

博士論文

旨味受容体 T1R1/T1R3 のアミノ酸受容機構の解明

戸田 安香

目次

第1章 序論	1
第2章 発光検出法を用いた高感度旨味評価系の開発	10
2-1. 序	11
2-2. 材料と方法	12
2-3. 結果	15
2-4. 考察	21
第3章 旨味受容体 T1R1/T1R3 のリガンド特異性を決定する分子メカニズムの解明	34
3-1. 序	35
3-2. 材料と方法	35
3-3. 結果	39
3-4. 考察	49
第4章 テアニンの旨味受容機構の解明	70
4-1. 序	71
4-2. 材料と方法	71
4-3. 結果	73
4-4. 考察	74
第5章 総合討論と今後の展望	79
参考文献	85
謝辞	89

第 1 章

序論

1. 味覚

味覚は食物を摂取する際に生じる化学感覚の一つである。視覚や嗅覚など他の感覚情報と共に、生物がその食物を摂食するか否かを決定する上で重要な役割を果たす。狭義には甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の基本5味が味として定義され、体性感覚の一種である辛味や渋味とは区別される。一般に、甘味や旨味といった嗜好味は糖類やアミノ酸などのエネルギー源の存在を示すシグナルであり、苦味や酸味といった忌避味は毒物や腐敗物の存在を示すシグナルだと考えられている。また、塩味は生体の浸透圧調節に関わる塩の存在を示すシグナルとして、低濃度では嗜好味、高濃度では忌避味として受け取られる(1)。

2. 味覚の動物種差

行動実験や電気生理学的解析により、動物種間で基本味の受容能に違いがあることが明らかになってきた。例えば、人工甘味料であるアスパルテームやネオテームはヒト、類人猿、旧世界ザルでは嗜好されるが、新世界ザルや齧歯類では嗜好されず、味神経応答も検出されない(2, 3)。また、非ヒト霊長類の行動実験により、グルタミン酸ナトリウム（以下、MSG）やNaClの嗜好閾値にも動物種差があることが明らかになった(4)。このような味物質に対する受容能の違いには後述する味覚受容体のリガンド受容能の違いが影響している場合がある。

3. 味覚受容体

味物質は舌、軟口蓋、喉頭蓋などに分布する味蕾と呼ばれる小器官で受容される(1)。味蕾は50~150個の味細胞から構成され、味細胞の先端部（味孔）にそれぞれの味質に対応した味覚受容体が発現している。近年、味覚受容体分子

の同定が進み、甘味、旨味、苦味受容体としては G タンパク質共役型受容体（以下、GPCR）である T1R2/T1R3、T1R1/T1R3 (5-8)、T2Rs がそれぞれ同定された(9-11)。苦味受容体 T2Rs はヒトでは 26 種類の存在が知られている(12, 13)。酸味および塩味の受容にはイオンチャネル型受容体が重要な役割を果たすと考えられており、酸味受容体としては PKD2L1/PKD1L3 が候補分子として同定された(14, 15)。一方で、低濃度塩味の受容体としては ENaC が同定されたが(16)、高濃度塩味の受容に関わる分子は未だ明らかになっていない。

4. 培養細胞を用いた客観的味評価系

味物質と味覚受容体の相互作用を解析する手法の一つとして、培養細胞を用いた客観的味評価系が開発された。この手法により、新規味覚修飾物質の探索や味物質の受容メカニズムの解明がなされてきた。甘味、旨味、苦味受容体などの GPCR の評価系では、培養細胞に味覚受容体を安定的もしくは一過的に発現させ、味物質添加時の受容体の活性化の強さを細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化量として数値化するのが一般的である(17, 18)。細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化量の検出には、fluo-4 や fura-2 などの Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬が広く用いられる。しかし、これらの蛍光指示薬を用いた蛍光検出系では、蛍光物質を含有するサンプルの測定が困難である。そのため、ビタミン類やメーラード反応物質など様々な蛍光物質を含む食品由来のサンプルをそのまま測定に供することはできない。また、吸光物質、細胞毒性を有する物質、高浸透圧溶液についても評価が行えないなどの問題点がある。

5. 旨味受容体 T1R1/T1R3

旨味は L-グルタミン酸のもたらす“うまい味”として 1907 年に発見され(19)、

その後、旨味受容体分子の同定(6)とノックアウトマウスの行動実験、電気生理学的解析(8, 20, 21)などを経て、基本5味の一つとして認められるようになった。旨味感覚特有の現象として、L-アミノ酸と核酸系旨味物質との間で生じる旨味の相乗効果が知られる。これまでに T1R1/T1R3 以外にも、mGluR1(22)、mGluR4(23)、taste-mGluR1(24)、taste-mGluR4(25, 26)など、複数の旨味受容体候補分子が報告されてきたが、その中でも T1R1/T1R3 はアミノ酸と核酸系旨味物質による旨味の相乗効果を媒介する重要な受容体として知られている(8, 20, 21)。

旨味受容体 T1R1/T1R3 は 2002 年にアミノ酸の味を受容する分子として同定された(6)。T1R1/T1R3 は T1R1 と T1R3 の 2 つのサブユニットから構成されるヘテロダイマーであり、mGluR や calcium-sensing receptor などと同様の Class C GPCR に属する(27)。Class C GPCR は、大きな細胞外領域 (Venus flytrap domain、以下、VFTD) を有することを特徴とし、7 回膜貫通領域

(seven-transmembrane domain、以下、TMD) および、VFTD と TMD をつなぐ小さな細胞外領域 (cysteine-rich domain、以下、CRD) の 3 つのドメインから構成される。これまでに X 線結晶構造解析により mGluR の構造が解かれており、VFTD が 2 つの Lobe で構成されること、リガンド結合部位が VFTD の 2 つの Lobe の接合部分(蝶番部分)に存在することが明らかになった(28, 29)。mGluR の構造を基にした分子モデリングや変異体の機能解析により、T1R1/T1R3 における L-Glu 結合部位の同定も行われ、T1R1 の VFTD の蝶番部分に存在することが明らかになった(30-32) (図 1-1)。更に、核酸系旨味物質の代表例であるイノシン酸 (inosine 5'-monophosphate、以下、IMP) の結合部位が T1R1-VFTD の入り口部分に存在することも明らかになった(31) (図 1-1B)。

6. 甘味受容体 T1R2/T1R3

甘味受容体 T1R2/T1R3 は Class C GPCR に属する T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーであり、旨味受容体 T1R1/T1R3 と T1R3 サブユニットを共通とする。T1R1/T1R3 に作用する物質がアミノ酸、核酸、人工旨味物質である S807 以外に知られていないのに対し(31)、T1R2/T1R3 は化学的性質や構造が多様な人工および天然物質を受容する(1) (図 1-1A)。上述の通り、甘味受容能には動物種間で違いがあるが、これに一致して、ヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 のアゴニストであるアスパルテームやネオテームなどの人工甘味料や、ミラクリンやネオクリンなどの甘味修飾タンパク質、甘味抑制剤であるラクチゾールは齧歯類の T1R2/T1R3 には作用しない。このような特性を生かして、ヒト - 齧歯類キメラ T1R2/T1R3 の機能解析が行われ、複数の甘味物質の結合部位が同定された(18, 33-35)。その結果、甘味物質の受容メカニズムは多様であり、T1R2 および T1R3 の VFTD および TMD に複数のリガンド結合部位が存在することが明らかになった(36)。

7. 甘味受容体安定発現細胞

当研究室ではこれまでに Flp-In System (Invitrogen) を用いて、ヒト甘味受容体 hT1R2/hT1R3 およびキメラ G タンパク質 hG16gust44 を安定発現する培養細胞株 (以下、甘味受容体安定発現細胞) を作製し、この細胞を用いることで高感度かつハイスループットな甘味評価系の構築に成功した(17)。Flp-In System とは、配列特異的リコンビナーゼである Flp リコンビナーゼを用いて目的遺伝子を培養細胞のゲノム中に組み込む手法である (図 1-2A)。具体的には、ゲノム中に Flp リコンビナーゼ標的部位 (FRT 部位) が一箇所含まれる Flp-In 293 細胞に対し、目的遺伝子を挿入した Flp-In 用発現ベクターと Flp リコンビ

ナーゼ発現ベクターである pOG44 をコトランスフェクションする。すると、宿主細胞にて一過的に発現した Flp リコンビナーゼによりゲノム中の FRT 部位に目的遺伝子が挿入される。この方法を用いると、目的遺伝子がゲノム中の同じ位置に一箇所のみ挿入された安定発現細胞株を作製することができる。発現コンストラクトには、hT1R2、hT1R3、hG16gust44 の 3 つのタンパク質を同時に発現させるために、2 つのプロモーターおよび IRES 配列を利用したコンストラクトを用いた (図 1-2B)。この甘味受容体安定発現細胞は、受容体およびキメラ G タンパク質を細胞に一過的に発現させた場合に比べ、甘味物質に対する応答性が飛躍的に向上した。その結果、一過的発現では蛍光顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージング法でしか検出できなかった僅かな細胞応答を、マイクロプレートリーダー (FlexStation 3) でも検出することが可能となった(17)。しかし、同様のコンストラクトで旨味受容体 T1R1/T1R3 安定発現細胞を作製しても L-アミノ酸に対する応答を検出することはできていなかった。

8. 本研究について

味覚受容体の発見と機能解析技術の開発により、味物質の受容メカニズムの解明や新規味覚修飾物質の探索が行われてきた(35, 37)。特に甘味受容体については、受容体が 1 種類であること、人工甘味料に対する産業上のニーズが高いことなどから盛んに研究が行われてきた。一方で、旨味受容体に関する研究は未だに報告が少ない。その理由として、世界において旨味という味質が甘味に比べて重要視されていないことに加え、旨味評価系の構築が甘味評価系構築に比べて難しいことが挙げられる。当研究室においても高感度な旨味評価系の構築には成功しておらず、機能解析が十分に行えていなかった。

そこで、まず第 2 章において、従来の蛍光検出法よりも高感度かつハイスル

ーブットな旨味評価系の構築を目標に、発光検出法を用いた新規味評価系の開発を行った。第3章では作製した旨味評価系を用いて、T1R1/T1R3のリガンド特異性を決定する因子の探索を行った。第4章では、茶特有のアミノ酸であるL-テアニンの旨味受容メカニズムの解明を行った。

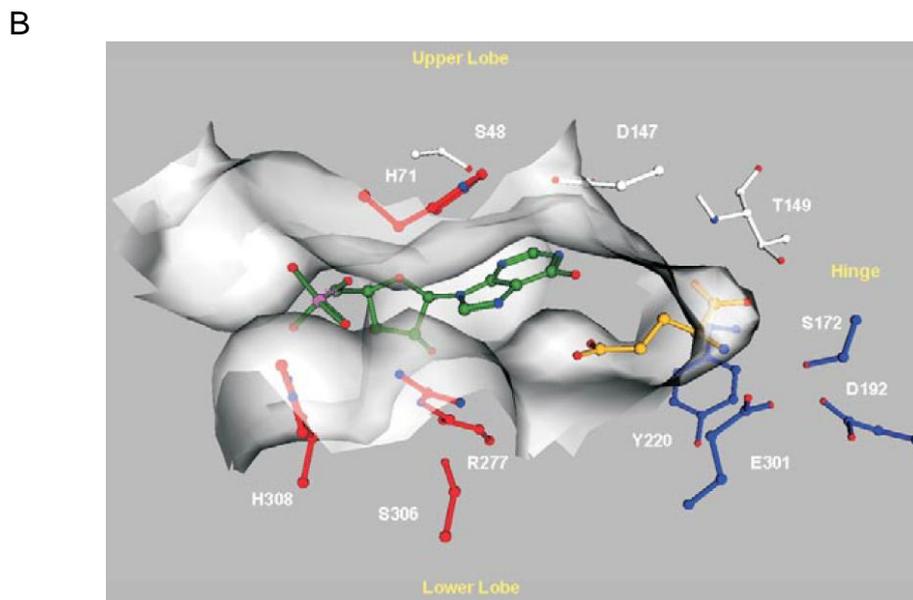
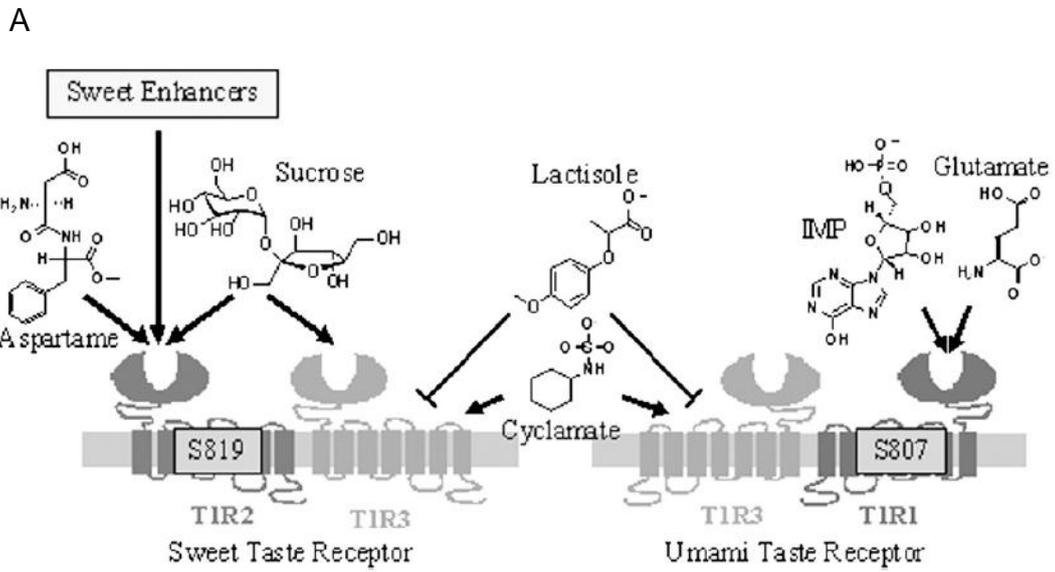


図 1-1 旨味受容体 T1R1/T1R3 における L-Glu、IMP の結合モデル

(A) T1R のリガンド結合部位のまとめ。T1R1 に作用することが知られる L-Glu、IMP は細胞外領域 (VFTD) に、S807 は膜貫通領域 (TMD) に結合する。Li et al., *PNAS*, 2009 (32) より抜粋。

(B) T1R1/T1R3-VFTD のホモロジーモデル。青色および赤色で示した残基がそれぞれ L-Glu (黄色) および IMP (緑色) の結合に重要な残基。L-Glu は VFTD の蝶番部分の奥深くに結合する。一方で、IMP は VFTD の入り口付近に結合する。Zhang et al., *PNAS*, 2008 (31) より抜粋。

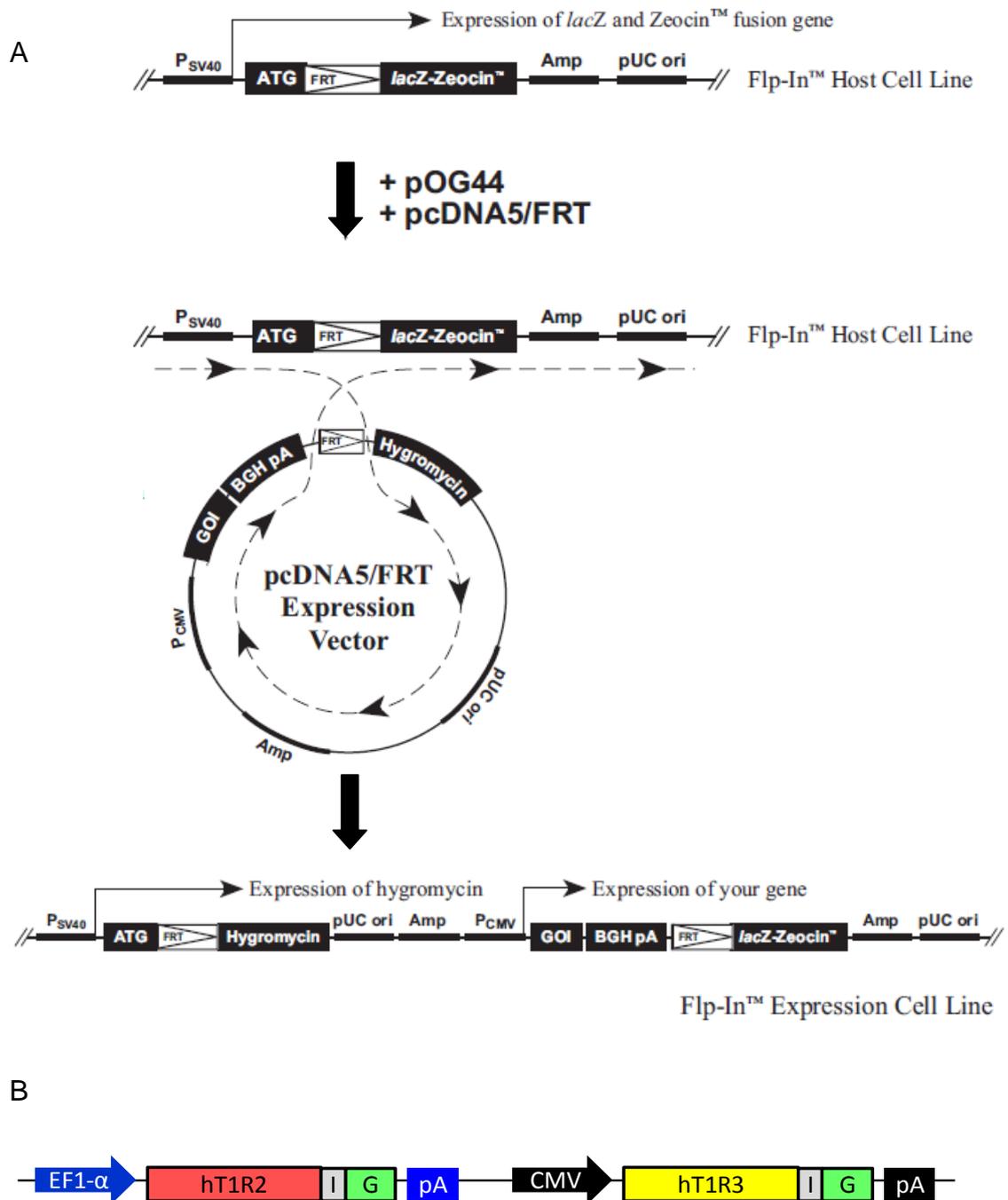


図 1-2 甘味受容体安定発現細胞株の作製

(A) Flp-In System の概要。FRT 配列がゲノム中に組み込まれた細胞に対し、目的遺伝子を挿入した Flp-In 用発現ベクター (pcDNA5/FRT) および Flp リコンビナーゼ発現ベクター (pOG44) を共導入すると、FRT 配列間で特異的な組み換えが起こり、目的遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子が細胞のゲノム中に挿入され発現する。Invitrogen 社の説明書から抜粋、一部改変。

(B)用いた発現コンストラクト。G: Ga16gust44、I: IRES 配列。

第2章

発光検出法を用いた高感度旨味評価系の開発

2-1. 序

近年、味覚受容体発現細胞を用いた客観的味評価系は、新規味覚修飾物質の探索や味覚修飾メカニズムの解明のために広く利用されるようになった。しかし、旨味評価系については高感度かつハイスループットな評価系の構築が難しく、ハイスループットアッセイの構築に成功しているグループにおいても L-Glu よりも弱い旨味をもつ L-Asp に対する応答の検出は行えていないような状況だった(5)。

一般に、味覚受容体の活性化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化量の検出には fluo-4 や fura-2 などの蛍光 Ca^{2+} 感受性指示薬を用いた蛍光検出法が採用されてきた。その蛍光検出法に代わる方法の一つに、 Ca^{2+} 結合型発光タンパク質を用いた発光検出法が挙げられる。 Ca^{2+} 結合型発光タンパク質はアポ発光タンパク質、発光基質である coelenterazine、酸素分子の複合体からなり、 Ca^{2+} が結合することで高次構造変化に伴う青色瞬間発光を呈する(38, 39)。よって、予め GPCR 及び発光タンパク質を発現させた細胞に対してリガンドを添加すると、受容体の活性化の強さに応じた発光強度変化が生じる。この発光強度変化をマイクロプレートリーダーにて検出することで受容体の活性化の強さを定量化することが可能となる(図 2-1)。蛍光検出系では細胞内に存在する弱い蛍光物質による干渉が生じるのに対し、発光検出系では事実上バックグラウンドがない状態での測定が可能であるため、蛍光検出系に比べ高いシグナル/ノイズ比を実現することが可能である。

Ca^{2+} 結合型発光タンパク質としては腔腸動物由来の aequorin(40, 41)、clytin(42, 43)、obelin(44-46)、clytin-II(47)などが知られている。その中でも aequorin は様々な GPCR アッセイで利用されてきたが(48-50)、味覚評価系へ

導入した報告例はなかった。そこで、まずは当研究室において最も安定的かつ強い細胞応答の検出が可能な甘味受容体安定発現細胞を用いて発光検出法の導入検討を行い、その最適化条件を用いて旨味評価系の開発を目指すことにした。また、食品由来のサンプルにはビタミン類やメーラード反応物質など様々な蛍光物質が含まれており、蛍光検出法では評価が困難な場合が多い。そこで、構築した発光検出系が蛍光物質を含むサンプルにも利用可能かという視点での検証も行った。

2-2. 材料と方法

材料

aspartame および riboflavin は Wako Chemical Co. (Osaka, Japan) より、BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyFluorescein) は Invitrogen (CA, USA) より、coelenterazine は Promega (WI, USA) より、coelenterazine 類縁体および IMP は Sigma Aldrich (MO, USA) より購入した。L-glutamic acid monosodium salt は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より、L-alanine は Kanto Chemical (Tokyo, Japan) より購入した。蛍光検出法用アッセイバッファーは 10mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、130mM NaCl、10mM glucose、5 mM KCl、2 mM CaCl₂ および 1.2 mM MgCl₂ で作製し、NaOH を用いて pH 7.4 に調整した。蛍光検出法用アッセイバッファーは蛍光検出法用アッセイバッファーに 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich) を添加し作製した。それぞれのサンプルは各アッセイバッファーに希釈し、必要に応じて NaOH または HCl を用いて pH を 7.4 に調整した。

各種アポ発光タンパク質発現プラスミドの作製

apo-aequorin、apo-obelin、apo-clytin、apo-clytin-II 遺伝子は、GenScript 社の配列最適化技術 OptimumGene™により哺乳類細胞用にコドンが最適化された遺伝子を購入した。得られた4種類のアポ発光タンパク質遺伝子は、5'末端に Kozak 配列を付加し、哺乳類細胞用発現ベクター pEAK10 の *Asc* I- *Not* I サイトにサブクローニングした。アポ発光タンパク質のミトコンドリアへの局在化は、cytochrome c oxidase (subunit VIII)の N 末端 29 アミノ酸のコード領域をアポ発光タンパク質のコード領域上流に挿入した発現プラスミドを作製することで達成した。

ヒト味覚受容体発現用プラスミドの作製

hT1R1 (NCBI RefSeq number NM_138697.3)、hT1R3 (NM_152228.1) はコード領域を polymerase chain reaction (PCR)法により overlapping primer を用いて増幅し、5'末端に Kozak 配列を付加して、哺乳類細胞用発現ベクター pEAK10 (Edge Biosystems, MD, USA) の *Asc* I-*Not* I サイトにサブクローニングした。

細胞培養および遺伝子導入

甘味受容体安定発現細胞は 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) を含む低グルコース濃度 (1.0 g/L) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Aldrich) を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

HEK293T 細胞は 10% FBS を含む高グルコース濃度 (4.5 g/L) DMEM (Sigma Aldrich) を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

