

第2章 ミラクリン発現系の構築

2-1. *Escherichia coli* を宿主とした発現系構築

序

E. coli を用いた発現系は、構造生物学に最もよく利用される発現系である。安価な培地で大量にタンパク質を生産することができ、さらに取り扱いが容易であることが利点である反面、翻訳後修飾を必要とする真核生物由来のタンパク質や、分子量の大きいタンパク質、S-S 結合を有するタンパク質は不溶性画分に封入体を形成しやすいという特徴をもつ。

封入体は精製が容易になる、プロテアーゼによる分解を受けにくい等の利点もあるものの、一般的には、活性体を得るためにリフォールディング条件の検討が必要になる。タンパク質のリフォールディングは現在でも盛んに研究が進められている分野であるが、未だ確実な方法は確立されておらず、試行錯誤によるところが大きい。また、仮にリフォールディングに成功したとしても、不純物として混入する不活性型タンパク質を除くための精製操作が必要になり、その後の解析に支障をきたすことも多い。

E. coli を用いた発現系は古くから利用されており、ベクターと宿主の様々な組み合わせが開発されている。すなわち、発現宿主、プロモーター、発現条件などの改善により、正しい構造を持つ活性型タンパク質を得られることも多い。抗体作成の項で述べたように、pET21b ベクターを用い、BL21(DE3)を宿主とした系では rMCL は大量の封入体を形成した。しかし、その他のベクターを使用して、発現誘導条件を改善することにより、可溶性タンパク質として発現できる可能性がある。

pCold ベクターは、*cspA* プロモーターを用い、目的タンパク質の低温条件での発現を行う。低温発現により、発現量の向上や可溶性の上昇が期待できる。pET32a ベクターはチオレドキシシン(TRX-tag)との融合タンパク質として発現させることで、S-S 結合形成を促進させ、正しいフォールディングを促進する。pGEX ベクターはグルタチオン S トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現させる。pTXB1 ベクターはキチン結合タンパク質との融合タンパク質として発現させることで、目的タンパク質が可溶性タンパク質として得られやすくと共に、インテイン切断により、目的タンパク質のみを得ることも可能である。pMAL p2x ベクターはマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として発現させることで目的タンパク質が可溶性画分に得られやすくなる。MBP は大腸菌のペリプラズムタンパク質であり、融合タンパク質はペリプラズムへ分泌される。pMAL c2x ベクターは、pMAL p2x ベクターの MBP に存在する

N末端シグナルペプチドが欠損しており、融合タンパク質は細胞質へ蓄積する。これらのベクターを用い、MCLの発現系構築を検討した。

2-1-1. 方法

発現株の作成

pCold, pET32a, pGEX5x-1, pMAL p2x, pMAL c2x ベクターを用い、発現系を構築した(図 1)。pBluescript ベクターへクローニングした mcl 遺伝子をテンプレートとして、pCold へは primer tatacatatggattcggcacccaatccggttcttgacatagacgg と atactcgag ttagaagtatacggttttgtgaactcgaatg、pET32a へは primer tatacatatg gattcggcacccaatccggttcttgacatagacgg と atactcgag ttagaagtatacggttttgtgaactcgaatg、pGEX5x-1 へは primer ctctgaattcgattcggcacccaatccggttc と atactcgag ttagaagtatacggttttgtgaactcgaatg、pTXB1 へは primer tatacatatg gattcggcacccaatccggttcttgacatagacgg と cgatgaattcgaagtatacggttttgtgaact、pMAL p2x へは primer ctctgaattcgattcggcacccaatccggttc と tgatctgcagttagaagtatacggttttgtgaac、pMAL c2x へは primer ctctgaattcgattcggcacccaatccggttc と tgatctgcagttagaagtatacggttttgtgaac を用い、PCR 産物をサブクローニングした。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発現解析を行った。

pCold ベクターによる発現と精製と精製

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、OD600=0.5 まで培養した。培養液を新しい LB 培地へ 1/100 量添加し、37°C、170 rpm にて、OD600=0.5 まで培養した。IPTG を終濃度 1 mM になるように添加し、18°C 18 h 発現誘導した。菌体破碎用 buffer (100 mM MES-NaOH(pH 6.0), 1M Arginine, 10% Glycerol, 500 mM NaCl, .0.1% triton X-100) を用い、超音波破碎により菌体を破碎した。4°C、18000 rpm、30 min 遠心分離を行ない、上清を回収し、His-tag 精製を行った。平衡化 buffer (20 mM MES-NaOH(pH 6.0), 10% Glycerol, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole) により平衡化した TALON コバルトカラムへ、菌体破碎液上清をのせた。5 mL の平衡化 buffer で未吸着画分を除いた後、溶出 buffer (20 mM MES-NaOH(pH 6.0), 500 mM Imidazole) により溶出させた。溶出画分を、20 mM Na-Acetate(pH 5.0), 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回収し、SDS-PAGE、および活性測定を行った。

pCold, pET32a, pGEX5x-1, pMAL p2x, pMAL c2x ベクターを使用した発現スクリーニン

グ

LB 培地にて 37°C、170 rpm、20 h 前培養した。培養液を、新しい LB 培地へ 1/100 量添加し、37°C、170 rpm にて、OD₆₀₀=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 3 h もしくは 20°C 18 h 発現誘導した。菌体破碎用 buffer (100 mM Na-Acetate(pH 5.0), 1M Arginine, 10% Glycerol, 500 mM NaCl, .0.1% triton X-100) を用い、超音波破碎により菌体を破碎した。4°C、18000 rpm、30 min 遠心分離を行い、上清を回収した。anti-MCL 抗体を用いてウエスタン解析を行った。

pMAL p2x, pMAL c2x ベクターを使用した発現と精製

LB 培地にて 37°C、170 rpm、20 h 前培養した。培養液を、新しい LB 培地へ 1/100 量添加し、37°C、170 rpm にて、OD₆₀₀=0.5 まで培養した。IPTG を終濃度 1 もしくは 0.1 mM になるように添加し、37 もしくは 20°C、2、6 もしくは 20 h 発現誘導した。菌体破碎用 buffer (100 mM Na-Acetate(pH 5.0), 1M Arginine, 10% Glycerol, 500 mM NaCl, .0.1% triton X-100) を用い、超音波破碎により菌体を破碎した。4°C、18000 rpm、30 min 遠心分離を行い、上清を回収した。anti-MCL 抗体を用いてウエスタン解析を行った。pMAL c2x ベクターを用い、大量培養を行い、1 mM IPTG、20°C、20 h の条件で発現誘導を行った。菌体破碎用 buffer (100 mM Na-Acetate(pH 5.0), 1M Arginine, 10% Glycerol, 500 mM NaCl, .0.1% triton X-100) を用い、超音波破碎により菌体を破碎した。4°C、18000 rpm、30 min 遠心分離を行い、上清を回収した。アミロースレジンによる精製を行った。平衡化 buffer (20 mM MES-NaOH(pH 6.0), 10% Glycerol, 500 mM NaCl) により平衡化したアミロースカラムへ、菌体破碎液上清をのせた。50 mL の平衡化 buffer で未吸着画分を除いた後、溶出 buffer (20 mM MES-NaOH(pH 6.0), 500 mM NaCl, 100 mM maltose) により溶出させた。溶出画分を 20 mM MES-Na-OH(pH 6.0) に対して透析した。CM-sepharose カラムを用いて、A buffer(20 mM MES-Na-OH(pH 6.0)) -B buffer(20 mM MES-Na-OH(pH 6.0), 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回収し、SDS-PAGE、および活性測定を行った。

2-1-2. 結果

pCold ベクターによる発現系構築、精製と活性測定

精製後の rMCL は nMCL と同様に S-S 結合を介した二量体構造を取っており(図 2)、

その収量は培養液 1 L あたり 20 μg であった。しかし、0.1 mg/mL の濃度で活性は検出されなかった (図 3)。

発現スクリーニング

pCold, pET32a, pGEX5x-1, pMAL p2x, pMAL c2x ベクターを使用し、37 および 20°C で発現スクリーニングを行った。菌体破碎後の上清画分のウエスタン解析を図 4 に示す。それぞれのベクターによって発現した場合に rMCL 二量体が検出されるべきバンドの位置を赤丸で示す。pMAL p2x, pMAL c2x ベクターでは、MBP が融合した rMCL 二量体の分子量の位置にバンドが検出され、還元条件では MBP が融合した rMCL 単量体の位置にバンドがシフトした。他のベクターでは、狭雑タンパク質由来のバンドが多く、いずれの条件でも可溶性画分への発現は確認できなかった。

pMAL 系ベクターによる発現条件検討

pMAL ベクターについて、IPTG 濃度 1 もしくは 0.1 mM、37 もしくは 20°C、2、6 もしくは 20 h において、発現条件の詳細な検討を行った。菌体破碎後の上清画分のウエスタン解析を図 5 に示す。条件により、MCL 二量体の発現量に差が見られた。pMAL p2x では、pMAL c2x と比較して 188 kDa 以上に複数のバンドが検出された。最も MCL 二量体の発現量の多い条件は、pMAL p2x では 0.1 mM IPTG、20°C、20 h、pMAL c2x では 1 mM IPTG、20°C、20 h であった。

pMAL c2x ベクターによる大量培養と精製

pMAL c2x ベクターを用い、1 mM IPTG、20°C、20 h の条件で大量発現を行った。アミロースレジンにより精製後の SDS-PAGE の結果を図 6 に示す。得られたタンパク質は MBP が融合した rMCL 単量体が主であり、MBP、MBP 融合 rMCL 二量体の分子量の位置にもバンドが検出された。CM-sepharose を用いた HPLC 精製の結果、MBP の分子量の位置のバンドは非吸着画分に溶出され、他の MBP が融合した rMCL は全て同じフラクションに溶出された。精製後の培養液 1 L あたりの収量は、MBP が融合した rMCL 二量体は 1 mg、MBP が融合した rMCL 単量体は 5 mg であった。Factor Xa による MBP 切断処理後の SDS-PAGE の結果を図 7 に示す。4、16°C で、ともに Factor Xa による切断が確認できた。しかし、アミロースレジン精製後、CM-sepharose 精製後、Factor Xa 処理後のいずれの画分も、rMCL 二量体の濃度 0.5 mg/mL の条件において、活性は検出さ

れなかった(図 8)。

2-1-3. 考察

pCold ベクターによる発現 rMCL の解析

E. coli による異種タンパク質の発現実験において、封入体の形成は以降の実験の支障となることが多く、特に構造解析を目的とする場合には、避けることが望ましい。封入体の形成を防ぐために、菌体破碎 buffer への Glycerol、NaCl, などの塩、Triton X-100 等の非イオン性界面活性剤の添加による、タンパク質凝集の阻害が試みられる。さらに、近年特に注目されている方法として、Arginine の添加が挙げられる。

Arginine はタンパク質を構成するアミノ酸の一つであるが、1~2 M 程度存在下でリフォールディングを行うと、タンパク質凝集体の形成を防ぎ、リフォールディング効率が上昇することが報告されている(Tsumoto et al. 2005, Tsumoto et al. 2003, Arakawa et al. 2003)。さらに、ある程度の二次構造を有している封入体からは、Arginine の添加によって、タンパク質の可溶性画分への回収効率が上昇することが報告されている(Umetsu et al. 2005)。

pCold ベクターを用い、pET21b と同様に発現実験を行ったが、可溶性画分に二量体 rMCL は得られなかった (data not shown)。しかし、菌体破碎 buffer に 1 M Arginine を加えた結果、量的には 20 µg/L とごくわずかながら、可溶性画分に回収することに成功した。しかし、精製後の rMCL が二量体であったにもかかわらず、活性は検出されなかった (図 3)。活性が検出できない理由は不明であるが、Arginine 添加によって改善したとはいえ、発現タンパク質の大部分は依然として封入体として回収されることから(data not shown)、殆どのタンパク質が正常な立体構造をとっていないと考えられる。取得できる量が微量であるため、実験的に困難ではあるが、高濃度条件での活性測定、rMCL の S-S 結合、二次構造などについて詳細な解析が必要である。

発現スクリーニング

発現スクリーニングの結果、pMAL ベクターを使用した場合、可溶性画分に MBP が融合した rMCL 二量体の発現が検出された (図 4)。他のベクターの場合、狭雑タンパク質由来のバンドが多く、MCL 二量体は検出できなかった。anti-MCL 抗体は *E. coli* を宿主とし、pET21b ベクターを用いて発現させた封入体 MCL を免疫して得られた抗血

清であり、*E. coli* に由来する多くのタンパク質に対して交差反応を示す。狭雑タンパク質由来のバンドを除くためには、nMCL を使用して抗体を精製する必要がある。

MBP は大腸菌のペリプラズムに存在するタンパク質であり、非常に高い可溶性を持つことから、発現タンパク質を可溶性画分に得る目的で使用される優れた tag である。さらに、アミロースレジンを使用することによって温和な条件で、尚且つ高い特異性での精製が可能である。pMAL p2x ベクターは目的タンパク質がペリプラズムに分泌されるため、高発現は望めないものの、S-S 結合形成には有利である。一方、pMAL c2x ベクターは N 末端ペリプラズム輸送シグナルが欠損しているために、目的タンパク質が細胞質に分泌され、大量発現に向いている。図 5 に示すように、pMAL p2x ベクターを使用した場合、MBP 融合 rMCL 二量体よりも大きい分子量のバンドが多く、pMAL c2x ベクターの場合では少ない。これらのバンドは、誤った S-S 結合形成による多量体 rMCL と考えられる。そのため、相対的に正しい構造の MCL 二量体が多いと推察される pMAL c2x ベクターを用い、大量培養を行った。

アミロースレジン、および CM-sepharose により精製したサンプルでは、全タンパク質の 90%以上が MBP と融合した rMCL であった (図 6)。しかし CM-sepharose を使用した HPLC の溶出パターンは MBP と融合した rMCL 二量体と MBP が融合した rMCL 単量体は同じ位置に溶出され、一つのブロードなピークを示した (data not shown)。また、nMCL で十分な活性が検出される 0.5 mg/mL の条件でも、活性は検出されなかった。さらに、Factor Xa によって MBP 部分を切断したが、同様に活性は検出されなかった。

pCold および pMAL ベクターにおいて、rMCL 二量体を得ることに成功した。しかし、それらに活性は検出できなかった。MBP は非常に優れた tag であるが、その高い可溶性から、融合した目的タンパク質が変性状態であっても、可溶性画分として回収されることがある。その場合、MBP-tag の切断によって融合タンパク質は不溶化することが多いが、MBP が融合した rMCL においては Factor Xa 処理によって MBP との切断による沈殿は生じなかった。原因は不明であるが、いずれの条件においても活性が検出できなかったことから、正しい立体構造をとっていないのかもしれない。特に、正確な S-S 結合の形成は立体構造形成に重要な要素であるため、分子内に 7 個の S-S 結合を有する MCL の発現には影響が大きいと考えられる (Igeta et al. 1991)。分子シャペロンとの共発現系構築や、Cys 残基への変異導入、S-S 結合形成に有利な宿主株を使用するなど、ベクターと宿主のさらなる改善が必要であろう。

抗体作成の項 (図 2) で述べたように、pET21b ベクターを使用した場合、rMCL タ

ンパク質は封入体として大量に得ることができた。タンパク質のリフォールディングには多大な条件スクリーニングが必要であり、さらに不活性型タンパク質を除く必要があるため、その後の解析に支障をきたすことも多い。しかし、リフォールディングによって活性型タンパク質取得に成功した例も多く、試みる価値はある。

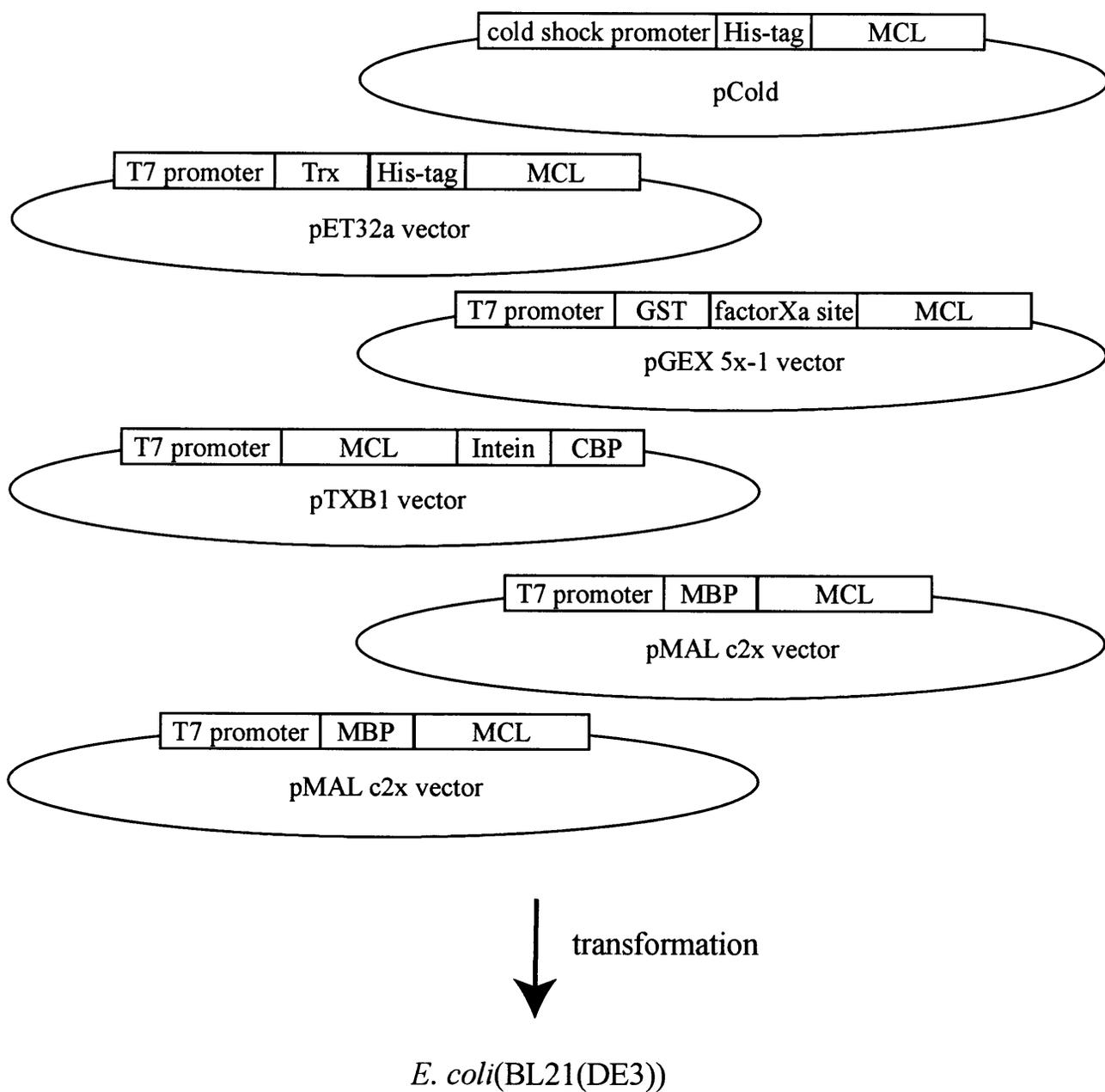


図1 : *E. coli*発現用コンストラクト

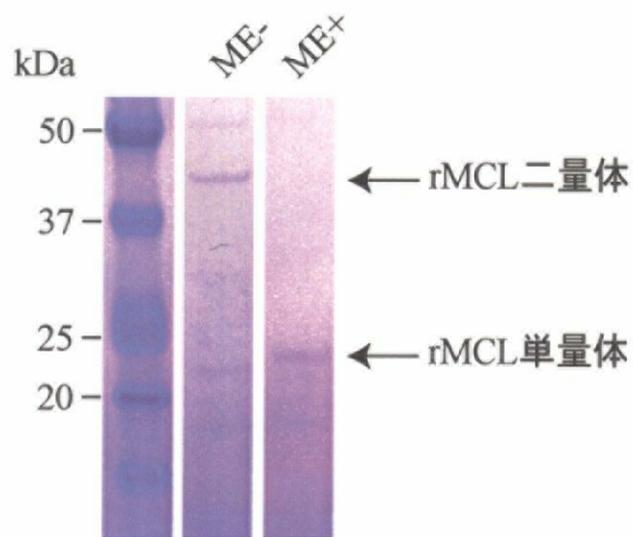


図2 : pColdベクターにより発現、精製したrMCL
精製後のrMCLをSDS-PAGE (CBB染色) により解析した。
rMCLはnMCLと同様な二量体を形成していた。

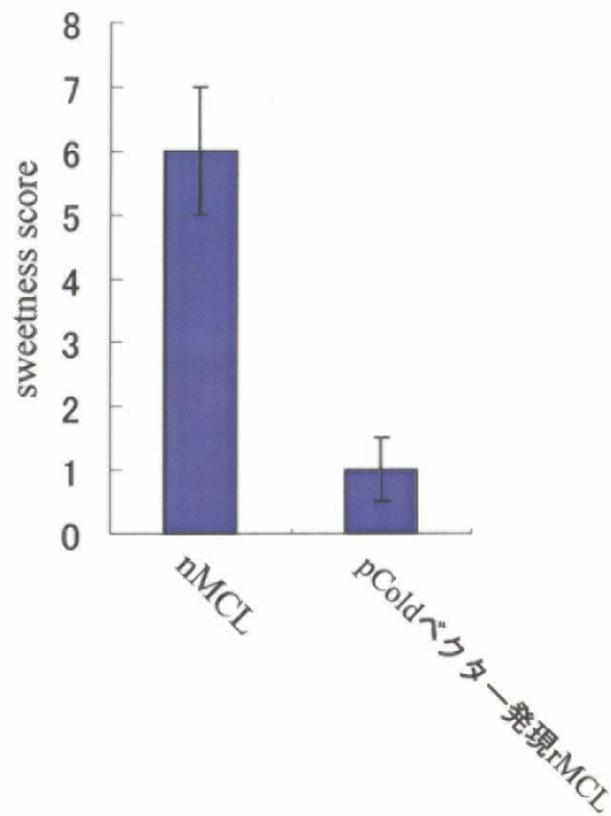


図3：pColdベクターにより発現、精製したrMCLの活性
 rMCL濃度0.5 mg/mLの条件で活性測定した (n=3)。
 味覚修飾活性は検出されなかった。

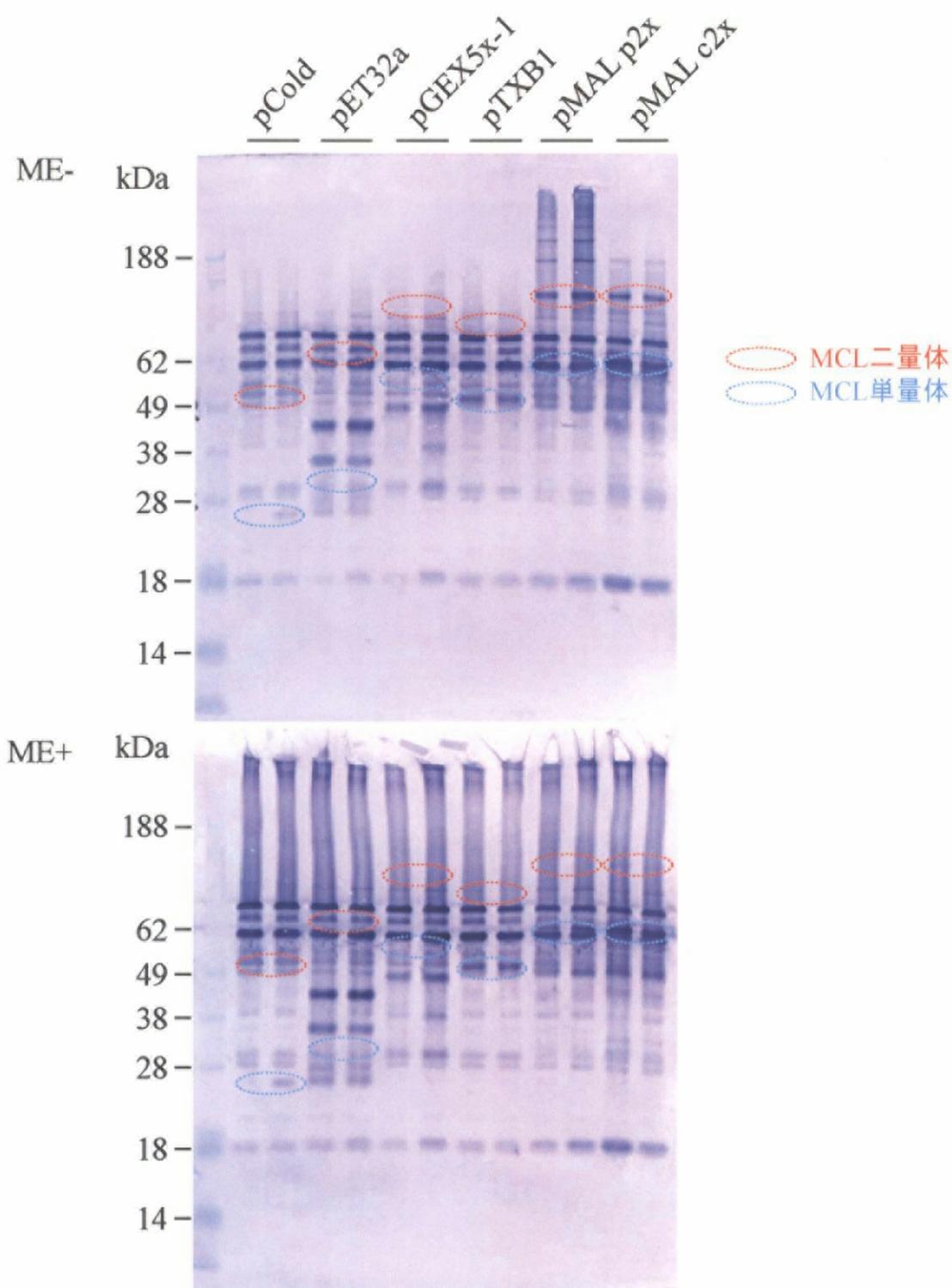


図4 : *E.coli*による各種ベクターを用いた発現スクリーニング
 発現誘導後、菌体破碎液上清のウエスタン解析。
 各ベクターで発現させた場合にrMCL二量体と見積もられるバンド位置を赤破線、
 rMCL単量体と見積もられるバンド位置を青破線で示す。
 pMAL p2x, pMAL c2xで可溶性タンパク質としてMBP融合rMCL二量体が検出された。

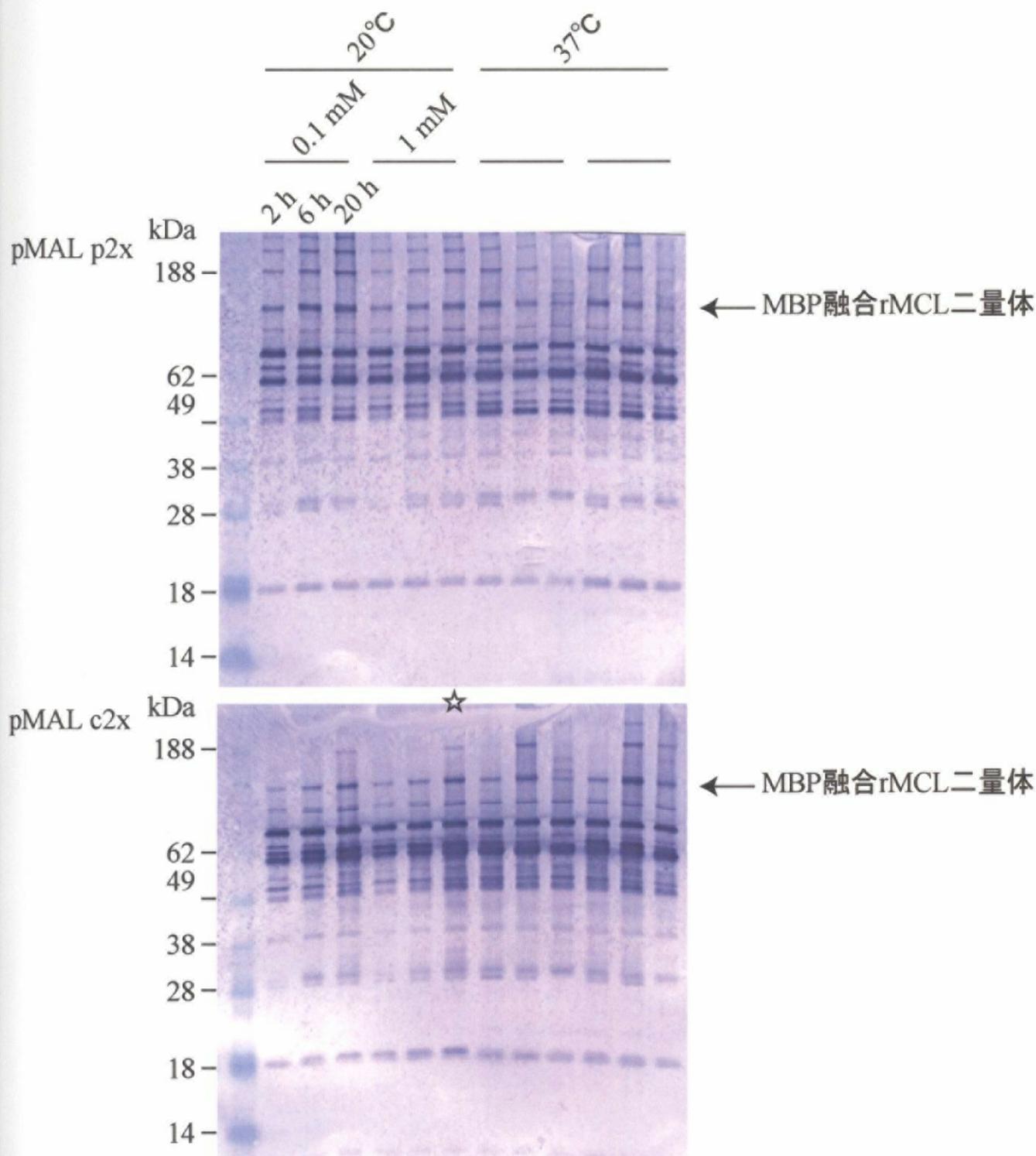


図5：pMALベクターを用いた発現条件の検討
 発現誘導後、菌体破碎液上清のウエスタン解析。
 MBP融合rMCL二量体を→で示した。
 条件検討の結果、☆印の条件を最適条件と決定した。

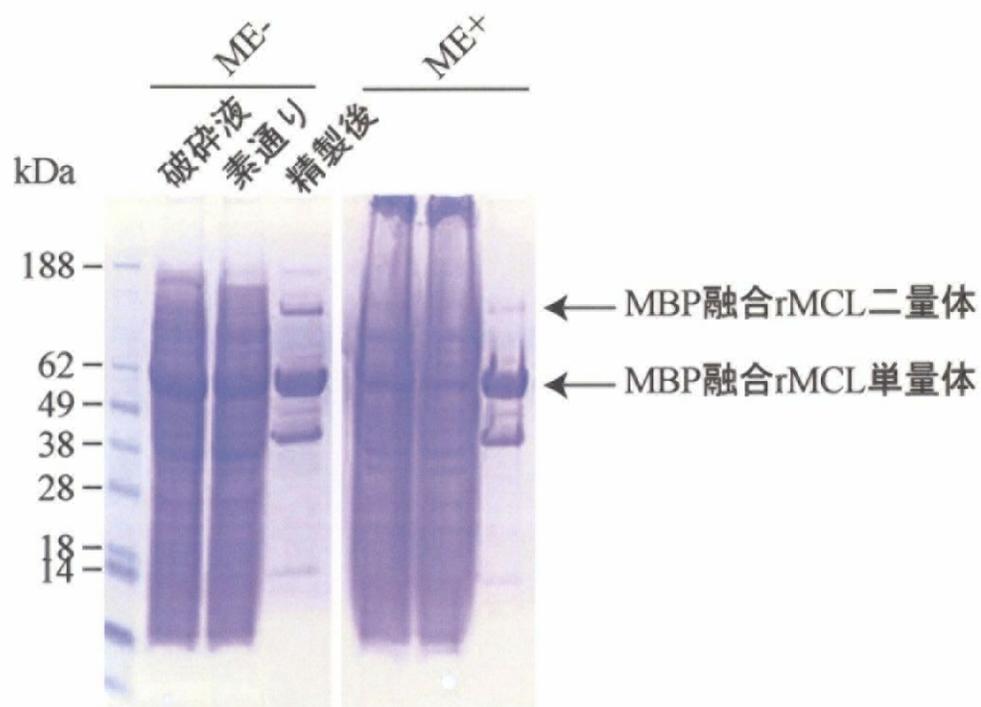


図6 : pMAL c2xにより発現したrMCLのアミロースレジンによる精製
 アミロースレジンにより精製したサンプルをSDS-PAGEにより解析した (CBB染色)。
 MBP融合rMCL単量体、二量体の精製に成功した。

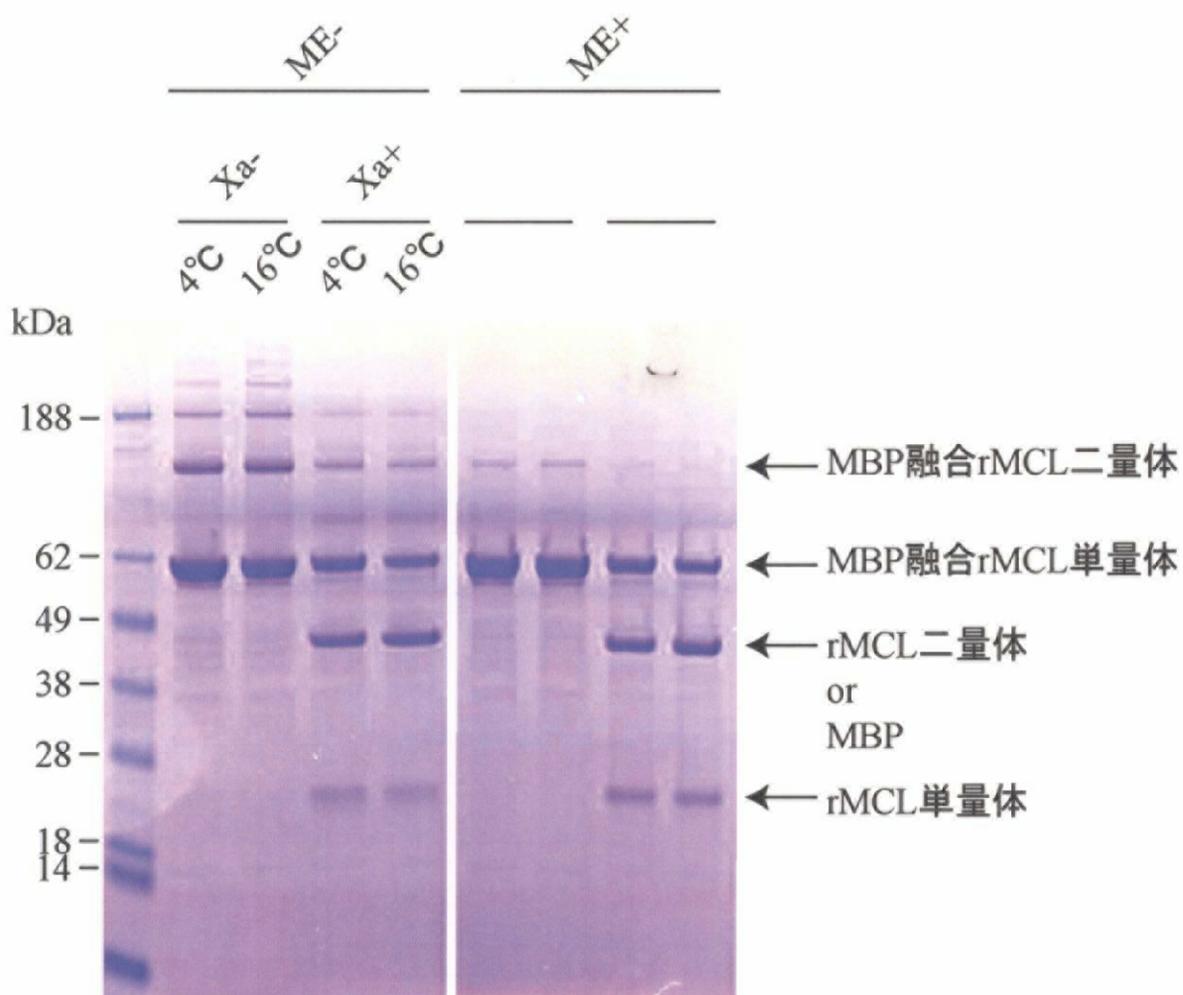


図7：pMALc2xにより発現したrMCLのFactor Xa(Xa)による切断
 精製後のサンプルをFactor Xaで処理し、SDS-PAGE（CBB染色）で解析した。
 Factor Xa処理により、rMCL単量体、二量体、MBPが生成した。

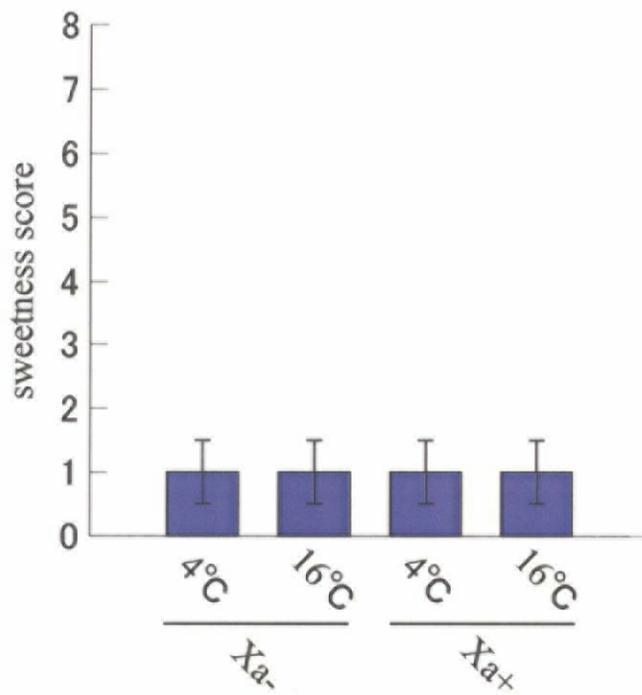


図8 : pMAL c2xにより発現したrMCLの活性
 CM-sepharoseによる精製、Factor Xaによる切断後、
 rMCL濃度0.5 mg/mLの条件で活性を測定した (n=3)。
 いずれのサンプルでも味覚修飾活性は検出されなかった。

2-2. *Bacillus brevis* を宿主とした発現系構築

序

Bacillus brevis はグラム陽性の枯草菌の一種であり、

- ① 大量のタンパク質を菌体外に分泌生産する
- ② プロテアーゼ活性をほとんど示さない
- ③ 活性型のタンパク質を生産する
- ④ 培養、滅菌が容易
- ⑤ 遺伝子操作が簡単

等の特徴を有していることから、特に真核生物由来の S-S 結合を有するタンパク質の発現に利用されている (Tojo et al. 1994, Miyauchi et al. 1999)、このような特徴は、1 分子中に 7 個もの S-S 結合を有する MCL の発現系として有用であると考えられる。そこで、ヒゲタ醤油が開発した *B. brevis* 発現系を用い、MCL の発現を検討した。

2-2-1. 方法

コンストラクトの作成

pBluescript ベクターへクローニングした *mcl* 遺伝子をテンプレートとして、primer: 5'-gctccatggctttcgctgattcggcaccacaatccggttcttg-3' と 5'-ttcctcgagtagaagtatacggttttgtgaa-3' を使用して PCR を行った。PCR 産物は、*B. brevis* において大量に分泌生産される細胞壁タンパク質由来 P2 プロモーター下流に存在するマルチクローニングサイトへ、*NcoI*, *XhoI* サイトによって pNCMO2 ベクターへサブクローニングした (図 1)。pNCMO2 ベクターは *B. brevis* と *E. coli* とのシャトルベクターであるが、P2 プロモーターは *E. coli* 内では働かないため、プラスミドが安定に保持され、*B. brevis* 内では強力なプロモーターとして働く。また、マルチクローニングサイト上流には分泌時に切断される分泌シグナルペプチド (ヒゲタ醤油開発) がコードされている。作製したコンストラクトを用い、エレクトロポレーションによって形質転換を行った。得られた形質転換体はネオマイシンによって選別し、発現培養実験を行った。形質転換体 1 コロニーを発現用液体培地 (1% glucose, 1% polypeptone, 0.5% meat extract, 0.2% yeast extract, 0.0001% FeSO₄, 0.0001% MnSO₄, 0.00001% ZnSO₄) へピックアップし、20 h, 30°C で培養した。30 min, 4°C, 6000g にて遠心分離を行い、菌体を除いた後、培養液上清のウエスタン解析を行った。

2-2-2. 結果と考察

培養液上清のウエスタン解析の結果、培地 1 L あたり 0.5 mg 程度、rMCL 単量体の発現が確認された (図 2)。しかし、rMCL 二量体の発現は確認できなかった。単量体として正しい構造を持たないために、二量体が形成されない可能性がある。もう一つの可能性として、タンパク質の局所濃度の問題が挙げられる。大腸菌の場合、S-S 結合の形成はペリプラズムに存在する DsbA-DsbB タンパク質によってなされる (Inaba et al. 2007, Kobayashi et al. 1997, Missiakas et al. 1993)。ペリプラズムには高濃度にタンパク質が存在するため、分子内 S-S 結合形成に加え、分子間 S-S 結合形成が起こりやすい環境となっていると考えられる。一方、*B. brevis* はグラム陽性細菌であり、DsbA-DsbB ホモログは有するものの (Ishihara et al. 1995)、ペリプラズムをもたない。そのことがタンパク質の分泌発現が可能な要因ともなっているが、*B. brevis* によって発現されたタンパク質はすぐに培地中へ拡散されるため、相対的に発現タンパク質同士が近接する機会が少なく、分子間 S-S 結合を形成しにくいのかもかもしれない。発現タンパク質は可溶性画分として検

出されており、詳細な S-S 結合形成の条件検討が必要である。

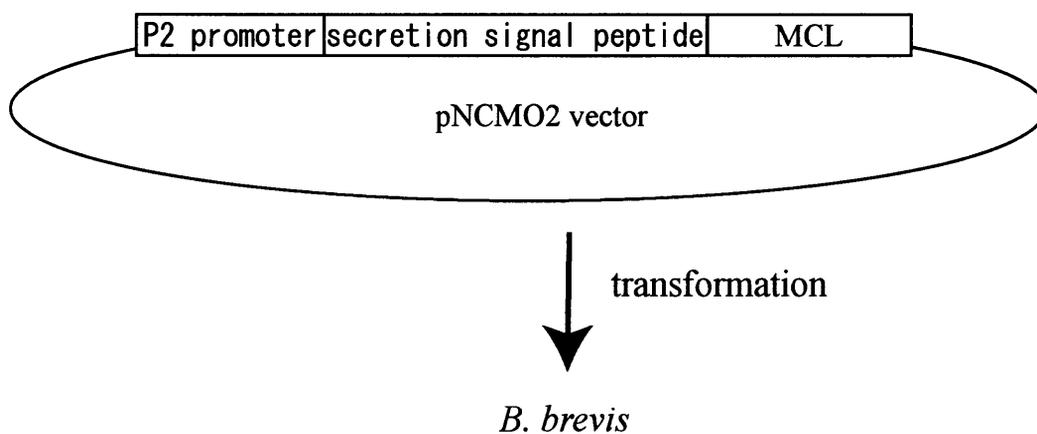


図1 : *B. brevis*発現用コンストラクト

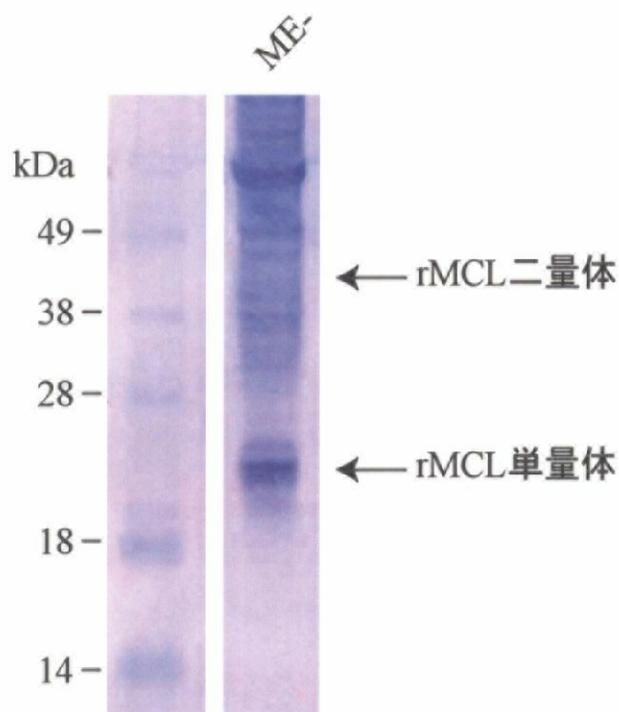


図2 : *B. brevis*によるrMCLの発現
発現誘導後、培養液上清のウエスタン解析を行った。
rMCL単量体のみ、可溶性画分に発現が確認された。

2-3. *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした発現系構築

序

Saccharomyces cerevisiae は出芽酵母の一種であり、ヒトをはじめとする真核生物との間で生命現象の基本的機構に多くの類似性が見られることから、古くから真核生物のモデル生物として注目されてきた。さらに、

- ① 培地が安価
- ② 1世代2時間程度で増殖し続ける
- ③ 均一な細胞集団を大量に用意できる
- ④ 一倍体世代、二倍体世代が安定して存在し、遺伝学的解析が多く行われてきた
- ⑤ ゲノムサイズが約1200万bpと小さい
- ⑥ 相同組替え効率が高く、多くの変異株が取得されている
- ⑦ パン製造、清酒製造に用いられてきたことから高く安全性が評価されている、等の理由から、近年、異種蛋白質の発現系構築において特に注目されている。*S. cerevisiae* による異種タンパク質発現系の内、Newstead 等の開発した方法 (Newstead et al. 2007) は、GFP および His-tag と目的タンパク質を融合させることで検出および精製を容易にし、迅速な発現評価ができる非常に優れた方法である。

前述のように、*S. cerevisiae* は真核生物であり、植物細胞に特徴的な細胞壁や液胞をも有している。また、タンパク質合成においても S-S 結合形成や糖鎖付加等の翻訳後修飾が起こる。又、その安全性も非常に高いことから、食品タンパク質である MCL の発現系として適していると考えられる。そこで、Newstead 等の開発した発現系を利用し、MCL の発現を検討した。

2-3-1. 方法

コンピテントセルの作製と形質転換

pBluescript ベクターへクローニングした *mcl* 遺伝子をテンプレートとして、primer: 5'-ggcggccgctctagaactagtgatcccccatgagatttcctcaattttactgc-3' と 5'-aaattgacctgaaaataaaattttcccctcagaagtatacggtttttgg-3' を使用して PCR を行い、PCR 断片を insert として使用した。pRS426 ベクター (Newstead et al. 2007) を *Sma* I 切断によって linear にしたものを発現ベクターとして使用した (図 1)。 *S. cerevisiae* FGY217 株を YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) にけんたくし、1 day, 250 rpm, 30°C で培養した。YPD 培地に、OD=0.12 になるように植え継ぎ、OD=0.6 になるまで 250 rpm, 30°C で培養した。4°C、2380 g、5 min 遠心分離を行い、菌体を回収した。菌体を滅菌水にけんたくした。4°C、2380 g、5 min 遠心分離を行い、菌体を回収した。菌体に 0.1M LiAc を加え、けんたくした後、スピンドウンした。上清を捨て、0.1 mM LiAc (400 µl) を加え、けんたくした。遠心後、上清を捨てた。50% PEG3350, 1.0 M LiAc, Single-Stranded Carrier DNA (Single-stranded carrier DNA を 95°C、5 分間熱し、氷水の上で急速に冷やしたもの)、ベクター/ PCR product mix を加え、けんたくした。30°C、30 分インキュベートした後、42°C、20-25 分ヒートショックにより形質転換した。8000 rpm で 15 秒遠心し、沈殿に 0.2 ml の滅菌水を加え、静かにけんたく後、Ura-プレートに塗布し、30°C、3 日間培養した。

発現

コロニーをピックアップし、5 mL Ura- 培地 (with 2% Glucose) で 1 day 30°C にて培養した。Ura-培地 (with 0.1% Glucose) に植え継ぎ、30°C で OD=0.6 になるまで培養した。終濃度 2.5% になるように Galactose を加え、20 h, 30°C で培養した。5min, 4°C, 3000 g で遠心分離した。菌体を GFP buffer に懸濁した後、500 µl の Dry グラスビーズを加え、ボルテックスで 40 分破碎後、14000 g で 1 分遠心し、上清を回収し、ウエスタンブロッティングを行った。

2-3-2. 結果と考察

培養液上清のウエスタン解析の結果、*B. brevis* を宿主とした発現系と同様に、培地 1 L あたり 0.05 mg 程度、rMCL 単量体の発現が確認された (図 2)。しかし、MCL 二量体

の発現は確認できなかった。検出された rMCL 単量体の分子量は MCL ポリペプチドに相当する 22 kDa 程度であり、GFP の蛍光は検出されなかった (data not shown) ことから、GFP との融合体として設計どおりに発現していないと考えられる。rMCL の C 末端に付加するように設計した GFP の蛍光が検出されないことは、C 末端近傍で部分分解が起きたことを示唆させる。真核生物における多くの分泌タンパク質は、プロセシングプロテアーゼによる切断や様々な修飾を受けて成熟タンパク質となる。kexin プロテアーゼは酵母に存在するプロセシングプロテアーゼの一つであり、塩基性アミノ酸残基、特に連続した塩基性アミノ酸残基の C 末端側を切断することが知られている (Germain et al. 1990, Contreras et al. 1991)。MCL は塩基性の Arg と Lys 残基が 1 分子中に 46 個存在し、等電点は pH 10 程度である (Theerasilp et al. 1989)。特に C 末端近傍にはアルギニンが 3 残基連なった “RRR 配列” が存在し、kexin プロテアーゼの標的となりやすいことが推察される。おそらく、この部分での部分分解により、C 末端 GFP が検出されないのだろう。また、GFP の分子量は約 27 kDa であり、二量体形成への立体障害ともなり得る。GFP を融合させるメリットは、迅速な発現スクリーニングと単分散性の評価が容易になる点であり、膜蛋白質の結晶構造解析においては非常に有用である。しかし、水溶性タンパク質である MCL には必ずしも必要ではない。

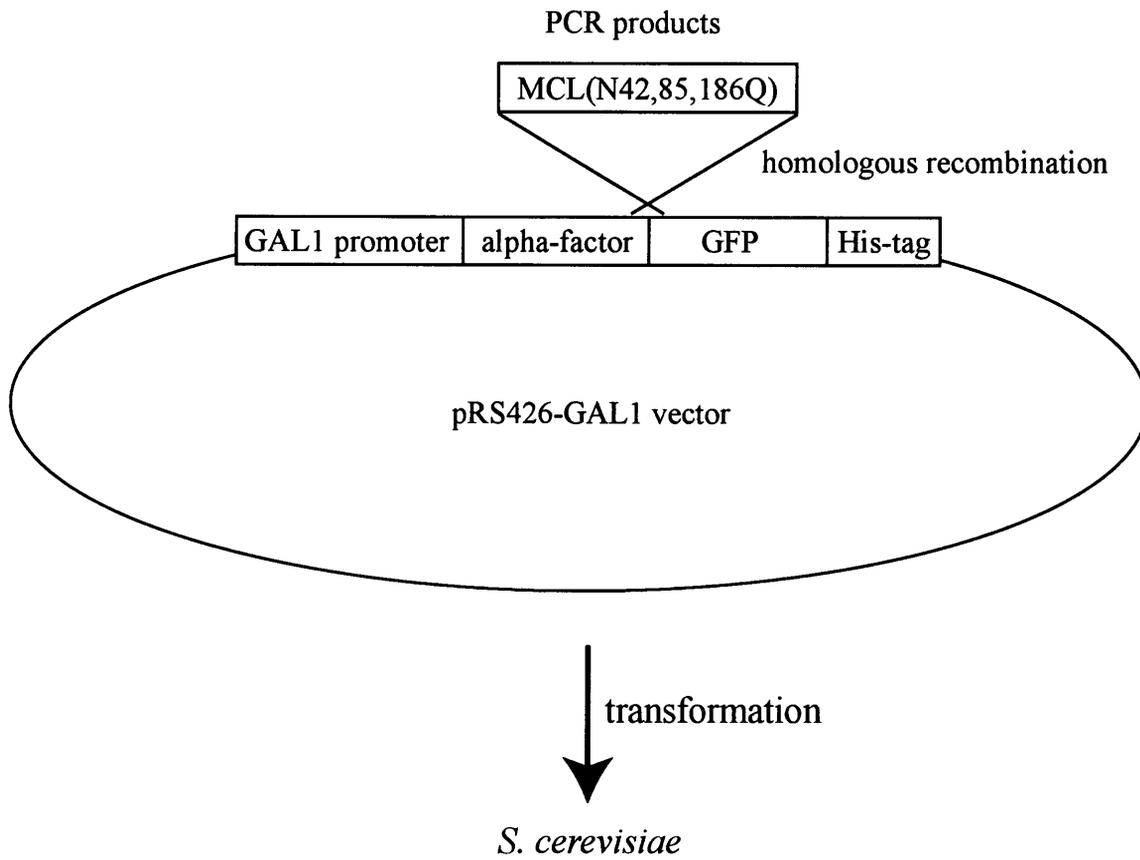


図1 : *S. cerevisiae*による発現コンストラクト

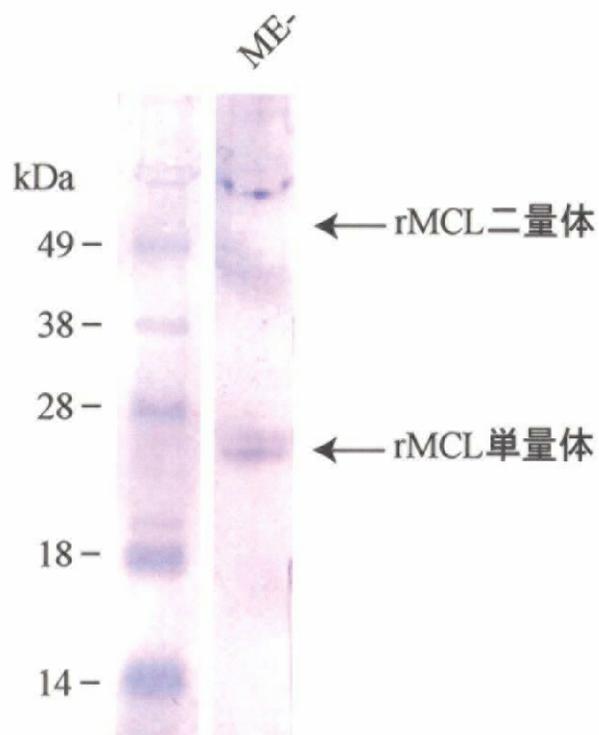


図2 : *S. cerevisiae*によるrMCLの発現
発現誘導後、菌体破碎液上清のウエスタン解析を行った。
rMCL単量体のみ、可溶性画分に発現が確認された。

2-4. *Pichia pastoris* を宿主とした発現系構築

序

Pichia pastoris はメタノール資化性酵母であり、高密度培養が可能であることから、異種タンパク質の大量発現系として広く用いられている。ファーメンターを使用した場合、その菌体量はフラスコ培養の 10 倍以上にもなり、その菌体重量は 1 L あたり 400 g を超えることもある。また、*S. cerevisiae* と同様に真核生物であることから、発現タンパク質に S-S 結合の形成や糖鎖付加等の翻訳後修飾が起き、活性を有する高品質なタンパク質が得られやすいといわれ、*P. pastoris* によって発現させたタンパク質を用いて X 線結晶構造解析を行った例が多く報告されている。さらに、培養や取り扱いが簡便であるという利点も有している。*P. pastoris* によるタンパク質発現系でよく使用されるプロモーターとして、アルコールオキシダーゼ (AOX1) プロモーターがある (Scorer et al. 1994)。AOX1 はメタノール代謝の第一段階に関与する酵素であるが、そのプロモーターは非常に強力で、メタノールを唯一の炭素源とする培地で培養した場合に可溶性タンパク質の 30%以上を AOX1 が占め、目的タンパク質の大量発現が期待できる。

そこで、MCL の *P. pastoris* による発現系構築を試みた。

2-4-1. 方法

形質転換

MCL(N42, 85, 186Q)発現ベクターは、TAKARA による全合成受託により作成した。pPIK9K ベクターの AOX プロモーター下流に、 α -ファクター、FLAG-tag、mcl 遺伝子、His-tag をこの順序で導入した (図 1)。 α -ファクターを付加することで分泌生産効率が上がり、 α -ファクター自身は翻訳後プロセッシングにより、除去される。なお、変異導入していないコンストラクトを用い、以下と同様の実験を行なったが、発現量や挙動に差が見られなかったことから、以降は MCL(N42, 85, 186Q)を rMCL として記述する。MCL 発現ベクターを PmeI 処理によって linear 化した後、エレクトロポレーション法によって *P. pastoris* (SMD1163 株)に導入した。MCL 遺伝子は相同組み換えによって AOX 遺伝子部分に挿入される。エレクトロポレーション後の菌体を MD プレートに塗布し、3 day, 30°C で培養した。プレート上のコロニー全てを 2 mL の YPD を用いて回収し、再度 0.2 mg/mL Geneticine 入りの YPD プレートに塗布し、3 day, 30°C で培養した。得られたコロニーを形質転換体とした。

発現株スクリーニング

5 mL の BMGY 液体培地に YPD プレート上の 1 コロニーをけん濁し、20 h, 30°C で前培養した。培養液 1 mL に対し、4 mL の BMGY を加えて 4 h, 30°C 培養した。500 μ l ととり、10 min, 2380 g, 4°C で遠心分離し、菌体を回収した。回収した菌体を 5 mL の BMMY 液体培地でけん濁し、20 h, 250 rpm, 30°C で培養した。4°C, 20 min, 2580 rpm で遠心分離を行い、菌体を除いた。anti-MCL 抗体を用いて培地上清のウエスタン解析を行った。

発現条件スクリーニング

ウエスタン解析の結果、最も rMCL 発現量の多い株を選別した。温度、pH、MtOH 濃度、誘導培養日数、による発現量の変化を解析した。5 mL の BMGY 液体培地に 1 コロニーをけん濁し、20 h, 30°C で前培養した。1 mL をとり、4 mL の BMGY を加えて 4 h, 30°C 培養した。終菌濃度が OD=1 になるように 500 μ l ととり、10 min, 2380 g, 4°C で遠心分離し、菌体を回収した。回収した菌体を 5 mL の BMMY 液体培地 (pH 3, 4, 5, 6, 7 もしくは 8) でけん濁した。24, 48, 72 h, 30 もしくは 20°C で培養し、終濃度が 1, 2, もしくは 3% MtOH になるように 24 h 毎に 20% MtOH を添加した。10 min, 2380 g, 4°C で遠心分離によって菌体を除いた。anti-MCL 抗体を用いて培地上清のウエスタン解析を行った。

大量培養

最も rMCL の発現量の多い発現条件(前培養から回収した菌体を BMMY 液体培地(pH 6、2% MtOH) でけん濁し、48 h, 30°Cで培養) による大量培養を行った。

His-tag による精製

5 L の大量培養後、30 min, 8000 xg, 4°Cで遠心分離を行い、菌体を除いた。上清を、平衡化 buffer (20 mM MES-NaOH(pH 6.0), 500 mM NaCl) により平衡化した 5 mL TALON コバルトカラムへのせた。200 mL の平衡化 buffer で未吸着画分を除いた後、50 mL 溶出 buffer (20 mM MES-NaOH(pH 6.0), 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole) により溶出した。精製後のサンプルを SDS-PAGE により解析した。

FLAG-tag による精製

5 L の大量培養後、30 min, 8000 xg, 4°Cで遠心分離を行い、菌体を除いた。上清を、平衡化 buffer (20 mM MES-NaOH(pH 6.0), 500 mM NaCl) により平衡化した 1 mL anti-FLAG M2 抗体レジンと混合し、20 h, 4°Cでゆるやかに攪拌した。200 mL の平衡化 buffer で未吸着画分を除いた。5 mL 溶出 buffer (20 mM MES-NaOH(pH 6.0), 500 mM NaCl, 0.1 mg/mL FLAG ペプチド) により溶出させた。溶出画分サンプルを anti-MCL 抗体を用いたウエスタン解析、および SDS-PAGE により解析した。

2-4-2. 結果

発現株スクリーニング

10 株のスクリーニングの結果、ウエスタン解析により培養液上清に rMCL 単量体、二量体の発現を検出した。最も発現量の高い株 α _MCL_N42, 85,186Q_No. 4 を選別した(図 2)。培養温度、BMMY 液体培地の組成、および培養時間を変化させ、発現条件の最適化を行った(図 3)。30°Cの発現量は、20°Cの 2 倍程度であった。30°C、24 h において、pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、および 8.0 では、pH 6.0 が最も発現量が多く、pH 3.0 の 3 倍程度であった。30°C、pH 6.0 の培養条件では、MtOH 濃度によらず、培養日数 2 日で平衡に達し、2% MtOH で最も多い発現量を示した。

大量培養を行い、His-tag 精製をおこなった。結果、培地 1 L 当たり 0.05 mg の rMCL

単量体の精製に成功した (図 4)。しかし、nMCL が十分に強い活性を示す 0.5 mg/mL の条件において活性は検出できなかった (図 5)。rMCL 二量体は他の狭雑タンパク質とともに未吸着画分に溶出された。一方、FLAG-tag 精製により、rMCL 単量体、二量体はともに精製に成功した。しかし、その収量は非常に少なく、ともに培地 1 L あたり 10 µg 程度であった。

2-4-3. 考察

発現条件の検討により、発現条件は pH 6.0、30°C、48 h で 24 h 毎に終濃度 2% になるように MtOH を添加する条件が最適であると結論した。TALON コバルトレジンに対し、rMCL 二量体はほとんど吸着せず、精製することができなかった。rMCL 単量体は精製できたことから、二量体化に伴う立体障害により、C 末端に付加した His-tag がコバルトへ結合できなくなったと考えられる。一方、N 末端に付加した FLAG-tag による精製効率は rMCL 単量体、二量体で差はなかった。このことから、N 末端に付加した tag は露出しており、精製用 tag として機能できると考えられる。しかし、FLAG-tag による精製収量は非常に少なく、培地 1 L 当たり 10 µg 程度であった。そのため、rMCL 二量体の活性の有無については測定できなかった。発現量の向上が必要であり、rMCL 二量体の取得、活性の確認が望まれる。一般に、*P. pastoris* は異種タンパク質の高生産宿主であるが、MCL の発現量は非常に低かった。MCL に使用されているコドンをもとに *P. pastoris* の使用コドン表と比較すると、レアコドンの使用頻度が高く、高発現の障害の一因となっていると考えられる (Codon Adaptation Index=0.1/1) (Sharp et al. 1987)。特に、MCL1 分子当たり 22 残基含まれる Arg をコードする CGT, CGC, CGA, CGG, AGG は *P. pastoris* においてレアコドンであり、これらを中心とした全体的な使用コドンの最適化により、発現量の改善が望まれる。

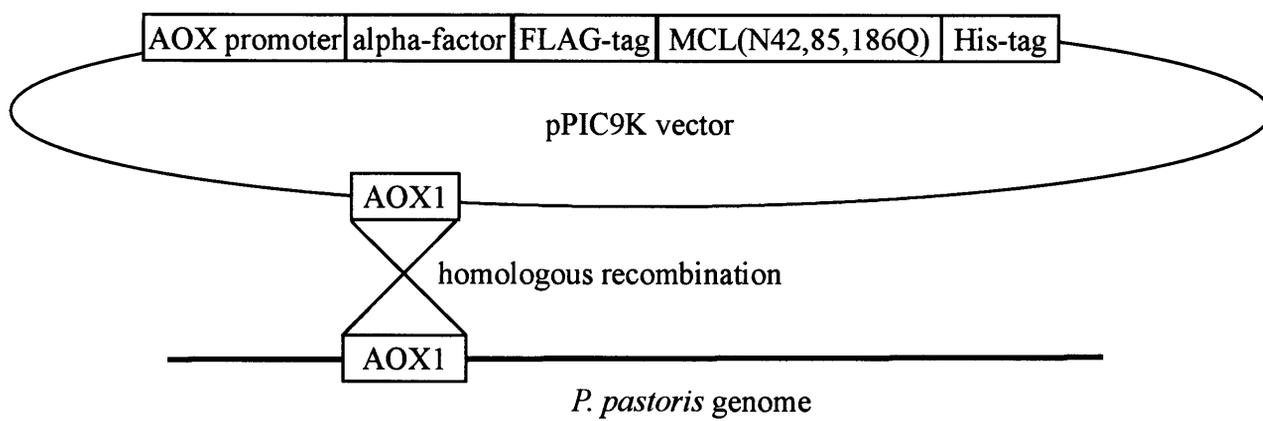


図1 : *P. pastoris*による発現コンストラクト

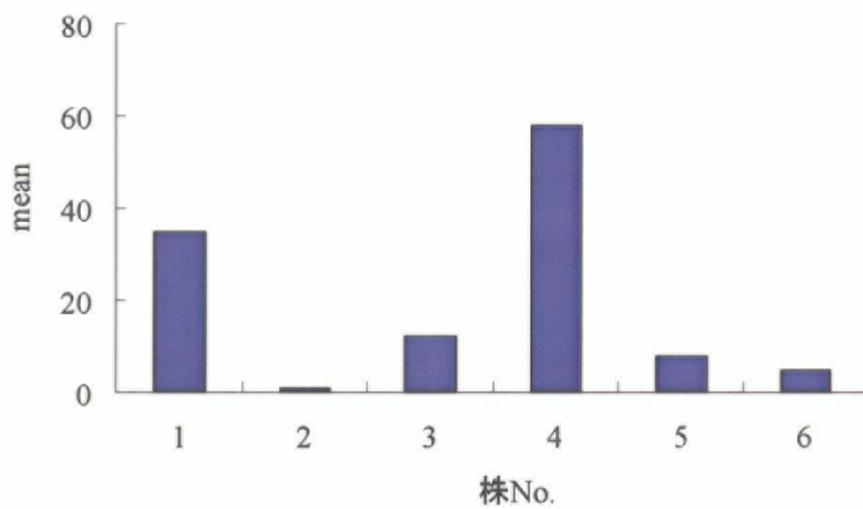


図2 : *P. pastoris*によるrMCL発現株の選別
培養液上清のウェスタン解析の後、NIH-imageでrMCL二量体バンドの濃度を測定した。
株No. 4を以降の実験に使用した。

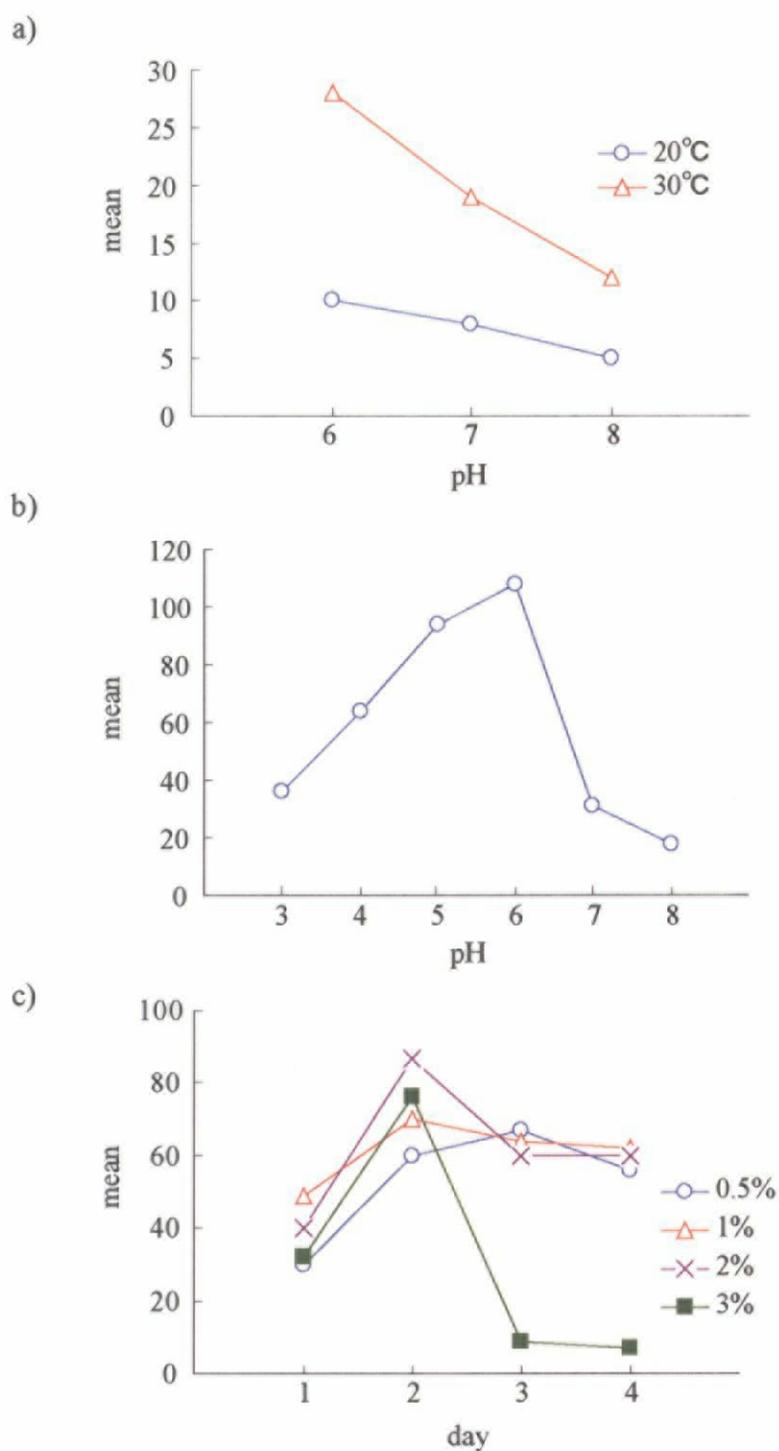


図3 : *P. pastoris*によるrMCL発現条件の検討

培養液上清のウェスタン解析の後、NIH-imageでrMCL二量体バンドの濃度を測定した。

a)温度による発現量の変化

b)pHによる発現量の変化

c)培養日数とMtOH濃度による発現量の変化

pH 6.0、30°C、48 h、2% MtOHを添加が最適条件であると結論した。

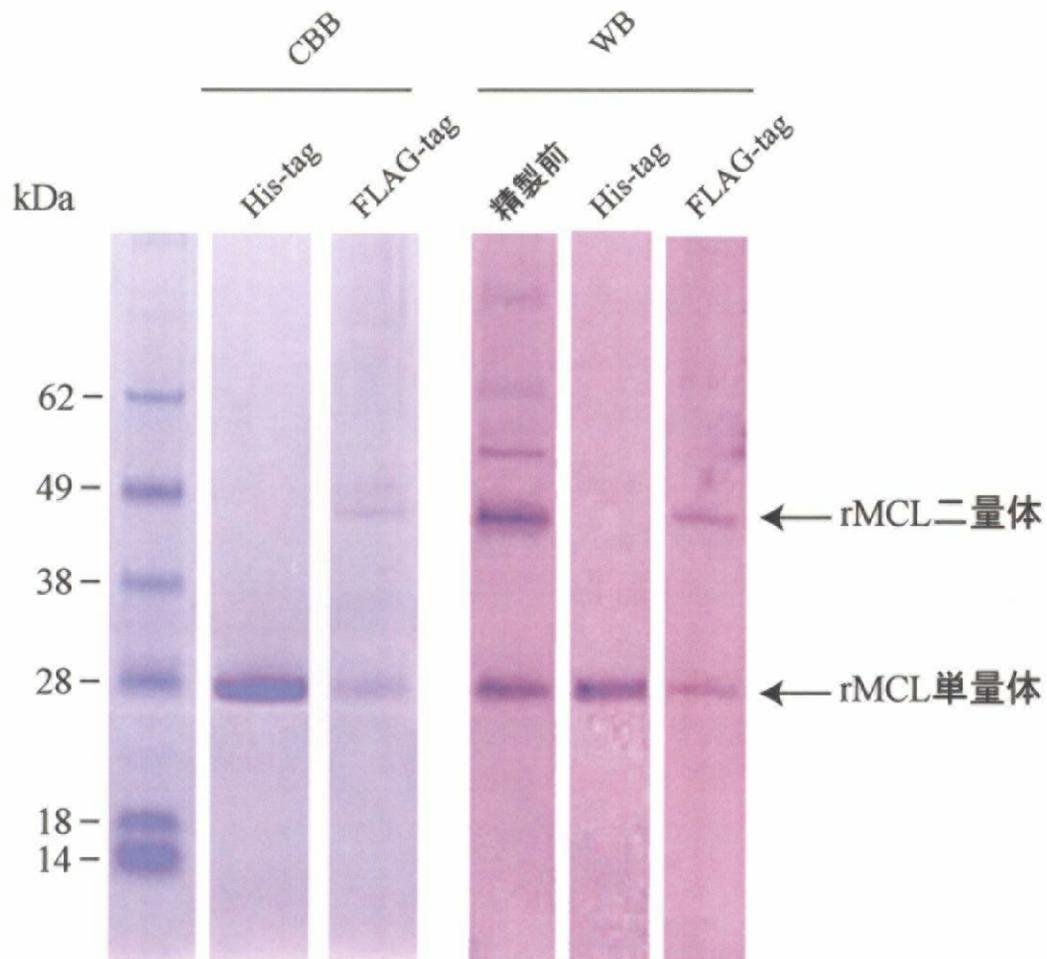


図4 : *P. pastoris*により発現したrMCLの精製

大量培養後、His-tagおよびFLAG-tagによる精製を行い、SDS-PAGE (CBB染色) およびウエスタン解析 (WB) を行なった。培地上清にはrMCL単量体、二量体が検出され、His-tag精製によりrMCL単量体のみが、FLAG-tag精製によりrMCL単量体、二量体の両方が精製された。

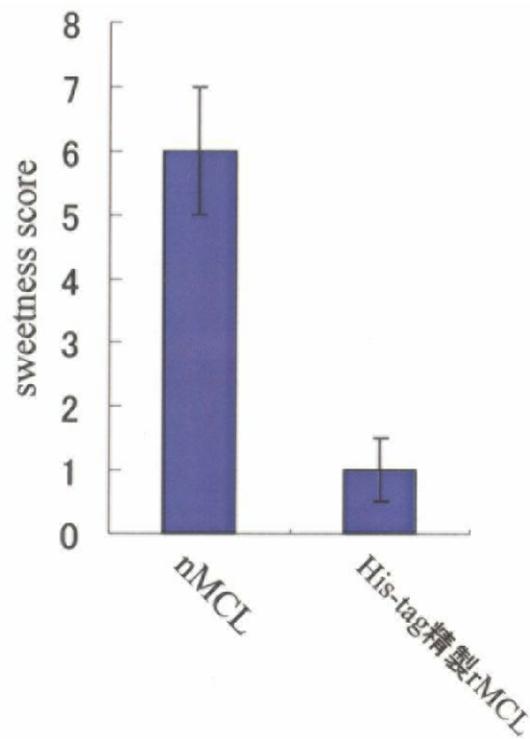


図5 : *P. pastoris*により発現、His-tagにより精製したrMCL単量体の活性
rMCL濃度0.5 mg/mLの条件で活性測定した (n=3)。
味覚修飾活性は検出されなかった。

2-5. *Aspergillus oryzae* を宿主とした発現系構築

序

麹菌は、「国菌」としても知られている糸状菌であり、古くから日本の伝統的な醸造製品である清酒、味噌、醤油などの製造に利用されている。アメリカ食品医薬品局によって GRAS (Substances Generally Recognised As Safe) にも指定されるなど、その安全性は世界的に高く評価されている。さらに、その高いタンパク質分泌性から、食品加工用酵素源としてだけでなく (Olempska-Beer et al. 2006)、異種有用タンパク質の発現宿主としても注目されている。麹菌の一種 *Aspergillus oryzae* は 2001 年に EST 解析が終了し、さらに 2005 年には全ゲノムが解読された (Machida et al. 2005)。同時期に *Aspergillus nidulans*、*Aspergillus fumigatus* のゲノムも解析され (Galagan et al. 2005)、国内外で注目を集めている。麹菌を宿主とした発現系はいくつか報告されているが、味覚修飾タンパク質であるネオクリン (Nakajima et al. 2006)、塩基性甘味タンパク質であるリゾチウムの発現が報告されている (Tsuchiya et al. 1992) *A. oryzae* を宿主として用い、MCL の発現系構築を試みた。

2-5-1. 方法

コンストラクトの作製

コンストラクトの作製は GATEWAY system(invitrogen) を用いて行った。pBluescript ベクターへクローニングした *mcl* 遺伝子をテンプレートとして、primer: 5'-ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctccaacgagattcggcacccaatccggttc-3' と 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtattagaagtatacggttttgtgaactcgaatgc-3' を使用して PCR を行った。PCR 断片は BP 反応 (相同組換え) によって pENTR ヘサブクローニングした (pENTR-*mcl*)。AmyB promoter と ORF を含む pg5'pFa と *A. nidulans* 由来 sC 選択マーカを含む pg3'sCJ の 2 つの plasmid を使い、LR 反応 (相同組換え) によって pDEST R4-R3 ベクターへ組み込んだ (pEXP-*mcl*)。すなわち *A. oryzae* において大量に分泌生産される α -アミラーゼの C 末端側に KEX 様プロテアーゼ切断配列を挟み、*mcl* 遺伝子を融合させた。KEX 様プロテアーゼは連続した塩基性アミノ酸の C 末端側で切断するプロテアーゼであり、発現成熟過程で正しい切断が起きれば、MCL タンパク質のみが分泌発現する。

形質転換

DPY 液体培地を用い、*A. oryzae* NS4(*naiD*, *sC*) (Jin et al. 2004) を 20 h, 30°C, 150 rpm で前培養した。Miracloth を用いて菌体を回収した後、滅菌水で菌体が白くなるまで洗浄した。菌体を L 字管に移し、TF solution 1(1% Yatalase, 0.6 M (NH₄)₂SO₄)10 mL を用い、3 h, 30°C, 50 strokes/min で緩やかにインキュベートした。再び miracloth を用いて菌体をろ過し、素通り画分にプロトプラストを得た。TF solution 2(1.2 M solbitol, 50 mM CaCl₂ 2H₂O, 35 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)) を加え、緩やかに混和した。8 min, 4°C, 2000 rpm で遠心分離を行い、沈殿にプロトプラストを回収した。TF solution2 を加えてから遠心分離の操作を二度行った。トーマ血球計算版を用い、プロトプラスト数を算出し、最終的にプロトプラスト濃度が 3*10⁷/mL になるように TF solution 2 を添加した。プロトプラスト溶液 200 μ l 当たり pEXP-*mcl* 5 μ g を加え、静かに混和した後、氷上で 30 min 静置した。250, 250, 800 μ l と 3 回に分けて TF solution 3(60% PEG4000, 50 mM CaCl₂ 2H₂O, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を加え、静かに混和した後、室温で 20 min 静置した。5 mL の TF solution 2 を加え、緩やかに混和してから、8 min, 4°C, 2000 rpm で遠心分離を行った。沈殿のプロトプラストを再度 500 μ l の TF solution 2 で混和した。45°C にプレインキュベートした TOP agar(0.2% NH₄Cl, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% KCl, 0.05% NaCl, 0.1% KH₂PO₄,

0.05% MgSO₄ 7H₂O, 0.002% FeSO₄ 7H₂O, 2% glucose, 1.2 M solbitol, 0.8% agar)に混和し、M plate sol+(0.2% NH₄Cl, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.05% KCl, 0.05% NaCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ 7H₂O, 0.002% FeSO₄ 7H₂O, 2% glucose, 1.2 M solbitol, 1.5% agar)へ重層し、3 day, 30°Cで培養した。

発現株および条件のスクリーニング

10個のコロニーをピックアップし、DPY液体培地(2% Dextrin, 1% polypeptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.05% MgSo₄ 7H₂O)で3日間培養した。miraclothを用いて菌体を除き、anti-MCL抗体を用いたウエスタン解析により、培地上清へのrMCLの発現を確認し、最も発現量が多い株を選別した。pH4, 5, 6, 7, 8, 温度20°C, 30°C, 培養時間1 day, 2 day, 3 dayにて発現条件の検討を行った。

大量培養と精製

DPY液体培地(pH 5.0)で3 day、30°Cで大量培養を行った。miraclothを用いて菌体を除去した。上清をゆっくりと攪拌しながら、細かく磨り潰した硫酸を少しずつ加えた。60%飽和になるまで硫酸を加え、4°C、1h放置した。30 min, 8000 xg, 4°Cで遠心分離を行い、沈殿を得た。粗精製タンパク質を3 M NaCl入り20 mM Na-Ace(pH 5.0)へ溶解し、PH814カラムを用いて、A buffer(20 mM Na-Acetate(pH 5.0), 3 M NaCl) –B buffer(20 mM Na-Acetate(pH 5.0))のリニアグラジエントによりHPLC精製を行った。溶出画分はanti-MCL抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出し、回収した。20 mM Na-Ace(pH 5.0)に対し透析した。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。活性画分を回収し、濃縮した。ゲルろ過カラムを使用したHPLC精製を行った。

活性

活性測定はミラクリンのタンパク質科学的解析の項と同様に行った。ラクチゾールによる甘味阻害活性は2 mM ラクチゾールを含むNa-Citrate (pH 5.0, 3.0)溶液を用いて測定した。

2-5-2. 結果と考察

発現条件の検討

10 株の発現量を解析した結果、培養液上清に rMCL 単量体、二量体の発現を確認し、rMCL 二量体発現量の最も多い株 rMCL_No. 8 を選別した (図 2)。発現条件検討の結果、3 日、30°C (図 3) で培養した場合にもっとも高い発現量が得られた。pH 条件による発現量の変動も見られ、pH 8.0 で最も多い発現量を示したが、経験的に nMCL が pH 6.0 以上で不安定であることから (data not shown)、pH 条件は 5.0 に決定した。

発現と精製

rMCL 二量体の発現量は培地 1 L あたり 2 mg であった。この発現量は麹菌においては中程度の発現量である。本研究ではプロテアーゼ破壊株を使用しているが、それ以外にも、使用コドンの最適化、プロモーターの変更、培養方法、菌の育種等に改善の余地がある。精製後、得られたサンプルの SDS-PAGE の結果を図 4 に示す。rMCL 二量体は 90%以上の純度のほぼ単一のタンパク質として、培地 1 L あたり 0.8 mg の収量で得られた。

N 末端アミノ酸解析

rMCL 単量体、二量体の N 末端 20 アミノ酸の配列は nMCL (Theerasilp et al. 1989) と同様に DSAPNPVLDIDGEKLRGTN であった。設計通り、rMCL の N 末端に付加した KR 配列において、KEX 様プロテアーゼによる切断が起きたと考えられる。

二次構造

CD スペクトル解析の結果、rMCL 二量体は nMCL と同様な強い負のスペクトルを示した (図 5)。二次構造構成比は α -helix 10.1%, β -sheet 82.8%, Turn 3.0%, Random coil 4.1% であり、nMCL のそれと類似していた。このことは、rMIR 二量体が nMIR と同様な正しいコンフォメーションをとっていることを示唆している。さらに、rMCL 二量体の CD スペクトルも nMCL と同様に pH に伴って変化した。この変化は味覚修飾活性にともなう構造変化と推察されることから、nMCL と同様の動的構造変化が見られたことにより、rMCL 二量体も味覚修飾活性を有している可能性が示唆された。ただし、nMCL と rMCL の CD スペクトルは厳密な重ね合わせにおいては正確には一致せず、狭雑物、もしくは誤ったフォールディングの rMCL が混入している可能性がある。

活性

rMCL の味覚修飾活性は官能試験により評価した。すなわち、MCL 溶液を 1 分間口に含み、水でリンスした後、各種酸溶液を口に含み、誘導された甘味を 0.25 mM-2 mM のアスパルテームの甘味と比較して評価した。0.5 mg/mL の rMCL 二量体の活性は、0.1 mg/mL の nMCL の活性と同等であり、1/5 程度の比活性であった。CD スペクトル解析の結果からも示唆されるように、精製後の rMCL において、誤ったフォールディングのタンパク質が混入していると考えられる。rMCL 二量体の味覚修飾活性は nMCL と同様に、pH 6.0 においてはほとんど感じられないが、pH 5 よりも低い場合は pH の低下に従って強く検出され、pH 3.0 では 1-2 mM のアスパルテーム濃度 (sweetness score 7) に匹敵する強い甘味を呈した (図 6)。このことから、rMCL 二量体は nMCL と同様な味覚修飾活性を有することが確認された。一方で、rMCL 単量体の味覚修飾活性は 1.5 mg/mL の条件でさえ検出されなかった。この結果は、MCL の二量体構造が味覚修飾活性に必須であることを示唆している。

MCL はそれ自身は無味であり、酸の存在下でのみ甘味を呈する。この誘導される“甘味”が他の甘味物質と同じように T1R2/T1R3 を介して起こるものかどうかは不明である。そこで、ラクチソールによる味覚修飾活性の阻害効果を調べた。ラクチソールは、甘味受容体 T1R3 の膜貫通ドメインへ結合することで、ネオクリン、スクロース、およびサッカリンの甘味を阻害することが報告されている (Jiang et al. 2005, Nakajima et al. 2006)。結果、rMIR と nMIR は共に pH 3.0, 5.0 の両方で味覚修飾活性が強く抑制され、pH 5.0 においては甘味が検出できなかった (図 7)。この結果は、MCL の味覚修飾活性も他の甘味物質と同様に T1R2/T1R3 を介して起こることを示唆している。

以上のように、*A. oryzae* を宿主とした発現系により、活性を有した rMCL 二量体の発現にはじめて成功した。以後、麹菌発現 rMCL 二量体を wild-type rMCL と記載する

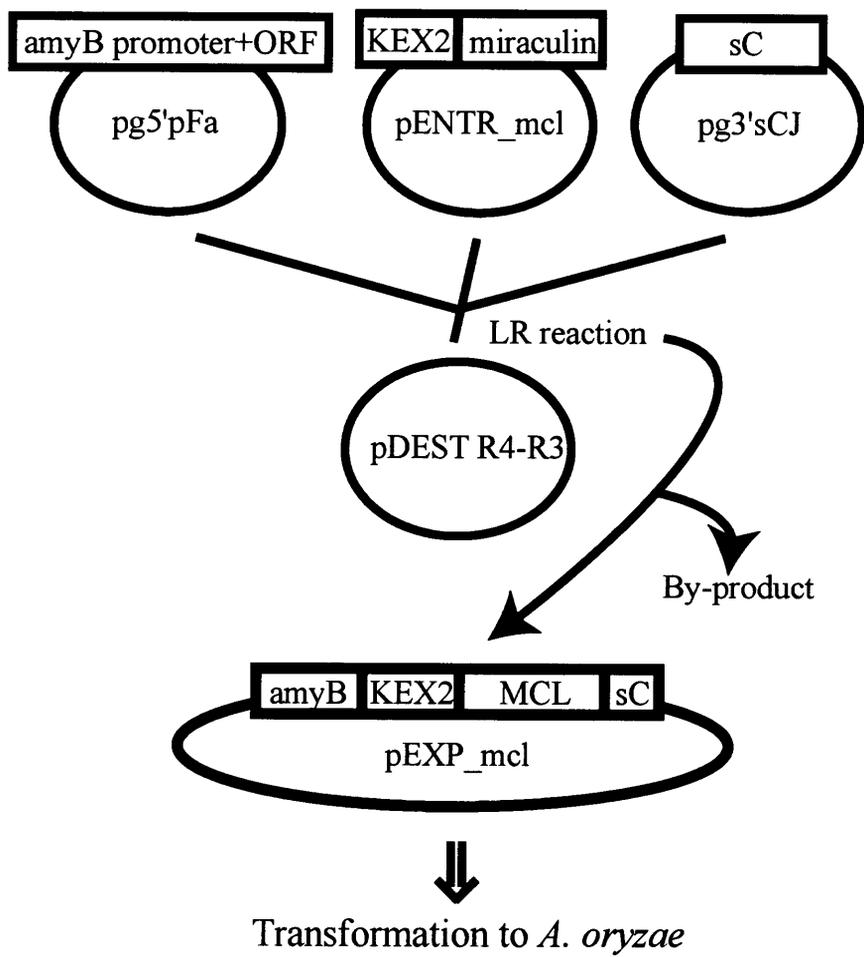


図1 : GATEWAYによる*A. oryzae*発現コンストラクトの作成

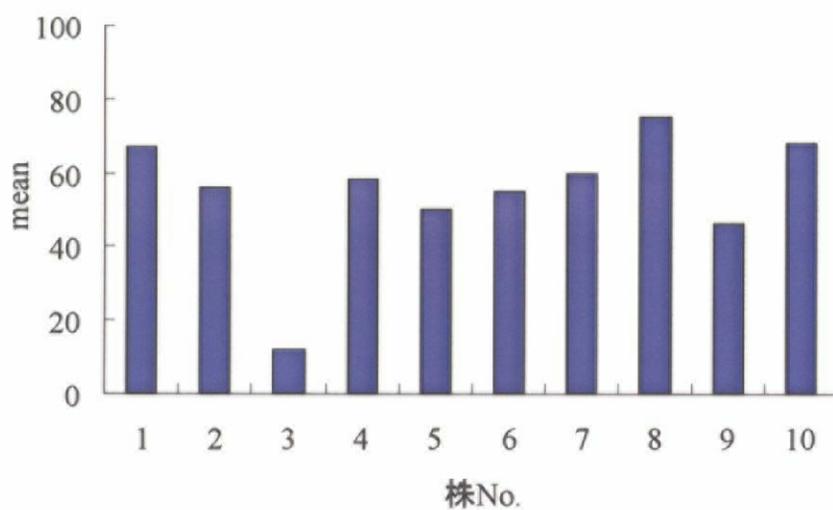
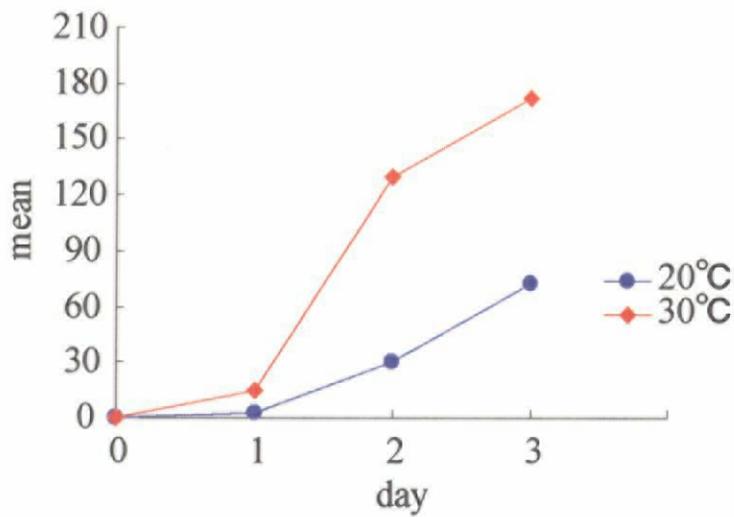


図2 : *A. oryzae*によるrMCL発現株の選別
培養液上清のウエスタン解析の後、NIH-imageでrMCL二量体バンドの濃度を測定した。
株No. 8を以降の実験に使用した。

a)



b)

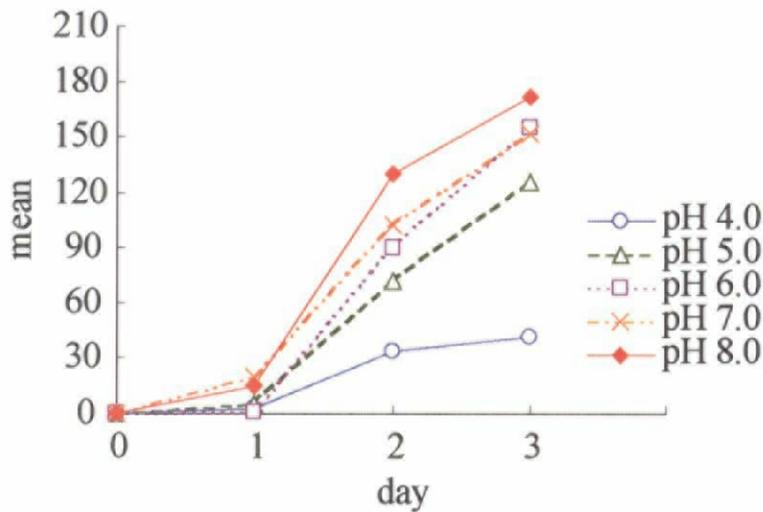


図3 : *A. oryzae*によるrMCL発現条件の検討

培養液上清のウェスタン解析の後、NIH-imageでrMCL二量体バンドの濃度を測定した。

a)温度と培養日数による発現量の変化

b)pHと培養日数による発現量の変化

pH 5.0、30°C、3日培養が最適条件であると結論した。

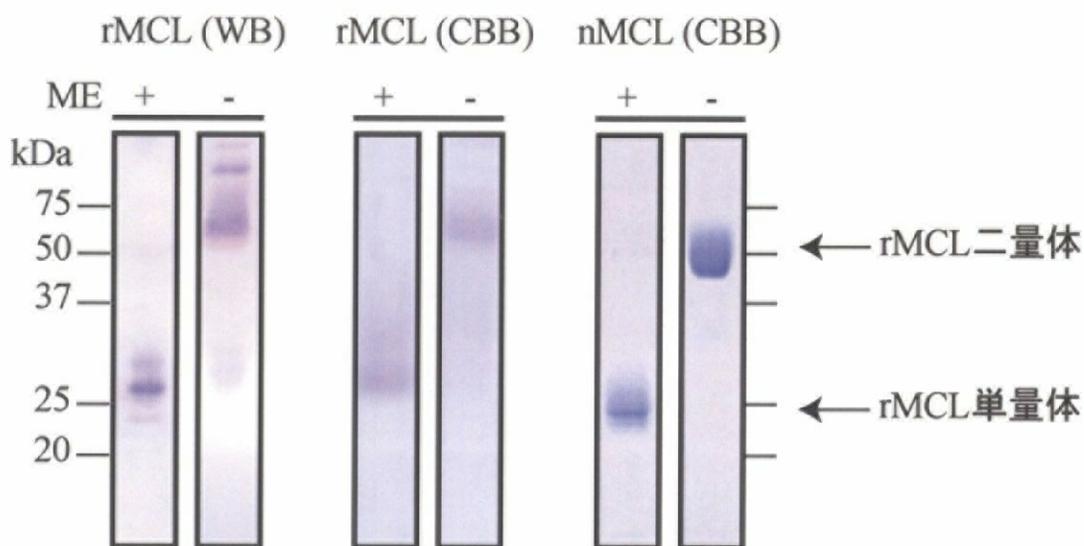


図4 : *A. oryzae*により発現したrMCLの精製
培地上清のウエスタン解析 (WB) および精製後のrMCLとnMCLの
SDS-PAGE(CBB染色)解析を行った。
rMCLはnMCLと同様な二量体を形成しており、精製後の純度は90%以上であった。

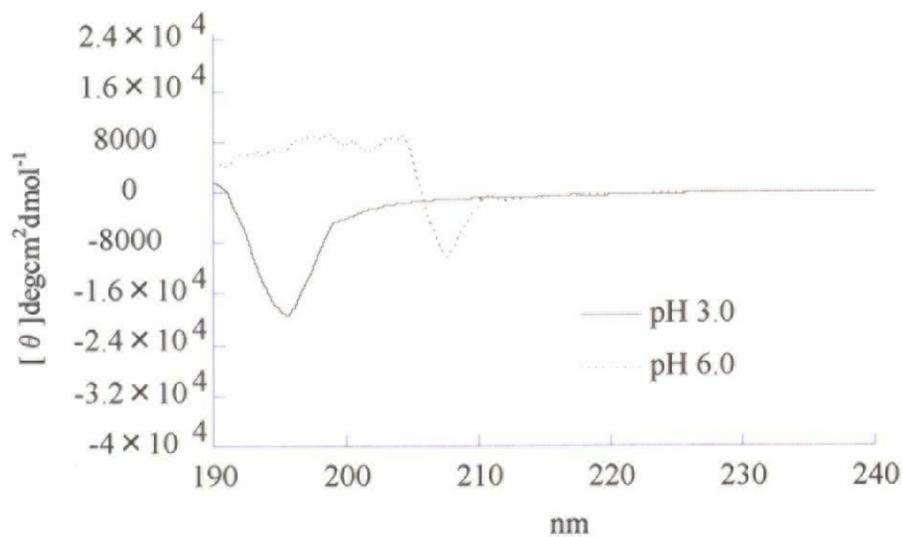


図5 : *A. oryzae*により発現したrMCLのCDスペクトル
 各pHのクエン酸緩衝液中でのCDスペクトルを解析した。
 buffer自体のスペクトルは差し引いた。
 rMCLはnMCLと同様な β -sheetに富んだ二次構造であり、
 pHによるスペクトルの変化も観察された。

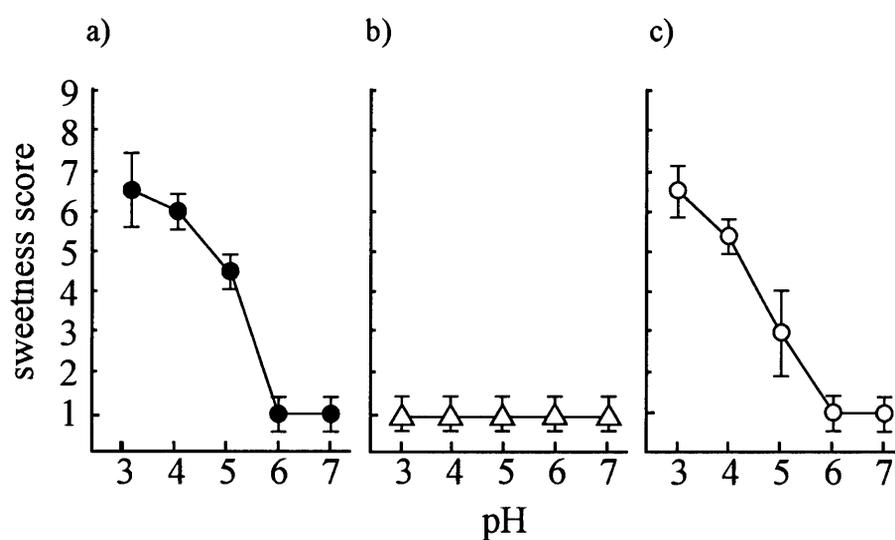


図6 : *A. oryzae*により発現したrMCLの味覚修飾活性

a) *A. oryzae*により発現したrMCL二量体 (rMCL濃度0.5 mg/mLで活性測定した (n=5))

b) *A. oryzae*により発現したrMCL単量体 (rMCL濃度1.5 mg/mLで活性測定した (n=5))

c) nMCL (nMCL濃度0.1 mg/mLで活性測定した (n=5))

rMCL二量体はnMCLと同様な味覚修飾活性を有していた。rMCL単量体には味覚修飾活性は検出されなかった。

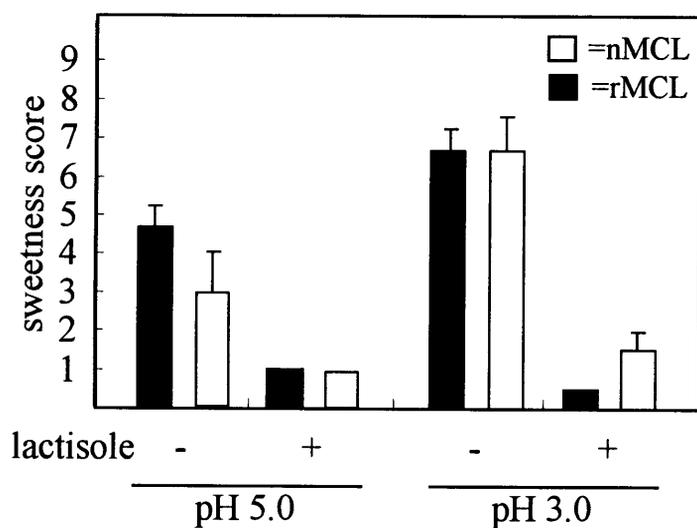


図7：ラクチゾールによる味覚修飾活性阻害

2 mMラクチゾールによる味覚修飾活性の阻害効果を解析した (n=5)。

nMCL、rMCLともにラクチゾールによる味覚修飾活性の阻害が観察された。

第3章 ミラクリンの構造生物学的解析

3-1. 変異体解析と分子シミュレーション解析

序

MCL の機能発現機構の解明を目的として、麹菌を用いて構築した発現系を用い、部位指定変異による変異体解析を行った。

糖鎖解析

糖タンパク質に付加している糖鎖は、分子認識やプロテアーゼからの保護の他、立体構造維持に関わることが報告されている。例として、エリスロポエチン、組織プラスミノゲン活性化因子、インターフェロン (β , γ)、血液凝固因子Ⅷなどの糖タンパクでは、その機能発現・活性維持にアスパラギン結合型糖鎖が必須であることが知られており、大腸菌ではこれらタンパク質の発現系構築は不可能である。

また、Kurihara等はMCLの機能発現には糖鎖が重要であると推定しているが (Kurihara & Beidler 1989)、実験的証拠はない。nMCLには複合型糖鎖が付加しているが、*A. oryzae* によって発現したwild-type rMCLには高マンノース型の糖鎖付加が起きていると考えられる。この違いにもかかわらず、wild-type rMCLは強い味覚修飾活性を有していた。また、本論文の「タンパク質科学的研究」の項で示したように、異なる糖鎖の付加したnMCL間での味覚修飾活性の差は見られなかった。そこで、wild-type rMCLの糖鎖構造解析を目的として、糖鎖付加アミノ酸残基であるAsn42、Asn186をGlnへと置換した変異体を作成し (N42Q, N42,186Q, N186Q)、SDS-PAGE解析を行なった。ツニカマイシンはヌクレオチド系抗生物質であり、糖タンパク質のN結合型糖鎖の付加を阻害することが知られている (Schwarz et al. 1979) ことから、糖鎖付加のないMCLを得るために使用した。

活性残基の特定

MCL は弱酸性 pH 領域で強い甘味を呈することから、その pH 領域でプロトネーションが起こる酸性アミノ酸残基が味覚修飾活性の発現に寄与していると考えられる。MCL はサブユニット当たり 13 個の Asp 残基、9 個の Glu 残基、2 個の His 残基を持つ。His 残基は中性から弱酸性領域でプロトネーションされることから、酵素をはじめ、生体内での多くのタンパク質の活性残基として機能している。MCL においても味覚修飾活性へ寄与している可能性が考えられる。そこで、His30、His60 を Ala へと置換した変

異体 (H30A, H30,60A, H60A) を作出し、味覚修飾活性への影響を解析した。

3-1-1. 方法

MCL 変異体の作成

pBluescript ベクターにクローニングした *mcl* 遺伝子をテンプレートとして、N42Q および N186Q 変異導入用に 5'-ttagaagtatacggtttctggaactcgaatcgaat-3'、5'-atccgccaccacccccaggcacccttcgtttgt-3'、5'-acaaacgaaggcgccctggggggtggtggcgat-3'、5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtattagaagtatacggtttctggaactcgaatgc-3' を用い、H30A および H60A 変異導入用に 5'-cggtgctccgacgctggcgccgcttac-3'、5'-gcgagggggcgatcggcgctgcacctcttc-3' を用いて PCR 法によって変異を導入した。得られた mutant DNA を麹菌へ導入し、形質転換体を得た。DPY 液体培地を用い、2day、30°C で培養した。糖鎖付加の無い MCL を得るために、ツニカマイシンを終濃度 0.1 mg/mL になるように添加し、同条件で培養した。anti-MCL 抗体を用いた培地上清のウエスタンブロッティングにより、N42Q, N186Q, N42,186Q 変異体の移動度を評価した。H30A, H30,60A 変異体は、wild-type rMCL と同条件での大量培養、精製、活性評価を行った。

3-1-2. 結果

糖鎖解析

SDS-PAGE 解析の結果 (図 1)、N42Q の分子量は、wild-type rMCL よりも小さく、シャープなバンドであった。N42,186Q の分子量はツニカマイシン処理した wild-type rMCL とほぼ同じであり、シャープなバンドであった。N186Q の分子量は wild-type rMCL とほぼ同じであり、ブロードなバンドであった。

活性残基の特定

H30A, H30,60A の発現量は共に大幅に減少し、培養液 1 L あたり 100 μ g であった。H60A の発現は検出できなかった。H30A, H30,60A の大量培養、精製を行い (図 2)、活性測定を行ったが、wild-type rMCL で十分に甘味を呈する濃度である 0.5 mg/mL の条件において、活性が検出されなかった (図 3)。しかし、より高濃度 2 mg/L の条件では sweetness score=2 のわずかな活性が検出された (data not shown)。

3-1-3. 考察

糖鎖解析

SDS-PAGE 上の分子量の変化から、付加糖鎖の大きさが推定できる。N42,186Q の分子量がツニカマイシン処理した wild-type rMCL とほぼ同じであったことから、既に知られている Asn42、Asn186 以外に糖鎖付加は起きていないと考えられる。N42Q の分子量は wild-type rMCL よりも小さく、シャープなバンドであることから、Asn42 には大きく不均一な糖鎖が結合していると考えられる。また、N186Q の分子量は wild-type rMCL とほぼ同じである一方、N42Q との二重変異によって N42Q 単独変異よりも分子量が小さくなったことから、Asn186 には比較的均一で小さい糖鎖が結合していると考えられる。

以上より、wild-type rMCL は、nMCL と比較して、糖鎖付加部位は同じであるが、その大きさは異なることが示唆された。付加した糖鎖は nMCL が複合型糖鎖であり、wild-type rMCL は高マンノース型糖鎖であると考えられる。このような違いにも関わらず、wild-type rMCL が強い味覚修飾活性を有していたことから、特定の糖鎖構造が活性に必要ではないと考えられる。この結果は、第 1 章で得られた結果、MCL-I,II,III 間の味覚修飾活性に大きな差がないことも矛盾しない。ただし、N42,186Q の発現量は培地 1 L あたり 10 μ g 程度と微量であったため、直接の活性測定まではいたっていない。糖鎖の機能についての直接的な知見を得るには、糖鎖付加の無い MCL の取得が不可欠である。

活性残基の特定

H30A と H30,60A は共に活性が大幅に減少したことから、His30 が活性化になんらかの重要な役割を担っていることが示唆された。MCL は弱酸性領域で活性化するが、その pKa はおよそ 5 付近である (*A. oryzae* を宿主とした発現系構築 図 6)。His 残基側鎖の pKa は分子内の局在によって大幅に変化するが (Westmoreland et al. 1975, Hayes et al. 1975)、一般的に遊離 His のイミダゾール基の pKa が 6.0 付近であること、H30,60A の活性が完全には失われなかったことは、他の残基も活性に寄与している可能性を示唆している。Asp、Glu 残基等、複数のアミノ酸残基のプロトネーションによって、活性化に必要な立体構造の変化が引き起こされると推察される。

3-1-4. シミュレーション解析

His 残基が活性に何らかの寄与をしていることが明らかとなったが、その機能については不明である。そこで、His 残基の活性への寄与機構を推定するために、分子シミュレーション解析を行った。MCL の立体構造は未知であるため、はじめに、Barley α -Amylase/Subtilisin inhibitor (BASI, PDB ID=1AVA_D) を鋳型とし、Insight II を用いたホモロジーモデリングにより MCL 単量体の立体構造を構築した。次に、HEX プログラムを用いて、MCL 単量体自身をリガンドとした結合シミュレーションを行い、その結果に基づいて二量体の立体構造を構築した。得られた約 100 個の結合構造を 2 つのクラスターに分類し、その代表構造を図 4 に示す。2 つのモデルの内、モデル a)において、His30 はサブユニット間の境界面に存在した。第 2 章で示したように、MCL は二量体であることが活性に重要である。His 残基がサブユニット間の境界面に存在することは、この残基が、プロトネーションとサブユニット間の相互作用に関与することで味覚修飾活性の発現に寄与している可能性を示唆している。他方、モデル b)では、His30 はサブユニット間の境界面に存在していなかった。この場合、His 残基の活性化への具体的な寄与機構を議論することは難しい。おそらく活性化に伴う H⁺の初期受容に関わっていると推察される。

MCL の CD スペクトルは pH 条件によって変化するが、Trp 側鎖の蛍光は変化しない (活性本体の同定 図 6)。このことは、味覚修飾活性発現にともない、Trp 残基の周辺以外で構造変化が起きることを示唆している。ホモロジーモデリングの結果、単量体内に 3 個存在する Trp 残基は S-S 結合とは反対の位置に存在した (図 4)。このことは、上記した MCL のサブユニット間の相互作用が活性に関与する考えとも矛盾しない。また、甘味タンパク質では塩基性アミノ酸残基がその甘味活性に重要であることが示唆されているが (Temussi et al. 2002, Spadaccini et al. 2003, Tancredi et al. 2004)。ホモロジーモデリングの結果、MCL の C 末端近傍には Arg 残基が 3 個連続した“RRR 配列”を中心として、His30 を取り囲むように塩基性アミノ酸残基によるコア領域が形成されていた (図 4)。この領域も Trp 残基とは別の位置に存在した。このことは、His30 がプロトネーションにより周辺の塩基性アミノ酸残基の構造変化を引き起こし、甘味が発現することを推察させる。

MCL のホモロジーモデリングにおけるサブユニット間の境界面は、2 つのモデルとも、鋳型とした BASI におけるアミラーゼとの結合領域に相当した (図 5)。この結果から、この領域が β -II タンパク質における活性に関与する共通領域であることが推察され

る。MCL にはプロテアーゼやアミラーゼへの阻害活性は検出されていないが、サブユニット間の境界面がそれら阻害活性に重要だとすれば、MCL は二量体化は、プロテアーゼやアミラーゼとの相互作用の立体障害となっているのかもしれない。

一般的に、タンパク質は一次構造の相同性が高ければ立体構造もある程度相同性が高いことが多い、MCL のホモロジーモデリングの確からしさは、MCL の CD スペクトルが β -II タンパク質と類似していることによっても支持される。また、筆者とは別の研究グループによる MCL のシミュレーション解析の結果においても、His 残基はサブユニット間の境界に存在し、活性に重要であることが示唆された (Paladino et al. 2007)。さらにこの報告では、NCL と同様に酸性条件下での MCL はサブユニット間が開いた “open” 構造をとることを示唆している。独立な二つのグループからのシミュレーション解析がほぼ同じ結果を示していることは興味深い。しかし、得られた構造はあくまでもシミュレーションモデリングの結果であり、特に詳細な構造的議論は困難である。味覚修飾機構の構造生物学的解析には、立体構造の解明が最重要課題である。

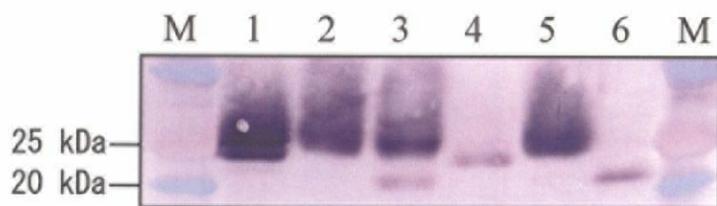


図1 : *A. oryzae*発現MCLの糖鎖解析

培養液上清のウエスタン解析を行った。

Lane 1, nMCL; lane 2, *A. oryzae*発現MCL; lane 3, ツニカマイシン処理; lane 4, N42Q;
lane 5, N186Q; lane 6, N42-186Q; lane M, 分子量マーカー

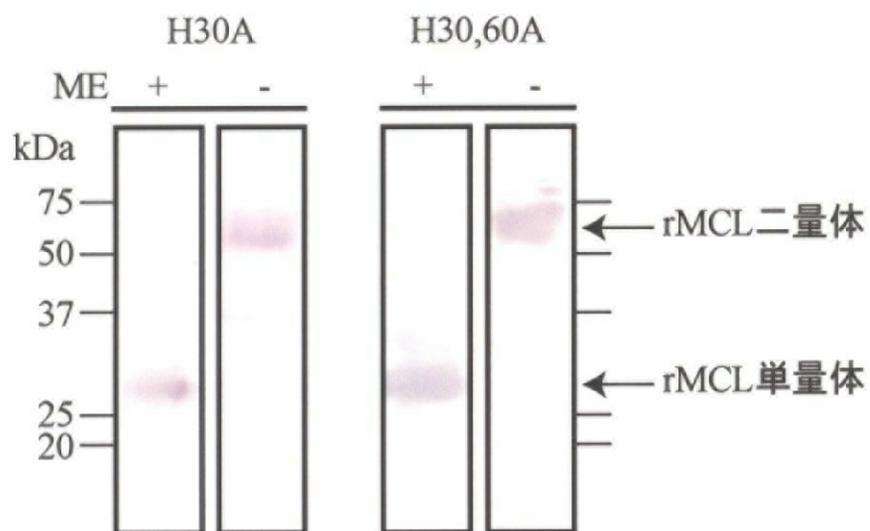


図2 : H30A, H30,60Aのウエスタン解析
 大量培養、精製後、ウエスタン解析を行った。
 H30A、H30,60A変異体はともにnMCLと同様な二量体を形成していた。

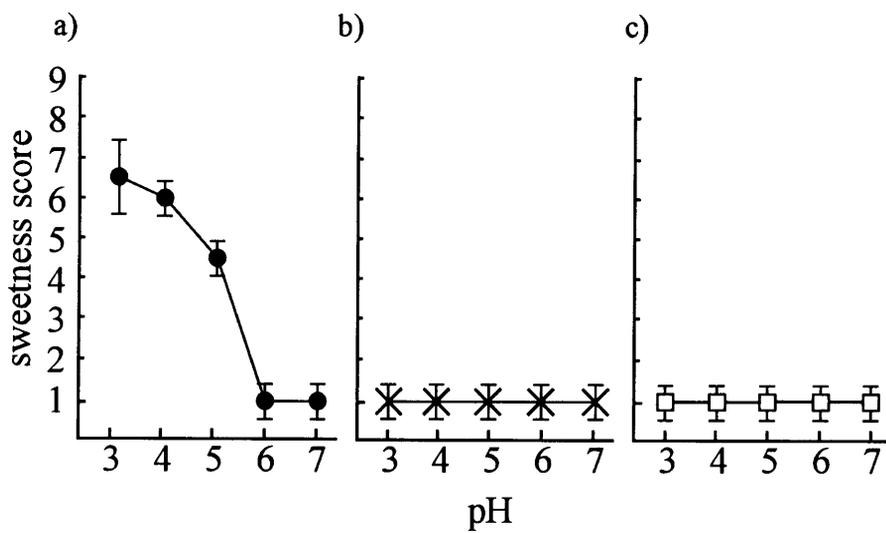


図3 : *A. oryzae*により発現したrMCLの味覚修飾活性
 a) *A. oryzae*発現MCL二量体 (rMCL濃度0.5 mg/mLで活性測定した (n=5))
 b) H30A (rMCL濃度0.5 mg/mLで活性測定した (n=5))
 c) H30,60A (rMCL濃度0.5 mg/mLで活性測定した (n=5))
 H30A、H30,60A変異体の味覚修飾活性は、ともに大幅に減少した。

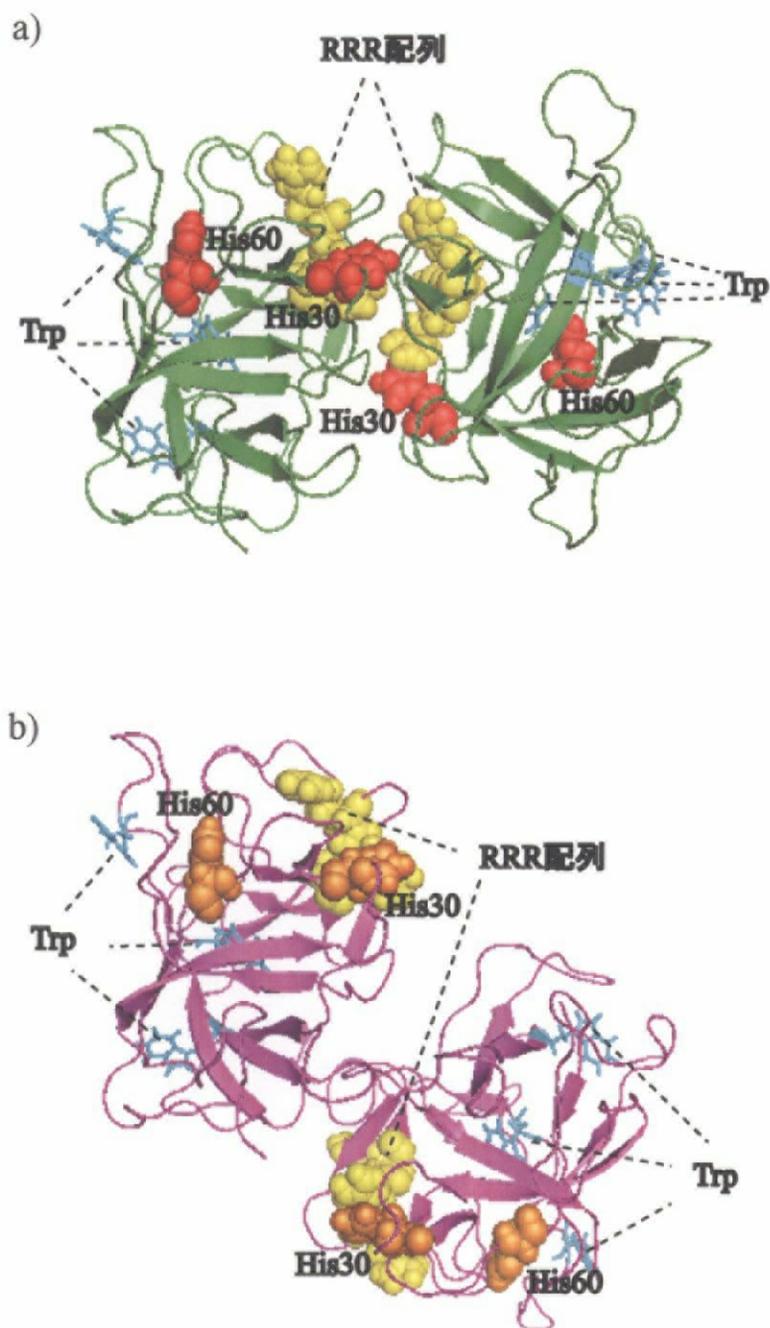


図4 : MCL二量体のシミュレーションモデリング

二量体シミュレーションの結果得られた2つの代表構造を示す。
 モデルa)では、His30はサブユニット間の境界に存在し、近傍には
 RRR配列を中心とした塩基性アミノ酸残基によるコア領域が形成されていた。
 Trp残基はサブユニット境界面とは反対側に位置していた。

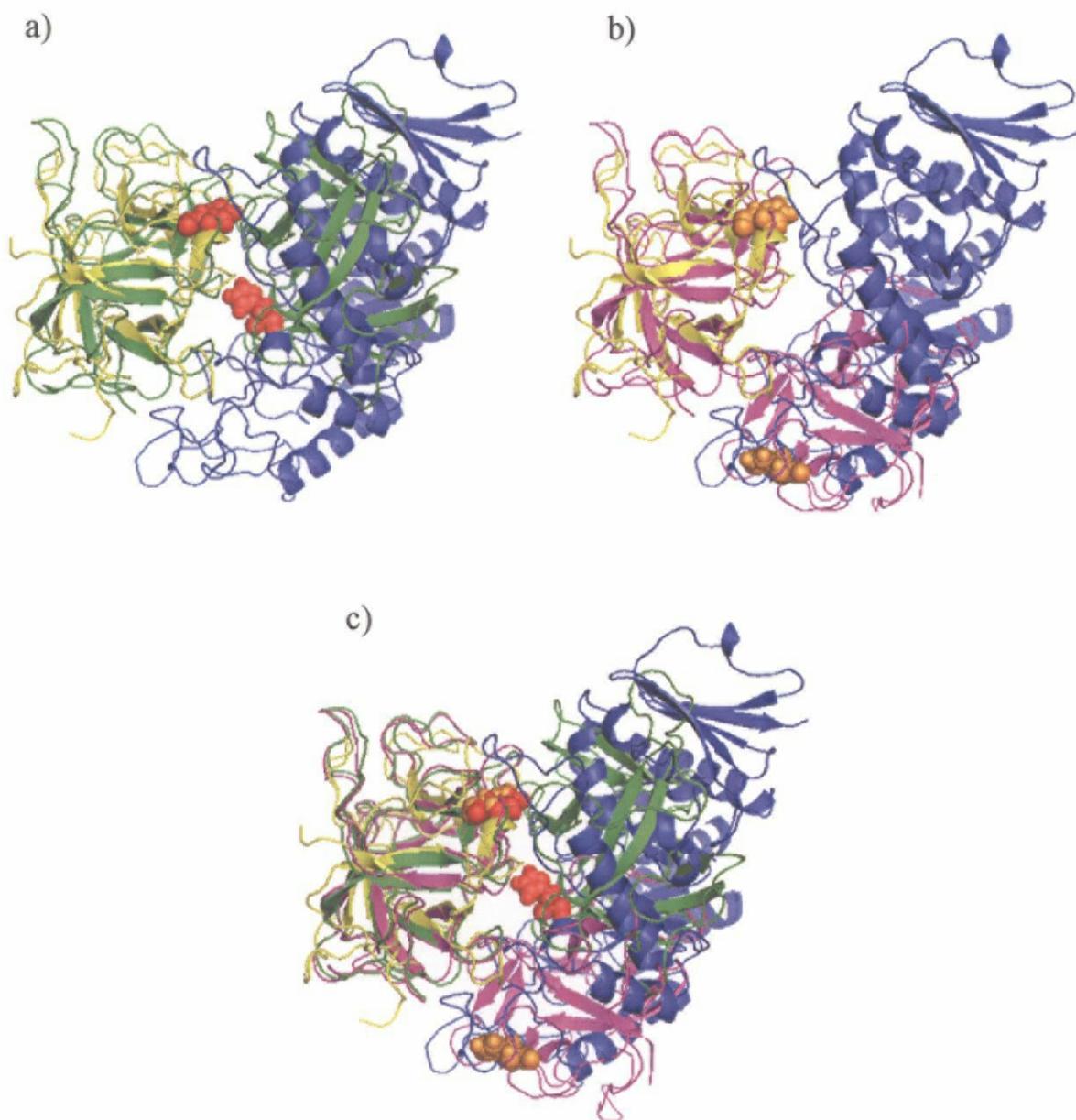


図5：アミラーゼ結合BASIとMCL二量体モデルの重ね合わせ

青：アミラーゼ 黄色：BASI 緑：図4a)モデル ピンク：図4b)モデル
 全体構造をリボンモデル、H30のみ空間充填モデルで示す。

a)図4a)のMCLモデル

b)図4b)のMCLモデル

c)図4a)と図4b)のMCLモデルの重ね合わせ

サブユニットの相対関係は異なるものの、モデルa)、b)ともにサブユニットの片側にはアミラーゼが位置していた。

総合討論

本研究によって、ミラクリン (MCL) の分子レベルでの解析を行う基盤である、発現系構築にはじめて成功し、実際に変異体解析によって His30 残基が味覚修飾活性の発現に重要であることを示唆する結果を得た。

以下に、味覚修飾活性および T1R2/T1R3 活性化機構の解明へ迫るための今後の課題と展望を中心として述べる。

発現系

発現系構築は試行錯誤によるところが大きい。第2章で述べたように複数の発現系について検討することで過去40年以上も成功例が報告されていない活性型 rMCL の発現に成功した。しかし、*A. oryzae* を宿主とした異種タンパク質発現系において、培地 1 L あたり 2 mg 程度の発現量は中程度であり、N42,186Q 変異体にいたっては、その発現量は培地 1 L あたり 10 µg 程度に激減した。変異体作成において、より高い発現量が確保できれば大きな利点となる。プロモーターの変更、アミラーゼとの融合タンパク質として分泌、使用コドンの最適化、MCL シグナル配列の付加、*A. oryzae* の固体培養等による発現量の向上が期待される。

本研究では *A. oryzae* 以外の宿主では活性を有した rMCL の発現には成功しなかった。しかし、*E. coli*、*P. pastoris* を宿主とした場合では rMCL 二量体が得られており、これらの系は特に改善の余地がある。MCL と比較的一次構造上の相同性が高いタンパク質である Kunitz 型トリプシンインヒビター (KTI) は、その多くが *E. coli* を宿主とした発現系で活性を有した状態で発現する。しかし、MCL の場合、可溶性画分に二量体として回収されたにもかかわらず、活性は検出できなかった。MCL と KTI のタンパク質科学的性質を比較すると、S-S 結合の数と等電点に差異が見られる。MCL は S-S 結合が分子内に 7 個存在し、特に Cys148 と Cys159、Cys152 と Cys155 はごく近傍で S-S 結合を形成しており、局所的なミスフォールドが起りやすいと考えられる。さらに、Cys138 は二量体形成に関わっているが、多くの KTI は単量体であり、このアミノ酸残基は Ser である。フォールディングへの S-S 結合の寄与は不明であるが、Cys 残基への変異導入により、誤った S-S 結合を形成させなくすることは活性を有した MCL 二量体の発現へ効果的かもしれない。*E. coli* を宿主とした発現系の利点はその発現量の高さにある。第一章で述べたように、pET21b ベクターを用いた場合、その発現量は培地 1 L あたり 20 mg 程度、封入体として発現する。不活性型タンパク質の除去は必要になるが、リフォ

ールディングによって活性のある rMCL が大量に得られれば、非常に有用である。

E. coli と同様、*P. pastoris* を宿主とした場合も可溶性画分に二量体として回収された。しかし、発現量と精製収率の低さから活性測定にはいたっていない。*P. pastoris* と MCL の使用コドンの偏りは大きく、発現量が低い要因の一つとなっていると考えられる。使用コドンの最適化および N 末端へ tag を付加することによる発現量・精製収率の向上が望まれる。

味覚修飾活性発現機構

MCL の味覚修飾活性は、MCL そのものには味がないが、後から酸を味わうと強い甘味が感じられる現象である。その機能過程は①非活性型 MCL が T1R2/T1R3 と結合し、続いて酸味物質によって周辺環境の pH が低下する。②MCL が H⁺ を受容し、③それが引き金となって MCL の立体構造変化が起こる。その結果、④活性残基の露出、もしくは構造変化そのものにより hT1R2/hT1R3 を活性化する過程からなると考えられる (図 1)。MCL の味覚修飾活性は長時間持続し、その間に何度酸を味わっても甘味が感じられることから、これらの過程はいずれも可逆的であると考えられる。以下にそれぞれの機構を解析するための作業仮説とその展望について述べる。

①hT1R2/hT1R3 との結合：MCL の味覚修飾活性の特徴として、その長い持続性が挙げられる。現段階では官能検査による持続性の評価は困難であるが、T1R2/T1R3 の細胞外ドメインとの相互作用をタンパク質レベルで解析することで、持続性の評価が可能になる。また、MCL は 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おり、それらの残基で T1R2/T1R3 と結合している可能性が高い。しかし、結合そのものが T1R2/T1R3 の活性化を伴わないことが他の甘味タンパク質と異なり、非常に興味深い。また、味の持続性は食品産業上の応用面においても重要な因子であり、詳細な結合機構の解明が望まれる。

②アミノ酸残基のプロトネーション：変異体解析により、His30 が味覚修飾活性に寄与していることが示唆された。しかし、His 残基へ変異導入した変異体は発現量が低く、CD スペクトルなどの解析にはいたらなかった。発現量の確保が重要である。この残基の機能として、弱酸性領域でプロトネーションされ、構造変化への引き金になると推察されるが、詳細は不明である。さらに、MCL の活性から推測される pKa は His 残基の

それとは必ずしも一致しないことから、他のアミノ酸残基の寄与も十分考えられる。その候補としては、酸性pH領域でプロトネーションされる Asp 残基や Glu 残基であろう。これらのアミノ酸残基への変異体解析により、H⁺受容機構の詳細が明らかとなると期待される。さらに、NMR によるプロトネーション機構の詳細な解析が可能である。プロトネーション機構が解明され、自在に制御できれば、活性化 pH 領域の異なる MCL の設計が可能になる。すなわち、中性 pH で甘味を呈する MCL やアルカリ性 pH で甘味を有する MCL 等が設計でき、新規機能性甘味料の開発へとつながる。

③立体構造変化：CD スペクトル解析の結果、MCL が pH の変化にともなった構造変化を起こすことが明らかとなり、MCL の味覚修飾活性は構造変化を伴うことが示唆された。MCL の機能発現機構の解析には H/D 交換 MS、NMR、X 線溶液散乱、Trp 残基の蛍光スペクトル解析等の動的構造解析が不可欠である。H/D 交換 MS は水素原子 (H) と重水素原子 (D) の交換反応をプロテアーゼ消化と質量分析により解析するもので、運動性の高いアミノ酸残基の特定に有用である。ただし、MCL の立体構造が不明なため、分子内部のアミノ酸が H/D 交換反応を起こしにくいことを考慮するなど、解析には注意が必要になる。NMR 法は 50 kDa の MCL の全体構造解析は困難であるが、スペクトルの帰属ができれば、例えば H⁺受容にかかわるアミノ酸残基の特定、詳細な構造解析が可能である。X 線小角散乱法は溶液中でのおおまかな全体構造を決定することが可能であるが、MCL は付加した糖鎖による分子量のバラつきが予想される。糖鎖の除去が必要であろう。Trp 残基の蛍光スペクトル解析は、構造変化の解析の中で最も簡便な方法である。しかし、MCL に存在する 3 個の Trp 残基の蛍光スペクトルにおいて pH に依存した変化は検出されなかった (data not shown)。別の箇所へ Trp 残基を導入することにより、構造変化の検出が可能になるかもしれない。これらの解析法はいずれも克服すべき課題がある。しかし、構造変化の検出が可能になれば変異体解析から得られる情報が飛躍的に増加する (図 2)。すなわち、得られた変異体を A. 構造変化が起こり甘味のある変異体、B. 構造変化がおこり甘味がない変異体、C. 構造変化がおこらず甘味のある変異体、D. 構造変化がおこらず甘味のない変異体に分類することができ、どのアミノ酸残基が味覚修飾活性のどの過程に寄与しているのかが特定できる。

④hT1R2/hT1R3 の活性化：他の甘味タンパク質では、塩基性アミノ酸残基が活性に重要であることが多く報告されている。MCL には C 末端に存在する“RRR 配列”に代表されるように、多くの塩基性残基が存在する。これらの網羅的な変異体解析により、相互作用するアミノ酸残基の特定が可能になる。一方、甘味受容体 T1R2/T1R3 の活性化機

構は不明である。mGluR1 では、その結晶構造を基に活性化機構が議論されており、活性化に伴い二量体を形成するサブユニット間の距離が縮まることが示唆されている (Muto et al. 2007)。非活性型 MCL が T1R2/T1R3 と結合しうることを考慮すると、MCL の構造変化が T1R2/T1R3 を活性化する機構は二通り考えられる。一つは MCL の構造変化によって活性中心が露出し、T1R2/T1R3 へ作用することであり (リガンドとしての MCL)、もう一つは MCL が T1R2/T1R3 と結合したまま構造変化することにより、T1R2/T1R3 の構造変化を誘導し、T1R2/T1R3 の構造を強制的に活性化状態にする (活性化因子としての MCL) ことである。MCL が甘味リガンドであるのか、活性化因子であるのかは今後の重要な研究課題である。

立体構造

MCL の立体構造は未知である。MCL は 50 kDa 程度であり、NMR による構造解析は困難である。最も有用な解析法は X 線結晶構造解析であろう。しかし、MCL は糖タンパク質であることが問題である。糖タンパク質に結合した糖鎖は、その微視的不均一性と高い運動性から結晶化のパッキングの障害となると考えられている。第 1 章、第 2 章で述べたように、MCL の糖鎖は活性には寄与していないと考えられることから、結晶化へは糖鎖の除去が効果的であろう。筆者が予備的に行なった結果、MCL の糖鎖の酵素除去はできなかったが、本研究で初めて構築した *A. oryzae* による MCL 発現系は、結晶化サンプル調整への重要な基盤となる。第 3 章で述べたように、糖鎖付加の無い変異体の作成に既に成功している。しかし、その発現量は微量であり、機能解析へは至っていない。発現量の向上が望まれる。

近年、NCL の結晶構造が明らかとなり、pH 低下にともなってサブユニット間が開く (open 構造) ことで T1R2/T1R3 と相互作用するというモデルが提唱されている (Shimizu-Ibuka et al. 2006)。ごく最近、筆者とは別の研究グループによる MCL のシミュレーション解析の結果、MCL も NCL と同様に、pH 低下に伴って構造変化を起こし、サブユニット間の開いた構造 (open 構造) をとることで活性化することが示唆された (Paladino et al. 2007)。NCL と MCL の一次構造上の相同性は 10% 以下であり、その類似した味覚修飾活性機構の比較は興味深い。MCL の結晶構造が明らかとなれば、その詳細な議論も可能になるであろう。MCL の結晶構造解析は構造生物学的解析の基盤研究として最重要課題である。

以上のような構造生物学的手法により、MCLの味覚修飾機構が解明されるであろう。現在、MCLのX線結晶構造解析を中心とした構造生物学的解析を進めている。将来的には、MCLによるhT1R2/hT1R3活性化機構の解明を通じて、新規機能性甘味料の創製へとつながることを期待する。

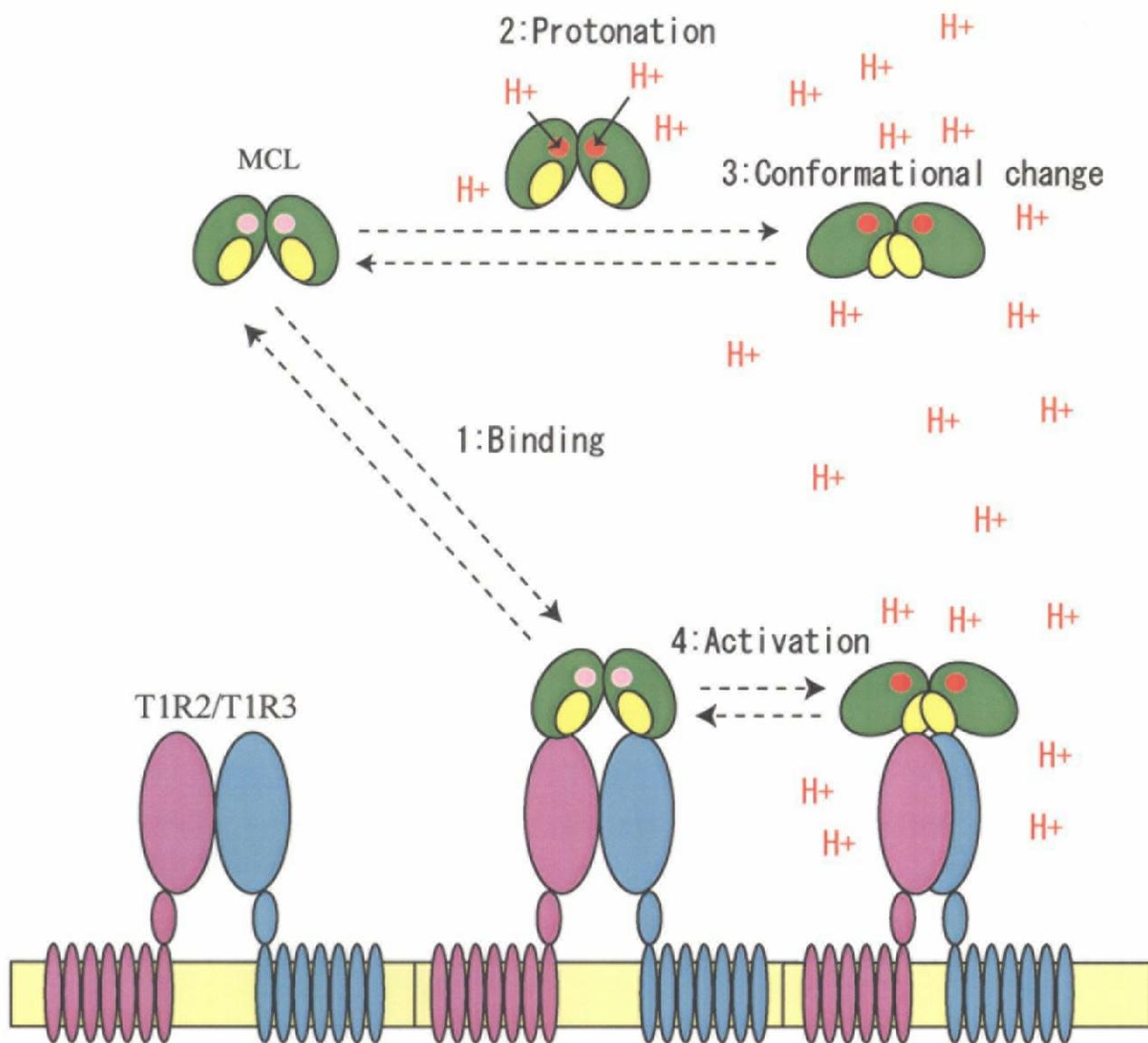


図1：MCLの味覚修飾活性とT1R2/T1R3活性化機構（モデル）

MCLはT1R2/T1R3と結合した後（1:Binding）、周辺のpH低下によって H^+ を受容し（2:Protonation）、構造変化を起こす（3:Conformational change）。その結果、T1R2/T1R3を活性化が起こり、甘味が誘導される（4:Activation）。

変異体	味覚修飾活性		推定されるアミノ酸残基の機能
	構造変化	甘味	
A	○	○	いずれの過程にも寄与していない
B	○	×	T1R2/T1R3活性化に寄与するアミノ酸残基
C	×	○	構造変化に寄与し、変異導入により活性化するアミノ酸残基
D	×	×	構造変化、もしくは構造変化と活性化の両方に寄与するアミノ酸残基

図2：変異体解析の動的構造解析と味覚修飾活性評価の組み合わせによるアミノ酸残基の役割の推定

参考文献

- Abe K, Yamashita H, Arai S, Kurihara Y. Molecular cloning of curculin, a novel taste-modifying protein with a sweet taste. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992 Mar 24;1130(2):232-4.
- Arakawa T, Tsumoto K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003 Apr 25;304(1):148-52.
- Assadi-Porter FM, Aceti DJ, Cheng H, Markley JL. Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 376: 252-8.
- Bachmanov AA, Li X, Reed DR, Ohmen JD, Li S, Chen Z, Tordoff MG, de Jong PJ, Wu C, West DB, Chatterjee A, Ross DA, Beauchamp GK. Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus. *Chem. Senses* 2001 Sep;26(7):925-33.
- Blake CC, Johnson LN, Mair GA, North AC, Phillips DC, Sarma VR. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1967 Apr 18;167(9):378-88.
- Caldwell JE, Abildgaard F, Dzakula Z, Ming D, Hellekant G, Markley JL. Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nat. Struct. Biol.* 1998; 5: 427-31.
- Chen CC, Liu IM, Cheng JT. Improvement of insulin resistance by miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*) in fructose-rich chow-fed rats. *Phytother Res.* 2006 Nov;20(11):987-92.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007 Nov 23;318(5854):1258-65. Epub 2007 Oct 25.
- Contreras R, Carrez D, Kinghorn JR, van den Hondel CA, Fiers W. Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. *Biotechnology (N Y).* 1991 Apr;9(4):378-81.
- Danilova V, Hellekant G. Elucidating coding of taste qualities with the taste modifier miraculin in the common marmoset. *Brain Res. Bull.* 2006 Jan 30;68(5):315-21. Epub 2005 Oct 18.
- Faus I, del Moral C, Adroer N, del Rio JL, Patino C, Sisniega H, et al. Secretion of the sweet-tasting protein thaumatin by recombinant strains of *Aspergillus niger* var. awamori. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998; 49: 393-8.

- Fischer B, Perry B, Phillips G, Sumner I, Goodenough P. Physiological consequence of expression of soluble and active hen egg white lysozyme in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993 Jul;39(4-5):537-40.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Ba?turkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scazzocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Penalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 2005 Dec 22;438(7071):1105-15.
- Gao GH, Dai JX, Ding M, Hellekant G, Wang JF, Wang DC. Solution conformation of brazzein by 1H nuclear magnetic resonance: resonance assignment and secondary structure. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999; 24: 351-9.
- Germain D, Zollinger L, Racine C, Gossard F, Dignard D, Thomas DY, Crine P, Boileau G. The yeast KEX-2-processing endoprotease is active in the Golgi apparatus of transfected NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Endocrinol.* 1990 Oct;4(10):1572-9.
- Guan RJ, Zheng JM, Hu Z, Wang DC. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the thermostable sweet protein mabinlin II. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2000 Jul;56(Pt 7):918-9.
- Hahm YT, Batt CA. Expression and secretion of thaumatin from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 1990; 54: 2513-2520.
- Hayes MB, Hagenmaier H & Cohen JS. Nuclear magnetic resonance titration curves of histidine ring protons. Human metmyoglobin and the effects of azide on human, horse, and sperm whale metmyoglobins. *J. Biol. Chem.* 1975 Sep 25;250(18):7461-72.
- Hellekant G, Ninomiya Y, Danilova V. Taste in chimpanzees. III: Labeled-line coding in sweet taste. *Physiol. Behav.* 1998 Nov 15;65(2):191-200.
- Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, Zuker CS. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 1999 Feb 19;96(4):541-51.
- Igeta H, Tamura Y, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y. Determination of disulfide array and

- subunit structure of taste-modifying protein, miraculin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991 Sep 20;1079(3):303-7.
- Ikeda K, Hamaguchi K, Yamamoto M, Ikenaka T. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of trypsin inhibitors. *J. Biochem.* 1968 Apr;63(4):521-31.
- Inaba K, Ito K. Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007 Nov 26 (in press)
- Ishihara T, Tomita H, Hasegawa Y, Tsukagoshi N, Yamagata H, Udaka S. Cloning and characterization of the gene for a protein thiol-disulfide oxidoreductase in *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 1995 Feb;177(3):745-9.
- Iyengar RB, Smits P, van der Ouderaa F, van der Wel H, van Brouwershaven J, Ravesteyn P, Richters G, van Wassenaar PD. The complete amino-acid sequence of the sweet protein thaumatin I. *Eur. J. Biochem.* 1979 May 2;96(1):193-204.
- Jiang P, Cui M, Zhao B, Snyder LA, Benard LM, Osman R, Max M, Margolskee RF. Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3. *J. Biol. Chem.* 2005 Oct 7;280(40):34296-305.
- Jin FJ, Maruyama J, Juvvadi PR, Arioka M, Kitamoto K. Adenine auxotrophic mutants of *Aspergillus oryzae*: development of a novel transformation system with triple auxotrophic hosts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004 Mar;68(3):656-62.
- Kant R. Sweet proteins-potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutr. J.* 2005 Feb 9;4:5. Review.
- Kitagawa M, Kusakabe Y, Miura H, Ninomiya Y, Hino A. Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 Apr 27;283(1):236-42.
- Kobayashi T, Kishigami S, Sone M, Inokuchi H, Mogi T, Ito K. Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997 Oct 28;94(22):11857-62.
- Kohmura M, Ariyoshi Y. Chemical synthesis and characterization of the sweet protein mabinlin II. *Biopolymers* 1998 Oct 5;46(4):215-23.
- Kohmura M, Nio N, Ariyoshi Y. Complete amino acid sequence of the sweet protein monellin. *Agric. Biol. Chem.* 1990; 54: 2219-24.
- Koizumi A, Nakajima K, Asakura T, Morita Y, Ito K, Shmizu-Ibuka A, Misaka T, Abe

K. Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 Jun 29;358(2):585-9. Epub 2007 May 7.

Kondo K, Miura Y, Sone H, Kobayashi K, Iijima H. High-level expression of a sweet protein, monellin, in the food yeast *Candida utilis*. *Nat. Biotechnol.* 1997; 15: 453-7.

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 2000 Oct 26;407(6807):971-7.

Kurihara K, Beidler LM. Mechanism of the action of taste-modifying protein. *Nature* 1969 JUN 21;222:1176-79

Liu X, Maeda S, Hu Z, Aiuchi T, Nakaya K, Kurihara Y. Purification, complete amino acid sequence and structural characterization of the heat-stable sweet protein, mabinlin II. *Eur. J. Biochem.* 1993 Jan 15;211(1-2):281-7.

Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4692-6. Epub 2002 Mar 26.

Maehashi K, Udaka S. Sweetness of lysozymes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998 Mar;62(3):605-6.

Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto K, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayashi T, Takeuchi M, Denning DW, Galagan JE, Nierman WC, Yu J, Archer DB, Bennett JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Fedorova ND, Gotoh O, Horikawa H, Hosoyama A, Ichinomiya M, Igarashi R, Iwashita K, Juvvadi PR, Kato M, Kato Y, Kin T, Kokubun A, Maeda H, Maeyama N, Maruyama J, Nagasaki H, Nakajima T, Oda K, Okada K, Paulsen I, Sakamoto K, Sawano T, Takahashi M, Takase K, Terabayashi Y, Wortman JR, Yamada O, Yamagata Y, Anazawa H, Hata Y, Koide Y, Komori T, Koyama Y, Minetoki T, Suharnan S, Tanaka A, Isono K, Kuhara S, Ogasawara N, Kikuchi H. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 2005 Dec 22;438(7071):1157-61.

Manavalan P, Johnson WC Jr. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 1987 Nov 15;167(1):76-85.

Masuda Y, Nirasawa S, Nakaya K, Kurihara Y. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein, miraculin. *Gene* 1995 Aug 19;161(2):175-7.

Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Damak S, Margolskee RF. *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat. Genet.* 2001 May;28(1):58-63.

Ming D, Hellekant G. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS Lett.* 1994; 355: 106-8.

Missiakas D, Georgopoulos C, Raina S. Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1993 Aug 1;90(15):7084-8.

Miyauchi A, Ozawa M, Mizukami M, Yashiro K, Ebisu S, Tojo T, Fujii T, Takagi H. Structural conversion from non-native to native form of recombinant human epidermal growth factor by *Brevibacillus choshinensis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999 Nov;63(11):1965-9.

Montmayeur JP, Matsunami H. Receptors for bitter and sweet taste. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002 Aug;12(4):366-71. Review.

Morris JA, Martenson R, Deibler G, Cagan RH. Characterization of monellin, a protein that tastes sweet. *J. Biol. Chem.* 1973; 248: 534-9.

Muto T, Tsuchiya D, Morikawa K, Jingami H. Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007 Mar 6;104(10):3759-64. Epub 2007 Feb 26.

Nakajima K, Asakura T, Oike H, Morita Y, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Sorimachi H, Arai S, Abe K. Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport* 2006 Aug 21;17(12):1241-4.

Nakajima K, Asakura T, Maruyama J, Morita Y, Oike H, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Sorimachi H, Arai S, Kitamoto K, Abe K. Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006 May;72(5):3716-23.

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 2001 Aug 10;106(3):381-90.

Nirasawa S, Liu X, Nishino T, Kurihara Y. Disulfide bridge structure of the heat-stable sweet protein mabinlin II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993 Oct 6;1202(2):277-80.

Newstead S, Kim H, von Heijne G, Iwata S, Drew D. High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces*

cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2007 Aug 28;104(35):13936-41.

Oberto J, Davison J. Expression of chicken egg white lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 1985;40(1):57-65.

Ogata C, Hatada M, Tomlinson G, Shin WC, Kim SH. Crystal structure of the intensely sweet protein monellin. Nature 1987; 328: 739-42.

Ogata CM, Gordon PF, de Vos AM, Kim SH. Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution. J. Mol. Biol. 1992 Dec 5;228(3):893-908.

Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2006 Jul;45(2):144-158.

Sainz E, Korley JN, Battey JF, Sullivan SL. Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. J. Neurochem. 2001 May;77(3):896-903.

Somoza JR, Jiang F, Tong L, Kang CH, Cho JM, Kim SH. Two crystal structures of a potently sweet protein. Natural monellin at 2.75 Å resolution and single-chain monellin at 1.7 Å resolution. J. Mol. Biol. 1993; 234: 390-404.

Paladino A, Costantini S, Colonna G, Facchiano AM. Molecular modelling of miraculin: Structural analyses and functional hypotheses. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007 in press

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science 2000 Aug 4;289(5480):739-45.

Pouvreau L, Gruppen H, van Koningsveld GA, van den Broek LA, Voragen AG. Tentative assignment of the potato serine protease inhibitor group as beta-II proteins based on their spectroscopic characteristics. Agric. Food Chem. 2004 Dec 15;52(25):7704-10.

Schwarz RT, Schmidt MF, Datema R. Inhibition of glycosylation of viral glycoproteins. Biochem. Soc. Trans. 1979 Apr;7(2):322-6.

Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. Biotechnology (N Y). 1994 Feb;12(2):181-4.

Sharp PM, Li WH. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. Nucleic Acids Res. 1987 Feb 11;15(3):1281-95.

Shimizu-Ibuka A, Morita Y, Terada T, Asakura T, Nakajima K, Iwata S, Misaka T, Sorimachi H, Arai S, Abe K. Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying

activity. *J. Mol. Biol.* 2006 May 26;359(1):148-58.

Shirasuka Y, Nakajima K, Asakura T, Yamashita H, Yamamoto A, Hata S, Nagata S, Abo M, Sorimachi H, Abe K. Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004 Jun;68(6):1403-7.

Spadaccini R, Trabucco F, Saviano G, Picone D, Crescenzi O, Tancredi T, Temussi PA. The mechanism of interaction of sweet proteins with the T1R2-T1R3 receptor: evidence from the solution structure of G16A-MNEI. *J. Mol. Biol.* 2003 May 2;328(3):683-92.

Sun HJ, Cui ML, Ma B, Ezura H. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett.* 2006 Jan 23;580(2):620-6. Epub 2006 Jan 3.

Sun HJ, Kataoka H, Yano M, Ezura H. Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. *Plant Biotechnol. J.* 2007 Nov;5(6):768-77. Epub 2007 Aug 13.

Suzuki M, Kurimoto E, Nirasawa S, Masuda Y, Hori K, Kurihara Y, Shimba N, Kawai M, Suzuki E, Kato K. Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities. *FEBS Lett.* 2004 Aug 27;573(1-3):135-8.

Sweet RM, Wright HT, Janin J, Chothia CH, Blow DM. Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* 1974 Sep 24;13(20):4212-28.

Takahashi N, Hitotsuya H, Hanzawa H, Arata Y, Kurihara Y. Structural study of asparagine-linked oligosaccharide moiety of taste-modifying protein, miraculin. *J. Biol. Chem.* 1990 May 15;265(14):7793-8.

Tancredi T, Pastore A, Salvadori S, Esposito V, Temussi PA. Interaction of sweet proteins with their receptor. A conformational study of peptides corresponding to loops of brazzein, monellin and thaumatin. *Eur. J. Biochem.* 2004 Jun;271(11):2231-40.

Temussi PA. Why are sweet proteins sweet? Interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor. *FEBS Lett.* 2002 Aug 28;526(1-3):1-4.

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

Theerasilp S, Hitotsuya H, Nakajo S, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. *J. Biol. Chem.* 1989 Apr 25;264(12):6655-9.

- Theerasilp S, Kurihara Y. Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit. *J. Biol. Chem.* 1988 Aug 15;263(23):11536-9.
- Tojo H, Asano T, Kato K, Udaka S, Horiuchi R, Kakinuma A. Production of human protein disulfide isomerase by *Bacillus brevis*. *J. Biotechnol.* 1994 Mar 15;33(1):55-62.
- Tsuchiya K, Tada S, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Jigami Y, Tamura G. High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992 Oct;38(1):109-14.
- Tsukuda S, Gomi K, Yamamoto H, Akimitsu K. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* lush. *Plant Mol. Biol.* 2006 Jan;60(1):125-36.
- Tsumoto K, Ejima D, Kita Y, Arakawa T. Review: Why is arginine effective in suppressing aggregation. *Protein Pept. Lett.* 2005 Oct;12(7):613-9.
- Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Arakawa T. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003 Dec 26;312(4):1383-6.
- Umetsu M, Tsumoto K, Nitta S, Adschiri T, Ejima D, Arakawa T, Kumagai I. Nondenaturing solubilization of beta2 microglobulin from inclusion bodies by L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 Mar 4;328(1):189-97.
- Van der Wel H, Loeve K. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur. J. Biochem.* 1972 Dec 4;31(2):221-5.
- Wasley LC, Timony G, Murtha P, Stoudemire J, Dorner AJ, Caro J, Krieger M, Kaufman RJ. The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. *Blood* 1991 Jun 15;77(12):2624-32.
- Wel H van der, Larson G, Hladik A, Hladik CM, Hellekant G, Glaser D (1989) Isolation and characterization of pentadin, the sweet principle of *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. *Chem. Senses* 14: 73-79.
- Westmoreland DG, Matthews CR, Hayes MB & Cohen JS. Nuclear magnetic resonance titration curves of histidine ring protons. The effect of temperature on ribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 1975 Sep 25;250(18):7456-60.
- Wu J, Yang JT, Wu CS. Beta-II conformation of all-beta proteins can be distinguished from unordered form by circular dichroism. *Anal. Biochem.* 1992 Feb 1;200(2):359-64.

Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M, Li X. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004 Sep 28;101(39):14258-63. Epub 2004 Sep 7.

Yamashita H, Theerasilp S, Aiuchi T, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y. Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein taste-modifying activity, curculin. *J. Biol. Chem.* 1990 Sep 15;265(26):15770-5.

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 17 年度博士課程 入学

氏名 伊藤 圭祐

指導教員名 阿部 啓子

論文題目

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

目的

甘味は人類がその長い歴史を通じて常に求めてきた味であり、食品の嗜好性に寄与する最も重要な因子の一つである。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、健康指向の甘味料の開発が食品医療産業上きわめて大きな注目を集めている。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の甘味受容機構の詳細は未知の部分が多く残す。

ミラクリン (MCL) は、西アフリカ原産の果実 *Synsepalum dulcificum* に含まれるホモ二量体糖タンパク質であり、MCL を口に含んでから酸を味わうと強い甘味を呈するユニークな味覚修飾活性を持つ。同様な活性を有するネオクリンはそのもの自身も甘味を呈するが、MCL との一次構造上の相同性はないことから、両者の間での機能発現機構の共通性の有無の検証は興味深い。MCL はそれ自身が無味であることから、甘味受容の有無をスイッチ on/off として捉えることもできる。その作用機構の解析を通じて、甘味受容機構解明へ新たな切り口を見出し得ると期待される。

タンパク質の分子レベルでの解析には発現系構築が不可欠である。しかし、MCL は約 40 年前に発見されて以来、多くの研究者が大腸菌や酵母での発現を試みてきたにもかかわらず、発現系構築に成功したとの報告はない。そのため、機能発現機構に関する

分子レベルでの知見は現在までほとんど得られていない。

そこで筆者は、MCL 発現系を構築して十分量の試料を取得し、構造生物学的手法による MCL の機能発現機構の解析を可能とした。以下にその経緯を述べる。

1. タンパク質化学的研究

Synsepalum dulcificum 果実より活性本体を精製し、同定を行なった。活性画分には少なくとも3種類の分子量の異なるタンパク質 MCL-I、II、III が検出された。それらの N 末端および内部アミノ酸配列解析は既知の MCL のデータと同一であったことから、付加した糖鎖に若干の分子量の違いはあるものの、基本的に MCL と同等であると結論した。MCL の機能発現機構として、酸で構造変化した糖鎖が甘味受容体と相互作用するモデルが提唱されているが、実験的証拠はない。これら MCL-I、II、III の3種タンパク質間で味覚修飾活性に差がみられなかったことから、味覚修飾活性には糖鎖構造そのものは不可欠ではないことが示唆された。

精製 MCL の円二色性 (CD) スペクトル解析の結果、 β -sheet に富んだ構造であり、 β -II タンパク質と総称される一連のタンパク質と、一次構造の相同性のみならず、高次構造上も類似性していることが示唆された。また、MCL のスペクトルが pH 変化に伴って変化することを見出した。これは味覚修飾活性の pH 依存性を反映した構造変化と考えられるが、 β -II タンパク質の CD スペクトル解析は困難であり、詳細な構造解析には至っていない。より多くの構造情報の集積により、味覚修飾活性と構造変化の相関解析が可能となるであろう。

2. MCL 発現系の構築

Synsepalum dulcificum 果実より MCL 遺伝子のクローニングを行い、*Escherichia coli*、*Bacillus brevis*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Aspergillus oryzae* を宿主とした発現系構築を試みた。*E. coli* を宿主とした発現系において、各種ベクターを用いて発現を試みた結果、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現した場合、菌体破碎後の可溶性画分に MCL 二量体が得られることを見出した。しかし、精製後のタンパク質には活性は検出できなかった。*B. brevis* を宿主とした発現系では、細胞壁タンパク質由来である P2 プロモーター下流に MCL 遺伝子のクローニングを行い、*B. brevis* を形質転換した。発現誘導の結果、培養液上清中に MCL 単量体のみが検出された。*S. cerevisiae* を宿主とした発現系では、ガラクトース添加によって発現誘導される GAL1 プロモーター下流に、分泌シグナルとして α -ファクターを融合した MCL 遺伝子を導入されるように PCR 法によって設計し、*S. cerevisiae* 菌体内での相同組み換えによって形

質転換を行った。発現誘導の結果、菌体破碎後の可溶性画分に MCL 単量体のみが検出された。*P. pastoris* を宿主とした発現系では、メタノールによって強力に発現誘導される AOX1 プロモーター下流に、分泌シグナルとして α -ファクターを融合し、N 末端に FLAG-tag、C 末端に His-tag を付加した MCL 遺伝子を合成し、*P. pastoris* 菌体内での相対組み換えによって形質転換を行なった。発現誘導後、培養液上清中に MCL 単量体と二量体の両方が検出された。His-tag 精製によって MCL 単量体のみが得られ、FLAG-tag 精製によって MCL 単量体と二量体の両方が得られたことから、C 末端に付加した tag は二量体化によって機能できず、N 末端に付加した tag が MCL 二量体の精製に有効であると結論した。しかし、この方法で精製した MCL 二量体の収量は非常に低く、活性測定には至らなかった。

A. oryzae を宿主とした発現系構築では、分泌キャリアータンパク質として α -アミラーゼを用い、その下流に KEX 2 プロテアーゼ切断配列を挟んで MCL 遺伝子を導入した。このコンストラクトにより *A. oryzae* を形質転換した。発現誘導後、培養液上清中に MCL 単量体と二量体の両方が検出された。培養条件の検討後、大量培養を行った。培養液上清からタンパク質を回収し、精製後、N 末端近傍一次構造解析、CD スペクトルによる二次構造解析によって天然 MCL と同等であることを確認した。さらに特性解析を行った結果、天然 MCL と同等の味覚修飾活性をも有しており、活性を有する MCL 二量体の発現系構築に初めて成功した。培養液中の発現量は 2 mg/L、精製後の収量は 0.8 mg/L であった。また、MCL 自身に無味であることから、味覚修飾活性の受容分子は不明であったが、ラクチゾールによって阻害されることから、ヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 を介したものであることが判明した。

3. 機能発現機構の構造生物学的解析

構築した発現系を用い、変異体解析を行った。MCL に存在する糖鎖付加部位 Asn42、Asn186 へ変異導入し、麹菌発現 MCL の糖鎖付加について解析したところ、付加部位は天然 MCL と同一であった。さらに、活性残基の特定を行った。MCL の味覚修飾活性が弱酸性 pH 領域で発現することから、その分子中に 2 つ存在する His 残基に着目し、Ala へ置換した変異体を作成した。結果、H30, 60A 二重変異体の味覚修飾活性は消失した。続いて H30A 変異体を作成したところ、同様に活性が消失したことから、His30 が活性残基の一つであると結論した。

MCL の構造は未知であるため、シミュレーションモデリングによる構造予測を行なったところ、MCL 二量体におけるサブユニット間の境界面は、シミュレーションモデ

リングの鋳型として用いたアミラーゼインヒビターのアミラーゼ結合領域と同一であった。この領域は β -IIタンパク質において機能発現に寄与する領域と考えられる。MCL単量体には味覚修飾活性が検出されなかったことと合わせ、MCLの味覚修飾活性には二量体であることが必須であり、特にサブユニット間の境界面が活性に重要であることが示唆された。さらに、構築したモデルにおいて、His30残基はMCLのサブユニット境界に位置したことから、His30はpH変化の受容を通じ、サブユニット間の相互作用へ寄与していることが推察された。

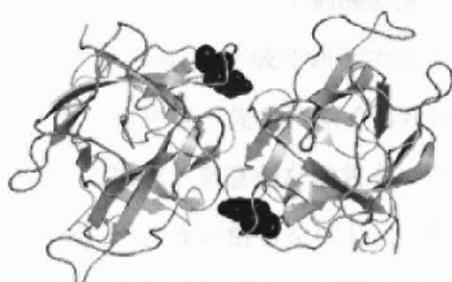


図 MCLのシミュレーション・モデル
(His30を空間重点モデルで示す)

まとめ

本研究により、過去40年以上も成し遂げられなかったMCLの発現系構築に成功し、構造生物学的解析のための基盤の確立に至った。さらに、構築した系を用いて、味覚修飾活性にHis残基が関与していることを明らかにし、シミュレーションモデリングによって作用機構を推察した。これは、味覚修飾タンパク質の活性残基についてはじめての成果である。

今後さらなる解析により、詳細な味覚修飾活性の機能発現機構が明らかとなると期待される。

発表論文

Ito K, *et al.* Microbial production of sensory-active miraculin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 407-411(2007)

Ito K, *et al.* Val326 of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 amylase II modulates the preference for alpha-(1,4)- and alpha-(1,6)-glycosidic linkages. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 443-449(2007)

謝辞

このような形で博士論文を提出することができましたのは、これまでお世話になった数多くの皆様方のご協力があったこそだと感じています。現在の研究室に所属するまで、学部、修士と研究室を移り、そのたびに研究者としてのみならず、教育者としても優れた先生方に恵まれてきました。ここに感謝の意を示させていただきます。

東京大学 生物機能開発化学研究室への入室を快く受け入れてくださり、その後も研究や待遇、研究室生活等、あらゆる面でご指導ご鞭撻を承り、日々励ましていただきました、東京大学 生物機能開発化学研究室 阿部啓子先生に心より感謝いたします。また、投稿論文作成や研究で行き詰ったときに励ましていただいた、味覚サイエンス研究室 朝倉富子先生に深く御礼申し上げます。修士課程より、引き続き構造生物学についてご指導、有意義な助言をいただきました東京農業大学 井深（清水）章子先生、シミュレーション解析をはじめ、多くの共同研究に携わらせていただきましたサントリー生物有機化学研究所 石黒正路先生、益田勝吉先生に御礼申し上げます。*A. oryzae*での発現系構築にご協力いただきました東京大学 微生物学研究室 北本勝ひこ先生、丸山潤一先生、また、X線結晶構造解析や*S. cerevisiae*、*P. pastoris*、*B. brevis*による発現系構築をはじめとした構造生物学実験について広くご教授いただきました京都大学（Imperial College London） 岩田想先生、小林拓也先生、村田武士先生に深く感謝いたします。

現在まで研究の世界に携わってこれたのは、博士課程進学以前にお世話になった先生方のおかげでもあります。学部での研究開始当初より、厳しくも暖かい指導をしていただき、卒業後もいろいろな面でお世話になりました日本獣医生命科学大学 麻生慶一先生、奈良井朝子先生に感謝いたします。静岡県立大学 酒井坦先生、伊藤創平先生には修士課程において、アミラーゼ等の酵素学、糖質科学、タンパク質工学、さらに博士課程へと続くミラクリンの研究まで様々な研究対象に触れる機会をいただき、さらに進路など多くの面で相談にのっていただきました。厚く御礼申し上げます。

その他、生物機能開発化学研究室同期の中島健一郎君、藍原祥子さん、後輩の森田悠治君をはじめ、多くの方々に研究室生活でお世話になりました。ありがとうございました。ミラクリンの研究をはじめにあたり、励ましていただきました故 池永路子さん、精神面で大きく支えていただきました道倉えりさんに感謝いたします。

最後に、ここまで温かく支えてくれた両親に感謝いたします。

平成 20 年 1 月 7 日 伊藤圭祐