食品のおいしさは味覚・嗅覚・視覚，体性感覚（辛味・渋味・温度など），そして食経験などの感性を総動員して認知される。この中で，味覚は通常，甘・酸・塩・苦・旨味の感覚を意味する。

食品中には種々の味物質が共存しているが，食品そのものの味は共存する味物質の単純加算にはならない。その理由の一つとして，味の相互作用の存在が挙げられる。たとえば，スイカに塩を振って食べるとさらに甘く感じられるが，これは塩味と甘味の対比効果によるものである。しかし，このような味の相互作用が，どのような分子機序で生じているかについてはほとんどわかっていない。

味覚研究は分子細胞生物学，遺伝子科学，ゲノミクス

酸性ジペプチドによる苦味抑制効果 を味覚シグナル分子論から検証する

櫻井敬展^{*1}，三坂 巧^{*2}，
阿部啓子^{*2}，

^{*1}日清食品ホールディングス（株），^{*2}東京大学大学院農学生命科学研究科

を中心とするバイオインフォマティクスなどの手法を用いて，最近10年来，目覚ましい進歩を遂げており，5基本味のうち，甘・旨・苦については受容体が同定されている⁽¹⁾。さらに近年では，これらの受容体を発現させた培養細胞を用いた機能解析により，味の相互作用の実態を明らかにしようとする研究が進められている。本稿では，酸性ジペプチドによる苦味の抑制効果の解析を例にとり，味覚受容体発現細胞を用いた味の相互作用の解析について紹介する。

哺乳類の味覚受容体

口腔内に取り込まれた味物質は，舌の表面，咽頭，喉

味質	旨味	甘味	苦味	酸味	塩味
受容体	T1R1+T1R3	T1R2+T1R3	T2R	PKD2L1 + PKD1L3	不明
味物質	L-アミノ酸	糖, D-アミノ酸, 人工甘味料, 甘味タンパク質	苦味物質	酸	
種類	Gタンパク質共役型			イオンチャネル型	

図1 ■ 味覚受容体の構造模式図

旨味・甘味受容体はそれぞれ、T1R1とT1R3、T1R2とT1R3のヘテロマーで構成される。苦味はヒトでは25種類あるT2Rで受容される。酸味受容体はPKD1L3とPKD2L1のヘテロマーが候補分子として報告されているが、塩味受容体については明らかにされていない。

頭に分布する味蕾で受容される。個々の味蕾は約50～100個からなる細胞の集合体で、電子顕微鏡観察による細胞形態と細胞内微細構造に基づいて、紡錘形をしたI型、II型、III型細胞と基底部に存在するIV型細胞に分類されている⁽²⁾。味物質が味孔に局在する味覚受容体によって感知されると、細胞内シグナル伝達を経て細胞膜の脱分極が引き起こされ、味細胞に投射している味神経に向けて神経伝達物質が放出される。味細胞から伝達されたシグナルは最終的に脳に到達し、味が認知される。

近年の分子生物学やゲノミクスの進展により、甘味、旨味、苦味、酸味受容の分子機構が明らかとなってきた(図1)。甘味・旨味物質の受容体としては、Gタンパク質と共役した受容体(GPCR)の1つT1R(TAS1Rとも呼ぶ)ファミリーが重要な働きをしている。これは、T1R1、T1R2、T1R3の3つの分子種からなり、T1R1+T1R3のヘテロマーで旨味物質を含めたL-アミノ酸を^(3,4)、T1R2+T1R3のヘテロマーで糖、D-アミノ酸、人工甘味料および甘味タンパク質などの甘味物質を受容する^(4,5)。

一方、苦味物質はヒトでは25種、マウスで35種のT2R(TAS2Rとも呼ぶ)ファミリーで受容される⁽⁶⁾。現在まで、ヒト苦味受容体を活性化させる約10数種のリガンドが報告されている。たとえば、hTAS2R16のリガンドはサリシンをはじめとするグルコピラノシド類⁽⁷⁾、hTAS2R38のリガンドはN-フェニルチオウレア(PTC)や6-プロピル-2-チオウラシル(PROP)といったN-C=S構造を有する苦味物質である⁽⁸⁾。

酸味物質については、ごく最近、TRPチャネルファミリーのメンバーであるPKD1L3およびPKD2L1のヘテロマーがその受容を担っている候補分子であると報告された^(9～11)。塩味受容体については、候補と考えられるイオンチャネルがいくつか挙げられているものの、残念ながら

ら未だ決定的な証拠の得られたものはない。

それぞれの受容体分子の発現パターンについてはすでに多くの研究者により検証がなされており、甘味・旨味・苦味・酸味受容体がそれぞれ異なる細胞に発現することから、これら4基本味は味蕾中で異なる細胞で受容されることが明らかとなっている^(4,9～11)。このことより、現在では味質は末梢の味細胞の段階で区別され、そのまま中枢に伝達されとする“labeled line theory”が想定されている⁽¹²⁾。このような観点からも、異なる味質間における味の相互作用については非常に興味深い研究対象であるといえる。

