

審査の結果の要旨

氏名 小泉 太一

甘味を呈する物質は多種多様であるが、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。低分子甘味物質の多くはヒト甘味受容体上の特定の受容ポケットに結合する。一方、高分子量であるタンパク質（甘味タンパク質）の受容機構は十分に解明されていない。甘味タンパク質の受容機構を通じて、ヒト甘味受容体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。

本論文の研究で注目した「ネオクリン」は、pHに依存して甘味の強さを変える性質をもつ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。本論文の研究では、ネオクリン分子がタンパク質であるゆえに、その立体構造がヒト甘味受容体を活性化するうえで重要であると予想している。そこでネオクリン分子の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を行っている。

第2章では、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検出している。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、pH 3~7の範囲において ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した。pHに依存したスペクトルの変化を指標として、ネオクリン分子上でpHに依存してその立体構造が変化するアミノ酸残基を網羅的に選別し、結晶構造上にマッピングして構造上の分布を調べる「pH 滴定法」を利用することで、pHに依存して立体構造変化を生じる特定構造領域の検出を試みた。ネオクリンの甘味強度が著しく変化するpH 5~7の範囲において解析を行った結果、選別されたアミノ酸残基はHis残基周辺の構造領域に集中して存在していたことから、このpH範囲ではHis残基周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。また塩基性サブユニット上に存在する2つのループ領域については、構造的に不安定であるために構成アミノ酸残基のシグナル帰属ができず、pH 滴定法を用いた解析ができなかった。2つのループ領域についても、構造的に不安定であるゆえに、pH変化に伴い立体構造変化を生じる可能性は否定できないと予想している。

第3章では、構造機能相関の検証を行っている。第2章で検出されたネオクリンのpHに依存した立体構造変化を誘導する各アミノ酸残基について、甘味強度変化に果た

している役割を変異体解析によってしらべた。計 14 種類の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ヒト甘味受容体を発現させた培養細胞評価系を用いて評価した。変異体の活性変化に基づき、変異を導入した各アミノ酸残基が本来果たしていた役割を推定した。結果、pH センサーとして機能する 3 種の His 残基に加えて、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アミノ酸残基を 1 種類発見した。この結果は pH センサーである His 残基が他のアミノ酸残基と協調的に働いていることを示唆している。これら 4 種類のアミノ酸残基については、構造機能相関が成立することが示された。対照的に、予想されたような pH に依存した甘味強度変化を誘導するはたらきは観察されなかなったものの、pH に依らず甘味強度決定に寄与している 4 種類のアミノ酸残基を併せて発見した。変異体タンパク質の性質を詳しくしらべた結果、変異を導入した 4 種類のアミノ酸残基は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された。また異なる役割を果たす 2 群のアミノ酸残基群は、タンパク質分子表面上で立体構造上異なる場所に位置するうえに、両残基群への変異導入の影響が相加的になることが示された。これより 2 群のアミノ酸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。

最後に、2 群の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ている。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が、pH に依存して両者の結合様式がわずかに変化することによって、酸性条件下ではヒト甘味受容体が活性化されると推測している。このときに活性化の鍵となっているヒト甘味受容体上の特定構造領域を同定することによって、ヒト甘味受容体自身およびクラス C GPCR の活性化機構についてこれまでにない新たな知見が得られると期待できる。またその構造領域を標的とした新規甘味料あるいは甘味増強剤の開発にもつながると期待できる。ゆえにこれらの研究成果は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。