

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19354

研究課題名（和文）味覚受容体の卵形成・初期発生への関与：一卵性の双子が生まれる分子機構の解明

研究課題名（英文）Involvement of taste receptor in oogenesis and early development

研究代表者

山下 敦子（Yamashita, Atsuko）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10321738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：食物に含まれる様々な化学物質を感知する味覚受容体は、卵巣など口腔内以外の様々な組織にも発現している。このことから、味覚感知以外の生理機能を持つ可能性が考えられているが、その多くは不明である。本研究では、味覚受容体変異メダカから生まれた受精卵に発生異常がみられた現象について、生殖・発生における味覚受容体の機能的役割を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、当該の発生異常は、味覚受容体変異を持っていた親メスメダカが原因で起こったもので、そのメダカでは、味覚受容体タンパク質の味物質結合領域で折りたたみ不全が起こり、受容体機能が大幅に減弱していたと考えられることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、味覚受容体分子の構造とそれに基づく分子機能から、生体での機能発現にいたるまでの幅広い観点で、生殖・発生における味覚受容体の機能的役割を明らかにしようとする、独自の萌芽的な取り組みを行ったものである。得られた結果は、味覚受容体が、卵形成などの生殖機能において何らかの関与をしている可能性を示唆するものである。その詳細の解明にはさらなる解析が必要であるが、今後味覚受容体が関与する味覚感知以外の生理機能を理解していく上での基礎的な知見となりうる。

研究成果の概要（英文）：Taste receptors are expressed in various tissues besides mouth, such as ovary, and considered to have physiological functions beyond taste perception. However, their details are mostly unknown. In this study, we addressed a phenomenon that eggs spawned by a female medaka fish with mutations in taste receptors showed abnormal development, in order to elucidate the physiological relevance of taste receptors to oogenesis and early development. The results suggest that the abnormality was derived from maternal factors, where the mutant taste receptors are considered to have folding dysfunction at the taste-substance binding region, resulting in a substantial decrease of receptor functions.

研究分野：構造生物学

キーワード：味覚受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

味覚受容体は、口腔内に存在し、食物に含まれる化学物質を感知するセンサータンパク質である。中でも Taste receptor type 1 (T1r)は、魚類から哺乳類に至るまで、脊椎動物に共通して存在する受容体で、T1r1/T1r3 あるいは T1r2/T1r3 のヘテロ二量体が、それぞれアミノ酸や糖などの栄養素となる味物質の認識を担う[1]。一方で、T1r が、口腔内だけでなく生体内のさまざまな組織に発現している事実が、近年明らかになり始めている[2]。しかし、その多くのケースで、機能的意義は明らかになっていない。

本研究開始前、研究代表者らは、メダカの味覚受容体研究を行う過程で、味覚受容体を構成するタンパク質である T1r3 の遺伝子破壊を試みた。すると、ゲノム編集によるフレームシフト変異を導入したメスメダカが産卵した卵に、野生型 (T1r3 変異導入を行っていないメダカ) のオスの精子を受精させた受精卵で、約 1/10 程度の頻度で、発生異常が見られることを見出した。味覚受容体の卵形成や発生などの過程における関与は、知る限りにおいてこれまで報告がない。一方で、T1r はヒト卵巣での発現も確認されており、その生理的意義に関する研究報告はないものの、何らかの生殖・発生機能に関与している可能性がある。また、精巣・精子にも T1r 発現が報告されており、精子形成などに関わる可能性も示唆されている。

これまで T1r の解析は、動物・細胞実験レベルにとどまっており、タンパク質分子レベルでの解析は進んでいなかった。これは、ヒトやマウス由来のものを含むほとんどの味覚受容体で、組換え発現が困難で、精製タンパク質試料調製が進んでいなかったからである。一方、研究代表者らは、広範な発現スクリーニングを行った結果、唯一メダカ由来の T1r2a/T1r3 について、機能単位であるヘテロ二量体として味物質結合領域を発現・精製することに成功し、味覚受容体としてはじめてその立体構造を明らかにした [3,4]。この研究過程において、同領域を用いた各種機能・構造解析プラットフォームを確立している。そこで、受容体分子の構造とそれに基づく分子機能から、生体での機能発現にいたるまでの幅広い観点で、卵形成・初期発生の過程を解析することで、味覚受容体変異によって発生に異常が生じた分子メカニズムを解明するとともに、生殖・発生における味覚受容体の機能的役割を明らかにすることができると考えた。

2. 研究の目的

味覚受容体変異によってメダカに発生異常が生じた分子機構を明らかにするとともに、卵形成や初期発生における味覚受容体の機能的役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) メダカ解析

