

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501006

研究課題名(和文)酸味受容修飾物質によるヒトレベルでの酸味受容体の特定とその構造相関性の解析

研究課題名(英文) Specification of sour taste receptor in human level by sour taste modifier and analysis of structural corelationship

研究代表者

塚本 義則 (TSUKAMOTO, Yoshinori)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60592079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：酸味受容体遺伝子候補ASICs(acid-sensing ion channel:1a,1b,2a,2b,3),PKD1L3及びPKD2L1遺伝子をアフリカツメガエルの卵母細胞に単独及び共発現させたものをセンサとして電気生理学的アッセイ法を用いて、ASIC1aと1bの単発現と共発現系において酸味抑制あるいは増強効果を示す物質候補を探索してきた結果、各々の統計学的有意差を伴って、納豆A、麦味噌、米味噌、イソフラボン及び炭化水素資化性菌培養液の界面活性画分の分子量3500以上の透析内液画分に酸味抑制効果、また、納豆Bの分子量3500以上の透析内液画分に酸味増強効果を有する成分の存在を見出した。

研究成果の概要(英文)：ASICs(acid-sensing ion channel:1a,1b,2a,2b,3),PKD1L3 and PKD2L1 genes, which are candidates of sour taste receptor, were expressed individually or simultaneously in oocyte of *Xenopus laevis*. Resulting oocytes expressed ASIC1a or/and 1b genes were used for electrophysiological assay as sensor in order to screen substances able to decline or increase sour taste. As the result, effectiveness of decline on sour taste were observed in dialyzed fraction of natto A, wheat miso, rice miso, isoflavone and emulsion layer of culture broth of hydrocarbon-utilizing bacterium using membrane with pore size of molecular weight of 3,500. In contrast, effectiveness of increase on sour taste was observed in dialyzed fraction of natto B using same membrane.

研究分野：応用微生物学、発酵生産、食品栄養科学、食品衛生学

キーワード：酸味受容体 酸味抑制 酸味増強 味覚修飾 パッチクランプ法 電気生理学的測定

1. 研究開始当初の背景

酸味受容体候補としては、いくつかの酸感受性イオンチャンネルが報告されたが、いずれもその動物細胞での酸感受性の電気生理学的な細胞応答レベルにとどまり、ヒトの舌の味蕾レベルでの酸味受容に關与する受容体は未だ特定できていない。近年、酸味の味覚障害者のヒト味蕾細胞の遺伝子解析から酸味受容体と予想される複合の酸感受性イオンチャンネルが推定された。これらを動物細胞に複合発現させた系でその電気生理学的な細胞応答を抑制又は増強する物質についてヒトの舌レベルで酸味の抑制又は増強(酸味受容修飾)を味覚検証してヒトの酸味受容を構成する受容体の特定と酸味受容修飾機能を有する物質と酸味受容修飾との構造相関性を明らかにする。食品において酸味は食欲増進はもとより近年では申請者らによって食酢に含まれる酢酸にコレステロール、血糖値及び血圧の上昇抑制さらには体脂肪の低減など生活習慣病の改善につながる効果のあることがヒトレベルで検証されている〔T. Fushimi et al. Br J Nutr (2006),95,916-924 他6報〕。しかし、この酸味のヒトレベルでの明確な受容機構は未だ解明されていないのが現状で、この酸味受容機構をヒトレベルで解明できれば学術的にその意義が大きく、また食生活はもとよりひいては生活習慣病の改善に寄与できる味覚の新たな世界が拓かれる可能性を秘めている。

これまでに哺乳類での酸味受容体候補としては、酸感受性イオンチャンネル分子がいくつか報告されている。

ラットでは、酸感受性イオンチャンネルの ASICs (acid-sensing ion channel : 1a, 1b, 2a, 2b 及び 3) が酸味受容体候補として報告された〔S. Ugawa et al. Nature, 395, 555 (1998)〕。

その後、ASICs 以外にも HCN (hyperpolarization-activated cyclic

nucleotide-gated channel) 1 と HCN4 も酸味受容体候補として報告された〔D.R. Stevens et al. Nature, 413, 631 (2001)〕。

さらに、2 アポドメイン K⁺イオンチャンネルも酸感受性があり、酸味受容体候補として注目された〔W. Lin et al. J. Neurophysiol., 92, 2909 (2004)〕。しかし、いずれも電気生理学的手法による動物細胞レベルの細胞応答を指標とした検証であり、未だにヒトの舌の味蕾レベルでの酸味受容に対する關与が明らかにされていない。

