

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	太田 圭介
論文題目	Studies on the interaction between sweet receptors and a sweet-tasting protein, thaumatin (甘味タンパク質ソーマチンの甘味発現と甘味受容体との相互作用に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>甘味は、ショ糖に代表される糖類などが呈する味で、通常、生物にとって好ましい味刺激である。しかしながら、近年は糖類の過剰摂取が、糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病の原因となっている。そこで、ショ糖に代わる低カロリー甘味料が注目され、実際に、アセスルファムKやスクラロースといった人工甘味料が飲料や菓子に使用されている。甘味を呈する物質は上記で述べた低分子甘味料だけでなく、タンパク質にも甘味を呈するものが存在する。甘味タンパク質の一つであるソーマチンは、西アフリカ産植物の果実の仮種皮に存在し、207アミノ酸残基からなる分子量22,000の一本鎖単純タンパク質である。その甘味閾値は50 nMと、甘味タンパク質の中で最も甘味強度が大きく、甘味料としての利用に限らず、甘味に関わる研究の優れた実験対象となり得る。本研究では、ソーマチンを用いて、甘味物質と甘味受容体がどのように相互作用しているかについて以下の検討を行っている。</p>			
1. ヒト官能試験を用いたソーマチンの甘味発現に関わるアミノ酸残基の同定			
<p>ソーマチンは特徴的なくぼみ構造(クレフト面)を有しており、その面に存在するリジン残基の重要性が報告されているが、詳細は明らかでない。本研究ではクレフト面に存在する塩基性アミノ酸残基に着目し、部位特異的変異導入法によりそれらの残基のアラニン置換体を作製し、ヒトによる官能試験で甘味強度を評価した。その結果、クレフト面に存在するほとんどのリジン残基、アルギニン残基が甘味発現に関わっていること、それらの中でも、Arg82とLys67は、甘味発現に中心的な役割を果たす残基であることが明らかとなった。これら二残基の側鎖の電荷、ならびに側鎖の構造の影響について検討するため、変異体(K67R, K67E, R82K, R82Q, R82E)を作製し甘味を評価したところ、Lys67に関しては電荷、Arg82に関してはグアニジノ基が甘味発現に重要であることが明らかとなった。さらに、R82Eの甘味閾値は顕著に上昇しており、Arg82の電荷の重要性が確認され、Arg82はソーマチンが低濃度で甘味を呈するのに不可欠な残基であることが明らかとなった。</p>			
2. 培養細胞を用いた甘味評価系によるソーマチン変異体の甘味評価			
<p>より客観的、安定なデータの取得を目的として、官能試験に代わる新たな甘味評価系の構築を試みた。ヒトの甘味受容体として、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)であるT1R2とT1R3のヘテロダイマー(T1R2-T1R3)が現在同定されている。T1R2-T1R3は、低分子甘味物質から甘味タンパク質まで、幅広く応答する。このT1R2-T1R3を一過的に発現させたHEK293細胞を用いて、細胞内へのカルシウム動員を応答の指標とした甘味評価系を構築した。官能試験で重要性が明らかとなったLys67とArg82の変異体に対する細胞応答を観察したところ、側鎖の電荷が正</p>			

から負になるに従って、応答が顕著に弱くなった。また、細胞応答に必要な各変異体の50%効果濃度( $EC_{50}$ )の野生型 $EC_{50}$ に対する比は、ヒト官能試験における甘味閾値の比と高い相関を示した。

### 3. ソーマチンとの応答に関わる甘味受容体の部位の同定

甘味受容体側に着目して、甘味受容体のどの部位がソーマチンとの相互作用に必要なのかについて検討した。ソーマチンなどの甘味タンパク質が呈する甘味は、ヒトは感知できるが、マウスは感知できない。この種間感受性の違いを利用して、ヒトとマウスの複合型甘味受容体を作製し、上記で構築した培養細胞による甘味評価系でソーマチンに対する応答を観察した。まず、T1R2とT1R3のどちらが重要なのかを明らかにするため、T1R2とT1R3をそれぞれヒト型、あるいはマウス型にした複合型甘味受容体を作製し、ソーマチンとの応答を観察した。その結果、T1R3をマウス型にすると、ソーマチンに対する応答が消失しており、ソーマチンの応答にヒト型のT1R3が関わっていることが明らかとなった。次に、T1R3内のどの部位がソーマチンの応答に重要であるかについて検討した。T1R2、T1R3は、それぞれ細胞外N末端領域(NTD)、膜貫通領域(TMD)、それらをつなぐ細胞外システインリッチ領域(CRD)からなる。T1R3のこれらの各部位をヒト型、あるいはマウス型にしたキメラ型T1R3をヒト型T1R2と共発現させた細胞を用いて、ソーマチンの応答を観察した。その結果、ヒト型T1R3CRDが、ソーマチンとの応答に不可欠であることがわかった。

以上のように、本研究により、ソーマチンの甘味発現に関わるアミノ酸残基の同定と、甘味受容体におけるソーマチンの応答に必要な部位の同定に成功した。このことは、甘味物質と甘味受容体の相互作用の解明において重要な知見となり得る。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

( 続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

近年、カロリーの過剰摂取を原因とする生活習慣病が社会問題となっている。様々な低カロリー甘味料が開発、使用されているが、甘味を呈する物質の共通構造や甘味の受容機構について不明な点が多い。甘味タンパク質の一つであるソーマチンは、甘味閾値が極めて低く (50 nM)、甘味料としての利用のみならず、甘味物質の基本構造、甘味受容機構を明らかにする研究の実験対象としても重要である。本研究では、甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用について、甘味物質側と甘味受容体側の二方向から検討している。評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. ソーマチン側に着目し、ソーマチンの甘味発現に影響を与える残基の同定を試みた。ヒトによる官能試験により、ソーマチン変異体の甘味評価を行った。その結果、クレフト面に存在するリジン残基とアルギニン残基、特にLys67とArg82の重要性が示された。さらに詳細な検討により、Lys67の側鎖の正電荷と、Arg82のグアニジノ基がソーマチンの甘味発現に深く関わっていることが明らかとなった。
2. ヒト甘味受容体(T1R2-T1R3)を発現させた培養細胞(HEK293細胞)を用いた甘味評価系を構築し、ソーマチン変異体との応答について検討した。Lys67とArg82の側鎖の電荷を正から負にすると、細胞内カルシウム動員の応答が減少した。また、細胞応答に必要な各変異体の50%効果濃度(EC<sub>50</sub>)とヒト官能試験における甘味閾値とは高い相関を示したことから、官能試験に代わる甘味評価系の構築に成功した。
3. 甘味受容体側に着目して、ソーマチンとの相互作用に関わる甘味受容体の部位の同定を試みた。ソーマチンの種間感受性の違いを利用して、ヒトとマウスの複合型甘味受容体を作製し、上記で示した細胞を用いた甘味評価系によりソーマチンとの応答について検討した。その結果、ヒト型T1R3のシステインリッチ領域(CRD)がソーマチンとの応答に必須であることが明らかとなった。

以上のように、本論文は、ソーマチンの甘味発現に特に重要なアミノ酸残基を見出し、ソーマチン分子との相互作用に関わるヒト甘味受容体の特定領域を明らかにしたものであり、食品分子機能学、生物機能変換学、食品化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成23年6月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降