

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23550171

研究課題名(和文)フラグメント集合方式によるレセプター型味覚センサーの開発

研究課題名(英文)Development of fragment assembling type taste sensors

研究代表者

林 宣之(Hayashi, Nobuyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品分析研究領域・主任研究員

研究者番号：40294441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：味物質のためのレセプターの分子構造を分割して合成後、それらのフラグメント分子を電極上に固定し、その表面でレセプター構造を再構築する新規なセンサー作成方法の開発に取り組んだ。この目的のために、メチルキサンチン類(苦味)や酸性アミノ酸塩(うま味)を水中で認識することができる人工レセプター分子を開発した。フラグメント分子を固定した電極を用いて、味物質の水溶液のインピーダンスを測定したところ、リアクタンスまたはレジスタンスの値と濃度の対数値の間にはある程度の直線性が認められた。しかし、センサーとしての実用的耐久性に解決すべき課題も見出された。

研究成果の概要(英文)：Development of a new method to prepare sensors for taste substances was addressed. The structures of the artificial receptors were segmented to a few parts, and then the structures of the binding sites were reconstructed on an electrode by immobilization of the fragment molecules. For this purpose, receptor molecules that were able to recognize methylxanthines with bitterness and acidic amino acids with umami taste in water were created. When impedance values of the taste substance solutions were measured using the electrodes on which the fragment molecules were immobilized, the relation between the reactance or resistance value and the logarithm of the concentration showed some linearity. However, a problem with the practical durability was found.

研究分野：有機化学

キーワード：分子認識 味覚センサー

1. 研究開始当初の背景

味は食品を特徴づける最も重要な要素であるが、従来はヒトの味覚によって判断せざるを得ない物理量と考えられ、その評価の客観性を如何に高めるかは重要な課題である。近年開発された味覚センサー装置は味強度を数値化できるため、その解決を図る有力な手段として注目されている。この装置は、ヒトの味細胞の細胞膜に該当する脂質膜を伴った複数のセンサープローブを有しており、試料中の味物質の作用によって引き起こされる脂質膜の膜電位変化を味情報として検出するシステムである（ここでは脂質膜型味覚センサーと呼ぶ）¹。市販の脂質膜型味覚センサー装置は、酸味、塩味、電解物質由来の苦味、うま味、渋味の強度が測定可能とされており、食品の品質評価、品質管理、マーケティング動向の解析から、水質管理、人体への影響に対する懸念のため官能試験が不适当である医薬品の評価まで、様々な分野で活用されている²⁻⁵。本研究課題の代表者らは、この脂質膜型味覚センサー装置を利用し、緑茶の味強度を格付けする方法を開発すると共に⁶⁻⁸、緑茶に含まれる化学成分の分子間相互作用による味変化のメカニズムを解明してきた⁹。その一方で、脂質膜型味覚センサーでは、基本的に非電解物質に由来する味は検出することが難しくなること(例えば、苦味物質カフェインのようなメチルキサンチン類は苦味センサーに応答しない)、さらに電解物質の味に関しても共存物質による影響によって適正なセンシングが困難になる場合があること(例えば、うま味センサーは渋味あるいは苦味物質であるポリフェノールにも応答する)も明らかになった。非電解性の味物質には、苦味物質や甘味物質、広義の味として認識されている辛味物質など、食品の味へ寄与するものが多いため、これらの味強度を測定することが可能なセンシング技術の開発が大いに期待されている。さらに、味センシングを適正に行うためには、脂質膜型既存味覚センサーにしばしば見られるような共存物質に対する誤った応答は改善される必要がある。

ヒトにおける実際の味認識は味物質が細胞膜上のレセプタータンパク質と結合することで開始される^{10,11}。このメカニズムを模倣し、味物質とレセプター分子間の相互作用をシグナルとして検出可能な味覚センサーシステム(レセプター型味覚センサー)が開発されるならば、脂質膜型味覚センサーが抱える上述の問題点を解消することが可能である。レセプター分子としては、味物質の受容タンパク質のような生体分子も候補となり得るが、将来的に実用化技術への発展を想定するならば、生産性、耐久性、応用性の面から、人工レセプター分子が有利である。これまでに、本研究代表者らは、レセプター型味覚センサーに関する先駆的な試みとして、金表面上に結合した糖鎖のカルボキシル基に

アミノ化された β -シクロデキストリンを固定したシステムを開発し、表面プラズモン共鳴(SPR)を観測することによって緑茶カテキン類の苦渋味強度が測定できることを示した¹²。一方で、レセプター分子のバリエーションの増加や選択性の向上を図るためには、準備すべきレセプター分子の種類が多くなり、それらの化学構造も複雑になることが予想される。そのような場合に、設計、合成、機能性評価をおこなってレセプターの分子構造を確定した後、検出システムに固定するための結合部位を伴うレセプターの全体構造を改めて合成する戦略は非効率的であると考えられた。

2. 研究の目的

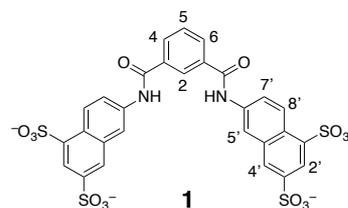
レセプター分子構造を複数の分子単位に分割後、それぞれのフラグメント分子を合成し、検出装置に固定することによって、最終的に期待されるレセプター構造を金属表面上に直接構築できるならば、効率的なセンサー開発法になると考えた(これをフラグメント集合方式と呼ぶ)。各フラグメント分子の合成経路は、レセプター分子全体を合成する経路よりも単純化できるため、効率性にメリットがある。本研究では、この新しいコンセプトに基づき、レセプター型味覚センサー開発の新たな方法論を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

センシング対象として、非電解物質と共存物質による影響を受けやすい電解物質の双方について取り組んだ。具体的には、非電解物質としてカフェイン等のメチルキサンチン類(苦味)、電解物質としてグルタミン酸(Glu)やアスパラギン酸(Asp)等の非芳香族 α -アミノ酸類(うま味)に着目し、それらの物質を水中で認識できるレセプターの分子の開発を行った。さらに、これらの分子構造を分割したフラグメントを合成後、金電極表面上に固定し、再構築したレセプター構造がオリジナルのレセプター分子と同様の分子認識能力を有するかどうかについて、インピーダンス測定によって検証することを試みた。

4. 研究成果

(1) メチルキサンチン類を認識するレセプター分子の開発¹³



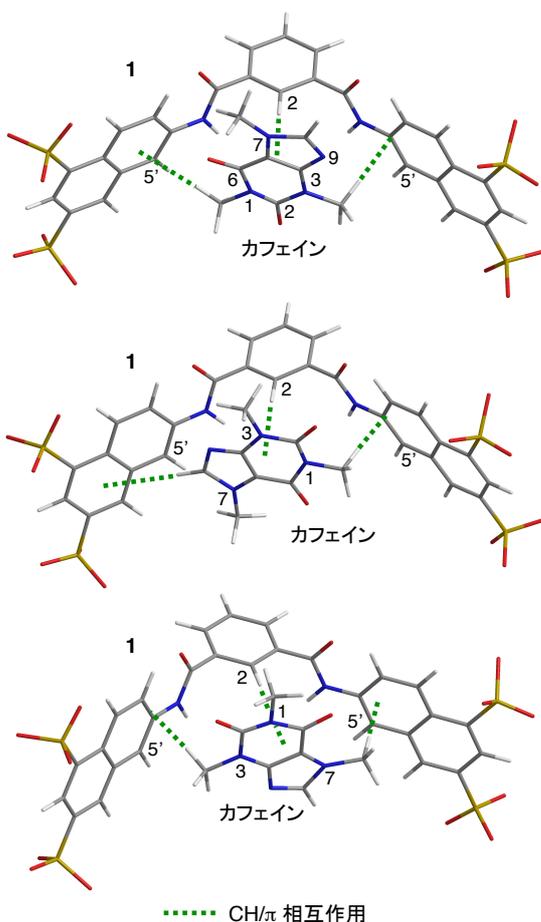


図 1. レセプター1/カフェイン複合体の推定構造. Adapted by courtesy of N. Hayashi et al. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 845–851. Copyright 2014 Elsevier.

