

## 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: Japanese
	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

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い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はベータ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か分かった。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 アーで透析し、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  $\beta$ -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  $\beta$ -strand-rich secondary structure and can bind fluorescent probe.

Cp-Lip1 has four cysteine residues. By SDS-PAGE with or without 2mercaptoethanol (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 (Kd) 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 Kd 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 pH7.4 did not. The Kd 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1	1
	1-4. Cp-Lip1タンパク質・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	L <b>2</b>
	1-5.研究目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ <b>1</b>	13
2	、実験材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1	15
	2-1. Cp-Lip1タンパク質発現・精製系の確立・・・・・・・・・・・・・1	16
	2-1-1.発現システムの構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	16
	2-1-2 Cp-Lip1の発現・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	8
	2-1-3 Cp-Lip1の精製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1	19
	2-1-4 . Cp-Lip1の定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2	24
	2-2. MALDI-TOFMSによりCp-Lip1分子量の確定・・・・・・・・・・ 2	25
	2-3 タンパク質の二次構造解析: CDスペクトル測定・・・・・・・・・ 2	26
	2-4.タンパク質とリガンドの結合特性:蛍光測定・・・・・・・・・・2	27
	2-5.システイン残基一残基置換体作製・・・・・・・・・・・・・・・・ 2	28
	2-6.還元剤有無によりSDS-PAGE・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3	32
	2-7.測定サンプルの調製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3	32
3	. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	33
	3-1.発現精製したCp-Lip1の構造と機能・・・・・・・・・・・・・・・・・3	34
	3-1-1、発現システムの構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3	35
	3-1-2 . Cp-Lip1の発現・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3	36
	3-1-3 Cp-Lip1の精製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3	37
	3-1-4 Cp-Lip1分子量の確定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3	39
	3-1-5 Cp-Lip1の二次構造・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	10
	3-1-6.リガンドとの結合特性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	12

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・・・・・ <b>52</b>
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
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。<sup>1)</sup>

ここで、空気中を漂ってきて嗅覚を刺激するものは「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。<sup>2)</sup> 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って脳に伝わり、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。

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、嗅細胞の電気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る。一般的、 匂い分子は疎水性分子であり、親水性の粘液を通っ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してい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 粘液層を通って嗅覚受容体まで運んであげると思われていますが、詳しい仕組みはまた 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、輸送や放出に関している 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。<sup>3)</sup>



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<sup>4)</sup>。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<sup>50</sup>。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してい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

13

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<sup>6)</sup>。また同じリポ カリン類タンパク質RBP (Retinol Binding Protien)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<sup>7)</sup>。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、Ndel と Xhol 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-Ndel : 5' - GC CAT ATG ATG GAG ATT CCA GTG ATG AG -3'

Ndel

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

Xhol



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Xhol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。

#### pET-28a(+) sequence landmarks 370-386 T7 promoter T7 transcription start 369 His•Tag coding sequence 270-287 T7•Tag coding sequence 207-239 Multiple cloning sites (BamH I - Xho I) 158-203 His•Tag coding sequence 140-157 26-72 T7 terminator lacI coding sequence 773-1852 pBR322 origin 3286 Kan coding sequence 3995-4807 f1 origin 4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



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て 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で約30分間冷却する。(Sample:TO)

(5).10 mL 菌液に100 mM IPTGか 100 µLを入れ、最終濃度か 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℃て 一晩培養する。

(7). Sample: T0, (-), (+)を1 mLす 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). 一晩培養した菌を5000g、5min、4C°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、4C°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) で破砕する(4000rpm、45sec、Stop 45sec、10 times)、

