

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658109

研究課題名（和文） 匂い結合タンパク質を利用した匂い分子の可溶化技術の開発と嗅覚バイオセンサへの応用

研究課題名（英文） Development of methods to solubilize odorants into aqueous phase using insect odorant binding proteins and their application to odorant biosensor

研究代表者

櫻井 健志 (SAKURAI TAKESHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：20506761

研究成果の概要（和文）：昆虫生体で匂いを可溶化する機能を持つ匂い結合タンパク質（OBP）を利用した匂い分子の液相への可溶化技術の開発を目的として、カイコガのフェロモン結合タンパク質およびキイロショウジョウバエの一般臭匂い結合タンパク質の大腸菌における大量発現系と簡便な精製法の確立を行った。大腸菌宿主株として Rosetta-gami を、タンパク質精製のタグとして exact タグを用いることで、単一の精製ステップにより比較的大量の OBP を単一バンドとして精製することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In insects, odorant binding proteins solubilize odorant molecules into the sensillum lymph that bathes olfactory receptor neurons in the antennae. In the present study, as the first step to develop methods to solubilize odorant molecules into aqueous phase, we established a large scale expression system and a simple purification protocol of odorant binding proteins from the silkworm, *Bombyx mori*, and the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, by using eXact-tag based single-step affinity column purification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：嗅覚バイオセンサ、昆虫、匂い結合タンパク質、嗅覚受容体、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

近年われわれの生活の安全・安心の質の向上のために、環境中の匂い分子を高感度・高選択的にリアルタイムで検出するセンサへの社会的ニーズが高まっている。これまで、水晶振動子や半導体、抗原抗体反応などを用いた匂いセンサの開発が進められており、そ

れらの一部は実用化されつつある。しかしながら、検出感度、識別能、検出速度など、匂いセンサの幅広いニーズを考慮すると検討すべき課題は多い。

このような課題を解決する方法として、最近昆虫の高感度（ppb オーダー）・高識別能・リアルタイム検出能を兼ね備えた嗅覚系の

センサへの応用が注目されている。昆虫の高感度な嗅覚受容は、①揮発性が高く難水溶性の匂い物質を嗅覚受容細胞を浸す感覚子リンパ液中に可溶化し、センサ部である受容細胞膜上のセンサタンパク質（嗅覚受容体）へと輸送するステップと、②匂い分子と受容体の相互作用により細胞内へ電流を発生させるステップの2つにわけられる⁽¹⁾。後者に関しては、これまでに、嗅覚受容体を異種細胞系で強制発現させる技術が確立され、生体内における受容体の機能を細胞で再現することが可能となってきた⁽²⁻⁵⁾。一方で、匂い分子の可溶化に関する研究はほとんど行われておらず、DMSOなどの有機溶媒に溶解した匂い物質をバッファーで希釈したものを刺激液として細胞の応答感度を計測している状況である。昆虫は匂い分子の可溶化に匂い結合タンパク質(odorant binding protein:以下OBPと略す)を利用している。OBPは感覚子リンパ液中に高濃度で存在する水溶性タンパク質であり、外界とリンパ液の界面で匂い分子と結合することで、匂い分子を効率的に可溶化し、受容体へ輸送する機能をもつ。この機能を利用し、OBP溶液で嗅覚受容体発現細胞を浸すことで、気中の匂い分子を直接、細胞へ可溶化し輸送できる技術が開発できるとの着想に至った。

参考文献

(1)櫻井健志ら(2006) 比較生理生化学会誌 **23**: 11-25. (2) Wetzell CH, et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9377-9380. (3) Sakurai T, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16653-16658. (4) Nakagawa T, et al. (2005) *Science* **307**: 1638-1642. (5) Mitsuno H, et al. (2008) *Eur J Neurosci* **28**: 893-902.

2. 研究の目的

昆虫の嗅覚系の高感度・高選択的に匂い分子をリアルタイムで検出する機構を人工的に再現した高性能な嗅覚バイオセンサの構築に向けて、これまでに、昆虫の嗅覚センサの実体である嗅覚受容体を異種細胞で発現させ、その機能を再現することで昆虫と同等の機能をもつセンサ開発の試みがなされてきた。しかし、匂い物質は一般に揮発性が高く難水溶性のため、細胞を浸す液中に匂いが溶け込まず、嗅覚受容体発現細胞まで匂い分子が到達しないことが、センサ実現の決定的な障壁となっている。本研究では、昆虫の嗅覚受容細胞を囲む感覚子リンパ液中で発現し、匂い分子の可溶化および嗅覚受容体への輸送機能をもつ OBP を用いて、気中の匂い分子を液中に可溶化する技術を開発することを目的とした。さらに、この技術を嗅覚受

