

鶏卵成分をモデルとする 食品タンパク質の“コク味”の分子実態解析

静岡県立大学 食品栄養科学部

伊藤 圭祐

1. 背景と目的

“コク”は伝統的に食品のおいしさを表現する際に頻繁に用いられてきた表現であり、熟した食べ物を口にしたときの豊かな味わいや、深みのある濃厚さの味わいに対して使用されてきた。コクには口の中において多くの成分が複雑に絡み合う時間的および空間的な広がりの特徴とする味、香り、食感すべてが関係しており、それらがバランスよく与えられ、濃厚感、持続性、および広がりが生じた時に感じられる味わいがコクと考えられている。近年、「そのもの自体には味が無いものの、他の食品中に添加することで食品の味の厚さ、持続性、広がりを引き出し、甘味、うま味、塩味を増強させる作用をもつ味」という“コク味”の定義が提唱され、Calcium-sensing receptor (CaSR) がそのような味覚特性を有する“コク味”物質の受容体であることが報告された¹。“コク味”によって食品のコクの全てを説明できるわけではないものの、CaSR 活性化成分にはヒトにとって好ましい味機能が期待できる²。

CaSR は副甲状腺や腎臓に発現する class C の GPCR である³。副甲状腺においては副甲状腺ホルモンの分泌を調節することで血清 Ca^{2+} 濃度の恒常性維持に、腎臓においては腎 Ca^{2+} 排泄に関与して Ca^{2+} の再吸収を調節する役割を担う。近年、CaSR が味蕾にも発現し、CaSR の活性化が“コク味”と相関することから、“コク味”受容体として機能していることが報告された¹。

我々の研究グループは、共役する細胞内 G タンパク質などを最適化することで、従来法よりも高感度な CaSR 応答評価系を開発した⁴。本系を用いてリゾチームが既知の CaSR 活性化成分であるスベルミンやプロタミンと同等の CaSR 活性化能を有することを見出した^{4,5}。リゾチームは甘味を呈する特殊なタンパク質ではあるものの⁶、リゾチームによる CaSR 活性化メカニズムの解明は、タンパク質の“コク味”機能を理解する上で有用な知見を与えると期待できる。そこで本研究では、リゾチームによる CaSR 活性化メカニズムの解明を目的として、リゾチーム由来 CaSR 活性化ペプチドの探索、およびそのアミノ酸置換体を用いた活性評価を進めた。

2. 方法

2-1. 試料

ペプチド合成用の Fmoc アミノ酸は渡辺化学工業社から購入した。有機溶媒など、その他のペプチド合成関連試薬は富士フィルム和光純薬社より購入した。CaSR 応答評価用の pHEK293 Ultra Expression Vector I はタカラ社より購入した。コドン使用頻度をヒトに最適化した human CaSR (UniProt: P41180) 及び human $\text{G}\alpha 15$ (UniProt: P30679) の人工遺伝子はユーロフィンジェノミクス社で受託合成した。Lipofectamine 2000 は Sigma-Aldrich 社より、Fluo-8 AM は AAT Bioquest 社より購入した。

2-2. 実験方法

(1) ペプチド合成

リゾチーム配列をもとにしたペプチドの合成は、Rink Amide resin (レジン) を用いた Fmoc 法により行った。レジンを充填したマイクロカラムを DMF で洗浄し、Piperidine でレジンを脱保護した。過剰量の DMF で洗浄した後、Fmoc アミノ酸を HBTU で活性化させ、レジンへ結合させた。未反応のアミノ基は Acetic anhydride でアセチル化した。そのように、設計したペプチドが合成されるまでアミノ酸の付加反応を繰り返した。最後に、ペプチドの N 末端の Fmoc 基を Piperidine で脱保護し、TFA によって脱保護と脱樹脂を行った。得られたペプチドは精製後に実験に用いた。

(2) カルシウムイメージング法による CaSR の応答評価

CaSR の応答評価は、我々が開発した高感度な CaSR 応答評価系を用いて実施した (図 1)⁴。本系は細胞ベースのカルシウムイメージング法である。HEK293T 細胞に対し、Lipofectamin 2000 を用いて CaSR および $\text{G}\alpha 15$ をサブクローニングした pHEK293 ultra expression vector I をトランスフェクションした。CaSR を発現しないネガティブコントロール細胞には、CaSR 発現プラスミドの代わりに空 vector を導入した HEK293T 細胞を使用した (mock 細胞)。

