総説

甘味タンパク質の構造と機能に関する研究

(平成 27 年度日本食品科学工学会奨励賞)

榊 田 哲 哉*

京都大学大学院農学研究科・食品生物科学専攻

Studies on the Structure-Sweetness Relationship of Sweet-Tasting Proteins

Tetsuya Masuda*

Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,
Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011

Many low-molecular weight molecules, including amino acids, saccharides, polyols, peptides, and synthetic compounds, are well known to elicit the sensation of sweetness, whereas most proteins are tasteless and flavorless. However, some proteins do elicit a sweet taste response on the human palate. Sweet-tasting proteins have potential as low-calorie sweeteners and as substitutes for sucrose for industrial applications, and could be useful in clarifying the mechanisms by which we perceive a sweet taste. However, despite a number of investigations assessing the relationship between sweetness and the structures of sweet-tasting proteins, no common feature has been identified in either their tertiary structures or amino acid sequences. However, most sweet-tasting proteins are basic and have high isoelectric points. Here, we first review site-directed mutagenesis and chemical modification studies on the charged residues of thaumatin and lysozyme. Efforts to increase the production yield of recombinant lysozyme and thaumatin from the yeast *Pichia pastoris* are then described. We conclude by introducing our recent investigations into the atomic-resolution structural analysis of thaumatin, and a cell-based assay using sweet taste receptors.

(Accepted Sep. 2, 2016)

Keywords : sweet-tasting proteins, lysozyme, thaumatin, structure-activity relationship

キーワード : 甘味タンパク質, リゾチーム, ソーマチン, 構造活性相関

1. はじめに

タンパク質は一般的に無味であるが、例外的に甘味を呈するタンパク質が存在する。現在まで6種の甘味タンパク質の存在が知られているが^{1)~10)}、これら甘味タンパク質間に共通して存在するアミノ酸配列や立体構造などの特徴は見出されていない。強い甘味を呈する甘味タンパク質は、ショ糖の代替物としての利用をはじめ、甘味の受容機構を解明するための有効なツールになると期待され、その特徴を明らかにすべく内外で多くの研究がなされている。

筆者らは甘味タンパク質リゾチーム、ソーマチンを題材として、化学修飾法、部位特異的変異法による甘味発現に係るアミノ酸残基の同定を通して、甘味タンパク質の構造と甘味発現の相関について研究を行ってきた。また甘味受容体、苦味受容体遺伝子をクローニングし、動物培養細胞に受容体を発現させた *in vitro* アッセイから甘味タンパク質の応答性に係わる受容体上の作用点に関する知見や甘味

タンパク質の苦味抑制効果に係る知見も得ている。さらに近年、大型放射光施設にて構造決定したソーマチンの高分解能構造情報と、部位特異的変異体法による構造活性相関の結果を考慮することで、甘味受容体との精度の高いドッキングモデルを構築することに成功し、甘味受容体との相互作用に関する多くの新たな知見を得ている。

本総説では、これまで筆者らが行ってきたリゾチームとソーマチンの構造活性相関研究を俯瞰し、近年得られた知見を交え、甘味タンパク質の特異な甘味発現機構と甘味受容体との相互作用について概説する。

2. リゾチームの呈味性

リゾチーム (EC 3.2.1.17) は細菌細胞壁に存在する *N*-アセチルグルコサミン、*N*-アセチルムラミン酸間のβ1-4結合を加水分解する溶菌酵素である。リゾチームの加水分解機構に関しては古くから研究が行われ、その作用機作についても多くの知見が得られている¹¹⁾¹²⁾。リゾチームは広

く動植物界に存在し、卵白に含まれるリゾチームは、ニワトリに代表される chicken-type リゾチーム (c-type lysozyme) と、ガチョウに代表される goose-type リゾチーム (g-type lysozyme) に大別される。鶏卵卵白リゾチームは分子量 14500、等電点が 11 の塩基性タンパク質であり、酵素として初めて X 線結晶構造解析が行われた¹³⁾¹⁴⁾。リゾチームは様々な分野でモデルタンパク質として利用されており、食品分野では品質の保持や特性の改良などの目的で利用されている。しかしながら、呈味性の観点からの研究は行われていなかった。1990 年代後半になり、我々を含めたグループからリゾチームの甘味性に関する報告がなされた⁹⁾¹⁰⁾。

甘味タンパク質の特異な甘味発現機構を解析するうえで、各々のアミノ酸残基の化学修飾や部位特異的変異による結果を立体構造と相関させて検討することが重要である。立体構造が既知であるリゾチームをモデルとして用いることにより、リゾチームの甘味発現部位の同定だけにとどまらず、甘味タンパク質間に共通して存在する特徴を見出すことが期待できる。そこでまずはじめに化学修飾法による甘味発現部位の同定を試みた。次に、リゾチーム大量生産系の確立、部位特異的変異法によるタンパク質工学的解析を行い、リゾチームの甘味発現機構を明らかにすることを試みた。

2-1 リゾチームの溶菌特性と甘味特性との関連

リゾチームは溶菌活性を有するため、基質分解物である糖質が甘味特性へ影響を与えることが考えられる。溶菌活性に関わる触媒残基は Glu35, Asp52 であるので (図 1)、その側鎖のカルボキシル基をグリシンメチルエステル、アミノメタンスルホン酸などの求核試薬を用い、水溶性カルボジイミド存在下で化学修飾を行い、溶菌活性を消失させた修飾リゾチームを作製した⁹⁾。溶菌活性ならびに甘味特性を検討したところ、修飾により溶菌活性は消失したが、この修飾リゾチームは甘味を呈したことから、リゾチームの甘味特性は溶菌活性とは対応せず、触媒残基は甘味発現に寄与しないことが明らかになった。

