

令和元年6月19日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07431

研究課題名(和文)立体構造から「匂い分子結合タンパク質」の機能を解明し、その応用を目指す

研究課題名(英文) Study on the function of "odorant binding protein" from the three-dimensional structure and its application

研究代表者

岩佐 達郎 (Iwasa, Tatsuo)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・名誉教授

研究者番号：00133926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 匂い受容に関わる匂い分子結合タンパク質、化学感覚タンパク質(CSP)は疎水性の匂い分子を結合し、リンパや嗅粘液に覆われた親水性環境にある嗅受容体タンパク質まで運び、匂い分子を受容体に渡す、と考えられているが、その詳細な機構は明らかではない。

本研究ではヤマトクロアリの持つCSP1タンパク質の溶液中での立体構造を溶液散乱(小角散乱から広角散乱まで)によって調べ、pH変化によってその回転半径が変化すること、この変化がリガンドの結合強度の変化を伴っていることを明らかにした。さらに、同一細胞で発現するCSP13タンパク質の諸性質を調べ比較することにより、両者の役割分担について考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

匂い受容に関わる「匂い分子結合タンパク質」「化学感覚タンパク質」のX線溶液散乱を行い、溶液中の構造と、その構造変化に基づいて、それらのタンパク質の機能と分子機構について調べた。ヤマトクロアリの感覚子に発現する2種の化学感覚タンパク質について、その生理機能と分子機構に関する新たな知見を明らかにしたことは、これらのタンパク質の研究において学術的に重要な成果であると考えられる。

また、これらのタンパク質は構造的に安定であり、遺伝子操作によって改変したものを得ることも可能であることから、種々の生体素子としての利用が検討されている。このような応用面からも、本研究の知見は社会的に意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)： Although chemosensory protein (CSP) and odorant binding protein bind hydrophobic odorant molecules, and believed to transport them to olfactory receptor proteins covered by hydrophilic lymph or olfactory mucus, its detailed mechanism is remained unclear.

In this study, the three-dimensional structure of CSP1 protein in the solution was examined by solution scattering (from small angle scattering to wide angle scattering). As a result, it was revealed that the turning radius was changed by pH change, and that this change was accompanied by a change in binding strength of the ligand. Furthermore, the properties of CSP13 which is expressed in the same cell as CSP1 were studied to compare with those of CSP1, and the possible roles of them were discussed.

研究分野：生体分子機能科学

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 X線小角散乱 立体構造 ヤマトクロアリ アカハラリモリ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 外界の情報を伝える信号として、「匂い」は多くの動物にとって重要な働きをしている。「匂い分子」は一般に疎水性の低分子化合物である。ところが、嗅覚受容体はリンパや粘液に覆われた親水性環境に存在している。そのため、「匂い分子結合タンパク質；odorant binding protein; OBP」、「フェロモン結合タンパク質；pheromone binding protein; PBP」、「化学感覚タンパク質；chemosensory protein; CSP」とよばれる水溶性低分子タンパク質が疎水性の匂い分子を結合し、リンパや嗅粘液に覆われた親水性環境にある嗅受容体タンパク質まで運び、匂い分子を受容体に渡す、と考えられている。これらのタンパク質が匂い分子を結合することは、多くの研究例があり、それらのタンパク質の結晶構造解析により明らかにされた立体構造と合わせて、議論されてきた。しかし、これらのタンパク質がどのようにして受容体タンパク質と相互作用し、結合していた匂い分子を渡すのか等の分子機構についての詳細は未だ明らかではない。また、脊椎動物の匂い分子結合タンパク質は「リポカリンスーパーファミリー」のタンパク質であり、無脊椎動物の「匂い分子結合タンパク質」、「化学感覚タンパク質」もそれぞれ異なった遺伝子グループであり、それらの類似点と相違点とに注目した研究が必要と思われる。

(2) 我々は先行研究「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」科研費基盤研究 C (平成 25 年～27 年)において、脊椎動物(アカハライモリ)より見出したリポカリンタンパク質；CpLip1 を用いて、大腸菌における大量発現系を構築し、精製したタンパク質を用いて、その結合特性を明らかにした。また、そのアミノ酸置換体を作製し、「匂い分子」結合特性を改変できることを示し、種々の「匂い分子」結合特性を持つ改変タンパク質を作り出す可能性を示し、それらを用いた「エレクトリックノーズ」のプロトタイプを作製し、その特性を調べ、その成果を 2 編の英文論文を含む 10 篇の論文として報告した。