カルシウムイメージング法

Fura-2などの蛍光カルシウム指示薬を負荷した生細胞や培養細胞に、指示薬固有の励起光を照射し、放出される蛍光をCCDカメラで検出・画像化する方法をカルシウムイメージング法という。GPCRの研究においては、HEK293T細胞内のホスホリパーゼC-イノシトール三リン酸シグナル伝達経路を用い、味物質刺激による受容体の応答の様子を細胞内のカルシウム濃度の変化を指標として検出する手法がよく用いられている。

サリシンを受容する苦味受容体hTAS2R16発現細胞のカルシウムイメージング解析を例にとり、簡単に実験方法を説明する。まず、培養細胞に受容体とGタンパク質を発現させるための発現プラスミドを遺伝子導入する。これには、市販の遺伝子導入用カチオン性脂質を用いれば簡便に、かつ高効率で外来遺伝子を細胞へ導入することが可能である。ごく少量のDsRedのような蛍光タンパク質発現プラスミドを同時に導入しておけば、DsRed陽性細胞を遺伝子導入された細胞とみなすことで、トランスフェクション効率を見積ることも可能である。

図 2 ■ カルシウムイメージング解析の手法とシグナル伝達経路

(A) カルシウムイメージング解析の手法. 細胞内のカルシウム濃度変化を 2 波長励起による Fura-2 蛍光の比率 (F340/F380) で観測し, 擬似カラーとして表示することで, 受容体の活性化をリアルタイムに観測することができる. (B) HEK293T 細胞内における Gq 系シグナル伝達経路. 受容体が苦味刺激により活性化されると PLC-β, IP₃R の活性化といったシグナル伝達経路を経て, 小胞体からカルシウムが放出される. PIP₂: ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸, PLC-β: ホスホリパーゼ C-β, DAG: ジアシルグリセロール, IP₃: イノシトール 1,4,5-三リン酸, IP₃R: イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体. (C) サリシンの構造とカルシウムイメージング法による hTAS2R16 発現細胞のサリシン刺激に対する濃度応答曲線. サリシンはヤナギの樹皮に含まれる β-グルコピラノシドの 1 種で, 鎮痛作用を示す天然物. リガンド添加前後の 2 波長励起による蛍光比 (F340/F380) の変化値が 0.2 以上の細胞を応答細胞と定義し, ランダムに選択した 100 個の DsRed 陽性細胞中の応答細胞数を計測した. hTAS2R16 および Ga16gust44 発現細胞のカルシウムイメージング法による EC₅₀ 値は 683±111 μM であり, 官能評価による EC₅₀ 値は 1.1±0.3 mM⁽⁷⁾ とほぼ同値である.

膜タンパク質である味覚受容体が機能するためには細胞膜上に発現することが必須であるが, 細胞外領域の短い苦味受容体の場合, そのままのコンストラクトでは膜発現効率が著しく悪い. そのため, ウシロドプシンの N 末端 39 残基 (ロドプシントグ) やラットソマトスタチン受容体 3 型の N 末端 45 残基 (ソマトスタチントグ) を苦味受容体の N 末端に付加することで, 膜移行性を高め, 応答性を向上させる工夫がなされている⁽¹³⁾. また,

G タンパク質には細胞内カルシウム濃度上昇の検出系として必須な Gαq 系 G タンパク質の α サブユニットのうち, 広範な受容体と共役することが報告されている Ga16 の C 末端 44 アミノ酸残基を味細胞に発現するガストデューシン (Gagust) のものと置換したキメラ G タンパク質 (Ga16gust44) を用いることで, 味覚受容体を介した応答を効率よく観測することができる⁽¹⁴⁾.

味覚受容体および G タンパク質を遺伝子導入した

HEK293T 細胞が味刺激に応答すると、図2に示すように遺伝子導入した G タンパク質依存的に、細胞内の一連のシグナリング活性化が生じ、小胞体からカルシウムが放出されることで、HEK293T 細胞内のカルシウム濃度が上昇する。2 波長励起による Fura-2 の蛍光比 (F340/F380) を擬似カラーで表示すると、味刺激に応答した細胞の表示は寒色から暖色へと変化する。つまり、擬似カラーの変化を観測することで、味覚受容体発現細胞内のカルシウム濃度の変化をリアルタイムにモニターすることが可能となる。

図2に示す hTAS2R16 および Ga16gust44 発現細胞のように、リガンド刺激に対し濃度依存的に応答し、かつ EC₅₀ 値が官能評価とほぼ同値であれば、味強度を客観的に評価できるバイオセンサーであるとみなすことができる。

