

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09818

研究課題名（和文）味覚受容体の動的相互作用機構の解明

研究課題名（英文）Dynamic Interaction Mechanisms of Taste Receptors

研究代表者

實松 敬介（Sanematsu, Keisuke）

九州大学・歯学研究院・講師

研究者番号：70567502

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで味物質と味覚受容体の相互作用解析では、静的な結合形態に注目されてきたことにより、味分子の受容体結合後に生じるダイナミックな受容体活性化・不活性化分子機構の多くは謎のままであった。本研究では、分子動力学シミュレーションを導入することで、甘味受容体サブユニットTAS1R3の膜貫通領域における甘味抑制物質ギムネマ酸、ラクチゾールや甘味物質シクラメートの種特異的な感受性を計算機上で再現することに成功した。特にシクラメートは、ヒト型では人工甘味料として作用し、マウス型では抑制物質として同じ部位に作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、味覚受容体の種特異的な感受性をシミュレーション上で再現可能であることを示した。これらは、甘味受容体の活性化・不活性化メカニズムの理解を深めるだけでなく、全身に発現する甘味受容体の制御機構の理解に重要であり、新規味覚修飾物質や機能性食品の開発や創薬に繋がる。また他のクラスC Gタンパク質共役型受容体の活性化機構に重要な知見を与える。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanisms of dynamic receptor activation and inactivation that occur after the binding of taste molecules to their receptors have remained unknown because the analysis of the interaction between taste substances and taste receptors has focused on the static binding form. In this study, by introducing molecular dynamics simulations, we succeeded in reproducing the species-specific sensitivity of the sweet inhibitors gymnemic acid and lactisole and the artificial sweetener cyclamate in the transmembrane domain of the sweet taste receptor subunit TAS1R3. In particular, cyclamate was found to act as an artificial sweetener in the human receptor and as an inhibitor in the mouse receptor.

研究分野：味覚

キーワード：味覚受容体 甘味 動的活性化機構

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 は、クラス C G タンパク質共役型受容体(GPCR)に属し、ヘテロ二量体を構成することで甘味受容体として機能する(図)。その構造的特徴はファミリー分子である mGluR1 の X 線結晶構造解析により明らかにされている。主に下流の G タンパク質を活性化させる 7 回膜貫通領域、それに続くシステインを多く含むシステインリッチド領域、さらに大きな細胞外領域を含みハエトリグサ様の構造を呈する Ven flytrap 領域により構成される。特徴として複数の結合サイトを有することで構造の異なる様々な甘味分子や修飾物質の受容を担うことが知られている。細胞膜に存在する味覚受容体は、細胞外の味分子をとらえ、細胞内の分子へ情報伝達を行う。ここで味分子と結合ポケット内のアミノ酸残基との相互作用は、受容体内部の相互作用により伝播され、結合ポケットから離れた部位へ影響を与える動的相互作用(アロステリック)により、受容体の活性化が引き起こされる。これまで味物質と味覚受容体の相互作用は、静的な結合形態に注目されてきた。たとえば、人工甘味料シクラメートと甘味抑制物質ラクチゾールは、甘味受容体サブユニット TAS1R3 の膜貫通領域にどちらも結合するが、アゴニストやアンタゴニストとして、どのようにして作用するか、実際に情報を伝える G タンパク質との相互作用を含め、そのメカニズムは明らかにされていなかった。すなわち味分子の受容体結合後に生じるダイナミックな受容体活性化・不活性化分子機構の多くは謎のままであった。

2. 研究の目的

分子モデリング上で分子間、分子内の動的相互作用を再現し、in vitro の受容体機能解析系で確認することで、味分子の受容体結合後に生じるダイナミックな受容体活性化・不活性化分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

発現プラスミドの準備

hTAS1Rs、mTAS1Rs および G₁₆-gust44 (G₁₆ の C 末端側 44 アミノ酸配列を、味細胞発現 G プロテイン サブユニット: Gustducin の相当部と置き換えたキメラ体) を、pEF-DEST51 vector (invitrogen) に導入した。TAS1R2/TAS1R3 のマウス/ヒトのキメラおよび G₁₆-gust44 は、オーバーラッピングプライマー、変異導入プライマーを用いて PCR にて作成した。それぞれの遺伝子には、Kozak 配列を開始コドン前の 5' 末端に導入し、発現コンストラクトを構築した。全ての DNA コンストラクトは、DNA シークエンスにて配列を確認した。