次に、リゾチームの立体構造の維持が甘味発現に寄与するか否かについて、分子内のジスルフィド結合を還元トリメチルアミノプロピル化した還元リゾチームについて呈味性を調べたところ、還元リゾチームは甘味を消失した⁹⁾。この結果から、リゾチームの立体構造の維持が甘味発現に重要な役割を果たしていることが示された。

鶏卵リゾチーム (c-type lysozyme) とは基質特異性、アミノ酸配列、立体構造が大きく異なるガチョウ、ダチョウリゾチーム (g-type lysozyme) の甘味性について検討した¹⁵⁾。ガチョウ、ダチョウの卵から卵白を取得し、陽イオンクロマトグラフィーによりリゾチームを精製し、官能検査に供した。この結果、ガチョウ、ダチョウリゾチームは鶏卵リゾチーム同様に甘味を呈した。G-type lysozyme は c-

図 1 リゾチームの構造

(A) 鶏卵リゾチーム (PDB: 2yb1), (B) ガチョウリゾチーム (PDB: 1531). Cartoon 図は PyMOL にて作成 (DeLano, W.L. (2002). The pyMOL/Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.). α ヘリックスをピンク色、 β ストランドを青色で示す。触媒残基 Glu35, Asp52, Glu73 をそれぞれ stick-model 黄色で示す。

type lysozyme と比べ立体構造は大きく異なるが (図 1)、両者とも等電点が 11 以上の塩基性タンパク質であることから、リゾチームの甘味発現には塩基性度が重要な役割を担っている可能性が示唆された⁹⁾。

2-2 リゾチームの塩基性度と甘味特性の関連

リゾチームは分子内に塩基性アミノ酸であるリジンを 6 残基、アルギニンを 11 残基有する。そこでまずリジン残基側鎖の化学修飾を行い甘味閾値に与える影響を検討した。化学修飾として、リジン残基側鎖の正電荷を維持するグアニジル化、側鎖の正電荷を中和するアセチル化、側鎖の正電荷を負電荷に変換するホスホピリドキサル化を行った¹⁵⁾。

2-2-1 グアニジル化

結晶化法により精製したリゾチームを *o*-メチルイソウレア溶液と反応させリジン残基側鎖のグアニジル化を行った。修飾体は硫酸沈殿後、十二分に透析を行い官能検査標品とした。修飾度をトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS)、および塩基性タンパク質用の native PAGE で検討したところグアニジル化リゾチームはアミノ基 6 残基が修飾されており、native PAGE の移動度は未修飾リゾチームとほぼ同等であった。また、グアニジル化リゾチームの甘味閾値は未修飾リゾチームと同等の甘味閾値であった (表 1)。この結果より、リジン残基側鎖の正電荷を維持する化学修飾では甘味に影響を与えないことが明らかとなった¹⁵⁾。

2-2-2 アセチル化

精製したリゾチームを酢酸緩衝液中において無水酢酸と反応させることによりアセチル化を行った。反応後十二分に透析を行い、引き続き HPLC を用いて精製し、修飾度の異なるアセチル化リゾチームを取得した。修飾度の判定は、先程と同等に native PAGE, TNBS 法により行った。またアセチル化リゾチームの等電点をショ糖密度勾配等電

表 1 化学修飾リゾチームの甘味閾値

	甘味閾値 (μM)
Unmodified lysozyme	6.7±2.5
Guanidinated-lysozyme	
6-residues-modified	~7.5
Acetylated-lysozyme	
6-residues-modified	>50
5-residues-modified	38±13**
4-residues-modified	15±6.3*
Phosphopyridoxylated (PLP)-lysozyme	
5-residues-modified	>50
4-residues-modified	>30
3-residues-modified	34±8.9**
2-residues-modified	8.3±2.6
1-residue-modified	5.6±2.6
Dephosphorylated	
PLP-3-residues-dephosphorylated	6.4±3.5

Threshold of sweetness expressed as (mean±SD).

** $P<0.01$, * $P<0.05$. The results of sensory analysis were from Masuda *et al.* 2005 [15].

点電気泳動法により決定した。官能検査の結果、4 残基以上アセチル化されたリゾチームは有意にその甘味閾値が上昇した (表 1)¹⁵⁾。

2-2-3 ホスホピリドキサル化

ホスホピリドキサル (PLP) 化はリゾチームとピリドキサル 5' リン酸を反応させた後、水素化ホウ素ナトリウムを加えて行った。アセチル化の場合と同様に、HPLC を用いて精製し、修飾度の異なる PLP 化リゾチームを取得した。官能検査の結果、リジン残基が 3 残基 PLP で修飾された場合、甘味閾値が顕著に上昇した。4 残基以上修飾されたものは甘味を呈さなかった (表 1)¹⁵⁾。閾値の上昇した PLP 化リゾチームについて phosphatase を用いて脱リン酸化を行い、リジン残基側鎖の電荷状況を負電荷から元の正電荷に戻し、甘味閾値に与える影響を検討した。その結果、脱リン酸化 PLP 化リゾチームの甘味閾値は、未修飾リゾチームと同等の甘味閾値を示した (表 1)。

以上のリジン残基の化学修飾の結果から、リゾチームの甘味発現にはリジン残基側鎖の塩基性度が重要であることが明らかになった¹⁵⁾。

2-3 酵母 *Pichia pastoris* でのリゾチーム大量発現系の構築

リゾチームの甘味閾値は 7 μM であるためヒトによる官能検査には大量のサンプルが必要である。特に以降の部位特異的変異体による解析では、閾値の減少も想定されるため、大量発現系の構築が必須である。そこで高分泌発現で知られているメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いたリゾチームの発現を試みた。その結果、培地上清 1 リットル当たり約 400 mg の発現量を達成した¹⁶⁾。酵母で発現させた組換え体リゾチームは、鶏卵卵白リゾチームと同じ N

