

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	味覚改変作用機構の解明:ミラクルフルーツの甘味提供機構をモデルとして
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	植野 洋志 (農学部・教授) 研究代表者 石 薇 (農学部・実験実習助手) 山崎 英恵 (農学部・准教授) 谷澤 克行 (大阪大学名誉教授) 渡部 紀久子 (所属なし)
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1) ミラクリン (2) 甘味 (3) 味覚改変 (4) 受容体 (5) 酸 (6) 官能試験

1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

ミラクリンは熱帯性植物であるミラクルフルーツの実から抽出されるタンパク質成分であり、口に含んだのちに酸味物質を食すると甘く感じるという味覚改変作用がある。わが国でミラクリンの作用が見つかっているが、酸味物質との相互作用、酸性条件下でのタンパク質の構造変化、酸味と甘味受容体との相互作用など、まだまだ解明すべき課題が残っている。昨今の肥満対策として、良質のしかも低カロリー性の甘味料の需要は高く、ミラクリンはその性質上、理想の甘味料として注目されており、機能解明は高く望まれている。

近年、遺伝子組換え技術により、ミラクリン遺伝子を組み込んだ大腸菌、酵母菌、そして植物体などが準備され、ミラクリンタンパク質の発現系として利用されてきたが、どれも生化学的な解析を行えるようなレベルには到達していない。

本研究では、1)酸味物質としてプロトン (pH) が重要なのか、それともクエン酸、リンゴ酸、酢酸などの陰イオンの違いが重要なのかを明らかにする、2)ミラクリンタンパク質に果たして酸による構造変化が起こるのかを明らかにする、3)ミラクリンタンパク質の標的受容体は酸味受容体なのか甘味受容体なのかを明らかにする、4)ミラクリンタンパク質の結晶化、構造決定を行う。【方法】1)味覚官能試験法により、酸味物質の違いを検討する。2)ミラクリンタンパク質をミラクルフルーツより単離・精製するか、遺伝子組換え体ミラクリンタンパク質を作製し、タンパク質化学・構造生物学的手法により構造の変化が酸物質との相互作用に依存するかを検討する。3)ミラクリンの生理作用が、ミラクリンタンパク質と酸物質の複合体形成を経由するのかどうかを検討して、味覚官能試験法により検討する。4)結晶構造解析により検討する。

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

研究計画ごとに成果概要を記載する.

1)酸味物質としてプロトン (pH) が重要なのか, それともクエン酸, リンゴ酸, 酢酸などの陰イオンの違いが重要なのかを明らかにする:

ミラクリンタンパク質を抽出した.

方法

1. 4°Cで保存していたミラクルフルーツを液体窒素で凍結後、乳鉢で破碎した。これを約 100ml のミリ Q 水に懸濁し、30 秒ホモジナイズさせた。50ml フェルコンに分注し、11000rpm、4°Cで 10 分間遠心機にかけた。
2. 遠心後、ピンクの上清は捨て、沈殿に少量のミリ Q 水を入れて、沈殿を洗った。30 秒ホモジナイズさせた後、11000rpm、4°Cで 15 分間遠心機にかけた。
3. 遠心後、薄ピンク色の上清を捨て、沈殿に 0.5M NaCl 120ml を加えて 2 分ホモジナイズし、タンパク質を抽出した後、11000rpm、4°Cで 20 分間遠心機にかけた。
4. 上清を保存し、沈殿にまた 0.5M NaCl/10mM HEPES buffer 約 100ml を加えて 30 秒ホモジナイズし、タンパク質を抽出した後、11000rpm、4°Cで 20 分間遠心機にかけた。
5. 上清を保存した。
ミラクリンタンパク質を精製した。

方法

・疎水性クロマト用担体 PHENYL - TOYOPEARL 650M

1. 樹脂をカラムに 2 ml 詰め、Equilibration buffer でカラムを平衡化した。
2. 次にサンプルを平衡化したカラムに通し、粗雑タンパク質を溶出した。
3. 再び Equilibration buffer でカラムを平衡化して洗浄を行い、Elution buffer をカラムに通し、各溶出液を回収した。

・クロマト用担体 Con A Sepharose 4B affinity chromatography

1. 樹脂をカラムに 2 ml 詰め、Equilibration buffer でカラムを平衡化した。
2. 次にサンプルを平衡化したカラムに通し、粗雑タンパク質を溶出した。
3. 再び Equilibration buffer でカラムを平衡化して洗浄を行い、Elution buffer をカラムに通し、溶出液を回収した。

脱塩・濃縮した。

透析チューブにサンプルを入れて、少し空気を入れて両端を結び、10mM HEPES buffer (pH6.0)を入れたビーカー中に入れて、スターラーで攪拌した。

2~3 時間おきに buffer を交換し、2~3 回繰り返すことで平衡化させた。平衡化の確認は等電率を測定して確認した。

透析終了後、透析チューブをタッパーに入れて、Aquacide II をまぶして冷蔵庫中に 3~4 時間程度静置して濃縮を行った。

タンパク質量と活性の確認を行った。活性の確認は 0.01%クエン酸を口に含み、スクロース溶液を含み、ミラクリンタンパク質の有無により甘味を感じるか否かで判断した。

ミラクリンタンパク質は SDS-PAGE および Western blot 法によりほぼ単一バンドであることを確認した。

官能試験に用いた酸味物質は:

クエン酸 0.01% (pH 3.4), 0.05% (pH 3.0)

リンゴ酸 0.008% (pH3.5), 0.038% (pH 3.1)

酢酸 0.007% (pH3.8), 0.037% (pH 3.5)

酒石酸 0.007% (pH 3.4), 0.035% (pH 3.0)

アスコルビン酸 0.021% (pH 3.6), 0.103% (pH 3.2)

乳酸 0.011% (pH 3.4), 0.054% (pH 2.8)

スクロース溶液は 0.8%を用いた。

酸味物質の濃度の差による活性比較

Table 1. クエン酸の濃度差による順位付け (n=12)

	0.01%	0.05%	0.8%スクロース
合計	29	23	20

Table 2. リンゴ酸の濃度差による順位付け (n=11)

	0.008%	0.038%	0.8%スクロース
合計	23	25	18

Table 3. 酢酸の濃度差による順位付け (n=11)

	0.007%	0.037%	0.8%スクロース
合計	21	26	19

Table 4. 酒石酸の濃度差による順位付け(n=11)

	0.007%	0.035%	0.8%スクロース
合計	24	23	19

Table 5. アスコルビン酸の濃度差による順位付け (n=11)

	0.021%	0.103%	0.8%スクロース
合計	27	21	18

Table 6. 乳酸の濃度差による順位付け (n=11)

	0.011%	0.054%	0.8%スクロース
合計	23	22	21

食品中に多く含まれるクエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、調味料として使われる酢酸、ぶどうなどに含まれる酒石酸、乳製品に含まれる乳酸、以上の6種類の酸味物質を用いて官能検査を実施した。評価は、甘味を強いと感じた順に1~3と順位をつけた。

順位法で検定を行ったところ、甘味に有意差は認められず、各濃度とスクロースの2つの間でも有意差は認められなかった。このことから、酸味物質の濃度によって活性の強さに差はないと考えられた。アスコルビン酸は他の有機酸と異なりカルボキシル基を持たない。しかし、ミラクリンの味覚修飾活性が認められたことから、味覚修飾活性は酸味物質依存的ではなく、pH 依存的な活性であることが示唆された。