強制発現

ヒト腎性胚細胞 (HEK293 細胞) は、10% fetal bovine serum を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium 中で、CO₂ インキュベーター (37 °C、5% CO₂) にて培養を行った。細胞は、コンフルエントになる前に 2 日おきに継代を行った。2 ヶ月経ったものは廃棄し、新しいストックから細胞を起こした。35 mm ディッシュに蒔いた 24 時間後 (60~70% コンフルエント)、リポフェクション法によりトランスフェクションを行った。プラスミド DNA は、0.9 µg の TAS1Rs および G₁₆-gust44、リポフェクション試薬として Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) (0.9 µg DNA あたり 2.5 µl) を使用した。

カルシウムイメージング

トランスフェクションを行ってから 24 時間後、5 µM fluo-4/AM (Invitrogen) を 37 °C で 30 分間ロードした。培地を捨てた後、測定用液 (10 mM HEPES を加えた Hank's balanced salt solution (HBSS pH 7.4) にて 2 回細胞を洗った。測定溶液にて灌流を行いながら、カルシウムイメージングを行った。味溶液は測定溶液に味物質を溶解させ用いた。ペリスタポンプを用いて測定用液を灌流させ (1 ml/分)、味刺激は 25 秒間行った。細胞内カルシウム濃度は、Ca²⁺-imaging system (AQUA COSMOS; Hamamatsu Photonics または、CellSens Dimension; Olympus) を用いて測定を行なった。各種甘味溶液に細胞内カルシウム濃度の上昇を示した細胞を遺伝子発現細胞として解析に使用した。

分子モデリング

mGluR1 を鋳型にしてホモロジーモデリングを行った。リガンドの立体構造は、量子化学計算プログラム Gaussian 16 を用いて構造最適化を行った。Autodock を用いて結合シミュレーションを行い、リガンド-受容体複合体を作製した。CHARMM-GUI (<http://www.charmm-gui.org/>) を用いてリガンド-受容体複合体を脂質二重膜中に浮かべ、上下に水とイオン (150 mM NaCl) を配置することで細胞膜中の受容体環境を再現した。分子動力学ソフト AMBER を用いて複合体の結

合動態をシミュレートした。分子動力学計算は、九州大学情報基盤研究開発センターのスーパーコンピュータシステム IT0 を用いて高速計算を行った。

4. 研究成果

甘味抑制物質ギムネマ酸は、ヒトの甘味を強力に抑制し、マウスには無効であることが知られている。このヒト-マウス間の異なる感受性を利用したキメラ体の解析および点変異を用いた解析により、我々は、ギムネマ酸がヒト TAS1R3 の膜貫通領域に作用することを明らかにしていた (Sanematsu et al., J Biol Chem, 2014)。本研究における分子動力学シミュレーションの結果、500 ナノ秒間を通してギムネマ酸は、ヒト TAS1R3 膜貫通領域の結合ポケットに安定して存在し続ける予測結果を得た。一方でマウス Tas1r3 膜貫通領域と結合させたモデルでは、ギムネマ酸が 20 ナノ秒以内でマウス Tas1r3 膜貫通領域から外れることが予測された。このことからギムネマ酸とマウス甘味受容体は相互作用しないことが明らかになった。この結果は、ヒトの甘味を抑制し、マウスの甘味を抑制しないギムネマ酸の種特異的感受性を再現しているものと想定された。このことから、本システムが、味覚アロステリックモジュレーターと TAS1R3 膜貫通領域の相互作用において、種間を含めた感受性の解析に有用であることが示唆された。

人工甘味料シクラメートは、ヒトでは甘味を呈し、マウスには無効であることが知られている。また、ギムネマ酸以外の抑制物質であるラクチゾールもヒトに有効で、マウスでは無効である。シクラメートおよびラクチゾールどちらも TAS1R3 膜貫通領域に作用することが知られている。分子動力学シミュレーションの結果、シクラメートとラクチゾールはヒト TAS1R3 膜貫通領域に安定して結合し続けることが明らかになった。一方で、マウス Tas1r3 膜貫通領域との相互作用でも結合サイトにシクラメートとラクチゾールが結合し続けることが分かった。主成分解析を用いた活性化モデルと不活性化モデルの構造比較を行ったところ、シクラメートやラクチゾールと結合しているマウス Tas1r3 は不活性化型の構造に近いことが分かった。そこで、甘味受容体強制発現系における機能解析を行ったところ、シクラメートやラクチゾールは高濃度でマウス受容体の甘味応答を抑制することが明らかとなった。特にシクラメートは、ヒト型では人工甘味料として作用し、マウス型では抑制物質として同じ部位に作用するという新たな発見へと繋がった。本研究から、TAS1R3 膜貫通領域の種特異的感受性をシミュレーション上で再現することに成功した (図、Sanematsu et al., Commun Biol, 2023)。

