

研究種目：若手研究 (A)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20688015  
研究課題名 (和文) 脊椎動物由来味覚受容体タンパク質を基盤にした呈味物質センサーの創出  
研究課題名 (英文) Construction of a novel taste sensor using the taste receptor protein of vertebrate origin

研究代表者  
三坂 巧 (MISAKA TAKUMI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：40373196

研究成果の概要 (和文)：味物質の受容を行う味覚受容体を利用し、呈味物質に対して安定的な数値を提示する味センサーの作製を行った。最も嗜好される味である甘味を測定するために、ヒト甘味受容体を安定的に発現する培養細胞を作製した。甘味物質を投与した際に観察される細胞内カルシウム濃度変化を蛍光カルシウム指示薬の蛍光強度変化として測定することで、長期間安定的な数値を提示しうる甘味センサー細胞となりうることを示した。

研究成果の概要 (英文)：We planned to construct a novel taste sensor using the taste receptor protein. The taste sensor should be present a stable score to the tastants. To measure the sweetness, we generated a cell line that were stably expressing the human sweet taste receptor (hT1R2/hT1R3). The cell could be worked as a sensor for sweet taste to obtain the change of fluorescent intensities of the intracellular calcium indicator dye.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2009 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：生物機能開発化学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：分子間相互作用、味覚、受容体、味物質、センサー、培養細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、ヒトやマウスを初めとするいくつかの生物種において、ゲノムプロジェクトの成果によりほぼ全遺伝子についての塩基配列情報が明らかとなった。そして情報工学を組み合わせたいわゆる「バイオ

インフォマティクス」の発展により、多くの新規遺伝子が同定された。味覚受容に関わる分子についてもこの手法が活かされ、長年多くの研究者達が同定できなかった甘味・旨味や苦味を受容するいわゆる味覚受容体分子の決定が、2000年からのたった

数年間のうちに行われた。

(2) 哺乳類由来の味覚受容体のうち、甘・旨・苦味を受容する受容体はGタンパク質共役型受容体であり、構造の大きく異なる2つのファミリーに分類される。甘味・旨味は細胞外領域が非常に大きく、代謝型グルタミン酸受容体やカルシウム受容体等と同じグループに属するT1Rファミリーと命名された3種類の分子の組み合わせで、苦味は光受容体であるロドプシンや嗅覚受容体等と同じグループに分類されるT2Rファミリーと命名された数十種類の分子で、それぞれ受容される。このような味覚受容体ファミリーの存在は哺乳類のみならず、他の脊椎動物においても保存されており、我々の研究グループにおいてはモデル動物として使用されている小型魚類(メダカ・ゼブラフィッシュ)における味覚受容体の発現様式について明らかにしてきた。

(3) 各味覚受容体に対するリガンド同定においては、培養細胞発現系を用いたカルシウムイメージング法が汎用されている。この方法では哺乳類培養細胞(HEK293T)に味覚受容体およびキメラGタンパク質(ヒトG $\alpha$ 16やラットG $\alpha$ 15のC末端部分を他のGiファミリーのものと置換したもの)を一過的に発現させ、リガンド投与依存的な細胞内カルシウム濃度の変化を観察している。しかしこの方法には以下のような欠点がある。

- ・培養細胞を用いる解析のため、投与するリガンドに制約がある(種類・pH・浸透圧・温度等)
- ・他の受容体の機能解析と比較して応答する細胞頻度が低いため、解析が困難である。
- ・受容体を一過的に発現させているために、細胞を都度準備する必要がある。

我々が口腔内で感じる味物質はバラエティに富んでおり、濃度や温度などの条件は多岐にわたる。このような条件下で呈味物質を客観的にかつ正確に評価するには、現在の評価系は十分に機能しているとは言い難い。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、甘味や旨味といった呈味物質を客観的に評価しうるセンサーを、味覚受容体タンパク質を基に創出することを目的として行われる。

(2) 細胞系を用いるセンサーについては、細胞系を用いる上での欠点は存在するものの、従来の手法よりも応答が高頻度で簡便に検出することが可能であれば、より現実的な

手法として利用することができると思われる。この目的のため、受容体やレポーターを安定的に発現する細胞株を新たに作製し、いわゆる「呈味物質センサー細胞株」を構築することを試みる。

(4) 呈味物質を検出する「味覚センサー」を開発する試みはこれまでも多くの研究がなされている。実際、多種の脂質膜と電位測定を組み合わせることにより、複数の味質を同時に計測するという機器も開発されている。しかしこうした試みは、味質の検出は可能ではあるかもしれないが、実際の生体における受容体を介した検出を反映していない。甘味・旨味といった呈味物質を、生体においてそれらを受容する味覚受容体を基盤としたタンパク質を用いて客観的に検出する系を構築しようとする本研究は非常に独創的であり、実際の呈味物質が有する「複合的な味」を評価する上での指標となりうることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト甘味受容体を機能解析するためには、甘味受容体サブユニット(hT1R2とhT1R3)とキメラGタンパク質を発現させる必要がある。安定的発現のために、配列特異的組換えを用いることによってゲノム中に1コピーのみを導入することが可能な市販の遺伝子導入システム(Flp-Inシステム)を利用することを考えた。作製した発現コンストラクトについて、安定発現細胞の作出を行った。

(2) 甘味受容体安定発現細胞を用いて、甘味物質に対する細胞応答をカルシウムイメージング法により測定した。細胞に蛍光カルシウム色素であるFura-2/AMを負荷し、細胞内にカルシウム感受性色素をとりこませた。洗浄後、細胞に甘味物質の投与を行った。甘味物質投与時におけるFura-2の蛍光強度を、蛍光顕微鏡下で観察を行った。取得した画像より、応答細胞数の計測を行った。

## 4. 研究成果

(1) ゲノム中に1コピーのみを導入することが可能な市販の遺伝子導入システム(Flp-Inシステム)を用いて複数のタンパク質を同時発現させる際には、発現させたい遺伝子を1つの発現プラスミドに集約する必要がある。そこで3遺伝子を発現させる発現コンストラクトを、複数のプロモーターならびにIRES配列を利用することによって構築することを試みた。

蛍光タンパク質であるGFPを利用し、高い発現量が期待されるような部位の検索を行った結果、図1に示すようなコンストラクトを用いることを決定した。つまり、プラスミ

ド内に2つの転写カセットを有するプラスミドであり、各々のカセットにはhT1R2とhT1R3のcDNAを含んでいる。それぞれのコード領域直下には一つのmRNAからポリシストロニックな発現が可能となるIRES配列を配置し、その後にキメラGタンパク質(G16gust44)のcDNAを配置した。この発現プラスミドを用いることで、細胞内において3遺伝子を同時に発現することが可能になると考えた。

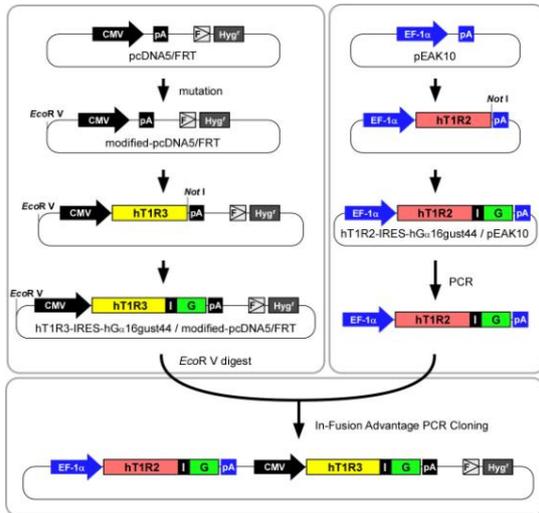


図1 構築した発現コンストラクト

(2) 作製した発現コンストラクトをもとに、安定発現細胞を作製した。市販のFLP-In-293細胞に、発現コンストラクトを配列特異的組換え酵素発現プラスミドとともに遺伝子導入した。薬剤耐性を指標にし、外来発現コンストラクトが挿入された細胞を選抜した。

(3) 得られたヒト甘味受容体安定発現細胞における甘味物質に対する応答性をアスパルテム投与により検証したところ、従来法と比較して劇的に向上している様子が確認できた(図2)。

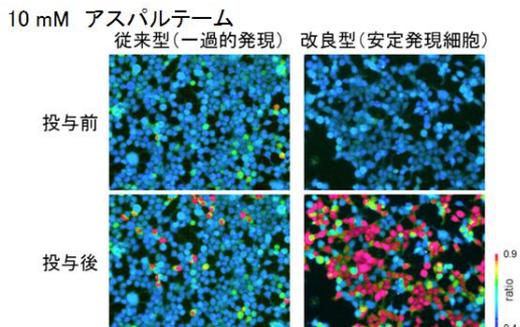


図2 従来の一過的発現と安定発現細胞との応答の比較

(4) 応答測定の簡便化のため、マルチウェ

ルプレートを用いたセルベースアッセイを行ったところ、多種の甘味物質に対する濃度依存的な応答が確認できたことから、「呈味センサー細胞」としての利用ができる可能性が示された(図3)。

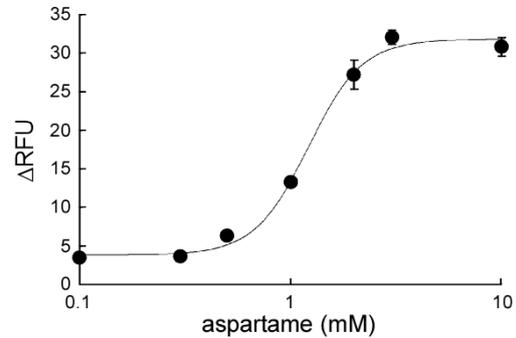


図3 セルベースアッセイによるアスパルテムに対する応答測定

## 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)

① Imada, T., Misaka, T., Fujiwara, S., Okada, S., Fukuda, Y., and Abe, K. Amiloride reduces the sweet taste intensity by inhibiting the human sweet taste receptor *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press (2010)

② Morita, Y., Nakajima, K., Iiduka, K., Terada, T., Shimizu-Ibuka, A., Ito, K., Koizumi, A., Asakura, T., Misaka, T., and Abe, K. pH-dependent structural change of neoculin in special reference to its taste-modifying activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2552-2555 (2009)

③ Ishii, S., Misaka, T., Kishi, M., Kaga, T., Ishimaru, Y., and Abe, K. Acetic acid activates PKD1L3-PKD2L1 channel—a candidate sour taste receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385**, 346-350 (2009)

④ Sakurai, T., Misaka, T., Nagai, T., Ishimaru, Y., Matsuo, S., Asakura, T., and Abe, K. pH-Dependent inhibition of the human bitter taste receptor hTAS2R16 by a variety of acidic substances. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 2508-2514 (2009)

〔学会発表〕(計2件)

①今田 隆将、阿部 啓子、三坂 巧、ヒト甘味受容体発現細胞による甘味阻害剤の検索、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京

②今田 隆将、阿部 啓子、三坂 巧、ヒト甘味受容体安定発現細胞株の作製の試み、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：甘味受容体発現コンストラクト、これを発現させた細胞体、及びその利用

発明者：阿部 啓子、三坂 巧、今田 隆将、藤原 聡

権利者：東京大学、長谷川香料株式会社

種類：特許

番号：特許出願 2009-274976

出願年月日：2009 年 12 月 2 日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biofunc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三坂 巧 (MISAKA TAKUMI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40373196

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし