

嗜好性を加味した塩味の特性評価法の開発とその利用

日下部 裕子, 河合 崇行

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

概要 食塩は、食品に「おいしさ」を付与するために必要不可欠である。しかしながら、その過剰摂取は、高血圧などの生活習慣病発症の遠因とも言われており摂取低減が求められている。このような背景から長年食塩の代替物の開発が行われてきたが、食塩と同様の嗜好性を保有するものはほとんど得られていない。長年にわたる塩味受容の研究から、塩味には少なくとも嗜好性の高い味と低い味の二種類があることが予想されている。そこで、我々は、塩味の評価を「嗜好性」という観点から動物行動学的手法と分子生理学的手法を用いて行うことを目的に研究を行った。まず、動物行動学的観点から塩味の評価を行った。塩化ナトリウムの摂取を制限し利尿薬を摂取させることによりヒトと同様の塩味嗜好性を有するマウスを作製し、そのマウスが溶液を舐める回数(リック)から塩化カリウムおよび塩化リチウムの塩味を評価した。その結果、嗜好性が低いことで知られている塩化カリウムを塩化ナトリウムに添加してもリック回数が上昇しない、すなわち嗜好性が增强しないことが示された。一方、塩化リチウムを塩化ナトリウムに添加するとリック回数が上昇し、嗜好性が增强することが示された。さらに、塩味增强効果があることが知られているグリシンエチルエステルについて、同様の解析を行ったところ、リック数の増加が観察され、嗜好性が增强されていることが観察された。また、これらの動物行動学的解析を行うのと併行して、塩味の嗜好性を担うとされているナトリウムチャネルである ENaC を発現させた培養細胞を用いた塩味評価方法の確立を試みた。培養細胞を用いた評価方法は、食品成分の塩味評価を簡便に行うことを目標とし、実験手法として比較的汎用性の高い培養細胞と蛍光イメージング(ナトリウムイメージング)を利用した評価方法の開発を試みた。ENaC の機能解析の知見として、培養細胞を利用した蛍光イメージング手法で行われている例が少ないため、まず始めに発現させる培養細胞、ENaC 遺伝子の導入方法など諸条件の検討を行った。その結果、ヒト ENaC の α 、 β 、 γ サブユニット遺伝子を CHO 細胞に一過的に発現することにより、ナトリウムイメージング法でヒト ENaC の開口、すなわち塩味受容を可視化できることが明らかになった。また、グリシンエチルエステルによる添加では、塩化ナトリウムによるヒト ENaC の開口の増加を観察出来なかった。これら動物行動学的手法と培養細胞による評価の結果から、グリシンエチルエステルは ENaC ではなく、別の分子の作用する可能性があることが示された。また、以上の解析を通して、培養細胞を用いた評価方法には安定性、定量性、効率性などに解決すべき問題が残されていることも示された。

1. 研究目的

食品を「おいしく」食べるためには食塩による塩味が不可欠である。一方、高血圧など生活習慣病の予防に向けて塩分摂取量を減らすことが求められており、食塩の代替物の開発が長年行われているが、食塩と同様に嗜好性の高い代替物はほとんど得られていない。塩味は食塩つまり塩化ナトリウムが引き起こす味だけでなく塩化カリウムなどをはじめとする塩化物も含まれ、塩味には塩化ナトリウム

によって引き起こされる味と塩化ナトリウムと塩化カリウムの両方によって引き起こされる味の少なくとも二つの種類があると予想されている。現在、減塩を目的とした調味料の多くに塩化カリウムが含まれているが、嗜好性は通常のものに比較して低いといわざるを得ない。そこで、我々は塩味受容機構の内、塩化ナトリウムが引き起こす味が嗜好性の高い塩味であると考え、この受容機構に特化した評価系の開発を目指した。手法としては、塩の嗜好性が高

いヒトと同様の生理状態のマウスを用いた動物行動学的手法を主に行った。ヒトは食塩に対する嗜好性が高い。その理由としては汗をはじめとした体外へのナトリウムイオン排出量が多いことが挙げられる。一方、マウスは体のほとんどが毛に覆われているため、汗をかかず、ヒトと比較して食塩に対する嗜好性が低い。申請者らはこのことを踏まえて利尿剤を用いてヒトと同様の塩味嗜好性を持つマウスの飼育条件を見出した。そこで、このマウスを用いて、食塩に食塩以外の物質(本研究ではグリシンエチルエステル)を加えることによる嗜好性の変化を解析することとした。動物行動学的手法では好ましい味ほど舐める回数が増えることを利用して味を評価するため、必然的に嗜好性を加味した評価が行えることが利点である。また、本年度に入って塩味受容体である可能性が極めて高いことが明らかになった ENaC チャネル¹⁾を導入した培養細胞を用いた評価も行った。ENaC はナトリウムを通すチャネルであることから、細胞内のナトリウムイオン変動を蛍光指示薬で観察するナトリウムイメージング法を用いた解析法の確立とその利用を目指した。

