

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 古泉 文子

甘味を呈する物質は、分子量、化学的構造が大きく異なり多種多様である。なかでも味覚修飾タンパク質と呼ばれるネオクリン (NCL) とミラクリン (MCL) は、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) を示し、一度これらを口に含むとその後数十分は、酸を味わう度に強い甘味が感じられる。哺乳類において、甘味物質は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である T1R2 と T1R3 のヘテロマーで受容される。

本研究では、甘味受容体の活性化機構を明らかにすることを目的とし、分子レベルでの知見が乏しい味覚修飾タンパク質とヒト甘味受容体 (hT1R2-hT1R3) の相互作用について、また化学的性質の異なる様々な低分子甘味物質の受容機構について明らかにした。本論文は 5 章から成り、第 1 章は序論、第 2、3、4 章が本論、第 5 章が総括と今後の展望である。

第 2 章では、hT1R2-hT1R3 における NCL の作用領域の解析を行った。ヒトは NCL の甘味を感じるがマウスは感じないことから、ヒトとマウスの T1R2-T1R3 のアミノ酸配列の相違に着目し、NCL の作用する受容体領域を探索した。ヒトおよびマウス、または両者のキメラ型の T1R2、T1R3 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した結果、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、hT1R3 の N 末端細胞外領域が NCL の受容に必要であることを見出した。さらにその領域において、必要な残基を含む領域を一部同定した。本研究で得られた結果は、中性での NCL の結晶構造をもとに作製された、hT1R2-hT1R3 の N 末端細胞外領域と NCL とのドッキングモデルを支持すると考えられた。

第 3 章では、MCL の味覚修飾活性機構の解析を行った。官能評価において MCL の酸誘導性の甘味は 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。MCL に対する応答をカルシウムイメージングにより評価した結果、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。また濃度応答関係を解析した結果、MCL は他の甘味物質に比べて低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受容体の活性化を抑制することを見出した。また MCL の受容に必要な受容体領域を明らかにした。本研究で得られた知見をもとに、MCL は舌上で hT1R2-hT1R3 に不活性型で保持され、酸を味わうと受容体上で活性型に変化しアゴニストとして作用する一方で、pH が中性に戻ると再び不活性型になり、アンタゴニストとして機能するという味覚修飾活性のモデルが考えられた。MCL と NCL は 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点で共通であるが、一方で受容体を活性化する pH 範囲や活性化に必要な受容体領域、受容体に対する親和性は異なることが本研究により示唆された。

第 4 章では、化学的性質の異なる低分子甘味物質の認識機構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 Na、アセサルフェム K、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。代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) の結晶構造を鋳型に、hT1R2-hT1R3 の N 末端細胞外領域の立体構造モデルを作製し、各甘味物質とのドッキングモデルを得た。hT1R2 において mGluR1 の Glu 結合部位に対応する残基を中心に点変異体を作製し解析した結果、一部の甘味物質の結合に関与すると思われる残基が 10 残基見いだされた。これらの残基について、点変異体の安定発現細胞株を作出し、各甘味物質に対する濃度応答関係を解析した結果、今回用いた低分子甘味物質はいずれも hT1R2 の N 末端細胞外領域の 2 つの lobe で構成される同一の領域に結合するが、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新たな知見を得た。

以上、本研究で得られた成果は、味覚修飾活性機構について新たな知見をもたらしたのみならず、今後新たな低カロリー甘味料の開発や 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。食品科学研究において本研究は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。