

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02907

研究課題名(和文) 客観的呈味測定技術の改良と天然成分由来呈味調節物質の探索

研究課題名(英文) Improvement of the taste measurement techniques using taste receptor-expressing cells and characterization of natural compounds contributing to the taste enhancer/suppressor

研究代表者

三坂 巧 (Misaka, Takumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：40373196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：味覚受容体を発現する培養細胞を用いた呈味測定技術について、受容体の発現コンストラクトや母体細胞について改変を実施し、呈味物質に対する応答性の向上が認められる条件について探索を実施した。その結果、ヒト甘味受容体安定発現細胞株について、既存の細胞株よりも高い応答性を有する細胞株の作出に成功した。

また、味覚受容体の活性制御を行う物質の探索については、抗炎症剤のイブプロフェンがヒト甘味受容体の強力な阻害剤として作用すること、レタス類の主要苦味物質を受容するヒト苦味受容体(TAS2R46)の活性が酸性物質添加により抑制することを、本研究で新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗜好性に関与する味覚受容体の活性を調節する物質/条件の発見は、食品の味のデザインに新たな方向性を示すことにつながっていく。今回、クエン酸を用いてpHを低下させることで、ヒト苦味受容体の1種について活性を抑制することができた。クエン酸は食品中に含有されるとともに、食品添加物としても使用することができる物質である。今回得られた知見は、基礎研究の成果から「おいしく食べる」方法論を提案することへとつながる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To improve the taste measurement technique using taste receptor-expressing cells, we modified the receptor expression constructs for hT1R2/hT1R3, and searched for conditions under which the response to taste substances could be improved. As a result, we succeeded in generating a stable cell line of the human sweet taste receptor with higher responsiveness than the existing cell lines.

In addition, in the search for conditions that regulate the receptor activity, we found that ibuprofen, an anti-inflammatory drug, acts as a potent inhibitor of the human sweet taste receptor, and that the activity of the human bitter taste receptor (TAS2R46), which recognizes the bitter taste substance of lettuce, is suppressed by the addition of acidic substances.

研究分野：食品科学

キーワード：嗜好性 味覚受容体 活性調節 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

食品の味は、その価値を決定づける重要な因子である。近年同定された味覚受容体の機能解析研究の成果により、味物質受容における詳細な分子メカニズムが解明されるとともに、官能評価に依らない客観的な呈味強度評価、実験室レベルではある程度、可能となった。しかしながら、将来的な応用利用を見据えると、測定のさらなる簡便化の達成、食品中の夾雑物に対する対応策の提案、「おいしい味」のデザインに有用な技術提供など、課題は多く残されている。食品産業における呈味評価の現状を勘案すると、これらの課題は喫緊に解決せねばならないと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、より広範囲の溶液に対する呈味評価を実現させるべく、味覚受容体発現細胞を用いた受容体活性測定において、感度上昇を目指した客観的呈味測定法の技術改良を実施する。我々独自のヒト甘味受容体安定発現細胞株の測定システムをベースに、細胞の培養条件検討・点変異導入による高感度型受容体の創出・発現コンストラクトの改変など、様々な方法論を取り入れて、測定の高感度化・簡便化を目指す。更に、実際の食品開発に利用可能な技術提供を視野に入れ、天然成分由来の呈味調節物質の探索も実施する。

これらの試みにより、簡便・広範囲に呈味強度測定が可能となることが期待されるとともに、産業的にも有用な呈味調節物質を提案することで、食品開発における味の設計に新たな指針を提示することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

味覚受容体発現細胞を用いた活性測定においては、培養細胞に呈味溶液を直接投与して、その後の細胞応答を蛍光指示薬などを用いて評価する、という方法を用いている。そのため、投与できる呈味溶液の制限はまだ多い。呈味評価対象の拡大ならびに測定の高感度化・簡便化を目指すため、培養細胞の培養条件、点変異導入による受容体の高感度型への改変、発現コンストラクトの改変等の技術改良を実施する。また食品開発に利用可能な技術提供を視野に入れ、天然成分に由来する(あるいは天然物に含有される)化合物・天然素材抽出物に焦点を当て、呈味調節物質の探索を実施する。

4. 研究成果

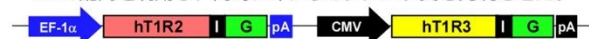
(1) 発現コンストラクトの改変によるヒト甘味受容体発現細胞の応答強度の変化

我々はこれまでに、一つのベクター中に2つの受容体サブユニットおよびキメラGタンパク質をタンデムに組み込んだ発現プラスミドを構築し、それを培養細胞のゲノム中に1コピー導入するといった方法によってヒト甘味受容体安定発現細胞株の作出を行った。これにより、一過性発現細胞と比較して応答が顕著に大きく、簡便なヒト甘味アッセイ系の構築に成功した。(Imada, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397**, 220-225, 2010) 本研究では発現プラスミドのデザインを変更し、新たにヒト甘味受容体安定発現細胞株を複数種類作出した。それらを詳細に比較することでヒト甘味受容体安定発現細胞の改善、およびより良い応答取得のための条件を探索することを目的とした。

