

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440164

研究課題名(和文) 生体機能指向性エレクトリックノーズを作製し、匂いコードモデルを検証する

研究課題名(英文) Study on the Bio-inspired electric nose and odor-coding theory

研究代表者

岩佐 達郎 (IWASA, Tatsuo)

室蘭工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00133926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：多様な化学物質(匂い)を嗅ぎ分ける、ヒトの嗅覚に倣った「生体機能指向型エレクトリックノーズ」の作製を試みた。センサー素子として用いるため、イモリの2種の匂い分子結合タンパク質、Cp-Lip1 および Cp-Lip2 と ヤマトクロアリの化学タンパク質を大量発現、精製する系を確立した。更に種々の匂い分子を結合できるように、遺伝子改変したタンパク質を作成し、それらの化学分子結合能を調べた。匂いセンサーデバイスとして SAW デバイス、FET センサーをベースにした試作機をつくり、それらの特性を調べた。

研究成果の概要(英文)：This research project aims to make a prototype of a bio-inspired electric nose, which can detect different types of odorant molecules and distinguish them. In order to use the sensing-element of the electric nose, we plan to use odorant binding proteins of Japanese common newt, Cp-Lip1 and -Lip2 which we found and chemosensory proteins (CSPs) found in the sensillum of carpenter ant, Camponotus japonicus. The expression and purification system of the proteins from E. coli expression systems were established. The purified proteins retained their native secondary structure and binding properties. The amino acid replacement of Cp-Lip1 changed its odorant binding properties, which enable to obtain odorant-sensor elements of the different odorant-binding capacity. These sensor elements were fixed and used on a prototype of a surface acoustic wave (SAW) sensor and a field effect transistor (FET) sensor.

研究分野：生体分子科学

キーワード：匂い分子結合タンパク質、化学感覚タンパク質、バイオ化学センサー、生体機能指向型エレクトリックノーズ、レイリー型表面弾性波センサー、FETセンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) 種々の化学物質に対するセンサーの開発は進んできてはいるが、それらは分子吸着や化学反応を利用し、特定の化学物質を検出するものがほとんどであり、生物が多くの化学物質を受容し、それらを区別している「匂い感覚」システムには、特に匂いの分別能力においてまだ及ばない。

(2) ヒトは 347 種類の受容体タンパク質によって一万種類もの匂いを区別しているといわれている。限られた数の受容体タンパク質によって圧倒的多数の匂い(化学物質)を区別することができることを説明するためのモデルが提出されている。

(3) 申請者らはイモリ嗅上皮特異的に発現する 2 種類の遺伝子 (*Cp-lip1*, *-lip2*) を見いだした。これらの遺伝子にコードされている 2 種のリポカリンタンパク質 (*Cp-Lip1*, *-Lip2*) が複数の化学物質(匂い)を強く結合することから、それらのタンパク質の化学物質との結合に関与すると思われるアミノ酸を改変し、新たな化学物質結合特性を持つ *Cp-Lip* 変異体を作製して、「タンパク質匂いセンサー素子」として利用することを考えた。

2. 研究の目的

(1) 多様な化学物質(匂い)を嗅ぎ分ける、ヒトの嗅覚に倣った「生体機能指向型エレクトリックノーズ」の作製を試みる。そのため申請者の見いだしたイモリの 2 種の匂い分子結合タンパク質、アリの化学感覚タンパク質を大量発現、精製する系を確立する。

(2) 上記のタンパク質をセンサー素子として用いるために、遺伝子改変したタンパク質を作成し、それらの化学分子結合能を調べる

(3) SAW デバイス、FET センサーをベースに、センサー素子として上記タンパク質を固定化したものを用いる。またその特性を明らかにし、「匂い」が嗅覚受容体からの出力パターンによってコードされているというモデルの妥当性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌の発現系を用いて、イモリの 2 種の匂い分子結合タンパク質、アリの化学タンパク質を大量発現、精製する系を確立する。

(2) *Cp-lip* を遺伝子改変した種々の「タンパク質匂いセンサー素子」を作成する。特に、タンパク質の安定に関わる Cys 残基、Trp 残基、更に匂い分子結合に関与すると思われる候補アミノ酸残基を改変したタンパク質を作製し、その特性を調べる。

(3) 作製された「タンパク質匂いセンサー素子」を持つ触媒ナノゲート電極電界効果トランジスタ (FET) や SAW デバイスセンサーを作成しその特性を調べる。集積した

