すっぱいものを甘くする蛋白質

栗 原 堅 三

(Kenzo KURIHARA)

東京工業大学理学部

1. はじめに

脊椎動物の舌の表面には、形の異なる数種の乳頭が存在する。図 1⁽¹⁾はカエルの舌の表面の茸状乳頭を走査型電子顕微鏡で観察したもので、この中に味蕾 (taste bud) と呼ばれるつぼみ状の構造の味覚受容器が存在する。味覚受容器は味覚刺激を受けとり、この刺激を電気的エネルギーに変換して、味覚刺激の情報を神経を経て脳に伝達する。味覚受容器が味覚刺激を受けとる機構に関して2つの説がある。1つは酵素説^(2,3)と呼ばれるもので、味覚物質が味覚受容器中の酵素に直接的影響を与え、これによる酵素作用の変化が味覚刺激を引き起こすとする。もう一方の説は吸着説⁽⁴⁾と呼ばれるもので、味

覚物質が味細胞膜の表面に吸着することにより味覚刺激が引き起こされるとする説である。従来、味覚刺激の受容機構は、主として味覚神経のインパルス放電を記録する電気生理学的方法と、味覚物質に対する動物の挙動を観察することにより研究されてきたが、視覚の受容機構の研究にみられるような分子生物学的研究は少ない。本稿の「すっぱいものを甘くする蛋白質」に関する研究は、味覚受容の初期過程を分子レベルで解明しようとする試みの1つである。なお、味覚生理の一般の問題に関しては他の総説⁽⁵⁻⁷⁾を参照されたい。

2. Miracle fruit

西アフリカ原産の植物 *Synsepalum dulcificum* は、

オリーブぐらいの大きさの赤い実をつける (図 2)。この実を口に含み、口をよくゆすいでからすっぱいものを味わうと、非常に甘く感じる。アフリカの現地人は、すっぱいヤシ酒やビールを飲む前、また *kankies* と呼ぶトウモロコシの粉で作ったすっぱいパンを食べたりする前に、この植物の実を食べて、すっぱい食物や飲料に甘みを与える習慣がある。

1852 年、イギリスの外科医である Daniell⁽⁸⁾は、この植物の実の特異な作用を薬理学の雑誌に紹介し、この植物の実を *miraculous berry* と名づけた。現在では *miracle fruit* という呼び名が

図 1 走査型電子顕微鏡で観察したカエルの舌の表面
写真中央は茸状乳頭を示す。

図 2 Miracle fruit

より一般的となっている。1965 年, Inglett ら⁽⁹⁾は, 有機溶剤, 界面活性剤などを用いて miracle fruit の活性物質を抽出することを試みたが, 活性物質を可溶化することができなかった。

筆者は 1966 年, フロリダ大学の Beidler 教授を訪れた際, miracle fruit の特異な作用を直接味わう機会を得た。miracle fruit の 1 粒を 2~3 分間口に含んだ後, 口をよくゆすぎ, レモンを味わうと非常に甘くなった。この際の甘味は, 合成甘味料のようなくせのある甘味ではなく, 非常に好ましい甘味であった。この miracle fruit の甘味誘導効果は, 単にすっぱい食物に限らず, すべての酸味物質について有効であった。たとえば, 塩酸や硫酸の稀薄溶液でさえも, miracle fruit を口に含んだ後は非常に甘くなった。このような miracle fruit の特異的作用に興味をもった筆者は, 1967 年, 再びフロリダ大学を訪れ, miracle fruit からの活性物質の単離とその作用機構に関する研究を行なった。

3. Miracle fruit からの活性物質の単離⁽¹⁰⁾

活性物質を可溶化することは, 炭酸ソーダ緩衝液を用いることにより解決された。まず 300 個ほどの miracle fruit を集め, 種と表皮を取り除いた果肉を蒸留水中でホモジナイズした (図 3)。これを遠心して得られた上澄みには, 活性は認められなかった (活性の測定法は後に詳しく述べる)。沈殿に炭酸ソーダ緩衝液 (pH 10.5) を加え, ホモジナイズした後遠心して得られた上澄みは, 強い活性を示した。抽出をさらに 2 度くり返すことにより, 活性物質はほぼ完全に抽出された。得られた活性物質を含む上澄みは多量の着色物質を含んでいるが, この上澄みを DEAE-Sephadex カラムに流すことにより, 無色の強い活性を示す留分が得られた。この留分を用い

