

TAS2R43・*TAS2R46* の遺伝子多型が
タンパク質の構造や機能・個人の味覚レベルで
ヒトに与える影響の解明

沼部 令奈

目次

目次.....	2
学位論文要旨	4
略語一覧	5
第 1 章 序論	6
1.1. 味覚と基本五味.....	6
1.1.1. ヒトの味覚受容体	6
1.1.2. 苦味情報受容の細胞内分子機構.....	6
1.1.3. TAS2R46 の構造解明により可能となった TAS2R の立体構造予測	9
1.2. 味覚受容体の遺伝子変異とその表現型	14
1.2.1. 苦味以外の味覚受容体遺伝子における遺伝子多型	14
1.2.2. TAS2R の遺伝子多型とヒトの味覚との関連	15
1.2.3. コーヒーの苦味と TAS2R43・TAS2R46	31
1.2.4. 本研究の目的.....	32
第 2 章 TAS2R43 と TAS2R46 の遺伝子多型がカフェインに対するヒトの苦味感覚に及ぼす影響.....	34
2.1. 背景	34
2.2. 材料・方法	35
2.2.1. ジェノタイピングとその対象者.....	35
2.2.2. 味覚試験	39
2.2.3. TAS2R の遺伝子型とカフェインの苦味認知閾値についての回帰分析	40
2.2.4. 1000 人ゲノムプロジェクトデータを用いた遺伝学的解析	40
2.3. 結果.....	41
2.3.1. カフェインの苦味に対するヒトの感受性の違い	41
2.3.2. TAS2R43 および TAS2R46 ハプロタイプの地域ごとの割合	53
2.4. 考察.....	57
2.5. 結論.....	59
第 3 章 TAS2R43 と TAS2R46 の遺伝子多型がカフェインに対する受容体応答能に及ぼす影響	61
3.1. 背景.....	61
3.2. 材料・方法	63
3.2.1. 材料・試薬	63
3.2.2. タンパク質発現・局在解析	65
3.2.3. カルシウムアッセイ	67
3.2.4. SNP による TAS2R 構造への影響のモデリングシミュレーション	68

3.2.5. リアルタイム PCR による細胞内の mRNA 定量	68
3.3. 結果	71
3.3.1. SNP を入れたベクターによる細胞表面・細胞全体でのタンパク質発現	71
3.3.2. SNP による TAS2R の機能的差異	76
3.3.3. SNP によるタンパク質の構造変化	82
3.3.4. mRNA の定量	86
3.4 考察	88
3.4.1. <i>TAS2R43</i> と <i>TAS2R46</i> の SNP によるタンパク質発現への影響	88
3.4.2. <i>TAS2R43</i> と <i>TAS2R46</i> の各ハプロタイプの機能的差異	89
3.4.3. タンパク質の立体構造と機能	91
3.4.4. <i>TAS2R43</i> ・ <i>TAS2R46</i> の SNP によるタンパク質発現量の差の要因の検討	92
3.5 結論	95
第 4 章 総合考察	97
4.1. コーヒーの苦味の感じ方の個人差	97
4.2. 苦味感覚の個人差と <i>TAS2R43</i> の SNP 分布	102
4.3. <i>TAS2R</i> の遺伝子多型とその構造への影響	104
謝辞	108
引用文献	110

本論文の各章については、以下の学術誌に掲載された原著論文に基づく。

第 2 章、第 3 章

Numabe R., Rainish A., Niv M. Y., Imai H. Effects of the genetic polymorphisms of *TAS2R43* and *TAS2R46* on receptors' function and on perceived bitterness of caffeine by human subjects. *Chem Senses*. 2025;50:bjaf027.

学位論文要旨

ヒトがもつ味覚受容体の中でも苦味受容体 *TAS2R* は 26 種類と多様であり、また遺伝子多型が多く存在する。*TAS2R* の遺伝子多型がヒトの苦味認知や受容体タンパク質に及ぼす影響は未解明な部分が多い。特に、*TAS2R46* の立体構造が解明された後でも、タンパク質の構造への影響からヒトの味覚まで結びつけた研究は存在しない。本研究では、カフェインなど多くの苦味物質を受容する *TAS2R43* および *TAS2R46* に注目し、コーヒーの嗜好性やカフェインの苦味知覚に関連するとされる一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism：SNP）の機能解析を行った。*TAS2R43* には主に W35・H212（祖先型）と S35・R212（派生型）の 2 つのハプロタイプが、*TAS2R46* には L228（祖先型）・M228（派生型）の 2 つのハプロタイプが存在する。味覚試験の結果では、*TAS2R43* 祖先型ハプロタイプを少なくとも 1 つ以上有し、派生型ハプロタイプを持たない被験者は、それ以外の遺伝子型を有する被験者よりもカフェインの苦味閾値が低く、カフェインの苦味に敏感である傾向がヒト味覚試験で見られた。また、1000 人ゲノムプロジェクトデータの解析から、*TAS2R43* の SNP はアフリカと東アジアで分布が異なることが判明し、人類拡散と関連することが示唆された。さらに、培養細胞を用いた受容体応答解析と構造モデリング解析により、*TAS2R43* の SNP は二次構造の変化、*TAS2R46* の SNP は膜との親和性を介してタンパク質の発現量を減少させ、リガンドへの応答性を弱めることが示唆された。これらの知見は、個人の遺伝子型によってコーヒー等の *TAS2R43* が受容する苦味を含む飲食物の味の感じ方に差が生じる可能性を示すとともに、リガンド結合部位とは異なる領域に存在する SNP が受容体機能に対して影響を与えることを示唆するものであり、カフェインやカフェストール以外の呈味物質や他の *TAS2R* の機能解明においても応用可能であると期待される。

略語一覧

AIC	Akaike's Information Criterion (赤池情報量基準)
CNV	Copy number variation
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECL	Extracellular loop (細胞外ループ)
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated degradation (小胞体品質管理機構)
Fst	Fixation index
GPCR	G protein-coupled receptor (G タンパク質共役型受容体)
GWAS	Genome wide association study
HEK293T	Human embryonic kidney 293T (ヒト胚性腎臓細胞)
HEPES	2-[4- (2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
ICL	Intracellular loop (細胞内ループ)
MSG	Monosodium glutamate (グルタミン酸ナトリウム)
PDB	Protein data bank
PROP	6-n-propylthiouracil (プロピルチオウラシル)
PTC	Phenylthiocarbamide (フェニルチオカルバミド)
RIDD	Regulated IRE1-dependent decay
SNP	Single nucleotide polymorphism (一塩基多型)
TAS1R	Taste 1 receptor
TAS2R	Taste 2 receptor
TM	Transmembrane region

第 1 章 序論

1.1. 味覚と基本五味

1.1.1. ヒトの味覚受容体

ヒトの味覚は、甘味、うま味、酸味、苦味、塩味の基本五味を中心に構成されている^{1,2}。甘味・うま味は嗜好性、酸味・苦味は忌避性の基本味とされ、塩味は濃度によって嗜好性・忌避性が変わると言われている。味物質は、口腔内の味蕾に存在する味細胞内の味覚受容体によって受容されており、基本五味の認知に関わる味覚受容体は、それぞれ次の通りである³。

うま味と甘味の受容体は、Class C 型 G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) である Taste 1 Receptor (TAS1R) ファミリーに属する。うま味物質は TAS1R1/TAS1R3、甘味物質は TAS1R2/TAS1R3 のヘテロダイマーによって受容される。苦味物質は、Class T 型 GPCR である Taste 2 Receptor (TAS2R) ファミリーに属する 26 種類の受容体によって受容される。塩味は epithelial sodium channel (ENaC) あるいはアミロライド感受性ナトリウムチャンネルとして知られるイオンチャンネル、酸味は Otopetrin 1 (OTOP1) というイオンチャンネルによってそれぞれ受容されることが明らかになっている。上記基本五味のうち、本論文では、忌避性に関与するとされている苦味受容体 TAS2R に着目する。

1.1.2. 苦味情報受容の細胞内分子機構

苦味受容体 TAS2R は 4 種類ある味細胞のうち II 型細胞の細胞膜表面で甘味受容体・うま味受容体と互いに排他的に発現している。本節では、TAS2R を介した II 型細胞における味覚伝達の分子機構について説明する。

TAS2R の膜貫通領域のポケットであるリガンド結合サイトに苦味物質が結合すると、

TAS2R の細胞質側に結合した $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ サブユニットから成る三量体 G タンパク質中のグアノシン二リン酸 (GDP) がグアノシン三リン酸 (GTP) に置換され、 α と β/γ サブユニットが解離する。次に、解離した β/γ サブユニットがホスホリパーゼ C β 2 (PLC β 2) を活性化し、イノシトール三リン酸 (IP₃) が細胞質中で産生される。IP₃ が小胞体膜上の IP₃ 受容体に結合することで、小胞体から Ca²⁺ が放出され、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。そして、細胞内カルシウムイオン濃度の変化により、Ca²⁺ 感受性陽イオンチャネルである TRPM5 が開き、細胞を脱分極させることで電位依存性 Na⁺ チャネルが活性化する。この過程で生じた活動電位が電位依存性 ATP チャネル CALHM1/CALHM3 を開口し、アデノシン三リン酸 (ATP) が放出されることで、苦味情報が味神経に伝達される^{4;5;6} (図 1)。味神経に伝達された苦味情報は、延髄孤束核で中継された後、島皮質に含まれる一次味覚野、眼窩前頭皮質に伝達され、味覚として認知される^{2;7}。すなわち、味物質がヒトに“味”として認識されるためには、味細胞に発現する味覚受容体に受容され、味覚受容体の活性化を介した味細胞の ATP 放出による情報が中枢まで伝達される過程を必要とする。

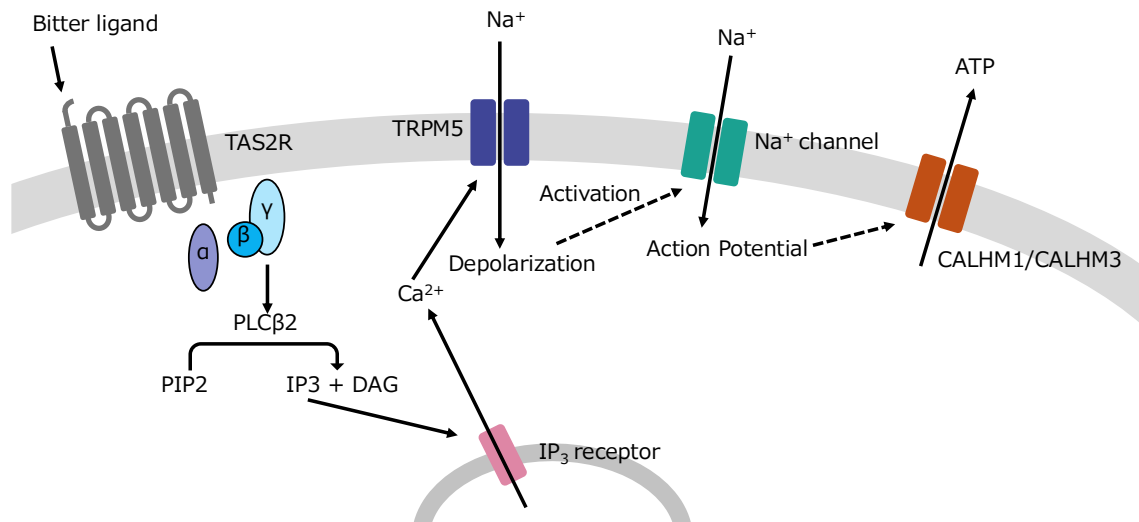


図 1 : TAS2R のシグナル伝達模式図

1.1.3. TAS2R46 の構造解明により可能となった TAS2R の立体構造予測

前節で述べたように、味覚は、味物質がそれぞれの味覚受容体のアゴニストとして作用することで初めて生じる。したがって、味覚を理解するにあたって味覚受容体のタンパク質構造や細胞内における分子間相互作用の解明は重要な課題である。

TAS2R はイントロンを含まない 1000 塩基程度の長さの遺伝子にコードされており、ファミリー内で似た配列・構造を示す^{8;9} (図 2)。2022 年に、TAS2R46 のアゴニスト結合状態および非結合状態の両方の立体構造が Cryo-EM (クライオ電子顕微鏡) 単粒子解析により初めて報告され、アゴニスト (ストリキニーネ) との結合様式や G タンパク質との相互作用構造が解明された¹⁰。TAS2R は最も多くの GPCR が属する Class A 型 GPCR^{11;12} との配列相同性が 30 % 以下であることから、独自の分類である Class T 型 GPCR とされており¹³、TAS2R46 の立体構造も Class A 型 GPCR とは異なる特徴を示すことが明らかになった。特に、膜貫通領域である TM3-TM4-TM5 の配置や、TM7 のヘリックス中央部に位置し、リガンド結合ポケットの形成やリガンド結合時の構造変化に寄与する kink 構造が特徴的である。活性化に伴い、TM5-TM6-TM7 間で疎水性相互作用と π - π 相互作用が形成され、構造が安定化する。この活性化様式は Class A 型 GPCR とは異なっており、TAS2R46 独自の活性化様式である。TAS2R46 の立体構造の解明は TAS2R ファミリーの構造・機能の多様性を理解する上で重要な知見であり、TAS2R46 の立体構造を基に、より正確な TAS2R の構造解析研究が可能となってきた。

TAS2R46 の構造解明に続き、TAS2R14 の構造も解明され、構造比較が行われた^{14;15;16}。Peri らの研究では、非ステロイド性抗炎症薬フルフェナム酸 (FFA) が TAS2R14 内の 2 つの異なるサイトに結合することが示された¹⁴。1 つは従来の GPCR に見られる細胞膜外でリガンドと結合するポケット、もう 1 つは細胞内結合ポケットであり、G タンパク質との相互作用を補助する位置にある。2 つ目の細胞内結合ポケットは、TM3、TM5、TM7 によって構成され、G α サブユニットの $\alpha 5$ ヘリックスと直接作用する。また、TM7 に位置する H276 や

R55 は、24 種の TAS2R で保存されているほか、Class A 型 GPCR 内でも化学的性質が類似した残基が広く保存されており、受容体活性化のマイクロスイッチとして機能する可能性が示唆された。さらに、細胞膜外でリガンドと結合するポケットは多様性が高い一方で、細胞内領域は構造的に保存性が高いことが明らかとなった。これは、TAS2R が多様な化学構造の苦味物質を認識するために、細胞膜外のリガンド結合サイトの柔軟性を必要とする一方で、細胞内では共通の活性化機構を維持していることを示唆している。この研究により、TAS2R ファミリーの保存領域と機能的特徴が明らかになった。

さらに近年立体構造が解明された TAS2R16 は、TM2、TM3、TM5、TM6 が受容体のリガンド認識と活性化に不可欠な構造を形成する¹⁷。TAS2R16 の TM2-TM6 は TAS2R46 より TAS2R14 の構造と類似性が高く、大きく解放された細胞外リガンド結合サイトを有する。また、細胞内ループ領域である ICL3 は TAS2R46 と TAS2R14・TAS2R16 で類似したヘリックス構造を維持しており、ICL3 の構造は TAS2R ファミリー内で共通である可能性が示唆された。複数の TAS2R の構造解析によって、リガンド結合に関わったり TAS2R の立体構造の維持に寄与したりする TM2~TM7、ICL3 については受容体機能における機構やその重要性が示されてきた。これに対し、TM1 に関しては構造上の機能における議論はこれまでほとんど行われてこなかった。2022 年以降は、TAS2R の詳細な構造シミュレーションが可能になってきたことで、同一種内におけるタンパク質コード領域の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) の影響による受容体タンパク質の構造変化 (二次構造および三次構造) をシミュレーションで予測できるようになってきた。これらの構造的知見が、実際のヒトの味覚知覚や食行動にどのように結びつくかについては、検証は未だ行われていない。特に、TM1 や、細胞膜貫通領域・G タンパク質との相互作用領域以外のアミノ酸変異がどのような影響を及ぼすのかについてはほとんど知見がない。また、遺伝子変異に伴うアミノ酸変異によってタンパク質の二次構造が変化し、この変化がミスフォールディングを引き起こす可能性も示唆されている¹⁸。しかし、TAS2R の SNP によって起きる受容体の構造変化の実

態や、SNP の影響で合成された異常タンパク質が分解される可能性については明らかにされていない。

表 1：TAS2R のアラインメントに用いた配列の ID 一覧

TAS2R	Accession No.
TAS2R1	NP_001373277.1
TAS2R3	NP_058639.1
TAS2R4	NP_058640.1
TAS2R5	NP_061853.1
TAS2R7	NP_076408.1
TAS2R8	AAH69084.1
TAS2R9	NP_076406.1
TAS2R10	NP_076410.1
TAS2R13	NP_076409.1
TAS2R14	AAI01994.1
TAS2R16	NP_058641.1
TAS2R19	NP_795369.1
TAS2R20	NP_795370.2
TAS2R30	NP_001091112.1
TAS2R31	NP_795366.2
TAS2R38	NP_789787.5
TAS2R39	NP_795362.2
TAS2R40	NP_795363.1
TAS2R41	AAI01159.1
TAS2R42	NP_852094.2
TAS2R43	NP_795365.2
TAS2R45	NP_795367.2
TAS2R46	NP_001413775.1
TAS2R50	NP_795371.2
TAS2R60	NP_803186

1.2. 味覚受容体の遺伝子変異とその表現型

1.2.1. 苦味以外の味覚受容体遺伝子における遺伝子多型

遺伝子変異の要因は、DNA の SNP や、1 塩基から数千塩基の DNA 塩基配列の挿入・欠失、数万塩基対に及ぶ大規模な変異であるコピー数の変異（Copy number variation：CNV）、偽遺伝子化、遺伝子重複、逆位、転移など様々である。一般的に、機能遺伝子においては、変異によってその機能が失われると生体に重大な影響を与える可能性があるため、同義変異（アミノ酸変異を伴わない遺伝子変異）に比べ、非同義変異（アミノ酸変異を伴う遺伝子変異）が少ないという負の選択圧がかかっている。

TAS2R 以外の味覚受容体遺伝子は、非同義変異が生じにくいという傾向を維持しており、非同義変異に伴う塩基置換は *TAS2R* に比べるとヒト集団内でそれほど多くはない²⁰。少ないながらも、*TAS1R1* および *TAS1R3* には、うま味応答と相関があると報告されているタンパク質コード領域の SNP がいくつか見つかっている。ヒトのグルタミン酸ナトリウム (MSG) 味覚試験と *TAS1R* の遺伝子型との相関解析によって、*TAS1R1* では A372T (rs34160967) と MSG の認知閾値、*TAS1R3* では R757C (rs307377) と増強剤イノシトールリン酸 (IMP) を添加した MSG の認知閾値との相関が示され、培養細胞を用いた機能解析でも SNP による応答強度の変化が確認された²¹。また、*TAS1R3* については、コーディング領域上流にある発現制御領域の 2 つの SNP、-1572 (rs307355) および -1266 (rs35744813) がヒトにおけるシヨ糖の感受性（同濃度で感じる甘味の強さ）と相関があり、培養細胞実験によりタンパク質発現に影響を与えることが示された²²。*TAS1R2* については、特定の肥満度指数 (Body mass index：BMI) の集団において、I191V (rs35874116) の SNP が甘味刺激に対する感受性に影響を与える可能性や、糖類の習慣的摂取と関連する可能性が示唆されている²³。I191V は、N 末端側の大きな細胞外ドメインに位置する²⁴。このドメインは炭水化物およびジペプチド甘味料のリガンド結合部であるため、リガンド結合サイトの変化が *TAS1R2* のリガンド応

答性の低下を引き起こしている可能性がある。このように、甘味・うま味受容体における遺伝子変異は、受容体機能を変化させ、さらに味覚感受性の個人差や食性の変化にも関係する可能性がある。

1.2.2. *TAS2R* の遺伝子多型とヒトの味覚との関連

1.2.2.1. ヒト以外の脊椎動物における *TAS2R* と食行動の関係

味覚受容体の中でも、*TAS2R* は共通の祖先遺伝子から遺伝子重複等によって比較的大きな多重遺伝子族を形成している。そのため機能的な重複も多く、機能遺伝子でありながら、他の遺伝子群に比べて負の選択圧が緩み、遺伝子変異が起きやすいことが報告されている^{25; 26}。毒物の忌避に関わるとされる *TAS2R* において遺伝子変異が起きやすいということは、大変興味深い特徴である。本研究では、*TAS2R* における遺伝子変異と苦味感受性、食行動との関係性について着目する。ヒトの *TAS2R* の変異については、次節以降で詳しく述べるが、まずはヒト以外の脊椎動物においても、*TAS2R* の遺伝子変異が起きやすく、*TAS2R* が多様である例を述べる。

ヒトは 26 種類の *TAS2R* を持つが、*TAS2R* の数は動物種によって異なり、種間の *TAS2R* の数と食性の比較から、植物食性の高い種ほど *TAS2R* の数が多い傾向があることが報告されてきた²⁷。この要因として、植物には動物よりも多くの有毒物質が含まれているため、植物食動物は可食植物の選別のためにより多くの苦味受容体が必要であったと考えられている。食物を丸飲みするため選別を必要としないイルカなどの種において *TAS2R* の数が少ないという現象も、有毒物を避けるための *TAS2R* の必要性が低下したことにより機能的制約が緩んだ結果であると捉えられている²⁷。最近では、この植物食性の高い種ほど *TAS2R* の数が多いという傾向は必ずしもすべての脊椎動物に当てはまるわけではなく、食性（植物性・動物性）、摂食様式（丸飲みするか口で選択して食べるか）、生息環境（陸生・水生）などの要

素が *TAS2R* の数に影響すると考察されている²⁸。また、*TAS2R* のリガンドは種間でも多様であり、遺伝子数と応答するリガンド数が必ずしも相関するわけではないことにも留意する必要がある。

植物食性に特化した非ヒト霊長類においては、腸内微生物による解毒機構が発達しているため有毒な苦味物質の回避が不要となり、解毒機構を持たない雑食性の霊長類と比べて *TAS2R* の数が少なくなる可能性があることが示唆された²⁹。Hou らの研究では、葉食性のコロブス亜科と雑食性のオナガザル亜科間で *TAS2R* 配列の種間比較が行われた。コロブス亜科では、*TAS2R* の数が 25-28 個で、オナガザル亜科 (27-36 個) よりも有意に少ないことや、コロブス亜科の共通祖先では 4 個の遺伝子欠失・オナガザル亜科では 3 個の遺伝子重複が確認された。また、*TAS2R38* について、コロブスには 4 か所の非同義変異をもたらす遺伝子変異が入っており、*TAS2R38* のアゴニストであるフェニルチオカルバミド (Phenylthiocarbamide : PTC) に対する感受性が、オナガザル亜科のマカクよりも低いことが培養細胞を用いた機能解析および行動実験の双方で示されている^{30; 31}。これらのことから、葉食に特化した霊長類であるコロブス亜科は、食性への適応として苦味への感受性が低下し、すなわち苦味に対する耐性を獲得することで可食植物を増やしたと考えられている。このように、*TAS2R* およびその機能の獲得・欠失は、ヒト以外でも、それぞれの種の食性と相関して進化の過程で頻繁に起こってきた。

ここまで種間の *TAS2R* の数の差について述べてきたが、種内においても *TAS2R* の遺伝子多型が存在する。例えば、ニシチンパンジー (*Pan troglodytes verus*) における *TAS2R* の集団解析³²では、チンパンジーの *TAS2R* である *cTAS2R1/-38/-42/-43/-45/-47* において、56 個の非同義変異、18 個の同義変異、および 5 個の挿入・欠失多型が同定されている。さらに、既に同定されていた *TAS2R38*³³に加え、6 つの *TAS2R* (*cTAS2R1/-42/-43/-44/-45/-47*) が分離偽遺伝子 (機能欠失多型を持つ遺伝子) 化していることが報告された³²。*TAS2R38* では、SNP により開始コドンが変異して偽遺伝子化し、苦味物質 (例 : PTC) に対する感受性が低下す

ることが示されている³⁴。この SNP はニシチンパンジーにおいて高頻度 (76%) で存在しており、この SNP により個体間で苦味感受性に差があることも実証されている^{33; 34}。

また、生息地域の異なる 4 つの亜種を含むチンパンジー 59 頭を対象にした研究では、個体間の比較で SNP、挿入・欠失、CNV (*TAS2R43*、*TAS2R46*、*TAS2R64* の 3 遺伝子におけるコピー数多型) が発見された³⁵。これらの *TAS2R* のオーソログであるヒトの *TAS2R43*、*TAS2R46* は、培養細胞実験で非同義 SNP がリガンド応答性を変化させるという報告がある^{9; 36}。SNP より大きな領域の変化である遺伝子欠失によって、個体において苦味物質に対する感受性の喪失が生じる可能性がある。遺伝子に CNV が発見された *TAS2R46* は、ヒトではセスキテルペンラクトン類 (例: *Vernonia* 属植物に含まれる苦味成分) に応答する受容体である³⁷。チンパンジーでも、機能型 *TAS2R46* を持つニシチンパンジーは *Vernonia* 属植物 (薬効植物の一種) を摂取しないのに対し、非機能型 *TAS2R46* を持つヒガシチンパンジー (*P. t. schweinfurthii*) が *Vernonia* 植物を摂取することがわかっており³³、食行動と *TAS2R* の遺伝子多型との関連が示唆されている。

前述した偽遺伝子化や遺伝子欠失による多型は、その遺伝子がコードするタンパク質の機能が欠失するため食行動との関連を比較的評価しやすいが、ゲノム全体における存在頻度は高くない。これに対して非同義置換をもたらす SNP は、ゲノム内に頻繁に存在するものの影響は大小さまざまであり、その個体レベルでの表現型やメカニズムについては不明なものが多い。

Jiao らの先行研究では、隣接する 2 つの異なる土壌 (石灰岩土壌と玄武岩土壌) に分かれて生息するガリラヤヤマメクラネズミ (*Spalax galili*) を対象に 32 個の *TAS2R* について集団間の遺伝的分化度を表す遺伝的分化係数 (Fixation index: *Fst*) 等を用いて解析が行われた³⁸。その結果、両集団間で 10 個の *TAS2R* において有意な遺伝的分化が確認された。さらに、培養細胞を用いた機能解析により、玄武岩型ハプロタイプが複数の苦味物質に対して石灰岩型ハプロタイプよりも高い応答性を示すことが明らかとなった。玄武岩土壌は、食物資源

が豊富な一方で毒性植物 (*Ornithogalum lanceolatum* など) が多いため苦味感受性が高い方が生存に有利である。それに対し、pH が高く植物の生育に適さない石灰岩土壌は、食物資源である植物自体が少ないため、苦味感受性が低い方が多様な植物を摂取できて生存に有利な環境である。すなわち、食環境の違いによって *TAS2R* の遺伝子型分布が変化し、生息環境に局所適応した集団を形成するという生態的種分化を促進する可能性が示された。

このように、ヒト以外の脊椎動物における *TAS2R* の遺伝子多型と食行動との関連を調査した先行研究は、*TAS2R* が種内でも多様な遺伝的多様性を持ち、個体ごとの苦味感受性や食性に影響を与える可能性を示している。特に、*TAS2R* は毒物の回避だけでなく、栄養摂取や植物に含まれる薬効成分の認知にも関与するため、進化的にも多様な選択圧が働いていると考えられる。SNP による受容体機能の変化、およびそれに伴う個体レベルでの味覚の変化は、ヒト以外の動物で起こることも珍しくなく、SNP による味覚の変化が食性と関係することが示唆されている。

表 2：動物種ごとの TAS2R の数とそれぞれの食性^{27; 28; 39; 40; 41}

Group	Species	TAS2Rs	Diet
Mammals	Human (<i>Homo sapiens</i>)	about 25	Omnivorous
Mammals	Chimpanzee (<i>Pan troglodytes</i>)	26	Omnivorous
Mammals	Western gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	24	Herbivorous
Mammals	House mouse (<i>Mus musculus</i>)	about 35	Omnivorous
Mammals	Bottlenose dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>)	0	Carnivorous
Mammals	Cow (<i>Bos taurus</i>)	about 20	Herbivorous
Mammals	Horse (<i>Equus caballus</i>)	about 28	Herbivorous
Mammals	European rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	about 33	Herbivorous
Birds	Chicken (<i>Gallus gallus</i>)	3	Omnivorous
Reptiles	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	less than 10	Omnivorous
Amphibians	African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	50	Omnivorous
Fish	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	7	Omnivorous

1.2.2.2. TAS2R の構造変化が影響する機能変化・味覚の変化

食べ物の味の感じ方が食行動に影響を及ぼすことから、遺伝子型の側面から推定した味覚の個人差が、ヒトの食行動を決定する要因解明の手掛かりとなり得る^{42; 43; 44; 45}。TAS2R は、受容する苦味物質の種類も数も受容体ごとに異なっているため^{45; 46; 47} (図 3)、TAS2R の SNP とヒトの苦味感覚の個人差との関係について多くの先行研究で議論されてきた^{20; 25; 39; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56} (表 3)。ヒトの TAS2R は、リガンド選択性の高さから 4 つのグループに分類される⁴⁷ (図 3)。(I) PTC やサリシンなど構造的に特異なリガンドに選択的に応答する TAS2R (TAS2R38 と TAS2R16)、(II) リガンド選択性の高い (応答するリガンドが 2-3 個) TAS2R、(III) 中程度のリガンド選択性を持つ (応答するリガンドが 10-40 個) TAS2R、(IV) リガンド選択性の低い (応答するリガンドが 40 個以上、幅広いリガンドに応答する) TAS2R である。これまでの研究では、(I) の非常に特異的なリガンドを持つ TAS2R38 や TAS2R16 を対象とした、SNP とヒトの苦味感覚の表現型の相関関係を解析する研究や、食行動との関連を調査したものが多い。中でも特に、TAS2R38 の変異は最も古くから、かつ最も多く議論されている³³。

