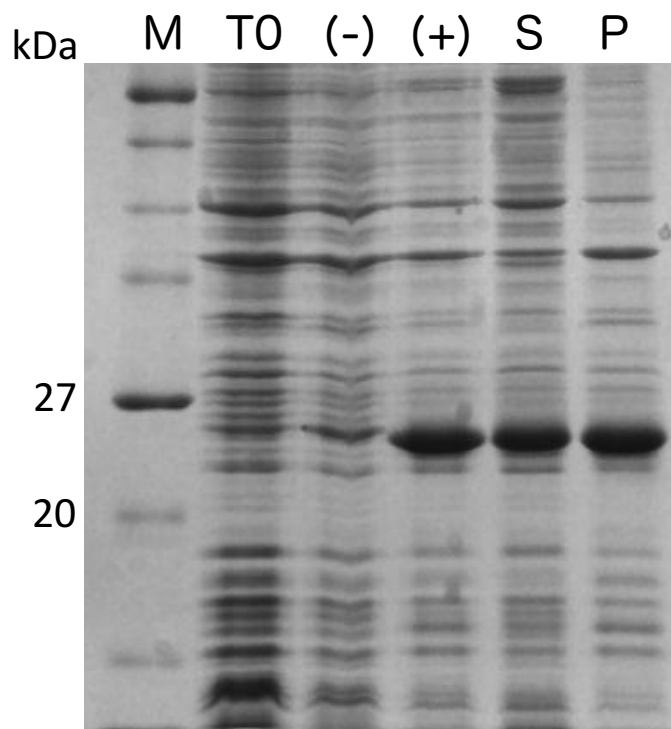
図： Cp-Lip1のPCR増幅結果（2%）。 M: マーカー; 1、2：増幅断片

増幅した DNA 断片を回収して pMD19 ベクターへクローニングした。プラスミドを取って DNA 配列を決定し、得られたプラスミドを BamHI と XhoI 酵素で切断し、同時に pET タンパク質高発現量ベクターpET28a(+)も同じ酵素で切断し、最後にライゲーションしてプラスミドを取って DNA 配列を確認した。DNA 配列を確認した結果は下の図に示しているように、Cp-Lip1 遺伝子は pET28a(+)ベクターに導入したことをできた。

			6×His	Thrombin site	M	
Cp-Lip1	1	-----	ATCATCATCACAGCAGCGGG	CTGGTGC	CGCGGCAGC	ATATATATCAGATTCCAGT
27-pETUp_B01	1	-----	ATCATCATCACAGCAGCGGG	CTGGTGC	CGCGGCAGC	ATATATATCAGATTCCAGT
re-27-pETUp_B02	1	-----	CATCATCATCATCACAGCAGCGGG	CTGGTGC	CGCGGCAGC	ATATATATCAGATTCCAGT
						ATCGAGATTCCAGT
						GAGCACTTTGACCCTCAGAA
						GATTCAGGGA
						49
						93
						100
Cp-Lip1	50	AGTGGTATGCTGTTCAGTGGCATCAAAC	TGCCAGAA	TTGTTTCAGATGAAGT	CAGT	GATGAAGATGCCCATCACCATATTCAGTGTACTTGACGACGG
27-pETUp_B01	94	AGTGGTATGCTGTTCAGTGGCATCAAAC	TGCCAGAA	TTGTTTCAGATGAAGT	CAGT	GATGAAGATGCCCATCACCATATTCAGTGTACTTGACGACGG
re-27-pETUp_B02	101	AGTGGTATGCTGTTCAGTGGCATCAAAC	TGCCAGAA	TTGTTTCAGATGAAGT	CAGT	GATGAAGATGCCCATCACCATATTCAGTGTACTTGACGACGG
						149
						193
						200
Cp-Lip1	150	GGACCTGTATGCTGCCACAGGCGTCGCAGGACCTTCAGGATGCATGACGATGGATATGGTATACCATACAGCCAAACACGGTCAATACACTCAAAGTGT				
27-pETUp_B01	194	GGACCTGTATGCTGCCACAGGCGTCGCAGGACCTTCAGGATGCATGACGATGGATATGGTATACCATACAGCCAAACACGGTCAATACACTCAAAGTGT				
re-27-pETUp_B02	201	GGACCTGTATGCTGCCACAGGCGTCGCAGGACCTTCAGGATGCATGACGATGGATATGGTATACCATACAGCCAAACACGGTCAATACACTCAAAGTGT				
						249
						293
						300
Cp-Lip1	250	CTCGACAACAGTGACATCCGATTTGTTGATGGGAC	TTTGATCATAGTGTCTTGGAGTACACCCAAAATGTCTCAGAAA	CGGTGATGCCTGCAAGATGG		
27-pETUp_B01	294	CTCGACAACAGTGACATCCGATTTGTTGATGGGAC	TTTGATCATAGTGTCTTGGAGTACACCCAAAATGTCTCAGAAA	CGGTGATGCCTGCAAGATGG		
re-27-pETUp_B02	301	CTCGACAACAGTGACATCCGATTTGTTGATGGGAC	TTTGATCATAGTGTCTTGGAGTACACCCAAAATGTCTCAGAAA	CGGTGATGCCTGCAAGATGG		
						349
						393
						400
Cp-Lip1	350	TGAAACTGTTAGCCAGACAGCCAGAAGTCGCTGAAATCCCTGCTTTAGCCATAGAACACTTCAAGATGCTGATACCGGTAGTTGGGCTATCAATGGAAGA				
27-pETUp_B01	394	TGAAACTGTTAGCCAGACAGCCAGAAGTCGCTGAAATCCCTGCTTTAGCCATAGAACACTTCAAGATGCTGATACCGGTAGTTGGGCTATCAATGGAAGA				
re-27-pETUp_B02	401	TGAAACTGTTAGCCAGACAGCCAGAAGTCGCTGAAATCCCTGCTTTAGCCATAGAACACTTCAAGATGCTGATACCGGTAGTTGGGCTATCAATGGAAGA				
						449
						431
						500
Cp-Lip1	450	CGTCACACACCTGGCCAAAGAGACATCGACTGTGTCCCTGGAGAGTTTAG				
27-pETUp_B01	431	CGTCACACACCTGGCCAAAGAGACATCGACTGTGTCCCTGGAGAGTTTAG				
re-27-pETUp_B02	501	CGTCACACACCTGGCCAAAGAGACATCGACTGTGTCCCTGGAGAGTTTAG				
						498
						431
						600
						Stop

3-1-2 . Cp-Lip1 の発現

構築した発現精製ベクターを大腸菌で発現し、SDS-PAGEで解析した結果は下の図に示している。Mがマーカを示しており、T0が発現誘導する前の菌のすべてのタンパク質で、-が発現誘導しない16h培養したの菌のタンパク質で、+が発現誘導した後16h培養した菌のタンパク質である。発現誘導した後、分子量20-27kDaの間に新たなバンドが見られた。目的タンパク質を発現されたと考える。次に菌を破碎し、遠心分離で可溶性画分 (S) と不溶性画分 (P) に分け、発現したCp-Lip1は不溶性画分と可溶性画分の両方に存在している。



図：Cp-Lip1 の発現と精製過程の SDS-PAGE (15%)。 M: マーカー; T0: OD600=0.6 時の大腸菌全タンパク質; (-): IPTG 未添加 (16 時間) ; (+): IPTG 添加後 (16 時間) ; sup: 可溶性画分; ppt: 不溶性画分。

3-1-3 . Cp-Lip1 の精製

可溶性画分を Ni-charged Resin にかき、吸着しているタンパク質をカラム内トロンビン消化して溶出、精製した。結果は下の図に示した。Ub:は Ni 担体に未結合画分であり、Cp-Lip1 が Ni 担体に結合したことがわかった。TF はカラム内トロンビンで消化後の溶出画分であり、20 kDa くらいの位置にバンドが現れたので、Cp-Lip1 が His タグと分離できたと考える。さらに、得られた His タグを含まない Cp-Lip1 を Q カラムで精製した。

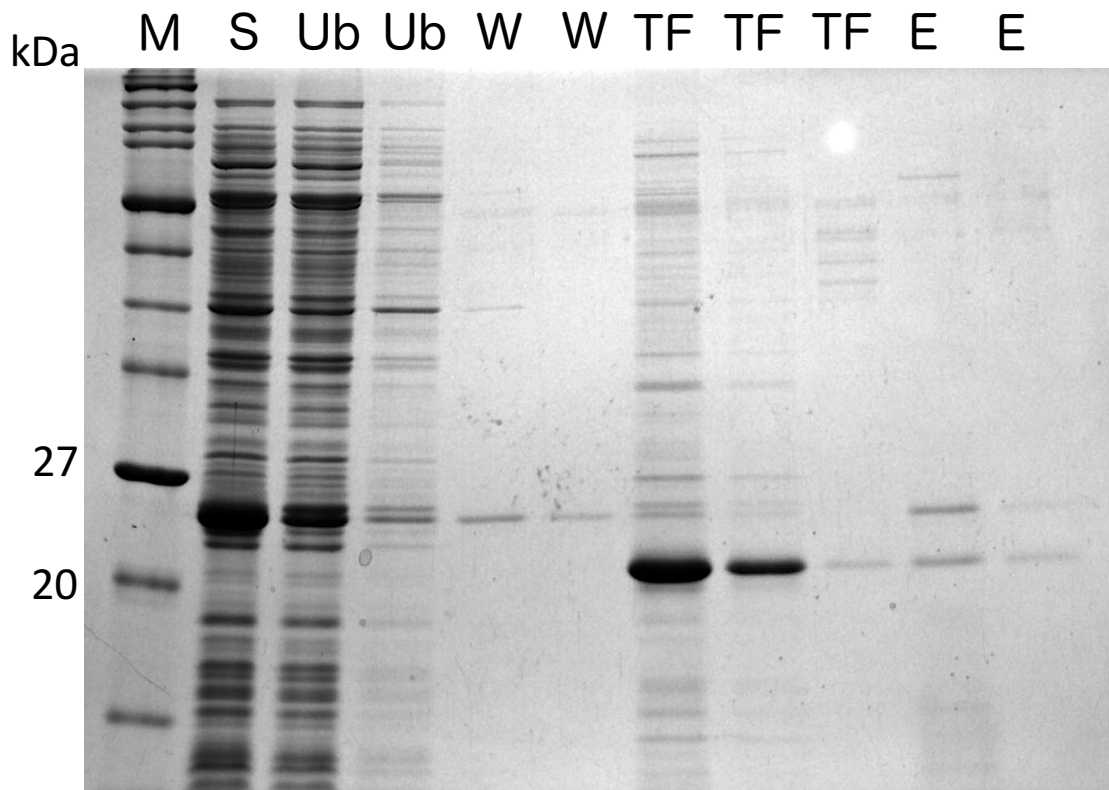
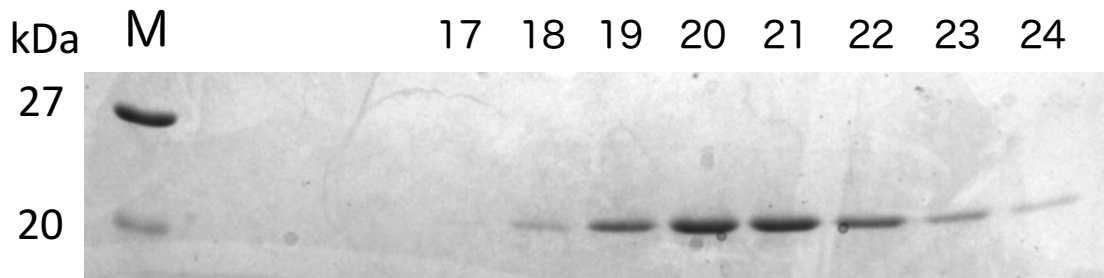


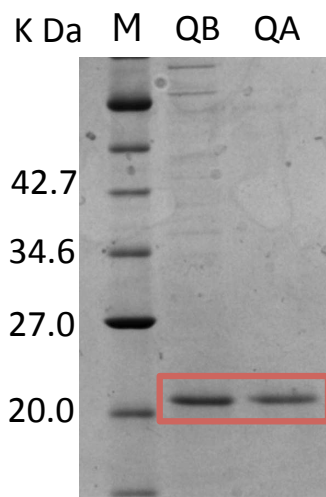
図 : Cp-Lip1 の Ni カラム精製過程の SDS-PAGE (15%) 。 M: マーカー; S: 可溶性画分; Ub: Ni担体に未結合画分; W: 洗浄画分; TF: トロンビンで消化後の溶出画分; E: 洗浄溶出画分.



図：Cp-Lip1のQカラム精製過程のSDS-PAGE（15%）。

M: マーカー; 17-24: 洗浄溶出画分.

