

## 放射光で視た甘味・うま味受容 ～味覚受容体 T1r の構造解析～

岡山大学 学術研究院医歯薬学域  
山下 敦子

### Abstract

味覚は、日々の食事で食物に含まれる化学物質を感知する生理反応である。味覚の生理反応は、食物中の味物質を味覚受容体タンパク質が結合し、生体内にシグナル伝達するところから始まる。一方、これらの仕組みの理解に欠かせない味覚受容体の構造は、近年まで明らかになっていなかった。筆者らは以前、SPring-8 を用いて、ヒトの甘味受容体やうま味受容体に該当するメダカ T1r2a/T1r3 の味物質結合領域の構造を、味覚受容体として初めて明らかにした。さらに最近、メダカの受容体に限らず、我々ヒトも含めた幅広い動物が持つ T1r3 に、塩化物イオン結合部位が存在することを、SPring-8 を用いた実験で見出し、実際に塩化物イオンが T1r を介して味覚で感知されることを解明した。本稿では、我々にとって身近な現象である甘味やうま味の受容について、SPring-8 での放射光実験から見えてきたことを報告する。

### 1. はじめに

味覚では、食物の中に含まれる化学物質を、甘味・うま味・苦味・酸味・塩味の基本の5つの味に分類して知覚する。我々の口腔内には、これらの味を呈する化学物質を感知する味覚受容体が存在し、味物質を結合して、生体内にシグナル伝達する役割を担っている<sup>[1]</sup>。味覚受容体は、基本五味それぞれに存在し、例えば甘味受容体やうま味受容体は、Taste receptor type 1 (T1r) と呼ばれるタンパク質で構成されている。ヒトでは、T1r2/T1r3 のヘテロ二量体が甘味受容体として機能し、糖などの甘味物質の受容を担う。また、T1r1/T1r3 ヘテロ二量体がうま味受容体として機能し、アミノ酸や核酸などのうま味物質の受容を担う。T1rはクラスC型Gタンパク質共役型受容体(GPCR) と呼ばれるタンパク質に分類されており<sup>[2]</sup>、細胞外に大きなリガンド結合ドメイン(LBD)を備え、このLBDで糖・アミノ酸・核酸などの主要な味物質を結合し、シグナル伝達することが報告されていた。一方、T1rの味物質認識の仕組みについては、T1rの構造解明が遅れていたため、近年まで明らかになっていなかった。

T1rの構造解明が阻まれていた理由は、構造解析に用いる試料調製のための組換え発現が、極めて困難なことであった。実際、ヒト T1r の構造は、いまだに解明されていない。一方、上述した基本五味に分類する

味覚受容システムは、脊椎動物で保存されており、T1rも、ほとんどの動物に存在する。筆者らは以前、さまざまな動物が持つ T1r の発現スクリーニングを実施し、メダカが持つ味覚受容体・T1r2a/T1r3 の LBD の試料調製を達成して<sup>[3]</sup>、SPring-8 を利用して結晶構造を解明した<sup>[4]</sup>。この構造は、T1r だけでなく味覚受容体として初めての構造報告例となり、現在でも報告されている唯一の T1r 構造である。さらに最近、メダカ T1r3 に塩化物イオン (Cl) が結合することを SPring-8 での実験から明らかにし、メダカだけでなくヒトも含めた幅広い動物の T1r3 に Cl 結合部位が存在しており、Cl の結合によって味覚を引き起こすことを解明した<sup>[5]</sup>。本稿では、以前報告した構造決定から最近報告した Cl 結合解析まで、SPring-8 を利用して行った T1r 構造解析と、そこからわかってきた味覚受容との関連を概説する。

### 2. 実験方法

メダカ由来 T1r2a/T1r3LBD は、ショウジョウバエ S2 細胞を用いて発現し、タンパク質に融合した FLAG タグを利用して、抗 FLAG タグ抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで、細胞培養上清から精製した。X線溶液散乱実験のための試料調製では、得られた精製タンパク質をさらにゲルろ過カラムクロマ

