

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300256

研究課題名（和文）味と物性の接点を探る-モデル味細胞膜を用いた物理的に感じる味の測定

研究課題名（英文）Search for a clue with contact of taste and texture-analysis of physical taste using model lingual epithelial cells

研究代表者

朝倉 富子 (ASAKURA TOMIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：20259013

研究成果の概要（和文）：味と物性は、今までは別々のカテゴリーに分類されてきた。しかし、味は強度だけでなく、口中での広がりや持続性など、物理的な要素を含んでいる。本研究では、味細胞表面を模した脂質二重膜と食品成分の相互作用を評価する簡便な方法を開発した。また、持続性のある味である苦味を抑制する物質をチーズから見出した。活性本体は脂肪酸で、苦味抑制活性の高いチーズには、遊離脂肪酸が多く含まれていた。

研究成果の概要（英文）：Food texture and tastes have been classified into distinct categories. Taste is evaluated by not only the intensity but also its continuity. We constructed the devise that examines the interaction between lipid bilayer mimicked in taste cell surface and food components. Bitterness is lasting taste among five basic tastes. The bitterness masking compounds were purified from natural cheese. Free fatty acids were identified as key substances of bitterness masking.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：味覚・持続性・表面プラズモン共鳴・物性・受容体

1. 研究開始当初の背景

味と物性は、今までは別のカテゴリーに分類されてきた。味は化学物質として味覚受容体に作用し、味シグナルが味神経を経て大脳味覚野へと伝達される。一方物性は、硬さ・凝集性・粘性・付着性などの力学的特性と、大きさや粒子の形などの幾何学的特性から成り、食品を口腔内に入れてから咀嚼、嚥下までの間に生じる体性感覚として伝わる。しかし、味と物性は密接な関係があり、「なめらかな味」、「粉っぽい味」

など物性と味がリンクする例も少なくない。近年第6番目の味と言われているコク味も、厚み、広がり、複雑さ、持続性といった言葉で表現されるように、“化学的な味”だけでなく、物性と関連のある味（“物理的な味”）を指している場合が多く見られ、味覚とテクスチャーなど口腔内体性感覚の2つの情報が脳に送られて統合されて生じると考えられる。本研究は“物理的な味”の要素の中から持続性に焦点を当て、食品成

分の口腔内での吸着性あるいは残留性を物質レベルで明らかにすることを旨とする。

味は強さだけでなく、時間的な要素（持続性）も重要な要素である。先味、後味と言われるように味の持続性は、食品加工、調理の分野においては非常に重要である。しかし、味の持続性を評価する方法は、現在のところ官能評価が主たる評価方法である。官能評価はパネルの個人差や体調等により安定したデータを得ることが難しく、簡便な方法とは言えない。

2. 研究の目的

本研究では、舌の細胞表面を模した脂質二重膜を作製し、表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて味物質と脂質二重膜との相互作用を測定することによって舌への持続性を評価した。

SPRは、生体分子間の相互作用を標識なしでリアルタイムに検出する分析装置である。SPRを用いて分子間相互作用を測定するには、対象となる一方の分子をセンサーチップと呼ばれる基盤に固定化し、これに作用する分子を含むサンプルを固定化表面に送液する。このときセンサーチップ表面で起こる分子間の結合、解離に依存する微量の質量変化をSPRシグナルとして検出し、経時的にセンサーグラムと呼ぶグラフとしてモニターする。分子間の相互作用に関して、平衡状態における2分子間のアフィニティを評価し、持続性を推定する評価方法の構築を試みる。また、苦味は、他の基本味に比べて持続性のある味物質が多いが、これをマスクする成分を食品から抽出し、苦味物質との相互作用を検証する。

3. 研究の方法

(1) SPRを用いることによって、他の分子生物学的な方法では難しい2分子間の微量な相互作用を簡便な方法で検出でき、マイクロフロー系での動的な環境における相互作用の変化を経時的に測定できるため、実際に口腔内で食品成分が残留する現象などを再現するのに適していると考えられる。脂質二重膜をキャプチャーさせるL1チップを用いて相互作用を解析した。リポソームを構成するリン脂質は、

DOPC:1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
単独のもの

DOPE:1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine

DOPS:1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]

SM:N-Oleoyl-D-erythro-Sphingosylphosphorylcholine

DOPC/DOPE/DOPS/SM(5:3:1:1)の混合脂質溶液(CESM)の2種類を調製した。SPRの詳細な反応条件および解析条件は、下記文献)に示す方法により、実施した。

(2) 食品成分からの苦味抑制物質の抽出ある種のナチュラルチーズがビールの苦味を抑制することから、チーズ中に苦味抑制物質が存在することが推定された。このチーズの脂質画分を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて極性の差による分画を行った。分画によって得られた画分は、官能評価によって苦味抑制効果を検証した。各画分は、薄層クロマトグラフィーおよび¹H NMRおよび¹³C NMRによって含まれる成分を同定した。同定した物質と苦味物質の相互作用解析を等温滴定熱量計を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 脂質膜との相互作用

SPRを用いて各種食品成分と脂質二重膜との相互作用を解析した結果、相互作用を示すセンサーグラムは3種類に分類された。Aは相互作用の大きい物質で、アナライトが、リガンドにゆっくりと結合し、アナライトの添加終了後、徐々にリガンドから遊離してくるもの、Bは、アナライトとリガンドの結合は早く、アナライト添加後は、急激にResponse unitがベースラインにまで低下する。CはA,Bのいずれにも分類されず、AとBを合成したような形を取るなどであった(図1)。

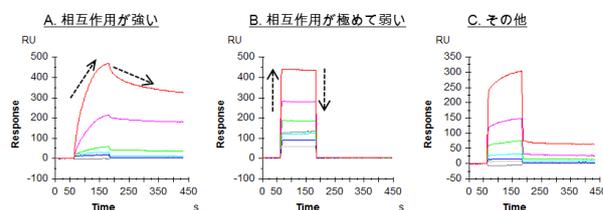


図1 センサーグラムの形状による相互作用の分類

種々の食品成分をこのパターンに分類したところ、多くの単糖とオリゴ糖はAに分類され、とろみなどを付与する多糖類もほとんどのものがBに分類された。Aに分類されたのは、タンパク質のうち、カゼイン、ラクトフェリン、ミラクリン、モネリン、ゾーマチンである。同じパターンのセンサーグラムを持つ分子群は、同様の近似式を用いて、相互作用を評価した。その結果、味覚関連タンパク質では、リポソームからの解離を示すステージで解離定数を求めたところ、解離定数の小さい順に、ゾーマチン、モネリン、ミラクリンであった。

センサーグラムのパターンの異なる物質間の評価をするために、解離ステージにおけるresponse unitの値を用いて簡便な評価を導入した。(図2)

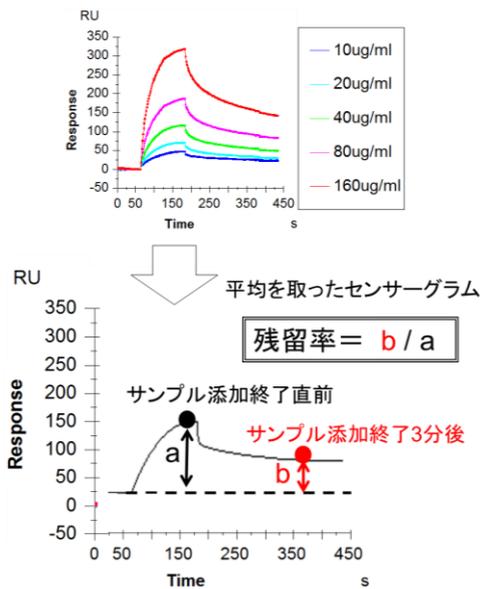


図2 残留率の算出方法

本法を用いることで、センサーグラムのパターンが異なる A, B, C の結合の強さを概ね数値化することができた。炭水化物の残存率と味質関連タンパク質の残留率を表 1、表 2 に示す。

