

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25242012

研究課題名(和文)食品成分間相互作用の新規解析方法の確立と味覚修飾物質のスクリーニング

研究課題名(英文)Novel interaction analysis of food components and screening of taste modifier.

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(農学部)・特任教授

研究者番号：20259013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,800,000円

研究成果の概要(和文)：塩味受容体候補であるENaCを活性化する物質に塩味増強作用があると仮定し、これをスクリーニングするためのハイスループットな系を構築した。また、化学合成によって塩味のみを増強させる物質の作出に成功した。苦味抑制剤として見出した脂肪酸による苦味の抑制機構を明らかにした。すなわち、脂肪酸のカルボキシル基が苦味物質中の窒素原子と水素結合によってbinary complexを形成し、binary complexは、さらに脂肪酸の側鎖同士で疎水結合を形成して凝集体を形成する。その結果、苦味物質の構造が変化するとともに、不溶化することで苦味が低減化されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Human ENaC (hENaC) is a candidate of salty taste receptor. High throughput screening of hENaC activation molecules was constructed. From about 4000 compounds, 4 molecules are extracted as a hENaC activation compound. Besides, a novel salty taste enhancer was synthesized by organic synthesis. We previously found free fatty acid suppresses the bitter taste and revealed the mechanism of bitterness suppression by fatty acid. Fatty acids interact directly with bitter substances through hydrogen bonds and hydrophobic interactions to form insoluble binary complexes that mask bitterness.

研究分野：食品科学、食生活

キーワード：食品 塩味 成分間相互作用 苦味

1. 研究開始当初の背景

食品の「おいしさ」は、味、匂い、舌触り、温度、歯ごたえ、色、など五感すべてで認識され、「おいしい」「おいしくない」は、やはり五感すべてによって感知された知覚によって評価される。特に味はおいしさの主たる要因であり、基本五味（甘、苦、酸、旨、塩）によって骨格が形成されている。味はまず舌で受容され、舌前面に存在する鼓索神経、舌後部の舌咽神経によって延髄孤束核に伝達され、大脳味覚野において味として認識される。最近 20 年の間に、舌上に存在する味覚受容体が次々と発見され、味の認知は味覚受容体が決定すると考えられるようになってきた。しかしながら、味の世界はそれほど単純ではない事を私達は経験的に認識している。

調理や食品加工の場では、味の変化（味の相乗作用、抑制作用、増強作用）は重要な意味を持つ。食品の味は単一ではなく、複数の味物質によって構成されている。単一の味を持つものは、特定の調味料くらいである。風味調味料でも一種類の味物質ではなく、複数の味物質で構成される。風味調味料には、匂いを付与する香料や香辛料も含まれる。食品の味はさらに複雑で、それらに含まれる味物質の総和ではなく、互いに強めあったり、弱めあったりして、独自の味の世界を実現している。代表的な味の相互作用例（グルタミン酸と IMP）は分子レベルで、相乗効果のメカニズムが解明された好例である。すなわち、甘味受容体 T1R に IMP が結合することでグルタミン酸の T1R に対する応答が増強されるというものである。

味の変化に影響を与えるメカニズムは一義的ではなく、複数かつ多岐に亘ることを示している。味の変化は、(1) 味覚受容体に対する味成分の作用、(2) さらに高次の認知領域へ向かう味神経の活性化 (3) 脳の味覚野における認知と、複数の段階において引き起こされている可能性がある。これらに加え、食品自身に含まれる成分間で生じる相互作用によって生じる変化や唾液との相互作用も影響するであろう。

