

塩味消失系統を用いた塩味増強剤の網羅的探索

上野 耕平, 齊藤 実

東京都医学総合研究所学習記憶プロジェクト

概要 NaCl によって引き起こされる塩味は食事に欠かせない味の1つである。一方, NaCl の摂取量が增大すると, 高血圧症や腎機能障害などの疾患リスクが増大すると考えられている。従って, 塩味を維持したままNaCl摂取量を減少させるには, 塩味を誘発もしくは塩味を増強する物質があることが望ましい。しかし, 低濃度で塩味を誘発ないしは増強させる物質はほとんど見出されていない。*in vitro* で塩味受容体を発現させその結合能によって上記の物質を同定することが可能に思われるが, 実際には単純ではない。なぜなら Na^+ や受容体の環境によって異なる味が引き起こされるからである。例えば, NaClと同じNa塩である酢酸Naは酸味を, グルタミン酸Naはうま味を引き起こす。従って, 塩味を増強する物質の検索には生体を用いた官能テストが有効であろう。しかし, ヒトやマウスを使った網羅的官能テストはコストが膨大に必要である。本研究では比較的低コストで実験が可能なショウジョウバエを用いて網羅的探索を試みることにした。

ハエはヒトと同様に低濃度の NaCl 溶液を好んで摂食し, やはり同様にアミロライドによってその嗜好性が低減する。我々は東大創薬機構から低分子で水溶性の高い物質をおよそ 1,000 分子提供してもらい, two-choice test 法と組み合わせ探索を行った。ハエがそれほど嗜好性を引き起こさない 2 mM NaCl 溶液に各物質 50 μM 加えたものをテストし, どの程度の嗜好性を示すかを検討した。その結果, 716 分子中 22 分子に対して強い嗜好性を示すことが見出された。以前に我々はショウジョウバエの野生集団の中に塩に対して嗜好性を示さない系統を同定することに成功している。このハエは甘味や苦味, または高濃度塩溶液に対する忌避性などは他のハエと全く変わらない。この系統が 22 分子に対してどのような嗜好性や忌避性を示すかを調べたところ 21 分子に対してはいずれの行動も示さなかった。

これらの結果は, 21 分子は塩味嗜好性を特異的に増強する物質であることを強く示唆するものである。今後はこの物質をより詳細に解析する予定である。具体的には高濃度における忌避性の有無や毒性のテスト, さらに哺乳動物を用いたテストを想定している。これによりヒトに有用な塩味増強剤の同定を目指す。

1. 研究目的

塩の過剰摂取は高血圧症を含む循環器疾患や腎機能障害のリスク要因である。一方, 塩味は嗜好性が高く, 塩摂取を制限されることは大きなストレスとなり生活レベルの低下を招く。これらの問題を打開する1つの方策として, 人工塩味料による塩の代替, もしくは塩味増強剤による塩味を維持したまま塩摂取の低減が有効である。しかし, これまでに有効な人工塩味料の報告はなく, 塩味増強剤も数多く開発・販売されているが増強効果は概ね 2 倍程度であり有効性は低い。

これら代替物質の探索方法の1つとして, 塩受容体とナ

トリウムイオンとのリガンド結合能を指標とした *in vitro* 実験が考えられる。現在, 塩受容体の候補として考えられているのが上皮性 Na^+ チャネル (epithelial Na^+ channel, ENaC) である。ENaC を用いたリガンド結合能スクリーニングによって有効な分子が得られたという報告は少ない。アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた系において, L-Arg などが ENaC の応答性を増強させることが報告されているが⁽¹⁾, 実際にこれらが塩味をどの程度増強させるのかは不明である。このような *in vitro* の実験系の問題点として, Na^+ と ENaC の周辺環境が ENaC の機能に影響を及ぼすことが挙げられる。例えば, Na^+ 塩でも NaCl は塩味を引き起こ

すが、グルタミン酸 Na や酢酸 Na に関してはうま味や酸味を引き起こすことが知られている。従って、代替物質の検索にはヒトの官能試験や動物の行動実験などによる *in vivo* スクリーニングが有効であると考えられるが、これらの実験には膨大なコストが想定される。

本研究ではヒトやマウスに比べて安価に大規模スクリーニングを行うことが可能なショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた網羅的スクリーニングを行う。ショウジョウバエはヒトやマウスと同様に適当な濃度の塩溶液を好んで摂取する⁽²⁾。我々はハエの塩嗜好性が極めてヒトに類似していることを見出した。すなわち、ハエはナトリウム塩化物だけでなくリチウム塩化物も嗜好することやアミロライドに対して感受性を示す。また、前述の L-Arg もハエの塩嗜好性を増大させることも見出した。本研究は、two-choice test 法という比較的ハイスループットにハエの嗜好性を定量的に測定できる方法を利用し、ケミカルライブラリーを網羅的に探索することでハエの塩味を増強させる物質を同定することを目的とする。さらに塩味嗜好性を消失したハエを利用することで、同定の精度を上昇させる。

2. 研究方法

2.1 ハエとその飼育

ハエは塩に対して嗜好性を示す通常系統として Canton-S を用いた。一方、塩に対して嗜好性を示さない系統としては OGS-4 を用いた(Ueno *et al.*, unpublished data)。ハエは通常のコーンミール培地を用い、室温 25°C、湿度 60%、12 時間の明暗サイクル下で飼育した。

2.2 行動実験

ハエの塩嗜好性を定量的に測定するために、本研究では two-choice test 法を採用した⁽³⁾。以下にその方法を簡単に説明する。ハエを 6~9 時間餌も水も無い容器で絶食させる。テストしたい溶液とコントロールの溶液にそれぞれに赤もしくは青の色素を加える(赤: Amaranth 0.5 mg/ml, 青: brilliant blue FCF 0.25 mg/ml)。それぞれの溶液を 60 穴マイクロテストプレート(Nunc 社)の各ウェルに市松模様になるように入れる。絶食したハエを数十匹入れ、暗室で 1 時間摂食させる。摂食後ハエを凍結して殺し、ハエを腹部の色で赤群、青群、紫群、無色群に弁別し匹数を計測する。仮にテスト溶液に赤色素が入っていた場合以下の

式によって preference index を求める。

$$\text{preference index} = (\text{赤群の匹数} - \text{青群の匹数}) / (\text{赤群の匹数} + \text{青群の匹数} + \text{紫群の匹数})$$

index が 1 となれば全てのハエが赤色溶液を摂取したことを表し、逆に -1 となれば全てのハエが青色溶液を摂取したことになる。

2.3 スクリーニング試薬

候補分子を探索するためのライブラリーは東京大学創薬機構 (<http://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/>) より得た。将来的に食事等に用いることを考慮し、比較的分子量が小さく水溶性の高い 1,196 分子を選択した。

3. 研究結果

3.1 ハエの塩嗜好性

前述したようにショウジョウバエは適当な濃度の塩溶液を好んで摂取する⁽²⁾。この報告において、ハエの嗜好性は実際に摂取した量を測定することで確認されている。今回の我々の two-choice test 法によっても塩に対する嗜好性が確認できるか否かを検討した。好んで摂取すると思われる 100 mM と忌避すると思われる 500 mM の NaCl を水と選択させた。その結果、通常の野生型(Canton-S)は 100 mM NaCl に対して強い嗜好性を示し、500 mM NaCl に対しては忌避した(Fig 1)。一方、以前に我々が見出している塩に対して嗜好性を示さない系統(OGS-4)は 100 mM NaCl に対する嗜好性はほぼ 0 であった。しかし、500 mM NaCl に対する忌避性は Canton-S とほぼ同程度であった。すなわち OGS-4 は塩の嗜好性を特異的に消失しているこ

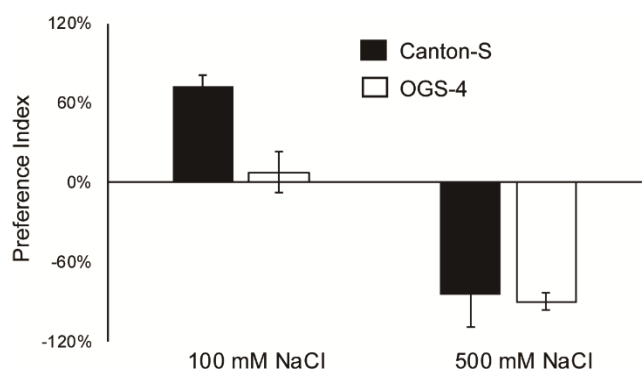


Fig.1. 100 mM および 500 mM の塩溶液嗜好性 100 mM NaCl と水(左), 500 mM NaCl と水(右)を選択させた時の Canton-S(黒四角)と OGS-4(白四角)それぞれの preference index を示す(平均値±標準誤差)。N=4

とが再確認された。

上記の実験によりハエはほ乳類と同様に低濃度の塩を好み、高濃度の塩を忌避することが示されたが、その他の点において、ハエとほ乳類の塩味に共通性があるか否かを検討した。ほ乳類の塩味は L-Arg によって増強されることが示唆されている⁽¹⁾。そこで、我々は L-Arg がハエの塩嗜好性を増強させるのか否かを検討した。5 mM NaCl 溶液に 15 mM の L-Arg を加えて水と比較させた。その結果、5 mM NaCl 単独よりも L-Arg を含んだ溶液の方がより強い嗜好性を示すことが明らかとなった (Fig. 2)。しかし、この嗜好性の増強が塩味以外の味成分による可能性がある。そこで前述の塩嗜好性を示さない系統を用いて同じ実験を行った。その結果、塩嗜好性を示さない系統においては L-Arg は嗜好性の増大を引き起こさなかった (Fig. 2)。このことは L-Arg がハエの塩味嗜好性を特異的に増強させることを示しており、ハエの塩味はほ乳類のそれと良く似ていることが明らかとなった。

3. 2 スクリーニング予備実験

スクリーニング試薬は全て 10 mM の濃度で dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解された状態で提供されている。従って実験する際には摂食させる溶液に DMSO が混入する。そこで DMSO が塩嗜好性に影響を与えるのか否かを調べた。DMSO そのものが嗜好性もしくは忌避性を引き起こすのか調べるために 0.1% および 0.5% の DMSO 溶液を作成し、それぞれを蒸留水と比較させる実験を行った。その結果、いずれの DMSO 溶液も蒸留水に対して嗜好性もしくは忌避性を引き起こすことはなかった。次いで、DMSO が塩嗜好性に対して影響があるのか否かを調べた。

0.1% および 0.5% DMSO を 100 mM の塩溶液と蒸留水に加え、塩嗜好性を調べた。その結果、いずれの濃度の DMSO を含んでも高い塩嗜好性を示した (Fig. 3)。すなわち 0.5% 以下の DMSO は塩嗜好性に影響を及ぼさないと考えられ、以下の研究では 0.5% DMSO を用いることとした。これによりスクリーニング試薬の最終濃度は 50 μ M となる。

スクリーニング用に分与された試薬は非常に少量であったため (10 μ l)、塩味を引き起こす人工塩味料と塩味を増強する塩味増強剤の2つを同時に検索する手法を考案した。すなわち、嗜好性を弱く引き起こす低い塩濃度溶液にスクリーニング試薬を加え、これに対して強い嗜好性を

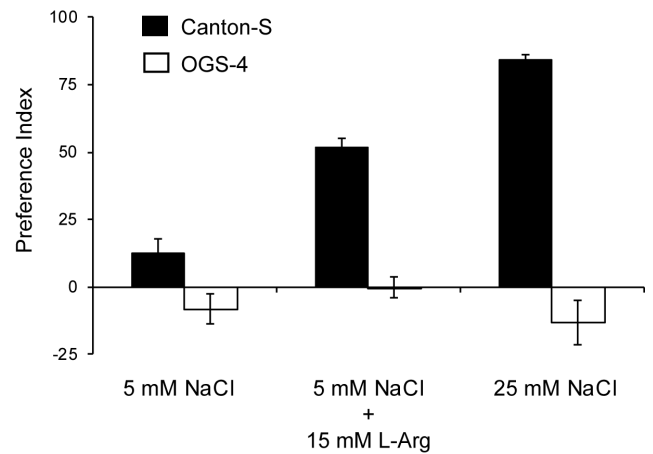


Fig.2. L-Arg のハエ塩嗜好性に及ぼす影響

5 mM NaCl, 5 mM NaCl に 15 mM L-Arg を加えた溶液、および 25 mM NaCl をそれぞれ水と選択させた時の Canton-S (黒四角) と OGS-4 (白四角) それぞれの嗜好性を示す (平均値 \pm 標準誤差)。N=8

