

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450194

研究課題名(和文) 甘味受容体の構造機能解析とその進化過程における変化の解明

研究課題名(英文) Structural, functional, and evolutionary properties of sweet taste receptors

研究代表者

日下部 裕子 (Kusakabe, Yuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門食品健康機能研究領域・ユニット長

研究者番号：90353937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：甘味受容体の構造機能特性の解明を目的に、複数の種の甘味受容体T1r2/T1r3について膜移行機序、甘味阻害効果等の解析を行った。まず、T1r2/T1r3の様々な部位の変異体について解析した。その結果、味物質を結合させる部位の変異が、受容体全体の構造を変化させてしまう現象を見出した。次に、ヒト、齧歯類、霊長類、魚類のT1r2/T1r3を用いて、膜移行能の比較を行った。その結果、齧歯類と魚類のT1r3は単独で膜へ移行出来るが、霊長類とヒトT1r3の膜移行にはT1r2の共存が必要であることが明らかになった。よって、T1r3は単独では膜移行できないように進化したことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate structural and functional properties of the sweet taste receptor T1r2/T1r3, we analyzed membrane trafficking abilities and inhibitory effects by high levels of sweet substances. First, we analyzed taste response and surface expression of mutants caused by point mutations at various sites of T1r2/T1r3. We observed that the binding site for sweet taste substances in T1r2/T1r3 also plays a role in maintaining its structure. Next, we compared the membrane trafficking abilities of T1r2/T1r3 in human, mouse, primate, and fish. Our results showed that mouse and fish T1r3 expressed at the cell surface independently. Primate and human T1r3 required T1r2 for expression at the cell surface. These results suggest that the membrane trafficking ability of T1r3 regressed evolutionarily. In addition, our results showed that C-terminal of T1r3 includes a region for regulating membrane trafficking, and that this region differs between species.

研究分野：食品機能学

キーワード：味覚 受容体 構造機能解析 進化

1. 研究開始当初の背景

味は生体に必要なものを摂取するための感覚であり、なかでも甘味は栄養源を感知するために必須である。また、ヒトにとっての甘味は、その快い感覚から食品の嗜好性を高める役割を併せ持っている。よって、甘味受容の理解は食品開発という観点からも健康維持という観点からもキーとなる。味覚の生理学的・生化学的研究は、実験条件の制約などからマウスなどのモデル動物を用いることが多い。しかしながら、動物の感覚機能は、食環境によって変異しながら進化している。例えば、霊長類以上でないと感じることができない人工甘味物質が存在するなど、モデル動物とヒトとの甘味受容の差は解決すべき課題である。近年、多様な種の遺伝子解読が進んだことから、様々な種の味覚遺伝子の構造機能を比較解析することが可能になってきた。しかしながら、味覚受容体の構造機能の種による差に関する知見は不足していた。

2. 研究の目的

本研究は、嗜好性の高い食品の開発や、ヒトの生体における甘味受容の役割の理解を念頭に、甘味物質との結合から細胞内への情報伝達に至るまでの甘味受容体の役割と、甘味受容体の膜移行機序の進化による変化の解明を目的に行う。進化と甘味受容体の機能変化に関する解析も併せて行うことで、ヒトの生体にとって甘味受容が果たす役割の理解を背景に置いた研究を行うことを特徴とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜表面に位置する甘味受容体 T1r2/T1r3 の検出

T1r2 および T1r3 の N 末端に、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 の c-Myc タグあるいは FLAG タグを付加した変異体を作製し、受容体の膜移行能解析に利用した。解析は受容体変異体を培養細胞 HEK293 に導入することで行った。タグを付加した変異体を導入した培養細胞を、固定せずにタグに対する抗体染色を行うことによって、細胞膜表面に露出した受容体のみを染色した。

