

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19780074

研究課題名 (和文) タンパク質の甘味発現機構に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on the elicitation of sweetness of sweet-tasting proteins.

研究代表者

梶田 哲哉 (MASUDA TETSUYA)

京都大学・大学院地球環境学堂・助教

研究者番号：80311744

研究成果の概要 (和文)：甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現部位を明らかにするため酵母を発現系として部位特異的変異体の作製を行い、クレフト面に存在する K67、R82 の 2 残基がソーマチンの特異な甘味発現に寄与していることを突き止めた。さらに甘味に重要な構造要因を検討するため、R82 変異体の結晶を作製し SPring8 にて解析を行った。その結果、R82 側鎖の正電荷の厳密な方向性がソーマチンの特異な甘味発現を決定付ける要因であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Thaumatococcus is an intensely sweet-tasting protein. To clarify the structure-sweetness relationships in thaumatococcus, we performed high resolution crystal structure analysis. The results showed that overall structures of these mutants are identical to that of plant thaumatococcus. However the subtle conformational changes in the main chain of K67 were induced by mutation of R82. The surface electric potential on the cleft containing side of the thaumatococcus was dramatically changed by the mutation at R82. These results demonstrated that the strict surface electrostatic potentials at the specific site formed by R82 and K67 are required for thaumatococcus sweetness

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：甘味タンパク質、ソーマチン、結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病が社会問題となっており、ショ糖に代替

できる甘味料が切望されている。タンパク質は一般的に無味であるが、例外的に甘味を呈するタンパク質が存在する。現在まで 6 種の

甘味タンパク質（ソーマチン、モネリン、ブラゼイン、マビンリン、リゾチーム、ネオクリン）の存在が確認されている。甘味タンパク質の特徴を見出すことにより、甘味タンパク質を糖代替物として利用が可能であると目論み現在、国内外で多くの研究がなされている。また、甘味タンパク質は特異性の高さから甘味受容のメカニズムを明らかにする上でも有用なツールとなる可能性がある。

2. 研究の目的

タンパク質の中には例外的に甘味を呈するタンパク質が存在する。しかしながらこれら甘味タンパク質間に共通して存在するアミノ酸配列や立体構造などの特徴は見出されていない。本研究は甘味タンパク質の中でも特に強い甘味を呈するソーマチンを研究対象とし、遺伝子工学的手法によって部位特異的変異体を作製して甘味発現に重要な部位を特定する。さらに甘味に影響を与えた変異体について高分解能X線結晶構造解析を行うことにより、どのような構造が甘味発現に重要であるかについて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ソーマチン発現系の構築

Thaumatooccus daniellii Benth の仮種皮からソーマチン遺伝子をクローニングした。ソーマチンは開始メチオニン以降 21 アミノ酸残基からなるプレ配列と、6 アミノ酸残基からなる C 末端側プロ配列を有している。これら N 末端プレ配列および C 末端プロ配列が、組換え型ソーマチンの分泌発現にどのような影響をもたらすかについて検討した。4 種のソーマチン発現ベクターを構築し、それぞれの遺伝子を酵母にエレクトロポレーションを行い形質転換した。スクリーニングは、抗生物質 blasticidin を用いた(図 1)。

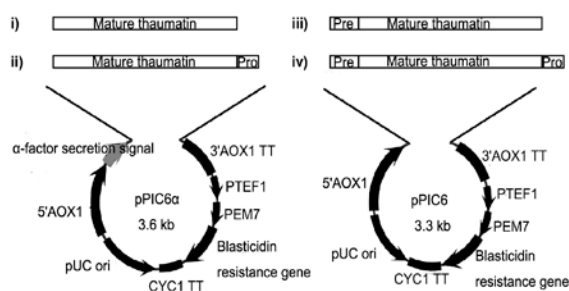


図 1. ソーマチン発現ベクター

(2) ソーマチンの発現、精製

ソーマチンの発現はファーメンターを用いて行った。発現誘導はメタノールの添加により行った。酵母培養液を遠心後、上清を透

析し、その後陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。精製純度は SDS-PAGE ならびに Native-PAGE にて行った。

変異体は、Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて作製し、組換え型ソーマチンと同等の手法により、形質転換、発現、精製を行った。

