

博士論文

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

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻
平成 20 年度 博士課程進学
生物機能開発化学研究室

古泉 文子

指導教員
東京大学大学院准教授
三坂 巧

目次

| | |
|---------------------------------------|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 第2章 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 | 17 |
| 2-1 序 | 18 |
| 2-2 材料と方法 | 20 |
| 2-3 結果 | |
| 2-3-1 NCLの受容に必要なT1Rサブユニットの同定 | 25 |
| 2-3-2 NCLの受容に必要なhT1R3のドメインの同定 | 25 |
| 2-3-3 hT1R3ATDにおける作用領域の探索(C末端側からの探索) | 26 |
| 2-3-4 hT1R3ATDにおける作用領域の探索(N末端側からの探索) | 27 |
| 2-4 考察 | |
| 2-4-1 NCLとhT1R2-hT1R3の相互作用 | 44 |
| 2-4-2 NCLとhT1R2-hT1R3のドッキングモデルの利用 | 45 |
| 2-4-3 キメラT1Rを用いた培養細胞評価系における課題 | 46 |
| 第3章 ミラクリンの味覚修飾活性機構の解析 | 50 |
| 3-1 序 | 51 |
| 3-2 材料と方法 | 55 |
| 3-3 結果 | |
| 3-3-1 MCLの酸誘導性甘味活性の培養細胞評価系の構築 | 63 |
| 3-3-2 MCLの味覚修飾活性の持続性の評価 | 64 |
| 3-3-3 中性においてMCLがhT1R2-hT1R3の活性化に与える効果 | 65 |
| 3-3-4 MCLの受容に必要なhT1R2-hT1R3のドメインの同定 | 65 |
| 3-4 考察 | |
| 3-4-1 構築したMCLの酸誘導性甘味活性の評価系について | 74 |
| 3-4-2 MCLの味覚修飾活性のメカニズム | 75 |
| 3-4-3 MCLとNCLの相違点 | 75 |
| 3-4-4 MCLの甘味受容体活性化抑制効果 | 77 |
| 第4章 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 | 82 |
| 4-1 序 | 83 |
| 4-2 材料と方法 | 86 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4-3 | 結果 | |
| 4-3-1 | 低分子甘味物質受容に関わるアミノ酸残基のスクリーニング | 88 |
| 4-3-2 | アスパルテーム、D-トリプトファンの受容に関与する残基 | 88 |
| 4-3-3 | サッカリン Na、アセサルファム K の受容に関与する残基 | 89 |
| 4-3-4 | スクラロースの受容に関与する残基 | 89 |
| 4-3-5 | 疎水性アミノ酸残基の役割 | 89 |
| 4-4 | 考察 | |
| 4-4-1 | hT1R2 の ATD における低分子甘味物質の認識に重要な残基 | 98 |
| 4-4-2 | 分子モデリング | 98 |
| 4-4-3 | hT1R2-hT1R3 の活性化機構と他のクラス C GPCR の活性化機構との比較 | 100 |
| | | 106 |
| 第 5 章 | 総合討論および今後の展望 | 106 |
| | | |
| | 参考文献 | 116 |
| | | |
| | 論文の内容の要旨 | 132 |
| | | |
| | 謝辞 | 136 |

本論文で使用した略語

| | |
|------------------|--|
| aa | amino acids |
| ATD | amino terminal domain |
| BCA | bicinchoninic acid assay |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid |
| CRD | cysteine-rich domain |
| EC ₅₀ | half maximal effective concentration |
| ENaC | epithelial sodium channel |
| fMRI | functional magnetic resonance imaging |
| GPCR | G protein-coupled receptor |
| HEK | human embryonic kidney |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic Acid |
| MCL | miraculin |
| MEG | magnetoencephalography |
| NCL | neoculin |
| NHDC | neohesperidin dihydrochalcone |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PKD | polycystic kidney disease |
| TMD | transmembrane domain |
| PET | positron emission tomography |
| pI | isoelectric point |

第 1 章

序論

<味覚>

味覚は、食物を摂取した際に生じる化学感覚の 1 つであり、食物を積極的に摂取すべきか忌避すべきかを判断するうえで重要な役割を担っている。ヒトは甘・酸・塩・苦・旨味の五基本味の他、辛味・渋味・こく味など様々な味を感じることができる。糖類やアミノ酸などエネルギー源となる物質の多くは甘味・旨味を呈し、嗜好される一方、腐敗物や植物の産生する有毒な代謝物は酸味・苦味を呈し、忌避される。塩味は生体の浸透圧調節に関与しており、高濃度では忌避される一方、低濃度では好まれる(Chandrashekar et al., 2006)。

呈味物質は舌上皮層に分布する味蕾の味細胞で受容される。味蕾は 50~150 個の味細胞がたまねぎ状に集まっており、呈味物質を受容した味細胞は、神経伝達物質を放出して味の情報を神経系へと伝達する(Finger et al., 2005)。最終的に味覚情報は大脳皮質味覚野へと伝達され、認識される。味覚に関する研究は、味覚受容体(表 1-1)の発見に伴い、近年目覚ましい進展を見せている。2000 年を過ぎ、分子生物学的・遺伝学的アプローチにより、Gタンパク質共役 7 回膜貫通型受容体(G-protein coupled receptor, GPCR)である T1R ファミリー(T1R1, T1R2, T1R3)(Hoon et al., 1999; Kitagawa et al., 2001; Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001; Nelson et al., 2001; Sainz et al., 2001)のうち、T1R2-T1R3 が甘味受容体として、T1R1-T1R3 が旨味受容体として機能することが明らかとなった(Li et al., 2002; Nelson et al., 2002; Nelson et al., 2001; Zhao et al., 2003)。また T2R ファミリーの GPCR が苦味受容体として同定された(Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami et al., 2000; Mueller et al., 2005)。哺乳類では、T2R ファミリーは約 30 個の遺伝子から構成される(Adler et al., 2000; Go et al., 2005; Matsunami et al., 2000)。さらに、酸味受容体候補としてイオンチャネル複合体である PKD1L3-PKD2L1 が(Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006)、塩味受容体候補としては ENaCs が同定された(Chandrashekar et al., 2010)。これら T1Rs, T2Rs, PKD1L3-PKD2L1, ENaCs は互いに異なる細胞に排他的に発現しており、末梢の味細胞のレベルから味質ごとに味情報は処理されていると考えられる(Chandrashekar et al., 2006; Chandrashekar et al., 2010)。

<甘味物質>

五基本味のうち、甘味は味物質の中でも栄養学的に最も重要な糖質を含んでいる。またその反面、糖の過剰摂取は糖尿病や高脂血症といった生活習慣病を引き起こす要因となり得るため、糖に替わる甘味料の開発がこれまで盛んに行われてきた。甘味物質は、ショ糖などの糖類を始め、グリシンや D-トリプトファンなど一部のアミノ酸、アスパルテームなどのペプチド性化合物、サッカリン Na などの人工甘味料、モネリンなどの甘味タンパク質と多岐にわたっており、分子量はもとより化学的構造も大きく異なる(表 1-2、表 1-3)。一般に高分子であるタンパク質は無味であるが、表 1-3 に示す 8 種のタンパク質(後述の味覚修飾タンパク質を含む)の多くはショ糖の数百~数千倍の強い甘味を呈することから(Kant,

2005)、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。これらのタンパク質については発現系が構築されており、ソーマチン、モネリン、ブラゼイン、リゾチームについては、それぞれ塩基性残基が甘味活性に関与することが示唆されている(Jin et al., 2003; Kaneko and Kitabatake, 2001; Masuda et al., 2005)。しかし、1次構造や分子量、立体構造に互いに共通性が見出されず、どのようにして甘味が生じるのかは不明である。甘味タンパク質は、いずれも分子進化的には果実や種子など植物の貯蔵組織に存在するタンパク質に類似しているが(表 1-3)、そもそも植物がなぜこのようなタンパク質を持つようになったかについても不明である。

<味覚修飾物質>

甘味物質に関連する物質として、味覚修飾物質が存在する。味覚修飾物質とは、味を変えてしまう性質をもつ物質であり、その性質によって甘味阻害物質と甘味誘導物質に分類される。前者には、配糖体であるギムネマ酸やジジフィンがあり、これらを口にした後、甘味物質を食べると甘味を感じなくなる(Kurihara, 1992)。後者には、ネオクリン(NCL)とミラクリン(MCL)(表 1-3)、ストロジンが存在する。NCLはそれ自身も甘味を呈するが、NCLを口にした後、水や酸を味わうと強い甘味が感じられる(Yamashita et al., 1995)。一方、MCLや配糖体であるストロジンはともにそれ自身は無味であるが、それぞれ酸、水を甘くする作用がある(Hiura et al., 1996; Kurihara and Beidler, 1969)。甘味誘導物質は、例えば、内臓脂肪を減少させる・食後の血糖値の上昇を穏やかにするなどの効果(Kondo et al., 2009)が報告されている食酢を摂取しやすくしたり、砂糖を入れることなく飲料の味付けをしたりするなどの利用が可能である。このように、糖の摂取を抑えることが可能であるため、糖尿病や肥満の予防・治療などをはじめとした産業上の利用が期待できる。近年、砂糖に代わって人工甘味料が広く用いられているが、味覚修飾タンパク質のNCL、MCLは、既存の甘味料に比べて、熱安定性が高く、また原産国における長年の食経験からその安全性についても保証されているなど、様々な利点がある。

これらの物質については、その化学的性質に関する研究は進められてきたものの、どのような機構によって味覚を変化させるのかについては、未だ明らかにされていない。アミノ酸配列の相同性が10%以下であるNCLとMCLに、共通のメカニズムが存在するのかわくは非常に興味深い。以下に、これら2つの味覚修飾タンパク質について、現在までに得られた知見を述べる。

<ネオクリン(NCL)>

NCLは西マレーシア原産の*Curculigo latifolia*(クルクリゴ)の果実(図 1-1A、B)に含まれる糖タンパク質である。この果実を味わうと、舌になじませてから30秒程度の間は、そ

れ自身の甘味（甘味活性）が生じる。その甘味がおさまった後、酸溶液を味わうと強烈な甘味を生じ（酸誘導性の甘味活性）、酸味が和らぐ。また、水を味わっても甘味が誘導される。この活性は、果実を口にしてから 30～60 分程度持続する性質があり、酸を味わうたびに甘味が感じられる(Yamashita et al., 1995)。現在のところ、NCL は甘味活性と味覚修飾活性の両方を併せ持つ唯一のタンパク質である。

発見当初、クルクリゴ果実に含まれる味覚修飾活性本体として精製されたクルクリンは、ホモダイマーとして同定され、その一次構造および cDNA 配列が報告された(Abe et al., 1992; Yamashita et al., 1990)。しかし、クルクリンの cDNA 配列をもとに組換え体の発現生産が試みられたものの、味覚修飾活性を有するタンパク質は得られなかった。近年になって、活性本体は、クルクリンのモノマーと新たに見出したサブユニットとのヘテロダイマーであることが示された(Shirasuka et al., 2004; Suzuki et al., 2004)。この活性を持つタンパク質を当研究室で“ネオクリン”と改名した。NCL は、113 アミノ酸残基からなる酸性サブユニット (neoculin acidic subunit, NAS) と、115 アミノ酸残基からなる塩基性サブユニット (neoculin basic subunit, NBS) がジスルフィド結合を介して結合したヘテロダイマーである(Shirasuka et al., 2004) (図 1-1C)。NAS と NBS はアミノ酸レベルで 77%の相同性があるが、それぞれの等電点は NAS が pI 4.0-6.0、NBS が pI 7.5-9.5 であり、その性質は異なる(Shirasuka et al., 2004)。また、NAS に 1 箇所の N 結合型糖鎖付加のコンセンサス配列を含む(Shirasuka et al., 2004)。大腸菌で発現した NCL は甘味活性、味覚修飾活性を示すことから、糖鎖は活性に必要ないことがわかっている(Suzuki et al., 2004)。

<ミラクリン (MCL) >

MCL は西アフリカ原産の *Richadella dulcifica* (ミラクルフルーツ) の果実 (図 1-2A) に含まれる糖タンパク質である。MCL そのものは甘味活性を持たず無味であるが、舌によくなじませた後に酸を味わうと強い甘味が誘導される(Theerasilp and Kurihara, 1988)。それ自身が甘味を呈するか否かという点において、MCL は NCL と性質を異にするが、いずれも酸味を甘味に変化させる味覚修飾活性を示す点において両者の性質は共通している(Kurihara, 1992; Yamashita et al., 1995)。MCL の味覚修飾活性は、一度 MCL を口にしてから 1～2 時間程度持続し、この間は酸を口に含むたびに甘味を感じることができる(Kurihara and Beidler, 1969)。現地の原住民は、酸味の強いヤシ酒や発酵したパンに甘味をつけるために日常的にこの実を用いてきたことから(Kurihara and Beidler, 1968)、その安全性については高く評価されている。日本では 1996 年に厚生省から既存添加物としての認可を受けたが、該当製品がないという理由で 2004 年には認可を取り消されている。

この果実に味覚修飾活性があることは、1800 年代にはすでに知られていた(Daniell, 1852)。1900 年代半ばになると、いくつかの研究グループがこの活性本体の精製に取り組み、分離

された活性本体は“ミラクリン”と名付けられた(Brouwer et al., 1968)。栗原らのグループによって、1989年にMCLの全アミノ酸配列が(Theerasilp et al., 1989)、1995年にcDNAの塩基配列が決定された(Masuda et al., 1995)。その結果、MCLはpI 9.1の塩基性糖タンパク質であり、191個のアミノ酸残基から成るポリペプチドがジスルフィド結合で結合したホモダイマーとして存在することが明らかとなった(図 1-2B)。モノマーのMCLは7個のCys残基を含み、そのうち6個がポリペプチド鎖内で3組のジスルフィド結合を形成し、残る1残基はサブユニット間でジスルフィド結合を形成している(Igeta et al., 1991)。また、42番目と186番目のAsp残基に、N結合型糖鎖が付加していることがわかっている(Takahashi et al., 1990)。

<動物種による甘味受容能の違い>

上述の甘味物質は、ヒトの感覚を基準としたものであり、これら甘味物質の感受性は動物種により異なることが知られている(図 1-3)。水と試験液(甘味溶液)の入った2つの瓶を与え、どちらをより多く飲むかを調べる二瓶選択実験、味神経繊維を用いた電気生理学的な方法により、甘味物質に対する嗜好性、感受性が調べられてきた。その結果、哺乳類に限定して述べると、甘味アミノ酸、天然糖、また人工甘味料のサッカリンNaは、マウスおよびラットなどのげっ歯類、新世界ザル、旧世界ザル、ヒトに共通して嗜好され、一方でげっ歯類は、人工甘味料のアスパルテームやネオテーム、甘味タンパク質を嗜好しないことが明らかになった(Danilova et al., 2002; Danilova et al., 1998; Hellekant et al., 1997b; Kurihara, 1992)。また甘味タンパク質については、旧世界ザルがソーマチン、モネリン、MCL全てを好むのに対し、新世界ザルはMCLしか好まない(Danilova et al., 2002; Hellekant et al., 1997a; Hellekant et al., 1997b)。これらの結果から、進化した動物ほどいろいろな甘味物質を好む傾向があると言える。

動物種による受容能の違いは、甘味阻害物質についても言える。ギムネマ酸(Glaser et al., 1984; Maeda et al., 1989)やジジフィン(Kurihara et al., 1988)、ラクチゾール(Schiffman et al., 1999; Scalfani and Perez, 1997)はヒトの甘味を抑制するが、げっ歯類の甘味は抑制しない。それに対し、ギムネマ酸と同じ植物から抽出されたグルマリンというペプチドはヒトの甘味を抑えないが、げっ歯類の甘味を抑制する(Imoto et al., 1991; Miyasaka and Imoto, 1995)。これら甘味物質および甘味阻害物質の受容能の違いは、以下に述べる甘味受容体のアミノ酸配列の違いにより説明できるものもあることがわかってきたが、甘味を感じる仕組み、甘味物質と甘味受容体の相互作用の詳細については、未解明の点が多い。

<甘味受容体>

哺乳類において、T1R2-T1R3(表 1-1)は唯一の甘味受容体であり、多数の甘味物質により活性化される(Chandrashekar et al., 2006; Nelson et al., 2001)。T1R2-T1R3が甘味の受容を担

っていることは、T1R の各サブユニットを欠損した遺伝子改変マウスの解析によって明らかにされた(Damak et al., 2003; Zhao et al., 2003)。すなわち、T1R2 または T1R3 を欠損したマウスは甘味応答が消失する。また T1R3 が、そもそも甘味物質に対する感受性に影響を与える遺伝子座位 (*Sac* locus) から見いだされた遺伝子であることから (Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001; Nelson et al., 2001)、甘味受容に関与していることがわかる。T1R2、T1R3 はともにクラス C GPCR ファミリーに属しており、このファミリーには代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor, mGluR)、カルシウム感受性受容体 (calcium-sensing receptor, CaSR)、フェロモン受容体 (vomeronasal receptor type 2, V2R)、GABA_B 受容体などが属する(Pin et al., 2003)。このファミリーの受容体は、いずれも長い N 末端細胞外領域を持つことを特徴としており、その構造から N 末端領域 amino terminal domain (ATD) と 7 回膜貫通領域 seven-transmembrane domain (TMD)、そしてこれらを結ぶ cysteine-rich domain (CRD) の 3 つのドメインに大別される (図 1-4)。CRD は、GABA_B 受容体を除き、クラス C GPCR 間でよく保存された 9 つの Cys 残基を含む約 70 アミノ酸残基から構成される(Pin et al., 2003)。

T1R2、T1R3 は、舌の味細胞の他、消化管(Dyer et al., 2005; Mace et al., 2007; Young et al., 2009)や膵臓(Nakagawa et al., 2009)、視床下部(Ren et al., 2009)など、代謝やエネルギーの恒常性に関わる器官にも発現していることが近年報告されており、味覚センサー以外にグルコースセンサーとしての役割を担っている可能性が示唆されている(Margolske et al., 2007)。また、これらの遺伝子の一塩基多型 (SNPs) と糖尿病などの相関も報告されており、糖尿病をはじめとした生活習慣病に悩む患者が多い昨今、注目が高まっている(Eny et al., 2010)。ただし、ショ糖の摂取量については、ドーパミン D2 受容体の SNPs との相関も報告されており(Eny et al., 2009)、味覚だけではなく、食品摂取後 (ポストインジェスティブ) の効果も含めると、T1R2、T1R3 の SNPs だけで糖尿病などとの相関を言えるのかは現在までのところ不明である。また、T1R2、T1R3 のコード領域の上流にある非コード領域にある SNP が、受容体の発現量を調節することで、ショ糖の感受性の違いを生み出すとする報告もある(Fushan et al., 2009)。

<甘味物質と甘味受容体の相互作用>

先にも述べたように、甘味物質は分子量も化学的構造も大きく異なり、実に多様であるが、ヒトではこれらはほぼ全て T1R2-T1R3 で受容される。T1R2-T1R3 と甘味物質の相互作用について、受容体、甘味物質の両側面から解析が進められた結果、T1R2-T1R3 には複数の甘味物質作用部位が存在することが明らかとなってきた (図 1-4) (Cui et al., 2006; Xu et al., 2004)。他のクラス C GPCR と比較してみても、このように 1 種類の受容体が複数のリガンド結合部位を持つ例は珍しく、その詳細な活性化機構は、依然として不明の部分が多い。

これまでにヒトとげっ歯類の甘味物質に対する感受性の違いに着目し、ヒトとマウス（またはラット）の T1R のキメラ受容体、または点変異体を導入した培養細胞を用いたカルシウムイメージング実験により、甘味物質の作用に関わるアミノ酸残基が明らかになったものには、人工甘味料のアスパルテーム、ネオテーム、シクラメート、ネオヘスペリジンジヒドロカルコン (NHDC)、甘味阻害剤のラクチゾールがある (図 1-4)。アスパルテーム、ネオテームはヒト T1R2 (hT1R2) の ATD に (Xu et al., 2004)、シクラメート (Jiang et al., 2005b)、NHDC (Winnig et al., 2007)、ラクチゾール (Jiang et al., 2005a; Winnig et al., 2005) はヒト T1R3 (hT1R3) の TMD にそれぞれ作用する。また甘味タンパク質については、モネリンの受容に hT1R2 の ATD または CRD が、ブラゼインの受容に hT1R3 の CRD がそれぞれ必要であることが分かっている (Jiang et al., 2004)。また、大腸菌で発現させたマウス T1R2、T1R3 (mT1R2、mT1R3) の ATD を用いた分光学的解析から、グルコースやショ糖が mT1R2 と mT1R3 の ATD に結合することが示唆されている (Nie et al., 2006; Nie et al., 2005)。

培養細胞を用いた実験系とは別に、T1R2-T1R3 と甘味物質の相互作用モデルも提唱されている。GPCR は結晶化が困難であり、結晶構造が解かれているものは数少ないが、クラス C GPCR で最初に結晶構造が解明された mGluR1 の ATD (Kunishima et al., 2000) を鋳型として、hT1R2-hT1R3 の ATD についてモデルを構築し、甘味物質とのドッキングシミュレーションが行われている (図 1-5) (Morini et al., 2005; Tancredi et al., 2004; Temussi, 2002)。それらのモデルによれば、T1R2-T1R3 の ATD は二つの lobe から構成され、低分子甘味物質は 2 つの lobe の境界面に存在する溝に相互作用する (図 1-5A)。一方、甘味タンパク質は分子表面の表面電荷を介して、ヒト甘味受容体 (hT1R2-hT1R3) の大きな溝に複数の箇所作用して強く結合すると考えられている (図 1-5A、B)。mGluRs はリガンドである Glu が ATD の溝に結合すると、大幅な立体構造変化を起こすとされており (Jingami et al., 2003)、T1R2-T1R3 についてもそのような構造変化があると予想される (第 4 章参照)。

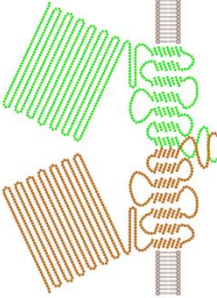
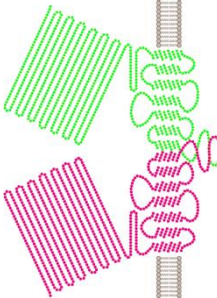

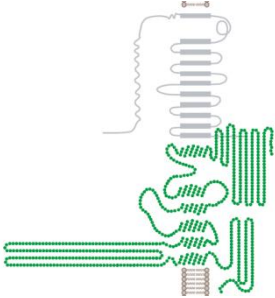
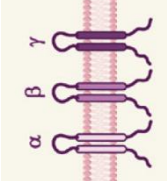
<本研究について>

先にも述べたが、1 つの受容体が複数の部位で多数のリガンド受容にかかわる例は、甘味受容体の他に知られておらず、分子量の全く異なる低分子甘味物質や甘味タンパク質がそれぞれどのように甘味受容体に作用するのかが興味深い。また、味覚修飾タンパク質 NCL、MCL をはじめとした味覚修飾物質の受容体との作用については、分子知見はほとんど皆無であり、これらがどのようにして不思議な感覚をもたらすのかは不明である。これらの受容体との相互作用に関する知見は、味覚修飾活性の分子機構の一端を明らかにするだけでなく、他の低分子甘味物質や甘味タンパク質からだけでは得られない、甘味受容体の活性化に関する新たな知見を得ることが期待される。T1R ファミリーの属するクラス C GPCR の活性化機構についても知見を与えようであろう。一方、低分子甘味物質については、必

要なドメイン、また残基の一部が明らかになりつつあるが、その詳細な結合様式は明らかになっておらず、甘味を示す高分子タンパク質と低分子甘味物質の受容部位が異なるのかどうかは明確にされていない。

本研究では、特に味覚修飾タンパク質に焦点を当て、味覚修飾タンパク質および低分子甘味物質が甘味受容体とどのように作用するのかを解析し、これらの受容機構の一端を解明することを試みた。第 2 章では、味覚修飾タンパク質である NCL の受容に必要な hT1R2-hT1R3 の領域の同定を行い、第 3 章では、MCL の味覚修飾活性がどのようなメカニズムで生じるのかを解明するため、hT1R2-hT1R3 との相互作用の解析を行った。さらに第 4 章では、いくつかの低分子甘味物質に関して、hT1R2-hT1R3 における相互作用部位を同定した。

表1-1 哺乳類の味覚受容体

| 味質 | 旨味 | 甘味 | 苦味 | 酸味 | 塩味 |
|--------|--|--|--|--|--|
| 受容体 | T1R1+T1R3  | T1R2+T1R3  | T2Rs  | PKD2L1+PKD1L3  | ENaCs  |
| 味物質 | L-アミノ酸 | 糖、D-アミノ酸、人工甘味料、甘味タンパク質 | 苦味物質 | 酸 | 低濃度の食塩 Na塩 |
| 受容体タイプ | Gタンパク質共役型 | | | イオンチャネル型 | |

