

論文審査の結果の要旨

伊藤圭祐

申請者氏名

目的

甘味は食品の嗜好性に寄与する最も重要な因子の一つであるが、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。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、発現系構築に成功したとの報告はない。申請者は、MCL 発現系を構築し、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、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重要ではないことが示唆された。また、MCL の受容分子は不明であったが、ラクチゾールによって味覚修飾活性が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を明らかにした。

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、Kunitz 型トリプシンインヒビターと、一次構造のみならず、高次構造上も類似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。

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、培養液上清中に MCL 単量体のみが発現した。*S. cerevisiae* を宿主とした発現系では、菌体破碎後の可溶性画分に MCL 単量体のみが発現した。*P. pastoris* を宿主とした発現系では、培養液上清中に MCL 単量体と二量体の両方が発現した。しかし、発現量、および精製収量が低く、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。

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、麹菌発現 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成した。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 変異体を作成したところ、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。

シミュレーションモデリングの結果、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。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。

以上、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た。これは、ミラクリンの基盤研究として非常に重要な成果であり、学術的に高く評価できる。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。