

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580105

研究課題名（和文） 甘味タンパク質の機能発現に関する構造生物学的解析

研究課題名（英文） Elucidation of the structure-function relationships in sweet-tasting proteins by x-ray analysis at atomic resolution

研究代表者

梶田 哲哉（MASUDA TETSUYA）

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80311744

研究成果の概要（和文）：甘味タンパク質ソーマチンの高分泌発現系の構築、分解能 1.1Å のソーマチン I の構造を決定した。ソーマチン II の構造解析に初めて成功し、甘味受容体との相互作用には側鎖の揺らぎが重要であるという新しい知見を得た。pH8.0 での構造解析により特定のリジン残基が加熱凝集に関与している可能性を提起した。甘味受容体を培養細胞に発現させ、客観的に甘味を評価する系の構築に成功した。ソーマチンの応答にはヒト型甘味受容体のサブユニット T1R3 のシステインリッチドメインが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The crystal structure of a recombinant thaumatin I was determined to a resolution of 1.1 Å (PDB:3AL7). The crystallographic structure of one of its variants, thaumatin II, was determined at a resolution of 1.27 Å (PDB:3AOK). The results showed the critical positive charges are disordered and the flexibility and fluctuation of these side chains would be suitable for interaction with sweet receptors. The atomic structure of a recombinant thaumatin at pH 8.0 was determined at a resolution of 1.0 Å (PDB:3VJQ). The results suggested a striking increase in the mobility of some lysine residues, which could facilitate a reaction with a free sulfhydryl residue produced via the β-elimination of disulfide bonds by heating at a pH above 7.0. Various mutants of thaumatin were prepared and their sweetness were quantitatively evaluated by cell-based assays using HEK293 cells expressing human sweet receptors. Chimeric human-mouse sweet receptors were constructed and their responses to sweeteners were investigated. The results showed the cysteine-rich domain of human T1R3 is important for the response to thaumatin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：甘味タンパク質、ソーマチン、X線結晶構造解析、甘味受容体

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病が社会問題となっており、ショ糖に代替

できる甘味料が切望されている。タンパク質は一般的に無味であるが、例外的に甘味を呈するタンパク質が存在する。現在まで6種の

甘味タンパク質（ソーマチン、モネリン、ブラゼイン、マビンリン、リゾチーム、ネオクリン）の存在が確認されている。その中でもソーマチンは甘味閾値が 50 nM、ショ糖に比べモル比で 10 万倍と非常に強い甘味を呈するのが特徴である。甘味タンパク質の特徴を見出すことにより、甘味タンパク質を糖代替物として利用が可能であると目論み現在、国内外で多くの研究がなされている。また、甘味タンパク質は特異性の高さから甘味受容のメカニズムを明らかにする上でも有用なツールとなる可能性がある。

2. 研究の目的

タンパク質の中には例外的に甘味を呈するタンパク質が存在する。しかしながらこれら甘味タンパク質間に共通して存在するアミノ酸配列や立体構造などの特徴は未だ見出されていない。本研究においては、甘味タンパク質の中でも特に強い甘味を呈するソーマチンを研究対象とし、遺伝子工学的手法によって部位特異的の変異体を作製して甘味発現に重要なアミノ酸残基を特定する。さらに甘味に影響を与えた変異体については、大型放射光施設 SPring-8 にて、高分解能 X 線結晶構造解析を行い、リコンビナントソーマチンおよび変異体間の構造の比較を行うことで、ソーマチンの強い甘味を決定付ける構造的要因を明らかにすることを目的とする。

甘味受容体遺伝子が同定されて以降、動物培養細胞に甘味受容体を発現させた評価系を用い、様々な甘味物質との相互作用に関わる受容体部位の特定、結合様式に関する検討がなされている。特に強い甘味を呈する甘味タンパク質は甘味物質の受容機構解明の有効なツールであると考えられ、その応答に必要な受容体部位を特定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ソーマチンの精製

植物由来ソーマチン I、ソーマチン II は、ソーマチン源株から陽イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製したソーマチンの純度は SDS-PAGE および Native-PAGE にて確認した。

(2) ソーマチン大量発現系の構築

ソーマチン I 遺伝子を有する発現ベクター pPIC6-THPre を制限酵素 *Bam* HI および *Bgl* II 処理し、アガロースゲル電気泳動に供した。ソーマチン遺伝子を含むフラグメントをゲルから切り出し精製し、これを pPIC6-THPre の *Bam* HI サイトに再クローニングしてソーマチン遺伝子をタンデムに有する 2 コピーベクター (pPIC6/thaumat in M2) を作製した。

引き続き pPIC6/thaumat in M2 を *Bam* HI 処理し、このサイトに *Bam* HI および *Bgl* II 処理した pPIC6-THPre を導入しソーマチン 3 コピーベクター (pPIC6/thaumat in M3) を作製した。以下同様の手法で 4、5 コピーベクター (pPIC6/thaumat in M4、pPIC6/thaumat in M5) を作製した (図 1)。得られたマルチコピーベクターについて、QIAGEN Maxiprep Kit にてプラスミドを大量取得した。50 μ g のプラスミドを用いてエレクトロポレーション法にて酵母 *Pichia pastoris* に形質転換した。スクリーニングは、抗生物質プラストサイジン (300 μ g/ml) を含む、YPD プレートを用いて行った。

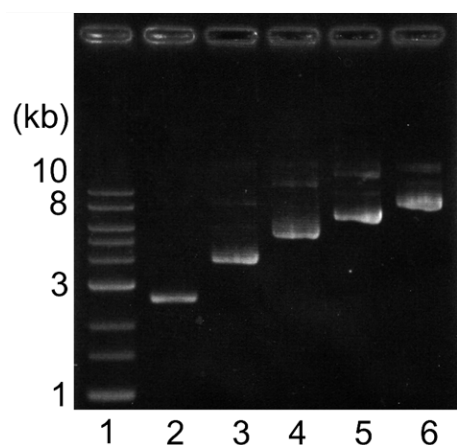


図 1. ソーマチンのマルチコピーベクター
Lane 1, 1 kb ladder marker, lane 2, 1-copy gene, lane 3, 2 copies genes, lane 4, 3 copies genes, lane 5, 4 copies genes, lane 6, 5 copies genes.

ソーマチンの発現は 7L のファーマンター (TS-M7L, 高杉製作所製) を用いて行った。175 mL のグリセロール培地にて前培養した培養液をファーマンターに添加した。培養中、温度は 29°C、pH5.0、溶存酸素は 20% 以上になるように制御した。FBS 培地に含まれるグリセロールが枯渇後、50%グリセロールを引き続き 8 時間添加した。タンパク質の誘導はメタノールの添加により行った。経時的にサンプリングを行い、発現量を確認した。

(3) リコンビナントソーマチンの精製

酵母培養上清を透析し、その後 SP 陽イオン交換カラムにアプライした。溶出は 0.5 M の NaCl を含む 5 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) にて行った。ソーマチンを含む画分を 75%硫酸沈殿させた後、Toyopearl HW-50F ゲルろ過カラムにて精製を行った。精製純度は SDS-PAGE ならびに Native-PAGE にて行った。

(4) ソーマチン変異体の作製

ソーマチン変異体は、ソーマチン遺伝子を持つプラスミドを鋳型として、Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて意図する変異を導入した。組換え型ソーマチンと同じ手法により、発現、精製を行った。

(5) 結晶化およびデータ測定

結晶化は蒸気拡散法にて行った。精製したタンパク質を膜濃縮し、タンパク質濃度が3から5%になるよう調製した。沈殿剤として濃度の異なるロッシェル塩とグリセロールあるいは濃度の異なるポリエチレングリコールを含むものを調製し、20度のインキュベーターにて静置した。結晶のデータ測定は、大型放射光施設 SPring-8 にて行った。ビームラインは BL38B1 および BL26B1、波長は 0.7-0.8 Å、ディテクターは、イメージングプレート様式の RAXIS-V および CCD タイプの Jupiter 210 を用いた。収集したデータを HKL2000 にてプロセッシングを行い、植物ソーマチン A の構造 (PDB: 1RQW) を初期モデルとして分子置換を行った。分子構造のモデリングは Coot を用いて行った。精密化は shelxl を用いて行った。以降変異体の初期構造については、自ら決定したリコンビナントソーマチン I の構造 (PDB: 3AL7) を鋳型とし、2.5 Å までのデータを使って shelxpro により rigid-body refinement を行った。その後順次分解能を上げて精密化を行い、最高到達分解能において、異方性温度因子を導入した。さらに水素原子を導入し、精密化を行った。構造を決定したのものについてはプロテインデータバンクに登録を行った。

(6) 培養細胞を用いた甘味特性評価、ソーマチンの応答に必須な受容体領域の特定

甘味受容体として7回膜貫通型G-protein coupled receptorであるT1R2、T1R3が同定されている。ヒトcDNAライブラリーより全長のT1R2、T1R3遺伝子を取得し、哺乳動物用発現ベクター (pCDNA3.2、pCDNA6.2、pCDNA3.3、pIRES2-DsRED2) にクローニングした。キメラGタンパク質 ($G_{\alpha 16-gust44}$) を安定的に発現するHEK293細胞にT1R2、T1R3をリポフェクション法によりトランスフェクションし、一過性に甘味受容体を発現させた。甘味物質に対する応答性は、Fluo-8AMを細胞に取り込ませた後甘味物質を添加し、蛍光イムノリーダー (Infinite F200, Tecan社製) を用い、励起波長 495 nm、蛍光波長 514 nm での蛍光強度を測定し、応答性を評価した。

マウス甘味受容体については、マウス舌 cDNA よりクローニングを行い、ヒト甘味受容体同様哺乳動物用発現ベクターにクローニングした。

4. 研究成果

(1) ソーマチン大量発現系の構築

抗生物質ブラストサイジン (300 µg/ml) を含む YPD プレートにて、スクリーニングを行ったところ M1, M3 についてはコロニーが得られたが、M5 についてはコロニーを得ることができなかった。そこで M3 の形質転換体について、ファーメンターによる発現を試みた。経時的にサンプリングを行い、SDS-PAGE にて発現を確認したところ、メタノール添加後 24 時間後にソーマチンと同じ移動度のバンドが確認された。最終的に発現量は培地上清 1L あたり約 100 mg であった。精製したリコンビナントソーマチンについて CD スペクトル、蛍光スペクトルを測定したところ、植物由来ソーマチンと顕著な違いは見られなかった。

(2) 酵母発現リコンビナントソーマチン I の構造解析

まず精製した植物由来ソーマチン I、リコンビナントソーマチン I について蒸気拡散法にて結晶化を試みた。グリセロール存在下で結晶化を行ったところ、植物由来ソーマチンと比べ、リコンビナントソーマチンの結晶生成が早いという結果が得られた。これは均一なリコンビナントソーマチンを結晶化サンプルとして用いることが結晶生成に影響を与えたものと考えられる。高分解能解析に適した結晶を得ることが出来たので、大型放射光施設 SPring-8 にてデータの取得を試み、双方とも分解能 1.1 Å までのデータを取得できた (表 1)。分子構造のモデリングは Coot を用いて行い、精密化は shelxl を用いて行った。異方性温度因子、水素原子を導入し最終構造を決定した (図 2)。分子内には、酒石酸イオン、グリセロールも含まれていた。

変異体の構造解析は構築したこれら構造モデルを鋳型にし現在精密化中である。

	Recombinant	Plant
Beamline	SPring-8 BL38B1	SPring-8 BL38B1
Detector	R-AXIS V	R-AXIS V
Crystal system	Tetragonal	Tetragonal
Space group	$P4_12_12$	$P4_12_12$
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 57.699, b = 57.699,$ $c = 149.776,$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$	$a = 57.698, b = 57.698,$ $c = 149.846,$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$
X-ray wavelength (Å)	0.7	0.7
Temperature (K)	100	100
Resolution limits (Å)	20.0-1.10 (1.14-1.10)	50.0-1.10 (1.12-1.10)
Total reflections	1118513	1032154
Unique reflections	102368 (9251)	103182 (5055)
R_{merge}	0.084 (0.368)	0.070 (0.417)
Completeness (%)	98.9 (90.8)	99.7 (99.5)
Multiplicity	6.5 (4.2)	5.2 (5.2)
$I/\sigma(I)$	27.69 (2.21)	37.74 (4.91)

表 1. リコンビナントソーマチン I、植物ソーマチン I の回折結果

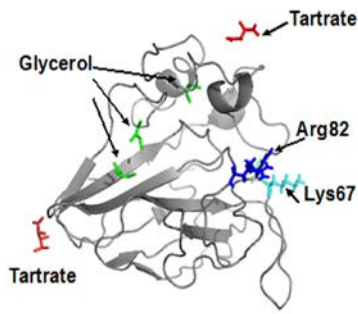


図2 リコンビナントソーマチン I の構造

リコンビナントソーマチン I の電子密度マップにおいて、ソーマチン I と II との間で配列が異なるアミノ酸残基近傍の電子密度マップがより明瞭であった (図3)

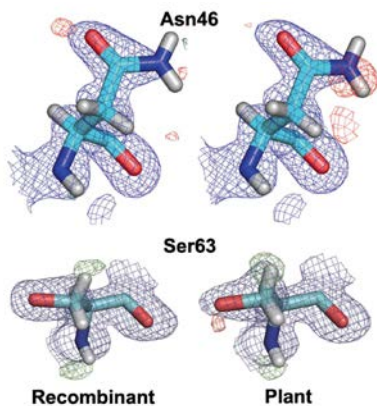


図3 Asn46、Ser63 近傍の電子密度

(3) ソーマチン II の構造解析

植物ソーマチンの中には少なくとも5種と同族体が存在し、その中でソーマチン I、ソーマチン II が主要構成成分である。これまでプロテインデータバンクには多くのソーマチン I の構造が登録されているが、ソーマチン II に関する構造情報はない。ソーマチン I とソーマチン II は 207 アミノ酸残基中僅か4アミノ酸残基の配列が異なるだけであるが、ソーマチン II の場合、高分解能解析に供することができる結晶を得るのが困難であった。精製条件、結晶化条件を精査することにより、初めてソーマチン II の構造を分解能 1.27 Å で決定することができた (図4)。

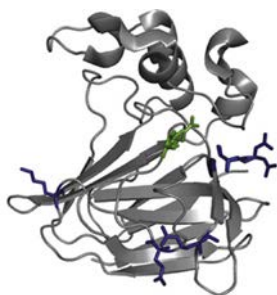


図4 ソーマチン II の構造

(4) pH8 におけるソーマチン I の構造

ソーマチンは酸性条件下では加熱に対し安定であるが、中性、アルカリ性条件下で加熱を施すと凝集し、甘味を消失する。この現象にはシスチン残基のβ-脱離反応が関わっており、リジノアラニン、システインの生成に伴う分子間ジスルフィド結合の形成が甘味消失に関与する。しかしながら、pH 変化に伴うどのような構造変化が加熱凝集の引き金になっているかの知見はない。今回 pH8 における高分解能構造 (1 Å) を決定した。pH6.5 および pH7.3 の構造と比較すると pH 変化に伴いドメイン II の 154 から 164 番目の領域が大きく揺らぐこと、リジン残基 (K137、K163、K187) の温度因子が高くなることが明らかとなった (図5)

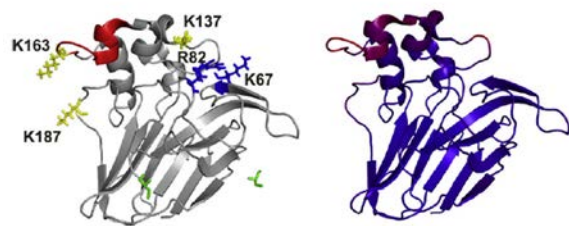


図5 pH8 におけるソーマチンの構造 (左図) pH 変化により赤色の領域が影響を受けやすい。温度因子の高いリジン残基を黄色で示す。(右図) average B-factor 最小 (青色=0)、最大 (赤色=30)

(5) ソーマチンの応答に必要な甘味受容体ドメインの同定

これまで甘味タンパク質の甘味特性評価はヒト官能検査によって行われてきたが、客観的評価が可能な評価系の構築を行った。甘味受容体を培養細胞に発現させた細胞を用い、ソーマチン変異体に対する応答を細胞内カルシウム変化により評価をした。ソーマチンの甘味は霊長類では検知されるが齧歯類では検知できない特徴を活かし、ヒト、マウス甘味受容体のサブユニットをスワップさせた受容体や、キメラ受容体を用い、ヒト T1R3 のシステインリッチドメインがソーマチンの応答に重要な役割を果たすことを見出した (図6)。

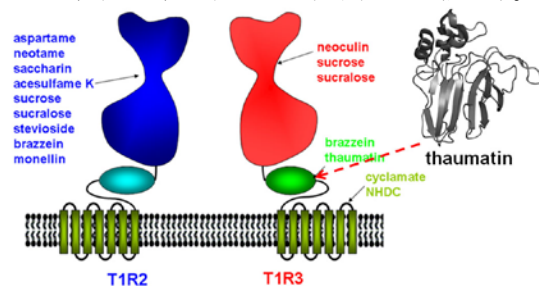


図6 ソーマチンの応答に必要な甘味受容体 (T1R2-T1R3) の部位

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 9 件)

- ① Masuda, T., Ohta, K., Mikami, B., Kitabatake, N., and Tani, F.
Atomic structure of the sweet-tasting protein thaumatin I at pH 8.0 reveals the large disulfide-rich region in domain II to be sensitive to a pH change. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、(2012) **419**, 72-76.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.129
- ② Ohta, K., Masuda, T., Tani, F., and Kitabatake, N.
Introduction of a Negative Charge at Arg82 in Thaumatin Abolished Responses to Human T1R2-T1R3 Sweet Receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、(2011) **413**, 41-45.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.08.033
- ③ Katagiri, M., Masuda, T., Tani, F., and Kitabatake, N.
Changes in textural properties of Japanese tenobe somen noodles during storage. *J. Food Sci.*, 査読有、(2011) **76**, S500-S507.
DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02419.x
- ④ Masuda, T., Ohta, K., Tani, F., Mikami, B., and Kitabatake, N.
Crystal structure of the sweet-tasting protein thaumatin II at 1.27 Å. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、(2011) **410**, 457-460.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.158
- ⑤ Masuda, T., Ohta, K., Mikami, B., and Kitabatake, N.
High-resolution structure of the recombinant sweet-tasting protein thaumatin I. *Acta Crystallogr. Sect. F67.*, 査読有、(2011) 652-658.
DOI: 10.1107/S174430911101373X
<http://hdl.handle.net/2433/142313>
- ⑥ Katagiri, M., Masuda, T., Tani, F., and Kitabatake, N.
Expression and development of wheat proteins during maturation of wheat kernel and the rheological properties of dough prepared from the flour of mature and immature wheat. *Food Sci. Technol. Res.*, 査読有、(2011) **17**, 111-120.
DOI:
<http://dx.doi.org/10.3136/fstr.17.111>
- ⑦ Ohta, K., Masuda, T., Tani, F., and Kitabatake, N.

The cysteine-rich domain of human T1R3 is necessary for the interaction between human T1R2-T1R3 sweet receptors and a sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、(2011) **406**, 435-438.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.063

- ⑧ Ohue, R., Hashimoto, K., Nakamoto, M., Furukawa, Y., Masuda, T., Kitabatake, N., and Tani, F.
Bacterial Heat Shock Protein 60, GroEL, Can Induce the Conversion of Naïve T Cells into a CD4⁺ CD25⁺ Foxp3-expressing Phenotype. *J. Innate Immunology*, 査読有、(2011) **3**, 605-613.
DOI: 10.1159/000330786
- ⑨ Masuda T., Ide N., Ohta K., and Kitabatake N.
High-yield secretion of the recombinant sweet-tasting protein thaumatin I. *Food Sci. Technol. Res.*, 査読有、(2010) **16**, 585-592.
DOI:
<http://dx.doi.org/10.3136/fstr.16.585>

[学会発表] (計 19 件)

