

味覚受容体発現細胞を利用した呈味改良剤評価系モデルの構築

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品機能研究領域
日下部 裕子

1. 研究の目的と背景

健康的な体を維持するために、機能性成分や人工甘味料を利用した食品の開発が行われているが、これらの物質の中には食品の嗜好性を低下させるものが多く、製品への利用には呈味性の改良を図る必要性が生じている。呈味性の改良に使用する物質の選抜は経験則に従うことが多く、またその評価のほとんどは官能試験であるが、効率性や科学的裏付けに乏しいことが問題となっている。そこで、これらの問題を解決するために近年明らかになった味覚受容体を発現させた培養細胞を用いて、呈味改良剤の味質改良効果を評価するモデル系の開発を行うことを目的とした。

モデル系となるべき物質の選択が本課題では最も重要な項目の一つである。苦味物質の種類もさることながら、苦味受容体は種類が多く、ヒトでは25種類存在し¹⁾、このことがモデル系の選択を複雑にしている。非常に多数の苦味物質が、これら25種類の苦味受容体のどれと結合するかについては、解析が困難で知見も少ないのが現状である。また、苦味受容体との対応が明らかな物質は、薬理成分など食品成分でない場合が多い。このような状況下で、我々は文献や特許などの情報から、本研究ではアセサルファムKとシクロデキストリンをモデル物質として選択することとした。アセサルファムKは飲料等に多用されている人工甘味料で甘味とともに苦味を持っており、その苦味はヒト苦味受容体T2r43およびT2r44と結合することが報告されている²⁾。シクロデキストリンは苦味を包接する効果があることが知られている。そこで、我々は、甘味増強あるいは苦味低減効果を味覚受容体と食品成分の結合状態を測定することで評価する方法の検討を行うことを目的とし、そのモデル系の構築のために、人工甘味料とシクロデキストリンを用いた系の構築を試みた。まず、我々は β シクロデキストリンとアセサルファムKの混合物が薬剤の苦味マスキング剤として効果的に機能するという知見(特開2007-269716)³⁾に着目した。 β シクロデキストリンはアセサルファムKの苦味もマスクしつつ、アセサルファムKとの共存で苦味マスク効果を増強させる、あるいは、 β シクロデキストリンがアセサルファムKの甘味を増強させることでアセサルファムKの呈する苦味や薬剤の苦味をマスクするように錯覚する可能性があるとして我々は予想した。アセサルファムKの苦味は苦味受容体との対応関係が明らかになっている数少ない物質の一つであることにも着目し、 β シクロデキストリンとアセサルファムKの混合物の呈味変化を解析する系が、甘味を保持したまま苦

味を低減させる方法を評価するモデルとなるのではないかと考えた。シクロデキストリンは包接できる分子の大きさにより α 、 β 、 γ の3種類が存在する。そこで、これら3種類のアセサルファムKに対する影響についても検討した。

2. 研究の方法

(1) 遺伝子材料

(a) 味覚受容体遺伝子

味覚受容体遺伝子はヒト甘味受容体遺伝子hT1r2/hT1r3⁴⁾およびヒト苦味受容体遺伝子hT2r43およびhT2r44²⁾を用いた。

(b) Gタンパク質

G α 16のC末端44アミノ酸残基を味蕾特異的Gタンパク質gustducinのアミノ酸配列と置換した変異体(G16gust44⁵⁾)を利用した。G α 16(GenBank, NM_002068)はヒト腎臓cDNAライブラリー(Clontech社)からPCRクローニングして用いた。

(c) 発現ベクター

G16gust44については、導入する培養細胞の特定の遺伝子領域に1コピーのみ導入するために、G16gust44の全長cDNAを発現ベクターpcDNA5/FRT(invitrogen社)に導入した。hT1r2は発現ベクターpEF-DEST51(invitrogen社)に、hT1r3、hT2r43、hT2r44は発現ベクターpEAK10(Edge Biosystems社)にそれぞれ導入した。

(2) 培養細胞

(a) 培養細胞

pcDNA5/FRTに対応したFlp-in 293 Cell(invitrogen社)を使用した。培養にはウシ胎児血清(invitrogen社)を10%加えたDMEM培地(invitrogen社)を用いた。

(b) 培養細胞への遺伝子導入

Flp-in 293 Cellへの味覚受容体およびGタンパク質発現ベクターの導入はカチオン性脂質であるLipofectamine LTX(invitrogen社)を用いて定法に従って行った。

(c) 恒常的に受容体およびGタンパク質を発現する培養細胞の選抜

発現ベクターを導入した24時間後に細胞を継代し、

さらに24時間後に発現ベクターに対応した薬剤 (Hygromycin 100 $\mu\text{g/ml}$, Blastcidin 10 $\mu\text{g/ml}$, Puromycin 1 $\mu\text{g/ml}$) を添加し, 薬剤耐性のある細胞を単離した.

