

I 味を受け取る仕組みに関わる分子の同定と その利用による味評価系の開発

1. はじめに

食事はヒトの生命活動に必要な栄養素を摂取するために必要不可欠なものであるが、それだけに留まらず、精神的充足感をもたらすなど生活の質を決定づける要因の一つでもある。また、「味」は本来、口腔内に含んだものが摂取すべき物が否かを判断するために存在しているが、基本的に食べられるものだけが手に入る現代においては、食品の消費の鍵を握る嗜好性を司る重要な要因として位置づけられている。そこで、嗜好性の高い食品を開発するために人工甘味料を始めとする新規味物質の開発や、どのような食品成分の組み合わせが嗜好性を高める味を創出するかについての研究開発が長年行われてきた。これらの過程で味を評価する方法の主流はヒトの感覚を用いた官能評価である。官能評価はヒトの嗜好性を加味して食品丸ごとを評価できる優れた方法であるが、人を媒介として用いるため、必要とする人材や試料の確保などに問題点がある方法でもある。そこで、筆者らは官能評価法を補完する味の評価法の創出を目的として、人が味を受容する分子的な仕組みを培養細胞に再現することにより味を評価する方法を開発し、その利用による新規味物質探索を試みた。具体的には、独自に味覚 DNA チップを開発して味を受け取る器官である味蕾に発現する遺伝子の網羅的取得の試み、および甘味・うま味受容体発現細胞の作製とその利用による味覚増強物質探索を行ったので、その概要を紹介する。

2. 「味」とは何なのか？

味の話の誤解のないようにするのは難しい。その原因の一つは、味の話に関わる言葉の定義がまちまちであることである。そこで、まず、味覚研究で使用される言葉の定義と一般の認識の差について紹介したい。

2.1 「味」、「味覚」言葉の定義について

「味覚」といえばもちろん五感の中の一つを示す感覚である、という定義は科学に携わる方々でなくとも理解できると思われる。しかしながら、「視覚」「嗅覚」など他の感覚と異なり、「味覚」は科学用語の範疇を超えて使用されている。例えば「味覚の秋」「味覚狩り」「郷土の味覚」などで「美味しい農産物」「おいしさ」を指す言葉として利用されているのを頻繁に目にするのではないだろうか。一方、私たちが普段「味」という言葉を使うのは食べ物をお口の中に入れた時の印象であることが多いのではないかと推察する。例えば「味見」とは読んで字のごとく、口に入れた食品の質を味覚を使って評価していると思っ

思われる。しかし、味見をする時に使っている感覚は味覚だけではない。私たちが口に食べ物を入れると味（味覚）、香り（嗅覚）、食感（触覚）、温度（触覚）など様々な感覚がほぼ同時に生じてくる。つまり、私たちが口に入れた食品の質を吟味している時には味覚以外の感覚からの情報が既に入っている、あるいは混在している状態にあり、純粹に味覚からの情報だけを感じている状況はほとんど皆無である。味を扱う研究者、食品開発者はこのような背景を踏まえて語句を使用していく必要がある。

2.2 定義づけられている味「基本味」

「味」に関して科学的にきちんと定義づけられているのが「基本味」である。基本味の概念は「赤」「青」「緑」の組み合わせで色を作り出せるように、味についても特定の要素を混ぜるだけで全ての味を作り出せないかという試みから生まれた定義づけである。基本味は、味蕾という舌を中心とする口腔内にある味を受容する器官によって受容され互いに明確に区別できる味と定義付けされている。この定義に合致するのは現在のところ、甘味、苦味、酸味、塩味、うま味の5つの味である。その他の「味」例えば辛味は、他の味とは明確に区別される味ではあるが、味細胞を介さず味蕾の近傍にある神経の自由終末によって受容されるため基本味ではない。また、うま味の取り扱いには注意を要する。うま味は基本味として1980年頃から国際的に認識され始めた最後の基本味であり、学術用語で「umami」と表記される。umamiの定義は「グルタミン酸が呈し、イノシン酸、グアニル酸などの核酸で増強される味」であり、その他の味を含んでいないがこのことは意外に知られていない。一方、食品添加物を扱う方々の指し示す「旨味」には貝の味であるコハク酸などの有機酸などを始めとする「おいしさ」を呈する味一般が含まれることが多い。このように、使用する人により幅がある原因は「うま味」という言葉は元々「うまい味」すなわち嗜好性を意味する言葉であるため、日本人は学術的な「umami」と嗜好性の表現である「旨味」を混同して使用していることにある。また、グルタミン酸が呈する味「うま味」と、コハク酸を始めとする嗜好性の高い物質の「旨味」にどのような相関があるかについては、科学的にはほとんど解明されていないのが現状である。基本味の受容体については塩味以外は明らかになってきており、うま味についても受容体 T1r1/T1r3 がグルタミン酸を中心とするアミノ酸を受容し、その応答はイノシン酸やグアニル酸により増強されることからうま味受容体であるとされている¹⁾。このような分子レベルの研究を取り入れるならば、単に「うま味」というよりは受容体「T1r1/T1r3を介する味」のように受容体分子の種類で味を分類する方が厳密な定義付けを可能にするかもしれない。

