

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08426

研究課題名(和文) ランダムなアミノ酸配列ライブラリを利用した抗苦味受容体人工抗体の開発

研究課題名(英文) Development of artificial antibody of anti-bitter taste receptor using random amino acid sequence library

研究代表者

内田 享弘 (Uchida, Takahiro)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70203536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：複数の医薬品を対象に苦味センサの出力と各種ヒト苦味受容体の応答性との間に有意な相関性を見出した。さらにジペプチドAsp-Asp、Glu-Gluならびにその構成アミノ酸Asp、Gluに着目してジフェンヒドラミン塩酸塩(0.5 mM)に対する苦味抑制効果を検証したところ、センサ出力値はAsp-AspまたはGlu-Glu添加濃度依存的に抑制された。SPR測定によるスペクトラム変化の大きさは、Asp-Asp>Glu-GluおよびAsp>Gluの順であったこと、および分子モデリングによる予測からジペプチド、アミノ酸のhTAS2R14への親和性の違いが薬物と競合的に拮抗する苦味抑制機序を考えるに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

苦味を呈する医薬品は苦味受容体タンパク(hTAS2R10、hTAS2R14他)の基質であることが確認されているが特異的な苦味抑制剤は開発されていない。研究代表者は多くのペプチド、アミノ酸類の中から旨味ペプチドに着目し、塩基性薬物への有意な苦味抑制効果を味覚センサで検証し、その機序について表面プラズモン共鳴(SPR)と分子モデリングにより予測した。検討により多くの塩基性薬物について比較的低分子のAsp-Asp、Glu-GluならびにAsp、Gluが一定の苦味抑制効果を示すことを見出した点に本研究の意義がある。今後分子モデリングの活用により苦味受容体のインバースアゴニストの分子設計に応用できる。

研究成果の概要(英文)：We firstly found the correlation between taste sensor output of commercial medicines and their response in various type of human receptors. Secondly, the inhibition of Asp-Asp and Glu-Glu as umami-peptides and their constituent Asp and Glu as amino acid toward 0.5 mM diphenhydramine hydrochloride (DPH) solution were examined. The Asp-Asp and Glu-Glu dramatically reduced bitterness sensor output of DPH in their concentration dependent manner. In the SPR experiment, the spectrum change was ranked as follows: Asp-Asp>Glu-Glu>Asp>Glu. This information and docking simulation study suggested that competitive inhibition of umami-peptide via binding to binding site of hTAS2R14

研究分野：医療系薬学

キーワード：味覚センサ Asp-Asp Glu-Glu アスパラギン酸 グルタミン酸 hTAS2R14 表面プラズモン共鳴 分子モデリング

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ランダムなアミノ酸配列ライブラリを利用して、医薬品の苦味受容体に関する安全で有効な抗体(拮抗物質)を探索することが当初の研究の目標であり、受容体に対するインバースアゴニストの候補物質の探索も目標であった。研究当初においては過去の論文を参考に複数アミノ酸ベースの苦味抑制剤を探索したが、安定性および苦味抑制効果が不十分であった。

そこで Kim M. Jらの文献<sup>1)</sup>を参考に2017年度に検討した苦味抑制が認められた2種のジペプチド Asp-Asp、Glu-Glu ならびにアミノ酸である Asp、Glu に着目して以下の検討を行った。

### 2. 研究の目的

小児を含めて幅広く使用されている複数の医薬品を対象に、当研究室で使用している苦味医薬品のセンサ出力を測定し、すでに報告されているヒト苦味受容体タンパク(hTAS2R10、hTAS2R14)との相関性を評価することを目的とした。次に代表的な塩基性苦味医薬品のジフェンヒドラミン塩酸塩を選択し、ジペプチドである Asp-Asp、Glu-Glu ならびに Asp、Glu の苦味抑制効果を苦味センサで検証することを目的とした。さらに苦味抑制機序解明のために表面プラズモン共鳴(SPR)実験によるジペプチド、アミノ酸の hTAS2R14 への親和性の確認と分子モデリングによる苦味抑制機序の推定を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 複数の医薬品のセンサ測定:

当研究室で過去に使用している苦味センサの ANO、BT0 を用いて医薬品の苦味の評価を試みた。センサ膜として苦味応答性に優れた BT0 膜を使用し、ジフェンヒドラミン塩酸塩(0.5 mM)に対する Asp-Asp または Glu-Glu (各 0.1、0.5、1.0、5.0 mM) の抑制効果を検証した。

