

塩化物イオンによる甘味受容体やうま味受容体制御の 構造生物学・生物物理学的検証

山下 敦子

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

概要 塩味は、対イオンが塩化物イオンのときに最も強く感じられることから、塩化物イオンも何らかの形で味覚に関与していると考えられている。一方、味覚において塩化物イオンがどのように認識されているのかについての全貌は、未だ明確にされているとは言い難い。味蕾には、それぞれの味質を呈する味物質を認識する味覚受容体が存在するが、助成研究者らは、ヒトで甘味およびうま味受容を担う Taste receptor type 1 (T1r) について、メダカ由来でアミノ酸受容体である、T1r2a/T1r3 のリガンド結合ドメイン (LBD) の立体構造を、味覚受容体として初めて決定した。この構造解析の過程で、T1r3 サブユニットのアミノ酸結合部位のすぐ近傍に、塩化物イオンが特異的に結合していることを見出した。一方で、T1r に対する塩化物イオン結合が、甘味受容およびうま味受容に何らかの影響を与えるかどうかについては、これまでに報告がない。そこで本研究では、T1r の代表例として、唯一組換え発現および試料調製に成功し、構造解析系および生物物理学的機能解析系が確立できているメダカ T1r2a/T1r3LBD を利用し、塩化物イオンの同受容体への結合が、受容体タンパク質および受容体によるアミノ酸結合にどのような影響を与えるのかについて解析を行った。その結果、塩化物イオンが実際に T1r2a/T1r3LBD に結合を示すことを等温滴定カロリメトリーで立証するとともに、塩化物イオンの結合が、同タンパク質を熱安定化させることを明らかとした。一方、同タンパク質に対するアミノ酸結合の親和性や、アミノ酸結合が引き起こす受容体タンパク質構造変化の作用濃度域は、塩化物イオンの有無によっては差異が見られなかった。これらのことから、T1r2a/T1r3 への塩化物イオンの結合は、同受容体の味物質であるアミノ酸への応答には顕著な影響を与えないことが示唆された。

1. 研究目的

私たちは、食品に含まれるさまざまな成分を、甘味・うま味・塩味・酸味・苦味の基本五味に分類し、味覚によって感知している。味覚では、口腔内に存在する味覚器である味蕾の味細胞に存在する味覚受容体が、味を呈する化学物質である味物質を結合することから始まる⁽¹⁾。例えば、塩味は、ナトリウムイオンが塩味受容体である上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) に結合することで引き起こされる味と考えられている⁽²⁾。塩味は、対イオンが塩化物イオンのときに最も強く感じられることから⁽³⁾、塩化物イオンも何らかの形で味覚に関与していると考えられる。一方 ENaC に対しては、塩化物イオンはむしろその活性を阻害すると

の報告がされている^(4,5)。また、ENaC の立体構造も報告されているが、構造中では、塩化物イオンの結合部位は同定されていない^(6,7)。さらに、生理学的・薬理的な結果からも、塩化物イオンは ENaC を介さない形で感知されていると考えられている⁽⁸⁾。これらの状況から、味覚において塩化物イオンがどのように認識されているかについての全貌は、未だ明確にされているとは言い難い。

味覚受容体は、塩味受容体以外にも、それぞれの味質ごとの味物質を認識する味覚受容体が存在する。この中で、甘味およびうま味受容を担うのが、Taste receptor type 1 (T1r) である⁽⁹⁻¹¹⁾。T1r はクラス C 型 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に属しており、T1r1 と T1r3 または T1r2 と

T1r3 のヘテロ二量体が、ヒトではそれぞれうま味または甘味の受容体として機能している。T1r には大きな細胞外領域が存在し、そのリガンド結合ドメイン (Ligand-binding domain, LBD) において糖やアミノ酸などの主要な味物質を認識する。助成研究者らはこのうち、メダカ由来でアミノ酸受容体である、T1r2a/T1r3LBD ヘテロ二量体の構造を、味覚受容体として初めて決定した (Fig. 1)⁽¹²⁾。T1r の LBD は Venus flytrap module と呼ばれる 2 つのサブドメインから構成される構造をとっており、T1r2a, T1r3 それぞれのサブユニットのサブドメイン間の隙間で、味物質であるアミノ酸を結合・認識していることを明らかとした。また、このアミノ酸の結合により LBD が構造変化すること、この構造変化が T1r によるシグナル伝達を誘起すると考えられることを報告した⁽¹³⁾。

一方、構造解析の過程で、T1r3 サブユニットのアミノ酸結合部位のすぐ近傍に、塩化物イオンが特異的に結合していることを見出した (Fig. 1)。アミノ酸配列上の相同性から、この部位は、メダカ T1r3 だけでなく、ヒトも含めたほとんどの T1r3 で保存されていると予想される (Fig. 2)。さらにこの部位は、同じクラス C 型 GPCR の他の受容体でも、イオン結合部位となっていることが報告されている。例えば、代謝型グルタミン酸受容体においても、当該部位に塩化物イオンが結合することが推測されており、塩化物イオンとグルタミン酸の結合に正の協同性が見られたことから、塩化物イオンがアゴニストに対する正のアロステリック・モジュレータとして機能することが報告されている⁽¹⁴⁾。また、カルシウム感知受容体においては、当該部位が同受容体のアゴニストであるカルシウムイオン結合部位の 1 つであると報告されている⁽¹⁵⁾。一方で、T1r に対する塩化物イオン結合が、甘味受容およびうま味受容に何らかの影響を与えるかどうかについては、これまでに報告がない。

T1r は組換え発現が困難なタンパク質であり、機能を保持したヘテロ二量体試料の組換え発現および試料調製が成功している例は、現時点で助成研究者らのメダカ T1r2a/T1r3LBD の他に報告はない。そこで本研究では、T1r の代表例として、唯一組換え発現および試料調製に成功し、構造解析系および生物物理学的機能解析系が確立できているメダカ T1r2a/T1r3LBD を利用し、塩化物イオンの同受容体への結合が同受容体にどのような影響を与えるかを解析した。さらに、同受容体の味物質であるア

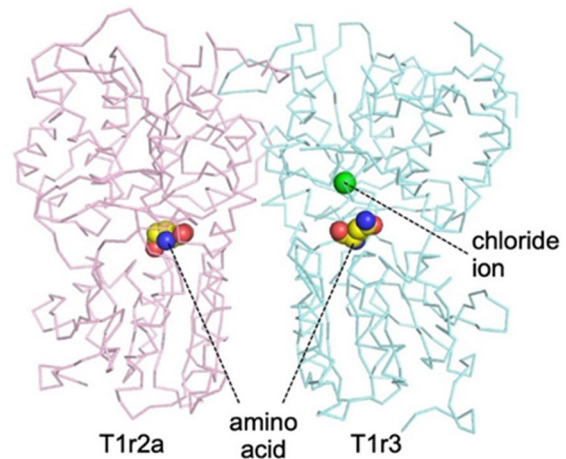


Figure 1. Crystal structure of medaka T1r2a/T1r3LBD. (PDB ID: 5X2M)

mft1r2a	S	L	P	N	V	S	L	G	Y	Q	M	F	D	H	C	S	D	.	I	H	S
mft1r3	Q	L	P	G	V	K	L	G	Y	K	I	Y	N	T	C	R	H	S	A	V	I
ht1r1	A	L	P	N	I	T	L	G	Y	Q	L	Y	D	V	C	S	D	S	A	N	V
ct1r1	A	L	P	N	V	T	L	G	Y	E	I	H	D	T	C	T	E	A	.	N	.
alt1r1	D	L	P	N	V	T	L	G	Y	E	I	Y	D	A	C	G	P	.	L	A	N
mft1r1	H	L	P	G	V	K	L	G	Y	Q	I	Y	D	V	C	S	I	P	A	S	V
ht1r2	S	L	P	G	V	L	L	G	Y	E	I	V	D	V	C	Y	I	.	S	N	N
alt1r2	A	L	P	G	L	S	L	G	Y	E	I	F	D	V	C	Y	L	.	T	N	I
ht1r3	D	L	P	G	L	R	L	G	Y	D	L	F	I	T	C	S	E	P	V	V	A
ct1r3	S	L	P	G	V	E	L	G	Y	D	I	Y	I	T	C	F	E	P	L	A	A
alT1r3	T	L	P	G	I	T	L	G	Y	D	F	Y	I	S	C	M	E	P	V	V	V
rmglur1	V	L	P	N	I	T	L	G	S	E	I	R	I	S	C	W	H	S	S	V	A
hCaSR	A	L	P	N	L	T	L	G	Y	R	I	F	I	T	C	N	K	T	V	S	K
hGBR1b	D	I	L	P	D	Y	E	L	K	L	I	H	H	I	S	K	C	D	P	G	Q
hGBR2	S	L	L	R	P	Y	F	L	D	L	R	L	Y	I	T	E	C	D	N	A	K

