

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月13日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650173

研究課題名（和文） 味覚修飾タンパク質ミラクリンによる味覚受容体に対する影響の検討

研究課題名（英文） Effect of miraculin, a taste-modifying protein, on taste receptor

研究代表者

井上 裕康 (HIROYASU INOUE)

奈良女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：40183743

研究成果の概要（和文）：ミラクリンの作用機構について、酸味受容体候補を発見させた培養細胞を用いて検討した。この受容体候補は酸刺激が除去された時に活性化している特性を持っている。カルシウムイメージング法による解析の結果、この酸刺激による活性化がミラクリンにより阻害されることを見出した。この結果から、ミラクリンの味覚修飾活性に、この酸味受容体候補の活性化阻害が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We have been investigating the effect of miraculin on activity of the sour taste receptor candidate, by using HEK293T cells expressing mouse PKD1L3/PKD2L1 heterodimer. This candidate has the unique ability, called as the off-response, to be activated after the removal of an acid stimulus. Calcium imaging analysis showed that the off response was inhibited by the addition of miraculin, indicating that antagonization of the sour taste receptor candidate by miraculin will be contributed to the molecular mechanism of its taste-modifying property.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：分子栄養学、食品機能化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食嗜好と評価、味覚

## 1. 研究開始当初の背景

食の嗜好性は、健全な食生活を支える柱である。しかし、年齢や病態によって変化することが知られており、実際、年齢に伴う味覚の変化や味が感知できなくなる症例、ある癌の罹患によって酸味を甘みに感知する症例などが報告されている。しかし、その分子作用機構は明らかではない。

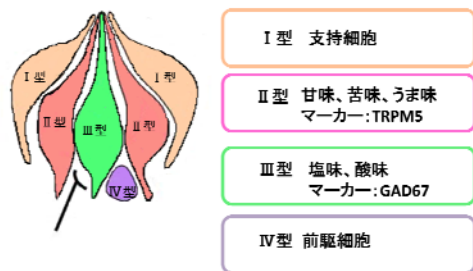
西アフリカ原産のアカテツ科の植物であ

る、ミラクルフルーツ(Richadella dulcifica)の果実は、酸味を甘味に変換する味覚修飾活性をもつ。具体的には、この果肉を数分間、舌に付着させると、数時間の間、クエン酸等の酸性溶液を摂取した際に、酸味が減弱し、強い甘味が体験できる。この味覚修飾活性は、ミラクルフルーツ果実に含まれるタンパク質ミラクリンに起因している。ミラクリンは、Kunitz型トリプシンインヒビターファミリ

一に属する糖タンパク質で、ホモダイマーで活性を持つ。これは、Kunitz型トリプシンインヒビターが通常、モノマーで活性をもつことと異なっており、進化の過程で、ミラクリンは味覚修飾活性を獲得したのではないかと考えられる。我々は、世界に先駆け、糖鎖を付加しない大腸菌で、味覚修飾活性を持つ組換えミラクリンの発現と精製に成功した (J. Biochem. 2009)。その結果から、ミラクリンの味覚修飾作用には 1) 糖鎖が必須ではないこと、2) ダイマー形成が必須であることを明らかにしてきた。しかし、ミラクリンがもつ味覚修飾活性の分子作用機構は未だ十分に明らかにされていない。特に、この分野の研究は、ヒトを用いた官能検査が最近まで主流であり、霊長類でのみ味覚修飾活性があるとされるミラクリン作用の定量化が難しいことが問題である。

なお、ミラクリンは横浜国立大学・栗原良枝教授(故人)により蛋白質精製が行われ、味覚に関する生化学的アプローチの端緒を切り開いた。その後、トマトやレタス (筑波大学・江面浩教授)、麴菌 (東京大学・阿部啓子教授) を用いた組換えミラクリンの発現の成功など、日本人研究者が活躍している分野である。また我々も、上記に記した大腸菌でのミラクリン発現とともに、植物体であるシロイヌナズナでのミラクリンの発現に成功している (京都大学・青山卓史 教授との共同研究)。

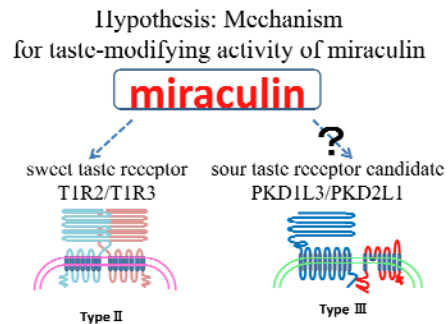
### 味蕾の構造



一方、味覚を感知する受容体群に関して研究が進展している。7回膜貫通型受容体ファミリーの一員として、甘味受容体 (T1R2/T1R3 のヘテロダイマー)、うま味受容体 (T1R1/T1R2 のヘテロダイマー)、苦み受容体群 (T2Rs、この受容体のみ、一つの細胞に複数の受容体が発現) が同定され、これらはいずれも味蕾の II 型細胞に発現していることが報告された。酸味受容体は未だ明確な結論が得られていないが、その候補として、イオンチャンネル型受容体ファミリーに属する PKD1L3/PKD2L1 のヘテロダイマーが報告された。注目すべき点として、この酸味受容

体候補は、味蕾の III 型細胞に発現している。感覚神経とシナプスと直接形成できるのは、III 型細胞であり、II 型細胞ではない。したがって、II 型細胞に由来する味覚情報は III 型細胞を経由して脳に送られるのではないかと考えられている。