得られた His タグを含まない Cp-Lip1 を Q カラムで精製した結果は上の図に示した。Fraction 17 から Cp-Lip1 が溶出してきて、NaCl の濃度は 540 mM の時から溶出した。Q カラム精製前後の Cp-Lip1 を SDS-PAGE で分析した結果は下の図に示した。Q カラム精製によって、Ni カラム精製した後の不純物を除き、高純度な Cp-Lip1 が精製できたと考える。

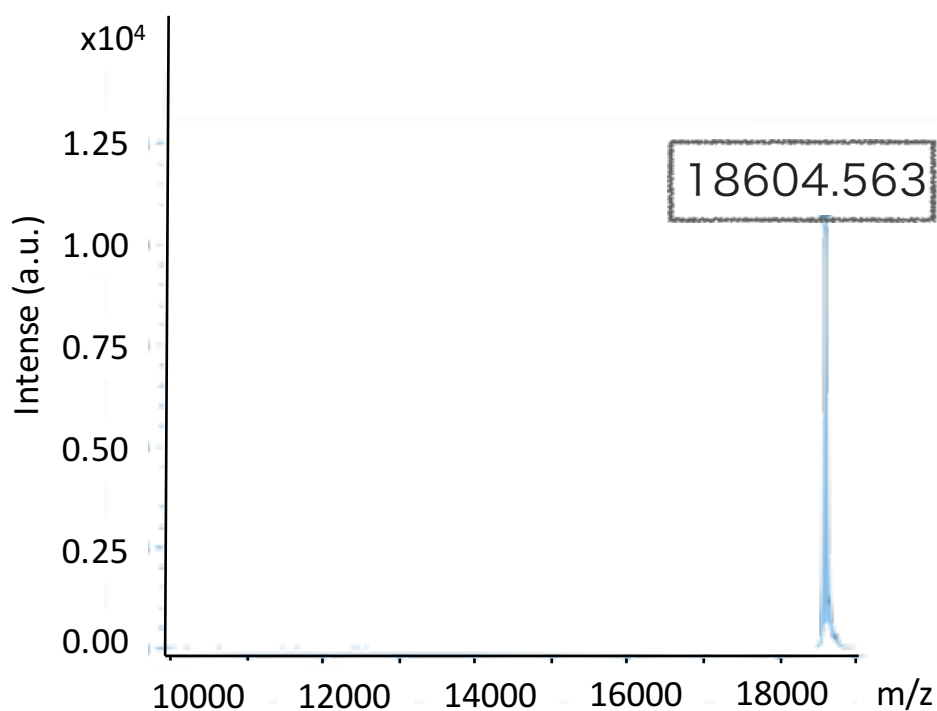


図：Cp-Lip1 の発現と精製過程の SDS-PAGE（15%）。M: マーカー;

QB: Q カラム前; QA: Q カラム後。

3-1-4 . Cp-Lip1 分子量の確定

得られた精製タンパク質(0.5 μ g)とDHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を混合して共結晶させ、MALDI-TOFMS (New ultrafleXtreme、Bruker) を用いて質量分析を行った。結果はこちらの図に示している。18604.563 M/Zの位置に単一のピークが認められた。精製したいCp-Lip1の計算分子量18604.42と極めてよく一致している。MALDI-TOFMSの結果により、高純度なCp-Lip1タンパク質を精製できたと分かりました。分子量の計算はExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/) を用いて計算した。



図：精製タンパク質の MALDI-TOFMS スペクトラム。

実際に精製した Cp-Lip1 はどんな構造を取っているか、また、匂い分子と結合するかどうかを調べました。

3-1-5 . Cp-Lip1 の二次構造

精製したCp-Lip1の10 μMと20 μMそれぞれのCDスペクトルは下の図1に示している。すべてのCD信号が以下の式を用いて、 $[\theta]_{\text{obs}}$ (楕円率) から $[\theta]$ (平均残基モル楕円率) に変換し、濃度の影響を除いた。

変換式：

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

$[\theta]$: 平均残基モル楕円率 [deg · cm² / d mol]

$[\theta]_{\text{obs}}$: 楕円率 [deg]

l : セル長 [m]

C : 残基モル濃度 [M]

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

変換した結果は下の図2に示している。少しCD強度が違うのは濃度定量の差であったと考えられる。ヒトの5種類リポカリン類タンパク質のCDスペクトルは下の図3に示している。リポカリン類タンパク質は210-230 nmの間に負の極大を示す。精製したCp-Lip1タンパク質のCDスペクトルはリポカリン類タンパク質のCDスペクトルの形はほぼ一致しているため、精製したCp-Lip1はリポカリン類タンパク質の類似構造が取れていると考えられる。また、222 nmのCD信号を用いてCD結果を検討する。10 μMと20 μMのCp-Lip1のCD信号がそれぞれ-62.5と-65.2になります。6回精製したCp-Lip1のCD信号強度の平均値が-63.1 ± 1.2となる。

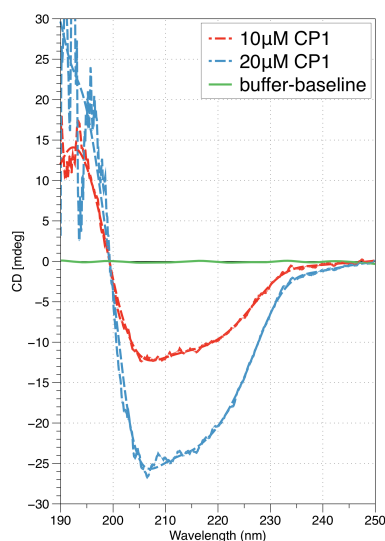


図1 : 10 μMと20 μM Cp-Lip1 のCD スペクトル。

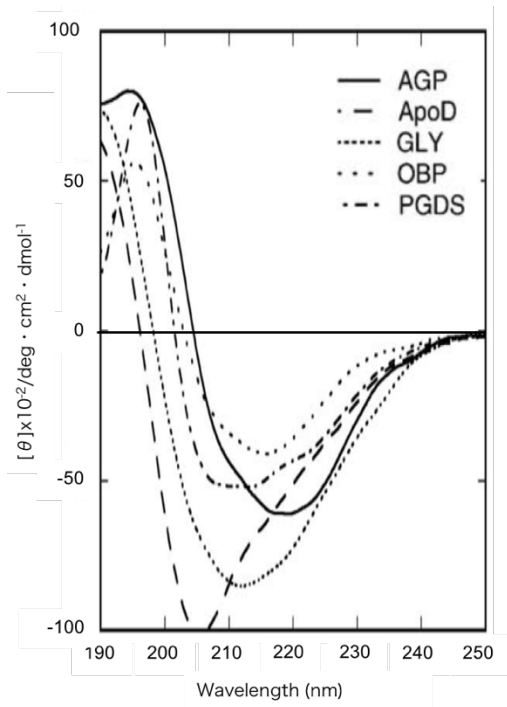


図2： ヒトの5種類リポカリン類タンパク質 (AGP, ApoD, GLY, OBP, and PGDS.) のCDスペクトル。¹⁴⁾

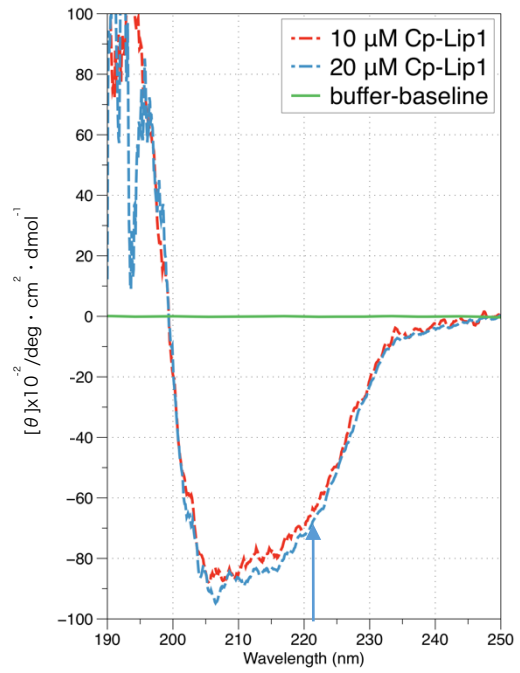
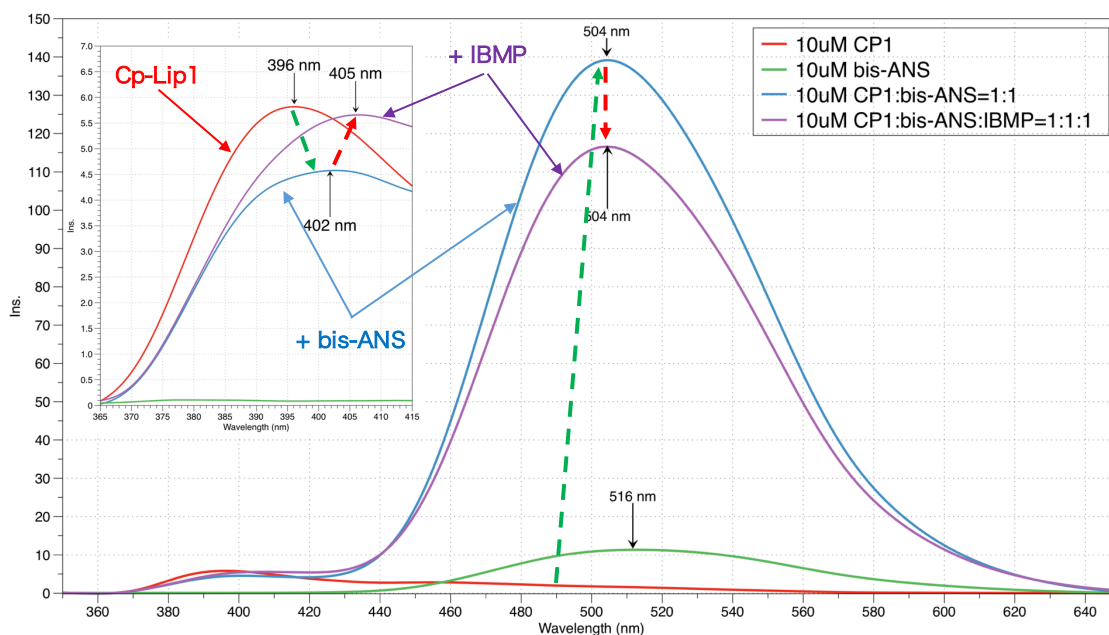


図3： 10 μM と 20 μM Cp-Lip1 の変換したCDスペクトル。

3-1-6. リガンドとの結合特性

発現精製した Cp-Lip1 の蛍光色素及び匂い分子との結合結果は下の図に示している。赤い線は Cp-Lip1 の Trp 由来蛍光スペクトルである。波長 275nm の光励起により、396nm に Trp 由来の蛍光を見られた。同じ濃度の蛍光色素 bis-ANS の蛍光スペクトルは緑の線である。次に、同じ濃度の Cp-Lip1 と蛍光色素 bis-ANS 混合した後の蛍光スペクトルは青い線になる。396nm に見られたタンパク質の Trp 由来蛍光が減少し、500nm 付近に Cp-Lip1 に結合した bis-ANS 由来の蛍光が現れた。これは、Cp-Lip1 と蛍光色素 bis-ANS と結合することが分かった。さらに、同じ濃度の匂い分子 IBMP が加えたところ、500nm 付近に Cp-Lip1 に結合した bis-ANS 由来の蛍光が減少し、対応する Trp 由来蛍光の回復が観察できた。これらの蛍光強度の変化は IBMP が bis-ANS と置換したことを示唆している。この結果により、精製 Cp-Lip1 は蛍光色素と匂い分子を結合することが分かった。



図：10 μ M Cp-Lip1 の Trp 由来と思われる蛍光スペクトル (Red)、10 μ M 蛍光色素 bis-ANS の蛍光スペクトル (Green)。10 μ M Cp-Lip1 に 10 μ M bis-ANS が加えた蛍光スペクトル (Blue)、さらに、10 μ M 匂い分子 IBMP が加えた蛍光スペクトル (Purple)。

ここまで実験結果から、Cp-Lip1 タンパク質の発現・精製系を確立した。MALDI-TOFMS の結果により、高純度な Cp-Lip1 タンパク質を精製できた。精製 Cp-Lip1 はリポカリン類タンパク質と類似の構造で取っている。また、蛍光色素と匂い分子結合能を持つことが分かった。我々は大腸菌を用いてリポカリン類タンパク質の立体構造と匂い分子結合能を持つ Cp-Lip1 タンパク質を得ることができた。

3-2. ジスルフィド結合

ジスルフィド結合は、タンパク質の立体構造を安定化する要因の1つとして、知られている。ポリペプチド中のシステイン残基の間にジスルフィド結合している。SS結合とも呼ばれています。リポカリン類タンパク質は一般的に分子内でSS結合を形成している。Cp-Lip1は4つのシステイン残基を持つので、SS結合があるかどうか、またSS結合がCp-Lip1の構造に及ぼす影響を調べた。

3-2-1. 還元剤2-ME有無により野生型Cp-Lip1のSDS-PAGE解析

まず、精製した野生型Cp-Lip1が2-メルカプトエタノール(2-ME)有無によるSDS-PAGE解析を行ない、SS結合があるかどうかを調べた。結果は下の図に示している。2-メルカプトエタノールはSS結合を還元することができる。2-メルカプトエタノール添加によって、還元したCp-Lip1は20 kDaの位置にバンドが現れた。還元していないCp-Lip1は14.3~20 kDaにバンドが現れた。還元によって、Cp-Lip1の移動度が異なっていた。この結果はCp-Lip1の分子内にSS結合があることを示唆している。

