

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05875

研究課題名(和文) 構造解析を基盤とした低利用植物タンパク質の機能性強化と食品素材への応用

研究課題名(英文) Functional enhancement and application to food materials of plant proteins based on structural analysis

研究代表者

榎田 哲哉 (Masuda, Tetsuya)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：80311744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ソーマチンは中性及び塩基性条件下で加熱を施すと急激に変性し甘味を消失するが、酸性条件下では、加熱処理に対して比較的安定であり、凝集体を形成せず、甘味が持続する。そこで酸性条件下における特徴的な構造要因を見出すため、X線結晶構造解析に供し原子レベルでの構造情報を得ることを試みた。また加熱変性温度(融解温度, T_m)を、示差走査蛍光光度法(DSF法)を用いて検討した。その結果pH 4.0では、全体的な構造は柔軟になるが、いくつかのリシン残基では、相対的な柔軟性が低下しており、このような相対的なリシン残基の柔軟性の低下が、熱凝集を防止、甘味を維持する上で重要な役割を果たす可能性が提起された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原子レベルでの構造解析により、ソーマチンの熱安定性や、熱凝集に寄与する構造要因を明らかにすることで、その他多くの食品タンパク質に対しても、構造安定性の強化や熱凝集性を抑制できる手法を構築し、新規植物由来の食品素材の開発に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：The sweetness of thaumatin remains when heating under acidic conditions, but it disappears when heating at a pH above 7. To assess this phenomenon more in detail, X-ray crystal structures analysis and the melting temperature (T_m) of thaumatin were examined. The T_m of thaumatin at pH 4 was substantially reduced when compared to pH 6, suggesting thermal unfolding of thaumatin at pH 4 was occurred in lower temperature than at pH 6. The structural comparisons among different pH values revealed overall B-factor value of structure at pH 4 was indeed higher than those at pH 6 and 8, but the relative B-factor values for most lysine residues tended to decrease on lowering the pH. These results suggested that structure at pH 4 becomes more flexible and feasible to be unfolding than at pH 6 and 8, but reduction of relative flexibility of the specific lysine residues might play important roles to prevent thermal aggregation under acidic conditions, thereby maintain sweetness.

研究分野：食品科学、構造生物化学

キーワード：taste sweet atomic resolution X-ray crystallography

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先進国では肥満、糖尿病が社会問題となっており、多くの食品、飲料でショ糖代替高甘味度甘味料が使用されている。タンパク質はカロリーが低く一般的に無味であるが、例外的に甘味を呈する「甘味タンパク質」が存在する。甘味タンパク質の甘味発現機構の解明は、新規な非糖質系甘味料の創出に繋がるため、世界中で多くの研究が行われている。また甘味タンパク質は、苦味抑制や風味増強を目的とした、食品素材として使用されているが、詳細な作用機作は不明である。更に近年では、甘味性や耐熱性を高めた応用研究もなされている。

甘味タンパク質がどのように受容されて、甘味を発現するのかについて、ヒト甘味受容体との相互作用様式を検討することが、重要である。これら精緻な理解を通して、甘味タンパク質の高甘味度化や高機能化が達成できると期待されるが、現状、ヒト甘味受容体の構造は決定されていない。そのため、甘味タンパク質と甘味受容体との構造活性相関研究を基盤とした、受容体との複合体モデルによる検討が行われている。これまで複合体モデルとして、間接的に受容体を活性化状態にする、ウェッジモデルが提唱されているが、その妥当性は、研究者間でも意見が分かれており、更なる複合体モデルの検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、甘味タンパク質ソーマチンの「甘味に必須な構造」を明らかにすること、および、ヒトが甘味を感じる甘味タンパク質ソーマチンの甘味性と耐熱性を高めることである。

