

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19753

研究課題名(和文)食素材たんぱく質の全網羅ペプチドアレイを用いた新規苦味マスキング剤探索法の開発

研究課題名(英文)Peptide array-based screening identifies bitterness-masking agents

研究代表者

伊藤 圭祐(Ito, Keisuke)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40580460

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):苦味成分と結合する物質には苦味マスキング剤としての利用が期待できる。本研究では、ペプチドアレイを応用し、苦味成分結合ペプチドの探索とそのマスキング効果を検証した。各種食品に含まれるタンパク質のアミノ酸配列を元にペプチドアレイを作製し、機能性食品成分と結合するペプチドを探索した。見出したペプチドについてはAlanine-scanning、およびDeletion analysisによってその結合メカニズムも詳細に解析した。得られたペプチドの多くは、ヒト苦味受容体の応答評価系を用いて分子レベルでの苦味マスキング効果が実証されたことから、新規苦味マスキング剤探索法の開発に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「良口に苦し」と言われるように、ポリフェノール等の多くの食品機能性成分は好ましくない苦味を呈する。いかに健康に良いことが分かっているにもかかわらず、ヒトはおいしくない食品を日々の生活の中で食べ続けることはできないことから、実生活の中で食品機能性成分を活用するためには、苦味味の抑制(マスキング)が不可欠な課題である。本研究では機能性ペプチド探索ツールであるペプチドアレイを応用し、苦味マスキング成分の新規探索法を開発した。

研究成果の概要(英文):Bitterness-masking agents for functional food ingredients facilitate the optimum use of the latter to improve human health. However, an efficient strategy to find bitterness-masking agents remains to be established. Here we developed a novel screening method using peptide array technology to identify bitterness-masking agents. From the amino acid sequence of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), several (-)-epigallocatechin-gallate (EGCG)-binding peptides were discovered using peptide array analysis as a model screening. The binding mechanisms were elucidated through deletion analysis and alanine-scanning analysis. In most cases, the interaction between the basic amino acid residues and EGCG was required for binding. Two EGCG-binding peptides suppressed the activation of the bitter taste receptor hTAS2R39, indicating a bitterness-masking effect.

研究分野：食品化学

キーワード：苦味 マスキング ペプチド ペプチドアレイ 味覚受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 食品には様々な機能性成分が含まれ、それらの継続的な摂取により健康維持や増進が期待できる。我が国における食品機能性成分の利用は特定保健用食品(トクホ)や機能性表示食品のような国の制度によっても後押しされ、市場規模は拡大し続けている¹⁾。しかしその一方、「良薬口に苦し」と言われるように、ポリフェノールに代表される食品機能性成分の多くは好ましくない苦味を呈する。いかに健康に良いことが分かっているにもかかわらず、ヒトはおいしくない食品を日々の生活の中で食べ続けることはできないことから、実生活の中で食品機能性成分を有効に利用するためには、苦味の抑制(マスキング)が重要な課題である。

(2) 苦味は、舌上に存在するヒト苦味受容体(hTAS2Rs)に苦味物質が結合することで生じる²⁾。すなわち、あらかじめ苦味成分に他の物質を結合させておけば、苦味成分は受容体と結合できず、苦味はマスキングされる³⁾。苦味成分と結合する物質は苦味マスキング剤として利用できる可能性があるが、これまで、任意の食品成分に特異的に結合する物質(食品成分)の探索法は確立されておらず、苦味マスキング剤の探索は、熟練した官能評価者の試行錯誤に依存してきた。その結果、多数存在する食品機能性成分のほとんどは有効な苦味マスキング剤が見出されていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では食品成分の中でも特にペプチドに着目した。ペプチドは20種類のアミノ酸が直鎖状に連なった食品成分であり、例えば2アミノ酸から構成されるペプチドは400種類、5アミノ酸であれば3,200,000種類存在する。化学合成が容易であること、また配列固有の機能を有することが特徴であり、このような特徴は苦味成分と結合して機能を発揮する苦味マスキング成分としてペプチドの有用性を期待させる。そこで本研究では、機能性ペプチド探索ツールであるペプチドアレイを活用した、新規苦味マスキング剤探索法の開発を検討した。