表 2 リゾチーム変異体の甘味閾値

	甘味閾値 (μM)
Recombinant lysozyme	6.7±2.6
K96 A	18.3±6.2**
K96 A-K97 A	16.7±5.7**
K33 A-K97 A	5.8±1.9
K1 A	9.2±1.9
K116 A-R125 A	7.5±2.5
K13 A	16.0±8.0**
K1 A-K13 A	14.7±5.8**
K1 A-K13 A-K33 A	15.0±6.3**
K1R-K13R-K33R-K96R-K97R-K116R	7.0±4.3
R14 A	14.2±6.2*
R21 A	13.3±4.3*
R73 A	18.3±3.7**
R45 A	13.0±6.0
R68 A	6.7±2.4
R45 A-R68 A	14.0±4.9*
K116 A-R125 A	7.5±2.5

Threshold of sweetness expressed as (mean±SD).

** $P<0.01$, * $P<0.05$. The results of sensory analysis were from Masuda *et al.* 2005 [17].

末端アミノ酸配列を持ち、酵母に於いて N 末端が正しくプロセッシングされていた。またこの組換え体リゾチームは、卵白リゾチームと同等の溶菌活性、甘味閾値を有していた。

2-4 リゾチームの甘味発現部位の特定

化学修飾の結果から、リジン残基側鎖の塩基性度がリゾチームの甘味発現に影響を与えることが明らかとなったが、リゾチームの甘味発現には特異的なリジン残基が関わっているのか、あるいは、非特異的に塩基性アミノ酸残基が甘味発現に係わっているのか不明である。また、リジン残基以外の塩基性アミノ酸であるアルギニン残基の影響についても全く知見が得られていない。そこでまずリジン残基にターゲットを絞り、変異体作製を試みた¹⁷⁾。

リゾチームには分子内に 6 個のリジン残基が存在する。これらはいずれも分子表面に位置している。部位特異的変異によりリジン残基をアラニン残基に置換したところ、K13 A, K96 A 変異体の甘味閾値が顕著に上昇した (表 2)。しかしながら、Lys13, Lys96 以外の 4 つのリジン残基の変異体は甘味閾値に影響を与えなかった。立体構造上、甘味に影響を与えたリジン残基 (Lys13, Lys96) は、溶菌活性に係わる触媒残基 (Glu35, Asp52) が存在する面とはリゾチーム分子上において反対面に位置していた (図 2)。

次にリジン残基をアルギニン残基に置換し、甘味閾値に与える影響を検討した。その結果、6 つのリジン残基を全てアルギニン残基に変換しても甘味閾値に影響を与えなかった。以上のことから、リジン残基 Lys13 および Lys96 の側鎖の塩基性度がリゾチームの甘味発現に重要な役割を

図 2 リゾチームのリジン残基と触媒残基

(A), (B) を cartoon モデルで (C), (D) を spheres モデルで示す。(A) と (C) 図を軸に沿って 180 度回転させたのが (B) および (D) に相当する。鶏卵リゾチーム (PDB: 2vbl) を用いて PyMOL にて作成。触媒残基 Glu35, Asp52 を赤色で示す。甘味に重要である Lys13, Lys96 を青色でその他のリジン残基をシアンで示す。Lys13, Lys96 は触媒残基と反対面に存在していることがわかる。

図 3 リゾチームの甘味発現部位

触媒残基とは反対面に存在する 5 つの塩基性アミノ酸残基 (Lys13, Arg14, Arg21, Arg73, Lys96) がリゾチームの甘味に重要な役割をする。

果たしていることが明らかとなった¹⁷⁾。

Lys13 および Lys96 が存在する分子表面上には複数のアルギニン残基が存在する。そこでこの分子面に存在するアルギニン残基 (Arg14, Arg21, Arg73) についてアラニン残基に置換した変異体を作製し、甘味閾値に与える影響を検討した。その結果、R14A, R21A, R73A の変異により顕著に甘味閾値が上昇した (表 2)。一方、この分子表面に存在しないアルギニン残基の変異体 (R45A, R68A) は甘味に影響を与えなかった。以上の結果から、立体構造上同一分

子面に存在する 5 つの塩基性アミノ酸残基 (Lys13, Lys96, Arg14, Arg21, Arg73) がリゾチームの甘味発現に重要な役割を果たすことが明らかになった (図 3)¹⁷⁾。

さらに甘味発現に関わる 5 つの塩基性アミノ酸残基の 2 および 3 アミノ酸変異体を作製し甘味閾値に与える影響を検討した。その結果、Lys13-Arg14 および Arg21-Arg73 で形成される塩基性領域が甘味発現に重要であることが明らかとなった。

図 4 ソーマチンの構造

(A) thaumatin I (PDB : 3al7, 1.10 Å), (B) thaumatin II (PDB : 3wou, 0.99 Å). 双方で異なる 4 カ所のアミノ酸残基を赤色で示す. (A) Asn46, Ser63, Lys67, Arg76 および (B) Lys46, Arg63, Arg67, Gln76 を stick-model で表示した. PyMOL にて作成.

3. ソーマチンの甘味発現機構の解明

ソーマチン (タウマチン) は西アフリカ原産の植物 *Thaumatococcus daniellii* Benth の果実から単離される. 19 世紀中頃に Daniell により発見されたが¹⁸⁾, その甘味の本質がタンパク質であると同定されたのは 1972 年オランダの van der Wel と Loeve らによってである¹⁾. ソーマチンはヒスチジン以外の 19 種のアミノ酸を構成成分とする 207 アミノ酸残基からなる一本鎖タンパク質であり, 分子量 22000, 等電点が 12, 分子内に 8 つのジスルフィド結合を持つ. ソーマチンには, 陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンから少なくとも 5 つのバリエーション (ソーマチン a, b, c, I, II) が存在し, ソーマチン I, ソーマチン II が構成成分の大半を占める¹⁹⁾. ソーマチン I および ソーマチン II のアミノ酸配列を比較すると, 4ヶ所 (46 位, 63 位, 67 位, 76 位) のアミノ酸残基の相違が見られる (図 4). ソーマチンの甘味閾値は 50 nM であり, ショ糖と比べモル比で 10 万倍, 重量比で 3 千倍と非常に強い甘味を呈する. リゾチームの甘味閾値が 7 μM であることを鑑みると, ソーマチンの甘味強度の強さが改めて認識できる. このようにソーマチンは強い甘味を呈することからショ糖の代替甘味料としての利用に留まらず, 甘味発現機構解明の有効なツールになると考えられる. 化学修飾法による甘味発現にかかわるアミノ酸残基の同定が試みられているが, リジン残基の塩基性度が甘味発現に寄与し, アルギニン残基は甘味に関与しないとの報告がある一方²⁰⁾, アルギニン残基も甘味に関わるとの報告もある²¹⁾. これら化学修飾法による検討では, 修飾位置が同定されず, かつ修飾による構造変化についての考察も十二分になされていない. 2001 年に入りホスホピリドキサル (PLP) 化したソーマチンの修飾残基の同定ならびにその甘味閾値の決定がなされ, 5 つのリジン残基 (Lys78, Lys97, Lys106, Lys137, Lys187) の重要性が指摘された²²⁾. またこれら修飾体の負電荷をアルカリフォスファターゼで除去すると, Lys106

以外は未修飾と同様の甘味閾値に戻ったが, クレフト内部に存在する Lys106 については, 負電荷を除去しても甘味が減少したままであり, その側鎖構造が甘味発現に重要であり, クレフト構造を含む面に広く存在するリジン残基の正電荷が, 受容体と multi-point interaction しているとの報告がなされた²²⁾. しかしながら, 同じクレフト構造を含む面に存在する, その他のリジン残基 (Lys19, Lys49, Lys163) やアルギニン残基 (Arg76, Arg79, Arg82) に関しては, 化学修飾法によるアプローチでは意図した位置が修飾された修飾体の取得が困難である. 今日では部位特異的変異体を作製し, 構造と機能を検討する手法が定法として用いられているが, ソーマチンの場合は, 長らく甘味を有した組換え体の取得が困難であった. これは分子内に 8 つのジスルフィド結合を有しているのが一因とも考えられるが, まず発現に係る諸問題を精査し, 高発現培養系の構築を目指した.

3-1 ソーマチン発現系の構築

成熟型のソーマチンは 207 アミノ酸残基からなるが, この遺伝子を酵母 *Pichia pastoris* のシャトルベクター pPIC9K にクローニングし, *Pichia* GS115 株にエレクトロポレーションにより形質変換した²³⁾. 最小培地での陽性コロニーの選別後, 更に抗生物質 G418 耐性のコロニーを取得し, 発現を行ったところ, 培地 1 L あたり 25 mg の組換え体ソーマチンが得られた (表 3). この組換え体ソーマチンは N 末端, C 末端に数個のアミノ酸残基が付加していたものの, 甘味閾値は植物由来のソーマチンと同等であり, N 末端, C 末端領域は甘味発現に寄与しないことが明らかとなった (図 5).

ソーマチンの発現に際し, 多くの研究者はソーマチン II 遺伝子を用いて行ってきたが, 化学修飾法で得られた知見の多くは, ソーマチン I を用いている. 筆者らはソーマチン I 遺伝子の取得に成功したことから, 以降はソーマチン I 遺伝子を用いて発現を試みた.

3-1-1 ソーマチン配列が発現効率に与える影響

シャトルベクター pPIC9K を用いた場合, 最小培地での

表 3 ソーマチンの酵母 *Pichia pastoris* による発現

Host	Yield	Secretion signal	Additional N-term residues
<i>P. pastoris</i> (GS115)	25 mg/L	<i>S. cerevisiae</i> α -factor	2
<i>P. pastoris</i> X33	29 mg/L	<i>S. cerevisiae</i> α -factor	2 or 3
<i>P. pastoris</i> X33	100 mg/L	Thaumatococcus pre-sequence	none

図 5 ソーマチンの N 末端, C 末端部位

ソーマチンの構造を surface model にて示す。軸に沿って 90 度ずつ回転させた。N 末端の Ala1 を赤色で、C 末端の Ala207 を青色で示す。N 末端の Ala は比較的分子内部に埋もれていることがわかる。黄色は後述の部位特異的変異の結果から甘味に特に重要な役割をする Arg82, Lys67 を示す。PyMOL にて作成。

選別に時間を要する欠点があった。そこで、最小培地を用いず直接抗生物質で選別可能な pPIC6 α ベクターを用いての発現を試みた。分泌シグナルとしてベクター由来の α -factor を用いて、その下流に成熟型ソーマチンの配列を連結させた。抗生物質 Blastcidin 耐性のコロニーを取得し、発現を試みたところ、培地 1L あたり 30 mg 程度の組換え体ソーマチンが得られた (表 3)²⁴⁾。甘味閾値は植物由来のソーマチンと同等であったが、N 末端の配列をプロテインシーケンサーで確認したところ、N 末端に 2 残基および 3 残基のアミノ酸が付加しているものが混在していた。酵母による N 末端のプロセスが不十分であることがこの要因であると考えられたが、部位特異的変異体による解析では、変異導入の指標に電荷的性質を用いた PAGE により行うので、均一な組換え体のほうがより相応しい。そこで分泌シグナルの影響について更に検討した。