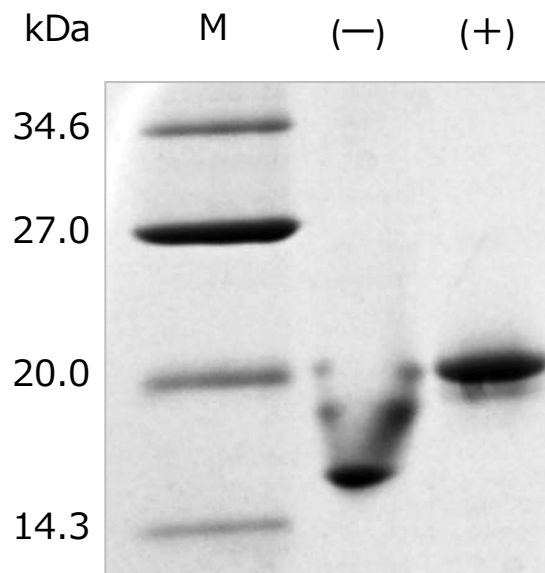


図. 精製Cp-Lip1のSDS-PAGE (20%)。M: マーカー; (-): 2-メルカプトエタノール未添加; (+): 2-メルカプトエタノール添加 (1%)。

3-2-2. 野生型 Cp-Lip1 の SS 結合の還元による二次構造の変化

精製した野生型 Cp-Lip1 に対して 1000 倍濃度の DTT を添加し、37°C で一晚分子内ジスルフィド結合を還元させ、CD 測定を行った。結果を下の図に示した。Cp-Lip1 はベータシート構造に典型的な CD スペクトルを示した。DTT の影響で 210 nm 以下の信号が不安定である。還元前後の試料の CD スペクトルの形はあまり変化していない。また、SS 結合を切断した後の 222 nm の CD 信号強度が -63.1 から -61.6 まで変化した。また、誤差の範囲にあることから還元前後の Cp-Lip1 が二次構造ほぼ変化していないと考えられる。

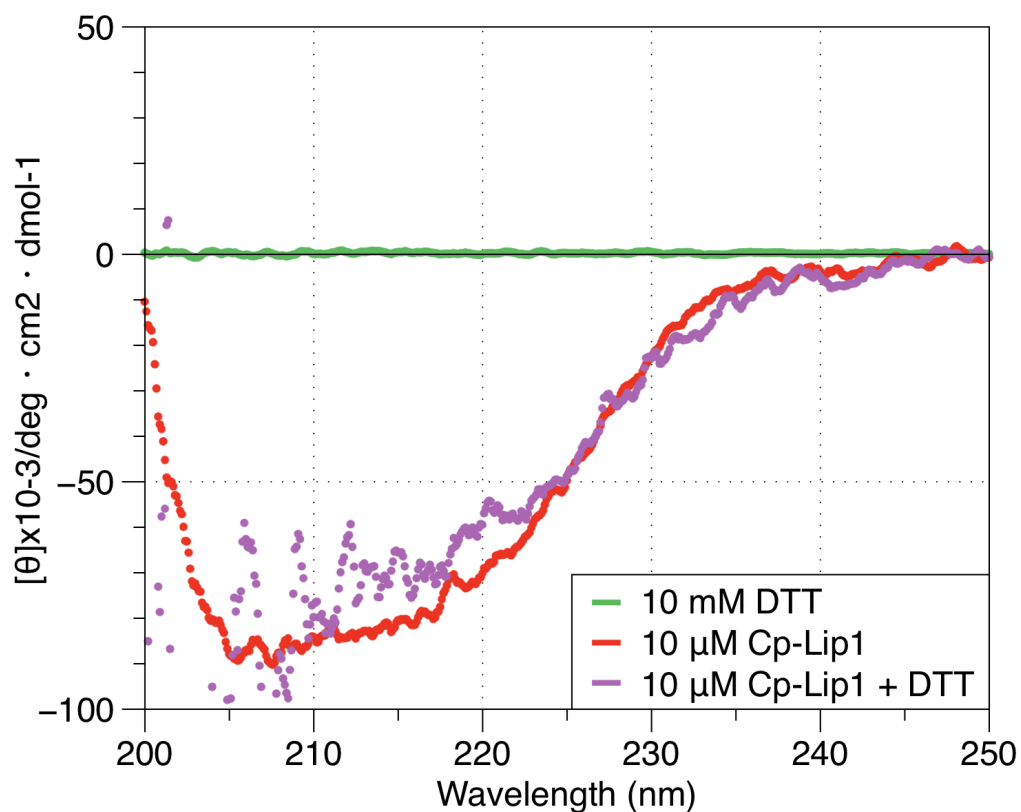


図 : 10 μM Cp-Lip1 の CD スペクトル (Red)、10 mM の Buffer の CD スペクトル (Green)、1000 μM DTT を加えて還元した Cp-Lip1 の CD スペクトル (Purple)。

3-2-3 . 野生型 Cp-Lip1 の SS 結合の還元による蛍光色素との結合変化

Cp-Lip1 の SS 結合の有無により蛍光色素との結合変化の結果を示した。まず、精製 Cp-Lip1 の 395 nm 付近に見られた Trp 由来の蛍光を測定した。赤い線は還元する前の Cp-Lip1 の Trp 由来の蛍光スペクトルで、青い線は還元した、SS 結合を切断した Cp-Lip1 の蛍光スペクトルである。分子内 SS 結合を切断したタンパク質の蛍光強度は SS 結合ありの Cp-Lip1 より強かった。この結果は、SS 結合を切断した Cp-Lip1 の Trp 残基周辺の環境が変化したことを示唆している¹³⁾。

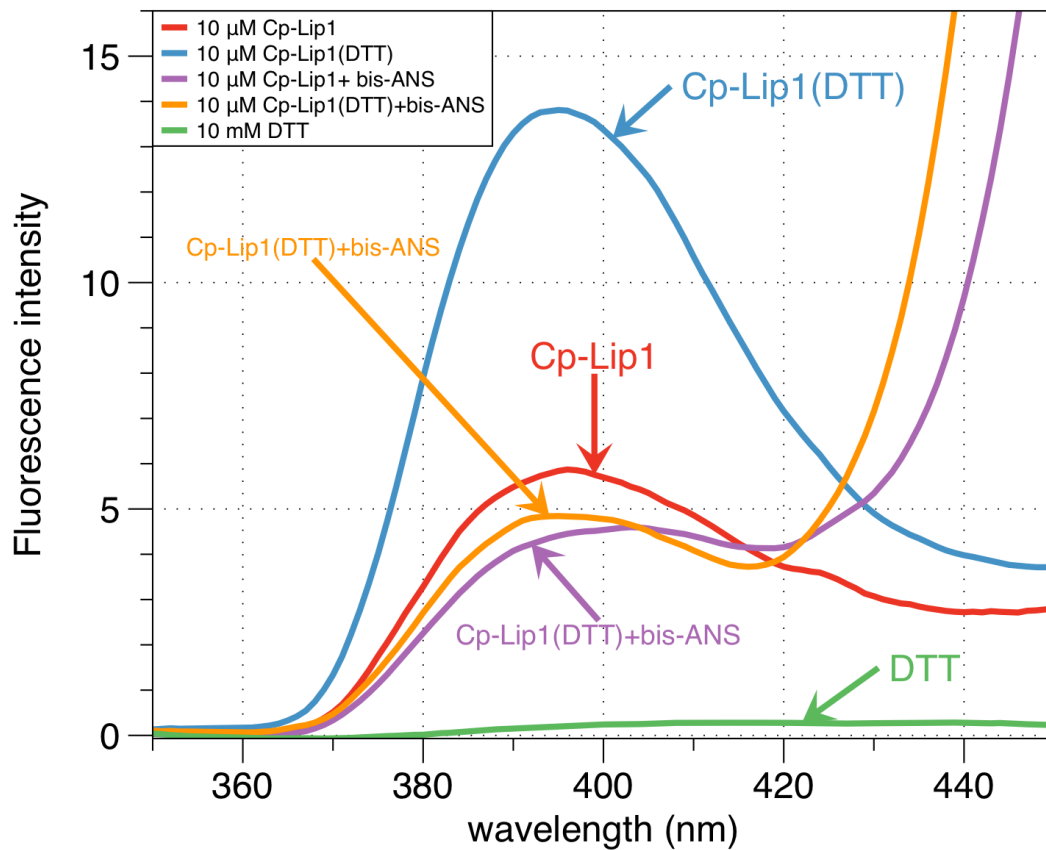


図: Cp-Lip1 と蛍光分子 bis-ANS と結合した時の Trp 由来

また、同じ濃度の bis-ANS を加えたところ、二つとも 500 nm 付近に bis-ANS 由来の強い蛍光を示した。還元した Cp-Lip1 の蛍光強度の方が大きく、同時に 395 nm 付近に見られた Trp 由来の蛍光の強度は減少した。還元前後の Cp-Lip1 に見られた Trp 由来の蛍光強度の差は bis-ANS を加えた後ではほぼ同じ蛍光強度になった。この結果から、分子内 SS 結合を切断した Cp-Lip1 は蛍光色素と結合することが分かった。また、SS 結合を切断した Cp-Lip1 の結合ポケット中の環境が変化することが考えられる。

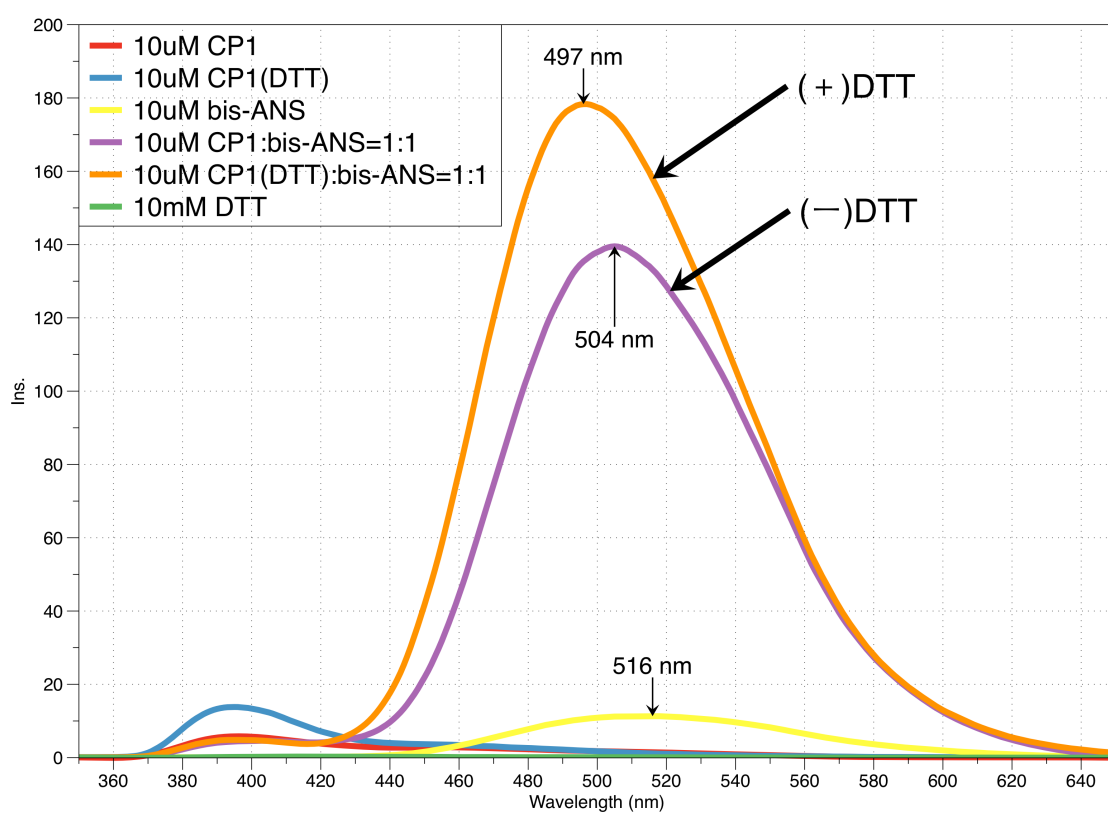


図: Cp-Lip1 と蛍光分子 bis-ANS と結合した時の bis-ANS 蛍光の増加 ;

さらに、Cp-Lip1のSS結合の有無により匂い分子との結合の影響を調べた。還元前後のCp-Lip1とbis-ANSの混合液に匂い分子 (IBMP) を加えた。匂い分子 (IBMP) を加えたところ、SS結合を切断したCp-Lip1のbis-ANS由来の蛍光が減少した。これは、SS結合を切断したCp-Lip1と匂い分子と結合することが示唆している。また、還元していないCp-Lip1では504 nm付近のbis-ANS由来の蛍光が減少し、対応するTrp由来の蛍光の回復が観察されたが、還元Cp-Lip1ではbis-ANS由来の蛍光の減少に伴って、Trp由来の蛍光強度は増加せずに減少した。これは分子内SS結合の有無の違いにより、Trp残基周辺の環境が変化したことを示唆している。つまり、結合ポケット中の環境が変化したことが考えられる。DTTによって還元してもCp-Lip1にリガンド結合能があることを示した結果は我々の知る限り初めての知見である。部位特異的変異導入により分子内S-S結合を作れなくした試料でも二次構造が保たれ、リガンド結合能のあることが報告されており¹³⁾、今回の我々の結果と一致している。

