



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

氏名	リ シン 李 興
学位論文題目	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
論文審査委員	主査 教授 岩 佐 達 郎 教授 宮 永 滋 己 准教授 澤 田 研

論文内容の要旨

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する水溶性タンパク質である。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 -ストランド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残基周辺の環境に変化が見られることがわかった。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なった。一方、リガンド結合や立体構造については、ジスルフィド結合を作っていないCys27とCys114の変異の方が大きな変化を与えた。

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。

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 pH7.4 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.

論文審査結果の要旨

李興君の博士学位論文は「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」と題するもので、近年研究の進展が著しい「嗅覚」受容に関与するとされるリポカリン類タンパク質の生物物理学的性質、特に分子内ジスルフィド結合と pH 変化に伴う構造と機能の相関を研究している。

匂い分子は嗅細胞に存在する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) が粘液層に存在していることが知られていて、両生類のアカハライモリでも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で、 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、李興君は 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。

まず、Cp-lip1 タンパク質の大量発現系を構築し、本来の二次構造を有し、蛍光色素結合能を持つ Cp-Lip1 を得ることに成功した。Cp-Lip1 は 4 つのシステイン残基を持つが、Cp-Lip1 の分子内のジスルフィド結合は 1 本であることを明らかにした。分子内ジスルフィド結合を還元剤によって切断し、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 残基周辺の環境に変化が見られることを明らかにした。次に、システインの変異体を作成し、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。Cp-Lip1 の周辺 pH との関連性については、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ている。これらの結果から、Cp-Lip1 タンパク質が周辺の 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いうモデルを提唱した。

以上の成果はこの分野の進展に寄与する重要な知見を与えるもので、本学位論文は博士（工学）の学位に値するものと認められた。