「エレクトリックノーズ」の作製とそれからの出力を多変量解析し、ヒトの「匂い感覚」との対応を解析する。

4. 研究成果

(1) イモリの 2 種の匂い分子結合タンパク質、*Cp-Lip1* および *Cp-Lip2* と ヤマトクロアリの化学タンパク質を大量発現、精製する系を確立することができた。(発表論文 2 - 5) *Cp-Lip1* は IPTG 添加によるタンパク質発現誘導後の培養を 16 でおこなうことにより、可溶性画分に現れる量を増やすことができた。また、カラム精製後に、透析、凍結乾燥を組み合わせてタンパク質濃度を上げることができることを見いだした。凍結乾燥後に適当な緩衝液に懸濁することにより、精製直後と同様の二次構造、匂い分子結合性を回復することも確認できた。これにより、精製タンパク質を構造解析に用いる濃度にまであげること、タンパク質試料を運搬することがきわめて容易になった。(発表論文 2, 5) *Cp-Lip2* については種々の培養条件を試しても、発現後のタンパク質の可溶性画分に現れる量がきわめて少ないため、膜画分から変性条件下で精製し、その後段階的透析によって変性剤を抜くことでリフォールディングさせる系を確立することができた。ヤマトクロアリの化学感覚タンパク質 (CSP) 8 種類について大腸菌発現系を構築し、発現を調べたところ、その内 2 種 (CSP1 と CSP3) が発現量が多く、かつ、水溶性画分に発現タンパク質が現れていたため、まずこれらの大量発現・精製系を確立することとした。図 1 は CSP1 タンパク質の発現精製過程を示したも

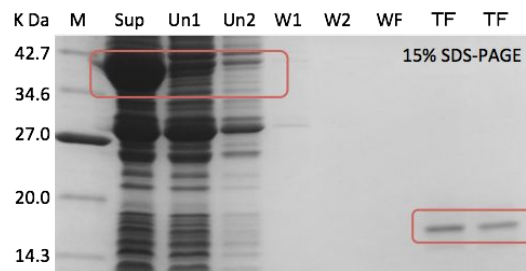


図 1 . CSP1 タンパク質の精製過程

ので、Sup のレーンに見られるように、水溶性画分に発現タンパク質に由来する顕著なバンドが現れている。これを Ni 親和性カラムにかけたところ、カラムに結合せず透過してきた画分 (Un1, 2) には発現タンパク質に由来するバンドは見られず、ほとんどが結合したことが分かる。この後トロンピンで HIS タグを切断し精製したところ、レーン TF に見られるようにほぼ単一のバンドにまで精製することができた。この精製タンパク質の円二色性 (CD) スペクトルを測定したところ、本来の二次構造を取っていることを示すスペクトルを得ることができた。また、蛍光スペクトル測定より調べたところ、蛍光色素や

リガンドに対する結合能を持っていることも分かった。また、CSP1 についても、透析、凍結乾燥を組み合わせるとタンパク質濃度を上げることができることが分かった。(発表論文 3,4) 今後、NMR測定等により、匂い分子結合機構の詳細についての研究に利用することができる。

(2) Cp-Lip1 を用いて種々の変異体を作成した。ベーターバレル構造内部に位置すると思われるアミノ酸に変異をかけたもの(発表論文 9) ベーターバレル構造の入り口に位置するアミノ酸に変異をかけたもの(発表論文 7)を作成し、それらの匂い分子結合特性の変化を調べた。その結果、結合の見られる匂い分子選択性に変化が認められた。特定アミノ酸に変異を導入することにより、結合する匂い分子選択性を変えることができることが示された。しかしながら、特定の匂い分子選択性を持つように「分子をデザイン」するには、匂い分子とタンパク質の結合様式に対するより詳細な知見が必要と思われる。

(3) センサー素子として利用するためにはタンパク質をセンサーデバイスに固定化する必要がある。そのために Cys 残基の SH 基を利用することを考え、Cp-Lip1 タンパク質の Cys 残基を Ser に置換した変異体を作成し、その立体構造、リガンド結合性に大きな変化のないことを見いだした。(発表論文 10) この知見は Cp-Lip1 タンパク質を金薄膜にチオエステル結合を利用して固定化するとき利用できる。また、それ以外の固定化方法として、N末端、またはC末端にビオチン化部位を導入した変異体も作成した。

