

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19092

研究課題名(和文)食品タンパク質のコク味機能の分子実態解明

研究課題名(英文)Analyzing the molecular basis of kokumi function in food proteins

研究代表者

伊藤 圭祐(Ito, Keisuke)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40580460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：“コク”は食品の豊かな味わいを表す用語として広く使われている表現である。過去の報告でCaSRが“コク味”物質の受容体として機能することが示されたことから、本研究では、新規CaSR活性化成分として我々が見出したリゾチームのCaSR活性化メカニズムの解明を目的とした。リゾチームのアミノ酸配列に基づいたペプチドの合成とCaSR応答評価を実施した結果、CaSRを活性化するリゾチーム由来ペプチド(CAAKFESNFNTQATN)を特定し、活性化に必要な最小単位と重要なアミノ酸残基を明らかにすることに成功した。本研究結果により、タンパク質によるCaSR活性化メカニズムの理解が進むと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

“コク”という語はおいしい食品を表現する際に頻りに用いられるが、その分子メカニズムは不明であった。さらに、高分子であるタンパク質がどのようにしてCaSRを活性化するのは不明であった。本研究の最も大きな意義は、これまでの味覚科学には無かった新しい概念「タンパク質のコク味機能」の分子実態の一端を解明したことである。本研究結果は、調味素材としての食品タンパク質成分の用途開発にとどまらず、未だ不明なコク味の分子メカニズムを解き明かす重要な手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：“Koku” is a term widely used to describe the rich taste of food. Previous studies have reported that the calcium-sensing receptor (CaSR) functions as a receptor for “kokumi” substances. This study aimed to elucidate the molecular mechanism by which lysozyme, identified by us as a novel CaSR agonist, activates CaSR. By synthesizing peptides based on the amino acid sequence of lysozyme and evaluating CaSR response, we identified a lysozyme-derived peptide (CAAKFESNFNTQATN) that activates CaSR. We successfully determined the minimal unit and critical amino acid residues necessary for CaSR activation. These findings are expected to advance the understanding of CaSR activation mechanisms by food proteins.

研究分野：食品化学

キーワード：おいしさ 味覚 ペプチド コク calcium-sensing receptor 受容体解析 食品タンパク質 リゾチーム

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

“コク”は伝統的に食品のおいしさを表現する際に頻繁に用いられてきた表現であり、熟した食べ物に口にしたときの豊かな味わいや、深みのある濃厚さの味わいに対して使用されてきた。コクには口の中において多くの成分が複雑に絡み合う時間的および空間的な広がりを特徴とする味、香り、食感すべてが関係しており、それらがバランスよく与えられ、濃厚感、持続性、および広がりが生じた時に感じられる味わいがコクと考えられている。近年、「そのもの自体には味が無いものの、他の食品中に添加することで食品の味の厚さ、持続性、広がりを引き出し、甘味、うま味、塩味を増強させる作用をもつ味」という“コク味”の定義が提唱され、Calcium-sensing receptor (CaSR) がそのような味覚特性を有する“コク味”物質の受容体であることが報告された。“コク味”によって食品のコクの全てを説明できるわけではないものの、CaSR 活性化成分にはヒトにとって好ましい味機能が期待できる。

2. 研究の目的

我々は、共役する細胞内 G タンパク質などを最適化することで、従来法よりも高感度な CaSR 応答評価系を開発した。本系を用いてリゾチームが既知の CaSR 活性化成分であるスペルミンやプロタミンと同等の CaSR 活性化能を有することを見出した。リゾチームによる CaSR 活性化メカニズムの解明は、タンパク質の“コク味”機能を理解する上で有用な知見を与えると期待できる。そこで本研究では、リゾチームによる CaSR 活性化メカニズムの解明を目的として、リゾチーム由来 CaSR 活性化ペプチドの探索、およびそのアミノ酸置換体を用いた活性評価を進めた。

