

培養細胞のカルシウムイメージングを用いた食品抽出物中に含まれる 塩味増強物質の探索

小澤 洋子, 潮 秀樹

東京大学大学院農学生命科学研究科

概要 塩は生命活動に欠かせない必須の物質であるとともに食味を決める上で重要な要素である。しかしながら、塩化ナトリウムの過剰摂取は高血圧の主な原因とされ、その摂取制限が高血圧症や血管疾患の予防や治療に重要である。食品中の塩化ナトリウム量を減少させると呈味性が損なわれるため、摂取の制限は容易ではない。

そこで本研究では、味細胞に発現する transient receptor potential (TRP) チャンネルを発現する培養細胞を用いて、TRP チャンネルを活性化する食品由来の成分を探索することとした。

その結果、数種の食品の水抽出物に Ca 応答を誘導する活性があることが明らかになった。これらの塩味増強物質をシーズとして、安全かつ消費者に満足感も提供できる減塩食品の開発につながるものと考えられる。

1. 研究背景および目的

塩は生命活動に欠かせない必須の物質であるとともに食味を決める上で重要な要素である。しかしながら、塩化ナトリウムの過剰摂取は高血圧の主な原因とされる。高血圧症は世界的に広くみられ、年々増加傾向を示し、誰にでも起こりうる身近な疾患である。高血圧は自覚症状がほとんど現れないが、心疾患および脳卒中のリスクを高めるため、高血圧の予防および治療が重篤な疾患を防ぐ上で非常に重要である。世界保健機関が塩化ナトリウムの摂取量を1日5g以下と推奨しているが、日本では推奨値の2倍以上を摂取している。また、日本だけでなく、多くの国々で推奨値以上の塩化ナトリウムを摂取しているのが現状である。塩化ナトリウムの摂取量の削減は、減塩食品を摂取することによって可能である。しかしながら、食品中の塩化ナトリウム量を減少させると呈味性が損なわれるため嗜好的に好まれず、摂取量を削減することが容易ではないことから、塩化ナトリウムに代わる高血圧を引き起こさない塩味増強物質が求められている。近年、エイコサペンタエン酸やアラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸の酸化生成物が哺乳類の塩味受容増強効果を持つことが明らかとなり、これは transient receptor potential (TRP) チャンネルが

塩味受容を修飾するためであると推定される。そこで本研究では、食品の呈味性を損なわず、持続的な適量の塩化ナトリウムの摂取を可能にするため、味細胞に発現する TRP チャンネルの活性を制御する成分を各種食品抽出物から探索することとした。

2. 研究方法

2.1 細胞

TRPC チャンネル群を定常的に発現するムスカリン受容体1-ヒト胎児由来腎臓 (M1-HEK) 細胞株およびマウスメラノーマ B16 細胞を用いた。10%ウシ胎児血清および4 mM グルタミンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中、37°C、5% CO₂ で培養した。

2.2 カルシウムイメージング

1 mM の Calcium Green-1 AM ジメチルスルフォキシド (in DMSO) 溶液に、終濃度 0.02% (w/v) になるよう 10% Cremophore EL を加えて混和した。これに後、終濃度 20 mM になるように 10 mM cyclosporin A in エタノール溶液 EtOH を加え、Tyrode solution で希釈して 10 mM の Calcium Green-1 AM 溶液を調製した。22 mm 平方のカバークラス上に細胞を播種し、真空グリースで観察用チャン

バーに固定した。倒立型蛍光顕微鏡 (IX-70, Olympus オリンパス) で観察したに設置した (図 1)。本チャンバー上にペリスタルティックポンプを用いて各種刺激物質を含む試験溶液を流速 2 ml で灌流した。観察には 20 倍対物レンズ (UApo/340, 20X, N.A.= /0.75∞0.17, Olympus オリンパス) を使用し、2 フレーム/秒で得られた蛍光像を ICCD カメラ (ICCD C2400-89, 浜松ホトニクス) を介してパーソナルコンピュータに取り込んだ。なお、データ解析には Image J (U.S. National Institutes of Health, zippy. nih.gov から anonymous FTP 入手) 上でマクロプログラムを用いて数値化した。

2. 3 食品水抽出物の調製

生鮮食品および加工食品などに等量の蒸留水を加え、ホモジナイズ後、5,000 xg にて遠心分離を行った。得られた上清をさらに 100,000 xg にて超遠心分離し、0.45 mm のフィルターでろ過した。限外濾過による脱塩を行い、食品水抽出物とした。

3. 研究結果

3. 1 B16 細胞における TRP チャンネル遺伝子の発現

今回用いたムスカリン受容体 1-ヒト胎児由来腎臓 (M1-HEK) 細胞については、すでに Strubing ら¹ によって、TRPC1 から 5 ままでが発現することが証明されている。そこで準備的研究によって、B16 細胞における TRPC チャンネル遺伝子の発現を RT-PCR によって確認したところ、TRPC1 を除くほとんどのサブタイプが発現していた (結果は示さず)。これは、マウスやラットの感覚細胞や神経における分布とほぼ同様といえる。

3. 2 食品抽出物が培養細胞のカルシウム応答に及ぼす影響

食品水抽出物に含まれる可能性のある呈味性物質、各種の塩、アミノ酸、有機酸、核酸などについて、あらかじめこれらの培養細胞にカルシウム応答を惹起するかについて検討を加えたところ、いずれの呈味成分も単独ではカルシウム応答を示さなかった (結果は示さず)。

図 2 に食品水抽出物による典型的なカルシウム応答の例を示す。

生鮮食品および加工食品から得た水抽出物について検討を加えたところ、いくつかの食品由来の水抽出物にカルシウム応答が観察された (結果は示さず)。

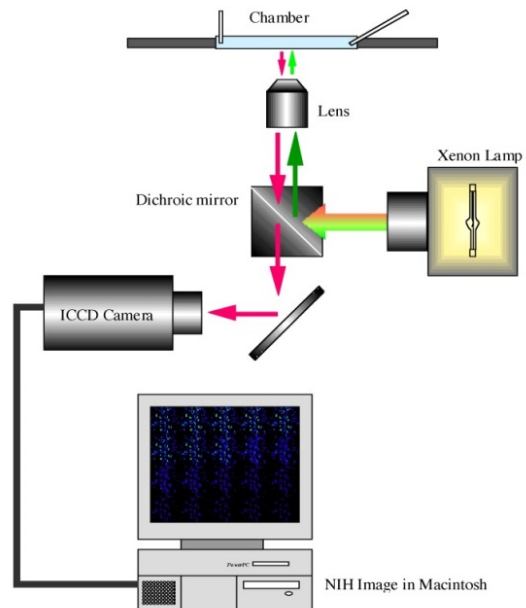


図 1. カルシウムイメージングシステムの概要

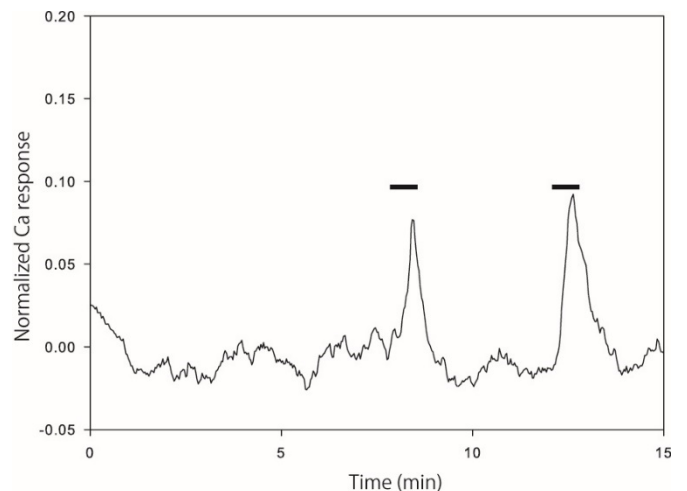


図 2. 食品水抽出物による B16 細胞のカルシウム応答

4. 本研究における考察と今後と展望

本研究によって、食品の水抽出物に 5 基本味やこれまで呈味性があることが確認されている成分以外に、TRP チャンネルを活性化して塩味を増強する成分が含まれる可能性が示唆された。これらの成分の実態については、現在引き続き単離精製および質量分析にて解析を進めている。本研究では TRP チャンネルを活性化しているか、いずれの TRP チャンネルに作用しているかなどについて直接的な結果は得られていない。今後は、各種 TRP チャンネルをノックダウンした細胞を作製し、チャンネル活性に及ぼす影響を

評価するとともに、マウス味覚神経を用いた生理学的手法や味覚嫌悪学習を施したマウスのリッキング数評価による塩味増強効果の確認を行う予定である。さらに、これらの評価によって候補となった化合物については、ヒトによる官能検査を行い、その効果の最終確認を行う予定である。

引用文献

1. Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. Formation of Novel TRPC Channels by Complex Subunit Interactions in Embryonic Brain. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 39014-39019, doi:10.1074/jbc.M306705200 (2003).

Salt Taste Enhancers in Foods

Hiroko Ozawa, Hideki Ushio

The University of Tokyo

Summary

Sodium chloride is essential for human beings and determines food tastes. However, the excessive intake of sodium chloride is considered to be a main cause of the high blood pressure, and intake restrictions are important for prevention of high blood pressure and the resulting vascular disease. Because taste palatability is spoiled without salt, the intake restriction is not easy for us. In this study, we have searched compounds derived from food and foodstuffs activating taste responses. Several water extracts from foods and foodstuffs have successfully enhanced taste responses. They are promising tools for the development of the low-sodium food.