

論文内容要旨

苦味受容体 TAS2R における 苦味物質受容と受容修飾の分子機構

主指導教員：岡田 貢教授

(広島大学病院 障害者歯科学)

副指導教員：杉田 誠教授

(基礎生命科学部門 口腔生理学)

副指導教員：津賀 一弘教授

(応用生命科学部門 先端歯科補綴学)

松本 幸一郎

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文内容要旨

論文題目

苦味受容体 TAS2R における苦味物質受容と受容修飾の分子機構

学位申請者 松本 幸一郎

【緒言】

ヒトは甘味、塩味、酸味、苦味及びうま味の 5 つの味を基本味として感知し 5 基本味の組み合わせで食物の味を認識する。その味覚によりヒトは食物のおいしさを感じ、食べる喜び、ひいては生きる喜びを感じることができる。その中で甘味、うま味、弱い塩味には嗜好性を示すが一方、苦味、強い塩味、強い酸味には忌避性を示す。

味覚受容細胞において甘味、うま味、苦味はそれぞれ異なる G タンパク質共役型受容体 (GPCR) により受容され細胞内情報伝達分子の活性化を介し味細胞を興奮させる。その中で苦味物質は苦味受容体 (TAS2R) に作用し、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、神経伝達物質の放出を引き起こし、味細胞とシナプスを形成する味覚神経線維に活動電位を発生させる。

ヒトでは 25 種類、マウスでは 36 種類の TAS2R が明らかになっており、マウス TAS2R の中の 1 つ TAS2R105 は cycloheximide (CYX) に対する受容体と報告されている。しかし、TAS2R105 の遺伝子座近傍に存在する TAS2R104 と TAS2R114 に関し、どのような苦味物質と結合し、どのような活性化機構を示すのかはほとんど解明されていない。

そこで本研究では苦味受容に焦点を当て、培養細胞に発現させたマウス苦味受容体 (TAS2R105, TAS2R104, TAS2R114) はどのような苦味物質と結合し、いかに活性化を示すのか、その苦味物質受容と受容遮断の分子機構を解明することを目的とした。

【材料と方法】

マウス苦味受容体 TAS2R の中の TAS2R105, TAS2R104, TAS2R114 を BAC クローンより PCR 増幅し、pEGFP ベクターに挿入後 HEK293 細胞に G タンパク質 α サブユニット (G α 15) と共に遺伝子導入し発現させた。遺伝子導入後、培養液中に sodium butyrate を添加して受容体タンパク質の発現を促進した。そして蛍光性カルシウムイオン濃度指示薬 (Fura2/AM) を細胞外液に添加することで細胞内に Fura2 を負荷し以下の実験を行った。

各種苦味物質が TAS2R に結合した後に惹起される細胞内カルシウムイオン濃度の変化を、細胞内カルシウムイオン濃度解析システム (ARGUS/HiSCA) にて蛍光強度比 (F340/F380) を測定することより探究し、TAS2R に対してリガンドとなり得る苦味物質を検出するとともに、苦味物質受容の遮断薬として allyl isothiocyanate (AITC) がいかに機能するかを解析した。

さらに、TAS2R105 の細胞膜貫通領域で細胞外表面に近いアミノ酸で、且つ TAS2R104 と TAS2R114 でも保存されているアミノ酸を一部変異させた変異型 TAS2R105 (R55A, V97A, W98A, W141A, F145A, F188A) を作製し、同様に HEK293 細胞に遺伝子導入しカルシウムイメージングにより、CYX に対する応答性、AITC による苦味物質受容の遮断効果、高塩濃度下での CYX 応答性を探究した。そして野生型 TAS2R105 に比べ変異型 TAS2R105 の応答性に変化が生じるかを解析し、TAS2R105 における苦味物質受容と受容遮断に関与する分子構造基盤を

解析した。

【結果】

TAS2R104 もしくは TAS2R114 を発現する HEK293 細胞において、TAS2R104 と TAS2R114 が CYX に結合し活性化され細胞内カルシウム濃度上昇が惹起されるか解析を行ったところ、TAS2R104 と TAS2R114 は共に CYX に対する結合能を有し活性化されること、濃度依存性が異なり TAS2R104、TAS2R114 は TAS2R105 に比較し低応答性の CYX に対する受容体であることが明らかになった。

次に TAS2R104 と TAS2R114 が他の 5 種の苦味物質(denatonium benzoate(DEN), 6-n-propyl-thiouracil(PROP), phenylthiocarbamide(PTC), sucrose octaacetate(SOA), caffeine(CAF))で活性化されるか解析を行ったが、これらの苦味物質では TAS2R104、TAS2R114 は活性化されなかった。

また、AITC を CYX 刺激前に投与すると、TAS2R105、TAS2R104 および TAS2R114 発現細胞すべてにおいて細胞内カルシウムイオン濃度上昇は抑制されたことより AITC はこれらの受容体で共通して苦味受容を遮断できることが示された。

変異型 TAS2R105 (R55A, V97A, W98A, W141A, F145A, F188A)の中で、変異型 TAS2R105-V97A, W98A, W141A, F145A を発現する HEK293 細胞では、野生型 TAS2R105 を発現する細胞に比較し、CYX による細胞内カルシウム濃度上昇が増大した。この 6 種の変異体の中で AITC による苦味物質受容の遮断をキャンセルできる変異体は観察されなかった。TAS2R105-W98A と TAS2R105-F145A は野生型 TAS2R105 に比較し、高塩濃度下で CYX 応答性が増大した。

【考察】

本研究において TAS2R104 と TAS2R114 は比較的高濃度の CYX で活性化され他の 5 種の苦味物質では活性化されないことから、TAS2R104 と TAS2R114 は TAS2R105 と似た苦味物質受容能を有し TAS2R105 に比較し低応答性の CYX 受容体として機能することが示唆される。

AITC は高濃度塩味受容を遮断することが報告されているが、苦味受容においても TAS2R105, TAS2R104, TAS2R114 における苦味物質 CYX の結合から G タンパク質の活性化までの過程のいずれかを AITC は阻害しカルシウム応答を遮断させていることが細胞レベルで明らかとなった。今回作製した変異型 TAS2R105 (R55A, V97A, W98A, W141A, F145A, F188A)では AITC の苦味受容遮断効果を解除できないことから AITC は TAS2R105 中のそれらの変異挿入部以外の部位に結合し、苦味受容を遮断することが考えられた。

変異型 TAS2R105-V97A, W98A, W141A, F145A では TAS2R105 に比較し CYX 応答性に差が生じたことより、TAS2R105 中の 97,98,141,145 番目のアミノ酸は苦味物質 CYX の結合もしくはその後の受容体活性化に関与することが示唆される。TAS2R105-W98A, F145A では高塩濃度下で CYX 応答性に差が生じたことより、98 番目と 145 番目のアミノ酸は細胞外塩濃度依存的に苦味物質 CYX の受容に関与することが考えられる。

苦味受容機構と苦味遮断機構の探求から得られた知見を元に苦味受容を修飾する方策を導き出すことにより、QOL の向上に貢献できると考える。