

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792128

研究課題名（和文） 甘味受容体と味覚修飾物質の相互作用解析

研究課題名（英文） Analysis for interaction between sweet receptor and taste modifiers

研究代表者

實松 敬介（SANEMATSU KEISUKE）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70567502

研究成果の概要（和文）：

甘味抑制物質であるギムネマ酸とグルマリンに関し、甘味受容体 T1r2/T1r3 再構築系を用いてその相互作用の解明を目指した。その結果、ギムネマ酸がヒト T1r3 の膜貫通領域、グルマリンがマウス T1r3 のアミノ末端領域に作用する結果を得た。さらにギムネマ酸は、ヒト甘味抑制物質であるラクチゾールと結合サイトを共有するが、ギムネマ酸感受性だけに重要なアミノ酸残基を同定した。グルマリンに関しては、各系統のマウス T1r2/T1r3 の応答解析を行い、系統差を生じる変異を同定した。

研究成果の概要（英文）：

Gymnemic acid (GA) and gurmardin (Gur) are known as selective inhibitors for sweet taste responses in mammals. To clarify the mechanisms of sweet-suppressing effects, we examined potential effects of these inhibitors on HEK293 cell responses heterologously expressed T1r2+T1r3. The results showed that similar to previous studies in humans and mice, GA and Gur inhibited the  $[Ca^{2+}]_i$  responses of HEK293 cells expressing human and mouse T1r2+T1r3 to various sweeteners and these effects were inhibited by  $\gamma$ - and  $\beta$ -CD, respectively. We examined the responses of mouse/human chimeras of T1r2 and T1r3 to identify the interaction sites for GA and Gur. Our results suggest that the main target for GA's action is transmembrane region of human T1r3 and Gur interacts with amino terminal region of mouse T1r3. Our mutation analysis indicate that the molecular basis for strain-specific sensitivity to Gur depends on a site within amino terminal region of mouse T1r2. In our models, GA is predicted to dock to a binding pocket within the transmembrane region of human T1r3 and Gur docks with amino terminal regions of mouse T1r2 and T1r3.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：味覚、甘味受容体、味覚修飾物質、グルマリン、ギムネマ酸

## 1. 研究開始当初の背景

甘味受容体 T1r2/T1r3 のリガンド特性には顕著な種差がある。植物ギムネマシルベスタに含まれるトリテルペン配糖体・ギムネマ酸 (GA) はヒトの甘味を抑制するが、マウスには無効である。同じ植物に含まれるペプチド・

グルマリン (Gur) は、逆に、マウスに有効で、ヒトには無効である。これらの事実は、甘味受容体 T1r2/T1r3 の、系統発生や進化の過程における食環境に適応した種特異的なアミノ酸変異に基づくものと推定される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒトおよびマウス T1r2/T1r3 を HEK293 細胞に強制発現させた甘味受容体再構築系を用い、GA、Gur を用いて、甘味受容体と味覚修飾物質との相互作用の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

甘味受容体 T1r2、T1r3 および Ga16-gust44 を HEK293 細胞にリポフェクション法により強制発現させた。甘味応答は、カルシウムイメージング法により測定を行い、環流下に甘味溶液、味覚修飾物質を流し、細胞内カルシウム濃度を測定、味覚修飾効果を評価した。導入遺伝子は、マウス、ヒト T1r2/T1r3、マウス、ヒト異種間のキメラ体、および点変異を導入した T1r2/T1r3 を用い、各味覚修飾物質に対する感受性の評価を行った。結合に関与あるいは味覚修飾作用に関与すると推測されるアミノ酸残基、感受性に種差を与える可能性のあるアミノ酸残基、マウスでの神経応答から得られた系統差を与える可能性のあるアミノ酸残基に対し点変異の導入を行った。得られたデータを基にドッキングシミュレーション解析を行い、詳細な結合モデルを作成し、味覚修飾物質が甘味受容体にどのように結合、修飾するかの検討を行った。

## 4. 研究成果

ヒト T1r2/T1r3 およびマウス T1r2/T1r3 を Ga16-gust44 とともに強制発現させた単一 HEK293 細胞の GA および Gur 処理前後の細胞内カルシウム応答例を示す(図 1, 2)。

ヒト T1r2/mT1r3 を強制発現させた HEK293 細胞は、各種甘味溶液による刺激に対して細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。GA 処理後、この細胞は甘味溶液に対する細胞内カルシウム濃度の上昇を示さず、甘味抑制効果を認めた。GA 抑制剤である  $\gamma$ -シクロデキストリン (CD) 処理後、同細胞は再び各種甘味溶液に反応を示した(図 1)。

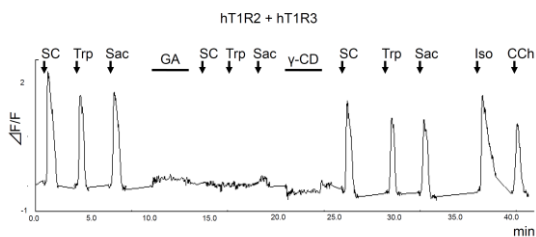


図 1 ヒト T1r2/T1r3 発現細胞の GA および  $\gamma$ -CD 処理前後の甘味応答

マウス T1r2/T1r3 を強制発現させた HEK293 細胞も、各種甘味溶液による刺激に対し細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。Gur 処理後、この細胞は、甘味溶液に対する

細胞内カルシウム濃度の上昇を示さず、甘味抑制効果を認めた。Gur 抑制剤である  $\beta$ -CD 処理後、同細胞は再び各種甘味溶液に反応を示した(図 2)。

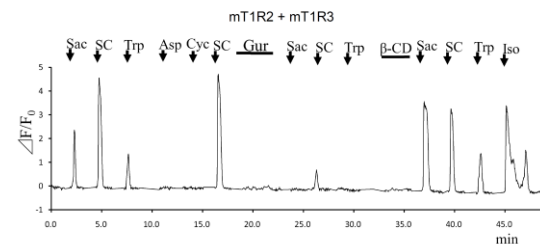


図 2 マウス T1r2/T1r3 発現細胞の Gur および  $\beta$ -CD 処理前後の甘味応答

GA は、マウス T1r2/T1r3 に甘味抑制効果を示さず、Gur はヒト T1r2/T1r3 で甘味抑制効果を示さなかった。

次にこの異なる感受性を利用し、マウス/ヒトの T1r2/T1r3 の異種間の組み合わせおよびキメラを用いた解析により、これら修飾物質の結合ドメインの同定を試みた。その結果、GA はヒト T1r3 の膜貫通ドメインおよびヒト T1r2 のシステインリッチドメイン(図 3)、Gur はマウス T1r3 の N 末端ドメインに作用することが示唆された(図 4)。

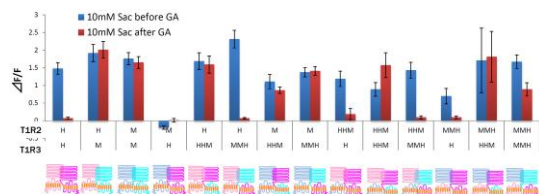


図 3 ギムネマ酸の結合サイトの同定

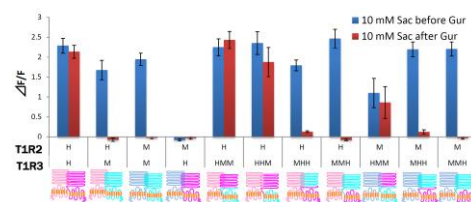


図 4 グルマリンの結合サイトの同定

以前報告されたギムネマ酸同様、ヒトの甘味を抑制するラクチゾールの感受性を低下させるアミノ酸変異を用いてギムネマ酸の効果を調べたところ、ギムネマ酸感受性の低下を示した。よってギムネマ酸は、ラクチゾールと結合サイトを共有することが示唆された。さらに分子モデリングの結果から、結合に重要なアミノ酸残基に変異を与えたところ、主にラクチゾールよりもギムネマ酸において感受性に重要なアミノ酸残基を同定した(図 5, 6)。

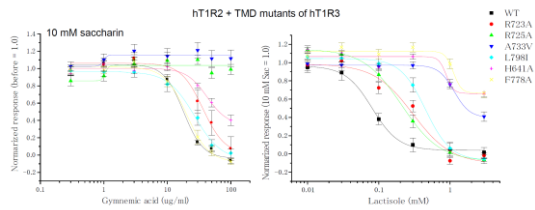


図5 ヒト T1r3 各変異におけるギムネマ酸(左)とラクチゾール(右)の甘味抑制効果

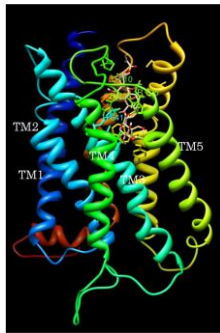


図6 ヒト T1r3 膜貫通領域に結合するギムネマ酸の分子モデル

Gur に関しては、マウス系統間の感受性の差を用いた解析により、Gur 抑制メカニズムにおける副経路の存在が示唆された。

#### 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 3 件)

①Shigemura N, Iwata S, Yasumatsu K, Ohkuri T, Horio N, Sanematsu K, Yoshida R, Margolskee RF, Ninomiya Y.

Angiotensin II Modulates Salty and Sweet Taste Sensitivities. *J Neurosci*. 査読有, 33: 6267-6277, 2013

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5599-12.2013

②Li YJ, Kukita A, Watanabe T, Takano T, Qu P, Sanematsu K, Ninomiya Y, Kukita T.

Nordihydroguaiaretic acid inhibition of NFATc1 suppresses osteoclastogenesis and arthritis bone destruction in rats. *Lab Invest.*, 査読有, 92: 1777-1787, 2012

DOI: 10.1038/labinvest.2012.134

③Yoshida R, Niki M, Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y.

Modulation of sweet responses of taste receptor cells, *Semin Cell Dev Biol.*, 査読有, 24: 226-231, 2012

DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.08.004

[学会発表] (計 8 件)

①實松 敬介, 北川 昌幸, 中村 由紀, 野村 政壽, 重村 憲徳, ニノ宮 裕三  
肥満者におけるレプチンおよび味覚日内変動の検索、味と匂学会第 46 回大会、2012. 10.3-5、大阪

②上瀧 将史, 實松 敬介, 重村 憲徳, ニノ宮 裕三  
腸管内分泌細胞の味覚感受性に対するカンナビノイドの効果、味と匂学会第 46 回大会、2012. 10.3-5、大阪

③實松敬介, ニノ宮裕三  
甘味受容細胞の感受性抑制機構、病態生理学会 (招待講演)、2012. 8. 3、大分

④Sanematsu K, Kitagawa M, Nakamura Y, Nomura M, Shigemura N, Ninomiya Y.  
Lack of diurnal variation of sweet recognition thresholds in over-weight and obese humans. ISOT XVI, 2012.6.23-27, Stockholm, Sweden

⑤Sanematsu K, Kitagawa M, Nakamura Y, Nomura M, Shigemura N, Ninomiya Y.  
Diurnal variation of plasma leptin levels and taste recognition thresholds in over-weight and obese subjects. *ACheMS* 2012, 2112.4.25-28, Huntington Beach, USA

⑥實松 敬介, ニノ宮 裕三  
Molecular mechanisms for sweet-suppressing effects of gymnemic acid and gurmarin、日本味と匂学会第 45 回大会 (招待講演)、2011.10.1、金沢

⑦實松 敬介, ニノ宮 裕三  
甘味受容体 T1r2/T1r3 に対する味覚修飾物質の相互作用部位の解析、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (招待講演)、2011. 9. 30、岐阜

⑧實松 敬介, ニノ宮 裕三  
甘味抑制物質グルマリンの分子メカニズム、第 34 回日本神経科学大会 (招待講演)、2011. 9. 1、横浜

[図書] (計 2 件)

①實松 敬介, 重村 憲徳, ニノ宮 裕三, 化学同人、化学受容の科学「味覚受容体」、2012、48-57

②實松 敬介, ニノ宮 裕三, 中山書店、疾患モデルマウス表現型解析指南「味覚」、2011、

128-133

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a06/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

實松 敬介 (SANEMATSU KEISUKE)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：70567502

### (2) 研究分担者

無し ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

無し ( )

研究者番号：