

〈平成17年度〉

熱帯植物由来味覚修飾タンパク質ネオクリンの 味覚修飾活性評価系の開発

三 坂 巧

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

1. 諸 言

西マレーシア原産の熱帯植物であるクルクリゴ (*Curculigo latifolia*) の果実を口に含んだ後にレモン等の酸味を呈するものを摂取すると、非常に甘く感じるという不思議な現象が存在する。この酸味を甘味へと変換する効果を味覚修飾活性と呼び、クルクリゴ果実に含まれるある種のタンパク質がその活性の本体である¹⁾。我々は最近、活性タンパク質の単離・精製を行い、アミノ酸配列解析・糖鎖解析・cDNAクローニングにより全配列を決定した²⁾。ネオクリンと命名したこのタンパク質は2つのサブユニット(酸性サブユニットNAS, 塩基性サブユニットNBS)から構成されており、ジスルフィド結合によりヘテロダイマーを構成していた。ネオクリンはそれ自身が甘味を有する甘味タンパク質であるだけでなく、同時に味覚修飾活性をも有するというユニークなタンパク質であり、非常に興味深い研究対象である。

一方、我々が食品を摂取する際に感じられる味のうち基本味については、それらを受容するいわゆる「味覚受容体」の実体がほぼ明らかとされた³⁾。哺乳類由来の味覚受容体についてこれまでの知見をまとめると、甘味・旨味は細胞外領域が非常に大きく、代謝型グルタミン酸受容体やカルシウム受容体等と同じグループに属するT1Rファミリーと命名された3種類の分子の組み合わせで、苦味は光受容体であるロドプシンや嗅覚受容体等と同じグループに分類されるT2Rファミリーと命名さ

れた数十種類の分子で、それぞれ受容されることが明らかにされた。T1R・T2Rは共にGタンパク質共役型受容体であり、味受容器官内において異なる細胞に発現することにより、末梢レベルで味質が区別されて認識されていることが示されている³⁾。甘味を受容する甘味受容体はT1Rファミリーに属するT1R2とT1R3のヘテロマーで構成されており、1種類の受容体で非常に広範な多種の甘味物質を受容しうることが、培養細胞発現系を用いた実験より示されている^{4,5)}。

前述したように、ネオクリンはそれ自身が甘味を呈するのみならず、クエン酸等の酸によってその甘味が著しく増加する。しかしながら、これまでネオクリンの甘味および味覚修飾活性は人間の官能検査によってのみ判断されており、客観的な評価を行う評価系は存在しなかった。本研究ではネオクリンの甘味や味覚修飾活性を、ヒト甘味受容体(hT1R2+hT1R3)を発現させた細胞を用いた*in vitro*の実験系にて評価することを目的として研究を行った。最終的に酸性条件下での機能解析が予想されるため、細胞外液の変化に対して丈夫な細胞であるアフリカツメガエル卵母細胞をヒト甘味受容体の発現系として最初に選択した。次にすでに甘味受容体の機能解析が行われている哺乳類培養細胞を用いた解析を行った。

2. 実験方法

2.1 ネオクリンタンパク質の精製

リガンドとして用いるネオクリンは、クルクリ

ゴ (*Curculigo latifolia*) の果実より抽出し、粗精製した画分を用いた²⁾。SDS電気泳動によりほぼ単一となっていることを確認している。

2.2 味覚受容体および使用する遺伝子のクローニング

ヒトT1R2・T1R3 cDNAはカリフォルニア大学サンディエゴ校のCharles S. Zuker教授より供与いただいた。ラットGタンパク質共役型内向整流性カリウムチャンネル (GIRK1, GIRK2)・ラットG α i2をコードするcDNAはラット脳より、ラットGgust・ラットG α 15をコードするcDNAはラット舌上皮より、ヒトG α 16をコードするcDNAはヒト脾臓より、それぞれ作成した1本鎖cDNAをテンプレートとし、PCRにより取得した。ラットG α 15やヒトG α 16のC末端部分をラットG α i3やGgustに入れ替えたキメラGタンパク質 (G15Gi3, G16Gust25, G16Gust44) はPCRにより作製した。これらのcDNA断片はアフリカツメガエル卵母細胞発現用ベクターおよび哺乳類細胞発現用ベクターに挿入し、以下の実験に使用した。