2. 研究方法

2. 1 動物行動学的手法を用いた塩味増強物質の評価

2. 1. 1 実験材料

5週齢の C57Bl/6N 系統雄性マウスを購入し、1週間予備飼育したのち実験に供した。ナトリウム制限中には、ナトリウムを極力含まない餌として、オリエンタル酵母社製 AIN-93G 配合試料の塩化ナトリウム分をスクロースに置き換えた粉餌作成し、それに利尿薬スピロラクソンを 300 mg/kg となるように添加したものをナトリウム制限食として与えた。対照群には、スピロラクソンの代わりに塩化ナトリウムを 2.6 g/kg 添加したものを与えた。飼養水には脱イオン水を用いた。スクロース、塩化ナトリウム、塩化リチウム、塩化カリウム、水酸化カリウム(いずれも試薬特級グレード)はナカライ社、安息香酸デナトニウム、スピロラクソン(純度 97% 以上)はシグマ社、グリシンエチルエステルは国産化学社より購入した。

2. 1. 2 動物飼育

マウスは 15 x 25 x 10 cm の金属製ケージ内で4匹ずつ群飼いにし、庫内温度 23±1℃、湿度 45±5%、6~18 時暗期、18~6 時明期の 24 時間明暗サイクルの飼育庫内で

維持した。純パルプ製の床敷を用い、2~3 日に一度交換した。予備飼育中およびナトリウム制限準備期間には水を自由摂取させた。リックレーニング中および塩味強度測定期間には毎日 4 時間のみ水を与えた。

2. 1. 3 マウスのリックレーニング

4 時間水供与ののち 3 時間以上絶水させたマウスを 5 x 15 mm の穴を開けた 12 x 20 x 10 cm の透明ポリカーボネート製ケージに移して、リック測定装置にセットした。金属製の玉付き吸い口のついた容器に 5% スクロース溶液を入れて穴の先から提示し、穴から舌を突き出して溶液を飲むように訓練した。1、2 日目は舐め始めてから 10 分間提示した。3、4 日目は舐め始めてから 30 秒提示するセッションを 10 回連続で行った。5 日目以降は 4 x 15 mm の穴を開けた不透明ポリカーボネート製ケージを用いて 2% スクロース溶液・0.4 mM 安息香酸デナトニウム溶液・水を順に提示し、味質による摂取の違いが安定して見られるまで繰り返した。

2. 1. 4 マウスに対するナトリウム制限準備

実験群にはナトリウム制限食を粉餌で与えた状態で 2~3 週間飼育した。

2. 1. 5 行動学実験塩味強度測定

4 時間水供与ののち 3 時間以上絶水させたマウスを 4 x 15 mm の穴を開けた不透明ポリカーボネート製ケージに移して、リック測定装置にセットした。金属製の玉付き吸い口のついた容器に 15、30、45、60 mM 塩化ナトリウム溶液および脱イオン水を入れて穴の先から提示した。また、塩化ナトリウム溶液に試料を混和した試験液を調製し、同様に提示した。提示溶液をマウスが舐め始めてから 10 秒間の舐めた回数(リック数)を測定した。直前に摂取した溶液の影響を小さくするため、各溶液の間に脱イオン水を提示した上、日毎に提示順を替えて測定した。塩化ナトリウム溶液および試験液を一度ずつ提示する実験を 1 セッションとし、一匹あたり一日 3 セッション連続で行った。

2. 1. 6 行動学実験解析方法

塩味に対する欲求度を適切にコントロールするため、解析利用データに様々な制限条件を設定した。水に対するリック数が 25 以上の場合、そのセッション中は味に関係なく摂取行動を取った可能性が高いので、セッションごと解析ソースから排除した。スピロラクソン入りの餌を与えたナトリウム制限群と対照群との比較する解析では、塩化ナ

トリウム溶液に対するリック数に制限をつけずに全て有効なデータとした。試料を混和した試験液の塩味強度解析では、60 mM 塩化ナトリウム溶液に対するリック数が 40 未満の場合、そのセッション中は塩味摂取に対するモチベーションが低い状態での摂取行動であった可能性が高いので、セッションごと解析ソースから排除した。予備実験により、塩味強度をより正確に表現できるときの 15 mM 塩化ナトリウム溶液に対するリック数は 40 以下、30 mM 塩化ナトリウム溶液に対するリック数は 10~55、45 mM 塩化ナトリウム溶液に対するリック数は 25~70 であることがわかっていたので、それを逸脱するリック数を示した場合は、セッションごと解析ソースから排除した。まったく舐めなかったとき(リック数 0)についてはそのデータのみ解析ソースから排除した。

