

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658106

研究課題名(和文) ヒト苦味レセプターTAS2Rの遺伝子多型と肝臓解毒酵素発現の個人差の関連性解析

研究課題名(英文) Inter-relationship analysis of genetic polymorphism of human bitter-taste receptor TAS2R and hepatic detoxification enzyme GSTs

研究代表者

駒井 三千夫(KOMAI, MICHIO)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80143022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：アブラナ科植物に含まれる isothiocyanate 類には発がん抑制作用がある。しかし、これには苦味があり、この苦味を強く感じ過ぎるために嫌いで摂取できない人で発がん率が高いことが示された。従って、発がん率の高い人では、この苦味成分を受け入れられないほど苦味感受性が高い遺伝子多型と、肝臓等でのこの植物由来物質の解毒化酵素の遺伝子多型の両方が関係しているかもしれない。TAS2R38の遺伝子多型とGSTM1とGSTT1の遺伝子頻度について比較したところ、PTC及びPROPの苦味を感じないIAVI/AVIの被験者ではGSTM1+の割合が多いことが分かった。二つの遺伝子多型に関連性がある事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies have shown that isothiocyanate compounds in the cruciferous plant prevents cancer incidence rate. If the taster of this bitter compounds by TAS2R, bitter taste receptor, the intake of this compound may decrease due to its too much bitterness sensation during eating. Another possibility is hepatic glutathione S-transferase (GST) polymorphism. The latter one is involved in the detoxification mechanism of isothiocyanate compounds after eating in the liver, i.e., we cannot eat cruciferous plants if the GST activity is low due to its enzyme polymorphism. Therefore, we analyzed the relationship of TAS2Rs and GSTs polymorphism in human volunteer, and intended to clarify the mechanism involved in the individual difference of cruciferous plant acceptability. Up to now, we found that one of the GST isozyme may be involved in this acceptability, and this may be associated with the non-taster of PTC by TAS2R38, though further detailed study is necessary.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：苦味受容体 アブラナ科植物 一塩基多型 肝臓解毒酵素 苦味物質 TAS2Rs GSTs

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト苦味レセプターTAS2R(25種類、GPCR)については、可食植物等に含まれる天然に存在する苦味物質のレセプターとのリガンド活性のあることが次第に明らかにされてきている(Chem. Senses, 35, 157, 2010)。これまで、TAS2R38がPTC(phenylthiocarbamide)のレセプターであることが証明され(Nature, 440, 930, 2006)、PTCレセプターであるTAS2R38の遺伝子多型と各被験者のPTC感受性の個人差が明らかにされ、苦味の感受性の個人差が一塩基多型(SNP= single nucleotide polymorphism)によっていることが明らかにされた。また2007年、植物のアロエに含まれるaloinがTAS2R43をレセプターとしていることが判明し(Current Biol., 17, 1403, 2007)、その後数種類の苦味物質とTAS2Rsとの親和性が明らかにされつつある。一方、ブロッコリーなどのアブラナ科植物の摂取量が多い集団では肺がんや乳がんの発症率が低いという疫学調査結果が多く報告され(Cancer Epidemiol. Biomark. Prev., 18, 184, 2009; Breast Cancer Res. Treat, 121, 195, 2010, 等多数)、とくにアブラナ科植物に含まれるisothiocyanate類が(苦味物質)有効な成分であろうと推定されている。このisothiocyanate類の主たる解毒機構である肝臓などにおけるmercapturic acid経路の最初の段階である、ヒトのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GSTs)酵素では遺伝子多型が頻繁に認められ、がんの発症の個人差に関与しているものと考えられている(Pharmacol. Res., 55, 224, 2007; Eur. J. Cancer, 46, 1617, 2010; Toxicol., 277, 74, 2010; Breast Cancer Res. Treat, 121, 195, 2010, 等多数)。しかし、この酵素活性の個人差と苦味の感受性の個人差との関連性は不明であり、今回のような研究が必要である。

2. 研究の目的

研究の着想は、ブロッコリー等のアブラナ科植物の摂取量が少ない被験者集団で各種の発がん率が高いというヒト疫学データにある(Nutr. Cancer, 2007など)。アブラナ科植物に含まれるisothiocyanate類には苦味があり、この苦味を強く感じ過ぎるために嫌いで、摂取しない人で発がん率が高いことが示唆される。すなわち、発がん率の高い人では、(1)植物体isothiocyanate類の苦味成分を受け入れられないほど苦味感受性が高いことと(苦味レセプターTAS2Rの遺伝子多型)、(2)肝臓等でのこの植物由来物質の解毒化・無毒化の酵素の遺伝子多型の両方が関係しているのかもしれない。この(1)と(2)を明らかにすることと、この二つの事項との関連性について明らかにする事が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)味覚に関する官能試験:

苦味感受性に関する官能評価試験とアンケートを88名(男性34名、女性54名)に対して実施した。DNA遺伝子情報は88名(男性34名、

女性54名)より提供された。

官能評価試験

試料 ブロッコリー(香川県産 品種:おはよう) クレソン(宮城県名取産)

方法 (Mari A.Sandell らの方法: Variability in a taste-receptor gene determines whether we taste toxins in food Current Biology Vol16 No18 R792, 2006)

[ブロッコリー]

a) ブロッコリーの花蕾部分を5gずつ計量した。
b) 計量後電子レンジにて加熱(50g/600W、1分又は30秒)し90mlのプラスチックカップに入れた。これにより1分加熱(ブロッコリー)、30秒加熱(ブロッコリー)、未加熱(ブロッコリー)の3種の試料を作製した。

[クレソン]

a) クレソン(葉、茎)を2g計量した。
b) ブロッコリーと同様に電子レンジにて加熱し1分加熱(クレソン)、未加熱(クレソン)の2種の試料を作製した。

評価方法(gLMS法):

被験者にそれぞれ試料を15秒間以上咀嚼しスケールにチェックして貰った。

(2)isothiocyanate類の肝臓代謝酵素(GSTM1及びGSTT1)の遺伝子多型解析:

綿棒で左右の内頬を回転させるようにして各50回程度こすり、口腔内粘膜細胞を採取した。500µL PBSを入れた滅菌済み1.5mLチューブ内で綿棒の先を切り取り、懸濁させた。綿棒をよく絞って取り出し、4で遠心(10000rpm, 5min)、沈殿を吸わないようにピペットで上清を除いた。200µL TNE bufferを加え、ボルテックスでよく攪拌した後、10%SDS溶液6µLを加え(最終濃度0.3%)チューブを静かに反転させた。5µL プロテイナーゼKを加え55℃、4時間インキュベートした。200µL フェノールクロロホルム(等量)を加えボルテックスで30秒振とうした後、13000rpmで、5分間遠心した。水槽を回収し、再度フェノールクロロホルム抽出した。1/10容3M酢酸ナトリウム溶液、2倍容エタノールを加

表1 GSTM1、GSTT1、-Globin 遺伝子増幅用 primer

GST M1	forward primer	GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC
	reverse primer	GTTGGGCTCAAATATACGGTGG
GST T1	forward primer	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC
	reverse primer	TCACCGGATCATGGCCAGCA
-globin	forward primer	CAACTTCATCCACGTTCCACC
	reverse primer	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

え、-20 で1時間放置し、その後13000rpm、0~4、20分間遠心した。上清を捨て-20保存しておいた70%エタノールを500µL加えて洗った後(13000rpm、0~4、20min)遠心した。上清を捨て、真空乾燥機で乾燥させElution Buffer50 mLに溶解した。

表1にGSTM1、GSTT1、-Globin 遺伝子増幅用 primer を示した。

表2.検出されたハプロタイプ別被験者 (TAS2R38)

Amino Acid Position	AVI/AVI (non-taster)	AVI/PAV (medium-taster)	PAV/PAV (taster)
49	A/A	A/P	P/P
262	V/V	V/A	A/A
296	I/I	I/V	V/V
Number of Subjects	13	36	39

4. 研究成果

(1) 味覚に関する官能評価試験:

ブロッコリーで苦みを感じる人が少なかった事と、クレソンの方が食べたことのある学生が少ないと予想されたためにこれまでの食経験などに味覚が左右されにくいと想定し、同じアブラナ科のクレソンで行った。その結果、クレソンの方がブロッコリーよりも苦味強度が強いことが分かった。また、ブロッコリー、クレソンとも加熱処理により苦みが低下することが今回の実験でも示された。このため、苦みが消失しないよう、今後の研究では生のままで試料提供することとした。

これまでの既報で発表の通り PTC と PROP では強い相関がみられたが、ブロッコリー(生)とクレソン(生)にも若干の相関がみられた。これより、今後はより苦味強度が強いクレソンの生で検討することとなった。

(2) Isothiocyanate 類の肝臓代謝酵素 (GSTM1 及び GSTT1) の遺伝子多型解析:

今回得られた被験者の GSTM1 有無の割合を既出文献と比較すると、ほぼ同じような結果が得られた。なお、表2に検出された TAS2R38 のハプロタイプ別被験者数をまとめた。

TAS2R38 の遺伝子多型の違いによる GSTM1 と GSTT1 の遺伝子頻度について、両方とも - である null タイプは83人中16人いた。この両方とも null タイプは AVI/AVI には0人、PAV/AVI は8人、PAV/PAV では7人という分類になった。また、AVI/AVI では GSTM1 + の割合が多いことが分かった。TAS2R のハプロタイプ遺伝子型と GSTM1 の

関連性があることを示唆するものであるが、なお例数を増やした詳しい研究が必要である。

PTC 及び PROP ノンテイスター者は GSTM1 を持っている人が多いので、味を知らずにこれら化学物質を摂取してしまったとしても GSTM1 があるので解毒できるという仕組みがあるのかもしれないが、これも例数を増やした検討が必要である。一方、PTC 及び PROP テイスター者またはミディアムテイスター者は GSTM1 がない人に多いので (= GSTM1 がないと解毒できない)、舌での苦味受容が門番 (gate keeper) となってアブラナ科植物の摂取を少なくしている可能性がある。しかし、これも引き続き検討することで全貌を説明する事ができるようになるであろう。

要約:

アブラナ科植物に含まれる isothiocyanate 類には発がん抑制作用がある。しかし、これには苦味があり、この苦味を強く感じ過ぎるために嫌いで摂取できない人で発がん率が高いことが示された。従って、発がん率の高い人では、この苦味成分を受け入れられないほど苦味感受性が高い遺伝子多型と、肝臓等でのこの植物由来物質の解毒化酵素の遺伝子多型の両方が関係しているかもしれない。TAS2R38 の遺伝子多型と GSTM1 と GSTT1 の遺伝子頻度について比較したところ、PTC 及び PROP の苦味を感じないハプロタイプ AVI/AVI の被験者では GSTM1 + の割合が多いことが分かった。これら二つの遺伝子多型には関連性がある事が示唆された。確固たる証明とするには、例数を増やしてさらに解析する必要がある。

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)

遺伝子情報を有する研究であり、研究が途中の段階のため、なるべく公開しないように対応している(データが盗まれる危険性を防ぐため)。方法2)の方法論的に全く同じ研究内容で学会発表が一つあったので、以下に記す。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 齋藤弘貴、沼倉悠紀子、磯野邦夫、安達良太、入部マイ子、後藤知子、白川 仁、駒井三千夫:「ジペプチドの苦味感受性の個人差をもたらす苦味レセプターの一塩基多型」、日本味と匂学会第47回大会、平成25年9月7日、仙台。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒井 三千夫 (KOMAI, MICHIO)
(東北大学・大学院農学研究科・教授)
研究者番号：80143022

(2) 研究分担者

・白川 仁 (SHIRAKAWA, HITOSHI)
(東北大学・大学院農学研究科・准教授)
研究者番号：40206280

・後藤 知子 (GOTO, TOMOKO)
(東北大学・大学院農学研究科・助教)
研究者番号：00342783

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：