

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660096

研究課題名(和文) 苦味の個人差と苦味レセプターTAS2R及び肝臓解毒酵素GSTの遺伝子多型の関連性

研究課題名(英文) Correlation analysis of genetic polymorphism of human bitter-taste receptor TAS2R and that of hepatic detoxification enzyme GST

研究代表者

駒井 三千夫 (KOMAI, MICHIO)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80143022

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)：アブラナ科植物の摂取量が少ないと、各種のがんの発症率が高いという疫学データが多く出されている。これは、一つにはこの植物中に含まれるallyl-isothiocyanates類の苦味感受性の個人差によって説明できる可能性があるが、もう一つの可能性としては、摂取後のこれらアブラナ科植物由来の肝臓における解毒酵素の活性に個人差があるために、嗜好の個人差が生じている可能性がある。これを証明するために、今回の研究を行ったところ、TAS2R38の配列のうちの3つのアミノ酸の部位の多型で、アブラナ科植物の苦味に対して遺伝的に分類できることを初めて示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Many epidemiological studies have shown that isothiocyanate compounds in the cruciferous plant prevents cancer incidence rate. If the taster of this bitter compounds by TAS2R, bitter taste receptor, the intake of this compound may decrease due to its too much bitterness sensation during eating. Another possibility is hepatic glutathione S-transferase (GST) polymorphism. The latter one is involved in the detoxification mechanism of isothiocyanate compounds after eating in the liver, i.e., we cannot eat cruciferous plants if the GST activity is low due to the enzyme polymorphism. Therefore, we analyzed the relationship of TAS2Rs and GSTs polymorphism in human volunteer, and intended to clarify the mechanism involved in the individual difference of cruciferous plant acceptability. Up to now, we found that the SNP of TAS2R 38 had a close relationship to broccoli bitterness.

研究分野：農芸化学、食品科学

キーワード：苦味受容体TAS2R 遺伝子多型 アブラナ科植物 苦味物質 解毒酵素 苦味感受性

1. 研究開始当初の背景

ヒト苦味レセプター-TAS2R は、G-protein coupled receptor (GPCR)であり、25 種類がある。TAS2R には一塩基多型 (SNP) による遺伝子多型が多く見出され、苦味感受性の個人差を説明することができる。よって、食品の苦味感受性に個人差があることを遺伝子的に説明できる時代となった。

近年、TAS2R については、可食植物等に含まれる天然に存在する苦味物質のレセプターとのリガンド活性のあることが次第に明らかにされてきている (Chem. Senses, 35, 157, 2010)。これまで、TAS2R38 が PTC (phenylthiocarbamide) のレセプターであることが証明され (Nature, 440, 930, 2006)、PTC レセプターである TAS2R38 の遺伝子多型と各被験者の PTC 感受性の個人差が明らかにされ、苦味の感受性の個人差が一塩基多型 (SNP= single nucleotide polymorphism) によっていることが明らかにされた。また 2007 年、植物のアロエに含まれる aloin が TAS2R43 をレセプターとしていることが判明し (Current Biol., 17, 1403, 2007) その後数種類の苦味物質と TAS2Rs との親和性が明らかにされつつある。

こうした中で学術的に関心を引いているのは、ブロッコリーやカリフラワーなどのアブラナ科植物の苦味感受性の個人差についてである。実際に、ブロッコリーなどのアブラナ科植物の摂取量が多い集団では肺がんや乳がんの発症率が低いという疫学調査結果が多く報告され (Cancer Epidemiol. Biomark. Prev., 18, 184, 2009; Breast Cancer Res. Treat., 121, 195, 2010, 等多数) とくにアブラナ科植物に含まれる isothiocyanate 類が (苦味物質) 有効な成分であろうと推定されている。

この isothiocyanate 類の主たる解毒機構である肝臓などにおける mercapturic acid 経路の最初の段階である、ヒトのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GSTs) 酵素では遺伝子多型が頻繁に認められ、がんの発症の個人差に関与しているものと考えられている (Pharmacol. Res., 55, 224, 2007; Eur. J. Cancer, 46, 1617, 2010; Toxicol., 277, 74, 2010; Breast Cancer Res. Treat., 121, 195, 2010, 等多数)。しかし、この酵素活性の個人差と苦味の感受性の個人差との関連性は不明であり、今回のような研究が必要である。

2. 研究の目的

研究の着想は、ブロッコリー等のアブラナ科植物の摂取量が少ない被験者集団で各種の発がん率が高いというヒト疫学データにある (Nutr. Cancer, 2007 など)。アブラナ科植物に含まれる isothiocyanate 類には苦味があり、この苦味を強く感じ過ぎるために嫌いで、摂取しない人で発がん率が高いことが示唆される。すなわち、発がん率の高い人で

