表面プラズモン共鳴法を用いた広義の味物質の計測

学生員 安 達 利 昭 (九州大学)

正 員 都 甲 潔 (九州大学)

Measurement of Taste Substances in a Broad Sense
Using Surface Plasmon Resonance

Toshiaki Adachi, Student Member, Kiyoshi Toko, Member (Kyushu University)

Interactions between a lipid-protein membrane and taste substances were investigated using SPR (surface plasmon resonance). The membrane was the LB (Langmuir-Blodgett) membrane composed of DHP (dihexadecyl phosphate) and the sugar-binding protein ConA. The LB membrane incorporating ConA showed larger responses to almost all the taste substances, such as quinine, caffeine and sucrose than the LB membrane without ConA. Additionally we introduced a dry method, where the resonance angle change is measured before and after drying water from the sample, to detect pungent substances. We compared results of other taste substances with those of pungent substances using this new method. Suggestion was also made on the interactions of astringent and pungent substances with the charged LB membrane.

キーワード：表面プラズモン共鳴，LB 膜，共振角，脂質膜，ConA，吸着

1. はじめに

本研究の目的は，SPR (Surface Plasmon Resonance : 表面プラズモン共鳴) 法⁽¹⁾を用いて呈味物質と脂質膜の相互作用メカニズムを探り，非電解質の高感度測定を目指すことにある。味そのものを測定する際，簡易でかつ迅速に計測できるセンサとして味覚センサがある⁽²⁾。この味覚センサは，現在，脂質二分子膜を模倣した，様々な電気化学的特性を有する複数種類の人工脂質膜によるマルチチャネル型センサとして構成されている。さらに，このセンサは膜電位計測であることから電解質に対する感度は非常に高く，再現性にも優れている。これまで種々の食品，例えば，ビール，日本酒，味噌，醤油，ミネラルウォーターなどへ適応され，その味の定量化及び識別に成功してきている⁽³⁾。

ところが，甘味や苦味及び辛味を呈する物質に多い非電解質に関しては感度が比較的低く，電解質（酸味，塩味，うま味，一部の苦味）と比べて，上記の味覚センサではこれらの物質に対して十分な情報が得られていない可能性がある。そこで，膜電位以外の物理量を得る方法の一つとして，屈折率（誘電率）に依存する物理量を得ることが可能な SPR 法を用いたセンサによる味物質の測定を行うことを試みた。

現在，SPR センサはバイオセンサとして，または医療，環境モニタリング等様々な分野で応用されている。このセンサは，センサ表面上における試料の屈折率の変化を光の強度変化としてとらえることができる。つまり，本研究に

利用した場合，呈味物質と脂質膜との相互作用を光の強度変化として検出することができるであろう。SPR 法は金属薄膜表面での現象である故，金属薄膜の表面付近（1 μ m 以内）の試料の性質を高感度に検出することができる。また，測定装置が小型であるため，使用する試料溶液の量が少量ですむことになる。さらに，このセンサは，光の強度変化を検出するので，対象物に蛍光標識や放射性標識をつける必要がなく，リアルタイムの測定ができることも利点である。膜電位測定による情報だけでなく SPR 法を用いたセンサで得られた新たな情報との総合的な見地から，味物質と脂質膜とのさらなる詳細な相互作用メカニズムをとらえることが可能であると考えられる。

既に脂質膜として DHP (ジヘキサデシルホスフェート) LB 膜を用いて SPR 測定が行われているが，苦味を呈する疎水性物質のキニーネ塩酸塩だけに応答が見られ，甘味を呈するショ糖や電解質の味物質に対しては応答が得られなかった⁽⁴⁾。そこで先の報告では⁽⁵⁾生体膜が脂質とタンパク質から構成されていることに鑑み，この脂質である DHP で構成された LB 膜に ConA (コンカナバリン A) を混入することにした。この ConA は，レクチン⁽⁶⁾の 1 つであり，レクチンとは，糖と結合するタンパク質の総称である。ConA 混入 LB 膜を用いることにより糖への応答，また膜構造の変化により他の味物質に対しても DHPLB 膜とは異なる応答が得られた。しかし，辛味物質に関してはこの ConA 混入 LB 膜でもほとんど応答を得ることができなかった。

図 1 表面プラズモン共鳴。
Fig. 1. Surface plasmon resonance.

そこで、今回は DHPLB 膜と ConA 混入 LB 膜を生体モデル膜として用いて、さらに新たな測定方法を導入し、広義の味に含まれる辛味を呈する物質を測定し検出することを試みた。広義の味とは、5 基本味（甘味、塩味、苦味、酸味、うま味）に加え、辛味及び渋味を含めた味のことを指す。それに対し、5 基本味のことを狭義の味という。なお、苦味、甘味、渋味を呈する物質についても同様の測定を行い、比較し検討を行った。

2. 測定方法

まず、簡単に表面プラズモン共鳴の原理について説明を行う。表面プラズモン共鳴を励起するには ATR (Attenuated Total Reflection: 全反射減衰) 法と呼ばれる方法を用いた。図 1 のように、プリズムと Au 膜を接触させたものを用意する。そして、プリズム側から全反射角以上の入射角 θ で、P 偏光された光を入射させる。このとき、プリズム側から Au 膜側にはエバネッセント波と呼ばれる表面波がにじみ出す。そして、入射角 θ を徐々に変えていくと、ある角度でエバネッセント波の波数が表面プラズモンの波数と一致し、共鳴現象が生じる。これが表面プラズモン共鳴である。すると、入射光のエネルギーは表面プラズモン共鳴に移り、反射光の強度が入射光の強度より弱まることになる。反射光の強度が入射光の強度に対して最も弱まるときの入射角を共振角と呼ぶ。この表面プラズモン共鳴の生じる条件は、Au 膜表面における屈折率（誘電率）に依存している。

次に、測定装置（日本レーザ電子(株)製生体分子反応測定装置）について説明する。本研究では、測定装置の光源として波長が 670nm の LD 光源を用いた。そして、基板の大きさは、13.5mm × 10mm × 0.7mm である。入射角は、直流モーター駆動によって約 65 度から約 82 度まで変化させ、受光素子（フォトダイオード）で反射光強度を測定した。測定データはコンピュータのソフトウェアによって計算され、任意の入射角に対する光強度比をプロットした共振曲線を出力する。

そして、図 2 のようにプリズム上に Au 膜を蒸着したガラス基板を置く。ガラス基板の半分にだけ人工脂質膜として LB (Langmuir-Blodgett) 膜を累積し、この LB 膜を累積した方を S (Sample) 側、累積していない方を R (Reference)

図 2 測定装置（共振角検出部）。
Fig. 2. Transducer of the surface plasmon resonance sensor system.

側とした。この 2 チャネルに同じ試料を置き、差分共振角変化を調べた。測定方法はまず、基準として蒸留水を測定して、次に味物質の共振角を測定し、S 側と R 側の 2 チャネルの共振角変化 $\Delta\theta_s$ 、 $\Delta\theta_r$ を求める。この測定方法を通常測定とする。ここで、

- $\Delta\theta_s = \Delta\theta_r$ のとき LB 膜への影響は見られない、
 - $\Delta\theta_s \neq \Delta\theta_r$ のとき LB 膜への影響が見られる、
- と考えられる。

なお、今回はこの通常測定に加え、次のような測定を行った（図 3 参照）。

- (1) 脂質膜上に測定試料を滴下し、通常に測定をする。（乾燥前）
- (2) 一旦、測定試料の水分を蒸発させる。
- (3) 乾燥後、乾燥前の濃度になるまで純水を加えて再び測定をする。（乾燥後）

この方法を先ほどの通常測定に対し、乾燥測定と呼ぶことにする。

図 3 乾燥測定の手順。
Fig. 3. Procedure in a dry method.

図4 差分共振角変化 ($\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$) の
カプサイシン濃度依存性。

Fig. 4. Dependence of $\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$ on the
concentration of capsaicin.

3. 測定結果と討論

測定試料には、以下のような物質を用いた。また、いずれの場合も基板に6層累積したDHPLB膜及びConA混入LB膜を使用した。なお、測定は各サンプルに対して最低3回以上試行し、結果に標準偏差を誤差棒として表示した。

- カプサイシン (疎水性物質：辛味)
- アリルカラシ油 (疎水性物質：辛味)
- ピペリン (疎水性物質：辛味)
- キニーネ塩酸塩 (疎水性物質：苦味)
- カフェイン (疎水性物質：苦味)
- ショ糖 (非電解質：甘味)
- タンニン酸 (電解質：渋味)

まず、辛味物質であるカプサイシンを通常測定で測定した結果である。これらの物質は、ほとんど水に溶けないため、10%エタノールを溶媒として使うことにした。

まず、図4からわかるように、共振角変化はConA混入LB膜、DHPLB膜のいずれの場合でも約±0.1度程度である。これは誤差範囲であり、応答はほとんど見られないと

図5 カプサイシン (0.3mM) の乾燥前と
乾燥後の差分共振角変化 ($\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$)。

Fig. 5. Comparison between $\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$ before and
after drying capsaicin of 0.3mM.

図6 アリルカラシ油 (25mM) の乾燥前と乾燥
後の差分共振角変化 ($\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$)。

Fig. 6. Comparison between $\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$ before and
after drying allyl isothiocyanate of 25mM.

考えられる。アリルカラシ油、ピペリンについても同様の実験を行ったが、やはりいずれの辛味物質の場合も共振角変化はほとんど見られなかった。キニーネ塩酸塩のような吸着性のある味物質が脂質LB膜に吸着すれば、共振角変化が正に応答する⁽⁶⁾。つまり、これらの物質は脂質LB膜には吸着をしていないと考えられる。辛味物質を検出できないという結果は膜電位計測の結果と対応しており、辛味物質には味覚センサは何の応答も示さなかった⁽⁷⁾。

そこで今回新たに導入した乾燥測定を行った結果が図5である。カプサイシンのヒトの閾値 ($4 \sim 6 \mu\text{M}$) より高い濃度である0.3mMのカプサイシンを使用した。この図からわかるように、乾燥前では共振角変化はほとんどみられないのに対して、乾燥後の測定では、いずれの脂質LB膜も明らかに共振角変化が大きくなっている。

アリルカラシ油、ピペリンに対しても同様の実験を試みた。図6と図7からわかるようにカプサイシンの結果とよく似ている。つまり、一旦乾燥させたことにより、これらの辛味物質は純水を再び加えても脂質LB膜からは脱離することができないほど強く吸着したものと考えられる。DHPLB膜とConA混入LB膜において、互いの誤差棒が重なって

図7 ピペリン (0.15mM) の乾燥前と乾燥後の
差分共振角変化 ($\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$)。

Fig. 7. Comparison between $\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$ before and
after drying piperine of 0.15mM.

図 8 キニーネ塩酸塩 (1mM) の乾燥前と乾燥後の差分共振角変化 ($\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$)。
Fig. 8. Comparison between $\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$ before and after drying quinine hydrochloride of 1mM.

図 10 ショ糖 (50mM) の乾燥前と乾燥後の差分共振角変化 ($\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$)。
Fig. 10. Comparison between $\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$ before and after drying sucrose of 50mM.

おり、これらの膜において応答の差は現れていない。
比較のため、他の味物質についても同様の実験を行った。まず、苦味を呈するキニーネ塩酸塩に対して乾燥測定を行った結果である。図 8 のように乾燥前の測定に比べ、乾燥後の測定では大きな共振角変化が見られた。吸着力のあるキニーネ塩酸塩は乾燥させることにより、さらに脂質 LB 膜に強く吸着したものと考えられる。以前、キニーネ塩酸塩に対して通常測定を行った場合⁽⁵⁾、ConA 混入 LB 膜、DHPLB 膜いずれの脂質 LB 膜も濃度が高くなるにつれて共振角変化の差が大きくなるという結果が得られていた。
次にキニーネ塩酸塩と同じく疎水性物質であり、苦味を呈するカフェインの測定結果である。乾燥測定では、図 9 のように DHPLB 膜には共振角変化は見られず、ConA 混入 LB 膜にのみ大きな共振角変化が見られた。この現象は、ConA を含まない DHPLB 膜において、最密充填膜を形成している DHP に、キニーネ塩酸塩ほど吸着力のないカフェインが吸着できないため生じると推察される。ところが、ConA を混入することにより膜に隙間が生じて疎水性部位が増加し、カフェインが吸着できるようになり、さらに乾燥させることで吸着量が増加したのと考えられる。以前

のデータからも通常測定において、純粋な DHPLB 膜の場合は共振角変化は見られず、ConA 混入 LB 膜を用いた場合にのみ共振角変化が大きくなった⁽⁵⁾。
甘味を呈するショ糖の測定結果は以下の通りである。乾燥前後の測定において、図 10 のように DHPLB 膜、ConA 混入 LB 膜どちらも共振角変化が見られなかった。これは、乾燥測定を行う際再び水を加えたとき、ショ糖が脂質 LB 膜から離脱し水に溶け出してしまったためと考えられる。また、以前の試験で通常測定の ConA 混入 LB 膜のみに 50～100mM の高濃度域で応答が現れたことがわかっていた⁽⁵⁾。今回使用した濃度が応答が現れ始める濃度であったため、乾燥前の応答がはっきりと現れなかったのと考えられる。
最後に電解質で渋味を呈するタンニン酸の場合である。乾燥測定を行った結果、図 11 のように乾燥前では、負に回答しているのだが、乾燥後では正に回答する。以前に通常測定を行った場合⁽⁵⁾、タンニン酸はキニーネ塩酸塩やカフェインとは違い、濃度が高くなるにつれて共振角変化の差が小さくなる傾向にあった。これは、脂質 LB 膜が負に帯電しているので、解離して負に帯電したタンニン酸分子が反発し脂質 LB 膜から遠ざかっていることが原因と考えられ

図 9 カフェイン (1mM) の乾燥前と乾燥後の差分共振角変化 ($\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$)。
Fig. 9. Comparison between $\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$ before and after drying caffeine of 1mM.

図 11 タンニン酸 (0.3mM) の乾燥前と乾燥後の差分共振角変化 ($\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$)。
Fig. 11. Comparison between $\Delta\theta_s - \Delta\theta_r$ before and after drying tannic acid of 0.3mM.

表 1 各サンプルの通常測定及び乾燥測定の応答結果の一覧。

Table 1. List of response patterns by normal and dry methods.

	通常測定		乾燥測定	
	DHP	ConA	DHP	ConA
キニーネ	↗	↗	↗	↗
カフェイン	—	↗	—	↗
タンニン酸	↘	↘	↗	↗
ショ糖	—	↗	—	—
辛味物質	—	—	↗	↗

た。実際、負に帯電したジオレイルホスフェート (DOPH) から作られた膜は負に帯電したピクリン酸に応答せず、他方、正に帯電したジオクタデシルジメチルアンモニウムブロマイドからなる膜はピクリン酸に応答することが知られている^{(8)~(10)}。複数の脂質をマルチチャネル化した膜電位計測型味覚センサでも、ピクリン酸やタンニン酸に同様の結果が得られている。それゆえ、この点については、疎水性苦味物質といえども、膜に吸着する以前に静電相互作用がまず重要であることが指摘されていた。このような通常測定の結果を踏まえて、今回のタンニン酸に対する乾燥測定の結果を考察すると、一旦乾燥させたことにより、タンニン酸分子が脂質 LB 膜に強く吸着し、再び水を加えても脂質 LB 膜から離れず、その結果正に応答したのと考えられる。

以上の結果を表 1 のようにまとめると、次のようなグルーピングをすることができる。右上がりの矢印は正の応答、右下がりの矢印は負の応答、ハイフンは応答なしを示している。

辛味物質 (カプサイシン、アリルカラシ油、ピペリン) に対して、通常測定に関して DHPLB 膜、ConA 混入 LB 膜いずれの膜もほとんど応答しなかったが、乾燥測定において両方の脂質 LB 膜は大きく正に応答し、渋味物質 (タンニン酸) は、通常測定では両脂質 LB 膜が負に応答し、乾燥測定では正に応答している。また、苦味物質 (キニーネ塩酸塩、カフェイン) は、通常測定では ConA 混入 LB 膜が正に応答し、乾燥測定ではこの脂質膜がさらに大きな応答を示している。甘味物質 (ショ糖) の場合は、今回の結果では、乾燥前と後の応答ははっきり見られなかった。しかし、以前の実験⁽⁵⁾による通常測定の ConA 混入 LB 膜にのみ応答が見られたことから、表には通常測定の ConA 混入 LB 膜にのみ応答があったと記述した。このように、SPR 法を用いたセンサを利用し新たな乾燥測定を加えることにより、苦味物質、甘味物質、渋味物質、辛味物質を識別できた。また、この乾燥測定は疎水性の吸着物質の検出に対して、大きな力を発揮することもわかった。

今回は 5 基本味を要素とする狭義の味に対し、辛味や渋味を含む広義の味に的を絞り実験を行った。辛味物質に関しては、SPR 法を用いたセンサを利用し、通常測定では応答を得ることができなかったが、乾燥測定ではその検出に

成功した。また、膜電位計測型味覚センサは渋味物質を検出可能であるのに対し、味覚センサは辛味物質には何の応答も示さなかった。この事実は今回の実験結果に対応しており、膜電位計測と SPR 計測の関係を今後さらに詳細に探る必要がある。辛味は味細胞で受容されないことを考えると、生体系の味受容システムを模倣したシステムでは検出できないことは、逆に不思議ではない。事実、辛味物質カプサイシンを受容するレセプターが近年発見され、カプサイシンと結び付くことで活性化されることが報告されている⁽¹¹⁾。このレセプターは、痛いほどの熱を感じた時にも同様に活性化することがわかっている。つまり、カプサイシンの受容は温覚でなされていると考えられる。このように、味の受容メカニズムはまだわかっていないところが多い。

そこで、SPR 法を用いたセンサを利用し、味物質との応答メカニズムを解明していくことにより、生体系における味受容の仕組みの解明にもつながり、さらにこのことが今後の味覚センサの研究・開発に貢献できるものと考えられる。

謝辞

本研究にあたり、実験に協力してくれた宮津匡君に感謝いたします。

(平成 11 年 12 月 24 日受付, 同 12 年 04 月 03 日再受付)

文 献

(1) J.Homola, S.S.Yee and G.Gaughitz: "Surface plasmon resonance sensors: review", Sens.Actuators B, **54**, 3~15 (1999)
(2) K.Toko: "Taste sensor", Transducers'99, 58~61(1999)
(3) 林健司, 下田英雄, 松藤誠則, 都甲潔: 電気学会論文誌 E, **119**, 374~382(1999)
(4) 安田隆一, 都甲潔, 秋山秀之, 兼石崇弘, 松野哲也, 江崎秀, 山藤肇: 「表面プラズモン共鳴法を用いた脂質 LB 膜と味物質の相互作用の検出」, 電子情報通信学会論文誌, **J80-C II**, 1~7 (1997)
(5) 安達利昭, 都甲潔: 「表面プラズモン共鳴法を用いたタンパク質混入 LB 膜と味物質の相互作用の検出」, 電気学会論文誌 E, **118**, 371~376 (1997)
(6) 山本一夫: 「レクチンの糖鎖認識機構」, 蛋白質核酸酵素, **37**, 1820~1829 (1992)
(7) S.Iiyama, K.Toko, T.Matsuno and K.Yamafuji: "Responses of lipid membranes of taste sensor to astringent and pungent substances", Chem.Senses, **19**, 87~96(1994)
(8) 飯山悟, 都甲潔, 山藤肇: 「合成脂質膜における味覚応答」, 膜 (MEMBRANE), **12**, 231~237(1987)
(9) S.Iiyama, K.Toko and K.Yamafuji: "Effect of bitter substances on a model membrane system of taste reception", Agric.Biol.Chem., **50**, 2709~2714 (1986)
(10) K.Hayashi, K.Yamafuji, K.Toko, N.Ozaki, S.Iiyama and N.Nakashima: "Effect of taste substances on electric characteristics of a lipid cast membrane with a Single Pore", Sens.Actuators, **16**, 25~42 (1989)
(11) D.E.Clapham: "Some like it hot: spicing up ion channels", Nature, **386**, 783~784 (1997)

安 達 利 昭（学生員） 1973 年生 8 月 19 日生まれ。1997 年 3 月 九州大学工学部電子工学科卒業。現在，同大学院システム情報科学研究科博士課程在学中。表面プラズモン共鳴法を用いたセンサ，味覚センサの研究に従事。

都 甲 潔（正員） 1953 年 2 月 23 日生まれ。1980 年 3 月 九州大学大学院工学研究科博士後期課程修了。同年，同工学部電子工学科助手を経て，現在同大学院システム情報科学研究科電子デバイス工学専攻電子機能材料工学講座教授。工学博士。バイオエレクトロニクスに関する研究に従事。