

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300258

研究課題名（和文） 塩味増強効果の定量的評価法の開発

研究課題名（英文） Development of the quantitative evaluation method of a salty enhancing effect

研究代表者 植野 洋志（Ueno Hiroshi）

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：30241160

研究成果の概要（和文）：

塩を加えなくても味質を損なわない減塩食品の開発は望まれている。塩味を感知する III 型味蕾細胞内で GABA 合成酵素（GAD67）が機能することより、GAD67 酵素活性に影響を与える食品成分（香辛料）に注目し、その塩味増強効果を評価する手法を開発した。GAD67 酵素活性を活性化する食品成分は、官能試験においても塩味増強効果を示すことが統計的に判明した。これにより、香辛料を用いる減塩食品への可能性が示唆できた。また、このような減塩食品は、対比効果の結果、うま味なども損なわない可能性が合わせて示唆できた。

研究成果の概要（英文）：

Development of the low-sodium food which does not spoil quality of taste even if it does not add salt is desired. The technique of evaluating the salty enhancing effect from GABA synthesizing enzyme (GAD67) functioning within the III type taste-buds cell which detects a salty taste paying attention to the food composition (spices) which affects GAD67 enzyme activity was developed. It became clear statistically that the food composition which activates GAD67 enzyme activity showed a salty enhancing effect also in sensory analysis. Thereby, the possibility to the low-sodium food using spices has been suggested. Moreover, a possibility of not impairing a taste etc. has set and suggested such low-sodium food as a result of the contrast effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：塩味増強剤，GABA，GAD，対比効果，味蓄，味覚情報伝達，香辛料，アミノ酸分析

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病対策としての減塩食の開発は、現代の食産業界の大きな目標となっており、病院食、介護食、コンビニ弁当、さらには、

一般家庭や学校での食教育とその波及効果は大きい。実際の食品製造は調理学の分野にて活発に検討されているが、官能検査による味質を評価基準としてみており、実際の味を感じる器官である味蕾細胞、そして、そこから

信号を脳に伝える味神経、さらに、味の記憶と総合判断を司る脳についてを評価の対象とはしていない。理由は、まだまだ理解されていない部分が多いことと、それぞれの専門分野が分かれており、網羅的に解析する学問分野が樹立できていないことにも起因する。現在まで、味の研究の主流は、味覚受容体の研究であろう。味にはうま味、甘み、苦み、酸味、そして塩味の五味が定義され、ヒトゲノム解析の結果、それぞれの受容体タンパク質の候補が同定されている。タンパク質の同定は、かならずしもどの味蕾細胞がどの受容体タンパク質をいつ、どれほど発現しているのかを示すことにはならず、多くの未知の部分が残っている。基本的には、うま味、甘み、苦み受容体タンパク質はG タンパク質共役系受容体タンパク質 (GPCR) であり、II 型味蕾細胞に分布するとされる。しかし、II 型には味覚神経の接続がみられず、どのようにしてII 型の味覚信号が脳に伝達されるかはまだ不明である。GPCR は、味覚以外のGPCR と類似しており、ヘテロ二量体を構成し、リガンド (味物質) と細胞表面で結合することで、細胞内のリン酸化を促し、信号の伝達の起点となると考えられている。また、味蕾とは関係のない培養細胞にGPCR を発現させ、味物質を加えた際の応答 (電気的な、そして、細胞レベルでの) が観察されて、味の受容体タンパク質であることの証明に使われている。しかし、実際に味を感じる味蕾細胞の培養が不可能なため、複雑な味の相乗効果などについての知見を与えるには至っていない。ノックアウトマウスのような遺伝子改変マウスを用いた研究も世界的になされているが、味の表現をしてくれない動物からの情報は限られている。この分野では、ヒトの感性に頼ることが一番感度がよく、正確であるとされており、ヒト、特に、味覚に敏感な若い女性を対象として、必要な味覚のトレーニングの後に行う官能試験が重要であるとされる。酸味と塩味は、III 型味蕾細胞に発現されており、それぞれはイオンチャンネル型の受容体を持つとされる。完全にイオンチャンネルタンパク質が

