

Bovine Odorant Binding Protein

– Binding Model, Its Proof and Practical Applications –

Mineo Ikematsu

Abstract

Bovine odorant-binding protein (OBPb), among OBP family, assumes a dimeric structure. We indirectly confirmed, by measuring the fluorescence of intrinsic tryptophan and tyrosine residues of OBPb that odorant enters the central pocket formed by the dimerization when OBPb first encounters odorant, and odorant with high affinity with OBPb subsequently enters the internal cavity (suggested binding site), releasing the pre-bound odorant. The internal cavity-bound odorant can be released by the binding of other odorants at another internal cavity or at the central pocket, depending on the affinity of the binding odorants to OBPb. This “switching” mechanism enables OBPb to bind coming odorants even with pre-bound odorant, and hence is considered to be more reactive than monomeric OBP. However the suggested mechanism must be directly confirmed before OBPb’s practical applications by some visualization techniques. Here, we suggested to prove the mechanism using a high-speed atomic force microscope that has recently been developed and presented some issues to be tackled for OBPb to be practically applied to sensor fields.

牛由来匂い物質結合タンパク質の結合モデルとその実証 及び実用化

池 松 峰 男

1. はじめに

災害に伴う人命救助活動では、今なお犬が活躍する。空港で爆発物や麻薬のありかを教えてくれるのも、犬である。微かな匂い物質を高感度に検出する装置で犬に勝るものは、今のところ、無い。匂い物質の検出は、それだけの特異的に結合できる性質（特異性）、ごく微量の計測を可能とする検出方法そして使い易さの全てが揃って可能となる。特異性は例えば、匂い物質を抗原と捉え、その抗体を作製することで達成可能である。しかし後者の二つ、すなわち方法論と、使用の容易性が未解決である。方法論として、匂い物質の結合に伴う重量変化を検出する方法^{1,2)}が開発されたが、信号増幅に課題があり、生物を越えていない。それならば生物をそのまま使おうという発想のもと、匂い物質受容体による検出^{3,4)}に始まり、現在では嗅細胞ごと使用する試み^{5,6)}が続けられている。しかし生体材料、特に細胞や細胞膜内でしか機能しない受容体のような、いわば「生き物丸ごと」を使用するシステムは作製が煩雑であることに加え、劣化が早いため、使用の容易性において脆弱である。しかし、これらの点を生物由来物質を用いていながら解決できる材料がある。それが匂い物質結合タンパク質（Odorant-Binding Protein: OBP）である。OBPは水溶性であるため、受容体のように細胞膜を必要としない。また細胞ではないため、扱いが容易である。また本稿で述べる牛由来 OBP（OBPb）は、どのセンシングシステムにもある、一旦匂い物質が結合した後は使えない、という「飽和」の問題を回避できる特殊な機構を持っている。OBPbには生体内での役割からくる「特異性の低さ」という欠点が存在するが、今後の研究によりそれが克服されれば、犬に匹敵する高感度センシングシステムが構築され得る。本稿ではこのシステム実現までの道のりについて議論する。

2. 牛由来 OBP

OBPは哺乳類^{7,8)}や昆虫^{9,10)}にその相同物が存在する可溶性のタンパク質である。OBPはニ

オイ分子を含む幅広い疎水性分子を結合する^{11,12)}ため、嗅覚系において、結合したニオイ分子を嗅上皮に存在する受容体まで運ぶ¹³⁾という、重要な役割を担っていると考えられている。また一般にOBPは単量体として存在する¹⁴⁾が、牛由来OBP (OBPb)は二量体を形成する¹⁵⁾(図1)

OBPbの二量体化は構造的に不安定である。その理由は、他の単量体OBPにあってその構造の安定化に寄与しているジスルフィド結合がOBPbには存在しないためである。OBPbでは構造の一部を別の単量体と共有するドメインスワッピングによる二量体化により構造の安定性を保っている^{15,16)}。このことは、進化の過程でOBPbが構造安定性を犠牲にしてまでも実現する必要があった、特別な機能の存在を想像させる。