図 3 味覚変革蛋白質の分離法

図 4 CM-Sephadex C-25 による味覚変革蛋白質の精製

リン酸緩衝液の濃度を 0.03 M (pH 6.0) から 0.2 M (pH 8.8) に連続的に変化させることにより, 味覚変革蛋白質を溶出した。

て活性物質の性質を調べた。

pH 2.5 以下, pH 12.0 以上の溶液中では, 活性は容易に失活した。煮沸したり, 室温で高濃度の有機溶媒を添加したり, プロナーゼなどの蛋白分解酵素を作用させたりすることにより, 活性の失活がみられた。活性物質を含む溶液を透析した場合に, 透析外液に活性は認められなかった。以上の諸性質から, 活性物質は蛋白質であろうと推定されたので, Andrews⁽¹¹⁾の方法により, Sephadex G-75 を用いて活性物質の分子量を推定した。活性物質の分子量は 44,000 と推定された。

活性物質は, CM-Sephadex カラムによりさらに精製された。DEAE-Sephadex カラムからの活性留分を,

表 1 味覚変革蛋白質のアミノ酸組成

Lysine	7.9	Half cystine	2.3
Histidine	1.8	Valine	8.0
(Ammonia)	17.4	Methionine	1.0
Arginine	4.7	Isoleucine	4.7
Aspartic acid	11.3	Leucine	6.5
Threonine	6.1	Tryptophan	—
Serine	6.1	Tyrosine	3.6
Glutamic acid	9.2	Phenylalanine	5.0
Proline	6.0	L-Arabinose + D-Xylose	5.4
Glycine	9.8		
Alanine	6.3		

表中の値は 100 アミノ酸残基当りのアミノ酸残基数を示す

0.025 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に対し透析した後, CM-Sephadex カラムに流すと, 活性物質はカラムに吸着された。リン酸緩衝液の濃度を連続的に高くすることにより, 図 4 に示すように, 活性蛋白質が溶出された。分離された活性蛋白質は, 蛋白質のモノマーが会合した形で存在するが, ディスク電気泳動 (pH 4.5, 尿素ゲル) により単一の蛋白質からなることが証明された。活性蛋白質の会合は, 蛋白質溶液が低イオン強度溶液に透析された際に起こったものであるが, 会合により活性は変化しなかった。

表 1 は活性蛋白質のアミノ酸分析値を示したものである。この蛋白分子中には, 約 6.7% の糖が含まれており, ペーパークロマトにより L-アラビノースと D-キシロースが確認された。電気泳動の結果と陽イオン交換樹脂に対する挙動から, 活性蛋白質は塩基性蛋白質であることが結論された。後に詳しく述べるが, この蛋白質は味覚受容器の機能そのものを変える作用を有するので, 味覚変革蛋白質 (taste-modifying protein) と名づけられた。

筆者らの研究に続いて, Brouwer ら⁽¹²⁾はサルミン, スペルミンなどの塩基性物質を用いて miracle fruit の活性物質を可溶化することに成功し, 抽出液を硫酸分画した後 Sephadex G-25 を用いて, 上と同じような活性蛋白質を部分的に精製した。彼らは, この蛋白質の分子量を 42,000~48,000 であると推定した。

4. 味覚変革蛋白質の作用機構^(13,14)

a. 味覚変革蛋白質は味覚受容器の機能を変える

精製された味覚変革蛋白質そのものは, まったく味がない。この蛋白質溶液に酸味物質を添加してから一定時間放置した後, この溶液を口に含んでも, 直後には甘味を示さない。このことは, 味覚変革蛋白質が酸味物質の

図 5 味覚誘導効果発現の時間的経過

横軸は味覚変革蛋白質溶液 ($7.0 \times 10^{-7} M$) を口に含んでいる時間を示し, 縦軸は甘味の強さをショ糖濃度で表わす。

構造を変えることにより甘味を誘導するのではなく, 味覚変革蛋白質が味覚受容器の機能そのものを変化させることを意味している。

味覚変革蛋白質の活性は, 7 人の被験者による味覚テストにより測定した。一般に, 味覚テストによる正確な定量的測定は難しいが, 2 つのテスト溶液を与え両者の味の強さを比較させる方法をとれば, かなり正確な定量が可能である。各被験者は, 5 ml ずつの蛋白質溶液を 5 分間口に含んだ後, 吐き出して口をよくゆすぎ, 0.02 M クエン酸溶液を味わう。別に 0.1~1 M のショ糖溶液を標準甘味液として用意し, 0.02 M クエン酸溶液と同じ甘さを有するショ糖液を選択させる。