旨味受容体、甘味受容体はそれぞれT1R1とT1R3、T1R2とT1R3のヘテロマーで構成される。苦味受容体はヒトでは25種類存在する。酸味受容体はPKD1L3とPKD2L1のヘテロマーが候補分子として報告されており、塩味受容体はENaCがマウスの低濃度の塩の嗜好性に関与している。受容体の図は、Chandrashekar et al., *Nature*, 2006およびYarmolinsky et al., *Cell*, 2009を一部改変して使用。

表1-2 代表的な低分子甘味物質

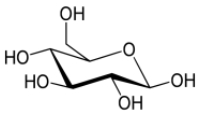
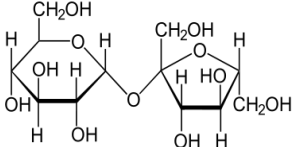
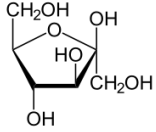
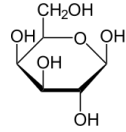
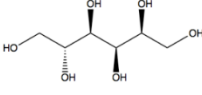
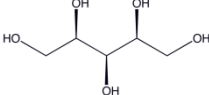
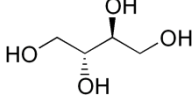
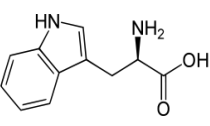
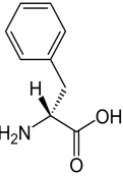
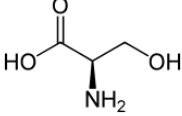
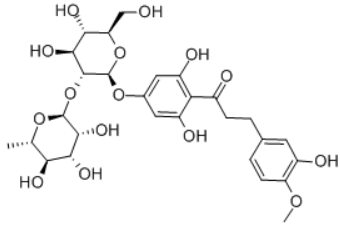
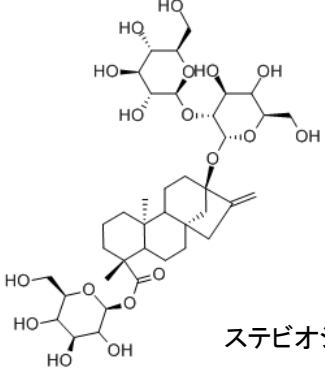
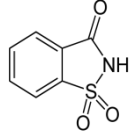
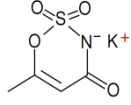
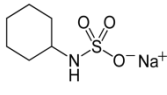
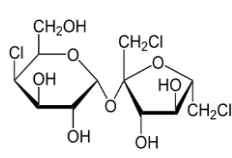
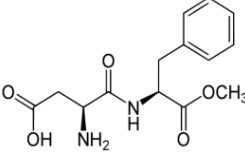
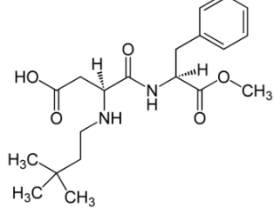




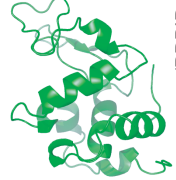
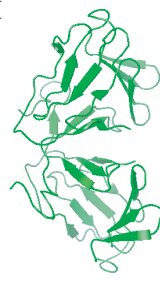
| | |
|---------------|---|
| <p>天然糖</p> | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>グルコース</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>スクロース</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>フルクトース</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>ガラクトース</p> </div> </div> |
| <p>糖アルコール</p> | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>ソルビトール</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>キシリトール</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>エリスリトール</p> </div> </div> |
| <p>アミノ酸</p> | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>D-トリプトファン</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>D-フェニルアラニン</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>D-セリン</p> </div> </div> |
| <p>配糖体</p> | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>ネオヘスペリジンジヒドロカルコン (NHDC)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>ステビオシド[®]</p> </div> </div> |
| <p>人工甘味料</p> | <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="text-align: center;">  <p>サッカリン</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>アセスルファムカリウム</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>シクラメート</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>スクラロース</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>アスパルテーム</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>ネオテーム</p> </div> </div> </div> |

表1-3 甘味タンパク質および味覚修飾タンパク質の特徴

| 甘味タンパク質 | ソーマチン (Thaumatin) | モネリン (Monellin) | ブラゼイン (Brazzein) | マビリン (Mabinlin) | ペンタジン (Pentadin) | リゾチーム (Lysozyme) |
|---------------------|---|---|--|---|--|--|
| 甘味強度 (重量比) スクロース換算 | 3000倍 | 3000倍 | 500倍 | 100倍 | 500倍 | 200倍 ⁽¹³⁾ |
| 由来 | <i>Thaumatococcus daniellii</i> Benth 西アフリカ | <i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> Diels 西アフリカ | <i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon 西アフリカ | <i>Capparis masakai</i> Lévl 中国 | <i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon 西アフリカ | Hen egg white |
| 原産地 | 西アフリカ | 西アフリカ | 西アフリカ | 中国 | 西アフリカ | |
| 分子量 (kDa) | 22.2 | 10.7 | 6.5 | 12.4 | 12.0 | 14.5 |
| アミノ酸残基 | 207 ⁽²⁾ | 44(A鎖)50(B鎖) ⁽⁶⁾ | 54 | 33(A鎖)72(B鎖) ⁽⁹⁾ | 報告無し | 129 |
| ジスルフィド結合数 | 8 | 0 | 8 | 4 ⁽¹⁰⁾ | 有り | 4 ⁽¹⁴⁾ |
| 立体構造 |  (PDBID 1thi) |  (PDBID 3mon) |  (PDBID 2brz) |  (PDBID 2DS2) | 報告無し |  (PDBID 8VZ) |
| 相同性の高いタンパク質 | トリプシンインヒビター | システインプロテアーゼインヒビター | セリンプロテアーゼインヒビター | 2S種子貯蔵タンパク質 | 報告無し | 報告無し |
| 発現系 ⁽¹⁵⁾ | 麹菌・ <i>A.niger</i> ジャガイモなど | 食品酵母 化学合成など | 大腸菌 化学合成 | 化学合成 植物 | 報告無し | 大腸菌 酵母 |

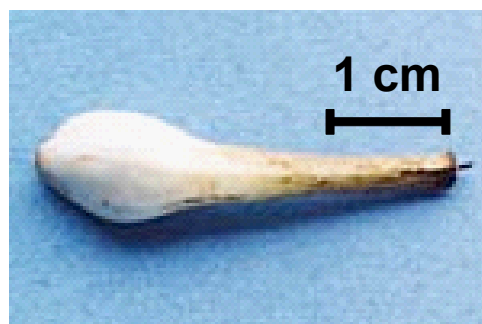
| 味覚修飾タンパク質 | ミラクリン (Miraculin) | ネオクリン (Neoculin) |
|--------------|---|---|
| 味 (スクロースと比較) | 無味、酸味→甘味 ⁽¹⁶⁾ | 甘味、酸味→甘味 ⁽²³⁾ 430倍 |
| 由来 | <i>Richadella dulcifica</i> | <i>Curculigo latifolia</i> |
| 原産地 | 西アフリカ | 西マレーシア |
| 分子量(kDa) | 48 | 24.9 |
| アミノ酸残基 | 191 ⁽¹⁷⁾ | 113 (NAS)・115 (NBS) ⁽²⁴⁾ |
| ジスルフィド結合数 | 7 ⁽¹⁸⁾ | 4 ⁽²⁵⁾ |
| 立体構造 | 報告無し |  (PDBID 2q04) |
| 相同性の高いタンパク質 | トリプシンインヒビター | ユキノハナレクチン |
| 発現系 | 大腸菌 ⁽¹⁹⁾ 麹菌 ⁽²⁰⁾ 酵母 ⁽²²⁾ | 麹菌 ⁽²⁶⁾ 大腸菌 ⁽²⁷⁾ |

- (1) van der Wel, H. and K. Loeve, 1972 (16) Kurihara and Beidler 1968
 (2) Iyengar *et al.*, 1979 (17) Theerasilp *et al.*, 1989
 (3) Ogata *et al.*, 1992 (18) Igeta *et al.*, 1991
 (4) Morris *et al.*, 1973 (19) Sun *et al.*, 2006
 (5) Kohmura *et al.*, 1990 (20) Ito *et al.*, 2007
 (6) Ogata *et al.*, 1987 (21) Matsuyama *et al.*, 2009
 (7) Ming, D. and G. Hellekant, 1994 (22) Ito *et al.*, 2010
 (8) Caldwell *et al.*, 1998 (23) Yamashita *et al.*, 1995
 (9) Liu *et al.*, 1993 (24) Shirasuka *et al.*, 2004
 (10) Nirasawa *et al.*, 1993 (25) Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006
 (11) Li *et al.*, 2008 (26) Nakajima *et al.*, 2006
 (12) van der Wel *et al.*, 1989 (27) Suzuki *et al.*, 2004
 (13) Maehashi and Udaka, 1998
 (14) Blake *et al.*, 1967
 (15) Masuda and Kitabatake 2006

A



B



C

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NAS | 1 | D | S | V | L | L | S | G | Q | T | L | Y | A | G | H | S | L | T | S | G | S | Y | T | L | T | I | Q | N | N | C | N |
| NBS | 1 | D | N | V | L | L | S | G | Q | T | L | H | A | D | H | S | L | Q | A | G | A | Y | T | L | T | I | Q | N | K | C | N |
| NAS | 31 | L | V | K | Y | Q | H | G | R | Q | I | W | A | S | D | T | D | G | Q | G | S | Q | C | R | L | T | L | R | S | D | G |
| NBS | 31 | L | V | K | Y | Q | N | G | R | Q | I | W | A | S | N | T | D | R | R | G | S | G | C | R | L | T | L | L | S | D | G |
| NAS | 61 | N | L | I | I | Y | D | D | N | N | M | V | V | W | G | S | D | C | W | G | N | N | G | T | Y | A | L | V | L | Q | Q |
| NBS | 61 | N | L | V | I | Y | D | H | N | N | N | D | V | W | G | S | A | C | W | G | D | N | G | K | Y | A | L | V | L | Q | K |
| NAS | 91 | D | G | L | F | V | I | Y | G | P | V | L | W | P | L | G | L | N | G | C | R | S | L | N | | | | | | | |
| NBS | 91 | D | G | R | F | V | I | Y | G | P | V | L | W | S | L | G | P | N | G | C | R | R | V | N | G | G | | | | | |

図1-1 *Curculigo latifolia*とネオクリン(NCL)のアミノ酸配列

(A) *C. latifolia*の全体図(赤い矢印で指した部分に結実する)

(B) *C. latifolia*の果実

(C) NASとNBSのアミノ酸配列のアラインメント

NAS、NBSで共通するアミノ酸残基を枠で囲んだ。酸性アミノ酸残基、塩基性アミノ酸残基をそれぞれ赤、青で示す。赤い丸印はNASにおける糖鎖付加部位(N81)を示す。

(A、Bの写真は、日本新薬株式会社山科植物資料館にて撮影)

A



B

```

      10          20          30          40      ●      50
DSAPNPVLDI DGEKLRTGTN YYIVPVL RDH GGGLTVSATT PNGTFVCP PR
      60          70          80          90          100
VVQTRKEVDH DRPLAFFPEN PKEDVVRVST DLNINFSAFM PCRWTSSTVW
      110         120         130         140         150
RLDKYDESTG QYFVTIGGVK GNP GPETISS WFKIEEFCGS GFYKLVFCPT
      160         170         180         ●      190          200
VCGSCKVKCG DVG IYIDQKG RRRLALS DKP FAFEFNKTVY F

```

図1-2 *Richadella dulcifica*とミラクリン(MCL)のアミノ酸配列

(A) *R. dulcifica* とその果実

(B) MCLのアミノ酸配列

赤い丸印は糖鎖付加部位(N42、N186)を示す。

(Aの写真は日本新薬株式会社山科植物資料館にて撮影)

甘味物質

動物種

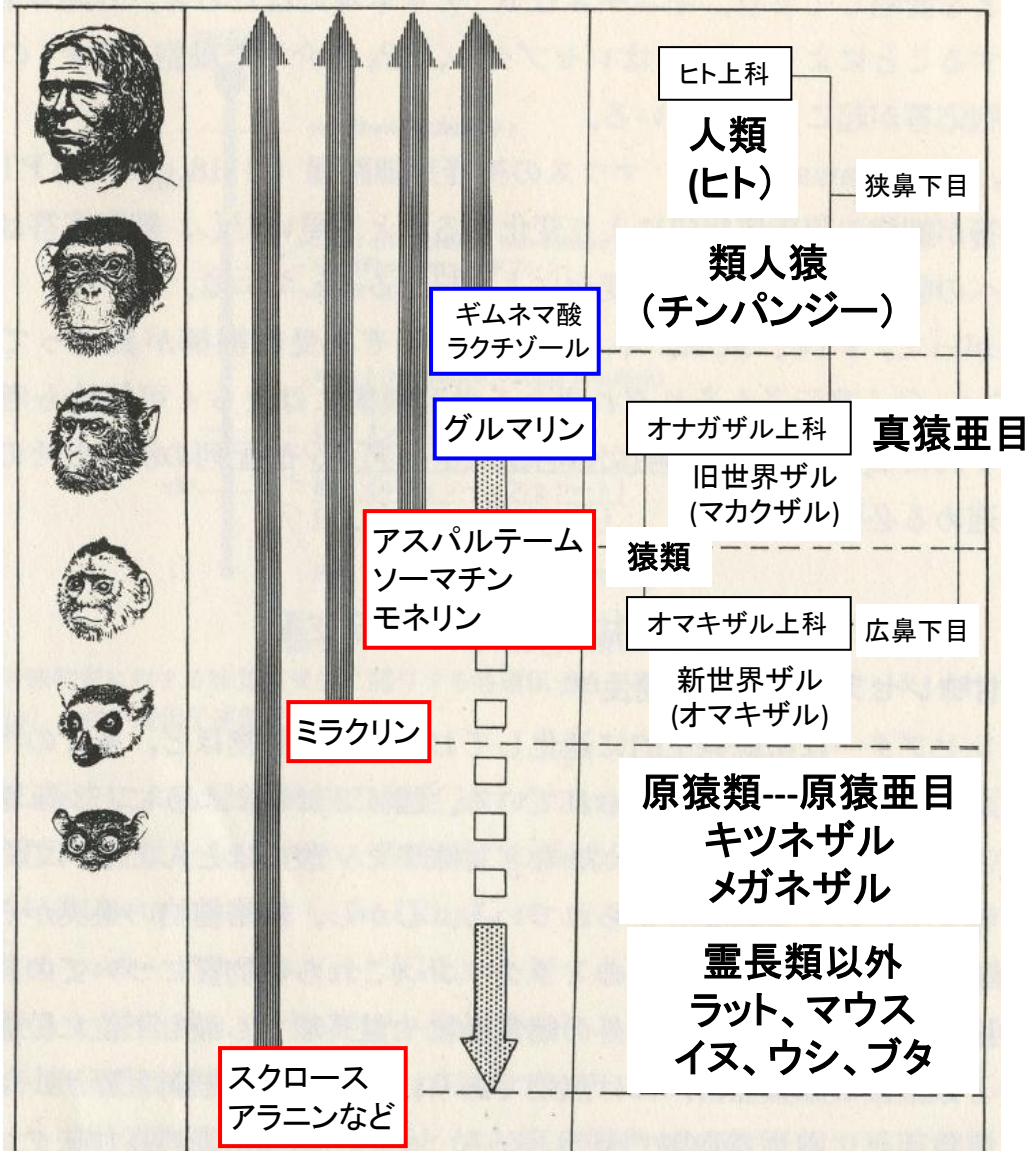


図1-3 動物種による甘味物質および味覚修飾物質の感受性の違い
 甘味物質または甘味誘導物質を赤枠で、甘味阻害物質は青枠で囲んだ。
 図は佐藤・小川編 『最新 味覚の科学』(1997)より抜粋・一部改変。

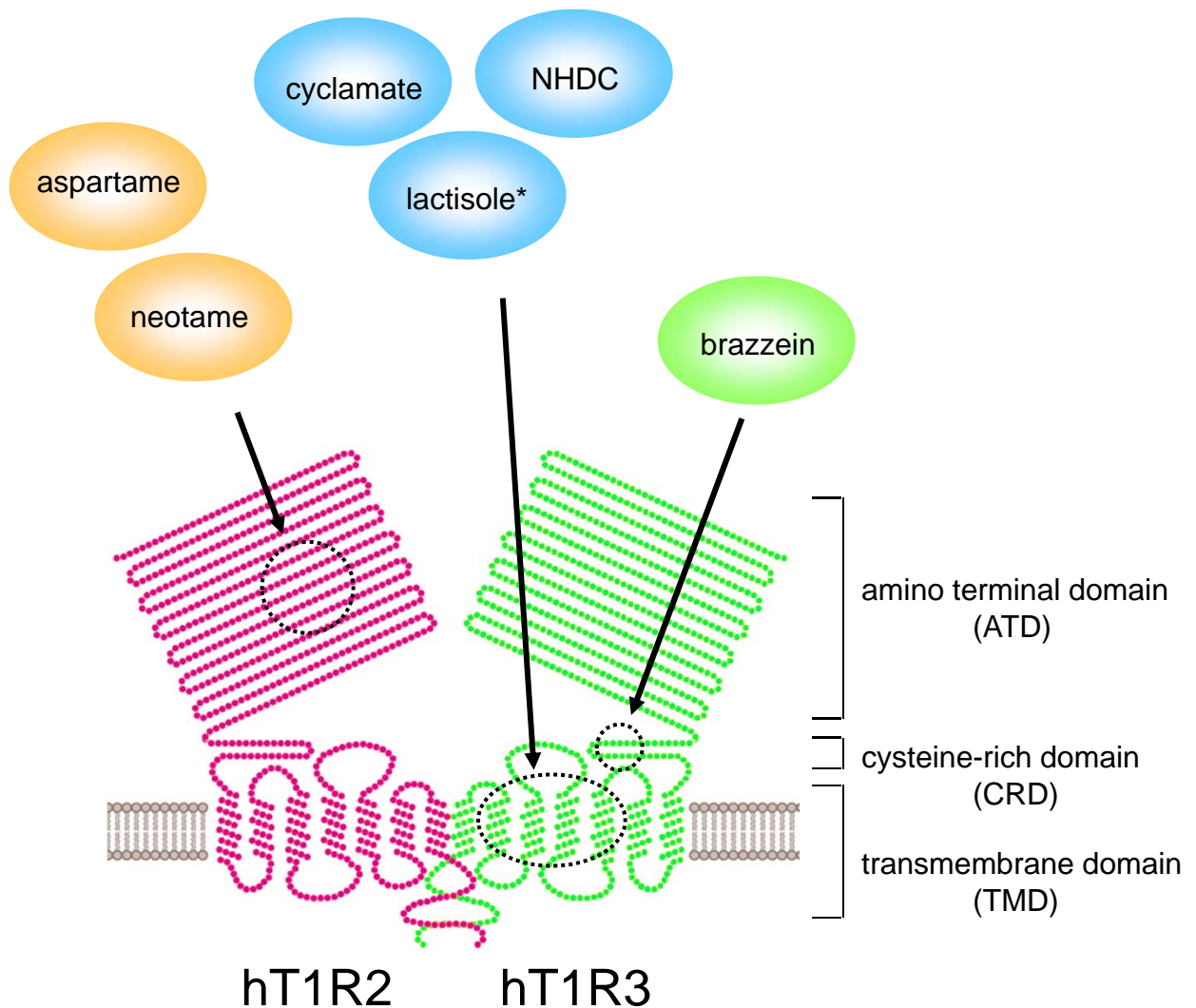
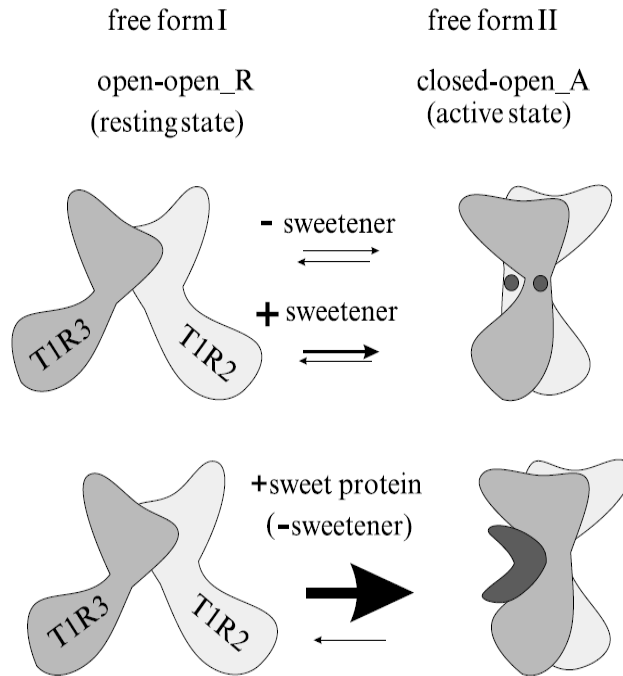


図1-4 ヒト甘味受容体の構造模式図と甘味物質の作用部位

ヒト甘味受容体はhT1R2とhT1R3からなるヘテロダイマーである。それぞれ、長いN末端ドメイン(ATD)とシステインリッチドメイン(CRD)からなる細胞外領域と7回膜貫通ドメイン(TMD)から構成されている。様々な甘味物質が受容体の複数の部位に作用する。*のついているものはアンタゴニスト、他はアゴニストを示す。受容体の図はChandrashekar *et al.*, *Nature*, 2006より抜粋、一部改変。

A



B

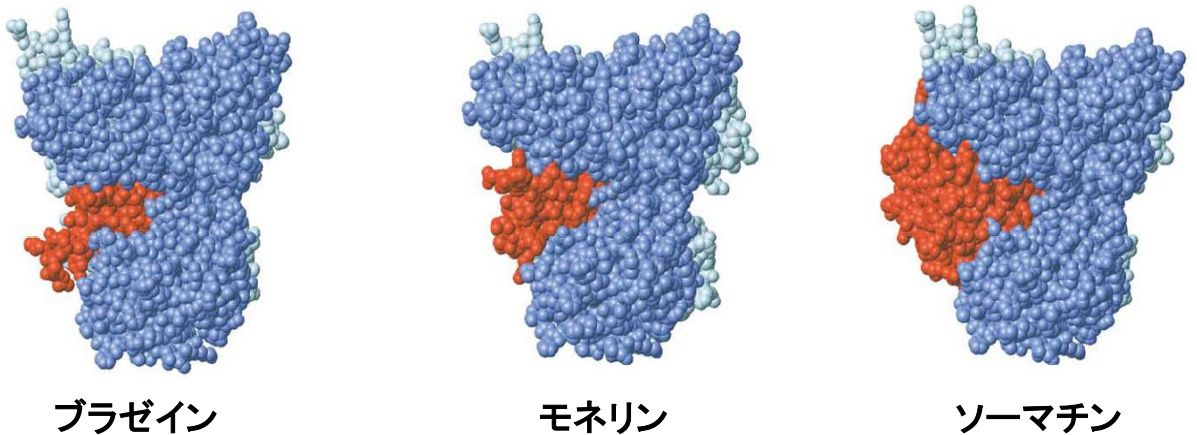


図1-5 甘味タンパク質とhT1R2-hT1R3のATDとのドッキングシミュレーション

(A) 低分子甘味物質 (sweetener、上図) および甘味タンパク質 (sweet protein、下図) と hT1R2-hT1R3 ATDとの相互作用モデル

低分子甘味物質の結合部位と甘味タンパク質の結合部位は異なる。

(B) 甘味タンパク質とhT1R2-hT1R3ATDとのドッキングモデル

ブラゼイン、モネリン、ソーマチンのいずれの甘味タンパク質(赤)も受容体(hT1R3は濃い青、hT1R2は薄い青で示す)の大きな溝にはまり込む。

図はTemussi, *FEBS letter*, 2002より引用。

第 2 章

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

2-1 序

第1章で述べたように、hT1R2-hT1R3 はほぼ全ての甘味物質を受容する。味覚修飾タンパク質である NCL についても、hT1R2-hT1R3 で受容されることが、本研究を開始した頃に当研究室にて明らかにされた(Nakajima et al., 2006b)。ATD、CRD、TMD の3つのドメインから構成されるこの受容体は、いずれのドメインも甘味物質の受容に関わることが示唆されている。多数のリガンド結合部位を持つ hT1R2-hT1R3 の NCL 作用部位を明らかにし、他の甘味物質作用部位と比較することで、NCL の味覚修飾作用の一端が明らかになるのではないかと考え、本研究では NCL の受容に必要な hT1R2-hT1R3 の領域を特定することを試みた。