TAS2R38 の 3 か所 (ICL1 に位置する第 49 アミノ酸の P49A、TM6 に位置する第 262 アミノ酸の A262V、TM7 に位置する第 296 アミノ酸の V296I) のほぼ連鎖するアミノ酸置換を有する SNP が、人工苦味物質である PTC や 6-n-propylthiouracil (PROP) に対する苦味感受性の差に影響すると報告されている^{31; 57; 58; 59}。主要なハプロタイプは 2 種類であり、以後は P49、A262、V296 の組み合わせを PAV 型、A49、V262、I296 の組み合わせを AVI 型と表記する。特に PTC は 26 種類存在する TAS2R の中でも TAS2R38 のみに受容される苦味物質であるため、TAS2R38 の表現型の指標として用いられることも多い⁴⁷。また、Bufe らが様々なハプロタイプの TAS2R38 タンパク質を培養細胞に発現させて PTC や PROP への応答性を検証した結果、P49 と A262 の組み合わせが TAS2R38 のリガンド応答性の維持に重要であり、特に P49 が機能を完全に維持するために必要であることが報告された⁶⁰。一方で、モ

デリングシミュレーションによって PTC と TAS2R38 の相互作用を調べた別の研究では、3 つの SNP のうち A262 が、PTC や PROP と水素結合を形成し、リガンド結合において重要であることが推定された^{61;62}。このモデルでは、taster 型 (PTC や PROP の苦味を感じる人が持つ TAS2R38 のハプロタイプ; PAV 型など) では W108 (TM3) と 262 番目のアミノ酸 (TM6) との間に水素結合が形成され、構造が安定化しているのに対し、non-taster 型 (PTC や PROP の苦味を感じない人が持つ TAS2R38 のハプロタイプ; AVI 型) では、この結合がなくなることが推定された。これは、A262 がタンパク質の構造安定性にも寄与していることを意味する。当時は TAS2R の構造が未解明であったため、Class A 型 GPCR であるロドプシンの活性化構造に基づき、TM3-TM6 の相互作用が、受容体の活性化に関与すると考えられていた。したがって、A262V が PTC・PROP との結合変化および TM3-TM6 の相互作用に寄与し、TAS2R38-PAV 型と TAS2R38-AVI 型の機能差に影響すると推定されたが、TAS2R の立体構造が解明された現在では P49 の効果とともに検証する必要がある。

TAS2R38 の連鎖する 3 か所の SNP による遺伝子型については、PTC や PROP など人工苦味物質に対する苦味感覚だけでなく、各種食品の嗜好性などとの相関が検討されてきた。食品については、PTC の構造が、アブラナ科植物の産生する苦味物質グルコシノレートに類似していることから、アブラナ科野菜の苦味感受性や嗜好性との比較が行われた⁶³。その結果、PAV 型を持つ人は、グルコシノレートを含む植物 (ブロッコリー、ケールなど) に対して強い苦味を感じる傾向があり、AVI 型の人はそれらの苦味をほとんど感じないことが明らかにになった。

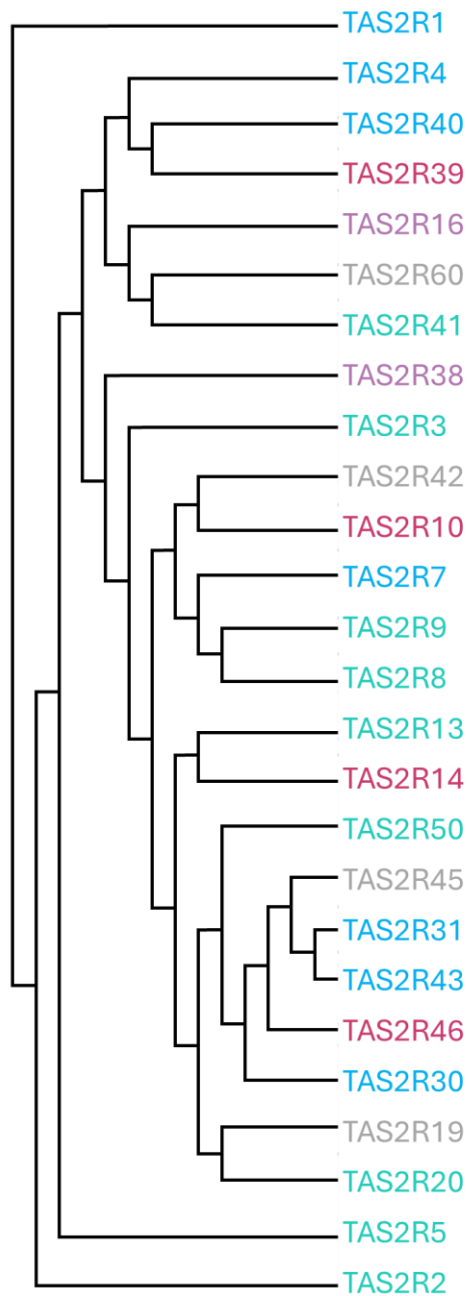
同じく特異的なリガンドを持つ TAS2R (1.2.2.2.で示したタイプ I) である TAS2R16 についても SNP と表現型の相関研究が行われてきた。TAS2R16 は、サリシンなどの β -D-glucopyranosides を受容する TAS2R である⁴⁷。TAS2R16 には複数の SNP が存在するが、特に rs846664 (TM5 に位置する第 172 アミノ酸について K172N のアミノ酸置換をもたらす) が注目されてきた。TAS2R16 の N172 型は K172 型のハプロタイプと比べて複数のリガンド

(サリシン、アルブチン等) への EC_{50} が低く、応答性が高い⁶⁴。第 172 アミノ酸は ECL2 に位置すると推定され⁶⁵、細胞表面での TAS2R 発現量は N172 が K172 の 2 倍となった⁶⁶。一方で、サリシンとの結合状態の Cryo-EM 構造解析の結果、ECL2 はリガンドとの結合には関与しないことが報告された¹⁷。そのため、K172N はリガンド結合そのものを直接的に変化させる変異ではないと考えられる。また、TAS2R16 の様々な箇所にアミノ酸置換を入れ、培養細胞における総タンパク質発現量と細胞膜への局在を調べた研究⁶⁶によると、細胞における総タンパク質発現量が祖先型と同等でありながら細胞膜表面への局在が減少した変異を有するアミノ酸の大部分 (17 変異体中 10 変異体) は TM1 または TM2 に位置していた。さらに、K172 は、シグナル伝達活性を失っていないことと、細胞外変異の中で唯一細胞膜表面での TAS2R 発現量を低下させる変異であることも明らかになった。現在までの知見では、K172N はリガンド結合ではなく、タンパク質の発現量変化を介して受容体の応答性を変化させると考えられる。

また、TAS2R4 (1.2.2.2.で示したタイプⅢの TAS2R) はステビオール配糖体を受容する TAS2R である⁶⁷。ステビオール配糖体は甘味料としてよく知られるが、同時に後味に苦味を呈することも知られている。ステビオール配糖体を受容する TAS2R が TAS2R4 と TAS2R14 であることから、ステビオール配糖体の味の感じ方と *TAS2R4*・*TAS2R14* の SNP との相関解析が行われた^{68,69}。Risso らの報告⁶⁸では、86 人のイタリア人を対象として、ステビオール配糖体の後味として甘味のみを感じるか、甘味と苦味を感じるかで被験者がグループ分けされ、TAS2R4 の TM2 に位置する第 96 アミノ酸の V96L をもたらす rs2234001 がステビオール配糖体の苦味を感じるか否かに関わっていることが示された。rs2234001 は V96L のアミノ酸置換をもたらす SNP であるが、変異体の機能を推定するプログラムである SIFT による解析では、タンパク質の二次構造には変化を与えないことが示唆された。また、Yang らの研究⁶⁹では、既知の複数のタンパク質構造を基に三次元構造モデルを作成する GEnSeMBLE と、結合様式をシミュレーションする DarwinDock により活性化状態の TAS2R4

の三次元構造が予測され、リガンド結合や細胞内での G タンパク質との相互作用に関わる結合残基が推定された。その結果、リガンド結合サイトの水素結合ネットワークが TM6 に位置し、受容体活性化スイッチである Y239 の構成に必要であることが推定された。さらに、特に TM1–TM2–TM7 間の水素結合ネットワークが活性状態での安定性に寄与していることも示された。第 96 アミノ酸は TM2 に位置するが、二次構造は変化させない。したがって、V96L は、TAS2R4 の活性状態での安定性に寄与し、結果としてリガンドへの応答性を変化させていると考えられる。

総じて、*TAS2R* における遺伝子変異は、リガンド結合部位または TM 間の相互作用の変化を通してタンパク質の立体構造を変化させたり、細胞表面でのタンパク質発現量を変化させたりすることで、受容体機能に影響を与え、苦味感受性の個人差の要因となる可能性が示唆されてきた。それが特異的なリガンドを持つ *TAS2R* であれば、遺伝子型からそのリガンドに対する個人の苦味感受性をある程度推定することが可能である。



- TAS2Rs those ligands have not been found
- TAS2Rs recognizing a few ligands(narrowly tuned)
- TAS2Rs recognizing 10 to 40 ligands(intermediately tuned)
- TAS2Rs recognizing more than 40 ligands (broadly tuned)
- TAS2Rs demonstrating specificity for chemical classes

図 3：ヒトの *TAS2R* 一覧^{45; 46; 47}

ヒトの 26 種類の *TAS2R* の系統樹と各 *TAS2R* のリガンド数を示す。

1.2.2.3. SNP 分布に地域差がある *TAS2R*

TAS2R については集団遺伝学的解析も行われてきた。2047 人の日本人のデータを用いた先行研究によると、*TAS2R38* については、日本では約 3 割が PAV 型ホモ接合、約 2 割が AVI 型ホモ接合、残りがヘテロ接合（約 5 割）およびマイナーアレルを含む遺伝子型であった⁷⁰。ハプロタイプ頻度は、PAV 型が 58%、AVI 型が 42%であった。また、世界中の 105 集団から集めた 5589 人のデータから、ハプロタイプの組み合わせである *TAS2R38* の遺伝子型の多様性を解析した先行研究によると、日本が含まれるアジア集団では PAV 型ハプロタイプが 65%、AVI 型ハプロタイプが 35%であった⁷¹。アフリカ集団では PAV 型ハプロタイプが 51%、AVI 型ハプロタイプが 35%であった。ヨーロッパ集団では PAV 型ハプロタイプが 46%、AVI 型ハプロタイプが 49%であり、その他の集団も含めた全体では PAV 型ハプロタイプが 51%、AVI 型ハプロタイプが 43%であった。以上のことから、アジア集団では PAV 型の頻度が高く、*TAS2R38* が受容する苦味物質に対して感受性が高いことが示唆された。さらに、集団統計遺伝学的手法（SNP 間の連鎖不平衡や Tajima'D、Fst の算出）により、*TAS2R38* にかかる選択圧の有無が検討された。結果として、*TAS2R38* には、選択圧は確認されず、現在の遺伝子型分布は、自然選択よりも人口動態（集団の移動・分岐）によって形成された可能性が高いことが示された。さらに、1000 人ゲノムプロジェクト（1000 Genomes Project）のデータを用いて *TAS1R* と *TAS2R* の地域ごとの遺伝的分化度を調べた Valente らの研究でも、*TAS2R16* は Fst が 0.278 で遺伝的分化度が高いのに対し、*TAS2R38* の Fst は 0.070 であり、*TAS2R16* は遺伝的分化度が高いという Risso らの先行研究をサポートする結果が得られた²⁰。

また、Soranzo らの研究では、*TAS2R16* について SNP の分布が調べられた⁵²。遺伝学的にみると、*TAS2R16* の N172 高反応型のハプロタイプが派生型（アミノ酸変異により新規に生じたハプロタイプ）であり、低反応型 K172 が祖先型である。アフリカ大陸内で地域ごとにハプロタイプの分布を調べたところ、N172 型ハプロタイプは東アフリカに分布し、一方で

K172 型ハプロタイプは、西中央部および中央アフリカでの存在割合が高い。中立進化の遺伝子と正の選択圧がかかった遺伝子を判別する統計指標である Fay and Wu's H により、*TAS2R16* の K172N を含む 3 か所のアミノ酸置換に正の選択圧がかかっていることと、K172N をもたらす SNP において、Fst が最も高いことが示された⁶⁴。*TAS2R16* のこれらのハプロタイプ分布の差は、アフリカ大陸全体で苦味感受性と関連するハプロタイプが地理的に分化していることを示唆している。これらの結果に反し、Kulichová らによる解析対象範囲をアフリカの 19 集団に拡張した解析⁷²では、*TAS2R16* の SNP において自然選択は検出されず、地理的な距離との相関が見られ、SNP 分布の違いは遺伝的浮動によるものであると報告された。標本の違いが算出される遺伝的分化度に影響を与えることが示唆されるため、今後はさらに多様な標本を対象としたデータの蓄積が求められる。SNP によって受容体の応答性とヒトの苦味感覚に変化があることがわかっている *TAS2R* において、民族集団・地域ごとに遺伝子型分布の有意差・遺伝的分化度を算出することは、ヒトの拡散と食行動について考えるうえで重要な手掛かりとなる。

1.2.2.4. *TAS2R* の遺伝子多型と飲食物に対する嗜好性との相関研究における課題

構造的に特異なりガンドに選択的に応答する *TAS2R* (1.2.2.2.で記述したタイプ I) についてはタンパク質レベルおよびヒトの味覚レベルの双方で研究が進んできた。その一方で、自然に存在する苦味物質・人工苦味物質共に幅広いリガンドに応答する *TAS2R* (1.2.2.2.で記述したタイプ III、IV) に関しては、立体構造やリガンド応答性に関する知見は蓄積されつつあるものの、その遺伝子多型がヒトの苦味知覚や嗜好性に与える影響については未だ体系的に解明されていない。特異的なリガンドを持たない *TAS2R* (*TAS2R10*、-14、-43 および -46) (表 3) における SNP とヒトの味覚・食行動の相関研究は、実際に味覚試験を実施した研究は Pronin ら³⁶や Roudnitzky ら⁷³に限られ、主に食に関するアンケート調査と GWAS (Genome Wide Association Study) によって行われてきた⁷⁴ (表 3)。

例えば、TAS2R14 は、カフェインやアリストロキア酸など最も多くの化合物に応答する TAS2R である。Hwang らが複数の苦味物質の苦味強度と TAS2R の SNP の相関解析を行った研究では、TAS2R14 を含む複数の TAS2R の上流に位置し、発現制御に関わるとされる rs2597979 が、カフェインの苦味強度と関連していることが報告されている⁷⁵。この研究を受け、Eulalia らは、イタリア人 1551 名を対象に、TAS1R、TAS2R の SNP とコーヒー嗜好性（甘味添加有/無）との関連を調査した⁷⁶。この研究で、TAS2R14 の rs2597979（eQTL〈発現量的形質遺伝子座、Expression-Quantitative Trait Locus〉解析で発見された発現制御に関わるとされる TAS2R14 の 5'側の SNP）が、無糖コーヒーの嗜好性と有意に関連していることが示された。しかし、rs2597979 は TAS2R14 を含む複数の TAS2R が並んでいる 12 番染色体上の領域に位置する⁷⁵ことから、TAS2R14 のみがこの SNP による制御の変化を受けてヒトのカフェインに対する苦味感覚に影響するのか、それとも他の TAS2R が関連しているのかは不明である。

TAS2R43 は、中程度の幅のリガンドへの応答性を持つ TAS2R（タイプⅢ）の一つである。Fu らの研究では、アメリカで行われたワインの試飲会に集まった成人を対象に、SNP と食習慣・食行動に対する回答の相関解析が行われた⁷⁷。この研究では、アンケート調査で回答されたブラックコーヒーの嗜好性と有意に相関のある SNP は検出されなかった。一方で、Pirastu らによるヨーロッパや中央アジアの集団を対象としたコーヒーの嗜好性を 9 段階の評価でデータ収集し、TAS2R の SNP との関連解析を行った先行研究⁷⁸では、TAS2R43 のタンパク質コード領域に位置する rs68157013（W35S）と rs71443637（H212R）がコーヒーの嗜好性に関連し、W35S よりも H212R の方がコーヒーの嗜好性およびカフェインの苦味知覚と強い相関を持つと報告された。この TAS2R43 の SNP は、Pronin らの研究で、培養細胞実験で W35 の方が H212 よりもアリストロキア酸やアロイン、サッカリンに対する受容体の反応強度の大きさ（Efficacy）の維持に必要であり、EC₅₀にも寄与するという報告がある³⁴。そのため、どちらの SNP が TAS2R43 の受容体機能およびヒトの苦味感覚、特にコーヒ

ーに対する味の感覚において重要なのか明らかにする必要がある。また、Pronin らは、TAS2R43 がメインの受容体であるアロインについて、味覚試験も実施し、TAS2R43 の遺伝子型ごとに苦味認知閾値の中央値を比較した。その結果、TAS2R43-W35 アレルを少なくとも 1 つ以上持つ遺伝子型のグループの方が TAS2R43-S35 または TAS2R43-Δ (TAS2R43 欠失) の遺伝子型のグループよりもアロインの苦味認知閾値が低く、アロインの苦味に対して感受性が高いことが報告された。Roudnitzky らの TAS2R の SNP と多種類の苦味物質に対する苦味知覚・受容体のリガンド応答性との相関を解析した研究では、グロシェイミンの苦味認知・苦味強度と TAS2R43・TAS2R46 の SNP とで有意な相関が認められ、培養細胞実験でもそれらの SNP によるリガンド応答性の変化が見られた。

ここまで述べてきたように、先行研究では、TAS2R の SNP とコーヒーの嗜好性には相関がないという報告⁷⁷と、TAS2R43 の SNP がコーヒーの高い嗜好性と相関するという報告⁷⁸がある。これまで行われた相関解析では異なる結果が報告されており、明確な結論には至っていない。

カフェインやコーヒーは、苦味のある化合物・飲料であり、本来であれば動物が忌避する味の物質である。しかし、ヒトにおいては、苦味があるにもかかわらず、むしろ嗜好品として、好んで摂取されることが多い点は興味深い。これらの先行研究の結論が異なるのは、ヒトにおいて、苦味感受性と嗜好性の関係が単純ではないことを示唆しており、苦味を強く感じる、または苦味を感じづらいことと、嗜好性とが必ずしも一意的な対応ではないことが要因の一つとして挙げられる。また、味と嗜好性との関係として考えられる可能性は 2 通り存在し、苦味を感じやすい遺伝子型を持つ人の方が、微妙な味の違いに敏感で識別力が高いために苦い飲食物を好んで摂取する可能性と、反対に、苦味が生物の本来持つ忌避性の味覚であることから、苦い飲食物を好まない可能性がある。さらに、嗜好性には文化的背景や食歴・食習慣が影響するだけでなく、嗅覚情報である匂い、味・匂いを複合した風味、視覚情報など、味以外の要因が複合的に絡み合っている。そのため、先

行研究のように一口に「嗜好性」として研究対象とするには、関係する要因が非常に多様で複雑であり、その研究で対象とした標本の性質の影響を大きく受ける。したがって、結果が標本依存的になってしまい、ケーススタディにとどまってしまう懸念がある。嗜好性という複雑で総合的なものの個人差ではなく、飲食物の嗜好性における主要素の一つである味覚に着目し研究を進めることで、味の感じ方の個人差とその要因を明らかにでき、嗜好性について検討するための手掛かりが得られると考えられる。そのため、遺伝子型と味覚との直接的な関係を明らかにする研究が必要であると考え、本研究の着想に至った。苦味の認知閾値を評価軸とし、*TAS2R* の遺伝子型のデータと照合して検討することで、*TAS2R* の SNP と苦味感覚の個人差との相関解析を行うことが可能になると期待される。

表3：先行研究で示唆されてきた *TAS2R* の SNP とヒトの苦味感覚の個人差との関係

rs NO.	TAS2R	Region	Amino acid substitution	Location	Relationship	Reference No.
rs765007	TAS2R3	Non-coding (5'UTR)	-	-	カフェインの苦味知覚、コーヒー摂取量	51
rs2233997	TAS2R4	Coding	Y6S	TM1	食事の質スコア (BHEIR)、SoFAAs (添加糖・飽和脂肪・アルコール) との関連	52
rs2234001	TAS2R4	Coding	V96L	TM2	カフェイン・エタノールの苦味知覚	58
rs2227264	TAS2R5	Coding	S261I	TM1	アルコールの消費、コーヒーの消費	58
rs2234012	TAS2R5	Non-coding (5'UTR)	-	-	カフェインの苦味知覚、エナジードリンクの嗜好	58
rs3741845	TAS2R9	Coding	V187A	TM5	人工甘味料アセスルファムKの苦味感受性、グルコースのホメオスタシスとの関連	53
rs1015443	TAS2R13	Coding	N259S	TM7	アルコールの消費	53
rs2597979	TAS2R14	Non-coding (制御領域)	-	-	無糖コーヒーの嗜好性、カフェインの苦味感受性との関連	51
rs846664	TAS2R16	Coding	K172N	ICL3	β -グルコピラノシドの苦味知覚、アルコール依存傾向	64
rs6466849	TAS2R16	Non-coding (制御領域)	-	-	赤ワインの酸味感受性、アルコール摂取頻度との関連	56, 77
rs10772420	TAS2R19	Coding	R299C	C末端	グレープフルーツジュースの消費、キニーネの苦味知覚	49
rs713598	TAS2R38	Coding	A49P	TM2-ICL1境界	PTC・野菜の苦味知覚、喫煙傾向	63
rs1726866	TAS2R38	Coding	V262A	ICL3	苦味知覚、野菜嫌い、アルコール摂取傾向	63
rs10246939	TAS2R38	Coding	I296V	TM7-C末端	苦味知覚、BMIとの関連	63
rs149217752	TAS2R40	Coding	G291S	TM7	食事の質スコア (BHEIR)、SoFAAs (添加糖・飽和脂肪・アルコール) との関連	52
rs68157013	TAS2R43	Coding	W35S	TM1-ECL1	カフェインの苦味知覚、コーヒー嗜好	34, 75, 78
rs68157014	TAS2R43	Coding	H212R	ICL3	カフェインの苦味知覚、コーヒー嗜好	34, 75, 78
rs71443637	TAS2R46	Coding	L228M	TM6	カフェインの苦味知覚	75

1.2.3. コーヒーの苦味と *TAS2R43*・*TAS2R46*

コーヒーは水と茶に次いで世界で 3 番目に多く消費されている飲料である⁷⁹。苦味物質を含むにもかかわらず、世界中で広く消費されている飲料として、従来から研究対象とされてきた。コーヒーの苦味成分としては、カフェインが有名である。カフェインに加えて、モザンビオシド、ベンガレンゾール、カフェストール等の水溶性苦味物質も近年単離され、コーヒーの苦味成分が明らかになりつつある⁸⁰。特に、モザンビオシドはカフェインよりもコーヒーの苦味に大きく寄与することが報告されている⁸¹。

カフェインは、コーヒー、紅茶、緑茶、エナジードリンク、チョコレートなどに含まれる天然のアルカロイドである。一般的な成人では 1 日あたり 400mg 以下が推奨摂取量とされる。カフェインは、睡眠物質として知られるアデノシンのアンタゴニストであり、覚醒作用、疲労感の軽減、軽度の抗うつ作用、利尿作用を有する⁸²。摂取後は主に肝臓で CYP1A2 酵素によって代謝される。先述の作用により、健康への影響はポジティブな面もネガティブな面も持つ⁸³。ポジティブな側面としては、認知機能の向上、アルツハイマー病やパーキンソン病のリスク低下の可能性がある、一部の研究では心血管疾患のリスク低下との関連も示唆されている。反対に、ネガティブな側面としては、過剰摂取による不眠、動悸、不安、胃腸障害、依存性（習慣的な摂取による離脱症状）、妊娠中の過剰摂取による胎児への影響の可能性も示唆されている。

カフェインを受容する苦味受容体は、*TAS2R4*、-10、-14、-43、-46 の 5 種類がある⁴⁷。このうち *TAS2R4*、*TAS2R10* にはコーヒーの嗜好性やコーヒーの苦味物質の感受性と関連する SNP が報告されておらず、*TAS2R14* にはコーディング領域の SNP がない⁷⁵。一方で、*TAS2R43*、*TAS2R46* はコーディング領域にそれぞれ 2 か所および 1 か所の受容体の応答能に関わるとされている SNP があることが知られており、これらの SNP によってアリストロキア酸などに対する苦味感覚が変化することが味覚試験により示唆されている³⁴。また、1999 人のコーカス人の双子を対象とし、カフェインを含む数種類の苦味物質に対する苦味強度と遺伝

子型との相関を解析した GWAS 研究により、*TAS2R14*、-43、-46 を含む 12 番染色体上にある *TAS2R* クラスターに位置する SNP が、カフェインに対する苦味感受性と相関があることが報告されている⁷⁵。

TAS2R についてのこれまでの研究は、受容体の立体構造解析や遺伝子多型の存在を明らかにしてきた。しかし、リガンド結合部位以外の変異による、受容体のリガンド結合以外の機能（発現、膜移行、安定性、G タンパク質との相互作用など）への影響およびそれらがヒトの味覚に与える影響について、受容体の構造変化とヒトの味覚の個人差の両面から統合的に検討した研究は、1.2.3.で述べた *TAS2R38*、-16、-4 以外存在しない。*TAS2R46* の立体構造が解明されて高精度の *TAS2R* の立体構造予測が可能となった後にも、構造の変化と苦味感覚の個人差を結びつけた研究は報告されていない。

1.2.4. 本研究の目的

本研究では、未だ全貌が解明されていない、*TAS2R* の遺伝子多型がヒトの苦味感受性に及ぼす影響を、コーヒーの苦味成分の一つであるカフェインについて、*TAS2R43* と *TAS2R46* の受容体タンパク質レベルからヒトの味覚レベルまで明らかにすることを目的とする。PTC のように特定の *TAS2R* のみに受容される苦味物質ではなく、複数の *TAS2R* に受容されるカフェインと *TAS2R* の SNP との関係について、本研究で新たな知見を得ることで、苦味物質の大部分である複数の *TAS2R* に受容される物質についてもその知見が応用可能となることが期待される。

本研究は、*TAS2R43* および *TAS2R46* を対象に、タンパク質レベルから味覚レベルまで多角的に検討を行った。これら 2 つの受容体は、タンパク質コード領域に存在する SNP が GWAS においてカフェインの苦味感受性と相関することや、培養細胞実験により複数の苦味物質への応答性が変化することが報告されている。これらの受容体の SNP の影響を検証

するため、ヒトの味覚試験・遺伝子型解析を中心とした実験と、培養細胞系を用いたタンパク質を対象とした実験の両方を実施した。

ヒトの味覚と遺伝子型との関連解析では、*TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP がヒトの味覚に影響を与えるかを検討するため、苦味感覚のうち特に定量化可能である苦味認知閾値を指標とし、ヒトの味覚試験を行った。ヒトの味覚試験で得られたデータから、*TAS2R43*・*TAS2R46* のジェノタイピングデータによりグループ分けを行って苦味認知閾値を比較することで、*TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP とカフェインの苦味感覚との相関解析が可能となった。続けて、先行研究で分布に地域差がある SNP が報告されていることから、被験者の遺伝的ルーツを分類し、本研究の被験者のデータと 1000 人ゲノムプロジェクトのデータソースを利用し、*TAS2R43* と *TAS2R46* における、食行動と関連した進化的背景について考察を広げた。

タンパク質の機能に対する SNP の影響検討では、培養細胞に各ハプロタイプのタンパク質を発現させ、先行研究にてアリストロキア酸等で報告されたのと同様に、SNP による遺伝子の違いがカフェインに対する *TAS2R* の応答性にも寄与するか確かめる実験を行った。作製したベクターを用いて発現させた *TAS2R* の培養細胞系内でのタンパク質の局在や細胞全体での発現量への影響を検討するため、細胞表面および細胞全体での発現量解析を行った。カルシウムアッセイによって受容体応答性の変化を確認した後、Cryo-EM 構造に基づくモデリングシミュレーションを行い、SNP のタンパク質構造への影響を検討した。加えて、SNP のタンパク質発現に寄与するメカニズムを調べるために、RNA の定量解析を行うことで、モデリングシミュレーションで示唆されたタンパク質の安定性の変化との関連性を考察した。

第 2 章 *TAS2R43* と *TAS2R46* の遺伝子多型がカフェインに対するヒトの苦味感覚に及ぼす影響

2.1. 背景

TAS2R43 は *TAS2R46* と相同性の高い配列を持ち、中程度の幅のリガンド応答性を持つ *TAS2R* のうちの一つである。*TAS2R43* の遺伝子多型には、SNP による多型と、欠失 (Δ) による遺伝子そのものの有無による多型の 2 パターンがある⁸⁴。*TAS2R43* には 2 つの主要な SNP (W35S、H212R のアミノ酸置換をもたらす) が存在し、その組み合わせに伴って 2 つの主要なハプロタイプが確認されている^{36;85} (図 2A,B,D)。これらのハプロタイプの違いによって、アロインやサッカリンなどに対する応答性や、ヒトの苦味認知閾値が変化することが知られている³⁶。

TAS2R46 のリガンド応答能を変化させる SNP は、L228M のアミノ酸置換をもたらす (図 2C,D)。培養細胞実験により、この SNP で生じるハプロタイプの違いによって、アマロゲンチンやグロシェイミンなどに対する最大反応強度が増加し、反応閾値が低下することが知られている⁹。また、グロシェイミンについては、*TAS2R43* や *TAS2R46* を含む、複数の *TAS2R* が位置する領域に存在する多数の SNP が苦味認知閾値に関わるという相関解析結果が報告されている⁹。

本章では、コーヒーに含まれる代表的な苦味物質であるカフェインに対する苦味感覚の個人差に、*TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP が寄与しているのかどうかを検証する。苦味の認知閾値を評価軸とし、*TAS2R* の遺伝子型のデータと照合して相関解析を行うことで、*TAS2R43*・*TAS2R46* における、SNP によるヒトの苦味知覚への影響を、より定量的に解明することを目指した。また、1000 人ゲノムプロジェクトのデータベースを用いて、*TAS2R* の SNP 分布とその遺伝的背景を探ることを目的とし、民族集団ごとの SNP 分布および遺伝的分化度を解析した。