同定された訳ではなく、その理由は、酸味と塩味の定義の曖昧さにもよるところが大きい。酸味は、酸性度を表す H^+ と、しょっぱさを表すクエン酸や酢酸などの陰イオン、そして塩酸 (HCl) などが一般に用いられる。塩味は、食塩 (NaCl) が主たるものである。ところが、酸味と塩味に関係する物質には両方にまたがって作用できる物質、例えば、クロライドイオン (Cl^-) があるが、厳密には区別されておらず、不明瞭さを呈する要因とされる。味蕾細胞そのものの寿命は約10 日と早く、IV 型味蕾細胞は幹細胞と呼ばれているが、IV 型から、II 型やIII 型細胞への分化の過程はまだ観察されておらず、味蕾細胞の形成過程の研究は、現在、もっとも注目されている分野の一つである。味蕾からの味覚情報信号は、GPCR 型受容体から細胞内のリン酸化カスケードを経由して、また、イオンチャンネル型受容体では細胞内のイオン濃度 (たぶん、 Ca^{2+}) の変動が信号に変換されて神経に情報伝達されると考えられている。しかし、情報を司る伝達物質の同定はまだなされておらず、II 型からはATP、III 型からはセロトニンという報告がある。しかし、これまで、味蕾細胞内での情報伝達機構を研究した例は少なく、まったくのブラックボックス状態である。また、味覚分野での長年の課題は、「隠し味の原理」の分子レベルでの解明であろう。うま味や甘みは、少量の食塩の存在で引き出されるこの原理は、II 型とIII 型の味蕾細胞間のコミュニケーションの結果であることは明白であるが、どのような情報伝達経路を解しているのかは全く明らかでなかった。この経路の解明は、おいしい減塩食品の開発には必須の課題であると考えられる。

当申請者らは、近年、III 型味蕾細胞に γ -アミノ酪酸 (GABA) 合成酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) が発現することを見出した (文献30)。これには、組織免疫染色の技術、RT-PCR の技術、それに、遺伝子改変マウス (GAD/GFP ノックインマウス) を用いた。GABAはクロライドイオンチャンネル (GABAA 受容体) のリガンドであ

ることより、III型細胞内での塩味の効果に関与する情報伝達物質の可能性が考えられた。その後、味蕾にはクロライドイオンチャンネルタンパク質が発現し、GABAが塩味に大きく寄与することを官能試験で検討してきた。さらに、GAD活性に影響を与える香辛料成分が塩味改変効果も持つことを、また、この効果には、相関性があることを2009年度の日本味と匂学会で発表している。これらが、申請時の研究背景である。

2. 研究の目的

(1) GAD活性に影響を与える物質を天然物(香辛料・生薬など)より抽出し、活性化・不活性化についての評価を与える。評価対象となるものは、官能試験を経て、有効な塩味増強剤とし、減塩食品の開発に結び付ける。

(2) GADの細胞内での味覚の情報伝達機構を明らかにする。

(3) GAD活性制御因子と味覚の関係を明らかにし、対比効果などを分子レベルで説明する。

(4) 超高感度・高速のGABA測定システムを確立し、GAD活性測定をより迅速に行い、塩味増強効果の評価系として確立する。

3. 研究の方法

GAD酵素を安定に、そして、大量に供給する手法を確保し、天然物から有効成分の抽出を行い、GAD活性への抽出液の効果を定量的に解析することをまず計画。その根底にある原理は、III型味蕾細胞にGABA合成酵素であるGADが発現し、GABAが合成されること。そして、GABAはGABA_A受容体のリガンドであることより、クロライドイオンを中心とする塩味信号の伝達経路の存在が示唆されることがある。その原理は、GAD活性を活性化する香辛料成分が、ヒトの塩味の味覚増強を示し、その関係が直線であることにより、さらに強く支持される。この原理を一般化し、塩味増強剤の探索手法としてGAD活性測定を活用しようとするもので、GADタンパク質の安定な供給は必須である。

1) 酵素の高発現系と精製方法の樹立組換え体GADタンパク質の発現系の構築を行う。これまで、ラット脳由来のGAD cDNAをもつプラスミドベクターを用いてパン酵母と大腸菌をそれぞれ形質転換し、活性型のGADの発現を可能としてきた。しかし、精製の困難さと発現量の低さが問題で、実用化できる状態ではなかった。His-tag融合タンパク質の形での発現系に組み換え直し、精製を容易にした。微生物の培養は、1回のプレップで10リットルレベル行う。培地は遠心分離後、細胞破壊し、可溶画分をアフィニティカラムにかけて、溶出タンパク質を精製標品として活性測定に用いる。

