

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成30年4月27日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団
会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局 農学研究科

職 名 助教

氏 名 梶 田 哲 哉

助成の種類	平成 29 年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	甘味タンパク質の甘味度強化、味質改善に係る構造基盤に関する研究			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) Frontiers Molecular Bioscience 農芸化学会			
成果の概要	資料等有			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	347,217円	
		機器使用料	277,200円	
		旅 費	122,040円	
		論文投稿料	180,670円	
英文校正費		48,120円		
謝 金	24,753円			
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)			

成果の概要

農学研究科・食品生物科学専攻・榊田哲哉

甘味タンパク質の甘味度強化、味質改善に係る構造基盤に関する研究

先進国では肥満、糖尿病が社会問題となっており、ショ糖代替ノンカロリー甘味料が多くの食品、飲料で使用されている。タンパク質は糖類と比べカロリーが低く、一般的に無味であるが、例外的に甘味を呈する「甘味タンパク質」が存在する。しかしながら甘味タンパク質間に共通する構造の特徴は見出されていない。甘味発現に必須な構造要因ならびに甘味受容体との結合様式を見出すことで、新規な非糖質系甘味料の創出が期待できる。

甘味タンパク質ソーマチンはショ糖に比べモル比で10万倍、重量比で3千倍甘いが、なぜこのように強い甘味を呈するかについては明らかとなっていない。ソーマチンはサッカリンやアスパルテム等の低分子人工甘味料と比べ分子サイズが大きく、低分子甘味物質が結合する受容体部位 (orthosteric site) に結合することが難しいと考えられ、受容体にくさびを打ち込むことで間接的に受容体を活性化状態にするウェッジモデル (wedge model) が提唱されているが、その妥当性については研究者間で意見が分かれ、更なる「甘味性と構造」の研究が必要である。

申請者はこれまでソーマチンの構造活性相関研究から、21位のアスパラギン酸をアスパラギンに置換することにより、甘味度を強化することに成功した。この知見により甘味受容体と精度の高いドッキングシミュレーションを行うことが可能となり、その結果ソーマチンは低分子甘味料とは異なる様式 (wedge model) で甘味受容体と相互作用すること、ソーマチンの甘味に特に重要なアミノ酸残基 (Arg82, Lys67) 以外にも複数のアミノ酸残基が受容体と相互作用することが示唆された。

そこで本研究では、wedge model の妥当性の検証を行うため、相互作用に寄与すると考えられる3つのリジン残基 (Lys78, Lys106, Lys137) について検討を行った。まず、それぞれのアラニン変異体 (K78A, K106A, K137A) を作製し、呈味性の検討を行ったところ、K78A, K106A, K137A の甘味閾値はそれぞれ 220 nM, 140 nM, 230 nM となり、いずれの変異体も wild-type と比べ甘味が低下していた。wild-type と比べ K106A 変異体では3倍、K78A、K137A 変異体では5倍程度の甘味の低下が見られたことから、変異体間でも甘味閾値の相違点が見られた。

次にそれぞれの変異体の構造特性を検討するために、変異体タンパク質の結晶化を行い、X線結晶構造解析を試みた。データ取得は大型放射光施設 (SPring-8) BL26B1 にてイメージングプレートディテクター (RAXIS-V) を用いて行った。その結果、K78A, K106A, K137A 変異体について 1.01 から 1.07 Å の原子分解能データの取得に成功した。収集したデータを HKL2000 にてプロセッシングを行い、wild-type ソーマチン I の構造を初期モデルとして分子置換を行った。分子構造のモデリングは Coot を用いて行った。精密化は SHELXL を用いた。最高到達分解能において、異方性温度因子を導入した。さらに水素原子を導入し、精密化を行った。得られた構造はプロテインデータバンク (PDB) に登録した (K78A:5YYQ, K106A:5YYR, K137A:5YYP)。決定した変異体の構造を wild-type ソーマチンの構造 (分解能 1.10 Å, PDB: 3AL7) と比較したと

ころ、C α の相違点は見られなかったが、変異箇所の静電ポテンシャルが負電荷に変化していた。特に Lys78 と Lys137 における静電ポテンシャル変化が顕著であった。各変異体の甘味度の低下度合いは、変異導入による静電ポテンシャル変化度とよく相関しており、非常に興味深い結果となった。また Lys78, Lys106, Lys137 は立体構造上それぞれ 20~40 Å 程度離れていることから、ソーマチン表面の正電荷が甘味発現に重要な役割をしていること、ソーマチン分子表面の広い範囲で甘味受容体と相互作用していることを示唆し、wedge model を支持する結果となった。

またソーマチン D21N 変異体同様に、甘味度を高める変異体の探索を試みた。今回ソーマチンの甘味に特に重要な役割をしている (Arg82, Lys67) が存在するドメイン III 近傍のループをターゲットとして変異体の作製を行った。今後、引き続き検討を行い、呈味性と構造の相関を明らかにしたい。

以上の研究は大型放射光施設 (2017A2511: 原子分解能 X 線結晶構造解析による甘味タンパク質の機能発現に関する研究) で行った研究である。内容の一部は、Frontiers in Molecular Bioscience (添付資料) に掲載された。

上記研究に加えて、大型放射光施設、X 線自由電子レーザー施設において、常温生理的条件下での室温構造解析を行った。生理的温度域によるタンパク質の揺らぎ構造と機能相関に関する研究 (2017A2526) では、Humid Air and Glue coating 法により、外接湿度をコントロールし、低温対応の調湿装置を用いることにより様々な温度域での実験を行った。異なる温度域における食品タンパク質の構造情報、酵素タンパク質の基質認識、創薬に係る酵素反応メカニズムの精緻な理解を通して、機能性タンパク質素材の創出、新薬の探索、阻害剤等のデザイン、最適化等に重要な情報を与えるだけでなく、蛋白質ダイナミクス研究にも応用でき、引き続き当該実験を推進していきたい。尚、大型放射光施設で得られたデータ解析については、大阪大学蛋白質研究所と共同研究を行い、オンサイトでの自動解析手法の検討を行った。

また、JAXA (宇宙航空研究開発機構) とは国際宇宙ステーション「きぼう」における「高品質タンパク質結晶生成実験」の共同研究を継続しており、結晶の大型化条件を精査している。現在宇宙ステーションで実験を行っており、本年 5 月に地球に帰還予定である。今後大型結晶を得ることにより、室温における原子分解能解析、中性子回析実験を進め、得られた情報を統合することにより、甘味発現に関わるアミノ酸残基の水素原子や水分子の配位状態を明らかにしたい。