(2) T1r2/T1r3 変異体の作製

甘味の情報伝達への関与が示唆される部位については、一アミノ酸残基を置換した変異体を作製した。膜移行の種による差の原因領域の解明および高濃度甘味物質による甘味阻害効果に関する解析には、複数種の T1r2/T1r3 を由来とするキメラ変異体を作製した。C 末端領域と膜移行の関係については、C 末端領域の長さを様々なに削除した変異体を作製し、細胞膜表面に位置する甘味受容体 T1r2/T1r3 の検出に利用した。

(3) 甘味物質に対する甘味受容体変異体の応答測定

カルシウムイメージング法を用いて甘味受

容体変異体を培養細胞 HEK293 に導入した培養細胞に対する甘味応答を測定した。細胞内カルシウムの検出には蛍光指示薬 Fluo-8NF を用い、蛍光強度を Flexstation3 で測定し、受容体応答強度とした。

4. 研究成果

(1) 甘味受容体 T1r2/T1r3 変異体の構造機能解析

甘味受容体が甘味を受容してから細胞内伝達に至る構造機能についての解析を行うために、甘味受容体 T1r2/T1r3 の構造の内、甘味物質と相互作用する部位、G タンパク質への情報伝達に關与する可能性のある部位などを点変異させて、受容体の膜への移行、甘味物質に対する応答等を解析した。その結果、多くの変異体で膜移行が出来なくなる現象が見られた。また、T1r2/T1r3 には甘味物質との結合部位を複数保有しているが、1つの結合部位の変異により複数の甘味物質に対する結合が損なわれることを観察した(図1)。甘味受容と密接な関わりが示唆されている T1r3 の N 末端領域に位置する 55 番目および 60 番目のアミノ酸残基を変異させたところ、変異部位とは異なる領域に結合する甘味物質の応答も消失した。この結果は、甘味物質の結合部位が甘味物質との結合を担うだけでなく、受容体全体の構造の維持に関わる可能性を示唆した。

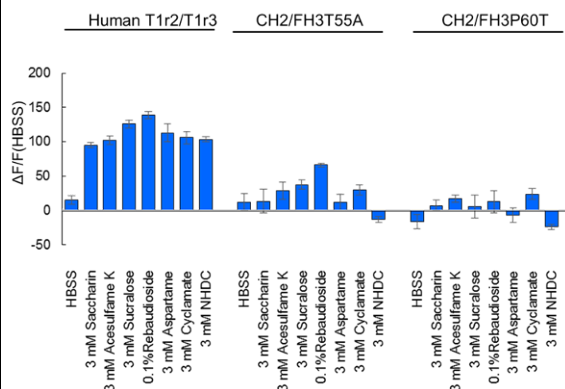
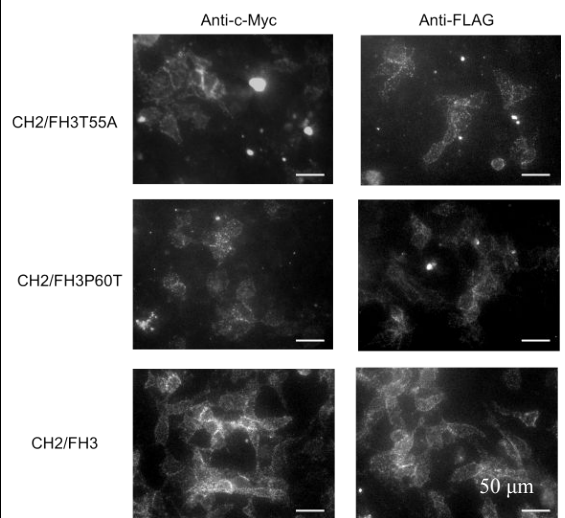


図 1. (前頁) ヒト甘味受容体点変異体の甘味応答能と膜移行能

上：変異体の膜移行能。変異体を導入した HEK293 細胞をタグに対する抗体で染色した。白色に染色されているのが膜表面に存在する味覚受容体。変異体も膜表面に存在していることが示されている。

下：変異体の甘味物質に対する応答能
HBSS はバッファー。甘味受容体の T1r2 の膜外領域に結合する甘味物質、サッカリン、アセスルファム K、レバウディオシド、アスパルテームと、T1r3 の膜貫通領域に結合する甘味物質、シクラメート、ネオヘスペリジンジヒドロカルコンに対する応答を測定した。

(2) 種による甘味受容体 T1r2/T1r3 の膜移行能の比較

ヒト、齧歯類、霊長類、魚類の T1r2/T1r3 を用いて、膜移行能の比較を行った。それぞれの受容体分子について N 末端にタグを付加し、マウスの T1r3 は単独で膜へ移行出来るが、ヒト T1r3 の膜移行には T1r2 の共存が必要であることが明らかになった(図 2)。メダカについての T1r3 もマウスと同様、単独で膜移行することが示された。

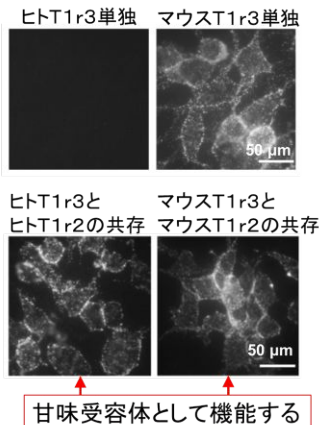


図 2. マウスとヒト T1r3 の膜移行の違い
HEK293 細胞に T1r3 を単独で導入した場合と、T1r2 と T1r3 を一緒に導入した場合の T1r3 の膜移行を調べた。

また、霊長類 3 種 (アカゲザル、マーモセット、チンパンジー) の T1r3 について同様の解析を行ったところ、どの種もヒト T1r3 と同様、T1r2 を伴わないと膜移行できないことが明らかになった (図 3)。霊長類は種によって一部の高甘味度甘味物質に対する感受性が異なることが知られているが、膜移行能の違いは、これに関与しないことが示唆された。以上の結果から、T1r3 は甘味物質に対する感受性とは別個に単独では膜移行できないように進化したと考えられる。

次に、T1r3 の C 端領域と膜移行能の関係を調べた。T1r3 の C 端に共通して含まれるシステイン残基以降の領域を欠損させた変異体を構築して膜移行を調べたところ、全ての種について膜移行能が著しく低下することを

見出した (図 4)。

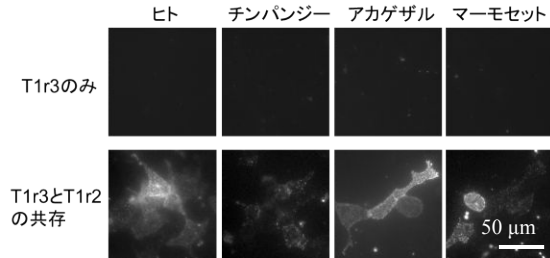


図 3. 霊長類 T1r3 の膜移行能

HEK293 細胞にヒトと霊長類の T1r3 を単独で導入した場合と、T1r2 と T1r3 を一緒に導入した場合の T1r3 の膜移行を調べた。

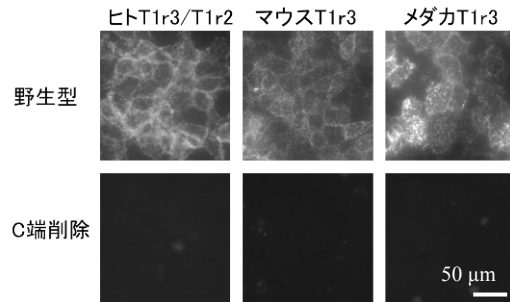


図 4. C 端を欠損させた T1r3 の膜移行能

HEK293 細胞にヒト、マウスおよびメダカの T1r3 および C 端を欠損させた T1r3 を導入して膜移行を調べた。ヒト T1r3 は T1r2 と共存させた状態で解析した。

