

〔研究ノート〕

味覚受容体の検索 (第2報) ヒトの舌より分離された THTR5 受容体の 呈味物質の応答性

森 明子・小西 智子・吉田 友佳
高尾 恭一・須賀比奈子・高尾 哲也

Screening of Taste Receptors (Part 2)
Responsiveness for Some Taste Stimulants of THTR5 That Originally
Cloned from the Papillae

Akiko MORI, Tomoko KONISHI, Yuka YOSHIDA,
Kyoichi TAKAO, Hinako SUGA and Tetsuya TAKAO

We introduced the THTR5 of the G-protein-coupled receptor into the CHO cell and examined its response to some tastants. In the case of the THTR5 clone, when stimulated by Glucose, Fructose, Sorbitol, Arginine, Guanosin 5-monophosphate disodium salt, Inosin 5'-monophosphate sodium salt and Denatonium benzoate, the concentration of the prostaglandin E₂ (PGE₂) in the culture solution rose. Due to the stimulus of Glucose, Fructose and Sorbitol, the PGE₂ concentration in the culture solution rose in accordance with the concentration of various tastants in it.

Thus, since the clone showed the concentration dependence-response to the sweet taste of saccharide, we guessed that this clone was a sweet taste receptor in connection with saccharide.

Key words: taste receptor (味覚受容体), CHO cell (CHO細胞), PGE₂ (PGE₂), clone (クローン), tastant (呈味物質)

実験目的

生物は甘味, 苦味, 塩味, 酸味, 旨味の五味(1)~4)を基本とする味覚を通じて, 糖などのエネルギーを摂取してきた。味の感知は, 味蕾組織に存在する味細胞により行われ, 味蕾組織基底部の神経により脳に伝達されていると考えられている。ヒトの場合, 味蕾細胞は舌の糸状乳頭を除く, 茸状乳頭, 有郭乳頭, 葉状乳頭の上皮内に2/3が存在し, そのほか軟口蓋, 咽頭, 咽頭蓋の上皮内に分布しているとされている5)。老齢期には味蕾の数が減少し, 味覚の機能, 味の感受性が低下するといわれていた6)。しかし, 近年味蕾の数は老人になっても有意に減少することはない7), 加齢に伴う疾病や入れ

歯との関係が深いと報告されている8~10)。さらに茸状乳頭では約60%の人が味蕾を消失しており, また味蕾の存在しない舌粘膜部でも味を感知することが知られている11)。このようなことから, 味覚には味蕾細胞だけでなく舌上皮表層部に存在する受容体が深く関与していると考えられる。

味覚は五感の中でも分子生物学的な機構の解明が遅れている感覚の1つである。しかし最近, 味覚受容体との分子的な機構が明らかになりつつある。塩味と酸味はチャンネル型受容体, 例えばDEG/EnaCスーパーファミリーに属する2回膜貫通型の受容体はその一部を担っていると考えられている12)。その他の味覚である甘味, 苦味, 旨味ではGタンパク質共役受容体であるT1Rファミリー

13) や T2R ファミリー¹⁴⁾, THTR ファミリー^{15, 16)} などの受容体が一部を担っていると考えられている。実際に T1R1 と T1R3 のヘテロダイマーはグルタミン酸ソーダに応答¹³⁾, T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーは Sucrose や Saccharin に応答することが報告されている¹³⁾。しかし、他の呈味物質と受容体の関係はほとんど明らかになっていない。

そこで舌の表層に多く存在しているアゴニストが不明な G タンパク質共役型受容体の THTR5 を味覚受容体候補として取り上げ、呈味物質により刺激し、その挙動を観察することによって THTR5 のアゴニストを明らかにすることを目的とした。