Figure 2. Amino acid sequence alignment of the chloride binding region of T1r. The label ahead of each T1r sequence indicates the source organism of the receptors, such as mf, medaka; h: human; c, chicken; al, green anole. The sequences for the other class C GPCRs with reported crystal structures, such as rmglur1 (rat metabotropic glutamate receptor 1), hCaSR (human calcium-sensing receptor), hGBR1b (human GABA_B receptor 1b), hGBR2 (human GABA_B receptor 2) are also shown.

ミノ酸の受容体への結合が、塩化物イオン結合により何らかの制御を受けるかどうかについて、解析を行った。

2. 研究方法

等温滴定熱量計および示差走査蛍光測定に用いるメダカ T1r2a/T1r3LBD 試料は、既報に基づき調製した^(12, 13)。具体的には、既に構築しているメダカ T1r2a/T1r3LBD 安

定発現ショウジョウバエ S2 細胞の培養上清から, Anti FLAG M2 affinity gel (SIGMA) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより試料精製を行った。

等温滴定カロリメトリーによる塩化物イオンおよびアミノ酸の結合解析は, MicroCal iTC200 (GE Healthcare) を用いて, 既報に基づき行った⁽¹³⁾。塩化物イオン結合解析においては, 試料の緩衝液成分を, 20 mM HEPES-Tris, 300 mM Na gluconate, pH 7.5 とし, この試料に NaCl 溶液を滴定することで, 結合熱を測定した。また, アミノ酸結合解析では, 試料の緩衝液成分を, 塩化物イオン存在下条件では, 20 mM HEPES-Tris, 300 mM NaCl, pH 7.5, 塩化物イオン非存在下条件では 20 mM HEPES-Tris, 300 mM Na gluconate, pH 7.5 とし, l-glutamine 溶液を滴定することで, 結合熱を測定した。いずれの条件においても, 精製 T1r2a/T1r3LBD 試料は, 実験直前に透析により所定の条件への緩衝液交換を行い, 測定に用いた。得られた結果から, Origin (Light Stone) を用いて, One site binding mode で計算することで解離定数 K_d 値を算出した。

示差走査蛍光測定による熱変性解析は, StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) および Protein Thermal Shift Dye (Applied Biosystems) を用いて, 既報に基づき行った⁽¹⁶⁾。上述の等温滴定カロリメトリーによるアミノ酸結合解析と同様に, 実験直前に透析により緩衝液交換を行って, 塩化物イオン存在下および非存在下での試料を調製し, 測定を実施した。得られた結果から, Protein Thermal Shift Software (Applied Biosystems) を用いて Derivative T_m を求め, 融解温度 T_m 値とした。

蛍光共鳴エネルギー移動法による受容体タンパク質の構造変化の解析は, Cerulean 融合 T1r2aLBD/ Venus 融合 T1r3LBD ヘテロ二量体安定発現ショウジョウバエ S2 細胞の培養上清から, Anti FLAG M2 affinity gel (SIGMA) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した試料を用いて行った^(12, 13)。得られた試料は, 上述の等温滴定カロリメトリーによるアミノ酸結合解析と同様に, 実験直前に透析により緩衝液交換を行って, 塩化物イオン存在下および非存在下条件とした。これらの試料に各種濃度の l-glutamine 溶液を添加し, 励起波長 433 nm における 475 nm および 526 nm の蛍光強度を蛍光分光光度計 Fluoromax 4 (堀場製作所) を用いて測定した。526 nm での蛍光強度を 475 nm での蛍光強度で割った値を FRET

index とし, 得られた値を Hill 式に fitting することで, EC_{50} 値を算出した。

塩化物イオン非存在下でのメダカ T1r2a/T1r3LBD 結晶化は, 基本的には既報に基づき⁽¹²⁾, 一部の緩衝液条件を変更することで実施した。具体的には, kifunensine (Carbosynth) 存在下で培養した安定発現ショウジョウバエ S2 細胞の培養上清から, Anti FLAG M2 affinity gel を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより発現タンパク質を回収し, Factor Xa (Enzyme Research Laboratories) を用いた精製タグ切断, Endo H を用いた糖鎖切断を行うところまでの試料調製過程は, 既報⁽¹²⁾と同様に行った。また, 抗 T1r2a モノクローナル抗体 16A からの Fab 断片 (Fab16A) も既報⁽¹²⁾と同様に調製した。得られたメダカ T1r2a/T1r3LBD 試料と Fab16A を混合し, 20 mM HEPES-NaOH, 300 mM Na gluconate, 2 mM Ca gluconate, 5 mM l-glutamine を緩衝液として, HiLoad 16/60 Superdex200 prep grade (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行うことで, T1r2a/T1r3LBD-Fab16A 複合体を精製した。得られた試料を限外ろ過濃縮することで緩衝液交換を行い, 試料中の HEPES-NaOH を 10 mM まで, Na gluconate を 50 mM まで減少させた。得られた試料をもとに, 既報⁽¹²⁾と同様に結晶化を行った。X 線回折強度データ収集は, SPring-8 の BL41XU にて, 波長 1 Å の X 線および検出器 EIGER16M (DECTRIS) を用いて行い, 得られたデータは XDS⁽¹⁷⁾により処理した。

3. 研究結果

T1r に対する塩化物イオンの結合については, これまでに明確な報告はない。また, メダカ T1r2a/T1r3LBD への塩化物イオンの結合は, 以前行った X 線結晶構造解析⁽¹²⁾において, 得られた電子密度や受容体タンパク質との結合距離に基づいて同定したものであったが, 生化学的あるいは生物物理学的な検証はできていなかった。そこで, 実際にメダカ T1r2a/T1r3LBD に対し塩化物イオンが結合を示すどうかを調べるため, 等温滴定カロリメトリーを用いて, 塩化物イオンを除いたメダカ T1r2a/T1r3LBD に対し塩化物イオンを滴定することで, 結合熱が発生するかどうかを解析した。その結果, 塩化物イオンの添加により, 実際に結合熱の発生が検出されたことから, 同受容体タンパク質に対する塩化物イオンの結合を生物物理学的に立証することができた。なお, 得られた結合熱から算出された

解離定数 K_d 値は、およそ数十~数百 μM のレベルであることが明らかとなった。

次に、塩化物イオンの結合が、受容体タンパク質にどのような影響を与えるかを調べるため、示差走査蛍光測定法を用いて、塩化物イオン存在下および非存在下におけるメダカ T1r2a/T1r3LBD の熱安定性を比較した。助成研究者らはすでに、塩化物イオンが存在する条件下での T1r2a/T1r3LBD の融解温度 T_m 値を示差走査蛍光測定法を用いて解析した結果、 $53.0 \text{ \AA} \pm 0.07 \text{ }^\circ\text{C}$ であることを報告しており⁽¹⁶⁾、今回の緩衝液成分での塩化物イオン存在下条件においても、同様の T_m 値が観測された。一方、塩化物イオン非存在下では、塩化物イオン存在下と比較して、 T_m 値が大きく減少することが判明した。この結果から、T1r2a/T1r3LBD への塩化物イオンの結合は、同タンパク質を熱安定化させることが示唆された。

さらに、T1r2a/T1r3LBD への塩化物イオンの結合が、同受容体の味物質であるアミノ酸の結合に何らかの影響を与えるかどうかについて、等温滴定カロリメトリーを用いて解析した。助成研究者らはすでに、塩化物イオンが存在する条件で等温滴定カロリメトリーを用いて解析した T1r2a/T1r3LBD に対する l-glutamine の K_d 値が $8.9 \mu\text{M}$ であることを報告しており⁽¹³⁾、今回の測定における塩化物イオン存在下での結果からも、同様の K_d 値が算出された。一方、緩衝液中の塩化物イオンを、同受容体に結合を示さない 1 価アニオンであるグルコン酸に置換した、塩化物イオン非存在下における l-glutamine の K_d 値についても、塩化物イオン存在下とほとんど変わらない値が得られた。このことから、T1r2a/T1r3LBD への塩化物イオンの結合は、アミノ酸結合には顕著な影響を与えないことが示唆された。

T1r2a/T1r3LBD へのアミノ酸の結合に対する塩化物イオンの影響をさらに検証するため、蛍光タンパク質融合体試料を用いて、アミノ酸結合に伴う受容体タンパク質の構造変化を蛍光共鳴エネルギー移動法で解析した。助成研究者らは、T1r2a/T1r3LBD に対するアミノ酸結合に関して、等温滴定カロリメトリーで得られる K_d 値と、蛍光タンパク質融合体試料を用いて蛍光共鳴エネルギー移動法で観察される蛍光強度変化の EC_{50} 値がほぼ一致することから、アミノ酸結合に伴い T1r2a/T1r3LBD が構造変化をすること、この構造変化を蛍光共鳴エネルギー移動法により検

出できることを報告している⁽¹³⁾。本研究において、塩化物イオン存在下または非存在下で蛍光タンパク質融合 T1r2a/T1r3LBD に l-glutamine を添加したところ、得られた蛍光強度変化の EC_{50} 値はほぼ一致し、等温滴定カロリメトリーでの測定結果と矛盾のない結果が得られた。この結果から、T1r2a/T1r3LBD への塩化物イオンの結合は、アミノ酸の結合が引き起こす同受容体タンパク質の構造変化にも影響を与えないことが示唆された。

最後に、T1r2a/T1r3LBD への塩化物イオン結合が同受容体に与える構造学的な影響を調べるため、塩化物イオン非存在下での T1r2a/T1r3LBD 結晶化を試みた。すでに報告している T1r2a/T1r3LBD 結晶構造⁽¹²⁾は、塩化物イオン存在下で精製・結晶化を行ったものであるが、今回の研究において、塩化物イオン非存在下でも、T1r2a/T1r3LBD タンパク質と Fab16 との複合体を、存在下と同様に精製することができた。得られたタンパク質を結晶化した結果、塩化物イオン存在下とほぼ同様の条件下で、これまで得られていた結晶と形状がよく似た棒状の結晶を得ることができた (Fig. 3)。一方、当該結晶は、短辺が数 μm 、長辺でも 20 μm 程度と結晶サイズが極めて小さかった。研究期間終了後、SPring-8 でのビームタイムを得て、X 回折強度データ収集を試みたが、7 \AA 分解能という、構造解析には不十分な低分解能のデータしか得ることができなかった。

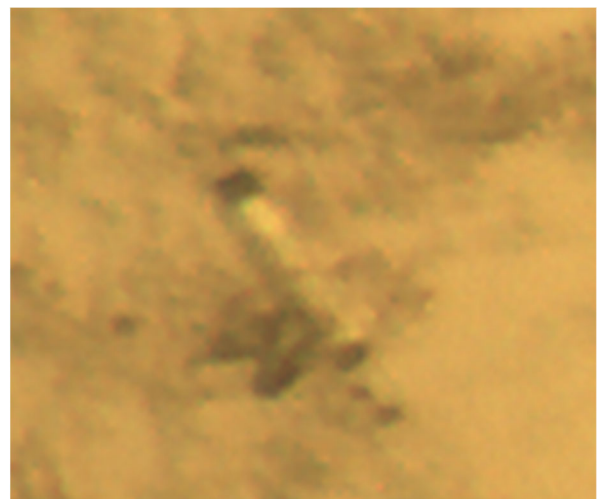


Figure 3. Crystal of medaka T1r2a/T1r3LBD obtained in the absence of chloride ion.

4. 考 察

塩味におけるナトリウムイオンの感知は、主として ENaC が担うと考えられている。一方、塩味は二面性のある味であり、低濃度の塩化ナトリウムは快い味として感じられる一方、高濃度では不快な味として感じられる。高濃度の塩については、苦味と酸味という、元来不快な味として認識される2つの味覚経路で受容されることが報告されている⁽¹⁸⁾。一方、申請代表者らは、甘味やうま味の受容体である T1r に、塩化物イオンの結合部位が存在することを見出していた⁽¹²⁾。そこで、低濃度の塩化ナトリウム感知は、ENaC によるナトリウムイオン感知に加え、甘味受容体やうま味受容体といった、元来快い味として感じられる味覚に関与する味覚受容体機能が塩化物イオンによって正に制御される形で合わせて感知されることで、快い感覚を生み出している可能性を作業仮説として考えた。本研究は、この可能性を検証する第一歩として、分子レベルでの解析を行ったものである。

本研究によって得られた結果から、少なくともメダカ T1r2a/T1r3 については、塩化物イオン結合は、その細胞外領域に存在する LBD の熱安定性上昇を引き起こすものの、味物質であるアミノ酸への応答には顕著な影響を与えないことが示唆された。これは、同じクラス C 型 GPCR の代謝型グルタミン酸受容体において、塩化物イオンとグルタミン酸の結合に正の協同性が見られた⁽¹⁴⁾こととは異なる結果となった。T1r2a/T1r3LBD で観察された塩化物イオンの結合部位は、T1r3 には存在する一方、T1r2a の同じ部位には確認されていない。これは、塩化物イオンの結合に関与している T1r3 のトレオニン残基が、T1r2a においてはヒスチジンに置換されており (Fig. 2)、側鎖であるイミダゾール環の立体障害により、塩化物イオンの結合ができなくなっているからと考えられる。T1r で構成される受容体において、T1r3 は共通の構成要素となっていることから、受容体ごとの異なる味物質の識別には、それぞれの受容体が独自に持つサブユニットである T1r1 または T1r2 側が主要な役割を担うことが報告されている⁽¹⁹⁾。今回 T1r2a/T1r3LBD における塩化物イオン結合によるアミノ酸結合に対する影響が見られなかった理由としては、塩化物イオンの結合部位が、味物質識別には補助的な役割しか果たさないと考えられている、T1r3 にしかなかったことにあるかもしれない。ヒトを含めた、メダカ以外の生物種に

おいて、T1r3 では、メダカ受容体で塩化物イオン結合に関与するトレオニンと同じ部位に位置するアミノ酸残基として、トレオニンまたはセリンが保存されている (Fig. 2)。このことから、他の生物種においても T1r3 への塩化物イオン結合は保存されている可能性が考えられる。一方、T1r1 または T1r2 の当該アミノ酸残基は、多くの場合バリンやアラニンなどに置換されている (Fig. 2)。これらは小型アミノ酸であるため、ヒスチジンのような立体障害の要因にはならないものの、いずれもイオン結合には不利な非極性アミノ酸である。ヒトを含めたメダカ以外の T1r1 または T1r2 について塩化物イオンの結合が見られるかどうか、また、それらの味物質応答に何らかの影響を与えるかどうかについては、今後検証の必要がある。また、塩化物イオンの T1r に対する結合そのものが何らかの形で味覚に関わるシグナル伝達を引き起こすかどうか、また、塩化物イオン結合による T1r の LBD 領域の熱安定化が味覚に関わるシグナル伝達の誘起に何らかの影響を与えるかどうかについても、今後検証の必要がある。

5. 今後の課題

本研究では、塩化物イオン非存在下での結晶作製は達成したものの、構造解析に十分な分解能の X 線回折強度データが得られなかった。塩化物イオン非存在下では、塩化物イオン存在下で通常得ている結晶と比較すると、同じ結晶化条件においても、結晶が得られる確率が低く、また得られた結晶のサイズが小さかった。このことは、本研究課題で明らかになった、塩化物イオン非存在下での T1r2a/T1r3LBD 試料の熱安定性の低さにも関連すると考えられる。今後、塩化物イオン非存在下での構造を明らかにする上では、何らかの条件で試料を安定化させるなど、さらなる結晶化条件の改善が必要になろう。

また、ヒトを含めたメダカ以外の T1r に対する塩化物イオン結合の有無とその味物質応答制御に関する解析については、構造生物学的および生物物理学的解析としては、現在これらの受容体タンパク質の組換え発現生産ができないことがボトルネックとなっている。そこで、これらの試料生産条件の確立を進めるとともに、受容体を強制発現させた細胞を用いた受容体の細胞応答解析や、味神経の応答解析など、現在確立されている生理学的な解析手法を用いた解析を進める必要がある。これらの構造生物学的・生物物理学的・生理学的な解析から得られる情報を統合

することで、塩化物イオンが味蕾細胞においてどのように感知されるのかの一端を明らかにすることができると考える。

本研究課題は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科安井典久准教授、大学院生伊藤千晶さん、同薬学部学生高科百合子さん、新田純矢さん、光永朋樹さんの協力を得て実施しました。これらの方々に感謝いたします。また、助成いただきました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に深謝いたします。