そこで、削除する C 末端領域の長さが異なる変異体を複数構築して膜移行に関わる部位を特定したところ、種によって異なることが示唆される結果が得られた (図 5)。

```
Human T1r3 801 C V L G I L A A F H L P R C Y L L M R Q
mouse T1r3 806 C A L G I L V T F H L P K C Y V L L W L
medaka T1r3 801 G I S A L V L A Y Y L P K C F L L L R K
```

Helix8構造

```
Human T1r3 821 P G L N T P E E F L G G G P G D A Q G Q
mouse T1r3 826 P K L N T Q E F F L E R N A K K A A D E
medaka T1r3 821 P N L N T P Q Q F C T F L E G V P P T Q
```

膜移行に関与する領域

```
Human T1r3 841 N D G N T G N Q G K H E *
mouse T1r3 846 N S G G G E A A Q G H N E *
medaka T1r3 841 T E E E P Q P R Q E K *
```

図 5. 種による T1r3C 末端における膜移行に関する領域の違い

T1r3 の C 末端に共通して存在するシステイン残基と Helix8 構造を赤字で示した。変異体解析から明らかになった膜移行に関与する領域を青で示す。

よって、T1r3 は種により異なる膜移行の仕組みを持つことが改めて示された。

(3) 高濃度甘味物質による甘味阻害効果に関する解析

高濃度の高甘味度甘味料が甘味受容を阻害する現象が官能評価で明らかにされているが、そのメカニズムについては未解明な部分

が残されている。そこで、ヒトとマウスの甘味受容体、およびヒトとマウスのキメラ変異体を用いて解析を行った。その結果、マウス甘味受容体では甘味阻害効果を観察できなかった。また、ヒト甘味受容体、膜外領域がヒト T1r3 由来、膜貫通領域がマウス T1r3 由来のキメラ受容体は甘味阻害効果を持つことが確認できた。よって、この甘味阻害効果はヒト甘味受容体の膜外領域で起こる可能性が高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

清水真都香、後藤昌生、河合崇行、山下敦子、日下部裕子、Distinct human and mouse membrane trafficking systems for sweet taste receptors T1r2 and T1r3. PLOS ONE, 査読有、9 巻、2014、DOI:10.1371/journal.pone.0100425

〔学会発表〕(計 4 件)

日下部裕子他、Role of the C-terminal region of T1r3 in the membrane trafficking of taste receptor T1r2/T1r3. 第 17 回国際嗅覚味覚シンポジウム、2016 年 6 月 6 日、横浜市

日下部裕子他、味覚受容体 T1r3 の C 末端が保有する膜移行機能、日本味と匂学会第 49 回大会、2015 年 9 月 25 日、岐阜市

日下部裕子他、甘味物質混合物の甘味強度と甘味受容体構造特性の関係、日本味と匂学会第 48 回大会、2014 年 10 月 4 日、清水市

日下部裕子他、マウス甘味感受性の系統差と T1r3 の構造機能の関係に関する解析、日本味と匂学会第 47 回大会、2013 年 9 月 6 日、仙台市

〔その他〕

プレスリリース

日下部裕子、ヒトとマウスの甘味受容体の機能の違いを解明、2014 年 7 月 17 日、http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nfri/053110.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

日下部 裕子 (KUSAKABE Yuko)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究部門・食品健康機能研究領域・ユニット長

研究者番号：90353937

(2)連携研究者

山下 敦子 (YAMASHITA Atsuko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10321738

阿部 啓子 (ABE Keiko)

東京大学・農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：10151094

今井 啓雄 (IMAI Hiroo)

京都大学・霊長類研究所・准教授

研究者番号：60314176

海老原 充 (EBIHARA Mitsuru)

石川県立大学・生物資源環境学部食品科学科・准教授

研究者番号：80232974