2. 研究の目的

そこで申請者は、このギャップを埋めるべく酸感受性イオンチャンネル遺伝子を動物細胞に発現させた電気生理学的なアッセイ系で細胞応答を抑制又は増強する機能(酸味受容を抑制又は増強する機能)、いわゆる酸味受容を修飾する物質をスクリーニングし、これを用いてヒトの舌の味蕾レベルでの酸味受容応答を直接的に検証することで酸味受容体の本体を明らかにする研究手法を考案した。そして、申請者は 2003 年に実際に ASIC2a と 2b 遺伝子をアフリカツメガエルの卵母細胞に共発現させた系をアッセイ系として天然物及びその微生物又は / 及び酵素処理物を作用させて酸味受容を抑制或いは増強する物質をスクリーニングした結果、茶カテキンの一種に動物細胞の電気生理学的手法のアッセイ系において酸味受容を抑制すると想定される細胞応答物質を見出し、実際にヒトの舌レベルで味覚検証したが、酸味抑制の効果は確認できなかった(研究成果未発表)。このことから、申請者は今まで発見された酸感受性イオンチャンネルの単独および 2 種の ASIC2a, 2b の発現系ではヒトの舌の味蕾レベルの酸味受容機構を反映しておらず、これら既知の酸感受性イオンチャンネルの 2 種類以上の複合発現系においてはじめてヒトの舌の味蕾レベルでの酸味受容を反映できるのではないかと仮説に至り、現在までの一連

の研究結果からは、特に後者の仮説の可能性が高いものと研究戦略を構想してきた。ところが、2006 年に入り TRP イオンチャネルスーパーファミリーに属する PKD2L1 と PKD1L3 の複合体が新たな酸味受容体候補として報告され〔Y. Ishimaru et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **103**, 12569 (2006)〕、酸味受容が複数のイオンチャネルの複合体で構成されている可能性がはじめて示唆された。

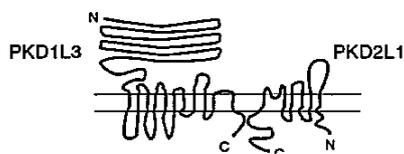


図 1. PKD2L1/PKD1L3 複合体チャネルの膜トポロジーモデル

そして、さらに 2009 年に米国の研究者らによる味覚障害を有するヒトの追跡調査の中で、他の味覚には全く異常がないにもかかわらず完全に酸味に反応しない患者が 2 名確認され、味蕾細胞における遺伝子発現解析から、酸味反応が正常なヒトでは発現している ASICs (acid-sensing ion channel: 1a, 1b, 2a, 2b 及び 3)、PKD2L1 及び PKD1L3 がこれら酸味に反応しない患者では全く発現していないことが明らかとなった〔T. Huque et al. PLoS ONE 2009;4:e7347〕。

