

群馬大学
助教
博士（医学）
中川 祐子

1999年 東京学芸大学 教育学部 卒業
2001年 東京学芸大学大学院 教育研究科
修士課程 修了
2005年 群馬大学大学院 医学研究科博士
課程 修了
2005年 独立行政法人 科学技術振興機構
研究員
2006年 現職

「甘さの質」を客観的に評価する多次元解析法の確立

1. 背景と目的

味の客観的な評価法の構築は、「おいしさ」を探す上できわめて重要である。現在、甘味の判定は主に官能試験により行われ、ヒトの感覚に依存しており、必ずしも客観的な評価方法とは言えない。一方で、官能試験によってのみ理解される「味の質」もある。例えばショ糖のもつ甘さは、人工甘味料アセスルファームKの甘さよりはるかに質が高いが、これは既存のバイオアッセイ、例えばマウスを用いた鼓索神経の電位測定ではまったく識別できず、また味覚センサーを用いても識別することは出来ない。なぜならば後二者の測定が単に甘味の強さのみを検出するいわば一次元の評価であるからである。甘味の質はこれよりはるかに複雑な過程を経て形成されると考えられる。

そこで本研究では、様々な甘味物質が甘味受容体を介して惹起する多彩な細胞内シグナルを多次元解析することにより、甘味物質の評価、とくに「甘さの質」を客観的かつ定量的に行うシステムを確立することを目的とした。

2. 研究方法

甘味物質により惹起されたシグナルの検出方法

膵β細胞を用いて甘味物質が惹起する細胞内シグナル伝達機構を明らかにするために、セカンドメッセンジャーをリアルタイムで観察した。cAMPおよびCa²⁺の動態を同時モニターするためMIN6細胞に、Lipofectamin 2000 (invitrogen) を用いてサイクリックAMP (cAMP) のインジケータ-Epac1-camps⁽¹⁾を導入し、その後、Ca²⁺インジケータ

ーであるfura-2-AMを導入した。Epac1-camps は、Rap1のGEFであるEpac1の両端に蛍光タンパク質であるYFPおよびCFPを融合したタンパク質である。定常状態ではYFPとCFPの距離が近いのでFRETが起きるが、Epac1にcAMPが結合するとYFPとCFPが離れ、FRETが解消される。この性質を利用してcAMPの産生量を相対的に検出した。またプロテインキナーゼC (PKC) のリン酸化活性を検出するためにPKCの基質であるMARKSに蛍光タンパク質GFPを融合したMRACKS-GFP⁽²⁾をMIN6細胞に導入し、観察した。MARCK-GFPは定常状態で細胞膜に局在するがPKCのリン酸化をうけると細胞質へと局在を変化させる。この性質を利用し、細胞質の蛍光強度を測定することによりPKCのリン酸化活性を相対的に評価した。これらの観察には、AQUACOSMOS/ASHURA (Hamamatsu Photonics) を使用した。またジアシルグリセロール (DAG) の産生量をモニターするため、コンベンショナル型PKCであるPKC γ のC1ドメインに蛍光タンパク質RFPを融合し、細胞に導入し、観察を行った。C1ドメインは、定常状態では細胞膜に局在し、DAGと結合することにより細胞膜に局在を移行する⁽³⁾。TIRF顕微鏡を用いて、細胞膜の蛍光強度を観察した。

3. 結果と考察

甘味物質の感知は、T1R2とT1R3から成る甘味受容体により行われる⁽⁴⁾。申請者は既に膵 β 細胞に発現する甘味受容体を解析する過程で興味深い現象を捉えることに成功した。本研究ではこの細胞内シグナルの感知システムを用いて、様々な甘味物質（スクラロース、アセスルファームK、サッカリン、グリチルリチン）を刺激物質として、それにより発生する細胞内Ca²⁺、cAMP、PKCの動態をモニターした。その結果、これらの甘味物質がすべて異なるパターンの細胞内シグナルを産生するものであった（図1と2）。この結果は、甘味受容体があゴニストによって異なるシグナルを発生させる

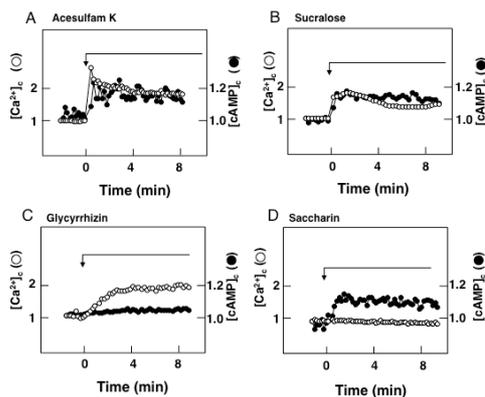


図1. 甘味物質刺激による細胞内Ca²⁺およびcAMPの濃度変化

A. アセスルファームKによる細胞内Ca²⁺およびcAMPの濃度変化。B. スクラロースによる細胞内Ca²⁺およびcAMPの濃度変化。C. グリチルリチンによる細胞内Ca²⁺およびcAMPの濃度変化。D. サッカリンによる細胞内Ca²⁺およびcAMPの濃度変化。

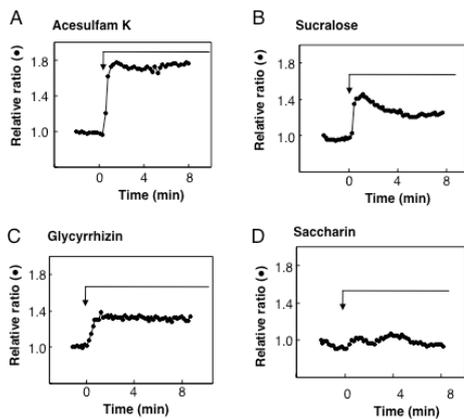


図2. 甘味物質刺激によるPKCの膜移行変化

A. アセスルファームKによるPKCの膜移行変化。B. スクラロースによるPKCの膜移行変化。C. グリチルリチンによるPKCの膜移行変化。D. サッカリンによるPKCの膜移行変化。

ユニークな受容体であることを示した。さらに得られた細胞内シグナルの結果を元にレーダーチャートを作成した。すなわち、 Ca^{2+} 、cAMP、Cキナーゼ (PKC) の膜移行、DAGの変化より得られた結果より、グラフを作成し、刺激後から8分までのArea under the curve (AUC) を算出し、これを数値化した。この数値を①細胞内プールからの Ca^{2+} 放出 (Ca IN)、②細胞外からの Ca^{2+} 流入 (Ca OUT)、③ cAMP、④ PKC活性化および⑤ DAGの5つの項目について算出した。本検討ではそのAUCの違いにより5段階に分け、レーダーチャートを作成した。図3はこの方法によりアセスルファームK、スクラロース、グリチルリチンおよびサッカリンの作用を示す。その結果、4種類の甘味物質が全く異なるパターンを示すことが分かった (図3)。さらにこの結果を官能試験により得られた味の傾向と比較した。まず、今回使用した甘味物質の味の傾向を記す。アセスルファームKは、甘味が強く、味の立ち上がりが早く後味が少ない。サッカリンは痺れるような刺激の後味をもつ。また高濃度では苦味を感じる。スクラロースは苦味や渋みがなく、後味があり、ショ糖のようなまろやかな甘さをもつ。グリチルリチンは甘味の立ち上がりが遅く、後味を感じる。細胞内シグナルより得られたレーダーチャート

と官能試験の結果を対応させると、共に苦味を呈するアセスルファームKとサッカリンでは、レーダーチャートに相関性が見られなかった。また、後味の有無で比較した結果でも、やはり相関性を得ることはできなかった。

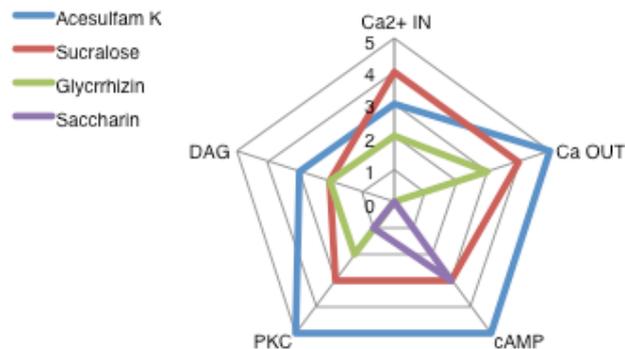


図3. 甘味物質刺激によるシグナル強度のレーダーチャート

今後は、検討に使用する甘味物質の種類を増やし、甘味物質により発生したシグナルと官能試験での結果に相関がないか否か検討を行う。また、糖、アミノ酸、タンパク質、糖エタノール、人工甘味料など多様な構造をとる甘味物質について、構造ごとに区別し、それぞれの物質の産生するシグナルのパターンと官能試験により得られた結果を比較したい。

今回の結果により既知の甘味物質の作用をカタログ化するとともに、パターンにより作用を分類することができた。しかし、今回検討した甘味物質の数では官能試験で得られた味のパターンとの相関性を得ることはできなかった。

以上の結果は、甘味物質が惹起するシグナル伝達機構を解析することにより、「甘味の強さ」だけでなく「甘味の質」をも客観的に把握することが可能になり、これは既存の甘味料の再評価、さらには新規の甘味物質の開発・評価にも有用であると期待さ

れる。

4. 謝辞

本研究はサッポロ生物科学振興財団助成金により実施された。ここに記して、サッポロ生物科学振興財団に深く感謝申し上げます。

5. 引用文献

1. Landa, L. R., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280, 31294-31302, 2005.
2. Suzuki, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281, 28499-28507, 2006.
3. Nakagawa, Y., *et al.*, *PLoS One*, 10, e0144053, 2015.
4. Nelson, G., *et al.*, *Cell*, 106, 381-390, 2001.