

計算化学によるカルボン酸とカルシウム受容体の相互作用の機構検証： in silico スクリーニングの検討

Investigation in the interaction of carboxylic acids and the calcium-sensing receptor using the computational chemistry: Approve in silico screening

小木曾 加奈^{*1§}、古田 一匡^{*2}
Kana Kogiso, Kazumasa Furuta

要旨：

消費者の味への要求は近年ますます高まっており、基本5原味だけでは表すことのできない「コク味」が重要視されている。「コク味」はカルシウム受容体のシグナルから得られるとされていることから、カルシウム受容体のアゴニストを検討することで新たな調味素材が創出できると考えられる。「コク味」を有する化合物はこれまでいくつか報告されているが、全てカルボキシル基を含んでいる。そこで今回は官能基にカルボキシル基を有するカルボン酸について、強いコク味を有する γ -Glu-Val-Gly を基準に、計算化学を用い模擬的に計算したカルシウム受容体への結合性について検討した。

計算の結果、受容体への結合度 (DockingScore) は分子量 FW ($p < 0.0001$) 及びオクタノール / 水分配係数 LogP ($p = 0.0102$) と強い負の相関を示し、水溶解度 LogS ($p = 0.0393$) との間には強い正の相関関係が認められた。コク味を有するカルボン酸群と強いコク味を有する γ -Glu-Val-Gly とを比較した結果、水溶性が高く同程度の分子の長さや配向があり、受容体の結合にはこれらが必要であると示唆された。

キーワード：コク味, カルボキシル基, 有機酸, *in silico*

I、はじめに

日本人の食生活は近年、経済的な豊かさが増すとともに大きく変化してきている。消費者の食、特に味への要求はますます高まってきている。これに伴い様々な食品について、5原味以外の表現を利用するシーンが増えており、「コク “味”」という新しい言葉を利用した表現が目立つようになってきている。近年では酵母エキスのような優れたコク味付与剤がスープ原料などに利用されることも多い。

コク味付与剤としてカルシウムセンシング受容体 (Calcium Sensing Receptor : CaSR, カルシウム受容体) に対しアゴニスト活性を有する化合物が用いられることがある¹⁾。CaSR は細胞外のカルシウムイオン濃度を感知する G タンパク質共役受容体であり、カルシウム恒常性のほか、生体内の様々な機能を調節している²⁻³⁾。CaSR は 7 回膜貫通型受容体のクラス C に分類されるアミノ酸 1078 個からなる受容体である⁴⁾。

コク味を有する化合物として、牛肉エキス中の成分である *N*-(4-methyl-5-oxo-1-imidazolin-2-yl) sarcosine⁵⁾、酵母中の成分であるグルタチオン⁶⁾などがあり、 γ -Glu-Val-Gly⁷⁾ は強いコク味を有することが報告されている。カルシウム自身も低濃度であればコク味を示す⁷⁾。また脂質成分ではアラキドン酸などの脂肪酸がコク味に関与していることが示されている⁸⁻⁹⁾。

我々は、発芽玄米酒粕を添加したパンを焼成するとコク味と塩味が増す傾向にあり¹⁰⁾、それが有機酸 (酢酸、リンゴ酸) の相互作用であることを見出した¹¹⁾。*N*-(4-methyl-5-oxo-1-imidazolin-2-yl) sarcosine などのアミノ酸や γ -Glu-Val-Gly などのペプチドならびに脂肪酸、有機酸も分子内にカルボキシル基を有する。そこで我々はコク味にはカルボン酸が関係するのではないかと推測した。

本研究では有機酸や脂肪酸などカルボキシル基を分子内に有する最も単純な形の 105 種類の化合物についてカルシウム受容体への結合性を計算化学手法で評価することにした。コク味発現にはタンパク質

*1 長野県短期大学 生活科学科 健康栄養専攻 *2 富士通株式会社
§ 連絡先 〒380-8525 長野県長野市三輪 8-49-7 TEL 026-234-1221 FAX 026-235-0026

とカルボン酸との相互関係が重要と考えられることから、タンパク質内のカルシウム含有化合物結合部位に各化合物が結合するかについての可能性を、化合物の性質および化合物の構造から比較した。