(4) センサー素子としてタンパク質を用いる場合、液相にセンサー素子を固定して反応させることを考えた。センサーデバイスとしては表面弾性波 (Surface acoustic wave ; SAW) を利用するもの、FET を利用するものを候補として考えた。表面弾性波は、圧電体表面に配置したすだれ状櫛形トランスデューサー (Interdigital transducer ; IDT) 電極に高周波を印加して発生させられる。その周波数は IDT の幅に依存し、半導体プロセス技術で微細化することで容易に IDT は MHz 帯の周波数を発生できる。しかしながら、レイリー波はデバイス構造の問題から液相試料の測定には不向きであると考えられており、これまで知る限りでは、数百 MHz 帯のレイリー波を用い、溶液中への縦波放射を利用した測定例はなかった。そこで縦波放射を利用した液相系センサー装置を開発するため、親水性と撥水性部分を設けたガラス製の溝ホルダーを用いたレイリー型 SAW 溝流路デバイス (図 2) を作成し、そこでのレイリー波の挙動について解析した (発表論文 1, 6)。得ら

れた知見はセンサーデバイスの高感度化に寄与するものと考えられる。

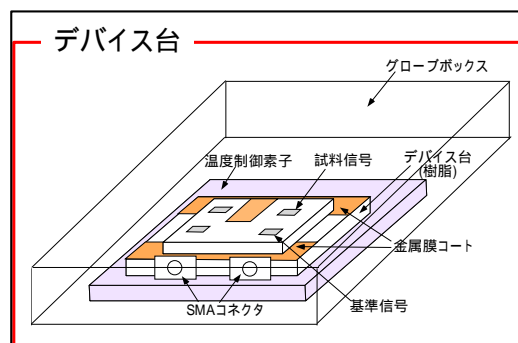


図 2 . レイリーSAW デバイス

(5) FET を利用するものとしては高感度化するために、延長ゲート型検出部を用いるセンサーデバイスを用いた予備実験をおこない、ビオチンの検出に成功している。これに末端をビオチン化したセンサー素子タンパク質を組み合わせる予定である。さらに、将来的にはFETに換えて、超軽量、超薄型、フレキシブルな有機薄膜トランジスタの利用を考えている (図 3)

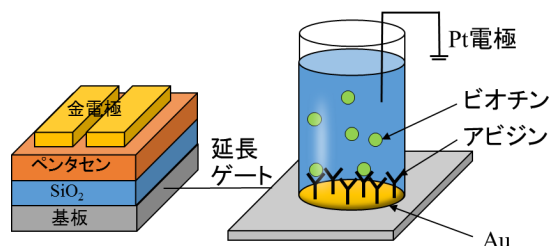


図 3 . 有機薄膜トランジスタ (左) を用いたバイオセンサ概要図。(右) は延長ゲート型検出部。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

K. Ogawa, T. Torigoe, K. Sawada, T. Iwasa, K. Nagano, Y. Shibayama, Y. Tada, K. Uesugi, and H. Fukuda, "Development of the Rayleigh type surface acoustic wave sensor liquid phase system using a longitudinal wave radiation into a liquid phase", refereed, *IEEJ-E*, 135, 490-495, (2015) DOI: 10.1541/ieejsmas.135.490
Xing Li, Wendurige, Ken Sawada and Tatsuo Iwasa, "The effect of structural fluctuations on the ligand-binding property of odorant-binding protein of Japanese common newt", refereed, *Jpn. J. Taste Smell Res.*, 22, 423-424. (2015)
Wendurige, Xing Li, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, and Tatsuo Iwasa.

“ Study on the structure and binding properties of CSP1 and CSP3 from *Camponotus japonica* ”, refereed, *Jpn. J. Taste Smell Res.*, 22, 425-428. (2015)

Wendurige, Xing Li, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki and Tatsuo Iwasa, “ The structure-function studies on chemosensory protein found in the sensillum of *Camponotus japonica* ”, refereed, *Jpn. J. Taste Smell Res.*, 21, 419-422 (2014)

Xing Li, Wendurige, Ken Sawada, and Tatsuo Iwasa, “ The study on the structural changes and ligand binding of Cp-Lip1 ”, refereed, *Jpn. J. Taste Smell Res.*, 21, 415-418 (2014)

