

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04918

研究課題名(和文)嗜好味受容体発現細胞を用いた呈味調節物質の探索とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Characterization of chemical compounds contributing to the taste enhancer/suppressor using the taste receptor-expressing cells and examination of those molecular mechanisms

研究代表者

三坂 巧 (MISAKA, Takumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：40373196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：味覚受容体を発現する培養細胞を用いて、呈味強度の調節を行う機能を有する成分の探索を行い、複数の呈味調節物質の同定に成功した。醤油・チーズ・トマトなど、日常用いられる食材に含まれるメチオナルについては、その詳細な旨味増強メカニズムを明らかにすることもできた。この成果は、他の受容体におけるリガンド認識機構の解明に寄与することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甘味・旨味のような嗜好性に関与する味質の強度を調節する物質の発見は、食品の味のデザインに新たな方向性を示すことにつながっていく。今回、メチオナルという、普段の食材にも含まれる成分が旨味増強効果を有することを、旨味受容体を発現させた培養細胞を用いて証明することができた。この物質がアミノ酸や核酸など他の旨味成分と協調し、世界中の人々の「食のおいしさ」に貢献していることが示されたのである。

研究成果の概要(英文)：We carried out a screening to identify compounds contributing to the taste enhancer/suppressor using the taste receptor-expressing cultured cells, and successfully characterized several compounds. In this study, methional, including an ordinary foods such as soy sauce, cheese and tomato, has been shown that it acts as an enhancer of umami taste. The detailed molecular mechanisms of methional have also been indicated, and this result may be applicable for elucidating the molecular mechanisms underlying ligand recognition by other receptors.

研究分野：食品科学

キーワード：食品 食品機能 嗜好性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

食品の味はその価値を決定づける重要な因子である。近年同定された味覚受容体の機能解析により、官能評価に依らない味物質の評価が可能となり、詳細な味物質受容メカニズムも解析可能となってきた。

「食品の味」を考える上で非常に特徴的なこととして、摂取する食品中には様々な成分が混在していることが挙げられる。多種類の物質を同時に口腔内に入れることで、味覚受容体には多種類の物質が同時に作用する。旨味の相乗効果に代表されるように、複数の物質が同時に味覚受容体に作用することで、呈味強度が増強（あるいは減弱）することがある。この作用は、我々が感じる味に大きく影響を与え、食品の価値向上にも資する可能性があることが予想された。

2. 研究の目的

本研究においては、複合的な物質投与に対する味覚受容体の応答評価を、嗜好味（甘味・旨味）を担う味覚受容体を対象として実施することで、どのような相互作用が発生しうるかを明らかにすることを目的とする。食品のおいしさを担う嗜好味について、特に増強物質が同定できれば、味のデザインに大きく寄与することが期待される。

甘味の増強剤については、我々がすでに同定した NHDC (Fujiwara *et al.*, *Food Chem.*, 2012) をはじめ、複数の物質が同定されている一方で、旨味の増強剤についてはグルタミン酸-イノシン酸というアミノ酸-核酸の組み合わせが知られているのみである。甘味・旨味受容体は、クラス C に属する GPCR のヘテロダイマーにより構成され、比較的相同性が高い。したがって、旨味受容体についても、大規模なスクリーニングにより、食品に利用可能な増強剤が同定できるものと期待される。旨味受容体のハイスループットな測定系については、世界でもいくつかの研究室で実施できているのみである。我々はこれまでの研究により、発光検出系を用いた旨味受容体の評価系構築や、変異体解析によるリガンド認識の構造的基盤を明らかにしている (Toda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2013) ことから、技術的な優位性を有しているといえる。

3. 研究の方法

本申請研究においては味覚受容体発現細胞を用い、受容体認識時の味物質間で生ずる複雑な相互作用を、複合的な物質投与に対する味覚受容体の応答評価という観点から解析する。複数の物質が同時に味覚受容体に作用することで、呈味強度が増強（あるいは減弱）するというこれまでにない組み合わせを提示できれば、食品の味のデザインに新たな基軸を設定することが可能となる。

一方、それら選抜された物質については、受容体の点変異体を用いることによる作用部位の同定、および活性物質の構造類縁体を用いることにより、相互作用における分子メカニズムの解明も試みる。相同性の高い甘味・旨味受容体のそれぞれについて、受容体活性化機構の違いについても検討をおこなう。