試料及び実験方法

1. THTR5 のクローニングと CHO 細胞への導入

THTR5 は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体と考えられている。この G タンパク質共役型受容体とは細胞膜中に多く存在する受容体の 1 つで、その多くはアゴニストが不明なオーファンな受容体である。さらに、THTR5 はアゴニストが受容体と結合しないと標的とする効果器の機能を調節できない不活性型である。また、THTR5 は G タンパク質共役型受容体であるが THTR5 と共役する G タンパク質は不明である。そこで、既知の G タンパク質であり、各種の G タンパク質共役型受容体と幅広く共役することが知られている G α 16 と THTR5 との融合遺伝子を作製して THTR5 と G α 16 を強制的に共役させた¹⁷⁾。

本研究では THTR5-G α 16 遺伝子を CHO に導入し、受容体が発現している THTR5 クローンを使用した。

THTR5 クローンの取得はまず THTR5 受容体遺伝子と G α 16 を既知の遺伝情報から受容体遺伝子のプライマーを設計し、PCR により増幅し取得した。その後 PCR 産物を精製したのち、大腸菌にクローニングし、オートシーケンサによってヌクレオチド配列を確認した。配列を確認後、哺乳類細胞で高発現するベクター pEF-BOS に組み込み、リポフェクションによって CHO 細胞に導入した。この細胞を G418 を含んだ培養液で約 2 週間培養し、単コ

ロニーを単離した。単離したコロニーを培養し、PR-PCR 法で THTR5 の存在を認識し、細胞内にそれぞれが存在するか否かを確認した。THTR5 受容体を安定的に発現したクローンを THTR5 クローンとして取得した。

2. 呈味物質への応答性の測定

THTR5-G α 16 融合受容体はアゴニストが受容体と結合すると活性型になり、効果器と直接結合して効果器からセカンドメッセンジャーである IP₃ を産生する。IP₃ は細胞内 Ca²⁺ 貯蔵庫から Ca²⁺ を放出させて細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させ、さらに細胞外に PGE₂ を産生する。本研究ではこの細胞外へ産生した PGE₂ の量を測定した。測定した PGE₂ 量の結果により、添加した呈味物質への応答性を検討した。

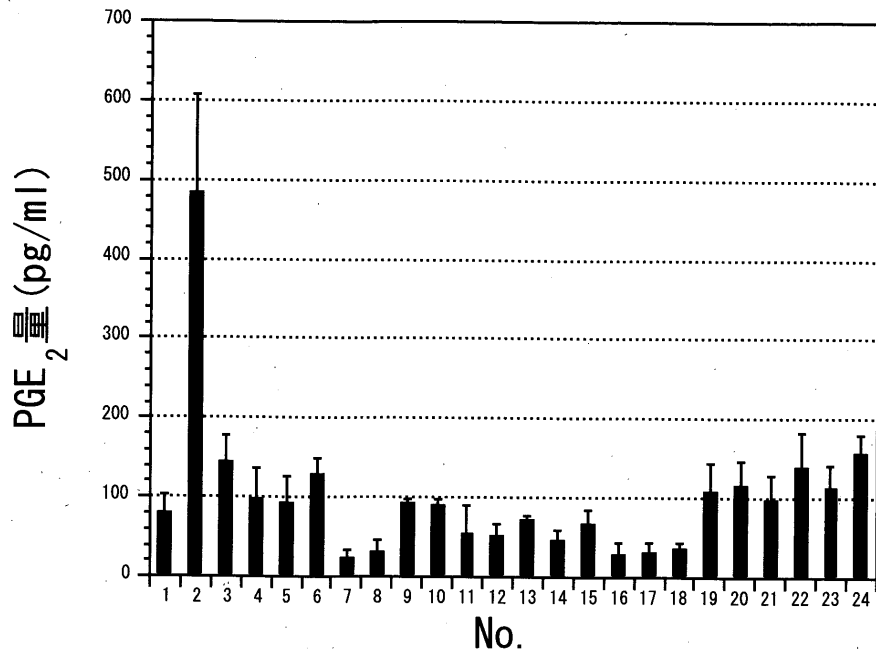
THTR5 クローンを 10% の血清を添加した F-12HAM (SIGMA 社製) で 5% 炭酸ガス環境下、37℃、3~4 日間培養後、PBS により 3 回洗浄し新鮮な培養液に置き換えた。その後表 1 に示した Sucrose, Glucose, Fructose をはじめとする 23 種類の呈味物質を添加し、5% 炭酸ガス環境下、37℃、4 時間刺激した。刺激後、培養液を回収して PGE₂ 量を Prostaglandin E₂ EIA Kit により測定し、応答性を検討した。また Sucrose, Glucose, Fructose, Sorbitol, Aspartame, Lysozyme, Denatonium benzoate について刺激濃度を 1 μ M~343mM とし、呈味物質の濃度変化による応答性を検討した。

結果及び考察

表 1 に示した呈味物質で THTR5 クローンを刺激し、PGE₂ 量を測定した結果を図 1 に示した。THTR5 クローンにおいては Glucose, Fructose, Sorbitol, Arginine, Guanosin 5-monophosphate disodium salt, Inosin 5'-monophosphate sodium salt, Denatonium benzoate での刺激により培養液上清中の PGE₂ 濃度が上昇した。これら以外の呈味物質、Sucrose, Glycine, Alanine, Stevioside, Acesulfame K, Citric acid, NaCl, Quinine-HCl, Caffeine, Phenylalanine, Tryptophane では培養液上清中の PGE₂ 濃度の有意な上昇を認めなかった。

表1 試料の濃度

味	試料名	使用濃度 (mM) *(μ mM)
甘 味	Sucrose	44
	Glucose	139
	Fructose	67
	Lactose	60
	Maltose	46
	Sorbitol	172
	Glycine	73
	Alanine	34
	Aspartame	*255
	Lysozyme	*5.2
	Stevioside	*51
	Acesulfame K	*373
酸 味	Citric acid	*651
塩 味	NaCl	46
苦 味	Quinine-HCl	*6.3
	Cafeine	7.7
	Phenylalanine	45
	Tryptophane	22
	Arginine	2.9
	Denatonium benzoate	*10
旨 味	Na-glutamate	8.0
	Guanosin 5-monophosphate disodium salt	*430
	Inosine 5'-monophosphate sodium salt	1.5
対 照	Milli-Q water	



- 1: Sucrose 2: Glucose 3: Fructose 4: Lactose 5: Maltose 6: Sorbitol
 7: Glycine 8: Alanine 9: Aspartame 10: Lysozyme 11: Stevioside
 12: Acesulfame K 13: Citric acid 14: NaCl 15: Quinine-HCl 16: Caffeine
 17: Phenylalanine 18: Tryptophane 19: Arginine 20: Denatonium benzoate
 21: Na-glutamate 22: Guanosin 5-monophosphate disodium salt
 23: Inosin 5'- monophosphate sodium salt 24: Milli-Q water

