

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09523

研究課題名(和文) 全身に発現する味覚受容体の分子・生理・病態機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular, physiological, and pathological functions of taste receptors expressed throughout the body

研究代表者

實松 敬介 (Sanematsu, Keisuke)

九州大学・歯学研究院・講師

研究者番号：70567502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの甘味修飾物質ミラクリンの解析により、甘味受容体TAS1R2+TAS1R3は、酸性条件下でリガンドに対する感受性を変化させる可能性が示唆された。そこで甘味受容体再構築系および分子シミュレーションを用いて、人工甘味料サッカリンの作用メカニズムを調べた。サッカリンは、hTAS1R2のアミノ末端領域に結合して甘味分子として受容体を活性化する。高濃度では、hTAS1R3の膜貫通領域にも結合し、アンタゴニストとして抑制作用を示すが、pHが下がるとこの結合が強くなり、抑制作用を増強することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、他のクラスC Gタンパク質共役型受容体の二量体構成に重要な知見を与える。また甘味受容体は環境pHによって感受性の制御を受ける可能性が示唆された。このことは酸味と甘味の相互作用が受容体レベルでも生じることを明らかにした。また、がん組織や炎症組織など、pHが下がる生態環境において、他のGタンパク質共役型受容体の感受性においても変化する可能性が示唆され、その機能制御にも重要な知見を与える。

研究成果の概要(英文)：Our previous study suggests that the sweet receptor TAS1R2/TAS1R3 may alter the sensitivity to ligands under acidic conditions. Therefore, we tried to clarify how the sweet taste receptor changes their sensitivities due to pH changes. As a result, the artificial sweetener saccharin binds to the amino-terminal domain of hTAS1R2 as an agonist. At high concentrations, saccharin also binds to the transmembrane domain of hTAS1R3 as an antagonist. Under low pH conditions, our results suggest that saccharin stably binds to this domain to enhance the inhibitory effect.

研究分野：味覚

キーワード：味覚 味覚受容体 甘味 Gタンパク質共役型受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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 回膜貫通領域、それに続くシステインを多く含むシステインリッチド領域、さらに大きな細胞外領域を含むアミノ末端領域により構成される(図)。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、複数の結合領域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ームは、ヒト TAS1R2 のアミノ末端領域、人工甘味料シクラメートはヒト TAS1R3 の膜貫通領域に作用する。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。申請者らはミラクリンの機能解析により、低 pH でミラクリンが甘味受容体に作用する際、ミラクリンの構造変化だけでなく、甘味受容体の酸性化が甘味受容体とミラクリンの相互作用を強く促すことを明らかにしている¹⁾。このことから、甘味受容体 TAS1R2+TAS1R3 は、酸性条件下でリガンドに対する感受性を変化させる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) 甘味受容体が二量体化し、機能受容体として構成するメカニズムの解明と、(2) pH 変化により甘味受容体の活性化能が変化するのか、またそのメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

発現プラスミドの準備

hTAS1Rs、mTAS1Rs、TAS1Rs キメラおよび G₁₆-gust44 (G₁₆ の C 末端側 44 アミノ酸配列を、味細胞発現 G プロテイン サブユニット: Gustducin の相当部と置き換えたキメラ体) は、pEF-DEST51 vector (inviatorogen) にサブクローニングした。TAS1R2/TAS1R3 のマウス/ヒトのキメラおよび G₁₆-gust44 は、オーバーラッピングプライマー、変異導入プライマーを用いて PCR にて作成した。サブクローニングに際し、それぞれの遺伝子には、Kozak 配列を開始コドン前の 5' 末端に導入した。全ての DNA コンストラクトは、DNA シークエンスにて配列を確認した。

強制発現

ヒト腎性胚細胞 (HEK293 細胞) は、10% fetal bovine serum を加えた Dulbecco 's modified Eagle 's medium 中に 37 °C、5% CO₂ 下にて培養を行った。細胞は、コンフルエントになる前に 2 日おきに継代を行い、起こしてから 2 ヶ月経ったものは廃棄し、新しいストックを起こした。35 mm ディッシュに蒔いた 24 時間後 (60~70%コンフルエント)、トランスフェクションを行った。プラスミド DNA は、1 µg の TAS1Rs および G₁₆-gust44、リポフェクション試薬として Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) (1 µg DNA あたり 2.5 µl) を使用した。

カルシウムイメージング

トランスフェクションを行ってから 24 時間後、5 µM fluo-4/AM (Invitrogen) を 37 °C で 30 分間ロードした。培地を捨てた後、測定用液 (10 mM HEPES を加えた Hank 's balanced salt solution (HBSS pH 7.4) にて 2 回細胞を洗った。5 分間測定溶液にて灌流を行い、その後カルシウムイメージングを行った。味溶液は測定溶液に味物質を溶解させ用いた。ペリスタポンプを用いて測定用液を灌流させ (1 ml/分)、味刺激は 25 秒間行った。細胞内カルシウム濃度は、AQUA COSMOS Ca²⁺-imaging system (Hamamatsu Photonics) を用いて測定を行なった。各種甘味溶液に細胞内カルシウム濃度の上昇を示した細胞を遺伝子発現細胞として解析に使用した。

分子モデリング

mGluR1 を鋳型にしてホモロジーモデリングを行った。リガンドの立体構造は、量子化学計算プログラム Gaussian 16 を用いて構造最適化を行った。Autodock を用いて結合シミュレーションを行い、リガンド-受容体複合体を作製した。CHARMM-GUI (<http://www.charmm-gui.org/>) を用いてリガンド-受容体複合体を脂質二重膜中に浮かべ、上下に水とイオンを配置することで細胞膜中の受容体環境を再現した。分子動力学ソフト AMBER を用いて複合体の結合動態をシミュレートした。動力学計算は、九州大学情報基盤研究開発センターのスーパーコンピュータシステム ITO を用いて高速計算を行った。

4. 研究成果

- (1) 膜発現およびパートナーサブユニット TAS1R3 との共輸送を調節する細胞内保持モチーフを同定した。高発現する TAS1R2 変異体を用いて、TAS1R3 との共輸送のための網羅的変異スクリーンにより、全構造領域内における全体のサブユニットにわたる二量体化サイトを同定した。また、TAS1R2 変異体と TAS1R3 を HEK293 細胞に発現させ、カルシウムイメージングにより、甘味応答を調べた。その結果、発現細胞は応答を示し、本実験で用いた TAS1R2 変異体は、甘味受容体として機能することを確認した。さらに、システインリッチ領域の C 末端側が適切に折りたたまれることが、TAS1R3 との二量体化および共輸送に必要であることが分かった (Park *et al.*, JBC, 2019)。
- (2) HEK293 細胞に hTAS1R2/hTAS1R3 を発現させてカルシウムイメージングを行い、甘味物質に対する pH の影響を調べたところ、人工甘味料サッカリンの濃度応答が低 pH (5.0) で低下することが明らかになった。この pH 依存的なサッカリン濃度応答変化に種差があるか確認するため、mTAS1R2/mTAS1R3 で同様の実験を行ったところ、マウス甘味受容体では、認められなかった。このことから、pH 依存的なサッカリン濃度応答変化には、ヒト マウス間で種差があり、ヒト特異的な現象であることが明らかになった。この現象が甘味受容体の 2 つのサブユニットのどちらで生じているかを調べるため、hTAS1R2/mTAS1R3 の異種間の組み合わせの受容体を発現させたところ、pH 依存的なサッカリン濃度応答変化は認められなかったことから、TAS2R3 が種特異的な現象に影響を与えていることが分かった。次により詳細な解析として甘味受容体のどの領域がこの効果に重要であるかを調べたところ、TAS1R3 の膜貫通領域が関与していることが明らかになった。さらに同領域に点変異を加えたところ、サッカリン感受性の pH 依存性の減少を認めた。分子動力学シミュレーション解析により、サッカリンはヒト TAS1R3 の膜貫通領域に低 pH でより強く結合することで、サッカリン本来のアゴニストの作用を減弱させる可能性が考えられた。これらの結果から、TAS1R3 の膜貫通領域には pH 感受性ネガティブアロステリックモジュレーターサイトが存在し、甘味受容体は環境 pH によって感受性の制御を受ける可能性が示唆された(図)。