酸味物質の種類の違いによる活性の強さの検討

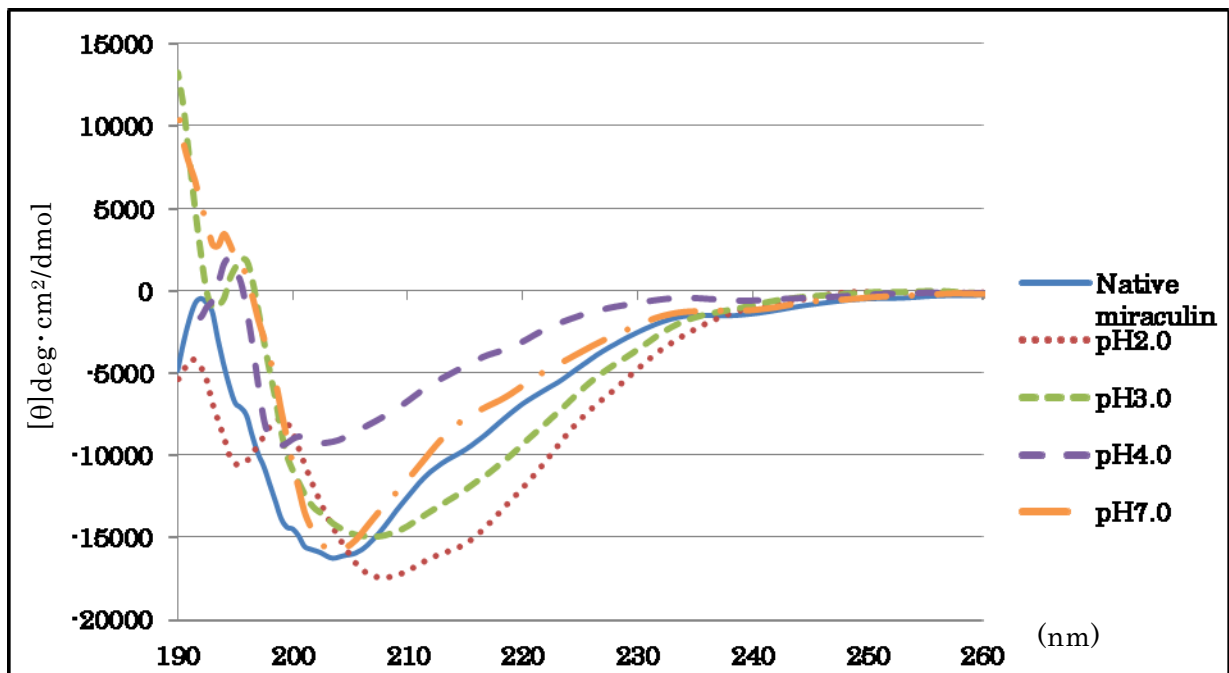
Table 7. 酸味物質の種類の違いによる甘味の順位付け(n=16)

	0.01%クエン酸	0.008%リンゴ酸	0.007%酢酸
平均	1.69	2.19	2.13
合計	27	35	34

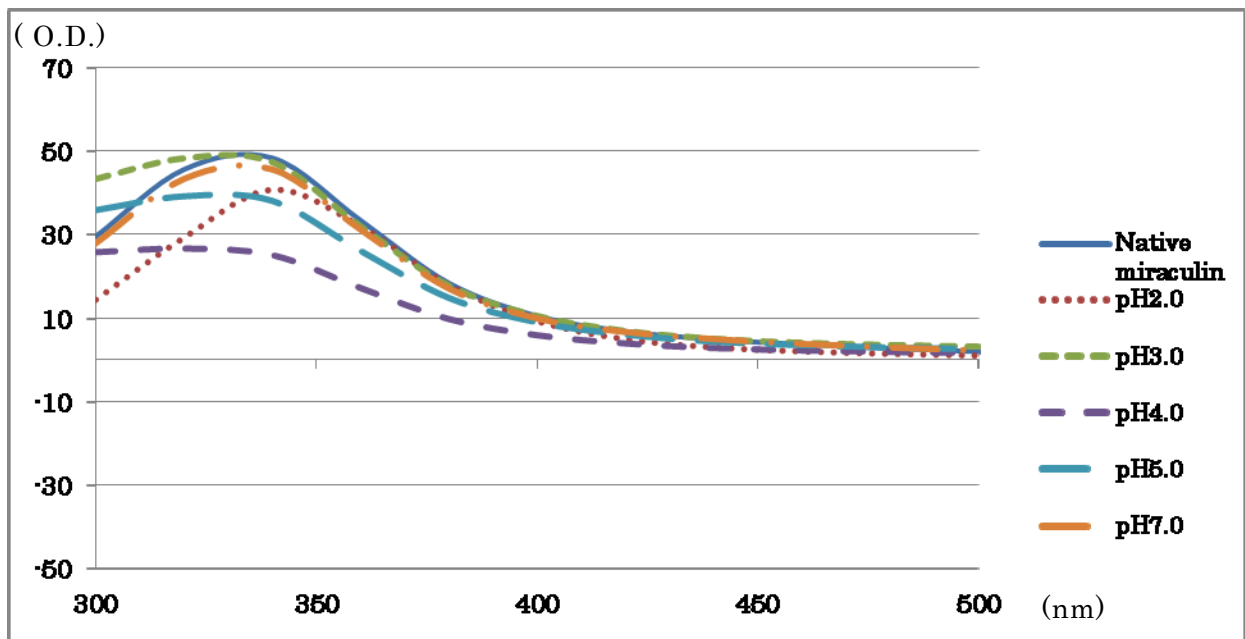
食品中に多く含まれるクエン酸、次に多く含まれるリンゴ酸、そして調味料として使われる酢酸を用いて酸味物質間で活性の強さに差は生じないのかを検討した。この3種類は全て有機酸であり、カルボキシル基の数がそれぞれ異なることも考慮して選択した。(クエン酸：3個、リンゴ酸：2個、酢酸：1個) 評価は、甘味を強いと感じた順に1~3と順位をつけた。酸味物質の種類の違いによる活性の強さの比較の結果を順位法で検定を行ったところ、酸味、甘味共に有意差はなく、それぞれ2点間でも有意差は認められなかった。酸味物質の種類の違いによる活性の強さに有意差は認められなかったことから、酸味物質の濃度の差による活性比較の結果と同様に、味覚修飾活性に関わっているのはカルボキシル基ではなく pH

であることが考えられた。

2)ミラクリンタンパク質に果たして酸による構造変化が起こるのかを明らかにする、
Graph 1. CD スペクトル解析結果(pH 変化)



Graph 2. 蛍光スペクトル (pH 変化)



分光学的には、ミラクリンタンパク質は pH 依存性を示した。ただ、官能試験での pH との相関を示すまでには至らず、さらにどのような残基（疎水性か親水性）が関与するのかに関しては、蛍光プローブでの検討が必要である。

3)ミラクリンタンパク質の標的受容体は酸味受容体なのか甘味受容体なのかを明らかにする、

この項に関しては、取り組み（組換え体タンパク質の発現）が遅れたことで結果なし。

4)ミラクリンタンパク質の結晶化，構造決定を行う．

ミラクリンタンパク質の結晶化には，糖鎖構造を持たないミラクリンタンパク質の準備が必須とされる．ネイティブのミラクリンは糖鎖構造を持ち，さらに，量的には多くを望めないことより遺伝子組換え体タンパク質を利用する方向で検討した．

ミラクリン遺伝子はミラクルフルーツから mRNA を抽出し，逆転写酵素により cDNA 化した後，クローニングベクター cGEM-T vector へ導入し，大腸菌 JM109 株に形質転換した．培養後，ミニプレップにて得たプラスミドをテンプレートとし，ミラクリンの本体（シグナルペプチドなどの部分を除いたもの）を PCR にて増幅し，麴菌，パン酵母，大腸菌で発現できるように cDNAs を準備した．低温にて作動するプロモータを備えたパン酵母発現ベクターに組み込み，誘導発現を試みた．ミラクリンの N 末端領域と C 末端領域に His タグを備えた発現系のため，発現の確認には抗 His-tag 抗体と抗ミラクリン抗体の両方を用いた．

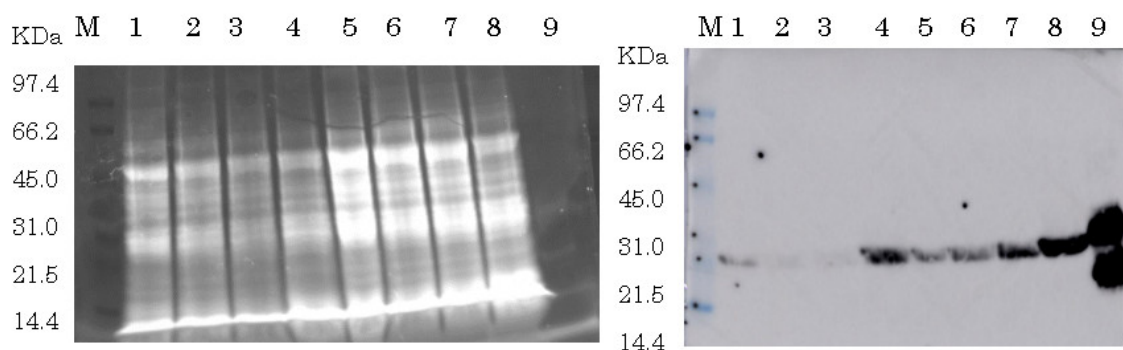


Fig.3 SDS-PAGE on 2018/2/13

Fig.4 Western-blot on 2018/2/13

12% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gel 200 V, 32 min,

Primary antibody : Anti-miraculin 1:1000 Rabbit resum @ RT for 1 hour

Secondary antibody : Anti-rabbit 1:100,000 Donkey IgG @ RT for 1 hour

Wako ImmunoStar®zeta 3mL, @ RT for 5 minutes

Fig.4 にて確認できるようにミラクリンタンパク質特異的なバンドが観察されており，発現の確認はとれた．さらに，収率効率を上げる作業を継続している．また，変異体タンパク質の作製に取り掛かっている時点である．