破砕した菌液を6000rpm、2min、4C°で遠心し、ガラスビーズを落とす。

(13). 破砕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。

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。
- 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で約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℃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、4C°で遠心し、集菌する。
- 8) 500 mLのPBSバッファーで懸濁する。
- 9) また、5000g、15min、4C°で遠心し、集菌する。
- 10) 250 mLのPBSバッファーで懸濁する。また、5000g、15min、4C°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-30C°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) で破砕する(4000rpm、45sec、Stop 45sec、10
   times)、破砕した菌液を6000rpm、2min、4C°で遠心し、ガラスビーズを落とす。
- 13) 破砕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を入り、Ni担体が落ちるまで放置する。
- 4) 上清を捨て、20 mL可溶性画分を入り、 振とう培養器にて振とうし(100 rpm)、
   4°Cて 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 thoughを回収する(Sample:Ub)、20 mL Binding Bufferを入り、もう一回Flow thoughを回収する(Sample:Ub)。
- 7) 20 mL Wash Bufferを入り、カラムを清浄する。6回くらい清浄する(Sample:W)。
- 8) 5 mL Wash Bufferを入り、また100U Thrombinを加え、振とう培養器にて振とうし (100 rpm)、24°Cて 20- 30時間結合させる。
- 9) Flow thoughを回収する(Sample:TF)、10 mL Wash Bufferを入り、もう一回Flow thoughを回収する(Sample:TF)。二回を行う。
- 10) 10 mL Elution Bufferを入り、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、ビシンコニン酸(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。

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

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 25µL用意。(標準偏差を求めるため3回分)

- 2. Reagent A:B=50:1で混ぜ合わせたWA溶液を200µLづつ加える。
- 3. 37C°、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 V0 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 V0 は、どのイ オンに対しても一定だので、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-TPFMS(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。



#### 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<sup>®</sup>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QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent Techologies)を用いて実験を行った。QuickChange法の原理は図に示す。



#### 1. Mutant Strand Synthesis Perform thermal cycling to:

- Denature DNA template
- Anneal mutagenic primers containing desired mutation
- Extend and incorporate primers with our exclusive *Pfu*-based DNA Polymerase Blend
- Total reaction time: 1 hour\*

#### 2. Faster Dpn I Digestion of Template

- Digest parental methylated and hemimethylated DNA with NEW Dpn I enzyme
- Total reaction time: 5 minutes

#### 3. Transformation

- Transform mutated molecules into competent cells for nick repair
- Total reaction time: 1.5 hours

\* Based on a 5-kb plasmid; excludes ramping time.

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 :

### 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

- $5 \ \mu l \ of \ 10 \times reaction \ buffer$
- 3 μl (10–100 ng) of dsDNA template (Cp-Lip1,-Lip2-Wild)
- 2 µl (125 ng) of oligonucleotide primer #1
- $2 \mu l$  (125 ng) of oligonucleotide primer #2
- $1\,\mu l$  of dNTP mix
- $1.5 \ \mu l \ of \ QuikSolution \ reagent$
- ddH2O to a final volume of 50  $\mu l$

Add 1  $\mu$ 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 µl 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シークエ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℃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 MUrea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、NdelとXhol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のところにバントが見られた。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 Xhol 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。