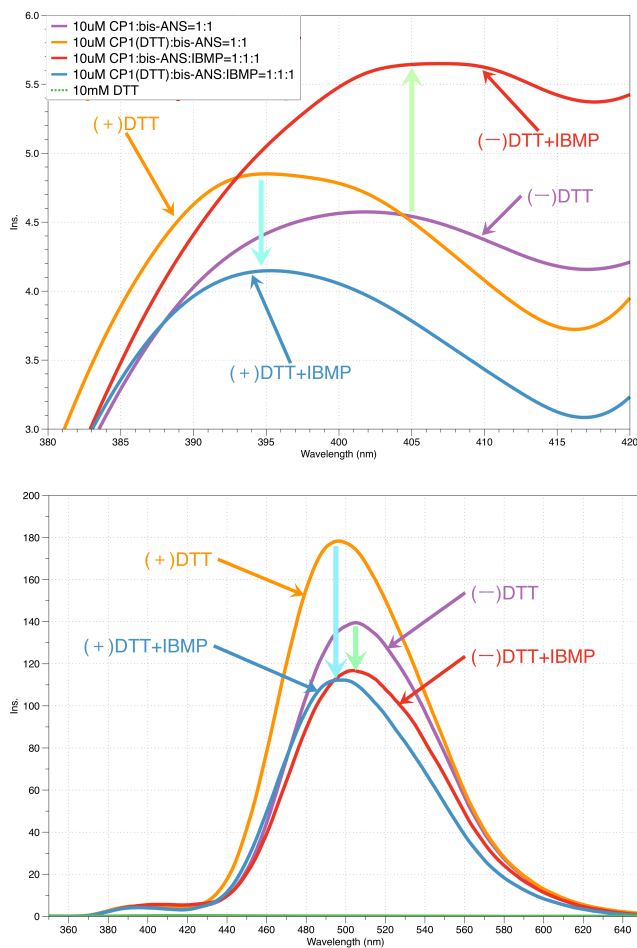
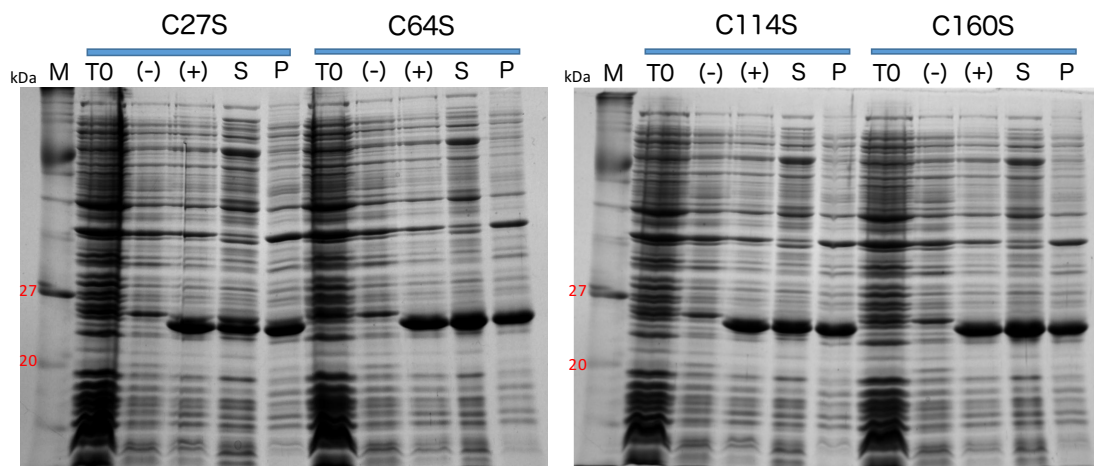


図: Cp-Lip1・bis-ANS混合物に等量の匂い分子(IBMP)を加えた時の蛍光スペクトルの変化。DTT還元Cp-Lip1 と非還元Cp-Lip1を比較している。

3-2-4 . 一残基置換体の発現・精製

分子内ジスルフィド結合していることが示されたので、4つのシステインのうち、どのシステインが分子内ジスルフィド結合しているか決める。システイン変異体(C27S、C64S、C114S、C160S)を作成し、構築した一残基置換体の発現ベクターを大腸菌で発現し、SDS-PAGEで解析した結果は下の図に示している。発現誘導した後、分子量20-27kDaの間に新たなバンドが見られた。目的タンパク質を発現されたと考える。発現した一残基置換体は不溶性画分と可溶性画分の両方に存在している。野生型と同じ方法で精製した。



図：Cp-Lip1 一残基置換体の発現の SDS-PAGE (15%)。M: マーカー; T0: OD600=0.6 時の大腸菌全タンパク質; (-): IPTG 未添加 (16 時間); (+): IPTG 添加後 (16 時間); sup: 可溶性画分; ppt: 不溶性画分。

3-2-5. 還元剤 2-ME 有無により一残基置換体の SDS-PAGE 解析

Cp-Lip1のシステイン変異体が2-メルカプトエタノール(2-ME)有無によるSDS-PAGE解析を行ない、SS結合をしているCysを調べた。結果は下の図に示した。先と同じく野生型のCp-Lip1は下のバンドは還元する前、SS結合がしている。上のバンドは還元した、SS結合を切断したCp-Lip1である。C27S、C114Sの結果は野生型と同じ、SS結合がしていることが分かった。つまり、C27S、C114SがSS結合があり、Cys27とCys114、この二か所がSS結合を形成しないことがわかった。また、C64S、C160S変異体の結果は野生型と異なっていた。C64SとC160S変異体はSS結合がないので、還元によって、変化がない。この結果により、Cys64とCys160が分子内SS結合をしていることが分った。次に、変異体を使って、SS結合と立体構造、匂い結合の関連を調べた。

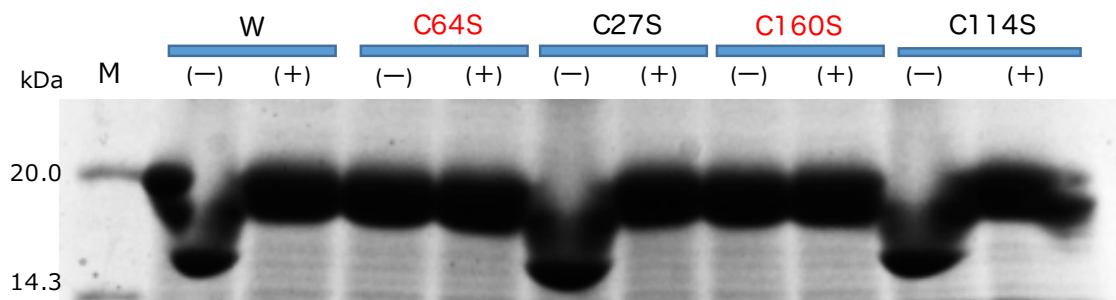
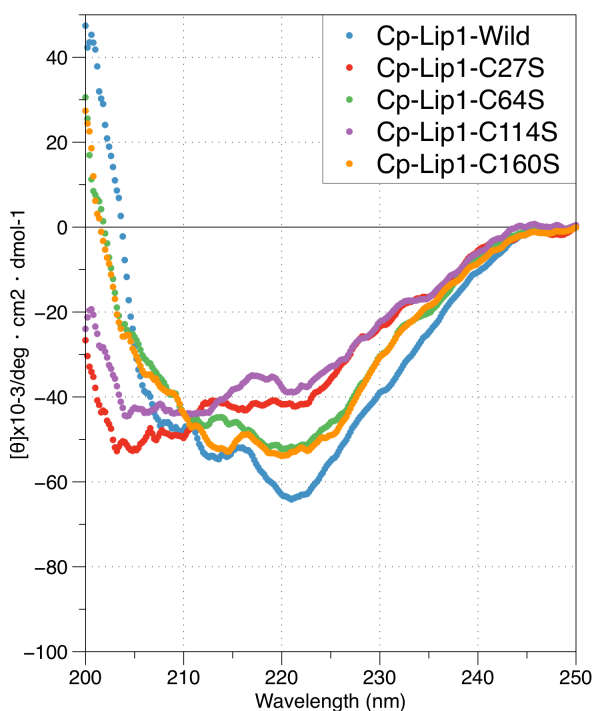


図 . 精製 Cp-Lip1 一残基置換体の SDS-PAGE (20%)。 M: マーカー; (-): 2-メルカプトエタノール未添加; (+): 2-メルカプトエタノール添加 (1%)。

3-2-6 . Cp-Lip1 のSS結合の有無による二次構造の変化

各変異体の二次構造の結果は以下に示した。左の図は野生型と変異体のCDスペクトルを示した。野生型と比べると変異体C64S、C160SのCDスペクトルの形は大きな変化が見られなかった。また、SS結合がない、変異体C64S、C160Sが222 nmのCD信号強度が減少し、-51.3と-51.9になった。SS結合が作っているCys64とCys160は変異導入によって、222 nmのCD信号強度が減少したが、CDスペクトルの形状は明らかな変化がなかった。

一方、野生型と比べると変異体C27S、C114SのCDスペクトルが変化していることが分かった。また、222 nmのCD信号強度が減少し、-41.6と-37.6くらいになり、SS結合が作っていないCys27とCys114は変異導入によって、二次構造が変化していることが考えられる。



表：各変異体の222 nmのCD信号強度

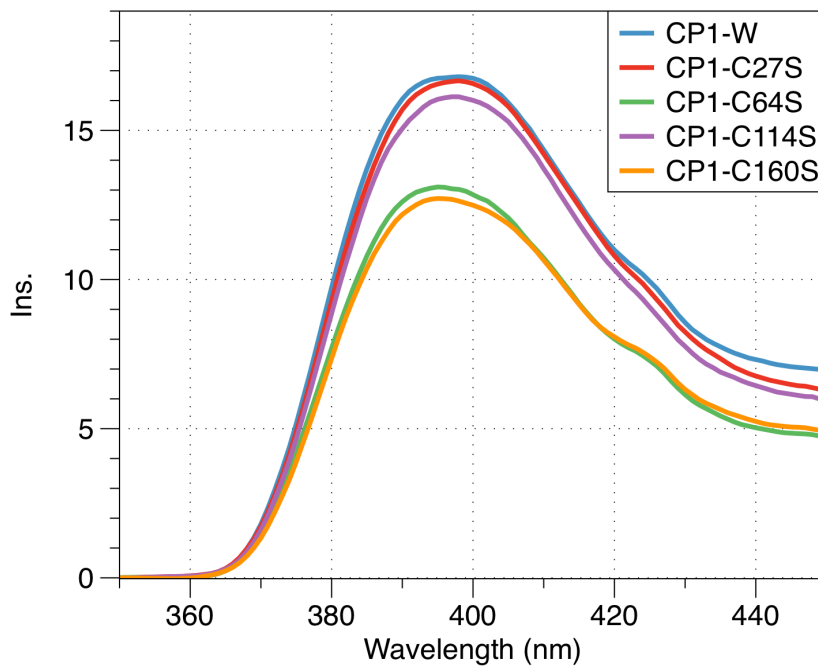
Sample	SS結合	$[\theta] \times 10^{-2}$
Wild-Type	+	-63.1
C64S	-	-51.3
C160S	-	-51.9
C27S	+	-41.6
C114S	+	-37.6

図：10 μM Cp-Lip1-Wild-type、C27S、C64S、C114S、C160SのCDスペクトル。

3-2-7. Cp-Lip1 のSS結合の有無による Trp 由来の蛍光の変化

各変異体のTrp由来蛍光を調べたところ、変異体C64S、C160SのTrp由来の蛍光が他の変異体より低い結果が得られた。SS結合がなくなるとTrp周辺の環境が変化することが考えられる。つまり、結合ポケット中の環境が変化することが考えられる。

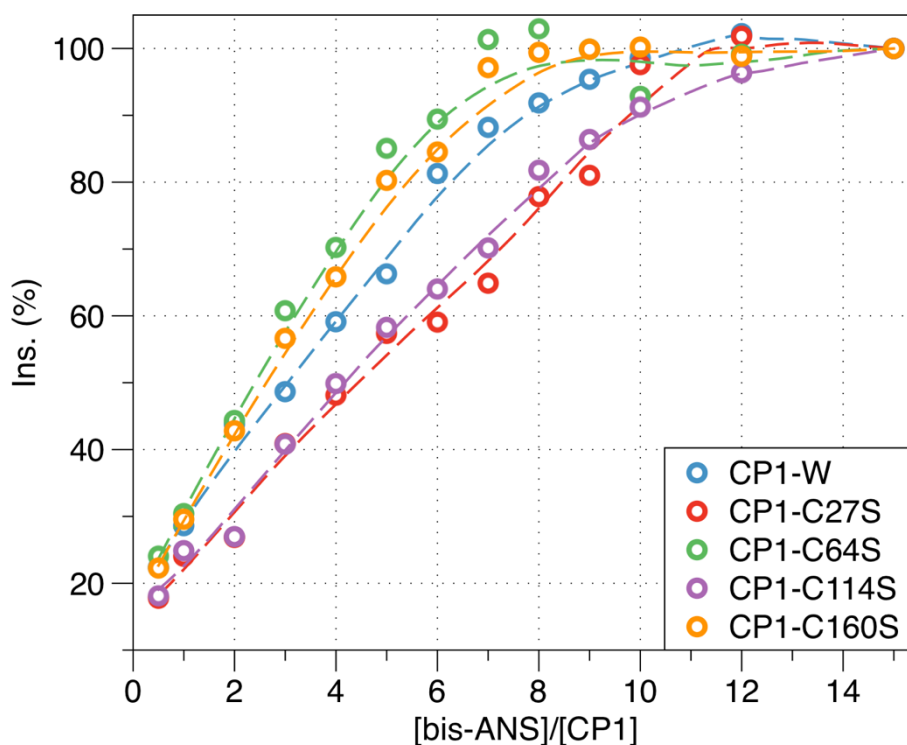
一方、野生型と変異体C27S、C114SのTrp由来の蛍光がほぼ同じ値になっていった。SS結合が形成していないCysが変異導入によってTrp周辺の環境は変化していないことを示唆している。つまり、結合ポケット中の環境が変化していないと考えられる。



