

氏 名	井 出 信 幸
-----	---------

(論文内容の要旨)

タンパク質は一般的に無味であるが、例外的に強い甘味を呈するタンパク質の存在が知られている。熱帯植物由来のソーマチンは古くから甘味を呈することが知られており、ショ糖に比べモル比で10万倍と非常に強い甘味を呈する。ソーマチンには、少なくとも5種類のタンパク質多型(I,II,a,b,c)が存在するとされている。主要成分であるソーマチンIについてはタンパク質分子の高次構造解析が行われているが、その遺伝子配列は同定されておらず、またアミノ酸配列についても意見が分かれている。本論文では、新たにソーマチンIのcDNAをクローニングし推定全長アミノ酸配列を決定した。このcDNAを用いてソーマチンIの甘味特性を調べるため、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて分泌発現系の構築を行ったところ、甘味活性を有するソーマチンの分泌生産に成功した。この際、N末端に分泌シグナル由来の数残基が付加しており、酵母によるプロセッシングが完全に行われていなかったが、組み換え型ソーマチンは、植物由来ソーマチンと同等の甘味を有していたことからソーマチンのN末端部位は甘味発現に重要ではないことが明らかになった。

ソーマチンは開始メチオニン以降21アミノ酸残基からなるプレ配列と、6アミノ酸残基からなるC末端側プロ配列を有している。植物内におけるこれらの役割は明らかではないが、成熟過程における輸送あるいは構造安定化や、正しいS-S結合形成に関与しているなどの可能性が考えられている。そこで、ソーマチン遺伝子由来のN末端プレ配列およびC末端プロ配列を用いることで、酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした組換え型ソーマチンの分泌発現効率の改善を検討した。

その結果、分泌シグナルとしてソーマチンプレ配列を用いた場合に培養上清中に分泌発現が認められた。また、C末端プロ配列は酵母内において認識除去されていなかったが、N末端プレ配列は正しく認識除去されており、*P. pastoris* によるソーマチン分泌発現系においてソーマチンプレ配列が分泌シグナルとしてより高効率であることが示された。

甘味受容体はGタンパク質共役型受容体であるT1R2とT1R3のヘテロ二量体から成ることが報告されている。本論文では、ヒト舌組織由来mRNAよりT1R2、T1R3各cDNAをクローニングし、得られた各cDNAを培養細胞HEK293に共発現させ、セカンドメッセンジャーとして細胞内cAMP濃度変化を指標とした*in vitro*甘味評価系を構築した。この系においてソーマチンはアスパルテームと同様、濃度依存的に細胞内cAMP濃度を減少させていた。この時、上記の組換え型ソーマチン分泌発現系により作製したソーマチンのR82A変異体においては、濃度依存的な細胞内cAMP濃度変化は観察されなかった。また、本研究では、甘味阻害剤であるラクチソールによる影響も検討した。ラクチソールはヒトによる官能検査においてソーマチンの甘味を抑制しないと報告されていたが、本研究では閾値濃度においてソーマチンの甘味は抑制され、明らかな甘味閾値の上昇が認められた。この甘味の抑制は、*in vitro*でのアッセイにおいても観察された。

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、甘味タンパク質の甘味発現機構を解明するため、部位特異的変異体作製を視野に入れた酵母培養系による甘味タンパク質のソーマチン I の大量生産系を確立し、さらに分子レベルでの甘味タンパク質－甘味受容体相互作用を解析するため、培養細胞上に甘味受容体 (T1R2+T1R3) を再構築することによる甘味評価系を確立した。これらの研究は甘味タンパク質の甘味発現機構ならびにヒトの甘味受容機構を明らかにしようとするものである。評価すべき点は以下のとおりである。

- 1) ソーマチン I の cDNA 配列を明らかにし、酵母 *Pichia pastoris* での分泌発現系を構築した。また、ソーマチン分子の N 末端近傍の構造はソーマチンの甘味活性に影響を与えないことが明らかになった。
- 2) ソーマチン分泌発現系におけるソーマチンプレ配列の重要性を明らかにし、これにより酵母培養系におけるソーマチンの高分泌発現系を確立することでソーマチン部位特異的変異体の作製を可能とした。
- 3) ヒト T1R2、T1R3 を HEK293 細胞に共発現し、得られた安定発現株に対して、細胞内 cAMP 濃度変化を指標とすることで *in vitro* における甘味評価系を確立した。
- 4) T1R2+T1R3 受容体は HEK293 細胞において Gi 様の G タンパク質と共役し、甘味阻害剤ラクチソールが細胞内 cAMP 濃度を上昇させていたことから、ラクチールは T1R2+T1R3 受容体に対して逆作動剤として機能していることを示した。
- 5) ラクチソールの甘味タンパク質ソーマチン、卵白リゾチームに対する甘味抑制効果を *in vivo* ならびに *in vitro* 系により明らかにした。

以上のように、本論文は組換え甘味タンパク質の高発現系の構築ならびに甘味受容体との相互作用について検討を行い、甘味タンパク質の構造と機能、ならびに甘味受容機構に関する研究に新たな視点を導入したもので、食品科学、栄養科学、食品分子機能学に寄与するところが多い。

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20年8月25日、論文なら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。