(3) 結晶化およびデーター測定

結晶化は蒸気拡散法にて行った。タンパク質濃度を 1 から 10% に調製し、沈殿剤として濃度の異なる、ロッシェル塩、グリセロールを含むものを調製し、20 度のインキュベーターにて静置した。結晶のデーター測定は、理研播磨研究所 SPring8 にて行った。ビームラインは BL38B1 および BL26B1、波長は 0.7-0.8 Å、ディテクターは、イメージングプレート様式の RAXIS-V および CCD タイプの Jupiter 210 を用いた。収集したデーターについて HKL2000 にてプロセッシングを行い、植物ソーマチン A の構造 (PDB: 1RQW) を初期モデルとして分子置換を行った。分子構造のモデリングは Coot を用いて行った。精密化は shelxl を用いて行った。変異体の初期構造は自ら構築した構造を鋳型として分子置換を行った。

4. 研究成果

(1) 酵母 *Pichia pastoris* でのソーマチン発現系の構築

RT-PCR にてソーマチン cDNA を合成し、ベクターにサブクローニングし、DNA シークエンサーにて核酸配列を決定した。核酸配列をもとに予想されるアミノ酸配列を、Iyenger や Edens らによって報告されたソーマチン I、ソーマチン II の配列と比較したところソーマチン I とは 113 番目の残基が Asn でなく Asp であった。ソーマチン II とは 46 番目 (Lys→Asp)、63 番目 (Arg→Ser)、67 番目 (Lys→Arg)、76 番目 (Gln→Arg) の 4 箇所に違いが見られた (図 2)。

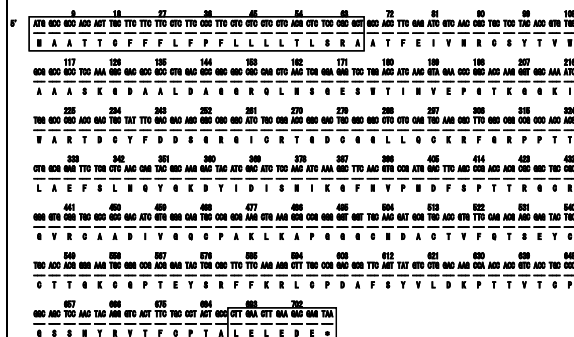


図 2. ソーマチン I の核酸配列 (GeneBank Accession No. AB265690)

以前からソーマチン I の 113 番目の残基について、Asn か Asp であるか議論されていたが、本研究によりソーマチンの 113 番目の残基は Asp であることが支持された。クローニングしたソーマチン遺伝子を再び、酵母のシャトルベクターにクローニングし 4 種の発現ベクターを構築した。分泌シグナルとして酵母由来 α ファクターを用いた場合の発現量は 1L あたり約 30 mg 程度であったが、ソーマチンのプレ配列を分泌シグナルとして用いた場合、発現量は培地上清 1L あたり約 100 mg の高発現を達成した。

(2) ソーマチン変異体の作製

高分泌生産が確認できたシャトルベクターを用いて変異体を作製した。アルギニン 82 をアラニンに置換した R82A 変異体、リジン 67 をアラニンに置換した K67A の甘味閾値がそれぞれ 1100 nM、870 nM となり植物由来ソーマチン (45 nM) やリコンビナントソーマチン (45 nM) と比べて 24 倍、19 倍甘味閾値が上昇した (下表)。

ソーマチン変異体の甘味閾値

Thaumatococcus	甘味閾値(nM)
plant	45±9
recombinant	45±12
K19A	70±0
K49A	140±10
K67A	870±92
K106A	140±19
K163A	180±24
R82A	1100±58
K67R	44±6
R82K	240±36

(n = 4-6)

(3) アルギニン 82 の影響

甘味閾値が顕著に上昇したアルギニン 82 についてさらにリジンに置換した R82K、グルタミンに置換した R82Q を作製し甘味に及ぼす影響を検討したところ、R82K の甘味閾値は 240 nM、R82Q は 1010 nM であった。この結果から、アルギニン 82 側鎖の正電荷のみならず、側鎖構造の違いがソーマチンの甘味発現に重要な役割を果たしていると考えられた。しかしながら変異を導入することにより、他の部位やソーマチン全体の構造に影響を与えるかについて CD スペクトルの結果からは詳細がわからなかった。そこで X 線結晶解析を試みた。

(4) ソーマチン変異体の X 線結晶構造解析

精製したソーマチン変異体を蒸気拡散法にて結晶化を行った。現在まで、リコンビナントソーマチン、3 種の変異体 R82A、R82Q、R82K について高分解能解析に適した結晶を