容体発現細胞と組み合わせることで、昆虫の匂い受容環境を完全に再現し、高性能な嗅覚バイオセンサの実現可能性を示すことを最終目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、生体と同様の~10mM 程度の高濃度の OBP 溶液を実験サンプルとすることを計画していたため、大量の精製 OBP を1ステップもしくは2ステップのカラムワークで簡便に精製する方法の確立を行った。精製法の確立には、カイコガの性フェロモンであるボンビコールと結合することが明らかになっている、カイコフェロモン結合タンパク質(BmPBP)を用いた。精製には、精製効率が高く、最終的にタグフリーの精製タンパク質を容易に得ることが可能という特徴をもつ eXact タグを用いた。eXact タグを含む市販の pPAL7 ベクター (Bio-Rad) に BmPBP を挿入し eXact タグを融合して発現するように設計したプラスミド DNA を構築した。タンパク質発現のための大腸菌株には Rosetta-gami (Novagen) を用いた。タンパク質発現の誘導は液体培養後、O. D. 600 が 0.5 のときに 1 mM IPTG を加えることで行った。その後 O. D. 600 が 2 以上になるまで 30°C で培養を行った。化学的破砕により大腸菌を溶菌し、可溶性画分を得た。BmPBP の精製は、Profinity eXact column (Bio-Rad) を用いて低圧クロマトグラフィーシステムにより行った。精製後のタンパク質は SDS-PAGE もしくは native-PAGE で分離し、CBB 染色により分析した。

本研究で可溶化効率を調べる対象とした、ショウジョウバエ嗅覚受容体である OR43a を発現する嗅覚受容細胞のある感覚子リンパ中で発現することが報告されている OBP83a と OBP83b についても BmPBP と同様の条件で発現および精製を行った。

4. 研究成果

本研究では、最終的にショウジョウバエ嗅覚受容体である OR43a を発現するアフリカツメガエル卵母細胞の匂いに対する電気的応答を指標として、OBP による匂い可溶化技術のセンサへの利用可能性を検討する計画であったため、ショウジョウバエ生体でそれぞれの受容体を発現する嗅覚受容細胞のある感覚子リンパ中で発現することが報告されている OBP83a と OBP83b を用いた。また、これら2つの OBP に加えて、性質がよくわかっている BmPBP を精製の陽性コントロールとして用いた。

OBP ファミリーのタンパク質は6つのシステイン残基をもち、それらが3対の分子内ジスルフィド結合を形成することにより機能的なコンフォメーションをとる。一般に還元環境にある大腸菌細胞質ではジスルフィド

結合の形成が見込めないため、BmPBPをはじめとして、いくつかのOBPについて酸化環境にあるペリプラズム間隙において分泌発現を行うことで正常な機能を持ったOBPを発現できることが知られている。そこで、本研究ではまずN末端にペリプラズム移行シグナルであるompAとeXactタグを融合したBmPBPを発現するベクターを構築し、さまざまな培養条件、タンパク質の発現誘導条件を試した。しかしながら、結果としていずれの条件においてもタンパク質の発現は確認されたがそのほとんどは不溶性画分で、ペリプラズムへの移行は観察されなかった。そこで、還元酵素の変異株であり、細胞内でジスルフィド結合を促進するように改変がされた大腸菌株Rosseta-gamiに宿主を変更した。eXactタグとBmPBP融合タンパク質の細胞質での発現を行い、発現タンパク質の大部分が可溶性画分に検出される条件を見出した(培養温度30℃、1mM IPTG)。この条件下で培養を行い、可溶性画分についてeXactタグを用いたアフィニティー精製を行った結果、その溶出画分はSDS-PAGE上でBmPBPの分子量である約15kDa付近に単一のバンド(分子量約15kDa)を示したことから、ワンステップでBmPBPを単一な状態まで精製できることを明らかになった(図1)。そこで、同様の方法により、ショウジョウバエOBP83aおよびOBP83bの精製を行った結果、BmPBPと同様にワンステップで単一バンドに精製できることが明らかになり(図2A、図3A)、本方法がOBP全般に有効である可能性が示唆された。なお、精製タンパク質のnative-PAGEを行った結果、いずれのOBPにおいても単一のバンドが検出されたことから、これらの精製タンパク質は単一のコンフォメーションをとっていることが示唆された。また、精製タンパク質の収量はOBP83aが3mg/L、OBP83bが約10mg/Lであり、匂い可溶化効率の検証に用いるのに十分量のOBPが本方法により精製可能であることが示された。このように、本研究では第一目的であったOBPの大量発現と簡便な精製法の確立に成功した。しかしながら、OBPの簡便な精製法の確立に当初の予定より長期間を要したため、精製OBP83a、OBP83bを用いた匂い可溶化効率の検証には至らなかった。研究期間は終了したが、本研究で確立した精製法を利用し、OBPによる気中の匂い分子の可溶化効率を検討していきたい。

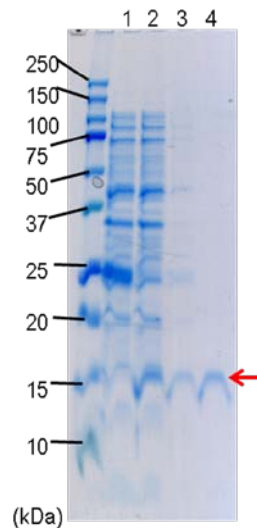


図1 eXact タグを利用したBmPBPのアフィニティー精製のSDS-PAGEによる検証
 レーン1：可溶性画分、2：カラムフロースルー画分、3：カラム洗浄画分、4：カラム結合タンパク質溶出画分。1ステップでBmPBPの分子量である15kDa付近の単一バンドまで精製できていることがわかる。

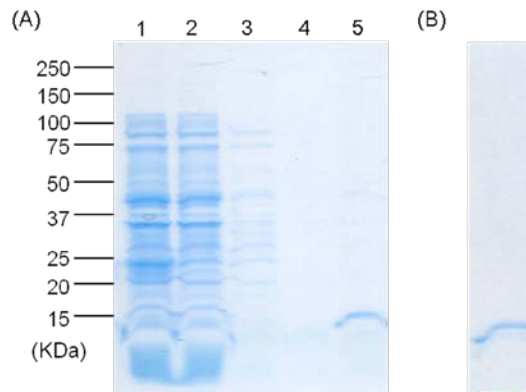


図2 eXact タグを利用したショウジョウバエOBP83aのアフィニティー精製結果
 (A) SDS-PAGE後にCBB染色を行ったゲルの写真。レーン1：可溶性画分、2：カラムフロースルー画分、3：カラム洗浄画分、4：カラム洗浄画分、5：カラム結合タンパク質溶出画分。1ステップでOBP83aの分子量である15kDa付近の単一バンドまで精製できていることがわかる。(B) 精製後のタンパク質のnative-PAGEによる分析。単一バンドが検出された。

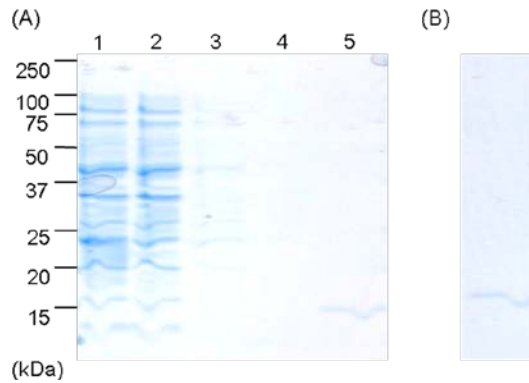


図3 eXact タグを利用したショウジョウバエ OBP83b のアフィニティー精製結果
 (A) SDS-PAGE 後に CBB 染色を行ったゲルの写真。レーン 1 : 可溶性画分、2 : カラムフロースルー画分、3 : カラム洗浄画分、4 : カラム洗浄画分、5 : カラム結合タンパク質溶出画分。1 ステップで OBP83b の分子量である 15kDa 付近の単一バンドまで精製できていることがわかる。(B) 精製後のタンパク質の native-PAGE による分析。単一バンドが検出された。

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
 光野 秀文 (MITSUNO HIDEFUMI)
 東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員
 研究者番号 : 60511855

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 櫻井健志、光野秀文、神崎亮平、昆虫嗅覚受容体を利用した匂いセンサの構築、ブレインテクノニュース、査読無、147 巻、2011、23-29

[学会発表] (計 2 件)

① 櫻井健志、フェロモン源定位行動発現の匂い特異性を決定する分子・神経基盤、第 55 回日本応用動物昆虫学会、2011 年 3 月 27 日 - 29 日、九州大学、福岡

② 櫻井健志、オス蛾の性フェロモン選択性と高感度性の分子・神経基盤、第 56 回日本応用動物昆虫学会、2012 年 3 月 27 日 - 29 日、近畿大学農学部、奈良

[その他]

<http://www.brain.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 健志 (SAKURAI TAKESHI)
 東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教
 研究者番号 : 20506761