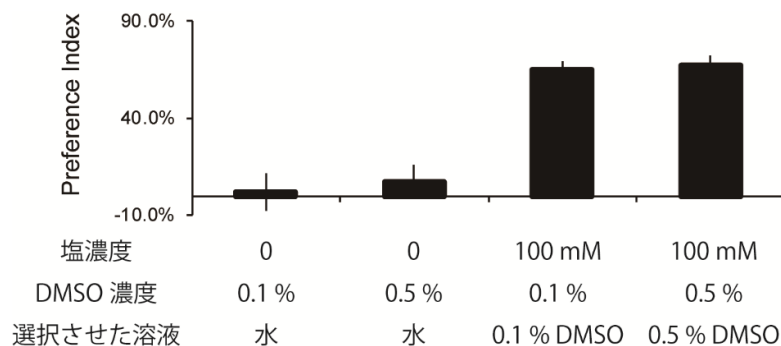


Fig.3. ハエの塩嗜好性に対する DMSO の影響

Canton-S 系統を用いて、DMSO 溶液と水、および DMSO を加えた 100 mM NaCl 溶液と DMSO 溶液を選択させた場合の preference index を示す (平均値 \pm 標準誤差)。N=4

示すか否かを検討することとした。低い塩嗜好性を引き起こす NaCl 濃度を検討するために 0.5, 2, 8 mM の塩溶液に対する嗜好性を調べた。ポジティブコントロールとして高い嗜好性を示すことがわかっている 100 mM も用いた (Fig. 1)。その結果, 0.5 と 2 mM に対してはわずかに嗜好性を示し, 8 mM に対しては強い嗜好性を示すことがわかった (Fig. 4)。従って, 本研究では 2 mM の塩溶液を閾値に近い濃度として採用することとした。

3.3 スクリーニング実験

0.5% DMSO 溶液(コントロール液)と 2 mM NaCl 溶液にスクリーニング試薬が 50 μ M となるように加えた溶液(テスト塩溶液, 0.5% DMSO を含む)を用意した。それぞれの溶液には色素を加えるが, 色素のバイアスを除去するためにコントロール液に青を加えた場合と赤を加えた場合それぞれを用意した。また, スクリーニング試薬を節約するために, マイクロテストプレートの 60 穴のウェルのうち 24 穴を用いて実験を行った。これを提供された 1,196 分子のうち 716 分子において行った (Fig. 5A-I)。加えた分子によっては塩嗜好性が上昇することや, 逆に塩に対する強い忌避性を引き起こすようになることが観察された。今回の研究では便宜的に preference index が 0.4 を超えた場合を候補分子と定めることとした。その結果, 716 分子中 22 分子が得られた。

これら 22 分子が塩味を増強したのか, それとも甘味等を引き起こすことで preference index を上昇させたのかを確認するために, 塩味嗜好性を示さない OGS-4 系統を用

いて確認実験を行った。Canton-S 系統同様に 2 mM NaCl 溶液に候補分子を加え, これを 0.5% DMSO と選択させた時の preference index を求めた。その結果, OGS-4 系統はいずれの分子に対しても顕著な嗜好性を示すことはなかった (Fig. 6)。これらの結果は, 21 の候補分子はハエの塩味を増強させる効果があることが示唆された。

4. 考察と今後の課題

NaCl は高い嗜好性を引き起こすが, 摂取量が上昇することは健康上好ましく無い。本研究は低濃度の NaCl においても強い塩味を引き起こす物質を検索・同定することで, NaCl 摂取を抑制しながら快適な食事ができることを目指すものである。ショウジョウバエはヒトと同様に低濃度の NaCl 溶液を好んで摂取する。これを利用しハイスループットで塩味を惹起もしくは増強する物質のスクリーニングを行った。その結果, 716 分子中 21 分子の候補を得ることに成功した。スクリーニング物質の提供を受けている創薬機構との契約上, これら分子が何であるかは明らかにされていない(全分子のスクリーニングが完了した時点で開示を受ける)。従ってこれら分子がどのような特性を備えているのかということは現在不明である。しかし, 多くの分子は比較的小さな分子量であり水溶性が高いことは創薬機構より報告されている。さらに, 本研究で用いた濃度はいずれも 50 μ M と比較的低濃度であり, 同様に塩味増強効果のある L-Arg の実効濃度 (10 mM 以上) に比べて将来的な調味料として有望であると考えられる。

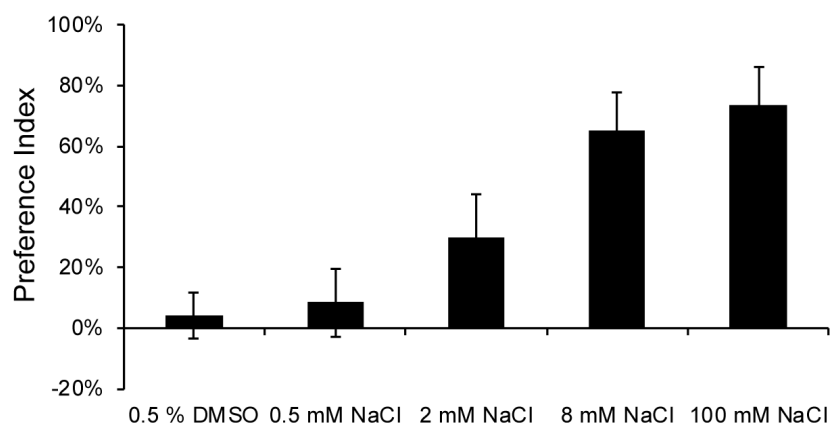


Fig.4. 様々な塩濃度に対する嗜好性

Canton-S 系統を用いて, 0, 0.5, 2, 8 および 100 mM NaCl と水を選択させた際の preference index を示す (平均値 \pm 標準誤差)。すべての溶液には 0.5% DMSO が加えられている。N=6

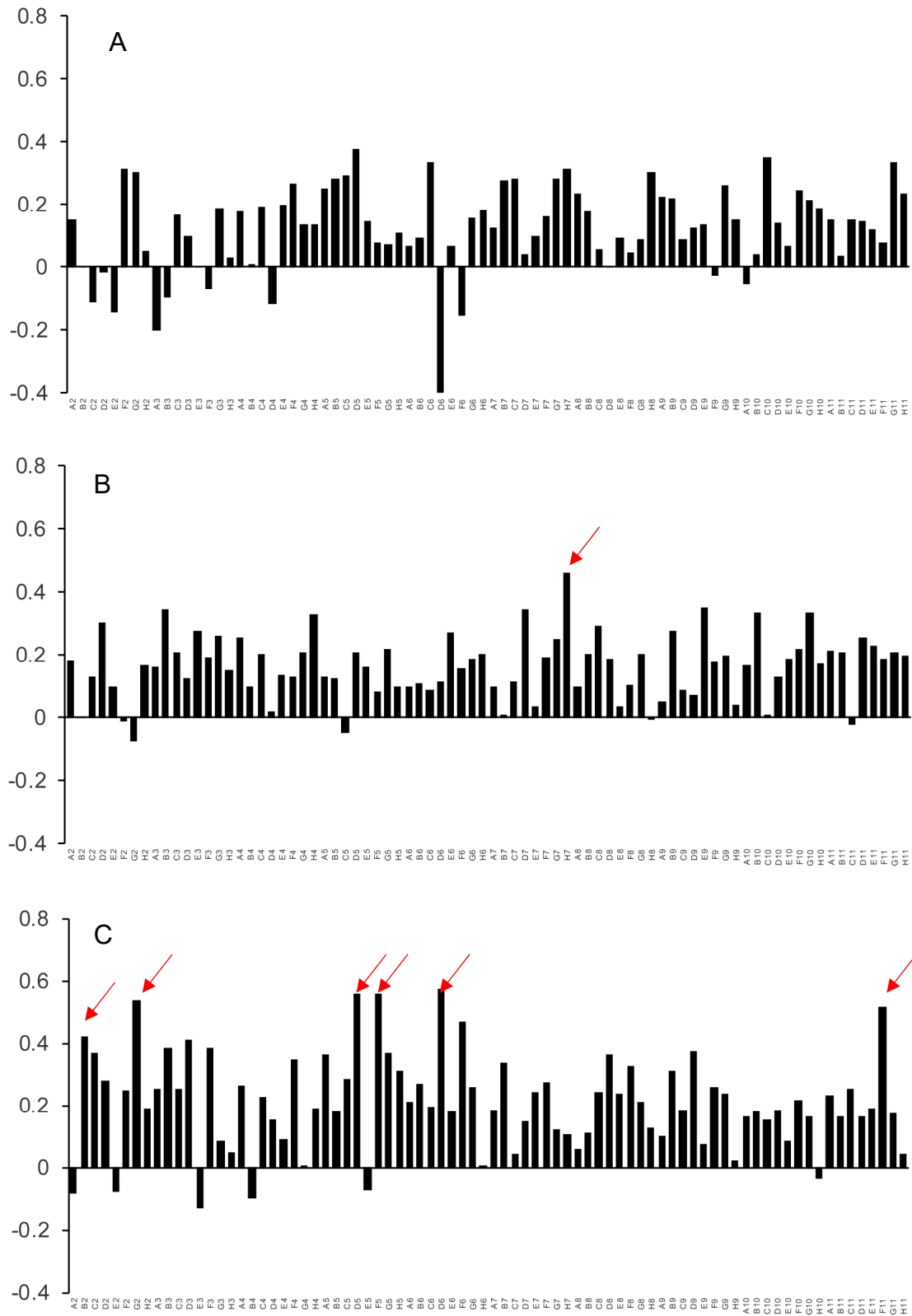


Fig.5. A-C 様々な化合物を含む 2 mM NaCl 溶液に対する嗜好性

716 分子をそれぞれ含む 2 mM NaCl 溶液と水を選択させた時の preference index を示す。赤矢印は index が 0.4 を超えたものを示す。N=4

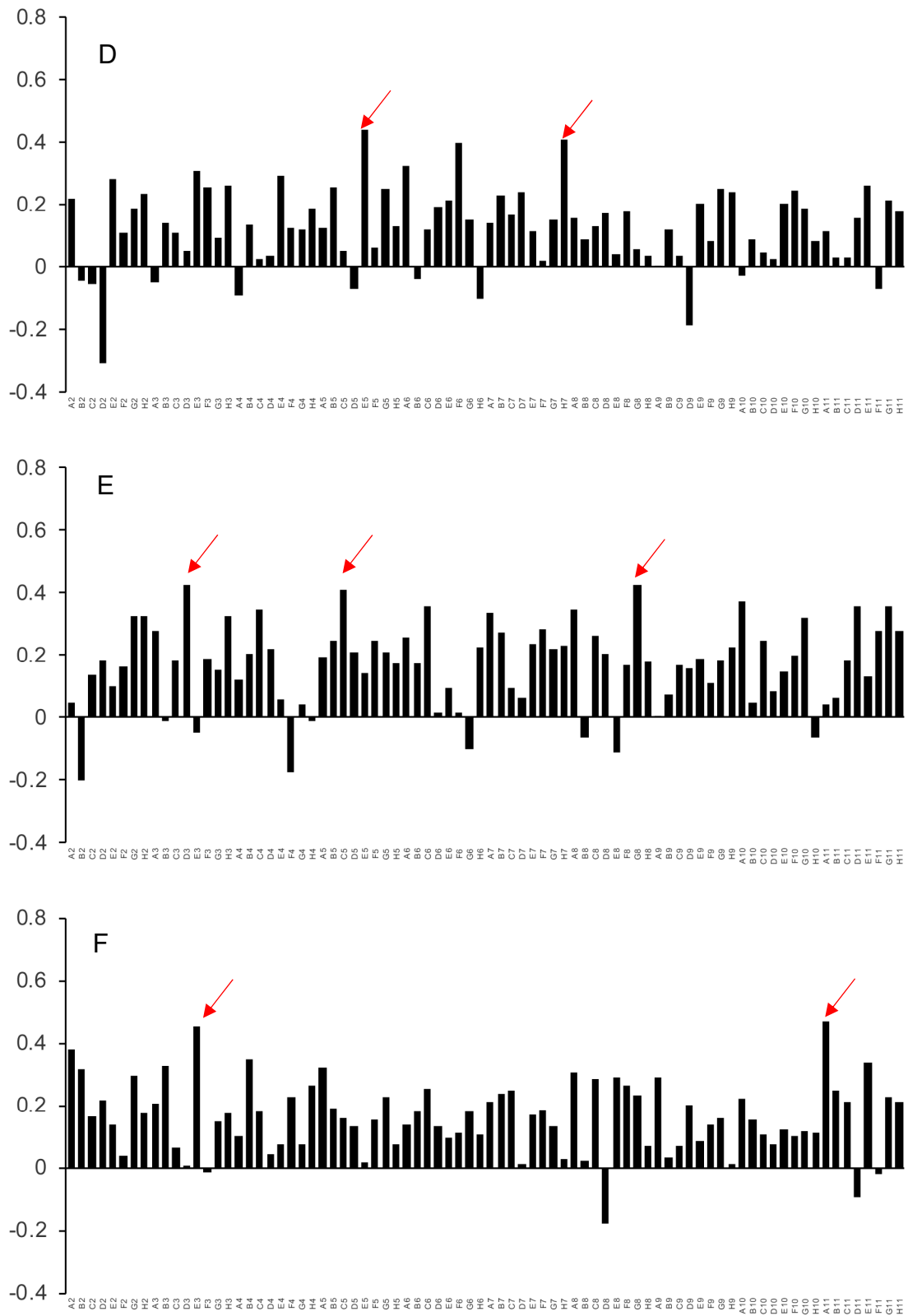


Fig.5. D-F 様々な化合物を含む 2 mM NaCl 溶液に対する嗜好性

716 分子をそれぞれ含む 2 mM NaCl 溶液と水を選択させた時の preference index を示す。赤矢印は index が 0.4 を超えたものを示す。N=4

