

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750028

研究課題名(和文)新規苦味センサーの構築および苦味抑制物質のスクリーニング

研究課題名(英文) Establishment of a novel bitter taste sensor and screening of bitter taste inhibitor

研究代表者

永井 俊匡 (Nagai, Toshitada)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・講師

研究者番号：50451844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： InoueらのTGF 切断アッセイを参考に、プレートリーダーのような汎用性の高い機器で測定可能な苦味センサーの構築を試みた。そのために、まず苦味受容体に適用可能であるかを検討する必要がある。適用可能性の指標として、すでに報告者らが苦味抑制効果を立証してある苦味受容体遺伝子hTAS2R16およびhTAS2R38を用いた。

種々の条件検討の結果、hTAS2R16に対して、そのリガンドであるサリシンに対する有意な応答を検出した。しかし、その応答は微弱であった。今後、さらなる条件検討による応答の強化、他の苦味受容体への適用検討を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)： I tried to establish a novel bitter taste sensor using common measuring instruments such as plate readers, with TGF shedding assay technology in the study of Inoue et al. At first, it needed to be investigate whether this assay was applicable to bitter taste receptors. So hTAS2R16 and hTAS2R38 bitter taste receptors, which was found to be inhibited by acidic compounds, was assayed with this method.

After various trial, cells expressing hTAS2R16 significantly responded to its ligand, salicin, but that response was very weak. In future, it is necessary to improve response strength and to apply other bitter taste receptors.

研究分野：味覚科学

キーワード：味覚受容体 Gタンパク質共役型受容体 セルベースアッセイ

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

味覚は、生理学的には食物の栄養素(糖質、アミノ酸)、毒性(苦味)、塩濃度、腐敗度(酸味)を検知するセンサーである。さらにヒトは、苦味や酸味などの本来忌避される味や、辛味や渋味のような五基本味に分類されない味も含めて、生活に潤いを与えるツールとして、食品を賞味している。したがって味覚の伝達機構を明らかにすることは、味覚障害等の疾患の治療に寄与するだけでなく、食品分野において生活の質を向上させる技術の開発につながる。

味は、舌や口蓋の味蕾に発現する味覚受容体によって受容される(図1)。五基本味のそれぞれを受容する味覚受容体は、最近の約15年間でおよそ明らかになった[総説: 永井俊匡, 『生物の科学・遺伝』2012年11月号]。

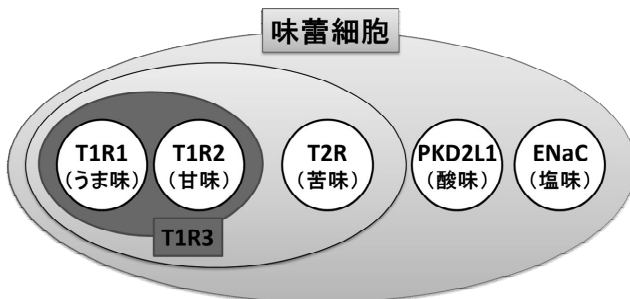


図1 味覚受容体

うま味・甘味・苦味は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)によって受容される。苦味の場合は、T2R(TAS2R)ファミリーというGPCRによって受容される[Nature (2000), **404**, 601-604; Nature (2005), **434**, 225-229; Chem. Senses (2010), **35**, 157-170]。T2Rは、ヒトで25遺伝子存在する。

報告者らは、苦味受容体の詳細な解明のため、最初に味覚のモデル動物として重要な魚類に注目した。魚類は、味覚応答の感度が高いため[Fish Chemoreception (1992), 171-198]、魚類とヒトを比較することで受容体の感度の機構を

明らかにすることを試みた。まず、魚類味覚受容体遺伝子の同定を試み、T1RおよびT2Rを発見した[Ishimaru, Okada, Naito, Nagai, Yasuoka et al., Mech. Dev. (2005), **122**, 1310-1321]。次に、T1RおよびT2Rのカルシウムイメージング法による機能解析を行い、T1RがL-アミノ酸を、T2Rが苦味物質デナトニウムを受容することを突き止め、感度の高さが味覚受容体に由来することも明らかにした [Oike, Nagai, Furuyama, Okada, Aihara et al., J. Neurosci. (2007), **27**, 5584-5592]。さらに最近、魚類T2Rの構造と機能の関係性(構造・機能相関)について、一塩基多型(SNP)がデナトニウム受容に大きな影響を与えることを発見した[Nagai, Misaka, Ishiguro, Sakurai, Okada et al., 投稿準備中]。

一方で、食品における苦味は、茶、コーヒー、あるいはビールなどのように独特の特色となるが、強すぎる苦味は好まれない。したがって、苦味強度の適正な制御は、食品産業における重要な課題の一つである。苦味抑制物質の探索は、以前から取り組まれており、官能試験による成果としては、ジペプチドであるGlu-Glu(グルタミングルタミン酸)などが知られている[J. Food Sci. (1975), **40**, 367-369; Chem Senses (1981), **6**, 119-128]。大豆の発酵食品は、その発酵産物である苦味ペプチドの味をほとんど感じない。これは、Glu-Gluなどの酸性ペプチドによる抑制が原因である。報告者らは、Glu-Gluなどの酸性物質が、ヒト苦味受容体 hTAS2R16 および hTAS2R38 の作用を抑制することを明らかにした[Sakurai, Misaka, Nagai, Ishimaru, Matsuo et al., J. Agric. Food. Chem. (2009), **57**, 2508-2514]。これは、私たちの日常で起こっている苦味の抑制が、受容体レベルで行われていることを示す最初の報告となった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの苦味受容体研究によって得た培養細胞によるアッセイ技術、および構造・機能相関や苦味受容体の抑制効果の知見を活かし、(1) より効率的な苦味受容体アッセイ系(苦味センサー)の構築、およびそれを用いた(2) 苦味抑制物質のスクリーニングを計画した(図 2)。

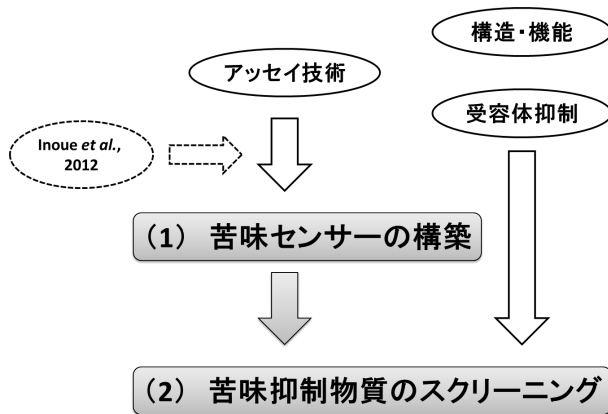


図 2 研究開始当初の成果と本研究の目的

(1) について、最近新たな GPCR アッセイ系として、AP-TGF α (アルカリホスファターゼ Tumor Growth Factor α) 切断アッセイが報告されたが[Inoue *et al.*, *Nat. Methods* (2012), **9**, 1021-1029]、この技術はプレートリーダーのような汎用性の高い機器で測定可能であり、有用性が高い(図 3)。よってこの技術を取り入れた、新しい苦味センサーを構築する。

(2) について、前述のとおり、苦味の抑制は重要であり、それが受容体の抑制によって可能なことを、報告者が明らかにしている[J. *Agric. Food. Chem.* (2009), **57**, 2508-2514]。このことから、(1)の苦味センサーを用いたスクリーニングが可能であると考えた。