味覚受容体のシグナル伝達系についても徐々に研究が進んできた。例えば、甘味受容体の情報は、セカンドメッセンジャー (cAMP、IP3、Ca<sup>2+</sup> など) が候補) の変動を介して、酸味受容体候補の情報はイオンチャンネルの開閉を介して伝達されると考えられる。これらの知見を考慮すると、ミラクリンによる味覚修飾活性の作用機構の一つとして、酸味刺激により、甘み受容体の活性化と、酸味受容体の活性抑制の 2 つが同時に起こることが予想される (下図)。最近になって、ミラクリンの甘味受容体に対する研究が報告されているが、酸味受容体候補に関しては、今までに報告されていない。



### 2. 研究の目的

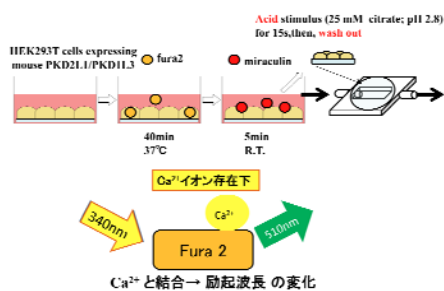
本研究では、ミラクリンによる味覚修飾活性の作用機構解明を目指して、カルシウムイオンなどの変動を可視化するリアルタイムのバイオイメージング技術を使い、ミラクリンと味覚受容体との相互作用を検証することを目的とする。それによって、年齢や病態による食嗜好の変化の分子作用機構を理解する基盤情報となることを目指す。

味覚受容体に関する研究は、世界的に競争の激しい分野である。限られた研究者の実験方法が使われている傾向があり、異なった視点、方法による検証が必要であると考えられる。本研究は、そのような視点に着目して、新しい実験方法にチャレンジする点、さらに、我々が確立した大腸菌による組換えミラクリンの構築が、種々の変異体を作成するのに容易である利点を生かして、分子作用機構、さらにバイオセンサー開発の基盤になると考えられる。

### 3. 研究の方法

ミラクリンの味覚修飾活性は、数分間ミラクリンをヒトの舌に塗布した後、クエン酸などを飲んだとき、酸味が減弱され、甘味が感知される現象である。本研究では、培養細胞系を用いて、上記に相当する現象を再現するため、酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 発現ベクターをヒト胎児由来腎癌細胞 HEK293 細胞に発現させ、それにミラクリンを添加し、さらに3分後にクエン酸添加することで、受容体とミラクリンの相互作用、受容体活性化で引き起こされると想定されるセカンドメッセンジャーの変動を時間軸に沿ってリアルタイムで検証した。

#### 実験方法



### 4. 研究成果

上記のアッセイ系において、酸刺激に対する応答は酸性状態から中性状態に戻る pH 変化により活性化する特性を持つことが報告され、この特性の発見者である富永らは「オフレスポンス」と命名した。このアッセイ系を用いてミラクリンに対する影響を検討した結果、酸味受容体候補のオフレスポンスを、ミラクリンは 1 nM より用量依存的に抑制した。さらに、このミラクリンによる抑制は、甘味、うま味、苦味、ミラクリンが属する Kunitz 型大豆トリプシンインヒビターの添加では認められず、酸味、及びミラクリンタンパク質に選択的な抑制であることを見出した。また、この抑制はミラクリン添加3分後から観察されたが、生体においてミラクリンを舌に塗布してから味覚修飾活性が観察されるまでに3分以上を必要とすることと時間的に一致した。

以上、ミラクリンによる味覚修飾分子作用機構の一部として、PKD1L3/PKD2L1 を介した酸味応答の抑制が強く示唆された。

なお本研究は、以下の方々の協力なしには成立せず、衷心より感謝申し上げます。

国立循環器病研究センター研究所  
分子生理部 若林繁夫 部長

自然科学研究機構 岡崎統合バイオセンター  
細胞生理研究部門 富永真琴 教授

奈良女子大学生生活環境学部  
食物栄養学科 中田理恵子 講師

### 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3件)

- ① Nakata, R, Takahashi, S. and Inoue, H. Recent advances in the study on resveratrol. Biol. Pharm. Bull. 35, 273-279 (2012) 査読有 DOI:10.1248/bpb.35.273
- ② 井上裕康、中田理恵子、生活習慣病予防を期待される精油成分の新たな機能、バイオインダストリー 69, 41-43 (2011) 査読無
- ③ 井上裕康、中田理恵子、生活習慣病予防を期待されるスパイス精油の有効性 Aromatopia 20, 6-9 (2011) 査読無

[学会発表] (計3件)

- ① ミラクリンの酸味受容体 PKD1L3/PKD2L1 に対する影響の検討 高井綾子、越地聡美、中田理恵子、富永真琴、松波宏明、若林繁夫、井上裕康 2011年10月6日 日本味と匂学会第45回大会、石川県立音楽堂
- ② 味覚修飾タンパク質ミラクリンの細胞内局在検討 高井綾子、佐藤麻紀子、越地聡美、中田理恵子、青山卓史、井上裕康 2011年9月23日 第83回日本生化学会大会、京都国際会館
- ③ 細胞外分泌シグナル配列を持つ味覚修飾タンパク質ミラクリン 高井綾子、佐藤麻紀、中田理恵子、青山卓史、井上裕康 2011年5月15日 第65回日本栄養・食糧学会大会、お茶の水女子大学

[図書] (計3件)

- ① 中田理恵子、井上裕康 食品学 II 改訂第2版 第8章 微生物利用食品 南江堂 181-189, 2011
- ② 中田理恵子、井上裕康 食品学 II 改訂第2版 第5章 油糧食品 南江堂 155-160, 2011
- ③ 中田理恵子、井上裕康 食品学 I 改訂第2版 第6章 食品の機能性 南江堂 153-177, 2011

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://narawuffc2.p1.bindsite.jp/news.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 裕康 (Hiroyasu Inoue)  
奈良女子大学・生活環境学部・教授  
研究者番号：40183743

(2) 研究分担者 なし