第 2 章

hTAS2R16 におけるサリシンの受容様式の解明

2-1 序

ヒトは 25 種類存在するヒト苦味受容体(hTAS2Rs)で苦味物質を認識している[1]が、実際感じることができる苦味物質はこれよりもはるかに多く存在する。しかしながら、限定された受容体でどのように膨大な数の苦味物質を認識しているかについては解明されていない。このような苦味の認識機構を明らかにするためには、受容体と苦味物質の結合様式に関する情報の蓄積が求められるが、実験的に結合様式を解明した報告は皆無である。

苦味は生物学的にみると毒物の存在を示唆するシグナルであるとされるが[1]、食品における苦味は、茶、コーヒーあるいはビールなどのように独特の特色となりうる。しかしながら強すぎる苦味は嗜好されず、苦味強度の適正な制御は食品産業における重要な課題の 1 つである。苦味受容体における苦味物質の結合様式に関する情報は、苦味のコントロールや苦味抑制素材の合理的設計に有益な情報となりうる。

苦味受容体におけるリガンドの結合様式を解明するためには 3 次元構造情報を得ることが有用で、X 線結晶構造解析法が最適である。しかしながら、多くの G タンパク質共役型受容体は結晶化することが困難であり、現段階まで、数例の結晶構造が解かれたにすぎず[27-32]、その中に味覚受容体は含まれない。これに代わる結合様式の推定方法として、すでに結晶構造が解かれている受容体とのホモロジーモデリングによる分子シミュレーションが挙げられる。しかしながら、ホモロジーに基づく分子モデリングはそれだけでは信憑性が低く、受容体の変異体を用いた機能解析を組み合わせることで精度が向上する。この手法により、マウスの嗅覚受容体の 1 つである mOR-EG において、オイゲノールの認識に重要なアミノ酸残基の同定がなされている[49]。ヒト苦味受容体においても、苦味物質との相互作用様式の解明を目指した分子モデリング手法を用いたいくつかの研究がなされている[50, 51]。これらの報告は、いずれも hTAS2R38 の推定 3 次元構造を、ウシロドプシンを鋳型として作製し、6-propyl-2-thiouracil (PROP)や *N*-phenylthiourea (PTC)とのドッキングシミュレーションを実施したものである。しかしながら、これらの解析ではコンピ

ュータシミュレーションによる予測について、変異体を用いた機能解析により検証することはしておらずモデルの正当性については実験的に証明されていない。

本研究では、β-グルコピラノシド構造を特異的に認識するヒト苦味受容体 hTAS2R16 に着目し、サリシンと hTAS2R16 の結合様式の解明を分子モデリングと変異体機能解析を組み合わせることで試みた。その結果、変異体機能解析に矛盾しない信頼性の高い複合体構造モデルが示されたとともに、サリシン受容に特に重要であるいくつかのアミノ酸残基を同定することに成功した。さらに芳香環上の置換基が異なるフェニル-β-D-グルコピラノシド類を用いた変異体機能解析結果もサリシンのものと一致していたことより、hTAS2R16 が認識するフェニル-β-D-グルコピラノシド類はいずれもサリシンと同一の受容サイトを共有し、特にリガンドの D-グルコース構造近傍に位置するアミノ酸残基がリガンド認識に重要であることが示唆された[19]。

2-2 材料と方法

化合物

サリシン、アルブチン、フェニル-β-D-グルコピラノシドを hTAS2R16 のリガンドとして使用した(図 2-1)。サリシンはナカライテスク株式会社より、アルブチンは東京化成株式会社より、またフェニル-β-D-グルコピラノシドはシグマアルドリッチジャパン株式会社(SIGMA)より購入した。

受容体モデリング

ロドプシンの光活性化中間体であるメタロドプシンのモデル[52]を鋳型とし、hTAS2R16 の分子モデリングを実施した。hTAS2R16 とウシロドプシンについて、White と Wimley のパラメーター[53]を用いて膜貫通領域を予測し、それぞれの疎水領域の比較からアミノ酸配列の対応を決定した。この相同性配列に基づいて、膜貫通領域のアミノ酸残基置換によって膜貫通領域の構造を構築した。さらにこれら膜貫通ヘリックスを結ぶ膜外領域のループ構造は Insight II（Accelrys, Inc., CA, USA）の Homology モジュールに含まれるループ構造から検索して得たものを初期構造として用いた。hTAS2R16 の初期構造は分子力学計算プログラム Discover3 を用いて Root Mean Square Deference (RMSD)が 0.1 kcal/mol/Å^2 以下になるまでエネルギー極小化を行い、さらに分子動力学計算（室温、200 ps）により構造最適化を行った。この間、受容体の主鎖構造は大きく変化しないように制限を加えて計算を行った。

hTAS2R16-サリシン複合体の構造モデルの構築

膜貫通ヘリックスが形成するリガンド結合部位の空間をInsight IIのbinding site モジュールを用いて算出し、このスペースを指標としてサリシンの初期位置を得たのち、Discover3 を用いてエネルギー極小化(RMSD が0.1 kcal/mol/Å^2 以下)と分子動力学計算（室温、200 ps）による構造最適化を行い、最小エネルギー構造を安定複合体構造とした。

hTAS2R16およびキメラ G タンパク質の発現プラスミドコンストラクト

hTAS2R16 の発現プラスミドコンストラクトを構築するため、ヒトゲノム DNA(BD Clontech, Mountain View, CA, USA)より、hTAS2R16 の DNA 断片 (NCBI refseq number: NM_016945)を PCR で増幅した。hTAS2R16 のコード領域(1-876)の N 末端にラットソマトスタチンタイプ3受容体の N 末端の 1-45 アミノ酸残基[21]を合成オリゴ DNA をもとに付加したのち、pEAK10 発現ベクター(Edge Biosystems, Gaithersburg, MD, USA)の *Eco*R I-*Not* I サイトにサブクローニングした(ssr3-hTAS2R16)。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて DNA シークエンスを行い PCR エラーがないことを確認した。

キメラ G タンパク質の発現ベクターは Gα16gust44 を発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen, San Diego, CA, USA)にサブクローニングしたものを植田高史博士(名古屋市立大学)および島田昌一博士(前名古屋市立大学、現大阪大学)より分与していただいた[22]。

変異体の構築

ssr3-hTAS2R16 cDNA への変異の導入は QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)を用いて行った。変異導入された ssr3-hTAS2R16 cDNA の *Eco*R I および *Not* I 切断断片を、pEAK10 発現ベクターにライゲーションした。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit を用いて DNA シークエンスを行い PCR エラーがないことを確認した。

細胞培養および遺伝子導入

HEK293T 細胞は 10% fetal bovine serum (Invitrogen)およびペニシリンーストレプトマイシン (SIGMA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen)を用いて、37°C、5% CO_2 存在下で培養した。遺伝子導入の際には、細胞を 35 mm ディッシュあるいは

6 ウェルプレート上に細胞を撒き、1晩培養後、60-80%コンフルエントの状態時に Lipofectamine 2000 reagent（Invitrogen）を用いて、ssr3-hTAS2R16 もしくは ssr3-hTAS2R16 変異体発現ベクターを Gα16gust44 発現ベクターとともに 4:1 の混合比で一過的に導入した。なお、遺伝子導入の前日からは、HEK293T 細胞はペニシリン－ストレプトマイシンを抜いた 10% fetal bovine serum 入りの DMEM を用いて培養した。

Cell-based Assay

トランスフェクションから 6 時間後に、上述の細胞を 96-well black, clear-bottomed CellBIND surface plate (Corning Inc., Bedford, MA, USA)に翌日細胞がコンフルエントの状態のようになるように希釈し、100 μl ずつ撒きなおした。18-20 時間 37℃, 5% CO_2 存在下で培養した後、DMEM 培地を除去、アッセイ用バッファー（130 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, and 1.2 mM $MgCl_2$ in 10 mM HEPES, pH 7.4, 以下バッファー）でリンスしたのちバッファーで希釈したカルシウム指示薬 Fluo-4/AM（同仁化学研究所）を、終濃度 5 μM となるように負荷し、27℃にて 30 分間遮光下静置した。続いてバッファーにてリンスしたのち、バッファー100 μl を加え、遮光下、さらに 27℃にて 10 分間静置した。その後、FlexStation 3(Molecular Devices, Inc., CA, USA)にて、蛍光観測した。以後、本文中に記載されているリガンド濃度はすべて、リガンド添加後の終濃度を示している。蛍光（励起：485 nm、 検出：525 nm、 カットオフ：515 nm）は 2 秒ごと 27℃で観測し、観測開始から、20 秒後に 2×のバッファーで溶解した試料溶液を 100 μl 添加し、さらに 100 秒間蛍光をモニターした。リガンド添加後の最大蛍光強度とリガンド添加前の蛍光強度の差をΔRFU(relative fluorescence units)とした。なお、Gα16gust44 のみを遺伝子導入した細胞ではリガンド刺激による応答は検出されなかった(データは示さない)。試験溶液（サリシン、アルブチン、フェニル-β-D-グルコピラノシド）の終濃度はいずれも 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, そして 30 mM とした。データは少なくとも 3 回の独立した実験を行い、それぞれの平均値を使用した。

EC_{50} 値は Clampfit ver. 9.2.0.09 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)を用いて Hill の式: $f(x) = I_{min} + (I_{max} - I_{min}) / (1 + (x / EC_{50})^{h})$より算出した。ここで、$x$ はリガンド濃度、h は Hill 係数を示す。

2-3 結果

2-3-1 分子モデリングによるサリシン-hTAS2R16 複合体モデルの予測

サリシンはhTAS2R16のアゴニストであるため、活性型受容体を分子モデリングにおける鋳型にすることが適切である。Gタンパク質共役型受容体の結晶構造はアドレナリン受容体やアデノシン受容体などが報告されているが、これらはすべて不活性化体である[27-32]。そこで本研究では、ロドプシンの光活性化中間体であるメタロドプシンの3次元モデル[52]を鋳型として選択した。まず、ウシロドプシンとhTAS2R16の相同配列に基づいて、膜貫通領域および膜外領域のループ領域を構築し、次いで、膜貫通ヘリックスが形成するリガンド結合部位の空間を推定した。サリシンをこのスペースにドッキングさせ、Discover3 を用いてエネルギー極小化(RMSD が0.1 kcal/mol/Å^2 以下)と分子動力学計算（室温、200 ps）による構造最適化を行い、最小エネルギー構造をとる安定複合体構造を得た。

しかしながら、サリシンは分子サイズがほぼ等しいD-グルコースとサリチルアルコールが酸素原子の両端に縮合した対称的な化学構造を示すため、分子モデリングから予測されたサリシン-hTAS2R16複合体モデルは単一のものには帰着せず、2つの推定複合体モデルが導き出された(図2-2)。いずれの複合体モデルもサリシンの推定リガンド結合ポケットは、TM(transmembrane domain, 膜貫通領域)3, 5, 6に囲まれた同一のものであったが、サリシンの配位が内外に対称の方向であった。1つめの複合体モデル(model A)は、推定リガンド結合ポケットにおいて、サリシンの芳香環が細胞質側、D-グルコース構造が細胞外側になるように配向しており(図2-2A)、もう1つの複合体モデル(model B)は、model Aと逆向きで配向していた(図2-2B)。さらに、推定リガンド結合ポケット付近でサリシン受容に関与している可能性が高いアミノ酸残基として表2-1にまとめる8種が予想された。

2-3-2 モデル間で相互作用様式が大きく異なるアミノ酸残基の点変異体を用いた機能解析

図2-3に示す通り、Trp94, Gln177およびGlu86が各モデル間でサリシンとの相互作用様式が異なるアミノ酸残基である。特に、Trp94については、Model Aでは芳香環－芳香環相互作用(π-π相互作用)という疎水的な相互作用を示すのに対し、Model Bではサリシンの糖水酸基との水素結合による相互作用が予想される。また、Gln177については、Model Aでは、サリシンの糖水酸基との水素結合による相互作用が予想されるのに対し、Model Bでは直接的な相互作用は認められない。この2つのアミノ酸残基とサリシンとの相互作用様式が明らかになれば、分子モデリングより得られた2つの推定複合体モデルを1つに帰着させることが可能になると考えられた。

まずTrp94とGln177の2つのアミノ酸残基に点変異を導入し、それらのサリシンに対する応答をセルベースアッセイにより解析した。Trp94は、Model Aでは、サリシンの芳香環とのπ-π相互作用のみが、一方model Bでは、CH-π相互作用だけではなく、サリシンの糖水酸基との水素結合を介した相互作用の存在も予想されている(図2-3)ことから、このアミノ酸残基とサリシンとの相互作用を解析するため、Trp94をフェニルアラニン(W94F)およびチロシン(W94Y)に置換した変異体を作製した。もし、サリシンがmodel Aの形で受容されているならば、フェニルアラニン変異体、チロシン変異体とも芳香環を有するアミノ酸残基であるため、芳香環同士の相互作用が維持され、変異体間での応答性に差はほとんどないと考えられる。しかしながら、model Bの形でサリシンが受容される場合、フェニルアラニン変異体は糖水酸基と相互作用する官能基を有さないため、水素結合を介した相互作用を失い、結果、チロシン変異体に比べ大幅に応答性が低下するはずである。

図 2-4A および表 2-2 に示すとおり、チロシン変異体のサリシンに対する応答性(W94Y EC_{50}: 1.36 mM)は野生型 (WT EC_{50}: 0.22 mM)に対し、比較的わずかな低下を示すのみであったが、フェニルアラニン変異体の応答は 40 倍以上応答性が低下した(W94F EC_{50}: 9.68 mM)。この結果は、94 番目のトリプトファン残基はサリシンと芳香環－芳香環相互作用(π-π相互作用)、あるいは CH-π相互作用だけではなく、水素結合を介した相互作用もしていることを示唆している。

次に、177 番目のグルタミン残基について検証を行った。この残基は、model A では、糖水酸基

との相互作用が予測されているが、model B では直接的な相互作用は認められない(図 2-3)。図 2-4B および表 2-2 に示すとおり、検証したアスパラギン変異体(Q177N)、グルタミン酸変異体(Q177E)、およびアラニン変異体(Q177A)の応答性はいずれも野生型とほとんど変わらなかった(Q177N EC_{50}: 0.39 mM, Q177E EC_{50}: 0.22 mM, Q177A EC_{50}: 0.55 mM, WT EC_{50}: 0.22 mM)ことから、177 番目のグルタミン酸残基はサリシンとは直接的な相互作用をしてないことが示唆された。

上記 2 つのアミノ酸残基を用いた変異体解析の結果から、サリシンは hTAS2R16 と model B の結合様式で相互作用していることが予想された。

2-3-3 Glu86変異体を用いた機能解析

次いで、hTAS2R16とサリシンの結合様式がmodel Bであることを確認するため、86番目のグルタミン酸をアスパラギン酸(E86D)もしくはグルタミン(E86Q)に置換した変異体を作製し、アルブチンおよびフェニル-β-D-グルコピラノシドに対する応答性の変化を解析した。

アスパラギン酸変異体(E86D)は、サリシンがGlu86と水素結合を介して相互作用する水酸基を同定することを目的として設計したものである。Model Bでは、86番目のグルタミン酸はサリシンの芳香環上のヒドロキシメチル基と相互作用が予想されている(図2-3)。一方で、図2-5に示すとおり、アルブチンの水酸基は芳香環上のパラ位に結合しているため、Glu86との距離が遠すぎる、またフェニル-β-D-グルコピラノシドは、芳香環上に水酸基が置換していないという理由から、Glu86とこれらのリガンド間には水素結合を介した相互作用が期待できない。逆にいうならば、サリシンだけがGlu86と水素結合を行い、結合を安定化させることが可能であると予測される。グルタミン酸残基の側鎖を1炭素短くしたアスパラギン酸に置換した変異体(E86D)でも、model Bの形で受容されていれば、置換されたAsp86とサリシンの芳香環上の水酸基の距離は水素結合を起こすのに十分であると予想される。

これに対し、model Aでは86番目のグルタミン酸はサリシンの芳香環上の水酸基ではなく、糖水

酸基との相互作用が予測されているため（図2-3）、いずれのリガンドも水素結合を介した相互作用が可能となる。当然、E86D変異体のアスパラギン酸残基と糖水酸基との相互作用の効果もサリシン、アルブチンおよびフェニル-β-D-グルコピラノシドとも同一のはずである。以上のことより、E86D変異体機能解析をサリシンとともにアルブチンおよびフェニル-β-D-グルコピラノシドを用いて実施すれば、89番目のアミノ酸残基が相互作用するサリシンの水酸基を同定することができると考えられる。

一方で、グルタミン変異体(E86Q)は、グルタミン酸残基の側鎖の長さを変更させず、官能基のみを置換した変異体であるため、アミノ酸残基の側鎖の長さが及ぼす影響、すなわちリガンド結合ポケットの空間的制御に及ぼす影響を検証するために設計したものである。

図2-5Aおよび表2-3に示す通り、E86D変異体とE86Q変異体のサリシンに対する応答性はほぼ一致した(WT EC_{50}: 0.22 mM, E86D EC_{50}: 2.13 mM, E86Q EC_{50}: 1.25 mM)。一方で、アルブチンやフェニル-β-D-グルコピラノシドに対するE86D変異体の応答性はE86Q変異体に比べ、大幅に低下した(E86D EC_{50}: arbutin, 10.6 mM; phenyl-β-D-glucopyranoside, 7.09 mM; EC_{50} E86Q: arbutin, 3.89 mM, phenyl-β-D-glucopyranoside, 1.96 mM; EC_{50} WT: arbutin, 1.34 mM, phenyl-β-D-glucopyranoside, 0.38 mM)(図2-5B, Cおよび表2-3)。

以上の実験結果より、このアミノ酸残基は、おもにリガンド結合ポケットの空間的制御が主な役割であり、Glu86の近傍に水素結合可能な置換基を有するサリシンの場合には、さらに水素結合を介した相互作用が形成されることが示唆された。

2-3-4 hTAS2R16とサリシンの結合様式の検証

Glu86、Trp94およびGln177変異体を用いた機能解析より、サリシンとhTAS2R16の結合様式はモデルBであることが強く示唆された(図2-2B)。この結果を検証するため、リガンド認識に関与していると考えられる他のアミノ酸残基についても機能解析を実施した。

