

博士論文

味覚修飾タンパク質ネオクリンが
ヒト甘味受容体を活性化する分子機構の研究

小 泉 太 一

目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 NMR 法を用いたネオクリンの pH に依存した立体構造変化の検出	22
2.1. 序	23
2.2. 材料・方法	25
2.3. 結果	32
2.4. 考察	62
第 3 章 アラニン点変異体を用いたネオクリンの構造機能相関解析	66
3.1. 序	67
3.2. 材料・方法	69
3.3. 結果	74
3.4. 考察	88
第 4 章 総合討論および今後の展望	94
参考文献	106
要旨	112
謝辞	116

本論文で使用する略語

CD circular dichroism

GPCR G protein-coupled receptor

ATD amino-terminal-domain

CRD cysteine-rich-domain

TMD transmembrane-domain

NAS neoculin acidic subunit

NBS neoculin basic subunit

NCL neoculin

NMR nuclear magnetic resonance

第 1 章

序論

味覚受容

動物は、視覚・聴覚・触覚・嗅覚・味覚からなる五感をもち、環境からの物理的・化学的刺激を感知することで生存している。その1つである味覚は、食物を摂取した際に生じる化学感覚であり、食物を積極的に摂取すべきか忌避すべきかを判断するうえで重要な役割を果たしている。ヒトの感じる味としては、甘味・旨味・苦味・酸味・塩味の5つの基本味に加えて、辛味、渋味、こく味などの口腔内で生じる様々な感覚を広義の味として認識している。糖類やアミノ酸などエネルギー源となる物質の多くは甘味および旨味を呈し、嗜好される。一方、腐敗物や植物の産生する有毒物は酸味および苦味を呈することが多く、忌避される。塩味については生体の浸透圧調整に関与しており、高濃度では忌避される一方で、低濃度では嗜好される(Chandrashekar *et al.*, 2006)。

甘味物質とヒトの甘味受容

甘味は動物にとって必須のエネルギー源である糖質が示す味であり、我々が最も嗜好している。しかし糖の過剰摂取はヒトにとって肥満や糖尿病の原因となりうることから、これまでに砂糖を代替する多様な甘味物質の開発が盛んに行われてきた。砂糖以外の糖質、一部のアミノ酸、アスパルテームなどの合成ペプチド、配糖体、甘味タンパク質などがその例である(表 1-1、表 1-2)。これらの甘味物質は、分子量はもとより化学構造的にも多様であるにも関わらず、口腔内においてただ1種類のヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 により受容される。ヒト甘味受容体はクラス C の G タンパク質共役型受容体(G-protein-coupled receptor; GPCR)である T1R2 と T1R3 のヘテロマーである(Nelson *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Damak *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003)。同じファミリーに属する受容体としては代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)、カルシウム感受性受容体(CaSR)、フェロモン受容体(V2R)、GABA_B 受容体などが存在する(Pin *et al.*, 2003)。このファミリーの受容体は、いずれも長い N 末端細胞外領域を持つことを特徴としており、その構造から N 末端領域 amino terminal domain (ATD)、膜貫通領域 transmembrane domain (TMD)、そしてこれらを結ぶ cysteine-rich domain (CRD) の 3 つのドメインに大別される(図 1-1)。

ヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 と甘味物質の相互作用については、主に受容体側からの解析が進められた結果、hT1R2-hT1R3 には複数の甘味物質相互作用部位が存在することが明らかになっている(図 1-1)(Xu *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2006)。例えば、ヒトとげっ歯類の甘味物質に対する感受性の違いに着目し、ヒトとげっ歯類のキメラ T1R 変異体および点変異体を用いた培養細胞実験が行われてきた。これよりアスパルテームやネ

オテームなどのジペプチドが hT1R2 の ATD に(Xu *et al.*, 2004)、シクラメート(Jiang *et al.*, 2005b)、NHDC(Winnig *et al.*, 2007)、甘味阻害剤のラクチゾール(Jiang *et al.*, 2005a)が hT1R3 の TMD に作用することが明らかとなっている。また点変異体を用いた培養細胞実験の結果をもとに、hT1R2 の ATD とスクラロース、アスパルテーム、サッカリン Na との結合モデルも作製されている(Masuda and Koizumi., 2012)。さらには大腸菌に生産させた T1Rs の ATD と甘味物質との相互作用を、分光学的手法および熱力学的手法で検出した報告も存在しており、グルコースやショ糖などの糖がマウス T1R2 とマウス T1R3 の ATD で受容されること(Nie *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2006)、hT1R3 の ATD はスクラロースを受容する一方でシクラメートを受容しないことが示唆されている(Maitrepierre *et al.*, 2012)。他のクラス C GPCR と比較しても、このように 1 種類の受容体が複数のリガンド結合部位を持つ例は珍しく、多様な構造を持つ甘味物質を唯一の甘味受容体を受容する分子機構は興味深い。

甘味タンパク質

一般に高分子であるタンパク質は無味であるが、甘味を呈するタンパク質が存在し、甘味タンパク質と呼ばれる。現在までに表 1-2 に示す 8 種類が発見されており、その多くが重量比でショ糖の数百倍～数千倍の甘味を呈するため、砂糖を代替する低カロリー甘味料としての使用が期待されている(Kant *et al.*, 2005)。8 種類の甘味タンパク質のうち、ソーマチン、モネリン、ブラゼイン、マビンリン、リゾチーム、ネオクリンの 6 種類については、一次構造のみならず立体構造も解かれている。これらの甘味タンパク質を対象として、これまでに変異体解析や構造機能相関解析が行われており、活性に重要なアミノ酸残基および受容体との相互作用部位の特定が試みられてきた。その結果、ソーマチン、モネリン、ブラゼイン、リゾチームについては、それぞれ塩基性残基が甘味活性に関与することが示唆された(Kaneko and Kitabatake., 2001; Jin *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2005; Ohta *et al.*, 2011)。またソーマチン、モネリン、マビンリン、ペントジンが高い等電点をもち、塩基性タンパク質であるという共通の性質を持つことも分かっている(Kurihara *et al.*, 1992)。しかし、これらの甘味タンパク質には一次構造上も立体構造上も共通性はほとんど見出されず、甘味活性に重要な構造モチーフなどについては、統一的な見解は得られていない(Tancredi *et al.*, 2004)。

甘味タンパク質の側だけでなく、甘味受容体の側からも、甘味タンパク質とヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 との相互作用部位の解析が行われてきた。例えばヒトとマウスの甘味タンパク質に対する感受性の違いに着目し、それらのキメラ T1R 変異体および点

変異体を用いた培養細胞実験により、モネリンの受容に hT1R2 の ATD または CRD が、ブラゼインの受容に hT1R3 の CRD がそれぞれ必要であることが示された(Jiang *et al.*, 2004)。同じくヒトとマウスのキメラ T1R 変異体および点変異体を用いた培養細胞実験により、ネオクリンの受容に hT1R3 の ATD が、ミラクリンの受容に hT1R2 の ATD が必要であることも示された(Koizumi *et al.*, 2007; Koizumi *et al.*, 2011)。甘味タンパク質の種類によってヒト甘味受容体上の受容部位が異なると予想される。

また、クラス C GPCR で最初に結晶構造が解明された mGluR1 の ATD (Kunishima *et al.*, 2000)を鋳型として、甘味受容体 hT1R2-hT1R3 の ATD の構造モデルが構築され、様々な甘味物質とのドッキングシミュレーションが行われている(Temussi *et al.*, 2002; Tancredi *et al.*, 2004; Masuda and Koizumi., 2012)。そのモデルによると、低分子甘味物質の多くは hT1R2-hT1R3 の持つ glutamate-like ポケットに受容されるが、甘味タンパク質は分子表面のアミノ酸残基の表面電荷を介して、hT1R2-hT1R3 の大きな溝に複数の箇所で作作用して強く結合すると考えられた(wedge model) (図 1-2)。実際に、モネリンやブラゼインの甘味活性に寄与するアミノ酸残基は分子表面上の様々な構造領域に散在していることが示されている(Somoza *et al.*, 1995; Assadi-Porter *et al.*, 2010)。また変異体解析の結果に基づいて甘味タンパク質とヒト甘味受容体とのドッキングモデル(wedge model)を検証することも行われている(Esposito *et al.*, 2006; Assadi-Porter *et al.*, 2010)。一方、甘味タンパク質が hT1R2-hT1R3 の大きな溝が存在する ATD に結合すると説く wedge model が唯一の作用モデルではなく、hT1R3 の CRD (cysteine-rich-domain) が甘味タンパク質の受容に寄与しているという報告が存在する(Jiang *et al.*, 2004; Ohta *et al.*, 2011)。

いずれにせよヒト甘味受容体による甘味タンパク質の受容機構は、その多くが hT1R2 上の glutamate-like ポケットに受容されるという低分子甘味物質の受容機構とは様式が異なると考えられており、その全貌は明らかになっていない。そもそも甘味受容体を構成する T1R2、T1R3 が属するクラス C GPCR ファミリーにおいて、ヒト甘味受容体のように高分子量のタンパク質を受容する GPCR についての報告を聞かない。ヒト甘味受容体が甘味タンパク質を受容する仕組みを解明することによって、クラス C GPCR のリガンド受容機構についても新たな知見が得られると期待される。

味覚修飾物質

甘味物質に関連して、味覚修飾物質が存在する。味覚修飾物質とは、本来の味とは異なる味覚を感じさせる性質をもつ物質の総称であり、その性質によって甘味阻害物質と

甘味誘導物質に大別される。前者の例としては、配糖体であるギムネマ酸やジジフィン、ポリペプチドであるグルマリンなどがあり、これらを口にしたあとに甘味物質を味わうと甘味を感じなくなるという性質を持つ(Kurihara *et al.*, 1992; Sigoillot *et al.*, 2012)。グルマリンはヒトには効果がなく、げっ歯類のみに作用する。後者の例としては、味覚修飾タンパク質であるネオクリンとミラクリン、配糖体であるストロジンなどがある。ネオクリンはそれ自身もほのかな甘味をもつが、このタンパク質を口にしたあとに酸や水を味わうと、強い甘味が感じられる(Yamashita *et al.*, 1995)。ミラクリンとストロジンはともにそれ自身は無味であるが、それぞれ酸、水を味わったときに甘味が感じられるようになる(Hiura *et al.*, 1996; Kurihara and Beidler, 1969)。甘味誘導物質は、例えば健康増進作用が報告されている食酢の酸味を和らげて飲みやすくする、あるいは砂糖を添加せずに甘味付けするなどの利用が可能である。味覚修飾タンパク質のネオクリンとミラクリンについては、熱安定性が高く、食品安全性も実証されているため、酸味軽減剤あるいは医療用食品向けの低カロリー甘味料としての産業利用も期待できる。

ネオクリン

ネオクリンは西マレーシア原産の植物 *Curculigo latifolia* の果実(図 1-3A, B)に含まれる糖タンパク質である。ネオクリンはそれ自身がほのかに甘味を感じさせるだけでなく、このタンパク質を口にした後に酸や水を味わうと強烈な甘味が誘導される性質(味覚修飾活性)を併せ持つ(Yamashita *et al.*, 1995)。ネオクリンの持つ味覚修飾活性は、タンパク質を口にしてから 30~60 分間程度持続し、この間は水や酸を口に含むたびに甘味が感じられる。現在のところ、ネオクリンは甘味活性と味覚修飾活性を併せ持つ唯一の甘味タンパク質として知られている。

ネオクリン分子は 113 アミノ酸残基からなる糖鎖の付加した酸性サブユニット(neoculin acidic subunit, NAS)と 114 アミノ酸残基からなる塩基性サブユニット(neoculin basic subunit, NBS)がジスルフィド結合を介して結合したヘテロダイマーである(Shirasuka *et al.*, 2004) (図 1-4、図 1-5)。NAS と NBS はアミノ酸配列で 77% と高い相同性を示すが、等電点は大きく異なり、NAS の等電点が 4.0~6.0 であるのに対し NBS の等電点は 7.5~9.5 である。これは、両サブユニット間で酸性アミノ酸残基数に差はないものの、リジン残基やアルギニン残基といった塩基性アミノ酸残基の数が NBS では 11 個あるのに対して NAS では 5 個しかないことに起因している。ネオクリンは X 線結晶構造解析により中性 pH での立体構造が解かれている(Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006)。その全体構造は図 1-6(a)のようになっており、NAS、NBS 両方のサブユニ

ットにおいて、4本の β -ストランドが組となって3つの β -シートを形成している(図1-6(c))。これら β -シートは互いに向き合い三角柱の形に配置されている。すべての β -シートは逆平行で、12番目の β -ストランドはもう一方のサブユニットに由来する。両サブユニットの構造は非常に類似しており、重ね合わせると図1-6(b)のようにほぼ一致する。

ミラクリン

ミラクリンは西アフリカ原産の植物 *Richadella dulcifica* の果実 (ミラクルフルーツ、図1-3C)に含まれる糖タンパク質である。ミラクリンはそれ自身が無味である点ではネオクリンと異なるが、このタンパク質を口にした後に酸を味わうと強烈な甘味が誘導される性質 (味覚修飾活性) をもつ点で共通である (Theerasilp and Kurihara., 1988)。ミラクリンの持つ味覚修飾活性は、タンパク質を口にしてから1~2時間程度持続し、この間は酸を口に含むたびに甘味が感じられる。

ミラクリンは191アミノ酸残基からなるポリペプチド2本がジスルフィド結合を介して結合したホモダイマーである (Theerasilp *et al.*, 1989; Igeta *et al.*, 1991)。他の甘味タンパク質と同様に塩基性アミノ酸に富む。立体構造は解かれていない。

ネオクリンとミラクリンの比較と共通点

酸味のある食べ物を甘く感じさせる性質をもつ味覚修飾タンパク質には、ネオクリンとミラクリンの2種類が存在する(図1-7)。ネオクリンはそれ自身もほのかな甘味を感じさせる一方で、ミラクリンはそれ自身無味である。味覚修飾活性の持続時間はネオクリンで30~60分、ミラクリンで1~2時間である。ネオクリンとミラクリンの一次構造上の相同性は低いが、どちらもジスルフィド結合で架橋されたダイマーが活性型であるという点で共通である。

ここ数年の間に当研究室において、ネオクリンとミラクリンが味覚修飾活性を発揮する共通メカニズムが提唱された。どちらの味覚修飾タンパク質もpHが低いほど口腔内に存在するヒト甘味受容体を強く活性化するために、酸に応答して強い甘味を感じさせるようになることが示唆されている(図1-8) (Nakajima *et al.*, 2006, 2008; Koizumi *et al.*, 2011)。ヒトが味覚修飾タンパク質そのものを味わっても口腔内は通常中性であるために強い甘味を感じないが、その後に酸を味わうことで口腔内pHが酸性側にシフトすると、口腔内に残存している味覚修飾タンパク質の甘味強度が増加するために強烈な甘味が感じられる。

またどちらの味覚修飾タンパク質においても、分子中に存在する His 残基が pH センサーとして甘味強度変化を誘導することが示されている (Ito *et al.*, 2007; Nakajima *et al.*, 2008, 2011)。ネオクリンの場合には特に NBS サブユニット 11 番目の His 残基が重要であり、この His 残基を Ala に置換した pH センサー変異体 NBS H11A は pH に依らず強い甘味を呈するように性質が変化する(図 1-9) (Nakajima *et al.*, 2011)。また NAS 36 番目の His 残基、NBS 14 番目の His 残基も補助的な pH センサーとして機能する可能性が示唆されている(Nakajima *et al.*, 2011)。

さらに、どちらの味覚修飾タンパク質も中性条件下においてヒト甘味受容体に相互作用するものの活性化能力が低いがゆえに、中性条件下ではヒト甘味受容体に対するアンタゴニストとして働きうることを示されている。ネオクリンは中性条件下でも強い甘味を呈する (ヒト甘味受容体を強く活性化する) 自身の pH センサー変異体 NBS H11A を競合阻害する(Nakajima *et al.*, 2008)。ミラクリンは中性条件下では多種多様な甘味物質に対してアンタゴニストとして働く(図 1-10) (Koizumi *et al.*, 2011)。

味覚修飾タンパク質の構造機能相関

味覚修飾タンパク質が pH に依存して甘味強度を変化させる分子機構については、これまでに構造化学的な観点からの検証が行われてきた。ネオクリンは X 線結晶構造解析により中性条件下(pH 7.4)での立体構造が解かれているので、その構造をもとにした酸性条件下での立体構造予測が行われた(Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006)。酸性条件下ではアスパラギン酸残基およびヒスチジン残基の側鎖にプロトン化が起こると仮定して分子動力学シミュレーションを行った結果、ネオクリンは酸性条件下では中性条件下よりも NAS-NBS サブユニット間の距離が開いた構造(open 構造)をとると推測された(Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006) (図 1-11)。open 構造は closed 構造よりもヒト甘味受容体に強く作用し、ヒト甘味受容体を強く活性化すると考えられた。また pH に依存して open 構造-closed 構造間の平衡状態が変化することによって、ネオクリンの甘味強度も pH に依存して変化すると推測された(Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2008) (図 1-10A)。ネオクリンが pH に依存して立体構造変化を生じることについては、pH を中性から酸性まで様々な条件で変化させて蛍光スペクトル測定を行うことによって、実験的にも示されている(Morita *et al.*, 2009)。

なお、もう 1 種類の味覚修飾タンパク質であるミラクリンについては立体構造が解かれていないため、構造機能相関について実験的に検証することは難しい。分子動力学シミュレーション上の予測に限れば、酸性条件下ではミラクリン分子表面上に存在する 4

つの His 残基がプロトン化されることにより、中性条件下よりも 2 つのサブユニット間の距離が開いた open 構造をとると予測した報告がある(Paladino *et al.*, 2010)。

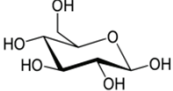
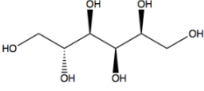
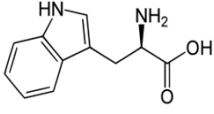
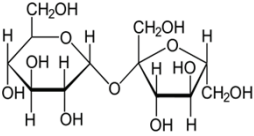
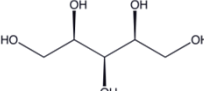
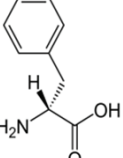
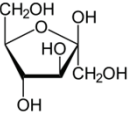
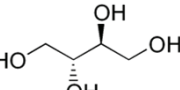
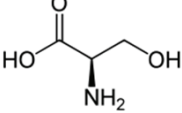
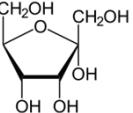
味覚修飾タンパク質の構造機能相関については、現状として分子シミュレーションに依る部分が大きく、その pH に依存した立体構造変化の詳細は実験的には十分に示されていない。

本研究について

このような背景を踏まえ、本研究では、味覚修飾タンパク質ネオクリンの pH に依存した立体構造変化を実験的に検出し、さらにその検出された立体構造変化と甘味強度変化との構造機能相関を検証することを試みた。

まず NMR 法を用いてネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化をアミノ酸残基単位でしらべることによって、分子上で pH に依存して立体構造変化を生じうるアミノ酸残基および構造領域を網羅的にスクリーニングした(第 2 章)。次に、選別されたアミノ酸残基および構造領域がネオクリンの pH に依存した甘味強度変化に果たす役割について、変異体解析によって検証した(第 3 章)。また各アミノ酸残基が果たす役割とその構造上分布に基づき、ヒト甘味受容体によるネオクリンの受容機構について新たな一つのモデルを提唱した。最後に、ネオクリンの構造機能相関を再度考察すると共に、今後の展望を記述した(第 4 章)。

表1-1 代表的な低分子甘味物質

天然糖	糖アルコール	アミノ酸
 <p>グルコース</p>	 <p>ソルビトール</p>	 <p>D-トリプトファン</p>
 <p>スクロース</p>	 <p>キシリトール</p>	 <p>D-フェニルアラニン</p>
 <p>フルクトース</p>	 <p>エリスリトール</p>	 <p>D-セリン</p>
 <p>プシコース</p>		

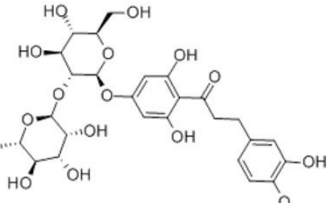
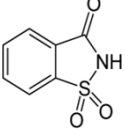
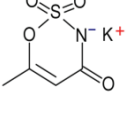
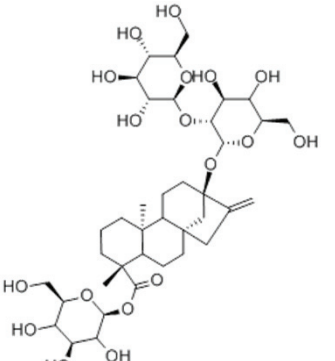
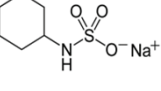
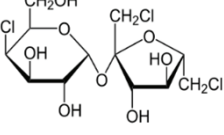
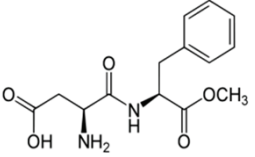
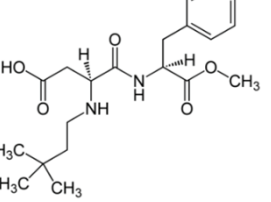



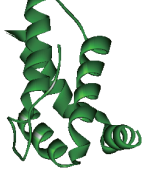
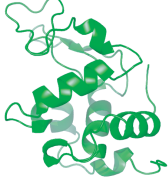

配糖体	人工甘味料
 <p>ネオヘスペリジンジヒドロカルコン (NHDC)</p>	 <p>サッカリン</p>  <p>アセスルファムカリウム</p>
 <p>ステビオシド</p>	 <p>シクラメート</p>  <p>スクラロース</p>
	 <p>アスパルテーム</p>  <p>ネオテーム</p>

表1-2 甘味タンパク質および味覚修飾タンパク質の特徴

甘味タンパク質	ソーマチン (Thaumatin)	モネリン (Monellin)	ブラゼイン (Brazzein)	マビリン (Mabinlin)	ペンタジン (Pentadin)	リゾチーム (Lysozyme)
甘味強度(重量比) スクロース換算	3000倍	3000倍	500倍	100倍	500倍	200倍 ⁽¹³⁾
由来	<i>Thaumatococcus daniellii</i> Benth 西アフリカ	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> Diels 西アフリカ	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon 西アフリカ	<i>Capparis masakai</i> Lévl 中国	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> Baillon 西アフリカ	Hen egg white
原産地	西アフリカ	西アフリカ	西アフリカ	中国	西アフリカ	
分子量 (kDa)	22.2	10.7	6.5	12.4	12.0	14.5
アミノ酸残基	207 ⁽²⁾	44(A鎖)50(B鎖) ⁽⁵⁾	54	33(A鎖)72(B鎖) ⁽⁹⁾	報告無し	129
ジスルフィド結合数	8 ⁽³⁾	0 ⁽⁶⁾	8 ⁽⁸⁾	4 ⁽¹⁰⁾	有り	4 ⁽¹⁴⁾
立体構造	 (PDBID 1thi)	 (PDBID 3mon)	 (PDBID 2brz)	 (PDBID 2DS2)	報告無し	 (PDBID 8lyz)
相同性の高いタンパク質	トリプシンインヒビター	システインプロテアーゼインヒビター	セリンプロテアーゼインヒビター	2S種子貯蔵タンパク質	報告無し	報告無し
発現系 ⁽¹⁵⁾	麹菌・ <i>A.niger</i> ジャガイモなど	食品酵母 化学合成など	大腸菌 化学合成	化学合成 植物	報告無し	大腸菌 酵母

味覚修飾タンパク質	ミラクリン (Miraculin)	ネオクリン (Neoculin)
味 (スクロースと比較)	無味、酸味→甘味 ⁽¹⁶⁾	甘味、酸味→甘味 ⁽²³⁾
由来	<i>Richadella dulcifica</i>	<i>Curculigo latifolia</i>
原産地	西アフリカ	西マレーシア
分子量(kDa)	48	24.9
アミノ酸残基	191 ⁽¹⁷⁾	113 (NAS)-115 (NBS) ⁽²⁴⁾
ジスルフィド結合数	7 ⁽¹⁸⁾	4 ⁽²⁵⁾
立体構造	報告無し	 (PDBID 2d04)
相同性の高いタンパク質	トリプシンインヒビター	ユキノハナレクチン
発現系	レタス ⁽¹⁹⁾ 大腸菌 ⁽²¹⁾	麹菌 ⁽²⁶⁾ 大腸菌 ⁽²⁷⁾

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

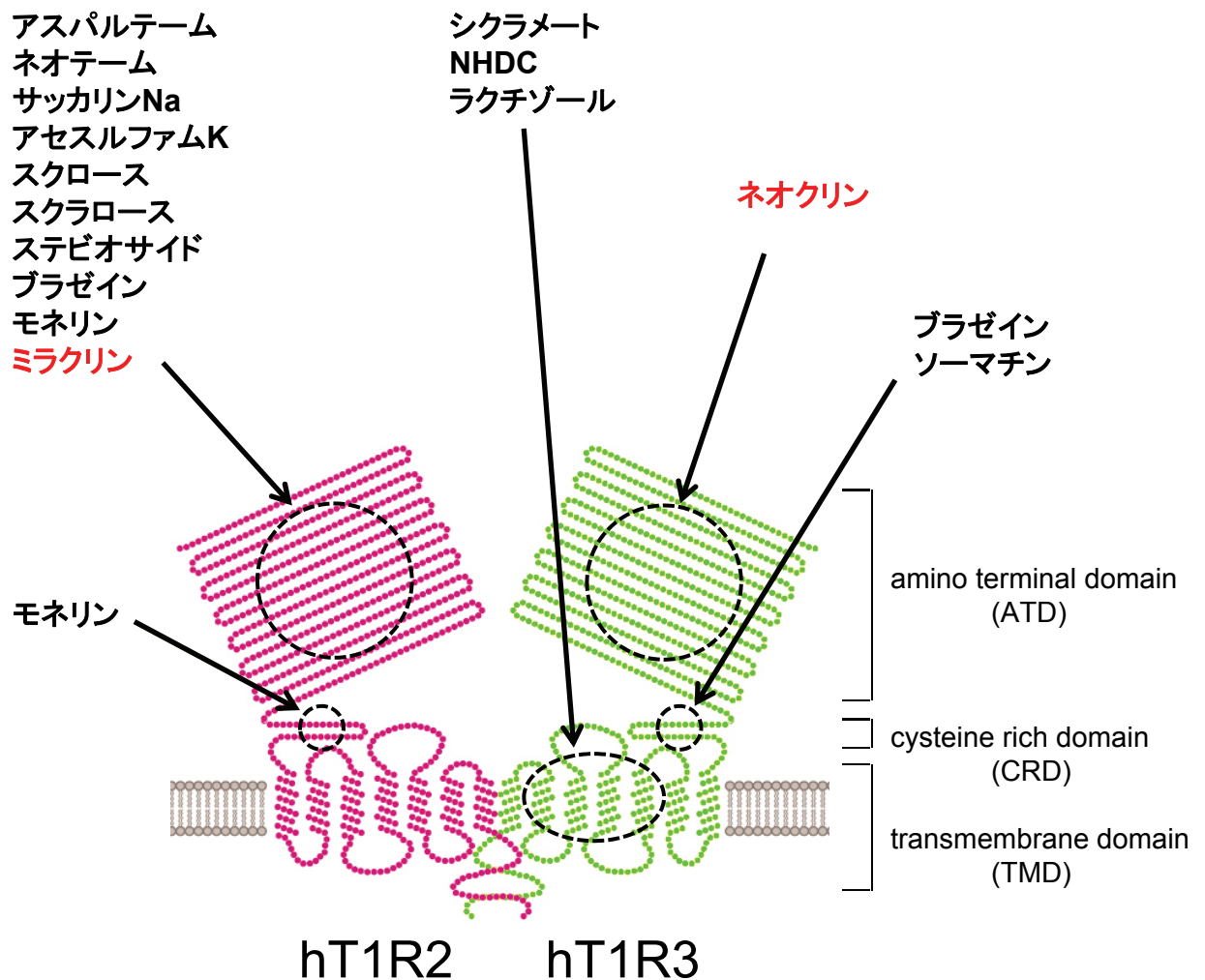
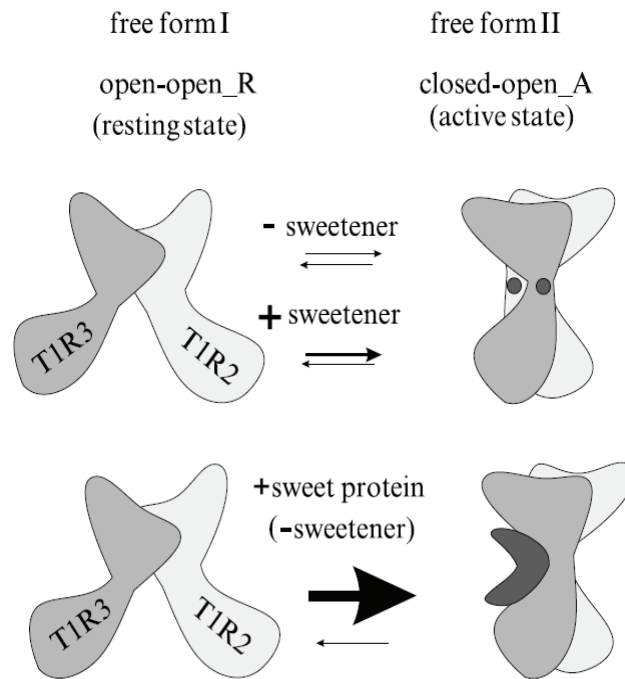


図1-1 ヒト甘味受容体の構造模式図と甘味物質の作用部位

ヒト甘味受容体には複数のリガンド結合部位が存在し、様々な甘味物質を認識する。受容体の図はChandrashekar *et al.*, *Nature.*, 2006より抜粋、一部改変。

A



B

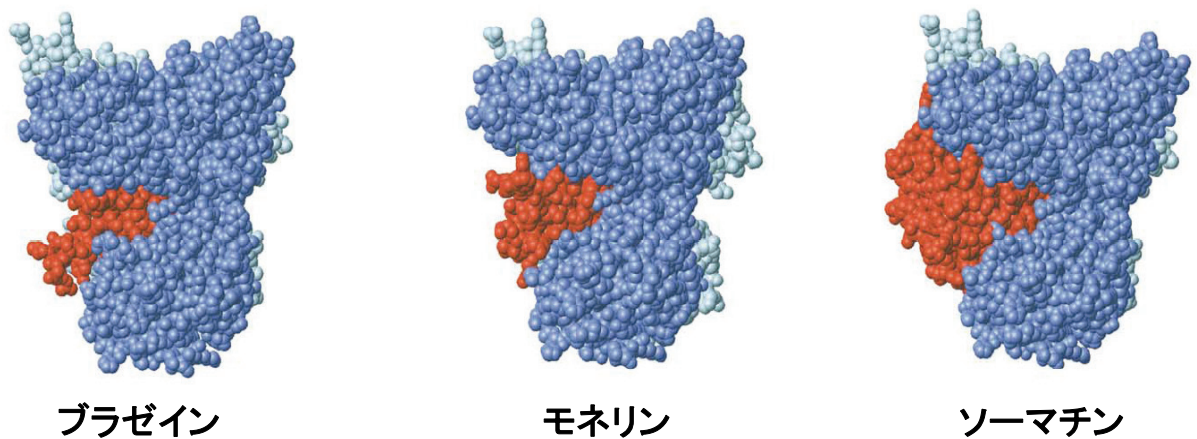


図1-2 甘味タンパク質とhT1R2-hT1R3のATDとのドッキングシミュレーション

A: 低分子甘味物質(上図)および甘味タンパク質(下図)とhT1R2-hT1R3のATDとの相互作用モデル
低分子甘味物質の相互作用様式と甘味タンパク質の相互作用様式は異なると予想される。

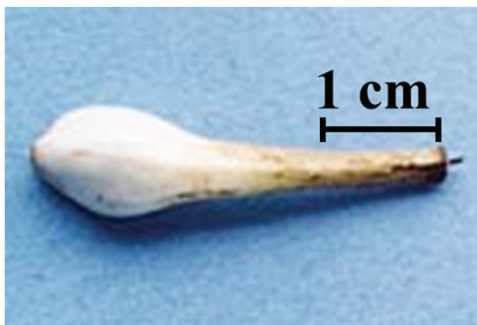
B: 甘味タンパク質とhT1R2-hT1R3のATDとの結合モデル
ブラゼイン、モネリン、ソーマチンのいずれの甘味タンパク質(赤)も受容体
(hT1R3は濃い青、hT1R2は薄い青で示す)の大きな溝にはまり込む。

図はTemussi *et al.*, *FEBS letter*, 2002より引用。

A



B



C



図1-3 *Curculigo latifolia*果実、*Richadella dulcifica*果実の写真

A: *C. latifolia*の全体図

B: *C. latifolia*の根元に結実するクルクリゴ果実

写真は日本新薬株式会社山科植物園にて撮影。

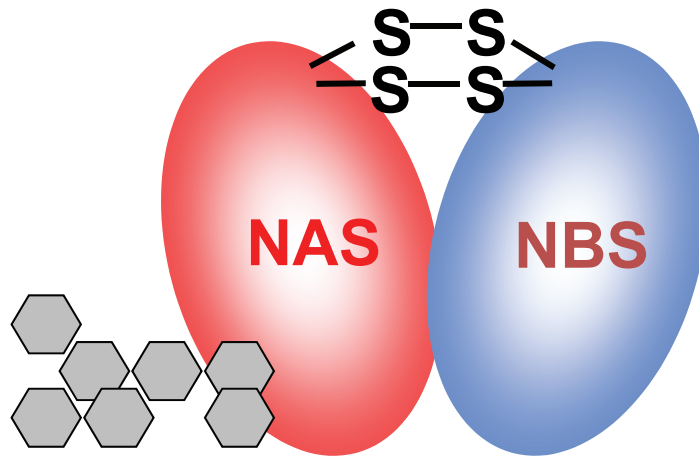
C: *R. dulcifica*の枝に結実するミラクルフルーツ果実

写真はMisaka *et al.*, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2013から引用。

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

図1-4 NASとNBSのアミノ酸配列のアラインメント

NAS、NBSで共通するアミノ酸残基を枠で囲んだ。酸性アミノ酸残基、塩基性アミノ酸残基をそれぞれ赤、青で示す。赤い丸印はNASにおける糖鎖付加部位であるAsn81を示す。



	NAS	NBS
等電点	4.0~6.0	7.5~9.5
アミノ酸残基	113	114
分子量(kDa)	14	12
糖鎖	有	無

図1-5 ネオクリン分子の模式図と化学的性質

ネオクリンは酸性サブユニット(NAS)と塩基性サブユニット(NBS)がジスルフィド結合で架橋されたヘテロダイマーである。NASには約2 kDaの糖鎖が付加している。

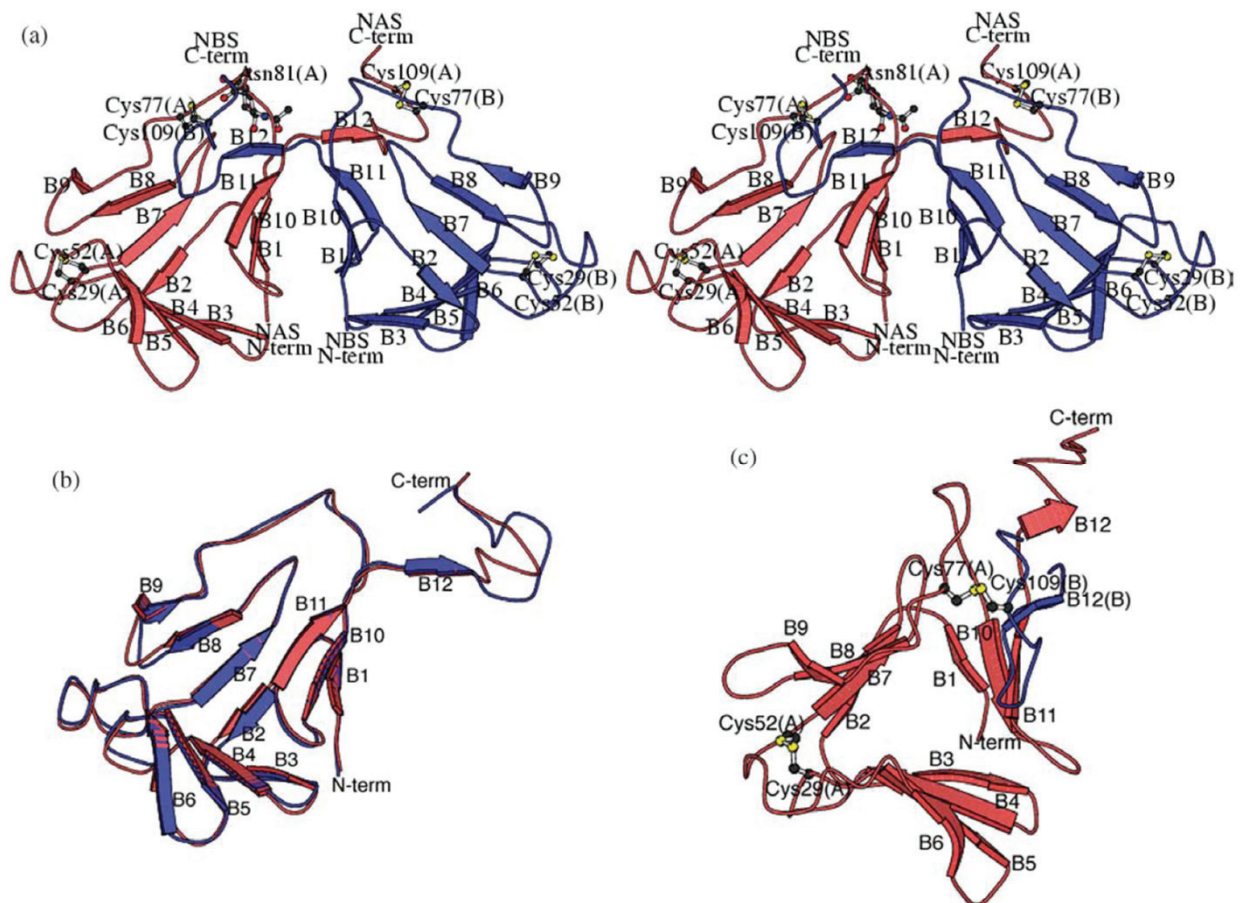


図1-6 X線結晶構造解析により決定されたネオクリンの立体構造

赤がNAS、青がNBSを示す。



(a) ネオクリンの結晶構造

(b) NASとNBSの重ね合わせ

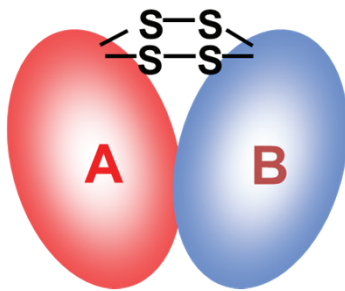
(c) NASの立体構造

図はShimizu-Ibuka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2006より引用。

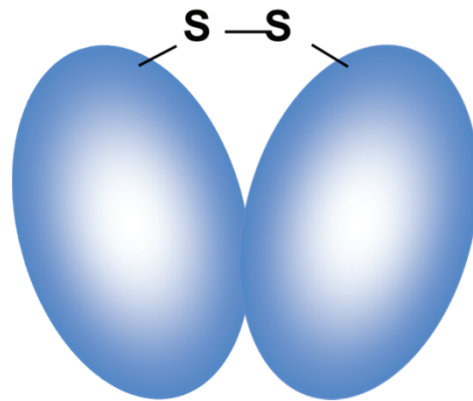
A

		それ自身の 甘味活性	味覚修飾活性 (酸)	味覚修飾活性 (水)	味覚修飾活性 持続時間
	ネオクリン	+	+	+	30~60分
	ミラクリン	-	+	-	1~2時間

B



ネオクリン
26 kDa
ヘテロダイマー



ミラクリン
42~44 kDa
ホモダイマー

図1-7 ネオクリンとミラクリンの特性を比較

A: ネオクリンおよびミラクリンを味わった時の味覚特性の比較

ネオクリンはそれ自身もほのかな甘味を感じさせる一方で、ミラクリンはそれ自身無味である。またネオクリンは酸だけでなく水も甘く感じさせる。味覚修飾活性の持続時間は、ミラクリンのほうが長い。

B: 分子のもつ特徴の比較

ネオクリン・ミラクリンはどちらも2本のポリペプチド鎖がジスルフィド結合で架橋されたダイマー構造をとっている。ただしネオクリンは酸性サブユニット(NAS)と塩基性サブユニット(NBS)が結合したヘテロダイマー、ミラクリンは塩基性のサブユニット2つが結合したホモダイマーである点で異なる。

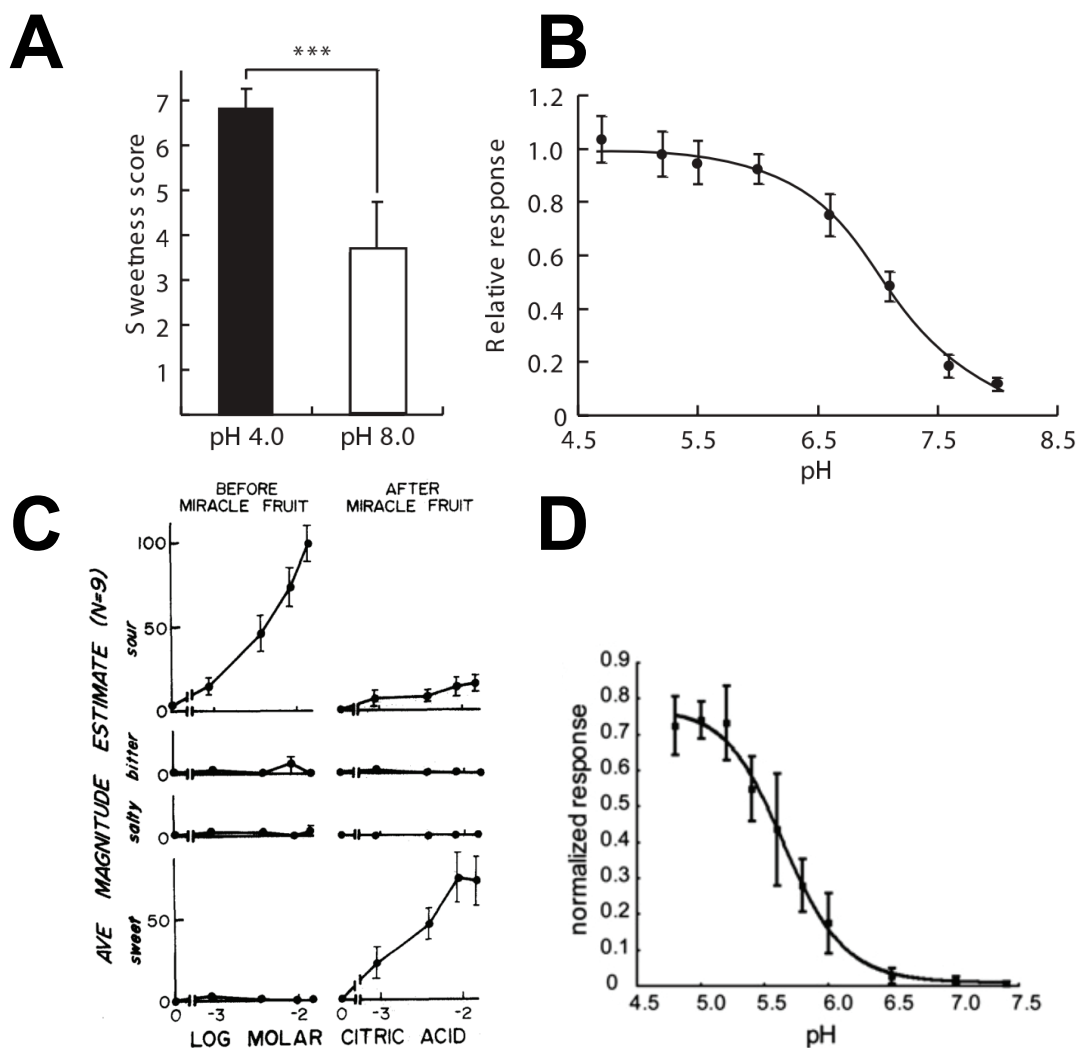


図1-8 ネオクリン・ミラクリンの甘味強度およびヒト甘味受容体活性化能のpH依存性

A: 官能試験によるネオクリンの甘味活性の評価

40 μM のネオクリン溶液100 μl を口に含んでから30s以内の甘味強度を評価した。

B: ヒト甘味受容体発現培養細胞系を用いたネオクリンの甘味活性の評価

ネオクリンを終濃度13.3 μM でヒト甘味受容体発現培養細胞に添加したときの細胞応答を、アスパルテームに対する細胞応答を基準とした相対値として示した。

C: 官能試験によるミラクリンの酸味抑制能および甘味活性の評価

D: ヒト甘味受容体発現培養細胞系を用いたミラクリンの甘味活性の評価

ミラクリンを終濃度30 nMでヒト甘味受容体発現培養細胞に添加したときの細胞応答を、アスパルテームに対する細胞応答値を基準とした相対値として示した。

図A, BはNakajima *et al.*, *FASEB. J.*, 2008、図CはBartoshuk *et al.*, *Physiol Behav.*, 1974、図DはKoizumi *et al.*, *PNAS.*, 2011より引用。