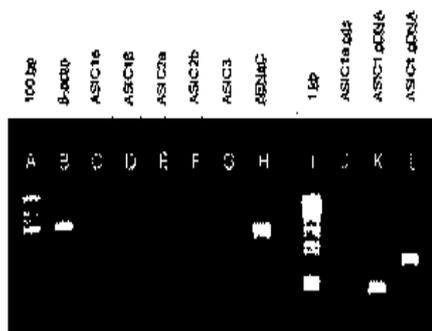


図 2. 酸味覚喪失患者の ASICs 遺伝子 RT-PCR と遺伝子解析

C:ASIC1a,D:ASIC1b,E:ASIC2a,F:ASIC2b
G:ASIC3

これは酸味受容体に関するヒトレベルでの自然ノックアウト体を意味するとともに酸味受容には酸感受性イオンチャネルを複合

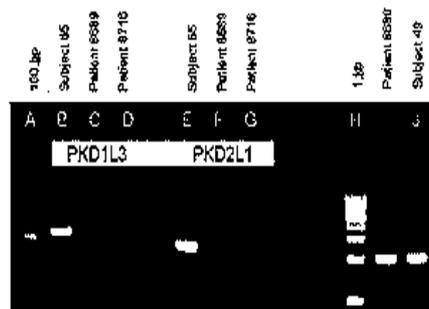


図 3. 酸味覚喪失患者と正常者の PKDs の遺伝子の RT-PCR と遺伝子解析

C: 酸味覚正常者, B, C: 酸味覚喪失患者
E: 酸味覚正常者, F, G: 酸味覚喪失患者

発現することの必要性を強力に示唆する発見でもある。

そこで、今回申請者らはこの酸味への応答を完全に喪失した患者の遺伝子発現解析から得られた 6 つの酸味受容体候補遺伝子〔ASICs(acid-sensing ion channel: 1a, 1b, 2a, 2b 及び 3)、PKD2L1 及び PKD1L3〕に着目して、これら ASICs と PKDs ファミリー遺伝子を全て同時に動物細胞(アフリカツメガエルの卵母細胞)において発現させ、その酸物質に対する電気生理学的な細胞応答を定量的に観察できるシステムをセンサーとして用いて天然物及びその微生物又は / 及び酵素などを作用させて物質変換した変換物を対象に電気生理学的な細胞応答を抑制又は増強する物質をスクリーニングした後、これらの物質を単独及び複合系で実際にヒトの舌レベルでその酸味受容の抑制又は増強効果を味覚検証することにより直接的に酸味受容に関わる受容体の分子実体をヒトレベルで特定するとともに、酸味受容を修飾する物質と酸味受容の構造相関性を明らかにする。

なお、酸味受容修飾物質のスクリーニングに関しては、ASICs の阻害剤としてのアミロラ

イド, PcTx1 [P. Escoubas et al. Protein Science (2003);12:1332-1343] 及び APETx2 [Jensen JE et al. Toxicon. 2009 Jul;54(1):56-61] などのペプチド化合物が既にいくつか報告されており, ASICs はもとより PKDs に対しても新たな酸味受容を修飾する物質をスクリーニングできる可能性は高いと考えている。また, ペプチド系以外の物質としては, ASIC2a 及び 2b を共発現させた系における電気生理学的な細胞応答を抑制する物質として, 申請者が発見したカテキン類 (研究成果未発表) や苦味受容を抑制する物質として脂質系の物質などが報告されており, ASICs はもとより PKDs に対しても酸味受容を抑制あるいは増強作用を有する酸味受容を修飾する物質の発見の可能性は高いものと予測される。今回, 申請者は上記ペプチド系, カテキン類, 脂質系に加えて糖質系も対象としてタンパク質, 脂質, カテキン, 多糖に対して微生物又は / 及び酵素を作用させた処理物から酸味受容修飾物質のスクリーニングを試みる。

3. 研究の方法

酸味障害者から酸味受容体候補として特定された【ASICs (acid-sensing ion channel : 1a, 1b, 2a, 2b 及び 3), PKD2L1, PKD1L3】は全てクローニングされており, これらの各遺伝子をアフリカツメガエルの卵母細胞に単独に発現させて電気生理学的手法によりその電気応答を修飾する活性を有する物質を明らかにする。次いで, これらの遺伝子を単独或いは各種の複合系で共発現させた系にて単独発現系で認められた酸味受容修飾物質を対象にこれらを複合的に作用させる系で酸味受容を修飾する応答を示す単独物質ないしは物質の組合せ系を検証する。次いで, 酸味受容を修飾する応答を示した単独物質乃至は物質の組合せ系についてヒトの舌レベルでの酸味受容修飾を検証する。スクリーニングする酸味受容修飾物質候補の調製

は過去に酸感受性を阻害した物質 (ペプチド類, カテキン類など) を基本にペプチド系, カテキン系, 糖質系, 脂質系の高分子を微生物又は / 及び酵素で作用させた反応物を試料とする。

- (A)酸味受容修飾アッセイ系の確立
- (B)酸味受容修飾物質候補の調製
- (C)電気生理学的手法による酸味受容修飾アッセイと酸味受容修飾物質のスクリーニング
- (D)ヒトの舌レベルでの酸味受容修飾のアッセイ
- (E)酸味受容修飾物質の構造相関性の解析