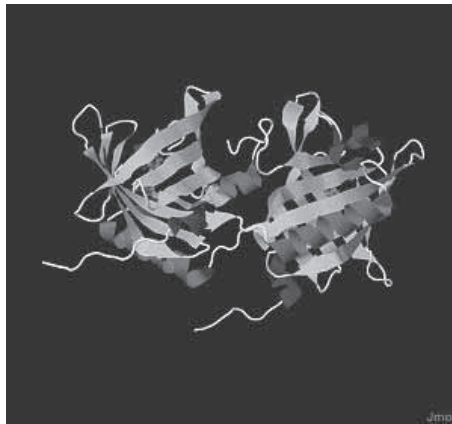


図1 牛由来匂い物質結合タンパク質の立体構造
(source: National Center for Biotechnology Information)

(1) OBPb 結合モデル

我々は蛍光測定による先行研究¹⁷⁾において、OBPbの匂い物質結合モデルを提案した(図2)。まず、(A)二量体化することで新たに出現したポケット部位(Central Pocket: CP)が、最初の結合部位(初結合部位)として匂い物質を捕捉すること(図2準安定状態)、続いて(B)二量体のどちらか一方の単量体結合部位(Internal Cavity: IC)への匂い物質の結合により、CPに結合した匂い物質が解離すること(図2安定状態1)、そして(C)もう一方のICあるいはCPに匂い物質が結合すると、他のICに結合した匂い物質が解離(図2安定状態2-1, 2-2)し、その結果、OBPbは常に二量体一分子に一つの匂い物質という化学量論を維持することを明らかにした。なお、(C)において匂い物質の結合がIC、CPの何れで起こるのかは、匂い物質とOBPbの親和性により決まると思われる。そして、この結合様式は、単量体であれば匂い物質が結合して機能が飽和してしまうこと(図2単量体)を回避させ、常に周囲の匂い物質との結合を可能にする(図3二量体のスイッチ)と結論し、Pevsnerら¹¹⁾以来謎であった「負の協働性」(上述の「特殊な機構」と同意)を説明した。そして、この「負の協働性」が、大気中の物質種の変化を迅速

に検出する上で必須である高感度化を実現するための、すなわち牛という草食動物にとっての肉食獣からいち早く逃れるための進化的適合であるとの仮説（図4）を提案した。

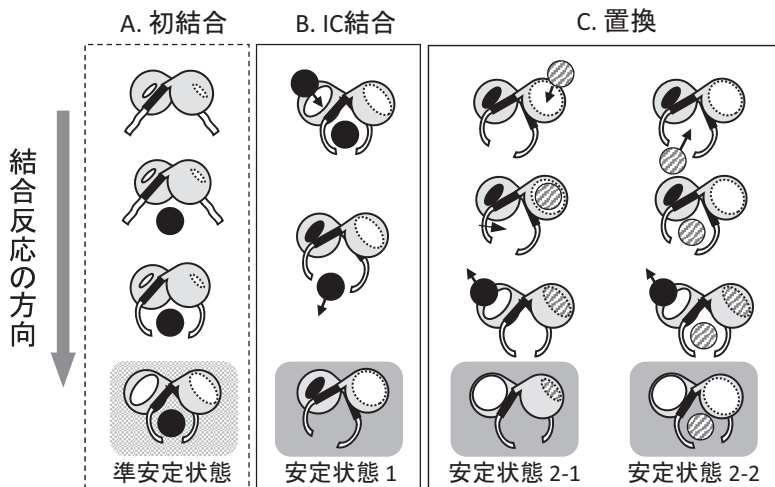


図2 OBPb への匂い物質の結合（仮説）

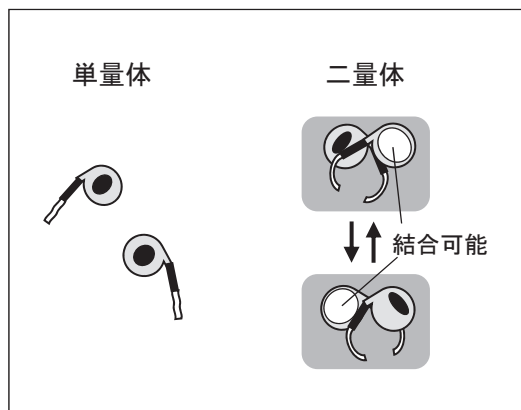


図3 匂い物質結合状態の単量体と二量体における違い（二量体は安定状態 1 と 2（図1）を分のオーダーでスイッチしており、常に何れか IC あるは両 IC が結合可能状態にある）