本研究では、上記の段階のうち、食品中の成分間反応に着目したアプローチ、および、口腔内で生じる反応に焦点を当て、独自のア

ッセイ系を導入して、栄養、摂食亢進に貢献できる味修飾物質の創出を目指した。

2. 研究の目的

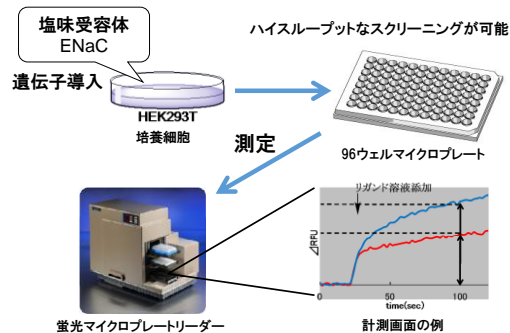
味は食品のおいしさにとって最も重要な要素である。そして食品に含まれる味物質は単一である場合はほとんどなく、複数の味物質が含まれる。これらは互いに影響を及ぼし合っており、各々の食品独自の個性を作り上げている。本研究では、味の相互作用の新規測定方法の確立とともに、味の相互作用を利用して、機能性を高めるための研究を実施する。第 1 に苦味を効率よく抑制する物質のスクリーニング、第 2 に塩味増強物質の創出である。現在日本では塩の摂取量が摂取目標量を大きく上回っている。減塩は重要課題であるが、単なる減塩は食べ物のおいしさを損なう。そこで塩味の強度を変えることなく、減塩を実践するための手段として、塩味増強物質の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) human ENaC 活性化剤スクリーニングのためのアッセイ系の構築

ハイスループットな測定系としてプレートリーダーを用いたスクリーニング系を構築した。リガンドが ENaC に応答すると膜電位が変化し、同時に導入した膜電位感受性色素の蛍光値の変化として現れる。この蛍光値変化 ΔRFU を記録する。図 1 に示すようにリガンド添加 100 秒後の ΔRFU を測定することで、応答強度の差を検出する。

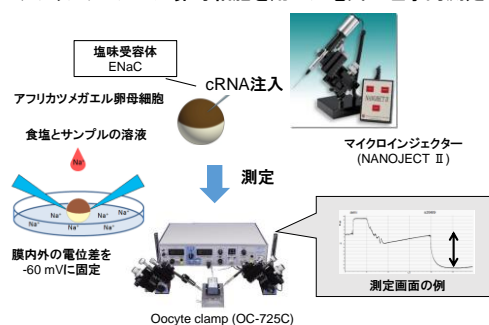
図1 培養細胞を用いた塩味増強物質のスクリーニング



細胞の培養時間、リガンドの添加方法は、hENaC α, β, γ を一過的に HEK293T 細胞に発現させ、DMEM 中にて 24~27 時間培養す

る。これを 96 ウェルマイクロプレートに播種する。Na⁺を含む測定用バッファーに置換し、膜電位感受性色素を添加する。リガンドを含む測定用バッファーをウェルの中に滴下し、蛍光を測定する。既に ENaC 活性化能を有すると報告されている S3969 を 1 μ M 加えた際の応答値に対する各リガンドの応答値の比率が 0.18 以上のものを、二次スクリーニングへ進めた。二次スクリーニングはアフリカツメガエル卵母細胞を用い、human ENaC の cRNA をマイクロインジェクターで導入し、サンプルを含む NaCl 溶液を滴下し、-60 mV における電流を測定する。ENaC の特異的阻害剤であるアミロライド添加時に変化した電流を補正值として用い、それぞれのサンプルの活性化度を評価した (図 2)。

図2 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的測定



(2) 脂肪酸の苦味抑制効果の解析と抑制メカニズムの解明

1) ヒト官能試験

苦味物質として0.22mMキニーネ塩酸塩、1.5mMプロメタジン塩酸塩、50mMカフェイン、脂肪酸として0.5mMオレイン酸ナトリウムを用い、脂肪酸の有無のみ異なる試料溶液 A、B二液間における二点比較による官能試験を行った。得られた結果は片側二項検定により危険率0.05でデータ解析を行った。

