

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

MCL の酸誘導性甘味活性を評価するためには、酸性条件で応答を定量的に測定できる評価系が必要である。NCL の酸誘導性甘味活性の評価においては、G タンパク質として G15Gi3 (G15 の C 末端 5 残基を Gi3 の対応する残基に置換) を導入した際には NCL の pH 依存的な甘味活性を評価できるのに対し、G16gust44 (G16 の C 末端 44 残基を gustducin の対応する残基に置換)(Ueda et al., 2003)を導入した際には pH 依存的な甘味活性の評価ができない、すなわち導入する G タンパク質によって酸性条件での応答パターンが異なるという報告がある(Nakajima et al., 2008)。そのため、MCL の酸誘導性甘味活性の評価系を構築するにあたって、まず受容体とともに導入する G タンパク質の検討を行った。広範囲な GPCR と共役することが知られている G15 および G16(Offermanns and Simon, 1995)のキメラ G タンパク質であり、過去に T1R ファミリーの機能解析にも用いられている(Jiang et al., 2005b; Jiang et al., 2004; Winnig et al., 2005)、G15Gi3、G16gust44、G16Gi3 (G16 の C 末端 5 残基を Gi3 の対応する残基に置換) の 3 種類の変異体を検討した (図 3-5A)。

官能試験において、MCL の味覚修飾活性は 1 時間以上にわたって持続することから(Kurihara and Beidler, 1969)、MCL は舌の味細胞に強い結合によって保持されていることが予想された。そこで、培養細胞アッセイ系においてもこの現象を再現することができるのではないかと考え、MCL (100 nM) を hT1R2+hT1R3 導入細胞にあらかじめプレインキュベーションさせ、酸刺激に対する応答を調べた。MCL のプレインキュベーションは蛍光カルシウムイオン濃度指示薬 fura-2 AM の負荷と同時に 30 分行い、アッセイバッファーに置換した後、イメージングを行った (図 3-3、図 3-5B)。

G15Gi3、G16gust44 をそれぞれ hT1R2-hT1R3 と共発現させた細胞は、pH によって甘味の変化しない物質であるアスパルテームに対して(Schiffman et al., 2000)、中性条件と酸性条件で同程度の応答を示すことが報告されている(Nakajima et al., 2008)。G15Gi3、G16gust44 いずれの G タンパク質を用いた場合においても、一過的に hT1R2、hT1R3 と共発現させると、MCL をプレインキュベーションした細胞は酸性バッファー (pH 5.0) に対して応答を示す一方で、中性バッファー (pH 7.0) に対しては応答を示さなかった (図 3-5B)。しかし、G16gust44 を用いた細胞は、pH 5.5 より pH が低い条件では、非特異的な応答が見られる傾向があったため (図 3-5B)、G15Gi3 の方が、より広範囲にわたる pH において細胞応答の定量的評価が可能であると考えた。また G16Gi3 については、酸性条件でアスパルテームに対し応答が見られず、MCL をプレインキュベーションした細胞も、酸性バッファーの刺激に対し応答を示さなかったことから (データは示さない)、MCL の酸誘導性甘味活性の評価には不向きであると判断した。なお、MCL をプレインキュベーションしなかった

hT1R2+hT1R3 導入細胞および、MCL をプレインキュベーションしたトランスフェクションを行っていない細胞は、酸性バッファー (pH 5.0) に対し、全く応答を示さなかった (図 3-5B)。以上の理由から、これ以降、MCL による受容体の活性化を計測するにあたっては、G15Gi3 を導入に用いた。

続いて、MCL の酸誘導性の甘味活性の pH 依存性を詳細に解析するため、プレインキュベーションに用いる MCL の濃度 (30 nM) を固定して、pH 4.8~7.4 の範囲で細胞の応答を評価した。この結果、pH 6.5~7.4 ではほとんど応答せず、pH 4.8~6.5 の範囲においては、pH の低下に伴い、応答が増加した (図 3-6)。このことから、MCL による hT1R2-hT1R3 の活性化は pH が低下するに従い、強まることが示された。pH 5.7 のとき、最大応答 (pH 4.8 のときの応答) の約半分の応答を示した (図 3-6)。この pH-応答曲線は、伊藤らが示した官能試験の結果 (Ito et al., 2007) をよく反映しており、この系が酸誘導性の甘味活性の評価系として適切であると考えられた。

次に、MCL の濃度と細胞応答の関係を解析した。様々な濃度の MCL を細胞にプレインキュベーションし、酸性バッファー (pH 5.0) に対する応答を測定した。hT1R2+hT1R3 導入細胞に対し、0.01~300 nM の MCL をプレインキュベーションしたところ、MCL の濃度が大きいほど強い応答を示し、30 nM のときに応答はほぼ飽和に達し、0.01~30 nM の濃度範囲において濃度依存的な応答を示した。MCL による活性化の EC₅₀ 値は 0.44 nM であった (図 3-7)。中性バッファー (pH 7.0) に対しては、pH 5.0 で十分な応答を示す濃度 (100 nM) においても、応答を示さなかった (図 3-5B)。

3-3-2 MCL の味覚修飾活性の持続性の評価

官能評価では、MCL を舌に保持させた後 1~2 時間にわたって、酸を口にするたびに強い甘味を感じることができ、その甘味は時間とともに弱まる (Kurihara and Beidler, 1969)。この持続性について、細胞評価系において検証を行った (図 3-8)。hT1R2+hT1R3 導入細胞を、十分な応答を示す濃度である 100 nM (図 3-7 参照) の MCL でプレインキュベーションした後、アッセイバッファーで灌流し、pH 5.0 のバッファーで 3 回繰り返し刺激した。その結果、3 回の酸刺激後にポジティブコントロールであるアスパルテームに応答した細胞 (51±15 細胞) のうち半数近く (19±6.4 細胞) が応答を示した。さらに、同バッファーの投与刺激を繰り返したところ、2 回目、3 回目の刺激に対し、最初の刺激に応答した細胞の一部 (それぞれ 11±1.2 細胞、5.3±0.33 細胞) が応答した (n=3) (図 3-8A)。MCL をプレインキュベーションしなかった細胞では、同じ条件において、アスパルテームに応答するものの、酸刺激による応答は見られなかった (図 3-8B)。これらの結果から、MCL は中性においては、hT1R2-hT1R3 への結合を維持しており、受容体を繰り返し活性化することが示唆された。

3-3-3 中性において MCL が hT1R2-hT1R3 の活性化に与える効果

序において述べたように、もう一つの味覚修飾タンパク質 NCL は、酸性でアゴニストとして hT1R2-hT1R3 に作用する一方、中性ではアンタゴニストとして機能する(Nakajima et al., 2008)。pH 依存的なアゴニスト-アンタゴニストの平衡により、NCL の味覚修飾活性を説明できたことから、MCL も中性においてアンタゴニストとして機能するのかどうかを検証した。

甘味受容体安定発現細胞株を MCL (30 nM) でプレインキュベーションした後、NCL (3 μ M、EC₅₀ 値付近の濃度) を投与すると、NCL による hT1R2-hT1R3 の活性化は抑制された。そこで、他の様々な甘味物質に対しても、MCL がこのような抑制効果を示すのかどうか検証したところ、試した全ての甘味タンパク質、低分子甘味物質に対し、有意な応答の抑制が観察された (図 3-9A)。但し、抑制の程度には差が見られ、ソーマチンやブラゼイン、NHDC については、完全には応答は抑制されなかった。

続いて、この現象が官能評価においても確認されるかどうかを調べた。その結果、MCL を舌に保持させた後に NCL を味わうと、MCL を保持させていないときに比べ、NCL 自身の甘味は弱まった (図 3-9B)。このことから、あらかじめ hT1R2-hT1R3 に結合した MCL が、NCL の受容体への結合を阻害していることが示唆された。以上の結果より MCL は NCL 同様、中性 pH ではアンタゴニストとして機能することが示唆された。

3-3-4 MCL の受容に必要な hT1R2-hT1R3 のドメインの同定

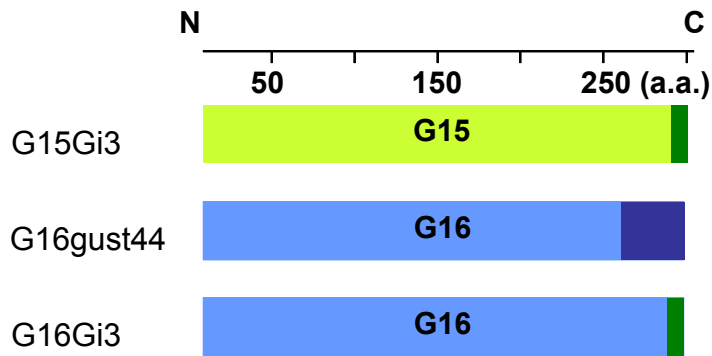
次に、MCL の受容に必要なドメインの同定を行った。序で触れたように、げっ歯類は MCL の甘味を認識していないと考えられている(Diamant et al., 1972)。そこで、MCL の動物種による感受性の違いについても T1R2-T1R3 のアミノ酸配列の違いで説明できるのではないかと予想し、hT1R2-hT1R3 とマウス甘味受容体 (mT1R2-mT1R3) のアミノ酸配列の相違に着目して、MCL の受容に必要な領域の同定を試みた。

まず、MCL の受容には、hT1R2 と hT1R3 のどちらが必要であるのかを調べるため、hT1R2-hT1R3、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 G15Gi3 とともに一過的に HEK293T 細胞に発現させ、図 3-3 に示す方法で酸性バッファー (pH 5.0) への応答を調べた (図 3-10A、B)。コントロールには、hT1R2-hT1R3 にも mT1R2-mT1R3 にも応答する D-トリプトファン、ヒト特異的な人工甘味料で、hT1R2 を介して受容されるアスパルテームを用いた。MCL をプレインキュベーションせずに酸性バッファーで刺激した際の応答をネガティブコントロールとした。その結果、hT1R2+hT1R3 導入細胞が MCL に応答を示すのに対し、mT1R2+mT1R3 導入細胞は、D-トリプトファンに反応を示す一方で、MCL には反応を示さなかった (図 3-10B)。また、hT1R2+mT1R3 導入

細胞は、MCL に応答を示した。mT1R2+hT1R3 導入細胞は、MCL のみならず、試したいずれの甘味物質にも応答しなかった。これらの結果から、MCL の受容には hT1R2 と hT1R3 の2つのサブユニットのうち、hT1R2 が必要であることが明らかとなった。

続いて、hT1R2 の3つのドメイン (ATD、CRD、TMD) のうち、どのドメインが MCL への受容に必要であるかを、ヒトとマウスのキメラ T1R2 を用いて調べた (図 3-11)。キメラ T1R2 には、h/h/m T1R2 (hT1R2 の ATD、CRD と mT1R2 の TMD から構成されるキメラ T1R2)、h/m/m T1R2 (hT1R2 の ATD と mT1R2 の CRD、TMD)、m/m/h T1R2 (mT1R2 の ATD、TMD と hT1R2 の CRD) の3種類を使用した。これらのキメラ T1R2 を hT1R3 と共発現させた細胞は、全体的に甘味物質に対する応答性が低かったため (図 3-11A)、mT1R3 と共発現させることでこれらの機能を調べた (図 3-11B)。h/h/m T1R2+mT1R3 導入細胞、h/m/m T1R2+mT1R3 導入細胞は酸性 pH で MCL に応答を示したが、m/m/h T1R2+mT1R3 導入細胞は MCL に応答を示さなかった (図 3-11B)。以上の結果から、MCL の受容には、hT1R2 の ATD が必要であることが示された。

A



B

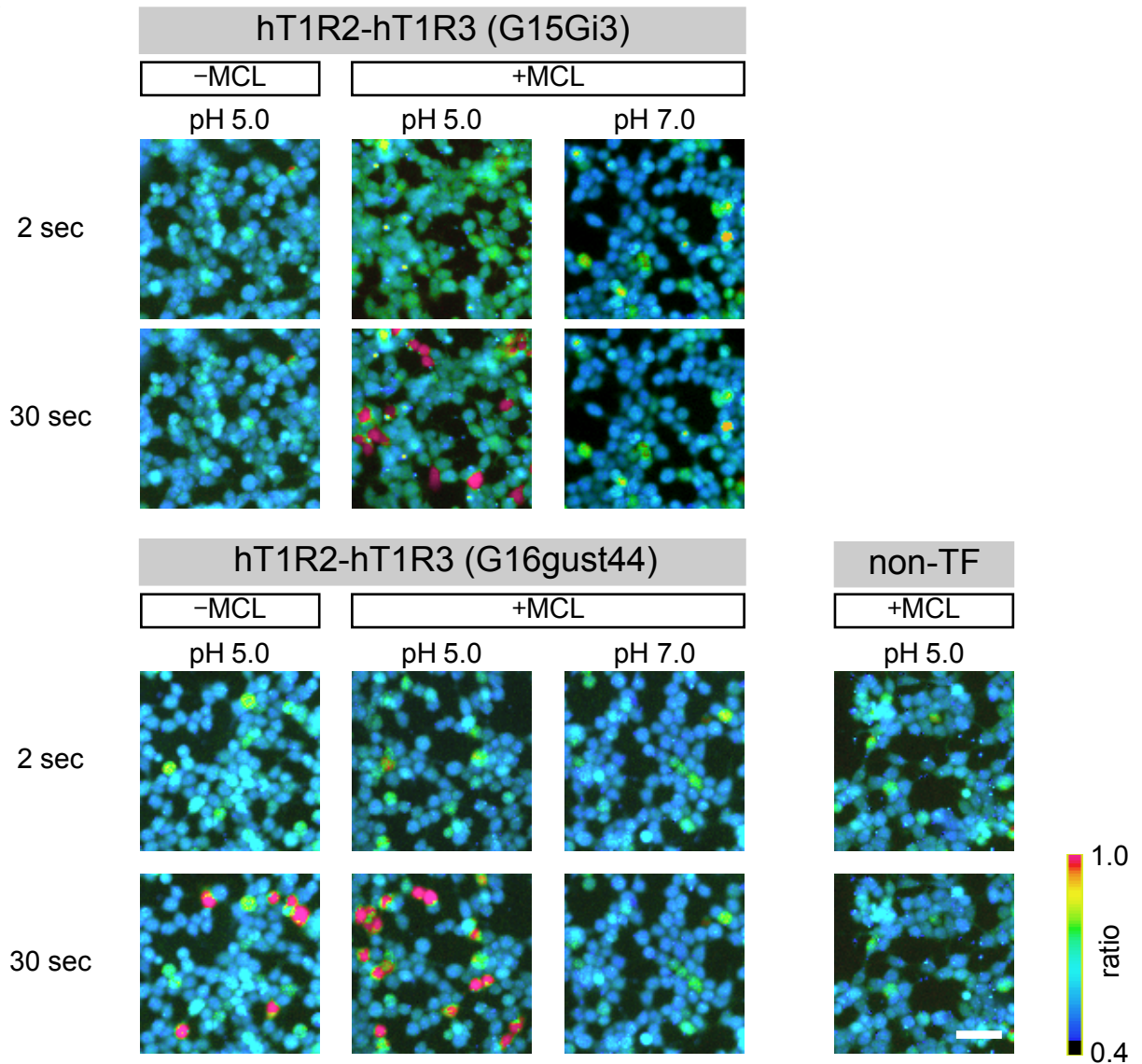


図3-5 hT1R2、hT1R3と共発現させるキメラGタンパク質の違いによるMCLへの応答性の変化
 (A) 検討に用いた3種類のキメラGタンパク質(G15Gi3、G16gust44、G16Gi3)の模式図
 (B) G15Gi3、G16gust44をhT1R2、hT1R3とともに発現させた細胞、およびトランスフェクションを行っていない細胞(non-TF)の、酸性バッファー(pH 5.0)または中性バッファー(pH 7.0)に対する応答。
 -MCL: MCLをプレインキュベーションしていない条件
 +MCL: MCLをプレインキュベーションした条件(G15Gi3は100 nM、G16gust44は30 nM)
 pHはリガンド投与後のpHを表記した。酸性バッファーを投与した直後(2秒後)および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 を示す。

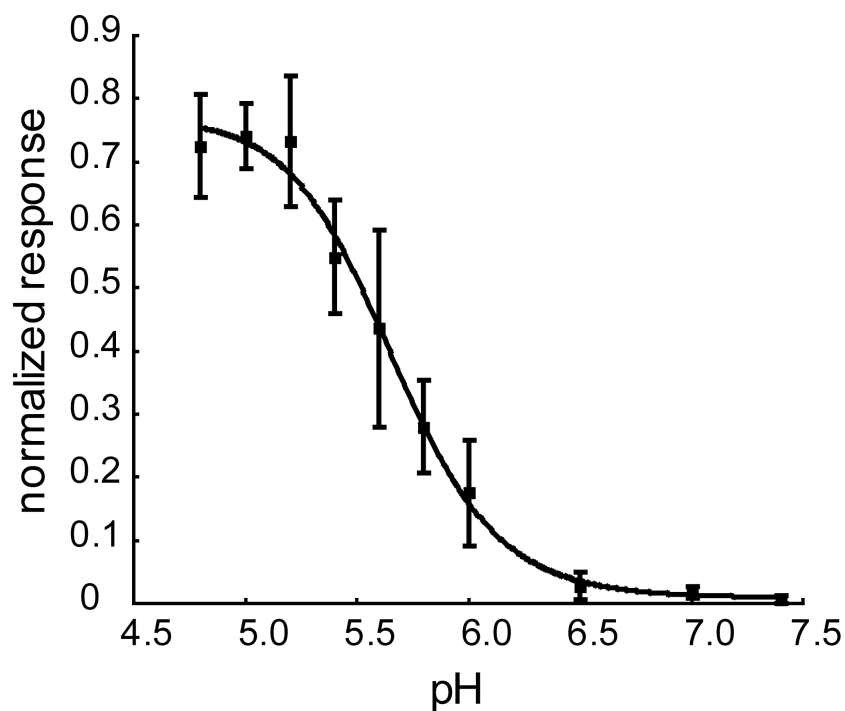


図3-6 培養細胞評価系を用いたMCLの酸誘導性の甘味活性のpH依存性
MCLへのpH依存的な応答。hT1R2、hT1R3とG15Gi3を共発現させたHEK293T細胞に対し、30 nM MCLのプレインキュベーションを行い、異なるpHのバッファーを投与した。応答細胞数は、pH 7.4の10 mMアスパルテームへの応答細胞数で標準化した。各点は独立した3~6回の実験の平均値±標準誤差を表す。

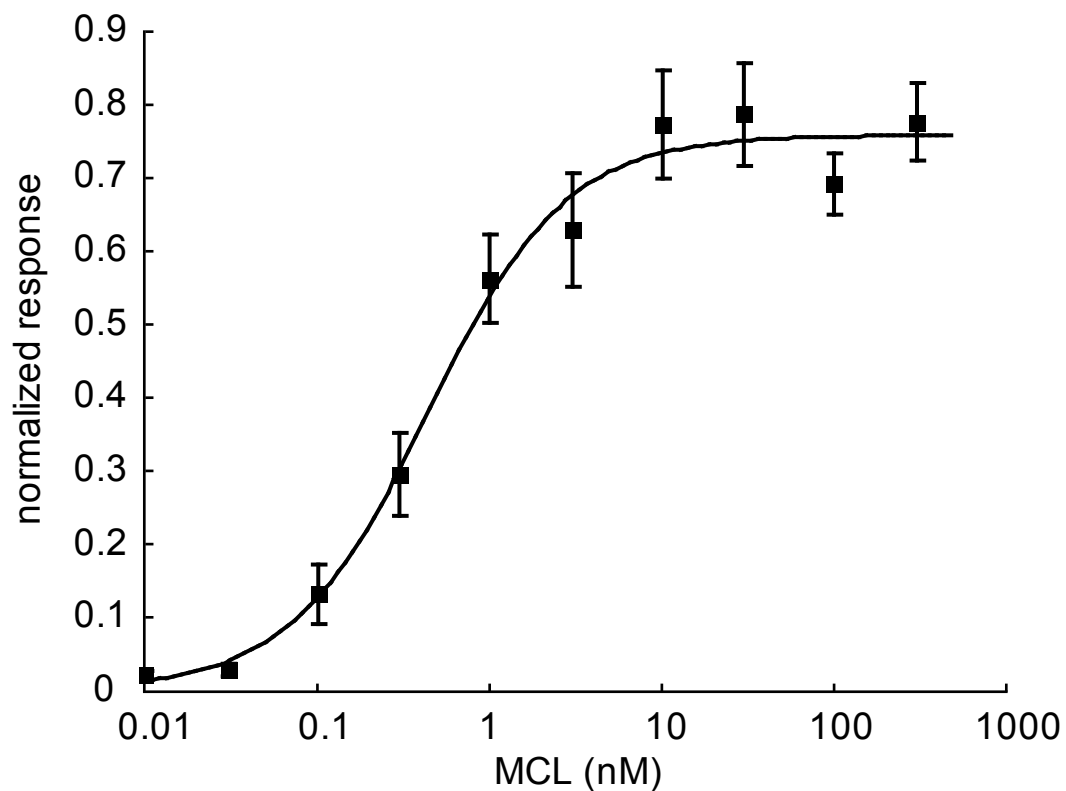


図3-7 pH 5.0におけるhT1R2+hT1R3導入細胞のMCLに対する濃度応答曲線
MCLの濃度は、プレインキュベーション時の濃度を表す。刺激後のpHがpH 5.0になるような酸性バッファを投与した。応答細胞数は、pH 7.4の10 mMアスパルテームへの応答細胞数で標準化した。各点は3回の独立した実験の平均値±標準誤差を表す。