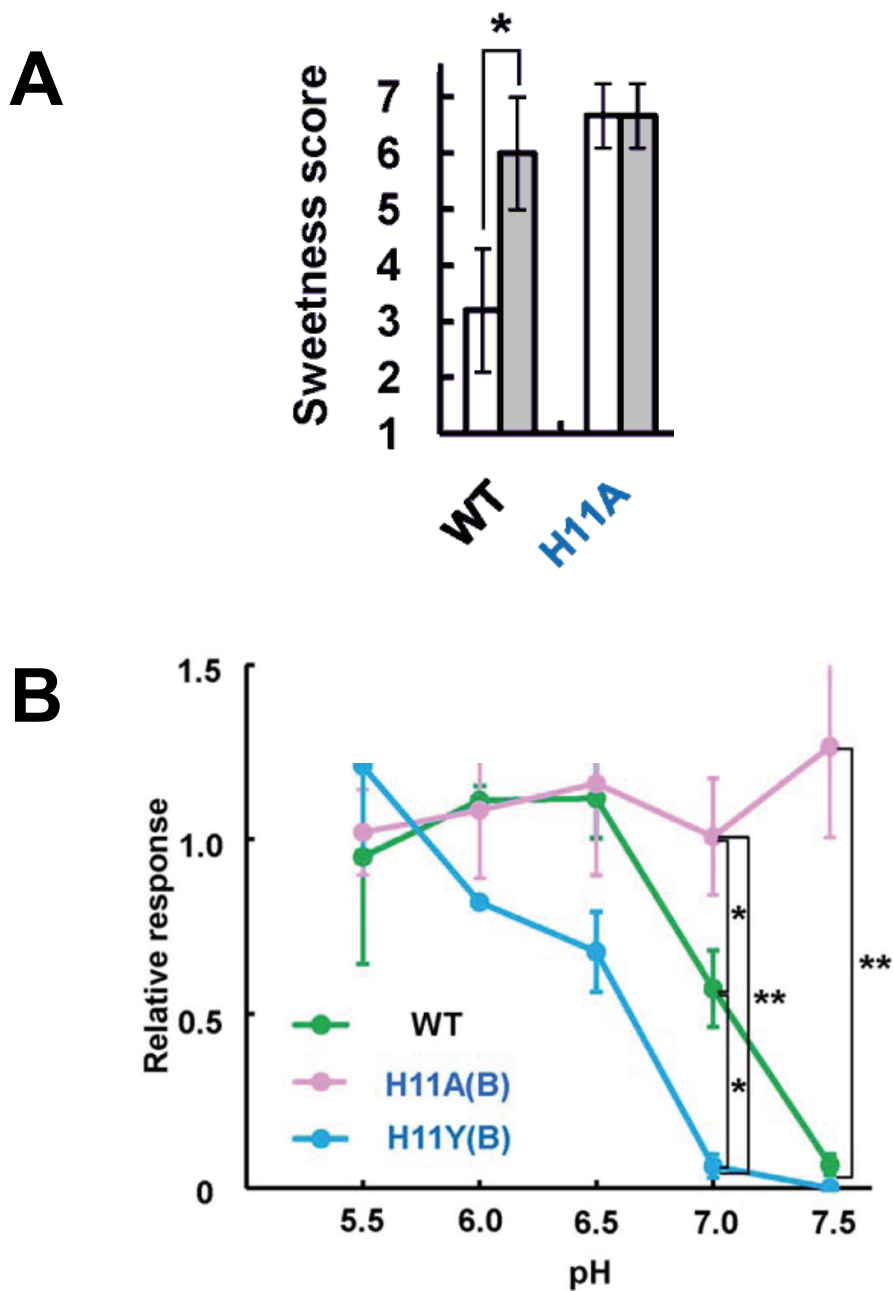


図1-9 ネオクリンのpHセンサー変異体NBS H11Aの甘味活性の評価

A: 官能試験によるNBS H11Aの甘味活性の評価

white barはpH 7.5のバッファーに溶解したタンパク質(20 μ M)の甘味強度、dark barはpH 4.0のバッファーに溶解したタンパク質(20 μ M)の甘味強度の評価値をそれぞれ示す。NBS H11Aは中性条件下でも酸性条件下でも同等に強い甘味を感じさせる。

B: ヒト甘味受容体発現培養細胞系を用いたNBS H11Aの甘味活性の評価

NBS H11AはpHに依らずヒト甘味受容体hT1R2-hT1R3を強く活性化する。図はNakajima *et al.*, *PLoS One.*, 2011より引用。

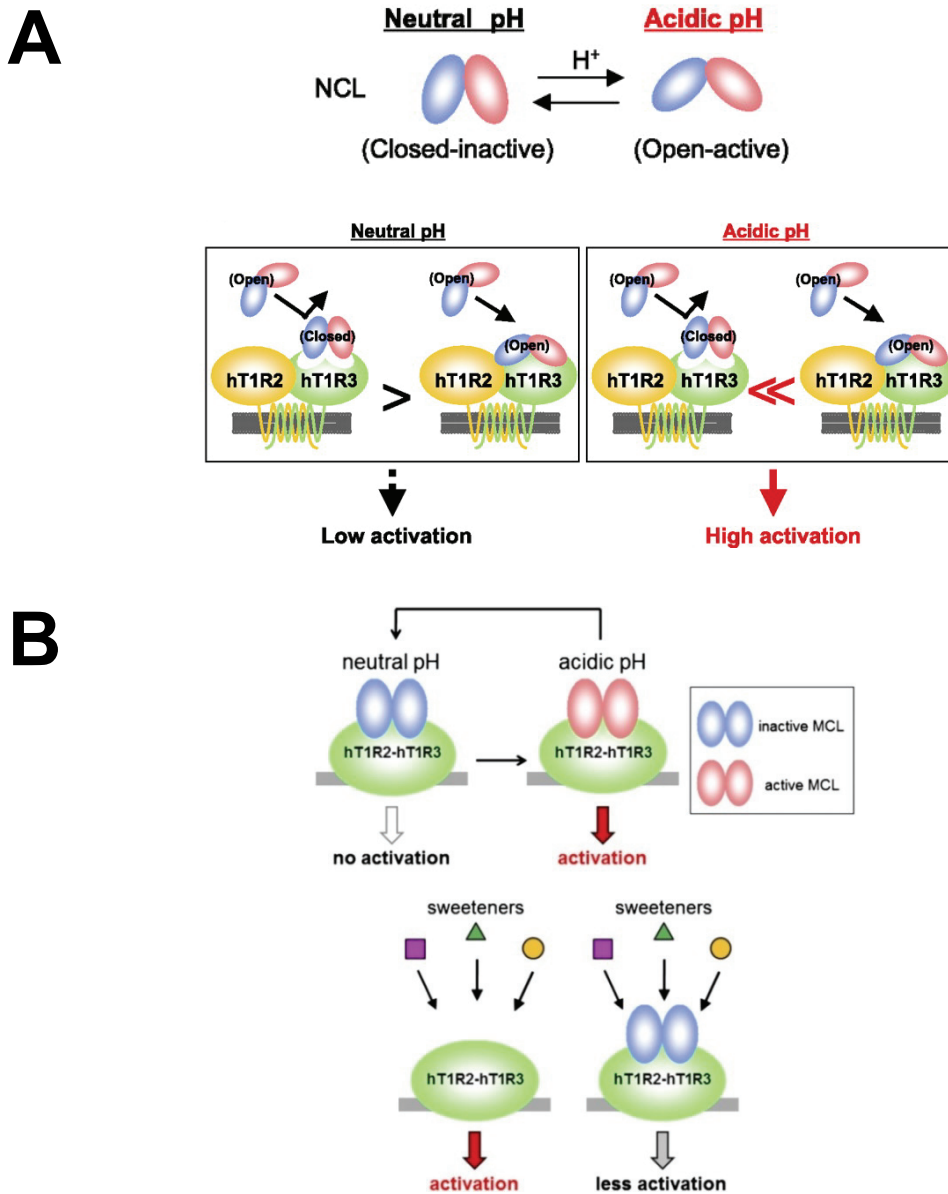


図1-10 ネオクリン・ミラクリンの中性条件下でのアンタゴニスト活性

A: ネオクリンのpHに依存したアンタゴニスト-アゴニスト活性変化についての分子仮説
 ネオクリンは中性条件下ではinactive-form(アンタゴニスト)としてはたらく分子の割合が大きいために、ヒト甘味受容体を弱く活性化する。一方で酸性条件下ではactive-form(アゴニスト)としてはたらく分子の割合が大きくなり、ヒト甘味受容体を強く活性化する。

B: ミラクリンのpHに依存したアンタゴニスト-アゴニスト活性変化
 ミラクリンも中性条件下ではヒト甘味受容体に対して主にアンタゴニストとしてはたらく、多様な甘味物質によるヒト甘味受容体の活性化を阻害する。一方で酸性条件下ではアゴニストとしてはたらく、ヒト甘味受容体を活性化する。

図はNakajima *et al.*, *FASEB. J.*, 2008およびKoizumi *et al.*, *PNAS.*, 2011より引用。

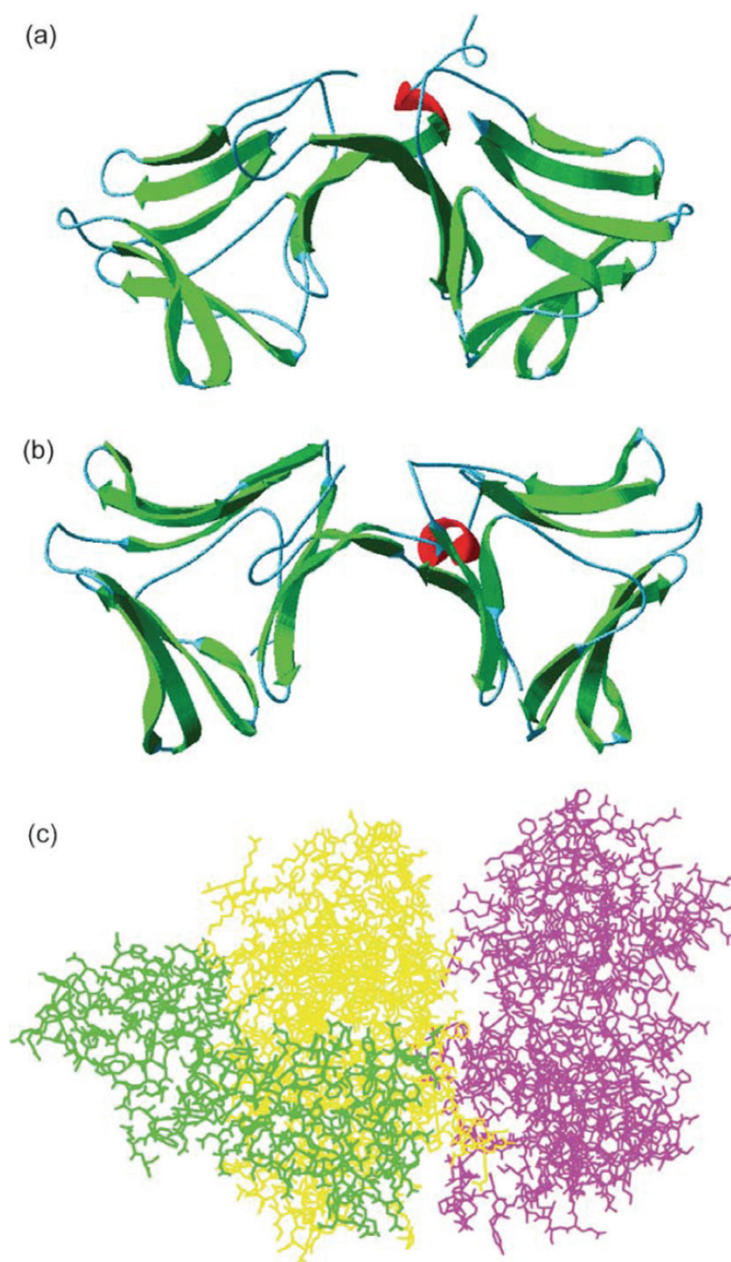


図1-11 分子動力学シミュレーションによるネオクリンの立体構造予測

(a) 予測された中性溶液中での立体構造

(b) 予測された酸性溶液中での立体構造

(c) 予測された酸性溶液中ネオクリン立体構造とhT1R2-hT1R3のATDとの結合モデル
hT1R2 ATDを赤、hT1R3 ATDを黄、ネオクリンを緑で示す。ネオクリンは酸性条件下では中性条件下よりもNAS-NBSサブユニット間の距離が開いた構造(open構造)をとり、ヒト甘味受容体に強く作用すると予測された。

図はShimizu-Ibuka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2006より引用。

第 2 章

NMR 法を用いたネオクリンの pH に依存した立体構造変化の検出

2.1 序

味覚修飾タンパク質ネオクリンは pH 低下に伴い甘味強度を増加させるが、その分子機構は十分に解明されていない。我々の研究グループでは、その仕組みを構造化学的な観点から解明しようと試みている。すなわちリガンドであるネオクリン分子が pH 低下に伴い立体構造変化を生じることによって、酸性条件下ではヒト甘味受容体を強く活性化するようになるという仮説のもとに研究を進めている(Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2009)。しかしネオクリンは中性条件下では結晶構造が解かれているものの、酸性条件下では立体構造が決定されていないために、その pH に依存した立体構造変化の詳細は明らかになっていない。

我々の研究グループは近年、分光学的な手法を利用してネオクリンの pH に依存した立体構造変化を解明することを試みてきた。はじめに分子半径変化や二次構造変化といったグローバルな構造変化を検証した。X 線小角散乱法を用いて、ネオクリンの慣性半径および見かけの分子量について pH に依存した変化をしらべた。その結果、ネオクリンには pH に依存して会合体や凝集体を形成する性質はなく、また慣性半径の変化を伴う大規模な構造変化を生じないことが示された(図 2-1 A)。さらに Far-UV CD スペクトルを測定することにより pH に依存した二次構造上の変化を検証したところ、ほぼ変化が観察されなかった(図 2-1 B)。これらの結果より、ネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化はグローバルなものではなく、局所的なものであると予想した。

以上のような背景を踏まえ本章では、NMR 法を用いてネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化をアミノ酸残基単位で検出することを試みた。pH 滴定法を利用することにより、pH に依存して立体構造変化を生じると予想されるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングした。これらのアミノ酸残基はネオクリン分子上に存在する 5 つの His 残基周辺に集合していたことから、pH に依存した立体構造変化は His 残基周辺の局所的なものであることが示唆された。

また NMR 解析の過程で、構造的な揺らぎが著しく大きいため、pH 変化の影響を受けて立体構造変化を生じる可能性もある 2 つの loop 領域を発見した。

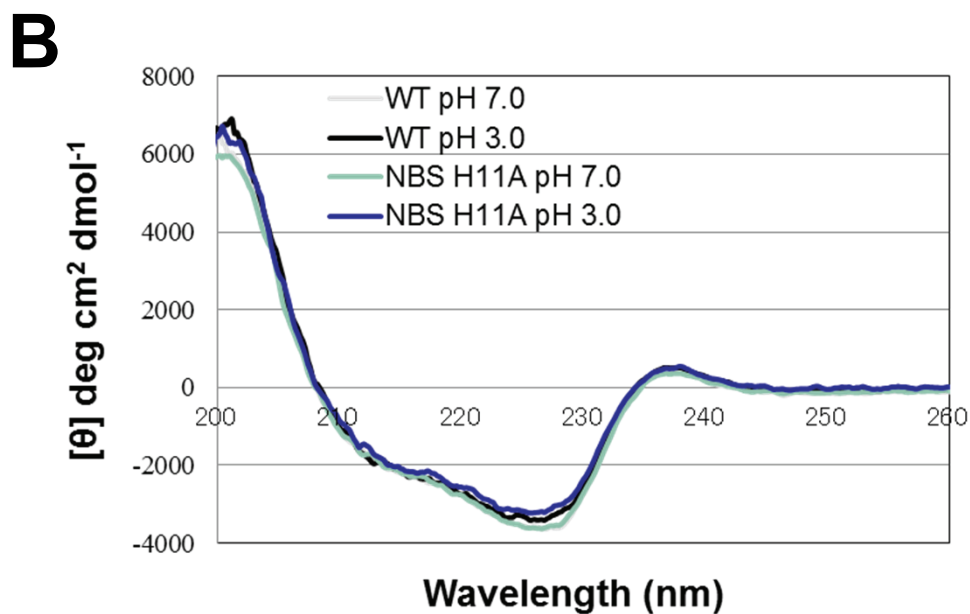
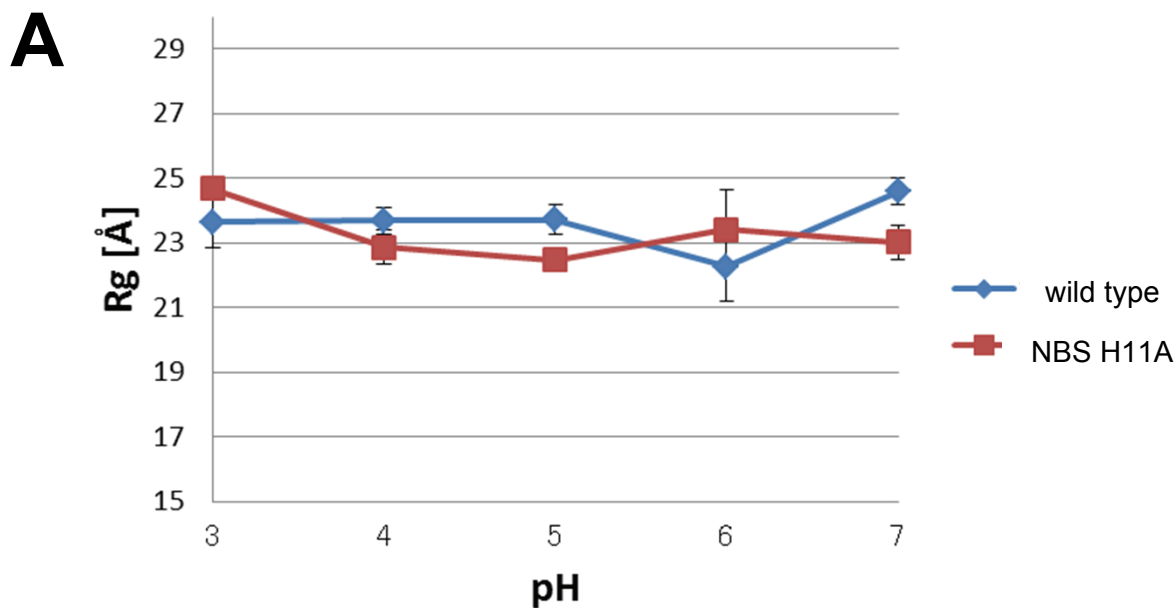


図2-1 ネオクリンのpHに依存した立体構造変化についてのグローバルな解析

A: 慣性半径RgのpH依存性

野生型ネオクリン、pHに依らず強い甘味を呈する点変異体NBS H11Aのいずれにおいても、慣性半径RgはpH3~7の範囲で 23.5 ± 2 Å程度であり、ほぼ一定値を示した。

B: Far-UV CDスペクトル

野生型ネオクリン、点変異体NBS H11Aのいずれにおいても、pHに依存した二次構造上の変化は観察されず、両者の間でも二次構造上の差異は観察されなかった。

2.2 材料・方法

2.2.1 安定同位体標識したネオクリンタンパク質の発現・精製

NMR 測定に用いる野生型ネオクリン(および点変異体 NBS H11A)のタンパク質は大腸菌を用いて産生した。大まかな手順を図 2-2 に示す。ネオクリンを構成する 2 種類のサブユニット(NAS, NBS)は大腸菌を用いて別々に産生した。さらに変性剤により可溶化した両者を混合した後、希釈法による巻き戻しと同時にダイマーを形成させた。なお点変異体の作製法も、元プラスミド以外は野生型のものと同様である。

ネオクリンは 77%の配列相同性をもつ異種サブユニットが結合したヘテロ 2 量体である。そのため両サブユニットを同時に NMR 測定することは難しいと考えた。そこで一方のサブユニットのみを ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識したネオクリンタンパク質を作製し、安定同位体標識した片側のサブユニットのみを NMR 測定するという手法を選択した(図 2-3)。安定同位体標識を行うサブユニットについては ^{15}N NH_4Cl / $^{13}\text{C}_6$ -glucose をそれぞれ唯一の窒素源・炭素源として用いた M9 培地中で大腸菌により発現させた。これを LB 培地中で大腸菌により発現させたもう一方のサブユニットと結合させてヘテロダイマーを形成させることにより、片側のサブユニットのみが安定同位体標識されたネオクリンタンパク質を作製した。

1) 大腸菌による NAS、NBS の生産

NAS、NBS (および点変異体 NBS H11A)の成熟配列(第 1 章 図 1-4)を大腸菌発現用ベクター-pET21b に導入したプラスミドを中島健一朗博士(東京大学)から分与していただいた。以下、野生型を産生する場合について述べるが、点変異体 NBS H11A を産生する場合も手順は同様である。

NAS・NBS 発現プラスミドをそれぞれ *E.coli* BL21(DE3)pLysS に形質転換し、終濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにアンピシリンを加えた LB プレートに塗布した。

安定同位体標識するサブユニットの生産

安定同位体標識したタンパク質の生産には M9 培地(12 g/L Na_2HPO_4 、6 g/L KH_2PO_4 、1 g/L NaCl 、3 mM MgSO_4 、150 μM CaCl_2 、1.8 μM FeCl_3 、4 μM ZnSO_4 、1 μM MnSO_4 、4.7 μM H_3BO_4 、0.7 μM CuSO_4 、20 mg/L Thiamine、150 mg/L アンピシリン、1 g/L NH_4Cl 、2 g/L glucose)を利用した。NAS・NBS 発現プラスミドを形質転換した BL21(DE3)pLysS のコロニーを前々培養として 5 ml LB 培地(150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン

含有)に植菌し、37℃、150 rpm で 8 時間振盪培養した。次に 15 ml M9 培地(100 µg/ml アンピシリン含有)に前々培養液を培地の容量の 5 %量を接種し、37℃、150 rpm で一晩振盪培養した。その後 1 L M9 培地に前培養液を培地の容量の 1 %量を接種し、37℃、150 rpm で培養した。分光光度計 BECKMAN DU-520 (Beckman Coulter, Inc, USA) を用いて 600 nm の吸光度を測定し、OD₆₀₀=0.8~1.0 に達した時点で 1.5 mM IPTG を加え、さらに 5 時間培養を行った。菌体は 10000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離し回収した。

安定同位体標識しないサブユニットの生産

NAS・NBS 発現プラスミドを形質転換した BL21(DE3)pLysS のコロニーを前培養として 15 ml LB 培地(100 µg/ml アンピシリン含有)に植菌し、37℃で一晩振盪培養(150 rpm)した。その後 1 l LB 培地(100 µg/ml アンピシリン含有)に前培養液を培地の容量の 1 %量を接種し、37℃、150 rpm で培養した。分光光度計で 600 nm の吸光度を測定し、OD₆₀₀=0.8~1.0 に達した時点で 1.5 mM IPTG を加え、さらに 4 時間培養を行った。菌体は 10000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離し回収した。

2) 変性剤による可溶化

回収した菌体を STE バッファー(50 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、150 mM NaCl、pH 8.0)に溶解し、超音波破碎機 BRANSON sonicator 450 (Branson Ultrasonics, USA)を用い、Duty 40 %、Output 4 で 30 秒ずつ 3~4 回破碎した。これを 10000 rpm、4℃、10 分で遠心分離し沈殿を回収した。さらに、Wash バッファー(50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、2 % TritonX100、pH 8.0)を加え、超音波破碎機により懸濁し、10000 rpm、4℃、10 分で遠心分離後、沈殿回収を 3 回繰り返し洗浄した。これに 6 M グアニジン塩酸(pH 2.0)を加えて超音波破碎機により懸濁し可溶化した後、室温で 1~2 時間放置した。

3) 巻き戻しによるダイマーの形成

可溶化した NAS 溶液と NBS 溶液の吸光度(280 nm)を分光光度計で測定し、タンパク質消光係数より濃度を算出した。

$$E_{280nm,1cm}^{1M} \text{ (光路長 1 cm のセルで 1 M のタンパク質溶液を測定したときの吸光度)} \\ = \text{Tyl 残基数} \times 1390 + \text{Trp 残基数} \times 5800$$

サンプルの濃度(mg/ml) = サンプルの OD₂₈₀ ÷ E_{280nm,1cm}^{1M} × Mw

$$E_{280nm,1cm}^{1M} \text{ (NAS)} = 6 \times 1390 + 4 \times 5800 = 31540$$

$$E_{280nm,1cm}^{1M} \text{ (NBS)} = 5 \times 1390 + 4 \times 5800 = 30150$$

$$Mw(\text{NAS}) = 12402$$

$$Mw(\text{NBS}) = 12636$$

NAS 溶液と NBS 溶液をそれぞれ 10 mg/ml になるように調製し、1:1 の割合で混合した。これをリフォールディングバッファー(50 mM Tris-HCl、1.56 M グアニジン塩酸、3 mM 還元型グルタチオン、0.3 mM 酸化型グルタチオン、pH 8.0)に少量ずつ滴下し、10 倍希釈した後、16°Cで一晩静置した。

4) 硫酸沈殿

16°Cで一晩巻き戻したネオクリン溶液を水で 2 倍に希釈し、硫酸アンモニウムを飽和濃度 80 %になるよう加え混合した。4°Cで一晩静置した後、10000 rpm、4°C、30 分、遠心分離して沈殿を回収した。沈殿を 50~100 ml の HPLC 用バッファーA(20 mM CH₃COONa-NaOH、100 mM NaCl、pH 5.0)に溶解し、4000 rpm、4°C、25 分、遠心分離して上清を回収することでタンパク質を抽出した。その後上清を 30~60 倍の体積の同じバッファーA に対して 4°Cで透析し、残存しているグアニジン塩酸や硫酸を除去した。3 時間後に外液を一度交換し、4°Cで一晩透析した。翌朝試料を回収し、0.44 μm の Centrifugal Filter(EMD Millipore, USA)でろ過した。

5) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による精製

HPLC により精製されたヘテロダイマーとホモダイマーを分取した。カラムは強陽イオン交換カラム Poros HS(Applied Biosystems, USA)を使用し、流速 9.0 ml/min で 280 nm の吸光度で検出した。まず 1 分間バッファーA を流した後、バッファーA とバッファーB(20 mM CH₃COONa-NaOH、1 M NaCl、pH 5.0)によるグラジエント溶出を行い、10 分間で塩濃度が 100 mM→1000 mM になるよう設定した。またその後 5 分間バッファーB を流した。

6) 透析・凍結乾燥

ネオクリンの溶出したピークを回収し、水に対して透析した後、凍結乾燥機 EYELA

FDU-2100 (TOKYO RIKAKIKAI CO, LTD, Japan)で凍結乾燥した。凍結乾燥したネオクリンを 3~5 ml の水に溶かして再度透析・凍結乾燥を行うことにより、残存している塩を可能な限り除去した。得られた粉末を最終的な精製ネオクリンタンパク質サンプルとした。

7) 官能試験による活性の評価

大腸菌で産生したネオクリンの活性を確認するため、必要に応じて官能試験を行った。凍結乾燥後の粉末状ネオクリンタンパク質を分取し、少量の水に溶解して官能試験サンプルとした。官能試験においては、最初にコントロールとして 0.1 mM、0.5 mM、2 mM のアスパルテーム溶液 300 μ l をそれぞれ味わい、甘味の強さを覚えた。水で口を軽くすすいだ後、4 μ M のネオクリン 150 μ l を口に含み、アスパルテーム溶液と比較することで、ネオクリンそのものの甘味の強さを評価した。さらに水で口を軽くすすいだ後、50 mM クエン酸バッファー(pH 4.0) を 300 μ l 口に含み、酸を味わったときに誘導される甘味の強さも評価した。

2.2.2 NMR 測定試料の調製

上記の大腸菌による発現系を用いて産生した ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識ネオクリン粉末を、脱気後にフィルターろ過したバッファー330 μ l に溶解し、15000 rpm、4°C、2分、遠心分離して上清を回収した。こうして調製した最大濃度(0.03~0.33 mM、pH 7.0 で 0.03 mM、pH 3.0 では 0.33 mM が最大濃度)のタンパク質溶液 300 μ l を直径 5 mm の対称形試料管(Shigemi, Inc, USA)に注入し、測定試料とした。バッファーには 20 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 の 5 種(いずれも 10% D_2O を含む)を用いた。

2.2.3 シグナル帰属

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した野生型ネオクリンおよび点変異体 NBS H11A の NAS・NBS それぞれについて、pH 3.0 および 4.0 で主鎖シグナルの帰属を行った。

帰属のための 3D-NMR 測定は理化学研究所横浜研究所の NMR 施設の Bruker 700 MHz 装置(低温プローブ付)を用いて 37°Cで行った。NMR 測定プログラムは小柴生造博士(理化学研究所)が作製したものを利用させていただき、最初に ^1H - ^{15}N HSQC を測定した後、3D HNCA、3D HN(CO)CA、3D CBCA(CO)NH および 3D HNCACB スペクトルの順に測定した(Cavanagh *et al.*, 2007)。最後に再度 ^1H - ^{15}N HSQC を測定

することで、タンパク質の状態を確認した。

得られた 3D NMR スペクトルを利用してシグナル帰属を行った。全てのデータはソフトウェア Azara-2.7(www2.ccpn.ac.uk/azara)を利用してプロセスし、さらにプログラム CcpNmr analysis(Vranken *et al.*, 2005)を利用して解析した。

2.2.4 pH 滴定

pH 3-7 の範囲における ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの変化をしらべた。 ^{15}N 標識した野生型ネオクリンおよび点変異体 NBS H11A の NAS・NBS それぞれについて、pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 において ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。測定は上記の 3D NMR 測定と同様の設備・測定条件で行った。pH 5.0 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルの主鎖シグナルの帰属は、pH 3.0 および pH 4.0 で測定した ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル間での化学シフト変化の傾向を外挿することで行った。同様に主鎖シグナルの化学シフト変化の傾向を高 pH 側に外挿することで pH 6.0, pH 7.0 の主鎖シグナルの帰属も行った。

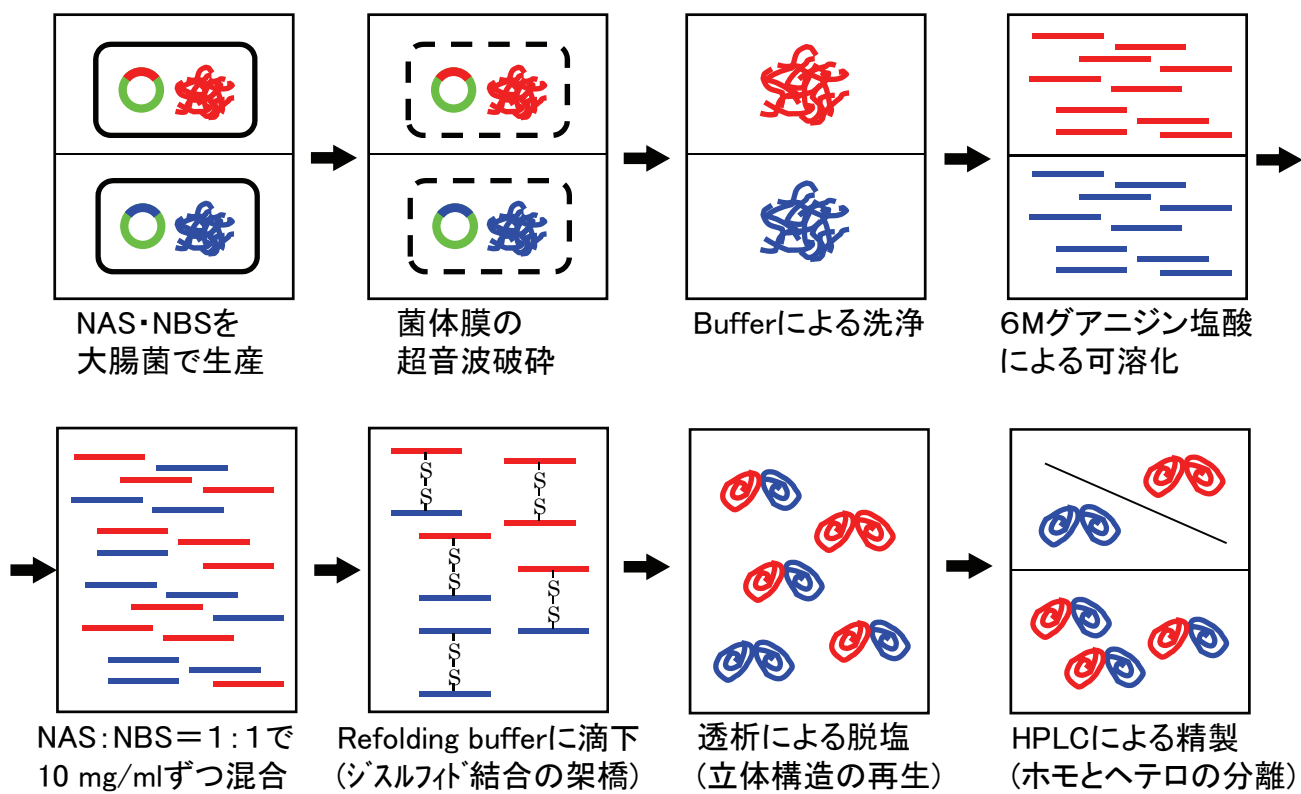


図2-2 大腸菌を用いた組換えネオクリンの発現・精製

横山卒業論文(2008)より抜粋、一部改変。

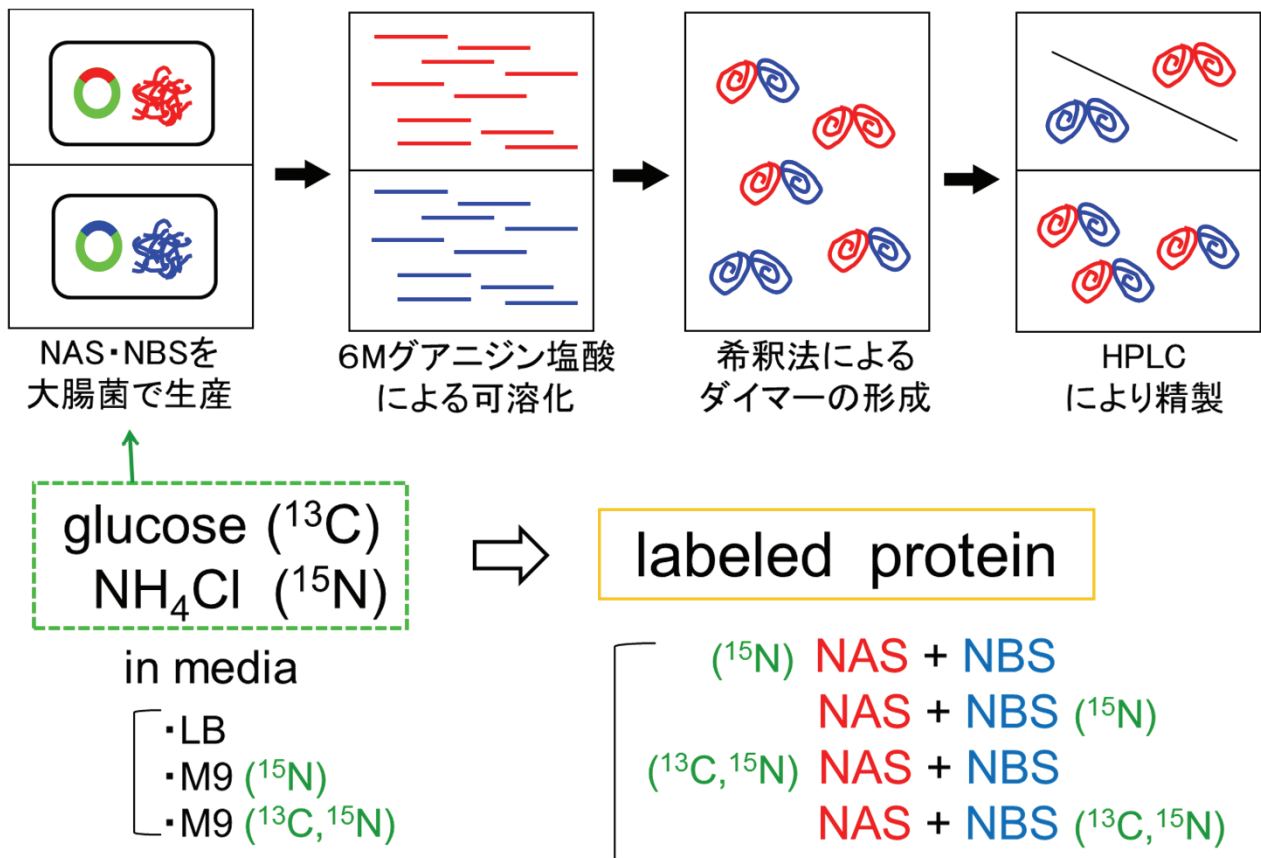


図2-3 大腸菌による安定同位体標識ネオクリンタンパク質産生の概要

NAS/NBSの片側サブユニットのみを安定同位体を含むM9培地で産生し、LB培地で産生したもう一方のサブユニットとダイマーを形成させた。片側サブユニットのみが安定同位体標識されたネオクリンタンパク質を作製できる。

2.3 結果

2.3.1 主鎖シグナルの帰属

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した野生型ネオクリンの NAS・NBS それぞれについて pH 3.0 および pH 4.0 で主鎖シグナルの帰属を行った(表 2-1、pH 3.0 のものを示す)。プロリンを除く NAS111 残基中 109 残基、NBS112 残基中 102 残基の主鎖シグナルを帰属した。

2.3.2 野生型ネオクリンの pH 滴定実験

NMR 法の応用例の 1 つに滴定実験がある。酵素を対象とした例を挙げると、基質を添加したときに 2D NMR スペクトル上で主鎖シグナルの化学シフトが変化する酵素上のアミノ酸残基を選別し、それらのアミノ酸残基を分子構造上にマッピングすることによって、酵素上の基質結合部位を探索できる(Okuda *et al.*, 2000; Hemmi *et al.*, 2009)。このような滴定実験は薬学の分野においても、標的タンパク質と薬剤候補物質の相互作用部位の探索などに利用されている。本研究ではネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化を検出する目的で、リガンド添加ではなく pH 変化によるネオクリンの 2D NMR スペクトル変化をしらべた (pH 滴定)。pH に依存して 2D NMR スペクトル上で主鎖シグナルの化学シフトが変化するネオクリンのアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングするとともに、それらのアミノ酸残基を分子構造上にマッピングすることで、pH に依存して立体構造変化すると考えられる特定の構造領域を検出することを目指した (Lee *et al.*, 2005; Sakurai and Goto *et al.*, 2007) (図 2-4 に方法の概要を記す)。

1) pH 3-7 での構造変化の解析

pH 滴定実験を行うことで、pH に依存して立体構造変化を生じると予想されるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングした。pH 3, 4, 5, 6, 7 のすべての pH において主鎖シグナルの帰属できているアミノ酸残基について、pH 3-7 の範囲での ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上の化学シフト変化の大きさを算出した。化学シフト変化の大きさが ^1H 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppm または ^{15}N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppm を示すアミノ酸残基を、pH に依存して化学シフトの変化するアミノ酸残基として選別した (スペクトル全体図を図 2-5、化学シフト変化チャートを図 2-6、化学シフト変化値の一覧を表 2-2 に示す)。NAS ではシグナル帰属できている 109 残基中 36 残基、NBS ではシグナル帰属できている 102 残基中 33 残基が選別された。さらに選別されたアミノ酸残基を天然ネオクリン結晶構造上にマッピングすることで、分子構造上の分布をしらべた。その結果、選別され

たアミノ酸残基は、pH 3-7 で側鎖がプロトン化される His 残基や Asp 残基自身およびその近傍残基を中心に分子構造上の様々な領域に散在しており、特定の構造領域には集合していなかった(図 2-7)。

この解析だけでは、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化に関与すると予想される、pH に依存して立体構造変化を生じるアミノ酸残基を十分に絞り込むことはできなかった。またそれらのアミノ酸残基が集合した特定の構造領域も検出することができなかった。

2) pH 5-7 での構造変化の解析

ネオクリンは pH 5-7 の弱酸性 pH 領域にて甘味強度を著しく変化させる(Nakajima *et al.*, 2006, 2008) (図 1-8B)。これより pH 5-7 の弱酸性領域において立体構造変化を生じると予想されるアミノ酸残基を選択的にスクリーニングすることで、ネオクリンの甘味強度変化を誘導しているアミノ酸残基群のみを検出できると考えた。

1)で選別した pH 3-7 での化学シフト変化値が $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppm または ^{15}N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppm を示すアミノ酸残基を対象として、pH 3-5 の酸性領域を中心に化学シフトが変化する残基から構成される「Group A」と、pH 5-7 の弱酸性領域を中心に化学シフトが変化する残基から構成される「Group B」の 2 群に分類した(図 2-8、図 2-9)。 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル上の $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向と ^{15}N 核方向の化学シフト変化についてそれぞれ解析を行った。いずれかの方向で「Group B」に分類され、かつ両方向で「Group A」には分類されない以下 23 種のアミノ酸残基を、pH 5-7 の弱酸性領域を中心に化学シフトが変化するアミノ酸残基、すなわち pH 5-7 の弱酸性領域において立体構造変化を生じると予想されるアミノ酸残基として選別した。なお「Group A」に分類されたものの、pH 3-5 の酸性領域だけではなく pH 5-7 の弱酸性領域でも著しい化学シフト変化値を示すアミノ酸残基として、NBS の Phe94 を例外的に選抜した。

NAS : L10, Y11, A12, G13, H14, S15, G19, H36, G37, R38

NBS : T9, H11, A12, D13, H14, S15, S50, G51, L54, Y65, H67, N69, F94

続いて選別されたアミノ酸残基を天然ネオクリン結晶構造上にマッピングすることで、分子構造上の分布を調べた。その結果、23 種のアミノ酸残基にはネオクリン分子中に存在する 5 つの His 残基周辺に位置する残基が多かった(図 2-10)。これより、pH 5-7 の弱酸性領域において His 残基周辺の局所構造変化が生じていることが示唆された。

3) 主鎖シグナルの帰属できていないアミノ酸残基

主鎖シグナルの帰属できたアミノ酸残基の大部分に対しては、pH 滴定実験を用いることによって、pH に依存した立体構造変化の大きさを予想することができた。しかし構造的なゆらぎが大きいためにそもそも主鎖シグナルが帰属できないアミノ酸残基が、以下に示すように NAS で 2 残基、NBS で 10 残基存在した(プロリンを除く)。

NAS : C29, C52

NBS : N27, K28, C29, N30, R47, R48, G49, C52, R53, V72

これらのアミノ酸残基について分子構造上の分布をしらべたところ、ほとんどが NBS サブユニット上の β 4-strand- β 5-strand 間の loop 領域、および β 6-strand- β 7-strand 間の loop 領域に集合していた(図 2-11)。これより β 4- β 5 loop, β 6- β 7 loop の 2 つの loop 領域は pH に依らず構造的な柔軟性が高いことが示され、それゆえ pH の影響を受けて立体構造変化を生じる可能性も考えられた。そこでこれらの loop 領域を構成するアミノ酸残基も pH 5-7 の弱酸性領域において立体構造変化を生じる可能性があるアミノ酸残基として選別しておいた。

以上より、ネオクリン分子上で pH 5-7 の弱酸性領域で立体構造変化を生じうるアミノ酸残基群を網羅的にスクリーニングできた。それらのアミノ酸残基群は

① 5 つの His 残基周辺領域 (図 2-10)

② NBS サブユニットの β 4- β 5 loop, β 6- β 7 loop (図 2-11)

の 2 つの局所構造領域を構成していた。これらのアミノ酸残基群および構造領域が pH に依存して立体構造変化を生じることによって、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化が誘導されている可能性が考えられた。

2.3.3 pH センサー一点変異体 NBS H11A の pH 滴定実験

野生型ネオクリンは pH に依存して甘味強度を変化させる。一方、ネオクリンのメイン pH センサーである NBS 11 番目の His 残基を Ala に置換した pH センサー変異体 NBS H11A は、pH に依らず強い甘味を呈するように性質が変化している(Nakajima *et al.*, 2011) (図 2-12A)。すなわち pH に依存した甘味強度の変化がほとんど生じない。野生型ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化が自身の立体構造変化に依るものと仮

定するならば、pH センサー変異体ではその立体構造変化が小さくなっていると予想できる。そこでネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化の指標である各アミノ酸残基の化学シフト変化に着目し、pH センサー変異体において pH に依存した化学シフト変化の大きさが減少するアミノ酸残基を、pH に依存した甘味強度変化を誘導している可能性が高いアミノ酸残基として探索することにした(図 2-12 B)。

1) 主鎖シグナルの帰属

¹³C/¹⁵N 標識した pH センサー変異体 NBS H11A の NAS・NBS それぞれについて pH 3.0 および pH 4.0 で主鎖シグナルの帰属を行った(表 2-3、pH 3.0 のものを示す)。プロリンを除く NAS 111 残基中 102 残基、NBS 112 残基中 103 残基の主鎖シグナルを帰属した。主鎖シグナルの帰属できなかったアミノ酸残基は以下の通りである。

NAS : C29, S50, Q51, C52, V71, V72, L101, W102, N113

NBS H11A : N27, K28, C29, N30, R47, R48, C52, R53, V72

2) pH 5-7 での構造変化の解析

pH センサー変異体 NBS H11A について、野生型と同様に pH 滴定実験を行った。pH 3-7 の範囲で主鎖シグナルの帰属できているすべてのアミノ酸残基について、化学シフト変化の大きさが ¹H 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppm または ¹⁵N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppm を示すアミノ酸残基を、pH に依存して化学シフトの変化するアミノ酸残基として選別した(スペクトル全体図を図 2-13、化学シフト変化チャートを図 2-14、化学シフト変化値の一覧を表 2-4 に示す)。

さらに野生型ネオクリンの場合と同様に、pH 5-7 の弱酸性領域を中心に化学シフトが変化する以下 19 種のアミノ酸残基を選別した(図 2-15)。

NAS : L10, Y11, A12, G13, H14, S15, G19, H36, G37, R38

NBS H11A : A11, A12, D13, H14, S15, S50, G51, H67, N69

選別されたアミノ酸残基を天然ネオクリン結晶構造上にマッピングすることで、分子構造上の分布をしらべた。その結果アミノ酸残基は、野生型ネオクリン同様に 5 つの His 残基周辺に集合していた(図 2-16)。

3) 野生型との比較

pH 5-7 の弱酸性領域を中心に化学シフト変化すると判別されたアミノ酸残基群について、野生型と pH センサー変異体 NBS H11A との結果を比較したところ、ほぼ同様のアミノ酸残基群が選別された。すなわち pH センサー変異体でも野生型とほぼ同様の pH に依存した立体構造変化が生じていると予想される。ただし、野生型では pH に依存して化学シフト変化を生じると判別された 3 種類のアミノ酸残基(Thr9、Leu54、Tyr65、すべて NBS)については、pH センサー変異体では pH に依存した化学シフト変化を生じると判別されなくなった。これら 3 種のアミノ酸残基はすべて変異を導入した His11 が存在する NBS 側の残基であり、His11 と空間的に遠くには位置していないものの、Leu54、Tyr65 の 2 残基は直接的に相互作用するほど近接しているわけではなかった(図 2-16)。これより pH センサー点変異体 NBS H11A では NBS 上の一部のアミノ酸残基群においてのみ野生型よりも立体構造変化が小さくなっていることが示された。

Number	Residue	HN	N	C α	C β	Number	Residue	HN	N	C α	C β
1	Asp	8.99	122.98	51.56	39.01	61	Asn	7.28	117.98	50.68	36.43
2	Ser	9.16	116.04	56.56	62.57	62	Leu	7.96	130.48	50.84	41.50
3	Val	7.49	117.84	56.90	33.28	63	Ile	8.59	123.76	56.50	40.10
4	Leu	9.20	129.65	51.28	44.92	64	Ile	8.78	122.70	57.81	37.37
5	Leu	8.32	124.85	50.45	41.83	65	Tyr	8.75	126.21	53.69	40.52
6	Ser	8.41	113.55	58.55	61.92	66	Asp	8.64	118.15	49.18	38.54
7	Gly	9.03	110.08	42.28	-	67	Asp	8.01	115.36	52.44	34.94
8	Gln	8.47	120.23	52.60	27.68	68	Asn	8.07	117.77	49.97	36.19
9	Thr	8.19	116.45	58.86	69.60	69	Asn	8.54	114.00	52.41	33.95
10	Leu	9.40	129.50	50.29	42.35	70	Met	8.26	117.47	51.51	29.95
11	Tyr	8.32	124.85	56.59	36.81	71	Val	8.54	123.65	61.07	-
12	Ala	8.22	121.09	51.67	16.07	72	Val	9.04	128.77	60.30	30.65
13	Gly	9.55	110.22	42.33	-	73	Trp	7.66	120.32	55.17	30.81
14	His	8.44	118.96	52.99	27.51	74	Gly	6.80	112.41	42.89	-
15	Ser	8.33	111.58	55.55	64.28	75	Ser	8.42	115.33	56.72	-
16	Leu	9.10	122.19	51.05	41.47	76	Asp	7.98	118.26	50.60	32.96
17	Thr	8.59	114.39	58.07	69.27	77	Cys	6.83	116.45	52.29	37.09
18	Ser	8.55	119.28	54.83	62.52	78	Trp	8.04	126.90	53.78	28.93
19	Gly	9.02	116.97	44.76	-	79	Gly	8.87	108.67	41.07	-
20	Ser	9.14	122.38	56.20	60.44	80	Asn	8.27	118.23	50.56	36.00
21	Tyr	8.62	121.64	55.74	38.69	81	Asn	8.78	120.04	52.14	36.49
22	Thr	8.87	117.08	58.64	70.42	82	Gly	9.18	113.41	44.53	-
23	Leu	9.35	128.58	50.96	44.05	83	Thr	8.15	121.20	60.92	67.46
24	Thr	9.40	122.99	58.97	69.80	84	Tyr	8.55	123.13	53.57	39.43
25	Ile	7.62	124.03	52.82	37.62	85	Ala	8.83	119.92	48.03	17.45
26	Gln	8.60	125.83	52.80	27.45	86	Leu	9.40	126.62	51.56	40.24
27	Asn	9.11	119.24	53.89	35.53	87	Val	9.46	127.17	58.17	32.66
28	Asn	7.61	114.38	49.89	-	88	Leu	8.78	128.13	51.44	39.69
29	Cys	-	-	58.67	-	89	Gln	8.81	126.01	52.87	27.44
30	Asn	7.76	118.65	48.45	37.11	90	Gln	8.86	118.54	55.97	25.56
31	Leu	7.94	129.84	51.04	40.80	91	Asp	7.63	114.38	50.01	36.55
32	Val	8.76	124.20	58.24	33.00	92	Gly	7.80	110.20	41.02	-
33	Lys	9.13	126.37	51.53	34.43	93	Leu	7.22	121.53	52.40	39.15
34	Tyr	9.86	126.77	54.05	40.27	94	Phe	7.13	118.42	51.19	37.14
35	Gln	9.03	119.50	52.18	28.54	95	Val	8.49	124.81	57.94	33.90
36	His	9.20	125.95	53.95	24.66	96	Ile	9.01	124.39	57.93	36.75
37	Gly	8.73	103.67	43.04	-	97	Tyr	9.73	127.86	54.52	40.34
38	Arg	8.02	121.34	51.95	29.22	98	Gly	8.47	105.36	43.95	-
39	Gln	9.18	127.12	54.92	25.62	99	Pro	-	-	59.72	29.47
40	Ile	9.18	123.18	58.04	37.11	100	Val	7.90	121.72	63.05	29.50
41	Trp	7.91	122.21	55.82	29.56	101	Leu	9.57	131.45	53.92	41.43
42	Ala	6.64	126.54	48.04	20.16	102	Trp	7.21	118.02	51.47	-
43	Ser	8.26	112.77	57.05	58.14	103	Pro	-	-	59.07	28.57
44	Asp	7.93	117.39	51.51	32.76	104	Leu	8.26	123.44	50.52	38.52
45	Thr	7.56	106.33	57.58	64.53	105	Gly	8.42	115.60	43.21	-
46	Asp	8.15	117.41	51.02	35.80	106	Leu	8.40	125.91	54.43	38.86
47	Gly	9.17	111.81	42.85	-	107	Asn	8.03	113.64	50.44	36.48
48	Gln	7.67	117.09	53.68	25.69	108	Gly	8.09	108.39	43.19	-
49	Gly	7.30	104.04	42.65	-	109	Cys	8.64	120.14	50.05	37.06
50	Ser	8.67	115.07	54.74	62.78	110	Arg	8.93	130.29	56.41	28.07
51	Gln	8.83	120.18	53.08	30.30	111	Ser	7.83	116.50	55.57	61.16
52	Cys	-	-	-	-	112	Leu	8.04	124.04	52.65	39.72
53	Arg	8.79	114.66	51.13	29.95	113	Asn	7.95	122.35	50.99	-
54	Leu	8.93	123.95	50.31	44.01						
55	Thr	9.46	121.73	57.93	68.98						
56	Leu	7.14	126.68	49.99	42.08						
57	Arg	8.90	125.17	53.57	29.87						
58	Ser	9.21	119.69	58.39	60.44						
59	Asp	7.26	115.80	49.58	36.78						
60	Gly	7.20	106.90	41.43	-						

表2-1 (A) 野生型ネオクリンNASのシグナル帰属 (pH 3.0)

各アミノ酸残基の化学シフト値を示す。

Number	Residue	HN	N	C α	C β	Number	Residue	HN	N	C α	C β
1	Asp	9.21	123.11	51.81	38.59	61	Asn	7.03	116.99	50.46	36.52
2	Asn	8.97	115.93	50.68	35.51	62	Leu	7.69	130.20	50.83	42.06
3	Val	7.43	118.08	57.45	33.28	63	Val	8.56	123.48	58.14	34.44
4	Leu	9.27	130.07	51.20	44.67	64	Ile	8.68	123.03	57.59	37.83
5	Leu	8.42	124.89	50.59	40.44	65	Tyr	8.35	124.88	52.88	40.50
6	Ser	8.30	113.99	57.94	61.36	66	Asp	8.39	118.07	50.17	39.70
7	Gly	9.21	110.41	42.33	-	67	His	8.11	113.31	55.31	25.35
8	Gln	8.46	119.92	52.55	27.75	68	Asn	7.73	118.12	49.76	36.29
9	Thr	8.32	115.89	58.68	69.27	69	Asn	8.35	113.34	52.46	33.75
10	Leu	9.56	130.64	50.47	41.99	70	Asn	8.71	117.09	50.83	36.09
11	His	8.64	123.33	53.95	26.75	71	Asp	8.86	121.89	49.96	-
12	Ala	8.23	120.17	51.93	17.09	72	Val	-	-	60.60	-
13	Asp	9.82	118.50	53.57	35.79	73	Trp	7.78	120.18	55.47	30.27
14	His	8.43	117.52	52.97	27.16	74	Gly	6.47	112.07	43.43	-
15	Ser	8.29	111.35	55.50	64.10	75	Ser	8.33	115.16	56.71	61.38
16	Leu	8.99	121.53	50.78	42.05	76	Ala	7.99	121.03	49.57	12.99
17	Gln	8.42	120.04	52.66	30.61	77	Cys	6.75	115.04	51.28	34.01
18	Ala	8.71	126.97	49.52	19.04	78	Trp	7.47	125.39	52.76	28.89
19	Gly	9.00	112.98	44.44	-	79	Gly	8.98	110.46	40.95	-
20	Ala	9.08	129.86	50.02	16.86	80	Asp	8.23	119.86	51.41	37.70
21	Tyr	8.64	118.76	55.57	38.29	81	Asn	8.83	120.51	52.09	36.21
22	Thr	8.82	117.07	58.47	70.08	82	Gly	8.89	113.59	44.95	-
23	Leu	9.23	128.40	50.95	44.55	83	Lys	7.95	126.68	54.36	32.67
24	Thr	9.47	123.63	59.21	69.82	84	Tyr	8.34	119.18	53.83	40.86
25	Ile	7.62	122.98	51.84	37.37	85	Ala	8.84	121.57	48.52	18.14
26	Gln	8.47	126.99	52.84	-	86	Leu	9.30	126.05	51.36	40.79
27	Asn	-	-	-	-	87	Val	9.52	126.84	57.83	32.87
28	Lys	-	-	-	-	88	Leu	8.86	128.06	51.63	40.01
29	Cys	-	-	-	-	89	Gln	8.76	125.29	52.41	27.08
30	Asn	-	-	48.95	36.16	90	Lys	8.77	117.66	56.29	29.74
31	Leu	7.92	130.24	50.86	40.71	91	Asp	7.45	114.53	50.33	37.11
32	Val	8.76	123.97	58.46	32.67	92	Gly	7.83	110.82	40.88	-
33	Lys	9.12	126.62	51.41	34.78	93	Arg	7.46	120.37	53.69	27.97
34	Tyr	9.88	126.42	53.63	39.45	94	Phe	7.56	118.38	51.44	37.61
35	Gln	9.23	120.61	51.61	29.05	95	Val	8.47	124.05	58.39	33.75
36	Asn	9.62	126.75	52.30	35.17	96	Ile	9.40	125.52	58.14	36.78
37	Gly	8.53	102.26	42.96	-	97	Tyr	9.63	127.06	54.51	40.02
38	Arg	7.99	121.38	51.87	29.16	98	Gly	8.21	105.40	43.67	-
39	Gln	9.25	127.80	55.05	25.31	99	Pro	-	-	59.66	30.02
40	Ile	9.08	120.58	58.25	38.08	100	Val	7.84	120.50	63.16	29.91
41	Trp	8.02	123.58	56.12	29.52	101	Leu	9.65	129.51	53.71	41.05
42	Ala	6.68	126.21	48.32	19.87	102	Trp	7.38	115.90	54.18	31.47
43	Ser	8.26	113.05	57.10	60.19	103	Ser	6.57	118.58	54.21	63.06
44	Asn	7.82	117.12	51.01	32.93	104	Leu	6.86	118.54	52.85	39.74
45	Thr	7.57	106.92	57.03	64.21	105	Gly	7.97	111.60	41.45	-
46	Asp	7.46	119.51	53.09	38.79	106	Pro	-	-	61.07	28.85
47	Arg	-	-	-	-	107	Asn	8.85	118.12	51.20	35.02
48	Arg	-	-	-	-	108	Gly	7.51	104.70	43.96	-
49	Gly	-	-	42.90	-	109	Cys	8.29	118.40	51.54	35.21
50	Ser	8.87	113.47	54.82	63.10	110	Arg	9.01	129.26	53.96	27.16
51	Gly	8.26	114.45	45.12	-	111	Arg	7.59	121.62	52.83	28.08
52	Cys	-	-	-	-	112	Val	8.16	122.34	59.85	29.71
53	Arg	-	-	50.96	-	113	Asn	8.40	122.56	50.51	36.46
54	Leu	8.69	123.08	50.36	44.54	114	Gly	8.23	110.11	42.82	-
55	Thr	9.40	122.49	58.37	69.25						
56	Leu	7.05	126.88	50.03	41.81						
57	Leu	9.06	126.64	52.18	39.53						
58	Ser	8.88	116.87	58.49	60.13						
59	Asp	7.15	114.92	48.96	35.37						
60	Gly	7.39	108.10	41.50	-						

表2-1 (B) 野生型ネオクリンNBSのシグナル帰属 (pH 3.0)

各アミノ酸残基の化学シフト値を示す。

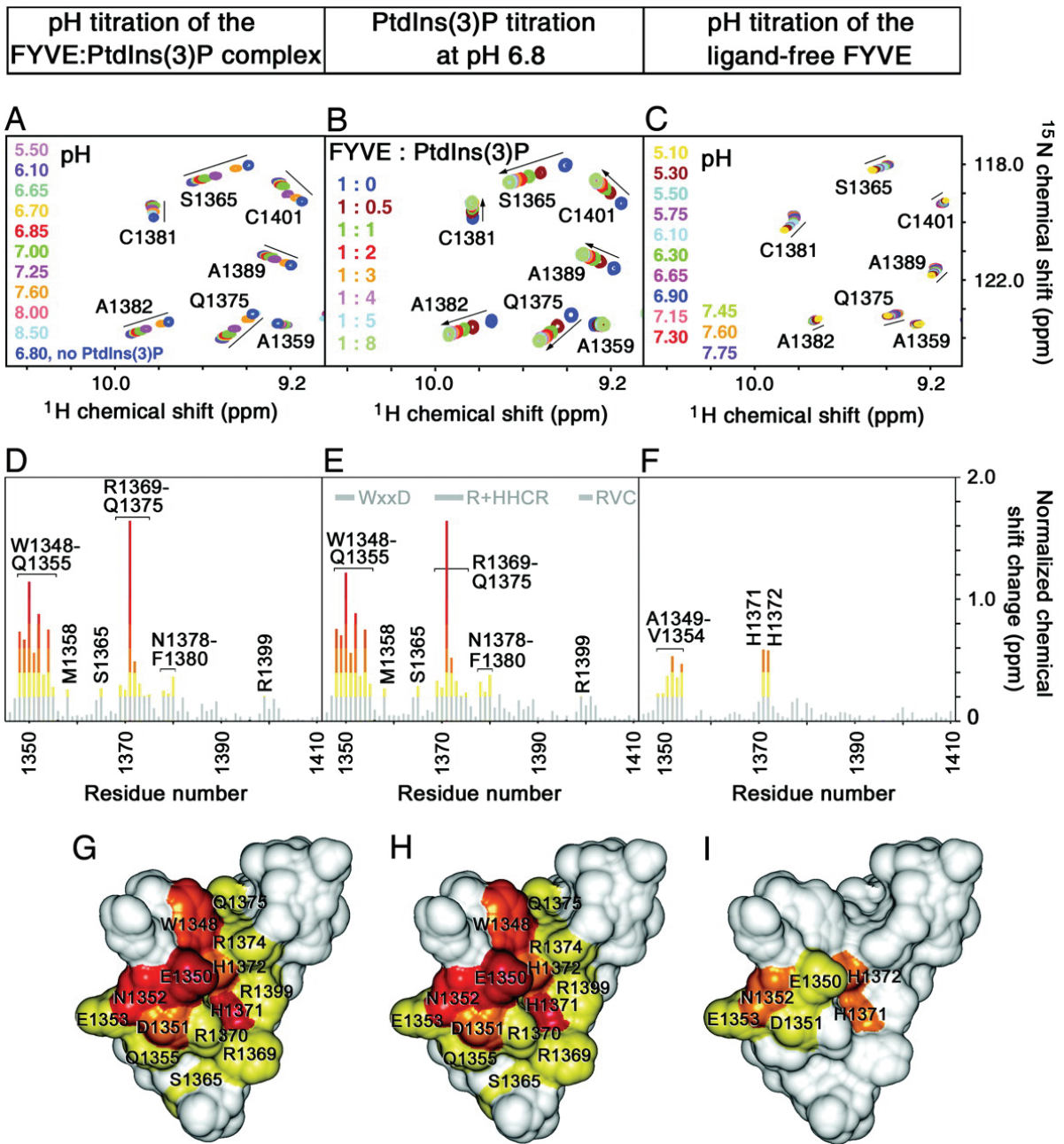


図2-4 pH滴定実験の例図

A-C: pH変化およびリガンド滴定に依る ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上での各アミノ酸残基の主鎖シグナルの化学シフト変化

D-F: 各アミノ酸残基の主鎖シグナルについて、pHに依存した化学シフト変化の大きさを示したチャート図

G-I: pHに依存して化学シフトの変化するアミノ酸残基の結晶構造上へのマッピング
図はLee *et al.*, *PNAS.*, 2005より引用。

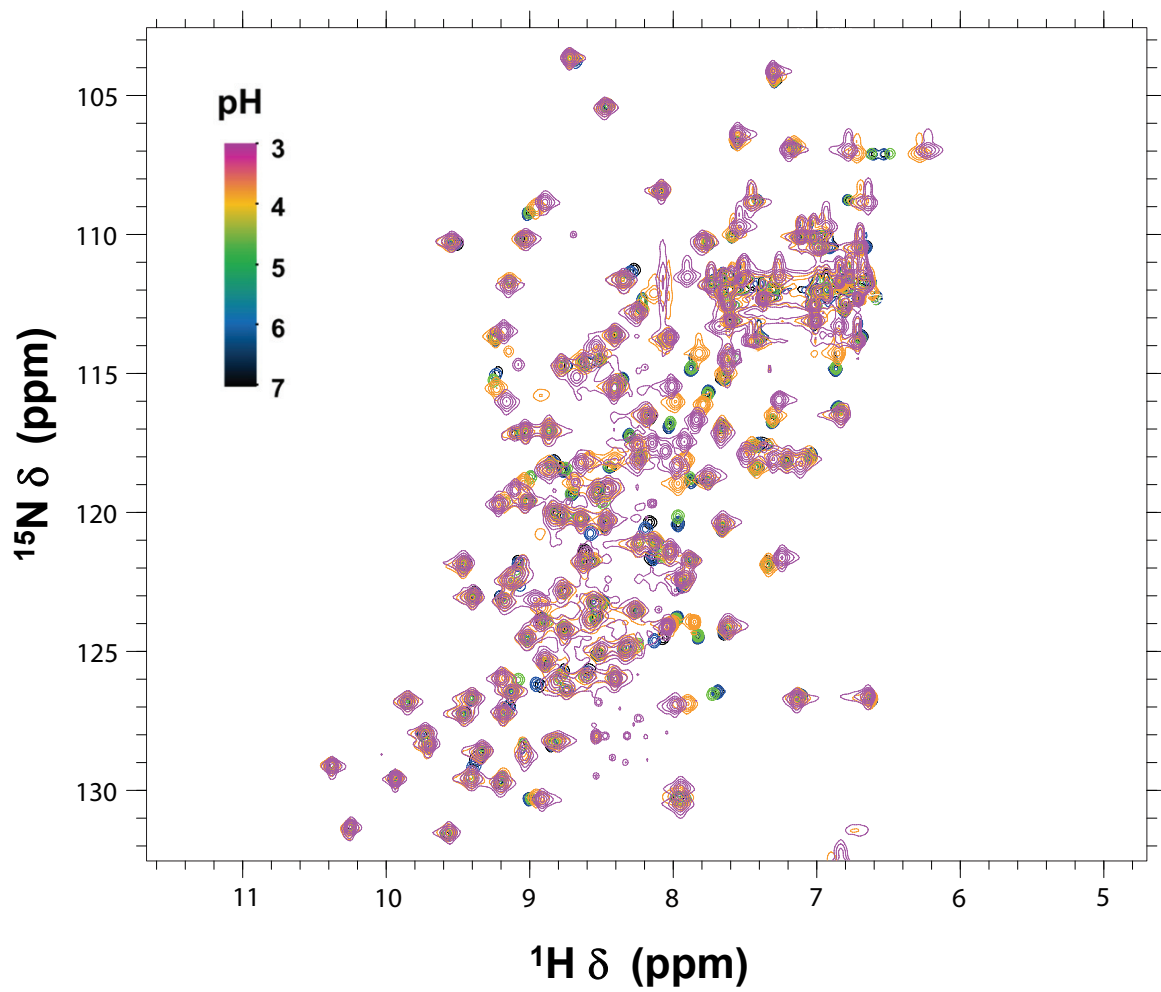


図2-5 (A) 野生型ネオクリンのpHに依存した ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルの変化

NAS(酸性サブユニット)のものを図示する。

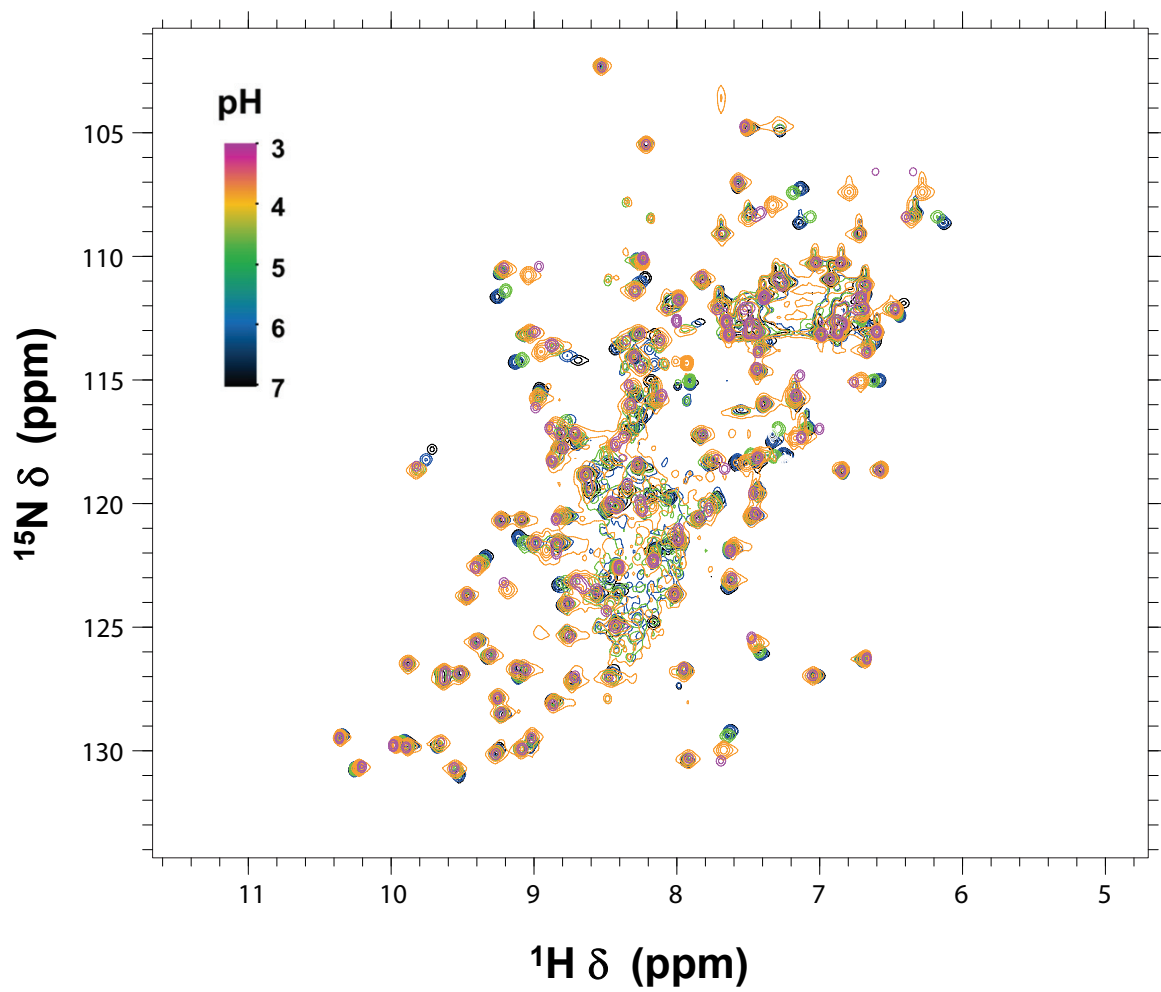


図2-5 (B) 野生型ネオクリンのpHに依存した ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルの変化

NBS(塩基性サブユニット)のものを図示する。

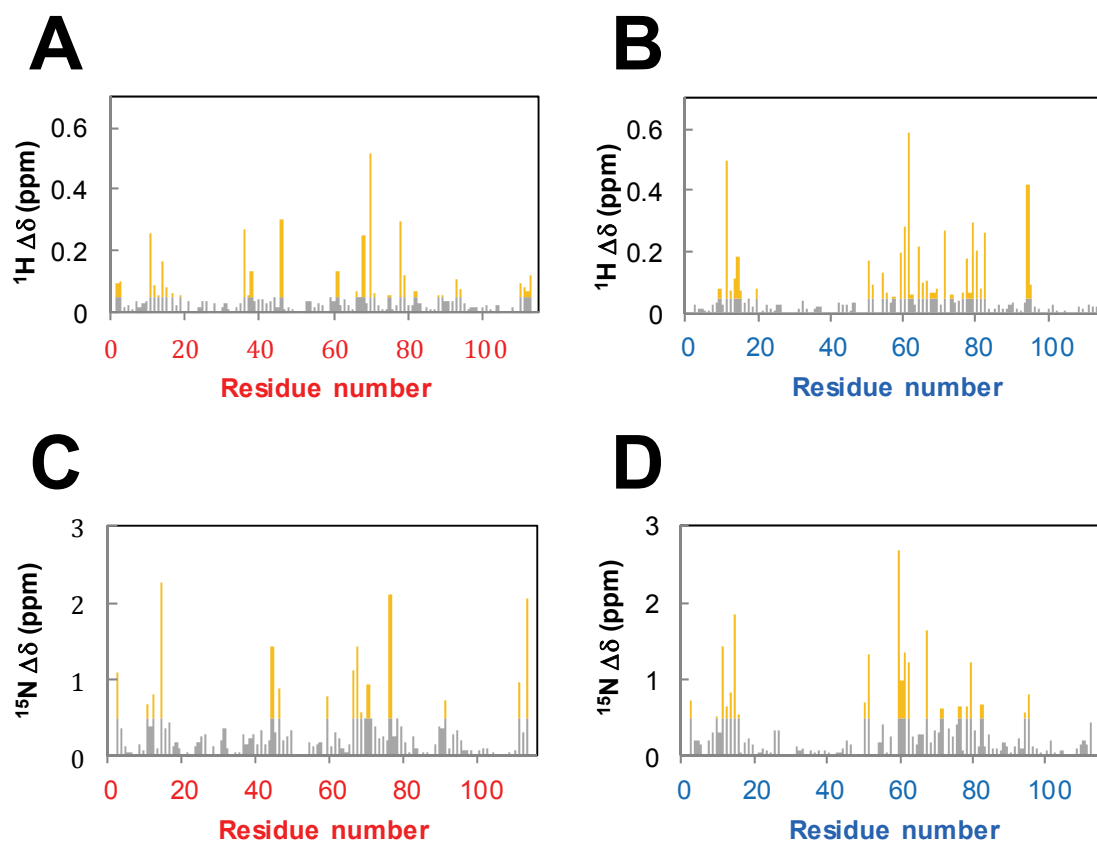
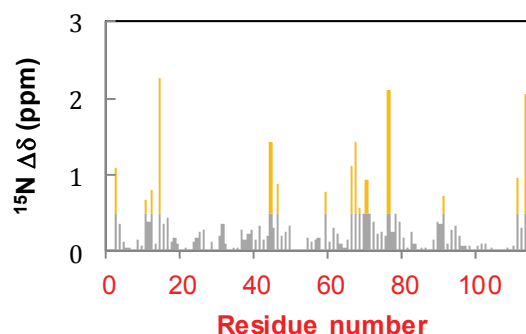
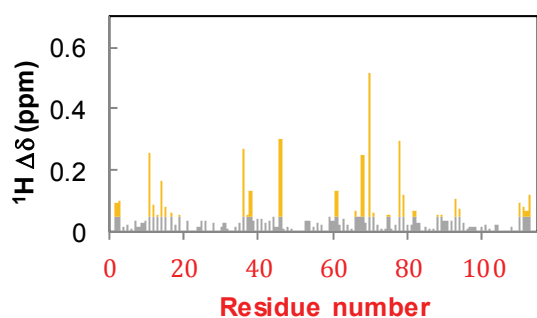


図2-6 野生型ネオクリンを構成するアミノ酸残基のpH 3-7での化学シフト変化値

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上の化学シフト変化値を算出した。 ^1H 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppmまたは ^{15}N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppmを示すアミノ酸残基を橙色で示した。

- A: NAS ^1H 核方向の化学シフト変化値
- B: NBS ^1H 核方向の化学シフト変化値
- C: NAS ^{15}N 核方向の化学シフト変化値
- D: NBS ^{15}N 核方向の化学シフト変化値

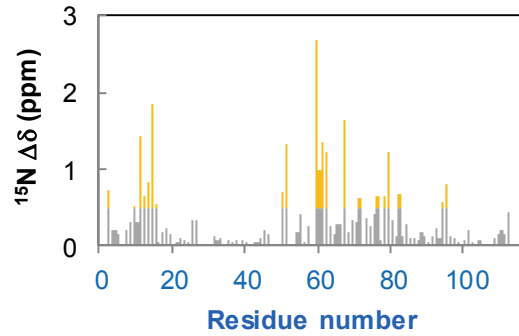
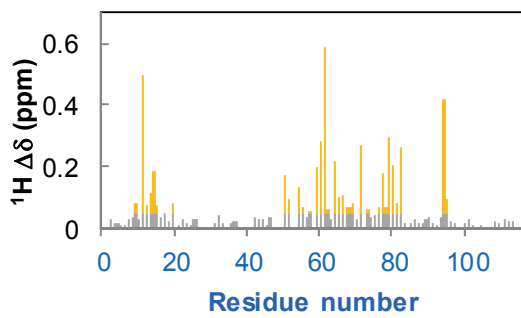


Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$	Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$	Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$
1	Asp	-	-	41	Trp	0.039	0.331	81	Asn	0.021	0.061
2	Ser	0.092	1.086	42	Ala	0.027	0.152	82	Gly	0.065	0.254
3	Val	0.103	0.373	43	Ser	0.035	0.198	83	Thr	0.027	0.105
4	Leu	0.020	0.139	44	Asp	0.049	1.439	84	Tyr	0.004	0.034
5	Leu	0.025	0.049	45	Thr	0.016	0.304	85	Ala	0.014	0.043
6	Ser	0.010	0.054	46	Asp	0.299	0.888	86	Leu	0.009	0.038
7	Gly	0.038	0.022	47	Gly	0.012	0.199	87	Val	0.010	0.027
8	Gln	0.016	0.156	48	Gln	0.017	0.268	88	Leu	0.053	0.141
9	Thr	0.026	0.085	49	Gly	0.010	0.346	89	Gln	0.050	0.388
10	Leu	0.038	0.664	50	Ser	-	-	90	Gln	0.033	0.353
11	Tyr	0.254	0.389	51	Gln	-	-	91	Asp	0.034	0.718
12	Ala	0.087	0.800	52	Cys	-	-	92	Gly	0.037	0.091
13	Gly	0.051	0.104	53	Arg	0.038	0.016	93	Leu	0.109	0.279
14	His	0.166	2.261	54	Leu	0.037	0.171	94	Phe	0.077	0.345
15	Ser	0.081	0.364	55	Thr	0.015	0.124	95	Val	0.030	0.192
16	Leu	0.006	0.442	56	Leu	0.028	0.141	96	Ile	0.010	0.079
17	Thr	0.059	0.132	57	Arg	0.023	0.178	97	Tyr	0.019	0.068
18	Ser	0.022	0.187	58	Ser	-	-	98	Gly	0.018	0.085
19	Gly	0.050	0.105	59	Asp	0.049	0.769	99	iPro	-	-
20	Ser	-	-	60	Gly	0.036	0.125	100	Val	0.014	0.070
21	Tyr	0.035	0.047	61	Asn	0.130	0.316	101	Leu	0.023	0.096
22	Thr	0.004	0.016	62	Leu	0.023	0.240	102	Trp	0.010	0.099
23	Leu	0.006	0.116	63	Ile	0.045	0.095	103	Pro	-	-
24	Thr	0.017	0.174	64	Ile	0.022	0.057	104	Leu	0.021	0.056
25	Ile	0.037	0.254	65	Tyr	0.008	0.142	105	Gly	-	-
26	Gln	0.035	0.293	66	Asp	0.071	1.124	106	Leu	-	-
27	Asn	-	-	67	Asp	0.046	1.437	107	Asn	-	-
28	Asn	0.028	0.136	68	Asn	0.252	0.562	108	Gly	0.017	0.047
29	Cys	-	-	69	Asn	0.030	0.484	109	Cys	0.005	0.021
30	Asn	0.017	0.202	70	Met	0.516	0.935	110	Arg	0.095	0.064
31	Leu	0.029	0.365	71	Val	0.059	0.484	111	Ser	0.079	0.972
32	Val	0.011	0.100	72	Val	0.024	0.396	112	Leu	0.066	0.296
33	Lys	0.003	0.026	73	Trp	0.010	0.235	113	Asn	0.119	2.053
34	Tyr	0.013	0.057	74	Gly	0.011	0.248				
35	Gln	0.031	0.048	75	Ser	0.058	0.199				
36	His	0.269	0.277	76	Asp	0.010	2.114				
37	Gly	0.052	0.165	77	Cys	0.023	0.267				
38	Arg	0.132	0.229	78	Trp	0.298	0.487				
39	Gln	0.039	0.288	79	Gly	0.120	0.399				
40	Ile	0.040	0.154	80	Asn	0.025	0.173				

表2-2 (A) 野生型ネオクリンのNASを構成するアミノ酸残基のpH 3-7での化学シフト変化値

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上の化学シフト変化値を算出した。 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppmまたは ^{15}N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppmを示すアミノ酸残基を橙色で示した。

またpH 3-7のいずれかのpHでシグナル帰属ができなかったアミノ酸残基を紫色で示した。



Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$	Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$	Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$
1	Asp	-	-	41	Trp	0.004	0.021	81	Asn	0.081	0.127
2	Asn	0.028	0.726	42	Ala	0.036	0.048	82	Gly	0.260	0.676
3	Val	0.014	0.200	43	Ser	0.032	0.043	83	Lys	0.015	0.127
4	Leu	0.020	0.212	44	Asn	0.031	0.107	84	Tyr	0.005	0.293
5	Leu	0.013	0.157	45	Thr	0.008	0.197	85	Ala	0.020	0.099
6	Ser	0.008	0.032	46	Asp	0.039	0.146	86	Leu	0.029	0.114
7	Gly	0.030	0.213	47	Arg	-	-	87	Val	0.014	0.064
8	Gln	0.037	0.308	48	Arg	-	-	88	Leu	0.016	0.172
9	Thr	0.085	0.528	49	Gly	-	-	89	Gln	0.030	0.121
10	Leu	0.032	0.300	50	Ser	0.175	0.708	90	Lys	0.036	0.057
11	His	0.494	1.437	51	Gly	0.097	1.318	91	Asp	0.014	0.119
12	Ala	0.074	0.647	52	Cys	-	-	92	Gly	0.010	0.221
13	Asp	0.112	0.841	53	Arg	-	-	93	Arg	0.037	0.109
14	His	0.184	1.845	54	Leu	0.136	0.171	94	Phe	0.419	0.567
15	Ser	0.074	0.543	55	Thr	0.070	0.421	95	Val	0.094	0.816
16	Leu	0.034	0.056	56	Leu	0.038	0.044	96	Ile	0.020	0.137
17	Gln	0.049	0.181	57	Leu	0.058	0.250	97	Tyr	0.015	0.092
18	Ala	0.026	0.225	58	Ser	-	-	98	Gly	0.005	0.062
19	Gly	0.080	0.146	59	Asp	0.198	2.672	99	Pro	-	-
20	Ala	0.012	0.010	60	Gly	0.280	0.987	100	Val	-	-
21	Tyr	0.011	0.048	61	Asn	0.590	1.347	101	Leu	0.029	0.196
22	Thr	0.027	0.090	62	Leu	0.065	1.211	102	Trp	0.012	0.052
23	Leu	0.018	0.067	63	Val	0.027	0.256	103	Ser	0.012	0.061
24	Thr	0.012	0.062	64	Ile	0.217	0.149	104	Leu	0.013	0.074
25	Ile	0.031	0.344	65	Tyr	0.102	0.286	105	Gly	0.019	0.108
26	Gln	0.028	0.330	66	Asp	0.110	0.277	106	Pro	-	-
27	Asn	-	-	67	His	0.071	1.647	107	Asn	-	-
28	Lys	-	-	68	Asn	0.066	0.191	108	Gly	0.022	0.096
29	Cys	-	-	69	Asn	0.079	0.344	109	Cys	0.015	0.158
30	Asn	-	-	70	Asn	0.030	0.305	110	Arg	0.006	0.200
31	Leu	0.015	0.137	71	Asp	0.267	0.636	111	Arg	0.029	0.146
32	Val	0.040	0.081	72	Val	-	-	112	Val	0.021	0.438
33	Lys	0.018	0.090	73	Trp	-	-	113	Asn	0.025	0.035
34	Tyr	0.002	0.013	74	Gly	0.033	0.258	114	Gly	0.043	0.148
35	Gln	0.020	0.078	75	Ser	0.045	0.403				
36	Asn	0.021	0.055	76	Ala	0.069	0.661				
37	Gly	0.022	0.076	77	Cys	0.177	0.077				
38	Arg	0.005	0.023	78	Trp	0.066	0.642				
39	Gln	0.004	0.080	79	Gly	0.294	1.225				
40	Ile	0.006	0.050	80	Asp	0.203	0.339				

表2-2 (B) 野生型ネオクリンのNBSを構成するアミノ酸残基のpH 3-7での化学シフト変化値

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上の化学シフト変化値を算出した。 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppmまたは ^{15}N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppmを示すアミノ酸残基を橙色で示した。

またpH 3-7のいずれかのpHでシグナル帰属ができなかったアミノ酸残基を紫色で示した。

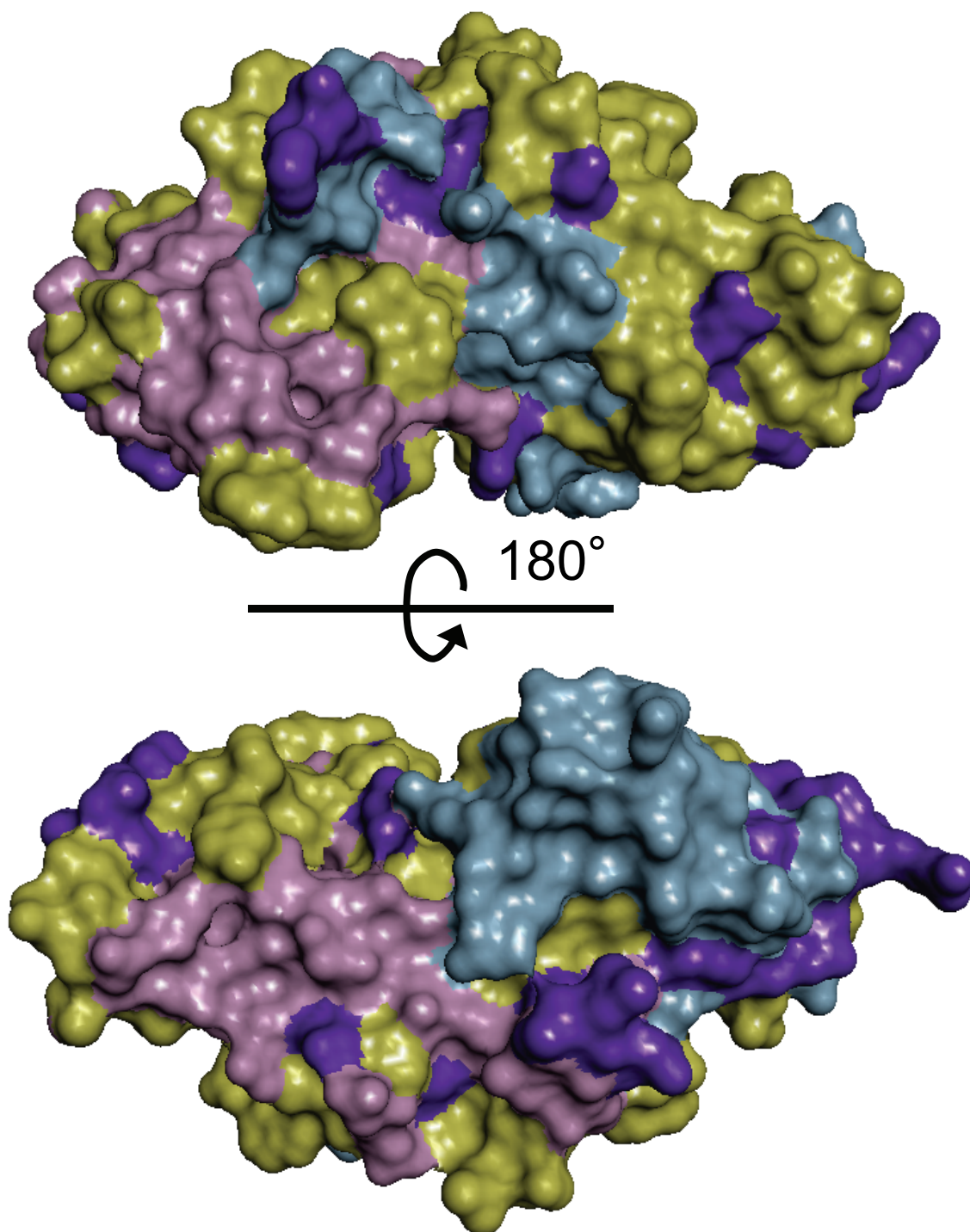


図2-7 野生型ネオクリン分子上でpH 3-7の範囲で化学シフト変化するアミノ酸残基

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上で化学シフト変化するると判別されたアミノ酸残基を、結晶構造上にマッピングし、黄色で示した。またpH 3-7のいずれかのpHでシグナル帰属ができないためにpH滴定が適用できなかったアミノ酸残基を紫色で示した。なお、NAS分子表面をマゼンタ、NBS分子表面をシアンで色づけしている。

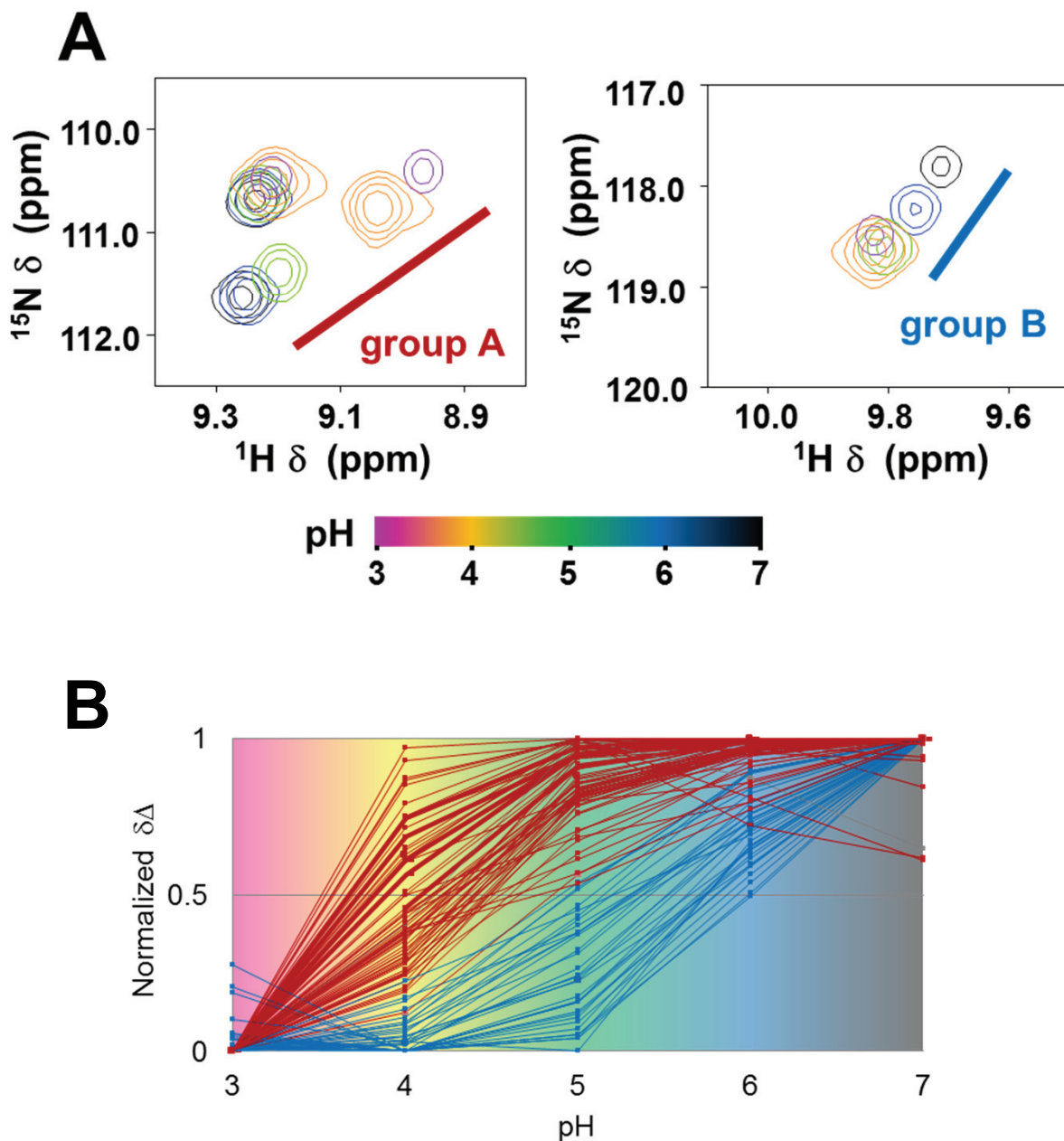


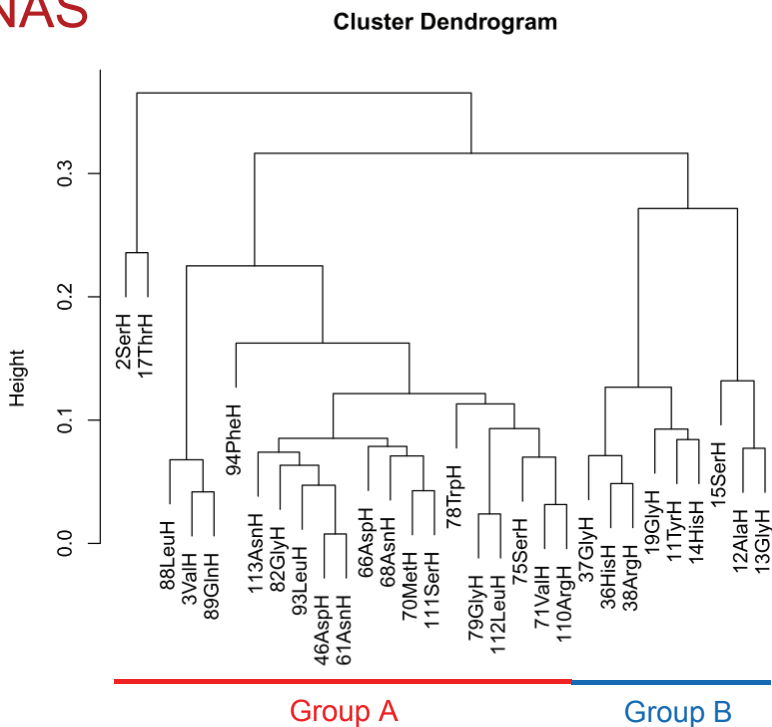
図2-8 pHに依存して化学シフト変化するアミノ酸残基のクラスター分け

A: pH 3-5の酸性領域を中心に化学シフト変化する「Group A」のアミノ酸残基と、pH 5-7の弱酸性領域を中心に化学シフト変化する「Group B」のアミノ酸残基の一例

B: クラスター分けの模式図

pH 3-5の酸性領域を中心に化学シフト変化する「Group A」のアミノ酸残基を赤色、pH5-7の弱酸性領域を中心に化学シフト変化する「Group B」のアミノ酸残基を青色でそれぞれ示した。

NAS



NBS

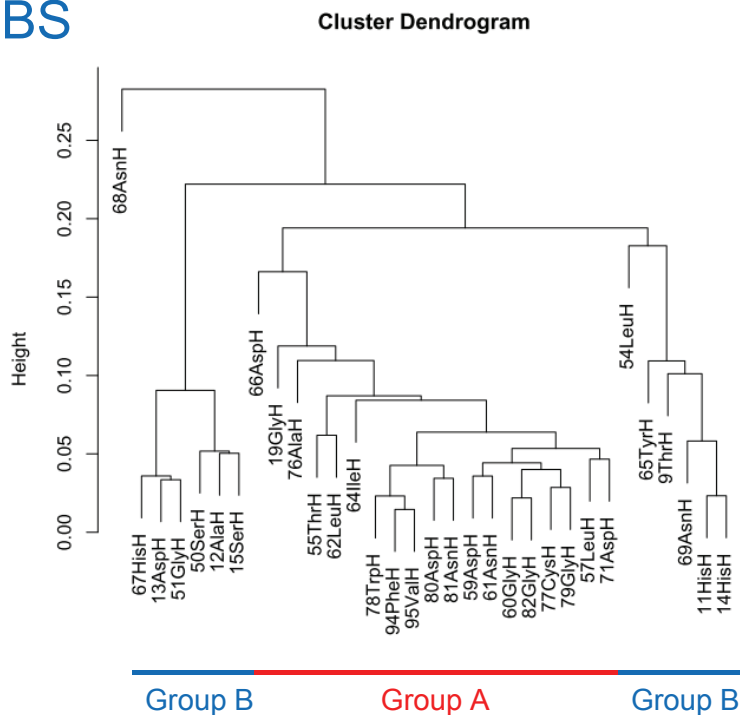
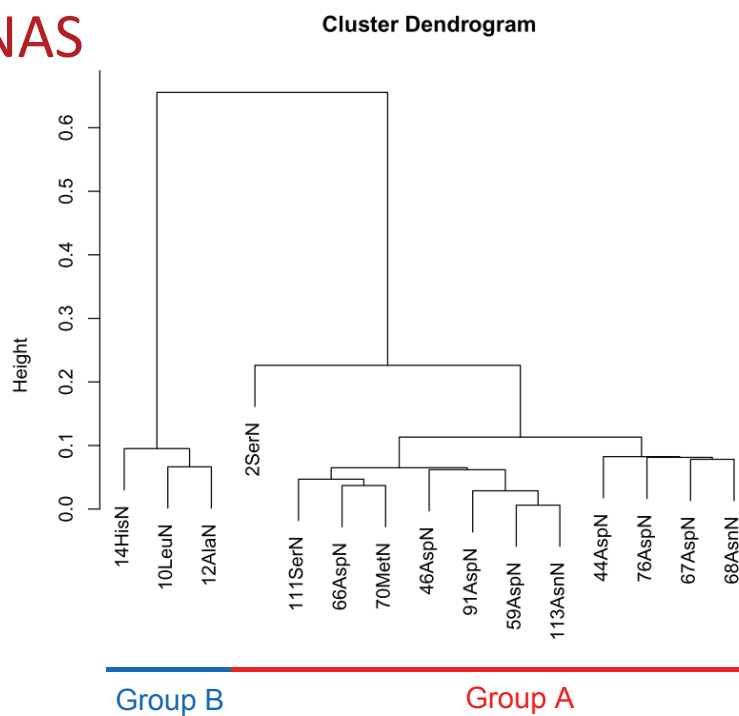


図2-9 (A) pHに依存して化学シフト変化するアミノ酸残基のクラスター分け ($^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向)

NAS



NBS

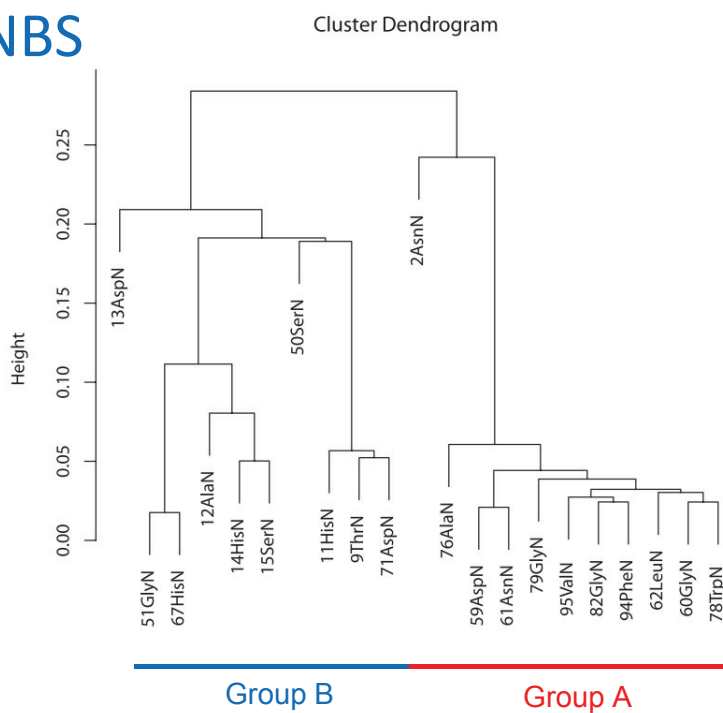


図2-9 (B) pHに依存して化学シフト変化するアミノ酸残基のクラスター分け (^{15}N 核方向)

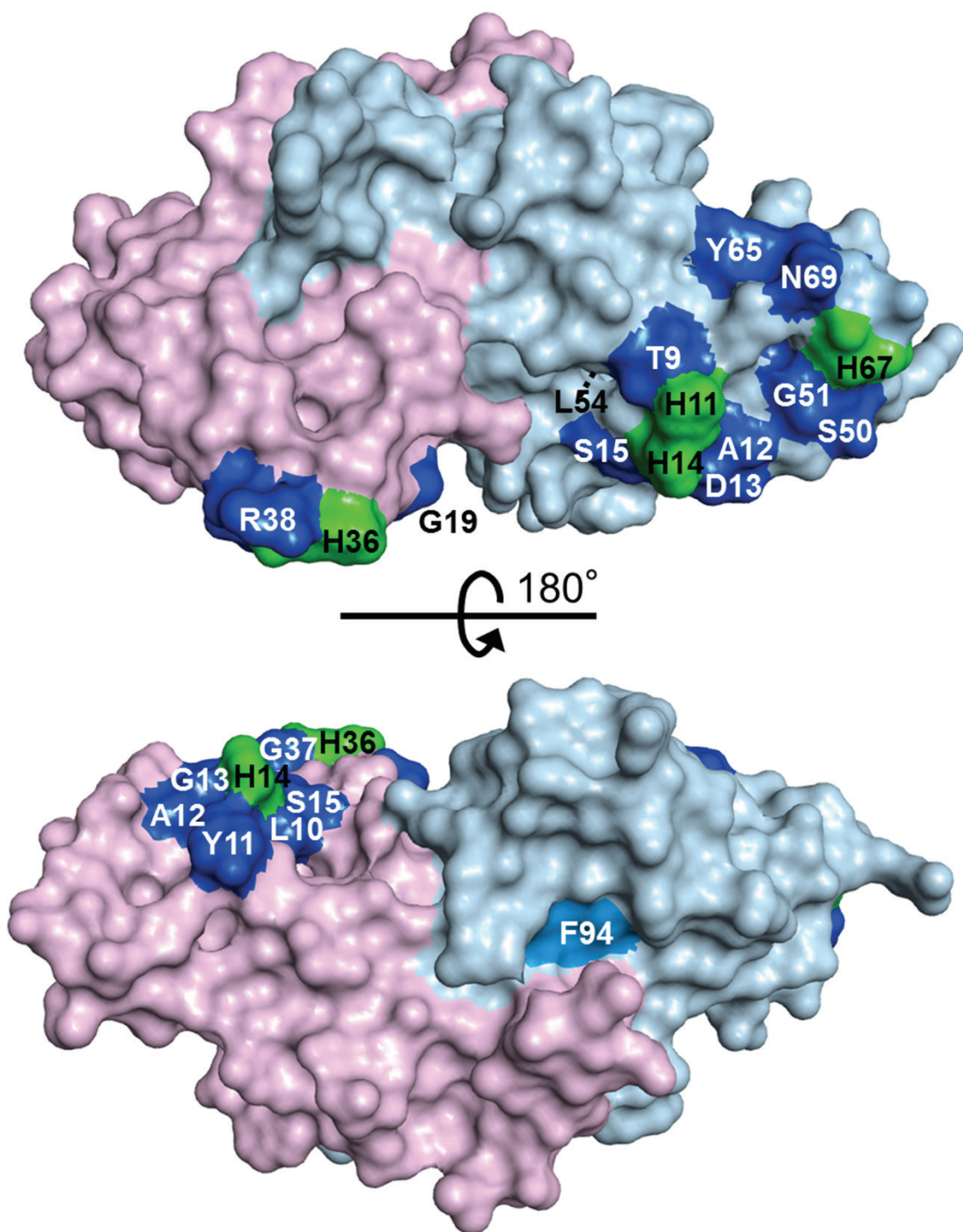


図2-10 野生型ネオクリン分子上でpH 5-7の範囲を中心に化学シフト変化するアミノ酸残基

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上でpH 5-7の弱酸性領域を中心に化学シフト変化すると判別されたアミノ酸残基を、結晶構造上にマッピングし、青色で示した。そのうち5つのHis残基は緑色で示している。またpH 3-5の範囲でも化学シフト変化が大きいものの、pH 5-7の範囲でも著しい化学シフト変化値を示すアミノ酸残基として、NBSのPhe94を選抜した。なお、NAS分子表面をマゼンタ、NBS分子表面をシアンで色づけしている。

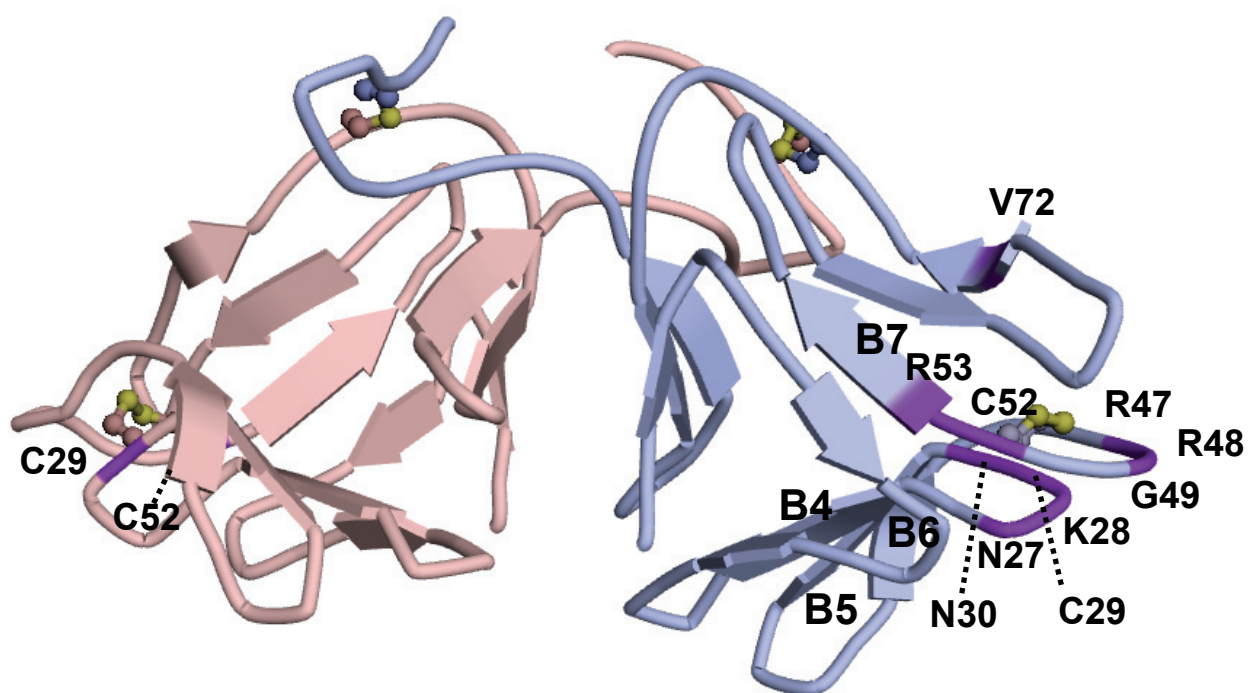
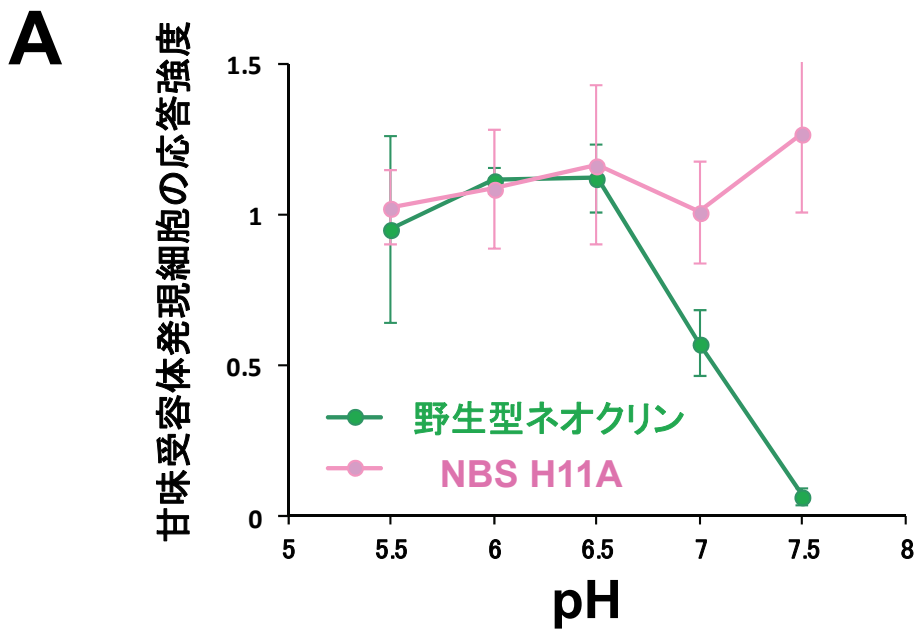


図2-11 野生型ネオクリン分子上で主鎖シグナルが帰属できないアミノ酸残基

pH 3.0で主鎖シグナルが帰属できなかったアミノ酸残基を、結晶構造上にマッピングし、紫色で示した。なお、NASをマゼンタ、NBSをシアンで示している。またネオクリン分子上で計4本のジスルフィド結合を形成しているCys残基の側鎖の硫黄原子を黄色で示している。



B ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル

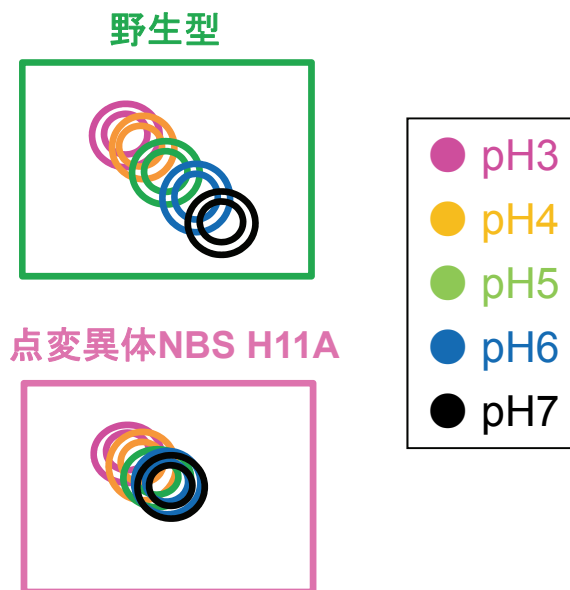


図2-12 pHセンサー変異体NBS H11AのpH非依存的な甘味活性と、予想されるNMRスペクトル上での主鎖シグナル変化

A: ヒト甘味受容体を発現させた培養細胞を用いた活性評価
 終濃度10 μM でネオクリンおよび点変異体NBS H11Aを添加している。
 図はNakajima *et al.*, *PLoS One.*, 2011を改変。

B: 予想されるNMRスペクトル上での化学シフト変化の違い
 ネオクリンのpHに依存した甘味強度変化に関与するアミノ酸残基では、pHセンサー変異体NBS H11Aにおいて化学シフト変化の大きさが減少すると予想される。

Number	Residue	HN	N	C α	C β	Number	Residue	HN	N	C α	C β
1	Asp	8.97	123.03	51.66	39.11	61	Asn	7.30	118.01	50.77	36.36
2	Ser	9.17	115.94	56.57	62.52	62	Leu	7.97	130.37	50.95	-
3	Val	7.48	117.82	56.92	33.22	63	Ile	8.59	123.73	56.44	-
4	Leu	9.20	129.63	51.28	42.06	64	Ile	8.77	122.72	57.81	-
5	Leu	8.32	124.85	50.51	41.83	65	Tyr	8.74	126.21	53.68	-
6	Ser	8.41	113.56	58.56	61.94	66	Asp	8.63	118.23	49.20	-
7	Gly	9.03	110.08	42.28	-	67	Asp	8.01	115.29	52.45	34.95
8	Gln	8.47	120.22	52.60	27.64	68	Asn	8.10	117.86	49.87	36.20
9	Thr	8.19	116.46	58.85	67.18	69	Asn	8.52	113.86	52.38	33.91
10	Leu	9.40	129.51	50.29	42.29	70	Met	8.26	117.50	51.44	-
11	Tyr	8.31	124.82	56.59	-	71	Val	-	-	-	-
12	Ala	8.23	121.10	51.70	15.95	72	Val	-	-	60.32	-
13	Gly	9.54	110.20	42.31	-	73	Trp	7.63	120.32	55.18	30.61
14	His	8.45	118.99	53.00	27.38	74	Gly	6.81	112.37	42.88	-
15	Ser	8.33	111.56	55.53	64.34	75	Ser	8.42	115.40	56.70	-
16	Leu	9.08	122.13	51.07	41.47	76	Asp	7.96	118.15	50.63	32.96
17	Thr	8.60	114.41	58.07	69.24	77	Cys	6.86	116.49	52.36	37.02
18	Ser	8.54	119.22	54.83	62.52	78	Trp	8.02	126.94	53.79	28.86
19	Gly	9.01	116.97	44.73	-	79	Gly	8.89	108.75	41.06	-
20	Ser	9.13	122.33	56.19	60.49	80	Asn	8.26	118.07	50.57	36.18
21	Tyr	8.62	121.66	55.71	38.56	81	Asn	8.77	120.05	52.16	36.52
22	Thr	8.87	117.06	58.66	70.27	82	Gly	9.19	113.44	44.51	-
23	Leu	9.34	128.58	50.96	44.08	83	Thr	8.16	121.11	60.91	67.53
24	Thr	9.40	122.98	58.96	-	84	Tyr	8.56	123.15	53.58	-
25	Ile	7.62	124.02	52.79	-	85	Ala	8.79	120.05	48.02	17.47
26	Gln	8.60	125.86	52.79	27.40	86	Leu	9.41	126.63	51.55	40.21
27	Asn	9.10	119.15	53.87	35.51	87	Val	9.46	127.18	58.17	32.37
28	Asn	7.61	114.33	-	-	88	Leu	8.79	128.15	51.46	39.67
29	Cys	-	-	58.52	-	89	Gln	8.81	126.04	52.90	-
30	Asn	7.75	118.57	48.43	37.18	90	Gln	8.86	118.46	55.95	25.55
31	Leu	7.95	129.85	51.02	40.71	91	Asp	7.63	114.41	50.05	36.68
32	Val	8.76	124.17	58.27	33.19	92	Gly	7.80	110.19	41.02	-
33	Lys	9.13	126.38	51.56	34.39	93	Leu	7.24	121.55	52.40	38.83
34	Tyr	9.85	126.75	54.00	40.01	94	Phe	7.12	118.27	51.15	-
35	Gln	9.03	119.52	52.18	28.67	95	Val	8.50	124.87	57.93	-
36	His	9.20	125.94	53.95	24.70	96	Ile	9.01	124.39	57.93	37.14
37	Gly	8.74	103.61	43.03	-	97	Tyr	9.73	127.95	54.48	-
38	Arg	8.02	121.33	51.95	29.12	98	Gly	8.48	105.33	44.01	-
39	Gln	9.18	127.13	54.91	25.62	99	Pro	-	-	59.73	-
40	Ile	9.17	123.13	58.05	-	100	Val	7.90	121.69	63.04	29.77
41	Trp	7.93	122.37	55.84	29.32	101	Leu	-	-	-	-
42	Ala	6.64	126.54	48.01	20.32	102	Trp	-	-	-	-
43	Ser	8.26	112.76	57.02	-	103	Pro	-	-	59.07	28.57
44	Asp	7.93	117.40	51.52	33.20	104	Leu	8.27	123.44	50.50	38.40
45	Thr	7.58	106.38	57.60	64.87	105	Gly	8.41	115.53	43.19	-
46	Asp	8.18	117.45	51.03	35.73	106	Leu	8.40	125.91	54.43	38.79
47	Gly	9.15	111.75	42.90	-	107	Asn	8.03	113.63	50.43	36.47
48	Gln	7.67	117.20	53.65	25.65	108	Gly	8.09	108.37	43.19	-
49	Gly	7.29	103.99	42.59	-	109	Cys	8.64	120.15	50.04	37.26
50	Ser	-	-	-	-	110	Arg	8.92	130.25	56.39	28.06
51	Gln	-	-	-	-	111	Ser	7.83	116.52	55.56	61.11
52	Cys	-	-	-	-	112	Leu	8.03	124.01	52.65	39.72
53	Arg	8.77	114.66	51.16	-	113	Asn	-	-	-	-
54	Leu	8.92	123.91	50.34	-						
55	Thr	9.46	121.73	57.98	57.98						
56	Leu	7.15	126.67	49.97	44.05						
57	Arg	8.90	125.19	53.57	-						
58	Ser	9.21	119.65	58.35	60.43						
59	Asp	7.27	115.85	49.58	36.82						
60	Gly	7.21	106.85	41.43	-						

表2-3 A pHセンサー変異体NBSH11AのNASのシグナル帰属 (pH 3.0)

Number	Residue	HN	N	C α	C β	Number	Residue	HN	N	C α	C β
1	Asp	9.21	122.96	51.59	38.28	61	Asn	6.99	116.91	50.45	36.58
2	Asn	8.99	116.05	50.68	35.54	62	Leu	7.70	130.36	50.89	41.96
3	Val	7.41	118.08	57.44	33.22	63	Val	8.59	123.34	58.08	34.36
4	Leu	9.27	130.07	51.21	44.69	64	Ile	8.70	122.98	57.68	37.61
5	Leu	8.43	124.94	50.61	40.39	65	Tyr	8.42	124.94	52.91	-
6	Ser	8.30	113.96	57.94	61.33	66	Asp	8.37	118.00	50.16	39.67
7	Gly	9.21	110.40	42.36	-	67	His	8.12	113.37	55.32	25.33
8	Gln	8.45	119.84	52.54	27.69	68	Asn	7.73	118.05	49.79	36.22
9	Thr	8.39	116.07	58.76	69.80	69	Asn	8.37	113.52	52.44	33.59
10	Leu	9.71	131.97	50.68	41.74	70	Asn	8.70	116.94	50.79	35.94
11	Ala	8.18	127.88	48.67	16.94	71	Asp	8.83	121.92	49.92	34.72
12	Ala	7.94	118.82	51.84	16.84	72	Val	-	-	60.70	-
13	Asp	9.75	118.56	53.59	35.64	73	Trp	7.79	120.20	55.48	30.30
14	His	8.57	117.91	52.98	26.84	74	Gly	6.47	112.06	43.43	-
15	Ser	8.26	110.97	55.47	63.92	75	Ser	8.34	115.14	56.71	57.03
16	Leu	9.02	121.59	50.72	42.28	76	Ala	7.98	120.94	49.61	13.00
17	Gln	8.39	120.00	52.68	30.65	77	Cys	6.77	115.08	51.29	33.85
18	Ala	8.71	126.90	49.53	19.05	78	Trp	7.47	125.33	52.70	28.86
19	Gly	9.00	113.00	44.45	-	79	Gly	8.97	110.36	40.98	-
20	Ala	9.09	129.86	50.03	16.81	80	Asp	8.26	119.78	51.28	37.38
21	Tyr	8.64	118.76	55.57	38.24	81	Asn	8.83	120.58	52.11	36.18
22	Thr	8.82	117.21	58.51	69.87	82	Gly	8.89	113.58	44.94	-
23	Leu	9.24	128.56	50.95	44.60	83	Lys	7.96	126.61	54.37	32.53
24	Thr	9.48	123.72	59.22	69.87	84	Tyr	8.35	119.16	53.84	40.85
25	Ile	7.67	123.12	51.86	37.32	85	Ala	8.84	121.58	48.52	18.05
26	Gln	8.47	126.91	52.84	26.28	86	Leu	9.31	126.04	51.37	40.60
27	Asn	-	-	-	-	87	Val	9.52	126.78	57.86	32.69
28	Lys	-	-	-	-	88	Leu	8.87	128.07	51.67	39.97
29	Cys	-	-	-	-	89	Gln	8.75	125.32	52.39	27.12
30	Asn	-	-	48.93	36.17	90	Lys	8.80	117.77	56.29	29.47
31	Leu	7.92	130.25	50.88	40.63	91	Asp	7.44	114.44	50.30	37.04
32	Val	8.78	124.00	58.46	32.58	92	Gly	7.83	110.78	40.90	-
33	Lys	9.12	126.56	51.43	34.74	93	Arg	7.44	120.31	53.63	27.82
34	Tyr	9.90	126.41	53.65	39.45	94	Phe	7.65	118.53	51.44	37.36
35	Gln	9.23	120.63	51.58	28.88	95	Val	8.50	124.26	58.39	33.59
36	Asn	9.62	126.75	52.30	35.20	96	Ile	9.41	125.57	58.18	36.59
37	Gly	8.53	102.27	42.95	-	97	Tyr	9.63	127.06	54.48	40.06
38	Arg	7.99	121.38	51.85	29.08	98	Gly	8.22	105.40	43.67	-
39	Gln	9.25	127.79	55.05	25.37	99	Pro	-	-	59.67	-
40	Ile	9.09	120.59	58.28	37.92	100	Val	7.84	120.49	63.14	29.73
41	Trp	8.02	123.60	56.15	29.42	101	Leu	9.65	129.49	53.72	41.11
42	Ala	6.66	126.19	48.32	19.78	102	Trp	7.39	115.89	54.19	31.45
43	Ser	8.26	113.07	57.11	57.99	103	Ser	6.57	118.59	54.23	63.06
44	Asn	7.82	117.15	51.03	32.89	104	Leu	6.85	118.55	52.88	39.72
45	Thr	7.57	106.95	57.05	64.13	105	Gly	7.97	111.65	41.45	-
46	Asp	7.47	119.49	53.09	38.99	106	Pro	-	-	61.07	28.85
47	Arg	-	-	-	-	107	Asn	8.86	118.16	51.20	35.00
48	Arg	-	-	-	-	108	Gly	7.52	104.68	43.96	-
49	Gly	7.29	104.69	42.86	-	109	Cys	8.29	118.36	51.54	35.25
50	Ser	8.88	113.56	54.82	63.10	110	Arg	9.02	129.29	53.93	27.09
51	Gly	8.30	114.59	45.09	-	111	Arg	7.60	121.68	52.85	28.24
52	Cys	-	-	-	-	112	Val	8.16	122.33	59.87	29.63
53	Arg	-	-	51.12	-	113	Asn	8.39	122.56	50.51	36.46
54	Leu	8.70	122.99	50.41	44.42	114	Gly	8.23	110.05	42.81	-
55	Thr	9.41	122.16	58.36	69.10						
56	Leu	7.08	126.83	50.03	41.82						
57	Leu	9.06	126.55	52.17	39.43						
58	Ser	8.89	116.90	58.52	60.19						
59	Asp	7.15	114.71	48.91	35.25						
60	Gly	7.42	108.21	41.51	-						

表2-3 B pHセンサー変異体NBSH11AのNBSのシグナル帰属 (pH 3.0)

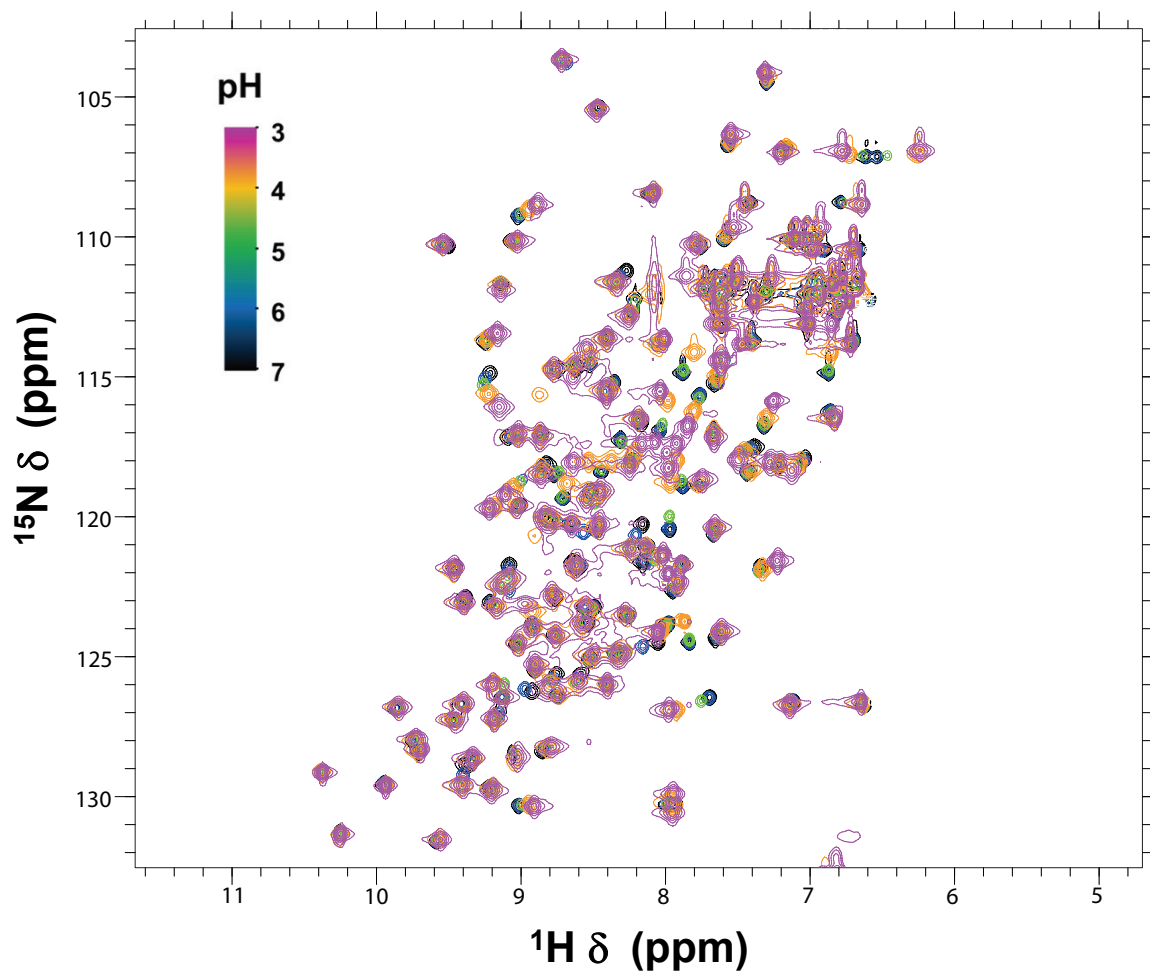


図2-13 (A) pHセンサー変異体NBS H11AのpHに依存した ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルの変化
NAS(酸性サブユニット)のものを示した。