2) 等温カロリメトリー(ITC)を用いた相互作用測定

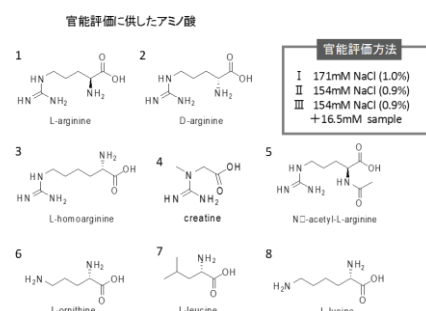
試料はサンプル側・シリンジ側共に5mMリン酸緩衝液を含む溶液として調製した。苦味物質としては2.2mMキニーネ、1.5mMプロメタジン、2.2mMまたは50mMカフェインを用いた。1.5mM各種苦味物質溶液をシリンジ側の溶液とし、脂肪酸としては0.5mMオレイン酸ナトリウムまたは0.5mM各種脂肪酸ナトリウムをサンプルセル側の溶液として用いた。

装置はMicroCal iTC₂₀₀(GEヘルスケア)、解析はOrigin 7.0を使用した。

(3) 化学合成による塩味増強物質の創出

1) 既知の塩味増強物質の塩味増強効果を官能評価によって評価した。試験に供した化合物は下記の 8 種である (図 3)。官能評価は I. 174mM NaCl(1.0%), II. 154 M NaCl(0.9%), III. 154 mM NaCl(1.0%) + 16.5 mM サンプルを用意し、I ~ IIIの塩味を比較した。

図3

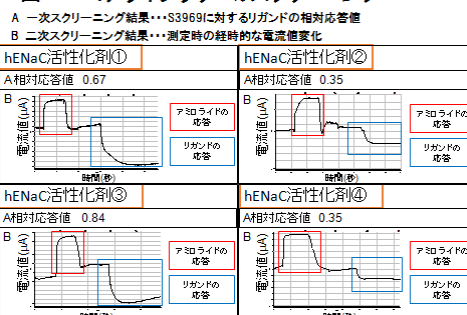


4. 研究成果

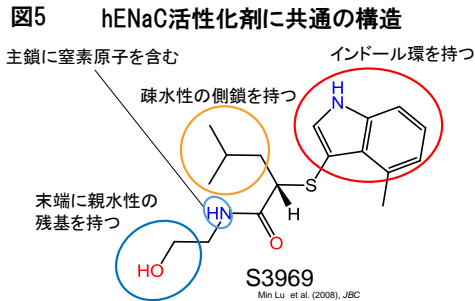
(1) human ENaC 活性化剤のスクリーニング

一次スクリーニングで得られた化合物には多くの疑陽性物質が含まれる可能性があり、二次スクリーニングではこれらを除去するためにアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。化合物ライブラリー(約 21 万化合物)の中で、構造的に多様性をもたせたコアライブラリー(約 1 万化合物)から、3,367 化合物をもちいてスクリーニングを行った結果、1 次スクリーニングでは 390 の陽性化合物が取得でき、そのうち二次スクリーニングで有意に活性化されたと判断された化合物が 4 個得られた。4 個の化合物の一次スクリーニングにおける相対応答値と二次スクリーニングでのアミロライドおよびサンプルによって変化した電流値を図 4 に示す。

図4 コアライブラリーのスクリーニング



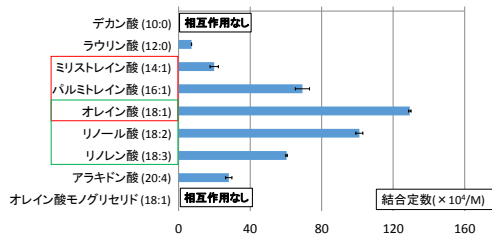
これらの化合物の共通構造として既に human ENaC 活性化剤として知られている S3969 の構造と類似の官能基の存在が示された (図 5)。



hENaCを活性化する部分構造である可能性

(2) チーズに含まれる脂肪酸の苦味抑制活性
既に我々は、チーズの中から苦味を抑制する物質として脂肪酸を同定していた (Homma et al. *J. Agric Food Chem.*, 2012)。苦味抑制活性をもつチーズにもっとも多く含まれていた脂肪酸であるオレイン酸の苦味抑制活性を官能試験によって評価した。
ITC を用いてどのような脂肪酸が苦味抑制活性を強く示すかを評価した結果、キニーネに対する相互作用は、オレイン酸 > リノール酸 > パルミトレイン酸 > リノレン酸 > ミリストレイン酸の順で、炭素鎖の長さや二重結合の数に関与しており、オレイン酸モノグリセリドでは全く効果を示さなかったことから、相互作用にはカルボキシル基と 12 以上の炭素鎖が必要であることが示された (図 6)。

図6 脂肪酸とキニーネの相互作用
9種の脂肪酸とキニーネの相互作用測定
⇒デカン酸、オレイン酸モノグリセリドは相互作用なし



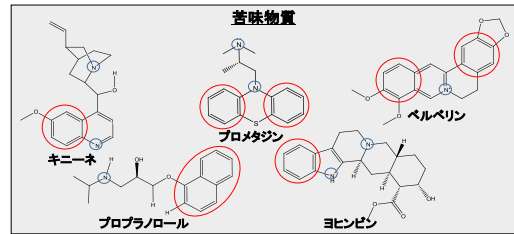
必要構造としてカルボキシル基と12以上の炭素数

すべての苦味物質に効果が有るか否かを評価するために、24 種類の苦味物質とオレイン酸の相互作用を解析した結果、5 個の化合物で相互作用が検出できた。これらは、窒素原子と芳香環をもつという共通構造を有してい

た(図 7)。

図7 オレイン酸と苦味物質の相互作用

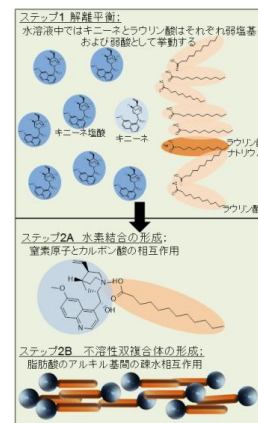
オレイン酸と24種の苦味物質の相互作用測定
⇒5種の苦味物質との間に相互作用



共通構造として窒素原子と芳香環

苦味物質と脂肪酸の相互作用メカニズムを更に詳細に調べるために、キニーネとラウリン酸を用いて両者を混合したときの構造変化を NMR によって解析した結果、図 8 に示す様に苦味物質の窒素原子とカルボン酸が水素結合を形成し、この複合体は、脂肪酸の疎水性基を介して疎水結合で会合した不溶性化合物を形成することが分かった。

図8



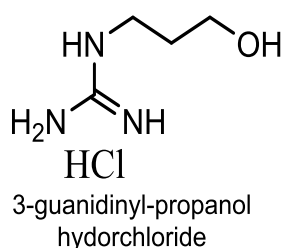
(3) 新規塩味増強物質の創出

図 3 に示す 8 つの化合物を用いて、I ~ III の溶液を用いて塩味の強さを比較した。III の溶液が II と同等の塩味と評価されるものは化合物 3, 4, 5, 6, 8 であり、I と同等は 2, 7, I よりも明らかに塩味を強く感じたものは 1 の L-arginine・HCl であった。以上の結果より、グアニジル基を有する化合物に塩味増強活性があることが示された。

そこで、各種グアニジル化合物を合成した結果、図 9 に示す 3-guanidinyl-propanol

hydrochloride が、溶解性、結晶の生成の容易さから応用範囲が高いと判断し、安全性試験を行った。急性毒性試験などを行った後、塩味増強活性を評価した。その結果、3-guanidinyl-propanol hydrochloride は、0.15%の添加で、食塩水の塩味を15%増強し、異味を全く感じさせなかった。麵つゆなど、うま味調味料の含まれるスープにおいては更に効果が高く、25%まで減塩することが出来た。