表1 炭水化物の脂質膜への残留率

化合物	DOPC	CESM
グルコース	0.01	0.03
ガラクトース	0.04	0.00
フルクトース	0.00	0.01
マンノース	0.01	0.00
ショ糖	0.02	0.01
マルトース	0.02	0.01
セルビオース	0.01	0.02
トレハロース	0.00	0.01
マルトトリオース	0.00	0.00
マルトテトロース	0.02	0.04
マルトペントース	0.02	0.01
カルボキシメチルセルロース	0.05	0.02
アラビアガム	0.14	0.12
K-カラギーナン	0.13	0.17
Λ-カラギーナン	0.04	0.04
キサンタンガム	0.07	0.01
ガラクトタン	0.04	0.04

表2 味覚関連タンパク質の脂質膜への残留率

タンパク質	DOPC	CESM
ソーマチン	0.57	0.52
ミラクリン	0.21	0.27
モネリン	0.42	0.48

(2) 苦味抑制物質の探索と相互作用の解析
ある種のナチュラルチーズから抽出した脂質画分 A, B, C, D はそれぞれ、A:脂質画分の主要成分であ

るトリグリセリド、B:ジグリセリド、C:ジグリセリドと遊離脂肪酸の混合物、D:モノグリセリドであった(図 3)。

Fraction	Identification	Assignment	Chemical shift(s)		
			¹ H	¹³ C	
A	triacylglycerol	1	4.10	4.25	62.1
		2	5.00	-	71.8
		3	3.61	-	60.9
B	1,2-diacylglycerol	1-OCO-	-	-	173.5
		2-OCO-	-	-	173.2
		3	4.05	64.7	-
C	1,3-diacylglycerol	1	4.22	62.1	
		2	4.1	68.9	
		3	4.22	62.1	
D	fatty acid	1-OCO-	-	-	173.3
		3-OCO-	-	-	173.6
		R-CO-OH	3.60	3.69	179.6

図3 チーズの脂質画分成分の主要化合物

苦味抑制活性評価を行ったところ、C の画分にのみ活性が認められたことから、チーズの苦味抑制活性物質の本体は遊離脂肪酸であることがわかった。苦味抑制活性の強いチーズと弱いチーズの遊離脂肪酸含有量を測定したところ、図 4 のように、苦味抑制活性の強いチーズでは、遊離脂肪酸含有量が高いことが分かった。また、遊離脂肪酸組成を調べたところ、4 種のチーズは種類に関係なく、主要な 4 遊離脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸であった(図 4)。

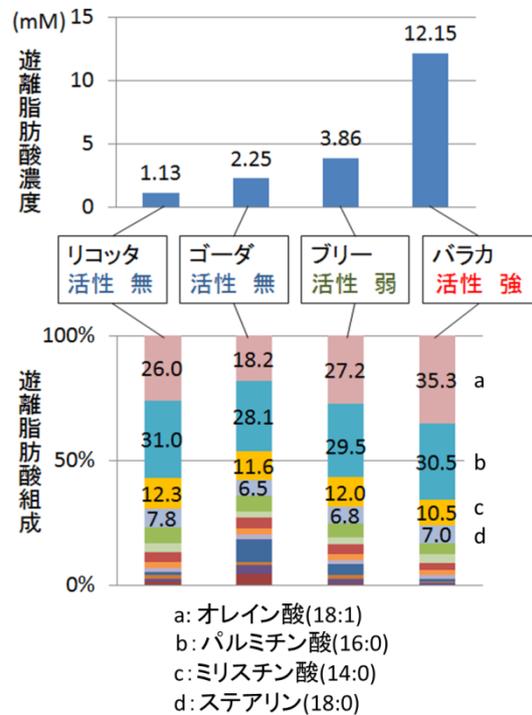


図4 苦味抑制活性と脂肪酸組成

脂肪酸の苦味抑制活性を直接評価するために、オレイン酸および、主要 4 種の脂肪酸を活性物質の

抽出に使用したチーズの遊離脂肪酸組成を模した混合脂肪酸溶液を用意し、苦味抑制活性効果を測定した。その結果、オレイン酸は、混合脂肪酸よりも、高い抑制効果を示した。これらの結果は、遊離脂肪酸が効率よく苦味を抑制することを示すものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