図 5 は, 味覚変革蛋白質の甘味誘導効果発現の時間的経過を示している。横軸は蛋白質溶液を口に含んでいる時間を示し, 縦軸は 0.02 M クエン酸溶液に対する甘味の強さをショ糖濃度で表わしたものである。甘味誘導効果を最大限に発現させるためには, 3 分間以上蛋白質溶液を口に含んでいることが必要であることがわかる。図

図 6 味覚変革蛋白質の濃度と活性の関係

図 7 味覚変革蛋白質の甘味誘導効果持続性

横軸は蛋白質作用後の時間を示す。

6 は、蛋白質濃度と甘味誘導効果の大きさの関係を示している。甘味誘導効果は $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ 濃度の蛋白質溶液で観察され、 $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ で甘味誘導効果は最大値に達する。0.02 M クエン酸溶液の甘味は、0.4 M シュ糖溶液の甘味に相当する。

味覚変革蛋白質の甘味誘導効果は、一度蛋白質溶液を口に含んだだけで、かなり長時間持続する。図 7 は、異なる濃度の蛋白質溶液をそれぞれ 5 分間口に含み、口をよくゆすいだ後の甘味誘導効果の持続性を示したものである。 $2.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 蛋白質溶液の場合は、約 20 分間で甘味誘導効果が消失するが、 $2.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ 蛋白質溶液を用いた場合には、3 時間以上も甘味誘導効果が持続される。

b. 味覚変革蛋白質は味覚物質の閾値を変化させない

味覚変革蛋白質はすっぱいものを甘くするが、塩味、甘味、苦味の味の性質には影響を与えない。各味を代表する物質として、食塩、ショ糖、キニーネを選び、おのおのの味覚物質の閾値を味覚変革蛋白質作用前後で調べたところ、いずれの場合にも閾値の変化はみられなかった。酸味物質の場合には、味の性質が変化するので複雑であると考えられたが、低濃度の酸溶液は味覚変革蛋白質作用後も酸味のみしか示さなかった。酸味物質の代表であるクエン酸の閾値も、また味覚変革蛋白質作用前後で変化しなかった。

c. 酸の甘味誘導効果の大きさは酸の酸味の強さと相関関係にある

味覚変革蛋白質は、有機酸、無機酸を問わず、

すべての酸味物質を甘くする。酸味の強さは溶液の pH に依存するが、同じ pH でも酸の種類により酸味の強さが異なる。たとえば、pH 3.0 の塩酸溶液はほとんど酸味を示さないが、同じ pH の酢酸溶液は非常に強い酸味を示す。図 8 は、クエン酸溶液を酸味標準液として各種酸の酸味の強さを比較したものであるが、同一 pH での酸味の強さは、酢酸 > ギ酸 > 乳酸 > シュウ酸 > 塩酸の順である。この結果は、ネズミを用いた電気生理学的実験結果⁽¹⁵⁾とよく一致しており、だ液や舌の表面の蛋白質の緩衝効果によるものではない。Beidler⁽¹⁵⁾は、この結果を酸の陰イオンが味覚受容細胞膜に吸着することを仮定して説明した。

図 9 は、味覚変革蛋白質作用後の各種酸の甘味の強さを、クエン酸溶液を標準(甘味)液として用いて比較したものである。この図は図 8 と非常に類似しており、甘味

図 8 各種酸の酸味の強さの比較

クエン酸溶液 (0.003~0.02 M) を酸味標準液として、各種酸の酸味の強さを比較した。

図 9 各種酸の甘味誘導効果

$2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 味覚変革蛋白質作用後、各種酸溶液の甘味の強さを甘味標準液 (0.003~0.02 M クエン酸溶液) と比較した。

の強さはその酸の酸味の強さと相関していることがわかる。

d. 酸味は味覚変革蛋白質の作用により抑制されない
先に述べたように、低濃度の酸溶液は、味覚変革蛋白質作用後でも甘味を示さない(表 2)。この事実から、

表 2 味覚変革蛋白質の甘味誘導効果に対する酸濃度および gymnemic acid A₁ の影響

	クエン酸濃度		
	7.5× 10 ⁻⁴ M	1.5× 10 ⁻³ M	2.0× 10 ⁻² M
味覚変革蛋白質作用前	すっぱい	すっぱい	非常にすっぱい
味覚変革蛋白質作用後	すっぱい	甘い	非常に甘い
味覚変革蛋白質および gymnemic acid A ₁ 作用後	すっぱい	すっぱい	非常にすっぱい

味覚変革蛋白質は、酸の酸味を甘味に変換するのではなく、酸の酸味を抑制せずに酸が強い甘味を誘導するのではないかという可能性が示唆された。この点を明らかにするために、甘味を抑制する物質として知られている gymnemic acid を用いた。この物質はインド産の *Gymnema sylvestre* という葉から抽出されたもので^(16,17)、この物質を口に含んだ後砂糖を味わうと、甘味がまったくなくなり砂のような感じになる。味覚変革蛋白質作用後、gymnemic acid A₁ 溶液⁽¹⁷⁾ を口に含み、口をよくゆすぐ。ついで 0.02 M クエン酸溶液を味わうと甘味はまったくなくなり、酸味のみが感じられた(表 2)。このときの酸味の強さは、味覚変革蛋白質作用前のクエン酸溶液の酸味の強さと変わらない。約 10 分後、gymnemic acid A₁ の甘味抑制作用が消えて、クエン酸溶液は再び甘味を示した。以上のことから、味覚変革蛋白質は酸の酸味を抑制せず、酸味に強い甘味をプラスする効果を有するので、みかけ上、酸が非常に甘くなることが結論された。

味覚変革蛋白質には、L-アラビノースと D-キシロースが含まれているが、これらの糖の 1 M 溶液は 0.35 M ショ糖溶液と同程度の甘味を有する。1 M の L-アラビノースまたは D-キシロースを 0.02 M クエン酸溶液に溶かした液の味は、味覚変革蛋白質作用後の 0.02 M クエン酸溶液の味に酷似していた。味覚変革蛋白質は 0.02 M クエン酸溶液中では安定であり、蛋白質中の糖残基がこのような弱い酸の作用により遊離することは考えられない。おそらく、味覚変革蛋白質中の糖残基は、蛋白分子に結合した状態のまま甘味を誘導する活性中心として作用するものと考えられる。5×10⁻⁸M 味覚変革蛋白質溶液は甘味誘導活性を示すが、味覚変革蛋白質 1 分子は

約 20 個の糖分子を有するので、5×10⁻⁸M 蛋白質溶液中には 10⁻⁶M の糖分子を含む。これに対し、遊離の糖(たとえばショ糖)の閾値は 10⁻²M 付近であり、遊離の糖が甘味を誘導するには 10⁴ 倍の糖濃度が必要である。

e. 味覚変革蛋白質の作用様式

以上の味覚変革蛋白質に関する実験結果は、図 10 に示した作用図式により矛盾なく説明される。味覚変革蛋白質は分子量が約 44,000 であるので、味細胞膜を容易に透過するとは考えられない。おそらく、味覚変革蛋白質は味細胞膜表面に吸着されるであろう。味覚変革蛋白質は allosteric protein であると考え、2 つの結合サイトを仮定する。すなわち、この蛋白質は一方のサイトで味細胞膜に吸着し、他方のサイトで味細胞中の甘味受容体と結合するとする。後者のサイトはアラビノースまたはキシロースであろう。この蛋白質は、味細胞膜表面に一樣に吸着するであろうが、いずれの味覚物質の閾値をも変化させないので、甘味、苦味、塩味などの味覚受容体の結合サイトをふさがはしない。酸溶液が舌に添加されると、味細胞膜が conformational change を起こし、これにより酸味が誘導される。この細胞膜の conformational change は、同時に甘味受容体の近傍に結合した味覚変革蛋白質の一方の結合サイトを、甘味受容体と結合させることになり、甘味が誘導される。ここで、味覚変革蛋白質自身の酸による conformational change が

図 10 味覚変革蛋白質の作用様式

重要な役割を果たしていることも考えられる。ただ、蛋白質の conformational change は、一般に蛋白分子中のカルボキシル基の pK (3.5~4.5) 付近で起こるので、甘味誘導効果はるかに低い pH でなければ引き起こされない点と一致しない。甘味誘導効果と酸味の強さが相関している事実は、図 10 のように細胞膜の conformational change を考えるとよく説明される。