2) 天然物抽出物を準備して、GAD酵素活性に与える効果を定量的そして網羅的に測定、そして、塩味増強剤としての評価システムの設定GAD活性測定は、GAD酵素溶液にアッセイミックス液(基質であるグルタミン酸、補酵素であるpyridoxal 5'-phosphate, PLP、と緩衝液)を加えて、一定時間インキュベートし、60%perchloric acid (PCA)を加えて反応を停止することで行う。コントロールには、開始時にPCA添加したものを用いる。この溶液に、天然物より抽出した溶液を加えて、生成するGABA量の変化を比較して評価する。GABA測定は、HPLCに強陽イオン交換樹脂カラム(アミノ酸分析機と同等のもの)を装備し、溶出は、クエン酸バッファーにて行い、溶出液は直接蛍光試薬でポストカラム的に誘導化してピーク解析する。ピークは面積で求めて、コントロールのGABAピークと比較して数値化する。

天然物としては、香辛料、生薬、ハーブとして利用されているものを中心に温水(熱水)抽出もしくはアルコール抽出を行う。抽出物は、単一成分で構成されている場合はほとんどなく、濃度差こそあれ、数100の化合物が混入して、その結果、生理作用をあらわすとされていることより、効果を確認できた抽出物に関しては、活性化化合物の単離精製を行う。

3) GADの細胞内での情報伝達機構への関与

GAD 活性測定を行うことで、塩味増強効果を評価できる原理の背景には、味蕾細胞内で味覚情報伝達がどのような経路で起きるのかを明らかにしておく必要がある。そのためには、細胞内のタンパク質間相互作用やリン酸化カスケードを明らかにしてゆく。タンパク質間相互作用には、表面プラズモン共鳴法を用いて、GAD と特異的に相互作用するタンパク質分子の探索を行う。

4) GAD の活性化に寄与する天然物抽出物の細胞膜透過性の検討

香辛料抽出物が塩味の味覚認識に影響している。しかし、どの部位に作用して、この結果を与えているのかは検討する必要がある。天然物抽出物の膜透過性について検討する。平衡透析法や、細胞内への抽出物マーカ化合物の取込みなどを定量的に測定することで評価する。

5) 細胞内GABA 量の定量的測定法の開発

味蕾細胞内のGAD 活性の改変であることより、微視的には細胞内のGABAレベルの変動という現象を観察していることにつながる。一般に細胞内のアミノ酸量の定量に関しては、マイクロ透析法などの最先端技術を用いる場合があるが、まだ味蕾では行われていない。細胞のマイクロダイセクションやマイクロ透析法を併用して、組織サンプルを採取し、その細胞内のフリーのGABA 量の定量化を試みる。非常にチャレンジングな課題と考えるが、限界に挑んでみたい。ちなみに、III 型味蕾細胞を標的として細胞の採取を試みる必要がある。ほとんどの研究室では不可能に近い。

4. 研究成果

(1) 香辛料抽出により、GAD67 活性への影響を *in vitro* の系にて評価するシステムを構築。

(2) 産総研との共同研究にて、低温発現系の酵母を宿主として、GAD67 タンパク質の発現系を構築。従来の大腸菌による GST-GAD67 と低温酵母による His-tag-GAD67 の発現系の発現評価を行ったが、どちらも同レベルの発現効率を示した (論文執筆中)

(3) 香辛料成分と塩味・甘味・酸味への効果を検討。香辛料成分はそれぞれの味質に影響することを官能試験を行って示した。また、官能試験の結果を数値化し、GAD67 の活性化・不活性化の効果との相関を示したところ、塩味>酸味>甘味の順で正の相関が得られた。この結果より、GAD67 を活性化する香辛料成分は、高い塩味増強効果を示すことが明らかとなった (論文執筆中)

(4) GAD67 と相互作用するタンパク質の探索を行った。細胞内での情報伝達機構を明らかにするために、生化学的な解析の結果、GAD67 とタンパク質間相互作用するタンパク質が二種類見つかった。それぞれ、シークエンス解析の結果、解糖系のタンパク質であることが判明した (論文執筆中)

(5) アミノ酸分析の技術向上をめざし、細胞中の GABA 量の定量を目指した。HITACHI のUHPLC を用いたアミノ酸分析装置により、サブ fmol レベルでの遊離アミノ酸プラス GABA の定量を行えるようになった。野菜や果実中の遊離アミノ酸の分析技術につなげているが、脳や神経細胞中の GABA 量の定量化に対してはまだ検討中である。