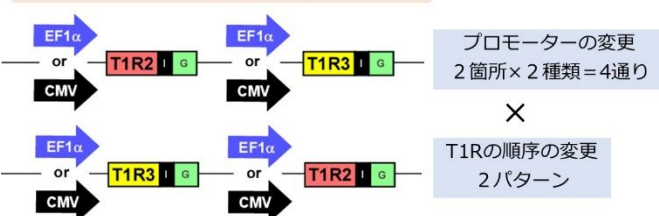
hT1R2 と hT1R3 について、二つの発現カセットをタンデムに並べるといった既存の発現コンストラクトを改変するため、基本的なデザインは維持したまま、コンストラクト中の hT1R2 と hT1R3 の順序やプロモーターの種類を変更した(図)。新たな改変発現プラスミドを導入した安定細胞株を、網羅的に7種類作出した。それぞれの安定発現細胞に蛍光カルシウム指示

既存の発現コンストラクト

T1R2とT1R3の2つの発現カセットをタンデムに並べた。
IRES配列を利用し、同時にキメラGタンパク質も発現させた。



新たな発現コンストラクトの作製



薬を取り込ませた後にリガンドを投与し、リガンド濃度依存的な蛍光強度の増加を計測した。

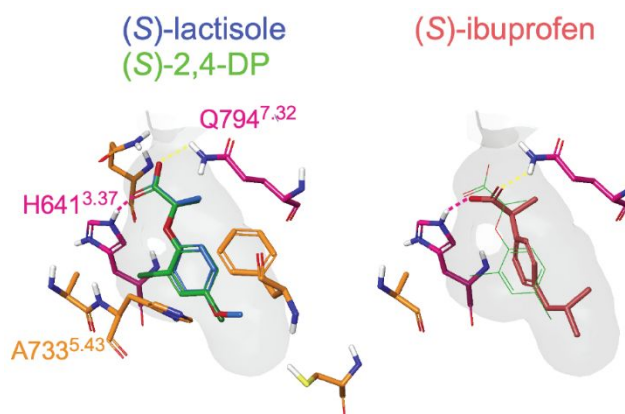
その結果、今回行った発現コンストラクトの変更により、既存のヒト甘味受容体安定発現細胞よりも応答性の高い新規細胞株の作出に成功した。リアルタイム PCR での測定から、発現プラスミド上で前方に組み込んだコード領域の mRNA 発現量が増加すること、さらに hT1R2 の mRNA 発現量が hT1R3 と比較して多い細胞株の応答性が高い傾向が認められるなど、いくつかの知見も明らかになった。

(2) 抗炎症剤イブプロフェンの甘味受容体に対する作用機構解析

甘味受容体は T1R2、T1R3 がヘテロダイマーを形成することにより機能することが明らかにされている。この受容体には複数のリガンド結合サイトが存在することが知られているが、T1R3 の膜貫通領域(TMD)にはラクチゾール及びその誘導体 2,4-DP、ギムネマ酸といった甘味阻害剤が作用することがこれまでに明らかとなっている。

一方、イブプロフェンは cyclooxygenase (COX)の活性阻害剤として作用し(IC₅₀ = 7 μM)、頭痛や発熱といった症状を緩和する抗炎症剤として広く知られている。化合物の化学構造から考慮すると、イブプロフェンはラクチゾールと類似骨格を有していることから、T1R3-TMD へ作用する可能性があることが示唆された。そこで本研究では、甘味受容体に対する阻害活性を調べるとともに、作用モデルを構築し、その機構を考察した。

甘味受容体及びキメラ G タンパク質を安定に発現する細胞株に対して、イブプロフェンと甘味料の混合液を投与した際の細胞応答を測定したところ、イブプロフェンが濃度依存的に甘味受容体を阻害することが明らかとなった。イブプロフェンの甘味受容体に対する IC₅₀ 値は 12 μM であり、この値は COX に対する IC₅₀ 値とほぼ同等であった。既知の甘味阻害剤の中では 2,4-DP と並び最強クラスの阻害効果を示すとともに、ラクチゾールや 2,4-DP とは異なる立体配置で受容体の阻害ポケットに結合している点もユニークであった。



Nakagita, T., Taketani, C., Narukawa, M., Hirokawa, T., Kobayashi, T., and **Misaka, T.***

"Ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, is a potent inhibitor of the human sweet taste receptor."

Chem. Senses, **45**, 667-673 (2020.10)

(3) レタス類に含まれる苦味物質の苦味を抑制する方法の探索

野菜を食べたときに感じられる苦味が子供の野菜嫌いの一因として知られている。そこで本研究では、レタス類に含まれる主要な苦味成分を受容するヒト苦味受容体を特定し、その活性を抑制する方法を検討した。

ヒト苦味受容体を用いた活性評価から、レタスに含まれる主要苦味物質(ラクチュコピクリン)は主に TAS2R46 によって認識されることが明らかになった。また、このリガンドにクエン酸などの酸性物質を混ぜて pH を下げることによって受容体活性が顕著に弱くなり、同じ濃度のラクチュコピクリンに対する応答が有意に低下することが明らかになった。つまり、野菜をおいしく食べるためにドレッシングやマヨネーズといった酸っぱい調味料を使用すると、苦味受容体の活性抑制を引き起こして苦味を感じにくくする、ということが、基礎研究の側面からも証明されたのである。



Yanagisawa, T., and **Misaka, T.**

"Characterization of the human bitter taste receptor response to sesquiterpene lactones from edible Asteraceae species and suppression of bitterness through pH control."

ACS Omega, **6**, 4401-4407 (2021.2)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Rhyu, M.R., Kim, Y., and Misaka, T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Suppression of hTAS2R16 signaling by umami substances	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 E7045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197045	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 該当する
1. 著者名 Nakagita, T., Taketani, C., Narukawa, M., Hirokawa, T., Kobayashi, T., and Misaka, T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, is a potent inhibitor of the human sweet taste receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Senses	6. 最初と最後の頁 667-673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/chemse/bjaa057	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 Yamazaki, T., Takahashi, C., Taniguchi, Y., Narukawa, M., Misaka, T., and Ano, Y.	4. 巻 533
2. 論文標題 Bitter taste receptor activation by hop-derived bitter components induces gastrointestinal hormone production in enteroendocrine cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 704-709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.10.099	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 Yanagisawa, T., and Misaka, T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Characterization of the human bitter taste receptor response to sesquiterpene lactones from edible Asteraceae species and suppression of bitterness through pH control	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 4401-4407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c05599	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 Toda, Y., Hayakawa, T., Itoigawa, A., Kurihara, Y., Nakagita, T., Hayashi, M., Ashino, R., Melin, A.D., Ishimaru, Y., Kawamura, S., Imai, H., and Misaka, T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Evolution of the primate glutamate taste sensor from a nucleotide sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr. Biol.	6. 最初と最後の頁 4641-4649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.08.002	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 該当する

1. 著者名 Toda, Y., Ko, M.C., Liang, Q., Miller, E.T., Rico-Guevara, A., Nakagita, T., Sakakibara, A., Uemura, K., Sackton, T., Hayakawa, T., Sin, S.Y.W., Ishimaru, Y., Misaka, T., Oteiza, P., Crall, J., Edwards, S., Buttemer, W., Matsumura, S., and Baldwin, M.W.	4. 巻 373
2. 論文標題 Early origin of sweet perception in the songbird radiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 226-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abf6505	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木寺 優太、竹谷 千晶、三坂 巧
2. 発表標題 高い応答性を有する hT1R1/hT1R3安定発現細胞株作出の試み
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐 晶帆、鈴木 あゆ、三坂 巧
2. 発表標題 メチオナル構造類縁体の嗜好味受容体活性調節能の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三坂 巧
2. 発表標題 おいしさを決定する味物質受容の分子メカニズム
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井手 美里、三坂 巧
2. 発表標題 レポーターアッセイを用いた客観的甘味評価系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（誌上発表のみ）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中北 智哉、成川 真隆、広川 貴次、三坂 巧
2. 発表標題 甘味受容体T1R3サブユニット膜貫通領域における活性型・不活性型モデルの比較
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（誌上発表のみ）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三坂 巧
2. 発表標題 うま味受容体におけるリガンド選択性を決める分子メカニズム
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸田安香、石丸喜朗、三坂 巧
2. 発表標題 旨味受容体T1R1/T1R3と食性との関わり
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 美波、三坂 巧
2. 発表標題 ヒト味覚受容体発現細胞を用いた清涼飲料水をモデル溶液とした呈味強度評価法の改良
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田 安香、早川 卓志、糸井川 壮大、栗原 洋介、中北 智哉、Amanda Melin、河村 正二、今井 啓雄、石丸 喜朗、三坂 巧
2. 発表標題 霊長類における旨味受容体のヌクレオチド感受性と食性の関わり
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳 思宇、三坂 巧
2. 発表標題 ヒトT1R1/T1R3の受容体活性を調節する受容体内の構造的特徴
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三坂 巧
2. 発表標題 味覚受容体を用いた細胞アッセイによる呈味評価とその応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

霊長類におけるグルタミン酸の旨味の起源 体の大きな霊長類は旨味感覚で葉の苦さを克服
https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20210827-1.html
 生物機能開発化学研究室 研究室HP
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biofunc/index.html>

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
---------	---------