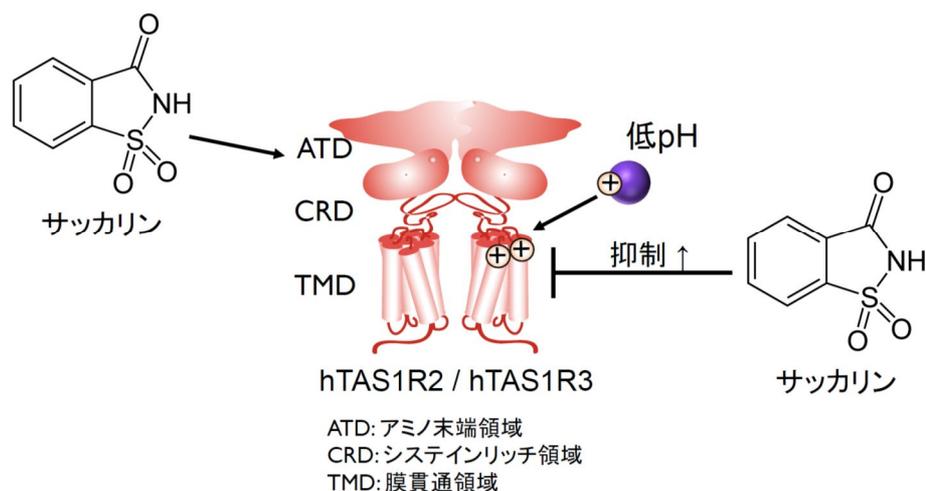


図 サッカリンの甘味受容体に対する作用メカニズム

サッカリンは、hTAS1R2 のアミノ末端領域に結合し、アゴニストとして受容体を活性化する。高濃度では、hTAS1R3 の膜貫通領域にも結合し、アンタゴニストとして抑制作用を示す。pH が下がるとこの結合が強くなり、抑制効果が増強される。

引用文献

1. Sanematsu K, Kitagawa M, Yoshida R, Nirasawa S, Shigemura N, Ninomiya Y., Intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor by miraculin. *Sci Rep.* 10;6:22807, 2016
2. Park J, Selvam B, Sanematsu K, Shigemura N, Shukla D, Procko E., Structural architecture of a dimeric class C GPCR based on co-trafficking of sweet taste receptor subunits. *J Biol Chem.* 294(13):4759-4774, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takai Shingo, Watanabe Yu, Sanematsu Keisuke, Yoshida Ryusuke, Margolskee Robert F., Jiang Peihua, Atsuta Ikiru, Koyano Kiyoshi, Ninomiya Yuzo, Shigemura Noriatsu	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of insulin signaling on mouse taste cell proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225190	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 該当する
1. 著者名 Shigemura Noriatsu, Takai Shingo, Hirose Fumie, Yoshida Ryusuke, Sanematsu Keisuke, Ninomiya Yuzo	4. 巻 11
2. 論文標題 Expression of Renin-Angiotensin System Components in the Taste Organ of Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2251 ~ 2251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11092251	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 Park Jihye, Selvam Balaji, Sanematsu Keisuke, Shigemura Noriatsu, Shukla Diwakar, Procko Erik	4. 巻 294
2. 論文標題 Structural architecture of a dimeric class C GPCR based on co-trafficking of sweet taste receptor subunits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4759 ~ 4774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.006173	査読の有無 有
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 Osaki A, Sanematsu K, Yamazoe J, Hirose F, Watanabe Y, Kawabata Y, Oike A, Hirayama A, Yamada Y, Iwata S, Takai S, Wada N, Shigemura N.	4. 巻 21
2. 論文標題 Drinking Ice-Cold Water Reduces the Severity of Anticancer Drug-Induced Taste Dysfunction in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 8958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21238958	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8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keisuke Sanematsu, Yuzo Ninomiya, Noriatsu Shigemura
2. 発表標題 Molecular mechanisms of suppressing and modifying effects on sweet taste receptor sensitivity
3. 学会等名 ECRO 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 實松敬介、尾崎礼奈、中林開人、重村憲徳
2. 発表標題 低pH条件はサッカリンの甘味感受性を低下させる
3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 實松敬介、二ノ宮裕三、重村憲徳
2. 発表標題 甘味受容体感受性における低pHによる抑制効果の分子メカニズム
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y
2. 発表標題 Agonistic/antagonistic properties of sweet taste receptor
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 實松敬介, 井上真由子, 高井信吾, 重村憲徳, 二ノ宮裕三
2. 発表標題 グルカゴン様ペプチド-1 受容体遺伝子多型と甘味認知閾値との関連について
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 低pH条件下における甘味受容体感受性の解析
2. 発表標題 實松敬介, 尾崎礼奈, 中林開人, 二ノ宮裕三, 重村憲徳
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 實松敬介, 重村憲徳
2. 発表標題 味覚受容体再構築系におけるCa ²⁺ イメージングを用いた受容体機能解析
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawabata Y, Takai S, Yoshida R, Sanematsu K, Kawabata F, Shigemura N.
2. 発表標題 The effects of flecainide on taste bud organoid growth and behavioral sour taste response in mice.
3. 学会等名 ISOT2020(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 實松敬介、重村憲徳、二ノ宮裕三	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 Clinical Neuroscience vol.37 no.12 1444-1447	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Illinois		