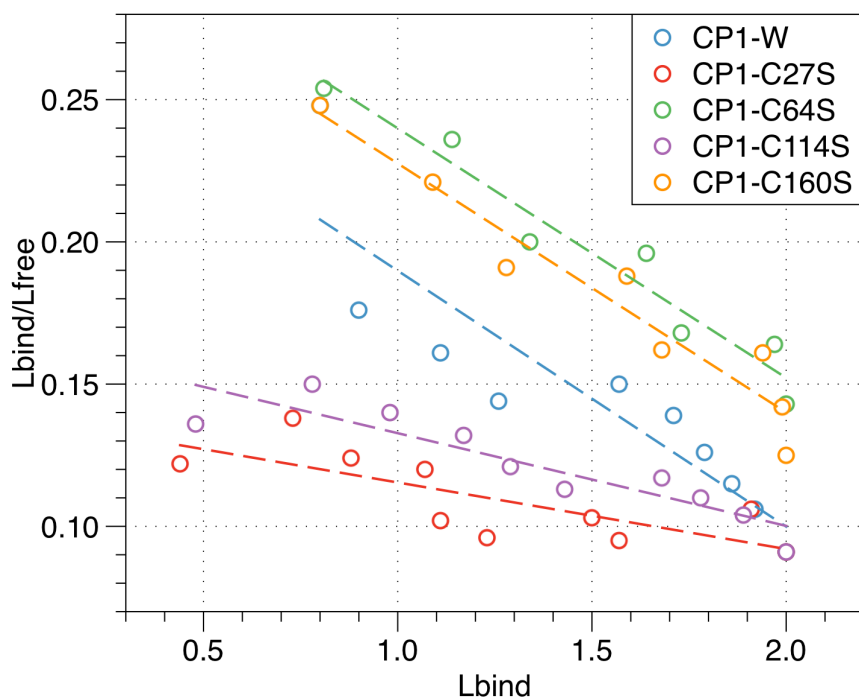
図：5 μ M Cp-Lip1-Wild-type、C27S、C64S、C114S、C160SのTrp由来蛍光スペクトル。

3-2-8 . Cp-Lip1 のSS結合の有無による蛍光色素との結合変化

Cp-Lip1のSS結合の有無により蛍光色素との結合変化と変異体と蛍光色素bis-ANSとの解離定数を調べた。bis-ANS濃度0から15倍まで加える時bis-ANSの500nmの蛍光強度変化を調べ、解離定数 k_d を算出した。野生型のCp-Lip1がbis-ANSに対して解離定数 k_d は11.1 μ Mで、C27Sは42.7 μ M、C64Sは30.7 μ M、C114Sは11.4 μ M、C160Sは11.4 μ Mでした。明らかにCys27とCys114は変異導入によって、蛍光色素bis-ANSに対して結合能が変わった。つまり、Cys27とCys114は変異導入によって、Cp-Lip1はbis-ANSに対して結合親和性が減少した。SS結合がしているCys64とCys160は変異導入によって、結合親和性があまり変わらなかった。



図： 2 μ M Cp-Lip1-Wild-type、C27S、C64S、C114S、C160Sにbis-ANS濃度0から15倍まで加える時bis-ANSの500 nmの蛍光強度変化。

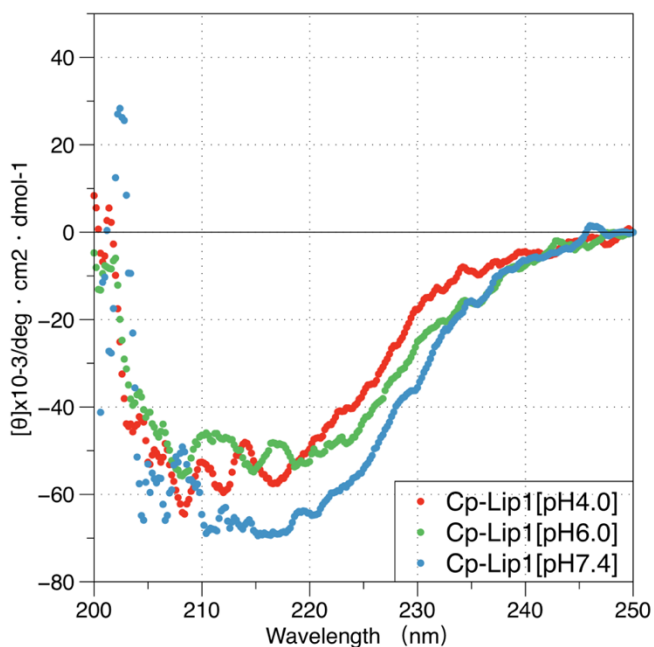


図：解離定数のScatchardプロット。

Cp-Lip1が持つ4つのシステイン残基のうち、Cys64とCys160が1つの分子内SS結合がしている。Cys27とCys114は分子内SS結合を形成していない。分子内SS結合がなくなっても、構造と蛍光分子との結合が大きい変化が見られなかった。SS結合の有無によって、Trp由来の蛍光が変化した。一方、Cys27とCys114の変異によって、二次構造が変化し、蛍光色素bis-ANSとの解離定数 K_d が増大した。

3-3-1 . pH による Cp-Lip1 の二次構造変化

精製Cp-Lip1を異なるpHのバッファーで透析し、pH4.0、6.0、7.4に調整してCD測定を行なった。結果は下の図に示した。pH7.4のCD信号が一番強く、pH4.0とpH6.0では弱かった。こちらの表は222 nmのCD信号強度を示している。pH4.0と6.0は222 nmのCD信号強度が減少し、-44.0と-49.2になった。こちらの結果は、溶液のpHは4.0と6.0になると、Cp-Lip1の二次構造に変化していることを示唆している。



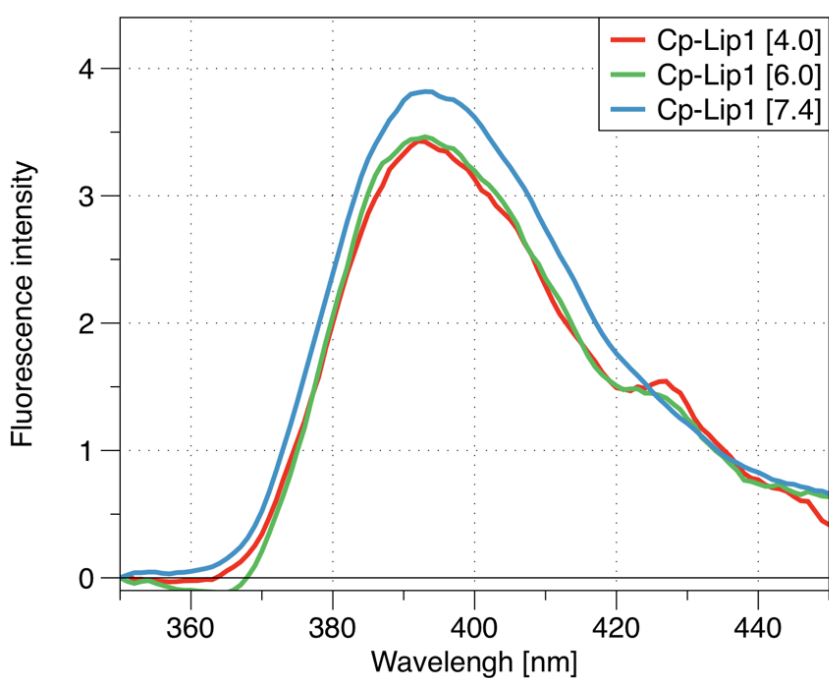
表：各pHの222 nmのCD信号強度

pH	$[\theta] \times 10^{-2}$
4.0	-44.0
6.0	-49.2
7.4	-59.8

図：各pHでのCp-Lip1のCDスペクトル。

3-3-2 . 異なる pH での Cp-Lip1 の Trp 由来蛍光

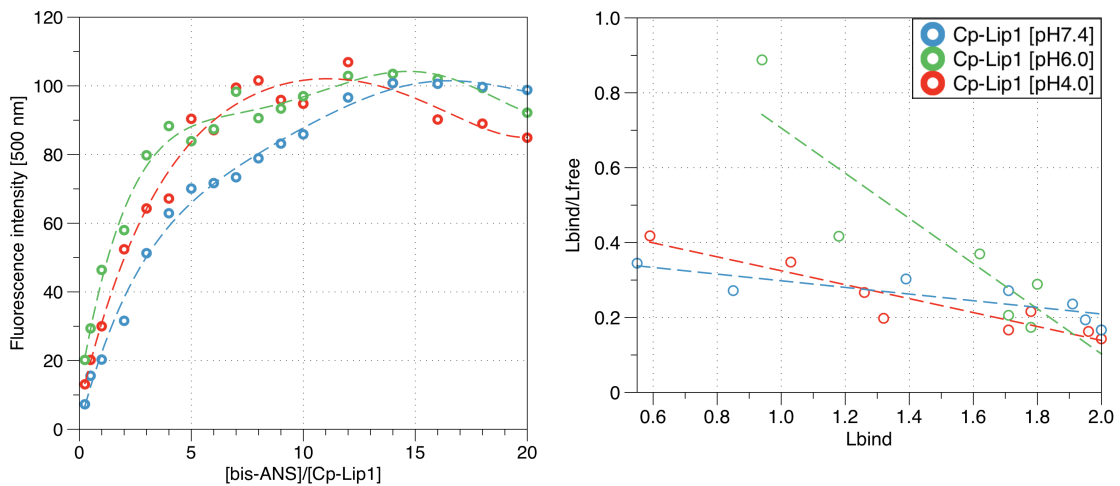
結合ポケットのTrpの周辺環境を調べた。pH6.0のCp-Lip1のTrp蛍光がpH4.0とほぼ同じ、pH7.4より弱かった。これはpH4.0とpH6.0のTrp周辺環境が同じ、pH7.4のTrp周辺環境と違うことを示唆している。また、CDと蛍光測定の結果から、Cp-Lip1の周辺環境がpH6.0とpH4.0に変化する時、二次構造とTrp周辺環境が変化したと考えられる。



図：各 pH の Cp-Lip1 の Trp 由来蛍光スペクトル。

3-3-3 . pH による Cp-Lip1 と bis-ANS との結合変化

pH による Cp-Lip1 と蛍光色素との結合変化を調べた。bis-ANS 濃度 0 から 15 倍まで加える時 bis-ANS の 500nm の蛍光強度変化を調べ、解離定数 k_d を算出した。pH7.4 の Cp-Lip1 が bis-ANS に対して解離定数 k_d は $11.2\mu\text{M}$ で、pH6.0 は $1.7\mu\text{M}$ 、pH4.0 は $5.4\mu\text{M}$ である。pH が pH7.4 から pH6.0 まで変化したら、Cp-Lip1 の結合親和性が増大し、pH6.0 から pH4.0 まで変化したら、Cp-Lip1 の結合親和性が減少することが分かった。この結果により、Cp-Lip1 の周辺 pH によって蛍光色素 bis-ANS との結合親和性が異なることが分かった。



図左：pH4.0, 6.0と7.4のCp-Lip1と bis-ANS (0 - 20倍) の結合による500 nmの蛍光変化
図右：解離定数の Scatchard プロット。

3-3-4 . 各 pH の Cp-Lip1 の bis-ANS 結合に伴う CD 強度の変化

各pHのCp-Lip1のbis-ANS結合に伴うCD強度の変化を調べた。pH4.0、7.4に調整したCp-Lip1にbis-ANSが加えた後の、222 nmでのCDスペクトルの負の強度を測定した。pH7.4の試料では蛍光色素bis-ANSの結合に伴うCDスペクトルの強度には変化がなかった。しかし、pH4.0のCp-Lip1試料ではbis-ANSの添加によりCDスペクトルの信号強度が明らかに減少し、222 nmのCD信号強度も-44.0から-30.1まで減少した。これはbis-ANSの結合に伴いpH4.0のCp-Lip1では二次構造がさらに変化していたことを示唆している。

