

## 味覚受容体の新しい機能解析技術の開発と味覚受容の分子機構の解明



明治大学 農学部 農芸化学科 食品機能化学研究室 戸田 安香

## はじめに

味覚は、食物を摂食可能であるかを決定する上で重要な化学感覚である。味は甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の基本五味からなり、それぞれの味は口腔中の味蕾に発現する受容体タンパク質により受容される<sup>1)</sup>。そのうち嗜好味である甘味と旨味はGタンパク質共役型受容体(GPCR)のT1Rファミリーのヘテロ2量体で受容され、基本的に甘味は糖質を、旨味はアミノ酸及びヌクレオチドを検出する役割を担う(図1)。筆者はこれまで、味覚受容体の新たな機能解析技術を開発し、その新技術により味覚受容の分子機構の解明を行ってきた。

## 1. 蛍光検出系の導入による味覚受容体の新規機能解析技術の開発

味覚受容体と味物質の相互作用を解析する手法として、培養細胞を用いたカルシウムイメージング法が広く用いられている(図2)。この評価系では、培養細胞に味覚受容体及びGタンパク質を強制発現させ、味物質添加時の受容体の活性化の強さを細胞内カルシウム濃度の変化量として数値化する。この際、細胞内カルシウムの検出には、カルシウム感受性蛍光指示薬が広く用いられてきた。しかし、サンプル中にビタミン類やメイラード反応物質などの蛍光物質が含有される場合、この蛍光検出系を利用することができない(図3)。そこで、1) 蛍光物質を含有するサンプルでも測定が可能な新規味覚評価系の開発が望まれていた。また、旨味受容体や苦味受容体の発現細胞においては、味物質添加時にごく僅かにしか細胞内カルシウム濃度

が変化せず、高感度評価系の構築が難しかったことから、2) 検出感度の高い評価系の開発が望まれていた。

上記2つの課題を解決するために、筆者は蛍光検出系に代わる細胞内カルシウムの検出技術として、カルシウム結合型発光タンパク質を用いた発光検出系を導入した<sup>2)</sup>。発光検出系では、検出の際に励起光の照射が不要なため、サンプル自体が蛍光特性を有する場合にも影響を受けずに測定が可能である(図3)。また、蛍光検出系では培養細胞内に存在する弱い蛍光物質による干渉が生じるのに対し、発光検出系では事実上バックグラウンドがない状態での測定が可能のため、蛍光検出系に比べ高いシグナル/バックグラウンド比を実現することも可能である。

筆者は、用いる発光タンパク質の種類を検討し、発光タンパク質をミトコンドリア内に局在化させる等の工夫を重ねることで、味覚受容体の活性化の強さを発光値として検出することに成功した。検出感度も向上し、苦味や旨味受容体の高感度評価系の構築にも成功した。特に、旨味受容体の高感度評価系の構築に成功しているグループは世界でも殆どなく、旨味受容体の機能解析において世界をリードした研究を行うことが可能となった。更に、この評価系はリボフラビンなど食品由来の蛍光特性を有するサンプルの測定にも利用可能なことが確かめられた<sup>3)</sup>。作製した評価系では発光値の検出にスループットの高いマイクロプレートリーダーを用いることから、味覚修飾作用を有する食品成分の大規模スクリーニングにも役立つものとなった。

## 2. 味覚受容の分子機構の解明

## 2-1. 旨味受容体のアミノ酸選択性を決定する分子機構の解明

ヒトの旨味受容体はグルタミン酸で強く活性化されるが、マウスの旨味受容体はグルタミン酸よりもむしろそれ以外の幅広いアミノ酸により強く活性化される(図4)<sup>4)</sup>。しかし、この分子機構は明らかになっていなかった。そこで、筆者は構築したハイスループットアッセイ法を用いて、ヒト及びマウス旨味受容体の変異体162種類の機能解析を実施し、ヒトとマウスの間にあるアミノ酸選択性の違いが、リガンド結合部位と非リガン

	甘味受容体	旨味受容体
リガンド	天然糖 人工甘味料 甘味タンパク質 など	アミノ酸 ヌクレオチド (イノシン酸、 グアニル酸など)

図1. 甘味・旨味受容体

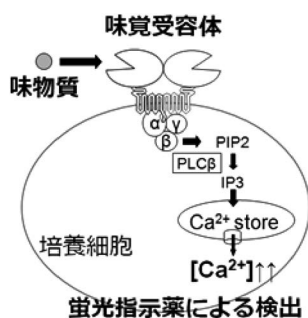


図2. 培養細胞を用いた味評価系

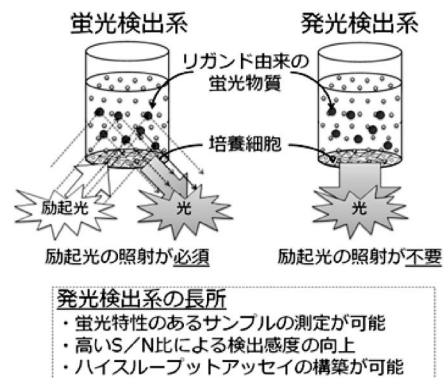


図3. 蛍光検出系と発光検出系の比較

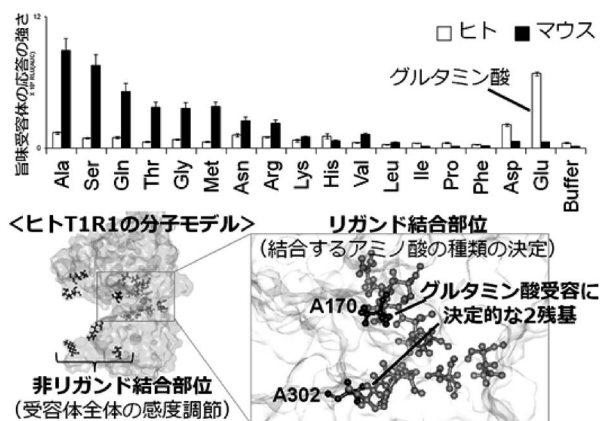


図4. 旨味受容体のアミノ酸選択性を決定する分子機構

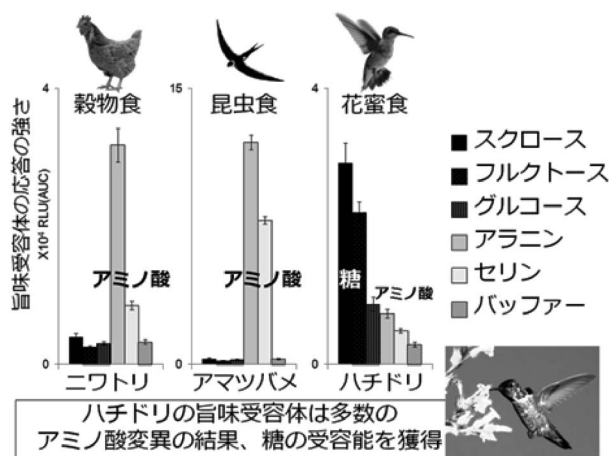


図5. ハチドリの花蜜の味受容機構

ド結合部位の特性の組み合わせで決定されることを明らかにした(図4)<sup>5)</sup>。中でもグルタミン酸受容能は、T1R1のリガンド結合部位に存在する2アミノ酸残基の負電荷の消失により獲得されることを明らかにした(図4)<sup>5)</sup>。今後、この2アミノ酸残基の変異が進化の過程でどのように獲得されたのかを明らかにすることで、ヒトがグルタミン酸に旨味を感じることの生理的意義を解明することにも繋がると期待される。

## 2.2. ハチドリの花蜜の味受容機構の解明

鳥類は甘味受容体の構成因子であるT1R2が偽遺伝子化しているため<sup>6)</sup>、甘味を感知できないと考えられている。そのため、糖が豊富な花蜜を主食とするハチドリなどの蜜食性鳥類がどのように蜜の味を感知しているのかは長年の謎であった。そこで、筆者が発光検出系を用いて鳥類の旨味受容体の機能解析を行ったところ、ハチドリは旨味受容体が糖を受容する機能を持つことが明らかになった。また、134種類のニワトリ及びハチドリのキメラ変異体や点変異体を解析することで、この機能転換はハチドリが非蜜食性鳥類から種分化した後に、旨味受容体における多数のアミノ酸変異を得たことでもたらされたことを実証した(図5)<sup>7)</sup>。本研究では鳥類の旨味受容体のリガンドと実際の嗜好性が非常に良く一致することが示された。今後、発光検出系を、家禽を含む産業動物の味覚受容体の機能解明に役立てることで、飼料開発への貢献も期待される。

