

鶏卵由来新規コク味成分の作用メカニズム解析

静岡県立大学食品栄養科学部・准教授 伊藤 圭祐

■ 緒 言

厚生労働省によって実施された「国民健康・栄養調査(平成 26 年)」、JETRO によって世界 7 カ国で実施された「日本食品に対する海外消費者意識アンケート調査(平成 23 年)」では、いずれも消費者の購買行動(食品の魅力)において、おいしさ(味)の寄与が最も大きいことが報告されている。しかし食品は多成分混合系であり、肝心の味の分子メカニズムは十分に解明されていない。そのような背景において近年、“そのもの自体は味を呈さず、好ましい基本味を増強し、厚みと持続性をもたらす味”としてコク味の定義が提唱され、その受容体として CaSR が同定された¹⁾。我々はカルシウムイメージングを基盤として従来法の 2 倍高感度な CaSR 応答評価システムを開発し、食品成分の網羅的スクリーニングを実施した結果、新規 CaSR アゴニスト(コク味成分)として鶏卵由来のリゾチームを発見した²⁾。

これまでに CaSR 活性化成分として Ca^{2+} を含む 2 価陽イオンや L-アミノ酸、ポリアミン等の低分子成分は報告されているが、分子量 1 万を超えるタンパク質成分は報告されていない。リゾチームがどのようなメカニズムで CaSR を活性化するかは不明であり、リゾチームによる CaSR 活性化メカニズムの解明は、一般に無味とされているタンパク質の“コク味”機能を理解する上で非常に有用な知見を与えると期待できる。そこで本研究では、リゾチームタンパク質の全網羅ペプチドライブラリーを用いて、CaSR との相互作用領域の特定を試みた。

■ 方 法

CaSR の活性化はカルシウムイメージング法により定量解析した²⁾。コドン最適化したヒト CaSR 及び $\text{G}\alpha 15$ の遺伝子を含むプラスミドを HEK293T 細胞に共トランスフェクトした。細胞をアッセイ緩衝液(146mM NaCl、5.5mM glucose、5mM KCl、1mM CaCl_2 、1mM MgSO_4 及び 2mM HEPES、pH 7.2)で洗浄した後、3 μM Fluo-8 AM(AAT Biquest, California, US)を添加し、37°Cで 30 分間インキュベートした。細胞をアッセイ緩衝液で洗浄し、アッセイ緩衝液中で 10 分間インキュベートした。FlexStation II マイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Inc., California, US)を用いてテストサンプルを well に加え、細胞内 Ca^{2+} レベルの変化を蛍光($\text{Ex}=490\text{nm}$ 、 $\text{Em}=525\text{nm}$)により定量解析した。

ペプチドは 4-(2', 4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy resin(レジン)を用い、パラレル型ペプチド合成装置(ResPep SL; Intavis 社)によって Fmoc 法により固相合成し、調製した。

■ 結果と考察

1) CaSR を活性化させるリゾチーム由来ペプチドの探索

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 応答を評価した結果、CaSR 応答を示す KRHGLDNYRG、KFESNFNTQA、TNRNTDGSTD を見出した。これら 3 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 1)。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ことから、ESNF を中心とした 16 ～ 3 アミノ酸の周辺ペプチドを網羅的に 51 個合成し、CaSR 応答を評価した(図 2)。その結果、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より低濃度での CaSR 応答を再度評価した結果、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として、CAAKFESNFNTQATN を特定した。

2) CAAKFESNFNTQATN による CaSR 応答の解析

CaSR の特異的阻害剤である NPS 2143 の同時添加により、CAAKFESNFNTQATN による CaSR 応答

は消失したことから、本応答は確かに CaSR を介して生じたものであることが確認された。また、応答の濃度依存性も解析され、EC50 値は 49 μ M と算出された。本研究で用いた CaSR 応答評価系において、既知 CaSR 活性化成分であるスペルミン、プロタミン及び GSH の EC50 値はそれぞれ 198 μ M、231 μ M 及び 560 μ M であった。リゾチームの CaSR 活性化能 (EC50 : 590 μ M) はこれら既知成分と比較可能な程度である。リゾチームと比較して、CAAKFESNFNTQATN の EC50 値は約 12 倍低かったことから、ペプチド化によって CaSR との相互作用において立体障害を起こしていた領域がなくなり、活性化に必要な領域のみが CaSR へ作用しやすくなった結果、活性が向上したことが示唆された。

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、CaSR の応答曲線を左ヘシフトさせ、低濃度でのオルソステリックアゴニストの CaSR 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の 2 種類が存在する³⁾。CAAKFESNFNTQATN は他のアゴニストを含まない条件においても CaSR を活性化させたことから、オルソステリックアゴニストとして CaSR に作用することが明らかとなった。

3) Alanine-scanning

続いて CaSR 活性化における CAAKFESNFNTQATN のアミノ酸残基の寄与を Alanine-scanning 法によって解析した (図 3)。CAAKFESNFNTQATN を構成するアミノ酸を 1 残基ずつ A に置換した 16 個のペプチドを合成し、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、F5、E6、N8、F9 及び Q12 の Ala 置換により、CaSR 応答が消失した。このことから、これら 6 アミノ酸残基が CaSR 応答に特に重要であることが示唆された。各ペプチドについて、より高濃度の 100 μ M での CaSR 応答を評価した結果では、F9 を Ala 置換したペプチドでのみ、CaSR 応答の消失が観察された。この結果から、F9 が CaSR との相互作用に最も重要であることが示された。リゾチームタンパク質における CAAKFESNFNTQATN の位置を調べた結果 (図 4)、C1、F5、E6、N8、F9 及び Q12 はいずれもリゾチームの分子表面に集中して存在していたことから、リゾチームは本領域で CaSR と相互作用する可能性が示唆された。

4) F9 の site-saturation analysis

CAAKFESNFNTQATN の CaSR 活性化に最も重要であることが示唆された F9 について、CaSR 活性化に必要なアミノ酸残基の特徴を調べるため、F9 を 20 種類のアミノ酸で置換したペプチド CAAKFESNXNTQATN について CaSR 応答を評価した。各ペプチドについて 50 μ M での CaSR 応答を評価した結果、R、D、C、E、G、H、I、L、M、F、P、T、及び V に置換したペプチドから明確な CaSR 応答が検出された。そこで、アミノ酸の様々な物理化学的及び生化学的特性を表す数値インデックスのデータベースである、AAindex を用いて CaSR 応答強度と F9 位のアミノ酸の AAindex との関連を調べた⁴⁾。AAindex は 544 種のアミノ酸指標を、その物理化学的性質によってクラスタリングした 13 種類の指標であり、固有の指標としてアミノ酸の物理化学的性質を把握できる。*in silico* 解析の結果、「Hydropathy index」が CaSR 応答強度ともっとも関連する傾向が見られたことから、特に F9 位に「疎水性度の高いアミノ酸残基」が存在することが CaSR の活性化に重要であることが示唆された。

以上の結果より、CaSR を活性化させる鶏卵リゾチームの部分領域ペプチドの特定に成功し、作用メカニズムの一端を明らかとした。

■ 要 約

本研究では鶏卵リゾチームによる CaSR 活性化メカニズムの解明を目的として、リゾチーム由来ペプチドの網羅的機能解析を実施した。リゾチームのアミノ酸配列を全網羅するペプチドライブラリーを合成し、カルシウムイメージング法によりヒト CaSR 応答を評価した。1 アミノ酸レベルの精密スクリーニング、及び続く deletion 解析により、リゾチーム (EC50 : 590 μ M) よりも 12 倍高活性な分子表面ペプチド CAAKFESNFNTQATN (EC50 : 49 μ M, オルソステリックアゴニスト) を見出した。Alanine-scanning により、リゾチームの分子表面に露出する本ペプチドの構成アミノ酸残基 (C1、F5、E6、N8、F9 及び Q12) が CaSR との相互作用に重要であり、また特に F9 位に疎水性残基が存在することが CaSR 活性化に不可欠であることが示唆された。

