

<平成 26 年度助成>

## 食嗜好性を高めるうま味・甘味増強作用の 分子メカニズムの解明

山下 敦子・安井 典久

(岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科)

うま味および甘味は、ヒトも含め多くの生物が高い嗜好性を示す味である。これらの味では、昆布と鰹節の合わせだしを日本人が好むように、ある味物質に対する味覚を別の味物質が増強することで、より嗜好性が高まる現象が存在することが知られている。この味増強作用は、さまざまな食物の組み合わせから、より食味のよい料理を生むなど、私たちの食生活をより豊かなものにしてくれる。

グルタミン酸やショ糖などのうま味や甘味を呈する化学物質は、口腔内の味感覚器である味蕾を構成する味細胞に存在する、うま味受容体や甘味受容体によって感知される<sup>1)</sup>。これらの受容体は、クラス C 型 G タンパク質共役型受容体ファミリーである、T1r タンパク質で構成されている。具体的には、T1r1 と T1r3 のヘテロ二量体がうま味受容体、T1r2 と T1r3 のヘテロ二量体が甘味受容体として機能しており、これらは脊椎動物で保存されている。クラス C 型 GPCR は、細胞外に存在する 500 アミノ酸残基程度あるリガンド結合ドメイン (LBD) が、細胞内へのシグナル伝達を引き起こすアゴニストの結合部位となっている。甘味とうま味の受容体の場合、T1r3 が両受容体共通の構成要素となっていることもあり、グルタミン酸やショ糖など主要なうま味物質や甘味物質の結合部位は、それぞれ T1r1 および T1r2 の LBD であると考えられている。一方、味増強物質の一部には、これらの味覚受容体の味物質の結合部位とは異なる部位に結合し、味物質の結合をアロステリックに制御するものが存在する。例えば先に挙げた「昆布と鰹節の合わせだし」のおいしさは、うま味受容体である T1r1/T1r3 ヘテロ二量体 LBD へのグルタミン酸の結合が、同じく T1r1/T1r3

ヘテロ二量体 LBD のアロステリック部位に結合するイノシン酸によって相乗的に増強する作用であることが報告されている<sup>2)</sup>。また、このような相乗効果は長らく T1r1/T1r3 ヘテロ二量体に特徴的な機能と考えられてきたが、近年、甘味受容体 T1r1/T1r3 ヘテロ二量体にも同様に甘味物質結合を相乗的に増強する作用を示す化合物が存在することが報告されており<sup>3)</sup>、T1r ヘテロ二量体が共通して有する機能的特徴と考えられる。

クラス C 型 GPCR の LBD は、Venus-flytrap module (VFTM) と呼ばれる立体構造をとっていることが知られている。これまでに結晶構造が解明されている代謝型グルタミン酸受容体 LBD<sup>4)</sup> や GABA 受容体 B-LBD<sup>5)</sup> の構造から、これらの受容体のアゴニストは、VFTM に存在する 2 つのサブドメインである LB1 と LB2 の間の隙間 (クレフト部) に結合することが報告されており、この結合によって引き起こされる LBD の構造変化が受容体活性化を誘起すると考えられている。このことから、甘味とうま味の受容体についても、同じ隙間に味物質が結合することで、味物質感知の情報が味細胞内に伝達される受容体作用の起点になると推測されてきた。一方、アロステリック制御因子に関しては、これまでの他のクラス C 型 GPCR の構造研究では、LBD に結合する因子の結合部位や作用メカニズムなどの情報は乏しい。うま味受容体・甘味受容体についても、味増強物質の変異体実験による結合部位探索への試みはあるものの、部位同定や作用メカニズムの解明は途上にある。