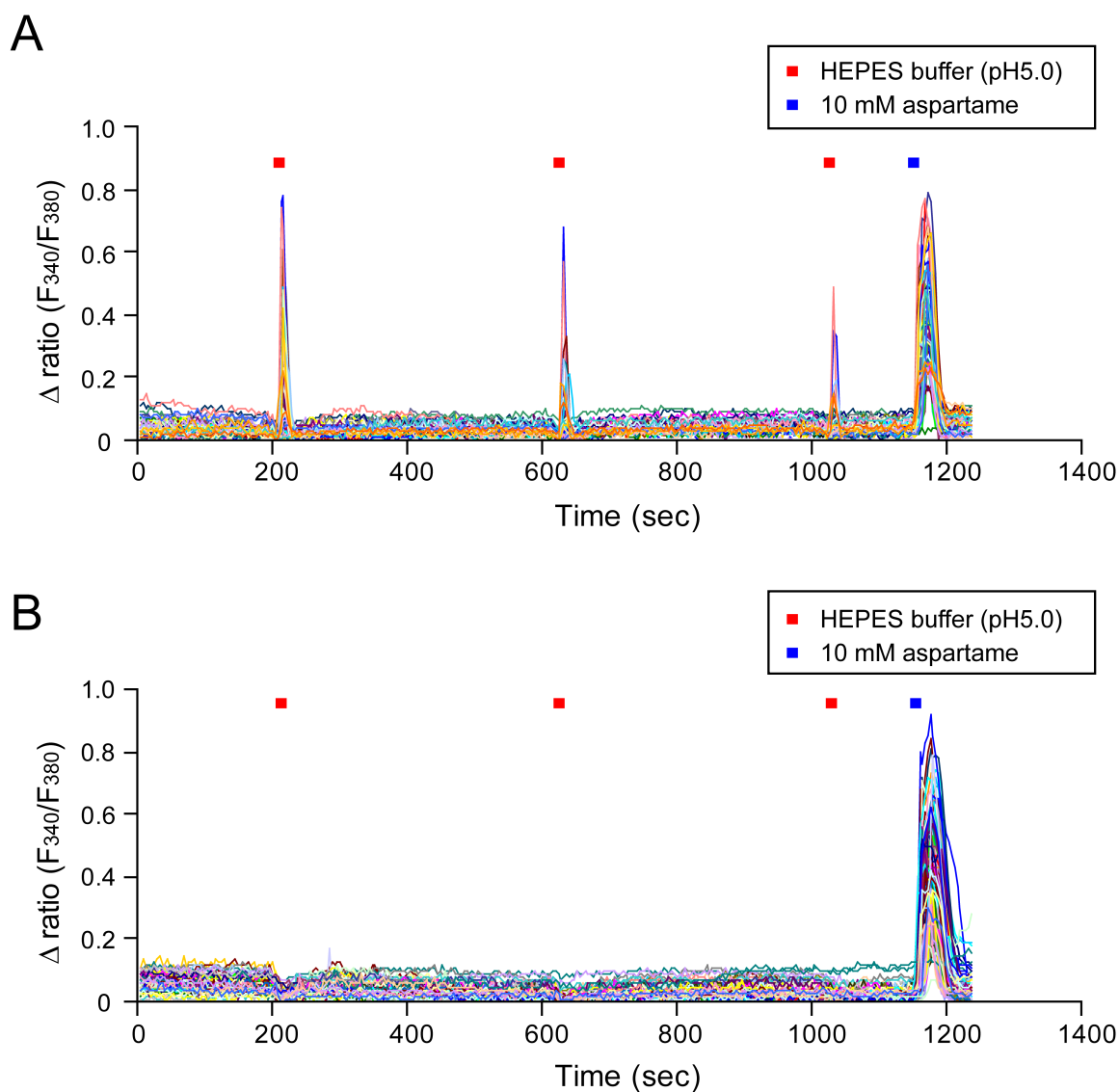


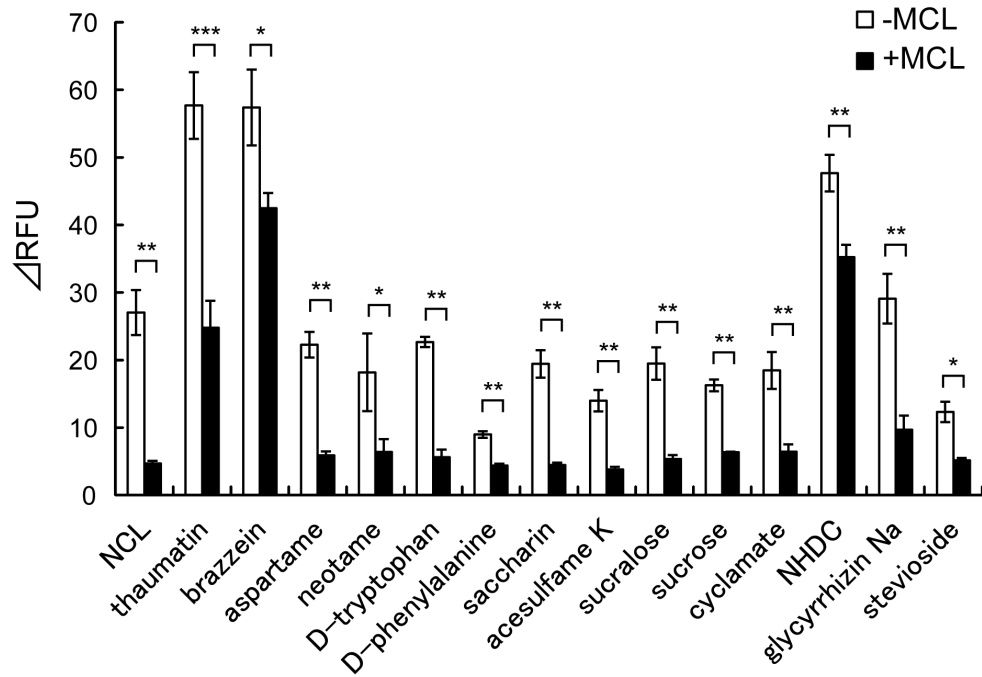
図3-8 培養細胞評価系を用いたMCLの持続性の評価

(A) MCL (100 nM) をプレインキュベーションしたhT1R2+hT1R3導入細胞の応答

(B) MCLをプレインキュベーションしていないhT1R2+hT1R3導入細胞の応答

灌流装置にて、8 ml/分で灌流した。トレースは各細胞のfura-2の蛍光強度比 (F_{340}/F_{380}) を示す。赤いバーは酸性バッファー (pH 5.0) の刺激、青いバーはアスパルテーム溶液 (10 mM) の刺激を示す。はじめに3回酸刺激を行った後、アスパルテームで刺激した。各溶液の刺激は、16秒間行った。図は3回行った実験のうち1回分のデータである。

A



B

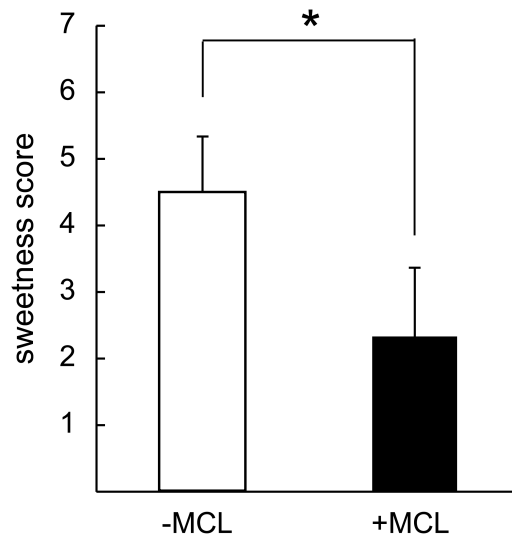


図3-9 MCLによる甘味応答の抑制

(A) MCLによるhT1R2+hT1R3導入細胞の甘味物質に対する応答抑制

pH 7.4におけるMCL (30 nM) 非プレインキュベーション時 (-MCL、白) およびプレインキュベーション時 (+MCL、黒) における、各甘味物質に対する甘味受容体安定発現細胞株の応答。各リガンドの最終濃度は以下の通り。

NCL, 3 μ M; thaumatin, 0.1%; brazzein, 0.02%; aspartame, 1 mM; neotame, 5 μ M; D-Tryptophan, 3 mM; D-phenylalanine, 15 mM; saccharin, 300 μ M; acesulfame K, 1 mM; sucralose, 100 μ M; sucrose, 100 mM; cyclamate, 3 mM; NHDC, 2 mM; glycyrrhizic acid, 300 μ M; stevioside, 100 μ M

各バーは独立した4~5回の実験の平均値±標準誤差を表す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Studentのt検定)

RFU: relative fluorescence units

(B) 官能試験におけるMCLによるNCLの甘味の抑制効果

各バーは平均値±標準偏差 (n=6) を表す。* $p < 0.05$ (Wilcoxon検定)

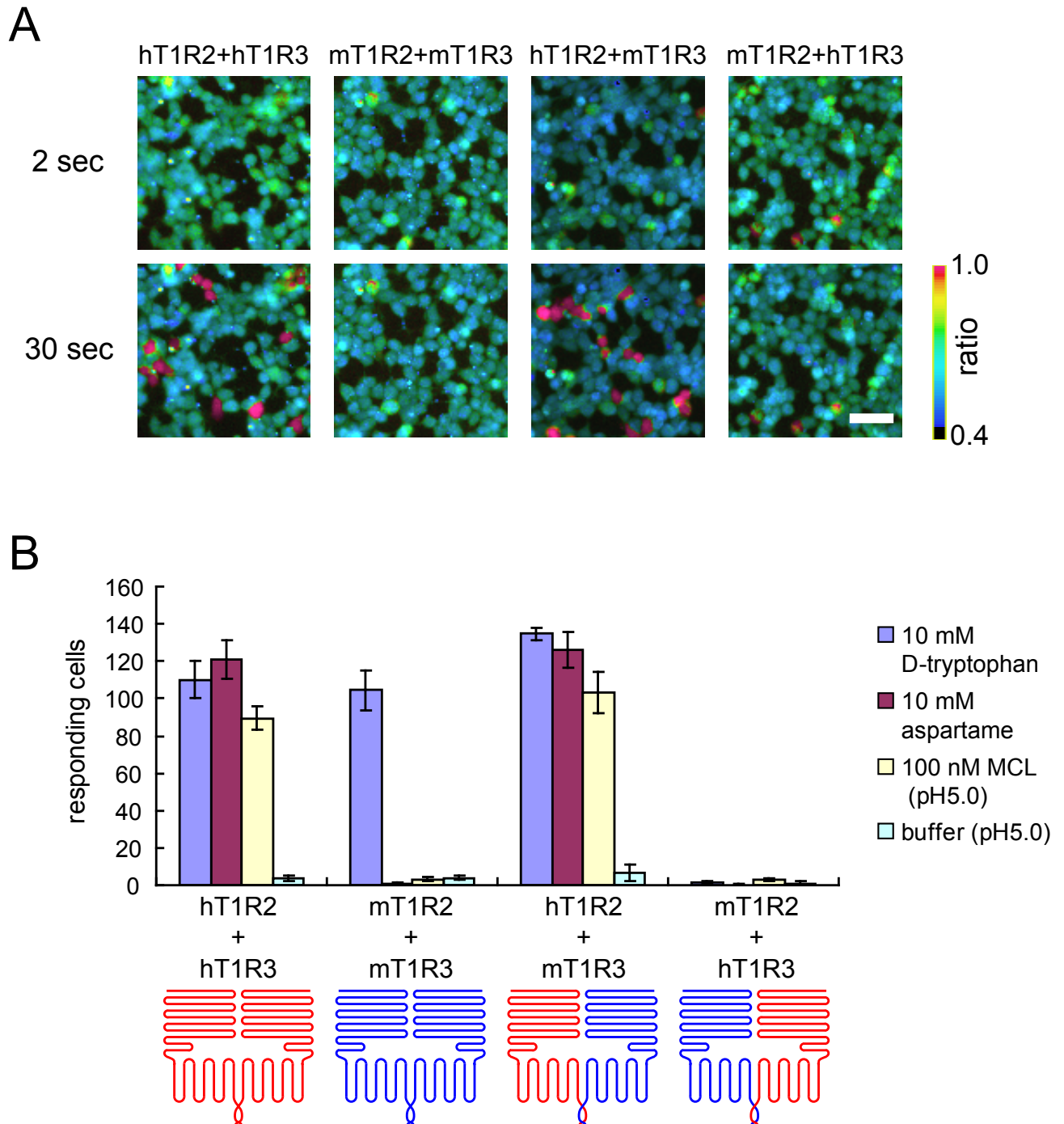


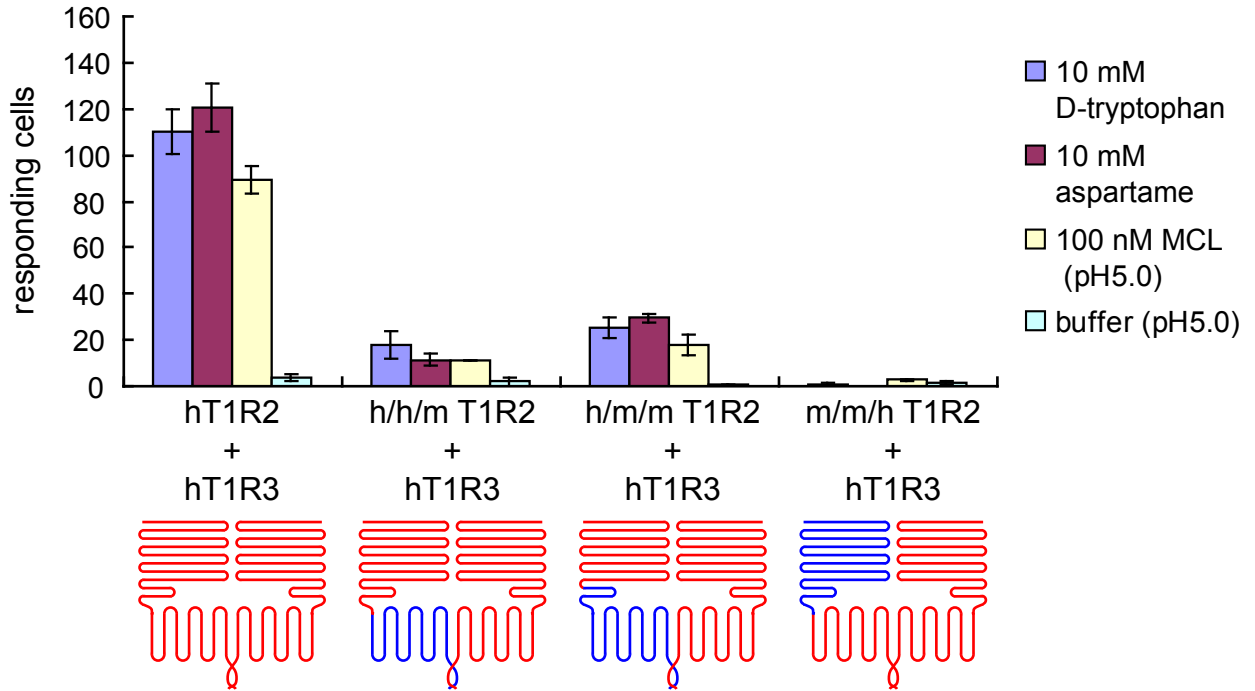
図3-10 MCLの受容に必要なサブユニットの同定

(A) MCL (100 nM) をプレインキュベーションした、hT1R2+hT1R3、mT1R2+mT1R3、hT1R2+mT1R3、mT1R2+hT1R3各導入細胞の酸性バッファー (pH 5.0) に対する応答。刺激後、2秒後と30秒後の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 を示す。

(B) hT1R2+hT1R3、mT1R2+mT1R3、hT1R2+mT1R3、mT1R2+hT1R3各導入細胞の、D-トリプトファン (終濃度10 mM)、アスパルテーム (10 mM) に対する応答と、100 nM MCLプレインキュベーション時、MCL非プレインキュベーション時の酸性バッファー (pH 5.0) に対する応答。各バーは独立した3回の実験の平均値 \pm 標準誤差を表す。

受容体の模式図は左側がT1R2、右側がT1R3を示す。ヒトとマウスの配列に相当する領域をそれぞれ赤色、青色で示した。

A



B

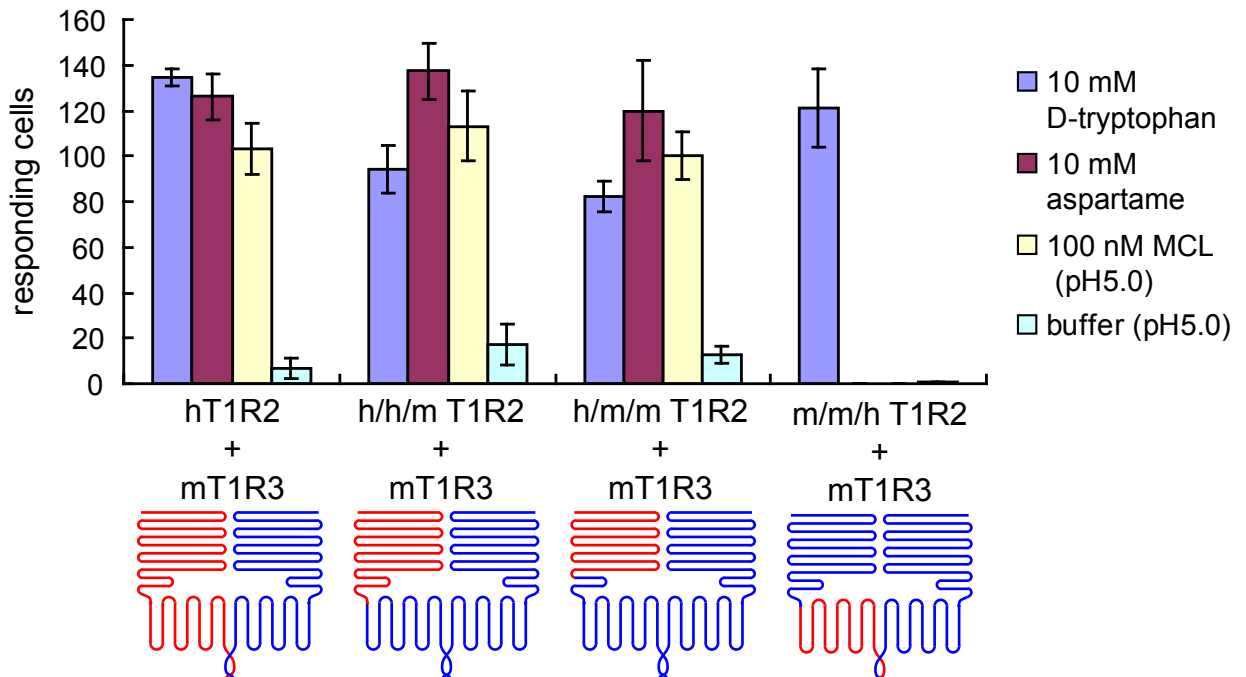


図3-11 hT1R2におけるMCLの受容に必要なドメインの同定

(A) h/h/m T1R2+hT1R3、h/m/m T1R2+hT1R3、m/m/h T1R2+hT1R3導入細胞のD-トリプトファン（終濃度10 mM）、アスパルテーム（10 mM）に対する応答と、100 nM MCLプレインキュベーション時、MCL非プレインキュベーション時の酸性バッファー（pH 5.0）に対する応答。各バーは独立した3回の実験の平均値±標準誤差を表す。左にコントロールとして、hT1R2+hT1R3導入細胞の応答を示した。

(B) h/h/m T1R2+mT1R3、h/m/m T1R2+mT1R3、m/m/h T1R2+mT1R3導入細胞の応答。リガンドは上に同じ。各バーは独立した3回の実験の平均値±標準誤差を表す。左にコントロールとして、hT1R2+mT1R3導入細胞の応答を示した。

受容体の模式図は左側がT1R2、右側がT1R3を示す。ヒトとマウスの配列に相当する領域をそれぞれ赤色、青色で示した。

3-4 考察

本章では、MCL の酸誘導性の甘味活性の評価系を構築することに成功した。この評価系を用いて、MCL の味覚修飾活性が hT1R2-hT1R3 との相互作用によること、甘味活性を示さない中性においても MCL が hT1R2-hT1R3 と結合し、他の甘味物質による受容体の活性化を抑制していることを見出した。さらに、MCL の受容に必要な hT1R2-hT1R3 の領域を同定した。

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

官能試験では、MCL は pH 6.0 より低い pH 範囲において pH が低いほど強い甘味が感じられる(Ito et al., 2007)。今回、培養細胞を用いた *in vitro* のアッセイにおいて、pH 4.8 以下では、非特異的な応答が生じるために測定できなかったものの、pH 6.0 より低い pH 範囲においては、pH が低くなるにつれて受容体が強く活性化された(図 3-6)。これは官能試験の結果によく一致しており、今回構築した方法は、MCL の酸誘導性甘味活性を客観的に評価する方法として妥当であると考えられる。また、活性を示す濃度については、官能評価において、約 3 nM から味覚修飾活性を感じはじめ、10 nM で最大活性の半分の甘味を感じるという報告があるのに対し(Kurihara and Terasaki, 1982)、今回の培養細胞評価系で得られた EC₅₀ 値は 0.44 nM であった(図 3-7)。多少の濃度のずれは、*in vitro* のアッセイにおいて 30 分にわたって MCL をプレインキュベーションしていることに因るのかもしれないが、pH 依存性、濃度依存性において、官能試験をよく反映していると言える。他の甘味物質は、 μM や mM 程度の濃度で受容体に作用することが報告されていることから(Schiffman et al., 2008)、MCL はこれらに比べて非常に低濃度で作用し、hT1R2-hT1R3 と高い親和性で結合することが示唆される。

さらに、味覚修飾活性の持続性についても評価することに成功した。灌流装置を用いたアッセイにおいて、MCL をプレインキュベーションした細胞は、酸性バッファーによる刺激に対して繰り返し応答を示した(図 3-8A)。これは、酸を口にすると甘味を感じるという官能評価の結果を反映していると考えられる。MCL が舌に残っているために甘味が持続するという推論はこれまでもあったが、MCL が受容体への結合を維持し、酸溶液による刺激のたびに MCL が活性化になり甘味を生じることを、初めて実験的に示した結果である。繰り返し応答が見られたことから、MCL の持続性には hT1R2-hT1R3 が十分であることが示唆されたが、アスパルテーム応答細胞数に対するミラクリン応答細胞数の割合は、非灌流実験(96 ウェルプレートを用いた方法でのアッセイ)における割合に比べて少なかった(図 3-6、図 3-8)。これは、灌流実験では 8 ml/分という唾液より速い速度で液が流れており、その流れによって、受容体から MCL が時間とともに少しずつ解離しているためでは

ないかと考えている。

3-4-2 MCL の味覚修飾活性のメカニズム

本研究において、上述の評価系を用いて MCL について得られた結果を以下にまとめる。

(1) MCL は中性では hT1R2-hT1R3 を活性化しないが、酸性になるにつれて pH 依存的に hT1R2-hT1R3 を活性化する (図 3-6)

(2) 灌流実験において、繰り返される酸刺激に応答を示す (図 3-8)

(3) 中性において、MCL は他の甘味物質による hT1R2-hT1R3 の活性化を抑制する (図 3-9)

(1)と(3)の結果から、MCL も NCL 同様、アゴニスト (酸性条件) とアンタゴニスト (中性条件) の平衡状態にあると推測され、また(2)の結果からは、中性において、MCL が培養細胞の表面に発現した hT1R2-hT1R3 に保持されており、それが受容体を繰り返し活性化することが示唆される。これらを考え合わせると、MCL が味覚修飾活性を示すメカニズムとして、図 3-12 に示すモデルが考えられる。すなわち、一度 MCL を味わうと、MCL は舌上の hT1R2-hT1R3 に不活性型 (アンタゴニスト) で保持され、酸を味わうと受容体上で活性型 (アゴニスト) に変化し、pH が中性になると不活性型に戻る (図 3-12A)。またこの状態の MCL は他の甘味物質による受容体の活性化を抑制する (図 3-12B)。MCL は、一度不活性型に戻った後も受容体への結合を維持しており、pH が酸性になる度に受容体を繰り返し活性化できる (図 3-12A)。

MCL と NCL は、アミノ酸配列に相同性が見いだされず、共通する機能的なモチーフもないが、中性と酸性で不活性型と活性型の平衡状態にあり、pH に依存したアゴニストとアンタゴニストの平衡状態にあるというメカニズムは共通であることが示唆される。この平衡状態により、両者の味覚修飾活性が生じるものと考えられる。以前の研究により、NCL においては His 残基が pH 依存的なアゴニスト、アンタゴニスト間の構造変化において、重要な役割を果たしていると考えられている (Morita et al., 2009; Nakajima et al., 2008)。一方で、MCL の 30 番目と 60 番目の His 残基を Ala にすると、味覚修飾活性が消失することから、MCL においても His 残基が味覚修飾活性に関与していると示唆されている (Ito et al., 2007)。したがって、His 残基が味覚修飾活性に関与している点においても両者は共通であり、His 残基のプロトン化が引き金となり味覚修飾活性が生じるという共通のメカニズムが働いていると推察される。

3-4-3 MCL と NCL の相違点

上述のとおり、MCL と NCL は、pH に依存したアゴニストとアンタゴニストの平衡状態にあるという点において共通であると考えられたが、以下に述べる 3 点において違いが見られた。

まず第一に、受容体を活性化する pH 範囲の違いである (図 3-13)。NCL は pH 4.7~7.6 の範囲において、pH 依存的に hT1R2-hT1R3 を活性化したのに対し(Nakajima et al., 2008)、MCL は pH 6.5 より高い pH では受容体を活性化せず、pH 6.5 より低い範囲において pH 依存的に受容体を活性化した (図 3-6)。この結果は、これら 2 種類の味覚修飾タンパク質の間で、アゴニスト-アンタゴニストの平衡状態に pH 感受性の違いがあることを示唆する。官能評価においては、MCL そのもの自身は甘味を呈さず、また水を甘くする作用を持たないのに対し、NCL はそのもの自身が甘味を呈し、水を甘くする作用がある(Kurihara, 1992)。これも pH 感受性の違いによるものであると考えられる。細胞を用いた *in vitro* の評価で見られた pH 感受性の違いは、両者のこのような違いに対応しているものと考えられる。

