

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 16 年度 博士課程 進学
氏 名 永井 俊匡
指導教員 阿部 啓子

論文題目

魚類味覚レセプター T1R および T2R を用いた脊椎動物の化学受容機構の解析

味覚は、生体にとって栄養となる物質と害となる物質とを判別するための化学感覚である。食物中の呈味物質は、味蕾と呼ばれる末梢器官で受容され、生じたシグナルは味神経を経て中枢に達し、そこで味覚として認識される。味蕾は、脊椎動物に共通して存在し、ヒトにおいては舌や咽頭、喉頭蓋などに存在する。脊椎動物の味覚受容機構については、近年、哺乳類において、味覚受容体として機能する 2 つの G タンパク質共役型受容体(GPCR)ファミリー T1R および T2R が発見され、解明へ大きく進展をみせた。これまでに、T1R ファミリーが甘味物質(糖類や人工甘味料、甘味タンパク質など)および旨味物質(L-アミノ酸)を、T2R ファミリーが苦味物質を受容すること、PLC- β 2 および TRPM5 が受容体の下流で機能する細胞内シグナル伝達因子であることが明らかになっている。このように、味物質受容から細胞内シグナル伝達に至る一連の分子機構の一端が明らかになってきたものの、その詳細や中枢の神経伝達系の機構については、不明なままである。

我々は、脊椎動物の味覚研究におけるこれらの問題点を解明するためのモデル動物として、魚類に注目した。魚類は、神経系の構造が単純であること、味覚応答の感度が高いことなど味覚研究、特に味神経伝達の研究を行う上での利点を持つ。また、脊椎動物の中で最も古く分岐した魚類と、最も新しく分岐した哺乳類について、味覚受容機構関連分子の機能および構造を比較解析することによって、脊椎動物全般にわたる味覚受容機構の進化論的な知見を得ることができると考えられる。

これまでに、我々の研究室によって、2 種の魚類(ドジョウおよびメダカ)の味蕾に、哺乳類と同様に PLC- β 2 が発現していることが明らかになっているものの、それ以外の味覚受容機構の分子基盤について、魚類と哺乳類の間でどれほどの共通性、あるいは相違点があるのかは明らかになっていない。本研究は、今後の中枢神経系の解析に向けて、未だ不明な魚類の味覚受容体に焦点を当て、魚類について哺乳類 T1R および T2R に相同な分子を同定し、その機能を解析することで、脊椎動物の味覚受容機構の一端を明らかにすることを目的とした。

魚類 T1R および T2R ファミリー遺伝子の同定¹⁾

魚類ゲノムデータベースの検索によって、哺乳類 T1R あるいは T2R と相同性を有する分子をコードする遺伝子の同定を試みた。ヒト T1R (hT1R1, 2, 3) のアミノ酸配列を用いて、トラフグ (*Fugu rubripes*; ff) ゲノムデータベースに対して TBLASTN 検索を行った結果、ffT1R 遺伝子を 4 種 (ffT1R1, 2a, 2b, 3) 見出した。ffT1R1 は hT1R1 と、ffT1R3 は hT1R3 とそれぞれ最も高い相同性 (約 40%) を示した。一方、ffT1R2a, ffT1R2b は、hT1R1 と hT1R2 に対して同程度の相同性 (約 30%) を示した。次に、見出された ffT1R のアミノ酸配列を用いてゼブラフィッシュ (*Danio rerio*; zf) およびメダカ (*Oryzias latipes*; mf) ゲノムデータベースを検索したところ、ffT1R に高い相同性を示す遺伝子をゼブラフィッシュで 4 種 (zfT1R1, 2a, 2b, 3) およびメダカで 5 種 (mfT1R1, 2a, 2b, 2c, 3) 同定した。これらの配列について分子系統樹を作製したところ、魚類 T1R1 は哺乳類 T1R1 の、魚類 T1R3 は哺乳類 T1R3 のそれぞれオルソログであることが示唆された。魚類 T1R2 と哺乳類 T1R2 もオルソログだと考えられるが、その進化距離は T1R1 間および T1R3 間のそれよりも離れていた。

T2R については、既知のヒトおよびマウス T2R (計約 60 種) のうち分子系統学的に偏りのない 15 種を選択し、それらのアミノ酸配列を用いて、トラフグ、ゼブラフィッシュ、メダカおよびミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*) の 4 種のゲノムデータベースを検索した。その結果、哺乳類 T2R に高い相同性を示す遺伝子配列をトラフグで 4 種、ゼブラフィッシュで 7 種、メダカで 1 種およびミドリフグで 7 種見出した。GPCR 様配列の網羅的な検索においても、上記以外のゼブラフィッシュ T2R 遺伝子は見出されなかった。以上の結果から、魚類 T2R の種類数は哺乳類 T2R のそれ (約 30 種) と比較して少ないことが強く示唆された。また、魚類 T2R と哺乳類 T2R の相同性は 20% 前後で、魚類 T1R と哺乳類 T1R との相同性よりも低かった。分子系統樹においては、哺乳類 T2R の枝と魚類 T2R の枝は大きく離れていた。このことから、魚類 T2R と哺乳類 T2R は、それぞれ独自に分子進化、多様化したと考えられる。

