

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。

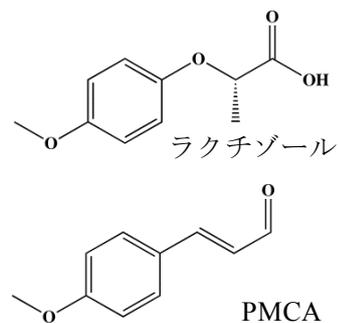


図 1. 抑制剤ラクチゾール及び、甘味料 PMCA

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、IC₅₀ 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、EC₅₀ 値を算出した。野生型に対する変異体の EC₅₀ 値、IC₅₀ 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位置していた(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。

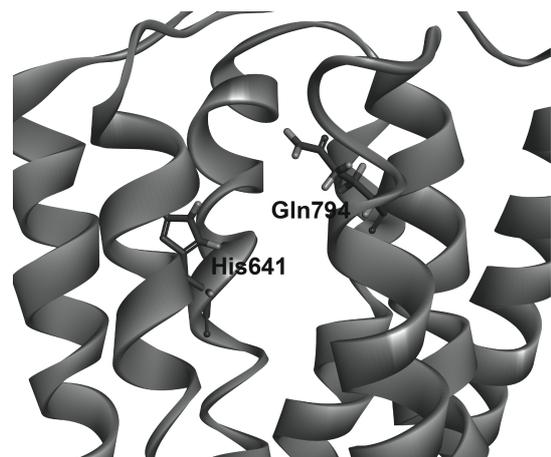


図 2a. T1R3 TMD ホモロジーモデルにおける His641、Gln794 の位置

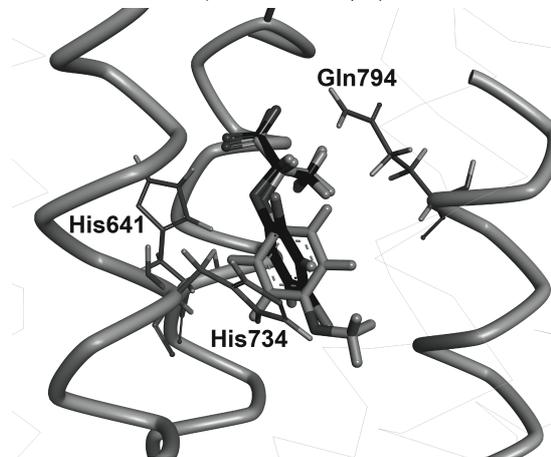


図 2b. ラクチゾール、2,4-DP のドッキング

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。

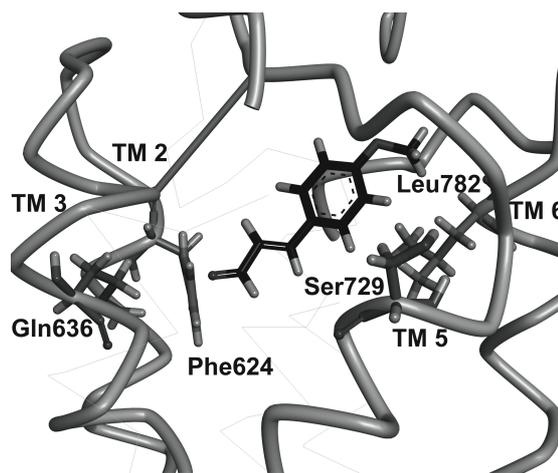


図 3a. PMCA の作用モデル

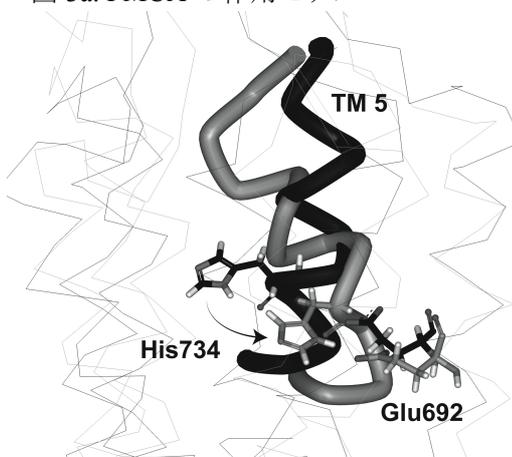


図 3b. 活性型と不活性型の重ね合わせ及びTM5の構造比較

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 b₅₆₂RIL (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

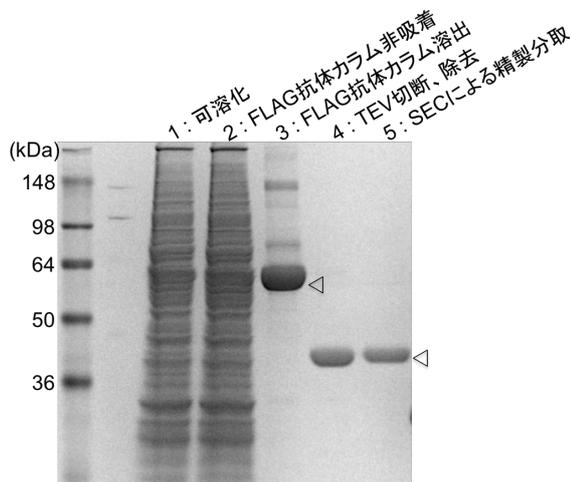


図 4a. bRIL-T1R3 TMD の精製

(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。

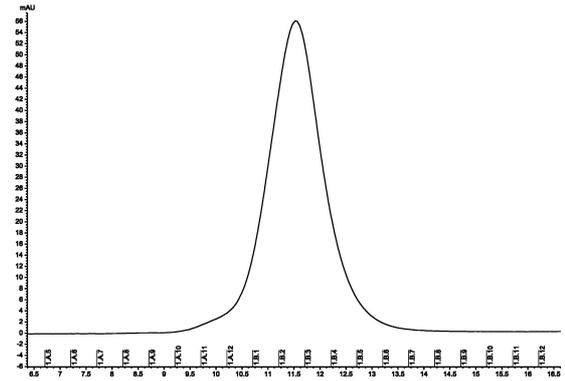


図 4b. 精製後の SEC の結果

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。