

2015A1795

BL41XU

うま味受容体細胞外リガンド結合ドメインの X 線結晶構造解析 Crystallographic Analysis of the Ligand-binding Domains of Umami Taste Receptor

細谷 麻以子, 山下 敦子
Maiko Hosotani, Atsuko Yamashita

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

T1r1/T1r3 ヘテロ二量体は、味覚受容において、アミノ酸などを感知するうま味受容体として機能する。T1r1/T1r3 受容体の主要な味物質結合部位であるリガンド結合ドメインについて、組換え発現・精製・結晶化を行い、得られた結晶の X 線回折実験を行った。その結果、結晶から確認された回折は、異方性が高く、構造決定に十分な分解能の回折強度データを得ることができなかった。

キーワード： 味覚受容体、クラス C 型 GPCR

背景と研究目的：

食物中に含まれる味物質の感知は口腔内に存在する味覚受容体が担っている。脊椎動物においては、味覚は甘味・うま味・苦味・塩味・酸味の基本五味と呼ばれる味質それぞれ固有に存在する味覚受容体を介して感知されている[1]。このうち、甘味物質とうま味物質を感知する受容体は、クラス C 型 G タンパク質共役型受容体(GPCR)ファミリーに属する Taste receptor type 1 (T1r)ファミリーである。クラス C 型 GPCR は、①ヘテロ二量体として機能する、②細胞外に 500 アミノ酸残基程度のリガンド結合ドメイン(LBD)を持ち、LBD で主要なアゴニストを認識する、との構造的特徴を持つ受容体群である[2]。T1r 受容体でも、これらの構造的特徴を利用して味物質認識を行っており、ヒトでは T1r1 と T1r3 のヘテロ二量体の LBD がグルタミン酸などのうま味物質の認識、T1r2 と T1r3 のヘテロ二量体の LBD が糖などの甘味物質の認識を担っている[3-5]。

これまで味覚受容体については立体構造が明らかになっておらず、味物質の認識メカニズムは不明であった。最近、我々のグループでは、味覚受容体としては初めての立体構造となるメダカ由来 T1r2a/T1r3LBD ヘテロ二量体の結晶構造を、SPring-8 を用いて解明した[6]。一方、T1r 受容体として機能するもう 1 つの受容体である T1r1/T1r3 ヘテロ二量体については、いまだ構造情報が明らかとなっていない。そこで、T1r 受容体による味物質認識の共通性と多様性を解明することを目的に、T1r2/T1r3 ヘテロ二量体とは異なる味覚モダリティーの感知を担う T1r1/T1r3LBD ヘテロ二量体の結晶構造解析に取り組んだ。

実験：

各種脊椎動物由来の T1r1LBD および T1r3LBD 遺伝子のうち、蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー解析[7]により良好な発現が見られたものについて、メダカ由来 T1r2a/T1r3LBD のタンパク質発現系を構築したときと同じ方法[8]を用いて、ショウジョウバエ S2 細胞の安定発現クローン細胞を確立した。T1r1LBD および T1r3LBD 遺伝子は、3'側に Factor Xa 認識配列、FLAG タグ配列、His タグ配列を順に融合した形で S2 細胞に導入した。

T1r1/T1r3LBD ヘテロ二量体タンパク質の発現と精製は、基本的にメダカ由来 T1r2a/T1r3LBD と同様の方法で実施した[5, 9]。具体的には、発現 S2 細胞を 5 μ M kifunensine 含有 ExpressFive SFM (Gibco)培地を用いて 27 $^{\circ}$ C で 5 日間培養した。得られた培養培地から、Anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA)を用いて発現 T1r1/T1r3LBD タンパク質を回収した。得られたタンパク質について、Factor Xa (Millipore)処理を行って精製タグを切除し、Endo H 処理を行って糖鎖を切断した。酵素処理後のタンパク質を Superdex200 10/300 GL (GE Healthcare)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

得られた精製タンパク質は、ポリエチレングリコールを沈殿剤としてハンギングドロップ蒸気

拡散法により 20 °C で結晶化した。得られた結晶は液体窒素にて凍結した。X 線回折実験は、SPring-8 の BL41XU にて波長 0.979 Å の X 線と検出器 PILATUS 6M (DECTRIS)を用いて、あるいは BL26B1 にて波長 0.97 Å の X 線と検出器 Saturn A200 (Rigaku)を用いて行った。結晶の格子定数は HKL2000 [10]を用いて決定した。

結果および考察：

精製 T1r1/T1r3LBD ヘテロ二量体試料の結晶化条件スクリーニングの結果、ポリエチレングリコールを沈殿剤とした 3 条件から、最大で大きさ 0.1 mm 程度の直方体結晶を得ることができた (図 1A)。BL26B1 にて結晶に X 線を照射したところ、タンパク質結晶由来と推測される回折点が観察された (図 1B)。そこで、結晶化条件の最適化を試み、種々の結晶化・凍結条件で作製した合計 46 個の結晶の回折能確認を行った。しかしながら、結晶からの回折には異方性が見られ、最も良好な回折を示したものでも、一方向には約 3.9 Å 分解能まで回折点が確認できたものの、他方向には約 7.6 Å 分解能までしか回折点が確認できなかった。また、BL26B1 にて 180 秒までの露光時間の延長や、BL41XU を用いた回折実験を行ったが、それ以上の分解能の向上は見られなかった。したがって、残念ながら構造決定に十分な分解能の回折強度データを得ることはできなかった。

得られた回折像より、結晶の格子定数を決定した。結晶系は直方晶系、ラウエ群は *mmm*、格子定数は $a = 71.3 \text{ \AA}$ 、 $b = 122.3 \text{ \AA}$ 、 $c = 597.3 \text{ \AA}$ であった。得られた格子定数と T1r1/T1r3LBD の分子量 (アミノ酸配列より計算したもので 107.0 KDa) を勘案すると、非対称単位中に含まれる T1r1/T1r3LBD ヘテロ二量体が 4 分子、5 分子、6 分子の場合、Matthews Coefficient がそれぞれ 3.04、2.43、2.03 Å³/Da となるため、非対称単位中の分子数として可能性が高いのは 4~6 分子であると考えられた。

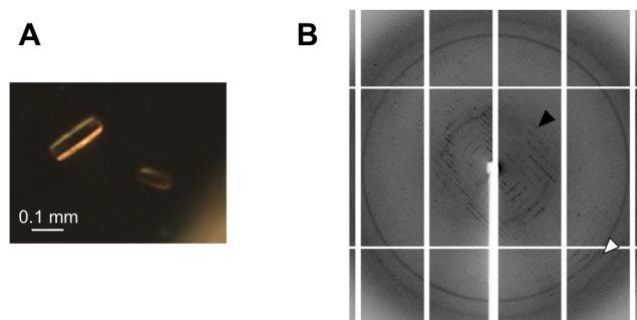


図 1. T1r1/T1r3LBD ヘテロ二量体結晶(A)およびその X 線回折像(B)。X 線回折像は、BL26B1 を用いて、実験項記載の条件にて、露光時間 180 秒で撮影したものである。白矢印は 3.9 Å 分解能、黒矢印は 7.6 Å 分解能の回折点を示す。

今後の課題：

組換え発現・精製した T1r1/T1r3LBD ヘテロ二量体試料より結晶を得ることができたものの、X 線回折能が低く、構造決定には至らなかった。その要因の 1 つとしては、得られている精製標品の純度や均一性が十分でない可能性が考えられる。そこで、発現・精製条件の過程から条件を改善していく必要がある。また、現在得られている結晶も、*c* 軸の格子軸長が約 600 Å と極めて長く、また回折にも異方性が見られるなど、構造解析可能な程度までの劇的な分解能向上をのぞめるかどうかはわからない。そこで、現在の結晶化条件の最適化とともに、さらに高分解能が得られる新たな結晶を得ることを目指して、より純度・均一性を向上した精製試料を用いてあらためて結晶化条件探索をやり直し、異なる結晶系で結晶化する条件を再探索する必要性もあると考えられる。

今回結晶化した T1r1/T1r3LBD と、すでに構造決定されているメダカ T1r2a/T1r3LBD の相同性は、分子量レベルでの差は小さく (後者についてアミノ酸配列より計算したもので 104.6 KDa)、T1r3 同士のアミノ酸配列の同一性が 59.7%、T1r1 と T1r2a 間では 33.3% である。このことから、上述の条件検討の結果、良好な分解能で回折する T1r1/T1r3LBD 結晶が得られれば、構造決定自体は、メダカ T1r2a/T1r3LBD 構造を用いた分子置換法により、迅速に解析可能と推測される。

参考文献：

- [1] D. A. Yarmolinsky, *et al. Cell* **139**, 234 (2009).
- [2] J. P. Pin, *et al. Pharmacol. Ther.* **98**, 325 (2003).
- [3] G. Nelson, *et al. Cell* **106**, 381 (2001).
- [4] G. Nelson, *et al. Nature* **416**, 199 (2002).
- [5] X. Li, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 4692 (2002).
- [6] N. Nuemket, N. Yasui, *et al. Nat. Commun.* **8**, 15530 (2017).
- [7] Y. Ashikawa, *et al. Prot. Sci.* **20**, 1720 (2011).
- [8] A. Yamashita, *et al. Prot. Sci.* **26**, 2291 (2017).
- [9] E. Nango, *et al. Prot. Sci.* **26**, 2291 (2017).
- [10] Z. Otwinowski, W. E. Minor, *Methods Enzymol.* **276**, 307 (1997).

研究資金：

1. 日本学術振興会・最先端・次世代研究開発支援プログラム、課題番号 LS130、平成 22～25 年度、研究代表者。
2. うま味調味料技術部会・研究助成、平成 25～27 年、研究代表者。

©JASRI

(Received: August 27, 2018; Early edition: November 28, 2018;
Accepted: December 17, 2018; Published: January 25, 2019)