味覚変革蛋白質が実際に舌の表面に結合していることは、次のような実験により確かめられた。まず、味覚変革蛋白質に蛍光色素を活性が失活しないような条件で反応させ、遊離の色素を Sephadex G-25 カラムで除去した。つぎに、この蛍光蛋白質をネズミの舌に作用させたところ、蛍光蛋白質が味細胞内部には存在せず、表面にのみ吸着していることが組織化学的に確認された。

はじめに紹介したように、味覚受容機構の初期過程に関し、酵素説と吸着説が提唱されているが、味覚変革蛋白質の作用機構に関する研究は、吸着説を支持する直接的証拠を提供したものと考える。

文 献

- 1) L. M. Beidler: "Olfaction and Taste III", ed. by C. Pfaffmann, Rockefeller Univ. Press, in press.
- 2) A. F. Baradi and G. H. Bourne: *Science*, 113, 660 (1951); *Nature*, 168, 977 (1951).
- 3) C. J. Duncan: *J. Theoret. Biol.*, 5, 114 (1963).
- 4) L. M. Beidler: *J. Gen. Physiol.*, 38, 133 (1954).
- 5) 河村洋二郎: 化学と生物, 4, 58 (1966).
- 6) 佐藤昌康: 歯界展望, 32, 599 (1968).
- 7) 栗原堅三: 生化学, 41, 209 (1969).
- 8) W. F. Daniell: *Pharm. J.*, 11, 445 (1852).
- 9) G. E. Inglett, J. J. Albrecht and F. A. Hoglan: *J. Agr. Food Chem.*, 13, 284 (1965).
- 10) K. Kurihara and L. M. Beidler: *Science*, 161, 1241 (1968).
- 11) P. Andrews: *Biochem. J.*, 91, 222 (1964).
- 12) J. N. Brouwer, H. Van Der Wel, A. Francke and G. J. Henning: *Nature*, 220, 373 (1968).
- 13) K. Kurihara, Y. Kurihara and L. M. Beidler: "Olfaction and Taste III", ed. by C. Pfaffmann, Rockefeller Univ. Press, in press.
- 14) K. Kurihara and L. M. Beidler: *Nature*, in press.
- 15) L. M. Beidler: "Olfaction and Taste II", ed. by T. Hayashi, Pergamon Press, 1967, p. 509.
- 16) W. Stöcklin, E. Weiss and T. Reichstein: *Helv. Chim. Acta*, 50, 474 (1967).
- 17) Y. Kurihara: *Life Sciences*, in press.

リグニンの利用

——拡大されたその用途——

工業的に利用しうるリグニンは、次の2種に大別される。

SP リグニン: 亜硫酸パルプ廃液を原料とし、リグニンスルホン酸を主成分とする。水溶性である。

KP リグニン: クラフトパルプ廃液を酸で中和して得た沈澱区分(チオリグニン)。水難溶性である。

これらの工業用リグニンには、種々のグレード、または改良品が存するが、量的には SP リグニンが圧倒的に大量利用され、KP リグニンは特殊な用途に独自の道を歩いているのが現状である。

SP リグニンの利用としてまず実用化されたのは、その粘結剂的性質である。古くより、鋳物砂、豆煉炭、耐火煉瓦などの成型に利用されてきたが、近時、農薬、飼料の造粒に多く用いられるようになった。

他方、SP リグニンの分散剂的な利用法として、その最大のものは、湿式セメント工場における原料スラリーへの添加、すなわち減粘剤としてである。この方法は全国すべての工場に応用され、キルンでの焙焼効率を著しく改善した。さらにコンクリート混和剤(減水剤ともいい、生コンクリートの減粘を主目的とする)、石油井掘さく泥水調整剤(循環ペントナイトスラリーの分散剤)、農薬分散剤(原体およびキャリアーの分散)、染料分散剤(均染剤)などに広く用いられている。

これらの用途の性格は添加剂的なものであるが、SP リグニンの化学反応を直接利用したものに皮革なめしがあり、これも古くより実用化されている。

SP リグニンの上記の使用法において、リグニンの種類の性質を組み合わせ利用していることもあり、また混入糖分もしばしばリグニンとの相乗効果を示す。