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 4 件)

1. 佐々木 公子, 龜山 菜美子, 園部 菜穂, 濱野 香里, 植野 洋志, GAD67 の活性に影響を与える食品成分と味覚の伝達との関連 - ハーブに含まれる食品成分による酸味と甘味に与える影響 -, 美作大学・美作大学短期大学部紀要, **58**, 1-10 (2013).
2. 佐々木 公子, 森本 仁美, 濱野 香里, 植野 洋志, GAD67 の活性に影響を与える食品成分と味覚の伝達との関連 - ハーブに含まれる食品成分の味覚への影響評価 -, 美作大学・美作大学短期大学部紀要, **57**, 1-7 (2012)
3. 佐々木 公子, 渡部 治奈, 植野 洋志, GABA

(γ -アミノ酪酸)の味覚への関与について
～酸味と塩味への関与～, *美作大学・美作
大学短期大学部紀要*, **56**, 9-14 (2011)

4. 佐々木 公子, 岩城 知津, 植野 洋志, *GABA*
(γ -アミノ酪酸)の味覚への関与について,
美作大学・美作大学短期大学部紀要,
55, 65-70 (2010).

[学会発表] (計 23 件)

1. Ito, H., Akagiri, S. and Ueno, H., Establishment
of database for free amino acids in food, 40th
International Symposium on High Performance
Liquid Phase Separations and Related
Techniques, Tasmania, Australia,
2013.11.18-21
2. 伊藤 日向子, 赤桐 里美, 植野 洋志, 野
菜・果実中の遊離アミノ酸データベース化
を目指した分析・定量, 第 86 回日本生化学
学会大会, 2013.9.11-13 横浜
3. 植野 洋志, 香辛料の塩味増強効果と
GABA 合成酵素 (GAD) の活性制御機構
との関係, 味と匂学会, 2013.9.7 仙台
4. Ito, H., Akagiri, S. and Ueno, H., Quantitative
amino acid analysis of free amino acids in
food, *Asianalysis XII*, 2013.8.22-24 福岡
5. 伊藤 日向子, 田中 仁美, 赤桐 里美, 植
野 洋志, 食品中の遊離アミノ酸のデー
タベース化を目指した抽出条件の検討及び
定量, 第 85 回日本生化学学会大会, 福岡,
2012.12.14-16
6. 久木 久美子, 濱野 香里, 植野 洋志, 味
覚における GAD アイソフォームの役割に
ついて: 食品成分による GAD 活性への効
果と味覚に与える影響から検討, 2012 年度
日本味と匂学会, 大阪, 2012.10.5
7. 濱野 香里, 久木 久美子, 佐々木 公子,
赤桐 里美, 鳴神 寿彦, 植野 洋志, GABA
合成酵素の活性化を促す香辛料成分の探
索と味覚改変効果について, 2012 年度日本
生物高分子学会大会, 秋田, 2012.9.22
8. 植野 洋志, 久木 久美子, 濱野 香里, 佐々
木 公子, 森 美奈子, 中村 友美, グルタ
ミン酸デカルボキシラーゼ (GAD67) の

活性化と塩味増強効果について, 第 429 回
ビタミン B 研究協議会, 湘南, 2012.9.1

9. 伊藤 日向子, 田中 仁美, 赤桐 里美, 植
野 洋志, 食品中の遊離アミノ酸の抽出検
討及びデータベース化を目指した定量,
日本農芸化学会関西支部第 475 回講演
会・ミニシンポジウム, 大阪府大, 2012.7.14
10. 植野 洋志, 減塩食品開発を目指して: 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, 2012 年度 日本農
芸化学会 産学官学術交流委員会フォーラ
ム, 京都, 2012.3.24
11. 濱野 香里, 久木 久美子, 伊藤 美奈, 赤
桐 里美, 植野 洋志, スパイス・ハーブの
 γ -アミノ酪酸 (GABA) 合成酵素の活性に
及ぼす効果と味覚との関係についての検
討, 日本生化学会大会, 京都, 2011.9.23
12. 藤田 星海, 伊藤 美奈, 佐原 健彦, 赤桐
里美, 植野 洋志, ラット脳由来 GAD67 の
酵母における低温発現系の構築, *J. Biol.
Macromol.*, **10**, 62 (2011.9.16).金沢
13. 伊藤 日向子, 田中 仁美, 赤桐 里美, 植
野 洋志, 食品中の遊離アミノ酸組成の解
析, *J. Biol. Macromol.*, **10**, 47 (2011.9.16).金
沢
14. 濱野 香里, 久木 久美子, 伊藤 美奈, 赤
桐 里美, 植野 洋志, スパイス・ハーブの
GABA 合成酵素アイソフォーム GAD67 の
活性に及ぼす効果と塩味増強効果の関係
についての検討, *J. Biol. Macromol.*, **10**, 46
(2011.9.16).金沢
15. 久木 久美子, 濱野香里 植野洋志, GAD
活性に係わる食品成分が与える塩味増強
効果について, 日本農芸化学会大会 2011
年度大会, 京都, 2011.3.27
16. Hisaki, K., Ueno, H., The participation of
GABA in salty taste signaling and how the
GABA synthesizing enzyme found in type III
taste cells may be affected by food
components, The International Chemical
Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu,
Hawaii, 2010.12.17
17. Ueno, H., Matsukawa, S., Nakamura, Y.,