### 2. 研究の目的

我々は、先行研究によって、「匂い分子結合タンパク質」の匂い分子の結合特性を明らかにし、相同性の高いタンパク質の結晶構造をもとにした立体構造モデルから、Cp-Lip1 や CSP1 の分子機構について検討してきた。しかし、これらのタンパク質がはたらくのは溶液中である。本研究では、それぞれのタンパク質の溶液中の構造、および、化学分子結合に伴う立体構造の変化を明らかにし、それに基づいて「匂い分子結合タンパク質」の分子機構を理解し、その応用を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 匂い結合タンパク質として脊椎動物のリポカリングループ(アカハライモリ；CpLip1)とヤマトクロアリの触覚より見出された化学感覚タンパク質 CSP1 とを用いた。これらの大量発現・精製系を構築した。精製したタンパク質について、MALDI-TOF Mass 測定により混在物の有無、タンパク質の質量を、円二色性測定から二次構造についての情報を得た。

(2) 溶液中の立体構造を SPring8 (申請課題；2015B1355) および高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリー(申請課題；2016G683)での SAXS (small angle X-ray scattering) および、WAXS (wide angle X-ray scattering) 測定を行った。この時、リガンド結合に伴う構造変化、pH 変化による構造変化について測定した。

(3) 各タンパク質のリガンド結合能を、蛍光色素 1-NPN との結合、更に、リガンドを加えた時の蛍光消光によって測定した。

(4) ヤマトクロアリの触覚より見出された化学感覚タンパク質 CSP1 については、同じグループに属する CSP13 タンパク質が同一細胞で作られていることが報告されている。CSP1 の生理機能を考える上で、CSP13 との役割分担についての知見を得るため、各タンパク質に対する抗体を作製し、それらタンパク質の局在をウエスタンブロット法、免疫組織化学によって調べた。また、CSP13 についてもリガンド結合特性を調べ、CSP1 と比較した。

### 4. 研究成果

(1) 本研究では X 線溶液散乱実験を計画しており、それにはリガンド結合実験等の生理学的実験に比べ、大量の試料を必要とする。アカハライモリの CpLip1 については先行研究によって大量発現・精製が確立されていたが、本研究ではそれに加えて、ヤマトクロアリの CSP1、CSP13 の大量発現、生成系を確立した。大腸菌による異種発現で得られたタンパク質が予想される質量で、かつ十分に精製されているかを MALDI-TOF Mass 分析で判定した。測定では目的試料の一価、二価イオンに由来するピークのみが現れ、またその質量数は予想された値と良い一致を示した。また円二色性測定では、CpLip1 では スtrand由来の、CSP1、CSP13 では ヘリックス

ス由来のシグナルを与え、各々溶液中で、結晶構造解析に基づくモデルから予想される立体構造と類似の構造を持つことが示された。

(2) 各タンパク質について、SPRING8、および高エネルギー加速器研究機構のフotonファクトリーにおいてX線溶液散乱実験を行なった。CpLip1 では試料が会合体を作っているためか、

再現性の良いデータが得るのが難しかったので、主にCSPタンパク質についての測定結果についてまとめた。図1左にCSP1タンパク質から測定された散乱データ(赤)とモデル構造より計算された散乱曲線(青)を比較して示した。ピークがなだらかなってはいいるが、高角側でのタンパク質のドメイン構造等に由来するピークに対応する位置にピークが認められるので、

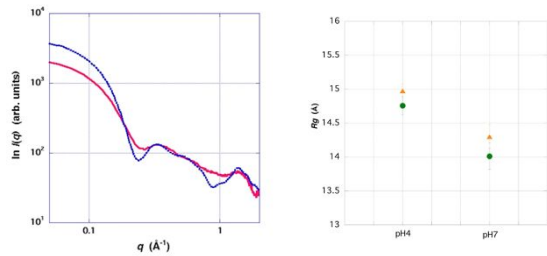


図1. CSP1 タンパク質の X 線溶液散乱。(左) CSP1 pH7.0 の散乱パターン(赤).CSP1 のモデル構造から計算された散乱パターン(青). (右) CSP1 のギニエ領域から求めた回転半径の pH による変化.CSP1 タンパク質(緑).CSP1 タンパク質とリガンド(Z-9-トリコセン)の混合物(オレンジ).

モデルと類似した構造を取っていることが示唆されるが、詳細な解析は難しい。種々の測定のギニエ領域の解析から、CSP1、CSP13 分子の回転半径を求めた(図1右)。まず、CSP1 ではリガンド(Z-9-トリコセン; ヤマトクロアリ体表の炭化水素の一種)を結合した場合とリガンドのない状態とでの回転半径には差が認められなかった。つまり、CSP1 タンパク質ではリガンド結合に伴う大きな構造変化はないと考えて良い。一方、CSP1 タンパク質の pI 値(計算値; 4.99)をまたいだ pH 7.0 と pH 4.0 とでは、pH 4.0 で回転半径が 10% 程大きくなることが観察された。この変化はリガンド結合した状態でも同様であった(図1右)。円二色性測定では、pH の変化によっては信号はほとんど変化せず、同様の pH 変化では二次構造レベルでの構造変化のないことを示している。

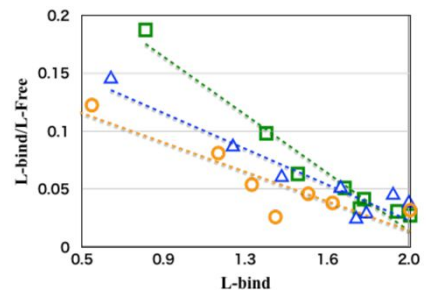


図2. CSP タンパク質と 1-NPN との結合体とレーションから得たスキャチャードプロット。CSP1 タンパク質 pH 7.0 (緑四角)、と pH 4.0 (オレンジ丸).CSP13 タンパク質 pH7.0 (青三角)

(3) 上記の回転半径の変化が示唆する分子の大きな形の変化が、CSP1 分子のリガンド結合能に関係するかどうかを調べた。1-NPN をリガンドとしてタイトレーションを行い、スキャチャードプロットから 1-NPN の

結合に対する Kd 値を求めたところ、pH 7.0 での値に比べ、pH 4.0 では大きくなっていることがわかった(図2)。これらの結果は、CSP1 分子が受容体近辺で結合した匂い分子を解離する機構を示唆するものではないかと考えている。

(4) ヤマトクロアリの触角細胞の一部では CSP1 遺伝子と CSP13 遺伝子が同一細胞で発現している事が北條らによって報告されている。

CSP1 タンパク質がヤマトクロアリ体表の炭化水素鎖受容に参与していることは尾崎らによって報告されて

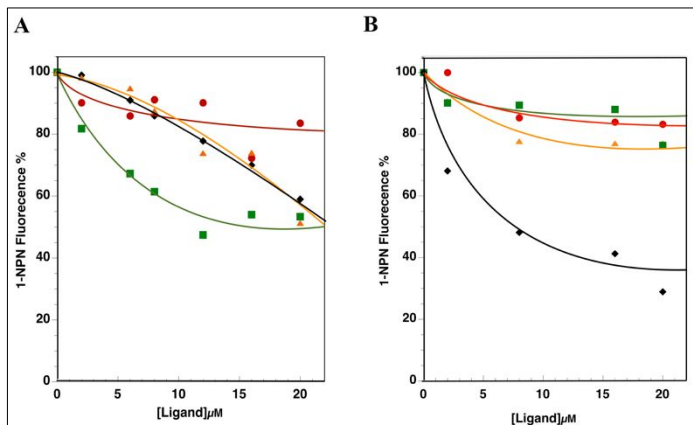


図3. CSP1 (A) と CSP13 (B) タンパク質の種々化合物との結合特性。蛍光色素 1-NPN と結合させておき、種々化合物を加えた時の蛍光の消光を示す。Z-9-トリコセン(黒丸)、エチルブチレート(赤丸)、2-イソブチルチアゾール(オレンジ三角)、ベンゾフェノン(緑四角)

いるが、同一細胞に存在する CSP13 の役割については報告がない。そこで、CSP1 と比較するために種々の測定を行なった。結晶構造に基づくモデル構造では大きな差異は観察されない。また溶液中の円二色性測定でもほぼ同一のシグナルを与えた。溶液散乱測定から、回転半径は pH 7.0 では CSP1 より 1 程小さく、また pI 値(5.0)をまたいだ pH 変化によっても回転半径はほぼ同一であった。リガンド結合特性を調べると、CSP1 では調べた化合物に対しほぼ同一な結合を示したのに対し、CSP13 では Z-9-トリコセン(ヤマトクロアリ体表の炭化水素の一種)に対し強い結合を示した(図3)。この両者の結合特異性の違いはそれぞれの役割分担の違いに対応しているのではないかと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 6 件)

Geng X., Dai G., Chao L., Wen D., Kikukawa T., Iwasa T. Two consecutive polar amino acids at the end of helix E are important for fast turnover of the archaerhodopsin photocycle. *Photochemistry and Photobiology*, 2019, in press. DOI: 10. 1111/php. 13072

Hirai M., Ajito S., Takahashi K., Iwasa T., Li X., Wen D., Kawai-Hirai R., Ohta N., Igarashi N., Shimizu N. Structure of ultrafine bubbles and their effects on protein and lipid membrane structures studied by small- and wide-angle X-ray scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2019, 123, 3241-3249. DOI: 10. 1021/acs. jpcb. 9b00837

Dai G., Geng X., Chaoluomeng, Tamogami J., Kikukawa T., Demura M., Kamo N., Iwasa T. Photocycle of sensory rhodopsin II from *Halobacterium salinarum* (HsSRII): Mutation of D103 accelerates M decay and changes the decay pathway of a 13-cis O-like intermediate. *Photochemistry and Photobiology*, 2018, 94, 705-714. DOI: 10. 1111/php. 12917

Yang Y., Nagano K., Chaoluomeng, Iwasa T. Analysis of surface acoustic wave propagation velocity in biological function-oriented odor sensor. *Journal of Sensors*, 2018, Article ID 8129484, 7 pages, DOI: 10. 1155/2018/8129484

Kimura J., Reddy U.V.S., Kohari Y., Seki C., Mawatari Y., Uwai K., Okuyama Y., Kwon E., Tokiwa M., Takeshita M., Iwasa T., Nakano H. Simple primary amino amide organocatalyst for enantioselective aldol reactions of isatins with ketones. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016, 22, 3748-3756. DOI: 10. 1002/ejoc. 201600414

Galaquin M., Uwai K., Yuguchi M., Iwasa T. simultaneous analysis of major ingredients of Gardenia fruit by HPLC-MS/TQMS method. *Mongolian Journal of Chemistry*, 2016, 17, 34-37.

### [学会発表](計 13 件)

Kanehara K, Cho Y, Iwasa T. The heterotrimeric G protein contributes to endoplasmic reticulum stress tolerance in Arabidopsis. EMBO workshop: Membrane contact sites in health and disease. 2018

Geng X., Chao L., Dai G., Iwasa T. Study on the pH-dependent changes in the structure and ligand-binding properties of the perireceptor proteins. 第 55 回日本生物物理学会, 2017

温都日格, 尾崎まみこ, 平井光博, 岩佐達郎. クロオオアリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性. 日本味と匂学会第 51 回大会, 2017

中村整, 山川浩之, 野海芳博, 仲村厚志, 温都日格, 李興, 耿兄, 澤田研, 岩佐達郎. アカハライモリ嗅上皮に発現するリポカリン Cp-Lip1 の匂い応答増強効果. 日本味と匂学会第 51 回大会, 2017

Iwasa T. Distribution of phosphate solubilizing bacteria in ground water and their potential impacts on groundwater quality. The 8th Forum on Studies of Environmental and Public Health Issues in Asian-Mega-cities (EPAM2017), 2017

Iwasa T., Wen D., Li X., Ajito S., Ozaki M., Hirai M. Structural studies on the perireceptor proteins involving in the chemoreception. 19<sup>th</sup> IUPAB, 2017.

温都日格, 李興, 平井光博, 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」のリガンド結合に伴う構造変化. 2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2017

Wendurige, Li X., Hojo M., Ozaki M., Iwasa T. The structure-function relationships of chemosensory protein found in the sensillum of *Camponotus japonicus*. The joint meeting of the 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology and the 87<sup>th</sup> Meeting of the Zoological Society of Japan, 2016

Geng X., Li X., Chaolumeng, Iwasa T. The odorant binding specificity of two odorant binding proteins of the Japanese common newt. The joint meeting of the 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology and the 87<sup>th</sup> Meeting of the Zoological Society of Japan, 2016

Nakamura T., Yamakawa H., Nakamura A., Li X., Sawada K., Iwasa T. Role of odorant binding protein of Japanese newt, *Cynopus pyrrhogaster*, examined by two different electrophysiological methods. The joint meeting of the 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology and the 87<sup>th</sup> Meeting of the Zoological Society of Japan, 2016

Wendurige, Li X., Hojo M., Ozaki M., Iwasa T. Structure-function relationship of two soluble proteins involved in chemoreception. 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016), 2016

Li X., Wendurige, Iwasa T. pH dependence of a ligand-binding property of the newt odorant binding protein, Cp-Lip1. International Symposium on Environmental Sensing and Animal Behavior, 2016

岩佐達郎. 生物模倣匂いセンサーとは；嗅覚のしくみ. 第90回北海道医学検査学会, 2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者 無し

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。