基本味以外の味としては、「辛味」以外には「えぐ味」、「渋味」などの味がある。また、「こく」など人によって認識が異なる味や「厚み」「広がり」「えもいえない

おいしさ」など、「風味」とも言われ「味」であるかどうかが明確でない要素も存在している。本稿では、基本味の発生する仕組みを中心に話を進めるが、基本味以外の味受容についても分子レベルでの研究が進んできており、辛味など味質によっては本稿で紹介する様な細胞を用いた味の評価法を展開することが可能である。

2.3 味物質が味として認識されるまでの道筋

さて、味物質と味覚受容機構の話をする前に、まず味物質が口腔内に入ってから味として認識されるにいたるまでの経路について紹介をしたい。食べ物の中の味を呈する物質、味物質は舌を中心とする口腔内に点在する味蕾という器官の中の味細胞に結合する（図1, 2）。味蕾は数十個の細長い味細胞と球状の基底細胞から構成される。味細胞はその組織学的形状から3種類に分類され、さらに甘味を受容する細胞、苦味を受容する細胞というように味感受性により細分化される。味細胞には味覚受容体が存在し、味物質と結合するとその情報が細胞内に伝達されて細胞が興奮し、味神経に味を受容した信号が伝えられるというのが、味覚受容伝達機構の初期段階である。その後、味神経に伝えられた情報は次々と神経間に伝達され、大脳の味覚野で味と認識される（図2）。その伝達経路の過程で味質間、嗅覚など他の感覚などとの相互作用が起こり、最終的な脳における味としての認識へと至る。

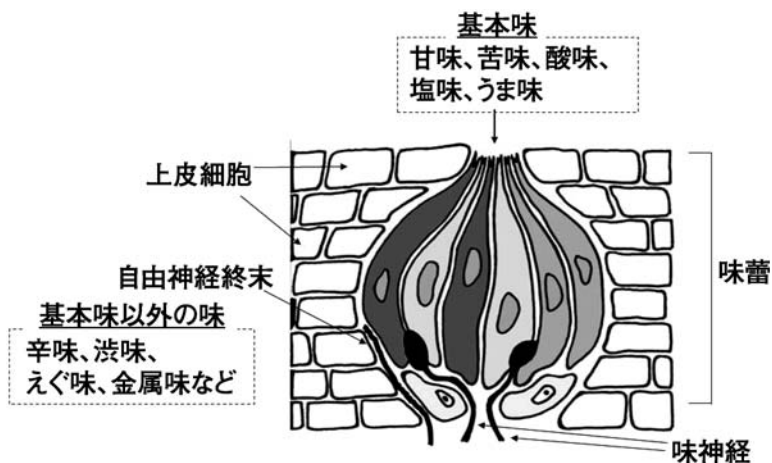


図1 味を受容する器官である味蕾の模式図

基本味は味蕾の頭頂部にある味孔で受容される。味神経は味蕾を構成する味細胞とシナプス結合して味細胞からの情報を伝達するが、自由神経終末はそれ自体が刺激を受容する。

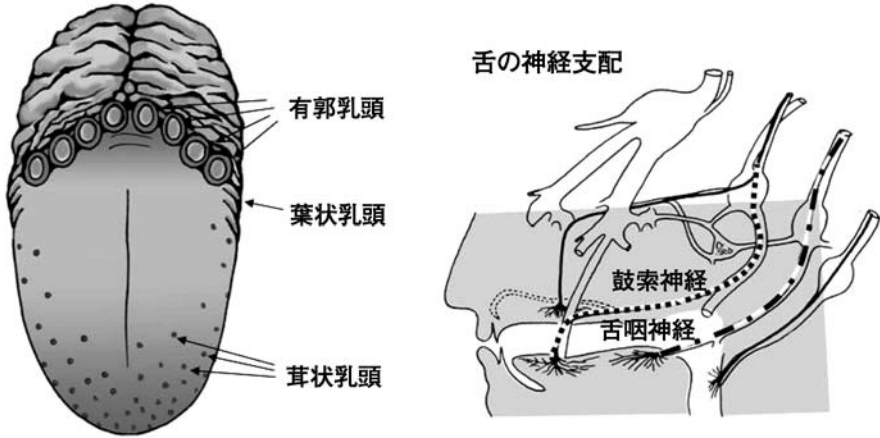


図 2 舌と舌の神経支配の模式図

味蕾は舌の有郭、葉状、茸状乳頭中に存在する。また、舌の基部（有郭乳頭、葉状乳頭）は舌咽神経に支配され、先端（茸状乳頭）は鼓索神経に支配されている。これらの神経を介して味覚情報は孤束核を経由し、大脳の味覚野に伝達される。