①Homma R, Yamashita, H, Funaki J, Ueda R, Sakurai T, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T, Identification of Bitterness-masking Cheese, *J. Agric Food*, 査読有、60、2012、4492-4499
DOI:dx.doi.org/10.1021/jf300563n

②Asakura T, Tamura T, Terauchi K, Narikawa T, Yagasaki K, Ishimaru Y, Abe K, Global gene expression profiles in developing soybean seeds, *Plant physiol. Biochem.*, 査読有、52、2012、147-153
DOI:dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.12.007

③Yamamoto, K, Ishimaru Y, Ohmoto M, Matsumoto I, Asakura T, Abe K, Genetic tracing of the gustatory neural pathway originating from Pkd113-expressing type III taste cells in circumvallate and foliate papillae, *J. Neurochem.*, 査読有、119、2011、497-506、
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07443.x

④Koizumi, A, Tsuchiya A, Nakajima K, Ito K, Terada T, Shimizu-Ibuka A, Loïc, B, Asakura T, Takumi M, Abe k, Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 査読有、108、2011、16819-16824,
DOI:10.1073/pnas.1016644108

⑤Nakajima K, , Identification and Modulation of the Key Amino Acid Residue Responsible for the pH Sensitivity of Neoculin, a Taste-Modifying Protein., *PLoS One*, 査読有、6、2011、274-278、 DOI: 10.1002/ffj.2073

⑥Asakura, T, Miyano M, Yamashita H, Sakurai T, Nakajima K, Ito K, Misaka T, Ishimaru Y, Abe K, Analysis of the interaction of food components with model lingual epithelial cells: the case of sweet proteins. , *Flavour Fragr. J.*, 査読有、26、2011、274-278
DOI: 10.1002/ffj.2073

⑦Nakajima, K, Koizumi A, Iizuka K, Ito K, Morita Y, Koizumi T, Asakura T, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Abe K, Non-acidic compounds induced the sweetness of neoculin a Taste-Modifying Protein, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、75、2011、1600-1602 DOI: 10.1271/bbb.110081

[学会発表] (計6件)

①本間亮丞、チーズの苦味抑制活性とその起因となる遊離脂肪酸の解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月23日、京都女子大学(京都)

②金田康平、味覚修飾タンパク質ネオクリンのシステインバリアント作製とその機能解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月23日、京都女子大学(京都)

③小泉太一、味覚修飾タンパク質ネオクリンにおけるpH依存的構造変化のNMRによる検出、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月23日、京都女子大学(京都)

④阿部美樹、アカゲザル味覚関連遺伝子群の茸状・有郭乳頭株味蕾における発現解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学(京都)

⑤松田龍星、ヒト上皮ナトリウムチャンネル活性化剤S3969の蛍光膜電位測定による活性評価、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学(京都)

⑥養田直倫、シロイヌナズナ由来シグナルペプチドペプチダーゼ(AtSPP)の過剰発現株を用いた網羅的遺伝子発現解析、日本農芸化学会 2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学(京都)

[図書] (計2件)

①朝倉富子、社団法人生命科学振興会「医と食」編集部、味覚受容体、2011、56

②朝倉富子、阿部啓子、三共出版株式会社、コメのアスパラギン酸プロテアーゼ機能解析と食品加工への応用一、2012、341

[その他]

ホームページ等

[http://park.itc.u-](http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/tastescience/index.html)

[tokyo.ac.jp/tastescience/index.html](http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/tastescience/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 富子 (ASAKURA TOMIKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：20259013

(2) 研究分担者

舟木 淳子 (FUNAKI JUNKO)
福岡女子大学・人間・環境学研究科・准教
授
研究者番号：60219079