K. Ogawa, S. Yamada, T. Torigoe, K. Sawada, T. Iwasa, F. Sugiyama, Y. Tada, K. Uesugi, and H. Fukuda, “ Electrical properties of liquid phase sensor using Rayleigh type surface acoustic wave ”, refereed, *J. Surf. Sci. Soc. Jpn.*, 35, 319-323 (2014)

Rina Suzuki, Yasuhiro Sugiura, Ayano Torii, Hirofumi Sugimoto, Tatsuo Iwasa, Hisashi Fukuda and Ken Sawada, “ Role of amino acid residues locating at the entrance of barrel structure of Cp-Lip1 in odorant binding ”, refereed, *Jpn. J. Taste Smell Res.*, 20, 373-376 (2013)

Hirofumi Sugimoto, Yasuhiro Sugiura, Tatsuo Iwasa, Hisashi Fukuda and Ken Sawada, “ Effect of Cp-Lip1 on odorant response in the olfactory epithelium of the Japanese common newt ”, refereed, *Jpn. J. Taste Smell Res.*, 20, 373-376 (2013)

Yasuhiro Sugiura, Ayano Torii, Hirofumi Sugimoto, Tatsuo Iwasa, Hisashi Fukuda and Ken Sawada, “ Odorant-binding function of amino acid residues located inside of the barrel structure of odorant-binding protein Cp-Lip1 ”, refereed, *Jpn. J. Taste Smell Res.*, 20, 359-362 (2013)

Xing Li, Junya Ohtsuka, Ken Sawada, Hisashi Fukuda, Yoshihiro Tada and Tatsuo Iwasa, “ The role of cysteine in the odorant-binding proteins found in the Japanese common newt ”, refereed, *Jpn. J. Taste Smell Res.*, 20, 351-354 (2013)

〔学会発表〕(計 13 件)

温 都日格, 李 興, 北條 賢, 尾崎まみこ, 岩佐 達郎, “ クロオオアリの 2 種の「化学感覚タンパク質」の構造と化

学分子結合特性の比較 ”、日本味と匂学会第 49 回大会、P-111、(2015) 岐阜、岐阜県

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, (2015) Krakow, Poland

小川 健吾, 山田 真也, 菅原 智明, 岩佐 達郎, 冨田 芳広, 福田 永, “ アデノシン三リン酸(ATP)水溶液におけるレイリー型 SAW 溝流路液相系センサーの動作特性 ”、第 76 回応用物理学会秋季学術講演会、(2015) 名古屋、愛知県

Xing Li, Wendurige, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki and Tatsuo Iwasa, “ Structural and functional studies on two kinds of perireceptor proteins (PRPs) working in chemoreception. ” 第 53 回日本生物物理学会、(2015) 金沢、石川県

Xing Li, Durige Wen, Masaru Hojo, Mamiko Ozaki, and Tatsuo Iwasa, "Expression and Structural Analysis of Two Kinds of Perireceptor Proteins (PRPs)", 第 52 回日本生物物理学会年会 1P019 (2014) 札幌、北海道

温都日格, 李興, 北條賢, 尾崎まみ子, 岩佐達郎, “アリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造機能解析 ”、日本味と匂学会第 48 回大会 P-104 (2014) 静岡、静岡県

K. Ogawa, T. Abe, Y. Seino, T. Torigoe, Y. Tada, K. Uesugi, H. Fukuda, K. Sawada, and T. Iwasa, "Highly Sensitive Analysis of Water-insoluble Nanoparticles and Soluble Protein in Liquid by Resonant Surface Acoustic Wave Modulation Measurement", 26th International Microprocess and Nanotechnology Conference, (2013), Sapporo, Japan
Xing Li, Junya Otsuka, Tatsuo Iwasa.

“ Structural and Functional Analysis of the Role of Cysteine Residue in Cp-Lip2, Lipocalin-type Protein Found in the Olfactory Epithelium of *Cynops Pyrrhogaster* ”, 第 65 回日本生物工学会大会 (2013) 広島、広島県

〔図書〕(計 1 件)

岩佐達郎, 澤田研 「室蘭工大 未来をひらく技術と研究」北海道新聞社発行 「生物に学ぶ においセンサー」 pp.

141-148 (2014. 07) 国立大学法人室蘭
工業大学編

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩佐 達郎 (IWASA, Tatsuo)

室蘭工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：00133926