メダカ系統 d-rR/TOKYO および OK-Cab は、28 °C で明期 14 時間暗期 10 時間の条件で飼育した。味覚受容体変異は、T1r3 遺伝子を標的とし CRISPR/Cas9 法により導入した。遺伝子型解析は、胚または孵化後の個体の尾ビレの一部からゲノムを抽出し、CRISPR/Cas9 での標的配列近傍を PCR で増幅して、当該領域の遺伝子配列を解析することで行った。なお、味覚受容体変異導入および一部のメダカ飼育は、研究協力者との共同研究により実施した。

(2) 味覚受容体解析

味覚受容体変異は各種 T1r3 発現ベクターに対し PCR 法により導入した。T1r2a/T1r3 味物質結合領域の分泌発現解析は、T1r2aLBD-Celurean-FLAG タグ/T1r3LBD-Venus-FLAG タグ融合タンパク質[3]をショウジョウバエ S2 細胞を用いて一過性発現し、細胞培養培地中の発現タンパク質を、抗 FLAG タグ抗体、抗 T1r2a 抗体、抗 T1r3 抗体をそれぞれ用いた Western blotting 法により検出することで実施した。同領域の構造形成は、同じ試料を用いた多色蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー(MC-FSEC)で解析した[4]。T1r2a/T1r3 全長受容体の細胞膜移行は、細胞外 N 末端にそれぞれ c-Myc タグあるいは FLAG タグを融合した T1r2a/T1r3 を HEK293 細胞に共発現させ、それぞれに対するタグ抗体を用いた免疫染色により確認した[5]。T1r2a/T1r3 全長受容体の応答解析は、T1r2a/T1r3 と、同受容体と共役可能なキメラ G タンパク質を共発現させた HEK293 細胞を用い、カルシウム指示薬 Fluo-8 (AAT Bioquest)と FLEX station 3 (Molecular Devices)を利用して、同受容体に作用する味物質であるアミノ酸添加時の細胞内カルシウム濃度上昇を測定することで実施した[3]。いずれの実験においても、野生型 T1r2a と、野生型または変異を導入した T1r3 を共発現し、T1r3 への変異導入による受容体構造形成・機能の変化を野生型と比較することで解析した。なお、膜移行解析と応答解析は、研究協力者との共同研究として実施した。

4. 研究成果

(1) 発生異常が生じたメダカの味覚受容体変異の遺伝子型解析

発生異常が生じた受精卵を産んだ遺伝子編集 G0 メスメダカは、CRISPR/Cas9 法により T1r3 に変異導入をしたものであり、複数種の変異が導入されていたと考えられた。そこで、当該メダカより生まれ発生異常が生じた個体と、同じ雌雄ペアから生まれ発生異常が確認できなかった個体それぞれにおいて、どのような味覚受容体変異が導入されていたかを確認した。その結果、発生異常が生じた個体からは、インフレームでの翻訳が起こる 33 塩基対欠失変異 2 種、フレームシフトにより翻訳停止が起こる 7 塩基対欠失 1 種、7 塩基対欠失 8 塩基対挿入 1 種の計 4

種類の変異が確認された。一方で、発生異常が見られなかった個体についても、同じ種類の変異が確認された。この結果から、発生異常は子に特定の T1r3 変異が導入されたことで起こったのではなく、T1r3 変異を持つ母体要因で起こったことが示唆された。

これらのメダカを T1r3 変異非導入メダカと交配し、F3 世代までの交配を行ったが、当該変異をヘテロ接合型として持つ個体は確認されたものの、発生異常の再現は得られなかった。これらの結果から、発生異常は T1r3 変異を有していれば必ず出現するものではなく、少なくともヘテロ接合型として変異を有する場合には、観察した限りにおいて発生異常は現れないことが明らかとなった。

そこで、当初発生異常が確認された d-rR/TOKYO 系統およびそれとは異なる OK-Cab 系統の 2 種で、発生異常が確認されたときと同一の配列を標的として CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集の追試を行った。得られたゲノム編集メダカを用いて、発生異常を確認したときと同様に交配を行ったが、子に発生異常は確認できなかった。これらの追試ゲノム編集メダカで確認された変異の一部は、発生異常を示したメダカで見られた変異と共通していたが、発生異常を示したメダカで確認された変異の一部は、追試ゲノム編集メダカでは確認されなかった。なお、ここまでの交配・ゲノム編集実験で得られたメダカについて、その他の顕著な表現型は観察されなかった。

