

博士論文

味覚修飾タンパク質ミラクリンの発現系構築と構造生物学的解析

Taste-modifying Protein Miraculin

-Expression System Construction and Structural Analysis-

東京大学大学院

農学生命科学研究科

応用生命化学専攻

生物機能開発化学研究室

伊藤 圭祐

指導教員

東京大学大学院教授

阿部 啓子

# 目次

|  |     |
|--|-----|
| 序章   | 2   |
| 第1章 ミラクリンのタンパク質科学的解析                             | 19  |
| 1-1. ミラクリンのタンパク質科学的解析                            | 20  |
| 1-2. ミラクリン遺伝子のクローニング                             | 33  |
| 1-3. 抗ミラクリン抗体の作成                                 | 37  |
| 第2章 ミラクリン発現系の構築                                  | 42  |
| 2-1. <i>Escherichia coli</i> を宿主とした発現系構築         | 43  |
| 2-2. <i>Bacillus brevis</i> を宿主とした発現系構築          | 59  |
| 2-3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> を宿主とした発現系構築 | 64  |
| 2-4. <i>Pichia pastoris</i> を宿主とした発現系構築          | 69  |
| 2-5. <i>Aspergillus oryzae</i> を宿主とした発現系構築       | 78  |
| 第3章 ミラクリンの構造生物学的解析                               | 90  |
| 3-1. 変異体解析と分子シミュレーション解析                          | 91  |
| 総合討論   | 101 |
| 参考文献   | 109 |
| 要旨   | 118 |
| 謝辞   | 122 |

## 序章

味は甘・酸・塩・苦・旨味の5基本味から構成されている。なかでも甘味は食品の嗜好性に寄与する最も重要な因子の一つであり、エネルギー源として重要な糖質が示す味であることから、人類がその長い歴史を通じて常に追求してきた。また、近年では、肥満、糖尿病の誘因となるメタボリックシンドロームのリスク低減の観点から、低カロリー甘味料は医療産業上きわめて大きな注目を集めており、新規機能性甘味料の開発が渴望されている。そのような重要性にも関わらず、ヒトがどのように甘味を受容し、甘味感覚を発現するか、甘味受容応答機構の詳細は未知の部分が多い。

甘味物質は数千種類以上も存在し、糖質系甘味物質とそれ以外に分類される(図1)。そのほとんどは低分子であるが、例外として、分子量が10000を超えるにも関わらず、強い甘味を呈するタンパク質の存在が知られている。

### 甘味タンパク質

高分子であるタンパク質は一般に無味である。しかし、いくつかのタンパク質は甘味を呈する(Kant 2005)。その作用機構の低分子甘味物質との比較は興味深い。甘味受容機構の対象としてタンパク質リガンドを解析することで、種々のタンパク質科学的手法による甘味受容の構造機能相関解析が可能である。現在までに知られている甘味タンパク質とその知見を図2に示す。5種の甘味タンパク質は立体構造が解明され、変異体解析および受容体との相互作用部位、活性に重要なアミノ酸残基の特定などが試みられてきた。結果、共通性として $\beta$ -sheetに富んだ二次構造であること、塩基性アミノ酸残基が甘味活性に重要であることなどが挙げられている(Temussi et al. 2002, Spadaccini et al. 2003, Tancredi et al. 2004)。しかし、これらの甘味タンパク質間での一次、および高次構造上の共通性は見出されておらず、甘味発現機構は解明されていない。

### 甘味受容体

甘味受容体の研究は1990年代後半から急速に進展を見せている。味細胞において特異的に発現するT1R2と、その後存在が明らかとなったT1R3の二つの系列のGタンパク質共役型受容体(GPCR)が甘味受容体として機能していることが発見された(Hoon et al. 1999, Bachmanov et al. 2001, Kitagawa et al. 2001, Max et al. 2001, Montmayeur et al. 2002, Sainz et al. 2001)。この受容体は7回膜貫通型であり、クラスCのGPCRに属している。クラスCのGPCRはVenus flytrapと呼ばれる長いN末端細胞外ドメインと膜貫通ドメイン、およびその間に存在するCysリッチドメインの3ドメインを有する(図3)。

HEK 細胞を用いたカルシウムイメージング解析において、T1R2、T1R3 単独では甘味物質への応答がみられず、これらを共発現させた場合にのみ応答が観察されることから、T1R2 と T1R3 はヘテロ二量体(T1R2/T1R3)を形成し、機能すると考えられている (Nelson et al. 2001, Li et al. 2002)。しかし、その詳細な活性化機構は依然として不明の部分が多い。

甘味受容体と 30%程度の相同性を有する GPCR に、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR1) がある。この GPCR は脳内に広く存在し、シナプス伝達やシナプスの可塑性に関与している。昆虫細胞を用いた N 末端細胞外ドメインの発現系が構築され、X 線結晶構造解析がなされた (図 4) (Kunishima et al. 2000, Muto et al. 2007)。それによると、N 末端細胞外ドメインは S-S 結合を介してホモ二量体を形成していた。一方で、T1R2 と T1R3 では mGluR1 において S-S 結合形成にかかわる Cys 残基が保存されていない。mGluR1 の N 末端細胞外ドメインはさらに二つのドメインに分けることができ、その境界面で、リガンドであるグルタミン酸を挟み込むように結合していた。さらに、リガンド結合による N 末端細胞外ドメインの構造変化は、膜貫通ドメインの構造へ影響することが示唆されている。現在までに甘味受容体の構造解析はなされておらず、そのリガンド結合部位は不明であるが、mGluR1 と類似した結合部位を有していると推察される。近年、ヒトとマウスのキメラ受容体を用いたカルシウムイメージング法によりリガンド結合部位が特定され、複数部位で異なるリガンドを受容することが示唆されている。(Xu et al. 2004, Koizumi et al. 2007, Temussi 2007)。これによれば、アスパルテームやネオテームは T1R2 の N 末端細胞外ドメインで、ラクチゾールやシクラメイトは T1R3 の膜貫通領域で、モネリンやブラゼインは T1R3 の Cys リッチドメインで、ネオクリン (NCL) は T1R3 の N 末端細胞外ドメインで受容される。

GPCR の全長構造は、N 末端細胞外ドメインをもたないクラス A の GPCR であるロドプシンと  $\beta 2$  アドレナリン受容体のみ構造が解明されており (Palczewski et al. 2000, Cherezov et al. 2007)、これらは互いに非常に類似した構造であることが明らかとなった。ロドプシンと  $\beta 2$  アドレナリン受容体の構造から得られる知見は、T1R2/T1R3 の膜貫通ドメインの構造に関する情報を与えることから、詳細な解析が期待される。

## 味覚修飾物質

味覚修飾物質とは、食品成分そのものには化学的な変化を与えず、味覚器に働いて一時的に本来の味とは異なる味覚をもたらす物質である。現在までに図 5 に示す物質が知

られている。ギムネマ酸、ジジフィン、ホタロシドは甘味を阻害する。グルマリンは甘味阻害活性を有するタンパク質であり、ヒトには効果がなく、げっ歯類のみに作用する。

ミラクリン (MCL)、NCL の両物質は酸味のあるものを甘味へと変換するユニークな性質を有するが、このような作用を持つ物質は他に報告されていない。その作用機構の解析により、受容体とリガンドの相互作用のみならず、味覚修飾活性の本質である受容体活性化機構等、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新たな知見を得ることが期待される。以下に NCL と MCL について現在までに得られている知見を述べる。

### ネオクリン

NCL は *Curculigo latifolia* 果実に含まれるヘテロ二量体の糖タンパク質で、強い味覚修飾活性を有する。その活性は MCL と類似しているものの、いくつかの差異がみられる。NCL はそのもの自身が甘味を呈し、さらに NCL を口に含んだ後に酸や水を味わうことで、より強い甘味を呈する。水によって誘導される甘味は酸によって誘導される甘味よりも弱く、その作用は 30 分程度持続する。発見当初、味覚修飾活性の本体としてホモ二量体であるクルクリンが精製され、一次構造および遺伝子配列が報告された (Yamashita et al. 1990, Abe et al. 1992)。しかし、クルクリンの遺伝子配列をもとに発現系構築が試みられたが、味覚修飾活性のあるタンパク質は得られなかった。Shirasuka et al. (2004) は *Curculigo latifolia* 果実より再度活性本体の精製を行ない、ヘテロ二量体である NCL を発見した。現在までに、*Escherichia coli* および *Aspergillus oryzae* を用いた発現系が構築されている (Suzuki et al. 2006, Nakajima et al. 2006)。カルシウムイメージング法により、T1R2/T1R3 を介して受容することが明らかとなり (Nakajima et al. 2006)、その受容部位として T1R3 の N 末端細胞外ドメインが重要であることが示唆されている (Koizumi et al. 2007)。

NCL の一次構造はユキノハナレクチンやガーリックレクチンと 50% 程度の相同性を持つ。X 線結晶構造解析の結果、その全体構造はレクチンに類似しているものの、表面電荷に違いが見られ、NCL には塩基性アミノ酸残基の集合した領域が存在することが明らかとなった (Shimizu-Ibuka et al. 2005)。結晶構造を鋳型とした MD シミュレーション解析の結果、NCL はサブユニット間が開いた構造 (open) と閉じた構造 (closed) の平衡状態にあり、低 pH では open コンフォメーション、高 pH では closed コンフォメーションを取ることが示唆された。また、T1R2/T1R3 とのドッキングシミュレーションの

結果、open コンフォメーションの NCL は T1R2/T1R3 と結合しやすくなることが示唆されている (Shimizu-Ibuka et al. 2005)。

