

令和元年5月30日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00872

研究課題名(和文) 香辛料によるGABA合成酵素の活性化と減塩そして塩味情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Effect of spices on GABA synthesizing enzyme activity and lowering saltiness and investigation of salt signal transaction mechanism

研究代表者

植野 洋志 (Ueno, Hiroshi)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：30241160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroのアッセイ系により、 γ -アミノ酪酸合成酵素であるGAD67を活性化する香辛料抽出物に塩味増強効果を見出した。これと塩味受容体を発現しているIII型味蕾にGAD67が発現していることから、塩味のシグナル伝達機構をタンパク質間相互作用の観点から探求することと、より広く塩味増強効果をもつ香辛料成分を探索し、減塩食の開発が可能かどうかを検討した。GAD67と複合体形成するタンパク質を見出し、減塩パンの試作品を官能試験に供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

香辛料には、独特の味覚を提供する以外に、酵素に働きかけてその活性を制御する機能を持つことを示してきた。そのなかで塩味受容体を発現しているIII型味蕾細胞内に発現が確認されているグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD67)の活性制御がある。GAD67を活性化する香辛料抽出物には塩味増強効果がみられ、減塩効果が認められる。調理学には少量の塩で、甘味やうま味を増強する効果(対比効果)が知られているが、香辛料の塩味増強効果は、この対比効果に関与し、減塩しても香辛料成分の存在でうま味を維持できることになる。そこで、減塩パンなどに適用することで、香辛料成分の減塩効果を示し、今後の減塩食につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Spice extracts activating glutamate decarboxylase (GAD67) are screened. Those extracts may express salt enhancing effect. Proteins associating with GAD67 in type III taste bud are searched by surface plasmon resonance method. We extended lists of spice extracts expressing GAD67 activation. Those spice extracts were subjected for the development of low salt diet foods. Some of the spice extracts were used to prepare low salt content bread that still maintains saltiness that be provided with original recipe. Protein-protein complex formed with GAD67 were screened and two proteins were identified. One of such protein was reported to associate with alpha-subunit of GABA-gated chloride ion channel protein complex; thus, it suggests chloride ion plays a central role in salt signal transaction in type III taste bud.

研究分野：生化学・応用微生物学・ビタミン学

キーワード：GABA 香辛料 GAD 塩味増強剤 減塩食品 味覚 対比効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) はグルタミン酸ナトリウムを基質とし、アミノ酪酸 (GABA) を合成する酵素である。ヒトを含む哺乳動物では異なる染色体上に二つの遺伝子が配置され、分子量の違いで GAD65 と GAD67 の二つのアイソフォームが発現される。アイソフォームには役割分担がなされており、それぞれの発現部位 (細胞内の局在性) も異なっている。当研究者らはアイソフォームの役割分担に興味を持ち研究を進めてきたが、その過程において、GAD67 が III 型味蕾細胞内に発現していることを見出した。III 型味蕾には酸味と塩味の受容体があり、甘味・うま味・苦味受容体を擁する II 型味蕾とは異なっている。GABA が作られた場合 GABA 受容体に作用する。GABA 受容体はクロライドイオンチャンネルであることより、塩味のシグナル伝達機構の一端を GABA が担っていると考えられた。そこで、GABA 合成が食品成分で制御されれば、塩味の信号の強弱に影響を与える可能性が示唆され、本研究が開始された。当時、GABA が味覚に関与するとは考えられておらなかった。しかし、脳の神経系では GABA は抑制性神経伝達物質であり、III 型味蕾には味神経がシナプス結合していることより、GABA が何らかのシグナル伝達に関与することは想像できる。

我々は、別途、GABA 合成酵素阻害薬の開発を進めてきた。合成に頼らない、天然物由来の GABA 合成酵素阻害薬はうつ病治療薬としての道がある。そこで、天然物、特に、食の分野で安全性が保障されている香辛料を中心に GAD 活性にどのように影響を与えるかを検討した。その結果、香辛料抽出物は GAD 活性に様々な効果を与えることが判明した。中には GAD を活性化するのができた。そこで、香辛料抽出物の GAD 活性に与える効果と味質に与える効果の相関図を作製すると、甘味では相関は得られなかったが、塩味では正の相関が得られた。これより、GAD67 酵素活性を活性化する香辛料抽出物は塩味増強効果が期待できることが判明した。

味物質を受容できる味蕾は II 型と III 型であるとされてきた。II 型は前述のように甘味・うま味・苦味を受容し、III 型は酸味と塩味を受容する。それぞれの受容信号は独立して味神経に伝達されると考えられるが、調理学で表現される「対比効果」は、少量の塩の存在がうま味や甘味を強調する、ということから、II 型と III 型の間には何らかのコミュニケーションがなければならぬことになる。そこで、II 型と III 型の間には存在する情報伝達物質を GABA であるという仮定のもとで、塩味の情報伝達機構について検討する必要性から、本研究につながった。

2. 研究の目的

本研究では次の 4 つのサブテーマを計画した。香辛料成分の GAD 活性の活性化・阻害効果の研究：香辛料の抽出物と著しい活性を示すものについては単離精製レベルにて活性化・阻害効果を検討する。In vitro のアッセイ系を用いる。GAD67 の活性化物質と塩味増強効果の解析：官能試験により塩味増強効果を示す香辛料成分をスクリーニングする。調理学の手法と合わせて、減塩食品の開発研究につなげる。塩とうま味の間に対比効果と香辛料成分との関係を明らかにする：官能試験を活用することで、対比効果を引き出す香辛料成分を同定する。塩味の情報伝達機構をタンパク質レベルで解明する：GAD67 と相互作用するタンパク質を同定し、さらに、他のタンパク質との相互作用を順次探索することで、情報伝達機構を明らかにする、ことを目的とする。

3. 研究の方法

香辛料成分の GAD 活性の活性化・阻害効果の研究：

香辛料 (ハーブ・生薬や天然物という香辛料とほぼ同様に扱われている材料を含むものとする) は、ハウス食品や一丸ファルコス (株) より提供を受けた。香辛料の抽出は、エタノール、冷水、温水の 3 種類を用いる。抽出物中の有効成分は、乾燥重量で表現する。

スクリーニングは、基本的には特許を取得した組換え体 GAD67 タンパク質を用いる。大腸菌や酵母を形質転換させた菌株を用いた発現系は既に研究室で構築しているが発現効率はまだ最適化されていない。菌の培養を行い、集菌後、細胞破碎、数種のクロマトグラフィを行い、精製タンパク質を準備する。酵素の品質管理は、活性測定により行う。GAD 活性は、L-グルタミン酸溶液を混ぜて、一定時間、37℃ で反応させる。反応液の上清は、誘導化後、GABA の分析定量する。香辛料の効果は、GAD 活性測定 (アッセイ) 時に、香辛料抽出物を含む溶液を加え、活性測定と同様に生成する GABA 量を定量する。香辛料中に存在する内在性 GABA 量は、活性測定開始時に強酸を加えたコントロールから算出する。香辛料成分を含まない GAD 活性測定時の GABA 量を 100% として、GABA 生成量の変化を比較検討する。100% 以上の数値は、活性化、以下の数値は阻害と判断する。

GAD67 の活性化物質と塩味増強効果の解析：

GAD67 を特異的に活性化する物質は塩味増強効果を示す。塩味増強効果は、ヒトによる官能試験の結果である。塩味増強効果をもつ成分をできるだけ多くもつことは、それだけ減塩食品に応用したときに、味の幅が広がり、減塩食を必要とする方々の食生活を豊かなものにできると考える。そこで、できるだけ多くの塩味増強効果をもつ化合物の探索が必要となる。その手法の一環は、GAD67 の活性化にある。 のスクリーニングで GAD67 を活性化する化合物に関して、官能試験を行い、塩味増強効果の有無をクラス分けする作業を行った。官能試験は、これまでは味覚に鋭敏な学生を対象としてきた。一般的に、若い女性が味覚に鋭敏であり、官能試験の被験者としてふさわしい、ということが言われてきて、そのようにしたのである。この方針は継続した。しかし、減塩食を必要とする年代は、高齢者であり、また、病人かその予備軍である。よって、新たな被験者の層の開拓を考えた。被験者として近隣の病院・養護施設（身障者養護施設である中川会の安井理事長、職員には当研究室の卒業生がいる）とすでに連絡を取り、官能試験と試作品である減塩食の評価を行う予定でいる。

塩とうま味の間対比効果と香辛料成分との関係を明らかにする：

調理学では、少量の食塩の存在がうま味を引き出す現象を対比効果と呼んでいる。対比効果は、分子レベルで解釈すると、うま味受容体と塩味受容体とで受けた別々の信号を、どこかで増幅するということであろう。しかし、二つの受容体は、異なる味蕾細胞に局在化しており、相互の信号がどのように処理されるのかは、未だに明らかでない。本研究では、塩味増強効果をもつ香辛料成分には、この対比効果があるのかどうかを検討する。