- ① Masuda, T., Sano, A., Ohta, K., Taguchi, W., Tsukahara, A., Tani, F., and Kitabatake, N. Properties of the sweet-tasting protein, thaumatin. World Congress on Oleo Science & 29th ISF Congress. Sep. 30-Oct. 4, 2012, Arkas Sasebo, Nagasaki, Japan.
- ② 榎田哲哉、佐野文音、三上文三、谷史人、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンの高分解能X線結晶構造解析、日本食品科学工学会、2012年8月31日、藤女子大学
- ③ 片桐実菜、平川由紀、榎田哲哉、谷史人、北島直文、小麦粉加工食品に関する研究(2)小麦粉ドウの構造緩和に及ぼす内在性キシラナーゼとアマラーゼの影響、日本食品科学工学会、2012年8月30日、藤女子大学
- ④ 佐野文音、榎田哲哉、三上文三、谷史人、高分解能X線結晶構造解析による甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現機構の解明、日本生化学会近畿支部例会、2012年5月19日、京都大学
- ⑤ 田口若奈、太田圭介、佐野文音、榎田哲哉、北島直文、谷史人、点変異甘味受容体が甘味タンパク質ソーマチンとの相互作用に与える影響、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学
- ⑥ 榎田哲哉、太田圭介、三上文三、北島直文、谷史人、高分解能X線結晶構造解析による甘味タンパク質ソーマチンの甘味

- 発現機構の解明、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学
- ⑦ 塚原礼恵、榊田哲哉、北島直文、谷史人、甘味タンパク質ソーマチンの苦味抑制機構の検討、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学
- ⑧ 橋本恵以、星澤奈央子、榊田哲哉、谷史人、腸間膜リンパ節のT細胞活性化機能に及ぼすストレスタンパク質の影響、日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学
- ⑨ 塚原礼恵、榊田哲哉、谷史人、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンの苦味抑制機構の検討、日本農芸化学会、関西・中部支部合同大会、2011年10月2日、京都大学
- ⑩ 太田圭介、田口若奈、榊田哲哉、谷史人、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用（1）ヒト-マウス複合型甘味受容体を用いた解析、日本農芸化学会、関西・中部支部合同大会、2011年10月2日、京都大学
- ⑪ 田口若奈、太田圭介、榊田哲哉、谷史人、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用（2）点変異甘味受容体を用いた解析、日本農芸化学会、関西・中部支部合同大会、2011年10月2日、京都大学
- ⑫ 橋本恵以、榊田哲哉、北島直文、谷史人、腸間膜リンパ節のT細胞活性化機能に及ぼすストレスタンパク質の影響、日本農芸化学会、関西・中部支部合同大会、2011年10月1日、京都大学
- ⑬ 大植隆司、橋本恵以、中元昌広、古川祐一、榊田哲哉、北島直文、谷史人、大腸菌GroELによるCD4+CD25+Foxp3+制御性T細胞の産生誘導、日本農芸化学会、関西・中部支部合同大会、2011年10月1日、京都大学
- ⑭ 山下知草、平川由紀、榊田哲哉、谷史人、西津貴久、北島直文、湿熱処理小麦粉を用いて調製した天ぷらのサクサ感評価；音響法による天ぷらのサクサ感定量測定とバターの特性評価、日本食品科学工学会、2011年9月10日、東北大学
- ⑮ 榊田哲哉、太田圭介、谷史人、三上文三、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現機構、日本農芸化学会、2011年3月27日、京都女子大学
- ⑯ 太田圭介、榊田哲哉、谷史人、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用（2）アルギニン残基の重要性、日本農芸化学会、2011年3月27日、京都女子大学
- ⑰ 田口若奈、太田圭介、榊田哲哉、谷史人、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用（1）リジン残基

の重要性、日本農芸化学会、2011年3月27日、京都女子大学

- ⑱ 塚原礼恵、太田圭介、榊田哲哉、谷史人、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンの苦味抑制機構の検討、日本農芸化学会、2011年3月27日、京都女子大学
- ⑲ 榊田哲哉、太田圭介、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンの大量発現系の構築、日本食品科学工学会、2010年9月2日、東京農業大学

〔その他〕

- ① 甘味タンパク質の機能発現に関する高分解能X線結晶構造解析、SPring-8 利用報告書、2012B1067
- ② 高分解能X線結晶構造解析による甘味タンパク質の甘味発現機構の解明、SPring-8 利用報告書、2012A1048
- ③ 甘味タンパク質の機能発現に関する高分解能構造解析、SPring-8 利用報告書、2011B1073
- ④ 味覚関連タンパク質の機能発現に関する高分解能構造解析、SPring-8 利用報告書、2010B1064

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊田 哲哉 (MASUDA TETSUYA)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：80311744