T1r 味覚受容体の構造研究は、LBD のみにおいても、タンパク質の組換え発現が極めて困難であったため、大きく遅れていた。しかし、筆者らの研

究グループでは、脊椎動物のモデル生物であるメダカの T1r2a の LBD と T1r3 の LBD のヘテロ二量体 (T1r2a/3LBD) であれば、良好な組換え発現タンパク質が生産できることを見出し<sup>6)</sup>、本研究開始時には、その結晶構造を明らかにすることに世界に先駆けて成功していた<sup>7)</sup>。さらに、この受容体にアゴニストとして作用する L-グルタミンが、これまで推測されていたように T1r2a のクレフト部に結合していることも確認していた。そこで、このメダカ T1r2a/3LBD をプローブとして用いて、T1r に存在する味増強作用、すなわち味物質結合のアロステリック制御の分子メカニズムを解明することを目的に、研究を実施した。

## 実験方法

### 実験材料

Selenomethyl-N-acetylglucosamine (SeMeNAG) および Selenoethyl-sialic acid (SeEtSIA) は岐阜大学応用生物科学部・安藤弘宗准教授 (研究当時、現教授) よりご供与いただいたものを実験に用いた。

### T1r2a/3LBD とアロステリック制御因子候補化合物の結晶化

結晶化のためのタンパク質試料は、ショウジョウバエ S2 細胞による組換え発現で生産した<sup>7)</sup>。C 末側に Factor Xa 認識配列と FLAG タグを融合した T1r2aLBD と T1r3LBD を恒常的に共発現する S2 細胞安定発現株を構築し、細胞培養を行って、分泌画分を回収した。この画分に対し、抗 FLAG タグ抗体レジンを用いたアフィニティークロマトグラフィー、Factor Xa 分解反応による FLAG タグ切除、Endo H 分解反応による糖鎖切除を行ったのち、結晶化に必要な抗 T1r2a 抗体 Fab 断片をタンパク質に結合させ、さらにゲルろ過クロマトグラフィー精製を行って、結晶化に用いる試料を調製した。各種のアロステリック制御因子候補化合物 (具体的な化合物は「実験結果」の項に記載) は、上述のように調製した T1r2a/3LBD に対して、種々の濃度で、結晶

化前に添加してインキュベーションする、あるいは PD-10 (GE Healthcare) を用いて化合物をあらかじめ添加したバッファーに置換する、のいずれかの手法を用いて、タンパク質試料に対し結合させた。

結晶化は、PEG400 と PEG1500 を沈殿剤に用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により 20°C で行った。得られた結晶はグリセロールを凍結保護剤として液体窒素中で凍結した。

### 結晶構造解析

X 線回折強度データ収集は SPring-8 のビームライン BL41XU にて、検出器 PILATUS 6M を用いて実施した。Se 含有化合物、S 含有化合物、Yb<sup>3+</sup> の異常分散データ収集の際はそれぞれ波長 0.979 Å, 1.9 Å, 1.385 Å の X 線を用いて、それ以外の場合は波長 1Å のデータを用いてデータ収集を行った。得られたデータは HKL2000 にて処理し、CCP4 を用いたアロステリック制御因子非結合構造の情報<sup>7)</sup> を分子置換法で構造を決定して、CCP4 にて構造の精密化を行った。

### 変異体解析

T1r3LBD 変異体は常法により作製し、単独および T1r2aLBD の共存下で一過性発現を行って、ウェスタンブロットティングによる発現量解析、多色蛍光検出クロマトグラフィー<sup>8)</sup> による折りたたみ状態と多量体形成の解析を行った。

### 等温滴定カロリーメトリーによる相互作用解析

T1r2a/3LBD は、上記「T1r2a/3LBD とアロステリック制御因子候補化合物の結晶化」の項と同様にアフィニティークロマトグラフィー精製し、iTTC200 (GE Healthcare) を用いてアロステリック制御因子候補化合物との相互作用解析を行った。