苦味物質であるメチルキサンチン類のためのレセプター候補分子として、化合物 **1** とその類縁体 5 種類の複合体形成能力の評価を行った。これらの化合物は、塩化イソフタロイルとそれぞれに対応する芳香族アミン化合物から 1 段階で合成された^{13,14}。1.00 mM のカフェインまたはテオフィリン水溶液に対し、レセプター候補分子の水溶液を 5 mM まで加えたときのカフェインおよびテオフィリンの ¹H NMR シグナルの化学シフト変化を pH 7.0、300 K の条件下にて調べた。レセプター濃度の増加に伴い、全ての NMR シグナルは高磁場側にシフトした。これらの滴定プロットに対し、1 : 1 の結合モデルを適用し、結合定数の解析を行った。化合物 **1** は、他の候補化合物と比較して、カフェイン、テオフィリンに対する高い結合能力があったが、カフェインに対してはテオフィリンの約 2 倍の結合定数を示した (カフェイン : 127 M⁻¹、テオフィリン : 64 M⁻¹)。カカオに含まれるテオフィリンの異性体であるテオプロミンは水に難溶性のため、滴定実験はできなかった。

これらのメチルキサンチン類と同様にプリン骨格を持つにも関わらず、うま味を呈するアデニル酸、グアニル酸、およびイノシン

酸についても化合物 **1** との複合体形成を調べた。いずれの場合も、化合物 **1** との複合体形成はほとんど認められなかった。

以上の結果から、化合物 **1** はメチルキサンチン類、特にカフェインのレセプター分子として適していることが示された。分子認識のメカニズムを明らかにするために、化合物 **1** とカフェイン間の分子間 NOE を調べた。NOESY スペクトル上における **1** の C5'-H とカフェインの N1-Me 間、および **1** の C5'-H とカフェインの N3-M 間にクロスピークは、図 1 に示される複合体構造を示唆した。これらの複合体構造は常に 3 つの CH/π 相互作用によって安定化されるため、プリン環上に 3 つのメチル基を持つカフェインは、特に複合体形成に有利であると考えられた。

(2) グルタミン酸やアスパラギン酸を認識するレセプター分子の開発¹⁵

Glu や Asp は小規模の分子内に複数の親水基で高度に官能基化されているため (2 つのカルボキシル基と 1 つのアミノ基)、レセプター分子との水中における複合体形成の際に疎水効果を期待することはできない。さらに、水素原子とヘテロ原子間に働く水素結合のような一般的な静電的相互作用を主体とする複合体形成は水中では困難であるため、これらの分子を水中で捕捉することは、通常は大変難しい。そこで、本研究ではスカンジウム化合物が示す水中でのルイス酸性に注目した¹⁶。分子内に 2 つのスルホン酸基をもつリガンド 2 分子を 3 価のスカンジウムカチオンに配位させることによって生成する化合物をデザインした (図 2)。構造 **2** は分子内に Lewis 酸性部位と Lewis 塩基性部位が存在するため、その両部位によって酸性アミノ酸 (Glu または Asp) を認識することを想定した。

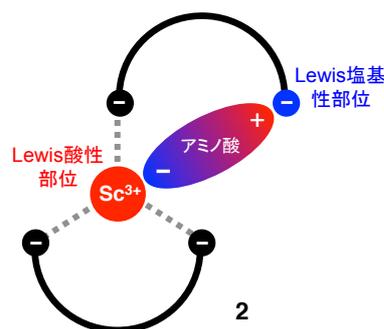


図 2. Glu、Asp のためのレセプター分子構造とその認識機構の概念図。

実際のレセプター候補分子 **3-6** (図 3) は、塩化テレフタロイルとアミノナフタレンスルホン酸塩から合成されたリガンド分子を、水中にてスカンジウムトリフラートと処理することによって得られた。これらの化合物は、いずれも難水溶性物質であったため、それらの分子認識能力は、それらのアミノ酸水溶液に化合物 **3-6** を添加した際の水層からの