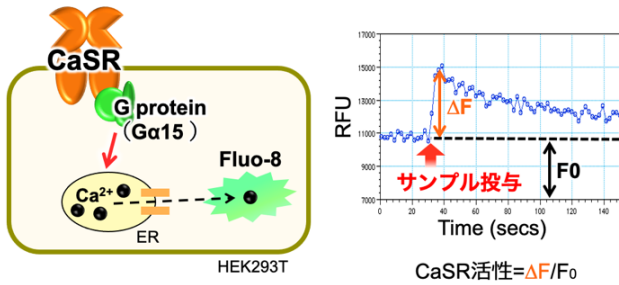


図1：カルシウムイメージング法によるCaSRの応答評価系
CaSRの活性化に伴って小胞体(ER)から放出されるCa²⁺をFluo-8によって定量した(左)。サンプル投与後の蛍光量の変化から応答強度(CaSR活性)を算出した(右)。

サンプル投与によるCaSR応答の評価は、細胞内Ca²⁺濃度の変化に伴うFluo-8の蛍光量変化により評価した。HEK293T細胞にFluo-8を取り込ませ、あらかじめ37℃に設定しておいたプレートリーダー(FlexStation III)にセットし、10分間インキュベートした後に、サン

プルを添加し、経時的に蛍光量を測定した。得られたデータはSoftMaxPro v5.0.1を用いて解析した。

3. 結果と考察

3-1. CaSRを活性化させるリゾチーム由来ペプチド領域の特定

CaSR活性化領域を特定するため、リゾチームのアミノ酸配列を全網羅する、10アミノ酸からなる15個のペプチドを合成し、CaSR応答を評価した。その結果、KRHGLDNYRG, KFESNFNTQA, TNRNTDGSTDの3ペプチドにおいてCaSR応答が検出された。次に、それらペプチドの周辺領域について、前後2または4アミノ酸ずつシフトさせた10アミノ酸鎖長の15個のペプチドを合成し、再度精密スクリーニングを行った(図2)。その結果、隣接する2個のペプチドVCAAKFESNF, ESNFNTQATNにおいてCaSR応答が検出された。これらのペプチドにはESNFのアミノ酸配列が共通していた。

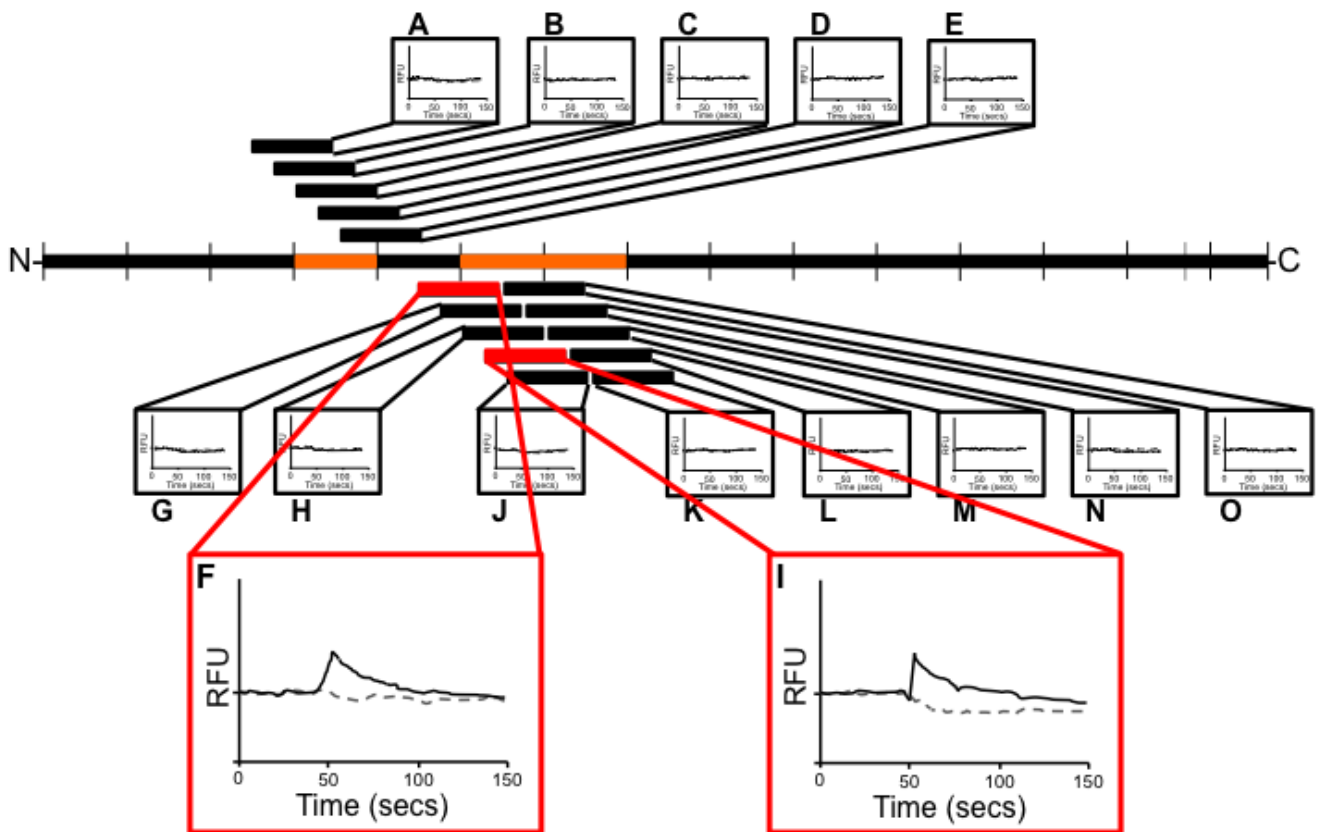


図2：リゾチーム由来CaSR活性化候補ペプチド周辺配列の精密スクリーニング

太線はリゾチームのアミノ酸配列全体を示した。チャートの黒色実線はCaSR発現細胞、灰色点線はmock細胞の応答を示す。

続いて VCAAKFESNF 及び ESNFNTQATN の両方のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列 VCAAKFESNFNTQATN を元に、N 末端及び／または C 末端を 1 ~ 7 残基ずつ欠失させていった、ESNF を中心とした 16 ~ 3 アミノ酸のペプチドを網羅的に 51 個合成した。各ペプチドについて 100 μM での CaSR 応答を評価した結果 (図 3 左)、16 ~ 4 アミノ酸のペプチドのほとんどで CaSR 応答が検出されたのに対し、トリペプチドからは CaSR 応答が検出

されなかった。このことから、リゾチーム由来ペプチドにおいては ESNF の 4 アミノ酸が CaSR 応答に必要な最小単位であることが示唆された。さらに各ペプチドについて 25 μM での CaSR 応答を評価した結果 (図 3 右)、CAAKFESNFNTQATN のみが CaSR 応答を示したことから、最も強く CaSR を活性化するリゾチーム由来ペプチド領域として、CAAKFESNFNTQATN (ペプチド L) を特定した。

