

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏名 古泉 文子
指導教員名 三坂 巧

論文題目

ヒト甘味受容体による味覚修飾タンパク質および低分子甘味物質の受容機構の解析

甘味を呈する物質には、糖類、アミノ酸、配糖体、人工甘味料、甘味タンパク質などがあるが、分子量も化学的構造も大きく異なり、それらの性質は多種多様である。哺乳類において、これら全ての甘味物質は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である T1R2 と T1R3 のヘテロマーから構成される甘味受容体によって受容される。T1R2、T1R3 は、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) などと同じクラス C GPCR ファミリーに属し、その構造は 2 つの lobe から構成される amino terminal domain (ATD)、ファミリー間でよく保存された 9 つの Cys 残基を含む cysteine-rich domain (CRD)、7 回膜貫通ドメインである transmembrane domain (TMD) の 3 つのドメインに大別される。近年、いくつかの甘味物質については T1R2-T1R3 上の作用部位が明らかになり、甘味受容体には複数の甘味物質作用部位が存在することがわかってきた。

甘味を呈する物質として興味深いのが、酸味を甘味に変化させるというユニークな性質 (味覚修飾活性) を持つ味覚修飾タンパク質である。味覚修飾タンパク質には、*Curculigo latifolia* 由来のネオクリン (NCL) と *Richardella dulcifica* 由来のミラクリン (MCL) の 2 種類が存在する。MCL がそれ自身は甘味を示さず、酸の存在下で初めて甘味を生じるのに対し、NCL はそれ自身が甘味を呈するうえ、酸の存在下ではさらに甘味が増強される。また、味覚修飾活性には持続性が認められ、一度これらを口に含むと、NCL ではその後 30 ~60 分、MCL では 1~2 時間にわたって、酸を味わう度に強い甘味が感じられる。このように両者の活性はよく似ているものの、アミノ酸配列の相同性は低く、構造上も共通性が

ほとんど無いと予想されるため、これらの分子レベルでの受容機構については不明であった。また、低分子甘味物質の受容については、近年 T1R2-T1R3 との相互作用が明らかになりつつあるが、大きさや電荷など化学的性質の異なる甘味物質がどのように受容されるのかについて全容は示されていない。

本研究では、味覚修飾タンパク質の酸誘導性の甘味活性の客観的な評価系を用いて、NCL および MCL の受容に必要な領域の同定ならびに、味覚修飾活性を示すメカニズムを明らかにした。またヒト甘味受容体 (hT1R2-hT1R3) の点変異体を用いた解析から、hT1R2-hT1R3 が化学的性質の異なる低分子甘味物質をどのように認識しているのかについての知見を明らかにした。

1. ヒト甘味受容体におけるネオクリン相互作用領域の解析

ヒトは NCL の甘味を感知できるが、マウスは嗜好しないことから、hT1R2-hT1R3 とマウス T1R2-T1R3 (mT1R2-mT1R3) のアミノ酸配列の相違に着目し、NCL の作用する受容体上の領域を探索した。T1R2、T1R3 はともに約 850 アミノ酸から成り、ヒトとマウスにおける相同性は約 70% である。ヒトとマウスのキメラ T1R を作製し、これらを G タンパク質とともに HEK293T 細胞に発現させ、NCL への応答をカルシウムイメージング法により計測することで、NCL の受容に必要な hT1R2-hT1R3 の領域の一部を同定した。

まず、NCL の受容に必要なサブユニットを同定するため、ヒトおよびマウスの T1R2、T1R3 を組み合わせて HEK293T 細胞に導入した。hT1R2+hT1R3 導入細胞は NCL に応答したのに対し、hT1R2+mT1R3 導入細胞は応答しなかったことから、hT1R3 が NCL の受容に必要であることを見出した。次に、ヒトとマウスのキメラ T1R3 を作製し、ATD、CRD、TMD のどのドメインが受容に関与するのかを調べた結果、hT1R3 の ATD が NCL の受容に必要であることを明らかにした。T1R3 の ATD は、これまでに他の甘味物質の作用部位として報告のない領域であり、T1R2-T1R3 と甘味物質の相互作用に関して新たな知見をもたらすものである。さらに、キメラ T1R3 を用いた実験により、ATD のうち 201-400 残基の領域など複数の領域に NCL 受容に必要な部位が含まれることを示唆する結果を得た。

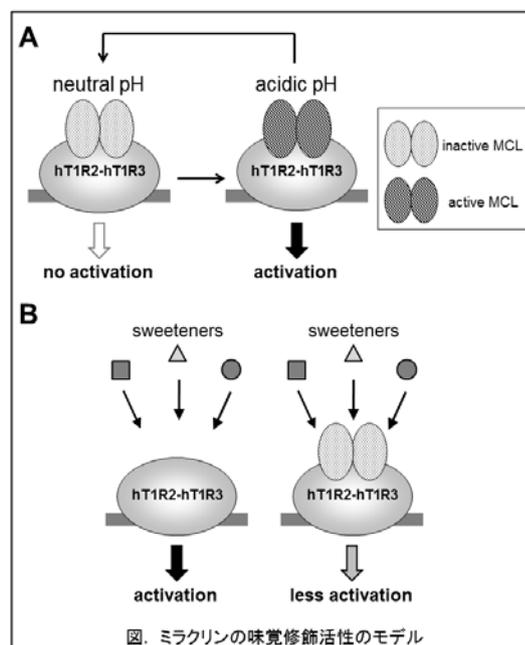
一方、中性条件で得られた NCL の結晶構造をもとに予測された酸性条件での NCL 構造モデルと、mGluR1 の ATD の結晶構造を鋳型に作製した hT1R2-hT1R3 の ATD の立体構造モデルとのドッキングモデルを、分子動力学計算により得た。hT1R3 の 201-300 残基のうち、ヒトとマウスで異なる残基の多くは、lobe1 と lobe2 から構成される溝付近に多く存在していた。培養細胞を用いた実験により得られた結果は、NCL がこの溝付近に作用するというモデルを支持する結果であると考えられる。

2. ミラクリンの味覚修飾活性機構の解析

MCL について甘味受容体との相互作用に関してはこれまで報告がなかったが、官能評価において MCL の酸誘導性の甘味が hT1R2-hT1R3 に作用する甘味阻害剤ラクチゾールにより抑制されることから、MCL も hT1R2-hT1R3 に作用することが予想された。hT1R2 と

hT1R3、G タンパク質を導入した HEK293T 細胞の応答を評価した結果、MCL をあらかじめ前処理した場合に、pH 4.8~6.5 の範囲において pH の低下に伴う細胞応答の増加が見られた。この pH-応答曲線は、pH 5.7 のとき最大応答の約半分の応答を示し、官能評価の結果をよく反映していた。また pH 5.0 において濃度応答関係を解析したところ、0.01~100 nM の範囲で濃度依存的な応答の増加が見られ、EC₅₀ 値は 0.44 nM であった。この値は他の甘味物質の EC₅₀ 値に比べて 2 桁以上小さく、MCL が非常に低い濃度で受容体に作用することが示唆された。さらに一度受容体に結合した MCL が、酸で刺激するたびに繰り返し受容体を活性化するという官能評価の結果を反映する結果を得ただけでなく、中性 pH において他の甘味物質による hT1R2-hT1R3 の活性化を抑制することを見出した。

以上の結果から、MCL は舌上で hT1R2-hT1R3 に不活性型（アンタゴニスト）で保持され、酸を味わうと受容体上で活性型（アゴニスト）に変化し、pH が中性になると不活性型に戻る（図 A）、またこの状態の MCL は他の甘味物質による受容体の活性化を抑制する（図 B）という、味覚修飾活性のモデルが考えられた。NCL の味覚修飾活性のモデルは以前に提唱されているが、本研究から、MCL と NCL はいずれも pH 依存的にアゴニストとアンタゴニストの平衡状態が変化するという点で共通であることが示唆された。



