

平成22年5月28日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19300248

研究課題名（和文） 味をデザインするタンパク質「ネオクリンとミラクリン」の調理への応用

研究課題名（英文） Application of taste modifying protein, neoculin and miraculin for food preparation

研究代表者 朝倉 富子 (ASAKURA TOMIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：20259013

研究成果の概要（和文）：

ネオクリンとミラクリンは、酸味を甘味に変換させる味覚修飾活性を有するタンパク質である。ネオクリンとミラクリンを、麹菌を用いて発現生産することに成功した。また、ネオクリンは、ニンニクレクチンと構造が類似していたが、レクチン活性は示さなかった。ネオクリンは、ヒト甘味受容体 T1R2-T1R3 によって受容され、特に、T1R3 の N-末端細胞外領域が受容部位であることが、甘味受容体を発現させた培養細胞系の実験から明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Neoculin and miraculin are taste modifying proteins which convert sourness to sweetness. They are occurring in tropical fruits, *Curculigo latifolia* and *Synsepalum dulcificum*, respectively. Each native protein is difficult to obtain constantly. We succeeded to produce recombinant neoculin and miraculin with *Aspergillus oryzae* that was designated to GRAS. To verify the safety of neoculin, viability of Caco-2 cells exposed to neoculin was investigated. The viability of cells was not changed with neoculin exposure. DNA microarray analysis also revealed that neoculin did not affect the gene expression of Caco-2 cells. Neoculin is received by human sweet taste receptor, T1R2-T1R3. The interaction sites of neoculin to T1R2-T1R3 were analyzed using HEK293T cells that express T1R2-T1R3. As a result, neoculin was received at the N-terminal extra cellular domain in T1R3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	7,600,000	2,280,000	9,880,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：ネオクリン、ミラクリン、甘味受容体、

1. 研究開始当初の背景

ネオクリンは、西マレーシア原産の植物クルクリゴの果実に含まれ、砂糖の約 600 倍もの甘味をもつ甘味たんぱく質である。クルクリゴの実を口に含むと果糖に似たさわやかな甘味を感じるが、この甘味はやがて消失する。その後酸を味わうとこれを甘く感させる味覚修飾活性を持つ。申請者らは、この味覚修飾活性を示すタンパク質をクルクリゴの実から抽出精製し、活性本体であるタンパク質の構造を決定し、ネオクリンと命名した。ネオクリンは分子量約 25,000 の糖たんぱく質で等電点が pH7.5~9.5 の塩基性サブユニット NBS(Neoculin basic subunit)と pH4~6 の酸性サブユニット NAS(Neoculin acidic subunit) からなるヘテロダイマーであることを明らかにしていた。一方、ミラクリンは、ミラクルフルーツの果実に含まれ、成熟した果実そのものは無味であるが、果実を味わった後に酸を口に含むと強い甘味を感じる。活性本体であるタンパク質である。

2. 研究の目的

本研究は、酸を甘くするタンパク質ネオクリンとミラクリンを食品素材として利用し、糖尿病食などの新たな調理食品を開発する基盤を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

1. ミラクリン及びネオクリンの甘味及び味覚修飾活性の客観的評価方法の確立

ヒトの甘味受容体であるT1R2+T1R3をHEK293T細胞に導入し、細胞内のカルシウム濃度の変化をカルシウムイメージング法を用いて、ネオクリンとミラクリンの活性を測定する。

2. ネオクリン及びミラクリンの安全性評価

①腸管上皮細胞(Caco-2)にミラクリン及びネオクリンを作用させ、細胞増殖の変化を観察する。

②各々の物質をCaco-2に作用させたのち、Caco-2からRNAを抽出する。これをDNAマイクロアレイ解析に供し、変動する遺伝子を抽出する。

3. 宿主を用いた外来タンパク質としての発現系の確立

ミラクリンはミラクルフルーツの果実から、ネオクリンはクルクリゴの果実から抽出される。いずれも亜熱帯の植物であり、生産量は制限され、安定した供給は期待できず、組み換え体を用いた発現生産が望まれる。ネオクリン及びミラクリンをGRASに指定されている麹菌を用いた発現生産する。

4. 甘味受容体とミラクリン、ネオクリンの相互作用の解析

近年報告された甘味受容体は、味細胞に発現するGタンパク質共役型受容体の一種で、T1R2 および T1R3 がヘテロダイマーを形成し、甘味物質を受容して甘味シグナルを生じる。味を変化させる物質と受容体との相互作用を味覚受容体の変異体を作製して、作用機作を解明する。

4. 研究成果

1. ミラクリン及びネオクリンの甘味及び味覚修飾活性の評価方法の確立

ミラクリンのネオクリンの活性測定は、官能評価とヒト甘味受容体を発現させた培養細胞系において評価をした。官能評価では、アスパルテームを甘味度の標準物質として用い、酸を味わった後の甘味をアスパルテーム濃度に換算した。ネオクリンの甘味は、甘味受容体である T1R2+T1R3 によって受容され、官能評価に加え、客観的な評価をすることができた。

2. ネオクリン及びミラクリンの安全性評価

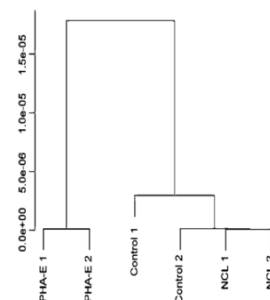
ネオクリンはニンニクレクチンに構造が似ていることから、安全性が疑問視された。しかし、一次構造から、糖鎖を認識する配列が一部保存されていないことから、レクチン活性はないことが予想された。血球凝集活性を測定したところ、ネオクリンには血球凝集活性はなかった。

ネオクリンの安全性を確認するために、Caco-2 細胞に対する作用を検証した。ネオクリン濃度を変化させ、細胞の生存率をトリパンブルー染色によって測定したところ、下記の表のようになった。

ネオクリン(mg/mL)	生存率(%)
0	100.0 ±2.0
0.03	93.2 ± 1.0
0.1	89.6 ± 2.7
0.3	91.6 ± 2.7

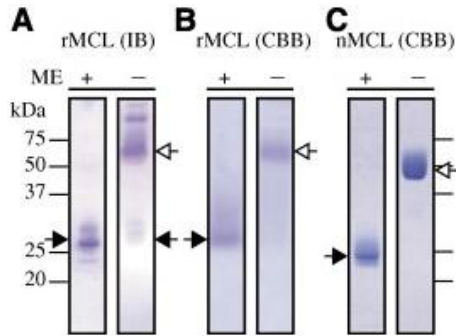
細胞内における遺伝子発現に変化が見られるかどうかを検証するために、DNA マイクロアレイ解析を行った。

その結果、ネオクリンはインゲン豆レクチンとは異なり、レクチンを加えない対照群と同じクラスターに配属され、小腸上皮細胞に悪影響は与えないことが推定された。



3. 宿主を用いた外来タンパク質としての発現系の確立

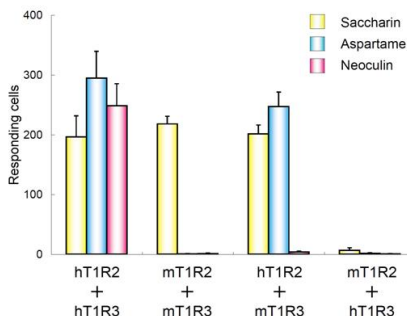
麹菌を用いてネオクリンを発現される系は、本研究を申請中に成功している。ミラクリンも同様の発現系を用いて生産することに成功した。



rMCL: 組み換えミラクリン
nMCL: 天然ミラクリン

4. 甘味受容体とミラクリン、ネオクリンの相互作用の解析

ネオクリンはそれ自身も強い甘味を有することが知られている。ネオクリンが甘味受容体とどのように作用するかを、ネオクリンを認識しないマウスの甘味受容体とヒト甘味受容体のキメラ分子を作製し、作用部位を特定した。



hT1R2, hT1R3: ヒト T1R2, T1R3
mT1R2, hT1R3: マウス T1R2, T1R3

その結果、ネオクリンは T1R3 のN-末端細胞外領域と作用することがわかった。

5. ネオクリンを含有する可食性フィルムの作製

ネオクリンをより使いやすくするために、可食性のフィルムに分散させ、舌全体にネオクリンが行き渡る工夫をした。

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 16 件)

1. Morita, Y., Nakajima, K., Iizuka, K., Terada, T., Shimizu-Ibuka, A., Ito, K., Koizumi, A., Asakura, T., Misaka, T. and Abe, K.

pH-dependent Structural Change of Neoculin in Special Reference to Its Taste-modifying Activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* (2009). **73**, 2552-2555.

2. Sakurai, T., Misaka, T., Nagai, T., Ishimaru, Y., Matsuo, S., Asakura, T., and Abe, K. pH-Dependent Inhibition of the Human Bitter Taste Receptor hTAS2R16 by a Variety of Acidic Substances. *J. Agric. Food Chem.* (2009). **57**, 2508-2514.

3. Okubo, S., Asakura, T., Okubo, K., Abe, K., Misaka, T., Akita, T., and Abe, K. Neoculin, a taste-modifying sweet protein, accumulates in ripening fruits of cultivated *Curculigo latifolia*. *J. Plant Physiol.* (2008). **165**(18):1964-9.

4. Shimizu-Ibuka, A., Nakai, Y., Nakamori, K., Morita, Y., Nakajima, K., Kadota, K., Watanabe, H., Okubo, S., Terada, T., Asakura, T., Misaka, T., and Abe, K. Biochemical and Genomic Analysis of Neoculin Compared to Monocot Mannose-Binding Lectins. *J. Agric. Food Chem.* (2008). **56**, 5338-5344.

5. Nakajima, K., Morita, Y., Koizumi, A., Asakura, T., Terada, T., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Maruyama, J., Kitamoto, K., Misaka, T., and Abe, K. Acid-induced sweetness of neoculin is ascribed to its pH-dependent agonistic-antagonistic interaction with human sweet taste receptor. *FASEB J.* (2008). **22**, 2323-2330.

6. Tamura, T., Asakura, T., Uemura, T., Ueda, T., Terauchi, K., Misaka, T., and Abe, K. Signal peptide peptidase and its homologs in *Arabidopsis thaliana*--plant tissue-specific expression and distinct subcellular localization. *FEBS J.* (2008). **275**, 34-43.

7. Ito, K., Asakura, T., Morita, Y., Nakajima, K., Koizumi, A., Shimizu-Ibuka, A., Masuda, K., Ishiguro, M., Terada, T., Maruyama, J., Kitamoto, K., Misaka, T., and Abe, K. (2007). Microbial production of sensory-active miraculin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 407-411.

8. Koizumi, A., Nakajima, K., Asakura, T., Morita, Y., Ito, K., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., and Abe, K. (2007). Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 585-589.

9. Kiyosaki, T., Matsumoto, I., Asakura, T., Funaki, J., Kuroda, M., Misaka, T., Arai, S., and Abe, K. (2007). Gliadin, a

gibberellin-inducible cysteine proteinase occurring in germinating seeds of wheat, *Triticum aestivum* L., specifically digests gliadin and is regulated by intrinsic cystatins. *FEBS J.* **274**, 1908-1917.

10. Tamura, T., Terauchi, K., Kiyosaki, T., Asakura, T., Funaki, J., Matsumoto, I., Misaka, T. and Abe, K. (2007). Differential functions of wheat aspartic proteinases, WAP1 and WAP2, in germinating and maturing seeds. *J. Plant Physiol.* **164**, 470-477.

[学会発表] (計 25 件)

[図書] (計 9 件)

1. 体験活動に必要な作物ーグリーンアドベンチャー作物編一, 朝倉富子 (2005) 国立信州高遠少年自然の家.
2. 調理学実習テキスト, 朝倉富子, 久木野睦子 (2005) 出版社: 京大出版センター.
3. 調理科学実験, 朝倉富子, 久木野睦子 (2004) 出版社: 京大出版センター.
4. 食と味覚, 朝倉富子, 阿部啓子, 山本隆, 的場輝佳, ジェーン シュミレット, 共著 (2008) ネスレ栄養科学会議監修, 建帛社.
5. 機能性食品の事典, 朝倉富子, 荒井綜一, 阿部啓子, 吉川敏一, 金沢和樹, 渡辺昌, 編集(2007) 朝倉書店.
6. 味覚修飾蛋白質ネオクリンの活性化機構と新規甘味蛋白質の開発, 蛋白質核酸酵素, 中島健一郎, 古泉文子, 朝倉富子, 三坂巧 (2009) 共立出版.
7. 植物のアスパラギン酸プロテアーゼ, 化学と生物, 朝倉富子, 田村倫子, 寺内かえで, 阿部啓子 (2009) 日本農芸化学会.
8. Neoculin as a new sweet protein with taste-modifying activity: purification, characterization, and X-ray crystallography. Sweetness and Sweeteners., Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Nakajima, K., Asakura, T., Terada, T., Misaka, T. and Abe, K. (2008) *Biology, Chemistry and Psychophysics. ACS symposium series.*
9. Neoculin as a novel sweet protein with taste-modifying activity. Nakajima, K., Asakura, T., Misaka, T. and Abe, K., (2009) *Current Topics in Biotechnology.*

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 甘味を有するタンパク質

発明者: 阿部啓子、中島健一郎、朝倉富子、三坂巧、石井翔

権利者:

種類:

番号: 特開 2008-228690

出願年月日: 2007 年 03 月

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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

朝倉 富子 (ASAKURA TOMIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号: 20259013

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

南 道子 (MINAMI MICHIKO)

東京学芸大学・教育学部・教授

研究者番号: 70272432

舟木 淳子 (FUNAKI JUNKO)

福岡女子大学・人間環境学部・准教授

研究者番号: 60219029

岡田 晋治 (OKADA SHINJI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 50376563