

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657120

研究課題名(和文) うま味受容体 T1R1・T1R3 の分子間およびドメイン間相互作用解析

研究課題名(英文) Interaction between domains of the umami receptor, T1R1 and T1R3

研究代表者

海老原 充 (Mitsuru, Ebihara)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：80232974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：うま味受容体 T1R1 および T1R3 はヘテロダイマーを形成することが知られているが、その相互作用領域は明らかにされていない。本研究では、膜貫通ドメイン間、特に最初の膜貫通ドメインに存在するロイシンリピートが T1R1 および T1R3 相互作用に関わっているかどうかを split GFP 法を用いて解析した。その結果、ロイシンリピートは長さ依存的に 2 分子の相互作用に相関があることが明らかになった。今後、肉食・草食動物由来のうま味受容体およびそれらのハイブリッド受容体を用い、T1R1・T1R3 の親和性やヘテロダイマー形成能がうま味受容に与える影響を解明していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Umami receptors, T1R1 and T1R3 are known to form heterodimer, but mechanism of interaction between them remain unclear. In this study, interaction between leucine repeat which exist in the first transmembrane domain of T1R1 and T1R3 was analyzed by using split GFP method. It was shown that both of leucine repeats from the first transmembrane domains have a role in T1R1-T1R3 interaction, at least in part. Hybrid molecules constructed from the umami receptor genes of carnivore, herbivore and omnivore animals may reveal which transmembrane domains could be involved in dimerization of T1R1 and T1R3. Furthermore, this interaction may affect function of the umami receptors and perception of umami taste.

研究分野：分子生物学

キーワード：うま味受容体 タンパク質 - タンパク質相互作用 GPCR split GFP法

1. 研究開始当初の背景

聴覚、視覚などと異なり、味覚は他者との比較や数値化が困難であり、また味覚障害は生活に決定的な不便をもたらすこともないことから、他の感覚研究に比較すると十分な研究がなされているとは言い難い。また、従来の味覚研究は、人を対象とした官能検査や神経化学的研究、およびマウスなどの限られた実験動物を用いた研究に限定されてきた。

しかし、近年、ジャイアントパンダのうま味受容体が偽遺伝子化していること、ネコの甘味受容体に変異が生じていることなどが報告され、従来用いられてきた実験動物だけでは感覚受容の一面を見ているに過ぎないことが明らかになってきている。これは、生物が多種多様な環境に生息しており、それぞれの環境に応じた適応をしてきたことによると考えられる。

以上のことから従前通りの実験動物の枠を超えた味覚受容体研究が求められている。

2. 研究の目的

うま味受容体T1R1 およびT1R3 はヘテロダイマーを形成し、うま味物質を受容することが知られている。味物質の結合部位やシグナル伝達機構についての研究はなされているが、ヘテロダイマー形成のメカニズムや相互作用に関するモチーフ等は、全く研究されていない。本研究では、split GFP 法やBiacore を用いて、T1R1・T1R3 にそれぞれ7 つ存在する膜透過ドメインのどれとどれが、あるいは細胞外ドメインのどの領域がヘテロダイマー形成に関与しているのかを明らかにするとともに、肉食・草食動物由来のうま味受容体およびそれらのハイブリッド受容体を用い、T1R1・T1R3 の親和性やヘテロダイマー形成能がうま味受容に与える影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

いしかわ動物園、のとじま水族館、名古屋港水族館、鳥羽水族館、鴨川シーワールド、熱川バナナワニ園などの協力を得て供与された約60 種類の動物それぞれから、うま味受容体遺伝子T1R1 およびT1R3 のクローニングを行った。方法は以下の通りである。

まず、すでにデータベースに登録されている様々な動物由来のT1R1 およびT1R3 遺伝子の塩基配列を取得した。ここで得られた配列をアライメントし、種を超えて保存されている領域を複数箇所見いだした。この情報をもとにして、Degenerated PCR 用プライマーをデザインし、60 種の動物からPCR クローニングを行う。

部分配列から、近傍領域をクローニングするためのInverse およびTail PCR 用プライマーをデザインした。このDegenerated PCR により、完全長T1R1 およびT1R3 遺伝子のクローニングを試みた。得られたクローンからドメインごとにサブクローニングを行い、split GFP 融合タンパク質発現ベクターへ導入した。これをドメインライブラリーと名付けた。プライマーにはGateway クローニング用配列を付加することで、発現ベクターへのクローニングが容易になるようにした。作成したドメインライブラリーを用いて、T1R1およびT1R3のドメイン-ドメイン相互作用を同一動物間および異種動物間で網羅的に行った。

4. 研究成果

ドメイン-ドメイン間相互作用を解析するために、Split GFP 法を用いた。Split GFP 法の有効性を検証するために、すでに相互作用が知られている Leucine Zipper を陽性コントロールとして作成した(図1)。

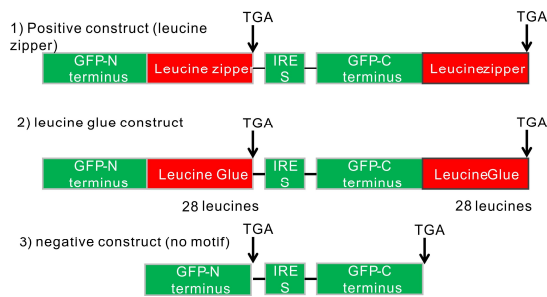


図1 発現ベクター

また、TIR1 および TIR3 の最初の膜貫通ドメインに存在するロイシンリピート (Leucine Glue)

これを HeLa 細胞にトランスフェクションした結果を図 2a ~ c に示す。

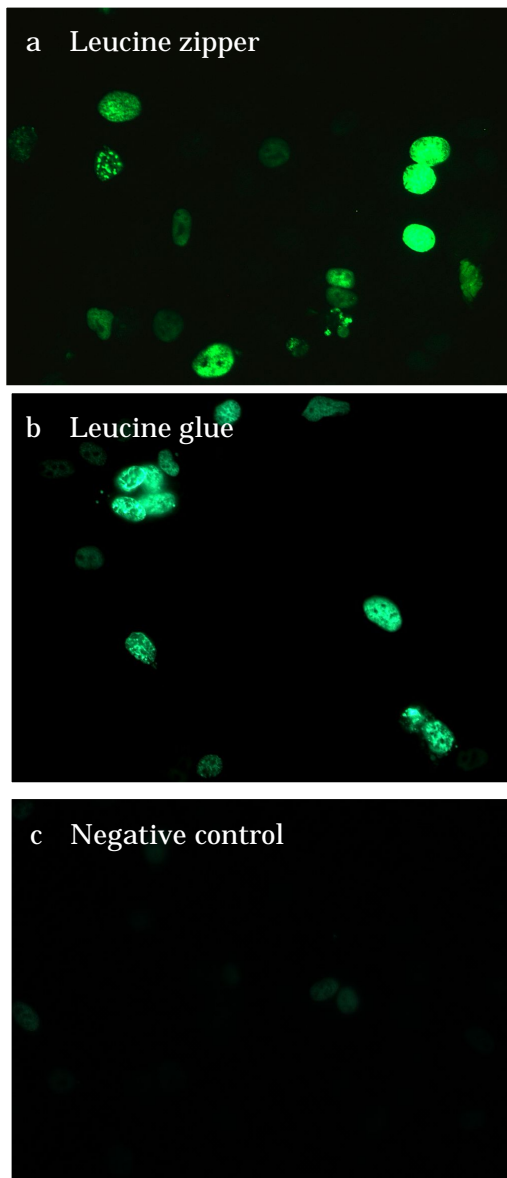


図2 Split GFP 法による相互作用

HeLa 細胞へのトランスフェクションは、PEI 法を用いた。この方法による HeLa 細胞への導入効率は 40% 程度である。このことから、Leucine zipper (図 2 a)、Leucine Glue (図 2 b) とともに、導入された細胞の 80% 以上で GFP の蛍光が観察された。一方、陰性コントロール (図 2 c) では、GFP の蛍光が観察されなかったことから、Leucine zipper および Leucine Glue を導入した HeLa 細胞で確認された蛍光は、Leucine 同士の相互作用の結果であると考えられた。

次に、Leucine Glue の長さが、相互作用に影響するかどうかを調べるために、図 2 で用いた (Leu)₂₈ の他、(Leu)₈ を作成して同様に HeLa 細胞へとトランスフェクションを行った (図 3)。

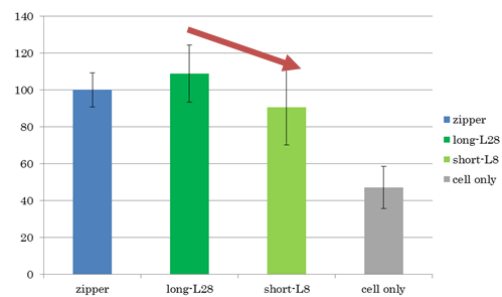


図3 長さ依存的な相互作用

有意差は示されなかったが、長さ依存的な蛍光強度を示し、TIR1 および TIR3 の最初の膜貫通ドメインに存在するロイシンリピートが、すくなくとも相互作用に関わっている可能性が強く示唆された。

今後、他のドメイン間との相互作用や動物種による相互作用の強度に差異があるかどうかを解析していく予定である。

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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) 加藤あずさ、西くるみ、大島結、若井嘉人、仲野千里、海老原充 (2014) ラッコにおける苦味受容体遺伝子の解析

- 日本味と匂学会誌 21(3) p293-296 査読有
- (2) 西くるみ、加藤あずさ、大島結、若井嘉人、仲野千里、海老原充 (2014) ラッコのうま味受容体遺伝子の機能解析 日本味と匂学会誌 21(3) p335-338 査読有
- (3) Violante, B. L., Minami, A., Koyanagi, T., Yano, T., Ebihara, M., and Honda, Y. (2015) Characterization of Lysozyme from Brown Eared Pheasant Egg White. Journal of Applied Glycoscience 62(1) p15-19 査読有
http://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2014_008
- (4) 海老原充、池口新一郎 (2012) 水棲哺乳類由来ENaC遺伝子の構造と機能 日本味と匂学会誌 19(3) p283-286 査読有
- 〔学会発表〕(計 12件)
- (1) 海老原充、池口新一郎. 2012. 水棲哺乳類由来 ENaC 遺伝子の構造と機能. 日本味と匂学会 2012 年度大会(大阪).
- (2) Ebihara M., Doumae H., Mima H., and Ikeguchi S. 2012. Molecular analysis of taste receptors in marine mammals. 第 35 回日本分子生物学会 (福岡).
- (3) Ebihara M., Nakayama Y., Uchiyama M., Iwao S., and Ikeguchi S. 2012. Pseudogenization of the umami and sweet receptor genes in cetacean. The 16th International Symposium on Olfaction and Taste (Stockholm, Sweden).
- (4) Ebihara M. 2012. Molecular analysis of the taste receptor genes derived from cetaceans. The 10th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (Fukuoka).
- (5) 海老原充、池口新一郎. 2012. 水棲哺乳類由来 ENaC 遺伝子の構造と機能.

- 日本味と匂学会 2012 年度大会(大阪).
- (6) Ebihara, M., and Matus, T.R.E. 2013. Isolation of DNA marker from Kaga Futokyuri. 第 36 回日本分子生物学会 (神戸).
- (7) Kato, A., Nishi, K., and Ebihara, M. 2013. Functional analysis of the bitter taste receptors in *Orcinus orca*. 第 36 回日本分子生物学会 (神戸).
- (8) Nishi, K., Kato, A., and Ebihara, M. 2013. Functional analysis of the umami taste receptor, T1R1/3, in marine mammals. 第 36 回日本分子生物学会 (神戸).
- (9) Kato, A., Nishi, K., Domae, H., Mima, H., and Ebihara, M. 2014. Analysis of protein-protein interaction between transmembrane domains derived from human taste receptor, T1R1 and T1R3. 第 37 回日本分子生物学会 (横浜).
- (10) Nishi, K., Kato, A., and Ebihara, M. 2014. Functional analysis of the umami taste receptor, T1R1/3. 第 37 回日本分子生物学会 (横浜).
- (11) Kato, A., Nishi, K., and Ebihara, M. 2014. Analysis of the bitter taste receptors in *Enhydra lutris*. 第 48 回日本味と匂学会 (静岡).
- (12) Nishi, K., Kato, A., and Ebihara, M. 2014. Functional analysis of the umami taste receptors in marine mammals in sea otter. 第 48 回日本分味と匂学会 (静岡).

〔図書〕(計 1件)
 池上 正人・海老原 充 「新バイオテクノロジーテキストシリーズ 分子生物学【第 2 版】」 講談社 2013 年 p1-16, p133-191

〔産業財産権〕
 出願状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 充 (EBIHARA, Mitsuru)
石川県立大学・生物資源環境学部・准教授
研究者番号：80232974

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：