2.3 アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたヒト甘味受容体の機能解析

作製した発現プラスミドよりT7 RNA Polymeraseを用いてcRNAを合成した。作製したcRNA溶液を適当な割合にて希釈・混合した後、コラゲナーゼにより単離したアフリカツメガエル卵母細胞にガラス針を用いて1細胞当たり50nlづつ微量注入した。17°Cで培養し、cRNA注入後2~4日経過した卵母細胞を実験に使用した。受容体・G α i2 (あるいはGgust)・GIRK1・GIRK2を共発現させた卵母細胞を-80mVに電位固定し、リガンドを投与した際に流れるGIRKに由来する内向き電流値を時間と共に記録した。

2.4 哺乳類培養細胞発現系を用いたヒト甘味受容体の機能解析

ヒト甘味受容体の機能解析のため、哺乳類培

養細胞 (HEK293T) に受容体 (hT1R2+hT1R3) とキメラGタンパク質を遺伝子導入した。遺伝子導入後2日目の細胞に蛍光カルシウム指示薬Fura-2AMを負荷し、細胞に取り込ませた。細胞内カルシウム濃度変化を測定するためには以下のようなカルシウムイメージングを行った。Fura-2AMを負荷した細胞を340nmと380nmで励起し、510nmにおいて観察される蛍光画像を蛍光顕微鏡ならびにCCDカメラを用いて4秒おきに取得した。2画像の比率 (F340/F380) から各細胞における細胞内カルシウム濃度を算出した。リガンドを投与する前後において比率 (F340/F380) の差が0.15を超えたときにその細胞を応答細胞と判断し、取得画像の視野中における応答細胞数を測定し、解析を行った。

3. 実験結果

3.1 アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたヒト甘味受容体の発現

まずアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、ヒト甘味受容体の機能解析を試みた。受容体と共にGi系Gタンパク質ならびにGタンパク質共役型内向整流性カリウムチャンネル (GIRKチャンネル) を共発現させることにより、リガンドを投与した際の受容体の活性化をGIRKチャンネルを流れる電流として検出することが一般的に行われている。本研究では受容体としてヒト甘味受容体 (hT1R2+hT1R3) を、Gタンパク質として味受容器官にて発現しているG α i2もしくはGgustを選択した。全ての組み合わせでGIRKチャンネルと共に卵母細胞に発現させた。-80mVに電位固定した卵母細胞に、リガンドとしてヒト甘味受容体を受容することが知られている⁵⁾ アセスルファムK・アスパルテーム・サッカリンをそれぞれ適当な濃度で投与し、内向き電流値を時間と共に記録した。cRNA注入後2および4日経った卵母細胞

胞について検討を行ったが、リガンドに対する応答はいずれも観察できず（結果未掲載）、この系においてヒト甘味受容体が機能的に発現していないと判断した。

3.2 哺乳類培養細胞発現系を用いたネオクリンの甘味評価系の構築

次に、甘味受容体が機能的に発現することが示されている^{4,5)} 哺乳類培養細胞発現系を用いた解析を行った。この系においては受容体とともにラットG α 15やヒトG α 16といったGqファミリーに属するGタンパク質のキメラタンパク質（G15Gi3, G16Gust25, G16Gust44）を発現させ、受容体の活性化を細胞内情報伝達経路の下流で起こる細胞内カルシウム濃度上昇として検出する。検出の方法としては細胞に蛍光カルシウム指示薬を取り込ませ、蛍光イメージングを用いる方法が広く行われている。

まずこの検出系にてネオクリンが呈する甘味を計測できるかどうか検討した。ヒト甘味受容体（hT1R2+hT1R3）をキメラGタンパク質（G16Gust25）とともに発現させ、中性（pH7.4）