蛍光検出法

甘味受容体安定発現細胞を測定用 96 穴プレート (96-well black-walled CellBIND surface plate, Corning, NY, USA) へ 90,000 cells/well の濃度で播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。24 時間後、細胞をアッセイ用バッファで洗浄し、終濃度 5 μM で fluo-4AM (Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan) を付加し、27°Cにて 30 分間遮光下静置した。再び、アッセイバッファで洗浄後、サンプル添加後の蛍光強度変化を FlexStation 3 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, CA, USA) にて検出した。蛍光値の検出は励起 485 nm、検出 525 nm、カットオフ 515 nm で 2 秒ごとに行い、観測開始 20 秒後に 2×濃度のサンプル溶液を等量添加し、その後 100 秒間蛍光値 (relative fluorescence units, RFU) 変化をモニターした。応答は最大蛍光値と最小蛍光値の差 (Δ RFU) で示した。少なくとも 3 回の独立した実験を行い、平均値をデータとして用いた。Clampfit ver. 9.2.0.09 (Molecular Devices) を用いて Hill の式よりリガンドに対する濃度応答曲線を求め、シグナル/バックグラウンド比 (=最大応答強度/最小応答強度) および EC₅₀ 値を算出した。

発光検出法 (甘味評価系)

甘味受容体安定発現細胞を 6 穴プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いてアポ発光タンパク質発現プラスミドを遺伝子導入し、6 時間後に測定用 96 穴プレート (96-well black-walled CellBIND surface plate) に 100,000 cells/well の濃度で撒き、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。一晩培養した後、細胞を発光検出用アッセイ用バッファで洗浄し、終濃度 10 μM の coelenterazine を付加し、27°Cにて 4 時間遮

光下静置した。サンプル添加後の発光強度変化は FlexStation 3 マイクロプレートリーダーにて検出した。発光値の検出は 1.5 秒おきに行い、検出開始から 20 秒後に 2×濃度のサンプル溶液を等量添加し、その後 55 秒間モニターした。検出した発光値はスムージング (5-point moving average) を行い、曲線下面積 (AUC: area under the curve) を算出し、RLU (relative light units) として示した。少なくとも 3 回の独立した実験を行い、平均値をデータとして用いた。Hill の式よりリガンドに対する濃度応答曲線を求め、シグナル/バックグラウンド比および EC₅₀ 値を算出した。

発光検出法 (旨味評価系)

HEK293T 細胞に Lipofectamine 2000 reagent を用いて T1R1、T1R3、rG15i2 (ラット G15 の C 末端 5 アミノ酸を Gi2 のものに置換したキメラタンパク質)、mt-apo-clytin-II を遺伝子導入し、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。培養液には GlutaMAX (Invitrogen) および 10% dialyzed FBS (Invitrogen) を含む低グルコース濃度 (1.0 g/L) DMEM を用いた。遺伝子導入から 48 時間後に細胞を測定用 96 穴プレート (96-well black-walled CellBIND surface plate) へ撒き、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。その後は、上述の旨味評価系と同様の方法でサンプル添加時の発光強度変化の検出を行った。発光値のモニターは 110 秒間行った。

2-3. 結果

2-3-1. 発光検出法を用いた旨味評価系の構築

まずは、様々な GPCR アッセイで利用例が報告されている aequorin (48-50)

を用いて発光検出法の味評価系への導入を試みた。対照には fluo-4 を用いた蛍光検出法を用い、リガンドには人工甘味料の aspartame を用いた。

aspartame 添加時の甘味受容体発現細胞の応答を fluo-4 アッセイ（蛍光検出系）にて検出すると、aspartame 添加直後から徐々に蛍光値の上昇が認められ、その後ベースラインまで緩やかに減少した（図 2-2A）。続いて、aequorin アッセイ（発光検出系）にて aspartame 添加時の甘味受容体安定発現細胞の応答を検出すると、aspartame 添加直後から徐々に発光値の上昇が認められ、その後ベースラインまで緩やかに減少するという蛍光検出系と同様の応答値の経時変化が認められた（図 2-2B）。両検出系で求めた aspartame に対する EC_{50} 値は、発光検出系のとき 1.1 ± 0.2 mM、蛍光検出系のとき 1.8 ± 0.1 mM であり、近い値を示した（図 2-2C および D）。このことから、発光タンパク質を用いた発光検出法が蛍光検出法と同様に甘味受容体の活性化能の評価に利用可能であると考えられた。シグナル/バックグラウンド比は aequorin アッセイで 2.6 ± 0.2 、fluo-4 アッセイで 12.6 ± 0.9 であり、fluo-4 アッセイの方が高かった。

2-3-2. 蛍光物質存在下での発光検出系の利用（甘味評価系）

構築した発光検出系が、蛍光物質を含むサンプルの評価にも利用可能か検証した。ここでは、fluo-4 での検出（Ex. 485 nm / Em. 525 nm）に影響を与える蛍光物質の例として BCECF を利用した。BCECF は pH 指示薬として広く利用される蛍光色素である。

fluo-4 アッセイの場合、10、20 もしくは 40 nM BCECF を添加すると、添加直後から BCECF 濃度依存的な蛍光値の上昇が認められた（図 2-3A）。この際に検出された蛍光値は時間が経過しても一定の値を保ったことから、甘味受容体の活性化に伴う fluo-4 の蛍光値の上昇ではなく BCECF 由来の蛍光であると

考えられた。続いて、BCECF と aspartame の混合溶液を甘味受容体安定発現細胞へ添加したところ、BCECF 由来の強い蛍光の影響で、aspartame の甘味受容体活性化能を正しく評価することができなかった (図 2-3C, 3E)。

一方、aequorin アッセイで同様の検討を行った場合、10、20 もしくは 40 nM BCECF のみの添加では BCECF 濃度依存的な発光値の上昇は認められず、バッファー添加時の発光値と変化がなかった (図 2-3B)。更に、BCECF と aspartame の混合溶液を測定した場合にも、BCECF 濃度によらず、aspartame のみを添加した場合に得られる発光値と同等の値が検出された (図 2-3D)。aspartame に対する EC_{50} 値は、aspartame のみで測定した場合 1.1 ± 0.2 mM であったのに対し、aspartame と 10、20 もしくは 40 nM BCECF の混合溶液で評価を行った場合もそれぞれ 1.2 ± 0.3 mM、 1.0 ± 0.1 mM、 1.1 ± 0.2 mM であり、差がなかった (図 2-3F)。このことから、fluo-4 アッセイと比較して、aequorin アッセイは蛍光物質共存下でも利用可能な優れた味評価系であると考えられた。

2-3-3. 最適な発光タンパク質の選定

用いる発光タンパク質の種類により、得られる発光強度が異なることが知られている。そこで今回は、aequorin、obelin、clytin、clytin-II の 4 種類の Ca^{2+} 結合型発光タンパク質間で比較を行い、味覚受容体を用いた評価系に最適な発光タンパク質の選定を行った。

各種アポ発光タンパク質 (apo-aequorin、apo-obelin、apo-clytin、apo-clytin-II) を一過的に発現させた甘味受容体安定発現細胞に対し、発光基質 coelenterazine を加え、細胞質内に発光タンパク質を形成させた。これらの細胞を用い、aspartame 添加時の発光強度を比較した。その結果、aequorin だけでなく obelin、clytin-II を用いた場合にも aspartame 濃度依存的な発光値の上昇

が認められた(図 2-4)。これら 3 種の発光タンパク質を用いた際に得られる EC₅₀ 値に差はなかった(表 2-1)。最大発光強度を比較した場合には、clytin-II は aequorin よりも約 3 倍高い値を示した(図 2-4)。一方で clytin を用いた場合には発光値の上昇は認められなかった。

細胞が刺激を受け、小胞体からの Ca²⁺放出が生じると、それに応じてミトコンドリア内でも Ca²⁺濃度の上昇が生じることが知られている(51, 52)。この際に生じる Ca²⁺濃度変化は細胞質よりもミトコンドリア内の方が大きいため、様々な GPCR アッセイにおいて、ミトコンドリア内に局在化させた発光タンパク質を Ca²⁺プローブとして利用する方法が用いられてきた(48, 53, 54)。そこで、アポ発光タンパク質遺伝子のコード領域上流にミトコンドリア局在化シグナルを挿入した発現コンストラクトを作製し、発光タンパク質をミトコンドリア内で発現させた場合と細胞質内で発現させた場合での発光値の比較を行った。その結果、ミトコンドリアへの局在化により、aequorin、clytin、clytin-II で発光値の上昇を認め、シグナルバック/グラウンド比が向上した(図 2-4、表 2-1)。ミトコンドリアへの局在化は EC₅₀ 値には影響を与えなかった(表 2-1)。ミトコンドリア局在化 aequorin (以下、mt-aequorin) およびミトコンドリア局在化 clytin-II (以下、mt-clytin-II) はシグナル/バックグラウンド比が 10 以上であり(表 2-1)、fluo-4 アッセイに匹敵する値だった(図 2-2C)。以降の検討には、最大発光強度の最も大きかった mt-clytin-II を用いることとした。

2-3-4. 最適な発光基質の選定

Ca²⁺結合型発光タンパク質はアポ発光タンパク質、発光基質、酸素分子からなる複合体である。発光タンパク質の性質はアポ発光タンパク質の種類のみならず発光基質の種類によっても影響を受け、その光の波長や持続時間、Ca²⁺に

対する親和性などに違いを生じる。そのため、発光基質 *coelenterazine* の類縁体が多く合成され利用されている(55, 56)。そこで *mt-clytin-II* を用いた味評価系において最適な発光基質を選定するべく、*coelenterazine* および 8 種類の *coelenterazine* 類縁体 (*coelenterazine cp, f, fcp, h, hcp, i, ip, n*) 間で発光強度を比較した。結果、*aspartame* 添加時に認められる発光値の大きさは発光基質により異なった (図 2-5)。*native coelenterazine* と同様、*coelenterazine cp, f, h, ip* を用いた場合にも *aspartame* 濃度依存的な発光値の上昇が認められた (図 2-5)。そのうち、最も発光強度が大きかったのは *coelenterazine f* と *native* だった。そこで、*coelenterazine f* よりも安価に入手が可能な *native coelenterazine* を今後も発光基質として利用することに決定した。

2-3-5. 食品由来の蛍光物質を含有するサンプルの評価 (甘味評価系)

mt-clytin-II を用いた甘味評価系で、蛍光物質を含むサンプルの評価を行った。まずは 2-3-2 で行った *aequorin* アッセイでの検討と同様に、*BCECF* 共存下で *aspartame* 応答の検出が可能であるかを検証した。その結果、*mt-clytin-II* アッセイにおいても *BCECF* 濃度によらず *aspartame* に対する応答が検出され、*mt-clytin-II* アッセイが蛍光物質を含むサンプルの評価に利用できることが確かめられた (図 2-6)。

続いて、*mt-clytin-II* を用いた甘味評価系で、食品由来の蛍光物質を含むサンプルの測定を行った。ここでは食品由来の蛍光物質の例として *riboflavin* (*vitamin B₂*) を用いた。*riboflavin* は *fluo-4* アッセイで使用される波長 (*Ex. 485 nm/Em. 525 nm*) で励起・検出される蛍光物質である。

fluo-4 を用いた蛍光検出系では、0.25、0.50 または 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の *riboflavin* を添加すると直後から *riboflavin* 濃度依存的な蛍光値の上昇が認められた (図

2-7A)。この際に検出された蛍光値は時間が経過しても一定の値を保ったことから、甘味受容体依存的な応答ではなく、riboflavin 由来の蛍光値であると考えられた。この濃度の riboflavin と aspartamate の混合溶液の測定を行ったところ、riboflavin 由来の強い蛍光により甘味受容体活性化能を評価することができなかった (図 2-7C および 2-7E)。

一方で、mt-clytin-II を用いた発光検出系で測定を行った場合、0.25、0.50 または 1.0 µg/ml riboflavin 添加時の発光値はバッファー添加時の発光値と差がなかった (図 2-7B)。更に、riboflavin と aspartame の混合溶液の測定を行った場合にも、riboflavin 濃度によらず aspartame のみに対する応答値と同等の値が検出された (図 2-7D および 2-7F)。これらの結果から、riboflavin に甘味受容体活性化能がないことが明らかとなった。

以上の検討により、mt-clytin-II を用いた発光検出系が、これまでの蛍光検出系では評価できなかった蛍光物質を含むサンプルの測定が可能な優れた検出系であることが確かめられた。更に、この評価系では aspartame 以外の人工甘味料や、Sucrose のように比較的弱い甘味を呈する物質に対する応答も検出可能なことを確認した (図 2-8)。

2-3-6. 旨味評価系の開発

旨味評価系で最適化した条件を元に、発光検出法による旨味評価系の開発を検討した。前述の通り、Flp-In System によりヒト旨味受容体安定発現細胞を複製しても、L-Glu 応答を検出することはできなかった。そこで、旨味評価系の場合には T1R1、T1R3、G タンパク質 (rG15i2) および mt-clytin-II を一過的に発現させた HEK293T 細胞を用いた。この一過的発現による旨味受容体発現細胞では、fura-2 を用いた Ca²⁺イメージング法により L-Glu 応答を検出すること

が可能だったが (図 2-9A)、応答細胞数が少なく、fluo-4 アッセイにてマイクロプレートリーダー (FlexStation 3) で応答を検出することはできなかった (data not shown)。

甘味評価系の方法に準じて、発光検出法により旨味受容体発現細胞の L-Glu 応答の検出を行った。その結果、FlexStation 3 を用いて L-Glu 濃度依存的な発光値の上昇を検出することができた (図 2-9B)。また、L-Glu に比べ弱い旨味をもつ L-Asp に対する応答も検出された。

2-4. 考察

2-4-1. 発光検出法の味評価系への導入

本研究では、味覚受容体の活性化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化量の検出に Ca^{2+} 結合型発光タンパク質を利用した発光検出法を導入することで、新しい甘味および旨味評価系の開発に成功した。発光検出系は従来の Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬を用いた蛍光検出系と比べて高感度であり、かつ、蛍光を有するサンプルにも利用可能だったことから、食品を対象とした味評価系に適した検出法であると考えられた。

2-4-2. Ca^{2+} 結合型発光タンパク質の最適化

Ca^{2+} 結合型発光タンパク質としては腔腸動物由来の aequorin(40, 41)、clytin(42, 43)、obelin(44-46)などが知られ、これまでも様々な GPCR アッセイやイオンチャネルアッセイに利用されてきた(48-50)。発光時間や強度、波長などは発光タンパク質ごとに異なるため、作製する評価系ごとに最適な発光タンパク質を選定することが重要だと考えられた。本研究では aequorin、obelin、

clytin、clytin-II の 4 種の発光タンパク質で比較を行った。その結果、最も高い発光値を示したのは clytin-II だった (図 2-4)。clytin-II は発光クラゲ *Clytia gregarium* から同定された clytin のアイソタイプである(47)。clytin-II は clytin や aequorin に比べ初期の発光値が約 5 倍高く、シグナル/バックグラウンド比も高いことが報告されている(47)。また、アポ発光タンパク質をミトコンドリアへ局在化させることで、シグナル/バックグラウンド比を向上させることができた (表 2-1)。ミトコンドリアへの局在化は EC₅₀ 値には影響を与えなかったことから、細胞質内の Ca²⁺濃度変化を正確に反映していると考えられた。

2-4-3. 蛍光物質存在下での発光検出系の利用

食品由来のサンプルは蛍光物質を含有することが多く、従来の蛍光検出法を用いた味評価系では食品サンプルの味覚受容体活性化能を正しく評価することが困難だった。本研究では、蛍光物質のモデルとして BCECF や riboflavin を使い、発光検出系が蛍光物質共存下で利用できることを証明した (図 2-3、2-6 および 2-7)。今後、発光検出系を用いることで、riboflavin の様に従来の蛍光検出系では評価ができなかった食品成分の味覚受容体活性化能を明らかにすることが可能である。しかし、未だ解決できない問題点として、高・低浸透圧、細胞毒性、吸光を持つサンプルの測定などが挙げられる。吸光物質の測定については、今後、ルシフェラーゼアッセイの開発などにより解決されることが期待される。

2-4-4. 旨味評価系の構築

発光検出系の導入により、高感度かつハイスループットな旨味評価系の構築に成功した。これまでに当研究室ではヒト旨味受容体発現細胞の L-Glu 応答を

蛍光顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージング法で検出することに成功していた (図 2-9A)。しかし、L-Glu 添加時に認められる細胞応答は fluo-4 アッセイにてマイクロプレートリーダー (FlexStation 3) で検出するには微弱であり、ハイスループットアッセイの構築には至っていなかった。一方で、本研究で開発した mt-clytin-II を用いた旨味評価系では、L-Glu よりも弱い旨味をもつ L-Asp に対する応答をも検出可能であり、高感度かつハイスループットな有用な評価系の構築に成功したといえる (図 2-9B)。

今回、甘味評価系の場合には、fluo-4 を用いた蛍光検出系 (図 2-2C) と mt-clytin-II を用いた発光検出系 (表 2-1、図 2-4) の間でシグナル/バックグラウンド比に差が認められなかったにもかかわらず、旨味評価系の場合には発光検出系の方が蛍光検出系よりも高感度だった。この理由の一つとして、用いた細胞種の違いが考えられる。甘味評価系の場合は、SV40 Large T 抗原をもたない Flp-In 293 細胞を宿主細胞として作製した甘味受容体安定発現細胞を用いた。一方で、旨味評価系では SV40 Large T 抗原をもつ HEK293T 細胞を用いた。これらの細胞に対し、SV40 の複製開始点をもったアポ発光タンパク質発現プラスミドを導入し一過的に発現させたため、HEK293T 細胞を用いた旨味評価系の方が、アポ発光タンパク質を高発現させることができたと考えられる。アポ発光タンパク質発現プラスミドの導入量と発光値が比例関係にあったことから (data not shown)、発光値の大きさはアポ発光タンパク質の発現量に依存すると考えられた。

旨味受容体の高感度ハイスループットアッセイ構築に成功しているグループは世界でも数が少ないため、未だ謎の多い旨味受容メカニズムの解明に本発光検出系が役立つことと期待される。

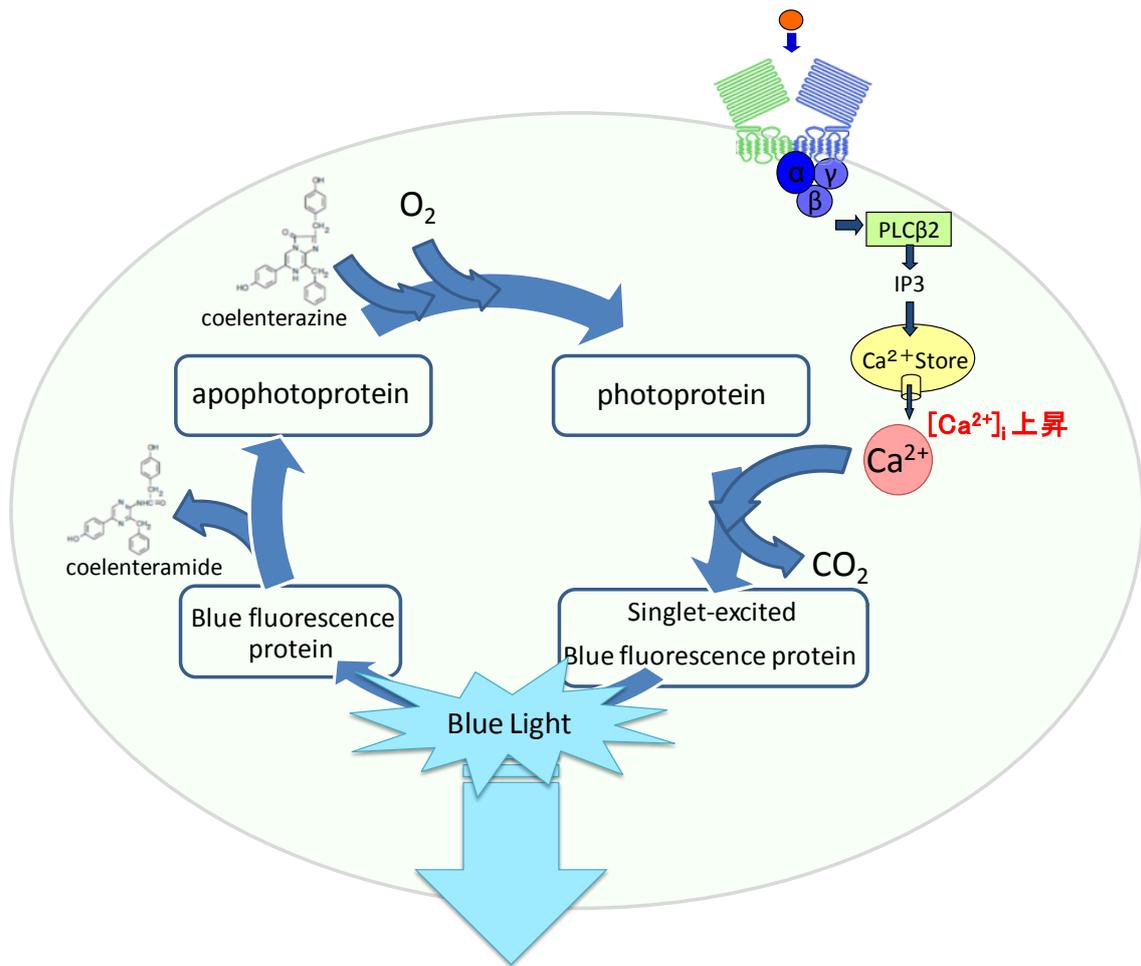


図 2-1 Ca²⁺結合型発光タンパク質を用いた発光検出法の概念図

Ca²⁺結合型発光タンパク質はアポ発光タンパク質、発光基質である coelenterazine、酸素分子の複合体からなる。味覚受容体およびアポ発光タンパク質を発現させた培養細胞に対し、発光基質 coelenterazine を添加すると、細胞内に発光タンパク質が形成される。この細胞に対し、味物質を添加すると細胞内 Ca²⁺濃度が上昇し、発光タンパク質が高次構造変化に伴う青色瞬間発光を呈する(38, 39)。この発光強度変化をマイクロプレートリーダーにて検出することで受容体の活性化の強さを定量化することが可能となる。

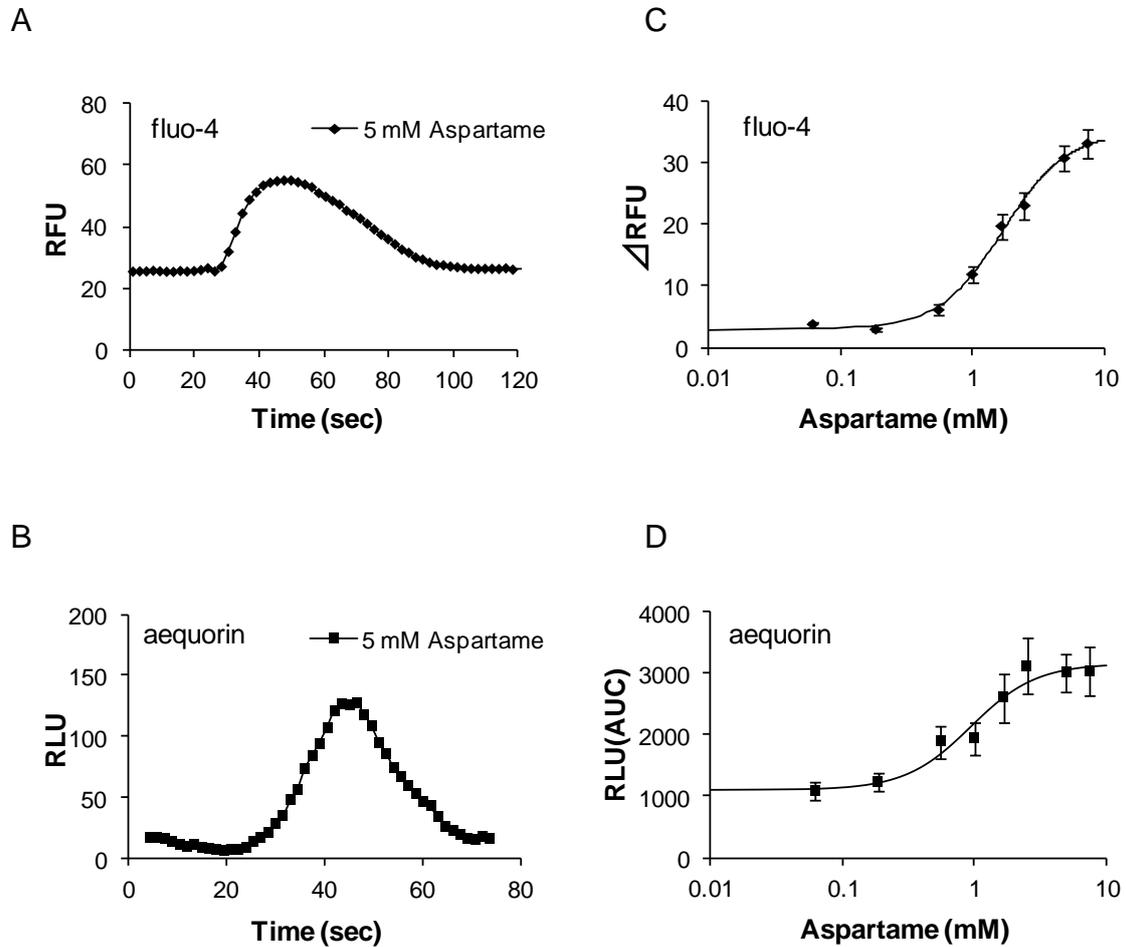


図 2-2 発光検出系と蛍光検出系の比較 (甘味評価系)

