

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11045

研究課題名(和文) エネルギー受容センサーとしての甘味受容体解析

研究課題名(英文) Analysis of the sweet receptor as an energy sensor

研究代表者

實松 敬介 (Sanematsu, Keisuke)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70567502

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)：甘味修飾物質ミラクリンは、酸性条件下で甘味を誘導するが、強酸と弱酸でその効果が異なり、弱酸で強く甘味誘導を引き起こすことが知られている。本研究では、甘味受容体再構築系を用いてこの謎に迫った。弱酸は、非解離体のまま細胞膜を通過し、細胞内で解離することで、細胞内pHを低下させる。これにより、甘味受容体の細胞内領域がプロトン化され、ミラクリンと甘味受容体の相互作用が促進し、強い甘味誘導が引き起こされることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sweet taste is mediated by the sweet taste receptor, TAS1R2 + TAS1R3, with multiple binding sites for structurally diverse chemical substances. Using the sweet receptor assay in heterologously transfected HEK293 cells, we examined the sweet-modifying effect of miraculin. As a result, intracellular acidification was found to be required for the effect of miraculin.

研究分野：味覚

キーワード：味覚 甘味受容体 ミラクリン

1. 研究開始当初の背景

甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 は、G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、その構造的特徴はサブファミリー分子である mGluR1 の X 線結晶構造解析により明らかにされている。主に下流の G タンパク質を活性化させる 7 回膜貫通ドメイン (TMD)、それに続くシステインを多く含む C リッチドメイン (CRD)、さらに大きな細胞外ドメインを含む N 末端ドメイン (ATD) により構成される。特徴としてヘテロマーを形成することで甘味受容体として機能し、複数の結合ドメインを有することが知られている。例えば、人工甘味料アスパルテムは、ヒト TAS1R2 の N 末端ドメイン、人工甘味料シクラメートはヒト TAS1R3 の膜貫通ドメインに作用する。しかしながら糖類、人工甘味料、甘味アミノ酸、甘味タンパク質等、様々な異なる立体構造を呈する甘味物質に対し、甘味受容を担う TAS1R2/TAS1R3 の機能の多くは不明である。

ミラクリンは、植物・ミラクルフルーツより抽出される糖たんぱく質で、酸性条件下で甘味を呈する甘味誘導効果を有する。この 191 アミノ酸からなる糖たんぱく質は、ホモ二量体を形成することで、甘味誘導効果を有し、その効果はヒトに有効でマウスには無効である。これらの異なる感受性は、系統発生や進化の過程において、食環境に適応した種特異的な甘味受容体のアミノ酸変異に基づくものと推定される。甘味誘導効果の大きさは、酸の種類により異なっており、同じ pH では弱酸の方が強酸よりも甘味誘導を強く引き起こすことが、1969 年に、栗原らにより報告されていた。これまで種差を用いた解析により、ミラクリンは TAS1R2 の N 末端ドメインに作用すること、また、ミラクリン自体の変異解析により、ミラクリンが酸により構造変化を起こし酸性条件下でリガンドとなることで甘味受容体を活性化し、甘味を呈することが示唆されてきた。しかしながら、ミラクリンは細胞外で甘味受容体に作用し、プロトンとの相互作用により甘味誘導効果が引き起こされると考えると、その効果は純粋に pH に依存するはずであるため、弱酸と強酸による感受性の違いがどこから生じるのかは、不明のままであった。

2. 研究の目的

これまで謎であったミラクリンの甘味誘導効果の酸の種類による効果の違いに関し、ミラクリンによる甘味受容体の活性化メカニズム、および甘味受容体とリガンドとの相互作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

甘味受容体 TAS1R2、TAS1R3 および G_i16-gust44 を HEK293 細胞にリポフェクション法により強制発現させた。甘味応答は、カルシウムイメージング法により測定を行い、環流下に甘味溶液、酸溶液、味覚修飾物

質を流し、細胞内カルシウム濃度を測定、味覚修飾効果を評価した。導入遺伝子は、マウス、ヒト TAS1R2/TAS1R3、マウス、ヒト異種間のキメラ体、および点変異を導入した TAS1R2/TAS1R3 を用い、甘味誘導効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 甘味受容体再構築系を用いた解析により、甘味受容体発現細胞は、細胞外 pH を低下させてもカルシウム応答は示さないが、ミラクリン処理後の pH 低下により応答を認め、ミラクリンによる甘味誘導効果を確認した。アミノ酸残基のヒスチジンは pKa が約 6 で、中性条件下では電荷をもたないが、ミラクリンが甘味誘導を引き起こす pH:5~6 付近では、プロトンを受け取る塩基としての性質を有する。電荷が変わることでタンパク質の立体構造に影響を与える可能性が生じる。点変異を用いた解析では、TAS1R2 のヒスチジン残基はミラクリンの甘味誘導効果に重要であり、酸による TAS1R2 自体の構造変化も甘味誘導効果に関与している可能性を示した。つぎに、pH 依存性曲線を得ると、これまでの報告通り弱酸であるクエン酸が、強酸の HCl よりもより強く甘味誘導効果を引き起こすことを示した(図 1a)。TAS1R2 の細胞内領域のヒスチジンに変異を与えると甘味誘導効果が小さくなるとともに強酸と弱酸の差を認めない結果を得た(図 1b)。さらに、細胞内 pH との関係性を調べると、甘味誘導効果は、細胞内 pH 依存的に引き起こされることが分かった(図 1d)。

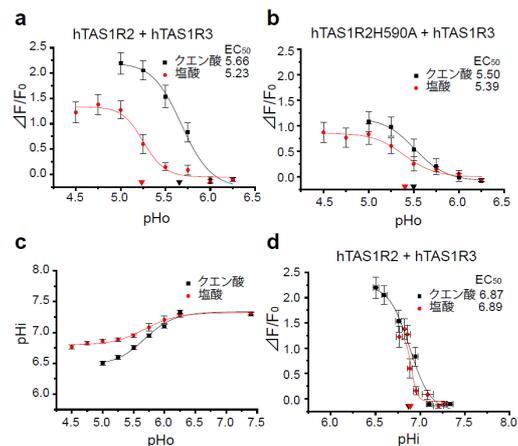


図 1 ミラクリンによる甘味誘導効果
ラクリンの甘味誘導効果の pH 応答曲線 hTAS1R2+hTAS1R3 (a)、hTAS1R2H590A+hTAS1R3 (b)、細胞外 pH と細胞内 pH との関係 (c)、細胞内 pH と甘味誘導効果 (d)。

以上の結果を踏まえて、ミラクリンの甘味誘導効果のモデルを提案する(図 2)。ミラクリンを作用させると、甘味受容体のヒト TAS1R2 の N 末端領域に結合する。中性条件下では、甘味応答は生じない。強酸を作用させ、細胞外 pH が低下すると、ミラクリンの構造

変化および甘味受容体の細胞外領域の構造変化が生じる。その両者の相互作用により、受容体が中程度の活性化状態になり甘味応答が引き起こされる。弱酸の場合、非解離体の割合が多く、細胞膜を通過しやすい。膜通過後に非解離体が解離することで細胞内 pH を低下させる。それにより、TAS1R2 の細胞内領域のヒスチジン残基をプロトン化させ、甘味受容体とミラクリンとの相互作用の強い活性化を促す。このメカニズムにより、弱酸が強酸より大きな甘味誘導を引き起こすものと考えられる。

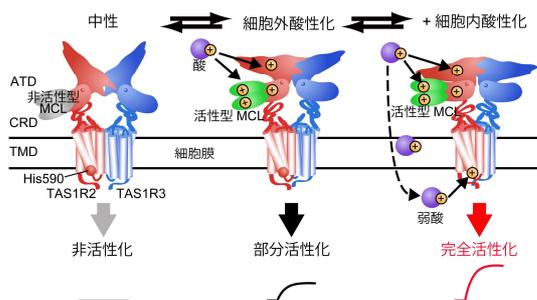


図2 ミラクリン甘味誘導効果のモデル

非活性型ミラクリン (MCL) は、ヒト TAS1R2 の N 末端ドメイン (ATD) に結合し、中性条件下では甘味誘導は生じない (左)。細胞外酸性化によりプロトン化したヒト TAS1R2 の細胞外領域と活性型 MCL の相互作用により甘味受容体の部分的な活性化が生じる (中央)。加えて、弱酸は細胞膜を通過し、細胞内酸性化を生じ、甘味受容体の完全活性化を引き起こす (右)。

(2)本研究では、さらに甘味受容体とリガンドとの相互作用の解明を進めた。その結果、ある生体内条件下で、甘味受容体の人工甘味料に対する応答性が変化することを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

實松 敬介,

甘味受容体と甘味修飾物質との結合特性, 日本味と匂学会誌, 25(1):9-15, 2018

Keisuke Sanematsu, Yuki Nakamura, Masatoshi Nomura, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya.

Diurnal variation of sweet taste recognition thresholds is absent in overweight and obese humans. *Nutrients*, 10(3). pii: E297. 査読有 doi: 10.3390/nu10030297, 2018

Keisuke Sanematsu, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya.

Binding properties between human sweet receptor and sweet-inhibitor, gymnemic acids. *Journal of Oral Biosciences*, 59(3):127-130 査読有 doi: 10.1016/j.job.2017.05.004, 2017

Keisuke Sanematsu, Masayuki Kitagawa, Ryusuke Yoshida, Satoru Nirasawa, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya. Intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor by miraculin. *Scientific reports*, 7(1):17402, 査読有 doi: 10.1038/srep22807 2016

[学会発表](計 5 件)

實松 敬介, 甘味受容体と甘味修飾物質との結合特性, 日本味と匂学会第 51 回大会, 2017

實松 敬介, 重村 憲徳, 二ノ宮 裕三, Intracellular acidification participates in full activation of the sweet taste receptor in taste-modifying effect of miraculin, 第 94 回 日本生理学会大会, 2017

實松 敬介, 重村 憲徳, 二ノ宮 裕三, 甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 におけるギムネマ酸の甘味抑制効果の分子メカニズム, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会, 2016

實松 敬介, 吉田 竜介, 重村 憲徳, 二ノ宮 裕三, ミラクリンによる甘味誘導効果の分子メカニズム, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会, 2016

實松 敬介, 北川 昌幸, 吉田 竜介, 蕪澤 悟, 重村 憲徳, 二ノ宮 裕三, Intracellular acidification is involved in full activation of the sweet taste receptor by miraculin., 17th International Symposium on Olfaction and Taste, 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a06/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

實松 敬介 (SANEMATSU, Keisuke)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：70567502

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

無し ()