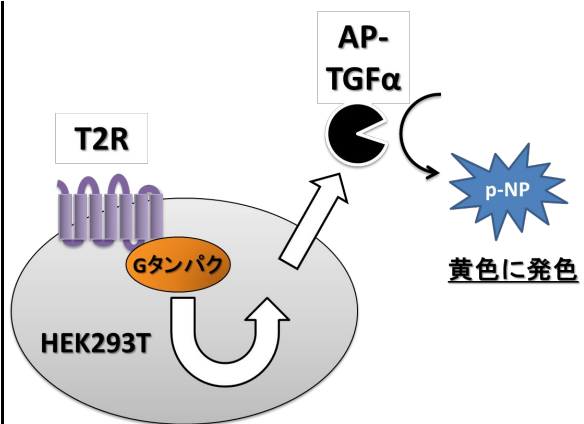


図 3 TGF 切断アッセイ

Inoue *et al.* (2012) を基に作成

3. 研究の方法

AP-TGF α 融合タンパク質発現プラスミドは愛媛大学・東山繁樹教授より供与頂いた[Nat. *Methods* (2012), **9**, 1021-1029]。ソマトスタチン受容体タグ付 hTAS2Rs 発現プラスミドは東京大学・三坂巧准教授より供与頂いた[J. *Agric. Food. Chem.* (2009), **57**, 2508-2514]。キメラ G タンパク質 G16gust44 発現プラスミドは名古屋市立大学・植田高史准教授より供与頂き[Ueda *et al.*, *J. Neurosci.* (2003), **23**, 7376-7380]、pEAK10 ベクター (Edge Biosystems) にサブクローニングした。

井上と青木の方法に従い[井上と青木, *実験医学* (2013), **31**, 1305-1313]、HEK (human embryonic kidney) 293T 細胞を 6 ウェルプレートに播種した(図 4)。24 時間後、AP-TGF α 、受容体 (hTAS2Rs のうち hTAS2R16 または hTAS2R38)、および G16gust44 を、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いてトランスフェクトした。さらに 24 時間後に HEK293T 細胞を HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) に懸濁して 96 ウェルプレートに再播種し、30 分間 CO₂ インキュベーター内でインキュベートした。内因性シグナル伝達因子のリガンドである 1 μ M 12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (TPA)、または

hTAS2R16, 38 に対するそれぞれの既知リガンドであるサリシン、フェニルチオカルバミド (PTC) を添加し、一定時間細胞を刺激した。培養上清を別のプレートに移し、パラニトロフェニルリン酸 (p-NPP) を添加して、AP 反応前後での培養細胞と培養上清の 405 nm における吸光度を測定した。

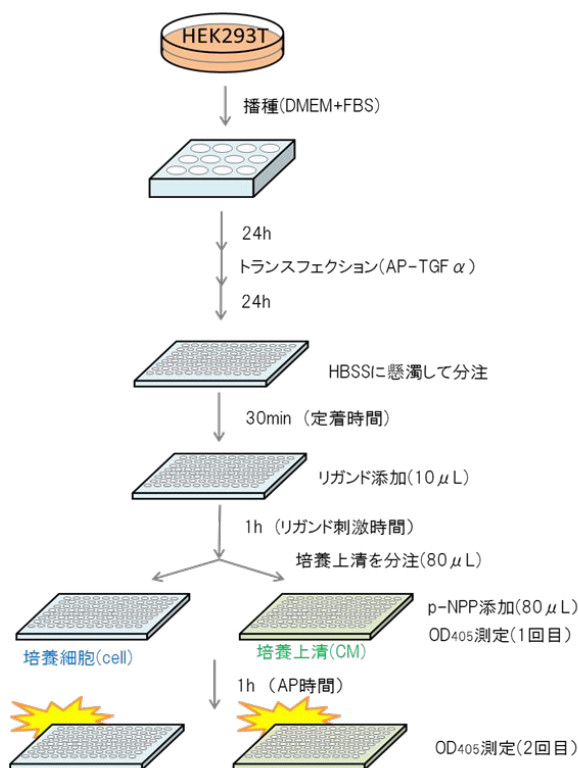


図 4 アッセイの概要

4. 研究成果

予備検討の結果、定着時間および AP 反応時間は、井上と青木と同様に、それぞれを 0.5、1 時間とし[実験医学 (2013), **31**, 1305-1313]、リガンド刺激時間は 1、2、3 時間と 3 点設定した。同様に、各プラスミドのトランスフェクション量も以下の通りに検討した。