図9



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Yuki Kayanuma, Reiko Ueda, Michiko Minami, Arata Abe, Kazumi Kimura, Junko Funaki, Yoshiro Ishimaru and Tomiko Asakura*. A Predictive Model Based on Surface Electromyography to Assess the Easiness of Deglutition of Dysphagia Diets. *Journal of Food Processing & Technology* 7,604 (2016.7)
2. Shota Ushiyama, Yoshiro Ishimaru*, Masataka Narukawa, Misako Yoshioka, Chisayo Kozuka, Naoki Watanabe, Makoto Tsunoda, Naomi Osakabe, Tomiko Asakura, Hiroaki Masuzaki, Keiko Abe*. Catecholamines Facilitate Fuel Expenditure and Protect Against Obesity via a Novel Network of the Gut-Brain Axis in Transcription Factor *Skn-1*-deficient Mice *EBioMedicine* 8,60-71 (2016.6)
3. Junko Funaki, Michiko Minami, Sachie Abe, Reiko Ueda, Wakako Eto, Kenji Kugino, Muthuko Kugino, Keiko Abe, Kiyoshi Toko and Tomiko Asakura*. Effect of proteolytic modification on texture and mastication of heat-treated egg white gels

Food Processing Preservation (2016.1)

4. Kayoko Ogi, Haruyuki Yamashita, Tohru Terada, Ryousuke Homma, Akiko Shimizu-Ibuka, Etsuro Yoshimura, Yoshiro Ishimaru, Keiko Abe and Tomiko Asakura*. Long-Chain Fatty Acids Elicit a Bitterness-Masking Effect on Quinine and Other Nitrogenous Bitter Substances by Formation of Insoluble Binary Complexes. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8493-8500 (2015)
 5. Taicni Koizumi, Tohru Terada*, Ken-ichiro Nakajima, Masaki Kojima, Seizo Koshiba, Yoshitaka Matsumura, Kohei Kaneda, Tomiko Asakura, Akiko Shimizu-Ibuka, Keiko Abe and Takumi Misaka*. Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor. *Sci Rep.* 5, 12947 (2015)
 6. Keiko Midorikawa, Masaharu Kuroda, Kaede Terauchi, Masako Hoshi, Sachiko Ikenaga, Yoshiro Ishimaru, Keiko Abe and Tomiko Asakura*. Additional nitrogen fertilization at heading time of rice down-regulates cellulose synthesis in seed endosperm. *PLoS One* 9, 6, e98738 (2014)
- [学会発表] (計 25 件)
1. 脂肪酸が苦味を抑制する作用機序の解明-脂肪酸は苦味物質の立体構造を変化させる- 大木伽耶子、山下治之、井深章子、石丸喜朗、阿部啓子、朝倉富子 日本農芸化学会 2014 年度大会 東京・明治大学 2014 年 3 月 28 日 トピックス賞
- [図書] (計 3 件)
1. 「チーズに含まれる苦味抑制物質と苦味物質との相互作用の解明」化学と生物 Vol.54 No.11 朝倉富子 山下治之 p.784-786 公益社団法人日本農芸化学会 2016 年 10 月 20 日
 2. 「おいしさの科学的評価・測定法と応用展開」第 9 章ゲノミクスを用いた食味関連遺伝子の探索—追肥によるコメの遺伝子発現変化から シーエムシー出版 朝倉富子、緑川景子 P.84-94 2016 年 9 月 12 日

3. 「食品成分間相互作用と味覚修飾」月刊
バイオインダストリー 朝倉富子、石丸
喜朗、p.3-8. 2014年8月号

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

1. 出願番号：PCT/JP2014053673 公開番
号：14882615.9-1655 発明者：Kenji
Kugino, Mutsuko Kugino, and Tomiko
Asakura. 発明名称：Method and device
for anesthetizing fish 公開日 2016年9
月21日 出願日：2014年2月17日 特
許出願人：Marin Biotechnology Inc.
2. 出願番号：PCT/JP2013/078178 公告
番号：WO2014061734 A1 発明者：櫻
井敬展、笠原洋一、田中充、阿部啓子、
朝倉富子、山下治之 発明名称：塩味
増強剤及びその製造方法、並びに、塩
味増強方法 公開日：2014年4月24
日 出願日：2013年10月17日 特許
出願人 日清食品ホールディングス株
式会社

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(農学
部)・特任教授
研究者番号：20259013

(2)研究分担者

永井 俊匡 (NAGAI, TOSHITADA)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・准教授
研究者番号：50451844