固相合成による甘味タンパク質モネリンの構造活性相関

有 吉 安 男*・香 村 正 徳*

Solid-Phase Synthesis and Structure-Activity Relationships of Analogs of the Sweet Protein Monellin

Yasuo ARIYOSHI* and Masanori KOHMURA*

Monellin, an intensely sweet protein, was isolated from the fruit of the West African plant, *Dioscoreophyllum cumminsii*. Monellin consists of two noncovalently associated polypeptide chains, the A chain with 44 amino acid residues and the B chain with 50 residues. The tertiary structure has been determined, and the native conformation is essential for the sweet taste. Recently, the primary structure of monellin was unambiguously determined, and monellin was synthesized by the Fmoc solid-phase method. In an attempt to delineate the active site(s) of monellin, amino acid residues within potential active sites were replaced. Replacement of Cys^{B41} by Ser led to a small change in sweetness. Replacement of Ile^{B6}, Asp^{B7} or Ile^{B8} by different amino acids resulted in a complete or marked loss of sweetness. Replacement of Asp^{A16} or Tyr^{A13} by other amino acids did not reduce the substantial sweetness. Replacement of each Lys residue by L-2-aminohexanoic acid (L-norleucine) significantly diminished the sweetness potency, but did not completely remove the sweetness. Analysis of the synthetic analogs by circular dichroism (CD) showed that the major structural features of monellin were not significantly altered. These findings suggest that Ile^{B6}, Asp^{B7} and Ile^{B8} are responsible for eliciting a sweet taste, and that one or more basic residues may also be important for eliciting a sweet taste. In the course of the investigation, the D-enantiomer of monellin was synthesized by the Fmoc solid-phase method, and crystallized by the hanging drop vapor diffusion method. The D-isomer was shown by CD to be the mirror image of the synthetic L-monellin, and was devoid of any sweetness (essentially tasteless). DL-Monellin was crystallized from a 1 : 1 mixture of the synthetic L- and D-monellin, and its CD spectrum did not show any absorption. DL-Monellin was 2000 times sweeter than sucrose on a weight basis (cf., monellin is 4000 times sweeter than sucrose). These results indicate that the crystals consist of the racemates of DL-monellin.

Key words : Solid-phase synthesis ; Sweet protein ; Monellin ; Monellin analogs ; Structure-activity relationship ; D-Enantiomer ; D-Monellin ; DL-Monellin ; Crystallization.

1. はじめに

タンパク質は遺伝子工学によって合成され、部位特異的変異によってアナログが合成されている。一方、化学合成法ではアミノ酸残基数 30 前後のペプチドは市販の固相合成機と試薬を用いて容易に合成できるが、高分子のタンパク質の合成にはおのずと限界があり、アミノ酸残基数 100 前後が限度であり、その合成例はほとんど知

られていない。しかし、化学合成法では非天然型のアミノ酸の導入が容易であり、極端な例としてはすべてのアミノ酸が D-アミノ酸からなるタンパク質の合成も可能である。近年、固相合成法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の進歩により、高純度のペプチドが得られるようになり、生成物は質量分析、キャピラリー電気泳動、気相シーケンサーなどによりきわめて高い精度で純度検定ができ、高次構造の解析は 500~600 MHz 核磁気共鳴 (NMR)、シンクロトロン放射光を用いる X 線解析で行われるようになってきた。このようなことから、タンパク質も通常の有機化合物を取り扱うのと同じ感覚で有機化学者に受け入れられるようになってきた。タンパク質の中には甘味を呈するものがある。低分子甘味物質のデ

* 味の素 (株) 中央研究所 ()

* Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., ()

ザインと合成は1990年のアメリカ化学会(ボストン)のシンポジウムで一段落したと考え、筆者らは甘味タンパク質を鍵とし、鍵穴に相当する甘味レセプター部位のモデリングを行うことを計画した。以下に甘味を呈するタンパク質モノリンの一次構造の決定と合成、構造活性相関、D-およびDL-モノリンの合成と結晶化に至る経過をタンパク質有機化学の立場から述べる。

2. モネリン(monellin)

西アフリカ原産のつる状植物、*Dioscoreophyllum cumminsii* は7月から10月の雨期にこの地方の密林に生育し、直径が約1/2インチの赤い実をブドウの房状に、1房に50~100個つける。果実は非常に甘く、Zaireでは食用に供され、塊茎と茎は薬用に供される。1972年にMorrisとCaganはこの果実から分子量10,700でショ糖の3000倍の甘味を呈するタンパク質を単離し、彼らの研究所の名にちなんでmonellinと名づけた¹⁾。これとは別に、van der Welも同じ頃、このタンパク質を単離している²⁾。モノリンは甘味が強く、一度口に含むと、その甘味が1時間以上も持続する。この現象はモノリンが味受容細胞に強く結合するためと考えられるが、味受容細胞だけに特異的に結合するのかは明らかではない。別の考え方としては、モノリンが口腔の上皮組織に非特異的に結合し、唾液で徐々に溶出されて甘味が長時間続くと考えてもよい。

モノリンの一次構造式は1976年に3つのグループから独立に提出されたが、それらは互いにわずかに違っていた(図1)³⁻⁵⁾。1つは質量分析法によって構造決定しており⁵⁾、当時としては一番不利な方法と考えられるが、残りの2つはエドマン分解をしたアミノ酸残基を液体クロマトで分析するか⁴⁾、ガスクロマトで分析するか³⁾の違いであったが、前者の方が有利と考えられ、書物には液体クロマトを用いて決定された構造式が引用されている(図1(a)と(c))。それによると、モノリンはアミノ酸

残基数44のA鎖と50のB鎖が非共有結合で結合した単純タンパク質である。また、モノリンはA鎖、B鎖単独では甘味を呈さず³⁾、甘味の発現には天然のコンホメーションが必須であり、その三次元構造はX線結晶解析によって決定されている⁶⁾。

3. 合成方法の選択

モノリンの分子は小さいが、タンパク質としての性質を備えている。構造活性相関の手法によってモノリンの活性部位を決定するためには、多数のモノリンアナログを合成し、高次構造を構築し、最終的にはX線結晶解析のために結晶化しなければならない。当初、モノリンの合成にあたっては2つ大きな困難が予想された。すなわち、固相合成法の進歩によってペプチド合成が容易になったとはいえ、アミノ酸残基数50前後のペプチドが純粋に、かつ容易に得られるであろうか、またモノリンは天然と同じ高次構造をとってはじめて活性を発現するが、一次構造を合成しても果たして天然と同じコンホメーションをとり、かつ結晶化できるであろうか、といった問題があった。