モデルBにおいて、89番目のアスパラギン残基(Asn89)および181番目のヒスチジン残基

(His181)はサリシンの糖水酸基と水素結合を形成することでリガンド認識に関与していると考えられる(図2-6)。まずHis181とサリシンの糖水酸基間の水素結合の存在を検証するため、H181LおよびH181T変異体を作成し、機能解析を行った。H181Tは水素結合による相互作用を保持させるように、一方、H181Lはこの相互作用をなくすように設計した変異体である。H181L変異体の応答性はH181Tに比べ大幅にサリシンに対する応答性が低下した(H181T EC_{50}: 1.84 mM, H181L EC_{50}: 12.9 mM, WT EC_{50}: 0.22mM)(図2-7A, 表2-2)。これらの実験結果から、181番目のヒスチジン残基はサリシンの糖水酸基と水素結合を形成しているといえる。残念なことに、作成したAsn89の変異体はいずれも完全にサリシンに対する応答性を消失してしまったため、このアミノ酸残基とサリシンの糖水酸基間の水素結合の有無を実験的に明らかにすることはできなかった(図2-7B, 表2-2)。

一方、Phe93、 Phe240 およびIle243の3つのアミノ酸残基は疎水的な相互作用によりサリシンの受容サイトを形成していることがモデルより予想される(図2-6)。検証したPhe93変異体はいずれもサリシンに対する応答性が大幅に低下した(F93T EC_{50}: 12.0 mM, F93Y EC_{50} ：10.0 mM, F93L EC_{50}: 4.15 mM, F93A EC_{50} ：11.5 mM, WT EC_{50} ：0.22 mM)(図2-7C, 表2-2)。Phe240の変異体解析はF240W, F240Y, およびF240Lを用いて実施した。F240WおよびF240Yは芳香環同士による相互作用を保持するように、一方、F240Lは芳香環同士の相互作用をなくすように設計した変異体である。芳香環同士の相互作用を行うことができないF240L変異体の応答性はF240WやF240Yに比べ大幅に低下した(F240L EC_{50}: >30mM, F240Y EC_{50}: 2.44 mM, F240W EC_{50}: 2.05 mM, WT EC_{50}: 0.22mM)(図2-7D, 表2-2)。Ile243の変異体解析には、I243L、I243V、およびI243A変異体を用いた。I243LおよびI243VはWTのイソロイシン残基と分子サイズの同程度の分子サイズを持つアミノ酸残基に置換した変異体として、一方、I243Aは分子サイズを小さくした変異体として設計した。図2-7Eおよび表2-2に示す通り、このアミノ酸残基のサイズを小さくしたI243Aのサリシンに対する応答性は、I243YやI243Lに比べ大幅に低下した(I243A EC_{50}: > 30 mM, I243L EC_{50}: 0.50 mM, I243V EC_{50}:0.84 mM)。これらの結果から、少

なくともこれらの3つのアミノ酸残基周辺の疎水性アミノ酸残基と疎水的な相互作用を生じ、リガンド結合サイトを形成していることが示された。

2-3-5 hTAS2R16と他のフェニル-β-D-グルコピラノシドとの結合様式の検証

上述の通り、hTAS2R16のリガンド結合サイトにおいてサリシンはmodel Bの形で受容され、細胞質側に位置するTrp94、His181とサリシンとの水素結合を介した直接的な相互作用、およびPhe93、Phe240、およびIle243による疎水的な相互作用によるリガンド結合ポケットの形成が実験的に示された。一方で、Glu86との水素結合を介した相互作用は、サリシンのみに認められ、アルブチンやフェニル-β-D-グルコピラノシドには存在しない。しかしながら、アルブチンやフェニル-β-D-グルコピラノシドもサリシンと同様、β-D-グルコピラノシドであり、hTAS2R16を活性化することを考えると、これらの類縁体もサリシンと同一の受容サイトを共有し、受容サイト内の細胞内側に位置する共通構造、すなわちD-グルコース構造の認識が主にhTAS2R16の活性化に特に重要であることが予測される。

アルブチンやフェニル-β-D-グルコピラノシドに対する点変異体機能解析結果は図2-8, 9及び表2-4, 5に示すとおりで、これら類縁体に対する点変異体応答性の変化の挙動はサリシンの場合と同様であった。これらの実験的結果から、これらはサリシンと同一の受容サイトにおいて、同様の様式で認識されているということが示された。

以上のことから、フェニル-β-D-グルコピラノシド類のhTAS2R16における認識は、いずれも図2-10に示すように、

①サリシンと同一のTM3, 5, 6に囲まれたリガンド結合ポケットで受容される

②フェニル-β-D-グルコピラノシド類のD-グルコース構造が細胞内側に配向した様式で受容される

③Asn89, Trp94, His181は水素結合を介した直接的相互作用をしている(Asn89については分子モデリングによる予測のみ)

④Phe93, Phe240, Ile243は周辺のアミノ酸残基と疎水的な相互作用を行い、リガンド受容サイトの形成に貢献している

ことが示された。

一方で、フェニル-β-D-グルコピラノシド類のアグリコン近傍に位置するGlu86は、水素結合可能な水酸基を芳香環上に持つサリシンのみ直接的な相互作用が認められ、Gln177との直接的な相互作用はいずれのリガンドにおいても認められなかった。このことから、フェニル-β-D-グルコピラノシド類のD-グルコース構造周辺のアミノ酸残基が特ににサリシン認識にかかわっていると考えられた。

2-4 考察

2-4-1 分子モデリングと変異体解析によるhTAS2R16におけるサリシンの結合様式の解明

ヒトは 25 種類という限定されたヒト苦味受容体(hTAS2Rs)で多種多様な苦味物質を認識している[1]。このようなことを可能にするためにはいくつかの可能性が考えられる。その 1 つが、苦味受容体が苦味物質の部分構造を認識しているという考え方である。実際、hTAS2R16 はβ-グルコピラノシド構造を、hTAS2R38 はN-C=S 構造を認識する受容体と考えられている[36, 42]。これらの苦味受容体におけるリガンドの結合様式を解明するためには 3 次元構造情報を得ることが有効であり、膜タンパク質の構造解析には X 線結晶構造解析法が最適である。しかしながら、現段階まで、ヒト苦味受容体の結晶構造が解かれた報告は一例もない。

これに代わる結合様式の推定方法として、すでに結晶構造が解かれている受容体とのホモロジーモデリングによる分子シミュレーションが挙げられる。本手法を用い、hTAS2R38 と PTC や PROP の結合様式を予測した実験についてはすでに報告されている[50, 51]。本シミュレーションはロドプシンの結晶構造を鋳型に計算をしたもので、PTC および PROP は hTAS2R38 の TM4, 5, 6, 7 に囲まれる疎水性の高い推定結合領域でともに受容されることが予想された。このなかで、Trp99, Met100, Phe197, Ser260, Ala262, Met286 がリガンド認識に重要なアミノ酸残基であると予測されたが、それぞれのリガンドが相互作用するアミノ酸残基が若干異なるため微妙に異なった結合様式を示していることが予想されていた(図 2-11)[50]。しかしながら、当時は変異体を用いた機能解析による予測された分子モデリングの正当性の検証はなされていない。

2010 年になり、変異体を用いた機能解析が別のグループによりなされ、

(1) Asn103 が PTC との結合に関与している

(2) Trp99, Met100, Ser259 がリガンド受容ポケットの形成に貢献している

(3) Trp99, Met100, Phe255, Val296 が受容体の活性化に関与している

ことが実験的に示された（図 2-12）[54]。既報の分子モデリングによる予測と変異体解析による検証

で、共にリガンド認識に重要であるとされたアミノ酸残基は、Trp99, Met100 のみであったことから、受容体とリガンドの結合状態を推定する実験では、分子モデリングだけの推定では精度が低く、変異体機能解析を組み合わせる必要性があるとことが示唆される。分子モデリングと変異体機能解析における実験結果に相違が見られた理由の 1 つとして、鋳型に不活性型のロドプシンを用いたことが挙げられる。PTC や PROP はいずれも hTAS2R38 のアゴニストであるため、本来、分子モデリングには活性型を鋳型として使用すべきである。

今回我々は、部分構造を認識しているとされるもう1つのヒト苦味受容体、hTAS2R16に着目し、β-D-グルコピラノシド類の結合様式を分子モデリングと変異体を用いた機能解析により推測した。サリシンは、hTAS2R16のアゴニストであるため、本研究ではウシロドプシンの光活性化体の中間体モデルであるメタロドプシン[52]を鋳型としhTAS2R16の立体構造モデルを構築した。サリシンとの複合体モデルについて、分子動力学計算により安定複合体構造を推定したところ、サリシンは分子サイズがほぼ等しいD-グルコースとサリチルアルコールが酸素原子の両端に縮合した対称的な化学構造を示すため、膜貫通領域3, 5, 6番目のヘリックスに囲まれた推定結合領域において、サリシンの配向方向が酸素原子を中心に内外対称な方向で受容された2つの複合体候補が得られた（図2-2）。さらに結合サイト付近でサリシン受容に関与している可能性が高い8つのアミノ酸が推定されたが（表2-1）、この中でアミノ酸残基とサリシン間の相互作用様式が2つの推定モデル間で変わるものはGlu86、Trp94、Gln177の3つであった（図2-3）。これらのアミノ酸残基に点変異を導入した変異体に対するサリシン応答性を野生型と比較することで、実験結果と矛盾しない1つのモデルに絞り込むことができた（図2-10）。他の5つのアミノ酸残基に対する変異体機能解析でも推定された複合体モデルに矛盾する実験結果は得られなかったことから、信頼度の高いhTAS2R16-サリシンの複合体構造モデルが示されたとともに、サリシン受容に特に重要ないくつかのアミノ酸残基を同定することに成功した（図2-10）。また、鋳型として活性化型であるメタロドプシンの分子モデルを用いることの有効性も本研究では示された。さらに、芳香環上の置換基が異なるフェニル-β-D-グルコピラノシド類を用いた変異体機

