

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891012

研究課題名(和文) 苦味受容体の機能チューニングメカニズムの解明

研究課題名(英文) Functional tuning mechanism of bitter taste receptors

研究代表者

筒井 圭 (Tsutsui, Kei)

京都大学・霊長類研究所・研究員

研究者番号：40714209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)： 感覚受容体の応答特性がチューニングされるメカニズムを明らかにするために、苦味受容体をモデルとして研究を行った。具体的には、種間でアミノ酸配列が異なる新世界ザルの苦味受容体TAS2R1およびTAS2R4の様々な苦味物質に対する応答を比較した。その結果、TAS2R1の樟脳に対する応答についてはヨザルのものが、TAS2R4のコルヒチンに対する応答についてはマーモセットのものが、他の種と比較して感受性が高いことが明らかとなった。さらに分子進化学的な解析により、それらの高い感受性が分子進化のどの段階で獲得されたか、またどのアミノ酸残基の置換がそれに寄与したのかが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： In order to elucidate the mechanism by which sensory receptors tune their properties, we compared the ligand sensitivities of TAS2Rs of five species of NWM heterologously expressed in HEK293T cells by calcium imaging. We found that TAS2R1 and TAS2R4 orthologues differ in sensitivity among the NWM species for colchicine and camphor, respectively. These results raise the possibility that the different feeding ecologies of NWMs are at least in part associated to different sensitivities of their TAS2Rs. Moreover, we reconstructed ancestral receptors of the NWM TAS2R1 and TAS2R4 and measured the ligand sensitivity. The results revealed when the shifts in ligand sensitivity among species emerged in the course of molecular evolution and helped to identify candidate amino acid residues responsible for the shifts.

研究分野：生物物理学

キーワード：苦味受容体 G蛋白質共役型受容体 感覚受容体

1. 研究開始当初の背景

生物がもつ視覚・嗅覚・味覚といった感覚は分子レベルではそれぞれ光受容体・嗅覚受容体・味覚受容体といった感覚受容体によって担われている。一般に感覚受容体はそれぞれの生物種に特有の環境に適応したレポーターや特性を持っていると考えられている。その適応が具体的にどのように起こっているのかを明らかにすることは、感覚生理学・進化生物学的に重要であるのみならず、受容体のセンサーとしての特性(「受容する刺激の種類」や「感度」)がどのようなメカニズムで「チューニング」されるのかを知るうえで蛋白質科学的にも意義のある課題である。

このような観点において、視覚を担う光受容体であるオプシンは長年にわたり優れたモデルでありつづけている。この分野では「吸収波長」(受容する刺激の種類)の光化学的なチューニングについては詳細に明らかになってきたが、報告者は光受容体の機能にとって重要なもう一方の側面である「光感受性」(感度)に注目して研究を行ってきた[文献①-④]。その一環としてオプシンの不活性化に関与する反応である GRK によるリン酸化の効率にオプシンの種類によって違いがあることを見いだした[文献④]。これは、リン酸化効率を変えることによって感度をチューニングするというメカニズムであると考えられる。

しかし、「感覚受容体一般のチューニングメカニズム」という観点からは、オプシンにおいて見いだされたこれらのメカニズムが感覚モダリティを超えて普遍的なメカニズムであるのか(嗅覚や味覚でも同じメカニズムがあるのか)が問題である。オプシンにおける「吸収波長」(受容する刺激の種類)のチューニングは「結合するリガンドの種類を変える」ことではなく「リガンドであるレチナールの光化学的な特性を制御する」ことによって行われており、これは明らかに光受容体だけに特異的なメカニズムである。すなわち、味覚受容体や嗅覚受容体における「結合するリガンドの種類」のチューニングを研究するモデルとしてはオプシンには限界があると言える。一方、「GRKによるリン酸化効率を変えることによる感度チューニングメカニズム」については感覚受容体一般において機能している可能性はある。ただ、嗅覚受容体および苦味受容体が GRK によるリン酸化を通じた活性制御を受けることを示唆する報告はあるものの、これらの受容体において GRK が受容体をリン酸化することの直接的証明はまだ成されていない。

これらの点を鑑みて、オプシンの研究と相補的になることが期待されるのが苦味受容体(TAS2R)の研究である。TAS2Rは2000年に同定された、オプシンと比較すると研究の歴史が浅い受容体であるが、リガンドの受容と感度について興味深い特徴を持つこと

が近年分かってきた。

TAS2Rはヒトの場合は約25種類のレポーターで1000種類以上もの苦味物質を選択性を損なうことなく受容できると言われているが、これは約25種類のTAS2Rが結合するリガンドの種類に関して非常に多様であり、かつTAS2R10、-R14、-R46といった一部のタイプが選択性を保ちつつも多くの種類のリガンドを受容するようにチューニングされていることに秘密があることが分かってきた[文献⑤]。これらの特徴は、「結合するリガンドの種類」のチューニングメカニズムを研究するうえで適していると言える。また、ある特定のTAS2R オートログの同じリガンドに対する感度が生物種によって異なることが報告されており[文献⑥]、「感度」チューニングメカニズムを研究するうえでも優れたモデルである。

そこで本研究では、オプシンでは検討することが難しい「結合するリガンドの種類」のチューニングメカニズムをTAS2Rという新たなモデルを用いて解明することを目的とした。同時に、報告者がオプシンで明らかにした感度チューニングメカニズム(「リン酸化効率を変えることによる感度チューニング」と同様のものがTAS2Rにおいても存在するのか、あるいは全く別のメカニズムがあるのかを明らかにすることで、オプシンに存在するメカニズムの感覚受容体一般における普遍性について検討したいと考えた。

2. 研究の目的

(1) 種間におけるTAS2Rの応答特性の違い、およびその分子進化的な変遷に注目することにより、TAS2Rの応答特性に影響するアミノ酸残基を同定する。

(2) TAS2Rの不活性化に関与する蛋白質(GRK)を同定することにより、「リン酸化効率を変えることによる感度チューニングメカニズム」が存在するのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) TAS2Rの特性(結合するリガンドの種類・感度)に影響を与えるアミノ酸残基候補を見つけるための戦略として、自然界において起こっている変異に注目した。具体的には、数多くの種間・種内変異が知られている霊長類のTAS2Rを用いて、種内あるいは近縁な生物種間で置換されているアミノ酸残基は受容体の特性に影響を与える位置である可能性が高いという前提のもとでTAS2Rの配列と特性を種内・種間で比較した。

まず、種間でアミノ酸配列が異なる新世界ザルのTAS2R1およびTAS2R4に注目して実験を行った。具体的には、マーモセット(*Callithrix jacchus*)・オマキザル(*Cebus capucinus*)・ヨザル(*Aotus azarae*)・クモザル(*Ateles geoffroyi*)・ホエザル(*Alouatta palliata*)のゲノムDNAからTAS2R1および

TAS2R4 をクローニングした。続いて、クローニングした TAS2R 遺伝子を培養細胞 (HEK293T) において強制発現させ、リガンドを加えた時の特性 (結合するリガンドの種類・感度) をオーソログどうしで比較した。その際、TAS2R の細胞膜表面への移行を促進する目的で、N 末にラットのソマトスタチン 3 受容体の N 末 45 アミノ酸を付加した [文献⑦]。また、カルシウムイメージングによる測定を可能にするため、TAS2R が本来活性化する G 蛋白質であるガストデュエシンの代わりに、G16 タイプの G 蛋白質の C 末 44 アミノ酸をガストデュエシンのものに置換したキメラ G 蛋白質を TAS2R と同時に発現させた [文献⑧]。これらの実験に用いるリガンドとしては、ヒトの TAS2R1 および TAS2R4 が受容することが既に知られている苦味物質 [文献⑤] を用いた。

さらに、TAS2R の応答の種間差を生み出すアミノ酸残基を同定するための手がかりを得るために、MEGA5 ソフトウェアを用いて共通祖先型の TAS2R のアミノ酸配列の推定を行い、そのリガンド感受性を行った。

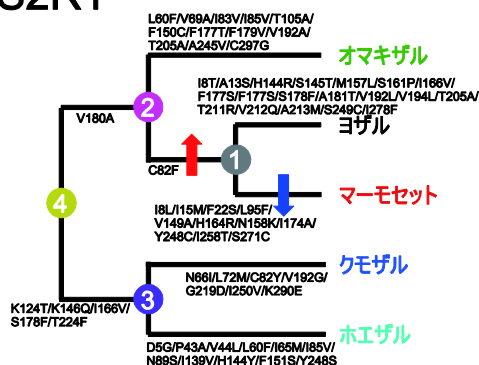
(2) TAS2R の感度チューニングメカニズムとして「GRK によるリン酸化効率」が機能している可能性を検討した。齧歯類の味蕾には GRK2 あるいは GRK5 が発現していることが報告されており [文献⑨, ⑩]、TAS2R の応答特性を制御していることが示唆されている。また、TAS2R の C 末には GRK によるリン酸化を受ける可能性があるセリンあるいはスレオニン残基が存在する。しかし、TAS2R が GRK によってリン酸化されることはまだ直接的には示されていない。そこで本研究ではまず、TAS2R を発現する味細胞に共発現する GRK を同定し、その GRK が TAS2R をリン酸化するのかどうかを明らかにすることを目指した。具体的には、全ゲノム情報が解読されているアカゲザルを用いて、舌から mRNA を抽出して逆転写により cDNA を得た後、ゲノム配列をもとに設計したプライマーを用いた PCR を行うことにより舌に発現する GRK をクローニングすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 新世界ザルの TAS2R1 および TAS2R4 の様々な苦味物質に対する応答を測定したところ、TAS2R1 は樟脳に、TAS2R4 はコルヒチンに対して明確な応答を示した。興味深いことに、その応答の大きさに種間で違いが見られた。具体的には、ヨザルの TAS2R1 の樟脳に対する応答は他の新世界ザルの TAS2R1 と比較して大きく、マーモセットの TAS2R4 のコルヒチンに対する応答は他の新世界ザルの TAS2R4 より大きかった。

このような TAS2R1 および TAS2R4 の種間におけるリガンド感受性の違いが分子進化のどの段階で生じたのかを明らかにするため、マーモセット・オマキザル・ヨザル・クモザル

TAS2R1



TAS2R4



図:新世界ザルの TAS2R1 (A) および TAS2R4 (B) の系統関係と祖先型。分岐点 1-4 のアミノ酸配列を推定し、それらのリガンド感受性を測定した。各枝にアミノ酸置換を示す。矢印はリガンド感受性の増減を示す。

ル・ホエザルの TAS2R1 あるいは TAS2R4 の共通祖先型の受容体のアミノ酸配列を推定し (図)、それら祖先型の受容体を実際に培養細胞に発現させ樟脳あるいはコルヒチンに対する感受性を測定した。その結果、TAS2R1 については「祖先型 1」以外の祖先型は比較的低い (マーモセット・オマキザル・クモザル・ホエザルと同等の) 樟脳に対する感受性を示した。一方、「祖先型 1」は「祖先型 2」よりも高い樟脳感受性を示したことから、高い感受性は「祖先型 2」から「祖先型 1」への進化の過程において獲得されたことが示唆された。また同時に、「祖先型 1」の感受性はマーモセットと比較して有意に高いことから、TAS2R1 の樟脳に対する感受性は「祖先型 1」からマーモセットへの進化の過程で減少したことが分かった。

一方、祖先型の TAS2R4 は全て比較的低いコルヒチン感受性 (オマキザル・クモザル・ホエザルと同程度) を示した。その感受性はマーモセット TAS2R4 より有意に低く、高い感受性は「祖先型 2」からマーモセットへの

進化の過程で獲得されたことが分かった。また同時に、「祖先型 1」の感受性はヨザル TAS2R4 よりも有意に高く、「祖先型 1」からヨザルへの進化の過程で感受性の低下が起こったことも分かった。

以上の結果と TAS2R のアミノ酸配列の比較により、新世界ザルの TAS2R1 および TAS2R4 の分子進化過程におけるリガンド感受性のシフトを引き起こしたアミノ酸置換の候補を挙げることができた。TAS2R1 に関しては、「祖先型 2」と「祖先型 1」の間で唯一異なるアミノ酸残基が 82 番目のシステイン/フェニルアラニンであった。このことから、この部位のシステインからフェニルアラニンへの置換 (C82F) が「祖先型 2」から「祖先型 1」への進化過程における TAS2R1 のリガンド感受性の上昇を引き起こしたことを示している。一方、マーモセットと「祖先型 1」のアミノ酸配列を比較すると、11 か所においてアミノ酸の置換が起こっていることが分かる (I8L / I15M / F22S / L95F / V149A / H164R / N158K / I174A / Y248C / I258T / S271C)。すなわち、これらの変異が「祖先型 1」からマーモセットへと至る進化の過程における TAS2R1 のリガンド感受性の低下の原因となるアミノ酸変異の候補ということになる。

同様に、TAS2R4 の進化におけるリガンド感受性の変化の原因となるアミノ酸置換の候補も挙げることができる。すなわち、「祖先型 2」からマーモセットの間の上昇については L7F / S24N / L62F / T143N / V156F / F189L / Q208R / H249N / M257 の置換が、「祖先型 1」からヨザルの間の低下については LA9G / V70I / A135T / T153A / V156F / L177V / R205K / F253T の置換が候補となる。

以上に挙げられた候補となるアミノ酸残基のうち、TAS2R4 の 62 番目のアミノ酸の違いが感受性の差にもたらす影響を明らかにするため、部位特異的変異体を作製して実験を行った。マーモセット TAS2R4 の 62 番目のフェニルアラニンをロイシンに置換すると (F62L)、応答の大きさの減少が見られた。逆にクモザル TAS2R4 の 62 番目のロイシンをフェニルアラニンに置換すると、応答が大きくなった。これらの結果から、62 番目の部位のアミノ酸の違いが新世界ザル TAS2R4 の応答の大きさに影響することが示された。

近縁な種間で TAS2R のリガンド感受性の違いが見られることを明らかにし、さらにその違いの原因となるアミノ酸残基を同定した以上の成果は、TAS2R をモデルとして感覚受容体の「感度」のチューニングメカニズムの一端をアミノ酸残基レベルで明らかにしたものであると言える。今後、同様の実験的アプローチにホモロジーモデリングや構造解析を組み合わせることによってより詳細な TAS2R のチューニングメカニズムが明らかにされると考えられる。また、本研究では明らかにすることができなかった「結合するリガンドの種類」のチューニングメカニズムにつ

いても、さらに多様な TAS2R を対象にすることにより解明されることが期待される。

(2) TAS2R のもう一つの感度チューニングメカニズムとして「GRK によるリン酸化効率」が機能している可能性を検討するために、TAS2R を発現する味細胞に共発現する GRK を同定することを目指したが、研究期間内にクローニングすることができなかった。今後、他の生物種も視野に入れつつ TAS2R をリン酸化する GRK の同定を目指す必要がある。

<引用文献>

- ① Tsutsui K., Imai H., Shichida Y. (2007) *Biochemistry* 46(21): 6437-6445
- ② Tsutsui K., Imai H., Shichida Y. (2008) *Biochemistry* 47(41): 10829-10833
- ③ Tsutsui K., Shichida Y. (2010) *Biochemistry* 49(47): 10089-10097
- ④ Tsutsui K., Tachibanaki S., Shimauchi-Matsukawa Y., Shichida Y., Kawamura S. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440(4):630-634
- ⑤ Meyerhof W., Batram C., Kuhn C., Brockhoff A., Chudoba E., Bufe B., Appendino G., Behrens M. (2010) *Chem. Senses* 35(2):157-170
- ⑥ Imai H., Suzuki N., Ishimaru Y., Sakurai T., Yin L., Pan W., Abe K., Misaka T., Hirai H. (2012) *Biol. Lett.* 8(4):652-656
- ⑦ Ammon C., Schäfer J., Kreuzer O.J., Meyerhof W. (2002) *Arch. Physiol. Biochem.* 110(1-2):137-145
- ⑧ Ueda T., Ugawa S., Yamamura H., Imaizumi Y., Shimada S. (2003) *J. Neurosci.* 23(19):7376-7380
- ⑨ Masuho I., Tateyama M., Saitoh O. (2005) *Chem. Senses* 30(4):282-290
- ⑩ Zubare-Samuelov M., Shaul M.E., Peri I., Aliluiko A., Tirosh O., Naim M. (2005) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289(2):C483-C492

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)

- ① 筒井圭、今井啓雄
霊長類苦味受容体の機能的多様性
比較生理生化学、査読有り
Vol. 32 (2015) P. 24-29
DOI:10.3330/hikakuseiriseika.32.24
- ② 今井啓雄、筒井圭
霊長類苦味受容体の多様化
生体の科学、査読有り
Vol. 64 (2013) P. 430-431

URL: <http://medicalfinder.jp/doi/abs/10.11477/mf.2425101500>

- ③ Tsutsui K, Tachibanaki S, Shimauchi-Matsukawa Y, Shichida Y, Kawamura S
Different phosphorylation rates among vertebrate cone visual pigments with different spectral sensitivities
Biochem. Biophys. Res. Commun.、査読有り
Vol. 440 (2013) P. 630-634.
DOI:10.1016/j.bbrc

[学会発表] (計 12 件)

- ① 筒井圭
Interspecific Variation of Ligand Sensitivity and Evolution of Bitter Taste Receptors TAS2R1 and TAS2R4 in New World Monkeys
12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception
2014年11月2日-3日、九州大学(福岡県・福岡市)
- ② 筒井圭
Interspecific Variation in Ligand Sensitivity of G-Protein-Coupled Bitter Taste Receptors in New World Monkeys
16th International Conference on Retinal Proteins
2014年10月5日-9日、長浜ロイヤルホテル(滋賀県・長浜市)
- ③ 筒井圭
Interspecific Variation of Ligand Sensitivity and Evolution of Bitter Taste Receptors TAS2R1 and TAS2R4 in New World Monkeys
第52回日本生物物理学会年会
2014年9月24-27日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- ④ 筒井圭
Functional Diversity of Bitter Taste Receptors in New World Monkeys
25th Congress of the International Primatological Society
2014年8月11日-16日、ハノイ(ベトナム)
- ⑤ 筒井圭
Functional diversity of bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R4 in New World monkeys
11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception

2013年10月31日-11月2日、九州大学(福岡県・福岡市)

- ⑥ 筒井圭
Functional diversity of bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R4 in New World monkeys
第51回日本生物物理学会年会
2013年10月29日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 圭 (Kei Tsutsui)
京都大学霊長類研究所・研究員
研究者番号：40714209

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：