

## 辛味受容体タンパク質の単離と構造解析

河 田 照 雄 (京都大学大学院農学研究科助教)

### 1. はじめに

香辛料は、味覚、嗅覚、視覚など様々な感覚神経への刺激を介して、食味を向上させたり、単調な食品の風味に変化を与えて食欲増進をもたらす。このような特性は、現代の食品加工並びに調理には必要不可欠な要素となってきた。香辛料の特性なかで、最も多用されているものが、トウガラシやコショウに代表される辛味特性である。これらの辛味成分は、痛覚あるいは温覚を刺激することによって辛味特性を発現するものと考えられている。また、これらの多くの辛味成分は、図1に示したように化学構造上類似し、辛味の程度と構造の間には、いわゆる構造活性相関が成立することが知られている<sup>1)</sup>。このことから、生体における辛味成分分子の認識機構は、かなり厳密であることが推察され、辛味成分分子の受容体(レセプター)の存在および構造が推察されている<sup>1,2)</sup>。また、トウガラシ辛味成分感受性神経が存在するとの報告もある。そこで本研究においては、まず最初にトウガラシ辛味成分、カプサイシンの生体による認識機構の解析を行うためにカテコールアミンの分泌と辛味を指標としてカプサイシン同族体の構造との関係を検討した。さらにその辛味成分感受性神経の窓口とも言える辛味受容体タンパク質をラットより単離し部分構造を決定するとともに、遺伝子工学的手法を用いてその全構造を明らかにすることを試みた。

### 2. 辛味および副腎からのカテコールアミン分泌を指標とした生体におけるカプサイシン同族体(カプサイシノイド)の構造認識

トウガラシ果実中にはカプサイシン以外に図2に示した様に多くの同族体が存在することが知られている。これらの同族体はカプサイシノイドと総称されている。カプサイシノイドは、構造的には類似しているが辛味の点では大きく2種類に分別される。すなわち辛味を有するグループと辛味のないグループである。既にわれわれは辛味を有するカプサイシンが、交感神経を刺激し副腎からのカテコールアミン(アドレナリンおよびノルアドレナリン)分泌を亢進してエネルギー代謝を促進することを見いだした<sup>3,4)</sup>。そこで辛味のないカプサイシノイドが、辛味のあるカプサイシンなどと同様に生体に認識されエネルギー代謝を促進するか否かをラットの副腎からのアドレナリン分泌を指標にして検討した。その結果、脂肪酸側鎖がC9からC18までのカプサイシノイドは副腎からのアドレナリン分泌を亢進した(図3)。C9からC12までは辛味を有するが、一方C14からC18までは辛味を有さないことから、アドレナリン分泌のためのカプサイシノイド構造の生体認識は、必ずしも「辛味」が必須条件ではないことが判明した。さらに、構造認識機構の詳細を明らかにするために、カプサイシン受容体(推定)のアンタゴニストであるカプサゼピン<sup>5)</sup>(図4)を用いてC18-VAとカプサイシン受容体との相互作用を検討した。その結果、カプサイシンによる副腎か

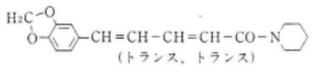
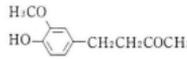
化合物の種類	化合物名	構造式	植物名
アミド類	カプサイシン		トウガラシ
	ビベリン		コショウ
	$\alpha$ -サンショオール	$CH_3CH=CHCH=CHCH=CH-CH_2CH_2CH=CHCONHCH_2\cdot CH(CH_3)_2$ (トランス、トランス、シス、トランス)	サンショウ
バニルケトン類	ジンゲロン		ショウガ
	[6]-ショウガオール		ショウガ
	[6]-ジンゲロール		ショウガ
イソチオシアネート類	アリールカラシ油	$CH_2=CHCH_2NCS$	クロカラシ、サンショウ、ダイコン
サルファイド類	ジアリルジサルファイド	$CH_2=CHCH_2SSCH_2CH=CH_2$	ネギ、ニンニク
	ジアリルサルファイド	$CH_2=CHCH_2SCH_2CH=CH_2$	タマネギ
	ジプロビルジサルファイド	$CH_3CH_2CH_2SSCH_2CH_2CH_3$	タマネギ

図1 主な香辛料の辛味成分の名称と化学構造

らのアドレナリン分泌はカプサイゼンによって有意に抑制されたが、C18-VAによるアドレナリン分泌はまったく影響されなかった(図5)。従って、辛味をもたないカプサイシノイドのアドレナリン分泌促進作用は、辛味をもつカプサイシンなどとは別の受容機構を介して行われていることが推察された。すなわち、カプサイシン及びその同族体には少なくとも2種類の受容体及び受容機構の存在が示唆された。

### 3. カプサイシン同族体の構造と辛味関連SP感受性神経

辛味は、一種の痛覚(さらには温覚)刺激機構を介して発現されると考えられており、この機構には内因性神経情報伝達物質であるP物質(substance P: SP)が介在している。従って、痛覚刺激機構の経路を介しているか否かを判定するには、脊髄内のSP濃度を測定すれば可能となる。そこ

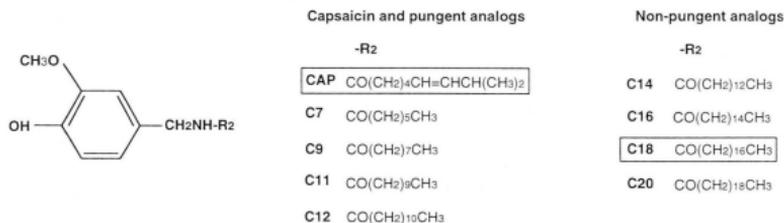


図2 カプサイシン同族体(カプサイシノイド)の化学構造と辛味  
CAP:カプサイシン, C18:オレイルバニルアミド(C18-VA)

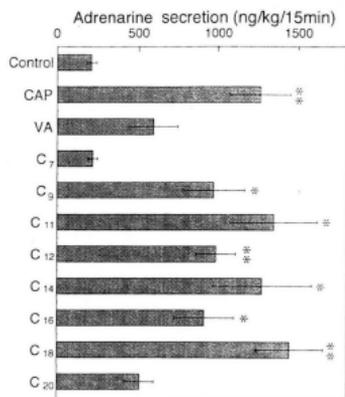


図3 カプサイシノイドによるラット副腎からのアドレナリン分泌促進効果  
各カプサイシノイドは655nmol/kg 大腸静脈から投与した<sup>4)</sup>。  
VA:バニルアミン

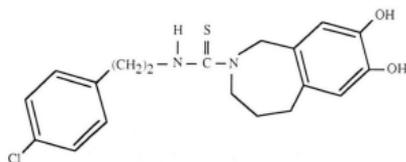


図4 カプサイシンの化学構造式<sup>5)</sup>

で、ヒトにおいて辛味を有するカプサイシンと辛味を有さないC18-VAのSP分泌への影響を比較することによって実験動物での辛味発現の構造的知見を得ることを試みた。その結果、図6に示したように実験動物脊髄内でのSP濃度の上昇は、カプサイシンにおいて顕著に認められたものの辛

味のないC18-VAにおいては全く認められなかった。このことから、辛味のないC18-VAは少なくとも痛覚刺激機構において構造認識されていないことが明らかとなった<sup>6)</sup>。この結果と上記のアドレナリン分泌の結果とを考え合わせると、以下の二つの経路の存在が推察された。ここでカプサイシン受容体は、辛味に対するものを1型、また非辛味性カプサイシノイドについては2型と定義した。

経路A:

辛味カプサイシノイド→カプサイシン受容体1型→  
交感神経—痛覚神経刺激(SP)→アドレナリン分泌

経路B:

非辛味カプサイシノイド→カプサイシン受容体2型  
→交感神経—未知神経刺激→アドレナリン分泌

#### 4. 辛味受容体タンパク質の精製と遺伝子のクローニング

上記の結果から少なくとも2種類の辛味成分受容体の存在が示唆されたため、まずカプサイシンなどの辛味を受容するカプサイシン受容体1型についてその構造的な諸性質を明らかにすべく受容体タンパク質の精製と遺伝子のクローニングを試みた。

方法1:カプサイシン結合タンパク質の精製  
生体の粘膜組織および舌上皮組織はカプサイシンの辛味を敏感に感受することからそれらの組織

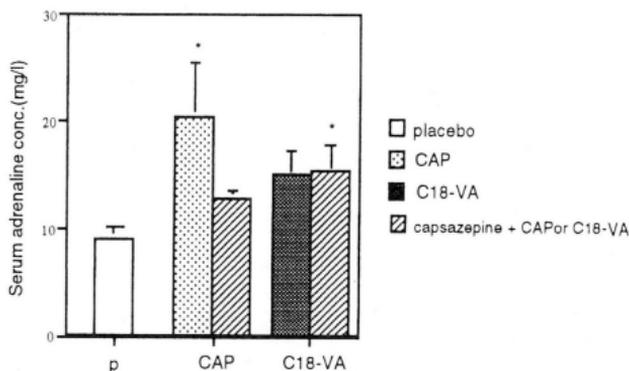


図5 カプサイシン及び非辛味性カプサイノイド (C18-VA) 投与による副腎からのアドレナリン分泌に及ぼすカプサイシン受容体アンタゴニスト、カプサゼピンの影響  
カプサイシン及びC18-VAは30nmol/kgを経口投与した。  
カプサゼピンは170nmol/kgをカプサイシンノイド投与1時間および5分前に投与した。

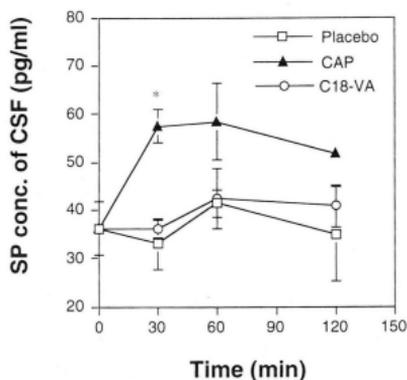


図6 カプサイシン及び非辛味性カプサイノイド (C18-VA) 投与によるマウス脳脊髄液 (CSF) 中のP物質 (SP) 濃度変化に及ぼす影響

ベントバルビタール麻酔下のマウスにカプサイシン及びC18-VAは30nmol/kgを経口投与し経時的に脳脊髄液をサンプリングした。SP濃度はケイマン社製のEIAキットにて定量した。

にカプサイシン受容体が豊富に存在すると考え、これらの組織からカプサイシンに特異的に結合する膜タンパク質の単離精製をラットを用いてカプサイシン結合アフィニティーカラムにて行った。しかしながら、結合タンパク質に対するカプサイシンの結合が弱いのか特異的に結合するタンバ

ク質は得られなかった。

方法2: RT-PCRによるカプサイシン受容体候補の同定

カプサイシンは、その分子内に中鎖脂肪酸の構造を有しておりカプサイシン受容体1型は厳密にこの脂肪酸構造を認識している。そこでこの特性と類似の性質を有することが知られている脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid binding protein) やスカベンジャーレセプター (SR-BI)、脂肪酸結合受容体 (oxidised low density lipoprotein, CD36/FAT, LIMPII, CLA-1) のタンパクおよびcDNA情報 (アミノ酸配列もしくは塩基配列) をもとにディジェネレーションプライマーを作製し、RT-PCRを行った。鋳型mRNAはラット舌上皮組織より抽出し、プライマーは以下の8種類を用いた。

primer 1; 5' GA(A/G)(A/C)T(G/C)(T/C)T(G/C)TGGG(T/C)TA(T/C)AA(A/G)GA 3'

primer 2; 5' GT(G/C)CC(A/G)TT(A/G)ATCAT(A/G)T(T/C)GCA 3'

primer 3; 5' AA(T/G)C(T/G)(A/G)TA  
(G/C)(A/G)(T/C)GGGGAT  
(T/G)CCTT 3'

primer 4; 5' GT(G/C)CCATT(A/G)AT-  
CATGT(C/T)(G/A)CA 3'

primer 5; 5' CCACAAGAGTTCCTTCAAAC  
3'

primer 6; 5' CTCTGTATGTGTAAGGACCTC  
3'

primer 7; 5' GACTCGAGTTCGACATC-  
GATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT  
3' [(dT)17-adapter primer]

primer 8; 5' GACTCGAGTTCGACATCGA 3'  
[adapter primer]

