

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00800

研究課題名(和文) 塩味受容体タンパクをセンサーとした塩味増強物質の探索とその単離・精製及び構造解析

研究課題名(英文) Screening of substance enhancing saltiness using sodium ion channel(ENaC) protein as a sensor and its isolation and purification, and structural analyses

研究代表者

塚本 義則 (TSUKAMOTO, Yoshinori)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60592079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の中で最も罹患者数が多い高血圧は、その原因が塩分の摂り過ぎに由来し、この高血圧を予防するには塩分の摂取を低減することが重要なことは自明の理ではある。しかし、単なる減塩では味が味気なくなるという問題が伴う。そこで、我々はこの問題を解決する手段として、塩味を増強する塩味増強方法の開発により減塩をしてもおいしい塩味を享受できる技術開発を試みた。具体的には、ヒトの塩味受容体遺伝子をアフリカツメガエルの卵母細胞に注入・発現させた塩味受容体タンパク質をセンサーとして、塩味増強物質を農作物、発酵食品、食品素材等を対象に探索した結果、1種類の農作物より塩味を有意に増強する物質を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Hypertension has the largest number of patient in life style related disease and its cause originates from the excess of salt intake. Therefore, the reduction of salt intake is important for the prevention of hypertension. However, only reduction of salt causes the problem of dreary taste. We tried the technological development which can enhance saltiness and acquire delicious satiness even the reduction of salt as a method able to dissolve this problem. Namely, we injected human gene of receptor for saltiness into Xenopus oocytes and expressed the corresponding protein and used this as a sensor for the screening of substances enhancing saltiness from agricultural stuffs, fermenting foods, food components. As a result, we succeeded in finding one substance enhancing saltiness from a kind of agricultural stuff.

研究分野：応用微生物学

キーワード：塩味増強 塩味受容体遺伝子 塩味応答 電気生理学的アッセイ 卵母細胞 イオンチャネル アミロライド 遺伝子インジェクション

1. 研究開始当初の背景

現在の日本社会は、高齢化社会の進展に伴って高血圧、糖尿病、高脂血症を初めとする生活習慣病が年々増加しており、その医療費は高血圧と糖尿病の二つをとってみてもそれぞれ 1 兆 8830 億円(H22 年度)と 1 兆 2149 億円(H24 年度)に達しており、国の医療行政を大きく圧迫しているのが現状である。よって、これらの生活習慣病をその食生活の改善によって予防することが出来れば大きな福音となる。そこで、申請者らは食酢の生活習慣病予防効果に着眼してより食酢を摂取しやすくすることを目指して酸味抑制物質の探索に関して、H24 ~ H26 年度の科学研究費基盤(C)の研究助成の下で、酸味受容体タンパク候補である酸感受性イオンチャンネルであるヒトの ASICs(acid-sensing ion channel:h1a,h1b,h2a 及び h3)と TRP イオンチャンネルスーパーファミリーに属する PKD2L1 と PKD1L3 を対象としてこれらの遺伝子をアフリカツメガエルの卵母細胞に単独或いは共発現させた系をセンサーとして電気生理学的手法(クランプ法)を用いて天然物の抽出物及び微生物培養物より酸味を抑制する物質のスクリーニングを行ってきた結果、炭水素資化性菌培養物の界面活性画分、カテキン、イソフラボン、テアニン、納豆、麦味噌、米味噌の MW3500 透析画分に統計学的に有意な差を持って酸味を抑制する物質の存在を突き止め、現在物質の単離・精製及びその構造決定について研究を進めているところである。加えて、高血圧は患者数が 979 万人にも達しており、漬物や醤油などの高塩分食品或いは調味料を多量に摂取しがちな日本人特有の食文化に起因しているが、塩味を増強する安全な物質を開発できて食塩摂取量を例えば半減することができれば高血圧予防策として社会に大きく貢献することが可能である。

2. 研究の目的

塩味を感じる生理学的機構に関しては、ナトリウムイオンチャンネルである ENaC(Epithelial sodium channel)が塩味受容体タンパクとして塩味を感知することが既に明らかになっている〔Shachar Eylam and Alan C. Spector, Chem. Senses, 28: 447-458, 2003〕。

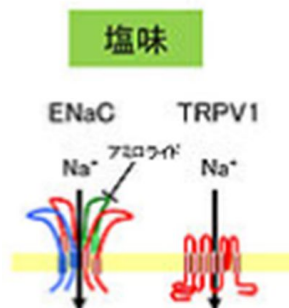


図 1. 塩味受容体

本研究はこの味覚修飾の対象に関して高血圧予防をターゲットに塩味受容体タンパク(ENaC)にフォーカスし、このたんぱく質をコードする遺伝子(ENaC)をアフリカツメガエルの卵母細胞に遺伝子注入し、発現する ENaC タンパクをセンサーとして、酸味抑制物質の探索と同様の手法で広く天然物抽出及び微生物培養物より塩味を増強する物質をスクリーニングし、その活性本体の物質の単離・精製及びその構造解析による構造解析することを研究目的とする。

3. 研究の方法

研究計画・方法を以下の 5 項目に分けて記載する。(1)塩味受容修飾アッセイ系の樹立(2)塩味増強物質候補試料の調製(3)電気生理学的手法(クランプ法)による塩味受容修飾アッセイと塩味増強効果を有する物質のスクリーニング(4)ヒトの舌レベルでの塩味増強効果の検証(5)塩味増強効果物質の単離・精製及びその構造解析

【平成 27 年度】

(1)塩味受容修飾アッセイ系の樹立

ENaC 遺伝子のアフリカツメガエルの卵母細胞における発現条件の樹立 担当 塚本義則、鷓川真也

塩味受容体遺伝子を発現したアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学的アッセイ系(クランプ法)の樹立

担当 塚本義則、鷓川真也



図 2. 電気生理学的アッセイシステム



図 3. 電気生理学的アッセイ装置の測定流路中の卵母細胞と電極

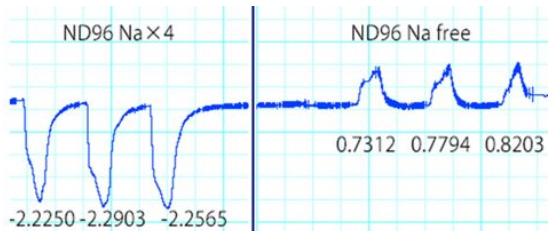


図 4. 食塩濃度(左)ND96 Na の 4 倍(右)Na ゼロ

- (2) 塩味増強物質候補試料の調製
 ペプチド系試料の調製
 a) 各種タンパク質の抽出物及びその部分加水分解物の調製
 b) 各種タンパク質のプロテアーゼ処理物の調製
 c) 各種タンパク質の微生物処理物及び微生物培養物の調製
 担当 塚本義則
 多糖類系試料の調製
 a) 各種多糖類及びその部分加水分解物の調製
 b) 各種多糖類の加水分解酵素処理物の調製
 c) 各種多糖類の微生物処理物の調製
 担当 塚本義則
 カテキン系試料の調製
 a) 各種カテキン類及びその部分加水分解物の調製
 b) 各種カテキン類の微生物処理物の調製
 担当 塚本義則
 イソフラボン系試料の調製
 a) 各種イソフラボン類及びその部分加水分解物の調製
 b) 各種イソフラボン類の微生物処理物の調製
 界面活性物質系試料の調製
 a) 各種界面活性素材及びその部分加水分解物の調製
 担当 塚本義則
 b) 炭化水素、脂質資化性微生物の産生する界面活性物質(バイオサーファクタント)の調製
 担当 塚本義則
 (3) 電気生理学的手法(クランプ法)による塩味受容修飾アッセイと塩味増強効果を有する物質のスクリーニング
 各種塩味増強候補物質の塩味増強活性のアッセイ
 担当 塚本義則
 塩味増強効果を有する物質候補の選抜
 担当 塚本義則
 【平成 28 年度】
 (4) ヒトの舌レベルでの塩味増強効果の検証
 担当 塚本義則
 塩味増強効果の定量的測定
 担当 塚本義則
 塩味の味質官能評価
 担当 塚本義則
 (5) 塩味増強効果物質の単離・精製及びその構造解析