## ミラクリン

MCL は西アフリカ原産の *Synsepalum dulcificum* 果実に含まれるホモ二量体の糖タンパク質で、そのもの自身に味が無く、MCL を口に含んだ後に酸を味わうことで、強い甘味を呈する。その作用は3時間以上も持続する。この作用は原住民によって何世紀にも渡り酸味の強い酒やパンに甘味をつけるために用いられてきたことから、その安全性は高く評価されており、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。しかし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。近年、メタボリックシンドロームや糖尿病の原因として、糖質やカロリーの過剰摂取が大きな社会問題となっているが、味覚修飾タンパク質は酸のみで甘味を呈することから、新しいタイプの機能性甘味料として期待されている。また、*S. dulcificum* 果実にインスリン抵抗性改善効果あることが報告され(Chen et al. 2006)、抗糖尿病素材としての利用も期待される。このように、味覚器へ作用する物質が糖質代謝へも影響を与えることは興味深い。

*S. dulcificum* 果実の味覚修飾活性は1800年代から知られていた。Kurihara et al. (1969)により、そのユニークな活性はpHにある程度依存するが、酸物質により強度が異なること、さらにその効果が3時間以上も持続することが報告され、酸により構造変化を起こしたMCLの糖鎖が甘味受容サイトへ結合するという作用モデルが提唱された(図6)。しかし、このモデルの実験的証拠は無く、味覚修飾機構は未解明である。

純粋なMCLを大量に得ることを目的に、硫酸や強アルカリ溶液を用いて精製が試みられてきたが、いずれも精製MCLを得ることはできなかった。Theerasilp et al. (1988)は0.5 M NaClを使用することで効果的に*S. dulcificum* 果実から抽出できることを報告し、MCLの全アミノ酸配列を決定した(Theerasilp et al, 1989) (図7)。それによると、MCLは191アミノ酸からなるホモ二量体であり、1サブユニットあたり11個のArgと12個のLysを含むことから、他の甘味タンパク質と同様に塩基性残基に富んでいる。続いて、N結合型糖鎖の解析がなされ、Asn 42とAsn 186に結合した複合型糖鎖の糖組成が報告された(Takahashi et al. 1990) (図8)。MCLの糖鎖は主に5種類存在し、分子量1400~2500程度の糖鎖が1分子中に4個結合していた。S-S結合についても解析がなされ、ホモ二量体であるMCLは1分子中に14個のCys残基を有し、Cys47とCys92、Cys148

と Cys159、Cys152 と Cys155 で分子内 S-S 結合を、Cys138 が分子間 S-S 結合を形成していることが明らかとなった (Igeta et al. 1991) (図 9)。遺伝子配列解析の結果、MCL 前駆体には 29 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドが存在した (Masuda et al. 1995) (図 10)。このシグナルペプチドはタンパク質の成熟過程で除去される。この遺伝子配列を用いて大腸菌、酵母、タバコ培養細胞を用いた発現系構築が試みられたが、いずれも発現した MCL は単量体であり、活性は検出されていない。最近、遺伝子組み換えレタスおよびトマトによる MCL 生産系が報告された (Sun et al. 2006, Sun et al. 2007)。しかし、これらの系は植物体そのものを用いた MCL の大量生産による流通拡大を目的としており、ハイスループットな発現、解析には不向きである。例えば遺伝子組み換えレタスの場合、種を蒔いてからタンパク質を得るまでに 2 ヶ月程度もかかる。分子レベルでの MCL の機能解析を行うために、微生物を宿主とした MCL 発現系を構築することが渴望されている。

MCL は一次構造上、大豆トリプシンインヒビター等の Kunitz 型トリプシンインヒビター (KTI) と 30%程度の相同性を有する。近年、MCL と 30%程度の相同性を有するラフレモンタンパク質の *E. coli* による発現系が構築され、トリプシン阻害活性と抗菌活性を持つことが報告された (Tsukuda et al. 2006)。MCL は KTI の保存領域を有することから、なんらかのプロテアーゼに対し、阻害活性を有していると考えられる。しかし、ほとんどの KTI は単量体であり、等電点は pH 7~8 付近である。MCL は二量体であり、等電点は pH 10 付近であることから、KTI とは大きく性質が異なる。そのため、プロテアーゼ阻害活性を有するかどうかは不明である。また、MCL が抗菌活性を有するという報告も無い。現在のところ、MCL が味覚修飾活性以外の機能を有するかどうかは不明である。MCL の構造は未知であるが、KTI は  $\beta$ -sheet に富んだ構造であり、 $\beta$ -II タンパク質として分類されている (Manavalan et al. 1987)。

MCL の受容機構は不明であるが、ヒト以外の生物では、高等なサルのみ感受性をしめし、げっ歯類は感受性を示さないことが知られている (Hellecant et al. 1998, Danilova et al. 2006)。また、MCL の味覚修飾活性により発現する甘味が T1R2/T1R3 を介したものであるかどうかは不明である。

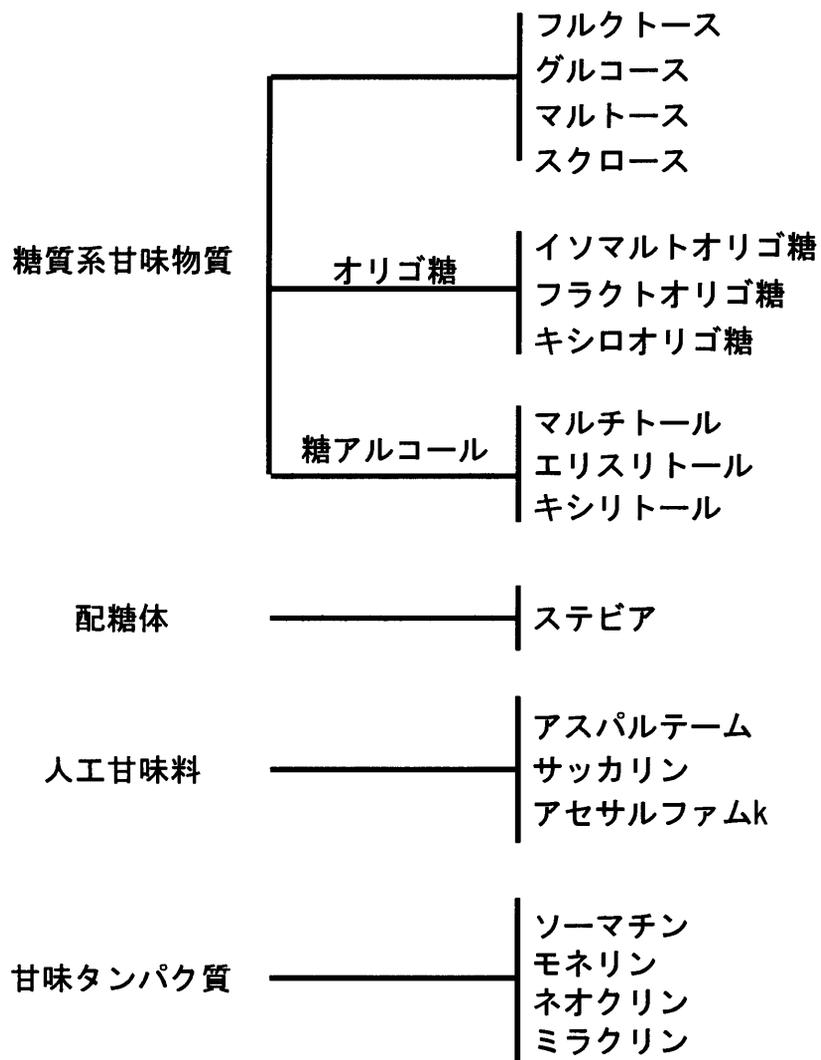
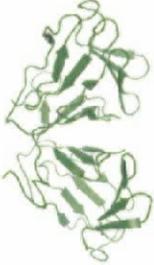


図1：主な甘味物質

甘味タンパク質

| ソーマチン (Thaumatin)   | モネリン (Monellin)   | ブラゼイン (Brazzein)   | マピンリン (Mabinlin)                   | ペンタジン (Pentadin)                                 | リゾチーム (Lysozyme)  |
|---|---|--|------------------------------------|--|---|
| 3000倍   | (3000倍)   | (500倍)   | (100倍)                             | (500倍)   | (200倍)  |
| <i>Thaumatococcus daniellii</i> Benth<br>西アフリカ                                      | <i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> Diels<br>西アフリカ                                    | <i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon<br>西アフリカ                                   | <i>Capparis masakai</i> L.vl<br>中国 | <i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon<br>西アフリカ | Hen egg white   |
| 22.2<br>207<br>8  | 10.7<br>44 (A鎖) 50 (B鎖)<br>0  | 6.5<br>54<br>8   | 12.4<br>33 (A鎖) 72 (B鎖)<br>4       | 12.0<br>報告無し<br>有り                               | 14.5<br>129<br>4  |
| (2)<br>(3)  | (6)<br>(8)<br>(9)   | (11)<br>(12)<br>(13)   | (15)<br>(16)<br>(17)               | (19)   | (20)  |
|  |  |  | preliminaryの報告のみ                   | 報告無し   |  |
| 単量体<br>A.oryzae・A.niger<br>ジャガイモ  | ヘテロ二量体<br>食品酵母・化学合成<br>植物   | 単量体<br>E.coli<br>化学合成  | ヘテロ二量体<br>化学合成<br>植物               | 報告無し<br>報告無し                                     | 単量体<br>E.coli<br>酵母   |
| サブユニット構成<br>活性タンパク質の<br>発現系   |   |  |                                    |  |   |

味覚修飾タンパク質

| ミラクリン (Miraculin)                    | ネオクリン (Neoculin)  |
|--------------------------------------|---|
| 無味、酸味→甘味<br>(400倍)                   | 甘味、酸味→甘味<br>(400倍)  |
| <i>Richadella dulcifica</i><br>西アフリカ | <i>Curculigo latifolia</i><br>西マレーシア  |
| 48<br>191<br>7                       | 24.9<br>113 (A鎖) 114 (B鎖)<br>4  |
| (25)<br>(26)<br>(27)                 | (30)<br>(31)<br>(32)  |
| 報告無し                                 |  |
| 単量体<br>報告無し                          | ヘテロ二量体<br>報告無し  |
| サブユニット構成<br>活性タンパク質の<br>発現系          | サブユニット構成<br>活性タンパク質の<br>発現系   |