図1 THTR5の応答性

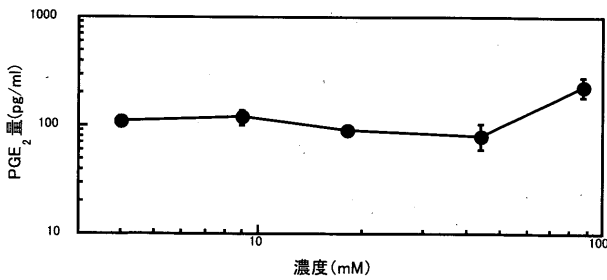


図2 Sucroseの濃度変化による応答性

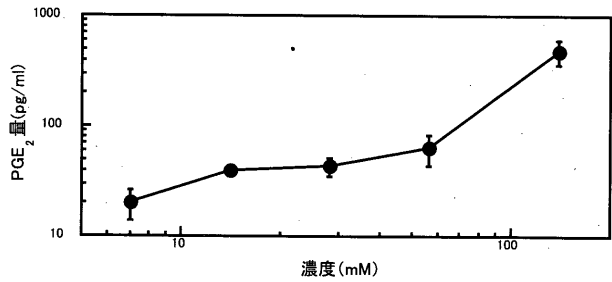


図3 Glucoseの濃度変化による応答性

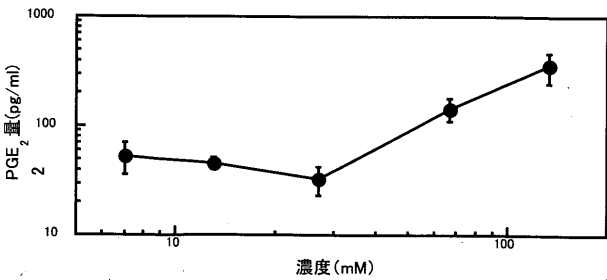


図4 Fructoseの濃度変化による応答性

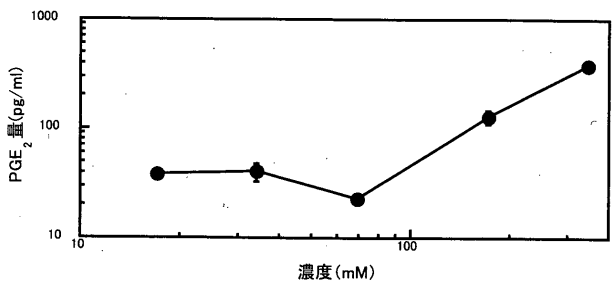


図5 Sorbitolの濃度変化による応答性

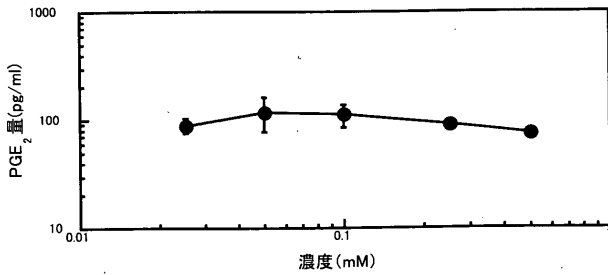


図6 Aspartame の濃度変化による応答性

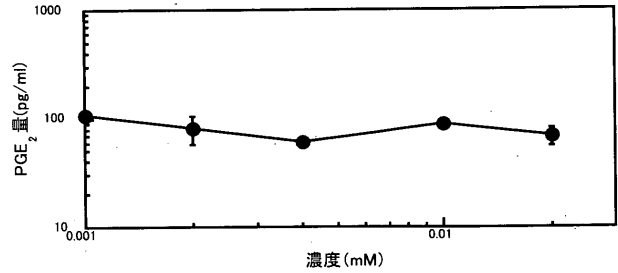


図7 Lysozyme の濃度変化による応答性

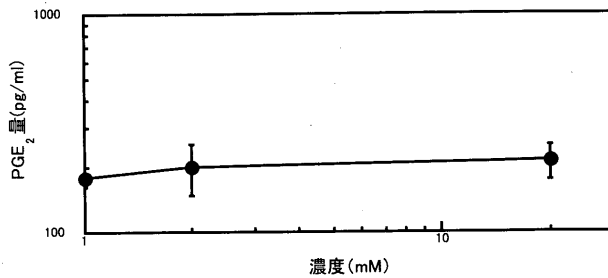


図8 Denatonium benzoate の濃度変化による応答性

THTR5 クロンの各呈味物質の濃度による応答の変化を Sucrose, Glucose, Fructose, Sorbitol, Aspartame, Lysozyme, Denatonium benzoate について検討した。その結果を図2～8に示した。Glucose, Fructose, Sorbitolでは濃度依存的に上昇した。Aspartame, Lysozyme, Denatonium benzoateは濃度依存的にPGE₂の量は変化しなかった。呈味物質の応答性でTHTR5クローンはGlucoseに強く応答していたので、主に糖に関わる呈味物質について濃度依存性を検討した。THTR5クローンはGlucoseについて濃度依存的にPGE₂の量が上昇していた。Fructoseについては、濃度が上昇するとPGE₂は上昇していた。Sorbitolに関してはその刺激によりPGE₂濃度は呈味物質の濃度に依存的に上昇した。Glucose, Fructose, Sorbitolに濃度依存性を認めたが、まだメカニズムはわかっていない。SucroseはGlucoseとFructoseが構成糖であり、濃度依存を認めるのではないかと考えられたが応答しなかった。これはSucroseがGlucose, Fructose, Sorbitolと異なっている点は単糖ではなく、二糖類であるために応答しないのではないかと推察した。高甘味度甘味料であるAspartameも濃度依存性を認めなかった。

応答を示したが濃度依存性を検討しなかった旨味については、今後検討の必要があるのではないかと考えられる。

以上のようにTHTR5は単糖であるGlucose, Fructose及びその糖アルコールであるSorbitolに対して応答した。これらのことからTHTR5は一部の糖の応答性を有すると考えられる。Gタンパク質共役型受容体THTR5は一部の糖質の甘味の味覚レセプターであると推定した。

要 約