2. 2 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞の作製

2. 2. 1 遺伝子材料

ヒト ENaC α 、 β 、 γ 遺伝子：それぞれヒト腎臓 cDNA (クロンテック社) を鋳型に、遺伝子情報を基に PCR を行い全長を得た。

発現ベクター：ヒト ENaC α 、 β 、 γ 遺伝子を恒常的に発現する培養細胞の作製を試みたため、複数の発現ベクター (pEF-DEST51, pcDNA5/FRT (以上インビトロジェン社)、pEAK10 (Edge Biosystems 社) を用いた。また、発現を確認するために N 端に蛍光タンパク GFP タグを付加するベクター pcDNA6.2/N-EmGFP-DEST を用いた。

2. 2. 2 培養細胞および培養条件

培養細胞：HEK293 細胞、CHO 細胞を用いて、ENaC 発現および応答解析への適性を比較した。培養にはウシ胎児血清 (invitrogen 社) を 10% 加えた DMEM 培地 (invitrogen 社) および ENaC のチャネル機能を阻害するアミロライド (30 μ M) を用いた。

遺伝子導入：ENaC 遺伝子の発現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。

恒常的に ENaC を発現する細胞の選抜：ENaC α 、 β 、 γ の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 μ g/ml, Blastcidin 10 μ g/ml, Puromycin 1 μ g/ml) を添加し、薬剤耐性のある細胞を単離した。

2. 2. 3 ナトリウムイメージング

ENaC による塩味応答は細胞内ナトリウムイオン濃度変化を蛍光色素の発光量で測定するナトリウムイメージング法を用いた。蛍光強度変化の測定および解析には AQUACOSMOS イメージングシステム (浜松ホトニクス社) を用いて行った。ナトリウムイオンを検出する指示薬としては CoroNa Red (invitrogen 社) を用い。また、測定はハンクス緩衝液中に含まれる塩化ナトリウムを N-メチル-D-グルカミン (NMDG) で置換した溶液を用い、塩味刺激はこの溶液の NMDG と NaCl の量比を変化させることで行った。細胞内にナトリウムイオンを強制的に流入させるためのイオノフォアとしてグラミシジンおよびモネンシン (いずれも sigma 社) を用いた。

3. 研究結果

3. 1 動物行動学的手法を用いた塩味増強物質の評価

塩味溶液の塩味強度、嗜好強度を再現性よく数値化するために、マウスの行動学に基づいた実験系を立ち上げた。短時間で多種の味強度を測定できるリック試験を行った結果、ナトリウム制限群では、0、15、30、45、60 mM 塩化ナトリウム溶液に対する 10 秒間リック数が濃度とほぼ直線的な正の相関を示したが、ナトリウムが充足している対照群では、塩化ナトリウム濃度増加にともなうリック数の変化は認められなかった (Fig. 1-a)。ナトリウムと同じ第 1 族に属するリチウム、カリウムの塩化物を添加してリック数の変化を調べた。塩化リチウムを添加した場合は、15、30 mM いずれの試験液においても、リック数の増加が認められた (Fig. 1-b, c)。このことは、塩化リチウムの添加により塩味が増強していることを示唆している。また、増強の大きさは、15 mM の添加で 10 mM 塩化ナトリウム相当、30 mM の添加で 15~25 mM 塩化ナトリウム相当であることが図より読み取ることができる。塩化カリウムを添加した場合は、15、30、45 mM いずれの試験液においても、リック数の顕著な増減は認められなかった (Fig. 1-d, e, f)。このことは、塩化カリウムの添加によっては塩味の増強が期待できないことを示唆している。この濃度域において、減塩のために塩化カリウムに置き換える効果は薄いと考えられる。グリシンエチルエステルは、醤油の中から見出された塩味増強候補物質である²⁾。グリシンエチルエステルを添加した場合は、30、45 mM いずれの試験液においても、リック

数の増加が認められた (Fig. 1-g, h)。このことは、グリシンエチルエステルの添加により塩味が増強していることを示唆している。また、増強の大きさは、30 mM の添加で 10 mM 塩化ナトリウム相当、30 mM の添加で 10~15 mM 塩化ナトリウム相当であることが図より読み取ることができる。しかし、45 mM 添加では、塩化ナトリウムとの混合比によって増強の大きさが変化する可能性が示された。

3. 2 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞の作製

塩味受容体候補である ENaC はナトリウムイオンを通すチャネルである。ENaC の機能解析はチャネルを通るイオンの量を電氣的に解析する電気生理学的解析が主に行われており、その際には ENaC を導入したアフリカツメガエルの卵母細胞を利用することが多い。この方法は、精度の良い実験手法であるが、実験材料である卵母細胞の確保や電気生理学的手法の汎用性に制限がある。そこで、我々は、より簡便な方法である培養細胞への ENaC の導入と蛍光イメージングによる呈味性評価の方法の確立を目指した。

