

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07445

研究課題名(和文) ミラクリン類似タンパク質を用いたミラクリン味覚修飾活性発現機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of taste-modifying mechanism of miraculin using miraculin-like proteins

研究代表者

井深 章子 (SHIMIZU-IBUKA, Akiko)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：60301420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミラクリンと相同性の高いブドウ由来MLP (vvMLP)の大腸菌を宿主とした大量発現系構築、精製条件の確立を行い、X線結晶構造解析を行いvvMLPの立体構造を明らかにした。ミラクリンにおいて二量体化に必須とされるシステイン残基を導入した変異型vvMLPを作製し、シャペロンタンパク質の共発現や菌株の変更により、大腸菌を用いてある程度の可溶性タンパク質を得ることに成功した。精製標品を用いて味覚修飾活性を解析したが、活性は確認できなかった。さらに、大腸菌において可溶性の状態で二量体化したミラクリンを得ることに成功したが、こちらについても味覚修飾活性は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚修飾活性をもつミラクリンの組換えタンパク質の大量生産は難しく、機能解析が進んでいない。本研究では、ミラクリンと60%近い配列が一致するブドウ由来ミラクリン類似タンパク質vvMLPの立体構造を明らかにした。単量体として存在するvvMLPにミラクリン型アミノ酸残基を挿入し二量体化に成功したが、この変異体は味覚修飾活性を有さなかった。大腸菌での可溶性ミラクリン生産にも成功したが、味覚修飾活性は確認されなかった。これらの結果はこれまでの味覚修飾タンパク質の研究結果と異なっており、ミラクリンの味覚修飾活性に糖鎖が重要な役割を果たす可能性を示唆し、今後の研究に一石を投じるものである。

研究成果の概要(英文)：Miracullin-like protein from *Vitis vinifera* (vvMLP) is a protein which is highly homologous to miraculin in primary structure. I constructed its high expression system in *Escherichia coli* and confirmed purification method. Using the purified vvMLP, I solved crystal structure of vvMLP. Our results revealed that vvMLP exists as monomer both in the solution and in the crystal. I introduced several mutation to vvMLP to make dimer vvMLP, since dimerization is mandatory for miraculin to have taste-modifying activity. In all the mutants, most of the protein became insoluble in *E. coli*, but it became more soluble when some chaperon proteins were co-expressed. Soluble mutants were subjected to sensory test, but none of them was shown to have taste-modifying activity.

研究分野：構造生物学

キーワード：甘味タンパク質 味覚修飾活性 ミラクリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

甘味は嗜好される味の代表格であるが、スクロースなどの糖質の過剰摂取は肥満、糖尿病、虫歯といった疾病の原因となる。そのため低カロリー甘味料の探索・開発が行われており、甘味タンパク質もその1つである。一般にタンパク質は無味であるが、現在までに複数の甘味タンパク質・味覚修飾タンパク質（酸味を甘味に変換する活性を有するタンパク質）の存在が知られている。食品では酸味と甘味を同時に付与することが多く、味覚修飾タンパク質も甘味料としての応用が期待される。味覚修飾タンパク質としては、ミラクリンとネオクリンの2種類が同定されている。アミノ酸配列の類似性から、ミラクリンは植物由来トリプシン・インヒビター（タンパク質分解酵素を阻害するタンパク質）ファミリーに分類される。ミラクリンの遺伝子配列は約20年前に報告されたが、組換えタンパク質の大量生産が困難なため、分子レベルでの解析は進んでいない。一方、トリプシン・インヒビターファミリーの中には、特にミラクリンとの相同性が高いタンパク質群“ミラクリン類似タンパク質(Miraculin-Like Proteins, MLP)”が存在する。味覚修飾タンパク質を含む甘味関連タンパク質は熱帯～亜熱帯植物に由来するが、MLPは日本で栽培される様々な植物（ダイズ、ブドウ、ナスなど）に広く存在し、すでにX線結晶構造が報告された分子もある。

申請者はこれまでに味覚修飾活性を有する甘味タンパク質ネオクリンの結晶構造を明らかにした。また、結晶構造に基づいたシミュレーションを行い、酸性pHでopen構造となったネオクリン分子が甘味受容体に結合・活性化するという仮説を導き出した。さらに、ネオクリンの食品添加物としての安全性検証も行った。現在までに立体構造が解析された味覚修飾タンパク質はネオクリンのみであり、この結果だけで味覚修飾活性メカニズムを理解するのは難しい。もう一つの味覚修飾タンパク質ミラクリンの構造解析を行いたいが、ミラクリンの大量発現は困難であり、解析に必要な単一精製標品が得られない。そこで、ミラクリンと相同性が高く、大量発現可能なMLPに味覚修飾活性を付与して解析することを計画した。

2. 研究の目的

ミラクリンは味覚修飾活性を有するユニークなタンパク質であるが、組換えタンパク質の大量調製が困難なため、分子レベルでの解析が進んでいない。また、大腸菌でインクルージョンボディとして発現したミラクリンを可溶化すると活性があると報告されているが、再現には成功しておらず、機器分析もできていない。本研究では、組換えタンパク質発現が比較的容易なミラクリン類似タンパク質を研究対象とし、ミラクリン味覚修飾活性発現メカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。具体的には、以下の研究を進めることを目指した。

- ① MLPの大量発現系・精製方法の確立
- ② ミラクリンの味覚修飾活性発現に重要なアミノ酸（領域）の特定
- ③ MLPおよびミラクリン-MLPキメラタンパク質の構造解析

3. 研究の方法

① MLPの大量発現系・精製方法の確立:

申請者は、MLPの中でも特にミラクリンとアミノ酸配列相同性が高いブドウ、ダイズ、ナンヨウザンショウ由来MLP遺伝子試料を保有している。ダイズMLPについては既に大腸菌・酵母での発現系を構築済みなので、本研究ではブドウ・ナンヨウザンショウ由来MLPの発現系構築を行った。最初に大腸菌での発現を試み、次に酵母を宿主とした発現系構築も試みた。また、発現系構築後は発現条件・精製法を検討・確立した。得られた精製タンパク質を用い、次の項目を実験的に検証した。

- a. 味覚修飾活性の有無
- b. 二量体形成の有無
- c. トリプシン阻害活性

② ミラクリンの味覚修飾活性発現に重要なアミノ酸（領域）の特定:

発現系構築に成功したMLPを用い、ミラクリンとMLPのキメラタンパク質を作成し、それらのキメラタンパク質のうち、発現が確認されるものについて精製を行い、二量体形成と味覚修飾活性を検証した。3種類のMLPの中では、ブドウ由来MLPが最もミラクリンとのアミノ酸配列の相同性が高いことから、ブドウ由来MLPとミラクリンのキメラタンパク質を優先して構築し、解析を進めた。また、ミラクリンの味覚修飾活性には二量体化が重要であると考えられている。ミラクリンでサブユニット間のジスルフィド結合を形成するシステイン残基(Cys138)は、MLPには保存されていない。このシステイン残基の位置も考慮してキメラタンパク質のデザインを行い、ミラクリンにおける二量体形成・味覚修飾活性発現に重要なアミノ酸（領域）の特定を試みた。

③ MLPおよびミラクリン-MLPキメラタンパク質の構造解析:

発現に成功したミラクリン類似タンパク質、および味覚修飾活性を発現したキメラタンパク質について構造解析を行い、味覚修飾活性を有する分子の構造上の特徴を明らかにすることを試みた。具体的には、以下の解析を行った。

- ・ pH依存的な構造変化の検証（円偏光二色性、蛍光等の分光学的解析）
- ・ 立体構造解析（X線結晶構造解析）

4. 研究成果

vvMLP の大量発現系の構築・精製方法の確立：

まず最初に、MLPs 中でも特にミラクリンとのアミノ酸配列相同性が高いブドウ由来 MLP (vvMLP) の大量発現系の構築、精製条件の確立を行った。大腸菌、酵母の両方において発現系の確立に成功した。

味覚修飾活性、二量体形成、トリプシン阻害活性：

大腸菌と酵母で生産した組換えタンパク質は、どちらも同程度の弱いトリプシン阻害活性を有していることが判明したが、味覚修飾活性は確認できなかった。味覚修飾活性を有するミラクリンは二量体として存在するが、vvMLP は溶液中で単量体として存在することがゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量分析により確認された。また、ミラクリンを大腸菌で発現させると不溶化することが報告されているが、vvMLP は可溶性画分に大量に得られた (図 1)。

構造解析：

構築した vvMLP の大量発現系・精製条件を用いて X 線結晶構造解析を行った。vvMLP 精製標品を調製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行ったところ、0.1 M MES buffer (pH 6.5), 12% PEG 6,000 を含むリザーバ液を用いて解析に適した良質な結晶が得られたため、この結晶を用いて高エネルギー加速器研究機構において X 線回折データを収集した。既に立体構造が解析されている *Murraya koenigii* (ナンヨウザンショウ) 由来 MLP (PDB code: 3ZC8) の構造を用いて分子置換法により位相を決定し、1.5-Å 分解能で構造を決定した (図 2)。vvMLP は、ナンヨウザンショウ由来 MLP と同様、β-トレフォイル構造を有していた。結晶中では (His)₈ タグが分子のパッキングに大きく関与しており、vvMLP の二量体形成は見られなかった (図 3)。アミノ酸配列から予想された通り、Cys44-Cys89, Cys140-Cys151, Cys144-Cys147 の 3 つのジスルフィド結合が確認された。pH や熱による構造変化を円偏光二色性で解析しようとしたが、pH 変化に伴いタンパク質の沈殿が生じてしまったため、現時点では解析できていない。

vvMLP 変異体およびキメラタンパク質の可溶化、味覚修飾活性：

vvMLP への部位特異的変異導入では、ミラクリンにおいて二量体化に必須とされるシステイン残基を導入した変異型 vvMLP を作製した。

この変異型酵素は大腸菌で発現させると不溶化したが、シャペロンタンパク質の共発現や宿主大腸菌株の変更により、ある程度の可溶化タンパク質を得ることに成功した。変異型タンパク質の精製標品を用いて味覚修飾活性を解析したが、活性は確認できなかった。さらに、ミラクリンの大腸菌での発現条件・生成条件の再調整を行ったところ、可溶性の状態でも二量体化したミラクリンを得ることに成功した。しかし、こちらについても味覚修飾活性は確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Ohkura, S., Hori, M., Saitoh, K., Okuzawa, T., Okamoto, I., Furukawa, N., Shimizu-Ibuka, A. "Structural and functional analysis of miraculin-like protein from *Vitis vinifera*", *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1866 巻(11号), 2018, 1125-1130.

〔学会発表〕 (計 1 件)

大倉 宗一郎、堀 実佐穂、古川 那由太、井深 章子、ブドウ由来ミラクリン類似タンパク質の構造解析、日本農芸化学会、2017

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

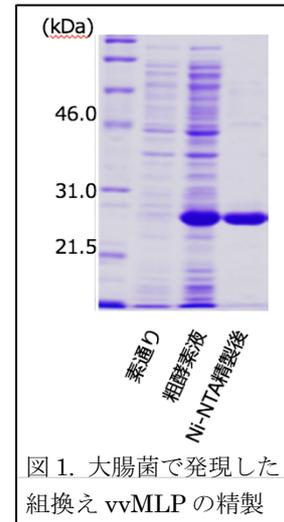


図 1. 大腸菌で発現した組換え vvMLP の精製

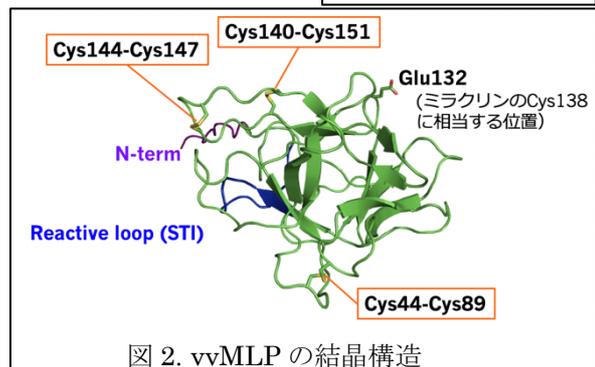


図 2. vvMLP の結晶構造

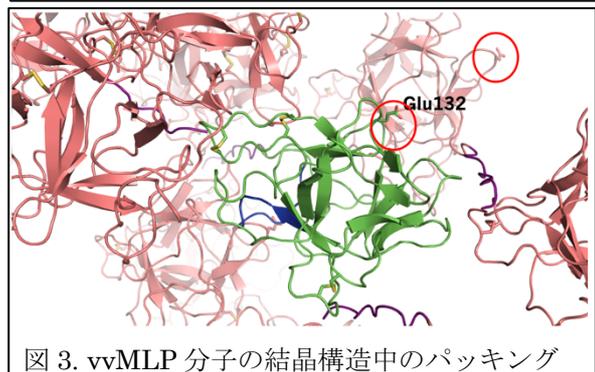


図 3. vvMLP 分子の結晶構造中のパッキング

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究分担者：なし
- (2) 研究協力者：なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。