ソーマチンはショ糖等に比べモル比で 10 万倍と非常に強い甘味を呈するノンカロリー甘味料であるが、甘味発現に必須な構造的特性については未だ明らかとなっていない。

高分解能 X 線結晶構造解析を行い、水素原子を含めた詳細な構造特性を原子レベルで明らかにするとともに、甘味受容体とのドッキングモデルから想定される相互作用領域に部位特異的の変異を加え、更なる高甘味度化が達成できれば、類似した構造を持つが、無味であるソーマチン様タンパク質の甘味化、新規なタンパク質性甘味料の創出に繋がるロールモデルとなり得る。しかしながら、ソーマチンはタンパク質性の甘味料であるために、中性及び塩基性条件下で加熱を施すと急激にタンパク質が変性、凝集し、甘味を消失するため、より多くの食品に活用するためには、これら pH の条件下での熱安定性の向上が重要である。本研究では、pH 変動に伴って構造変化するアミノ酸残基に着目し、ソーマチンの熱安定性に寄与する構造要因を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、酸性条件下における特徴的な構造要因を見出すため、pH 4.0 における結晶を作製し、X 線結晶構造解析に供し、原子レベルでの構造情報を得ることを試みた。pH 4.0 の結晶は 50 mM クエン酸緩衝液、35% PEG8000 の条件で蒸気拡散法により作製した。得られた pH 4.0 の構造と精度の高い構造の比較を行うために、pH 4.0 の結晶と同じ晶系 ($P 2_1 2_1 2_1$)、かつ格子定数 ($a = 51.6 \text{ \AA}$, $b = 52.1 \text{ \AA}$, $c = 70.5 \text{ \AA}$) が比較的近い値である pH 6.0 と pH 8.0 の結晶が得られるように結晶化の条件を検討した。回折データの収集は、大型放射光施設 SPring-8、BL26B1、BL38B1 にて低温窒素ガス気流下 (100 K) で行った。リコンビナントソーマチンの構造 (PDB: 3vhg, 1.00 \AA) を用いて分子置換を行い、初期モデルを構築後、Coot により順次モデルの修正を、PHENIX により構造の精密化を行い、最終構造を決定した。得られた構造間で、r.m.s.d (平均二乗偏差) や B-factor (温度因子) の比較を行った。pH 4.0、6.0、8.0 における加熱変性温度 (融解温度, T_m) は示差走査型蛍光定量法 (DSF 法) により評価した。

4. 研究成果

pH 4.0 については分解能 1.27 \AA 、pH 6.0 については分解能 1.10 \AA と 1.20 \AA 、pH 8.0 については分解能 1.30 \AA のデータを取得できた (図 1, Table 1)。それぞれの構造はプロテインデータバンク (PDB) に登録を行った。pH 4.0 (5sw0)、pH 6.0 (5sw1) および (5sw2)、pH 8.0 (5gqp)。

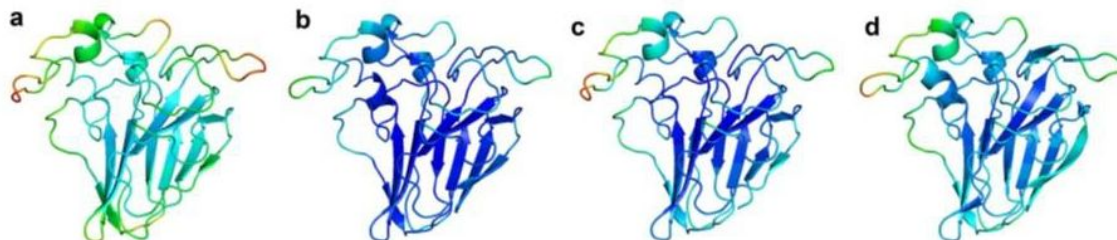


図 1 ソーマチンの各 pH における構造
温度因子(B-factor)で色付けした (最小、青 = 5, 最大、赤 = 50)。
a: pH 4.0 (5sw0), b: pH 6.0 (5sw1), c: pH 6.0 (5sw2), d: pH 8.0 (5gqp)。

Table 1 | Data collection

	pH 4.0 (5sw0)	pH 6.0 (5sw1)	pH 6.0 (5sw2)	pH 8.0 (5gqp)
<i>Data collection</i>				
Beamline	SPring-8 BL26B1	SPring-8 BL26B1	SPring-8 BL26B1	SPring-8 BL38B1
Detector	RIGAKU R-AxisV	RIGAKU R-AxisV	Rayonix MX225HE	ADSC QUANTUM 210
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Cell dimension (Å)	$a = 51.64$ $b = 52.07$ $c = 70.53$	$a = 52.37$ $b = 52.53$ $c = 71.03$	$a = 50.79$ $b = 53.86$ $c = 70.75$	$a = 50.96$ $b = 53.37$ $c = 71.14$
X-ray wavelength (Å)	0.80	0.80	0.80	1.00
Temperature (K)	100	100	100	100
Resolution limit (Å)	50.0-1.27 (1.29-1.27) [†]	50.0-1.10 (1.12-1.10) [†]	42.9-1.20 (1.22-1.20) [†]	50.0-1.30 (1.32-1.30) [†]
Unique reflections	50,840 (2,481)	80,097 (3,968)	61,418 (2,972)	47,852 (2,287)
Redundancy	6.2 (6.2)	6.8 (6.0)	7.8 (7.2)	7.1 (6.9)
Completeness (%)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	98.1 (96.4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	64.11 (5.61)	49.80 (5.64)	17.70 (2.90)	52.33 (4.67)
R_{merge}	0.054 (0.499)	0.071 (0.499)	0.064 (0.702)	0.056 (0.498)
$CC_{1/2}$	0.996 (0.867)	0.998 (0.855)	0.999 (0.833)	0.998 (0.992)

