

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19780103

研究課題名(和文) 甘味関連タンパク質の構造・機能相関解析

研究課題名(英文) Structure-function analysis of sweetness-related proteins

研究代表者

清水 章子 (SHIMIZU AKIKO)

東京農業大学・応用生物科学部・講師

研究者番号：60301420

研究成果の概要：タンパク質の多くは無味であるが、甘味を持つタンパク質の存在が複数知られている。ネオクリンは甘味と味覚修飾活性（酸味を甘味に換える活性）を併せ持つユニークなタンパク質である。その分子表面に塩基性アミノ酸が集まっていることに注目し、塩基性ヒスチジン残基をアラニン残基に置換したネオクリン変異体を作成した結果、それらの残基が味覚修飾活性に深く関与していることが明らかになった。ネオクリンは舌上に存在する甘味受容体によって認識されていることから、受容体側を遺伝子学的に改変し、受容体のどの部位がネオクリンと相互作用しているかについても一定の知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,800,000 | 0 | 2,800,000 |
| 2008年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 210,000 | 3,710,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：食品機能学

1. 研究開始当初の背景

ヒトが感じる味は、甘味、塩味、酸味、苦味、旨味の5基本味に大別される。生物が味を感じるメカニズム自体は長い間研究されてきたが、近年になって味の受容を担う受容体がやっと明らかになり、味覚についての研究自体が分子レベルで大きく進みつつある段階にある。

甘味物質の大部分は低分子化合物であるが、6種類のタンパク質（タウマチン、ブラゼイン、モネリン、マンベリン、ペンタディン、ネオクリン）がヒトにおいて甘味を呈す

ることが知られている。これらのうちの1つであるネオクリンは、西マレーシアに生育する植物 *Curculigo latifolia* の実に含まれるタンパク質で、それ自身が甘味を呈すると同時に酸味を甘味に変換する味覚修飾活性を有するというユニークな性質を持っている。ネオクリンの甘味は、ヒトには認識されるがマウスなどでは甘味として感じられていないことも判明しており、これはヒトとマウスの甘味受容体 T1R2-T1R3 の差を反映するものと考えられている。

甘味タンパク質の構造はタウマチン、モネ

リン、ブラゼインの3つについてX線結晶構造解析等の手法により詳しく研究されていた。これらのタンパク質の構造にはいくつかの共通点があるものの、甘味活性を決定付けるような構造的特徴は見つかっていない。そこで我々はネオクリンのX線結晶構造解析を行いその立体構造を明らかにした。その結果、既知の甘味タンパク質同様、甘味活性・味覚修飾活性のメカニズムを説明できるような特徴を見つけることは出来なかったが、以下のような構造的特徴が明らかになった。

- 1) β -シート構造に富んでいる。
 - 2) ジスルフィド結合が多い（各サブユニット内に1箇所ずつ、サブユニット間に2箇所合計4個）。
 - 3) タンパク質分子表面にプラス電荷の集まる領域がある。
- これらの構造的特徴は、他の甘味タンパク質にも共通して見られるものであり、甘味の発現に何らかの関係があるものと考えられた。

2. 研究の目的

これまでの研究の進行状況を踏まえ、本研究では以下を明らかにすることを目的とした。

- (1) ネオクリンの分子構造についての詳細な解析。ネオクリンの全体的なアミノ酸配列および立体構造は、マンノース結合型レクチンと非常によく類似している。その類似点、相違点を詳細に検証し、ネオクリンの甘味活性・味覚修飾活性に関与している因子を絞り込む。また、レクチンは遺伝子組み換え作物等において安全性が議論されるタンパク質でもあることから、将来的な甘味料としての利用を見据えてネオクリン分子の安全性の検証を行う。
- (2) ネオクリン分子表面のプラス電荷の重要性の検証。ネオクリンのX線結晶構造解析の結果から、ネオクリン分子表面にはプラス電荷の集まる領域があることが明らかになった。既知の甘味タンパク質の構造研究においても表面に存在する塩基性アミノ酸が甘味活性に寄与しているとの報告があることから、ネオクリンにおいてもこれらの電荷が重要な役割を果たしていると考え、それらの残基とネオクリンの甘味・味覚修飾活性との関連を調べる。
- (3) 甘味受容体 T1R2-T1R3 との相互作用。甘味受容体とネオクリンの相互作用の解析を進めたい。ネオクリンの甘味はヒトには認識されるが、マウス等では認識されないとされている。甘味受容体側の構造の差異を利用して、甘味受容体とネオクリンとの相互作用についての知見を得る。