受容体の機能解析を行う方法の1つに、培養細胞に発現させた目的の受容体が発現により活性化するかどうかを、細胞内カルシウム濃度の上昇を指標に検出する、カルシウムイメージング法がある。味覚受容体の機能解析、リガンドスクリーニングにおいても広く用いられている方法であり、本研究でもこの方法を使用した。T1R2、T1R3 と G タンパク質 α サブユニット ($G\alpha$) の3者を human embryonic kidney 293T (HEK293T) cell に共発現させる。 $G\alpha$ には、広範囲な GPCR と共役する $G\alpha_{15}$ または $G\alpha_{16}$ (Offermanns and Simon, 1995) の C 末端を、味細胞に発現する $G\alpha$ タンパク質である gustducin の対応する配列に置換したキメラ変異体 $G\alpha$ タンパク質 (図 3-5A 参照) が使用される例が多い(Jiang et al., 2004; Zhao et al., 2003)。図 2-1 に示すように、甘味物質が T1R2-T1R3 に受容されると、 $G\alpha$ タンパク質が T1R2-T1R3 から解離し、下流の PLC-IP₃ カルシウムシグナリング経路が活性化されるため、最終的に細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。この濃度上昇をカルシウムイオン濃度指示薬の蛍光強度の変化を指標に検出し、受容体の活性化を計測する。

マウスやラットなどのげっ歯類は、ソーマチンやモネリン、ブラゼインといった甘味タンパク質を嗜好しないため (図 1-3) (Danilova et al., 2002; Danilova et al., 1998; Hellekant et al., 1997b)、NCL もまたヒト特異的に作用する甘味タンパク質なのではないかと予想した。実際、マウスを用いた二瓶選択実験では、NCL に対する嗜好性が見られなかったことから、マウスは NCL の味を感受していないと考えられた (中島健一郎博士、私信)。これまでに報告のあるアスパルテームやシクラメート、ブラゼインなどの甘味物質については、感受性の違いは T1R2-T1R3 のアミノ酸配列の違いで説明できることから、本研究ではヒトとマウスの T1R2-T1R3 のアミノ酸配列の相違に着目し、NCL の受容に必要な hT1R2-hT1R3 の領域の同定を試みた。

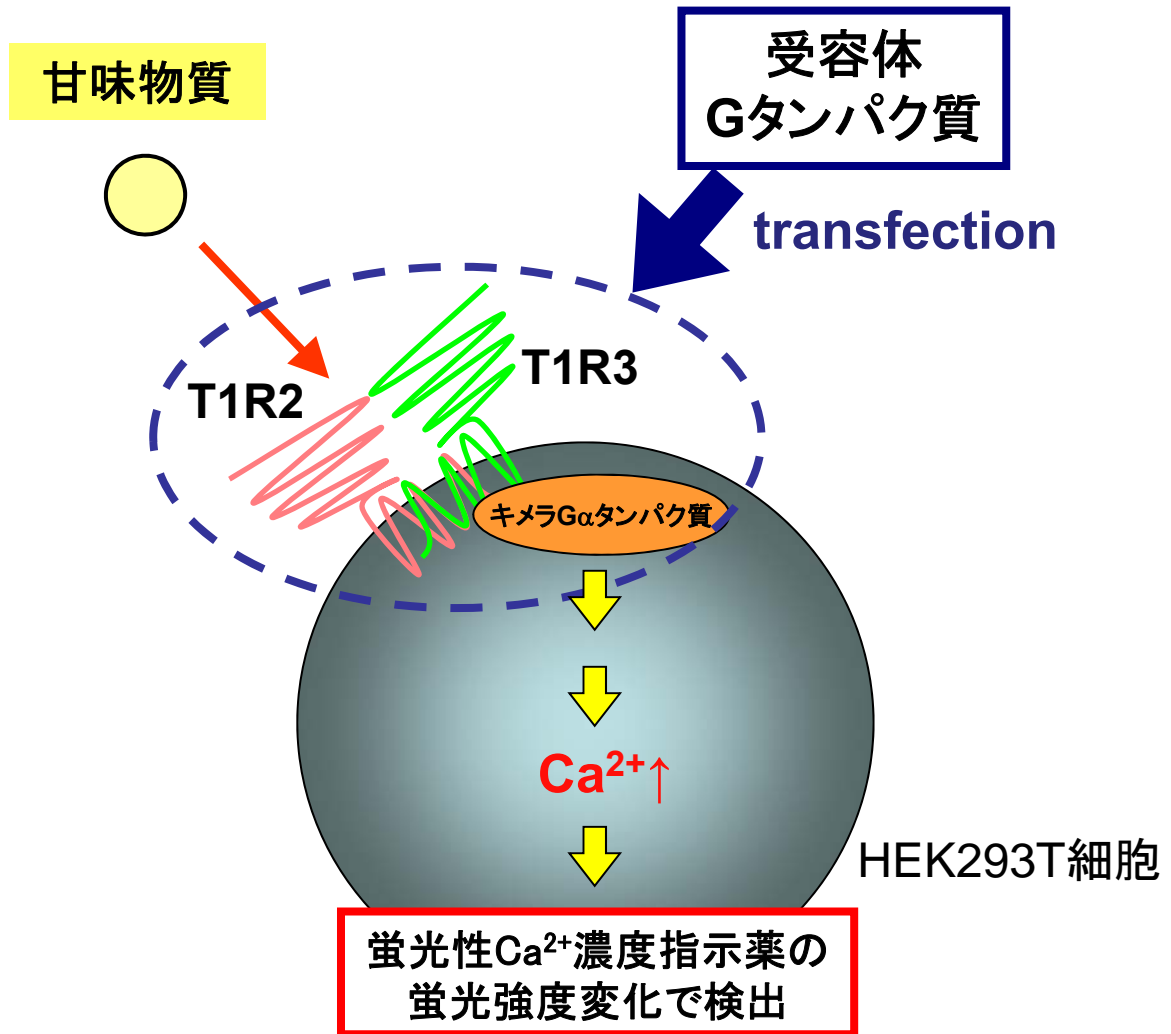


図2-1 カルシウムイメージング法を用いたT1R2-T1R3の機能解析
 HEK293T細胞にT1R2、T1R3、キメラGαタンパク質を一過的に発現させる。甜味物質がT1R2-T1R3に受容されると、Gαq系のキメラGタンパク質を介して、IP₃-カルシウムシグナリング経路の活性化が生じ、最終的に細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇する。これを蛍光性の指示薬により検出する。

2-2 材料と方法

2-2-1 NCL サンプル

クルクリゴ果実はマレーシアに自生している *C. latifolia* から収穫後、凍結乾燥し、以下の方法により精製された粗精製粉末を、山下治之博士より御供与いただいた。

まずクルクリゴ果実の果肉を粉砕し、40 倍量の純水で 2 度洗浄後、20 倍量の 0.05 N 硫酸に懸濁し、15000 rpm で 30 分遠心して上清を得た。同じ操作を再び行い、2 回分の上清を NaOH で中和後、Amberlite IRC-50 (ORGANO) に吸着させ、1 M NaCl を含む 50 mM リン酸バッファー (pH 5.5) で溶出した。溶出液の 60%飽和硫酸アンモニウム沈殿画分を 100 ml の 0.2 N 酢酸に溶解した後、0.2 N 酢酸で平衡化した Sephadex G-25 (GE Healthcare) により脱塩操作を行った。溶出画分は凍結乾燥させた後、実験に使用した。

得られた NCL 精製粉末は、SDS-PAGE において 9 割以上の純度であることを確認した。また、タンパク質の定量は BCATM Protein Assay Kit (PIERCE) を用い、検量線の作製は BSA を用いた。

2-2-2 プラスミド

hT1R2 および hT1R3 の cDNA を、哺乳類培養細胞用発現ベクター pEAK10 (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) に導入したプラスミドは、Dr. Charles Zuker (University California of San Diego) と Dr. Nicholas J. P. Ryba (NIDCD) より御供与いただいた。また、hT1R2-hT1R3 と効率よく作用することが知られているキメラ Gα タンパク質 G16gust25 (Gα16 の C 末端 25 残基を味細胞に発現する G タンパク質である gustducin (McLaughlin et al., 1992) の C 末端 25 残基に置換したもの) を pcDNA3.1(+) (Invitrogen) に導入した発現プラスミド、mT1R2 および mT1R3 の cDNA を pEAK10 に導入したプラスミドは、当研究室にて作製されたものを使用した。

2-2-3 ヒトとマウスのキメラ T1R3 および hT1R3 点変異体のコンストラクトの作製

ヒトとマウスのキメラ T1R3 は overlap PCR 法 (Horton et al., 1989) により作製した。鋳型には pEAK10 ベクターに挿入された hT1R3、mT1R3、または両者のキメラ T1R3 を用いた。各コンストラクト作製において使用した鋳型とプライマーの組み合わせを表 2-1 に示す。まず、Prime STAR HS DNA ポリメラーゼ (TaKaRa BIO Inc., Shiga, Japan) を用いて 1st PCR を行い、目的断片の増幅を行った。N 末端側の断片は pEAK10 S2 プライマー (5'-CTCAGACAGTGGTTCAAAG-3') と各コンストラクトに特異的なアンチセンスプライマー (表 2-1) で増幅を、C 末端側の断片は pEAK10 AS プライマー (5'-GACCTACGTCCGATGAGAT-3') と各コンストラクトに特異的なセンスプライマー (表 2-1)

で増幅を行った。コンストラクトに特異的なプライマーは、センスプライマーとアンチセンスプライマーで配列の一部がオーバーラップするように設計した。反応サイクルは DNA ポリメラーゼのマニュアルに従い、基本的には 98°C 10 秒、55°C 5 秒、72°C 1 分/kb の条件で 30~35 サイクルにて行った。これら 1st PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の長さのバンドを含むゲルを切り出した後、Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf) または NucleoSpin Kit (Macherey-Nagel) により DNA を抽出・精製した。そのうちの一部を電気泳動して濃度の確認を行った後、これらを鋳型に用いて、pEAK10 S2 プライマーと pEAK10 AS プライマーで overlap PCR を行った。条件は 98°C 10 秒、55°C 5 秒、72°C 1 分/kb で行い、30~35 サイクルで増幅した。1st PCR 同様、PCR 産物をアガロース電気泳動に供し、目的の長さのバンドを含むゲルから DNA を抽出・精製した。

次に、得られた DNA を *AscI* と *NotI* を用いて制限酵素処理を行った後、Ligation High (TOYOBO Co. Ltd., Tokyo, Japan) によって、あらかじめ *AscI* と *NotI* で制限酵素処理を行い脱リン酸化した pEAK10 ベクターとライゲーションさせ、大腸菌 DH5 α に導入した。得られたコロニーについてコロニーPCR によりインサートチェック後、コロニーを増殖させ、Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD) を用いてプラスミドを抽出した。挿入断片の塩基配列の確認は、ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサンプルを調製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer または ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (ともに Applied Biosystems) を用いてシーケンスを確認した。確認後、EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いて、細胞に導入するためのプラスミドを抽出した。プラスミドの濃度は、分光光度計の OD₂₆₀ の値をもとに計算した。

図 2-5 で使用したキメラ T1R3 については、ATD/CRD/TMD の順にヒト(h) 由来かマウス(m) 由来であることを明記した。例えば、hT1R3 の ATD と CRD、mT1R3 の TMD から構成されるキメラ T1R3 については h/h/m T1R3 と命名した。

図 2-6 以降で使用したキメラ T1R3 については、hT1R3 に由来する部分をアミノ酸残基番号で記した。また、T1R3 の N 末端側もしくは C 末端側でない部分を他方(ヒトまたはマウス) の T1R3 の対応する配列に置換したキメラ T1R3 については、括弧内にその部分の配列を記し、コンストラクト名とした。

2-2-4 リガンド溶液の調製

味刺激溶液には、刺激後の終濃度がそれぞれ、NCL 20 μ M、サッカリン Na 10 mM、アスパルテーム 10 mM、シクラメート 10 mM、アセスルファム K 10 mM となるよう、アッセイバッファー (130 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, and 1.2 mM MgCl₂ in 10 mM HEPES, pH 7.4) に溶解し、2×濃度の溶液を調整した。これらは、他の報告から T1R2-T1R3 発現細胞で最大の応答が見られるとわかっている濃度である(Li et al., 2002;

Nakajima et al., 2006b; Xu et al., 2004)。NCL 溶液は、アッセイを行う直前に随時溶解し、OD₂₈₀ の値をもとに目的の濃度に調整した。

2-2-5 細胞培養

human embryonic kidney (HEK) 293T 細胞は、直径 100 mm のプラスチック・ディッシュ (Iwaki glass, Chiba, Japan または Corning) に播種し、10% fetal bovine serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した。継代は 2 日おきに行った。実験には 25 代以上継代した細胞は使用しないようにした。

2-2-6 トランスフェクション

トランスフェクションは、35 mm ディッシュ (Iwaki glass) または 6 ウェルプレート (Iwaki glass) に細胞を撒き、1 晩培養後、70~80%コンフルエントの状態の時に Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen, San Diego, CA) を用いて行った。トランスフェクションには、T1R2、T1R3 各 2.75 µg、G16gust25 0.5 µg、DsRed2 (pDsRed2-N1; TAKARA BIO Inc., Shiga, Japan) 0.06 µg の cDNA を用いた。約 60%コンフルエントの状態時にトランスフェクションを行う際には、T1R2、T1R3 各 2.2 µg、G16gust25 0.4 µg、DsRed2 0.05 µg の cDNA を用い、トランスフェクション効率をできるだけ揃えるようにした。トランスフェクション効率は DsRed2 の蛍光から 40%程度であると判断した。トランスフェクションから 6 時間後に、適宜希釈して細胞を 35 mm ディッシュに撒いて一晩培養した。

2-2-7 カルシウムイメージング

トランスフェクションから約 24 時間後に、トリプシン処理を行った後、細胞を 96 ウェルガラスボトムプレート (Iwaki glass) あるいは 96 CytoWell plate (Nalge Nunc International, Rochester, NY) に、1 ウェルあたり 80,000~100,000 細胞となるよう希釈して移した。細胞の計数は、トーマ血球計算盤を用いて行った。さらに約 24 時間培養した後、アッセイバッファーで希釈した 5 µM fura-2/AM (Invitrogen) 100 µl に、37°Cにて 30 分間遮光して浸した。続いてアッセイバッファーで 1 度洗浄した後、100 µl のアッセイバッファーで置換した。この状態で室温にて 20~30 分静置した後、2×濃度に調整した味刺激溶液を 100 µl 加えて刺激した。340 nm 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 10-2 (Sutter, San Rafael, CA)、MicroMax 冷却 CCD カメラ (Princeton Instruments, Trenton, NJ)、蛍光倒立顕微鏡 IX-70 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて測定した。蛍光画像は、3 秒おきに味刺激溶液投与後、約 60 秒間記録し、MetaFlour ソフトウェア (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて解析した。細胞内カルシウムイオン濃度変化

は、2種の励起波長における蛍光強度の比 (F_{340}/F_{380}) の変化で決定した。

結果は、顕微鏡の視野中およそ 1000 細胞あたりの応答細胞数を数えることで定量化した。味刺激後 60 秒以内に F_{340}/F_{380} が 0.2 より増加した細胞を、応答細胞と定義した。また、hT1R2 を介して受容されることが既知であるアスパルテーム溶液 (10 mM) (第 4 章参照) への応答細胞数で、normalization を行った。

2-2-8 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。2 群間の比較には Student の t 検定を用いた。

表2-1 コンストラクトの作製に使用した鋳型とプライマーの組み合わせ

| construct name | | 1st PCR template | | primer sequence (5'–3') | 図 |
|----------------------------|-----|------------------|----|---|-------|
| h/h/m T1R3 | (N) | hT1R3 | as | GGCTCCCCCAAGCCAGAAA | 図2-5 |
| | (C) | mT1R3 | s | TTTCTGGCTTGGGGGAGCC | |
| m/h/m T1R3 | (N) | mT1R3 | as | CTCCTGGCACTGCCGGAAACAC | 図2-5 |
| | (C) | h/h/m T1R3 | s | GTGTCCCCGGCAGTGCCAGGAG | |
| h/h/m T1R3 | (N) | hT1R3 | as | CATCTTTGCACTGGCGCGAGCAC | 図2-5 |
| | (C) | mT1R3 | s | GTGCTCGCGCCAGTGCAAAGATG | |
| h.1-400.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | AGGGCTTGAGCCACGCTATACAC | 図2-6 |
| | (C) | mT1R3 | s | GTGTATAGCGTGGCTCAAGCCCT | |
| h.1-300.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | GTCAGCCAAAGACTCGCTGGCCA | 図2-6 |
| | (C) | mT1R3 | s | TGGCCAGCGAGTCTTGGCTGAC | |
| h.1-200.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | CAGCTGAAGTTCTGCAGCAGCTC | 図2-6 |
| | (C) | mT1R3 | s | GAGCTGCTGCAGAACTTCAGCTG | |
| h.1-100.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | CTCGGAGCATGTGTCAAAGAGTGC | 図2-6 |
| | (C) | mT1R3 | s | GACCTCTTTGACACATGCTCCGAG | |
| h.1-475.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | GAAGGGTGGCGTTGAACCTGC | 図2-7 |
| | (C) | mT1R3 | s | GCAGGTTCAACGGCACCCCTT | |
| h.1-450.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | GGTCATATTCCATGTCCACGTTTCC | 図2-7 |
| | (C) | mT1R3 | s | GGAAACGTGGACATGGAATATGACC | |
| h.1-425.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | CTCCAGGAGCTGCCAGGGCTTC | 図2-7 |
| | (C) | mT1R3 | s | GAAGCCCTGGCAGCTCCTGGAG | |
| h.1-497.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | CTTTGCACTGGCGGGAACACTGGGACACGGGCTTCTGGTTGTC | 図2-8 |
| | (C) | mT1R3 | s | GACAACCCAGAACCCCGTGTCCCACTGTTCCTCCGCACTGCAAAG | |
| h.1-494.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | CACTGGGAGACTGGCACCTGGTTGTGACAGCTGTGCCAGC | 図2-8 |
| | (C) | mT1R3 | s | GCTGGCACACGCTGACAACCCAGGTGCCAGTCTCCCACTG | |
| h.1-487.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | GCACCTGGTTGCTGGCCAGCGGATCTTCAGGCGCTC | 図2-8 |
| | (C) | mT1R3 | s | GAGCGCTGAAGATCCGCTGGCCAGGCAACCCAGTGC | |
| h.1-484.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | CTGGTTGCCTGGCCAGTACATCTTCAGGCGCTGTGCTCCTG | 図2-8 |
| | (C) | mT1R3 | s | CAGGACAGAGCCGCTGAAGATGTACTGGCCAGGCAACCCAG | |
| h.1-478.mT1R3 | (N) | hT1R3 | as | CATTTTAGACTGCTGCAGCTGGAGGCTGCCGTTGAACCTGC | 図2-8 |
| | (C) | mT1R3 | s | GCAGGTTCAACGGCAGCCTCCAGCTGCAGCAGTCTAAAATG | |
| hT1R3(K494V) | (N) | hT1R3 | as | GAGCACCCGGACACCGGCACCTGGTTGTGACAGCTGTGCCAG | 図2-9 |
| | (C) | hT1R3 | s | CTGGCACACGCTGACAACCCAGGTGCCCGTGTCCCGGTGCTC | |
| mT1R3.h.476-852 | (N) | mT1R3 | as | CTGAGGCTGCCGTTGAAGGTG | 図2-10 |
| | (C) | hT1R3 | s | CACCTTCAACGGCAGCCTCAG | |
| mT1R3.h.451-852 | (N) | mT1R3 | as | GGTCGTACTCCATGTCTACATCCCTTC | 図2-10 |
| | (C) | hT1R3 | s | GAAGGGAATGTAGACATGGAGTACGACC | |
| mT1R3.h.426-852 | (N) | mT1R3 | as | CATGTTCTCCAGGAGCTGCCAGG | 図2-10 |
| | (C) | hT1R3 | s | CCTGGCAGCTCCTGGAGAACATG | |
| mT1R3.h.401-852 | (N) | mT1R3 | as | CCACGCTATACAGCTGCATAG | 図2-10 |
| | (C) | hT1R3 | s | CTATGCAGCTGTGTATAGCGTGG | |
| mT1R3.h.301-852 | (N) | mT1R3 | as | CTCGCTGGCCACCCATACCTTGG | 図2-10 |
| | (C) | hT1R3 | s | CCAAGGTATGGGTGGCCAGCGAG | |
| mT1R3.h.201-852 | (N) | mT1R3 | as | CCAGCCGAACCTCTGCAACAGAGTC | 図2-10 |
| | (C) | hT1R3 | s | GACTCTGTTGCAGGAGTTCGGCTGG | |
| mT1R3.h.101-852 | (N) | mT1R3 | as | GCTCCGAGCACGTGTCAAATAGGTC | 図2-10 |
| | (C) | hT1R3 | s | GACCTATTTGACACGTGCTCGGAGC | |
| hT1R3(m.408-479) | (N) | h.1-400.mT1R3 | as | CTGCCGTTGAACCTGCCACAGTATGTAATACAGG | 図2-11 |
| | (C) | hT1R3 | s | CCTGTATTACATACTGTGGGCAAGTTCAACGGCAG | |
| hT1R3(m.301-407) | (N) | h.1-300.mT1R3 | as | AGGGCTTGAGCCACGCTATACAC | 図2-11 |
| | (C) | hT1R3 | s | CTATGCAGCTGTGTATAGCGTGG | |
| hT1R3(m.201-300) | (N) | h.1-200.mT1R3 | as | CTCGCTGGCCACCCATACCTTGG | 図2-11 |
| | (C) | hT1R3 | s | CCAAGGTATGGGTGGCCAGCGAG | |
| hT1R3(m.101-200) | (N) | h.1-100.mT1R3 | as | CCAGCCGAACCTCTGCAACAGAGTC | 図2-11 |
| | (C) | hT1R3 | s | GACTCTGTTGCAGGAGTTCGGCTGG | |
| mT1R3.h.476-852(h.101-400) | (N) | mT1R3.h.101-852 | as | AGGGCTTGAGCCACGCTATACAC | 図2-12 |
| | (C) | mT1R3.h.476-852 | s | GTGTATAGCGTGGCTCAAGCCCT | |
| mT1R3.h.476-852(h.101-200) | (N) | mT1R3.h.101-852 | as | CAGCTGAAGTTCTGCAGCAGCTC | 図2-12 |
| | (C) | mT1R3.h.476-852 | s | GAGCTGCTGCAGAACTTCAGCTG | |
| mT1R3.h.476-852(h.201-300) | (N) | mT1R3.h.201-852 | as | GTCAGCCAAAGACTCGCTGGCCA | 図2-12 |
| | (C) | mT1R3.h.476-852 | s | TGGCCAGCGAGTCTTGGCTGAC | |
| mT1R3.h.476-852(h.301-400) | (N) | mT1R3.h.301-852 | as | AGGGCTTGAGCCACGCTATACAC | 図2-12 |
| | (C) | mT1R3.h.476-852 | s | GTGTATAGCGTGGCTCAAGCCCT | |

(N)は1st PCRでpEAK10 S2と目的のコンストラクトに特異的なアンチセンスプライマー(as)により増幅を行った断片を、(C)は1st PCRでpEAK10 ASと目的のコンストラクトに特異的なセンスプライマー(s)により増幅を行った断片を表す。

2-3 結果

2-3-1 NCL の受容に必要な T1R サブユニットの同定

本研究では、hT1R2-hT1R3 とマウス甘味受容体 (mT1R2-mT1R3) のアミノ酸配列の相違に着目し、NCL の受容に必要な領域の同定を試みた。ヒトとマウスの T1R2 ならびに T1R3 のアラインメントを図 2-2、図 2-3 に示す。両者の T1R2、T1R3 における相同性を解析したところ、それぞれ 69.3%、72.2%であった。

まず、NCL の受容に hT1R2 と hT1R3 のどちらのサブユニットが必要であるかを同定するため、hT1R2-T1R3、mT1R2-mT1R3、hT1R2-mT1R3、mT1R2-hT1R3 の 4 つのヘテロマーの組み合わせをそれぞれキメラ G タンパク質 G16gust25 とともに一過的に HEK293T 細胞に発現させ、NCL への応答を調べた。導入した T1R2、T1R3 が甘味受容体として機能しているかどうかのコントロールとして、hT1R2-hT1R3 と mT1R2-mT1R3 の両者で受容されることが示されているサッカリン Na やアセスルフアム K、およびヒト特異的に作用し、hT1R2 の ATD に作用するアスパルテーム(Xu et al., 2004)や hT1R3 の TMD に作用するシクラメート(Jiang et al., 2005b)を用いた。図には、サッカリン Na、アスパルテームの結果のみ示す。

hT1R2+hT1R3 導入細胞は、他の甘味物質同様 NCL に応答し (図 2-4A)、その応答はアスパルテームに対する応答と同程度であった (図 2-4B)。mT1R2+mT1R3 導入細胞は、サッカリン Na には応答したが、アスパルテームや NCL には全く応答しなかった (図 2-4)。これは、マウスはアスパルテームや NCL を嗜好しないという行動実験の結果 (データは示さない) と一致する。また、hT1R2+mT1R3 導入細胞は、サッカリン Na やアスパルテームに応答したが、NCL には全く応答しなかった (図 2-4)。このことは、NCL の受容に hT1R3 が必要であることを示唆する。mT1R2+hT1R3 導入細胞は、試したいずれの甘味物質にも応答せず、受容体として機能していないと考えられた (図 2-4)。これは他のグループの報告(Jiang et al., 2004)と一致する。以上の結果より、NCL の受容には少なくとも hT1R3 が必要であることが明らかとなった。