得ることが出来た。これらについて理研播磨研究所 SPring8 にてデータの取得を行い、リコンビナント (1.10 Å)、R82A (1.05 Å)、R82Q (0.95 Å)、R82K (0.90 Å) までのデータを得た。構造の精密化を行ったところ、R82 の 1 残基変異により、甘味発現に重要な残基である K67 の主鎖の構造が 0.5 Å ~ 1 Å 変化していた。またこれら一連の構造変化により R82 近傍の局所的な分子表面の静電的環境が大きく変化していた。以上の結果から、R82 の側鎖の正電荷の厳密な方向性が、ソーマチンの特異な甘味発現を決定付ける要因であると考えられる。

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 4 件)

- ① Ide N., Sato E., Ohta K., Masuda T., and Kitabatake N. Interactions of the sweet-tasting proteins thaumatin and lysozyme with the human sweet-taste receptor. *J. Agric. Food Chem.*, 査読有 (2009) **57**, 5884-5890.
- ② Ohta, K., Masuda, T., Ide, N., and Kitabatake, N. Critical molecular regions for elicitation of the sweetness of the sweet-tasting protein, thaumatin I. *FEBS J.*, 査読有 (2008) **275**, 3644-3652.
- ③ Ide N., Masuda, T., and Kitabatake, N. Effects of pre- and pro-sequence of thaumatin on the secretion by *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 (2007) **363**, 708-714.
- ④ Ide, N., Kaneko, R., Wada, R., Metha, A., Tamaki, S., Tsuruta, T., Fujita, Y., Masuda, T., and Kitabatake, N. Cloning of the thaumatin I cDNA and characterization of recombinant thaumatin I secreted *Pichia pastoris*. *Biotechnol. prog.*, 査読有 (2007) **23**, 1023-1030.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 木子理美、太田圭介、榎田哲哉、三上文三、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンの X 線結晶構造解析 (1) リジン残基の重要性、日本農芸化学会、2010 年 3 月 28 日、東京大学
- ② 榎田哲哉、木子理美、太田圭介、三上文三、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンの X 線結晶構造解析 (2) アルギニン 82 の重要性、日本農芸化学会、2010 年 3 月 28 日、東京大学
- ③ 木子理美、太田圭介、井出信幸、榎田哲

- 哉、三上文三、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンのX線結晶構造解析（1）甘味活性におけるリジン残基の重要性、日本農芸化学会、2009年3月28日、福岡国際会議場
- ④ 榊田哲哉、木子理美、太田圭介、井出信幸、三上文三、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンのX線結晶構造解析（2）甘味活性におけるアルギニン残基の重要性、日本農芸化学会、2009年3月28日、福岡国際会議場
- ⑤ 太田圭介、木子理美、井出信幸、榊田哲哉、北島直文、甘味タンパク質ソーマチンの部位特異的変異による甘味活性部位の解析、日本農芸化学会、2009年3月28日、福岡国際会議場
- ⑥ 榊田 哲哉、片桐 実菜、小原 雅子、北島直文、小麦登熟過程における種子タンパク質遺伝子の発現量に関する研究、日本食品科学工学会、2008年9月7日、京都大学
- ⑦ 榊田哲哉、Chen C, Monica, Sinnett-Smith, James, Rozengurt, Enrique、フェニルチオカルバミド(PTC)に対するSTC-1細胞の応答、日本農芸化学会、2008年3月27日、名城大学（名古屋市）
- ⑧ 佐藤 枝里子、井出 信幸、榊田 哲哉、北島 直文、甘味タンパク質の甘味に対するNaClおよび甘味阻害剤ラクチゾールの影響、日本農芸化学会、2008年3月27日、名城大学（名古屋市）
- ⑨ 井出 信幸、榊田 哲哉、北島 直文、培養細胞上に発現させたヒト甘味受容体の甘味タンパク質への応答、日本農芸化学会、2008年3月27日、名城大学（名古屋市）
- ⑩ 谷口 哲一、川元 麻衣子、榊田 哲哉、北島 直文、甘味タンパク質ソーマチンによる血糖値上昇抑制効果、日本農芸化学会、2008年3月27日、名城大学（名古屋市）
- ⑪ 榊田 哲哉、井出 信幸、北島 直文、リゾチームの甘味特性、日本食品科学工学会、関西支部大会、2007年11月9日、京都大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊田 哲哉 (MASUDA TETSUYA)
京都大学・大学院地球環境学堂・助教
研究者番号：80311744