3. 研究の方法

(1) 試薬

ペプチド合成用の Fmoc アミノ酸は渡辺化学工業社から購入した。有機溶媒など、その他のペプチド合成関連試薬は富士フィルム和光純薬社より購入した。CaSR 応答評価用の pHEK293 Ultra Expression Vector II はタカラ社より購入した。コドン使用頻度をヒトに最適化した human CaSR (UniProt: P41180) 及び human Gα15 (UniProt: P30679) の人工遺伝子はユーロフィンジェノミクス社で受託合成した。Lipofectamine 2000 は Sigma-Aldrich 社より、Fluo-8 AM は AAT Bioquest 社より購入した。

(2) ペプチド合成

リゾチームのアミノ酸配列をもとにしたペプチドの合成は、Rink Amide resin (レジン) を用いた Fmoc 法により行った。レジンを充填したマイクロカラムを DMF で洗浄し、Piperidine でレジンを脱保護した。過剰量の DMF で洗浄した後、Fmoc アミノ酸を HBTU で活性化させ、レジンへ結合させた。未反応のアミノ基は Acetic anhydride でアセチル化した。そのように、設計したペプチドが合成されるまでアミノ酸の付加反応を繰り返した。最後に、ペプチドの N 末端の Fmoc 基を Piperidine で脱保護し、TFA によって脱保護と脱樹脂を行った。得られたペプチドは精製後に実験に用いた。

(3) カルシウムイメージング法による CaSR 応答の評価

CaSR の応答評価は、我々が開発した高感度な CaSR 応答評価系を用いて実施した。本系は細胞ベースのカルシウムイメージング法である。HEK293T 細胞に対し、Lipofectamin 2000 を用いて CaSR および Gα15 をサブクローニングした pHEK293 ultra expression vector I をトランスフェクションした。CaSR を発現しないネガティブコントロール細胞には、CaSR 発現プラスミドの代わりに空 vector を導入した HEK293T 細胞を使用した (mock 細胞)。

サンプル投与による CaSR 応答の評価は、細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化に伴う Fluo-8 の蛍光量変化により評価した。HEK293T 細胞に Fluo-8 を取り込ませ、あらかじめ 37°C に設定しておいたプレートリーダー (FlexStation III) にセットし、10 分間インキュベートした後に、サンプルを添加し、経時的に蛍光量を測定した。得られたデータは SoftMaxPro v5.0.1 を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) CaSR を活性化させるリゾチーム由来ペプチド領域の特定

CaSR 活性化領域を特定するため、リゾチームのアミノ酸配列を全網羅する、10 アミノ酸からなる 15 個のペプチドを合成し、CaSR 応答を評価した。その結果、KRHGLDNYRG、KFESNFNTQA、TNRNTDGSTD の 3 つのペプチドにおいて CaSR 応答が検出された。次に、それらペプチドの周辺領域について、前後 2 または 4 アミノ酸ずつシフトさせた 10 アミノ酸鎖長の 15 個のペプチドを合成し、再度精密スクリーニングを行った (図 1)。その結果、隣接する 2 個のペプチド VCAAKFESNF、ESNFNTQATN において CaSR 応答が検出された。これらのペプチドには ESNF のアミノ酸配列が共通して含まれていた。

続いて VCAAKFESNF 及び ESNFNTQATN の両方のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列

VCAAKFESNFNTQATN を元に、N 末端及び / または C 末端を 1~7 残基ずつ欠失させていった、ESNF を中心とした 16~3 アミノ酸のペプチドを網羅的に 51 個合成した。各ペプチドについて 100 μ M での CaSR 応答を評価した結果(図 2 左)、16~4 アミノ酸のペプチドのほとんどで CaSR 応答が検出されたのに対し、トリペプチドからは CaSR 応答が検出されなかった。このことから、リゾチーム由来ペプチドにおいては ESNF の 4 アミノ酸が CaSR 応答に必要な最小単位であることが示唆された。さらに各ペプチドについて 25 μ M での CaSR 応答を評価した結果(図 2 右)、CAAKFESNFNTQATN のみが CaSR 応答を示したことから、最も強く CaSR を活性化するリゾチーム由来ペプチド領域として、CAAKFESNFNTQATN (ペプチド L) を特定した。