トグラフィーで精製した。結晶化のための試料調製では、精製タンパク質のFLAG タグ配列をプロテアーゼ (Factor Xa) で切断除去し、さらに糖鎖をグリコシダーゼ (Endo H) で切断除去した。ついで、抗メダカ T1r2a 抗体より調製した Fab 断片をタンパク質に結合させ、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行なって、T1r2a/T1r3LBD-Fab 複合体を精製した。いずれの場合でも、精製バッファーに各種アミノ酸を添加する (あるいはしない) ことで、目的とする味物質結合状態 (または非結合状態) のタンパク質試料を調製した。

X 線溶液散乱実験は、BL45XU にて、波長 1 Å の X 線を用いて実施した。L-グルタミン存在下およびアミノ酸非存在下の T1r2a/T1r3LBD 溶液についてそれぞれ測定を行い、PRIMUS を用いて解析したギニエプロットから回転半径を、GNOM を用いて解析した距離分布関数から粒子内最大距離を算出した。

結晶化は、T1r2a/T1r3LBD-Fab 複合体を用いて、PEG1000 と PEG500 を沈殿剤とし、シッティングドロップ蒸気拡散法により行った。ただし、Br 結合結晶については、NaCl 存在下で結晶を作製したのち、結晶化溶液中の NaCl を NaBr に置換した溶液をソーキングして、結晶中の Cl を Br に置換した。結晶の X 線回折強度データは、BL41XU にて、検出器として

PILATUS3 6M (DECTRIS) を用いて収集した。L-グルタミン (Gln)、L-アラニン (Ala)、L-アルギニン (Arg)、L-グルタミン酸 (Glu)、グリシン (Gly) 結合状態結晶は波長 1.0 Å、L-セレノメチオン結合状態結晶は波長 0.979 Å、Br / L-グルタミン結合状態結晶は波長 0.9194 Å、Cl / L-グルタミン結合状態結晶は波長 1.9 Å の X 線を用いてデータ収集を行った。得られたデータは HKL2000 または XDS を用いて処理し、Phaser を用いて、代謝型グルタミン酸受容体 LBD (PDB ID: 2E4U) および Fab 断片 (PDB ID: 1A6T) 構造を利用して、分子置換法により位相を決定した。

### 3. T1r2a/T1r3 へのアミノ酸結合とその作用<sup>3,4)</sup>

T1r2a/T1r3LBD は結晶化が困難で、当初得られた結晶の回折能も高いものではなかった。そこで、BL41XU の高輝度 X 線を利用することで、2.2 Å 分解能の回折強度データを収集し、立体構造を決定できた<sup>4)</sup> (図 1A)。T1r2a/T1r3LBD の結晶は、同受容体に対する味物質である L-アミノ酸存在下で作製し、実際、味物質認識を担うと予想されていた T1r2a に L-アミノ酸が結合していることが確認できた。一方、T1r3 の該当する部位にも、何らかの物質が結合していることを示す電子密度が観察された。T1r3 は、甘味受容体