- van der Wel, H. and K. Loeve, 1972
- Iyengar et al., 1979
- Ogata et al., 1992
- Hahm, Y. T. and C. A. Batt, 1990
- Faus et al., 1998
- Morris et al., 1973
- Kohmura et al., 1990
- Ogata et al., 1987
- Somoza et al., 1993
- Kondo et al., 1997
- Ming, D. and G. Hellekant, 1994
- Caldwell et al., 1998
- Gao et al., 1999
- Assadai-porter et al., 2000
- Liu et al., 1993
- Nirasawa et al., 1993
- Guan et al., 2000
- Kohmura and Ariyoshi, 1998
- van der Wel et al., 1989
- Maehashi and Udaka, 1998
- Blake et al., 1967
- Fischer et al., 1993
- Oberto et al., 1985
- Kurihara et al., 1969
- Theerasilp and Kurihara, 1988
- Theerasilp et al., 1989
- Igeta et al., 1991
- Ito et al., 2007
- Sun et al., 2006
- Yamashita et al., 1995
- Shirasuka et al., 2004
- Shimizu-Ibuka et al., 2006
- Nakajima et al., 2006
- Suzuki et al., 2004

図2：甘味タンパク質と味覚修飾タンパク質

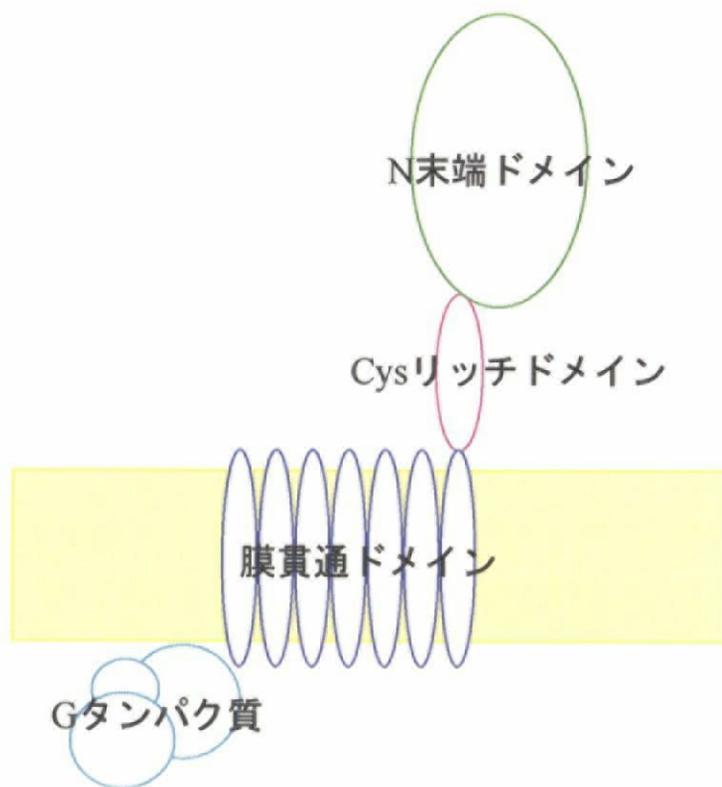


図3：クラスCのGPCRの模式図

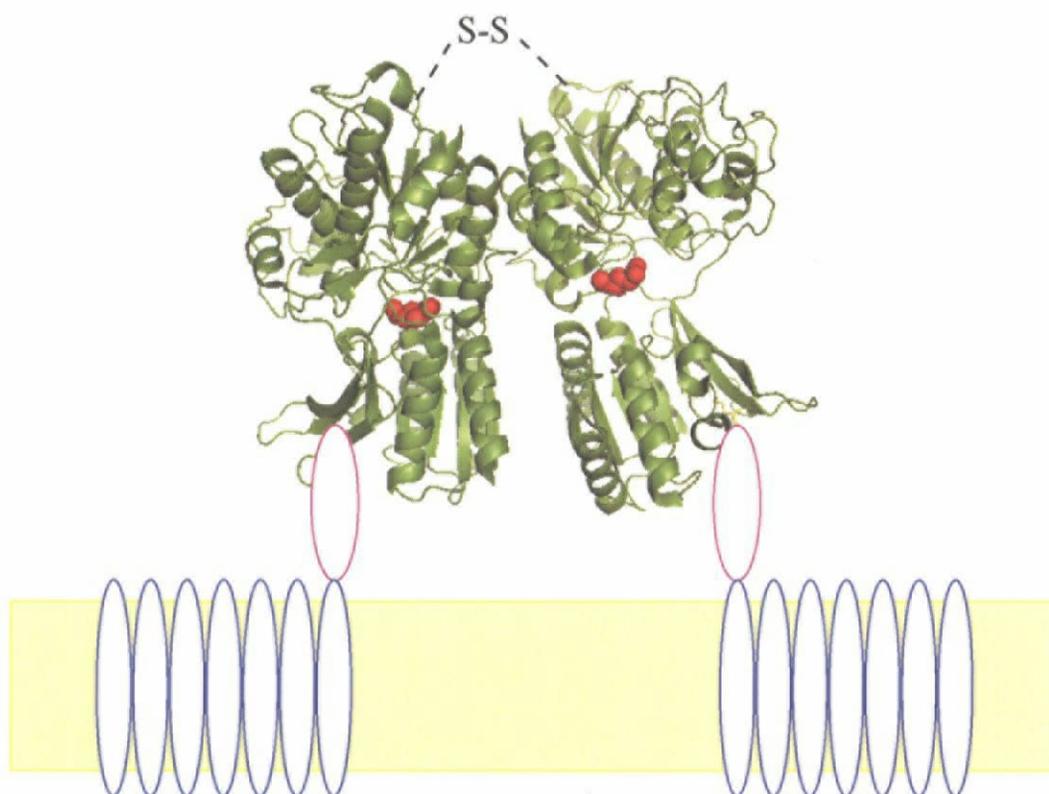


図4 : mGluR1の結晶構造

全体構造をリボンモデル、リガンドであるグルタミン酸を空間充填モデルで示す。ピンクはCysリッチドメイン、青は膜貫通ドメインの模式図。破線で示したS-S結合は結晶中では揺らいでおり、観察されない。

| 物質            | 起源                                  | 効果              | 活性本体  |
|---------------|-------------------------------------|-----------------|-------|
| ミラクリン         | <i>Richardella dulcifica</i>        | 酸味を甘味へ変換        | タンパク質 |
| ネオクリン         | <i>Curculigo latifolia</i>          | 酸味を甘味へ変換、水を甘くする | タンパク質 |
| ストロジン         | <i>Staurogyne merguensis Kuntze</i> | 水を甘くする          | 配糖体   |
| ギムネマ酸         | <i>Gymnema sylvestre</i>            | 甘味阻害            | 配糖体   |
| グルマリン         | <i>Gymnema sylvestre</i>            | 甘味阻害            | タンパク質 |
| リボフラビン結合タンパク質 | <i>Gallus gallus</i>                | 甘味阻害、苦味阻害       | タンパク質 |
| ジジフィン         | <i>Zizyphus jujuba</i>              | 甘味阻害            | 配糖体   |
| ホタロシド         | <i>Hovenia dulcus</i>               | 甘味阻害            | 配糖体   |

図5：現在までに知られている味覚修飾物質

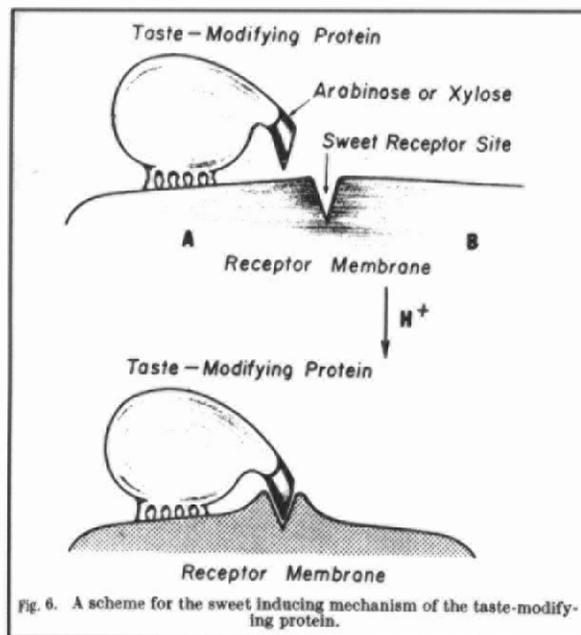


Fig. 6. A scheme for the sweet inducing mechanism of the taste-modifying protein.