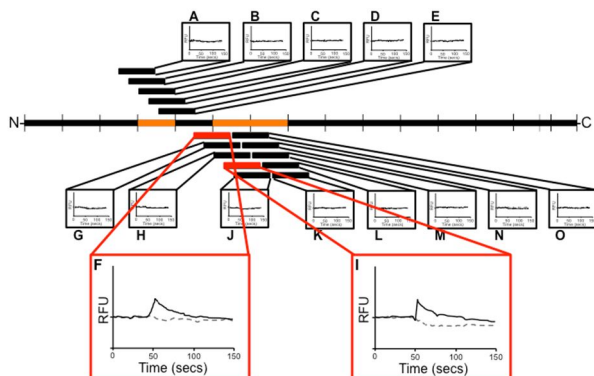


図 1 : リゾチーム由来CaSR活性化候補ペプチド周辺配列の精密スクリーニング
太線はリゾチームのアミノ酸配列全体を示した。チャートの黒色実線は CaSR 発現細胞、灰色点線は mock 細胞の応答を示す。

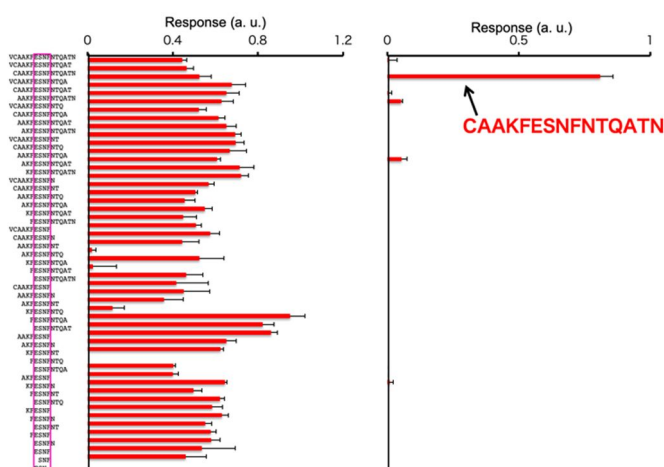


図 2 : リゾチーム由来ペプチドの欠失解析
左) 100 μ M における各ペプチドの CaSR 応答、右) 25 μ M における各ペプチドの CaSR 応答。3 回の試験における平均値を棒グラフで示し、標準偏差をエラーバーで示した。

(2)CaSR 作用様式の解析

CaSR活性化成分にはその成分のみで作用するオルソステリックアゴニストと、オルソステリックアゴニストの応答を増加させるポジティブアロステリックモジュレーターが存在する。リゾチームとペプチドLは、オルソステリックアゴニスト (Ca^{2+} と Mg^{2+}) の有無に関わらずCaSRを活性化したことから、共にオルソステリックアゴニストとして直接的にCaSRを活性化することが明らかとなった。ペプチドLのEC₅₀値は、リゾチームのEC₅₀値 (590 μ M) と比較して約12倍低い 49 μ Mであった。ペプチド化によってCaSRとの相互作用に不要な立体障害を起こしていた領域が消失し、活性化に必要な領域がCaSRへ作用しやすくなったために活性が向上したと考えられる。

(3)Alanine-scanning 解析

CaSR活性化における各アミノ酸残基の寄与を解析するため、ペプチドLを構成するアミノ酸を1残基ずつAに置換したペプチドを合成し、CaSR応答を評価した(図 3)。その結果、C1、N8、F9、Q12、及びT14のA置換により、元の配列のペプチドに比べ応答値が78%以上減少し、CaSR 応答が消失した。このことから、これら5アミノ酸残基の側鎖がCaSRの活性化に特に重要であることが示唆された。なお、これら5つのアミノ酸残基は全てリゾチームタンパク質の分子表面に

存在している。すなわち、これらのアミノ酸残基とCaSRとの相互作用がコク味機能の発現に重要であることが示唆された。

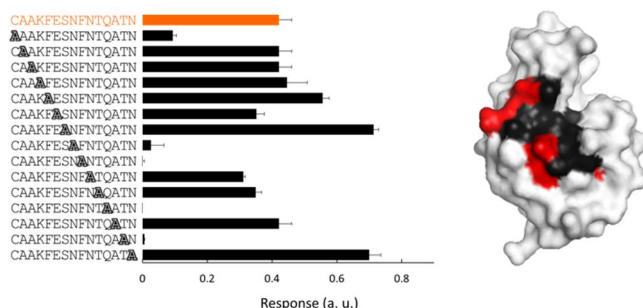


図3：ペプチドLのAlanine-scanning

左) 50 μ Mでの3回の試験における平均値を示し、標準偏差をエラーバーで示した。右) Alanine-scanningによりCaSR応答が著しく減少したC1、N8、F9、Q12、及びT14を赤色、それ以外のペプチドLの残基を黒色で示した。