第二に、両者は受容体の活性化に hT1R2-hT1R3 の異なる領域を必要とする。NCL への応答には hT1R3 の ATD が必要であったのに対し (図 2-5)、MCL への応答には hT1R2 の ATD が必要であった (図 3-11)。NCL の受容に hT1R2 が必要であるかは明確にすることができなかつたため、hT1R2 の共通領域を両者が必要とする可能性は否定できないが、同じ味覚修飾活性という性質を有していながら、両者が応答に必要とする受容体の領域が異なるというのは非常に興味深い。今後、結合部位をさらに特定することで、両者の hT1R2-hT1R3 への作用機構を調べることは意義深いと考える。結合部位の同定にあたっては、MCL や T1Rs の ATD の立体構造の解明が望まれる。NCL は、井深・森田らが結晶構造解析に成功し、pH により構造が変化することを示唆する結果を得ている(Shimizu-Ibuka et al., 2006)。MCL についても、pH による構造変化を示唆するデータが得られれば、アンタゴニストとアゴニストとの平衡状態が pH に依存するという仮説を裏付けることができると考える。非常に興味深い性質を持つこれらのタンパク質と受容体との結合様式の解明は、クラス C GPCR 一般の活性化・阻害機構の研究において、大きな意味を持つであろう。

第三に、親和性の違いである。本研究から、MCL は受容体に強く結合していることが示唆された。味覚修飾活性の持続は NCL においても見られることから、本研究で構築したアッセイ法 (図 3-3) が NCL にも適用可能かどうかを検証した。hT1R2-hT1R3 を活性化するのに十分な濃度である 10 μ M の NCL をプレインキュベーションし、MCL の場合と同様、非灌流実験 (96 ウェルプレートを用いた方法でのアッセイ) を行ったところ、酸性バッファー (pH 5.0) 刺激による受容体の活性化は見られなかった (図 3-14A)。また灌流実験においても、応答は見られなかった (図 3-14B)。このことから、MCL は NCL に比べて、hT1R2-hT1R3 とより強く結合していることが示唆された。この結果は、官能試験・細胞評価系において、MCL が nM オーダーで活性を示すのに対し、NCL は μ M 以上でないと活性を示さないという作用濃度の違いを反映しているものと考えられる。また、官能評価における NCL の味覚修飾活性の持続時間が 30~60 分程度であるのに対し、MCL では 60~120 分程度である(Kurihara and Beidler, 1969; Yamashita et al., 1995)。このことから、両者の受容

体への親和性には違いがあると考えられ、本実験における結果は両者の持続性の違いを反映したものであるかもしれない。

3-4-4 MCL の甘味受容体活性化抑制効果

中性において、MCL は試した全ての甘味物質による受容体の活性化を抑制した (図 3-9A)。この作用は NCL に対して、官能評価においても観察された (図 3-9B)。今回調べた甘味物質のうち、アスパルテーム、D-Trp は hT1R2 の ATD (第 4 章参照)、ブラゼインは hT1R3 の CRD、シクラメート、NHDC は hT1R3 の TMD にそれぞれ作用することが報告されている (Cui et al., 2006)。また第 2 章で示したとおり、NCL は hT1R3 の ATD を必要とする。一方、MCL による受容体の活性化には hT1R2 の ATD が必要であった (図 3-11)。これらの結果を考え合わせると、MCL は全ての甘味物質を競合的に阻害しているとは考えにくく、非競合的な阻害剤として機能していると推察される。

MCL の他の甘味応答に対する抑制効果は、過去にも示唆されている。Brouwer らは、アカゲザルにおいて、舌を MCL で処理した前後でショ糖、キシリトール、ソーマチンに対する神経応答が減少したと報告している (Brouwer et al., 1983)。またヒトにおいては、ショ糖の甘味の感じ方に、MCL 処理前後で統計学的に有意な差は得られないとする官能試験の報告がある一方 (Bartoshuk et al., 1969)、MCL の前後で、ショ糖の閾値が 2 倍増加するという官能試験の報告もある (Kurihara et al., 1969)。このことから、その差は小さいが、ヒトでも MCL による甘味応答の抑制があるのではないかと Brouwer らは考察している (Brouwer et al., 1983)。今回得られた結果は、Brouwer らの報告を支持するものである。

甘味物質であるサッカリン Na やアセスルファム K は、低濃度においては濃度依存的な甘味活性を示すが、高濃度では苦味受容体に作用し苦味を生じると同時に (Horne et al., 2002; Kuhn et al., 2004)、甘味活性が減弱し、甘味阻害剤として働く。また、甘味阻害剤のラクチゾールや高濃度のサッカリン Na を味わった後に水を味わうと、水が甘く感じられるという現象が知られていたが、近年、この現象は、これらの物質が hT1R2-hT1R3 の hT1R3 TMD にインバースアゴニストとして作用することが原因であると明らかになった (Galindo-Cuspinera et al., 2006)。ラクチゾールが全ての甘味物質の応答を完全に抑制するのに比べて、抑制の度合いは弱いですが、MCL は試した全ての甘味物質による hT1R2-hT1R3 の活性化を抑制した (図 3-9A)。したがって、MCL は hT1R2-hT1R3 のパーシャルインバースアゴニストである可能性が考えられる。サッカリン Na、アセスルファム K は、甘味を引き起こす結合部位とは別に、甘味阻害剤として作用する部位が、hT1R3 の TMD に存在する (Galindo-Cuspinera et al., 2006)。したがって、これまでに知られている阻害物質 (ラクチゾール、高濃度のサッカリン Na、アセスルファム K) の結合部位は全て hT1R3 の TMD に存在する。活性化に hT1R2 の ATD を必要とする MCL が、一体どのように他の甘味物質による

受容体の活性化を阻害するのは興味深い。

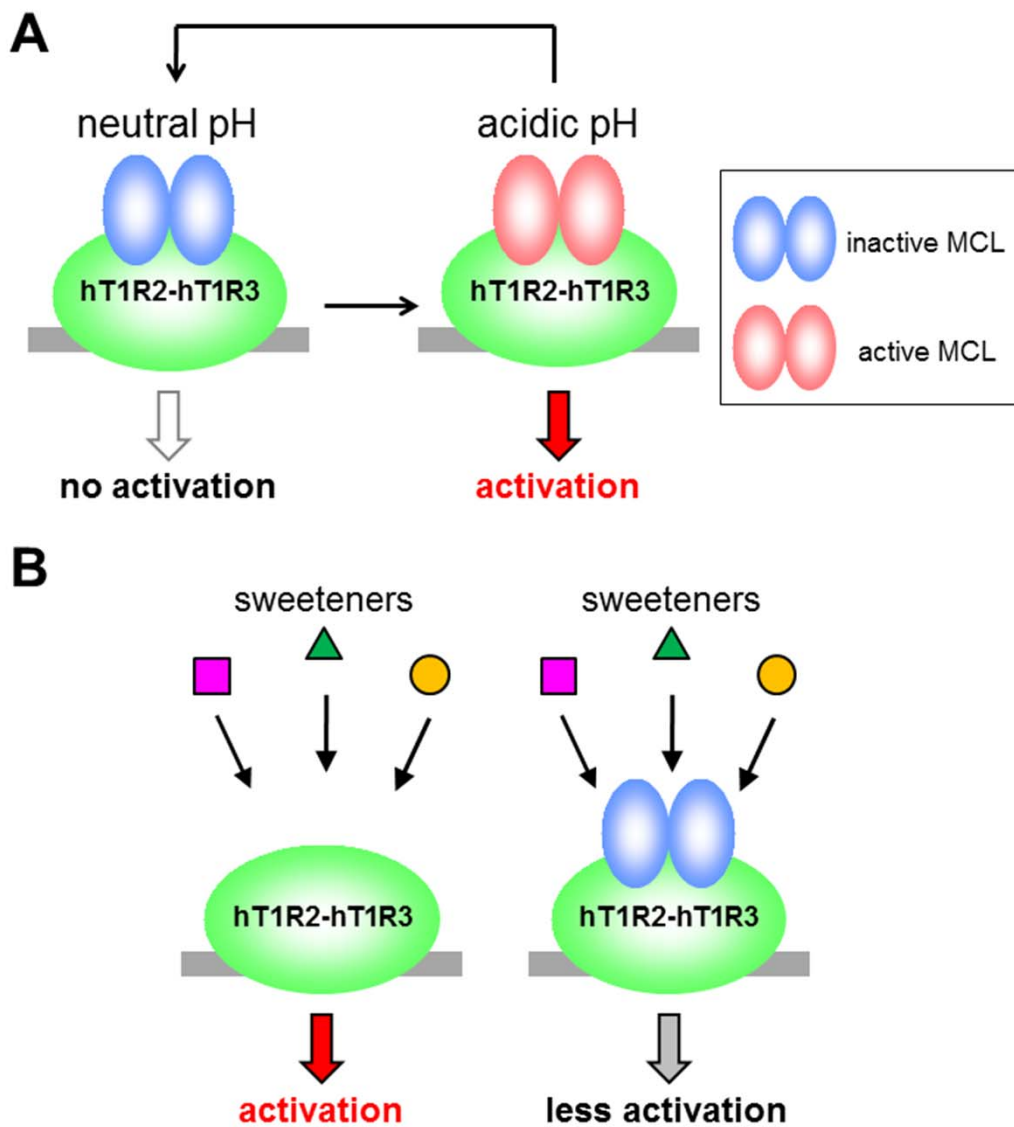


図3-12 MCLの味覚修飾活性のモデル

(A) MCLは中性でhT1R2-hT1R3に結合し(左)、酸性で受容体を活性化する(右)。pHが中性に戻ると、MCLは受容体上で不活性型に変化する。

(B) 多様な甘味物質がhT1R2-hT1R3を活性化するが、中性において、MCLはこの活性化を阻害する。

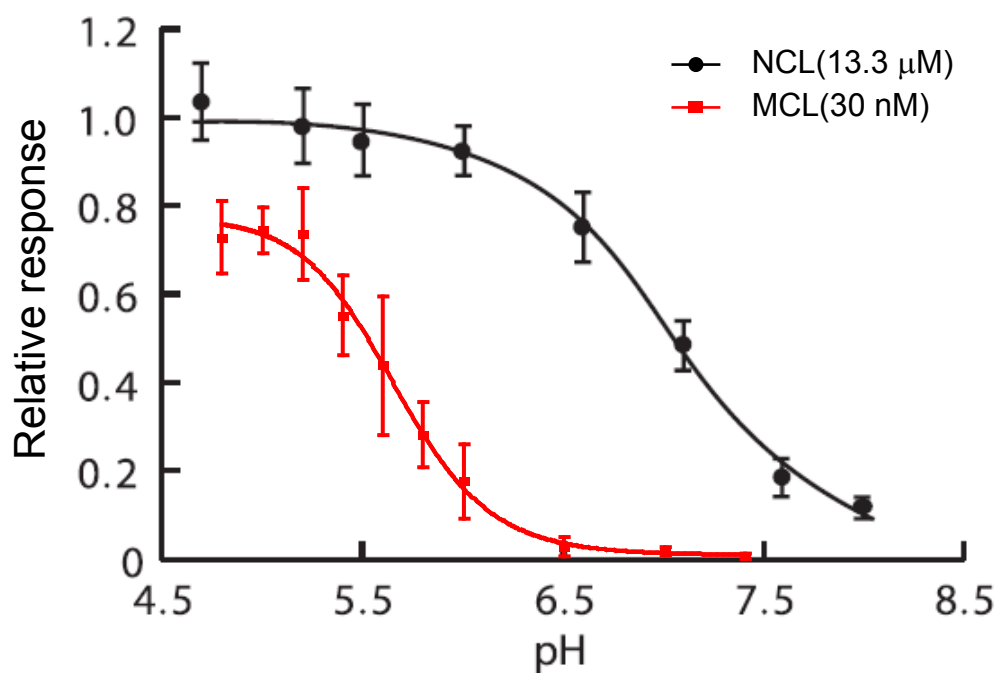


図3-13 MCLとNCLに対するhT1R2+hT1R3導入細胞の応答のpH依存性
 hT1R2+hT1R3導入細胞のMCLおよびNCLに対するpH-応答曲線(MCLは30 nM、NCLは13.3 μMに濃度を固定)を重ね合わせたもの。MCLのpH-応答曲線は図3-6に示したものと同一である。NCLは、酸溶液に溶解したNCL溶液に対する応答を見たもので、リガンド濃度、pHの値はそれぞれ、刺激後の値を示す。NCLのpH-応答曲線はNakajima *et al.*, *FASEB J.*, 2008より引用した。縦軸は、MCL、NCLに対する応答細胞数を、それぞれ10 mMアスパルテーム、6.7 mMアスパルテーム(いずれも応答飽和濃度)への応答細胞数で相対値化した値を示す。

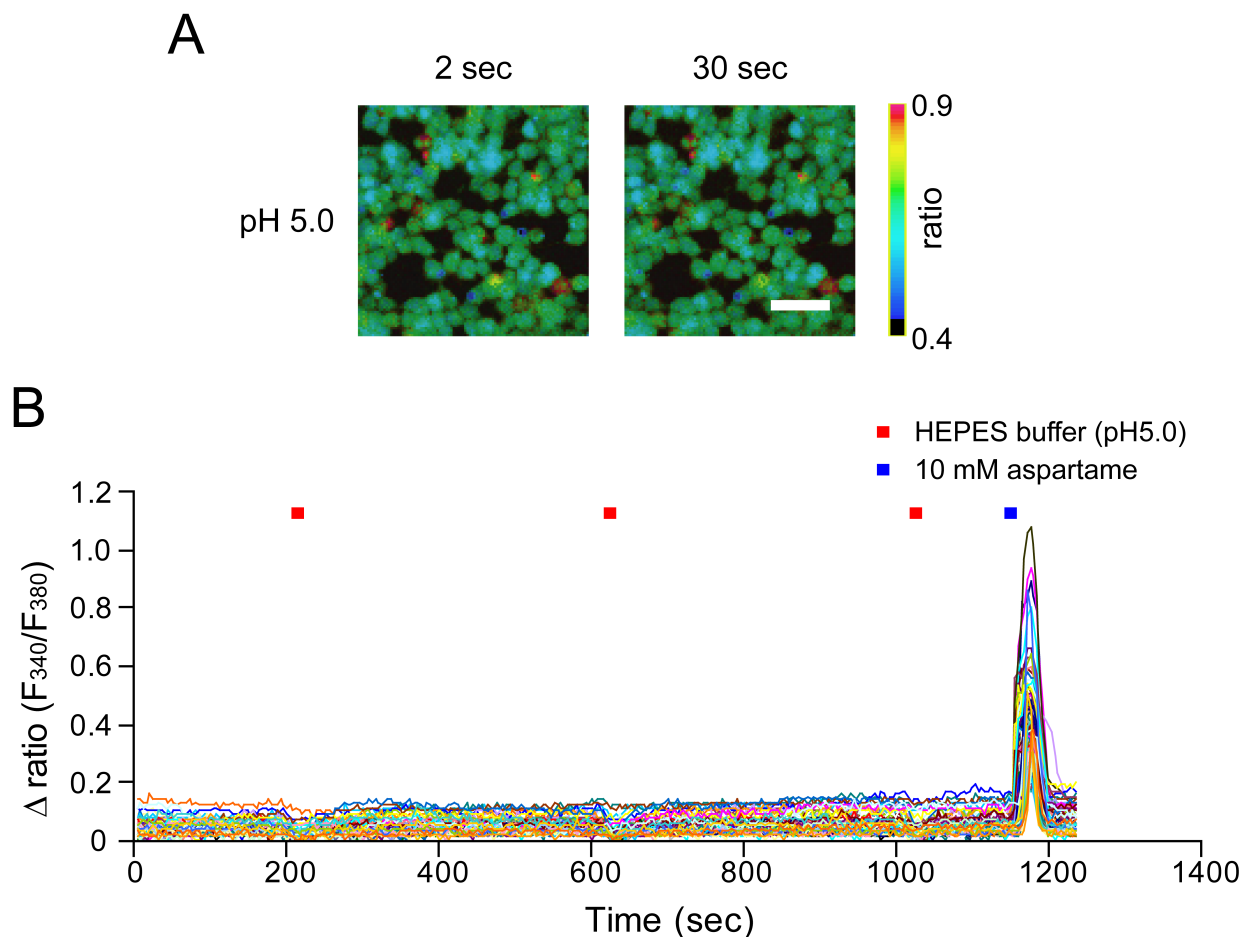


図3-14 NCLはhT1R2-hT1R3への結合を長時間維持できない

(A) NCL(10 μ M)を図3-3の方法でプレインキュベーションした時の、hT1R2、hT1R3、G15Gi3を一過的に発現した細胞の、酸性バッファー(pH 5.0)に対する応答。

2秒後と30秒後におけるfura-2の蛍光強度比(F_{340}/F_{380})を疑似カラーで示した。スケールバーは50 μ mを示す。

(B) NCL(10 μ M)をプレインキュベーションした時の、hT1R2、hT1R3、G15Gi3を一過的に発現した細胞の、酸性バッファー(pH 5.0)に対する応答。

トレースは各細胞のfura-2の蛍光強度比(F_{340}/F_{380})を示す。赤いバーは酸性バッファー(pH 5.0)の刺激、青いバーはアスパルテーム溶液(10 mM)の刺激を示す。3回酸刺激を行った後、アスパルテームで刺激した。各溶液の刺激は、16秒間行った。図は3回行った実験のうちの1回分のデータである。

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

4-1 序

hT1R2-hT1R3 が受容する低分子甘味物質には、糖や糖アルコール、D-アミノ酸、人工甘味料などがあり、これらの分子量や化学的性質（電荷、親疎水性）は様々である（表 1-2）。これら低分子甘味物質と hT1R2-hT1R3 との相互作用については、本研究を始めた当初、一部の低分子甘味物質についてしか報告がなく(Xu et al., 2004)、性質の異なるこれらの物質を、hT1R2-hT1R3 がどのように認識しているのかについては不明であった。

1960 年代から甘味受容体が同定される 2001 年までは、甘味化合物およびその類縁体の各々の甘味活性をもとに、構造と活性の関係が調べられた(Temussi, 2007)。どのような構造の化合物が甘味を呈するのか追究された結果、様々な甘味物質が合成されることとなった。また一方で、これら化合物の共通構造から、当時まだ発見されていなかった受容体の架空の活性部位構造が予測され、AH-B 則をはじめとした甘味分子のモデルが提唱された(Shallenberger and Acree, 1967)。AH-B 則では、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 2.5~4.0 Å であると考えられる。同様の AH-B ユニットの甘味受容部位にも存在し、それぞれの AH-B ユニットの対をなすように水素結合を行うことで、甘味物質が認識されると考えられていた(Meyers and Brewer, 2008; Shallenberger and Acree, 1967)。

T1R2-T1R3 が甘味受容体として同定されてからは、甘味受容体の変異体作製に基づく受容機構の解明へと手法がシフトした。この手法を用いられるようになった大きな要因の一つが、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) の ATD の結晶構造の解明であろう。mGluR1 は、2000 年にクラス C GPCR として初めて X 線結晶構造解析が成功した分子であり(Kunishima et al., 2000)、mGluR3、mGluR7 の ATD、CRD についても相次いで構造が解明された(Muto et al., 2007; Tsuchiya et al., 2002)。これらの構造をもとに、同じクラス C GPCR ファミリーに属する T1R2-T1R3 の ATD や CRD の分子モデリングを行うことが可能となり、以来、この分子モデルに基づき、甘味受容体と甘味物質の結合様式が議論されるようになった。

mGluR1 の ATD は lobe1 (LB1) と lobe2 (LB2) とよばれる 2 つの lobe から構成されており、venus fly-trap (ハエ取り器) 様の構造をとっている (図 4-1A、B)。ホモダイマーである mGluR1 は、リガンドである Glu の結合有無によって、open-open 構造、open-closed 構造の二つの平衡状態にある。リガンド非結合時には両サブユニットの LB1、LB2 が開いた open-open 構造を、リガンド結合時にはどちらか一方の LB1、LB2 が閉じた closed-open 構造をとり、この closed-open 構造が mGluR1 の活性化状態に寄与しているものと考えられる (図 4-1 A、B) (Kunishima et al., 2000)。hT1R2、hT1R3 はそれぞれ mGluR1 と 23%、24% のアミノ酸配列相同性があり、同じクラス C GPCR ファミリーに分類されることから、mGluR1 と

似通った構造をとることが予想される。すなわち、Glu が mGluR1 の LB1 と LB2 から構成される溝に結合するように (図 4-1B、C)、低分子甘味物質もまた T1Rs の LB1 と LB2 から構成される溝に結合し、リガンド非結合状態では open-open 構造を、リガンド結合状態では closed-open 構造をとり、受容体が活性化される可能性が考えられる。しかし、mGluRs が基本的には Glu およびその誘導体のみをリガンドとするのに対し、前述のように低分子甘味物質は疎水性、電荷、分子量などの点において性質が異なる。例えば、糖が親水性の基質で電荷を帯びていないのに対し、スルファミン酸の誘導体である人工甘味料のサッカリン Na やアセスルファム K は、疎水性の性質を有し、電荷を帯びている。D-Trp やアスパルテームは、アミノ酸およびその誘導体である (図 4-2 参照)。またこれらの作用濃度は異なり、人工甘味料のアスパルテームやスクラロースが、天然のショ糖に比べて、重量あたり 2 桁ほど強い活性を示すことも興味深い (Schiffman et al., 2008)。

T1R2 と T1R3 は、共発現により初めて甘味に対する応答が確認されることから、ヘテロマーを形成し、甘味受容体として機能していると考えられているが (Li et al., 2002; Nelson et al., 2001)、その一方で、マウスでは T1R3 単独を培養細胞に発現させた場合でも、高濃度の糖に応答するという報告もあり (Zhao et al., 2003)、その詳細な活性化機構は不明な部分が多い。

甘味受容体発見以前から長年にわたり、人々は、糖の摂取量を抑えるため、ノンカロリーの甘味料の開発に取り組んできたが、現存する人工甘味料はいずれも後味が感じられ、その味質はショ糖の甘味とは異なると言われている。甘味受容体による甘味物質受容機構の分子レベルでの解明は、ショ糖に替わる新たな甘味物質の作出や、糖の甘味エンハンサーの探索において、非常に有益な情報となり得ると考えられる。

本研究では、一連の hT1R2 の変異体を用いたカルシウムイメージングと分子モデリングを用いたドッキングシミュレーションにより、hT1R2-hT1R3 における一部の低分子甘味部物質の相互作用作用を明らかにした。

なお、本研究における一連の分子モデリングは、新潟薬科大学の石黒正路教授ならびにサントリー生物有機科学研究所の益田勝吉主席研究員に行って戴いたものであり、培養細胞を用いた実験部分は筆者が行った。