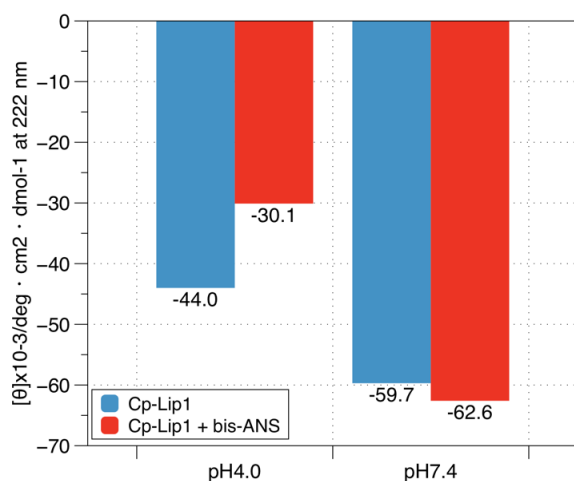


表 : 各 pH の Cp-Lip1 に 3 倍濃度の bis-ANS を加えた後の 222 nm の CD 信号強度

Cp-Lip1 pH	bis-ANS	
	-	+
[θ] x 10 ⁻²		
4.0	-44.0	-30.1
7.4	-59.8	-62.8

図 : pH4.0, 7.4 と 9.0 の試料 (Blue) 、それに 3 倍量の bis-ANS を加えた後(Red)の 222nm の CD 強度

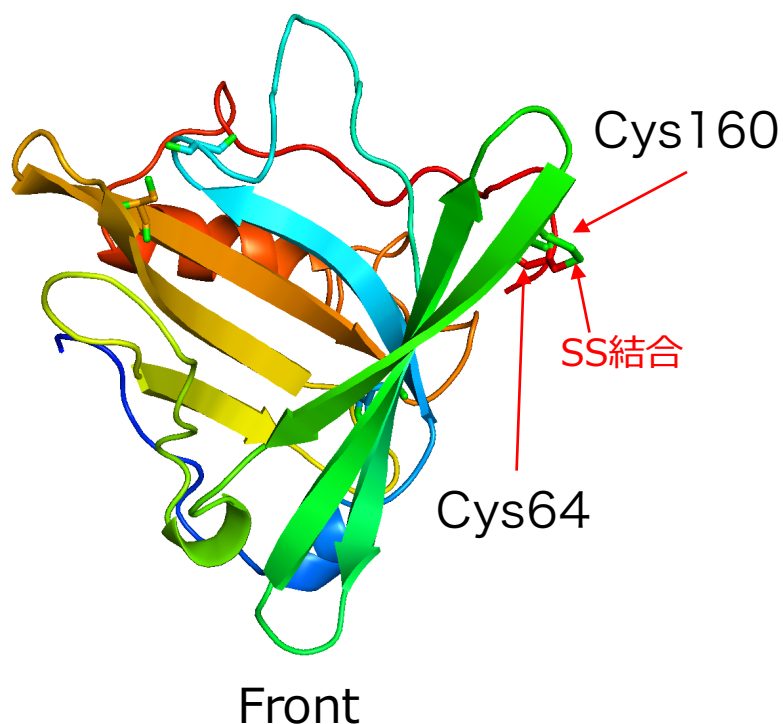
Cp-Lip1 の周辺の環境が pH6.0 と pH4.0 に変化する時が二次構造も変化する。pH6.0 から pH4.0 の Cp-Lip1 の結合親和性が減少した。pH4.0 の Cp-Lip1 の二次構造は結合によって、二次構造はほぼ変性状態になったことがわかった。

4 . 結論と考察

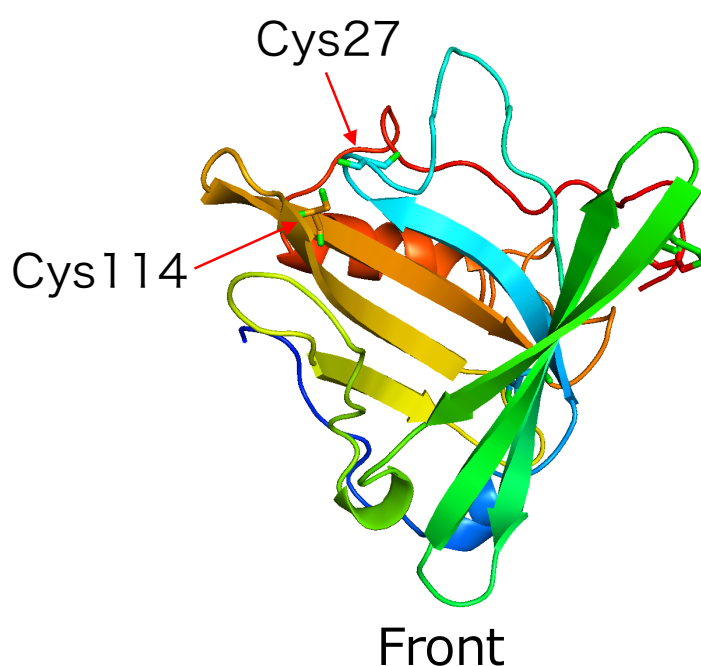
Cp-Lip1タンパク質の発現・精製系を確立した。MALDI-TOFMSの結果により、高純度なCp-Lip1タンパク質を精製できた。精製Cp-Lip1はリポカリン類タンパク質と類似の構造で取っている。また、蛍光色素と匂い分子結合能を持つことが分かった。我々は大腸菌を用いてリポカリン類タンパク質の立体構造と匂い分子結合能を持つCp-Lip1タンパク質を得ることができた。

Cp-Lip1が持つ4つのシステイン残基のうち、Cys64とCys160が1つの分子内SS結合がしている。Cys27とCys114は分子内SS結合を形成していない。分子内SS結合がなくなっても、構造と蛍光分子との結合が大きい変化が見られなかった。SS結合の有無によって、Trp由来の蛍光が変化した。一方、Cys27とCys114の変異によって、二次構造が変化し、蛍光色素bis-ANSとの解離定数Kdが増大した。

下の図は、Cys64とCys160の位置とSS結合の位置を示している。



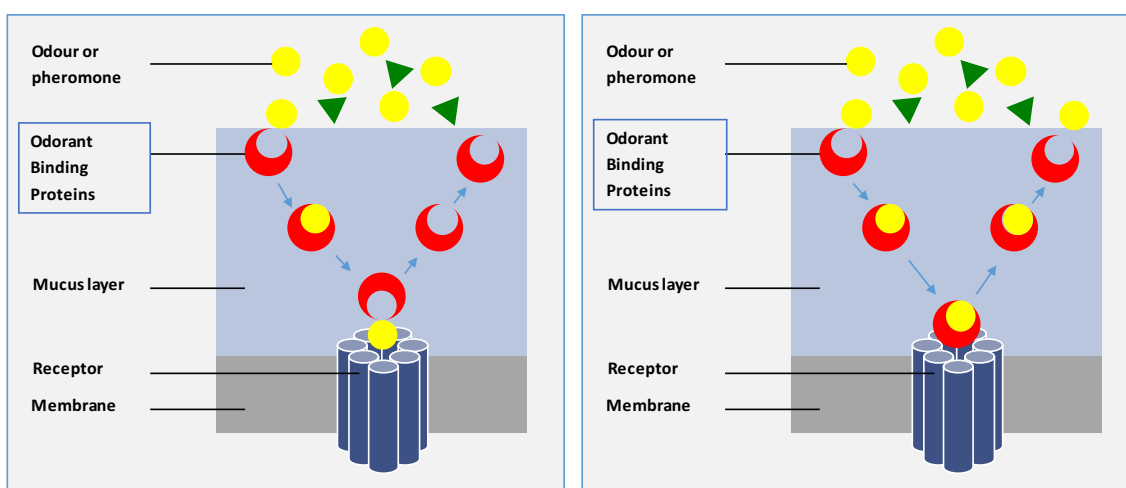
SS 結合はタンパク質の β バレル構造の外側にあるので、なくなっても二次構造に大きな変化がなかったのだろうと考えられる。結合ポケットの Trp の周辺の環境は変化した。これは、SS 結合がなくなったら、Trp 残基の周辺の環境が何らかの影響で変わると考えられる。しかし、SS 結合なくなっても、蛍光色素 bis-ANS との解離定数 K_d が変化しないので、機能に影響しないと考えられる。つまり、SS 結合の有無によって、構造の変化があるが、結合には影響しないと考えられる。



一方、こちらの図に示しているようにCys27とCys114が結合ポケットの入り口に存在しています。Cys27とCys114への変異導入によって、二次構造の変化がありました。しかし、結合ポケットのTrpの周辺の環境に影響がないと考えられます。また、蛍光色素 bis-ANS との解離定数 K_d が増大したことから、bis-ANS との結合親和性が減少し、結合に影響していると考えられます。

Cp-Lip1の周辺の環境がpH6.0とpH4.0に変化する時が二次構造も変化する。pH6.0からpH4.0のCp-Lip1の結合親和性が減少した。pH4.0のCp-Lip1の二次構造は結合によって、さらに変化した。

今までの研究では、匂い分子結合タンパク質による匂い分子運搬は二つ仮説がある。一つは、OBPタンパク質が匂い分子と結合し、粘液層を通過して、嗅覚受容体まで運んで、膜表面に到達し、匂い分子を放出し、匂い分子と嗅覚受容体を結合する。もう一つの仮説は、匂い分子と結合しているまま、嗅覚受容体と反応する。



図：匂い分子結合タンパク質による匂い分子運搬の二つ仮説の模式図

ところで、他の研究では膜表面の負電基が高密度であると、局所的な酸性pH環境になる、表面pHは1.6–2.4単位低いことが示されている、また同じリポカリン類タンパク質RBP (retinol binding protein) がpH4.5までになるとリガンドを放出すると指摘している。

今回、私の研究では、pH7.4からpH6.0のCp-Lip1の結合親和性が増大し、pH6.0からpH4.0のCp-Lip1の結合親和性が減少した。さらに、pH4.0のCp-Lip1の二次構造は結合によって、さらに変化したことから、同じくCp-Lip1タンパク質は周辺pHは酸性に変化すると匂い分子の結合と放出を調整していると考えられる。

SS結合の有無によって、構造の変化があるが、結合に影響しない。リポカリン類タンパク質は一般的に分子内に1つのSS結合を形成しており、この2つのシステイン残基は

よく保存されている。しかし、SS結合がなくなっても、蛍光色素や匂い分子との結合に影響しない。では、匂い分子の受容に果たす役割は何？

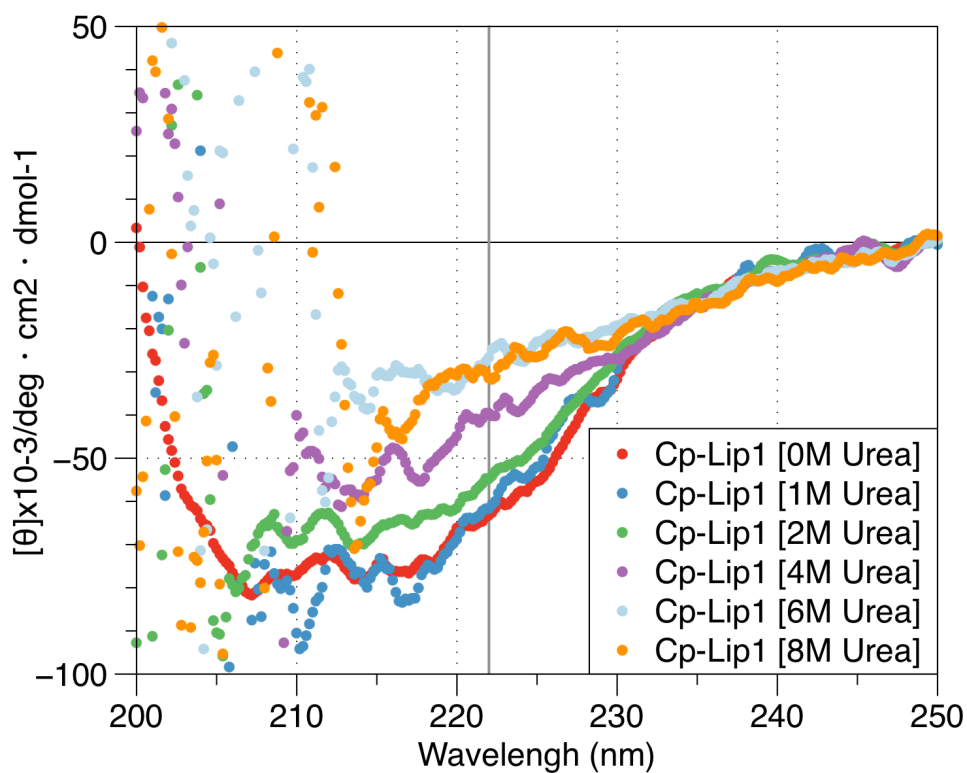
また、Cp-Lip1タンパク質は周辺のpHは6.0になると匂い分子との結合が強くなり、4.0になると弱くなって匂い分子との結合親和性が減少し、匂い分子の結合と放出を調整していると考えられる。では、SS結合はpH変化によって匂い分子の結合や放出に関与する？「SS結合はpH変化によって匂い分子との結合や構造変化」、また「酸性pHのCp-Lip1の匂い分子との結合結合や構造変化」が今後の課題になり、詳しく調べたいと考えている。

5 . 付録

Cp-Lip1 の変性剤(Urea)濃度依存

Cp-Lip1 の変性剤(Urea)濃度依存的な二次構造の変化

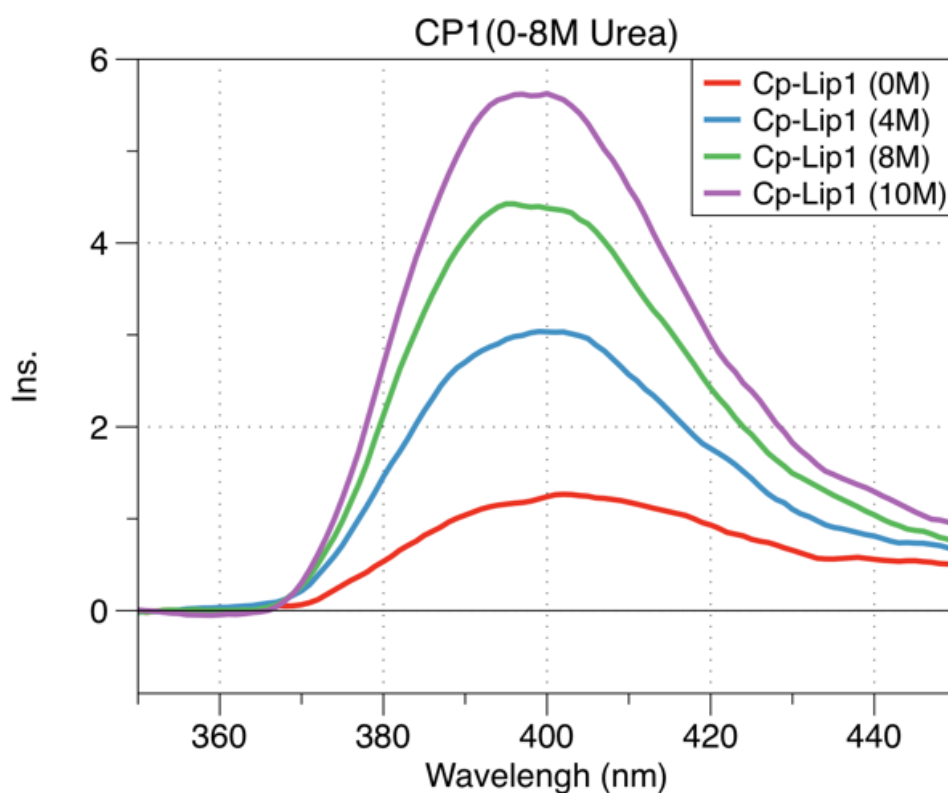
Urea濃度が0 Mから8 Mまでの溶液中のCp-Lip1のCDスペクトルを測定した。結果は下の図に示している。Ureaの濃度によって、Cp-Lip1の222 nmのCDスペクトルの信号強度の変化した。Urea濃度が6 M、8 MからCD信号がほぼ一定値になり、変性状態と思われるCD強度は-26から30までになった。