は、(1) 植物体 isothiocyanate 類の苦味成分を受け入れられないほど苦味感受性が高いこと (苦味レセプター-TAS2R の遺伝子多型)、(2) 肝臓等でのこの植物由来物質の解毒化・無毒化の酵素の遺伝子多型の両方が関係しているのかもしれない。この(1) と(2) を明らかにすることと、この二つの事項の関連性については、これまで着目されてきていないことから、本研究でこれを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 味覚に関する官能試験:

苦味感受性に関する官能評価試験とアンケートを 166 名 (男性 44 名、女性 122 名) に対して実施した。

官能評価試験

試料: ブロッコリー (香川県産 品種: おはよう)

クレソン (宮城県名取産)

方法: (Mari A. Sandell らの方法: Variability in a taste-receptor gene determines whether we taste toxins in food. Current Biology, Vol.16 No.18, R792-, 2006.)

(ブロッコリー)

a) ブロッコリーの花蕾部分を 5g ずつ計量した。

b) 計量後電子レンジにて加熱 (50 g /600W、1 分又は 30 秒) し 90ml のプラスチックカップに入れた。これにより 1 分加熱 (ブロッコリー) 30 秒加熱 (ブロッコリー) 未加熱 (ブロッコリー) の 3 種の試料を作製した。

(クレソン)

a) クレソン (葉、茎) を 2g 計量した。

b) ブロッコリーと同様に電子レンジにて加熱し 1 分加熱 (クレソン) 未加熱 (クレソン) の 2 種の試料を作製した。

評価方法 (gLMS 法):

被験者にそれぞれ試料を 15 秒間以上咀嚼しスケールにチェックして貰った。

(2) isothiocyanate 類の肝臓代謝酵素 (GSTM1 及び GSTT1) の遺伝子多型解析:

GSTs の DNA 遺伝子情報の解析においては、アンケート調査が含まれている 86 名について、TAS2R38 のハプロタイプ別に分類を行った。

綿棒で左右の内頬を回転させるようにして各 50 回程度こすり、口腔内粘膜細胞を採取した。500 μ L PBS を入れた滅菌済み 1.5 mL チューブ内で綿棒の先を切り取り、懸濁させた。綿棒をよく絞って取り出し、4 で遠心し (10000 rpm, 5 min) 沈殿を吸わないようにピペットで上清を除いた。200 μ L TNE buffer を加え、ボルテックスでよく攪拌した後、10% SDS 溶液 6 μ L を加え (最終濃度 0.3%)

チューブを静かに反転させた。5 μL プロテイナーゼ K を加え 55 °C、4 時間インキュベートした。200 μL フェノールクロロホルム(等量)を加えボルテックスで 30 秒振とうした後、13000rpm で、5 分間遠心した。水槽を回収し、再度フェノールクロロホルム抽出した。1/10 容 3M 酢酸ナトリウム溶液、2 倍容エタノールを加え、-20 °C で 1 時間放置し、その後 13000rpm、0~4 °C、20 分間遠心した。上清を捨て -20 °C 保存しておいた 70%エタノールを 500 μL 加えて洗った後(13000rpm、0~4 °C、20 min) 遠心した。上清を捨て、真空乾燥機で乾燥させ Elution Buffer 50 mL に溶解した。**表 1**に GSTM1、GSTT1、 α -Globin 遺伝子増幅用 primer を示した。

表 1 GSTM1、GSTT1、 α -Globin 遺伝子増幅用 primer

GSTM1	forward primer	GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC
	reverse primer	GTTGGGCTCAAATATACGGTGG
GSTT1	forward primer	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC
	reverse primer	TCACCGGATCATGGCCAGCA
α -globin	forward primer	CAACTTCATCCACGTTCCACC
	reverse primer	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

4. 研究成果

(1) 味覚に関する官能評価試験：

ブロッコリーで苦みを感じる人が少なかった事と、クレソンの方が食べたことのある学生が少ないと予想されたためにこれまでの食経験などに味覚が左右されにくいと想定し、同じアブラナ科のクレソンで行った。その結果、クレソンの方がブロッコリーよりも苦味強度が強いことが分かった。また、ブロッコリー、クレソンとも加熱処理により苦みが低下することが今回の実験でも示された。このため、苦みが消失しないよう、今後の研究では生のままで試料提供することとした(**図 1**)。

これまでの既報で発表の通り PTC と PROP では強い相関がみられたが、ブロッコリー(生)とクレソン(生)にも若干の相関がみられた。これより、今後はより苦味強度が強いクレソンの生で検討することとなった。