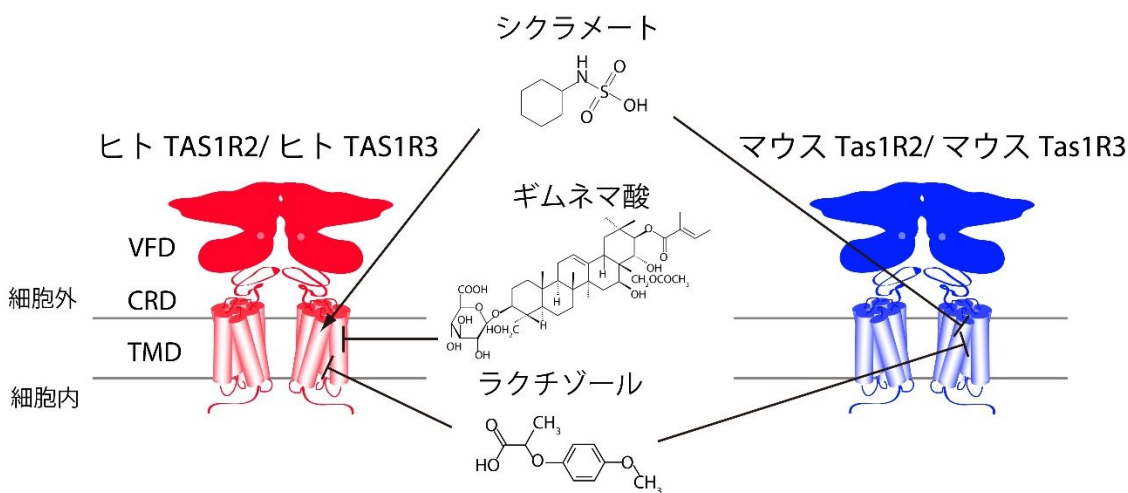


図 TAS1R3に作用するアロステリックモジュレーターの種特異的感受性

甘味受容体は Venus flytrap 領域 (VFD)、システインリッチ領域 (CRD)、膜貫通領域 (TMD) を含む TAS1R2/TAS1R3 ヘテロ二量体から構成される。シクラメートはヒト型には甘味物質として作用し、マウス型には抑制物質として作用する。ギムネマ酸は、ヒト型を抑制し、マウス型は抑制しない。ラクチゾールはヒト型、マウス型どちらも抑制するが、マウス型の感度が低い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sanematsu Keisuke, Yamamoto Masato, Nagasato Yuki, Kawabata Yuko, Watanabe Yu, Iwata Shusuke, Takai Shingo, Toko Kiyoshi, Matsui Toshiro, Wada Naohisa, Shigemura Noriatsu	4. 巻 6
2. 論文標題 Prediction of dynamic allostery for the transmembrane domain of the sweet taste receptor subunit, TAS1R3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-04705-5	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 Kawabata Yuko, Takai Shingo, Sanematsu Keisuke, Iwata Shusuke, Kawabata Fuminori, Kanematsu Takashi, Jimi Eijiro, Shigemura Noriatsu	4. 巻 597
2. 論文標題 The G protein coupled receptor <sc>GPRC5C</sc> is a saccharide sensor with a novel 'off' response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2006 ~ 2016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwata Shusuke, Yoshida Ryusuke, Takai Shingo, Sanematsu Keisuke, Shigemura Noriatsu, Ninomiya Yuzo	4. 巻 15
2. 論文標題 Adrenomedullin Enhances Mouse Gustatory Nerve Responses to Sugars via T1R-Independent Sweet Taste Pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2941 ~ 2941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu15132941	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 Kawabata Yuko, Takai Shingo, Sanematsu Keisuke, Yoshida Ryusuke, Kawabata Fuminori, Shigemura Noriatsu	4. 巻 10
2. 論文標題 The Antiarrhythmic Drug Flecainide Enhances Aversion to HCl in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0048 ~ 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0048-23.2023	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 Yamauchi K, Matsushita D, Shimizume N, Kudo R, Kohama Y, Miyazaki A, Taguchi H, Hirao T, Kawabata F, Kawabata Y, Sanematsu K, Takai S, Yamazoe J, Anabuki K, Aoshima K, Takahashi Y, Goto S, Sasaki A, Shigemura N, Matsubara A	4. 巻 51
2. 論文標題 Relationship between olfactory and gustatory functions: The Iwaki health promotion project 2019	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 443 ~ 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2023.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oike Asami, Iwata Shusuke, Hirayama Ayaka, Ono Yurika, Nagasato Yuki, Kawabata Yuko, Takai Shingo, Sanematsu Keisuke, Wada Naohisa, Shigemura Noriatsu	4. 巻 12
2. 論文標題 Bisphosphonate affects the behavioral responses to HCl by disrupting farnesyl diphosphate synthase in mouse taste bud and tongue epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-25755-5	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 Lee Yuna, Nakano Akihiro, Nakamura Saya, Sakai Kenta, Tanaka Mitsuru, Sanematsu Keisuke, Shigemura Noriatsu, Matsui Toshiro	4. 巻 5
2. 論文標題 In vitro and in silico characterization of adiponectin-receptor agonist dipeptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Science of Food	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41538-021-00114-2	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 Serrano Joan, Seflova Jaroslava, Park Jihye, Pribadi Marsha, Sanematsu Keisuke, Shigemura Noriatsu, Serna Vanida, Yi Fanchao, Mari Andrea, Procko Erik, Pratley Richard E., Robia Seth L., Kyriazis George A.	4. 巻 54
2. 論文標題 The Ile191Val is a partial loss-of-function variant of the TAS1R2 sweet-taste receptor and is associated with reduced glucose excursions in humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101339 ~ 101339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101339	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 該当する