## 実験結果

### アロステリック結合部位の探索

本研究では、筆者らが構造解析に成功しているメ

ダカ T1rLBD を用いることで、味物質結合をアロステリックに制御する因子の結合部位を同定し、構造と機能の両面から分子メカニズムの理解に重要な情報を得る、との研究戦略をとった。一方、アロステリック制御因子については、イノシン酸など私たちヒト T1r に対し味増強作用を示す物質は知られているものの、メダカ受容体に対して作用するものはまだ明らかになっていない。そこでまず、食物に含まれている可能性の高い、(1) 核酸および関連化合物、(2) 糖および関連化合物、(3) アミノ酸および関連化合物、(4) イオンについて、候補化合物を添加して T1r2a/3LBD の結晶構造解析を行い、T1r2a に存在する味物質結合部位とは異なるアロステリックな部位に結合がみられるかどうかの確認を行った。その結果、後述するように、(1) 核酸・(2) 糖およびそれらの関連化合物については、有意な結合が確認できなかったものの、(3) アミノ酸および (4) イオンを用いて、アロステリック結合部位を見出すことに成功した。

### (1) 核酸および関連化合物

ヒト T1r1/T1r3 において呈味作用・味増強作用がみられるイノシン酸 (IMP)、グアニル酸 (GMP) や、同じくプリン塩基を有するアデノシン三リン酸 (ATP) について、メダカ T1r2a/3LBD のアゴニストである L-グルタミンと共存させた状態で結晶化し、得られた結晶の構造解析を行った。しかしながら、結晶構造において、これら化合物に該当するとみられる電子密度は確認できなかった。このことから、今回試した条件においては、T1r2/3LBD に対して、これらの化合物の有意な結合はみられなかったと考えられる。なお、他にグアノシン、アデニン、チミンとの結晶化も試みたが、これらについては良好な結晶が得られなかった。

### (2) 糖および関連化合物

メダカ T1r2a/T1r3 は、L-アラニンや L-グルタミンなどに対して応答を示し、哺乳類などの T1r2/T1r3 ヘテロ二量体が応答を示す糖などの甘味物質

については応答を示さないとの報告がある。一方、これらの物質がアロステリック制御因子として機能する可能性を考え、L-グルタミンと共存させた状態で結晶化を行った。このとき、結晶構造解析による物質の結合の同定を確実にかつ容易に行うため、糖の O 原子を S または Se 原子に置換した糖誘導体である、1-thio- $\beta$ -D-glucose, 1-thio- $\beta$ -D-galactose, isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactoside, SeMeNAG, SeEtSIA を結晶化に用いた。これらの結晶について、それぞれ S および Se の特性吸収端波長近傍である 1.9 Å および 0.979 Å にて X 線回折強度データ収集を行い、化合物の電子密度の確認に加え、S 原子または Se 原子由来の異常分散ピークの確認も試みた。しかしながら、得られたデータから、これらの化合物に該当するとみられる電子密度や異常分散ピークを確認することはできなかった。このことから、今回試した条件においては、T1r2/3LBD に対して、これらの化合物の有意な結合はみられなかったと考えられる。

### (3) アミノ酸および関連化合物

魚類の味覚応答は、ベタインによって増強されるとの報告がある<sup>9)</sup>。そこで、ベタインが T1r2a/T1r3 のアロステリック増強因子となる可能性を考え、ベタイン関連化合物であるサルコシン (メチルグリシン)、ジメチルグリシン、ベタイン (トリメチルグリシン) について、アゴニスト L-グルタミンと共存させた状態で結晶化を行った。しかしながら、結晶構造において、これら化合物に該当するとみられる電子密度は確認できなかった。このことから、今回試した条件においては、T1r2/3LBD に対して、これらの化合物の有意な結合はみられなかったと考えられる。

次に、L-アミノ酸そのものの結合を確認するため、メチオニンの S 原子が Se 原子に置換されているセレノメチオニンを T1r2a/3LBD に結合させ、Se の特性吸収端波長近傍である 0.979 Å にて X 線回折強度データ収集を行った。セレノメチオニンの結合方法について、インキュベーション、バッファー置換など種々の条件を用いたものを結晶化してデータ収集



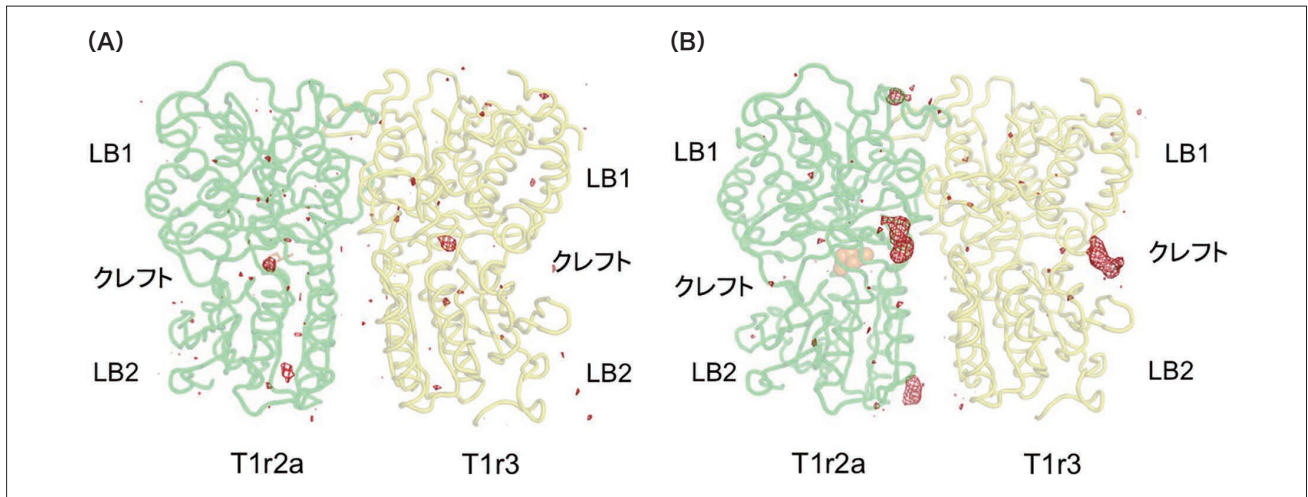


図1 結晶構造解析により見つかったアロステリック因子結合候補部位。(A) T1r2a/3LBD-セレノメチオニン複合体結晶のSeの異常分散ピーク。(B) T1r2a/3LBD-Yb<sup>3+</sup>複合体結晶のYb<sup>3+</sup>の異常分散ピーク。A, Bとも3.5σの異常分散電子密度図を赤色で示す。

を行ったところ、PD-10にてバッファー置換を行い、L-グルタミンを除去してセレノメチオニンに置換した結晶について、セレノメチオニンに該当するとみられる電子密度およびSe由来の異常分散ピークを確認することができた。

セレノメチオニンの結合は、アゴニストであるL-グルタミンの結合部位としてこれまで同定できていたT1r2aのクレフト部で、L-グルタミン結合部位と全く同じ部位に確認された。さらにこの位置の結合に加え、これまで予想されていなかった、T1r3のクレフト部の該当する部位にもみられることが明らかになった(図1A)。

セレノメチオニンのT1r2a/3LBDへの結合を検証するため、等温滴定カロリーメトリーによる結合実験を行った。結合実験はメチオニンを用いて実施したところ、T1r2a/3LBD溶液へのメチオニン添加に伴い発熱反応が観測され、結合定数 $K_a$ 値が $5.97 \pm 5.71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  ( $K_d$ 値 $16.8 \mu\text{M}$ )と求められた。なお、同じ条件でアゴニストであるL-グルタミンについて結合定数を求めたところ、 $K_a$ 値は $2.74 \pm 0.363 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  ( $K_d$ 値 $3.65 \mu\text{M}$ )であった。このことから、メチオニンが確かにT1r2a/3LBDに結合することが確認でき、極めて類似した物理化学的性質を持つセレノメチオニンも同様の結合をしていること示唆する結果を得た。

