

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03195

研究課題名（和文）逆構造生物学による味覚受容体の動的構造の捕捉とシグナル変換機構解明

研究課題名（英文）Reverse structural biology of conformational dynamics and signal transduction mechanisms of taste receptors

研究代表者

山下 敦子 (Yamashita, Atsuko)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：10321738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：甘味受容体・うま味受容体T1rについて、現在唯一構造が報告されているメダカT1r2a/T1r3リガンド結合領域(LBD)を用いた構造機能解析を実施した結果、LBDに結合しアゴニスト様の構造変化を引き起こすものの顕著な受容体応答を引き起こさないリガンドを見出し、LBDを「活性化状態」と考えられているコンフォメーションに構造変化させることができたとしても、必ずしも受容体活性化につながらない例があることを明らかにした。また、これまでT1rへの作用が知られていなかった塩化物イオンが、T1rに結合して、その他の味物質と同様の構造変化をLBDに引き起こし、T1rを介して味覚で感知されることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甘味受容体・うま味受容体T1rについては、これまでに得られている構造情報が極めて限定的であった。本研究課題で、受容体への作用の異なるリガンドの結合状態構造を明らかにしたことで、今後T1r活性化機構を明らかにしていく上での基盤情報を得た。さらに、本研究課題において、塩化物イオンのT1rへの作用を新たに解明した。この作用部位は、解析に用いたメダカ受容体のみならず、ヒトも含めた他のT1rにも共通して保存されていると考えられることから、食品産業に重要な甘味・うま味受容の理解に新たな知見を提供したことに加え、適量の摂取が健康維持に重要な食塩の味覚感知に対しても、新たな観点を提供した。

研究成果の概要（英文）：Structural and functional analyses of sweet and umami taste receptors (T1rs) were performed using the ligand-binding domain (LBD) of medaka T1r2a/T1r3, the current sole protein amenable for structural analysis, as a model T1r protein. We first identified ligands that exhibit binding to LBD and elicit its conformational change similarly to other T1r agonists but evoke no noticeable responses of the receptor. We also found that chloride ions, whose actions on T1rs have not been explored, exhibit binding to LBD and elicit its conformational change as similar as other agonists and evoke a preferable taste sensation via T1rs.

研究分野：構造生物学

キーワード：味覚受容体

1. 研究開始当初の背景

受容体タンパク質は、細胞外からの化学情報を認識し、その情報を変換して細胞内に伝達する機能を担う分子である。味覚受容体は、この化学情報認識・変換を生体内外の境界点で行う受容体であり、食物に含まれる様々な化学物質の感知を担う。すなわち、外界からの多様な化学情報を感知し、情報を共通の(あるいはごく限定されたパターンの)フォーマットの情報に変換して細胞内にインプットする機能を果たしている。

味覚受容体のうち、糖・アミノ酸・核酸など、栄養素となる水溶性化学物質を認識するのが、甘味受容体およびうま味受容体・Taste receptor type 1 (T1r)である。T1rは、二量体を形成して機能するクラスC型Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に属し、ヒトでは、T1r2/T1r3ヘテロ二量体が甘味受容体、T1r1/T1r3ヘテロ二量体がうま味受容体を構成する。甘味受容体における糖や、うま味受容体におけるアミノ酸・核酸などの化学情報は、細胞外に存在する大きなリガンド結合領域(LBD)で感知され、下流に存在する7回膜貫通領域(TM)を介して細胞内Gタンパク質へシグナル伝達される。このシグナル伝達の過程では、リガンドの結合に伴いLBDが構造変化し、同じく細胞外に存在してLBDとTM間のリンカー領域として機能するシステインリッチ領域(CRD)を介してその動きがTMに伝わり、TMの構造変化が細胞内Gタンパク質の活性化を引き起こすと考えられる。すなわち、受容体の多様な化学情報感知と共通フォーマットへの情報変換の主たる機能を担うのが、LBDとCRDからなる細胞外領域である。

味覚受容体は、これまで試料調製が極めて困難で、構造解析が全く進んでいなかった。研究代表者らのグループは、広範なスクリーニングの結果、唯一メダカ由来のアミノ酸受容体・T1r2a/T1r3LBDヘテロ二量体について、味覚受容体としては初めて立体構造の解明に成功した(Nuemket, Yasui *et al. Nat Commun.* 2017)。そして、受容体の味物質であるさまざまなアミノ酸が結合した状態の構造から、機能の背景にある、物理化学的性質の異なる多様な味物質を認識できるリガンド結合部位の構造基盤を解明した。

一方、の情報変換については、

-i. リガンド結合はどのように細胞外領域のコンフォメーション変化(特にサブユニット間相互作用が変わる変化)を引き起こすのか

-ii. どのようなコンフォメーションあるいはコンフォメーション変化が受容体活性化・シグナル伝達を引き起こすのか

がいまだ明確になっていない。理解を阻む要因として、高分解能構造と、構造動態・シグナル伝達状態との紐付けが十分にできていないことが挙げられる。また、重要だが高分解能構造未解明のコンフォメーションがあり、構造変化の一連の過程をつかめていない可能性もある。

味覚受容体T1rは、多様な化学物質をリガンドとして認識し、ヘテロ二量体という構成因子に固有の非対称性を持つ分子である。この特徴を活かし、各コンフォメーションを戦略的に捕捉して構造解明することで、リガンド結合というかたちで感知された化学情報が、どのように変換され細胞内に伝達されるのかを明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

味覚受容体T1r2a/T1r3細胞外領域が取り得る複数のコンフォメーションを捕捉し、それぞれの状態の高分解能構造を明らかにするとともに、構造動態・シグナル伝達状態との紐付けを行うことで、化学情報感知後の情報変換のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リガンド結合解析

メダカT1r2a/T1r3LBDは、すでに構築している組換え安定高発現S2細胞クローンを用いて発現し、試料タンパク質に融合したFLAGタグを利用したアフィニティークロマトグラフィーを行って細胞培養上清より精製した(Nuemket, Yasui *et al. Nat Commun.* 2017)。変異体解析では、変異導入したメダカT1r2a/T1r3LBDの発現ベクターをポリエチレンイミンを用いてS2細胞に導入し、一過性発現を行って、同様に精製した。得られた試料タンパク質を用いて、示差走査蛍光測定法により(Yoshida *et al. PLoS ONE* 2019)、結合するリガンドの探索ならびに親和性解析を行った。一部のリガンドについては、等温滴定型カロリメトリー(Nango *et al. Sci. Rep.* 2016)による親和性解析も実施した。また、これらのリガンドについて、T1r2a/T1r3LBDの蛍光融合タンパク質を用いたFRET解析(Nango *et al. Sci. Rep.* 2016)を行い、リガンド結合に伴う構造変化を解析した。

(2) 立体構造解析

リガンド結合状態メダカT1r2a/T1r3LBDは、最終精製過程であるサイズ排除クロマトグラフ

イー (SEC) 時に当該リガンドを添加することで調製した。また、リガンド非結合状態メダカ T1r2a/T1r3LBD は、SEC 時にリガンドを除去したバッファーを用いることで調製した。これらの試料を用いて、既報に基づき結晶化を行い (Nuemket, Yasui *et al. Nat Commun.* 2017) 得られた結晶から SPring-8 BL41XU にて X 線回折強度データを収集して、既解析構造を利用した分子置換法により構造決定した。また、同じ試料を用いて SPring-8 設置の CRYOARM200 などを利用してクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析も試みた。

4. 研究成果

(1) T1r2a/T1r3LBD の「非活性化状態」の立体構造解析

これまで T1r2a/T1r3LBD では、受容体の応答を誘起するアミノ酸結合状態の構造が明らかになってきたが (Nuemket, Yasui *et al. Nat Commun.* 2017) いずれの構造も、他のクラス C 型 GPCR のアゴニスト結合状態と同様の、「活性化状態」と考えられているコンフォメーションをとっていた。そこで、「非活性化状態」の構造を捉えるため、リガンド非結合状態試料を調製し、構造解析を試みた。まず、結晶化条件の探索を行ったが、良好な結晶が得られず、X 線結晶構造解析による構造決定はできなかった。さらに、クライオ電子顕微鏡単粒子構造解析も試みたが、高分解能構造決定可能な試料条件を見出すことができず、期間内の構造決定はできなかった。特に、アミノ酸非結合状態 T1r2a/T1r3LBD では、構造の収束が見られず、極めて多様なコンフォメーションをとっていることがわかった。このことから、アミノ酸非結合状態は、いわゆる「不活性化状態」と定義されるような単一のコンフォメーションをとっているのではなく、極めて多様なコンフォメーションのアンサンブルとして存在することが明らかとなった。

そこで次に、これらの「非活性化状態」の中から、特定のコンフォメーションを安定化して構造解析することを目指し、受容体応答を引き起こさないリガンドを探索した。その結果、L-ロイシンや L-フェニルアラニンなどの中・大型疎水性アミノ酸が、T1r2a/T1r3LBD に結合を示すものの全長受容体を用いた応答解析では顕著な応答を引き起こさないことを見出した。特に L-フェニルアラニンについては、応答を示す小型疎水性アミノ酸である L-アラニンと同程度の 100 μ M 程度の解離定数で結合を示すにもかかわらず、L-アラニンの作用濃度域では受容体応答を引き起こさないことがわかった。そこで、L-ロイシンおよび L-フェニルアラニン結合状態での T1r2a/T1r3LBD 結晶構造解析を実施した結果、予想に反し、これらのアミノ酸についても L-アラニンと同様の結合様式で結合し、「活性化状態」と考えられている同様のコンフォメーションをとっていることが明らかとなった。実際 L-ロイシンや L-フェニルアラニンは、FRET 解析においても、L-アラニンと同様の FRET 強度変化を引き起こしたことから、これらの応答を誘起しないアミノ酸は、溶液状態においても、応答を誘起するアミノ酸と同様の構造変化を LBD にもたすことが示唆された。これらの応答を誘起しない中・大型疎水性アミノ酸は、LBD への作用とは独立の機序で受容体応答を阻害していると考えられる。これらの結果から、LBD を「活性化状態」と考えられているコンフォメーションに構造変化させることができたとしても、必ずしも受容体活性化につながらない例があることが明らかとなった。

以上、本研究課題の実施により、T1r 細胞外領域が取る特定のコンフォメーションがシグナル伝達状態と紐付けされるのではなく、膜貫通領域も含めた構造動態との関係性を理解する必要があることが示された。

(2) 結合解析による T1r2a/T1r3LBD の新規リガンド解明

T1r2a/T1r3LBD に結合するリガンド探索を行った結果、これまでに結合を確認していたタンパク質構成性アミノ酸だけでなく、タンパク質構成性アミノ酸に含まれないアミノ酸や、一部のアミノ酸誘導体も結合を示すことを明らかにした。非タンパク質構成性アミノ酸には、各種代謝経路の中間産物として知られているものも存在することから、今後、これらのリガンドの受容体に対する作用や、これらの物質を受容する生理学的意義についての解析が必要である。

(3) 「逆構造生物学的」アプローチによる T1r2a/T1r3LBD の新規作用物質の発見

構造生物学研究では、標的タンパク質への作用が判明している物質との結合構造を解析し、得られた構造から作用メカニズムを探るのが一般的な流れとなっている。一方、本研究課題において、構造情報から作用物質を発見する「逆構造生物学的」解析により、T1r に作用する新たな物質を見出すことに成功した。