1984年頃、筆者らは生理活性ペプチドの構造活性相関の研究で多種類の純粋なペプチドを合成する必要がある。その当時は α -アミノ基をt-Butoxycarbonyl(Boc)基で保護するBoc固相合成法がこのような目的のために広く用いられていたが、ヨーロッパでは α -アミノ基の保護にFluoren-9-ylmethoxycarbonyl(Fmoc)基を用いるFmoc固相合成法が推奨され始めていた。Boc法では各段階でのBoc基の除去に強酸のトリフルオロ酢酸(TFA)を用い、最終段階でフッ化水素やトリフルオロメタンスルホン酸などの強酸を用いるが、Fmoc固相合成法では各段階でのFmoc基の脱離には弱い塩基のピペリジンを用い、強酸としてはTFAを最終段階で用いるだけですむのでペプチド鎖を傷めないという利点がある。Boc法の歴史は古く、合成のノウハウは知りつくさ

れているので、Boc法で合成しても今以上の成果を期待できないと考え、筆者らは当時日本では馴染の薄かったFmoc法⁷⁾でペプチドを合成することにした。一般に有機化学からペプチド化学へ入った研究者は、固相法では液相法で得られるような純粋なペプチドは得られないと考えがちであり、筆者らもそのような考えをもっていた。しかし、Fmoc法で合成してみるときわめて高純度の

- (a) REIKGYEYQLYVYASDKLFRADISEDYKTRGRKLLRFNGPVPVP
 (b) REIKGYEYQLYVYASDKLFRANISQNYKTRGRKLLRFBGPVPVP
 A chain
 (c) GEWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLLTFNKVIRPCMCKKTIYENE
 (d) GEWEIIDIGPFTQNLGKFAVDEENKIGQYGRLLTFNKVIRPCMCKKTIYEE
 B chain

Fig. 1 Primary structures reported for monellin. For a, b, c and d, see references 4, 5, 4 and 3, respectively.

オリゴペプチドが得られ、容易に結晶化することがわかった。この結果はFmoc固相合成法でモノレリンの合成が可能であることを強く示唆していた。そこで、筆者らはこれまでに例のない化学合成によるタンパク質の構造活性相関の研究を開始した。

4. モネリンの推定構造式の合成

4.1. 推定構造式(図1(a)と(c))⁴⁾の合成

構造活性相関の基準物質として、提出されていた構造式のうち、まず最も正しいと考えられるモノレリンの一次構造式(図1(a)と(c))をFmoc固相法で合成した⁸⁾。A鎖は半自動合成機(Labotec SP 640)で、B鎖はガラスフィルターをつけた反応容器を振とう機に取り付け、手で合成した。保護と脱保護は図2に示した。 α -アミノ基の保護は弱い塩基で除去できるFmoc基を、側鎖の保護には酸で除去できるBu^t基(OH, COOH基の保護), Mtr基(Argのグアニジノ基の保護), Mbh基(AsnとGlnのアミド基の保護), MBzl基(CysのSH基の保護)を用いた。MetはS原子が合成中に一部酸化されてMetOに変わることがわかった。目的物にMetOを含むペプチドが混入するとHPLCでの分離が困難になることがわかったので、Metは最初からMetOとして導入し、最終段階でTMSBrでMetにもどす方法をとった。A鎖のC末端にはProが3残基結合しているが、Fmoc-Pro-Pro-Resinからピペリジンによる脱Fmocはジテトラヒドロピペラジンを生成することがわかったので、Fmoc-Pro-Pro-OHとH-Pro-Resinを縮合してFmoc-Pro-Pro-Resinとした後にFmoc基を除去した。

ペプチド鎖の伸長はdicyclohexylcarbodiimide(DCC)/1-hydroxybenzotriazole(HOBt)(CH₂Cl₂-DMF溶媒)法で行い、Fmoc基はピペリジンで除去した。縮合と脱保護はそのつどニンヒドリンでモニターし、反応が不完全な場合は繰り返し反応を行った。それでも不完全なときは、無水酢酸でキャッピングし、アミノ酸が欠落したペプチドの混入を防止した。B鎖の合成では縮合が困難なアミノ酸については、対称酸無水物法またはDCC/HOBt(N-methyl-2-pyrrolidone=NMP溶媒)法などを組み合わせて用いた。全アミノ酸の導入が終わった後に、A鎖ではまずN末端のFmoc基をピペリジンで除去し、図2に示したようにTFAで樹脂から切り離すとともに側鎖の保護基を除去した。B鎖も同様に処理したが、MetOとCys(MBzl)残基があるのでさらにTMSBrで処理した。生成物はHPLCで精製し、A鎖は14.6%、B鎖は5.6%の収率で得られた(収率は出発原料のアミノ酸-樹脂から算出)。これらのペプチドの純度はHPLC, fast

atom bombardment mass spectrometry(FAB-MS), アミノ酸分析, シーケンシングで検定され、満足する結果を与えた。

このようにして得られたA鎖とB鎖は合わせたのち、疎水クロマトグラフィー(hydrophobic interaction chromatography=HIC)で精製し、53.9%の収率でモノレリンが得られた。上記と同様の純度検定は満足する結果を与えた。合成モノレリンはモノレリンに特徴的な長引く強い甘味(重量比でショ糖の4000倍の甘味)を呈した。モノレリンの甘味は長時間にわたって感じられるので、甘味力の測定は閾値付近で行うこととし、0.6%のショ糖水溶液と重量比で比較した。以下の実験ではこの方法での結果が示されている。なお甘味物質の甘味力は、対照として用いる甘味物質とその濃度によって大きく変わってくる。同じ物質の甘味度が文献によって違っていることがあるので注意されたい。天然モノレリンの甘味度について、2500~3000倍と報告されているが、測定条件が違うため、いずれも正しい値である。結晶化は蒸気平衡拡散法で行い、板状の結晶を与えた。

次に合成モノレリンは天然モノレリンと同じであるか否か、言い替えれば合成した一次構造式は正しいか否かを決定するために、モネル化学感覚研究所のBrand博士から恵与された天然モノレリンとの同定を行った。同定にあたっては、天然モノレリンのA鎖は、A鎖のN末端にPheを余分にもつPhe-A鎖を10%含むことがわかっていたので、HPLCでA鎖、Phe-A鎖、B鎖に分けた後に、A鎖、B鎖について同定を行った。C₁₈カラムを用いるHPLCではA鎖、B鎖ともに天然物と一致したが、ペプチドマッピングでは、A鎖は天然のA鎖と一致したが、B鎖はわずかに違っていた。この結果は提出されていたB鎖の一次構造式が天然のB鎖とはわずかに違うことを示している。ここで合成したモノレリンはモノレリンアナログの[Asn^{B49}, Glu^{B50}]モノレリン(2)であった(項5. 参照)。

