



准教授
三坂 巧

1998年 東京大学大学院農学生命科学研究科
博士課程修了 博士(農学)
2001年 日本学術振興会 特別研究員(PD)
2003年 岡崎国立共同研究機構生理学研究所
助手
2005年 東京大学大学院農学生命科学研究科
講師
2008年 同 准教授 現在に至る

「おいしさ」の増強に寄与しうる食品含有成分の探索

1. 背景・目的

食品の味は、その価値を決定づける重要な因子である。何を食べるとおいしく感じるのか、という疑問を解決する目的で、嗜好性に関する食品科学基礎研究は古くから実施されてきた。口腔内における味物質受容・認識機構の理解については、味細胞に発現する味覚受容体の同定が2000年以降の数年間で米国研究者によってなされて以来、急速に進展した[1]。その後に行われてきた、主に培養細胞発現系を用いた味覚受容体の機能解析研究の成果により、味物質受容に関する詳細な分子メカニズムについても解明されるようになってきた。

5種類の基本味のうち、食品の嗜好性に端的に寄与するのが甘味とうま味である。本質的にこれらの味は、エネルギー源やタンパク質の存在を示す味であることから、全ての動物はこれらの味を呈する物質を嗜好し、積極的に摂取する。和食の世界ではグルタミン酸などのアミノ酸とイノシン酸などの核酸を組み合わせることで生ずる「うま味の相乗効果」を有効に利用し、「おいしさ」を提供している。この効果はうま味受容体にアミノ酸と核酸が隣り合った位置で同時に認識され、受容体の活性が増強することで生ずるという分子メカニズムがすでに明らかになっている[2]。また甘味受容体やうま味受容体に作用して呈味調節作用を有する物質の探索は、海外食品企業等を中心に幅広く行われており、そのような基礎研究から見出された増強物質[3]が、海外ではすでに上市されているという例も見受けられるのである。

我々の研究グループにおいても、独自に工夫を加えた高感度な細胞アッセイ手法を用いることで、天然香気成分のメチオナルがヒトうま味受容体の活性を増強する物質であることをすでに見出している[4]。メチオナルは幅広い食品素材に含有されている単純な化学構造の低分子アル

デヒドであり、アミノ酸と核酸の組合せで生ずるうま味の相乗効果をさらに強めることができるという特徴も有していた。このような「おいしさ増強」に寄与しうる食品成分の探索は、食品開発における味の設計に新たな指針を提示することが可能となるという点で、重要な意義を有するといえる。本研究においては、「おいしさ」の増強に寄与しうる食品含有成分の探索を目的に、嗜好味受容体に作用してその活性を調節する物質の探索、ならびにその作用メカニズムの解明を目的として研究を実施した。

2. 方法

2.1 メチオナル構造類縁体の選抜

低分子の直鎖アルデヒドであるメチオナルがヒトうま味受容体の活性増強物質であるという知見[4]をもとに、今回はその構造類縁体を対象として評価を行った。具体的には炭素数 1~4 のアルコールとアルデヒドに加え、有機硫黄化合物に含まれるアルコールであるメチオノールを候補物質とした。さらに候補物質群の中で水溶性が高く、細胞毒性が低い等の基準で選抜を行い、実験に使用した。これらのメチオナル構造類縁体はアッセイバッファーに溶解し、同様にアッセイバッファーに溶解した呈味物質(スクロース、グルタミン酸ナトリウム(MSG)など)と混合してから、下記に示す味覚受容体を発現させた培養細胞に投与した。

2.2 培養細胞アッセイ系による味覚受容体の活性測定

アッセイに用いる HEK293T 等の培養細胞には、ヒト甘味受容体(hT1R2 と hT1R3 の組合せ)やヒトうま味受容体(hT1R1 と hT1R3 の組合せ)とともに、キメラ G タンパク質(G16gust44 あるいは G16Gi3)を遺伝子導入などによって強制発現させた[4, 5]。このような味覚受容体発現細胞を使用することで、対応する呈味物質の投与によって味覚受容体が活性化すると、細胞内シグナリングを介して細胞内カルシウム濃度の上昇が引き起こされる。このとき生ずる細胞内カルシウム濃度変化を、カルシウム感受性蛍光指示薬の蛍光強度変化等の手法により計測することで、発現させた味覚受容体がどれくらい強く活性化されたのかを評価することができる。

細胞応答の検出には、蛍光顕微鏡下で細胞を画像化するカルシウムイメージングと、リガンド分注機能が付いたプレートリーダーを用いたウェルベースアッセイの手法を併用した。

3. 結果および考察

3.1 メチオナルの構造類縁体における培養細胞に投与可能な上限濃度の決定

まず培養細胞アッセイ系におけるメチオナル構造類縁体の濃度設定を行うため、味覚受容体を発現させていない培養細胞に構造類縁体を単独で投与した時の応答の様子をカルシウムイメージングにより観察した(図 1)。アッセイバッファーに溶解したエタノールを様々な濃度で培養細胞に投与した場合、市販のアルコール飲料に含有されているような高濃度のエタノール(およそ 1~3

M)を投与すると、カルシウム感受性指示薬の蛍光観察に大きな影響を及ぼし、細胞内カルシウムイオン濃度変化の測定が正しく行われないことが判明した(図 1)。一方、終濃度が 100 mM 以下という条件においては、蛍光観察を妨げることなくイメージングをすることが可能であった。したがって、本研究で使用するメチオナル類縁体については 100 mM 以下の範囲で培養細胞に投与することに

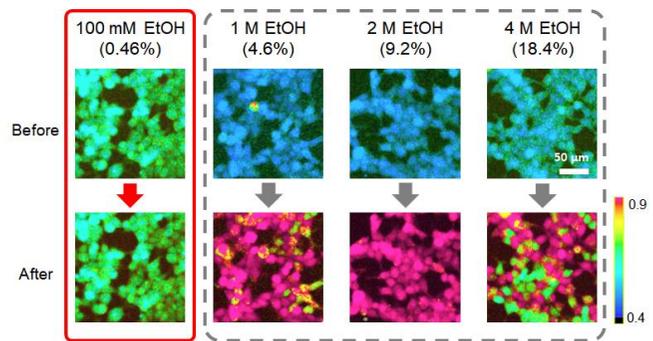


図1 エタノールが培養細胞のカルシウムイメージング解析に与える影響
味覚受容体を発現していない培養細胞を蛍光カルシウム濃度指示薬(Fura-2)で負荷し、カルシウムイメージングに供した。リガンド添加前後の代表的な蛍光画像を疑似カラー表示(細胞内カルシウム濃度が高いと暖色系)で示している。高濃度エタノール添加後、視野中のすべての細胞の細胞内カルシウム濃度が正しく反映されていない様子が認められた。

した。尚、過去の報告[4]でも指摘したように、メチオナルについては培養細胞に非特異的な応答を引き起こしやすいため、この物質に限ってはさらに低い濃度(終濃度 120 μ M)で使用した。

3.2 嗜好味受容体に対する低濃度エタノール添加の効果

最初に類縁体の中から、エタノール添加の効果に関する検証を行った(図 2)。ヒト甘味受容体発現細胞あるいはヒトうま味受容体発現細胞に呈味物質単独、あるいはエタノールとの混合物を投与して細胞応答を測定したところ、リガンドへのエタノールの添加はヒト甘味受容体に対して特異的に増強効果

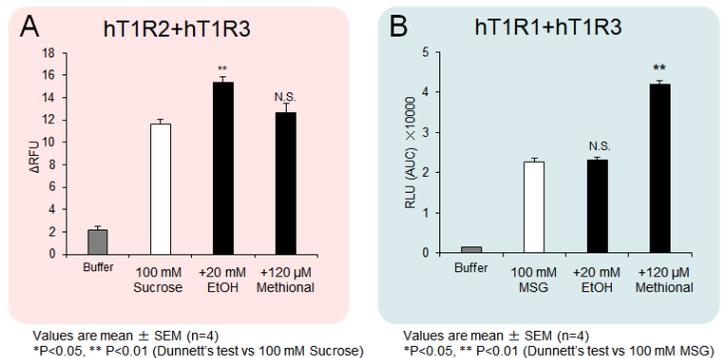


図2 エタノール添加によって生ずるヒト甘味・うま味受容体の活性変化
ヒト甘味受容体(hT1R2+hT1R3, A)あるいはヒトうま味受容体(hT1R1+hT1R3, B)発現細胞に対し、リガンド添加後の細胞応答をウェルベースアッセイにて評価した。呈味物質としてスクロース(A)、グルタミン酸ナトリウム(MSG, B)を使用した。

を示すことが明らかになった(図 2A)。対照的に、メチオナルを添加した場合には、ヒトうま味受容体の活性を有意に増強した一方で、ヒト甘味受容体に対する増強効果は観察されなかった(図 2B)。

したがって、メチオナルの構造類縁体中には、ヒト甘味受容体特異的に増強効果を示す化合物が含まれる可能性が示唆された。また甘味受容体とうま味受容体はそれぞれ 2 つの T1R サブユニットのヘテロダイマーから構成されているが、hT1R3 は両者に共通であるため、エタノールの作用部位が甘味受容体特異的なサブユニットであるhT1R2に存在する可能性も示唆された。

3.3 メチオナル構造類縁体間におけるヒト甘味受容体活性増強能の比較

次に、準備したメチオナル構造類縁体について、ヒト甘味受容体の活性増強能が存在するかどうかについて調べるため、それぞれの化合物をスクロースと混合してヒト甘味受容体発現細胞に投与した。その結果、化学構造は類縁体間で類似しているのに対し、甘味受容体に対する活性増強能には物質間で大きな差が認められた。今回の条件

においては、有意な活性増強効果は C2 あるいは C3 のアルコールにのみ認められた。

さらに、C2 あるいは C3 のアルコールで認められた活性増強効果は、甘味物質としてスクロースを使用した場合以外においても、試したすべての甘味料(アスパルテーム、アセスルファム K、サッカリン等)において確認できた(データは示さない)。またプロパノールについてはエタノールと同様、ヒト甘味受容体や苦味受容体に対する増強効果は全く示さなかった(データは示さない)ことから、いずれの化合物についても、ヒト甘味受容体に特異的な増強作用を有することが強く示唆された。

4. まとめ

ヒト甘味受容体の活性化剤として機能することが示された低分子直鎖アルデヒドであるメチオナルの構造類縁体を対象として、嗜好味受容体に対する活性調節能の検証を行った。その結果、C2 あるいは C3 のアルコールにヒト甘味受容体の活性増強効果が認められることが明らかになった。この増強効果はヒト甘味受容体に特異的なものであり、構成するサブユニットのうち hT1R2 に作用する可能性が示唆された。キメラ受容体を用いた予備的な検証から、アルコールの作用部位は hT1R2 サブユニット中に少なくとも複数存在する結果を得ており、既存の甘味物質や甘味増強剤とは作用機序が大きく異なることが示されつつある。今後は作用部位の同定や、活性増強に関わる詳細な分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

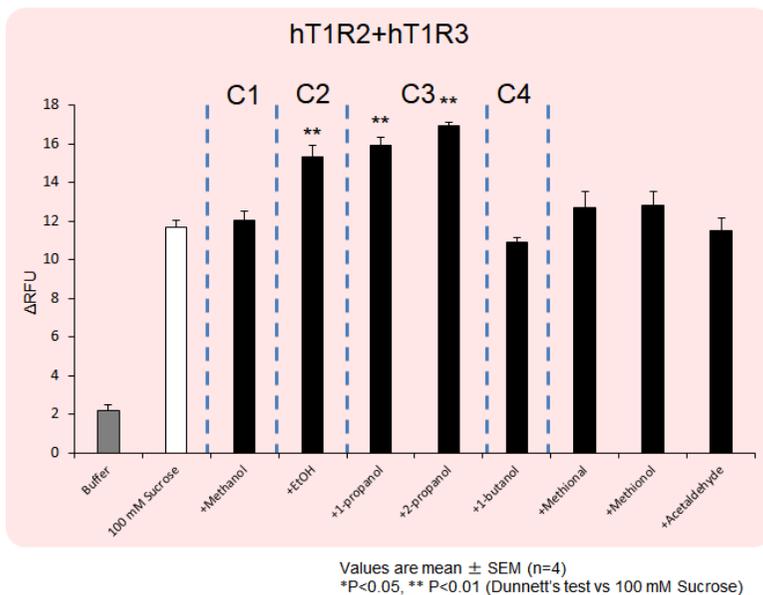


図3 メチオナル構造類縁体添加によって生ずるヒト甘味受容体の活性変化
ヒト甘味受容体(hT1R2+hT1R3)発現細胞に対し、リガンド添加後の細胞応答をウェルベースアッセイにて評価した。呈味物質としてはスクロースを使用した。

5. 謝辞

本研究の実施において、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。

6. 引用文献

1. Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., and Ryba, N.J.P. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, **139**, 234-244 (2009).
2. Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R.M., Xu, H., Pronin, A., Liu, H., Tachdjian, C., and Li, X. Molecular mechanism for the umami taste synergism. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **105**, 20930-20934 (2008)
3. Servant, G., Tachdjian, C., Tang, X.Q., Werner, S., Zhang, F., Li, X., Kamdar, P., Petrovic, G., Ditschun, T., Java, A., Brust, P., Brune, N., DuBois, G.E., Zoller, M., and Karanewsky, D.S. Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 4746-4751 (2010)
4. Toda, Y., Nakagita, T., Hirokawa, T., Yamashita, Y., Nakajima, A., Narukawa, M., Ishimaru, Y., Uchida, R., and Misaka, T. Positive/negative allosteric modulation switching in an umami taste receptor (T1R1/T1R3) by a natural flavor compound, methional. *Sci. Rep.*, **8**, 11796 (2018)
5. Imada, T., Misaka, T., Fujiwara, S., Okada, S., Fukuda, Y., and Abe, K. Amiloride reduces the sweet taste intensity by inhibiting the human sweet taste receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397**, 220-225 (2010)