(4) ペプチドLの網羅的 site-saturation 解析

ペプチドL (CAAKFESNFNTQATN)のCaSR活性化において重要であることが示唆されたC1位、N8位、F9位、Q12位、及びT14位について、CaSRの活性化に必要なアミノ酸残基の特徴を調べるため、各部位を19種類のアミノ酸で置換した計100種類のペプチドを合成し、CaSR応答を評価した(図4)。各ペプチドについて50 μ MでのCaSR応答を評価した結果、C1位、N8位、Q12位では、各アミノ酸側鎖を失うA置換を含め、ほとんどの置換体でCaSR活性化能が消失したことから、C1、N8、及びQ12がCaSRの活性化に重要であることが再確認された。F9位では、Aで置換した変異体を含め多くの変異ペプチドで明確な応答が失われた一方で、LやIなどの疎水性アミノ酸に置換した変異ペプチドでは応答が大きく増大した。これにより、F9はCaSRの活性化に重要であることが再確認され、またF9位のアミノ酸の性質によってペプチドLのCaSR活性化能が大きく変化することが示唆された。一方、T14位では19種中のN、D、E、G、I、L、F、T、W、Y、及びVに置換した12種もの変異ペプチドで明確な応答が検出され、また応答の増減が30%未満であったものが全体の6割程度存在した。A置換によってCaSR活性化能は著しく低下したものの、T14は側鎖の比較的大きな様々なアミノ酸残基で代替可能であることが示唆された。

続いて、Alanine-scanningによって活性の顕著な低下が見られたアミノ酸残基、すなわち活性に決定的に重要と考えられる位置のアミノ酸以外についても、同様に19種類の置換体を解析した(図4)。各ペプチドについて50 μ MでのCaSR応答を評価した結果、A2位では19種の変異ペプチドのうち16種で元の配列以上のCaSR応答が検出された。同様にA3位でも17種/19種のペプチドで元の配列以上のCaSR応答が検出された。これらの結果から、A2とA3はペプチドLのCaSR活性化能には大きく寄与しておらず、他のアミノ酸への置換によって相互作用を強化できる余地があることが示唆された。K4位、S7位、及びT11位でも同様に、それぞれ11種/19種、12種/19種、11種/19種、の変異ペプチドで元の配列以上のCaSR応答が検出され、応答値が30%以上増大したものが4割程度であった。特にK4位、S7位はA置換によって活性の増加が見られたことから、それらの側鎖はCaSR活性化能に負の影響を及ぼしていたことが示唆された。特にS7位はA、V、I、F、Y、H、R、D、N、Q、M、T、C、及びPに置換した14種のペプチドで、応答値が元の配列の70%以上増大または減少したことから、S7位がCaSR活性化に大きく寄与する部位であることが示唆された。一方、F5位とE6位ではそれぞれ16種/19種、17種/19種のペプチドでCaSR応答が減少し、応答値が30%以上減少したペプチドも6割程度であった。特にE6位は、A置換によって応答値が40%減少したため、E6側鎖のCaSR活性化への寄与が示唆された。すなわち、Alanine-scanningでは顕著な活性減少を示さなかったものの、C1、N8、F9、及びQ12に次いで、CaSRの活性化に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。N10位とN15位では、それぞれ14種/19種、13種/19種の変異ペプチドで明確な応答が保持され、また応答の変動が30%未満であったものが全体の6割程度であった。アミノ酸置換によるCaSR応答への影響が全体として小さかったことから、N10位とN15位はCaSRの活性化への寄与が小さいことが示唆された。残るA13位については、現在解析中である。