6. 文 献

1. Taruno A, Nomura K, Kusakizako T, Ma Z, Nureki O, Foskett JK. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflugers Arch.* 2021;473(1):3-13.
2. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, et al. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature.* 2010;464(7286):297-301.
3. Ye Q, Heck GL, DeSimone JA. The anion paradox in sodium taste reception: resolution by voltage-clamp studies. *Science.* 1991;254(5032):724-6.
4. Collier DM, Snyder PM. Extracellular chloride regulates the epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* 2009;284(43):29320-5.
5. Collier DM, Snyder PM. Identification of epithelial Na⁺ channel (ENaC) intersubunit Cl⁻ inhibitory residues suggests a trimeric alpha gamma beta channel architecture. *J Biol Chem.* 2011;286(8):6027-32.
6. Noreng S, Bharadwaj A, Posert R, Yoshioka C, Bacongus I. Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy. *Elife.* 2018;7.
7. Noreng S, Posert R, Bharadwaj A, Houser A, Bacongus I. Molecular principles of assembly, activation, and inhibition in epithelial sodium channel. *Elife.* 2020;9.
8. Lewandowski BC, Sukumaran SK, Margolskee RF, Bachmanov AA. Amiloride-Insensitive Salt Taste Is Mediated by Two Populations of Type III Taste Cells with Distinct Transduction Mechanisms. *J Neurosci.* 2016;36(6):1942-53.
9. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. Mammalian sweet taste receptors. *Cell.* 2001;106(3):381-90.
10. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, et al. An amino-acid taste receptor. *Nature.* 2002;416(6877):199-202.
11. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(7):4692-6.
12. Nuemket N, Yasui N, Kusakabe Y, Nomura Y, Atsumi N, Akiyama S, et al. Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors. *Nat Commun.* 2017;8:15530.
13. Nango E, Akiyama S, Maki-Yonekura S, Ashikawa Y, Kusakabe Y, Krayukhina E, et al. Taste substance binding elicits conformational change of taste receptor T1r heterodimer extracellular domains. *Sci Rep.* 2016;6:25745.
14. Tora AS, Rovira X, Dione I, Bertrand HO, Brabet I, De Koninck Y, et al. Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors by chloride ions. *FASEB J.* 2015;29(10):4174-88.
15. Geng Y, Mosyak L, Kurinov I, Zuo H, Sturchler E, Cheng TC, et al. Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. *Elife.* 2016;5.
16. Yoshida T, Yasui N, Kusakabe Y, Ito C, Akamatsu M, Yamashita A. Differential scanning fluorimetric analysis of the amino-acid binding to taste receptor using a model receptor protein, the ligand-binding domain of fish T1r2a/T1r3. *PLoS One.* 2019;14(10):e0218909.
17. Kabsch W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(Pt 2):125-32.
18. Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJ, Zuker CS. High salt recruits aversive taste pathways. *Nature.* 2013;494(7438):472-5.
19. Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M, Li X. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(39):14258-63.

Structural and Biophysical Analysis of Sweet and Umami Taste Receptor Regulation by Chloride Ion

Atsuko Yamashita

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Summary

Since a salty taste is most strongly perceived with chloride as the counterion, it is considered that chloride is involved in taste sensation. However, how chloride is recognized in the taste system has been remained elusive. In the taste buds, taste receptors play key roles in the recognition of taste substances. Among them, taste receptor type 1 (T1r) is responsible for sweet and umami taste perceptions. Previously, we solved the crystallographic structure of the ligand-binding domain (LBD) of T1r for amino-acid perception from medaka fish, T1r2a/T1r3. In the structure, we found that a chloride ion specifically binds in the close vicinity of the amino-acid binding site in the T1r3 subunit. Nevertheless, whether the binding of chloride ion to T1r has affects sweet or umami perception is unknown. In this study, we analyzed the binding and action of chloride ion to T1r by use of medaka T1r2a/T1r3LBD, a currently sole sample with successful recombinant protein preparation amenable to structural and biophysical analyses, as a representative. Firstly, we confirmed the binding of a chloride ion to T1r2a/T1r3LBD by isothermal titration calorimetry. Furthermore, the chloride binding was found to thermally stabilize the T1r2a/T1r3LBD protein. On the other hand, the affinity of an amino acid to the receptor protein and its effective concentration for the conformational change of the receptor protein concomitant with binding did not show a significant difference in the presence or absence of chloride ion. These results suggest that the binding of a chloride ion to T1r2a/T1r3 does not significantly affect the receptor responses to taste substance amino acids.