

味細胞における甘味情報の受容・変換機構の分子的基礎

Molecular biological study on taste reception and transduction for sweetness

代表研究者 大阪大学理学部研究生 尾崎 まみこ
Res. Student, Faculty of Sci., Osaka Univ.
Mamiko OZAKI

Taste organ on the labellum of the fly is in the shape of a chemosensillum, which shows less complicated structure than the taste bud in vertebrate. The chemosensillum includes four functionally differentiated taste cells, which are the primary sensory cells generating the impulses to taste stimuli. One of them, called the sugar receptor cell, bears two different types of sugar receptor site to keep a wide responsiveness to various kinds of sugar. A group of sugars stimulate the cell via the "pyranose site (P site)" and the other group of sugars stimulate the same cell via the "furanose site (F site)".

The electrophysiological experiment on the competition of polysaccharides with sugars is an available method to distinguish between the P site- and the F site-stimulative sugars. I found that starch and levan selectively compete with the stimulus sugars for the P and the F sites, respectively. Based upon these results, I detected the sugar receptor protein candidates for the P and the F sites by a novel affinity electrophoresis with starch or levan. These proteins showed the consistent sugar-binding specificities and affinities with the two types of receptor sites, respectively, and were detected in the extract of the isolated chemosensillum, which exclusively includes the sensory processes of the taste cells as cellular components. The candidate proteins are water-insoluble and estimated to be 27-32 KDa.

Next, I tried to detect taste cell-specific GTP-binding protein. The labella were collected from about 10,000 flies, polyA(+)RNAs were extracted from them and cDNAs were synthesized to use as the templates for PCR. As the result of the PCR with adequate primers, a part of cDNA of GTP-binding protein was amplified and we suggested the transcripts of two types of GTP-binding protein in the labellum. Based upon the nucleotide sequences, it was suggested that one was Gi and the other was Gq type. It is too early to say that these GTP binding proteins are involved in the taste cells. However, Gq, which must couple with phospholipase C, can be concerned with the taste cell adaptation by regulating the intracellular level of IP₃ or Ca²⁺, considering our previous electrophysiological study (1992).

I further found a soluble protein of 25 KD in the isolated chemosensilla. It was an acidic protein whose content was remarkable among total proteins of the chemosensilla. This protein may be the main component of the receptor lymph filling the inside of the chemosensillum. I determined the amino acid sequence in the N'end and also the corresponding nucleotide sequence. Now the cDNA library screening is going to get the entire cDNA sequence.

Reference

Mamiko Ozaki and Taisaku Amakawa: Adaptation-promoting effects of IP₃, Ca²⁺ and phorbol ester on the sugar taste receptor cell of the blowfly. *Phormia regina*. *J. Gen. Physiol.*, 100: 867-879 (1992).

研究目的

味覚器の構造が比較的単純で味細胞の機能的分化がはっきりと知られている昆虫を使って味細胞

における情報変換の仕組みを担う機能蛋白質分子を分子生物学的に同定する。特に着目する分子は以下の3通りとした。

1) 味覚受容蛋白質, 2) GTP 結合蛋白質, 3) 水溶性 25 KD 蛋白質。

研究経過

味覚受容蛋白質について

フラノース糖群を受容する F 部位蛋白質を新たに分離した。分離に際しては以前私が P 部位蛋白質を同定した時と同様, 多糖類を使った親和電気泳動法を用いたが, それに先だって F 部位を拮抗的に阻害する多糖類を電気生理学的手法によって探し, フルクトフラノース重合体のレバンを親和性リガンドとして選択した。さらに, P 部位蛋白質と F 部位蛋白質とを分子量, 糖に対する選択的結合性, 味覚器内での存在場所などについて比較し, これらの蛋白質の甘味受容蛋白質としての信憑性を検討した。

当初は次の段階としてこれらの蛋白質を精製し N 末端付近のアミノ酸配列を決定する方針であったが, 機器分析に必要な量を精製できなかった (精製できたとしても N 末端がブロックされているとアミノ酸配列決定は難しい)。そこで方針を変更し, 嗅覚受容蛋白質ファミリーの候補 cDNA 群を見いだした Buck and Axel (1991) にならって GTP 結合蛋白質連関性の 7 回膜貫通ドメインをもつ受容蛋白質に共通なヌクレオチド配列をプライマーとして合成し, PCR 法によって唇弁由来の cDNA から味覚受容体の cDNA 部分配列を得ることを試みた。