ソーマチンは前駆体として N 末端に 22 アミノ酸残基からなるプレ配列と C 末端に 6 アミノ酸残基からなるプロ配列を有する。そこでソーマチン由来のプレ配列ならびにプロ配列の有無が発現ならびに N 末端プロセスに与える影響について検討を行った²⁵⁾。その結果、ソーマチンプレ配列を用いると N 末端が正しくプロセスされ、かつ発現量が大幅に増加する結果が得られた²⁵⁾。一方プロ配列は除去されず、植物とは違う機構で発現されることが示唆された。培養条件の至適化、マルチコピー株の培養により発現量も 1L あたり 100 mg と大きく改善した (表 3)²⁶⁾。

3-2 ソーマチンの甘味発現部位の特定

酵母 *Pichia pastoris* による発現系の構築に成功したので部位特異的変異体による甘味発現部位の同定を試みた。ま

表 4 ソーマチン変異体の甘味閾値

	甘味閾値 (nM)
Plant thaumatin I	45 $\pm$ 9
Recombinant thaumatin I	45 $\pm$ 12
K19 A	70 $\pm$ 0
K49 A	140 $\pm$ 10
K67 A	870 $\pm$ 92
K106 A	140 $\pm$ 19
K163 A	180 $\pm$ 24
R76 A	95 $\pm$ 12
R79 A	170 $\pm$ 24
R82 A	1 100 $\pm$ 58
K67R	44 $\pm$ 6
K67E	1 500 $\pm$ 61
R82 K	240 $\pm$ 36
R82Q	1 010 $\pm$ 135
R82E	8 800 $\pm$ 1 600

The results of sensory analysis were from Ohta *et al.* 2008 [27], and 2010 [28].

ず変異を導入するアミノ酸残基として化学修飾法の結果より重要性が指摘されていた、クレフト面側に存在するリジン残基、アルギニン残基に焦点を絞った²⁷⁾。その結果、リジン残基をアラニン残基に置換した (K19 A, K49 A, K106 A, K163 A) 変異体では、甘味が 1.6 倍から 4 倍程度低下した (表 4)。K67 A 変異体では甘味が 19.3 倍と顕著に低下した。一方アルギニン残基の変異体では R76 A 変異体では 2.1 倍, R79 A 変異体では 3.8 倍, R82 A 変異体では 24.4 倍甘味が低下し、これまでアルギニン残基がソーマチンの甘味に寄与しないという化学修飾の報告とは大きく異なっ

いた (表 4)。

Lys67 と Arg82 の 2 残基がソーマチンの甘味発現に特に重要であることが明らかとなったので、さらに変異体のバラエティーを増やして、詳細を検討した。まず表面の電荷を維持させる変異、リジン残基をアルギニン残基、アルギニン残基をリジン残基に置換した場合に甘味にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、K67R 変異体では、その甘味閾値は植物ソーマチン、組換え体ソーマチンとほぼ同じ閾値であった。一方、R82K 変異体では甘味が 5.3 倍低下していた。この結果から、67 位においては、アミノ酸側鎖の正電荷が甘味に重要であること、82 位では正電荷のみならず、アミノ酸側鎖の厳密な構造が甘味に重要な役割を果たすことが明らかとなった。67 位はソーマチン I ではリジン残基、ソーマチン II ではアルギニン残基であり双方のアミノ酸配列で異なる 4 カ所のうちのひとつであるが、甘味閾値が同程度であることから K67R 変異体が甘味に影響を与えないことは想定できる。次に、リジン残基、アルギニン残基をグルタミン酸残基に置換した K67E、R82E 変異体を作製し甘味にどのような影響を与えるかを検討した²⁸⁾。その結果、K67E 変異体では 33.3 倍の甘味低下が、R82E 変異体ではおよそ 200 倍甘味が低下した。R82E 変異体の甘味の低下は極めて著しい低下であった。82 位についてはさらに R82Q 変異体を作製し、甘味に与える影響を検討したところ、甘味が 22.4 倍低下したことから、82 位のアミノ酸側鎖の厳密な構造、電荷位置がソーマチンの強い甘味を決定づける要因であると考えられた。

3-3 ソーマチンの高分解能構造解析

ソーマチンは酒石酸塩存在下で容易に正方晶の結晶が得られ、結晶化のモデルタンパク質として利用されている。研究の多くは植物由来のソーマチンを用いてのものであるが、筆者らは大型放射光施設 SPring-8 で構造解析を行い、酵母で発現させた組換え体ソーマチン I を用いて分解能 1.1 Å の構造を決定することに成功した²⁹⁾。高分解能データ取得により、異方性温度因子を含めた構造の精密化が可能となり、多くのアミノ酸残基において、水素原子の存在が確認できたのをはじめ、ソーマチンのバリエーション間で異なるアミノ酸側鎖構造の相違点を電子密度より明らかとした。また甘味に重要な役割をしている Arg82 残基の側鎖のフレキシブルな構造が甘味受容体との相互作用に重要な役割を果たしている可能性を示唆した (図 6)。またソーマチン II について、初めてその構造を分解能 1.27 Å で決定することに成功し³⁰⁾、さらに組換え体ソーマチン II の構造を分解能 0.99 Å で決定した³¹⁾。その結果、甘味受容体との相互作用には Arg67、Arg82 側鎖のフレキシブルな構造が重要であるという新しい知見を得た。また、アルカリ条件下で作製した結晶を用いた解析から、pH 変化に伴い特定のリジン残基側鎖の揺らぎが確認され、これらアミノ酸残基がアルカリ性条件下での加熱凝集に参与する可能性を示