			Thus we him site	Μ	
Cp-Lip1	1		Inromoin site	ATC GAGATTCCAGTGATGAGCAACTTTGACCCTCAGAAGATTCTAGGGA 4	49
27-pETUp_B01	1	ATCATCATCAC	CTGGTGCCGCGCGGCAGC	ATATCATCGAGATTCCAGTGATGAGCAACTTTGACCCTCAGAAGATTCTAGGGA	93
re-27-pETUp_B02	1	CATCATCATCATCACAGCAGCGGC	CTGGTGCCGCGCGGCAGC	ATATCATCGAGATTCCAGTGATGAGCAACTTTGACCCTCAGAAGATTCTAGGGA 1	100
Cp-Lip1	50	AGTGGTATGCTGTTGCAGTGGCATCAA	ACTGTCCAGAATTTGTTCA	GATGAAGTCAGTGATGAAGATGCCCATCACCATATTCAGTGTACTTGACGACGG 1	149
27-pETUp_B01	94	AGTGGTATGCTGTTGCAGTGGCATCAA	ACTGTCCAGAATTTGTTCA	GATGAAGTCAGTGATGAAGATGCCCATCACCATATTCAGTGTACTTGACGACGG 1	193
re-27-pETUp_B02	101	AGTGGTATGCTGTTGCAGTGGCATCAA	ACTGTCCAGAATTTGTTCA	GATGAAGTCAGTGATGAAGATGCCCATCACCATATTCAGTGTACTTGACGACGG 2	200
Cn Lin1	150	CCA CONCURA INCOME COCA CA CCCC INCOCA	ACCA COMMON CONTROL AND	<b>7.007 000 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 </b>	240
27-DETUD B01	194	GGACCIGIAIGCIGCCACAGGCGICGC	AGGACCTICAGGATGCATG		249
re-27-nETUn B02	201	GACCTGTATGCTGCCACAGGCGTCGC	AGGACCTTCAGGATGCATG	ACCATCCATATCCTATACCATACACCCAAACACCGTCAATACACTCAAAGTCTT	300
10 L/ phiop_boz	201				
Cp-Lip1	250	CTCGACAACAGTGACATCCGATTTGTT	GATGGGGACTTTGATCATA	GTGTCTTGGAGTACACCCAAAATGTCTCAGAAAGCGGTGATGCCTGCAAGATGG 3	349
27-pETUp B01	294	CTCGACAACAGTGACATCCGATTTGTT	GATGGGGACTTTGATCATA	GTGTCTTGGAGTACACCCAAAATGTCTCAGAAAGCGGTGATGCCTGCAAGATGG 3	393
re-27-pETUp_B02	301	CTCGACAACAGTGACATCCGATTTGTT	GATGGGGACTTTGATCATA	GTGTCTTGGAGTACACCCAAAATGTCTCAGAAAGCGGTGATGCCTGCAAGATGG 4	400
Cp-Lip1	350	TGAAACTGTTAGCCAGACAGCCAGAAG	TCGCTGAAATCCCTGCTTT	AGCCATAGAACACTTCAAGATGCTGATACCGGTAGTTGGGCTATCAATGGAAGA 4	449
27-pETUp_B01	394	TGAAACTGTTAGCCAGACAGCCAGAAG	STCGCTGAAATC	4	431
re-27-pETUp_B02	401	I'GAAACTGTTAGCCAGACAGCCAGAAG	TCGCTGAAATCCCTGCTTT	AGCCATAGAACACTTCAAGATGCTGATACCGGTAGTTGGGCTATCAATGGAAGA	500
Cn Linl	450	CC#CACACCCCCCCAACACACACA	CHCHCHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	TAC	100
27-DETUD B01	431	COTCACACCO GCCAAGAGACATCGA	CTGTGTCCC1994949111		120
re-27-pETID B02	501	CGTCACACCCTGCCAAGAGACATCGA	CTGTGTCCCTGGAGAGTTT	TACTTCGACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGA	600
TO D. PHIOP DOL	001	out an antitude of a standard and a standard and a standard	01010101001001010111		000


#### 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がマーカーを示しており、TOが発現誘導する前の菌のすべてのタンパ ク質で、一が発現誘導しない16h培養したの菌のタンパク質で、+が発現誘導した後16 h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。次に菌を破砕し、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 にかけ、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。



S Ub Ub W W TF TF TF E Μ F

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.



'AGE (15%) 。

製した結果は上の図に示した。 540 mM の時から溶出した。 540 mM の時から溶出した。



### 3-1-4. Cp-Lip1 分子量の確定

得られた精製タンパク質(0.5µg)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の位置に単一のピックが認めれらた。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 はどんな構造が取っているか、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。すべでのCD信号が以下の式を用いて、[θ]obs(楕円率)から[θ](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:

 $[\theta] = [\theta] obs / (I \cdot C)$ 

[θ]	:	平均残基モル楕円率	$[deg \cdot cm^2 / d mol]$
[θ]obs	:	楕円率	[deg]
Ι	:	セル長	[m]
С	:	残基モル濃度	[M]

\* [残基モル濃度] = [タンパク質のモル濃度]×[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 ほぼ一致しているので、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 っ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。10μMと 20μM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。<sup>14)</sup>