2-3-2 NCL の受容に必要な hT1R3 のドメインの同定

続いて、hT1R3 の 3 つのドメイン、すなわち ATD、CRD、TMD のうち、どのドメインが NCL の受容に必要なかを調べた。初めに、ATD と CRD から構成される細胞外領域と膜貫通領域 TMD のどちらが受容に必要なかを調べるため、hT1R3 の ATD と CRD (1-567 aa、mT1R3 では 1-572 aa に対応) (図 2-3) および mT1R3 の TMD (573-858 aa、hT1R3 の 568-852 aa に対応) (図 2-3) から成るキメラ T1R3、h/h/m T1R3 (図 2-5A) を作製した。これを hT1R2、G16gust25 とともに HEK293T 細胞に導入したところ、サッカリン Na、アスパルテーム、NCL ともによく応答した (図 2-5B)。このことから hT1R3 の細胞外領域が NCL

の受容に必要であることが示唆された。

続いて、hT1R3 の細胞外領域のうち ATD と CRD のどちらが必要であるかを調べるため、ATD のみをヒトの配列にしたキメラ T1R3 (h/m/m T1R3)、ならびに CRD のみをヒトの配列にしたキメラ T1R3 (m/h/m T1R3) を作製し (図 2-5A)、これらをそれぞれ hT1R2、G16gust25 とともに細胞に導入して、リガンドへの応答を調べた結果、hT1R2+m/h/m T1R3 導入細胞は サッカリン Na、アスパルテームにはよく応答したが、NCL に全く応答しなかった (図 2-5B)。したがって、NCL の受容には hT1R3 の ATD が必要であることが示唆された。一方、hT1R2+h/m/m T1R3 導入細胞は、アスパルテームへの応答細胞数の半分程度の応答が NCL に対して見られた (図 2-5C)。続いて、応答が見られた hT1R2+h/h/m T1R3 導入細胞と、hT1R2+h/m/m T1R3 導入細胞において、濃度応答曲線を描いて EC₅₀ 値を求めたところ、EC₅₀ 値はそれぞれ 1.01 μM、0.60 μM と、hT1R2+hT1R3 導入細胞の EC₅₀ 値 (0.99 μM) とほぼ同じであった (図 2-5D、E)。アスパルテームに対する相対応答の値は、hT1R2+hT1R3 導入細胞と hT1R2+h/h/m T1R3 導入細胞ではほとんど変わらなかったが、hT1R2+h/m/m T1R3 導入細胞では最大応答が hT1R2+hT1R3 導入細胞のそれに比べて有意に低かった (図 2-5D、E)。EC₅₀ 値は野生型とほとんど差がなかったことから、NCL の受容には hT1R3 の ATD が十分であると考えられ、CRD は応答強度を調節するのに関与していると考えられた。

2-3-3 hT1R3 ATD における作用領域の探索 (C 末端側からの探索)

続いて、hT1R3 ATD の中で NCL 受容に必要な領域を C 末端側から絞り込むために、以下の流れで実験を行った。

まず hT1R3 ATD において NCL の受容に必要な領域を絞りこむために、この領域について C 末端側より 100 残基単位で徐々に mT1R3 ATD の対応する配列に置換した、4 種類のキメラ T1R3 (h.1-400.mT1R3、h.1-300.mT1R3、h.1-200.mT1R3、h.1-100.mT1R3) を作製し (図 2-6A)、これらをそれぞれ hT1R2、G16gust25 とともに HEK293T 細胞に発現させ、NCL への応答を調べた。発現する組み合わせによって応答の程度に差はあるものの、いずれもアスパルテームに応答を示した一方、NCL への応答は見られなかった (図 2-6B、C)。h/m/m T1R3 の結果を考え合わせると、少なくとも hT1R3 の 401-498 aa に NCL の受容に必要な部位を含むことが示唆された。

続いて hT1R3 の 401-498 aa における必要な領域を絞るため、C 末端側から 25 残基単位で徐々に mT1R3 の対応する配列に置換した、3 種類のキメラ T1R3 (h.1-475.mT1R3、h.1-450.mT1R3、h.1-425.mT1R3) を作製し (図 2-7A)、検討した。これらを hT1R2、G16gust25 と共発現させた細胞は、いずれもアスパルテームに十分な応答を示したが、NCL には全く応答しなかった (図 2-7B、C)。したがって、hT1R3 の 401-498 aa のうち 476-498aa に NCL の受容に必要な部位が含まれることが示唆された。

次に 476-498 aa のうち NCL の受容に必要なアミノ酸残基を調べるため、この範囲に関して hT1R3 を C 末端側より徐々に mT1R3 の対応する配列に置換し、応答が見られなくなる箇所を探索した。hT1R3 と mT1R3 のアミノ酸配列の相違に基づき、5 種類のコンストラクト (h.1-497.mT1R3、h.1-493.mT1R3、h.1-487.mT1R3、h.1-484.mT1R3、h.1-478.mT1R3) を作製した (図 2-8A)。これらをそれぞれ hT1R2、G16gust25 とともに細胞に導入したところ、hT1R2+h.1-497.mT1R3 導入細胞は、h/m/m T1R3 同様、アスパルテームに応答する細胞の約半数の細胞が NCL に応答した (図 2-8B)。またアスパルテームへの応答細胞数による相対応答には、h/m/m T1R3 と h.1-497.mT1R3 の間に有意な差は見られなかった (図 2-8C)。一方、N 末端方向へ向けて mT1R3 の対応する配列に置換した、h.1-493.mT1R3 を始めとする残り 4 種類のキメラ T1R3 については、アスパルテームには h/m/m T1R3 と比べて減少したものの応答したのに対し、NCL には応答しなかった (図 2-8B、C)。これらの結果から、mT1R3 でアミノ酸の異なる hT1R3 の Lys494 が、NCL の受容に必要であることが示唆された。

続いて、Lys494 を対応する mT1R3 のアミノ酸残基 Val に置換した点変異体、hT1R3(K494V) を作製し、hT1R2、G16gust25 とともに細胞に導入し、NCL に対する応答を調べた (図 2-9)。その結果、NCL に対する応答は野生型導入細胞の NCL に対する応答に比べて有意な差が認められた (図 2-9A、B)。また濃度応答関係を調べたところ、NCL に対する EC₅₀ 値は 0.21 μM と野生型より低い値であった。濃度応答曲線 (図 2-9C) においては有意差は見られなかったが、図 2-9B で測定に用いた濃度 (20 μM) はほぼ飽和している濃度であり、この濃度においては有意差が見られたことから、アスパルテームに対する相対応答強度は野生型に比べ有意に低下していると判断した (図 2-9B、C)。

2-3-4 hT1R3 ATD における作用領域の探索 (N 末端側からの探索)

Lys を対応する mT1R3 のアミノ酸 Val に置換した点変異体では NCL への応答は完全には抑制されなかったことから、他にも受容に関与する部位があると考えられた。そこで、NCL の受容に必要な他の領域を探索するため、hT1R3 の N 末端側から 100 残基単位で対応する mT1R3 の配列に置換したキメラ T1R3 を作製し、hT1R2 と発現させた。しかし、いずれも試した甘味物質に応答が見られず、受容体として機能していないと判断された (データは示さない)。一方、2-3-3 において、Lys494 以外に NCL の受容には少なくとも hT1R3 の 401-498 aa が必要であることが明らかとなったため (図 2-6)、494 aa 以外にもこれらの領域中に受容に必要な残基が含まれている可能性があった。そこで、mT1R3.h.401-852 の hT1R3 の配列部分において、N 末端側から 25 残基単位で徐々に対応する mT1R3 ATD の配列に置換した 3 種類のキメラ T1R3 (mT1R3.h.426-852、mT1R3.h.451-852、mT1R3.h.476-852) を作製した (図 2-10A)。それぞれを hT1R2 および G16gust25 と共発現させた細胞の応答を調べた結果、hT1R2+mT1R3.h.476-852 導入細胞はアスパルテームを始め、他の甘味物質にも応答したが、

NCL には応答しなかった (図 2-10B、C)。一方、他 2 種類のキメラ T1R3 を用いた場合には、いずれのリガンドに対してもほとんど応答が見られなかった (データは示さない)。以上の結果より Lys494 だけでなく、hT1R3 の 1-475 aa にも NCL の受容に必要な部位を含むことが示唆された。

そこで、hT1R3 の 1-475 aa において必要な領域を同定するため、この領域について 100 残基単位で対応する mT1R3 の配列に置換し、必要な領域の探索を試みた。すなわち、hT1R3 の 401-475 aa、301-400 aa、201-300 aa、101-200 aa のそれぞれについて、対応する mT1R3 の配列、408-479 aa、301-407 aa、201-300 aa、101-200 aa に置換したキメラ T1R3 (hT1R3(m.408-479)、hT1R3(m.301-407)、hT1R3(m.201-300)、hT1R3(m.101-200)) を作製した (図 2-11A)。各領域に NCL の受容に必要な残基が含まれていれば、NCL への応答が減少する、もしくは全く応答が無くなるはずである。これらを hT1R2 および G16gust25 と共発現させた細胞の NCL に対する応答を調べた結果、hT1R2+hT1R3(m.408-479) 導入細胞および hT1R2+hT1R3(m.101-200) 導入細胞は、いずれの甘味物質にも応答が見られなかったため、401-475 aa および 101-200 aa の関与は検証できなかった (データは示さない)。一方、hT1R2+hT1R3(m.301-407) 導入細胞、hT1R2+hT1R3(m.201-300) 導入細胞は、NCL にも応答が確認された (図 2-11B)。応答が見られたこれら 2 種類の導入細胞について濃度応答関係を解析したところ、EC₅₀ 値はそれぞれ 1.77 μ M、4.74 μ M であった (図 2-11D)。hT1R2+hT1R3(m.201-300) 導入細胞は、アスパルテームに対する最大相対応答は hT1R2+hT1R3 導入細胞と変わらないが、EC₅₀ 値 (0.99 μ M) は 5 倍近く大きな EC₅₀ 値を示したことから (図 2-11C、D)、hT1R3 の 201-300 aa は NCL 受容に関与することが示唆された。一方、hT1R2+hT1R3(m.301-407) 導入細胞は、最大相対応答は hT1R2+hT1R3 導入細胞に比べて低下したものの、EC₅₀ 値に大きな違いは見られなかったため (図 2-11C、D)、hT1R3 の 301-400 aa は NCL 受容に直接関与していないと判断した。

上記の実験において、hT1R3(m.408-479)、hT1R3(m.101-200) はそれぞれ hT1R2 との共発現において受容体として機能せず、hT1R3 の 401-475 aa、101-200 aa のそれぞれの関与は不明であった。また hT1R3 の 201-300 aa、301-400 aa の受容への関与について、十分性の面からも解析を行うため、mT1R3 の 1-400 aa の一部を対応する hT1R3 の配列に置換したキメラ T1R3 を作製し、NCL への応答が回復するかどうか検討した (図 2-12)。

1-100 aa を含む N 末端側の配列が mT1R3 の配列、それ以降が全て hT1R3 の配列で構成されるキメラ T1R3 は hT1R2 と共発現させると、試したいずれの甘味物質にも応答せず、受容体として機能しないものが多かった (データは示さない)。その中でもアスパルテームに反応し、NCL には反応が見られなかった mT1R3.h.476-852 (図 2-11A、C) のマウスの配列の一部をヒトの配列に置換した、4 種類のキメラ T1R3 (mT1R3.h.476-852(h.101-400)、mT1R3.h.476-852(h.101-200)、mT1R3.h.476-852(h.201-300)、mT1R3.h.476-852(h.301-400)) を

作製した (図 2-12A)。これらを hT1R2、G16gust25 とともに細胞に導入した結果、hT1R2+mT1R3.h.476-852 導入細胞は NCL に応答が見られなかったのに対して、mT1R3.h.476-852(h.201-300)は NCL への応答が見られるようになった (図 2-12B、C)。他 3 種類のキメラ T1R3 については、試したいずれの甘味物質にも応答しなかった (データは示さない)。応答が見られたキメラ T1R3 について、NCL に対する濃度応答関係を測定した結果、濃度依存的な応答が確認され、EC₅₀ 値は 31.3 μM であった (図 2-12D)。したがって、hT1R3 の 201-300 aa は十分ではないが、NCL の受容に必要であることが確認された。また、hT1R3 の ATD 中の他の領域については、いずれの甘味物質にも応答せず、受容体が機能しなかったために、その関与を見出すことはできなかった。

| | | |
|-------|-----|--|
| hT1R2 | 1 | MGPRAKTICSLEFILLWLAEPAAAA--ENSDFYLPQDYLLGGLFSLHANMKGIVHLNFIQVPE |
| mT1R2 | 1 | MGPOARTLHLLEFLILHALPKPVMVLVGNSTDFHLAAGDYLLGGLFTLHANVKSVSHLISYIQVPE |
| hT1R2 | 58 | MCKEYEVKVIQYNLMQAMRFVVEEINNDSSLLPGVLLGYEIVDVCYISNNVQPVLYFLAH |
| mT1R2 | 61 | KONEYNMKVLQYNLMQAMRFVVEEINNCSSLLPGVLLGYEIVDVCYLSNNIQPGLYFLISQ |
| hT1R2 | 118 | EDNLIPTIQEDYSNYISRWAVIGPDNSESMTVANFLSLFILPQITYSATISDELRDKVREF |
| mT1R2 | 121 | IDDFLPIILKDYSOYRPOWAVIGPDNSESATIVSNILSYFLVPOVITYSATITDKLRDKRREF |
| hT1R2 | 178 | PALLRRTIPESADHMEAMVQIMLHFRWNWIIVLVSSDIYGRDNGQLIGERVARR--DICIAF |
| mT1R2 | 181 | PAMLRTVPSAITHIEAMVQIMVHFQWNWIIVLVSDDDYGRENSHLLSQRLLTNTGDIQIAF |
| hT1R2 | 237 | QETLPTIQPNQNMISFEERQRIVITVDKIQOSTARWVWFSPDLITLYHFFNEVLRQNFICA |
| mT1R2 | 241 | QEVLPVPEPNQAVRPEEQDQLDNLDKLRRTSARWVWFSPDLSLHNFREVLRWNFICGF |
| hT1R2 | 297 | VWIASESWAIDPVLHNLTELGHIGTFILGITIQSVPTPGFSEFREWGPQAGPPPLSRISQS |
| mT1R2 | 301 | VWIASESWAIDPVLHNLTELRLHIGTFILGVITIQSVIPGFSQFRVRHDKPEYPMPEISLR |
| hT1R2 | 357 | YTCNQECDNCLNATLSENFILRLSGERVVYSVYSAVAVAHALHSLILGCDKSTCIKRVVY |
| mT1R2 | 361 | TTCNQCDACMNITESENFVLMISGERVVYSVYSAVAVAHILHRLHLCNQVRCIKQIVY |
| hT1R2 | 417 | PWQLLEETWKNFTLLDHOIFFDPOGDVALHLEIVQWQWRSONPFQSVASYPLQRLK |
| mT1R2 | 421 | PWQLLEETWKNFTLLGNOLFFDPOGDVMEMLDIIQWQWGLSONPFQSIASYSPITETRLT |
| hT1R2 | 477 | NIQDISWHITMNTIPMSMCKSRQSGQKKKPVGIVHCCFECIDCLPGTFLNHTEDEYEQ |
| mT1R2 | 481 | YISNVSWYTPNNTVPIISMCKSKQPGQMKKPIGLHPCCFECVDCPPGYILNRSVDEFNCL |
| hT1R2 | 537 | ACPNEWSYQSETSCKKROLVLEWHEAPTTAVALLAALGFLSTLAILVIFWRHFQTPIV |
| mT1R2 | 541 | SCPQSMWSYKNNIACFKRRLAFLEWHEVPTIVVITLAAALGFLSTLAILLIFWRHFQTPV |
| hT1R2 | 597 | RSAGGPMCFIMLITLIVAYMVVPPVYGPPKVVSTCLCRQALFPLCFITICISCTAVRSFQIV |
| mT1R2 | 601 | RSAGGPMCFIMLVPLLLAFGMVPPVYGPPPIVFSQFCRQAFFIVCFVSLSCIIVRSFQIV |
| hT1R2 | 657 | CAFKMASRFPRAYSYWRYQGPYVSMFTIVLKMVIIVIGMLATGLSPITRTDPDDPKIT |
| mT1R2 | 661 | CVFKMARRLPSAYGEWRYHGPYVFAFTTAVKVALVAGNMLATTINPIGRTPDDPNII |
| hT1R2 | 717 | IVSCNPNYRNSLLFNISLDLILLSVWGFSEFAYMGKELPINYNEAKFITLSMIFYSFTSSVSI |
| mT1R2 | 721 | ILSCHPNYRNGLLFNISMVLLILSVLWGFSEFAYMGKELPINYNEAKFITLSMIFYSFTSSISL |
| hT1R2 | 777 | CTFMSAYSGLVVTIMDLLVTVINILATISLGYFGPKCYMILFYPERNTPAYFNSMIQGYTM |
| mT1R2 | 781 | CTFMSVHDGVLVVTIMDLLVTVINFLAIGLGYFGPKCYMILFYPERNTSAYFNSMIQGYTM |
| hT1R2 | 837 | RRD |
| mT1R2 | 841 | RKS |

図2-2 ヒト(h)とマウス(m)のT1R2のアミノ酸配列のアラインメント

ATD、CRD、TMDの領域を、上部にそれぞれピンク色、緑色、青色の線で示した。両者で保存されているアミノ酸残基を黒く反転して表した。また、膜貫通領域部は、Pin et al., *Pharmacol. Ther.*, 2003を参考にし、上部に灰色の線で示した。

| | | |
|-------|-----|---|
| hT1R3 | 1 | MLGPAVLGLSLMALIHPGIGAPICLSQQLRMKGDYVILGGLFPILGEAEEAGLRSRTIPSSP |
| mT1R3 | 1 | MPALAIMGLSLAAFLLETGVGASICLSQQLFKAQGDYVILGGLFPILGSTEAEALNORTQPSI |
| hT1R3 | 61 | VCFRESSNGILWALAMKMAVEEINNKSDLLPGLRLGYDLFDTCSEPVWAMKPSIMFLAKA |
| mT1R3 | 61 | PONRFSPILGLFTLAMKMAVEEINNGSALLPGLRLGYDLFDTCSEPVWIMKSSIMFLAKV |
| hT1R3 | 121 | GSRDLAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSELAMVIGKFFSFFLMPQVSYGASMEILSARETF |
| mT1R3 | 121 | GSQSLAAYCNYTQYQPRVLAVIGPHSSEALALIIGKFFSFFLMPQVSYSASMDRISDRETF |
| hT1R3 | 181 | PSFFRTVPSDRVQLTAAEELIQEFGWNWAAALGSDDEYGRGGLSIFSAALAAARGICIAHE |
| mT1R3 | 181 | PSFFRTVPSDRVQLCAWVILLQNEFWNWAALGSDDDYGREGLSIFSSLANARGICIAHE |
| hT1R3 | 241 | GLVPLPRADDSRLGKVDVILHVNQSSVQWVLLFASVHAHAHALFNYSISSRILSPKWWAS |
| mT1R3 | 241 | GLVPLQHDTSGQQLGKVIDVLRQVNSKVQWVLLFASARAVYSILFYSYTIHGLSPKWWAS |
| hT1R3 | 301 | EAWLTSDLVMGLPGVAQGVIVLGFQRGALHEEPQVVKITHLALADPAFCSAILGEREQG |
| mT1R3 | 301 | ESWLTSDLVMILFNIAKRVGIVLGFQRGALPEFSHYVEITHLALADPAFCASLNAELD |
| hT1R3 | 361 | IIEEDVVGQRCPCCDITLQNVSAGI-----NHQTEFVYAAVYSVAQALHNTLQCN |
| mT1R3 | 360 | IIEEHVVGQRCPCCDITLQNLSSGLLQNLQNSAGQLHQTEFATYZAAVYSVAQALHNTLQCNV |
| hT1R3 | 413 | SGCPAQDPVKPWOLLENMNLTFHVGGLPIRFDSSGNVDMEYDLKLMWQGSVPRILHDVG |
| mT1R3 | 420 | SHCHVSEHVLPWOLLENMNMSTHARDLTIQFDAGNVDMEYDLKLMWQSPTEVILHVG |
| hT1R3 | 473 | RENGSLRTERLKRWHMSTDNQKPVSRCSRQQEGQVRRVKGFHSCCYDCVDCKAGSYRQN |
| mT1R3 | 480 | TFNGILQLQOSKMYW--PGNQVPSQCSRQCKDGOVRRVKGFHSCCYDCVDCKAGSYRKH |
| hT1R3 | 533 | PDDIACTFCGDEWSPERSTRCFRRRSRIFLAWGEPAVILLILLISIALGLVLAALGLFVH |
| mT1R3 | 538 | PDDFTCTPCNQDQWSPKSTACLPRRPKELAWGEPVVLISILLILLICLVIGLIALAALGLSVH |
| hT1R3 | 593 | HRDSPLVQASGGPLACFGLVCLGLVCLSVLLFPQPSPARCLAQQPLSHLPLHTGCLSTLFL |
| mT1R3 | 598 | HWDSPLVQASGGSQFCGLICLGLVCLSVLLFPGRPSSASCLAQQPMAHLPLHTGCLSTLFL |
| hT1R3 | 653 | LQAAETLVESELPLSWADRI SGOLRGPWAWLWLLAMLVEVAICTWYVAFPPPEVWTDWH |
| mT1R3 | 658 | LQAAETLVESELPLSWANWLCSYLRGLWAWLWLLAIFVEVAALCAWYLIAFPPPEVWTDWS |
| hT1R3 | 713 | MLPTEATVHORIRSWSEGLAFAINATLAFLCFLGTFILVRSQPGRYNRARGLTFAMLAYE |
| mT1R3 | 718 | VLPTEVILEHCHVRSWWSLGLVHIINAMLAFLCFLGTFILVQSQPGRYNRARGLTFAMLAYE |
| hT1R3 | 773 | LTWWSFVPLLANQVWLRPAVQMGALLICVLGTLAAFHILPRCYLLMRQPLNIPHEFFIG- |
| mT1R3 | 778 | LTWWSFVPLLANQVAYQPAVQMGALLVCAIGLIVTFHLRCKCYVLLWLRKLNIPHEFFLGR |
| hT1R3 | 832 | GGPGDAQGQNDGNIGNQKHE |
| mT1R3 | 838 | NAKKAADENSGGGEAAQGHNE |

図2-3 ヒト(h)とマウス(m)のT1R3のアミノ酸配列とそのアラインメント

ATD、CRD、TMDの領域を、上部にそれぞれピンク色、緑色、青色の線で示した。両者で保存されているアミノ酸残基を黒く反転して表した。また、膜貫通領域部は、Pin et al., *Pharmacol. Ther.*, 2003を参考にし、上部に灰色の線で示した。

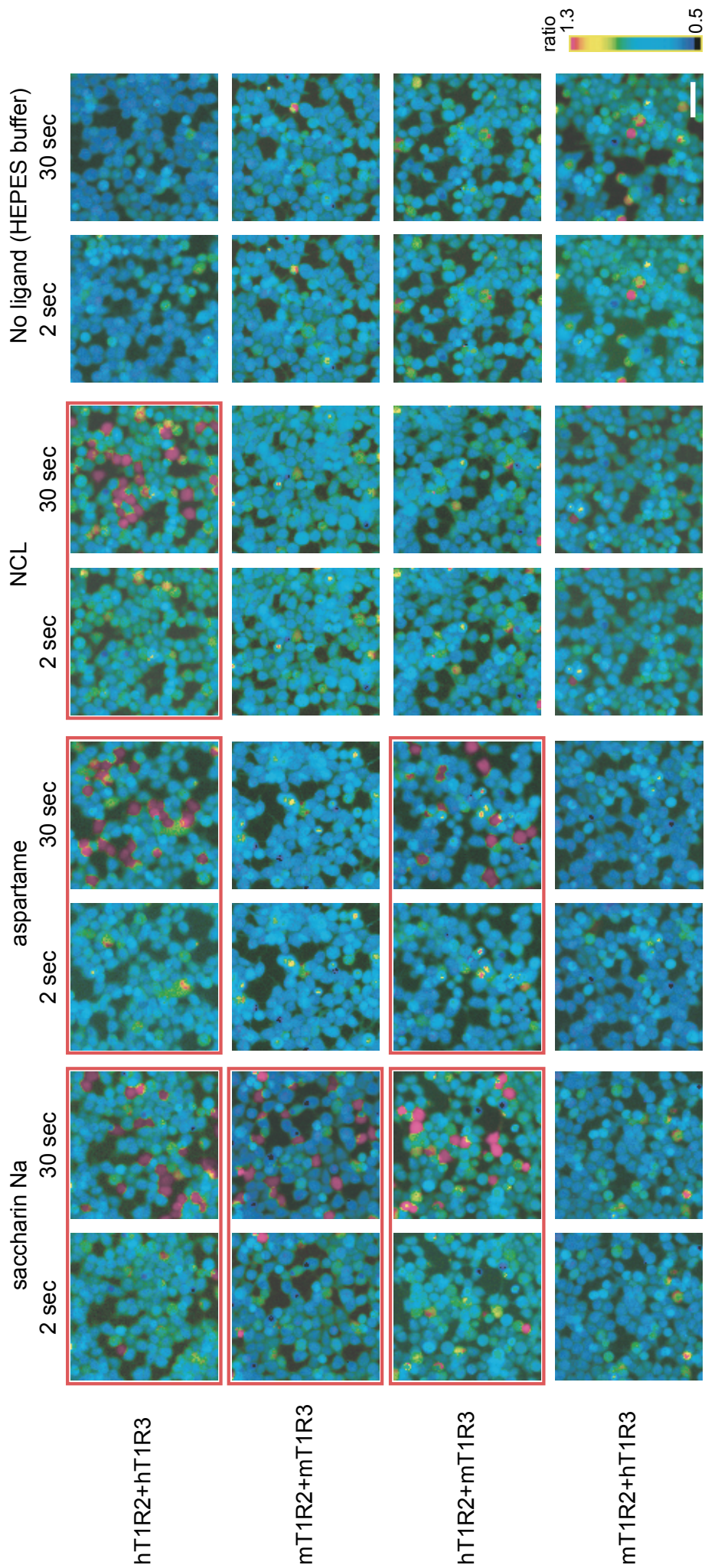


図2-4 NCLの受容に必要なT1Rサブユニットの同定(ページ1/2)