図 6 ソーマチンの 67 位と 82 位の側鎖構造

上段リコンビナントソーマチン I (緑色)、リコンビナントソーマチン II (赤色)、植物ソーマチン II (シアン) の側鎖構造を stick model にて示す。

下段リコンビナントソーマチン II の電子密度マップ。alternative 構造がみられ、フレキシブルな構造を取っていることがわかる。PyMOL にて作成。

図 7 ソーマチンの pH 8.0 の構造

(A) *B*-factor の違いを色で示す (minimum=5 (blue), maximum=60 (red))。

(B) Large disulfide-rich region (154-164) を赤色で示す。Average *B*-factor の高い Lys137 (52.4 Å²), Lys163 (57.3 Å²), Lys187 (42.9 Å²) を黄色で示す。甘味に重要な Lys67 と Arg82 を青色で示す。PDB: 3vjv, PyMOL にて作成。

唆した (図 7)³²⁾。

3-4 甘味受容体発現細胞を用いた解析

甘味受容体は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である T1R2 と T1R3 のヘテロ二量体 (T1R2-T1R3) で構成される^{33)~40)} (図 8)。動物培養細胞を用いた実験より、糖類、アミノ酸、ペプチド、合成甘味料などの低分子甘味料から甘味タンパク質までこの甘味受容体 (T1R2-T1R3) によって受容されることが知られている。T1Rs は細胞外の N 末端部分に約 500 個のアミノ酸残基からなる大きな細胞外領域 (NTD) を持ち、その下流に約 60 個のアミノ酸残基ほどのシステインリッチ領域 (CRD)、さらに約 300 個のアミノ酸残基からなる C 末側膜貫通領域 (TMD) から構成される。現時点で、T1Rs の構造は決

図8 甘味受容体の構造

T1Rsは細胞外のN末端部分に約500アミノ酸残基からなる大きな細胞外ドメイン(NTD)を持ち、その下流に約60アミノ酸残基ほどのシステインリッチ領域(CRD)、さらに約300アミノ酸残基からなるC末側膜貫通領域(TMD)から構成される。糖類、アミノ酸、ペプチド、合成甘味料などの低分子甘味料から甘味タンパク質までこの甘味受容体(T1R2-T1R3)により受容される。

定されていない。

ソーマチンの甘味は、齧歯類では感受性がなく、旧世界ザルより進化した動物しか感受性を示さないことが知られている。そこで筆者らはこの種間の感受性の相違を利用し、ヒト甘味受容体(hT1R2-hT1R3)およびマウス甘味受容体(mT1R2-mT1R3)をクローニングし、さらにヒト型—マウス型受容体(hT1R2-mT1R3, mT1R2-hT1R3)を作製しHEK細胞に発現させ応答性の検討を行った⁴¹⁾。その結果、ヒト型甘味受容体(hT1R2-hT1R3)を発現させた細胞はソーマチンをはじめスクラロース、アスパルテーム、サッカリンに対して応答したが、マウス型甘味受容体(mT1R2-mT1R3)を発現させた細胞はソーマチン、アスパルテームに反応せず、スクラロースとサッカリンのみに反応した。また、hT1R2-mT1R3発現細胞ではスクラロース、アスパルテーム、サッカリンに対して応答したがソーマチンに対する応答のみが顕著に減少した。この結果よりhT1R3がソーマチンの応答に必須であることが明らかとなった(図9a)。次に筆者らは、hT1R3内における3つのドメイン(NTD, CRD, TMD)をswappingさせた受容体hT1R2-T1R3(hNTD/mCRD/mTMD), hT1R2-T1R3(hNTD/hCRD/mTMD)を作製し、ソーマチンの応答を検討したところ、hT1R2-T1R3(hNTD/mCRD/mTMD)は応答が見られなかったがhT1R2-T1R3(hNTD/hCRD/mTMD)は応答したことから、ヒト型のCRDが応答性に重要な役割を果たすことが明らかとなった(図9b)。さらに、CRD領域のヒトとマウスのアミノ酸配列を比較し、双方で16カ

所異なるアミノ酸残基についてヒト型からマウス型へ置換した点変異体を作製し応答性を検討したところ、CRD領域の5カ所(Q504, A537, R556, S559, R560)の置換がソーマチンに対する応答を顕著に減少させることが明らかとなった⁴²⁾。ソーマチンの応答に必須な受容体の領域は低分子甘味物質との相互作用部位とは異なっており、強い甘味を呈するソーマチンの特徴づける一因であると考えられた。

4. おわりに

ソーマチンの応答に重要な役割を果たすCRD領域は膜貫通領域(TMD)近傍に位置しており、実際にソーマチンがこの部位と相互作用しているのかについては未だ検討の余地が残っている。ソーマチンは27000 Å³程度の大きさであり、直接CRD領域と相互作用するにはかなり大きく、膜を貫通してしまう恐れがある。つまりソーマチンはCRD領域ではなくNTDにも結合し、情報伝達の際にCRDが重要な役割をしているという見解である。近年筆者らは、既に構造が決定されているグルタミン酸受容体の構造を鋳型として甘味受容体T1R2-T1R3のモデル構造を構築し、ソーマチンと甘味受容体のドッキングシミュレーションを行い、双方の相互作用に関する知見を得ており、ソーマチンの更なる高甘味度に取り組んでいる⁴³⁾。