魚類 T1R および T2R ファミリー遺伝子の発現解析¹⁾

データベース検索により同定された魚類 T1R および T2R が、味覚受容体としての役割を果たしているかの検討を行った。まず、これらの遺伝子の味蕾での発現を、ゼブラフィッシュおよびメダカを用い、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法によって解析した。その結果、4 種の zfT1R、5 種の mfT1R、6 種の zfT2R および mfT2R1 が味蕾に特異的に発現していた。このことから、魚類 T1R および T2R が味覚受容体である可能性が示唆された。

また、これらの遺伝子のうち、zfT1R および zfT2R1a, 1b のそれぞれと PLC-β2 遺伝子との発現相関を解析したところ、すべて PLC-β2 発現細胞に発現していることが明らかとなった。このことから、魚類においても、哺乳類と同様に PLC-β2 が T1R および T2R の下流の細胞内シグナル伝達因子として機能していることが示唆された。

さらに、魚類の味蕾における T1R および T2R の発現相関を、多重標識 ISH 法によって詳細に解析した。T1R については、哺乳類において、T1R1 と T1R2 が排他的に発現し、両者を内包するように T1R3 が発現していることが報告されている。ゼブラフィッシュにおいても、哺乳類と同様に、zfT1R1 と zfT1R2 が排他的に発現し、zfT1R3 発現細胞は zfT1R1 発現細胞のほとんどおよび zfT1R2 発現細胞の一部を含んでいた。一方、zfT1R2 と zfT1R3 の発現の重なりは小さく、zfT1R2 のみが発現する細胞が多数存在し、哺乳類とは異なる様相も呈していた。メダカにおいても、ゼブラフィッシュと同様に、mfT1R1, mfT1R2a, 2b, 2c のそれぞれと mfT1R3 は少なくとも

一部の細胞で共発現していた。

T2Rについては、哺乳類においてT1Rと排他的に発現することが報告されている。ゼブラフィッシュにおいても、解析した2種のzfT2R(zfT2R1a, 1b)はzfT1Rと異なる細胞に発現していた。このことから、魚類においても、哺乳類と同様に、末梢の味細胞レベルで分離される2つの味覚受容経路が存在することが予想された。

魚類 T1R および T2R ファミリーのリガンドの同定

哺乳類味覚受容体と相同性を有し、味蕾に発現することが示された魚類 T1R および T2R が、真に味物質を受容するかを明らかにするため、これらの受容体のリガンドを同定することを次に目指した。そのために、まず、ゼブラフィッシュがどのような味物質を受容しうるかを、神経応答の解析によって検討した。アミノ酸(各種 L 型、グリシン、D-アラニン)、糖(スクロース)、哺乳類における苦味物質(デナトニウムおよびキニーネ)をゼブラフィッシュに経口投与し、顔面神経の応答を記録した結果、各種 L-アミノ酸、グリシン、デナトニウム、キニーネに対して応答が見られた。D-アラニンおよびスクロースには応答が見られなかった。アミノ酸の中では、アラニン、システイン、プロリン、セリン、チロシン(いずれも L 型)およびグリシンに比較的強い応答が見られた。

次にゼブラフィッシュおよびメダカの T1R, T2R について、培養細胞 HEK293T に遺伝子導入し、カルシウムイメージング法によって、リガンドの同定を試みた。まず T2R について解析を行った結果、zfT2R5 および mfT2R1 が、デナトニウムを受容することを発見した。zfT2R5 導入細胞および mfT2R1 導入細胞は、他の苦味物質およびアミノ酸を投与した場合には応答が見られなかった。分子系統学的にオルソログである zfT2R5 および mfT2R1 が共通のリガンドを受容することは興味深い。以上の結果から、魚類においても、哺乳類と同様に T2R ファミリーが忌避物質を受容することが示唆された。

魚類 T1R については、T1R1+T1R3 あるいは T1R2+T1R3 を共トランスフェクトした時のみ、各種 L-アミノ酸への応答が見られた。ゼブラフィッシュにおいては、zfT1R2a+3 の組合せでアラニン、プロリン、セリン、チロシン(いずれも L 型)に特異的な応答が見られた。zfT1R2b+3 導入細胞は、より多くの L-アミノ酸に応答が見られ、アラニン、システイン、プロリン、セリン、チロシン(いずれも L 型)およびグリシンに比較的強く応答した。これらの応答パターンは、神経応答解析で得られたものとよく一致した。メダカについては、mfT1R2a+3, mfT1R2b+3 および mfT1R2c+3 導入細胞に加えて mfT1R1+3 導入細胞も L-アミノ酸に応答した。一方、これらのどの受容体セットを導入した細胞も、D-アラニンやスクロースおよびグルコースの糖類には応答が見られなかった。これらの結果から、魚類 T1R が L-アミノ酸の受容体であることが示された。T1R1+T1R3 のヘテロマーでアミノ酸を受容するという、哺乳類との共通点が見られたが、魚類 T1R2+T1R3 ヘテロマーはアミノ酸を受容し、糖類などを受容する哺乳類 T1R2+T1R3 との相違点も見出された。魚類 T1R2+T1R3 は、アミノ酸に対する感度が哺乳類 T1R1+T1R3 に比べて高いだけでなく、多種類のアミノ酸を、異なる受容特性を持った複数の T1R2 によって幅広く受容できることが明らかになった。このことから、それぞれの環境に適応して、哺乳類 T1R2 が糖質を受容する能力を獲得していったのに対し、魚類 T1R2 は、よりアミノ酸受容に適した分子へと進化していったことが推測される。

以上の結果から、魚類 T1R および T2R が味物質を受容する味覚受容体として機能していることが強く示唆された(図)。

デナトニウム受容体の構造機能相関解析

zfT2R1b をクローニングする過程で、再現性のある多型配列 zfT2R1b₁ および zfT2R1b₂ と、zfT2R1b₁ と 1 塩基置換に由来するアミノ酸 1 残基のみ異なる配列 zfT2R1b₁-K270E が得られた。これら zfT2R1b の多型および変異体のリガンド解析を行ったところ、zfT2R1b₁-K270E がデナトニウムを受容することを発見した (EC₅₀ = 34 μM)。zfT2R1b₁ および zfT2R1b₂ は、アミノ酸配列が zfT2R1b₁-K270E とそれぞれ 1 および 6 残基しか異なっていないにもかかわらず、これらを導入した細胞は、デナトニウムに対する感受性をほとんど示さなかった。zfT2R1b₁-K270E の特性をより詳細に解析したところ、zfT2R5 および mfT2R1 の場合と同様に他の苦味物質を受容しないだけでなく、デナトニウムに対する感度が zfT2R5 および mfT2R1 (それぞれ EC₅₀ = 4.4, 5.8 mM) に比べて約 130-170 倍も高かった。zfT2R1b₁-K270E の配列が再現的に得られるかを検討するため、由来の異なる複数個体のゼブラフィッシュについて zfT2R1b のジェノタイプングを行ったところ、zfT2R1b₁-K270E の遺伝子配列を持つ個体は得られず、再現性を証明することはできなかった。しかし、1 残基変異によって感受性が劇的に変化しており、ここにデナトニウム受容の構造機能相関に関する重要な手がかりがあると考え、その解析を試みている。

まとめ

哺乳類味覚受容体と相同性を有する遺伝子を魚類ゲノムデータベースから同定し、それらが味覚受容器である味蕾に発現することを明らかにした。さらに、ゼブラフィッシュの神経生理学的解析により予想された味物質候補の中から、魚類 T1R および T2R ファミリーのリガンドを *in vitro* の系を用いて同定した。以上のことから、今後、逆遺伝学的な解析による証明が必要ではあるものの、同定した GPCR ファミリーが味覚受容体であることが強く示唆された。魚類味覚受容体の同定は、哺乳類との比較解析から進化学的な知見を得ることを可能にするとともに、今後はヒト味覚研究の基盤となると考える。

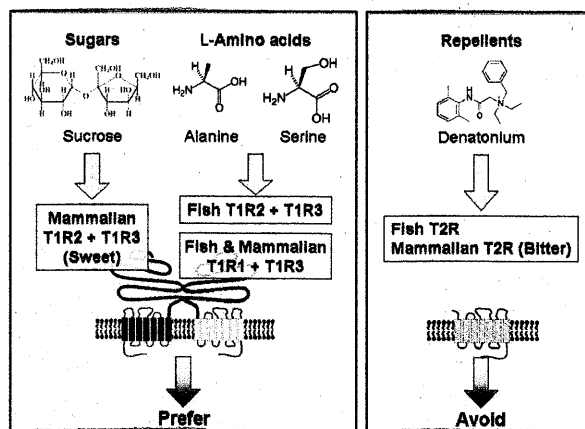


図 魚類および哺乳類の味覚受容体とリガンドの対応関係

参考文献

- ¹⁾ Ishimaru, Y., Okada, S., Naito, H., Nagai, T., Yasuoka, A., Matsumoto, I., and Abe, K. (2005) Two families of candidate taste receptors in fishes. *Mech. Dev.* 122, 1310–1321