

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16192

研究課題名(和文)新規苦味センサーを用いた苦味抑制物質の同定

研究課題名(英文) Investigation on bitter-suppressing reagents using a novel bitter sensor

研究代表者

永井 俊匡 (Nagai, Toshitada)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・准教授

研究者番号：50451844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：苦味の評価をハイスループットを行うため、吸光プレートリーダーのような汎用的な機器で測定できる苦味センサーの構築を目指し、報告者らの以前の研究からの応答性の改善を検討した。低い応答性の原因が、培養細胞へ導入した遺伝子のうち1つの機能不全にあることを実験的に見出し、その遺伝子を安定的に発現する細胞株の構築によって2.3倍、その遺伝子の導入条件検討によって1.6倍の応答性改善に成功した。さらなる条件検討を全ての遺伝子について行った結果、最大でポジティブコントロール薬剤との比で22%まで応答を向上させた。

研究成果の概要(英文)：To establish a bitter sensor for high-throughput evaluation, the easier method with common instruments such as microplate reader was applied in my previous study. In this study, I have improved this method. First, I found out that dysfunction of a transfected gene was responsible for the low responsibility. The response to bitter tastant salicin was increased to 2.3 times by establishing stably expressed cell lines, and was increased to 1.6 times by modifying transfection condition of the gene. At the end of further modification of transfecting all genes, the response was increased to 22% of that to positive control reagent.

研究分野：味覚科学

キーワード：苦味 セルベースアッセイ 受容体

1. 研究開始当初の背景

味覚は、生理学的には食物の栄養素(糖質、アミノ酸)、毒性(苦味)、塩濃度、腐敗度(酸味)を検知するセンサーである。さらにヒトは、苦味や酸味などの本来忌避される味や、辛味や渋味のような五基本味に分類されない味も含めて、生活に潤いを与えるツールとして、食品を賞味している。したがって味覚の伝達機構を明らかにすることは、味覚障害等の疾患の治療に寄与するだけでなく、食品分野において生活の質を向上させる技術の開発につながる。

味は、舌や口蓋の味蕾に発現する味覚受容体によって受容される(図 1)。五基本味のそれぞれを受容する味覚受容体は、最近の約 15 年間でおよそ明らかになった(文献)。うま味・甘味・苦味は、G タンパク質共役型受容体(GPCR)によって受容される。苦味の場合は、T2R(TAS2R)ファミリーというGPCRによって受容される(文献 -)。T2R は、ヒトで 25 遺伝子存在する。

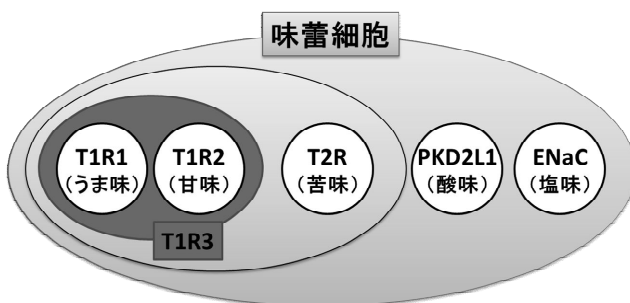


図 1 味覚受容体

報告者らは、苦味受容体の詳細な解明のため、最初に味覚のモデル動物として重要な魚類に注目した。魚類は味覚応答の感度が高く、魚類とヒトを比較することで受容体の感度の機構を明らかにできると考えた。まず、魚類味覚受容体遺伝子の同定を試み、T1R および T2R を発見した(文献)。次に、T1R および T2R のカルシウムイメージング法による機能解析を行い、T1R が L-アミノ酸を、T2R が苦味物質デナトニウムを受容することを突き止め、感度の高さが味覚受

容体に由来することも明らかにした(文献)。

一方で、食品における苦味は、茶、コーヒー、あるいはビールなどのように独特の特色となるが、強すぎる苦味は好まれない。したがって、苦味強度の適正な制御は、食品産業における重要な課題の一つである。苦味抑制物質の探索は、以前から取り組まれており、官能試験による成果としては、ジペプチドである Glu-Glu(グルタミングルタミン酸)などが知られている(文献 ,)。大豆の発酵食品は、その発酵産物である苦味ペプチドの味をほとんど感じない。これは、Glu-Glu などの酸性ペプチドによる抑制が原因である。報告者らは、Glu-Glu などの酸性物質が、ヒト苦味受容体 hTAS2R16 および hTAS2R38 の作用を抑制することを明らかにした(文献)。これは、私たちの日常で起こっている苦味の抑制が、受容体レベルで行われていることを示す最初の報告となった。

2. 研究の目的

上述のように、苦味強度の適正な制御は、重要な課題である。苦味の評価をハイスループットに行う方法として、これまでカルシウムイメージング法によるアッセイが一般的であったが、特殊で高価な測定機器を必要とし、研究環境のハードルを高くしていた(文献)。そこで報告者は、Inoue らの TGF α (Tumor Growth Factor α) 切断アッセイを基に(図 2, 文献)、吸光プレートリーダーのような汎用的な機器で測定できる苦味センサーの構築を目指した。これによって研究環境のハードルが下がり、より多くの研究者によって苦味受容体の解析が進むことが期待される。

報告者の以前の研究で、ヒト苦味受容体 hTAS2R16 のリガンドであるサリシンに対する応答を検出することに成功した(科研費・若手 B, H25-26, 25750028)。しかしサリシンに対する

応答は、有意ではあったものの微弱であった。そこで本研究では、応答強度を改善し、実用に耐えうる苦味センサーの構築を目的とした。

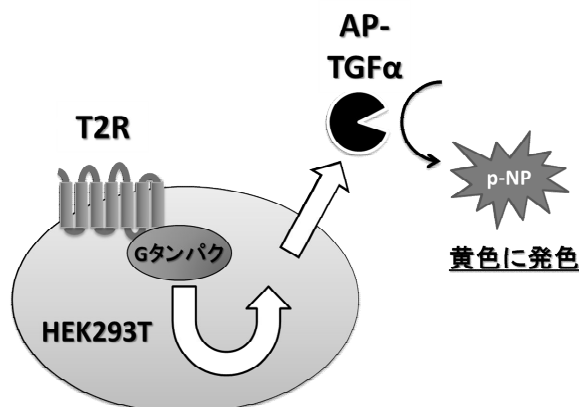


図2 TGF α 切断アッセイ
文献 を基に作成

3. 研究の方法

材料

HEK293T 細胞を、Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5g/L Glucose, Sigma-Aldrich) に fetal bovine serum (Bio West) を 10% 加えた培地を用いて、培養した。

Alkaline Phosphatase (AP)-TGF α 融合タンパク質発現プラスミドを、愛媛大学・東山繁樹教授より供与頂いた(文献)。ソマトスタチン受容体タグ付 hTAS2R16 発現プラスミドは、東京大学・三坂巧准教授より供与頂いた(文献)。キメラ G タンパク質 Ga16gust44 発現プラスミドは、名古屋市立大学・植田高史准教授より供与頂き(文献)。pEAK10 ベクター (Edge Biosystems) にサブクローニングした。このキメラ G タンパク質は、ヒト Ga16 の C 末端 44 アミノ酸を、味蕾特異的 G タンパク質 gustducin に置換したものである。同様に C 末端を Gaz に置換した Ga16/z44 を、三坂巧准教授から供与頂いた。

本研究に使用した他の G タンパク質 (Ga16, Gaq, Gaq/s, Gaq/i1, Gaq/i3, Gaq/o, Gaq/z)

は、Invitrogen Gene Art サービスにて合成し、pcDNA3.1(+)(Invitrogen)へ挿入した。合成の際に、ヒトへのコドン最適化も行った。Gaq/s, Gaq/i1, Gaq/i3, Gaq/o, Gaq/z は、Gaq の C 末端 6 アミノ酸を、それぞれ Gas, Gai1, Gai3, Gao, Gaz に置換したものである。

Ga16gust44 安定発現株の構築

HEK293T 細胞にキメラ G タンパク質 Ga16gust44 発現ベクターをトランスフェクトした。選択薬剤培地 (10 μ g/ml ピューロマイシン) で培養した後に細胞をクローニングし、耐性株を得た。各クローンの細胞から DNA を抽出し、PCR でピューロマイシン耐性遺伝子の導入を確認した。

TGF α 切断アッセイ

12 ウェルプレートに播種した HEK293T 細胞または Ga16gust44 安定発現株に、AP-TGF α 、苦味受容体 hTAS2R16、およびキメラ G タンパク質を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて一過的にトランスフェクトした。24 時間後、細胞を Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) に懸濁して 96 ウェルプレートに再播種し、CO₂ インキュベータ内で 30 分間静置した。その後、リガンドを含んだ HBSS に置換して 3 時間インキュベートし、細胞を刺激した。細胞の応答を評価するために、培養上清を別のプレートに移し、パラニトロフェニルリン酸 (p-NPP) を添加して、AP 反応前後での培養細胞と培養上清の 405 nm における吸光度を測定した。

4. 研究成果

G タンパク質の機能評価

応答が微弱である原因として、トランスフェクトした受容体または G タンパク質が、HEK293T 細胞内で十分に機能していないことが考えられた。そこで、HEK293T 細胞に内在的に発現している β アドレナリン受容体を刺激し、キメラ G タ

ンパク質 Ga16gust44 の機能を評価した(文献)。

B アドレナリン受容体のリガンドであるイソプロテレノールを、AP-TGF α と Ga16gust44を一過的にトランスフェクトした HEK293T 細胞に投与したところ、微弱な応答しか得られなかった(図 3)。一方、G タンパク質の下流に位置するプロテインキナーゼ C の活性化剤(12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, TPA)を投与すると、強い応答が得られた。これらのことから、トランスフェクトした G タンパク質から下流のシグナル伝達系が、細胞内で十分に機能していないことが示唆された。

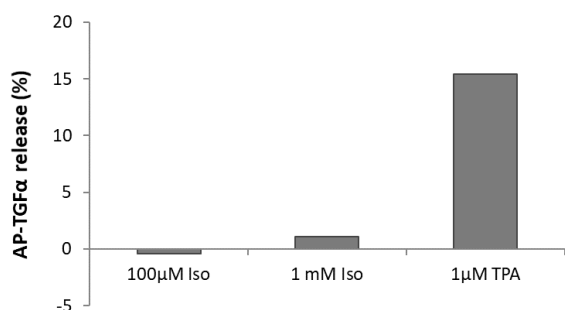


図 3 イソプロテレノール刺激に対する応答

AP-TGF α と Ga16gust44を一過的にトランスフェクトした HEK293T細胞に、イソプロテレノール(Iso)または 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)を投与し、細胞の応答を AP-TGF α 放出率 (%)として評価した。

トランスフェクション条件の検討

G タンパク質の機能不全の原因を、トランスフェクトした遺伝子の発現不十分であると考え、トランスフェクションの条件検討を行った。

まず、一過的な遺伝子導入では G タンパク質が十分機能しない可能性を考慮し、Ga16gust44の安定発現株構築を試みた。その結果、ピューロマイシン耐性株を 17 クローン得ることに成功した。これらの細胞株に TGF α 切断アッセイを行ったところ、検討した 5 クローンのうち 2 クローンで、一過性トランスフェクションよりも高い応答が得られた(図 4)。一過性トランスフェクションの場合と比べて、応答が最大 2.3 倍に上

昇した。しかしながら、その強度は未だハイスルーブットアッセイに耐えるに十分なものとは言えなかった。

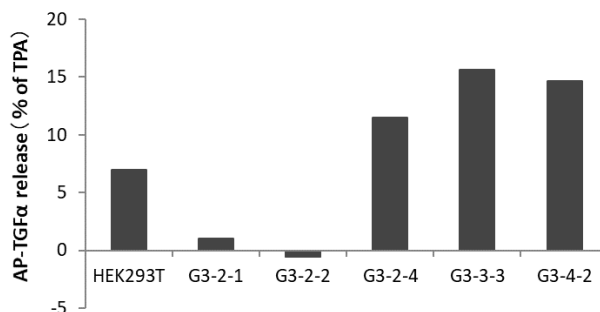


図 4 Ga16gust44 安定発現株の応答

各安定発現株(G3-x-x)には AP-TGF α と hTAS2R16を、HEK293T細胞にはさらに Ga16gust44を、一過的にトランスフェクトした。サリシン刺激時の応答を AP-TGF α 放出率として算出し、TPA 刺激時の応答に対する相対値として評価した。

次に、一過性トランスフェクション時の Ga16gust44 プラスミド量を検討した。図 3 の実験と等量(50 ng/well)、2 倍量(100 ng/well)、または 4 倍量(200 ng/well)の Ga16gust44 をトランスフェクトして、TGF α 切断アッセイを行った。その結果、サリシンに対する応答は Ga16gust44 の DNA 量依存的に応答強度が増加した(図 5)。従来と等量(50 ng/well)の場合と比べて、応答が最大 1.6 倍に上昇した。しかし、その応答は依然として微弱であった。

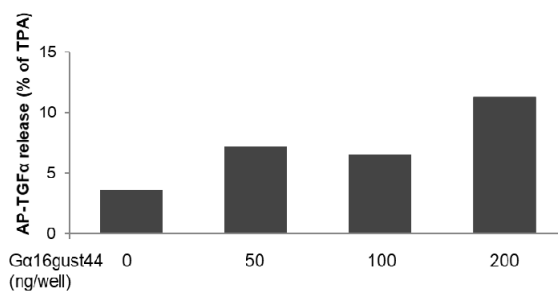


図 5 Ga16gust44 トランスフェクション量の検討

HEK293T 細胞に、AP-TGF α 、hTAS2R16、およびプラスミド DNA 量を変化させた Ga16gust44 を、一過的にトランスフェクトした。サリシン刺激時の応答を AP-TGF α 放出率として算出し、TPA 刺激時の応答に対する相対値として評価した。

キメラ G タンパク質の最適化

図 5 の実験から、さらに条件検討を進めた結果、3 種の遺伝子 (AP-TGF α 、hTAS2R16、G α 16gust44) の全てを、これまでの量の 3 倍 (それぞれ 750, 300, 150 ng/well) トランスフェクトすることで、最も応答が増強されることが明らかになった (図 6)。しかし、抜本的な解決には至らなかった。

そこで G タンパク質の発現が問題なのではなく、G タンパク質が下流へ十分なシグナルを伝達出来ていないのではないかと考え、G α 16 以外の G タンパク質を試験し、最適なキメラ G タンパク質の選抜を行った。その結果、サリシンに対する応答で G α 16gust44 を超える G タンパク質は見出されなかった (図 6)。少なくとも現段階では、G α 16gust44 が苦味センサー構築において最も有用であると考えられる。

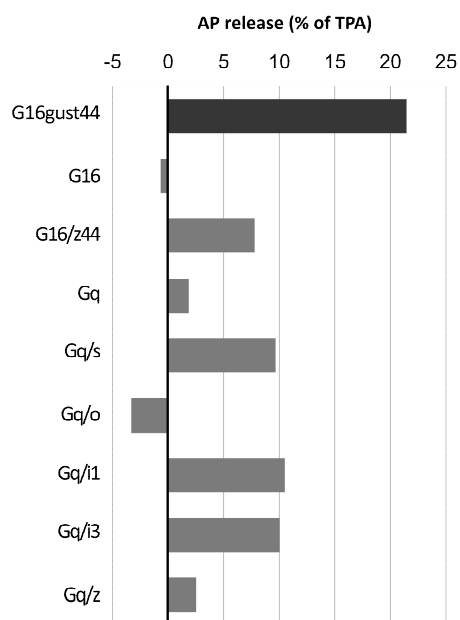


図 6 最適なキメラ G タンパク質の検討

HEK293T 細胞に、AP-TGF α 、hTAS2R16、および各 G タンパク質を、一過的に従来の 3 倍量トランスフェクトした。サリシン刺激時の応答を AP-TGF α 放出率として算出し、TPA 刺激時の応答に対する相対値として評価した。

結論

TGF α 切断アッセイを基にした苦味センサーの構築を目指し、報告者らの以前の研究からの応答性の改善を検討した。低い応答性の原因が G タンパク質の機能不全にあることを実験的に見出し、安定発現株の構築によって 2.3 倍、トランスフェクション量の増加によって 1.6 倍の応答性改善に成功した。さらなる一過性トランスフェクション条件検討の結果、最大で TPA 比 22% まで応答を向上させた。これらの知見を組み合わせた条件検討を加えることで、より実用に耐える苦味センサーを構築することができると考えられる。

< 引用文献 >

永井俊匡. 味細胞内シグナル伝達 苦味. 生物の科学・遺伝 (2012) 66, 632-636.

Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* (2000) 404, 601-604.

Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJ. The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* (2005) 434, 225-229.

Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical Senses* (2010) 35, 157-170.

Ishimaru Y, Okada S, Naito H, Nagai T, Yasuoka A, Matsumoto I, Abe K. Two families of candidate taste receptors in fishes. *Mechanisms of Development* (2005) 122, 1310-1321.

Oike H, Nagai T, Furuyama A, Okada S, Aihara Y, Ishimaru Y, Marui T, Matsumoto I, Misaka T, Abe K. Characterization of ligands for fish taste receptors. *Journal of Neuroscience* (2007) 27, 5584-5592.

Noguchi M, Yamashita M, Arai S, Fujimaki M. On the bitter-masking activity of a glutamic acid-rich oligopeptide fraction. *Journal of Food Science* (1975) 40, 367-369.

Iwasaki K, Sato M. Neural responses and aversion to bitter stimuli in rats. *Chemical Senses* (1981) 6, 119-128.

Sakurai T, Misaka T, Nagai T, Ishimaru Y, Matsuo S, Asakura T, Abe K. pH-Dependent inhibition of the human bitter taste receptor hTAS2R16 by a variety of acidic substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009) 57, 2508-2514.

Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, Aoki J. TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nature Methods* (2012) 9, 1021-1029.

Ueda T, Ugawa S, Yamamura H, Imaizumi Y, Shimada S. Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein α subunits expressed in taste receptor cells. *Journal of Neuroscience* (2003) 23, 7376-7380.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 2 件)

Ogawa M, Nagai T, Saito Y, Miyaguchi H, Kumakura K, Abe K, Asakura T. Short-term mastication after weaning upregulates GABAergic signalling and reduces dendritic spine in thalamus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2018) 498, 621-626. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.03.032. 査読あり

Tanaka M, Yasuoka A, Shimizu M, Saito Y, Kumakura K, Asakura T, Nagai T. Transcriptomic responses of the liver and adipose tissues to altered carbohydrate-fat ratio in diet: an isoenergetic study in young rats. *Genes & Nutrition* (2017) 12, 10. DOI: 10.1186/s12263-017-0558-2. 査読あり

{その他}

ホームページ

http://www.takasaki-u.ac.jp/p_eiyo/1498/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 俊匡 (NAGAI, Toshitada)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・准教授

研究者番号: 50451844