2.2. 材料・方法

2.2.1. ジェノタイピングとその対象者

京都大学大学院医学研究科倫理委員会の倫理指針（許可番号：G1295-2）に従い、日本国内で 188 名の被験者を募集した。被験者は全員がボランティアで集められた健康な 18 歳以上の成人であった。被験者の一部は混合ルーツを有していたため、被験者の遺伝的ルーツは「アフリカ系」、「東アジア系」または「その他」の 3 つのグループに分類した。すべての被験者が日本で募集されたため、被験者の大多数が「東アジア系」に分類される日本人であり、そのほとんどが *TAS2R43* の W35 を有していなかった（表 5）。このような募集方法・時期・地域による民族集団構成の制約のため、被験者の遺伝的ルーツ（表 5）に偏りがある点には留意する必要がある。

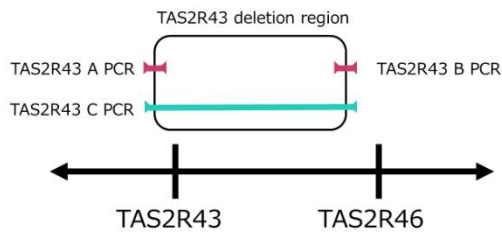
DNA サンプルを得るため、Isohelix スワブ（Cell Projects Ltd.、イギリス）を使用した口腔スワブ法により、被験者の口腔粘膜細胞を採取した。ゲノム DNA は、QIAamp DNA Investigator Kit（QIAGEN N.V.、オランダ）を使用してこれらのスワブから抽出した。*TAS2R* は、各遺伝子のコーディング領域を挟むように設計したプライマーを用いて、Tks Gflex™ DNA ポリメラーゼ（タカラバイオ株式会社、日本）の標準プロトコルに従った PCR で増幅し、DNA シーケンスによって遺伝子配列解析を行った（表 4）。*TAS2R43* については、非特異的増幅を完全には排除できなかったため、アガロース電気泳動により約 1000 bp の位置に出たバンドを切り出し、QIAQuik® Gel Extraction Kit（QIAGEN N.V.、オランダ）で目的のバンドを抽出し、DNA シーケンスで配列を決定した。一部の被験者の *TAS2R43* の遺伝子型は、Zero Blunt™ TOPO™ PCR クローニングキット（Thermo Fisher Scientific Inc.、アメリカ）を用いてクローニングし、被験者 1 人当たり 8 個のコロニーから抽出した DNA を精製して、DNA シーケンスにより遺伝子型を決定した（表 5）。また、*TAS2R43* 欠失（Δ）は、先行研究の手法に従い、*TAS2R43* 上流の配列のフォワードプライマー、*TAS2R43* 配列冒頭の配列の

リバースプライマー、*TAS2R43* 下流の配列のリバースプライマーの計 4 種類のプライマーを用い⁸⁴、Advantage 2 Polymerase (Clontech Laboratories, Inc., アメリカ) の標準プロトコルに従った PCR によって確認した (図 4)。

表 4：ジェノタイピングに用いた *TAS2R43*・*TAS2R46* のプライマー

Gene	Forward/Reverse	Sequence	Location
<i>TAS2R43</i>	Forward	AATTCCGGACACAACACCAGC	from c.-52 to c.-32
<i>TAS2R43</i>	Reverse	ATTTTCTAGACTGCCATTGGGT	from c.135 to c.158
<i>TAS2R46</i>	Forward	TTCAAGCAATCACAACCAGTG	from c.-65 to c.-45
<i>TAS2R46</i>	Reverse	CACAATGCTGCTCTTGTGAA	from c.2 to c.21

A



B

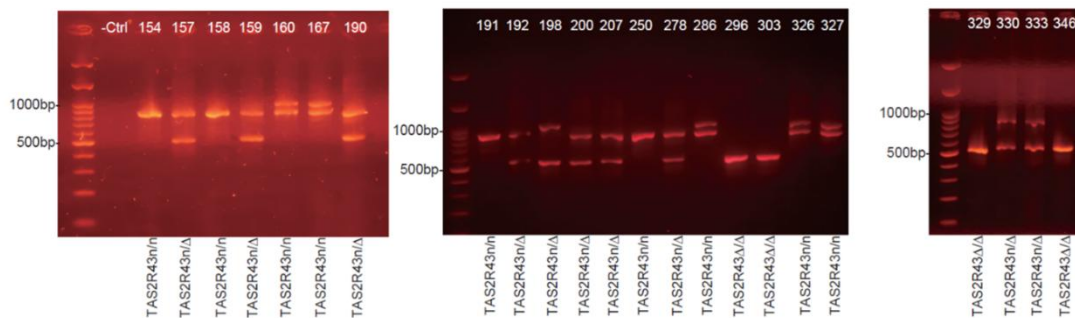


図4：TAS2R43 欠失ハプロタイプ (Δ) の検出

(A) TAS2R43 の CNV 検出のためのプライマー位置模式図⁸⁴。PCR の DNA 伸長時間を短く設定しているため、TAS2R43 が欠失していない場合はプライマーA および B で増幅される PCR 産物（マゼンタ）が生じる。一方、欠失の場合はプライマーに挟まれた領域の大部分が存在しないため、C のプライマーで挟まれる領域（白い四角）が短くなり、先述とは別の PCR 産物（緑）が生じる。(B) CNV 検出のための PCR 産物電気泳動。先行研究に基づき^{84;101}、TAS2R43 遺伝子におけるコピー数変異 (CNV) を確認した。一番上のバンド（984 塩基）は A の PCR 産物、中央のバンド（832 塩基）は B の PCR 産物、一番下（520 塩基）のバンドは C の PCR 産物。C の PCR 産物のバンドのみの場合は TAS2R43 コピー数 0 を示し、A および B の PCR 産物のバンドの 2 つが存在する場合は TAS2R43 コピー数 2 を示す。A、B、C すべての PCR 産物のバンドが存在する場合は TAS2R43 コピー数 1 を示す。A と C、または B と C の 2 つのバンドが存在する場合も TAS2R43 コピー数 1 を示すが、遺伝子近傍の欠損箇所が異なったり、変異が入っていたりする可能性を表す。被験者番号を記した各レーンの下に TAS2R43 の遺伝子型（TAS2R43n は TAS2R43 が欠失していないことを、Δ は TAS2R43 欠失を表す）を示す。一番左のレーンはネガティブコントロールで、DNA サンプルを入れていない PCR 産物である。

2.2.2. 味覚試験

苦味感受性を評価するには、苦味強度をデータ取得対象とするという手法も考えられるが、苦味強度の LMS (Labeled Magnitude Scale) による評価は、評価尺度を統一するために被験者の事前訓練を必要とする。そこで本研究では、多数の被験者を対象に味覚データの収集を行うため、より簡便かつ絶対値で比較可能な苦味認知閾値を、個人の苦味感覚の評価に用いた。

味覚試験は、先行研究で報告されている方法に基づいて実施した^{36,86}。味覚試験用溶液として、無水カフェイン（富士フイルム和光純薬株式会社、日本）を蒸留水に溶解し、カフェイン溶液を調製した。カフェイン溶液の濃度は、50、100、200、400、800、1600、3200、6400 μM に設定した。これらの溶液は、試験日ごとに調製し、冷蔵庫で保管し、味覚試験の前に室温に戻した後、白い紙コップに入れ、被験者に提示した。被験者は、味覚試験開始前に蒸留水で口をすすぎ、カフェイン溶液の調製時に使用した蒸留水を基準としてテイスティングし、試験溶液のテイスティングを開始した。被験者には室温、カフェイン溶液（5 mL）8 種類すべてを口腔全体で味わい、各溶液をテイスティングした後、次のカップに進む前に溶液を廃液入れに吐き出すよう指示した。溶液間では蒸留水による口すすぎは行わなかった。味覚試験は各被験者につき一度のみ実施した。被験者は、基準として提示した蒸留水と比較して苦味を感じたカップ名をすべて評価用紙に回答した。溶液間の相互影響を避けるため、試飲の順序は最も低い濃度から濃度が徐々に上がるように、濃度順に提示した。ただし、被験者には溶液に関する情報は一切提供されていない。

また、被験者は、味覚試験の後に PTC 試験紙を舐めて、苦味を感じるか否か回答した。このデータを用い、PTC の苦味に対する表現型が *TAS2R38* の遺伝子型と一致しない被験者（例えば、PAV 型ホモ接合体の遺伝子型でありながら PTC の苦味を感知できなかった被験者や、AVI 型ホモ接合体の遺伝子型でありながら PTC の苦味を感知すると回答した被験者）を解析から除外した。PTC 試験が実施できなかった被験者については、解析の除外対象と

はしなかった。

2.2.3. *TAS2R* の遺伝子型とカフェインの苦味認知閾値についての回帰分析

TAS2R43 および *TAS2R46* のジェノタイピングデータに基づいて被験者をグループ分けした。解析には被験者数が 7 人以上のグループのみを用いた。それ以外のグループはいずれも被験者が 3 人以下であり、統計的な比較解析に適さなかった。*TAS2R43* については、*TAS2R43*-WH (*TAS2R43* の W35 および H212 の組み合わせのハプロタイプ) ホモ接合体、*TAS2R43*-SR (*TAS2R43* の S35、R212 の組み合わせのハプロタイプ) ホモ接合体、*TAS2R43*-WH と -SR のヘテロ接合体、およびその他 (*TAS2R43* の欠失を含む、 Δ と表記) の 4 グループに分類した。*TAS2R46* については、*TAS2R46*-L (*TAS2R46* の L228 のハプロタイプ) ホモ接合体、*TAS2R46*-M (*TAS2R46* の M228 のハプロタイプ) ホモ接合体、*TAS2R46*-L と -M のヘテロ接合体の 3 グループに分類した。また、*TAS2R43*・*TAS2R46* の遺伝子型の組み合わせを用いた解析を行った。*TAS2R43*-WH/WH & *TAS2R46*-M/M の被験者はいなかったため、解析していない。統計解析には R (version 4.5.0) を用いた。群間の比較には、一部の群における被験者数が少なかったため、ノンパラメトリック検定を選択した。カフェインの苦味認知閾値の多群比較には Kruskal–Wallis 検定を用い、各 2 群間の比較には Wilcoxon の順位和検定 (有意水準 $\alpha=0.05$) を Bonferroni 補正付きで実施した。

2.2.4. 1000 人ゲノムプロジェクトデータを用いた遺伝学的解析

Ensembl genome browser 115⁸⁷ の 1000Genomes Project Phase 3 データベースから、*TAS2R43* の W35S と H212R、*TAS2R46* の L228M、*TAS2R38* の P49A をコードする SNP について、 $F_{st} = \sigma_S^2 / \sigma_T^2 = \sigma_S^2 / \bar{S} (1 - \bar{S})$ (F_{st} : 対立遺伝子頻度分散による遺伝的距離、 σ_S^2 : 異なる集団間の

対立遺伝子頻度の分散、 σ_T^2 ：集団全体での対立遺伝子の分散、 $\bar{S}$ ：集団全体の対立遺伝子の平均頻度）を算出した。

2.3. 結果

2.3.1. カフェインの苦味に対するヒトの感受性の違い

被験者のカフェインの苦味認知閾値は 50 μM から 6400 μM を超える範囲で分布していた（表 5、図 5）。先行研究では 500～700 μM がカフェインの苦味認知閾値とされている⁸⁸。本研究の全被験者のカフェインの苦味認知閾値は 1600 μM が中央値であるため、全体的にカフェインの苦味認知閾値が高い傾向にある被験者集団であったと言える。

被験者の出身地域（アフリカ系、東アジア系、その他）ごとにデータを分けた分析を試みたが、被験者の出身地域に偏りがあることや、それに伴って各グループ内の遺伝子型頻度にも偏りが生じたことから、統計解析に十分なサンプル数が得られなかった。そのため、地域による分類を行わず、*TAS2R43* および *TAS2R46* の遺伝子型に基づいてデータを分類し、回帰分析を行った。*TAS2R43* のアミノ酸配列をヒトと近縁の霊長類数種と比較したところ、第 35 アミノ酸が W、第 212 アミノ酸は H である組み合わせは、チンパンジーのオーソログで観察されるものと同一であった（図 6）。したがって、本研究では、この WH 型ハプロタイプを祖先型と定義した。一方、第 35 アミノ酸が S、第 212 アミノ酸が R である組み合わせはチンパンジーでは観察されず、ヒトのみで観察されたことから、本研究では SR 型ハプロタイプを派生型と定義した。また、*TAS2R46* も同様に近縁の霊長類との比較を行い、L228 のハプロタイプを祖先型、M228 のハプロタイプを派生型と定義した（図 6）。

TAS2R43-WH/WH グループでは、すべての被験者においてカフェインの苦味認知閾値が 1600 μM 以下、*TAS2R43*-WH/ Δ グループで 3200 μM 以下であったのに対し、*TAS2R43*-WH/SR

グループ・*TAS2R43*-SR/SR グループは閾値が広い範囲に分布し、6400 μ M でもカフェインの苦味を知覚しない被験者も見られた (図 7A)。中央値はそれぞれ、*TAS2R43*-WH/WH グループが 400 μ M (図 7A のマゼンタ)、*TAS2R43*-WH/ Δ グループが 400 μ M (図 7A の紫)、*TAS2R43*-WH/SR グループが 1600 μ M (図 7A の水色)、*TAS2R43*-SR/SR グループが 1600 μ M (図 7A の緑) であった。*TAS2R43* の遺伝子型ごとのグループ間でカフェイン苦味認知閾値の差を検討した結果、Kruskal-Wallis 検定にて有意差が認められた ($p=0.015$)。さらにどのグループ間で差があるのか検証するために 2 群間比較を行ったが、グループごとの被験者数の制約により、有意差のある組み合わせは検出されなかった ($p>0.05$ 、Bonferroni 補正付き Wilcoxon 順位和検定) (表 6)。

TAS2R46 は、*TAS2R46*-L/L グループ、*TAS2R46*-L/M グループ、*TAS2R46*-M/M グループの 3 グループに分けられ、すべてのグループで閾値が広く分布し、中央値は 1600 μ M (図 7B) であった。*TAS2R46* の遺伝子型ごとのグループ間でカフェイン苦味認知閾値の差を Kruskal-Wallis 検定により比較した結果、有意差は認められなかった ($p=0.582$)。加えて、各 2 グループ間で比較を行ったが、どのグループ間でも統計的な有意差は検出されなかった ($p>0.05$ 、Bonferroni 補正付き Wilcoxon 順位和検定) (表 6)。

TAS2R43 および *TAS2R46* の組み合わせ解析 (図 7C) では、*TAS2R43*-WH/WH & *TAS2R46*-L/L グループはすべての被験者においてカフェインの苦味認知閾値が 1600 μ M 以下であるのに対し、*TAS2R43*-WH/SR & *TAS2R46*-L/L、*TAS2R43*-SR/SR & *TAS2R46*-L/L、*TAS2R43*-SR/SR & *TAS2R46*-L/M、*TAS2R43*-SR/SR & *TAS2R46*-M/M グループは閾値が広く分布していた (図 7C)。中央値はそれぞれ、*TAS2R43*-WH/WH & *TAS2R46*-L/L グループが 400 μ M (図 7C のマゼンタ)、*TAS2R43*-WH/SR & *TAS2R46*-L/L グループが 1600 μ M (図 7C の紫)、*TAS2R43*-SR/SR & *TAS2R46*-L/L グループが 1600 μ M (図 7C のグレー)、*TAS2R43*-SR/SR & *TAS2R46*-L/M グループが 1600 μ M (図 7C の水色)、*TAS2R43*-SR/SR & *TAS2R46*-M/M グループが 1200 μ M (図 7C の緑) であった。*TAS2R43*・*TAS2R46* の遺伝子型の組み合わせグループ間でカフェイン苦

味認知閾値の差を検討した結果、Kruskal–Wallis 検定にて有意差は認められなかった ($p = 0.068$)。加えて各 2 グループ間で比較を行ったが、どのグループ間でも統計的な有意差は検出されなかった ($p > 0.05$ 、Bonferroni 補正付き Wilcoxon 順位和検定) (表 6)。

表 5：被験者リスト

a：TAS2R38 の taster 型ハプロタイプ⁸⁹、 b：TAS2R38 の non-taster 型ハプロタイプ、c：受容

体欠失

Subject number	Male/Female	TAS2R38	TAS2R43	TAS2R46	Threshold of caffeine bitterness perception (μ M)	Region	PTC (bitter:1, not bitter:0)	Coffee preference
58	m	PAV ^a /PAV	SR	L	6400	East Asian	1	
60	m	PAV/PAV	SR	L	400	East Asian	1	
61	m	PAV/AVI ^b	SR	L	400	East Asian	1	
116	m	PA ^a /AV ^b	SR	L/M	400			
117	m	PA/AV	WH/SR ?	L/M	100			
118	m	PA/AV	SR	L	800	other		
119	f	PA/AV	SR	L	1600	East Asian		
124	m	PA/PA	SR	L	3200	East Asian		
125	m	PA/PA	SR	M	200			
126	f	PA/PA	SR	L/M	1600	East Asian		
127	f	AV/AV	SR	L	400	East Asian		好き
128	f	AV/AV	SR	M	400	East Asian		
129	f	PA/AV	SR	L	3200	East Asian		
130	f	PA/PA	SR	L	400	other		
131	f	PA/AV	SR	L	800	East Asian		
132	m	PA/PA	SR					
133	f	PA/AV	SR	L	400	East Asian		どちらかというと好き
134	m	PA/AV	SR	L	3200	East Asian		
135	f	PA/AV	SR	M	800	other		
136	m	PA/PA	SR	L	400	East Asian		
137	m	PA/PA	SR	L	100			
138	f	PA/PA	SR	L/M	3200	East Asian		
139		PA/AV	SR	L	400			
141	m	PA/AV	SR	L	400	East Asian		
142	m	PA/AV	SR	L	100	East Asian		
146	m	AV/AV	SR	L	100	East Asian		
147	m	AV/AV	SR	L	100	East Asian		
148	?	PA/PA	SR	L	800	other		
149	m	PA/AV	SR	L	12800	other		
150	m	PA/AV	SR	L	3200	East Asian		
151	m	PA/AV	SR	L	6400	East Asian		どちらかというと好き
152	m	PA/AV	SR	M	6400	East Asian		
153	m		SR					
154	f	AV/AV	WH	L	200	African	0	どちらかというと好き
155	m	PA/AV	SR	L/M	100	other		嫌い
156	f?	PA/AV	SR	M	12800	other		好き
157	?	AV/AA	WH/ Δ^c	L	400	African	1	
158	m	AV/AA	WH	L	400	African	0	どちらかというと好き
159	m	PA/AA	WH/ Δ	L	400	African		
160	f	PA/AV	WH	L	400	African	0	
161	m	PA/PA	WH/SH		1600		1	
162	m		WH/SR	L	6400	African	1	
163	f		SR	L	400	African	0	
164			WH/SR		6400		1	
165	m		SR		1600		1	
166	m	PA/AV	SR	L	400	East Asian	1	好き
167	f	PA/PA	WH	L	800	East Asian	1	好き
168	f	AV/AV	SR	L	3200	East Asian	0	好き
169	m	PA/PA	SR	L	50	East Asian	1	どちらかというと好き
170	f	PA/PA	SR	M	3200	East Asian	1	

171	m	PA/AV	SR	L/M	1600		1	好き
172	m	AV/AV	SR	L/M	3200		0	どちらかというと好き
173	f	PA/AV	SR	L/M	3200		1	どちらかというと好き
174	f	PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	
175	f	PA/AV	SR	L/M	1600		1	
176	f	PA/AV	SR	L	6400	East Asian	1	
177	f	PA/AV	SR	L	100	East Asian	1	
178	f	PA/AV	SR	L/M	1600	East Asian	0	
179	f	P?	SR	L	800	East Asian	0	好き
180		PA/PA	SR	L	3200	East Asian	1	
181	m	PA/AV	SR	L	200	East Asian	1	
182	m	PA/PA	SR	L/M	3200	East Asian	1	
183	m	AV/AV	SR	L	400	East Asian	0	好き
184	m	PA/AV	SR	L	3200	East Asian	1	
185	m	PA/AV	SR	L	3200		1	
186	f	PA/AV	SR	M	3200	East Asian	1	
187	f	PA/AV	SR	L	200	East Asian	1	
188	m	PA/PA	WH/SR	L	1600	East Asian	1	
189	m	PA/PA	SR	L/M	800	East Asian	0	
190	m?	PA/AV	WH/Δ	L	1600	African	0	
191	m	PA/AV	WH	L	50	African	1	
192	m	PA/AA	WH/Δ	L	3200	African	1	
193	m	PA/AA	WR/SR?	L	800	African	1	
195	m	PA/PA	WH/SR	L	1600	African	1	
196	f?	PA/AV	WH/SR	L	6400	African	0	どちらかというと好き
198	?	PA/PA	W ? /Δ	L	1600	African	1	
199	?	AV/AV	SR	L	3200	African	0	
200	f	PA/AA	WH/Δ	L	3200	African	1	
201	m	PA/AV	SR	L	800	African	1	
202	m	PA/AV	?		1600		0	
203	m	AV/AV	SR	L	200	East Asian	0	
204	f	PA/AV	WH/SR	L	1600	East Asian	1	好き
205	f	PA/AV	WR/SR	M	200	East Asian	0	どちらかというと好き
206	f	AV/AV	SR	L/M	100	East Asian	0	
207	m	PA/AA	WH/Δ		100	African	1	
208	f	PA/AV	SR	L/M	800	East Asian	1	好き
209	m	PA/PA	SR	L	200	East Asian	1	好き
210	m	AV/AV	SR		400		0	どちらかというと好き
211	m	AV/AV	SR	L/M	1600	East Asian	0	好き
212	m	PA/AV	SR	L/M	3200	East Asian	0.5	
213	m	AV/AV	SR	L	6400	East Asian	0	どちらかというと好き
214	f	PA/PA	SR	L	400	East Asian	1	
215	f	PA/AV	SR	L	400	East Asian	0	
216	f	PA/AV	SR	L/M	1600	East Asian	1	
217	f	PA/PA	SR	L/M	3200	East Asian	1	どちらかというと嫌い
218	m	PA/AV	SR	L	3200	East Asian	1	
219	f	PA/PA	SR	L	3200	East Asian	1	嫌い
220		PA/PA	SR	L	1600	East Asian	1	
221		AV/AV	SR	L/M	800	East Asian	0	
222		PA/PA	SR	L	200	East Asian	0	
223		AV/AV	WH/SR	L	1600	East Asian	0	
224		AV/AV	SR	L/M	1600	East Asian	0	
225		AV/AV	SR	L/M	6400	East Asian	0	
226		AV/AV	SR	L	400	East Asian	0	どちらかというと好き
227		AV/AV	SR	L	6400	East Asian	0	
228		PA/PA	SR	L	1600	East Asian	1	
229		PA/AV	SR	L/M	1600	East Asian	1	
230		PA/AV	SR	L/M	800	East Asian	1	どちらかというと嫌い
231		PA/PA	SR	L	200	East Asian		

232		PA/AV	SR	L	800	East Asian	1	
233		AV/AV	SR	L	1600	East Asian	0	
234		PA/PA	SR	L	3200	East Asian	1	
235		PA/AV	SR	L/M	1600	East Asian	1	
237		PA/AV	SR		1600			嫌い
238		PA/AV	SR		800		1	どちらかというと好き
239		AV/AV	SR	L	6400	East Asian	0	どちらかというと好き
240		PA/PA	SR	L	6400	East Asian	1	
241		PA/AV	SR	L/M	800	East Asian	1	どちらかというと嫌い
242		PV/AV			3200		0	
243		PA/PA			1600		1	
244		PA/AV	SR	L	200	East Asian	1	
245		PA/AV			800		0	
246		PA/AV	SR	L/M	800	other	1	好き
247		AV/AV	WH/SR	L	100	other	1	
248		PA/AV	WH/SR	L	1600	other	1	
249		AV/AV			50		0	
250		PA/PA	WH	L	1600	other	1	
251		PA/AV	SR	L/M	50	other	0	好き
252		AV/AV	SR	M	800	other	0	
253		PA/PA	WH/SR	L	1600	other	1	
254		PA/PA	SR	L	800	East Asian	1	
255		PA/AV	SR	L	3200	East Asian	0	
256				M	50		0	
258		AA/AV	SR	L/M	100	other	0	
259		PA/PA	SR	L	800	East Asian	1	
260		PA/PA	WH/SR	L	800	East Asian	1	
261		PA/PA	SR	L	3200	East Asian	1	
262		PA/AV	SR	L/M	800	East Asian	1	
263		AV/AV	SR	L	800	East Asian	0	
264		PA/AV			3200		1	
265		AV/AV	SR		800		0	
266		PA/PA	SR	L	1600	East Asian	1	
267		PA/AV	SR	L/M	3200	East Asian	1	どちらかというと嫌い
268		AV/AV	SR	L	100	East Asian	1	
269		AV/AV	SR	L	1600	East Asian	1	
270		PA/AV	SR	L	6400	East Asian	1	
271		PA/PA	SR	L	50	East Asian	0	
272		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	
273		PA/PA	SR	L	1600	East Asian	1	
274		PA/AV	WH	L	200	East Asian	1	
275		PA/AV	SR	L	400	East Asian	1	
276		AV/AV	SR	M	400	other	0	
277		PA/AV	SR	L/M	1600	other	1	
278		PA/AV	WH/Δ	L/M	50	other	1	どちらかというと嫌い
279		PA/PA			400		1	どちらかというと嫌い
280		PA/AV	SR		3200		1	
281		PA/PA			200		1	
282		PA/AV	SR		800		1	
283		PA/PA			1600		1	
284		PA/AV	SR		1600		0	
285		PA/AV	SR				1	どちらかというと嫌い
286		AV/AV	SR		1600		0	
287		PA/PA	SR					
288		PA/PA	SR	L	3200	East Asian	1	好き
289		AV/AV	SR		6400		1	
290		PA/PA	SR		200		1	
291		PA/AV	SR	L			1	
292		PA/AV	SR	L			1	

293		AV/AV	SR	L	1600	East Asian	1	どちらかというと好き
294		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	
295		PA/AV	SR	L	6400	East Asian	1	
296		AV/AV	Δ	M	3200	East Asian	0	
297		PA/AV	SR	L	400	East Asian	0	
298		PA/AV	SR	L	400	East Asian	1	
299		PA/AV	SR	L	800	East Asian	1	どちらかというと好き
300		PA/AV	SR	L	400	East Asian	1	
301		PA/PA	SR	L	3200	East Asian	0	
302		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	どちらかというと好き
303		PA/PA	Δ	M	3200	East Asian	1	
304		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	
305		PA/AV	SR	L	6400	East Asian	1	
306		PA/AV	SR	L	3200	East Asian	1	
307		PA/AV	SR	L/M	1600	East Asian	1	好き
308		PA/PA	SR	L/M	6400	East Asian	1	
309		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	
310		AV/AV	SR	L	3200	East Asian	0	好き
311		PA/AV	SR	L		East Asian	1	
312		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	
313		PA/PA	SR	L	6400	East Asian	1	
314		PA/AV	SR	L	3200	East Asian	1	
315		PA/PA	SR	L	100	East Asian	1	
316		PA/PA	SR	L	1600	East Asian	1	好き
317		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	どちらかというと好き
318		PA/AV	SR	L	800	East Asian	0	
319		PA/PA	SR	L	800	East Asian	1	
320		PA/AV	SR		400		1	
321		PA/PA	SR	L	400	East Asian	1	
322		PA/PA	SR	L	200	East Asian	1	
323		PA/AV	SR	L	800	East Asian	1	
324		PA/AV	SR	L/M	3200	East Asian	1	
325		PA/AV	SR	L/M	6400	African	1	どちらかというと好き
326		AV/AV		L	800		0	好き
327		PA/AV	SR	L	1600	other	1	
328		AV/AV	SR	L	200	other	0	
329		PA/PA	Δ	L/M	3200	other	1	
330		AV/AV	WH/Δ	L/M	100	other	0	
331		PA/AV	SR	L/M	3200	other	1	
332		PA/PA	SR	L	400	other	1	
333		PA/PA	WH/Δ	L	200	other	1	
334		PA/AV	SR	L/M	1600	other	1	
335		AV/AV	SR	L	3200	East Asian	0	
336		AV/AV	SR	L/M	800	East Asian	0	
337		PA/AV	SR	L/M	3200	East Asian	1	
338		PA/PA	SR		800		1	
339		PA/PA					1	
340		AV/AV	SR		3200		0	
341		PA/PA	SR	L/M	800	East Asian	1	
342		AV/AV	SR	L	6400	other	1	
343		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	0	好き
345		PA/PA	SR	L	1600	other	1	
346		PA/AV	Δ	M	3200	East Asian	1	好き
347		PA/AV	SR	L/M	1600		1	
348		AV/AV	SR	L/M	200		0	
349		PA/AV	SR	L	800	East Asian	1	
350		AV/AV	SR	L	1600	East Asian	0	
351		PA/AV	SR	L	3200	East Asian	1	
352		PA/AV	SR	L/M	1600		0	

353		AV/AV	SR	M	1600	East Asian	0	
354		PA/AV	SR	M	200	East Asian	0	好き
355		AV/AV	S?	M	1600	East Asian	0	どちらかというと嫌い
356		AV/AV	SR	L	3200	East Asian	0	どちらかというと嫌い
357		PA/PA	SR	L	3200	East Asian	0	
358		PA/AV	SR	L	1600	East Asian	1	嫌い
359		PA/AV	SR	L	3200	East Asian	0	
360		PA/PA	SR		3200		1	
361		PA/AV	SR	L/M	3200		1	
362		PA/AV	SR		6400		1	好き
363		AV/AV	SR	L	800	East Asian	1	
364		AV/AV	SR	L	3200	East Asian	0	どちらかというと好き

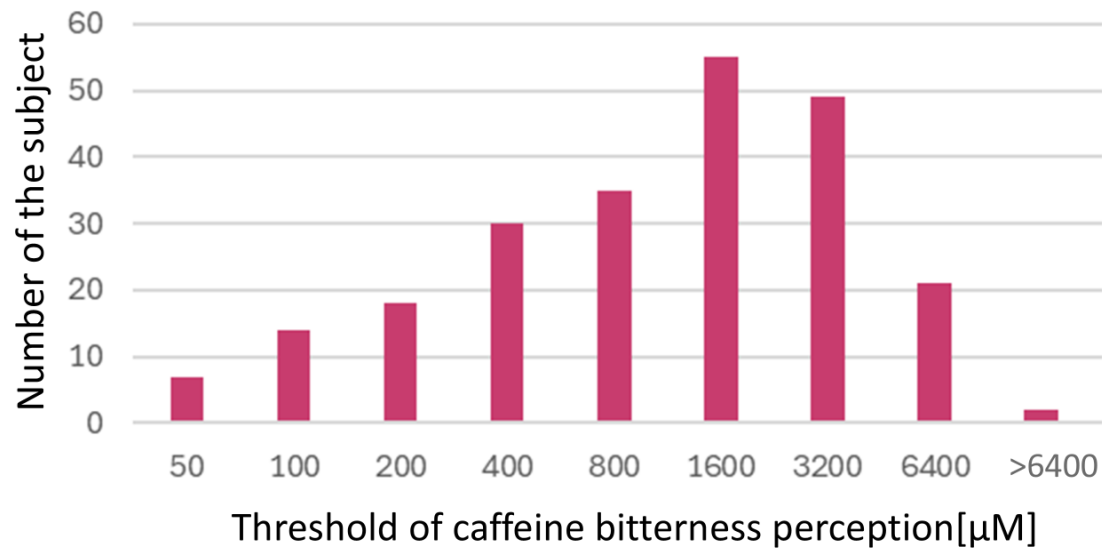


図5：カフェインの苦味認知閾値の分布

表5のデータを基に、カフェインの苦味認知閾値ごとの被験者の人数をカウントした。

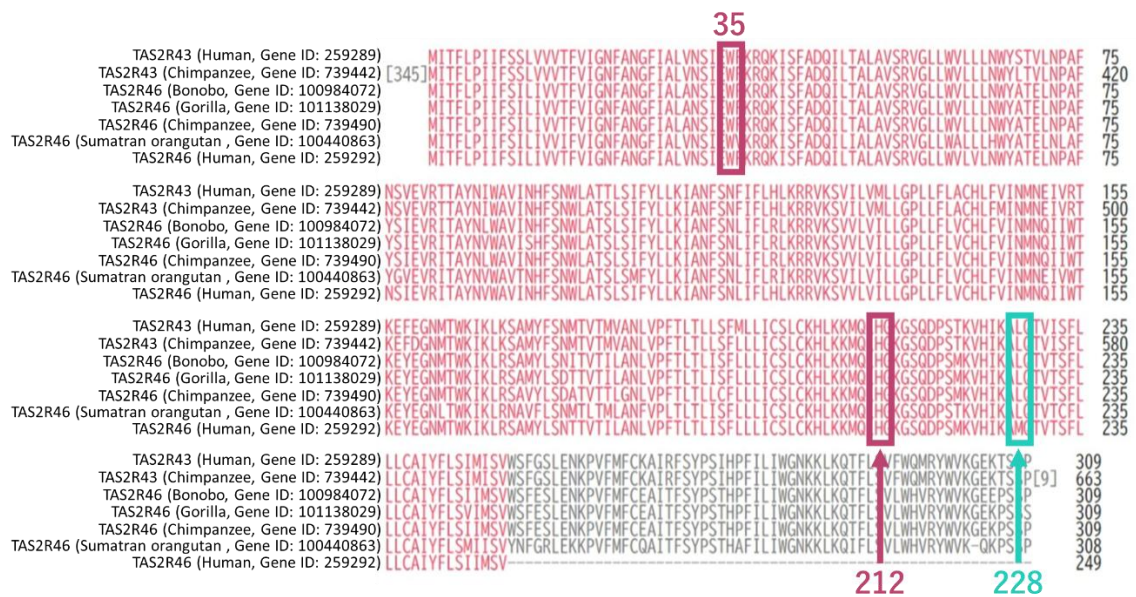


図 6：近縁の霊長類とヒトの TAS2R43・TAS2R46 の配列比較

NCBI¹⁹ の配列を使用し、Constraint-based Multiple Alignment Tool⁹⁰ で多重アラインメントを行った。マゼンタが TAS2R43、緑が TAS2R46 の SNP によるアミノ酸置換位置を示す。

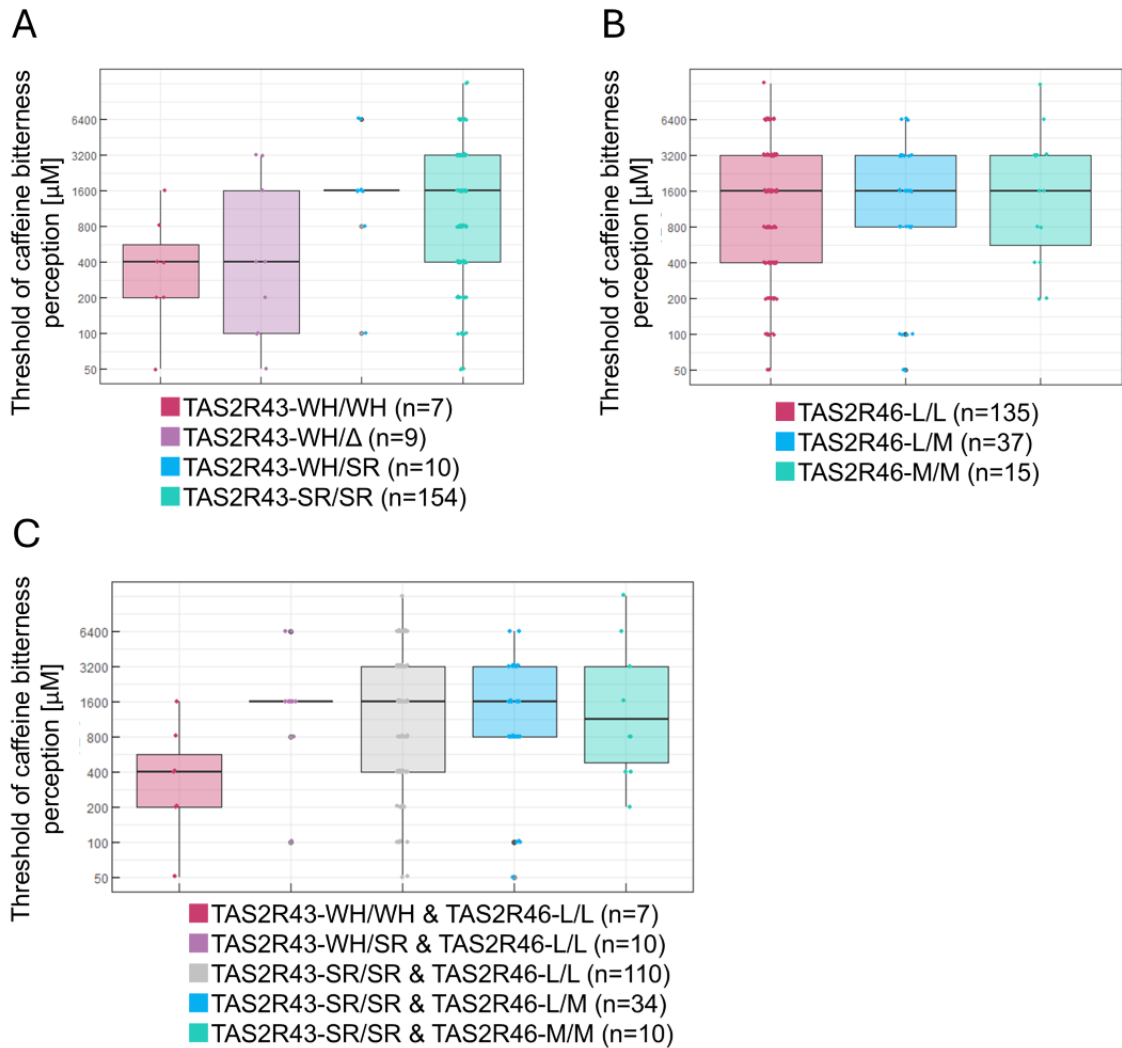


図7：カフェインの苦味認知閾値の味覚試験

被験者のカフェイン閾値を遺伝子型に基づいてグループ分けし、比較した。(A) *TAS2R43* の遺伝子型 (*TAS2R43*-WH/WH:マゼンタ、*TAS2R43*-WH/ Δ :紫、*TAS2R43*-WH/SR:水色、*TAS2R43*-SR/SR:緑) 別に分類したカフェイン苦味認知閾値の箱ひげ図。(B) *TAS2R46* の遺伝子型別 (*TAS2R46*-L/L:マゼンタ、*TAS2R46*-L/M:水色、*TAS2R46*-M/M:緑) のカフェイン苦味認知閾値の箱ひげ図。(C) *TAS2R43*・*TAS2R46* の遺伝子型別に分類したカフェイン苦味認知閾値の箱ひげ図。グループ人数が7人以上の組み合わせ群を抽出した。

表 6：Wilcoxon 順位和検定によるグループ間のカフェインの苦味認知閾値比較

Group1 と 2 のカフェインの苦味知覚を比較した際の p 値を p_none 、Bonferroni 補正をかけた p 値を p_bonf 列に示す。(A) *TAS2R43* の遺伝子型で分けたグループごとの比較。(B) *TAS2R46* の遺伝子型で分けたグループごとの比較。(C) *TAS2R43*・*TAS2R46* の遺伝子型で分けたグループごとの比較。

A

Group1	Group2	p_none	p_bonf
WH/ Δ	WH	0.914566	1
WH/SR	WH	0.014961	0.089764
WH/SR	WH/ Δ	0.101406	0.608437
SR	WH	0.012667	0.076005
SR	WH/SR	0.51175	1
SR	WH/ Δ	0.046175	0.277052

B

Group1	Group2	p_none	p_bonf
L/M	L	0.580704	1
M	L	0.348549	1
M	L/M	0.577411	1

C

Group1	Group2	p_none	p_bonf
WH_L	SR_L	0.019828	0.198279
WH_L	SR_L/M	0.007531	0.075314
WH_L	SR_M	0.048136	0.481357
WH_L	WH/SR_L	0.014961	0.149607
WH/SR_L	SR_L	0.463925	1
WH/SR_L	SR_L/M	0.6954	1
WH/SR_L	SR_M	0.786088	1
SR_M	SR_L	0.654381	1
SR_M	SR_L/M	0.954325	1
SR_L/M	SR_L	0.485494	1

2.3.2. *TAS2R43* および *TAS2R46* ハプロタイプの地域ごとの割合

2.2.1.で記載したように、本研究では、日本在住の成人（日本人と海外からの留学生や移住者）が主な被験者であった。*TAS2R43* について、主に WH（W35 および H212 の組み合わせ）型と SR（S35 および R212 の組み合わせ）型のハプロタイプが検出され、WR および SH はごく少数であり、メジャーなハプロタイプとマイナーなハプロタイプの種類は先行研究と一致していた³⁴。*TAS2R43*-WH 型と-SR 型では、-SR 型ハプロタイプが被験者の大半であり、全体の 89%を占めた。これは、1000 人ゲノムプロジェクトのデータベースで報告されている東アジア集団の *TAS2R43*-W35S の SNP 頻度と類似していた（図 8、9）⁹¹。興味深いことに、被験者のジェノタイピングデータと遺伝的ルーツを参照すると、*TAS2R43* の遺伝子型は、特に東アジアおよびアフリカの参加者の出身地との関連が見られ（表 5）、1000 人ゲノムプロジェクトのデータベースにおける、アフリカ人は他地域の人々よりも *TAS2R43*-WH ハプロタイプを多く有するという傾向と一致していた（全世界では *TAS2R43*-WH ハプロタイプが 38%・*TAS2R43*-SR ハプロタイプが 62%、アフリカでは *TAS2R43*-WH ハプロタイプが 90%・*TAS2R43*-SR ハプロタイプが 10%、東アジアでは *TAS2R43*-WH ハプロタイプが 6%・*TAS2R43*-SR ハプロタイプが 94%）。

TAS2R46 に関しては、M228 よりも L228 ハプロタイプが多く検出された。全被験者において L ハプロタイプ（87%）が M ハプロタイプ（13%）よりも多く、この割合は 1000 人ゲノムプロジェクトのデータベースで報告されている割合と一致していた（図 8、9）⁹¹（全世界では *TAS2R46*-L ハプロタイプが 66 %・*TAS2R46*-M ハプロタイプが 34 %、アフリカでは *TAS2R46*-L ハプロタイプが 66%・*TAS2R46*-M ハプロタイプが 34 %、東アジアでは *TAS2R46*-L ハプロタイプが 81%・*TAS2R46*-M ハプロタイプが 19%）。また、*TAS2R43*-WH ホモ接合体および *TAS2R46*-L ホモ接合体の組み合わせを有する被験者はすべてアフリカ系であった（表 5）。

さらに、1000 人ゲノムプロジェクトの SNP 頻度データに基づき、世界的な遺伝的差異を

検討するために、アフリカ系集団と東アジア系集団間で F_{st} を算出した (図 9)。TAS2R43 の W35S における F_{st} はアフリカ系集団と東アジア系集団の間で 0.71、TAS2R43 の H212R における F_{st} はアフリカ系集団と東アジア系集団の間で 0.71、TAS2R46 の L228M では 0.02 であった。比較対象として同様にアフリカ系集団と東アジア系集団のデータを用いて算出した、TAS2R43・TAS2R46 とは連鎖しない 7 番染色体上の TAS2R38 における P49A の F_{st} は 0.04 であった。さらに、TAS2R16 の K172N の F_{st} は 0.19、TAS2R4 の V96L の F_{st} は 0.18 であり、TAS2R43 の W35S および H212R の F_{st} は、ヒトの苦味知覚に影響を与えるとされている他の TAS2R の SNP と比較しても高い値を示した。

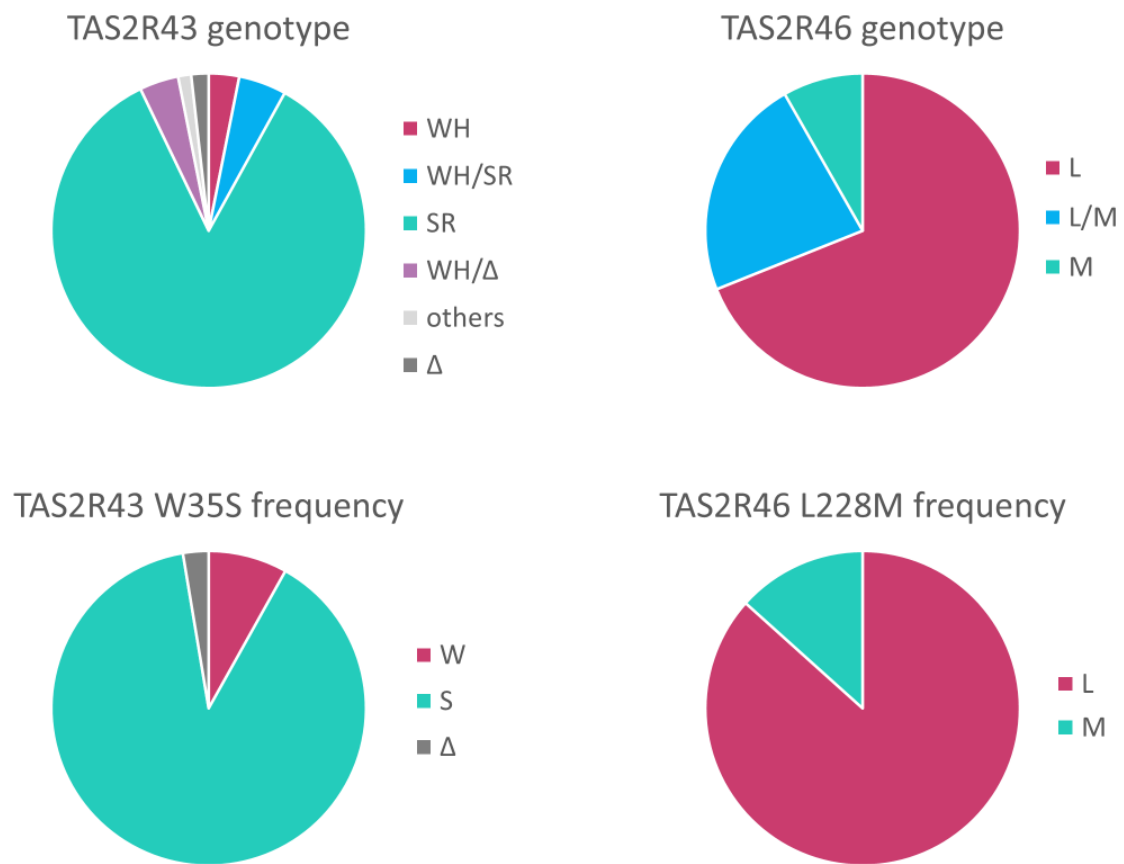


図 8：被験者の遺伝子型・ハプロタイプ頻度の内訳

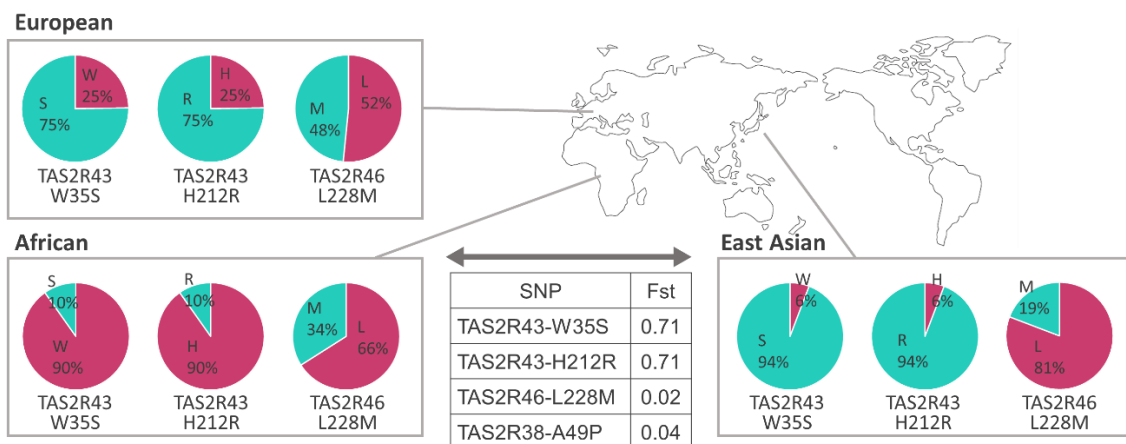


図 9：地域集団ごとの SNP 頻度

各ボックス内の円グラフは、3つの地域集団（1000 ゲノムプロジェクトによるアフリカ系、ヨーロッパ系、東アジア系）における SNP の割合を示している。マゼンタ部分は祖先型ハプロタイプ（*TAS2R43*-W35S、*TAS2R43*-H212R、*TAS2R46*-L228M）の割合を示し、緑色部分は派生型ハプロタイプ（*TAS2R43*-S35S、*TAS2R43*-R212R、*TAS2R46*-M228M）の割合を示す。図内の表は、アフリカ系と東アジア系の集団間で計算された、SNP（*TAS2R43*-W35S、*TAS2R43*-H212R、*TAS2R46*-L228M、ならびに *TAS2R38*-A49P）における遺伝的構造による集団分化指標である Fst 値を示す。

2.4. 考察

TAS2R43-WH/WH グループのすべての被験者は、カフェインの苦味認知閾値が 1600 μ M 未満であったのに対し、*TAS2R43*-SR/SR グループでは閾値がより広く分布し、6400 μ M でもカフェインの苦味を知覚しない被験者も見られた (図 7A)。多群間比較では *TAS2R43* の遺伝子型とカフェインの苦味認知閾値とに有意な相関が認められたが、2 群間比較に Bonferroni 補正を適用したところ、どのグループ間でも有意差は検出できなかった。補正をかける前の値で見ると、*TAS2R43*-WH/WH グループと *TAS2R43*-SR/SR グループ ($p=0.015$)、*TAS2R43*-WH/ Δ グループと *TAS2R43*-SR/SR グループ ($p=0.046$) 間でカフェインの苦味認知閾値に有意差が見られた ($p<0.05$) (表 6)。本研究で扱った被験者のデータでは、各グループに属する人数に限りがあることと、多重比較のグループが多くなるほど有意差の検出力が下がることから、各 2 グループ間での検定で有意差が検出できなかったと考えられる。そのため、*TAS2R43* の遺伝子型がカフェインの苦味認知閾値へ影響する傾向は見られたものの、各グループの被験者データを充実させ、さらなる検証を行う必要がある。*TAS2R43*-WH/WH、-WH/ Δ グループは、*TAS2R43*-SR/SR グループよりもカフェインに対する苦味認知閾値が低かったことから、*TAS2R43* の祖先型ハプロタイプを 1 つ以上持ち、派生型ハプロタイプを持たない被験者は、カフェインに対する苦味感受性が高い可能性が示唆された。*TAS2R46* については、多群比較でも遺伝子型とカフェインの苦味認知閾値の相関が検出されなかったことから、*TAS2R46* の遺伝子多型はカフェインの苦味知覚に大きな影響を与えないと考えられる。さらに、*TAS2R43*・*TAS2R46* の遺伝子型の組み合わせについて解析を行った結果、有意ではないが多群間比較で *TAS2R43*・*TAS2R46* の遺伝子型の組み合わせによりカフェインの苦味認知閾値に差がある傾向が見られた ($p=0.068$)。各 2 グループ間で比較を行ったところ、Bonferroni 補正をかけると有意差はどのグループ間でも検出されなかった。しかし、補正前の値で見ると、*TAS2R43*-WH/WH & *TAS2R46*-L/L グループと *TAS2R43*-SR/SR & *TAS2R46*-L/L グループ間 ($p=0.020$)、*TAS2R43*-WH/WH & *TAS2R46*-L/L グループと *TAS2R43*-SR/SR &

TAS2R46-L/M グループ ($p=0.008$) 間、*TAS2R43*-WH/WH & *TAS2R46*-L/L グループと *TAS2R43*-SR/SR & *TAS2R46*-M/M グループ ($p=0.048$) 間、*TAS2R43*-WH/WH & *TAS2R46*-L/L グループと *TAS2R43*-WH/SR & *TAS2R46*-L/L グループ ($p=0.015$) 間でカフェインの苦味認知閾値に差がある傾向が見られた ($p<0.05$)。本研究で扱った被験者のデータでは、各グループに属する人数に限りがあったため、*TAS2R43*・*TAS2R46* の遺伝子型の組み合わせでグループ分けするとさらにグループごとのサンプルサイズが小さくなることや、メジャーな遺伝子型同士でも *TAS2R43*-WH/WH & *TAS2R46*-M/M は被験者内にいなかったことにより、すべての組み合わせに関して解析が行えたわけではないことを付記しておく。マイナーハプロタイプを含む遺伝子型を有する被験者も複数人いたことから、多重比較のグループが多くなり検定の検出力が下がってしまい、各 2 グループ間での検定で有意差が検出できなかったと考えられる。そのため、各グループ内に少なくとも 10 人以上は属し、可能な限り各グループのサンプルサイズが揃うように、各郡の被験者データを充実させ、さらなる検証を行う必要がある。

序論で *TAS2R16* の例⁶⁴を示したように、ヒトの苦味感受性の変化は、地域集団間のハプロタイプ出現頻度差や人類の拡散ルートと関連している可能性がある。この可能性を検討するため、アフリカ集団と東アジア集団間において、*TAS2R43* の W35S・H212R および *TAS2R46* の L228M について F_{st} を算出した。ヒトの苦味感覚に影響すると報告されている他の *TAS2R* の SNP についてもアフリカ集団と東アジア集団間で F_{st} を算出し比較した結果、*TAS2R43* の W35S、H212R の SNP は 0.71 であり、*TAS2R43* の SNP は他の *TAS2R* の SNP と比較して特異的に高い F_{st} 値を示すことが明らかになった (*TAS2R38* の P49A : 0.06、*TAS2R16* の K172N : 0.19、*TAS2R4* の V96L : 0.18)。すなわち、*TAS2R43* の 2 つの SNP の F_{st} が 0.25 以上であることから、*TAS2R43* の地域集団間の遺伝的分化度は非常に高いことが示された^{92;93}。ヨーロッパ集団におけるこれらのハプロタイプ出現頻度がアフリカ集団と東アジア集団の間であることから、これらの *TAS2R43* の SNP は、人類の出アフリカ後に、食環境に

応じて分化していった可能性があると考えられる。食環境の地域差には、地域ごとの有毒植物の植生の違い、例えば TAS2R43 が応答する有毒なアリストロキア酸を産生するアリストロキア属植物などの有毒植物の植生の違いが挙げられる⁹⁴。アリストロキア属植物は、熱帯～亜熱帯地域を中心に分布しており⁹⁵、これらの地域では TAS2R43 の祖先型ハプロタイプが多く見られる。熱帯地域であるアフリカでは TAS2R43 の祖先型ハプロタイプが多く、温帯～亜寒帯のヨーロッパや東アジアでは祖先型ハプロタイプの割合がさらに減少している。有毒植物が存在するアフリカ地域では、毒を忌避するために TAS2R43 の祖先型ハプロタイプが必要だったと考えられる。一方で、出アフリカ後のヨーロッパまたは東アジア地域では、苦味感覚に基づいて忌避する食材を減らすことで可食物の選択肢をより広げられることから、派生型ハプロタイプが寒冷地での生存により有利であり、TAS2R43 の派生型ハプロタイプが増えたのではないかと考えられる。TAS2R43 が受容する苦味物質は広範囲であるため、熱帯～亜熱帯地域に存在する有毒植物を避けるためにこれらの TAS2R43 の祖先型が維持され、反対に、熱帯以外の地域では有毒植物を敏感に忌避するよりも、可食物の選択範囲を広げた方が生存に有利であったため、これらの TAS2R43 の機能が低下していく（祖先型ハプロタイプの割合が減少していく）選択圧がかかったという可能性がある。

本研究では、TAS2R43 の遺伝的分化度について解析・考察を行ったが、計算資源の制約により、これらの分化が遺伝的浮動によるものなのか、自然選択によるものなのかを判断することはできなかった。これを解明するためには、将来的により大規模な計算環境を用いた選択検出手法（Maximum frequency of derived mutations neutrality test : MFDM⁷² など）での解析が必要である。

2.5. 結論

第2章では、純粋な苦味物質であるカフェインに対する苦味認知閾値と TAS2R43・TAS2R46

の遺伝子型との関係を検討した。その結果、*TAS2R43* の遺伝子型によって、ヒトのカフェインの苦味認知閾値が異なることが示された。また、*TAS2R43* の SNP がヒトの苦味感覚に与える影響は、出アフリカから始まる人類拡散の歴史と関連している可能性が示唆された。

第 3 章 *TAS2R43* と *TAS2R46* の遺伝子多型がカフェインに対する受容体応答能に及ぼす影響

3.1. 背景

第 2 章では、*TAS2R43* の SNP が、ヒト個体レベルにおいて、カフェインの苦味認知閾値に影響を与えることが明らかになった。この *TAS2R43* の SNP について、タンパク質の立体構造の面から見ると、W35S は TM1 に位置し、H212R は ICL3 に位置する（図 10A）。ICL3 は GPCR と G タンパク質が相互作用する領域であることから、H212R の SNP は細胞内での G タンパク質との相互作用に影響し、苦味伝達シグナルに影響を及ぼす可能性がある。*TAS2R46* の構造を明らかにした先行研究では、TM3、TM5、TM6、TM7 がリガンド結合領域に関与し、TM5–TM6–TM7 の構造がタンパク質の安定性に寄与することが示されてきた¹⁰ が、TM1 に関する記述はなされていない。したがって、*TAS2R43* の TM1 に位置する W35 の受容体機能への構造上の影響は明らかになっていない。*TAS2R16* に関する研究⁶⁶ で、TM1 および TM2 のアミノ酸置換が細胞膜表面での *TAS2R* 発現量に寄与すると示唆されていることから、*TAS2R43* の W35S 変異により、*TAS2R43* の局在が変化する可能性が考えられる。一方、*TAS2R46* の第 228 アミノ酸は TM6 に位置しており、TM6 の構造変化により、受容体のリガンド結合およびタンパク質の安定性に影響を与える可能性が考えられる（図 10B）。構造変化に伴い、タンパク質の転写・翻訳に影響する可能性や、タンパク質分解へ影響する可能性も挙げられる。

本章では、これらの *TAS2R43*・*TAS2R46* のアミノ酸置換が、ヒトの味覚に影響する要因を検討するために、タンパク質の構造と機能に与える影響と、その要因について、発現に関わる条件を統一することのできる培養細胞系を用い、細胞ベースで解明することを目指した。

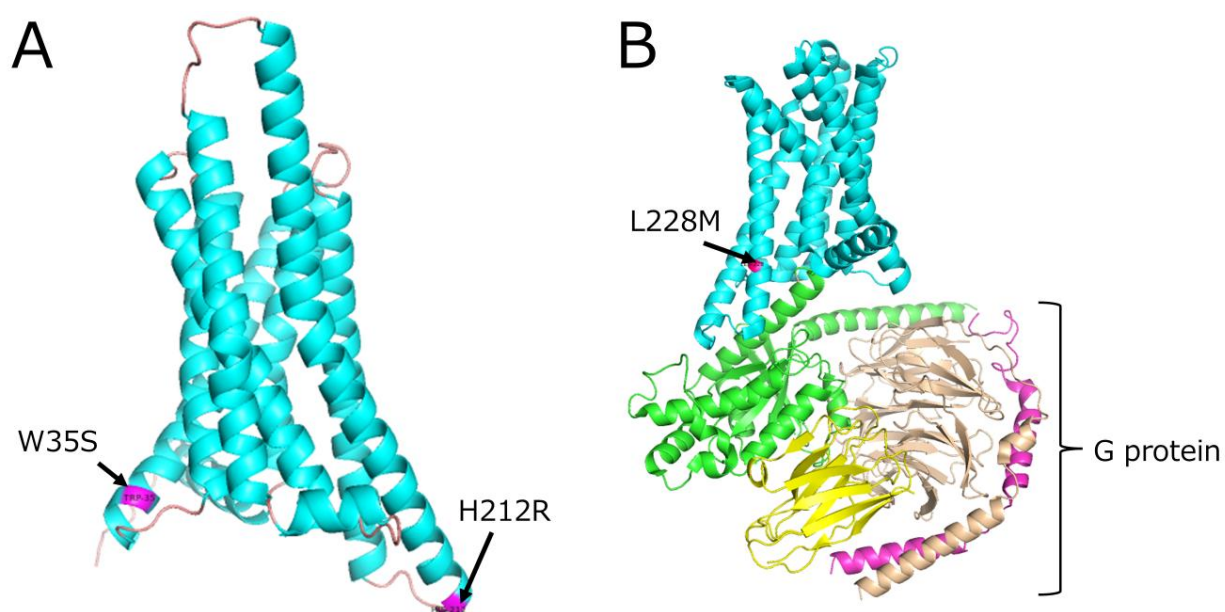


図 10 : TAS2R43・TAS2R46 の SNP の立体構造上の位置

構造の描画には PyMOL を用いた。(A) PDB (Protein Data Bank) 内の *TAS2R43* 配列 (AF_AFP59537F1) を用いた、ColabFold v1.5.5:⁹⁶ による構造モデル。TAS2R43 の 2 か所の SNP によるアミノ酸置換位置をマゼンタで示す。(B) PDB 内の *TAS2R46* の Cryo-EM 構造 (リガンド結合なし、7XP4) を基に作成した。TAS2R46 の SNP によるアミノ酸置換位置をマゼンタで示す。

3.2. 材料・方法

3.2.1. 材料・試薬

3.2.1.1. 材料・試薬

カフェイン溶液は、10 mM の無水カフェイン（富士フイルム和光純薬株式会社、日本）を含む 1× HEPES バッファー（130 mM NaCl、10 mM glucose、5 mM KCl、2 mM CaCl₂、1.2 mM MgCl₂、10 mM HEPES、pH 7.4）を作製し、これを希釈して 7 種類の濃度（0 μM、60 μM、200 μM、600 μM、2 mM、6 mM、10 mM）の溶液を調製した。カフェストール（富士フイルム和光純薬株式会社、日本）は水に不溶な脂溶性物質であるため、カフェストール溶液は、DMSO で 200 mM のストック溶液を作製した後に、1× HEPES バッファーで希釈し、6 段階（0 μM、2 μM、6 μM、20 μM、60 μM、200 μM）の濃度の溶液を作製した。

HEK293T 細胞は、ヒト胚性腎臓細胞由来の培養細胞であり、組み換えタンパク質の大量発現が可能であることから、TAS2R の機能解析などで一般的に用いられている細胞である。先行研究での機能解析の結果と比較できるようにするため、本研究でも、HEK293 細胞の派生であり、SV40 Large T 抗原を発現させることでタンパク質の大量発現が可能となっている HEK293T 細胞を用いて、第 3 章の実験を行った。

3.2.1.2. TAS2R 発現ベクター

発現ベクターは、先行文献に基づき作製した^{98;99;100}。まず、標準的な TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ株式会社、日本）のプロトコルを用いて、アニーリング温度 57°C、35 サイクルの PCR を行い、ヒトゲノム DNA（被験者の DNA 由来、25 μL 反応あたり 10 ng）から *TAS2R43* および *TAS2R46* のタンパク質コーディング領域を増幅した。さらに、標準的な Tks Gflex™ DNA Polymerase（タカラバイオ株式会社、日本）のプロトコルを用いて、アニーリング温度 60°C、35 サイクルの PCR により、タンパク質コーディング領域の N 末端には膜移行シグナ

ルペプチドとしてラットソマトスタチン受容体タイプ 3 (SST3) 配列中の N 末端膜ターゲティング配列 (TAS2R を培養細胞の膜表面に発現させるために必要)⁹⁹ を付加し、C 末端にはヘルペスウイルス糖タンパク質 D エピトープをコードする HSV タグ (免疫染色で検出可能) を付加した^{98;101}。得られた PCR 産物は、発現ベクター pcDNA™5/FRT (Thermo Fisher Scientific Inc., アメリカ) の EcoRV サイトに In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio USA, Inc., アメリカ) を用いてサブクローニングした。その後、形質転換とクローニングにより目的の配列が含まれているベクターを選択した。最初に TAS2R43-SR 型のベクターが得られたため、QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, アメリカ) を用いて TAS2R43-WH 型、TAS2R43-WR 型、そして TAS2R43-SH 型の発現ベクターをそれぞれ作製した。TAS2R46 については、最初に TAS2R46-L ハプロタイプの遺伝子が得られたため、QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて TAS2R46-M 型の発現ベクターを作製した。サブクローニングした配列はアッセイに使用する前に標準プロトコルにしたがってサンガーシーケンス (Applied Biosystems™ 3130/3130x/ DNA Analyzer, Thermo Fisher Scientific Inc., アメリカ) により確認した。作製したベクターは QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kit (QIAGEN N.V., オランダ) により精製した。

より効率的な膜移行シグナルペプチドとしてラットの M3 ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (M3R、典型的な Class A 型 GPCR の一種、ヒトの M3R と 98% の配列相同性) が報告された¹⁰¹ ため、上記で作製した発現ベクターのシグナルペプチドを、SST3 の膜ターゲット配列から M3R のシグナルペプチド領域に置換し、再度ベクター構築を行った。本研究の培養細胞実験では、主に次に述べるベクターを使用した。TAS2R の N 末端にはシグナルペプチドとして M3R 配列を付加し、これに続いて N 末端側から順に 13 アミノ酸 (EFGGGSGGSSSGG) から成るリンカー配列、11 アミノ酸から成る HiBiT 配列 (発光測定用タグ)、および 17 アミノ酸 (GGSGGGSGGSSSGGVD) から成るリンカー配列を付加した。また、C 末端には HSV タグ配列を付加した。それぞれの全長配列はアッセイに使用す

る前に標準プロトコルにしたがってサンガーシーケンス（Applied Biosystems™ 3130/3130xI DNA Analyzer、Thermo Fisher Scientific Inc.、アメリカ）により確認した。同様に、その他の TAS2R（TAS2R4、TAS2R7、TAS2R10、TAS2R14）についても発現ベクターを作製し、QIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kit（QIAGEN N.V.、オランダ）により精製した。本実験で作製・使用したベクターはそれぞれ、TAS2R4、TAS2R7、TAS2R14 についてはキニーネを用いた実験でリガンド応答が検出され（所属研究室の未発表データ）、TAS2R10 は本実験により、カフェインへの応答が検出されている。そのため、これらのベクター・プロトコルを使用した本実験系において、機能的なタンパク質が発現していることが確認されている。

ほとんどの実験には上記の M3R を膜移行シグナル配列とするベクターを用いたが、図 12C、12D の実験では、より反応の大きさ（ $\Delta F/F_0$ ）の差が見やすい状態で各 SNP による影響を検討するために、メインで用いたベクターではなく、初期に構築が完了し反応の大きさが確かめられていたベクターを用いた。また、同一条件下での SNP の影響を検討するため、図 12C、12D の実験には TAS2R43-WH、-SR も含めてすべて HiBiT・リンカー配列がなくシグナルペプチドも異なる（SST3）ベクターを使用した。

3.2.2. タンパク質発現・局在解析

各 TAS2R ハプロタイプの細胞表面発現量の測定には、Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System（Promega Co.、アメリカ）を使用した。細胞培養、トランスフェクションおよびカルシウムアッセイは、先行研究にしたがって実施した^{98; 103}。HEK293T 細胞を 100 mm ディッシュに播種し、DMEM 培地と 10 % FBS (v/v) (DMEM+FBS 培地) を添加し、37°C、5%CO₂の加湿空気中で培養した。トランスフェクションの前日に、細胞を 100 mm ディッシュから Nunc™ Cell-Culture Treated Multidishes（Thermo Fisher Scientific Inc.、アメリカ）

に播種し、37℃、5% CO₂の加湿空気中で24時間培養した。その後、DMEM+FBS培地で洗浄し、Lipofectamine 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.、アメリカ)を用いて Gα (キメラ G タンパク質 Gα16gust44¹⁰³) 50 ng および TAS2R 発現ベクター200 ng をトランスフェクションした。各ハプロタイプ間で、SNP 以外の差異がないよう同じディッシュから分けた細胞、同じチューブ内で作製し分注したトランスフェクション試薬、同チューブから取った同量のベクターを用い、HEK293T 細胞に TAS2R43・TAS2R46 を発現させた。トランスフェクション後、37℃、5%CO₂の加湿空気中6時間培養した細胞を 1.0×10⁶~1.2×10⁶個/mL の濃度で 96 ウェルマイクロプレートチャンバー (MB シリーズ 96 ウェルマイクロプレートチャンバー、50 µl、8 mm²、Merck KGaA、ドイツ) に播種した。37℃、5% CO₂の加湿空気中で終夜培養後、Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System のプロトコルにしたがって各ウェルに Nano-Glo® HiBiT Extracellular 試薬を添加した。発現ベクターの N 末端に付加した HiBiT に、添加した試薬中に含まれる約 18 kDa の NanoLuc® ルシフェラーゼ断片 (LgBiT) が結合し、基質反応が起こることによって生じる発光量を検出するため、室温で40分間試薬と反応させた後、FlexStation3 (モレキュラーデバイスジャパン株式会社、日本)を用いて積分時間1秒で発光量を測定した。各 TAS2R ハプロタイプの総発現量の算出には、Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System の代わりに Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega Co.、アメリカ)を使用した。このキットでは、Nano-Glo® HiBiT Extracellular 試薬の代わりに細胞膜溶解成分・LgBiT・基質を含む Nano-Glo® HiBiT Lytic 試薬を用いて細胞膜を透過させ、細胞表面のみでなく細胞内も含めて HiBiT 由来の発光量を測定できる。解析では、発光強度を比較するために TAS2R43-WH を基準として、それぞれのベクターを用いた時の発光強度を相対値に変換してデータを扱った。

3.2.3. カルシウムアッセイ

TAS2R43 および TAS2R46 のハプロタイプ間におけるリガンド応答性を比較することを目的として、これらの受容体および各変異体の苦味物質への応答をカルシウムアッセイにより検討した。TAS2R のリガンドに対する応答性測定には、FLIPR Calcium 5 Assay Kit (モレキュラーデバイスジャパン株式会社、日本) を用いた。このアッセイは、色素添加後のインキュベーション中に細胞質内に取り込まれるカルシウム蛍光色素を使用することで機能し、TAS2R とリガンドが結合すると、カルシウムイオンが細胞質に放出され (図 1)、色素と結合して蛍光シグナルを増加させる。すなわち、受容体活性化により細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する現象を、蛍光強度でモニタリングする手法である。3.2.2. と同様の方法で TAS2R ベクターとキメラ G タンパク質ベクターをトランスフェクションした 6 時間後に、Corning® CellBIND® 96 ウェル透明マルチウェルプレート平底 (Corning Inc.、アメリカ) に播種し、終夜培養した。その後、細胞を 37°C の 1× HEPES バッファーで洗浄し、各ウェル中の洗浄残液 (50 μ L の 1× HEPES バッファー) と等量の FLIPR Calcium 5 Assay 試薬を加え、27°C で 40 分間静置し、FlexStation3 を用いて蛍光測定を行った。カフェイン溶液およびカフェストール溶液を FlexStation3 内で 27 °C に保ち、アッセイ開始まで 40 分間静置した。その後、FlexStation3 を用いて溶液投入前後の蛍光量を 2 秒間隔で、投入前 20 秒間および投入後 120 秒間測定した。カルシウム応答の強度は、バックグラウンド蛍光 (溶液投入前 20 秒間の平均蛍光強度: F_0) に対するピーク蛍光強度 (F) の変化量 ($\Delta F = F - F_0$) として評価した: $\Delta F/F_0$ ($= [F - F_0] / F_0$)。得られた $\Delta F/F_0$ 値は、濃度依存的蛍光応答データに対して非線形最小二乗法 (nonlinear least squares) を適用し、4 パラメータロジスティック回帰モデル (LL.4 model) によりフィッティングした。解析は R (version 4.2.0) にて実施し、drc パッケージ¹⁰³ を利用してパラメータ推定を行った。TAS2R ベクター導入細胞と pcDNA (空ベクター) 導入細胞間におけるリガンドへの反応差は Dunnett 検定で評価した ($\alpha = 0.05$)。

3.2.4. SNP による TAS2R 構造への影響のモデリングシミュレーション

TAS2R43 の構造モデル作製には、TAS2R46 の Cryo-EM 構造 (PDB : 7XP6、ストリキニーネ結合状態) をテンプレートとして使用し、I-TASSER モデリングツールを用いた^{104;105;106}。作製したモデルに基づき、ChimeraX (version 1.4, 2022-06-03) の Rotamers ツールを用いて変異モデルを構築した。二次構造の違いを検出するために、PSIPRED という二次構造予測ウェブサーバーを使用した¹⁰⁷。また、受容体と G タンパク質との相互作用を評価するため、モデルを TAS2R46 構造にアライメントし、ChimeraX を用いて $G\alpha_{s/gust}$ と結合させた¹⁰⁸。受容体の構造は、Protein Preparation Wizard (Schrödinger Release 2023-3: Protein preparation wizard, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023) を用いて準備した。SNP による熱安定性変化 ($\Delta\Delta G$) の予測には、ThermoMPNN、DDGun、および DynaMut2 を使用した^{109; 120; 111}。DynaMut2 は、祖先型の残基環境をグラフ構造として表現し、変異による構造的影響を数値化する Graph-based signatures とタンパク質の自然振動モードを解析し、構造の動的性質を評価する Normal Mode Analysis (NMA) を組み合わせた $\Delta\Delta G$ 予測手法である¹¹¹。W35S、H212R は構造上距離が離れているため、協調的・共有的な影響の可能性は低いことと、それぞれの安定性予測ツールが単一塩基の置換による影響を予測するものであることから、TAS2R43 の各変異は独立で分析した。これらのシミュレーションは、共同研究者の Masha Niv 博士、Alon Rainish 氏に依頼した。

3.2.5. リアルタイム PCR による細胞内の mRNA 定量

リアルタイム PCR により、細胞内の RNA の定量解析を行った¹¹²。各ハプロタイプの RNA 発現量に対する SNP の影響を調べるため、3.2.1.と同様の方法で TAS2R タンパク質を HEK293T 細胞に発現させた。Nunc™ Cell-Culture Treated Multidishes (Thermo Fisher Scientific Inc.、アメリカ) の各ウェルから RNeasy Mini Kit (QIAGEN N.V.、オランダ) を用いて RNA

を抽出した。抽出した RNA 濃度を測定し、各サンプルを希釈して RNA 濃度を揃えてから PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社、日本) の標準プロトコルに従ってゲノム DNA 除去反応およびリアルタイム PCR 用の鋳型 cDNA 合成を行った。また、SYBR™ Green I 検出系によるリアルタイム PCR は、THUNDERBIRD® Next SYBR™ qPCR Mix (東洋紡株式会社、日本) の標準プロトコルにしたがって行い、内在性コントロールとして ACTB を用いた¹¹³ (プライマー配列: 表 6)。RNA の定量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行った。

表 6：リアルタイム PCR 用プライマー配列

Gene	Forward/Reverse	Sequence	Location
<i>TAS2R43</i>	Forward	ACTGGCTTGCTACTACCCTCA	from 287 to 307
<i>TAS2R43</i>	Reverse	GCAAAGGCCCCAACAACATCA	from 392 to 412
<i>TAS2R46</i>	Forward	TTGCTGACCAAATTCTCACTGCTCT	from 128 to 152
<i>TAS2R46</i>	Reverse	TGGTTGATTACTGCCCAGACATTGT	from 254 to 278
<i>ACTB</i>	Forward	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	from 1359 to 1378
<i>ACTB</i>	Reverse	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	from 1476 to 1498

3.3. 結果

3.3.1. SNP を入れたベクターによる細胞表面・細胞全体でのタンパク質発現

TAS2R43 および TAS2R46 とそれぞれの変異体における苦味物質への応答をカルシウムアッセイにより検討した。まず、作製したベクターによって、タンパク質が HEK293T 細胞で正常に発現して膜移行することを検討するために、HiBiT システムを用いて細胞表面における TAS2R に付加したタグ配列の量を測定した (図 11)。

TAS2R43-SR および TAS2R46-M は、それぞれ TAS2R43-WH および TAS2R46-L と比較して、発現タンパク質由来の発光量が少なかった (図 11A、B)。TAS2R43-SR は TAS2R43-WH より細胞表面における発光量が有意に低く、測定された発光量は $\text{TAS2R43-SR/TAS2R43-WH} = 0.56 (\pm 0.11)$ であった。TAS2R46-M は TAS2R46-L より細胞表面での発光量が有意に低く、測定された発光量は $\text{TAS2R46-M/TAS2R46-L} = 0.40 (\pm 0.17)$ であった。

また、細胞膜を透過させる条件 (Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System) で、細胞全体における TAS2R-HiBiT 融合タンパク質の総発現量を測定した (図 11C、D)。その結果、発光量比は $\text{TAS2R43-SR/TAS2R43-WH} = 0.68 (\pm 0.15)$ 、 $\text{TAS2R46-M/TAS2R46-L} = 0.69 (\pm 0.09)$ であり、TAS2R43-SR および TAS2R46-M は、それぞれ TAS2R43-WH および TAS2R46-L と比較して、細胞全体でも発現量が低いことが示唆された。細胞全体では派生型 (TAS2R43-SR、TAS2R46-M) は祖先型 (TAS2R43-WH、TAS2R46-L) の約 7 割の発現量であったのに対して、細胞膜では派生型が祖先型の TAS2R43 で約 6 割、TAS2R46 で約 4 割であったことから、膜移行の効率も祖先型と派生型間で変化する可能性が示唆された。

HiBiT システムを用いたタンパク質発現解析により、本研究で用いた 4 つのベクターすべてが HiBiT を細胞外に突出する形で発現することが明らかになった。すなわち、少なくとも細胞膜上でのタンパク質発現が担保されていることが示された。

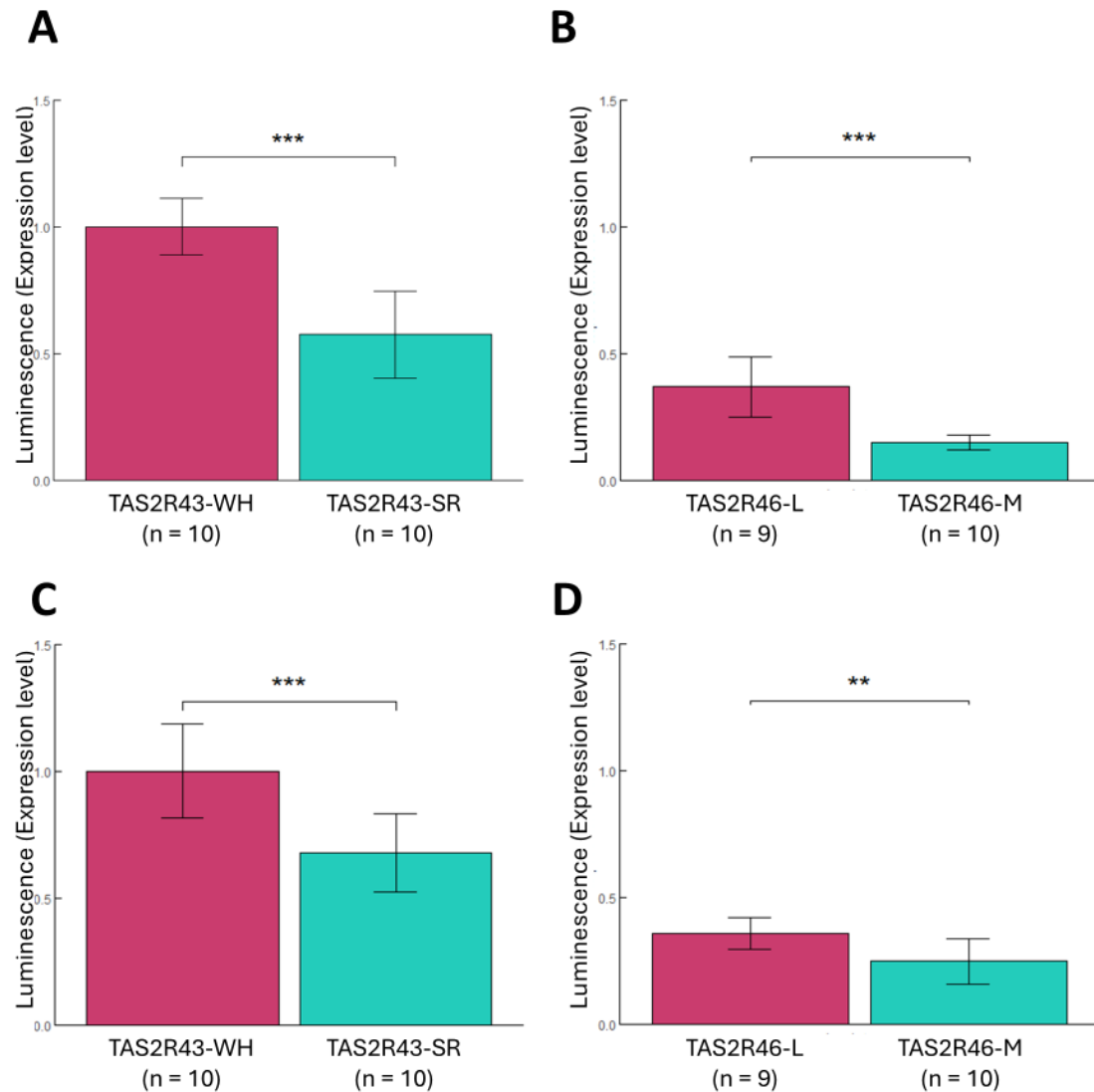


図 11：TAS2R タンパク質の細胞表面発現量および総発現量の解析

HiBiT タグに LgBiT が結合した際の発光量により測定した TAS2R の発現量を TAS2R43-WH を基準としてプロットした (Welch の t 検定、**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。エラーバーは標準偏差を示す。ネガティブコントロールとして用いた空ベクターは、TAS2R43-WH を基準とした発光量が A、B において平均 0.0006 ± 0.003 、C、D においては平均 0.0006 ± 0.004 であった。(A) TAS2R43-WH および TAS2R43-SR の細胞表面でのタンパク質発現量。(B) TAS2R46-L および TAS2R46-M の細胞表面でのタンパク質発現量。(C) TAS2R43-WH および TAS2R43-SR の総発現量。(D) TAS2R46-L および TAS2R46-M の総発現量。(n=9 または 10)

表 7：HiBiT アッセイの基データ

同じ 6 ウェルプレートから 96 プレートに播種したデータを行ごとに示す。

Date	Vector	Extracellular expression ratio relative to base	Lytic expression ratio relative to base
2024/12/19	TAS2R43-WH	0.901	0.894
2024/12/19	TAS2R43-WH	1.099	1.106
2024/12/21	TAS2R43-WH	0.930	0.946
2024/12/21	TAS2R43-WH	1.070	1.054
2024/12/19	TAS2R43-SR	0.789	0.766
2024/12/19	TAS2R43-SR	0.789	0.681
2024/12/21	TAS2R43-SR	0.605	0.679
2024/12/21	TAS2R43-SR	0.837	0.964
2024/12/27	TAS2R43-WH	0.918	1.059
2024/12/27	TAS2R43-WH	0.873	0.941
2024/12/27	TAS2R43-WH	1.209	1.000
2024/12/27	TAS2R43-SR	0.448	0.824
2024/12/27	TAS2R43-SR	0.403	0.547
2024/12/27	TAS2R43-SR	0.560	0.706
2024/12/29	TAS2R43-WH	1.044	1.394
2024/12/29	TAS2R43-WH	0.899	0.655
2024/12/29	TAS2R43-WH	1.057	0.951
2024/12/29	TAS2R43-SR	0.449	0.655
2024/12/29	TAS2R43-SR	0.383	0.444
2024/12/29	TAS2R43-SR	0.489	0.507

2024/12/19	TAS2R46-L	0.394	0.328
2024/12/19	TAS2R46-L	0.451	0.332
2024/12/21	TAS2R46-L	0.512	0.375
2024/12/21	TAS2R46-L	0.558	0.375
2024/12/19	TAS2R46-M	0.199	0.119
2024/12/19	TAS2R46-M	0.145	0.196
2024/12/21	TAS2R46-M	0.100	0.179
2024/12/21	TAS2R46-M	0.134	0.250
2024/12/27	TAS2R46-L	0.246	0.406
2024/12/27	TAS2R46-L	0.291	0.465
2024/12/27	TAS2R46-M	0.129	0.406
2024/12/27	TAS2R46-M	0.167	0.353
2024/12/27	TAS2R46-M	0.171	0.335
2024/12/29	TAS2R46-L	0.222	0.380
2024/12/29	TAS2R46-L	0.342	0.254
2024/12/29	TAS2R46-L	0.300	0.296
2024/12/29	TAS2R46-M	0.140	0.211
2024/12/29	TAS2R46-M	0.169	0.188
2024/12/29	TAS2R46-M	0.127	0.232
2024/12/21	pcDNA	0.003	0.002
2024/12/21	pcDNA	0.003	0.002
2024/12/27	pcDNA	0.007	0.003
2024/12/27	pcDNA	0.005	0.003

2024/12/27	pcDNA	0.005	0.004
2024/12/29	pcDNA	0.009	0.008
2024/12/29	pcDNA	0.010	0.012

3.3.2. SNP による TAS2R の機能的差異

HiBiT アッセイによって、作製したベクター導入での TAS2R43・TAS2R46 の細胞膜での発現が確認できたため、カフェインに対する応答を TAS2R43 (図 12A、C)・TAS2R46 (図 12B) の各ハプロタイプ間で比較した。TAS2R43-WH ではカフェイン濃度が 0 の時、 $\Delta F/F_0$ は約 0.2 であった (図 12A)。カフェイン濃度が増加するにつれて $\Delta F/F_0$ の値が増加した。ネガティブコントロール (空ベクターである pcDNA) よりも有意に $\Delta F/F_0$ が大きくなる濃度は 1000 μM であった。TAS2R43-SR でもカフェイン濃度が 0 の時、 $\Delta F/F_0$ は約 0.2 であった。リガンド濃度を上げてても $\Delta F/F_0$ はほとんど増加せず、蛍光強度の変化がネガティブコントロールと有意に異なる濃度は 5000 μM 以下では存在しなかった。これは、ネガティブコントロールである pcDNA を導入した細胞とほとんど同じ応答パターンであった。また、反応強度の大きさ ($\Delta F/F_0$) は、カフェイン濃度が 5000 μM の値を比較すると TAS2R43-WH が 0.43 であるのに対し、TAS2R43-SR は 0.31 であった。TAS2R43-SR の結果は、pcDNA を導入した細胞 (0.29) とほぼ同等であった。すなわち、TAS2R43-WH はカフェインに対する有意な応答を示したのに対して、TAS2R43-SR はほとんど応答を示さないことが示唆された。

TAS2R46-L ではカフェイン濃度が 0 の時、 $\Delta F/F_0$ は約 0.2 であった (図 12B)。カフェイン濃度が増加するに従って $\Delta F/F_0$ の値が増加した。ネガティブコントロールより有意に $\Delta F/F_0$ が大きくなる濃度は 1000 μM であった。TAS2R46-M でもカフェイン濃度が 0 の時、 $\Delta F/F_0$ は約 0.2 であった。リガンド濃度を上げてても $\Delta F/F_0$ はほとんど増加せず、蛍光強度の変化がネガティブコントロールと有意に異なる濃度は 5000 μM 以下では存在しなかった (図 12B)。TAS2R46-M の結果は、ネガティブコントロールである pcDNA を導入した細胞とほとんど同じ応答パターンであった。また、反応強度の大きさ ($\Delta F/F_0$) は、カフェイン濃度が 5000 μM の値を比較すると TAS2R46-L が 0.76 であるのに対し、TAS2R46-M は 0.36 であった。TAS2R46-M の結果は、pcDNA を導入した細胞 (0.34) とほぼ同等であった。すなわち、TAS2R46-L はカフェインに対する有意な応答を示したのに対して、TAS2R46-M はほとんど

応答を示さないことが示唆された。

さらに、TAS2R43 の 2 つの SNP (W35S、H212R) のうち、カフェインに対する応答性への影響が大きい SNP を同定するために、ヒトではあまり見られないマイナーな組み合わせである TAS2R43-WR、-SH ハプロタイプを含めて、カルシウムアッセイによる機能解析を行った (図 12C)。TAS2R43-WH、-WR ではカフェイン濃度が 0 の時、 $\Delta F/F_0$ は約 0.5 であり、カフェイン濃度が増加するに従って $\Delta F/F_0$ の値が増加した。ネガティブコントロールより有意に $\Delta F/F_0$ が大きくなる濃度は 100 μM であった。TAS2R43-SR、-SH ではカフェイン濃度が 0 の時、 $\Delta F/F_0$ は約 0.4 であった。リガンド濃度を上げた際の $\Delta F/F_0$ は TAS2R43-WH、-WR と比べてあまり増加せず、蛍光強度の変化がネガティブコントロールと有意に異なる濃度は TAS2R43-SH では 5000 μM のみであり、TAS2R43-SR は 5000 μM 以下では存在しなかった (図 12C)。また、反応強度の大きさ ($\Delta F/F_0$) は、カフェイン濃度が 5000 μM の値を比較すると、TAS2R43-WH、-WR が 0.95、0.96 であるのに対して、TAS2R43-SR、-SH は 0.44、0.51 であった。TAS2R43-SR、-SH の反応は、pcDNA を導入した細胞 (0.28) と同じ傾向であり、ベクターの反応を非特異的反応として差し引くと、TAS2R43-WH が 0.67、-WR が 0.68、TAS2R43-SR が 0.16、-SH が 0.23 となった。すなわち、TAS2R43-WH、-WR はカフェインに対する有意な応答を示したのに対して、TAS2R43-SH、-SR はほとんど応答を示さないことが示唆された。