うま味と塩との組み合わせを官能試験にて行う。さらに、香辛料成分が対比効果を引き起こすのかも合わせて検討する。基本的な手法は と同じである。

塩味の情報伝達機構をタンパク質レベルで解明する：

塩味の情報伝達機構の解明は、すべての味覚の情報伝達の基本となるものであり、重要課題である。免疫沈降法や表面プラズモン共鳴法によるタンパク質間相互作用により、GAD67 を中心としてタンパク質複合体形成を足掛かりとして、タンパク質群を探索する。

探索できたタンパク質との複合体形成を酵素活性への影響、結合力の算出、組織免疫染色法での局在性の検討などを行う。これまで、サル脳ホモジェネートを用いてタンパク質の探索を行い、ラットもしくはマウスの脳とラットの味蕾を組織免疫染色することで、これらの試料では、脳と舌のサンプルでは局在性に差がないことも見出している。本研究でも、サル脳ホモジェネートを基本的に用いる。サル脳は、申請者が大阪医科大学に在籍していた時の数頭分のストックを持ち合わせている。

表面プラズモン共鳴法は、センサーチップにリガンド（例えば組換え体 GAD67 タンパク質）を化学的に結合させ、サル脳ホモジェネートを流して、特異的に結合するタンパク質を検出する方法である。ホモジェネートは、カラムクロマトグラフィにより分取し、精製を繰り返す。精製の都度、センサーチップにより結合力を測定することで、どの分画に目的タンパク質が存在するのかを決めることができる。最後には、SDS-PAGE を介して、MASS 分析を行い、マスコット解析により未知のタンパク質をライブラリーから見出し、同定する。

4. 研究成果

香辛料成分の GAD 活性の活性化・阻害効果の研究：

GAD67 の酵素活性に影響を与える香辛料抽出物の探索は、市販、ハウス食品のスパイス研究室、および一丸ファルコス社研究所より香辛料を購入または提供を受け、温水抽出を基本とした。抽出条件により効果が異なることより、アルコール抽出、水抽出、熱水抽出なども行って結果の比較も行っている。

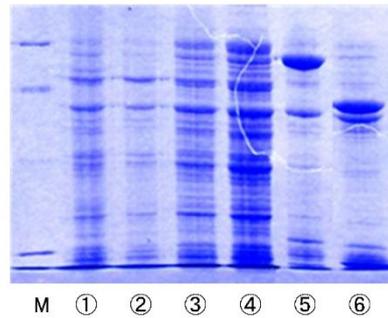
香辛料抽出物は適量を酵素液に加え、酵素の基質であるグルタミン酸を添加することで酵素反応を開始させ、一定時間後に PCA による除タンパクを行い、沈殿物を遠心除去後、上清中の GABA 量をアミノ酸分析法にて定量した。酵素はラット脳由来の GAD67 であるが、遺伝子組換え体技術を用いてラット GAD67 遺伝子を大腸菌を宿主とした発現系に組込んで研究に供した。その際、精製の簡便化のために、N 末に GST タンパク質が fusion するように設計したベクターを用いた（Rosetta-gamiB(DE3)pLysS pGEX2T GST-GAD67）。その発現様式は、SDS-PAGE 解析によりモニターした。GST タグはトロンピン処理することで切断し、得られたものを酵素試料として用いた。精製状態をモニターしたものは Fig. 1 に示す。

他にも、酵母 *BJ2168* pLTex321sV5H -GAD67 に組込んだ系での GAD67 発現系も試

した。これは、N 末に His タグをつけたもので、His タグ精製カラムにて精製後、His タグは切断除去しないで用いた。大腸菌と酵母で発現・精製した GAD67 は同等の酵素活性をしめしたことで、特段の区別はしないで用いた。

今回、ゆず、ポピーシード、パセリ、クミン、メース、パプリカ、ペパーミント、マイカイカ、レモングラス、ユーカリ、ウーロン、オレガノ、ジンジャー、セロリ、シソ、バジル、アニスをを用いた結果を表に示す。ここでは、コントロールとして水を加えた場合の酵素活性を 100 として、正の数値は活性化、負の数値は阻害の度合いを表している。このような実験はデータのばらつきが大きく、この表では実験の回数ごとに示している。

Fig1.SDS-PAGE



M: SDS-PAGE Low Range Marker

- ①: 菌体破碎後 可溶画分
- ②: 硫酸分画後
- ③: Frow through
- ④: Wash
- ⑤: Elution
- ⑥: トロンピン処理後

このようにして、香辛料の種類を増やす作業を継続しているが、まだ途中である。現時点では、ゆず、クミン、メース、シソ、バジル、アニスなどが酵素活性を促進することで、塩味増強効果をもつものとして挙げるができると思う。

このようにして、香辛料の種類を増やす作業を継続しているが、まだ途中である。現時点

では、ゆず、クミン、メース、シソ、バジル、アニスなどが酵素活性を促進することで、塩味増強効果をもつものとして挙げるができると思う。

GAD67 の活性化物質と塩味増強効果の解析：

塩味は III 型味蕾細胞に発現するクロライドイオンチャンネルとナトリウムイオンチャンネルが関与すると考えられている。これまでクロライドイオンは塩味と

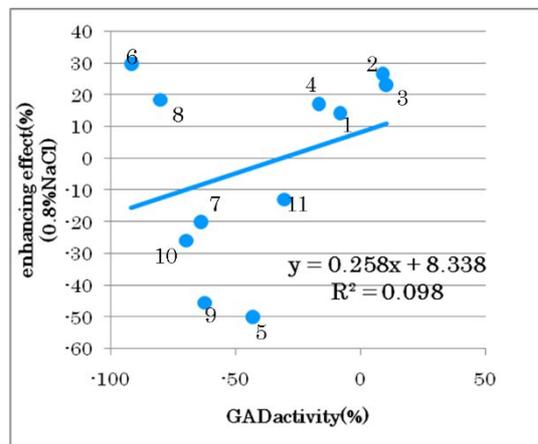
の関係ではあまり重視されていなかったが、III 型味蕾細胞に GAD67 が発現し、GABA 合成がなされていることで、GABA 受容体に注目でき、さらに GABA 受容体そのものがクロライドイオンチャンネルであることより、塩味の受容体としての役割が示唆できる。そこで、塩味と GAD67 活性の相関を検討した。比較として甘味と GAD67 活性の相関も検討した。味覚の閾値レベルで味質が分かる被験者を集め、官能試

Table2.スパイス・ハーブ抽出液を加えた時の GAD 活性 (%)

スパイス・ハーブ	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
ゆず				60.3	114.5		-20	-10.7
ポピーシード							-11.5	18.5
パセリ							-9.7	-6.7
クミン						15.8		1.9
メース						13.3	-8.9	7.3
パプリカ						-8.0	-22.1	-19.9
ペパーミント			-62.6	-43.4	-23.1		-46.1	-41.3
マイカイカ							-93.4	-90.4
レモングラス		-55.6	-69.4				-66.2	-64.5
ユーカリ		-67.3	-77.5				-88.4	-88.4
ウーロン		-60.7	-88.9	-64.2	-65.9			
オレガノ		-45.6	-70.3				-71.1	-63.1
ジンジャー	-11.1		-31.8				-42.1	-37.5
セロリ						15.2	-3.1	-6.9
シソ				46.1	29.1		-32.3	-29.4
バジル			-27.5	25.0	23.6		-12.9	-19.3
アニス		13.9	-33.0	26.9	43.1		-18.7	-19.1

※色分け
 → GAD 活性を抑制したもの
 → GAD 活性を促進したもの

Fig4.塩味増強効果と GAD 活性の関係 (セロリ以外のすべて)



- 1: パセリ
- 2: クミン
- 3: メース
- 4: パプリカ
- 5: ペパーミント
- 6: マイカイカ
- 7: レモングラス
- 8: ユーカリ
- 9: ウーロン
- 10: オレガノ
- 11: ジンジャー

験を用いて食塩の存在下、非存在下での香辛料抽出物添加・無添加というサンプル試料で塩味の強さを答えてもらい、それを数値化した。結果を示す。甘味では意味のある相関関係は得られなかったが、塩味では正の相関関係が得られた。この結果を踏まえて、香辛料、特に、GAD67 活性を促進するものには、塩味増強効果があることが示唆できた。なぜ甘味では相関関係が得られなかったのか、その理由を追求する実験は行っていないので分からないが、単純に GABA が塩のシグナル伝達経路に作用していると考えて矛盾しない。ここで大事なことは、塩味増強効果の強弱に関わらず、香辛料には GAD 酵素活性を左右する（制御するとすべきか）働きがあり、その効果は香辛料ごとに異なる、という点である。筆者らの研究室では他の酵素、例えばヒスタミン合成酵素であるヒスチジンデカルボキシラーゼに対しても同様に香辛料抽出物の効果を検討しているが、やはり GAD と同じように香辛料により様々な活性への影響を観察している。まことに重要な点だと考える。