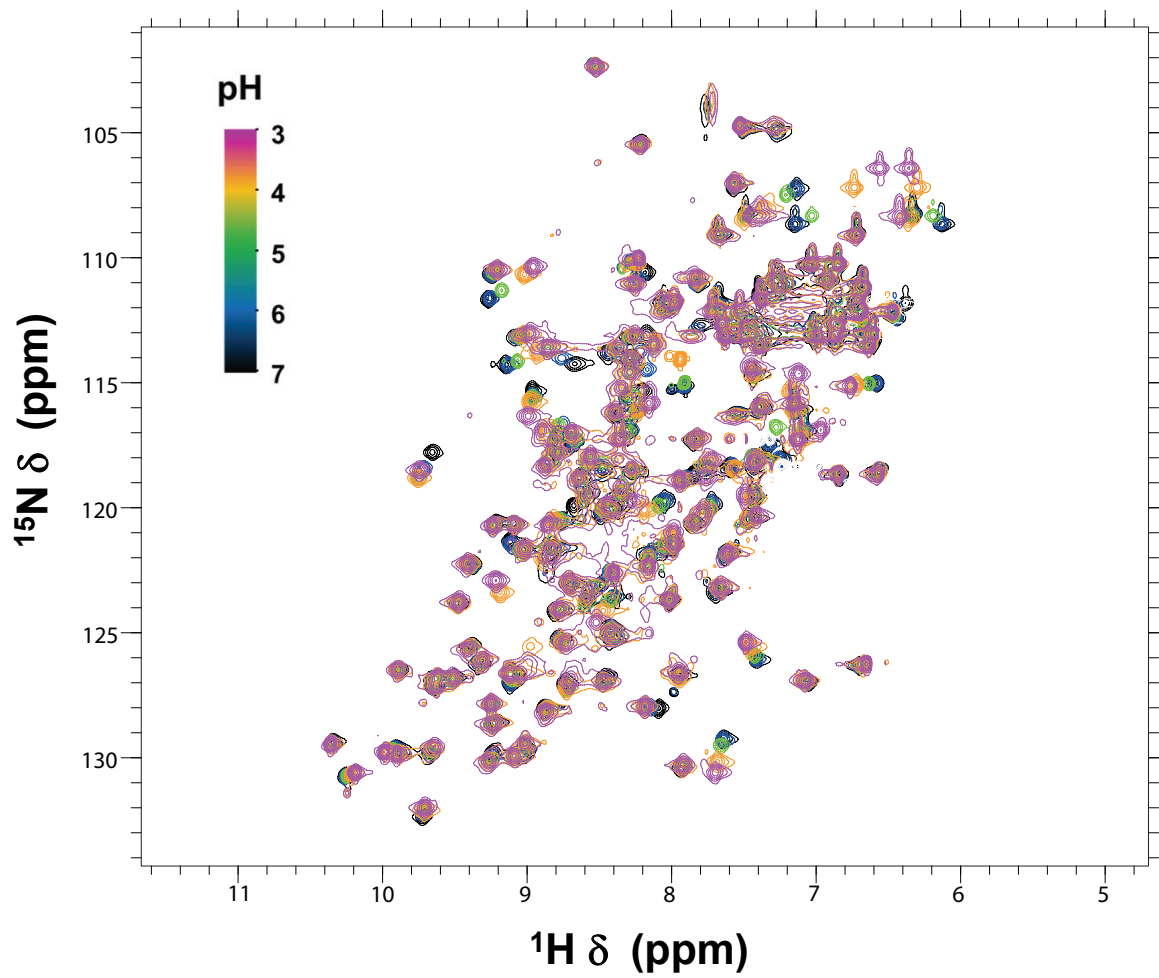


図2-13 (B) pHセンサー変異体NBS H11AのpHに依存した ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルの変化
NBS H11A(塩基性サブユニット)のものを示した。

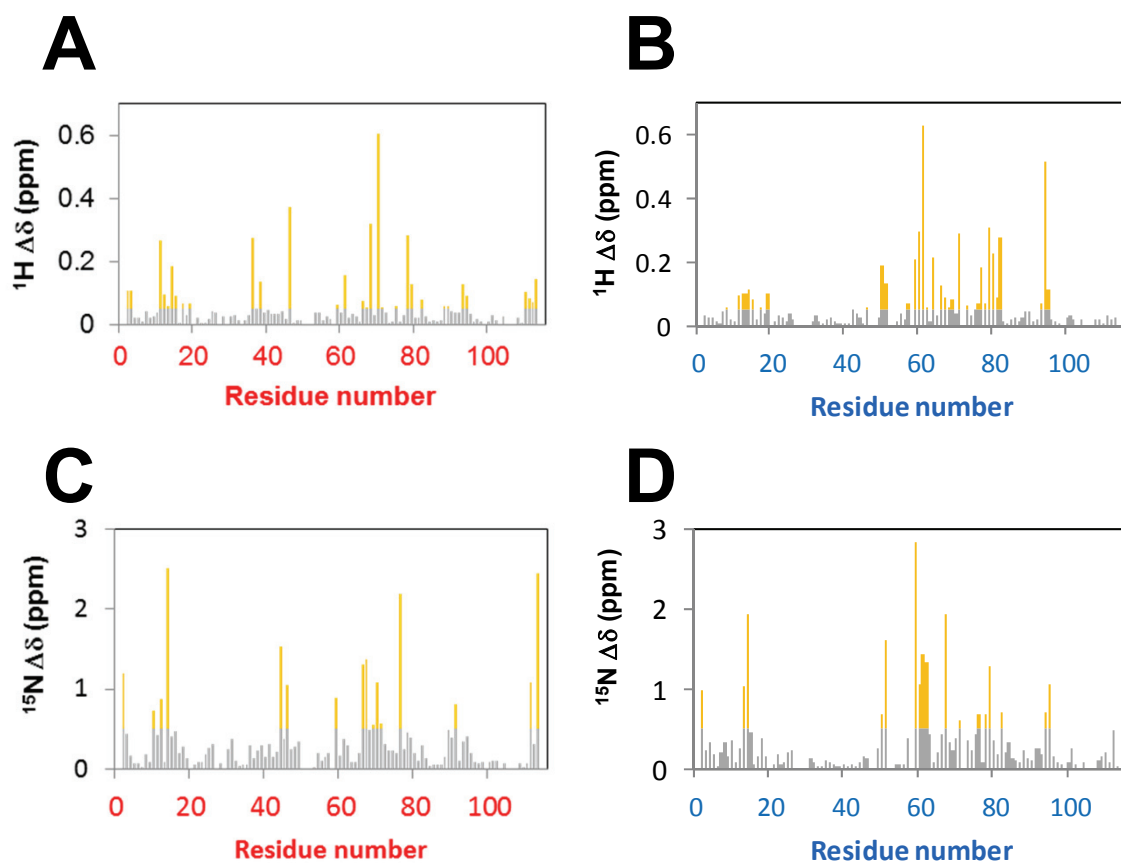
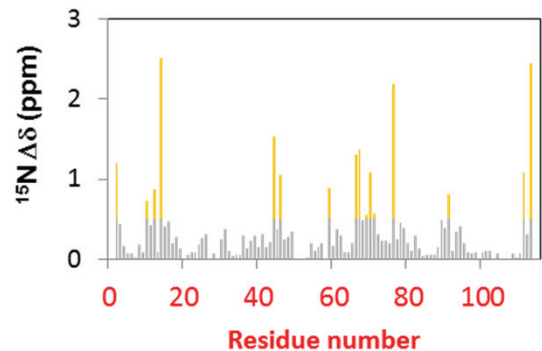
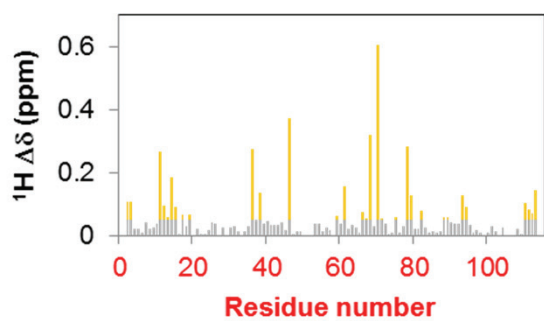


図2-14 pHセンサー変異体NBS H11Aを構成するアミノ酸残基のpH 3-7での化学シフト変化値

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上の化学シフト変化値を算出した。 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppmまたは ^{15}N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppmを示すアミノ酸残基を橙色で示した。

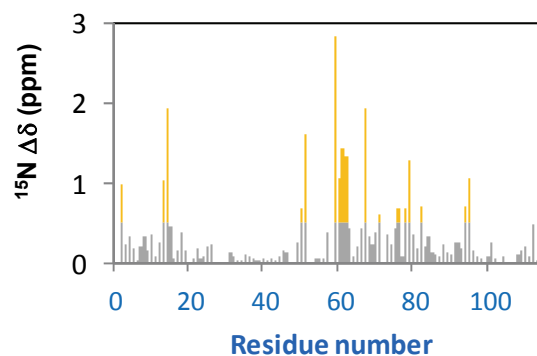
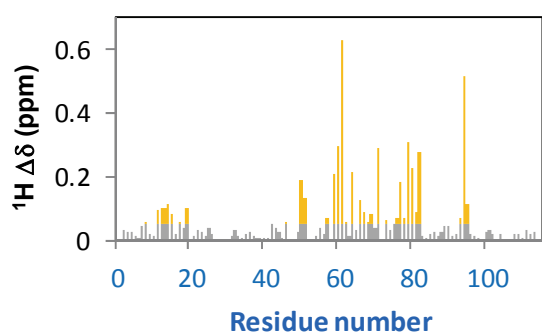
- A: NAS $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向の化学シフト変化値
- B: NBS H11A $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向の化学シフト変化値
- C: NAS ^{15}N 核方向の化学シフト変化値
- D: NBS H11A ^{15}N 核方向の化学シフト変化値



Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$	Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$	Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$
1	Asp	-	-	41	Trp	0.035	0.313	81	Asn	0.024	0.100
2	Ser	0.108	1.200	42	Ala	0.033	0.149	82	Gly	0.082	0.289
3	Val	0.110	0.440	43	Ser	0.034	0.212	83	Thr	0.029	0.129
4	Leu	0.021	0.161	44	Asp	0.045	1.525	84	Tyr	0.011	0.036
5	Leu	0.025	0.071	45	Thr	0.021	0.373	85	Ala	0.013	0.060
6	Ser	0.010	0.064	46	Asp	0.376	1.049	86	Leu	0.011	0.046
7	Gly	0.042	0.027	47	Gly	0.008	0.240	87	Val	0.015	0.048
8	Gln	0.024	0.176	48	Gln	0.014	0.280	88	Leu	0.061	0.155
9	Thr	0.028	0.085	49	Gly	0.014	0.346	89	Gln	0.062	0.483
10	Leu	0.040	0.726	50	Ser	-	-	90	Gln	0.044	0.398
11	Tyr	0.268	0.424	51	Gln	-	-	91	Asp	0.040	0.816
12	Ala	0.095	0.871	52	Cys	-	-	92	Gly	0.040	0.096
13	Gly	0.060	0.092	53	Arg	0.041	0.028	93	Leu	0.127	0.340
14	His	0.184	2.519	54	Leu	0.039	0.194	94	Phe	0.091	0.403
15	Ser	0.094	0.407	55	Thr	0.015	0.107	95	Val	0.033	0.191
16	Leu	0.009	0.467	56	Leu	0.026	0.148	96	Ile	0.012	0.080
17	Thr	0.067	0.200	57	Arg	0.021	0.193	97	Tyr	0.021	0.072
18	Ser	0.031	0.272	58	Ser	-	-	98	Gly	0.012	0.082
19	Gly	0.069	0.132	59	Asp	0.064	0.886	99	Pro	-	-
20	Ser	-	-	60	Gly	0.041	0.161	100	Val	0.013	0.080
21	Tyr	0.024	0.046	61	Asn	0.157	0.367	101	Leu	0.030	0.100
22	Thr	0.007	0.088	62	Leu	0.023	0.287	102	Trp	0.015	0.109
23	Leu	0.007	0.091	63	Ile	0.034	0.092	103	Pro	-	-
24	Thr	0.018	0.175	64	Ile	0.026	0.079	104	Leu	0.027	0.066
25	Ile	0.044	0.254	65	Tyr	0.011	0.190	105	Gly	-	-
26	Gln	0.040	0.316	66	Asp	0.075	1.300	106	Leu	-	-
27	Asn	-	-	67	Asp	0.055	1.377	107	Asn	-	-
28	Asn	0.026	0.070	68	Asn	0.319	0.482	108	Gly	0.023	0.062
29	Cys	-	-	69	Asn	0.033	0.544	109	Cys	0.008	0.023
30	Asn	0.027	0.240	70	Met	0.606	1.078	110	Arg	0.105	0.070
31	Leu	0.031	0.372	71	Val	0.050	0.575	111	Ser	0.086	1.079
32	Val	0.013	0.102	72	Val	0.039	0.313	112	Leu	0.074	0.303
33	Lys	0.002	0.037	73	Trp	0.008	0.226	113	Asn	0.147	2.451
34	Tyr	0.016	0.056	74	Gly	0.012	0.234				
35	Gln	0.030	0.047	75	Ser	0.059	0.204				
36	His	0.274	0.286	76	Asp	0.013	2.194				
37	Gly	0.050	0.135	77	Cys	0.031	0.243				
38	Arg	0.138	0.233	78	Trp	0.282	0.462				
39	Gln	0.040	0.299	79	Gly	0.128	0.396				
40	Ile	0.047	0.143	80	Asn	0.024	0.204				

表2-4 (A) ネオクリン点変異体NBS H11AのNASを構成する残基のpH 3-7での化学シフト変化値

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上の化学シフト変化値を算出した。 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppmまたは ^{15}N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppmを示すアミノ酸残基を橙色で示した。またpH 3-7のいずれかのpHでシグナル帰属ができなかったアミノ酸残基を紫色で示した。



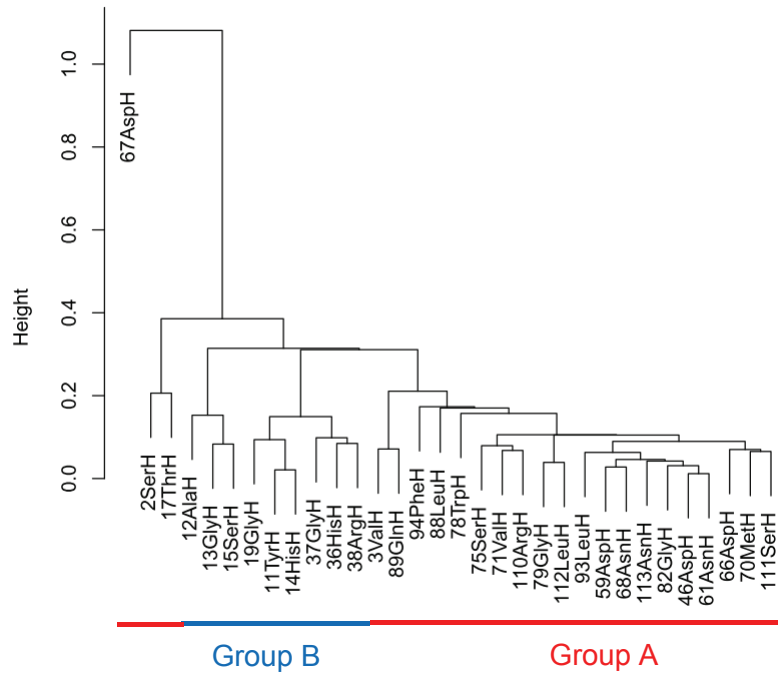
Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$	Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$	Number	Residue	$\Delta^1\text{H}^{\text{N}}\delta$	$\Delta^{15}\text{N}\delta$
1	Asp	-	-	41	Trp	0.003	0.017	81	Asn	0.092	0.191
2	Asn	0.031	0.998	42	Ala	0.049	0.064	82	Gly	0.277	0.710
3	Val	0.024	0.247	43	Ser	0.039	0.045	83	Lys	0.012	0.214
4	Leu	0.026	0.329	44	Asn	0.029	0.075	84	Tyr	0.006	0.344
5	Leu	0.012	0.182	45	Thr	0.008	0.157	85	Ala	0.020	0.136
6	Ser	0.009	0.040	46	Asp	0.059	0.133	86	Leu	0.028	0.114
7	Gly	0.043	0.202	47	Arg	-	-	87	Val	0.013	0.085
8	Gln	0.051	0.341	48	Arg	-	-	88	Leu	0.024	0.228
9	Thr	0.018	0.150	49	Gly	0.029	0.270	89	Gln	0.046	0.144
10	Leu	0.014	0.353	50	Ser	0.191	0.683	90	Lys	0.042	0.103
11	Ala	0.094	0.082	51	Gly	0.135	1.609	91	Asp	0.014	0.273
12	Ala	0.102	0.255	52	Cys	-	-	92	Gly	0.020	0.261
13	Asp	0.102	1.034	53	Arg	-	-	93	Arg	0.068	0.188
14	His	0.115	1.946	54	Leu	0.012	0.070	94	Phe	0.517	0.712
15	Ser	0.082	0.464	55	Thr	0.039	0.057	95	Val	0.117	1.054
16	Leu	0.020	0.065	56	Leu	0.022	0.072	96	Ile	0.022	0.161
17	Gln	0.056	0.173	57	Leu	0.072	0.393	97	Tyr	0.012	0.076
18	Ala	0.038	0.376	58	Ser	-	-	98	Gly	0.005	0.070
19	Gly	0.103	0.154	59	Asp	0.211	2.844	99	Pro	-	-
20	Ala	0.012	0.027	60	Gly	0.296	1.050	100	Val	0.025	0.096
21	Tyr	0.011	0.070	61	Asn	0.628	1.450	101	Leu	0.035	0.273
22	Thr	0.032	0.175	62	Leu	0.057	1.336	102	Trp	0.018	0.071
23	Leu	0.025	0.066	63	Val	0.012	0.439	103	Ser	0.011	0.086
24	Thr	0.013	0.089	64	Ile	0.218	0.095	104	Leu	0.019	0.093
25	Ile	0.039	0.204	65	Tyr	0.032	0.210	105	Gly	0.024	0.120
26	Gln	0.022	0.248	66	Asp	0.129	0.435	106	Pro	-	-
27	Asn	-	-	67	His	0.091	1.935	107	Asn	-	-
28	Lys	-	-	68	Asn	0.052	0.334	108	Gly	0.020	0.115
29	Cys	-	-	69	Asn	0.080	0.241	109	Cys	0.019	0.155
30	Asn	-	-	70	Asn	0.039	0.388	110	Arg	0.005	0.213
31	Leu	0.013	0.129	71	Asp	0.289	0.605	111	Arg	0.034	0.097
32	Val	0.036	0.075	72	Val	-	-	112	Val	0.022	0.482
33	Lys	0.011	0.021	73	Trp	0.063	0.369	113	Asn	0.028	0.044
34	Tyr	0.010	0.014	74	Gly	0.030	0.241	114	Gly	0.049	0.198
35	Gln	0.022	0.109	75	Ser	0.049	0.434				
36	Asn	0.027	0.078	76	Ala	0.070	0.694				
37	Gly	-	-	77	Cys	0.185	0.095				
38	Arg	0.005	0.030	78	Trp	0.072	0.688				
39	Gln	-	-	79	Gly	0.309	1.292				
40	Ile	0.008	0.051	80	Asp	0.227	0.352				

表2-4 (B) ネオクリン点変異体NBS H11AのNBS(H11A)を構成する残基のpH 3-7での化学シフト変化値

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上の化学シフト変化値を算出した。 $^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向で $\Delta\delta > 0.05$ ppmまたは ^{15}N 核方向で $\Delta\delta > 0.5$ ppmを示すアミノ酸残基を橙色で示した。またpH 3-7のいずれかのpHでシグナル帰属ができなかったアミノ酸残基を紫色で示した。

NAS

Cluster Dendrogram



NBS H11A

Cluster Dendrogram

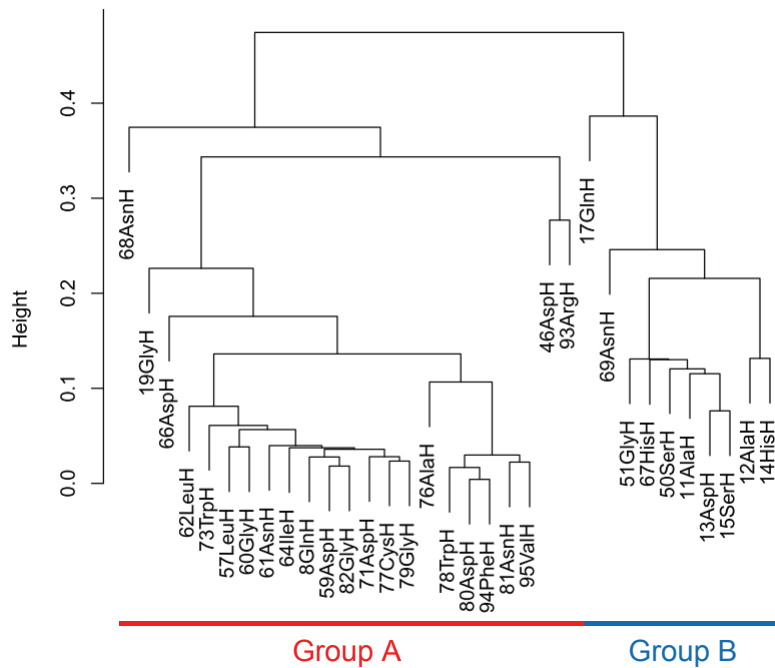
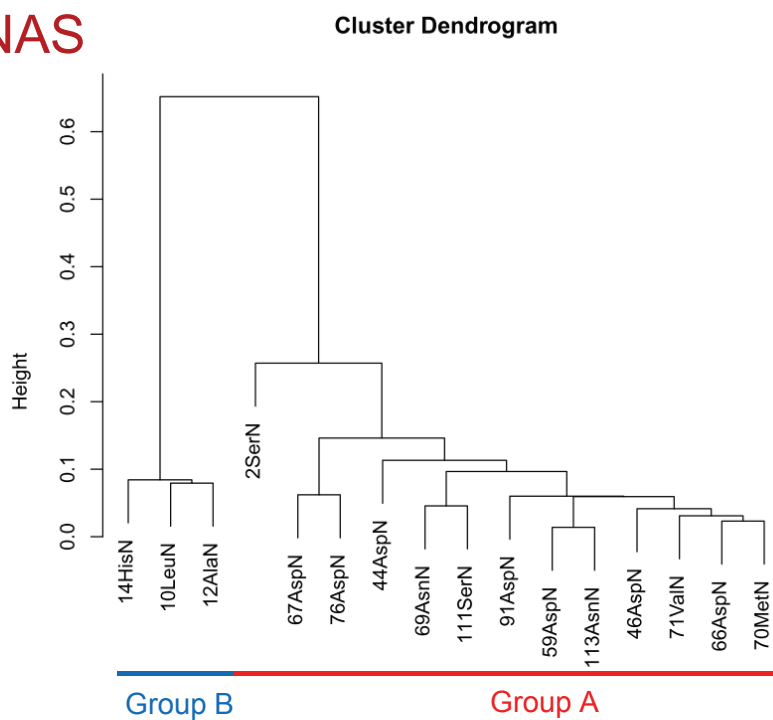


図2-15 (A) pHセンサー変異体NBS H11AのpHに依存して化学シフト変化するアミノ酸残基のクラスター分け ($^1\text{H}^{\text{N}}$ 核方向)

NAS



NBS H11A

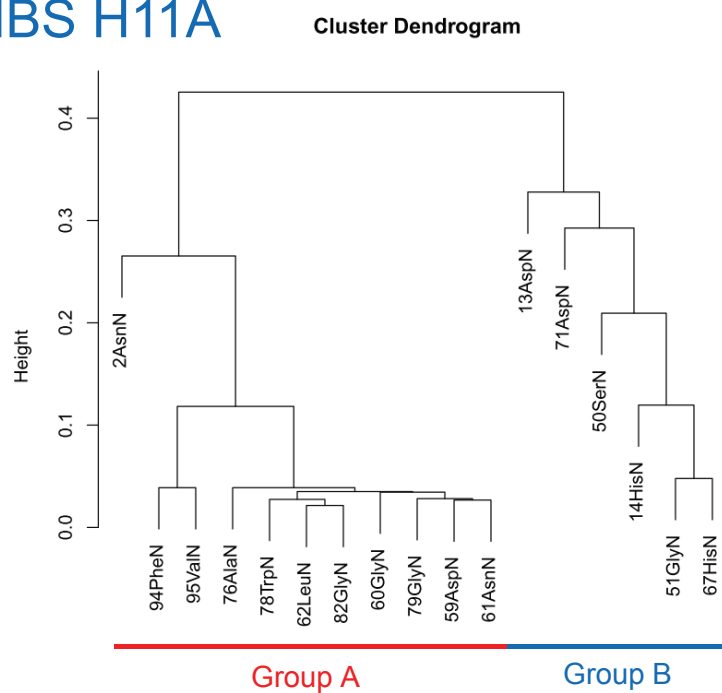


図2-15 (B) pHセンサー変異体NBS H11AのpHに依存して化学シフト変化するアミノ酸残基のクラスター分け (^{15}N 核方向)

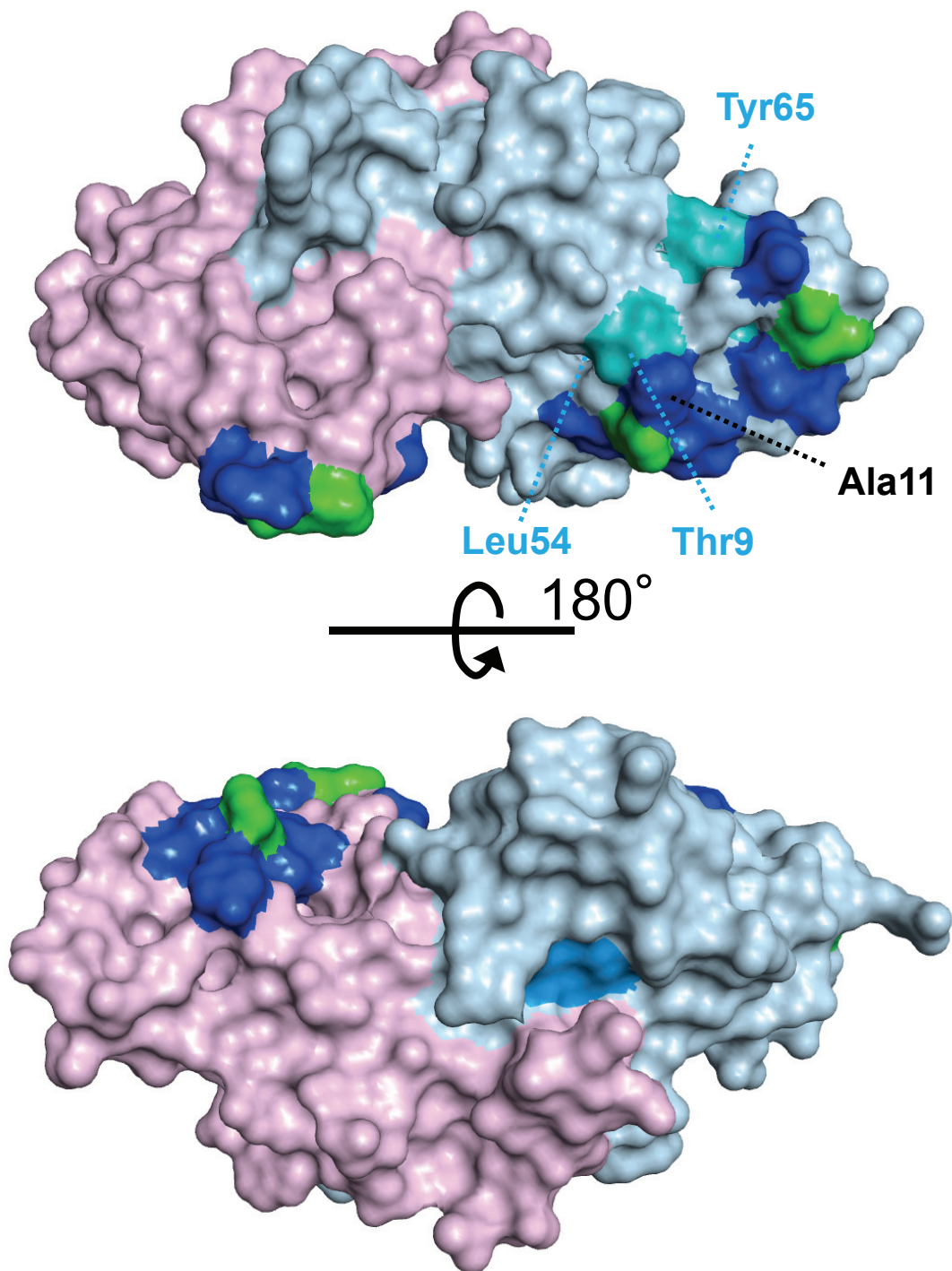


図2-16 pHセンサー変異体NBS H11A分子上でpH 5-7の範囲で化学シフト変化するアミノ酸残基

^1H - ^{15}N HSQCスペクトル上でpH 5-7の弱酸性領域を中心に化学シフト変化すると判別されたアミノ酸残基を、結晶構造上にマッピングし、青色で示した。そのうち点変異体NBS H11AではpHに依存して化学シフト変化する判別されなくなった3つのアミノ酸残基を水色で示した。なお、NAS分子表面をマゼンタ、NBS分子表面をシアンで色づけしている。

2.4 考察

ネオクリンは pH 5-7 の弱酸性領域で甘味強度を著しく変化させる。NMR 法を用いることにより、この pH 範囲において pH に依存して立体構造変化を生じうると予想されるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングした。さらに選別されたアミノ酸残基群の構造上分布をしらべたところ、以下 2 つの局所構造領域で立体構造変化が生じる可能性が示唆された。

- ① 5 つの His 残基周辺領域
- ② NBS の 64-65 loop, 66-67 loop

また pH に依らず強い甘味を呈する pH センサー変異体 NBS H11A と野生型との間でスクリーニングされたアミノ酸残基の種類を比較することにより、① 5 つの His 残基周辺領域 において甘味強度変化を誘導する可能性が高いと予想される His 残基自身以外のアミノ酸残基を 3 つに絞りこんだ。

2.4.1 NMR 法により観測された立体構造変化と先行文献との比較

ネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化については、当研究室において分子動力学シミュレーションおよび分光学的手法を用いた検証が行われてきた (Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2009)。分子シミュレーションの結果、ネオクリンは pH に依存して 2 つのサブユニット間の距離が変動するような立体構造変化を生じると予測されてきた (第 1 章 図 1-11) (Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006)。ただし本研究で行った NMR 法を利用した解析においては、分子シミュレーションで予測されたような両サブユニット間の距離の変動が生じた場合に観測されると考えていた、両サブユニット間の interface 領域の pH に依存した立体構造変化は観測されなかった。また同時に観測されると考えていた両サブユニットを繋ぐ 2 本のジスルフィド結合周辺領域の pH に依存した立体構造変化も観測されなかった。

このように本実験の結果がシミュレーションによる予測と一致しなかった一つの要因として、シミュレーションに用いた計算法が挙げられる。以前のシミュレーションでは計算コストを低減するために “implicit solvent model” を利用したために、2 つのサブユニット間の静電的反発が過剰に評価されてしまったと考えられる。また二つ目の要因として、解析に用いる pH 範囲の差が挙げられる。以前の分子シミュレーションでは pH 3-7 の範囲でのネオクリン分子の立体構造変化を予測してきた。そのためネオクリンの pH に依存した活性変化に重要な役割を果たす His 残基のみならず、分子中に

16つ存在する Asp 残基の側鎖もプロトン化を受けると仮定して、解析を進めてきた。その結果同じく 2 つのサブユニット間の静電的反発が過剰評価されたと考えられる。

実際に、pH 5-7 の範囲に絞って“explicit water model”を利用して 2 μ s で分子シミュレーションをやり直してみると、以前に予測されたような両サブユニット間距離が変動するような立体構造変化は生じなかった(図 2-17)。本研究による NMR 実験の結果、あるいは近年行ったグローバルな立体構造変化解析の結果からも示されたように、ネオクリン分子はこれまでに分子シミュレーションによって提唱されてきたものよりも局所的な立体構造変化を生じると考えられる。

2.4.2 野生型と点変異体 NBS H11A との pH に依存した立体構造変化の比較

pH センサー変異体 NBS H11A は pH に依らず強い甘味を呈するように性質が変化しており、pH に依存した甘味強度の変化がほとんど生じない(Nakajima *et al.*, 2011, 図 2-12 A)。しかし野生型と同様に pH に依存して立体構造変化すると予想されるアミノ酸残基をスクリーニングし、その種類を野生型と比較したところ、異なる傾向を示したのは変異導入部位と空間的に遠くには位置しない 3 アミノ酸残基のみであった(図 2-16)。この結果からも、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化を誘導している立体構造変化は、His 残基周辺の構造領域に限られた局所的なものであることが示唆された。

2.4.3 本研究での NMR 測定条件の問題点

ネオクリンが pH 低下に伴い塩基性条件下での「甘味がほぼ無い」構造から酸性条件下での「甘味が強い」構造へと立体構造変化すると仮定すると、pH 3.0 では「甘味が強い」構造が大部分を占めると考えられるので、その構造情報を取得できたと考えられる。一方でネオクリンがほのかに甘味を呈する pH 7.0 においては、「甘味がほぼ無い」構造から「甘味が強い」構造へと立体構造変化する中間構造についての情報が得られたと考えられる。つまり厳密には「甘味がほぼ無い」状態の構造情報を本研究の測定 pH 範囲では観測することができなかつた可能性がある。「甘味がほぼ無い」構造についての情報を取得するためには、ネオクリンの甘味が消失するような、pH 7.0 よりも塩基性側の pH において測定を行う必要があったと考えられる。しかしながらネオクリンの溶解度は pH が塩基性に傾くほど減少し、かつ NMR 測定の感度も塩基性 pH ほど低下する。したがって pH 7.7 程度の、NMR 測定可能な範囲内でできるだけ高い pH において測定を行ってみるのが良いと考えられる。あるいは pH 7.0 でもほぼ甘味を呈さな

いように性質が変化しているネオクリン点変異体 NBS H11Y を利用することも、一つの手段として考えられる(Nakajima *et al.*, 2011) (第 1 章 図 1-9B 青線参照)。この点変異体 NBS H11Y を利用して、本研究と同じく pH 3-7 の範囲で同様の NMR 測定を行うことにより、「甘味がほぼ無い」構造と「甘味が強い」構造についての正確な構造情報を得ることができると予想している。

本章の成果をまとめると、ネオクリンが甘味強度を変化させる pH 5-7 の弱酸性領域において、pH に依存して立体構造変化を生じうるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングできた。またそれらのアミノ酸残基群が集合した、pH に依存して立体構造変化を生じうる 2 つの局所構造領域を検出することもできた。次章ではこれらのアミノ酸残基および構造領域が、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化において果たしている役割を検証していく。

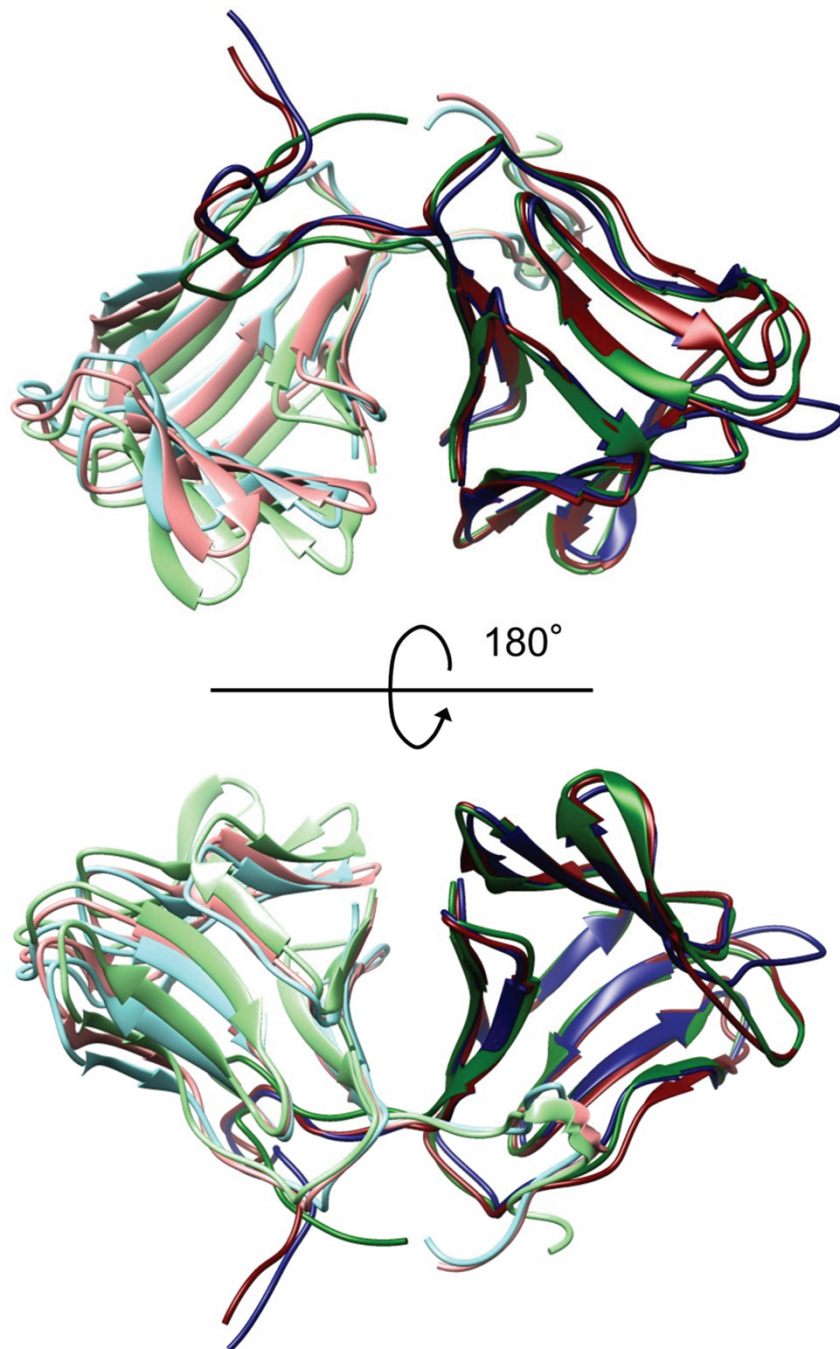


図2-17 分子動力学シミュレーションによる野生型ネオクリンのpHに依存した立体構造変化予測

WT 結晶構造 pH 7.4 : NAS 薄青 NBS 青
 WT MD構造 pH 7 : NAS 薄赤 NBS 赤
 WT MD構造 pH 5 : NAS 薄緑 NBS 緑

NBSの $\beta 6$ - $\beta 7$ loopを除けば立体構造に大きな差は観察されない。

第 3 章

アラニン点変異体を用いた ネオクリンの構造機能相関解析

3.1 序

味覚修飾タンパク質ネオクリンはそれ自身ほのかな甘みを感じさせるが、その後に酸を味わうと強烈な甘みを感じさせる性質(味覚修飾活性)を併せ持つ。このようにユニークな呈味特性をもつネオクリンの構造機能相関について、変異体解析を用いてしらべた報告が存在する(Kurimoto *et al.*, 2007)。その結果、ネオクリン分子には「それ自身を味わったときの甘味に寄与するアミノ酸残基群」と「酸を味わったときの甘味に寄与するアミノ酸残基群」が存在し、一部重なってはいるものの、それぞれ異なる分子表面上領域に存在することが示唆された。これよりネオクリンはそれ自身ほのかな甘みを感じさせているときと、酸に呼応して強烈な甘みを感じさせているときでは、異なる様式でヒト甘味受容体を活性化させていることが示唆された。しかしネオクリン分子が酸に呼応してヒト甘味受容体への作用様式をどのように変化させているのかについては、十分な知見が得られていなかった。

我々のグループでは、ネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化によってヒト甘味受容体への作用様式が変化するという仮説のもとに研究を進めている。第 2 章で行った NMR 法を用いた解析では、ネオクリン分子上で pH に依存して立体構造変化すると予想されるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングするとともに、それらのアミノ酸残基が集合した 2 つの局所構造領域も検出した。これらのアミノ酸残基および局所構造領域の pH に依存した立体構造変化によって、ヒト甘味受容体への作用様式が変化すると推測している。実際に、ネオクリンと同じ甘味タンパク質であるソーマチンやブラゼインにおいても、数アミノ酸残基から構成される局所構造領域の立体構造変化が甘味強度を変化させることが示唆されている(Masuda *et al.*, 2011; Cornilescu *et al.*, 2013)。

以上のような背景を踏まえ本章では、第 2 章でスクリーニングされたアミノ酸残基について、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化に果たしている役割を検証した。スクリーニングされたアミノ酸残基およびその近傍に位置するアミノ酸残基を対象として 14 種類のアラニン点変異体を作製し、pH に依存してヒト甘味受容体を活性化させる性質に及ぼす影響について培養細胞評価系を利用して評価した。その結果、既知の pH センサーである His 残基を中心とした 4 種類のアミノ酸残基が「pH に依存した活性変化」に寄与していることが示された。また予想外ではあったものの、別の 4 種類のアミノ酸残基は pH に依らず「ヒト甘味受容体との親和性決定」に寄与しており、それゆえ各 pH でネオクリンが発揮する甘味強度の決定に寄与していることが示唆された。これらの「pH に依存した活性変化」と「pH に依らない親和性決定」とに寄与する 2

種類のアミノ酸残基群はそれぞれ構造上異なる部位に位置しており、また二重変異体解析の結果から独立的にネオクリンの甘味活性を制御していることが示唆された。最後にこれらのネオクリン側の構造機能相関解析から得られた知見をもとにして、ヒト甘味受容体による pH に依存したネオクリンの受容機構について改めて一つのモデルを提唱した。

3.2.1 変異型ネオクリン発現プラスミドの作製

鋳型となる NAS・NBS の成熟配列を大腸菌発現用ベクター pET21b に導入したプラスミドは中島健一郎博士(東京大学)から分与して頂いたものを使用した。変異型ネオクリン発現プラスミドは In-fusion クローニングシステム(Clontech Laboratories, Inc, USA)を用いて作製した(図 3-1)。In Fusion HD Cloning Kit の酵素は DNA 断片の末端 15 塩基の相同配列を融合する性質を有する。

まず①変異導入部位を含むセンスプライマーと *ScaI* アンチセンスプライマー、②変異導入部位を含むアンチセンスプライマーと *SphI* センスプライマーの 2 通りの組み合わせで、それぞれ Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA)を用いて PCR を行い、目的断片を得た。