酸性ジペプチドの苦味抑制効果と苦味受容体発現細胞を用いた検証

一般的に食品中の苦味は、商品価値を失わせるほど深刻な問題となりうる。しかし、たとえばビール中のフムロン、ココア中のテオブロミン、茶中のカテキン類などのように、適切にコントロールされた苦味はおいしさの

中心的要素を担っている。さらに、「良薬口に苦し」のこともわざにもあるように、多くの薬は苦味を有する。そのため、苦味をコントロールすることは食品・医薬品産業において重要な課題の一つである。

このような背景の中、官能評価を中心とした苦味抑制素材の探索が古くよりなされてきており、L-Glu-L-Glu に代表される酸性アミノ酸が2~3 個結合した酸性オリゴペプチドが、大豆グロブリンのペプシン分解物あるいはカゼインのトリプシン分解物の有する苦味をマスキングする効果をもつことが見いだされた⁽¹⁵⁾。また、この苦味のマスキング効果は、タンパク質加水分解物だけではなく、広範な苦味物質に対しても効果があった。さらに、L-Glu-L-Glu による苦味の抑制効果は官能評価だけではなく、ラットを用いた神経応答を観測した実験においても認められ⁽¹⁶⁾、抑制効果は味神経応答より前の段階で引き起こされていると考えられていたが、詳細な抑制機構は不明であった。

筆者らは、L-Glu-L-Glu が有する苦味抑制効果が苦味受容体に対する働きによって説明できるか否かを検証するため、酸に対し安定な構造を有するサリシンをモデル苦味物質として用い、hTAS2R16 を発現させた培養細胞系によるカルシウムイメージング法を用いた解析を行

図3 ■ 酸性物質添加による hTAS2R16 発現細胞の応答抑制効果

(A) hTAS2R16 発現細胞のサリシン応答性へのジペプチド・アミノ酸・アミノ酸塩添加による効果。1 mM サリシン単独もしくは 10 mM ジペプチド・アミノ酸・アミノ酸塩を混合した溶液を hTAS2R16 発現細胞に投与したときの応答の様子を擬似カラーで表示した。(B) 広範な酸性物質を用いた応答抑制効果の検証。さまざまな酸性物質の添加による応答抑制効果をカルシウムイメージング法により解析した。***: $p < 0.001$ vs サリシン, Cit: クエン酸, Asc: L-(+)-アスコルビン酸, Tar: DL-酒石酸, Phos: リン酸

図4 ■ pH および酸性物質の濃度が応答抑制効果へ及ぼす影響

(A) 応答抑制効果と pH の関係. 酸性物質の濃度を 10 mm に固定し, pH を変化させてサリシン応答への抑制効果を検証した. pH 依存的な抑制効果が認められ, pH 4.5 以下でいずれの酸性物質も有意な応答抑制効果が認められた. (B) 応答抑制効果と酸性物質の濃度との関係. pH を 4.0 もしくは 4.5 に固定し, 酸性物質の濃度を変化させてサリシン応答への抑制効果を検証した. pH が同一であれば, 酸性物質の濃度を変化させても抑制効果に有意な差は認められなかった.

なった.

図3に示す通り, サリシン刺激に対する hTAS2R16 発現細胞の応答は, サリシンに L-Glu-L-Glu を添加したものを投与すると有意に抑制されることが確認された. さらに同様の効果が酸性アミノ酸である L-Glu を添加したときにも観測されたが, 中性ジペプチドである Gly-Gly やアミノ酸塩である MSG (グルタミン酸ナトリウム) では抑制効果が見られなかった. この結果から, L-Glu-L-Glu による苦味抑制効果は, hTAS2R16 発現細胞に苦味物質であるサリシンを投与する系でも検証が可能であることが示唆された.

次いで, L-Glu-L-Glu や L-Glu による応答抑制効果が, これら酸性ジペプチドやアミノ酸に特異的な現象であるか否かを検証するため, 有機酸および無機酸を含めた複数の酸性物質を用いて抑制効果を検証した. その結果, 8 種類の酸性物質いずれを用いても高濃度の添加で hTAS2R16 発現細胞のサリシンに対する応答の抑制効果が観測された (図3-B).

リガンドに酸性物質を添加すると, 溶液の pH も低下する. そこで, pH および酸性物質の濃度が応答抑制効果に及ぼす影響を明らかにするため, まず酸性物質の濃度を固定し, pH を変化させ応答抑制効果を検証したところ, 図4に示すように, 応答は pH 依存的に抑制され, pH 4.5 以下で有意な応答抑制効果が認められた. しかし, pH が同一であれば酸性物質間の応答抑制効果に有意な差がなかったことから, 酸性物質における物質特異

性はないことが示された. 一方, pH を固定し, 酸性物質の濃度を変化させ応答抑制効果を検証したところ, pH が同一であれば応答抑制効果に有意な差が認められなかった. 以上のことから, 応答抑制効果は pH のみにコントロールされることが明らかとなった.

さらに, サリシンと化学構造がまったく異なる PTC や PROP に対しても, これらを受容する hTAS2R38 を発現させた培養細胞を用いたカルシウムイメージング解析において pH 低下により応答が抑制されたことより⁽¹⁷⁾, L-Glu-L-Glu が有する苦味抑制効果の作用機序の要因の一つとして, pH 低下に伴う苦味受容体の感受性の低下が関与していることが示唆された.

サリシンなどの苦味物質を酸と混合して官能評価をすると, 先味の苦味はマスキングされるが, 後味の苦味はさほど抑制されないことに気づく. この現象は, 口腔内では強力な緩衝能を有する唾液の影響で pH が速やかに中性にもどされてしてしまうためであると考えられ, 今回培養細胞系でみられた pH 依存的な応答抑制効果はうまく生体現象を反映していると考えられる.

おわりに

これまで, 食品の味の評価・設計は, 主に人間による官能評価試験を中心に行われてきた. 今回紹介したヒト味覚受容体を培養細胞に発現させたバイオセンサーは, 味覚シグナリングの入口である受容体で生じている

呈味の変化をとらえることから、直接的に苦味をブロックする受容体阻害剤や、甘味や旨味の感覚を増強するような効果をもつ食品素材の探索に応用しようという研究が世界各国で開始されつつある。近年では、測定装置の開発に伴い、ハイスループットな細胞応答解析が可能となっており、さらなる競争が繰り広げられると予想される。今後、味覚受容体の立体構造がX線結晶構造解析などで明らかにされれば、受容体とリガンド（味物質）との結合状態をシミュレートするというドラッグデザイン的な新しい切り口による呈味物質の設計が可能となり、官能評価では見いだすことができなかった素材をスピーディーに発見できる可能性も期待される。このような手法を用い、新たな食品素材が開発されるのも近い将来の話ではないかもしれない。

謝辞：本稿で紹介した筆者らの研究の一部は「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」の助成によりなされたものである。

文献

- 1) J. Chandrashekar, M. A. Hoon, N. J. Ryba & C. S. Zuker : *Nature*, **444**, 288 (2006).
- 2) B. Lindemann : *Physiol. Rev.*, **76**, 718 (1996).
- 3) G. Nelson, J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N. J. Ryba & C. S. Zuker : *Nature*, **416**, 199 (2002).
- 4) X. Li, L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller & E. Adler : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4692 (2002).
- 5) G. Nelson, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. Ryba & C. S. Zuker : *Cell*, **106**, 381 (2001).
- 6) M. Behrens & W. Meyerhof : *Cell Mol. Life Sci.*, **63**, 1501 (2006).
- 7) B. Bufe, T. Hofmann, D. Krautwurst, J. D. Raguse & W. Meyerhof : *Nature Genet.*, **32**, 397 (2002).
- 8) B. Bufe, P. A. Breslin, C. Kuhn, D. R. Reed, C. D. Tharp, J. P. Slack, U. K. Kim, D. Drayna & W. Meyerhof : *Curr. Biol.*, **15**, 322 (2005).
- 9) N. D. LopezJimenez, M. M. Cavenagh, E. Sainz, M. A. Cruz-Ithier, J. F. Battey & S. L. Sullivan : *J. Neurochem.*, **98**, 68 (2006).
- 10) Y. Ishimaru, H. Inada, M. Kubota, H. Zhuang, M. Tomimaga & H. Matsunami : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12569 (2006).
- 11) A. L. Huang, X. Chen, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Trankner, N. J. Ryba & C. S. Zuker : *Nature*, **442**, 934 (2006).
- 12) D. A. Yarmolinsky, C. S. Zuker & N. J. Ryba : *Cell*, **139**, 234 (2009).
- 13) J. H. Dunham & R. A. Hall : *Trends Biotechnol.*, **27**, 541 (2009).
- 14) T. Ueda, S. Ugawa, H. Yamamura, Y. Imaizumi & S. Shimada : *J. Neurosci.*, **23**, 7376 (2003).
- 15) M. Noguchi, M. Yamashita, S. Arai & M. Fujimaki : *J. Food Sci.*, **40**, 367 (1975).
- 16) K. Iwasaki & M. Sato : *Chem. Senses*, **6**, 119 (1981).
- 17) T. Sakurai, T. Misaka, T. Nagai, Y. Ishimaru, S. Matsuo, T. Asakura & K. Abe : *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 2508 (2009).