

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 14 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580172

研究課題名(和文) 味覚受容体における味物質認識機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of taste-recognition mechanism through taste receptor

## 研究代表者

井深 章子 (SHIMIZU-IBUKA, Akiko)

新潟薬科大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60301420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：甘味は舌上の味細胞の細胞膜に存在する膜タンパク質、甘味受容体によって受容される。本研究では、甘味受容体と味物質の相互作用解析を目指し、ヒト甘味受容体のN末端細胞外ドメイン(ATD)の発現系構築と解析を試みた。

甘味受容体を構成するサブユニットhT1R2, hT1R3のATD(hT1R2-ATD, hT1R3-ATD)をマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として大腸菌で生産することに成功した。発現量の多いhT1R3-ATDを解析に供したが、タンパク質が非常に不安定であり、その分子サイズを解析したところ、実際のタンパク質よりも桁違いに大きい粒子を形成していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sweet taste is perceived through sweet-taste receptor, which is a membrane protein of taste cells. In this study, we tried to construct expression system of amino terminal domain (ATD) of human sweet-taste receptor, that is a heterodimer of hT1R2 and hT1R3, in order to analyze the interaction between sweet-taste receptor and sweeteners.

We succeeded to produce ATD of hT1R2 and hT1R3 fused with maltose-binding protein (MBP) in E.coli. We further analyzed hT1R3-ATD, since its expression level was higher than that of hT1R2-ATD. The protein was very unstable, and the molecular size was found to be much larger than the size expected.

研究分野：酵素学

キーワード：甘味受容体

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトが感じる味は、塩味・酸味・苦味・旨味・甘味の5基本味に大別される。味物質は舌上の組織“味蕾”の細胞表面に存在する味覚受容体に結合し、味のシグナルを細胞内に伝える。5基本味の味物質は、味ごとにそれぞれ異なる受容体によって認識される。味覚受容体タンパク質の研究は国内外の多くのグループで進行中であるが、発現量が非常に少なく、また膜タンパク質であるために生成・発現系構築が困難であり、分子レベルでの解析例はほとんどない。

5基本味のうち甘味・旨味・苦味はGタンパク質共役型受容体によって受容される。苦味受容体では苦味物質の種類によって受容体が異なり、ヒトでは25種類の苦味受容体が同定されている。一方、甘味受容体・旨味受容体はそれぞれ1種類ずつしか確認されていない。つまり甘味の場合、低分子甘味料から高分子甘味タンパク質まで、多様なサイズ・構造の甘味料を単一の受容体が結合・認識することになる。甘味受容体がいかにして分子量180のグルコースと分子量数万の甘味タンパク質の両方を“甘味”として認識するのか、その結合様式はどうなっているのか。甘味を含む味物質の認識機構は未だに明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、味覚受容体の味認識メカニズムの分子レベルでの解明である。そのためには、研究対象となる味覚受容体の精製標品を得る必要がある。本研究での到達目標は以下の通りであった。

(1) 甘味受容体 T1R2-T1R3 (特に細胞外ドメイン ATD) を微生物で高発現する条件を探索し、その精製方法を確立する。また、発現したタンパク質のフォールディング・二量体形成を解析する。

(2) 旨味受容体の全長および各ドメインでの発現系を構築し、高発現コンストラクトのスクリーニングを行う。

(3) 苦味受容体はヒトで25種類が知られている。これらの発現スクリーニングを行い、相対的に発現量が高いものについて発現系の改良・培養条件の検討・精製を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト甘味受容体の発現系構築

甘味受容体はT1R2とT1R3という2つの分子から成るヘテロ二量体である。各サブユニットはN末端細胞外ドメイン(ATD)、システイン残基に富むCys-rich領域、7本の $\alpha$ -ヘリックスを含む膜貫通領域、そしてC末端細胞内領域で構成され、このうちN末端細胞外ドメイン(ATD)が甘味物質を結合・認識する。膜タンパク質である甘味受容体の全長を大

量発現・精製することは困難であるため、本研究ではATDを対象を絞って大腸菌を用いた発現系構築を行った。発現系の構築に当たっては、菌株の検討、発現ベクターおよび融合タンパク質の検討、発現領域の検討を行った。

### (2) 大腸菌で発現したヒト甘味受容体 ATD の精製条件の検討

組換えタンパク質を(His)<sub>6</sub>タグに対するアフィニティカラムで精製し、TEVプロテアーゼ処理による融合タンパク質の除去を行った。

### (3) 精製タンパク質の分子サイズの解析

精製タンパク質の分子サイズをゲルろ過クロマトグラフィー、動的光散乱、原子間力顕微鏡の手法を用いて解析した。

### (4) 苦味受容体 hTAS2R41 の精製に用いる界面活性剤のスクリーニング

酵母を宿主として苦味受容体 hTAS2R41 の発現系を構築し、目的タンパク質の高発現株をFACS(fluorescence activated cell system)、結晶化に適した界面活性剤のスクリーニングを蛍光ゲルろ過クロマトグラフィーにて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 大腸菌を宿主としたヒト甘味受容体 ATD の発現系構築

本研究では、発現に用いる大腸菌株の検討、発現ベクターおよび融合タンパク質のコンストラクトの検討を行った。まず、融合させるタンパク質として、融合タンパク質の可溶性を高めることが知られているマルトース結合タンパク質(MBP)を選択した。pET系ベクターを用いてhT1R2、hT1R3のそれぞれのATDのN末端側にMBPを配置し、MBPとATDの間にはTEVプロテアーゼ認識部位、さらに全体のN末端に(His)<sub>6</sub>タグ、C末端にはFLAGタグを付加した融合タンパク質発現ベクターを構築した。菌株は、BL21(DE3)pLysS、Shuffle T7 Express、Origami(DE3)の3種を用い、融合タンパク質の発現を確認した。全ての菌株において目的タンパク質が生産されたものの、その大部分は不溶性画分に存在していた。大腸菌の培養温度を37から30、25、18に下げると、Origami(DE3)にジスルフィド結合イソメラーゼ(DsbC)発現プラスミドを導入した菌において、18で培養した場合に目的タンパク質が可溶性画分に確認された。また、ヒト甘味受容体はhT1R2とhT1R3という2つの異なるサブユニットからなるヘテロダイマーであるが、両方のATD発現系を構築したところ、hT1R3-ATDの方が発現量が多いことが判明した。よって以下の実験では、この発現系で生産したhT1R3-ATDを解析に用いることとした。

### (2) 発現タンパク質の精製および融合タン

## パク質の除去

融合タンパク質の(His)<sub>6</sub>タグに対するアフィニティークロマトグラフィ精製を行い、SDS-PAGE (クマシー染色) で単一バンドとして確認できる状態に精製することに成功した(図1)。

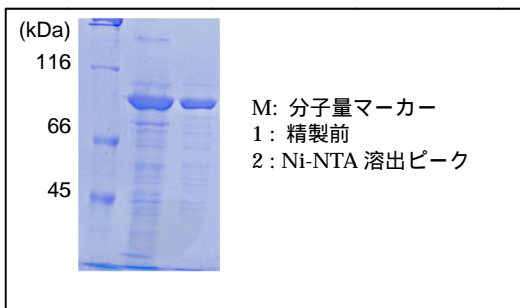


図1. Ni-NTA を用いた MBP-hT1R3-ATD の精製結果 (SDS-PAGE)

この精製タンパク質を TEV プロテアーゼ処理することにより、融合タンパク質からの MBP 除去を試みた。しかし、融合タンパク質は TEV プロテアーゼによってほとんど切断されなかった。TEV プロテアーゼ認識部位が存在する MBP と ATD の間の配列 (リンカー配列) が、プロテアーゼ側からアクセスしにくい状態になっている可能性が高いと考え、リンカー配列の改良・アミノ酸残基の挿入を行った。その結果、TEV プロテアーゼ処理により MBP 除去した hT1R3-ATD を得ることに成功した。

## (3) 大腸菌で発現した hT1R3-ATD の分子状態の解析

以降の解析を進めるにあたっては、融合タンパク質から MBP を除去した hT1R3-ATD のフォールディングが適切に起こり、分子が均一 (単分散) 状態であるかどうか重要となる。そこで、得られた hT1R3-ATD をゲルろ過クロマトグラフィーで分析した。その結果、ここで得られたピーク位置は、T1R3-ATD の分子サイズから予想されるピーク位置よりも遙かに大きいことが判明した。(図2)

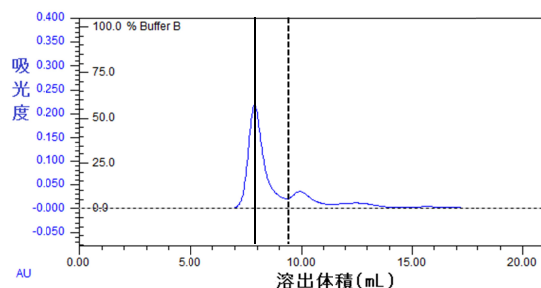


図2. 組換え hT1R3-ATD のゲルろ過クロマトグラフィーの結果。は排除体積 (70 kDa)、は hT1R3-ATD の分子量から計算した予想ピーク位置を示す。

タンパク質のピークがゲルろ過カラムの排除体積に確認されたため、アグリゲーションが起きている可能性が考えられた。そこで、

試料に界面活性剤  $\alpha$ -DDM を添加したが、ピーク位置に変化は見られなかった。また、MBP 除去後の hT1R3-ATD タンパク質は非常に不安定であり、短時間であっても室温にすると SDS-PAGE でバンドが検出できなくなった。以上のことから、一般に球状タンパク質で起こるようなフォールディングは起きておらず、プロテアーゼによる分解を受けやすい状態であると考えられた。

MBP を除去した hT1R3-ATD が室温で不安定であったため、MBP 除去前の融合タンパク質を用いて、動的光散乱 (DLS) 解析および原子間力顕微鏡 (AFM) 解析を行った。どちらの解析法でも、この分子は予想よりも遙かに大きい分子量で存在することが示され、アグリゲーションを起こした状態であることが強く示唆された (図3)。

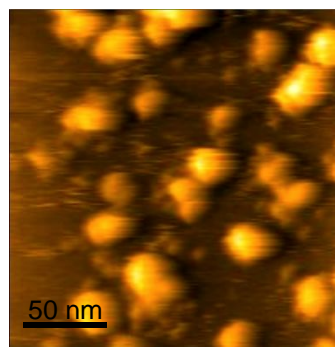


図3. 原子間力顕微鏡で観察した MBP-hT1R3-ATD 融合タンパク質。

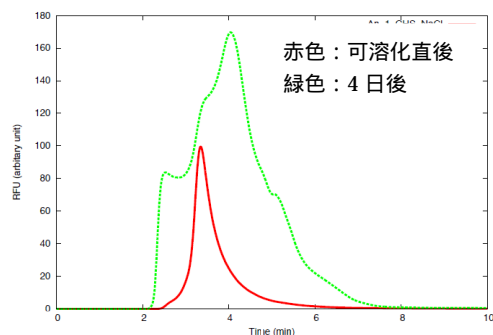
ここまでの結果より、大腸菌で発現した hT1R3-ATD は期待したような立体構造は取っておらず、不安定な構造でアグリゲーションを起こしている可能性が高いことが示された。現状では、この分子を用いたリガンド結合アッセイ・立体構造解析は難しい。界面活性剤の添加や、構造を安定化するリガンドの添加などを行い、さらなる条件検討を行う必要があると考える。

## (4) 苦味受容体の高発現株スクリーニングおよび結晶化に適した苦味受容体のスクリーニング

酵母 *P. pastoris* を宿主として苦味受容体 hTAS2R41 の発現系を構築し、目的タンパク質の高発現株を FACS (fluorescence activated cell system) で選択した。さらに、結晶化に適した単分散状態の受容体を選択するため、蛍光ゲルろ過クロマトグラフィーで GFP 融合タンパク質として発現した hTAS2R41 の界面活性剤スクリーニングを行った。添加した界面活性剤は、膜タンパク質の精製・結晶化で良く用いられる 3-(テトラデシルジメチルアミノ)プロパン-1-スルホナート (ANZERGENT 3-14)、ANZERGENT3-14、ラウリルマルトースネオペンチルグリコール (MNG)、n-ドデシル-D-マルトピラノシド (DDM) である。脂質としてコレステロールヘミコハク酸 (CHS) を添加する条件も試した。その結果、

1.0% DDM/0.1% CHS の条件で、精製後も受容体タンパク質が単分散状態を保つことが明らかになった(図4)。

#### <ANZERGENT 3-14>



#### <DDM-CHS>

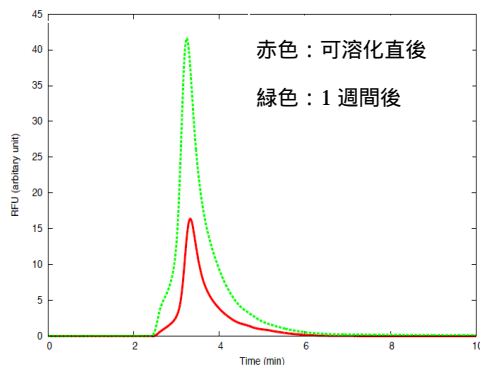


図4. FSEC 蛍光分析による界面活性剤のスクリーニング

この結果に基づいて、今後は可溶化条件の検討、塩や温度の安定性への影響を調べ、構造解析可能な精製試料の調製法を確立したいと考えている。

#### 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)

[学会発表](計 1件)

佐藤沙知、大石佳奈、大谷典正、井深章子、ヒト甘味受容体タンパク質 hT1R2/hT1R3 ATD の発現・精製、日本農芸化学会東北支部第 147 回対会、2012 年 10 月 6 日、弘前大学(青森県)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

井深 章子 (IBUKA, Akiko)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：60301420