加熱変性温度 (融解温度, T_m) は pH 4.0 では 56.4°C、pH 6.0 で 65.0°C、pH 8.0 で 59.6°C であり、pH 4.0 の T_m は pH 6.0 と比べ低かった (図 2)。

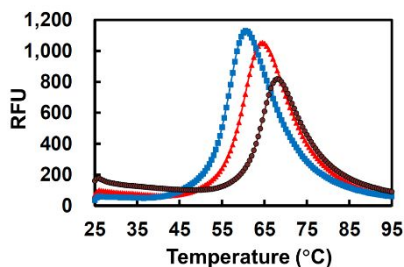


図 2 示差走査型蛍光定量法 (DSF 法) による加熱変性温度 (融解温度, T_m) の決定
pH 4.0 : 青色、pH 6.0 : 茶色、pH 8.0 : 赤色

pH 4.0 の構造全体の B -factor (温度因子) は 21.13 \AA^2 であり、pH 6.0 (11.61 \AA^2) よりも高い値を示した (図 1)。しかしながら、興味深いことに、いくつかのリシン残基では pH が低下するにつれて、その B -factor が相対的に減少していた (図 3)。以上の結果より、pH 4.0 では、全体的な構造は柔軟になっているが、いくつかのリシン残基では、相対的な柔軟性が低下していることがわかった。したがって、相対的なリシン残基の柔軟性の低下が、ソーマチンの熱凝集を防ぎ、甘味を維持する上で重要な役割を果たす可能性が提起された。本結果をもとに更に原子レベルでの解析を進め、ソーマチンの熱安定性や、熱凝集に寄与する構造要因を明らかにし、その他多くの食品タンパク質に対しても、安定性や凝集性をコントロールできる手法を構築し、ソーマチン様タンパク質をはじめ植物由来のタンパク質の新規食品素材への開発に繋げたい。

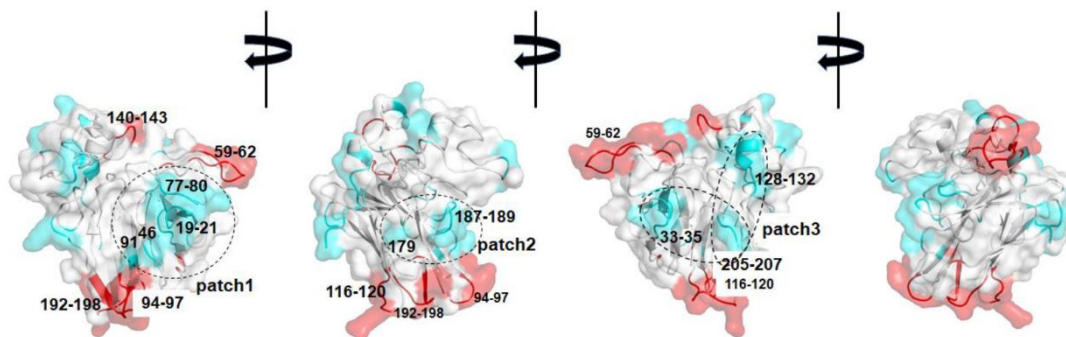


図 3 pH 低下により顕著に B -factor ratio が変化した領域
赤色 : Relative B -factor ratio が増加、青色 : Relative B -factor ratio が低下。それぞれ軸に沿って 90° 回転。Patch を形成していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuda Tetsuya, Okubo Kyohei, Baba Seiki, Suzuki Mamoru, Tani Fumito, Yamasaki Masayuki, Mikami Bunzo	4. 巻 389
2. 論文標題 Structure of thaumatin under acidic conditions: Structural insight into the conformations in lysine residues responsible for maintaining the sweetness after heat-treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 132996 ~ 132996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2022.132996	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横井 朱里、樹田 哲哉、三上 文三、谷 史人
2. 発表標題 甘味タンパク質ソーマチンのpH変動に伴う構造変化と熱安定性に関する研究
3. 学会等名 日本食品科学工学会、関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 手島 和裕、樹田 哲哉、谷 史人
2. 発表標題 呈味物質に対するヒト腸管内分泌細胞の応答性評価
3. 学会等名 日本食品科学工学会、関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樹田 哲哉、馬場 清喜、鈴木 守、山崎 正幸、三上文三
2. 発表標題 酸性条件下における甘味タンパク質ソーマチンの構造
3. 学会等名 日本農芸化学会・関西支部大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------