①・②の反応により得られた PCR 産物をそれぞれ電気泳動で分離し、目的 DNA 断片をゲルごと切り出した後、NucleoSpin Extract II Kits (Clontech Laboratories, Inc, USA)を用いて精製した。*ScaI*・*SphI* で断片化した線状ベクターと①・②の精製 DNA 断片を用いて In-fusion-ligation を行い、反応物を大腸菌 DH5 α に TF した。

得られたコロニーを 5 ml LB 培地(100 μ g/ml アンピシリン含有)に植菌し、37 $^{\circ}$ C で一晚振盪培養(150 rpm)した。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Netherlands)を用いてプラスミドを抽出後、*XhoI*・*NdeI* 制限酵素反応産物を電気泳動してインサートチェックした。塩基配列の確認には ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)を用いてサンプルを調製し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いてシークエンスを確認した。

3.2.2 変異型ネオクリンタンパク質の発現・精製

作製した変異型 NAS・NBS 発現プラスミドをそれぞれ *E.coli* BL21(DE3) pLysS に形質転換し、LB プレート(150 μ g/ml アンピシリン含有)に塗布した。得られたコロニーを用いて 2.2.1 と同様の手順でタンパク質を発現・精製し、凍結乾燥した粉末状の精製変異型ネオクリンタンパク質を得た。

3.2.3 Far-UV CD の測定

変異型ネオクリンタンパク質が正しい立体構造を保持しているか検証するために、Far-UV CD スペクトルを測定した。

1) Far-UV CD の測定に用いる試料の調製

粉末状の変異型ネオクリンタンパク質を、脱気後にフィルターろ過した 20 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 3.0 または 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 に溶解し、0.1 mg/ml になるように調製した。

2) Far-UV CD の測定

Far-UV CD の測定は CD J-820(JASCO Co, JAPAN)を用いて 25°Cで行った。0.1 cm 幅のセルを使用して、波長は 190 nm-260 nm の間を走査速度 50 nm/min で 0.2 nm ごとにデータを測定し、4 回積算を行った。CD 測定により得られたデータは平均残基モル楕円率(θ)に変換した。

3.2.4 カルシウムイメージング法

1) 細胞培養

Human embryonic kidney (HEK) 293T 細胞は、直径 100 mm のプラスチックディッシュ (AGC Techno glass co, ltd, JAPAN) に撒種し、10% fetal bovine serum (Invitrogen, USA) を添加した高グルコース (3.5 g/l) Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, USA) を用いて 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。細胞継代は 2 日ごとに行い、PBS で洗浄後トリプシン消化を経て行った。

2) ヒト甘味受容体発現プラスミド

hT1R2 および hT1R3 の cDNA を導入した哺乳類培養細胞用発現ベクター pEAK10 (Edge Biosystems, USA) は、Dr. Charles Zuker (University California of San Diego) と Dr. Nicholas J. P. Ryba (NIDCD) よりご供与頂き、当研究室で保有しているものを使用した。またヒト甘味レセプターと効率よく作用することが知られているキメラ G α タンパク質の G α 15gi3 (G α 15 の C 末端 5 残基を G α i3 の対応する残基に置換) の cDNA を導入した発現ベクター pcDNA3.1(+) (Invitrogen) は大池秀明博士 (東京大学・現食品総合研究所) からいただいた。

3) トランスフェクション

前日に 6-well プレート (AGC Techno glass co, ltd, JAPAN) に撒種した HEK293T 細胞に対して Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションを行った。1-well につき hT1R2、hT1R3、G α 15gi3、pDsRed2-N (Takara Bio Inc, JAPAN) の発現プラスミドをそれぞれ 2.9 μ g、0.5 μ g、0.5 μ g、0.1 μ g 導入した。トランスフェクションの 6 時間後に培地を低グルコース (1.0 g/l) Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) に交換した。

4) カルシウムイメージング

トランスフェクションから約 30 時間後、PBS で洗浄後にトリプシンを用いて 6-well プレートから細胞を剥離し、低グルコース培地で適宜希釈して 96-well プレートに撒種した。37°C、5% CO₂ の条件下で 20 時間インキュベート後、BIOWASHER50 (DS PHARMA BIOMEDICAL Co, Ltd, JAPAN) で洗浄し、2.5 μ M となるようにカルシウム

蛍光指示薬 fura-2 AM (Invitrogen, USA)を添加して 27°Cにて 30 分間遮光下で静置した。再び洗浄後、アッセイバッファー (10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 10 mM D-glucose, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂)を 50 µl 残した状態で 15 分間室温放置し、カルシウムイメージングアッセイに供した。

アッセイバッファーを用いて 1.5 倍濃度に調製した味溶液 100 µl を well に添加し、細胞を刺激した。画像は刺激後 72 秒に渡って約 4 秒おきに記録した。細胞内カルシウム濃度の変化をカルシウム蛍光指示薬 fura2-AM でモニターし、味溶液に対する細胞応答強度の指標とした。2つの励起波長 340 nm および 380 nm によって生じる 510 nm の蛍光強度の比率(F₃₄₀/F₃₈₀)を測定することで検出した。データの解析には MetaFlour ソフトウェア(Molecular Devices, USA)を利用した。

DsRed 陽性細胞を、甘味受容体発現プラスミドおよび G タンパク質発現プラスミドの導入効率が高い細胞とみなし、解析に利用した。DsRed 陽性細胞のうち味刺激直後から 72 秒間での F₃₄₀/F₃₈₀ の増加が 0.15 以上の細胞の割合を求め、応答細胞率として定義した。またトランスフェクション効率のばらつきを軽減するため、各味溶液による応答細胞率を 6.7 mM のアスパルテームによる応答細胞率で標準化した値「relative response」を算出した。濃度応答曲線は Clampfit 9.2 ソフトウェア (Axon Laboratory, Switzerland)を用いてヒルの式で近似することで作成した。

3.2.5 官能試験

官能試験は 5 名の評価者で行った。評価者は実験 30 分前から食事を控えた。甘味強度の指標として 0.1、0.5、2.0 mM のアスパルテーム溶液を利用した。評価者は濃度の異なる 3 種類のアスパルテーム溶液の甘味強度を区別できるように訓練した。

官能試験ではネオクリンおよび変異体について、まずそれ自身を味わったときの甘味の強さを評価し、続いてその後に酸を味わったときに感じられる甘味の強さを評価した。評価者は最初に 0.1、0.5、2.0 mM のアスパルテーム溶液を 300 µl ずつ味わって甘味強度を覚えた。次に 4 µM に調製したタンパク質サンプル溶液(50 mM sodium phosphate buffer に溶解, pH 7.4)を 150 µl 味わい、甘味の強さをアスパルテーム溶液の甘味の強さと比較して 7 段階で評価した。水で口をゆすいだ後、さらにクエン酸バッファー(50 mM sodium citrate buffer, pH 4.0)を 300 µl 口に含み、酸により生じる甘味の強さをアスパルテーム溶液の甘味の強さと比較して 7 段階で評価した。

- 7: 2.0 mM アスパルテーム溶液より甘い
- 6: 2.0 mM アスパルテーム溶液と同等に甘い
- 5: 0.5~2.0 mM アスパルテーム溶液の間
- 4: 0.5 mM アスパルテーム溶液と同等に甘い
- 3: 0.1~0.5 mM アスパルテーム溶液の間

2: 0.1 mM アスパルテーム溶液と同等に甘い

1: 0.1 mM アスパルテーム溶液よりも甘味が弱い

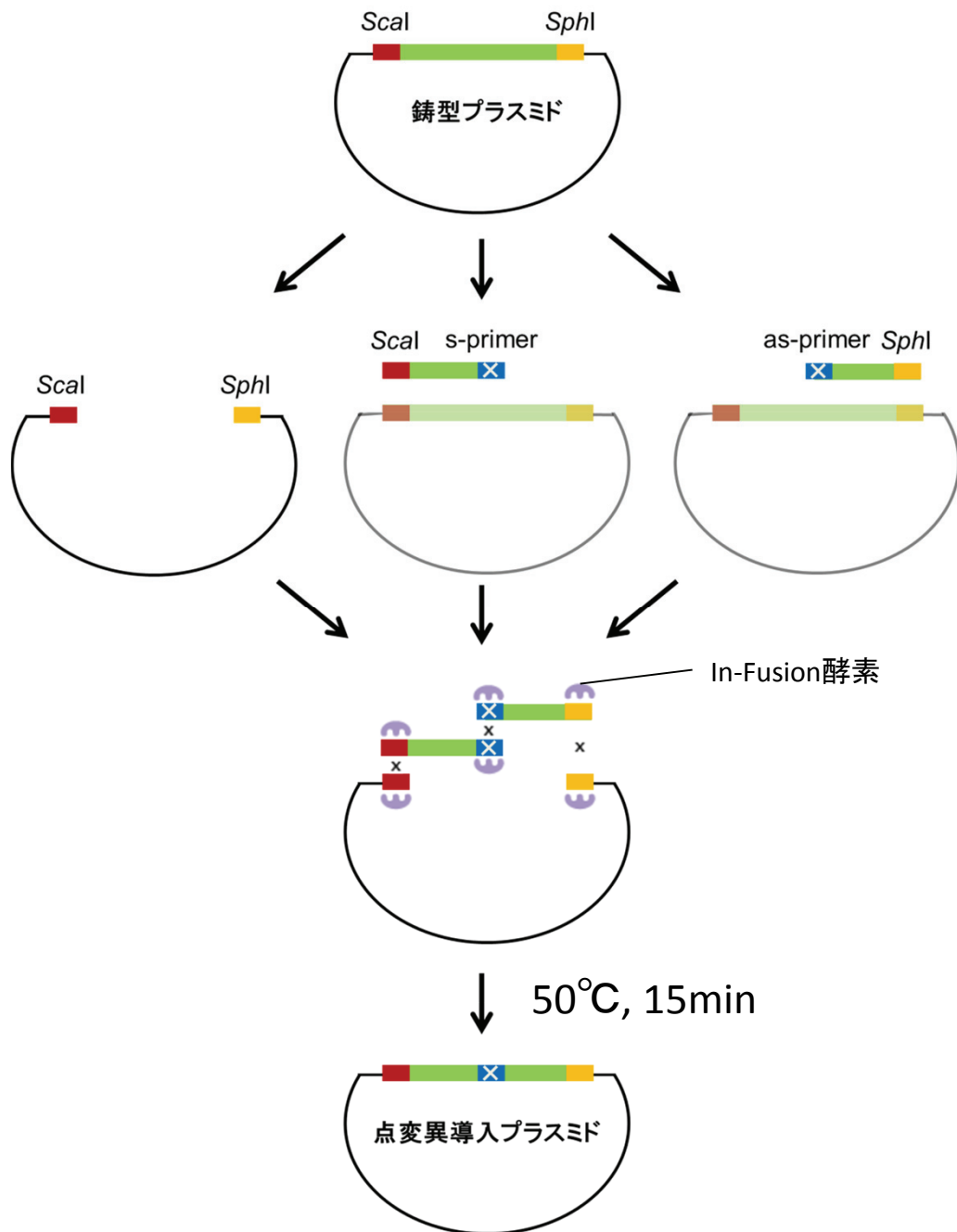


図3-1 In Fusion Cloningの概要

In Fusion HD Cloning Kitの酵素はDNA断片の末端15塩基の相同配列を融合する性質を有する。目的変異を導入したs-,as-プライマーと制限酵素切断配列を利用して2本のDNA断片を作製し、線状化ベクターとIn-fusion酵素により結合させることで、目的の点変異を導入したプラスミドを作製した。

3.3 結果

3.3.1 変異導入部位

NMR 解析により、ネオクリンの甘味強度が著しく変化する弱酸性 pH 領域において立体構造変化を生じうると考えられるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングできた。またそれらのアミノ酸残基が集合した 2 つの局所構造領域“His 残基周辺領域”(図 3-2A)と“B4-B5 loop, B6-B7 loop”(図 3-2B)を検出できた。本章ではこれらのアミノ酸残基群および局所構造領域がネオクリン分子の pH に依存した甘味強度変化を誘導している可能性があると考え、その検証を試みた。そこで計 14 種類の Ala 点変異体を作製し、そのヒト甘味受容体活性化能を培養細胞系によって評価した。

標的 I. “His 残基周辺領域” (図 3-2C、水色、緑色)

pH 滴定実験において pH に依存して立体構造変化を生じうると予想された 23 種類のアミノ酸残基は、5 つの His 残基周辺領域に集中して存在していた。さらに pH に依らず強い甘味を呈する pH センサー変異体との比較により、とりわけ Thr9、Leu54、Tyr65 (すべて NBS)の 3 残基が甘味強度変化に寄与する可能性が高いと考えた。また Phe94 (NBS)は pH 滴定実験において pH 5-7 の弱酸性領域での主鎖化学シフト変化が特に大きかったことから、同じく甘味強度変化に寄与する可能性が高いと考えた。

なお 23 種類のアミノ酸残基には主要的もしくは補助的にネオクリンの pH センサーとして働く His36 (NAS)、His11、His14 (ともに NBS)の 3 残基も当然含まれていた(Nakajima *et al.*, 2011)。本章では pH に依存した甘味強度変化に寄与するアミノ酸残基のコントロールとして、これら 3 つのアミノ酸残基についても改めて Ala 点変異体を作製した。さらにネオクリン分子表面上において 3 つの His 残基と同一平面に存在する唯一の芳香族アミノ酸残基である Tyr21(NAS)も変異体解析の標的とした。その理由としては、3 つの His 残基が直接的にヒト甘味受容体と相互作用することで pH に依存した甘味強度変化を制御している場合には、His 残基と同一平面上に存在する Tyr21 (NAS)も直接相互作用に関与している可能性が高いと予想したためである。

標的 II. “B4-B5 loop, B6-B7 loop” (図 3-2C、紫色)

NMR 解析において主鎖シグナルが帰属できないアミノ酸残基は、NBS サブユニット中の β 4-strand- β 5-strand 間の loop 領域、および β 6-strand- β 7-strand 間の loop 領域に集合していた。これらの loop 領域は pH に依らず構造的な柔軟性が高く、ゆえに pH

5-7の弱酸性領域においても立体構造変化を生じうるため、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化に寄与している可能性が否定できないと考えた。Loop を構成するアミノ酸残基のうち、NMR 解析において主鎖シグナルが帰属できない Asn27、Arg47、Arg48、Val72 の 4 残基(すべて NBS)、さらに Arg47 および Arg48 と空間的に近接する Asp46、Asp66 の 2 残基(ともに NBS)を加えた計 6 残基を、点変異体解析の標的とした。Asp66 は 88 -89 loop、Val72 は 89 strand 上に位置する。

3.3.2 培養細胞評価系を用いた点変異体のヒト甘味受容体活性化能の測定

計 14 種のネオクリン点変異体のうち、ヒト甘味受容体活性化能に変化が生じた点変異体を検出することを試みた。まず中性条件下(pH 7.4)・弱酸性条件下 (pH 6.3)のそれぞれ一点の pH において各ネオクリン点変異体のヒト甘味受容体活性化能をカルシウムイメージング法により評価した。少なくとも中性・酸性のいずれかの条件下において野生型と異なるヒト甘味受容体活性化能を示す点変異体を、変化が生じた点変異体とみなすことにした。

1) 中性条件下(pH 7.4)でのヒト甘味受容体活性化能の網羅的評価

中島らの知見通り、His36 (NAS)、His11、His14 (ともに NBS)の 3 つの pH センサーとして機能する His 残基を Ala に置換した点変異体では、野生型と比較して中性条件下でのヒト甘味受容体活性化能が有意に増加した(図 3-3A, C。H36A、H11A、H14A の順に pH 7.4 での EC₅₀ = 1.20 μM、2.12 μM、1.20 μM)。また今回新たに作製した Tyr21(NAS)を Ala に置換した点変異体でも、同様にヒト甘味受容体活性化能が有意に増加した(図 3-3A, C。pH 7.4 での EC₅₀ = 1.03 μM)。これらの点変異体についてヒト甘味受容体活性化能の pH 依存性をしらべたところ、その pH 依存性が減少する傾向が観察された(図 3-3D)。これらの変異体が正しいフォールディング構造をとっていることは Far-UV CD スペクトルを用いて確認した(図 3-4B)。

これより以上 4 種類のアミノ酸残基は、ネオクリン分子の pH に依存した甘味強度変化を制御しているアミノ酸残基であることが示唆された。

2) 弱酸性条件下(pH 6.3)でのヒト甘味受容体活性化能の網羅的評価

pH 5.5 以下でカルシウムイメージングを行うと非特異応答が観察されるため、pH 6.3 で測定を行うことにした。結果、Arg48、Val72 (ともに NBS)を Ala に置換した点変異体では甘味受容体活性化能が増加した(図 3-3B, E。WT、R48A、V72A の順に EC₅₀

= 1.24 μ M、0.31 μ M、0.84 μ M)。一方で、Tyr65、Phe94 (ともに NBS)を Ala に置換した点変異体では甘味受容体活性化能が減少した(図 3-3B, E。Y65A、F94A の順に EC_{50} = 6.90 μ M、3.79 μ M)。興味深いことに、これらの点変異体についてヒト甘味受容体活性化能の pH 依存性をしらべたところ、野生型と同様に、pH 低下に伴い受容体活性化能が増加する傾向が観察された(図 3-3F)。これらの変異体が正しいフォールディング構造をとっていることは Far-UV CD スペクトルを用いて確認した(図 3-4C)。

これより以上 4 種類のアミノ酸残基は、当初予想していたようなネオクリンの pH に依存した甘味強度変化を制御しているアミノ酸残基ではない。だがそれとは別に、pH に依らずネオクリンが発揮する甘味強度の決定に寄与しているアミノ酸残基であることが示唆された。味覚修飾タンパク質上でこのような性質をもつアミノ酸残基についての確かな報告はこれまでになかった。

3) 弱塩基性条件下(pH 8.0)でのヒト甘味受容体に対する阻害活性の評価

ネオクリンはそれ自身ヒト甘味受容体をわずかにしか活性化できない中性条件下においては、同条件下でヒト甘味受容体を強く活性化自身の pH センサー変異体 NBS H11A を競合阻害することが示されている(Nakajima *et al.*, 2008)。2)で発見した 4 種類のアミノ酸残基は、pH に依らずネオクリンが発揮する甘味強度決定に寄与している。すなわち pH に依らずネオクリン分子がヒト甘味受容体に及ぼす作用の大きさを決定していると解釈することができ、この中性条件下でのヒト甘味受容体に対する阻害活性にも寄与しうると予想した。そこで 4 種類のアミノ酸残基の Ala 点変異体について、自身がヒト甘味受容体を活性化しない弱塩基性条件下(pH 8.0)での pH センサー変異体に対する競合阻害活性を評価した(図 3-5)。その結果、酸性条件下で野生型よりもヒト甘味受容体を強く活性化した点変異体では、同様に弱塩基性条件下での競合阻害活性が強くなる傾向が観察された。また酸性条件下で弱く活性化した点変異体では、同様に競合阻害活性も弱くなる傾向が観察された。

これより、pH に依らずネオクリンが発揮する甘味強度の決定に寄与する Arg48、Tyr65、Val72、Phe94 (すべて NBS)の 4 種類のアミノ酸残基は、中性条件下でのヒト甘味受容体に対する阻害活性にも同方向に寄与していることが示された。これより 4 種類のアミノ酸残基は、pH に依らずヒト甘味受容体との親和性決定に寄与していることが示唆された。

4) 各種アミノ酸残基の構造上の分布

pH センサーである His 残基を含めた「pH に依存した活性変化」に寄与する 4 種のアミノ酸残基群、「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与する 4 種類のアミノ酸残基群について、それぞれ天然ネオクリン結晶構造上にマッピングすることで分子構造上の分布を調べた(図 3-6)。その結果、2 群のアミノ酸残基は分子構造上で異なる領域に分布していることが示された。

3.3.3 二重変異体の作製と活性評価

「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基群と、「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与することが示唆されたアミノ酸残基群とはネオクリン分子構造上で異なる領域に分布していたことから、2 群を構成するアミノ酸残基は独立的にネオクリンのヒト甘味受容体活性化能を制御していることが予想された。そこで 2 群からそれぞれ 1 残基ずつ選択して Ala に置換した二重変異体を作製して活性を評価することにより、2 群を構成するアミノ酸残基が独立的に機能しているのか、それとも従属的に機能しているのか検証することを試みた。

「pH に依存した活性変化」に最も寄与するメイン pH センサーである His11(NBS) を Ala に置換するのに加えて、「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与する 4 つのアミノ酸残基(Arg48、Tyr65、Val72、Phe94、すべて NBS)のうち 1 つを Ala に置換した二重変異体を、計 4 種類作製した(H11A/R48A、H11A/Y65A、H11A/V72A、H11A/F94A)。これらの変異体が正しいフォールディング構造をとっていることは Far-UV CD スペクトルを用いて確認した(図 3-4D)。

カルシウムイメージング法で活性を評価したところ、4 種類の二重変異体すべてが中性条件下(pH 7.4)においても弱酸性条件下(pH 6.3)においてもヒト甘味受容体を強く活性化した(図 3-7)。これはメイン pH センサーである His11(NBS)を Ala に置換したことによって pH 依存性が減弱されたためだと考えられる。また 4 種類の二重変異体が甘味受容体発現細胞を活性化する最大強度に注目したところ、二重変異体 NBS H11A/R48A、NBS H11A/V72A では点変異体 NBS H11A と比較して増加し、二重変異体 NBS H11A/Y65A、NBS H11A/F94A では点変異体 NBS H11A と比較して減少した。この増減傾向は Arg48、Tyr65、Val72、Phe94 という受容体との親和性決定に寄与するアミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した点変異体のもの(図 3-3E)と一致していた。

結果として、ネオクリン分子上で「pH に依存した活性変化」に寄与する His11(NBS) を Ala に置換するのに加えて、「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与するア

ミノ酸残基とをそれぞれ1つずつAlaに置換した変異の影響は、相加的であった。2群の残基は、独立的にネオクリンのヒト甘味受容体活性化能を制御していると考えられる。

3.3.4 官能試験による点変異体の活性評価

培養細胞評価系を用いた実験によって野生型と異なる活性をもつことが示された8種類のネオクリン点変異体について、その甘味活性を官能試験によっても評価した。被験者は最初にネオクリン点変異体自身の甘味を評価した。水で口をゆすいだ後、クエン酸バッファーを口に含み、酸により生じる甘味の強さを併せて評価した。

結果を図3-8に示す。「pHに依存した活性変化」に寄与する4種類のアミノ酸残基の点変異体は、培養細胞評価系においてpH依存性が低減されたために中性条件下でヒト甘味受容体を強く活性化させた。官能試験においては、野生型と同等もしくはやや強い程度の甘味を感じさせる結果となった。同時に、その後に酸を味わった段階で誘導される甘味が弱くなる傾向も観察された。

「pHに依らない受容体との親和性決定」に寄与する4種類のアミノ酸残基の点変異体は、培養細胞評価系において弱酸性条件下での甘味受容体活性化能が増減した。官能試験においても、酸を味わったときの甘味強度が培養細胞系と同様に増減する傾向が観察された。

3.3.5 種々の甘味物質によるヒト甘味受容体活性化に対してネオクリンが及ぼす影響

ネオクリンは中性条件下(pH 7.6)において、同条件下でヒト甘味受容体を強く活性化する性質を獲得した自身のpHセンサー変異体NBS H11Aを競合阻害する(Nakajima *et al.*, 2008)。ただし他種類の甘味物質によるヒト甘味受容体活性化に対する阻害活性は検証されていなかった。

そこでネオクリン自身がヒト甘味受容体をほぼ活性化しない弱塩基性条件下(pH 8.0)において、ネオクリンが他種類の甘味物質によるヒト甘味受容体活性化を阻害するか検証した。ネオクリンと他種類の甘味物質の混合溶液を調製し、ヒト甘味受容体を発現させた培養細胞へ添加したときの細胞応答を、カルシウムイメージング法によって評価した。その結果、予想とは逆に、ネオクリンの添加によってスクラロースおよびソーマチンへの細胞応答が増加した(図3-9A)。アスパルテームおよびシクラメートへの細胞応答も増加する傾向が観察された。自身の変異体であるNBS H11Aに対する細胞応答のみ減少した。これよりネオクリンは弱塩基性条件下において、他種類の甘味物質に対してはpositive-allosteric-modulator (PAM)としてはたらくことが示された。

さらに PAM 効果の強さが、ネオクリンおよび変異体自身がヒト甘味受容体を活性化
する強度と相関しているかを検証した。pH に依らず野生型よりもヒト甘味受容体を強
くまたは弱く活性化する性質を示す 4 種のネオクリン点変異体について、同様の手法で
PAM 効果を検証したが、自身がヒト甘味受容体を活性化する強度と PAM 効果との相
関は観察されなかった(図 3-9B)。

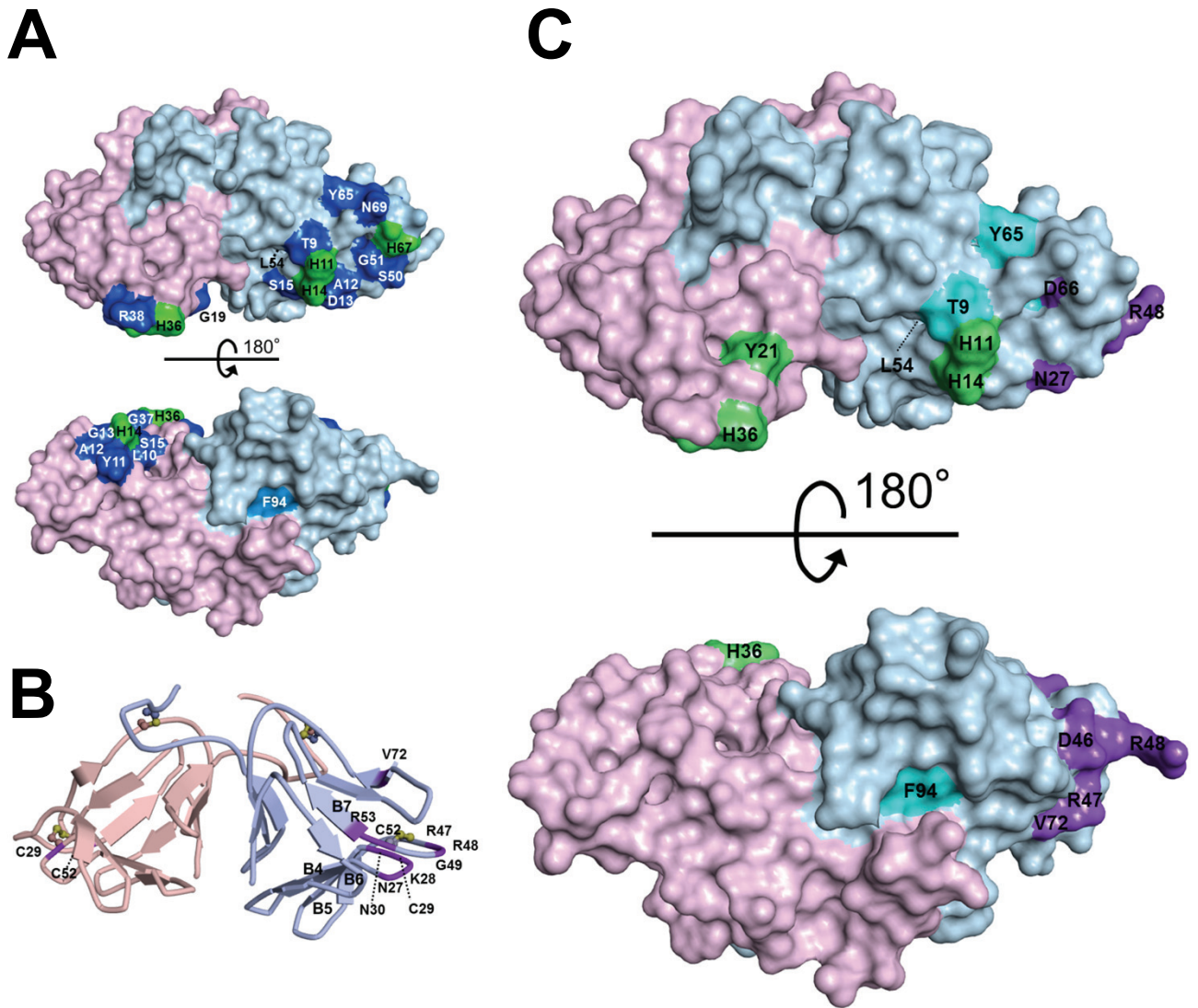


図3-2 Ala点変異を導入したアミノ酸残基

A: NMR解析の結果 (pH滴定)

緑: His残基を、および同一平面に存在するNAS Tyr21残基

水色: pHに依存して立体構造変化を生じると予測された残基を青色でそれぞれ示した

B: NMR解析の結果 (シグナル帰属)

構造的な揺らぎが大きくpHに依らず立体構造変化を生じると予測された残基を紫色で示した

C: Ala変異の標的としたアミノ酸残基

緑: 3つのHis残基、および同一平面に存在するNAS Tyr21残基

水色: pHに依存して立体構造変化を生じると予測されたアミノ酸残基

紫色: pHに依らず立体構造変化を生じると予測されたアミノ酸残基およびその近傍のアミノ酸残基
 なお、NAS分子表面をマゼンタ、NBS分子表面をシアンで色づけしている。

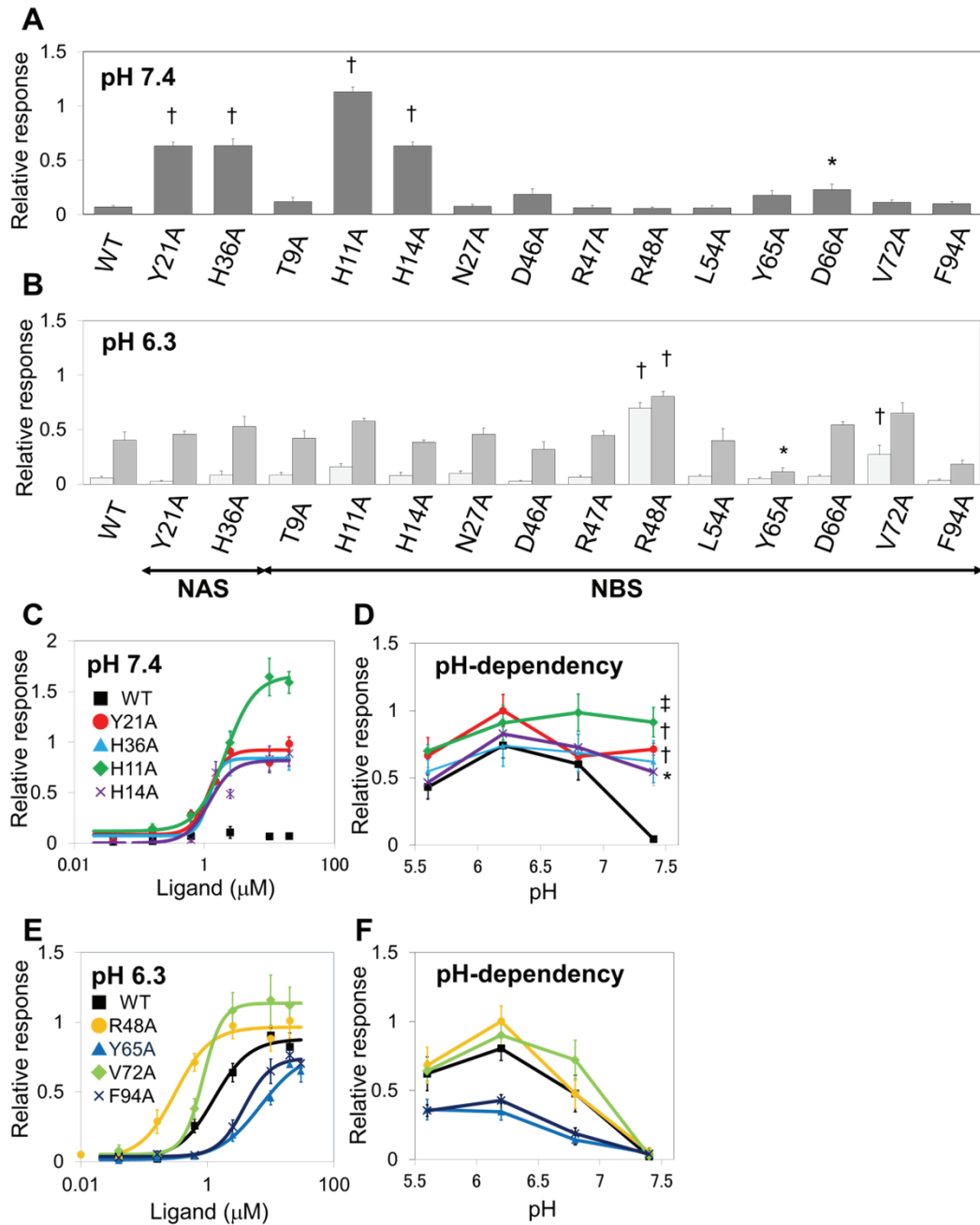


図3-3 培養細胞系によるネオクリン点変異体のヒト甘味受容体活性化能の評価

カルシウムイメージング法によって、ネオクリン点変異体を添加したときの甘味受容体発現細胞の応答値を測定した。6.7 mMアスパルテームによる細胞応答を基準として相対応答値を算出した。A, B: 14種類の点変異体の甘味受容体活性化能の網羅的解析。リガンドは中性条件下(pH 7.4)の場合に3 μ M、酸性条件下(pH 6.3)の場合に0.3, 1 μ Mの濃度で添加した。One-way ANOVAの後、ダネットの多重比較検定を行った($\dagger P < 0.001$, $* P < 0.05$ vs. WT)。各バーは独立した4-6回の実験の平均 \pm SEを示す。

C, E: 濃度応答曲線。各点は独立した3-5回の実験の平均 \pm SEを示す。

D, F: 各点変異体のヒト甘味受容体活性化能のpH依存性の検証。リガンドはすべて終濃度3 μ Mで添加した。One-way ANOVAの後、ダネットの多重比較検定を行った($\dagger P < 0.001$, $\dagger P < 0.01$, $* P < 0.05$ vs. WT)。各点は独立した3-6回の実験の平均 \pm SEを示す。

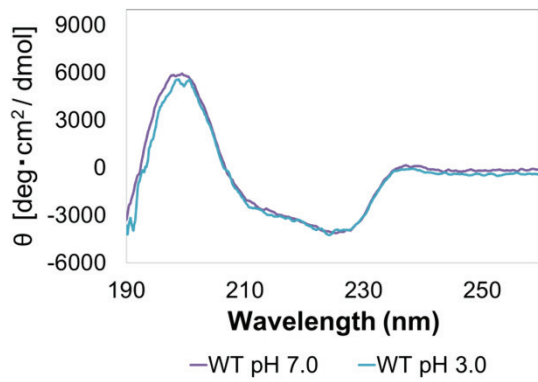
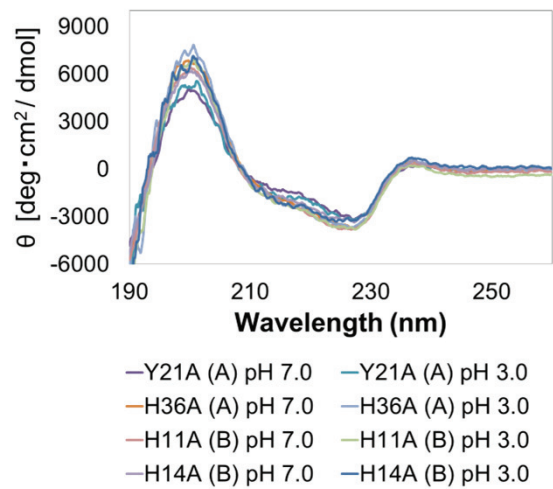
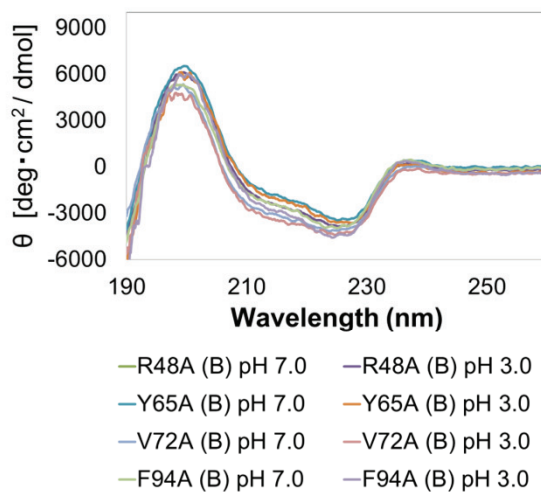
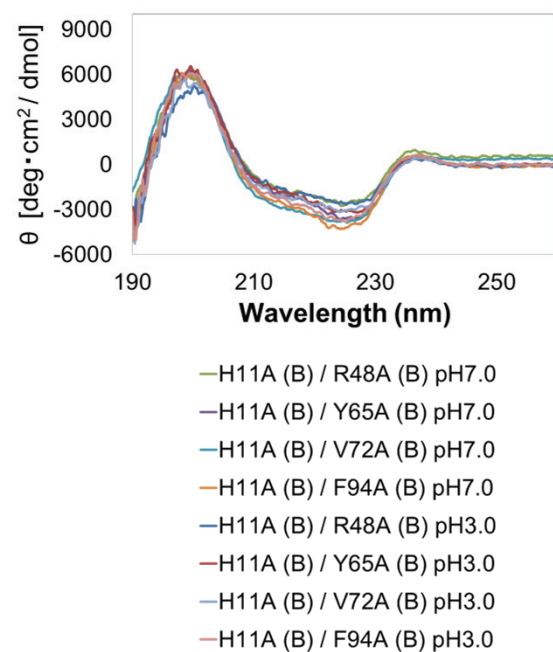
A**B****C****D**

図3-4 Far-UV CDスペクトルによるフォールディング構造の確認

A: 野生型

B: pHに依らずヒト甘味受容体を強く活性化する性質を獲得した点変異体

C: ヒト甘味受容体との親和性が変化した点変異体

D: 二重変異体

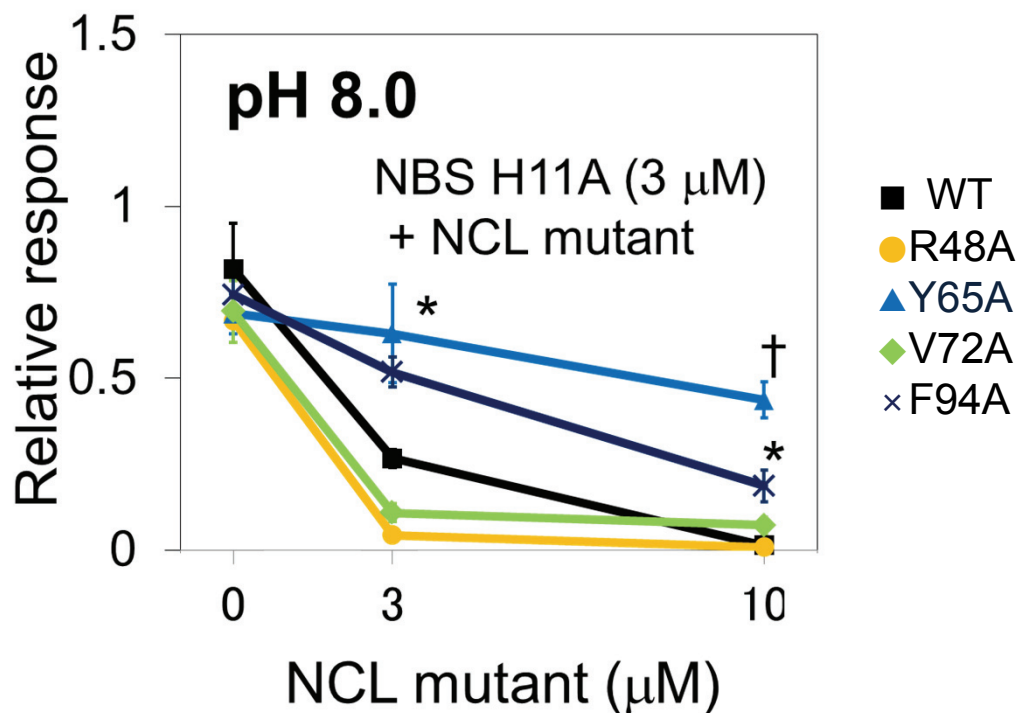


図3-5 pHセンサー変異体NBS H11Aに対する各種ネオクリン点変異体の競合阻害活性の評価

カルシウムイメージング法によって、pHに依らずヒト甘味受容体を強く活性化するネオクリン点変異体NBS H11Aと各種ネオクリン点変異体とを同時添加したときの甘味受容体発現細胞の応答値を測定した。6.7 mMアスパルテームによる細胞応答を基準として相対応答値を算出した。

One-way ANOVAの後、ダネットの多重比較検定を行った(† $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs. WT)。各バーは独立した3-4回の実験の平均± SEを示す。

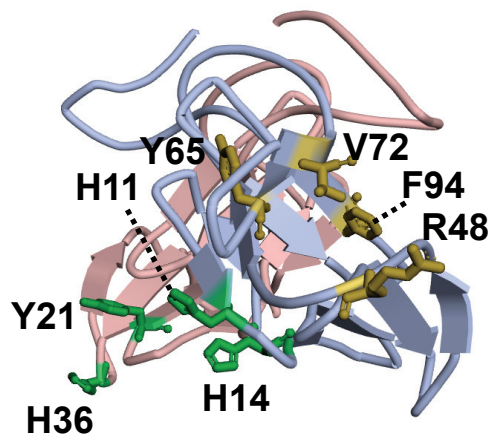
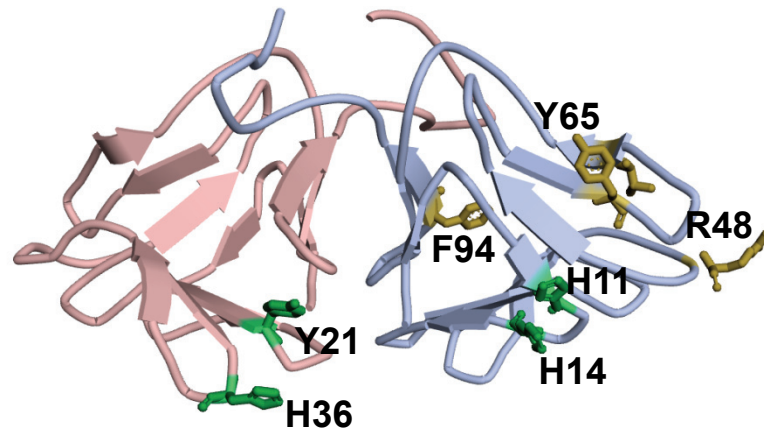


図3-6 ネオクリンのヒト甘味受容体活性化能に寄与するアミノ酸残基の構造上分布

緑:pHに依存した甘味強度変化に寄与することが示唆されたアミノ酸残基
 黄:pHに依らずヒト甘味受容体との親和性決定に寄与することが示唆されたアミノ酸残基
 なお、NASをマゼンタ、NBSをシアンで色付けして示している。
 また下図は上図を水平方向に80° 回転させた図である。

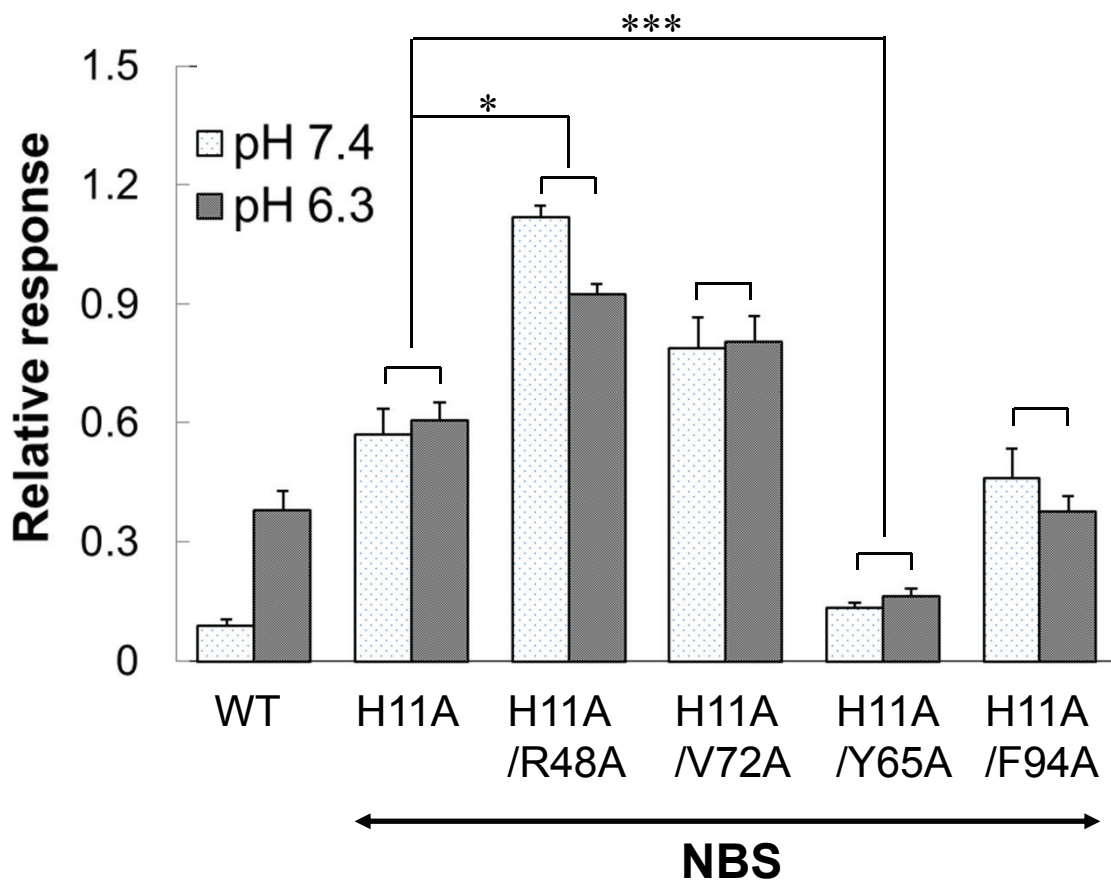


図3-7 二重変異体の甘味受容体活性化能

カルシウムイメージング法によってヒト甘味受容体発現細胞の細胞応答値を測定した。リガンド濃度は1 μ Mで統一した。また6.7 mMアスパルテームによる細胞応答を基準として相対応答値を算出した。4種の二重変異体はどれもpH非依存的にヒト甘味受容体発現細胞を活性化した。またH11A変異とは別のもう一種類の変異(R48A、V72A、Y65A、F94A)の種類によって、活性化強度が増減した。

One-way ANOVAの後、ダネットの多重比較検定を行った(** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs. H11A)。各バーは独立した4回の実験の平均 \pm SEを示す。

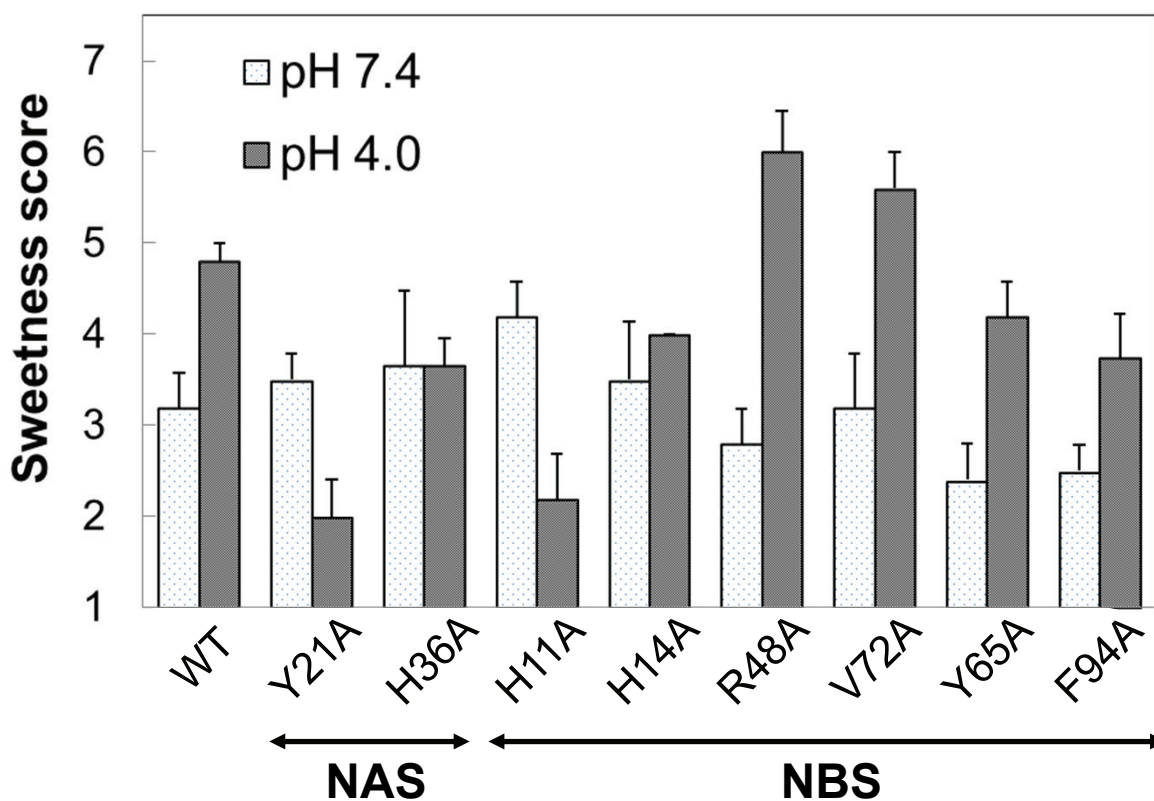


図3-8 ネオクリン点変異体の官能評価

被験者は最初に4 μ Mのタンパク質サンプル(pH 7.4)を味わい、甘味の強さを評価した。水で口を濯いだ後、50 mMのクエン酸バッファー(pH 4.0)を口に含み、酸により誘導される甘味の強さを併せて評価した。計5名の被験者で評価を行った。各バーは平均 \pm SEを示す。

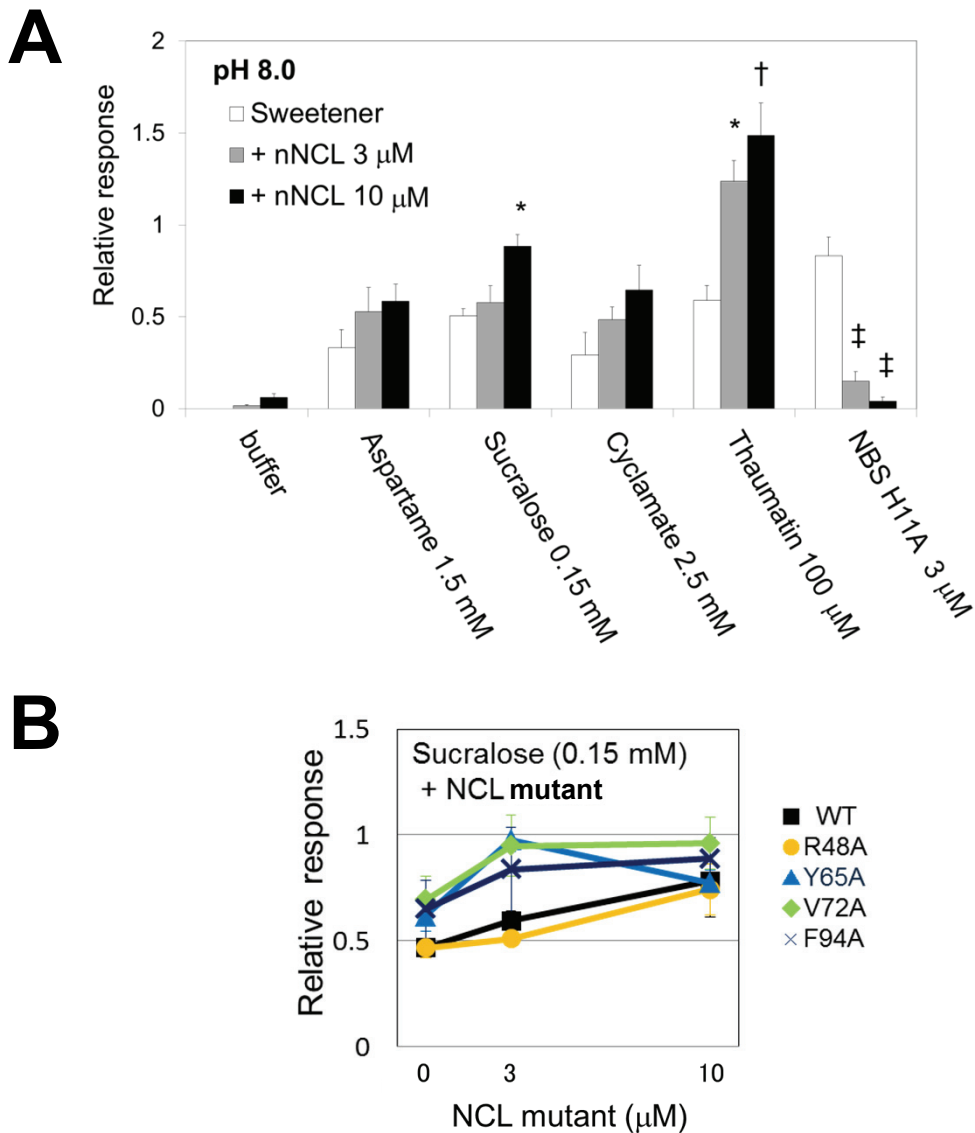


図3-9 ネオクリンが種々の甘味物質によるヒト甘味受容体活性化に及ぼす影響の評価

A ネオクリンが種々の甘味物質によるヒト甘味受容体活性化に及ぼす影響

カルシウムイメージング法によって、各種甘味物質と天然ネオクリンとを同時添加したときのヒト甘味受容体発現細胞の応答値を測定した。6.7 mMアスパルテームによる細胞応答を基準として相対応答値を算出した。One-way ANOVAの後、各種甘味物質のみを添加した場合に対して、各種甘味物質に天然ネオクリンを添加した場合のダネットの多重比較検定を行った(* $P < 0.001$, † $P < 0.01$ * $P < 0.05$ vs. WT)。各バーは独立した3-5回の実験の平均± SEを示す。

B ネオクリン点変異体が種々の甘味物質による受容体活性化に及ぼす影響

各種ネオクリン点変異体を用いて同様の実験を行った。0.15 mMスクラロースに各種ネオクリン点変異体を添加したときの甘味受容体発現細胞の応答値を測定した。ネオクリン点変異体の添加濃度が0, 3, 10 μMのそれぞれの場合においてOne-way ANOVAを行ったが、有意な差のある組は検出されなかった。

3.4 考察

NMR 解析の結果に基づき、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化に寄与する可能性が高いと予想されたアミノ酸残基および局所構造領域を標的とした一連の変異体解析を行った。その結果、ネオクリンには「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基群と、「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与するアミノ酸残基群とが存在していることが示唆された。また 2 つのアミノ酸残基群はネオクリン分子表面上異なる位置に分布しており、独立的にネオクリンのヒト甘味受容体活性化能を制御していることも示された。

3.4.1 pH に依存した活性変化に寄与するアミノ酸残基の作用機構について

「pH に依存した活性変化」に寄与する残基として、既知の pH センサーである 3 つの His 残基だけでなく、ネオクリン分子表面上でそれらの His 残基と同一平面に位置する Tyr21 (NAS) を新たに発見した(図 3-6)。しかし NMR 解析の結果によるとこのアミノ酸残基自身は pH 変化の影響を受けて立体構造変化を生じるわけではないため、pH に依存した活性変化に寄与していることは一見不思議である。この結果を説明するにあたり、我々は次のように考えた。「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基から構成される分子表面領域 (以下 pH 感受性領域と呼ぶ) そのものが、ヒト甘味受容体と直接的に相互作用しているのではないかと推測している(図 3-10A)。pH 低下に伴う 3 つの His 残基のプロトン化が生じたとき、pH 感受性領域では NMR で観測されたようなネオクリン側の局所構造変化が生じる。その結果、pH 感受性領域においてネオクリンとヒト甘味受容体との相互作用様式が局所的に変化することによって、ネオクリンによりヒト甘味受容体がより強く活性化されるような相互作用様式に遷移すると推測している。Tyr21 (NAS) はそれ自身 pH の影響を大きく受けないが、pH 感受性領域でのヒト甘味受容体との直接相互作用に少なからず寄与していると予想している。そのため、Tyr21 (NAS) への Ala 変異導入が pH 感受性領域において両者の相互作用様式を局所的に変化させることで、His 残基のプロトン化と同様の効果をもたらしたと考えている。

この pH 感受性領域における両者の相互作用様式の変化について、より詳細に分子機構を予想すると、例えば次のような考察もできる。ネオクリンの pH センサーとして機能する His 残基側鎖イミダゾール基の窒素原子は、中性条件下ではプロトンアクセプターとしてはたらく。それゆえ中性条件下では、これらの His 残基はヒト甘味受容体側に

存在するプロトンドナーとしてはたらくアミノ酸残基と水素結合を形成して安定化しうる。pH 低下に伴い His 残基がプロトン化を受けるとネオクリン側が局所構造変化を生じることはもちろん、同時にこのネオクリンとヒト甘味受容体をつなぐ水素結合が切断されると推測できる。このような現象も、His 残基周辺において pH 依存的に両者の相互作用様式を変化させる一因になりえると予想している。

3.4.2 予想されるネオクリンの pH に依存した活性変化メカニズム

得られた知見をもとに、ネオクリンが pH に依存してヒト甘味受容体を活性化させる分子機構について一つの新たなモデルを示した(図 3-10B)。4 種類のアミノ酸残基が pH に依らずヒト甘味受容体との親和性決定に寄与していることを考慮すると、少なくとも一部の構造領域においては、ネオクリンとヒト甘味受容体との結合様式は pH が変化しても大きくは変化しないと考えるのが自然だろう。一方で、ネオクリンの pH センサーとして機能する 3 つの His 残基を含む「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基から構成される構造領域 (pH 感受性領域) では、3.4.1 で述べたようにネオクリンとヒト甘味受容体との結合様式が変化すると予想される。このように両者の結合様式が pH に依存して局所的に変化することによって、酸性条件下ではネオクリンによりヒト甘味受容体が強く活性化されるようになると推測している。

3.4.3 変異体解析の結果と先行文献との整合性

本研究では変異体解析の結果に基づき、ネオクリンには「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基群と、「pH に依らないヒト甘味受容体との親和性決定(各 pH での活性の強さ)」に寄与するアミノ酸残基群とが構造上異なる位置に分布していることが示唆された。味覚修飾タンパク質ネオクリンの構造機能相関については、変異体解析を用いてしらべた報告が存在する(Kurimoto *et al.*, 2007)。Kurimoto らの結果と本研究の結果を比較して整合性を検証した(図 3-11)。

Kurimoto らの結果を参照すると、「pH に依存した活性変化」に寄与すると解釈できるアミノ酸残基として His36、Gln90 (NAS)が存在し、これらのアミノ酸残基に変異を導入すると中性条件下でも強い甘味を感じさせるようになると同時に、酸を味わったときに感じられる甘味が減弱されていると解釈できる。His36 (NAS) は中島らの先行研究および本研究において pH に依存した活性変化に寄与することが示されている(Nakajima *et al.*, 2011)。また Gln90 (NAS) のネオクリン分子表面上位置に注目すると、本研究で「pH に依存した活性変化」に寄与することを示した 4 種類のアミノ酸残

基と重なる分子表面上領域に位置している。「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基の構造上分布については、先行研究と本研究とで整合性がとれていると言える。

「pH に依らないヒト甘味受容体との親和性決定」に寄与するアミノ酸残基については、先行研究では Pro103、Leu106 (NAS)、Asn44、Arg93 (NBS)が存在し、これらのアミノ酸残基に変異を導入すると中性・酸性の両条件下において甘味強度が減弱されていると解釈できる。4 種の残基の構造上分布に着目すると、Asn44 (NBS)については、本研究で「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与することが示唆された Arg48、Val72 (NBS)と空間的に近接していた。また Pro103、Leu106 (NAS)、Arg93 (NBS)についても同様に、本研究で同定された Phe94 (NBS)と空間的に近接していた。これより「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与するアミノ酸残基の構造上分布についての主張も、先行文献と本研究との間でほぼ矛盾を生じていないと考えてよいだろう。

3.4.4 ネオクリンが口腔内に長時間保持される分子機構について

ネオクリンを口に含むとそれ自身のほのかな甘味が感じられる。さらにネオクリンはその後も 30 分間ほど口腔内に保持され、その間はレモン汁などの酸味物質を口に含むたびに強烈な甘味を感じさせる。ところが本研究で 8 種のネオクリン点変異体を対象として官能試験を行ったところ、2 種の点変異体 NAS Y21A と NBS H11A では、酸を味わったときに感じられる甘味が減弱される傾向が観察された(図 3-8)。官能試験では、最初に中性のネオクリン溶液を口に含んでそれ自身の甘味強度を評価し、その後に水で口をリンスした後、さらに酸性のクエン酸バッファーを口に含んだときに誘導される甘味強度を評価するという手順をとっている。2 種のネオクリン点変異体を味わった場合には、水で口をリンスし終えた段階にはすでに多くのタンパク質が口腔内から洗い流されていたために、酸を味わったときに感じられる甘味が減弱されたと推測できる。これより、Tyr21 (NAS)および His11 (NBS)などの「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基群は、ネオクリンが口腔内に保持される働きにも寄与していると考えられる。ネオクリン分子は通常中性条件下にあるヒト口腔内においてこれらのアミノ酸残基を利用して、ヒト甘味受容体上（あるいは舌上皮膜や口腔粘膜など）に結合して口腔内に保持されることで、その後に酸を味わったときに再度甘味を感じさせる効果を発揮するものと予想している。3.4.1 で提唱した仮説に基づいて考察してみると、中性条件下においてネオクリン分子上の「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基群とヒト甘味受容体との間で形成される水素結合こそが、ネオクリンが長時間ヒト口腔内に

保持される鍵になっている可能性も考えられる。

3.4.4 PAM 効果について

ネオクリンは中性条件下でヒト甘味受容体に相互作用するもののほぼ活性化はせず、同条件下でヒト甘味受容体を強く活性化する自身の pH センサー変異体 NBS H11A を競合阻害することが示されている(Nakajima *et al.*, 2008)。一方で、スクロースやシクラメートなどの他種類の甘味料に対しては受容体活性化を増強する positive-allosteric-modulator (PAM) としてはたらくことが分かった。ところで、ネオクリンはヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 の hT1R3 側の Amino-terminal-domain (ATD) を中心とした領域に作用することが示されている (Koizumi *et al.*, 2007)。甘味物質は多種多様であるが、ネオクリン同様に hT1R3 の ATD を中心とした領域に作用する甘味物質についての報告はほとんど聞かない(スクロースおよびスクラロースが作用するという報告のみ)。それゆえネオクリンが中性条件下において他の甘味物質のヒト甘味受容体に対する作用を物理的に競合阻害しないことは自然だろう。

ただしネオクリンが他の甘味物質によるヒト甘味受容体の活性化を阻害しないばかりか、活性化を増強する PAM 効果を発揮する分子機構については、本研究では十分な理解を得ることができなかつた。PAM 効果の強さは野生型および変異型ネオクリン自身がヒト甘味受容体を活性化する強度とも相関しなかつた(図 3-9B)。他に考える分子機構としては、ネオクリンが他の甘味物質により誘導されたヒト甘味受容体の活性化構造を安定化させるなどの現象が考えられるが、さらなる検証が必要である。

以上のように本章のまとめとしては、ネオクリン分子表面上には「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基群と、「pH に依らないヒト甘味受容体との親和性決定」に寄与するアミノ酸残基群とがそれぞれ存在するという先行文献と矛盾しない事象を提唱することができた。さらに得られた知見をもとに、「ネオクリンとヒト甘味受容体との結合様式は pH が変化しても大きくは変化しないものの、pH 低下に伴いネオクリンの pH センサーである His 残基周辺において両者の結合様式が局所的に変化し、その結果ネオクリンによりヒト甘味受容体が強く活性化されるようになる」という新たな分子仮説を提示した。

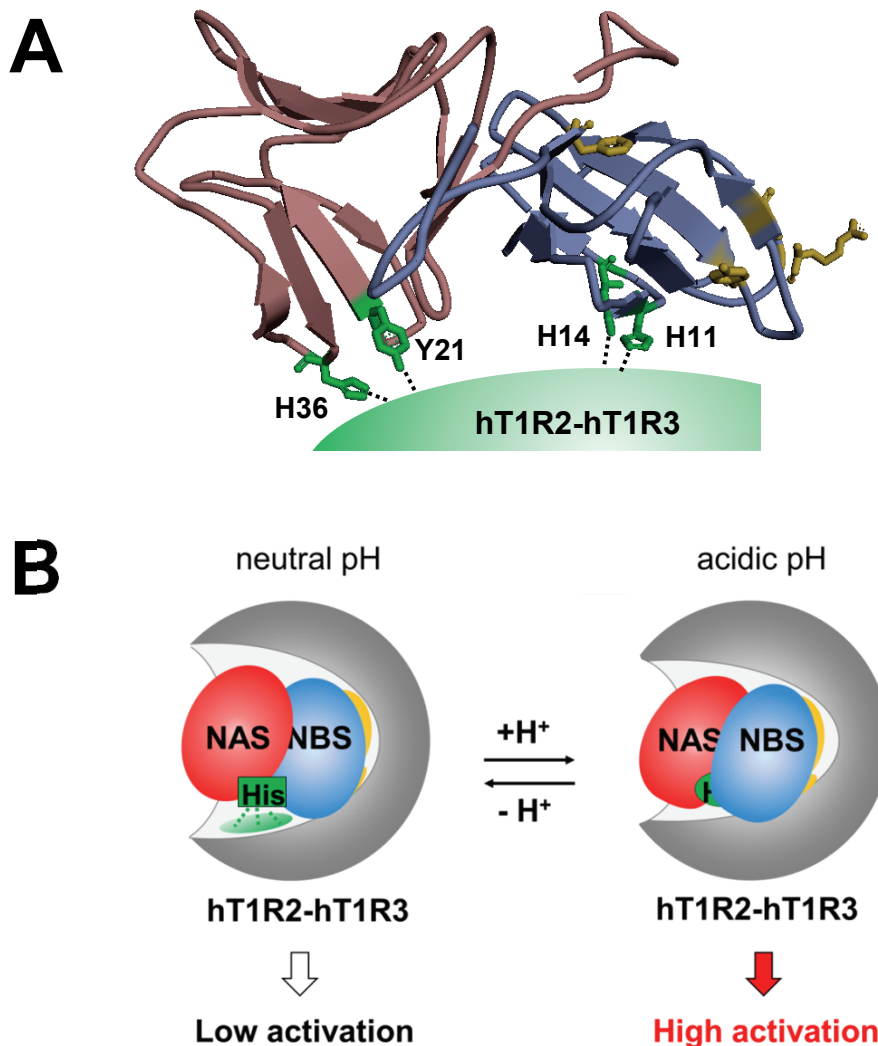


図3-10 本研究から予想されるヒト甘味受容体によるネオクリンの受容機構

A: 予想されるpHに依存した活性変化に寄与するアミノ酸残基群の作用機構

同定された4種類のpHに依存した活性変化に寄与するアミノ酸残基は、ヒト甘味受容体と直接的に相互作用していると推測している。pH低下によりネオクリンのpHセンサーとして機能するHis残基の側鎖イミダゾール基がプロトン化され、それに伴いネオクリン分子上のHis残基周辺領域の局所構造変化が生じると考えられる。また中性条件下においてHis残基を介してネオクリンとヒト甘味受容体との間で水素結合が形成されていたとしても、His残基のプロトン化により開裂すると予想される。これらの影響によって両者の結合様式が局所的に変化すると考えている。

B: 予想される受容機構

ネオクリンはpHに依らずヒト甘味受容体と結合している。pH低下に伴いHis残基周辺の構造領域において両者の結合様式が局所的に変化することで、酸性条件下ではネオクリンによりヒト甘味受容体が強く活性化されると推測している。

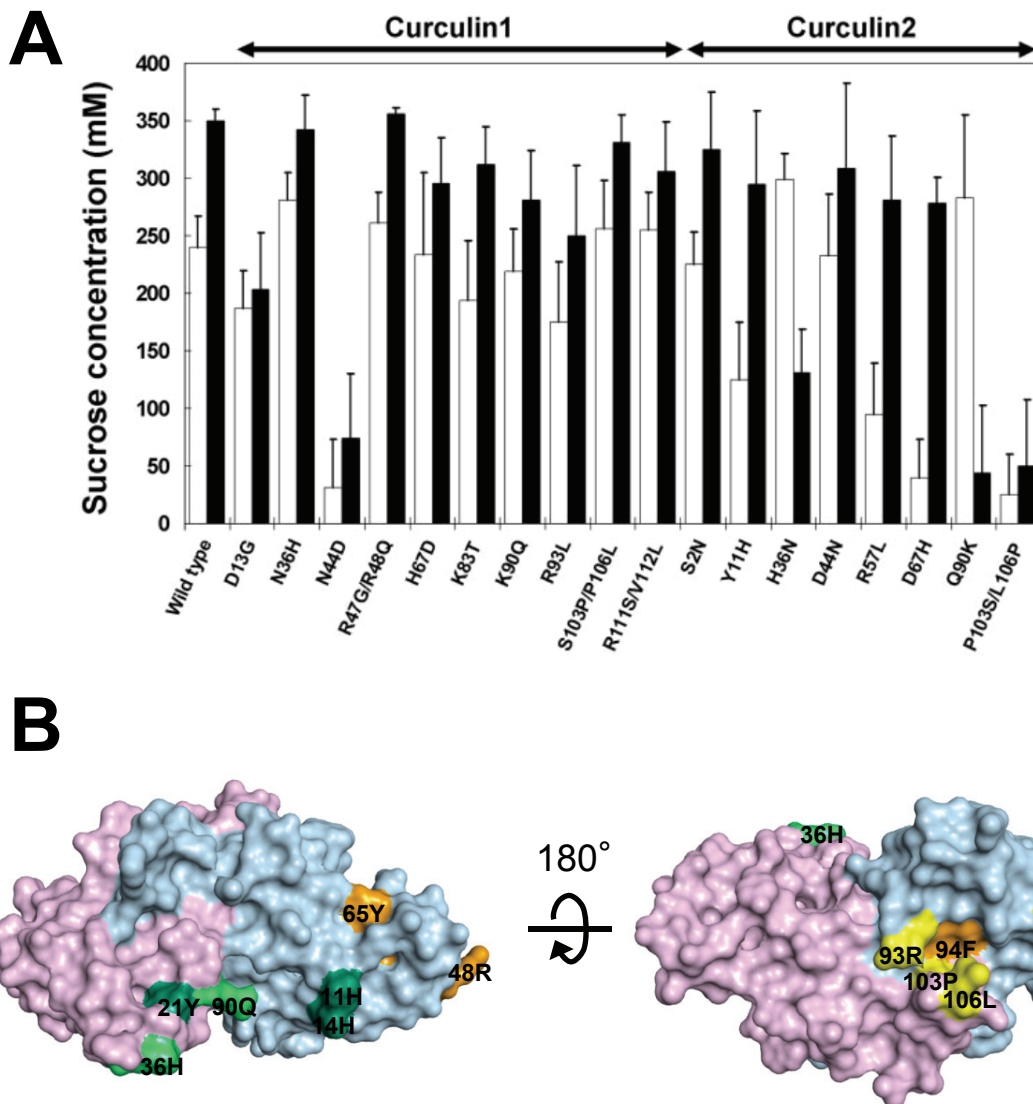


図3-11 本研究と先行研究(Kurimoto *et al.*, 2007)との比較

A: 官能試験によるクルクリン(ネオクリン)の官能評価。

クルクリン溶液を味わってそれ自身の甘味強度を評価した後に、酸性バッファを味わったときに感じられる甘味強度を評価している。Curculin1がNBS、Curculin2がNASに相当する。図はKurimoto *et al.*, 2007より引用。

B: ネオクリンの甘味活性に寄与するアミノ酸残基についての本研究と先行研究との比較。

本研究(緑)および先行研究(黄緑)で同定されたネオクリンのpHに依存した活性変化に寄与すると解釈できるアミノ酸残基と、本研究(橙)および先行研究(黄色)で同定されたネオクリンの酸性条件下での受容体との親和性決定に寄与すると解釈できるアミノ酸残基。

2群のアミノ酸残基群は、本研究でも先行研究でも、ほぼ重なる構造領域に集合している。なお、NAS分子表面をマゼンタ、NBS分子表面をシアンで色づけしている。

第 4 章

総合討論および今後の展望

本研究では 2 種の味覚修飾タンパク質のうち立体構造の解かれているネオクリンに注目し、ヒト甘味受容体による味覚修飾タンパク質の受容機構を構造化学の観点から解明することを目指した。

まず第 2 章では、NMR 法を用いてネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化をアミノ酸残基単位で検出した。その結果、pH に依存して立体構造変化を生じうる、それゆえネオクリンの pH に依存した甘味強度変化に寄与すると予想されるアミノ酸残基および構造領域を網羅的にスクリーニングできた。第 3 章ではスクリーニングしたアミノ酸残基を中心とした変異体解析を行った。その結果、ネオクリン分子上には「pH に依存した活性変化」に寄与するアミノ酸残基群と「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与するアミノ酸残基群が存在し、独立的にネオクリンのヒト甘味受容体活性化能を制御していることが示唆された。最後に得られた結果から、ネオクリンが pH に依存してヒト甘味受容体を活性化する分子機構について新たなモデルを提唱した。

以下、得られた知見および今後の課題を中心として考察した。

4.1 味覚修飾タンパク質とヒト甘味受容体との結合様式の検出

本研究ではネオクリン分子の構造機能相関の観点から、味覚修飾活性の分子機構について一つのモデルを提唱した。ただし味覚修飾活性の分子機構についてさらなる知見を獲得するためには、最終的には pH に依存した味覚修飾タンパク質とヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 との結合様式の変化を解明する必要がある。そのためには、両者の結合様式を X 線結晶構造解析（共結晶構造解析）などの手法で決定するのが有効である。ただしヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 自身、7 回膜貫通型クラス C GPCR のヘテロダイマーであるために結晶化が大変難しく、結晶構造解析に成功したという報告はない。味覚修飾タンパク質との共結晶化には時間がかかると考えられる。

他の手段としては、例えば光アフィニティーラベル法の利用が考えられる。光アフィニティーラベル法とは、光照射により光反応基をもったプローブ分子と標的タンパク質の間に共有結合を形成させることで、標的タンパク質上のプローブ分子結合部位近傍を標識する方法である(Vodovozova *et al*, 2007) (図 4-1)。化学修飾の容易な Cys 残基を導入したネオクリン変異体を利用すればこの方法も可能である。Cys 残基を介して光アフィニティーラベル化されたネオクリン変異体と精製した hT1R2 および hT1R3 細胞外領域との混合溶液を作製して光照射することで両者の複合体を得た後に、ペプチドに断片化して質量分析を行うことにより、ネオクリンとヒト甘味受容体との結合部位に関する知見が得られると期待できる。本研究によりネオクリン分子上でヒト甘味受容体との

親和性決定に寄与しており、それゆえ受容体と直接相互作用している可能性が高い4種類のアミノ酸残基を特定できたので、これらのアミノ酸残基群あるいはその近傍残基に光反応性ラベルを導入すればよいと考えられる。両者の結合部位が2~3点ほど決定できれば、ヒト甘味受容体によるネオクリンの受容機構を議論するに値する精度の結合モデルを作製することも可能であると期待している。もっとも、この相互作用解析を行うためには、甘味物質受容能を保持した状態でヒト甘味受容体 hT1R2 あるいは hT1R3 サブユニットの細胞外領域を単離精製する必要がある。マウスの T1R2, T1R3 については、大腸菌発現系を用いて糖への応答能を保持した細胞外領域の発現に成功した報告がある(Nie *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2006)。ヒト hT1R3 についても近年、大腸菌発現系を用いてスクラロスへの応答能を保持した細胞外領域の発現に成功した報告がなされた(Maitrepierre *et al.*, 2012, 2013)。また真核生物由来の細胞である昆虫細胞 Sf9 を宿主とした hT1R2 および hT1R3 の細胞外領域の産生も試みられている。将来的にはこれらの精製 hT1R2/hT1R3 細胞外領域を利用した相互作用解析が可能となるだろう。

4.2 ネオクリンが活性をもつのにヘテロダイマーである必要性について

ネオクリンは酸性サブユニット(NAS)と塩基性サブユニット(NBS)が2本のジスルフィド結合で架橋されたヘテロダイマー(NAS-NBS)として、それ自身の甘味活性および味覚修飾活性を発現する。NAS ホモダイマー、NBS ホモダイマーではともに甘味を発現しない(Suzuki *et al.*, 2004)。特に X 線結晶構造解析により決定された NBS ホモダイマー(NBS-NBS)の立体構造は、ヘテロダイマー(NAS-NBS)の立体構造と比較しても大きな差が観察されないにも関わらず甘味活性をもたないため興味深い(Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006; Kurimoto *et al.*, 2007) (図 4-2)。両者の立体構造を比較すると C 末端ループの立体構造に差が観察される。またネオクリンと進化的に近縁である単子葉レクチンとの立体構造比較によっても C 末端ループの重要性が説かれている(Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006)。さらに本研究の結果からネオクリンとヒト甘味受容体との親和性決定への寄与が示唆され、それゆえにヒト甘味受容体と直接的に相互作用する可能性が考えられるアミノ酸残基 Phe94 (NBS)は、NAS の C 末端ループの近傍に位置する。これらの知見より、ヘテロダイマー(NAS-NBS)と NBS ホモダイマー(NBS-NBS)との間で甘味活性の有無を左右しているのは、NAS サブユニットの C 末端ループの有無であると推測した。そこでヘテロダイマー(NAS-NBS)の NAS C 末端ループ 11 残基を NBS のものに置換したキメラヘテロダイマーを作製してみると、ヒト甘味受容体活性化能が消失した(Reverse Chimera、図 4-3、4-4 を参照)。これより NAS C 末端ループがネオクリン

によるヒト甘味受容体活性化には必要であることが示された。興味深いことに、逆に NAS の C 末端ループを NBS ホモダイマーに導入したキメラ NBS ホモダイマーを作製してみたところ、ヒト甘味受容体を活性化する性質を獲得した(Chimera①、図 4-3、4-4 を参照)。また NAS C 末端ループ上の特定領域のみを導入した 2 種のキメラ NBS ホモダイマーを作製してヒト甘味受容体活性化能の有無をしらべることによって、NAS C 末端ループの 103 番目の Pro (NBS では Ser)、106 番目の Leu (NBS では Pro)のわずか 2 アミノ酸残基の違いが、ヒト甘味受容体活性化能の有無に著しく寄与していることが示された(Chimera②、③、図 4-3、4-4 を参照)。さらなる検証が必要ではあるものの、この結果もヒト甘味受容体によるネオクリンの受容機構を解明する際に貴重な情報となるであろう。

4.3 味覚修飾活性の持続時間についての考察

ネオクリンの味覚修飾活性はおよそ 15~30 分ほど持続し、その間は水や酸を口に含むたびに甘味が感じられる。この現象は口腔内においてネオクリンがヒト甘味受容体上に保持されやすいためには生じていると考えられる。ところで中性条件下でもヒト甘味受容体を強く活性化するネオクリン変異体では、それ自身を味わった後、酸を味わったときに改めて感じられる甘味が減弱される傾向が観察された。またその持続時間も短くなる傾向が観察された(データは示さない)。これよりネオクリンがヒト甘味受容体を活性化させる状態(酸性)のときには、ほとんど活性化させずにただ保持されているだけの状態(中性)と比較して、ヒト甘味受容体からの解離速度が大きいと推測できる。それゆえ表面プラズモン共鳴法を利用した速度論的解析(図 4-5)によってそれぞれの状態でのヒト甘味受容体からの解離速度定数を算出することで、味覚修飾活性の持続時間について定性的な説明ができるかもしれない。

例えば、ネオクリンがヒト甘味受容体を活性化する状態のときには、ただ保持されているだけの状態よりもヒト甘味受容体からの解離速度が大きいと仮定してみる。すると、ネオクリンを口に含んだ後に何度も酸を味わって甘味を感じている(ネオクリンが何度も受容体を強く活性化する)うちに、感じられる甘味の強さが次第に減弱し、10 分もたたないうちに酸を甘く感じさせる性質が消失する現象を説明できる。また同様の方法でもう 1 種の味覚修飾タンパク質であるミラクリンについても、ただ保持されているだけの状態(中性)あるいは強く活性化する状態(酸性)のヒト甘味受容体からの解離速度定数を算出し、ネオクリンのものと比較することで、2 種の味覚修飾タンパク質間で味覚修飾活性の持続時間が異なる現象も説明できるかもしれない。また表面プラズモン

共鳴法による結合定数および解離速度定数の算出に加えて、等温滴定カロリメトリー法による熱力学的解析によって結合定数などを算出することも一つの方法である。

4.4 味覚修飾タンパク質に共通する PAM 効果

ネオクリンは中性条件下において自身の pH センサー変異体 NBS H11A によるヒト甘味受容体の活性化を競合阻害するが(Nakajima *et al.*, 2011)、他種類の甘味物質に対してはヒト甘味受容体活性化を増強する positive-allosteric-modulator (PAM)として機能することが示された。なお、もう一種の味覚修飾タンパク質であるミラクリンも PAM 効果を発揮することが報告されている(Koizumi *et al.*, 2011)。ただし PAM 効果を発揮する pH 範囲には差がある。ネオクリンは pH 8.0 で PAM、pH 6.5 では主にアゴニストとしてはたらく。一方ミラクリンは pH7.4 でアンタゴニスト(インバースアゴニスト)、pH 6.5 で PAM、pH 5.0 で主にアゴニストとしてはたらく(Koizumi *et al.*, 2011)。これより PAM 効果は、「味覚修飾タンパク質がヒト甘味受容体に結合するが、それ自身では活性化も阻害もしない状態」で発揮されると考えられる。

4.5 味覚修飾タンパク質による酸味抑制効果

本研究では味覚修飾タンパク質ネオクリンが酸に呼応して甘味を感じさせる分子機構について探究した。ところで味覚修飾タンパク質ネオクリンあるいはミラクリンには酸味を和らげる性質もあると言われており、その分子機構を解明することは、酸味抑制物質の開発にもつながると考えられる(Bartoshuk *et al.*, 1974)。味覚修飾タンパク質が酸味を和らげる分子機構としては

- i) 味覚修飾タンパク質が酸に呼応して感じさせる強烈な甘味入力、末梢神経系あるいは中枢神経系レベルで酸味入力を抑制している
- ii) 味覚修飾タンパク質が末梢組織レベルで酸味物質への細胞応答を抑制する

という 2 つの分子機構が考えられる。「i) 甘味入力による酸味入力の抑制」が生じているかをしらべる目的で、甘味抑制物質であるギムネマ酸を味わうことで甘味をほとんど感じない状態にしてから、ミラクリンによる酸味抑制効果を検証しようと試みた報告が存在する(Bartoshuk *et al.*, 1974)。その結果、ギムネマ酸により甘味入力を抑制した状態では、ミラクリンによる酸味抑制効果が消失することが示唆された。すなわち Bartoshuk らの結果は「i) 甘味入力による酸味入力の抑制」が生じていることを支持する。また Bartoshuk らは同程度の甘味強度を示す他の甘味物質を味わったときの甘味入力によっても、ミラクリン同様の酸味抑制効果が生じることを示している。ただし

我々の研究グループが過去に試験的に行った官能試験では、少なくとももう 1 種類の味覚修飾タンパク質であるネオクリンについては、同程度の甘味強度を示す他の甘味物質（スクロース、ソーマチンなど）よりも強い酸味抑制効果を発揮することが示唆されている。ミラクリンについては定かではないが、ネオクリンにおいては「i) 甘味入力による酸味入力の抑制」とは異なる酸味抑制効果が生じている可能性を検証する価値はあると考える。

「i) 甘味入力による酸味入力の抑制」が生じているかしらべる 1 つの新たな方法として、それ自身甘味活性を示さないがネオクリン(NAS-NBS)と非常に相同性の高い分子構造をもつ NBS ホモダイマー(NBS-NBS)を利用する方法が考えられる。甘味をもたない NBS ホモダイマーを味わったあとでも酸味が減弱されれば、ネオクリン分子の立体構造あるいは分子特性に起因する「i) 甘味入力による酸味入力の抑制」とは異なるメカニズムの酸味抑制機構が存在すると考えられる。逆に酸味が減弱されなければ、ネオクリンによる酸味抑制効果は「i) 甘味入力による酸味入力の抑制」に依る可能性が高い。

一方で「ii) 末梢レベルで酸味物質への細胞応答を抑制する」現象が生じているならば、ネオクリンが口腔内において酸味受容体あるいは酸味受容関連因子に作用していると予想できる。ゆえに、ネオクリンは未知の酸味受容体あるいは酸味受容関連因子を探すための有効なツールとして利用できるかもしれない。磁気ビーズを用いた免疫沈降法などを利用して、ヒト甘味受容体とは別にネオクリンが舌上において作用する未知分子を獲得し、その中から酸味受容体あるいは酸味受容関連因子を探索することができると考える。ただしヒト組織の入手は困難であるので、モデル動物を利用した段階から取り組む必要があるだろう。その際、ヒトとモデル動物との間での酸味受容因子の相同性が一つの鍵になるだろう。

またもう一つの可能性として

iii) ネオクリンは口腔内において酸味受容体や酸味受容関連因子にも作用せず、単純に酸味物質自体に作用し、その働きを弱めている

という可能性も考えられる。すなわちネオクリンは一分子中に 5 つの His 残基を持っており、これらの His 残基がアクセプターとして酸味物質からプロトンを奪うことで、酸味物質が引き起こす口腔内 pH の低下を弱めていると考えられる。その場合、ネオクリンが自身の His 残基のプロトン化という単一の現象によって、甘味を発現すると同時に酸味を抑制するという点で、呈味物質として非常に興味深い。このように「iii) ネオクリンが舌上でプロトンアクセプターとして機能することで酸味を和らげる」という現象が真であるならば、それ自身甘味活性を示さないがネオクリンと同様の立体構造をも

ち、かつ一分子中 6 つの His 残基をもつ NBS ホモダイマーでも同様の現象が生じると予想される。やはり NBS ホモダイマーによる酸味抑制効果は検証してみる価値があると考えられる。

甘味の受容機構の解明は、生命科学はもちろん、砂糖を代替する新規甘味料の開発につながるという点でも興味深い研究課題であるといえる。またヒト甘味受容体による甘味タンパク質の受容機構を解明することによって、ヒト甘味受容体自身のリガンド受容機構の解明に近づくのはもちろんのこと、主に低分子物質をリガンドとするクラス C GPCR のリガンド受容機構にも新たな知見を提供できると期待される。今後、本研究が味覚化学研究およびGPCR 研究の一助となることを切に願ひ、本論文の結びとしたい。

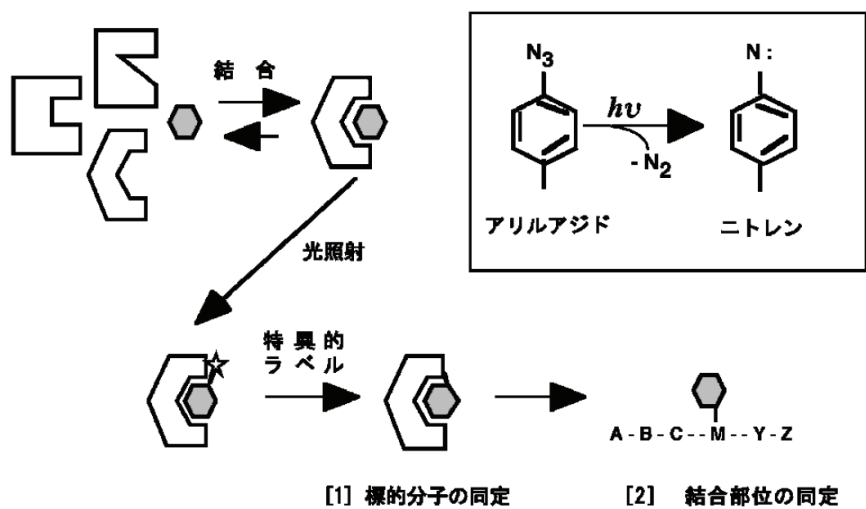


図4-1 光アフィニティーラベル法の概要図

光照射により光反応基をもったプローブ分子と標的タンパク質の間に共有結合を形成させることで、結合部位近傍を標識できる。
 図は、國安ら、薬学雑誌、2003より引用。

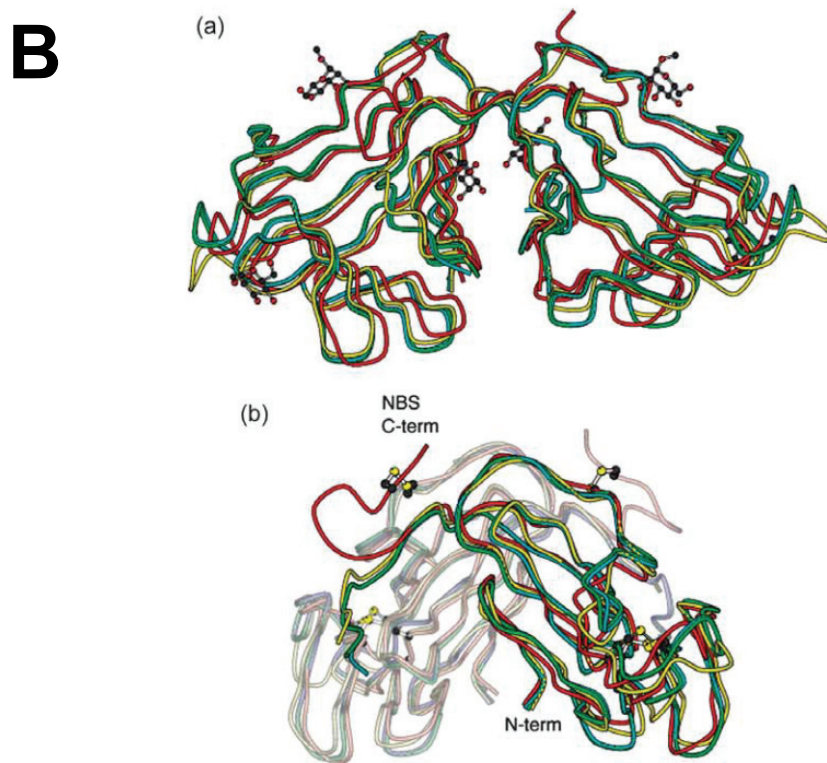
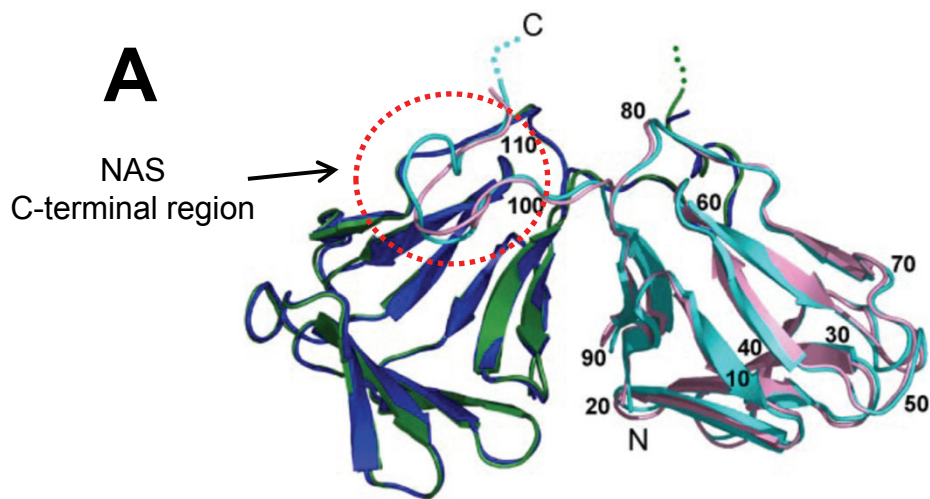


図4-2 ネオクリンヘテロダイマーとNBSホモダイマーおよびレクチンの立体構造比較

A: ヘテロダイマー(NAS-NBS)とNBSホモダイマー(NBS-NBS)の結晶構造の重ね合わせ
 ヘテロダイマーのNASをマゼンタ、NBSを青で、NBSホモダイマーの両NBSをシアン、緑で
 示している。NASのC末端ループ領域に相当する部分に最も大きな構造的差異が観察さ
 れている。

図はKurimoto *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2007より引用、一部改変。

B: ヘテロダイマーと単子葉マンノース結合レクチンの結晶構造の重ね合わせ
 ネオクリン(赤)、ガーリックレクチン(黄)、スノードロップレクチン(シアン)、ラッパズイセンレク
 チン(緑)の結晶構造を重ね合わせている。ネオクリンのNBSのC末端ループ領域に最も大
 きな構造的差異が観察されている。

図はShimizu-Ibuka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2006より引用。

A

NAS_new_1	1	DS	V	L	L	S	G	Q	T	L	Y	A	G	H	S	L	T	S	G	S	Y	T	L	T	I	Q	N	N	C	N	L	V	K	Y	Q	H	G	R	Q	I	W	A	S	D	T	G	Q	G	S	Q	C	R	L	T	L	R	S	D	G	60		
NBS_new_1	1	D	N	V	L	L	S	G	Q	T	L	H	A	D	H	S	L	Q	A	G	A	Y	T	L	T	I	Q	N	K	C	N	L	V	K	Y	Q	H	G	R	Q	I	W	A	S	N	T	D	R	R	G	S	G	C	R	L	T	L	L	S	D	G	60
NAS_new_1	61	N	L	I	L	Y	D	D	N	N	M	V	V	W	G	S	D	C	W	G	N	N	G	T	Y	A	L	V	L	Q	D	G	L	F	V	I	Y	G	P	V	L	W	P	L	G	L	N	G	C	R	S	L	N	-	113							
NBS_new_1	61	N	L	V	I	Y	D	H	N	N	N	D	V	W	G	S	A	C	W	G	D	N	G	K	Y	A	L	V	L	Q	K	D	G	R	F	V	I	Y	G	P	V	L	W	S	L	G	F	N	G	C	R	R	V	N	G	114						

キメラ化した領域

B

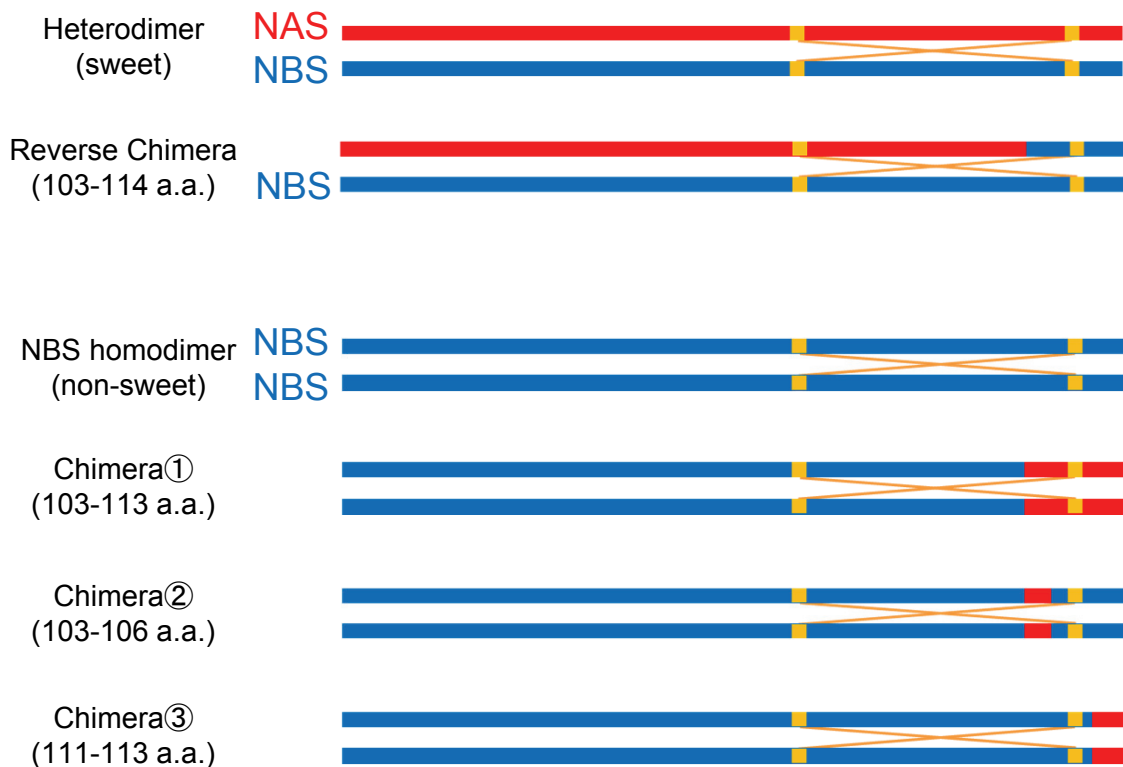


図4-3 キメラNBSホモダイマーの作製デザイン

A: NASとNBSのアミノ酸配列の比較

NASのC末端領域11アミノ酸残基がヘテロダイマー(NAS-NBS)とNBSホモダイマー(NBS-NBS)との間での甘味活性の有無を左右していると予想した。そこで11アミノ酸残基およびその一部をNBSホモダイマー(NBS-NBS)に導入し、ヒト甘味受容体活性化能を獲得するかしらべた。

B: キメラタンパク質の模式図

まずNASのC末端領域11アミノ酸残基をNBSのものに置換したキメラヘテロダイマー(Reverse Chimera)を作製し、NASのC末端領域がヒト甘味受容体活性化に必要な構造領域であるかをしらべた。次にそれ自身ヒト甘味受容体を活性化しないNBSホモダイマーに対して、NASのC末端領域11アミノ酸残基およびその一部を導入したキメラNBSホモダイマー(Chimera①、②、③)を作製し、ヒト甘味受容体活性化能を獲得するか検証した。

両サブユニット間を架橋するジスルフィド結合および関与するCys残基を黄色で示した。

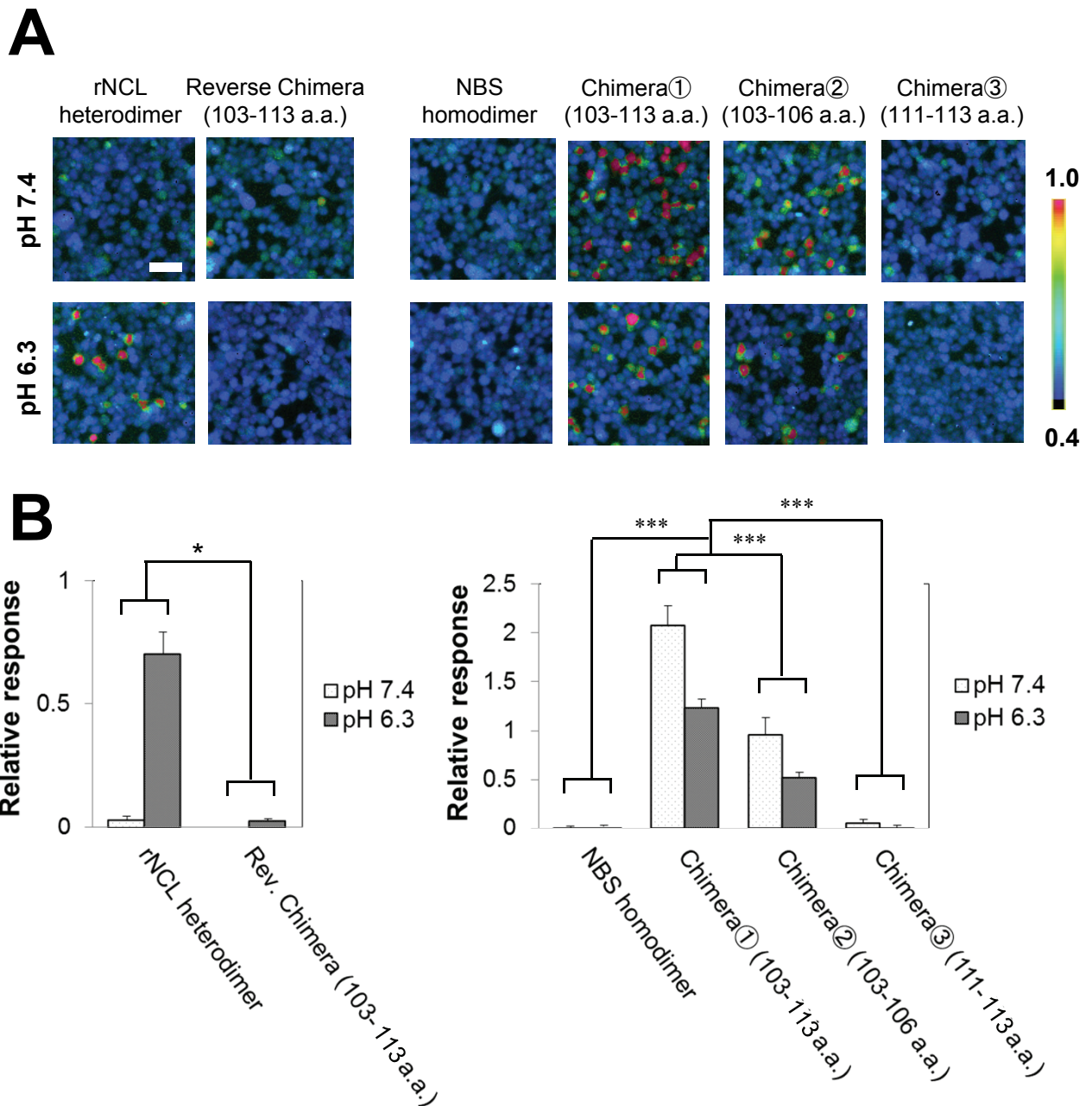


図4-4 キメラタンパク質のヒト甘味受容体活性化能の評価

A: カルシウムイメージング法によるヒト甘味受容体活性化能の評価

hT1R2、hT1R3、G15Gi3を一過的に発現したHEK293T細胞に、各種タンパク質を終濃度3 μMで添加して30-40秒後の細胞応答。カルシウム蛍光指示薬Fura-2/AMが発する蛍光強度(F_{340}/F_{380})を疑似カラーで示した。スケールバーは50 μmを示す。

B: カルシウムイメージング法によるヒト甘味受容体活性化能の算出

各タンパク質を添加したときの甘味受容体発現細胞の応答値を測定した。6.7 mMアスパルテームによる細胞応答を基準として相対応答値を算出した。リガンドはすべて3 μMの濃度で添加した。

(左)t検定を行った(* $P < 0.05$)。各バーは独立した4-5回の実験の平均 ± SEを示す。

(右)One-way ANOVAの後、テューキーの多重比較検定を行った(** $P < 0.001$, * $P < 0.05$)。各バーは独立した4-5回の実験の平均 ± SEを示す。

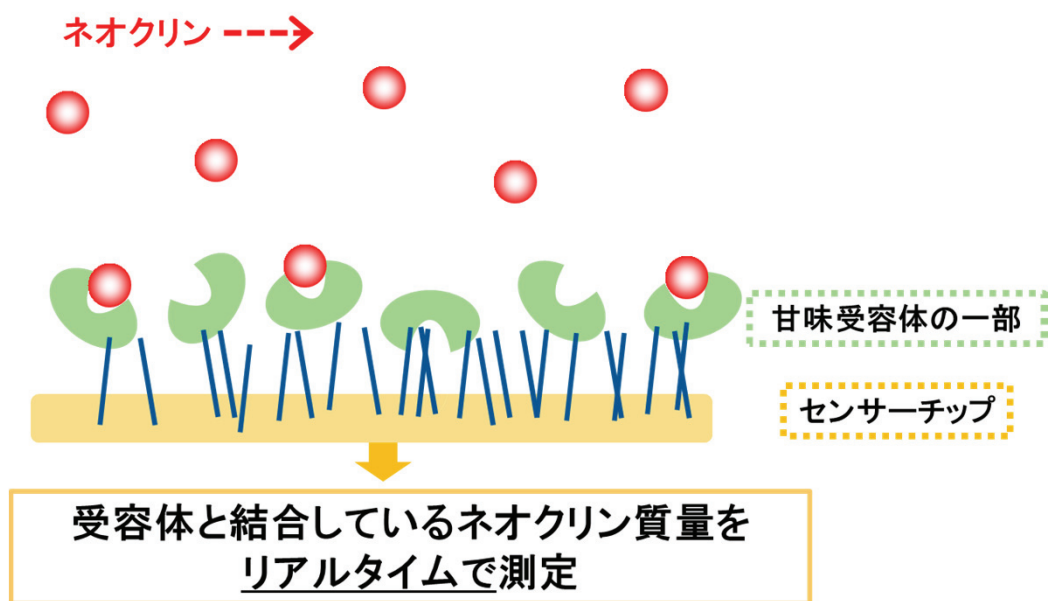


図4-5 表面プラズモン共鳴法によるネオクリンとヒト甘味受容体との相互作用解析のモデル図

一定量のネオクリンを添加したときに、センサーチップ上に固定したヒト甘味受容体細胞外領域(hT1R2 ATDおよびhT1R3 ATD)に結合するネオクリン質量を測定することで、甘味受容体とネオクリンの結合の強さを評価できる。またネオクリンが甘味受容体から解離していく様子を観察できるため、速度論的解析にも応用できる。

参考文献

- Assadi-Porter FM, Mailliet EL, Radek JT, Quijada J, Markley JL & Max M. (2010). Key amino acid residues involved in multi-point binding interactions between brazzein, a sweet protein, and the T1R2-T1R3 human sweet receptor. *J Mol Biol* 398, 584-599.
- Bartoshuk LM, Gentile RL, Molkowitz HR & Meiselman HL. (1974). Sweet taste induced by miracle fruit (*Synsepalum dulcificum*). *Physiol Behav* 12, 449-456.
- Cavanagh J. (2007). *Protein NMR spectroscopy : principles and practice*. Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ & Zuker CS. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444, 288-294.
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS & Ryba NJ. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100, 703-711.
- Cornilescu CC, Cornilescu G, Rao H, Porter SF, Tonelli M, DeRider ML, Markley JL & Assadi-Porter FM. (2013). Temperature-dependent conformational change affecting Tyr11 and sweetness loops of brazzein. *Proteins* 81, 919-925.
- Cui M, Jiang P, Mailliet E, Max M, Margolskee RF & Osman R. (2006). The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites. *Curr Pharm Des* 12, 4591-4600.
- Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y & Margolskee RF. (2003). Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301, 850-853.
- Esposito V, Gallucci R, Picone D, Saviano G, Tancredi T & Temussi PA. (2006). The importance of electrostatic potential in the interaction of sweet proteins with the sweet taste receptor. *J Mol Biol* 360, 448-456.
- Hemmi H, Kuno A, Ito S, Suzuki R, Hasegawa T & Hirabayashi J. (2009). NMR studies on the interaction of sugars with the C-terminal domain of an R-type lectin from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Febs J* 276, 2095-2105.
- Hiura A, Akabane T, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K & Kurihara Y. (1996). Taste-modifying triterpene glycosides from *Staurogyne merguensis*. *Phytochemistry* 43, 1023-1027.
- Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJP & Zuker CS. (1999). Putative mammalian taste receptors: A class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96, 541-551.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ &

Zuker CS. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934-938.

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

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

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

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

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

Jin Z, Danilova V, Assadi-Porter FM, Markley JL & Hellekant G. (2003). Monkey electrophysiological and human psychophysical responses to mutants of the sweet protein brazzein: delineating brazzein sweetness. *Chem Senses* 28, 491-498.

Kaneko R & Kitabatake N. (2001). Sweetness of sweet protein thaumatin is more thermoresistant under acid conditions than under neutral or alkaline conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 409-413.

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

Koizumi A, Nakajima K, Asakura T, Morita Y, Ito K, Shimizu-Ibuka A, Misaka T & Abe K. (2007). Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 585-589.

Koizumi A, Tsuchiya A, Nakajima K, Ito K, Terada T, Shimizu-Ibuka A, Briand L, Asakura T, Misaka T & Abe K. (2011). Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16819-16824.

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

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

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

Kurimoto E, Suzuki M, Amemiya E, Yamaguchi Y, Nirasawa S, Shimba N, Xu N, Kashiwagi T, Kawai M, Suzuki E & Kato K. (2007). Curculin exhibits sweet-tasting and taste-modifying activities through its distinct molecular surfaces. *J Biol Chem* 282, 33252-33256.

Lee SA, Eyeson R, Cheever ML, Geng J, Verkhusha VV, Burd C, Overduin M & Kutateladze TG. (2005). Targeting of the FYVE domain to endosomal membranes is regulated by a histidine switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13052-13057.

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

Maitrepierre E, Sigoillot M, Le Pessot L & Briand L. (2012). Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor. *Protein Expr Purif* 83, 75-83.

Maitrepierre E, Sigoillot M, Le Pessot L & Briand L. (2013). An efficient *Escherichia coli* expression system for the production of a functional N-terminal domain of the T1R3 taste receptor. *Bioengineered* 4, 25-29.

Masuda K, Koizumi A, Nakajima K, Tanaka T, Abe K, Misaka T & Ishiguro M. (2012). Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLoS One* 7, e35380.

Masuda T, Ohta K, Tani F, Mikami B & Kitabatake N. (2011). Crystal structure of the sweet-tasting protein thaumatin II at 1.27Å. *Biochem Biophys Res Commun* 410, 457-460.

Masuda T, Taguchi W, Sano A, Ohta K, Kitabatake N & Tani F. (2013). Five amino acid residues in cysteine-rich domain of human T1R3 were involved in the response for sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochimie* 95, 1502-1505.

Masuda T, Ueno Y & Kitabatake N. (2005). High yield secretion of the sweet-tasting protein lysozyme from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 39, 35-42.

Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Damak S & Margolske RF. (2001). *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nature genetics* 28, 58-63.

Misaka T. (2013). Molecular mechanisms of the action of miraculin, a taste-modifying protein. *Semin Cell Dev Biol* 24, 222-225.

- Morita Y, Nakajima K, Iizuka K, Terada T, Shimizu-Ibuka A, Ito K, Koizumi A, Asakura T, Misaka T & Abe K. (2009). pH-Dependent structural change in neoculin with special reference to its taste-modifying activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 2552-2555.
- Nakajima K, Asakura T, Oike H, Morita Y, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Sorimachi H, Arai S & Abe K. (2006). Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport* 17, 1241-1244.
- Nakajima K, Morita Y, Koizumi A, Asakura T, Terada T, Ito K, Shimizu-Ibuka A, Maruyama J, Kitamoto K, Misaka T & Abe K. (2008). Acid-induced sweetness of neoculin is ascribed to its pH-dependent agonistic-antagonistic interaction with human sweet taste receptor. *Faseb J* 22, 2323-2330.
- Nakajima K, Yokoyama K, Koizumi T, Koizumi A, Asakura T, Terada T, Masuda K, Ito K, Shimizu-Ibuka A, Misaka T & Abe K. (2011). Identification and modulation of the key amino acid residue responsible for the pH sensitivity of neoculin, a taste-modifying protein. *PLoS One* 6, e19448.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ & Zuker CS. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* 416, 199-202.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ & Zuker CS. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381-390.
- Ohta K, Masuda T, Tani F & Kitabatake N. (2011). The cysteine-rich domain of human T1R3 is necessary for the interaction between human T1R2-T1R3 sweet receptors and a sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 435-438.
- Ohta K, Masuda T, Tani F & Kitabatake N. (2011). Introduction of a negative charge at Arg82 in thaumatin abolished responses to human T1R2-T1R3 sweet receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 41-45.
- Okuda M, Watanabe Y, Okamura H, Hanaoka F, Ohkuma Y & Nishimura Y. (2000). Structure of the central core domain of TFIIEbeta with a novel double-stranded DNA-binding surface. *Embo J* 19, 1346-1356.
- Paladino A, Colonna G, Facchiano AM & Costantini S. (2010). Functional hypothesis on miraculin' sweetness by a molecular dynamics approach. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 726-730.
- Pin JP, Galvez T & Prezeau L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98, 325-354.
- Sakurai K & Goto Y. (2007). Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine beta-lactoglobulin monitored by heteronuclear

NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15346-15351.

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

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

Sigoillot M, Brockhoff A, Meyerhof W & Briand L. (2012). Sweet-taste-suppressing compounds: current knowledge and perspectives of application. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 619-630.

Somoza JR, Cho JM & Kim SH. (1995). The taste-active regions of monellin, a potently sweet protein. *Chem Senses* 20, 61-68.

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

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

Theerasilp S, Hitotsuya H, Nakajo S, Nakaya K, Nakamura Y & Kurihara Y. (1989). Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. *J Biol Chem* 264, 6655-6659.

Theerasilp S & Kurihara Y. (1988). Complete purification and characterization of the taste-modifying protein, miraculin, from miracle fruit. *J Biol Chem* 263, 11536-11539.

Vodovozova EL. (2007). Photoaffinity labeling and its application in structural biology. *Biochemistry (Mosc)* 72, 1-20.

Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J & Laue ED. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59, 687-696.

Winnig M, Bufe B, Kratochwil NA, Slack JP & Meyerhof W. (2007). The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct Biol* 7, 66.

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

Yamashita H, Akabane T & Kurihara Y. (1995). Activity and stability of a new sweet

protein with taste-modifying action, curculin. *Chem Senses* 20, 239-243.

Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ & Zuker CS. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115, 255-266.

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

古泉文子 (2010). 博士論文「ヒト甘味受容体による味覚修飾タンパク質および低分子甘味物質の受容機構の解析」

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

横山可那子 (2009). 卒業論文「甘味タンパク質の発現系構築」

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 24 年度博士課程進学
氏 名 小泉 太一
指導教員名 三坂 巧

論文題目

味覚修飾タンパク質ネオクリンがヒト甘味受容体を活性化する分子機構の研究

背景および目的

甘味を呈する物質には糖、アミノ酸、配糖体、タンパク質などが存在し、その分子量や化学構造は多種多様であるにも関わらず、我々はただ 1 種類のヒト甘味受容体でこれらの甘味物質を受容することで「甘い」と認識する。ヒト甘味受容体は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である T1R2 と T1R3 のヘテロマーである。T1R2、T1R3 は、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) などと同じクラス C GPCR ファミリーに属するが、ヒト甘味受容体のように高分子量のタンパク質を受容するクラス C GPCR についての報告は聞かない。ヒト甘味受容体が甘味を呈するタンパク質 (甘味タンパク質) を受容する仕組みを解明することによって、クラス C GPCR のリガンド受容機構について新たな知見が得られると期待できる。

本研究で注目したネオクリンは西マレーシア原産の食用果実クルクリゴより発見された甘味タンパク質で、それ自身がほのかな甘味を感じさせるだけでなく、酸味を甘味に変える不思議な性質 (味覚修飾活性) を併せ持つ。例えばこのタンパク質を摂取した後にレモンなどを口にすると、非常に甘く感じる。これは口腔内の pH が酸性側に傾くことで、舌上に残存しているネオクリン自身の甘味が強くなるためである。このようにネオクリンは pH に依存して甘味の強さを変える稀有な甘味タンパク質であり、ヒト甘味受容体による甘味タンパク質の受容機構をしらべるなかでも、特に興味深い研究材料である。

ネオクリンは酸性サブユニット (neoculin acidic subunit, NAS) と塩基性サブユニット (neoculin basic subunit, NBS) がジスルフィド結合で架橋されたヘテロダイマーである。中性条件下では X 線結晶構造解析によって立体構造がすでに解かれている。それをもとにした分子動力学シミュレーションから、ネオクリンは pH の低下に伴って立体構造変化を起こし、酸性条件下ではヒト甘味受容体に強く作用する構造を示すと推測された。またネオクリン分子中に存在する His 残基が pH センサーとして甘味強度変化を誘導することが示されており、pH 低下に伴う His 残基側鎖イミダゾール基のプロトン化と分子全体の立体構造変化との相関も提唱された。しかし、ネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化の詳細は実験的には示されていない。

本研究では、ネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化と甘味強度変化との構造機能相関について検証した。まず、NMR 法を利用してネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化をアミノ酸残基単位でしらべることによって、分子上で pH に依存して立体構造変化を生じうるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングした。次に、選別されたアミノ酸残基がネオクリンの pH に依存した甘味強度変化に果たす役割について、変異体解析によってしらべた。最後に、各アミノ酸残基が果たす役割とその構造上分布に基づき、ヒト甘味受容体によるネオクリンの受容機構について一つのモデルを提唱した。

NMR 法によるネオクリンの構造変化の解析

以前に当研究室で行った X 線小角散乱法および Far-UV CD スペクトル法を用いた解析の結果より、ネオクリン分子の pH に依存した構造変化は大規模なものではなく、局所的な立体構造変化が重要であると考えられた。そこで NMR 法を用いてアミノ酸残基単位でその立体構造変化を検出した。安定同位体標識した野生型ネオクリンが大腸菌により発現・精製し、pH3~7 の範囲において ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。スペクトル上で主鎖シグナルの化学シフトが pH に依存して変化するアミノ酸残基を、pH に依存してその立体構造が変化するアミノ酸残基として網羅的に選別した。ここではネオクリンの甘味強度が著しく変化する pH5~7 の範囲に絞って解析を行い、さらに選別されたアミノ酸残基を結晶構造上にマッピングして分布を調べた。

その結果、選別された pH に依存して主鎖化学シフトが変化するアミノ酸残基は、ネオクリン分子中に 5 つ存在する His 残基周辺の構造領域に集中して存在していた(図 1 A : 黒色)。これよりネオクリンの甘味強度が著しく変化する pH 5~7 の範囲において、His 残基周

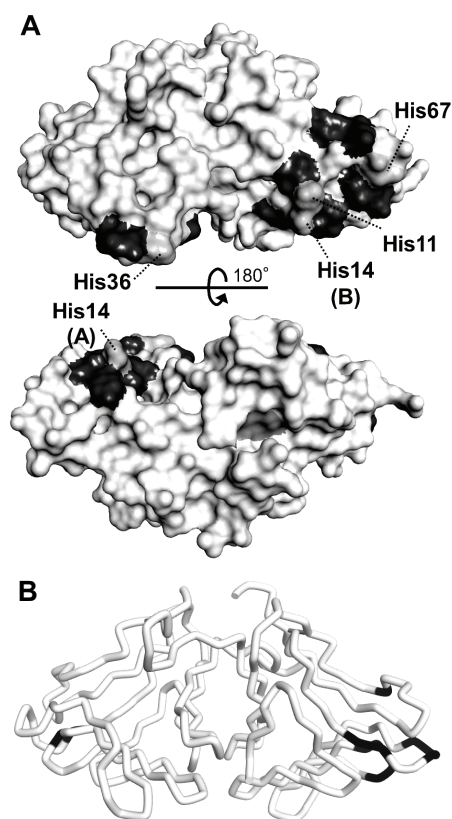


図 1 NMR 法による立体構造変化解析
A: pH 依存的に化学シフト変化する残基
B: pH に依らずシグナル帰属できない残基

辺領域の局所的な立体構造変化が生じていることが示唆された。これらの局所構造変化は、ネオクリンの pH センサーとして機能する His 残基の働きによって誘導されると考えられるため、pH に依存した甘味強度変化に寄与している可能性が高いと考えた。

一方で、pH に依らず構造的なゆらぎが大きいために、スペクトル上でその主鎖シグナルが観測されないアミノ酸残基が多数存在した(図 1 B: 黒色)。結晶構造上にマッピングして分布をしらべたところ、塩基性サブユニット上の 2 つのループ領域に集中して存在していた。これより 2 つのループ領域は構造的な柔軟性が高く、pH 変化によっても立体構造変化を生じることが示唆された。

以上、NMR 法を用いてネオクリンの甘味強度が変化する pH5~7 の範囲において立体構造変化を生じうるアミノ酸残基を網羅的にスクリーニングした。またそれらのアミノ酸残基が集合した、pH に依存して立体構造変化を生じうる 2 つの局所構造領域を同定できた。

変異体解析による各アミノ酸残基が果たす機能の検証

スクリーニングした一連のアミノ酸残基を中心として 14 種類の残基を選択し、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化に果たす役割を変異体解析によってしらべた。アラニン点変異体を大腸菌発現系によって産生し、その甘味活性について培養細胞評価系を用いて評価した。ヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 およびキメラ変異体 Gαタンパク質 G15Gi3 を一過的に発現させた HEK 293T 細胞を用意し、野生型および変異型ネオクリンを添加したときの細胞内カルシウム濃度の増加を蛍光試薬 Fura2-AM によってモニターした。結果、pH センサーとして機能する His 残基同様に、Ala 置換されるとその変異体が pH に依らずヒト甘味受容体を強く活性化するようになるアミノ酸残基(NAS Tyr21)を同定した。このアミノ酸残基は pH センサーである His 残基と協調的に働き、ネオクリンの pH に依存した甘味強度変化を誘導する役割を担っていることが示唆された。

対照的に、Ala 置換されてもその pH 依存性には影響を与えないものの、各 pH において野生型よりもヒト甘味受容体を強くまたは弱く活性化するようになるアミノ酸残基を 4 種類(NBS Arg48、Tyr65、Val72、Phe94)同定した。これら 4 種のアミノ酸残基は、pH に依らずネオクリンが発揮する甘味強度の決定に寄与していることが示唆された。またネオクリンはわずかにしかヒト甘味受容体を活性化できない中性条件下において、pH に依らずヒト甘味受容体を強く活性化する pH センサー変異体を競合的に阻害することが示されているが、4 種類の変異体ではこの中性条件下での競合阻害活性も同様に野生型よりも強くまたは弱く変化していることが示された。これより 4 種類のアミノ酸残基は pH に依らずネオクリンとヒ

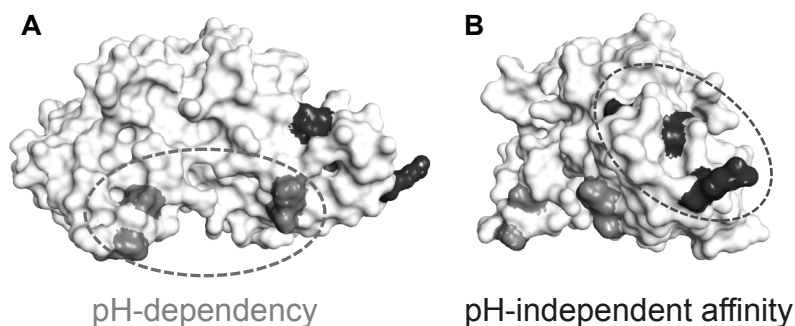


図 2 ネオクリンの活性に寄与する残基

A: pH に依存した活性変化を担う残基

B: pH に依らず受容体との親和性決定に寄与する残基

(図 2A を紙面右手側から見た角度で示す)

ト甘味受容体との親和性決定に寄与していることが示唆された。

以上の結果より、ネオクリンの甘味活性に寄与するアミノ酸残基として、pH センサーである His 残基を含めた「pH に依存した活性変化」に寄与する 4 種類のアミノ酸残基群と、「pH に依らない受容体との親和性決定」に寄与する 4 種類のアミノ酸残基群をそれぞれ検出できた。これらのアミノ酸残基群を結晶構造上にマッピングして分布をしらべたところ、両残基群はネオクリン分子表面上で立体構造上異なる場所に位置することが示された(図 2)。そこで両残基群から 1 種類ずつアミノ酸残基を選択して Ala に置換した二重変異体を作製し、その甘味活性について培養細胞評価系を用いて評価してみた。その結果、「pH 依存性」と「活性の強さ(受容体との親和性の影響を受けると考えられる)」がそれぞれの残基を Ala 置換したときと同様に変化し、変異導入の影響は相加的であった。これより両残基群は独立的にネオクリンの甘味活性を制御していることが示唆された。

予想されるヒト甘味受容体によるネオクリンの受容機構

得られた知見をもとに、ヒト甘味受容体によるネオクリンの受容機構について一つのモデルを提唱した(図 3)。4 種類のアミノ酸残基が pH に依らずヒト甘味受容体との親和性決定に寄与していると予想されることを考慮すると、ネオクリンとヒト甘味受容体との結合様式は pH に依らず大きくは変化しないと考えられる。ただし pH 低下によりネオクリンの pH センサーとして機能する His 残基の側鎖イミダゾール基がプロトン化されると、それに伴い His 残基周辺領域においては NMR で観測されたような局所構造変化が生じると予想される。その影響で両者の結合様式がわずかに変化することで、酸性条件下ではネオクリンによりヒト甘味受容体が強く活性化されるようになると推測する。

本研究では、pH に依存して甘味の強さを変化させる稀有な甘味タンパク質ネオクリンに注目し、そのヒト甘味受容体との結合様式のわずかな変化が、受容体の活性化状態を劇的に変化させるというモデルを提唱した。今後、このときにヒト甘味受容体が活性化される分子機構をさらに詳しくしらべることで、ヒト甘味受容体の活性化の鍵となる構造領域を新たに発見することにつながると予想している。本研究の結果は、クラス C GPCR のリガンド受容機構にも新たな知見を提供すると期待される。

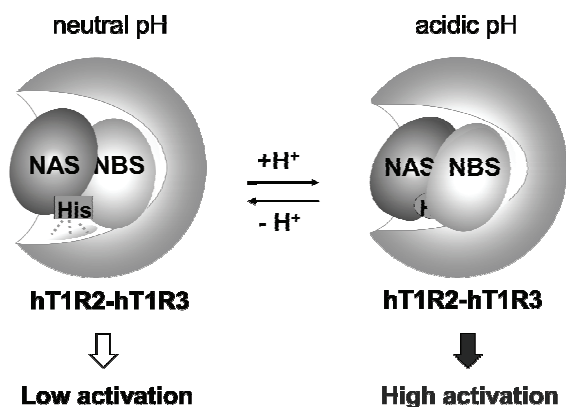


図 3 ヒト甘味受容体によるネオクリン受容機構のモデル図

謝辞

研究室に入ってから6年間、多くの方々の御指導、御鞭撻、ご協力を頂くことができたおかげで、博士論文を提出するに至りました。拙筆ではありますが、ここに感謝の意を述べさせていただきます。

三坂巧 准教授には、修士課程・博士課程に渡って本研究を実施する貴重な機会をいただきました。研究に邁進する環境を頂いただけでなく、行き詰ったときには的確な助言をくださったおかげで、ここまで辿り着くことができました。また研究のみならず日常生活の様々な場面においても、常に親身になって導いていただきました。心より深く感謝致します。

本研究科 寄付講座 阿部啓子 特任教授には、学部学生のとときに本研究室に快く受け入れていただき、教授職を退任されてからもずっと温かく叱咤激励していただきました。また進路についてもお心遣いを頂ききました。心より厚く感謝致します。

中島健一朗 特任助教には、研究を一から丁寧に教えていただきました。その研究に取り組む真摯な姿勢は、私の目標とすべき姿であると考えています。また他研究室での研究に挑戦する機会も紹介していただきました。厚く御礼申し上げます。

本研究科 アグリバイオインフォマティクス人材養成ユニット 寺田透 准教授には、NMR法をはじめとした構造化学的手法を熱心に教えていただきました。また学術論文の執筆にあたっては、辛抱強くかつ丁寧に指導していただきました。心より感謝申し上げます。

成川真隆 特任助教には、研究においても日常生活においても、周りの人々と協同して進めていくことの大切さを学ばせていただきました。本研究科 寄付講座 朝倉富子 准教授には、タンパク質研究について多くを教えていただき、ときには新たな視点から貴重なアイデアを頂きました。本研究科 寄付講座 岡田晋治 准教授には、ゼミ発表などで常に的確なアドバイスを頂き、日常生活においてもお世話になりました。厚く感謝申し上げます。

東京薬科大学生命科学部 生物情報科学研究室 小島正樹教授には、X線小角散乱法を丁寧に教えて頂きました。新潟薬科大学 応用生命科学部 応用生命科学科 清水(井深) 章子 教授、当研究室先輩の 森田悠治博士には、研究について多くの貴重な助言を頂きました。日本新薬株式会社山科植物資料館 秋田徹館長、大久保智史研究員には、貴重

な実験試料をご供与頂きました。深く御礼申し上げます。

当研究室先輩の中島文子博士には、研究ならびに進路で悩んだりした際に、温かい励ましの言葉を賜り、大変お世話になりました。また後輩の金田康平さんには研究のサポートをしていただいただけでなく、日々の会話を通じて、精神的にもリラックスさせていただきました。

その他、生物機能開発化学研究室、ILSI 寄付講座、日清食品寄付講座、食品生体機能研究室の皆様方のおかげで、楽しく充実した研究生生活を送ることができました。また当研究室で共に研究活動に取り組んだ卒業生の皆様方からの励ましは、心の支えとなっております。感謝申し上げます。

最後に、6年もの研究生生活を精神的、経済的に支え続けてくれた家族に感謝致します。

2014年12月