

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14734

研究課題名(和文)ミラクリン非感受性のヒト遺伝子解析による味覚修飾分子機構の検討

研究課題名(英文)Study of the molecular mechanism of a taste-modification by miraculin

研究代表者

井上 裕康 (INOUE, Hiroyasu)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：40183743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミラクリンと味覚受容体との相互作用を明らかにするため、ミラクリン非感受性のヒト特有の遺伝子変異の同定を予定していたが、当該被験者を見つけれなかった。そこで、マウス舌から調整した味細胞を用い、酸味受容体候補に対するミラクリンの作用を検討した。その結果、酸刺激後の受容体の活性化が、ミラクリンの添加により消失し、アンタゴニストとして作用することが明らかとなった。さらに、ミラクリンタンパク質の構造解析から相互作用について検討した。X線小角散乱法による解析から、溶液中のミラクリンの構造はpHにより変化することが明らかとなった。また、蒸気拡散法により糖鎖を切断したミラクリンから微結晶を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We have been investigated the effect of miraculin on activity of the sour taste receptor candidate, PKD1L3/PKD2L1 heterodimer, by using taste cells prepared from the tongue of GAD67-GFP knock-in mice. Calcium imaging analysis showed that the off response, the activation of this receptor after the removal of an acid stimulus was inhibited by the addition of miraculin. These results indicate that antagonization of the sour taste receptor candidate by miraculin will be contributed to the molecular mechanism of its taste-modifying property. Furthermore, we examined the interaction miraculin and taste receptors by structural analysis of miraculin. X-ray small angle scattering measurement showed the structure of native miraculin in solutions changed by pH of solution. By sitting drop vapor diffusion method, micro-crystallizations of miraculin de-glycosylated carbohydrate chains were observed.

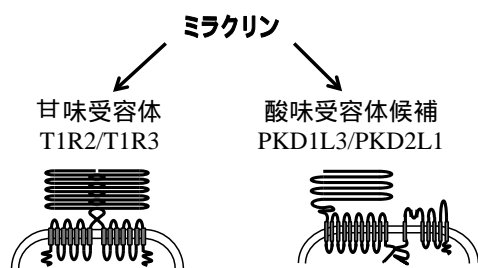
研究分野：分子栄養学

キーワード：味覚 味覚修飾 味覚受容体 ミラクリン

1. 研究開始当初の背景

味覚はヒトの健康な生活のために重要な感覚で、老化や疾病により変化するが、味覚の分子栄養学的研究は発展途上の段階にある。申請者は、酸味を甘味に変換する味覚修飾蛋白質ミラクリンの分子作用機構解明を目的に研究を進めている。

ミラクルフルーツに含まれる糖蛋白質ミラクリンは、Kunitz型トリプシンインヒビターファミリーに属し、酸味を甘味に変換する味覚修飾活性を持つが、その分子作用機構は不明な部分が多い。我々は世界に先駆け、味覚修飾活性を持つミラクリンを大腸菌で発現・精製することに成功し、その活性にはホモダイマー形成が必須であり、糖鎖修飾は必須でないことを明らかにした (J. Biochem. 2009)。さらに、YFP(黄色蛍光蛋白質)との融合体の作成、シロイヌナズナを用いた組換えミラクリンの作成を行い、アミノ酸配列の解析からミラクリンは Kunitz 型トリプシンインヒビターファミリーに属することが報告されているが、トリプシン阻害活性を持たないこと、シグナル配列によって細胞外へ分泌されることを見出し(FEBS Lett. 2013)、ミラクリンの分子進化について新しい知見を報告してきた。



味覚を感知する分子群として、甘味受容体 (T1R2/T1R3)、酸味受容体候補 (PKD1L3/PKD2L1) が報告され、そのシグナル伝達系について研究が行われている。ミラクリンの味覚修飾活性の分子作用機構は、甘味受容体および酸味受容体候補との相互作用が関与し、それぞれの受容体からのセカンドメッセンジャー (cAMP、IP₃、Ca²⁺などが候補) の変動に起因していると考えられる。

これまでに、酸性条件下でミラクリンがヒト甘味受容体 (T1R2/T1R3) と相互作用すること、それはマウス甘味受容体では観察されないことが報告された。一方、我々は官能検査の結果、ミラクリンの酸味抑制効果が甘味増強効果と分離できることを見出した。また、HEK293細胞に発現させたマウス酸味受容体

候補 (PKD1L3/PKD2L1) に対して、ミラクリンがアンタゴニストとして働くことも見出した、しかしながら、ミラクリンと酸味および甘味受容体との相互作用についての詳しい分子作用機構には不明な点が多い。

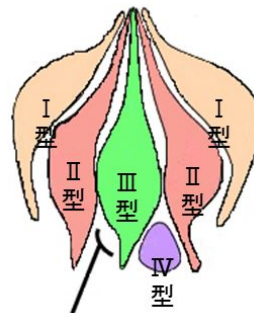
2. 研究の目的

本研究では、ミラクリンと酸味および甘味受容体との相互作用を明らかにする新しい萌芽的な研究として、ミラクリン非感受性のヒト特有の遺伝子変異を同定し、その遺伝子産物を培養細胞系に発現させ、ミラクリン感受性群と比較することで、ミラクリンと相互作用する味覚受容体の結合部位、あるいは味覚修飾に関わる新規タンパク質の同定を行い、ミラクリンと味覚受容体との相互作用について明らかにすることを目的とした。しかしながら、研究期間中にミラクリン非感受性のヒトを見つけることができなかった。そこで、ミラクリンと味覚受容体との相互作用を解明するためのアプローチを変更して、マウス酸味受容体候補に対するミラクリンの作用の解明、およびミラクリンタンパク質の構造解析から作用機構の解明を目指しこととした。