まず始めに培養細胞の種類の検討を行った。培養細胞を用いた味覚の評価方法として、すでに甘味、うま味、苦味、酸味では HEK293 細胞を用いてカルシウムイメージング法での測定法が多く行われている³⁻⁶⁾。そこで、まず HEK293 細胞に ENaC を一過的に発現させた細胞を用いた測定を試みたが、ENaC 発現によるナトリウムの流入を確認することができなかった。そこで、過去の知見を調べたところ、CHO 細胞で電気生理学的実験が行われていることを確認した⁷⁻⁸⁾。そこで、我々も CHO 細胞の使用を試みた。その結果、CHO 細胞に一過的に ENaC α 、 β 、 γ サブユニットを一度に発現させた時に細胞外に NaCl を添加させると細胞内ナトリウム濃度が上昇することが明らかになった (Fig. 2)。また、この流入は ENaC チャネル機能を阻害するアミロライドの存在下では観察されないことも確認した (Fig. 2)。また、ENaC α の N 端に蛍光タンパク質 GFP を付加した変異体を用いた場合にも同様の流入が起きることが確認できた。そこで、遺伝子を発現している細胞を区別するために ENaC α の N 端に蛍光タンパク質 GFP を付加した変異体を使用することとした。

次に、ENaC α 、 β 、 γ サブユニットを恒常的に発現する細胞の作製を試みた。ENaC α 、 β 、 γ サブユニット遺伝子を薬

剤耐性の異なる別々の発現ベクターに挿入した発現用プラスミドを構築し、CHO 細胞に導入し薬剤による選抜を行った。得られた細胞について NaCl 添加による細胞内ナトリウム濃度変化を観察したが、一過性発現とは異なり、恒常的に発現する細胞では応答を確認することができなかった。そこで、塩味増強物質の評価には、ENaC α 、 β 、 γ サブユニット遺伝子を一過的に発現する方法をとることとした。

3. 3 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞を用いた塩味増強物質の評価

3. 2 の検討から、ENaC α 、 β 、 γ 遺伝子を CHO 細胞に一過的発現させたものを用いて塩味増強物質の評価を行った。一般的に使用されている塩味増強物質は存在しないため、塩味を増強することが知られているペプチドであるグリシンエチルエステル²⁾を塩味増強物質として用いた。濃度は増強効果が得られるとされている 45 mM で行った。その結果、グリシンエチルエステルによる刺激では有意な応答増強が観察されなかった (Fig. 3)。

4. 考 察

4. 1 動物行動学的手法を用いた塩味増強物質の評価

利尿薬スピロノラクトを常時摂取させることで慢性的なナトリウム欠乏状態にし、塩味に敏感なマウスを作成した。そのマウスは、塩化ナトリウム 60 mM 以下の低濃度域において 10 秒間のリック数と濃度に直線的な正相関を見せることがわかった。このシステムを利用して、いくつかの塩味増強候補物質の増強度を調べた。塩化リチウムとグリシンエチルエステルの添加では塩味増強を示唆する結果が得られたが、塩化カリウム添加では得られなかった。

マウスやヒトで塩味受容体は味蕾細胞に存在する ENaC というイオンチャネルであると考えられている^{1,9)}。塩化リチウムと塩化カリウムで塩味増強に差が出たのは、リチウムイオンがナトリウムイオンより小さいため ENaC のチャネル孔を通過できるのに対し、カリウムイオンはナトリウムイオンより大きいため通過できないことに一因があるのではないかと考えられる。リチウムイオンは塩味増強能を持っているが、摂取量を増やすと腹痛¹⁰⁾や脳神経系への影響が懸念される¹¹⁾ため、安全な減塩対策物質としては利用できない。ヒトでは ENaC のリガンドではない塩化カリウムも塩味を呈すると考えられているが、本実験ではカリウムイオンの影響は認められなかった。このことは、マウス

では ENaC 優位であり¹⁾、塩化カリウムイオンを塩味の一つとして分類していないからではないと考えられる。

本研究では、塩味増強効果の測定にリック試験法を採用した。この方法の利点は試験液を舐めている時間が非常に短く、測定値が消化吸収代謝などの影響を受けにくい点である。また、多くの種類の試験液を短時間に比較できる点である。一方、時間が短いため、しっかり味わって判断した行動ではなく、舐め始めた最初の印象に左右される可能性がある。実食での味評価とは直接結びつかない可能性も考えられる。