図6：ミラクリンの作用機構モデル (Kurihara et al. 1969)  
 中性条件では味細胞へ結合しており、酸性条件下で構造変化した糖鎖が  
 甘味受容サイトへ結合することで甘味が誘導される。

dsapnpvldi dgeklrtgtn yyivpvlrhd gggltsatt pngtfvcppr  
vvqtrkevhd drplaffpen pkedvrvst dlninfsafm pcrwtsstvw  
rldkydestg qyfvtiggvk gnpgpetiss wfkieefcgs gfyklvcpt  
vcgsckvkcg dvgiyidqkg rrrlalsdkp fafefnktvy f

図7 : MCLのアミノ酸配列 (Theerasilp et al, 1989)

Proposed structures of N-linked oligosaccharides obtained from miraculin

|   |  | Total<br>% | Asn-42<br>% | Asn-186<br>% |
|---|--|------------|-------------|--------------|
| A |  | 58.0       | 37.6        | 80.5         |
| B |  | 8.2        | 11.4        | 4.9          |
| C |  | 18.8       | 33.3        | 6.7          |
| D |  | 10.9       | 10.5        | 6.4          |
| E |  | 4.1        | 7.2         | 1.5          |

図8 : MCLのN結合型糖鎖 (Takahashi et al. 1990)

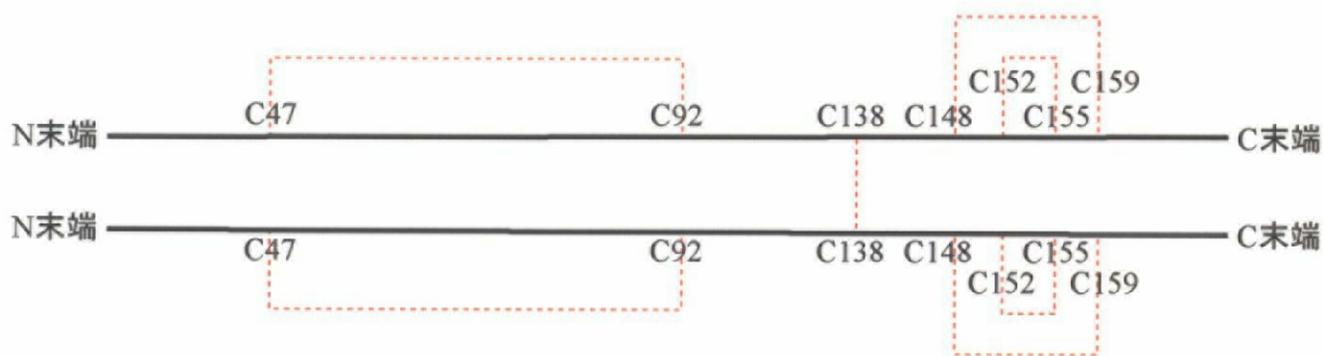


図9：MCLのS-S結合 (Igeta et al. 1991)  
MCLのポリペプチド鎖を実線で、S-S結合を赤破線で示す。

gattcggcac ccaatccggt tcttgacata gacggagaga aactccggac ggggaccaat  
tattacattg tgccggtgct ccgcgaccat ggcggcggcc ttacagtatc cgccaccacc  
cccaacggca ccttcgtttg tccaccaga gttgtccaaa cacgaaagga ggtcgaccac  
gatcgcccc tcgctttctt tccagagaac ccaaaggaag acgttgttcg agtctccacc  
gatctcaaca tcaatttctc ggcgttcatg ccctgtcgtt ggaccagttc caccgtgtgg  
cggctcgaca aatacgatga atccacgggg cagtacttcg tgaccatcgg cggtgtcaaa  
ggaaaccag gtcccgaac cattagtagc tggtttaaga ttgaggagt ttgtggtagt  
ggtttttaca agcttgttt ctgtcccacc gtttgtggtt cctgcaaagt aaaatgcgga  
gatgtgggca tttacattga tcagaagga agaaggcgtt tggctctcag cgataaacca  
ttcgcattcg agttcaacaa aaccgtatac ttctaa

図10 : MCLのcDNA配列 (Masuda et al. 1995)

## 本論

T1R2/T1R3 と甘味物質との相互作用機構、および活性化機構は不明である。その解析は味覚という化学感覚の解明において重要であるだけでなく、新規機能性甘味料の設計、探索への有用な知見ともなり得る。

背景で述べたように、T1R2/T1R3 は複数のリガンド結合部位を持つことから、それによって引き起こされる受容体活性化機構の解析は重要である。味覚修飾タンパク質である MCL と NCL は、環境によってその特性が変化し、受容体を活性化させる。この性質は、受容体活性化の on/off を切り替える分子スイッチとして捉えることもでき、受容体活性化機構そのものの解析において、新たな切り口を与え得ると期待される。

NCL は発見以来急速に研究が進み、機能発現機構、T1R2/T1R3 による受容機構が解明されつつある。一方、MCL は微生物を用いた発現系が構築されていないために、分子レベルでの研究はなされていない。MCL の味覚修飾活性は NCL と類似しているにもかかわらず、NCL とは異なり、そのもの自身の甘味がなく、さらに持続性が非常に強い。MCL の味覚修飾活性の発現機構が解明されればと NCL の味覚修飾機構を比較することによって、甘味受容機構の解明に一層近づくことが可能となる。

本研究では、MCL の機能発現機構の構造生物学的解析を目的として、第 1 章の研究では発現系構築のための基盤研究として活性本体の同定および遺伝子クローニングを行い、第 2 章の研究では微生物を宿主とした MCL の発現系を構築した。第 3 章の研究では構築した発現系を用いた変異体解析、およびシミュレーション解析によって MCL の味覚修飾活性発現解明について論述する。

## 第1章 ミラクリンのタンパク質科学的解析

## 1-1. ミラクリンのタンパク質科学的解析

### 序

MCLはその特異な性質から、約40年前の発見以来注目を集めてきた。しかし、材料の入手が比較的容易にもかかわらず、活性化機構の分子レベルでの知見は得られていない。その理由としてもっとも大きな要因は、微生物による発現系構築がなされていないことである。近年行われているタンパク質の分子生物学的研究の多くは、発現系の構築無くして行なうことはできず、タンパク質科学研究における発現系構築は最重要課題ともいえる。本研究の開始当初、MCLの発現系は報告されておらず、発現系が構築されていない原因として、活性本体が異なること、別の補助因子が必要であること、発現系との相性が悪いこと等、多くの可能性が考えられた。そこで、*S. dulcificum* 果実より、改めて活性本体の分離精製、再同定を行い、発現系構築への基盤とした。

### 1-1-1. 方法

#### *S. dulcificum* 果実からの MCL の粗精製

-80°Cへ凍結保存したミラクルフルーツ果実の果肉を、冷却した破碎 buffer(10 mM Na-acetate pH 5.0)を用いてポリトロンホモジナイザーにより破碎した。30 min, 4°C, 12000 rpm 遠心分離を行い、沈殿を回収した。破碎 buffer を加え、破碎～遠心による同様の操作を3回繰り返した。沈殿に溶出 buffer(100 mM Na-acetate (pH 5.0), 500 mM NaCl) 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 min, 4°Cで静置した。30 min, 4°C, 12000 rpm 遠心分離を行い、上清を回収した。4°Cで攪拌しながら、細かく磨り潰した硫酸を少しずつ加えた。50%飽和濃度になるまで硫酸を加え、1 h 静置した。30 min, 4°C, 12000 rpm 遠心分離を行い、沈殿を粗精製サンプルとした。

#### 精密精製

粗精製サンプルを 20 mM Na-acetate buffer(pH 5.0)に溶解し、同 buffer に対して透析した。POROS-HS カラムを用いて、A buffer(20 mM Na-Acetate(pH 5.0)) –B buffer(20 mM Na-Acetate(pH 5.0), 1 M NaCl)のリニアグラジエントにより HPLC 精製を行った。HPLC 後のフラクションを活性評価した。活性の評価法には、図1のシートを用い、基準アスパルテームを明確に判別できるパネルによって評価した。各基準アスパルテーム溶液を順に味わい、甘味強度を覚えた。score 9, >2 mM; score 8, 2 mM; score 7, 2-1 mM; score 6, 1 mM; score 5, 1-0.5 mM; score 4, 0.5 mM; score 3, 0.5-0.25 mM; score 2, 0.25 mM; and score 1, <0.25 mM。次に MCL 100 µl を口に含み、1 min 保持した後、吐き出した。400 µl の 100 mM Na-Citrate (pH 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0) を口に含み、誘導される甘味を、基準アスパルテーム相当の甘味強度として評価した。活性 fraction を回収し、精製 native-MCL(nMCL) とした。

#### トリプシン、加熱処理

nMCL を 3 min, 95°C、またはトリプシン処理 (0.05 mg/mL トリプシン, 24 h, 37°C, pH 6.0) を行い、味覚修飾活性の変化を解析した。

#### 二次構造解析

nMCL の二次構造を circular dichroism (CD) により測定した。CD スペクトルは Jasco-810 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD)を用いて測定した。0.1 mg/mL の nMCL

を 100 mM Na-Cit(pH 6.0)に透析した後、Range 240-190 nm, scanning rate 200 nm/min, response time 1 sec で測定した。Buffer のスペクトルを差し引き、J-700 プログラムによって二次構造を解析した。

### 1-1-2. 結果

加熱、トリプシン処理

nMCL は加熱、またはトリプシン処理によって、活性が大幅に低下した (図 2)。

#### SDS-PAGE

HPLC 精製後のクロマトチャートは、1 つのブロードなピークを示していたが、ピークの前後半で分子量が異なる、少なくとも 3 種類以上のタンパク質が検出された。これらを分子量別に MCL-I、II、III の 3 種類へ分離し (図 3)、活性の評価を行ったところ、全てのサンプルで同程度の活性が検出された (図 4)。また、MCL-I, II, III 混合物の N 末端アミノ酸配列、およびトリプシン消化によって生じた断片ペプチドのアミノ酸配列は、全て既知の MCL のデータと一致した。(図 5)

二次構造

CD スペクトル解析の結果、nMCL は強い負のスペクトルを示した (図 6)。その二次構造構成比は  $\alpha$ -helix 9.9%,  $\beta$ -sheet 76%, Turn 4.5%, Random coil 8.4%であった。さらに、nMCL の CD スペクトルは pH 条件に伴った変化が検出された。

### 1-1-3. 考察

活性本体の再同定

加熱、およびトリプシン処理により活性が大幅に低下したことから、活性本体はタンパク質であることが強く示唆された。また、SDS-PAGE、N 末端および内部アミノ酸配列解析の結果、活性画分に含まれるタンパク質には報告されている MCL 以外は検出されなかった。これらのことから、活性本体は既知の“味覚修飾タンパク質ミラクリン”そのものであると結論した。

SDS-PAGE の結果、nMCL には分子量の異なる、少なくとも MCL-I、II、III の 3 種類

が存在することが明らかとなった。MCL に付加している糖鎖は多くのバリエーションが存在する (図 7) (Takahashi et al. 1990)。MCL の糖鎖を分子量と存在比から計算すると、その分布は図 8 に示すような主に 3 つの群からなり、SDS-PAGE 上で 3 バンドに分離されることとも一致する (図 3)。このことから、MCL-I、II、III は付加した糖鎖の異なる MCL であることが示唆された。MCL の発見当初、MCL の糖鎖部位が甘味受容サイトへ結合することで活性が発現するというモデルが提唱された (Kurihara and Beidler 1969)。しかし、MCL の糖鎖は植物中に一般的にみられる複合型糖鎖であり、糖鎖構造そのものが味覚修飾活性を規定しているとは考えにくい。さらに、本研究で新たに取得した糖鎖構造の異なる MCL-I、II、III 間で味覚修飾活性に大きな差は検出されなかった (図 4)。これらのことから、味覚修飾活性には、糖鎖構造そのものが直接必要ではないと考えられる。

## 二次構造解析

nMCL の CD スペクトルは、強い負のスペクトルであることから、その二次構造は  $\beta$ -sheet に富んでいることが示唆された。MCL の一次構造は KTI と 30%程度の相同性がある (Sweet et al. 1974, Theerasilp et al. 1989)。MCL の高次構造に関する知見は報告されていないが、KTI との間において 1 次構造のみならず、二次構造上においても類似性がみられることが明らかとなった。MCL には KTI に共通な保存領域を有するが、プロテアーゼ阻害活性は確認されていない。MCL はトリプシンにより容易に分解されることから (図 5)、対応するプロテアーゼが異なる可能性が考えられる。MCL がインヒビター活性そのものを持たないのであれば、MCL の特徴である塩基性アミノ酸残基が多いこと、MCL が二量体構造を取ることに起因しているのかもしれない。

nMCL の CD スペクトルは pH に伴って変化した。MCL は酸により味覚修飾活性が発現することから、酸性条件下においてなんらかの構造変化が起こると考えられる。KTI は  $\beta$ -sheet に富むことから、 $\beta$ -II タンパク質として分類されているが、 $\beta$ -II タンパク質の CD スペクトルは S-S 結合や芳香族アミノ酸の側鎖によって影響を受けやすく (Ikeda et al. 1968, Wu et al 1992, Pouvreau et al. 2004, Manavalan et al. 1987)、二次構造の解析は困難である。そのため、MCL の CD スペクトルの変化が二次構造の変化を反映しているかどうかは FT-IR 等、別の手法による解析が必要である。他に、分光学的手法によりタンパク質の構造変化を検出する方法として、Trp 残基の側鎖の蛍光の変化を解析することができる。この手法は Trp 側鎖の微弱な蛍光が、その周辺環境によって変化すること

を検出する方法である。MCL は 1 分子内に 6 個の Trp 残基を有するが、筆者の行なった予備的な実験では、pH の違いによる nMCL の Trp 蛍光の変化は検出できなかった (data not shown)。このことから、CD によって検出された MCL の構造変化は、分子全体で起こるのではなく、Trp 残基周辺以外の局所部位で起きていると考えられる。

MCL の構造変化は活性化と密接に結びついていると推察されることから、その検出、および詳細な解析が今後の課題である。

- ①水を飲む。
- ④標準液 1、2、3 の順に 400  $\mu$ l を口に含み、甘味を覚える。溶液間には水を口に含む。
- ⑤水を飲む。
- ⑥ミラクリン溶液 100  $\mu$ l を 1 分間口に含む。
- ⑦水を飲む。
- ⑧A、B、C、D の順に口に含み、標準液と比較した甘味値を記入する。溶液間には水を口に含む。

|   |  | 1 |  | 2 |  | 3 |  |
|---|--|---|--|---|--|---|--|
| A |  |   |  |   |  |   |  |
| B |  |   |  |   |  |   |  |
| C |  |   |  |   |  |   |  |
| D |  |   |  |   |  |   |  |

図 1：官能試験測定シート

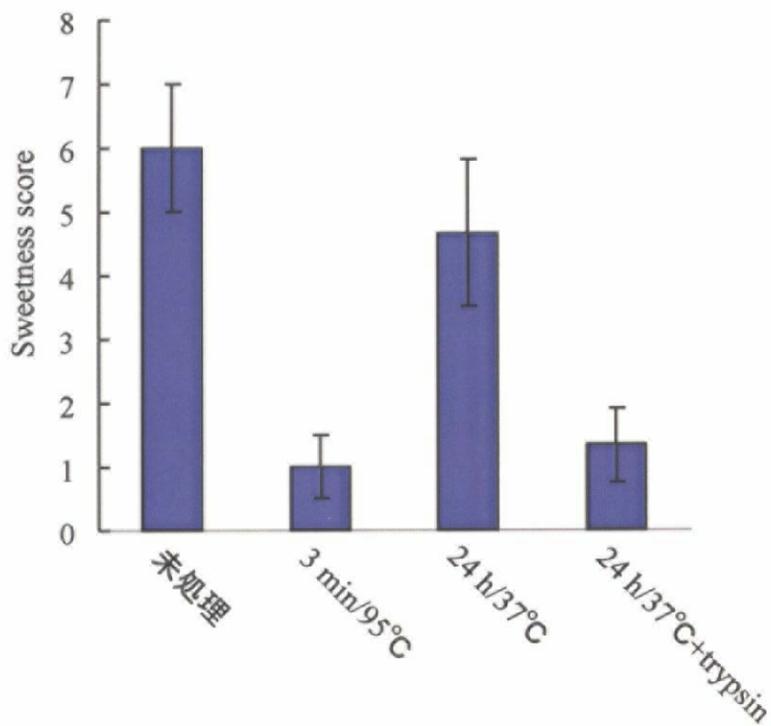


図2：加熱、トリプシン処理による味覚修飾活性への影響  
nMCLを未処理、加熱処理、トリプシン処理後にMCL濃度0.1 mg/mLの条件で  
活性測定した (n=3)。  
加熱およびトリプシン処理により、味覚修飾活性は大幅に減少した。

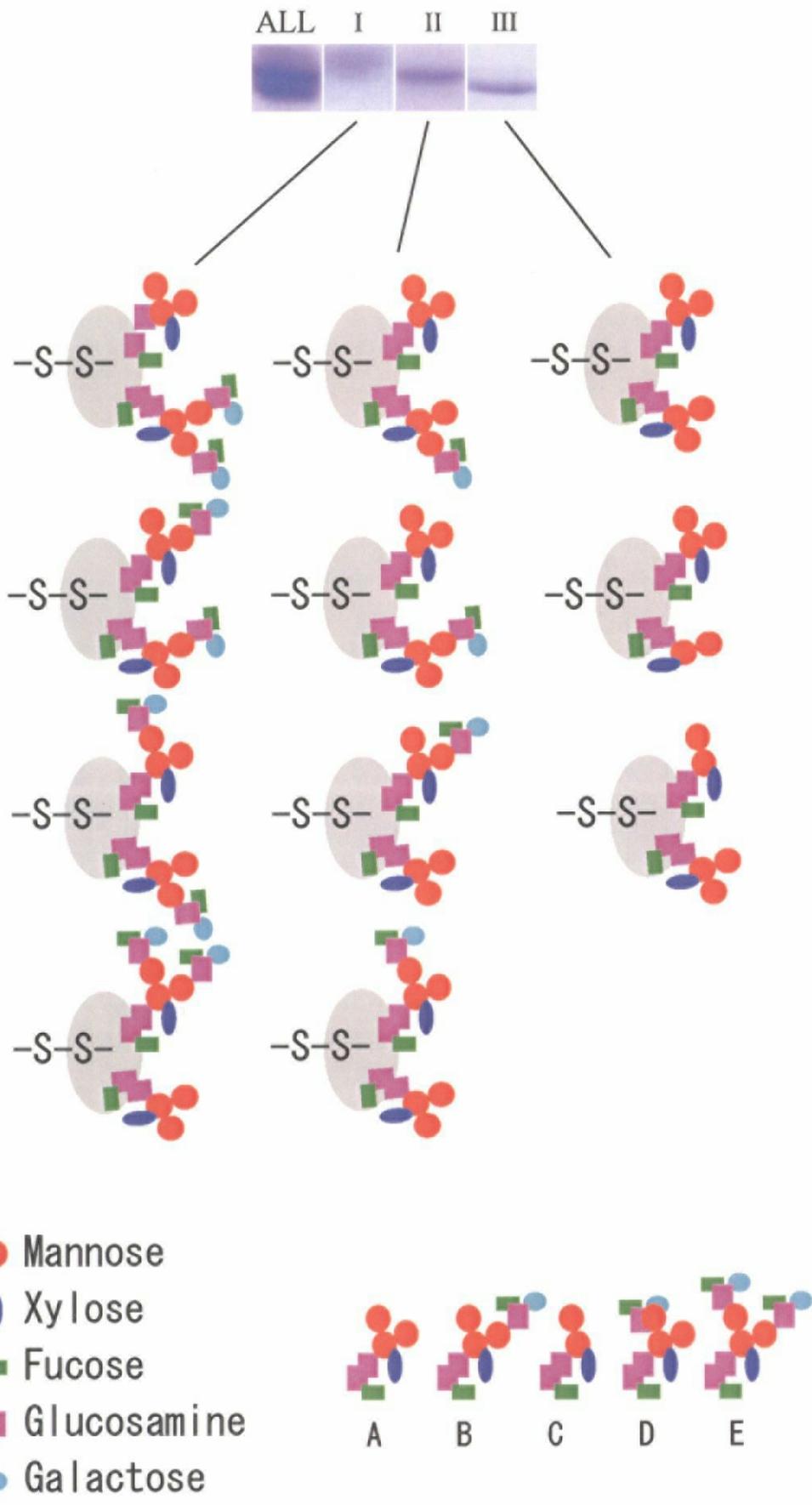


図3 : SDS-PAGE (CBB染色) によって分離されるMCL-I, II, IIIと、それらの分子量に相当する糖鎖バリエーション  
 糖鎖A,B,C,D,EはTakahashi等の報告に基づく (Takahashi et al. 1990) 。