(A) hT1R2+hT1R3, mT1R2+mT1R3, hT1R2+mT1R3, mT1R2+hT1R3をそれぞれ導入したHEK293T細胞のリガンドに対する応答それぞれのT1Rの組み合わせを発現する細胞に、2×濃度のリガンド溶液(終濃度はそれぞれサッカリンNa: 10 mM、アスパルテーム: 10 mM、NCL: 20 μM)を滴下し、その直後(約2秒後)および30秒後におけるfura-2の蛍光の比(F_{340}/F_{380})を擬似カラーで表示した。応答の見られたものを赤枠で囲んだ。スケールバーは50 μmを示す。

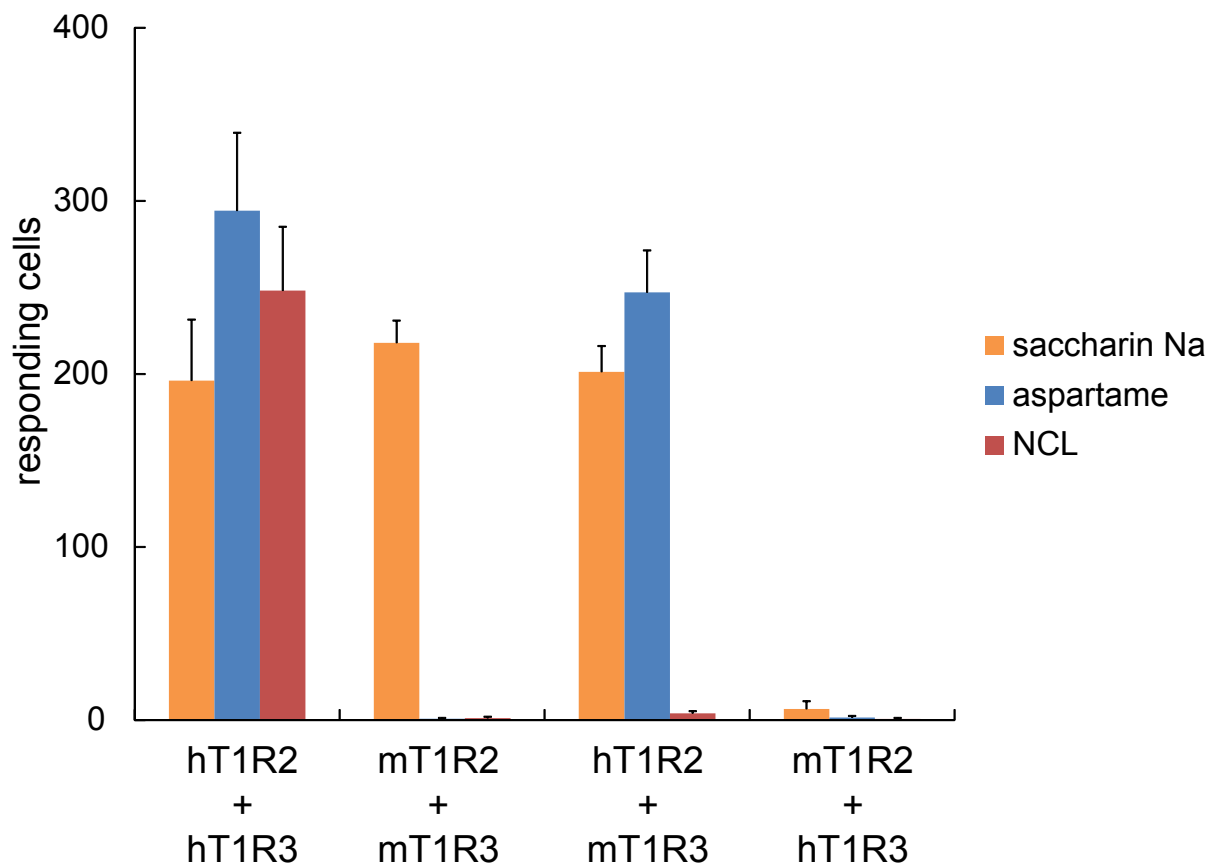
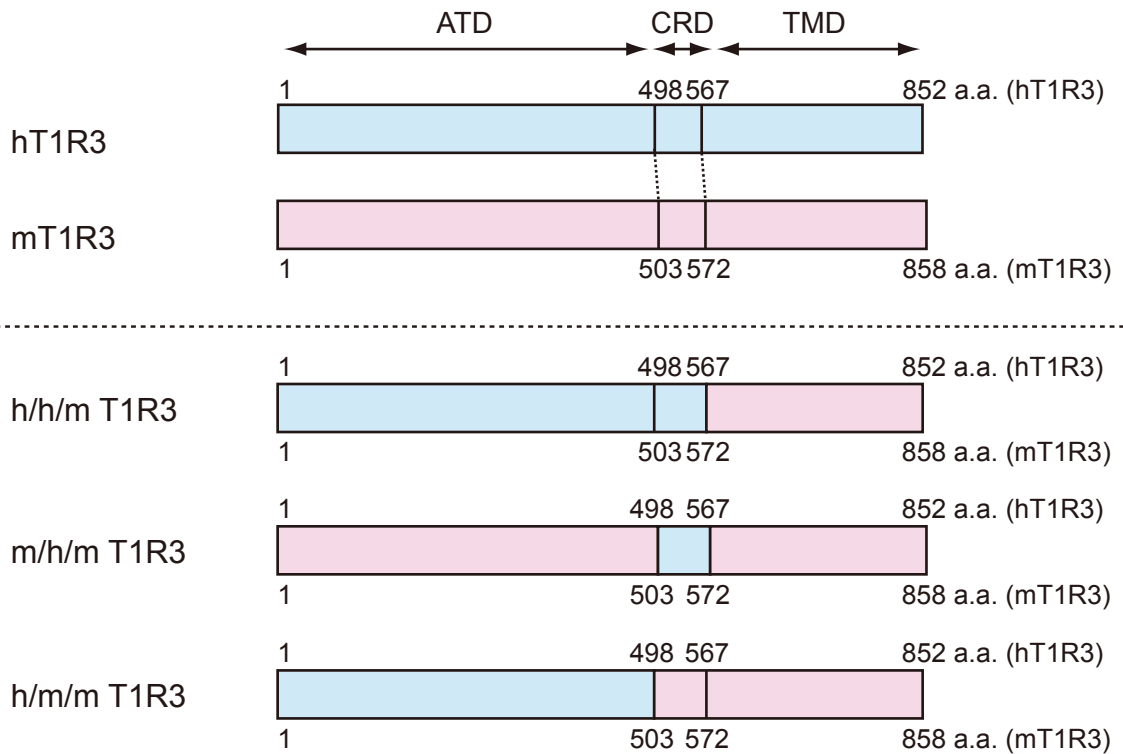


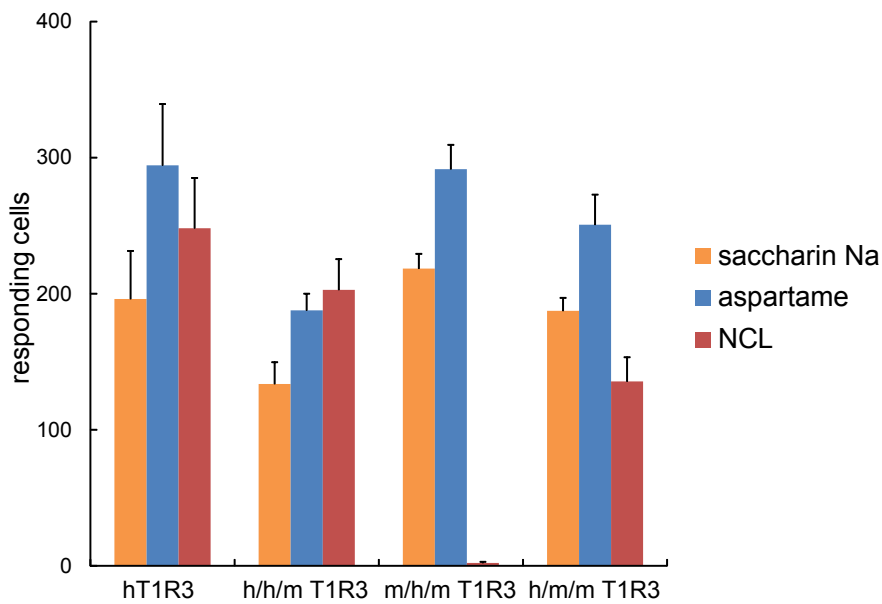
図2-4 NCLの受容に必要なT1Rサブユニットの同定(ページ2/2)

(B) 各導入細胞にリガンド溶液(終濃度はそれぞれサッカリンNa: 10 mM、アスパルテーム: 10 mM、NCL: 20 μ M)を滴下し、視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測して、その平均を示した。独立した3回の実験を行い、各回2連で実験を行った。エラーバーは標準誤差を表す(n=6)。

A



B



C

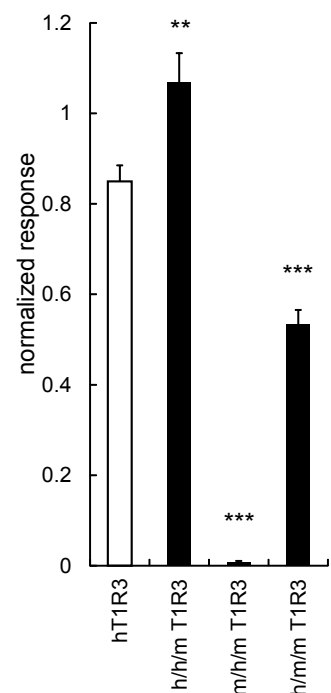


図2-5 NCLの受容に必要なhT1R3のドメインの同定(ページ1/2)

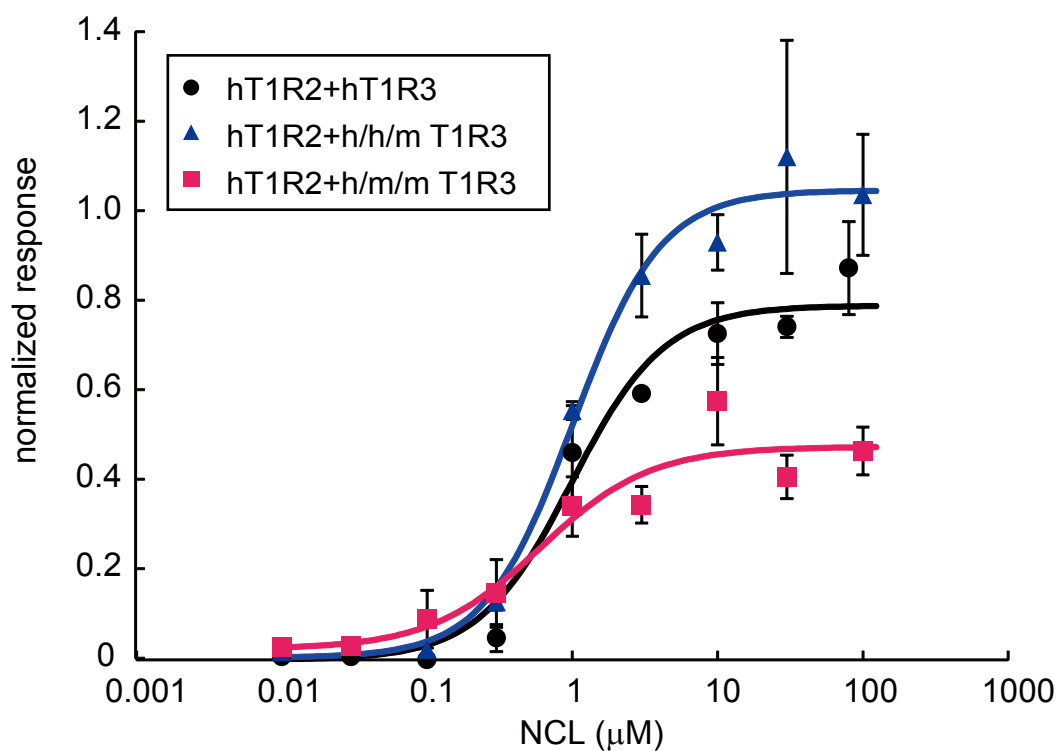
(A) キメラT1R3のコンストラクトの模式図

hT1R3の配列を水色で、mT1R3の配列をピンク色で示した。

(B) 各導入細胞のサッカリン(終濃度10 mM)、アスパルテーム(10 mM)、NCL(20 μ M)への応答。視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測して、その平均を示した。独立した3回の実験を行い、各回2連で実験を行った。エラーバーは標準誤差を表す(n=6)。

(C) (B)のデータを相対値化(NCL応答細胞数/アスパルテーム応答細胞数)した。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ (ダネット検定により野生型の応答と比較)

D



E

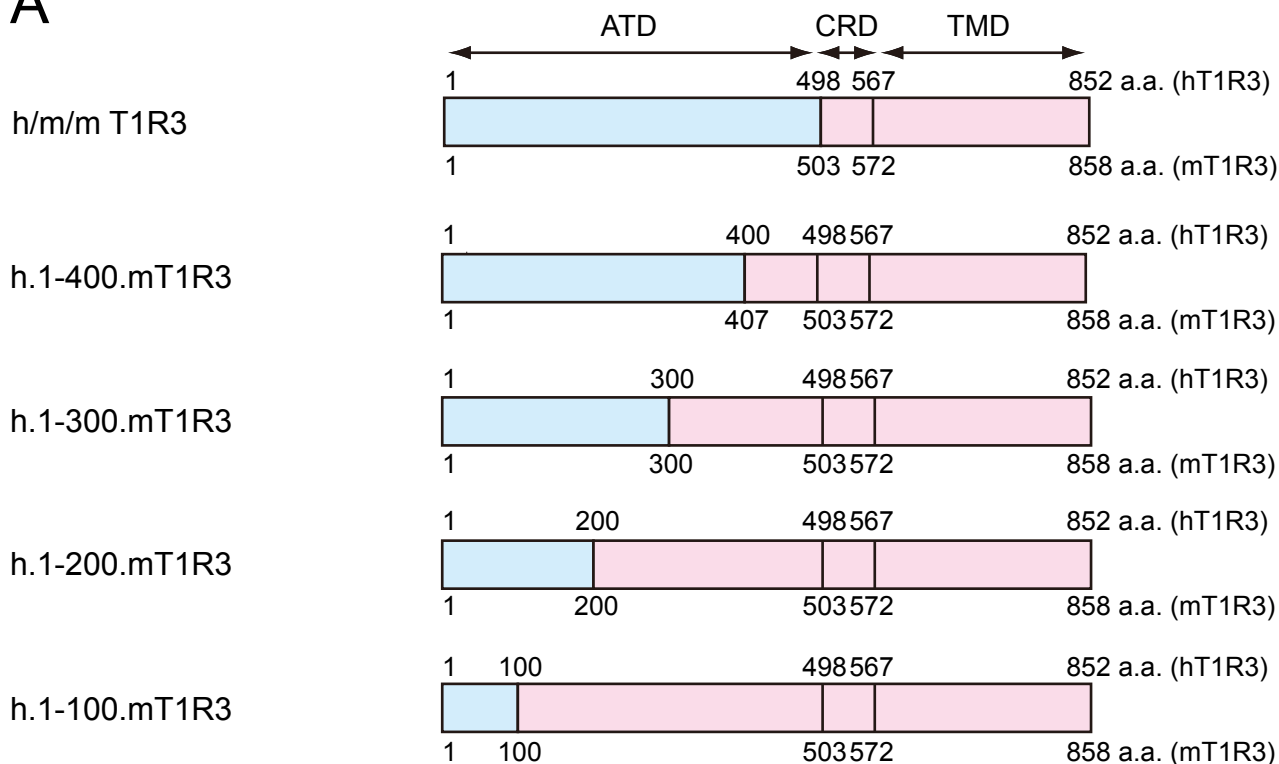
| 受容体 | EC_{50} (μM) |
|------------------|-----------------------------|
| hT1R2+hT1R3 | 0.99 |
| hT1R2+h/h/m T1R3 | 1.01 |
| hT1R2+h/m/m T1R3 | 0.60 |

図2-5 NCLの受容に必要なhT1R3のドメインの同定(ページ2/2)

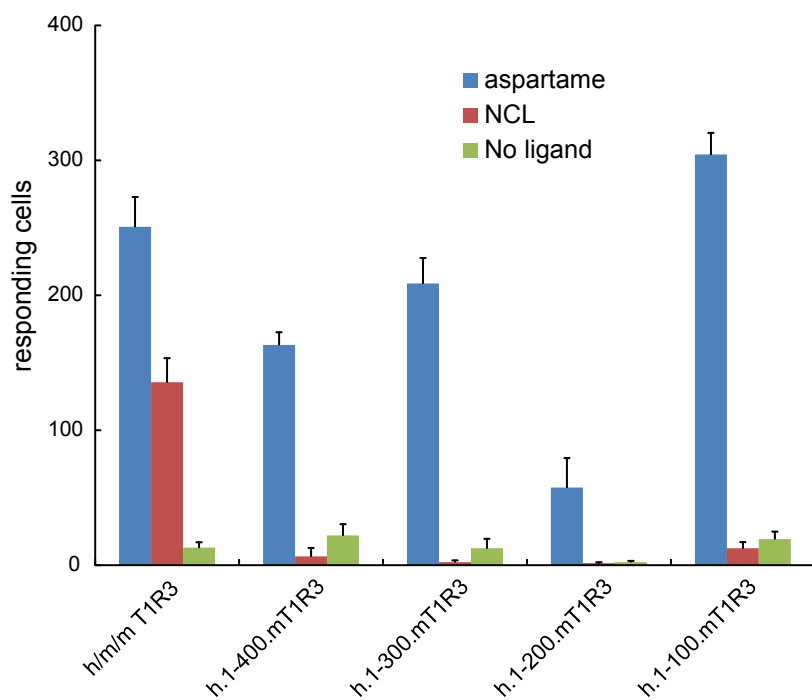
(D) hT1R2+hT1R3、hT1R2+h/h/m T1R3、hT1R2+h/m/m T1R3導入細胞のNCLに対する濃度応答曲線。各点は3回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差を表す。

(E) 各細胞のNCLに対する応答の EC_{50} 値。

A



B



C

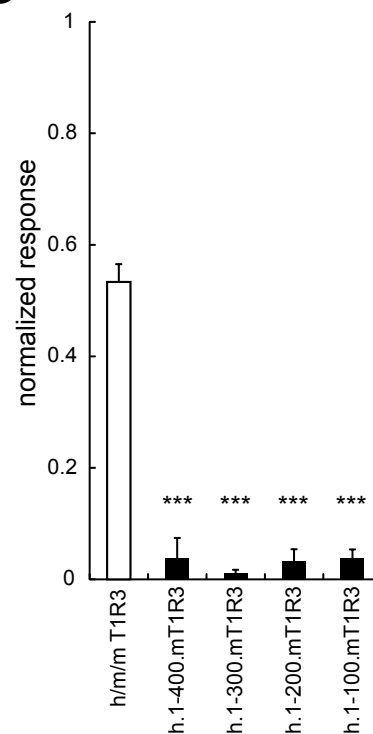


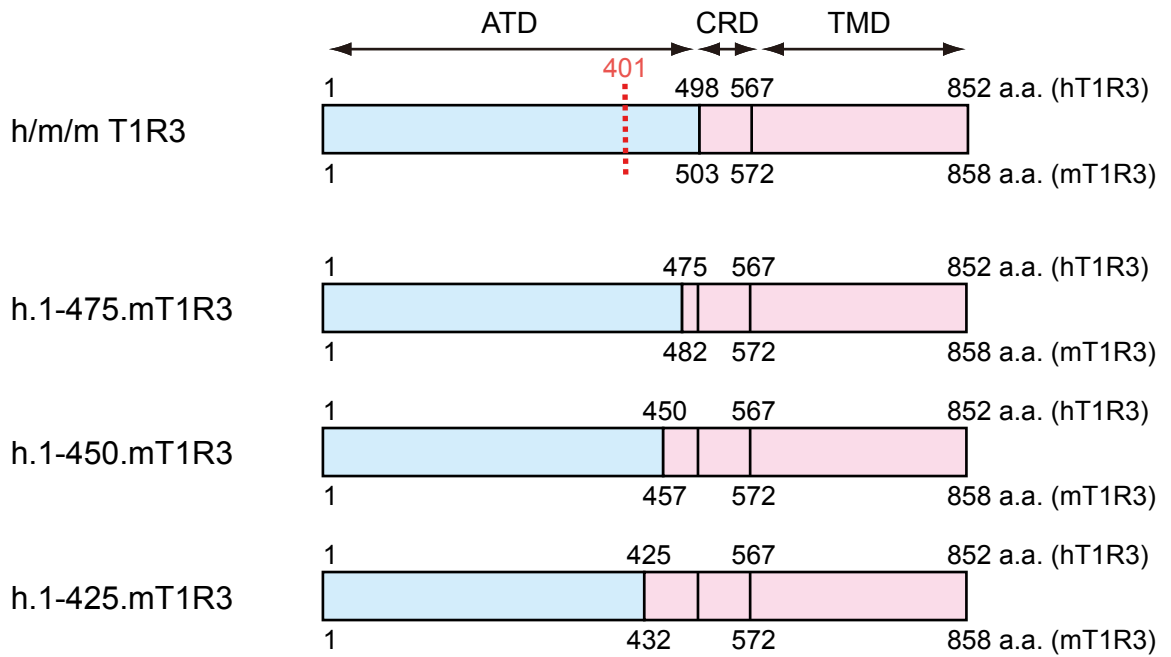
図2-6 hT1R3 ATDIにおけるNCLの受容に必要な領域の探索

(A) キメラT1R3のコンストラクトの模式図。hT1R3の配列を水色で、mT1R3の配列をピンク色で示した。

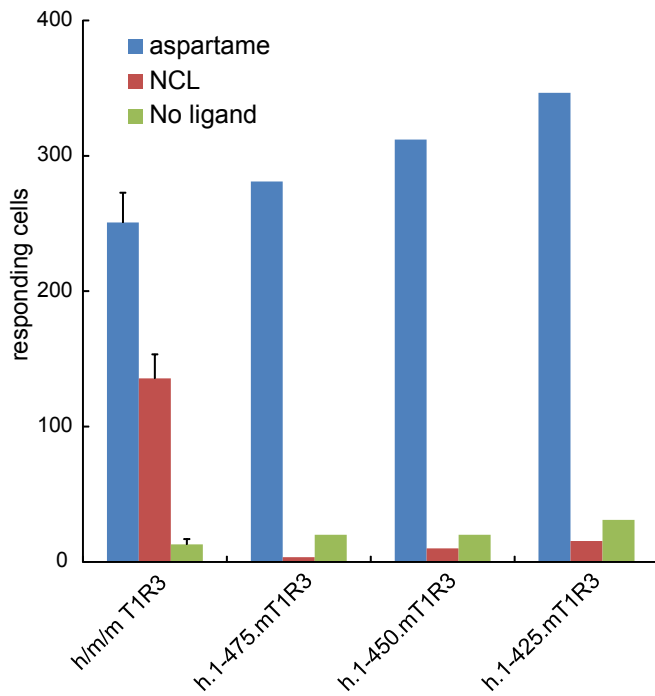
(B) hT1R2+h.1-400.mT1R3、hT1R2+h.1-300.mT1R3、hT1R2+h.1-200.mT1R3、hT1R2+h.1-100.mT1R3導入細胞のアスパルテーム(終濃度10 mM)およびNCL(20 μM)への応答。視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測して、その平均を示した。独立した2回の実験を行い、各回2連で実験を行った。エラーバーは標準誤差を表す(n=4)。左にコントロールとしてhT1R2+h/m/m T1R3導入細胞の結果を示す(図2-6に同じ)。