(A)fluo-4 アッセイにて、甘味受容体安定発現細胞 (hT1R2/hT1R3 および hG16gust44 安定発現細胞) へ 5 mM aspartame を添加した際に得られる蛍光値の経時変化。aspartame の添加は測定開始から 20 秒目に行った。mean、n=6。

(B)aequorin アッセイにて、甘味受容体安定発現細胞へ 5 mM aspartame を添加した際に得られる発光値の経時変化。mean、n=6。

(C, D)fluo-4 アッセイ(C)もしくは aequorin アッセイ(D)を用いて得た、aspartame に対する濃度応答曲線。mean±SEM、n=6。シグナル/バックグラウンド比は aequorin アッセイ=2.6±0.2、fluo-4 アッセイ=12.6±0.9。

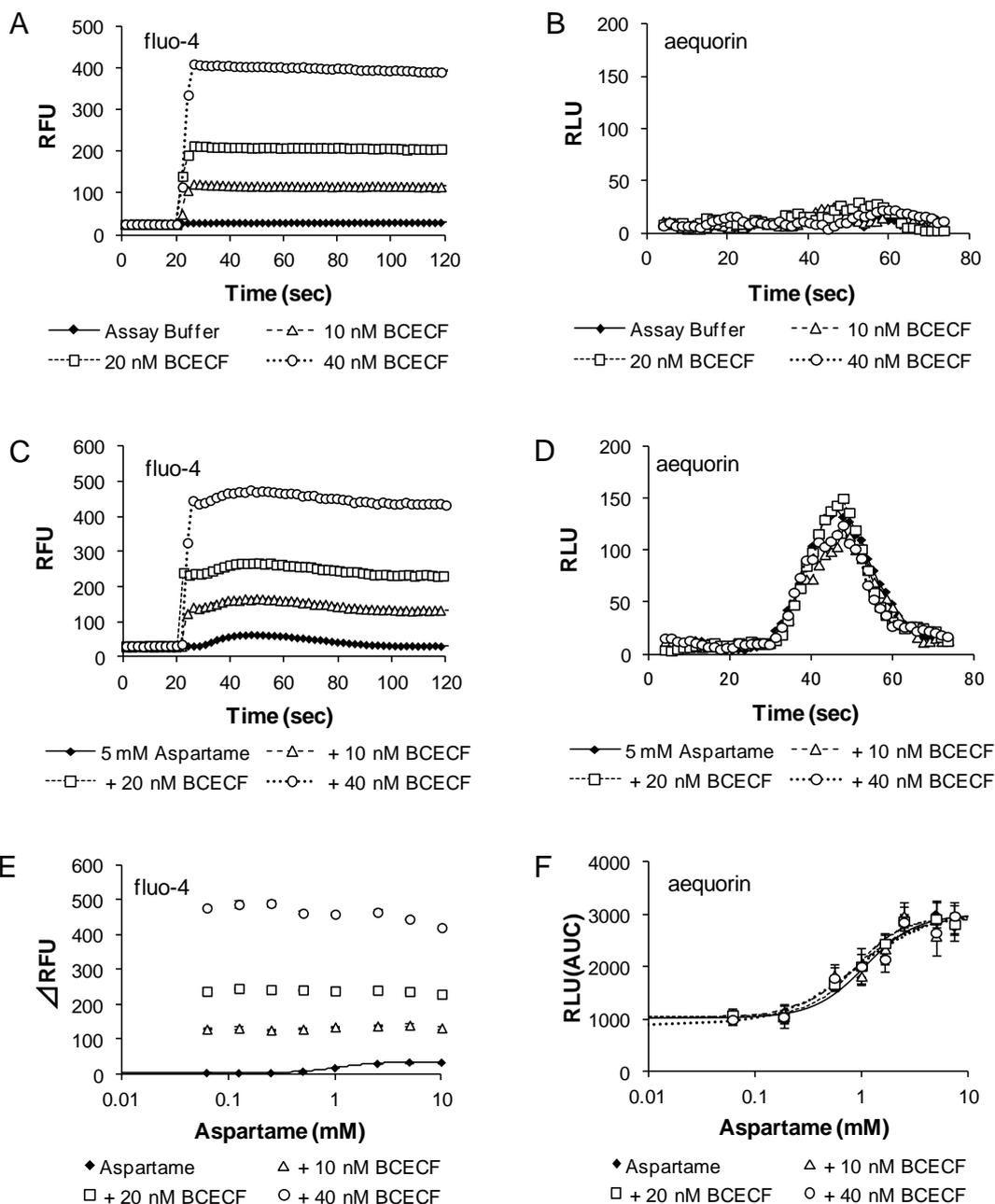


図 2-3 BCECF を含むサンプルを測定した際の比較 (甘味評価系)

(A, B)fluo-4 アッセイ(A)もしくは aequorin アッセイ(B)にて、甘味受容体安定発現細胞へバッファーもしくは 10、20、40 nM BCECF を添加した際に得られる応答値の経時変化。サンプルの添加は測定開始から 20 秒目に行った。mean、n=3-6。

(C, D)fluo-4 アッセイ(C)もしくは aequorin アッセイ(D)にて、甘味受容体安定発現細胞へ 5 mM aspartame もしくは 5 mM aspartame および 10、20、40 nM BCECF 混合溶液を添加した際に得られる応答値の経時変化。mean、n=3-6。

(E, F)BCECF 共存下で fluo-4 アッセイ(E)もしくは aequorin アッセイ(F)を用いて得た、aspartame に対する濃度応答曲線。mean±SEM、n=3-6。

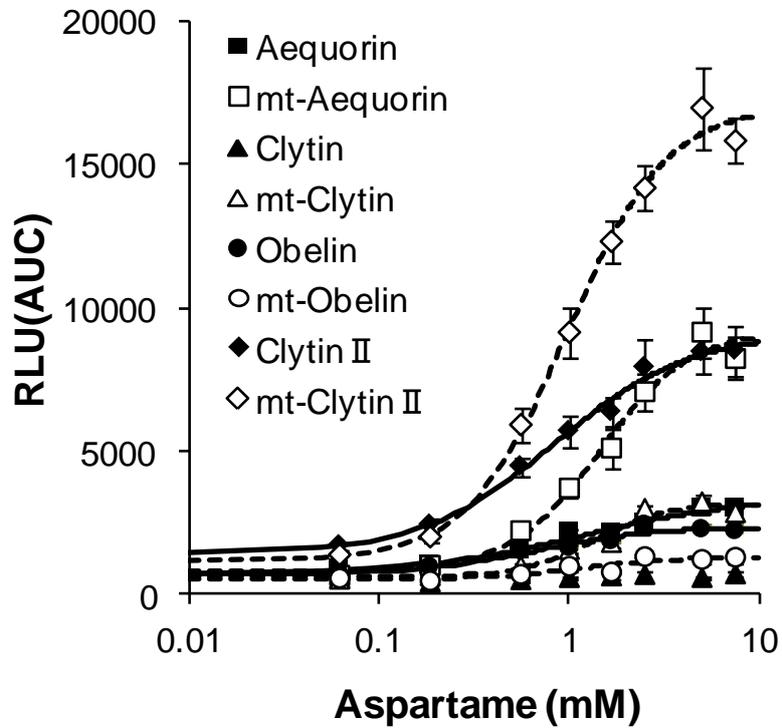


図 2-4 発光タンパク質の比較

各種発光タンパク質を用いた際に得られる、甘味受容体安定発現細胞の aspartame に対する濃度応答曲線。甘味受容体安定発現細胞に各種アポ発光タンパク質を一過的に発現させた後、10 μ M coelenterazine を添加して細胞内に発光タンパク質を形成させた。mean \pm SEM、n=6。mt-、ミトコンドリア局在化。

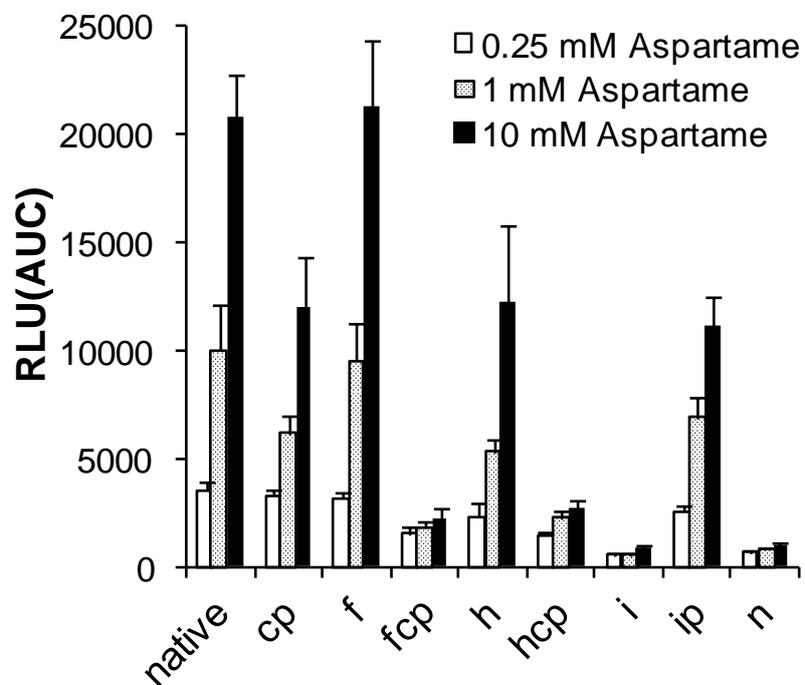


図 2-5 発光基質の比較

甘味受容体安定発現細胞に mt-apoclytin-II 発現プラスミドを導入した後、10 μ M coelenterazine もしくは coelenterazine 類縁体を添加し、aspartame 添加時の発光強度を検出した。mean \pm SEM、n=5-6。

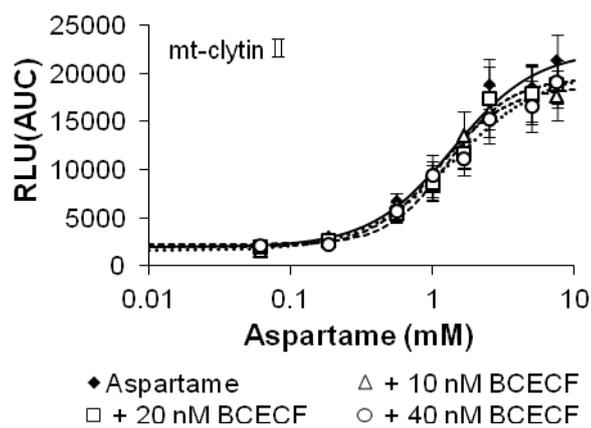


図 2-6 BCECF 共存下における mt-clytin-II アッセイの利用

BCECF 共存下で mt-clytin-II アッセイを用いて得た aspartame に対する濃度応答曲線。mean \pm SEM、n=6。EC₅₀(aspartame)=1.6 \pm 0.2 mM、EC₅₀(aspartame+10 nM BCECF)=1.2 \pm 0.2 mM、EC₅₀(aspartame+20 nM BCECF)=1.4 \pm 0.2 mM、EC₅₀(aspartame+40 nM BCECF)=2.6 \pm 1.2 mM。

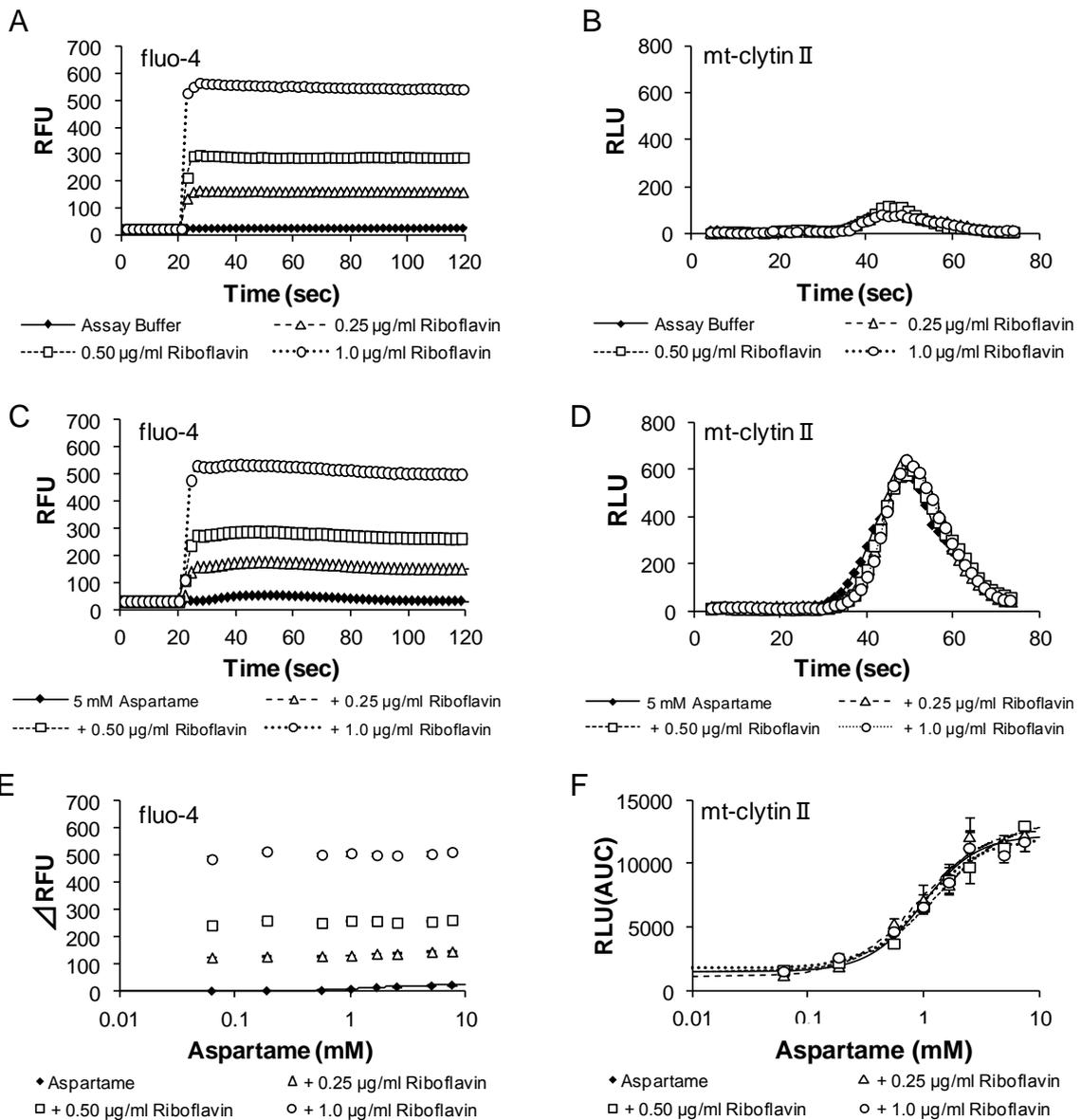


図 2-7 発光検出系と蛍光検出系の比較 (甘味評価系)

(A, B) fluo-4 アッセイ(A)もしくは mt-clytin-II アッセイ(B)にて、甘味受容体安定発現細胞へバッファーもしくは 0.25、0.50、1.0 μ g/ml riboflavin を添加した際に得られる応答値の経時変化。サンプルの添加は測定開始から 20 秒目に行った。mean、n=3。

(C, D) fluo-4 アッセイ(C)もしくは mt-clytin-II アッセイ(D)にて、甘味受容体安定発現細胞へ 5 mM aspartame もしくは 5 mM aspartame と 0.25、0.50、1.0 μ g/ml riboflavin の混合溶液を添加した際に得られる応答値の経時変化。mean、n=3。

(E, F) riboflavin 共存下で fluo-4 アッセイ(E)もしくは mt-clytin-II アッセイ(F)を用いて得た、aspartame に対する濃度応答曲線。mean \pm SEM、n=3。

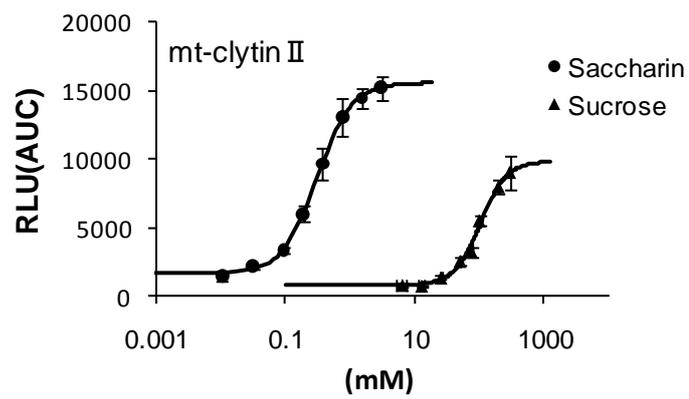


図 2-8 mt-clytin-II アッセイで測定した甘味物質に対する濃度応答曲線
 甘味受容体安定発現細胞のサッカリンおよびスクロースに対する濃度応答曲線。mean±SEM、
 n=3。

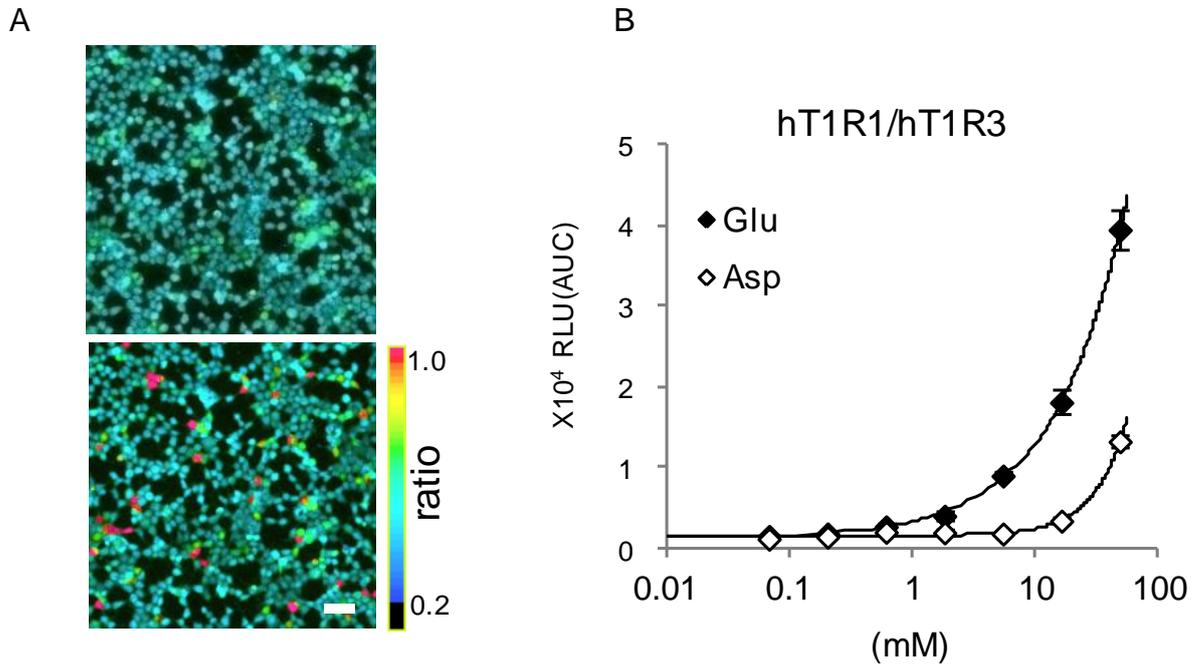


図 2-9 蛍光または発光検出法を用いて検出したヒト旨味受容体の酸性アミノ酸応答
 (A)Ca²⁺イメージング法（蛍光検出法）により検出したヒト旨味受容体発現細胞の L-Glu 応答。
 HEK293T 細胞に hT1R1、hT1R3、rG15i2 を一過的に発現させ、100 mM L-Glu 添加時の蛍光強度変化を蛍光指示薬 fura-2 を用いて検出した。添加前（上）と添加後（下）における fura-2 の蛍光強度比(F340/F380)を疑似カラー表示した。スケールバーは 50 μ m。
 (B)発光検出法により検出したヒト旨味受容体発現細胞の L-Glu および L-Asp に対する濃度応答曲線。mean \pm SEM、n=4。

表 2-1 各種発光タンパク質で測定した甘味受容体安定発現細胞の aspartame に対する EC₅₀ 値およびシグナル/バックグラウンド比。mean±SEM、n=3-6。

Photoprotein	EC ₅₀ (mM)	Signal/Background
aequorin	1.7 ± 0.9	3.9 ± 1.1
mt-aequorin	1.5 ± 0.2	11.5 ± 1.8
clytin	-	-
mt-clytin	1.5 ± 0.2	4.9 ± 0.5
obelin	0.8 ± 0.2	3.5 ± 0.7
mt-obelin	1.2 ± 0.3	2.8 ± 0.4
clytin-II	0.9 ± 0.1	6.5 ± 1.0
mt-clytin-II	1.0 ± 0.1	12.2 ± 0.9

第3章

旨味受容体 T1R1/T1R3 のリガンド特異性を
決定する分子メカニズムの解明

3-1. 序

旨味受容体 T1R1/T1R3 は 2002 年にアミノ酸の味を受容する分子として同定された(6)。その際に、ヒト T1R1/T1R3 が L-Glu に対し高感度であるのに対し、マウス T1R1/T1R3 は L-Glu よりもその他の幅広い L-アミノ酸に対し強く応答することが明らかとなった。しかし、この動物種間で異なるアミノ酸受容を引き起こす分子機構は明らかになっていなかった。そこで、構築した高感度旨味評価系を用いて、この分子メカニズムの解明を行うことにした。

甘味受容体 T1R2/T1R3 においても動物種間で甘味物質に対する受容能に違いがあることが知られており、ヒト - 齧歯類(18, 33-35)やヒト - リスザル(57)キメラ受容体の機能解析を行うことで様々な甘味物質の結合部位が明らかにされてきた。一方で、旨味受容体では L-Glu 以外のアミノ酸の結合部位は明らかになっていなかった。更に、L-Glu の結合に重要な残基として hT1R1 の VFTD の蝶番部分に位置する 5 残基が同定されていたが(31)、これらの残基はすべてヒトとマウス間で保存されていたため、ヒトとマウスの酸性アミノ酸受容能の違いを決定する因子がこれら 5 残基とは別に存在すると考えられた。そこで、ヒト - マウスキメラ受容体および点変異体 T1R1/T1R3 の機能解析を行うことで、アミノ酸受容の動物種差を決定する因子を同定することとした。

3-2. 材料と方法

材料

L-aspartic acid sodium salt、L-glutamic acid monosodium salt、L-serine、L-lysine monohydrochloride、L-histidine monohydrochloride monohydrate、

L-proline、L-phenylalanine は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より、L-glutamine、L-threonine、glycine、L-alanine、L-valine、L-isoleucine、L-leucine、L-arginine、L-asparagine monohydrate は Kanto Chemical (Tokyo, Japan) より、L-methionine は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) より、coelenterazine は Promega (Madison, WI) より購入した。発光検出法用アッセイバッファーは 10 mM HEPES、130 mM NaCl、10 mM glucose、5 mM KCl、2 mM CaCl₂ および 1.2 mM MgCl₂ で作製し、NaOH を用いて pH 7.4 に調整したのち、0.1% BSA (Sigma Aldrich) を添加し作製した。それぞれのサンプルはアッセイバッファーに希釈し、必要に応じて NaOH または HCl を用いて pH を 7.4 に調整した。

ヒト、マウス、ヒト - マウスキメラ味覚受容体および点変異体発現用プラスミドの作製

hT1R1 (NCBI RefSeq number NM_138697.3)、hT1R3 (NM_152228.1)、mT1R1 (NM_031867.2)、mT1R3 (NM_031872.2)、human-mouse T1R1 キメラ、hT1R1 および mT1R1 点変異体はコード領域を PCR 法により overlapping primer を用いて増幅し、5'末端に Kozak 配列を付加して、哺乳類細胞用発現ベクター pEAK10 (Edge Biosystems) の *Asc* I-*Not* I サイトにサブクローニングした。リガンド特異性の決定に重要な残基を同定するために下記のキメラ受容体、1点変異体もしくは多重変異体を作製した: hVF_{TD}-mCRD-mTMD T1R1、mVF_{TD}-hCRD-hTMD T1R1、hT1R1 (m.1-143)、(m.144-178)、(m.179-370)、(m.371-380)、(m.381-497)、(m.179-279)、(m.280-329)、(m.280-305)、(m.306-314)、(m.315-329)、(m.330-370)、(m.373-375)、(m.376-380)、(m.381-440)、(m.452-472)、(m.473-497)。hT1R1-S148N、-R151H、-A170E、

-E174V、-R281G、-E285R、-T290A、-V298I、-A302D、-L305I、-R307T、-H308Y、
-G311N、-R317G、-M320T、-K328Q、-M371T、-A372T、-K377E、-K379G、
-S385A、-D435K、-T464E、-K460E。mT1R1 (h.1-142) 、 (h.143-177) 、
(h.178-369) 、(h.370-379)、(h.380-496)、(h.144-151)、(h.152-169)、(h.170-177)、
(h.178-218)、(h.219-278)、(h.380-391)、(h.392-422) 、(h.423-439) 、(h.460-471)。
mT1R1-N149S、-D151N、-H152R、-E171A、-V175E、-I176T、-N277S、-H279Q、
-D303A、-T308R、-T321M、-Q329K、-E378K、-G380K、-A386S、-V390A、
-E392R 、 -Q424E 、 -Y427H 、 -N430H 、 -K436D 、 -E461K 。
hT1R1-A170E/A302D/M320T/K379G
mT1R1-N149S/H152R/E171A/V175E/D303A/T308R/T321M/Q329K/E378K/
G380K/K436D/E461K。

各種非ヒト霊長類味覚受容体および点変異体発現用プラスミドの作製

本実験はすべて、京都大学霊長類研究所による“サル類の飼育管理及び使用に関する指針（第3版, 2010年）”に準じて行った。ゲノムDNAはアカゲザル *Macaca mulatta* の場合には舌を、マントヒヒ *Papio hamadryas* およびボリビアリスザル *Saimiri boliviensis* の場合には肝臓の組織の一部を proteinase K 処理して得た。データベース上のゲノム配列 (macaque (NC_007858.1)、baboon (NW_003871134.1)、squirrel monkey (NW_003943720.1)) から BLASTN search (58)により T1R1 遺伝子のアノテーションを行い、PCR用プライマーを設計した。設計したプライマーを用いて *Tas1r1* をコードする6つのエクソン断片をPCR法により増幅し、配列の確認を行った。本研究で用いた、macaque T1R1のアミノ酸残基P278およびM320と、baboon T1R1のアミノ酸残基P459

はデータベース上の配列とは 1 塩基多型により異なっていた。更に、baboon T1R1 の P595 はデータベース上ではフレームシフト変異が導入されていた。各エキソンをコードする PCR 産物は overlapping PCR 法により全長をつなぎ、上述の hT1R1 および mT1R1 と同様の方法で pEAK10 ベクターに組み込んだ。

細胞培養および遺伝子導入

HEK293T 細胞は 10% FBS (Invitrogen) を含む高グルコース濃度 (4.5 g/L) DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

発光検出法 (旨味評価系)

HEK293T 細胞に Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いて T1R1、T1R3、rG15i2、mt-apo-clytin-II 発現プラスミドを導入し、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。培養液には GlutaMAX (Invitrogen) および 10% dialyzed FBS (Invitrogen) を含む低グルコース濃度 (1.0 g/L) DMEM を用いた。遺伝子導入から 48 時間後に細胞を測定用 96 穴プレート (96-well black-walled CellBIND surface plate) へ撒き、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。その後は、第 2 章に記載の方法と同様の方法でサンプル添加時の発光強度変化を検出した。L-Trp と L-Tyr は溶解度が低いため測定に用いなかった。また、L-Cys はバッファー溶液中 (pH7.4) で不安定だったため、測定を行わなかった。L-Arg および L-His 溶液は pH7.4 に調整する際に多量の HCl もしくは NaOH の添加が必要だったため、他のアミノ酸サンプル溶液に比べ高浸透圧になった。統計解析は解析ソフト Ky Plot version 3.0. を用いて、Student's *t*-test および one-way ANOVA followed by Dunnett's test を行った。

Homology Modeling

hT1R1 のホモロジーモデルは鋳型に open form の mGluR1 (PDB ID: 1EWT) を用い、MOE (Chemical Computing Group Inc.) により作製した。モデルの可視化には Discovery Studio Visualizer (Accelrys) を用いた。

3-3. 結果

3-3-1. リガンド特異性の決定に重要なドメインの同定

まず、ヒトとマウスの T1R1/T1R3 のアミノ酸応答パターンを比較するために、溶解度や安定性の問題がある L-Tyr、L-Trp、L-Cys を除く 17 種類のアミノ酸に対する応答を測定した。発光検出系において 50 mM 以上の L-Glu 溶液を添加すると、味覚受容体によらない非特異的な細胞応答が検出されたため、評価に用いるアミノ酸溶液の濃度は 50 mM までとした。50 mM の 1 点濃度での応答値を比較したところ、hT1R1/hT1R3 はヒトが強い旨味を感じる L-Glu および L-Asp といった酸性アミノ酸に対し強く応答した (図 3-1)。更に、hT1R1/hT1R3 は L-Ala、L-Ser、L-Gln、L-Asn、L-Arg、L-His 添加時にも有意な応答値の上昇を示した。これらのアミノ酸の中で、L-Ala、L-Ser、L-Gln、L-Asn は高濃度で弱い旨味を呈することがヒトの官能評価試験で明らかになっている(59)。一方で、hT1R1/hT1R3 は浸透圧上昇に伴い味覚受容体によらない非特異的な細胞応答を生じやすいことが予備検討から分かっており、L-Arg および L-His 添加時に認められた応答値の上昇はこの 2 つのサンプル溶液が他のアミノ酸溶液に比べ高浸透圧であったことが原因である可能性が考えられた (材料の項を参照)。一方、先行研究の結果と一致して(6)、mT1R1/mT1R3 は酸性アミノ酸よりも L-Ala、L-Ser、L-Gln などのその他の幅広いアミノ酸に対して強く応答した (図 3-1)。

T1R1 と T1R3 のどちらのサブユニットがリガント特異性の決定に重要であるのかを調べるために、ヒトとマウスの組み合わせを入れ換えた T1R1/T1R3（すなわち、hT1R1/mT1R3 および mT1R1/hT1R3）のアミノ酸応答パターンを評価した。それぞれの受容体がヒト型、マウス型どちらの応答パターンを示すのかを明らかにするために、hT1R1/hT1R3 の代表的なアゴニストとして L-Glu、L-Asp を、mT1R1/mT1R3 の代表的なアゴニストとして L-Ala、L-Ser を用いた。その結果、hT1R1/mT1R3 は L-Ala や L-Ser よりも L-Glu、L-Asp に対し強く応答するというヒト型の応答パターンを示した（図 3-2）。このことから、アミノ酸応答パターンの決定には T1R1 サブユニットが寄与していると考えられた。一方で、mT1R1/hT1R3 では測定した 4 種すべてのアミノ酸に対し応答が認められなかった（図 3-2）。甘味受容体 T1R2/T1R3 の場合においても、mT1R2/hT1R3 の組み合わせでは甘味物質に対する応答が認められないとの報告がある(33, 34)。

続いて、T1R1 のどのドメインがリガント特異性の決定に重要であるのかを調べるために、L-Glu 結合部位が存在する VF₁TD をヒトとマウスで入れ替えたヒト - マウスキメラ T1R1 のアミノ酸応答パターンを評価した。その結果、hVF₁TD-mCRD-mTMD T1R1/mT1R3 は L-Ala や L-Ser よりも L-Glu、L-Asp に強く応答するという、hT1R1/mT1R3 と同様の応答パターンを示した（図 3-3A）。一方で、mVF₁TD-hCRD-hTMD T1R1/mT1R3 は酸性アミノ酸よりもその他の幅広いアミノ酸に対し強く応答するという mT1R1/mT1R3 と同様のアミノ酸応答パターンを示した（図 3-3B）。これらの結果より、T1R1 の VF₁TD がヒト型、マウス型両方のアミノ酸受容に重要なドメインであると考えられた。

3-3-2. リガント特異性の決定に重要な領域の絞り込み

リガンド特異性の決定に影響を与える領域をより詳細に絞り込むために、T1R1 の VFTD を 5 つの領域に分けてヒト - マウスキメラ T1R1 発現プラスミドを作製した (図 3-4, 3-5A および 3-6A)。これらの受容体の L-Glu、L-Asp、L-Ala、L-Ser 応答を測定し、酸性アミノ酸活性 (potency もしくは efficacy) に影響を与える領域をヒト型のアミノ酸受容に重要な領域として、L-Ala および L-Ser 活性に影響を与える領域をマウス型のアミノ酸受容に重要な領域として選抜した。なお、potency はリガンドと受容体の親和性の指標であり、potency が異なる場合、受容体の活性化に必要なリガンド濃度に差が生じるため、濃度応答曲線が左右に移動する (図 3-7A)。一方、efficacy はリガンドが受容体をどれだけ活性化したかを示す指標であり、efficacy が異なる場合には、最大応答に差が生じるため、濃度応答曲線が上下に移動する (図 3-7B)。各アミノ酸について 50 mM までの測定を行い、濃度応答曲線を得たところ、5 つのキメラ受容体のうち、hT1R1(m.1-143)および hT1R1(m.144-178)では 4 種類のどのアミノ酸に対しても応答が認められなかった (図 3-5, B-E)。これら 2 つの受容体のアミノ酸応答パターンを調べるために、T1R1/T1R3 の positive allosteric modulator である IMP 共存下で L-Glu および L-Ala 活性の評価を行った。その結果、両受容体において L-Glu および L-Ala 活性が増強され検出が可能となり、hT1R1(m.144-178)においては L-Glu 活性が L-Ala 活性よりも低いことが明らかになった (図 3-5D)。この結果より、hT1R1(m.144-178)は受容体としての機能を保っているが、マウス型の変異導入により酸性アミノ酸の受容能が著しく低下したと考えられた。この領域における mT1R1 キメラ、すなわち mT1R1(h.143-177)においては、酸性アミノ酸活性が著しく上昇し、L-Glu 活性は L-Ala 活性と同程度まで増加していた (図 3-6, D および E)。以上の結果から、hT1R1 の 143-177 番のアミノ酸残基の中に酸性アミノ酸受容に重要な残基が含

まれていると考えられた。一方で、IMP 共存下において hT1R1(m.1-143)では、野生型 hT1R1 (以下、hT1R1-WT) と同様、L-Glu 活性が L-Ala 活性よりも高かった (図 3-5B)。また、mT1R1(h.1-142)の 50 mM L-Glu に対する応答は野生型 mT1R1 (以下、mT1R1-WT) よりも上昇していたものの (図 3-6B)、L-Asp 応答は mT1R1-WT よりも低下していた (図 3-6C)。よって、hT1R1 のアミノ酸残基 1-142 (mT1R1 のアミノ酸残基 1-143) は、酸性アミノ酸の受容に特異的な影響を与える領域というよりも、受容体全体の構造の維持や受容体の細胞膜表面への移行効率など、細胞の機能的発現に影響を与える領域ではないかと推察された。

hT1R1(m.179-370)では、L-Ala および L-Ser 活性が hT1R1-WT 比べ上昇した一方で、酸性アミノ酸活性は低下した (図 3-5, F および G)。hT1R1(m.381-497)では、L-Ala および L-Ser 活性が hT1R1-WT に対し上昇した一方で、L-Asp 活性が低下した (図 3-5, J および K)。これらの結果は mT1R1 のアミノ酸残基 179-370 番および 381-497 番 (hT1R1 のアミノ酸残基 178-369 番および 380-496 番) の間にヒト型およびマウス型両方のアミノ酸受容に重要な残基が含まれていることを示唆した。これらの領域における mT1R1 キメラ (すなわち、mT1R1(h.178-369)および mT1R1(h.380-496)) は、4 種類のどのアミノ酸にも応答しなかった (図 3-6, F、G、J および K)。これらの受容体では IMP 共存下においても L-Glu や L-Ala 応答が検出されなかったことから (data not shown)、これらの領域へのヒト型の変異導入が mT1R1/mT1R3 の機能的な発現に影響を与えてしまった可能性が考えられた。hT1R1(m.371-380)は hT1R1-WT に比べ、L-Ala および L-Ser 活性 (potency) が上昇した (図 3-5, H および I)。このことから mT1R1 のアミノ酸残基 371-380 番にマウス型応答に重要な残基が含まれていると考えられた。更に、hT1R1(m.371-380)は mT1R1/mT1R3 が高感度に

受容する L-Ala や L-Ser だけでなく、酸性アミノ酸に対しても高い活性 (potency) を示した (hT1R1-WT における $EC_{50(L-Glu)}=3.13\pm 0.19$ mM、hT1R1(m.371-380)における $EC_{50(L-Glu)}=0.11\pm 0.01$ mM)。一方で、この領域に対する mT1R1 キメラ、すなわち mT1R1(h.370-379)では、4 種すべてのアミノ酸活性の低下が認められた (図 3-6, H および I)。

以上の結果より、ヒト型の酸性アミノ酸受容に重要な領域として hT1R1 のアミノ酸残基 143-177、178-369、380-496 番を、マウス型の幅広いアミノ酸受容に重要な領域として mT1R1 のアミノ酸残基 179-370、371-380、381-497 番を選択し、この部位についてより詳細に検証することにした。

3-3-3. 酸性アミノ酸受容に重要な残基の決定

ヒト型の酸性アミノ酸受容に重要な残基を決定するために、hT1R1 のアミノ酸残基 143-177、178-369、380-496 番の間で更なるマウス-ヒトキメラ T1R1 および点変異体発現プラスミドの作製を行った。これらの受容体を HEK293T 細胞に発現させ L-Glu、L-Asp、L-Ala、L-Ser に対する応答パターンを評価することで、酸性アミノ酸受容に重要な残基を絞り込んだ。その結果、作製した変異体のうち、mT1R1-N149S、-H152R、-E171A、-V175E、-D303A、-K436D の 6 つの 1 点変異体で mT1R1-WT に比べ L-Glu 応答が上昇した (図 3-8, A-F)。この結果は、前述のヒト-マウスキメラ T1R1 で認められた酸性アミノ酸活性の変化 (図 3-5 および 3-6) に hT1R1 の 6 つのアミノ酸残基 Ser-148、Arg-151、Ala-170、Glu-174、Ala-302、Asp-435 が寄与していることを示唆した。これらの 6 残基が hT1R1/hT1R3 の酸性アミノ酸受容能に重要な役割を果たしているのかを確認するために、これらの残基に対しマウス型の変異を導入した hT1R1-1 点変異体のアミノ酸応答を評価した。その結果、6 つの変異体のうち

hT1R1-A170E および hT1R1-A302D の 2 つの変異体で著しく L-Glu 活性が低下し、評価を行った最大濃度 (50 mM) まで L-Glu 応答を検出することができなかった (図 3-8, I および K)。hT1R1-A170E および hT1R1-A302D の L-Ala 活性は低下しなかったことから、A170E および A302D の変異導入は L-Glu 活性を選択的に低下させたと考えられた。hT1R1-E174V および hT1R1-D435K でも L-Glu 活性の低下が認められた (図 3-8, J および L)。D435K の変異導入は L-Ala 活性には影響を与えなかったため (図 3-8L)、この変異導入は受容体の機能的発現には影響を与えないと考えられた。一方で、E174V の変異導入は L-Glu だけでなく L-Ala 活性も低下させた (図 3-8J)。よって、E174V の変異導入は、酸性アミノ酸特異的ではなくアミノ酸全般に対する受容に影響を与えた、もしくは、受容体の機能的発現に影響を与えたと考えられた。hT1R1-S148N および hT1R1-R151H は、hT1R1-WT と比較して L-Glu および L-Ala 活性に変化がなかった (図 3-8, G および H)。以上の結果より、ヒト型の酸性アミノ酸受容に最も決定的な残基は hT1R1 の Ala-170 および Ala-302 (mT1R1 の Glu-171 および Asp-303) であると考えられた。

3-3-4. 幅広いアミノ酸の受容に重要な残基の同定

マウス型のアミノ酸受容に重要な残基を同定するために、mT1R1 のアミノ酸残基 179-370、371-380、381-497 番の間で更なるヒト-マウスキメラ T1R1 および点変異体発現プラスミドの作製を行った。これらの T1R1 を mT1R3 と共に HEK293T 細胞に発現させ、L-Glu、L-Asp、L-Ala、L-Ser の 4 アミノ酸に対する応答を測定し、L-Ala、L-Ser 活性に影響を与える残基を絞り込んだ。その結果、hT1R-R307T、-M320T、-K328Q、-K377E、-K379G、-K460E の 6 つの hT1R1-1 点変異体で、hT1R1-WT に比べ、L-Ala および L-Ser 活性が上昇した

(図 3-9, A および B)。これらの残基がマウス型の幅広いアミノ酸に対する応答に重要な残基かどうかを調べるために、17 種類のアミノ酸に対する応答を評価した。その結果、これら 6 つの hT1R1-1 点変異体では、hT1R1-WT では応答が検出されなかった複数のアミノ酸に対しても応答が検出された (図 3-9A)。よって、これら 6 残基がマウス型のアミノ酸受容に重要な残基であると考えられた。更に、mT1R1-WT は酸性アミノ酸活性が低いにもかかわらず、これら 6 つの hT1R1-1 点変異体はマウス型の変異導入により hT1R1-WT に比べ L-Glu 活性 (potency) が上昇していた (図 3-9C、表 3-1)。これは、前述のキメラ受容体 hT1R1(m.371-380)で得られた結果と同様だった (図 3-5H)。これら 6 つの hT1R1-1 点変異体は、hT1R3 と共発現させた際にも L-Ala 活性の上昇が認められた (図 3-9D)。6 つの変異のうち、K379G の変異導入がアミノ酸活性 (potency) を最も大きく増加させた (図 3-9, A-D)。しかし、これらの残基に対応する mT1R1-1 点変異体の中で L-Ala 活性が低下したのは mT1R1-T321M のみであり、mT1R1-G380K の L-Ala 活性の低下は認められなかった (図 3-9E)。以上の結果より、マウス型の幅広いアミノ酸に対する受容能はこれら 6 つの残基を含む複数の残基により獲得されると考えられた。

3-3-5. T1R1 のリガンド特異性を決定する 2 つの因子

ヒト型またはマウス型のアミノ酸受容に重要だった計 12 個の残基を hT1R1-VFTD の分子モデル上にマッピングした (図 3-10A)。分子モデルは mGluR1 を鋳型にして作製した。ヒト型の酸性アミノ酸受容に重要な 6 残基のうち、Ser-148、Arg-151、Ala-170、Glu-174、Ala-302 の 5 つの残基は、先行研究で同定された L-Glu 結合部位を構成する残基の近傍に位置していた (図 1-1, 3-10A)。特に、hT1R1/hT1R3 の酸性アミノ酸受容に決定的な影響を与えた 2

残基 (Ala-170 および Ala-302) は L-Glu 結合部位の端に上下対になって存在していた。残りの 1 残基 (Asp-435) は蝶番部分の外側に位置していた。

一方で、マウス型の幅広いアミノ酸の受容に重要な 6 残基はすべて、既知の L-Glu 結合部位 (オルソステリック部位) から離れた位置に存在していた (図 3-10A)。6 つの残基のうち 4 残基 (Arg-307、Lys-377、Lys-379、Lys460) は VFTD の入り口近傍に存在する IMP 結合部位(31)よりも更に外側に位置していた。それ以外の、Met-320 は下の lobe の内部に位置し、Lys-328 は蝶番部分の外側に位置していた。ここで、L-Ala や L-Ser などの mT1R1/mT1R3 が感度良く受容するアミノ酸が既知の L-Glu 結合部位に結合するのか、もしくは、今回新たに同定したオルソステリック部位から離れた残基に結合して受容されるのかを検証した。L-Glu 結合能を消失することが知られていたオルソステリック部位の Ala 変異体 (hT1R1-S172A および-E301A) (31)のアミノ酸応答を測定したところ、両変異体とも L-Glu だけでなく L-Ala や L-Ser 受容能を消失することが分かった (図 3-11)。よって、L-Glu 以外のアミノ酸も T1R1 の蝶番部分に存在するオルソステリック部位に結合し受容されると考えられた。今回同定した 6 残基に対してマウス型の変異を導入した hT1R1 が、mT1R1 が感度良く受容するアミノ酸だけでなく、酸性アミノ酸に対する活性も上昇させたという結果と合わせて考えると (図 3-9C)、マウス型のアミノ酸受容に重要な残基は L-アミノ酸の結合ではなく、受容体全体の活性調節に関わる残基だと推察された。

マウス型のアミノ酸受容に重要な 6 残基のうち 4 残基が既知の IMP 結合部位近傍に位置していたため (図 3-10A)、これらの残基が IMP と同様のメカニズムで受容体の活性を調節している可能性が考えられた。IMP は T1R1-VFTD の入り口側に結合し、負に帯電したリン酸基が近傍の T1R1 の正電荷をもつ残基を引き付けることで T1R1 の closed-conformation の安定化をもたらすと考えら

れている(31)。そのため、IMP 結合部位の一方の lobe に逆電荷の変異を導入した 1 点変異体 hT1R1-H308E では、IMP による closed-conformation の安定化を模倣して hT1R1-WT に比べ受容体の活性が上昇し、かつ、IMP による受容体の活性化能は消失することが知られている(31) (図 3-12B)。そこで、本研究で同定した幅広いアミノ酸に対する活性が上昇した 6 つの hT1R1-1 点変異体において、IMP 添加効果を調べたところ、すべての変異体で IMP の受容体活性化能が保たれていた (図 3-12)。以上の結果から、本研究で同定したマウス型の幅広いアミノ酸の受容に影響を与える残基は IMP とは異なるメカニズムで受容体の活性を調整していると考えられた。

ここまでの変異体実験と分子モデリングで得られた結果から、T1R1 のリガンド特異性が 1) オルソステリック部位の残基により決定される「アミノ酸選択性」と 2) 非オルソステリック部位の残基により調整される「受容体の活性の強さ」の 2 つの因子の組み合わせで決定されるという仮説が得られた。この仮説を検証するために、2 つの因子に寄与する残基の多重変異体を作製し、hT1R1 と mT1R1 のアミノ酸応答パターンを入れ替えることが可能か検証した。まず、hT1R1 の酸性アミノ酸受容に決定的な 2 残基 (Ala-170 および Ala-302、図 3-8) および幅広いアミノ酸の受容に重要な 2 残基 (Met-320 および Lys-379、図 3-9) にマウス型の変異を導入した hT1R1-4 重変異体の応答を評価した。その結果、hT1R1-A170E/A302D/M320T/K379G は酸性アミノ酸よりもその他の様々なアミノ酸に対し強い応答を示すという mT1R1-WT と同様の応答パターンを示した (図 3-13A)。続いて、酸性アミノ酸受容に重要な 6 残基および幅広いアミノ酸の受容に重要な 6 残基すべてに対しヒト型の変異を導入した mT1R1-12 重変異体の応答を評価した。その結果、mT1R1-12 重変異体は評価した 17 アミノ酸

の中でL-Gluに対して最も強い応答を示すというhT1R1-WTと同様の応答パターンを示した(図3-13B)。以上の結果から、上述の2つの因子がT1R1/T1R3のリガンド特異性を決定するという仮説が裏付けられた。

3-3-6. 非ヒト霊長類T1R1を用いた検証

非ヒト霊長類を用いた行動実験により、霊長類の中でもL-Gluに対する感度に差があることが知られている(4)。T1R1のリガンド特異性の決定に重要な残基の違いが、非ヒト霊長類T1R1/T1R3のアミノ酸受容能に違いをもたらしているのではないかと考え、これまでに同定した12個のアミノ酸残基およびアミノ酸応答パターンの比較を行った。検討に用いたのは旧世界ザル2種(アカゲザル *Macaca mulatta* およびマントヒヒ *Papio hamadryas*) および新世界ザル1種(ボリビアリスザル *Saimiri boliviensis*) である。

アカゲザルT1R1では、ヒトおよびマウスT1R1においてリガンド特異性の決定に重要だった12残基のうち、10残基がhT1R1と同一であり、残り2残基もhT1R1と性質の近いアミノ酸残基だった(図3-14A)。実際にmT1R3と組み合わせアミノ酸応答の評価を行ったところ、L-Ala活性よりもL-Glu活性が高いというhT1R1と同様の傾向を示した(図3-14, BおよびC)。マントヒヒT1R1は12残基のうち、320番のアミノ酸残基以外はすべてアカゲザルT1R1と同一であり、320番がmT1R1と同様のThr残基だった(図3-14A)。配列情報から推察された通り、マントヒヒT1R1/mT1R3はL-Ala活性よりもL-Glu活性が高いというhT1R1と同様の傾向を示した(図3-14, BおよびD)。更に、マントヒヒT1R1はアカゲザルT1R1よりも高いL-GluおよびL-Ala活性を示した。アカゲザルT1R1の320番のMet残基をマントヒヒT1R1と同様のThr残基に置換したところ、L-Glu活性、L-Ala活性ともにアカゲザルT1R1-WTに比

べ上昇した (図 3-14C)。この結果から、マントヒヒ T1R1 の高い受容体活性に Thr-320 が貢献していることが示唆された。

一方で、リスザル T1R1 は 12 残基のうち 5 残基が mT1R1 と同一の残基だった (図 3-14A)。特に、酸性アミノ酸の受容に決定的な影響を与える 302 番が mT1R1 と同じく Asp 残基だった。更に、幅広いアミノ酸受容に重要な 6 残基のうち 3 残基が mT1R1 と同一で、379 番も mT1R1 と同様に電荷を持たない残基 (Thr-379) だった。これらの配列情報から予測された通り、リスザル T1R1 の L-Glu 活性は hT1R1-A302D 変異体と同程度に低く (図 3-14E)、一方で、L-Ala 活性 (potency) は評価を行った 4 種の霊長類 T1R1 の中で最も高かった (図 3-14, B-E)。

以上の結果から、本研究で同定した 12 個のアミノ酸残基はヒトとマウスの T1R1/T1R3 のみならず様々な動物種の受容体において、リガンド特異性の決定における重要な役割を果たしていると考えられた。

3-4. 考察

第 3 章では旨味受容体 T1R1/T1R3 のリガンド特異性を決定する因子を明らかにした。変異体実験および分子モデリングにより、ヒト型の酸性アミノ酸受容とマウス型の幅広いアミノ酸受容は T1R1 の VFTD 上に存在する異なる残基により調整されることが明らかとなった。

3-4-1. オルソステリック部位で決定されるヒト型の酸性アミノ酸受容能

変異体の機能解析と分子モデリングを用いた先行研究によって、ヒト T1R1/T1R3 の L-Glu 結合部位が T1R1-VFTD の蝶番部分に存在することが明らか

かになっていた(30, 31, 60)。しかし、ヒト T1R1/T1R3 が高い L-Glu 活性を有する理由は明らかになっていなかった。本研究では、更なる T1R1/T1R3 の機能解析を行うことで、新たに酸性アミノ酸の受容に寄与する 6 つの残基を同定した (Ser-148、Arg-151、Ala-170、Glu-174、Ala-302、Asp-435)。これら 6 残基のうち、Asp-435 を除く 5 つの残基は既知の L-Glu 結合部位が存在する T1R1-VFTD の蝶番部分に存在していた。更に、mGluR1 において T1R1 の Ser-148、Arg-151、Ala-170、Ala-302 に相当する残基は、L-Glu の結合に関わることが報告されている(30, 61)。このことから、酸性アミノ酸に対する活性は主にオルソステリック部位の残基の性質で決定されると考えられた。オルソステリック部位における hT1R1 と mT1R1 の違いとして特筆すべきものに電荷の違いが挙げられる。hT1R1 と mT1R1 では重要な 6 残基のうち 4 残基で電荷が異なっていた (h/m; Ala-170/Glu-171、Glu-174/Val-175、Ala-302/Asp-303、Asp-435/Lys-436) (図 3-10B)。これら 6 残基に対して作製した hT1R1-1 点変異体の中でも、電荷の変化をもたらす 4 つの変異体 (hT1R1-A170E, -E174V, -A302D および-D435K) の方が電荷の変化を生じない 2 つの変異体 (hT1R1-S148N および-R151H) に比べ L-Glu 活性に与える影響が大きかった (図 3-8, G-L)。特に、hT1R1 の L-Glu 活性に決定的な影響を与えた Ala-170 および Ala-302 (mT1R1 における Glu-171 および Asp-303) はオルソステリック部位の端に上下対になって存在していた (図 3-10A)。mGluR1 において hT1R1-Ala-170 に相当する残基の mGluR1-Ser-186 は L-Glu 結合時に L-Glu の遠位カルボキシル基と水分子を介して相互作用することが明らかになっている (28, 61)。更に、hT1R1-Ala-302 に相当する mGluR1-Gly-319 もまた L-Glu の遠位カルボキシル基近傍に位置することが知られている(61, 62)。mT1R1 はこれら 2 残基が酸性アミノ酸残基であるため、L-Glu の遠位カルボキシル基と

T1R1 間で静電的反発が生じ、酸性アミノ酸受容能が低くなっていると考えられた。

3-4-2. 非オルソステリック部位により決定されるマウス型の幅広いアミノ酸受容能

これまで、L-Glu 以外のアミノ酸の受容メカニズムは明らかになっていなかった。本研究ではマウス型の幅広いアミノ酸受容に関わる残基を 6 残基同定した (図 3-9)。これらの 6 残基を T1R1-VFTD の分子モデル上にマッピングすると、オルソステリック部位とは異なる位置に存在することが明らかとなった (図 3-10A)。T1R ファミリーはオルソステリック部位だけではなく、複数のリガンド結合部位を有することが知られている(63)。よって、今回同定した残基が今まで知られていなかった別のアミノ酸結合部位を構成している可能性も考えられた。しかし、これらの残基に対するマウス型の変異導入は mT1R1/mT1R3 が高感度に受容するアミノ酸だけでなく、オルソステリック部位に結合する L-Glu の活性も変化させた (図 3-9C)。更に、オルソステリック部位を構成する残基の Ala 変異体 (hT1R1-S172A および hT1R1-E301A) において、L-Glu だけでなく L-Ala や L-Ser 活性の低下が認められた (図 3-11)。S172A および E301A の変異導入は、hT1R1 の膜貫通領域 (TMD) に作用する化合物 S807 に対する活性には影響を与えないため(31)、変異導入により受容体の機能的発現が損なわれたために応答が低下したのではなく、オルソステリック部位に結合するリガンドの活性が特異的に低下したものと考えられた。よって、L-Ala や L-Ser などの L-Glu 以外のアミノ酸もオルソステリック部位に結合すると考えられた。このことから、本研究で同定したマウス型の幅広いアミノ酸応答に影響を与えた残基は L-Ala や L-Ser などの結合に寄与する残基ではなく、受容体の活性調節に影響

を与える残基だと推察された。つまり、mT1R1/mT1R3は受容体自体の活性が高いために様々なアミノ酸に対し高い受容能を示すのだと考えられた。これらの残基が受容体の活性を調整するメカニズムとして、少なくとも下記の2つの可能性が考えられた。残基の性質の違いが、1) オルソステリック部位におけるリガンド (L-アミノ酸) の結合・解離定数に影響を与える場合 (affinity modulation)、もしくは、2) オルソステリック部位にアミノ酸が結合した後のシグナル伝達に影響を与える場合 (efficacy modulation) である。Zhanらは、T1RのVFTDの入り口付近に存在する“pincer残基”が、lobe-lobe間もしくはlobe-enhancer間の相互作用に影響し、VFTDのclosed conformationを安定化させると提唱した(31)。例えば、IMPによる受容体の活性化は、T1R1-VFTDの上下のlobeに存在する正電荷をもつpincer残基と負電荷をもつIMPのリン酸基が引き合い、T1R1-VFTDのclosed conformationが安定化することで誘導されると考えられている(31)。それゆえ、片側のlobeのpincer残基に電荷を正から負に換える変異 (H308E) を導入すると、IMPによる修飾作用を模倣したかのように、L-Glu活性 (potency および efficacy) の上昇が生じ、一方でIMPによるL-Glu活性の増強効果は消失する(31) (図 3-12B)。ところが、本研究で作製した6つの活性型変異体 (hT1R-R307T、-M320T、-K328Q、-K377E、-K379G、-K460E) は、IMPによるL-アミノ酸活性の増強効果を保っていた (図 3-12)。この結果から、マウス型の幅広いアミノ酸受容に関わる6残基はIMPによる活性化メカニズムとは異なるメカニズムで受容体の活性調節を行っている と推察された。Rouraらは、分子モデリングをもとにhT1R1のArg-307がアミノ酸認識に重要な残基であることを指摘し、齧歯類T1R1ではこの位置に塩基性アミノ酸残基 (Arg残基) ではなく中性残基 (Thr残基) が存在するために、オルソステリック部位に幅広い種類のアミノ酸が侵入し、作用することができ

るのではないかと考察している(60)。実際に、本研究で同定した 6 残基のうち、VFTD の表面上に存在する 5 つすべての残基において hT1R1 と mT1R1 で電荷が異なっていた (h/m; Arg-307/Thr-308、Lys-328/Gln-329、Lys-377/Glu-378、Lys-379/Gly-380、Lys-460/Glu-460)。これらの残基による受容体の活性調節の直接の原因を明らかにすることはできなかったが、T1R1 のリガンド特異性の決定には、オルソステリック部位だけでなく、非オルソステリック部位の静電的な特性も大きく寄与すると考えられた。一方で、下側の lobe 内部に存在していた残基 (h/m; Met-320/ Thr-321) においては hT1R1 と mT1R1 間で電荷の違いはなかった (図 3-10)。以上の結果から、非オルソステリック部位の残基の様々な性質の違いが、T1R1/T1R3 のリガンド特異性の決定に影響を与えうると結論付けられた。

3-4-3. T1R1/T1R3 のリガンド特異性を決定する因子

多重変異体の機能解析により、T1R1/T1R3 のリガンド特異性が 1) オルソステリック部位の残基により決定される「アミノ酸選択性」、および 2) 非オルソステリック部位の残基により調整される「受容体の活性の強さ」の 2 つの因子の組み合わせで決定されるという仮説が裏付けられた (図 3-13)。更に、この仮説がヒトとマウスだけでなく、3 種の非ヒト霊長類 T1R1 においても適応可能であることが確認された (図 3-14)。一方、hT1R1/mT1R3 の活性が hT1R3/hT1R3 よりも高いことから (図 3-8, 3-14B)、受容体の活性調節に関わる残基は T1R3 を含む様々な部位に存在すると考えられる。T1R1/T1R3 はオルソステリック部位および非オルソステリック部位の両方の性質の違いにより、リガンドを多様化させているのだと考えられた。

近年、T1R ファミリーおよびその下流シグナル伝達因子 (Gagust、PLC β 2、

TRPM5) が口腔内に限らず体中の様々な組織に分布していることが明らかになった(64-66)。味覚組織以外に発現する T1R1/T1R3 の機能は未だ明確になっていないが、動物種間のアミノ酸受容能の違いは味受容に留まらず様々な生理現象に影響を及ぼす可能性が考えられる。我々ヒトの T1R1/T1R3 が酸性アミノ酸受容に特化したのは何故だろうか。本研究では、ヒト T1R1/T1R3 が酸性アミノ酸受容に特化した仕組みを明らかにすることができた。今後、この成果が T1R1/T1R3 のリガンド多様性をもたらした進化的・生理的意義を明らかにするための切り口になることが期待される。

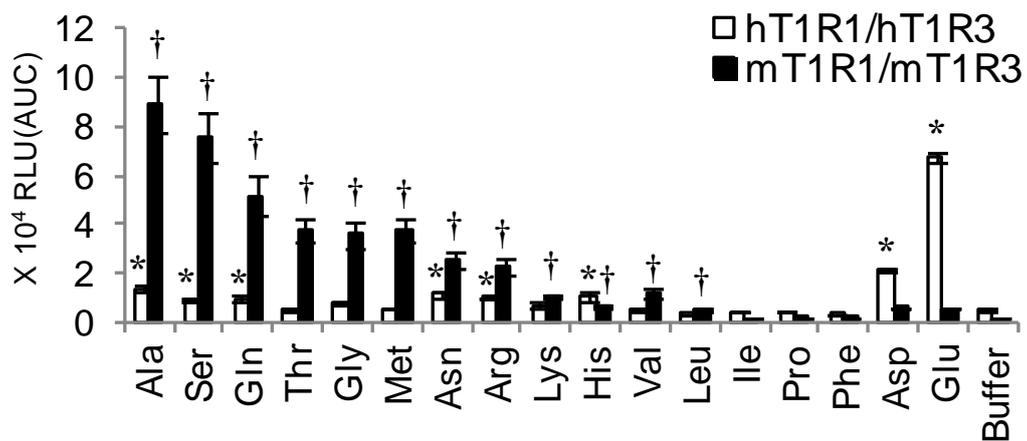


図 3-1 ヒト及びマウス旨味受容体のアミノ酸応答パターン

HEK293T 細胞に hT1R1/hT1R3 もしくは mT1R1/mT1R3 および rG15i2、mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、各 50 mM アミノ酸溶液添加時の発光強度変化を検出した。mean ± SEM、n=6。*, p<0.05 for hT1R1/hT1R3、†, p<0.05 for mT1R1/mT1R3 vs. Buffer (one-way ANOVA followed by Dunnett's test)。

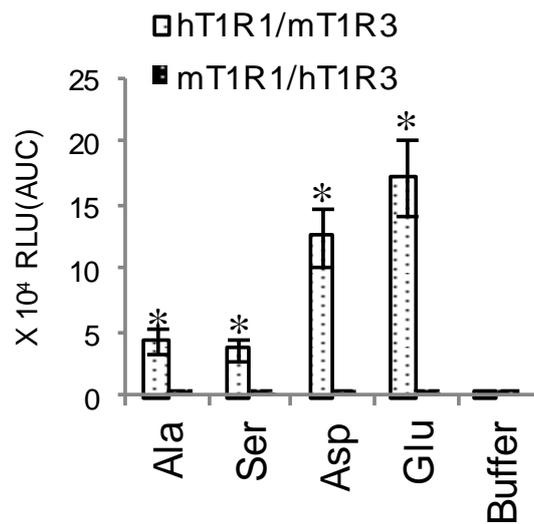
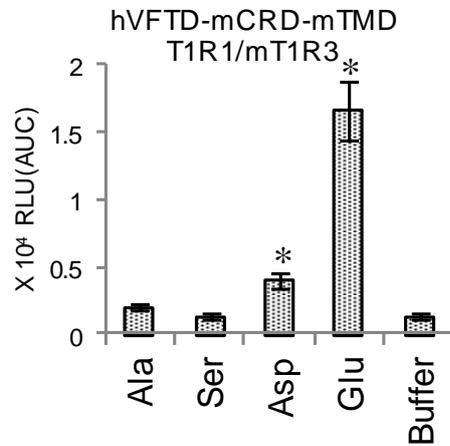


図 3-2 T1R1/T1R3 のアミノ酸応答パターンを決定するサブユニットの同定
 HEK293T 細胞に hT1R1/mT1R3 もしくは mT1R1/hT1R3 および rG15i2、mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、各 50 mM アミノ酸溶液添加時の発光強度変化を検出した。mean ± SEM、n=6。*, p<0.05 vs. Buffer (one-way ANOVA followed by Dunnett's test)。

A



B

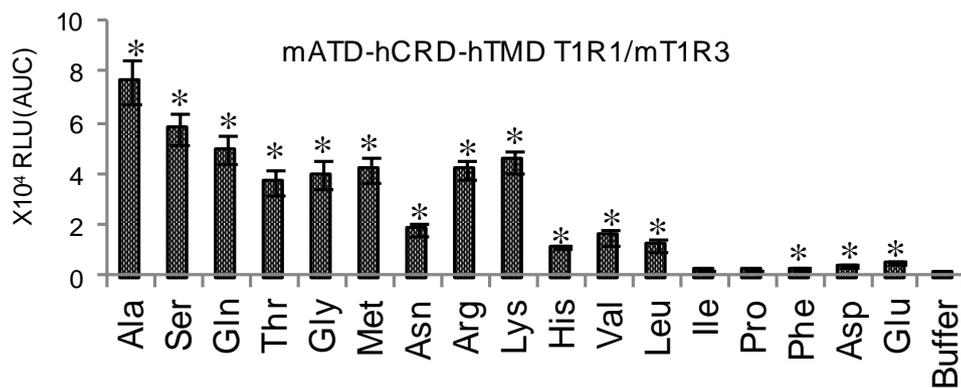


図 3-3 T1R1/T1R3 のアミノ酸応答パターンを決定するドメインの探索

HEK293T 細胞に hVFTD-mCRD-mTMD T1R1/mT1R3(A)もしくは mVFTD-hCRD-hTMD T1R1/mT1R3(B)および rG15i2、mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、各 50 mM アミノ酸溶液添加時の発光強度変化を検出した。mean ± SEM、n=5-6。*, p<0.05 vs. Buffer (one-way ANOVA followed by Dunnett's test)。

```

hT1R1 1 MLLCTAR-LVGLQLLISCCWAFACHSTESSPDFTLPGDYLLAGLFPLHSG 49
mT1R1 1 MLFWAAHL LLSLQLAVAYCWAFCQRTESSPGFSLPGDFLLAGLFSLHAD 50

hT1R1 50 CLQVRHRPEVTLCDRS CSFNEHG YHLFQAMRLGV EEEINNSTALLPNITLG 99
mT1R1 51 CLQVRHRPLVTS CDRSDSFNGHG YHLFQAMRFTV EEEINNSTALLPNITLG 100

hT1R1 100 YQLYDVCSDSANVYATLRVLSLPGQH HIELQGDLLHYSPTVLAVIGPDST 149
mT1R1 101 YELYDVCSESSNVYATLRVLAQQGTG HLEMQRDLRNHSSKVVALIGPDNT 150

hT1R1 150 NRAATTAALLSPFLVPMISYAA SSETLSVKRQYPSFLRTIPNDKYQVE TM 199
mT1R1 151 DHAVTTAALLSPFLMPLVSYEAS SVILSGKRKFPSFLRTIPSDKYQVEVI 200

hT1R1 200 VLLLQKFGWTWISLVGSSDDY GQLGVQALENQATGQGICIAFKDIMPFSA 249
mT1R1 201 VRLLOSFGVWVWISLVGSYGDY GQLGVQALEELATPRGICVAFKDVVPLSA 250

hT1R1 250 QVGDERMQCLMRHLAQAGATVV VVVFSSRQLARVFFESVVLTNLTGKVWVA 299
mT1R1 251 QAGDPRMQRMMLRLARARTTV VVVFVSNRHLAGVFFRSVVLANLTGKVWIA 300

hT1R1 300 SEAWALSRHITGVPGIQRIGM VLGVAIQKRAV PGLKAFEEAYARADKKAP 349
mT1R1 301 SEDWAISTYITNVPGIQGIGT VLGVAIQQRQV PGLKEFEESYVQAVMGAP 350

hT1R1 350 RPCHKGSWC SSNQLCRECQAFMAHTMP K LKAFS M S S A Y N A Y R A V Y A V A H G 399
mT1R1 351 RTCPEGSWCGTNQLCRECHAFT T W N M P E L G A F S M S A A Y N V Y E A V Y A V A H G 400

hT1R1 400 LHQLLGCASGACSRGRVYPWQLLEQ I H K V H F L L H K D T V A F N D N R D P L S S Y 449
mT1R1 401 LHQLLGCTSGTCARGPVYPWQLLQ Q I Y K V N F L L H K K T V A F D D K G D P L G Y Y 450

hT1R1 450 NIIAWDWN GPKWTF T V L G S S T W S P V Q L N I N E T K I Q W H G K D N Q V P K S V 496
mT1R1 451 DIIAWDWN GPEWTF E V I G S A S L S P V H L D I N K T K I Q W H G K N N Q V P V S V 497

```

図 3-4 hT1R1 と mT1R1 の VFTD におけるアミノ酸配列のアライメント

作製したヒト - マウスキメラの境界部を矢尻で、先行研究(31)により同定された L-Glu の結合に重要な残基 (Thr-149、Ser-172、Asp-192、Tyr-220、Glu-301) を黄色で示した。