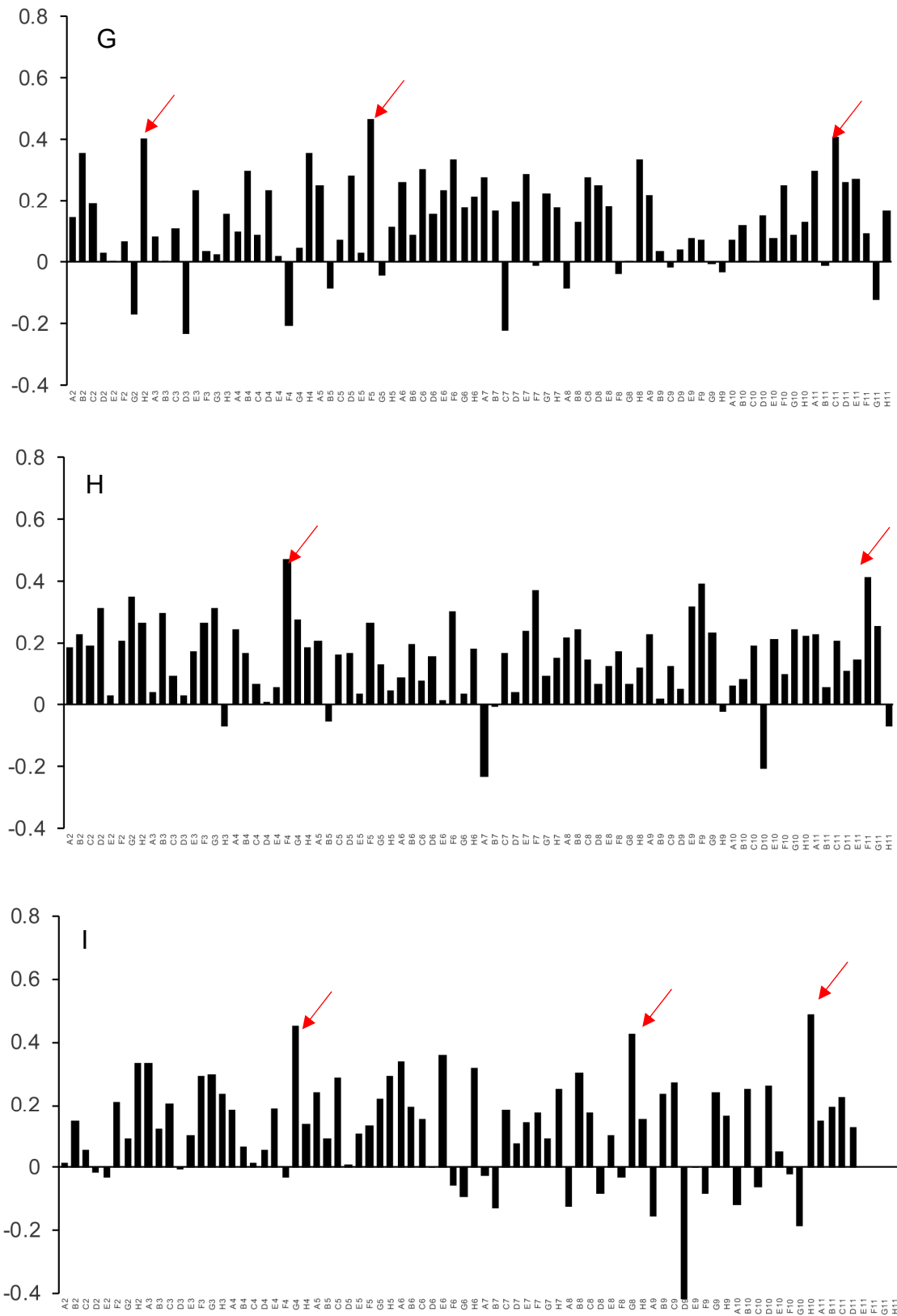


Fig.5. G-I 様々な化合物を含む 2 mM NaCl 溶液に対する嗜好性

716 分子をそれぞれ含む 2 mM NaCl 溶液と水を選択させた時の preference index を示す。赤矢印は index が 0.4 を超えたものを示す。N=4



Fig. 6. OGS-4 系統における候補分子の効果

図 5 で得られた 22 分子のうち 21 分子を Canton-S 系統同様に OGS-4 で実験を行った。いずれの分子も Canton-S 系統で見られた 0.4 を超える preference index を引き出すことは見られなかった。N=4

本研究で見出した 21 分子(スクリーニングは完了していないのでそれ以上に同定される可能性も高い)は有望な候補分子であるが、未だ不確定な点が多い。最も重要な点はこれら分子が真に塩味増強を引き起こしているかどうかである。そこで、ハエで同定されている別の塩味消失変異体⁽⁴⁾を用いた確認実験を予定している。さらにはラット等のほ乳類でも同様の塩味消失系統⁽⁵⁾を用いた解析を経て最終的にはヒトの官能テストを予定している。

毒性および高濃度における忌避性の検証も重要である。物質が同定された後は濃度を低濃度から高濃度へと変化させた場合のハエの嗜好性測定や長期間摂取させた場合の寿命を測定し、これら問題へと対応する。場合によっては同定された分子を修飾させることによりこれら問題を解決することが必要となるかもしれない。

5. 文献

1. Stähler F, *et al.* (2008) A Role of the Epithelial Sodium Channel in Human Salt Taste Transduction? *Chemosensory Perception* 1(1):78-90.
2. Hiroi M, Meunier N, Marion-Poll F, & Tanimura T (2004) Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *J Neurobiol* 61(3):333-342.
3. Ueno K, *et al.* (2006) Galpha is involved in sugar perception in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 26(23):6143-6152.
4. Zhang YV, Ni J, & Montell C (2013) The molecular basis for attractive salt-taste coding in *Drosophila*. *Science* 340(6138):1334-1338.
5. Midkiff EE, Fitts DA, Simpson JB, & Bernstein IL (1985) Absence of sodium chloride preference in Fischer-344 rats. *Am J Physiol* 249(4 Pt 2):R438-442.

Screening of Salt-Taste Enhancer Using Mutant Lacking Salt-Taste

Kohei Ueno, Minoru Saitoe

Learning and Memory project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Summary

Sodium chloride (NaCl) is a major substance to induce salt taste. Salt taste is an important factor for comfortable meals, however excessive intake of NaCl is higher risk for various diseases including high blood pressure, renal dysfunction and arrhythmia. Thus, artificial salt tastant or enhancer of salt taste is needed.

To explore novel substances, which modulate salt taste, we used *Drosophila melanogaster*. As mammal, *Drosophila* also prefers moderate concentration of NaCl and LiCl, and the preference is suppressed by amiloride. Moreover, in both mammal and fly, the salt taste sensitivity is enhanced by L-Arg.

First, by two-choice test, we examined the preference for various concentration of NaCl and found that 5 mM NaCl is closed to threshold. We obtained about 1000 molecules from Drug Discovery Initiative in Tokyo University. Then, we added each molecule to 5 mM NaCl solution and examined the preference to the salt solutions. We have tested 716 molecules and found that 22 molecules enhanced the preference for 5 mM NaCl. Previously, we found that one strain, OGS-4, does not show any preference to NaCl solutions. Since this fly normally exhibits the preference to sugars and avoidance to bitter substances, OGS-4 specifically lacks salt preference. We tested whether the 22 molecules induce preference in the OGS-4, and found that the 21 molecules failed to induce preference in the OGS-4 flies. These results imply that the 21 molecules specifically enhance salt taste in fly. In future, we need to examine whether these molecules induce salt taste in mammals.