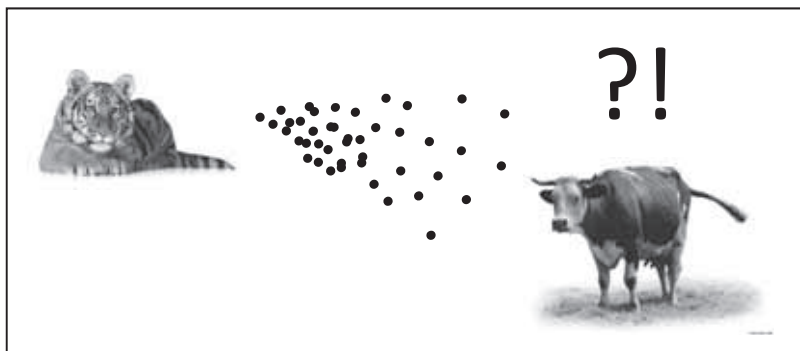


図4 進化的適合（仮説）
肉食動物から逃れるためには、早期に気配を感じる必要がある。

(2) OBPb 結合モデルのセンサ応用に向けた課題

しかしながら本結合モデルは、上述の通り高感度計測を可能にすることを示唆するものではあるが、結合部位にある蛍光性アミノ酸の蛍光強度が結合した匂い物質による蛍光クエンチによって低下することを利用した間接的測定に基づいたものであり、かつ匂い物質の置換が IC と CP のどちらで起こるのかが匂い物質によって決まることの詳細が明らかにされていないことから、図1のような詳細な反応機構を確定するには不十分であった。以来今日まで、センサ実用化を目指す上では、結合・解離を直接観察するための方法が望まれていた。そして近年、ようやく本目的を達成できる直接観察法として、*in situ* でナノメートルオーダーの分解能と一秒当たり 20 フレームという高速度で蛋白質の動きを観察することができる高速原子間力顕微鏡 (High-Speed Atomic Force Microscope: HS-AFM)¹⁸⁻²⁰⁾ が開発され、十年の時を経てようやく OBPb の結合モデルを実証することが可能になった。OBPb 結合モデルを直接観測する上で、特に明確化しなければならないのは次の2点、すなわち

- ① 初結合が CP で起こること。
- ② 物質の置換が IP と CP 間、あるいは IP ともう一方の IP 間で起こること。

である。

3. OBPb 結合機構の直接的検証

(1) 方法

匂い物質の結合を直接観察するためには、溶液中での反応を、ナノメートルレベルの空間分解能とタンパク質の構造変化を追跡できる十ミリ秒オーダーの時間分解能で観察できる装置が必要となる。これを可能にするものとして近年、金沢大学で開発され、(株) 生体分子計測研究所で商品化された HS-AFM が挙げられる。本装置は既にミオシン分子の動き¹⁹⁾、光照射時のバクテリオリドプシンの構造変化²¹⁾などの観察に成功している。

OBPb は 20kDa と大きなタンパク質ではないが、上述の成果に鑑みてその機能の直接観察は可能と考えられるため、OBPb 結合モデルの直接的機能実証に HS-AFM を使用することとした。

(2) 検証にむけた課題

HS-AFM を用いることによって溶液中でのタンパク質の動きを観察することが可能となるが、実際に観察をするためには、いかに OBPb を基板へ固定化するかが重要となる。それは OBPb への最初の匂い物質の結合が CP で起こることが予測されていることから、これを可能とする分子の柔軟性を損なわないような工夫が必要であるためである。

図 5 を用いて詳細を説明する。OBPb (二量体) を構成する各単量体の C 末端はどこにも固定化されていない「揺れる帯」構造を持っており、仮説においては、この「揺れる帯」によって CP への匂い物質の結合と引き続く匂い物質の包み込みが発生するとしている。タンパク質の基板への固定は通常、C 末端側に何らかのリンカーを結合し、そのリンカーを特異的に結合するものを基盤側に配置しておくことで行う。従って、通常の方法に従えば、二量体を構成する両単量体の C 末端が基板に固定されてしまう (図 5 (a)) ため、ともすれば「揺れる帯」の「ゆれ」が消失し、CP への匂い物質の結合が阻害される可能性がある。よって例えば、図 5 (b) にあるように片側だけ固定化できれば、この問題を回避することができる。しかしながらタンパク質を発現させる場合、大腸菌内で作製されるのは単量体であって、それが菌体内、あるいは精製の過程で二量体化するため、二量体を構成する各単量体間で構造の違いを持たせることは困難である。

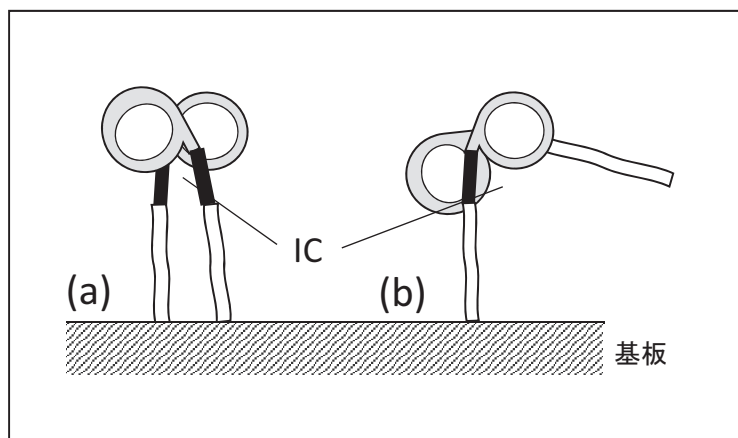


図 5 OBPb の基板への固定化

二量体を構成する両者が固定化される (a) と IC への初結合が阻害されることが予想される。

4. OBPb 結合機構に学ぶ高感度センサ

(1) センサ化に向けた課題

OBPb の結合モデルが実証され、「常時結合可能」な性質が確定すれば、次はこの優れた性質を利用するセンサ開発が目標となる。しかしながらそのためには、特定の匂い物質を検出するための①特異性の付与と②信号変換が課題となる。以下に詳細を述べる。

① 特異性の付与

タンパク質の性質を変える方法には、遺伝子配列に変更を加えてアミノ酸の種類を変更する方法と、何らかの機能分子を付け替える方法があるが、本研究では容易さを考慮し、前者を選択する。遺伝子配列の変更には部位特異的変異導入とランダム変異導入があるが、設計性の容易性をさらに考慮し、ランダム変異による遺伝子配列の変更を選択する。

ランダム変異の導入はランダム変異誘発法を用いて行い、変異体を通常遺伝子と同様にクローニングする。そして検出対象の匂い物質を含む培地で大腸菌を培養・精製し、二量体を形成する OBPb を得る。OBPb は結合する物質がなければ二量体を形成して安定化できないため、検出対象物存在化で二量体化すれば、それは検出対象物を結合できる OBPb ということになる。

次のステップはより特異性が高い OBPb の選別である。ランダム変異を導入した遺伝子（それぞれのプラスミドは異なる変異が導入された OBPb 遺伝子をもっている）によって形質転換された大腸菌はそれぞれ、異なる変異が導入された OBPb を菌体内で発現する。よってまず検出対象物に対して高い特異性を示す OBPb を蛍光測定¹⁷⁾ や上述の HS-AFM を用いた計測により特定し、これを作り出す菌体から大量培養によって遺伝子を取り出し、引き続き特異性の高い OBPb が得られるようにする。そしてさらその OBPb 遺伝子のシーケンスを行い、特異性をもたらずアミノ酸配列変化を特定する。

