

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 17 年度博士課程 入学

氏名 伊藤 圭祐

指導教員名 阿部 啓子

論文題目

味覚修飾タンパク質ミラクリンの発現系構築と構造生物学的解析

目的

甘味は人類がその長い歴史を通じて常に求めてきた味であり、食品の嗜好性に寄与する最も重要な因子の一つである。また、近年では、肥満、糖尿病の誘因となるメタボリックシンドロームのリスク低減の観点から、健康指向の甘味料の開発が食品医療産業上きわめて大きな注目を集めている。そのような重要性にも関わらず、ヒトがどのように甘味を受容し、甘味感覚を発現するかの甘味受容機構の詳細は未知の部分が多く残す。

ミラクリン (MCL) は、西アフリカ原産の果実 *Synsepalum dulcificum* に含まれるホモ二量体糖タンパク質であり、MCL を口に含んでから酸を味わうと強い甘味を呈するユニークな味覚修飾活性を持つ。同様な活性を有するネオクリンはそのもの自身も甘味を呈するが、MCL との一次構造上の相同性はないことから、両者の間での機能発現機構の共通性の有無の検証は興味深い。MCL はそれ自身が無味であることから、甘味受容の有無をスイッチ on/off として捉えることもできる。その作用機構の解析を通じて、甘味受容機構解明へ新たな切り口を見出し得ると期待される。

タンパク質の分子レベルでの解析には発現系構築が不可欠である。しかし、MCL は約 40 年前に発見されて以来、多くの研究者が大腸菌や酵母での発現を試みてきたにも

かかわらず、発現系構築に成功したとの報告はない。そのため、機能発現機構に関する分子レベルでの知見は現在までほとんど得られていない。

そこで筆者は、MCL 発現系を構築して十分量の試料を取得し、構造生物学的手法による MCL の機能発現機構の解析を可能とした。以下にその経緯を述べる。

1. タンパク質化学的研究

Synsepalum dulcificum 果実より活性本体を精製し、同定を行なった。活性画分には少なくとも 3 種類の分子量の異なるタンパク質 MCL-I、II、III が検出された。それらの N 末端および内部アミノ酸配列解析は既知の MCL のデータと同一であったことから、付加した糖鎖に若干の分子量の違いはあるものの、基本的に MCL と同等であると結論した。MCL の機能発現機構として、酸で構造変化した糖鎖が甘味受容体と相互作用するモデルが提唱されているが、実験的証拠はない。これら MCL-I、II、III の 3 種タンパク質間で味覚修飾活性に差がみられなかったことから、味覚修飾活性には糖鎖構造そのものは不可欠ではないことが示唆された。

精製 MCL の円二色性 (CD) スペクトル解析の結果、 β -sheet に富んだ構造であり、 β -II タンパク質と総称される一連のタンパク質と、一次構造の相同性のみならず、高次構造上も類似性していることが示唆された。また、MCL のスペクトルが pH 変化に伴って変化することを見出した。これは味覚修飾活性の pH 依存性を反映した構造変化と考えられるが、 β -II タンパク質の CD スペクトル解析は困難であり、詳細な構造解析には至っていない。より多くの構造情報の集積により、味覚修飾活性と構造変化の相関解析が可能となるであろう。

2. MCL 発現系の構築

Synsepalum dulcificum 果実より MCL 遺伝子のクローニングを行い、*Escherichia coli*、*Bacillus brevis*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Aspergillus oryzae* を宿主とした発現系構築を試みた。*E.coli* を宿主とした発現系において、各種ベクターを用いて発現を試みた結果、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現した場合、菌体破碎後の可溶性画分に MCL 二量体が得られることを見出した。しかし、精製後のタンパク質には活性は検出できなかった。*B. brevis* を宿主とした発現系では、細胞壁タンパク質由来である P2 プロモーター下流に MCL 遺伝子のクローニングを行い、*B. brevis* を形質転換した。発現誘導の結果、培養液上清中に MCL 単量体のみが検出された。*S. cerevisiae* を宿主とした発現系では、ガラクトース添加によって発現誘導される

GAL1 プロモーター下流に、分泌シグナルとして α -ファクターを融合した MCL 遺伝子を導入されるように PCR 法によって設計し、*S. cerevisiae* 菌体内での相同組み換えによって形質転換を行った。発現誘導の結果、菌体破碎後の可溶性画分に MCL 単量体のみが検出された。*P. pastoris* を宿主とした発現系では、メタノールによって強力に発現誘導される AOX1 プロモーター下流に、分泌シグナルとして α -ファクターを融合し、N 末端に FLAG-tag、C 末端に His-tag を付加した MCL 遺伝子を合成し、*P. pastoris* 菌体内での相同組み換えによって形質転換を行なった。発現誘導後、培養液上清中に MCL 単量体と二量体の両方が検出された。His-tag 精製によって MCL 単量体のみが得られ、FLAG-tag 精製によって MCL 単量体と二量体の両方が得られたことから、C 末端に付加した tag は二量体化によって機能できず、N 末端に付加した tag が MCL 二量体の精製に有効であると結論した。しかし、この方法で精製した MCL 二量体の収量は非常に低く、活性測定には至らなかった。

A. *oryzae* を宿主とした発現系構築では、分泌キャリアータンパク質として α -アミラーゼを用い、その下流に KEX 2 プロテアーゼ切断配列を挟んで MCL 遺伝子を導入した。このコンストラクトにより A. *oryzae* を形質転換した。発現誘導後、培養液上清中に MCL 単量体と二量体の両方が検出された。培養条件の検討後、大量培養を行った。培養液上清からタンパク質を回収し、精製後、N 末端近傍一次構造解析、CD スペクトルによる二次構造解析によって天然 MCL と同等であることを確認した。さらに特性解析を行った結果、天然 MCL と同等の味覚修飾活性をも有しており、活性を有する MCL 二量体の発現系構築に初めて成功した。培養液中の発現量は 2 mg/L、精製後の収量は 0.8 mg/L であった。また、MCL 自身に無味であることから、味覚修飾活性の受容分子は不明であったが、ラクチゾールによって阻害されることから、ヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 を介したものであることが判明した。

3. 機能発現機構の構造生物学的解析

構築した発現系を用い、変異体解析を行った。MCL に存在する糖鎖付加部位 Asn42、Asn186 へ変異導入し、麴菌発現 MCL の糖鎖付加について解析したところ、付加部位は天然 MCL と同一であった。さらに、活性残基の特定を行った。MCL の味覚修飾活性が弱酸性 pH 領域で発現することから、その分子中に 2 つ存在する His 残基に着目し、Ala へ置換した変異体を作出した。結果、H30、60A 二重変異体の味覚修飾活性は消失した。続いて H30A 変異体を作出したところ、同様に活性が消失したことから、His30 が活性

残基の一つであると結論した。

MCL の構造は未知であるため、シミュレーションモデリングによる構造予測を行なったところ、MCL 二量体におけるサブユニット間の境界面は、シミュレーションモデリングの鋳型として用いたアミラーゼインヒビターのアミラーゼ結合領域と同一であった。この領域は β -II タンパク質において機能発現に寄与する領域と考えられる。MCL 単量体には味覚修飾活性が検出されなかったことと合わせ、MCL の味覚修飾活性には二量体であることが必須であり、特にサブユニット間の境界面が活性に重要であることが示唆された。さらに、構築したモデルにおいて、His30 残基は MCL のサブユニット境界に位置したことから、His30 は pH 変化の受容を通じ、サブユニット間の相互作用へ寄与していることが推察された。

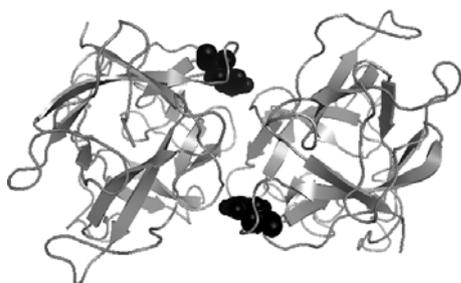


図 MCL のシミュレーション・モデル
(His30 を空間重点モデルで示す)

まとめ

本研究により、過去 40 年以上も成し遂げられなかった MCL の発現系構築に成功し、構造生物学的解析のための基盤の確立に至った。さらに、構築した系を用いて、味覚修飾活性に His 残基が関与していることを明らかにし、シミュレーションモデリングによって作用機構を推察した。これは、味覚修飾タンパク質の活性残基についてはじめての成果である。

今後さらなる解析により、詳細な味覚修飾活性の機能発現機構が明らかとなると期待される。

発表論文

Ito K, *et al.* Microbial production of sensory-active miraculin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 407-411(2007)

Ito K, *et al.* Val326 of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 amylase II modulates the preference

for alpha-(1,4)- and alpha-(1,6)-glycosidic linkages. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 443-449(2007)