おわりに

筆者らは発光検出法の導入により、高感度かつハイスループットな味覚受容体の機能解析技術を構築することに成功し

た。特に、甘味・旨味・苦味といったGPCRを介した味質の中で、旨味受容に関する研究は進んでいないことから、旨味受容体のハイスループットアッセイ法が確立できたことの意義は大きい。ヒト旨味受容体はグルタミン酸によって強く活性化されるが、マウス<sup>4)</sup>や鳥類、魚類<sup>8)</sup>の旨味受容体はグルタミン酸によってほとんど活性化されない。今後は、本評価系を味覚修飾物質の探索や味覚修飾メカニズムの解明に役立てるだけでなく、「ヒトがどのような成分においしさを感じるのか」という生物学的な問いを解決するためにも活用していきたい。

(引用文献)

- 1) Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, Vol. 444, p 288–294, (2006)
- 2) Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Further Data on the Bioluminescent Protein, Aequorin. *J. Cell Physiol.*, Vol. 62(1), p 1–8, (1963)
- 3) Toda Y, Okada S, Misaka T. Establishment of a new cell-based assay to measure the activity of sweeteners in fluorescent food extracts. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 59(22), p 12131–12138, (2011).
- 4) Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS. An amino-acid taste receptor. *Nature*, Vol. 416 (6877), p 199–202, (2002)
- 5) Toda Y, Nakagita T, Hayakawa T, Okada S, Narukawa M, Imai H, Ishimaru Y, Misaka T. Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor). *J. Biol. Chem.*, Vol. 288(52), p 36863–36877, (2013)
- 6) Shi P, Zhang J. Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 23(2), p 292–300, (2006)
- 7) Baldwin MW\*, Toda Y\*, Nakagita T, O'Connell MJ, Klasing KC, Misaka T, Edwards SV, Liberles SD. Evolution of sweet taste perception in hummingbirds by transformation of the ancestral umami receptor. *Science*, Vol. 345(6199), p 929–933, (2014)
- 8) Oike H, Nagai T, Furuyama A, Okada S, Aihara Y, Ishimaru Y, Marui T, Matsumoto I, Misaka T, Abe K. Characterization of Ligands for Fish Taste Receptors. *J. Neurosci.*, Vol. 27(21), p 5584–5592, (2007)

謝辞 本研究は、東京大学大学院 農学生命科学研究科 生物機能開発化学研究室にて行われたものです。本研究を進める上で多大なるご助言を賜りました東京大学 三坂巧先生に深く感謝申し上げます。日頃よりご指導ご鞭撻賜り、研究者としての成長を応援して下さいました明治大学 石丸喜朗先生、東京大学 成川真隆先生、岡田晋治先生に厚く御礼申し上げます。また、中北智哉博士をはじめ、本研究の遂行にご協力いただいた生物機能開発化学研究室の卒業生、企業からの派遣研究員の方々に感謝申し上げます。また、東京大学にて研究を行う機会を与えて下さいましたキッコーマン株式会社 常務執行役員 松山旭博士、小幡明雄博士、内田理一郎博士に厚く感謝申し上げます。なお、旨味受容体のアミノ酸受容に関する分子機構の解明は京都大学霊長類研究所の今井啓雄先生、早川卓志先生との共同研究によるものであり、ハチドリの味覚研究はハーバード大学のMaude Baldwin博士(現Max Planck Institute)、Scott Edwards先生、Stephen Liberles先生方との共同研究によるものです。ご支援賜りました諸先生方に深く感謝致します。最後に、本賞にご推薦下さいました東京大学 名誉教授 阿部啓子先生に心より御礼申し上げます。