以上、本研究から得られた結果から、発生異常が生じた卵を生んだ母メダカでは、追試では再現されなかった特定の T1r3 変異が生殖関連組織に導入されていたなど、ある特定の条件下で、卵形成時に異常が起こっていたなどの可能性が考えられた。

(2) 変異味覚受容体の構造形成・機能解析

発生異常を示したメダカで見られた T1r3 変異は、いずれも受容体の N 末端側で細胞外に位置する味物質結合領域に導入されていた。これらの変異を、研究代表者らが解析した立体構造 [4]上にマッピングすると、翻訳停止変異では、T1r2 との相互作用部位は一部形成されるものの、機能部位や独立した構造ドメインは形成されずに翻訳が停止する一方、インフレーム欠失変異では、C 末端まで翻訳されるものの、受容体に作用する味物質であるアミノ酸が T1r3 に結合する部位の一部が欠失することが明らかとなった。メダカには T1r1/T1r3, T1r2a/T1r3, T1r2b/T1r3, T1r2c/T1r3 の 4 種類の T1r ヘテロ二量体によるアミノ酸受容体が存在し、T1r3 はそれら全ての共通の構成要素である。そこで、観察された T1r3 変異が、T1r 受容体機能にどのような影響を与えるかを明らかにするため、組換え発現による構造・機能解析系が確立されている T1r2a/T1r3 をモデル受容体とし、発生異常を示したメダカで見られた変異と同一の変異を導入して、受容体構造形成および受容体機能を解析した。

味物質結合領域の Western blotting および MC-FSEC 解析の結果、野生型 T1r2 と共発現させた T1r3 変異体は、いずれの変異においても分泌発現を示したが、野生型 T1r3 の場合と比較し分泌発現量が減少しており、多くの割合で折りたたみ不全が起こっていることが判明した。この結果、T1r2 とヘテロ二量体を形成している分子種が大幅に減少していることが明らかとなった。また、全長受容体の細胞膜移行を確認した結果、T1r3 翻訳停止変異体では、T1r2, T1r3 のいずれも膜移行を示さなかった一方、T1r3 インフレーム変異体では、受容体の膜移行自体は確認された。そこでさらに、膜移行の見られた変異体について、当該受容体に作用する味物質であるアミノ酸に対する応答を確認したところ、野生型と比較して応答能が大幅に減弱していることが判明した。これらの結果から、T1r3 変異導入により、T1r3 味物質認識領域での折りたたみ不全が起こった結果、T1r2a/T1r3 受容体の機能喪失が起こることが示唆された。

なお、今回 T1r3 とのヘテロ二量体受容体モデルとして用いた T1r2a は、T1r1, T1r2b, T1r2c ともある程度の相同性が見られることから、他の T1r 受容体でも、今回 T1r2a/T1r3 で観察されたものと同様の受容体機能喪失があったものと考えられる。

以上、本研究から得られた結果から、発生異常が生じた卵を生んだ母メダカでは、T1r3 の変異により起こった味物質認識領域での折りたたみ不全により、T1r 全般の受容体機能が大幅に減弱していたため、卵形成時などに異常が発生した可能性があることが示唆された。この知見は、味覚受容体が、卵形成などの生殖機能において何らかの関与をしていることを示唆するものである。一方で、本研究では、当初観察された発生異常そのものの再現はできなかったため、この発生異常が味覚受容体変異以外の要因で生じた可能性は否定できない。今後異なる手法で味覚受容体機能を欠損させた個体で追試を行うなど、さらなる解析が必要である。

< 引用文献 >

- [1] Yarmolinsky DA, *et al.* “Common Sense About Taste: From Mammals to Insects” *Cell* (2007) **139**, 234-244.
- [2] Foster SR, *et al.* “Extrasensory perception: Odorant and taste receptors beyond the nose and mouth” *Pharm. Ther.* (2014) **142**, 41-61.
- [3] Nango E, *et al.* “Taste substance binding elicits conformational change of taste receptor T1r heterodimer extracellular domains” *Sci. Rep.* (2016) **6**, 25745.
- [4] Nuemket N, Yasui N, *et al.* “Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors” *Nat. Commun.* (2017) **8**, 15530.

[5] Shimizu M, *et al.* “Distinct human and mouse membrane trafficking systems for sweet taste 1 receptors T1r2 and T1r3” *PLOS ONE* (2014) **9**, e100425.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshida T, Yasui N, Kusakabe Y, Ito C, Akamatsu M, Yamashita A	4. 巻 14
2. 論文標題 Differential scanning fluorimetric analysis of the amino-acid binding to taste receptor using a model receptor protein, the ligand-binding domain of fish T1r2a/T1r3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0218909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0218909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 山下敦子	4. 巻 37
2. 論文標題 食行動と栄養摂取をむすぶ味覚受容体による味分子認識	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 31-535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Behrens Maik, Briand Loic, de March Claire A, Matsunami Hiroaki, Yamashita Atsuko, Meyerhof Wolfgang, Weyand Simone	4. 巻 43
2. 論文標題 Structure-Function Relationships of Olfactory and Taste Receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Senses	6. 最初と最後の頁 81~87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/chemse/bjx083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 細谷 麻以子, 山下 敦子	4. 巻 7
2. 論文標題 うま味受容体細胞外リガンド結合ドメインのX線結晶構造解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SPring-8/SACLA利用研究成果集	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.189567/rr.7.1.37	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 食品成分と生体のインターフェース・味覚受容体による味物質認識の構造基盤
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第37回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuko Yamashita
2. 発表標題 A fish taste receptor opened the way for structural biology of taste perception
3. 学会等名 The 18th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤千晶、安井典久、渥美菜奈子、山下敦子
2. 発表標題 味覚受容体T1R2/T1R3リガンド結合領域カチオン結合部位の構造生物学的解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田高志、安井典久、伊藤 千晶、山下敦子
2. 発表標題 T1r1-T1r3味覚受容体味物質認識領域の構造生物学的解析
3. 学会等名 新学術領域研究（研究領域提案型）「化学コミュニケーションのフロンティア」第5回公開シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤千晶、高科百合子、安井典久、山下敦子
2. 発表標題 味覚受容体T1rへの1価カチオン結合の構造生物学的解析
3. 学会等名 新学術領域研究(研究領域提案型)「化学コミュニケーションのフロンティア」第6回公開シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuko Yamashita
2. 発表標題 Taste perception approached by biophysics and structural biology
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuko Yamashita
2. 発表標題 Structural basis for recognition of preferable taste substances by T1r taste receptors
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田 高志, 安井 典久, 渥美 菜奈子, 山下 敦子
2. 発表標題 サーマルシフトアッセイによる味覚受容体細胞外領域に対するアミノ酸の結合解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田 涼希, 安井 典久, 山下 敦子
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴法による味覚受容体T1R細胞内C末端領域とカルシウム結合タンパク質の相互作用の速度論的解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Yoshida, Norihisa Yasui, Nanako Atsumi, Yuko Kusakabe, Atsuko Yamashita
2. 発表標題 Protein thermal shift assay indicated a broad amino acid-binding capability of the ligand-binding domains of fish T1r taste receptor
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 喜多志保子, 日下部裕子, 山下敦子
2. 発表標題 味覚受容体T1R2/T1R3の甘味物質応答に対する亜鉛イオンの作用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuko Yamashita
2. 発表標題 Structural basis of amino acid-perception by T1r taste receptors
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 味覚受容体による味物質応答の相関構造解析
3. 学会等名 平成30年度第1回構造生物学研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 味物質-味覚受容体の構造生物学研究による化学コミュニケーションの理解
3. 学会等名 新学術領域研究（研究領域提案型）「化学コミュニケーションのフロンティア」第3回公開シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Yoshida, Norihisa Yasui, Atsuko Yamashita
2. 発表標題 Amino acid-binding characteristics of the ligand-binding domains of taste receptors analyzed by thermal shift assay
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Chemical Communication (ISCC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 味覚受容体細胞外領域による味物質認識の構造基盤
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー・SPring-8先端利用技術ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 多様な化学シグナルを感知する味覚受容体味物質認識領域の構造と機能
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyuki Maruhashi, Daisuke Noshiro, Norihisa Yasui, Toshio Ando, Atsuko Yamashita
2. 発表標題 Expression, purification, and characterization of the entire heterodimeric extracellular regions of fish taste receptor
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渥美菜奈子、安井典久、山下敦子
2. 発表標題 X線結晶構造解析によるメダカT1r2a/T1r3細胞外領域への無機金属イオン結合解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第51回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nipawan Nuemket, Norihisa Yasui, Yuko Kusakabe, Yukiyo Nomura, Nanako Atsumi & Atsuko Yamashita
2. 発表標題 Crystal structures of the ligand-binding domains of taste receptor T1r heterodimer
3. 学会等名 The 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 味覚受容細胞で起こる味覚の初反応への構造生物学的アプローチ：味覚受容体細胞外領域の構造解析
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 体外からの栄養素を感知する味覚受容体の構造基盤
3. 学会等名 日本薬学会第138年 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考