

発表番号 53 (0347)

甘味タンパク質の味質に及ぼす塩の影響

助成研究者:北畠 直文(京都大学大学院農学研究科)

共同研究者:榊田 哲哉(京都大学大学院農学研究科)

味覚は生物が日常的な生活を営むうえで重要なシグナルである。苦味や酸味は毒物、腐敗物を忌避するシグナルとして、また甘味、うま味は栄養源のシグナルとして働く。精製されたタンパク質は通常味刺激をもたないが、例外的に甘味を呈するタンパク質の存在が知られている。熱帯植物由来のソーマチン、モネリンは古くから甘味を呈することが知られその立体構造も詳細にわかっている。鶏卵卵白中に存在する溶菌酵素リゾチームもまた甘味を呈することを見出したが未だこれら甘味タンパク質間に共通した配列、構造を特定するまでには至っていない。

タンパク質の特異的な機能発現は、その立体構造やアミノ酸の側鎖に依るところが多く、とりわけ分子表面に存在する残基が機能発現に関わっている可能性が高い。そこで、リゾチームのどのアミノ酸残基が甘味発現に重要な役割を担っているのかを化学修飾法や、遺伝子工学的手法を用いて明らかにすることを試みた。甘味特性評価は人に対して三点識別法による官能検査を行い、味の閾値を調べ、リゾチームの有する味刺激能の検討を行った(官能検査を行うに際し、十分な予備実験を行い、安全性を保障できる条件下で行った。かつ官能検査協力者には、予め実験の趣旨、内容説明を十二分に行い同意を得た)。水溶性カルボジイミドを用いた求核試薬グリシンメチルエステルやアミノメタンスルホン酸による化学修飾の結果、溶菌活性に関わるカルボキシル基は甘味発現には関係ないことが明らかになった。また、リジン側鎖の化学修飾においては側鎖の荷電状態を維持するグアニジル化の場合、甘味閾値に顕著な差が見られなかったのに対し、アセチル化やホスフォピリドキシル化においては修飾度合いが増加するにつれ、甘味閾値が顕著に増加したことから、リゾチームの甘味発現はリジン残基側鎖の塩基性度と相関があることが示唆された。さらに詳細に甘味に関わる部位を特定するために部位特異的変異を用いた遺伝子工学的手法により行った。変異タンパク質の発現系はメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いた。その結果、リジン残基をアルギニン残基に変えても甘味に対して顕著な影響はなかったが、リジン残基をアラニン残基に、アルギニン残基をアラニン残基に変えたものの中には顕著に甘味閾値が上昇するものがあり、これら領域がリゾチームの甘味発現に寄与しているものと考えられた。電荷を持つリジンやアルギニン残基の重要性が認められたので、次に官能検査に用いる溶媒の条件、塩濃度を変えその影響を検討した。その結果、塩濃度が増加するにつれ甘味閾値が上昇し、特に 50mMの塩濃度では甘味を検知できなかった。以上の結果から、リゾチームの ϵ -アミノ基やグアニジル基などの positive チャージを持つリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸残基がレセプタータンパク質と静電相互作用等を形成することで甘味の情報伝達を行っている可能性が示唆された。

21

助成番号 0347

甘味タンパク質の味質に及ぼす塩の影響

梶田 哲哉 京都大学大学院農学研究科

北畠 直文 京都大学大学院農学研究科

研究目的

味覚は生物が日常的な生活を営むうえで重要なシグナルである。苦味や酸味は毒物、腐敗物を忌避するシグナルとして、また甘味、うま味は栄養源のシグナルとして働く。精製されたタンパク質は一般的に味を呈さないが、例外的に甘味を呈するタンパク質の存在が知られている[1-7]。熱帯植物由来のソーマチン、モネリンは古くから甘味を呈することが知られその立体構造も詳細にわかっている。近年、Zucker を始めとするグループによりシクロース、サッカリンに対する甘味レセプターが同定され、G protein coupled receptor (GPCR)であるT1R2とT1R3のヘテロダイマーがこれら低分子の甘味物質を始め、甘味タンパク質であるソーマチン、モネリンをも認識していることが明らかとなった[8, 9]。しかしながら巨大分子である甘味タンパク質がこれらのレセプターに対し、サッカリンなどの低分子甘味料と同等の作用機作により情報伝達を行うか否かは未だ明らかになっておらず甘味タンパク質とレセプター間の様々なモデルが提唱されている[10-11]。

卵白は透明で粘性のある液体であるが、加熱を施すことにより変性、凝集及びゲル化を起こす。これまでに本研究者らは、pH、イオン強度などのゲル形成性に及ぼす知見を検討し、卵白タンパク質のゲル形成過程のメカニズムを明らかにしてきた。その過程に於いて卵白由来で甘味を呈するタンパク質を見出した。この甘味を呈する画分はアルブミンと異なった画分にあり、分子量からリゾチームと推定した。精製リゾチームについて官能検査を行ったところ確かにリゾチームが甘味を呈した。

リゾチームはバクテリア細胞壁のペプチドグリカンの *N*-acetyl muramic acid と *N*-acetyl glucosamines 間の β -1,4 結合を切断する溶菌酵素であり、酵素として初めてX線結晶構造解析が行われ、その立体構造も詳細に解っている[12, 13]。そのため様々な分野でモデルタンパク質として用いられている[14, 15]。しかしながら、その研究の多くは、溶菌のメカニズム、プロテインエンジニアリング等の生化学的なもので、リゾチームを甘味物質として食品化学的観点から研究を行っている例は皆無に等しい。

タンパク質の特異的な機能発現は、その立体構造やアミノ酸の側鎖に依るところが多く、とりわけ分子表面に存在する残基が機能発現に関わっている可能性が高い。そこで、リゾチームのどのアミノ酸残基が甘味発現に重要な役割を担っているのかを化学修飾法や、遺伝子工学的手法を用い明らかにすることを目的とした。リゾチームは、甘味の他に苦味、

渋味、旨味等を示し、溶媒の条件によってその味強度や味質が変化する。これらの変化は溶媒等に用いる塩濃度の影響を受けるものと考えられる。塩を賦与することにより、旨み等が増強されることはよく知られているが、甘味タンパク質に対しても同等の効果があるかは明らかになっていない。そこでこれら要因を明らかにするため種々の溶媒を用いた三点識別法による官能検査を行い、味の閾値を調べ、リゾチームの有する味刺激能の検討を行った。

2. 研究方法

2-1. リゾチームの調整

実験に用いる鶏卵卵白リゾチームは、塩化リゾチームを pH 9.5、塩化ナトリウム(5%) 溶液中で五回再結晶を行うことにより調整した。ダチョウ卵は長野県グリーンファームより購入し、ガチョウ卵は京都市動物園から供与していただいた。卵白を分離後、硫酸沈殿させ、イオン交換カラムにて精製した。純度は SDS-PAGE にて確認した。

2-2. 溶菌活性測定

溶菌活性の確認は *Micrococcus lutes* の懸濁液の濁度の減少を指標として評価した。吸光度 450 nm においてリゾチームを加えてから 1 分間において吸光度 0.001 減少を 1 unit とした。

2-3. 甘味特性評価

リゾチームの甘味特性評価は人による官能検査にて行った(以下官能検査を行うに際し、十分な予備実験を行い、安全性を保障できる条件下で行った。かつ官能検査協力者には、予め実験の趣旨、内容説明を十二分に行い同意を得た)。官能検査は三点識別法により行った。用いるサンプルは 5 ml とし、リゾチーム溶液を低濃度から高濃度(1, 2, 3, 5, 10, 20, 30 μ M) へと段階的に濃度を上昇させたサンプルとイオン交換水とを用いた比較を行った。甘味強度測定は、0: 味刺激なし、1: 味刺激あり(甘味と特定できない)、2: 甘い(甘味閾値)、3: 強い甘味、4: さらに強い甘味、と 5 点までの点数をつけ行った。渋味についても同等の数値を用い評価を行った。

2-4. 化学修飾法による甘味強度への影響

溶菌触媒残基の化学修飾による影響

溶菌活性に関わる触媒残基の化学修飾を行うことにより溶菌活性を消失させた修飾体を作製し、甘味に対する影響を検討した。リゾチーム溶液(700 μ M)を求核試薬であるグリシンメチルエステルやアミノメタンスルホン酸と混合し、水溶性カルボジイミドを加える

ことにより反応を開始させた。反応中 pH を 1N HCl を添加することで 4.75 に保った。反応開始後、経時的にサンプリングを行い、過剰量の酢酸緩衝液を加えることで反応を停止させた。硫酸沈殿後、十二分に透析を行い官能検査サンプルとした。

リゾチームの化学修飾による影響

リゾチームは等電点 11 の塩基性タンパク質であり、分子内にリジン残基 6 残基、アルギニン残基 11 残基もつ。そこでまず、リジン残基にターゲットを絞り、*o*-メチルイソウレアを用いたグアニジル化、無水酢酸を用いたアセチル化、ピリドキサル 5'リン酸を用いたホスフォピリドキサル化 (PLP 化) を行った。化学修飾を行った修飾体は硫酸沈殿後、十二分に透析を行い官能検査標品とした。各々の化学修飾体の修飾度合いは塩基性タンパク質用の native PAGE、及びトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を用いて評価した。PLP 化したリゾチームについてはより詳細に甘味発現に対する影響を検討すべく、陽イオン交換カラムを用いて HPLC により PLP の修飾度合いの異なる修飾体を分取した。

2 - 2 酵母 *Pichia pastoris* でのリゾチーム変異体の発現

リゾチーム変異体作製

リゾチームの変異導入は塩基性アミノ酸であるリジン残基、アルギニン残基にターゲットを絞り、それらをアラニン残基やアルギニン残基に変換する部位特異的変異を行った。正しく変異が導入されているか否かは、ベクター由来の M13 プライマーを用いて Big Dye Terminate 法により確認した。正しく変異の導入された遺伝子を酵母のシャトルベクター pPIC6 の *Xho* I, *Not* I サイトにライゲーションし、*Pichia pastoris* へ形質転換した。

ファーマンターによるリゾチームの発現

リゾチームの発現は 2 L のジャーファーマンターを用いた。4% のグリセロールを含む 1 . 3 L の FBS 培地に前培養した酵母を植菌後、28℃、pH 5、溶存酸素が 20% 以上になるよう至適化を行った。グリセロールが枯渇後、さらに細胞数を増加させるために 50% グリセロールを引き続き 8 時間添加した。タンパク質の誘導はメタノールの添加により開始し、72 時間行った。

培養上清からのリゾチーム精製

Pichia 培養液を遠心後、上清を限外ろ過にて濃縮し、陽イオン交換カラム CM - toyopearl 650M にアプライした。溶出は 0 から 0 . 5 M の NaCl のグラジエントにて行った。このように精製したタンパク質の純度を塩基性タンパク質用の native PAGE を行い確認した。また甘味特性評価は上述の三点識別法にて行った。

2 - 3 リゾチームの甘味に対する塩の影響

リゾチームは甘味の他に渋味や苦味等を呈する。これらの味は溶媒等の条件によってその強さや質が変化する。そこでリゾチーム溶液に種々の濃度の NaCl を添加することで味質に対してどのような影響をもたらすかを検討した。

3 . 研究結果・考察

3-1. 種々のリゾチームの甘味特性

リゾチームはそのアミノ酸配列、立体構造に基づき3つのタイプ(c-type, g-type, v-type)に分類されている。鶏卵リゾチームはc-type (chicken-type)に分類されており、アミノ酸129残基からなり、その分子量は14,500である。そこでc-type以外のリゾチームが甘味を呈するか否かを検討するため、g-type (goose-type)に属するガチョウ (goose), ダチョウ (ostrich) 卵白からリゾチームを精製し、その甘味特性を評価した。ガチョウ (goose), ダチョウ (ostrich) リゾチームの分子量は20,500であり、鶏卵リゾチームとは分子量、アミノ酸配列及び立体構造が大きく異なっていたが、鶏卵リゾチーム同様甘味を呈することがわかった (Figure 1, 2)。

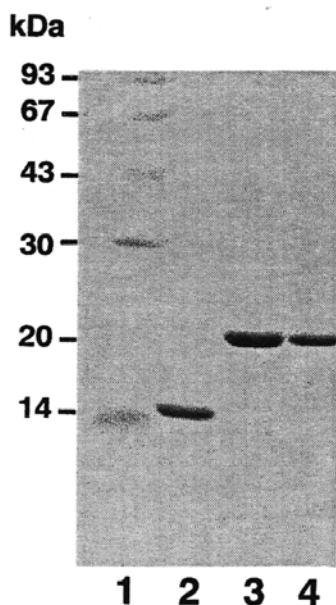


Figure 1 . SDS-PAGE analysis of hen and goose egg lysozymes. SDS-PAGE was performed on a 13.5% gel and stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, MW marker; lane 2, hen egg lysozyme; lane 3, goose egg lysozyme; lane 4, ostrich egg lysozyme.

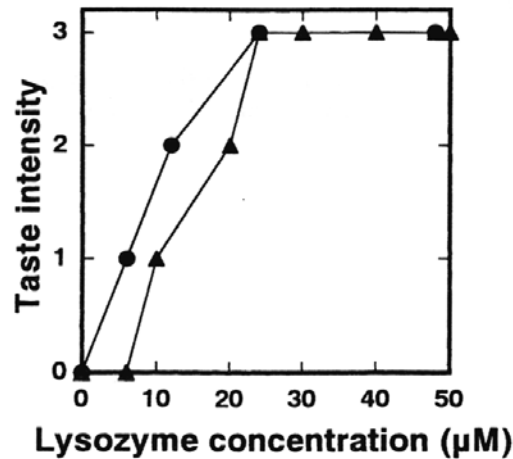


Figure 2 Sweetness intensity of goose egg lysozyme and hen egg lysozyme. The sweetness intensity of goose lysozyme (closed circle) and hen lysozyme (closed triangle) are plotted according to increases in concentration.

3-2. リゾチームの溶菌活性と甘味特性

溶菌活性に関わる触媒残基をグリシンメチルエステルやアミノメタンスルホン酸を用いた化学修飾を行い、溶菌活性を消失させたリゾチーム誘導体を作製した。双方の修飾においても溶菌活性は反応開始後急速に減少した(Figure 3)。これら修飾体の甘味特性評価を行ったが、甘味度は修飾を行っても変化せず、溶菌活性を消失したリゾチームもまた未修飾リゾチーム同様甘味を保持していたことから、リゾチームの甘味特性は、溶菌活性とは無関係であることが明らかになった(Figure 3)。

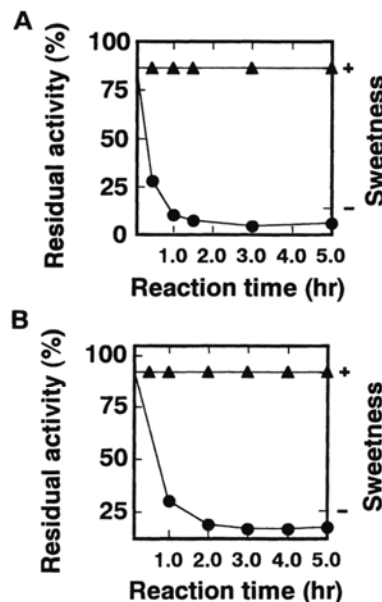


Figure 3 Sweetness and residual activity of chemically modified lysozymes. Lysozyme (700 μM) is chemically modified with (A) glycine methyl ester (1.0 M) and (B) aminomethansulfonic acid (0.25 M) in the presence of EDC, at pH 4.75. Closed circles indicate residual activity, and triangles indicate sweetness.

3-2. リジン残基の化学修飾による甘味に対する影響

グアニジル化による影響

リジン残基をホモアルギニンに変換するグアニジル化では TNBS による定量の結果、6 残基が修飾されていた。N 末端のアミノ基を含めるとリジン由来の ϵ -アミノ基は 7 つ存在するので、最大 7 ヲ所修飾される可能性があるがリゾチームの N 末端がリジンであるため、すべてのリジン残基が修飾されていると考えられた。塩基性タンパク質の Native PAGE の結果 (Figure 4) グアニジル化リゾチームの移動度は未修飾リゾチームとほぼ同等であるため、この化学修飾においてはリジン残基の側鎖の荷電状態はポジティブチャージに維持されていると考えられた。このグアニジル化リゾチームの官能検査を行ったところ、未修飾リゾチームとその甘味閾値が同等であった。グアニジル化によるリジン残基の修飾ではリゾチームの甘味に影響を与えないことが明らかとなった。

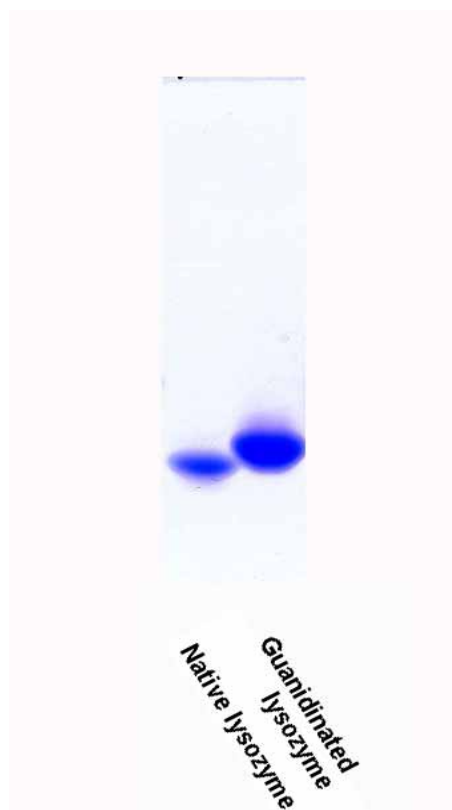


Figure 4. Native-PAGE analysis of guanidinated lysozyme.

アセチル化による影響

次にリジン残基のアセチル化を検討した。反応に用いる無水酢酸の量を 2 μ L から 150 μ L へと変化させることで修飾度合いの異なるアセチル化リゾチームを得ることを試みた。各々を電気泳動に供したところ無水酢酸の量が増加するにつれ、バンドの移動度が減少し、

表面電荷が減少していることが明らかになった(Figure. 5)。これらのうち2 μ L、30 μ L、150 μ Lの無水酢酸を用いたサンプルについて官能検査を行った。その結果、アセチル化の度合いが増加するにつれ甘味閾値が増大していた。

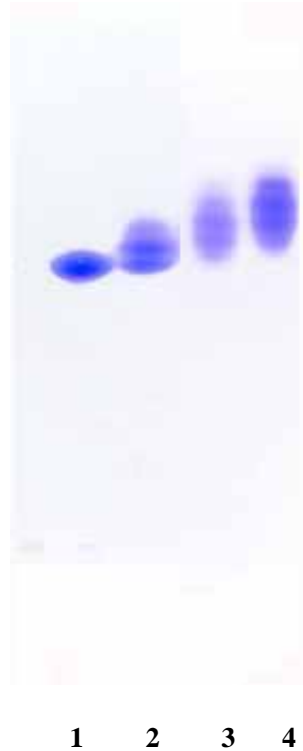


Figure 5. Native-PAGE analysis of acetylated lysozyme

Lane 1, native lysozyme, lane 2, Ac-lysozyme (2 μ L of acetic anhydride was used for reaction), lane 3, Ac-lysozyme (30 μ L), lane 4, Ac-lysozyme (150 μ L)

ホスフォピリドキサル化による影響

アセチル化によりリジン残基の側鎖の荷電状況が甘味閾値に影響を与えることが示唆されたので、アセチル化に比べさらに電荷環境を変化させることのできる pyridoxal-5'-リン酸 (PLP) を用い、リジン残基の側鎖に負電荷を導入することを試みた。また、修飾体混合物をさらに SP 陽イオン交換カラムを用いて PLP が 3 残基、2 残基、1 残基修飾されたリゾチームを分取し、各々を官能検査に供した。その結果、リゾチームの甘味閾値はリジン残基の PLP の修飾度合いが高まるにつれ増加した。4 残基修飾されたものは甘味を呈さなかった。この傾向はアセチル化の場合より顕著であった。以上のことよりリゾチームの甘味発現はリジン残基側鎖の塩基性度と相関があることが示唆された。

3-3. 酵母 *Pichia pastoris* でのリゾチーム変異体の発現

甘味タンパク質の特性評価には部位特異的変異体を用いた遺伝子工学的なアプローチが有力な手段である。大腸菌を用いた発現は広く行われているが、多くの場合インクルー

ジョンボディとして発現される。さらにリゾチームの場合、N末端にメチオニンが付加された状態で発現されるため立体構造に影響を与えるというデメリットがある。またリゾチームの甘味閾値が10 μM であるため甘味特性評価(官能検査)には多くのサンプル量が必要である。本研究室においては、先に甘味タンパク質であるソーマチンの *Pichia pastoris* における分泌発現に成功している[16]。リゾチームについても同等の手法を用い、2 Lのジャーファーマンターを用い培養条件の至適化を行うことで、官能検査に十分量の組み換え体の分泌発現に成功した[17]。得られた組み換え体リゾチームをプロテインシークエンサーに供したところN末端が正しくプロセスされており、卵白由来のネイティブリゾチームと同等の甘味特性、溶菌活性を有していた。このことより、リゾチームの甘味特性に与える影響を検討する上で *Pichia pastoris* の系を用いた各種変異体の作製が有効であることが確認できた。まずリジン残基の変異体について検討した。リジン残基をアルギニン残基に変換する K R 変異体を作製し、甘味に対する影響を検討したところ、これら変異体は甘味閾値に顕著な影響はなかった。しかしながらリジン残基をアラニン残基に変えた K A 変異体、アルギニン残基をアラニン残基に変えた R A 変異体の中には顕著に甘味閾値が上昇するものがあり、これら領域がリゾチームの甘味発現に寄与しているものと考えられた。

3-4. リゾチームの甘味に対する塩の影響

電荷を持つリジンやアルギニン残基の重要性が認められたので、次に官能検査に用いる溶媒の条件、塩濃度を変えその影響を検討した。その結果、塩濃度が増加するにつれ甘味閾値が上昇し、特に50mMの塩濃度では甘味を検知できなかった (Figure 6 A-D)。以上の結果から、リゾチームの -NH_2 基やグアニジル基などの positive チャージを持つリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸残基が甘味レセプターとイオン結合や静電相互作用等を形成する可能性が示唆された。

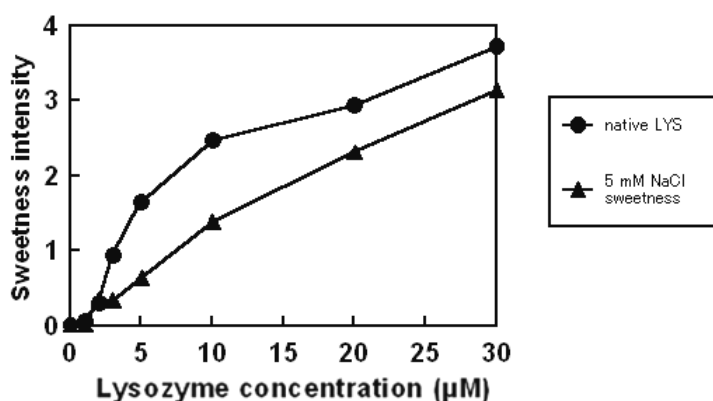


Figure 6A

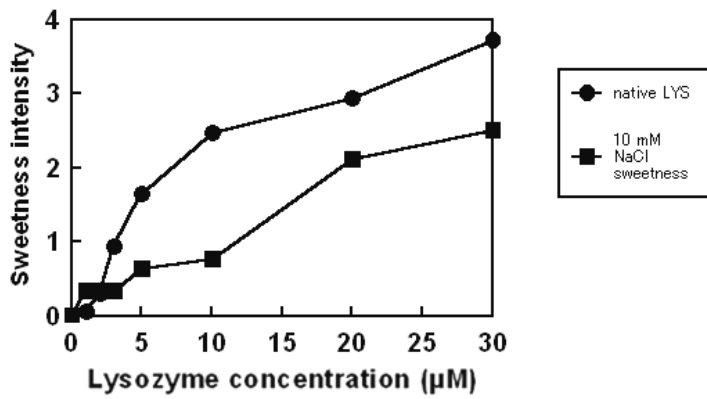


Figure 6B

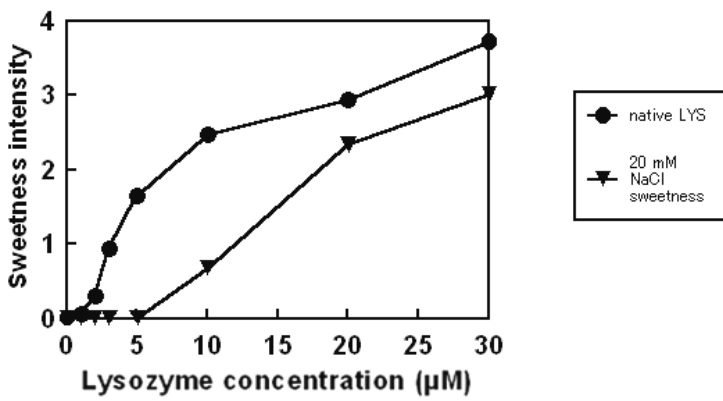


Figure 6C

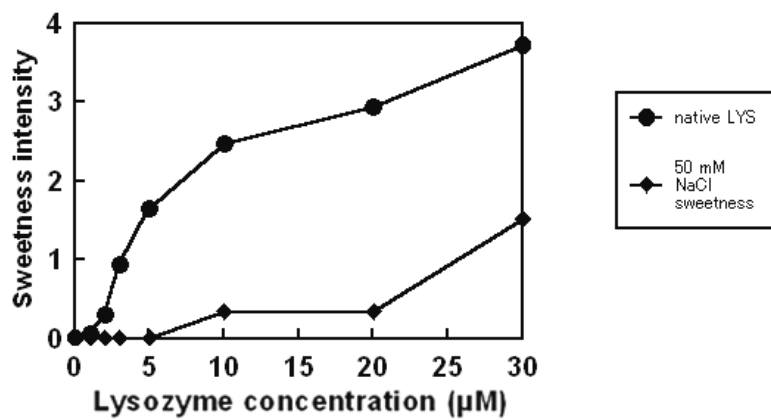


Figure 6D

文献等

- [1] H. van der Wel, K. Loeve, Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus danielli* Benth. *Eur. J. Biochem.* **31** (1972) 221-225.
- [2] H. van der Wel, Isolation and characterization of the sweet principle for *Dioscoreophyllum cumminsii* (Stapf) Diels. *FEBS Lett.* **21** (1972) 88-90.
- [3] J.A. Morris, R.H. Cagan, Purification of monellin, the sweet principle of *Dioscoreophyllum cumminsii*. *Biochem. Biophys. Acta.* **261** (1972) 114-122.
- [4] H. van der Wel, G. Larson, A. Hladik, C.M. Hladik, G. Hellekant, D. Glaser, Isolation and characterization of pentadin, the sweet principle of *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. *Chem. Senses* **264** (1989) 6655-6659.
- [5] X. Liu, Z. Hu, S. Maeda, T. Aiuchi, K. Nakaya, Y. Kurihara, Purification, complete amino acid sequence and structure characterization of the heat stable sweet protein, mabinlin II. *Eur. J. Biochem.* **211** (1993) 281-287.
- [6] H. Yamashita, A. Theeraship, T. Nakaya, Y. Nakamura, Y. Kurihara, Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein with taste-modifying activity, curculin. *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 15770-15775.
- [7] D. Ming, G. Hellekant, Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS Lett.* **355** (1994) 106-108.
- [8] X. Li, J. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller, E. Adler, Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (2002) 4692-4696.
- [9] G.Q. Zhao, Y. Zhang, M.A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N.J.P. Ryba, C.S. Zuker, The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115** (2003) 255-266.
- [10] P.A. Temussi, Why are sweet proteins sweet? Interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor. *FEBS Lett.* **526** (2002) 1-4.
- [11] R. Spadaccini, F. Trabucco, G. Saviano, D. Picone, O. Crescenzi, T. Tancredi, P.A. Temussi, The mechanism of interaction of sweet proteins with the T1R2-T1R3 receptor: Evidence from the solution structure of G16A-MNEI. *J. Mol. Biol.* **328** (2003) 683-692.

- [12] C.C.F. Blake, L.N. Johnson, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, V.R. Sarma, Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc. R. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* **167** (1967) 378-388.
- [13] D.C. Phillips, The hen egg white lysozyme molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **57** (1967) 484-495.
- [14] T. Imoto, L.N. Johnson, A.C.T. North, D.C. Phillips, J.A. Rupley, *The Enzymes*, vol. 7, in: P.D. Boyer, (ed.), Academic Press, New York, 1972, pp. 665-868.
- [15] P. Jollès, J. Jollès, Review of progress in lysozyme research. *Mol. Cell. Biochem.* **53** (1984) 165-189.
- [16] T. Masuda, S. Tamaki, R. Kaneko, R. Wada, Y. Fujita, A. Mehta, N. Kitabatake, Cloning, Expression and Characterization of Recombinant Sweet-Protein Thaumatin II Using the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **85** (2004) 761-769.
- [17] T. Masuda, Y. Ueno, N. Kitabatake, High yield expression of sweet-tasting protein lysozyme in the yeast *Pichia pastoris*. *in preparation*

Effects of salts on the elicitation of sweetness of sweet-tasting protein

Tetsuya MASUDA and Naofumi KITABATAKE

Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

Summary

Lysozyme is one of the most thoroughly characterized enzymes, and one of the sweet-tasting proteins. However, a detailed explanation of the sweetness of the hen egg white lysozyme (HEL) is as yet unknown.

At first in order to clarify the relationship between the sweetness and enzymatic activities of lysozyme, chemical modification of carboxyl residues were attempted. Modification of lysozyme by glycine methylester or aminomethansulfonic acid resulted in the loss of enzymatic activity. On the contrary the sweetness of lysozyme was fully retained. These results indicate that both enzymatic and sweetness activities were independent each other.

Second, to clarify the functional regions for elicitation of sweetness of lysozyme, the effect of the side chain of lysine was investigated by chemical modification method. Three types of chemically modified variants (guanidination, acetylation, and phosphopyridoxylation) were prepared. These results indicated that positive charges of side chain of lysine residues influenced on the sweetness of lysozyme and blocking the positive charge or introduction of negative charge in lysine residues resulted in the loss of sweetness.

Next, to obtain the detailed information on the sweetness of lysozyme, site-directed mutagenesis studies using *Pichia* expression systems were also performed. A series of lysozyme mutants, single, double, triple mutants at various regions were prepared. Mutations of lysine to arginine residues, lysine to alanine residues, arginine to alanine residues have been performed to elucidate the critical regions of sweetness of lysozyme in detail.

Taken together these results, finally, effects of salts on the elicitation of sweetness of lysozyme were investigated in detail. The results demonstrated that electrostatic interaction would play a significant role in the interaction the sweet-tasting protein and receptor.