

博士論文

甘味受容体における呈味調節物質  
作用モデルの構築及びその検証

東京大学大学院  
農学生命科学研究科  
応用生命化学専攻  
平成 24 年度進学  
生物機能開発化学研究室  
中北 智哉

指導教員  
東京大学大学院准教授  
三坂 巧

# 目次

第 1 章 序論	2
1-1. 序	3
1-2. 本研究の背景	8
第 2 章 T1R3 膜貫通領域に作用する甘味調節物質の作用機序の解明	23
2-1. 味覚調節物質の現状	24
2-2. 甘味受容体に作用する甘味調節物質の網羅的解析	25
2-3. T1R3 TMD と抑制剤・甘味料ドッキングモデルの作製	36
2-4. シミュレーションに基づくより強力な抑制剤・甘味料のデザイン	41
第 3 章 X 線結晶構造解析を目指した T1R3 膜貫通領域の発現及び精製の検討	69
3-1. T1R3 TMD の結晶化へ向けて	70
3-2. GPCR の安定化、及び精製手法の概要	72
3-3. T1R3 TMD コンストラクトの検討	74
3-4. 大量発現と精製	79
3-5. 今後の展望	85
総合討論	
補充資料	
参考文献	
論文要旨	
謝辞	



# 第 1 章

## 序論

## 1-1. 序

### 1-1-1. 味覚

味覚は口腔に含んだ物質を取りこむべきか否かを判断する化学感覚であり、ヒトでは甘・旨・苦・酸・塩味の五基本味から構成されている（図 1-1）。これら五基本味は、エネルギー源やミネラルといった生命の維持に必要な栄養素を嗜好味として認識し、有害な物質や腐敗物に伴う酸、及び恒常性を乱す過剰なミネラルを忌避味として認識する、というように体に有用な成分のみを取りこむためのセンサーとして非常に重要な役割を担っている。これらのうち甘味、旨味、苦味の受容体が近年相次いで同定された。これらは G タンパク質共役型受容体（G-protein coupled receptor, GPCR）に属する T1Rs (taste 1 receptor member 1-3)、Tas2Rs (taste 2 receptor member 1-60) によって認識されている。甘味受容体は T1R2、T1R3 がヘテロダイマーを形成することで機能し (Hoon et al., 1999; Kitagawa, 2001; Li et al., 2002; Max et al., 2001; Montmayeur, Liberles, Matsunami, & Buck, 2001; Nelson et al., 2001)、旨味受容体は T1R1、T1R3 がヘテロダイマーを形成する事によって機能する (Li et al., 2002; Nelson et al., 2002)。その一方で、苦味受容体 Tas2Rs (Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami, Montmayeur, & Buck, 2000) はヒトにおいては 25 種類存在しており、これらの受容体が多種多様な構造を有する苦味物質の認識に役立っている (Behrens et al., 2006)。

また、酸味、及び塩味についても同定されつつある。酸味受容体は、候補分子として TRP (Transient Receptor Potential) チャンネルファミリーに属する PKD (Polycystic Kidney Disease) 2L1 + PKD1L3 が同定された (Huang et al., 2006; Inada et al., 2008; Ishii et al., 2009; Ishimaru et al., 2006)。塩味はマウスにおいて ENaC (Epithelial Sodium Channel) KO マウスが低濃度における塩味の嗜好性を失うことから ENaC が塩味受容体として有力な候補となっている (Bachmanov & Beauchamp, 2007; Chandrashekar et al., 2010) (図 1-1)。しかしながら、酸味、塩味については不明な点が多く、これらのセンサーが単独でそれぞれの味覚を担っているわけではないと考えられている。一方で、マウスの神経伝達を調べた実験により、高濃度の塩味に対する忌避行動は苦味と酸味の複合的なシグナルであることが明らかにされている (Oka, Butnaru, von Buchholtz, Ryba, & Zuker, 2013)。これら五基本味の味覚受容体はそれぞれ味蕾に 50~150 個含まれる味細胞の中で味質ごとに異なる細胞に発現しており、味質ごとに異なるシグナル経路で味情報を伝達するラベルドライン仮説が有力とされている (Chandrashekar, Hoon, Ryba, & Zuker, 2006; Yarmolinsky, Zuker, & Ryba, 2009)。

### 1-1-2. GPCR としての T1Rs・Tas2Rs

GPCR は全タンパク質中で最も大きなスーパーファミリーを構成しており、様々な化学物質を介したシグナル伝達に密接に関わっている。GPCR は共通して 300 残基程からなる 7 回膜貫通構造を有しているが、N 末端の形状の違いにより大きく Class A, B, C に分類される (Conn, Christopoulos, & Lindsley, 2009) (図 1-2)。Class A GPCR は最大の GPCR グループである嗅覚受

容体を含み、最も多くの GPCR が属している。Class A GPCR 間では保存するアミノ酸配列が存在しており、かつ、多くの結晶構造が明らかにされていることから、最も解析が進んでいる。Class B GPCR は Class A に比べ N 末端領域が 100 – 200 残基長いという特徴を有している。これらはこの N 末端部分でペプチドホルモンを受容する物が多い。Class C GPCR は Class B よりも更に N 末端が長く、細胞外ドメインはおおよそ 500 残基からなる。また、Class C GPCR はダイマー形成することが報告されており、主として膜外領域にリガンド受容サイトが存在する。

甘味、旨味受容体を担っている T1Rs は Class C GPCR に属している一方、苦味受容体の Tas2Rs は Class A like な構造であると予想されているものの、配列保存性が認められない上に全長が極めて短いという特徴を有していることから、上記 3 つの class 分けとは別にカテゴライズされている (図 1-2 下)。

これら味覚受容体は *gustducin* と呼ばれる味覚伝達系固有の Gi 系 G タンパク質と相互作用すると考えられており (McLaughlin, McKinnon, & Margolskee, 1992; Wong, Gannon, & Margolskee, 1996)、実際に *gustducin* をノックアウトしたマウスにおいては甘味、苦味に対する応答が認められなくなることが報告されている (He et al., 2002; He et al., 2004)。

一方で *gustducin* と T1Rs、Tas2Rs との共発現がマウスの味蕾に対する組織染色により調べられているが、Tas2Rs と *gustducin* はほぼ 100% の共発現が認められるものの、T1Rs とは一部の細胞でしか共発現が認められていないという結果が示されている ((Stone, Barrows, Finger, & Kinnamon, 2007))。また、T1Rs は *gustducin* 以外にも Gq 系 G タンパク質、G14 との共発現が認められていることから (Shindo et al., 2008; Tizzano et al., 2008)、これらの G タンパク質による複数のシグナル伝達経路が存在していることを示唆するが、その働きは明らかにはされていない。

なお、25 種類の苦味受容体のナンバリングは複数存在するが (Bufe, Hofmann, Krautwurst, Raguse, & Meyerhof, 2002; Conte, Ebeling, Marcuz, Nef, & Andres-Barquin, 2002; Shi, Zhang, Yang, & Zhang, 2003) (表 1-1)、本論文中では遺伝子名に沿ってナンバリングがなされている Bufo et al. に倣い、他のナンバリングと混同しないよう Taste 2 receptors を T2Rs ではなく、Tas2Rs と記述する。

### 1-1-3. 甘味受容体

甘味受容体 T1R2 / T1R3 はヘテロダイマーを形成しており、唯一の甘味受容体であると考えられている。このことは T1R2 あるいは T1R3 を欠損したマウスは甘味応答を消失することから明らかにされている (Damak et al., 2003; Zhao et al., 2003)。

T1R2、T1R3 は舌の味細胞以外にも消化管 (Dyer, Salmon, Zibrik, & Shirazi-Beechey, 2005; Mace, Affleck, Patel, & Kellett, 2007; Young et al., 2009)、膵臓 (Nakagawa et al., 2009)、視床下部 (Ren, Zhou, Terwilliger, Newton, & de Araujo, 2009)、脂肪組織 (Simon et al., 2013) など、代謝やエネルギーの恒常性に関わる器官にも発現していることが報告されており、グルコースセンサーとしての役割を

担っている可能性がある(Margolskee et al., 2007)。

大きな細胞外領域を有することを特徴とする class C GPCR に属する T1R2、T1R3 であるが、大きく 3 ドメインに分類される。細胞外に位置する (Venus Flytrap domain, VFTD)、細胞膜に存在する膜貫通領域 (transmembrane domain, TMD)、それらを結ぶシステインリッチ領域 (cystein-rich domain, CRD) の 3 ドメインである (図 1-3)。class C GPCR には T1Rs の他、代謝型グルタミン酸受容体 (metabolic glutamate receptor, mGluR)、カルシウム感受性受容体 (calcium sensing receptor, CaSR)、フェロモン受容体 (vomeronasal receptor type 2, V2R)、GABA<sub>B</sub> 受容体 (GABA<sub>B</sub>R) などが属しており、これらの受容体間の配列は比較的保存されている。なお、GABA<sub>B</sub> 受容体には CRD が存在せず、配列が保存されていない。

これまでに mGluR1(Kunishima et al., 2000)、mGluR5、mGluR7(Muto, Tsuchiya, Morikawa, & Jingami, 2007)、GABA<sub>B</sub>R1 及び GABA<sub>B</sub>R2(Geng, Bush, Mosyak, Wang, & Fan, 2013)については VFTD が、mGluR3(Muto, Tsuchiya, Morikawa, & Jingami, 2009)、については VFTD 及び CRD が X 線結晶構造解析により明らかとなっており、これらの構造から class C GPCR においては VFTD がリガンド受容に深く関わっていると考えられている(図 1-4)。

しかしながら、他の class C GPCR とは異なり、甘味受容体が受容する甘味物質はその大きさ・構造が実に多様である(1-1-4 参照)。この多様性について受容体、甘味物質の両側面から解析が進められた結果、複数の作用部位が存在することが明らかとなっている(Cui et al., 2006; Xu et al., 2004)。

#### 1-1-4. 甘味物質と甘味受容体

甘味受容体とそのリガンドについて詳しく述べる(図 1-5)。なお、図中、本論文において使用したリガンドに関しては赤枠(T1R2 VFTD に作用)、青枠(T1R3 TMD に作用)で囲った。

甘味受容体は生命維持には欠かせないエネルギー源としての糖を認識する受容体である。しかしながら、受容される甘味料はスクロースやフルクトース、グルコースなどの糖類だけに留まらず、キシリトール、ソルビトール、エリスリトールなどの糖アルコールや D-フェニルアラニン、D-トリプトファン、D-セリンといった種々の D-アミノ酸、人工甘味料、さらにはステロイド配糖体やタンパク質に至るまで実に幅広いリガンドが受容されることが知られている。現在日本においてはスクラロース(sucralose)・アセスルファム K (acesulfame K)・アスパルテーム (aspartame) の 3 種類の人工甘味料が主として用いられている。この他、海外においてはサッカリン (saccharin)やシクラメート (=チクロ、サイクラミン酸; cyclamate)といった人工甘味料も一般的に用いられている。これらの低分子甘味料は偶然に発見されたものがほとんどである。

上記人工甘味料の味をスクロース・フルクトースと比較すると、それぞれ単独では甘味を感じる時間が短い・逆に後味がある・金属様の呈味を有する・さらには苦味を伴うなど、決しておいしいと感じる甘味ではない。一般的には複数種の甘味料を混ぜ合わせることでそれぞれの弱点を

補う必要がある。

また近年、ステビオサイド(stevioside)・レバウディオサイド A (rebaudioside A) (ステビア由来) やモグロシド V (mogloside V) (ラカンカ由来)、グリチルリチン酸(grichyrrizic acid) (甘草由来) など天然の甘味成分が注目を集めている。これらはいずれもステロイド骨格を有する化合物で、苦味も伴うものもあるが比較的スクロースに近く好ましいものであると言われている。そのため、これらが得られる植物の栽培方法、抽出方法が盛んに研究されている。

高甘味度の甘味料についての研究も盛んに進められている。ネオヘスペリジンジヒドロカルコン (neohesperidin dihydrochalcone ; 以下 NHDC と略記する。) はカルコンの配糖体に対し、開環及び水素付加した半人工甘味料として主にヨーロッパにおいて用いられてきた甘味料であるが、スギナエンドウに天然成分として存在するという報告がなされている(She, Wang, & Liu, 2011)。NHDC はスクロースのおよそ 1500 倍の甘味度を有しており、日本では香料としての添加が認められている。

またアスパルテームを基にした高甘味度甘味料が盛んに開発されている。アスパルテームはスクロースの 200 倍程度の強度を有するが、これに対してネオテーム(neotame)はスクロースの 10,000 倍の甘さを有する。さらに最近では味の素(株)によりアドバンテーム(advantame) (スクロースの 20,000 倍の甘さ) が開発された。これらは既に食品添加物としての認可が下りている。アスパルテームは熱や酸性に弱く、分解し無味となるという欠点があったが、これら改良型は加水分解、代謝を受けにくいという利点も備えている。

2014 年現在で最も強い甘味を呈する化合物はラグドゥネーム(lugduname)と呼ばれる分子で、スクロースの 22 万~30 万倍の甘味があることが確認されている(Nofre, Glaser, Tinti, & Wanner, 2002)。ラグドゥネームにみられるグアニジノ酢酸骨格は高甘味度に関係が強いと言われている。

ヒト甘味受容体は低分子に限らず、モネリン(monellin)、ソーマチン(thaumatin)、ブラゼイン(brazzein)といったタンパク質も受容することが知られている。さらに当研究室で研究を行っているネオクリン(neoculin)・ミラクリン(miraculin)については酸味を甘味に変える味覚修飾活性を有している極めて珍しいタンパク質である。

甘味料とは逆に、甘味を抑える物質も存在することが知られている。焙煎したコーヒー豆に含まれるラクチゾール(lactisole)、およびギムネマシルベスタ(*Gymnema sylvestre*)に含まれるギムネマ酸(gimnemaric acid)を始めとするトリテルペン配糖体類が挙げられる。ギムネマ酸の他に、ナツメの葉に含まれるジジフィン(ziziphin)、ケンポナシの葉に含まれるホズロシド (hoduloside) が該当するが、これらの抑制活性はギムネマ酸に劣るとされている。

また、ラクチゾールとの構造類似性から、農薬である 2,4-DP に関する構造活性相関が行われている(Maillet, Margolskee, & Mosinger, 2009)。この結果から、2,4-DP はラクチゾールよりも強力な抑制剤として機能し、これまでに報告されている最も強力な甘味抑制剤である。

これらの甘味料、甘味抑制剤のうちいくつかの甘味料については受容サイトが特定されている。

スクロースやグルコースはマウスの T1R2、T1R3 の VFTD を用いた分光学的解析から、VFTD に結合することが示唆されている(Nie et al., 2006; Nie, Vignes, Hobbs, Conn, & Munger, 2005)。ヒトとマウス(ラット)の T1R キメラ受容体や点変異を入れた受容体を導入した培養細胞を用いたカルシウムイメージング法(1-2-1 にて述べる)による実験によりアスパルテーム、スクラロース、アセスルファム K、サッカリンについてはスクロースと同様 T1R2 の VFTD で受容されることが判明している(Li et al., 2011; Masuda et al., 2012)。一方で、シクラメート (Jiang, Cui, Zhao, Snyder, et al., 2005)、NHDC (Winnig, Bufe, Kratochwil, Slack, & Meyerhof, 2007)、さらには甘味抑制剤のラクチゾール (Jiang, Cui, Zhao, Liu, et al., 2005)、ギムネマ酸(Sanematsu et al., 2014)については T1R3 の TMD に受容されることが報告されている。

## 1-2. 本研究の背景

### 1-2-1. 蛍光カルシウム指示薬を用いたカルシウムイメージング法

1-1-4 におけるリガンドの作用部位の特定など、受容体の機能解析を行う手段としてカルシウムイメージング法が一般的に用いられている（図 1-6）。この手法においては、目的の受容体及び Gq 系の G タンパク質を一過的、あるいは安定的に遺伝子導入した培養細胞を用いる。受容体及び G タンパク質を発現した細胞にリガンドを投与すると、リガンド受容のシグナルが G タンパク質を介して伝達され、IP<sub>3</sub>-カルシウムシグナル伝達経路が活性化されるため、小胞体からのカルシウム放出が起こる。このカルシウム濃度の変化を Fura-2 や Fluo-4 などの蛍光カルシウム指示薬を用いて蛍光として検出し、これを可視化することにより受容体の活性化を観察する。この手法を用いることで、リガンドに対する細胞応答が客観的な数値として表現されるため、*in vitro* における客観的な活性評価が可能となっている。

味覚受容体においては、Gi 系 G タンパク質である *gustducin* とカップリングするが、このままではカルシウムイメージング法を用いることができない。そこで、Gq 系 G タンパク質である G16 と、味覚受容体とカップリングする *gustducin* を組み合わせたキメラ G タンパク質 *Gα16gust44* を導入することでこの問題を解決している(Ueda, Ugawa, Yamamura, Imaizumi, & Shimada, 2003)。

苦味受容体の苦味測定は目的の受容体及び *Gα16gust44* を用いて一過的に導入し発現させることで応答の観察が可能である。ところが、甘味受容体の場合は T1R2、T1R3、*Gα16gust44* を全て発現している細胞のみが応答することが可能であるため応答細胞数が低下する。この効率の悪さからスクロースやフルクトースといった甘味の弱い糖類の応答は検出できず、甘味測定系として十分ではなかった。これを解決すべく安定的に甘味受容体及び G タンパク質を発現する安定発現細胞の開発が期待された。

### 1-2-2. ヒト甘味受容体安定発現細胞

当研究室では、2010 年度修士今田によりヒト甘味受容体安定発現細胞が作製された。これは、Flp-In system (invitrogen)を用いて作製されている（図 1-7）。特異的配列(FRT 配列)を認識する Flp recombinase を用いて、目的遺伝子を培養細胞ゲノムに組み込む手法であることから特定の 1 箇所に 1 コピーの外来遺伝子が導入されるため、再現性の高い安定発現細胞を構築することが可能である。甘味受容体 T1R2、T1R3 及び応答感度が優れたキメラ G タンパク質 *Gα16gust44* を pcDNA5/FRT (invitrogen)に挿入し、Flp recombinase を発現させるプラスミド pOG44 とともに Flp-In 293 細胞にトランスフェクションすることにより得られる。

ヒト甘味受容体安定発現細胞は従来の一過的発現細胞に比べて応答感度、強度ともに増大したため、これまで測定困難であったスクロースに対しても応答を観察することが可能となった（図

1-8)。また、安定発現細胞は1年以上継代を続けても同様の感度で測定を行うことが可能であることを確認している。

さらに改善されたのがその作業効率である。細胞の応答強度を稼ぐことができるようになったため、検出閾値の高いウェルベースアッセイ装置 (FlexStation 3; Molecular Devices) を用いて測定を行うことが可能となった。この装置は96穴プレートを8穴ずつ同時に測定することが可能であるため、およそ30分で1プレートを測定することが可能である(Imada et al., 2010) (図 1-9)。

ヒト甘味受容体とキメラ G タンパク質を同時に、効率的に発現させるコンストラクトの開発は変異体実験を行う上でも有用である。ヒト甘味受容体の変異体を用いて安定発現細胞を作製する場合において、変異受容体の情報は原理上野生型 (WT) と細胞ゲノムの同一位置に組み込むことが可能であるため、純粋に甘味受容体の変異による変化のみが応答に反映されるためである。

### 1-2-3. T1R3 TMD に作用する甘味料における増強作用の発見

1995 年の実際に舌で味わうことによる試験 (官能試験) において、人工甘味料シクラメート・NHDC を他の甘味料とともに用いることで感じられる甘味がそれぞれの足し合わせではなく、相乗的に増強された甘味が得られるという報告があった(Schiffman et al., 1995)。この知見が甘味受容体を介してもたらされる現象であるのかを確かめるため、当研究室ではヒト甘味受容体安定発現細胞を用いて次のような実験を行った。

T1R2 の VFTD に作用するスクロースに対し、T1R3 の TMD に作用するシクラメート・NHDC を微量添加した応答をそれぞれ測定し、スクロース単独の応答と比較した。添加濃度は添加物自身の甘味はほとんど感じられない濃度 ( $EC_{10}$  = 10% effective concentration ; 最大応答に対し 10% 程の応答を示す濃度) に設定した。するとスクロース + シクラメート及びスクロース + NHDC にはそれぞれ甘味の相乗効果が得られることが明らかとなった (図 1-10 (A)、(B))。これに対し、スクロースと同一部位である T1R2 の VFTD に作用するアセスルファム K・アスパルテーム・サッカリンを同様に添加した際には単なる相加効果しか観察されなかった (図 1-11(C))。

このことから甘味受容体において受容される位置の違いと応答増強効果は密接な関係にあると考えられる。さらにシクラメート・NHDC はスクロース以外にも広範な甘味料と共に用いることによっても増強効果が観察されることが明らかとなった (図 1-10(D)) (Fujiwara et al., 2012)。

### 1-2-4. T1R3 TMD に作用する新規甘味料の発見

甘味受容体安定発現株を用いたアッセイ系のハイスループット性を生かし、食品への応用が可能であり、かつ様々な構造を有する香料の中に甘味受容体に作用する物質が存在するのか、スクリーニングを実施した(図 1-11)。その結果、シンナムアルデヒド、及び p-メトキシシンナムアルデヒド(以下 PMCA と略記)についてはこれら単独による強い受容体活性化能が認められ、かつ他の甘味料への添加により相乗的な応答増強が認められた()。



相乗的な増強効果が認められたこと、かつこれらの構造（特に PMCA の構造）が甘味抑制剤のラクチゾールに近いことから、PMCA も T1R3 TMD に作用することが考えられた。しかしながらこれらは類似構造でありながらも、一方は甘味料として作用し、一方は抑制剤として作用するという、異なる応答調節能を有していることから、これらがどのように T1R3 TMD と相互作用することによって受容体を活性化、及び抑制するのかという疑問が生じた。

#### 1-2-5. 本研究の目的

上記ラクチゾール、PMCA は類似構造でありながらも、その応答調節能が異なっていた。そこで本研究では、ラクチゾール、PMCA 及びこれらの類縁体を用いた網羅的な点変異体解析を実施することでこれらの作用機序の違いを把握することを目的とした。

また一方で、mGluR1 TMD、mGluR5 TMD の結晶構造(PDB ID : 4OR2、4OO9)が明らかにされたことから(Dore et al., 2014; Wu et al., 2014)、これらの構造を基にすることで精度の高い T1R3 TMD ホモロジーモデルの作製が可能となった。そこで T1R3 TMD のホモロジーモデルを作製した上で、甘味料・甘味抑制剤の作用部位を同定し、これより詳細な作用機序を把握することを目指した。

本論文は以下の構成となっている。

第 2 章では、T1R3 TMD における網羅的変異体解析を実施し、この結果から分子モデリングの手法を用いた抑制剤、甘味料のドッキング構造の作製を実施し、これらについて考察した。

第 3 章では、食品への応用を目指し、毒性がない、すなわち T1R3 TMD 特異的に作用する高甘味度甘味料のデザインをすべく、より精度の高い構造を得るべく T1R3 TMD の結晶化を目指したコンストラクトの作製、精製を実施した。

また、最後に全体の考察及び展望を第 4 章に記した。

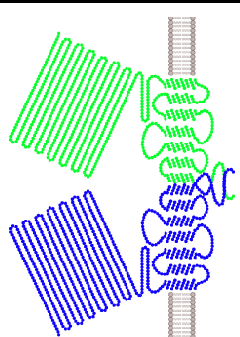
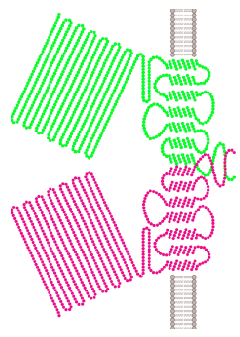
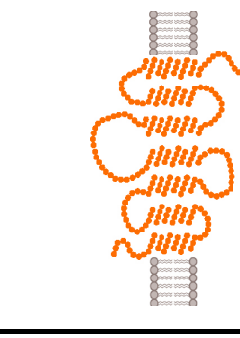
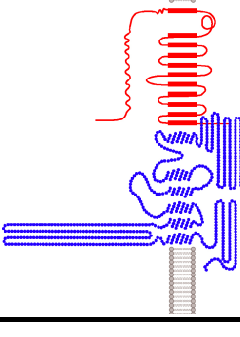
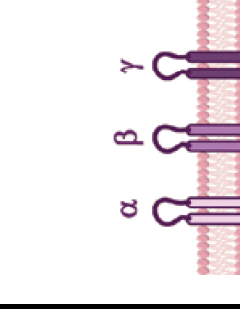
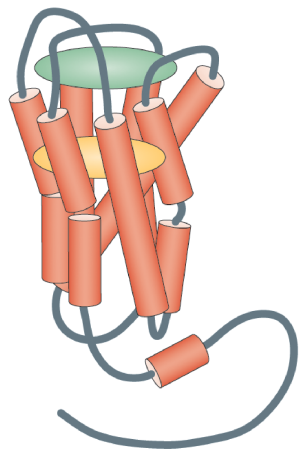
味質	旨味	甘味	苦味	酸味	塩味
受容体	 T1R1+T1R3	 T1R2+T1R3	 Tas2R	 PKD2L1 + PKD1L3	 ENaC
味物質	L-アミノ酸	糖類、配糖体 L-, D-アミノ酸、 人工甘味料、 甘味タンパク質	種々の 苦味物質	酸	低濃度の食塩
Type	Gタンパク質共役型 (GPCR)				イオンチャネル型

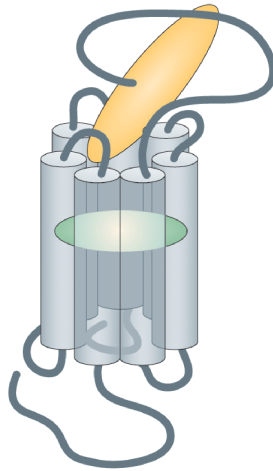
図1-1：五基本味を受容する受容体及び、その候補

(A)

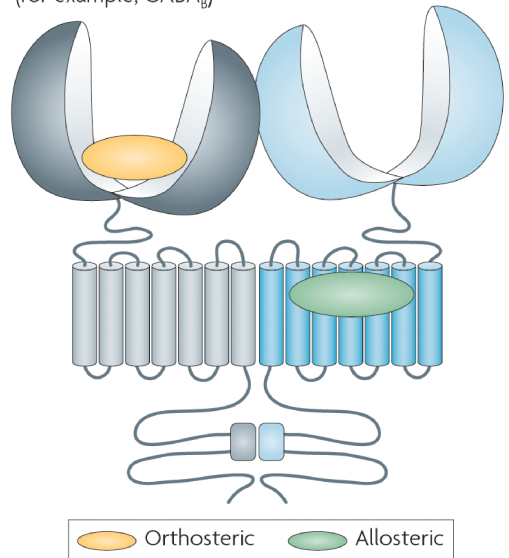
Class A  
(for example, M2 mAChR)



Class B  
(for example, CRF1)



Class C  
(for example, GABA<sub>B</sub>)



Orthosteric Allosteric

(B)

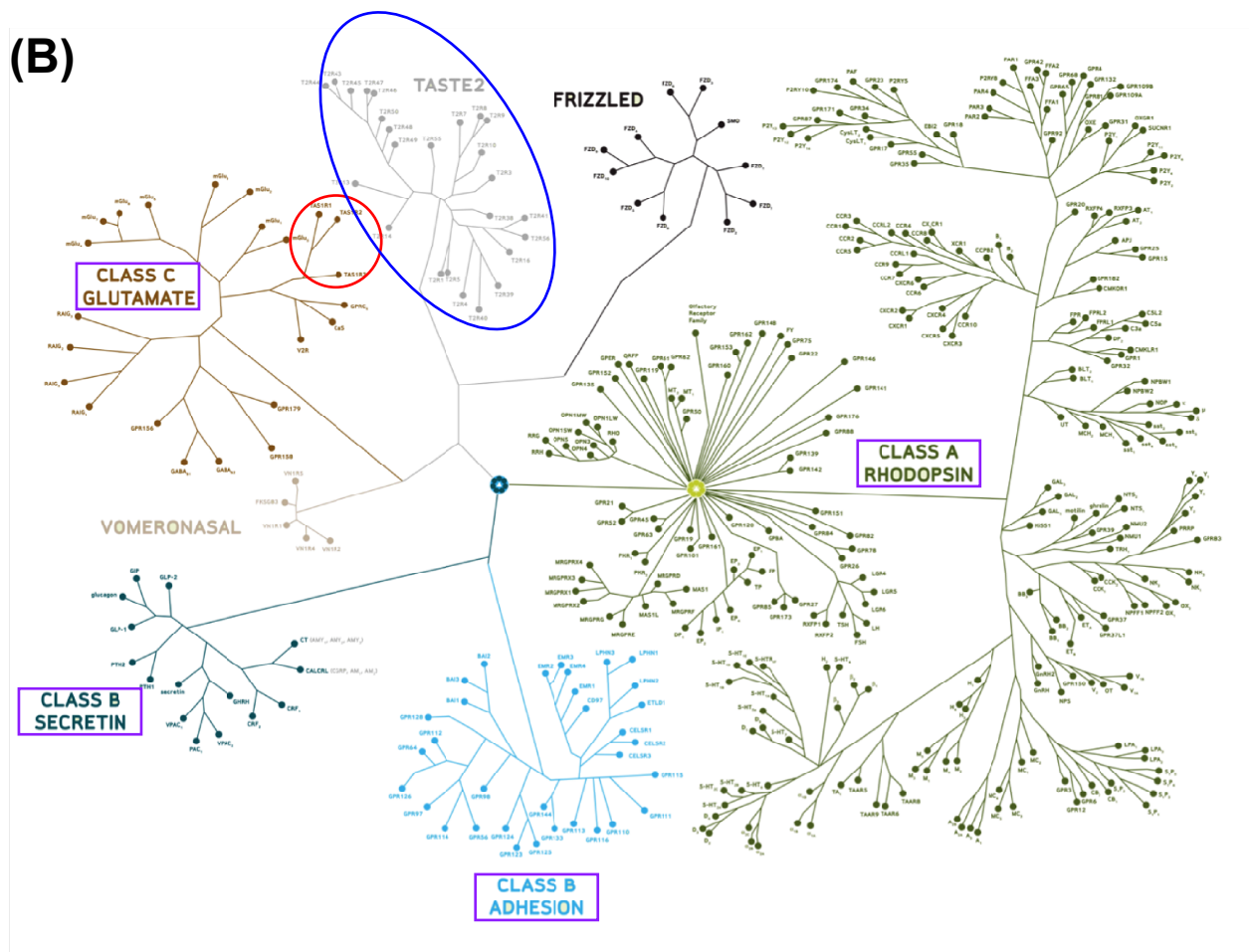


図1-2 : (A) GPCRの構造による分類(Conn et al., Nat rev. 2009)  
(B) GPCRome (Millipore社より引用、改変)

五基本味のうち甘味、旨味、苦味はGPCRである。  
GPCRはN末端の長さにより、Class A, B, Cに大別される。  
甘味及び旨味を担うT1RsはClass C GPCR (赤囲み)に分類されるが、  
一方で苦味を担うTas2Rsはいずれの構造も有していないことから  
別分類となっている(青囲み)。

表1-1 : 苦味受容体ファミリーの呼称の対応  
 25のサブタイプが存在するが、混同をさけるため、  
 本論文中ではBufe et al.,に基づき、Tas2Rsの呼称を採用する。

Gene code = Bufo et al.,	Shi et al.,	Conte et al.,	Senomyx Inc.
Tas2R1	T2R1		
Tas2R3	T2R3		
Tas2R4	T2R4		
Tas2R5	T2R5		
Tas2R7	T2R7		
Tas2R8	T2R8		
Tas2R9	T2R9		
Tas2R10	T2R10		
Tas2R13	T2R13		
Tas2R14	T2R14		
Tas2R16	T2R16		
Tas2R38	T2R38	T2R61	T2R51
Tas2R39	T2R39	T2R57	T2R54
Tas2R40	T2R40	T2R58	T2R55
Tas2R41	T2R41	T2R59	T2R71
Tas2R42	T2R55	T2R55	T2R24
Tas2R43	T2R43	T2R52	T2R61
Tas2R44	T2R44	T2R53	T2R64
Tas2R45	T2R45	T2R59	T2R50
Tas2R46	T2R46	T2R50	T2R75
Tas2R47	T2R47	T2R44	T2R44
Tas2R48	T2R48	T2R55	T2R65
Tas2R49	T2R49	T2R56	T2R63
Tas2R50	T2R50	T2R51	T2R67
Tas2R60	T2R56	T2R60	T2R76

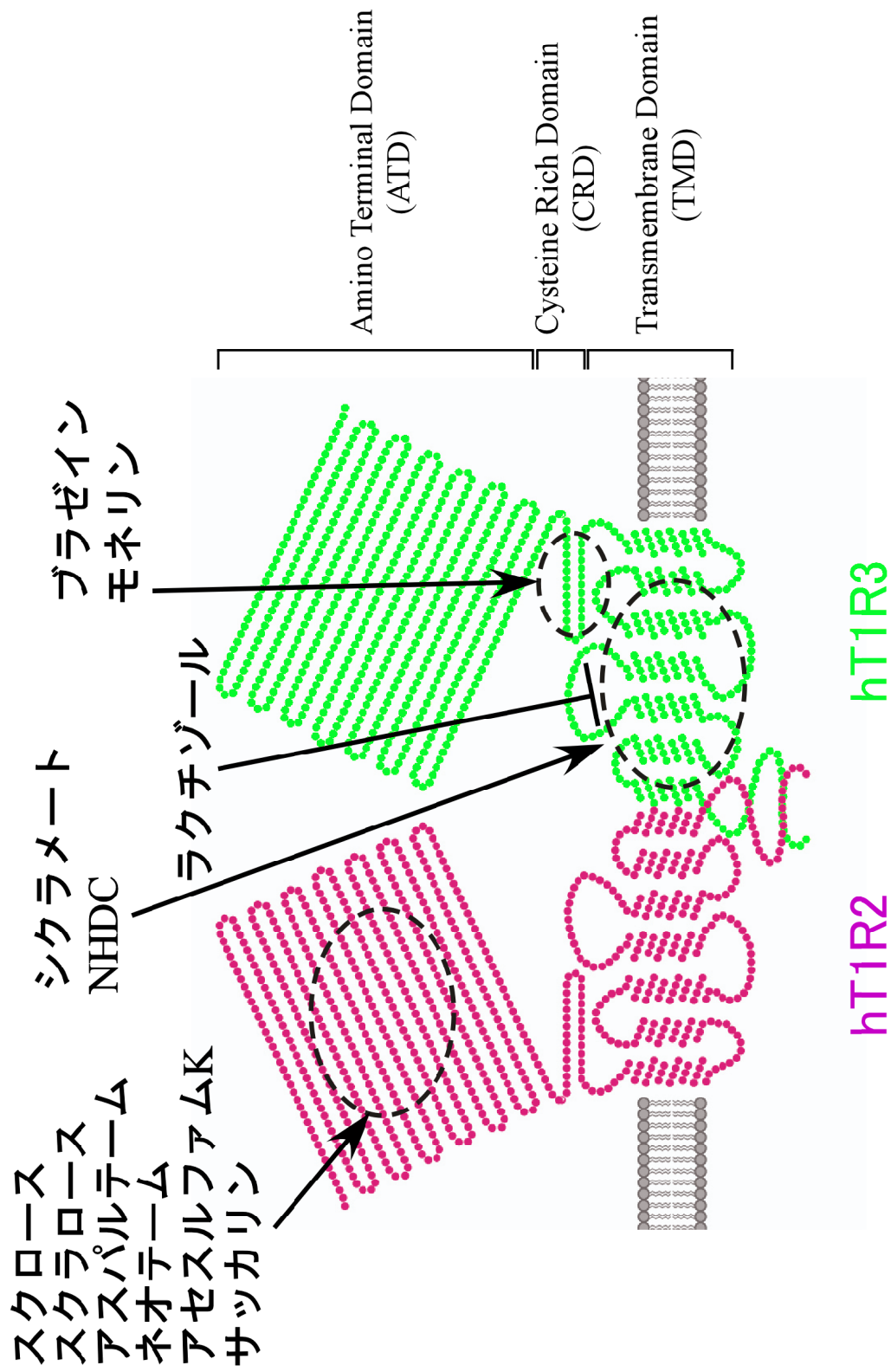


図1-3：甘味受容体の構造及びリガンドの受容体への作用部位

ヒト甘味受容体は多くのリガンド結合部位を有し、様々な化合物を認識する。  
Chandrashekar J. et al., (2006)より抜粋、改変

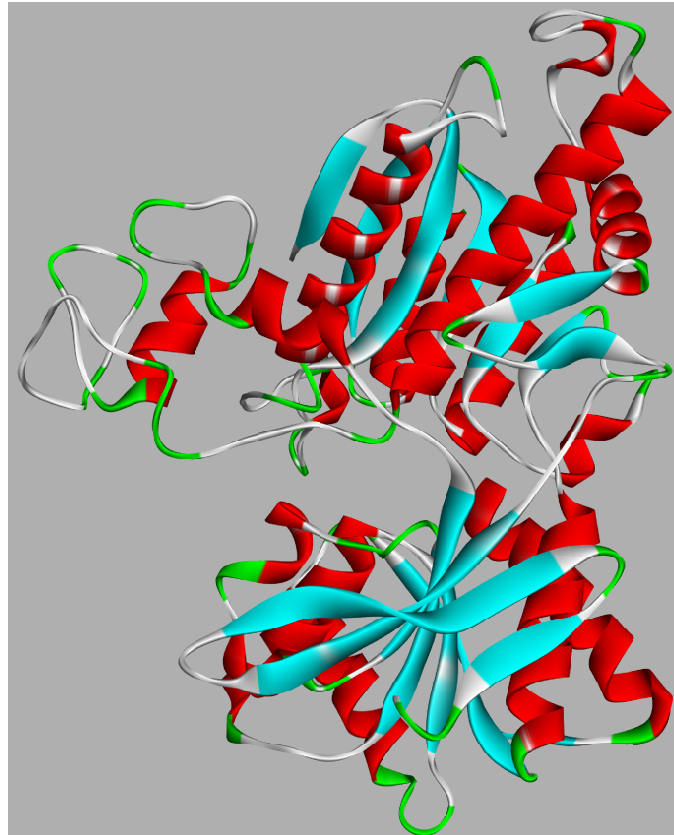


図1-4 : class C GPCRであるmGluR1のATDの構造

Class C GPCRのATDには中心に大きなくぼみがあり、ここでリガンドを受容している。 (PDB ID :1EWK)