コーヒーに含まれる苦味物質であるカフェストールについても、同様の解析を行った (図 12D)。TAS2R43-WH、-WR ではカフェストール濃度が 0 の時、 $\Delta F/F_0$ は約 0.5 であり、カフェストール濃度が増加するにつれて $\Delta F/F_0$ の値が増加した。ネガティブコントロールより有意に $\Delta F/F_0$ が大きくなる濃度は 30 μM であった。TAS2R43-SR、-SH ではカフェストール濃度が 0 の時、 $\Delta F/F_0$ は約 0.3 であった。リガンド濃度を上げた際の $\Delta F/F_0$ は TAS2R43-WH、-WR と比べてあまり増加せず、蛍光強度の変化がネガティブコントロールと有意に異なる濃度は 100 μM 以下では存在しなかった。また、反応強度の大きさ ($\Delta F/F_0$) は、カフェス

ル濃度が 100 μM の値を比較すると、TAS2R43-WH、-WR が 0.75、0.73 であるのに対して、TAS2R43-SR、-SH はどちらも 0.48 であった。TAS2R43-SR、-SH の反応は、pcDNA を導入した細胞 (0.41) とほぼ同等であった。すなわち、TAS2R43-WH および-WR の反応が類似し、TAS2R43-SR および-SH と空ベクターがほとんど同じくカフェストールへの反応性を示さない反応曲線となった。しかし、細胞毒性を有する DMSO によって元のカフェストールストック溶液を作製したこと、またリガンド溶液濃度によって DMSO の濃度が異なる (リガンド濃度が薄いほど DMSO の割合も低くなる) ことから、溶液添加後の細胞の状態が異なる可能性があり、先述のカフェインに対する応答性実験の結果 (図 12A) とは単純比較できないことには注意が必要である。

カフェインに応答する TAS2R のうち、ヒトの苦味感覚に寄与する TAS2R がどれであることを応答強度の側面からも検討するため、TAS2R4、-7、-10、-14 についても TAS2R43-WH と併せてカルシウムアッセイを行った (図 13)。ネガティブコントロールよりも有意に $\Delta F/F_0$ が大きいのは、TAS2R10 は 5000 μM 、TAS2R43-WH では 300 μM ~5000 μM であり、他の TAS2R では有意に $\Delta F/F_0$ が大きい点は見られなかった。反応強度の大きさ ($\Delta F/F_0$) は、カフェイン濃度が 5000 μM の値を比較すると、TAS2R43-WH は 1.33 で、TAS2R4 は 0.39、TAS2R7 は 0.50、TAS2R10 は 0.70、TAS2R14 は 0.36 であった。ベクターの反応 (0.30) を非特異的反応として差し引くと、TAS2R43-WH は 1.03 で、TAS2R4 は 0.09、TAS2R7 は 0.20、TAS2R10 は 0.40、TAS2R14 は 0.06 となった。すなわち、TAS2R43-WH は他の TAS2R と比較して、カフェインに対する応答の閾値が低く、最大応答強度が相対的に高かった。

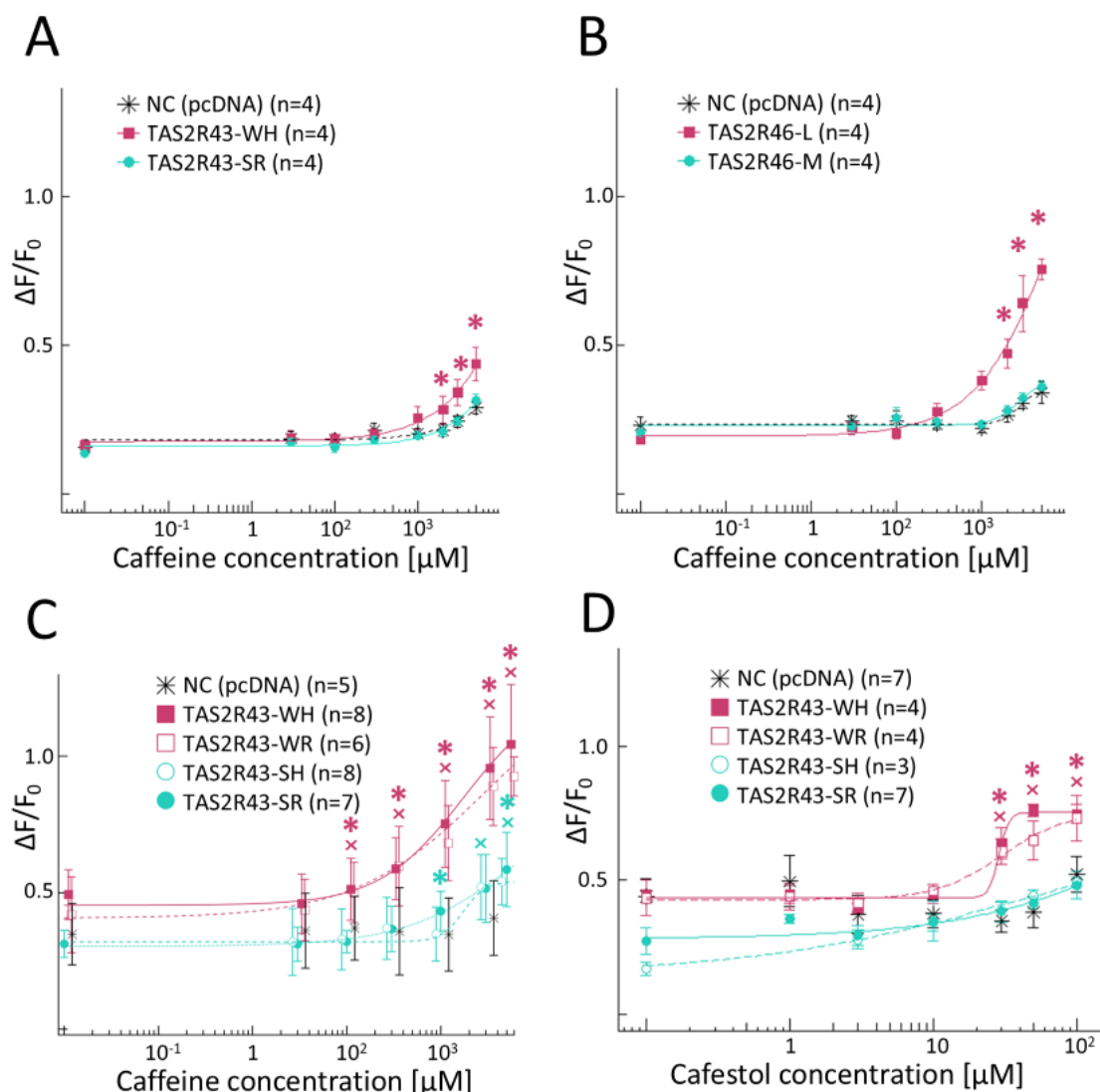


図 12：カルシウムアッセイによる TAS2R43 および TAS2R46 のリガンド応答性解析
 X 軸はリガンド濃度、Y 軸はリガンド溶液添加後の蛍光強度の最大変化量 ($\Delta F/F_0$) を示す。
 (A) カフェインに対する TAS2R43 の主要ハプロタイプの容量反応プロット (曲線は近似曲線を示す)。TAS2R43-WH の反応 (マゼンタ、四角) と TAS2R43-SR の反応 (緑、丸) をカフェイン濃度に対してプロットした。*は TAS2R ベクター導入細胞と pcDNA (空ベクター、黒) 導入細胞間のカフェイン反応における有意差 ($p < 0.05$) を示す。(B) カフェインに対する TAS2R46 の各ハプロタイプの容量反応プロット (曲線は近似曲線を示す)。TAS2R46-L の反応 (マゼンタ、四角) と TAS2R46-M の反応 (緑、丸) をカフェイン濃度に対してプロットした。*は TAS2R ベクター導入細胞と pcDNA (空ベクター、黒) 導入細胞間のカフェイン反応における有意差 ($p < 0.05$) を示す。(C) カフェインに対する TAS2R43 の 4 種類のハプロタイプの容量反応プロット (曲線は近似曲線を示す)。TAS2R43-WH の反応 (マゼンタ、四角)、TAS2R43-WR の反応 (白、四角)、TAS2R43-SH の反応 (白、丸)、

TAS2R43-SR の反応（緑、丸）をカフェイン濃度に対してプロットした。*、×は TAS2R ベクター導入細胞と pcDNA（空ベクター）導入細胞間のカフェイン反応における有意差（ $p < 0.05$ ）を示す（マゼンタ*は TAS2R43-WH、マゼンタ×は TAS2R43-WR、緑*は TAS2R43-SH、緑×は TAS2R43-SR）。(D) カフェストールに対する TAS2R43 の 4 種類のハプロタイプの容量反応プロット（曲線は近似曲線を示す）。TAS2R43-WH（マゼンタ、四角）、TAS2R43-WR（白、四角）、TAS2R43-SH（白、丸）、TAS2R43-SR（緑、丸）を発現した細胞のカルシウム応答をカフェストールの濃度に対してプロットした。*、×は、TAS2R ベクターと pcDNA（空ベクター、黒）を発現した細胞間のカフェストール反応における有意差（ $p < 0.05$ ）を示す（マゼンタ*は TAS2R43-WH、マゼンタ×は TAS2R43-WR）。

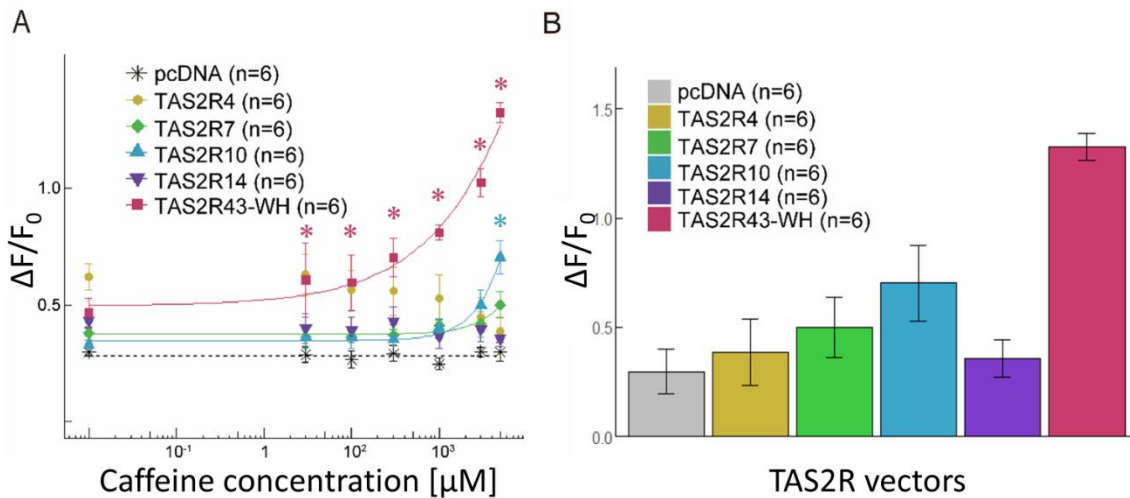


図 13：カフェインに対する複数の TAS2R の応答比較

用いたすべてのベクターについて、本実験または所属研究室の未発表データを含む実験にて、リガンド応答が確認されている。すなわち、本実験系において、各ベクター由来で機能的なタンパク質が発現していることが確認されている。(A) カフェインに反応すると報告されている複数の TAS2R⁴⁷ の容量反応曲線。X 軸はカフェイン濃度、Y 軸はカフェイン添加後の蛍光強度の変化量 ($\Delta F/F_0$) を示す。各 TAS2R 受容体の応答は異なる色・形で表示し (○: TAS2R7、△: TAS2R10、▽: TAS2R14、□: TAS2R43-WH)、カフェイン濃度に対してプロットした。*は TAS2R ベクター導入細胞と pcDNA (空ベクター、黒) 導入細胞間のカフェイン反応における有意差 ($p < 0.05$) を示す。(B) TAS2R のカフェイン最大応答値 ($\Delta F/F_0$) の棒グラフ。Y 軸はカフェイン濃度 5000 μM における最大応答量 ($\Delta F/F_0$) を示す。(n=6、エラーバーは標準偏差)

3.3.3. SNP によるタンパク質の構造変化

構造モデルによると、本研究で検討した TAS2R43 のアミノ酸置換はリガンド結合サイトには位置しておらず、W35 は TM1 に、H212 は ICL3 上に位置すると予測された (図 2D)。これらのアミノ酸置換が、苦味化合物への応答性や受容体の総発現量、膜局在性、G タンパク質との相互作用、あるいはそれらの組み合わせに影響するという可能性が考えられる。

TAS2R43・TAS2R46 の SNP の受容体構造への影響を検証するため、PSIPRED 二次構造予測ツールを用いて祖先型および派生型配列を基に二次構造予測を行った。祖先型では、W35 周辺はヘリックス構造、H212 周辺はコイル構造であると予測された一方、派生型では、S35 周辺は W35 のヘリックス構造からコイル構造へ変化すると予測され、R212 はコイル構造のままであった (図 14)。

次に、SNP によるアミノ酸置換がタンパク質の安定性に寄与するか調べるために、ThermoMPNN を用いて、タンパク質配列中の点変異による熱安定性変化を評価した^{26; 108}。ThermoMPNN は、ProteinMPNN の学習システムを基に、単一アミノ酸変異が起こした熱力学的安定性の変化を予測するツールである。安定性の変化は、変異型の自由エネルギーと野生型の自由エネルギーとの差を $\Delta\Delta G^\circ$ スコアとして算出し、評価した。 $\Delta\Delta G^\circ$ スコアは、負の値が変異によるタンパク質立体構造の安定化、正の値が変異によるタンパク質立体構造の不安定化を意味する。W35S は $\Delta\Delta G^\circ$ スコア 1.6679 (kcal/mol)、H212R は $\Delta\Delta G^\circ$ スコア 0.0054 (kcal/mol) を示し、W35S が TAS2R43 タンパク質を不安定化させると予測された (図 15G)。

DDGun⁷⁷ はタンパク質の構造を解くのに必要な自由エネルギー (ΔG) の野生型と変異型間の差として算出し、タンパク質立体構造の安定性を予測する。W35S は $\Delta\Delta G$ スコア -4.1 (kcal/mol)、H212R は $\Delta\Delta G$ スコア -0.4 (kcal/mol) を示し、両変異とも安定性低下が予測されたが、W35S の方が H212R よりも影響が大きいと予測された。DynaMut2 は構造の熱力学安定性 ($\Delta\Delta G$) と柔軟性変化を統合的に評価したスコアを算出する。DynaMut2 でも、DDGun と同様に W35S の $\Delta\Delta G$ スコアが -0.94 (kcal/mol)、 $\Delta\Delta G$ H212R は -0.18 (kcal/mol) を示し、

両変異とも安定性低下が予測されたが、W35Sの方がH212Rよりも影響が大きいという予測結果が得られた。これらの結果により、W35SがH212Rよりもタンパク質の安定性に大きな影響を与え、タンパク質の安定性を低下させる可能性があることが示唆された。

さらに、モデルをTAS2R46構造にアライメントし、ChimeraXを用いて構造中の結合Gタンパク質との相互作用に対するSNPの影響も検討した。祖先型では、H212がGタンパク質 α サブユニットのH217と2Å以内の距離で水素結合を形成する可能性が示唆された。一方、派生型では、R212がGタンパク質のD232と塩橋を形成する可能性があり、この塩橋がH217との結合喪失を補填する。この補填により、派生型と祖先型で212番目のアミノ酸の機能が類似しているため、安定性予測におけるSNPの影響が大きく出ていない可能性がある（図15B、C）。

TAS2R46の場合、L228M変異はTM6上に位置している（図15D、E）。L228Mはリガンド結合による活性化過程に関与するTM6の可動領域に位置しており、メチオニンの分子長がロイシンよりも長いため、残基間の長さの違いが物理的な干渉を生じ、活性化機構に影響を与える可能性も考えられる。また、ChimeraXのRotamersツールを用いてL228Mのアミノ酸置換を導入した結果、この変異の影響はTM6とTM5間の相互作用に関連している可能性が示唆された。この疎水性/親水性の変化の影響をThermoMPNN、DDGun、DynaMut2による安定性予測で検討した結果、軽度のタンパク質の不安定化効果が予測された（図15G）。また、ChimeraXによる構造モデリングから、L228MによりTM6の疎水性が低下し、TM5-TM6間の疎水性相互作用が変化することが予測された（図16F）。

A



B



図 14：PSIPRED による TAS2R43 の二次構造予測

(A) 祖先型である TAS2R43-WH。(B) 派生型である TAS2R43-SR。

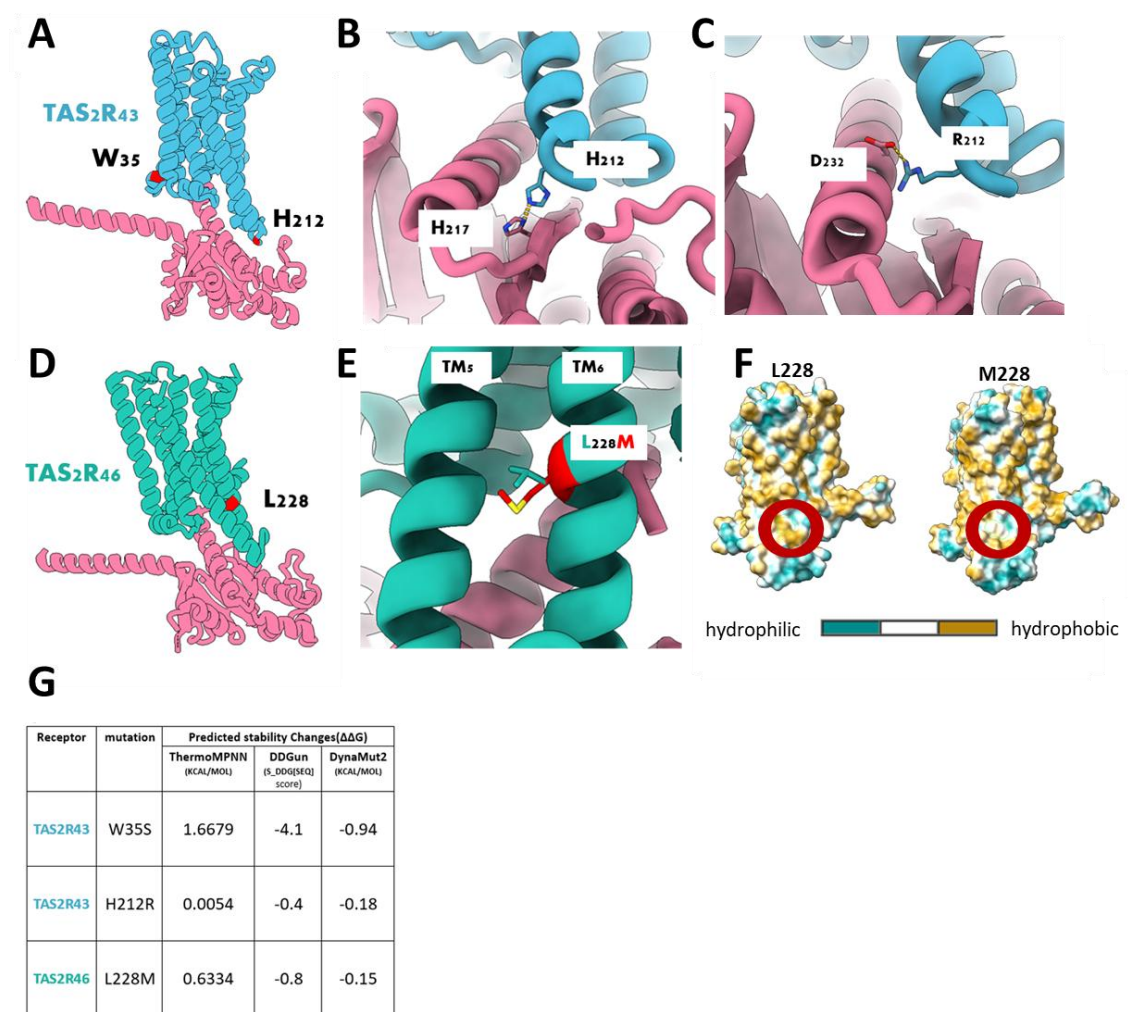


図 15 : TAS2R43 および TAS2R46 タンパク質の構造解析

(A) TAS2R46 構造 (PDB : 7XP6) に基づく TAS2R43 のモデル。TAS2R は水色、 $G\alpha_{s/gust}$ はピンク色、SNP のもたらすアミノ酸変異部位は赤色で示される。(B) 祖先型 TAS2R43 における ICL3 上の H212 と $G\alpha_{s/gust}$ の H217 との相互作用。(C) 派生型 TAS2R43 における ICL3 の R212 と $G\alpha_{s/gust}$ の D232 との相互作用。(D) TAS2R46 の構造 (PDB : 7XP6)。TAS2R は緑色、 $G\alpha_{s/gust}$ はピンク色、SNP のもたらすアミノ酸変異部位は赤色で示される。(E) TAS2R46 における L228M 変異の位置。L228 は緑色、M228 は赤色で示される。(F) TAS2R46 の疎水性・親水性予測図。L228M によって変化する箇所を赤丸で示す。(G) 構造安定性の予測表。ThermoMPNN では、スコアが高いほど変異による不安定化作用が大きいと予測される。DDGun では、S_DDG [SEQ]スコアが低いほど変異による不安定化作用が大きく、DynaMut2 では、 $\Delta\Delta G$ スコアが低いほど変異による不安定化作用が大きいと予測される。

3.3.4. mRNA の定量

3.3.1.の HiBiT アッセイによるタンパク質の発現量解析では、TAS2R43 および TAS2R46 の両受容体で、細胞表面においても細胞全体においても TAS2R43-SR・TAS2R46-M が TAS2R43-WH・TAS2R46-L よりタンパク質発現量が有意に低いことが示された。すなわち、3.3.2 のカフェインに対する応答性の差の一部は SNP の影響によるタンパク質発現量の差異に由来すると考えられる。この点を踏まえ、タンパク質発現量が SNP によって低下する要因の解明を目的として、発現ベクターに由来する TAS2R の mRNA の定量解析を行った。RNA の定量結果を各 TAS2R について相対比で表したところ、TAS2R43-SR/TAS2R43-WH = 0.88 ± 0.44 、TAS2R46-M/TAS2R46-L = 0.86 ± 0.44 となった (図 16)。Welch の t 検定を行うと TAS2R43・TAS2R46 のいずれにおいても、ハプロタイプ間で RNA 量を比較した結果は $p > 0.05$ となり、SNP による mRNA 量の有意差は検出されなかった。

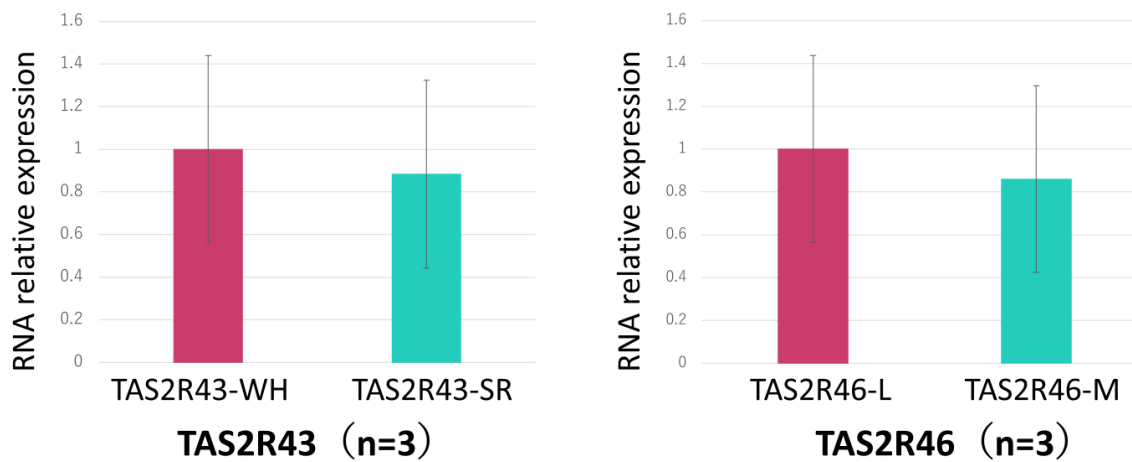


図 16：RNA の定量解析

(A) TAS2R43-WH の RNA 量に対する TAS2R43-SR の RNA 量を相対的に定量 (n = 3、エラーバーは標準偏差、各施行につき 3 ウェル分で平均を取った)。(B) TAS2R46-L の RNA 量に対する TAS2R46-M の RNA 量を相対的に定量。(n=3、エラーバーは標準偏差、各施行につき 3 ウェル分で平均を取った)。

3.4 考察

3.4.1. *TAS2R43* と *TAS2R46* の SNP によるタンパク質発現への影響

HiBiT タグは *TAS2R* の N 末端に付加されているため、HiBiT の発光量の有意差は、*TAS2R* の発現量の有意差を反映していると考えられる。すなわち、*TAS2R43*-SR は *TAS2R43*-WH と比べて細胞表面における発現量が有意に低く、*TAS2R46*-M は *TAS2R46*-L と比べて細胞表面における発現量が有意に低いことが示唆された。また、細胞全体でも、*TAS2R43*-SR は *TAS2R43*-WH と比べて有意に発現量が低く、*TAS2R46*-M は *TAS2R46*-L と比べて有意に発現量が低いことが示唆された。細胞全体でのタンパク質発現量は *TAS2R43*・*TAS2R46* 共に派生型が祖先型の約 0.7 倍、細胞表面での発現量は *TAS2R43* の派生型が祖先型の約 0.6 倍、*TAS2R46* の派生型が祖先型の約 0.4 倍であった。この結果は、*TAS2R43* の W35S および *TAS2R46* の L228M 変異が、細胞表面での発現に影響を与え、このタンパク質発現量の差が、細胞ベースの実験における受容体応答性の差異の一要因となっている可能性を示唆している。

Pronin らの研究で行われたウエスタンブロット法では、*TAS2R43* の各ハプロタイプ (*TAS2R43*-WH、-SH、-SR) は細胞全体での発現レベルが同程度である (*TAS2R43*-Δ のみタンパク質発現量が減少) と報告されていた³⁴ が、各サンプルのバンド強度の定量はされていなかった。本研究の HiBiT アッセイにより、細胞全体の総発現量についてもウエスタンブロット法では検出できなかった *TAS2R43* のハプロタイプ間の発現量の差があることが示唆された。これらの SNP が、*TAS2R* の細胞全体での発現量および細胞膜上の受容体量に影響を与えることで、培養細胞実験において、*TAS2R* のカフェインに対する応答性がハプロタイプごとに変化する可能性がある。ただし、本研究では N 末端に膜移行シグナルとして M3R とリンカー配列、発現解析のための HiBiT タグを付加しているのに対して、Pronin らの先行研究では膜移行シグナルとしてウシロドプシンの最初の 39 アミノ酸を付け、HiBiT

タグは付加されていないため、発現データの単純な比較はできない点には注意する必要がある。SNP の影響をタンパク質レベルで検討するための実験は、本来の生理的な発現細胞における発現比較が望ましいが、ヒトの生体サンプル入手・取り扱いが困難であることから実現には至らなかった。本研究で対象とした *TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP が、実際のヒト口腔内の味細胞でも発現量に寄与するか調べる研究が今後必要である。

3.4.2. *TAS2R43* と *TAS2R46* の各ハプロタイプの機能的差異

先行研究³⁶で培養細胞ベースの実験により確認されていたアリストロキア酸など他の苦味物質に関する機能解析で、*TAS2R43*-WHの方が-SRよりもリガンド応答性が高いという報告がなされていた。この結果と同様に、*TAS2R43*-WHハプロタイプの方が-SRよりもカフェインへの応答性が高い可能性が示された。この応答性の違いの要因の一つとして、3.3.1.で示唆された細胞表面・細胞全体での発現量の変化もある点には留意しなければならない。3.4.1.でも述べた通り、細胞全体でのタンパク質発現量は *TAS2R43*・*TAS2R46* 共に派生型が祖先型の約 0.7 倍、細胞表面での発現量は *TAS2R43* の派生型が祖先型の約 0.6 倍、*TAS2R46* の派生型が祖先型の約 0.4 倍であった。タンパク質の発現量の違いが、カフェインに対する応答性の違いを説明する要因の少なくとも一部であることから、*TAS2R43*・*TAS2R46* のこれらの SNP によるアミノ酸置換は、カフェイン以外のリガンドに対する応答性にも影響があると考えられる。しかし、機能解析では *TAS2R43*・*TAS2R46* 共に祖先型はカフェインに対する有意な反応が見られたのに対し、派生型ではほとんど反応が見られなかった。このように、発現量の違いよりもさらに大きな応答性の違いが出たことから、タンパク質発現量の差のみでなく、受容体そのもののリガンド応答性が低下している可能性が示唆される。

次に、*TAS2R43* の SNP とリガンド応答性・ヒトの苦味感覚との相関について報告した先行研究と本研究との関係性を考察する。まず、Pronin らの研究³⁶ではアロイン、アリストロ