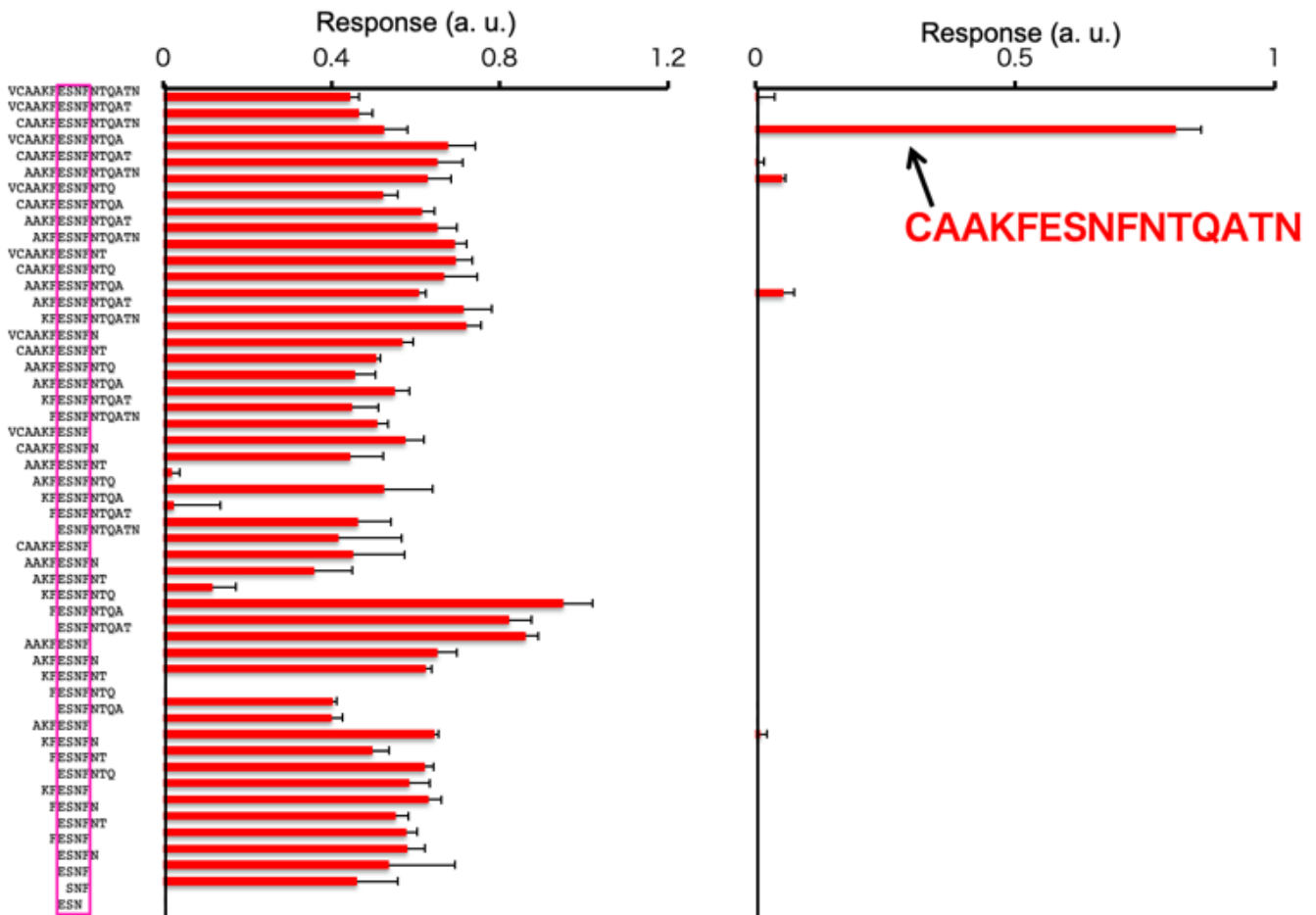


図 3 : リゾチーム由来ペプチドの欠失解析

100 μM における各ペプチドの CaSR 応答 (左)、25 μM における各ペプチドの CaSR 応答 (右) を示す。3 回の試験における平均値を棒グラフで示し、標準偏差をエラーバーで示した。

CaSR 活性化成分にはその成分のみで作用するオルソステリックアゴニストと、オルソステリックアゴニストの応答を増加させるポジティブアロステリックモジュレーターが存在する⁷。リゾチームとペプチド L は、オルソステリックアゴニスト (Ca^{2+} と Mg^{2+}) の有無に関わらず CaSR を活性化したことから、共にオルソステリックアゴニスト

として直接的に CaSR を活性化することが明らかとなった。ペプチド L の EC_{50} 値は、リゾチームの EC_{50} 値 (590 μM) と比較して約 12 倍低い 49 μM であった。ペプチド化によって CaSR との相互作用に不要な立体障害を起こしていた領域が消失し、活性化に必要な領域が CaSR へ作用しやすくなったために活性が向上したと考えられる。

3-2. ペプチド L の Alanine-scanning 解析

CaSR 活性化における各アミノ酸残基の寄与を解析するため、ペプチド L を構成するアミノ酸を 1 残基ずつ A に置換したペプチドを合成し、CaSR 応答を評価した (図 4)。その結果、C1, N8, F9, Q12, 及び T14 の A 置換により、元の配列のペプチドに比べ応答値が 78 % 以上減少