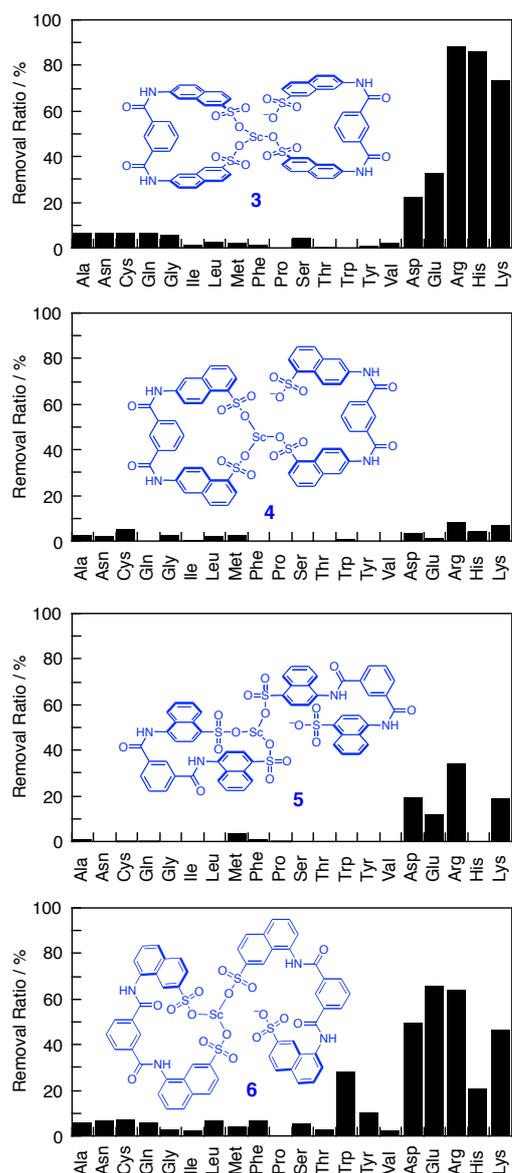


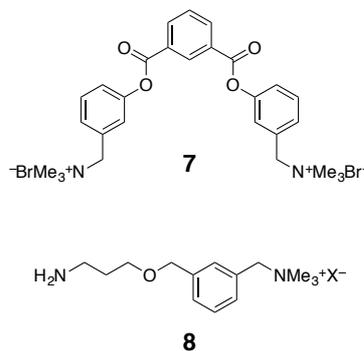
図3. 4つのスカンジウム化合物とそれらによる水中での必須アミノ酸の除去率. Adapted with permission from N. Hayashi et al. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9652–9658. Copyright 2012 American Chemical Society.

アミノ酸分子の除去率として評価された。2.00 mMのアミノ酸水溶液 (0.700 mL) に等モル量の化合物 **3–6** を加え、室温にて 30 分間激しく攪拌した。遠心分離後、上澄みのアミノ酸残存率を $^1\text{H NMR}$ スペクトルの積分値から算出した。図3に示されたように、Glu および Asp は、化合物 **6** によって最も高い割合で除去された。一方で、化合物 **6** はアルギニン (Arg) やリジン (Lys) といった塩基性アミノ酸も同等の割合で除去することができた。塩基性アミノ酸であっても、ヒスチジン (His) の除去率は低かった。中性アミノ酸では、トリプトファン (Trp) に対して中程度の除去率を示したが、その他の中性アミノ酸

に対しては、ほとんど認識を示さなかった。化合物 **3** は、3つの塩基性アミノ酸 (Arg、His、Lys) に対しては高い除去率を示したが、酸性アミノ酸 (Glu、Asp) には中程度の除去率しか示さなかった。化合物 **4** は全ての必須アミノ酸に対して、ほとんど除去機能を示さず、化合物 **5** は Glu、Asp、Arg および Lys に対して除去能を示したが、それらの比率はそれほど高いものでは無かった。以上のことから、うま味を呈する酸性アミノ酸塩のレセプター化合物としては、現時点では **6** が最適であると判断された。

(3) 金電極表面へのレセプターフラグメントの固定と呈味物質への応答について

化合物 **1** をアミド結合部で分割し、ベンゼン環部とナフタレンスルホン酸部の各フラグメント分子の合成とそれらの化合物の電極表面への固定化を検討したところ、目的物の簡便な調製と固定化反応に、迅速な解決が困難である問題が生じた。そこで、フラグメント集合方式によるセンサーの構築をよりシンプルな系で試みた。化合物 **1** と比較的類似した骨格構造を持つ非環状芳香族化合物 **7** を用いて、固定化実験を行った。化合物 **7** はガレート型カテキンを優先的に認識する能力を有することが分かっている¹⁷。



化合物 **7** をエステル結合部で分割し、リンカー部の付いたフラグメント化合物 **8** を合成した。化合物 **8** とベンジルアミンを、あらかじめ金電極表面上に固定されたチオールカルボン酸のカルボキシル基に、EDC を用いた縮合反応によって固定した。その際、化合物 **8** とベンジルアミンはモル比 1:1 の水溶液を用いた。

上述の方法で構築されたシステムを用いて、0.001mM、0.01mM、0.1mM、1mM、10mM の(-)-3O-エピガロカテキンガレート水溶液のインピーダンスを測定した。0.01–10mM の範囲で、リアクタンスおよびレジスタンスの値と濃度の対数値との間にはある程度の直線関係が認められた。これは、フラグメント集合型センサーの可能性を示唆するものと考えられた。しかし、電極を数回洗浄すると、インピーダンス値の極端な低下が観測された。これは固定化した修飾部分が金電極表面から剥離したことが原因と推定されたため、

このシステムは実用的耐久性に関して問題のあることが明らかになった。これらの結果から、レセプター型味覚センサーの検出方法としては、インピーダンス以外の検出方法を利用することが望ましいと結論づけられた。

引用文献

- (1) Habara, M. *et al. Encyclopedia of Sensors*, 2006, Vol. 10; pp. 107–119. (2) 味香り戦略研究所ホームページ(<http://www.mikaku.jp/>). (3) Uchida, T. *et al. Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1336–1339. (4) Kataoka, M. *et al. Int. J. Pharm.* **2008**, *351*, 36–44. (5) Fujita, A. *et al. J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4414–4420. (6) Hayashi, N. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 626–631. (7) Hayashi, N. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 587–589. (8) Hayashi, N. *et al. J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7384–7387. (9) Hayashi, N. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 1306–1310. (10) Breslin, P. A. S. *et al. Current Biology* **2008**, *18*, R148–R155. (11) Roper, S. D. *Pflüger Arch. Eur. J. Physiol.* **2007**, *454*, 759–776. (12) Hayashi, N. *et al. J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8351–8356. (13) Hayashi, N. *et al. Tetrahedron* **2014**, *70*, 845–851. (14) Hayashi, N. *et al. Tetrahedron* **2009**, *65*, 8209–8215. (15) Hayashi, N. *et al. J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9652–9658. (16) Kobayashi, S. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 15–27. (17) Hayashi, N. *et al. J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4848–4854.

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 2 件)

- ① Nobuyuki Hayashi, Tomomi Ujihara, Shigeki Jin, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 845–851.
(査読有)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.12.035>
- ② Nobuyuki Hayashi, Shigeki Jin, Tomomi Ujihara, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9652–9658.
(査読有)
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo301739s>

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 宣之 (HAYASHI Nobuyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品分析研究領域・主任研究員

研究者番号：40294441

(2)研究協力者

陳 榮剛 (CHEN Ronggang)