Gタンパク質共役受容体THTR5をCHO細胞に導入し、呈味物質への応答性を検討した。THTR5クローンにおいてはGlucose, Fructose, Sorbitol, Arginine, Denatonium benzoate, Guanosin 5'-monophosphate disodium salt, Inosin 5'-monophosphate sodium saltでの刺激により培養液上清中のPGE₂濃度が上昇した。さらに、Glucose, Fructose, Sorbitolでの刺激では培養液上清中のPGE₂濃度は呈味物質の濃度に依存的に変動した。

以上のようにTHTR5はGlucose, Fructose, Sorbitolに濃度依存的な応答を示したことから糖質系甘味受容体であると推察した。

参考文献

- 1) B. Lindenmann: *Physiological Rev.*, **76**, 718 (1996)
- 2) R.E. Stewart, J.A. Desimone and D.L.Hill: *Am. J. Physiol.*, **272**, 1 (1997)
- 3) B. Lindenmann: *Nature Neurosci.*, **3**, 99 (2000)
- 4) M.S. Herness and T.A. Gilbertson: *Annu. Rev. Physiol.*, **61**, 873 (1999)
- 5) 佐藤昌康, 小川尚: 味覚の科学, p. 91, 朝倉書店 (1997)
- 6) Misteretta, C. M.: *J. Gerontol.*, **3**, 131-136 (1984)
- 7) Miller, I.J.: *J. Gerontol.*, **43**, B26-30 (1988)
- 8) Bartoshuk, L.M.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **561**, 65-75 (1989)
- 9) Weiffenbach, J.M., Baum, B.J. and Burghhauser, R.: *J. Gerontol.*, **37**, 372-377 (1982)
- 10) 小谷暢子ら: 日本味と匂学会第37回大会プログラム・予稿集, p. 90 (2003)
- 11) 藤田恒太郎: 人体解剖学, 改訂41版, p. 194, 南江堂 (1993)
- 12) S. Ugawa, et al.: *Nature*, **395**, 555 (1998)
- 13) G. Nelson, et al.: *Cell*, **106**, 381 (2001)
- 14) E. Adler, et al.: *Cell*, **100**, 693 (2000)
- 15) Takeda, S., et al.: *Febs Letters*, **520**, 97-101 (2002)
- 16) 芳賀達也, 武田茂樹, 美宅成樹: 特開, 2002-112793 (2002)
- 17) H.Suga, et al.: *J. Biochem*, **135**, 605-613 (2004)

(もり あきこ 生活機構研究科生活科学研究専攻1年生)

(こにし ともこ 平成15年度生活科学科卒業生)

(よしだ ゆか 食物科学科)

(たかお きょういち 日本大学医学部)

(すが ひなこ 群馬大学生体調節研究所)

(たかお てつや 生活科学科)