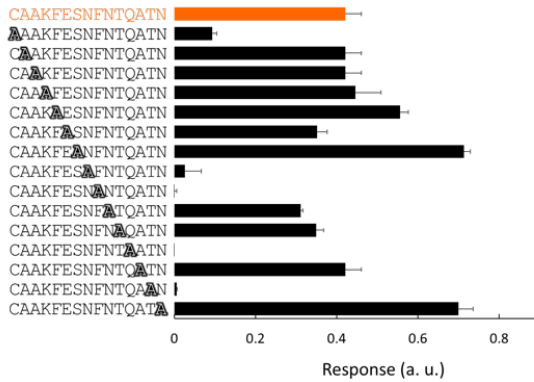


図 4 : ペプチド L の Alanine-scanning 精密スクリーニング

50 μ M での 3 回の試験における平均値を示し、標準偏差をエラーバーで示した。

3-3. ペプチド L の網羅的 site-saturation 解析

ペプチド L (CAAKFESNFNTQATN) の CaSR 活性化において重要であることが示唆された C1 位, N8 位, F9 位, Q12 位, 及び T14 位について、CaSR の活性化に必要なアミノ酸残基の特徴を調べるため、各部位を 19 種類のアミノ酸で置換した計 100 種類のペプチドを合成し、CaSR 応答を評価した (図 6)。各ペプチドについて 50 μ M での CaSR 応答を評価した結果、C1 位, N8 位, Q12 位では、各アミノ酸側鎖を失う A 置換を含め、ほとんどの置換体で CaSR 活性化能が消失したことから、C1, N8, 及び Q12 が CaSR の活性化に重要であることが再確認された。F9 位では、A で置換した変異体を含め多くの変異ペプチドで明確な応答が失われた一方で、L や I などの疎水性アミノ酸に置換した変異ペプチドでは応答が大きく増大した。これにより、F9 は CaSR の活性化に重要であることが再確認され、また F9 位のアミノ酸の性質によってペプチド L の CaSR 活性化能が大きく変化することが示唆された。一方、T14 位では 19 種中の N, D, E, G, I, L, F, T, W, Y, 及び V に置換した 12 種もの変異ペプチドで明確な応答が検出され、また応答の増減が 30 % 未満であったものが全体の 6 割程度存在した。A 置換によって CaSR 活性化能は著しく低下したものの、T14 は側鎖の比較的大きな様々なアミノ酸残基で代替可能であることが示唆された。

続いて、Alanine-scanning によって活性の顕著な低下

し、CaSR 応答が消失した。このことから、これら 5 アミノ酸残基の側鎖が CaSR の活性化に特に重要であることが示唆された。なお、これら 5 つのアミノ酸残基は全てリゾチームタンパク質の分子表面に存在している (図 5)。すなわち、これらのアミノ酸残基と CaSR との相互作用がコク味機能の発現に重要であることが示唆された。

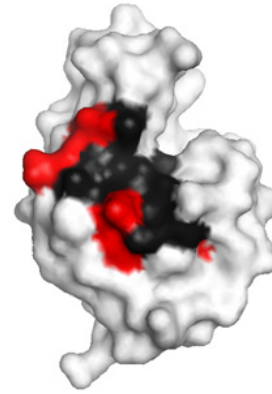


図 5 : リゾチームの立体構造⁸

Alanine-scanning により CaSR 応答が著しく減少した C1, N8, F9, Q12, 及び T14 を赤色、それ以外のペプチド L の残基を黒色で示した。

が見られたアミノ酸残基、すなわち活性に決定的に重要と考えられる位置のアミノ酸以外についても、同様に 19 種類の置換体を解析した (図 6)。各ペプチドについて 50 μ M での CaSR 応答を評価した結果、A2 位では 19 種の変異ペプチドのうち 16 種で元の配列以上の CaSR 応答が検出された。同様に A3 位でも 17 種 / 19 種のペプチドで元の配列以上の CaSR 応答が検出された。これらの結果から、A2 と A3 はペプチド L の CaSR 活性化能には大きく寄与しておらず、他のアミノ酸への置換によって相互作用を強化できる余地があることが示唆された。K4 位, S7 位, 及び T11 位でも同様に、それぞれ 11 種 / 19 種, 12 種 / 19 種, 11 種 / 19 種, の変異ペプチドで元の配列以上の CaSR 応答が検出され、応答値が 30 % 以上増大したものが 4 割程度であった。特に K4 位, S7 位は A 置換によって活性の増加が見られたことから、それらの側鎖は CaSR 活性化能に負の影響を及ぼしていたことが示唆された。特に S7 位は A, V, I, F, Y, H, R, D, N, Q, M, T, C, 及び P に置換した 14 種のペプチドで、応答値が元の配列の 70 % 以上増大または減少したことから、S7 位が CaSR 活性化に大きく寄与する部位であることが示唆された。一方、F5 位と E6 位ではそれぞれ 16 種 / 19 種, 17 種 / 19 種のペプチドで CaSR 応答が減少し、応答値が 30 % 以上減少したペプチドも 6 割程度であった。特に E6 位は、A 置換によって応答値が 40 % 減少したため、E6 側鎖の CaSR 活性化への寄与が示唆された。すなわち、

Alanine-scanning では顕著な活性減少を示さなかったものの, C1, N8, F9, 及び Q12 に次いで, CaSR の活性化に重要なアミノ酸残基であることが示唆された. N10 位と N15 位では, それぞれ 14 種 / 19 種, 13 種 / 19 種の変異ペプチドで明確な応答が保持され, また応答の変動

が 30 % 未満であったものが全体の 6 割程度であった. アミノ酸置換による CaSR 応答への影響が全体として小さかったことから, N10 位と N15 位は CaSR の活性化への寄与が小さいことが示唆された. 残る A13 位については, 現在解析中である.