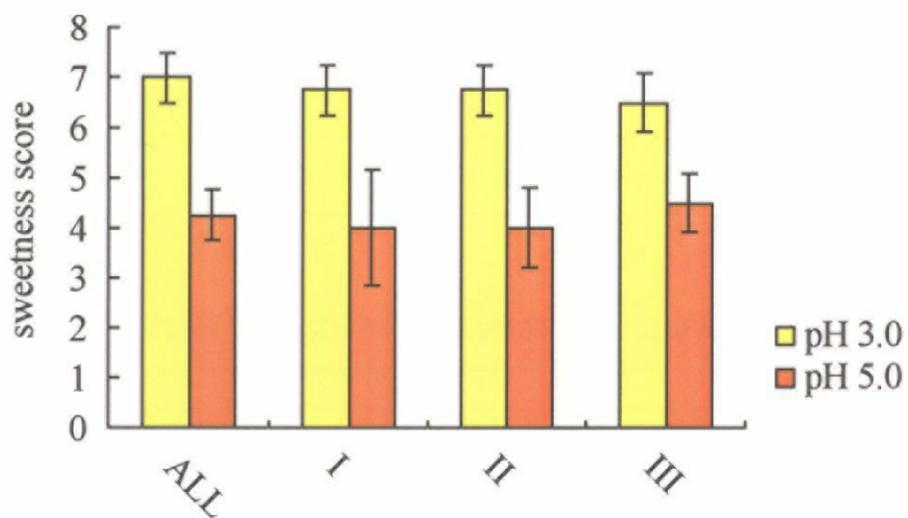


図4 : MCL-I, II, IIIおよびそれらを分離前の味覚修飾活性  
MCL濃度0.1 mg/mLの条件で活性測定した (n=3)。  
いずれのサンプルも同程度の味覚修飾活性が検出された。

MCL. 1: MKELTMLSLSFFFVSALLAAAANPLL SAADSAPNPVLDIDGKLRGTGNYIYIPVLRDHG 60  
 peptide 1. :-----DSAPNPVLDIDGKLRGTGNYIYIPVLRDHG  
 peptide 2. :-----  
 peptide 3. :-----LRTGTNYIYIPVLRDHG  
 peptide 4. :-----  
 peptide 5. :-----  
 peptide 6. :-----  
 peptide 7. :-----DSAPNPVLDIDGKLR-----

MCL. 61: GGLTVSATTPNGTFVCPPRVQTRKEVDHDRPLAFFPENPKEDVVRVSTDNLINFSAFMP 120  
 peptide 1. :GGLTVSATT-----  
 peptide 2. :-----  
 peptide 3. :GGLTVSATTP-----  
 peptide 4. :-----  
 peptide 5. :-----  
 peptide 6. :-----EDVVRVSTDNLINFSAFMP  
 peptide 7. :-----

MCL. 121: CRWTSSTVWRLDKYDESTGQYFVTIGGVKGNPGETISSWFKIEEFCGSGFYKLVFCPTV 180  
 peptide 1. :-----  
 peptide 2. :-----  
 peptide 3. :-----  
 peptide 4. :-----  
 peptide 5. :-----GNPGETISSWFKIEEFCGSGFYKLVF-----  
 peptide 6. :CRWTSSTVWRLD-----  
 peptide 7. :-----

MCL. 181: CGSCKVKCGDVG IYIDQKRRRLALSDKPF AFEFNKTVYF 220  
 peptide 1. :-----  
 peptide 2. :-----CGDVG IYIDQKRRR-----  
 peptide 3. :-----  
 peptide 4. :-----VKCGDVG IYIDQKRRRLALSDKP-----  
 peptide 5. :-----  
 peptide 6. :-----  
 peptide 7. :-----

図5：MCLの配列と、本研究で精製した活性本体の部分配列

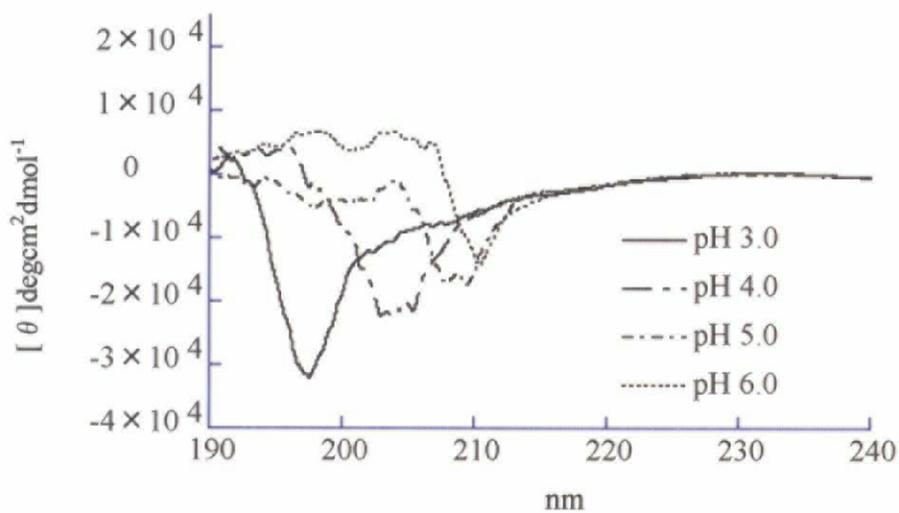
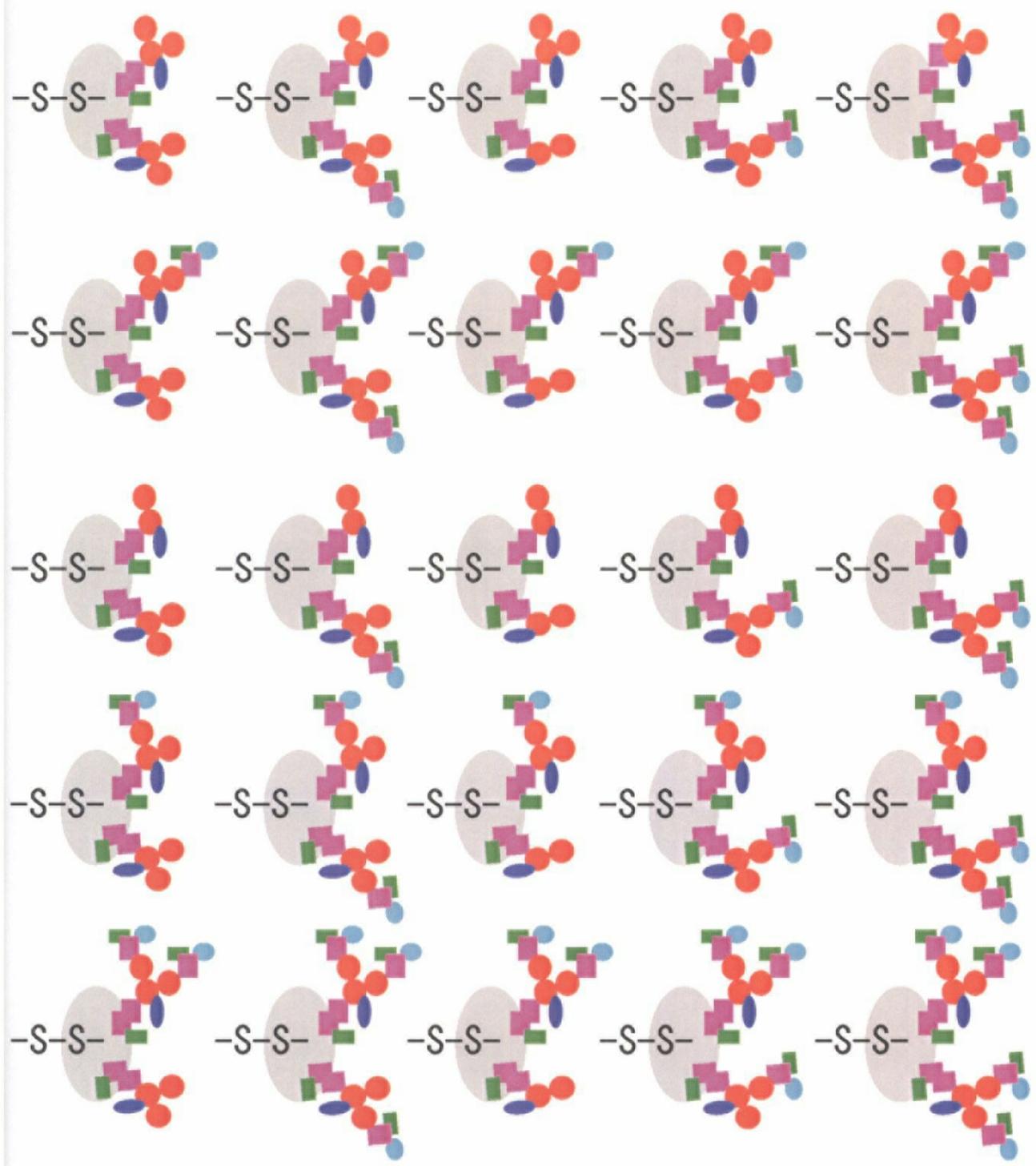


図6 : nMCLのCDスペクトル

各pHのクエン酸緩衝液中でのCDスペクトルを測定した。

buffer自体のスペクトルは差し引いた。

nMCLは $\beta$ -sheetに富んだ二次構造であり、pHによるスペクトルの変化が観察された。



- Mannose
- Xylose
- Fucose
- Glucosamine
- Galactose

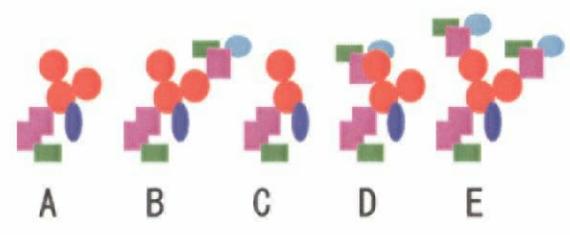


図7: MCLの糖鎖バリエーション  
MCL単量体に存在する糖鎖を描写した。  
糖鎖A,B,C,D,EはTakahashi等の報告に基づく (Takahashi et al. 1990)。

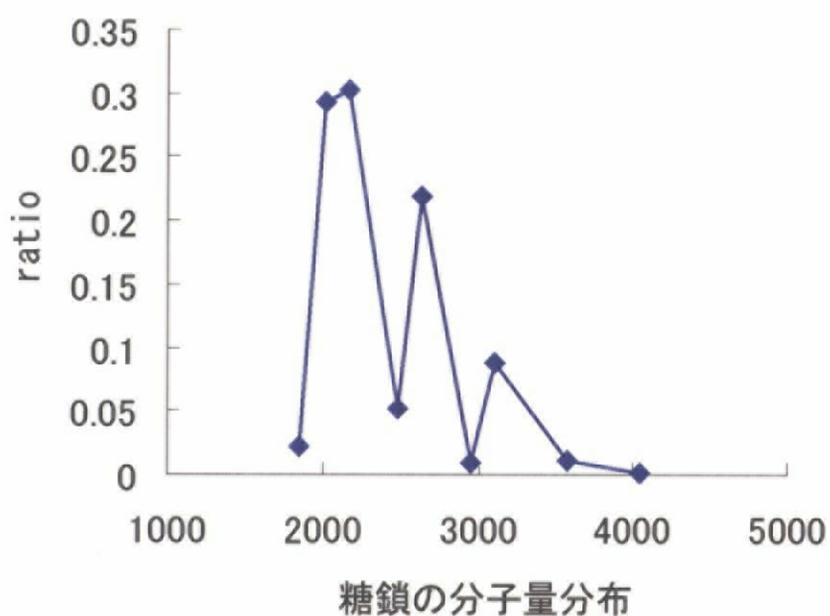


図8 : MCLの糖鎖分布  
 Takahashi等の報告に基づいて糖鎖の分子量ごとに分類し、  
 その存在比を求めた (Takahashi et al. 1990)。  
 MCLの糖鎖は主に3つの分子量分布を示した。

## 1-2. ミラクリン遺伝子のクローニング

### 序

異種宿主での発現系構築のために、目的遺伝子のクローニングは必須である。また、クローニングの過程で、MCL ホモログの存在も検出できる可能性がある。そこで、*S. dulcificum* 果実より、MCL をコードする *mcl* 遺伝子のクローニングを行った。

### 1-2-1. 方法

#### RNA の抽出

乳鉢を用い、*S. dulcificum* 果実を液体窒素中で破砕した。フェノール 5 mL、100 mM Tris-HCl (pH 8.5)、5 mM EDTA、1% SDS、200 mM DTT 5 mL を加え、激しく攪拌した。10 min, 4°C, 4000 rpm 遠心分離し、水層を回収した。フェノール 5 mL を加え、激しく攪拌～遠心分離までの同操作を 3 回繰り返した。水層に 300  $\mu$ l 3 M CH<sub>3</sub>COOH, 7.5 mL 冷 ETOH を加え、-20°C で 1 h 静置した。20 min, 4°C, 12000 rpm 遠心分離し、上清を捨てた。75% ETOH を加えて再び遠心分離した。上清を捨て、dry up した。TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) 1 mL を加えて沈殿を溶解した。5 min, 4°C, 15000 rpm 遠心分離し、上清を回収した。等量の 4 M LiCl を加え、氷上で 1 h 静置した。10 min, 4°C, 15000 rpm 遠心分離し、沈殿を回収した。70% EtOH 800  $\mu$ l を加えて再び遠心分離し、dry up した。100  $\mu$ l の滅菌水で溶解し、1  $\mu$ l の Rnase inhibitor を加えた。First-Strand cDNA synthesis kit (Amersham Biosciences) を用い、cDNA を合成した。

#### クローニング

合成した cDNA をテンプレートとしてプライマー 5'-gattcggcaccatccggttctga-3' と 5'-ttagaagtatacggtttgaactcgaatgcgaatggttat-3' を用い、PCR によって mcl を増幅した。得られた PCR 産物は pBluescript ベクターの EcoRV サイトへ導入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  を用いて形質転換を行った。

#### シークエンス

ブルーホワイトセクションによって形質転換体を選別した。LB 液体培地 (0.5% Yeast extract, 1% Tryptone, 1% NaCl) により形質転換体を培養した。ミニプレップによりプラスミドを得、DNA シークエンサー (Applied Biosystems) によって塩基配列を解析した。

### 1-2-2. 結果と考察

得られた 10 クローンについて塩基配列を解析した結果、全てのクローンが、報告されている mcl 遺伝子と同じ塩基配列であった (図 1)。この結果から、少なくとも *S. dulcificum* 果実に存在する大部分の MCL をコードする mRNA は、報告されている mcl

遺伝子と同じであると考えられる(Masuda et al. 1995)。Masuda 等の報告では、mcl 遺伝子はシグナルペプチドと予想される Pro 配列を有する。PCR primer 5'-atgaaggaattaacaatgctctctctcgttcttc-3'を 5'側 primer として使用した場合、Pro 配列を有する mcl 遺伝子の存在が確認された。しかし、nMCL タンパク質には Pro 配列が存在しないことから、以降の実験には Pro 配列を除いた配列を MCL の遺伝子配列として使用した。

```

miraculin.      0:----- 0
promiraculin.  1:ATGAAGGAATTAACAATGCTCTCTCTCTCGTTCTTCTTCGTCTCTGCATTGTTGGCAGCA 60

miraculin.      1:-----GATTTCGGCACCCAATCCGGTTCTTGACATAGAC 33
promiraculin.  61:GCGGCCAACCCACTGCTTAGTGCAGCGGATTTCGGCACCCAATCCGGTTCTTGACATAGAC 120
                *****

miraculin.      34:GGAGAGAAACTCCGGACGGGGACCAATTATTACATTGTGCCGGTGCTCCGCGACCATGGC 93
promiraculin.  121:GGAGAGAAACTCCGGACGGGGACCAATTATTACATTGTGCCGGTGCTCCGCGACCATGGC 180
                *****

miraculin.      94:GGCGGCCTTACAGTATCCGCCACCACCCCAACGGCACCTTCGTTTGTCCACCCAGAGTT 153
promiraculin.  181:GGCGGCCTTACAGTATCCGCCACCACCCCAACGGCACCTTCGTTTGTCCACCCAGAGTT 240
                *****

miraculin.     154:GTCCAAACACGAAAGGAGGTGACACGATCGCCCCCTCGCTTTCTTTCCAGAGAACCCA 213
promiraculin.  241:GTCCAAACACGAAAGGAGGTGACACGATCGCCCCCTCGCTTTCTTTCCAGAGAACCCA 300
                *****

miraculin.     214:AAGGAAGACGTTGTTTCGAGTCTCCACCGATCTCAACATCAATTTCTCGGCGTTCATGCC 273
promiraculin.  301:AAGGAAGACGTTGTTTCGAGTCTCCACCGATCTCAACATCAATTTCTCGGCGTTCATGCC 360
                *****

miraculin.     274:TGTCGTTGGACCAGTTCCACCGTGTGGCGGCTCGACAAATACGATGAATCCACGGGGCAG 333
promiraculin.  361:TGTCGTTGGACCAGTTCCACCGTGTGGCGGCTCGACAAATACGATGAATCCACGGGGCAG 420
                *****

miraculin.     334:TACTTCGTGACCATCGGCGGTGTCAAAGGAAACCCAGGTCCCGAAACCATTAGTAGCTGG 393
promiraculin.  421:TACTTCGTGACCATCGGCGGTGTCAAAGGAAACCCAGGTCCCGAAACCATTAGTAGCTGG 480
                *****

miraculin.     394:TTTAAGATTGAGGAGTTTTGTGGTAGTGGTTTTTACAAGCTTGTTTTCTGTCCCACCGTT 453
promiraculin.  481:TTTAAGATTGAGGAGTTTTGTGGTAGTGGTTTTTACAAGCTTGTTTTCTGTCCCACCGTT 540
                *****

miraculin.     454:TGTGGTTCCTGCAAAGTAAAATGCGGAGATGTGGGCATTTACATTGATCAGAAGGGAAGA 513
promiraculin.  541:TGTGGTTCCTGCAAAGTAAAATGCGGAGATGTGGGCATTTACATTGATCAGAAGGGAAGA 600
                *****

miraculin.     514:AGGCGTTTGGCTCTCAGCGATAAAACCATTCGCATTCGAGTTCAACAAAACCGTATACTTC 573
promiraculin.  601:AGGCGTTTGGCTCTCAGCGATAAAACCATTCGCATTCGAGTTCAACAAAACCGTATACTTC 660
                *****

miraculin.     574:TAA 576
promiraculin.  661:TAA 663
                ***