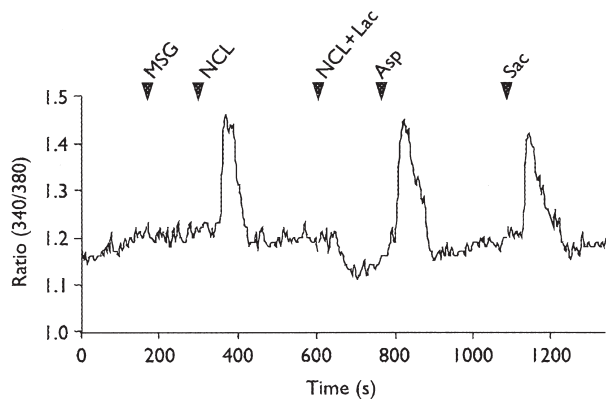


図1 ヒト甘味受容体（hT1R2+hT1R3）発現細胞におけるネオクリンの応答

ヒト甘味受容体（hT1R2+hT1R3）とキメラGタンパク質（G16Gust25）をHEK293T細胞に共発現させ、リガンド投与における細胞内カルシウム濃度変化を蛍光カルシウム指示薬（Fura-2）の蛍光強度比によって表示した。ある1個の細胞における結果を図に示した。リガンドは還流により投与し、リガンドを投与後、バッファーにて洗浄する操作を繰り返した。投与したリガンドは10mMグルタミン酸ナトリウム（MSG）、20 μ Mネオクリン（NCL）、2.5mMラクチゾールを含む20 μ Mネオクリン（NCL+Lac）、10mMアスパルテーム（Asp）、10mMサッカリン（Sac）である。

条件下でネオクリンを投与した。20 μ Mのネオクリンを投与したところ、細胞内カルシウム濃度変化を起こす細胞が観察された（図1）。この応答は甘味受容体の阻害剤であるラクチゾール存在下では観察されず、またネオクリンに反応した細胞においては、アスパルテームやサッカリンといった他の甘味物質に対しても反応することを確認した（図1）。様々な濃度のネオクリンを投与した際に観察される反応を、細胞内カルシウム濃度変化を起こした細胞数で計測したところ、20 μ Mまでの範囲において濃度依存的な反応を示すことが判明した（図2）。以上の結果より、ネオクリンが中性条件下においてヒト甘味受容体により受容されることが判明し、ヒト甘味受容体を発現した哺乳類培養細胞を用いてネオクリンの甘味を評価することができたと判断した。

3.3 哺乳類培養細胞発現系を用いたネオクリンの味覚修飾活性評価系の構築

次に同様の発現系を用いて、ネオクリンの味覚修飾活性を評価することを試みた。ネオクリンはそれ自身が甘味を呈するのみならず、クエン酸等

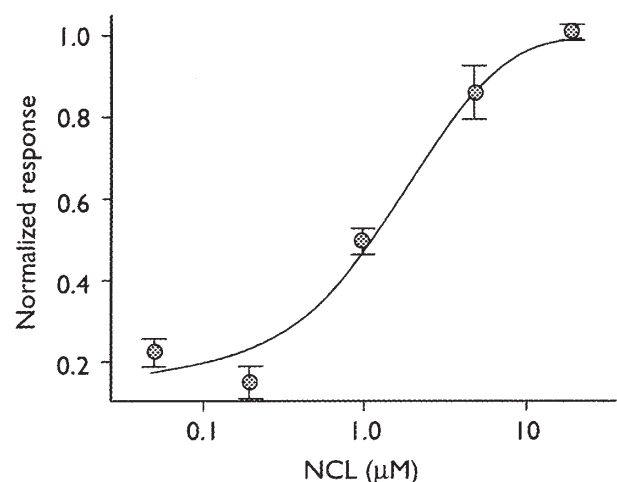


図2 ヒト甘味受容体に対するネオクリンの濃度応答相関
様々な濃度のネオクリンを、ヒト甘味受容体（hT1R2+hT1R3）とキメラGタンパク質（G16Gust25）を共発現させたHEK293T細胞に投与し、反応細胞数を計測した。20 μ Mネオクリンを投与した際の反応細胞数で正規化した数値を図に示した。

の酸によってその甘味が著しく増加する。従って酸性条件下において、中性条件下よりもヒト甘味受容体に対して強い応答性を示すことが期待される。これを哺乳類培養細胞発現系により示すことができるかについて検討した。

3.2のようにヒト甘味受容体 (hT1R2+hT1R3) をGgustとのキメラGタンパク質 (G16Gust25もしくはG16Gust44) とともに共発現させた場合、中性 (pH7.2) もしくは酸性 (pH5.5) 条件下で比較的濃い濃度のネオクリンに対する応答性に違いが見られなかった (図3・左列)。視野中において細胞内カルシウム濃度上昇を起こした細胞 (灰白色で示されている) の数はほぼ同じ程度であった。一方、ヒト甘味受容体と共発現させるキメラGタンパク質としてG15Gi3を用いた場合、異なるpH条件下において応答性が異なっていた (図3・右列)。中性条件下ではネオクリン投与により応答する細胞数が少ないのに対し、酸性条件下では応答細胞数が多かった。さらに投与するリガンドとして合成甘味料であるアスパルテームを用いた場合には、細胞外液のpHや共発現させるキメラGタンパク質の種類によって応答性に差がほとんど

なかったのに対し、pH依存的な差はリガンドとしてネオクリンを用い、G15Gi3を共発現させた場合についてのみ観察された (図4)。尚、この場合について観察される応答性の差は弱アルカリ性～酸性領域においてpH変化に依存的であることも確認された (結果未掲載)。

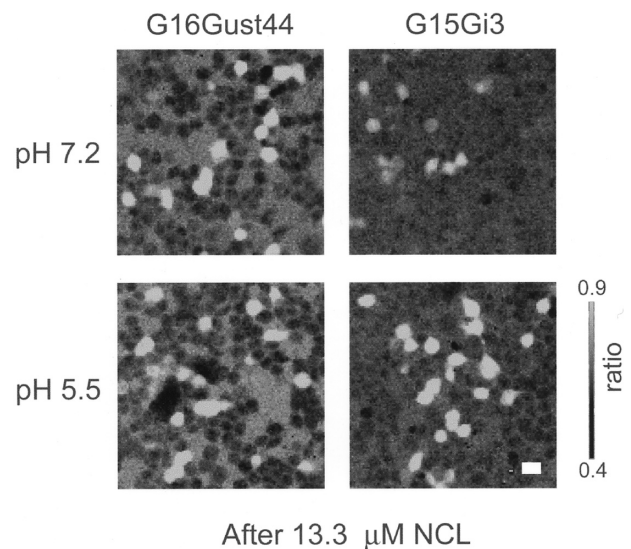


図3 異なるGタンパク質を用いた際のヒト甘味受容体のネオクリンに対する応答
ヒト甘味受容体 (hT1R2+hT1R3) を異なるキメラGタンパク質 (G16Gust44もしくはG15Gi3) とともにHEK293T細胞に共発現し、中性 (pH7.2) もしくは酸性 (pH5.5) 条件下でネオクリンに対する応答を観察した。13.3 μ Mのネオクリンを投与した後の蛍光カルシウム指示薬 (Fura-2) の蛍光強度比をグレースケールにて図に示した。

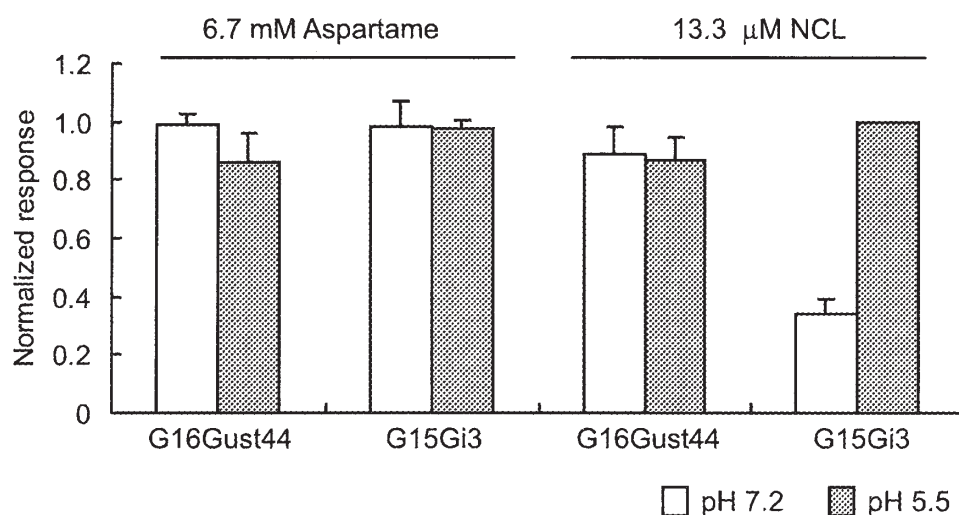


図4 異なるGタンパク質を用いた際のヒト甘味受容体の応答
ヒト甘味受容体 (hT1R2+hT1R3) を異なるキメラGタンパク質 (G16Gust44もしくはG15Gi3) とともにHEK293T細胞に共発現し、中性 (pH7.2) もしくは酸性 (pH5.5) 条件下でアスパルテームもしくはネオクリンに対する応答を観察した。Gタンパク質としてG15Gi3を用い、酸性 (pH5.5) 条件下で13.3 μ Mネオクリンを投与した際の応答細胞数で正規化した数値を図に示した。

以上の結果より培養細胞発現系においては、ヒト甘味受容体は共発現するGタンパク質により性質が異なること、またある種のキメラGタンパク質 (G15Gi3) と共発現させた場合においてはネオクリンの味覚修飾活性を評価しうる系となると判断した。

4. 考 察

本研究において味覚修飾タンパク質ネオクリンの味覚修飾活性評価系を構築するため、ヒト甘味受容体を2種類の発現系を用いて発現させ、機能解析を行った。

一般にアフリカツメガエル卵母細胞を受容体タンパク質の発現系として用いる利点として、①この発現系が外来膜タンパク質の発現に非常に適していること、②卵母細胞にcRNAを直接注入するため、複数遺伝子の同時発現が容易であること、③電気生理学的な記録は感度が良く、リアルタイムの記録が可能であること、④卵母細胞が非常に丈夫なため、培養細胞では困難な強い刺激（高濃度刺激、低温度刺激等）の適用が可能であること、等が挙げられる。しかしヒト甘味受容体については機能的に発現させることができず、ネオクリンの評価系として使用することはできなかった。

一方、哺乳類培養細胞発現系を用いた場合、ヒト甘味受容体は機能的に発現させることが可能であることはすでに報告されている⁵⁾。この系をリガンドとしてネオクリンを用いたところ、共発現させるGタンパク質を変えることによって、ネオクリンの持つ甘味と味覚修飾活性の両方を評価することができるかと判断した。共発現させるGタンパク質により受容体の性質が変化する例は他の受容体でも知られており⁶⁾、ヒト甘味受容体についてもその点については同様であるといえよう。

我々はすでに麴菌を宿主としてリコンビナントネオクリンを発現生産することに成功している⁷⁾。

麴菌により発現させた野生型ネオクリンはヘテロダイマーを形成しており、味覚修飾活性を有していることを官能検査により確認している⁷⁾。本研究により構築したネオクリンの味覚修飾活性評価系を用いることにより、リコンビナントネオクリンの味覚修飾活性が天然のものと同様であるかどうかを評価することが課題として挙げられる。また麴菌によるネオクリンの発現は発現プラスミドの導入により行われるため、ネオクリンの変異体をコードするcDNAを作製することにより変異体タンパク質を発現生産させることも可能である。複数の変異体を用いることにより、ネオクリンの持つ味覚修飾活性が何に由来するのかを検討して行く予定である。その際にも、本研究により構築した培養細胞を用いた味覚修飾活性評価系は強力なツールとして機能することが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Yamashita, H., Theerasilp, S., Aiuchi, T., Nakaya, K., Nakamura, Y., and Kurihara, Y. Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein taste-modifying activity, curculin. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15770-15775 (1990)
- 2) Shirasuka, Y., Nakajima, K., Asakura, T., Yamashita, H., Yamamoto, A., Hata, S., Nagata, S., Abo, M., Sorimachi, H., and Abe, K. Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1403-1407 (2004)
- 3) Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, **444**, 288-294 (2006)
- 4) Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, **106**, 381-390 (2001)

- 5) Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., and Adler, E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 4692-4696 (2002)
- 6) Shirokova, E., Schmiedeberg, K., Bedner, P., Niessen, H., Willecke, K., Raguse, J. D., Meyerhof, W., and Krautwurst, D. Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants. *J. Biol. Chem.*, **280**, 11807-11815 (2005)
- 7) Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, Y., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Kitamoto, K., and Abe, K. Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3716-3723 (2006)

Construction of the assay system evaluating the taste-modifying activity of neoculin derived from a tropical fruit (*Curculigo latifolia*)

Takumi Misaka

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

Neoculin, a sweet protein occurring in *Curculigo latifolia*, is unique in that it also has taste-modifying activity capable of converting sourness to sweetness. We here tried to construct the *in vitro* assay system evaluating both the sweetness and the taste-modifying activity of neoculin.

Calcium imaging analysis with HEK cells, which were expressing the human sweet taste receptor (hT1R2+T1R3) and a chimeric G protein (G16Gust25), demonstrated that the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) increased following the addition of 20 μ M NCL at the neutral pH. The use of lactisole, a blocker of the sweet receptor, inhibited the $[Ca^{2+}]_i$ increase almost completely. These results indicate that neoculin is actually received by the human sweet receptor and the reception can be monitored using the expression system using the mammalian cultured cells. On the other hand, when human sweet taste receptor was coexpressed with another G protein (G15Gi3), the cell response to neoculin was observed in a pH-dependent manner. The number of the responding cells at the acidic pH was higher than that at the neutral pH.

Our results obtained here suggest that we can evaluate both the sweetness and the taste-modifying activity of neoculin by the use of the mammalian cultured cells expressing the human sweet taste receptor.