すでに明らかにしていたアミノ酸結合状態 T1r2a/T1r3LBD の構造では、アミノ酸に加えて、塩化物イオンが T1r3 のアミノ酸結合部位近傍に結合していることを見出していた。一方、メダカ T1r2a/T1r3 に限らず、他の T1r に対しても、塩化物イオンの作用はこれまで全く知られていなかった。そこで、まず、精製メダカ T1r2a/T1r3LBD を用いた結合解析を行った結果、塩化物イオンは溶液状態の T1r2a/T1r3LBD にも結合を示し、結合により、アミノ酸が結合したときと同様の構造変化を LBD に引き起こすことを明らかとした。さらに、結晶構造解析で見られた塩化

物イオン結合部位に変異を導入した結果、塩化物イオンの結合ならびに塩化物イオン添加時の LBD の構造変化が見られなくなることが明らかとなった。実際、塩化物イオンは、アミノ酸結合部位とは異なる位置に結合するものの、いずれの結合部位も、LBD が「活性化状態」と考えられているコンフォメーションをとるときに構造変化する二量体相互作用界面の近傍で、構造変化により配向変化する α ヘリックスのすぐ上流に位置しており、結合・解離により、受容体応答を引き起こすアミノ酸と同様の LBD 構造変化を引き起こす可能性が十分に考えられた。さらに、この塩化物イオン結合部位は、アミノ酸配列上の相同性から、メダカ T1r2a/T1r3 だけでなく、ヒトやマウスも含めたほとんどの T1r3 に保存されていることがわかった。そこで共同研究によりマウスを用いた実験を実施した結果、電気生理学的実験および二瓶法による行動実験から、塩化物イオン添加が T1r 発現味細胞からの情報を伝達する味神経発火を引き起こすこと、マウスが塩化物イオンを含む水を好んで多く摂取することを明らかとし、塩化物イオンが T1r を介して味覚で感知されていることを初めて解明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Liang Qiaoyi, Ko Meng-Ching, Ng Nathaniel S.R., Reh Borja, Lee Jessica G.H., Yamashita Atsuko, Nishihara Hidenori, Toda Yasuka, Baldwin Maude W.	4. 巻 32
2. 論文標題 T1R2-mediated sweet sensing in a lizard	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 R1302 ~ R1303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.10.061	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 該当する
1. 著者名 Ogane Tomonori, Noshiro Daisuke, Ando Toshio, Yamashita Atsuko, Sugita Yuji, Matsunaga Yasuhiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Development of hidden Markov modeling method for molecular orientations and structure estimation from high-speed atomic force microscopy time-series images	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1010384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pcbi.1010384	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 Atsumi Nanako, Yasumatsu Keiko, Takashina Yuriko, Ito Chiaki, Yasui Norihisa, Margolskee Robert F., Yamashita Atsuko	4. 巻 12
2. 論文標題 Chloride ions evoke taste sensations by binding to the extracellular ligand-binding domain of sweet/umami taste receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e84291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.84291	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 Jaunet-Lahary Titouan, Shimamura Tatsuro, Hayashi Masahiro, Nomura Norimichi, Hirasawa Kouta, Shimizu Tetsuya, Yamashita Masao, Tsutsumi Naotaka, Suehiro Yuta, Kojima Keiichi, Sudo Yuki, Tamura Takashi, Iwanari Hiroko, Hamakubo Takao, Iwata So, Okazaki Kei-ichi, Hirai Teruhisa, Yamashita Atsuko	4. 巻 14
2. 論文標題 Structure and mechanism of oxalate transporter OxIT in an oxalate-degrading bacterium in the gut microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-36883-5	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 Ojima Kento, Kakegawa Wataru, Yamasaki Tokiwa, Miura Yuta, Itoh Masayuki, Michibata Yukiko, Kubota Ryou, Doura Tomohiro, Miura Eriko, Nonaka Hiroshi, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Yuzaki Michisuke, Hamachi Itaru, Kiyonaka Shigeki	4. 巻 13
2. 論文標題 Coordination chemogenetics for activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30828-0	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 14
2. 論文標題 味覚受容体の構造と働き	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 milsil	6. 最初と最後の頁 6-8
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 Yasui N, Nakamura K, Yamashita A	4. 巻 169
2. 論文標題 A sweet protein monellin as a non-antibody scaffold for synthetic binding proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 585-599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa147	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 Yamashita A	4. 巻 48
2. 論文標題 Current pivotal strategies leading a difficult target protein to a sample suitable for crystallographic analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Soc. Trans.	6. 最初と最後の頁 1661-1673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BST20200106	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 山下敦子, 芦川雄二, 南後恵理子, 安井典久	4. 巻 79
2. 論文標題 受容体タンパク質を用いた味覚感知初反応の解析と応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 86-89
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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 石田 光, 安井 典久, 山下 敦子
2. 発表標題 メダカ由来味覚受容体T1R2a/T1R3細胞外領域のリガンド結合解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第56回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田純矢, 安井典久, 堤尚孝, 山下敦子
2. 発表標題 メダカ由来味覚受容体T1R2a/T1R3リガンド結合領域に対する疎_性アミノ酸の作_解析および結合構造解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsuko Yamashita, Nanako Atsumi, Keiko Yasumatsu, Yuriko Takashina, Chiaki Ito, Norihisa Yasui, Robert F. Margolskee
2. 発表標題 Chloride ion-binding to the extracellular ligand-binding domain of sweet/umami taste receptors evokes taste sensation
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 受容体組換え発現タンパク質を用いたリガンド結合解析と味物質評価への可能性
3. 学会等名 感覚研究コンソーシアム・第 1 回味覚ワーキンググループ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 タイプ 1 型味覚受容体細胞外領域に対する 1 価カチオン結合の構造生物学・生物物理学的解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝口 楽人, 吉田 高志, 細谷 麻以子, 伊藤 千晶, 芦川 雄二, 安井 典久, 山下 敦子
2. 発表標題 フグ由来味覚受容体T1R1/T1R3リガンド結合領域の試料調製とリガンド結合解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新田純矢、廣瀬未果、加藤貴之、山下敦子
2. 発表標題 メダカ由来味覚受容体T1R2a/3細胞外領域のリガンド非結合状態における立体構造解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 メダカ受容体構造に見る味覚受容体の呈味分子認識
3. 学会等名 第15 回食香粧研究会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigeki Kiyonaka
2. 発表標題 Coordination chemogenetics for artificially controlling neurotransmitter receptor function
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuko Yamashita, Chiaki Ito, Yuriko Takashina, Nanako Atsumi, Norihisa Yasui
2. 発表標題 Structural and biophysical analysis of ion-binding to the extracellular ligand-binding domains of a fish taste receptor T1r2a/T1r3
3. 学会等名 International symposium on olfaction and taste (ISOT2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下敦子
2. 発表標題 味覚受容体リガンド結合ドメイン - 細胞外イオン相互作用の構造基盤
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 裕太、小島 憲人、浜地 格、清中 茂樹
2. 発表標題 新たな配位ケモジェネティクス(1): タンパク質構造変化の干渉に基づくグルタミン酸受容体の活性制御法開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦 裕太、小島 憲人、美野 文晴、浜地 格、清中 茂樹
2. 発表標題 配位ケモジェネティクスによる細胞種・サブタイプ選択的なグルタミン酸受容体の活性阻害法開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山下敦子(都甲潔監修)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 435
3. 書名 おいしさの科学とフードテック最前線	

1. 著者名 津本浩平、浜窪隆雄(監修)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 624
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック	

〔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
研究 分 担 者	日下部 裕子 (Kusakabe Yuko) (90353937)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・グループ長補佐 (82111)	
研究 分 担 者	清中 茂樹 (Kiyonaka Shigeki) (90422980)	名古屋大学・工学研究科・教授 (13901)	

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			
ドイツ	Max Planck Institute			
米国	Moneil Chemical Senses Center			
フランス	University of Nantes			