

## 論文の内容の要旨

論文題目 旨味受容体 T1R1/T1R3 のアミノ酸受容機構の解明

氏名 戸田 安香

味覚は食物を摂取する際に生じる化学感覚の一つである。狭義には甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の 5 つの味が基本味として定義され、体性感覚の一種である辛味や渋味とは区別される。これらの味はそれぞれの味質に対応した別々の味覚受容体により口腔内で受容される。嗜好味である甘味と旨味の受容は Class C の G タンパク質共役型受容体（以下、GPCR）に属する T1R ファミリーが担い、甘味が T1R2 と T1R3 のヘテロダイマー（T1R2/T1R3）、旨味受容体が T1R1 と T1R3 のヘテロダイマー（T1R1/T1R3）によって受容される。近年では、人工甘味料に対する産業上のニーズが高いことなどから、甘味受容体の機能解析が盛んに行われ、甘味物質の受容メカニズムの解明や新規甘味修飾物質の探索に役立てられてきた。一方で、旨味受容体に関する研究の報告数は少ない。その理由として、世界において旨味という味質が甘味に比べて重要視されていないことに加え、旨味受容体の評価系構築が甘味受容体に比べて難しいことが挙げられる。そこで、本研究では高感度かつハイスループットな旨味評価系の開発を行い、その評価系を用いて未だ謎の多い旨味受容機構の解明を行うことを目標とした。

本論文は全 4 章で構成されており、第 1 章では研究の背景および目的を示した。続いて、第 2 章では発光検出法による新規旨味評価系の開発を行った。第 3 章および第 4 章では、旨味物質の代表例であるアミノ酸の受容機構の一端を解明した。

### 1. 発光検出法を用いた高感度旨味評価系の開発

味物質と味覚受容体の相互作用を解析する手法の一つとして、培養細胞を用いた客観的味評価系が利用されてきた。甘味受容体や旨味受容体などの GPCR の評価系では、培養細胞に味覚受容体を強制発現させ、味物質添加時の受容体の活性化の強さを細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化量として数値化するのが一般的である。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化量の検出には、Fluo-4 や Fura-2 などの  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光指示薬を用いた蛍光検出法が広く採用されてきたが、これに代わる方法として、 $\text{Ca}^{2+}$  結合型発光タンパク質を用いた発光検出法が挙げられる。蛍光検出系では細胞内に存在する弱い蛍光物質による干渉が生じるのに対し、発光検出系では事実上バックグラウンドがない状態での測定が可能であり、蛍光検出系よりも高いシグナル/ノイズ比を実現可能だと期待された。そこで、発光検出法を用いた旨味評価系の開発を試みることにした。

まずは当研究室において最も安定的かつ強い細胞応答の検出が可能な甘味受容体安定発現細胞を用いて発光検出法の導入検討を行い、その最適化条件を用いて旨味評価系の開発

を目指した。発光タンパク質の最適化を行った結果、発光タンパク質 **Aequorin** もしくは **Clytin-II** をミトコンドリアへ局在化させて用いることで、甘味受容体の応答を感度良く検出することが可能になった。

また、食品由来のサンプルにはビタミン類やメーラード反応物質など様々な蛍光物質が含まれており、蛍光検出法では評価が困難な場合が多い。そこで、構築した発光検出系が蛍光物質を含むサンプルにも利用可能かという視点での検証も行った。結果、リボフラビンなどの蛍光物質を含有するサンプルを用いた場合にも、発光検出系では影響を受けることなく、評価が可能であることが確かめられた。

甘味評価系での条件を元に、ミトコンドリア局在化 **Clytin-II** を用いて、旨味評価系の構築を行った。結果、**L-Glu** よりも弱い旨味をもつ **L-Asp** に対する応答をも検出可能な、高感度な評価系の構築に成功した。旨味受容体の高感度ハイスループットアッセイ構築に成功しているグループは世界でも数が少ないため、未だ謎の多い旨味受容メカニズムの解明に本発光検出系が役立つことと期待された。

## 2. 旨味受容体 **T1R1/T1R3** のリガンド特異性を決定する分子メカニズムの解明

旨味受容体 **T1R1/T1R3** はアミノ酸の味を受容する分子であり、ヒト **T1R1/T1R3** (**hT1R1/hT1R3**) が **L-Glu** に対し高感度であるのに対し、マウス **T1R1/T1R3** (**mT1R1/mT1R3**) は **L-Glu** よりもその他の幅広い **L-アミノ酸** に対し強く応答することが知られていた。これまでに、**L-Glu** の結合に重要な残基として、**T1R1** の細胞外領域に存在するオルソステリック部位の 5 つの残基が同定されていたが、これらの残基は全てヒトとマウス間で保存されていたため、ヒトとマウスの酸性アミノ酸受容能の違いを決定する因子がこれら 5 残基とは別に存在すると考えられた。また、**L-Glu** 以外のアミノ酸の受容機構は明らかになっておらず、マウスが幅広いアミノ酸を受容する仕組みも明らかになっていなかった。そこで、アミノ酸受容の動物種差を引き起こす分子機構の解明を行うことにした。

ヒトとマウスのキメラ **T1R1** や点変異体の機能解析により、ヒト型の酸性アミノ酸受容に重要な残基として、**T1R1** の細胞外領域に存在する 6 つの残基を同定した。これら 6 残基を **T1R1** の分子モデル上にマッピングしたところ、5 つの残基がオルソステリック部位に存在していたことから、酸性アミノ酸の受容能は主にオルソステリック部位の残基の性質で決定されると考えられた。特に、この 6 残基のうち **L-Glu** 活性に決定的な影響を与えた 2 つの残基は、オルソステリック部位の端に上下対になって存在しており、**L-Glu** 結合時に遠位カルボキシル基が近傍に配置すると考えられた。**hT1R1** ではこれら 2 残基が **Ala** 残基であったのに対し、**mT1R1** では酸性アミノ酸残基であったことから、**mT1R1** では **L-Glu** の遠位カルボキシル基と **T1R1** 間で静電的反発が生じるために、酸性アミノ酸受容能が低くなっていると考えられた。

一方で、マウス型の幅広いアミノ酸受容に関わる残基も **T1R1** の細胞外領域に 6 残基同

定されたが、これらの残基はオルソステリック部位とは離れた位置に存在していた。変異体の機能解析により、これらの残基はアミノ酸の結合ではなく、受容体の活性を調節するはたらきをしていることが明らかになった。つまり、**mT1R1/mT1R3** は受容体自体の活性が高いために様々なアミノ酸に対し高い受容能を示すのだと考えられた。

以上の結果より、**T1R1/T1R3** のリガンド特異性が 1) オルソステリック部位の残基により決定される「アミノ酸選択性」、および 2) 非オルソステリック部位の残基により調整される「受容体の活性の強さ」の 2 つの因子の組み合わせで決定されるという仮説が得られた。この仮説は、両因子にまたがる多重変異体の機能解析や、非ヒト霊長類 **T1R1** を用いた実験からも妥当性が証明された。

本研究により、**T1R1/T1R3** はオルソステリック部位および非オルソステリック部位の両方の性質の違いにより、リガンドを多様化させていることが明らかとなった。

### 3. テアニンの旨味受容機構の解明

L-テアニン (*5-N-methylglutamine*) は茶特有に含まれるアミノ酸であり、茶の味に重要な役割を果たしている。これまでに、ヒトの官能評価試験やマウスを用いた行動実験により、L-テアニンが旨味を有すること、L-テアニンと **IMP** の間で旨味の相乗効果が認められることが明らかになっていた。これらの知見に加え、L-テアニンが **L-Glu** 誘導体であることから、L-テアニンの旨味は **T1R1/T1R3** を介して受容されると推察された。しかし、実際に L-テアニンの **T1R1/T1R3** 活性化能を評価した報告はなかった。そこで、構築した旨味評価系を用いて、L-テアニンの旨味受容メカニズムの解明を行った。

結果、L-テアニンが **T1R1/T1R3** 活性化能を有することが明らかとなり、更に、**IMP** との同時添加により **T1R1/T1R3** が相乗的に活性化されることも確かめられた。このことから、ヒトの官能評価やマウスの行動実験で認められた L-テアニンの旨味感覚が **T1R1/T1R3** を介していることが明らかとなった。また、変異体の機能解析により、L-テアニンも既知の L-アミノ酸結合部位で受容されることが明らかになった。

本研究では味覚受容体を用いた客観的味評価系に **Ca<sup>2+</sup>**結合型発光タンパク質を利用した発光検出法を導入することで、高感度かつハイスループットな旨味評価系の構築に成功した。甘味物質としては様々な天然物・人工物が知られ、産業にも利用されてきた一方で、旨味受容体の活性化剤は L-アミノ酸および核酸以外には殆ど知られていない。本研究で開発した旨味評価系を用いることで、新たな旨味修飾物質の発見が期待される。また、この評価系ではこれまでの蛍光検出系では不可能であった、蛍光物質を含むサンプルの評価も可能であった。発光検出系の利用により、細胞評価系で測定可能なサンプルの幅が広がり、新しい味覚修飾物質の発見や味覚修飾メカニズムの解明の一助となることが期待される。

近年、動物の食性と **T1R** には密接な関わりがあることが明らかになってきた。更に、口

腔内以外に発現する味覚受容体の機能にも注目が集められている。T1R1/T1R3の味覚受容以外の機能は未だ明確になっていないが、果たしてリガンドの変化がもたらす影響が味覚の変化のみに留まるのか、その他の重要な生理作用の違いを引き起こしているのかについては興味深い。今後、発光検出系を用いて様々な動物種のT1R1/T1R3のリガンドの変化と生態について包括的な視点で調べることで、旨味受容体の新たな機能が明らかになることも期待される。