能解析結果もサリシンのものと一致していたことより、hTAS2R16が認識するフェニル-β-D-グルコピラノシド類はいずれもサリシンと同一の受容サイトを共有し、特にリガンドのD-グルコース構造近傍に位置するアミノ酸残基がリガンド認識に重要であることが示唆された（図2-10）。

グルコピラノシド類が、hTAS2R16で受容されるためにはD-グルコースの1位のβ方向にアグリコンが縮合していなくてはならず、α方向にフェニル基が縮合したフェニル-α-D-グルコピラノシドではhTAS2R16を活性化しない[36]。今回の変異体機能解析において、Gln177とβ-D-グルコピラノシド類間の直接的な相互作用を実験的に見出すことはできなかった。しかしながら、分子モデリングによる予測ではGln177はアグリコンと近接した場所に位置している(図2-13)。D-グルコースのα方向にベンゼン環が縮合したフェニル-α-D-グルコピラノシドでは、Gln177との間の立体障害が生じることが予想されることから、Gln177がフェニルグルコピラノシド類の立体構造の認識に関与しているアミノ酸残基の1つである可能性が高い。また、hTAS2R16の活性化には、ピラノースのC4位の水酸基の立体配置も重要であると報告されており、糖構造がD-グルコース型であるもののみがhTAS2R16を活性化する[36]。しかしながら、今回の我々の解析において、この水酸基の立体配置の認識に関与しているアミノ酸残基を同定することはできなかった。

正確なhTAS2R16におけるサリシンの結合様式が明らかになるためには、X線結晶構造解析により構造が解かれるのを待たねばならないが、今回推定されたhTAS2R16-サリシンの複合体構造モデル（図2-10）は、分子モデリングによる予想だけではなく、変異体機能解析実験において矛盾点が認められなかった推定モデルであることから信頼度の高いものであると考えられる。

2-4-2 光ラベル化法によるリガンド結合部位周辺のアミノ酸残基の同定

受容体中のリガンド結合サイトを解析する方法は、本論文において我々が述べてきた変異体を用いた機能解析などに代表される分子生物学的手法のほかに、タンパク化学的手法がある。タンパク化学的手法の代表はX線結晶構造解析であるが、リガンド誘導体を用いたアフィニティーラベ

ルで結合部位を解析する光アフィニティーラベル化法も有効な情報を提供するタンパク化学的手法の1つである。光アフィニティーラベル化は特異的化学修飾法の代表であり、光照射により、ニトレン、カルベンといった非常に反応性の高い化学的活性種を発生させて結合部位近傍を標識する方法である(図2-14)[55, 56]。本方法では、hTAS2R16におけるサリシンの結合部位近傍のアミノ酸残基を、

(1) リコンビナントhTAS2R16タンパクに光アフィニティーラベル化したサリシンを作用

(2) 光照射

(3) プロテアーゼ処理

(4) ペプチド断片の質量分析

の一連の実験により同定することができる。この中で、サリシンの芳香環上に光アフィニティーラベル化したサリシンについては、共同研究者である益田らのグループらによりすでに合成が完成しており(未発表)、この合成光アフィニティーラベル化サリシンはhTAS2R16発現HEK293T細胞を活性化するという結果を得ている(図2-15)。リコンビナントhTAS2R16の発現と精製については、当研究室の菅原らが、*S. cerevisiae*を宿主とした発現検討において、5種類のヒト苦味受容体(hTAS2R7, -R8, -R16, -R19(旧名-R48), -R41)において、精製と結晶化に好ましいレベルである1 mg/l-培養以上の発現に成功している[57]。今後、純度の高いhTAS2R16が精製できれば、光アフィニティーラベル化実験が可能となる。光ラベル化実験から得られる情報は、我々の報告した分子モデルの検証とともに、Asn89やGln177のリガンド認識・識別への関与やC4位の水酸基の立体配置の認識に関与しているアミノ酸残基の同定を可能とする有益な情報をもたらすことが期待される。

図2-1. サリシンおよびその類縁体の化学構造式

図2-2. 分子モデリングから予測されたサリシン-hTAS2R16複合体構造モデル

メタロドプシンの分子モデルをテンプレートに分子モデリングを行い、2つの複合体構造モデル候補が得られた。
いずれの複合体モデルもサリシンはTM3, 5, 6に囲まれた同一の推定結合ポケットで受容されており、サリシンの配向方向のみが異なる。
推定結合サイトにおいて、
モデルA: サリシンの芳香環が細胞質側、D-グルコース構造が細胞外側に配向
モデルB: サリシンの芳香環が細胞外側、D-グルコース構造が細胞質側に配向
TM: transmembrane domain

表2-1. 分子モデリングからサリシンの認識に重要であることが予測されたアミノ酸残基

Location	Residues			
TM3	Glu 86	Asn 89	Phe 93	Trp 94
TM5	Gln 177	His 181		
TM6	Phe 240	Ile 243		

アミノ酸残基	Model A	Model B
Trp94	芳香環	糖水酸基
Gln177	糖水酸基	相互作用なし
Glu86	糖水酸基	芳香環上の水酸基

図2-3. 各モデル間で相互作用様式が大きく異なるアミノ酸残基

赤点線は水素結合による相互作用を示す。

図2-4. モデル間で相互作用様式が大きく異なるアミノ酸残基の点変異体を用いた機能解析

ssr3-hTAS2R16もしくは点変異体をGα16gust44とともにHEK293T細胞に一過的に発現させ、cell-base assayにより濃度応答曲線を作成した。
エラーバーは標準誤差(n≧3)を示す。RFU: relative fluorescence units
(A) Trp94変異体 (B) Gln177変異体

図2-5. Glu86変異体のさまざまなphenyl-β-D-glucopyranoside類に対する応答性

ssr3-hTAS2R16もしくは点変異体をGα16gust44とともにHEK293T細胞に一過的に発現させ、cell-base assayにより濃度応答曲線を作成した。
エラーバーは標準誤差(n≧3)を示す。RFU: relative fluorescence units
(A) salicin (B) arbutin (C) phenyl-β-D-glucopyranoside

表2-2. hTAS2R16点変異体のサリシンに対するEC_{50}値

Location	mutants		EC_{50} (mM)	EC_{50} mut. / EC_{50} WT
-	WT		0.22	1.0
TM3	E86	E86D	2.13	9.8
		E86Q	1.25	5.7
	N89	N89Q	No response	-
		N89D	No response	-
		N89V	No response	-
		N89L	No response	-
		N89A	No response	-
	F93	F93T	12.0	55.1
		F93Y	10.0	45.9
		F93L	4.15	19.1
		F93A	11.5	52.8
	W94	W94F	9.68	44.5
		W94Y	1.36	6.2
TM5	Q177	Q177N	0.39	1.8
		Q177E	0.22	1.0
		Q177A	0.55	2.5
	H181	H181T	1.84	8.5
		H181L	12.9	59.3
TM6	F240	F240Y	2.44	11.2
		F240L	>30	-
		F240W	2.05	9.4
	I243	I243L	0.50	2.3
		I243V	0.84	3.9
		I243A	>30	-

表2-3. E86変異体における各リガンドに対するEC_{50}値

mutants	salicin (mM)	arbutin (mM)	phenyl-β-D-glucopyranoside (mM)
WT	0.22	1.34	0.38
E86D	2.13	10.6	7.09
E86Q	1.25	3.89	1.96

図2-6. Model Bの結合様式におけるアミノ酸残基とサリシンの推定相互作用

Asn89, His181はサリシンの糖水酸基との水素結合が、Phe93, Phe240, Ile243については周辺アミノ酸残基との疎水的な相互作用による結合サイトの形成が予想される。

図2-7. hTAS2R16とサリシンの結合様式の変異体機能解析による検証

ssr3-hTAS2R16もしくは点変異体をGα16gust44とともにHEK293T細胞に一過的に発現させ、cell-base assayにより濃度応答曲線を作成した。
エラーバーは標準誤差(n≧3)を示す。RFU: relative fluorescence units
(A) His181変異体 (B) Asn89変異体 (C) Phe93変異体 (D) Phe240変異体 (E) Ile243変異体

図2-8. リガンドとしてアルブチンを用いた変異体機能解析

ssr3-hTAS2R16もしくは点変異体をGα16gust44とともにHEK293T細胞に一過的に発現させ、cell-base assayにより濃度応答曲線を作成した。
エラーバーは標準誤差(n≧3)を示す。RFU: relative fluorescence units
(A) Asn89変異体 (B) Phe93変異体（C) Trp94変異体（D) Gln177変異体 (E) His181変異体 (F) Phe240変異体 (G) Ile243変異体

表2-4. hTAS2R16点変異体のアルブチンに対するEC_{50}値

Location	mutants		EC_{50} (mM)	EC_{50} mut. / EC_{50} WT
-	WT		1.34	1.0
TM3	E86	E86D	10.6	7.9
		E86Q	3.89	2.9
	N89	N89Q	No response	-
		N89D	No response	-
		N89V	No response	-
		N89L	No response	-
		N89A	No response	-
	F93	F93T	>30	-
		F93Y	>30	-
		F93L	>30	-
		F93A	No response	-
	W94	W94F	No response	-
		W94Y	5.87	4.4
TM5	Q177	Q177N	2.25	1.7
		Q177E	1.20	0.9
		Q177A	2.17	1.6
	H181	H181T	2.73	2.0
		H181L	>30	-
TM6	F240	F240Y	8.75	6.5
		F240L	No response	-
		F240W	8.71	6.5
	I243	I243L	2.72	2.0
		I243V	3.61	2.7
		I243A	No response	-