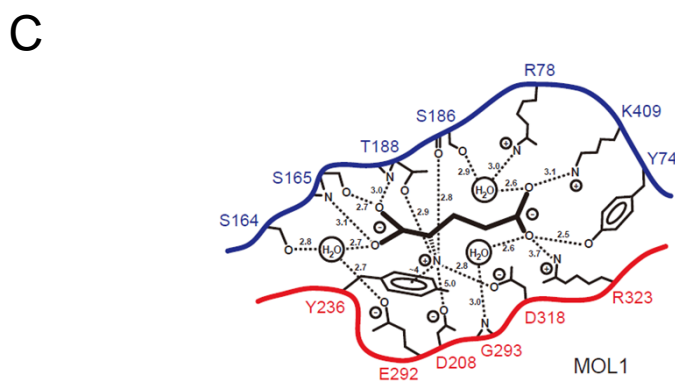
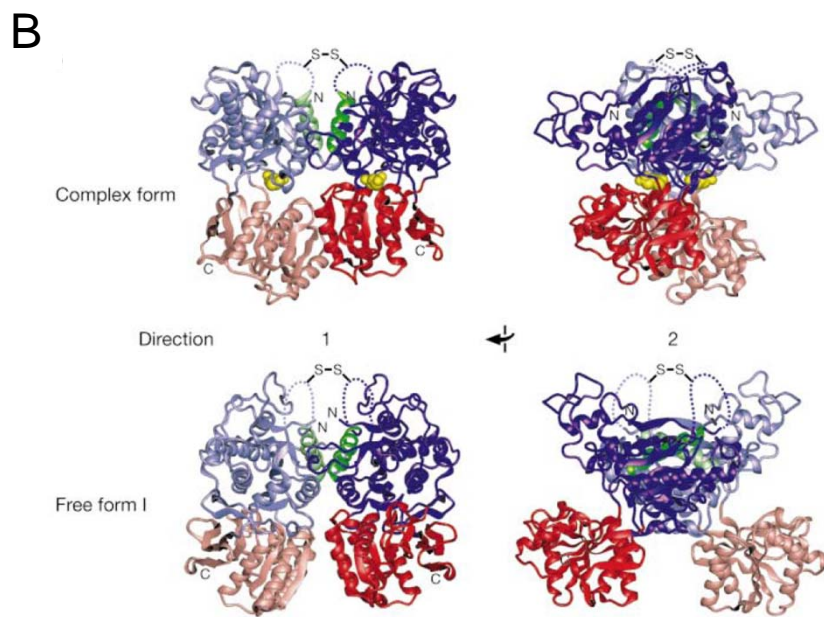
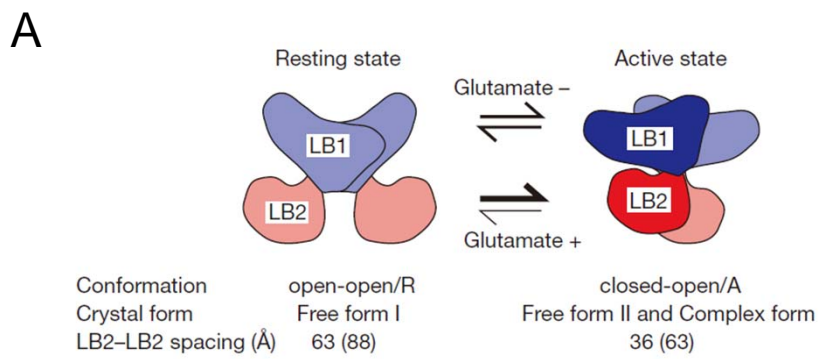


図4-1 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) の活性化機構

(A) mGluR1のATDの模式図。lobe1 (LB1)とlobe2 (LB2)から構成されるサブユニットのホモダイマーである。リガンド結合時にはopen-closed構造を、リガンド非結合時にはclosed-closed構造をとる。

(B) リガンド結合時(上)、非結合時(下)の結晶構造。黄色で示す分子はリガンドであるGluを示す。

(C) リガンド結合時の相互作用および分子間距離。

図はKunishima *et al.*, *Nature*, 2000より抜粋。

4-2 材料と方法

4-2-1 hT1R2 の点変異体の作製

S40、K65、Y103、D142、S144、S165、Y215、P277、D278、Y282、E302、S303、D307、E382、R383 の箇所を、それぞれ個々に Ala に置換した変異体を作製した。Y103、P277、R383 の残基については、Ala 以外のアミノ酸残基に置換した変異体も作製した。hT1R2 の各点変異体は、それぞれに特異的なプライマーを作製し、第 3 章 (3-2-4) に記載の方法と同様に作製した。

4-2-2 細胞培養

第 2 章 (2-2-5) に記載の方法と同様に行った。

4-2-3 トランスフェクション

導入する G タンパク質に G16gust44 を用いた以外は、第 2 章 (2-2-6) に記載の方法と同様に行った。

4-2-4 カルシウムイメージング法

第 2 章 (2-2-7) に記載の方法と同様に行った。

4-2-5 ヒト甘味受容体点変異体安定発現株の作製

ヒト甘味受容体安定発現株の作製は、第 3 章 (3-2-8) に記載の方法で行った。HEK293T 細胞を用いた一過的発現細胞の結果により、受容に参与していることが示唆されたアミノ酸残基の点変異体については、濃度応答曲線を解析するため、安定発現株を作製した。ヒト甘味受容体点変異体安定発現株の作製は、第 3 章 (3-2-8) に記載の方法に基づき、野生型 hT1R2 の cDNA の代わりに点変異体 hT1R2 の cDNA を用いて行った。安定発現株を作製した点変異体は、Y103A、Y103F、D142A、S144A、S165A、P277A、P277G、P277S、P277Q、D278A、E302A、D307A、E382A、R383H である。作製した安定発現細胞株は、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。

4-2-6 FlexStation3 を用いたウェルベースアッセイ

安定発現株を用いた実験については、FlexStation3 (Molecular Devices) を用いて、以下の方法で応答を測定した。

100 mm ディッシュで培養している細胞を 0.25%トリプシンで消化し、ディッシュから剥

がして DMEM に懸濁、細胞懸濁液を作製した。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 plate; CORNING) に播き、CO₂ インキュベーター内で培養した。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、37°C にて遮光して 60 分負荷した。アッセイは 37°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、EC₅₀ 値を算出した。x はリガンド濃度、h は Hill 係数を示す。

4-2-7 分子モデリング

hT1R2 と hT1R3 の ATD の分子モデリングは、活性型 (Glu 結合型) と不活性型 (Glu 非結合型) の mGluR1 の ATD の結晶構造 (PDB ID はそれぞれ 1EWK, 1EWT) (Kunishima, Nature, 2000) をもとに行い、ヘテロダイマーの構造モデルは、mGluR1 の ATD との配列相同性に基づき作製した。ヘテロダイマーの活性型モデルの作製においては、hT1R2 に mGluR1 の closed 型を、hT1R3 に mGluR1 の open 型の構造を適用した。また不活性型モデルの作製においては、mGluR1 の open 型の構造を使用した。各ヘテロダイマーの構造は、Discover 3 (Accelrys Inc., CA, USA) を用いて、エネルギーが最小となるように最適化した。

mGluR1 において Glu が結合する溝に、低分子甘味物質が結合するようなモデルを hT1R2 に適用し、Discover 3 を用いた分子動力学シミュレーションにより、エネルギーが最小となるような複合体モデルを得た。

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

T1R ファミリーと同じクラス C GPCR に属する mGluR1 は ATD で Glu を受容する (Kunishima et al., 2000)。また旨味物質は T1R1-T1R3、甘味物質は T1R2-T1R3 でそれぞれ受容される (Chandrashekar et al., 2006)。これら 2 点から、T1R1 の ATD が旨味物質受容に、T1R2 の ATD が甘味物質受容に関わるのではないかと予測した。本研究では、甘味受容に関与する部位を探索するため、以下の実験を行った。

mGluR1 の Glu 結合領域に対応する、hT1R2 の LB1 と LB2 から構成される境界面における甘味物質の結合様式を検討するため、hT1R2 ATD に点変異を導入し、図 4-2 に示す甘味物質応答への影響を調べた。mGluR1 のリガンド結合時の closed 構造をもとに、hT1R2 ATD の分子モデルを構築した後、hT1R2 と mGluR1 とのアラインメント (図 4-3) から、mGluR1 の Glu 結合に関与する残基に着目した。これらの残基の他、関与の可能性が示唆される残基も含め、計 15 残基 (S40、K65、Y103、D142、S144、S165、Y215、P277、D278、Y282、E302、S303、D307、E382、R383) に点変異を導入し (図 4-3A、B)、27 種類の点変異体を作製した (データは示さない)。各甘味物質への応答は、hT1R2 の点変異体と hT1R3、G16gust44 を一過的に発現させた HEK293T 細胞を用いたカルシウムイメージングにより計測した。点変異体を用いた結果から、15 残基中 10 残基 (Y103、D142、S144、S165、P277、D278、E302、D307、E382、R383) について、低分子甘味物質への応答が一部変化したこと (データは示さない)、その後の詳細な解析を進めた。R383 については、R383A がいずれの甘味物質にも応答しないノンファンクショナルな変異体であったことから (データは示さない)、その後の解析には R383H を用いた。

応答に変化が見られた 10 残基については、hT1R2 点変異体と hT1R3、G16gust44 をすべて安定発現する細胞株を作製し、各甘味物質に対する濃度応答曲線から EC₅₀ 値を算出した。各変異体の EC₅₀ 値の一覧を表 4-1 に示す。各変異体の活性のコントロールとして、hT1R3 の TMD に作用するシクラメート (Jiang et al., 2005b) と、hT1R3 の ATD に作用する NCL (第 2 章) を使用した。各変異体はシクラメート、NCL に応答し、野生型の示す EC₅₀ 値とほぼ同じ EC₅₀ 値 (5 倍以内のずれ) を示したことから (表 4-1)、受容体として機能していると判断した。以下、安定発現細胞株を用いた結果を、甘味物質ごとに詳述する。

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

E302A、S144A、D142A、Y103A は、アスパルテームに対して全く応答しなかった (図 4-4A)。D278A は、EC₅₀ 値が野生型に比べて 8.14 倍と大きく増加した (表 4-1、図 4-4B)。この結果から、E302、S144、D142、Y103、D278 がアスパルテームの受容に重要な残基で

あると判断した。

一方、D-トリプトファン (D-Trp) に対する細胞応答は、E302A において完全に消失した (図 4-4C)。D307A、D142A、D278A、S165A、Y103A、P277A においては、野生型と比べて 5 倍以上大きな EC₅₀ 値を示し (表 4-1、図 4-4D)、これらの残基が D-Trp の受容に重要であることが示唆された。アスパルテームに応答を示さなかった D142A、Y103A の D-Trp に対する EC₅₀ 値は、野生型の EC₅₀ (1.88 mM) に比べて、5 倍以上大きな値を示した (表 4-1、図 4-4D)。S165A と P277A は、D-Trp に対して野生型に比べてそれぞれ 5.40 倍、6.31 倍の EC₅₀ 値を示したが、アスパルテームに対しては、野生型の EC₅₀ 値と比べて大きな変化は見られなかった (表 4-1)。したがって、受容体の活性化における S165 と P277 の役割は、アスパルテームと D-Trp において異なることが示唆された。

4-3-3 サッカリン Na、アセスルファム K の受容に関与する残基

サッカリン Na とアセスルファム K は、いずれも低濃度においては濃度依存的に hT1R2-hT1R3 を活性化するが、高濃度 (サッカリン Na : >~3 mM、アセスルファム K : >~10 mM) では応答が抑制された (図 4-5A、B)。そのため、サッカリン Na、アセスルファム K については 0.01~3 mM、0.01~10 mM の濃度範囲において濃度応答曲線を作成し、EC₅₀ 値を算出した (表 4-1)。

サッカリン Na、アセスルファム K に対する応答は、R383H、D142A、E382A において消失したことから (図 4-5A、B)、これらの残基はサッカリン Na、アセスルファム K の受容に重要な残基であると考えられる。一方、アスパルテームや D-Trp とは異なり、E302A、S144A、D278A は、サッカリン Na、アセスルファム K の EC₅₀ 値にほとんど影響を与えなかった (表 4-1)。

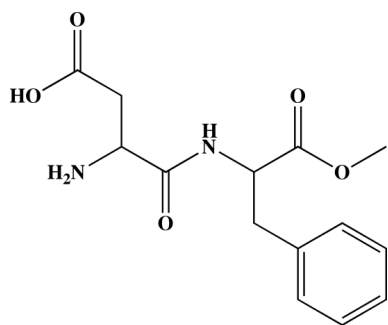
4-3-4 スクラロースの受容に関与する残基

スクラロースに対する応答は、D278A、Y103A において完全に消失した (図 4-6A)。E302A、D307A、D142A、P277A は、野生型に比べて EC₅₀ 値が大きく増加した (図 4-6B、表 4-1)。スクラロースの受容に必要な残基 (E302、D142、Y103、D278、D307) の多くは、アスパルテームや D-Trp の受容に必要な残基と共通していた (表 4-1)。しかし、アスパルテームとは異なり、S144A のスクラロースに対する EC₅₀ 値は野生型と比べて大きな変化は見られず、P277A における EC₅₀ 値は野生型に比べて大きく増大していた (表 4-1)。以上の結果から、スクラロースはアスパルテームと結合領域を一部共有するが、S144 や P277 のような特異的な残基も必要とすることが示唆された。

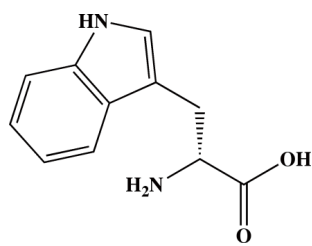
4-3-5 疎水性アミノ酸残基の役割

表 4-1 に示す 10 残基中、酸性または塩基性の 6 残基 (D142、D278、E302、D307、E382、R383) については、静電的相互作用によりリガンドと相互作用していると考えられた。また、S144、S165 はアミノ酸 (誘導体) であるアスパルテーム、D-Trp の受容にそれぞれ重要であった (図 4-4A、D)。疎水性残基の Y103 と P277 は、LB1 と LB2 の境界面に面した部位にそれぞれ位置するが (図 4-8、4-10 参照)、これらの役割について明確にするため、さらに解析を行った。Y103A ではスクラロースへの応答はほぼ完全に消失したが、Y103F では野生型に比べて濃度応答曲線の高濃度側へのシフトが見られたものの、EC₅₀ 値の値は野生型の 4.31 倍とそれほど大きな変化はなかった (図 4-7A、表 4-1)。これらの結果から、スクラロースの結合には Y103 の芳香環が重要であると示唆される。

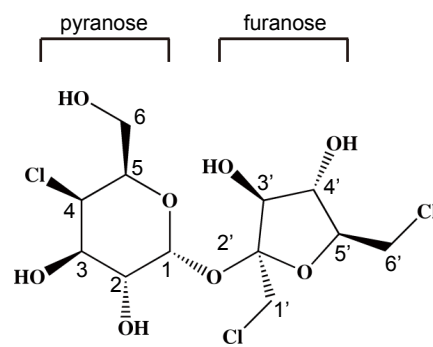
Pro 残基はタンパク質が二次構造をとるのを妨げる可能性が予想されたため、P277 については、P277A の他、P277G、P277Q、P277S の変異体を作製した。P277Q においては、アスパルテームおよび D-Trp に対して応答が著しく変化したのに対して (表 4-1)、P277G および P277S では応答にほとんど変化は見られなかった (図 4-7B)。一方で、サッカリン Na やアセスルファム K については、これら 3 種類の全ての変異体において、野生型と比べて EC₅₀ 値に大きな違いは見られなかった。したがって、P277 は、アミノ酸誘導体 (アスパルテームや D-Trp) と他の甘味物質を識別するのに重要な残基であると示唆された。



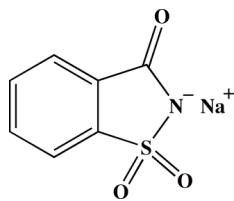
aspartame



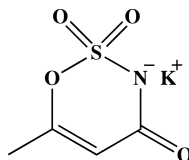
D-tryptophan



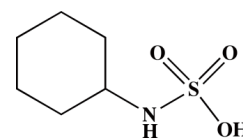
sucralose



saccharin Na



acesulfame K



cyclamate

図4-2 本実験で解析に用いた低分子甘味物質
シクラメート(hT1R3のTMDに作用する)はコントロールとして使用した。

A

hT1R2	1	-----MGPRAKTICSLFFLLWVLAEPAENSDFYLP	C DYLL C GL
rat mGluR1	1	MVRLLLIFFPMIFLEMSILPRMPDRKVLLAGASSQRS	S VARMD C DVI C AR
hT1R2	39	E SL H ANMKGIVHLNFLQVPM C K E Y E V K V I CYNLMQAMRFAVEE I N N D S SL	
rat mGluR1	51	E SV H HQPPA----EKVPERK C G E IREQ- Y G IQRVEAMFHTLDK I N A D P V I	
hT1R2	89	I EGVLL C Y E T V D V C Y -----ISNNVQ----PVLVFLAHE D N L --- I PIQE	
rat mGluR1	96	I ENIT C S E T R D S CWHSSVALEQSI F I R D S L I S I R D E K D G L N R C I D GO	
hT1R2	127	DYS--NYISRVA V I G P D N S ESVMT V AN F L S L L P O I T Y S A S DE L R D K	
rat mGluR1	146	TLPPGRTKKPIAG V I G P G SSVAIQ V Q N L L Q L E D I P O I A V S A T S I D L S D K	
hT1R2	175	VRFPAL L R T P S ADHHVE A M V Q L M L H F R W N W I V L V S S D T Y C R D N G Q L L G	
rat mGluR1	196	TLYKY F L R V V P S D T LQAR A M L D I V K R Y N W T Y V S A V H T E G N Y C E S G M D A F K	
hT1R2	225	E RV A R R D I C T A F Q E T L P T L Q P N Q N M T S E E R Q R L V T I V D K L Q O S T A R V V V V	
rat mGluR1	246	E LA A Q E GL C T A H S D K I-----Y S N A G E K S F D R L R K L-R E R L P K A R V V V C	
hT1R2	275	E SP D L L Y H FFNEV L R Q N F T C A V W- I A S E S W A I D P V L H N L T E L G H L C T F L	
rat mGluR1	290	E CE G M T V R G L L S A M R R L G V V C E F S L I G S D G W A D R DE V I E G Y E V E A N G -I	
hT1R2	324	G I T I S V P I P G E S E F R E W G P Q A G P P L S R T S Q S Y T C N Q E C D -- N C I N A T L	
rat mGluR1	339	T I K L S P E V R S E D D Y F L K R L D T N T R N P W F P E F W Q H R F Q C R L P G H I L E N P	
hT1R2	372	S E N T I ----- L --- R L S G E R V V Y S V S A V Y A V A H A L --- H S L L G C D K S	
rat mGluR1	389	N E K V C T G N E S E E N Y V Q D S K M G F V I- N A I V A M A H G L Q N M H A L C P G H V G	
hT1R2	409	T C-T K R V V Y P W Q L L E E I W K V N E T - L L D H Q I F E D P Q E D V A L H L E I V Q W Q W D	
rat mGluR1	438	L C D A M K P I D G R K L I D F L I K S S E V G V S G E E V W E D E K E D A P G R Y D I M N L O Y T	
hT1R2	457	R S Q N P F Q S V A S Y P L Q R Q L K N I Q D I S W H T V N N T I P M S M	
rat mGluR1	488	E A- N R Y D Y V H V G - T W H E G V L N I D D Y K I Q M N K S G M V R S V	

- hT1R2において変異を入れた残基
- hT1R2において変異を入れ、かつ安定発現株を作製した残基
- rat mGluR1においてGluの側鎖のカルボン酸の結合に關与する残基
- rat mGluR1においてGluのα-アミノ酸部分の結合に關与する残基

B

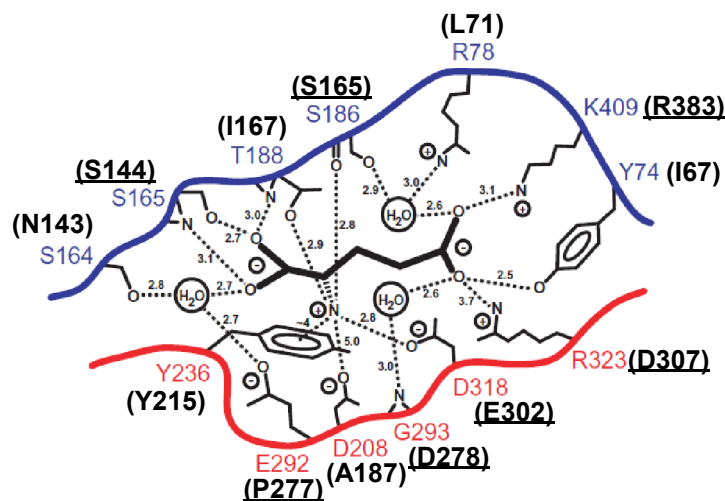


図4-3 hT1R2とrat mGluR1のATDのアミノ酸配列

(A) hT1R2とrat mGluR1のATDのアラインメント

(B) rat mGluR1のGlu受容に關与する残基。対応するhT1R2の残基を括弧内に示し、本研究において変異を導入した残基については下線で示した。rat mGluR1の図はKunishima *et al.*, *Nature*, 2000より抜粋。

表 4-1 甘味受容体点変異体安定発現細胞株の各甘味物質に対する EC₅₀ 値一覧

	aspartame (mM)		D-tryptophan (mM)		saccharin Na (mM)		acesulfame K (mM)		sucralose (mM)		cyclamate (mM)		neoculin (μM)	
	EC ₅₀ (mM)	EC ₅₀ mutant/EC ₅₀ WT	EC ₅₀ (mM)	EC ₅₀ mutant/EC ₅₀ WT	EC ₅₀ (mM)	EC ₅₀ mutant/EC ₅₀ WT	EC ₅₀ (mM)	EC ₅₀ mutant/EC ₅₀ WT	EC ₅₀ (mM)	EC ₅₀ mutant/EC ₅₀ WT	EC ₅₀ (mM)	EC ₅₀ mutant/EC ₅₀ WT	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ mutant/EC ₅₀ WT
WT	0.75	1	1.88	1	0.19	1	0.54	1	0.08	1	2.56	1	1.21	1
E302A	No response	-	No response	-	0.10	0.56	0.35	0.65	0.46	5.69	3.53	1.38	1.66	1.37
S144A	No response	-	9.85	4.71	0.36	1.92	0.94	1.74	0.27	3.42	4.16	1.62	1.60	1.32
D142A	No response	-	12.30	5.88	No response	-	No response	-	6.03	75.35	5.83	2.27	2.25	1.85
Y103A	No response	-	15.41	7.36	0.64	3.45	1.67	3.12	>10000	-	11.63	4.53	1.55	1.28
D278A	6.12	8.14	29.42	14.06	0.29	1.59	0.95	1.77	No response	-	6.53	2.54	1.61	1.33
D307A	3.74	4.97	21.27	10.17	1.06	5.71	2.16	4.02	1.77	22.11	4.14	1.61	1.60	1.32
S165A	0.51	0.67	11.31	5.40	0.28	1.52	0.60	1.11	0.20	2.52	6.19	2.41	1.34	1.10
P277A	1.83	2.43	13.21	6.31	0.89	4.82	1.61	2.99	2.35	29.41	5.12	2.00	2.03	1.68
R383H	1.44	1.91	7.39	3.53	No response	-	No response	-	0.30	3.72	6.24	2.43	2.70	2.22
E382A	1.76	2.34	4.46	2.13	No response	-	No response	-	0.22	2.79	4.45	1.74	1.86	1.54
Y103F	No response	-	20.56	9.83	0.45	2.41	0.66	1.23	0.34	4.31	4.97	1.94	2.13	1.76
P277G	1.12	1.48	8.29	3.96	0.62	3.33	1.28	2.38	3.22	40.30	5.06	1.97	1.95	1.61
P277Q	No response	-	24.29	11.61	0.58	3.11	2.02	3.77	6.12	76.56	4.75	1.85	2.15	1.77
P277S	1.38	1.83	5.82	2.78	0.65	3.50	1.55	2.88	1.08	13.48	4.04	1.58	1.77	1.46