ソーマチンは強い甘味を呈する一方で、苦味を低減させる作用を有することが知られている。この現象についても苦味受容体を動物培養細胞に安定発現させた細胞アッセイ系を用いて、官能検査に依らず、客観的にソーマチンの苦

図 9a ヒト、マウス甘味受容体と甘味物質との応答

ヒト甘味受容体(hT1R2-hT1R3)およびマウス甘味受容体(mT1R2-mT1R3), ヒト-マウス型受容体(hT1R2-mT1R3, mT1R2-hT1R3)を作製し応答性の検討を行った。ヒト甘味受容体はソーマチン、スクラロース、アスパルテーム、サッカリンに対して応答したが、マウス甘味受容体はソーマチン、アスパルテームに反応せず、スクラロースとサッカリンのみに応答した。hT1R2-mT1R3はスクラロース、アスパルテーム、サッカリンに対して応答したがソーマチンに対する応答のみが減少したことよりhT1R3がソーマチンの応答に必須であることが明らかとなった。

図 9b ヒト、マウス甘味受容体と甘味物質との応答

hT1R3内における3つのドメイン(NTD, CRD, TMD)をswappingさせた受容体hT1R2-T1R3(hNTD/mCRD/mTMD), hT1R2-T1R3(hNTD/hCRD/mTMD)を作製し、ソーマチンの応答を検討した。hT1R2-T1R3(hNTD/mCRD/mTMD)は応答しなかったがhT1R2-T1R3(hNTD/hCRD/mTMD)は応答したことから、ヒト型のCRDがソーマチンの応答性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

味抑制作用を確認し、その作用機作の一端を明らかにしている⁴⁴⁾。

また近年筆者らは甘味タンパク質の放射光高分解能解析による低分子呈味物質との相互作用に関する知見、室温で

の放射光、X線自由電子レーザーによる解析を試み⁴⁵⁾、新規な知見を得ている。今後甘味タンパク質と食品成分との詳細な相互作用に係る現象を可視化することで更なる甘味タンパク質の有効利用に貢献できるのではと考えている。

本研究は筆者が在籍する京都大学大学院農学研究科・食品生物科学専攻・食環境学分野にて行ったものである。御指導、御助言を頂きました、京都大学名誉教授（現ノートルダム清心女子大学教授）北畠直文先生、京都大学大学院教授谷史人先生に深謝申し上げます。タンパク質の構造解析では京都大学大学院教授三上文三先生、高輝度光科学研究センター、理化学研究所の関係諸氏に御礼申し上げます。最後に本研究に携わり辛苦を共に協力頂いた食環境学分野の関係諸氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- van der Wel, H. and Loeve, K., Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur. J. Biochem.*, **31**, 221-225 (1972).
- van der Wel, H., Isolation and characterization of the sweet principal for *Dioscoreophyllum cumminsii* (Stapf) Diels. *FEBS Lett.*, **21**, 88-90 (1972).
- Moris, J.A. and Cagan, R.H., Purification of monellin, the sweet principal for *Dioscoreophyllum cumminsii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **261**, 114-122 (1972).
- Liu, X., Hu, Z., Maeda, S., Aiuchi, T., Nakaya, K. and Kurihara, Y., Purification, complete amino acid sequence and structure characterization of the heat stable sweet protein, mabinlin II. *Eur. J. Biochem.*, **211**, 281-287 (1993).
- Yamashita, H., Theeraship, A., Nakaya, T., Nakamura, Y. and Kurihara, Y., Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein with taste-modifying activity, curculin. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15770-15775 (1990).
- 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).
- Suzuki, M., Kurimoto, E., Nirasawa, S., Masuda, Y., Hori, K., Kurihara, Y., Shimba, N., Kawai, M., Suzuki, E. and Kato, K., Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities. *FEBS Lett.*, **573**, 135-138 (2004).
- Ming, D. and Hellekant, G., Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS Lett.*, **355**, 106-108 (1994).
- Masuda, T., Ueno, Y. and Kitabatake, N., Sweetness and enzymatic activity of lysozyme. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4937-4941 (2001).
- Maehashi, K. and Uda, S., Sweetness of lysozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **53**, 605-606 (1988).
- Imoto, T., Johnson, L.N., North, A.C.T., Phillips, D.C. and Rupley, J.A., Vertebrate lysozymes. In Boyer, P.D. (ed.), *The Enzymes*, vol. 7. Academic Press, New York, pp. 665-868 (1972).
- Jollès, P. and Jollès, J., Review of progress in lysozyme research. *Mol. Cell. Biochem.*, **53**, 165-189 (1984).
- Blake, C.C.F., Johnson, L.N., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C. and Sarma, V.R., Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc. R. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, **167**, 378-388 (1967).
- Phillips, D.C., The hen egg white lysozyme molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 484-495 (1967).
- Masuda, T., Ide, N. and Kitabatake, N., Effects of chemical modification of lysine residues on the sweetness of lysozyme. *Chem. Senses*, **30**, 253-264 (2005).
- Masuda, T., Ueno, Y. and Kitabatake, N., High yield secretion of the sweet-tasting protein lysozyme from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **39**, 35-42 (2005).
- Masuda, T., Ide, N. and Kitabatake, N., Structure-sweetness relationship in egg white lysozyme : role of lysine and arginine residues on the elicitation of lysozyme sweetness. *Chem. Senses*, **30**, 667-681 (2005).
- Danieli, W.F., On the *Synsepalum dulcificum*, De Cand. ; or miraculous berry of Western Africa. *Pharmaceutical J.*, **11**, 445-448 (1852).
- Higginbotham, J.D., Protein sweeteners In: Hough, C.A.M., Parker, K. J. and Viltos, A. J. (eds.), *Developments in Sweeteners I*, Applied Science, London (1979).
- van der Wel, H. and Bel, W.J., Effect of acetylation and methylation on the sweetness intensity of thaumatin I. *Chem. Senses Flavor*, **2**, 211-218 (1976).
- Kitabatake, N. and Kusunoki, M., Role of arginine and lysine residues in sweetness expression of thaumatin. In Kurihara K, Suzuki N, Ogawa H (eds), *Olfaction and Taste XI*. Springer-Verlag, Japan (1994).
- Kaneko, R. and Kitabatake, N., Structure-sweetness relationship study of sweet protein thaumatin : Importance of lysine residues. *Chem. Senses*, **26**, 167-177 (2001).
- Masuda, T., Tamaki, S., Kaneko, R., Wada, R., Fujita, Y., Mehta, A. and Kitabatake, N., Cloning, expression, and characterization of recombinant sweet-protein thaumatin II using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, **85**, 761-769 (2004).
- Ide, N., Kaneko, R., Wada, R., Mehta, A., Tamaki, S., Tsuruta, T., Fujita, Y., Masuda, T. and Kitabatake, N., Cloning of the thaumatin I cDNA and characterization of recombinant thaumatin I secreted by *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.*, **23**, 1023-1030 (2007).
- Ide, N., Masuda, T. and Kitabatake, N., Effects of pre- and pro-sequence of thaumatin on the secretion by *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363**, 708-714 (2007).
- Masuda, T., Ide, N., Ohta, K. and Kitabatake, N., High-yield secretion of the recombinant sweet-tasting protein thaumatin I. *Food Sci. Technol. Res.*, **16**, 585-592 (2010).
- Ohta, K., Masuda, T., Ide, N. and Kitabatake, N., Critical molecular regions for elicitation of the sweetness of the sweet-tasting protein, thaumatin I. *FEBS J.*, **275**, 3644-3652 (2008).
- Ohta, K., Masuda, T., Tani, F. and Kitabatake, N., Introduction of a negative charge at Arg82 in thaumatin abolished responses to human T1R2-T1R3 sweet receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **413**, 41-45 (2011).
- Masuda, T., Ohta, K., Mikami, B. and Kitabatake, N., High-resolution structure of the recombinant sweet-tasting protein thaumatin I. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **67**, 652-658 (2011).
- Masuda, T., Ohta, K., Tani, F., Mikami, B. and Kitabatake, N., Crystal structure of the sweet-tasting protein thaumatin II at 1.27 Å. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **410**, 457-460 (2011).
- Masuda, T., Mikami, B. and Tani, F., Atomic structure of recombinant thaumatin II reveals flexible conformations in two residues critical for sweetness and three consecutive glycine residues. *Biochimie*, **106**, 33-38 (2014).
- Masuda, T., Ohta, K., Mikami, B., Kitabatake, N. and Tani, F.,