② 信号変換

OBPb の優れた性質は、匂い物質が IC と CP、あるいは IC と IC との間で常に入れ替っているところにある。このいわば匂い物質のスイッチングにより、常に外界の環境を捉えることが可能となっており、このため急激な環境変化に対応できるわけである。しかしこの変化をセンサとしてどう捉えるかは容易ではない。それは、スイッチング前後で OBPb と匂い物質が結合している状態は何ら変化が無いためである。

スイッチング前後、あるいはスイッチングの過程で見られるのは、OBPb の構造変化である。よってこの構造変化を捉えられれば、スイッチングそのものを検出することができる。この方法としては光による検出と電気的検出が考えられる。光を用いる場合、OBPb が元来有する蛍光性アミノ酸を用いる方法（上述）と新たに蛍光性物質をタンパク質に付加する方法がある。前者は蛍光性アミノ酸の数が3種類と少ないため蛍光強度が弱くセンシング手段には適していない。従って、光を用いる場合には後者を選択することになる。後者では、蛍光物質間でのエネルギーの受け渡しで環境変化を高感度に検出できる蛍光共鳴エネルギー移動（Fluorescence Resonance

Energy Transfer: FRET) が応用²²⁾されており、OBPb への匂い物質結合に伴うタンパク質内の環境変化の検出にも適用可能と考えられる。

構造変化を電気信号として取り出す場合、変位電流を用いることができる。変位電流は下式で表される。

$$i = \varepsilon S/d \cdot dV/dt \quad (\varepsilon: \text{誘電率、} S: \text{膜面積、} d: \text{膜厚、} V: \text{印加電圧})$$

よって OBPb が固定化されている下地の誘電率を高くすることで大きな信号変化として取り出すことが可能となる。つまりセンサ化における信号変換の課題は、光検出においては構造変化という小さな環境変化をエネルギー移動等によりいかに大きな信号変化に変換できるか、そして電氣的検出であればいかに誘電率を高めるかにある。

(2) 実用化

空港での麻薬探知や災害現場での人命救助、さらには戦場における地雷探知等、高感度な匂い検出は犬に頼らざるを得ないのが現状である。グローバリゼーションの発展に伴い、犬の嗅覚に頼らざるを得ない「現場」の数が増大することは容易に想像され、人工的であつ犬と同等以上の性能を有する化学センサの要求もそれに伴い増加するだろう。OBPb の実用化には上述の 2 つの課題があるが、これらが解決されれば、この要求に応えることができる。

5. おわりに

OBPb の特徴は二量体化に伴う匂い物質の「常時結合可能性」である。この性質によって上述の通り、匂い物質の結合に伴う連続的な構造変化が期待でき、それが検出できれば OBPb によって生物の感度に匹敵する化学センサが構築できる。解決が必要な 2 つの課題のうち、特に検討が必要なのは特異性の向上である。OBPb の匂い物質への特異性は高くない。それは多くの匂いを受容体まで運搬する機能が予測されていることから理解できる。被検出物質への特異性を高めることは、上述の通りランダム変異の導入により早期に所望の OBPb を得られる可能性もあるが、場合によっては厳密な分子設計が必要になることも想定される。OBPb の「常時結合可能性」は低特異性であっても、外敵から逃れるための高感度性を実現するユニークな性質である。我々はこの「玉に瑕」である低特異性の改変に特に注力することで、OBPb をより高機能化し、牛ならぬ犬を代替する。

参考文献

- 1) I. Sugimoto, M. Nakamura, H. Kuwano, Chemical sensing structure, direction, and quantification of plasma-organic films with α -amino acids, *Sensors Actuators B* 35-36 (1996) 342-347.
- 2) P. Singh, T. Onodera, Y. Mizuta, K. Matsumoto, N. Miura, K. Toko, Dendrimer modified biochip for detection of 2,4,6 trinitrotoluene on SPR immunosensor: fabrication and advantages, *Sensors & Actuators B* 137 (2009) 403-409.
- 3) K. Sato, M. Pellegrino, T. Nakagawa, T. Nakagawa, L.B. Vosshall, K. Touhara, Insect olfactory receptors are