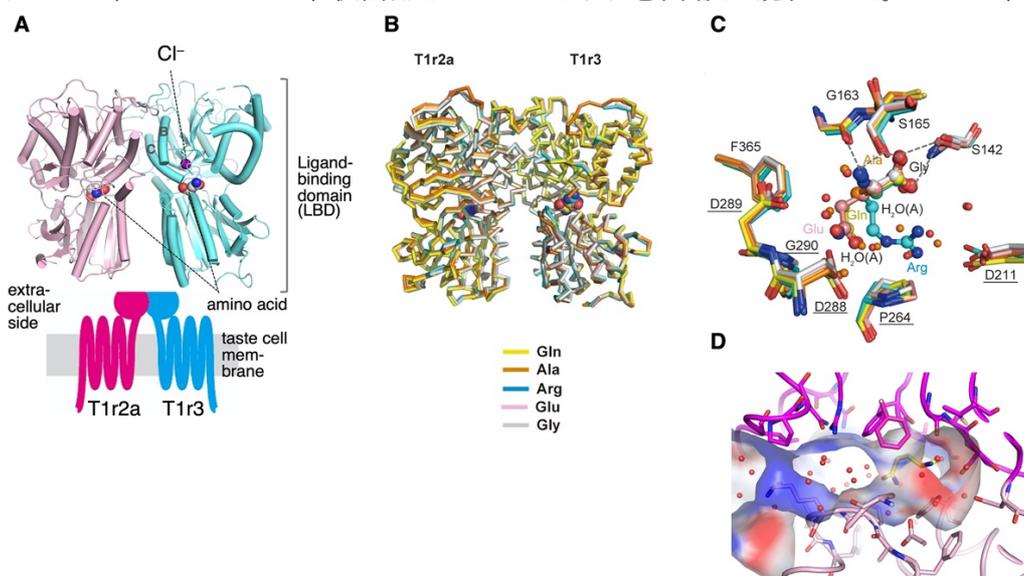


図 1 メダカ T1r2a/T1r3LBD の結晶構造。(A) T1r2a/T1r3 構造の概略図。LBD 部分は明らかになった結晶構造を示す。(B) L-グルタミン (Gln)、L-アラニン (Ala)、L-アルギニン (Arg)、L-グルタミン酸 (Glu)、グリシン (Gly) 結合 T1r2a/T1r3LBD 構造の重ね合わせ。(C) L-グルタミン、L-アラニン、L-アルギニン、L-グルタミン酸、グリシン結合 T1r2a リガンド結合部位の重ね合わせ。図中のアルファベットと数字は T1r2a 中の各アミノ酸残基のアミノ酸の 1 文字表記と残基番号を示す。(D) L-グルタミン結合 T1r2a のリガンド結合ポケットの構造。青、赤はそれぞれポケット表面の正、負の静電ポテンシャルを示す。図は文献 4, 5 より改変転載。

T1r2/T1r3 やうま味受容体 T1r1/T1r3 の共通サブユニットであり、それまで機能は明確になっていなかった。そこで、糖やアミノ酸など T1r の味物質として知られる物質について、BL41XU で異常分散効果を確認可能な核種を含む誘導体を添加して結晶を作製し、異常分散ピークの有無を指標にそれらの結合を調べた。その結果、Se を含有する L-セレノメチオニン存在下の結晶において、T1r3 に明瞭な異常分散ピークが確認できたことから、T1r3 も L-アミノ酸を結合することが明らかとなった。

T1r2a/T1r3LBD の構造は、クラス C 型 GPCR に共通する、Venus flytrap (ハエトリグサ) モジュール構造とよばれる、2つのサブドメインからなる構造をとっていた。そして、味物質となる L-アミノ酸は、この 2つのサブドメインの間の隙間に存在する結合部位に結合していた。興味深いことに、L-グルタミン、L-アラニン、L-アルギニン、L-グルタミン酸、グリシンといった、大きさ・電荷・疎水性度などの物理化学的性質の異なるさまざまな L-アミノ酸は、いずれも、T1r2a、T1r3 それぞれのサブユニットのアミノ酸結合部位におさまっており、どのアミノ酸が結合しているか、T1r2a/T1r3LBD は同じコンフォメーションをとっていることが判明した (図 1B, C)。

これらのアミノ酸の結合が、どのようにシグナル伝達を引き起こすのかを明らかにするため、アミノ酸非結合状態の構造解析を試みた。しかし残念ながら、アミノ酸非結合状態では結晶を得ることができなかった。そこで、アミノ酸存在下と非存在下における T1r2a/T1r3LBD 溶液の X 線散乱実験を行い、構造の

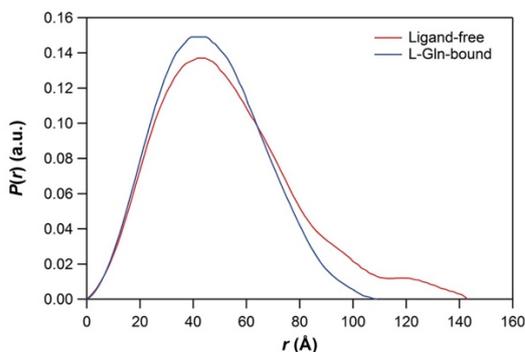


図 2 メダカ T1r2a/T1r3LBD の X 線溶液散乱実験から求めた距離分布関数。赤色はアミノ酸非存在下、青色はアミノ酸 L-グルタミン存在下での実験結果を示す。図は文献 3 より転載。

違いを解析した<sup>13)</sup>。その結果、アミノ酸非存在下とくらべ、アミノ酸存在下の T1r2a/T1r3LBD の回転半径や粒子内最大距離は小さく、結晶構造から見積もられる大きさと同程度であることが明らかとなった (同実験は分子科学研究所の Nano-Viewer システムを用いて再現性を確認した; 図 2)。したがって、T1r2a/T1r3LBD はアミノ酸の結合に伴い、広がった構造からコンパクトな構造に変化することがわかった。他のクラス C 型 GPCR でも、アゴニストの結合により、LBD の二量体間が広がった構造から、コンパクトな構造に変化し、この構造変化がシグナル伝達を引き起こすと考えられている<sup>14)</sup>。これらの結果から、T1r についても、アミノ酸が結合することで同様の構造変化が起こっているものと考えられた。

T1r2a や T1r3 のアミノ酸結合部位の構造を調べると、アミノ酸の多様性を生み出す置換基部分を受け入れるポケットは、容量が大きく、モザイク状の電荷分布を示しており、大きさや電荷にかかわらず多様なアミノ酸が結合できる構造となっていた。一方、アミノ酸の共通構造である  $\alpha$ -アミノ基やカルボキシ基は、共通した水素結合ネットワークで結合し、この部分の結合が LBD の構造変化に重要であることがわかった<sup>14)</sup>

(図 1C, D)。以上、放射光実験からわかったことと、実際の味覚との関連を考察すると、T1r2a/T1r3LBD の構造は、それまでに構造が報告されていた神経伝達物質などの生理活性物質の受容体とは異なる、味覚受容体特有の機能を示していることがわかった。生理活性物質受容体は、特定の生理活性物質を特異的に認識する機能が求められる。一方味覚では、食物に含まれる幅広い味物質を、限られた種類の受容体で認識する必要があることから、幅広い基質特異性を持つ受容体が多く見られる。例えばヒトの甘味受容体 T1r2/T1r3 が、単糖、二糖からオリゴ糖、さまざまな化学構造を持つ人工甘味料、甘味タンパク質まで、さまざまな物質に応答することもその一例である。実際、メダカ T1r2a/T1r3 は、幅広い L-アミノ酸に結合・応答することがわかっている<sup>14, 15)</sup>。今回放射光で視た T1r2a/T1r3LBD のアミノ酸結合部位は、幅広いアミノ酸を結合し、シグナル伝達につなげる仕組みをうまく説明できる構造を備えていた。

#### 4. T1r2a/T1r3 への塩化物イオン結合とその作用<sup>5)</sup>

上述したアミノ酸結合状態の結晶構造解析を進めていた過程で、T1r3 内のアミノ酸結合部位の上部に、アミノ酸の他に、水分子またはイオンと思われる物質が結合していることが見出された。結合距離や電子密度、結合部位を構成するアミノ酸の性質から、その物質が Cl<sup>-</sup> なのではないかと推測された (図 1A)。

そこでまず、この物質が本当に Cl<sup>-</sup> であるかどうかを確認するために、タンパク質結晶化に用いた溶液中の Cl<sup>-</sup> を Br<sup>-</sup> に置換した結晶を作製した。Br<sup>-</sup> であれば、BL41XU で実験可能な波長域で異常分散効果を確認することができるからである。実際に、Br<sup>-</sup> の特性吸収端近傍波長でデータ収集を行ったところ、元の結晶では Cl<sup>-</sup> と思われる物質が結合していた部位に、Br<sup>-</sup> 由来と思われる異常分散ピークが明確に確認され、この部位に確かにハロゲンイオンが結合できることを確認した (図 3A)。

さらに、元の結晶では実際に Cl<sup>-</sup> が結合しているのかを確認するため、Cl<sup>-</sup> 結合状態結晶の回折強度データを、BL41XU で実験可能な範囲としては最長の波長となる 1.9 Å の X 線を用いてデータ収集した。この波長は、Cl<sup>-</sup> の特性吸収端波長 (4.39 Å) からは離れているものの、Cl<sup>-</sup> も弱い異常分散シグナルを示すことが期待できる。一方で、Cl<sup>-</sup> だけではなく、タンパク質結晶に含まれる S や Ca などと同程度に弱いシグナルを示すことも予想される。そこで得られたデータを慎重に解析したところ、T1r3 に結合している Cl<sup>-</sup> 位置に異常分散ピークが確認され、その他に確認されたピークは全て、タンパク質のメチオニン残基やシステイン残基の S 原子に由来するものであることがわかった。この結果は、Photon Factory の BL-1A にて、さらに長

波長の 2.7 Å の X 線を用いた実験でも、再現性を確認することができた (なお、原著論文<sup>5)</sup>では、より長波長で測定した Photon Factory での実験データを報告している; 図 3B)。先ほどのハロゲンイオン結合実験結果とも考え合わせると、T1r3 には確かに Cl<sup>-</sup> が特異的に結合する部位が存在することが明らかになった。

メダカ T1r3 に結合している Cl<sup>-</sup> には、Thr105 の側鎖の水酸基と、Gln148-Ser149 の主鎖アミド基が配位していることがわかった (図 4)。調べると、Thr105 に相当するアミノ酸と、Gln148-Ser149 近傍のアミノ酸配列は、メダカだけでなく、ヒトも含めたほとんどの動物の T1r3 に保存されていることがわかり、これらの動物の T1r も Cl<sup>-</sup> 結合能を有することが示唆された。

放射光実験で初めて見つかったこの Cl<sup>-</sup> 結合が、T1r にどのような作用をもたらすかについては、知る限り

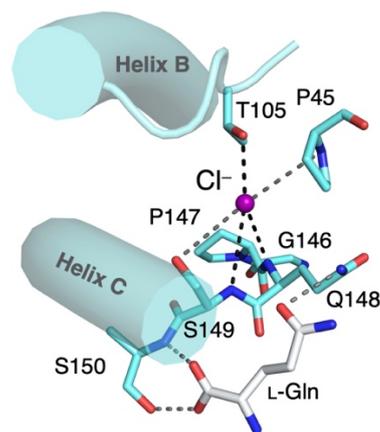


図 4 メダカ T1r3 の Cl<sup>-</sup> 結合部位とアミノ酸結合部位。図中のアルファベットと数字は T1r3 中の各アミノ酸残基のアミノ酸の 1 文字表記と残基番号を示す。Helix B, C は T1r2a/T1r3LBD の二量体界面を構成するヘリックス構造 (図 1A 図中に B, C と示すヘリックス構造)。図は文献 5 より転載。

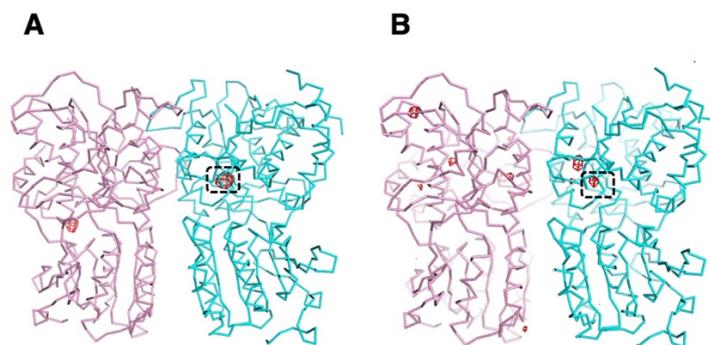


図 3 異常分散効果を利用したメダカ T1r2a/T1r3LBD におけるイオン結合解析。(A) Br<sup>-</sup> 結合結晶。(B) Cl<sup>-</sup> 結合結晶。赤色の電子密度はいずれも 4.5 rmsd の異常分散差フーリエピークを示す。図は文献 5 より転載。

において、これまで調べられた例がなかった。そこでまず、メダカ T1r2a/T1r3LBD を用いて調べたところ、Cl<sup>-</sup>は、結晶状態だけでなく溶液状態のタンパク質にも確かに結合し、結合によって LBD の構造変化を引き起こすことがわかった。さらにこの構造変化は、アミノ酸などの従来の味物質が引き起こすものと同様の変化であることが示唆された。実際、Cl<sup>-</sup>の結合部位も、味物質アミノ酸の結合部位も、シグナル伝達と関連する構造変化が起きる LBD 二量体界面の近傍にあり (図 1A、図 4)、これらの結合と解離が二量体構造変化を引き起こすものと考えられる。