II、試料及び実験方法

CaSR アゴニスト活性を検討する方法としては、ヒトカルシウム受容体の遺伝子配列 GenBank Accession No. NM_000388 から受容体タンパク質を模擬的に計算、作成し、そこに結合¹²⁻¹³⁾させることで検討した (図1)。

1) 受容体タンパク質モデルの構築方法及び各リガンド分子の DockingScore 算出方法

パーソナルコンピュータは富士通製パーソナルコンピュータ (FMV-biblo NF/G70N、P/N : CP456026-01) を使用した。コンピュータの内容は windows 7 Home Premium、プロセッサは Intel

(R) Core (TM) i5 CPU M430 2.27GHz、メモリ (RAM) は 4.00 GB、システム種類は 32 ビットオペレーティングシステムである。計算ソフトは富士通製 Scigress ver.2.4 を使用した。

ココ味レセプターをグルタミン酸レセプターとし、PDB から 2e4u の結晶構造データを入手し、それをひな形に、CaSR タンパク質を Scigress 上で構築した。2e4u 結晶構造データ内の L-グルタミン酸を骨格にし、CaSR タンパク質結合部位を定義した。リガンド分子を同様に Scigress で作成し、リガンド分子として定義した。その後 FastDoc を使い、各リガンドの DockingScore を算出した。このソフトに搭載されている計算エンジン FastDock はタンパク質分子モデルの活性部位にリガンド分子モデルをドッキング (自動でリガンド分子モデルの向き、形状などを調節できる) させ、それらの親和性を Docking Score として算出する。FastDock を用いた理由は複数のリガンド候補から対象のタンパク質活性部位により親和性の高いものを選択できるため

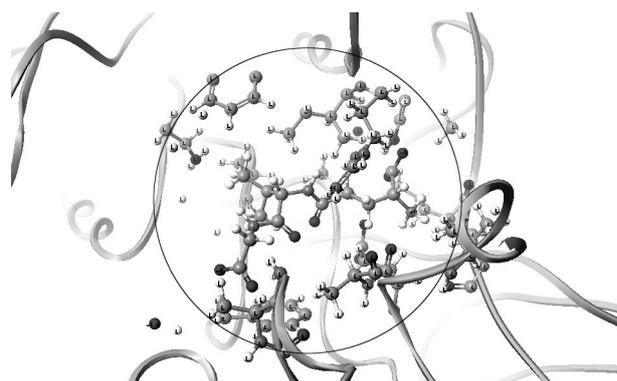
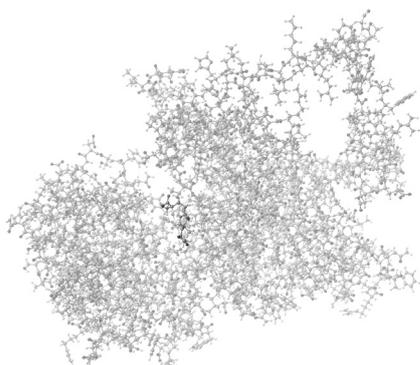


図1、CaSR タンパク質モデルとリガンド (γ -Glu-Val-Gly) の結合
(左：全体図、右：結合部位)

である。

2) 各リガンド分子の結合評価方法

DockingScore は各リガンド分子が活性部位に到着した後の親和性が評価可能である。しかし活性部位へ到達するまでの評価はできない。そのため呈味発現に重要とされる物理特性を DockingScore と同時に検討することとした。今回は強いココ味を有する γ -Glu-Val-Gly の物理特性、DockingScore を各リガンド分子と比較することで評価した。

カルボン酸 105 種類について分子の性質と構造を計算で検討した (表1 及び 2)。分子の性質にかかわる指標としてはオクタノール/水分配係数 Log Pow (LogP)、水溶解度 (LogS)、酸解離定数

(pKa)、分子量 (FW) を用いた。なお、pKa は最も酸性度が高いものを使用して検討した。計算ソフトは ACD/Percepta PhysChem Suite V2012 を使用した。なお、表や図中ではわかりやすくするために γ -Glu-Val-Gly に * 印を付し、呈味発現がある有機酸であるリンゴ酸、酢酸などの小分子のカルボン酸に Δ 印を、ココ味を呈することが示唆されているアラキドン酸、オレイン酸、 γ -リノレン酸、 α -リノレン酸、リノール酸には \times 印を付した (表1 及び 2、図2)。