3. なぜ分子を利用した味の評価法が必要なのか

味を受け取る仕組みが研究される以前から、新しい味物質は食経験や偶然から発見されてきた。食経験を元に同定された味物質として代表的なのはうま味物質グルタミン酸ナトリウムである。グルタミン酸ナトリウムは今から約 100 年前、東京大学の池田菊苗博士が、湯豆腐の出汁の美味しさの原因物質を同定したいと考え、約 30 kg もの昆布の出汁から「うま味物質」として見出した。同様の手法を用いて、その後、経節からうま味を引き立てるイノシン酸が見出されている。これらのうま味関連物質と同様に甘味物質も見出されている。低カロリー飲料に使用されているステビオシドはステビアという植物から抽出することにより見出されたものである。一方、近年よく使用されているアスパルテーム、アセサルファム K などの人工甘味料は、実験中に指を舐めたなど偶然によって発見されている。

以上の味物質の発見は食経験であれ偶然であれ、実際に口に入れて味を評価することだけで、物質の選抜を行っていることになる。その一方で、医薬品開発など生体を制御する物質の探索は作用点となる分子機構の解明とその利用により大規模に展開されている。そこで、筆者らは味物質の開発も医薬品開発のような方法を取れないかと考えた。医薬品開発では、ある特定の生理現象を制御することを目的に、しばしば、その現象を担う分子を標的に物質開発が行われる（図 3）。その中で、対象とする現象が起こる分子機構をまず明らかにし、標的とする分子

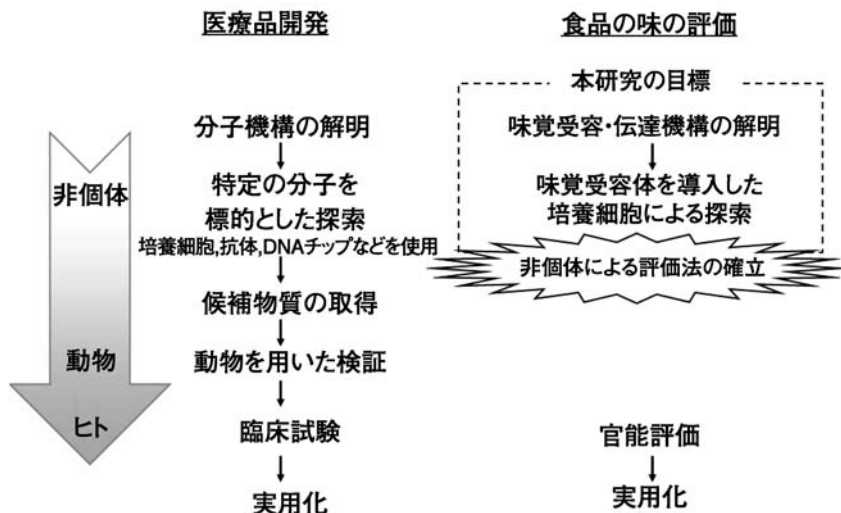


図 3 味覚受容・伝達機構を利用した食品の呈味性評価系の概念図
物質探索を例にとり、筆者らが目指した医薬品開発の方法を応用した食品の味の評価系
開発の概略を示した。

を設定し、その分子に作用する物質を培養細胞や抗体、DNAチップなどのツールを用いて探索するのが、開発の第一段階、すなわち候補物質の絞り込みである。候補物質はその後、マウスなどの動物を用いた検討、最終的にはヒトによる臨床試験を経て実用化への運びとなる。一方、官能評価を主流とする味物質評価をこのスキームに当てはめてみるとどうであろう。あまたある物質に対していきなり臨床試験を行うようなものではないだろうか。そこで、味物質の探索についても味を受容する仕組みを明らかにしてその仕組みを培養細胞に再現することができれば、味物質の探索において候補物質の絞り込みに利用できると考えた。

以上を踏まえ、本稿で紹介する内容は大きく二つである。一つは味覚DNAチップとその利用による味蕾特異的分子の取得とその機能解析であり、もう一つは味覚受容体の利用による味評価系の開発とその利用による新規味物質探索である。