図3: 10 µMと20 µMCp-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 µM Cp-Lip1 の Trp 由来と思われる蛍光スペクトル(Red)、10 µM 蛍光色素 bis-ANS の蛍光スペクトル(Green)。10 µM Cp-Lip1 に 10 µM bis-ANS が加えた蛍光 スペクトル(Blue)、さらに、10 µM 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 結合があるがどうか、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℃ で一晩分子内 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 まで変化したが、 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に示した。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<sup>13)</sup>。



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したことが考えられる。



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<sup>13)</sup>、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。先のと同じく 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

SS結合	$[\theta] \times 10^{-2}$
+	-63.1
_	-51.3
—	-51.9
+	-41.6
+	-37.6
	SS結合 + - - + + +



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 µM 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kdを算出した。野生型のCp-Lip1がbis-ANSに対して解離定数kdは11.1µMで、C27Sは42.7µM、C64Sは30.7µM、C114Sは11.4µM、C160Sは11.4µM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 µM 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 ても、構造と蛍光分子との結合が大きの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。 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

рН	[θ] x 10 <sup>-2</sup>
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の周辺の環境を調べた。pH6.0のCp-Lip1のTrp蛍光がpH4.0とほぼ 同じ、pH7.4よりが弱かった。これはpH4.0とpH6.0のTrp周辺の環境が同じ、pH7.4の Trp周辺の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 の周辺の環境がpH6.0とpH4.0に変化する時、二次構造とTrp周辺の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 kd を算出した。pH7.4 の Cp-Lip1 が bis-ANS に対して解離定数 kd は 11.2µM で、pH6.0 は 1.7µM、pH4.0 は 5.4µM 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

	bis-ANS			
Cp-Lip1 pH	-	+		
	[θ] x 10 <sup>-2</sup>			
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 ても、構造と蛍光分子との結合が大きの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が、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 Kd 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Kd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、粘液層を通って、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 protien) 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6M、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0Mから8M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、新たの発 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-Ncol : 5' - TA <u>CCA TGG</u>GCA GCA GCC ATC ATC -3'

Ncol

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

Ncol

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

Sacl



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 のところにバントが 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。

		Ncol 6×F	lis 1	Chromhin	eite	Μ	
Cp-lip2	1					ATCGATGTC	9
N-CP2-pETUp	1	GATATACCATGGCAGCAGCCATCATCATC	ATCATCACAGCAGCGGCC	TEGTECCECECEC	AGCCATAT	ATGGATGTC	80
N-CP2-T7	1	GATATACCATGGCAGCAGCCATCATCATC	ATCATCACAGCAGCGGCC	Teeteccececec	AGCCATAT	ATGGATGTC	80
C-CP2-pETUp	1	GATATACCATGGAT				ATGGATGTC	23
C-CP2-T7	1	GATATACCATCCAT				ATGGATGTC	23
Cp-lip2	10	CCAGTGGTGAAAGACTTTGAAACTGACAAG	TTTCTAGGAAGGTGGTAC	TCAGTCGTGGTGGC	ATCAAACT	GCACTCAATT	89
N-CP2-pETUp	81	CCAGTGGTGAAAGACTTTGAAACTGACAAG	TTTCTAGGAAGGTGGTAC	TCAGTCGTGGTGGC	ATCAAACT	<b>SCACTCAATT</b>	160
N-CP2-T7	81	CCAGTGGTGAAAGACTTTGAAAACTGACAAG	TTCTAGGAAGGTGGTAC	TCAGTCGTGGTGGC	ATCAAACT	<b>SCACTCAATT</b>	160
C-CP2-pETUp	24	CCAGTGGTGAAAGACTTTGAAACTGACAAG	TTCTAGGAAGGTGGTAC	TCAGTCGTGGTGGC	ATCAAACT	SCACTCAATT	103
C-CP2-T7	24	CCAGTGGTGAAAGACTTTGAAACTGACAAG	TTCTAGGAAGGTGGTAC	TCAGTCGTGGTGGC	ATCAAACT	<b>SCACTCAATT</b>	103
Cp-lip2	90	TATGAAGATGAAATCGATGTTGAAGATGCC	IGTGAACGTGATCACCG(	GCATGAAAATGGGG	ACCTGGAT	STTCGCATGG	169
N-CP2-pETUp	161	TATGAAGATGAAATCGATGTTGAAGATGCC	IGTGAACGTGATCACCGC	GCATGAAAATGGGG	ACCTGGAT	<b>STTCGCATGG</b>	240
N-CP2-T7	161	TATGAAGATGAAATCGATGTTGAAGATGCC	IGTGAACGTGATCACCG(	GCATGAAAATGGGG	ACCTGGAT	<b>STTCGCATGG</b>	240
C-CP2-pETUp	104	TATGAAGATGAAATCGATGTTGAAGATGCC	IGTGAACGTGATCACCG(	GCATGAAAATGGGG	ACCTGGAT	STTCGCATGG	183
C-CP2-T7	104	TATGAAGATGAAATCGATGTTGAAGATGCC	IGTGAACGTGATCACCG(	GCATGAAAATGGGG	ACCTGGAT	<b>STTCGCATGG</b>	183
Cp-lip2	170	GCTTCCCGGGGAAAGATGGATGCATGAAGA	AGGACATGTACTACCAG	ATGATCAGCCCAGGC	CGCTACAC	<b>PCAAAGCACT</b>	249
N-CP2-pETUp	241	GCTTCCCGGGGAAAGATGGATGCATGAAGA	AGGACATGTACTACCAG	TGATCAGCCCAGGC	CGCTACAC	<b>FCAAAGCACT</b>	320
N-CP2-T7	241	GCTTCCCGGGGAAAGATGGATGCATGAAGA	AGGACATGTACTACCAG	ATGATCAGCCCAGGC	CGCTACAC	<b>FCAAAGCACT</b>	320
C-CP2-pETUp	184	GCTTCCCGGGGAAAGATGGATGCATGAAGA	AGGACATGTACTACCAG/	ATGATCAGCCCAGGC	CGCTACAC	<b>PCAAAGCACT</b>	263
C-CP2-T7	184	GCTTCCCGGGGAAAGATGGATGCATGAAGA	AGGACATGTACTACCAG/	TGATCAGCCCAGGC	CGCTACAC	<b>ICAAAGCACT</b>	263
	050						200
Cp-lip2	250	GCTACACAGACTGAAGTCCGGATTGTAGAG	ACAGACTATAAGCATAC	GCCATTGAGTACTC	ACGCAAGG	ICTCCGAATT	329
N-CP2-pETUp	321	GCTACACAGACTGAAGTCCGGATTGTAGAG	ACAGACTATAAGCATAC	GCCATTGAGTACTC	ACGCAAGG	ICTCCGAATT	400
N-CP2-T/	321	GCTACACAGACTGAAGTCCGGATTGTAGAG	ACAGACTATAAGCATACC	GCCATTGAGTACTC	ACGCAAGG	PCTCCGAATT	400
C-CP2-pETUp	264	GCTACACAGACTGAAGTCCGGATTGTAGAG	ACAGACTATAAGCATAC	GCCATTGAGTACTC	ACGCAAGG	ICTCCGAATT	343
C-CP2-T/	264	GCTACACAGACTGAAGTCCGGATTGTAGAG	ACAGACTATAAGCATACC	GCCATTGAGTACTC	ACGCAAGG	ICTCCGAATT	343
Cp-lip2	330	AGAAGTGGTCAGCGTCATGGTGAAACTGTA	IGCTAGAGAAGCTGATG	GCACCCTGGAGTCT	TTACTCTC	TCAAGATGT	409
N-CP2-pETUp	401	AGAAGTGGTCAGCGTCATGGTGAAACTGTA	IGCTAGAGAAGCTGATG	GCACCCTGGAGTCT	TTACTCTC	<b>PTCAAGATGT</b>	480
N-CP2-T7	401	AGAAGTGGTCAGCGTCATGGTGAAACTGTA	IGCTAGAGAAGCTGATG	GCACCCTGGAGTCT	TTACTCTC:	<b>PTCAAGATGT</b>	480
C-CP2-pETUp	344	AGAAGTGGTCAGCGTCATGGTGAAACTGTA	I'GCTAGAGAAGCTGATGT	GCACCCTGGAGTCT	TTACTCTC:	<b>PTCAAGATGT</b>	423
C-CP2-T7	344	AGAAGTGGTCAGCGTCATGGTGAAACTGTA	IGCTAGAGAAGCTGATG	GCACCCTGGAGTCT	TTACTCTC	<b>PTCAAGATGT</b>	423
Cp-lip2	410	TGATGGAAGGACTTGGACTCACAGAGGAAA	ACATGGTGGTTCTGCCT	CACGATGTGGAATGT	GTACCTGG/	AACCTTTTAG	489