【平成 24 年度】

- (A)酸味受容修飾活性アッセイ系の確立
 - (1)酸味受容体候補【ASICs (1a,1b , 2a , 2b 及び 3) , PKD2L1 , PKD1L3】遺伝子のアフリカツメガエルの卵母細胞における単独発現条件の確立
 - (2)酸味受容体候補【ASICs (1a,1b , 2a , 2b 及び 3) , PKD2L1 , PKD1L3】遺伝子のアフリカツメガエルの卵母細胞における共発現条件の確立
 - (3)酸味受容体候補遺伝子を発現した(1)と(2)のアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学的アッセイ系の確立
- (B)酸味受容修飾物質候補の調製
 - (1)ペプチド系試料の調製
 - 各種タンパク質 (-PGA を含む) 及びその部分加水分解物の調製
 - 各種タンパク質のプロテアーゼ処理物の調製
 - 各種タンパク質の微生物処理物の調製
 - (2)糖質系試料 (オリゴ糖 , 多糖) の調製
 - 各種多糖類とその部分加水分解物の調製
 - 各種多糖類の加水分解酵素処理物の調製
 - 各種多糖類の微生物処理物の調製
 - (3)脂質系試料の調製
 - 各種脂質及びその部分加水分解物の調製
 - 各種脂質のリパーゼ他酵素処理物の調製

各種脂質の微生物処理物の調製

(4)カテキン類試料の調製

各種カテキン類及びその部分加水分解物の調製

(5)上記 4 種類の物質の複合系試料の調製

(C)電気生理学的手法による酸味受容修飾活性アッセイと酸味受容修飾物質のスクリーニング

(1)各酸味受容体候補の単独発現系での味覚受容修飾活性のアッセイ

(2)各酸味受容体候補の共発現系での味覚受容修飾活性のアッセイ

【平成 25 年度】

(D)ヒトの舌レベルでの酸味受容修飾活性アッセイ

(E)酸味受容修飾物質の構造相関性の解析

4. 研究成果

酸味障害者の舌では ASIC α (acid-sensing ion channel : 1a, 1b, 2a, 2b 及び 3), PKD1L3 及び PKD2L1 遺伝子が発現していないことから、これらの酸味受容体遺伝子候補を単独及び共発現させたものをセンサとして電気生理学のアッセイ法を用いて、酸味受容体のイオンチャネルの孔を高分子で覆ってプロトンの流入をブロックして酸味抑制するという仮説と イオン結合、疎水結合或いは静電気結合によって酸味受容体タンパクをプロトンが流入しにくい(酸味抑制)又は流入しやすい(酸味増強)構造にその 3 次元構造を変化させるという 2 つの仮説に基づいて、先ず ASIC1a と 1b の単発現と共発現系で酸味修飾(抑制 or 増強)効果が期待できる物質候補を探索してきた結果、各々の分子量 3500 以上の透析内液画分に統計学的有意差を伴って納豆 A、麦味噌、米味噌、イソフラボン及び炭化水素資化性菌培養液の界面活性画分で



図3 電気生理学のアッセイシステム

は酸味抑制効果、納豆 B では酸味増強効果を有する成分の存在を明らかにした。

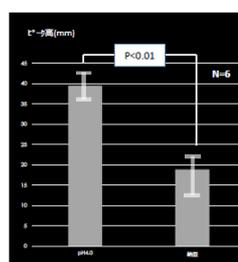


図4 納豆の酸味抑制効果

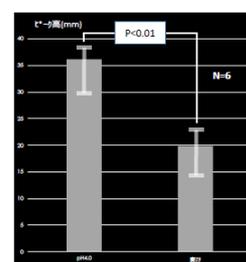


図5 麦味噌の酸味抑制効果

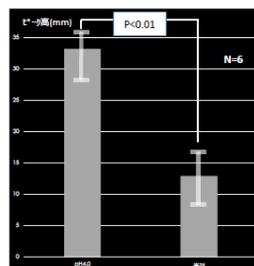


図6 米味噌の酸味抑制効果

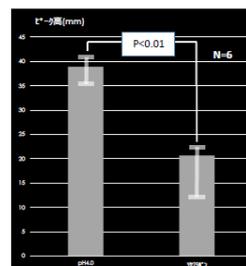


図7 イソフラボンの酸味抑制効果

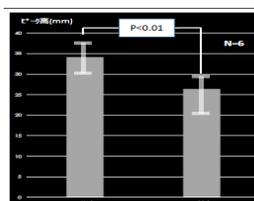


図8 炭化水素資化性菌P18-2培養物の酸味抑制効果

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本義則 (TSUKAMOTO, Yoshinori)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号 : 6 0 5 9 2 0 7 9

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

鵜川真也 (UKAWA, Shinya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 2 0 3 2 6 1 3 5