表 1、各カルボン酸の DockingScore、LogP、LogS、pKa の計算結果 1

No.	label	Name	DockingScore	LogP	LogS (pH = 7.00)	pKa	FW
1		ギ酸	-21.657	-1.873	0.716	3.7	46.025
2	△	酢酸	-25.946	0.025	1.222	4.8	60.052
3		プロピオン酸	-26.335	0.485	1.130	4.8	74.079
4		グリコール酸	-32.069	1.627	0.785	3.7	76.051
5		クロトン酸	-33.777	2.793	-0.004	4.8	86.089
6		ピルビン酸	-37.835	-0.688	1.055	2.7	88.062
7		酪酸	-31.434	0.890	1.055	4.8	88.105
8		シュウ酸	-39.957	-0.834	1.046	1.4	90.035
9	△	乳酸	-33.858	-0.487	1.045	3.9	90.078
10		吉草酸	-34.097	1.139	0.991	4.8	102.132
11		マロン酸	-42.311	-0.522	0.983	2.9	104.062
12		2-ヒドロキシ酪酸	-36.002	-0.169	0.983	3.8	104.105
13		3-ヒドロキシ酪酸	-36.683	-0.574	0.983	4.4	104.105
14		γ-ヒドロキシ酪酸	-35.149	-0.618	0.983	4.7	104.105
15		グリセリン酸	-42.909	-0.781	1.119	3.4	106.077
16		フマル酸	-45.762	-0.023	0.935	3.2	116.072
17		マレイン酸	-43.110	-0.023	0.935	2.4	116.072
18		カプロン酸	-36.912	4.069	-0.446	4.8	116.158
19	△	コハク酸	-43.323	1.322	0.744	4.2	118.088
20		タルトロン酸	-48.522	-0.818	0.921	2.0	120.061
21		安息香酸	-44.922	1.868	0.913	4.2	122.121
22		エナン酸	-40.894	7.796	-4.266	4.8	130.185
23		グルタル酸	-47.928	-0.978	0.974	4.3	132.115
24		ロイシン酸	-43.802	0.731	0.879	3.9	132.158
25	△	リンゴ酸	-52.670	-1.069	0.873	3.6	134.087
26		サリチル酸	-47.835	-0.424	0.928	3.0	138.121
27		カプリル酸	-40.007	7.426	-3.617	4.8	144.211
28		アジピン酸	-49.813	0.163	0.835	4.4	146.141
29		シトラマル酸	-51.574	-0.654	0.829	3.6	148.114
30		パントイン酸	-44.657	-0.785	0.829	3.7	148.157
31		メバロン酸	-47.536	-0.889	0.829	4.3	148.157
32		ケイ皮酸	-48.191	-0.304	0.451	4.3	148.159
33	△	酒石酸	-55.980	-1.416	0.824	3.1	150.087
34		マンデル酸	-49.264	0.663	0.818	3.4	152.147
35		ゲンチジン酸	-52.723	2.290	0.477	3.0	154.120
36		ピロカテク酸	-51.550	1.423	0.812	3.0	154.120
37		プロトカテク酸	-52.543	0.973	0.812	4.5	154.120
38		レソルシル酸	-49.053	2.319	0.812	1.3	154.120
39		ペラルゴン酸	-45.420	3.370	-0.071	4.8	158.238
40		ピメリン酸	-52.709	0.618	0.795	4.4	160.168
41		クマル酸	-55.047	-1.336	0.716	4.5	164.158
42		イソフタル酸	-56.548	1.562	0.780	3.5	166.131
43		テレフタル酸	-54.015	1.562	0.780	3.5	166.131
44		フタル酸	-58.588	1.562	0.780	3.0	166.131
45		アトロラクチン酸	-54.525	1.066	0.779	3.5	166.174
46		フロレット酸	-56.381	1.478	0.779	4.7	166.174
47		オルセリン酸	-54.247	6.851	-2.799	3.2	168.147
48		バニリン酸	-56.863	1.372	0.774	4.5	168.147
49		没食子酸	-56.610	0.608	0.769	4.3	170.120
50		カプリン酸	-47.499	2.985	0.319	4.8	172.265
51		シキミ酸	-57.019	-1.587	0.759	4.5	174.151
52		スベリン酸	-55.237	1.047	0.759	4.5	174.194
53		ウンベル酸	-57.756	0.960	0.744	4.7	180.157

3) リガンドの構造における受容体への結合検討方法

ドッキング計算の後、活性部位にドッキングした状態で得られる各カルボン酸の三次元分子構造を用

いた。強いコク味を有する γ-Glu-Val-Gly を基準に各リガンドの分子の形状や分子の長さ、配置を比較した。なお、この検討はコク味の報告があるものだけを対象とした。

4) 統計解析方法

2) から算出された個々の数値において JMP9.0.2 を用い Pearson の積率相関分析を行った。有意水準は5%とした。

Ⅲ、結果

DockingScore、LogP、LogS、pKa、FW について算出した (表2)。まずはカルボン酸の性質を計

表2、各カルボン酸の DockingScore、LogP、LogS、pKa の計算結果 2

No.	label	Name	DockingScore	LogP	LogS (pH = 7.00)	pKa	FW
54		コーヒー酸	-56.575	1.551	0.812	4.6	180.157
55		アゼライン酸	-58.218	1.860	0.725	4.5	188.221
56		イソクエン酸	-67.269	-1.491	0.716	3.4	192.124
57	△	クエン酸	-61.854	-0.693	1.337	2.9	192.124
58		キナ酸	-61.924	1.902	0.935	4.3	192.167
59		フェルラ酸	-63.788	1.699	0.712	4.6	194.184
60		シリング酸	-64.043	1.292	0.703	4.3	198.173
61		ラウリン酸	-56.302	4.594	-1.182	4.8	200.318
62		セバシン酸	-58.706	2.148	0.694	4.5	202.248
63		シナピン酸	-70.454	0.975	0.649	4.5	224.210
64		ミリストレイン酸	-54.900	4.409	-1.587	4.8	226.355
65		ベンジル酸	-62.514	2.431	0.642	3.3	228.243
66		ミリスチン酸	-54.972	6.235	-1.900	4.8	228.371
67		クレオソート酸	-71.451	-0.123	0.879	3.0	248.155
68		パルミトレイン酸	-61.680	6.128	-2.287	4.8	254.408
69		パルミチン酸	-63.923	6.960	-2.589	4.8	256.424
70		マルガリン酸	-53.448	7.524	-2.929	4.8	270.451
71		ボセオペンタエン酸	-34.803	5.170	-1.810	4.7	274.398
72		ステアリン酸	-67.536	5.249	-1.876	4.6	276.414
73		α-エレオステアリン酸	-63.437	5.792	-2.366	4.8	278.430
74	×	α-リノレン酸	-55.258	5.792	-2.307	4.8	278.430
75		β-エレオステアリン酸	-68.762	5.792	-2.366	4.8	278.430
76	×	γ-リノレン酸	-55.765	6.075	-2.304	4.7	278.430
77		ピノレン酸	-64.402	6.075	-2.320	4.8	278.430
78	×	リノール酸	-60.284	6.544	-2.667	4.8	280.446
79		エライジン酸	-57.918	2.410	0.699	4.8	282.461
80	×	オレイン酸	-59.555	2.109	0.774	4.8	282.461
81		バクセン酸	-60.545	6.468	-2.969	4.8	282.461
82		ステアリン酸	-60.351	7.980	-3.259	4.8	284.477
83		リシネライジン酸	-68.229	5.174	-1.817	4.8	298.461
84		リシノール酸	-62.228	5.174	-1.817	4.8	298.461
85		エイコサペンタエン酸	-49.240	5.858	-2.979	4.8	302.451
86	×	アラキドン酸	-66.338	6.386	-2.613	4.8	304.467
87		エイコサテトラエン酸	-65.295	6.492	-2.953	4.3	304.467
88		ジホモ-γ-リノレン酸	-61.059	6.552	-2.974	4.8	306.483
89		ミード酸	-61.410	6.949	-2.963	4.8	306.483
90		エイコサジエン酸	-63.475	7.702	-3.773	4.6	308.499
91		エイコセン酸	-58.711	5.519	-2.253	4.8	310.515
92		ガドレイン酸	-59.971	7.228	-2.967	4.8	310.515
93		ドコサヘキサエン酸	45.215	5.882	-2.449	4.6	328.488
94		イワシ酸	-46.404	6.066	-2.856	4.6	330.504
95		オズボンド酸	-48.497	8.246	-4.249	4.6	330.504
96		アドレン酸	-59.018	6.946	-3.255	4.8	332.520
97		ドコサジエン酸	-68.453	8.387	-4.413	4.6	336.552
98		エルカ酸	-67.189	7.228	-2.967	4.8	338.568
99		メリト酸	-83.293	2.361	0.466	1.2	342.169
100		クロロゲン酸	-75.177	0.639	1.065	3.9	354.309
101		ニシン酸	-70.322	6.333	-3.193	4.7	356.541
102		テトラコサペンタエン酸	-70.266	7.746	-3.924	4.3	358.557
103		ネルボン酸	-69.590	8.846	-4.859	4.8	366.621
104		セレブロン酸	-59.909	8.716	-3.225	3.9	384.636
105		アガル酸	-84.801	5.531	0.380	2.9	416.549
	γ-Glu-Val-Gly	*	-62.304	-1.503	0.518	2.2	303.312

表 3、各種カルボン酸の計算結果から得られた変数間の相関関係

変数	vs. 変数	R	p値
LogP	DockingScore	-0.2486	0.0102
LogS (pH = 7.00)	DockingScore	0.2006	0.0393
pKa	DockingScore	0.0275	0.7792
FW	DockingScore	-0.5240	<.0001

算した結果から得られた物性の相関を見ることでカルシウム受容体に結合しやすい分子の傾向を見た(表 3)。

結合に関与している DockingScore との関係では FW ($p < 0.0001$) 及び LogP ($p = 0.0102$) に強い負の相関があり、LogS ($p = 0.0393$) に強い正の相関があった。pKa には相関がなかった。相関のあった DockingScore、LogP、LogS について三次元散布図を示した(図 2)。 γ -Glu-Val-Gly (*) は図 2 の最も右上端に位置していた。これは水溶性が高く、DockingScore が低いことを示す。呈味性のある有機酸群 (Δ) とオレイン酸も図中で近いところに存在していた。その他のコクのあると報告のある脂肪酸群 (\times) は離れたところに存在していた。

先行研究⁷⁾では化合物の構造のわずかな違いによってコク味の強弱があることを報告している。この違いについて検討を行うために γ -Glu-Val-Gly と近い位置にあった群を水溶性が高い A 群とし、構造を比較した。A 群の有機酸 (Δ) とオレイン酸についてドッキングサイトに入った際の構造を取り出し、同じ環境にある γ -Glu-Val-Gly と比較した。

まず基本の構造となる γ -Glu-Val-Gly は受容体と結合する際、大きく途中で折れたりせず、まっすぐな構造を示していた(図 1)。次に受容体結合時における A 群の γ -Glu-Val-Gly と重ね合わせた結果を示す(図 3)。A 群の化合物は γ -Glu-Val-Gly を中心軸とすると、同様の方向に伸びており、分子の長さも同程度であった。しかし、横の広がりを見せる構造のものもあった。

一方、A 群から外れたコク味のある脂肪酸 (\times) の群を水溶性が低い B 群としてそれぞれの構造を比較した。B 群とし、同じように受容体結合時における γ -Glu-Val-Gly との重ね合わせた結果を示す(図 4)。B 群の方は γ -Glu-Val-Gly を中心軸とする方向には伸びないことで γ -Glu の部分には掛かっておらず、Val-Gly 部分に集中し重なっていた。

IV、考察

DockingScore は FW ($p < 0.0001$) と LogP ($p = 0.0102$) に強い負の相関があり、LogS ($p = 0.0393$) に強い正の相関があった。コク味発現様式には以下の 2 つ (A または B) が考えられる。図 2 の三次元散布図において γ -Glu-Val-Gly と同じような位置に存在した化合物のうち、有機酸群とオレイン酸を水溶性が高い A 群とし、そこから外れたコク味のある脂肪酸の群を水溶性が低い B 群としてそれぞれの構造を比較検討した。A 群の化合物は分子量が小さく水溶性の高い化合物であった。受容体での構造をみると、 γ -Glu-Val-Gly の長さと同じ程度になっているものが多く、向きも一定でまた広がりを見せていることがわかった。このことは活性中心に広く親和性を示す分子であることが示された。 γ -Glu-Val-Gly やオレイン酸においては A 群の化合物に対し分子量は比較的大きかったが、受容体に適切な形状、配置を取ることがわかった。以上のことから受容体の結合には水溶性のほか、分子の向きが一定になること、分子の長さが一定以上必要で、そのためには分子の構造が重要であることが示唆された。今後はこれらの有機酸についてそれぞれの構造を個別により詳細に検討し、実際の官能試験を行うことで研究を進めたい。

一方、B 群では分子量が A 群より大きく、水溶性は低いものが多かった。受容体に入った際の分子は構造的に重なる部位があるものの、分子の向きと長さは γ -Glu-Val-Gly を軸としたときには短く、A 群とは異なっていることがわかった。B 群の化合物は DockingScore が低く、また先行研究でもコク味を報告⁸⁻⁹⁾されており、受容体に強く結合を示唆している。このため今回示唆された A 群の要素とは異なる部分でコク味を発現している可能性がある。この件に関しても個別に検討して行きたいと考えている。

以上のことから今回の研究では水溶性が高いカルボン酸で γ -Glu-Val-Gly と同程度の長さで一定の向きを有するものは受容体と結合し、コク味を有す

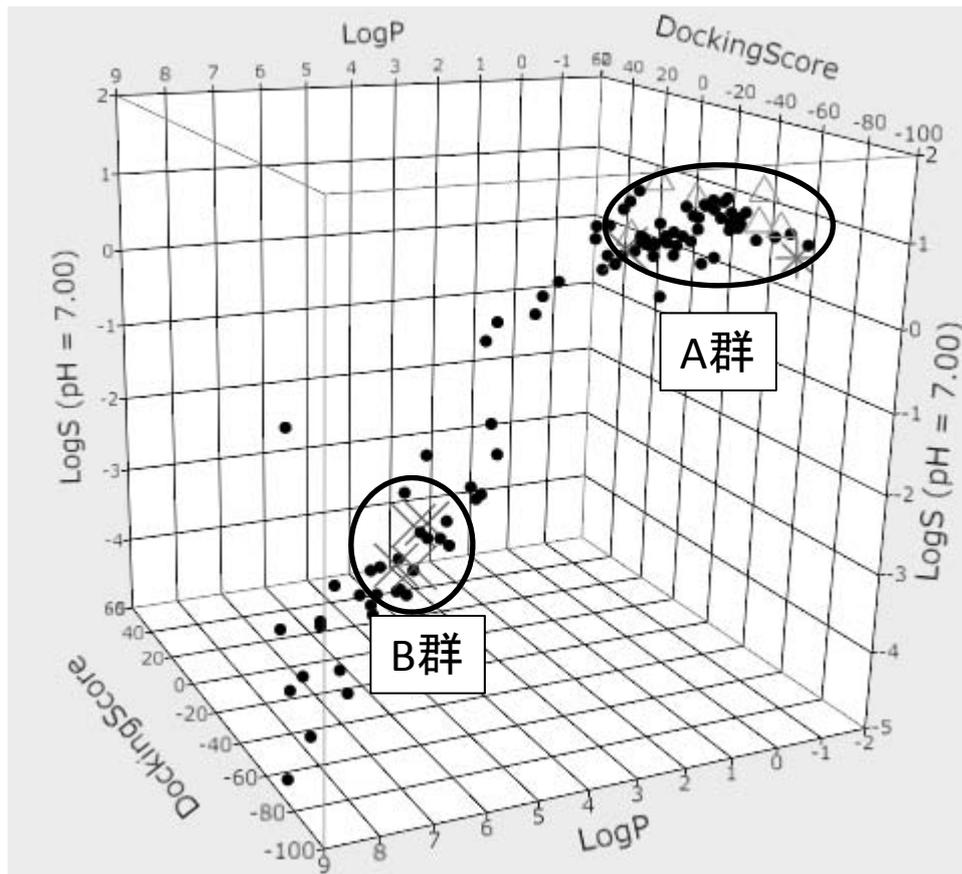


図 2、DockingScore、LogP、LogS の三次元散布図

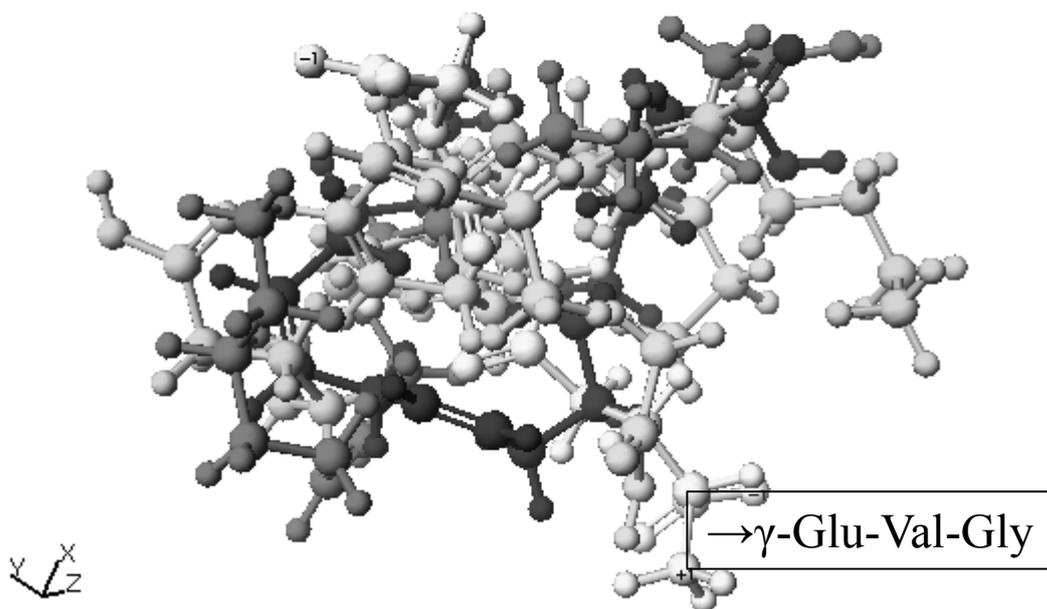


図 3、受容体結合時における A 群の構造重ね合わせ

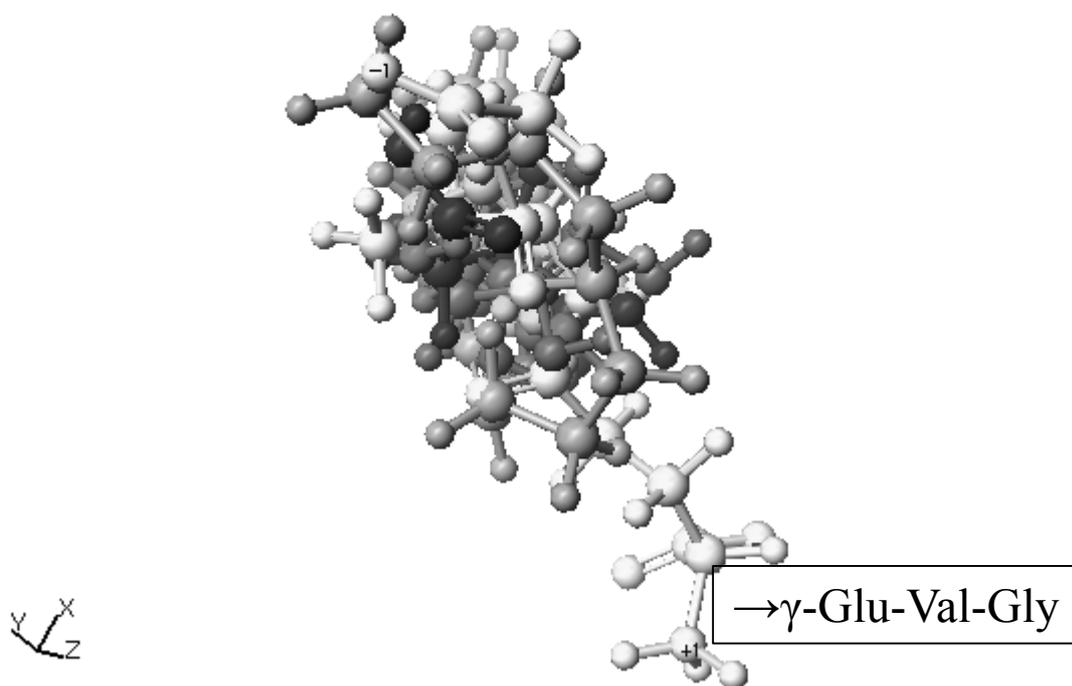


図 4、受容体結合時における B 群の構造重ね合わせ

る可能性があることが示唆された。コク味を示すことが報告されていない化合物についても、この方法を用いることでコク味発現を有すると考えられるものを将来的に見出すことができると考えられ、今後、官能試験などで検討を重ねていく予定である。

V、謝辞

本研究は科研費（23700892）の助成を受けたものである。

VI、参考文献

- 1) Ohsu T, Amino Y, Nagasaki H, Yamanaka T, Taseshita S, Hatanaka T, Maruyama Y, Miyamura N and Eto Y: Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception, *J Biol Chem*, 285 (2), 1016-1022 (2010)
- 2) Cobb M, Heagy W, Danner J, Lenhoff H and Marshall G: Structural and conformational properties of peptides interacting with the glutathione receptor of hydra, *Mol Pharmacol*, 21 (3), 629-636 (1982)
- 3) D'Souza-Li L.: The calcium-sensing receptor and related diseases, *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 50 (4), 628-639 (2006)
- 4) Garrett J, Capuano I, Hammerland L, Hung B, Brown E, Hebert S, Nemeth E and Fuller F: Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs, *J Biol Chem*, 270 (21), 12919-12925 (1995)
- 5) 黒田素央, 山中智彦, 宮村直宏: 食品の加熱熟成に伴う呈味の変化: 加熱によるコク味発現を中心に, *日本味と匂学会誌*, 11 (2), 175-180 (2004)
- 6) 宮村直宏: “こく” を作り出す製造・加工法: 天然系調味料の開発経験から, *日本味と匂学会誌* 9 (2), 147-151 (2002)
- 7) 田原優樹, 大洲竹晃, 金子 恵, 中沢正和, 宮村直宏, 網野裕右, 江藤 譲: 「コク味」を有する新規γグルタミンペプチドの創出, *日本農芸化学会大会講演要旨集* 2J16p09 (2012)
- 8) 山口 進: アラキドン酸による食品の美味しさ向上効果, *オレオサイエンス*, 12 (7), 283-288 (2012)
- 9) Westerling D. and Hedrick H.: Fatty acid composition of bovine lipids as influenced by diet, sex and anatomical location and relationship to sensory characteristics, *J Anim Sci*, 48 (6), 1343-1348 (1979)
- 10) 小木曾加奈, 中澤弥子, 吉岡由美, 佐藤晶子, 岡崎光雄: 発芽玄米酒粕製パンの呈味性, *日本味と匂学会誌*, 18 (3), 387-390 (2011)
- 11) 小木曾加奈, 中澤弥子, 吉岡由美, 佐藤晶子, 岡崎光雄: 発芽玄米酒粕中の有機酸がパンの呈味に及ぼす影響, *日本味と匂学会誌*, (*in press*)
- 12) Kahlon A, Roy S and Sharma A: Molecular docking studies to map the binding site of squalene synthase inhibitors on dehydro-squalene synthase of *Staphylococcus aureus*, *J Biomol Struct Dyn*, 28 (2), 201-210 (2010)
- 13) Swastika G and Naresh P: Docking studies of some novel 1-{2-(Diarylmethoxy) ethyl}-2-methyl-5-

nitroimidazole (DAMNI) analogs. Int J ChemTech Res, 1
(4), 974-984 (2009)
(平成 25 年 10 月 1 日受付、平成 25 年 11 月 19 日受理)