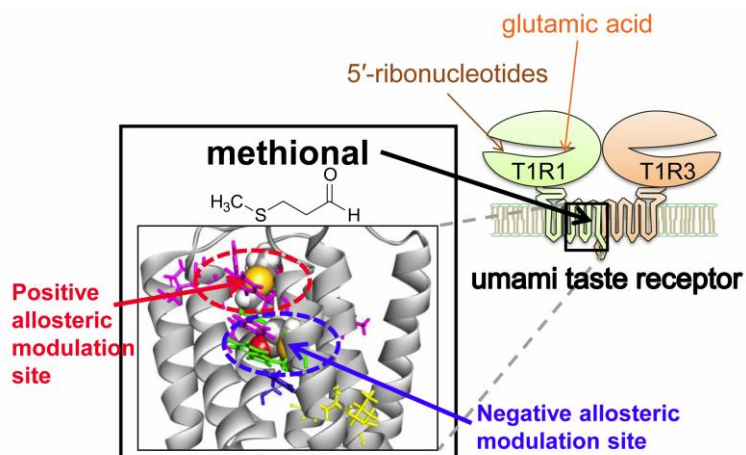
また、各種味覚受容体の測定は現時点である程度可能ではあるものの、測定条件・応答強度や受容体の種類といった点については、食品を対象とするにはまだ十分とはいえない。よって評価系の改良についても遂行し、応答強度の高い細胞株の作出を試みる。

4. 研究成果

(1) 天然香気成分メチオナルによる旨味受容体の新規活性調節機構の解明

培養細胞発現系を用いて旨味受容体の機能解析を行い、天然香気成分であるメチオナルが、ヒト旨味受容体のアミノ酸に対する応答を有意に増強することを見出した。旨味受容体の既知のアロステリックモジュレーターであるイノシン酸とメチオナルの同時添加試験を行った結果、メチオナルとイノシン酸はそれぞれの増強効果を相殺せず、ヒト旨味受容体を更に活性化させたことから、メチオナルはイノシン酸とは異なる部位に結合することも示唆された。

一方で、メチオナルの効果 Maus 旨味受容体でも確認したところ、ヒト旨味受容体とは逆に活性抑制効果を示した。このようにヒトと Maus の味覚受容体の間で、作用が逆になる物質はこれまで報告がなかった。ヒトと Maus 旨味受容体での作用の違いが、旨味受容体におけるどのような違いによ



て生じるのか明らかにするため、ヒトとマウスのキメラ受容体、およびアラニン変異体を用いて検証を行った。その結果、メチオナルの結合部位は T1R1 サブユニットの膜貫通領域に 2ヶ所存在することが示された (図)。

T1R1 の膜貫通領域におけるメチオナルとのドッキングモデルを作成し、実験結果を合わせて考察したところ、興味深い結果が明らかになった。つまり、膜貫通領域に存在するリガンド結合ポケットの底部のアミノ酸残基の違いにより、メチオナルが 2ヶ所のうちのどの結合部位に結合するかが決定され、ヒト旨味受容体ではリガンド結合ポケットの上部に結合して受容体活性を増強するが、マウス旨味受容体では下部に結合して活性を抑制するという、新しい作用メカニズムを見出すことができた (図)。

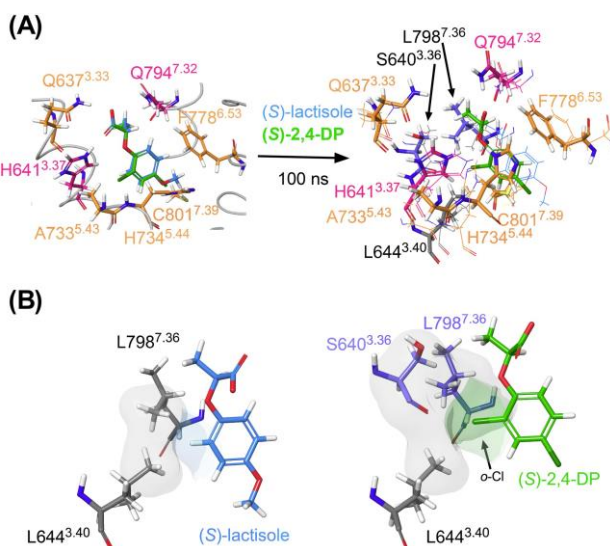
この成果についてはすでに原著論文として公表するとともに、研究科ホームページに解説を公開した。和文解説記事についても執筆を行い、成果の広報に努めた。

(2) 複数のヒト甘味受容体阻害剤の間における受容体阻害様式の差異の解析

甘味受容体は G タンパク質共役型受容体(GPCR)に分類される T1R2 及び T1R3 がヘテロダイマーを形成しており、甘味抑制物質であるラクチゾール及びその類似構造を有する 2,4-DP は、T1R3 の膜貫通領域に作用することが明らかとなっている。両者の構造は類似しているものの、その阻害効果は 2,4-DP の方が 10 倍程度、低濃度で作用する。

この作用機序の違いについて解析するため、代謝型グルタミン酸受容体の膜貫通領域 (mGluR1-TMD) の構造から T1R3-TMD のホモロジーモデルを構築し、ここへ既存のリガンド (ラクチゾール・2,4-DP) をドッキングしたモデルを構築した。阻害剤との相互作用が予想された受容体側の残基については、点変異を導入した変異体を発現する甘味受容体安定発現細胞株を構築し、阻害活性の実験的な検証を行った。ドッキングモデルを精査した後、更に Molecular Dynamics を用いたシミュレーションにてモデルを最適化することで阻害剤-受容体複合体モデルを構築し、どの残基に阻害剤が作用するかの詳細な検討を行った。

その結果、ラクチゾールと 2,4-DP は(R)体よりも(S)体のほうが受容体に強力に作用していることが明らかになった。またラクチゾールに比べ、2,4-DP が分子内クロロ基を介した受容体との強い疎水結合を有しており、これが強力な阻害活性に寄与していることが、構築したモデルより明らかになった。この成果についてはすでに原著論文として公表を行った。



(3) 味覚受容体応答評価系に関する改良

ヒト甘味受容体の安定発現細胞について、応答性向上を目的に発現コンストラクトの改良を行った。受容体サブユニットを発現させるプロモーターやコンストラクト上の位置の変更を網羅的に実施し、既存の細胞株よりも高い応答性を有する新規細胞株の作出に成功した。リアルタイム PCR での測定から、hT1R2 の mRNA 発現量が hT1R3 と比較して多い細胞株の応答性が高い傾向が認められるなど、いくつかの知見が明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Nakagita, T., Ishida, A., Matsuya, T., Kobayashi, T., Narukawa, M., Hirokawa, T., Hashimoto, M., and Misaka, T.
Structural insights into the differences among lactisole derivatives in inhibitory mechanisms against the human sweet taste receptor.
PLoS One, 14, e0213552 (2019.3) 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0213552
- ② Toda, Y., Nakagita, T., Hirokawa, T., Yamashita, Y., Nakajima, A., Narukawa, M., Ishimaru, Y., Uchida, R., and Misaka, T.

Positive/negative allosteric modulation switching in an umami taste receptor (T1R1/T1R3) by a natural flavor compound, methional.

Sci. Rep., **8**, 11796 (2018.8) 査読有

DOI:10.1038/s41598-018-30315-x

③Abe, K., and Misaka, T.

Food functionality research as a new national project in special reference to improvement of cognitive and locomotive abilities.

Biosci. Biotechnol. Biochem., **82**, 573-583 (2018.4) 査読有

DOI: 10.1080/09168451.2017.1412249

[学会発表] (計5件)

①井手 美里、竹谷 千晶、三坂 巧

ヒト甘味受容体安定発現細胞を用いた高濃度糖溶液の甘味評価法の改良
日本農芸化学会 2019 年度大会 (2019/3/26)

②竹谷 千晶、松谷 拓弥、中北 智哉、三坂 巧

ヒト甘味受容体発現細胞の応答強度向上のための培養条件検討
日本農芸化学会 2019 年度大会 (2019/3/26)

③中北 智哉、竹谷 千晶、成川 真隆、小林 拓也、三坂 巧

抗炎症剤イブプロフェンの甘味受容体に対する阻害剤としての作用機構解析
日本農芸化学会 2019 年度大会 (2019/3/26)

④竹谷 千晶、三坂 巧

ヒト甘味受容体安定発現細胞株の応答性向上の試み
日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018/3/17)

⑤松谷 拓弥、中北 智哉、広川 貴次、三坂 巧

甘味物質とヒト甘味受容体膜貫通領域の相互作用モデルの検討
日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017/3/18)

[図書] (計0件)

[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:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

生物機能開発化学研究室のホームページ

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biofunc/researchmap> のページ

https://researchmap.jp/misaka_takumi

研究紹介「天然香気成分メチオナルによる旨味受容体の新規活性調節機構の解明」

<https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2018/20180824-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。