#### (4) イオン

クラスC型GPCRの代謝型グルタミン酸受容体では、Ca<sup>2+</sup>などの陽イオンがアゴニストへの応答や結合を増強するとの報告がある<sup>10,11</sup>)。そこで、同様の作用がT1r2a/3LBDにも見られるかどうかを検証するため、X線結晶構造解析により異常分散ピークの確認が可能なYb<sup>3+</sup>やHo<sup>3+</sup>などのランタノイドイオンをL-グルタミンと共存させた状態で結晶化を行った。両者より結晶が得られ、より良質の結晶が得られたYb<sup>3+</sup>結合結晶について、Ybの特性吸収端波長近傍である1.385 ÅにてX線回折強度データ収集を行った。その結果、L-グルタミンの結合部位とは異なる複数の部位に、Yb<sup>3+</sup>の結合を示す異常分散ピークが確認された(図1B)。具体的には、T1r2aとT1r3の相互作用面近傍や、T1r3のクレフト部で、上述したアミノ酸結合部位とは異なる開口部近傍などの部位に、比較的高いピークが検出された。これらの結果から、陽イオンも含めたアロステリック制御因子の結合部位として、複数の候補部位の存在が示唆された。

#### T1r3LBDに存在するアロステリック結合部位の意義の検証

X線結晶構造解析による結果から、T1r2a/3LBDについて、複数のアロステリック制御因子結合部位候補を見出すことができた。特に、これまで味物質

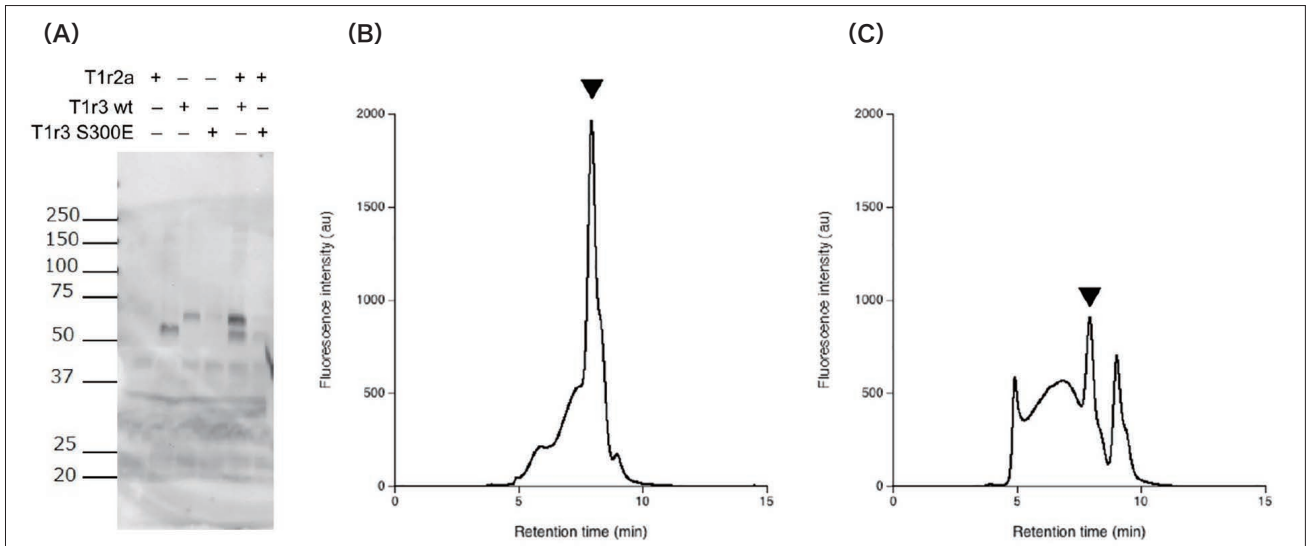


図2 T1r3 変異体発現解析. (A) Western blotting による発現量比較解析. (B, C) T1r2/3LBD の多色蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィーによる T1r3LBD の凝集・会合状態解析. 黒矢印は T1r 二量体の溶出位置を示す. (B) T1r2a/T1r3 野生型 LBD, (C) T1r2a/T1r3-S300E 変異体 LBD.

結合に直接関わらないと考えられてきた T1r3 のクレフト部に、アミノ酸およびランタノイドイオンの複数の候補因子の結合がみられたことから、この部位に対するアロステリック因子の結合の意義に興味を持った。そこで、この部位に変異を導入し、T1r2a/3LBD にどのような影響があらわれるか確認を行った。

メダカ T1r3 のクレフト部には Ser300 のアミノ酸残基が存在するが、メダカ以外の多くの動物種では、該当する部位がグルタミン酸になっているのがみられる。そこで、このアミノ酸をグルタミン酸に変異すると、立体構造には大きな影響を与えず、アロステリック因子の結合に何らかの影響が与えられることを期待し、T1r3 に S300E 変異を導入し、T1r2a/3LBD ヘテロ二量体の発現解析を行った。

その結果、T1r3-S300E-LBD 変異体は、正常に膜移行できているものについては T1r2aLBD とヘテロ二量体形成を行うことができるものの、正常に膜移行する分子自体が減少しており、結果としてヘテロ二量体の膜移行しているものの発現量が減少していることが明らかとなった。さらに、蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、T1r3-S300E-LBD 変異体は野生型に比べ凝集している分子が多く存在することが判明した (図 2)。この結果は、変異体では野生型に比べ分子の生理的な折りたたみ構

造が不安定化していることを示している。これらの結果から、T1r3 に存在するアロステリック部位は、何らかの物質を結合することで、T1r3LBD の構造を安定化し、その結果として T1r2a/3 ヘテロ二量体の膜移行を促進し、また細胞膜に提示されている受容体構造を安定化することで、受容体の味物質に対する応答性を高める方向に機能する可能性が示唆された。

## 考察

本研究では、T1r3 に対する物質結合を見出し、その結合が受容体構造安定化や膜移行の効率に寄与している可能性を明らかにした。これまでに得られている T1r3LBD の結晶構造では、全てこの部位に何らかの物質が結合しており、クレフト部を閉じたコンフォメーションで観察されている。このことから、この部位への物質結合は、T1r3LBD のコンフォメーションを、構造安定化に有利な閉じた形に安定化する役割を持つ可能性が考えられる。T1r 味覚受容体における T1r3 の機能的役割はこれまで明確ではなかったが、本研究は、T1r3 が T1r2 同様リガンド結合能を持つことを明らかにしたものである。T1r3 に対するリガンド結合の機能的意義として、本研究で示された受容体安定化に対する寄与に加え、味物質

感知に関わるその他の受容体機能への関与にも興味を持たれる。今後は、この部位への物質結合が、受容体応答反応に対して何らかの影響を与えているかについても、詳しく解析して必要があるだろう。

また、今回イオン結合実験で用いたランタノイドイオンは、 $\text{Ca}^{2+}$  とイオン半径が近似しているため、生理学的に重要なイオンである  $\text{Ca}^{2+}$  の結合と何らかの関係がある可能性がある。加えてランタノイドイオンは、高い分極率を持ち、HSAB 則における「柔らかい酸 (soft acid)」に該当する。この soft acid の結合部位は、他のタンパク質において、アミノ基など有機化合物中の塩基性官能基の結合部位となっているケースがみられる。今回みられた結合部位の1つは、上述した T1r3 クレフト部で、アミノ酸結合部とは異なる開口部に近い部分であり、この部位への結合も、T1r3LBD の閉じた構造の安定化に寄与することが考えられ、上述した T1r3 に対するリガンド結合と同様の機能的意義を持つと推測される。さらに、クラス C 型 GPCR のシグナル伝達では、二量体相互作用変化がみられることが報告されており<sup>12)</sup>、二量体相互作用面近傍の結合部位は、相互作用様式に何らかの影響を与える可能性が考えられる。これらのことから、今回ランタノイドイオン結合で明らかとなったアロステリック因子結合候補部位は、実際に受容体応答に何らかの影響を与える可能性がある。本研究で得られた情報を足がかりに、アロステリック制御因子の結合と作用について、今後さらに研究を進めていきたい。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者の皆様に、心から感謝申し上げます。また X 線回折強度データ収集および結合解析では、公益財団法人 高輝度光科学研究センターの長谷川和也博士、奥村英夫博士、岡山大学薬学部 渥美菜奈子氏、変異体実験では岡山大学医歯薬学総合研究科 細谷麻以子氏、薬学部 平澤輝一氏のご協力を得ました。本研究にご協力いただいた方々に御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Chandrashekar, J. *et al.*: *Nature*, 444: 288-294, 2006.
- 2) Zhang, F. *et al.*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:20930-20934, 2008.
- 3) Zhang, F. *et al.*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:4752-4757, 2010.
- 4) Kunishima, N. *et al.*: *Nature*, 407: 971-977, 2000.
- 5) Geng, Y. *et al.*: *Nature*, 504: 254-259, 2013.
- 6) Nango, E. *et al.*: *Sci. Rep.*, 6: 25745, 2016.
- 7) Nuemket, N. *et al.*: *Nat. Commun.*, 8: 15530, 2017.
- 8) Parcej, D. *et al.*: *PLoS One*, 8: e67112, 2013.
- 9) Osuga, K., and Marui, T.: *Jpn. J. Taste and Smell Res.*, 10: 29-42, 2003.
- 10) Kubo, Y. *et al.*: *Science*, 279: 1722-1725, 1998.
- 11) Suzuki, Y. *et al.*: *J Biol Chem*, 279: 35526-35534, 2004.
- 12) Vafabakhsh, R. *et al.*: *Nature*, 524: 497-501, 2015.

## Elucidation of molecular mechanisms of umami and sweet taste enhancement

Atsuko Yamashita, Norihisa Yasui

*Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,  
Okayama University*

Umami and sweet taste enhancement phenomena, such as that found with Japanese soup stock made from dried kelp broth along with dried bonito, are at least partly explained by taste receptor functions. Umami and sweet taste substances are perceived by members of class C GPCR, T1r proteins, which are conserved among vertebrates. Specifically, one heterodimer of T1r1 and T1r3 serves as the umami taste receptor, while another of T1r2 and T1r3 serves as the sweet taste receptor. T1r receptors possess a large ligand binding domain (LBD) at the extracellular side, and major taste substances are considered to bind to the LBD of the unique subunit of the T1r receptors (*i.e.*, either T1r1 or T1r2). In addition, some taste enhancers, such as inosine monophosphate, an ingredient of bonito, are known to bind to the allosteric site in T1rLBD, and enhance the binding of taste substances, such as monosodium glutamate, an ingredient of kelp. However, due to the limited structural information regarding T1rLBD, the molecular mechanisms of the allosteric modulation of taste substance perception by T1r receptors have not completely been elucidated. Further, a structural analysis of the T1r receptors has been hampered by difficulties in recombinant sample protein preparation.

Recently, our group found that a heterodimer of T1r2a and T1r3 LBD from medaka fish, a model organism of vertebrates, exhibits proper recombinant expression. We successfully solved the crystal structure of T1r2/3LBD with an agonist L-glutamine bound at the cleft between two subdomains, LB1 and LB2, in T1r2a. In this study, we attempted to elucidate the molecular mechanisms of taste enhancement, with a particular focus on the allosteric modulation of taste perception, by utilizing medaka fish T1r2a/3LBD as a structural and functional probe of T1r proteins.

We first searched for allosteric ligands and their binding sites at T1r2a/3LBD, testing various compounds among possible ingredients in foods, including nucleotides, sugars, amino acids, ions, and their derivatives, and analyzed their binding via X-ray crystallography. We found that some amino acids and cations bind at the cleft between LB1 and LB2 in T1r3. In order to assess the effect of ligand binding at the site, we introduced a mutation into T1r3, so as to perturb ligand binding at that site. The mutant exhibited a lower level of membrane trafficking and more aggregation fractions, compared to the wild type protein. These results suggest that binding of the ligand at the allosteric site found in T1r3 improves the protein's stability, resulting in a higher level of membrane trafficking as well as higher receptor stability at the plasma membrane, thus contributing to an enhanced level of taste perception by the receptor. We also identified several additional candidate sites for allosteric modulator binding.