		C	A	A	K	F	E	S	N	F	N	T	Q	A	T	N
A	応答値	0.25	1.00	1.00	1.81	1.31	0.61	2.77	-0.19	-0.07	0.54	0.96	0.21	0.04	1.24	
	±標準偏差	0.16			0.22	0.07	0.07	0.05	0.07	0.10	0.03	0.20	0.13	0.10	0.11	
V	応答値	0.04	1.79	2.06	1.66	0.87	0.69	2.89	-0.36	1.27	0.78	1.41	1.85	1.28	0.76	
	±標準偏差	0.06	0.27	0.18	0.28	0.14	0.23	0.19	0.05	0.17	0.20	0.28	0.27	0.16	0.15	
L	応答値	0.87	1.36	1.23	2.01	0.82	0.04	1.21	1.86	1.75	1.46	1.95	0.98	1.04	1.11	
	±標準偏差	0.10	0.24	0.23	0.17	0.05	0.06	0.59	0.18	0.22	0.12	0.13	0.12	0.09	0.23	
I	応答値	0.07	0.77	1.25	2.03	0.58	0.55	2.17	0.07	1.98	0.96	1.21	0.33	0.97	0.99	
	±標準偏差	0.02	0.09	0.24	0.16	0.05	0.06	0.40	0.07	0.31	0.20	0.42	0.07	0.53	0.32	
F	応答値	0.72	1.29	1.34	1.19	1.00	1.05	2.62	1.56	1.00	0.83	1.49	1.48	1.29	0.88	
	±標準偏差	0.10	0.34	0.14	0.22		0.10	0.52	0.29		0.22	0.20	0.32	0.25	0.29	
Y	応答値	0.21	1.46	1.57	1.42	0.54	0.88	1.74	-0.22	-0.17	0.85	1.44	-0.04	1.25	0.97	
	±標準偏差	0.19	0.09	0.03	0.23	0.02	0.16	0.21	0.04	0.20	0.09	0.04	0.06	0.12	0.20	
W	応答値	0.02	1.80	1.65	0.91	-0.04	-0.04	1.48	-0.29	-0.18	0.30	1.34	0.32	0.39	0.36	
	±標準偏差	0.03	0.28	0.16	0.25	0.05	0.02	0.59	0.23	0.32	0.14	0.12	0.37	0.16	0.05	
H	応答値	0.04	1.08	0.24	-0.24	-0.05	-0.11	0.18	0.19	0.80	0.18	0.17	-0.03	-0.09	0.20	
	±標準偏差	0.03	0.08	0.05	0.06	0.07	0.02	0.07	0.15	0.10	0.09	0.03	0.12	0.01	0.11	
K	応答値	-0.11	1.97	1.84	1.00	0.08	-0.02	0.37	-0.05	-0.07	0.22	0.40	0.07	-0.02	0.36	
	±標準偏差	0.07	0.16	0.25		0.09	0.02	0.12	0.01	0.11	0.06	0.27	0.02	0.08	0.03	
R	応答値	-0.06	1.91	1.10	0.77	-0.23	0.01	0.04	0.23	0.96	0.08	0.16	0.22	0.00	-0.01	
	±標準偏差	0.14	0.18	0.27	0.32	0.07	0.05	0.04	0.10	0.07	0.12	0.06	0.34	0.04	0.08	
D	応答値	0.15	1.89	1.75	1.55	1.34	0.57	2.89	0.32	1.22	1.18	1.09	0.17	1.67	1.22	
	±標準偏差	0.06	0.19	0.20	0.29	0.12	0.14	0.25	0.07	0.13	0.17	0.36	0.28	0.30	0.14	
E	応答値	1.23	2.05	1.36	0.97	0.29	1.00	1.36	0.05	0.73	0.76	0.74	-0.34	0.58	1.24	
	±標準偏差	0.37	0.23	0.03	0.38	0.03		0.14	0.15	0.08	0.03	0.12	0.01	0.42	0.32	
N	応答値	1.61	1.38	1.38	1.10	1.12	1.12	3.32	1.00	0.37	1.00	1.41	0.10	0.78	1.00	
	±標準偏差	0.16	0.15	0.19	0.25	0.03	0.15	0.12		0.28		0.08	0.08	0.26	0.11	
Q	応答値	1.31	2.20	1.39	1.44	0.87	0.73	2.68	0.07	-0.01	1.77	1.80	1.00	1.00	1.07	
	±標準偏差	0.15	0.10	0.13	0.09	0.12	0.05	0.16	0.07	0.09	0.11	0.31		0.17	0.11	
M	応答値	-0.11	1.87	2.38	0.83	0.88	-0.10	0.16	-0.04	1.24	1.27	1.58	0.10	1.21	0.76	
	±標準偏差	0.24	0.15	0.12	0.06	0.04	0.04	0.07	0.11	0.12	0.35	0.27	0.01	0.22	0.10	
T	応答値	-0.28	0.95	1.12	0.71	0.42	0.59	-0.11	1.04	1.10	0.78	1.00	0.18	1.00	0.06	
	±標準偏差	0.18	0.25	0.19	0.10	0.09	0.28	0.06	0.10	0.06	0.30		0.23		0.01	
S	応答値	0.96	1.23	1.15	1.06	0.69	0.99	1.00	1.53	-0.06	1.17	0.75	-0.15	0.48	0.43	
	±標準偏差	0.15	0.24	0.16	0.47	0.05	0.08	0.47	0.09	0.12	0.27	0.22	0.21	0.10	0.12	
C	応答値	1.00	2.14	1.83	0.75	0.70	0.95	0.08	-0.19	1.44	0.79	0.82	0.11	1.11	1.62	
	±標準偏差		0.21	0.18	0.19	0.20	0.15	0.07	0.04	0.15	0.34	0.40	0.15	0.15	0.18	
P	応答値	0.74	0.97	0.88	0.59	0.38	0.11	-0.01	-0.28	1.32	0.27	0.34	0.39	1.09	0.09	
	±標準偏差	0.12	0.50	0.12	0.18	0.09	0.16	0.06	0.20	0.04	0.23	0.20	0.02	0.13	0.02	
G	応答値	0.21	1.14	1.22	1.29	0.58	0.92	1.62	0.10	1.32	0.87	1.07	0.25	1.20	0.88	
	±標準偏差	0.11	0.41	0.05	0.20	0.01	0.08	0.26	0.04	0.07	0.12	0.24	0.02	0.08	0.22	

図6: ペプチド L の網羅的 site-saturation 解析

アミノ酸部位(横軸)ごとに, 元の配列の応答値(黒い四角)を1とした時の, 各アミノ酸置換(縦軸)ペプチドの応答値を示す. 元の配列のペプチドの応答値に対して応答が70%以上消失したものを青塗り, 30~70%未満消失したものを水色塗り, 30%未満と小さい消失が生じたものを青文字で示した. 応答が70%以上増大したものを赤塗り, 30~70%未満増大したものを桃色塗り, 30%未満と小さい増大が生じたものを赤文字で示した.