	C	A	A	K	F	E	S	N	F	N	T	Q	A	T	N
A	応答値 0.25 ±標準偏差 0.16	1.00	1.00	1.81	1.31	0.61	2.77	-0.19	-0.07	0.54	0.96	0.21	0.04	1.24	0.10
V	0.16	1.75	2.33	1.66	0.97	0.89	2.75	-0.36	1.27	0.78	1.41	1.35	1.25	0.76	0.16
L	0.06	0.27	0.15	0.28	0.14	0.23	0.19	0.05	0.17	0.20	0.28	0.27	0.18	0.15	0.16
I	0.87	1.36	1.21	2.01	0.82	0.64	1.21	1.86	1.75	1.46	1.65	0.98	1.04	1.11	0.09
H	0.10	0.24	0.23	0.17	0.05	0.06	0.59	0.18	0.22	0.12	0.13	0.12	0.09	0.23	0.02
F	0.07	0.77	1.25	2.03	0.58	0.55	2.17	0.07	1.58	0.96	1.21	0.33	0.97	0.89	0.02
Y	0.02	0.09	0.24	0.16	0.05	0.06	0.40	0.07	0.31	0.20	0.42	0.07	0.53	0.32	0.02
R	0.72	1.29	1.34	1.19	1.00	1.05	2.62	1.56	1.00	0.83	1.49	1.48	1.29	0.88	0.10
G	0.10	0.34	0.14	0.22	0.10	0.52	0.29	0.22	0.20	0.22	0.20	0.32	0.25	0.29	0.10
D	0.21	1.48	1.67	1.42	0.54	0.85	3.74	-0.22	-0.17	0.85	1.44	0.84	1.25	0.87	0.19
E	0.19	0.09	0.03	0.23	0.02	0.16	0.21	0.04	0.33	0.09	0.04	0.06	0.12	0.20	0.03
K	0.02	1.63	1.65	0.91	-0.04	-0.04	1.45	-0.28	-0.18	0.30	1.34	0.32	0.39	0.36	0.03
W	0.03	0.28	0.16	0.25	0.05	0.02	0.59	0.23	0.32	0.14	0.12	0.37	0.16	0.05	0.03
H	0.04	1.08	0.24	-0.24	-0.06	-0.11	0.18	0.19	0.80	0.18	0.17	-0.03	-0.09	0.20	0.03
K	0.03	0.08	0.05	0.06	0.07	0.02	0.07	0.15	0.10	0.09	0.03	0.12	0.01	0.11	0.03
R	-0.11	1.97	1.84	1.00	0.06	-0.02	0.37	-0.05	-0.07	0.22	0.40	0.07	-0.02	0.36	0.07
R	0.07	0.16	0.24	0.09	0.02	0.12	0.01	0.11	0.06	0.27	0.02	0.08	0.08	0.03	0.03
R	-0.05	1.24	1.10	0.77	-0.23	0.01	0.04	0.23	0.90	0.68	0.13	0.24	0.03	-0.04	0.03
D	0.14	0.18	0.27	0.32	0.07	0.05	0.04	0.10	0.07	0.12	0.08	0.34	0.04	0.08	0.05
D	0.15	1.89	1.75	1.55	1.34	0.57	2.88	0.32	1.22	1.18	1.05	0.17	1.87	1.22	0.06
E	0.06	0.19	0.20	0.29	0.12	0.14	0.25	0.07	0.13	0.17	0.36	0.28	0.30	0.14	0.03
E	1.23	2.05	1.36	0.97	0.29	1.00	1.36	0.05	0.73	0.76	0.74	-0.34	0.58	1.24	0.37
N	0.37	0.23	0.03	0.38	0.03	0.14	0.15	0.08	0.03	0.12	0.01	0.42	0.42	0.32	0.03
N	1.61	1.38	1.38	1.10	1.12	1.12	3.32	1.00	0.37	1.00	1.41	0.10	0.78	1.00	0.16
Q	0.16	0.15	0.19	0.25	0.03	0.15	0.12	0.28	0.28	0.08	0.08	0.08	0.26	0.26	0.10
Q	1.51	2.25	1.38	1.44	0.57	0.73	2.29	0.07	-0.09	1.57	1.58	1.00	1.03	1.07	0.13
M	0.15	0.10	0.15	0.09	0.12	0.05	0.16	0.07	0.09	0.11	0.31	0.31	0.17	0.11	0.03
M	-0.11	1.67	2.33	0.83	0.84	-0.10	0.16	-0.04	1.24	1.27	1.58	0.18	1.21	0.76	0.24
T	0.24	0.15	0.12	0.06	0.04	0.04	0.07	0.11	0.12	0.35	0.27	0.01	0.22	0.10	0.03
T	-0.28	0.95	1.12	0.71	0.42	0.59	-0.11	1.04	1.10	0.78	1.00	0.18	1.00	0.86	0.18
S	0.18	0.25	0.19	0.10	0.09	0.28	0.06	0.10	0.06	0.30	0.23	0.23	0.01	0.01	0.01
S	0.96	1.23	1.15	1.06	0.69	0.95	1.00	1.53	-0.06	1.17	0.75	-0.15	0.48	0.43	0.15
C	0.15	0.24	0.16	0.47	0.05	0.09	0.47	0.09	0.12	0.27	0.22	0.21	0.10	0.12	0.03
C	1.00	2.10	1.53	0.75	0.70	0.95	0.56	-0.19	1.44	0.79	0.82	0.11	1.11	1.62	0.10
P	0.21	0.19	0.19	0.20	0.15	0.07	0.04	0.15	0.34	0.40	0.15	0.15	0.15	0.18	0.03
P	0.74	0.97	0.69	0.59	0.35	0.11	-0.01	-0.28	1.32	0.27	0.34	0.38	1.05	0.65	0.12
G	0.12	0.50	0.12	0.18	0.09	0.16	0.06	0.20	0.04	0.23	0.20	0.02	0.13	0.02	0.03
G	0.21	1.14	1.22	1.29	0.58	0.92	1.62	0.10	1.32	0.87	1.07	0.25	1.20	0.88	0.11
G	0.11	0.41	0.05	0.20	0.01	0.08	0.26	0.04	0.07	0.12	0.24	0.02	0.08	0.22	0.03