図：濃度 Urea 溶液中での Cp-Lip1 の CD 信号強度変化

Cp-Lip1 の変性剤(Urea)濃度変化による Trp 由来の蛍光の変化

Urea 濃度が 0 M から 10 M までの溶液中の Cp-Lip1 の Trp 由来の蛍光を測定した。結果は下の図に示している。Urea の濃度によって、Cp-Lip1 の Trp 由来の蛍光が増大した。



図：Urea 濃度によって、Cp-Lip1 の Trp 由来と思われる蛍光変化。

また、Urea の濃度によって、Trp 由来の蛍光強度と蛍光波長の変化は下の図に示している。Urea の濃度によって、Trp 由来の蛍光強度が 1.27 から 5.62 まで変化し、波長も 393 nm から 400 nm まで、長波長側にシフトした。この結果から、Urea の濃度によって Trp の周辺が親水的な環境になったことが考えられる。

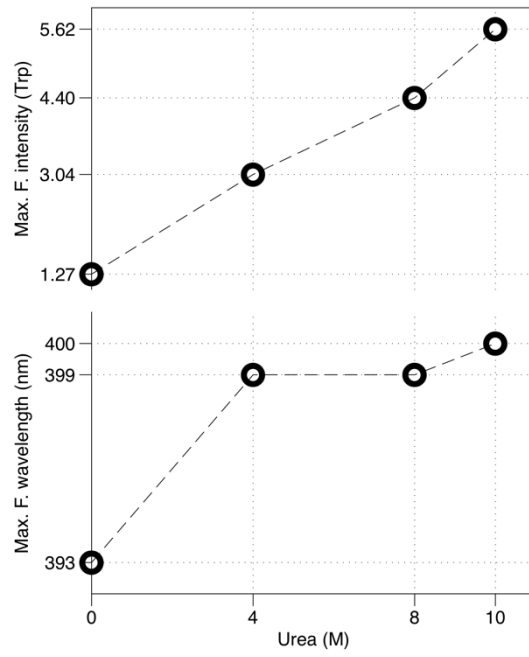


図 Urea 濃度によって、Cp-Lip1 の Trp 由来と思われる蛍光強度変化値と波長変化値

Cp-Lip1 の変性剤(Urea)濃度変化による bis-ANS との結合変化

Urea 濃度が 0 M から 8 M までの溶液中の Cp-Lip1 と蛍光色素 bis-ANS との結合変化を測定した。結果は下の図に示している。Urea の濃度によって、蛍光色素 bis-ANS との結合による蛍光強度が減少し、6 と 8M になると結合しなくなることが分かった。

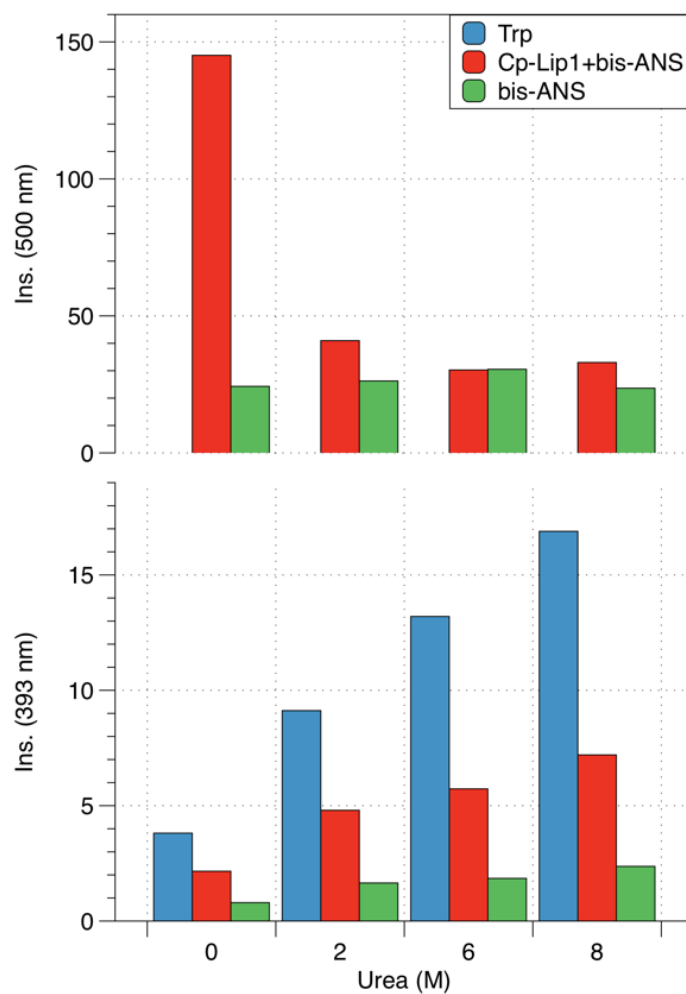


図 Urea 濃度によって、Cp-Lip1 の Trp 由来の蛍光強度変化と蛍光色素 bis-ANS 結合変化

Cp-Lip2 タンパク質発現・精製系の確立

発現システムの構築

以前に構築した pET28a(+)-Cp-Lip2 発現ベクターが発現できなかったため、新たな発現ベクターを構築した。pET28(+)-から pET52b(+)-に変換し、Cp-Lip2 タンパク質の N 末端と C 末端に His タグを付けた。また、C 末端のみにも構築した。以下の図に示すように実験を行なった。

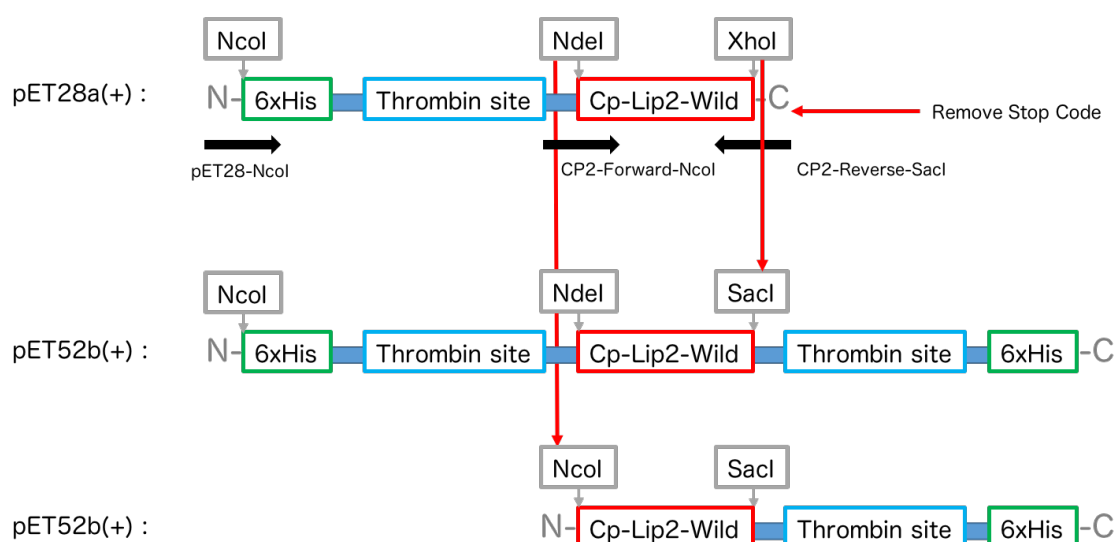


図 Cp-Lip2 タンパク質が pET28(+)-から pET52b(+)-に変換

プライマー：

pET28-NcoI : 5' - TA **CCA TGG** GCA GCA GCC ATC ATC -3'

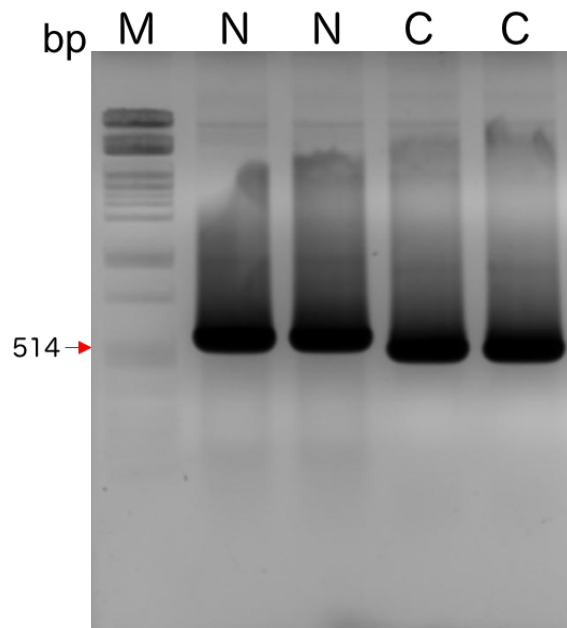
NcoI

CP2-Forward-NcoI : 5' - GC **CCA TGG** ATA TGG ATG TCC CAG TGG TG -3'

NcoI

CP2-Reverse-SacI : 5' - GC **GAG CTC** AAA GGT TCC AGG TAC -3'

SacI



図：Cp-Lip2のPCR増幅結果（2%）。M: マーカー; N、C：増幅断片

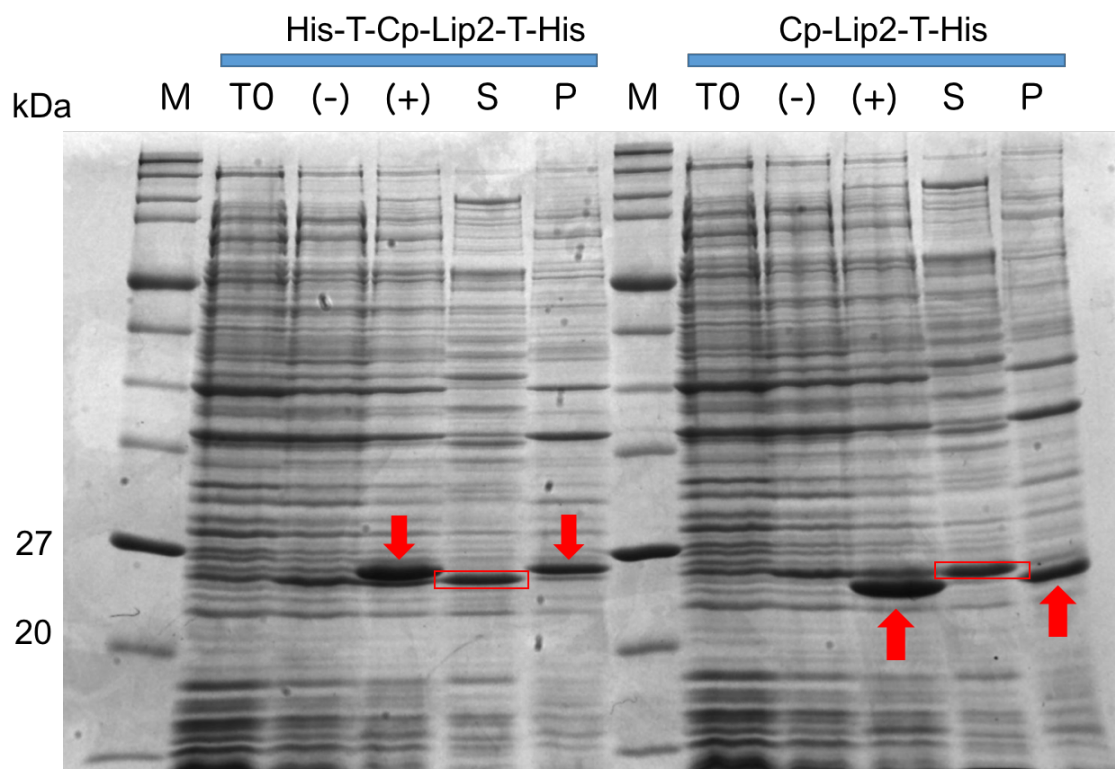
結果は右の図に示しているように、増幅した DNA 配列は 514bp のところにバンドが見られた。増幅されたい DNA 配列のサイズも同じ 514bp である。この結果から、目的配列を増幅できた。

増幅した DNA 断片を回収して pMD19 ベクターへクローニングした。プラスミドを取って DNA 配列を決定し、得られたプラスミドを酵素で切断し、同時に pET タンパク質高発現量ベクター pET52b(+) も同じ酵素で切断し、最後にライゲーションしてプラスミドを取って DNA 配列を確認した。DNA 配列を確認した結果は下の図に示しているように、Cp-Lip2 遺伝子は pET52b(+) ベクターに導入したことをできた。