- 塩味増強効果物質の単離・精製
 a) 塩味増強効果物質の分子量分画
 担当 塚本義則
 b) 塩味増強効果物質のカラム分画
 担当 塚本義則

【平成 29 年度】

- (6) 塩味増強効果物質の単離・精製及びその構造決定
 精製塩味増強効果物質の機器分析による構造解析
 a) GC/MS による構造解析
 担当 塚本義則、石田康行
 b) LC/MS、NMR による構造解析
 担当 塚本義則、堤内 要

4. 研究成果

- (1) 塩味受容体遺伝子(ENaC)の単発現系での安定的アッセイ条件の樹立 塩味増強アッセイに用いる塩味受容体(ENaC)のアフリカツメガエルの卵母細胞内での安定的な発現条件について塩味受容体阻害因子であるZn²⁺とアミロライドの各種濃度と塩味刺激応答並びに卵母細胞の状態について調べた結果、アミロライド 40 μM 処理で最も安定した塩味応用に由来する電気応答が得られることを確認することができた。

(2) 塩味増強物質のスリーニング

- 農作物(野菜類、果物類、キノコ類、豆類、穀物類)50 種
 発酵食品(味噌類、納豆類)30 種類
 蛋白質素材の塩酸ないしは酵素による部分加水分解物 12 種類
 食品素材(大豆由来、茶由来)10 種類
 微生物産生界面活性物質 6 種類
 の合計 108 種類の試料について、透析膜を用いて 100 倍希釈の透析を 5 回繰り返すことにより、試料中に含まれる Na⁺を完全に除去した透析膜内液(pH7.4)について上記の電気生理学的アッセイ系で塩味増強物質を探索した結果、
 農作物については、
 1 種類から有意に塩味応答が増強されることが再現性を伴って認められた。現在、塩味応答物質のゲルろ過による単離・精製を行っている。
 発酵食品(味噌類、納豆類)については、酸味受容 ASICs の酸味応答において酸味増強(納豆、豆味噌)あるいは酸味抑制(米味噌、麦味噌)作用を有するものが見出されており、ASICs 同様 ENaCs も同じイオンチャネル型の受容体であることから、これら酸味増強及び酸味抑制物質についてアッセイしたが全く塩味応答しなかった。
 蛋白質素材の塩酸ないしは酵素による部分加水分解物についても、
 12 種類全てにおいて塩味増強を確認できなかった。ただし、透析膜の分画サイズが多すぎて外液に透析されてしまった可能性は否定できない。

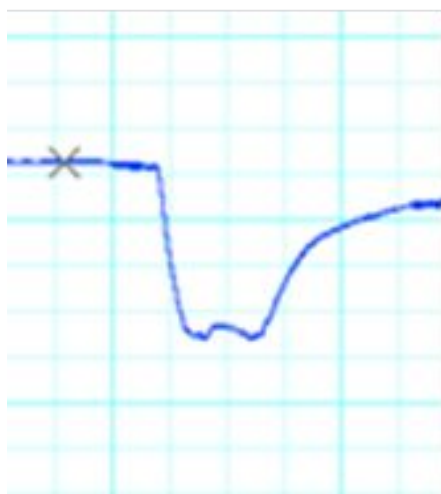


図 5. 農作物から見出された塩味増強応答の電位差チャート(縦軸:電位差)

食品素材(大豆由来、茶由来)と微生物産生界面活性物質については、発酵食品(味噌類、納豆類)と同様に酸味増強ないしは酸味抑制作用を有する物質が見出されたことから塩味応答について調べたが、全て塩味増強の応答を見出すことはなかった。

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)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本 義則 (TSUKAMOTO, Yoshinori)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：6 0 5 9 2 0 7 9

(2)研究分担者

堤内 要 (TSUTSUMIUCHI, Kaname)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：5 0 3 2 9 8 5 1

石田 康行 (ISHIDA, Yasuyuki)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：7 0 2 7 3 2 6 6

(3)連携研究者

鵜川 眞也 (UKAWA, Shinya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：2 0 3 2 6 1 3 5

(4)研究協力者

なし