```

図1：報告されているMCLの配列（promiraculin）と、今回クローニングした配列（miraculin）

### 1-3. 抗ミラクリン抗体の作製

#### 序

発現系構築に際し、発現タンパク質を特異的に高感度で検出するため、抗体の取得が有用である。しかし、nMCLは糖タンパク質であり、そのままの状態では動物に免疫した場合は糖鎖が抗原となりやすく、ペプチド部分を認識する抗体が得られにくい。また、MCLの立体構造が未知であるため、分子表面に露出しているペプチド領域を特定することは困難である。そのため、将来的に必要な生理的条件下（非変性条件下）での使用が可能な抗体を取得するには、ポリペプチド鎖全長を用いて免疫する必要がある。そこで、大腸菌を宿主として糖鎖付加の無いMCLの大量発現系を構築し、抗体を作製した。

### 1-3-1. 方法

pBluescript ベクターへクローニングした *mcl* 遺伝子を *Nde*I, *Xho*I の制限酵素サイトを用いて、pET-21b ベクターへサブクローニングした (図 1)。その際、C 末端に終止 codon を導入することで、His-tag 付加の有無を設計した。大腸菌 BL21(DE3)株をトランスフォーメーションし、得られた形質転換体による、recombinant MCL (rMCL) の大量発現を行った。LB 培地にて 37°C、170 rpm、20 h 前培養した。新しい LB 培地へ 1/100 量添加し、37°C、170 rpm にて、OD<sub>600</sub>=0.5 まで培養した。IPTG を終濃度 1 mM になるように添加し、37°C、20 h 発現誘導した。4°C、6000 rpm、30 min 遠心分離を行い、菌体を回収した。超音波破碎により菌体を破碎し、4°C、18000 rpm、30 min 遠心分離を行った。rMCL は封入体として、沈殿画分に大量に発現した (図 2、20 mg/L)。His-tag 付加無しの rMCL の沈殿を PBS により懸濁し、4°C、18000 rpm、30 min 遠心分離を行った。PBS により懸濁～遠心分離の同操作を 3 回を行い、沈殿画分に rMCL タンパク質を得た。以降の実験はイムノプローブ (株) への外注により行った。得られた rMCL を 8 M 尿素に溶解し、ウサギに免疫した。四回の免疫後、抗体価十分上がった血清を得、anti-MCL 抗体として以降の実験に用いた。得られた anti-MCL 抗体を用い、検出感度を測定した。1~0.00001 µg の nMCL タンパク質を用い、1/1000 に希釈した anti-MCL 抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。ウエスタンブロッティングによる発色程度は誤差が大きい。そのため、以降の実験においては、1 枚の PVDF 膜上のバンド濃度を NIH-image で解析し、その値を比較することで、相対的タンパク質量とした。

### 1-3-2. 結果と考察

得られた anti-MCL 抗体は、nMCL の濃度依存的に 1 ng レベルまで高感度で検出できることが確認された (図 3)。以降、この抗体をウエスタン解析に使用した。

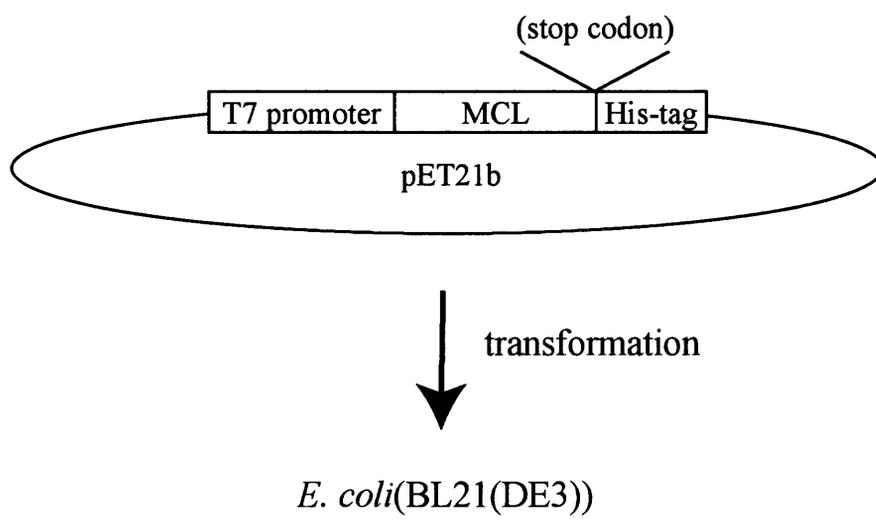


図1：抗体作成用、MCL発現コンストラクト

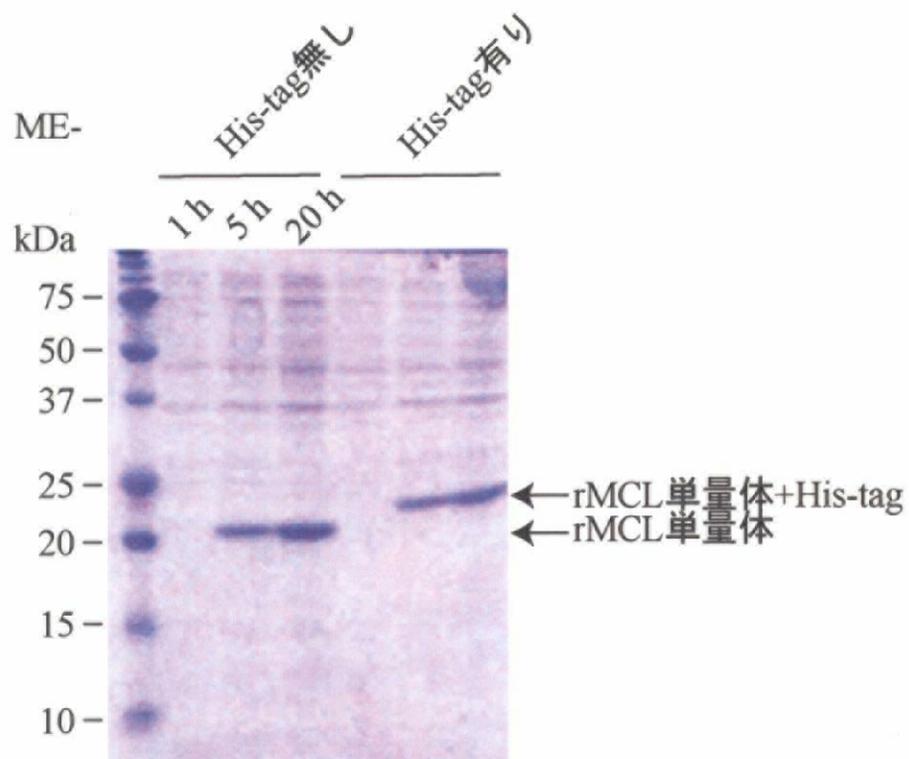
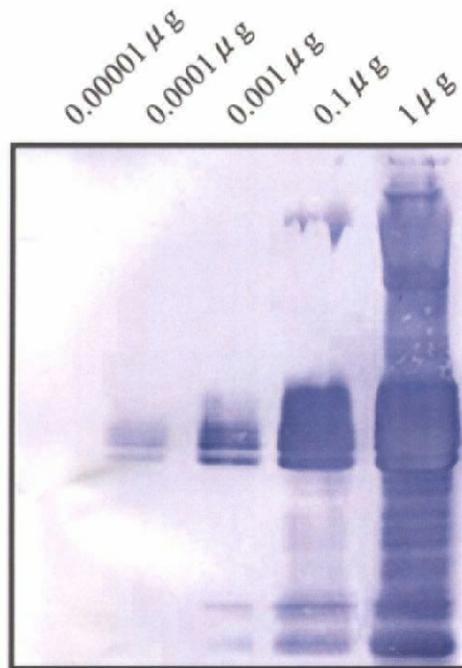


図2：抗体作成用rMCLの大量発現。  
 菌体を破碎後、不溶性画分をSDS-PAGE（CBB染色）で分析した。  
 His-tagの有無にかかわらず、rMCLは大量の封入体を形成した。

a)



b)

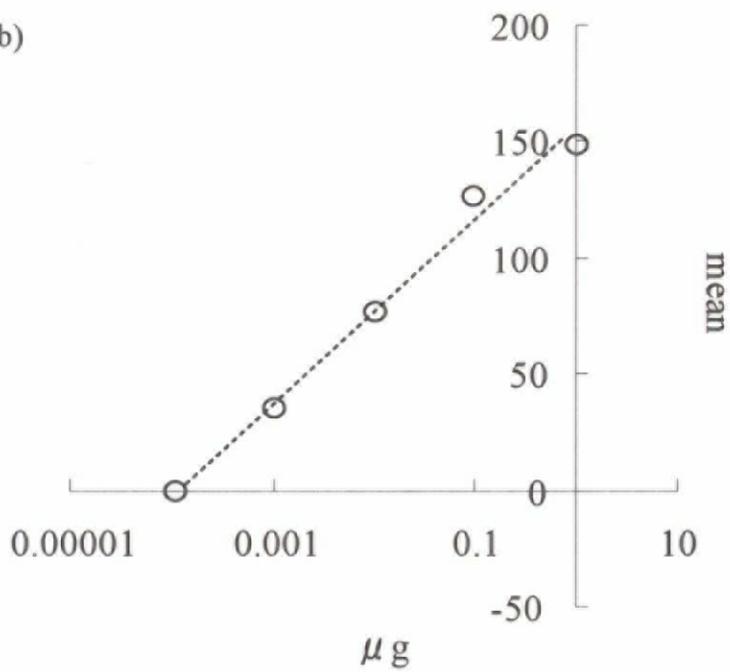


図3 : anti-MCL抗体の検出感度

a) nMCLの量に依存したアルカリフォスファターゼ発色

b) プロッティング膜のNIH-image解析

作成した抗体により、MCLは0.0001  $\mu\text{g}$ レベルまで検出された。