4. まとめ

本研究では, コク味受容体(CaSR)を活性化させるリゾチームの分子表面ペプチド(CAAKFESNFNTQATN)

を見出し, 構成アミノ酸残基のうち, CaSR 活性化に特に重要な残基として C1, N8, F9, 及び Q12, また次いで重要な残基として E6 を特定した. すなわちリゾチームは,

これら5つのアミノ残基でCaSRと相互作用することが示唆された。CaSRの活性化に必要な物理化学的性質についてはF9位の「疎水性」が重要であることが明らかとなったものの、他のアミノ残基については未解明であるため、今後、機械学習などによる解析が必要である。また、A2, A3, K4及びS7を他のアミノ酸に置換することでCaSR活性化能の向上が可能であることが示された。

以上のように、本研究によって得られた知見は、リゾチームによるCaSR活性化メカニズムの解明に役立つのみならず、より高活性な“コク味”機能ペプチドの創製につながるものと期待できる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、(公財)東洋食品研究所から多大なるご支援を戴きました。関係者の皆様に感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1 Yusuke, Amino; Masakazu, Nakazawa; Megumi, Kaneko; Takashi, Miyaki; Naohiro, Miyamura; Yutaka, Maruyama; Yuzuru, Eto. Structure-CaSR-activity relation of kokumi γ -glutamyl peptides. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 2016, **64**(8), p. 1181-1189. doi: 10.1248/cpb.c16-00293
- 2 Takeaki, Ohsu; Yusuke, Amino; Hiroaki, Nagasaki; Tomohiko, Yamanaka; Sen, Takeshita; Toshihiro, Hatanaka; Yutaka, Maruyama; Naohiro, Miyamura; Yuzuru, Eto. Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception. *J. Biol. Chem.* 2010, **285**(2), p. 1016-1022. doi: 10.1074/jbc.M109.029165
- 3 Tariq, I. Alfadda; Ahmad, M. A. Saleh; Pascal, Houillier; John, P. Geibel. Calcium-sensing receptor 20 years later. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2014, **307**(3), p. C221-231. doi: 10.1152/ajpcell.00139.2014
- 4 Mizuki, Yamamoto; Yuko, Terada; Takayasu, Motoyama; Tsutomu, Saito; Keisuke, Ito. Sweet proteins lysozyme and thaumatin are protein-type agonists for the calcium-sensing receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020, **521**(1), p. 227-231. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.111
- 5 Edward, M. Brown, M. D.; Craig, Katz; Robert, Butters; Olga, Kifor. Polyarginine, polylysine, and protamine mimic the effects of high extracellular calcium concentrations on dispersed bovine parathyroid cells. *J. Bone Miner. Res.* 1991, **6**(11), p. 1217-1225. doi: 10.1002/jbmr.5650061112
- 6 Tetsuya, Masuda; Yuki, Ueno; Naofumi, Kitabatake. Sweetness and enzymatic activity of lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**(10), p. 4937-4941. doi: 10.1021/jf010404q
- 7 Zuzana, Saidak; Michel, Brazier; Saïd, Kamel; Romuald, Mentaverri. Agonists and allosteric modulators of the calcium-sensing receptor and their therapeutic applications. *Mol. Pharmacol.* 2009, **76**(6), 1131-1144. doi: 10.1124/mol.109.058784
- 8 Yoshito, Abe; Mitsuru, Kubota; Shinya, Takazaki; Yuji, Ito; Hiromi, Yamamoto; Dongchon, Kang; Tadashi, Ueda; Taiji, Imoto. Effect on catalysis by replacement of catalytic residue from hen egg white lysozyme to *Venerupis philippinarum* lysozyme. *Protein Sci.* 2016, **25**(9), 1637-1647. doi: 10.1002/pro.2966