(C) (B)のデータを相対値化(NCL応答細胞数/アスパルテーム応答細胞数)した。***p < 0.001(ダネット検定によりhT1R2+h/m/m T1R3導入細胞の応答と比較)

A



B



C

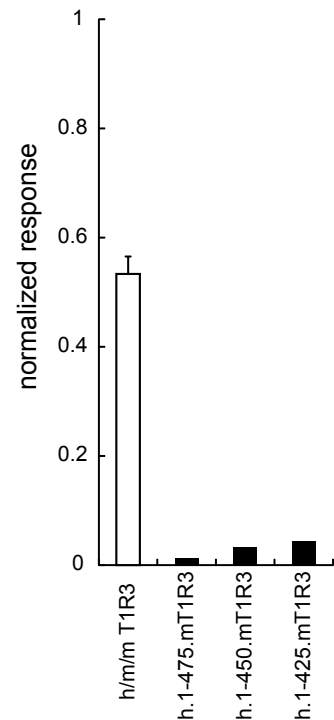


図2-7 hT1R3の401-498aaにおけるNCLの受容に必要な領域の探索

(A) キメラT1R3のコンストラクトの模式図。hT1R3の配列を水色で、mT1R3の配列をピンク色で示した。
 (B) hT1R2+h.1-475.mT1R3、hT1R2+h.1-450.mT1R3、hT1R2+h.1-425.mT1R3導入細胞のアスパルテーム(終濃度10 mM)およびNCL(20 μM)への応答。視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測した。2回のデータの平均値を示す。左にコントロールとしてhT1R2+h/m/m T1R3導入細胞の結果を示す(図2-6に同じ)。

(C) (B)のデータを相対値化(NCL応答細胞数/アスパルテーム応答細胞数)した。

A

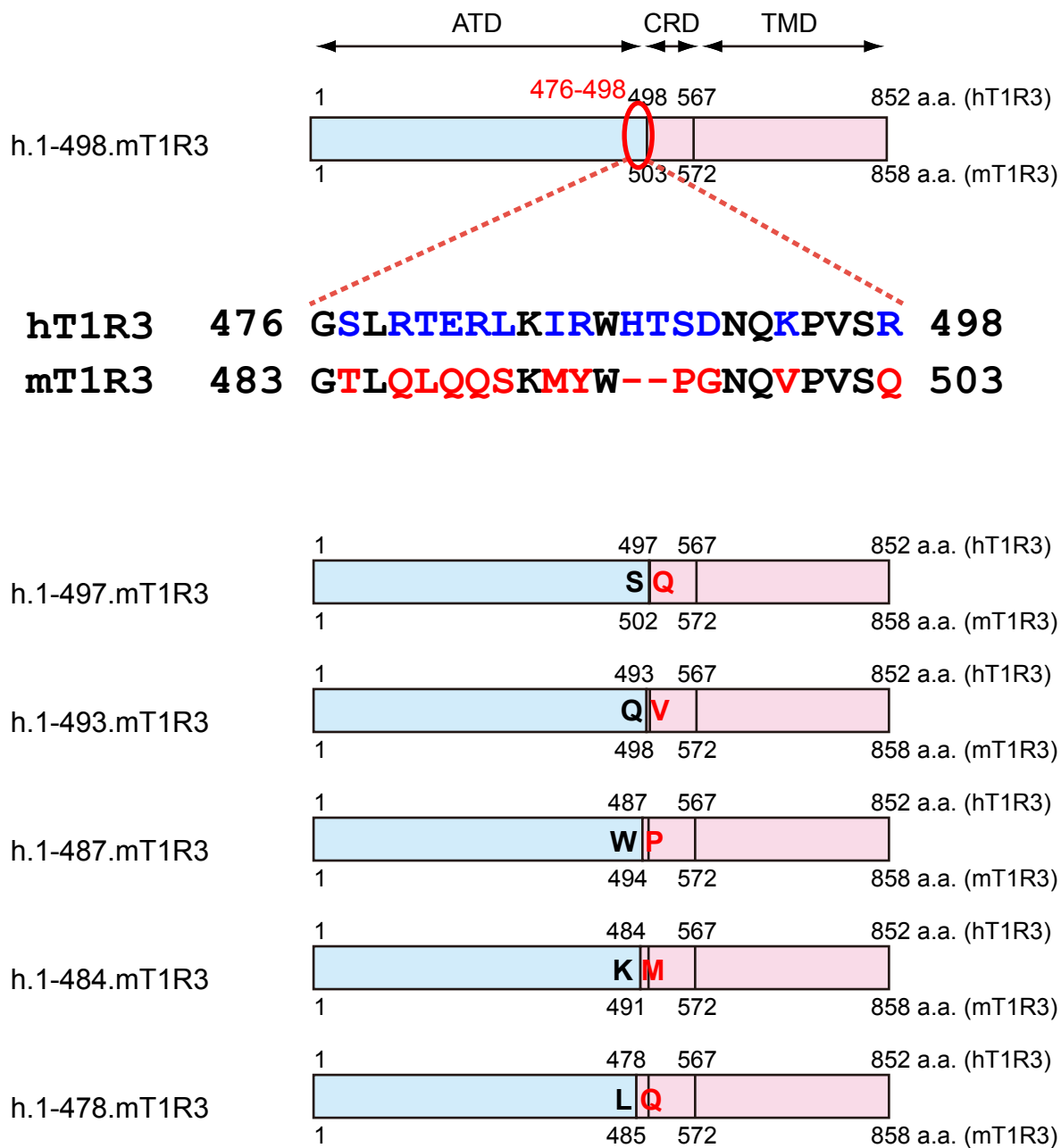
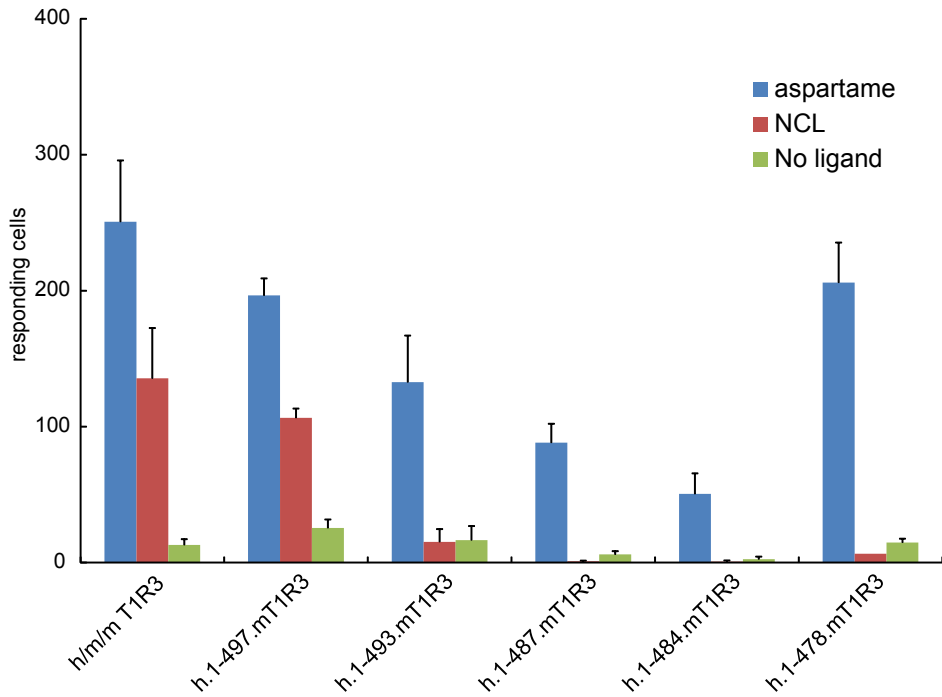


図2-8 hT1R3の476-498 aaにおけるNCLの受容に必要な領域の探索(ページ1/2)

(A) キメラT1R3のコンストラクトの模式図。hT1R3とmT1R3で異なるアミノ酸残基をそれぞれ青、赤で示した。hT1R3の配列を水色で、mT1R3の配列をピンク色で示した。

B



C

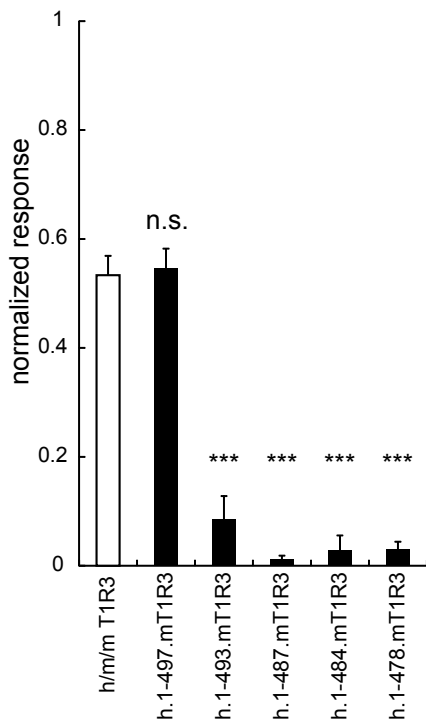


図2-8 hT1R3の476-498 aaにおけるNCLの受容に必要な領域の探索(ページ 2/2)

(B) hT1R2+h.1-497.mT1R3、hT1R2+h.1-493.mT1R3、hT1R2+h.1-487.mT1R3、hT1R2+h.1-484.mT1R3、hT1R2+h.1-478.mT1R3導入細胞のアスパルテーム(終濃度10 mM)およびNCL(20 μ M)への応答。視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測した。独立した2回の実験を行い、各回2連で実験を行った。エラーバーは標準誤差を表す(n=4)。コントロールのhT1R2+h/m/m T1R3導入細胞の結果については、図2-6に使用したものと同一ものを使用した。

(C) (B)のデータを相対値化(NCL応答細胞数/アスパルテーム応答細胞数)した。

*** $p < 0.001$ 、n.s. not significant(ダネット検定によりhT1R2+h/m/m T1R3導入細胞の応答と比較)

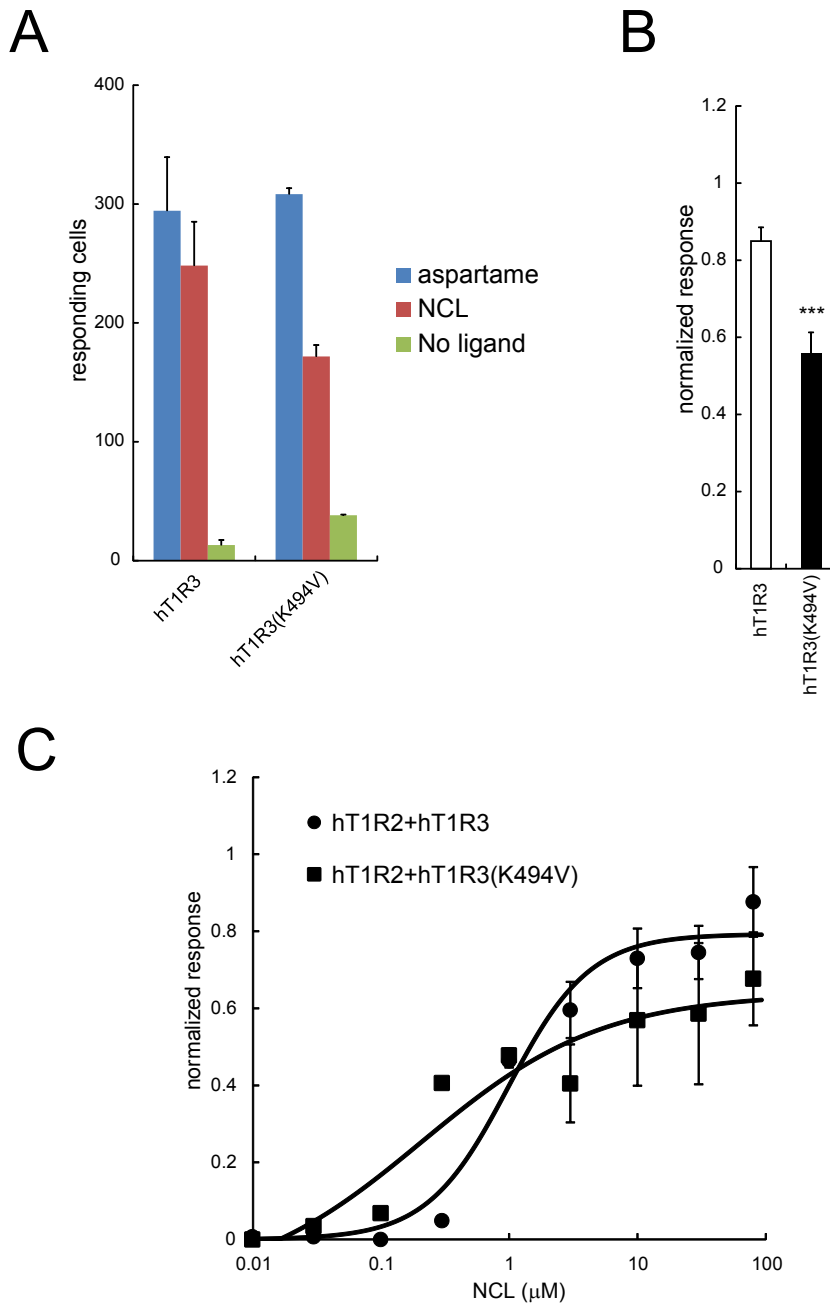


図2-9 hT1R2+hT1R3(K494V)導入細胞の結果

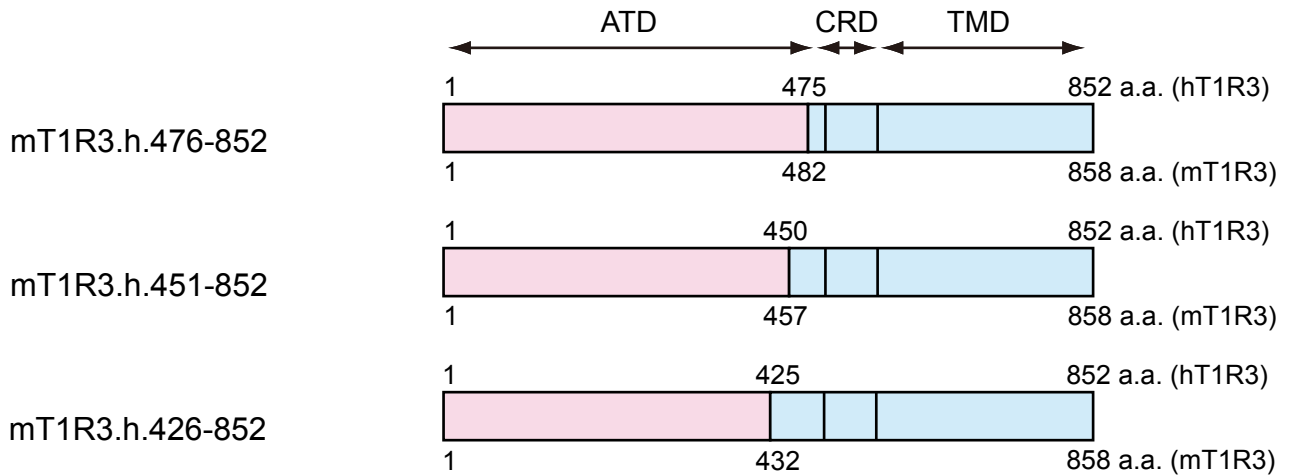
(A) hT1R2+hT1R3(K494V)導入細胞のアスパルテーム(終濃度10 mM)およびNCL(20 μ M)への応答。視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測した。独立した2回の実験を行い、各回2連で実験を行った。エラーバーは標準誤差を表す(n=4)。左にコントロールとしてhT1R2+hT1R3導入細胞の結果を示す(図2-5に同じ)。

(B) (A)のデータを相対値化(NCL応答細胞数/アスパルテーム応答細胞数)した。

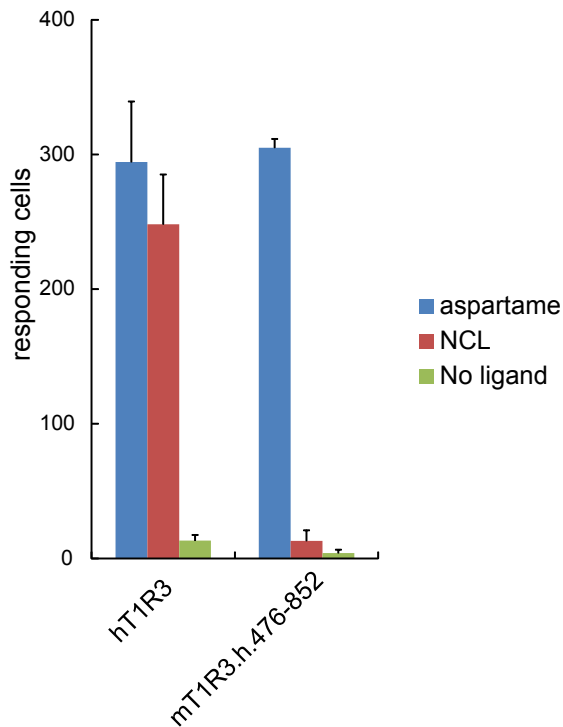
*** $p < 0.001$ (studentのt検定)

(C) hT1R2+hT1R3(K494V)導入細胞のNCLに対する濃度応答曲線。各点は3回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差を表す。

A



B



C

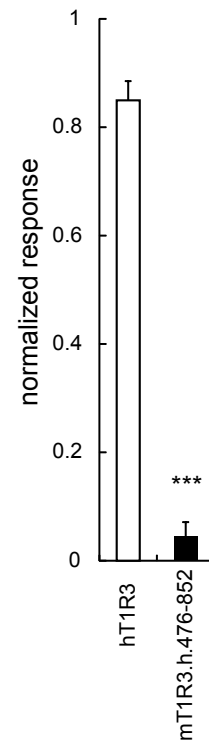


図2-10 hT1R3の401-498 aaにおけるNCLの受容に必要な領域の検討

(A) キメラT1R3のコンストラクトの模式図。hT1R3の配列を水色で、mT1R3の配列をピンク色で示した。

(B) hT1R2+mT1R3.h.476-852導入細胞のアスパルテーム(終濃度10 mM)およびNCL(20 μ M)への応答。視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測して、その平均を示した。独立した3回の実験を行い、各回2連で実験を行った。エラーバーは標準誤差を表す(n=6)。

hT1R2+mT1R3.h.451-852およびhT1R2+mT1R3.h.426-852導入細胞については、いずれのリガンドにも応答が見られなかったため、図に示さない。左にコントロールとしてhT1R2+hT1R3導入細胞の応答を示した(図2-5の結果に同じ)。

(C) (B)のデータを相対値化(NCL応答細胞数/アスパルテーム応答細胞数)した。

*** $p < 0.001$ (Studentのt検定)

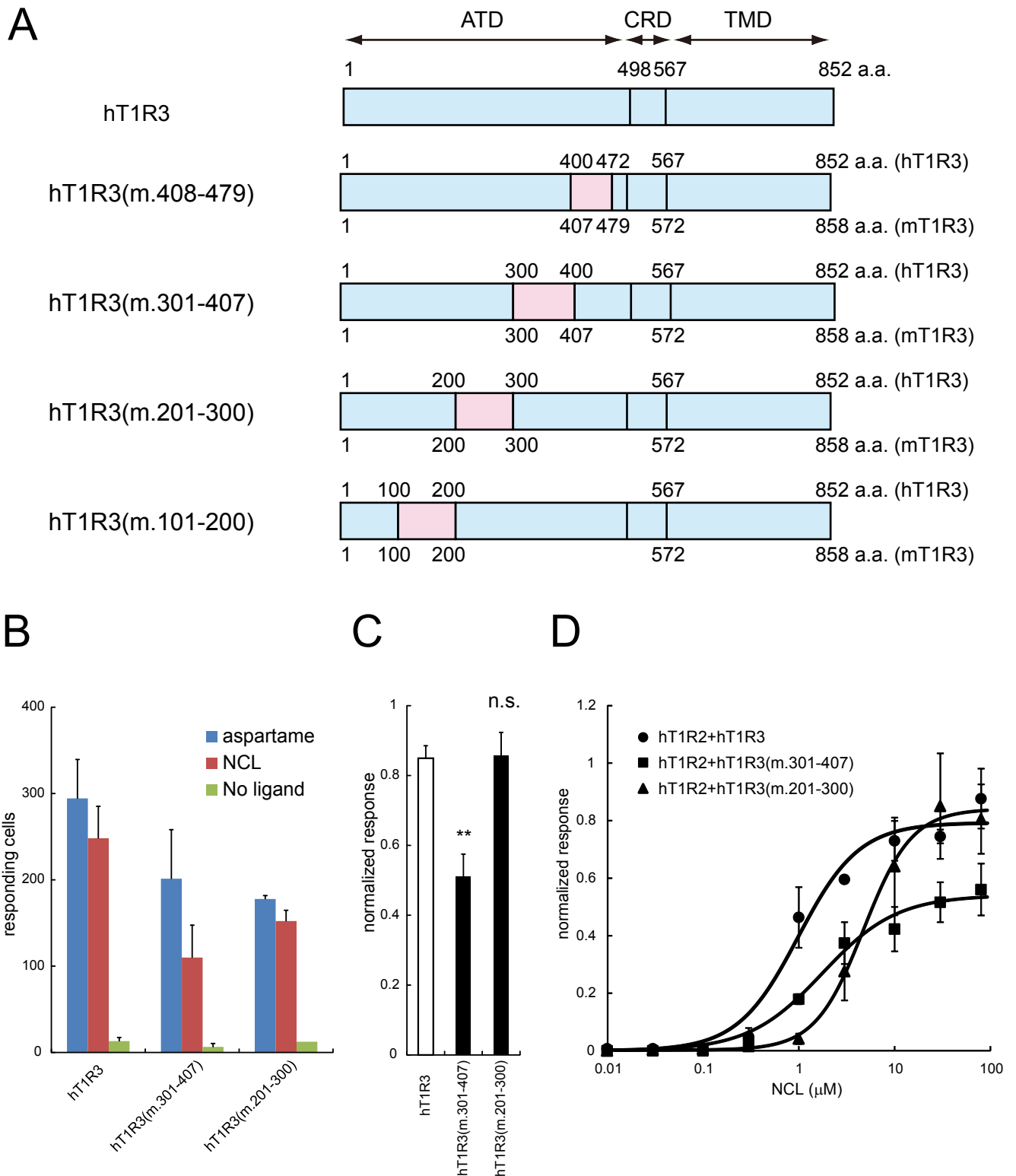


図2-11 hT1R3 ATDにおけるNCLの受容に必要な領域の探索

(A) キメラT1R3のコンストラクトの模式図。hT1R3の配列を水色で、mT1R3の配列をピンク色で示した。
 (B) hT1R2+hT1R3(m.301-407)、hT1R2+hT1R3(m.201-300) 導入細胞のアスパルテーム(終濃度 10 mM)およびNCL (20 μM)への応答。各導入細胞に各溶液を滴下し、視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測した。独立した2回の実験を行い、各回2連で実験を行った。エラーバーは標準誤差を表す(n=4)。hT1R2+hT1R3(m.408-479)およびhT1R2+hT1R3(m.101-200) 導入細胞については、いずれのリガンドにも応答が見られなかったため、図に示さない。左にコントロールとしてhT1R2+hT1R3導入細胞の応答を示した(図2-5の結果に同じ)。

(C) (B)のデータを相対値化(NCL応答細胞数/アスパルテーム応答細胞数)した。

** $p < 0.01$ 、n.s. not significant(ダネット検定により野生型の応答と比較)

(D) hT1R2+hT1R3(m.301-407)、hT1R2+hT1R3(m.201-300) 導入細胞のNCLに対する濃度応答曲線。各点は3回の独立した実験の平均値±標準誤差を表す。