4.2. 推定構造式(図1(b))⁵⁾の合成

A鎖(図1(b))の合成は半自動合成機を用いて行った。縮合はDCC/HOBt法(溶媒はDMF-CH₂Cl₂またはNMP)または対称酸無水物法で行い、各縮合と脱離の工程はニンヒドリンでモニターした。4.1.と同様に処理してA鎖を13.4%の収率で得た⁹⁾。このA鎖は4.1.で得たB鎖と1:1(w/w)でフォールディングさせ、モノレリンを26.2%の収率で得た。甘味度はショ糖の550倍で、甘味力からみてもモノレリンではないことがわかる。結晶化は蒸気平衡拡散法で行い、細長い柱状の結晶として得られた。ここで合成したモノレリンはモノレリンアナログの

[Asn^{A22}, Gln^{A25}, Asn^{A26}, Asn^{B49}, Glu^{B50}]モノリン(3)

であった(項5. 参照)。

提出された構造式に従って全合成をしてみると違っていた, ということは天然物の合成ではよくあることでやむをえないが, ここで天然モノリンの一次構造を決定す

る必要が生じた。

5. モネリンの一次構造の決定

筆者らがモノリンの一次構造を決定した1989年当時は市販のモノリンの在庫がなく, モネル研究所の Brand

博士にお願いして天然物から単離していただいた。先に3グループが一次構造を決定したときに用いたサンプルは, いずれもモネル研究所で単離されたものであり, 筆者らも同じサンプルの一次構造を決定したことになる。先に, 3グループから提出されていたアミノ酸配列のうち, A鎖では22, 25, 26位が, B鎖では49と50位に相違がみられた。モノリンはHPLC(C₁₈カラム)の条件下ではA鎖, Phe-A鎖, B鎖に分かれるので, まずA鎖, Phe-A鎖, B鎖を分取し, それぞれのアミノ酸配列を決定した。まずA鎖はFAB-MSで分子量を決定し, アミノ酸分析を行った後に, 気相シーケンサーでアミノ酸配列を決定した。A鎖のArg¹からPhe³⁷まではA鎖の自動エドマン分解で決定できた。残りの配列は, まずA鎖をトリプシンで加水分解し, 生成したフラグメントをHPLCで分取し, 各フラグメントのアミノ酸組成を決定し, C末端オクタペプチドに相当するフラグメントの配列を自動エドマン分解で決定した(Phe³⁷-Pro⁴⁴)。モノリンの分子量が既に決定されているので, このオクタペプチドがC末端部であると決定できた。

B鎖の解析はA鎖と違って複雑であった。HPLCで分取したB鎖を自動エドマン

Fig. 2 Protection and deprotection schemes for the solid-phase synthesis of monellin. Abbreviations follow the recommendations of the IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature in *Eur. J. Biochem.*, 138, 9 (1984). Other abbreviations used: Mbh, 4,4'-dimethoxybenzhydryl; Mtr, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl; MBzl, *p*-methoxybenzyl; DMF, *N,N*-dimethylformamide; TMSBr, trimethylsilylbromide.

分解かけると N 末端部として, Gly, Glu, Thr が検出された。一般に, エドマン分解では Thr や Ser の phenylthiohydantoin(PTH)の誘導体は分解するために, 回収率が悪い。モノレリンのエドマン分解では, PTH-Thr 誘導体が PTH-Gly や PTH-Glu に比べて小さなピークではあるが検出された。この事実は B 鎖は 2 本のホモログを伴っていることを示している。そこで, この混合物を electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)で分析し, 分子量とおおよその混合比を決定することにした。その結果, B 鎖の他に, N 末端の Gly が欠けた des-Gly¹-B 鎖と N 末端に Thr が結合した Thr-B 鎖が混入していることがわかった。B 鎖: des-Gly¹-B 鎖: Thr-B 鎖の比はおおよそ 100:43:33 であった。これら 3 種のホモログは HPLC では分別することができなかった。そこで 3 種の混合物をトリブシンで加水分解し, 生成したフラグメントを分取し, 各フラグメントのアミノ酸組成を決定し, 自動エドマン分解でアミノ酸配列を決定した。フラグメントのうち, Gly¹-Lys¹⁷ と Thr-Gly¹-Lys¹⁷ を含むフラグメントは HPLC で分離できなかった。そこで分子量は FAB-MS で決定し, さらにプロリルエンドペプチダーゼで Pro¹⁰ と Phe¹¹ の間でペプチド鎖を切断し, Thr-Gly¹-Pro¹⁰, Gly¹-Pro¹⁰, Phe¹¹-Lys¹⁷ の 3 本に分け, HPLC で分取してエドマン分解にかけ, アミノ酸配列を決定した。唯一の Cys を含むフラグメント(Val³⁷-Ile-Arg-Pro-Cys⁴¹)の

エドマン分解は 41 番の Cys に相当する PTH-アミノ酸誘導体を与えなかったが, FAB-MS で求めた分子量から 41 番が Cys であると決定できた(図 3)¹⁰⁾。なお, B 鎖は図 1(d)に一致した。以上のように, 自動エドマン分解と質量分析を組み合わせることにより, 短期間で一次構造を決定することができた。A 鎖と B 鎖の N 末端の不均一性は, おそらく一本鎖であったモノレリンが酵素加水分解によって二本鎖になったものと推定される。Kim らは結晶構造上で近い位置にある B 鎖の C 末端と A 鎖の N 末端とを遺伝子工学で結合した一本鎖のモノレリンを合成し, モネリンと同じ甘味と立体構造をもつことを報告している¹¹⁾。なお, 最近, 市販のモノレリンの一次構造を調べたところ, A 鎖と Phe-A 鎖の比はほぼ 1:1 であり, B 鎖は上記のホモログをほとんど含まない 50 残基の一本鎖であった。

6. モネリンの改訂式の合成

A 鎖は, 項 4.1. で合成した A 鎖が天然物と一致したことから, B 鎖のみを合成してこの A 鎖とフォールディングさせればよい。ペプチド合成は半自動合成機で行い, 保護と脱保護は項 4.1. で述べたのと同じ方法で行った。縮合は DCC/HOBt(NMP)法と対称酸無水物法を組み合わせで行い, 各縮合と脱離工程は 4.1. と同様に行った。収率は出発原料の保護アミノ酸・樹脂から算出して 6.2% であった。合成 B 鎖はアミノ酸分析, HPLC,

Fig. 3 Complete amino acid sequence of monellin. Approximately 10% of the A chain carries an extra Phe residue at the N-terminus, and approximately 19% of the B chain carries an extra Thr residue at the N-terminus and approximately 24% of the B chain lacks the N-terminal Gly residue.

ESI-MS, FAB-MS で純度を検定し、満足する結果を与えた。A 鎖, B 鎖およびそのアナログを合成してみると, A 鎖は収率良く(最高 30.6%)合成できたが, B 鎖およびそのアナログは常に低収率であった。B 鎖およびそのアナログは HIC でしばしば 2 本のピークとして現れることがわかった。この原因は、詳しくは解明されていないが、単離の工程で B 鎖どうしが会合するらしいこと、また B 鎖の合成中に副生する短鎖ペプチドが、B 鎖と会合したり、B 鎖の会合と何らかの関係がありそうだということが、HIC での B 鎖の挙動により推定された。このような会合した B 鎖を A 鎖と処理して、モネリン分子を構築しようとする、多量の、未反応の A 鎖と B 鎖が残ってしまう。そこで、A 鎖と B 鎖の比を 1:1.9(w/w)でフォールディングさせると A 鎖がすべて消費され、25.7%の収率でモネリン(1)を与えた。甘味力はショ糖の 4000 倍であった。結晶化は蒸気平衡拡散法で行い、板状の結晶が得られた¹²⁾。

7. 構造活性相関

甘味物質は、その化学構造を少し変えただけでも甘味を失うことはよく知られており、甘味タンパク質の活性部位を見つけるのは困難が予想される。モネリンの活性部位を決定するための実験に役立ちそうな情報として、以下のようなことがわかっていった。(i)一次構造、(ii)結晶構造、(iii)甘味の発現には天然のコンホメーションが必要、(iv)A 鎖, B 鎖単独では甘味を呈さない、(v)モネリンとタウマチン(thaumatin, 甘味タンパク質)に交差反応をする抗体がある、(vi)モネリンとタウマチンの一次構造および三次構造の間には、特別の共通点は見られない。ただし、統計的にはほとんど意味がないと考えられるが、アミノ酸が 3 残基同じものがモネリンに 7 箇所ある、(vii)Cys を化学修飾したり、隣接する Met を BrCN で処理すると甘味を失う。

構造活性相関の研究の最初の化合物としては、Cys^{B41}を化学修飾すると甘味を失うことが知られているので、まず Cys^{B41}を Ser で置換した[Ser^{B41}]モネリンを合成した¹³⁾。[Ser⁴¹]B 鎖の合成はガラスフィルターを付けた反応容器を振とう機に取り付け、手動で合成した。縮合は DCC/HOBt 法(溶媒は DMF-CH₂Cl₂ または NMP)または対称酸無水物法で行い、各縮合と脱離反応はニンヒドリンでモニターした。図 2 と同様に処理し、[Ser⁴¹]B 鎖を 3.9%の収率で得た。この[Ser⁴¹]B 鎖も先に述べたように、HIC で 2 本のピークに分かれた。HIC で遅れて溶出される[Ser⁴¹]B 鎖を用いて A 鎖とフォールディングさせると、[Ser^{B41}]モネリンの収率は低かったので、HIC

で先に溶出される[Ser⁴¹]B 鎖を単離(1.9%)して A 鎖と 1:1(w/w)の比率でフォールディングさせると、[Ser^{B41}]モネリン(4)が 31.0%の収率で得られた。結晶化は前記と同様に行い、鱗片状の結晶が得られた。甘味度はショ糖の 2000 倍であった。4 は HIC の条件下では不安定であり、Cys^{B41}は分子の安定化に寄与していると考えられ、活性部位ではないと結論された。

天然のコンホメーションを保ったまま分子中の特定のアミノ酸を別のアミノ酸で置換して、甘味がなくなるか、著しく低下することがわかれば、そのアミノ酸が活性発現と関係があると推定できる。遺伝子工学ではアミノ酸を順次 Ala で置換するアラニンスキャン変異などの手法が知られているが¹⁴⁾、化学合成で多くの位置置換タンパク質を合成することは困難である。そこで標的とするアミノ酸を特定する必要がある。先に合成した[Asn^{A22}, Gln^{A25}, Asn^{A26}, Asn^{B49}, Glu^{B50}]モネリン(3)は甘味力が著しく低下したが、A 鎖中のこれらの Asn と Gln は天然モネリンでは Asp と Glu であった。そこで、これらのアミノ酸が単独ではどのくらい甘味力を低下させるかを検討することは、活性中心の発見に何らかの手掛かりを与えるかもしれない。また、ジペプチドが甘味を呈するのは L-Asp-L-Phe-OMe や (R)-Ama-L-Phe-OMe のように、N 末端側のアミノ酸が L-Asp か (R)-Ama のときである。このようなことからモネリン分子中の Asp を Asn に置換したアナログを合成し、甘味におよぼす影響を検討した。

A 鎖には 16, 22, 26 位に Asp が存在するので、これらを Asn に置換し、さらに上に述べたアナログ中の Glu^{A25} も Gln に置換した。[Asn²²]A 鎖, [Asn²⁶]A 鎖, [Gln²⁵]A 鎖の合成は半自動合成機で行い、[Asn¹⁶]A 鎖の合成は Applied Biosystems 社製の全自動合成機(ABI 430 A)で行った。B 鎖は半自動合成機で行い、HIC で早く溶出される B 鎖だけを用いて A 鎖と 1:1(w/w)の比率でフォールディングさせて、収率よくモネリンアナログを得ることができた。

[Asn^{A16}]モネリン(5), [Asn^{A22}]モネリン(8), [Gln^{A25}]モネリン(9), [Asn^{A26}]モネリン(10)は、それぞれショ糖の 7500, 750, 2500, 5500 倍の甘味を呈した¹⁵⁾。8 と 9 の甘味力がかなり低下し、かつ HIC の条件下で不安定であった。この理由としては、モネリン分子中の Asp^{A22}は、Leu^{A35} および Arg^{A36} と水素結合を、Glu^{A25}は Arg^{A32} とイオン結合をしているが⁶⁾、これらの遊離カルボキシル基をアミド基に変えたことによって、分子内の結合が弱くなったと考えられる。いずれにせよ、A 鎖中の Asp は活性中心とは関係なさそうである。

Table 1 Structure and sweetness of monellin analogs.