1. 著者名 Yamada Yu, Takai Shingo, Watanabe Yu, Osaki Ayana, Kawabata Yuko, Oike Asami, Hirayama Ayaka, Iwata Shusuke, Sanematsu Keisuke, Tabata Shoji, Shigemura Noriatsu	4. 巻 557
2. 論文標題 Gene expression profiling of -gustducin-expressing taste cells in mouse fungiform and circumvallate papillae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 206 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.022	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9件(うち招待講演 5件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 實松 敬介、永里 侑貴、山本 真隆人、平山 彩夏、今村 恵美子、川端 由子、高井 信吾、重村 憲徳
2. 発表標題 サッカリンの種特異的感受性の分子メカニズム
3. 学会等名 日本味と匂学会第57回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 實松 敬介、川端 由子、渡邊 雄、岩田 周介、高井 信吾、重村 憲徳
2. 発表標題 甘味受容体サブユニットTAS1R3の活性化・不活性化メカニズムの解明
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keisuke Sanematsu, Masato Yamamoto, Yuki Nagasato, Yuko Kawabata, Shingo Takai, Noriatsu Shigemura
2. 発表標題 Elucidation for the activation/inactivation dynamics of the sweet taste receptor
3. 学会等名 ISMNTOP2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keisuke Sanematsu, Masato Yamamoto, Yuki Nagasato, Yuko Kawabata, Shingo Takai, Noriatsu Shigemura
2. 発表標題 Molecular mechanisms of sweet taste receptor activation/inactivation and species-specific sensitivity
3. 学会等名 日本生理学会 第101回大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 實松 敬介
2. 発表標題 味覚受容機構のデジタル化における現状
3. 学会等名 第19回日本感性工学会春季大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Sanematsu Keisuke
2. 発表標題 Visualization of taste
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 實松 敬介、山本 真隆人、川端 由子、渡邊 雄、岩田 周介、高井 信吾、重村 憲徳
2. 発表標題 甘味受容体サブユニットTAS1R3 の膜貫通ドメインにおける動的機能の解明
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 實松 敬介、山本 真隆人、川端 由子、岩田 周介、高井 信吾、重村 憲徳
2. 発表標題 甘味受容体の動的活性化・不活性化メカニズム
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 實松 敬介
2. 発表標題 味覚受容体の動的活性化・不活性化メカニズムの理解
3. 学会等名 感覚研究コンソーシアム：第一回 味覚ワーキンググループ（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 實松敬介、重村憲徳	4. 発行年 2023年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊化学Vol.78 No.8 甘味受容体の動的な活性化・不活性化 メカニズムの解明ー血糖値をコントロールできる甘味修飾物質の開発を目指して	

1. 著者名 實松 敬介	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 9
3. 書名 糖質・甘味のおいしさ評価と健康・調理・加工（山野善正 監修） 第4編3章 ギムネマ酸の相互作用による甘味受容体抑制機構	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 研究者情報
<https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003516/index.html>
九州大学 研究者情報
<https://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003516/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------