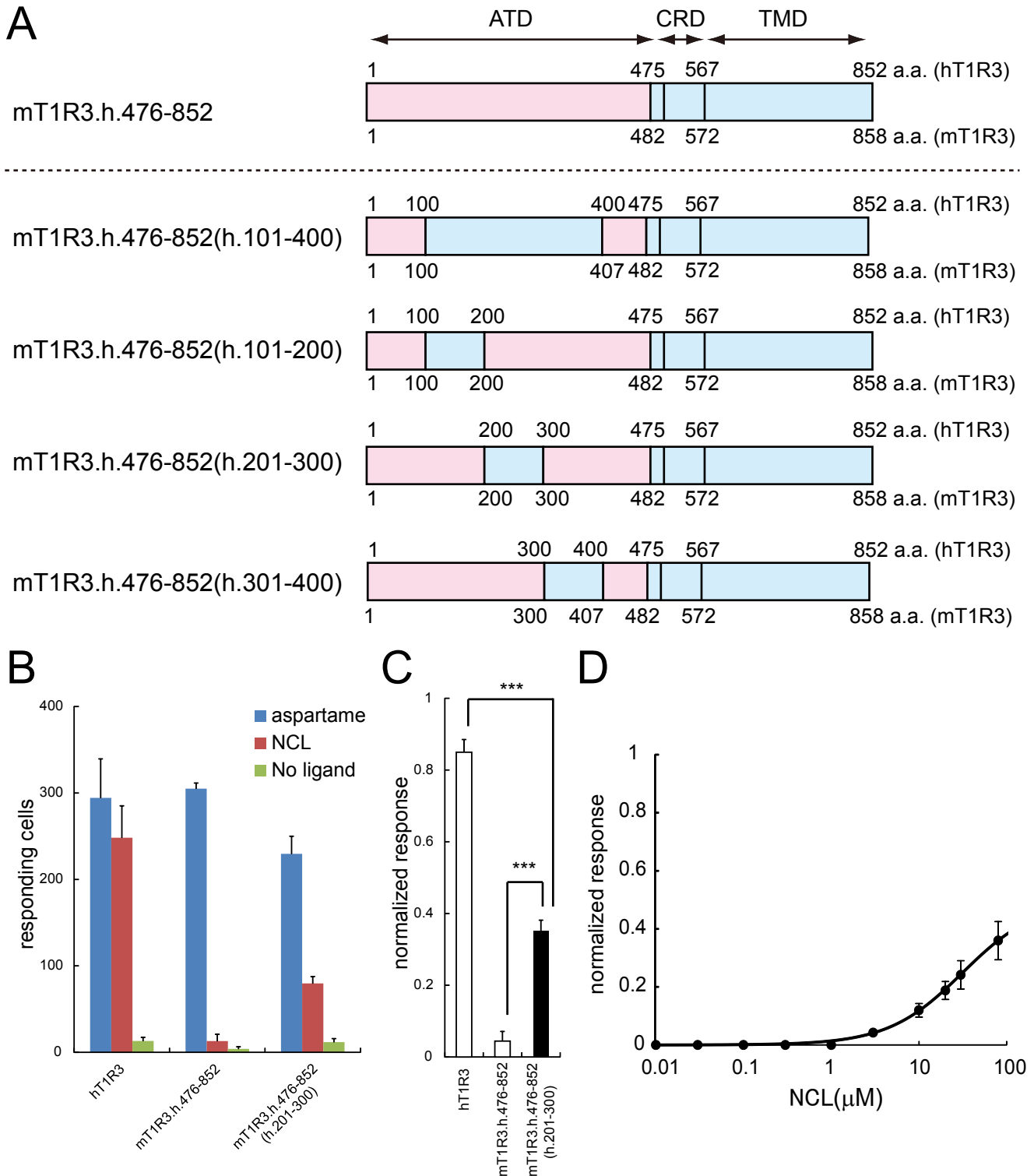


図2-12 hT1R3 ATD におけるNCLの受容に必要な領域の探索

(A) キメラT1R3のコンストラクトの模式図。hT1R3の配列を水色で、mT1R3の配列をピンク色で示した。
 (B) hT1R2+mT1R3.h.476-852(201-300) 導入細胞のアスパルテームおよびNCLへの応答。各導入細胞に溶液を滴下し、視野中およそ1000細胞あたりの応答細胞数を計測した。独立した3回の実験を行い、各回2連で実験を行った。エラーバーは標準誤差を表す(n=6)。

hT1R2+mT1R3.h.476-852(h.101-400)、hT1R2+mT1R3.h.476-852(h.101-200)、
 hT1R2+mT1R3.h.476-852(h.301-400) 導入細胞は、いずれのリガンドに対しても応答が見られなかったため、図に載せていない。

左にコントロールとしてhT1R2+hT1R3導入細胞とhT1R2+mT1R3.h.476-852導入細胞のそれぞれの応答を示した(それぞれ図2-5、2-11の結果に同じ)。

(C) (B)のデータを相対値化(NCL応答細胞数/アスパルテーム応答細胞数)した。

*** $p < 0.001$ (ダネット検定により比較)

(D) hT1R2+mT1R3.h.476-852(201-300) 導入細胞のNCLに対する濃度応答曲線。各点は3回の独立した実験の平均値±標準誤差を表す。

2-4 考察

2-4-1 NCL と hT1R2-hT1R3 の相互作用

本研究から、NCL の受容には hT1R2-hT1R3 の 2 つのサブユニットのうち、hT1R3 が必要であることが明らかになった (図 2-4)。さらにドメインごとのヒトとマウスのキメラ T1R3 を用いた実験から、hT1R3 の ATD が NCL の受容に重要であることが明らかになった (図 2-5)。hT1R3 の ATD は、これまでに甘味物質の受容に必要な領域として報告のない領域であり、NCL 特異的な作用部位が受容体に存在することが予想される。この領域がもう 1 つの味覚修飾タンパク質である MCL の受容に関与しているかどうかは、第 3 章で検証を行う。

mT1R2+hT1R3 導入細胞は試したいずれの甘味物質に対しても応答が見られず (図 2-4)、受容体として機能していないと考えられたため、残念ながら NCL 受容における hT1R2 の関与を明らかにすることはできなかった。mT1R2+ h/h/m T1R3 導入細胞、mT1R2+h/m/m T1R3 導入細胞についても実験を行ったが、ともに mT1R2 +hT1R3 導入細胞同様、試したいずれの甘味物質にも応答しなかった (データは示さない)。したがって、NCL の受容における hT1R2 の関与は不明である。hT1R2 の関与の有無を明らかにするには、T1R2 についても hT1R2 と mT1R2 でキメラ T1R2 を作製し、これらを培養細胞に発現させ NCL への応答を調べれば、T1R2 の必要性を示すことができるかもしれないと考えている。また、mT1R2 の代わりにラットの T1R2 (hT1R2、mT1R2 との相同性はそれぞれ 72.3%、92.3%) を用いることが選択肢の一つであろう。mT1R2+hT1R3 導入細胞が全く応答しないのに対し、rT1R2+hT1R3 導入細胞は応答性が低いもののいくつかの甘味物質に対しては応答するとされている(Winnig et al., 2007; Xu et al., 2004)。

NCL への応答の低下が見られた hT1R2+h/m/m T1R3 導入細胞については、hT1R2+hT1R3 導入細胞の濃度応答曲線と比較して EC₅₀ 値は変化せず、アスパルテームへの相対応答において最大応答が減少していた (図 2-5C、D)。mGluR や CaSR に見られるように、クラス C GPCR では、一般に ATD でリガンドを受容し、CRD はリガンド結合に伴う ATD の構造変化を TMD に伝達し、TMD が G タンパク質に結合するという 3 つのドメインの機能が分担している(Hu et al., 2000; Parmentier et al., 2002; Peltekova et al., 2000; Tsuji et al., 2000)。このことを考慮すると、hT1R2+h/m/m T1R3 導入細胞では NCL は hT1R3 の ATD で受容されるため EC₅₀ 値が変化せず、CRD がマウス型であるため最大応答強度が変化すると考えられる。したがって、NCL が直接作用する部位は hT1R3 の ATD であると示唆される。CRD は NCL の結合ではなく、むしろ受容体の活性化に伴う立体構造の変化に関わっているのであろう。

また、hT1R2+hT1R3(K494V)導入細胞では、野生型に比べて EC₅₀ 値は低い値を示したものの、相対応答が有意に低下した (図 2-9B、C)。Lys494 は CRD の近傍に位置することから (図 2-3)、結合に直接関与しているというよりも、むしろこの部位における変異は受容

体の活性化の調節に影響を及ぼしたのではないかと考えられる。

一方で、hT1R2+hT1R3(m.201-300)導入細胞においては、野生型と比べて NCL に対する相対応答に差はないものの EC₅₀ 値が約 5 倍増大したことから (図 2-11C、D)、hT1R3 の 201-300 aa に NCL 受容に直接関与する残基が含まれる可能性が示唆された。実際、hT1R2+mT1R3.h.476-852 導入細胞で見られなかった NCL への応答は、hT1R2+mT1R3.h.476-852(h.201-300)導入細胞において一部回復した (図 2-12)。この結果は、hT1R3 ATD の中で 201-300 aa が NCL 受容に関与する可能性を支持する結果と考えられる。

一方、hT1R2+hT1R3(m.301-407)導入細胞は、EC₅₀ 値に野生型と大きな変化は見られなかったが、相対応答が減少したことから (図 2-11C、D)、この領域は NCL と直接の作用は低いことが示唆された。ただし、NCL は分子量が約 25 kDa の高分子であり、hT1R2-hT1R3 との結合には hT1R3 の 201-300 aa だけでなく、今回明らかにすることのできなかつた他の領域に含まれるアミノ酸残基も関与するためではないかと推察される。このようにリガンドの受容に複数の部位が関与すると示唆される場合、関与する部位のうち、一部の部位にアミノ酸変異が生じていても、応答に大きな影響を生じない場合があり、カルシウムイメージング実験では、実際には変異を入れている箇所が受容に関与していても、見落とす可能性がある。この問題は細胞に導入した各受容体について、濃度応答関係を評価することで一部解決されるであろうが、応答の見られる全ての受容体について確認しなければならない。したがって、受容に必要な領域の特定には他のアプローチも行うことが望ましい。

2-4-2 NCL と hT1R2-hT1R3 のドッキングモデルの利用

そこで次に、培養細胞を用いた実験とは別に、NCL と hT1R2-hT1R3 との相互作用について、分子動力学的手法を用いたモデリングからのアプローチを行った。甘味タンパク質のブラゼイン、モネリン、ソーマチンについては、その立体構造が明らかになっているため、T1R と同じクラス C GPCR に属し、結晶構造が明らかになっている mGluR の ATD(Kunishima et al., 2000)をもとに作製した hT1R2-hT1R3 の ATD のモデルとのドッキングモデルが提唱されている(Morini et al., 2005; Tancredi et al., 2004; Temussi, 2002)。それによると、これら 3 者の甘味タンパク質はすべて、分子表面の表面電荷を介して、T1R の ATD と相互作用することが示唆されている (図 1-5)。

本研究を進めている頃、井深・森田らにより、中性条件における NCL 分子の X 線結晶構造解析が行われた(Shimizu-Ibuka et al., 2006) (図 2-13A)。この結晶構造に基づき、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 NCL とのドッキングシミュレーションを行ったところ、NCL が hT1R2-hT1R3 の 2 つの lobe から構成される溝にフィットするようなモデルが考えられた (図 2-13B)。モデルでは NCL は hT1R2

もしくは hT1R3 の ATD に存在する大きな溝に作用し得たが、hT1R3 の ATD が NCL の受容に必要であるという本実験で得られた結果を考慮し、NCL が hT1R2 ではなく、hT1R3 の ATD の溝と相互作用するモデルを採用した。このモデルをもとに、本研究によって得られた作用領域について考察する。

NCL との作用部位を含むことが明らかとなった 201-300 aa の一部は、この溝の構成に関わっており、さらに 201-300 aa のうち、hT1R3 と mT1R3 で異なる残基の多く（28 残基中 17 残基）はこの溝の表面に存在していた（図 2-14A）。実際、これらの領域のうち、特にヒトとマウスで異なるアミノ酸配列が多く存在し、また受容体の表面にある配列（具体的には hT1R3 の 245-252 aa や 271-292 aa）（図 2-14A）について、mT1R3 の対応する配列に置換することで、NCL への応答が消失するかを評価した。その結果、mT1R3.h.476-852 (h.201-244, h.253-300)（図 2-14B）において NCL への応答が消失したことから（データは示さない）、この領域が NCL の受容に関与している可能性は高く、培養細胞評価系を用いて得られた結果は、シミュレーションにより得られたドッキングモデルを支持しているものと考えられた。一方で、この溝の表面に位置するアミノ酸残基と NCL が直接相互作用しているとする、NCL が Lys494 周辺領域と直接相互作用することは立体構造上、困難である。このことは、CRD に近い Lys494 が NCL の受容に直接関与するのではなく、受容体の構造変化を制御しているのではないかという前述の考察を支持するものと言える。今後、ドッキングモデルをもとに両者の相互作用についてさらに解析することで、NCL の作用部位を特定したい。

2-4-3 キメラ T1R を用いた培養細胞評価系における課題

本研究では、ヒトとマウスのアミノ酸配列の違いに着目し、キメラ T1R3 を用いた培養細胞発現系による評価系により、NCL 受容に必要な領域の一部を同定することができた。しかし、mT1R2+hT1R3 発現細胞は、いずれの甘味物質にも応答が見られなかった（図 2-4）。ヒトとマウスともに受容されるサッカリン Na や アセスルファム K にも応答が見られないことから、甘味受容体として機能していないと考えられた。これは他の報告と一致する結果である(Jiang et al., 2004)。受容領域を同定するにあたって、キメラ T1R3 を hT1R2 と共発現させた際にも、甘味物質に全く応答せず、受容体として機能していないものが複数存在した（データは示さない）。

これらが応答しない理由としては、受容体が細胞膜表面に発現していない、または発現しているものの受容体として適切な構造をとっていないためにリガンドを受容できない、などの可能性が考えられる。本研究では、受容体の細胞膜への発現は確認していないが、Jiang らの報告によると、mT1R2+hT1R3 導入細胞において、受容体の細胞膜への発現は確認されることから(Jiang et al., 2004)、細胞膜表面に発現しているものの、T1R2 と T1R3 の間

でのシグナル伝達がうまく行われていないために生じると考えられる。この点については、抗体染色により細胞膜への発現を確認することで、明らかになるであろうと考えられる。ただし、GPCR の高発現細胞においてはその受容体タンパク質の細胞膜輸送が妨げられているという例もあり (Jacquier et al., 2006)、T1R についても細胞膜への発現は非常に微量であるという報告もある (福田修士論文)。したがって、受容に必要な領域の特定には他のアプローチも行うことが望ましい。これについては、第 5 章で述べる。

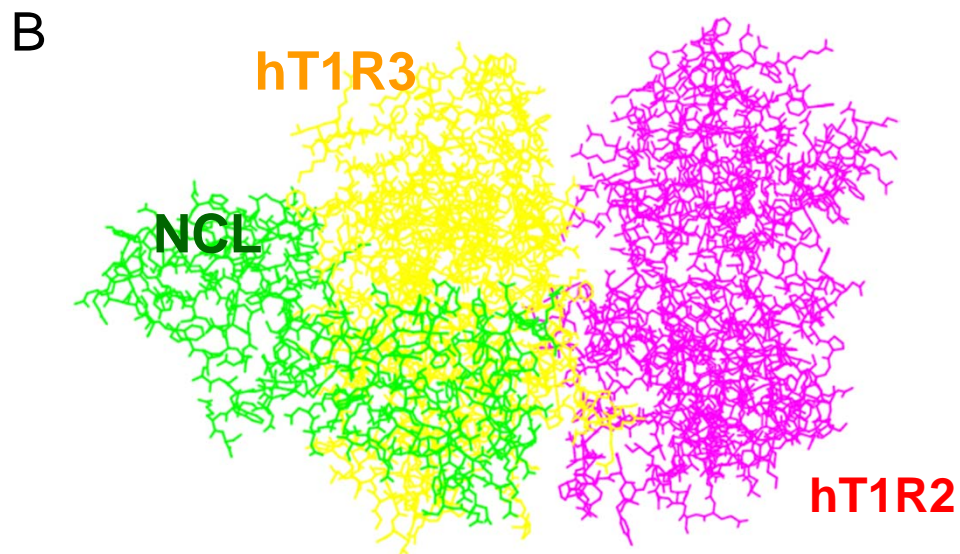
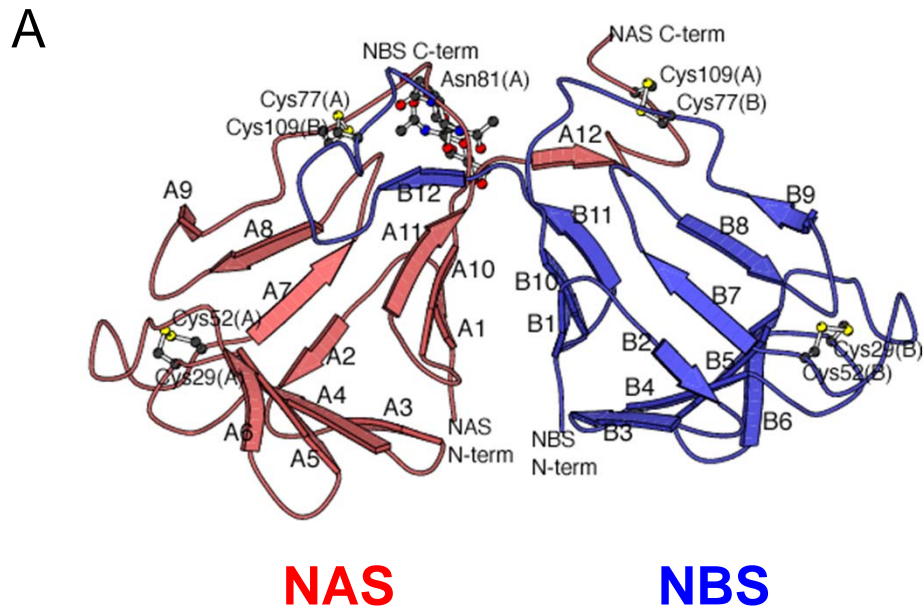
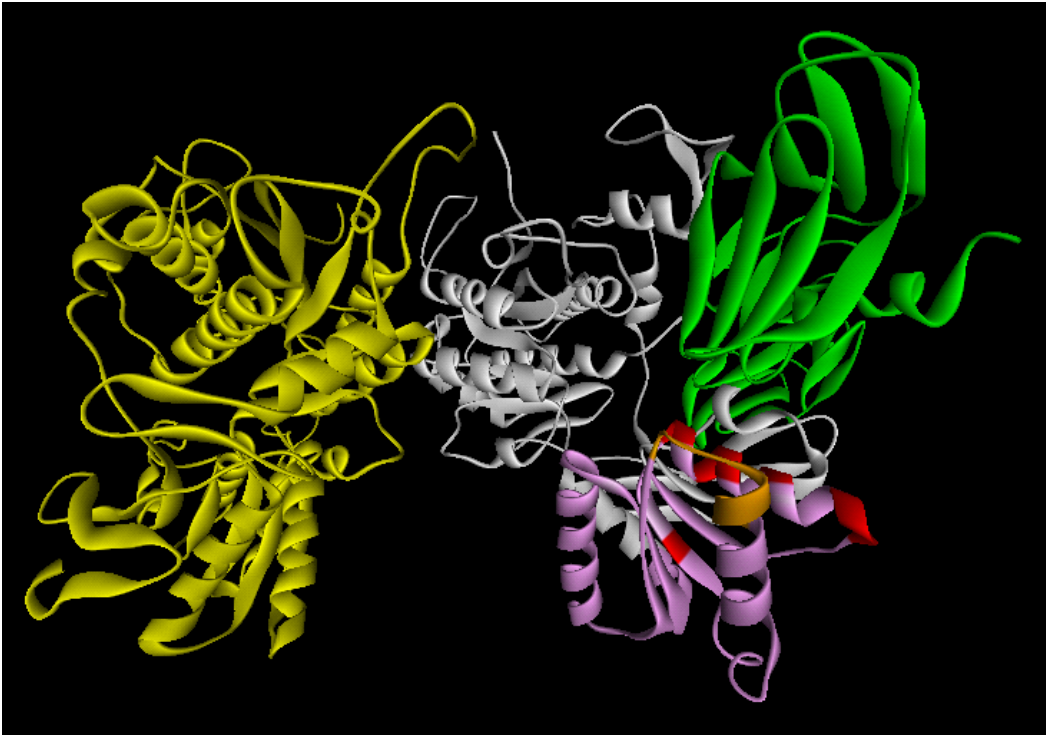


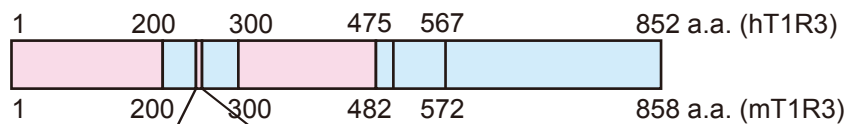
図2-13 NCLの結晶構造とhT1R2-hT1R3のATDとの作用モデル
 (A) NCLの結晶構造。貝殻状の形状のNASとNBSが逆平行に位置している。
 (B) NCLとhT1R2-hT1R3 ATDのモデルとのドッキングモデル。NCLはhT1Rの溝にフィットする。
 図はShimizu-Ibuka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2006より引用。

A



B

mT1R3.h.476-852(h.201-244,h.253-300)



QHDTSGQQ (m.245-252)



LPRADDSR (h.245-252)

図2-14 NCLとhT1R2-hT1R3のATDのドッキングモデル

(A) NCLとhT1R2-hT1R3のATDのドッキングモデル

黄色はhT1R2、白はhT1R3、緑はNCLを示す。ピンクはhT1R3の201-300残基を示し、オレンジ(245-252残基)と赤(271-292残基)はマウスとヒトで相同性が大きく異なる部分を表す。

(B) mT1R3.h.476-852(h.201-244, h.252-300)の模式図

mT1R3.h.476-852(h.201-300)において、hT1R3の245-252残基を対応するmT1R3の配列に置換した。

第 3 章

ミラクリンの味覚修飾活性機構の解析

3-1 序

第2章では、NCLとhT1R2-hT1R3の作用について解析したが、本章ではもう1つの味覚修飾タンパク質MCLがhT1R2-hT1R3とどのように作用するのかについて実験を行った。

MCLは1960年代半ばに活性本体として同定されて以来、酸味を甘味に変えるという活性に興味を持たれ、複数の研究グループがこの活性本体の精製に取り組んだ(Bartoshuk et al., 1974; Brouwer et al., 1968; Giroux and Henkin, 1974; Inglett et al., 1965; Kurihara and Beidler, 1968; Kurihara and Terasaki, 1982)。一度MCLを口にすると、酸を味わう度に強い甘味を生じるという現象に基づき、味細胞に結合したMCLは酸の存在下で構造変化し、甘味活性部位が受容体の甘味受容部位に結合し、甘味を引き起こすというモデルが提唱された(図3-1)(Kurihara and Beidler, 1969)。しかし当時、味覚の分子機構については研究が進んでおらず、今日に至るまでこのモデルは実験的に証明されてこなかった。受容体の実体が不明であった当時は、電気生理学的手法を用いてサルやげっ歯類など様々な動物の鼓索神経応答の解析が進められた。舌をMCL処理した後に酸で刺激を行うと、甘味によく応答する鼓索神経が強い発火を示すようになるという結果から、神経レベルで甘味としての情報が認知されていると考えられた。このような神経応答パターンが見られるか否かは動物種により異なり、類人猿(チンパンジー)や旧世界ザル(ミドリザル、マカク、アカゲザルなど)、新世界ザル(タマリン)などに対してはMCLの味覚修飾活性の効果があるが(Brouwer et al., 1983; Danilova and Hellekant, 2006; Hellekant et al., 1985; Hellekant et al., 1976)、原猿類(メガネザル、ロリスなど)やブタ、げっ歯類に対しては効果がない(Diamant et al., 1972; Hellekant, 1976; Hellekant et al., 1981)。また最近、fMRIやPETよりも優れた時間分解能を有する脳磁気図検査(magnetoencephalography, MEG)を用いて山本らにより、ヒトはミラクルフルーツを舂めた後にクエン酸溶液を味わうと、ショ糖溶液を味わった際と同じ大脳皮質の部位が活性化され、この部位はクエン酸溶液のみを味わった時に活性化される部位とは異なることが示された。また、応答の波形もショ糖を味わった際の波形に似ており、クエン酸のみを味わった際の波形とは異なっていた(Yamamoto et al., 2006)。これらの結果から、舌をミラクルフルーツで覆うことにより、脳レベルにおいても、酸味は抑制され、甘味として認知されていることが示唆される。第1章で述べたとおり、近年味覚受容体の同定が進み、ほぼ全ての甘味物質はhT1R2-hT1R3により受容されることが明らかとなった。他の甘味物質について、リガンドと受容体の分子レベルでの相互作用解析が進められる中、MCLについては未だ分子レベルでの受容体との作用の報告はなく、発見から40年以上が経つにもかかわらず、味覚修飾活性の生じる分子メカニズムは解明されていない。

第2章で触れたとおり、NCLについては結晶構造が解明され(Shimizu-Ibuka et al., 2006)、pHと構造活性相関の解析が進められている(Morita et al., 2009)。味覚修飾活性を示すメカニ

ズムについても明らかになりつつあり、MCL に比べて解析が進んでいる NCL のこれらの情報は、MCL の味覚修飾活性のメカニズムを解明するにあたって、非常に有益な情報となり得ると考えられる。当研究室では、hT1R2-hT1R3 と共に導入するキメラ Gα タンパク質を検討することで、NCL の味覚修飾活性の評価系の構築に成功した。この評価系を用いた実験により、NCL は酸性 pH では hT1R2-hT1R3 のアゴニストとして作用し、中性 pH ではアンタゴニストとして作用することを見出した(Nakajima et al., 2008)。この培養細胞評価系の結果と、NCL の結晶構造をもとに行った、pH 変化における構造変化の分子シミュレーションの結果から、NCL の味覚修飾活性は甘味活性型と不活性型の pH 依存的な平衡状態によるものであると考えられた (図 3-2) (Nakajima et al., 2008)。

