

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20632

研究課題名（和文）ヒト苦味受容体の構造機能解析

研究課題名（英文）Structure-function analysis of human bitter taste receptors

研究代表者

堤 尚孝（Tsutsumi, Naotaka）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：70963495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：苦味受容体TAS2Rは味細胞における苦味物質の認識に加えて、口腔外の組織で多様な機能を有すると考えられている。本研究では、各種TAS2Rの発現・精製系を確立したうえで、gustducinをはじめとしたGタンパク質とTAS2Rのシグナル複合体の調製にも成功し、今後の機能・構造解析に向けた基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を基盤として苦味受容体の機能研究を展開することで、将来的には食品・医薬産業への貢献が期待できる。また、本研究で開発した組換えタンパク質発現技術は他の難生産性膜タンパク質へも適用可能であり、これまで機能・構造研究が停滞していた生理学的に重要なタンパク質の研究が進展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Bitter taste receptor TAS2Rs recognize bitter substances in taste cells and other tissues in the body and are considered to have diverse functions beyond bitter taste perception. In this study, I established expression and purification systems for various TAS2R subtypes and successfully prepared the signaling TAS2R complexes with gustducin. The recombinant TAS2Rs would be beneficial for future structural and functional analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：難生産性タンパク質 苦味受容体

1. 研究開始当初の背景

ヒトは 25 種類の苦味受容体 TAS2R を有し (TAS2R2 を含めると 26 種類)、これらを駆使して苦味物質を感知する (Wiener *et al. Nucleic Acids Res.* 2019, Lang *et al. Mol Nutr Food Res.* 2023)。TAS2R は、味細胞において各種化学物質を基本五味のひとつである「苦味」として認識するのみならず、呼吸器や消化器、皮膚、中枢神経系、生殖器、免疫細胞など全身の組織に発現して多様な機能を発揮すると考えられている (Tuzim and Korolczuk, *J Transl Med.* 2021)。

研究開始当初、クラス A/B/C/F 型のヒト GPCR に関しては構造・機能研究が進んでいたものの (Kooistra *et al. Nucleic Acids Res.* 2021)、これらとは独立の「クラス T 型」GPCR を形成する TAS2R の構造報告例はなく、その苦味物質の認識機構や受容体の活性化機構は未知であった。また、組換えタンパク質を用いて物理化学的解析を行った例も少なかった。

2. 研究の目的

TAS2R の大量発現・精製系を確立し、構造生物学的・物理化学的解析を進めることを目的として研究を行った。また、得られた組換えタンパク質を用いて薬理学的研究を進めるためのツールを開発することも当初の目的の 1 つであった。

3. 研究の方法

期待される組換えタンパク質の品質とスループットから、ヒト細胞株を用いた TAS2R 発現を行った。当初は一過性恒常発現 (Gibco Expi293F expression system) を試みていたが、令和 5 年度予算で誘導発現系 (Gibco Expi293F inducible expression system) を導入した。pcDNA5/TO ベクターに配列の類似性が比較的低い 9 種類の TAS2R 遺伝子をクローニングし、導入した系でタンパク質を発現させ、界面活性剤による細胞膜の可溶化後に抗 FLAG M1 抗体を用いた Western Blotting (WB) を行うことで小スケールでの 1 次発現スクリーニングと発現コンストラクトの最適化を進めた。2 次発現スクリーニングとしては、界面活性剤で可溶化した TAS2R に対して、蛍光標識した抗 FLAG 抗体断片 (Alexa647-conjugated anti-FLAG M1 Fab, Fab647) を利用した蛍光サイズ排除クロマトグラフィー (FSEC) を行った。カラムには Bio SEC-5 (Agilent Technology, 500 Å, 4.6×300 mm) を使い、650 nm の励起光で 671 nm の蛍光を検出した。得られた FSEC プロファイルから、組換え TAS2R の発現量と分散性を評価した。

初期の検討で特に性状の良いと考えられた TAS2R サブタイプについて、小スケールでの発現・精製実験を行った。TAS2R 単体での発現、および NanoBit の系を利用して TAS2R と G タンパク質 (Gustducin: $G\alpha_{gust}$, $G\beta_1$, $G\gamma_2$ のヘテロ三量体) の共発現を行い、細胞膜を界面活性剤で可溶化して抗 FLAG M1 アフィニティレジンを用いた精製を行った。溶出液を濃縮して Superose 6 10/300 GL (Cytiva) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーでさらに精製し、SDS-PAGE でおおよその純度を評価した。

4. 研究成果

種々の条件を最適化することで、図 1A に示したように複数の TAS2R サブタイプについて WB レベルでの大幅な発現量の向上に成功した。また FSEC 解析から、いくつかの TAS2R サブタイプが良好な分散性を示すことを確認した。図 1B に、最も性状の良いと考えられた TAS2R サブタイプの FSEC プロファイルを、ヒトサイトメガロウイルス由来の GPCR である US28 との比較として示した。また図 2 に示したように、TAS2R と gustducin の共発現と精製を行うことで、シグナル複合体をクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) 単粒子解析の条件検討を開始するのに十分な品質で得ることに成功した。これらの結果から、発現・精製のスケールアップとさらなる条件検討により、様々なリガンドの存在下で cryo-EM 条件の検討を行うのに十分な量の組換え TAS2R を得ることができると考えられる。また、立体構造を認識する抗体の取得やリガンドスクリーニングなど、得られた組換えタンパク質の解析・利用を進めるための前提条件が整った。

一方で、研究開始後すぐに他のグループから TAS2R46 の構造が報告され (Xu *et al. Science* 2022)、最近では TAS2R14 の構造も明らかとなった (Kim *et al. Nature* 2024, Peri *et al. bioRxiv* 2024)。これら 2 つの TAS2R は、TAS2R10 と共に特に多様な苦味物質に応答することで知られる。発現量の向上が見られた TAS2R には、苦味物質への選択性が極めて高いものから中程度のもの、低いものも含まれ、TAS2R と苦味物質の多対多の認識機構を研究する上での基盤となりうる。

また本研究で確立した Expi293F inducible system を用いた難生産性膜タンパク質のハイスループット発現法は、TAS2R 以外の難生産性膜タンパク質の発現にも応用できる可能性がある。そのため今後は、例えばヒト由来の嗅覚受容体や非視覚型光受容体など、高品質組換えタンパク質の生産が難しいとされる標的への応用を検討する。

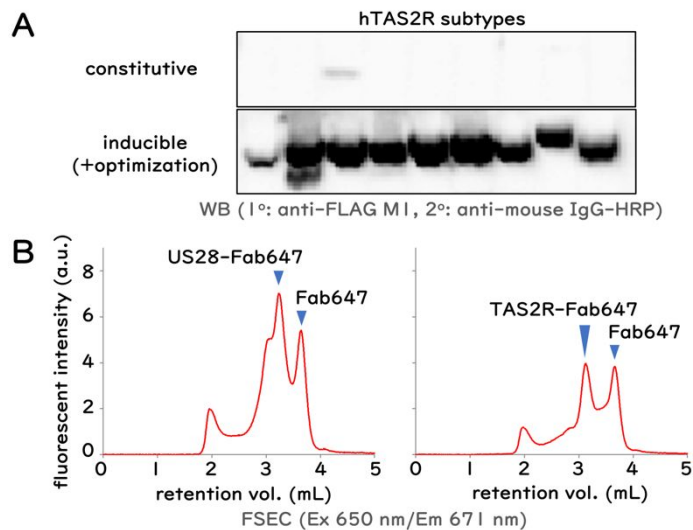


図1 TAS2Rの発現スクリーニング

- (A) 発現系とコンストラクトの最適化。一定培養量あたりの発現量を、抗FLAG抗体を用いたWBで比較した。
- (B) 界面活性剤で可溶化したTAS2Rの溶液中での分散性。Alexa647標識した抗FLAG Fabを用い、FSEC(励起波長650 nm、蛍光波長671 nm)で解析している。左はコントロールとして使用したヒトサイトメガロウイルス由来のGPCR(US28)、右は特に性状の良かった実験構造が未報告のヒトTAS2R。

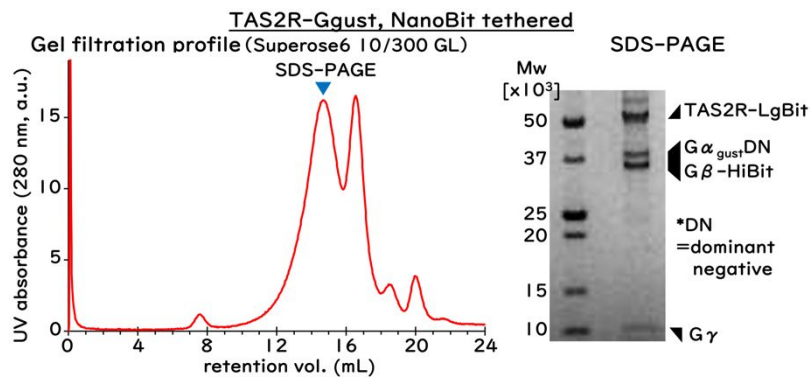


図2 TAS2R-Ggust複合体の精製

左にサイズ排除クロマトグラフィーのプロファイル、右にピークフラクションのSDS-PAGEを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Jaunet-Lahary Titouan, Shimamura Tatsuhiro, 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 -

1. 著者名 Caveney Nathanael A, Tsutsumi Naotaka, Garcia K Christopher	4. 巻 12
2. 論文標題 Structural insight into guanylyl cyclase receptor hijacking of the kinase?Hsp90 regulatory mechanism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP86784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.86784.3	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 Tsutsumi Naotaka, Masoumi Zahra, James Sophie C., Tucker Julie A., Winkelmann Hauke, Grey William, Picton Lora K., Moss Lucie, Wilson Steven C., Caveney Nathanael A., Jude Kevin M., Gati Cornelius, Piehler Jacob, Hitchcock Ian S., Garcia K. Christopher	4. 巻 186
2. 論文標題 Structure of the thrombopoietin-MPL receptor complex is a blueprint for biasing hematopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 4189 ~ 4203. e22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2023.07.037	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 Glassman Caleb R., Tsutsumi Naotaka, Saxton Robert A., Lupardus Patrick J., Jude Kevin M., Garcia K. Christopher	4. 巻 376
2. 論文標題 Structure of a Janus kinase cytokine receptor complex reveals the basis for dimeric activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 163 ~ 169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abn8933	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 Caveney Nathanael A, Glassman Caleb R, Jude Kevin M, Tsutsumi Naotaka, Garcia K Christopher	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of the IL-27 quaternary receptor signaling complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e78463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.78463	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 Wilson Steven C., Caveney Nathanael A., Yen Michelle, Pollmann Christoph, Xiang Xinyu, Jude Kevin M., Hafer Maximilian, Tsutsumi Naotaka, Piehler Jacob, Garcia K. Christopher	4. 巻 609
2. 論文標題 Organizing structural principles of the IL-17 ligand-receptor axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 622 ~ 629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05116-y	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 Rosenkilde Mette M., Tsutsumi Naotaka, Knerr Julius M., Kildedal Dagmar F., Garcia K. Christopher	4. 巻 9
2. 論文標題 Viral G Protein-Coupled Receptors Encoded by - and -Herpesviruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annual Review of Virology	6. 最初と最後の頁 329 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-virology-100220-113942	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 Tsutsumi Naotaka, Hwang Sunhee, Waghay Deepa, Hansen Simon, Jude Kevin M., Wang Nan, Miao Yi, Glassman Caleb R., Caveney Nathanael A., Janda Claudia Y., Hannoush Rami N., Garcia K. Christopher	4. 巻 120
2. 論文標題 Structure of the Wnt-Frizzled-LRP6 initiation complex reveals the basis for coreceptor discrimination	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2218238120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2218238120	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 Caveney Nathanael A., Saxton Robert A., Waghray Deepa, Glassman Caleb R., Tsutsumi Naotaka, Hubbard Stevan R., Garcia K. Christopher	4. 巻 42
2. 論文標題 Structural basis of Janus kinase trans-activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112201 ~ 112201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112201	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4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 堤尚孝
2. 発表標題 Wnt-Frizzled-LRP6複合体の構造が明らかにした古典的 -カテナニンシグナルの開始機構
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naotaka Tsutsumi
2. 発表標題 Structural evolution of human cytomegalovirus GPCRs US27 and US28
3. 学会等名 The 4th European Chemokine and Cell Migration Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naotaka Tsutsumi
2. 発表標題 Structural mechanism of Janus kinase activation
3. 学会等名 第20回蛋白研リトリート (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤尚孝
2. 発表標題 サイトカインと腫瘍性変異によるヤヌスキナーゼの活性化機構
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 堤尚孝	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 3
3. 書名 実験医学2024年9月号	

1. 著者名 堤尚孝	4. 発行年 2024年
2. 出版社 日本生物物理学会	5. 総ページ数 4
3. 書名 生物物理2023年63巻6号	

1. 著者名 堤尚孝	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学2022年9月号	

〔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
---------	---------