RT-PCRの結果、脂肪酸結合ドメインを有する可能性の高いいくつかのクローンが得られたのでそれらをプローブとしてラット舌上皮組織由来のcDNAライブラリーのスクリーニングを行った<sup>7)</sup>。スクリーニングの結果、多数のポジティブクローンが得られたが、塩基配列を調べたところすべてのものが既知のCD36/FATおよびスカベンジャーレセプター等の塩基配列と一致しカプサイシン受容体候補のものは得られなかった。

## 5. おわりに

上述のようにカプサイシン受容体には少なくとも2種類のタイプが存在し生理作用を発現することが判明し、遺伝子のクローニングを試みた。しかし残念ながら新規の遺伝子は単離出来なかった。ところが、われわれの本研究実施の途中、1997年10月米国カリフォルニア大学の研究者らがわれわれの想定したカプサイシン受容体1型と思われる

受容体の遺伝子を脊髄後根神経節からクローニングすることに成功したことがNature誌に発表された<sup>8)</sup>。この受容体のアミノ酸数は838個であり6回膜貫通型のイオンチャンネルとして機能していることが示されている。彼らの成功のポイントは、カプサイシンによる生体反応の情報としてCaイオン濃度の細胞内変化を指標として遺伝子のクローニングを行った点であると思われる。彼らは、このレセプターをカプサイシンのみならず痛覚刺激物質も含めた広義のレセプターと解釈しバニロイドレセプター (vanilloid receptor) と命名している。このバニロイドレセプターは神経節からクローニングされたことか、この受容体が実際の口腔内での食品レベルの「辛味」の受容に実際に関与しているのかどうかなどの検証が今後必要と考えられる。

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りました浦上食品・食文化進行財団に心より感謝の意を表しますと共に貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

## 文 献

- 1) J.Szolcsanyi and A.Jancso-Gabor: *Arzneim-Forsch.* **25**, 1877 (1975)
- 2) A.Szallasi: *Gen. Pharmacol.*, **25**, 223 (1994)
- 3) T.Kawada et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **188**, 229 (1988)
- 4) T.Watanabe et al.: *Am. J. Physiol.*, **255**, E23 (1988)
- 5) C.A.Maggi et al.: *Br. J.Pharmacol.*, **108**, 801 (1991)
- 6) K-M. Kim et al., *J. Nutr.*, **128**, in press (1998)
- 7) T. Fukuwatari et al.: *FEBS Lett.* **414**, 461 (1997)
- 8) M.J.Caterina et al.: *Nature*, **389**, 816 (1997)

---

## Isolation and analysis of capsaicin-pungent receptor

Teruo Kawada

(Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Capsaicin is a major pungent principle of hot pepper. Capsicum fruits are now one of the most widely consumed spices and have been used to flavor foods because of their pungency, color, and aroma. At pharmacological doses, capsaicin exerts various interesting actions: long-lasting or permanent desensitization of chemical noxious stimuli with destruction of nerve endings of primary afferents or depletion of putative peptide neurotransmitters, i.e., substance P, CCK, or calitonin gene related peptide. The pharmacological actions of capsaicin have therefore been studied intensively. In spite of its extensive usage in foods, information on the pungent acceptance, capsaicin receptor, is sparse.

In this study, it was suggested that capsaicin and its analogs acceptance pathways with or without pungency acted on the physiological function of capsaicin and its analogs via adrenarine secretion from adrenal medulla in rats. They were termed the receptor capsaicin receptor type 1 (pungent acceptance) and type 2 (non-pungent acceptance). And then, the isolation of capsaicin receptor in oral cavity sensory remains unsolved. But, recently the gene cloning of red-hot receptor like as our capsaicin receptor type 1 from brain was reported in Nature. This receptor may relate to acceptance of oral cavity sensory, pungency.