EC₅₀ mutant/EC₅₀ WT < 5.0

5.0 < EC₅₀ mutant/EC₅₀

No response

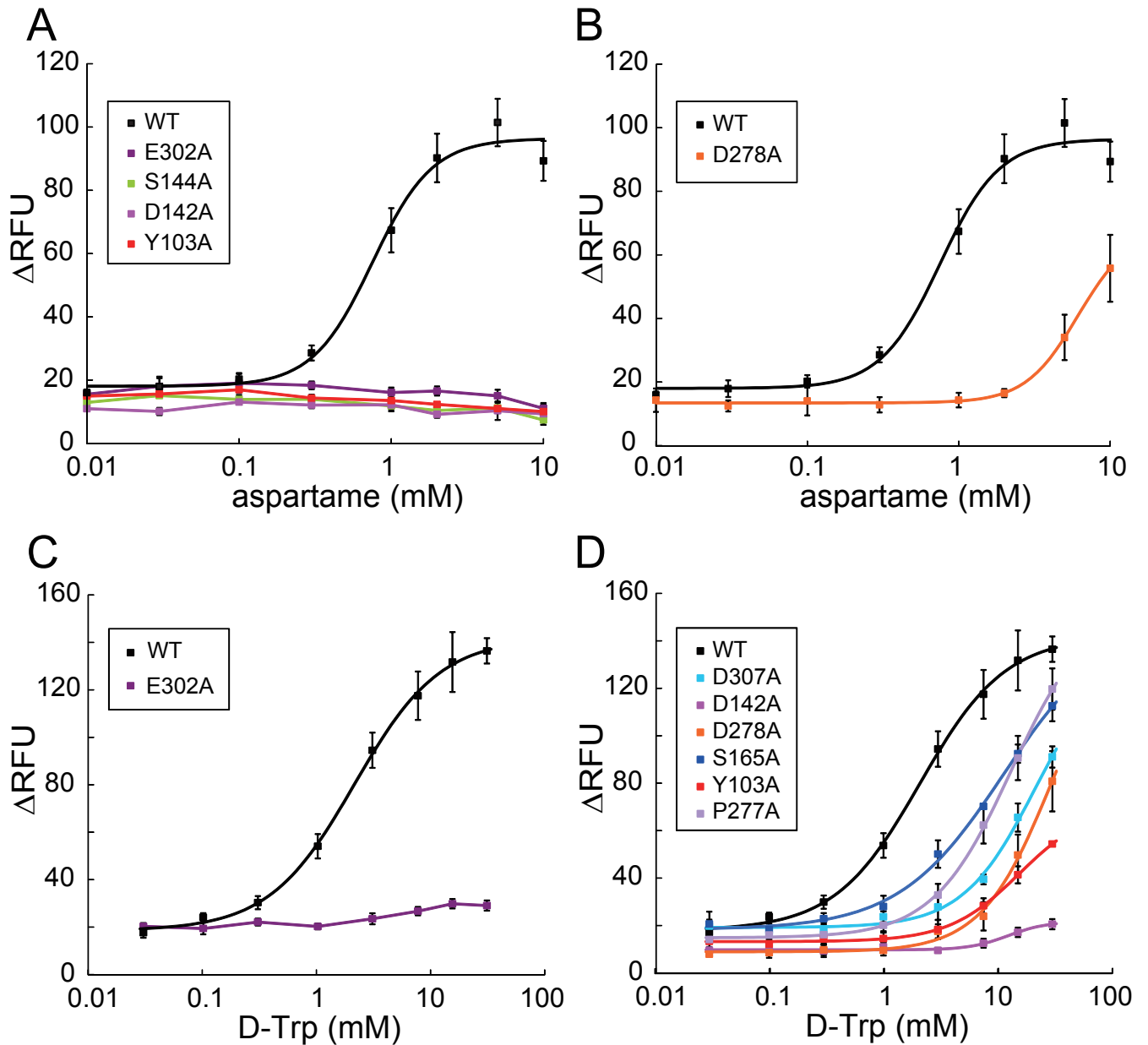


図4-4 hT1R2-hT1R3変異体安定発現細胞のアスパルテーム、D-トリプトファンに対する濃度応答曲線
 (A) E302A、S144A、D142A、Y103Aのアスパルテームへの応答は消失した。
 (B) D278Aはアスパルテームの応答において、 EC_{50} 値が野生型に比べて5倍以上増大した。
 (C) E302AのD-トリプトファンへの応答は消失した。
 (D) D307A、D142A、D278A、S165A、Y103A、P277AはD-トリプトファンへの応答において、 EC_{50} 値が野生型に比べて5倍以上増大した。
 各点は3回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差を表す。

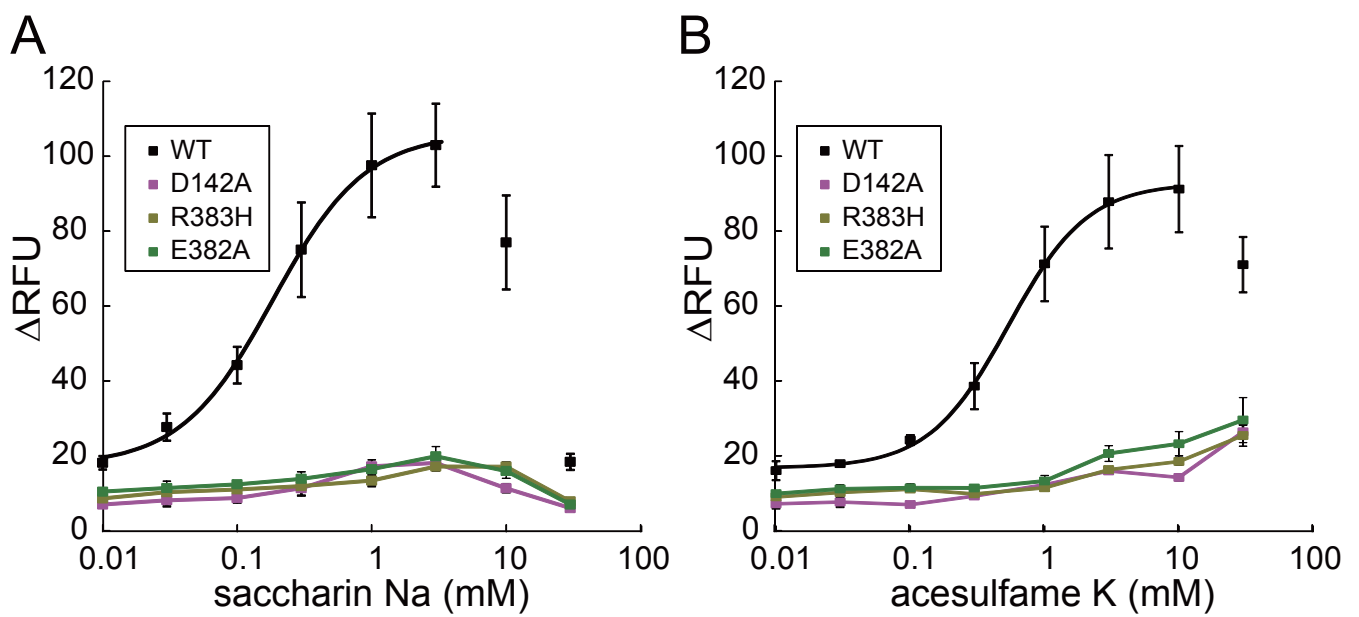


図4-5 hT1R2-hT1R3変異体安定発現細胞のサッカリンNa、アセスルファムKに対する応答
 (A) D142A、R383H、E382AのサッカリンNaへの応答は消失した。
 (B) D142A、R383H、E382AのアセスルファムKへの応答は消失した。
 各点は3回の独立した実験の平均値±標準誤差を表す。

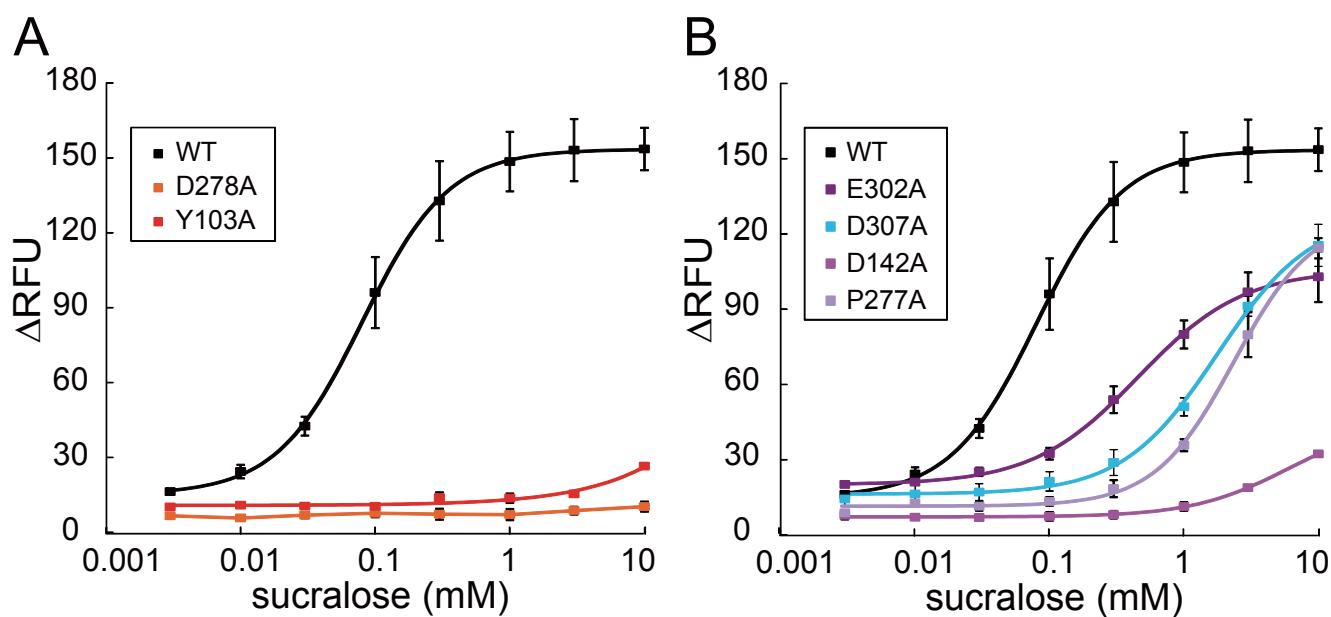


図4-6 hT1R2-hT1R3変異体安定発現細胞のスクラロースに対する応答

(A) D278A、Y103Aのスクラロースへの応答は消失した。

(B) E382A、D307A、D142A、P277Aはスクラロースの応答において、 EC_{50} 値が野生型に比べて5倍以上増大した。

各点は3回の独立した実験の平均値±標準誤差を表す。

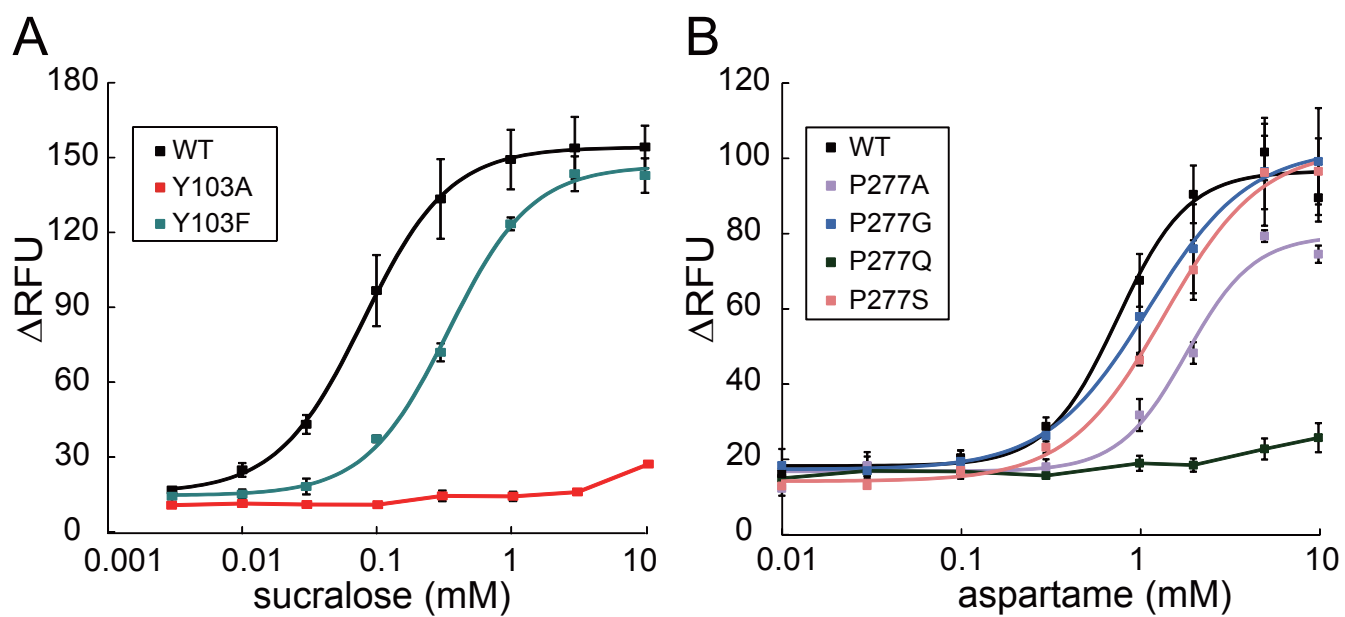


図4-7 甘味物質受容におけるY103とP277の役割
 (A) Y103変異体のスクラロースへの応答。
 (B) P277変異体のアスパルテームへの応答。
 各点は3回の独立した実験の平均値±標準誤差を表す。

4-4 考察

本研究では、各低分子甘味物質は hT1R2 ATD の溝に作用するが、各々の化学的性質により、受容体の異なるアミノ酸残基を必要とすることを示唆する結果を得た。考察では、さらに分子モデリングを用いて各甘味物質の結合様式を検討した。

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

open 型の hT1R2 ATD のモデルを構築し、低分子甘味物質の認識に必要であった 10 残基をマッピングした (図 4-8)。その結果、化学的に性質の異なる 3 種類のタイプ、アミノ酸誘導体 (アスパルテーム、D-Trp)、スルファミン酸 (サッカリン Na、アセスルファム K)、糖アナログ (スクラロース) への応答に基づき、これらの残基は 4 種類のグループに分けられた。いずれも T1R2 の N 末端ドメインの中央部の溝に位置する同一の領域内に存在するが、各々の化学的性質によって異なるアミノ酸残基を必要とすることが示唆された。図 4-8 に示すように、アスパルテーム、D-Trp、スクラロースは、hT1R2 ATD の LB1 中の残基 (Y103、D142)、LB2 中の残基 (D278、E302、D307) をともに結合に必要とする一方で、各々の化学的性質に基づき、特異的な残基 (アスパルテーム : S144 と P277、スクラロース : P277) を必要とした。一方で、サッカリン Na やアセスルファム K の結合にはこれらの残基は関与しておらず、LB1 の他の部位に位置する残基 (D142、E382、R383) が関与していた (図 4-8)。

4-4-2 分子モデリング

次に、これらの甘味物質との結合について考察するため、スクラロース、アスパルテーム、サッカリン Na と closed 型の T1R2 ATD とのドッキングモデルを作製した (図 4-9、図 4-10、図 4-11)。以下に、ドッキングモデルから推察される各残基の役割について述べる。

(i) Y103 (LB1 入り口) と D278 (LB2 入り口) の役割

hT1R2 ATD とスクラロースおよびアスパルテームとのドッキングモデルにより、Y103 は受容体の活性化において、異なる役割を果たしていることが示唆された。スクラロースについては (図 4-2)、スクラロースのピラノースの C2-H と C4-Cl が Y103 の芳香環に結合し、ピラノースの水酸基は D278 と水素結合を形成する。この結果、ヘキソースが LB1 の Y103 と LB2 の D278 に結合することにより、hT1R2 ATD の closed 構造をとりやすくすると考えられる (図 4-9)。一方、アスパルテームについては、Y103 のフェノール基が D278 と水素結合を形成し (図 4-10)、これにより T1R2 の closed 構造が安定すると考えられる。このことは、Y103A、Y103F の細胞応答 (図 4-7A、表 4-1) の結果、Y103 のフェノール基がアス

パルテームの結合に関与する一方、芳香環がスクラロースの結合には重要であることを説明できる。

(ii) E302 (LB2 中央部) の役割

E302 は負電荷を帯びており、正電荷を帯びたアスパルテームのアミン基と塩橋を形成する (図 4-10)。一方、スクラロースの結合においては、E302 はスクラロースのフラノースの水酸基と水素結合を形成する (図 4-9)。したがって、LB2 の E302 は、受容体の活性化において、closed 構造の形成に寄与する水素結合供与基として甘味物質の認識に重要な残基であると言える。一方で、E302 とサッカリン Na との間には静電的相互作用は見出されず (図 4-11)、変異体を用いた実験の結果 (表 4-1) から示唆されるように、受容体の活性化には寄与していないと考えられる。このように E302 の役割は甘味物質ごとに異なることが示唆された。

(iii) D142、E382、R383 (LB1 中央部) の役割

hT1R2 のモデルにおいて、R383 は D142 や E382 と水素結合を形成し、甘味物質の負電荷を帯びた残基の認識に重要な役割を果たす (図 4-11)。D142、E382 は、負電荷を帯びた甘味物質と直接は相互作用しないが、R383 を甘味物質と結合しやすい位置に配置する役割を担っていると考えられる (図 4-11)。アスパルテームの認識においては、LB1 に位置する R383 のカルボキシル基と LB2 に位置する E302 のアミノ基との結合により ATD の closed 構造の形成が進むものと思われる (図 4-10)。サッカリン Na の負電荷を帯びた官能基と正電荷を帯びた Na⁺イオンも、closed 構造の形成にあたり、同様の役割を果たすものと考えられる (図 4-11)。

一方、電荷的に中性な甘味物質であるスクラロースは、フラノースの水酸基と D142 とが水素結合を形成し、直接作用する (図 4-9)。これにより、R383 と E302 が水素結合を形成するようになり、受容体の活性化が生じると考えられる。

(iv) P277 (LB2 入り口付近) の役割

アスパルテームやサッカリン Na は、P277 と直接結合はしない (図 4-9、図 4-10)。しかし、P277 を Gln に置換するとアスパルテームによる受容体の活性化が阻害されたのに対し、側鎖の小さい Gly や Ser への置換では活性化に影響を与えなかったことから (図 4-7B)、アスパルテームは P277 の近傍に位置すると考えられる。より小さい甘味物質であるサッカリン Na は P277 から遠い位置にあるため、変異によって影響をほとんど受けなかったと考えられる (表 4-1)。一方、D-Trp に対しては P277A、P277Q で EC₅₀ 値の著しい増大が見られたことから (表 4-1)、D-Trp に受容においても、P277 は結合部位の 1 つであると考えられ

る。

スクラロースのフラノースの C1' 位置にある Cl は P277 とファンデルワールス力により結合しており (図 4-9)、P277Q では Gln の導入により Cl との結合が立体的に障害を受ける。一方、P277G や P277S では疎水性相互作用が妨げられたと考えられる。

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

本研究から、hT1R2 の ATD の LB1、LB2 が構成する溝の中央部における相互作用は、全ての甘味物質の受容に重要であること、また LB1、LB2 の入り口における相互作用は、受容体が活性化のための closed 構造をとるのを推進する役割を果たすことが示唆された。この点において、甘味受容体の活性化機構は mGluR の活性化機構(Kunishima et al., 2000; Muto et al., 2007)と共通であると考えられる。一方で、mGluR の活性化機構とは異なる点も見られた。mGluR のリガンドが Glu またはその誘導体のみであるのに対し、hT1R2-hT1R3 は化学的性質の異なる様々なリガンドを受容する。今回解析に用いた低分子甘味物質は、いずれも hT1R2 の ATD の二つの lobe によって構成される同一の領域内に結合するが、甘味物質のタイプにより必要とする甘味受容体の残基は異なっており、甘味物質の化学的性質により異なるアミノ酸残基を受容に必要とすることが明らかとなった。CaSR や GABA_B 受容体などの他のクラス C GPCR においても、X 線結晶構造解析や分子モデリングおよび変異体解析により、リガンド認識に関与する残基が明らかにされている(Brauner-Osborne et al., 1999; Galvez et al., 1999; Galvez et al., 2000; Hammerland et al., 1999)。他のクラス C GPCR の結果と本研究で得られた hT1R2-hT1R3 の結果を比較すると、他のクラス C GPCR が 1 つないしは 2 つの酸性アミノ酸残基しかリガンド認識に関与していないのに対し(Wellendorph and Brauner-Osborne, 2009)、hT1R2-hT1R3 では 5 つの酸性アミノ酸残基 (D142、D278、E302、D307、E382) がリガンド認識に関与していた。この結果は、複数のクラス C GPCR において、LB1 と LB2 の境界面がアゴニストの結合部位として保存されている一方で、hT1R2-hT1R3 が化学的性質の異なる低分子甘味物質を受容するために、異なるアミノ酸残基からなる複数の結合ポケットを有するようになったことを示唆していると考えられる。

本研究の途上、Senomyx 社により、スクラロース特異的な甘味エンハンサー、スクラロースとショ糖の両方に特異的な甘味エンハンサーを見つけたという報告がなされた(Servant et al., 2010)。本研究の手法と同様、変異体を用いたカルシウムイメージングによって、スクラロースやスクロースの結合部位を明らかにしたうえで、分子モデリングにより、甘味エンハンサーがどのように結合し、エンハンサーとしての役割を示すのかについて、そのメカニズムを明らかにしている。彼らのモデルによれば、見出された甘味エンハンサーは、アゴニスト (スクロース、またはスクラロース) の傍に結合し、アゴニストとの間にファンデルワールス結合または水素結合を形成し、closed 構造をとりやすくすることで受容体の

活性化を強めると考えられる(Zhang et al., 2010)。彼らの研究に続き、本研究における成果も新たな甘味料の開発ならびに GPCR のリガンド認識機構の解明に役立つことが期待される。また、特にクラス C GPCR は薬のターゲット分子であるものも多いことから、多数の結合部位を持つ T1R2-T1R3 の活性化のメカニズムの解明が、今後の創薬産業につながることを期待したい。

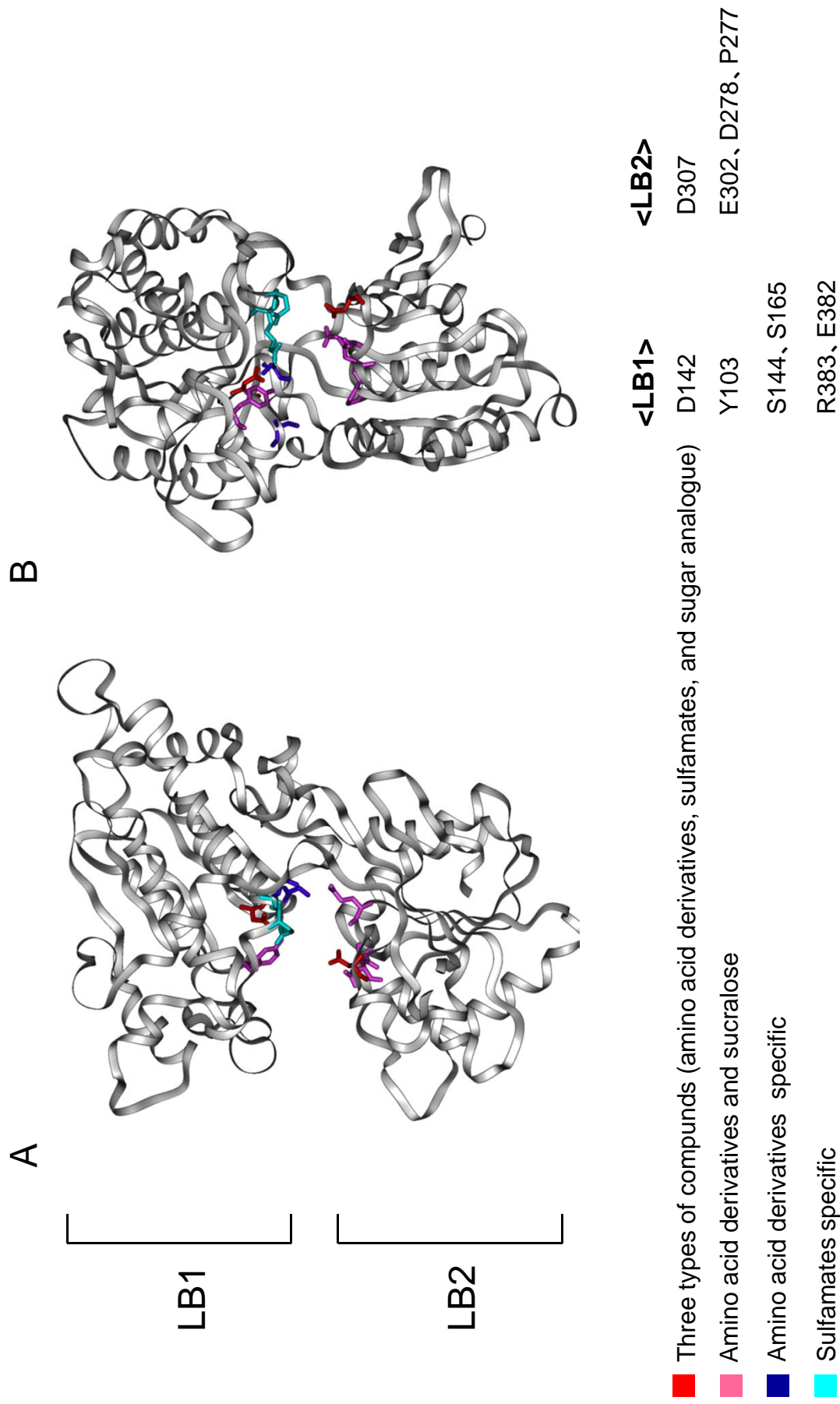


図4-8 hT1R2 ATDのopen型のモデル

(A) 受容に関与する10残基をモデルにおいて、stickで表示した。3種類の異なる化学的性質の低分子甘味物質受容に関与する残基について、応答パターンから4種類のグループが考えられた。