4. 味覚受容関連遺伝子の単離と同定

4.1 味覚DNAチップの作製と利用による味蕾特異的発現候補遺伝子の取得

筆者らはまず、味を受容する仕組み、すなわち味覚受容関連遺伝子の同定を試みた。筆者らが味覚の研究を始めた当初(1999年)は、基本味(甘・苦・酸・塩・うま味)の受容体は一つも明らかにされていなかった。そこで、筆者らはマウスの味感受性の差の原因遺伝子の解明とマウスの味受容器である味蕾に特異的に発

現している遺伝子の網羅的探索の二つの方法を行うことで味覚受容関連遺伝子を取得しようと考えた。まず、マウスの甘味感受性の差の原因遺伝子座である Sac 遺伝子座の近傍に味細胞特異的に発現する G タンパク質共役型受容体 T1r1, T1r2 が位置することを手がかりとして、2001 年に Sac 遺伝子座に位置する G タンパク質共役型受容体 T1r3 を発見した²⁾。その一方で T1r3 の同定に併行して cDNA マイクロアレイを用いた味蕾特異的に発現する遺伝子の網羅的探索を試みた。cDNA マイクロアレイ法とは、数千から数万の遺伝子 (cDNA) をスライドガラスなどの上に固定化した DNA チップを用いて特定の組織におけるそれら遺伝子の発現を検出する方法である。現在では、生体に発現している mRNA のほとんどを網羅するマイクロアレイが市販され、汎用されるようになったが、研究を始めた当初は、マイクロアレイに固定されている遺伝子の種類は限られており、脳などの主要な組織に発現している遺伝子を取り扱うものしか市販されていなかった。当然舌のわずかな部分を占める味蕾に対する DNA チップは存在しない。そこで、独自に cDNA マイクロアレイを作製して味蕾特異的に発現する遺伝子の網羅的な取得を行った³⁾。

4.2 遺伝子発現様式の解析による取得遺伝子の機能予測

味蕾特異的遺伝子候補として選抜した遺伝子については組織発現様式の解析を行って味蕾や舌上皮における発現を解析した。マウス有郭乳頭の切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法を行ったところ、発現量が低いため味蕾における発現を確認できない遺伝子や味蕾だけでなく上皮にも発現が確認される遺伝子などが複数確認された。最終的には味蕾特異的に発現する遺伝子を 37 種類得ることに成功した (図 4)。

取得した味蕾特異的に発現する遺伝子に関して組織発現様式の解析を行い機能の予測を行った。味蕾特異的に発現する遺伝子は、味蕾全体に発現する遺伝子と、特定の味細胞に発現する遺伝子に分類される。味蕾は多様な細胞から構成され、受容体の発現など細胞ごとに遺伝子発現様式が異なることが知られていることから、特定の味細胞に発現する遺伝子に関しては、既知の味覚関連遺伝子との共発現様式を調べることによりその機能を予測することが出来る。また、近年は、ほとんどの遺伝子が何らかの遺伝子情報を有していることから、バイオインフォマティクスを利用した遺伝子機能の予測も重要であり、両者を融合させた機能解析を行っていくのが効果的である (図 5)。

そこで、まず、取得遺伝子の内、特定の味細胞に発現する遺伝子について、二重標識 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて既知の味覚関連遺伝子との共発現様式を解析した。その結果、甘味・うま味受容体 T1r3 と共発現して甘味あるいはうま味に関与することが予想される遺伝子 $\text{G}\alpha 14$ 、甘味・苦味・うま味情報伝達に共通して関与する Trpm5⁵⁾ と共発現する遺伝子 FXVD6, Jaw1 など

