

X線結晶構造解析による甘味タンパク質ソーマチンの 甘味発現機構の解明と高甘味度化



桝田 哲哉 Masuda Tetsuya (京都大学大学院農学研究科食品生物科学)

ンパク質 (ソーマチン, モネリン, ブラゼイン, マ

1 はじめに

「甘い」という単語を聞くと、ケーキや饅頭、チ ョコレート. 飴. ジュースなどの食品・飲料を連想 される方々も多いのではないだろうか。この「甘さ, 甘味」の発現はショ糖をはじめとする甘味物質が甘 味受容体と相互作用することによりもたらされる。 近年、ショ糖に代替可能な甘味料として、ステビオ シド等の天然甘味料や、高甘味度甘味料と呼ばれる スクラロース,アセスルファムカリウム,アスパル テームなどのノンカロリー人工甘味料が使用されて いる。これら多くの甘味物質は分子量の比較的小さ い低分子化合物である。高分子化合物であるタンパ ク質は元来味を呈さないと考えられてきた。これは, タンパク質の場合、その大きさ故に、低分子甘味物 質が結合する受容体上の orthosteric ポケットに結合 することが困難であるためと考えられるからであ る。しかしながら 1970 年頃から甘味を呈するタン パク質、「甘味タンパク質」の報告がなされた。本 稿では、筆者らの甘味タンパク質「ソーマチン」の X線結晶構造解析による甘味発現機構の解明、高甘 味度化について紹介する。

2 甘味タンパク質とは

先述したようにタンパク質の中にも例外的に強い 甘味を呈するものが存在する。現在まで,6種のタ

ビンリン、クルクリン(ネオクリン)、リゾチーム) が甘味を呈すると報告されている¹⁵⁰。これら甘味 タンパク質の立体構造を比較すると明らかなように (図1), 甘味タンパク質間に共通して存在する「構 造モチーフ」は見当たらないため、各々のタンパク 質について甘味発現に関わる特徴を見出そうとする 研究が盛んに行われている。モネリン,マビンリン, ネオクリンは2つのサブユニットからなるヘテロダ イマーであるのに対し、ソーマチン、ブラゼイン、 リゾチームは一本鎖モノマータンパク質であり、酸 性条件下においては、80℃の加熱に対して、その甘 味が維持され、食品添加物としての汎用性が高い。 甘味タンパク質の中でも、モネリン、ブラゼインの 甘味―構造活性相関の研究は進んでおり、甘味受容 体との結合部位に関する知見も得られている。"。 ヒトがソーマチンとモネリンの甘味を感じることが できる最低濃度(甘味閾値)はわずか 50 nM であり. ショ糖と比べるとモル比で10万倍強い甘味を呈す ることから、ショ糖の代替甘味料としての利用、甘 味発現機構解明の有効なツールとなると期待され る。ソーマチンは現在、我が国において食品添加物 (甘味料)として、広く食品、飲料、医薬品等に使 用されている。



図1 甘味タンパク質の構造

a. ソーマチン I, b. モネリン, c. プラゼイン, d. ネオクリン, e. リゾチーム, f. マビンリンを示す。a, c, e はモノマータンパク質, b, d, f はヘテロ二量体 タンパク質である。PyMOL にて作成(DeLano, W. L. (2002). The pyMOL /Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.)

3 甘味タンパク質ソーマチン

ソーマチンは西アフリカ原産の植物 *Thaumatococcus daniellii* Benthの果実から単離され る。陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出パター ンから少なくとも5つのバリアント(ソーマチン a, b, c, I, II)が存在し、ソーマチン I、ソーマチン II が構成成分の大半を占める。現地においては、酸味 や不快味がする食品、例えばパンや果物、悪質のパ ームワインを甘くするのに用いられてきたが、その 甘味の本質が「タンパク質」と見出されたのは、オ ランダの研究者 van der Wel と Loeve らの研究によ る⁸⁰。その後、ソーマチンのアミノ酸配列や遺伝子 配列の決定を皮切りに⁸⁻¹¹⁾、微生物や植物での組換 え体の発現^{12,13)}、甘味発現部位の探索^{5,14-17)} など活 発に研究がなされている。



図2 ソーマチンの構造 a. ドメインIをピンク, ドメインIIを黄緑, ドメインIIIをシアンで示す。 甘味に重要な残基を stick-model で示す b. 8 カ所のジスルフィド結合を黄色で示す

3-1. ソーマチンの構造の特徴

ソーマチンはヒスチジン以外の19種のアミノ酸 を構成成分とする 207 アミノ酸残基からなる一本鎖 タンパク質である。分子量は22,000, 等電点が12, 分子内に8つのジスルフィド結合を持ち、その構造 は、3つのドメインからなる(図2)¹⁸⁾。ドメインI は典型的な 11 個の B - ストランドで構成されてい る (アミノ酸残基1-53,85-127,178-207)。 ドメインⅡはアミノ酸残基128-177から構成され. ドメイン III はアミノ酸残基 54 - 84 からなりジス ルフィド結合に富んでいる(図2)。甘味に特に重 要な残基(Lys67, Arg82)はこのドメインIIIに含 まれている。ソーマチンと類似した構造を持つタン パク質は広く植物に存在しておりソーマチン様タン パク質(thaumatin-like protein)と呼ばれている。オ スモチン,タバコ PR-5d タンパク質,バナナ,ト マトの抗真菌タンパク質、キウイ、リンゴ、チェリ ー等のアレルゲンタンパク質,キシラナーゼインヒ ビターTLX1 などがソーマチンと構造が類似してい る 19-23)。しかしながら、いずれのタンパク質も甘味 を呈するとの報告はなされていない。これらソーマ チン様タンパク質の特徴としては、アミノ酸配列比 較を行うと16個のシステインの位置が保存されて おり、8つのジスルフィド結合が保存されている点 が挙げられる。

3-2. ソーマチンの高分解能構造解析

ソーマチンは酒石酸塩存在下で容易に bipyramid 型の tetragonal 結晶が得られる。そのため結晶化のモ デルタンパク質として利用され、プロテインデータ バンク(PDB)にも 100以上のソーマチンの構造が 登録されている。多くの研究では植物由来のソーマ

チンを用いて結晶化が行われているが、植物由来の ソーマチンには複数のバリアント(ソーマチン I, II, a, b, c)が含まれている。精製すること無しに結晶化 も可能であるが、更に陽イオン交換クロマトグラフ ィーで精製を行うことで原子分解能(0.95Å)のソ ーマチンIの解析も行われている²⁴⁾。筆者らは、ソ ーマチン遺伝子をクローニングし,酵母 Pichia pastoris でのソーマチンの発現を試み、組換え体ソー マチン I の高分泌発現系の構築に成功した^{25,26)}。得 られた組換え体ソーマチンIの構造を大型放射光施 設 SPring-8 のビームライン BL38B1 で構造解析を行 った^m。イメージングプレート様式の検出器 (RAXIS-V) を用いて分解能 1.1 Åのデータ取得に成 功した²⁸⁾。異方性温度因子 (anisotropic temperature factors)を考慮した構造の精密化を行った。その結果、 多くのアミノ酸残基において,水素原子の存在が確 認できたのをはじめ、多くのアミノ酸の側鎖が alternative 構造(2つ以上の構造)を有していた。興 味深いことに甘味に特に重要な役割をしている Arg82 残基の側鎖はフレキシブルな構造を有してい た。もう1つの重要なアミノ酸残基であるLys67の 側鎖ではフレキシブルな構造は見られなかった。植 物から精製したソーマチンIの構造(PDB:3ald)と 比較すると、ソーマチンのバリアントで異なるアミ ノ酸残基において組換え体ソーマチンIの電子密度 が明瞭に見受けられた。

次にソーマチンのバリアントの1つであるソーマ チンⅡについて解析を行い,分解能 0.99 Å での構 造を決定した²⁰⁾。ソーマチン I とソーマチン II では 4 カ所の配列上の違い(ソーマチン I: Asn46, Ser63, Lys67, Arg76, $\mathcal{V} - \forall \mathcal{F} \mathcal{V}$ II: Lys46, Arg63, Arg67, Gln76) があり、ソーマチン II のほうが塩基性度が 高い。ソーマチンⅡにおいては、甘味に重要な2 残基 (Arg67, Arg82) の側鎖がフレキシブルな構造 をとっていることが明らかとなった。以上の結果か ら甘味受容体との相互作用は鍵と鍵穴のような rigid なものではなく, 揺らぎ構造を踏まえた induced fit 型の柔軟な構造特性が甘味受容体との相 互作用に重要な役割を果たしているという新規な知 見を得るに至った。立体構造上、甘味に特に重要な 2残基はクレフトを含む面に存在していることか ら、この面上で甘味受容体と相互作用していると考 えられる。近年筆者らは 0.9Åの原子分解能での構

造決定に成功しており, 1.1 Åの分解能の構造に比 べて新規な知見も得ている(論文投稿中)。

これまでは tetragonal 結晶の構造について述べて きたが、ソーマチンは結晶化条件を変えることによ り針状や板型の orthorhombic 型, hexagonal 型の結 晶が生成し, orthorhombic 型では分解能1.0Å前後で, hexagonal 型では1.6Åの分解能で構造解析されてい る^{24, 28, 30, 31)}。orthorhombic 型の結晶を用いた解析では, pH 変化に伴うタンパク質の揺らぎ,構造変化をも 追跡が可能となっている³⁰⁾。

4 Wedge model を用いた甘味受容体との相互作用解析

甘味受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役型 受容体(GPCR)である T1R2 と T1R3 のヘテロ二量 体(T1R2-T1R3)から構成され, 糖類, アミノ酸, ペプチド、合成甘味料などの低分子甘味料、甘味タ ンパク質までをこの甘味受容体で認識する 32-30)。現 在のところ、甘味受容体の立体構造は決定されてい ないが、甘味受容体と同じN末端に500残基ほど の大きな細胞外ドメインを有する c-type GPCR ファ ミリーに属する代謝型グルタミン酸受容体は既に構 造が決定されており37,この構造を鋳型として甘味 受容体 T1R2-T1R3 のモデルが構築されている³⁸⁾。 低分子甘味物質の場合はグルタミン酸とグルタミン 酸受容体との結合の場合と同様に orthosteric ポケッ トに結合することにより、受容体を活性化状態に移 行させると考えられるが、分子量の大きいタンパク 質の場合,この orthosteric site に結合することは困 難であると思われる。そのため、受容体表面上にく さび (wedge) をはめ込むことで受容体を強制的に 活性化させるというモデル "wedge model" が Temussi らにより考案された³⁸⁾。Wedge model にヒ ントを得た、モネリンの研究では、Y65R 変異体を 作製し, wild-typeより 1.6 倍ほど甘味を強くするこ とに成功している³⁹⁾。ソーマチンについては、クレ フト面に含まれる塩基性アミノ酸残基が甘味発現に 関わるとの知見があったが, wedge model 構築に重 要となる甘味に重要な役割をするアミノ酸残基の情 報が足りず、精度の高いモデルの構築が困難であっ た。構造上甘味に特に重要な2残基(Lys67, Arg82) が存在する面、クレフト面に含まれる塩基性アミノ 酸残基についてはおおよそ検討を終えていたので,

荷電性アミノ酸残基、特に酸性アミノ酸残基(アス パラギン酸、グルタミン酸)に着目し、甘味に与え る影響を検討した⁴⁰⁾。ソーマチンはアミノ酸 207 残 基からなるが.酸性アミノ酸残基であるアスパラギ ン酸は13残基、グルタミン酸は6残基存在する。 立体構造上でクレフト面に位置している酸性アミノ 酸残基に着目すると、アスパラギン酸は4残基 (Asp21, Asp55, Asp59, Asp60), グルタミン酸は2残 基(Glu42, Glu89)であった。この6残基について 変異体を作製し、甘味に与える影響を検討したとこ ろ, Asp55, Asp59, Asp60, Glu42, Glu89の変異体 (D55N, D59A, D60A, E42Q, E89Q) は甘味に寄与し なかった。一方、21位のアスパラギン酸(D)をア スパラギン(N) に置換した変異体(D21N) は wild-type と比べ甘味度が 1.7 倍ほど強化した⁴⁰。D をNに置換したことにより、受容体上の酸性アミ ノ酸残基とアスパラギン酸との反発が弱められたこ とで甘味度が強化されたと考えられた。N21も甘味発 現に関わるとの知見を加え, wedge model を用いた 甘味受容体とドッキングモデルを再構築した(図3)。 その結果、ソーマチンの甘味に特に重要なアミノ酸 残基 (Lys67, Arg82) は、受容体上の酸性アミノ酸 残基(T1R3_E45, T1R2_D173)と電荷相補的な相互 作用をすること、今回の21位のアミノ酸置換によ る高甘味度化は受容体との相互作用領域を更に増加 させた(赤点線で囲まれた領域)結果である可能性 を示唆した(図3)。

5 おわりに

ソーマチンの高甘味度化を達成することで, 甘味



図3 ソーマチンと甘味受容体のドッキングモデル

a. 甘味受容体を青色, ソーマチンを黄色で示す b. a の拡大図。相互作用にかかわるソーマチン側のアミノ酸残基(R82, K67, K106, K137, K78)と, 受容体側のアミノ酸残基(R2_D173, R2_ D433, R3_E45, R3_E47, R3_D215)をそれぞれ示す 受容体と精度の高いドッキングモデルが構築できた。今後このドッキングモデルの正当性を実証すべく、相互作用部位に関わるアミノ酸残基について変異体を作製し、構造と甘味性の相関を検討する必要があると考えられる。昨年イタリアのグループよりモネリンの高甘味度化の報告がなされ⁴¹⁾、甘味度の点からいうと後塵を拝している。この道「甘く」なさそうだが、21位に加え、他の部位に変異を導入することで更なる高甘味度化を達成できればと思っている。

近年得られているソーマチンおよび変異体の原子 分解能構造解析の結果はこれまでの部位特異的変異 体と甘味受容体との相互作用の知見を更に深める結 果となっている。また一方で,非凍結結晶を用いた 放射光構造解析,X線自由電子レーザーによる解析 では⁴²⁾,従来の凍結結晶とは異なる構造の多様性が タンパク質の機能発現に重要な役割をする知見を得 ている。今後様々な手法を用いて甘味タンパク質の 有する特異な性質を原子レベルでの構造解析で明ら かにし,食品開発に利用できればと考えている。

謝辞

本稿で紹介したソーマチンの構造データは大型放 射光施設 SPring-8(BL26B1, BL38B1)にて測定したも のである(課題番号 2009A1096, 2009B1379, 2010B1064, 2011B1073, 2012A1048, 2012B1067, 2013A1053, 2013B1069, 2014A1063, 2014B1181, 2014B1339, 2014B2020, 2015A1037, 2015B2037, 2016A2548, 2016A2552, 2016B2548, 2016B2552)。

参 考 文 献

- 1) J.D. Higginbotham, Protein sweeteners In Developments in Sweeteners I, Applied Science, London (1979)
- 2) Y. Kurihara, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 32, 231 (1992)
- 3) R. Kant, Nutr. J., 4, 5 (2005)
- 4) P.A. Temussi, Cell. Mol. Life Sci., 63, 1876 (2006)
- 5) 桝田哲哉, 化学と生物, 52, 23 (2014)
- 6) P. Jiang, et al., J. Biol. Chem., 279, 45068 (2004)
- 7) F.M. Assadi-Porter, et al., J. Mol. Biol., 398, 584 (2010)
- H. van der Wel and K. Loeve, *Eur. J. Biochem.*, **31**, 221 (1972)
- 9) R.B. Iyengar, et al., Eur. J. Biochem., 96, 193 (1979)
- 10) L. Edens, et al., Gene, 18, 1 (1982)
- 11) N. Ide, et al., Biotechnol. Prog., 23, 1023 (2007)
- 12) I. Faus, Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 145 (2000)

- 13) T. Masuda and N. Kitabatake, J. Biosci. Bioeng., 102, 375 (2006)
- 14) S.-H. Kim and J.L. Weickmann, *In Thaumatin*. CRC Press, Boca Raton, FL (1994)
- 15) R. Kaneko and N. Kitabatake, *Chem. Senses*, 26, 167 (2001)
- 16) K. Ohta, et al., FEBS J., 275, 3644 (2008)
- 17) K. Ohta, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 413, 41 (2011)
- 18) H. van der Wel, et al., Eur. J. Biochem., 144, 41 (1984)
- 19) K. Min, et al., Proteins, Struct. Funct. Genet., 54, 170 (2004)
- 20) H. Koiwa, et al., J. Mol. Biol., 286, 1137 (1999)
- 21) P. Leone, et al., Biochimie, 88, 45 (2006)
- 22) R. Ghosh and C. Chakrabarti, Planta, 228, 883 (2008)
- 23) E. Vandermarliere, et al., Proteins, Struct. Funct. Genet., 70, 2391 (2010)
- 24) N. Asherie, et al., Cryst. Growth Des., 9, 4189 (2009)
- 25) N. Ide, T. Masuda and N. Kitabatake, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363**, 708 (2007)
- 26) T. Masuda, et al., Food Sci. Tech. Res., 16, 58 (2010)

- 27) G. Ueno, et al., J. Struct. Funct. Genomics, 7,15 (2006)
- 28) T. Masuda, et al., Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., 67, 652 (2011)
- 29) T. Masuda, et al., Biochimie, 106, 33 (2014)
- 30) T. Masuda, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 419, 72 (2012)
- C. Charron, R. Giege and B. Lorber, Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol. Cryst. Commun., 60, 83 (2004)
- 32) G. Nelson, et al., Cell, 106, 381 (2001)
- 33) X. Li, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99, 4692 (2002)
- 34) G.Q. Zhao, et al., Cell, 115, 225 (2003)
- 35) H. Xu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 14258 (2004)
- 36) J. Chandrashekar, et al., Nature, 444, 288 (2006)
- 37) N. Kunisima, et al., Nature, 407, 971 (2000)
- 38) P.A. Temussi, FEBS Lett., 526, 1 (2002)
- 39) V. Esposito, et al., J. Mol. Biol., 360, 448 (2006)
- 40) T. Masuda, et al., Sci. Rep., 6, 20255 (2016)
- 41) S. Leone, et al., Sci. Rep., 6, 34045 (2016)
- 42) M. Sugahara, et al., Nature Methods, 12, 61 (2015)