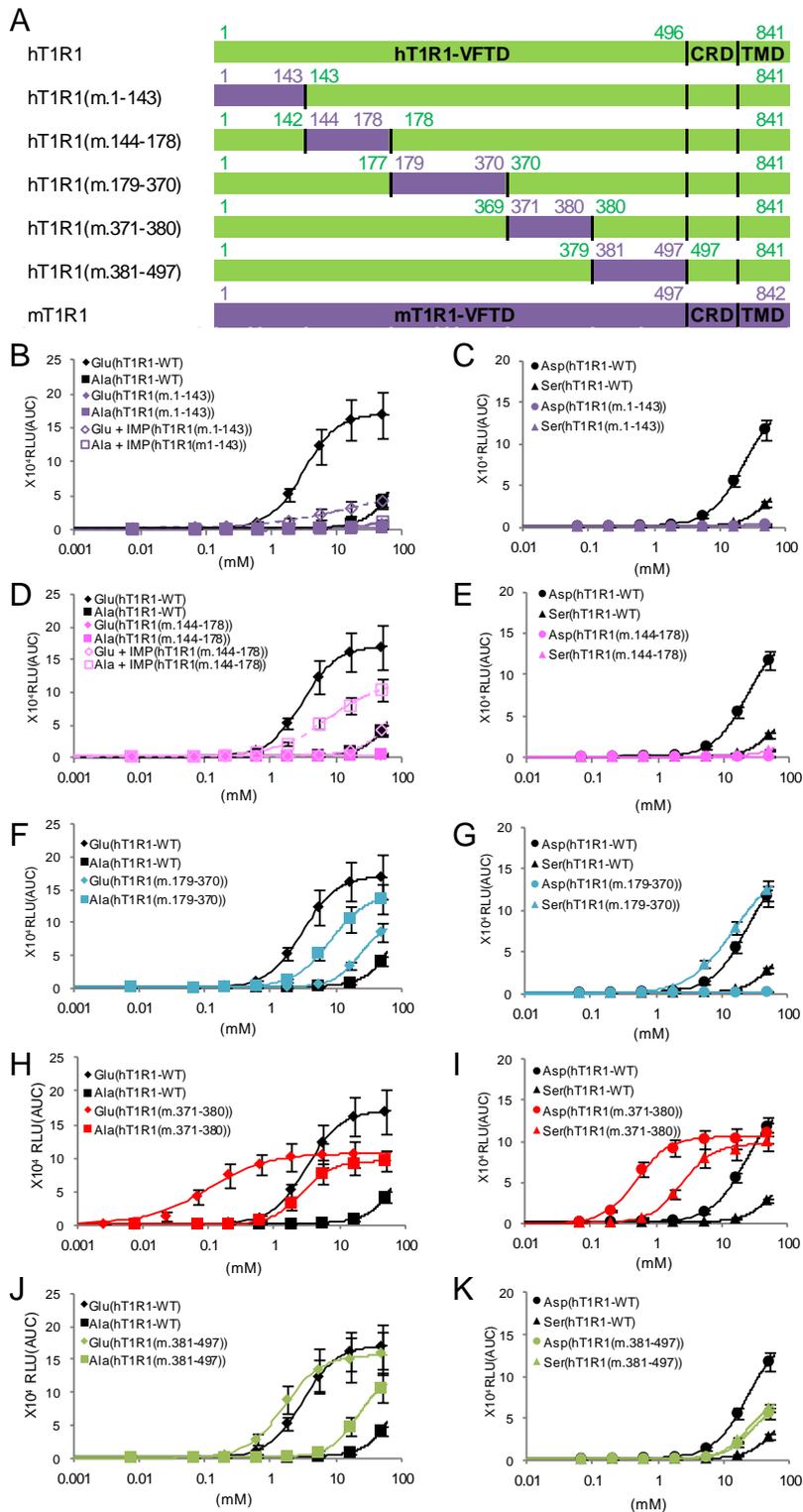


図 3-5 ヒト-マウスキメラ T1R1 のアミノ酸応答の評価

(A)ヒト-マウスキメラ T1R1 のコンストラクトの模式図。hT1R1 の配列を緑色、mT1R1 の配列を紫色で示した。例えば、hT1R1(m.1-143)はアミノ酸残基 1-143 番が mT1R1 の残基から、残りの残基が hT1R1 の残基から構成される。アミノ酸配列のアライメントは図 3-8B に示した。(B-K)各ヒト-マウスキメラ T1R1/mT1R3 発現細胞の L-Glu および L-Ala(B、D、F、H、J)もしくは L-Asp および L-Ser(C、E、G、I、K)に対する濃度応答曲線。

mean±SEM、n=5-6

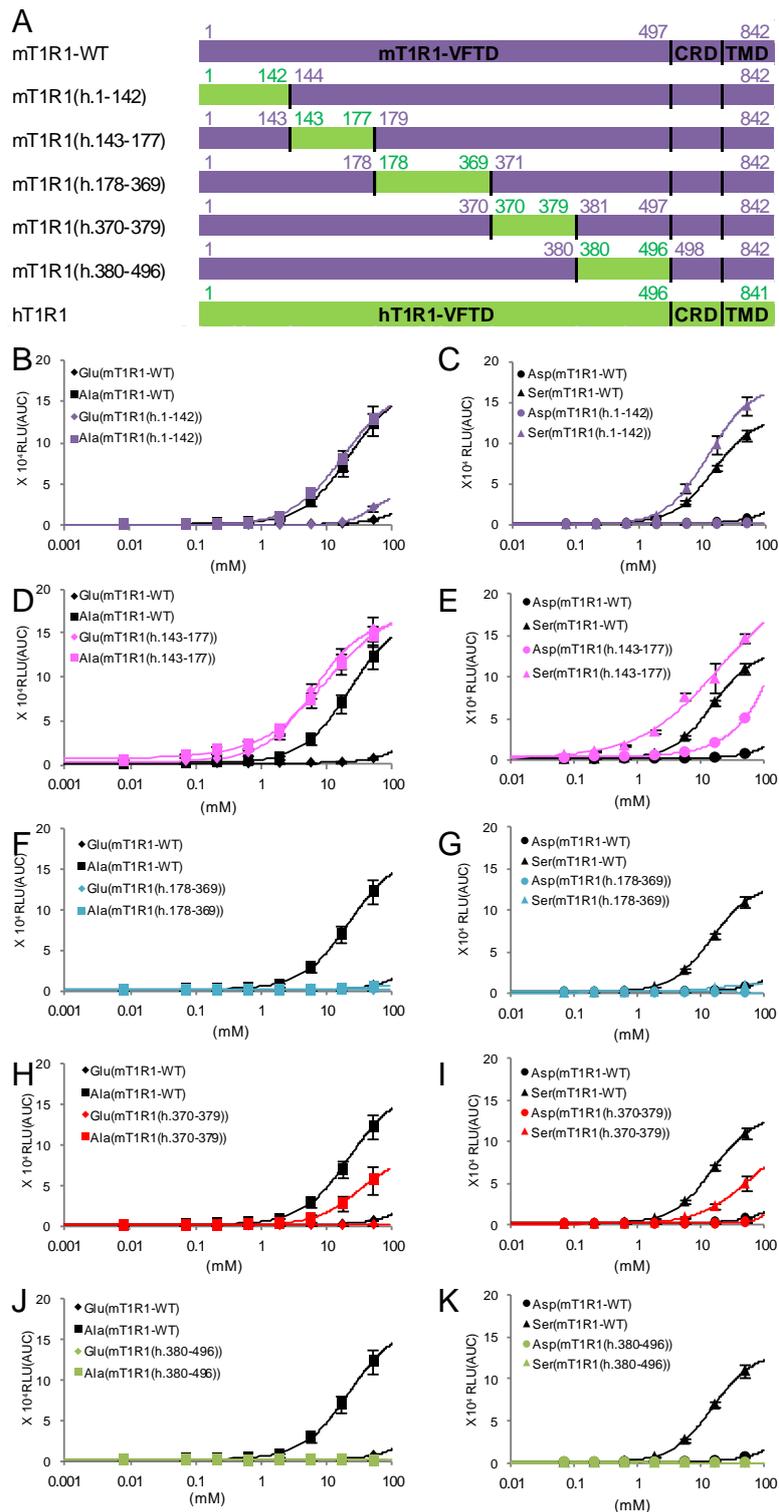


図 3-6 マウス - ヒトキメラ T1R1 のリガンド特異性の評価

(A)マウス - ヒトキメラ T1R1 のコンストラクトの模式図。hT1R1 の配列を緑色、mT1R1 の配列を紫色で示した。アミノ酸配列のアライメントは図 3-8B に示した。

(B-K)各マウス - ヒトキメラ T1R1/mT1R3 発現細胞の L-Glu および L-Ala(B、D、F、H、J)もしくは L-Asp および L-Ser(C、E、G、I、K)に対する濃度応答曲線。

mean±SEM、n=5-6。

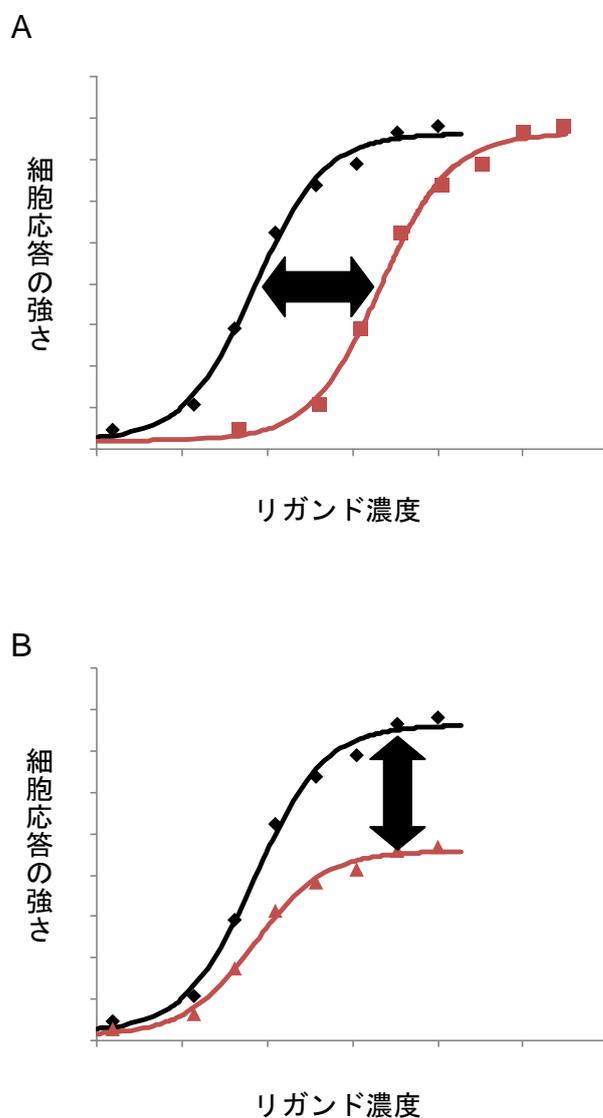


図 3-7 potency と efficacy

受容体アッセイにおける濃度応答関係を模式的に示した。

- (A) potency (用量効果) はリガンドと受容体の親和性の指標である。potency が異なる場合、受容体の活性化に必要なリガンド濃度に差が生じるため、濃度応答曲線は左右にずれる。
- (B) efficacy (最大効力) はリガンドが受容体をどれだけ活性化したかを示す指標である。efficacy が異なる場合、最大応答に差が生じるため、濃度応答曲線は上下にずれる。

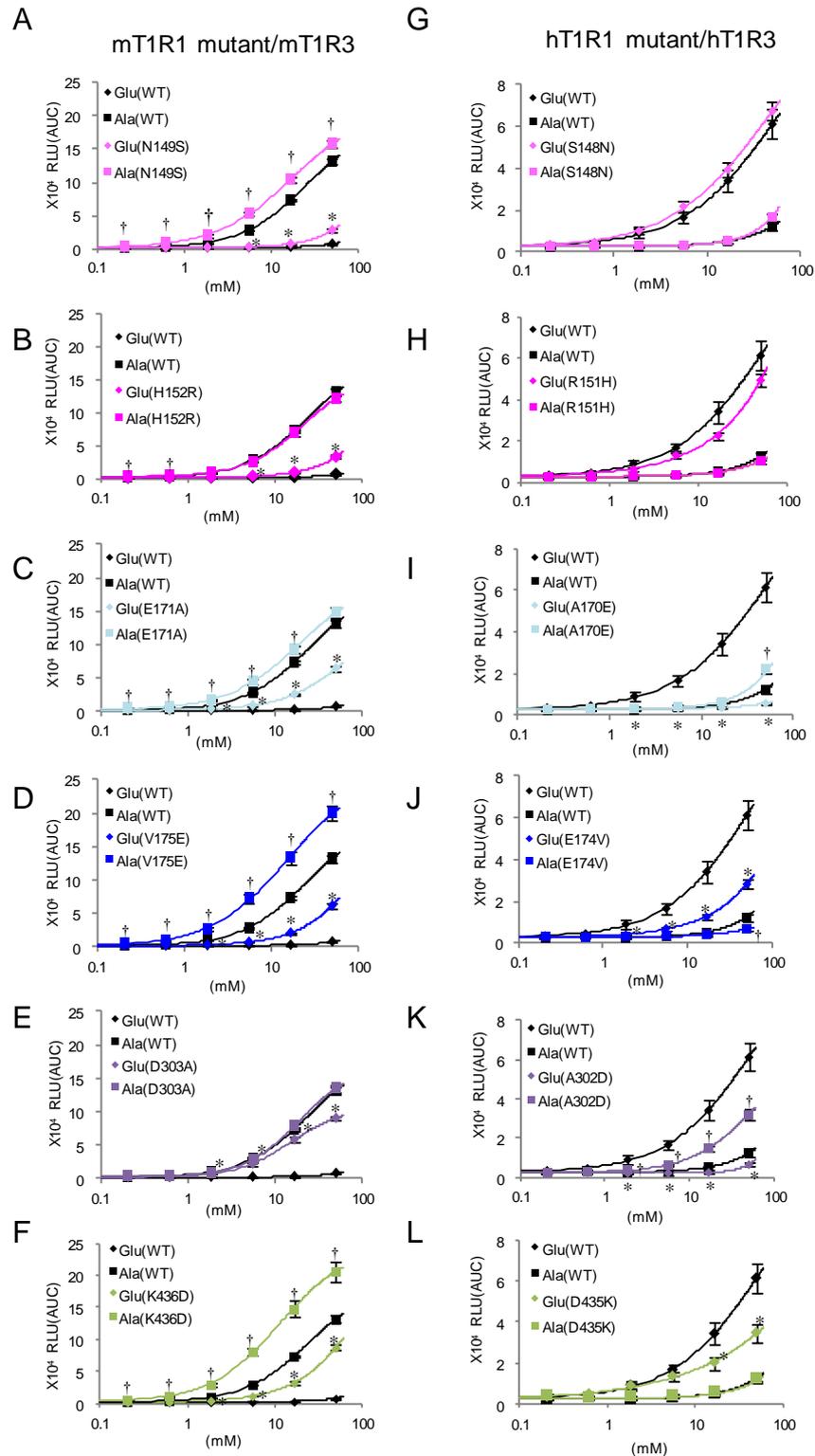


図 3-8 酸性アミノ酸受容に重要な残基

(A-F)mT1R1-1 点変異体発現細胞の L-Glu および L-Ala に対する濃度応答曲線。

(G-L)hT1R1-1 点変異体発現細胞の L-Glu および L-Ala に対する濃度応答曲線。

mean \pm SEM, n=6-7. *, p<0.05 for L-Glu responses; †, p<0.05 for L-Ala responses (one-way ANOVA followed by Dunnett's test)。

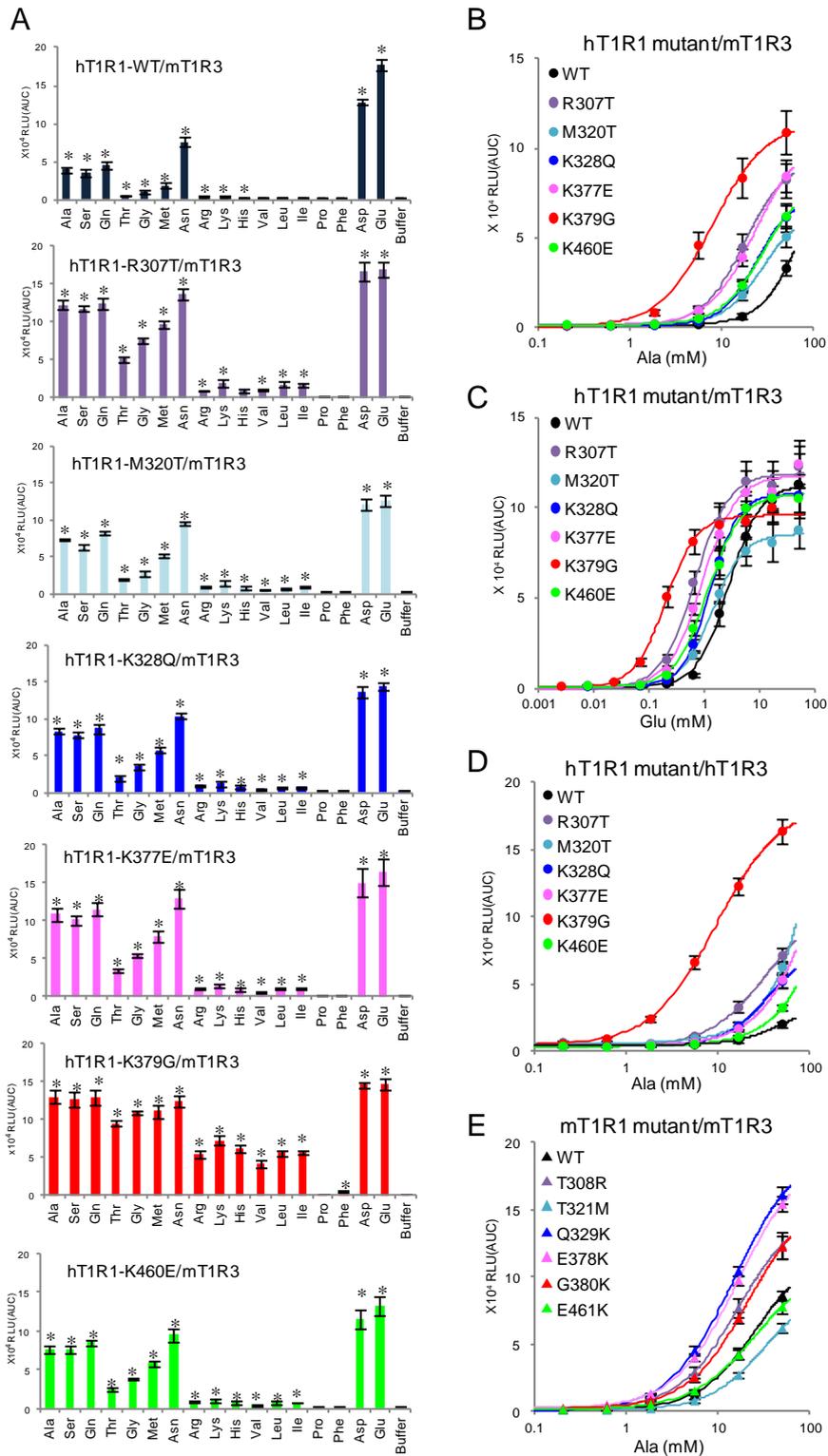


図 3-9 幅広いアミノ酸受容に重要な残基

(A)hT1R1-1 点変異体発現細胞のアミノ酸応答パターン。HEK293T 細胞に hT1R1-1 点変異体、mT1R3 および rG15i2、mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、各 50 mM アミノ酸溶液添加時の発光強度変化を検出した。

(B-E) hT1R1 または mT1R1-1 点変異体発現細胞の L-Glu および L-Ala に対する濃度応答曲線。mean±SEM、n=6-7。*, p<0.05 vs. Buffer (one-way ANOVA followed by Dunnett's test)。

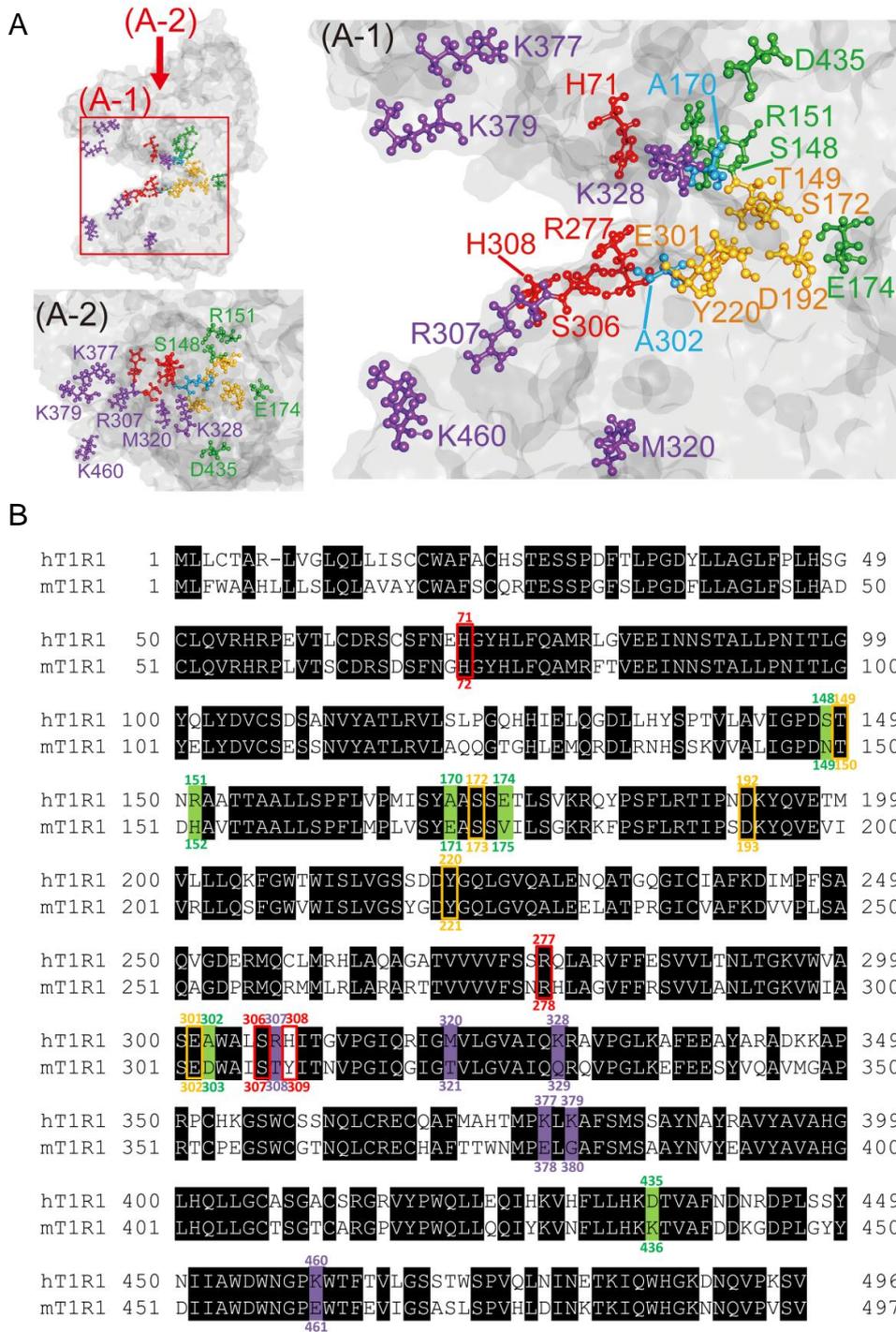


図 3-10 T1R1 のリガンド特異性の決定に寄与する残基

(A)hT1R1 の VFTD の分子モデル。蝶番部分が右側、入り口部分が左側。本研究で同定した酸性アミノ酸の受容に重要な 6 残基を緑色 (Ser-148、Arg-151、Glu-174、Asp-435) もしくは水色 (Ala-170、Ala-302)、幅広いアミノ酸に対する応答に重要な 6 残基 (Arg-307、Met-320、Lys-328、Lys-377、Lys-379、Lys-460) を紫色で示した。先行研究(31)により同定された、L-Glu の結合に重要な残基 (Thr-149、Ser-172、Asp-192、Tyr-220、Glu-301) を黄色、IMP の結合に重要な残基 (His-71、Arg-277、Ser-306、His-308) を赤色で示した。

(B)hT1R1 と mT1R1 の VFTD のアミノ酸配列アライメント。残基の配色は(A)と同様にした。

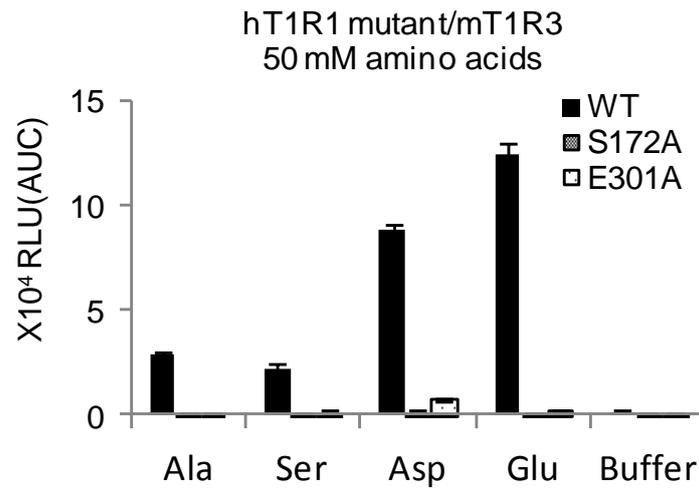


図 3-11 L-Glu 結合部位における Ala 変異体のアミノ酸応答

HEK293T 細胞に hT1R1-1 点変異体、mT1R3 および rG15i2、mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、各 50 mM アミノ酸溶液添加時の発光強度変化を検出した。mean±SEM、n=4。

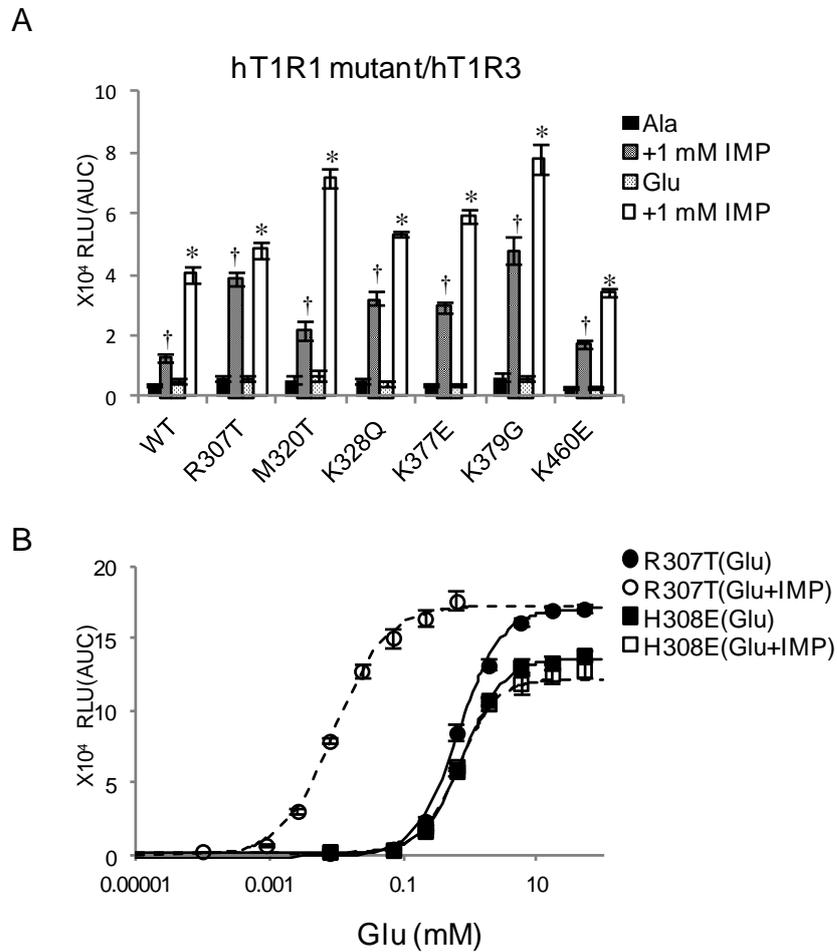


図 3-12 IMP 結合部位における活性型変異体 (hT1R1-H308E) との比較

(A)幅広いアミノ酸応答に重要な残基における hT1R1-1 点変異体の IMP 活性。HEK293T 細胞に hT1R1-1 点変異体、hT1R3、rG15i2 および mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、L-Ala もしくは L-Glu 溶液添加時の発光強度変化を IMP 存在下あるいは非存在下で測定した。用いた L-Glu 濃度は 1 (WT)、0.1 (R307T)、0.2 (M320T、K328Q、K377E、K460E)、0.01 (K379G) mM。L-Ala 濃度は 15 (WT)、5 (R307)、10 (M320T、K328Q、K377E、K460E)、1 (K379G) mM。
* $p < 0.05$ for L-Glu, † $p < 0.05$ for L-Ala vs. - IMP (Student's t-test)。

(B)IMP 結合部位における変異体 (H308E) と幅広いアミノ酸応答に重要な残基における変異体 (R307T) の IMP 活性の比較。各 hT1R1 変異体を mT1R3、rG15i2、mt-apo-clytin-II と共発現させ、L-Glu に対する濃度応答曲線を 1 mM IMP 存在下あるいは非存在下で測定した。hT1R1-R307T における $EC_{50(L-Glu)} = 0.7 \pm 0.1$ mM および $EC_{50(L-Glu + IMP)} = 0.008 \pm 0.002$ mM。hT1R1-H308E における $EC_{50(L-Glu)} = 0.7 \pm 0.1$ mM および $EC_{50(L-Glu + IMP)} = 0.8 \pm 0.1$ mM。
mean \pm SEM、 $n = 5-7$ 。

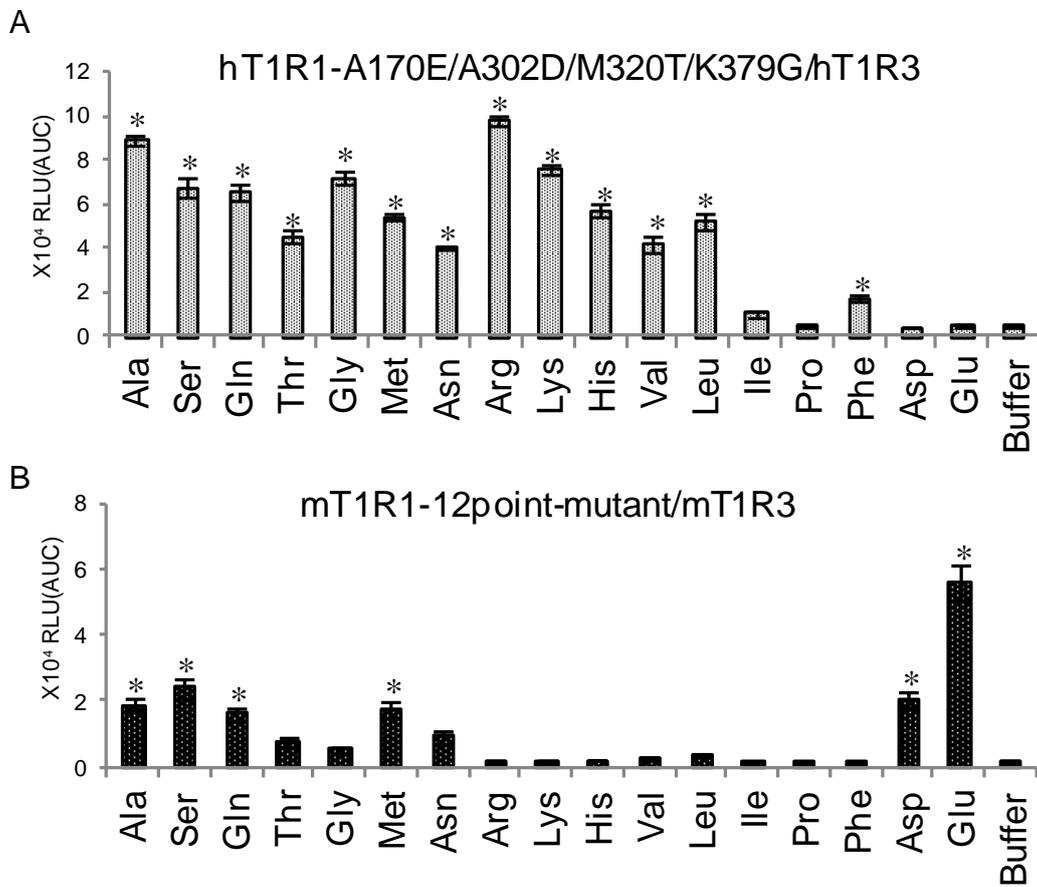


図 3-13 多重変異体のアミノ酸応答パターン

HEK293T 細胞に hT1R1-A170E/A302D/M320T/K379G/hT1R3 (A) もしくは mT1R1-N149S/H152R/E171A/V175E/D303A/T308R/T321M/Q329K/E378K/G380K/K436D/E461K/mT1R3 (B) および rG15i2、mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、各 50 mM アミノ酸溶液添加時の発光強度変化を測定した。mean ± SEM、n=6。*p<0.05 vs. Buffer (one-way ANOVA followed by Dunnett's test)。

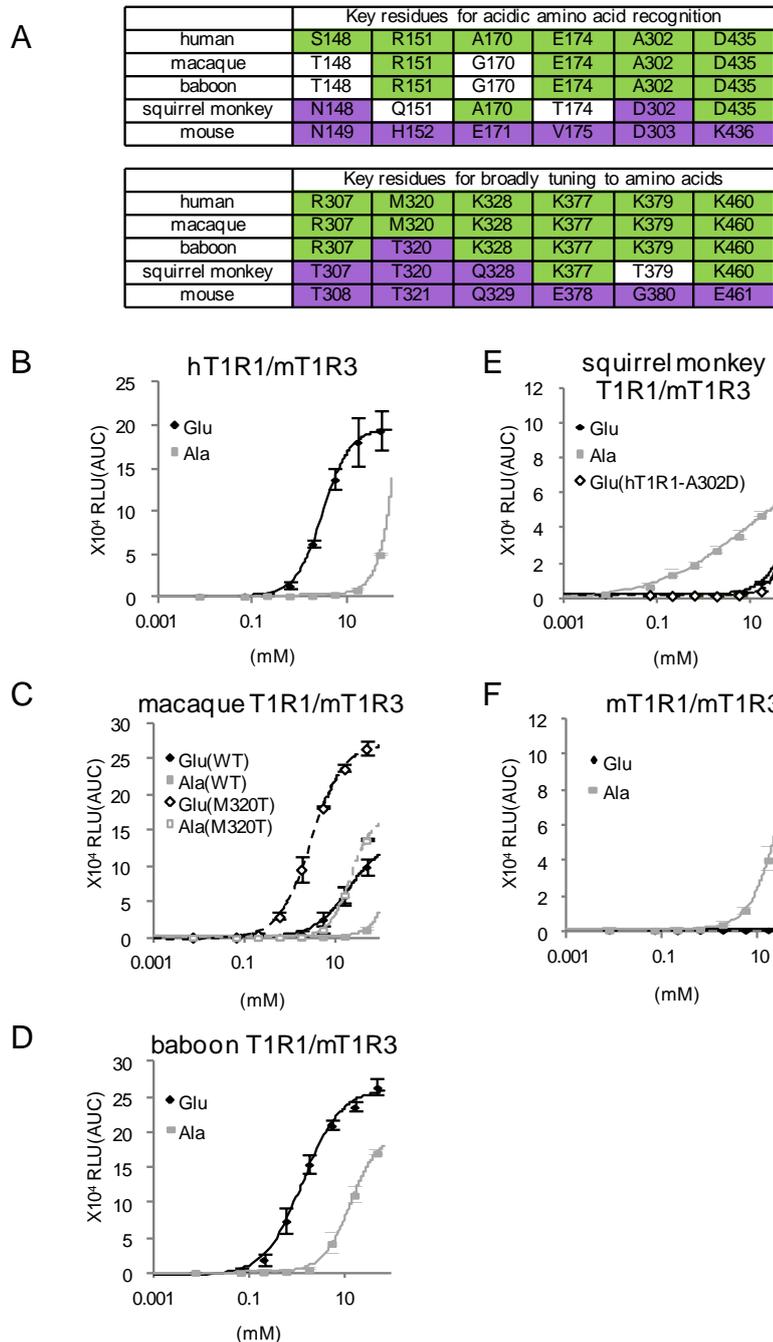


図 3-14 非ヒト霊長類 T1R1 における 12 個のアミノ酸残基とアミノ酸応答の比較

(A)ヒトおよびマウス T1R1 で同定したリガンド特異性の決定に重要な 12 残基と、対応する非ヒト霊長類 T1R1 のアミノ酸残基。hT1R1 と同一の残基を緑色、mT1R1 と同一の残基を紫色で示した。

(B-F)ヒト(B)、マカク(C)、ヒヒ(D)、リスザル(E)、マウス(F)の L-Glu および L-Ala に対する濃度応答曲線。変異体 (macaqueT1R1-M320T および hT1R1-A302D) の結果はそれぞれ C、E に点線で示した。mean \pm SEM、n=5。macaqueT1R1-M320T の $EC_{50(L-Glu)}=3.3 \pm 0.4$ mM、baboon T1R1 の $EC_{50(L-Glu)}=1.8 \pm 0.4$ mM。

表 3-1 hT1R1-1 点変異体の L-Glu に対する EC₅₀ 値および E_{max} 値の比較。
 mean ± SEM、n=5-7。*p<0.05; **p<0.01; and ***p<0.001 (one-way ANOVA
 followed by Dunnett's test)

	L-Glu	
	EC ₅₀ (mM)	E _{max} (X10 ⁴ RLU (AUC))
hT1R1-WT	2.7 ± 0.4	11.2 ± 1.6
R307T	0.7 ± 0.1***	12.0 ± 1.3
M320T	1.4 ± 0.1**	8.6 ± 1.0
K328Q	1.3 ± 0.1**	10.8 ± 1.0
K377E	0.9 ± 0.03**	11.9 ± 1.2
K379G	0.2 ± 0.01***	9.6 ± 1.0
K460E	1.2 ± 0.1**	10.7 ± 0.7

第4章

テアニンの旨味受容機構の解明

4-1. 序

L-テアニン (5-N-ethylglutamine) は茶特有に含まれるアミノ酸であり(67)、茶の味に重要な役割を果たしている。これまでに、ヒトの官能評価試験やマウスを用いた行動実験により、L-テアニンが旨味を有することが明らかになった(68, 69)。L-テアニンが L-Glu 誘導体であることや (図 4-1)、核酸との間で旨味の相乗効果が認められることから、L-テアニンの旨味は旨味受容体 T1R1/T1R3 を介して受容されると推察された。しかし、実際に L-テアニンの T1R1/T1R3 活性化能を評価した報告はなかった。そこで、本研究では第 2 章で構築した旨味評価系を用いて、L-テアニンの旨味受容メカニズムの解明を行った。

4-2. 材料と方法

材料

coelenterazine は Promega (Madison, WI) より、L-glutamic acid monosodium salt は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より、L-alanine は Kanto Chemical (Tokyo, Japan) より、IMP は Sigma (MO, USA) より、L-テアニンは Taiyo chemical (Mie, Japan) より購入した。アッセイバッファーは 10 mM HEPES、130 mM NaCl、10 mM glucose、5 mM KCl、2 mM CaCl₂ および 1.2 mM MgCl₂ で作製し、NaOH を用いて pH 7.4 に調整後、0.1% BSA (Sigma Aldrich) を添加して作製した。それぞれのサンプルはアッセイバッファーに希釈し、必要に応じて NaOH または HCl を用いて pH を 7.4 に調整した。

各種 (ヒト、マウス) 味覚受容体および点変異体発現用プラスミドの作製

hT1R1 (NCBI RefSeq number NM_138697.3)、hT1R3 (NM_152228.1)、mT1R1 (NM_031867.2)、mT1R3 (NM_031872.2)、hT1R1 および mT1R1 点変異体はコード領域を PCR 法により overlapping primer を用いて増幅し、5'末端に Kozak 配列を付加して、哺乳類細胞用発現ベクター pEAK10 (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) の *Asc I-Not I* サイトにサブクローニングした。リガンド結合部位を同定するために下記の 4 つの 1 点変異体を用いた: hT1R1-S172A、hT1R1-E301A、mT1R1-S173A および mT1R1-E302A。

細胞培養および遺伝子導入

HEK293T 細胞は 10% FBS (Invitrogen) を含む高グルコース濃度 (4.5 g/L) DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

発光検出法 (旨味評価系)

HEK293T 細胞に Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いて T1R1、T1R3、rG15i2、mt-apo-clytin-II 発現プラスミドを導入し、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。培養液には GlutaMAX (Invitrogen) および 10% FBS (Invitrogen) を含む低グルコース濃度 (1.0 g/L) DMEM (Sigma Aldrich) を用いた。遺伝子導入から 48 時間後に細胞を測定用 96 穴プレート (96-well black-walled CellBIND surface plate) へ撒き、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。その後は、第 2 章に記載の方法と同様の方法でサンプル添加時の発光強度変化の検出を行った。統計解析には解析ソフト Ky Plot version 3.0.を用いた。

Homology Modeling

hT1R1 のホモロジーモデルは鋳型に open form の mGluR1 (PDB ID: 1EWT)

を用いて MOE (Chemical Computing Group Inc.) により作製した。モデルの可視化には Discovery Studio Visualizer (Accelrys) を用いた。

4-3. 結果

4-3-1. L-テアニンの T1R1/T1R3 活性化能の評価

L-テアニンの T1R1/T1R3 活性化能を評価するために、hT1R1/hT1R3 もしくは mT1R1/mT1R3 を発現させた HEK293T 細胞へ L-テアニンを投与した際の発光値の変化を検出した。その結果、L-テアニンの添加により、hT1R1/hT1R3 および mT1R1/mT1R3 発現細胞で、L-テアニン濃度依存的な応答値の上昇が認められた (図 4-2)。更に、L-テアニンと IMP を同時に添加すると L-テアニン単独もしくは IMP 単独を添加した場合に比べ有意に発光値が上昇した。以上の結果から、L-テアニンが旨味受容体 T1R1/T1R3 の活性化能を有すること、および、IMP と相乗的に T1R1/T1R3 を活性化することが明らかになった。

4-3-2. L-テアニンの結合部位の同定

T1R1/T1R3 の 1 点変異体を用いて L-テアニンが既知のアミノ酸結合部位で受容されるのかを検証した。変異体には、第 3 章で用いたのと同様 (図 3-11)、T1R1 のオルソステリック部位の Ala 変異体 (hT1R1-S172A、hT1R1-E301A、mT1R1-S173A および mT1R1-E302A) を用いた (図 4-3A)。その結果、hT1R1-S172A、hT1R1-E301A、mT1R1-S173A、mT1R1-E302A の 4 つの変異体すべてで WT と比較して L-テアニン活性の低下が認められた (図 4-3, B-E)。よって、L-テアニンは T1R1 の VFTD に存在する既知のアミノ酸結合部位で受容されると考えられた。

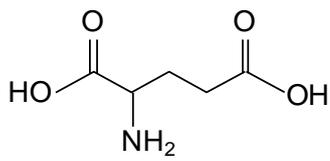
4-4. 考察

ヒトおよびマウスを用いた先行研究により、L-テアニンが旨味を含む複雑な呈味を有すること、L-テアニンと IMP の間で旨味の相乗効果が認められることが明らかになっていた(68, 69)。しかし、その味の受容メカニズムは明らかになっていなかった。そこで本章では、第2章にて構築した高感度旨味評価系を用いて、L-テアニンの T1R1/T1R3 活性化能の評価を行った。その結果、L-テアニンが T1R1/T1R3 活性化能を有することが明らかとなり、更に、IMP との同時添加により旨味受容体が相乗的に活性化されることも明らかになった (図 4-2)。このことから、ヒトの官能評価やマウスの行動実験で認められた L-テアニンの旨味感覚が T1R1/T1R3 を介していることが明らかとなった。

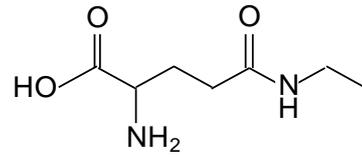
先行研究において、ヒトの L-テアニンの検知閾値は約 25 mM だった(68)。本研究においても、L-テアニンの hT1R1/hT1R3 活性化能の閾値は約 30 mM であり (図 4-2A および 4-3D)、ヒトの官能閾値と良く一致していた。また、先行研究において、L-テアニンと IMP の相乗効果はヒトよりもマウスで顕著な効果が認められていたが(68, 69)、この *in vivo* の結果と一致して、hT1R1/hT1R3 よりも mT1R1/mT1R3 の方が IMP 添加時の L-テアニン応答の増強効果が大きかった (図 4-2)。

Class C GPCR は複数のリガンド結合部位を有することが知られており(70)、T1R1/T1R3 においても VFTD および TMD に複数のリガンド結合部位が存在することが明らかになっている。先行研究により、T1R1-VFTD の蝶番部分における Ala 変異体 (hT1R1-S172A および hT1R1-E301A) で酸性アミノ酸、L-Ala および L-Ser 活性が低下することが明らかになり(31) (図 3-11)、様々なアミノ

酸がこの蝶番部分に結合し受容されると考えられた。そこで、hT1R1-S172A および hT1R1-E301A の L-テアニン応答を測定したところ、これらの変異体では L-テアニン活性も低下することが明らかになった (図 4-3, B および D)。また、これら 2 つの変異体に対応する mT1R1 変異体 (mT1R1-S173A および mT1R1-E302A) においても同様に L-テアニン活性の低下が認められた (図 4-3, C および E)。以上の結果から、L-テアニンも T1R1-VFTD に存在する既知の L-アミノ酸結合部位で受容されることが明らかになった。



Glutamic acid



Theanine

図 4-1 L-Glu および L-テアニンの構造式

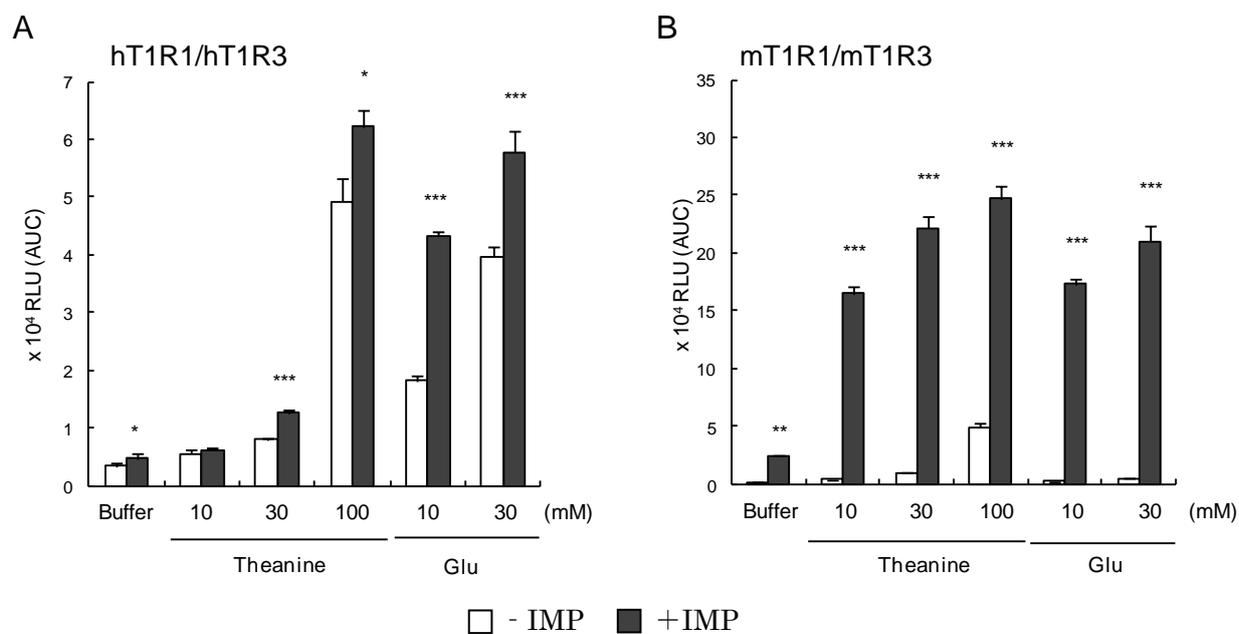


図 4-2 L-テアニンの旨味受容体活性化能の評価

HEK293T 細胞に hT1R1/hT1R3(A) もしくは mT1R1/mT1R3(B) および rG15i2、mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、各濃度の L-テアニンもしくは L-Glu 添加時の発光強度変化を 1 mM IMP 存在下あるいは非存在下で測定した。mean ± SEM、n=4、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001 (Student's t-test)。