- Atomic structure of the sweet-tasting protein thaumatin I at pH 8.0 reveals the large disulfide-rich region in domain II to be sensitive to a pH change. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **419**, 72–76 (2012).
- 33) Hoon, M.A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, N.J. and Zuker, C.S., Putative mammalian taste receptors : a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, **96**, 541–551 (1999).
 - 34) Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y. and Hino, A., Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 236–242 (2001).
 - 35) Max, M., Shanker, Y.G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S. and Margolskee, R.F., Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus sac. *Nat. Genet.*, **28**, 58–63 (2001).
 - 36) Montmayeur, J.P., Liberles, S.D., Matsunami, H. and Buck, L. B., A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat. Neurosci.*, **4**, 492–498 (2001).
 - 37) Sainz, E., Korley, J.N., Battey, J.F. and Sullivan, S.L., Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *J. Neurochem.*, **77**, 896–903 (2001).
 - 38) 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).
 - 39) Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J. and Zuker, C.S., The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, **444**, 288–294 (2006).
 - 40) 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).
 - 41) Ohta, K., Masuda, T., Tani, F. and Kitabatake, N., The cysteine-rich domain of human T1R3 is necessary for the interaction between human T1R2-T1R3 sweet receptors and a sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **406**, 435–438 (2011).
 - 42) Masuda, T., Taguchi, W., Sano, A., Ohta, K., Kitabatake, N. and Tani, F., Five amino acid residues in cysteine-rich domain of human T1R3 were involved in the response for sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochimie*, **95**, 1502–1505 (2013).
 - 43) Masuda, T., Ohta, K., Ojio, N., Murata, K., Mikami, B., Tani, F., Temussi, P.A. and Kitabatake, N., A Hypersweet Protein: Removal of The Specific Negative Charge at Asp21 Enhances Thaumatin Sweetness. *Sci. Rep.*, **6**, 20255 (2016).
 - 44) 榊田哲哉, 塚原礼恵, 太田圭介, 北畠直文, 谷 史人, 日本食品科学工学会第 60 回大会要旨, p. 74
 - 45) Sugahara, M., Mizohata, E., Nango, E., Suzuki, M., Tanaka, T., Masuda, T., Tanaka, R., Shimamura, T., Tanaka, Y., Suno, C., Ihara, K., Pan, D., Kakinouchi, K., Sugiyama, S., Murata, M., Inoue, T., Tono, K., Song, C., Park, J., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Yabashi, M. and Iwata, S., Grease matrix as a versatile carrier of proteins for serial crystallography. *Nature Methods*, **12**, 61–63 (2015).

(平成 28 年 9 月 2 日受理)