

氏 名(本 籍)	香 村 正 徳 (神奈川県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 938 号
学位授与年月日	平成 6 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学位論文題目	Studies on the Sweet Protein Monellin : Solid-Phase Synthesis and Structure-Taste Relationships (甘味タンパク質モネリンの研究：固相合成と構造呈味相関)
主 査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副 査	筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌

論 文 の 要 旨

近年、低カロリー甘味料の需要が増大し、新規甘味剤の開発研究が広く行われるようになった。現在人工甘味料として広く利用されているアスパルテーム (Asp-Phe-OMe) は砂糖の約200倍の甘味を持つジペプチドである。このアスパルテームを含め、現在利用されている甘味料は全て偶然に発見されたものであるが、最近では、より甘味が強く安定な新しいタイプの甘味剤を、理論的にデザインし創出しようという研究が世界中で行われている。新規甘味剤を理論的にデザインするためには、甘味発現機構が明らかにされなければならない。これまでの甘味発現機構の仮説として代表的なものは、shallen-berger と Acree, および Kier の AH, B, X 説である。AH は水素供与基, B は水素受容基, そして X は疎水性基である。アスパルテームのような甘味ペプチドにおいては AH はアスパラギン酸の α -アミノ基, B は β -カルボキシル基である。甘味レセプターはこれらと相補的な部位を持ち、それらがイオン結合で相互作用する時強い甘味が引き起こされると考えられている。

甘味発現機構を明らかにし、甘味物質を理論的にデザインするのに最も有効な方法は、甘味物質とレセプター複合体の三次元構造を明らかにすることであるが、現在のところ甘味レセプターについては単離精製すら行われておらず、これらの立体構造を明らかにすることは現時点では不可能である。そこで、甘味物質の構造と甘味の関係を詳細に検討することによってレセプターの構造を推定するレセプターマッピングの手法が有効と考えられる。このような研究はアスパルテーム関連のペプチドアナログ等について行われてきた。しかしこれらの方法は、計算で得たエネルギー極少構造をレセプターとの結合構造、すなわち活性構造と仮定するため、エネルギー極少構造を多数持つペプチドのような

分子については、活性構造を正確には決定できないという問題がある。そこで筆者は立体構造がより固定されており、X線解析等により構造を正確に決定することができるタンパク質に着目した。そしてまず、甘味タンパク質の活性中心を明らかにすることを目的として本研究を行った。

現在、甘味たんぱく質として、モネリン、ソーマチン、ペンタディン、マビンリン、クルクリンが知られている。また別のタイプの甘味タンパク質として、それ自身は無味であるが、酸味を甘味に変える味覚変革物質ミラクリンが知られている。クルクリンはそれ自身が甘い、酸味を甘味に変える活性を持っている。筆者は、このうち最も分子量が小さくて化学合成に適しており、かつ既にX線結晶構造解析が行われているモネリンに着目した。モネリンについては化学修飾により活性中心を検索する試みも行われたが、修飾により立体構造が変化してしまうため成功しなかった。筆者らは、モネリンとそのアミノ酸残基を置換したアナログの合成を行い、その構造と呈味の相関を明らかにすることにより、甘味発現に必須のアミノ酸残基を決定することを目的として本研究を行った。

モネリンの甘味は重量比で砂糖の約3000倍と報告されており、これはモル比換算で約10万倍と天然物としてはソーマチンと並んで最も甘味の強い物質である。アミノ酸残基44のA鎖と50のB鎖の2つのサブユニットからなり、サブユニット単独では全く甘味を呈さないが、これらのサブユニットが1対1で非共有結合的に会合し天然の3次構造をとった時に始めて甘味を呈する。従って甘味の発現には立体構造が必要不可欠である。モネリンの一次構造式は1976年に3つのグループよりA、B鎖それぞれ2つずつ提出されていたが、その後どれが本当に正しいかは確かめられていなかった。そのため、第一章では、これまで一般的に正しいと信じられてきたその内の1つの組み合わせについて合成した。モネリンA、B鎖の化学合成は、 α -アミノ基の保護にFmoc基を用いる固相合成法を用いた。樹脂上に保護ペプチド鎖を構築し、続いて樹脂からのペプチド鎖の切断と全保護基の脱保護を行い、逆相HPLCによる精製で高純度の目的物が得られた。合成したA鎖とB鎖を溶液中で混ぜると、自発的、かつすみやかにfoldingし甘味が発現することがわかった。これによりfoldingした活性体のみを疎水クロマトで精製することによって純粋なモネリンを得ることができ、これを結晶化することができた。この合成モネリンの甘味力は重量比で砂糖の約4000倍であった。しかし、合成物を天然物と比較したところ、A鎖は完全に一致したが、B鎖についてはペプチドマッピングにおいて違いが見られた。この差違の原因は、合成に用いた構造式の一部の間違いであることがわかったので、第二章では、天然物についてそのアミノ酸配列を再検討した。この結果、天然物の正しい構造式は、合成に用いた構造式のC末端の2残基の順番を入れ替えたものであることが明らかになった。また、これまで知られていたA鎖のN末端の多様性に加え、B鎖のN末端にも多様性があることも明らかにした。

第三章では、第二章で明らかにした天然物のアミノ酸配列に基づく天然型モネリンを合成し、B鎖のC末端2残基の順番を入れ替えても甘味力は変化せず、この部分は甘味に関与していないことを確かめた。

第四章では、まず最初に、提出構造式の他の組み合わせの一つである[Asn^{A22}, Gln^{A25}, Asn^{A26}, Asn^{B49}, Glu^{B50}] モネリンを合成したところ甘味力が550倍に低下した。そこでこれら置換したA鎖の各アミノ酸残基の甘味力低下に及ぼす役割を明らかにするため、また、モネリンのX線結晶構造解析をおこなっ

た Kim らが、活性中心である可能性を示唆している A 鎖16番目 Asp 残基の甘味発現に対する影響を調べるために、これらのアミノ酸残基を一つずつ対応するアミド型に置換した〔Asn^{A18}〕－, 〔Asn^{A22}〕－, 〔Gln^{A25}〕－及び〔Asn^{A28}〕モネリンを合成した。これらのアナログはそれぞれショ糖の7500, 750, 2500および5500倍の甘味を示した。〔Asn^{A22}〕－と〔Gln^{A25}〕モネリンは甘味が低下すると同時に疎水クロマト条件下で不安定になることが分かった。これらの結果、A 鎖22番目 Asp 残基と、25番目 Glu 残基は、Kim らの指摘するように、立体構造を維持する分子内の水素結合やイオン結合に関与しているため、これらのアミノ酸残基を置換すると分子の安定性の低下と関連して、甘味力が低下することが分かった。また、他の Asp 残基の置換体は甘味力が増強され、これらの残基が甘味発現に必須ではないことがわかった。

第五章では、B 鎖のアミノ酸残基を置換したアナログを合成した。まず、天然物の化学修飾により、甘味発現に必須であると報告されていた B 鎖41番目 Cys を、Ser に置換したアナログを合成したところ、甘味力は約2000倍に低下したうえ、疎水クロマト条件下で安定性が非常に低下することが分かった。このことは、置換した Cys が立体構造を維持するうえで重要な役割を持っていることを示唆したが、甘味発現には必須ではないことを示していた。次に B 鎖 7 番目と21番目の Asp を Asn に置換したアナログを合成したところ、〔Asn^{B21}〕モネリンは甘味が若干増強されたが、〔Asn^{B7}〕モネリンの甘味力は約20倍に低下した。この甘味力の低下は B 鎖 7 番目 Asp が活性中心である可能性を示唆した。そこでこの Asp 残基の役割を明らかにするために、この残基を Abu に置換した〔Abu^{B7}〕モネリンを合成した。その結果、このアナログは甘味を呈さないことを発見した。そして CD スペクトルと蛍光スペクトルの結果は、甘味の無い〔Abu^{B7}〕モネリンの立体構造が天然型のものと大きく変化はしていないことを示していた。

一般に、ペプチド性の甘味物質の甘味発現には Asp 残基のβ-カルボキシル基が必要であるとされている。本研究によって、モネリンの全ての Asp 残基の内 B 鎖 7 番目の Asp 残基を置換したときのみ、置換により甘味が失われることが分かった。これらのことより、B 鎖 7 番目の Asp 残基が甘味発現に必須なモネリンの活性中心の一つである可能性が非常に高いと結論された。甘味タンパク質の活性中心である可能性が高いアミノ酸残基を特定したのは、本研究が初めてである。

審 査 の 要 旨

モネリンは西アフリカ原産の野イチゴの果実に含まれ、重量比で砂糖の約3000倍の甘味を持つタンパク質で、天然物では最も甘味の強い物質である。本研究はモネリンとそのアミノ酸残基を置換したアナログを合成し、化学構造と呈味の相関を明らかにする事によって、甘味発現に必須なアミノ酸残基(甘味の活性中心)を決定することを目的としている。

モネリンはA鎖(アミノ酸残基44個)とB鎖(同50個)からなり、これらが1対1で会合することによって甘味を呈する。現在までにモネリンの一次構造はA鎖とB鎖のそれぞれについて2つずつ提出されているが、それらの正当性について確かめられていなかったが、申請者が合成した合成物と天

然物の構造を比較して、天然物について正しい構造を提出した。一方、A鎖とB鎖それぞれのアミノ酸残基を置換したアナログを合成し、分子構造と甘味発現の相関について研究した結果〔Asp^{A22}〕と〔Glu^{A25}〕を〔Asn^{A22}〕と〔Gln^{A25}〕に置換すると分子は不安定になり、甘味度も低下した。またモネリンの全ての Asp 残基の内、〔Asp^{B7}〕は甘味発現に必須であったことから、これが活性中心の一つであることをつきとめた。

申請者は甘味タンパク質の甘味発現機構を明らかにする研究を行ったものであり、モネリンの甘味発現のアミノ酸残基を特定した研究は初めてであり、高く評価でき、今後産業への発展が期待できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。