

高感度ヒト味覚受容体発現細胞系の樹立と 食品の新しい客観的呈味評価への利活用

三 坂 巧

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 准教授

サマリー

食品の味は、その品質を決定する重要な因子である。味物質の受容を担う味覚受容体を用いた簡便な客観的評価系を開発することにより、味覚受容体に起因する様々な味覚現象のメカニズムを解き明かすことができただけでなく、官能評価に依らない客観的な呈味強度の評価が可能となってきた。

特に甘味評価系に関して、ヒト甘味受容体を機能的かつ安定的に発現する細胞株の構築に成功した。得られた細胞株を用いた評価系は、従来法と比較して応答細胞頻度・感度とも顕著な上昇が認められ、長期にわたり安定的な測定が可能であった。これまで測定が困難であったショ糖に対してもヒトの官能閾値を代弁しうる評価が可能となり、食品科学における応用研究にも十分適用しうると考えられる。

このような客観的呈味評価系を有効に活用していくことで、産業的に利用可能な呈味調節物質の探索が実施できるだけでなく、味覚受容体による味物質の認識がどのように行われているかという構造学的な理解についても、進展していくことが期待される。

緒 言

食品の味はその価値を決定する重要な因子であり、味物質が口腔内でどのようにして受容・認識されているかについて解明することは、食品科学における重要な課題の一つである。口腔内上皮層に存在する味細胞は、呈味物質受容に必要な分子群を発現することで味物質認識能を獲得している。近年、哺乳類において、甘味・旨味・苦味物質を受容するいわゆる味覚受容体が同定された。酸味・塩味についても受容体候補分子の同定がすでになされており、いわゆる五基本味（甘・酸・塩・苦・旨）が受容体を介して受け取られているという旧来の仮説が、分子生物学の進歩によって証明されたともいえる。

しかしながら、基礎学術分野において味覚受容体の実

態が解明されているにも関わらず、産業的な食品開発の場では、訓練されたパネラーが食品を実際に口に入れ、官能評価により味を判別しているのが現状である。官能評価は長年の技術の蓄積によりその精度が向上していると言われているものの、主観を排除した定量的なデータを得るには相当な訓練が必要となる。また、実際にパネラーが味わっているため、一度に評価できるサンプル数には限りがある。勿論、安全性が確認されていない物質の味を評価するには、この方法は適切ではない。

このような背景のもと、簡便で汎用性の高い客観的味評価系を開発することは、食品科学を対象とした研究において強いインパクトを持つ研究となりうると考えられた。我々は、ヒト味覚受容体を利用して呈味強度を高感度に測定する技術を開発するとともに、客観的呈味評価を活用することで味に関する様々な現象の発生機構を解明することを目的に、これまで研究を実施してきた。

1. 呈味成分に対応する味覚受容体の同定

味細胞において行われている味物質受容の仕組みを、味覚受容体を発現させた培養細胞を用いて再現することで、それぞれの味物質が示す呈味強度を培養細胞の細胞応答強度によって数値化することができる。本法においては、受容体サブユニットおよびキメラ G タンパク質を一過的もしくは安定的に培養細胞に発現させ、リガンド投与時の受容体の活性化によって引き起こされる細胞内カルシウム濃度の上昇を、蛍光性カルシウム指示薬の蛍光強度変化に変換する（図 1）。この蛍光強度変化を、蛍光顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法や、マルチウェルプレートリーダーを用いた測定によって検出することで、味覚受容体の活性化の程度が客観的数値として提示される。

培養細胞発現系を用いることで、様々な生物に由来する味覚受容体を機能的に発現させることが期待できるため、新たに同定された味覚受容体のリガンドを決定する

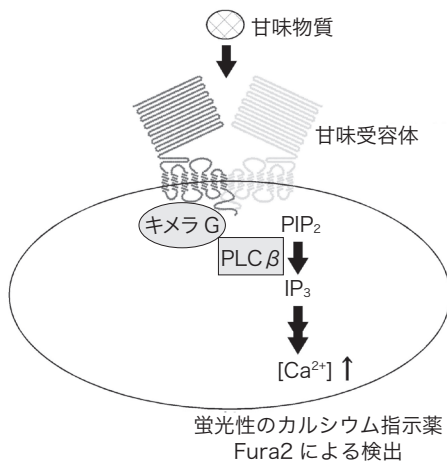


図1 味覚受容体発現細胞における細胞応答

リガンドを投与することにより受容体が活性化されると、細胞内カルシウム濃度が上昇する。この細胞応答を、蛍光性カルシウム指示薬の蛍光強度変化により検出し、客観的な数値として表す。