- heteromeric ligand-gated ion channels, *Nature* 452 (2008) 1002-1006.
- 4) D. Wicher, R. Schafer, R. Bauernfeind, M.C. Stensmyr, R. Heller, S.H. Heinemann, B.S. Hansson, *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels, *Nature* 452 (2008) 1007-1011.
 - 5) A. Kiely, A. Authier, A.V. Kralicek, C.G. Warr, R.D. Newcomb, Functional analysis of a *Drosophila* melanogaster olfactory receptor expressed in Sf9 cells, *J. Neurosci. Methods* 159 (2007) 189-194.
 - 6) E.M. Neuhaus, G. Gisselmann, W. Zhang, R. Dooley, K. Stortkuhl, H. Hatt, Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 15-17.
 - 7) A. Felicioli, F. Ferraro, M. Fanni, M. Garibotti, A. Navarrini, D. Pes, P. Pelosi, Odorant-binding proteins and biosensors for odours, *Life Chem. Reports* 11 (2000) 345-355.
 - 8) E. Bignetti, A. Cavagioni, P. Pelosi, K.C. Persaud, R.T. Sorbi, R. Tirindelli, Purification and characterization of an odorant-binding protein from cow nasal tissue, *Eur. J. Biochem.* 149 (1985) 227-231.
 - 9) P. Pelosi, Odorant-binding proteins: structural aspects, *Ann. NY Acad. Sci.* 855 (1988) 281-293.
 - 10) R.G. Vogt, Molecular genetics of moth olfaction, a model for cellular identity and temporal assembly of the nervous system, Cambridge University Press, Cambridge (1995) 341-367.
 - 11) J. Pevsner, V. Hou, A.M. Snowman, S.H. Snyder, Odorant-binding protein characterization of ligand binding, *J. Biol. Chem.* 25 (1990) 6118-6125.
 - 12) M.-F. Herent, S. Collin, P. Pelosi, Affinities of nutty and green-smelling pyrazines and thiazoles to odorant-binding proteins, in relation with their lipophilicity, *Chem. Senses* 20 (1995) 601-608.
 - 13) E. Bignetti, G. Damianim, P. De Negri, R. Romani F. Avanzini, G. Ferrari, F.L. Rossi, Specificity of an immunoaffinity column for odorant binding protein from bovine nasal mucosa, *Chem. Senses* 12 (1987) 601-608.
 - 14) A. Felicioli, F. Ferraro, M. Fanni, M. Garibotti, A. Navarrini, D. Pes, P. Pelosi, Odorant-binding proteins and biosensors for odours, *Life Chemistry Reports* 11 (1994) 347-355.
 - 15) J. M. Bennet, M. P. Schlunegger, and D. Eisenberg, 3D Domain swapping: a mechanism for oligomer assembly, *Protein Sci.* 4 (1995) 2455-2468.
 - 16) S. Spinelli, TR. Ramoni, S. Grolli, J. Bonicel, C. Cambillau, M. Tegoni, The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism, *Biochemistry* 37 (1998) 7913-7918.
 - 17) M. Ikematsu, T. Han, and A. Yamada, Odorant binding initially occurring at the central pocket in bovine odorant-binding protein, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 333 (2005) 1227-1233.
 - 18) T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito, and A. Toda, A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules, *PNAS* 98 (22) (2001) 12468-12472.
 - 19) N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando, Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy, *Nature* 468 (2010) 72-76.
 - 20) T. Ando, T. Uchihara, and S. Scheuring, Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy, *Chem. Rev.* 114 (6) (2014) 3120-3188.
 - 21) M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, T. Ando, High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin, *Nat. Nanotech.* 5 (2010) 208-212.
 - 22) F. Khan, L. Gnudi, J.C. Pickup, Fluorescence-based sensing of glucose using engineered glucose/galactose-binding protein: A comparison of fluorescence resonance energy transfer and environmentally sensitive dye labelling strategies, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365 (2008) 102-106.