(2) Isothiocyanate 類の肝臓代謝酵素 (GSTM1 及び GSTT1) の遺伝子多型解析：

昨年度よりも被験者数を増やしたところ、TAS2R38 のハプロタイプは、以下のように分類された(**表 2**)。

今回得られた被験者の GSTM1 有無の割合を既出文献と比較すると、ほぼ同じような結

果が得られた。なお、表 2 に検出された TAS2R38 のハプロタイプ別被験者数をまとめたところ、以下ようになった。

調理法の違いによる苦味感受性の変化

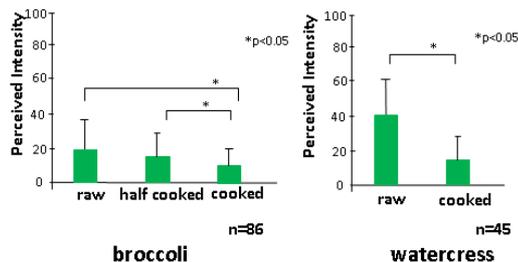


図 1. アブラナ科植物の苦味感受性

表 2. 検出されたハプロタイプ別被験者 86 名の分類 (TAS2R38)

Amino Acid Position	AVI/AVI (non-taster)	AVI/PAV (medium-taster)	PAV/PAV (taster)
49	A/A	A/P	P/P
262	V/V	V/A	A/A
296	I/I	I/V	V/V
Number of Subjects	13	35	38

今回分かった重要な知見は、PTC 及び PROP non-taster 者 (AVI/AVI ハプロタイプ) は、アブラナ科植物のような天然の苦味物質をむしろより苦く感じる事が分かった事である(未発表のためデータ未公開)。これは、別な天然の苦味物質の感受性と同様であった。この知見は、少人数で行われて発表された Breslin, P.らの報告とは異なるものである。私どもの研究は、被験者数も 5 倍ほど多い点で、データはより信用できるものであると確信している。

TAS2R38 の遺伝子多型の違いによる GSTM1 と GSTT1 の遺伝子頻度について、両方とも - である null タイプは 86 人中 15 人いた。この GST の両方とも null タイプは AVI/AVI には 0 人、PAV/AVI は 8 人、PAV/PAV では 7 人という分類になった。また、AVI/AVI では GSTM1 + の割合が多いことが分かった。また、アンケート調査ではあるがこの GSTM1/GSTT1 両方 null タイプは、他のタイプよりもブロッコリーにより強い苦味を感じていることが分かった(統計的有意性あり)。TAS2R のハプロタイプ遺伝子型と GSTM1 の関連性があることを示唆するものであるが、なお例数を増やした詳しい研究を続けて統計処理を続けていきたい。

PTC 及び PROP non-taster 者は、既報とは異なりアブラナ科植物の苦味はより強く感じ

ることは、前述した。このタイプは GSTM1 + の割合が多かった。よって、TAS2R38 の AVI/AVI ハプロタイプの人は、健常人の場合では、苦味を適度に感じつつも、摂取後にも解毒酵素があるので、健全な抗酸化酵素系を気付けているものと思われる。しかし、我々の最近の解析では、生活習慣病の人では健常人とは異なる GSTs 発現になっている可能性が想定されるので、さらなる TAS2R38 と GSTs 遺伝子多型解析を続けて結論を得たいと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 八巻美智子、齋藤弘貴、磯野邦夫、後藤知子、白川 仁、駒井三千夫：「アブラナ科野菜の苦味感受性の個人差と苦味レセプター-TAS2R の遺伝子多型に関する研究」、日本味と匂学会第 48 回大会、平成 26 年 10 月 2 日、静岡市清水区。

2) Hiroki Saito, Michiko Yamaki, Kunio Isono, Hitoshi Shirakawa, Tomoko Goto, Michio Komai: Analysis of human TAS2R variants underlying individual difference in the food preference and bitter taste evaluation. In ECRO (European Chemoreception Research Organization) 2014, Sept. 10-14, 2014 (平成 26 年), Dijon, France.

3) 齋藤弘貴、八巻美智子、沼倉悠紀子、磯野邦夫、安達良太、入部マイ子、後藤知子、白川 仁、駒井三千夫：「ジペプチドの苦味感受性と苦味レセプター-TAS2R の一塩基多型」、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、平成 26 年 5 月 31 日、札幌。

4) 齋藤弘貴、沼倉悠紀子、磯野邦夫、安達良太、入部マイ子、後藤知子、白川 仁、駒井三千夫：「ジペプチドの苦味感受性の個人差をもたらす苦味レセプターの一塩基多型」、日本味と匂学会第 47 回大会、平成 25 年 9 月 7 日、仙台。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒井 三千夫 (KOMAI, MICHIO)
(東北大学・大学院農学研究科・教授)
研究者番号：80143022

(2) 研究分担者

・白川 仁 (SHIRAKAWA, HITOSHI)
(東北大学・大学院農学研究科・准教授)
研究者番号：40206280

・後藤 知子 (GOTO, TOMOKO)
(東北大学・大学院農学研究科・助教)
研究者番号：00342783

(3) 連携研究者

なし。
()
研究者番号：