Cp-Lip2 の発現チェック

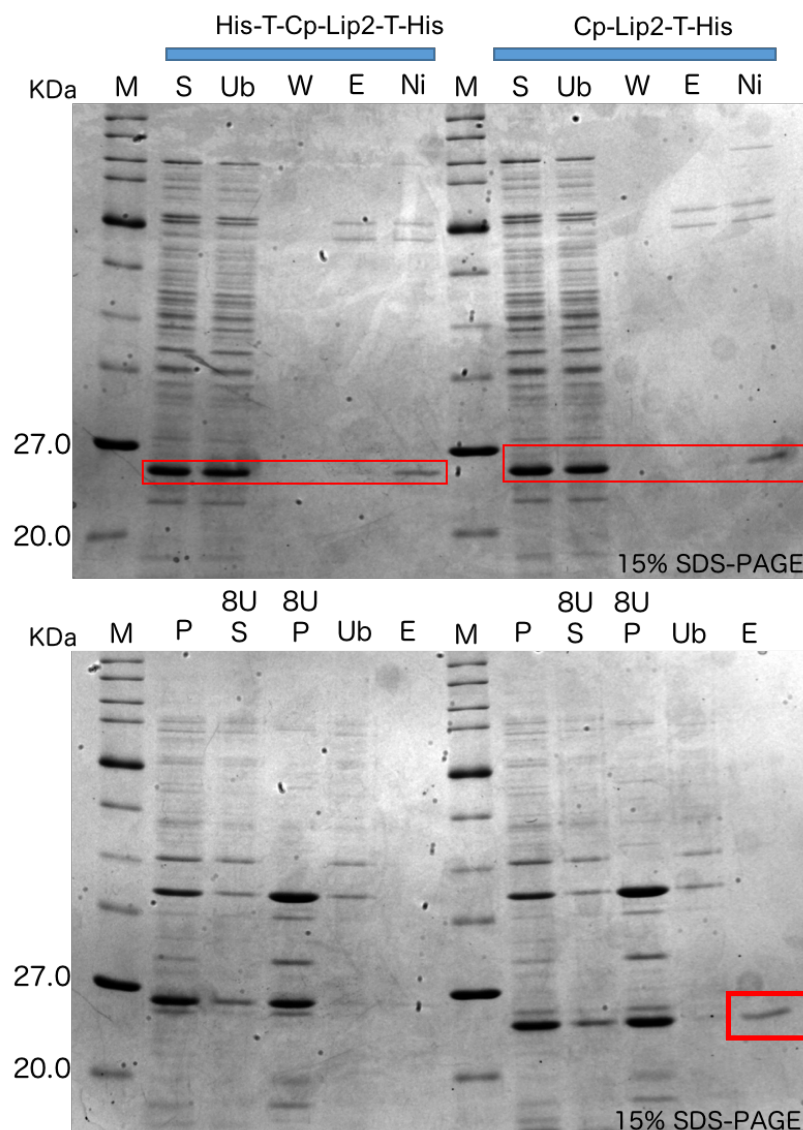
構築した発現精製ベクターを大腸菌で発現し、SDS-PAGEで解析した結果は下の図に示している。Mがマーカを示しており、T0が発現誘導する前の菌のすべてのタンパク質で、-が発現誘導しない16h培養したの菌のタンパク質で、+が発現誘導した後16h培養した菌のタンパク質である。発現誘導した後、分子量20-27kDaの間に新たなバンドが見られた。目的タンパク質を発現されたと考える。次に菌を破碎し、遠心分離で可溶性画分(S)と不溶性画分(P)に分け、発現したCp-Lip2は不溶性画分に存在している。



図：Cp-Lip2 の発現過程の SDS-PAGE (15%)。M: マーカー; T0: OD600=0.6 時の大腸菌全タンパク質; (-): IPTG 未添加 (16 時間); (+): IPTG 添加後 (16 時間); sup: 可溶性画分; ppt: 不溶性画分。

Cp-Lip2 の精製チェック

発現した Cp-Lip2 は可溶性画分に存在している可能性があるため、可溶性画分を Ni-charged Resin で精製した。結果は図上に示した。また、発現した Cp-Lip2 は不溶性画分に存在しているため、Urea を用いて変性させ、Ni-charged Resin にかき、Imidazole で溶出、精製した。結果は図下に示した。結果から、C 末端に His タグがつけてる Cp-Lip2 が不溶性画分から精製できると分かった。



図：Cp-Lip2 の Ni カラム精製過程の SDS-PAGE (15%)。M: マーカー; S: 可溶性画分; P: 不溶性画分; Ub: Ni 担体に未結合画分; W: 洗浄画分; E: 洗浄溶出画分. Ni:未溶出 Ni 担体

タンパク質の構造解析：X線散乱測定

リポカリン類タンパク質の立体構造と匂い分子結合能を持つ高純度なCp-Lip1タンパク質を得ることができたため、X線散乱測定を用いてタンパク質の溶液内の構造を調べた。我々の研究室では、Cp-Lip1以外にアリ (*Camponotus japonicus*) から発現されたCSP (Chemosensory protein) タンパク質についても研究を行なっている。二種類のタンパク質は同じ働きをしているが、Cp-Lip1が主に β -ストランドで構成され、CjapCSPでは α -ヘリクスで構成されている。群馬大学の平井先生と共にX線散乱測定を用いて二種類のタンパク質の構造解析しながら、タンパク質の二次構造がX線散乱測定で解析できるかどうかにも同時に進めている。Cp-Lip1については、Urea変性、pH変化とシステイン変異体などの実験を行なった。X線散乱測定は国内の放射光施設KEK/PF、Spring-8で行なった。実験結果はまだ解析している。

タンパク質の構造と機能解析：熱測定

SS 結合の有無によって、蛍光色素 bis-ANS との結合には影響しない結果が得られたが、SS 結合を形成する二つのシステインがよく保存されている。そして、このよく保存する SS 結合が具体的な作用が調べるため、DSC（示差走査熱量測定）を用いて、野生型とシステイン変異体の熱量変化を調べた。北海道大学の創薬センターの DSC を用いて測定した。現段階では、まだ実験条件を検討している。

参考文献

- 1) 高木、渋谷達明：「匂いの科学」、朝倉書店（1989）
- 2) 渋谷達明、外池光雄：「においの受容」、フレグランスジャーナル社(2002) .
- 3) Pelosi, Paolo, et al. "Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins." *Applied microbiology and biotechnology* 98.1 (2014): 61-70.
- 4) Jones FM, Pfeiffer CJ, and Asahima M: Ultrastructure of the olfactory organ of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Ann Anat* 176, 269-275 (1994)
- 5) 岩佐達郎, 満都拉, 浦野和雄, 高橋 司, 澤田 研, 岡野恵子, 中村 整: イモリ嗅上皮ポーマン腺に発現するリポカリンファミリータンパク質. *味と匂誌* 15, 211-220 (2008)
- 6) Prats et al., 1986; Stegmann et al., 1989; McLaughlin, 1989; van der Goot, F. G., Gonzales-Manas, J. M., Lakey, J. H., & Pattus, F. (1991) *Nature* 354, 408-410.
- 7) Bychkova, Valentina E., et al. "Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH." *Biochemistry* 31.33 (1992): 7566-7571.
- 8) Greenfield, Norma J., and Gerald D. Fasman. "Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation." *Biochemistry* 8.10 (1969): 4108-4116.
- 9) 岩佐達郎, 満都拉, 高橋司, 高島大貴, 澤田研: アカハライモリ嗅上皮のリポカリンタンパク質, Cp-Lip2. *味と匂誌* 15, 587-590 (2008)
- 10) Chen, Yee-Hsiung, and Jen Tsi Yang. "A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism." *Biochemical and biophysical research communications* 44.6 (1971): 1285-1291.
- 11) Chen, Yee-Hsiung, Jen Tsi Yang, and Hugo M. Martinez. "Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion." *Biochemistry* 11.22 (1972): 4120-4131.
- 12) 甲斐義幸. 単一-Trp残基蛍光法と光合成蛋白質の内部局所環境. 中央大学理工学研究所 論文集, 55-61(2000).

- 13) Liu J, Guo C, Yao Y, & Lin D: Effects of removing a conserved disulfide bond on the biological characteristics of rat lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochimie*, 90(11), 1637-1646. (2008).
- 14) Breustedt, Daniel A., Dorian L. Schönfeld, and Arne Skerra. "Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1764.2 (2006): 161-173.

謝 辞

本論文は著者が室蘭工業大学 大学院工学研究科 工学専攻 博士後期課程に在学中の研究成果をまとめたものです。

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。

本学 生体分子材料研究室 澤田研准教授から研究指導、貴重なご助言を頂きまして、ありがとうございました。

群馬大学 学術研究院 平井光博教授にはX線散乱測定解析や測定方法を教えて頂きました。また、実験手法などに関して、多くのご助言をいただきました。心から感謝いたします。

インターンシップの間に電気通信大学 大学院 情報理工学研究科 先進理工学専攻 中村整教授と北海道大学 生物情報解析科学研究室 菊川峰志講師には大変お世話になっておりました。実験手法などに関して、多くのご助言をいただきました。心から感謝いたします。

岩佐研メンバーのみなさん、澤田研メンバーのみなさんそのほかたくさんの方々からアドバイスや励ましのお言葉をいただきました。みなさんに大変お世話になりました。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学生活に助けたこと、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、田澤早智子様、日栄様から始めたたくさんの方々の友人たち、留学生同士に心より感謝致します。

外国人留学生として「研究留学生日本政府（文部科学省）奨学金」を付与された日本

文部科学省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。

最後に長い留学生生活を応援してくれたご両親や友たちに、深く感謝の意を表します。

研究業績

論文（査読付き）

1. **李興**, 温都日格、福田永、澤田研、岩佐達郎: イモリ Cp-Lip1 のリガンド結合と構造変化の解析. **味と匂誌**, 21 (3), 415-418 (2014).
2. 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. **味と匂誌**, 21 (3), 419-422 (2014).
3. **李興**, 温都日格、澤田研、岩佐達郎: 匂い分子結合タンパク質のリガンド結合特性におよぼす立体構造ゆらぎの効果. **味と匂誌**, 22 (3), 423-424 (2015).
4. 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「科学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性の比較. **味と匂誌**, 22 (3), 425-428 (2015).

国際学会報告

1. **Xing Li**, Wendurige, Iwasa Tatsuo: Study on the Perireceptor Protein (PRP) as the Sensor Element of a Bioinspired Electricnose, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research, 2014, pp61-62, Muroran, Japan (2014年3月)
2. **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 (2015年8月)
3. Wendurige, **Xing Li**, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: The structural-function relationships of chemosensory protein found in the sensillum of *Camponoyus japonicus*., Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research, 2016, pp70-71, Muroran, Japan (2016年3月)
4. Wendurige, **Xing Li**, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: Structural-function relationship of two soluble proteins involved in chemoreception., International Symposium on Olfaction and Taste, 2016, pp63, Yokohama, Japan (2016年6月)
5. **Xing Li**, Wendurige, Iwasa Tatsuo: pH dependence of a ligand-binding property of the new odorant binding protein, Cp-Lip1.; Environmental Sensing and Animal Behavior, 2016, pp38, Tokyo, Japan (2016年6月)

6. **Xing Li**, Wendurige, Iwasa Tatsuo: Structural 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, 2016, pp104-105, Muroran, Japan (2016 年 9 月)
7. Xiong Geng, **Xing Li**, Chaoluomeng, Iwasa Tatsuo: The study on the binding of small chemicals to odorant binding protein (Cp-Lip2); The 7th Forum on studies of Environmental and Public Health Issues in Asian Mega-cities, 2016, pp108-109, Muroran, Japan (2016 年 9 月)
8. 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, 2016, pp112-113, Muroran, Japan (2016 年 9 月)

国内学会報告

1. **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 (2014 年 9 月)
2. **李興**, 温都日格、福田永、澤田研、岩佐達郎: イモリ Cp-Lip1 のリガンド結合と構造変化の解析. 日本味と匂学会第 48 回大会、静岡、日本 (2014 年 10 月)
3. **李興**, 温都日格、澤田研、岩佐達郎: 匂い分子結合タンパク質のリガンド結合特性におよぼす立体構造ゆらぎの効果. 日本味と匂学会第 49 回大会、岐阜、日本 (2015 年 10 月)
4. 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「科学感覚タンパク質」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、岐阜、日本 (2015 年 10 月)
5. **Xing Li**, Wendurige, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, Tatsuo Iwasa: Structural and functional studies on two kinds of perireceptor proteins (PRPs) working in chemoreception., The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 3Pos004, Kanazawa, Japan (2015 年 9 月)

賞 罰

論文賞。日本味と匂学会第 48 回大会、静岡、日本 (2014 年 10 月)

李興, 大塚淳哉, 澤田研, 福田永, 冨田芳宏, 岩佐達郎: イモリ嗅上皮に発現する「匂い分子結合タンパク質」のシステイン残基の働き. **味と匂誌**, 20(3), 351-354(2013).

論文賞。日本味と匂学会第 49 回大会、岐阜、日本 (2015 年 10 月)

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「科学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性の比較. **味と匂誌**, 22(3), 425-428(2015).

室蘭工業大学外国人留学生として「研究留学生日本政府（文部科学省）奨学金」を付与された。（2014年4月）