官能試験において、MCL の酸誘導性の甘味は、hT1R2-hT1R3 に作用する甘味阻害剤であるラクチゾールによって抑制されることから(Ito et al., 2007)、MCL も hT1R2-hT1R3 を介して受容されると予想される。しかし NCL と MCL は、ともに酸を甘くする味覚修飾活性を示すにもかかわらず、アミノ酸配列の相同性や共通するモチーフ配列は見出されないため、両者の間に共通するメカニズムが存在するのかどうかは非常に興味深い。

以上を背景として、本章では、MCL がどのようなメカニズムで味覚修飾作用を示すのか、MCL の味覚修飾活性も NCL と同様のメカニズムにより説明できるのかを、分子レベルで明らかにすることを目的に実験を行った。最初に MCL と hT1R2-hT1R3 との間に相互作用があるかどうかを検討し、MCL の酸誘導性の甘味を定量的に評価する系を構築した。続いて、MCL の味覚修飾活性の持続性が、培養細胞を用いた系においても観察されることを見出し、また中性 pH において、MCL が他の甘味物質による甘味受容体の活性化を抑制することを発見した。さらに、ヒトとマウスのキメラ受容体を用いて MCL の受容に必要なドメインを同定した。以上の結果をもとに、MCL の味覚修飾活性のメカニズムの一端を明らかにし、MCL と NCL の共通点ならびに相違点を見出した。本研究は、受容体レベルでの MCL の作用を調べた初めての報告である。

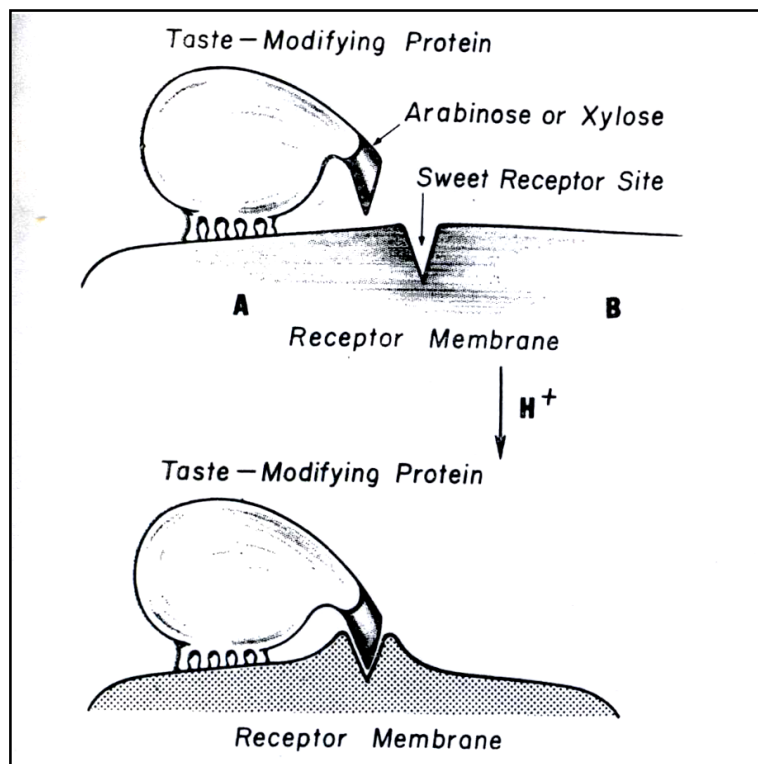


図3-1 MCLの作用機構モデル

中性条件ではMCLは味細胞へ結合しており、酸性条件下で構造変化したMCLの糖鎖が甘味受容部位へ結合することで甘味が誘導される。図はKurihara and Beidler, *Nature*, 1969より抜粋。

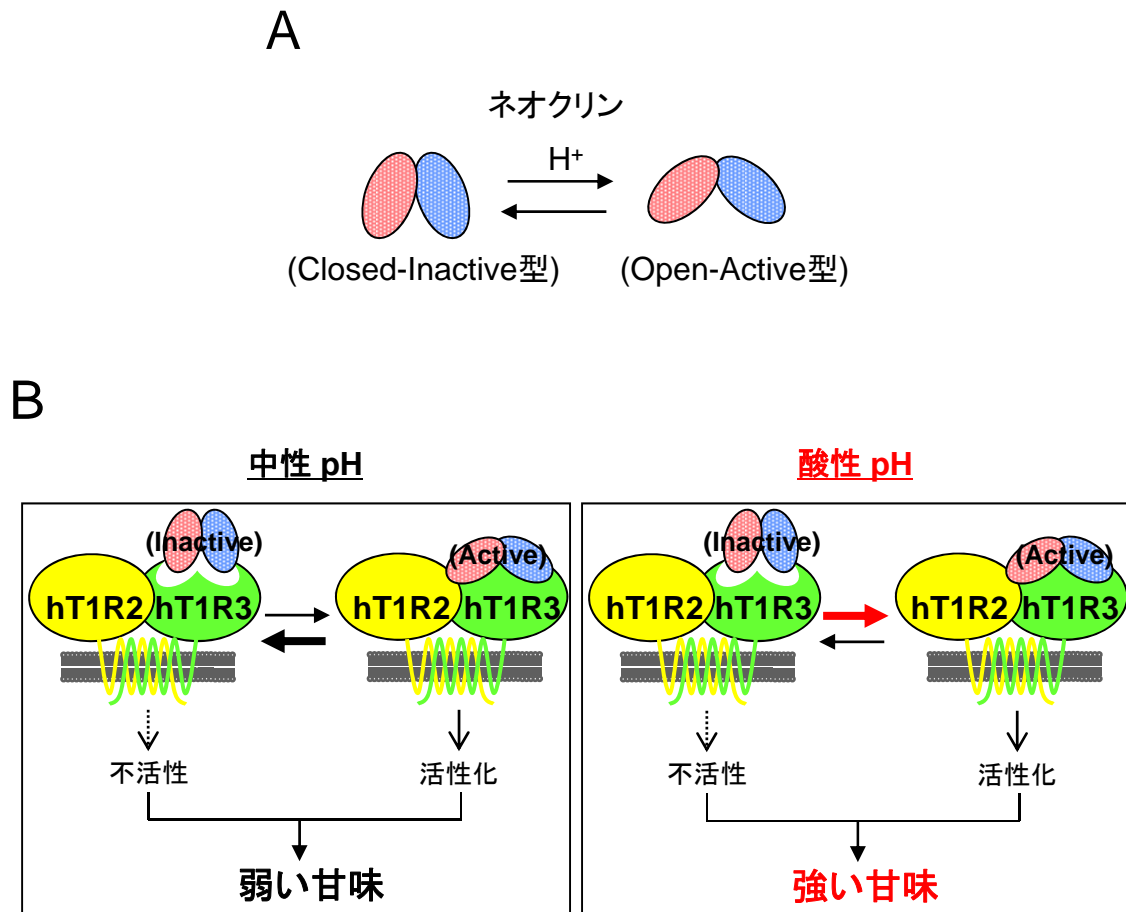


図3-2 NCLの酸誘導性の甘味活性の推定モデル

(A) NCLの構造と活性はpH依存的な平衡状態にある。NCLは酸性pHではopen-active状態、中性pHではclosed-inactive状態に平衡が傾く。

(B) 中性pHではNCL分子はclosed構造をとる傾向にあり、競合阻害的にhT1R2-hT1R3の活性化を抑制する(左)。酸性pHではNCL分子の大半はopen構造をとり、hT1R2-hT1R3を活性化する(右)。

図はNakajima *et al.*, *FASEB J.*, 2008より抜粋、一部改変。

3-2 材料と方法

3-2-1 *R. dulcifica* からの MCL の精製

-80°Cにて凍結保存した *R. dulcifica* の果実は、実験開始 30 分～1 時間前に-20°Cに移した。皮を取り除いた後、Proteinase Inhibitor Cocktail (for plant cell and tissue extracts, DMSO solution) (Sigma-Aldrich Japan) を 1l あたり 500 μ l 程度加えた冷却水を用いてポリトロンホモジナイザーにより破碎した。これを 2 回ほど繰り返して、種子と実を分離した後、遠心 (12,000 rpm、4°C、30 分) し、沈殿を回収した。その後、冷却水を加えて破碎後に遠心 (12,000 rpm、4°C、30 分) するという一連の操作を 3 回繰り返した。沈殿に溶出バッファー (100 mM Na-acetate、500 mM NaCl、pH 5.0) を加え、ポリトロンホモジナイザーでよく破碎懸濁した後、15 分氷上で静置し、遠心 (12,000 rpm、4°C、30 分) した後、上清を回収した。続いて氷上で攪拌しながら、乳鉢で細かく磨り潰した硫酸アンモニウムを 50%飽和濃度になるまで少しずつ加え、4°Cで 1 晩静置した。翌日、遠心 (12,000 rpm、4°C、30 分) により回収した沈殿を A バッファー (20 mM Na-acetate、pH 5.0) に溶解し、このサンプルを POROS-HS カラムを用いて、A バッファーと B バッファー (20 mM Na-acetate、1 M NaCl、pH 5.0) のリニアグラジエント (流速 3 ml/分、30 分) により、HPLC 精製を行って、活性画分を取得した。

3-2-2 リガンド溶液の調製

NCL は、第 2 章 (2-2-1) に記載の方法で精製したものを使用した。ブラゼインは、*Pichia pastoris* で発現させた組み換え体を Loïc Briand 博士 (フランス国立農学研究所) より供与して戴き、使用した。組み換え体は、*Saccharomyces cerevisiae* の α -factor プレプロ配列を N 末端に融合し細胞外に分泌させ、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。これらのタンパク質は、いずれも純度が 95%以上であることを SDS-PAGE により確認した。その他の甘味物質は、和光純薬工業株式会社または Sigma-Aldrich Japan から購入したものを使用した。これらを第 2 章 (2-2-4) に記載したアッセイバッファーに溶解し、カルシウムイメージング実験に用いるリガンド溶液とした。

酸性バッファーの調製は、アッセイバッファー (pH 7.4) に 500 mM クエン酸溶液を添加することで、投与後の最終 pH が目的の pH になるように調製し、アッセイに使用した。図 3-5、図 3-6 では、pH 4.8 より低い pH においては、刺激後に非特異的な応答が観察されたため (データは示さない)、実験を行わなかった。

3-2-3 プラスミド

ヒトおよびマウスの T1R2、T1R3 は、第 2 章で使用したのと同じものを使用した。

3-2-4 ヒトとマウスのキメラ T1R2 の作製

ヒトとマウスのキメラ T1R2 は、第 2 章 (2-2-3) に記載の方法と同様に作製した。作製したコンストラクトについては、ATD/CRD/TMD の順にヒト(h) 由来かマウス(m) 由来であることを明記した。例えば、hT1R2 の ATD と CRD、mT1R2 の TMD から構成されるキメラ T1R2 については h/h/m T1R2 と命名した。各コンストラクトの作製において使用した鋳型とプライマー配列の組み合わせを表 3-1 に示す。h/m/m T1R2 のみ以下の方法で作製した。

N 末端側の断片は pEAK10 S2 プライマーとあらかじめリン酸化したアンチセンスプライマーで増幅を、C 末端側の断片は pEAK10 AS プライマーとセンスプライマーで増幅した。PCR 産物を電気泳動し、目的のバンドを含むゲルを切り出して DNA を抽出・精製した。N 末端側の断片を *AscI* で、C 末端側の断片を *NotI* で制限酵素処理した後、これらをあらかじめ *AscI* と *NotI* で制限酵素処理を行い、脱リン酸化した pEAK10 ベクターとライゲーションさせ、大腸菌 DH5 α に導入した。その後の手順は、第 2 章 (2-2-3) に記載の方法と同じである。

3-2-5 細胞培養

HEK293T 細胞の培養は、第 2 章 (2-2-5) に記載の方法と同様に行った。

3-2-6 トランスフェクション

トランスフェクションは、35 mm ディッシュ (Iwaki glass) または 6 ウェルプレート (Iwaki glass) に細胞を撒き、1 晩培養後、70~80% コンフルエントの状態の時に LipofectamineTM 2000 reagent (Invitrogen, San Diego, CA) を用いて行った。トランスフェクションには、T1R2、T1R3 各 2.0 μ g、キメラ G タンパク質 0.5 μ g、DsRed2 (pDsRed2-N1; TAKARA BIO Inc., Shiga, Japan) 0.06 μ g の cDNA を用いた。トランスフェクション効率は DsRed2 の蛍光から 40% 程度であると判断した。トランスフェクションから 6 時間後に、適宜希釈して細胞を 35 mm ディッシュに撒いて一晩培養した。

3-2-7 カルシウムイメージング

トランスフェクションから約 24 時間後に、トリプシン処理を行った後、細胞を 96 ウェルガラスボトムプレート (Iwaki glass) あるいは 96 CytoWell plate (Nalge Nunc International, Rochester, NY) に、1 ウェルあたり 80,000 細胞となるよう希釈して移した。細胞の計数は、トーマ血球計算盤を用いて行った。さらに約 24 時間培養した後、MCL のアッセイを行うウェルにおいては、アッセイバッファー (第 2 章 2-2-4 に記載) で希釈した 5 μ M fura-2/AM (Invitrogen) 100 μ l を負荷すると同時に MCL を細胞に負荷し、37°C にて遮光下で 30 分静

置した。続いてアッセイバッファーで洗浄した後、100 μ l のアッセイバッファーで置換した。この状態で室温にて 10 分以上静置した後、目的の pH になるようにあらかじめ調整したアッセイバッファーを 100 μ l 加えて刺激した (図 3-3)。本文中および図中には、刺激後の pH を表記した。pH の調整は 500 mM のクエン酸溶液を用いて行った。その他のウェルについては、5 μ M fura-2 100 μ l を負荷し、37°Cにて遮光下で 30 分静置した。続いてアッセイバッファーで洗浄した後、100 μ l のアッセイ用バッファーで置換した。室温にて 10 分以上静置した後、2×濃度に調整した味刺激溶液を 100 μ l 加えて刺激した。

灌流装置を用いたアッセイでは、トランスフェクションの約 6 時間後に、細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (AGC techono glass Co., Chiba, Japan) に播種し、40~46 時間後に 100 nM MCL を 5 μ M fura-2 AM と同時に負荷し、37°Cにて 30 分間遮光して浸した。その後、アッセイバッファーで洗浄した後に、2 ml のアッセイ用バッファーで置換し、室温にて 10 分間静置した。続いて、流速 8 ml/分で灌流し、酸性バッファー (pH 5.0) または 10 mM アスパルテーム溶液で刺激を行った。それぞれの刺激は 16 秒間行った。

340 nm 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 10-2 (Sutter, San Rafael, CA)、MicroMax 冷却 CCD カメラ (Princeton Instruments, Trenton, NJ)、蛍光倒立顕微鏡 IX-70 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて測定した。蛍光画像は、3 秒または 4 秒おきに味刺激溶液投与後、約 60 秒間記録し、MetaFlour ソフトウェア (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて解析した。細胞内カルシウム濃度変化は、2 種の励起波長における蛍光強度の比 (F_{340}/F_{380}) の変化で決定した。味刺激後 60 秒以内に F_{340}/F_{380} が 0.15 より増加した細胞を、応答細胞と定義した。結果は、顕微鏡の視野中およそ 1000 細胞あたりの応答細胞数を数えることで定量化した。ただし、図 3-6、図 3-7 においては、pH 7.4 における 10 mM アスパルテームへの応答細胞数に対する相対値で表記した。

3-2-8 甘味受容体安定発現細胞株の構築と細胞培養

当研究室にて下記の方法で作出した細胞株を用いた (Imada et al., 2010)。この安定発現細胞株の応答の EC_{50} 値と、官能評価の結果から導きだされた認識閾値との間には強い相関があることが認められている (今田修士論文)。

安定発現細胞株の作出には Flp-In System (Invitrogen) を使用した。これは配列特異的リコンビナーゼである Flp リコンビナーゼを用いて目的遺伝子を培養細胞のゲノム中に組み込む手法である。目的の遺伝子を pcDNA5/FRT (Invitrogen) に挿入したコンストラクトを、Flp リコンビナーゼを発現させるプラスミド pOG44 とともに Flp-In 293 細胞にトランスフェクションし、その後は Invitrogen 社のプロトコールに従い、ハイグロマイシン B を用いた選抜を行った。コンストラクトは、EF-1 α プロモーター制御下で hT1R2、Internal Ribosome Entry Site (IRES) 2 配列、G16gust44 を発現し、CMV プロモーター制御下で hT1R3、IRES 2 配列、

G16gust44 を発現するよう作出したコンストラクトを用いた。コンストラクトの作製にあたっては、DNA 断片が長くライゲーションが困難な場合には、In-Fusion PCR Cloning Kit (Clontech) を利用した。選抜した細胞株は、10%FBS (Invitrogen) を含む低グルコース (1.0 g/l) DMEM (SIGMA) を用いて、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。

この安定発現細胞株は、fura-2、FLIPR Calcium 4 Assay Kit (Molecular Devices) のいずれを用いたアッセイにおいても、NCL 以外の甘味物質に対し、甘味受容体一過的発現細胞を用いて得られる EC₅₀ 値とほぼ同じ値を示すことを確認した (データは示さない)。但し NCL に対しては、fura-2 を用いたアッセイでは、一過的発現細胞を用いて得られる EC₅₀ 値 (0.99 μM) に比べて、安定発現細胞株は大きく異なる EC₅₀ 値 (>100 μM) を示し (データは示さない)、後述の FLIPR Calcium 4 Assay Kit (Molecular Devices) を用いた場合のみ一過的発現細胞とほぼ等しい EC₅₀ 値を NCL に対して示したため (データは示さない)、安定発現細胞株を用いた実験においては FLIPR Calcium 4 Assay Kit を使用することとした。

中性における MCL のアンタゴニスト活性の解析 (図 3-9A) には、この甘味受容体安定発現細胞株を用いた。トランスフェクションの手間が省けること、後述の FlexStation3 を用いて簡便な測定が可能であることが理由である。Flp-In 293 細胞は酸性では非特異的な応答を示す傾向があり、作製した安定発現細胞についても酸性での測定は不可能であったが、pH 7.4 では解析が可能であったため (図 3-4)、使用した。

3-2-9 FlexStation3 を用いたウェルベースアッセイ

甘味受容体安定発現細胞株を用いた実験 (図 3-9A) においては、FlexStation3 (Molecular Devices) を用いて、蛍光性カルシウム指示薬を負荷した細胞にリガンド溶液を投与し、その蛍光強度の経時変化を測定した。

100 mm ディッシュで培養している細胞を 0.25%トリプシン処理後、ディッシュから剥がして DMEM に懸濁した。トーマ血球計算盤を用いて細胞数を数え、1 ウェルあたり 80,000 個になるよう、96 ウェルプレート (black wall CellBIND surface; CORNING) に播き、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。約 24 時間後、この細胞をアッセイ用バッファーで洗浄し、同バッファーに溶解した FLIPR Calcium 4 Assay Kit (Molecular Devices) を、27°Cにて遮光して 45 分負荷した。MCL による他の甘味物質への応答抑制を調べるため、蛍光性カルシウム濃度指示薬の負荷と同時に MCL (30 nM) を負荷 (プレインキュベーション) した条件、負荷しない条件の両方で実験を行った。アッセイは 27°Cで行い、485 nm で励起したときの FLIPR Calcium 4 Assay Kit の蛍光 (525 nm) を 2 秒ごとに測定した。測定開始から 20 秒後に 2×濃度に調整したリガンド溶液 100 μl を細胞に投与し、120 秒間にわたり、経時的な蛍光強度変化を測定した。データ解析は、FlexStation3 によって得られた蛍光の経時変化から、蛍光強度の最大値と最小値の差分を算出してこれを細胞の応答と定義した。この値をプロ

ットし、ソフトウェア Clampfit 9.2 (Molecular Devices) を用いてヒルの式 $f(x) = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / (1 + (x/EC_{50})^h)$ で近似した。x はリガンド濃度、h は Hill 係数を示す。

3-2-10 官能試験

MCL が他の甘味物質の味に与える効果を官能評価により調べた。6 人の評価者は実験 1 時間前から食事を控え、水以外は口にしないようにした。初めに評価者は、0.1 mM、0.5 mM、2.0 mM のアスパルテーム溶液を 300 μ l ずつ味わい、これらの甘味を覚えた。続いて NCL (40 μ M) を味わい、15 秒以内に生じる甘味を、先に味わったアスパルテーム溶液の甘さと比較し、評価した。MCL による NCL の甘味の阻害効果を調べる実験においては、先に述べた 3 種類のアスパルテーム溶液を味わい、甘味を覚えた後、300 nM の MCL 溶液 2 ml を舌に 1 分間保持させ、その後 NCL (40 μ M) を味わい、15 秒以内に生じる甘味を評価した。甘味の評価は、以下の 7 段階で得点付けした。

7: 2.0 mM アスパルテーム溶液より甘い

6: 2.0 mM アスパルテーム溶液と同じ

5: 0.5 mM・2.0 mM アスパルテーム溶液の間

4: 0.5 mM アスパルテーム溶液と同じ

3: 0.1 mM・0.5 mM アスパルテーム溶液の間

2: 0.1 mM アスパルテーム溶液と同じ

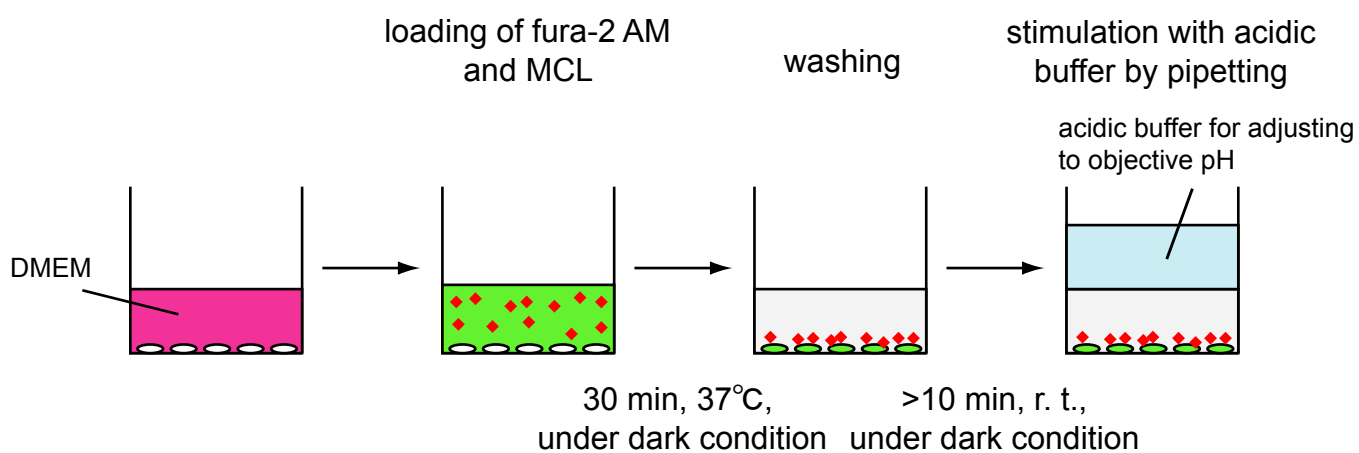
1: 0.1 mM アスパルテーム溶液より甘くない

MCL の有無による甘味スコアは、Wilcoxon 検定により有意差を評価した。

表3-1 コンストラクトの作製に使用した鋳型とプライマーの組み合わせ

| construct name | | 1st PCR template | | primer sequence (5'—3') |
|----------------|-----|------------------|----|--------------------------|
| h/h/m T1R2 | (N) | hT1R2 | as | CTTCGTGCCACTCCAGGAAG |
| | (C) | mT1R2 | s | CTTCCTGGAGTGGCACGAAG |
| h/m/m T1R2 | (N) | mT1R2 | as | CATAGGGATCGTGTTGTTAACGGT |
| | (C) | h/h/m T1R2 | s | TCCATGTGTTCTAAGAGTTGCC |
| m/m/h T1R2 | (N) | mT1R2 | as | CCTCATGCCATTCCAGGAAG |
| | (C) | hT1R2 | s | CTTCCTGGAATGGCATGAGG |

(N)は1st PCRでpEAK10 S2と目的のコンストラクトに特異的なアンチセンスプライマー(as)により増幅を行った断片を、(C)は1st PCRでpEAK10 ASと目的のコンストラクトに特異的なセンスプライマー(s)により増幅を行った断片を表す。



- hT1R2-hT1R3-expressing HEK293T cells
- ◆ MCL

図3-3 MCLのアッセイ法の概要図

hT1R2、hT1R3およびキメラGタンパク質導入細胞に、37°Cにてfura-2 AM (5 μ M) とMCLを同時に負荷し、遮光下で30分静置した。アッセイバッファーで置換した後、室温で10分以上静置し、酸性バッファーの刺激による受容体の活性化を測定した。図には、96ウェルプレートの中の1つのウェルの模式図を示す。