キア酸、サッカリンに対する TAS2R43 の応答に W35 が必要であることが示されていた。一方で、GWAS を行った Pirastu らの研究では、H212R が W35S よりもコーヒー嗜好性との相関が強く、Pirastu ら³⁶は W35 がアロインの苦味認知に重要であり、H212 がカフェインによる TAS2R43 の活性化に関与している可能性を論じていた。TAS2R43 の 2 つの SNP のうちどちらがリガンド応答性により大きな影響を及ぼすのかを検証するために行った本研究の 3.3.2.では、カフェインに対する応答において、W35 をもつハプロタイプと S35 をもつハプロタイプの間で違いが見られた (図 12C)。すなわち、TAS2R43 の W35S は H212R よりも、カフェインに対する応答に与える影響が大きいことが示唆された。これは、カフェインやカフェストール応答についても W35 が H212 よりも培養細胞における受容体機能の維持に重要であることを示し、Pronin ら³⁶の TAS2R43-WH と TAS2R43-SR 間で反応閾値が異なる (EC_{50} が約 10 倍異なる) という報告を支持している。この W35 の方が H212 よりリガンド応答性への寄与が大きいという結果は、カフェイン以外の複数の苦味物質を用いて行われた先行研究の結果を支持しており、受容体レベルでは、W35S の効果が H212R よりも大きいと考える妥当性があると考えられる³⁴。また、本研究で示唆された、TAS2R43-SR の細胞表面発現量が TAS2R43-WH よりも低く、そもそもリガンドと接触する受容体の数が少なくなってカフェインおよびカフェストール応答性が低下しているという可能性とも整合性がある。受容体の発現量とそれに伴う機能維持に重要であることを裏付けるように、W35 は TAS2R46 を含む多くの TAS2R (26 種中 21 種) に保存されている (図 2A)。

カフェインへの応答解析については、0 μ M での反応がより安定することと、タンパク質の発現解析も可能であることから、先述のベクター (M3R、リンカー、HiBiT、HSV 付加) を用いた。一方、図 12C・D については、① 0 μ M での反応は安定しづらいが最大応答強度の大きさがより大きいことが事前に確認できていたこと、② TAS2R43-WR、-SH のベクターの構築が難航したこと、③ 実験の目的が「TAS2R43 の 2 つの SNP のうちどちらがより大きくリガンド応答性に寄与するか検証する」ことであり、比較するデータ内においてベクター

の構成が統一されていれば検証可能であったこと、という 3 点の理由から、図 12A の実験とは異なるベクターを用いた。さらなる検証としては、TAS2R43-WR、-SH についても図 12A と同様の構成のベクターを用いてタンパク質発現解析・カルシウムアッセイを行い、TAS2R43-WH と -WR、TAS2R43-SR と -SH で同様のまたは類似したデータが得られるか確認することが挙げられる。

また、TAS2R43-WH が TAS2R4、-7、-10、-14 と比較してカフェインに対する応答閾値が相対的に低かったこと（図 13）から、TAS2R43 および TAS2R46 は、カフェインの苦味を検出する主要な受容体である可能性が示唆された。しかし、これらのベクターによるタンパク質の膜移行効率については未検証であるため、この実験結果がタンパク質の機能のみを反映しているとは言い切れない点には注意が必要である。そのため、さらなる検証として、各ベクターを用い、3.2.2.と同様のタンパク質の発現解析を行うことが課題である。

本研究で行ったカルシウムアッセイで、カフェイン濃度 0 μM の時も $\Delta F/F_0$ が 0 より高くなっている理由としては、0 μM の溶液（バッファーのみ）を添加した際の物理的刺激が影響している可能性が考えられる。Matsunaga らの研究で、圧力変化等の物理的刺激が Piezo1 チャンネルを活性化し、一過性の Ca^{2+} の増加を引き起こすことがわかっている¹¹⁴。本実験に使用した HEK293T 細胞が Piezo1 チャンネルノックアウト系統ではないため、リガンド溶液添加の物理刺激が非特異的な Ca^{2+} の増加を引き起こした可能性がある。

3.4.3. タンパク質の立体構造と機能

モデリング解析により、W35S のアミノ酸置換が TAS2R43 タンパク質の二次構造を変化させることが示唆された。二次構造の変化はさらに高次の三次構造の変化にもつながることから、W35S によるヘリックス構造の喪失は、タンパク質自体の安定性低下を生じさせる可能性がある。ThermoMPNN による熱安定性変化の評価および DDGun・DynaMut2 による

安定性予測では、W35S と H212R の両変異ともタンパク質の安定性を低下させることが予測されたが、W35Sの方がH212Rよりも影響が大きいと予測された。この予測は、W35がH212よりTAS2R43のカフェインへの応答性維持に大きく影響するという機能解析で得られた結果を支持する。

TAS2R46のL228Mは、アミノ酸置換サイトがGタンパク質から離れているため、Gタンパク質との相互作用に直接関係するとは考えにくい。しかし、L228がリガンド結合後の受容体活性化時に構造が変化するTM6内に位置し、LからMへの置換で分子長の変化があることと、TM5とTM6間の疎水性相互作用を変化させることから、L228Mの変異によってTAS2R46の受容体活性化時のタンパク質の構造変化の仕方が変わる可能性がある。

培養細胞実験では、*TAS2R43*・*TAS2R46*のSNPによる細胞表面および細胞全体でのTAS2R発現量低下が生じ、その結果としてカフェインに対する応答性を低下させる可能性が示された。TAS2Rの発現量低下の要因として、SNPによりタンパク質の安定性が低下し、膜移行可能な正しい構造を持つTAS2Rが減少したことが考えられる。

3.4.4. TAS2R43・TAS2R46のSNPによるタンパク質発現量の差の要因の検討

本実験では、培養細胞でのタンパク質発現系を使用したことから、ベクターの構成はTAS2RのSNP部分以外は共通している。すなわち、CMVプロモーター自体には、ハプロタイプごとの差はないと仮定できる。ただし、ベクターの高次構造の変化等により、転写効率が変化している可能性については検討する必要がある。RNA自体が発現量変化の要因となる機構としては、mRNAの安定性がハプロタイプごとに異なり、翻訳前に分解されるため細胞内のRNAの量が低下している可能性が挙げられる^{115; 116}。さらに、SNPによって塩基配列が変化すると、3塩基の組み合わせであるコドンも変化する。通常時に翻訳することが少ないコドンは、対応するtRNAの元々の存在量が少なく、コドンを解読するのにより長い

時間が必要になる。解読に時間がかかり翻訳スピードが落ちると、mRNA の安定性が低下し、細胞内の RNA の量が低下すると考えられる¹¹⁵。コドン頻度による翻訳への影響は、mRNA の安定性の測定（半減期の測定）で確かめることができると考えられる^{117; 118}。しかし、3.3.4.より、*TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP による mRNA 量の差（派生型が祖先型の 0.9 倍程度）は、タンパク質の発現量の差（派生型が祖先型の 0.7 倍程度）に比べるとわずかであるため、RNA 不安定化や、コドン頻度の変化に伴う翻訳効率の変化がタンパク質発現量低下に与える影響は小さいと言える。

転写調節以外で SNP によるタンパク質発現量低下に寄与する機構としては、小胞体ストレス（Endoplasmic reticulum-associated degradation：ERAD）によるタンパク質品質管理機構がある。真核生物の細胞で合成された膜タンパク質は、小胞体内で高次構造が形成されて機能的なタンパク質となるが、何らかの要因で不良タンパク質が合成されて小胞体に蓄積すると、小胞体ストレスという状態に陥る。SNP に伴うアミノ酸変異によってタンパク質の二次構造が変化し、この変化がミスフォールディングを引き起こすことが示唆されているため¹⁸、異常タンパク質が細胞へのストレスを生じさせる可能性がある。これまでの研究では、*TAS2R* の SNP によって起きる受容体の構造変化や、SNP の影響で合成された異常タンパク質の分解過程については未だ明らかにされてこなかったが、本研究では、3.3.3.で SNP によるアミノ酸置換で受容体の構造が変化することが示唆された。すなわち、変異の入った受容体の構造が変化し、不良タンパク質となる可能性がある。不良タンパク質による小胞体ストレスがかかると、タンパク質の品質管理機構として大きく二つの経路が働く¹¹⁹。

一つ目が RIDD（regulated IRE1-dependent decay）で、新規のタンパク質合成を抑制し、小胞体にかかる負荷を軽減する機構である。RIDD は、小胞体における翻訳抑制をするほか、タンパク質をコードする mRNA を分解するため、RNA 量の低下という実験結果として現れると予測される。しかし、3.3.4.より、*TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP による mRNA 量の有意な変化は見られなかったため、タンパク質発現量の要因が RIDD である可能性は低いと言え

る。

二つ目が、すでに合成された不良タンパク質をリフォールディングして正しい高次構造を作り直す、または不良タンパク質を細胞質に逆輸送して分解する ERAD 機構である¹¹⁶。これらの小胞体におけるタンパク質の品質管理機構は UPR (unfolded protein response) と呼ばれるが、mRNA 量には影響を及ぼさない。3.3.4.より、*TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP による mRNA 量の有意な変化は見られなかったことと、仮に試行数を重ねて mRNA 量に有意差が検出されたとしても、mRNA の低下は多く見積もっても一割程度にとどまるため、タンパク質発現量の低下には、翻訳以降のタンパク質品質管理機構の影響が大きいと考えられる。

まず、*TAS2R43* について、タンパク質品質管理機構の寄与を検討する。*W35S* の SNP によって、*TAS2R43* の TM1 のヘリックス構造が失われてシート構造になるという二次構造の変化があることがモデリングシミュレーションにより示唆された。二次構造の変化に伴って *TAS2R43* 受容体のミスフォールディングが起こり、小胞体ストレスがかかっていると考えられる。

TAS2R46 の SNP による *L228M* のアミノ酸置換は膜貫通領域 TM6 に位置し、疎水性相互作用を変化させることが予測された。*TAS2R* の膜貫通領域は、タンパク質が細胞膜上に安定して発現するために必要であることから、*TAS2R46-M* は *TAS2R46-L* と比べて細胞膜との親和性が低いことが予測される。これは、*TAS2R43-WH* と *TAS2R43-SR* を比較したときよりも、*TAS2R46-L* と *TAS2R46-M* を比較したときの方が、膜表面での発現量の差が大きいという結果からも示唆される。すなわち *TAS2R46-M* は翻訳・膜移送後に細胞膜上に安定して局在できず、細胞質内に受容体タンパク質が滞留し、小胞体ストレスがかかると考えられる。小胞体ストレスがかかっている場合、ERAD によって、不良タンパク質が細胞質に逆輸送され、細胞質内のユビキチン・プロテアソーム系により選択的に分解される^{80; 81}。SNP の影響で合成された不良タンパク質の分解過程については未だ明らかにされていないが、小胞体ストレスに伴う ERAD が起きているか検証するためには、各ハプロタイプのベクターを

トランスフェクションした培養細胞にプロテアソーム分解インヒビターを導入し、タンパク質の発現量が増加するか確かめる実験が有効であると考えられる。

以上の考察から、カフェインに対する応答性の差異の一部は SNP の影響によるタンパク質の膜表面発現量の差異に由来すると考えられる。しかし、これだけでは十分に説明できないため、タンパク質発現以外に応答性に関係する可能性のある要因を個別に検討していく必要がある。具体的には、祖先型・派生型それぞれの、カフェインやカフェストールなど、実際に機能解析等で用いたリガンドを結合させた構造について、モデリングによる結合変化の有無の確認等が挙げられる。

3.5 結論

第 3 章の実験により、TAS2R43 の W35S、TAS2R46 の L228M の変異によって細胞表面および細胞全体における TAS2R の発現量が低下することがわかった。これを要因の一つとして、カフェインに対する応答が SNP により変化し、TAS2R43-WH、TAS2R46-L と比べ、TAS2R43-SR、TAS2R46-M によるカフェインに対する応答性が低下していることが示唆された。また、TAS2R46 の Cryo-EM 構造を基にしたモデリングのデータから、TAS2R43 の W35S により TAS2R43 の二次構造が変化してタンパク質の構造安定性が低下することが予測された。以上のことから、本研究で着目した *TAS2R43* の SNP は、受容体タンパク質の安定性低下を介して TAS2R の発現量を低下させ、それがリガンドに対する応答性低下の要因の一つであることが示唆された。

TAS2R46 の L228M は、TM5 と TM6 間の疎水性相互作用を変化させることと、リガンド結合後の受容体活性化時に構造が変化する TM6 内に SNP 変異が位置することから、L228M の変異によって TAS2R46 の受容体活性化時のタンパク質の構造変化の仕方が変わる可能性が示唆された。一方で、モデリングの結果からは、L228M はタンパク質の構造安定性には

TAS2R43 の W35S ほど大きくは寄与しないことが示唆された^{10; 119; 120}。また、タンパク質発現の変化量だけでは説明しきれない、機能解析での反応強度差について、TAS2R46 では、L と M の分子長の違いが物理的に活性化機構に影響する可能性が示唆された。

本実験ではカフェインに対する応答性を培養細胞実験で検討し、ハプロタイプによって応答性の差異が出ることが示された。この応答性の変化の一部が受容体発現量の変化に起因することから、未だ培養細胞実験で SNP による応答性の差が調査されていない TAS2R43・TAS2R46 のリガンドについても、本実験結果と同様に応答性が変化することが予測された。不安定なタンパク質の発現により、小胞体ストレスがかかり、ERAD 機構が働くことでタンパク質の発現量低下が引き起こされているという仮説を検証することを今後の課題とする。

第4章 総合考察

4.1. コーヒーの苦味の感じ方の個人差

本研究は、*TAS2R* の遺伝子多型によるヒトの苦味感覚に対する影響を明らかにすることを目的として実施した。先行研究の知見を踏まえ、本研究の結果から、当初に設定した *TAS2R43* および *TAS2R46* の SNP がコーヒーの味の感じ方に関係するのか、という問いに対する答えを検討するうえで、考察要因として次に示す5点が挙げられる。

1つ目は、第3章の培養細胞実験により、*TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP が受容体の細胞表面発現量を変化させることが、受容体の機能差の要因の一部であると示唆されたことである。SNP による *TAS2R* の応答性の低下の一因が、タンパク質の発現量低下であるということは、*TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP が全リガンドに対する応答性に影響を与えることを示唆する。

2つ目は、細胞表面でのタンパク質発現量低下と部分的に対応して、コーヒーに含まれる苦味物質の一つであるカフェインに対し、*TAS2R43* と *TAS2R46* の SNP がそれぞれのリガンド応答性を変化させたことである。*TAS2R43* の W35S をもたらす SNP が寄与し、*TAS2R43*-SR は *TAS2R43*-WH よりカフェインに対する応答性が低下する。また、*TAS2R46* の L228M をもたらす SNP によって *TAS2R46*-M は *TAS2R46*-L よりカフェインに対する応答性が低下することが示された。

3つ目は、第2章のヒトの味覚試験と遺伝子型データの解析により、*TAS2R43* の遺伝子型とカフェインの苦味認知閾値との相関傾向が見られたことである。一方で、*TAS2R46* の遺伝子型とカフェインの苦味認知閾値には相関が見られなかった。

4つ目は、*TAS2R* のリガンド反応閾値とヒトの苦味認知に影響する *TAS2R* の関係性に対して示唆が得られたことである。第3章の培養細胞実験にて、カフェインに応答する *TAS2R* 間の反応閾値を比較したところ、*TAS2R43* がカフェインに対する応答閾値が最も低かった。さらに、第2章の味覚試験では、*TAS2R43* の遺伝子変異が、ヒトのカフェインに対する苦

味認知閾値を変化させた。すなわち、カフェインへの応答閾値が最も低い TAS2R43 に機能性を変化させるアミノ酸置換をもたらす SNP があると、ヒトのカフェインに対する苦味認知も変化することが示唆された。したがって、ある化合物に対し、応答性の高い（最大反応強度が大きい・反応閾値が低い）TAS2R について遺伝子解析を行うことで、その化合物に対するヒトの苦味感覚を検討することができると考えられる。

また、市販の焙煎コーヒーには 600~700 mg/L (3000~3600 μ M) のカフェインが含まれている¹¹⁸。第 2 章の味覚試験では、TAS2R43 の祖先型ホモ接合体の遺伝子型グループでは、カフェインの苦味認知閾値の中央値は 400 μ M で、すべての被験者においてカフェインの苦味認知閾値が 1600 μ M 未満であった。それに対し、TAS2R43 の派生型ホモ接合体の遺伝子型グループでは、中央値は 1600 μ M であり、味覚試験に用いたうちの最高濃度である 6400 μ M でもカフェインの苦味を認知しない被験者も見られた。したがって、TAS2R43 の祖先型ホモ接合体の遺伝子型を持つ人は市販の焙煎コーヒーのカフェイン由来の苦味を感じる人が多く、TAS2R43 の派生型ホモ接合体の遺伝子型を持つ人は同様の苦味を感じづらい人が多いと考えられる。

最後に、培養細胞実験を行った先行研究により、コーヒーに含まれる複数の苦味物質が TAS2R43 と TAS2R46 によって受容されるという報告があることが挙げられる^{41; 65}。カフェインはコーヒーの苦味の 10~30%を占めるとされている。また、コーヒー豆に含まれる苦味物質モザンビオシドは、カフェインと同等またはそれ以上の苦味を呈することが官能試験の結果により報告されている^{80; 122; 123; 124}。モザンビオシドはアラビカ種コーヒーに含まれるジテルペングリコシドであり、植物の防御物質である苦味物質の一種である¹²⁵。Lang らは、培養細胞実験でスクリーニングを行い、TAS2R43 と TAS2R46 がモザンビオシドやカフェストール等アラビカ種のコーヒーに含まれる苦味物質の受容体であることを発見した。また、Czech らはモザンビオシドを含むアラビカコーヒーから抽出された複数の苦味物質に対する TAS2R43・TAS2R46 の応答性を調べるため、HEK293T 細胞を用いた培養細胞実験で

のスクリーニングを行った¹²⁵。モザンビオシド以外でも 5 種類の苦味物質に対する TAS2R43・TAS2R46 の応答が確認され、そのうち 3 種類の苦味物質に関しては TAS2R43 が TAS2R46 よりも反応閾値が低く、リガンド応答性が高いことが明らかにされた。コーヒーには、2,5-ジケトピペラジン、フルフリルアルコール、ピラジン、クロロゲン酸など、他にも多くの苦味化合物が含まれているが、TAS2R43 は、特にカフェインおよびモザンビオシド関連苦味物質に対する主要な受容体の一つであると考えられる。

これら 5 つの点を踏まえると、コーヒーに含まれる複数の苦味物質に対しても、TAS2R43 と TAS2R46 の SNP により受容体の応答性が変化すると考えられる。例えばモザンビオシドはカフェインよりもコーヒーの苦味に大きく寄与していると言われるが、単一物質を抽出するためには膨大なコストを要することから、特にヒトを対象とした味覚試験に用いることは現実的ではなく、本研究ではモザンビオシドを用いて苦味感受性を実験的に評価することはできなかった。しかし、本研究でタンパク質の細胞表面での発現量が TAS2R43・TAS2R46 のリガンド応答性に寄与することが示唆されたため、TAS2R43・TAS2R46 の SNP は、カフェインと同様にモザンビオシドに対する受容体の応答性も変化させることが示唆された。このことから、コーヒーの苦味は、TAS2R43 および TAS2R46 の遺伝子型の個人差によって異なる感じ方を生じる可能性は十分にある。

コーヒーは栄養補給よりはアロマや嗜好品として摂取されることから、以前からコーヒーの嗜好性について研究が行われてきた。TAS2R43 の W35S と H212R がコーヒーの嗜好性に関連するという報告⁷⁸がある一方で、ブラックコーヒーの嗜好性と有意に相関のある SNP はないという報告もなされていた⁷⁷。すなわち、TAS2R の SNP とコーヒーの嗜好性との関係性についての結論が、研究ごとに異なっていた。これは、ヒトにおいて、味の感じ方と嗜好性との関係が一意に定まらないことが要因の一つであると考えられる。ヒトの食嗜好性は複雑で、ワインのように、苦味の感受性が高い人がより嗜好性が高くなる（消費量が増加する）可能性⁷⁷と、忌避性の味である苦味を避けるため苦い食品・飲料は嗜好性が低くなる

可能性の少なくとも二つの可能性がある。本研究により、*TAS2R43* および *TAS2R46* の SNP によってコーヒーの苦味の感じ方、すなわちコーヒーの味自体の感じ方が変化することが示唆された。しかし、*TAS2R* の SNP とコーヒーなどの苦い食品・飲料の嗜好性との相関を解析する場合には、各食品の「苦味に対する嗜好（苦い方が好ましいのか、苦くない方が好ましいのか）」と、苦味の感じ方に関わる *TAS2R* の遺伝子情報のどちらも考慮してグループ分けをしたのちに、相関解析を行う必要があると考えられる。

本研究の味覚試験参加者に事後アンケートを取り、コーヒーの嗜好性（好き・どちらかといえば好き・どちらかといえば嫌い・嫌いの4段階）のデータを収集し、遺伝子型とコーヒーの嗜好性との関係の考察を試みた。コーヒー嗜好性（4水準の順序因子）を応答変数、*TAS2R43* の遺伝子型、*TAS2R46* の遺伝子型、カフェインの苦味認知閾値の3つの要素をそれぞれ単独または組み合わせで説明変数として投入し、R の *ordinal* パッケージに含まれる *clm* 関数を用いて順序ロジットモデル（Cumulative Link Model：CLM）構築を行った。被験者の遺伝的ルーツは固定効果として加えた。最適モデルの選出のため、AIC（赤池情報量基準、Akaike's Information Criterion）比較を行った。AIC による適合度比較の結果、*TAS2R43* + カフェインの苦味認知閾値を含むモデルが $AIC = 64.79$ と最小であった。次点の *TAS2R43* 単独および *TAS2R46* 単独モデルは $AIC = 65.20$ で、 ΔAIC は 0.40 と僅差であり、さらに *TAS2R46* + カフェインの苦味認知閾値（ $AIC = 65.40$ ）、*TAS2R43* + *TAS2R46*（ $AIC = 65.44$ ）も $\Delta AIC < 1$ の範囲に収まった。AIC は上位 6 モデルで 64.79~65.84 の狭い範囲に収まっており、 ΔAIC もすべてのモデルにおいて $\Delta AIC < 1$ となっていることから、単一のモデルが圧倒的に支持される状況ではないと解釈できた。すなわち、すべてのモデルにおいて、構築したモデルが十分に収束していないため、現時点の小さいサンプルサイズを基にしたモデルでは統計的にコーヒーの嗜好性に影響する要素が検討できるとは言えなかった。より信頼性の高い統計的モデル構築のためにさらなるデータの蓄積が求められる。

先行研究では、*TAS2R43* および *TAS2R46* の SNP による、コーヒーに含まれない他の苦味

化合物への培養細胞実験での応答の違いも報告されている。TAS2R43-WH は、アロイン、サッカリン、アリストロキア酸など複数の苦味物質に対して TAS2R43-SR よりも反応強度が大きいほか、アロインの苦味認知閾値とも相関することが報告された³⁶。また、TAS2R46-L は、アマロゲンチン、グロシェイミン、アブシンチンなどの苦味化合物に対して TAS2R46-M よりも反応強度が大きいことや、これらに対する苦味認知閾値と TAS2R46 の SNP とに相関があることが報告されている⁹。本研究で確かめられた *TAS2R43*・*TAS2R46* の SNP によるカフェインへの応答性の違いおよびヒトの苦味認知閾値の違いは、これらの先行研究の結果を支持する。本研究で明らかになった *TAS2R43* および *TAS2R46* の SNP による受容体機能の違いは、細胞表面および細胞全体での発現量の違いが一因であると考えられる。したがって、カフェインと同様に、TAS2R43 を活性化する他の苦味物質に対しても、ヒトの苦味認知閾値に個人差として表現型に現れる可能性があり、先行研究の結果を説明することが可能である。また、その他の *TAS2R43*・*TAS2R46* のリガンドに対しても、以下の新たな考察が可能である。

TAS2R43 および TAS2R46 が応答する苦味物質には、チコリに含まれる 11,13-Dihydrolactucin、中国の苦茶やアマゾン原産果実クプアスに含まれるテアクリン、チコリおよびレタスに含まれるラクツコピクリンなどがある^{126; 127; 128; 129;130;131;132}。中国の苦茶は、嗜好品や一般的な飲料というよりは健康のための飲料・薬用飲料として飲まれており、その味より薬効の方に焦点が当てられてきたため、苦茶の苦味の感じ方と飲用習慣との相関はないと考えられる。また、クプアスの果実には、主にテオブロミン、カテキン類、プロシアニジンなどのポリフェノールが含まれ、これらが複数の TAS2R (*TAS2R7*、-14、-39、-43、-46 など) を活性化することにより、果肉に独特の複合的な苦味・渋味を与えているとされる。クプアスの生産に適した気候が限られていることや、保存性が高くないことから、熱帯地域以外では一般的な食品として広まっていない。このように味以外の要因が関係することから、クプアスの食文化と *TAS2R43* の SNP 分布を直接的に関連付けることはできないが、

クプアスに対する味の感じ方は *TAS2R* の遺伝子型によって異なる可能性がある。

一方でチコリはヨーロッパ、地中海沿岸から中央アジアまでが原産地にあたり、現在ではヨーロッパ、西アジア、ウラル山脈、北アフリカなどの地域で栽培され、一般的な飲食物に用いられる植物の一つである。チコリに含まれる 11,13-Dihydrolactucin は、*TAS2R14*、*-43*、*-46* に受容され、中でも *TAS2R43* の反応閾値が最も低い¹³²。ヨーロッパおよびインドでは野生のチコリが郷土料理に使用されており、ヨーロッパ、アメリカ、日本ではコーヒー代替品やサラダ野菜としても利用されている。アフリカでは一般的に消費されていないが、ヨーロッパや日本での食品・飲料としての利用は、*TAS2R43* の遺伝子型の違いが人々の苦味感受性を通じて地域の食文化に影響を与えている可能性を示唆している。

本研究で得られたカフェインに関する知見は、*TAS2R43* および *TAS2R46* を主要な受容体とする他のリガンドにも拡張可能であると考えられ、これらの苦味物質を含む食品・飲料の知覚における集団間の違いを説明する手がかりとなる可能性がある。また、他の苦味物質に関しても、その主要な受容体の遺伝子型を解析することで、その苦味物質に対する個人の苦味感覚を予測できる可能性があることが示唆された。この可能性は、個人の遺伝子型による味覚の違いや、地域集団における味覚傾向の違いが食行動に影響を与えることを理解する上で重要であり、*TAS2R* の SNP 頻度が地域集団間で異なることとも関連している。

4.2. 苦味感覚の個人差と *TAS2R43* の SNP 分布

第2章で述べたように、1000 人ゲノムプロジェクトのデータ (図 9) および本研究で得られたヒト味覚試験被験者の遺伝子型データ (表 5) から、ヒトの *TAS2R43* の遺伝子型の地域差と苦味感覚の関連を考察するための以下の 3 つの知見が得られた。

1 つ目は、*TAS2R43* の SNP 分布が、人類の出アフリカ後の拡散経路に沿って変化している可能性があることである。人類がアフリカから中東を経てヨーロッパまたはアジアへ進

出・拡散していったことを考慮すると、*TAS2R43* の低反応型ハプロタイプの割合は人類の出アフリカ後に増加していったと考えられる。

2つ目として、第2章で述べたように、有毒植物の分布と *TAS2R43* の遺伝子型の分布との相関が挙げられる。有毒物質を感知する能力の有無と生存への有利さが関係し、遺伝子型の分布に差が生じた可能性がある。

3つ目は、第2章の味覚試験により、*TAS2R43* の遺伝子型とカフェインの苦味認知に相関が見られたことである。本研究により、カフェインに対する苦味認知閾値は、*TAS2R43* の SNP によって、有意差があることが示唆された。ヒトが口にする飲食物は多様な化合物の混合であるため、各化合物の主要な受容体の応答を総合して判断することで、苦味の感じ方が決まっている可能性が考えられる。

以上の3点を踏まえると、*TAS2R43* の SNP 分布は、苦味感覚の個人差と関連し、人類の出アフリカ後の食環境や食行動の変化に関連する形で遷移してきた可能性が示唆された。ここまで述べてきたように自然選択による可能性がある一方で、アフリカ集団と東アジア集団での *TAS2R43* の遺伝的分化が遺伝的浮動による可能性も否定できない。特に、人類の出アフリカ後のヨーロッパおよび東アジアへの進出は、いずれも小規模な創始集団によって行われたと推定されている。出アフリカを経たヨーロッパ進出集団は、1000 人未満とされ、その後の東アジア進出集団も数百～数千人規模とされている^{127; 133; 134}。小集団での移動は、創始効果や遺伝的浮動を強め、アレル頻度のランダムな変動を通じて集団間の遺伝的分化度を高める要因となる^{135; 136}。したがって、*TAS2R43* における高い *F_{st}* 値やアレル頻度差が、自然選択によるものか、あるいは中立的な過程によるものかを判断するために、より大規模な計算環境で自然選択の有無を調べるのが今後の課題である。

4.3. TAS2R の遺伝子多型とその構造への影響

先行研究では、TM2、TM3、TM7 が TAS2R ファミリー内で保存性が高く TAS2R の構造に重要であることや、TM3～TM7 がリガンド結合ポケットを構成し、受容体の応答性維持に寄与することが報告されてきた^{10;14;17}。この TM2～TM7 までの膜貫通領域は、リガンドとの結合や 7 回膜貫通型受容体の立体構造の維持に関わることから、これらの領域に位置する非同義 SNP はリガンドへの応答性に影響を与えることが比較的容易に予測可能であった。これまで、TM1 は TAS2R の機能に大きく影響する領域としては注目されてこなかったが、培養細胞実験により、TM1 に位置する W35S が TAS2R43 のリガンドへの応答性に大きく寄与することが報告されていた³⁶。本研究のモデリングシミュレーションと 3 つのツールによるタンパク質構造の安定性予測により、W35S のアミノ酸置換によって二次構造が変化して α ヘリックス構造の一部が失われたことでタンパク質の安定性が変化することが予測された。さらに、TAS2R43 の SNP によって、培養細胞での発現量が低下することと、リガンド応答性が変化することが示された。このことから、TAS2R において、TM1 の二次構造が保たれていることが、受容体タンパク質自体の安定性をもたらし、TAS2R のリガンド応答性維持に寄与することが示唆された点は重要である。

これまではリガンドとの結合サイトに位置するアミノ酸変異をもたらす SNP や、TM3-TM5-TM6 など TAS2R の立体構造内の結合ネットワークを変えるような SNP についてリガンド応答性変化の要因を検証する研究が主に進んできた。しかし、本研究の第 3 章の結果・考察を受けて、リガンド結合サイトに直接関係しない位置に SNP が存在していた場合でも、それが二次構造を変えるような変異であれば、受容体タンパク質を不安定化させ、リガンドへの応答性を低下させる可能性が示唆されたことは、新たな知見である。

本研究では TAS2R43 の TM1 に位置する SNP と、TAS2R46 の TM6 に位置する SNP について考察してきたが、本研究で「リガンド結合サイト以外の SNP」の受容体への影響を解析した一連の知見は、他の TAS2R のリガンド結合サイト以外の SNP についても応用し得る。

これまでの研究において、細胞のリガンド応答性を変化させることが確認されたが、そのメカニズムが不明だった SNP に関して、その SNP の位置から受容体機構への影響を考察するために有用である。

例えば、序論で述べた TAS2R38 の P49A が受容体の応答性を変化させる機構について、新たに次のような考察が可能となる。P49A は ICL1 に位置し、リガンド結合サイトではないものの、TAS2R38 のリガンド応答性維持に大きく寄与する。TAS2R14 を用いた先行研究では、ICL1 が G タンパク質の β サブユニットと塩橋を形成し、リガンド結合前の TAS2R と G タンパク質の pre-coupled な結合状態に寄与することがわかっている⁸⁵。したがって、P49A のアミノ酸置換により引き起こされる TAS2R38 の機能変化の要因として、G タンパク質との相互作用の変化という可能性を予測することが可能であった。これらに加えて、本研究から得られた知見より、P49A のアミノ酸置換がタンパク質の二次構造を変化させ、TAS2R38 のタンパク質発現量低下を招く可能性が示唆されるようになり、TAS2R38 の機能変化の要因について新たな議論が可能となった。これを確かめるためには、培養細胞に TAS2R38 の各ハプロタイプを発現させ、免疫細胞染色（細胞膜透過あり/なしの両方）やウエスタンブロット法、HiBiT アッセイ等の実験により、細胞表面での発現量の変化を測定する必要がある。TAS2R38 の特異抗体を用いた免疫染色により、ヒトの有郭乳頭中の II 型細胞における TAS2R38 の局在を調べた Behrens らの先行研究⁵⁷では、培養細胞中で観察された TAS2R の局在について、ヒトの味細胞でも類似した局在が見られると述べている。そのため、彼らの実験で特異性が確かめられた TAS2R38 の抗体を用いて、各ハプロタイプの TAS2R38 を発現させた培養細胞の免疫細胞染色を行うことで、タンパク質発現への影響を検討することができる。

また、TAS2R16 に関しては、K172N が ECL2 に位置し、サリシンとの結合において、リガンド結合領域には関与しないことが報告されていた。しかし一方で、K172 型のハプロタイプでは、細胞表面でのタンパク質発現量が N172 型の約半分に低下することが明らかにな

り、サリシンに対するヒトの苦味知覚の低下の要因が細胞表面での発現量であることが示唆された¹⁰³。K172N は ECL2 に位置すると推定され⁵⁵、細胞表面での TAS2R 発現量は N172 が K172 の 2 倍となり⁵⁶、サリシン感受性もそれに伴い 2 倍となる。本研究の対象であった TAS2R43 が、SNP の影響で二次構造が変化することによってタンパク質が不安定化し、細胞表面での発現量も低下したと示唆されたことを踏まえると、TAS2R16 の K172N はリガンド結合ではなく、二次構造を変化させることでタンパク質の構造自体が不安定となり細胞表面での TAS2R16 の発現量を低下させた可能性がある。さらに、先述の Behrens らの先行研究によって、培養細胞中とヒトの味細胞中での TAS2R 局在に相関があると報告されていることから、K172N によるアミノ酸置換が、味細胞における TAS2R16 の発現量を低下させ、サリシンに対するヒトの苦味感受性低下を引き起こしている可能性も示唆された。

第 3 章では、受容体機能やタンパク質レベルでの影響を、培養細胞を用いた実験で実証したが、この培養細胞内で確かめられた SNP によって受容体応答性が変化するメカニズムが、実際に生体内の味細胞でも起こっているのかを検証していく必要がある。ヒトの味細胞組織を用いて直接解析することは、現状では容易ではないものの、初代培養細胞やオルガノイドのようなより生体に近い培養系を用いることで、詳細な検証ができる可能性はある。培養細胞で確認された現象がヒトの生体内でも起きていることが実証できれば、TAS2R の SNP の位置から、その受容体タンパク質レベル・ヒトの味覚レベルでの影響まで予測可能になることが期待される。

本研究では、タンパク質のアミノ酸配列から構造を予測し、受容体の機能変化の機構を解明するというタンパク質レベルと、タンパク質レベルの変化の影響をヒト個人の苦味感覚でも確認するという味覚レベルの 2 つの面から、TAS2R の SNP の影響を考察した。その結果、これまで受容体機能への影響メカニズムが解明されていなかった TM1 の SNP が、タンパク質の二次構造変化を介して TAS2R の細胞膜表面での発現量を低下させ、リガンドに対する応答性低下に寄与していることが明らかになった。細胞表面での TAS2R 発現量の

低下の要因としては、アミノ酸変異によりタンパク質の構造安定性が低下する可能性がある。また、この TAS2R の応答性の変化がヒトの味覚にも影響し、TAS2R が受容するリガンドの苦味認知閾値を上げ、苦味感覚を鈍化させることが示唆された。本研究では *TAS2R43*・*TAS2R46* の 2 つに着目したが、今後は研究対象を他の *TAS2R* にも拡大して、遺伝子変異による苦味受容体機能の変化、さらには個人の味覚や食行動との関連について包括的に議論していきたいと考えている。

現在では、*TAS2R* に対して機能解析と構造モデリングを組み合わせた解析が可能となっており、味覚認知の個人差に関する研究への貢献が期待される。個人の味の感じ方や嗜好性に対する理解が深まることで、人々に広く受け入れられやすい食品や医薬品の研究等、味覚を起点とした製品開発にも繋がる可能性がある。また、苦味のある飲食物への感受性や嗜好性に対して影響を及ぼす遺伝的背景を明らかにすることで、遺伝子の面から味覚の個人差を予測できるようになると考えられる。本研究を鍵として遺伝的背景からヒトの味覚機能を紐解き、さらにヒトの食行動の根幹に迫ることができれば、人類進化の過程において味覚や食行動がどのように関わってきたのかを解明する重要な手がかりとなるだろう。本研究が、ヒトの味覚と食行動に関わる研究分野の発展に貢献することを願う。

謝辞

本研究は、多くの方々のご協力とご支援を賜り、遂行することができました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、京都大学 今井啓雄教授、大阪大学 糸井川壮大助教、ならびに京都大学ヒト行動進化研究センター ゲノム進化分野の皆様には、研究全般にわたり貴重なご助言と温かいご支援を頂戴しましたことに、厚く御礼申し上げます。

第2章の味覚試験においては、延べ300名を超える多くの皆様に、ボランティアとして快くご協力いただきました。被験者募集に際しては、筑波大学 綾部早穂教授および研究室の皆様、京都大学 林由佳子教授、Kennedy O. Okeyo 博士、ならびに名古屋市科学館の皆様にご多大なるご尽力を賜りました。この場を借りて、深く感謝いたします。

第3章の構造解析に関しては、Hebrew University of Jerusalem の Alon Rainish 氏および Masha Y. Niv 教授との共同研究として実施しました。両氏には、構造解析の方法立案から解析、結果の解釈に至るまで、有益な議論と専門的知見を共有していただきましたことに、謝意を表します。

論文執筆にあたり、京都大学 明里宏文教授、林由佳子教授、大石高生准教授、大阪大学 糸井川壮大助教、株式会社ゼンショーホールディングス 永井元氏、尾関峻輔氏、Nirin Udomsom 博士、荒川実穂氏、藤記沙耶華氏、石田葵氏、ならびに Monell Chemical Senses Center の Paul Wise 博士から、多方面にわたるご助言とご支援を頂戴しました。ここに記して、感謝の意を表します。

本研究は、日本学術振興会科研費（23K23937、23K23557、24K21275）、うま味研究会、京都大学霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院、ならびに京都大学大学院教育支援機構 SPRING プログラムの支援を受けて実施されました。また、本研究の一部は、イスラエル革新科学技術省、イスラエル農務省、Good Food Israel（Masha Y. Niv 教授）からの助成を受けたものです。

最後に、常に私を支え、励まし続けてくれた、愛する友人および家族に、心から感謝いたします。

引用文献

- ¹ Chandrashekar, J. et al. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. 2006;444(7117):288-294.
- ² Temussi, P. A. Sweet, bitter and umami receptors: a complex relationship. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(6):296-302.
- ³ Trivedi, B. P. Gustatory system: The finer points of taste. *Nature*. 2012;486(7403):S2-S3.
- ⁴ Narukawa, M.; Misaka, T. 味細胞における味の検知と伝達機構. *自律神経*. 2021;58(4):290-293.
- ⁵ Taruno, A. et al. CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*. 2013;495(7440):223-226.
- ⁶ Ma, Z. et al. CALHM3 Is Essential for Rapid Ion Channel-Mediated Purinergic Neurotransmission of GPCR-Mediated Tastes. *Neuron*. 2018;98(3):547-561.e10.
- ⁷ Muramoto, K. 味と匂いを統合する脳内機構. *歯科薬物療法*. 2020;39(1):1-7.
- ⁸ Brockhoff, A. et al. Structural requirements of bitter taste receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(24):11110-11115.
- ⁹ Roudnitzky, N. et al. Receptor Polymorphism and Genomic Structure Interact to Shape Bitter Taste Perception. *PLoS Genet*. 2015;11(9):e1005530.
- ¹⁰ Xu, W. et al. Structural basis for strychnine activation of human bitter taste receptor TAS2R46. *Science*. 2022;377(6612):1298-1304.
- ¹¹ Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*. 1999;18(7):1723-1729.
- ¹² Matsui, T.; Katou, H. Cryo-EM を用いたニューロテンシン受容体による GPCR 動態解析. *J Biochem Soc Jpn*. 2022;94(6):916-922.

- 13 Isberg, V. et al. GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D356-D364.
- 14 Peri, L. et al. Intracellular binding pocket revealed in the human bitter taste receptor TAS2R14. *bioRxiv.* 2024:2024.04.10.588278.
- 15 Hu, X. et al. Bitter taste TAS2R14 activation by intracellular tastants and cholesterol. *Nature.* 2024;631(8020):459-466.
- 16 Peri, L. et al. A bitter anti-inflammatory drug binds at two distinct sites of a human bitter taste GPCR. *Nat Commun.* 2024;15(1):9991.
- 17 Wang, X. et al. Structural basis of β -glucopyranoside salicin recognition by a human bitter taste GPCR. *Cell Rep.* 2025;44(5):115604.
- 18 Marinko, J. T. et al. Folding and Misfolding of Human Membrane Proteins in Health and Disease: From Single Molecules to Cellular Proteostasis. *Chem Rev.* 2019;119(9):5537-5606.
- 19 O'leary, N. A. et al. Exploring and retrieving sequence and metadata for species across the tree of life with NCBI Datasets. *Sci Data.* 2024;11(1):732.
- 20 Valente, C. et al. Genes from the TAS1R and TAS2R Families of Taste Receptors: Looking for Signatures of Their Adaptive Role in Human Evolution. *Genome Biol Evol.* 2018;10(4):1139-1152.
- 21 Shigemura, N. et al. Genetic and molecular basis of individual differences in human umami taste perception. *PLoS One.* 2009;4(8):e6717.
- 22 Fushan, A. A. et al. Allelic polymorphism within the TAS1R3 promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Curr Biol.* 2009;19(15):1288-1293.
- 23 Eny, K. M. et al. Genetic variation in TAS1R2 (Ile191Val) is associated with consumption of sugars in overweight and obese individuals in 2 distinct populations. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(6):1501-1510.
- 24 Liang, Y. et al. The rs35874116 single nucleotide polymorphism increases sweet intake and the risk of severe early childhood caries: a case-control study. *BMC Oral Health.* 2022;22(1):471.

- 25 Wooding, S. P.; Ramirez, V. A. Global population genetics and diversity in the TAS2R bitter taste receptor family. *Front Genet.* 2022;13:952299.
- 26 Wang, X.; Thomas, S. D.; Zhang, J. Relaxation of selective constraint and loss of function in the evolution of human bitter taste receptor genes. *Hum Mol Genet.* 2004;13(21):2671-2678.
- 27 Li, D.; Zhang, J. Diet Shapes the Evolution of the Vertebrate Bitter Taste Receptor Gene Repertoire. *Mol Biol Evol.* 2014;31(2):303-309.
- 28 Itoigawa, A.; Nakagita, T.; Toda, Y. The Remarkable Diversity of Vertebrate Bitter Taste Receptors: Recent Advances in Genomic and Functional Studies. *Int J Mol Sci.* 2024;25(23):12654.
- 29 Hou, M. et al. Reduction of bitter taste receptor gene family in folivorous colobine primates relative to omnivorous cercopithecine primates. *Primates.* 2024;65(4):311-331.
- 30 Purba, L. et al. Evolution of the bitter taste receptor TAS2R38 in colobines. *Primates.* 2020;61(3):485-494.
- 31 Purba, L. H. P. S. et al. Functional characterization of the TAS2R38 bitter taste receptor for phenylthiocarbamide in colobine monkeys. *Biol Lett.* 2017;13(1):20160834.
- 32 Sugawara, T. et al. Diversification of bitter taste receptor gene family in western chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 2011;28(2):921-931.
- 33 Wooding, S. Phenylthiocarbamide: a 75-year adventure in genetics and natural selection. *Genetics.* 2006;172(4):2015-2023.
- 34 Wooding, S. et al. Independent evolution of bitter-taste sensitivity in humans and chimpanzees. *Nature.* 2006;440(7086):930-934.
- 35 Hayakawa, T. et al. Eco-Geographical Diversification of Bitter Taste Receptor Genes (TAS2Rs) among Subspecies of Chimpanzees (Pan troglodytes). *PLoS One.* 2012;7(8):e43277.
- 36 Pronin, A. N. et al. Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the

bitterness of aloin and saccharin. *Curr Biol.* 2007;17(16):1403-1408.

- ³⁷ Brockhoff, A. et al. Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J Agric Food Chem.* 2007;55(15):6236-6243.
- ³⁸ Jiao, H. et al. Local Adaptation of Bitter Taste and Ecological Speciation in a Wild Mammal. *Mol Biol Evol.* 2021;38(10):4562-4572.
- ³⁹ Hinrichs, A. L. et al. Functional variant in a bitter-taste receptor (hTAS2R16) influences risk of alcohol dependence. *Am J Hum Genet.* 2006;78(1):103-111.
- ⁴⁰ Zhong, H. et al. Characterization and phylogeny of bitter taste receptor genes (Tas2r) in Squamata. *Genetica.* 2019;147(2):131-139.
- ⁴¹ Higgins, K. W. et al. Rapid expansion and specialization of the TAS2R bitter taste receptor family in amphibians. *PLoS Genet.* 2025;21(1):e1011533.
- ⁴² Breslin, P. A. An evolutionary perspective on food and human taste. *Curr Biol.* 2013;23(9):R409-418.
- ⁴³ Chamoun, E. et al. A review of the associations between single nucleotide polymorphisms in taste receptors, eating behaviors, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(2):194-207.
- ⁴⁴ Duffy, V. B. Variation in oral sensation: implications for diet and health. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(2):171-177.
- ⁴⁵ Behrens, M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CXVII: Taste 2 receptors-Structures, functions, activators, and blockers. *Pharmacol Rev.* 2025;77(1):100001.
- ⁴⁶ Feng, P. et al. The evolution of bitter taste receptor gene in primates: Gene duplication and selection. *Ecol Evol.* 2023;13(10):e10610.
- ⁴⁷ Meyerhof, W. et al. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses.* 2010;35(2):157-170.

- 48 Hall, M. J. et al. PTC taste blindness and the taste of caffeine. *Nature*. 1975;253(5491):442-443.
- 49 Hayes, J. E. et al. Allelic variation in TAS2R bitter receptor genes associates with variation in sensations from and ingestive behaviors toward common bitter beverages in adults. *Chem Senses*. 2011;36(3):311-319.
- 50 Bloxham, C. J.; Foster, S. R.; Thomas, W. G. A Bitter Taste in Your Heart. *Front Physiol*. 2020;11:431.
- 51 Ong, J. S. et al. Understanding the role of bitter taste perception in coffee, tea and alcohol consumption through Mendelian randomization. *Sci Rep*. 2018;8(1):16414.
- 52 Leite, J. et al. Missense genetic variants in major bitter taste receptors are associated with diet quality and food intake in a highly admixed underrepresented population. *Clin Nutr ESPEN*. 2024;63:311-321.
- 53 Allen, A. L. et al. Bitterness of the non-nutritive sweetener acesulfame potassium varies with polymorphisms in TAS2R9 and TAS2R31. *Chem Senses*. 2013;38(5):379-389.
- 54 Choi, J.-H. et al. Genetic variations in taste perception modify alcohol drinking behavior in Koreans. *Appetite*. 2017;113:178-186.
- 55 Garcia-Bailo, B. et al. Genetic variation in taste and its influence on food selection. *OMICS*. 2009;13(1):69-80.
- 56 Carrai, M. et al. Association between taste receptor (TAS) genes and the perception of wine characteristics. *Sci Rep*. 2017;7(1):9239.
- 57 Behrens, M. et al. Genetic, Functional, and Phenotypic Diversity in TAS2R38-Mediated Bitter Taste Perception. *Chem Senses*. 2013;38(6):475-484.
- 58 Snyder, L. H. INHERITED TASTE DEFICIENCY. *Science*. 1931;74(1910):151-152.
- 59 Fox, A. L. The Relationship between Chemical Constitution and Taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1932;18(1):115-120.

- 60 Bufo, B. et al. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol.* 2005;15(4):322-327.
- 61 Tan, J. et al. 3D structure prediction of TAS2R38 bitter receptors bound to agonists phenylthiocarbamide (PTC) and 6-n-propylthiouracil (PROP). *J Chem Inf Model.* 2012;52(7):1875-1885.
- 62 Tan, J. et al. The Predicted 3D Structure of Bitter Taste Receptors, TAS2R38 Based on a BiHelix and SuperBiHelix Methodologies. *Procedia Environ. Sci.* 2011;8:543-548.
- 63 Sandell, M. A.; Breslin, P. A. Variability in a taste-receptor gene determines whether we taste toxins in food. *Curr Biol.* 2006;16(18):R792-794.
- 64 Soranzo, N. et al. Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16. *Curr Biol.* 2005;15(14):1257-1265.
- 65 Herrera, L. P. T. et al. GPCRdb in 2025: adding odorant receptors, data mapper, structure similarity search and models of physiological ligand complexes. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(D1):D425-D435.
- 66 Thomas, A. et al. The Bitter Taste Receptor TAS2R16 Achieves High Specificity and Accommodates Diverse Glycoside Ligands by using a Two-faced Binding Pocket. *Sci Rep.* 2017;7(1):7753.
- 67 Hellfritsch, C. et al. Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. *J Agric Food Chem.* 2012;60(27):6782-6793.
- 68 Risso, D. et al. Genetic signature of differential sensitivity to stevioside in the Italian population. *Genes Nutr.* 2014;9(3):401.
- 69 Yang, M. Y. et al. Predicted structure of fully activated human bitter taste receptor TAS2R4 complexed with G protein and agonists. *QRB Discov.* 2021;2:e3.
- 70 Yamaki, M. et al. Analysis of Genetic Polymorphism of Bitter Taste Receptor TAS2R38 and TAS2R46, and Its Relationship with Eating and Drinking Habits in Japanese ToMMo Subjects. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2023;69(5):347-356.

- ⁷¹ Risso, D. S. et al. Global diversity in the TAS2R38 bitter taste receptor: revisiting a classic evolutionary PROPosal. *Sci Rep.* 2016;6:25506.
- ⁷² Kulichová, I. et al. Demographic history was a formative mechanism of the genetic structure for the taste receptor TAS2R16 in human populations inhabiting Africa's Sahel/Savannah Belt. *Am J Biol Anthropol.* 2022;177(3):540-555.
- ⁷³ Roudnitzky, N. et al. Genomic, genetic and functional dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners. *Hum Mol Genet.* 2011;20(17):3437-3449.
- ⁷⁴ Trius-Soler, M.; Moreno, J. J. Bitter taste receptors: Key target to understand the effects of polyphenols on glucose and body weight homeostasis. Pathophysiological and pharmacological implications. *Biochem Pharmacol.* 2024;228:116192.
- ⁷⁵ Hwang, L. D. et al. Bivariate genome-wide association analysis strengthens the role of bitter receptor clusters on chromosomes 7 and 12 in human bitter taste. *BMC Genomics.* 2018;19(1):678.
- ⁷⁶ Eulalia, C. et al. Are taste variations associated with the liking of sweetened and unsweetened coffee? *Physiol Behav.* 2022;244:113655.
- ⁷⁷ Fu, D. et al. Complex relationship between TAS2 receptor variations, bitterness perception, and alcohol consumption observed in a population of wine consumers. *Food Funct.* 2019;10(3):1643-1652.
- ⁷⁸ Pirastu, N. et al. Association analysis of bitter receptor genes in five isolated populations identifies a significant correlation between TAS2R43 variants and coffee liking. *PLoS One.* 2014;9(3):e92065.
- ⁷⁹ Grigg, D. The worlds of tea and coffee: Patterns of consumption. *GeoJournal.* 2002;57:283-294.
- ⁸⁰ Lang, T. et al. Numerous Compounds Orchestrate Coffee's Bitterness. *J Agric Food Chem.* 2020;68(24):6692-6700.
- ⁸¹ Lang, R. et al. Mozambioside Is an Arabica-Specific Bitter-Tasting Furokaurane Glucoside in Coffee Beans. *J Agric Food Chem.* 2015;63(48):10492-10499.

- 82 Fredholm, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999;51(1):83-133.
- 83 Nishikawa, N.; Hieda, M. 大学生におけるカフェイン摂取に対する健康リスクの認識とカフェイン含有飲料の摂取状況. *日本食品化学学会誌.* 2022;29(2):114-123.
- 84 Roudnitzky, N. et al. Copy Number Variation in TAS2R Bitter Taste Receptor Genes: Structure, Origin, and Population Genetics. *Chem Senses.* 2016;41(8):649-659.
- 85 Kim, U. et al. Worldwide haplotype diversity and coding sequence variation at human bitter taste receptor loci. *Hum Mutat.* 2005;26(3):199-204.
- 86 Hussain, R.; Shah, A.; Afzal, M. Distribution of sensory taste thresholds for phenylthiocarbamide (PTC) taste ability in North Indian Muslim populations. *Egypt J Med Hum Genet.* 2013;14(4):367-373.
- 87 Dyer, S. C. et al. Ensembl 2025. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(D1):D948-D957.
- 88 Mattes, R. D. Effects of linoleic acid on sweet, sour, salty, and bitter taste thresholds and intensity ratings of adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(5):G1243-1248.
- 89 Kim, U. K. et al. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science.* 2003;299(5610):1221-1225.
- 90 Papadopoulos, J. S.; Agarwala, R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics.* 2007;23(9):1073-1079.
- 91 Spudich, G. M.; Fernández-Suárez, X. M. Touring Ensembl: a practical guide to genome browsing. *BMC Genomics.* 2010;11:295.
- 92 Bhatia, G. et al. Estimating and interpreting FST: the impact of rare variants. *Genome Res.* 2013;23(9):1514-1521.
- 93 Holsinger, K. E.; Weir, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F (ST). *Nat Rev Genet.* 2009;10(9):639-650.

- 94 Wooding, S. P. et al. Association of a bitter taste receptor mutation with Balkan Endemic Nephropathy (BEN). *BMC Med Genet.* 2012;13:96.
- 95 Maxim, K. et al. The history of distribution of the family Aristolochiaceae s.l. *Lomonosov Geography Journal.* 2025;80(5):56-72.
- 96 Mirdita, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* 2022;19(6):679-682.
- 97 Imai, H. et al. Amino acid residues of bitter taste receptor TAS2R16 that determine sensitivity in primates to β -glycosides. *Biophys Physicobiol.* 2016;13:165-171.
- 98 Itoigawa, A. et al. A natural point mutation in the bitter taste receptor TAS2R16 causes inverse agonism of arbutin in lemur gustation. *Proc Biol Sci.* 2019;286(1904):20190884.
- 99 Tan, S. M.; Seetoh, W. G. Construction of a bioluminescence-based assay for bitter taste receptors (TAS2Rs). *Sci Rep.* 2022;12(1):17658.
- 100 Ammon, C. et al. Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem.* 2002;110(1-2):137-145.
- 101 Belloir, C. et al. Optimized vector for functional expression of the human bitter taste receptor TAS2R14 in HEK293 cells. *Protein Expr Purif.* 2025;227:106643.
- 102 Kruse, A. C. et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 2012;482(7386):552-556.
- 103 Ueda, T. et al. Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *J Neurosci.* 2003;23(19):7376-7380.
- 104 Ritz, C. et al. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One.* 2015;10(12):e0146021.
- 105 Zhou, X. et al. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2022;17(10):2326-2353.

- 106 Ziegler, F. et al. Physiological activation of human and mouse bitter taste receptors by bile acids. *Commun Biol.* 2023;6(1):612.
- 107 Buchan, D. W. A.; Jones, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W402-W407.
- 108 Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612.
- 109 Dieckhaus, H. et al. Transfer learning to leverage larger datasets for improved prediction of protein stability changes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024;121(6):e2314853121.
- 110 Montanucci, L. et al. DDGun: an untrained method for the prediction of protein stability changes upon single and multiple point variations. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(Suppl 14):335.
- 111 Rodrigues, C. H. M.; Pires, D. E. V.; Ascher, D. B. DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. *Protein Sci.* 2021;30(1):60-69.
- 112 Malki, A. et al. Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes. *J Leukoc Biol.* 2015;97(3):533-545.
- 113 Imai, H. et al. Expression of Bitter Taste Receptors in the Intestinal Cells of Non-Human Primates. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):902.
- 114 Matsunaga, M. et al. Mechanical Stimulation-Induced Calcium Signaling by Piezo1 Channel Activation in Human Odontoblast Reduces Dentin Mineralization. *Front Physiol.* 2021;12:704518.
- 115 Mishima, Y. et al. Ribosome slowdown triggers codon-mediated mRNA decay independently of ribosome quality control. *EMBO J.* 2022;41(5):e109256.
- 116 Huang, E. et al. Genetic variants affecting RNA stability influence complex traits and disease risk. *Nat Genet.* 2025;57(10):2578-2588.
- 117 dos Reis, M.; Savva, R.; Wernisch, L. Solving the riddle of codon usage preferences: a test for translational selection. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(17):5036-5044.

- 118 Presnyak, V. et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*. 2015;160(6):1111-1124.
- 119 Taguchi, H. タンパク質フォールディングの「理想」と「現実」：凝集形成とシャペロンの役割. *Journal of Japanese Biochemical Society*. 2015;87(2):194-204.
- 120 Lang, T. et al. Activation Profile of TAS2R2, the 26th Human Bitter Taste Receptor. *Mol Nutr Food Res*. 2023;67(11):e2200775.
- 121 Tokmakova, A. et al. Predicted structure and cell signaling of TAS2R14 reveal receptor hyperflexibility for detecting diverse bitter tastes. *iScience*. 2023;26(4):106422.
- 122 Cano-Marquina, A.; Tarín, J. J.; Cano, A. The impact of coffee on health. *Maturitas*. 2013;75(1):7-21.
- 123 Chen, W. C. Studies on the bitter taste of roasted coffee. Relationship between structure and bitter taste of some organic compounds. 1979. PhD thesis, University of Munich, Munich, Germany.
- 124 Prewo, R. et al. Crystal structure of mozambioside, a diterpene glycoside of *Coffea pseudozanguebariae*. *Phytochemistry*. 1990;29(3):990-992.
- 125 Czech, C. et al. Identification of mozambioside roasting products and their bitter taste receptor activation. *Food Chem*. 2024;446:138884.
- 126 Feduccia, A. A. et al. Locomotor activation by theacrine, a purine alkaloid structurally similar to caffeine: involvement of adenosine and dopamine receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;102(2):241-248.
- 127 Lang, R. et al. Overlapping activation pattern of bitter taste receptors affect sensory adaptation and food perception. *Front Nutr*. 2022;9:1082698.
- 128 Margulis, E. et al. BitterMatch: recommendation systems for matching molecules with bitter taste receptors. *J Cheminform*. 2022;14(1):45.
- 129 Wang, Y. et al. Theacrine, a purine alkaloid with anti-inflammatory and analgesic activities. *Fitoterapia*. 2010;81(6):627-631.

- ¹³⁰ Yan, J.; Tong, H. An overview of bitter compounds in foodstuffs: Classifications, evaluation methods for sensory contribution, separation and identification techniques, and mechanism of bitter taste transduction. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023;22(1):187-232.
- ¹³¹ Yanagisawa, T.; Misaka, T. Characterization of the Human Bitter Taste Receptor Response to Sesquiterpene Lactones from Edible Asteraceae Species and Suppression of Bitterness through pH Control. *ACS Omega.* 2021;6(6):4401-4407.
- ¹³² Zheng, X. Q. et al. Theacrine (1,3,7,9-tetramethyluric acid) synthesis in leaves of a Chinese tea, kucha (*Camellia assamica* var. kucha). *Phytochemistry.* 2002;60(2):129-134.
- ¹³³ Mallick, S. et al. The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations. *Nature.* 2016;538(7624):201-206.
- ¹³⁴ Bennett, E. A.; Liu, Y.; Fu, Q. Reconstructing the Human Population History of East Asia through Ancient Genomics. *Cambridge: Cambridge University Press; 2025.*
- ¹³⁵ Pagani, L. et al. Genomic analyses inform on migration events during the peopling of Eurasia. *Nature.* 2016;538(7624):238-242.
- ¹³⁶ Kirk, M. Genetic drift and founder effects: Implications for population genetics, conservation, and human health. *Genet Mol Res.* 2024;23(2):gmr34057