(3) 味物質および食品添加物

アセサルファム K は和光純薬社製のものを使用した. また, α , β , γ シクロデキストリンは林原社製を使用した.

(4) 細胞応答の測定

刺激に対する細胞の応答は, 細胞内カルシウム濃度変化を細胞内に取り込ませた蛍光指示薬の蛍光強度変化で測定するカルシウムイメージング法を用いて解析した. 甘味あるいは苦味受容体を恒常的に発現する細胞を96ウェルプレートに播種し, 蛍光指示薬 Fluo 8-NW (コスモバイオ) を加えて37度で30分細胞に取り込ませた後測定を行った. 蛍光強度変化の測定および解析には Flexstation 3 (Molecular Devices 社) を用いて行った.

(5) 官能試験

(a) シクロデキストリン単独の呈味性評価

表1に示した各 CD 溶液について, 単独での味を確認するために3点識別法により4名のパネルで官能試験を実施した. 各パネルは, 水 (A) と CD 溶液 (B~G) とが3

個1組となった試料から奇数試料を回答した. 結果はその正解数を数え, 検定表により味の有無を判定した.

表1 官能試験のサンプル調整

サンプル	成分
A	DW
B	0.15 mM α -CD
C	0.15 mM β -CD
D	0.15 mM γ -CD
E	1.5 mM α -CD
F	1.5 mM β -CD
G	1.5 mM γ -CD

(b) シクロデキストリン添加によるアセサルファム K 溶液の嗜好性改善効果の評価

アセサルファム K に各シクロデキストリンを添加することによる呈味性への効果の検討は, 表2に示すように, 組成の異なる溶液について一対比較法の浦の変法により4名のパネルで官能検査を実施することにより行った. 各パネルは, すべての順序のある対をそれぞれ1回判断した. 味の好ましさは表3の5段階の判断尺度で評価した.

表2 官能試験のサンプル調整

サンプル		成分	
サンプル1	(コントロール)	0.75 mM AceK	
サンプル2	(+ α -CD)	0.75 mM AceK +	0.15 mM α -CD
サンプル3	(+ β -CD)	0.75 mM AceK +	0.15 mM β -CD
サンプル4	(+ γ -CD)	0.75 mM AceK +	0.15 mM γ -CD

表3 官能試験の判断尺度

評点	判断基準
+2	先に味わったサンプルの方がよい
+1	先に味わったサンプルの方がややよい
0	どちらも同じ程度
-1	後に味わったサンプルの方がややよい
-2	後に味わったサンプルの方がよい

3. 研究内容

概要: β シクロデキストリンとアセサルファム K の混合物が薬剤の苦味マスキング剤として効果的に機能するという知見をもとに, 水溶液中のシクロデキストリンとアセサルファム K について, それぞれ単独および混合物の呈味性を, 官能試験と味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞を用いて評価し, 比較した.

(1) アセサルファム K の甘味および苦味を培養細胞で評価する系の構築

(a) アセサルファム K の苦味に対する受容体を恒常的に発現する細胞の作製

我々は, まず甘味と苦味応答を測定する培養細胞の取得を目指した. 甘味に対する応答は既に保有しているヒト甘味受容体 hT1r2/hT1r3 と G タンパク質 G16gust44 を恒常的に発現する細胞を充てることとした. アセサルファム K の苦味を受容することが明らかにされている hT2r43 および hT2r44 の遺伝子については発現ベクター pEAK10 に挿入したコンストラクトを作製し, G16gust44 を恒常的に

発現させた Flp-in 293 Cell に導入した。薬剤選抜の結果得られた培養細胞について、hT2r43 および hT2r44 に結合することが知られているアセサルファム K で刺激を行い、苦味応答を観察できる細胞を再選抜した。

(2) シクロデキストリンの呈味性評価

(a) 官能試験によるシクロデキストリンの呈味性評価

シクロデキストリン単独での呈味評価を行った。苦味マスキングがあるとされる β シクロデキストリンとアセサルファム K の混合比は 1 : 1 (重量比) であること (特開 2007-296716)³⁾ から、アセサルファム K の甘味の閾値に合わせた濃度における呈味性を評価することとし、官能試験で水との区別を指標に呈味性評価を行った。

(b) 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞を用いたシクロデキストリンの呈味性評価

官能試験と併行して培養細胞によるシクロデキストリン単独の評価を行った。培養細胞を用いた評価の場合、評価する物質についていくつかの観点で培養細胞を用いた評価に適切であるかを確認する必要がある。そこで、①非特異的な細胞応答、②自家蛍光について検討を行った。両者とも味覚受容体非存在下で引き起こされる蛍光強度変化であるため、実験には味覚受容体を恒常的に発現している細胞ではなく、G タンパク質のみを導入した細胞 (F44s#5) を用いて行った。

(3) アセサルファム K とシクロデキストリンの混合物の呈味性評価

(2)の結果より、0.75 mM アセサルファム K と 0.15 mM シクロデキストリンに焦点を絞ってアセサルファム K とシクロデキストリンの混合物の呈味性評価を官能試験と培養細胞による測定により行った。

(a) アセサルファム K とシクロデキストリンの混合物の官能試験

官能試験では、アセサルファム K の甘味、苦味といった味質ではなく、好ましさすなわち嗜好性を指標にシクロデキストリン添加による効果を評価した。

(b) 培養細胞によるアセサルファム K とシクロデキストリンの混合物の評価

(1)で作製した苦味受容体を発現する細胞と甘味受容体発現細胞を用いて α 、 β 、 γ シクロデキストリン (各 0.15 mM) に 0.75 mM アセサルファム K を添加した場合の応答の変化を解析した。

4. 研究の実施経過

(1) アセサルファム K の甘味および苦味を培養細胞で評価する系の構築

(a) アセサルファム K の苦味に対する受容体を恒常的に発現する細胞の作製

まず、アセサルファム K の苦味を受容する hT2r43 および hT2r44 の遺伝子を恒常的に発現する培養細胞 Flp-in 293 Cell を、薬剤耐性を指標として選抜した。細胞に導入された遺伝子の量は細胞ごとに異なる。また、Flp-in 293 cell は培養過程で性質が変化することも少なくない。そこで薬剤により選抜された細胞を単離して培養し、苦味物質に対する応答性を測定することで、アセサルファム K の苦味を評価できる細胞の選抜を行った。hT2r43 については 18 種類、hT2r44 については 10 種類の細胞についてアセサルファム K 10 mM の苦味応答を測定し、最終的に 43#9 および 44#2 をアセサルファム K の苦味応答測定用を使用することとした (図 1)。

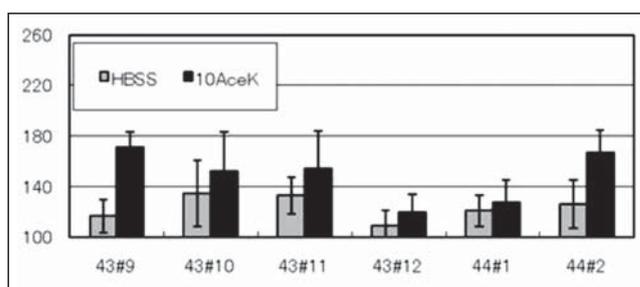


図 1 アセサルファム K の苦味に対して応答する細胞の選抜

Flp in 293 細胞に G タンパク質と苦味受容体 hT2r43 あるいは hT2r44 を恒常的に発現する細胞を作製し、その中からアセサルファム K 刺激に対する応答の大きいものを選抜した。図は選抜の例を示す。縦軸はベースラインを 100 とした場合応答強度を示す。ここでは hT2r43 を発現する 43#9 と hT2r44 を発現する 44#2 をアセサルファム K の苦味に反応する細胞として選抜した。

(2) シクロデキストリンの呈味性評価

(a) 官能試験によるシクロデキストリンの呈味性評価

α 、 β 、 γ シクロデキストリンのそれぞれについて、0.15 mM、1.5 mM の 2 点で評価を行った。その結果、1.5 mM α -CD はかろうじて水との区別が付く程度の呈味性を有していた (5% 有意差有り) が、その他については水との区別がつかず、ほぼ無味であった。

(b) 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞を用いたシクロデキストリンの呈味性評価

①非特異的な細胞応答：官能試験と同様の 0.15 mM、1.5 mM、の 2 点で G タンパク質のみを発現している Flp-in 293 Cell, F44s#5 への影響を調べたところ、いずれのシクロデキストリンも 1.5 mM の濃度で大きな、0.15 mM でも軽微な非特異的応答を引き起こすことが明らかになった (図 2)。中でも特に γ デキストリンについては非特異的な

応答が大きかった (図2)。

②自家蛍光: α , β , γ シクロデキストリンのいずれも, カルシウムイメージング測定を阻害する自家蛍光は持たなかった。

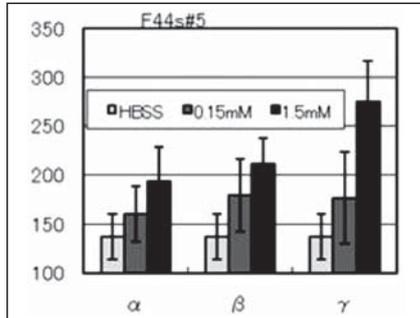


図2 シクロデキストリンが Flip in 293 cell に与える非特異的影響

味覚受容体を導入していない F44s#5 を用いて各シクロデキストリンが培養細胞に直接与える影響を評価した。縦軸はベースラインを 100 とした場合の応答強度を示す。

(3) アセサルファム K とシクロデキストリンの混合物の呈味性評価

(2)の結果を受けて, アセサルファム K とシクロデキストリンの混合物の呈味性評価は 0.75 mM アセサルファム K と 0.15 mM シクロデキストリンの混合物で行うこととした。

(a) 官能試験による呈味性評価

0.75 mM アセサルファム K に α , β , γ シクロデキストリンのいずれかを 0.15 mM 混合することにより, アセサルファム K 単独よりも好ましいと感じるかを調べることにシクロデキストリンの呈味改良効果を評価した。その結果, α , β , γ シクロデキストリンいずれを添加した場合にも好ましさには有意な差は発生しなかった (図3)。また, アセサルファム K を連続して口に含んで評価した場合, 先に味わったサンプルが過大に評価されてしまう順序効果が存在することが明らかになった。

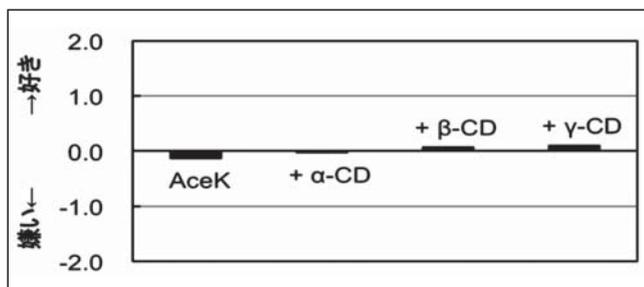


図3 各シクロデキストリン添加によるアセサルファム K の嗜好度

(b) 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞を用いた呈味性評価

苦味受容体発現細胞と甘味受容体発現細胞を用いて α , β , γ シクロデキストリン (各 0.15 mM) に 0.75 mM アセサルファム K を添加した混合液に対する応答を解析した (図4)。甘味受容体発現細胞においては, (1)の結果から予想された通りシクロデキストリンによる非特異応答がアセサルファム K の応答に上乗せされる結果となった。一方, 苦味受容体発現細胞においては, γ シクロデキストリンによる非特異応答がアセサルファム K の応答に上乗せされたが, α と β シクロデキストリンはアセサルファム K の苦味応答を若干低減させる傾向があった。以上の結果は官能試験の結果と大きく異なるものではないが, これらの培養細胞の応答にはばらつきがあることも判明した (考察を参照)。

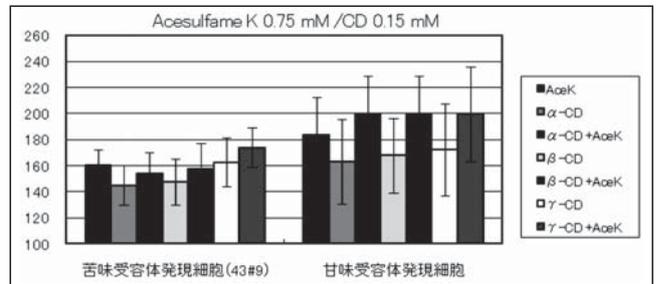


図4 味覚受容体発現細胞を用いたアセサルファム K の甘味および苦味に対するシクロデキストリンの効果の評価

縦軸はベースラインを 100 とした場合の応答強度を示す。

5. 研究から得た結論・考察

培養細胞による評価と官能検査による評価の比較

本研究では, 培養細胞による評価と官能検査による評価を併行して行った。その結果, シクロデキストリンが細胞の非特異応答を引き起こしてしまうこと以外は, 官能検査による結果と培養細胞による結果が大きく食い違うことはなかった。また, 低濃度のシクロデキストリンは甘味を阻害しないことが, 官能検査と培養細胞の両方の系で確認された。苦味に関しては, 培養細胞では α , β シクロデキストリンがアセサルファム K の苦味を低減させる可能性があることが示された。しかしながら, シクロデキストリンが低濃度で細胞の非特異応答を引き起こしてしまったことにより, アセサルファム K の苦味の閾値範囲内でシクロデキストリンの添加による苦味低減効果を解析する実験を行うことができなかったこともあり, この低減効果の信頼性には疑問が残されている。また, アセサルファム K による官能検査は, 連続して行くと甘味が低減し, 苦味が増大する現象が起き, 高濃度での評価が困難であった。よって, 呈味性改良のモデルに適当な物質を, 今後の分子生物学的研究の進展を把握しながら探索していく必要があると考えられた。また, 詳細は「6. 残された問題, 今後の課題」で

触れるが, 本研究により, 培養細胞による評価と官能検査による評価の長所と短所は, お互いの短所を長所が補える点が多いことが示唆された.

6. 残された問題, 今後の課題

本研究を行う過程で, 培養細胞, 官能検査, 双方の長所と短所が具体的に明らかになった.

(1) 培養細胞で行う味覚評価の長所・短所について

長所: i. 比較的多くのサンプルについて短時間で解析が可能である.

ii. 評価する物質は食品グレードでなくもよい.

iii. 評価する物質の量が少なくてもよい.

短所: i. 培養細胞の応答は一定ではなく, 定量性に乏しい. 図3, 5などのエラーバーの大きさが, 応答の不安定さを示している. この解決は今後の課題である.

ii. 実際に口に含んでも傷害を引き起こさない物質であっても, 培養細胞に対して非特異応答を引き起こしてしまうことがある. 本課題では, 無味・無刺激のシクロデキストリンが比較的低濃度で培養細胞に対して非特異応答を引き起こしてしまい, 高濃度で呈味性に与える効果の解析が行えなかった. また, 低 pH も細胞に対して非特異応答を引き起こすことも我々は観察している.

(2) 官能検査の長所・短所について

長所: i. 美味しさを含めた総合的な品質評価を一度に行うことができ, 消費者のニーズに直結した評価方法である.

短所: i. 評価する物質が大量に必要である. また, ヒトが口に入れるため, 評価する物質は食品グレードであることが要求される.

ii. 評価する物質によって, 連続した評価を行うことができない. 本課題ではアセサルファム K を用いたが, 濃度が濃くなると連続刺激効果により甘味が低減して苦味が増大した. このことが原因で複数のサンプルを比較すると先に味わったサンプルが過大に評価される順序効果が発生し, 正確な評価を困難にした.

以上の長所, 短所を考慮に入れると, 双方の長所を活かして両者を併用することが効率のよい科学的な呈味性評価を可能にするものと考えられる.

謝辞: 本研究を遂行するにあたり, 研究助成を賜りました財団法人 東洋食品研究所ならびにご関係の皆様へ深く感謝致します.

参考文献

1) Pronin, A.N., Tang, H., Connor, J., and Keung, W., Identification of Ligands for Two Human Bitter T2R Receptors. *Chem Senses*. **29**, 583-593 (2004).

2) Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., Hofmann, T., Frank, O., Behrens, M., Lewtschenko, T., Slack, J.P., Ward, C.D., and Meyerhof, W. Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J Neurosci*. **24**, 10260-10265 (2004).

3) 東 智, 多々良光敏, 清水敏人: 塩酸セチリジン含有粒子, 特開 2007-269716

4) Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J., and Zuker, C.S. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*. **106**, 381-390 (2001).

5) Ueda, T., Ugawa, S., Yamamura, H., Imaizumi, Y., and Shimada, S. Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *J Neurosci*. **23**, 7376-7380 (2003).