

審査の結果の要旨

氏名 中北 智哉

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、甘味抑制剤の双方が作用することが明らかとなっている。T1R3 TMD に作用するリガンドの中でも、甘味料 p-メトキシシンナムアルデヒド(以下 PMCA) 、甘味抑制剤ラクチゾールは異なる応答調節能を有しているにも関わらずその大きさ、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。

そこで本論文では T1R3 TMD における甘味調節物質の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 の類縁体を用いた構造活性相関、網羅的な点変異体解析、及びこれらを基にしたドッキングモデルの作製を行った。

はじめに、甘味受容体 T1R2、T1R3 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に対し、50 種類以上にも及ぶ PMCA・ラクチゾールの類縁構造を有する化合物の投与を実施した。その結果、甘味料・甘味抑制剤それぞれに対して特徴的な構造活性相関が見出された。

次に、T1R3 TMD において、30 を超える残基に対し点変異を導入した甘味受容体を安定的に発現する培養細胞を野生型と同様にそれぞれ作製し、網羅的に点変異体解析を実施した。野生型に対する変異体の EC₅₀ 値、IC₅₀ 値の変化値を指標とすることで、受容体とリガンドの相互作用に密接に関わると考えられる残基の抽出がなされた。多数の残基に対し変異体解析を実施したにもかかわらず、甘味料・甘味抑制剤の受容に関わることが想定された残基はそれぞれ 6-8 残基であったことから、さほど多くはない残基がそれぞれの受容に関わっていることが想定された。

上記構造活性相関及び変異体解析の結果を基にドッキングモデルの作製を実施した。まずは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 を

鋳型として T1R3 TMD の精度の高いホモロジーモデルの構築が行われた。

変異体解析結果から最も影響が大きいと想定された残基と相互作用するよう甘味抑制剤ラクチゾールのドッキングを実施したところ、変異体解析により抽出された全ての残基が近傍に位置するモデルが得られ、かつ甘味抑制剤の構造活性相関を反映したものであった。

一方、甘味料 PMCA はホモロジーモデル上に配置したのちに最適化し、分子動力学計算に処することでドッキングモデルを作製した。PMCA 結合モデルからは、変異体解析の結果より活性化に関わると想定された残基が説明することが可能であり、構造活性相関の結果を十分に反映するものであった。

本論文ではさらに、食品への応用可能なリガンド設計が可能となることを目標に、X 線結晶構造解析により詳細な構造を取得すべく、コンストラクト及び精製条件の検討を実施した。N 末端・C 末端の切断位置を様々に変化させた T1R3 TMD の C 末端に EGFP を融合させたコンストラクトを多数作製し、昆虫細胞 Sf9 を用いて発現させることにより各々の単分散性を測定することにより安定性を評価した。すると、N 末端に安定化タンパク質である bRIL、C 末端に EGFP を有するコンストラクトについては比較的発現量が多く、安定性の高いものであった。

このコンストラクトは、結晶化に向けた厳しい条件における精製には成功しなかったものの、立体構造認識抗体の取得を目指した温和な精製条件の元では単離することに成功した。立体構造認識抗体は単離タンパク質の安定性を大幅に向上させることが可能となることから、結晶化へ向けた条件の改善が期待される。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学または獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。