N-CP2-pETUp	481	TGATGGAAGGACTTGGACTCACAGAGGAAA	ACATGGTGGTTCTGCCT	CACGATGTGGAATGT	GTACCTGG/	AACCTTIGAG	560
N-CP2-T7	481	TGATGGAAGGACTTGGACTCACAGAGGAAA	ACATGGTGGTTCTGCCT	CACGATGTGGAATGT	GTACCTGG/	AACCTTIGAG	560
C-CP2-pETUp	424	TGATGGAAGGACTTGGACTCACAGAGGAAA	ACATGGTGGTTCTGCCT	CACGATGTGGAATGT	GTACCTGG/	AACCTTIGAG	503
C-CP2-T7	424	TGATGGAAGGACTTGGACTCACAGAGGAAA	ACATGGTGGTTCTGCCTC	CACGATGTGGAATGT	GTACCTGG/	AACCTTIGAG	503
Cn-lin?	180					Sa	ICL
N-CP2-DETID	561	erdeereereed					57/
N_CP2_T7	561	CTOCCTCTCCTCCCC					574
C-CP2-DETTIN	504	Chocchedecaecc					517
С-СР2-т7	504	CTCCCTCTCGTCCC					517
0 012 17	004	proportion de la companya de la					511
	Sa	ci i hrombin site					
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 がマーカーを示しており、T0 が発現誘導する前の菌のすべてのタンパ ク質で、一が発現誘導しない 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。次に菌を破砕し、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ので、可溶性画分を Nicharged 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 にかけ、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-スドランドで構成され、 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).
- Pelosi, Paolo, et al. "Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins." *Applied microbiology and biotechnology* 98.1 (2014): 61-70.
- 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 皮ボーマン腺に発現するリポカリンファミリータンパク質. 味と句誌 15,211-220 (2008)
- 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.
- Bychkova, Valentina E., et al. "Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH." *Biochemistry* 31.33 (1992): 7566-7571.
- 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)
- 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.
- 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).

- 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).
- Breustedt, Daniel A., Dorian L. Schönfeld, and Arne Skerra. "Comparative ligandbinding analysis of ten human lipocalins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1764.2 (2006): 161-173.

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).
- 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

- 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)
- 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)
- 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 newt odorant binding protein, Cp-Lip1.; Environmental Sensing and Animal Behavior, 2016, pp38, Tokyo, Japan (2016 年 6 月)

- Xing Li, Wendurige, Iwasa Tatsuo: Structural changes of the newt odorant binding protein, Cp-Lip1, on ligand-binding.; The 7<sup>th</sup> Forum on studies of Environmental and Public Health Issues in Asian Mega-cities, 2016, pp104-105, Muroran, Japan (2016 年 9 月)
- Xiong Geng, Xing Li, Chaoluomeng, Iwasa Tatsuo: The study on the binding of small chemicals to odorant binding protein (Cp-Lip2); The 7<sup>th</sup> 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 7<sup>th</sup> 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)
- 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 53nd 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,夛田芳宏,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)