3. 研究の方法

(1) ペプチドアレイ解析 本研究では緑茶の苦味成分であるエピガロカテキンガレート(EGCG)をモデルとして、茶殻 Rubisco 由来の EGCG 結合ペプチドを探索し、またその苦味マスキング効果を検証した。緑茶葉の主要タンパク質である Rubisco(UniProt: Q8WIZ5、A0FIP7)の全アミノ酸配列を網羅するように、ペプチド合成装置 ResPep SL(Intavis社)を用いてペプチドアレイを作製した。続いてペプチドアレイを0.1 mM EGCGを含む50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)に30分間浸し、同緩衝液で洗浄した後、レドックスサイクリング染色法によってEGCGと結合したペプチドを検出した⁴⁾。各スポットのシグナル強度は、ImageJソフトウェアを使用して定量した。

(2) ヒト苦味受容体の応答評価 EGCGの苦味感知に関わるヒト苦味受容体としてhTAS2R39が報告されていることから⁵⁾、培養細胞を用いた*in vitro*のhTAS2R39応答評価系を用いてEGCG結合ペプチドの苦味マスキング効果を検証した。Ga16gust44安定発現細胞(HEK)に対し、hTAS2R39発現プラスミドを一過的に導入した後、細胞を3 μM Fluo-8 AMとともに60分間イン

キュベートし、リガンド投与に対する細胞応答を Flexstation II マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社) を使用して経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) EGCG 結合ペプチドの網羅的探索 Rubisco の全アミノ酸配列をカバーする 598 種類のペプチドから構成されるペプチドアレイを作製し、EGCG 結合ペプチドを探索した。その結果、複数のペプチドが EGCG との強い結合を示し、特に結合強度が強いペプチドとして TKASVGFKAGVKDYK、TIKPKLGLSAKNYGR、KNHGMHFRVLAKALR、HGMHFRVLAKALRMS、PAQASMAAPFTGLKS、FTGLKSTSAFPVTRK、VQCMKVWPLGLLKKF が特定された (図 1)。

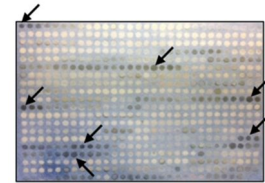


図 1 EGCG 結合ペプチドの検出

(2) EGCG 結合ペプチドの欠失解析 見出されたペプチドにおける EGCG 結合領域を明らかにするために、前述の 7 種類の EGCG 結合ペプチドを N または C 末端から 1 残基ずつ欠失させていった 218 種類のペプチドについて、EGCG との結合を網羅的に解析した。その結果、元の配列に加え、様々な配列、長さのペプチドが EGCG と結合することが明らかとなった。

(3) EGCG 結合ペプチドの Ala-scanning 解析 各ペプチドについて、構成アミノ酸残基を一つずつ Ala へ置換した 52 種類のペプチドについて、EGCG 結合能を解析した。その結果、元のペプチドと比較して、ほとんどのペプチドの EGCG 結合能は Ala 置換により減少した。また、全ペプチドで共通して、Arg や Lys を Ala へ置換すると、他のアミノ酸残基を Ala に置換した場合よりも顕著に結合強度が減少した (図 2)。これらの結果から、EGCG との結合には、ペプチドに含まれる Arg または Lys が特に重要であることが示唆された。

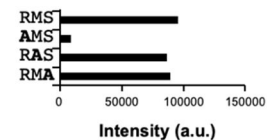


図 2 Alanine-scanning による EGCG 結合メカニズムの解析

EGCG は様々なタンパク質と相互作用することが報告されているが、特に高い親和性を持つタンパク質としてラミニン受容体 (67LR) が知られている⁶⁾。EGCG との相互作用には、67LR の Lys166 が重要であることが明らかとなっている。EGCG のフェノール性水酸基は脱プロトン化することで負電荷を生じることから、本研究で同定されたルビスコ由来ペプチドも 67LR 由来ペプチドと同様の静電的作用によって EGCG と相互作用結合したと考えられる。

(4) 苦味受容体発現細胞を用いた苦味マスキング効果の解析 ペプチドアレイ解析から EGCG と特に強く結合することが示唆された 2 つのペプチド (MHFRVLAKALR、FTGLKSTSAFPVTRK) について、hTAS2R39 の応答抑制効果を解析した (図 3)。その結果、EGCG と EGCG 結合ペプチドを同時に細胞へ添加した場合、ペプチド濃度依存的に hTAS2R39 応答は抑制され ($EC_{50} = 0.36 \text{ mM}$ 、 0.39 mM)、苦味マスキング作用を持つことが示された。

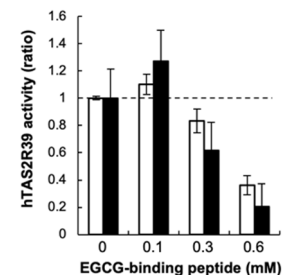


図 3 hTAS2R39 応答を指標とした苦味マスキング効果の検証
MHFRVLAKALR
FTGLKSTSAFPVTRK

以上のように本研究では、茶殻 Rubisco 由来の新規 EGCG 結合ペプチドを見出し、作用メカニズムを明らかにするとともに、その苦味マスキング効果を分子レベルで実証した。ペプチドアレイは機能性ペプチドの探索のみならず、苦味マスキング剤探索ツールとしても利用可能である。

本研究では、機能性ペプチドの探索に関する研究、ヒト味覚受容体への作用成分に関する研究も進めた。

< 引用文献 >

- 1) Jędrusek-Golińska, A., Górecka, D., Buchowski, M., Wieczorowska-Tobis, K., Gramza-Michałowska, A., and Szymandera-Buszka, K. Recent progress in the use of functional foods for older adults: a narrative review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **19**, 2020, 835–856.
- 2) Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Hoon, M.A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C.S., and Ryba, N.J. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, **100**, 2020, 703–711.
- 3) Bohin, M.C., Roland, W.S., Gruppen, H., Gouka, R.J., van der Hijden, H.T., Dekker, P., Smit, G., and Vincken, J.P. Evaluation of the bitter-masking potential of food proteins for EGCG by a cell-based human bitter taste receptor assay and binding studies. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 2013, 10010–10017.
- 4) Mori, T., Ishii, T., Akagawa, M., Nakamura, Y., and Nakayama, T. Covalent binding of tea catechins to protein thiols: the relationship between stability and electrophilic reactivity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2010, 2451–2456.
- 5) Narukawa, M., Noga, C., Ueno, Y., Sato, T., Misaka, T., and Watanabe, T. Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**, 2011, 620–625.
- 6) Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., and Yamada, K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 2004, 380–381.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 I. Ojiroa, H. Nishioa, T. Yamazaki-Ito, S. Nakanoa, S. Ito, Y. Toyohara, T. Hiramoto, Y. Terada, K. Ito.	4. 巻 85
2. 論文標題 Trp-Trp acts as a multi-functional blocker for human bitter taste receptors, hTAS2R14, hTAS2R16, hTAS2R43, and hTAS2R46.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1526-1529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S. Tsuchiya, Y. Terada, M. Matsuyama, T. Yamazaki-Ito, K. Ito.	4. 巻 85
2. 論文標題 A new screening method for identifying chemosensory receptors responding to agonist.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1521-1525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Matsuyama, Y. Terada, T. Yamazaki-Ito, K. Ito.	4. 巻 10
2. 論文標題 A luminescence-based human TRPV1 assay system for quantifying pungency in spicy foods.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods10010151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 K. Ito, M. Koike, Y. Kuroda, T. Yamazaki-Ito, Y. Terada, T. Ishii, Y. Nakamura, T. Watanabe, Y. Kawarasaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Bitterness-masking peptides for epigallocatechin gallate identified through peptide array analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Sci. Technol. Res.	6. 最初と最後の頁 221-228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.27.221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Ito, T. Hosoya, T. Yamazaki-Ito, Y. Terada, Y. Kawarasaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Dipeptidyl peptidase IV inhibitory dipeptides contained in hydrolysates of green tea grounds.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Sci. Technol. Res.	6. 最初と最後の頁 329-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/fstr.27.329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤圭祐
2. 発表標題 ヒト味覚・嗅覚受容体の応答評価による分子レベルでの食品フレーバー解析
3. 学会等名 日本食品科学工学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤圭祐
2. 発表標題 食品開発を見据えた味覚・嗅覚研究最前線「おいしさの分子設計技術」の開発
3. 学会等名 食品ニューテクノロジー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾城一恵、西尾洋美、伊藤豊実、豊原良和、平本忠浩、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 アゴニスト構造を元に見出したヒト苦味・甘味受容体共阻害ペプチド
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------