まず井上と青木に従い、1 ウェル当たり AP-TGFα 250 ng、受容体 100 ng、および G タンパク質 50 ng を、Lipofectamine 2000 1.25 μL を用いてトランスフェクトし、アッセイを行った。その結果、hTAS2R16 導入細胞は、サリシンに対して、受容体を導入していない細胞と同程度の AP-TGFα 放出率しか検出されなかった(図は示さず)、hTAS2R38 導入細胞についても同様であり(図は示さず)、培養細胞系を用いた機能解析において実績のある 2 種の受容体 (hTAS2R16, 38) を用いても、受容体に依存した応答は検出できなかった。

次にトランスフェクション条件を検討するため、それぞれ上記の 2 倍量にあたる、AP-TGFα 500 ng、hTAS2R16 200 ng、および G タンパク質 100 ng を、Lipofectamine 2000 2 μL を用いてトランスフェクトした (16++)。ネガティブコントロールとして、AP-TGFα 500 ng および G タンパク質 100 ng をトランスフェクトした (G++)。その結果、16++において、10 mM サリシン刺激時に G++と比較して有意な応答が見られた(図 5)。このとき、低濃度のサリシンや 10 mM PTC 刺激では応答が検出されなかったことから(図は示さず)、わずかではあるが、hTAS2R16 のサリシン特異的な応答を検出することに成功した。しかし、ポジティブコントロールである 1 μM TPA と比べると応答は弱く、そのため濃度依存性の検討には至らなかった(図 5)。

次にトランスフェクション条件を検討するため、それぞれ上記の 2 倍量にあたる、AP-TGFα 500 ng、hTAS2R16 200 ng、および G タンパク質 100 ng を、Lipofectamine 2000 2 μL を用いてトランスフェクトした (16++)。ネガティブコントロールとして、AP-TGFα 500 ng および G タンパク質 100 ng をトランスフェクトした (G++)。その結果、16++において、10 mM サリシン刺激時に G++と比較して有意な応答が見られた(図 5)。このとき、低濃度のサリシンや 10 mM PTC 刺激では応答が検出されなかったことから(図は示さず)、わずかではあるが、hTAS2R16 のサリシン特異的な応答を検出することに成功した。しかし、ポジティブコントロールである 1 μM TPA と比べると応答は弱く、そのため濃度依存性の検討には至らなかった(図 5)。

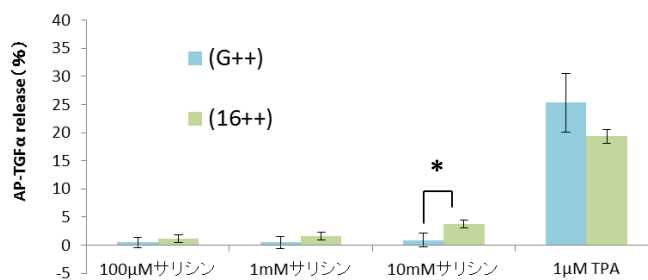


図 5 hTAS2R16 発現細胞 (16++) の応答
横軸は添加したリガンドと、その添加濃度を表す。終濃度はそれぞれの 1/10 になる。リガンド刺激は 2 時間行った。

*: p<0.05 (n=3)

以上のように、AP-TGF α 切断アッセイの苦味受容体への適用に、初めて成功した。しかし、応答は微弱であり、当初の目的とするハイスループットスクリーニングに耐えられるだけのパフォーマンスを得られていない。今後はさらなる条件検討を進め、十分な応答を検出できるアッセイ系を構築しなければならない。また、hTAS2R16 だけでなく、hTAS2R38 または他の hTAS2Rs への適用へと発展させていく必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 俊匡 (Toshitada Nagai)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・講師

研究者番号：50451844

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし