

《農芸化学奨励賞》



味覚受容・応答の分子生物学的解析とヒト甘味感覚計測細胞系の開発

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 准教授 三 坂 巧

はじめに

食品の味はその価値を決定づける重要な因子であり、味認識機構の解明は食品を対象とする研究において重要な課題である。口腔内上皮層に存在する味細胞においては、呈味物質受容に必須な分子群を発現することで、味物質認識能を獲得している。味細胞特異的に発現する分子の同定は正にその出発点であり、筆者も研究開始当初に舌上皮に特異的に発現する陽イオンチャネルの発見に成功した。一方、味物質を受容する味覚受容体についても近年同定がなされ、呈味物質認識に関与する分子群の正体がようやく解き明かされてきたといえよう。

味認識機構の全体像を理解するためには、まず味物質による味覚受容体への作用機構を解明することが近道であると考えた。そこで本研究では、ヒトを含む脊椎動物に由来する味覚受容体機能について、培養細胞発現系を用いた客観的評価を主たる研究手法として解析を行ってきた。以下に主な研究概要を紹介する。

1. 味覚受容体発現細胞を用いた客観的評価系による味物質受容機構の解析

Gタンパク質共役型受容体ファミリーに属する味覚受容体をキメラGタンパク質とともに培養細胞に発現させ、味物質に対する細胞応答を蛍光イメージングにより測定することで、受容体活性化を客観的指標としてとらえることができる(図1)。キメラGタンパク質に細胞内カルシウム濃度変化を引き起こすもの(G15やG16のC末端部分を他のGタンパク質のものに置換したものが汎用される)を用いることで、受容体が活性化すると細胞内カルシウム濃度の上昇が生ずる。この変化を、蛍光カルシウム指示薬(Fura-2など)の蛍光強度変化として観察することで、味物質投与に対して応答を示した細胞を可視化する

ることができる。したがって投与した物質に対する受容体活性化の程度を、応答細胞数によって数値化することができるのである。

本手法により、各受容体を受容する味物質の種類や応答濃度の範囲を決定することができるのが第一の利点である。筆者らは、モデル動物として用いた小型魚類(メダカ、ゼブラフィッシュ)に由来する味覚受容体について、そのリガンドを同定することに成功した。哺乳類では甘味を受容する味覚受容体(T1R2+T1R3)の組み合わせが、これらの魚類においては多種のL-アミノ酸をリガンドとしていることが判明した。魚類ではアミノ酸を嗜好する一方で甘味を嗜好しないが、これが味覚受容体の受容する味物質に起因するという説を支持する結果である。また第二の利点として、味覚受容体発現細胞を用いた客観的評価系を用いることで官能評価によらない味物質の評価が可能であることが挙げられる。対応する味覚受容体の活性化を数値化することによって、各味物質についてより詳細な比較が可能であるだけでなく、味覚受容体に起因するさまざまな味覚現象のメカニズムを解き明かすことができた。

熱帯植物果実由来のタンパク質ネオクリンは、そのもの自身が弱い甘味をもつうえに、つづけて酸っぱいものを味わうと強い甘味を呈するという味覚修飾活性を有する。この不思議な活性の詳細なメカニズムについては長い間不明であった。本研究においては、ヒト甘味受容体を発現させた細胞評価系を用い、さまざまなpH条件下におけるネオクリンの甘味強度について測定を行った。その結果、ネオクリンはpH依存的に甘味受容体を活性化する、つまり低いpHにおいて甘味受容体を強く活性化することが判明した。さらにネオクリンの点変異体を同時に用いた解析により、ネオクリンが甘味受容体に対して中性で

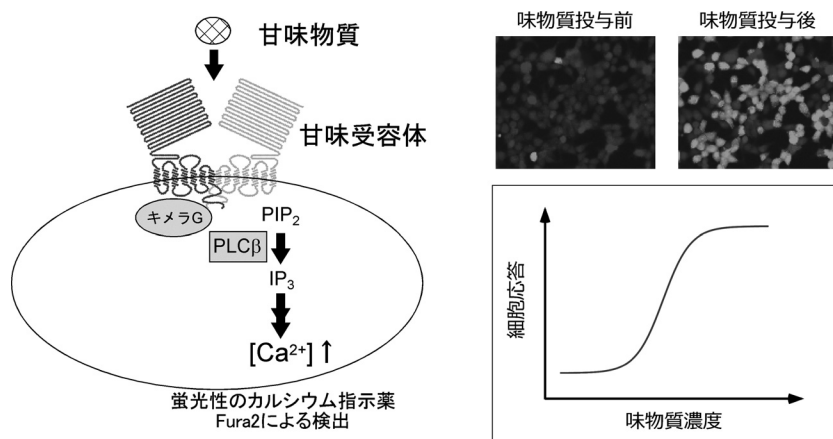


図1 味覚受容体発現細胞を用いた客観的評価系の概要

甘味受容体発現細胞における例を示した。味覚受容体発現細胞の画像は100個程度の細胞が視野中に含まれており、蛍光カルシウム指示薬Fura-2の蛍光強度比(F340/F380)をグレースケールで示している。味物質投与により応答した細胞において明るくなるように画像を表示している。さまざまな濃度の味物質を投与した際の受容体活性化の程度を、応答細胞数によって数値化することができる。

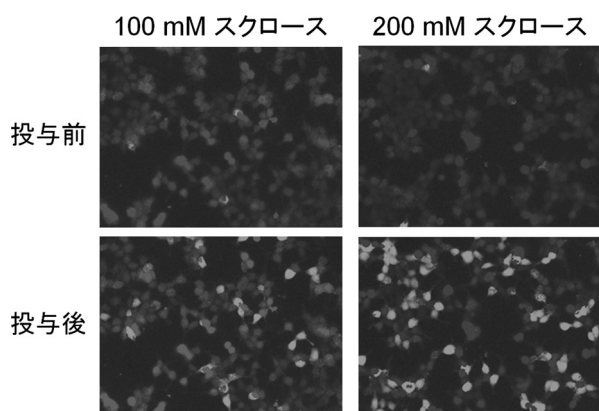


図2 ヒト甘味受容体安定発現細胞株の甘味物質に対する応答

甘味物質としてスクロース（ショ糖）を用いた例を示す。画像は蛍光カルシウム指示薬 Fura-2 の蛍光強度比 (F340/F380) をグレースケールで示しており、応答した細胞において明るくなるように表示している。100~200 mM のスクロース投与により、一部の細胞が強く応答している様子が認められる。

はアンタゴニストとして、酸性ではアゴニストとして作用するという、酸誘導性の甘味活性発現について新たなモデルを提唱することができた。

また産業上非常に興味をもたれる苦味の抑制についても、苦味受容体発現細胞を用いた解析によりその一端を明らかにした。旧来の官能評価によって苦味抑制物質の探索が行われてきたが、それらを苦味受容体発現細胞により評価してみたところ、酸性物質がヒト苦味受容体に対して一過的阻害をもたらすという結果を得ることができた。旧来、知られていた酸性ジペプチドのみならず、広範な酸性物質添加による外液 pH の低下により、複数のヒト苦味受容体においてリガンド応答が有意に減少した。したがって、適量の酸性物質の添加により、苦味抑制が達成できる可能性が示唆された。

味覚修飾活性や苦味抑制が味覚受容体発現細胞を用いた解析により説明できたということは、このような複雑な味覚現象の理解について、味物質による味覚受容体への作用機構の解明が有用であることを示した結果であるといえよう。今後、本手法を利用することで、さらなる味覚現象の理解が進むことが期待される。

2. ヒト甘味感覚計測細胞系の開発

前述の味覚受容体発現細胞による機能解析において、評価系改良についての試みを継続的に行ってきた。その途上、ヒト甘味受容体サブユニット (hT1R2 および hT1R3) ならびにキメラ G タンパク質 (G16gust44) の 3 者を、一定比率で発現させる新規発現コンストラクトを設計し、かつそれらを安定的に発現する細胞株の構築に成功した。得られたヒト甘味受容体安定

発現細胞株を用いた評価系は、従来法と比較して応答細胞頻度・感度とも顕著な上昇が認められただけでなく、長期にわたり安定的な測定が可能であるという利点が認められた。さらに、これまで甘味受容体発現細胞系による測定が困難であったショ糖に対しても十分に強い応答が確認され、ヒトの官能閾値を代弁しうる評価が可能であった (図 2)。また本発現コンストラクトは、受容体サブユニットの点変異体を用いた解析においても有効であり、20 種類を超える点変異体について安定発現細胞株の構築を行ってきたが、いずれも良好な応答を示すことも確認している。

甘味はエネルギー源として本能的に欲するものであるとともに、食品中の味としても最も大事な味である。本研究によって構築されたヒト甘味受容体安定発現細胞株は基礎研究の場のみならず、産業利用の場においても非常に有益な評価ツールになると確信している。

おわりに

味物質客観的評価系を中心とした本研究は、将来的には生体が実際に感じている味物質の質的・量的測定を行うセンサーの作製へと発展しうる、非常に価値のある研究といえる。事実、筆者らが開発したヒト甘味感覚計測細胞系については、「甘味」という最も重要な味覚情報を、現時点においても数値化することが可能となっている。本研究は、ヒト味覚受容体を用いた客観的評価系による味の設計といった全く新しい方法論を生み出す、画期的な研究成果であるといえよう。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物機能開発化学研究室にて行われたものです。研究を行う機会を与えていただき、終始ご指導、ご助言を賜りました東京大学教授・阿部啓子先生に心より感謝申し上げます。本研究を進めるうえで多大なご助言をいただいた朝倉富子先生、中井雄治先生、松本一朗先生、石丸喜朗先生、岡田晋治先生に御礼申し上げます。また本研究の成果は、生物機能開発化学研究室で研究を行った多くの皆様の多大なる努力の賜物であります。大池秀明博士、永井俊匡博士、中島健一朗博士、藍原祥子博士、伊藤圭祐博士をはじめ、ご協力いただいたすべての卒業生、在学生、在籍者の皆様方に深く感謝いたします。また、本研究は大学・企業の方々で行ったさまざまな共同研究により大きく進展いたしました。ここですべての方々のお名前を挙げることはできませんが、本研究に携わった共同研究者の皆様方に深く感謝いたします。

最後になりましたが、学部生・大学院生時代に研究者としての基礎をご指導いただき、その後もさまざまな機会にご助言を賜っただけでなく、本奨励賞にご推薦くださいました元 東京大学教授・荒井綜一先生に厚く御礼申し上げます。