#### SPR 測定による Asp-Asp、Glu-Glu、Asp、Glu の苦味受容体に対する親和性評価:

旨味ペプチドである Glu-Glu、Asp-Asp および、その構成アミノ酸の Glu、Asp がどのような機序で苦味を抑制しているかを推定するため、SPR のシグナル変化を測定してペプチド・アミノ酸-苦味受容体 hTAS2R14 の分子間相互作用を評価するために速度論的解析を行った。自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayer: SAM)を形成した金薄膜にヒト苦味受容体タンパク(hTAS2R14)を固定した。金薄膜に hTAS2R14 を固定した場合、固定しなかった場合と比較して SPR シグナルの生じる偏光照射角度変化により、hTAS2R14 の金薄膜に固定を確認後、SPR 測定によるスペクトラム変化を評価した。

#### 分子モデリングの検討:

苦味受容体 hTAS2R14 と DPH、Asp-Asp または Glu-Glu の相互作用を調べるため分子モデルシミュレーションを用いた。過去の研究を参考に hTAS2R14 モデルは、ヒト CC ケモカイン受容体タイプ9、CCR9 (pdb コード: 5lwe) の構造に基づいて作成した。

### 4. 研究成果

#### 複数の医薬品のセンサ測定:

多くの苦味医薬品について、3種の苦味センサ、収斂味センサを使用してセンサ出力を測定し、その結果について主成分分析を用いて解析し、苦味を呈する医薬品と収斂味を呈する医薬品にグループ化されることが明らかとなった。つづけて苦味を呈する多くの医薬品についての3種苦味センサの出力とヒト苦味受容体の応答性との間の相関性を確認した。さらに、2種のジペプチド Asp-Asp、Glu-Glu ならびにアミノ酸である Asp、Glu に着目して以下の検討を行った。苦味受容体タンパク(hTAS2R10、hTAS2R14)の基質であることが確認されているジフェンヒドラミンを対象薬物とし苦味応答性に優れた BT0 膜を使用して、ジフェンヒドラミン塩酸塩のセンサ出力の抑制を評価した。その結果、ジフェンヒドラミン塩酸塩(0.5 mM)の苦味センサ出力値は Asp-Asp または Glu-Glu (各 0.1、0.5、1.0、5.0 mM) 添加濃度依存的に抑制された。抑制率は Asp-Asp>Glu-Glu>Asp>Glu の順となった。この結果はアミノ酸の脂溶性や酸性度と相関していることも示唆された。

#### SPR 測定による Asp-Asp、Glu-Glu、Asp、Glu の苦味受容体に対する親和性評価:

SPR による hTAS2R14-DPH、-旨味ペプチド(Glu-Glu、Asp-Asp)、-構成アミノ酸(Glu、Asp)間の分子間相互作用測定とその速度論的解析により、DPH と比較して旨味ペプチドである Glu-Glu および Asp-Asp とその構成アミノ酸である Glu および Asp は hTAS2R14 との結合速度定数  $k_a$  が大きいことが明らかになった。このことより旨味ペプチドである Glu-Glu および Asp-Asp とその構成アミノ酸である Glu および Asp が DPH と比較して hTAS2R14 と親和性が高いことが推察された。SPR 測定によるスペクトラム変化の大きさは、Asp-Asp>Glu-Glu>Asp>Glu の順となり、ジペプチド、アミノ酸の hTAS2R14 への親和性の違いがジフェンヒドラミン塩酸塩を競合的に拮抗する苦味抑制機序を考えるに至った。

#### 分子モデリングの検討:

リガンドとしてそれぞれ DPH、Asp-Asp、または Glu-Glu を用いて hTAS2R14 のドッキングシミュ

レーションを行った。5つのシミュレートした構造を分析し、最もエネルギーが小さく安定した構造からリガンドと相互作用する4 Å領域内のアミノ酸残基を同定した。分析により、DPHがF47、W119、およびI122との疎水性相互作用およびS55との静電相互作用があることがわかった。一方、N123、Y270、S274、Y302、Q296との静電相互作用、およびW119との弱い疎水性相互作用が形成され、シミュレートした構造内にAsp-Aspがドッキングした。Glu-GluもAsp-Aspと同様に静電相互作用と弱い疎水性相互作用を形成した。上記の相互作用についての推定距離についてもまとめた。一般的に静電相互作用は、疎水性相互作用と比べて強力である。DPHよりGlu-Glu、Asp-Aspの方が疎水性相互作用より強い静電相互作用の結合様式を多く持っている。このことは、SPR測定の数値論的解析の結果である、Glu-Glu、Asp-AspはDPHよりhT2R14との親和性が高いということに矛盾していなかった。

<引用文献>

1) Min Jung Kim, Hee Jin Son, Yiseul Kim, Takumi Misaka, Mee-Ra Rhyu, Umami-bitter Interactions: The Suppression of Bitterness by Umami Peptides via Human Bitter Taste Receptor, *Biochem Biophys Res Commun.*, **456**, 586-590, 2015

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Okuno T., Morimoto S., Nishikawa H., Haraguchi T., Kojima H., Tsujino H., Arisawa M., Yamashita T., Nishikawa J., Yoshida M., Habara M., Ikezaki H., Uchida T.	4. 巻 68
2. 論文標題 Bitterness-Suppressing Effect of Umami Dipeptides and Their Constituent Amino Acids on Diphenhydramine: Evaluation by Gustatory Sensation and Taste Sensor Testing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 234-243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Haraguchi T., Okuno T., Nishikawa H., Kojima H., Ikegami S., Yoshida M., Habara M., Ikezaki H., Uchida T.	4. 巻 67
2. 論文標題 The Relationship between Bitter Taste Sensor Response and Physicochemical Properties of 47 Pediatric Medicines and Their Biopharmaceutics Classification.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1271-1277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Haraguchi T., Uchida T., Yoshida M., Kojima H., Habara M., Ikezaki H.	4. 巻 66
2. 論文標題 The Utility of the Artificial Taste Sensor in Evaluating the Bitterness of Drugs: Correlation with Responses of Human TASTE2 Receptors (hTAS2Rs)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 71~77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c17-00619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiraishi S., Haraguchi T., Nakamura S., Li D., Yoshida M., Uchida T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Taste-Masking Effect of Chlorogenic Acid (CGA) on Bitter Drugs Evaluated by Taste Sensor and Surface Plasmon Resonance on the Basis of CGA-Drug Interactions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 127-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c16-00621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Uchida T., Okuno T., Haraguchi T., Kojima H., Ikegami S., Yoshida M.
2. 発表標題 Factors of bitterness in clinical medicines for pediatric patients evaluated by correlation between physicochemical properties or biopharmaceutics classification and taste sensor responses
3. 学会等名 AAPS 2019 PHarmSci 360 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川知花、奥野敬義、小島穂菜美、池上咲枝里、辻野博文、有澤光弘、山下沢、西川淳一、吉田都、内田享弘
2. 発表標題 旨味ペプチドによる医薬品の苦味マスキングおよびメカニズムの検討
3. 学会等名 第69回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田享弘
2. 発表標題 味覚センサを用いた医薬品の苦味マスキング設計-原理から最近の話題まで-
3. 学会等名 国立研究開発法人産業技術総合研究所主催 第28回講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川知花、奥野敬義、森本栞、原口珠実、小島穂菜美、池上咲枝里、王文平、吉田都、内田享弘
2. 発表標題 低分子ペプチドによるジフェンヒドラミン塩酸塩の苦味抑制効果
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田享弘、森本菜、春名麻美、小島穂菜美、原口珠実、吉田都
2. 発表標題 薬物の苦味抑制剤としての旨味ペプチドの有用性評価
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Uchida, S. Morimoto, H. Kojima, T. Haraguchi, M. Yoshida
2. 発表標題 Evaluation the bitterness masking effect of umami peptides on bitter drugs by taste sensor measurement and human sensation test
3. 学会等名 AAPS 2018 PHarmSci 360 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川聡奈、西川知花、井上穂南、井上由梨、廣田理奈、山本優、原口珠実、小島穂菜美、吉田都、内田享弘
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いた薬物の苦味受容体サブタイプへの応答予測
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	吉田 都  (Yoshida Miyako)  (20369028)	武庫川女子大学・薬学部・准教授   (34517)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	伊東 祐二  (Ito Yuuji)  (60223195)	鹿児島大学・理工学域理学系・教授       (17701)	