

# 新規甘味関連タンパク質の探索および解析

山形大学 理学部  
井深 章子

## 【研究の目的と背景】

甘味は嗜好される味の代表格であるが、スクロースなどの糖質の過剰摂取は肥満、糖尿病、虫歯といった疾病の原因となる。そのため、様々な低カロリー甘味料の探索・開発が行われており、その1つに甘味タンパク質がある。タンパク質は一般に無味であるが、複数の甘味タンパク質が発見され、一部は甘味料として実用化が認められている。甘味タンパク質に加え、味覚修飾タンパク質（酸味を甘味に変換する活性を有するタンパク質）も同定されている<sup>1)</sup>。酸味と甘味の両方を付与する食品が多いことから、これらのタンパク質も甘味料としての応用が期待される。現段階では、甘味タンパク質や味覚修飾タンパク質が甘味を呈するメカニズムは未解明の部分が多い。

味覚修飾タンパク質ミラクリンは、亜熱帯原産ミラクルフルーツの果実に含まれる味覚修飾タンパク質である<sup>1)</sup>。複数の研究グループがミラクリンの大量生産を試みているが現時点では成功しておらず、タンパク質分子レベルでの解析は進んでいない。ミラクリンの一次構造（アミノ酸配列）は植物のトリプシン・インヒビター（タンパク質分解酵素を阻害するタンパク質）と類似している。本研究では、日本で栽培される農作物（大豆など）に含まれるミラクリンに類似したタンパク質（ミラクリン類似タンパク質）を対象とし、タンパク質分子がどのようにして「味覚修飾活性」や「甘味」を有するのか、その分子レベルでの特徴の解明を目指した。

## 【研究の方法】

### 1. ミラクリン類似タンパク質遺伝子のクローニング

平成25年7月初旬に山形県農業総合研究センターよりダイズの葉および実、山形県園芸試験場より3品種のブドウの葉および実の供与を受けた。RNeasy plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて各試料から total RNA を抽出し、First-strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare) を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、データベースに登録された配列情報をもとに PCR 法により目的遺伝子を増幅した。

### 2. 組み換えタンパク質発現系の構築

得られたミラクリン類似タンパク質遺伝子を、大腸菌の発現ベクター pET28a (Novagen), pColdI (タカラバイオ), および酵母の発現ベクター pPICZ $\alpha$  C (Life

Technologies) に挿入し、組み換えタンパク質発現を行った。タンパク質の発現は SDS-PAGE で確認した。

### 3. 組み換えタンパク質の精製

50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した陽イオン交換レジン (CM-TOYOPEARL 650M) を用い、NaCl 濃度を 0-500 mM の直線濃度勾配で精製を行った。

### 4. ミラクリン型へのアミノ酸残基置換

PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ) を用い、ミラクリン類似タンパク質にシステイン残基を導入した変異体を作製し、野生型タンパク質と同じ方法で発現・精製を行った。

## 【研究内容、実施経過】

### 1. ミラクリン類似タンパク質遺伝子のクローニング

ダイズおよびブドウからの totalRNA の抽出を行ったところ、ダイズの葉・実からは十分量の totalRNA が得られ、cDNA の合成および目的遺伝子の増幅に成功した。一方、ブドウから得られた RNA 量は非常に少なく、cDNA を得ることができなかったため、ブドウ由来の目的遺伝子は得られなかった。クローニングされた遺伝子から、ダイズ由来ミラクリン類似タンパク質 (Soybean miraculin-like protein, SoyMLP) の全長は 209 アミノ酸、分子量は約 23kDa と推定された。

### 2. 組み換えタンパク質発現系の構築

クローニングした遺伝子をシグナル配列解析プログラム SignalIP で解析したところ、N 末端側 26 アミノ酸残基はシグナル配列であることが推定された。そこで、この部分を除いた成熟タンパク質部分の発現を試みた。大腸菌の発現プラスミドベクター pET28a に遺伝子を挿入した pET28a-SoyMLP $\Delta$ ss で大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換し発現を確認したところ、発現したタンパク質は主に不溶性画分に確認された。pColdI を用いた発現ベクター pColdI-SoyMLP $\Delta$ ss で大腸菌 BL21 を形質転換したところ、目的タンパク質に相当するバンドが可溶性画分に確認された (図 1A)。酵母の発現系においても、目的タンパク質の分泌が確認された (図 1B)。

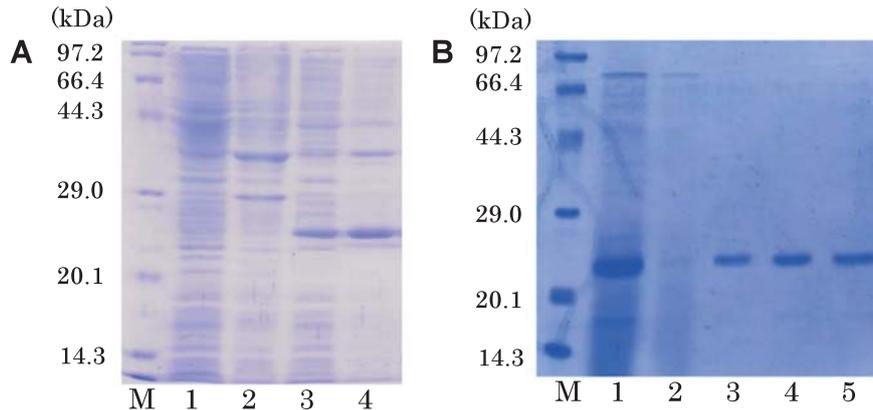


図1 組み換え SoyMLP の発現および精製.

A, 大腸菌 BL21 における SoyMLP の発現. レーン M: 分子量マーカー, レーン 1: BL21 の可溶性画分, レーン 2: BL21 の不溶性画分, レーン 3: SoyMLP 発現プラスミドを導入した BL21 の可溶性画分, レーン 4: SoyMLP 発現プラスミドを導入した BL21 の不溶性画分. B, 酵母 *Pichia pastoris* における SoyMLP の発現. M: 分子量マーカー, レーン 1, 精製前の培地画分, レーン 2: 陽イオン交換カラム精製時の素通り画分, レーン 3~5: 精製時の SoyMLP を含む溶出画分.

### 3. SoyMLP の精製

陽イオン交換カラムを用いて酵母で生産した SoyMLP の精製を行った (図 1B). 200 mL の液体培養によって約 5 mg の精製標品が得られた.

### 4. ミラクリン型へのアミノ酸残基置換

ミラクリンは二量体を形成することではじめて味覚修飾活性を持つということがわかっている. ミラクリンの二量体形成に重要なシステイン残基は, SoyMLP では保存されていない. そこで, そのシステイン残基を導入した変異

体を作製し, 発現・精製を行った. 具体的には, ミラクリンの 137 番目のシステイン残基を, SoyMLP の相当する位置に導入した変異体 SoyMLP-Cin を作成した (図 2A). 精製方法は野生型 SoyMLP と同様に行った (図 4B). 精製タンパク質はゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量を解析した. 二量体を形成した場合は約 11.1 mL, 単量体の場合は 12.5 mL にピークが現れると推定された. その溶出位置は 12.5 mL 付近で野生型 SoyMLP の場合と同じであり, 二量体は形成されていないと判断された (図 2B).

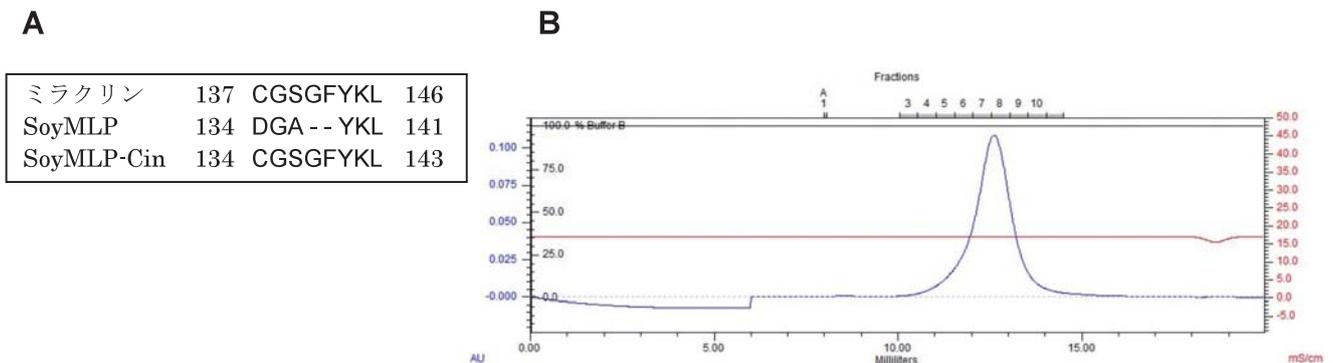


図2 変異型酵素 SoyMLP-Cin の変異導入位置とゲルろ過クロマトグラフィー分析.

A, SoyMLP-Cin における変異導入部位のアミノ酸配列を示した. ミラクリンの Cys137 を SoyMLP に導入することを目的とし, 相当する領域のアミノ酸置換および 1 アミノ酸残基の挿入を行った. B, SoyMLP-Cin のゲル濾過クロマトグラフィーの結果.

### 【研究から得た結論・考察】

本研究ではダイズ由来ミラクリン類似タンパク質 SoyMLP のクローニングおよび組み換えタンパク質発現・精製に成功した。大腸菌を宿主とした場合、T7 プロモーターを利用した pET 発現系ではタンパク質が不溶性画分に確認され、培地や培養温度等の条件を変えてもタンパク質の可溶化は見られなかった。一方、大腸菌コールドショック遺伝子 *cspA* のプロモータ配列を利用した pCold 発現系ではタンパク質が可溶性画分に確認され、pCold ベクターのほうが SoyMLP の発現に適していることが明らかになった。

ミラクリンの味覚修飾活性にはタンパク質分子の二量体化が重要であると報告されている<sup>2)</sup>。本研究では、SoyMLP に味覚修飾活性を付与することを目的としてシステイン残基導入と二量体化を試みたが、システイン残基付近のアミノ酸置換だけでは二量体は形成されることが判明した。

### 【残された問題、今後の課題】

ミラクリンが味覚修飾活性を呈するメカニズムは明らかになっていない。本研究ではダイズ由来ミラクリン類似タンパク質 SoyMLP に味覚修飾活性を付与することで、ミラクリンの味覚修飾機構を明らかにすることを目指した。この試みの第一歩として SoyMLP の二量体化を試みたが、成功には至らなかった。SoyMLP とミラクリンのアミノ酸配列の相同性は約 50% であり、部位特異的なアミノ酸数残基の置換で SoyMLP にミラクリンの性質を付与することは難しいと考えられる。今回試みた二量体化においても、共有結合を形成するシステイン残基以外のアミノ酸残基も二量体化に重要である可能性が高い。今後は、部位特異的なアミノ酸残基置換だけでなく、立体構造モデリングの結果も参考にしながら、ミラクリンと SoyMLP のキメラタンパク質の作成を行い、ミラクリンの味覚修飾活性に重要なアミノ酸残基・領域を明らかにしたいと考えている。

### 【参考文献】

1. Behrens M, Meyerhof W, Hellfritsch C, Hofmann T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 2220-2242 (2011).
2. Matsuyama T, Satoh M, Nakata R, Aoyama T, Inoue H. *J Biochem.* **145**, 445-450 (2009).