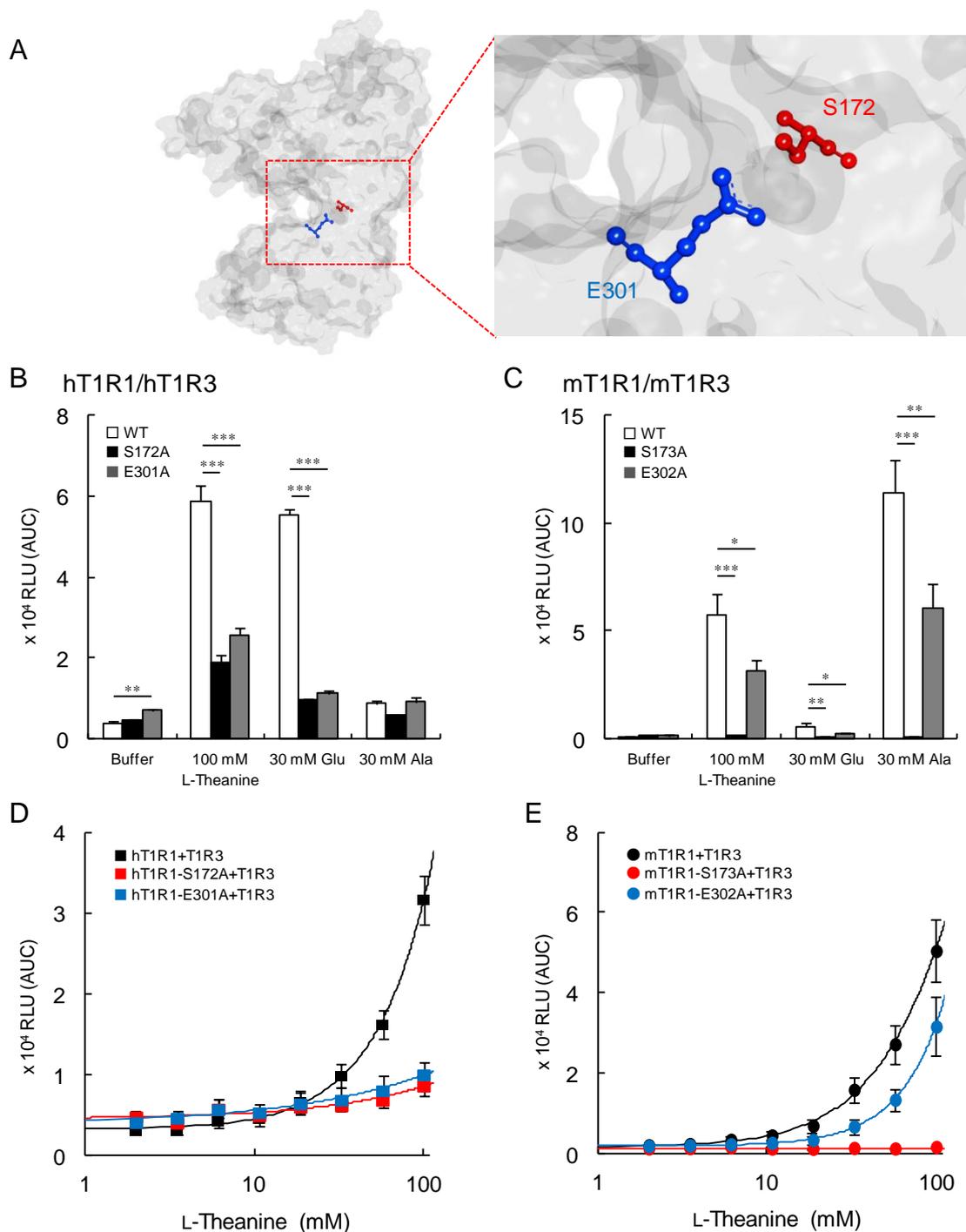


図 4-3 L-テアニン結合部位の同定

(A)hT1R1-VFTD の分子モデル。変異を導入した残基を赤色 (S172) もしくは青色 (E301) で示した。

(B, C)HEK293T 細胞に野生型もしくは 1 点変異体 hT1R1/hT1R3(B)または mT1R1/mT1R3(C) および rG15i2、mt-apo-clytin-II を発現させ、100 mM L-テアニン、30 mM L-Glu もしくは 30 mM L-Ala 添加時の発光強度変化を検出した。

(D, E) 野生型もしくは 1 点変異体 hT1R1/hT1R3(D)または mT1R1/mT1R3(E)発現細胞の L-テアニンに対する濃度応答曲線。

mean±SEM、n=4-6、*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001 (Dunnett's t-test)。

第5章

総合討論と今後の展望

5-1. 発光検出法を用いた味覚評価系

本研究では、味覚受容体を用いた客観的味評価系に発光検出法を導入することに成功した。これまでに、第2章で示した甘味受容体、旨味受容体の評価系に加え、複数の苦味受容体や辛味受容体 TRPV1 の評価系においても発光検出法の利用が可能であることを確認している。発光検出系は蛍光を有するサンプルの測定にも利用可能なことから、評価可能なサンプルの幅が広がり、新しい味覚修飾物質の発見や味覚修飾メカニズムの解明の一助になることが期待される。

特に、今回、高感度かつハイスループットな旨味評価系の開発に成功したことの意味は大きい。甘味物質としては様々な天然物・人工物が知られ、産業にも利用されてきた一方で、旨味受容体の活性化剤は天然物ではL-アミノ酸および核酸、人工物では S807 ぐらいしか知られているものがない(31)。本研究で開発した旨味評価系が、新たな旨味修飾物質の発見に貢献することを期待したい。

5-2. T1R1/T1R3 のリガンド特異性の決定に関する法則

第3章で提唱した T1R1/T1R3 のリガンド特異性の決定に関する法則はヒトとマウスのみならず、3種の非ヒト霊長類の受容体でも適応可能であることが確かめられた。このことは、様々な動物の T1R1 について、キーとなる 12 のアミノ酸残基を確認するだけでアミノ酸応答パターンの大まかな予測が可能であることを示唆している。つまり、既にゲノムデータベース上に遺伝子配列が登録されている動物種についてはその配列情報を確認するだけで、嗜好性のアミノ酸を予測することが可能である。ネコやイヌなどの愛玩動物、もしくはブタ、ウシ、ウマなどの家畜の T1R1/T1R3 のアミノ酸応答パターンの予測は、ペット

フードや飼料開発など産業への貢献も期待できる。

5-3. T1R1/T1R3 の機能解明の意義と発光検出系の貢献

味覚受容体の機能と食性には深い関わりがある。我々は既に発光検出系の利用により、鳥類の一種であるハチドリは T1R1/T1R3 が食性に見合う新しい機能を獲得したことを明らかにした(71)。鳥類の食物は穀物、小動物、昆虫など多様性に富んでいる。その中で、ハチドリは花の蜜を主食にすることで知られる。ハチドリには、現在 300 以上の種が確認されているが、この種の繁栄には花蜜食という他の鳥類とは別の食性を獲得したことが貢献したと考えられている(72)。しかし、ニワトリ、シチメンチョウ、ゼブラフィンチのゲノム解析により、これらの鳥類が甘味受容体の構成因子 T1R2 をコードする *Tas1r2* 遺伝子を欠失していることが明らかになり(73)、鳥類は甘味を感じることができないと考えられてきた。そのため、甘味受容体がないはずのハチドリがどうやって花蜜の味を感知しているのかは謎だった。そこで、我々は鳥類における *Tas1r* 遺伝子の探索と味覚受容体の機能解析を行い、ハチドリの糖の受容機構の解明に取り組んだ。その結果、穀物食のニワトリや、昆虫食のアマツバメの T1R1/T1R3 がアミノ酸に応答する一方で、ハチドリにおいては T1R1/T1R3 が sucrose などの甘味物質の受容能を獲得していることを明らかにした(図 5-1)。更に、ハチドリとニワトリのキメラ T1R1/T1R3 の機能解析を行うことで、ハチドリ T1R1/T1R3 は T1R1 と T1R3 両方に広がる複数の変異の末、祖先が失った糖を感知する能力を再び獲得したことが明らかになった。この発見は、まさに発光検出系による高感度かつハイスループットな T1R1/T1R3 の機能解析技術がなければ成し得ないものだった。

哺乳類においても食性と味覚受容体レパトリーとの相関が認められている。例えば、ネコ、アシカ、オットセイ、ハイエナ、カワウソなどの肉食動物は *Tas1r2* 遺伝子が偽遺伝子化しており、実際にネコやオットセイでは甘味物質に対する嗜好性を失っていることが行動実験からも確認されている(74)。また、肉食から竹食へ転向したジャイアントパンダでは旨味受容体の構成因子 **T1R1** をコードする *Tas1r1* 遺伝子の偽遺伝子化が知られている(75)。これらは生存に必要でなくなった **T1R** の退化の例だと考えられており、哺乳動物の食行動の決定においても **T1R** が重要な役割を果たしていることを示唆している。ヒトの食行動に照らし合わせてみても、世界中で醤油やトマト、チーズなどの L-Glu を豊富に含む食材を調理に用いてきたことと(76)、ヒトが酸性アミノ酸特化型の **T1R1/T1R3** を有していることには関わりがあるのではないかと想像される。

更に、近年では口腔内以外に発現する味覚受容体の機能にも注目が集められている(65)。**T1R1/T1R3** の味覚受容以外の機能は未だ明確になっていないが、果たしてリガンドの変化がもたらす影響が味感覚の変化のみに留まるのか、その他の重要な生理作用の違いを引き起こしているのかについては興味深い。もし **T1R1/T1R3** が、単なるタンパク源を感知するためのセンサーなのであれば、マウス **T1R1/T1R3** のように幅広いアミノ酸を認識できる受容体の方が優位のように思われる。なぜ、ヒトの受容体は必須アミノ酸でもない酸性アミノ酸に特化した受容能を有するのだろうか。**T1R1/T1R3** の受容するアミノ酸の種類には、霊長類間でも多様性があることが今回、明らかになった(図 3-14)。いつから、どうして、酸性アミノ酸特化型の **T1R1/T1R3** を有する霊長類が出現したのか。今後、発光検出系を用いて様々な動物種の **T1R1/T1R3** のリガンドの変化と生態について包括的な視点で調べていくことで、このような問いに対する解決の糸口が見つかるのではないかと考えている。発光検出系の利用により、旨味

受容体の知られざる機能が解明されることに期待したい。

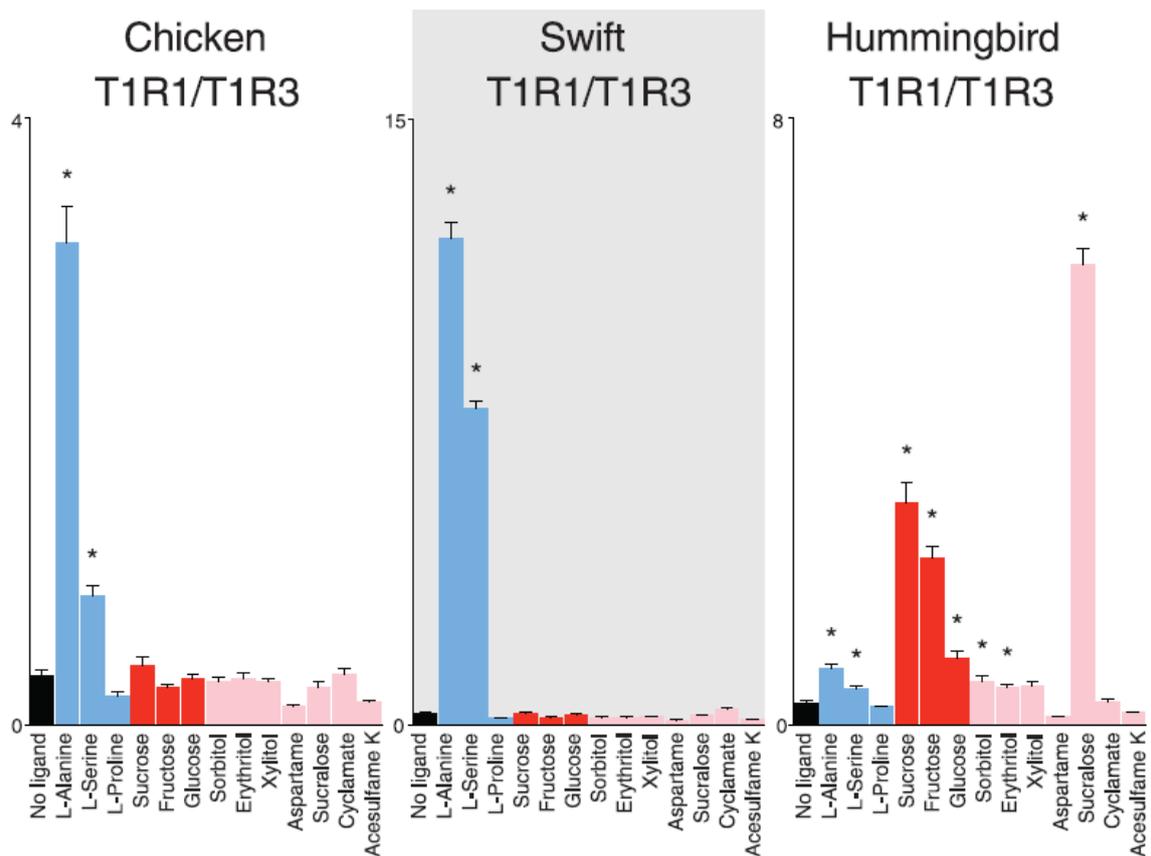


図 5-1 鳥類 T1R1/T1R3 の応答の比較

左から、ニワトリ、アマツバメ、ハチドリ T1R1/T1R3 の応答パターン。HEK293T 細胞に各種 T1R1/T1R3 および mG15、mt-apo-clytin-II を一過的に発現させ、100 mM リガンド溶液 (aspartame のみ 15 mM) 添加時の発光強度変化を検出した。mean±SEM、n=6。*, p<0.05 (Welch's t-tests and followed by the Holm adjustment for multiple comparisons ($\alpha=0.05$))。Baldwin et al., *Science*, 2014 (71)より抜粋。

参考文献

1. Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, & Zuker CS (2006) *Nature* **444**, 288-294.
2. Hellekant G & Danilova V (1996) *Food Chemistry* **56**, 323-328.
3. Li X, Glaser D, Li W, Johnson WE, O'Brien SJ, Beauchamp GK, & Brand JG (2009) *J Hered* **100 Suppl 1**, S90-100.
4. Laska M & Hernandez Salazar LT (2004) *J Exp Zool A Comp Exp Biol* **301**, 898-905.
5. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, & Adler E (2002) *Proc Natl Acad Sci U SA* **99**, 4692-4696.
6. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, & Zuker CS (2002) *Nature* **416**, 199-202.
7. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, & Zuker CS (2001) *Cell* **106**, 381-390.
8. Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, & Zuker CS (2003) *Cell* **115**, 255-266.
9. Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, & Zuker CS (2000) *Cell* **100**, 693-702.
10. Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, & Ryba NJ (2000) *Cell* **100**, 703-711.
11. Matsunami H, Montmayeur JP, & Buck LB (2000) *Nature* **404**, 601-604.
12. Behrens M & Meyerhof W (2006) *Cell Mol Life Sci* **63**, 1501-1509.
13. Hayakawa T, Suzuki-Hashido N, Matsui A, & Go Y (2014) *Mol Biol Evol* **31**, 2018-2031.
14. Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ, & Zuker CS (2006) *Nature* **442**, 934-938.
15. Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, & Matsunami H (2006) *Proc Natl Acad Sci U SA* **103**, 12569-12574.
16. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, & Zuker CS (2010) *Nature* **464**, 297-301.
17. Imada T, Misaka T, Fujiwara S, Okada S, Fukuda Y, & Abe K (2010) *Biochem Biophys Res Commun* **397**, 220-225.
18. Koizumi A, Tsuchiya A, Nakajima K, Ito K, Terada T, Shimizu-Ibuka A, Briand L, Asakura T, Misaka T, & Abe K (2011) *Proc Natl Acad Sci U SA* **108**, 16819-16824.
19. Ikeda K (2002) *Chem Senses* **27**, 847-849.
20. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y, & Margolskee RF (2003) *Science* **301**, 850-853.

21. Kusuhara Y, Yoshida R, Ohkuri T, Yasumatsu K, Voigt A, Hubner S, Maeda K, Boehm U, Meyerhof W, & Ninomiya Y (2013) *J Physiol* **591**, 1967-1985.
22. Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Kawano S, Shigemoto R, & Toyoshima K (2003) *Cell Tissue Res* **313**, 29-35.
23. Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Harada H, Morotomi T, Kawano S, Shigemoto R, & Toyoshima K (2002) *Arch Histol Cytol* **65**, 91-96.
24. San Gabriel A, Uneyama H, Yoshie S, & Torii K (2005) *Chem Senses* **30 Suppl 1**, i25-26.
25. Chaudhari N, Landin AM, & Roper SD (2000) *Nat Neurosci* **3**, 113-119.
26. Chaudhari N, Yang H, Lamp C, Delay E, Cartford C, Than T, & Roper S (1996) *J Neurosci* **16**, 3817-3826.
27. Pin JP, Galvez T, & Prezeau L (2003) *Pharmacol Ther* **98**, 325-354.
28. Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, & Morikawa K (2000) *Nature* **407**, 971-977.
29. Muto T, Tsuchiya D, Morikawa K, & Jingami H (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3759-3764.
30. Lopez Cascales JJ, Oliveira Costa SD, de Groot BL, & Walters DE (2010) *Biophys Chem* **152**, 139-144.
31. Zhang F, Klebansky B, Fine RM, Xu H, Pronin A, Liu H, Tachdjian C, & Li X (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20930-20934.
32. Li X (2009) *Am J Clin Nutr* **90**, 733S-737S.
33. Jiang P, Ji Q, Liu Z, Snyder LA, Benard LM, Margolskee RF, & Max M (2004) *J Biol Chem* **279**, 45068-45075.
34. Koizumi A, Nakajima K, Asakura T, Morita Y, Ito K, Shmizu-Ibuka A, Misaka T, & Abe K (2007) *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 585-589.
35. Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M, & Li X (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14258-14263.
36. Urwyler S (2011) *Pharmacol Rev* **63**, 59-126.
37. Masuda K, Koizumi A, Nakajima K, Tanaka T, Abe K, Misaka T, & Ishiguro M (2012) *PLoS One* **7**, e35380.
38. Shimomura O & Johnson FH (1975) *Nature* **256**, 236-238.
39. Tsuji FI, Inouye S, Goto T, & Sakaki Y (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8107-8111.
40. Shimomura O, Johnson FH, & Saiga Y (1962) *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.
41. Shimomura O, Johnson FH, & Saiga Y (1963) *J Cell Physiol* **62**, 1-8.
42. Inouye S & Tsuji FI (1993) *FEBS Lett* **315**, 343-346.

43. Shimomura O & Shimomura A (1985) *Biochem J* **228**, 745-749.
44. Campbell AK (1974) *Biochem J* **143**, 411-418.
45. Morin JG & Hastings JW (1971) *J Cell Physiol* **77**, 305-312.
46. Morin JG & Hastings JW (1971) *J Cell Physiol* **77**, 313-318.
47. Inouye S (2008) *J. Biochem.* **143**, 711-717.
48. Dupriez VJ, Maes K, Le Poul E, Burgeon E, & Detheux M (2002) *Receptors Channels* **8**, 319-330.
49. Jones B, Holskin B, Meyer S, Ung T, Dupriez V, Flores SY, Burgeon E, Ator M, & Duzic E (2010) *Anal. Biochem.* **400**, 184-189.
50. Ungrin MD, Singh LM, Stocco R, Sas DE, & Abramovitz M (1999) *Anal. Biochem.* **272**, 34-42.
51. Rizzuto R, Duchen MR, & Pozzan T (2004) *Sci STKE* **2004**, re1.
52. Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, & Pozzan T (1992) *Nature* **358**, 325-327.
53. Bovolenta S, Foti M, Lohmer S, & Corazza S (2007) *J. Biomol. Screen.* **12**, 694-704.
54. Stables J, Green A, Marshall F, Fraser N, Knight E, Sautel M, Milligan G, Lee M, & Rees S (1997) *Anal. Biochem.* **252**, 115-126.
55. Shimomura O, Inouye S, Musicki B, & Kishi Y (1990) *Biochem. J.* **270**, 309-312.
56. Shimomura O, Musicki B, & Kishi Y (1989) *Biochem. J.* **261**, 913-920.
57. Liu B, Ha M, Meng XY, Kaur T, Khaleduzzaman M, Zhang Z, Jiang P, Li X, & Cui M (2011) *J Neurosci* **31**, 11070-11076.
58. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, & Lipman DJ (1990) *J Mol Biol* **215**, 403-410.
59. Kawai M, Sekine-Hayakawa Y, Okiyama A, & Ninomiya Y (2012) *Amino Acids* **43**, 2349-2358.
60. Roura E, Humphrey B, Klasing K, & Swart M (2011) *Flavour and Fragrance Journal* **26**, 282-285.
61. Wellendorph P & Brauner-Osborne H (2009) *Br J Pharmacol* **156**, 869-884.
62. Madsen U, Bräuner-Osborne H, Greenwood J, Johansen T, Krogsgaard-Larsen P, Liljefors T, Nielsen. M, & Frølund. B (2005) *Drug Discovery Handbook*, 797-907.
63. Jiang P, Cui M, Zhao B, Snyder LA, Benard LM, Osman R, Max M, & Margolskee RF (2005) *J Biol Chem* **280**, 34296-34305.
64. Finger TE & Kinnamon SC (2011) *F1000 Biol Rep* **3**, 20.
65. Wauson EM, Zaganjor E, Lee AY, Guerra ML, Ghosh AB, Bookout AL, Chambers CP, Jivan A, McGlynn K, Hutchison MR, *et al.* (2012) *Mol Cell* **47**, 851-862.
66. Yamamoto K & Ishimaru Y (2012) *Semin Cell Dev Biol.*
67. Sakato Y (1949) *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **23**, 262-267.

68. Narukawa M, Morita K, & Hayashi Y (2008) *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 3015-3017.
69. Narukawa M, Morita K, Uemura M, Kitada R, Oh SH, & Hayashi Y (2011) *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 2125-2131.
70. Conigrave AD & Hampson DR (2010) *Pharmacol Ther* **127**, 252-260.
71. Baldwin MW, Toda Y, Nakagita T, O'Connell MJ, Klasing KC, Misaka T, Edwards SV, & Liberles SD (2014) *Science* **345**, 929-933.
72. McGuire JA, Witt CC, Remsen JV, Jr., Corl A, Rabosky DL, Altshuler DL, & Dudley R (2014) *Curr Biol* **24**, 910-916.
73. Feng P & Zhao H (2013) *Chin Sci Bull* **58**, 2198-2204.
74. Jiang P, Josue J, Li X, Glaser D, Li W, Brand JG, Margolskee RF, Reed DR, & Beauchamp GK (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4956-4961.
75. Li R, Fan W, Tian G, Zhu H, He L, Cai J, Huang Q, Cai Q, Li B, Bai Y, *et al.* (2010) *Nature* **463**, 311-317.
76. Giacometti T (1979) *Glutamic Acid: Advances in Biochemistry and Physiology*. New York: Raven Press, 25-34.

謝辞

本研究を遂行するに当たりお世話になった方々に謹んで感謝の意を表します。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 生物機能開発化学研究室にて行われました。本研究室へ共同研究員として受け入れ、研究の機会を与えて下さった東京大学名誉教授 阿部啓子先生に心より感謝いたします。また、本研究の遂行に当たり多大な御指導と御協力を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 生物機能開発化学研究室 三坂巧准教授に心より感謝いたします。

研究の方針に多くの御助言をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科 日清食品「味覚サイエンス」 石丸喜朗特任准教授、東京大学大学院農学生命科学研究科 ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」 岡田晋治特任准教授、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 生物機能開発化学研究室 成川真隆特任助教に心より感謝いたします。

貴重な霊長類のサンプルを御提供いただき、研究に関する多くの御助言を頂きました京都大学霊長類研究所分子生理部門遺伝子情報分野 今井啓雄准教授および早川卓志氏に心より御礼申し上げます。分子モデルの作製に御協力いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 生物機能開発化学研究室 中北智哉氏に心より感謝いたします。

東京大学への出向の機会を与えて下さり、研究遂行に当たり深い御理解をいただきましたキッコーマン株式会社常務執行役員 松山旭氏、キッコーマン株式会社研究開発本部

長 小幡明雄氏、内田理一郎博士、佐藤常雄博士に厚く御礼申し上げます。

更に、本研究の遂行にあたり多くの御助力をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 生物機能開発化学研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。

また、同じ企業研究員として沢山の刺激をいただきました日清食品ホールディングス株式会社 櫻井敬展博士、笠原洋一氏、株式会社ミツカングループ本社 石井翔博士、吉本靖東氏、長谷川香料株式会社 藤原聡氏、野尻健介氏、高砂香料工業株式会社 寺田育生氏、キューピー株式会社 柳澤琢也氏にご心より御礼申し上げます。

最後に、いつも支えてくれる友人および家族にご心より感謝いたします。

平成 26 年 11 月

戸田 安香