■ 文 献

- 1) Ohsu, T., Amino, Y., Nagasaki, H., Yamanaka, T., Takeshita, S., Hatanaka, T., Maruyama, Y., Miyamura, N., Eto, Y. (2010) Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception. *J. Biol. Chem.* 285, 1016-1022.
- 2) Yamamoto, M., Terada, Y., Motoyama, T., Saito, T., Ito, K. (2020) Sweet proteins lysozyme and thaumatin are protein-type agonists for the calcium-sensing receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 521, 227-231.
- 3) Zuzana, S., Michel, B., Saïd, K., Romuald, M. (2009) Agonists and allosteric modulators of the calcium-sensing receptor and their therapeutic applications. *Mol. Pharmacol.* 76, 1131-1144.
- 4) Ito, K., Hikida, A., Kawai, S., Lan, V.T.T., Motoyama, T., Kitagawa, S., Yoshikawa, Y., Kato, R., Kawarasaki, Y. (2013) Analysing the substrate multispecificity of a proton-coupled oligopeptide transporter using a dipeptide library. *Nat. Commun.* 4, 2502.

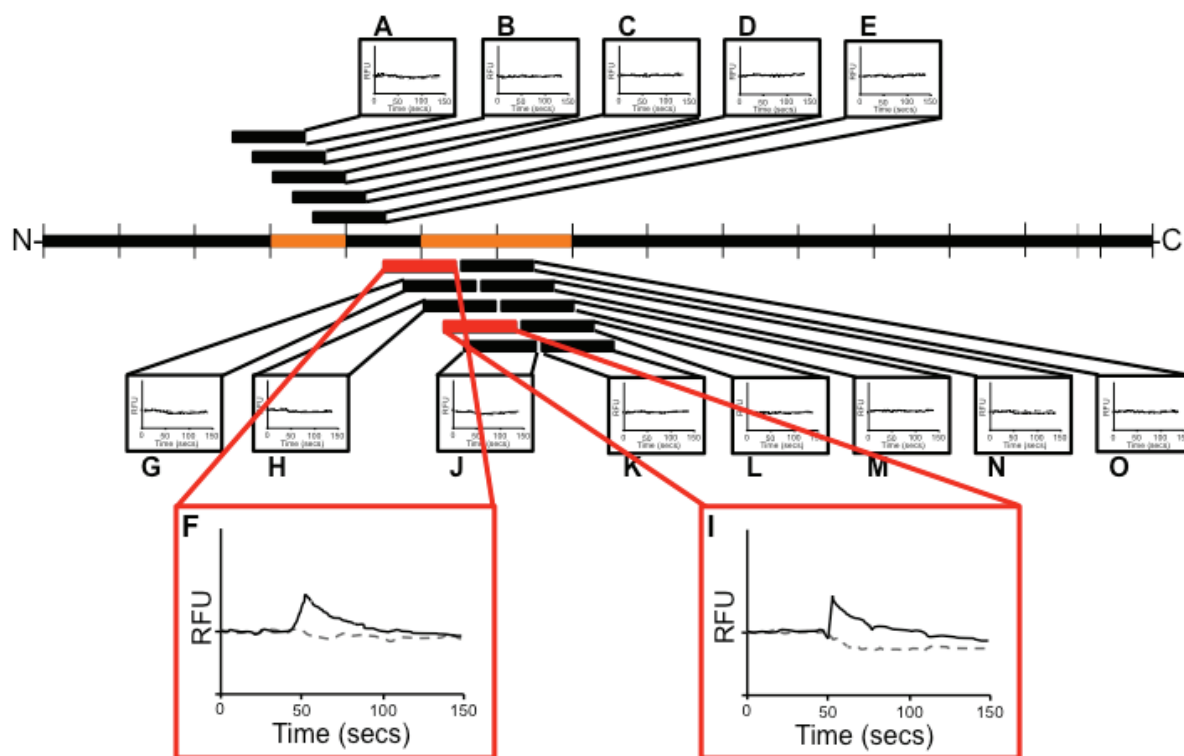


