

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	松本 幸一郎
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
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			
論文審査担当者			
主査	教授	兼松 隆	印
審査委員	教授	柴 秀樹	
審査委員	准教授	廣野 力	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>苦味受容味細胞は G タンパク質共役型受容体に属する苦味受容体(TAS2R)を発現し，各種苦味物質を受容し，G タンパク質やホスホリパーゼ C の活性化を介し，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す。ヒトでは 25 種類，マウスでは 36 種類の TAS2R が存在する。マウス TAS2R の中で，TAS2R105 は cycloheximide (CYX) に対する受容体として機能することが報告されているが，TAS2R105 の遺伝子座近傍に存在し，高い相同性を示す TAS2R104 と TAS2R114 が受容する苦味物質については未解明な部分が多い。また TAS2R105，TAS2R104，TAS2R114 の受容体分子内において苦味物質の受容に重要な役割を果たす領域やアミノ酸，及び TAS2R105，TAS2R104，TAS2R114 における苦味物質の受容を遮断する物質やその遮断機構についても不明な点が多い。本研究では培養細胞に遺伝子導入し発現させたマウス苦味受容体 TAS2R105，TAS2R104，TAS2R114 における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。</p> <p>方法として TAS2R105，TAS2R104，TAS2R114 を G タンパク質αサブユニット（Gα15）と共に HEK293 細胞に遺伝子導入し発現させた後，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 を細胞内に負荷し，細胞内 Fura2 の蛍光強度比(F340/F380)を ARGUS/HiSCA システムを用い経時的に計測することにより，各種苦味物質刺激により惹起される細胞内カルシウムイオン濃度の変化を解析した。そして本カルシウムイメージングにより HEK293 細胞に発現させた TAS2R105，TAS2R104，TAS2R114 に結合し細胞カルシウム濃度上昇を引き起こす苦味物質リガンドを検出するとともに，苦味受容遮断薬として 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，同様にカルシウムイメージングを</p>			

用いて、CYX に対する応答性、AITC による苦味物質受容の遮断効果、および高塩濃度下での CYX 応答性を探究した。そして野生型に比べ変異型 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。

結果として、TAS2R104 もしくは TAS2R114 を発現する HEK293 細胞においては高濃度の CYX 刺激により細胞内カルシウム濃度上昇が惹起された。TAS2R104 と TAS2R114 は denatonium benzoate , 6-n-propyl-thiouracil , phenylthiocarbamide , caffeine , sucrose octaacetate 等の他の苦味物質では活性化されず、TAS2R104 と TAS2R114 は共に TAS2R105 と似た苦味物質受容能を有し、TAS2R105 に比較し低反応性の CYX 受容体として機能することが示唆された。

また AITC は TAS2R105, TAS2R104 および TAS2R114 発現細胞すべてにおいて CYX による細胞内カルシウム濃度上昇を抑制することより、AITC は共通して 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。

変異型 TAS2R105 (R55A, V97A, W98A, W141A, F145A, F188A) の中で、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。TAS2R105 中の V97, W98, W141, F145 は苦味物質 CYX の結合もしくはその後の受容体活性化に抑制的に関与することが示唆された。この6種の変異体の中には AITC による苦味物質受容の遮断を解除できる変異体は検出されなかったことより、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。TAS2R105-W98A, F145A では野生型 TAS2R105 に比較し、高塩濃度下で CYX 応答性が増大したことより、W98 と F145 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示唆された。苦味受容体 TAS2R における苦味受容と苦味受容遮断の分子機構の探究から得られた知見を基にして、苦味受容を修飾する方策を導き出すことが可能となり、QOL の向上に貢献できる。

以上の結果から、本論文は、苦味受容体 TAS2R104 と TAS2R114 の苦味物質リガンドと受容特性を明らかにするとともに、AITC が TAS2R105, TAS2R104, TAS2R114 に共通して苦味物質受容を遮断する様式を解明した。さらに変異型 TAS2R105 を用い TAS2R105 の苦味物質受容と受容遮断の分子構造基盤を明らかにした。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。