No.	Protein	Sweetness ^a	Ref.
1	Synthetic monellin	4000	12
2	[Asn ^{B49} , Glu ^{B50}] monellin	4000	8
3	[Asn ^{A22} , Gln ^{A25} , Asn ^{A26} , Asn ^{B49} , Glu ^{B50}] monellin	550	9
4	[Ser ^{B41}] monellin	2000	13
5	[Asn ^{A16}] monellin	7500	15
6	[Abu ^{A16}] monellin	8000	18
7	[D-Asp ^{A16}] monellin	8000	18
8	[Asn ^{A22}] monellin	750	15
9	[Gln ^{A25}] monellin	2500	15
10	[Asn ^{A26}] monellin	5500	15
11	[Asn ^{B7}] monellin	20	16
12	[Abu ^{B7}] monellin	0	16
13	[Glu ^{B7}] monellin	10	18
14	[Gly ^{B7}] monellin	0	18
15	[D-Asp ^{B7}] monellin	0	18
16	[Asn ^{B21}] monellin	7000	16
17	[Gly ^{B6}] monellin	10	18
18	[Ala ^{B6}] monellin	100	18
19	[D-Ala ^{B6}] monellin	0	18
20	[Gly ^{B8}] monellin	20	18
21	[Ala ^{B8}] monellin	90	18
22	[Phe ^{B8}] monellin	10	18
23	[D-Ala ^{B8}] monellin	0	18
24	[Ala ^{B5}] monellin	1500	18
25	[Ala ^{B9}] monellin	0	18
26	[D-Ala ^{B9}] monellin	0	18
27	[Gly ^{A13}] monellin	3500	18
28	[Phe ^{A13}] monellin	3500	18
29	[D-Tyr ¹³] A chain + B chain	—	18
30	[Ahx ^{A4}] monellin	1500	18
31	[Ahx ^{A17}] monellin	1000	18
32	[Ahx ^{A28}] monellin	1750	18
33	[Ahx ^{A33}] monellin	1750	18
34	[Ahx ^{B17}] monellin	1000	18
35	[Ahx ^{B25}] monellin	1250	18
36	[Ahx ^{B36}] monellin	750	18
37	[Ahx ^{B43}] monellin	500	18
38	[Ahx ^{B44}] monellin	500	18
39	[Ahx ^{B43} , Ahx ^{B44}] monellin	50	18
40	[Ahx ³⁶ , Ahx ⁴³ , Ahx ⁴⁴] B chain + A chain	—	18
41	D-Monellin	0	26
42	DL-Monellin	2000	26

^a Times sweeter than sucrose (weight basis, 0.6 % sucrose=1). Zero indicates that the protein was devoid of any sweetness and was essentially tasteless when tasted as a lyophilized powder. The hyphen indicates that a 1 : 1 (w/w) mixture of the corresponding two chains was devoid of any sweetness; the [D-Tyr¹³] A chain did not associate with the B chain (see protein 29).

B鎖には7位と21位にAspがあるので、これらをAsnに置換した。合成は全自動合成機を用いて行い、縮合はdiisopropylcarbodiimide (DIC)/HOBT法で行い、縮合が困難なアミノ酸は縮合を2回行った。脱保護、精製は先に述べた方法で行い、[Asn²¹]B鎖と[Asn⁷]B鎖を3.0%と3.2%の収率で得た。

ESI-MS分析の結果、[Asn²¹]B鎖は少量のdes-Thr³³-[Asn²¹]B鎖を含むことがわかったが、このThr欠落ペプチドはHPLCおよびHICでは除去できなかった。しかし、以前の実験から、B鎖が不純ペプチドを含んでいても、フォールディングしてモネリン分子が生成したときには、不純ペプチドはフォールディングしないので混入してこないことがわかっていて、そこでA鎖と[Asn²¹]B鎖を1:1(w/w)の比率でフォールディングさせ、[Asn²¹]モネリン(16)を63.2%の収率で得ることができた。HICで精製した16のESI-MS分析はdes-Thr³³-[Asn²¹]B鎖を含まないことを示し、合成した16は高純度であることが証明された。なお、未反応のA鎖と、[Asn²¹]B鎖中に不純物として混入していたdes-Thr³³-[Asn²¹]B鎖は、確認のために、HIC精製残液から単離し、同定された。16はショ糖の7000倍の甘味を呈した¹⁶⁾。Asp²¹はモネリン分子の α -ヘリックス上にあるが、Asnに置換したことで若干のコンホメーション変化が起こったか、酸性度が低下したために、よりよくレセプターに結合したと推定される。

[Asn⁷]B鎖とA鎖を1:1(w/w)の比率でフォールディングさせると、HIC上で[Asn⁷]モネリンのピークは小さく現れた。そこで[Asn⁷]B鎖とA鎖を1.6:1(w/w)の比率でフォールディングさせ、[Asn⁷]モネリン(11)を47.4%の収率で得た。11の甘味力はショ糖の20倍であった¹⁶⁾。11中に、もし脱アミド化して生成した微量のB鎖(天然の配列)が混入していると甘味を呈する可能性がある。そこで、この問題を解決するために、11の[Asn⁷]B鎖を単離し、キャピラリー電気泳動で分析したが、B鎖の混入は認められなかった。そこでモネリンのAsp⁷はカルボキシル基がレセプターサイトでイオン結合で結合して強い甘味を呈するが、11ではアミド基がレセプターサイトで水素結合で結合して弱い甘味を呈すると考えた。この考えを確かめるために、アミド基もカルボキシル基も持たないL-2-アミノ酪酸(Abu)に置換した[Abu⁷]モネリン(12)の合成を計画した。[Abu⁷]B鎖の合成は上記と同様に行い、4.1%の収率で得られた。これをA鎖と1:1(w/w)の比率でフォールディングさせ12を62.0%の収率で得た。結晶化は蒸気平衡拡散法で行い、柱状結晶として得られた。12は甘

味をもたず、本質的に無味であった¹⁶⁾。

12および11のcircular dichroism(CD)スペクトルは天然のモネリンと同じであり、骨格に大きな変化はないこと、Asp⁷(天然)は分子の表面にあり、 β -ストランド上に位置し、分子内水素結合に関与していないこと、およびこの付近のGlu⁸²、Glu⁸⁴、Ile⁸⁶は、それぞれThr⁸⁴⁵、Lys⁸⁴³、Cys⁸⁴¹と水素結合をしており¹⁷⁾、Gly⁸¹からIle⁸⁶までは固定されていると考えられる。このようなことからAsp⁷は活性に関係があると考えられた。モネリンとタウマチンとの間には、同じアミノ酸配列をもつトリペプチドが7対ある。トリペプチドのような短いペプチドの相同性が統計的な意味があるとする考えと、意味がないとする考えがある。偶然かもしれないが、モネリンのIle⁸⁶-Asp-Ile⁸⁸はタウマチンのIle¹⁰⁰-Asp-Ile¹⁰²と同じ配列である。モネリンとタウマチンに交差反応をする抗体があり、トリプシンで加水分解したモネリンのフラグメント2種をこの抗体が認識することが知られている¹⁷⁾。このフラグメントの1つにAsp⁷が含まれている。このようなことから、Asp⁷が活性中心である可能性はかなり高いと考えられる。そこで、この付近をさらに集中的に検討することにした。

以下の合成は全自動合成機で行い、A鎖とB鎖アナログは1:1(w/w)の比率でフォールディングさせた¹⁸⁾。Asp⁷をGluで置換した[Glu⁷]モネリン(13)はショ糖の10倍の甘味を呈したが、GlyまたはD-Aspで置換した[Gly⁷]モネリン(14)と[D-Asp⁷]モネリン(15)は甘味をもたず、本質的に無味であった。[Glu⁷]モネリンのGlu⁷は、その側鎖がAspの側鎖より炭素原子一個分だけ長いために、COOH基がレセプターとイオン結合をするのが困難になるために、弱い甘味を呈したと考えられる。[Gly⁷]モネリンは、レセプターサイトに結合するためのCOOH基を持たないために無味であり、[D-Asp⁷]モネリンは、側鎖のCOOH基の方向がL-Aspとは違うためにレセプターサイトに結合できないので甘味を呈さないと考えられる。

強い甘味を呈する化合物は疎水性の部位または基を分子内に持っており、疎水性相互作用によってレセプターと結合し、甘味力を高めると考えられている。例えば、甘味ペプチドL-Asp-L-Phe-OMeのPhe-OMe部分はレセプターと疎水結合をして甘味力を高めていると考えられている¹⁹⁾。また甘味ペプチド類では、Aspの両側にあるアミノ酸、例えばD-Ala-L-Asp-L-Phe-OMe(ショ糖の170倍の甘味)のAlaとPheは、形、大きさ、立体化学が非常に制限されている²⁰⁾。もしモネリンと甘味ペプチドが同じレセプターサイトに結合すると仮定すると、モ

ネリンの Asp^{B7} の両側にあるアミノ酸の形、大きさ、立体化学にも同じような制限があり、これらのアミノ酸を置換すると甘味に大きく影響すると考えられる。そこで Asp^{B7} の両側の Ile^{B6} と Ile^{B8} を他のアミノ酸で置換し、その影響を検討した。

Ile^{B6} を Gly および Ala で置換して得られた [Gly^{B6}]モネリン(17)と [Ala^{B6}]モネリン(18)は、それぞれショ糖の10倍と100倍の甘味を呈した。Ile^{B6} を D-Ala で置換して得られた [D-Ala^{B6}]モネリン(19)は、不安定で HIC による精製の条件下で著しく解離することがわかった。そこで甘味のテストのためには [D-Ala^{B6}]B 鎖と A 鎖を 1:1(w/w)の比率で溶かし、10°C で HIC を行い、凍結乾燥した粉末の味を調べた。このようにしてつくった 19 は甘味をもたず、本質的に無味の化合物であった。

一方、Ile^{B8} を Gly, Ala, Phe で置換した [Gly^{B8}]モネリン(20), [Ala^{B8}]モネリン(21), [Phe^{B8}]モネリン(22)は、それぞれショ糖の20倍、90倍、10倍の甘味を呈したが、Ile^{B8} を D-Ala で置換した [D-Ala^{B8}]モネリン(23)は甘味をもたず、本質的には無味の化合物であった。このように、Asp^{B7} の両側のアミノ酸を置換すると甘味ペプチドでの置換と同じように甘味力に著しく影響することがわかった。

次に、さらに隣の Ile^{B5} と Gly^{B9} を置換したときの影響を検討した。Ile^{B5} を Ala で置換して得られた [Ala^{B5}]モネリン(24)はショ糖の1500倍の甘味を呈した。この置換では Asp^{B7} 付近のコンホメーション変化はあまり起きなかったと考えられる。Gly^{B9} は側鎖がないので活性中心にはなりえないと考えられる。Gly^{B9} を Ala および D-Ala で置換して得られた [Ala^{B9}]モネリン(25)と [D-Ala^{B9}]モネリン(26)は、予想に反して甘味をもたなかった。これらの CD スペクトルは合成モネリンと同じであり、骨格構造には大きな変化は起きていないので、Asp^{B7} 付近のコンホメーションが変化したと考えられる。モネリンの結晶構造の中で、Gly^{B9} は α -ヘリックスの始まりに位置し、Gly^{B9} から Pro^{B10} の骨格構造は立体的にかなり無理がかかっている。立体モデルで Gly^{B9} 付近を検討してみると、導入した Ala の Me 基が Pro^{B10} のピロリジン環に衝突すること、また D-Ala の Me 基は Ile^{B8} の CO 基に衝突することから、これらの衝突を回避すると Asp^{B7} 付近のコンホメーションが変化すると考えられる。

Asp^{A16} と Tyr^{A13} は突出したヘアピン構造に位置しており、抗モネリン抗体が反応するモネリンのトリプシン加水分解ペプチドの中にある。また Asp^{A16} と Tyr^{A13} の側鎖の距離は、甘味ペプチド L-Asp-L-Phe-OMe の Asp

と Phe の側鎖と同じ位である。このようなことから、Asp^{A16} と Tyr^{A13} は甘味レセプターを認識する部位である可能性が示唆された¹⁷⁾。これを確かめるために、筆者らは Asp^{A16} と Tyr^{A13} を他のアミノ酸で置換した。Asp^{A16} は既に Asn で置換していたが、さらに Abu と D-Asp で置換した。[Asn^{A16}]モネリン(5)はショ糖の7500倍の甘味を呈し、[Abu^{A16}]モネリン(6)と [D-Asp^{A16}]モネリン(7)はどちらも8000倍の甘味を呈した。Asn と Abu は β -COOH 基を欠き、D-Asp は L-Asp の対掌体でありながらモネリンよりも強い甘味を呈した。この結果は、L-Asp-L-Phe-OMe が甘味を呈するには、Asp は遊離の COOH 基をもち、かつ L-体でなければならないということに反する。したがって、Asp^{A16} は甘味のレセプターとの結合には関係がないと結論できる。