図4：ペプチドLの網羅的site-saturation解析

アミノ酸部位（横軸）ごとに、元の配列の応答値（黒い四角）を1とした時の、各アミノ酸置換（縦軸）ペプチドの応答値を示す。元の配列のペプチドの応答値に対して応答が70%以上消失したものを青塗り、30~70%未満消失したものを水色塗り、30%未満と小さい消失が生じたものを青文字で示した。応答が70%以上増大したものを赤塗り、30~70%未満増大したものを桃色塗り、30%未満と小さい増大が生じたものを赤文字で示した。

(5)まとめ

本研究では、コク味受容体（CaSR）を活性化させるリゾチームの分子表面ペプチド（CAAKFESNFNTQATN）を見出し、CaSR活性化に特に重要な構成アミノ酸残基を特定した。本研究によって得られた知見は、リゾチームによるCaSR活性化メカニズムの解明に役立つのみならず、より高活性な“コク味”機能ペプチドの創製につながるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 伊藤圭祐	4. 巻 69
2. 論文標題 ヒト化学感覚受容体の応答評価を指標とする味と香りの分子設計技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本食品科学工学会誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/nskkk.69.1	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 Y. Terada, K. Tanaka, M. Matsuyama, M. Fujitani, M. Shibuya, Y. Yamamoto, R. Kato, K. Ito	4. 巻 12
2. 論文標題 Collection of data variation using a high-throughput image-based assay platform facilitates data-driven understanding of TRPA1 agonist diversity..	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sci.	6. 最初と最後の頁 1622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app12031622	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 M. Masuda, Y. Terada, R. Tsuji, S. Nakano, K. Ito	4. 巻 12
2. 論文標題 Time-Series Sensory Analysis Provided Important TI Parameters for Masking the Beany Flavor of Soymilk.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 2752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods12142752	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内村美里、尾城一恵、土屋さくら、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 フレーバー感知に関わるヒト味覚・嗅覚受容体の網羅的解析システムの開発
3. 学会等名 第68回日本食品科学工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤圭祐
2. 発表標題 味機能ペプチド解析への合成ライブラリーの活用
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2022年度大会（招待講演）
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
研究分担者	寺田 祐子 (Terada Yuko) (80767632)	静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803)	

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