GTP 結合蛋白質について

他の多くの組織で知られている GTP 結合蛋白質の塩基配列をもとによく保存されている配列部分のオリゴヌクレオチドを合成し, これをプライマーとして唇弁由来の cDNA から GTP 結合蛋白質の cDNA 部分配列を得た。この部分配列をプローブにして唇弁 cDNA ライブラリーのスクリーニングを試みている。

水溶性 25 KD 蛋白質について

昆虫の味細胞は化学感覚毛内に感覚突起を伸ばし, 味物質はこの突起膜上で受容蛋白質に捉えられ, 味物質はこの突起膜上で受容蛋白質に捉えられると考えられている。したがって, 感覚毛を単離して集めることができたなら味覚情報受容・変換に関する機能分子をより効率よく調べられるか

も知れないという発想のもとに感覚毛を単離し, 蛋白質構成を電気泳動法で調べた。そこで, 感覚毛に特異的かつ多量に含まれる 25 KD の水溶性蛋白質を比較的きれいに分離することができたので, これについて N 末端付近のアミノ酸配列を決定した。次いで PCR 法により, その部分のヌクレオチド配列をもつプローブを作成し, 味覚器 (唇弁) の cDNA ライブラリースクリーニングを行った。

研究成果

味覚受容蛋白質について

P 部位蛋白質, F 部位蛋白質ともに分子量 30,000 前後で P 部位蛋白質は F 部位蛋白質よりやや酸性である。糖との結合選択性, 親和性の序列は電気生理学的に調べたそれぞれの受容部位の性質とよく一致した。また両者とも単離感覚毛中に検出されたことから, 味覚受容膜上に存在すると思われる。これらは味覚受容蛋白質として, それぞれの刺激物との親和性を定量的に調べ電気生理学的実験結果に照らしてその信憑性をきちんと論じる形で報告された最初の例であろう (論文投稿中)。

PCR による受容体 cDNA の探査

受容体ファミリー (オプシン, 嗅覚受容体, β アドレナリン受容体, etc) として報告された cDNA 配列の 510 bp の部分配列をはさむ順逆 2 ヶ所のプライマーを用いて唇弁由来の cDNA を鋳型に PCR を行ったところ, 500 から 600 bp の範囲に 6 通りの大きさの DNA 断片が増幅されてきた。それぞれの DNA 断片をクローン化し現在 15 通りの塩基配列を決定し, ハイドロパシープロットを作成した。それによると 4 クローンが妥当な膜貫通ドメインを持っているらしいことが分かった。互いに完全に一致した塩基配列を示すものはないが 3 クローンが比較的共通な配列を部分的にもち何らかのファミリーの存在が予想された。

GTP 結合蛋白質について

GTP 結合蛋白質の α サブユニットで比較的よく保存されている塩基配列部分をもとにプライマーを合成し, 唇弁由来の cDNA を鋳型に約 300 bp の部分配列を増幅させた。増幅 DNA を

クローニングし、塩基配列を調べたところ、機能的に異なる2種のGTP結合蛋白質の配列が見いだされた。ひとつはGiグループに、他はGqグループに属するものと思われた。

今年6月にNature誌に報告された味覚器のGTP結合蛋白質 α サブユニットのcDNA配列はトランスデュースン(Gt)型(脊椎動物視細胞の光情報変換機構に普遍的に介在する)であったが、今のところハエの味覚器においてGt型の存在は確認していない。しかし先頃、ショウジョウバエの視細胞における光情報変換機構に介在するGTP結合蛋白質はGt型ではなくGq型であるとの報告がだされており(Neuron, 1990), これらを考え合わせると無脊椎動物では味細胞にもGq型のGTP結合蛋白質が存在するとしても驚くべきことではない。むしろ、最近まで私が行っていた電気生理学的研究(*J. Gen. Physiol.*, in press)から糖に対する味覚応答の順応機構に受容体とホスホリパーゼCを連関させるGq型のGTP結合蛋白質の介在が示唆されている。つまり、味覚情報変換機構そのものではなく、それをフィードバック的に制御する順応機構にこのGqが介在している可能性があることを銘記すべきであろう。GTP結合蛋白質の働きを順応機構との関わりに着目して調べた研究はこれまでにほとんどないと思われる。

水溶性25KD蛋白質について

化学感覚毛の全蛋白質を電気泳動で展開したとき圧倒的に多量に含まれる酸性蛋白質が目についた。この25KD蛋白質は水溶性で取扱いが比較的容易であったこともあり、分離精製をして約25 pmolをアミノ酸シーケンサーにかけN末端35残基の配列を決定したところ35残基中9残基が酸性アミノ酸であった。PCRによってこのN末端部分の塩基配列を決定し、そのPCR産物をプローブにして唇弁由来のcDNAライブラリースクリーニングを行った結果、700から800bpのクローンが数個得られた。

味覚器表面は私達の舌の表面にしても常に唾液によって覆われているもので、そういう環境の中で味物質の受容は行われているのである。昆虫の

化学感覚毛も内部は受容器リンパで満たされており、おそらくこの25KD水溶性蛋白質はその含量の多さから受容器リンパの主成分ではないかと思われる。同様に化学感覚毛に多量に含まれている水溶性蛋白質の例としてはカイコなどの触覚化学感覚毛(嗅覚器)中のフェロモン結合蛋白質がよく知られている。この25KD蛋白質については特殊な刺激物質と結合するかどうかなどその役割は分からないが(多糖との親和性はみられなかった)、その分子構造を決定することにより受容器リンパの主要蛋白質としてフェロモン結合蛋白質のような特殊な役割を担うようになった分子のプロトタイプを探るきっかけになるかもしれない。

今後の課題と発展

大局的展望

昨今、感覚の分子生理学といえほとんどが視覚に関するものであったのが、1990年代に入って急激に嗅覚、味覚といった化学感覚の研究が発展してきた。この助成期間中に限っても嗅覚の受容蛋白質のcDNAファミリー、脊椎動物味覚器のGTP結合蛋白質cDNAと重要な報告が相ついで。これは歓迎すべきことだが、まだ個々の機能分子に関してcDNAレベルの知見がとりあえず得られたといった状況である。機能蛋白質分子本体の性質や挙動を直接的に調べたり、味細胞、あるいは嗅細胞の機能的分化と対応づけてそれぞれの機能分子の座や役割を考える、あるいは、個々の機能分子の役割の個体行動への反映を考察するという段階にはまだ遠く、これらは今後に託された課題の大きな道筋であるといえよう。私としては本研究を発展させて、機能分子の挙動から細胞の特異的機能発現、個体行動への影響までを包括できる味覚生理学を目指したいと思う。その際、補食環境や食習慣の異なるいろいろな動物で得られた知見を断片的に寄せ集めるのではなく、まず一つの生物で「機能分子から個体行動」までを追うことが肝要と思う。本来動物が行動する動機の一つに「食べる」という目的があるとすれば、給餌コントロールによって体内状況(飢餓か満腹か)を設定できる動物、味覚に刺激されて摂食(ある

いは忌避)行動が比較的単純に解発され、またそれが簡単に定量的に測定できる動物としてハエは好適な研究対象である。

脊椎動物においては、味覚器(味らい)の構造がより複雑で一つ一つの味細胞の機能的同定もむずかしいために蛋白質レベルの研究を保留してcDNAレベルの研究が味覚の分子機構を探るほとんど唯一の突破口になることは想像に難くない。今後、味覚研究者が分子生物学的方向を積極的に進めていくことは必至と思われる。

またいうまでもなく、味覚は我々人間の生活や健康に日常的に深く関わっている。本研究のような基礎的研究は短絡的に実用と結びつくことはなくとも、ひいてはヒトに関わる実学的な方面に新たな視点と展開を与えていくと思う。

具体的展望

今回、扱い始めた機能分子は生体内外を隔てる細胞膜上において外界からの味覚情報を受け取るいわば主役の受容蛋白質、細胞内においてその情報を変換機構に伝えるGTP蛋白質、そして細胞外において刺激受容の場の環境を左右するであろう25KD蛋白質である。これらはその存在様式、考えられる機能も三者三様なら、現時点での知見の集積もまちまちである。

2種類の糖受容蛋白質についてはこの研究助成によって極微量の蛋白質を扱う技術的限界内で得られる知見はひとまず得られたと思う。PCRによる味覚受容蛋白質のcDNAの探査には引き続き気長にかつ精力的に取り組んでいかねばならない。しかし、ある時点で遺伝子ファミリーの全容が見え始めてきたら翻って、P部位蛋白質、F部位蛋白質との対応づけもなされ、大腸菌や培養細胞を利用した受容蛋白質の多量合成の道も開かれるであろうし、各々の受容蛋白質は機能の違う味細胞のマーカー蛋白質として細胞分化の研究に利用できるであろう。

GTP結合蛋白質は既にいろいろな組織で研究が進んでおり、各タイプのGTP結合蛋白質が受容蛋白質とどういう機能蛋白質との連関を仲介し生体情報変換機構をどう動かすかがある程度推理できる。例えばGqはホスホリパーゼCとの連関

を仲介し、IP₃合成を経て細胞内Ca濃度を上げる方向を示し、つまりこれらを直接2次メッセンジャーとするか、モジュレーターとしてこれらに制御される情報変換機構の存在が浮かび上がる。今回部分的にクローニングしたGq, GiについてはcDNAの全長が得られ、発現細胞の同定ができれば、電気生理学的実験結果と併せて該当する味細胞の情報変換機構の大枠が見当できるであろう。

水溶性25KD蛋白質については機能的な知見は皆無である。しかし現時点でライブラリースクリーニングにより全長のcDNA候補クローンがとれているので、今後はショウジョウバエの染色体上で遺伝子座を決定し、該当する突然変異体を利用できれば個体レベルで摂食行動を調べることに、この蛋白質の影響を捉えていきたい。このように大型のハエでいったんcDNAの塩基配列を決定してそれをもとにショウジョウバエの突然変異体を利用してその個体の行動を調べるという方法はあらゆる機能分子に関して応用可能な方法と思われる。

発表論文リスト

印刷論文

- 1) Mamiko Ozaki, Taisaku Amakawa, Koichi Ozaki, and Fumio Tokunaga: Two types of sugar-binding protein in the labellum of the fly: Putative taste receptor molecules for sweetness, (1992) 投稿中。

国際会議、シンポジウムにおける口頭及びポスター発表

- 2) Mamiko Ozaki, and Fumio Tokunaga: Main soluble protein found in the labellar chemosensilla of the blowfly, *Phormia regina*. 4th International Congress of Comparative Biochemistry and Physiology, (1991, Japan).
- 3) Mamiko Ozaki: Two functionally different sugar receptors on a taste cell of fly. 4th International Congress of Comparative Biochemistry and Physiology, (1991, Japan).
- 4) Mamiko Ozaki, Taisaku Amakawa, and Fumio Tokunaga: Putative sugar taste receptor proteins found in the chemosensillum of the fly, *Phormia regina*. 2nd Japan-USSR Symposium on Function and Structure of Receptor, (1991, Japan).

国内学会，シンポジウムにおける口頭およびポスター発表

- 5) 尾崎まみこ，尼川大作，尾崎浩一，徳永史生：クロキンバエ味覚器にみいだされた2種類の糖結合蛋白質 第62回日本動物学会大会（岡山）1991.
- 6) 尾崎まみこ，尼川大作，徳永史生：クロキンバエ味覚器の2種類の糖受容体：受容分子の同定と交叉順応からの考察 第25回味と匂いのシンポ

ジウム（松本）1991.

- 7) 尾崎まみこ：ハエの味覚器における糖受容 筑波昆虫科学研究会ワークショップ（筑波）1992.
- 8) 尾崎まみこ：基礎生物学研究所セミナー：感覚受容における機能性蛋白質の実体と挙動（岡崎）1992.
- 9) 尾崎まみこ，徳永史生：クロキンバエ味覚器のGTP結合蛋白質 第3回比較生理生化学会大会（鹿児島）1992.