以上、放射光実験からわかったことと、実際の味覚との関連を考察すると、食塩の味覚受容に T1r が関与する可能性が考えられた。塩味は、食塩の成分である Na<sup>+</sup>が塩味受容体 ENaC に作用して引き起こされる味覚であると理解されている<sup>[1]</sup>。一方、ENaC が Na<sup>+</sup>に応答する濃度域よりも低い数 mM 程度の食塩水は、甘いと感じられることが報告されていた<sup>[7]</sup>。上述したように、Cl<sup>-</sup>の結合部位が動物種を超えて T1r3 に保存されていること、低濃度食塩水の甘味はヒト甘味受容体 T1r2/T1r3 の阻害作用を持つギムネマ酸で阻害されること<sup>[7]</sup>、さらに上述したメダカ T1r2a/T1r3 に対する Cl<sup>-</sup>の作用濃度 (EC<sub>50</sub> 値) が約 1 mM 程度であることを考え合わせると、食塩の塩味成分・Na<sup>+</sup>の対アニオンである Cl<sup>-</sup>は、実は甘味やうま味の受容に関わる T1r で感知されている可能性が考えられる。実際我々も、マウスを用いた検証実験を行い、T1r からのシグナルを伝達する味神経は、Cl<sup>-</sup>のみの添加でも応答を示すこと、マウスは純水よりも Cl<sup>-</sup>を含む水を好んで多く飲むこと、これらの反応・行動は、T1r の阻害薬で阻害されることを確認した<sup>[6]</sup>。このことから、少なくともマウスでは、Cl<sup>-</sup>は実際に T1r を介して味覚で感知されることが証明された。

## 5. おわりに

我々は光を使って物を見る視覚によって、そのものがどういふもので、どういふことが起こっているのかを理解する。一方同じ五感の中でも、味覚は、化学物質を認識する化学感覚として知られる。今回の一連の実験では、日々経験しているはずの味覚においても、

実際に放射光という光を使って視ることで、初めて明らかになる、あるいは実は経験しているはずの現象の仕組みがわかる、という結果がもたらされた。このことは、放射光を利用した構造研究の重要性をあらためて感じさせる。味覚受容には、まだまだ解明されていない様々な謎が多く残っている。今後も、放射光利用と他の手法による解析を連関した受容体構造研究を進めていくことで、生命を支える摂食と大きな関わりを持つ味覚受容の仕組みを明らかにしていきたい。

本研究は BL41XU、BL45XU を利用し、理研ビームライン利用研究課題 No. 20120003、SPRING-8 利用研究課題 No. 2013A1162、2013B1113、2014A1085、2014A1859、2014B1147、2014B2021、2015A1074、2015B2074、2016A2534 にて実施しました。また、理研・南後恵理子博士、Nipawan Nuemket 博士、芦川雄二博士 (研究当時)、岡山大学・安井典久博士、渥美菜奈子氏をはじめとする多くの共同研究者のご協力のもとに実施しました。放射光実験について多大なご支援をいただいた JASRI・熊坂崇博士、長谷川和也博士、理研・山本雅貴博士、引間孝明博士をはじめとするビームラインサイエンティストの方々、共同研究者の方々にこの場を借りて心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] Taruno, A. *et al.*: *Pflugers Arch.* **473** (2021) 3-13.
- [2] Ellaihy, A., Gonzalez-Maeso, J., Logothetis, D. and Levitz, J.: *Trends Biochem Sci.* **45** (2020) 1049-1064.
- [3] Nango, E., *et al.*: *Sci Rep.* **6** (2016) 25745.
- [4] Nuemket, N. *et al.*: *Nat Commun.* **8** (2017) 15530.
- [5] Atsumi, N. *et al.*: *eLife* **12** (2023) e84291.
- [6] Yoshida, T. *et al.*: *PLoS One* **14** (2019) e0218909.
- [7] Bartoshuk, L.M., Murphy, C. and Cleveland, C.T.: *Physiol Behav.* **21** (1978) 609-613.

## 山下 敦子 YAMASHITA Atsuko

岡山大学 学術研究院医歯薬学域  
〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 1-1-1  
TEL : 086-251-7974  
e-mail : a\_yama@okayama-u.ac.jp