本実験結果では、各図の n 数に幅が示されている。これは、溶液吸い口に近づくことなく、まったくリックしなかった試験液のデータを除外しているからである。マウスが長い休憩を取って溶液を飲み始めた場合、リック数が不適切に大きくなるのが分かっていたので、本実験では 60 秒経てもリックしない場合は、自動的に次の溶液を提示することにした。リック数 0 だった場合は、実際の値を下方へ引っ張る可能性があるため解析から除外した。塩には、他の風味成分を混合されたときに、その風味を強く感じさせる効果がある。また、強い塩の味付けにすることにより、飲料や主食を美味しく食べさせる効果もある。本実験の条件では、これらの効果を評価することはできないので、塩味単独の増強が認められないからといって減塩対策に不適であるとは断言できない。

4. 2 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞の作製

塩味増強物質を評価する方法として、塩味受容体候補 ENaC 遺伝子を導入した培養細胞の作製についての条件検討を行った。細胞内蛍光指示薬を用いた細胞応答測定としてはカルシウムイオンの濃度変化を評価するカルシウムイメージングが多く行われている一方、ナトリウムイオンの濃度変化を評価するナトリウムイメージングについては

多くは行われていないのが現状である。問題点としてはナトリウム濃度を検知する蛍光指示薬の感度が必ずしも良くないこと、また、種類も少ないなどが挙げられる。今後、汎用性の高い蛍光指示薬の開発が成されることを期待する。塩味受容体候補 ENaC 遺伝子の細胞への導入方法としては、一過性発現と、恒常発現の二種類を試した。恒常的に発現する培養細胞の細胞は、塩味増強物質の評価を安定的・効率的に行うことを可能にするため、実現性を検討したが、本研究では応答を観察することができなかった。原因を特定するには至っていないが、恒常的に発現する培養細胞の作製には、一貫して ENaC の阻害剤であるアミロライド存在下で培養を行っているため、培養細胞に何らかの影響を与えている可能性がある。誘導発現ベクターを使用するなどの工夫を行いアミロライドを添加する期間の短縮化を図ることで、培養細胞に恒常的に ENaC 遺伝子を導入できる可能性がある。

4. 3 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞を用いた塩味増強物質の評価

確立した実験条件を用いて塩味増強物質の候補として知られるグリシンエチルエステル²⁾の ENaC に対する作用を評価した。ENaC の開口を増強する様子は観察されなかったため、グリシンエチルエステルは他の塩味受容体あるいは ENaC を介する情報伝達系に属する他の分子に作用すると考えられる。また、確立した系は、感度や安定性が必ずしも良いとは言えない上に、グリシンエチルエステルの塩味増強度は 2 倍以下と高くなく、増強度が誤差に含まれてしまっている可能性がある。我々が確立した系は人工甘味料の様に 1 mM あるいはそれ以下の濃度でも受容体に作用でき、また、ENaC を大きく開口できる物質を探索するには有効であると思われる。ただし、実際に探索する場合には、遺伝子発現が一過的であることが必要なことが、探索の効率のネックになると思われる。

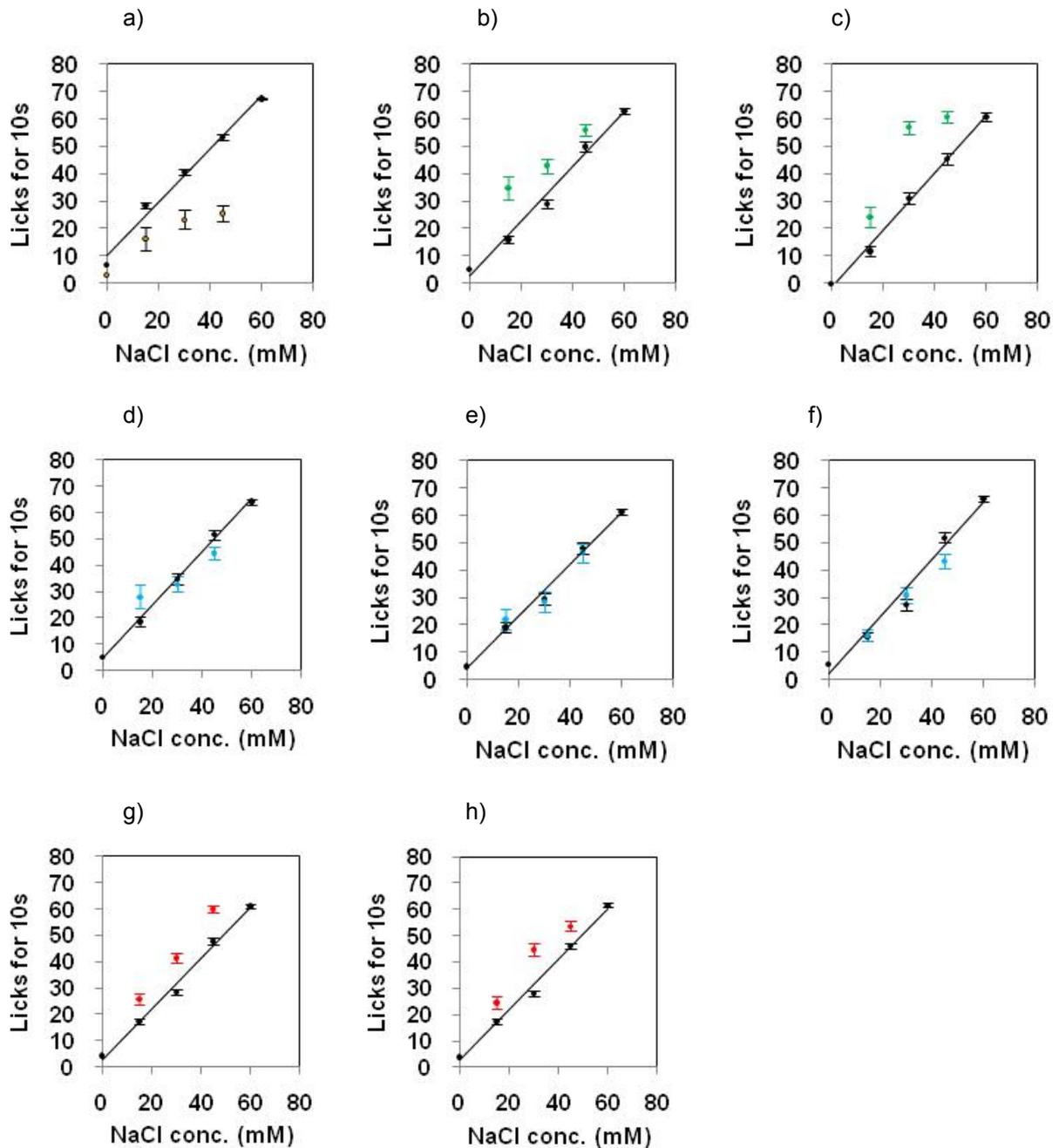


Fig. 1. Licking analysis to various salty solution. a. Comparison between Na-depleted and replete mice. (●: Na-depleted group n=355-492, ●: Na-replete group n=19-51). b. Licks to 15 mM LiCl-add. solu. (n=20-58). c. Licks to 30 mM LiCl-add. solu. (n=30-36). d. Licks to 15 mM KCl-add. solu. (n=27-44). e. Licks to 30 mM KCl-add. solu. (n=25-36). f. Licks to 45 mM KCl-add. solu. (n=29-47). g. Licks to 30 mM glycine-ethyl-ester-add. solu. (n=86-132). h. Licks to 45 mM glycine-ethyl-ester-add. solu. (n=65-130). ●: NaCl solu., ●: LiCl-add. solu., ●: KCl-add. solu., ●: glycine-ethyl-ester-add. solu. Values are Average \pm SE.

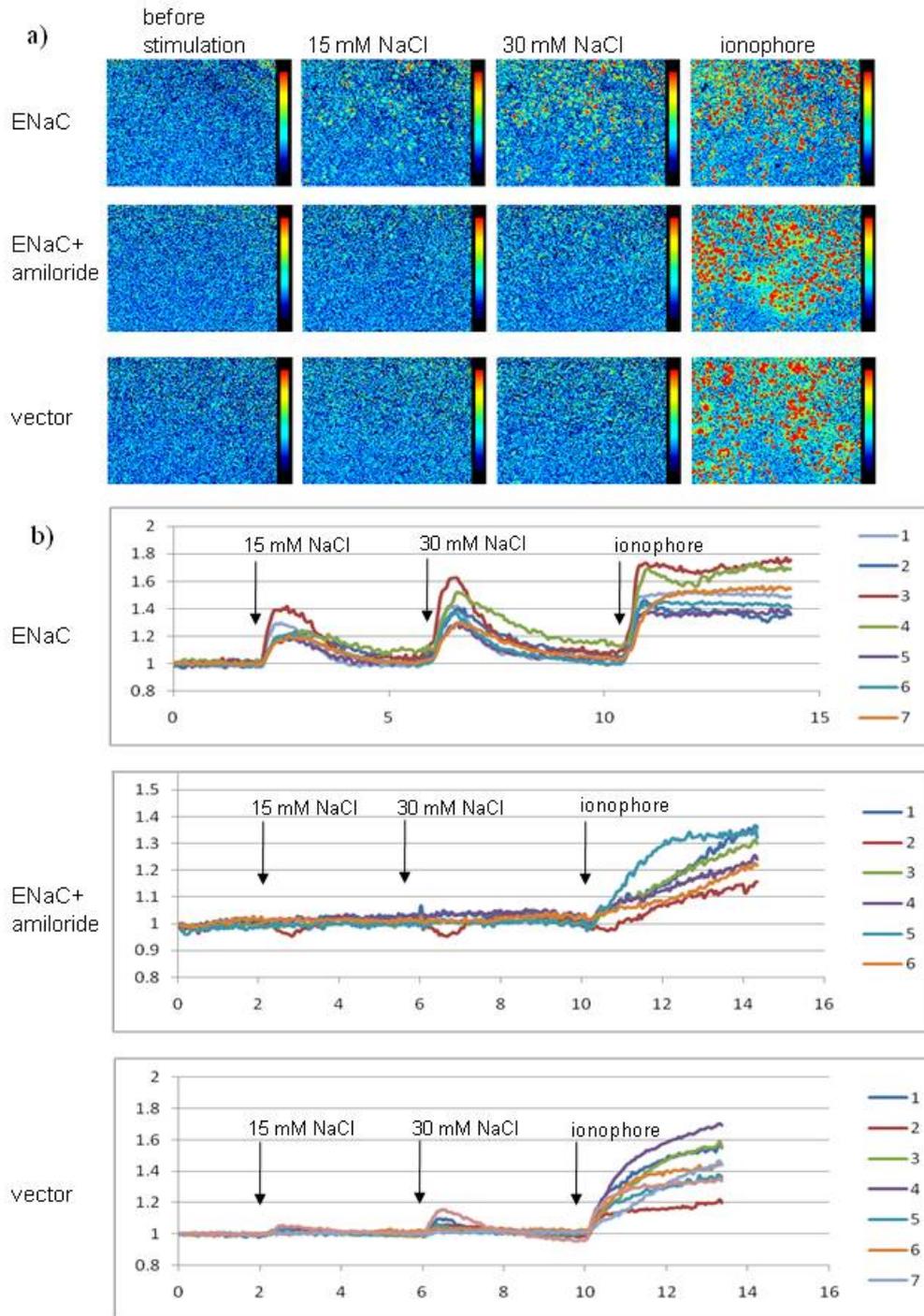


Fig. 2. Response to NaCl in CHO cells expressed ENaC gene. A. Representative ratiometric images of CoroNa Red-loaded CHO cells coexpressing human ENaC α , β , γ subunit genes. The cell images were obtained before stimulation, 30 s after stimulation with 15 or 30 mM NaCl or ionophore (20 μ M gramicidin, 29 μ M monensin). The ratio was calculated as normalized difference to baseline recorded before stimulation (F/F_0). Red or yellow spots were indicated the responded cells to stimuli. Top: CHO cells coexpressing human ENaC α , β , γ subunit genes. Middle: CHO cells coexpressing human ENaC α , β , γ subunit genes with 10 μ M amiloride. Bottom: CHO cell expressing control vector (pcDNA6.2/N-EmGFP-DEST). B. Responses of representative cells expressing ENaC α , β , γ subunit genes to NaCl. Arrows indicate the starting points for stimulations. The traces were derived from 6 or 7 responding cells.

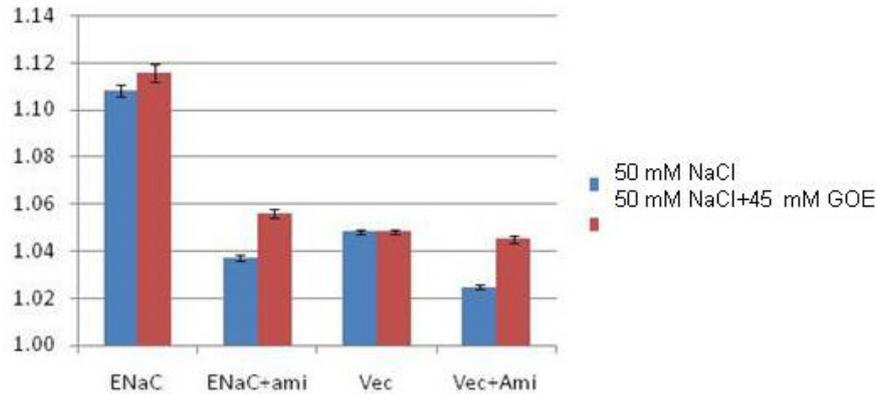


Fig. 3. Response to Glycine ethyl ester in CHO cells expressed ENaC gene. 35 CHO cells expressed ENaC gene were chosen for each measurement. The ratio was calculated as normalized difference to baseline recorded before stimulation (F/F0). ENaC: CHO cells coexpressing human ENaC α , β , γ subunit genes. ENaC+ami: CHO cells coexpressing human ENaC α , β , γ subunit genes with 10 μ M amiloride. Vec: CHO cells expressing control vector (pEF-DEST51). Vec+ami: CHO cells expressing control vector (pEF-DEST51) with 10 μ M amiloride.

5. 今後の課題

5.1 動物行動学的手法を用いた評価系について

塩化ナトリウムは塩味を呈するが、酢酸ナトリウムは塩味を感じさせない。グルタミン酸ナトリウムはうま味を呈するが、塩味を感じさせない。このように、塩味発現にはナトリウムイオンだけでなく、陰イオンの影響も見逃せないものと考えられる。今後は、陰イオン側のバリエーションも増やして、塩味発現に対する影響を調べて行く必要もあると考えられる。

5.2 培養細胞を用いた評価系の感度について

培養細胞を用いた評価系の不安定性について：培養細胞を用いたイメージング実験では、培養細胞の応答性が必ずしも安定ではないことがしばしば問題となる。 μ M レベルあるいはそれ以下で大きな応答を引き起こす物質については、この点はあまり問題にはならないが、食品成分の呈味性は、そもそも低濃度で強い味、すなわち大きな応答を引き起こすものではないことから、大きな問題となる。今後、遺伝子の発現方法や、培養および測定条件の改良が必要であると思われる。

文献

1) Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ and Zuker CS: The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*,

464, 297-301 (2010)

2) Glycine methyl or ethyl ester hydrochloride as the simplest examples of salty peptides and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* 52, 2679-2681 (1988)

3) Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ and Zuker CS: Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381-390 (2001)

4) Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M and Adler E: Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4692-4696 (2002)

5) Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S. and Ryba, N. J.: T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, 100, 703-711 (2000).

6) Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M and Matsunami H: Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12569-12574 (2006)

7) Staruschenko A, Medina JL, Patel P, Shapiro MS, Booth RE, Stockand JD: Fluorescence resonance energy transfer analysis of subunit stoichiometry of the epithelial Na⁺ channel. *Staruschenko J Biol Chem.* 279, 27729-27734 (2004)

- 8) Booth RE, Tong Q, Medina J, Snyder PM, Patel P, Stockand JD: A region directly following the second transmembrane domain in gamma ENaC is required for normal channel gating. *J Biol Chem* 278, 41367-41379 (2003).
- 9) Kretz O, Barbry P, Bock R, Lindemann B: Differential expression of RNA and protein of the three pore-forming subunits of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel in taste buds of the rat. *J Histochem Cytochem.* 47, 51-64 (1999).
- 10) Smith DF, Balagura S: Role of oropharyngeal factors in LiCl aversion. *J Comp Physiol Psychol.* 69, 308-310. (1969).
- 11) Mayfield D, Brown RG.: The clinical laboratory and electroencephalographic effects of lithium. *J Psychiatr Res.*4, 207-219 (1966).

Development and Application of Evaluation Methodology for Salt Taste Preference

Yuko Kusakabe, Takayuki Kawai

National Agriculture and Food Research Organization, National Food Research Institute

Summary

Salt is essential for enhancing the palatability of food. Excessive intake of salt, however, is an indirect cause of lifestyle-related diseases such as high blood pressure, and hence, salt intake must be regulated. Researchers have attempted to develop a substitute for salt for many years but have not yet succeeded in developing a substitute with equivalent palatability. It is said that there are at least 2 types of salty taste: one is palatable salty taste, or the other is not palatable one. Therefore, we tried to evaluate the palatability of saltiness on the basis of its ethology and molecular physiology.

Initially, we evaluated saltiness by using an ethological approach. We developed mice that prefer saltiness, as *Homo sapiens* do, by limiting the intake of sodium chloride and diuretic agents and evaluated the palatability of potassium chloride and lithium chloride by counting the number of times that the mice licked either solution. We found that when potassium chloride, whose palatability is low, was added to sodium chloride, the mice did not lick the solution any more than they licked the pure sodium chloride solution. In contrast, when lithium chloride was added to sodium chloride, the mouse licked the solution more number of times, which is indicative of increased palatability. Similarly, when glycine ethyl ester, which is known to have a saltiness-enhancing effect, was added to sodium chloride, the mice licked the solution more often, which again is indicative of increased palatability.

We also tried to establish a saltiness evaluation method by using cultured cells expressing epithelial sodium channel (ENaC), which is a candidate receptor in saltiness perception. Our aim was to evaluate the taste of food materials easily. We used cultured cells because they are easy to handle, and developed a saltiness evaluation method by using cultured cells and fluorescence imaging technique. We first studied the experimental conditions and found that the response to saltiness was observed when the genes for ENaC α , β , and γ subunits were expressed transiently in CHO cells. Subsequently, we measured the response from the ENaC-expressing CHO cells when glycine ethyl ester was added to the sodium chloride solution and found that there was no increase in the intensity of the response to saltiness due to sodium chloride. Our results suggest that ENaC might not be involved in increasing the saltiness when glycine ethyl ester is added and that other molecules could be responsible for it. The evaluation method used in this study however has a limitation: the responses of the culture cells were unstable, which made quantitative and efficient evaluation difficult. We hope to resolve this problem in the future.