図2-9. リガンドとしてphenyl- β -D-glucopyranosideを用いた変異体機能解析

ssr3-hTAS2R16および点変異体をGα16gust44とともにHEK293T細胞に一過的に発現させ、cell-base assayにより濃度応答曲線を作成した。
エラーバーは標準誤差(n≧3)を示す。RFU: relative fluorescence units
(A) Asn89変異体 (B) Phe93変異体 (C) Trp94変異体 (D) Gln177変異体 (E) His181変異体
(F) Phe240変異体 (G) Ile243変異体

表2-5. hTAS2R16点変異体のphenyl-β-D-glucopyranosideに対するEC_{50}値

Location	mutants		EC_{50} (mM)	EC_{50} mut. / EC_{50} WT
-	WT		0.38	1.0
TM3	E86	E86D	7.09	18.4
		E86Q	1.96	5.1
	N89	N89Q	No response	-
		N89D	No response	-
		N89V	No response	-
		N89L	No response	-
		N89A	No response	-
	F93	F93T	12.7	33.0
		F93Y	8.45	22.0
		F93L	5.47	14.2
		F93A	12.6	32.8
	W94	W94F	>30	-
		W94Y	2.42	6.3
TM5	Q177	Q177N	0.84	2.2
		Q177E	0.56	1.5
		Q177A	1.12	2.9
	H181	H181T	2.58	6.7
		H181L	>30	-
TM6	F240	F240Y	3.06	8.0
		F240L	>30	-
		F240W	2.49	6.5
	I243	I243L	1.98	5.2
		I243V	1.56	4.1
		I243A	>30	-

図2-10. 変異体機能解析実験結果に矛盾しないhTAS2R16-サリシン複合体構造モデル

Model Bの結合様式でサリシンはhTAS2R16に受容されることが変異体実験から示された。
Glu86, Asn89, Trp94, His181-サリシン間の水素結合を介した相互作用の存在、
Phe93, Phe240, Ile243については周辺アミノ酸残基との疎水的相互作用を介した
リガンド受容ポケットの形成への貢献が実験的に示唆された(Asn89については予測のみ）。
受容サイトの細胞内側に位置するサリシンのD-グルコース周辺のアミノ酸残基が主に
サリシン認識にかかわっている。

図2-11. 分子モデリングによるhTAS2R38による推定リガンド結合モデル

hTAS2R38における(a)PTCおよび(b)PROPの結合モデル
点線はリガンドとアミノ酸残基間の推定相互作用を示す。
Miguet *et al*., 2006 (Ref.50) より引用。

図2-12. 分子モデリングと変異体機能解析を組み合わせた検証で推定された
PTC-hTAS2R38複合体構造モデル

PTCの認識に関与しているアミノ酸残基および受容体の活性化に関与していることが予測されたアミノ酸残基を記載。
Biarnes *et al*., 2010 (Ref.54) より引用。

図2-13. Gln177とサリシンの立体的関係

サリシンはD-グルコースの1位のβ方向にサリチルアルコールが縮合した構造を有し、Gln177とは立体的に近接している。フェニル-α-グルコピラノシドがhTAS2R16を活性化しない(Bufe *et al.*, 2002 (Ref.36))理由は、D-グルコースのα方向にベンゼン環が縮合するとGln177との間に立体障害が生じるためと予想される。

図2-14. 光アフィニティ―ラベル化法概要

國安ら, 2003 (Ref.55) より引用。

図2-15. hTAS2R16発現細胞の光アフィニティーラベル化サリシンへの応答

ssr3-hTAS2R16およびGα16gust44を一過的に発現させたHEK293T細胞の
10 mM光アフィニティーラベル化サリシン刺激に対する応答の一例。
応答の様子を疑似カラーで表示。
左はリガンド添加前、右はリガンド添加30秒後の画像。

第 3 章

苦味を呈する二糖（ゲンチオビオース）の hTAS2R16 における認識機構

3-1 序

塩味、酸味、甘味、苦味、そして旨味という基本 5 味の中で、甘味と苦味は、生物学的にみるとそれぞれ食物の摂取と拒絶を決定づける重要な因子のひとつである[58]。糖は元来、生体維持に必須なエネルギー源であり、一般的に甘味を呈する。しかしながらすべての糖が甘いわけではなく、苦味を呈するものも存在する。その一例がD-グルコース2分子がβ-1,6-縮合したゲンチオビオースである[48]。蜂蜜やワインに含まれる[59-62]ゲンチオビオースは苦味を呈する[48]のに対し、そのアノマーであるイソマルトースは甘い[48, 63]。

味覚受容体が発見されるまで、甘味物質と甘味受容サイトの間の受容モデルとして AH-B 則が広く受け入れられていた[64-66]。このモデルでは、甘味物質は水素供与基(AH)と受容基(B)をともに有し、AH-B ユニットの長さは 2.5～4Åであるとされる。同様の AH-B ユニットは甘味受容サイトにも存在し、それぞれの AH-B ユニットが対をなすように水素結合を行うことで、甘味物質が甘味受容サイトで認識されているという考え方である（図 3-1）[64-66]。多くの甘味物質に対し、このモデルは適応可能であるが、AH-B ユニットを有するゲンチオビオースでは官能上、甘味を呈さず、苦味を示すという矛盾が生じていた。味覚受容体の発見に伴い、甘味と苦味は別々の受容体で認識されていることが明らかとなり(図 1-2)[1]、ゲンチオビオースの苦味は、苦味受容体の活性化により引き起こされていると予測されるが、その受容体の同定はなされていない。

本研究では苦味を呈する二糖であるゲンチオビオースの苦味発現機構についてヒト味覚受容体発現細胞を用いたカルシウムイメージング法により解析した。まずヒト苦味受容体を発現させた培養細胞による機能解析を行い、25 種類の苦味受容体の中で hTAS2R16 のみがゲンチオビース刺激に対する応答を示した実験結果から、ゲンチオビオースの苦味は hTAS2R16 の活性化に起因するものであることを解明した。またゲンチオビースは甘味受容体発現細胞を活性化しなかったのに対し、このアノマー体であるイソマルトースは甘味受容体のみを活性化し、hTAS2R16 は活性化しなかった。以上の結果から、ヒトの味覚受容体は糖のわずかな構造の違いも厳密に識別して、その結果、甘味と苦味という異なる味の感覚をもたら

すことが明らかとなった。さらに、変異体機能解析結果から、ゲンチオビオースもサリシンと同一の受容サイト内で認識されることも示唆された[67]。

3-2 材料と方法

化合物

ゲンチオビオース、D-(+)-トレハロース二水和物、D-(+)-セロビオース、ラクツロース、パラチノース は和光純薬工業株式会社より、D-(+)-マルトース一水和物、イソマルトース、 D-(+)-ラクトース一水和物、D-(+)-スクロース、D-(+)-メリビオース一水和物、ガラクチノール二水和物、D-(+)-ツラノースは東京化成工業株式会社より購入した。また、ニゲロースは株式会社林原生物化学研究所より購入した。これらの二糖は構造式を図 3-2 に示す。サリシンはナカライテスク株式会社より、また Glu-Glu はペプチド研究所より購入した。

hTAS2Rs の発現プラスミドコンストラクト

25 種類の hTAS2Rs の発現プラスミドコンストラクトを構築するため、ヒトゲノム DNA(BD Clontech)より、各 hTAS2R の DNA 断片 を PCR で増幅した。各 hTAS2R の遺伝子名と NCBI Reference Sequence number を表 3-1 にまとめる。なお、つい最近一部の遺伝子名が変更されたため、変更があった遺伝子についてはカッコ内に以前の遺伝子記号を併記した。増幅したコード領域の N 末端にラットソマトスタチンタイプ3受容体の N 末端の 1-45 アミノ酸残基[21]を付与したのち、pEAK10 発現ベクター(Edge Biosystems, Gaithersburg, MD, USA)の *Eco*R I-*Not* I サイトもしくは *Asc* I-*Not* I サイトにサブクローンした(ssr3-hTAS2Rs)。hTAS2R38 には 49-262-296 番目のアミノ酸残基の変異により、いくつかの遺伝子多型が報告されているが、使用する発現プラスミドには N-フェニルチオウレア(PTC)、6-プロピル-2-チオウラシル(PROP)に対し最も高い応答性を示すことが報告されている 49, 262, 296 番目のアミノ酸がそれぞれプロリン、アラニン、バリンの PAV 体を使用した[42]。PCR の増幅により得られた hTAS2R38 は 49, 262, 296 番目のアミノ酸がそれぞれ、アラニン、バリン、イソロイシンの AVI 体であったため、この cDNA を鋳型に第 2 章に記載した QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)により変異体導入を行