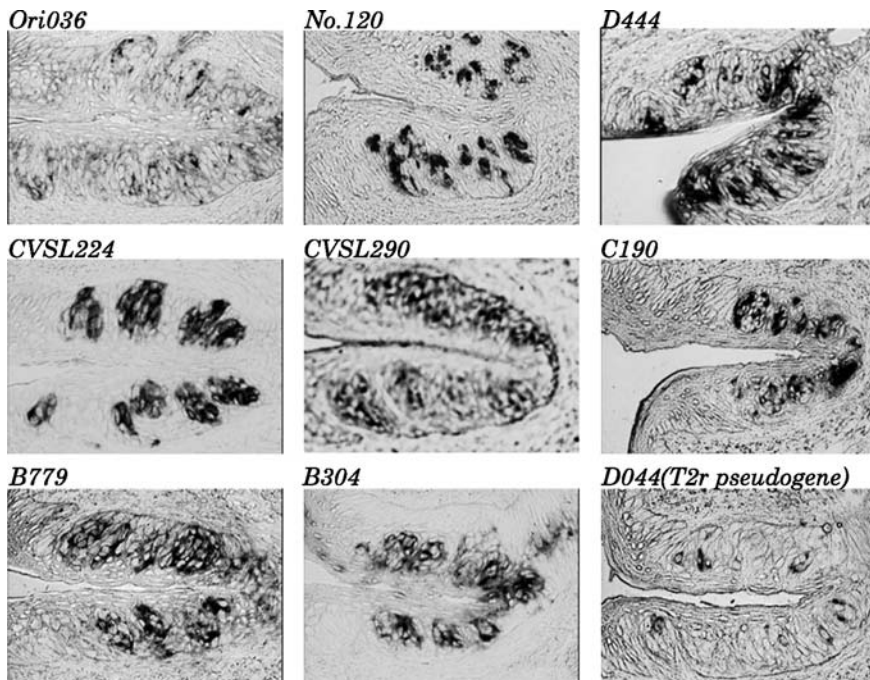


図 4 味覚 DNA チップを利用して取得した味蕾特異的遺伝子の例
 取得した遺伝子についてマウス舌有郭乳頭上皮の味蕾における発現様式を示す。黒く染色されている箇所が遺伝子が発現している細胞を示す。各写真左上の記号は著者らが暫定的に付けた遺伝子番号である。

見出した。また、これらのカテゴリーに属さず、どの遺伝子とも部分的に共発現する遺伝子も複数見出している。これらの遺伝子の機能予測を行うには新たな味細胞のマーカ-となる遺伝子の知見が必要である。

4.3 取得遺伝子の機能解析

取得遺伝子に関しては、さらに詳細な遺伝子発現様式の解析、他の分子との相互作用の解析などを現在も進めており、味覚情報伝達に重要だと考えられる分子を複数見出している。

一つは味覚受容体と結合する可能性がある G タンパク質 $G\alpha_{14}$ である⁶⁾。 $G\alpha_{14}$ は口腔内の部位により発現に差があり、舌の奥の有郭乳頭、側部の葉状乳頭では甘味、うま味受容体ファミリー $T1rs$ と共発現し、特に、甘味受容体 $T1r2/T1r3$ とほぼ発現が重なる。一方、舌の先端に点在する茸状乳頭、軟口蓋の味蕾には発

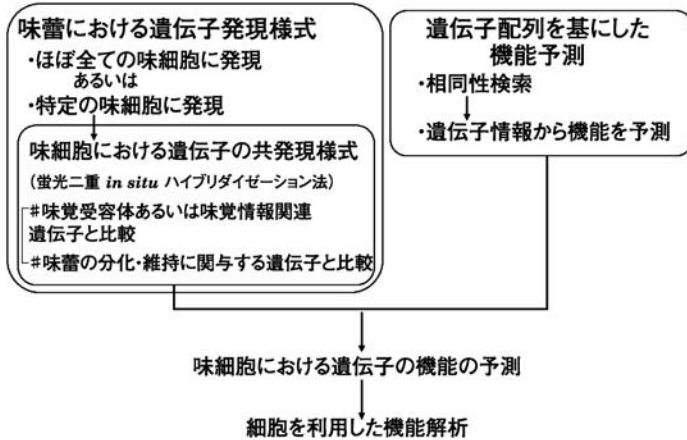


図 5 味蕾特異的発現遺伝子の機能予測および機能解析の概略

現を観察されない。よって、舌の奥で甘味受容に関与する可能性を筆者らは期待しており、その生物学的意義とともに現在検討中である。

もう一つは細胞内のナトリウム、カリウム濃度制御に重要な役割を持つポンプ Na, K-ATPase のレギュレーター FXYP6 である。筆者らは、FXYP6 と共に機能する Na, K-ATPase のサブタイプを探した結果、Na, K ATPase α サブユニット $\alpha 1$ と β サブユニット $\beta 1$ が FXYP6 と共発現することを見出した。これらはいずれも甘味、苦味、うま味受容体と同じ細胞に存在していることから、甘味、苦味、うま味情報伝達には、その他の味の情報伝達とは異なるナトリウム、カリウム濃度制御系があると考えており、ナトリウム、カリウムの細胞内イオン動態が甘味、苦味、うま味の強さなどに影響する可能性も視野に入れて今後の研究展開を図っている。

5. 味覚受容体を利用した食品成分の呈味性評価系の開発

5.1 培養細胞を用いた味応答の測定方法について

筆者らは味覚受容体関連遺伝子の探索と併行して、味覚受容体分子の食品開発への応用を試みた。すなわち、味覚受容体を発現している培養細胞を作製し、食品成分の添加刺激の結果得られた応答を解析することで食品成分の呈味性を評価することを計画した。味覚受容体を用いた呈味性の解析は国内外で広く行われるようになってきており、その大部分が培養細胞であるヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞を用いている。HEK293 細胞はそのままでは味刺激に対して応答しないが、味覚受容体などの分子を導入することにより、味覚刺激に対して細胞内カルシウム

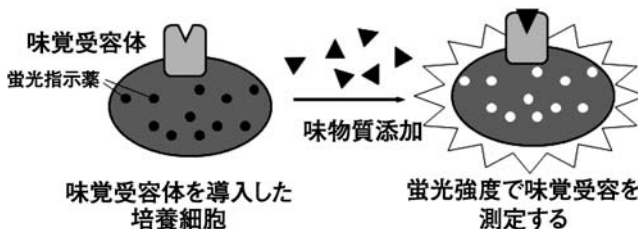


図 6 受容体を培養細胞に発現させて味覚応答測定する方法のイメージ図

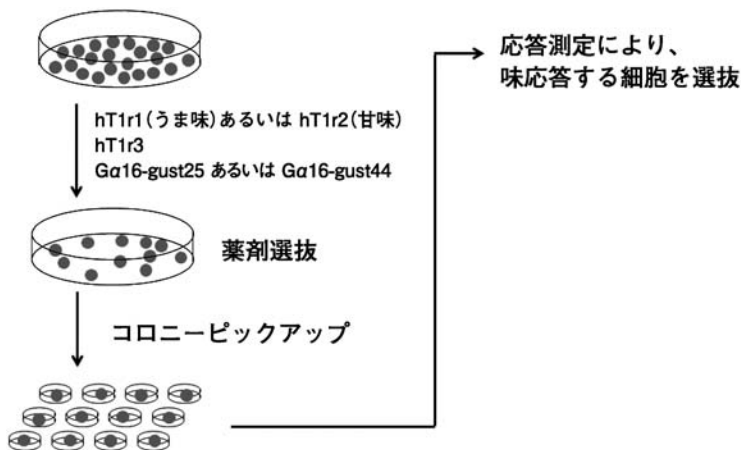


図 7 味覚受容体を恒常的に発現する細胞作製の概略図

ムイオン濃度が上昇するというかたちで応答するようになる。そして、作製した培養細胞内にカルシウムイオンの蛍光指示薬を導入し細胞内カルシウムイオンの濃度変化による蛍光量の変化を測定するカルシウムイメージング法によって味応答を観察することができる（図6）。

5.2 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞の作製

このような方法を用いて食品成分の呈味性を評価することを目的に、まず、筆者らが2001年に同定した甘味・うま味受容体 T1r3 を利用して、うま味受容体 (T1r1/T1r3) および甘味受容体 (T1r2/T1r3)⁷⁾ を恒常的に発現する細胞の作製を行った。手順を図7に示す。味覚受容体の発現プラスミドを構築し、細胞内に導入したのち、発現プラスミドに対応した薬剤選抜を行った。培養細胞は種類が同じであっても、細胞による応答能の違いが頻繁に観察される。そこで、薬剤選抜

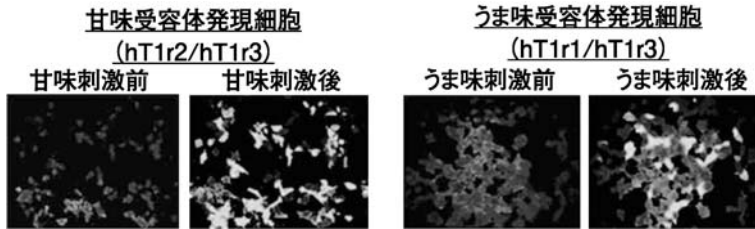


図 8 作製した甘味あるいはうま味受容体を恒常的に発現する細胞
図はそれぞれ味刺激前後の細胞応答強度を示す。白色になるほど細胞応答が強い。

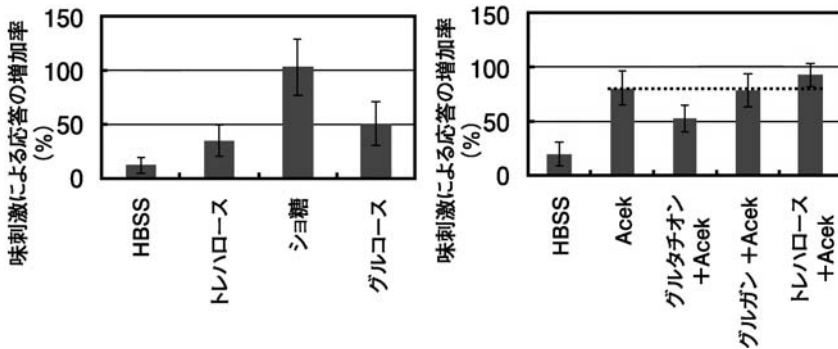


図 9 食品成分に対する甘味受容体発現細胞の応答

左：糖に対する応答解析例

右：人工甘味料アセサルファム K に食品成分を添加した場合の甘味応答強度変化の解析例

後の培養細胞を数十種類単離して味覚応答を測定し、応答能の高い細胞を呈味性評価に用いる細胞とした。現在、甘味受容体発現細胞とうま味受容体発現細胞を保有している（図 8）。

5.3 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞の利用による食品成分の評価

筆者らは作製した甘味受容体を恒常的に発現する細胞を用いて、様々な食品成分の評価を開始している。その中の一つは糖の甘味度評価である（図 9）。筆者らの保有する甘味受容体発現細胞は 50 mM（1.7%（w/v））のショ糖に対して強い応答を観察することが可能である。そこで、同じ 50 mM の糖（グルコース、トレハロース）について応答強度を測定、比較してみた。その結果、甘味強度はショ糖 >> グルコース > トレハロースであり、官能評価と呼応することが示された。また、食品中の他の成分が甘味応答にもたらす影響についても検討を開始してい

る。今のところ、甘味応答に明瞭な影響を与える食品成分を見出すには至っていないが、今後他の成分に関する解析と官能評価との相関について検討していきたいと考えている。

5.4 味覚受容体を恒常的に発現する培養細胞の利用による呈味増強物質の探索

味覚受容体を発現する培養細胞は呈味性の評価に有効であるが、微妙な味の差を明らかにするのが難しいこと、味の強さと時間の関係性を評価できないこと、自家蛍光や細胞傷害性を有するサンプルを評価できないといった制限があることが短所である。一方、培養細胞を用いた評価法の長所は膨大な試料を比較的短時間で評価できることと、評価に必要なサンプルの量が少なく済むこと、評価に関わる人が少人数で済むことである。これらを考慮すると、味覚受容体発現細胞がもっとも効力を発揮するのが新規味物質を探索するためのツールとしての利用であろう。そこで、新規味物質の探索を試みることとし、まず最初に探索系の構築を検討した。実験室レベルの装置を探索という産業側に一歩踏み込んだシステムへ発展させるためには、細胞応答測定効率化を図る必要が生じた。それまでの細胞応答測定は、1枚のシャーレに播種した細胞に対して一つの味物質を灌流刺激し、顕微鏡を用いて蛍光量の変化を測定していた。そこで、幅 $500\mu\text{m}$ 以下の微小な流路を作製し、その流路を顕微鏡の視野内に8本集積させることで一度に8個の試料を灌流して連続的に評価できるセルチップを開発した(図10)。その結果、流路に播種した細胞に連続16回の灌流刺激を行うことができ、96ウェルプレートに分注した試料を連続的に評価することが可能になった。また、微小な流