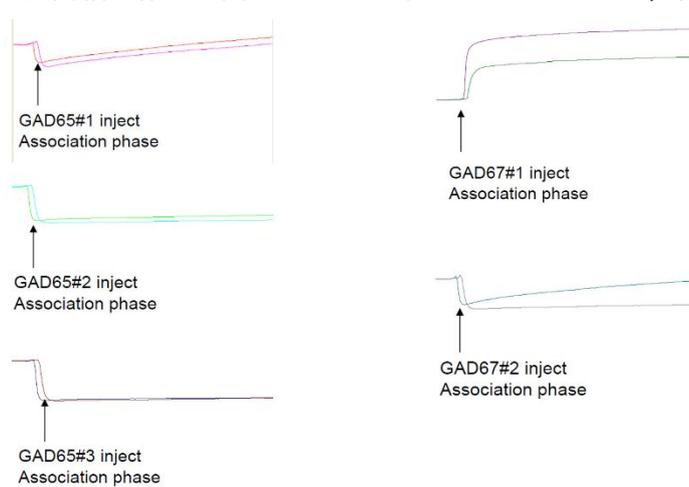
塩とうま味の間の対比効果と香辛料成分との関係を明らかにする：

実際の食品を調理し、減塩食と減塩食に塩味増強剤の添加の有無で味質を比較した。パン、ソテー、汁物などを対象に、市販のレシピに表示されている塩分量を半分にしたものを減塩食と定義した。アニス、クミン、メース、オレガノ、レモングラスを選択し、パンの味質を大きく変えないで、しかも香辛料の味もほとんど感じさせない量を添加しての検討である。その結果、香辛料が実際の調理でも塩味増強効果を発揮することが判明した。しかし、その効果は *in vitro* の酵素でのアッセイ系とは逆で、酵素活性を阻害したものが高い塩味増強効果を示したことになった。現在、その理由を検討中であるが、純粋に酵素、緩衝液、基質と香辛料抽出物だけの系と、小麦粉のように様々なタンパク質や糖質が混在している系とでは味覚への影響が異なるのであろう。異次元のレベルでの検討といえるのかもしれない。今後の課題として取り組んでいくことにした。

塩味の情報伝達機構をタンパク質レベルで解明する：

情報伝達機構はタンパク質が実際に複合体を形成することで、タンパク質間相互作用の結果、何らかの化学的な修飾活動（リン酸化など）により形成されることが考えられる。塩味の情報伝達はまだ完全には理解されておらず、我々が GAD67 の存在を III 型味蕾に発見したことで、GAD67 を中心としたタンパク質間相互作用を探索することで徐々に明らかにできると考える。その際、GAD には GAD65 と GAD67 のアイソフォームが存在するが、なぜ GAD67 が特異的に III 型味蕾に発現しているのか、ということを考えて。GAD アイソフォーム間の違いは、アミノ酸配列にある。N 末端 100 残基の相同性は 30% 以下で、100 残基以降のアミノ酸配列の相同性が 70% 程度あるのに比較すると極端に低く特徴的である。そこで N 末端 100 残基のなかにタンパク質の細胞内局在性を支持する配列が存在すると仮定した。そのような部位がタンパク質間相互作用に関与できると考えられる。そこで、疎水性領域を Hydroxypathy plot に

て検討した結果、GAD65 には 3 か所、GAD67 には 2 か所あることが予想できた。それぞれの領域に相当するペプチドを合成し、Biacore のセンサーチップにアミンカップリング法で結合させ、タンパク質溶液のなかから相互作用の有無を検討した。タンパク質溶液には、味蕾のホモジェネートがよいのだが、量的に無理があったので、サル脳のホモジェネートを用いることにした。すでにサル脳ホモジェネート中の GAD67 の動態とマウス味蕾ホモジェネートの動態を比較し、ほぼ同一であることを確認している。図に示すように、GAD67#1 ペプチドが特異的に複合体を形成することが判明した。"GAD67#1" ペプチドチップは脳ホモジェネート中のタンパク質から目的タンパク質を探索する際の検出用に用いることにした。サル脳ホモジェネートをイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、それぞれの分画を Biacore 解析し、ポジティブな応答を示す分画を分離精製した。そのタンパク質を SDS-PAGE 解析し、シングルバンドをエドマン反応にて N 末配列決定し、既存のタンパク質データベースと照合する