Yanagawa, Y., Obata, K., Watanabe, M. and Otsuki, Y., Vitamin B₆-dependent enzyme, glutamate decarboxylase: A possible role in leucocyte and new development in taste, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, 2010.12.16

18. Hisaki, K., Nakashima, M., Hamano, K. and Ueno, H., Effect of food components on the salty taste signaling examined by taste sensation tests, 8th International Symposium on Taste and Olfaction, Kyushu Univ., Maidashi, 2010.11.6
19. 吉田 瑤子, 新森 温子, 新田 陽子, 赤桐 里美, 植野 洋志, グルタミン酸デカルボキシラーゼ GAD65・GAD67 の N 末端領域解析によるアイソフォームの機能解明, 2010 年度日本農芸化学会関西支部大会, 近大, 2010.10.3
20. 吉田 瑤子, 新森 温子, 新田 陽子, 赤桐 里美, 植野 洋志, GAD65・GAD67 N 末端領域の生化学的解析による機能解明, 酵素・補酵素研究会 2010 年度研究会, 北九州, 2010.9.11
21. 濱野 香里, 久木 久美子, 伊藤 美奈, 赤桐 里見, 植野 洋志, γ -アミノ酪酸 (GABA)合成酵素の活性に影響を及ぼす食品成分についての検討, 日本生物高分子学会大会, 姫路, 2010.9.10
22. 吉田 瑤子, 新森 温子, 新田 陽子, 赤桐 里美, 植野 洋志, GAD65・GAD67 の N 末端領域解析による役割解明, 日本生物高分子学会大会, 姫路, 2010.9.10
23. 吉田 瑤子, 植野 洋志, グルタミン酸デカルボキシラーゼ GAD65・67 の N 末端領域の機能解明, 奈良女子大学・京都府立大学合同ゼミ, 京都府大, 2010.9.1

[図書] (計 3 件)

1. Ueno, H., Inoue, Y., Matsukawa, S. and Nakamura, Y., Glutamate decarboxylase, *Amino acids in human nutrition and health*, J.P.F. D'Mello, Ed., CABI, London, 103-121

(2011).

2. 植野 洋志, GABA 合成酵素, グルタミン酸デカルボキシラーゼ: その生理作用と塩味・隠し味に関する最近の話題, バイオテクノロジーシリーズ 食品酵素化学の最新技術と応用 II -展開するフードプロテオミクス-, 井上 國世監修, シーエムシー出版, 174-183 (2011).
3. 植野 洋志, GABA 合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼにみる隠れた機能: 味覚での役割と応用, *Dojin News*, 136, 1-7 (2010)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 塩味増強方法および塩味増強剤

発明者: 植野 洋志

権利者: 奈良女子大学

種類: 特許

番号: 4845067

取得年月日: 2011 年 10 月 21 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

1. 植野 洋志 (コメント), 「濃い味」習慣 再考を, 中日新聞, 2012 年 9 月 4 日朝刊
2. 植野 洋志, 奈良ユニバーサロン ログ・イン 1000 文字講座, 「減塩食品の開発に向けて<下>味覚はだませるか?」, 毎日新聞, 2012 年 7 月 18 日朝刊
3. 植野 洋志, 奈良ユニバーサロン ログ・イン 1000 文字講座, 「減塩食品の開発に向けて<上>味覚について一言」, 毎日新聞, 2012 年 7 月 11 日朝刊

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植野 洋志 (Ueno Hiroshi)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号: 30241160