さらに、ヒトとマウスの T1R2-T1R3 のキメラ受容体を用いた解析を行った結果、MCL の受容には hT1R2 の ATD が必要であることを見出した。NCL は hT1R3 の ATD を必要としたことから、MCL と NCL はともに味覚修飾活性という共通の性質を示すが、両者は受容体の活性化に必要とする hT1R2-hT1R3 の領域が明確に異なっていた。また、受容体を活性化する pH 範囲や受容体に対する親和性においても MCL と NCL は大きく異なり、これらの結果はそれぞれの一次構造の相同性の低さに起因するものと考えられた。

3. ヒト甘味受容体における低分子甘味物質群の相互作用部位の同定

hT1R2-hT1R3 が化学的性質の異なる多種類の低分子甘味物質をどのように識別するかを明らかにするため、アスパルテーム、D-トリプトファン、サッカリンナトリウム、アセサルフェムカリウム、スクラロースについて、hT1R2-hT1R3 における各々の相互作用部位の同定を試みた。これらは、mGluR1 の Glu 結合部位に相当する領域、すなわち hT1R2 ATD の lobe1 と lobe2 の境界面において hT1R2-hT1R3 と作用することが示唆されていたが、その詳細な相互作用については明らかにされていなかった。

まず mGluR1 の結晶構造を鋳型に、hT1R2-hT1R3 の ATD の立体構造モデルを作製し、分子動力学計算により各低分子甘味物質とのドッキングモデルを得た。hT1R2 と mGluR1 とのアラインメントから、mGluR1 の Glu 結合に関与する残基に着目し、相互作用が予測されるアミノ酸残基に点変異を導入した変異体を作製した。これら点変異体を一過的に培養細胞に導入し、カルシウムイメージングにより、変異を導入した残基の低分子甘味物質の受容への関与を応答性の変化により判断した。特に強く関与していると思われる 10 残基について、変異体の安定発現細胞株を作出し、各種甘味物質に対する濃度応答関係を解析した。

その結果、hT1R2 ATD の lobe1 と lobe2 の境界面における相互作用は、今回用いた全ての甘味物質に重要であること、また境界面の入り口における相互作用は、受容体の活性化のための closed 構造をとるのを推進する役割を果たすことが、分子モデリングにより示唆された。これらの結果から、甘味受容体の活性化機構には、mGluR1 の活性化機構と共通点が認められた。その一方、今回用いた低分子甘味物質の相互作用部位は、hT1R2 ATD の lobe1 と lobe2 の境界面によって構成される同一の領域内に存在するが、各々の化学的性質によって異なるアミノ酸残基を必要とするという興味深い現象も示された。

まとめ

本研究では、ヒト甘味受容体における、味覚修飾タンパク質 NCL、MCL、および化学的性質の異なるいくつかの低分子甘味物質の作用領域・部位を明らかにした。その結果、味覚修飾タンパク質と低分子甘味物質が hT1R2-hT1R3 の異なる部位に作用することを明らかにした。さらに NCL と MCL について味覚修飾活性の生じる機構の一端を明らかにしただけでなく、いくつかの性質が明確に異なることを示すことができた。本研究は、新たな低カロリー甘味料の開発などに役立つのみならず、T1R2-T1R3 の属する他のクラス C GPCR の活性化機構の解明に役立つことが期待される。

発表論文

1. Koizumi, A., Nakajima, K., Asakura, T., Morita, Y., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Abe, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358 (2) 585-589 (2007)
2. Nakajima, K., Morita, Y., Koizumi, A., Asakura, T., Terada, T., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Maruyama, J., Kitamoto, K., Misaka, T., Abe, K., *FASEB J.*, 22 (7) 2323-30 (2008)
3. Masuda, K., Koizumi, A., Misaka, T., Hatanaka, Y., Abe, K., Tanaka, T., Ishiguro, M., Hashimoto, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20 (3) 1081-1083 (2010)
4. Koizumi, A., Tsuchiya, A., Nakajima, K., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Briand, L., Asakura, T., Misaka, T., Abe, K. “Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin” (submitted)