Peptide on Biacore chip association phase with monkey brain extract

ことで、そのタンパク質がグリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) であることが引き出された。GAPDH は moonlighting protein として知られ、非特異的な複合体形成でも知られているものであるが、GAPDH を Biacore chip に結合させた結果、GAD67 との特異的複合体形成が確認でき、さらに、全長型 GAD67 を Biacore chip に結合させて GAPDH との複合体形成を調べた結果、これも特異的に結合することを見出した。興味深いことに、GAPDH はクロライドイオンチャンネルを構成する 1 サブユニットと特異的に結合することがすでに報告されており、結果的に、クロライドイオンチャンネル GAPDH GAD67 という三段階の複合体形成がなされていることが判明した。GAD67 の N 末領域にはリン酸化部位としての Tyr 残基の存在が報告されている。GAD67 の活性がリン酸化・脱リン酸化により制御されているとの報告もある。さらに GAD67 タンパク質をリン酸化特異的抗体で染めることができた。また、GAPDH の moonlighting protein 活性には、リン酸基転移活性が含まれている。これらを合わせて考えると、GAPDH による GAD67N 末領域のリン酸基転移反応によるリン酸化が起こる可能性を示唆される。これらより、GABA が細胞膜上に位置するクロライドイオンチャンネルに作用し、チャンネル機能を ON/OFF させ、その情報が GAPDH に、さらに GAD67 に伝達される経路が存在することを示唆するものである。タンパク質間相互作用を調べることで、リン酸化以外の情報伝達機構の存在にたどり着ける可能性もあるが、現時点では、リン酸化の関与を否定できない。引き続き、更なるタンパク質間複合体形成を探索し、味蕾細胞内において、味覚物質の受容から味神経に到達するまでの経路を確立したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

坂本 千科絵, 深田 茉莉絵, 久木 久美子, 植野 洋志, 上田 由喜子, 増田 俊哉, 味覚情報伝達への影響が期待される香辛料を用いた料理への減塩効果および添加香辛料の探索方法, 日本食育学会誌, **12**, 147-155 (2018). 査読有

植野 洋志, 久木 久美子, 上田 由喜子, (特集)「高血圧と機能性食品」天然物由来成分のもつ塩味増強効果を活用した減塩食品開発へのアプローチ, 機能性食品と薬理栄養: 日本機能性食品医用学会誌, **11**, 19-23 (2017). 査読無

植野 洋志, 天然物由来成分の塩味増強効果を定量的に評価するシステム開発の経緯, 日本醸造協会誌, **111**, 182-190 (2016). 査読無

植野 洋志, (特集 タンパク質・酵素の隠された機能について, 探索とその技術) GABA 合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼの発現場所での役割分担, 生化学, **87**, 333-336 (2015). 査読無

植野 洋志, (総説) GABA 合成を活性化することが減塩食品へとつながる研究, 家政学研究, **61**(2), 61-63 (2015). 査読有

植野 洋志, (新技術) 天然物を利用した塩味増強による減塩効果の発揮と食品産業への利用について, 明日の食品産業, 6月号, pp.15-20 (2015). 査読無

〔学会発表〕(計 3 件)

坂本 千科絵, 久木 久美子, 植野 洋志, 上田 由喜子, 増田 俊哉, 塩味増強効果が期待される香辛料を添加したパンにおける遊離アミノ酸含量の変化, 日本栄養改善学会近畿支部学術総会, 3/9-10 (2019).

坂本 千科絵, 三好 紗代, 久木 久美子, 植野 洋志, 上田 由喜子, 増田 俊哉, 対比効果から評価した香辛料の塩味増強効果, 日本食育学会第 5 回学術大会, 愛媛 5/13・14 (2017)

坂本 千科絵, 深田 茉莉絵, 久木 久美子, 植野 洋志, 上田 由喜子, 春木 敏, 味覚情報伝達への影響が期待される香辛料の減塩食への応用, 日本食育学会, 東京 (2016)

〔図書〕(計 1 件)

植野 洋志, 新技術開発「塩味増強物質探索のツールとしての GABA 合成酵素」, 日本食糧新聞, 2015 年 8 月 24 日, 1 頁