(B) (A)のモデルを90°回転したものの。

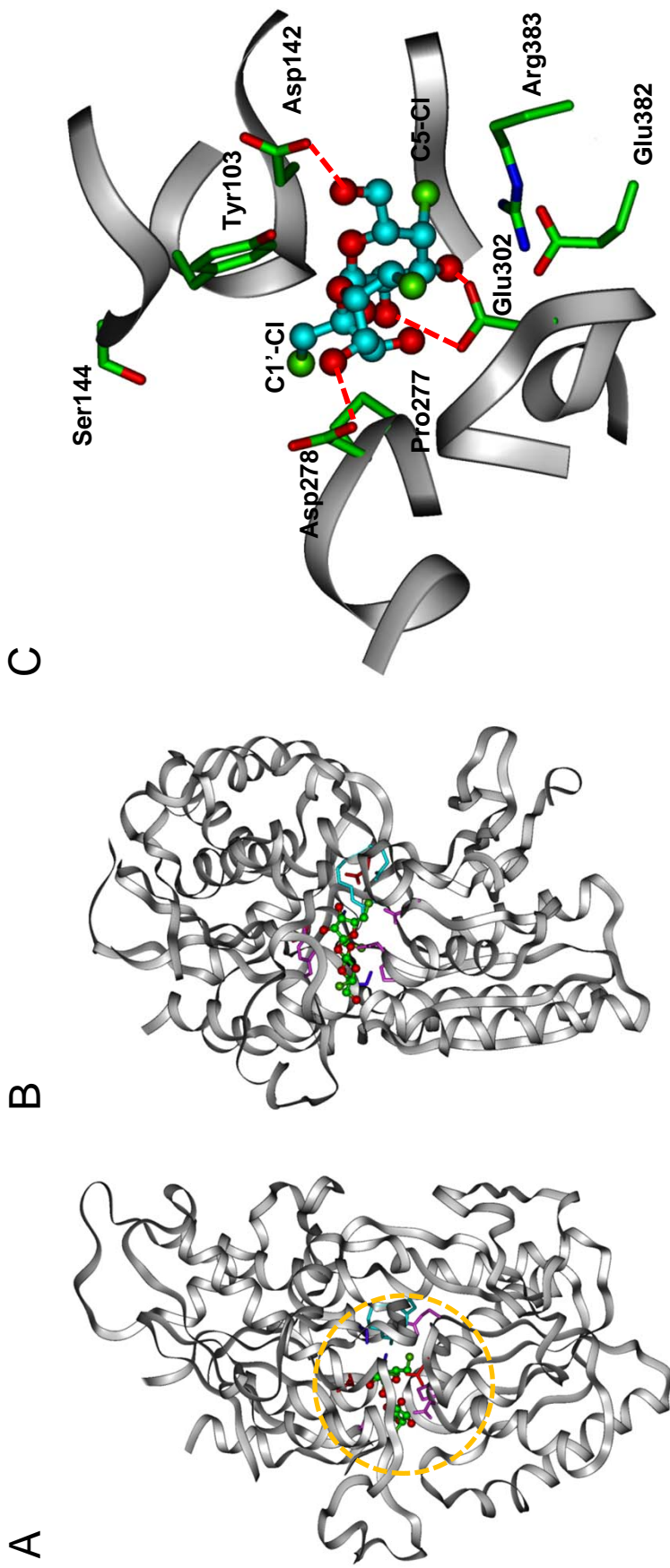


図4-9 スクラロースとhT1R2 ATDのドッキングモデル
 (A) スクラロースとclosed型のhT1R2 ATDとのドッキングモデル。塩素原子を緑色で示した。
 (B) (A)のモデルを90°回転させた図。
 (C) スクラロースの結合ポケットの拡大図。(A)の橙色の点線で囲んだ部分に相当する。

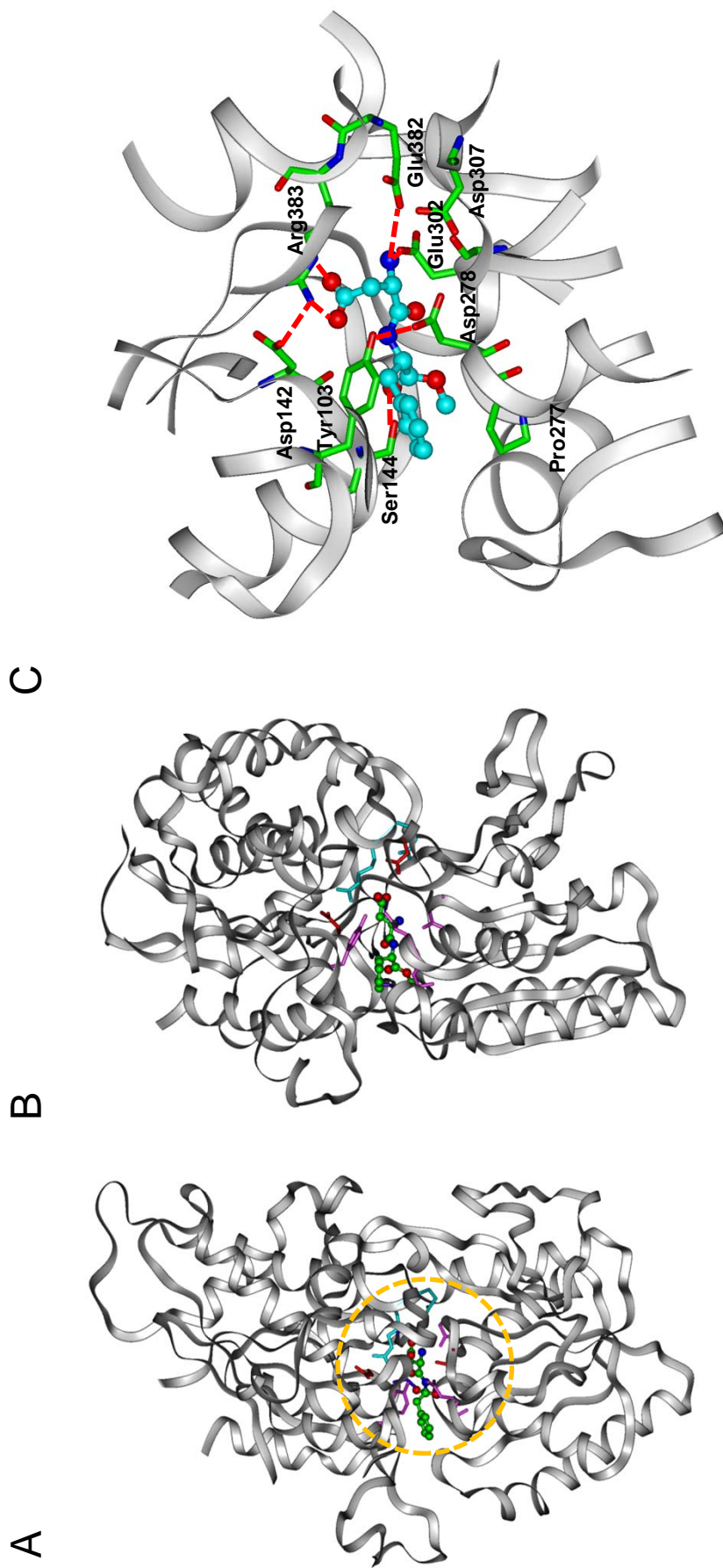


図4-10 アスパルテームとhT1R2 ATDのドッキングモデル
 (A) アスパルテームとclosed型のhT1R2 ATDとのドッキングモデル。
 (B) (A)のモデルを90°回転させた図。
 (C) アスパルテームの結合ポケットの拡大図。(A)の橙色の点線で囲んだ部分に相当する。

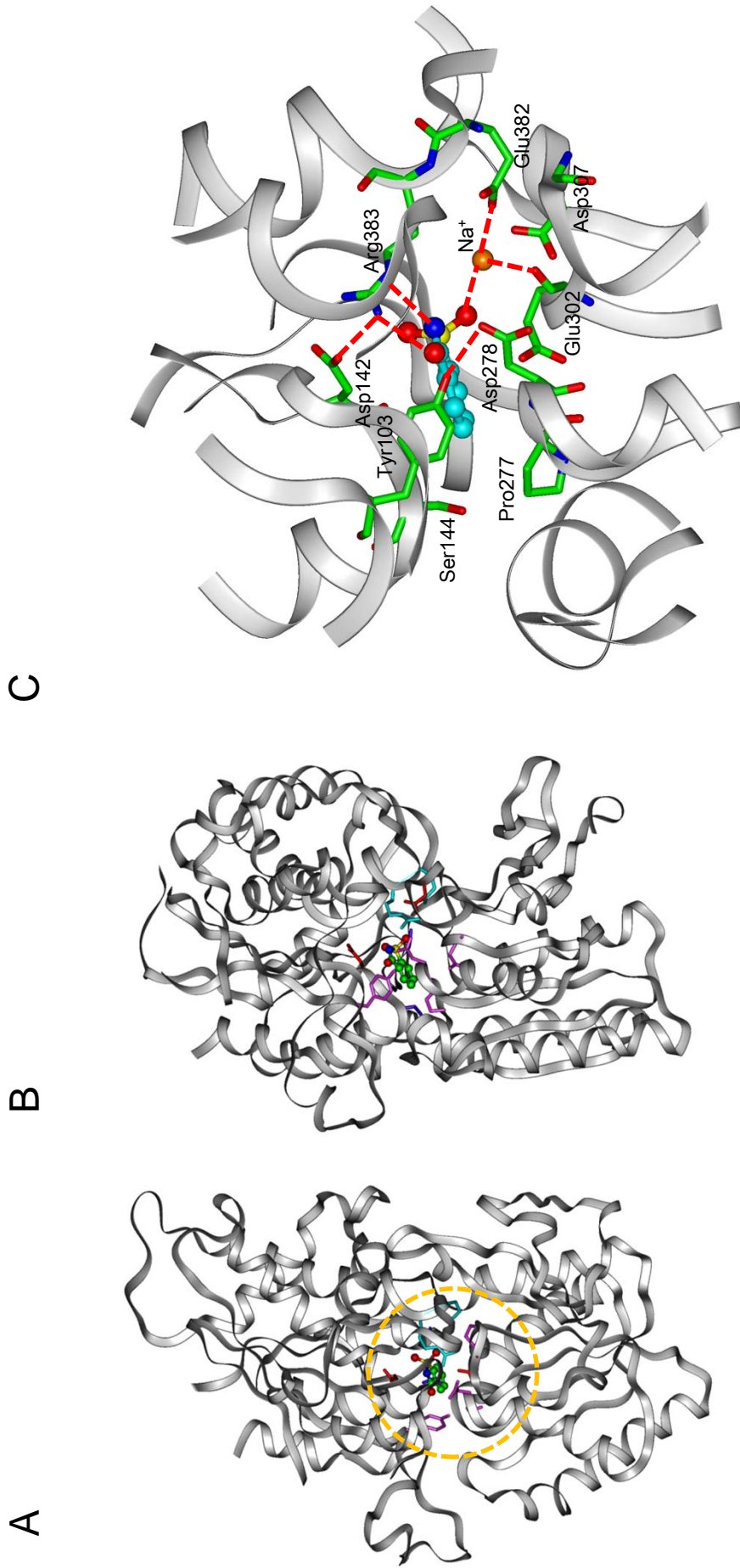


図4-11 サッカリンNaとhT1R2 ATDのドッキングモデル
 (A) サッカリンNaとclosed型のhT1R2 ATDとのドッキングモデル。
 (B) (A)のモデルを90°回転させた図。
 (C) サッカリンNaの結合ポケットの拡大図。(A)の橙色の点線で囲んだ部分に相当する。

第5章

総合討論および今後の展望

本研究は、多様な甘味物質を受容する T1R2-T1R3 について、その活性化のメカニズムの解明を最終的な目標として、様々な甘味物質と hT1R2-hT1R3 の相互作用を明らかにしたものである。そのツールとして、酸味を甘味に変えるという不思議な性質を持つ味覚修飾タンパク質と、化学的性質の異なる低分子甘味物質を用いた。第 2 章では、NCL と受容体の相互作用を調べるため、NCL の受容に必要な hT1R2-hT1R3 の領域の一部を明らかにし、第 3 章では、もう一つの味覚修飾タンパク質として知られる MCL の酸誘導性の甘味活性の客観的な評価系を構築し、MCL の味覚修飾活性を示すメカニズムを明らかにした。最後に第 4 章では、hT1R2-hT1R3 における化学的性質の異なる低分子甘味物質をどのように認識しているかについての知見を明らかにした。

本章では、本研究を総括するとともに、今後の展望を述べる。

<hT1R2-hT1R3 による甘味物質の受容>

本研究を通じて明らかになった、味覚修飾タンパク質および低分子甘味物質の受容に必要な領域をまとめる (図 5-1)。味覚修飾タンパク質である NCL、MCL はそれぞれ hT1R3 の ATD、hT1R2 の ATD を受容に必要とすることが明らかになった (第 2 章、第 3 章)。また、今回解析の対象とした低分子甘味物質は、mGluR1 がリガンドである Glu を受容する領域に対応する、hT1R2 ATD の 2 つの lobe の境界面領域にいずれも結合することが示された。その一方で、これらは各々の化学的性質によって異なる残基を必要とするという興味深い現象も示された (第 4 章)。

以上の結果は、hT1R2-hT1R3 が多数の活性化部位を有するというこれまでの知見を支持するものである。特に NCL の受容に必要とされる hT1R3 ATD は、mT1R3 の ATD が糖の受容に関わることが報告されているものの (Nie et al., 2006; Nie et al., 2005)、hT1R2-hT1R3 ではこれまでに受容に必要な領域として報告のない領域である。一方、MCL の受容には、他の甘味タンパク質 (ソーマチン、モネリン) の作用領域として示唆されている hT1R2 の ATD が受容に必要であった。NCL については、mT1R2+hT1R3 発現細胞が培養細胞発現系において受容体として機能していないために、hT1R2 の関与を明らかにすることはできなかったが、これらの結果から、NCL と MCL はともに味覚修飾活性という共通の性質を示すが、両者は受容体の活性化に必要な hT1R2-hT1R3 の領域が明確に異なることが明らかになった。

<味覚修飾タンパク質と hT1R2-hT1R3 の相互作用>

第 3 章の考察においても述べたように、NCL と MCL は同じ味覚修飾活性を示すにもかかわらず、受容体の活性化に必要な hT1R2-hT1R3 の領域が異なっていた。また両者は、受容体を活性化する pH 範囲や受容体に対する親和性においても大きく異なっており、これらの

結果は、両者の一次構造の相同性の低さに起因するものと考えられた。

第2章のNCLの培養細胞評価系においては、受容体とともに導入するキメラGタンパク質としてG16gust25を使用した。G16gust25を用いた系では、中性条件と酸性条件のいずれにおいてもNCLによく応答し、NCLの酸誘導性の甘味活性を測定することは不可能である。すなわち、この系はNCLを味わった際に中性pHよりも酸性pHの方が強い甘味を生じるといふ官能試験の結果を反映していないという問題点があった。本研究を開始した後、共同研究者の中島らにより、他のキメラGタンパク質G15Gi3を用いることでNCLの酸誘導性の甘味活性のpH依存性を評価できる、すなわち中性pHでは弱い甘味、酸性pHでは強い甘味を示す培養細胞評価系の構築が報告された(Nakajima et al., 2008)。この応答性の違いは、甘味活性型と不活性型のNCLの両者が存在する場合(図3-2)、両者はともに受容体に結合するが、G16gust25を用いた場合にはいずれにも応答するのに対し、G15Gi3を用いた場合には甘味活性型のみに応答し、不活性型には応答しないために生じると解釈できる(中島博士論文)。したがって、第2章におけるG16gust25を用いた実験により明らかになった、NCL受容に必要な領域は、甘味活性型・不活性型両方のNCLの認識に必要な領域であると考えられる。

今後、今回作製したキメラT1RをG15Gi3と共発現させ、G16gust25を用いた時の結果と比較することで、活性型・不活性型NCLのそれぞれに関わる領域の特定に繋がるのではないかと考えている。NCL分子については、CDスペクトルの測定から中性条件と酸性条件で分子の二次構造は変化しないことがわかっている。一方、蛍光Trpスペクトルや分子モデリングなどの結果から、pHにより全体の立体構造に変化が生じることが示唆されている(Morita et al., 2009)。これに伴い、受容体との作用領域も中性条件と酸性条件で変化するかどうか、また甘味の強さがこの作用領域の違いによって生じるのかどうか、その後のシグナル変化にどのように影響を及ぼすのかを、今後調べる必要がある。

一方で、MCLの評価系においては、興味深いことにNCLの場合と異なり、G15Gi3、G16gust44(G16gust25を用いた結果に同じ)のいずれのキメラGタンパク質を用いても、酸性になるにつれて強い活性化を示す傾向が見られ、酸誘導性甘味活性の評価が可能であった(図3-5、3-6)。また酸性条件での活性化にはhT1R2 ATDが必要であった(図3-11)。第3章の考察でも述べたように、hT1R2-hT1R3のアンタゴニストとして知られる物質はいずれもhT1R3のTMDに結合することがわかっている。一方、MCLはhT1R2 ATDに結合すると考えられるが、受容体の活性化を抑制するメカニズムとはどのようなものだろうか？これを明らかにするには、ヒトとマウスのキメラ受容体を用いて、MCLがアンタゴニストとして結合するドメインを特定する必要がある。

両味覚修飾タンパク質に共通する特徴として、pH依存的な甘味強度の変化、味覚修飾活性の持続性の2点が挙げられる。本研究では、カルシウムイメージング法を用いて、MCL

による hT1R2-hT1R3 の活性化が pH 依存的に変化することを示した (図 3-6)。さらに、hT1R2-hT1R3 に対する MCL の EC₅₀ 値が他の甘味物質に比べて小さく、非常に低い濃度で受容体に作用することを見出し、灌流装置を用いた実験により、MCL が長時間、受容体への結合を維持していることを示唆する結果を得た (図 3-8)。しかし、持続性の評価にあたっては、カルシウムイメージング法では生化学的な解析を行えない。また活性化に必要な領域についても、直接の結合に関わる部位であるのかは特定が不可能である。これらの問題を明らかにする方法として、例えば表面プラズモン共鳴を用いて結合定数を測定し、結合速度と解離速度を調べる方法がある (図 5-2)。他の甘味物質と比べて、これらの値に極端な違いが見られるのかどうか、今後明らかにしたい。また興味深いことに、以前に構築した NCL の酸誘導性の甘味活性の評価法(Nakajima et al., 2008)、すなわち酸性バッファーに溶解したサンプルで直接刺激を行い受容体の活性化を見る方法においては、酸性バッファーに MCL を溶解して投与しても、活性化の頻度が低かったり、投与してから応答するまでの時間が通常より遅かったりと、安定した応答が観察されなかった (データは示さない)。このことは MCL 溶液と酸性物質を混ぜた溶液を口の中に入れても口に直後は甘味を示さない、という官能試験の結果に一致している。したがって、活性型の MCL (酸性条件) と不活性型の MCL (中性条件) の受容体への結合速度は異なる可能性がある。このような観点からも、中性条件と酸性条件での受容体との相互作用の結合速度を測定するのは興味深い。この実験を行うためには、受容体側の発現精製が必要である。マウスの T1R2、T1R3 については、大腸菌において、糖の結合能を保持した細胞外領域の発現に成功したという報告がある(Nie et al., 2006)。しかし、hT1Rs の発現に取り組んでいる事例は耳にするものの、成功したという報告は未だない。当研究室では、昆虫細胞 Sf9 を用いて hT1Rs の細胞外領域の発現に取り組んでおり、今後の研究の進展が望まれる。

<光アフィニティーラベル化した甘味物質の利用>

GPCR は、大量発現・精製が困難であること、疎水性であるために結晶化が困難であることから、良好な X 線回折データが得られず、結晶化が困難であるとされている。実際、構造が解析された GPCR の例は数少なく、T1R2、T1R3 の結晶構造も未だ解明されていない。現在は、複数のグループにより、mGluR1 の ATD の結晶構造をもとに、T1R の細胞外領域の構造が予想されているが、そのようなモデルを利用して、MCL のような構造が明らかでないリガンドに対し、両者の複合体モデルを作製しても、そのモデルの信頼性は十分なものとは言えないであろう。

リガンドの結合部位は、本研究で行ったように、受容体の変異体を作製し、カルシウムイメージングなどの方法でリガンドへの応答変化を測定することにより、ある程度明らかにすることが可能である。しかし、変異体によっては変異導入そのもので、受容体自身の

活性が失われたり、細胞膜への移動に変化が生じたりする例があり、リガンド受容能の変化以外の要素が結果に反映されてしまうこともある。

受容体とリガンドの相互作用部位の解析に用いられる方法の一つに、光アフィニティーラベル法がある。光アフィニティーラベル法とは、タンパク質の特異的化学的修飾法の一つであり、光照射により光反応基を持ったプローブ分子と標的タンパク質とを化学的に安定な共有結合でクロスリンク（架橋）させる方法である（図 5-3）（Vodovozova, 2007; 國安明彦, 2003）。これにより、標的タンパク質とリガンドの複合体のまま解析を行うことが可能となり、例えば標的タンパク質上の結合部位を同定することができ、両者が分子レベルでどのように相互作用しているのかを同定することが可能である。リガンド - 受容体、基質 - 酵素の相互作用の解明には、ベンゾフェノンやアリルアジド、ジアジリンなどの光反応基が用いられる。益田らとの共同研究により、Phe のベンゼン環の 3 位と 4 位の位置にトリフルオロメチルジアジリンを導入することで、光反応性の D-Phe 誘導体を作成することに成功した（図 5-4）（Masuda et al., 2010）。この化合物は、培養細胞を用いた評価系により、甘味活性を示すうえ、甘味阻害剤であるラクチゾールによりその活性が抑制されることを確認しており、甘味受容体とリガンドの相互作用を調べるにあたり、十分なアフィニティーを持っていることが示唆された。前述のように昆虫細胞などで発現させた TIRs をこうした光ラベル体で光アフィニティーラベル化し解析を行うことで、リガンドと受容体のドッキングモデルを証明することができるものと思われる。

<甘味物質の相乗効果>

甘味においては、官能評価により、複数の甘味物質を同時に用いると単に足し合わせた以上に甘味が増す効果（相乗効果）があることが報告されている（Schiffman et al., 1995）。例えば、食品産業において、スクラロースとアセスルファム K などの組み合わせは、甘味料としてよく用いられる。こうした甘味物質同士の相乗効果は、低分子甘味物質と甘味受容体の相互作用の解明により、結合部位の違いなどで説明が可能となるかもしれない。今まで官能評価により評価されてきた効果的な組み合わせについて、今後受容体レベルで明らかにすることができれば面白い。

また甘味の質は、甘味物質により異なる。例えば、同じ糖質であっても、スクロースとフラクトースでは味質が異なり、スクロースの甘味が口中に残るのに対し、フラクトースは残らず、切れのよい甘味を呈する。このような違いが、受容体との結合速度や解離速度で速度論的に説明できるものなのか、今後の研究の発展に期待したい。

甘味に関する研究は世界的な関心を呼び、ここ数年の間に複数のグループにより、甘味物質と甘味受容体の相互作用について、研究が進められた。これほどまでに関心と呼んで

いる主な理由は、糖やエネルギーの過剰摂取による肥満や生活習慣病が、昨今問題となっていることであろう。事実、これらを背景として、糖の甘味エンハンサーが報告された (Servant et al., 2010)。Senomyx 社が発表したこの物質は GRAS (Generally Recognized As Safe) に認定され、食品添加物としての認可が降りている。甘味受容体の発見から約 10 年という短いスパンで、この段階に至ったことは、このような物質の登場が待ち望まれていたことを反映した結果であろう。他の基本味の受容体に関しても急速に研究が進んでおり、今後塩味のエンハンサーや苦味の抑制物質などの開発が加速していくものと思われる。本研究が今後の味覚研究の一助になることを期待したい。

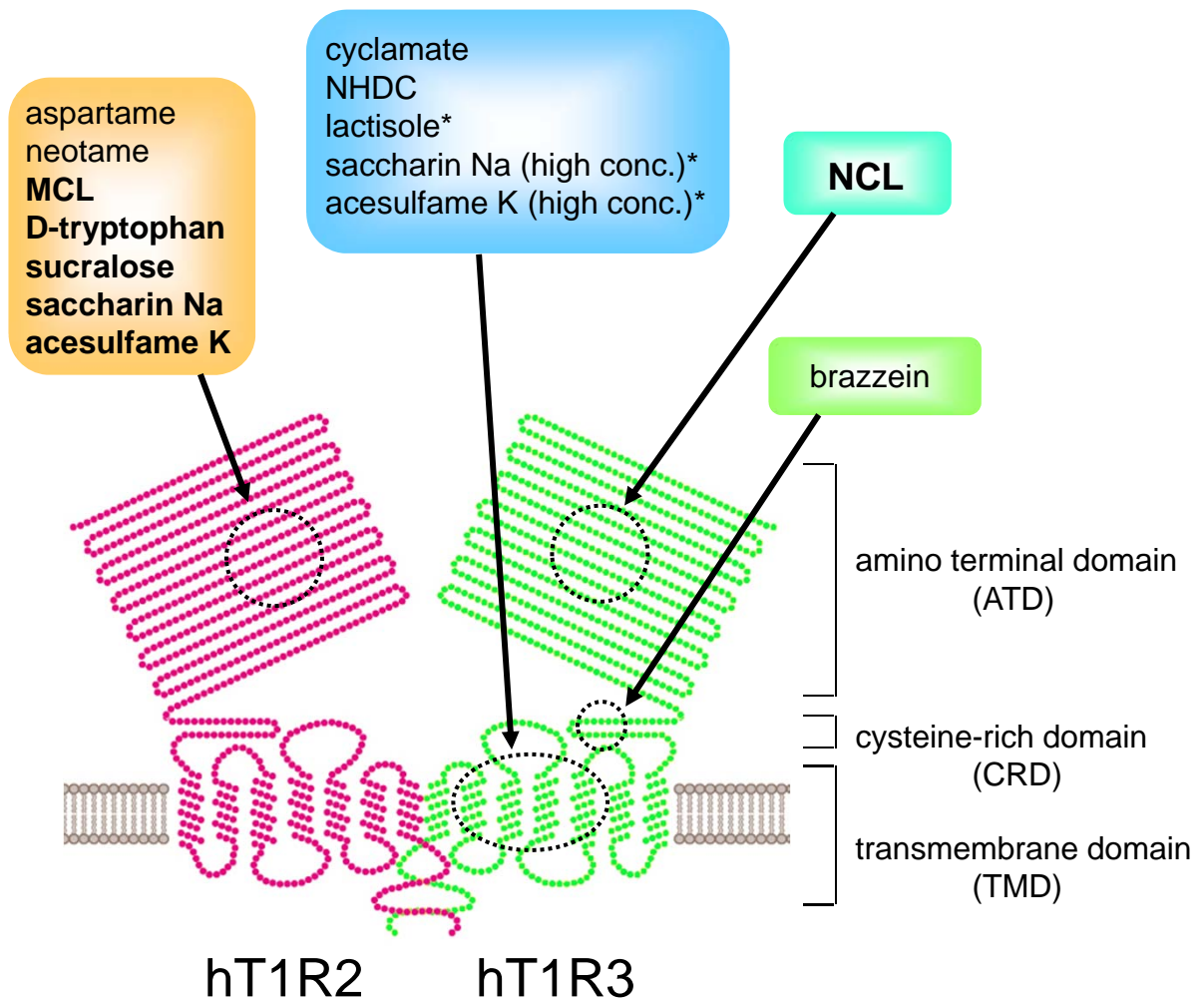


図5-1 ヒト甘味受容体の構造模式図と甘味物質の作用部位
 本研究により作用領域および部位が明らかになった物質は、太字で示す。*のついているものはアンタゴニスト、他はアゴニストを指す。受容体の図はChandrashekar *et al.*, *Nature*, 2006より抜粋、一部改変。

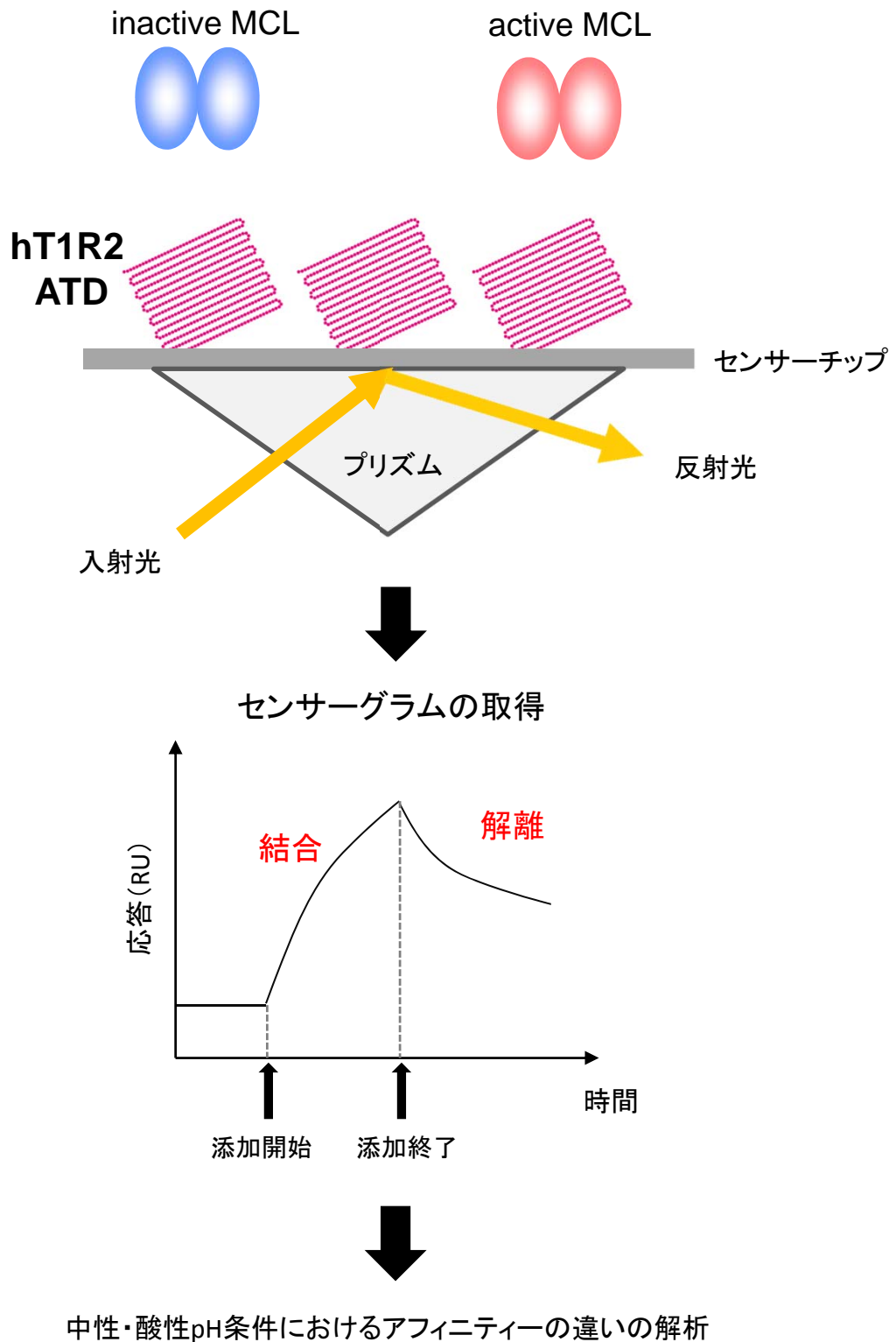


図5-2 表面プラズモン共鳴を用いたMCLとhT1R2 ATDとの相互作用の測定
 センサーチップにhT1R2 ATDを固定し、中性・酸性pH条件でのMCLの結合速度、
 解離速度などを測定する。センサーグラムのカーブから結合速度定数、解離速度
 定数、アフィニティーが求められる。

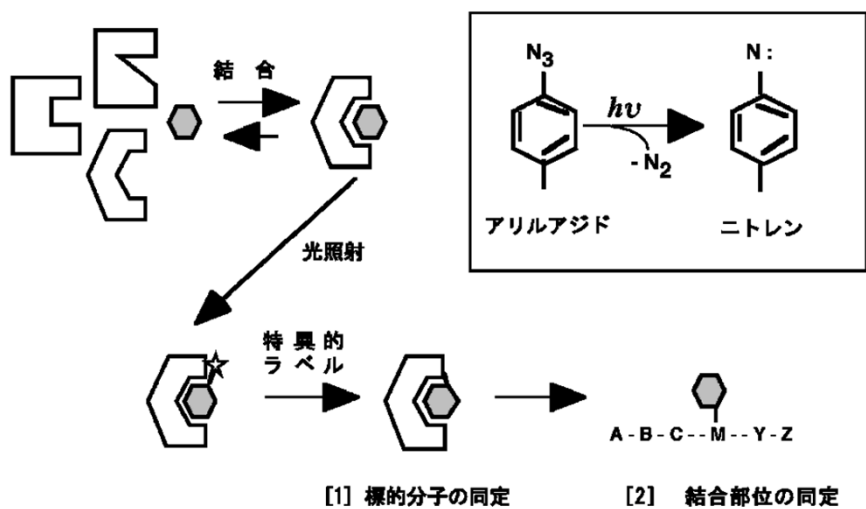


図5-3 光アフィニティーラベル法の概要図

特異的化学修飾法の1つで、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ラベルする方法。

図は、國安ら、薬学雑誌、2003より引用

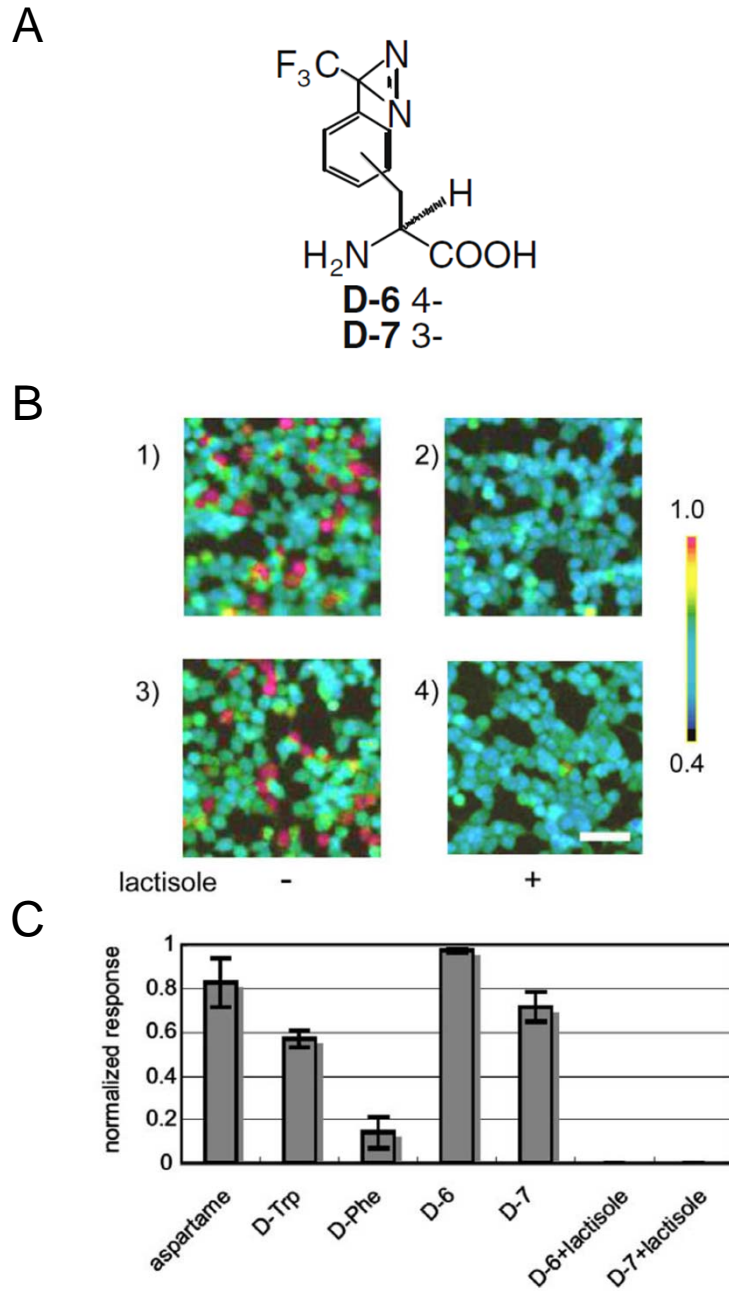


図5-4 培養細胞評価系を用いたD-フェニルアラニンの光ラベル体の甘味活性の評価
 (A) 光ラベル化D-フェニルアラニンの構造。D-6; 4-ジアジリニルD-フェニルアラニン、
 D-7; 3-ジアジリニルD-フェニルアラニン
 (B) hT1R2、hT1R3、G16gust44を一過的に発現したHEK293T細胞の、4-ジアジリ
 ニルD-フェニルアラニン(D-6)と3-ジアジリニルD-フェニルアラニン(D-7)に対する応
 答(1、3)、甘味阻害剤ラクチゾール存在下のD-6およびD-7に対する応答(2、4)。
 2×リガンド溶液(終濃度はいずれも1.25 mM)を滴下した30秒後におけるfura-2
 の蛍光の比(F_{340}/F_{380})を擬似カラーで表示した。スケールバーは50 μm を示す。
 (C) 各甘味物質とD-6、D-7に対する応答の比較。いずれも終濃度は1.25 mM。
 F_{340}/F_{380} が0.15より大きいものを応答細胞とみなした。応答細胞数は、pH 7.4の
 10 mMアスパルテムへの応答細胞数で標準化した。各点は3回の独立した実験
 の平均値±標準誤差を表す。

<参考文献>

- Abe, K., Yamashita, H., Arai, S., and Kurihara, Y. (1992). Molecular cloning of curculin, a novel taste-modifying protein with a sweet taste. *Biochim Biophys Acta* 1130, 232-234.
- Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100, 693-702.
- Bartoshuk, L.M., Dateo, G.P., Vandenbelt, D.J., Buttrick, R.L., and Long, L. (1969). Effects of *Gymnema sylvestre* and *Synsepalum dulcificum*. In *Olfaction and Taste III*, C. Pfaffman, ed. (Rockefeller University Press), pp. 436-449.
- Bartoshuk, L.M., Gentile, R.L., Molkowitz, H.R., and Meiselman, H.L. (1974). Sweet taste induced by miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*). *Physiol Behav* 12, 449-456.
- Blake, C.C., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C., Phillips, D.C., and Sarma, V.R. (1967). Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 167, 378-388.
- Brauner-Osborne, H., Jensen, A.A., Sheppard, P.O., O'Hara, P., and Krogsgaard-Larsen, P. (1999). The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 274, 18382-18386.
- Brouwer, J.N., Glaser, D., Hard Af Segerstad, C., Hellekant, G., Ninomiya, Y., and Van der Wel, H. (1983). The sweetness-inducing effect of miraculin; behavioural and neurophysiological experiments in the rhesus monkey *Macaca mulatta*. *J Physiol* 337, 221-240.
- Brouwer, J.N., van der Wel, H., Francke, A., and Henning, G.J. (1968). Miraculin, the sweetness-inducing protein from miracle fruit. *Nature* 220, 373-374.
- Caldwell, J.E., Abildgaard, F., Dzakula, Z., Ming, D., Hellekant, G., and Markley, J.L. (1998). Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nat Struct Biol* 5, 427-431.
- Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444, 288-294.

- Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.A., Hummler, E., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* *464*, 297-301.
- Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Hoon, M.A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C.S., and Ryba, N.J. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* *100*, 703-711.
- Cui, M., Jiang, P., Maillet, E., Max, M., Margolskee, R.F., and Osman, R. (2006). The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites. *Curr Pharm Des* *12*, 4591-4600.
- Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Zou, S., Jiang, P., Ninomiya, Y., and Margolskee, R.F. (2003). Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* *301*, 850-853.
- Daniell, W.F. (1852). Miraculous berry of Western Africa. *Pharmaceutical Journal* *11*, 445-448.
- Danilova, V., Danilov, Y., Roberts, T., Tinti, J.M., Nofre, C., and Hellekant, G. (2002). Sense of taste in a new world monkey, the common marmoset: recordings from the chorda tympani and glossopharyngeal nerves. *J Neurophysiol* *88*, 579-594.
- Danilova, V., and Hellekant, G. (2006). Elucidating coding of taste qualities with the taste modifier miraculin in the common marmoset. *Brain Res Bull* *68*, 315-321.
- Danilova, V., Hellekant, G., Tinti, J.M., and Nofre, C. (1998). Gustatory responses of the hamster *Mesocricetus auratus* to various compounds considered sweet by humans. *Journal of neurophysiology* *80*, 2102-2112.
- Diamant, H., Hellekant, G., and Zotterman, Y. (1972). The effect of miraculin on the taste buds of man, monkey and rat. In *Olfaction and Taste IV*, D. Schneider, ed. (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH), pp. 241-244.
- Dyer, J., Salmon, K.S., Zibrik, L., and Shirazi-Beechey, S.P. (2005). Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* *33*, 302-305.

Eny, K.M., Corey, P.N., and El-Sohemy, A. (2009). Dopamine D2 receptor genotype (C957T) and habitual consumption of sugars in a free-living population of men and women. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2, 235-242.

Eny, K.M., Wolever, T.M., Corey, P.N., and El-Sohemy, A. (2010). Genetic variation in TAS1R2 (Ile191Val) is associated with consumption of sugars in overweight and obese individuals in 2 distinct populations. *Am J Clin Nutr* 92, 1501-1510.

Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., and Kinnamon, S.C. (2005). ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310, 1495-1499.

Fushan, A.A., Simons, C.T., Slack, J.P., Manichaikul, A., and Drayna, D. (2009). Allelic polymorphism within the TAS1R3 promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Curr Biol* 19, 1288-1293.

Galindo-Cuspinera, V., Winnig, M., Bufe, B., Meyerhof, W., and Breslin, P.A. (2006). A TAS1R receptor-based explanation of sweet 'water-taste'. *Nature* 441, 354-357.

Galvez, T., Parmentier, M.L., Joly, C., Malitschek, B., Kaupmann, K., Kuhn, R., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B., and Pin, J.P. (1999). Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a venus flytrap mechanism for ligand binding. *The Journal of biological chemistry* 274, 13362-13369.

Galvez, T., Prezeau, L., Milioti, G., Franek, M., Joly, C., Froestl, W., Bettler, B., Bertrand, H.O., Blahos, J., and Pin, J.P. (2000). Mapping the agonist-binding site of GABAB type 1 subunit sheds light on the activation process of GABAB receptors. *The Journal of biological chemistry* 275, 41166-41174.

Giroux, E.L., and Henkin, R.I. (1974). Purification and some properties of miraculin, a glycoprotein from *Synsepalum dulcificum* which provokes sweetness and blocks sourness. *J Agric Food Chem* 22, 595-601.

Glaser, D., Hellekant, G., Brouwer, J.N., and van der Wel, H. (1984). Effects of gymnemic acid on

sweet taste perception in primates. *Chemical Senses* 8, 367-374.

Go, Y., Satta, Y., Takenaka, O., and Takahata, N. (2005). Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics* 170, 313-326.

Hammerland, L.G., Krapcho, K.J., Garrett, J.E., Alasti, N., Hung, B.C., Simin, R.T., Levinthal, C., Nemeth, E.F., and Fuller, F.H. (1999). Domains determining ligand specificity for Ca²⁺ receptors. *Mol Pharmacol* 55, 642-648.

Hellekant, G. (1976). Gustatory Effects of Gymnemic Acid and Miraculin in Dog, Pig and Rabbit. *Chem Sens Flav* 2, 85-95.

Hellekant, G., af Segerstad, C.H., Roberts, T., van der Wel, H., Brouwer, J.N., Glaser, D., Haynes, R., and Eichberg, J.W. (1985). Effects of gymnemic acid on the chorda tympani proper nerve responses to sweet, sour, salty and bitter taste stimuli in the chimpanzee. *Acta Physiol Scand* 124, 399-408.

Hellekant, G., Danilova, V., and Ninomiya, Y. (1997a). Primate sense of taste: behavioral and single chorda tympani and glossopharyngeal nerve fiber recordings in the rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *J Neurophysiol* 77, 978-993.

Hellekant, G., Glaser, D., Brouwer, J., and van der Wel, H. (1981). Gustatory responses in three prosimian and two simian primate species (*Tupaia glis*, *Nycticebus coucang*, *Galago senegalensis*, *Callithrix jacchus jacchus* and *Saguinus midas niger*) to six sweeteners and miraculin and their phylogenetic implications *Chem Senses* 6, 165-173.

Hellekant, G., Glaser, D., Brouwer, J.N., and van der Wel, H. (1976). Gustatory effects of miraculin, monellin and thaumatin in the *Saguinus midas* tamarin monkey studied with electrophysiological and behavioural techniques. *Acta Physiol Scand* 97, 241-250.

Hellekant, G., Ninomiya, Y., and Danilova, V. (1997b). Taste in chimpanzees II: single chorda tympani fibers. *Physiol Behav* 61, 829-841.

Hiura, A., Akabane, T., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., and Kurihara, Y. (1996). Taste-modifying triterpene glycosides from *Staurogyne merguensis*. *Phytochemistry* 43, 1023-1027.

Hoon, M.A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (1999). Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96, 541-551.

Horne, J., Lawless, H.T., Speirs, W., and Sposato, D. (2002). Bitter taste of saccharin and acesulfame-K. *Chem Senses* 27, 31-38.

Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61-68.

Hu, J., Hauache, O., and Spiegel, A.M. (2000). Human Ca²⁺ receptor cysteine-rich domain. Analysis of function of mutant and chimeric receptors. *J Biol Chem* 275, 16382-16389.

Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934-938.

Igeta, H., Tamura, Y., Nakaya, K., Nakamura, Y., and Kurihara, Y. (1991). Determination of disulfide array and subunit structure of taste-modifying protein, miraculin. *Biochim Biophys Acta* 1079, 303-307.

Imada, T., Misaka, T., Fujiwara, S., Okada, S., Fukuda, Y., and Abe, K. (2010). Amiloride reduces the sweet taste intensity by inhibiting the human sweet taste receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 397, 220-225.

Imoto, T., Miyasaka, A., Ishima, R., and Akasaka, K. (1991). A novel peptide isolated from the leaves of *Gymnema sylvestre*--I. Characterization and its suppressive effect on the neural responses to sweet taste stimuli in the rat. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 100, 309-314.

Inglett, G.E., Dowling, B., Albrecht, J.J., and Hoggan, F.A. (1965). Taste-modifiers, taste-modifying properties of Miracle Fruit (*Synsepalum Duficicum*). *J Agric Food Chem* 13, 284-287.

Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., and Matsunami, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste

receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 12569-12574.

Ito, K., Asakura, T., Morita, Y., Nakajima, K., Koizumi, A., Shimizu-Ibuka, A., Masuda, K., Ishiguro, M., Terada, T., Maruyama, J., *et al.* (2007). Microbial production of sensory-active miraculin. *Biochem Biophys Res Commun* *360*, 407-411.

Ito, K., Sugawara, T., Koizumi, A., Nakajima, K., Shimizu-Ibuka, A., Shiroishi, M., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Asakura, T., *et al.* (2010). Bulky high-mannose-type N-glycan blocks the taste-modifying activity of miraculin. *Biochim Biophys Acta* *1800*, 986-992.

Iyengar, R.B., Smits, P., van der Ouderaa, F., van der Wel, H., van Brouwershaven, J., Ravesteyn, P., Richters, G., and van Wassenaar, P.D. (1979). The complete amino-acid sequence of the sweet protein thaumatin I. *Eur J Biochem* *96*, 193-204.

Jacquier, V., Prummer, M., Segura, J.M., Pick, H., and Vogel, H. (2006). Visualizing odorant receptor trafficking in living cells down to the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 14325-14330.

Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Liu, Z., Snyder, L.A., Benard, L.M., Osman, R., Margolskee, R.F., and Max, M. (2005a). Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J Biol Chem* *280*, 15238-15246.

Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Snyder, L.A., Benard, L.M., Osman, R., Max, M., and Margolskee, R.F. (2005b). Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3. *J Biol Chem* *280*, 34296-34305.

Jiang, P., Ji, Q., Liu, Z., Snyder, L.A., Benard, L.M., Margolskee, R.F., and Max, M. (2004). The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J Biol Chem* *279*, 45068-45075.

Jin, Z., Danilova, V., Assadi-Porter, F.M., Aceti, D.J., Markley, J.L., and Hellekant, G. (2003). Critical regions for the sweetness of brazzein. *FEBS Lett* *544*, 33-37.

Jingami, H., Nakanishi, S., and Morikawa, K. (2003). Structure of the metabotropic glutamate

receptor. *Curr Opin Neurobiol* 13, 271-278.

Kaneko, R., and Kitabatake, N. (2001). Structure-sweetness relationship in thaumatin: importance of lysine residues. *Chem Senses* 26, 167-177.

Kant, R. (2005). Sweet proteins--potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutr J* 4, 5.

Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y., and Hino, A. (2001). Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 236-242.

Kohmura, M., Nio, N., and Ariyoshi, Y. (1990). Complete amino acid sequence of the sweet protein monellin. *Agric Biol Chem* 54, 2219-2224.

Kondo, T., Kishi, M., Fushimi, T., Ugajin, S., and Kaga, T. (2009). Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 1837-1843.

Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., Hofmann, T., Frank, O., Behrens, M., Lewtschenko, T., Slack, J.P., Ward, C.D., and Meyerhof, W. (2004). Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J Neurosci* 24, 10260-10265.

Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971-977.

Kurihara, K., and Beidler, L.M. (1968). Taste-modifying protein from miracle fruit. *Science* 161, 1241-1243.

Kurihara, K., and Beidler, L.M. (1969). Mechanism of the action of taste-modifying protein. *Nature* 222, 1176-1179.

Kurihara, K., Kurihara, Y., and Beidler, L.M. (1969). Isolation and mechanism of taste modifiers; taste-modifying protein and gymnemic acids. In *Olfaction and Taste III*, C. Pfaffman, ed.

(Rockefeller University Press), pp. 450-469.

Kurihara, Y. (1992). Characteristics of antisweet substances, sweet proteins, and sweetness-inducing proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32, 231-252.

Kurihara, Y., Ookubo, K., Tasaki, H., Kodama, H., Akiyama, Y., Yagi, A., and Halpern, B. (1988). Studies on the taste modifiers. I. Purification and structure determination of sweetness inhibiting substance in leaves of *ziziphus jujuba*. *Tetrahedron* 44, 61-66.

Kurihara, Y., and Terasaki, S. (1982). Isolation and chemical properties of multiple active principles from miracle fruit *Biochimica et Biophysica Acta* 719, 444-449.

Li, X., and Servant, G. (2008). Functional Characterization of the Human Sweet Taste Receptor: High-Throughput Screening Assay Development and Structural Function Relation. In *Sweetness and Sweeteners Biology, Chemistry and Psychophysics*, D. Weerasinghe, and G. Dubois, eds. (Oxford Univ Press), pp. 368–385.

Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., and Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4692-4696.

Liu, X., Maeda, S., Hu, Z., Aiuchi, T., Nakaya, K., and Kurihara, Y. (1993). Purification, complete amino acid sequence and structural characterization of the heat-stable sweet protein, mabinlin II. *Eur J Biochem* 211, 281-287.

Mace, O.J., Affleck, J., Patel, N., and Kellett, G.L. (2007). Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol* 582, 379-392.

Maeda, M., Iwashita, T., and Kurihara, Y. (1989). Studies on taste modifiers. II. Purification and structure determination of gymnemic acids, antisweet active principle from *gymnema sylvestre* leaves. *Tetrahedron Letters* 30, 1547-1550.

Maehashi, K., and Udaka, S. (1998). Sweetness of lysozymes. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 605-606.

- Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.S., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E.L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., and Shirazi-Beechey, S.P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 15075-15080.
- Masuda, K., Koizumi, A., Misaka, T., Hatanaka, Y., Abe, K., Tanaka, T., Ishiguro, M., and Hashimoto, M. (2010). Photoactive ligands probing the sweet taste receptor. Design and synthesis of highly potent diazirinyl D-phenylalanine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* *20*, 1081-1083.
- Masuda, T., Ide, N., and Kitabatake, N. (2005). Structure-sweetness relationship in egg white lysozyme: role of lysine and arginine residues on the elicitation of lysozyme sweetness. *Chem Senses* *30*, 667-681.
- Masuda, T., and Kitabatake, N. (2006). Developments in biotechnological production of sweet proteins. *J Biosci Bioeng* *102*, 375-389.
- Masuda, Y., Nirasawa, S., Nakaya, K., and Kurihara, Y. (1995). Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein, miraculin. *Gene* *161*, 175-177.
- Matsunami, H., Montmayeur, J.P., and Buck, L.B. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* *404*, 601-604.
- Matsuyama, T., Satoh, M., Nakata, R., Aoyama, T., and Inoue, H. (2009). Functional expression of miraculin, a taste-modifying protein in *Escherichia coli*. *J Biochem* *145*, 445-450.
- Max, M., Shanker, Y.G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S., and Margolskee, R.F. (2001). *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat Genet* *28*, 58-63.
- McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J., and Margolskee, R.F. (1992). Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* *357*, 563-569.
- Meyers, B., and Brewer, M.S. (2008). Sweet taste in man: a review. *J Food Sci* *73*, R81-90.

Ming, D., and Hellekant, G. (1994). Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. FEBS Lett 355, 106-108.

Miyasaka, A., and Imoto, T. (1995). Electrophysiological characterization of the inhibitory effect of a novel peptide gurmarin on the sweet taste response in rats. Brain Res 676, 63-68.

Montmayeur, J.P., Liberles, S.D., Matsunami, H., and Buck, L.B. (2001). A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. Nat Neurosci 4, 492-498.

Morini, G., Bassoli, A., and Temussi, P.A. (2005). From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. J Med Chem 48, 5520-5529.

Morita, Y., Nakajima, K., Iizuka, K., Terada, T., Shimizu-Ibuka, A., Ito, K., Koizumi, A., Asakura, T., Misaka, T., and Abe, K. (2009). pH-Dependent structural change in neoculin with special reference to its taste-modifying activity. Biosci Biotechnol Biochem 73, 2552-2555.

Morris, J.A., Martenson, R., Deibler, G., and Cagan, R.H. (1973). Characterization of monellin, a protein that tastes sweet. J Biol Chem 248, 534-539.

Mueller, K.L., Hoon, M.A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C.S., and Ryba, N.J. (2005). The receptors and coding logic for bitter taste. Nature 434, 225-229.

Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., and Jingami, H. (2007). Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 3759-3764.

Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Yamada, S., Hara, A., Mogami, H., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Shigemura, N., Ninomiya, Y., and Kojima, I. (2009). Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. PLoS One 4, e5106.

Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, Y., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Kitamoto, K., *et al.* (2006a). Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol 72, 3716-3723.

Nakajima, K., Asakura, T., Oike, H., Morita, Y., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. (2006b). Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport* *17*, 1241-1244.

Nakajima, K., Morita, Y., Koizumi, A., Asakura, T., Terada, T., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Maruyama, J., Kitamoto, K., Misaka, T., *et al.* (2008). Acid-induced sweetness of neoculin is ascribed to its pH-dependent agonistic-antagonistic interaction with human sweet taste receptor. *FASEB J* *22*, 2323-2330.

Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* *416*, 199-202.

Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* *106*, 381-390.

Nie, Y., Hobbs, J.R., Vignes, S., Olson, W.J., Conn, G.L., and Munger, S.D. (2006). Expression and purification of functional ligand-binding domains of T1R3 taste receptors. *Chem Senses* *31*, 505-513.

Nie, Y., Vignes, S., Hobbs, J.R., Conn, G.L., and Munger, S.D. (2005). Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol* *15*, 1948-1952.

Nirasawa, S., Liu, X., Nishino, T., and Kurihara, Y. (1993). Disulfide bridge structure of the heat-stable sweet protein mabinlin II. *Biochim Biophys Acta* *1202*, 277-280.

Offermanns, S., and Simon, M.I. (1995). G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem* *270*, 15175-15180.

Ogata, C., Hatada, M., Tomlinson, G., Shin, W.C., and Kim, S.H. (1987). Crystal structure of the intensely sweet protein monellin. *Nature* *328*, 739-742.

Ogata, C.M., Gordon, P.F., de Vos, A.M., and Kim, S.H. (1992). Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution. *J Mol Biol* *228*, 893-908.

Parmentier, M.L., Prezeau, L., Bockaert, J., and Pin, J.P. (2002). A model for the functioning of family 3 GPCRs. *Trends Pharmacol Sci* 23, 268-274.

Peltekova, V., Han, G., Soleymanlou, N., and Hampson, D.R. (2000). Constraints on proper folding of the amino terminal domains of group III metabotropic glutamate receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 180-190.

Pin, J.P., Galvez, T., and Prezeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98, 325-354.

Ren, X., Zhou, L., Terwilliger, R., Newton, S.S., and de Araujo, I.E. (2009). Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front Integr Neurosci* 3, 12.

Sainz, E., Korley, J.N., Battey, J.F., and Sullivan, S.L. (2001). Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *J Neurochem* 77, 896-903.

Schiffman, S.S., Booth, B.J., Carr, B.T., Losee, M.L., Sattely-Miller, E.A., and Graham, B.G. (1995). Investigation of synergism in binary mixtures of sweeteners. *Brain Res Bull* 38, 105-120.

Schiffman, S.S., Booth, B.J., Sattely-Miller, E.A., Graham, B.G., and Gibes, K.M. (1999). Selective inhibition of sweetness by the sodium salt of +/-2-(4-methoxyphenoxy)propanoic acid. *Chem Senses* 24, 439-447.

Schiffman, S.S., Sattely-Miller, E.A., and Bishay, I.E. (2008). Sensory properties of neotame: Comparison with other sweeteners. In *Sweetness and Sweeteners*, D. Weerasinghe, and G.E. DuBois, eds. (The American Chemical Society), pp. 511-529.

Schiffman, S.S., Sattely-Miller, E.A., Graham, B.G., Bennett, J.L., Booth, B.J., Desai, N., and Bishay, I. (2000). Effect of temperature, pH, and ions on sweet taste. *Physiol Behav* 68, 469-481.

Sclafani, A., and Perez, C. (1997). Cypha [propionic acid, 2-(4-methoxyphenol) salt] inhibits sweet taste in humans, but not in rats. *Physiol Behav* 61, 25-29.

Servant, G., Tachdjian, C., Tang, X.Q., Werner, S., Zhang, F., Li, X., Kamdar, P., Petrovic, G., Ditschun, T., Java, A., *et al.* (2010). Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4746-4751.

Shallenberger, R.S., and Acree, T.E. (1967). Molecular theory of sweet taste. *Nature* 216, 480-482.

Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Terada, T., Asakura, T., Nakajima, K., Iwata, S., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., and Abe, K. (2006). Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity. *J Mol Biol* 359, 148-158.

Shirasuka, Y., Nakajima, K., Asakura, T., Yamashita, H., Yamamoto, A., Hata, S., Nagata, S., Abo, M., Sorimachi, H., and Abe, K. (2004). Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1403-1407.

Sun, H.J., Cui, M.L., Ma, B., and Ezura, H. (2006). Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett* 580, 620-626.

Suzuki, M., Kurimoto, E., Nirasawa, S., Masuda, Y., Hori, K., Kurihara, Y., Shimba, N., Kawai, M., Suzuki, E., and Kato, K. (2004). Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities. *FEBS Lett* 573, 135-138.

Takahashi, N., Hitotsuya, H., Hanzawa, H., Arata, Y., and Kurihara, Y. (1990). Structural study of asparagine-linked oligosaccharide moiety of taste-modifying protein, miraculin. *J Biol Chem* 265, 7793-7798.

Tancredi, T., Pastore, A., Salvadori, S., Esposito, V., and Temussi, P.A. (2004). Interaction of sweet proteins with their receptor. A conformational study of peptides corresponding to loops of brazzein, monellin and thaumatin. *Eur J Biochem* 271, 2231-2240.

Temussi, P. (2007). The sweet taste receptor: a single receptor with multiple sites and modes of interaction. *Adv Food Nutr Res* 53, 199-239.

Temussi, P.A. (2002). Why are sweet proteins sweet? Interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor. *FEBS Lett* 526, 1-4.

- Theerasilp, S., Hitotsuya, H., Nakajo, S., Nakaya, K., Nakamura, Y., and Kurihara, Y. (1989). Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. *J Biol Chem* 264, 6655-6659.
- Theerasilp, S., and Kurihara, Y. (1988). Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit. *J Biol Chem* 263, 11536-11539.
- Tsuchiya, D., Kunishima, N., Kamiya, N., Jingami, H., and Morikawa, K. (2002). Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd^{3+} . *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2660-2665.
- Tsuji, Y., Shimada, Y., Takeshita, T., Kajimura, N., Nomura, S., Sekiyama, N., Otomo, J., Usukura, J., Nakanishi, S., and Jingami, H. (2000). Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J Biol Chem* 275, 28144-29151.
- Ueda, T., Ugawa, S., Yamamura, H., Imaizumi, Y., and Shimada, S. (2003). Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *J Neurosci* 23, 7376-7380.
- van der Wel, H., Larson, G., Hladik, A., Hladik, C.M., Hellekant, G., and Glaser, D. (1989). Isolation and characterization of pentadin, the sweet principle of *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. *Chem Senses* 14, 75-79.
- van der Wel, H., and Loeve, K. (1972). Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur J Biochem* 31, 221-225.
- Vodovozova, E.L. (2007). Photoaffinity labeling and its application in structural biology. *Biochemistry (Mosc)* 72, 1-20.
- Wellendorph, P., and Brauner-Osborne, H. (2009). Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 156, 869-884.
- Winnig, M., Bufe, B., Kratochwil, N.A., Slack, J.P., and Meyerhof, W. (2007). The binding site for

neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct Biol* 7, 66.

Winnig, M., Bufe, B., and Meyerhof, W. (2005). Valine 738 and lysine 735 in the fifth transmembrane domain of rTas1r3 mediate insensitivity towards lactisole of the rat sweet taste receptor. *BMC Neurosci* 6, 22.

Xu, H., Staszewski, L., Tang, H., Adler, E., Zoller, M., and Li, X. (2004). Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14258-14263.

Yamamoto, C., Nagai, H., Takahashi, K., Nakagawa, S., Yamaguchi, M., Tonoike, M., and Yamamoto, T. (2006). Cortical representation of taste-modifying action of miracle fruit in humans. *Neuroimage* 33, 1145-1151.

Yamashita, H., Akabane, T., and Kurihara, Y. (1995). Activity and stability of a new sweet protein with taste-modifying action, curculin. *Chem Senses* 20, 239-243.

Yamashita, H., Theerasilp, S., Aiuchi, T., Nakaya, K., Nakamura, Y., and Kurihara, Y. (1990). Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein taste-modifying activity, curculin. *J Biol Chem* 265, 15770-15775.

Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., and Ryba, N.J. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 139, 234-244.

Young, R.L., Sutherland, K., Pezos, N., Brierley, S.M., Horowitz, M., Rayner, C.K., and Blackshaw, L.A. (2009). Expression of taste molecules in the upper gastrointestinal tract in humans with and without type 2 diabetes. *Gut* 58, 337-346.

Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R.M., Liu, H., Xu, H., Servant, G., Zoller, M., Tachdjian, C., and Li, X. (2010). Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4752-4757.

Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115, 255-266.

今田隆将 (2010) 修士論文「ヒト甘味受容体安定発現細胞株を用いた甘味評価系の構築」

佐藤昌康、小川尚 (1997) 『最新 味覚の科学』 (朝倉書店)

中島健一郎 (2008) 博士論文「甘味タンパク質ネオクリンの発現生産とその味覚修飾活性機構の解析」

福田悠佑 (2008) 修士論文「培養細胞発現系を用いたヒト味覚受容体 hT1R タンパク質の発現生産」

國安明彦 (2003) 光アフィニティラベル法による薬物結合部位の同定と新規薬物標的の検索 YAKUGAKU ZASSHI 123, 673-679.

論文の内容の要旨

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

論文題目

ヒト甘味受容体による味覚修飾タンパク質および低分子甘味物質の受容機構の解析

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

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

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

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

1. ヒト甘味受容体におけるネオクリン相互作用領域の解析

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

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

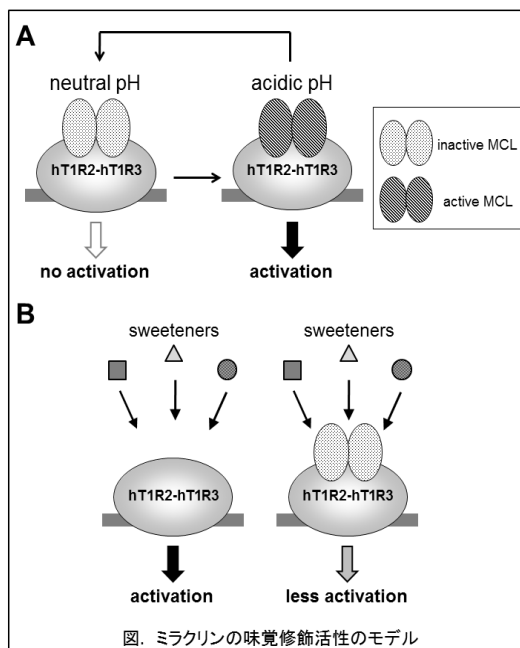
一方、中性条件で得られた NCL の結晶構造をもとに予測された酸性条件での NCL 構造モデルと、mGluR1 の ATD の結晶構造を鋳型に作製した hT1R2-hT1R3 の ATD の立体構造モデルとのドッキングモデルを、分子動力学計算により得た。hT1R3 の 201-300 残基のうち、ヒトとマウスで異なる残基の多くは、lobe1 と lobe2 から構成される溝付近に多く存在していた。培養細胞を用いた実験により得られた結果は、NCL がこの溝付近に作用するというモデルを支持する結果であると考えられる。

2. ミラクリンの味覚修飾活性機構の解析

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

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

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



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

3. ヒト甘味受容体における低分子甘味物質群の相互作用部位の同定

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

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

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

まとめ

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

発表論文

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

謝辞

学部4年生のときに研究室に配属されてから6年間、多くの方々の御指導、御鞭撻、御協力を戴き、博士論文を提出するに至りました。拙筆ではありますが、ここに謝意を述べさせていただきます。

東京大学名誉教授 阿部啓子教授には、大変熱心な御指導、御鞭撻を戴きました。研究においては勿論、その他様々な場面においても常に温かく叱咤激励してくださり、またお心遣いを戴きましたことを、心より深く感謝致します。常に前向きな先生のお姿に、何度励まされたことかわかりません。

東京大学大学院農学生命科学研究科 生物機能開発化学研究室 三坂巧准教授には、実験において的確かつ大変貴重なアドバイスを戴き、また実験作業においてもご協力戴きました。厚く御礼申し上げます。

同研究科 日清食品寄附講座 朝倉富子特任准教授には、進路で悩んだり、実験が行き詰まったりした際に励ましの言葉を賜り、お世話になりました。心より感謝申し上げます。

東京農業大学 荒井綜一客員教授には、研究の節目節目に、経験に基づいた貴重なアドバイスを戴くとともに励ましの言葉を賜りました。心より感謝申し上げます。

同研究科 アグリバイオインフォマティクス人材養成ユニット 寺田透准教授には、ネオクリンの実験を進めるにあたり、モデリングを行って戴き、それに基づいた適切なアドバイスを戴きました。新潟薬科大学 石黒正路教授、サントリー生物有機科学研究所 益田勝吉主席研究員、北海道大学大学院農学研究院 橋本誠准教授には、低分子甘味物質の実験を進めるにあたり、分子モデリングの作製や甘味化合物の光ラベル体の合成などにおいて、大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

フランス国立農学研究所 Loïc Briand 博士には、組み換え体ブラゼインを快く供与して戴いたうえ、ミラクリンの論文の執筆にあたって御助言を戴きました。静岡県立大学 伊藤圭祐助教には、ミラクリンに関する多くの知識・実験技術を教えて戴き、アドバイスならびに豊富なアイデアを戴きました。前東京農業大学講師 清水（井深）章子博士には、研究の相談をさせていただき、ご協力戴きました。日本新薬株式会社山科植物資料館 秋田徹館長ならびに大久保智史研究員には、貴重な実験試料をご供与戴きました。心より感謝申し上げます。

現モネル研究所（前同研究科 ILSI 寄附講座准教授） 松本一朗博士、日清食品寄附講座

石丸喜朗特任助教、生物機能開発化学研究室 岡田晋治助教には、ゼミにおいて厳しいご指摘を戴きました。皆様の研究への熱い姿勢から、研究の進め方等について多くを学ばせていただきました。心より感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 生物機能開発化学研究室 土屋麻美さんには、ミラクリンの研究においてご助力戴きました。有難うございます。最後になりましたが、夫である、同研究室 中島健一朗特任助教には、研究室配属時より実験を指導して戴きました。実験が思うように進まないときも温かく励ましてくれ、精神的にも支えてくれたことを、心より感謝します。

その他、生物機能開発化学研究室、ILSI 寄付講座、日清食品寄附講座の皆様方のお陰で、楽しく充実した研究室生活を送ることができました。感謝申し上げます。

最後になりましたが、博士進学を認めてくれ、経済的・精神的に研究生生活を支えてくれた両親、ならびに兄、姉達に感謝致します。

平成 22 年 12 月

古泉 文子