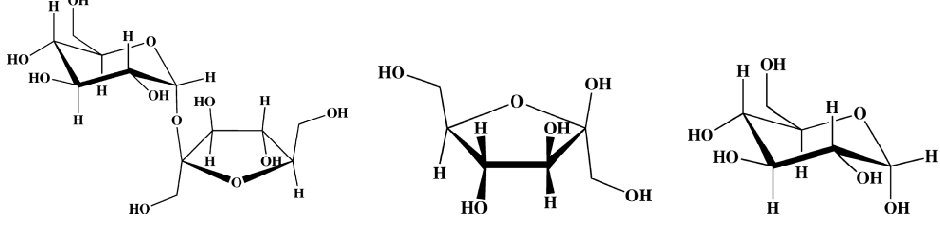
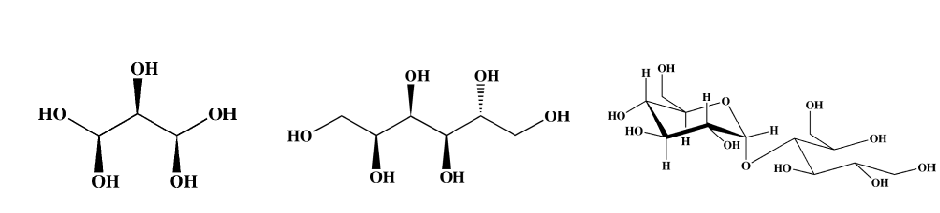
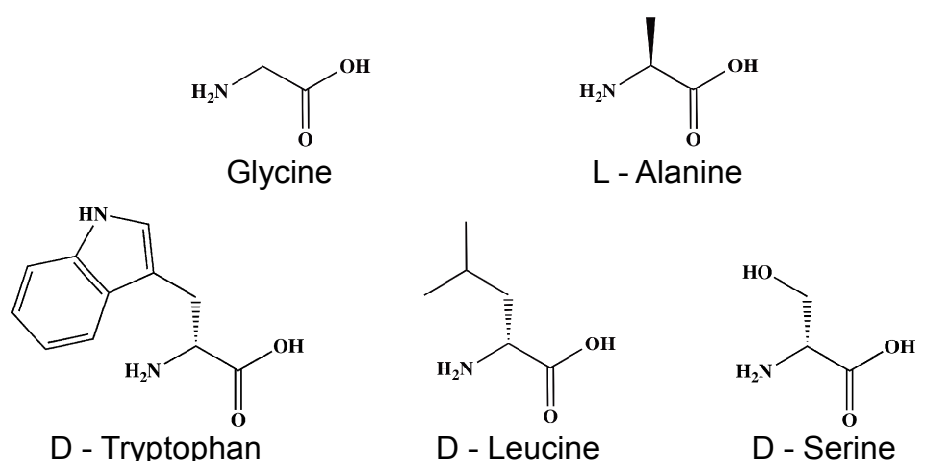
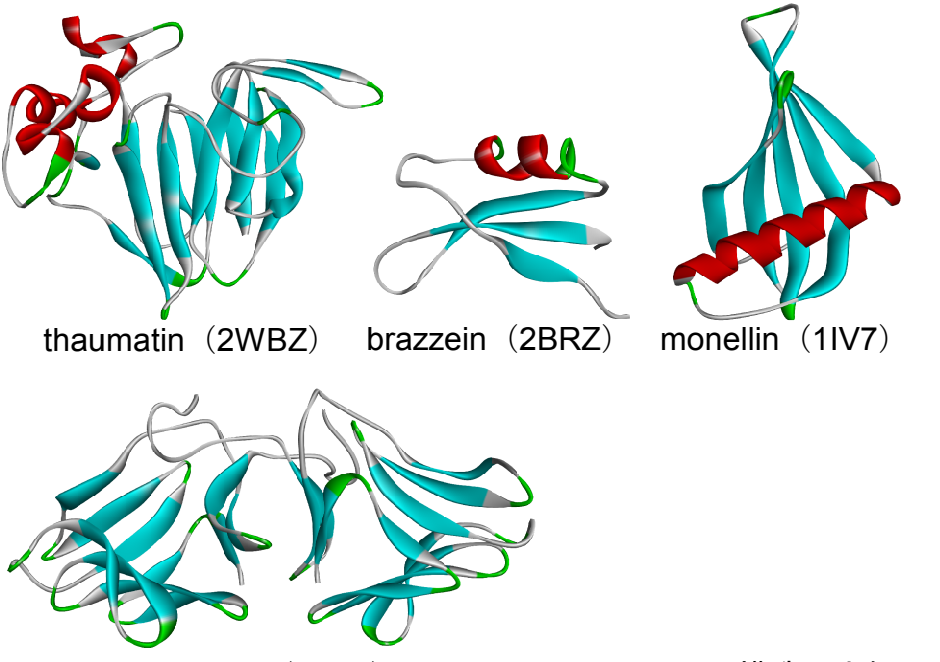
糖	 <p style="text-align: center;">sucrose                      fructose                      glucose</p>
糖アルコール	 <p style="text-align: center;">xylitol                      sorbitol                      maltitol</p>
アミノ酸	 <p style="text-align: center;">Glycine                      L - Alanine</p> <p style="text-align: center;">D - Tryptophan                      D - Leucine                      D - Serine</p>
甘味タンパク質	 <p style="text-align: center;">thaumatin (2WBZ)      brazzein (2BRZ)      monellin (1IV7)</p> <p style="text-align: center;">neoculin (2D04)                      miraculinの構造は未解明</p>

図1-5 : 甘味受容体に受容される物質 その1  
甘味タンパク質は名前及びPDB IDを示した。

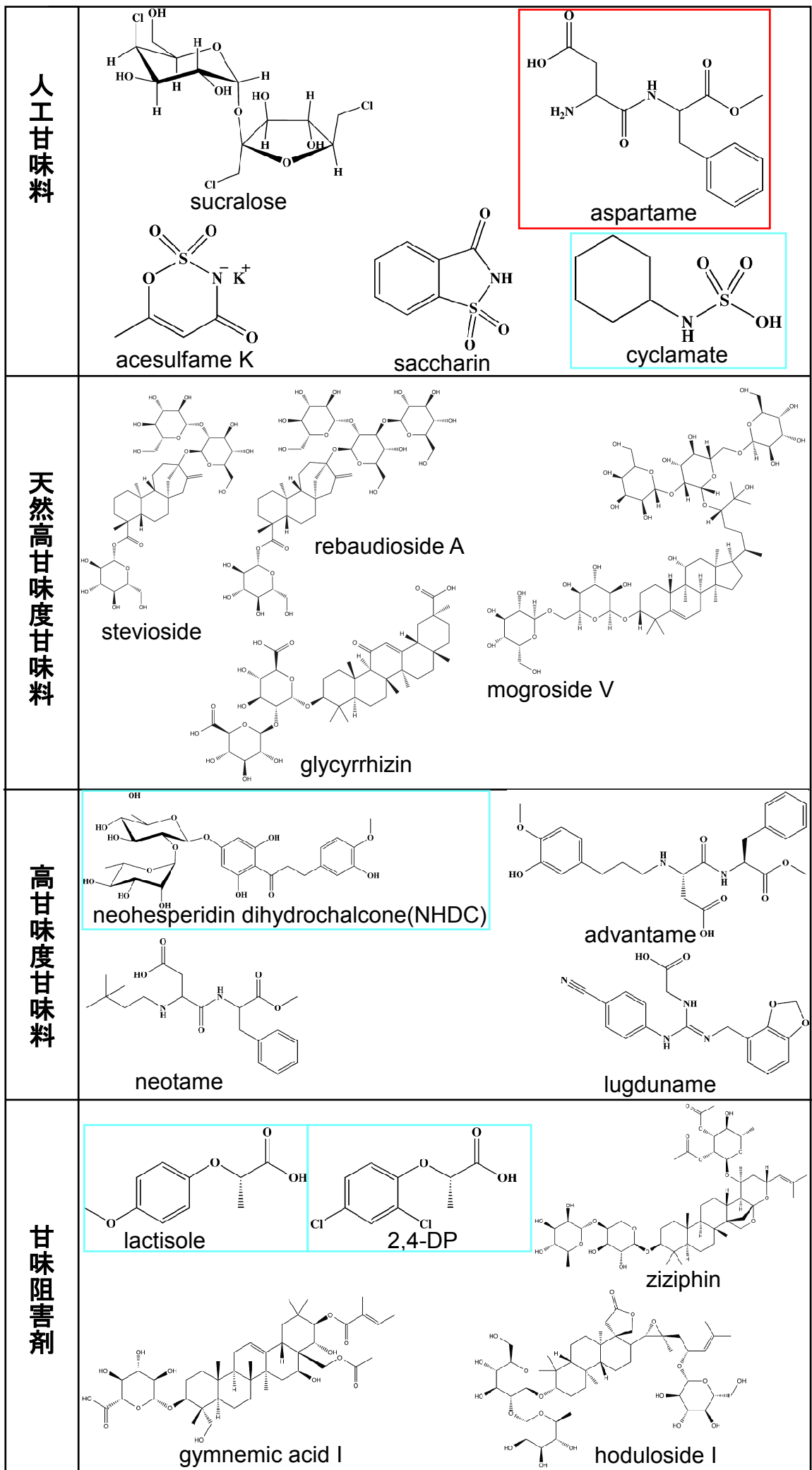


図1-5：甘味受容体に受容される物質 その2

本論文中多用したリガンドを赤枠、青枠で囲んだ。  
赤枠：T1R2 VFTDに作用、青枠：T1R3 TMDに作用



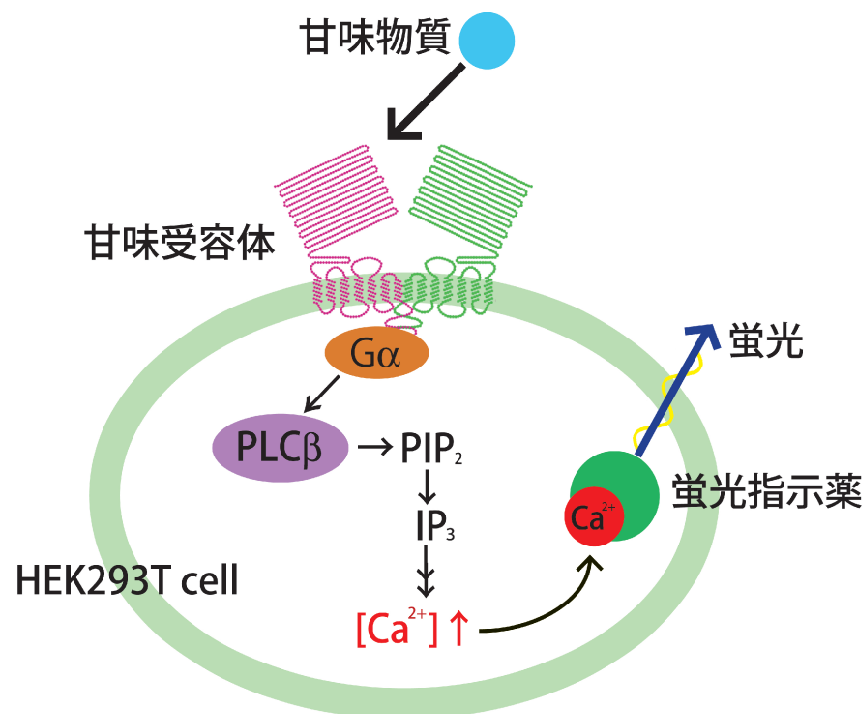


図1-6： カルシウムイメージング法による甘味受容体の機能解析の模式図

ヒト甘味受容体・キメラGタンパク質を発現させた培養細胞に甜味物質を添加すると、膜上に発現した甘味受容体がこれを受容する。これに伴ってGq系のGタンパク質を介したIP<sub>3</sub>シグナル経路が活性化されることで小胞体からカルシウムの放出が起こる。これをFura-2、Fluo-4等の蛍光カルシウム指示薬で検出する事で、受容体の応答を可視化できる。

Fura-2、Fluo-4はAM(acetoxymethyl ester)体として細胞に取り込まれる。細胞内に取り込まれると細胞内のエステラーゼにより加水分解を受ける。これによりCa<sup>2+</sup>を捕捉能が生じると同時に再び細胞膜を透過しなくなる。

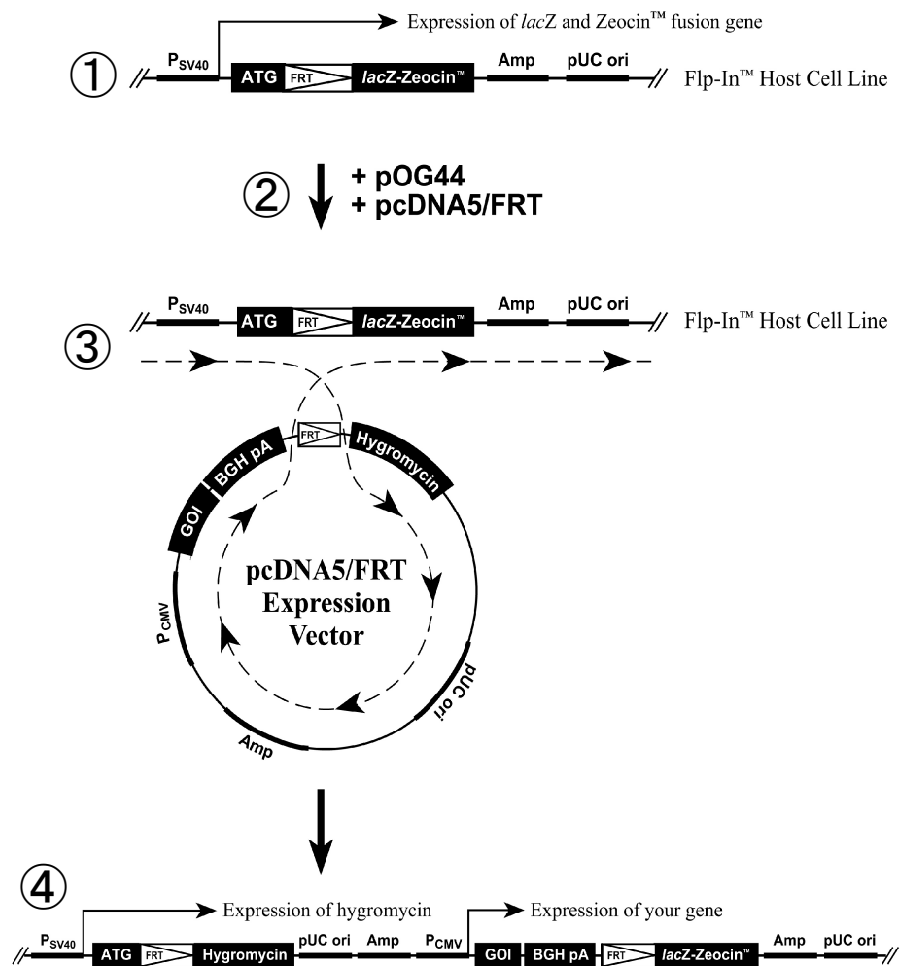


図1-7 : Flp-In Systemの模式図

- ①FRT配列がゲノム中に組み込まれた細胞
- ②目的遺伝子を挿入したpcDNA5/FRTと組換え酵素を発現するpOG44を共導入
- ③FRT配列間で特異的な組換えが起こる
- ④目的遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子が細胞のゲノムに挿入され、発現する  
Invitrogen社HPより抜粋、一部改変。

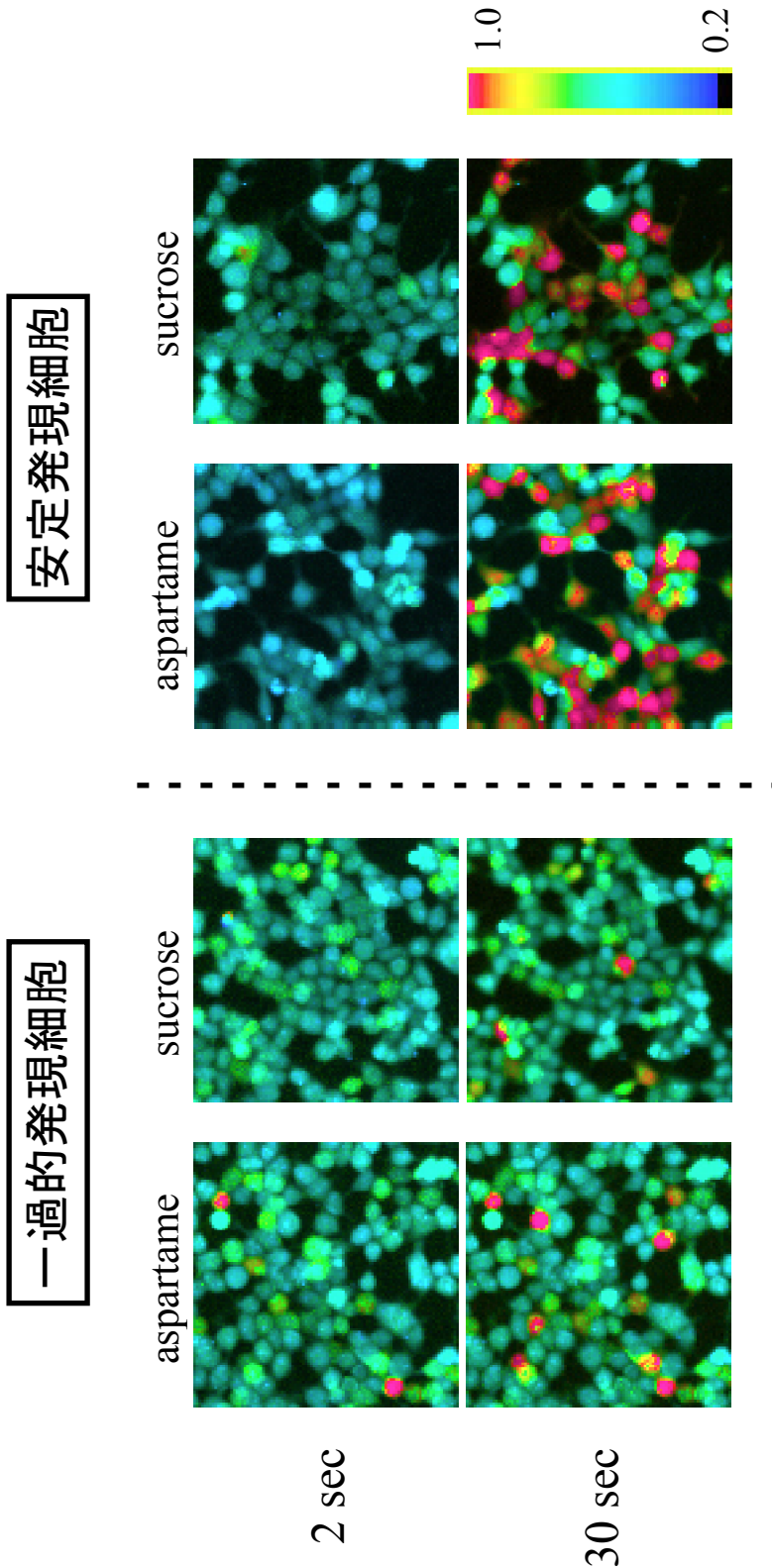
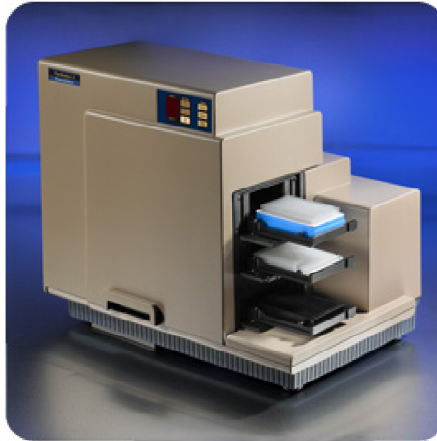


図1-8: ヒト甘味受容体の一過的発現細胞と安定発現細胞の応答性比較  
 一過的または安定的にヒト甘味受容体およびキメラGタンパク質Ga16gust44を発現する細胞に対して2×濃度のリガンド溶液 (終濃度: アスパル  
 テーム 10 mM、スクロース 200 mM) を投与し、その2秒後と30秒後におけるFura-2の蛍光強度比  
 ( $F_{340}/F_{380}$ ) を擬似カラーで表示した。

今田隆将 修士論文(2010)より抜粋。

(A)



(B)

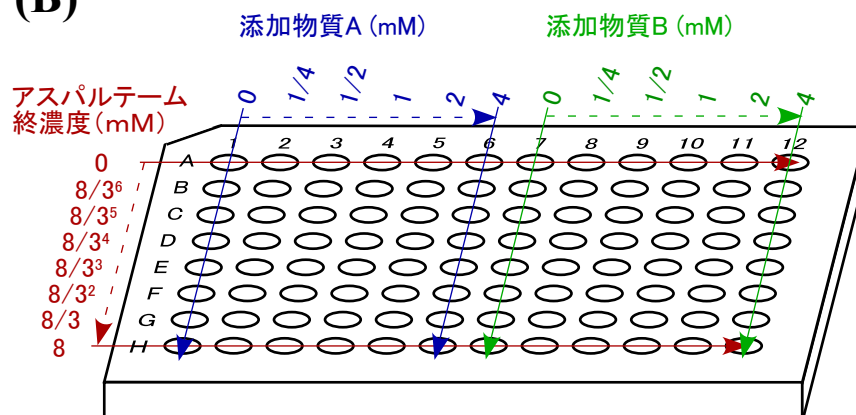


図1-9： (A)ウェルベースアッセイ装置 (FlexStation3)

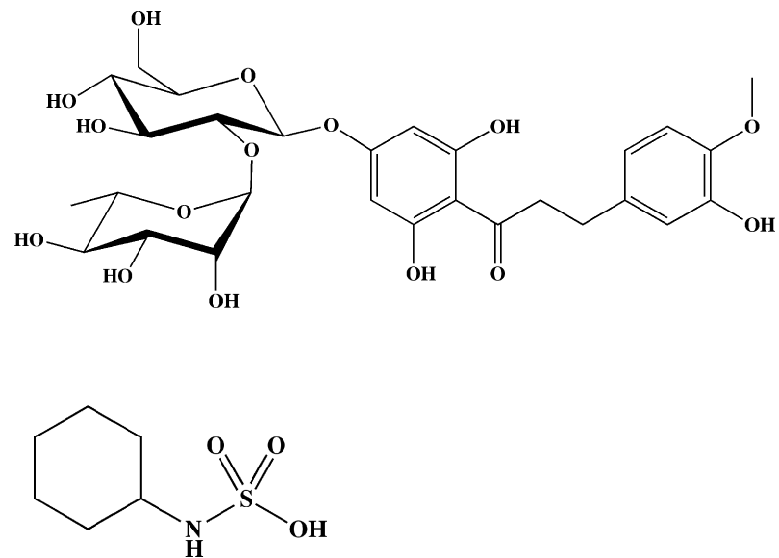
(B)96穴プレートへの試料調製例

ウェルベースアッセイ装置を用いると1プレートをおよそ30分で測定することができる。

A-Hの8穴を同時に測定することができることから、測定誤差が小さくなり、より良いデータを得ることができる。

FlexStation3の図はMolecular DevicesのHPより抜粋。

(A)



(B)

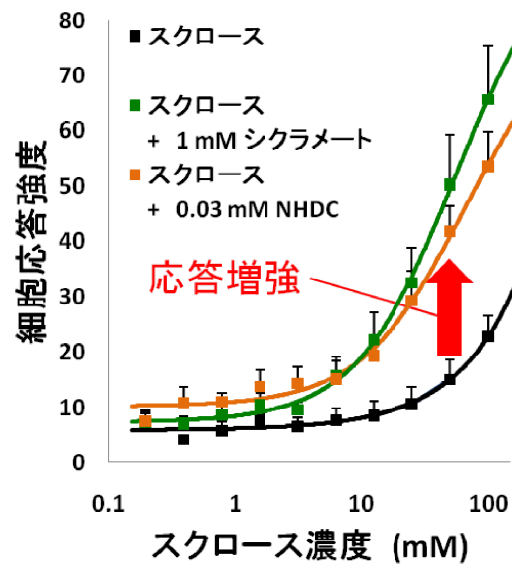


図1-10 : NHDC、シクラメートによる応答増強効果

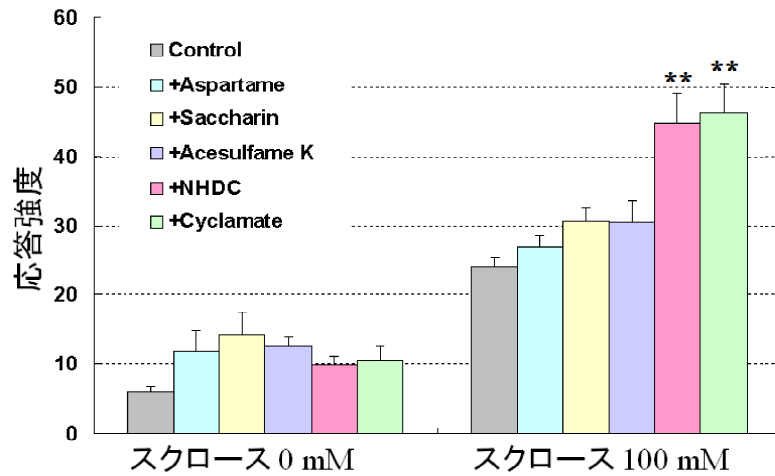
(A)NHDC、シクラメートの分子構造

(B)はスクロースに対しそれぞれ微量添加した際の濃度応答曲線

NHDC、シクラメートには応答増強能があることがわかる。

(B)はFujiwara S. et al., (2012)より抜粋、一部改変。

(C)



(D)

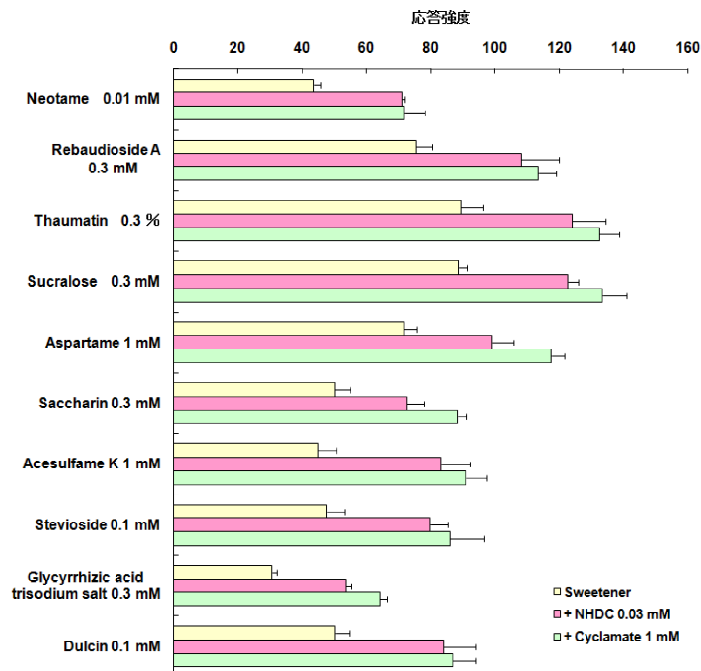


図1-10 :

(C)NHDC、シクラメートと他の甘味物質の応答増強効果の比較  
(D)NHDC、シクラメートによる他の甘味物質に対する応答増強効果

(C)より、応答増強能が他のリガンドと比較しても秀でていることがわかる。  
(D)より、NHDC、シクラメートにはスクロースだけでなく、他の様々な甘味物質に対しても応答増強能があることがわかる。

Fujiwara S. et al., (2012)より抜粋、一部改変。

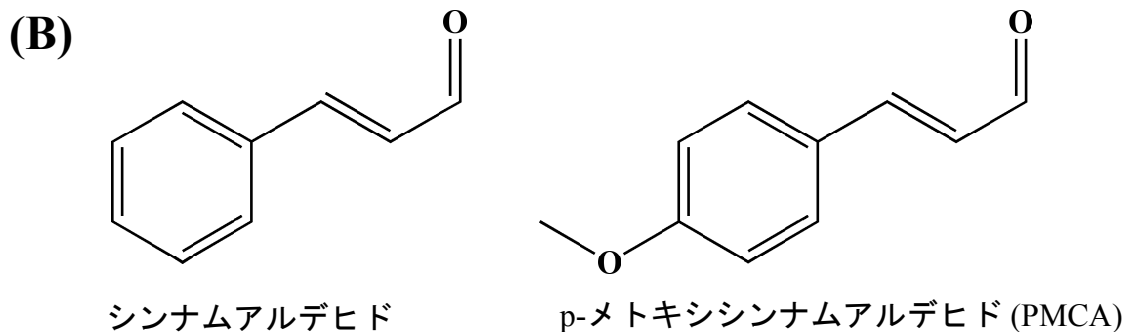
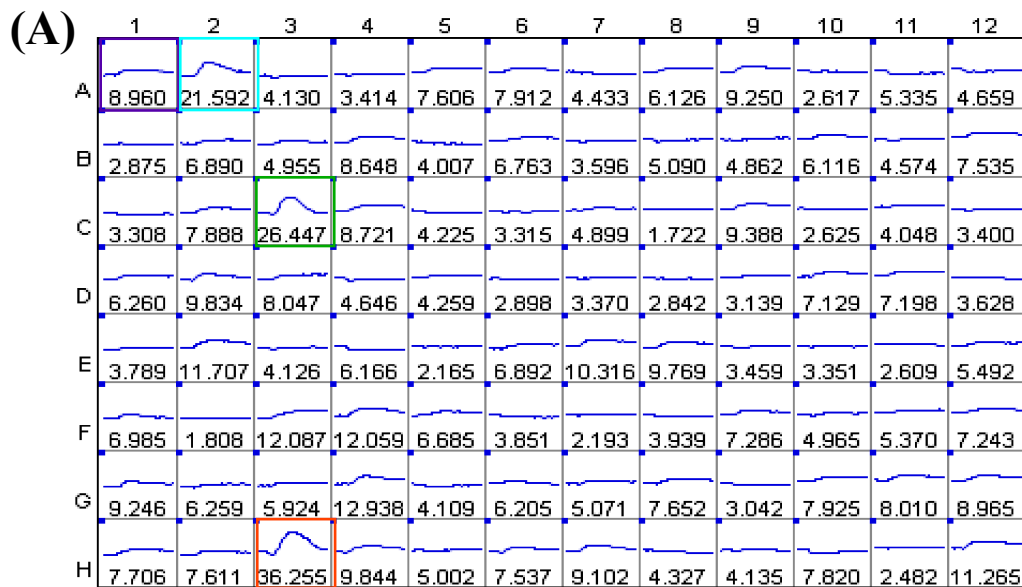
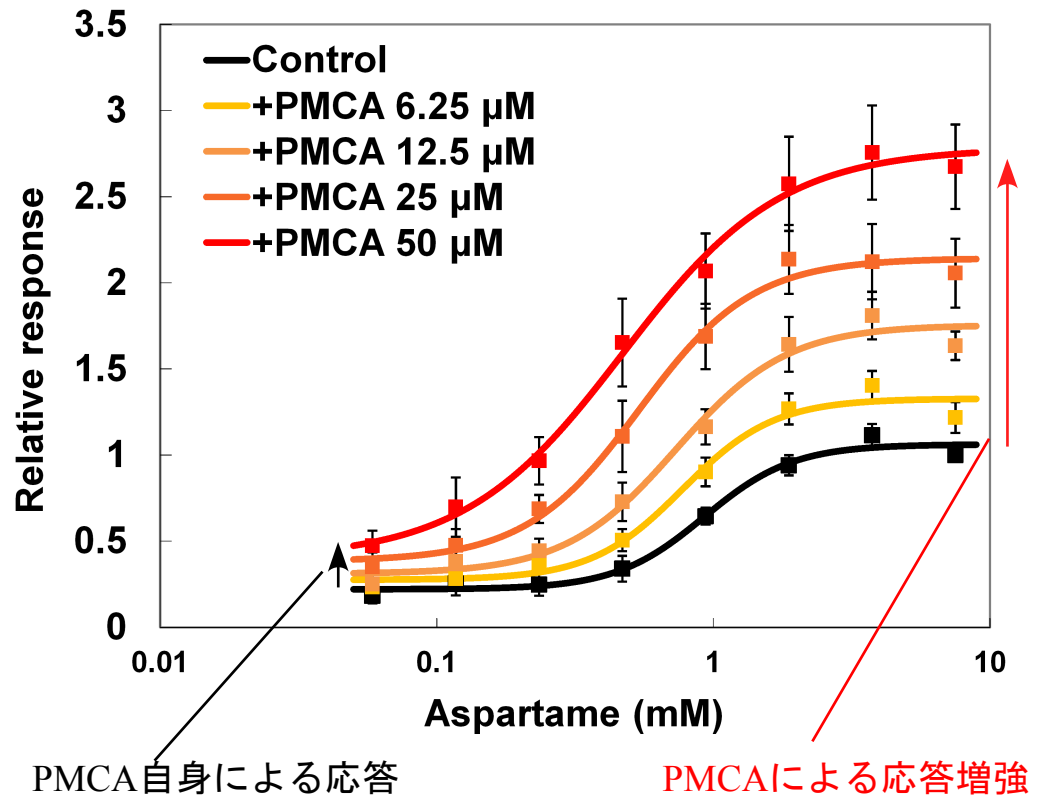


図1-11：甘い香りを有する香料のスクリーニング

(A)：甘い香りを有する香料94種をそれぞれ1 mMに調製し、細胞に投与した。なお、図中1Aはアッセイバッファーのみ2Aはアスパルテーム 1mMの応答である。3Cのシンナムアルデヒド及び3Hのp-メトキシシンナムアルデヒド (PMCA)において応答が確認された。

(B)：シンナムアルデヒド及びp-メトキシシンナムアルデヒド(PMCA)の構造式

(A)



(B)

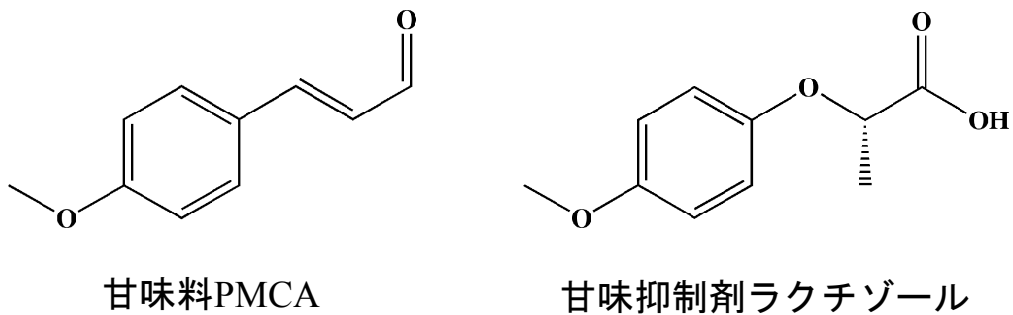


図1-12 : (A)PMCAによる、アスパルテームの応答増強効果  
(B)甘味料PMCA及び甘味抑制剤ラクチゾール

(A) : PMCAにはNHDCやシクラメートと同様にT1R2に作用するアスパルテームの甘味応答を増強する能力を有する

(B) : PMCA、ラクチゾールのは共通の構造を有しているにも関わらずその応答調節能は逆である



## 第 2 章

# T1R3 膜貫通領域に作用する 甘味調節物質の作用機序の解明

## 2-1. 味覚調節物質の現状

味覚に関わる受容体が同定されつつあり、その役割や構造が明らかにされてきている昨今、味覚受容体の応答調節物質の作用機構の解明及び開発が盛んに行われている(図 2-1)。

旨味受容体において主要リガンドであるグルタミン酸は T1R1 サブユニットの VFTD に存在する受容ポケットに作用するが、イノシン酸は同一ポケット内の、グルタミン酸作用部位に比べやや外側に作用することが報告されている(Zhang et al., 2008)。この報告より、ヒト T1R1 に対しイノシン酸単独では作用できないが、グルタミン酸と共に添加することによって T1R1 VFTD の構造変化を促し、旨味受容体の活性化するという機構が明らかとなっている。これがよく知られているグルタミン酸 (こんぶだし) とイノシン酸 (かつおだし) による旨味の相乗増強効果の作用機構である。これと同様の作用機構を利用して、甘味受容体のサブユニットである T1R2 においても甘味増強剤が研究されている。Senomyx, Inc.により開発された SE-3、SE-4(Servant, Tachdjian, Li, & Karanewsky, 2011; Servant et al., 2010)は自身では甘味を有していないが、スクロースやスクラロースの甘味を相乗的に増強するようにデザインされた化合物である。これらは本論文で取り上げている T1R3 TMD に作用する増強剤とは異なる部位に作用することから、併用することで更なる増強効果をもたらすことが期待される。

苦味受容体においても抑制物質の開発が盛んに行われている。これまでに、GIV3727 : Tas2R43, Tas2R44 (Slack et al., 2010)、3 $\beta$ -hydroxypelenolide, 3 $\beta$ -hydroxydihydrocostunolide : Tas2R46 (Brockhoff et al., 2011)、probenecide : Tas2R16 (Greene et al., 2011)、6-methoxyflavanones : Tas2R39 (Roland et al., 2014)、GABA、N,N-Biscarboxy-methyl-Lysine (BCML) : Tas2R4 (Pydi et al., 2014)といったいくつかの報告がなされている。しかしながらこれらのリガンドはいくつかの苦味受容体において抑制効果が認められてはいるが、25 種類ある Tas2Rs 全てに対し苦味抑制が認められるわけではないことから、苦味抑制剤の開発は現状では難しい。

本章ではまず、ラクチゾール、PMCA 類縁体を用いた網羅的な変異体解析を実施した。一方で昨年、T1Rs と同様 Class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 TMD、及び mGluR5 TMD の結晶構造が相次いで報告された。これらを用いて T1R3 TMD の精度の高いホモロジーモデルを作製し、変異体解析によって得られた結果と照らし合わせることで甘味料、抑制剤双方のドッキングモデルを作製した。

## 2-2. 甘味受容体に作用する甘味調節物質の網羅的解析

### 2-2-1. 材料と方法

#### 試薬

- DMEM (ダルベッコ改変イーグル培地)

SIGMA 社より購入したものを用いた。測定用には低グルコース D6046 (1000 mg / mL) の培地を用いたが、細胞株の作製時には増殖速度を早めたいため、高グルコース D5796 (4500 mg / mL) の培地を使用した。

- PBS

NaCl 8.0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.9 g

KCl 0.2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g

以上の物質を MilliQ 水に溶解させ 1 L にメスアップすることで調製した。

- トリプシン溶液

2.5%トリプシン液 (Invitrogen) を 1 mM EDTA 入り PBS で 10 倍希釈して使用した。

- カルシウムイメーシングアッセイバッファー (アッセイバッファーと表記)

10 mM HEPES

130 mM NaCl

10 mM グルコース

5 mM KCl

2 mM CaCl<sub>2</sub>

1.2 mM MgCl<sub>2</sub>

NaOH を用いて pH を 7.40 に調整した。

- 用いた試薬 (1)

測定を行った試薬の名前、構造を表 2-1 に記した。

#### リガンド溶液

アスパルテームは 10 × アッセイバッファーに溶解させ、Milli Q でメスアップすることで 1 × アッセイバッファーに 32 mM 溶解させることでアスパルテーム液を作製した。これを、水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH は 7.4 にした上で、適宜希釈したものを測定に用いた。一方、水への溶解性の低い物質に対しては dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて 1M 溶液を調製し、これを

アッセイバッファーにより希釈することによって用いた。なお、DMSO 1%以下であれば DMSO を加えることによる細胞への非特異的な影響はないことは確認済みである。

さらに、酸性、塩基性のリガンドを用いた場合は、適宜中和を行い、細胞が正常に機能できる pH 内で測定を行った。

## コンストラクトの作製

当研究室 2010 年度修士、今田により作製された甘味受容体安定発現株作製用コンストラクト (T1R2、T1R3、G16gust44 が pcDNA5 / FRT vector に挿入され、同時発現させることが可能) を基に、T1R3 TMD の点変異体発現コンストラクトを作製した。変異体コンストラクトの作製にあたり、プライマーは Sigma-Aldrich に依頼した。Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo) 及び GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて PCR にかけて、得られた断片を In Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて vector を作製した。シーケンスの確認は 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により実施した。

## 培養細胞

### ・安定発現細胞の作製

Flp-in system (invitrogen) を用いて各点変異体発現コンストラクトとリコンビナーゼ pOG44 を遺伝子導入、100 µg / mL hygromycin B (invitrogen) を用いてセレクションにかけた。培地は High Glucose の DMEM を用いた。細胞を増殖させ、直径 100 mm の接着細胞用プラスチックディッシュ (CORNING 430167) 数枚分になるまで培養し、その後 CELLBANKER 1 (TAKARA) に入れ BICELL (日本フリーザー) を用いて -80 度で凍結し、液体窒素へ凍結保存した。

### ・継代

凍結ストックより 1 ロット細胞を起こし、10% FBS (GIBCO) を含む DMEM (SIGMA) を用いて 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。1 日または 2 日に一度細胞を PBS で洗浄した後に 0.25% トリプシン (invitrogen) で消化することにより継代を行った。100 µg / mL hygromycin B 存在下で培養した。

## ウェルベースアッセイ

### ・測定方法

ウェルベースアッセイ装置は FlexStation 3 (Molecular Devices) を用いた。血球計算盤 (トーマ) を用いて細胞数を数え、96 ウェルプレート (Cell Bind ; CORNING) 1 穴あたり、100 µL、70,000 – 80,000 個の細胞を播種し、培養した。23 時間培養後、BIO-WASHER 50 (DS PHAMA BIOMEDICAL) を用いて細胞をアッセイバッファーで培地を洗浄し、1 ウェルあたりの全容を 50 µL とした。ここへ、蛍光カルシウム指示薬 FRIPR Calcium 4 Assay Kit (Molecular Devices) を 50

μL 添加し 37 °C、遮光条件下で 45 分間静置した（全容 100 μL）。なお、FRIPR Calcium 4 Assay Kit は一瓶あたりを 100 mL のアッセイバッファーに溶解させ、これを分注、凍結保存したものを都度溶解し、用いた。

測定条件のうち温度は細胞の活性に関わるため非常に重要である。室温付近(27 °C)で行うか、体温付近(37 °C)で行うかで蛍光指示薬の取り込み量の違いなどから応答強度がかなり異なる。27 °C で測定を行う利点としては、アッセイバッファーのみ細胞にかけた際の Basal の応答が抑えられることである。37 °C では Basal 活性も認められてしまうが応答強度が増す。本研究では応答増強・抑制を観察するという観点から、Basal 活性は考慮する必要がない。さらに、変異体によっては応答強度が低下してしまうことに加え、応答強度が大きい方が抑制剤の測定に適していることから 37 °C で測定を行う方が適切であると判断した。

測定前に 15 分間、ウェルベースアッセイ装置内で細胞をチップ及びリガンドとともに 37 °C 下で静置した（蛍光指示薬の合計インキュベート時間は 1 時間）。リガンド溶液は 96 穴の V 字底リガンドプレート(COSTAR 3897)上に 2 × 濃度で各 120 μL 用意した。100 μL の蛍光指示薬入り細胞液に対し、2 × 濃度のリガンドを 100 μL 添加することにより、終濃度を 1 × 濃度となる。485 nm で励起し、FRIPR Calcium 4 Assay Kit の蛍光（525 nm）を 2 秒に 1 度測定した。測定開始から 20 秒後に 2 × 濃度に調製したリガンド溶液 100 μL を細胞に投与し、120 秒間にわたり経時的な蛍光強度変化を測定した。蛍光強度は relative fluorescence units (RFU) で表される。

なお、変異体解析において T1R2 VFTD に作用するアスパルテムを基準物質として用いた。アスパルテム自身は T1R3 TMD における変異の影響は受けないはずであることから、アスパルテムの活性が保持されていることをもって変異体甘味受容体が機能していることを確認した。応答調節能解析においては、4 × 濃度のアスパルテムと 4 × 濃度の添加物質を用意し、これを 1:1 で混ぜ合わせるにより 2 × 濃度に調製したものをリガンドプレートに用意し、細胞へかけた。

#### ・データ解析

FlexStation 3 によって得られた蛍光の経時変化から、蛍光強度の最大値と最小値の差分を算出してこれを細胞の応答と定義した（ΔRFU）。この値をプロットし、ソフトウェア Clampfit 9.2 を用いて以下に示す Hill bloker kinetics の式を用いて近似曲線を得た。

$$f(x) = I_{min} + \frac{I_{max} - I_{min}}{1 + (x/EC_{50})^h}$$

$I_{max}$  はグラフの最大値、 $I_{min}$  はグラフの最小値、 $h$  は Hill 係数

これにより得られた計算結果から、最大値  $I_{max}$  の 50% の応答強度が得られる際の甘味料 or 抑制剤の濃度を  $EC_{50}$  値 (half maximal effective concentration)、 $IC_{50}$  値 (half maximal inhibitory concentration) として表し、この値を各リガンドの受容体に対する応答調節能の強さの指標とした。

## 2-2-2. 構造類似化合物のスクリーニング測定

シナナムアルデヒド、ラクチゾールの類縁体計 78 種の測定を行い、構造活性関連の検討を行った。これらの測定結果は本論文の末尾に補足資料(p. に掲載)として一覧を掲載した。これらのうち、主だったものについて触れる。

### 測定 1 PMCA の p 位メトキシ基について

シナナムアルデヒドよりも PMCA の方が受容体の活性化能が強力であったことから、p 位のメトキシ基の鎖の長さを変えた類縁体の測定を行った。炭素鎖長が 2 から 6 までのリガンド(エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基、ペンチロキシ基、ヘキシロキシ基)を用意し、それぞれの応答調節能を比較した(図 2-2)。この結果、メトキシ基、エトキシ基は同等の受容体の活性化を示したが、プロポキシ基は活性化も抑制もなく、ブトキシ基は強い抑制を示した。ペンチロキシ基、ヘキシロキシ基も応答抑制能を示したが、ブトキシ基に比べれば弱いという結果が得られた。

この結果から、甘味料として働く構造の範囲は抑制剤として働く構造の範囲より狭いことが示唆される。また、抑制剤として働くにはブトキシ基ほどの鎖の長さを有していることが重要であることが示唆された。

### 測定 2 ラクチゾールの類縁体について

ラクチゾールの他、図 2-3 に示した類縁体の測定を行った。これらの類縁体から、

- ・カルボキシ基から芳香環までの炭素鎖には枝が存在するリガンドは応答抑制能が強い(枝の Me 基は 2 つ > 1 つ > なし の順に抑制能が強い)。

- ・カルボキシ基から芳香環までの長さは炭素鎖 4 > 3 > 2 である。

芳香環のカルボキシ基に対する p 位には、クロロ基 > ピペロニル基 > メトキシ基 > なし の順に強力である。

- ・メトキシ基の配向は m-位 > p 位 > o 位である。

以上のことが言える。この結果から、ラクチゾール作用部位の周囲にはスペースが広く空いており、様々な構造を許容することを示唆する。そして、それを埋める構造の方が、強力に作用する可能性を示唆する。

これは、リガンド測定により、多くの物質が抑制剤として作用したことから推測が可能である。詳しい考察については、2-3 にてホモロジーモデルを交えて行う。

## 2-2-3. 複数の甘味料、抑制剤に対する T1R3 TMD の網羅的変異体解析

甘味料として、シクラメート、NHDC、シナナムアルデヒド、PMCA の 4 物質を、抑制剤として、ラクチゾール、2,4-DP、2-phenylpropionic acid (ラクチゾールの p-位メトキシ基を取った構造。2-Phe と略記)、2-(4-methoxyphenoxy)acetic acid (ラクチゾールの枝を取った構造。4-OMe と略記) の 4 物質に対して、変異体解析を網羅的に実施した。はじめに変異体解析を実施するにあたり、変異の位置変異体におけるアスパルテームの応答強度 I Max と EC<sub>50</sub> 値、及び各変異体の EC<sub>50</sub> を

野生型(WT)の EC<sub>50</sub> で割った値、EC<sub>50</sub>/EC<sub>50\_WT</sub> を示した (表 2-1、図 2-4)。

なお、膜貫通領域における位置は一般的に Ballesteros と Weinstein により定められた残基の配置法(BW numbering)が用いられている。これは Class A GPCR において各膜貫通構造のヘリックス(以下 transmembrin ; TM)内で最も保存されているアミノ酸残基を 50 番として、それより前の残基を 49,48…、後の残基を 51,52…と名付けた位置の数え方である。例えば、T1R3 TMD の場合、TM 2 における Leu614 を 2.50 として定められ、Gly615 は 2.51、Cys613 は 2.49 となる。本論文での T1R3 TMD における BW numbering の位置は mGluR1 TMD (Wu et al.) を参考にした。これらは Class A とのアラインメントを基にしたものであり、Class C GPCR において必ずしも保存性の高い残基ではない。

アスパルテームの測定結果から、S620A<sup>2.56</sup>、N737Q<sup>5.47</sup> の 2 変異体についてはアスパルテーム自身の EC<sub>50</sub> 値が WT に比べ 5 倍以上大きくなったことから、参考値とした。また、L644V<sup>3.36</sup>、L648V<sup>3.40</sup>、L740V<sup>5.50</sup>、A797V<sup>7.41</sup>、C801I<sup>7.45</sup>、G804A<sup>7.48</sup> の 6 変異体についてはアスパルテームの応答がほぼ認められなかった、あるいは濃度応答曲線が描けなかったことから、これらの変異体は以後の解析には用いなかった。

上記変異体を用いて、各リガンドの測定を行った。まずは WT におけるそれぞれの濃度応答曲線を示した (図 2-5)。活性化剤 (増強剤) では PMCA の EC<sub>50</sub> 値が最も小さく、90 μM であった。続いて NHDC は 220 μM、シンナムアルデヒドが 300 μM、シクラメートは 2.7 mM であった。一方、抑制剤の中では、2,4-DP の IC<sub>50</sub> が 6 μM、ラクチゾールが続き 70 μM、4-OMe が 440 μM、2-Phe が 780 μM であった。

次に、各々のリガンドに対して変異体解析を行った結果を示す (表 2-2、表 2-3)。各リガンドに対する変異体の影響を EC<sub>50</sub> 値、IC<sub>50</sub> 値のずれにより判定した。上の表には EC<sub>50</sub> 値、IC<sub>50</sub> 値 (濃度、mM) を、下の表には、それぞれの変異体における EC<sub>50</sub> 値、IC<sub>50</sub> 値を WT の EC<sub>50</sub> 値、IC<sub>50</sub> 値で割った比を掲載した。比の値が大きいものほど WT よりも大きく値がずれ、変異による影響を大きく受けていることを意味する。変異による影響が極めて大きかった残基 (50 倍以上のずれ) を赤色に、WT に比べ 10 倍以上のずれが生じた変異については橙色に、5 倍以上のずれが生じた残基については黄色に示した。

さらに、各リガンドの影響の大きい変異の位置を膜貫通構造の模式図 (スネークプロット) で示した (図 2-6、図 2-7)。

甘味料の 4 物質は共通して TM3、TM5 のそれぞれかなり浅い位置に存在する Gln636<sup>3.28</sup> 及び Ser729<sup>5.39</sup> における変異の影響が極めて大きかった。この結果は修士における PMCA の測定を再現する結果である。また、N737Q<sup>5.47</sup> はポジティブコントロールであるアスパルテームの活性化能が低下した残基であるが、全ての甘味リガンドの活性化能が低下していることから、変異により受容体が活性化しにくい構造へ変化した。つまり膜貫通構造が不活性化型から活性化へ変化する際に重要な残基である可能性が挙げられる。なお、シクラメートについては H734N<sup>5.44</sup> 及び

R790Q<sup>ECL3</sup>の2変異体において受容体活性化ではなく、抑制能を獲得している。

一方で、甘味抑制剤の4物質は共通して、TM3のHis641<sup>3,33</sup>、TM7のGln794<sup>7,38</sup>における変異の影響が極めて大きかった。Q794N<sup>7,38</sup>変異体は先行研究(Jiang et al., winnig et al.)においても報告されていない新たな知見である。また、Q637E<sup>3,29</sup>、A733V<sup>5,43</sup>、H734N<sup>5,44</sup>、F778A<sup>6,51</sup>に対してはリガンドごとの変異による影響の大きさは異なるものの、総じて抑制能の低下が認められる残基であった。

修士論文において述べた通り、増強剤、抑制剤は一部を除き、同一残基により双方の調節能低下をもたらされることはなく、これらは異なる部位に作用している結果が得られた。

以上の網羅的な変異体のスクリーニングに基づき、mGluR1 (PDBID: 4OR2)の結晶構造を基にしたT1R3 TMDのホモロジーモデルを作製した。



## 2-3. T1R3 TMD と抑制剤・甘味料ドッキングモデルの作製

本節におけるモデルの作製は産業技術総合研究所、創薬分子プロファイリング研究センター広川貴次博士の監修により実施した。

### ・ホモロジーモデルの作製

これまでに結晶構造が解かれている mGluR1 及び mGluR5 に対しアミノ酸配列のアラインメントを作製した。この結果を図 2-8 に示す。アラインメントは clustalW2 を用いて行った。また、gap の位置は実際の結晶構造から判断し、最適な位置（膜外のループで、かつ特定の構造（シートやヘリックス）を保持していないランダムコイルな位置）に配置した。このアラインメントを基に、mGluR1 の結晶構造を鋳型としてホモロジーモデルを 10 通り作製させ、最も安定な構造を選んだ。モデルの作製には Maestro (Schrödinger, Inc.)を用いた。

### ・甘味抑制剤 2,4-DP のドッキングモデルの作製

mGluR1 の結晶構造は抑制剤 FITM が結合した不活性型である。そこで、既知のリガンドの中で最も抑制能が強い 2,4-DP を用いてドッキングモデルの作製を試みることにした。なお、変異体解析実験に用いたラクチゾール、2,4-DP はラセミ体であるが、天然に存在するラクチゾールは S 体が多いという報告が存在することから(Rathbone, Butters, Cookson, & Robinson, 1989)、S 体を用いてドッキングを実施した。

まずは 2-2-3 に示した 2,4-DP を用いた変異体解析結果をモデル上に表示した（図 2-9a）。残基の色は、変異体解析結果と同様、変異によるリガンド抑制能への影響度に従った。すなわち、IC<sub>50</sub> 値が WT に比べ 50 倍以上低下したものを赤色に、10 倍以上低下したものを橙色に、5 倍以上低下したものを黄色で示してある。

ホモロジーモデルから、His641<sup>3.33</sup> 及び Gln794<sup>7.38</sup> は膜貫通構造内において、向かい合う位置に存在することがわかる。そこで、この 2 つの残基と相互作用することを指定し、ドッキングモデルを 100 通り作製させ、最も安定な構造を選択した。ドッキングモデルの作製には Glide (Schrödinger, Inc.)を用いた。得られたドッキング結果を示す(図 2-9b)。

### ・2,4-DP と不活性型のドッキングモデルに対する考察

2,4-DP の甘味抑制能が 10 倍以上低下した 6 残基（Gln637<sup>3.29</sup>、His641<sup>3.33</sup>、Ala733<sup>5.43</sup>、His734<sup>5.44</sup>、Phe778<sup>6.51</sup>、Gln794<sup>7.38</sup>）について考察できることをもって十分なモデルとみなす。

このドッキングモデルでは、2,4-DP のカルボキシル基は、His641<sup>3.33</sup> 及び Gln794<sup>7.38</sup> を架橋するように存在し、かつ同時に Gln637<sup>3.29</sup> も近傍に存在しており、合計 3 残基と相互作用している。カルボキシル基のみがこのように作用することが可能であることから、2-2-2 におけるリガンドの類縁体添加実験においてカルボキシル基を有するリガンドが全て抑制効果を示したという結果

を支持するものである。2,4-DP の芳香環を支えるように His734<sup>5.44</sup>、及び Phe778<sup>6.51</sup> が存在し、o-位、p-位の Cl 基が Phe778<sup>6.51</sup> との疎水性相互作用を強めている。これが、ラクチゾールとの抑制能が異なる要因である（ラクチゾールのドッキングモデルとの重ね合わせを図 2-10a に示した。）。F778A<sup>6.51</sup> 変異体において、ラクチゾールの抑制能低下(WT の 16 倍)に比べ、2,4-DP の抑制能低下が著しい(WT の 48 倍)ことも、このモデルを支持していると言える。また、主要 6 残基ではないが、Phe624<sup>2.60</sup> と、2,4-DP の枝の Me 基が近傍に存在しており、相互作用していることが想定される。この相互作用は R 体(Me 基と H が逆になる。)では認められないはずであることから、少なくとも 2,4-DP では S 体が T1R3 TMD との相互作用に役立っていると考えられる。

残る主要残基 Ala733<sup>5.43</sup> について考察する。A733V<sup>5.43</sup> 変異体はヒト→マウス型へと置換した変異体であり、733<sup>5.43</sup> 番目の残基が Val であることは、ラクチゾールがマウス甘味受容体に作用しない主要因であると考えられている。しかしながら、直接的には 2,4-DP との相互作用には関わっていない。

Ala733<sup>5.43</sup> は抑制剤にとってキーとなっている残基、His641<sup>3.33</sup> と向かい合う位置に存在しており、これが Ala であればモデルの位置に His641<sup>3.33</sup> が存在することが可能である。これに対し、より嵩高い Val が存在している場合、His641<sup>3.33</sup> がヒト抑制剤にとっての程よい位置 (Gln637<sup>3.29</sup>、His641<sup>3.33</sup>、Gln794<sup>7.38</sup> の 3 残基と相互作用可能な位置) に存在できなくなることが要因であると考えられる。

ホモロジーモデルは、鋳型となっている mGluR1 の結晶構造の主鎖の位置には変更を加えず、あくまで側鎖の向きに変更を加えることによって作製している。リガンドによってはホモロジーモデルのままではうまく作用できず、主鎖をリガンドに作用するように動かしていく induced fit を実施する必要があるが、2,4-DP についてはホモロジーモデルの時点で既に変異体解析結果を十分に説明することが可能であることから、そのままこのモデルをドッキングモデルの完成系とした。

2,4-DP の周囲 4 Å 以内の残基を表示した(図 2-10b)。図 2-10a で示した通り、ラクチゾール、2,4-DP の芳香環の角度が異なっている。このことから、周囲にはスペースにゆとりが存在し、幅の広いポケットであることがわかる。

#### ・甘味料ドッキングモデルの作製

GPCR の活性型構造は G タンパク質へのシグナル伝達という性質上、不活性型構造とは異なる形状を有している。ところが、GPCR のアゴニストフォームが明らかにされている例は少なく、かついずれも Class A の GPCR であることからこれらは T1R3 の活性型の鋳型としては用いることができないと判断した。

そこで、抑制型と同じく mGluR1 の不活性型構造をはじめとして、これに対し既知のリガンド

の中で最も活性化能が強い PMCA を配置し、MD (molecular dynamics method; 分子動力学法) を用いたシミュレーションを行うことで、活性型構造の探索を図った。

はじめに、2-2-3 の変異体解析結果から PMCA の活性化能が大きく低下した残基を T1R3 ホモロジーモデル上に示した(図 2-11a)。解析結果にこれより、影響がある残基は大きく 2 箇所、TM3 の Gln636<sup>3,28</sup> 付近、及び TM5 の Ser729<sup>5,39</sup> 付近にある程度まとまって存在しているものの、これらは離れた位置に存在している。特に Ser726<sup>ECL2</sup>、Trp727<sup>ECL2</sup>、Ser729<sup>5,39</sup> といった残基はリガンド作用ポケットの方向へと向いておらず、単純に PMCA を配置することは困難であった。

そこで、PMCA から p-位のメトキシ基を除いたシンナムアルデヒドと T1R3 TMD の相互作用の差に注目した。PMCA はシンナムアルデヒドに比べ、Phe624<sup>2,60</sup>、Ser640<sup>3,32</sup>、Ser726<sup>ECL2</sup>、Trp727<sup>ECL2</sup>、Leu782<sup>6,55</sup> との相互作用が増している。この結果と不活性型ポケットにおいてリガンド配置が可能なスペースより、PMCA のアルデヒド基を Gln636<sup>3,28</sup> と相互作用し、メトキシ基が Leu782<sup>6,55</sup> と相互作用することを指定し、ドッキング用ソフトウェア Glide 内で induced fit を実施した。induced fit により得られたモデルを 100 通り作製し、変異体結果に最も合うモデル(4 番目にエネルギー的に安定なモデル)を選択した(図 2-11b)。

続いて、MD を開始するにあたり、結晶構造から膜の層を計算しているインターネット上のサイト、PDBTM (<http://pdbtm.enzim.hu>)より mGluR1 の結晶構造 4OR2 の膜データを読み込み、これに T1R3 のモデルを重ね合わせて膜方向を決定したのちに膜部分に膜成分を、膜外に水分子を配置した後に MD を開始した。MD はおよそ 1 月かけて実施し、計算上 100 ns 経過した時点で計算を終了し、100 ns 時点の構造を PMCA 結合活性型構造とした(図 2-12)。

#### ・ PMCA と活性型モデルに対する考察

活性型モデルが不活性型と大きく異なる点は、MD 計算の開始直後より TM5 が大きく折れ曲がった点である。これにより、不活性型では遠位に存在していた Ser726<sup>ECL2</sup>、Trp727<sup>ECL2</sup>、Ser729<sup>5,39</sup> の 3 残基が Leu782<sup>6,55</sup> に近づき、PMCA との相互作用に関わっている位置に存在している。2-2-3 における変異体解析結果から重要であると判断された Ser620<sup>2,56</sup>、Phe624<sup>2,60</sup>、Gln636<sup>3,28</sup>、Ser640<sup>3,32</sup>、Ser726<sup>ECL2</sup>、Trp727<sup>ECL2</sup>、Ser729<sup>5,39</sup>、Asn737<sup>5,47</sup>、Leu782<sup>6,55</sup> のうち、Asn737<sup>5,47</sup> を除いた 8 残基は PMCA の近傍に集中するという結果が得られた。しかしながら、PMCA の周辺(4 Å 以内)に存在する残基を表示したところ(図 2-13)、Phe624<sup>2,60</sup>、Leu782<sup>6,55</sup> については PMCA との相互作用が認められるものの、むしろ他の残基については直接的な相互作用は認められず、活性型への構造変化に重要な残基である可能性が挙げられる。

MD により得られた活性型モデルが確からしい構造であるのかについて、次の 4 点について考察した。

#### 1. 抑制剤の作用部位

抑制剤が抑制剤としてはたらくためには活性型への構造変化を妨げる位置に作用していなくてはならない。そこで、PMCA の活性型モデルと、2,4-DP の不活性型モデルを重ね合わせた上で、TM5 の折れ曲がりに対し、抑制剤 2,4-DP がどのように位置しているのかを検証した。重ね合わせは、主鎖の重なりが最も高くなるように実施した（図 2-14）。活性型及び不活性型では Phe730<sup>5.40</sup> 及び、His734<sup>5.44</sup> に大きな違いが認められた。

Phe730<sup>5.40</sup> は不活性型モデルでは横に逃げているのに対して、PMCA 活性型モデルでは抑制剤の作用部位に蓋をするように存在している。活性型では TM5 の構造変化に伴い、Phe730<sup>5.40</sup> がポケットの内側に位置するようになるため、不活性型のような芳香環が外側へ逃げるロータマーは取りにくいと推察される。これより、2,4-DP が His641<sup>3.33</sup> や Gln794<sup>7.38</sup> と相互作用することで、活性型への構造変化を妨げていると言える。

また、His734<sup>5.44</sup> は活性型では大きく TM4 側へと動いており、TM4 に存在する Glu692<sup>4.53</sup> とイオン性の相互作用を形成している。一方で、不活性型では 2,4-DP の芳香環と His734<sup>5.44</sup> イミダゾール環の向きが重なり合い、 $\pi$ - $\pi$  相互作用が生じている。これより His734<sup>5.44</sup> が TM4 の方へ移動するのを妨げ、抑制剤として機能していると考えられる。

以上より、抑制剤としてはたらくためには Phe730<sup>5.40</sup>、His734<sup>5.44</sup> の動きを固定することが重要であることが推察される。

## 2. Ser620<sup>2.56</sup>変異体、N737Q<sup>5.47</sup>変異体における受容体全体のアゴニスト活性の低下

2-2-3 のはじめに、受容体の機能の保持の確認のためにアスパルテームの応答を確認しているが、Ser620<sup>2.56</sup>、N737Q<sup>5.47</sup>においてはアスパルテームの EC<sub>50</sub> 値が低下していた。

PMCA の活性型モデルで、これらの残基の位置を表示した(図 2-15)。Ser620<sup>2.56</sup> は、活性型へ変化するために重要な残基、Gln636<sup>3.28</sup> との相互作用に関わっていることがわかる。この残基を Ala へと置換したことでヘリックス構造に歪みが生じ、Gln636<sup>3.28</sup> との相互作用が弱まる可能性が考えられる。一方、Asn737<sup>5.47</sup> は TM5 の折れ曲がりの根元に位置していることがわかる。この残基を 1 炭素分長い Gln に置換したことで、TM5 の折れ曲がりの柔軟性を妨げたという推察は十分に可能である。

## 3. 甘味料 NHDC 及びシクラメートは PMCA の活性型モデルに作用するか。

NHDC、シクラメートが PMCA 活性型モデルに作用するのかが検討したが、NHDC は分子が大きいため、PMCA 活性型モデルには作用できなかった。NHDC は H734N<sup>5.44</sup> 変異体においても変異の影響を受けているため、PMCA 活性型モデルでは Phe730<sup>5.40</sup> により蓋がされている抑制剤作用部位にも作用している可能性がある(図 2-16a)。

シクラメートは逆に、分子が小さい割に、影響を受ける変異体の数が多い。PMCA や NHDC には無い、シクラメート固有で影響を受ける残基 Arg790<sup>ECL3</sup> を基準に、PMCA 活性型モデルにド

ッキングを実施した (図 2-16b)。これにより、TM5 - 6 側の残基については解釈が可能であるが、TM2 - 3 側の残基については説明が難しい。そこで、あくまで仮説ではあるが、シクラメートが 2 分子、作用し得る部位が存在し、これらのどちらか、あるいは両方に作用することで活性化に働いていると考えた。

#### 4. H734N<sup>5.44</sup> 変異体における、甘味料シクラメートの抑制剤への変化

抑制剤の 2,4-DP は His734<sup>5.44</sup> との相互作用により抑制剤として機能していることが示唆された。一方で、甘味物質であるシクラメートは、H734N<sup>5.44</sup> 変異体において抑制剤として機能することを 2-2-3 において述べている。H734N<sup>5.44</sup> 変異体においてシクラメートがどのように作用しているのか、モデルを作製した (図 2-17)。シクラメートのスルホ基はやはり His641<sup>3.33</sup> と相互作用し、シクロヘキサン環は Phe778 の方向へ配向した。また、Asn<sup>5.44</sup> アミド基のうち C=O がシクラメートのリンカーとなる第 2 級アミンと、NH<sub>2</sub> がスルホ基の S=O と相互作用することが示唆された。そして、2,4-DP の不活性型モデルとの重ね合わせを実施すると、やはり 2,4-DP とシクラメートが似た位置に作用していることがわかる。

以上の結果より、PMCA 活性型モデルからは NHDC の作用形式を説明できなかったものの、PMCA に対する変異体解析結果がしっかり説明できることから、概ね確からしい構造が得られていると判断した。

また、図 2-8 のアラインメントから、活性型へのキーとなっている残基、Glu692<sup>4.53</sup> と His<sup>5.44</sup> が他の GPCR においてどのようになっているのかを考察した。mGluR1、mGluR5、T1R1、T1R2 の中では T1R2 のみ、4.53 位が Lys となっており、かつ TM5 の 5.44 位より一段低い位置、5.47 位が Asp となっていることから、これらで相互作用を起こしている可能性が挙げられた。他の GPCR にはイオン性相互作用が期待される残基は存在しなかったものの、5.45 位、5.49 位に Gly (T1R1、5.45 は Leu) が存在していることから TM5 は柔軟な構造を有していることが期待される。

## 2-4. シミュレーションに基づくより強力な抑制剤・甘味料のデザイン

得られたそれぞれのモデルに対し、2,4-DP あるいは PMCA の周辺の残基に注目し、より強力なリガンドの探索を実施した。

### 2-4-1. 抑制剤のデザイン

まずは2,4-DPの不活性型モデルを基に、更なる強力な抑制剤について考察を実施した。2,4-DP不活性型モデルと、既知の結晶構造 mGluR1 + FITM と、mGluR5 + mavoglurant を重ね合わせることで、リガンドが結合可能な空間を探索した(図 2-18)。図中、水色で示したものが mGluR1 のリガンド FITM、橙色で示したものが mGluR5 のリガンド mavoglurant、そして、紫色で示したものが 2,4-DP である。これらはよく似た角度で受容体と相互作用しているものの、FITM、mavoglurant に比べ、2,4-DP は構造が短く、作用部位が浅いことが明らかとなった。そこで、mGluR1 及び mGluR5 の残基と、T1R3 の残基を比較することで、FITM や mavoglurant と同様の作用部位が存在するのか、検証を行った。

まずはより深い位置に作用している mGluR5 の mavoglurant と T1R3 について注目した(図 2-19)。mavoglurant は 2,4-DP の作用部位よりも深い位置から、直線上のアルキン構造によりさらに深い残基へと相互作用している。ここで、TM3 の 3.36 の位置に存在する残基を比べると、mGluR5 では Pro であるが、T1R3 では Leu になっている。T1R3 の Leu は嵩高い構造を有していることから、mavoglurant の作用部位と重なってしまう。これより、T1R3 には mGluR5 のようなポケットは存在しないことが予想された。

続いて、mGluR1 と T1R3 との比較を行った。FITM は 2,4-DP の p 位 Cl 基よりも、芳香環 1 つ分奥へと作用した構造を有している。この空洞が T1R3 にも存在しているのか、検証を実施した(図 2-20)。リガンド作用部位を上から(細胞外側から)覗いた図を、mGluR1 (水色)、T1R3 (紫色)のそれぞれで示した(最も奥に存在する FITM の芳香環の周囲について言及する)。2 つのポケットの空間を比較すると、T1R3 の方がやや狭いことがわかる。しかしながら、奥行きは十分に存在することから、長さが 4 - 5 程の炭素鎖であれば、残りの空間に作用する可能性が示唆された。

次に、2,4-DP の芳香環の周囲について注目する。図 2-10 に示した通り、ラクチゾール、2,4-DP の芳香環の向きが異なっているが、2,4-DP の芳香環の周囲には比較的大きな空間が存在しており、芳香環は地涌な配向を取ることが可能である。一方で不活性型ガスと活性型モデルとの比較から、His734<sup>5,44</sup> との相互作用が強くなっているものは抑性能が強い可能性が示唆された。以上から、His734<sup>5,44</sup> との  $\pi$ - $\pi$  相互作用が大きくなる角度で芳香環が固定されるような構造は抑性能が強くなると考えられる。例えば、ナフタレン環(C10 からなる六員環の 2 量体)を有するような構造は His734<sup>5,44</sup> との相互作用力が強くなる上に、ベンゼン環に比べ自由度が低いことから、強力に作用しうると考えられる。

ここで、2-2-2 において実施した類縁体の解析結果の考察を行う。PMCA の p 位類縁体の添加実験において、炭素鎖 4 の p-butoxycinnamaldehyde は活性化能ではなく、抑制能を有していた。これは、p-ブトキシフェニル基が抑制能を発揮するのに適した構造であることを示唆する。更にこれは 2,4-DP 作用部位よりも奥に存在している空間の大きさと一致することから、ラクチゾールの p 位をブトキシ基に置換した 2-(4-butoxyphenoxy)propionic acid は強力な抑制剤として機能する可能性がある。

また、ラクチゾール類縁体による解析では、カルボキシル基と芳香環の間の鎖の長いものがより強力に作用した（炭素鎖  $2 < 3 < 4$ ）。これは His734<sup>5.44</sup> との相互作用できる芳香環の距離・角度によるものであると考えられる（図 2-21）。ラクチゾールと同程度の抑制能を有する 4-4-methoxyphenoxybutanoic acid では、His734<sup>5.44</sup> とより向かい合うことが可能である。また、この炭素鎖の下にも空間が存在することから、なるべく隙間を埋める構造（枝がある）ものの抑制力がより強力であったのであると推測される。

## 2-4-2. 甘味料のデザイン

PMCA の付近の構造について考察する。増強剤が増強剤として機能するためには、ECL2 と、TM との双方に相互作用し、構造を変化させることが重要であると考えられる。

ラクチゾールと PMCA の構造がよく似ていることからわかる通り、PMCA の周囲に存在する残基の種類は抑制剤作用部位に存在する残基によく似ている(図 2-10b、図 2-13)。しかしながら、抑制剤の作用部位は幅の広い（様々な構造が入りうる）ポケットを有しているのに対し、増強剤の作用部位は細長い構造を有している。2-2-2 において構造活性相関では多くのものが抑制剤として作用し、PMCA のような平面、直線的な構造のみが増強剤として作用したのはおそらくこのためであろう。

PMCA よりも強力なデザインを考案するにあたり、構造変化のキーとなっている ECL2 はもちろんのこと、TM2 - 3 の Gln636<sup>3.28</sup> 周辺及び TM5 - 6 の Ser729<sup>5.39</sup> 周辺への相互作用力が大きいものの方が強力であると考えた。一方、PMCA については、TM 2 の Phe624<sup>2.60</sup> や TM 6 の Leu782<sup>6.55</sup> への相互作用がぎりぎり可能な程度の分子長しかなく、TM2 - 3 側、及び TM5 - 6 側の双方にゆとりが存在する(図 2-22)。TM2 - 3 側は疎水基が多く、TM5 - 6 側は親水基が多い。更には、ECL3 に Arg790、また、ECL2 には His721 が近傍に存在することから、これら 2 残基に対してカルボキシ基を配置した構造が強力に作用する可能性がある。

## 2-4-3. デザインした化合物の応答調節能の検討

2-4-1、2-4-2 においてデザインした化合物を WT 甘味受容体安定発現細胞に 1 mM アスパルテームと共に添加し、その応答調節能を調査した。

- ・用いた試薬 (2)

それぞれのドッキングの結果から新たにデザイン試薬の名前、構造を表 2-4 に記した。化合物の測定結果を図 2-23 にまとめた。

#### 2-4-4. 抑制物質作用部位について

つい先日報告された mGluR4 TMD に関する研究(Rovira et al., 2014)によると、アゴニストには PMCA と同様の位置、及びラクチゾール、2,4-DP と同様な位置に作用するもの、TMD 内に 2 箇所作用部位が存在すると述べられている (図 2-24a)。また、Class A GPCR の M2 ムスカリン受容体においては、アゴニストとアゴニストの補助的な役割をする positive allosteric modulator (PAM) の 2 つの分子が同時に膜貫通領域に作用する活性型の結晶構造(PDB ID : 3MQT)が得られている(図 2-24b)。これらから、T1R3 TMD においても、ラクチゾール様作用部位においてアゴニストとして作用し得る化合物が存在するのかを考察する。ラクチゾール様作用部位は PMCA 活性型モデルにおいては Phe730<sup>5,40</sup> が蓋をしていることを活性型モデル作製時に述べた。そこで、この Phe730<sup>5,40</sup> が取りうる他のロータマーを検討した。すると、図 2-25 に示す通り MD により得られたモデルに比べ、やや細胞外側に向けた構造を取ることが可能であることが明らかとなった。このロータマーであれば、膜貫通部分に作用するリガンドが存在する可能性があるものの、TM5 が折れ、倒れ込んでいるという性質上、隙間はかなり狭い。よって、アルキン構造のような小さな直線上の分子であれば作用しうるかもしれない。このような分子が存在するならば、TMD 内でも膜構造内部、ECL2 に作用する 2 リガンドで相乗的な増強が起こる可能性がある。

一方で、甘味料 NHDC は PMCA 活性型モデルからはドッキングを実施できなかった。これより、NHDC は分子の大きさを鑑みても、膜貫通構造に入り込んで作用している可能性がある。今後、NHDC を用いて MD をかけ直し、同様に NHDC 活性型モデルを作製することで、新たな知見が得られると期待される。このような作用形式の違いが甘味料ごとの味質の違いを説明する手がかりとなるかもしれない。



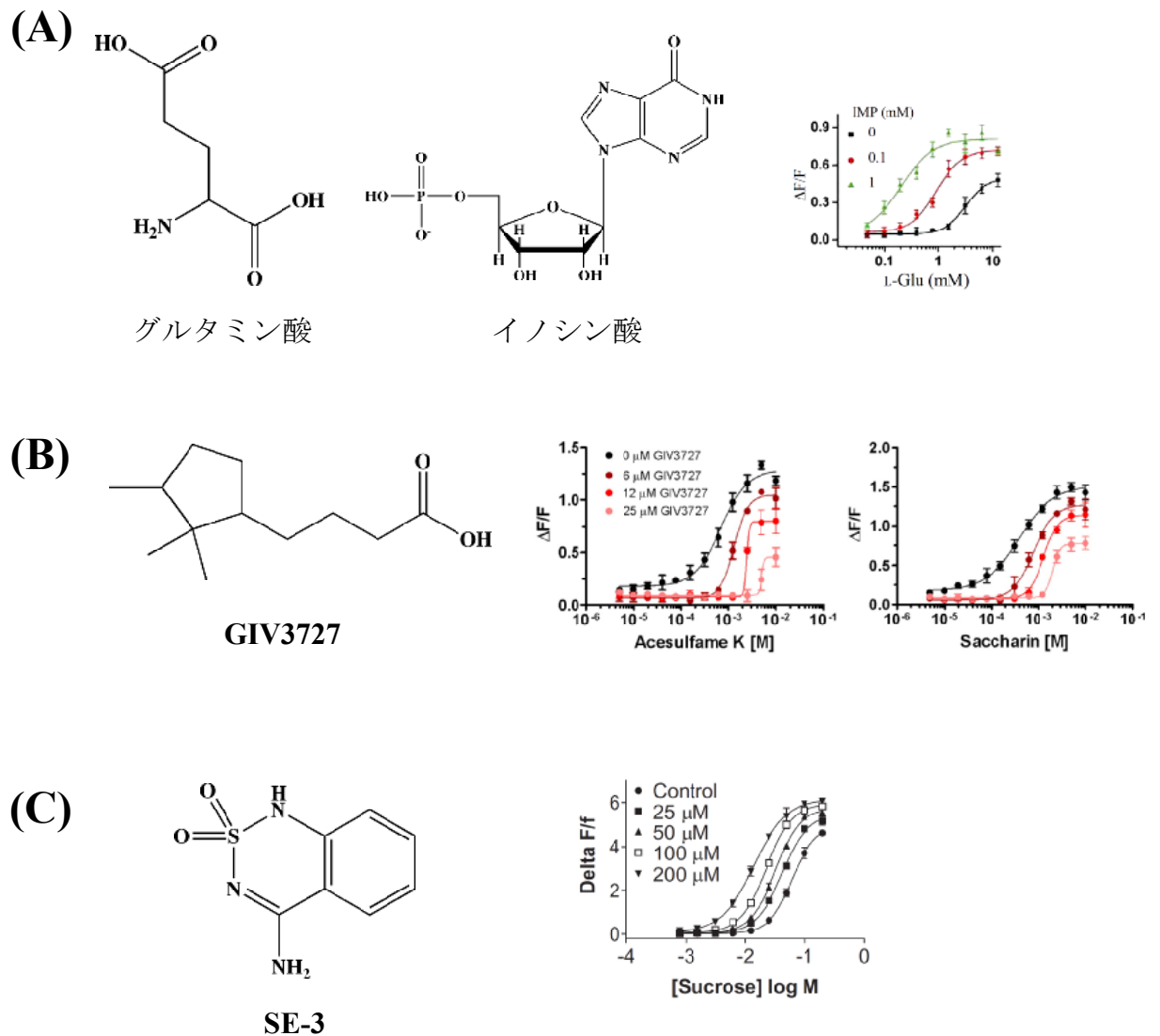


図2-1：これまでに明らかとなっている呈味調節物質の例

(A) T1R1 / T1R3におけるグルタミン酸とイノシン酸による旨味増強  
Zhang F. et al., (2008)より抜粋

(B) 苦味抑制物質GIV3727によるTas2R43における  
アセスルファムK、サッカリンの苦味抑制  
Slack J. P. et al., (2010)より抜粋

(C) SE-3によるスクロースの甘味増強  
Servant G. et al., (2010)より抜粋

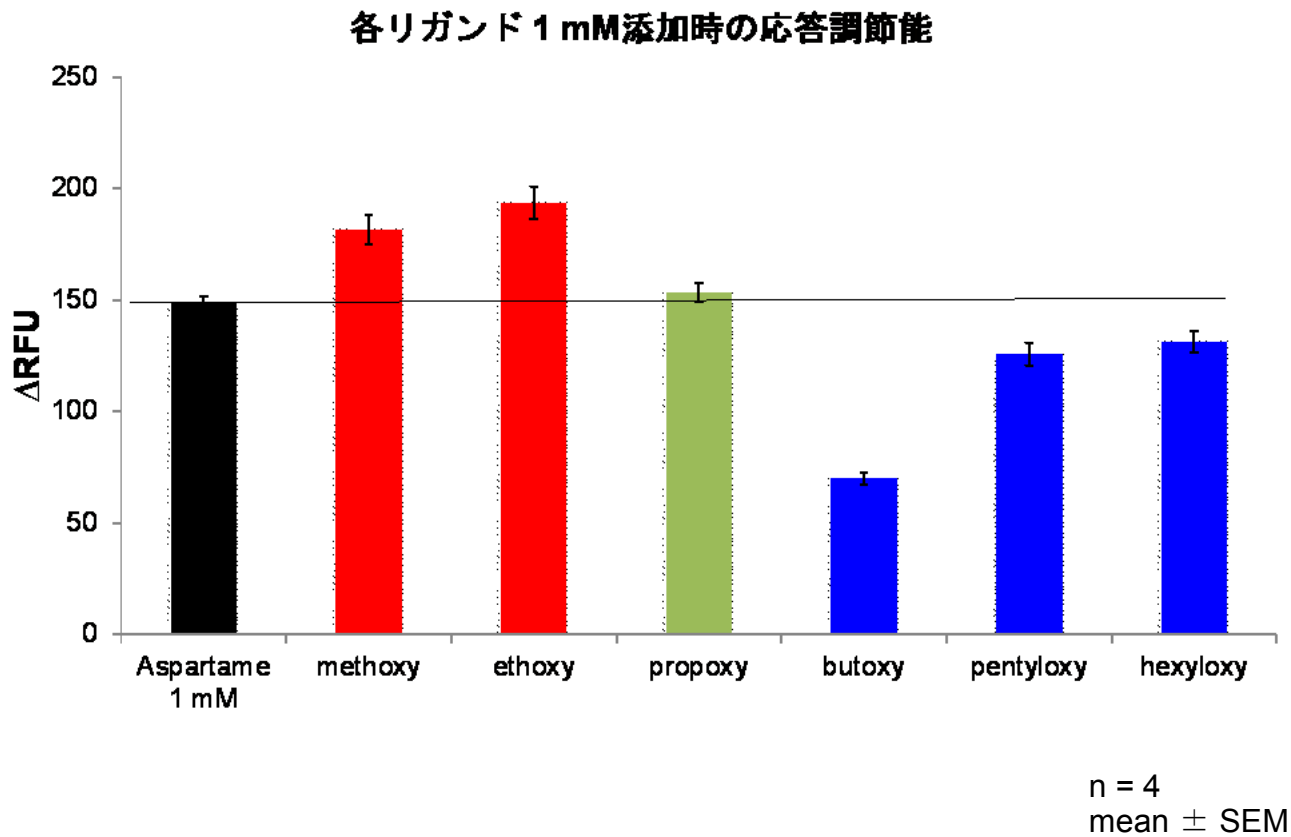
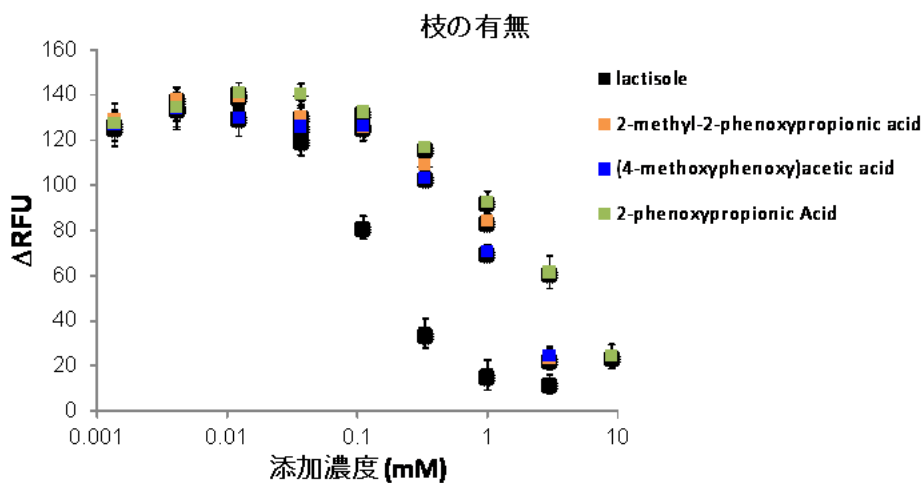
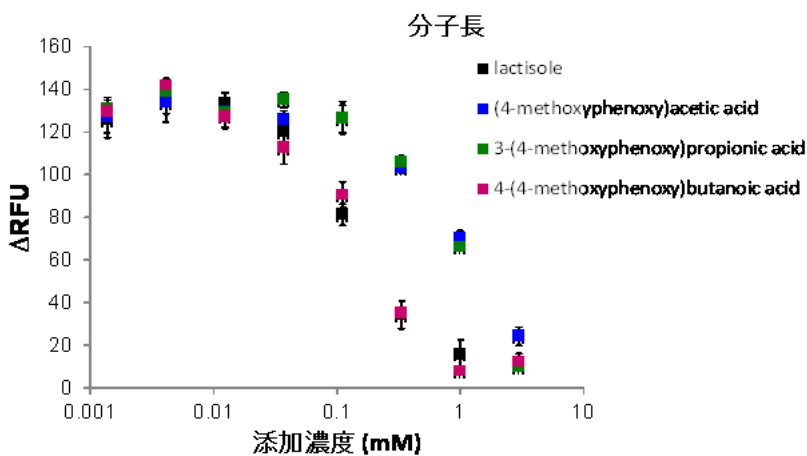
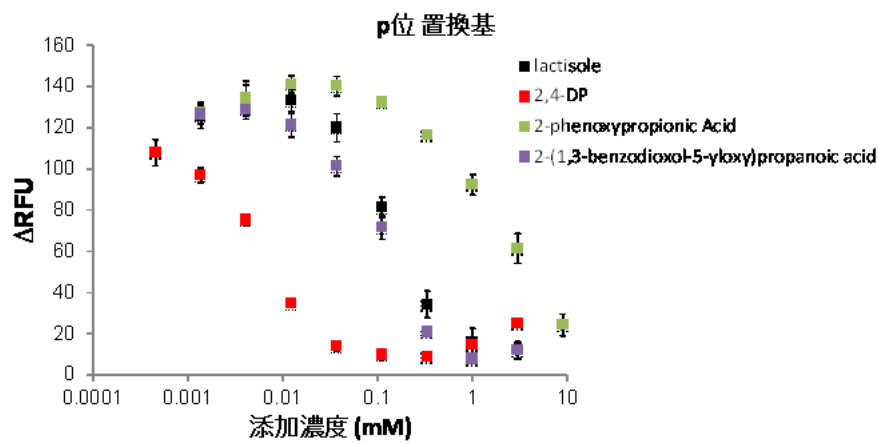


図2-2. シンナムアルデヒドp位アルコキシ基誘導体の応答



n = 4  
mean  $\pm$  SEM

図2-3. ラクチゾール類縁体の構造及びその応答

表2-1 各変異体におけるアスパルテームの応答

variants	BW numbering	I max (RFU)	EC <sub>50</sub> (mM)	EC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> _WT
WT		112.7	0.57	1.00
S620A	2.56	80.1	3.20	5.57
V621I	2.57	90.9	1.37	2.38
F624L	2.60	36.6	2.17	3.78
R632S	ECL1	44.8	1.28	2.24
Q636A	3.28	46.6	1.16	2.02
Q637E	3.29	92.3	1.84	3.20
S640A	3.32	63.5	1.16	2.03
H641A	3.33	90.7	0.93	1.62
L644V	3.36	N.F.	N.D.	-
L648V	3.40	N.F.	N.D.	-
L695V	4.56	154.3	0.82	1.42
C696S	4.57	120.5	0.75	1.30
Y699F	4.60	122.2	0.81	1.41
H721A	ECL2	80.7	1.85	3.23
R723A	ECL2	134.1	1.05	1.84
T724L	ECL2	92.7	1.38	2.40
R725A	ECL2	138.5	1.98	3.46
S726A	ECL2	89.7	2.09	3.64
W727L	ECL2	81.7	1.89	3.30
V728A	5.38	127.9	0.99	1.72
S729A	5.39	38.8	1.31	2.29
F730L	5.40	84.0	2.05	3.57
A733V	5.43	142.2	0.63	1.09
H734N	5.44	85.6	0.94	1.63
N737Q	5.47	65.2	3.05	5.31
L740V	5.50	N.F.	N.D.	-
F742V	5.52	126.6	0.51	0.89
W775F	6.48	78.8	1.61	2.80
F778A	6.51	149.5	0.59	1.02
V779A	6.52	109.2	1.23	2.14
L782A	6.55	117.2	1.22	2.12
R790Q	ECL3	162.0	0.63	1.09
Q794N	7.38	100.9	0.57	0.99
A797V	7.41	29.7	N.D.	-
L798I	7.42	123.4	1.07	1.86
C801I	7.45	63.9	N.D.	-
G804A	7.48	24.7	N.D.	-

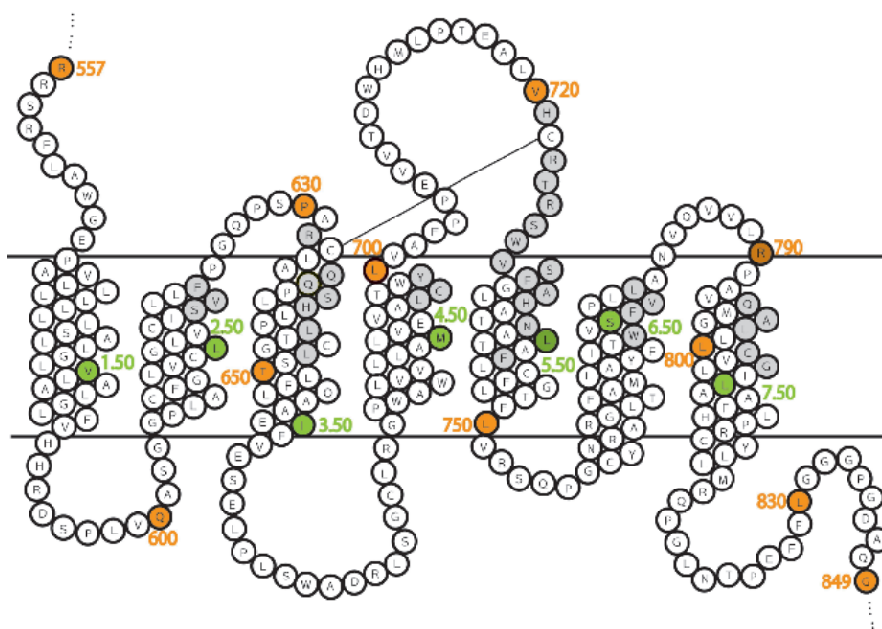
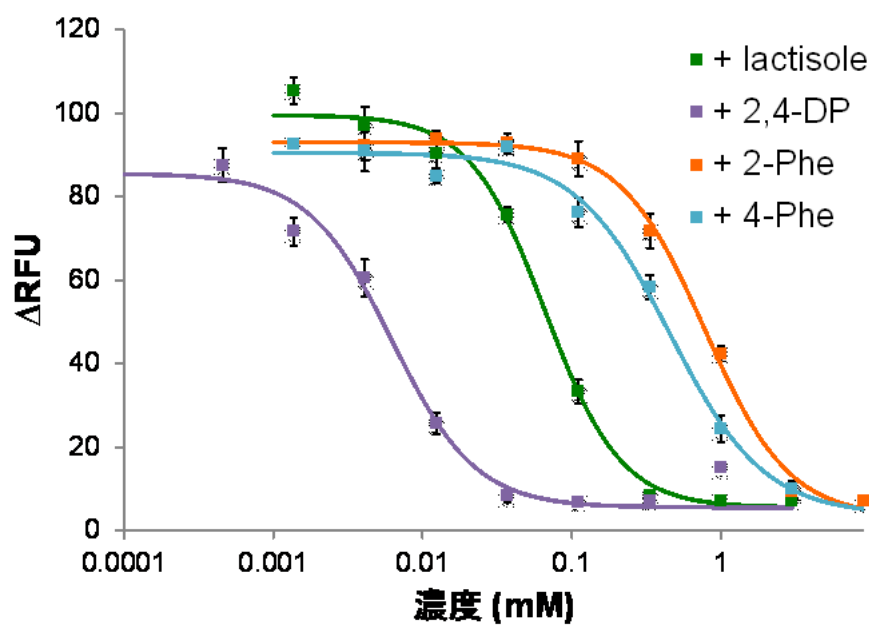
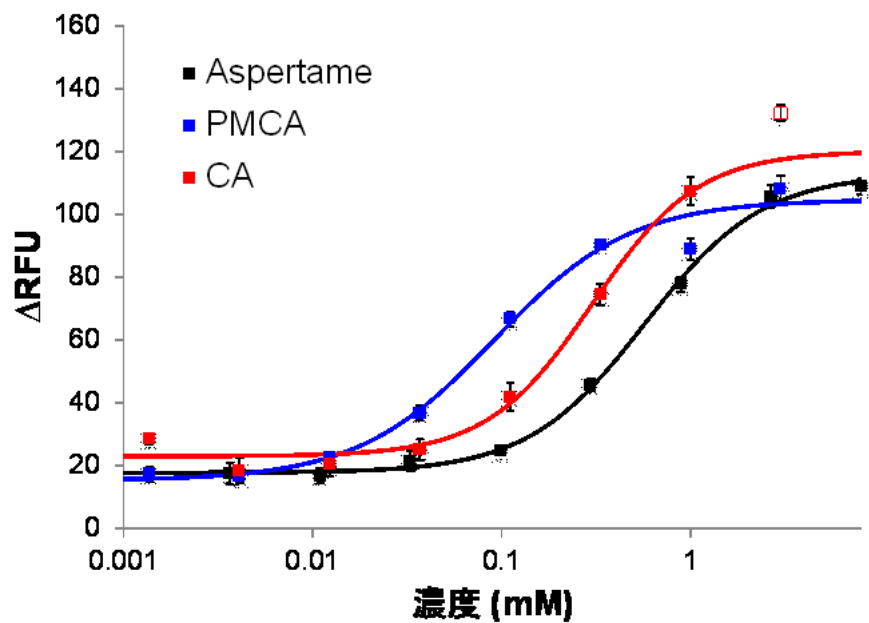


図2-4 T1R3膜貫通領域の模式図（スネークプロット）と、BW numbering



n = 4  
mean ± SEM

図2-5 変異体解析を実施したリガンドのWTにおける応答

表2-2 各甘味料の変異体ごとの応答挙動

variants	BW numbering	EC50 (mM) (IC50)			
		cyclamate	NHDC	cinnamaldehyde	PMCA
WT		2.74	0.22	0.30	0.091
S620A	2.56	5.89	2.61	6.72	3.79
V621I	2.57	4.57	1.87	0.85	0.35
F624L	2.60	-	2.65	1.05	2.23
R632S	ECL1	5.87	0.47	1.17	0.28
Q636A	3.28	-	76.34	6.04	8.39
Q637E	3.29	-	4.23	1.33	0.29
S640A	3.32	5.49	1.76	0.86	1.05
H641A	3.33	327	1.56	0.73	0.11
L695V	4.56	2.14	0.18	0.25	0.073
C696S	4.57	8.65	0.43	0.39	0.17
Y699F	4.60	5.67	1.62	0.28	0.079
H721A	ECL2	7.61	10.97	0.40	0.092
R723A	ECL2	7.47	0.13	0.21	0.061
T724L	ECL2	7.30	0.37	0.37	0.11
R725A	ECL2	4.92	0.23	0.40	0.094
S726A	ECL2	15.65	0.74	0.98	2.04
W727L	ECL2	-	2.27	1.01	0.60
V728A	5.38	4.17	1.76	0.41	0.069
S729A	5.39	-	431.84	12.78	10.69
F730L	5.40	-	108.52	0.82	0.26
A733V	5.43	3.28	0.13	0.20	0.064
H734N	5.44	7.69	9.56	0.38	0.079
N737Q	5.47	-	9.20	5.36	3.03
F742V	5.52	2.07	0.23	0.36	0.053
W775F	6.48	6.70	0.61	0.60	0.25
F778A	6.51	11.38	1.45	0.19	0.047
V779A	6.52	2.94	0.24	0.74	0.18
L782A	6.55	-	1.25	0.92	1.18
R790Q	ECL3	59.54	0.13	0.41	0.070
Q794N	7.38	3.13	0.57	0.16	0.040
L798I	7.42	4.04	0.30	0.65	0.14

variants	BW numbering	EC <sub>50</sub> / EC <sub>50</sub> _WT			
		cyclamate	NHDC	cinnamaldehyde	PMCA
WT		1	1	1	1
S620A	2.56	10.26	4.56	22.23	41.62
V621I	2.57	7.97	3.26	2.81	3.79
F624L	2.60	-	4.62	3.48	24.46
R632S	ECL1	10.22	0.82	3.86	3.11
Q636A	3.28	-	133.05	-	92.13
Q637E	3.29	-	7.38	4.39	3.18
S640A	3.32	9.56	3.06	2.83	11.48
H641A	3.33	569.58	2.71	2.41	1.26
L695V	4.56	3.72	0.31	0.83	0.80
C696S	4.57	15.08	0.76	1.30	1.84
Y699F	4.60	9.89	2.82	0.93	0.87
H721A	ECL2	13.27	19.13	1.32	1.00
R723A	ECL2	13.01	0.22	0.68	0.67
T724L	ECL2	12.71	0.64	1.21	1.21
R725A	ECL2	8.57	0.40	1.31	1.03
S726A	ECL2	27.27	1.29	3.25	22.36
W727L	ECL2	-	3.96	3.34	6.59
V728A	5.38	7.26	3.07	1.35	0.75
S729A	5.39	-	752.61	42.27	117.40
F730L	5.40	-	189.14	2.72	2.87
A733V	5.43	5.72	0.23	0.66	0.70
H734N	5.44	13.41	16.66	1.27	0.87
N737Q	5.47	-	16.04	17.72	33.23
F742V	5.52	3.60	0.41	1.20	0.59
W775F	6.48	11.68	1.07	1.99	2.79
F778A	6.51	19.84	2.53	0.64	0.52
V779A	6.52	5.13	0.42	2.46	1.93
L782A	6.55	-	2.18	3.05	12.93
R790Q	ECL3	103.77	0.23	1.36	0.77
Q794N	7.38	5.46	0.99	0.53	0.44
L798I	7.42	7.04	0.52	2.16	1.49

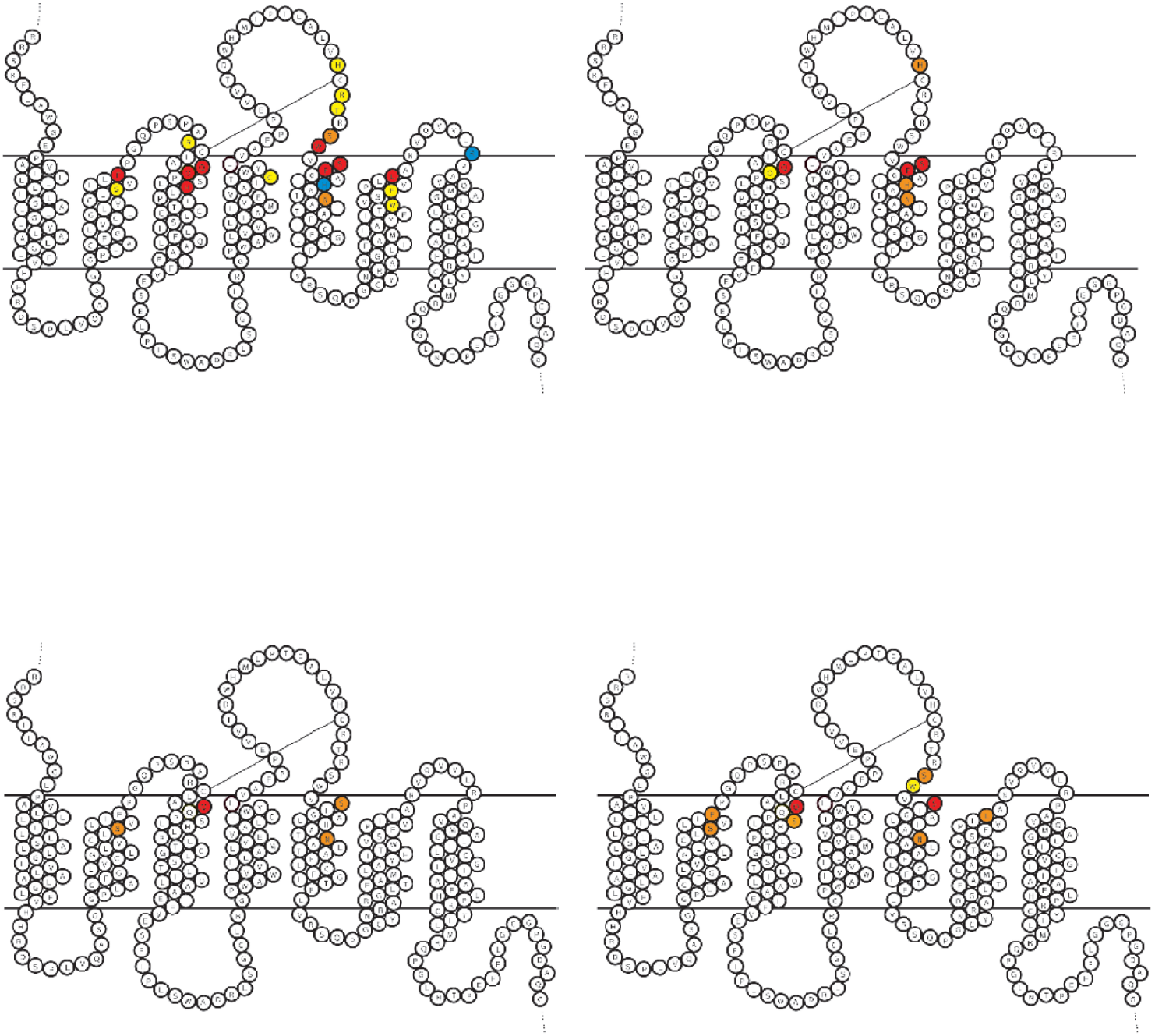


図2-6 各甘味料ごとの変異体における応答変化

表2-2 各抑制剤の変異体ごとの応答挙動

variants	BW numbering	IC50 (mM)			
		lactisole	2,4-DP	2-Phe	4-OMe
WT		0.066	0.0062	0.78	0.45
S620A	2.56	0.021	0.0154	0.37	0.33
V621I	2.57	0.045	0.0111	0.88	0.47
F624L	2.60	0.171	0.0526	1.72	1.02
R632S	ECL1	0.341	0.0459	2.01	2.27
Q636A	3.28	0.165	0.0215	1.55	0.61
Q637E	3.29	1.360	0.1274	6.20	4.73
S640A	3.32	0.021	0.0017	0.32	0.17
H641A	3.33	0.000	1.5407	/	/
L695V	4.56	0.049	0.0052	0.60	0.32
C696S	4.57	0.106	0.0038	0.89	0.52
Y699F	4.60	0.294	0.0168	2.86	1.75
H721A	ECL2	0.075	0.0101	0.99	0.55
R723A	ECL2	0.164	0.0137	1.86	1.15
T724L	ECL2	0.097	0.0190	1.60	0.57
R725A	ECL2	0.068	0.0067	0.93	0.69
S726A	ECL2	0.020	0.0045	0.33	0.17
W727L	ECL2	0.071	0.0033	1.43	0.37
V728A	5.38	0.292	0.0151	2.22	1.60
S729A	5.39	0.098	0.0149	0.92	0.51
F730L	5.40	0.078	0.0072	1.16	0.57
A733V	5.43	1.703	0.1281	62.5	93.6
H734N	5.44	1.690	0.1242	8.11	/
N737Q	5.47	0.321	0.0367	3.29	1.39
F742V	5.52	0.126	0.0144	1.15	0.81
W775F	6.48	0.026	0.0147	0.74	0.15
F778A	6.51	1.060	0.3011	5.27	64.7
V779A	6.52	0.158	0.0188	1.75	1.04
L782A	6.55	0.015	0.0021	0.35	0.09
R790Q	ECL3	0.200	0.0322	3.30	1.82
Q794N	7.38	0.000	1.7873	0.00	/
L798I	7.42	0.144	0.0010	1.27	0.28

variants	BW numbering	IC <sub>50</sub> / IC <sub>50</sub> _WT			
		lactisole	2,4-DP	2-Phe	4-OMe
WT		1	1	1	1
S620A	2.56	0.32	2.47	0.47	0.73
V621I	2.57	0.68	1.79	1.12	1.03
F624L	2.60	2.58	8.43	2.21	2.24
R632S	ECL1	5.14	7.36	2.58	5.00
Q636A	3.28	2.50	3.44	1.99	1.34
Q637E	3.29	20.5	20.4	7.97	10.4
S640A	3.32	0.32	0.27	0.42	0.38
H641A	3.33	-	247	-	-
L695V	4.56	0.73	0.84	0.78	0.71
C696S	4.57	1.60	0.61	1.14	1.15
Y699F	4.60	4.44	2.69	3.67	3.87
H721A	ECL2	1.12	1.62	1.27	1.20
R723A	ECL2	2.47	2.20	2.39	2.54
T724L	ECL2	1.46	3.05	2.06	1.25
R725A	ECL2	1.02	1.07	1.20	1.53
S726A	ECL2	0.30	0.72	0.42	0.37
W727L	ECL2	1.07	0.53	1.84	0.82
V728A	5.38	4.40	2.43	2.85	3.53
S729A	5.39	1.47	2.39	1.18	1.13
F730L	5.40	1.17	1.16	1.49	1.26
A733V	5.43	25.7	20.5	80.3	207
H734N	5.44	25.5	19.9	10.4	-
N737Q	5.47	4.84	5.89	4.22	3.06
F742V	5.52	1.90	2.31	1.48	1.79
W775F	6.48	0.39	2.36	0.95	0.33
F778A	6.51	16.0	48.3	6.78	143
V779A	6.52	2.39	3.02	2.25	2.30
L782A	6.55	0.22	0.34	0.45	0.21
R790Q	ECL3	3.02	5.17	4.24	4.02
Q794N	7.38	-	287	-	-
L798I	7.42	2.18	0.17	1.63	0.62