のにも、この方法は有効である。我々は、モデル動物であるメダカやゼブラフィッシュといった小型魚類に由来する味覚受容体を新規に同定し、これら魚類の味覚受容体がアミノ酸に対して高感度で応答する様子を実験的に示すことができた¹⁾。このとき、哺乳類においては甜味物質を受容する受容体が、これらの魚類ではアミノ酸の受容に関与していたため、小型魚類が甜味物質に反応しない理由が、それらが有する味覚受容体のリガンド様式から説明できることをも示唆することができた¹⁾。

また逆に、食品成分中に含まれる呈味成分が、どの受容体によって受容されるのかという解析にも、ヒト味覚受容体を発現した培養細胞発現系は有効である。例えば、苦味物質を受容する苦味受容体はヒトでは25種類発現しており、それぞれの受容体が異なる苦味物質を認識することで、我々は多様な苦味物質を認識している。食品中には様々な苦味物質が含有されているが、我々は苦味を示すペプチドの一つや、カテキン類を受容しているヒト苦味受容体の同定を行うことができた^{2,3)}。このような呈味物質と受容体との対応関係の解明は、後で述べるような呈味調節機構を考えるうえで、有効な情報となりうる。

2. 長期間安定的な応答が得られる測定系の構築

基本味のうち、我々が嗜好する味である甘味は、デザートや飲料などに含まれており、産業的にも非常に重要な

味である。ヒトには甜味物質を受容する甜味受容体はたった1種類しか存在せず、この1種類の受容体で多種類の甜味物質を受容することが明らかになっている。しかし、培養細胞にヒト甜味受容体を一過的に発現させた測定系では、細胞の応答頻度が非常に低いため、細胞応答の検出や解析に高度な技術が必要となってしまう。そのため、特に多種類のサンプルを評価することを考慮した際には、簡便な解析ができるような測定系を構築することが必要であるという実情があった。

我々は、ヒト甜味受容体およびキメラGタンパク質を一定の比率で安定的に発現し、長期にわたって甜味物質に応答を示すような細胞株の作出を目指して、条件検討を数年間実施した。甜味受容体の発現コンストラクトや安定発現細胞の構築方法に独自の工夫を加えた結果、ヒト甜味受容体を機能的に、かつ安定的に発現する細胞株の作製に成功した⁴⁾。作製したヒト甜味受容体安定発現細胞においては、アスパルテーム・サッカリン・アセスルファムカリウム・シクラメートといった甜味物質に対して、非常に高頻度に応答する様子が確認できた⁴⁾。甜味物質に対する応答頻度が向上した結果、これまで応答測定が困難であったスクロース(砂糖)に対する細胞応答も、明確に測定することができるようになるという、驚くべき成果を同時に達成することができた。

さらに、細胞応答を測定する際の細胞密度・培地・測定時間等、測定条件の最適化を厳密に行うことで、甜味物質に対するヒト甜味受容体安定発現細胞の細胞応答を、マルチウェルプレートリーダーを用いたハイスループット測定により検出することにも成功した。我々が現在実施しているハイスループット測定では、8サンプルに対する甜味強度の測定が約2分で、96サンプルに対する測定が約25分で完了するため、短時間で多数のサンプルに対する測定が可能である。また、長期にわたる細胞応答の安定性についても検討してみたところ、数ヶ月間にわたって甜味物質に対する応答感度の低下が生じなかったことから(図2)、我々の作製したヒト甜味受容体安定発現細胞を用いることで、ヒトが感じる甘味の強度を、簡便にかつ安定的に測定することができるようになったといえる。

3. 味に関する様々な現象の発生機構の解明

古からの官能評価による経験から、味に関する複雑な現象が多数報告されている。前述した培養細胞発現系を用いた味覚受容体の評価系を用いることで、それら味に

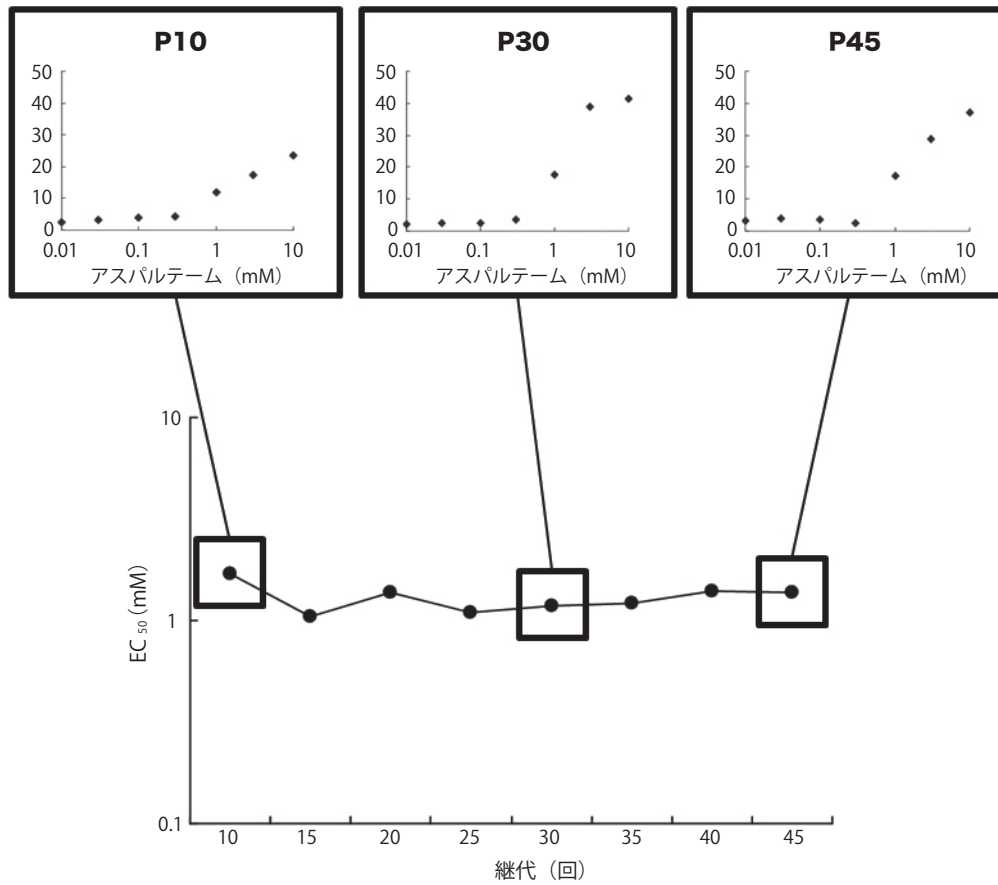


図2 作製したヒト甘味受容体安定発現細胞における応答の長期安定性

ヒト甘味受容体安定発現細胞を5回継代する毎に、異なる濃度のアスパルテームに対する応答強度を測定し、EC₅₀値を求めた。数ヶ月にわたり、安定した応答を示している。

関する様々な現象が、味覚受容体の活性制御を介した現象であるかどうかについて解析できると考えられたため、いくつかについて実施を試みた。

一般的に苦味は好まれない味質であるが、食品加工・貯蔵の過程において意図しない苦味が生じてしまうことがしばしば起こってしまうため、苦味強度を適切に制御する目的で、苦味抑制物質の探索が古くから行われてきた。一つの解決方法として、酸性ジペプチドを食品に添加することで、広範な苦味物質の苦味強度が低下するという報告がなされている。これが苦味受容体の活性抑制に起因するかどうかを検証するため、ヒト苦味受容体の一つであるhTAS2R16のリガンド応答をモデルとして評価を行った。その結果、hTAS2R16のリガンドに対する応答は、酸性アミノ酸や酸性ペプチドといった酸性物質の添加によって有意に抑制されることが判明した⁵⁾。この応答抑制効果はpH依存的であり、pHを低下させる

ことで強い応答抑制が認められた。またpHを中性に戻すと受容体応答が回復することから、pH低下による受容体立体構造変化により苦味受容体の応答低下がもたらされ、これが苦味抑制につながっていることが強く示唆された⁵⁾。

一方、西アフリカ原産のミラクルフルーツや、西マレーシア原産のクルクリゴという熱帯植物の果実には、不思議な働きをするタンパク質が含まれている。これらの果実を口に含んだ後に、酢酸やクエン酸といった酸っぱいものを味わうと、驚くべきことに非常に甘く感じられる。酸っぱいレモンが甘いオレンジであるかのように感じられるため、「酸味が甘味に変換した」ように思ってしまう。この効果は味覚修飾活性と呼ばれ、果実に含まれるミラクリンやネオクリンという味覚修飾タンパク質が、その活性の本体であることが知られている。我々は味覚修飾タンパク質の不思議を解明するため、ヒト甘味受容体を

発現させた培養細胞を用い、pHを変化させたときに生ずる甘味強度の客観的測定を行った。ヒト甘味受容体を発現させた細胞にミラクリンを投与した後に酸性溶液で刺激を行ったところ、ヒト甘味受容体を介した細胞応答が観察された。酸性溶液投与による細胞応答は、pHが下がるにしたがって強くなったため、ミラクリンがpH低下に伴ってヒト甘味受容体を強く活性化することが明らかになった(図3)⁶⁾。ネオクリンを用いた場合においても、同様にpH低下に伴ってヒト甘味受容体を強く活

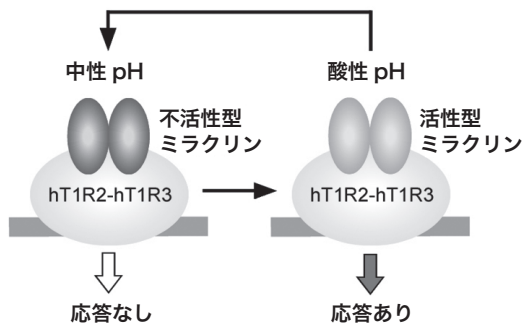


図3 味覚修飾タンパク質ミラクリンの作用機序

ミラクリンはヒト甘味受容体に結合し、酸性条件下でヒト甘味受容体を強く活性化することにより、酸味を甘味に変換している。

性化する様子が確認できた⁷⁾ことから、味覚修飾タンパク質が酸味を甘味に変換する現象は、ヒト甘味受容体に結合したミラクリンやネオクリンが、酸性条件下でヒト甘味受容体を強く活性化することによるものであることが、実験的に示されたのである。酸っぱいものを甘くする味覚修飾タンパク質の不思議が、ヒト甘味受容体の機能解析によって明らかになったとすることができる。

4. 呈味調節物質の探索

食品産業においては、新製品開発などの場面で、既存製品と異なる味を示す製品を日常的に創出している。このような際に、好ましい味を強めたり、嫌な味を抑えたりすることができれば、食品の味の設計が非常に容易になると考えられる。五つの基本味すべてについて、そのような効果を有する物質が存在すれば、食品のデザインに新たな指針を提案できるようになる。

例えば、甘味を増強するような物質は、同じ甘さでありながら砂糖のカロリーを減らす目的や、後口に嫌な味が残ってしまう人工甘味料の使用量を減らす目的で使用することができるため、産業的に非常に有用な物質となりうる。そこで我々は、複数の甘味物質を混合した際に甘味強度を変化させる効果が認められている物質⁸⁾を

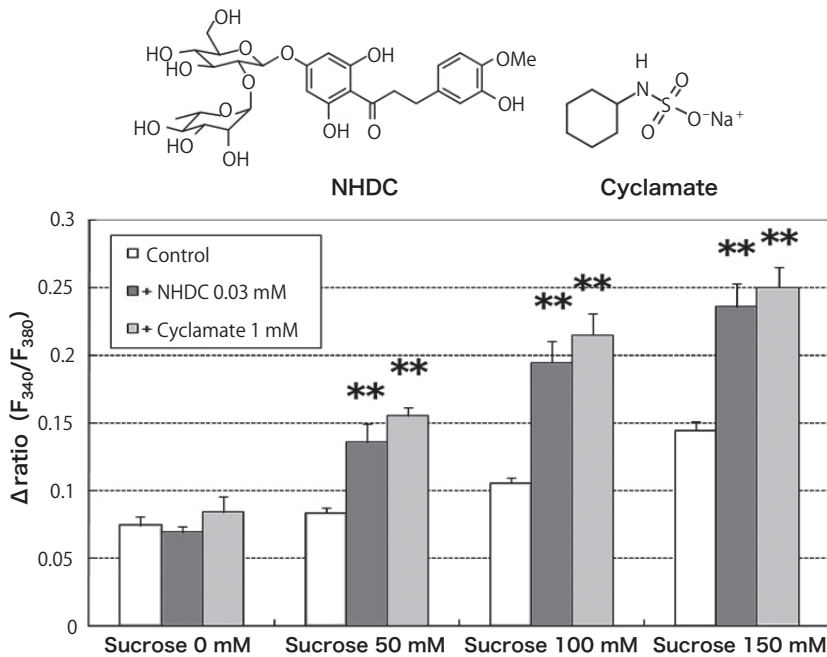


図4 ヒト甘味受容体安定発現細胞を用いた甘味増強物質の探索

砂糖に対してごく少量添加した際に、砂糖の甘味強度を有意に変化させるかどうかというスクリーニングを行ったところ、上記2種類の物質が甘味増強物質として機能することを見出した。

対象として、前述のヒト甘味受容体安定発現細胞を用いた活性測定を実施した。対象物質をごく少量添加した際に、砂糖の甘味強度を変化させるかどうかという基準で多数の物質をスクリーニングした結果、ネオヘスペリジンジヒドロカルコンやシクラメートといった物質が、多種の甘味料に有効な甘味増強物質として機能しうることを実証した(図4)⁹⁾。最近、他の研究グループにおいても新規甘味増強物質の同定に関する報告がなされており¹⁰⁾、甘味増強物質の探索は世界中の多くの研究者において競争となっている。ヒト甘味受容体発現細胞を利用して同定された新たな甘味増強剤が、実際の食品に利用されるようになる日もそう遠くはないと感じている。

おわりに

以上のように、味覚受容体発現細胞を用いた客観的呈味評価系を有効に活用していくことで、これまで官能評価でしか達成し得なかった食品の味のデザインに対して、新たな解決方法を提案することができるようになる。この技術によって、産業的に利用可能な呈味調節物質の探索が実施できるだけでなく、味覚受容体による味物質の認識がどのように行われているかという構造学的な理解についても進んでいくことが期待される。実際に我々はすでに、分子シミュレーションによる味覚受容体の構造予測と、点変異を導入した受容体における活性評価を組み合わせることで、ヒト甘味受容体や苦味受容体におけるリガンド認識機構を明らかにすることができた^{11,12)}。

味覚に関する研究は、味覚受容体の実態が明らかになった最近10年間で飛躍的に進展しており、食品研究におけ

る新たな潮流としても、認識されるようになってきている。今後もその先陣を切り拓くべく、研究を遂行していきたい。

謝 辞

私のこれまでの研究業績を評価いただき、栄えある第1回三島海雲学術賞として選定いただきましたことにつきまして、公益財団法人三島海雲記念財団の今関博理事長ならびに財団関係者の方々、学術賞選考委員の先生方、また学術賞に推薦いただきました公益社団法人日本農芸化学会の太田明徳会長に、深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Oike, H. et al. : *J. Neurosci.*, 27, 5584-5592, 2007.
- 2) Ueno, Y. et al. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1188-1190, 2011.
- 3) Narukawa, M. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405, 620-625, 2011.
- 4) Imada, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 397, 220-225, 2010.
- 5) Sakurai, T. et al. : *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2508-2514, 2009.
- 6) Koizumi, A. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 16819-16824, 2011.
- 7) Nakajima, K. et al. : *FASEB J.*, 22, 2323-2330, 2008.
- 8) Schiffman S.S. et al. : *Brain Res. Bull.*, 38, 105-120, 1995.
- 9) Fujiwara, S. et al. : *Food Chem.*, 130, 561-568, 2012.
- 10) Servant, G. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107, 4746-4751 (2010)
- 11) Masuda, K. et al. : *PLoS One*, 7, e35380, 2012.
- 12) Sakurai, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402, 595-601, 2010.