

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かった。

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を大腸菌により発現・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

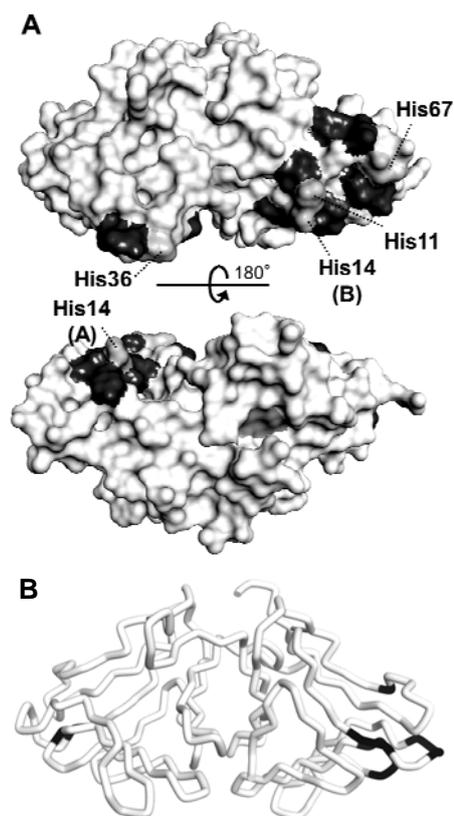


図 1 NMR 法による立体構造変化解析

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

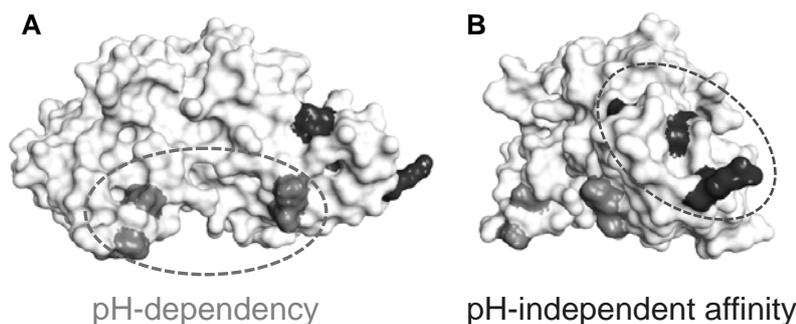


図 2 ネオクリンの活性に寄与する残基

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。

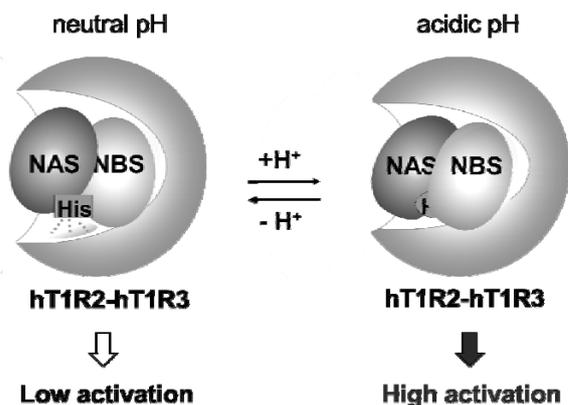


図 3 ヒト甘味受容体によるネオクリン受容機構のモデル図