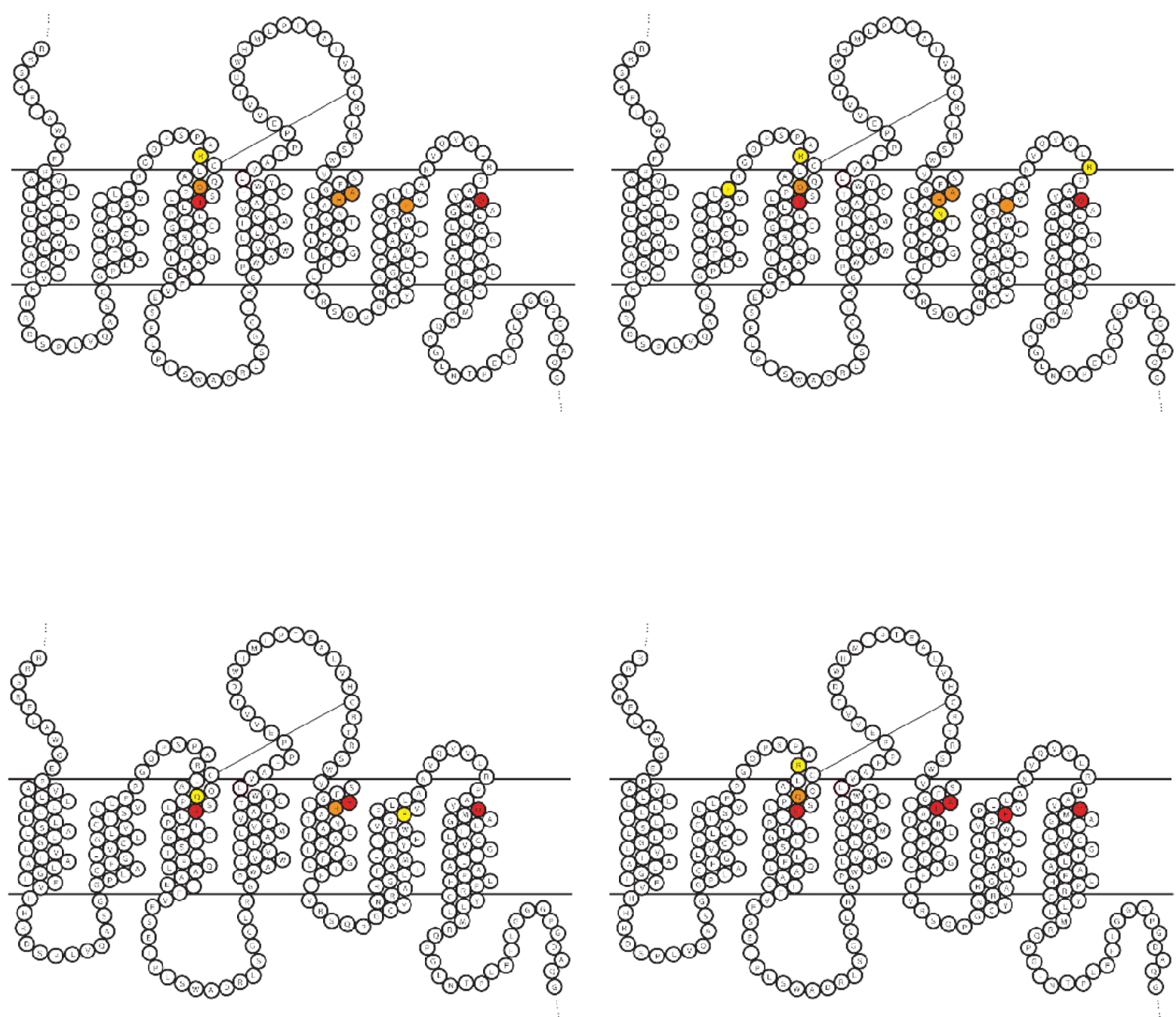


図2-7 各抑制剤ごとの変異体における応答変化

4OR2	1	IPVRYLEWSNIESIIAIAFSCLGILVTLFVTLIEFVLYRDTPVVKSSSRELCYIILAGIFL	60
mGluR1	581	IPVRYLEWSNIESIIAIAFSCLGILVTLFVTLIEFVLYRDTPVVKSSSRELCYIILAGIFL	640
4009	1	-PVQYLRWGDPAPIAAVVFACLGLLATLFVTVVFI IYRDTPVVKSSSRELCYIILAGICL	59
mGluR5	568	IPVQYLRWGDPEPIAAVVFACLGLLATLFVTVVFI IYRDTPVVKSSSRELCYIILAGICL	627
T1R1	555	RTVVFLALREHTSWVLLAANTLLLLLLLGTAGLEAWHLDTPVVRSAGGRLCFLMIGSLAA	614
T1R2	554	RQLVFLEWHEAPTIAVALLAALGFLSTLAILVIEFWRHFQTPIVRSAGGPMCFLMLTLLLV	613
T1R3	557	RRSRFLAWGEPVLLLLLLLSLALGLVLAALGLEFVHHRDSPIVQASGGPLACFGLVCLGL	616
4OR2	61	GYVCPFTLIAKPTTTSQYLQRLIVGLSSAMCYSALVTKTNRIARILA-----RKPRF	112
mGluR1	641	GYVCPFTLIAKPTTTSQYLQRLIVGLSSAMCYSALVTKTNRIARILAGSKKKICTRKPRF	700
4009	60	GYLCTFXLIAKPKQIYCYLQRIIGIGLSPAMSYSALVTKTYRAARILAMSKK-----	110
mGluR5	628	GYLCTFCLIAKPKQIYCYLQRIIGIGLSPAMSYSALVTKTNRIARILAGSKKKICTKKPRF	687
T1R1	615	GSGLYGFGEPTRPACLLRQALFALGFTIFLSCLTVRSFQLIIIFKFSTK-VPTFYHAW	673
T1R2	614	AYMVVPVYVGPVKVSTCLCRQALFPLCFTICISCI AVR SFQIVCAFKMASR-FPRAYSYW	672
T1R3	617	VCLSVLLFPGQPSPARCLAQQPLSHPLTGCSTLFLQAAEIFVESELPLS-WADRLSGC	675
4OR2	113	MSAWAQVIIASILISVQLTLVVTLIIMEPPM--PILSYPSIKEVYLICNTS-NLGVVAPL	169
mGluR1	701	MSAWAQVIIASILISVQLTLVVTLIIMEPPM--PILSYPSIKEVYLICNTS-NLGVVAPL	757
4009	111	-SAXAQLVIAFILICIQLGIIVALFIMEPPD--IM-----VYLICNTT-NLGVVAPL	158
mGluR5	688	MSACAQLVIAFILICIQLGIIVALFIMEPPD--IMHDYPSIREVYLICNTT-NLGVVTPPL	744
T1R1	674	VQNHGAGL FVMISSAACLICLTWL VVWTPL-PAREYQRFP HLMLECTETNSLGFILAF	732
T1R2	673	VRYQGPVYSMAFITV LKMVIVVIGMLATGLSPTTRTDPDDPKITIVSCNPNYRNSLLFNT	732
T1R3	676	LRGPWAWLVLLAMLVEVALCTWYLVAFPPE-VVTDWHMLPTEALVHCRTRSWVVSFGLAH	734
4OR2	170	GYNGLLIMSCTYYAFKTRNVPANENEAKYIAFTMYTTCIIWLAFVPIYFG--SNYKIITT	227
mGluR1	758	GYNGLLIMSCTYYAFKTRNVPANENEAKYIAFTMYTTCIIWLAFVPIYFG--SNYKIITT	815
4009	159	GYNGLLILACTFYAFKTRNVPANENEAKYIAFTMYTTCIIWLAFVPIYFG--SNYKIITM	216
mGluR5	745	GYNGLLILSCTFYAFKTRNVPANENEAKYIAFTMYTTCIIWLAFVPIYFG--SNYKIITM	802
T1R1	733	LYNGLLSISAFACSYLGKDLPENYNEAKCVTFSLLFNFVSWIAFFTTASVYDGKYLPAAN	792
T1R2	733	SLDLLLSVVGFSFAYMGKELPTNYNEAKFITLSMTFYFTSSVSLCTFMSAYSGLVLTIVD	792
T1R3	735	ATNATLAFLCFLGTFLVRSQPGCYNRARGLTFAMLAYFITWVSFVPLLANVQVVL RPAVQ	794
4OR2	228	CFAVSLSVTVALGCMFTPKMYIIIAKPE--	255
mGluR1	816	CFAVSLSVTVALGCMFTPKMYIIIAKPERN	845
4009	217	CFSVLSATVALGCMFVPKVYIILAKPERN	246
mGluR5	803	CFSVLSATVALGCMFVPKVYIILAKPERN	832
T1R1	793	MMAGLSSLSSGFGGYFLPKCYVILCRPDLN	822
T1R2	793	LLVTVLNLLAISLGYFGPKCYMILFYPERN	822
T1R3	795	MGALLLCVLGILAAFHLPRCYLLMRQPGLN	824

図2-8 mGluR1、mGluR5、T1R1、T1R2、T1R3を用いたアラインメント

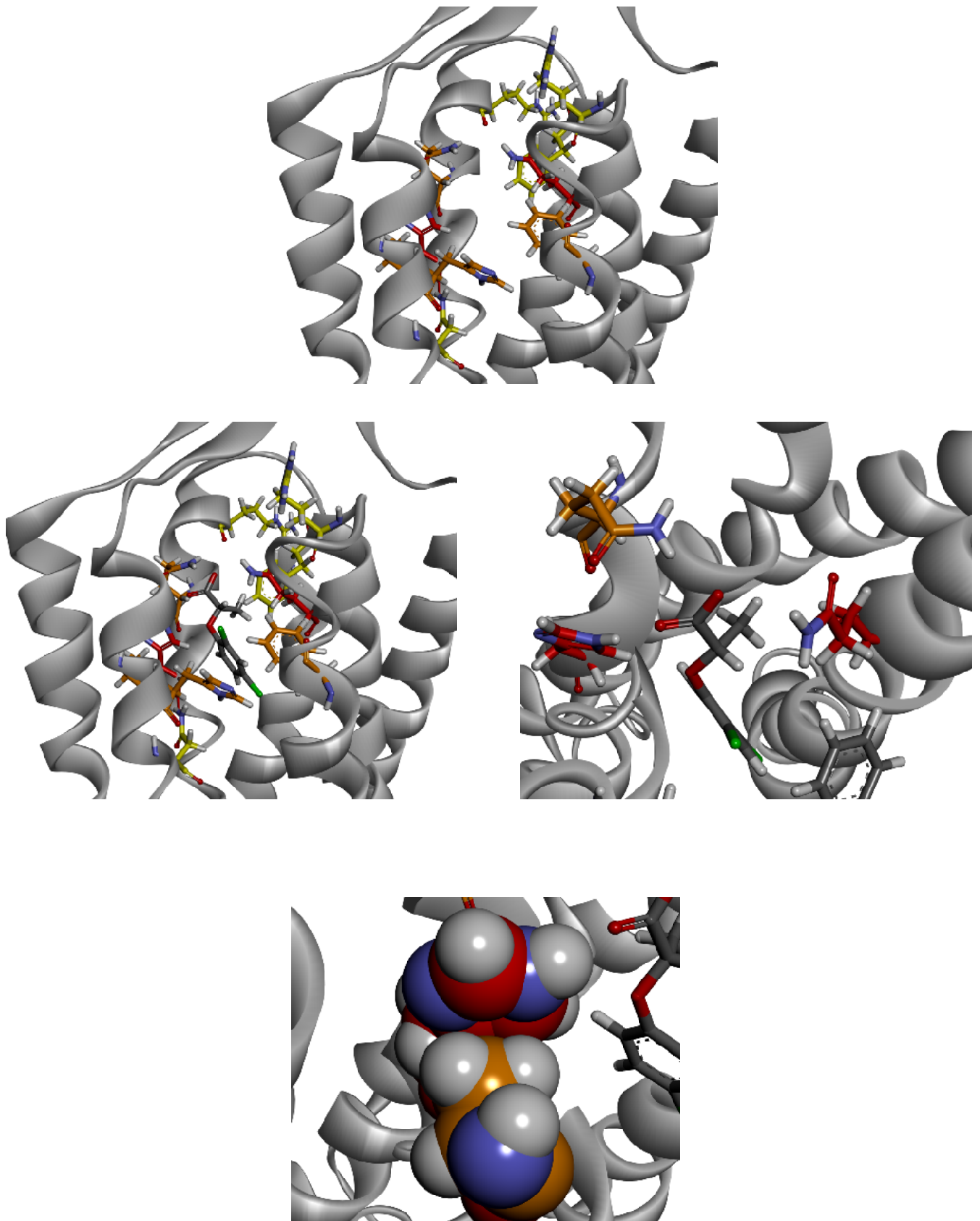


図2-9

(a) 甘味抑制剤2,4-DPに影響のあった残基をホモロジーモデル上に表示

(b)2,4-DPのドッキングモデル

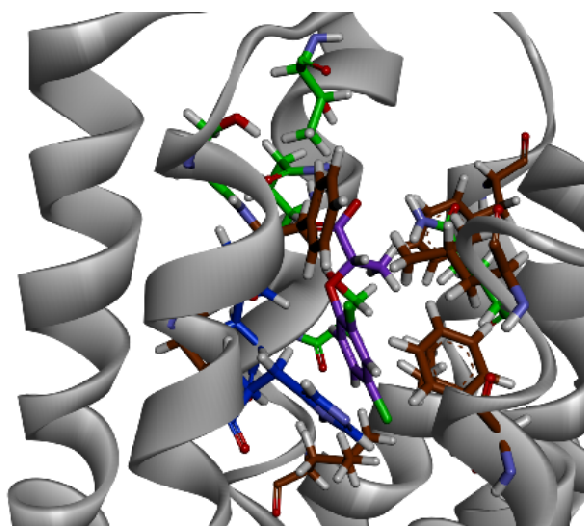
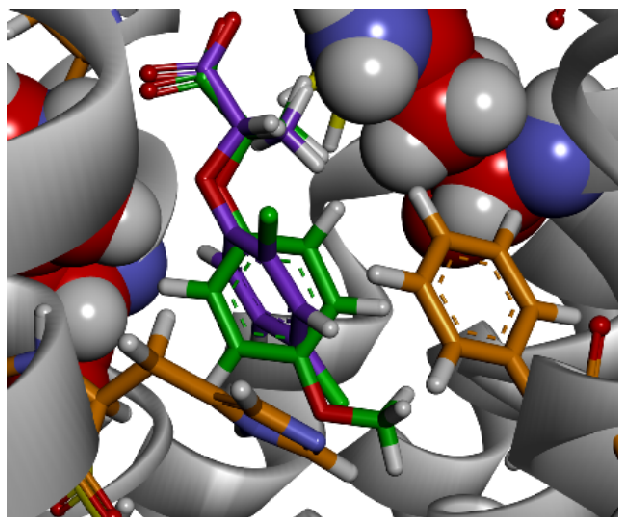


図2-10

(a)ラクチゾールと2,4-DPのドッキングモデルの重ね合わせ

(b)2,4-DPの4 Å以内の残基を表示



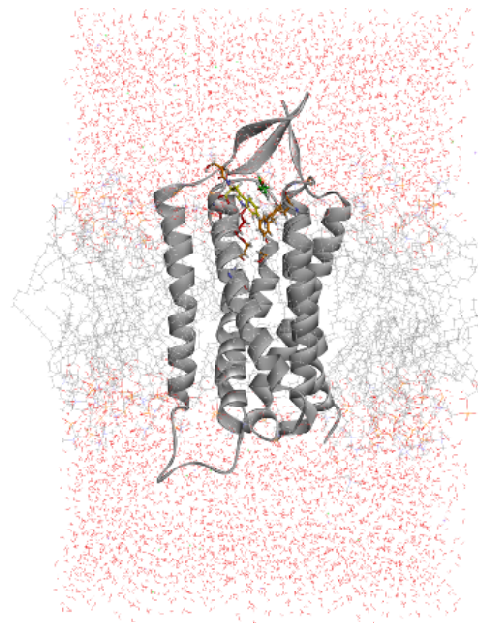
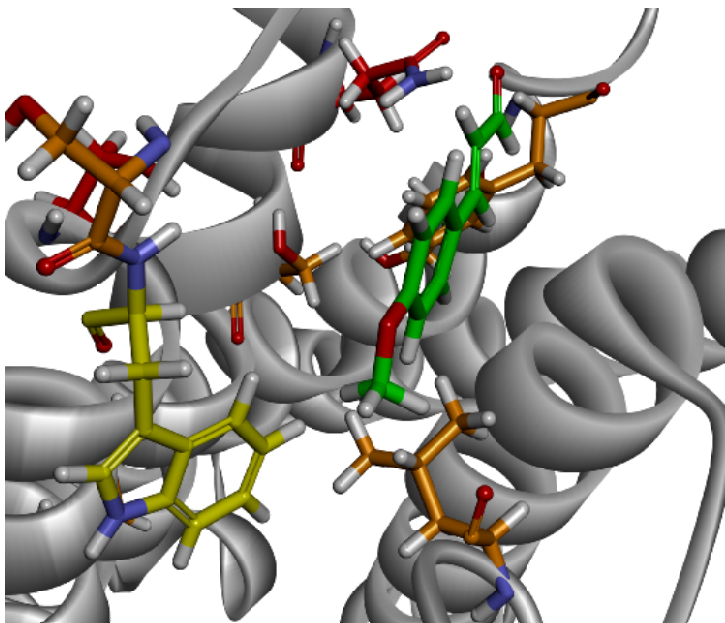
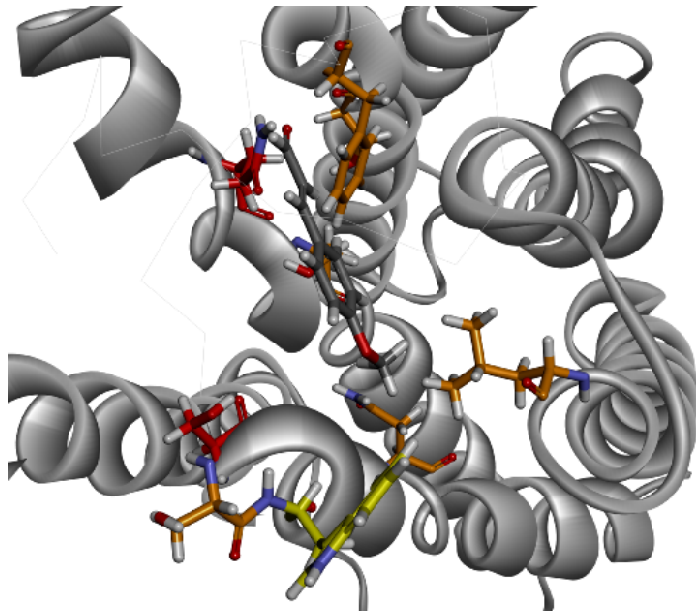


図2-11

(a)ホモロジーモデル上にPMCAの変異体解析において影響のあった残基を表示

(b)PMCAとGln636<sup>3.28</sup>及びLeu782<sup>6.55</sup>に対するinduced fit結果

(c)MD開始前の様子

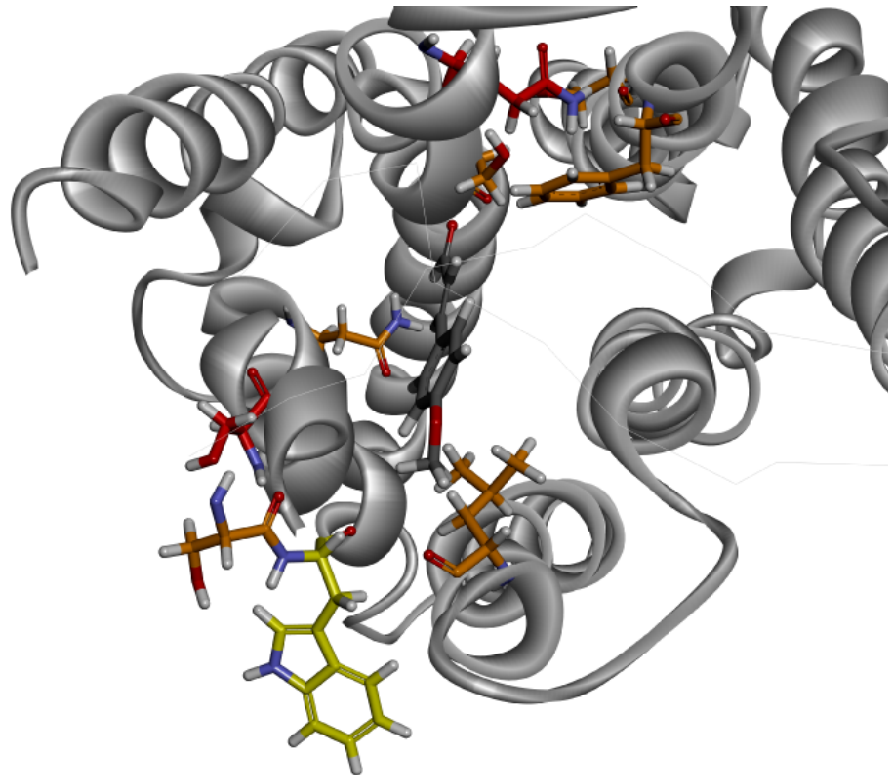
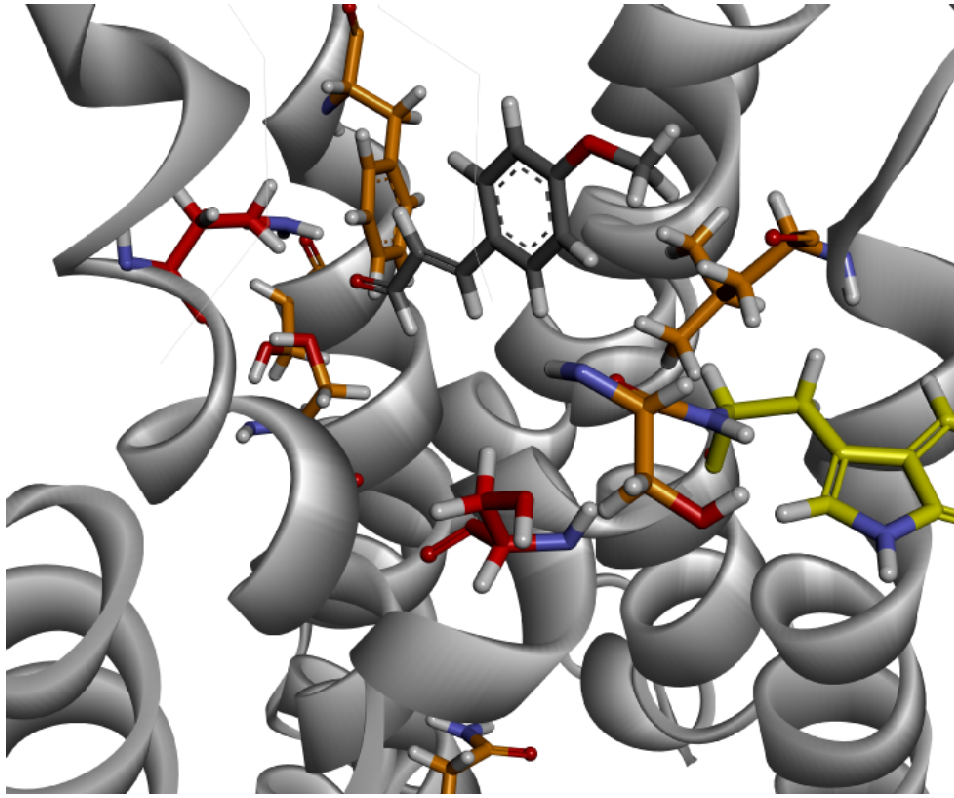


図2-12 PMCA結合活性型モデル  
MDの計算を実施し、100 ns時点の型を活性型とした。

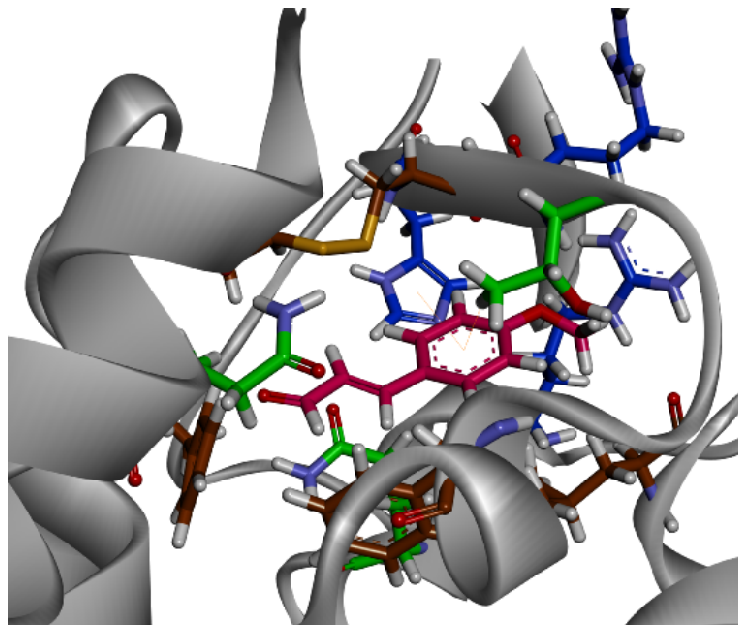
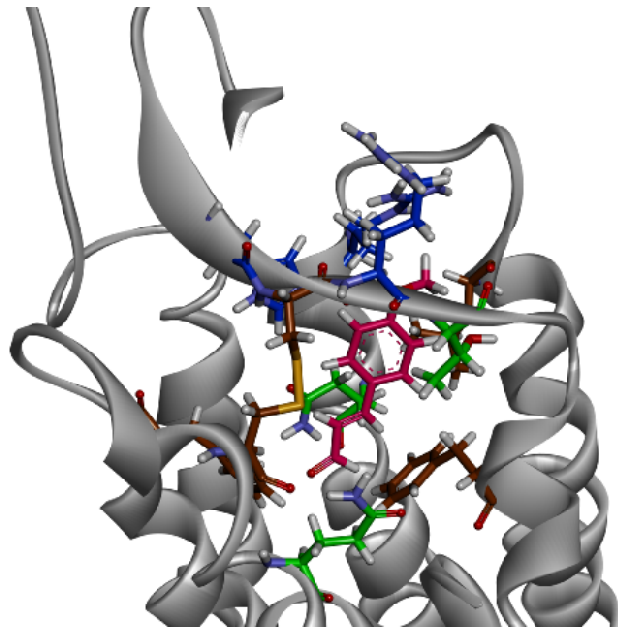


図2-13 PMCA周辺の残基を表示

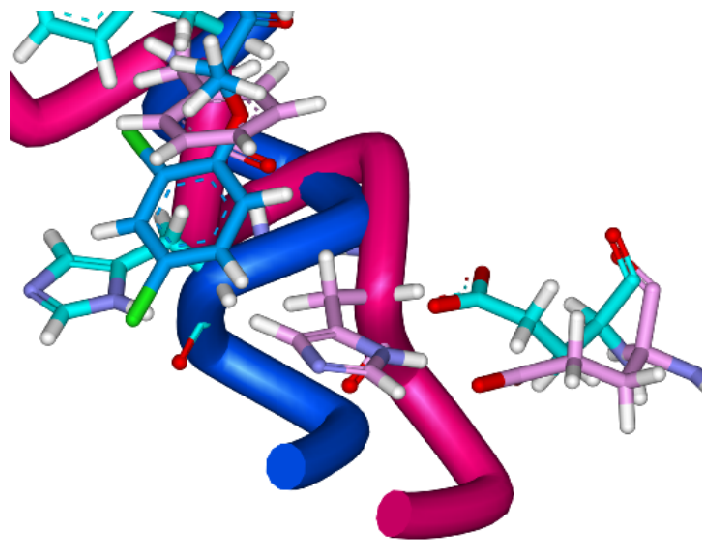
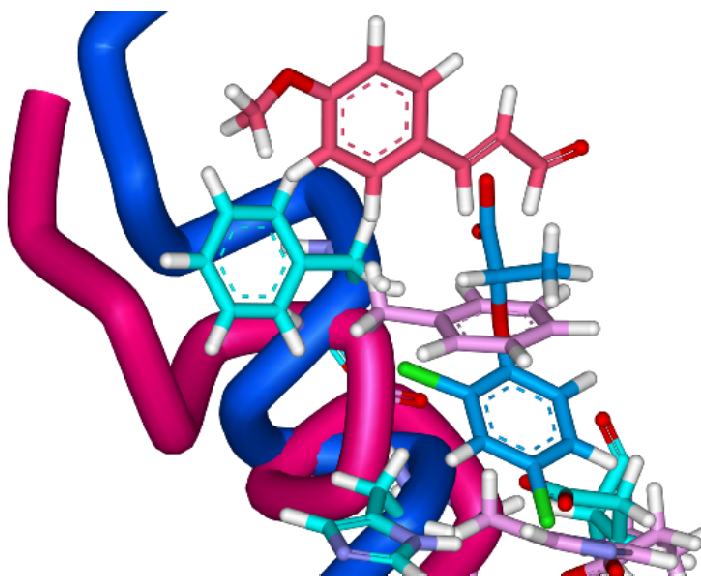
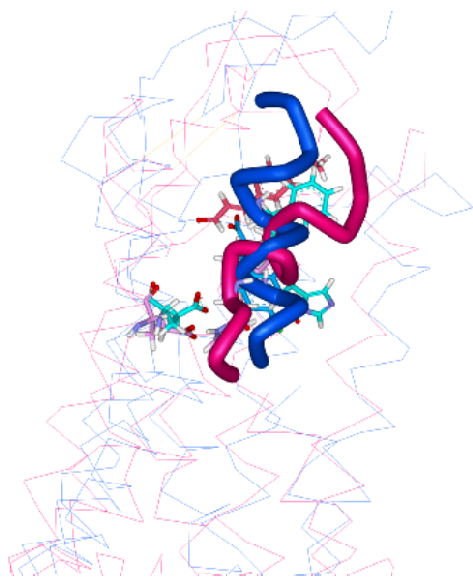


図2-14 2,4-DP不活性型及び、PMCA活性型モデルの重ね合わせ



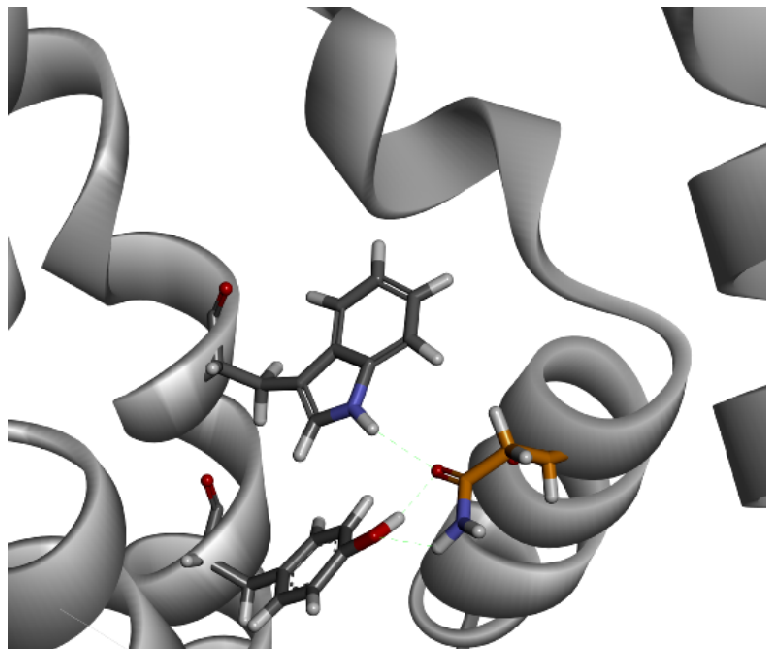
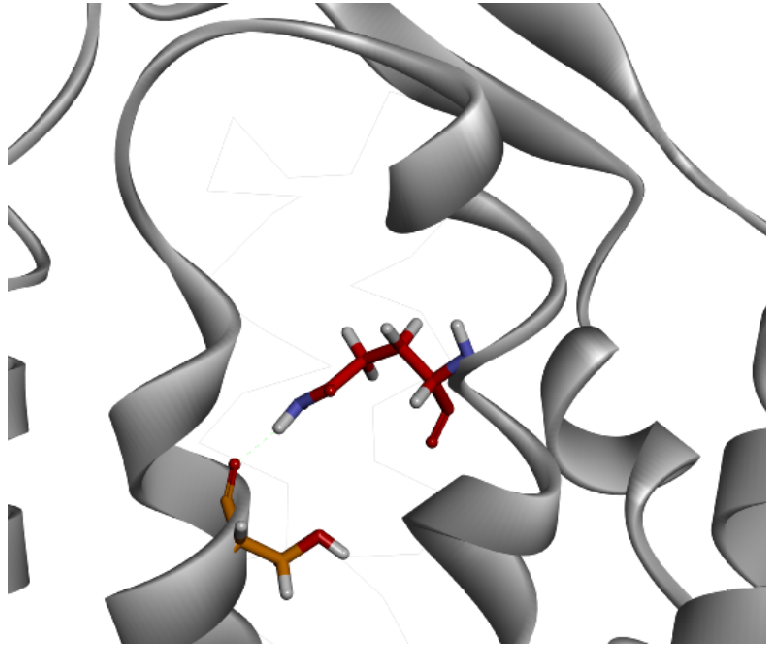


図2-15 活性型への構造変化に関わっているSer620<sup>2.56</sup>、Asn737<sup>3.47</sup>の位置

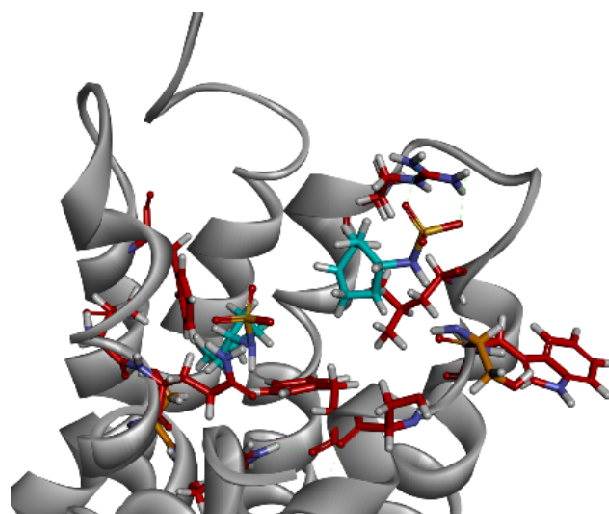
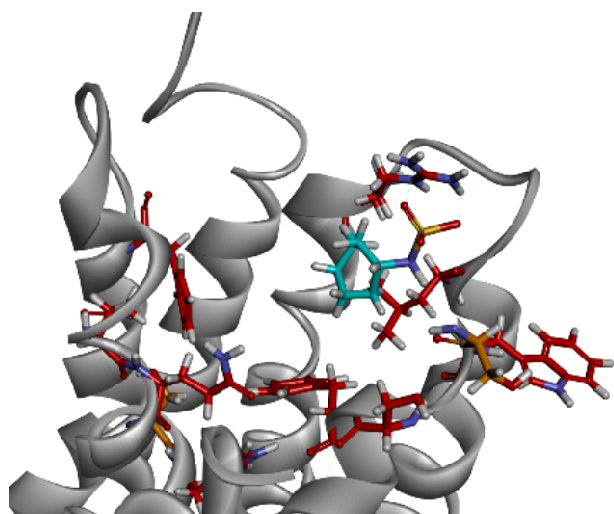
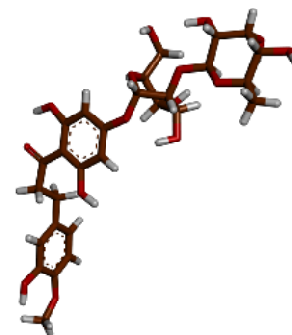
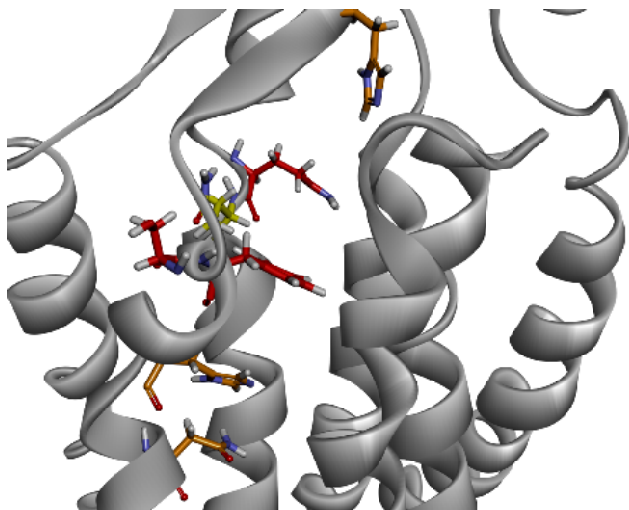


図2-16. PMCA以外のT1R3 TMDに作用する甘味料について  
(a)NHDC  
(b)シクラメート

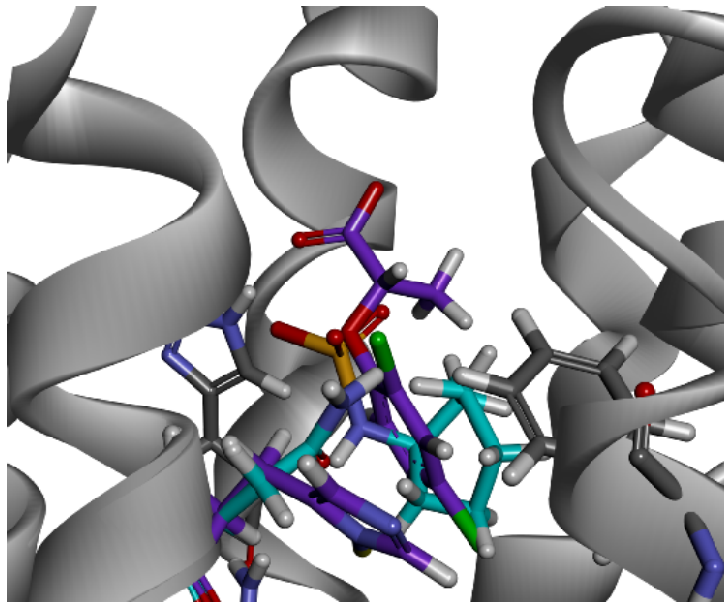
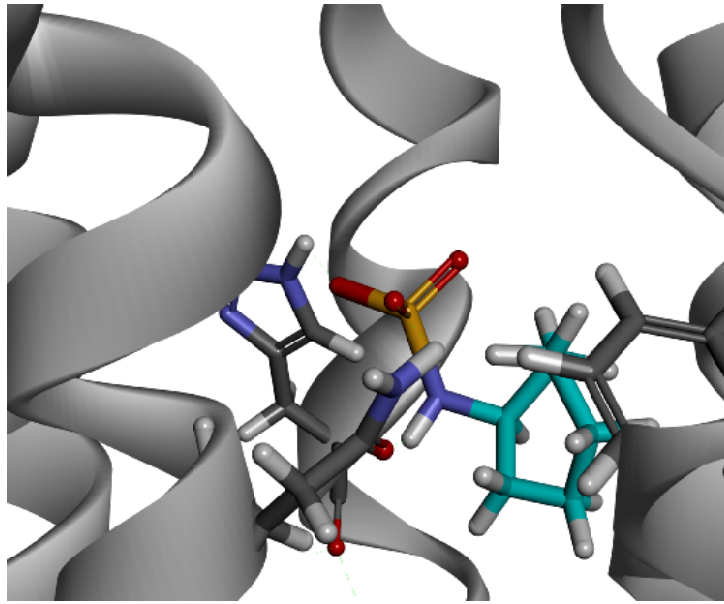


図2-17. H734N<sup>5.44</sup>変異体においてシクラメートの抑制剤としての作用

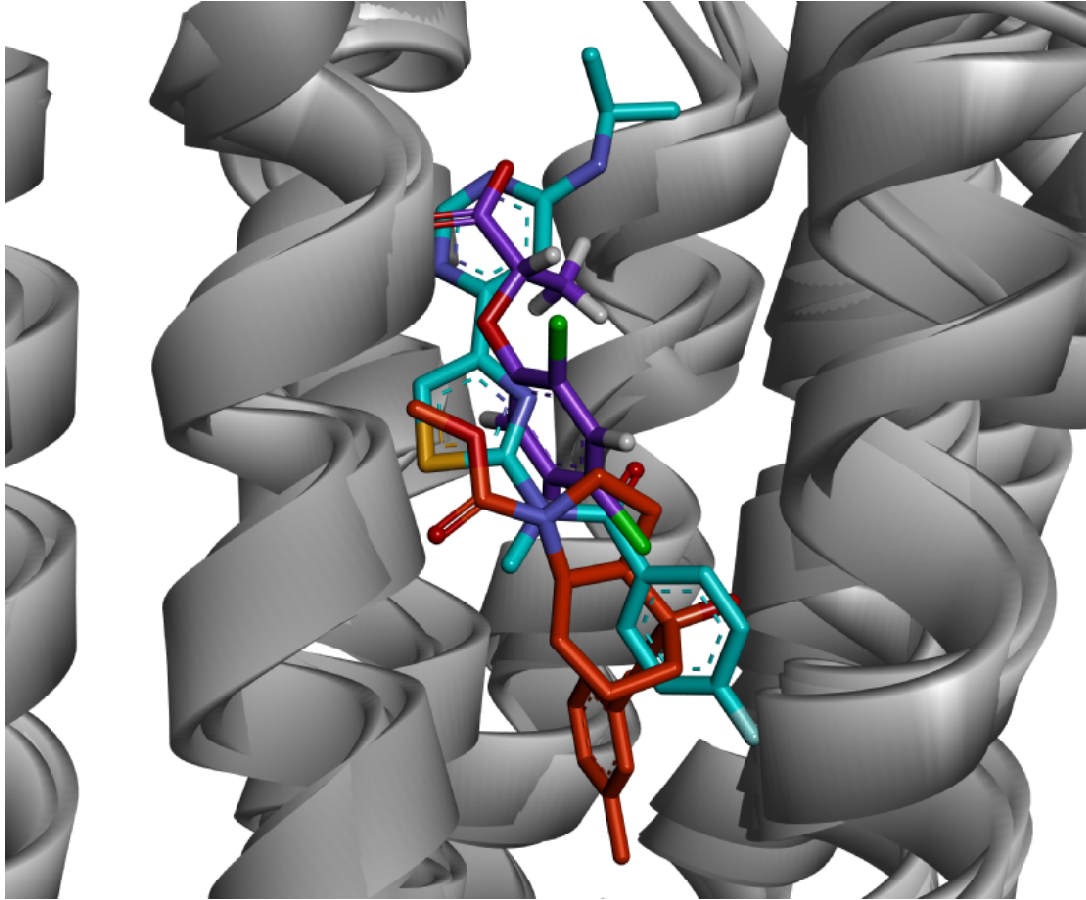


図2-18 T1R3 TMDの2,4-DP結合モデルとmGluR1、mGluR5との比較

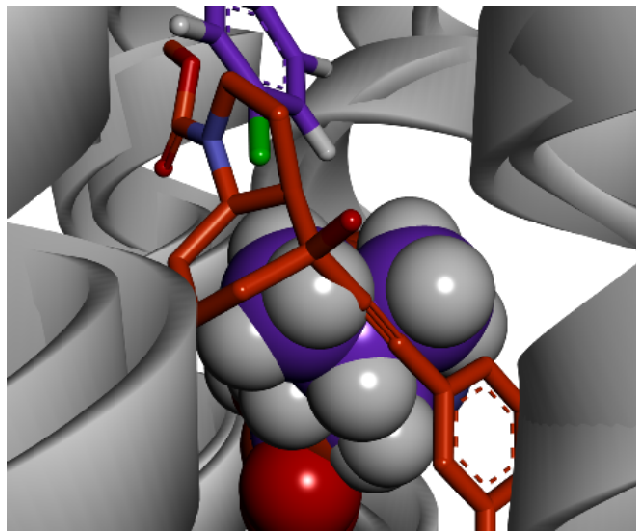
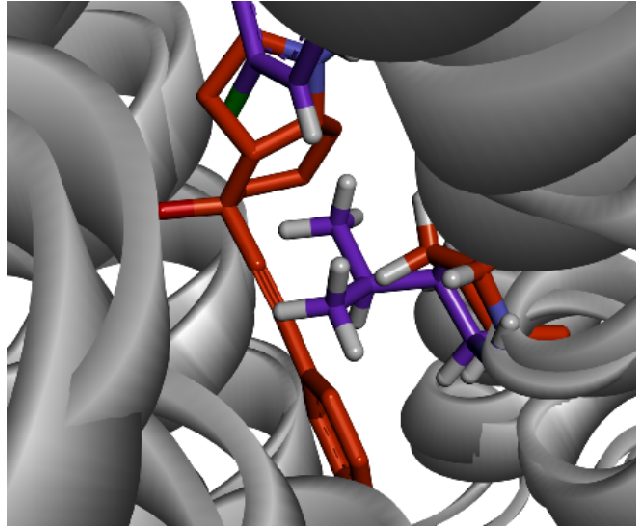


図2-19 2,4-DPと mavoglurantの比較

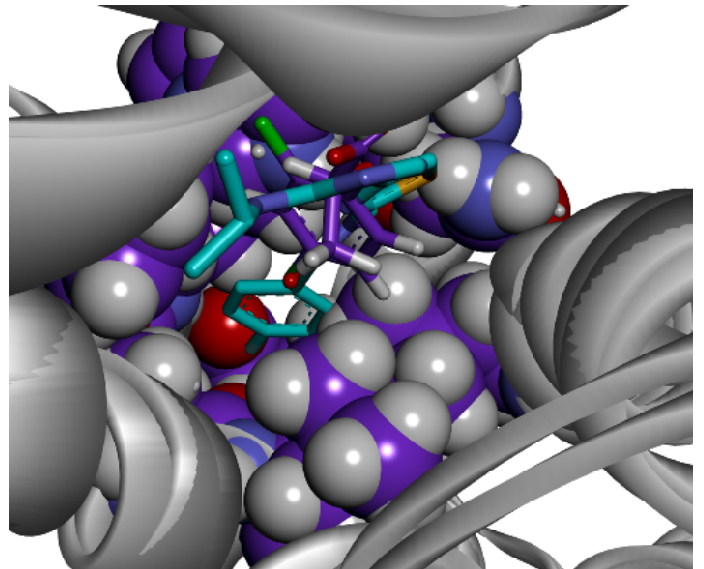
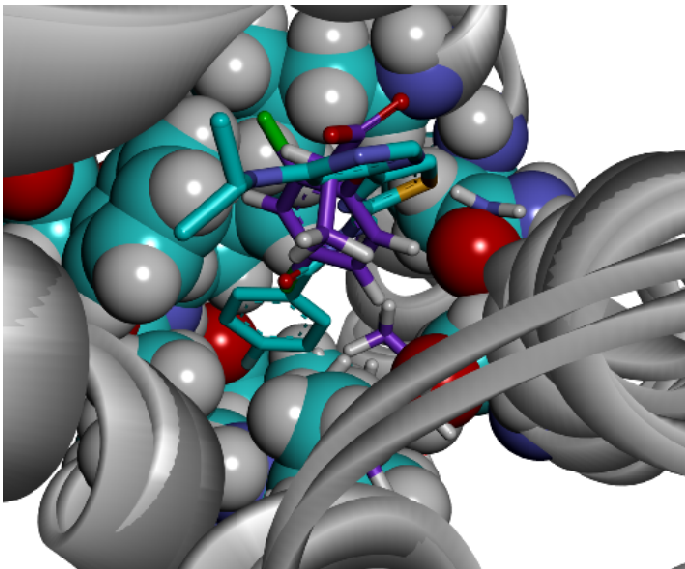
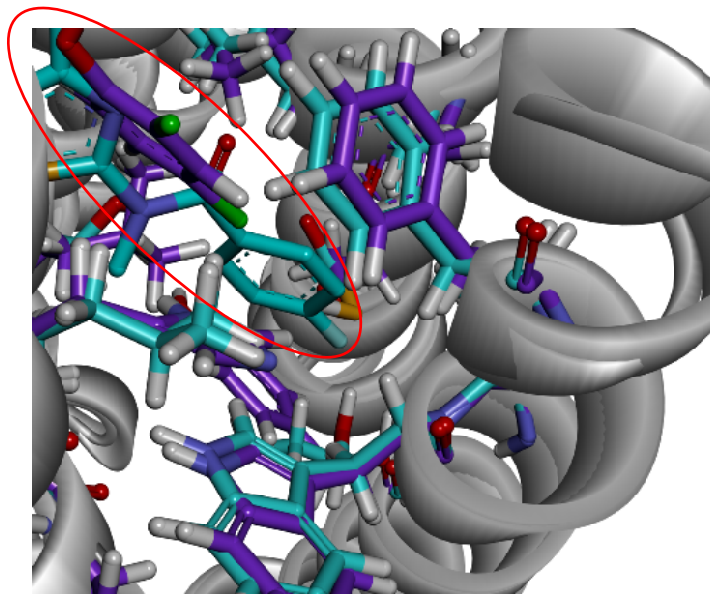


図2-20 2,4-DPとFITMの比較

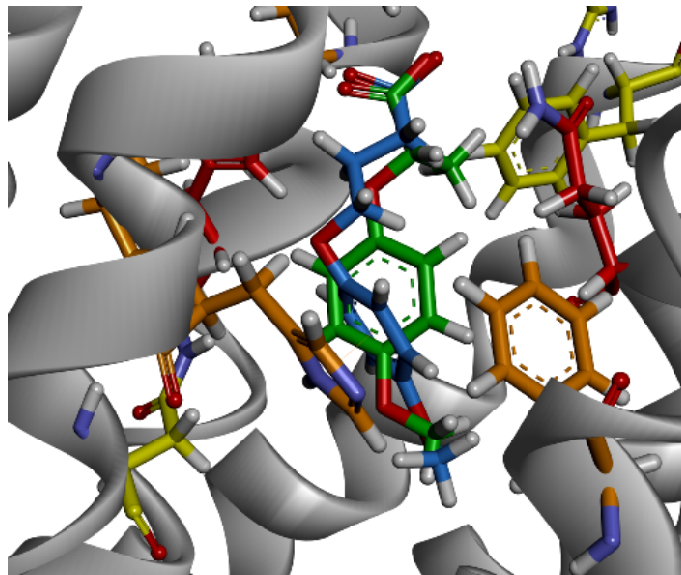


図2-21 4-(4-methoxyphenoxy)butanoic acidの作用モデル



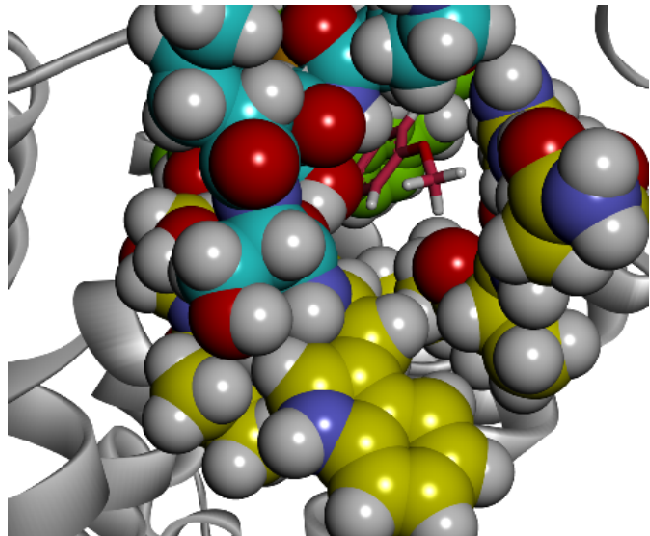
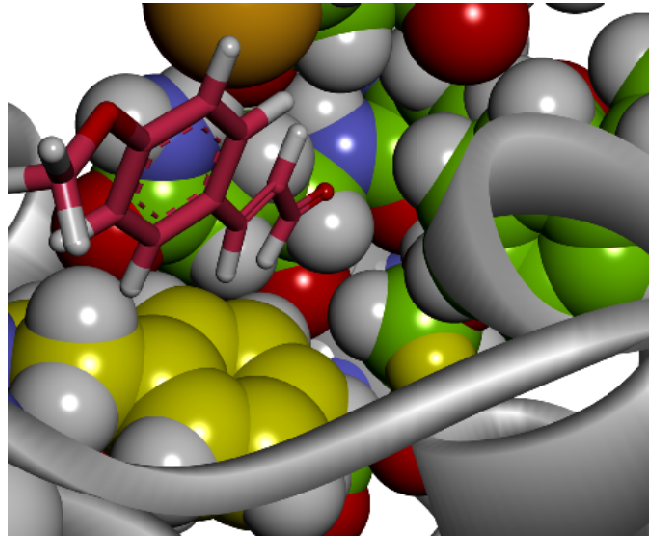


図2-21 PMCA作用部位周辺の空間



## 表2-4 デザインした化合物一覧

図2-23 デザインされた化合物の応答調節能の比較

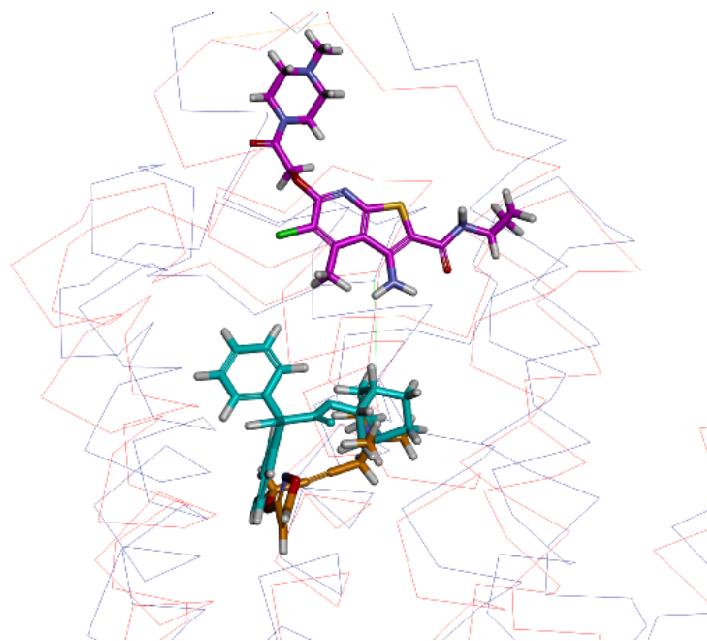
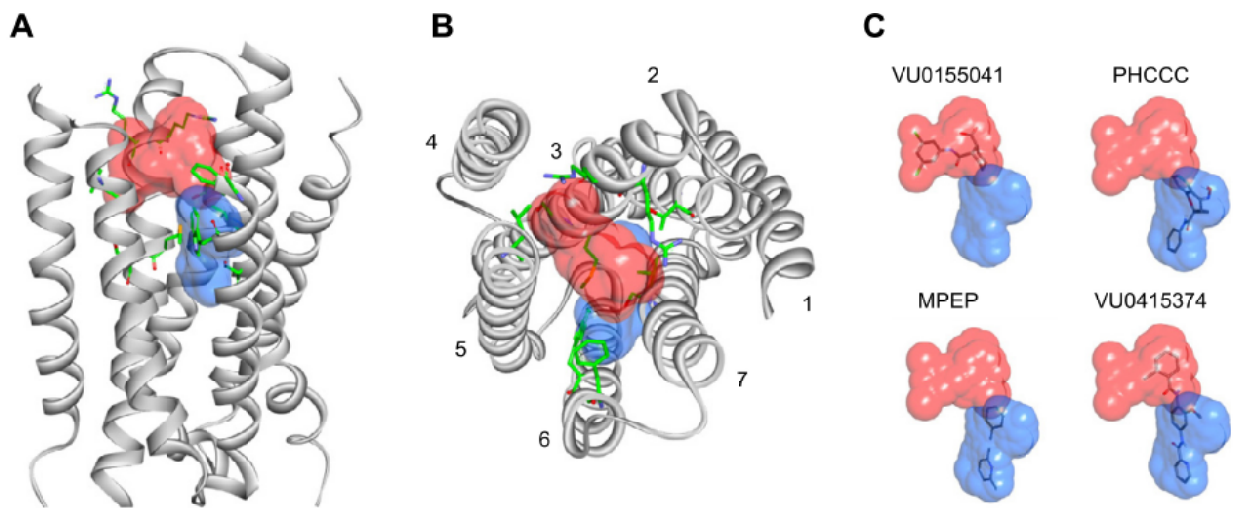


図2-24 膜貫通構造内の複数の作用部位  
 (a)mGluR4のリガンド(Xavier Rovira et al., 2014)  
 (b)M2ムスカリン受容体の結晶構造(PDB ID : 3U0N、3MQT)

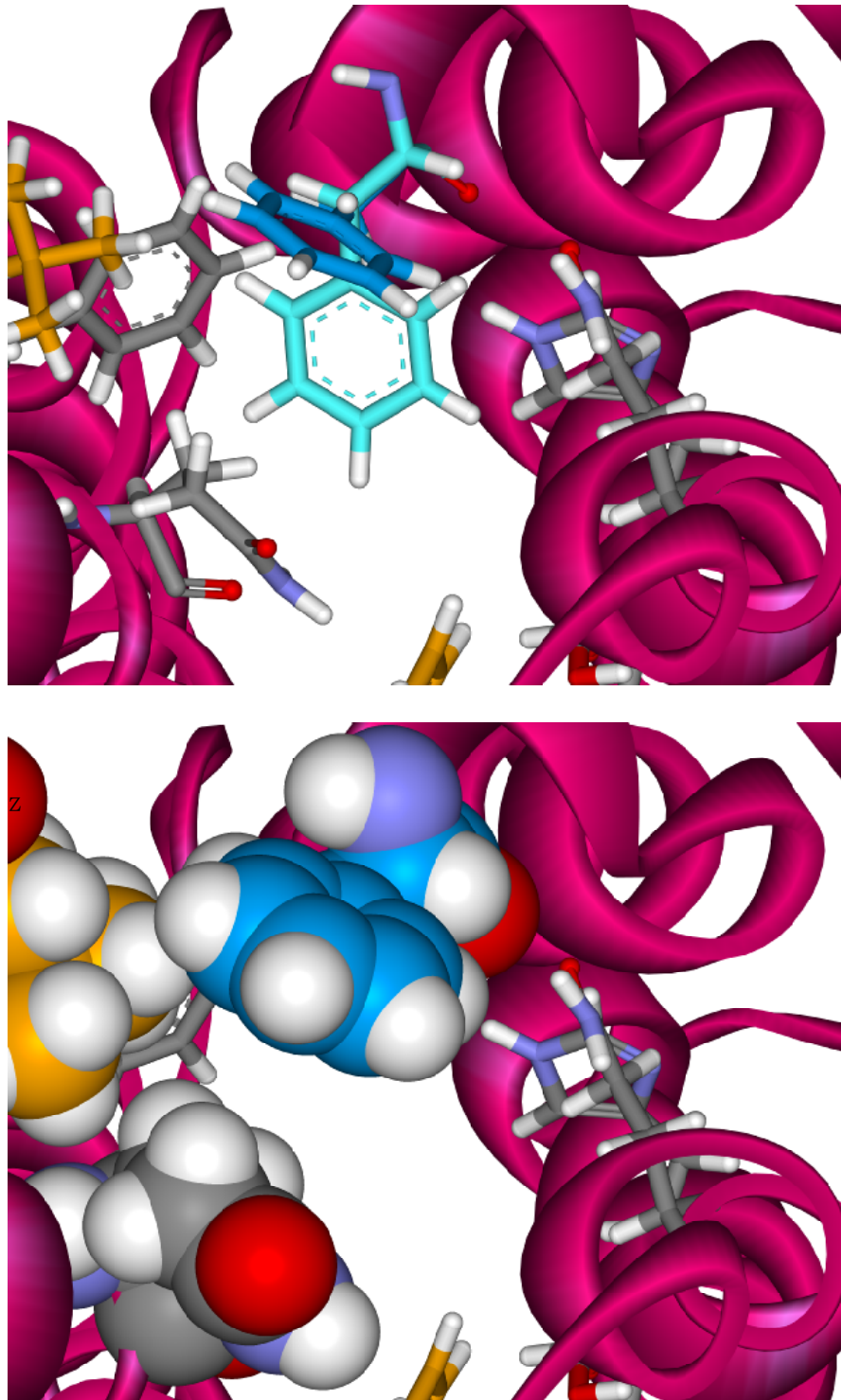


図2-25 PMCA活性型におけるPhe730<sup>5.40</sup>のロータマーの検討

## 第 3 章

X 線結晶構造解析を目指した

T1R3 膜貫通領域の発現及び精製の検討

## 3-1. T1R3 TMD の結晶化へ向けて

### 3-1-1. 目的

第2章で提示したモデルを基にした甘味料・甘味抑制物質の探索結果から、モデルは実物に近い構造を有していることが示唆された。しかしながら、食品添加物としての応用を考慮すると、ただ強力だけでなく、他の受容体には影響を与えない T1R3 TMD 特異的に作用する甘味料、抑制剤の開発が求められる。そのためにはより確度の高い構造を基にリガンド設計し、構造を検討する必要がある。そこで、本章では T1R3 TMD の結晶構造の取得を目指し、コンストラクト及び精製条件の検討を行った。

なお、本章の研究は京都大学医学部分子細胞情報学研究室において実施した。

### 3-1-2. GPCR の結晶構造解析の現状

水溶性タンパク質に比べて膜タンパク質の解析は遅れている。これは、膜タンパク質を単離するためには膜を可溶化し、ミセルを形成させなくてはならないという作業工程の複雑さ及びそれにかかるコスト、更に脂質膜を保ったまま結晶化を進めなくてはならないという結晶の生成難度に起因する。

GPCR は構造変化によりリガンドの受容を G タンパク質へと情報伝達するという特性上常に揺らいでいることから構造安定性が低く、発現及び精製が難しい。加えて、他の膜タンパク質に比べても疎水性の高い構造を有しており、構造のほとんどが膜に埋もれていることから結晶格子が形成されにくい。このため、結晶が生成せず、成長もしにくい。以上の理由から GPCR の結晶構造の取得は長らく困難とされてきた。

GPCR の結晶構造は 2000 年に牛のロドプシンにおいて初めて取得に成功している((Palczewski et al., 2000))(図 3-1)。ロドプシンはレチナールが共有結合しており、光が当たらない限り常に不活性型で保持されているため比較的安定な構造を有しており、かつ眼球内に多量に存在する。それ故単離が容易であり、GPCR の中ではいち早く構造が明らかとなった。7 回膜貫通構造はあらかじめ予測はされていたものの、実際にその形状を明らかにしたという意味では非常に重要な成果と言える。

しかしながらその他の GPCR の結晶構造は、2007 年に Brian Kobilka らによりアドレナリン受容体  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -AR) の構造が解かれるまで明らかにされなかった。Brian Kobilka らは、 $\beta_2$ -AR の結晶を得るにあたり、2 通りの方法で 7 回膜安定構造を安定化している(Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007)(図 3-2)。一つは、立体構造を認識する構造認識抗体を用いた安定化。もう一つは TM5 から TM6 の間に存在する intracellular loop 3 (=以下 ICL3)に安定化タンパク質を導入する方法である。

これら2つの手法がGPCRの結晶構造解析のbreak throughとなり、GPCRの結晶構造が次々と解かれるようになった。Brian KobilkaはGPCRの結晶化方法の確立により2012年ノーベル化学賞を受賞している。

2014年現在、Class A GPCRを中心に30ほどの構造が明らかにされているが、これはおよそ700種存在するGPCRファミリーのほんの一部にすぎない。

### 3-2. GPCR の安定化、及び精製手法の概要

Class A GPCR において Kobilka らにより開発された 7 回膜貫通構造を安定化する手法について詳しく述べる。

GPCR はアゴニストを受容した際に G タンパク質が結合できるように構造変化し、活性型となる。しかしながら多くの GPCR において、リガンドが作用していない定常状態では活性型と不活性型の間で揺らいでおり、常に一定のシグナルを下流に伝えている。この揺らぎこそが GPCR の安定性が低い要因となっている。従って GPCR を安定化するには、7 回膜貫通構造を 0%活性の不活性型に固定するインバースアゴニスト（定常活性をなくすことが可能な抑制剤）を加えるか、あるいは 100%活性化が可能なアゴニストを加えて活性型に固定しなくてはならない。また、活性型では G タンパク質との結合サイトが生じることから、不活性型に比べ安定性に欠ける。このため今までに活性型の取得に成功しているのはロドプシン、 $\beta$ 2-AR、ムスカリン受容体 M2、アデノシン受容体 A<sub>2A</sub> の 4 種類のみである。

Class A GPCR の構造は、N 末端はさほど長くないものの、TM5、TM6 間に存在する ICL3、及び C 末端が長いものが多い。例として、 $\beta$ 2-AR 及びムスカリン受容体 M2 のスネークプロットを表示した（図 3-3）。細胞内側のこれらの配列は G タンパク質との相互作用に大きく関わっていると考えられるが、G タンパク質が存在していない限り安定な構造を保てないために、発現効率・タンパク安定性及び結晶化の妨げとなる。そこで、7 回膜貫通構造を保ち、リガンド結合能が失われない程度に N 末端、C 末端、ICL 3 を削り、最小限の構造にした手法が現在明らかにされている結晶構造では一般的である。このように加工し、更に強力なインバースアゴニストを加えた上で、抗体、安定化タンパク質の導入を行う。

立体構造を認識する抗体を取得するためには、当然ながら立体構造を保持したままの抗原が必要となる。しかしながら、GPCR は安定性が低いために、構造を保持したまま発現・精製可能な構造は多くはないことから、この手法をそのまま用いることが可能な GPCR は少ない。

そこで、もう一つの GPCR を安定化させる手法として安定化タンパク質の挿入が挙げられる。Kobilka らは、ICL3 を削るにあたり、TM5 と TM6 のヘリックス間の距離に注目した。TM5 と TM6 の距離と等距離に N 末端と C 末端が存在する結晶性の高いタンパク質の探索を行った結果、T4 フェージ由来リゾチーム（T4L）を挿入する方法が見出された。安定化タンパク質はその後改良が行われており、さらに結晶性の高い、熱安定化アポシトクロム b 562RIL（bRIL）や(Chun et al., 2012)、T4L の不要なドメインを削り、さらにコンパクトにして結晶性を高めた minimal T4L (mT4L)が開発されており(Thorsen, Matt, Weis, & Kobilka, 2014)、より構造安定性、結晶性の高い安定化タンパク質が用いられている（図 3-4）。また、近年では N 末端に安定化タンパク質を配置し、ICL3 を途中で切断、短絡した構造で結晶が得られているケースが多い（mGluR1 TMD の結晶構造、後述）。



構造認識抗体、安定化タンパク質とともに GPCR の 7 回膜貫通構造の揺らぎを抑えるだけでなく、親水部が増大することにより結晶の格子形成に大きく寄与している。

### 3-3. T1R3 TMD コンストラクトの検討

#### 3-3-1. mGluR1 TMD、mGluR5 TMD のデザインについて

mGluR1 TMD・mGluR5 TMD の結晶構造解析の手法を基に T1R3 TMD の結晶構造解析のコンストラクトの作製を試みた。

mGluR1 TMD の結晶構造(図 3-5a)は N 末端に bRIL を配置した構造を有しており、リガンドにはインバースアゴニストの FITM (IC<sub>50</sub>: 5.1 nM (Sato et al., 2009)) を用いている。Class C GPCR の特徴として、膜外領域が大きいことに関連して Class A GPCR に比べ大きな Extracellular loop 2 (ECL2)有していること、ICL3 が短く、ICL2 の方が長いこと、の 2 点が挙げられる。N 末端に bRIL が配置されているため、細胞外側の解像度が高いが、一方で細胞内側の長い ICL2 の一部は構造が定まらず、解読できていない。

mGluR5 TMD の結晶構造(図 3-5b)は ICL2 に T4L を挿入した上で、更にリガンドの結合能には影響のない位置 6 ヶ所に、構造のぶれを小さくする (定常活性を下げる) 変異を加えることで構造の安定化を図っている。リガンドには mavoglurant (IC<sub>50</sub>: 30 nM (Vranesic et al., 2014))を用いている。こちらは T4L を細胞内側に挟み込んでいることから、ECL2 のループが解読できていない部分がある。

どちらの結晶構造も、N 末端、及び C 末端の切断位置はほぼ同じであることから、同様の部分で切断した TMD 構造で精製を実施すると良いと考えられる。

#### 3-3-2. 実験方法

##### ・用いた試薬

Bacmid 用大腸菌培養培地 (プレート) (以下、TKG 培地、TKGIB プレート)

tetracycline (ナカライ) 2mg

kanamycin (ナカライ) 10 mg

gentamycin (GIBCO) 1.4 mg

(イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド; IPTG (ナカライ) 0.85 mg)

(Bluo-Gal (invitrogen) 20 mg)

/ 200 mL LB 培地

昆虫細胞用培地 ESF921 (Expression systems)

FACS buffer

2% FBS

0.05% NaN<sub>3</sub> in PBS

hypotonic buffer

10 mM HEPES (pH7.5)

20 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

high osmotic buffer

1M NaCl  
10 mM HEPES (pH7.5)  
20 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

FSEC buffer

150 mM NaCl  
50 mM Tris-HCl (pH7.5)  
0.3 % DDM

可溶化剤

n-Dodecyl-β-maltopyranoside (= DDM) (anatrane)  
Lauryl maltose neopentyl glycol (= L-MNG) (anatrane)  
Cholesteryl hemisuccinate (= CHS) (sigma-Aldrich)

なお、CHS はそのままでは難溶性である。そこで、10% DDM あるいは 10% L-MNG を加えた 200 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中で超音波破碎を実施することで溶解させた。

#### ・コンストラクトの作製

膜タンパク質の発現には宿主として夜盗蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 幼虫由来細胞 Sf9 を用い、バキュロウィルスに感染させることによる発現方法が主流となっている。この系では目的のタンパク質の遺伝子情報を有したバキュロウィルスを Bac to Bac system (Invitrogen) を用いた。Bac to Bac system 用ベクターである pFastBac1 を用いて目的の配列を作製した。作製したコンストラクトのデザインについては後述する。プライマー合成は Invitrogen に依頼した。PCR はポリメラーゼとして Primestart Max (TAKARA) を用い、T100 Thermal Cycler (BIO-RAD) で行った、ライゲーションは In-Fusion HD (Clontech) を用いた。

#### ・Bacmid の作製

pFastBac1 ベクターを大腸菌 DH5α High (TOYOBO) に取り込ませ、形質転換を行った後に Ampicillin (ナカライ) 入りの LB 培地 (1 mg / mL) に播種した。翌日に得られたシングルコロニーを Ampicillin 入り LB 培地 (1 mg / mL) で 1 晩培養し、さらに翌日 PureLink Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen) を用いてプラスミドを回収、塩基配列の確認を行った。塩基配列の確認は京都大学医学研究支援センター DNA シークエンス解析室に依頼した。次に、配列の確認がとれたプラスミ

ドを大腸菌 DH10Bac1 (Invitrogen)へ形質転換し、TKGIB プレートに播種することによりブルーホワイトセレクションを行った。3-4 日後に得られた白色のシングルコロニー3 種を TKG 培地で培養し、これを 24 時間後に回収、PureLink Quick Plasmid Miniprep kit を用いて Bacmid を得た。得られた Bacmid に目的の遺伝子が組み込まれていることを確認するために、pUC\_M13 プライマー(Fw : CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG、Rv : AGCGGATAACAATTTACACAGG)を用いて PCR により増幅させ、Bacmid 内に目的の長さのバンドが得られている事を確認した（組み込みに成功していれば組み換えで挿入された pFastBac1 の長さ 2400bp 程 + デザインしたコンストラクトの長さのバンドが認められる）。

- ・ 昆虫細胞 Sf9 の培養

細胞の継代 2.5% FBS (Sterile) BOVOGEN SFBS-M 入りの ESF921 を用いた。 $1 \times 10^6$  個 / mL とし、3 - 4 日に一度継代した。スケールは必要細胞数に応じて 125 mL フラスコ、500 mL フラスコ、1 L フラスコ、3 L フラスコ、5 L フラスコ (Corning) を用いた。培養は INNOVA44 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC)を用い、125 rpm, 27 °C で実施した。細胞数は Luna Automated Cell Counter (logos biosystems) 及び Trypan Blue Stain (0.4%) (GIBCO)を用いて計数した。

- ・ transfection

継代から 3 日目の昆虫細胞を 6 穴プレート(Falcon)に  $0.5 \times 10^6$  個 / 1 mL  $\times$  2 mL で播種し、15 分静置することで細胞をプレート表面に沈めた。この間に各 well あたり無血清培地 grace buffer (invitrogen)を 150  $\mu$ L 用意し、ここへ 1.7  $\mu$ g の Bacmid と transfection 試薬 Fugene HD (promega) 6  $\mu$ L を加えてよくピペティングした。沈んだ細胞に対し混合液を滴下し、transfection を行った。6 穴プレートは乾燥を防ぐため、パラフィルムでコートし、27 °C で 4 - 6 日静置することにより P0 ウィルスを作製した。なお、より感染力価の強いウィルスを得るべく、同一コンストラクトの Bacmid を 2 - 3 穴分作製した。

- ・ P1 ウィルスの作製

Sf9 細胞を  $1.0 \times 10^6$  個で 50 mL 用意し、ここへ P0 ウィルス 1 mL を添加することで P1 ウィルスの作製を行った。培養は INNOVA44 にて、27 °C、125 rpm で行った。P0 ウィルス感染の感染具合（細胞がはげる等）に応じて、4 - 6 日後 50 mL 遠心チューブに回収し、4 °C、3000 g、3 min. 遠心することで上清を得、これを P1 ウィルスとした。遠心により沈めた細胞は、目的のコンストラクトが発現していることから、下記 FSEC に用いるべく、20% glycerol 入り PBS 5 mL ほどで懸濁した後に液体窒素で瞬間凍結し-80 °C で保存した。

- ・ タイターチェック

バキュロウイルスに感染した細胞は、細胞表面にバキュロウイルス由来糖タンパク質 gp64 が発現することが知られる。これを認識する抗体を用いて蛍光色素を負荷し、フローサイトメーター Guava EasyCyte plus(Guava Technologies, MILLIPORE)で FACS (fluorescence activated cell sorter) を実施し、感染率の算出、ウイルスの力価の判定を行った。

具体的な試料調製法としては、まず 1 種類のウイルスに対し 6 穴プレートに Sf9 細胞を  $0.5 \times 10^6$  個 / 1mL  $\times$  2 mL を 3 穴分播種し、それぞれに P1 ウィルス を 0.5  $\mu$ L、1  $\mu$ L、2  $\mu$ L 添加し、一晚 27 °C でインキュベートした。翌日これらの細胞を懸濁して集め、各々 1.5 mL チューブへ 1 mL 入れ、4 °C、1200 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨てたのち、1 本あたり 0.5 $\mu$ L の gp64 抗体 Anti-BV Envelope gp64 Clone : AcV1(eBioscience)と 100  $\mu$ L FACS buffer を加え、氷上で 30 分静置した。静置後、1 mL の FACS buffer を加えて再び 4 °C、1200 rpm で 5 分間遠心、上清 (過剰な抗体) を除去したのちに、500  $\mu$ L の FACS buffer を加え懸濁した。この細胞液を用いて FACS を実施した。

#### ・ FSEC (fluorescence size exclusion chromatography)

ターゲットの安定性の評価には、C 末端に EGFP を融合させたコンストラクトを用いた。EGFP 融合タンパク質が発現している細胞を細胞破碎、膜取りした後に可溶化を行い、ミセルとなり溶けた成分を HPLC (HITACHI Chromaster (5110, 5210, 5440, 5410))に通じ、FSEC を行った。

膜取りの具体的手法としては、P1 ウィルスを作製した際に残った細胞を解凍し、これを少量 (300  $\mu$ L ほど) Hitachi 超遠心機用 1.5 mL チューブ(Hitachi Koki)に取り、PBS で細胞を懸濁後、遠心機で 4 °C、1000 rpm で 5 分間遠心することによって細胞を再び遠心、上清を廃棄した。ここへ hypotonic buffer を 1 mL 入れ、よくピペッティングした後に超遠心機 (Hitachi himac CS100FNX) を用いて 4 °C、43,000 rpm、30 分間遠心した後に上清を捨てた。続いて high osmotic buffer を 1 mL 加え同様に懸濁、超遠心を 30 分間行ったのちに上清を廃棄。もう一度 high osmotic buffer に処し、超遠心機で 30 分間遠心を行った。こうして得られた膜を、可溶化剤組成が 1% DDM、-0.2% CHS からなる可溶化 buffer で 1 時間可溶化を行った。可溶化後、溶け残りを除くべく、もう一度超遠心機で 4 °C、43,000 rpm、30 分間遠心し、この上清をシリンジで吸い、HPLC に通じた。カラムは TSKgel SuperSW mAb HTP (TOSOH)を用い、EGFP の蛍光は 488 nm で励起し、509 nm で検出した。

### 3-3-3 コンストラクトについて

ヒト T1R3 のアミノ酸配列を図 3-7 に示した。CRD (Cysteine-rich-domain) を構成しているジスルフィド結合が Cys499 - Arg558 までに存在し、これより前が VFTD、後ろが TMD となっている。TMD のみを結晶化する場合においても、どの位置で切断するのかが結果が大きく異なっている。本研究では数多くのコンストラクトを作製したが、ここでは、主なコンストラクトの 4 種

類の検討結果を示す。図 3-6 に示す 4 種のコンストラクトを作製した。CRD を構成する最後の Cys である、Cys554 直後の Phe555 から T1R3 の C 末端までのコンストラクト（以下 TMD 全長）と、mGluR1 の結晶構造に合わせ、Arg557 から C 末端を 13 残基短くし、Gly849 で切断したもの（以下 TMD Δ）を用意した。さらに、短くしたコンストラクトにおいて、mGluR1 の結晶構造に倣い N 末端に bRIL を付加したもの（以下 bRIL TMD）、mGluR5 の結晶構造に倣い ICL2 に bRIL を挟んだもの（以下 TMD IL2bRIL）を作製した。これらのコンストラクトをそれぞれ Sf9 によって発現させ、P1 ウィルス作製時点で FSEC により安定性を評価した。結果は図 3-8 に示す。

FSEC では EGFP 由来の蛍光を検出することから、GFP が融合しているタンパク質の分子量を知ることが可能である。大きな分子は早く流出し、小さな分子は遅く流出する。膜タンパク質が安定でしっかり形状維持していれば、その周りを覆うミセルもコンパクトに、一定の大きさとなる。これにより、FSEC の単分散性を評価することで、タンパク質の安定性を評価することが可能である。タンパク質が不安定で、タンパク質同士で凝集してしまった場合にはピークが左にシフトする。一方で、N 末端や、ターゲットの C 末端と EGFP 間、各 TM 間のループが長すぎた場合はその部分で分解されてしまい、小さくなる。その場合ピークは右にシフトする。

上記 4 コンストラクトの結果を見比べると、TMD 全長はやはり C 末端が長すぎるためか、メインピークの他に幾つかの凝集・分解ピークが認められる。

一方で、TMD Δはわずかに凝集ピークが認められるものの、極めて安定性の高い構造であることが明らかとなった。bRIL TMD はさらに安定性が増し、発現量の上昇が認められた。一方で、TMD IL2bRIL は良い単分散性を示したものの、TMD Δに比べてもやや凝集のピークが大きくなった。

以上の結果より、TMD Δ及び bRIL TMD を大量培養へと進め、更なる条件検討を実施した。

### 3-4. 大量発現と精製

#### 3-4-1. 実験方法

- ・ 試薬

##### IPL41 (Applicem)

IPL 41 10 L あたり

NaHCO<sub>3</sub> 3.5 g

NaCl 29.5 g

Tryptose Phosphate (BD) 26 g

TC Yeastolate (BD) 26 g

NaOH で pH6.0 - 6.2 に調整

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール (Wako) 50 mL

ペニシリンストレプトマイシン 50 mL

これを 0.22 μm のフィルターに通し、4 °C で保存した。大量培養には ESF921 と IPL41 を 1 : 1 の割合で混ぜて使用した。

##### CPM buffer

20 mM Tris-HCl (pH7.6)

150 mM NaCl

+ 各々の可溶化剤

- ・ P2 ウィルスの作製

P1 ウィルスを用いて、1 L の P2 ウィルスを作製した。1.0×10<sup>6</sup> 個 / mL の濃度の細胞を 1 L 用意し、ここへ P1 ウィルスを MOI (multiplicity of infection; 1 細胞あたりのウィルスの量) = 0.1 となるように加え、4 日間 27 °C、125 rpm で振盪培養した。感染 96 時間後に、大型遠心機(HITACHI himac CR7)を用いて 4 °C、7000 g で 5 分間遠心して細胞を落とし上清を得、0.8μm Rapid-Flow Sterile Disposable Filter (Nalgene)を用いてフィルターし、これを P2 ウィルスとした。P2 ウィルスは 4 °C で保管し、P1 ウィルス同様タイターチェックを行った。

- ・ 大量培養

大量培養は 5 L フラスコ (Corning) あるいは、セルバッグ、バイオエアクター (、CELLBAG DISPOSABLE BIOREACTOR C80022L 10-02、Wave BIOREACTOR SYSTEM 20 / 50 EHT (GE healthcare, Wave)) を用いて行った。6.0 – 8.0×10<sup>6</sup> 個 / mL の濃度にした培養液を 1.5 L 用意した。ここへ、あらかじめ作製しておいた IPL41 培地を 1.5 L 添加し、終濃度 3.0 - 4.0×10<sup>6</sup> 個 / mL の溶液 3 L とした。抗真菌薬 Amphotericin B (ナカライ) 25 μg / mL を 300μL (2.5 μg / mL) 添加した。

ここへ、P2 ウィルスをもイ=2 とするよに加え、およそ 48 時間培養した。培養時間は Sf9 細胞の生存数、及び細胞の大きさを判断した。Sf9 細胞はバキュロウィルスに感染することで次第に肥大化し、細胞が膨張に耐えられなくなると破裂、まわりの細胞へとウィルスをばらまく。これより、通常の細胞（直径 17 μm 程）に比べ、肥大細胞（直径 20 μm 程）の数が増えていること、生存数が 85% - 90% となっていること、の 2 点を目安に細胞膜に十分な目的タンパク質が発現しているとして回収した。細胞を 1 mL 採取し、目的タンパク質の発現チェックを行った。GFP 融合タンパク質の場合はそのまま FACS により得られる蛍光値から発現量を見積もった。GFP 融合タンパク質ではないコンストラクトの場合は、N 末端に発現させた FLAG-tag (DYKDDDDK) を指標に、分子細胞情報学の研究室において自作の FLAG 抗体 αFLAG Ab と、2 次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) (Molecular Probes) を用いて検出し、発現量を見積もった。

#### ・細胞の回収

細胞生存率 85% - 90%、肥大細胞の増加を目安に細胞の回収を行った。800 mL 入れることが可能な大型遠心機用ボトルに均等に培養液を分配し、大型遠心機(HITACHI himac CR7)を用いて 4 °C、7000 g で 5 分遠心することで、細胞を沈め、上清を廃棄した。その後、1 本のボトルに細胞を集約し、PBS を 400 mL ほど加え、Wash した。

その後、カウンターとして水を入れたボトルと共にもう一度 4 °C、8000 g、10 分遠心した後に上清を廃棄し、細胞重量の測定を行った。得られた細胞は 100 mL チューブ (IWAKI) に PBS を用いて洗い込み、総量の 1/8 量の 80% glycerol (終濃度 10%) を加えてよく攪拌したのち、液体窒素により週間凍結し、-80 °C で保存した。

#### ・膜取り

凍結した細胞を流水で解凍したのち、細胞 15 g あたり 70 mL の hypotonic buffer でよく懸濁し、大型超遠心起用チューブ (BECKMAN COULTER) へ各々 70 mL 分配してバランスをとり、大型超遠心機 Optima L-80 XP Ultracentrifuge or Optima XPN-90 Ultracentrifuge or Optima XE-100 Ultracentrifuge (BECKMAN COULTER)を用いて 4 °C、40000 rpm で 30 分超遠心した。上清を廃棄し、得られたペレットを high osmotic buffer へ懸濁し、100 mL のガラス製容器、Dounce Tissue Grinder (KONTES)へ移し、ダウンスを行った。抵抗が減り、滑らかになるまでダウンスを実施した。その後超遠心機で 4 °C、40000 rpm で 1 時間超遠心した。上清破棄後、さらにダウンスの作業を繰り返したのち、遠心機で 4 °C、40000 rpm で 30 分超遠心を行った。上清を破棄したのち、得られた膜重量の測定を行った。

#### ・精製に用いる TEV protease の作製



TEV protease (Tobacco Etch Virus Protease)は ENLYFQ/ (G or S)の 7 残基を特異的に認識し、Gly あるいは Ser の前で切断することが可能なプロテアーゼである。TEV protease の C 末端に His-tag (His×8) を付与したタンパク質を大腸菌により作製し、これを精製に用いた。詳しい作業工程は図 3-8 に示した。TEV protease は高濃度で使用することから、50 mg / mL 程の濃度に調製し、液体窒素で凍らせたのち、-80 °C に分駐して保存、適宜使用時に解凍して用いた。

#### ・精製

精製は主に次の手順で行った。各々の工程の実験手法を簡単に記述する。

#### 1.可溶化

可溶化には DDM が用いられることが多い。これは、DDM の親水部が非イオン性のマルトースからなっており、他の界面活性剤に比べ膜タンパク質の構造が崩れにくく温和に可溶化することが可能であるためである。また CHS を加えることで目的タンパク質の可溶化効率、及び安定性が増すことから、本研究では 1% DDM – 0.2% CHS による可溶化を実施した。

膜取りにより得られた細胞膜を可溶化 buffer で洗い込み、ダウンスを行った。その後、超遠心チューブに分配したのち、4 °C 下、ミックスローターで回転させて膜を可溶化させた。2 時間後に超遠心機で 4 °C、40000 rpm で 30 分遠心することで溶け残りを除き、上清を得た。

#### 2. M1-FLAG 抗体カラムを用いた精製

M1-FLAG 抗体(Sigma-Aldrich)は N 末端の FLAG-tag のみを認識する抗体で、吸着には  $\text{Ca}^{2+}$  が必要となる。この性質を利用し、2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でレジンを吸着させ、 $\text{Ca}^{2+}$  入りのバッファーで洗浄したのち、EDTA 入りのバッファーを用いて容易に溶出することが可能である。

また、結晶化を目指すにあたって可溶化剤を DDM から L-MNG に置換する必要がある。L-MNG は DDM に比べ臨界ミセル濃度 CMC が低いことが知られる。結晶を生成させるには極限までミセルを小さくし、親水部を露出させなくてはならないことから、CMC が低い L-MNG は結晶化に適している ( )。

M1-FLAG レジンに目的タンパク質を吸着させた状態で、2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  入り 0.05% DDM-0.01% CHS 溶液で洗浄し、次いで 0.01% L-MNG – 0.002%CHS 溶液で洗浄することで、可溶化剤の置換を行った。

#### 3. TEV protease 処理

精製のためにコンストラクトに組み込んだ tag や EGFP を切断し除去することを目的に TEV protease に処した。TEV protease の至適温度は 30 °C であるが、膜タンパク質の安定性の都合上、過剰量 (重量比 1 : 1) 、4 °C で一晩処することで切断を行った。

#### 4. PD-10 による buffer 置換

PD-10 (GE healthcare)はゲルろ過の手法を用いて分子量 5,000 以上の物質と 1,000 以下の低分子を分離することが可能なディスポーザブル脱塩カラムである。あらかじめ、置換したいバッファーを通じておいた PD-10 に 2.5 mL まで濃縮されたサンプルを加え、3.5 mL の置換バッファーで溶出することでバッファー置換が完了する。

#### 5. rIMAC (reverse immobilized-metal affinity chromatography)

His-tag と Co 錯体や Ni 錯体を固定した金属アフィニティーレジンの結合を利用して目的タンパク質を補足させて精製・分離する手法を IMAC という。本実験では、Ni-sepharose (GE healthcare) を金属アフィニティーレジンのとして用いた。TEV protease 処理により目的タンパク質から His-tag を除去した後に、目的タンパク質を素通りさせ、His-tag 付きの切断断片や EGFP、TEV 等を補足させることで最終精製を行った。

#### 6. 濃縮

コンセントレーター、Amicon Ultra filter units process (MERCK MILLIPORE)を分子量に応じて使い分けて遠心機により濃縮を行った。精製サンプルはミセルをまとっていることから、分子量がやや大きくなる。このため、EGFP 付きのサンプル (70 kDa 程)であれば 100,000 MWCO (Mw cut off)コンセントレーターで、TEV 処理後(40 kDa 程)は 50,000 MWCO のコンセントレーターで濃縮を行った。

また、GPCR は安定性が低いことから、タンパク質濃度を上げるにはより一層の注意を払わなくてはならない。そこで、濃度に応じて 10 分に 1 度から 3 分に 1 度、遠心機を止め、フィルター付近の局所的な濃度上昇をピペッティングにより解消しつつ、濃縮を行った。濃度は nanodrop 2000c (Thermo)において 280 nm の波長を測定することで見積もった。

#### 7. CPM assay

精製後の GPCR の安定性は膜タンパク質の安定性評価が可能な CPM assay によって評価した (Alexandrov, Mileni, Chien, Hanson, & Stevens, 2008)。CPM (N-[4-(7-diethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)phenyl]maleimide)はフリーの Cys 特異的に結合し、特定の蛍光を発する能力を有している。GPCR が膜構造を保持している場合には、GPCR 内部の Cys は CPM とは反応しない。ところが、徐々に熱を加えていくにつれ GPCR の膜構造が崩れると Cys が露出することから、CPM が新たに結合し、その分蛍光強度が増す。この蛍光強度を測定することで、膜構造の安定性を評価することが可能である。

CPM は invitrogen から購入し、エタノールに溶解させ、4 mg / mL で調製した。測定には、390 nm の励起光用フィルターと、485 nm の蛍光用フィルターをセットしたリアルタイム PCR 装置、MyIQ2 (BIO-RAD)を用いた。サンプルは白色の 8 連チューブ及びフラットキャップ (BIO-RAD)

に用意した。1 サンプルあたり精製サンプルが 10  $\mu\text{g}$ 、CPM をバッファーで 1 mg / mL に希釈したものを 2  $\mu\text{L}$  加え、20  $\mu\text{L}$  にバッファーでメスアップした(CPM 終濃度 0.1 mg / mL)。氷上で5分以上静置してから、MyIQ2 にセットし、2  $^{\circ}\text{C} / \text{min}$ .の割合で温度を上昇させることで測定を行った。

CPM の蛍光強度曲線の変曲点を算出し、これを Tm 値とした。結晶化が可能な GPCR の Tm 値は 55  $^{\circ}\text{C}$  以上とされている。安定性はコンストラクトの改良、リガンドの変更、及び抗体による固定により上昇させることが可能である。

## 8. ゲルろ過

精製後のサンプルが単分散性を保っているのか（構造を保持しているのか）を HPLC により確認した。

サンプルを 500  $\mu\text{L}$  まで濃縮したのち、HPLC ÄKTA pure (GE Healthcare)に通じた。カラムには、Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare)を用い、流速は 0.75 mL / min. で流した。

## 9. SDS-PAGE

全作業工程でサンプリング後、問題なく精製が行われているのかをチェックするために SDS-PAGE にて確認を行った。SDS-PAGE は XCell SureLock (Invitrogen)で行い、ゲルは NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Novex)を用いた。EGFP の In-gel 蛍光観察を行いたい場合には 12%tris-glycine gel (Novex)を用いた。マーカーには SeeBlue Plus2 Prestained Standard (invitrogen)、in-gel マーカーには BenchMark Fluorescent Protein Standard (Novex)を用いた。電気泳動後、Thermo Imperial Protein Stain (Thermo)を用いて CCB 染色後、一晚脱染した。ゲルは LAS-1000 で撮影した。

### ・リポソーム化

精製に成功したコンストラクトについては立体構造認識抗体を取得するための抗原とするためにリポソームへの再構築を行った。リポソームは DDM、L-MNG 等可溶化剤に比べ、より生体膜に近いことから膜タンパク質の構造を安定化、保持させることが可能であるため、通常リポソームへ再構築したものを抗原として用いる。

精製サンプル 1mg あたり、リポソーム脂質 Egg yolk phosphatidylcholine (Egg PC) 5 mg と、サンプルの抗体価を上昇させる Adjuvant として大腸菌由来 Lipid A (Sigma) 1mg を 10% Na-cholate を用いて 10 $\times$ PBS に可溶化させて Milli Q 水でメスアップし終濃度 1.2%Na-cholate の PBS 500 $\mu\text{L}$  とした。

余剰な Na-cholate やサンプルから持ち込みの DDM を除くために Bio-Beads 1mL (BIO-RAD)をあらかじめ用意しておいた上で 1 mg のタンパク質 (10 mg / mL = 100 $\mu\text{L}$ )と上記 EggPC、Lipid A 溶液を混合した。よく攪拌してから PBS をさらに 400 $\mu\text{L}$  加え、計 0.6% Na-cholate、1 mL としたところに直ちに Bio-Beads を加えて良く混ぜた。

1 晩 4 °C で攪拌した後、poly-prep chromatography columns (BIO-RAD)を用いて Bio-Beads を除去後、超音波処理を、溶液が透明になるまで実施した。これを-80 °C で凍結保存して、抗原用とした。

### 3-4-2. 精製結果 1

TMD Δ -EGFP 及び bRILTMD-EGFP の大量培養を実施した。これらは結晶化を見据え、図 3-9 に示す精製手法により精製を実施した。SDS-PAGE の結果を示す(図 3-10)。また、これらの精製後の HPLC によるゲルろ過のパターンをに示した(図 3-11)。

TMD Δ -EGFP は bRIL TMD-EGFP に比べ発現量が低い。また、TEV 処理後不安定となり、凝集及び分解が認められた。

### 3-4-3. 精製結果 2

精製結果 1 を受けて、結晶化条件での精製は不可能であると判断し、抗体作製の精製を行った(図 3-12)。大きく次の 3 点変更を行った。bRIL-TMD コンストラクトにおける精製において

1. 可溶化剤終濃度を 0.01% L-MNG - 0.002% CHS → 0.05% DDM - 0.01% CHS
2. 塩終濃度 NaCl 200 mM → 800 mM
3. TEVprotease 処理前に 1,000 rpm でなるべく濃縮し、切断後は 500 rpm で濃縮

この条件のもと、精製を実施したところ図 3-13 のような結果が得られた。また、CPM assay により安定度の評価を行い(図 3-14a)、HPLC において単分散性の評価を行った(図 3-14b)。

HPLC による単分散性が良好であったことから、bRIL-TMD のコンストラクトをリポソーム化し、凍結保存した。今後、T1R3 KO マウスを用いて抗体作製を行う予定である。

また、CPM assay の結果、bRIL-TMD の T<sub>m</sub> 値は 41 °C であった。これより、T1R3 TMD は結晶化に耐えうる T<sub>m</sub> 値を有していないことが明らかとなった。T<sub>m</sub> 値が低い最大の要因はやはりリガンドであると考えられる。今回用いたインバーサアゴニストである 2,4-DP のアスパルテームに対する IC<sub>50</sub> 値は 6 μM である。一方で、先に紹介した mGluR1 TMD の結晶構造におけるインバーサアゴニスト、FITM のグルタミン酸に対する IC<sub>50</sub> 値は 5.1 nM であることから、3 桁、リガンド特異性に違いがある。一方で、mGluR5 のインバーサアゴニスト mavoglurant の IC<sub>50</sub> 値は 30 nM であることから、今後結晶化に進めるためには、立体構造認識抗体と数十 nM 程度の抑制力のあるインバーサアゴニストとの併用が必要であると考えられる。

### 3-5. 今後の展望

- ・免疫
- ・結晶化

- ・苦味受容体 Tas2Rs について

T1R3 を含む T1Rs の他、Tas2Rs も GPCR であることから、これらについても今後、解析に期待ができる。現に当研究室 2010 年度修士、菅原は酵母 (*saccharomyces cerevisiae*) を用いた発現系において、25 種類ある Tas2Rs-EGFP の発現検討を実施している ( )。この結果から、比較的発現量及び単分散性の良い Tas2R41 と、当研究室において機能解析がなされている ( ) Tas2R16 の 2 つのサブタイプについて Sf9 における発現及び精製条件の検討を行った。

Tas2R41 はリガンドが明らかにされていない、オーファンな受容体であり、

コンストラクトは T1R3 TMD と同様、N 末端に bRIL を付加したものを作製した。それぞれの単分散性チェック、及び精製結果を示す。

一方で昨年、Tas2R4 の抑制剤 BCML の、アゴニストキニーネに対する  $IC_{50}$  が  $59 \pm 18$  nm であるという報告がなされている。現在報告されている苦味受容体中で最も強力な抑制剤であることから、Tas2R4 をターゲットにすることで、苦味受容体の構造を明らかにすることが可能となるかもしれない。

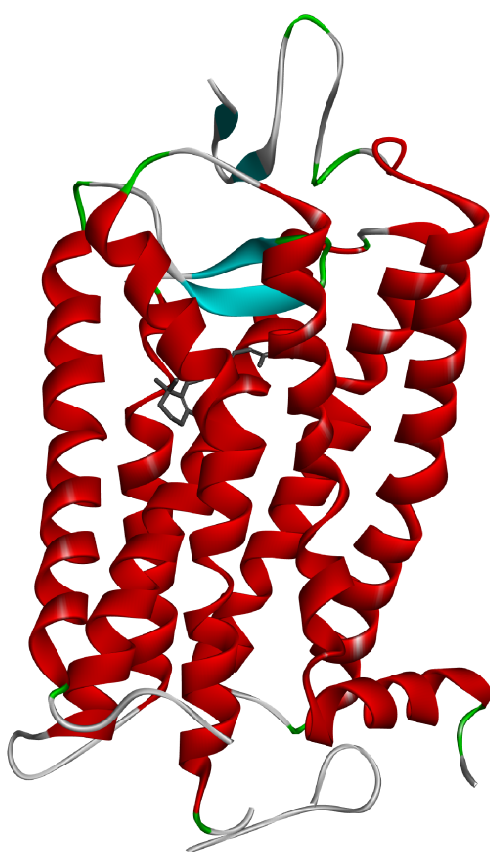


図3-1 : Class A GPCRであるロドプシンのX線結晶構造(1F88)

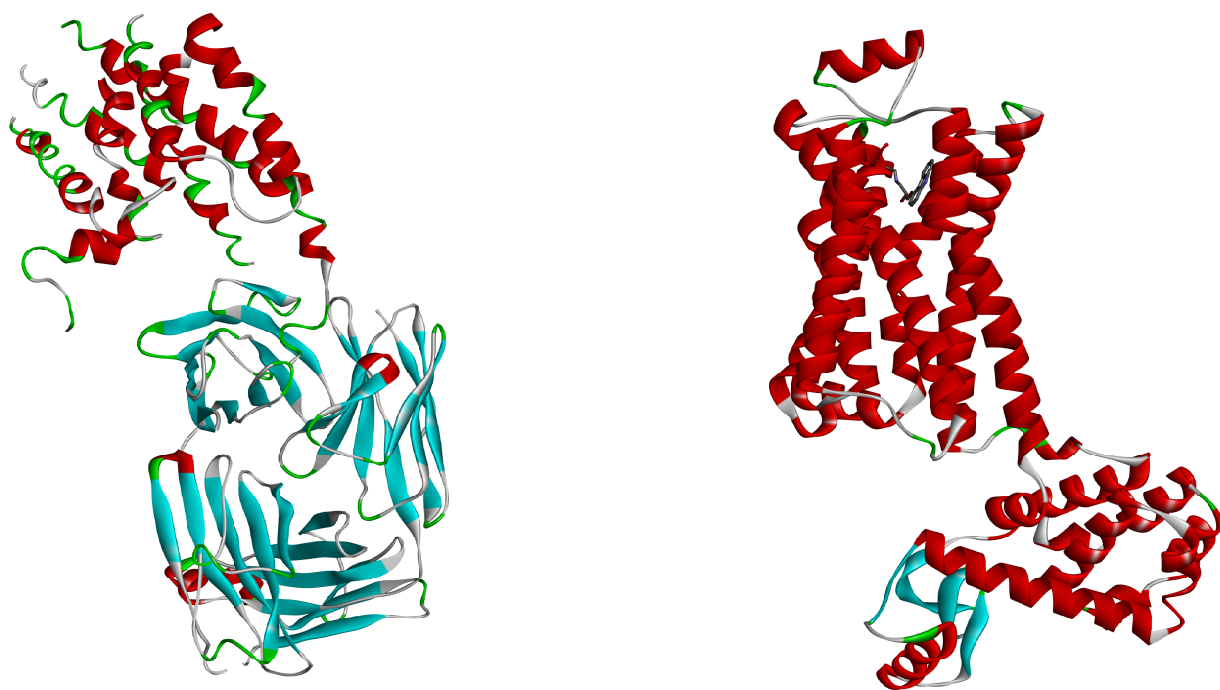


図3-2 : GPCRを安定化させる方法

立体構造を認識する抗体による安定化  
安定化タンパク質T4LをICL3の間に挟み込む手法

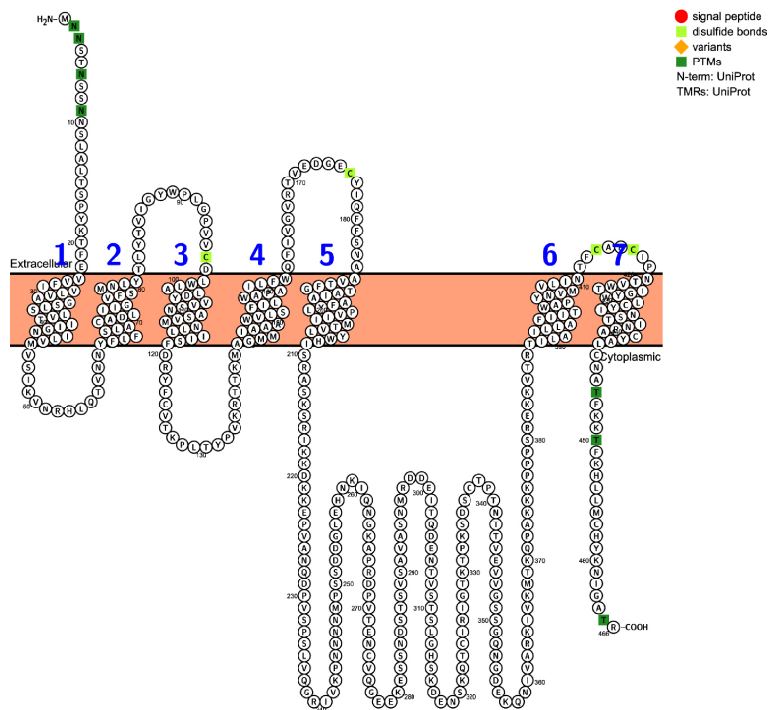
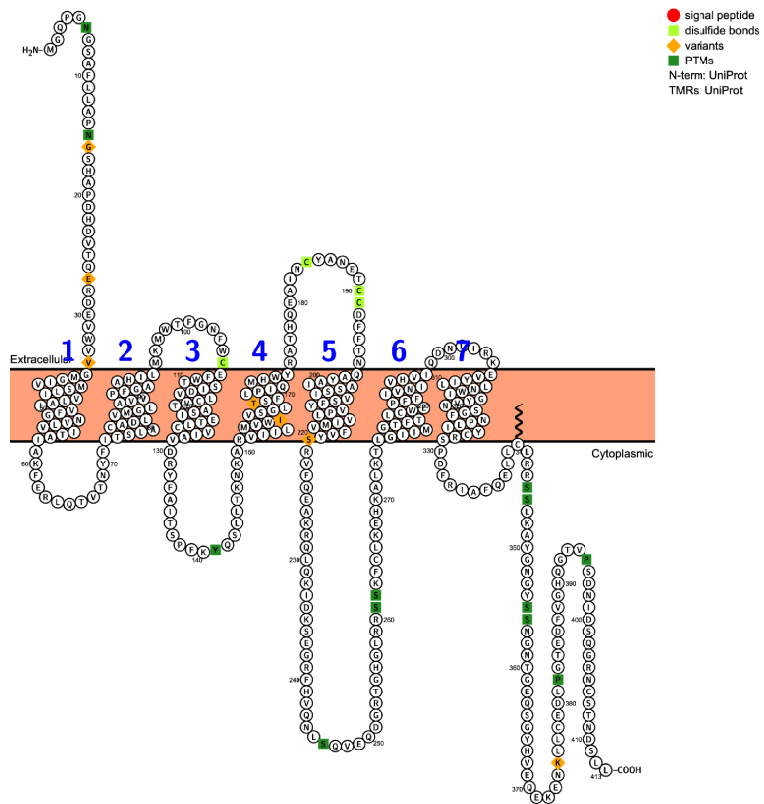


図3-3：アドレナリン受容体 $\beta 2$ 及びムスカリン受容体M2のスネークプロット  
ICL3、C末端が長い。



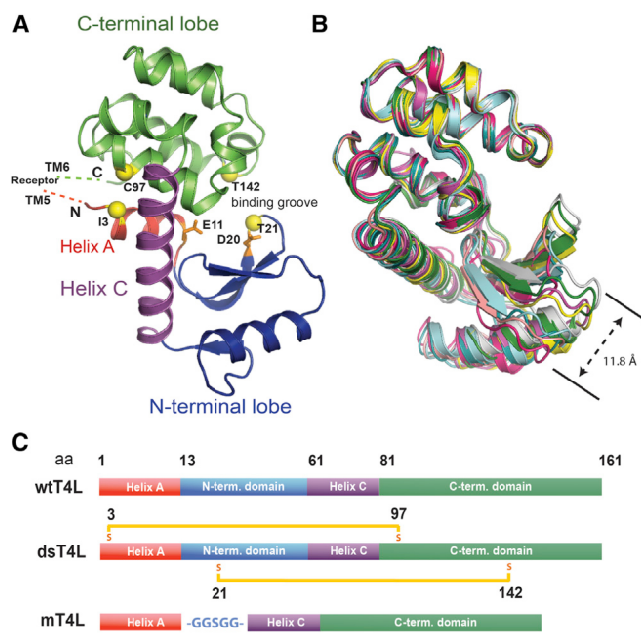
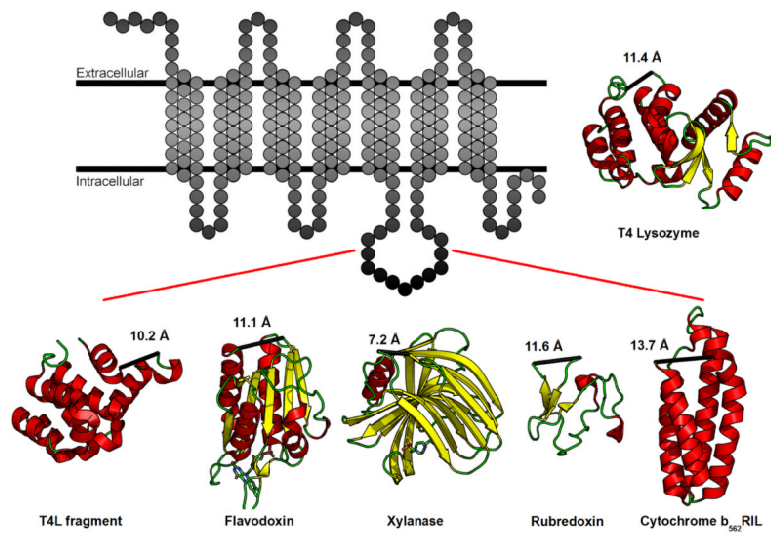


図3-4 : 安定化タンパク質の改良

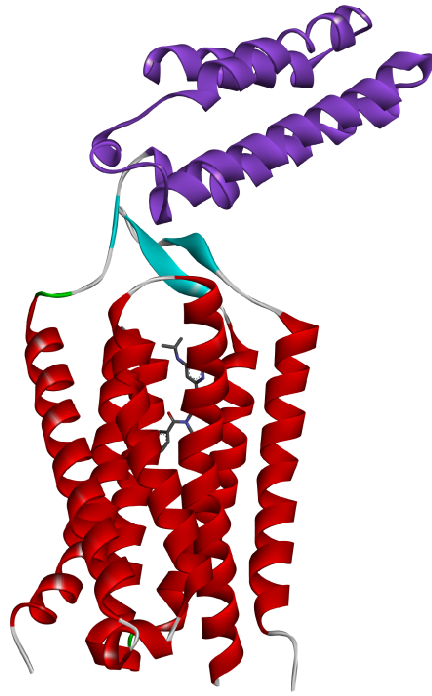


図3-5 : mGluR1 TMD及びmGluR5 TMDの結晶構造

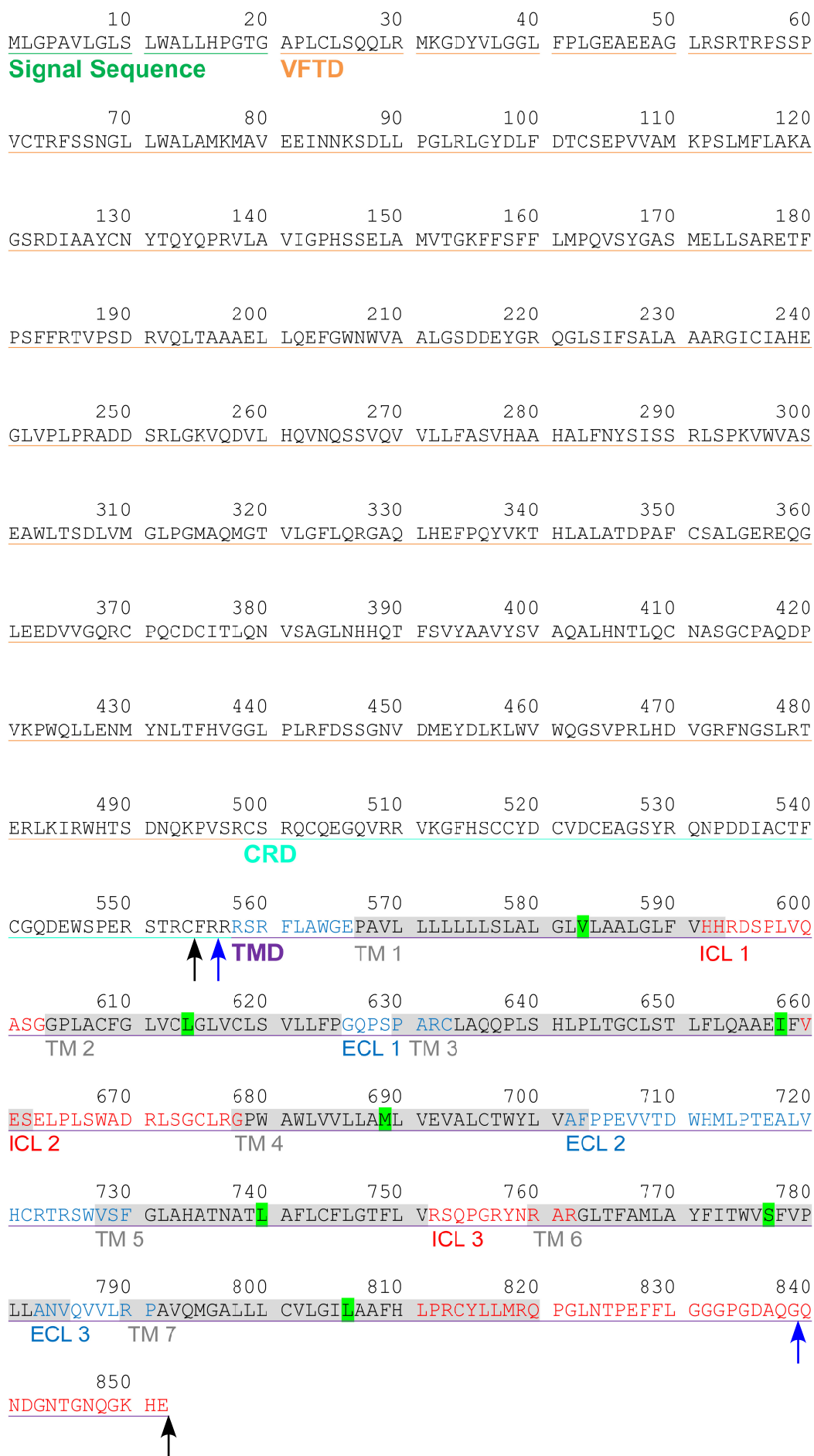


図3-6 : T1R3 TMDの全アミノ酸配列

## 参考文献

- Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, *100*(6), 693-702. doi: S0092-8674(00)80705-9 [pii]
- Alexandrov, A. I., Mileni, M., Chien, E. Y., Hanson, M. A., & Stevens, R. C. (2008). Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins. *Structure*, *16*(3), 351-359. doi: 10.1016/j.str.2008.02.004
- Bachmanov, A. A., & Beauchamp, G. K. (2007). Taste receptor genes. *Annu Rev Nutr*, *27*, 389-414. doi: 10.1146/annurev.nutr.26.061505.111329
- Behrens, M., Bartelt, J., Reichling, C., Winnig, M., Kuhn, C., & Meyerhof, W. (2006). Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J Biol Chem*, *281*(29), 20650-20659. doi: M513637200 [pii]
- 10.1074/jbc.M513637200
- Brockhoff, A., Behrens, M., Roudnitzky, N., Appendino, G., Avonto, C., & Meyerhof, W. (2011). Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds. *J Neurosci*, *31*(41), 14775-14782. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2923-11.2011
- Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J. D., & Meyerhof, W. (2002). The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet*, *32*(3), 397-401. doi: 10.1038/ng1014
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, *444*(7117), 288-294. doi: nature05401 [pii]
- 10.1038/nature05401
- Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A., Hummler, E., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, *464*(7286), 297-301. doi: nature08783 [pii]
- 10.1038/nature08783
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., . . . Ryba, N. J. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, *100*(6), 703-711. doi: S0092-8674(00)80706-0 [pii]
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., . . . Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, *318*(5854), 1258-1265. doi: 10.1126/science.1150577

- Chun, E., Thompson, A. A., Liu, W., Roth, C. B., Griffith, M. T., Katritch, V., . . . Stevens, R. C. (2012). Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. *Structure*, *20*(6), 967-976. doi: 10.1016/j.str.2012.04.010
- Conn, P. J., Christopoulos, A., & Lindsley, C. W. (2009). Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov*, *8*(1), 41-54. doi: 10.1038/nrd2760
- Conte, C., Ebeling, M., Marcuz, A., Nef, P., & Andres-Barquin, P. J. (2002). Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet Genome Res*, *98*(1), 45-53. doi: 68546
- Cui, M., Jiang, P., Maillet, E., Max, M., Margolskee, R. F., & Osman, R. (2006). The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites. *Curr Pharm Des*, *12*(35), 4591-4600.
- Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Zou, S., . . . Margolskee, R. F. (2003). Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science*, *301*(5634), 850-853. doi: 10.1126/science.1087155  
1087155 [pii]
- Dore, A. S., Okrasa, K., Patel, J. C., Serrano-Vega, M., Bennett, K., Cooke, R. M., . . . Marshall, F. H. (2014). Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature*, *511*(7511), 557-562. doi: 10.1038/nature13396
- Dyer, J., Salmon, K. S., Zibrik, L., & Shirazi-Beechey, S. P. (2005). Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans*, *33*(Pt 1), 302-305. doi: BST0330302 [pii]  
10.1042/BST0330302
- Fujiwara, S., Imada, T., Nakagita, T., Okada, S., Nammoku, T., Abe, K., & Misaka, T. (2012). Sweeteners interacting with the transmembrane domain of the human sweet-taste receptor induce sweet-taste synergisms in binary mixtures. *Food Chemistry*.
- Geng, Y., Bush, M., Mosyak, L., Wang, F., & Fan, Q. R. (2013). Structural mechanism of ligand activation in human GABA(B) receptor. *Nature*, *504*(7479), 254-259. doi: 10.1038/nature12725

- Greene, T. A., Alarcon, S., Thomas, A., Berdugo, E., Doranz, B. J., Breslin, P. A., & Rucker, J. B. (2011). Probenecid inhibits the human bitter taste receptor TAS2R16 and suppresses bitter perception of salicin. *PLoS One*, 6(5), e20123. doi: 10.1371/journal.pone.0020123
- He, W., Danilova, V., Zou, S., Hellekant, G., Max, M., Margolskee, R. F., & Damak, S. (2002). Partial rescue of taste responses of alpha-gustducin null mice by transgenic expression of alpha-transducin. *Chem Senses*, 27(8), 719-727.
- He, W., Yasumatsu, K., Varadarajan, V., Yamada, A., Lem, J., Ninomiya, Y., . . . Damak, S. (2004). Umami taste responses are mediated by alpha-transducin and alpha-gustducin. *J Neurosci*, 24(35), 7674-7680. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2441-04.2004
- Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (1999). Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, 96(4), 541-551. doi: S0092-8674(00)80658-3 [pii]
- Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., . . . Zuker, C. S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*, 442(7105), 934-938. doi: nature05084 [pii]
- 10.1038/nature05084
- Imada, T., Misaka, T., Fujiwara, S., Okada, S., Fukuda, Y., & Abe, K. (2010). Amiloride reduces the sweet taste intensity by inhibiting the human sweet taste receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 397(2), 220-225. doi: S0006-291X(10)00988-5 [pii]
- 10.1016/j.bbrc.2010.05.088
- Inada, H., Kawabata, F., Ishimaru, Y., Fushiki, T., Matsunami, H., & Tominaga, M. (2008). Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3-PKD2L1. *EMBO Rep*, 9(7), 690-697. doi: embor200889 [pii]
- 10.1038/embor.2008.89
- Ishii, S., Misaka, T., Kishi, M., Kaga, T., Ishimaru, Y., & Abe, K. (2009). Acetic acid activates PKD1L3-PKD2L1 channel--a candidate sour taste receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 385(3), 346-350. doi: S0006-291X(09)01003-1 [pii]
- 10.1016/j.bbrc.2009.05.069

- Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., & Matsunami, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, *103*(33), 12569-12574. doi: 0602702103 [pii]  
10.1073/pnas.0602702103
- Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M., . . . Max, M. (2005). Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J Biol Chem*, *280*(15), 15238-15246. doi: M414287200 [pii]  
10.1074/jbc.M414287200
- Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Snyder, L. A., Benard, L. M., Osman, R., . . . Margolskee, R. F. (2005). Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3. *J Biol Chem*, *280*(40), 34296-34305. doi: M505255200 [pii]  
10.1074/jbc.M505255200
- Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y., and Hino, A. (2001). Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *283*, 236-242.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., . . . Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, *407*(6807), 971-977. doi: 10.1038/35039564
- Li, X., Bachmanov, A. A., Maehashi, K., Li, W., Lim, R., Brand, J. G., . . . Floriano, W. B. (2011). Sweet taste receptor gene variation and aspartame taste in primates and other species. *Chem Senses*, *36*(5), 453-475. doi: bjq145 [pii]  
10.1093/chemse/bjq145
- 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*(7), 4692-4696. doi: 10.1073/pnas.072090199  
072090199 [pii]
- Mace, O. J., Affleck, J., Patel, N., & Kellett, G. L. (2007). Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol*, *582*(Pt 1), 379-392. doi: jphysiol.2007.130906 [pii]  
10.1113/jphysiol.2007.130906



Maillet, E. L., Margolskee, R. F., & Mosinger, B. (2009). Phenoxy herbicides and fibrates potently inhibit the human chemosensory receptor subunit T1R3. *J Med Chem*, *52*(21), 6931-6935. doi: 10.1021/jm900823s

Margolskee, R. F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K. S., Ilegems, E., Daly, K., . . . Shirazi-Beechey, S. P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(38), 15075-15080. doi: 0706678104 [pii] 10.1073/pnas.0706678104

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*(4), e35380. doi: 10.1371/journal.pone.0035380

Matsunami, H., Montmayeur, J. P., & Buck, L. B. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, *404*(6778), 601-604. doi: 10.1038/35007072

Max, M., Shanker, Y. G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., . . . Margolskee, R. F. (2001). Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nat Genet*, *28*(1), 58-63. doi: 10.1038/88270 88270 [pii]

McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J., & Margolskee, R. F. (1992). Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*, *357*(6379), 563-569. doi: 10.1038/357563a0

Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H., & Buck, L. B. (2001). A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat. Neurosci.*, *4*(5), 492-498. doi: 10.1038/87440 87440 [pii]

Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., & Jingami, H. (2007). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the ligand-binding domain of metabotropic glutamate receptor 7. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, *63*(Pt 7), 627-630. doi: 10.1107/S1744309107030059

Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., & Jingami, H. (2009). Site-specific unglycosylation to improve crystallization of the metabotropic glutamate receptor 3 extracellular domain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, *65*(Pt 3), 236-241. doi: 10.1107/S1744309109002267

- Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Yamada, S., Hara, A., Mogami, H., Nikolaev, V. O., . . . Kojima, I. (2009). Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One*, *4*(4), e5106. doi: 10.1371/journal.pone.0005106
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature*, *416*(6877), 199-202. doi: 10.1038/nature726 nature726 [pii]
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, *106*(3), 381-390. doi: S0092-8674(01)00451-2 [pii]
- Nie, Y., Hobbs, J. R., Vignes, S., Olson, W. J., Conn, G. L., & Munger, S. D. (2006). Expression and purification of functional ligand-binding domains of T1R3 taste receptors. *Chem Senses*, *31*(6), 505-513. doi: bjj053 [pii] 10.1093/chemse/bjj053
- Nie, Y., Vignes, S., Hobbs, J. R., Conn, G. L., & Munger, S. D. (2005). Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol*, *15*(21), 1948-1952. doi: S0960-9822(05)01107-3 [pii] 10.1016/j.cub.2005.09.037
- Nofre, C., Glaser, D., Tinti, J. M., & Wanner, M. (2002). Gustatory responses of pigs to sixty compounds tasting sweet to humans. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, *86*(3-4), 90-96. doi: 361 [pii]
- Oka, Y., Butnaru, M., von Buchholtz, L., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2013). High salt recruits aversive taste pathways. *Nature*, *494*(7438), 472-475. doi: 10.1038/nature11905
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., . . . Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, *289*(5480), 739-745.
- Pydi, S. P., Sobotkiewicz, T., Billakanti, R., Bhullar, R. P., Loewen, M. C., & Chelikani, P. (2014). Amino acid derivatives as bitter taste receptor (T2R) blockers. *J Biol Chem*, *289*(36), 25054-25066. doi: 10.1074/jbc.M114.576975

- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., . . . Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, *450*(7168), 383-387. doi: nature06325 [pii]  
10.1038/nature06325
- Rathbone, E. B., Butters, R. W., Cookson, D., & Robinson, J. L. (1989). Chirality of 2-(4-Methoxyphenoxy)Propanoic Acid in Roasted Coffee Beans - Analysis of the Methyl-Esters by Chiral High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*(1), 58-60. doi: Doi 10.1021/Jf00085a014
- Ren, X., Zhou, L., Terwilliger, R., Newton, S. S., & de Araujo, I. E. (2009). Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front Integr Neurosci*, *3*, 12. doi: 10.3389/neuro.07.012.2009
- Roland, W. S., Gouka, R. J., Gruppen, H., Driesse, M., van Buren, L., Smit, G., & Vincken, J. P. (2014). 6-methoxyflavanones as bitter taste receptor blockers for hTAS2R39. *PLoS One*, *9*(4), e94451. doi: 10.1371/journal.pone.0094451
- Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., . . . Kobilka, B. K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, *318*(5854), 1266-1273. doi: 10.1126/science.1150609
- Rovira, X., Malhaire, F., Scholler, P., Rodrigo, J., Gonzalez-Bulnes, P., Llebaria, A., . . . Goudet, C. (2014). Overlapping binding sites drive allosteric agonism and positive cooperativity in type 4 metabotropic glutamate receptors. *FASEB J*. doi: 10.1096/fj.14-257287
- Sanematsu, K., Kusakabe, Y., Shigemura, N., Hirokawa, T., Nakamura, S., Imoto, T., & Ninomiya, Y. (2014). Molecular mechanisms for sweet-suppressing effect of gymnemic acids. *J Biol Chem*, *289*(37), 25711-25720. doi: 10.1074/jbc.M114.560409
- Satoh, A., Nagatomi, Y., Hirata, Y., Ito, S., Suzuki, G., Kimura, T., . . . Kawamoto, H. (2009). Discovery and in vitro and in vivo profiles of 4-fluoro-N-[4-[6-(isopropylamino)pyrimidin-4-yl]-1,3-thiazol-2-yl]-N-methylbenzamide as novel class of an orally active metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) antagonist. *Bioorg Med Chem Lett*, *19*(18), 5464-5468. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.07.097
- Schiffman, S. S., Booth, B. J., Carr, B. T., Losee, M. L., Sattely-Miller, E. A., & Graham, B. G. (1995). Investigation of synergism in binary mixtures of sweeteners. *Brain Res Bull*, *38*(2), 105-120. doi: 0361-9230(95)00062-J [pii]

- Servant, G., Tachdjian, C., Li, X., & Karanewsky, D. S. (2011). The sweet taste of true synergy: positive allosteric modulation of the human sweet taste receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 32(11), 631-636. doi: S0165-6147(11)00115-5 [pii]  
10.1016/j.tips.2011.06.007
- Servant, G., Tachdjian, C., Tang, X. Q., Werner, S., Zhang, F., Li, X., . . . Karanewsky, D. S. (2010). Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(10), 4746-4751. doi: 0911670107 [pii]  
10.1073/pnas.0911670107
- She, G., Wang, S., & Liu, B. (2011). Dihydrochalcone glycosides from *Oxytropis myriophylla*. *Chem Cent J*, 5, 71. doi: 1752-153X-5-71 [pii]  
10.1186/1752-153X-5-71
- Shi, P., Zhang, J., Yang, H., & Zhang, Y. P. (2003). Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Mol Biol Evol*, 20(5), 805-814. doi: 10.1093/molbev/msg083
- Shindo, Y., Miura, H., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Ninomiya, Y., . . . Kusakabe, Y. (2008). G alpha14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun*, 376(3), 504-508. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.035
- Simon, B. R., Parlee, S. D., Learman, B. S., Mori, H., Scheller, E. L., Cawthorn, W. P., . . . MacDougald, O. A. (2013). Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. *J Biol Chem*, 288(45), 32475-32489. doi: 10.1074/jbc.M113.514034
- Slack, J. P., Brockhoff, A., Batram, C., Menzel, S., Sonnabend, C., Born, S., . . . Meyerhof, W. (2010). Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist. *Curr Biol*, 20(12), 1104-1109. doi: S0960-9822(10)00522-1 [pii]  
10.1016/j.cub.2010.04.043
- Stone, L. M., Barrows, J., Finger, T. E., & Kinnamon, S. C. (2007). Expression of T1Rs and gustducin in palatal taste buds of mice. *Chem Senses*, 32(3), 255-262. doi: 10.1093/chemse/bjl053
- Thorsen, T. S., Matt, R., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2014). Modified T4 Lysozyme Fusion Proteins Facilitate G Protein-Coupled Receptor Crystallogenesis. *Structure*, 22(11), 1657-1664. doi: 10.1016/j.str.2014.08.022

- Tizzano, M., Dvoryanchikov, G., Barrows, J. K., Kim, S., Chaudhari, N., & Finger, T. E. (2008). Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci*, *9*, 110. doi: 10.1186/1471-2202-9-110
- Ueda, T., Ugawa, S., Yamamura, H., Imaizumi, Y., & Shimada, S. (2003). Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *J Neurosci*, *23*(19), 7376-7380.
- Vranesic, I., Ofner, S., Flor, P. J., Bilbe, G., Bouhelal, R., Enz, A., . . . Gasparini, F. (2014). AFQ056/mavoglurant, a novel clinically effective mGluR5 antagonist: Identification, SAR and pharmacological characterization. *Bioorg Med Chem*, *22*(21), 5790-5803. doi: 10.1016/j.bmc.2014.09.033
- Winnig, M., Bufe, B., Kratochwil, N. A., Slack, J. P., & Meyerhof, W. (2007). The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct Biol*, *7*, 66. doi: 1472-6807-7-66 [pii]  
10.1186/1472-6807-7-66
- Wong, G. T., Gannon, K. S., & Margolskee, R. F. (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, *381*(6585), 796-800. doi: 10.1038/381796a0
- Wu, H., Wang, C., Gregory, K. J., Han, G. W., Cho, H. P., Xia, Y., . . . Stevens, R. C. (2014). Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science*, *344*(6179), 58-64. doi: 10.1126/science.1249489
- 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*(39), 14258-14263. doi: 10.1073/pnas.0404384101  
0404384101 [pii]
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, *139*(2), 234-244. doi: S0092-8674(09)01249-5 [pii]  
10.1016/j.cell.2009.10.001
- Young, R. L., Sutherland, K., Pezos, N., Brierley, S. M., Horowitz, M., Rayner, C. K., & Blackshaw, L. A. (2009). Expression of taste molecules in the upper gastrointestinal tract in humans with and without type 2 diabetes. *Gut*, *58*(3), 337-346. doi: gut.2008.148932 [pii]  
10.1136/gut.2008.148932

Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R. M., Xu, H., Pronin, A., Liu, H., . . . Li, X. (2008). Molecular mechanism for the umami taste synergism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(52), 20930-20934. doi: 0810174106 [pii]

10.1073/pnas.0810174106

Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, *115*(3), 255-266. doi: S0092867403008444 [pii]

## 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 中北 智哉

指導教員名 三坂 巧

### 論文題目： 甘味受容体における呈味調節物質作用モデルの構築及びその検証

甘味受容体は G タンパク質共役型受容体(GPCR)に属する T1R2、T1R3 がヘテロダイマーを形成することによって機能する。これらは大きな膜外領域を有する class C GPCR に分類され、スクロースやアスパルテームといった甘味料が T1R2 の膜外領域で受容される。一方で、甘味受容体には複数のリガンド受容サイトの存在が明らかになっている。その中の一つ、T1R3 の膜貫通領域(transmembrane domain; TMD)には甘味料であるネオヘスペリジンジヒドロカルコンやシクラメート、及び当研究室において甘味を有することを見出した香料、p-メトキシシナナムアルデヒド(以下 PMCA)が受容される一方、甘味抑制剤であるラクチゾールやギムネマ酸も作用することが示されている。これらのリガンドの中で、図 1 に示した抑制剤ラクチゾールと甘味料 PMCA は異なる応答調節能を有しているにも関わらずその形状が類似しており、これらの応答調節能の違いが何に起因するのかは不明であった。そこで作用機序を明らかにすることを目的としてラクチゾール、PMCA の類縁体を用いた網羅的な点変異体解析を実施した。

一方、甘味受容体と同じく class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 TMD 及び mGluR5 TMD の結晶構造が明らかとなったことから、これらを用いた T1R3 TMD の精度の高いホモロジーモデルの構築が可能となった。そこで、変異体解析結果を基にドッキングモデルを作製し、作用機序の違いを詳細に明らかにするとともに、より強力な甘味料、甘味抑制剤を探索することを目的とした。

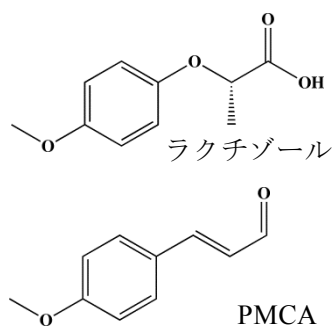


図 1. 抑制剤ラクチゾール及び、甘味料 PMCA

## ラクチゾール、PMCA 類縁体に対する変異体解析

甘味受容体 T1R2、T1R3 (またはその変異体)及びキメラ G タンパク質 G16gust44 を安定的に発現する培養細胞株を用い、点変異体解析を実施した。ラクチゾールの類縁体はアスパルテーム 1 mM の応答を基準とし、各リガンドを添加することで濃度依存的な応答抑制能を測定した後、IC<sub>50</sub> 値を算出した。一方で、PMCA 類縁体は自身の濃度依存的な受容体活性化能を測定し、EC<sub>50</sub> 値を算出した。野生型に対する変異体の EC<sub>50</sub> 値、IC<sub>50</sub> 値の変化値を指標とし、変化が大きい変異体の残基が受容体と各類縁体の相互作用に密接に関わっていると判断した。

## mGluR1 TMD の結晶構造を基にした甘味抑制剤ドッキングモデルの構築

ラクチゾール類縁体の変異体解析の結果、いずれも膜貫通領域のヘリックス 3 (以下 TM3)の His641、及び TM7 の Gln794 の 2ヶ所の残基の変異体により著しい抑制能の低下が認められたことから、これらの残基は相互作用に密接に関わっていることが示唆された。一方、mGluR1 の結晶構造を基にして作製したホモロジーモデル上ではこれらの残基は TM 内部で向かい合っている位置にいた (図 2a)。そこで、これらの残基と相互作用する初期条件のもと、抑制剤のドッキングを試みた。ホモロジーモデルの作製、ドッキングは Maestro、Glide (Schrödinger Inc.)を用いた。

ラクチゾール及び、ラクチゾールよりも強力な抑制能を有する 2,4-DP (2-(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid)に対しドッキングを実施し比較した (図 2b)。変異体解析により相互作用が示唆されていた残基が、作製したモデルにおいてこれらのリガンドの近傍に位置していた。ラクチゾール (図 2b 中、グレー)と 2,4-DP (同、黒)は芳香環の向きに相違が認められ、2,4-DP は His734 のイミダゾール側鎖との  $\pi-\pi$  相互作用がより強かった。この向きの違いが強力な抑制能に寄与していることが推測された。

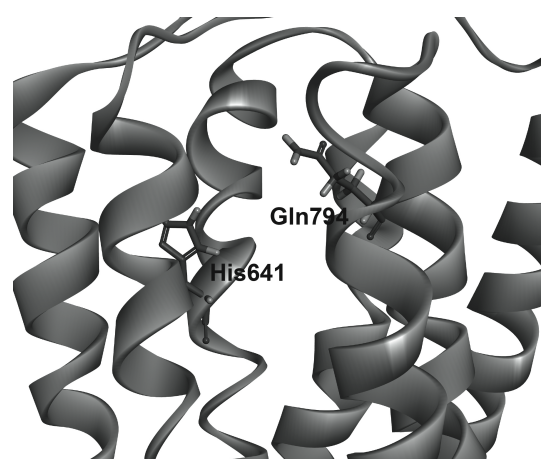


図 2a. T1R3 TMD ホモロジーモデルにおける His641、Gln794 の位置

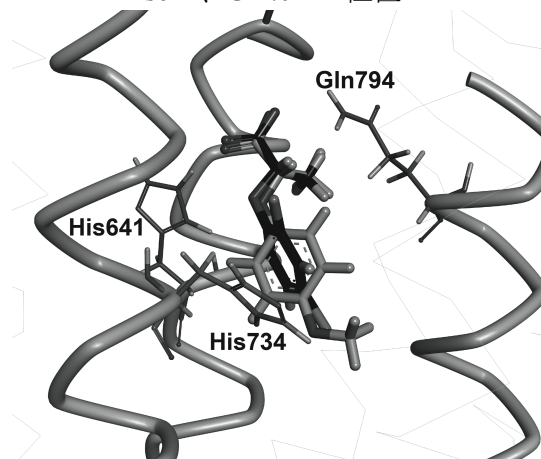


図 2b. ラクチゾール、2,4-DP のドッキング

## ホモロジーモデルを基にした活性型モデルの構築

続いて、T1R3 TMD ホモロジーモデルから、PMCA 活性型モデルの作製を実施した。PMCA の変異体解析結果と、ホモロジーモデルの残基の位置から TM3 Gln636 及び TM6 Leu782 に相互作用すると仮定し、ホモロジーモデルを PMCA と相互作用するよう変形させる induced fitを実施した。この状態から水相、油相を配置した後分子動力学計算を実施し、T1R3 TMD と PMCA との相互作用が最も安定する位置を算出した。100 ns 分の計算を行い、最終的に PMCA による活性型モデルとした。



PMCA 活性型モデルではTM5が大きく折れ曲がり、TM6に接近していた。変異体解析の結果からTM2-3、TM5-6の残基がPMCAと相互作用することが予想されていたが、活性型モデルではこれらの残基がPMCAの近傍に位置していた(図3a)。

また、不活性型モデルと、PMCAによる活性型モデルとをそれぞれ重ね合わせて比較した。この結果を、TM5のみについて図3bに示した(黒：不活性型、グレー：活性型)。活性型ではTM5に存在するHis734が大きく回転し、隣接するTM4のGlu692とのイオン性相互作用が生じていた。これより、His734がT1R3 TMDの活性化に重要な役割を果たしており、このHis734の回転を妨げることが抑制剤として機能するために必要であると考えられた。これは抑制剤作用モデルにおいて、2,4-DPがラクチゾールに比べより強力な抑制能を有していることに一致する。一方、甘味料はTM2,3、TM5,6及びextracellular loop 2(TM4,5間の細胞外ループ)にまたがって相互作用することが可能な、十分な分子長を有することが重要であると考えられた。

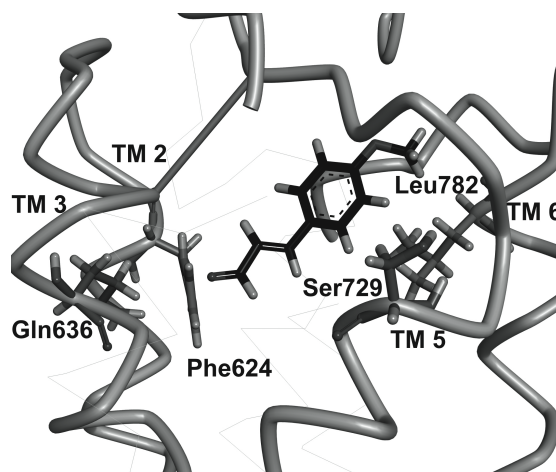


図 3a. PMCA の作用モデル

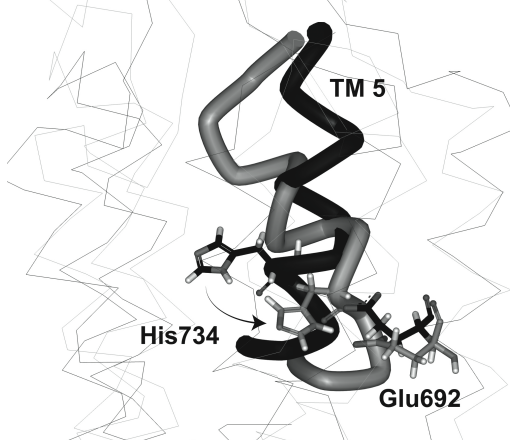


図 3b. 活性型と不活性型の重ね合わせ及びTM5の構造比較

### T1R3 TMD の結晶化を目指したコンストラクトの作製及び精製

甘味料、甘味抑制物質を実用化するにあたって、これらに毒性があってはならない。即ちT1R3の特異性が高く、他の受容体には作用しないリガンドの開発を行う必要がある。これを達成するためには作製したモデル以上に、より厳密な構造を基にしたリガンドデザインが必須となる。そこで、X線結晶構造解析により詳細な構造を取得することを目指し、コンストラクト、精製条件の検討を実施した。

mGluR1 TMDの結晶化条件を参考にしてT1R3 TMDのコンストラクトを作製した。T1R3の膜外領域及びC末端を切断してTMDのみとし、更にTMDのN末端側に安定化タンパク質である熱安定化アポシトクロムb 562RIL (bRIL)を導入した。N末端にはFLAG-tagを、C末端にはEGFPを付加し、TEV-proteaseによる切断が可能な設計にした。このコンストラクトを、昆虫細胞 Sf9 を用いて大量生産した後可溶化、精製を実施した。M1 FLAG抗体レジンをを用いて精製した後に

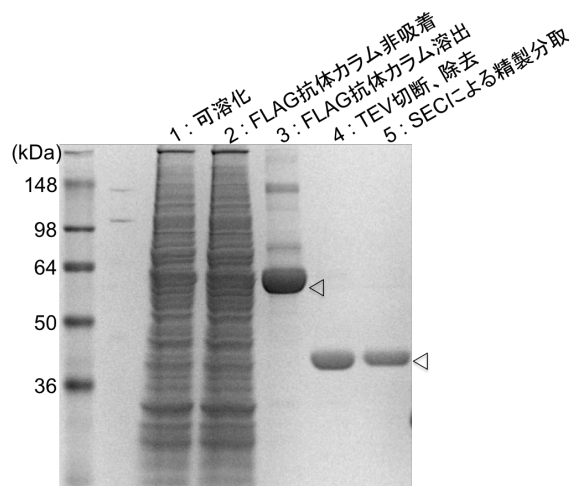


図 4a. bRIL-T1R3 TMD の精製

(図 4a lane3)、tag や EGFP を TEV protease で処理することで、切断、除去した(図 4a lane 4)。これを濃縮、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)で分取したのち再び濃縮することで精製を完了した(図 4a lane 5)。

精製後、得られたタンパク質の純度、安定性を評価するために再度 SEC にかけて(図 4b)。単分散性が保たれていたことから、目的タンパク質は凝集を起こしておらず、構造を保ったまま精製することに成功したと言える。しかしながら現時点では、精製タンパク質の安定性は十分ではなく、結晶を得るまでには至らなかった。

GPCR を含む膜タンパク質では、立体構造を認識する抗体を用いて安定性を上昇させると同時に、結晶格子形成を促進させる手法がしばしば用いられる。そこで今後、得られた精製標品を抗原として用い、立体構造認識抗体の取得した上での結晶化を目指して行く。

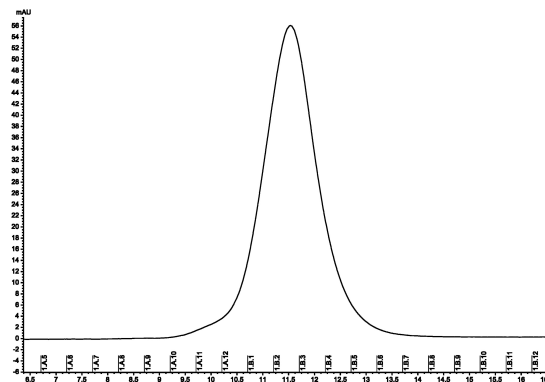


図 4b. 精製後の SEC の結果

## 結論及び展望

本研究では昨年明らかにされた mGluR1 TMD の結晶構造を用いて、T1R3 TMD の解析を実施した。変異体解析により想定された作用部位と一致する甘味抑制剤の作用モデル、及び甘味料の作用モデルを作製することに成功したことから、今後これらのモデルを用いることで新規甘味料、甘味抑制剤の開発が可能になると期待される。また、当研究室において T1R3 TMD に作用する甘味料は他の甘味料に対し少量添加することで相乗的に甘味増強することを明らかにしている。このことから、本研究により開発される新規甘味料は甘味増強能を有する汎用性の高い甘味料であることが期待される。

更に、活性型モデルにおいては TM5 が折れ曲がるという特徴が認められたが、この構造変化は既に明らかにされている class A GPCR の活性型構造とは大きく異なっていた。このことは class C GPCR が膜外領域を有していることに起因する可能性があることから、今後本研究が甘味受容体を含む class C GPCR の活性化機構を明らかにする手がかりとなることが期待される。

また一方で、食品としての応用を考えた際には、結晶構造による綿密なリガンド設計により毒性を考慮することは不可欠である。本研究では T1R3 TMD の単離には成功したことから、今後さらなる手法の改良を行うことで T1R3 TMD の結晶構造解析が可能になると期待される。