

機関番号：12601
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21880015
 研究課題名（和文）ネオクリンの味覚修飾機能の分子機構解明のための構造生物学的・タンパク質工学的解析
 研究課題名（英文） Structural analysis and protein engineering for clarifying the molecular mechanism of the taste-modifying activity of neoculin
 研究代表者
 中島 健一郎 (NAKAJIMA KENICHIRO)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教
 研究者番号：70554492

研究成果の概要（和文）：ネオクリンはそれ自身が甘いうえ、酸により強い甘味を呈する活性（味覚修飾活性）をもつヘテロ 2 量体タンパク質である。この活性に重要な残基を探索したところ、1 ヶ所のヒスチジン残基が特に重要であることが判明した。また、pH 依存的な活性の変化がどのような構造変化に伴って生じるのかを NMR により解析したところ、ネオクリンは中性では酸性 pH と異なる構造をとることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Neoculin is a sweet protein with taste-modifying activity converting sourness into sweetness. In this study, I performed a mutational analysis of neoculin to identify the important residue(s) for this pH-dependent activity. It revealed that one histidine residue in neoculin was critical for the activity. NMR analysis also performed to evaluate the structural-activity relationship of neoculin. It was found that the neoculin structurally changed between neutral and acidic pH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	111,000	333,000	1,443,000
2010 年度	101,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	212,000	636,000	2,756,000

研究分野：味覚科学

科研費の分科・細目：農学・食品科学

キーワード：味覚修飾活性・ヒスチジン・NMR

1. 研究開始当初の背景

(1) ネオクリンはそれ自身が弱く甘いうえ、酸性条件下で強い甘味を呈する活性（味覚修飾活性）をもつタンパク質で酸性サブユニット

と塩基性サブユニットのヘテロ 2 量体からなる。ネオクリンを味わうと酸味の強いレモンもオレンジのように甘く感じられることから、そのユニークな活性は基礎および応用（食品）

分野からも注目されていた。これまでに研究代表者らは、ネオクリンに存在する5つのヒスチジン残基すべてをアラニンに置換した変異体は味覚修飾活性を失い、中性条件でも強い甘味を呈することを明らかにしていた。しかし、これらヒスチジン残基のうち、どの残基が味覚修飾活性に特に重要なのかは不明であった。

(2) ネオクリンの活性が pH 依存的に変化することから、中性・酸性 pH でのネオクリンの立体構造が異なることが予想された。また、ネオクリンの中性 pH での構造は両サブユニットが近接するものであったのに対し、分子シミュレーションにより予測した酸性 pH での構造は両サブユニットが開いたものであった。そこで、pH 依存的な構造変化を実験的に明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

(1) ネオクリンの活性に特に重要なヒスチジン残基を特定する。また、その pH 依存的な活性の制御機構を明らかにする。

(2) ネオクリンの pH 依存的な活性の変化がどのような分子構造の変化に伴って生じるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではネオクリン変異体を用いて活性に重要な残基の特定を行うとともに、ネオクリンの立体構造変化をNMRとX線溶液散乱により解析した。

(1)ネオクリン変異体の作製とその活性評価

各ヒスチジン残基をアラニンに置換したネオクリン点変異体は大腸菌発現系により生産し、リフォールディングを行うことで活性を有す

るヘテロ 2 量体を得た。その活性を官能試験および甘味受容体を導入した培養細胞系を用いたカルシウムイメージングにより評価した。

(2)ネオクリンのpH依存的な構造変化の解析

ネオクリンの活性が pH 依存的に変化することから、その構造変化を伴うかどうか NMR により解析した。ネオクリンの一方のサブユニットのみを ^{15}N および $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識したタンパク質を取得し、NMR を測定した。pH3 において主鎖の化学シフトを帰属後、pH3~pH7 までにおける $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ 相関スペクトルを測定し、pH 依存的な化学シフト変化の有無を解析した。また、各 pH において X 線溶液散乱を測定し、分子半径の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) ネオクリンのヒスチジン残基をひとつずつアラニンに置換した変異体および一方のサブユニットのヒスチジン残基のみをアラニンに置換した変異体が大腸菌発現系により生産した。これらの活性を甘味受容体発現細胞を用いたカルシウムイメージングにより評価したところ、いずれも酸性 pH 条件では細胞を強く活性化した。一方で、塩基性サブユニットの 11 番目のヒスチジンをアラニンに置換した変異体は酸性 pH だけでなく、中性 pH でも甘味受容体を強く活性化した。また、官能試験でも、これら変異体の活性を評価したところ、塩基性サブユニットの 11 番目のヒスチジンをアラニンに置換した変異体は味覚修飾活性を消失していた。したがって、味覚修飾活性にはこの残基が特に重要であることが明らかになった。

(2) 塩基性サブユニットの 11 番目のヒスチ

ジンの役割を明らかにするため、この残基をアラニン以外のアミノ酸に置換した変異体を作製し、その活性を評価した。その結果、酸性アミノ酸(アスパラギン酸・グルタミン酸)、塩基性アミノ酸(アルギニン)、疎水性アミノ酸(ロイシン)に置換するとアラニンに置換した場合と同様に味覚修飾活性を消失するが、チロシンやフェニルアラニンにすると味覚修飾活性が保持されることが明らかになった。また興味深いことに、チロシンに置換した変異体は、そのもの自身は甘味を呈さず、味覚修飾活性の pH 感受性が野生型(WT)とは異なっていた(図 1)。以上の結果より、本アミノ酸残基が芳香環を有することが味覚修飾活性に必須であり、点変異を導入することでネオクリンの pH 依存的な活性を制御できることが明らかになった。

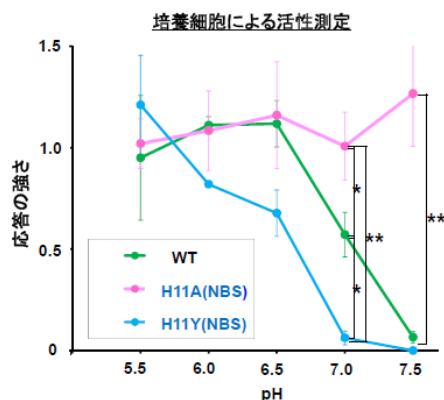


図1 H11Y(NBS)変異体はpH感受性が野生型とは異なる

(3) ネオクリンの一方のサブユニットのみを¹⁵Nおよび¹³C/¹⁵N安定同位体標識した変異体のNMRをpH3~pH7の範囲で測定したところ、pHの変化によって化学シフトが徐々に変化することが明らかになった。また、それだけでなく興味深いことに、pH7では新たなシグナルが観測された(図2)。このシグナルはネオクリンが強い甘味を呈する酸性条件では観察されず、弱い甘味を呈する中性条件で

観察されたことから、甘味活性と関連していると考えられる。したがって、ネオクリンの立体構造はpHによって異なることが示唆された。その一方、各pH条件でネオクリンのX線溶液散乱を測定したところ、分子半径はpHによってほとんど変化しなかった。したがって、pHによるネオクリンの構造変化は大きなものではなく、局所的なものである可能性が示唆された。

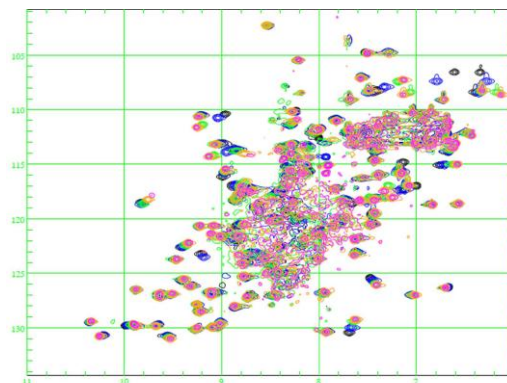


図2 塩基性サブユニットの異なるpHでのHSQCスペクトル

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2件) いずれも査読あり

- ① Ken-ichiro Nakajima, Kanako Yokoyama, Taichi Koizumi, Ayako Koizumi, Tomiko Asakura, Tohru Terada, Katsuyoshi Masuda, Keisuke Ito, Akiko Shimizu-Ibuka, Takumi Misaka, and Keiko Abe, "Identification and Modulation of the Key Amino Acid Residue Responsible for the pH Sensitivity of Neoculin, a Taste-modifying Protein" *PLoS One*, under review (2011)
- ② Ken-ichiro Nakajima, Ayako Koizumi, Kisho Iizuka, Keisuke Ito, Yuji Morita,

Taichi Koizumi, Tomiko Asakura, Akiko Shimizu-Ibuka, Takumi Misaka, and Keiko Abe, "Non-acidic Compounds Induce the Intense Sweet Taste of Neoculin, a Taste-modifying Protein", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, under review (2011)

[学会発表] (計 4 件)

①小泉 太一、森田 悠治、中島 健一朗、飯塚 希翔、古泉 文子、清水 (井深) 章子、朝倉 富子、三坂 巧、阿部 啓子、味覚修飾タンパク質ネオクリンの構造、機能相関の分光学的解析、日本農芸化学会、2010年3月28日、東京

②中島 健一朗、横山 可那子、清水 (井深) 章子、小泉 太一、古泉 文子、朝倉 富子、村 清司、徳江 千代子、荒井 綜一、三坂 巧、阿部 啓子、味覚修飾タンパク質ネオクリンとそのバリエーションの培養細胞を用いた活性評価、日本農芸化学会、2010年3月28日、東京

③小泉 太一、寺田 透、中島 健一朗、古泉 文子、土屋 麻美、朝倉 富子、阿部 啓子、三坂 巧、NMRによる味覚修飾タンパク質ネオクリンの構造変化の解析、日本農芸化学会、2011年3月26日、京都

④金田 康平、中島 健一朗、小泉 太一、古泉 文子、土屋 麻美、朝倉 富子、阿部 啓子、三坂 巧、点変異導入による味覚修飾タンパク質ネオクリンの活性制御、日本農芸化学会、2011年3月26日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者
中島 健一朗 (NAKAJIMA KENICHIRO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号 : 70554492

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号 :