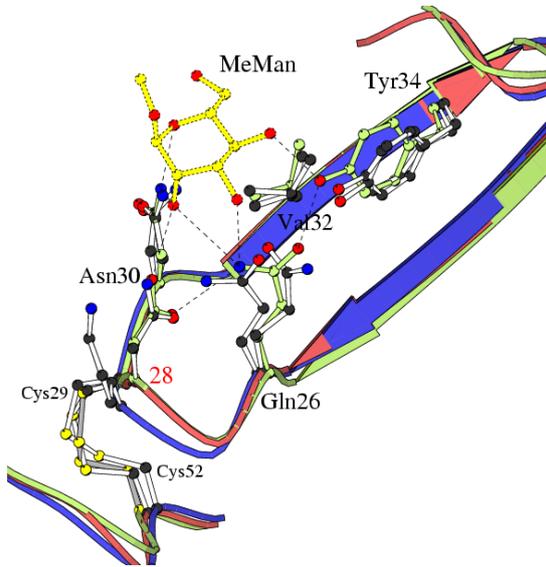
3. 研究の方法

- (1) マンノース結合型レクチンの構造は、すでに数種類がX線結晶構造解析により解かれている。これらの立体構造とネオクリンの立体構造を比較し、構造の違い・アミノ酸残基の違いを詳細に検討した。また、血液凝集活性試験、細胞毒性試験、DNA マイクロアレイの手法を用い、ネオクリンの血液凝集活性・細胞毒性・遺伝子発現への影響を調べ、レクチンのそれと比較した。
- (2) 表面電荷の解析。本研究では特にヒスチジン残基に注目し、遺伝子上で変異導入をして5つあるヒスチジン残基をアラニン残基に置換し、甘味活性と味覚修飾活性の変化を官能検査にて検証した。なお、ネオクリンの全ヒスチジン残基に変異を導入したタンパク質は *Aspergillus oryzae* で構築した発現系にて発現させ、実験に用いた。
- (3) 多くの変異型酵素の活性を検証する上で、*Aspergillus oryzae* の発現系よりも扱いの簡単な大腸菌での発現系を試した。この大腸菌での発現系を用いて、1つ1つのヒスチジン残基を置換した変異体の発現を行った。
- (4) ネオクリンとヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 の相互作用についての解析。ネオクリンの甘味がヒトでは認識されるがマウスでは認識されないことを利用し、この差は2つの種の甘味受容体の差異に起因するものと考えて研究を行った。ヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 とマウス甘味受容体 mT1R2-mT1R3 のキメラ分子を作製し、それらの受容体を発現する HEK293 細胞を用いたカルシウムイメージング実験を行い、ネオクリンとの相互作用を解析することで受容体側において甘味分子と相互作用する部位を特定しようと試みた。

4. 研究成果

- (1) レクチンは遺伝子組み換え作物等で安全性が議論されるタンパク質である。レクチンにはいくつかのファミリーがあり、マンノース結合型レクチンは毒性の高いレクチンとは構造が大きく異なり、毒性が非常に低い（あるいは毒性がない）と考えられる種類である。しかし今後のネオクリンの食品への応用を踏まえ、ネオクリンのレクチン活性・安全性を検証した。数種類のマンノース結合型レクチンと立体構造を詳細に比較したところ、ネオクリンの全体構造はレクチンに非常によく類似しているものの、ネオクリンにおいてはレクチンのマンノース結合部位に対応する部分でアミノ酸置換がみられ、マンノース結合能に欠けるであろうことが推測された（図1）。

図 1.マンノース結合型レクチンのマンノース結合部位と、同部位に対応するネオクリンの局所構造の比較。ネオクリンの主鎖は青色、マンノース結合タンパク質 (2 種類) の主鎖は薄緑色とピンク色のリボンモデルで示し、マンノース結合タンパク質の結晶構造でこの部位に結合していた糖を黄色のモデルで示した。



血液凝集活性を見たところ、構造的にネオクリンに非常に近いレクチンでは血液凝集活性が確認されたが、ネオクリンでは濃度を挙げても活性が確認できなかった。細胞毒性試験では、強い細胞毒性が知られているレクチン (マンノース結合型レクチンとは異なる種類のレクチン) を比較対象として実験を行ったが、ネオクリンには細胞毒性が見られなかった。DNA マイクロアレイを用いてネオクリンとレクチンの遺伝子発現に対する影響を見たところ、ネオクリンは遺伝子発現に全く影響していないことが判明した。

(2) ネオクリン分子に存在する全ヒスチジン残基をアラニン残基に置換したところ、その変異型タンパク質は味覚修飾活性を失うことが明らかになった。そこで、さらにそれぞれのヒスチジン残基を 1 個あるいは数個ずつ置換した変異型タンパク質を作製し、大腸菌での発現を試みた。大腸菌においてはサブユニットごとに発現させ、可溶化・リフォールディングを行い、官能試験に用いることができる分量のタンパク質を得ることに成功した。変異型タンパク質を発現・精製し、官能試験により解析した結果、ヒスチジン残基によって役割が異なり、甘味活性に関与している残基、味覚修飾活性に関与している残基があることが明らかになった。特に、NAS の 14 番目のヒスチジンは甘味活性、NBS の

11 番目のヒスチジン残基は味覚修飾活性に大きく寄与していることが明らかになった (表 1)。

表 1. ネオクリン、ミラクリンおよびネオクリンのヒスチジン変異体の官能試験による活性評価

| | 変異導入部位 | | 活性評価 | |
|--------------------------|----------|---------------|------|--------|
| | NAS | NBS | 甘味活性 | 味覚修飾活性 |
| ネオクリン | — | — | ○ | ◎ |
| ミラクリン | — | — | × | ◎ |
| HA mutant | H14, H36 | H11, H14, H67 | ◎ | × |
| NAS-HA mutant | H14, H36 | — | × | △ |
| NBS-HA mutant | — | H11, H14, H67 | ◎ | × |
| NAS-H14 single HA mutant | H14 | — | × | ◎ |
| NAS-H36 single HA mutant | H36 | — | ○ | ◎ |
| NBS-H11 single HA mutant | — | H11 | ◎ | × |
| NBS-H14 single HA mutant | — | H14 | ○ | ◎ |
| NBS-H67 single HA mutant | — | H67 | ○ | ◎ |

甘味の強さは◎:強い甘味、○:甘い、△:わずかに甘い、×:甘味なしとして表示した。

(3) ネオクリンはヒトでは甘味が認識されるが、ラットやマウスなど他の生物では認識されることが知られている。そこでマウス甘味受容体とヒト甘味受容体のキメラを作製し、HEK293 細胞にて発現させ、添加したネオクリンに対する反応をカルシウムイメージングにて解析した。その結果、ヒト甘味受容体 hT1R2-hT1R3 ヘテロ二量体のうち、hT1R3 のアミノ末端ドメインがネオクリンの認識に必須であることが判明した。

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 3 件)

① Shimizu-Ibuka, A., Nakai, Y.,

- Nakamori, K., Morita, Y., Nakajima, K., Kadota, K., Watanabe, H., Okubo, S., Terada, T., Asakura, T., Misaka, T., and Abe, K. (2008). Biochemical and genomic analysis of neoculin compared to monocot mannose-binding lectins. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 5338-5344.
- ② Nakajima, K., Morita, Y., Koizumi, A., Asakura, T., Terada, T., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Maruyama, J., Kitamoto, K., Misaka, T., and Abe, K. (2008). Acid-induced sweetness of neoculin is ascribed to its pH-dependent agonistic-antagonistic interaction with human sweet taste receptor. *FASEB J.* **22**, 2323-2330.
- ③ Koizumi, A., Nakajima, K., Asakura, T., Morita, Y., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., and Abe, K. (2007) Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 585-589.

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 中島 健一郎「味覚修飾タンパク質ネオクリンの構造機能相関の解析」日本農芸化学会 2009 年度大会。2009 年 3 月発表、マリンメッセ福岡（福岡）
- ② 伊藤 圭祐「ミラクリンの味覚修飾活性に関与するアミノ酸残基の特定とシュミレーションモデリング」日本農芸化学会 2008 年度大会。2008 年 3 月 27 日発表、名城大学（名古屋）

〔図書〕（計 1 件）

Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Naakajima, K., Asakura, T., Terada, T., Misaka, T., and Abe, K. Oxford University Press “Sweetness and Sweeteners-Biology, Chemistry, and Psychophysics” 2008 年, 546-559 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 章子（井深 章子）

（(SHIMIZU AKIKO) (IBUKA AKIKO)）

東京農業大学・応用生物科学部・講師

研究者番号：60301420