次に、A 鎖の Tyr¹³ を Gly および Phe で置換して得られた [Gly¹³]A 鎖および [Phe¹³]A 鎖を B 鎖とフォールディングさせた。[Gly^{A13}]モネリン(27)と [Phe^{A13}]モネリン(28)はそれぞれショ糖の3500倍の甘味を呈した。甘味ペプチド L-Asp-L-Phe-OMe の Phe-OMe 部分はレセプターと疎水結合をして甘味力を強めると考えられている。例えば、L-Asp-L-Phe-OMe はショ糖の180倍の甘味を呈し、ベンゼン環に OH が入った L-Asp-L-Tyr-OMe は50倍の甘味を呈するが、疎水性の芳香環を持たない L-Asp-Gly-OMe はわずかにショ糖の8倍の甘味を呈するのみである²¹⁾。モネリンの Tyr^{A13} を Gly で置換しても甘味力の本質的には変化しなかった。この事実は甘味ペプチド L-Asp-Gly-OMe が著しく甘味力を低下させたことと相反する。A 鎖の Tyr¹³ を D-Tyr で置換して得られた [D-Tyr¹³]A 鎖は B 鎖と会合しなかった(29 参照)。おそらく、D-Tyr^{A13} と Leu^{A18} の側鎖どうしが衝突するためと考えられる。なお、[D-Tyr¹³]A 鎖と B 鎖の混合物の CD スペクトルはランダム構造を示した。

L-Asp-L-Phe-OMe のペプチド結合(-CO-NH-)は甘味の発現に必須であり、逆の構造(-NH-CO-)も含めて、この部分の修飾は甘味を失うことがわかっている²²⁾。またモネリン分子の中で、Asp^{A16} から Tyr^{A13} までの骨格構造は、L-Asp-L-Phe-OMe の骨格構造とは逆の方向にペプチド結合が走っている。このようなことから、モネリンの Asp^{A16} から Tyr^{A13} までの構造を L-Asp-L-Phe-OMe の構造と比較することはできない。したがって、上記の結果と合わせて、Tyr^{A13} と Asp^{A16} はレセプターサイトとの結合に関与していないと結論できる。

タウマチン分子中には11個の Lys 残基があり、これらの Lys 残基をアセチル化すると、アセチル化の度合いが進むにつれて、甘味力が徐々に低下し、4 残基がアセ

チル化されると甘味を失う²³⁾。モネリンは9個のLys残基をもっているが、それぞれをL-2-アミノヘキサ酸(Ahx; L-ノルロイシン)で置換すると甘味力が低下する。特にLys^{B36}, Lys^{B43}, Lys^{B44}で著しい(30~38)。そこで、B鎖のLys⁴³とLys⁴⁴をAhxで置換した[Ahx⁴³, Ahx⁴⁴]B鎖を合成し、A鎖と会合させ、[Ahx^{B43}, Ahx^{B44}]モネリン(39)を得た。39はショ糖の50倍の甘味を呈した。同様に、[Ahx³⁶, Ahx⁴³, Ahx⁴⁴]B鎖を合成し、A鎖と合わせた。CDスペクトルはフォールディングしていることを示したが、HIC条件下では解離した。なおA鎖とB鎖アナログの1:1(w/w)の混合物は甘味をもたなかった(40)。最近、Somozaらは、一本鎖モネリンのArg⁸⁶とArg⁷⁰をそれぞれ部位特異的変異によってGluに置換し、前者は甘味力が2オーダー低下し、後者は甘味力が10倍低下したと述べている²⁴⁾。これらのArg⁸⁶とArg⁷⁰は天然モネリンのArg^{A36}とArg^{A20}に相当する。甘味タンパク質はクルクリン(curculin, 等電点=7.1)を除いて高い等電点をもち、塩基性タンパク質である²⁵⁾。また、甘味タンパク質は一箇所以上の部位でレセプターに結合すると推定されている。これらの事実と以上の結果を合わせると、モネリンの塩基性の性質、または塩基性アミノ酸の1つまたは複数個が甘味の発現に関与しているのかもしれない。

この構造活性相関研究の結論としては、Ile^{B6}, Asp^{B7}, Ile^{B8}は甘味のレセプターサイトに結合する。この結合で、Asp^{B7}は β -COOH基がイオン結合でレセプターサイトに結合し、Ile^{B6}とIle^{B8}は、両者、またはどちらか一方がレセプターサイトと疎水結合をして甘味力を強めていると考えられる。また、塩基性アミノ酸の1つまたは複数個が甘味の発現に関与している可能性がある。

8. D-タンパク質の合成と結晶化

化学合成法では、遺伝子工学では困難な非天然型のアミノ酸(D-アミノ酸を含む)を天然型のアミノ酸と同様に導入できるが、さらに一歩進めて全アミノ酸をD-アミノ酸で置き換えたD-タンパク質の合成も可能である。では、D-タンパク質を合成すると何が期待できるのだろうか。生物界は周知のごとく不斉で成り立っている。例えば、はっきりした理由はわからないが、タンパク質はL-アミノ酸から構成されている。エナンチオマーどうしは互いに鏡像体の関係にあり、対称な(不斉でない)環境下では両者の性質は全く同じであると考えられている。確かに、低分子化合物ではこの考えは正しい。そしてタンパク質のような高分子化合物でもそのように考えられている。モネリン分子はフォールディングの過程で

熱力学的に最も好ましい方向へ高次構造をとるようである。D-モネリン分子も同様にフォールディングすると考えられるが、完全な鏡像体を形成するかどうかを確かめることは意味がある。また、項9.で述べるが、DL-タンパク質合成の原料としてD-エナンチオマーが必要である。このようなことから、D-モネリンの合成と結晶化を行った。

A鎖とB鎖のD-エナンチオマーの合成は、モネリンA鎖とB鎖の合成と同様に行い、D-A鎖を5.5%の収率で、D-B鎖を1.1%の収率で得た。これらをフォールディングさせてD-モネリン(41)を62.6%の収率で得た。D-モネリンのCDスペクトルはL-モネリンの鏡像体であることを示した。D-モネリンの凍結乾燥粉末は甘味をもたず、本質的には無味であり、予想どおり、レセプターはL-モネリンとD-モネリンを区別した。結晶化は前記と同様に行い、小さな板状結晶を与えた²⁶⁾。X線結晶解析のためにはもっと大きな結晶を作製する必要がある。