3. 研究の方法

(1) マウス酸味受容体候補に対するミラクリンの作用

マウス酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 は、味蕾型味細胞に発現している。そこで実験には、同じく味蕾型味細胞に発現しているグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GAD) 67 を蛍光タンパク質 GFP で標識した GAD67-GFP knock-in マウスを用いた。



味細胞の種類

- I型：甘味、苦味、うま味
(マーカー：TRPM5)
- II型：酸味、塩味
(マーカー：GAD67)

このマウスは、型味細胞において GFP が発現しているため、型細胞の判別を容易に行うことができる。まず GAD67-GFP knock-in マウスの舌から乳頭を採取した。次にコラゲナーゼ処理により、乳頭から味細胞を単離した。この細胞をディッシュに移し、蛍光指示薬 Fura-2 を用いカルシウムイメージング法によって、ミラクリン処理前後の酸味応答の変化を観察した。

(2) 構造解析を目指した組換えミラクリンの大量発現系の構築

ミラクリンタンパク質の構造解析を目指して、まず果肉から精製したミラクリンを用いて、溶液内での構造を X 線小角散乱法による解析、X 線結晶構造解析のために液晶化ロボット Mosquito により結晶化条件を検討した。さらに、構造解析に必要な大量のタンパク質を得るために、大腸菌を用いた発現系の構築を行った。

4. 研究成果

(1) マウス酸味受容体候補に対するミラクリンの作用

酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 は、イオンチャンネル型受容体ファミリーに属している。この受容体候補は酸刺激が除去された時に活性化する、オフレスポンスと呼ばれる特性を持っている。我々は、酸味受容体候補を発現させた培養細胞において、酸刺激による活性化がミラクリンによって容量依存的に阻害されることを明らかにしている。そこで、酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 が発現している型味細胞をマウス舌の乳頭から単離し、初代培養細胞を用いて酸味受容体候補に対するミラクリンの作用を、カルシウムイメージング法を用いて検討した。GAD67-GFP knock-in マウス由来の味細胞において、酸刺激の暴露と除去を行ったところ、GFP ポジティブの型味細胞において、酸刺激除去後にカルシウム濃度の上場がみられ、オフレスポンスが観察された。一方、ミラクリンで予め暴露した味細胞では、酸刺激除去後のオフレスポンスはほとんど消失した。続けてミラクリンを含まない溶液で処理した場合は、その後の酸応答（オフレスポンス）が観察されたことから、先に見られた酸応答の消失は、ミラクリンに特異的な反応であると考えられた。最後にこの細胞に塩化カリウムを加えて脱分極を行うと、カルシウム濃度の大きな上昇が認められたため、酸味受容体

候補は機能を維持した状態で、ミラクリンにより酸応答が抑制されていたことが明らかとなった。以上の結果から、ミラクリンの味覚修飾活性には、型味細胞に発現する酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 の活性化抑制が関与していることが示唆された。

(2) 構造解析を目指した組換えミラクリンの大量発現系の構築

ミラクフルーツの果肉よりタンパク質を抽出し、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを順次行い、ミラクリンの精製品を得た。これを用いて、X 線小角散乱法により溶液構造を解析した。X 線小角散乱法とは、散乱角が数度以下の X 線を観察することにより、1~100nm の物質の大きさや形状などの構造情報を得ることができる方法である。その結果、ミラクリンは pH によって溶液中の構造が変化することが明らかとなった。

さらに詳細なミラクリンの構造情報を得るため、X 線結晶構造解析を行った。解析には、精製ミラクリンを 3 種類のグルコシダーゼで処理し糖鎖を切断したものを使用した。まず結晶化ロボット Mosquito により結晶化条件を検討した。Mosquito はナノリッター分注システムで、このシステムを用い 468 条件でシットティングドロップ蒸気拡散法にて結晶化を行ったところ、58 条件で微結晶が出現した。硫酸アンモニウムあるいはポリエチレングリコール存在下で、微結晶化する傾向にあった。X 線結晶構造解析が可能な大きさの単結晶には至らなかったが、初めてミラクリンの微細結晶を得ることができた。現在この条件を中心に、最適結晶化条件の確立を進めている。

ミラクフルーツから精製した場合、ミラクリンの収量が少ないことが問題点として挙げられる。そこで、大腸菌を用いた組換えタンパク質の発現系の構築を検討した。ミラクリンダイマーおよびミラクリンモノマーを大腸菌に発現させ、各々精製品を得ることができた。精製したタンパク質溶液の動的光散乱測定を行ったところ、ミラクフルーツ由来のミラクリンと比較して、均一性が低く凝集体が多いことから、結晶化に用いることはできなかった。現在、発現量および可溶性の増加を目指して、融合型ミラクリンの発現を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上裕康 (INOUE Hiroyasu)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：40183743

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし