

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 17 年度進学

氏名 中島 健一朗

指導教員名 阿部 啓子

論文題目 甘味タンパク質ネオクリンの発現生産とその味覚修飾活性機構の解析

甘味を呈する物質には、ショ糖などの糖類、D-トリプトファンなどのアミノ酸、ステビオサイドなどの配糖体、アスパルテームなどのペプチド性化合物からサッカリンなどの人工甘味料、モネリンなどのタンパク質まで化学類型の異なる化合物が多種多様に存在する。これらの甘味物質はGタンパク質共役型受容体TIR2とTIR3のヘテロマーからなる甘味レセプターにより受容される。これまでに、レセプター上には複数の甘味物質作用部位の存在が報告され、その**broad tune** なリガンド認識機構については非常に興味をもたれている。

ごく最近、同様のレセプターが腸管においても発現し、グルコースセンサーとして機能してペプチドホルモンの分泌の制御に関与するとの報告があり、肥満や糖尿病などの治療のターゲットとしてもその活性化機構が注目されている。

これまでに先進国での糖の過剰摂取による疾病への対策として、味覚科学と食品産業の分野が長年に亘って興味を示してきたものに甘味タンパク質があり、すでに、8種類のタンパク質の存在が知られている。その多くは、重量比率あたりショ糖の数百から数千倍もの強い甘味を示し、糖に替わる低カロリー甘味料としての使用が期待されている。なかでも、1960年代にアフリカ産のミラクルフルーツの果実から発見されたミラクリンと1980年代にマレーシア産のクルクリゴの果実から発見されたクルクリン、そして我々のグループが発見したネオクリン(NCL)は酸味を甘味に変換する活性(味覚修飾活性)を持つユニークなタンパク質である。

NCLは、糖鎖の付加した酸性サブユニットNASと塩基性サブユニットNBSがジスルフィド結合で架橋された約22 kDaのヘテロダイマーである。そのもの自身も甘味を呈するうえ、口に含んだあとに酸を味わうと強烈な甘味が生じる。また、この活性は30分から1時間程度持続する。一方、ミラクリンは塩基性サブユニットがジスルフィド結合で架橋された約50 kDaのホモダイマーで、そのもの自身は無味であるがNCLと同様に味覚修飾活性を持つ。この活性は1時間から2時間程度持続する。生物行動学的には、どちらのタンパク質もヒト(およびヒト近縁のサル)によってのみ甘味が認識されると考えられている。したが

って、味覚評価に通常の実験動物は使用できない。

両者の活性は非常に類似しているものの、アミノ酸配列の相同性は低いことから、構造と機能の関係はほとんどわかっていなかった。さらに、味覚修飾タンパク質がどのように受容されることによってユニークな活性を示すのかに関する、分子機構も不明であった。

本研究では NCL の受容、特に酸によって増強する甘味がどのような機構によって生じるのかを、独自に作出した NCL 変異体をツールとして用い、官能試験およびヒト甘味レセプター発現細胞を用いた評価系により解析した。

NCL のヒト甘味レセプターへの作用の検証

NCL も他の甘味物質と同様に、ヒト甘味レセプター(hT1R2-hT1R3)に作用すると予想し、その作用を培養細胞に hT1R2-hT1R3 を発現させた系を用いて評価した。hT1R2、hT1R3、キメラ変異体 Gα タンパク質 (G16Gust25) の 3 者を human embryonic kidney (HEK) 293T cell に一過的に導入し、IP3-Ca⁺⁺シグナリング系による細胞内カルシウムイオン濃度の増加を Fura2-AM を用いたカルシウムイメージングによりモニターしたところ、アスパルテームやサッカリンといった低分子量甘味物質に反応する細胞は NCL にも反応した。また、この反応は hT1R2-hT1R3 の阻害剤であるラクチゾールによって抑制された。このことから NCL は hT1R2-hT1R3 を介して受容されると考えられる。しかし、この系では NCL に対する細胞反応が酸を添加しても変化しなかった(この問題は後述のように解決した)。そこで、当面、官能試験により甘味の強度と pH の関係性を評価した。NCL を味わった後に、pH の異なる酢酸緩衝液を味わうことで生じる甘味の強度をアスパルテーム当量で評価したところ、酸により生じる甘味が pH の低下に依存して増強することを確認した。また、この甘味はラクチゾールを味わうことで阻害された。以上の結果から、NCL 自身の甘味および酸を味わうことで増強される甘味はいずれも hT1R2-hT1R3 を介することを明らかにした。

麹菌を宿主とした組換え NCL の発現生産系の構築

NCL の構造・機能相関の解明のためには、その変異体を用いた解析が有効である。このため、次に組換え NCL の発現系の構築を行った。NCL は糖鎖の付加した NAS と NBS がジスルフィド結合で架橋されたヘテロダイマーであることから、本研究ではジスルフィド結合の架橋や糖鎖の付加などの翻訳後修飾が可能なうえ、大量の分泌生産が期待できる麹菌 (*Aspergillus oryzae*) を宿主として用いた。

NAS と NBS の cDNA をそれぞれ、麹菌が大量分泌する酵素である α-amylase の遺伝子と KEX2 プロテアーゼ切断配列の間に挿入した発現プラスミドを構築した。組換え NCL は α-amylase との融合タンパク質として翻訳された後、宿主のタンパク質分泌経路を輸送され、ゴルジ体内に局在する KEX2 プロテアーゼにより α-amylase と切り離され、培地中に分泌生産される。発現プラスミドを麹菌へ共導入する際には、サブユニットのアミノ末端にトリグリシン配列を付加して KEX2 プロテアーゼの切断精度を向上させる、2つの発現プラスミドの比率を検討して両サブユニットの発現量を揃えるなどの改良を行った。NCL 生産株は小規模培養を行い、抗 NCL 抗体を用いた上清のウェスタン解析で選抜した。組換え NCL の生産量は培地 1.3 mg/L 程度であった。NCL 生産株を大量培養後、培地上清を回収し、硫酸アンモニウム沈殿、フェニル疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの

順に精製を行った。クルクリゴ果実から精製した NCL と組換え NCL のタンパク質化学的な性質は SDS-PAGE、ウエスタン解析、糖タンパク質染色により比較し、両者とも同等の構造をもつ、糖鎖の付加したヘテロダイマーであることを確認した。また、組換え NCL の甘味活性と味覚修飾活性を hT1R2-hT1R3 発現細胞を用いた評価系と官能試験により評価した結果、その活性が果実由来の NCL に匹敵することを確認した。

NCL の酸誘導性の甘味の定量的評価系の構築とそれに基づく味覚修飾活性機構の解明

NCL の pH 依存的な甘味の増強を客観的・定量的に評価するため、細胞評価系の改良を行った。hT1R2-hT1R3 と共に導入するキメラ変異体 G α タンパク質を検討した結果、NCL の pH 依存的な味覚修飾活性を培養細胞評価系により測定することに成功し、前述の問題を解決した。すなわち、hT1R2-hT1R3 とキメラ変異体 G α タンパク質を HEK293T 細胞に機能的に発現させ、異なる pH 条件で NCL を培養細胞に投与したところ、pH が 8.0 から 4.7 に低下するにつれて細胞応答の増加が観察された。また、この系により計測した pH-応答のシグモイド曲線の 50%応答値は pH 7.1 にあり、ヒスチジンのイミダゾール基のプロトン化-脱プロトン化の曲線 (pKa 6.5) に近いことから、NCL のヒスチジン残基が pH 依存的な甘味の増強に関与すると予想した。そこで、NCL 分子に存在する 5 つのヒスチジン残基全てをアラニンに置換した NCL 変異体(HA バリエント)を麹菌による生産系を用いて生産して、精製した。HA バリエントの活性を細胞評価系・官能試験により評価したところ、酸性 pH でも中性 pH でも強い甘味を示した。このことから、NCL の味覚修飾活性にヒスチジン残基の関与することが示唆された。

次に、NCL の濃度応答曲線を異なる 3 つの pH 条件(pH 5.5, pH 6.2, pH 7.2)で作成したところ、最大応答の値は一定であったが、EC₅₀ 値は pH の低下により小さくなる傾向にあった。一方で、HA バリエントは pH 7.6 でも、NCL の pH 5.5 の場合に類似した EC₅₀ 値を示した。この結果をもとに、NCL および HA バリエントが同じ中性 pH 条件で、それぞれ弱い甘味および強い甘味を呈することに注目し、両者を異なる割合で混合して細胞応答を計測した。その結果、中性 pH では NCL は HA バリエントによるヒト甘味レセプターの活性化を競合的に阻害することを見出した。これらの結果から、NCL は中性 pH では hT1R2-hT1R3 のアンタゴニストとして作用する一方、酸性 pH ではアゴニストとして作用すること、また NCL は甘味活性型と不活性型の pH 依存的な平衡状態にあるという、新たな味覚修飾活性の分子モデルを提唱した(図 1・図 2)。

まとめ・展望

本研究では、ヒト甘味レセプターに対するネオクリンの作用様式が pH によって変化するという結果を得た。この結果は、酸によって甘味が増強するというネオクリンの大変興味深い性質を説明できるだけでなく、複数の作用部位を持つ hT1R2-hT1R3 の活性化機構を理解する上でも役立つ可能性がある。今後、hT1R2-hT1R3 と NCL の作用部位の詳細な解析および酸味抑制への NCL の関与を解析することで、味の新たな受容機構の一端を解明し得るであろう。また、長年にわたって食品生産に利用され、GRAS (generally recognized as safe) 指定を受けている麹菌を宿主として NCL およびその変異体の生産を行い得ることは、実用的観点からも意義深いと考える。

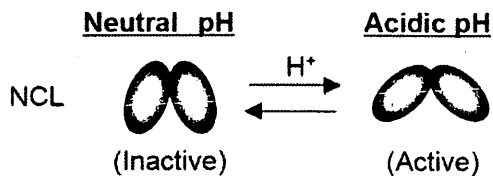


図1. 甘味活性型—不活性型ネオクリンのpH依存的平衡

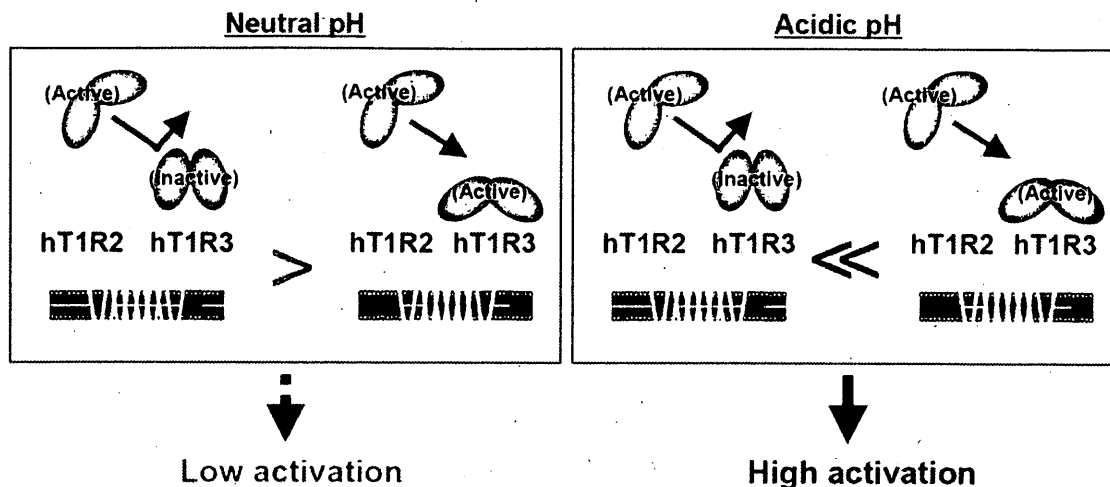


図2. ネオクリンのヒト甘味レセプターとの作用モデル

発表

- 1 Yukako Shirasuka, **Ken-ichiro Nakajima**, Tomiko Asakura, Haruyuki Yamashita, Atsuko Yamamoto, Shoji Hata, Shinji Nagata, Mitsuru Abo, Hiroyuki Sorimachi and Keiko Abe. Neoculin as a New Taste-modifying Protein Occurring in the Fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1403-1407. (2004) (*Y.S. and K.N. contributed equally)
- 2 **Ken-ichiro Nakajima**, Tomiko Asakura, Hideaki Oike, Yuji Morita, Akiko Shimizu-Ibuka, Takumi Misaka, Hiroyuki Sorimachi and Keiko Abe. Neoculin, a taste-modifying protein is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport*, 17, 1241-1244. (2006)
- 3 **Ken-ichiro Nakajima**, Tomiko Asakura, Jun-ichi Maruyama, Yuji Morita, Hideaki Oike, Akiko Shimizu-Ibuka, Takumi Misaka, Hiroyuki Sorimachi, Soichi Arai, Katsuhiko Kitamoto, and Keiko Abe. Extracellular Production of Neoculin, a Sweet-Tasting Heterodimeric Protein with Taste-modifying Activity, by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3716-3723. (2006)
- 4 Akiko Shimizu-Ibuka, Yuji Morita, Tohru Terada, Tomiko Asakura, **Ken-ichiro Nakajima**, So Iwata, Takumi Misaka, Hiroyuki Sorimachi, Soichi Arai and Keiko Abe. Crystal Structure of Neoculin: Insights into its Sweetness and Taste-modifying Activity. *J. Mol. Biol.* 359, 148-158. (2006)
- 5 Ayako Koizumi, **Ken-ichiro Nakajima**, Tomiko Asakura, Yuji Morita, Keisuke Ito, Akiko Shimizu-Ibuka, Takumi Misaka, and Keiko Abe. Taste-modifying protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 584-589. (2007)
- 6 Keisuke Ito, Tomiko Asakura, Yuji Morita, **Ken-ichiro Nakajima**, Ayako Koizumi, Akiko Shimizu-Ibuka, Katsuyoshi Masuda, Masaji Ishiguro, Tohru Terada, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto, Takumi Misaka, and Keiko Abe. Microbial Production of sensory-active miraculin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 407-411. (2007)
- 7 Akiko Shimizu-Ibuka, Yuji Morita, **Ken-ichiro Nakajima**, Tomiko Asakura, Tohru Terada, Takumi Misaka, and Keiko Abe. Neoculin as a New Sweet Protein with Taste-modifying Activity: Purification, Characterization, and X-ray Crystallography" In *Sweetness and Sweeteners: Biology, Chemistry, and Psychophysics*, Deepthi K. Weerasinghe and Grant E. Dubois Eds., American Chemical Society, Washington, D. C., *in press*.
- 8 **Ken-ichiro Nakajima**, Yuji Morita, Ayako Koizumi, Tomiko Asakura, Tohru Terada, Keisuke Ito, Akiko Shimizu-Ibuka, Jun-ichi Maruyama, Katsuhiko Kitamoto, Takumi Misaka, and Keiko Abe. Acid-induced sweetness of neoculin is ascribed to its pH-dependent agonistic-antagonistic interaction with human sweet taste receptor. *FASEB J.*, *in press*.