9. DL-タンパク質の作製と結晶化

中心対称性(centro-symmetric)DL-タンパク質が得られるとX線結晶解析が容易になり、ひいては、より正確な結晶構造解析ができると考えられている²⁷⁾。そこで、合成L-モネリンとD-モネリンを1:1の比率で混合し、凍結乾燥後、モネリンと同様の条件下で結晶化させたところ、きわめて容易に、形の良い、大きな結晶が析出した。この結晶はX線解析に十分な大きさをもっていた(0.22×0.22×0.53 mm)。DL-モネリン(42)の結晶は遠心分離で分離し、CDスペクトルを測定したところ、200~250 nmの領域に全く吸収を示さず、DL-体であることを示した。DL-モネリンはHIC条件下でモネリンと同じ保持時間で溶出された。また、大きな結晶1ヶを取り出し、CDスペクトルを測定したが、吸収を示さないことから、ラセミ化合物と結論された。なお、甘味力はショ糖の2000倍であった²⁶⁾。

10. おわりに

タンパク質は遺伝子工学で合成されているが、タンパク質合成を有機合成化学としてとらえると、最終物は化学的に純粋で、天然物と同じ高次構造をとり、かつ結晶にしなければ有機合成の範疇には入らない。加うるに、結晶はX線結晶解析ができるように、形が良く、安定で、大きくなければならない。となると、タンパク質の化学合成は何とも面倒な分野といえる。しかし、最近では、合成技術の進歩、高性能の分離技術、各種の質量分析法

の出現、シーケンサーの精度の向上、シンクロトロン放射光の利用、コンピュータグラフィックスの使用などで、小さなタンパク質の合成は有機合成化学の一分野としてとらえることができるようになってきた。将来、タンパク質の化学合成法が進歩したときに最も期待されることは、非天然型アミノ酸を導入したタンパク質やD-タンパク質を合成することができるという点であろう。モネリンのようなある種のタンパク質は、フォールディングの過程で熱力学的に最も好ましい方向へ高次構造をとるが、大部分のタンパク質は、フォールディングするのに分子シャペロン²⁸⁾や分子内シャペロン²⁹⁾の助けを必要とする。分子シャペロンはタンパク質である。となると、フォールディングの際に分子シャペロンを必要とするタンパク質のエナンチオマー(D-タンパク質)はフォールディングできないのであろうか。このようなことから、非天然型アミノ酸を含むタンパク質やD-タンパク質を合成するとフォールディング機構の解明に役立つと考えられる。また、地球上で、なぜ不斉が起きたのか、なぜタンパク質はL-アミノ酸だけで成り立っているのか、なぜそのようなアミノ酸配列になり、なぜそのような立体構造になったのか、それらは必然なのか偶然なのか、といった問題の解決に何かヒントを与えるかもしれない。このようなことを考えるとタンパク質化学合成の夢は広がる。以上のように、タンパク質は、ペプチドとは一味違った面白さをもつ標的であり、有機合成化学者の参入が期待される分野である。

謝辞 天然モネリンを御恵与下さったモネル化学感覚研究所 J.G. Brand 教授、ESI-MS を測定していただいた VG Masslab B.N. Green 博士、一本鎖モネリンの原子座標を御恵与下さったカリホルニア大学バークレー校 S.-H. Kim 教授、アミノ酸分析、各種マスペクトルを測定していただいた味の素(株)中央研究所分析研究所の皆様感謝いたします。

(平成6年2月9日受理)

文 献

- 1) J.A. Morris, R.H. Cagan, *Biochim. Biophys. Acta*, **261**, 114 (1972)
- 2) H. van der Wel, *FEBS Lett.*, **21**, 88 (1972)
- 3) Z. Bohak, S.-L. Li, *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 153 (1976)
- 4) G. Frank, H. Zuber, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 585 (1976)
- 5) G. Hudson, K. Biemann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 212 (1976)
- 6) C. Ogata, M. Hatada, G. Tomlinson, W.-C. Shin, S.-H. Kim, *Nature*, **328**, 739 (1987)
- 7) For a review : see G.B. Fields, R.L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 161 (1990)
- 8) M. Kohmura, N. Nio, Y. Ariyoshi, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1521 (1990)
- 9) *idem*, *ibid.*, **54**, 3157 (1990)
- 10) *idem*, *ibid.*, **54**, 2219 (1990)
- 11) S.-H. Kim, C.-H. Kang, R. Kim, J.M. Cho, Y.-B. Lee, T.-K. Lee, *Protein Engineering*, **2**, 571 (1989)
- 12) M. Kohmura, N. Nio, Y. Ariyoshi, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 539 (1991)
- 13) *idem*, *ibid.*, **55**, 1831 (1991)
- 14) B.C. Cunningham, J.A. Wells, *Science*, **244**, 1081 (1989)
- 15) M. Kohmura, N. Nio, Y. Ariyoshi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 472 (1992)
- 16) *idem*, *ibid.*, **56**, 1937 (1992)
- 17) S.-H. Kim, C.-H. Kang, J.-M. Cho, "Sweeteners", ed. by D.E. Walters, F.T. Orthoefer, G.E. DuBois, American Chemical Society, Washington, DC, 1991, p.28
- 18) M. Kohmura, N. Nio, Y. Ariyoshi, 投稿中。
- 19) For a review : see H. van der Wel, A. van der Heijden, H.G. Peer, *Food Rev. Int.*, **3**, 193 (1987)
- 20) Y. Ariyoshi, Y. Hasegawa, M. Ota, N. Nio, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1623 (1990)
- 21) 有吉安男, "味とにおいの化学", 日本化学会編, 学会出版センター, 東京, 1976, p.85
- 22) S.A. MacDonald, C.G. Willson, M. Chorev, F.S. Vernacchia, M. Goodman, *J. Med. Chem.*, **23**, 413 (1980)
- 23) H. van der Wel, W.J. Bel, *Chem. Senses Flavour*, **2**, 211 (1976)
- 24) J.R. Somoza, F. Jiang, L. Tong, C.-H. Kang, J.M. Cho, S.-H. Kim, *J. Mol. Biol.*, **234**, 390 (1993)
- 25) For a review : see Y. Kurihara, *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, **32**, 231 (1992)
- 26) 香村正徳, 有吉安男, 日本化学会第67春季年会講演予稿集II, p.890 (1994)
- 27) A.L. Mackay, *Nature*, **342**, 133 (1989)
- 28) R.J. Ellis, *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 321 (1991)
- 29) U. Shinde, M. Inouye, *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 442 (1993)