い、ssr3-hTAS2R38-PAV 体を得た。25 種類すべての配列はシークエンスにより PCR エラーがないことを確認した。

細胞培養および遺伝子導入

細胞培養は第 2 章に記載と同一の方法で行った。遺伝子導入の際には、細胞を 35 mm ディッシュあるいは 6 ウェルプレート上に細胞を撒き、1晩培養後、60-80%コンフルエントの状態時に Lipofectamine 2000 reagent（Invitrogen）を用いて、ssr3-hTAS2Rs、Gα16gust44 発現ベクターおよび蛍光タンパク質発現プラスミド pDsRed2-N1（TaKaRa BIO Inc., Shiga, Japan）を 40:10:0.8 の混合比で一過的に導入した。なお、遺伝子導入の前日からは、HEK293T 細胞はペニシリンーストレプトマイシンを抜いた 10% fetal bovine serum 入りの DMEM を用いて培養した。

Ca^{2+} imaging analysis

トランスフェクションから 6 時間後に、上述の細胞を 96-well lumox® multiwell (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Germany) に翌日細胞がコンフルエントの状態のようになるように希釈し、100 μl ずつ撒きなおした。さらに 18-20 時間 37℃、5%CO_2 存在下で培養した後、DMEM 培地を除去、第 2 章に記載の組成のバッファーでリンスしたのち、バッファーで希釈したカルシウム指示薬 Fura-2/AM（Invitrogen）を終濃度 5 μM になるように負荷し、27℃で 30 分間遮光下静置した。続いてバッファーにてリンスしたのち、バッファー100 μl を加え、遮光下、さらに 27℃にて 10 分間静置したのち、カルシウムイメージング解析に供した。アッセイでは、2×の濃度に調製した二糖を溶解した試験溶液を 100 μl ピペッティングにて滴下した。以降の本文中に記載されているリガンド濃度はすべて、リガンド添加後の終濃度を示している。pH 調整が必要な場合は、1N NaOH を用いてリガンド添加後の pH が 4.0 もしくは 4.5 になるようにあらかじめ調整した。

細胞応答は 340 および 380 nm にて励起した Fura-2 の蛍光（510 nm）の強度をシャッターコ

ントローラーLambda 10-3（Sutter Instrument, San Rafael, CA, USA）、MicroMax 冷却 CCD カメラ（CoolSNAP HQ2, Photometrics, Tucson, AZ, USA）、蛍光倒立顕微鏡 IX-81（Olympus, Tokyo, Japan）を用いて測定した。蛍光画像は、4 秒ごとに味刺激溶液投与後 30 秒間記録し、解析ソフトウェア MetaFluor(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)で解析した。細胞内カルシウム濃度変化を、無作為に選択した 100 個の DsRed 陽性細胞（遺伝子導入がなされたとみなされる細胞に相当）の 2 種の励起波長における蛍光の強度の比（F340/F380）の変化で観測した。蛍光の強度の比（F340/F380）が 0.2 以上の細胞を応答細胞と定義した。

Cell-based Assay

第 2 章に記載の方法と同一の手法により実施した。

統計解析

有意差検定は、KyPlot® Version 3.0 (KyensLab Inc.)を用いて、一元配置分散分析(ANOVA)にて検定を行った後、ダネット法による多重比較により検定した。p 値が 0.05 より小さいものを有意差ありと定義した。

3-3 結果

3-3-1 ヒト苦味受容体発現培養細胞のゲンチオビオース刺激に対する応答解析

ゲンチオビオースは、2つのD-グルコースがβ-縮合したβ-D-グルコピラノシドの1種であるとみなすことができる(図 3-2A)。hTAS2R16はβ-D-グルコピラノシド構造を認識する苦味受容体であるため、ゲンチオビオースも hTAS2R16 で認識されることが予想される。この仮説を検証するため、ヒト苦味受容体とGα16gust44 を HEK293T 細胞に一過的に発現させ、ゲンチオビオース刺激に対する応答をカルシウムイメージング法およびセルベースアッセイにより解析した。なお、ヒト苦味受容体の N 末端にはソマトスタチンタグを付加したコンストラクト(ssr3-hTAS2Rs)を使用した。

図 3-3 および 3-4 に示す通り、30 mM のゲンチオビオースを 25 種類のヒト苦味受容体発現細胞に作用させたところ、予想通り、hTAS2R16 発現 HEK293T 細胞において応答強度および頻度ともに高い応答が観測された。これに対し、受容体を発現していない細胞や他の 24 種のヒト苦味受容体発現細胞では 30 mM のゲンチオビオース刺激に対する応答は認められなかった。これらの結果から、ゲンチオビオースの苦味は hTAS2R16 の活性化に起因することが解明された。ゲンチオビースの応答は濃度依存的で、EC_{50} 値は 3.84 mM と hTAS2R16 のアゴニストであるサリシン(EC_{50}: 0.22 mM)よりも大きい(図 3-5)。

3-3-2 さまざまな二糖に対する hTAS2R16 発現 HEK293T 細胞の応答

続いて、hTAS2R16 を活性化する二糖がゲンチオビオースのほかに存在するか否かを検証した。使用した二糖の構造式一覧を図 3-2 に示す。D-(+)-トレハロース、ニゲロース、D-(+)-マルトース、イソマルトース、D-(+)-セロビオースは、ゲンチオビオースと同じく 2 つのグルコースユニットがそれぞれ、α-(1-1), α-(1-3), α-(1-4), α-(1-6), もしくはβ-(1-4)グリコシド結合した二糖である。まず、これらを検討対象とした。他にも、コージビオース、イソトレハロース、ソホロース、ラミナリビオースも 2 つのグルコースユニットがそれぞれα-(1-2), β-(1-1), β-(1-2), β-(1-3)グリコシド結合した二糖である

が、これらは市販されていないため、検討することができなかった。

グルコースとフルクトースからなる D-(+)-スクロースは甘味料として食品産業で最も使用されている糖の 1 つであるため、その類縁体である D-(+)-ツラノースやパラチノースとともに検討対象に加えた。D-(+)-ツラノースは還元糖であり、パラチノースはグルコースとフルクトースがα-1,6 結合した二糖で、工業的にスクロースの酵素的転移反応によって製造される糖である[68]。加えて、ガラクトースとグルコースがそれぞれβ-(1-4), α-(1-6)結合した D-(+)-ラクトースおよび D-(+)-メリビオースも検証した。さらに、ガラクトースとフルクトースがβ-1,6 結合した合成二糖、ラクツロースと糖アルコールであるガラクチノールも検討対象として用いた。各二糖の粉末を官能すると、これらはすべてゲンチオビオースとは異なり、強度に差はあるものの甘味を示し、苦味は感じなかった。

図 3-6 に示すとおり、hTAS2R16 を発現した HEK293T 細胞は 30 mM のゲンチオビオースを除くいずれの二糖にも応答しなかった。ゲンチオビオースのアノマー体であるイソマルトースは hTAS2R16 を活性化しなかったことから、この受容体は糖のわずかな立体構造の違いを正確に認識しているといえる。

一方で、スクロースやイソマルトースはヒト甘味受容体を安定的に発現している細胞[69]を活性化させ応答を示したが、ゲンチオビオースはこの細胞を活性化することはなかった（図 3-7）。これらの現象は官能結果と一致している。以上の結果から、ヒトの味覚受容体は糖のわずかな立体構造の違いも厳密に識別して、その結果、甘味と苦味という異なる味の感覚をもたらすことが明らかとなった。

3-3-3 hTAS2R16 の変異体解析によるゲンチオビオース結合様式の解析

Bufe らは、hTAS2R16 を活性化させるリガンドの条件として、①β-グリコシド結合をしていること、②ピラノースの C4 位の水酸基の立体配置が重要であること(D-グルコース構造であること)を挙げている[36]。また、第 2 章において示したとおり、我々は hTAS2R16 のサリシンのリガンド結合ポケットを明らかにし、検討したフェニル-β-D-グルコピラノシドはいずれもサリシンと同一のリガンド結合

ポケットを共有し、特に細胞内側の D-グルコース構造がリガンド認識に特に重要であることを見出した。ゲンチオビオースは①および②の条件を満たし、さらに分子サイズも第 2 章で検証したフェニル-β-D-グルコピラノシド類とほぼ同じであることから(図 3-8)、サリシンと同一のリガンド結合ポケットを共有していることが予想された。

この仮説を検証するため、第 2 章で見出されたサリシン認識に関連していると考えられるアミノ酸残基の変異体を用いた機能解析を実施した。第 2 章にて示した通り、hTAS2R16 のサリシン結合サイト周辺に存在し、リガンド認識に関与していると考えられるアミノ酸残基は大きく分けて、3 つのグループに分類できる。1 つ目のグループは Asn89, Trp94, His181 である。これらはサリシン結合サイトの細胞質側に位置し、水素結合による相互作用が想定されているアミノ酸残基である。2 つ目のグループは Phe93, Phe240, Ile243 からなり、周辺アミノ酸残基との疎水的な相互作用によりリガンド結合サイトを形成していると考えられているアミノ酸残基である。最後の 3 つ目のグループは Glu86 および Gln177 であり、これらはアグリコン周辺に位置するアミノ酸残基である(図 2-10)。

まず、グループ 1 の Trp94 および His181 とゲンチオビースの水酸基との相互作用について検証を行った。W94Y および H181T は水素結合による相互作用を保持、一方、W94F および H181L は水素結合による相互作用を消失するように設計した変異体である。W94F(no response)および H181L (EC_{50}>30 mM)変異体のゲンチオビオースに対する応答は W94Y(EC_{50}: 10.6 mM)や H181T(EC_{50}: 11.2 mM)および WT (EC_{50}: 3.84 mM)に比べ大幅に低下した(図 3-9A, B および表 2-2)。第 2 章に記載の通り、W94F や H181L 変異体のサリシンに対する応答は観測されているため(図 2-4A, 2-7A)、これらの変異体は機能的である。これらの実験結果より、Trp94 および His181 とゲンチオビオースの糖水酸基の間には水素結合を介した相互作用が存在していることが示唆された。一方で、Asn89 変異体については第 2 章での検証(図 2-7B, 2-8A, 2-9A)と同様に、検討したすべての変異体がゲンチオビースに対する応答性を消失したため、このアミノ酸残基とゲンチオビオースの水酸基間の水素結合を介した相互作用の存在を