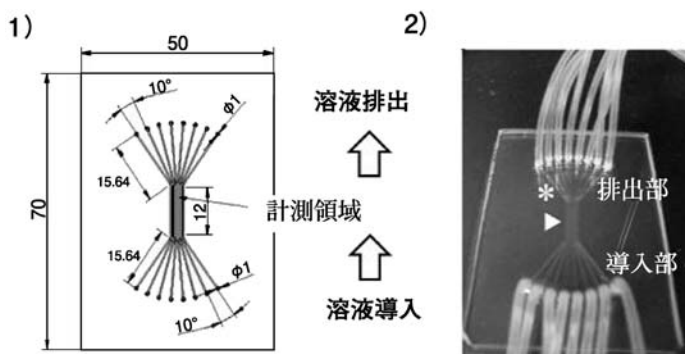


図10 開発した多検体微量試料を連続的・並行的に評価できるセルチップ

- 1) プロトタイプセルチップの設計図
- 2) プロトタイプセルチップ。実際に探索に使用したセルチップはチューブが直接接続されていない。

解決すべき問題点：探索の効率性

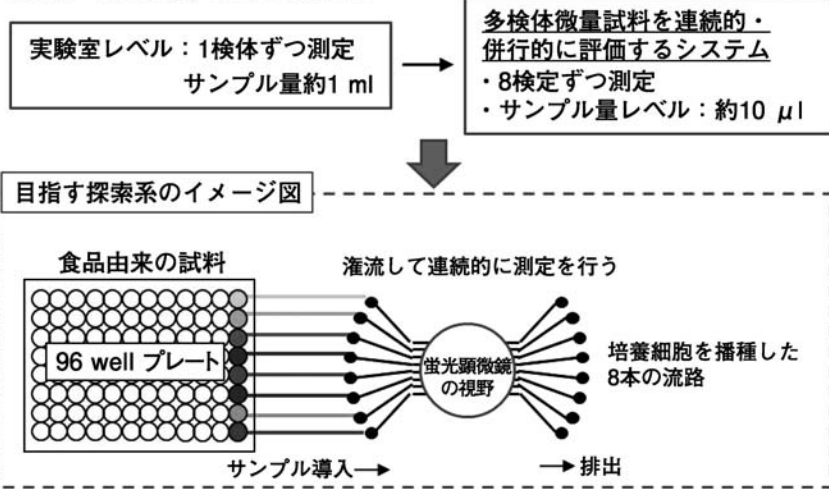


図 11 目指す探索系のイメージ図

路を利用することで、評価する試料の量はわずか数 μ l で済むことも明らかになった。そこで、このセルチップを組み込んだ呈味物質探索装置を利用して呈味増強物質の探索を行うこととした（図 11）。

探索のターゲットとする味としてうま味を選択した。うま味は食品に心地よい味を付加することが知られ、うま味物質やうま味増強物質が食品に多用されている。代表的なうま味物質としてグルタミン酸ナトリウム、うま味増強物質としてイノシン酸ナトリウムが知られているが、何れもナトリウム塩である。ナトリウム塩の過剰摂取は高血圧を始めとした生活習慣病の発症への関与が示唆されており適正な摂取が呼びかけられているが、我が国では過剰摂取になっている。そこで、ヒトうま味受容体 hT1r1/hT1r3 を利用した系を開発しナトリウム塩ではないうま味増強物質を探索することとした。探索源としては「日本発」の研究であることを意識し、地域特産品を中心に食品を収集して食品成分ライブラリを作製した。そして、ヒトうま味受容体 hT1r1/hT1r3 を発現させた培養細胞を組み込んだ呈味物質探索装置を利用してうま味増強物質の探索を行った。その結果、今までにその効果を知られていないうま味増強物質を複数同定することに成功した。現在、同定した物質の諸性質を検討中である。

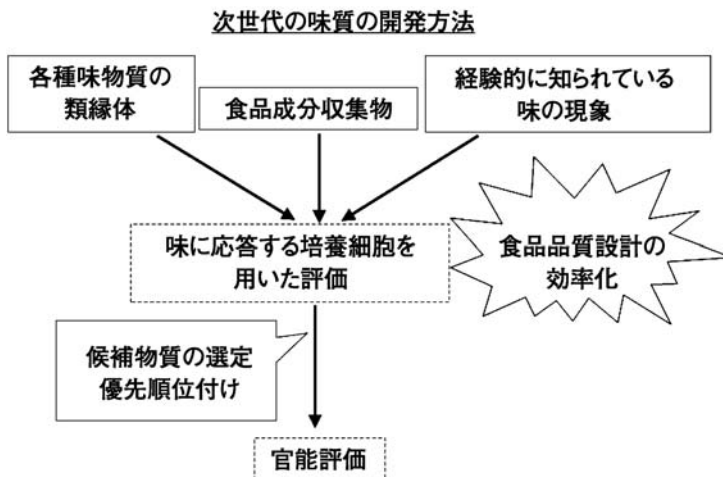


図 12 味覚受容体を発現する細胞を利用した味質の開発方法の概念図

6. おわりに

以上の研究によって、味覚受容関連遺伝子の探索・同定という基礎研究を、食品成分からの呈味増強物質の探索・同定といった応用研究へと展開した。本研究では、うま味に照準を絞った研究を行ったが、同様の手法は他の味にも適用可能である。今後、本研究の成果を多数の味の評価に応用していくことにより、本法が官能評価を補完する次世代型の味覚評価法として利用されていくことが期待される（図 12）。また、本研究では膨大な食品成分を効率よく評価する方法にも成功した。よって、食品成分の機能評価という観点からも新たな評価のアプローチを示すことができたのではないかと考えている。

（食品機能研究領域 食認知科学ユニット 日下部 裕子）

参考文献

- 1) Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J. and Zuker, C. S. : An amino-acid taste receptor. *Nature*, **416**, 199-202 (2002)
- 2) Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y. and Hino, A. : Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 236-242 (2001)
- 3) 進藤洋一郎, 日下部裕子, 日野明寛, 「味覚研究への DNA チップの応用」日本味と匂学会誌, **10**, 103-108 (2003)

- 4) Dulac, C. : Cloning of genes from single neurons. *Curr Top Dev Biol*, **36**, 245–258 (1998)
- 5) Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S. and Ryba, N.J. : Coding of sweet, bitter, and umami tastes : different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, **112**, 293–301 (2003)
- 6) Shindo, Y., Miura, H., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Ninomiya, Y., Hino, A., Kanda, T. and Kusakabe, Y. : G alpha14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**, 504–508 (2008)
- 7) 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)