図1 リゾチーム由来 CaSR 活性化候補ペプチド周辺配列の精密スクリーニング

リゾチームのアミノ酸配列に由来する 15 個のペプチドを投与した際の CaSR 応答チャートの例。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。応答評価ペプチドは、AAAMKRHGLD (A)、AMKRHGLDNY (B)、KRHGLDNYRG (C)、HGLDNYRGYS (D)、LDNYRGYSLG (E)、VCAAKFESNF (F)、AAKFESNFNT (G)、KFESNFNTQA (H)、ESNFNTQATN (I)、NFNTQATNRN (J)、NTQATNRNTD (K)、QATNRNTDGS (L)、TNRNTDGSTD (M)、RNTDGSTDYG (N)、及び TDGSTDYGIL (O) である。VCAAKFESNF (F)、ESNFNTQATN (I) 投与後に、CaSR 発現細胞において RFU の増加(活性化)が見られた。

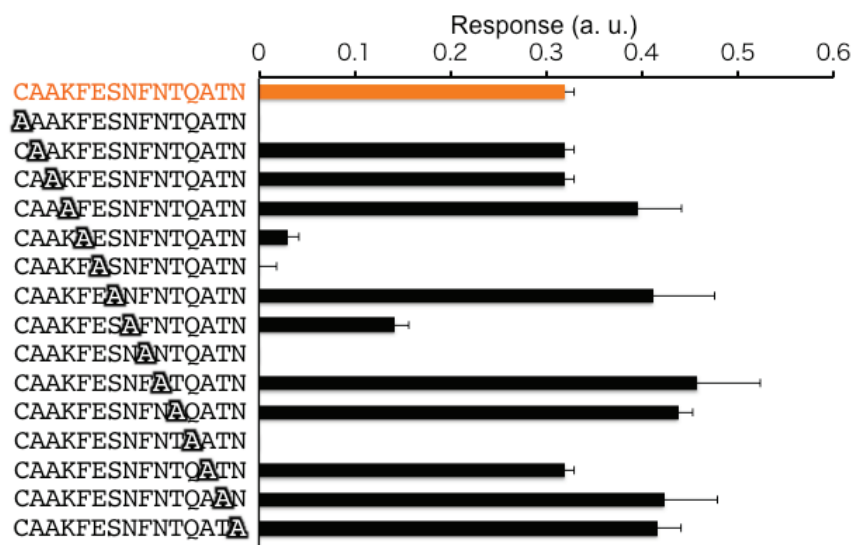


図3 CAAKFESNFNTQATN の Alanine-scanning

元配列のペプチド(CAAKFESNFNTQATN)のアミノ酸配列と棒グラフをオレンジ色で示した。置換した A 残基は白字黒縁取りの「A」で示した。50 μ M の 3 回の応答評価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。

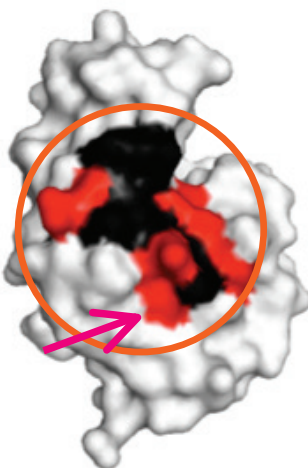


図4 リゾチームタンパク質における CAAKFESNFNTQATN の位置

リゾチーム (Uniprot: P00698) の立体構造を surface モデルで示す。(図 3) に示した Alanine-scanning において CaSR 応答の顕著な低下が見られたアミノ酸残基を赤色で示し、それ以外のアミノ酸残基を黒色で示した。推定される CaSR との作用領域をオレンジ線で囲み、特に重要と考えられる F9 をピンク色の矢印で指した。