実験的に証明することはできなかった(図 3-9C および表 3-2)。

次いで、グループ 2 の Phe93, Phe240, Ile243 の 3 つの疎水性アミノ酸残基について検討した。F240W は芳香環同士による π- π相互作用を保持、一方、F240L はこの相互作用をなくすように設計した変異体である。Ile243 の変異体解析ではアミノ酸残基の分子サイズの影響を検証するため、I243V および I243A を用いた。図 3-9D, E および表 2-2 に示す通り、F240L (EC_{50} >30 mM) および I243A(no response)変異体のゲンチオビオースに対する応答は F240W (EC_{50}: 14.3 mM), I243V (EC_{50}: 8.27 mM)および WT(EC_{50}: 3.84 mM)に比べ大幅に低減した。また、Phe93 変異体のゲンチオビオースに対する応答性はいずれも WT に比べ大幅に減少した(F93L EC_{50}: 15.0 mM; F93T, F93A, and F93Y: no response) (図 3-9F および表 2-2)。これらの実験結果はいずれも第 2 章で検証したフェニル-β-D-グルコピラノシド類(サリシン、アルブチン、フェニル-β-D-グルコピラノシド)を用いた変異体解析結果(図 2-7C, D, E、図 2-8B, F, G および図 2-B, F, G)と一致することから、これらの疎水性アミノ酸残基は周辺アミノ酸残基との疎水的相互作用によりリガンド結合サイトの形成に貢献していると考えられる。

最後にグループ 3 の Glu86 および Gln177 の変異体を用いた解析を実施した。第 2 章での検討結果から、リガンド認識において Glu86 はリガンド結合ポケットの空間的制御に主に寄与しており、距離的に水素結合が可能な水酸基を有するサリシンのみ、水素結合を介した相互作用が認められた。ゲンチオビオースもサリシンと同一のリガンド結合サイトで認識されているのならば、Glu86 はゲンチオビオースの結合サイトにおいて細胞外ループ側に存在するグルコース上の糖水酸基と近接しているため、水素結合を介した直接的な相互作用が存在するはずである。そこで、E86Q, E86D および E86L 変異体を用いた機能解析を実施した。E86Q および E86D は、水素結合による相互作用を保持、一方、E86L はこれをなくすように設計した変異体である。図 3-9G および表 2-2 に示す通り、E86L 変異体(EC_{50}: 16.4 mM)のゲンチオビオースに対する応答性は E86Q(EC_{50}: 4.93 mM)や E86D (EC_{50}: 9.40 mM)に比べ大幅に低下した。これらの実験結果は、このアミノ酸残基はゲンチオビオースの糖水酸基と水素結合を形成していることを意味している。さ

らに、E86D 変異体のゲンチオビオースに対する応答性は、E86Q に比べ約 2 倍低下していることから、このアミノ酸残基の側鎖の長さによるリガンド結合ポケットの空間的制御に対する寄与が第 2 章と同様に示された。最後に、Gln177 がゲンチオビオース認識に及ぼす影響について検証した。図 3-9H および表 2-2 に示す通り、アミノ酸残基の構造を大幅に変更した Q177A および Q177L 変異体でも、ゲンチオビオースに対する応答性はいずれも WT とほぼ同じであった。これらの結果から、ゲンチオビオースとGln177 間の直接的な相互作用の存在を示すような実験結果は、他のフェニル-β-D-グルコピラノシド類と同様、認められなかった。

以上の変異体を用いた機能解析結果は、すべて第 2 章に記載したフェニル-β-D-グルコピラノシド類を用いた検証結果と一致しており、このことからゲンチオビオースもサリシンと同一の受容サイト内で同様の結合様式で認識されていることが強く示唆された。本実験結果は、第 2 章で検証した hTAS2R16 のモデリング予測の正当性をさらに証明した実験結果であるともいえる。

3-4 考察

3-4-1 ゲンチオビオースの苦味認識機構

甘味物質は多様な構造をもつ。多種類の甘味物質の分子構造上に何かの共通的な特徴があるはずだという仮説のもと、甘味物質に関して様々な仮説が提唱されてきたが、味覚受容体が発見されるまでは、Shallenbergerらの「甘味物質の共通の性質として水素供与基(AH)と水素受容基(B)を有し、その間が2.5～4Å離れており、生体側の受容体にも存在するこのようなAHとBの間で甘味物質は水素結合する」というAH-B則が広く受け入れられていた(図3-1)[64-66]。甘味受容体の発見、その後のヒトとマウスのキメラ体や変異体を用いた機能解析により、現在では低分子の甘味物質はhT1R2上のN末端細胞外ループ上に存在するVFTドメインで受容されるといわれている[5, 6, 70-72]。AH-B則が甘味受容体上でも適応可能であるか否かについては、今後の研究により明らかになるであろう。しかしながら、AH-B則では説明がつかない化合物も存在する。二糖の1つであるゲンチオビオースはAH-B則に従うならば、甘味を呈するはずであるが、実際に官能してみると苦い。ヒトの味感覚において苦味の認識を司っている受容体はhTAS2Rsであることより、おそらくゲンチオビオースの苦味に25種類存在するヒト苦味受容体が関与していることが予想される。

本研究において我々は、ヒト苦味受容体を発現させた培養細胞による機能解析を行い、25種類の苦味受容体の中でhTAS2R16のみがゲンチオビース刺激に対する応答を示した実験結果（図3-3, 3-4）から、ゲンチオビオースの苦味はhTAS2R16の活性化に起因するものであることを明らかにした。またゲンチオビースは甘味受容体を活性化しなかったのに対し、このアノマー体であるイソマルトースは甘味受容体のみを活性化し（図3-7）、hTAS2R16は活性化しない（図3-6）との実験結果から、ヒトの味覚受容体は糖のわずかな構造の違いも厳密に識別して、その結果、甘味と苦味という異なる味の感覚をもたらすことを実験的に示した。

ごくわずかな立体構造の違いにより味質が大きく異なる化合物といえば、アミノ酸もその1つであ

る。アミノ酸の中には光学異性体間で、味質が全く異なるものがいくつか存在する。たとえば、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、およびL-チロシンは苦味を呈するが、これらのD体は甘い[58, 73, 74]。この中で、D-トリプトファンが甘味受容体においてhT1R2のN末端細胞外ループ上に存在するVFTドメインで受容されることは既に明らかになっている[72]。現在まで、苦味アミノ酸を認識する苦味受容体は明らかとなっていないが、苦味ペプチドを認識する受容体については報告があることから[26, 34]、アミノ酸の光学異性体間で認められる味質の違いもゲンチオビースとイソマルトースの関係のように立体構造の違いにより、それぞれ甘味、苦味を認識する異なる受容体を活性化させることに起因する可能性が高い。

一方で、人工甘味料であるアセサルファム K やサッカリン Na のようにヒト甘味受容体(hT1R2/hT1R3)とヒト苦味受容体(hTAS2R31, hTAS2R44)といった全く異なる味覚受容体をともに活性化させ、甘味と苦味をあわせもった味感覚を示す化合物も世の中には存在する[37, 75]。このような事実から、細胞外のVFTドメインに存在する甘味受容体のリガンド結合サイトと、膜貫通領域に存在することが予想される苦味受容体のリガンド結合サイトの空間的な環境は似ているのかもしれない。驚くべきことに、サッカリンの芳香環上 6 位にハロゲン分子を置換すると、導入するハロゲンの違いにより味質が変化し、F、Cl および Br 体は後味の苦味を伴った甘味を呈するのに対し、I 体は完全に苦味を消失し、甘味のみを示す[58]。この理由については今のところ不明であるが、ハロゲン分子の分子サイズが大きくなることで、苦味受容体では I 体が認識されなくなるのかもしれない。

3-4-2 ゲンチオビオースのhTAS2R16における結合様式とその生物学的意味

hTAS2R16を活性化させるには、①β-グリコシド結合をしていること ②ピラノースのC4位の水酸基の立体配置が重要であること(D-グルコース構造であること)の両条件を満たす必要がある。ゲンチオビオースは2つのD-グルコースがβ-縮合したβ-D-グルコピラノシドとみなすことができ、確かに①および②の条件を満たす。これに対し、トレハロース、ニゲロース、マルトース、およびイソマルト

ースはいずれもα-グルコシド縮合した二糖(図3-2)であるので、①の条件に反しhTAS2R16を活性化しないのは理にかなっている。また、ラクトース、メリビオース、ラクツロース、およびガラクチノールはいずれもピラノースのC4位の水酸基の立体がゲンチオビオースとは逆、すなわちD-ガラクトース構造(図3-2)であるため、②の条件に反することから、hTAS2R16活性化しない実験結果は、先行報告による知見と一致している。

第2章における検証から、検討したフェニル-β-D-グルコピラノシドはいずれもサリシンと同一のリガンド結合ポケットを共有し、特に細胞内側のD-グルコース構造がリガンド認識に重要であることが示唆されている。さらにゲンチオビオースの分子サイズは、第2章で検証したフェニル-β-D-グルコピラノシド類とほぼ等しいため、サリシンと同一の受容サイト内で認識されていると予想され、変異体機能解析結果から、この仮説は実証された。

図 3-10 に示すアミグダリン、リナマリン、プルナシン、オスマロニンエポキシドのようなβ-D-グルコピラノシドは非常に毒性の高いシアン発生性の青酸配糖体である[76, 77]。これらの化合物の化学構造を見てみると上記の①および②の条件を満たすことに気づき、実際 hTAS2R16 を活性化することが報告されている[36, 77]。本来、hTAS2R16 は、これらの毒物の摂取を防ぐために機能する受容体なのかもしれない。これらのアグリコンの化学構造が異なる毒物をもれなく認識するためには共通構造である CN 基か D-グルコース構造を認識するほかない。第 2 章および本章における検証結果から、hTAS2R16 で受容されるβ-D-グルコピラノシド類はいずれもサリシンと同一のリガンド結合ポケットで認識される可能性が高いこと、認識には特に細胞内側の D-グルコース構造が重要であることが示唆されている。上記の青酸配糖体の受容もサリシンと同一の受容サイトでなされ、特に共通構造である D-グルコース構造を認識しているといえるのではないだろうか。偶然にもゲンチオビオースは化学構造的に hTAS2R16 で認識される化合物の条件をすべて満たしているため、hTAS2R16 を活性化させる。このことが、ゲンチオビオースが二糖であるにもかかわらず苦味を呈する理由である。

図3-1. ShallenbergerらのAH-B則

甘味受容体が見つかるまで広く受け入れられていた甘味受容サイトにおける甘味物質の認識機構
AH: 水素結合供与基(hydrogen bond bonor)
B: 水素結合受容基(hydrogen bond acceptor)
Meyers *et al.*, 2008 (Ref.65) および山本隆：脳と味覚、共立出版, 1996より引用。

A

D-(+)-Trehalose
(α-D-Glucopyranosyl-α-D-glucopyranoside)

Nigerose
(3-O-α-D-Glucopyranosyl-D-glucose)

D-(+)-Maltose
(4-O-α-D-Glucopyranosyl-D-glucose)

Isomaltose
(6-O-α-D-Glucopyranosyl-D-glucose)

D-(+)-Cellobiose
(4-O-β-D-Glucopyranosyl-D-glucose)

Gentiobiose
(6-O-β-D-Glucopyranosyl-D-glucose)

B

D-(+)-Sucrose
(β-D-Fructofuranosyl-α-D-glucopyranoside)

D-(+)-Turanose
(3-O-α-D-Glucopyranosyl-D-fructose)

Palatinose
(6-O-α-D-Glucopyranosyl-D-fructose)

C

D-(+)-Lactose
(4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-glucose)

D-(+)-Melibiose
(6-O-α-D-Galactopyranosyl-D-glucose)

Lactulose
(4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-fructose)

Galactinol
(1-O-α-D-Galactopyranosyl-L-myo-inositol)

図3-2. 機能解析に用いた二糖の化学構造

(A) 2つのグルコースユニットがグリコシド結合した二糖
(B) D-(+)-スクロースおよびその類縁体
(C) その他の二糖

表3-1. 各hTAS2Rの遺伝子名とNCBI Reference Sequence number

レセプター	NCBI RefSeq No.
hTAS2R1	NM_019599.2
hTAS2R3	NM_016943.2
hTAS2R4	NM_016944.1
hTAS2R5	NM_018980.2
hTAS2R7	NM_023919.2
hTAS2R8	NM_023918.1
hTAS2R9	NM_023917.2
hTAS2R10	NM_023921.1
hTAS2R13	NM_023920.2
hTAS2R14	NM_023922.1
hTAS2R16	NM_016945.2
hTAS2R19(hTAS2R48)	NM_176888.1
hTAS2R20(hTAS2R49)	NM_176889.1
hTAS2R30(hTAS2R47)	AF494233.1
hTAS2R31(hTAS2R44)	NM_176885.1
hTAS2R38-AVI	NM_176817.2
hTAS2R39	NM_176881.2
hTAS2R40	NM_176882.1
hTAS2R41	NM_176883.1
hTAS2R42	NM_181429.1
hTAS2R43	NM_176884.1
hTAS2R45	NM_176886.1
hTAS2R46	NM_176887.2
hTAS2R50	NM_176890.1
hTAS2R60	NM_177437.1

図3-3. hTAS2R発現HEK293T細胞の30 mMゲンチオビオースに対する応答の
カルシウムイメージングによる検証

ssr3-hTAS2RsおよびGα16gust44を一過的に発現させたHEK293T細胞に30 mMゲンチオビオース刺激を行った。ゲンチオビオース刺激前と刺激30秒後におけるFura-2の蛍光強度比(F_{340}/F_{380})を疑似カラーで表示。スケールバーは50 μm

図3-4. hTAS2R発現HEK293T細胞の30 mMゲンチオビオースに対する応答の
セルベースアッセイによる検証

ssr3-hTAS2RsおよびGα16gust44を一過的に発現させたHEK293T細胞に30 mMゲンチオビオース刺激を行ったときの応答をcell-base assaysにより解析した。リガンド添加前後の蛍光変化値をΔRFUで表示。グラフは平均値±標準誤差(n≧3)を示す。有意差検定は、一元配置分散分析(ANOVA)にて検定を行った後、ダネット法による多重比較により検定。
*p*値が0.05より小さいものを有意差ありと定義した。***: $p<0.001$ vs mock
RFU: relative fluorescence units

図3-5. hTAS2R16発現HEK293T細胞のリガンド刺激に対する濃度応答曲線

ssr3-hTAS2R16をGα16gust44とともにHEK293T細胞に一過的に発現させ、cell-base assaysにより濃度応答曲線を作成した。
○印はゲンチオビオース、●印はサリシン刺激に対する応答値を示す。
エラーバーは標準誤差(n≧3)を示す。RFU: relative fluorescence units

図3-6. hTAS2R16発現HEK293T細胞のさまざまな二糖に対する応答

(A)ssr3-hTAS2R16およびGα16gust44を一過的に発現させたHEK293T細胞に30 mM二糖による刺激を行ったときの応答の様子を疑似カラーで表示した。スケールバーは50 μm
(B)ssr3-hTAS2RsおよびGα16gust44を一過的に発現させたHEK293T細胞の30 mM二糖に対する応答をcell-base assaysにより解析。リガンド添加前後の蛍光変化値をΔRFUで表示。
グラフは平均値±標準誤差(n≧3)を示す。
有意差検定は、一元配置分散分析(ANOVA)にて検定を行った後、ダネット法による多重比較により検定。*p*値が0.05より小さいものを有意差ありと定義した。
***: $p<0.001$ vs buffer
RFU: relative fluorescence units

図3-7. ヒト甘味受容体安定発現細胞の各種二糖類に対する応答

スクロース、イソマルトース、ゲンチオビオースに対するヒト甘味受容体安定発現細胞の応答性をカルシウムイメージング法により解析。終濃度が200 mMの各二糖による刺激を行い、その添加前と添加30秒後におけるFura-2の蛍光強度比(F_{340}/F_{380})を疑似カラーで表示した。スケールバーは50 μm

図3-8. ゲンチオビオースとサリシンの化学構造の比較

ゲンチオビオース、サリシンともD−グルコースの1位にアグリコンがβ縮合した配糖体である。
ゲンチオビオースのアグリコンはD−グルコース、サリシンのアグリコンはサリチルアルコール。

図3-9. hTAS2R16変異体のゲンチオビオースに対する応答

ssr3-hTAS2R16および点変異体をGα16gust44とともにHEK293T細胞に一過的に
HEK293T細胞に発現させ、cell-base assayにより濃度応答曲線を作成した。
エラーバーは標準誤差。RFU: relative fluorescence units
(A) Trp94変異体 (B) His181変異体 (C) Asn89変異体 (D) Phe240変異体 (E) Ile243変異体
(F) Phe93変異体 (G) Glu86変異体 (H) Gln177変異体

表3-2. hTAS2R16点変異体のゲンチオビオースに対するEC_{50}値

Location	Mutant	EC_{50} (mM)	EC_{50} Ratio (mutant/WT)
	WT	3.84	1.0
TM3 *	E86D	9.40	2.4
	E86Q	4.93	1.3
	E86L	16.4	4.3
	N89D	no response	
	N89Q	no response	
	N89A	no response	
	N89V	no response	
	N89L	no response	
	F93L	15.0	3.9
	F93T	no response	
	F93A	no response	
	F93Y	no response	
	W94F	no response	
	W94Y	10.6	2.8
TM5	Q177A	4.36	1.1
	Q177L	3.28	0.9
	H181T	11.2	2.9
	H181L	> 30	-
TM6	F240W	14.3	3.7
	F240L	> 30	-
	I243V	8.27	2.2
	I243A	no response	

* TM: transmembrane

Amygdalin

Linamarin

Prunasin

Osmaronin epoxide

gentiobiose

salicin

図3-10. 青酸配糖体類の化学構造

青酸配糖体(アミグダリン、リナマリン、プルナシン、オスマロニンエポキシド)とゲンチオビオ―ス
およびサリシンの化学構造の比較。
いずれの化合物もβ-グルコピラノシド構造の部分(赤線で示した部分)は共通、糖はD−グルコ―ス、
その1位のβ方向にアグリコンが縮合した構造をしている。