

## 塩による甘味増強のメカニズム

吉田 竜介<sup>1</sup>, 實松 啓介<sup>2</sup><sup>1</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔生理学分野, <sup>2</sup>九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野

**概要** 塩化ナトリウム(NaCl)は、主に塩味を生じさせる物質であるが、スイカに塩をかけたり、お汁粉に塩を入れることで甘味がより強く感じられるように、甘味を増強、もしくは強調するような効果を持つことが経験的にも良く知られている。しかしながら、その基盤となる生理・分子メカニズムについてはまだよく分かっていない。甘味受容体は T1R2 と T1R3 (T1R2/T1R3) のヘテロ複合体により構成される。よって、T1R2/T1R3 の活性化が塩存在下で増強されることにより、塩による甘味増強が生じる可能性が考えられる。本研究では、ヒト味覚感受性が塩添加により変化するか解析すると共に、特に T1R2/T1R3 の機能に注目し、HEK 細胞を用いた強制発現系により塩の甘味増強効果の分子メカニズムについて検討した。ヒトの味覚感受性テストでは、ほぼ味の認識ができない低濃度の NaCl (3 mM) を加えるだけで、ショ糖、グルコース、アスパルテームといった甘味物質に対する認知閾値が低下した。一方、NaCl 添加は酸味 (HCl)、苦味 (QHCl)、うま味 (MSG+IMP) 認知閾値に影響を与えなかった。また、人工甘味料であるアスパルテームに対する甘味認知閾値は NaCl 添加でのみ低下し、糖であるショ糖、グルコースに対する甘味認知閾値は他の塩類 (NMDG-Cl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>) の添加でも低下する傾向が見られた。これらは、塩添加の効果が甘味に限定されることを示すと同時に甘味受容に複数のシステムが関わる可能性を示唆する。HEK 細胞を用いた強制発現系の実験では、Na free バス溶液中で Na を添加した刺激を与えるとカルシウム応答が減弱する傾向が見られた。HEK 細胞を、低濃度 Na を含むバス溶液で順応させるとそのような応答減弱が抑えられたことから、0, 3, 10 mM の Na を含むバス溶液中での各種刺激に対する応答を比較したところ、T1R2/T1R3 を発現する HEK 細胞のアスパルテームに対する応答は各バス溶液間で有意な差は見られず、シュクラロース応答は Na を含むバス溶液中で増大した。一方、内在性受容体を刺激するイソプレテレンールに対する応答は Na を含むバス溶液中で有意に減少し、苦味受容体 T2R38 を発現する HEK 細胞のフェニルチオカルバミドに対する応答も Na を含むバス溶液中で有意に減少した。以上の結果から、Na はヒト T1R2/T1R3 に作用し、甘味物質に対する応答を増大させる可能性が示唆される。

## 1. 研究目的

味覚は食物中に含まれる栄養物や摂取すべきではない毒物を認識するために必要不可欠な感覚であり、また、食を介した生活の質 (QOL) の向上にも大きく貢献する。現在、ヒトの味覚は 5 つの基本味 (甘味、塩味、うま味、苦味、酸味) が認められている。甘味は糖や炭水化物を、塩味はミネラルを、うま味はアミノ酸やタンパク質を、酸味は腐敗物などに含まれる酸を、苦味は毒物を検出する役割を持つと考えられる。末梢における味覚受容機構については、これまでの研究により多くのことが分かってきており、

甘味、うま味、苦味は G タンパク質共役型受容体を介し、塩味、酸味はチャネル型受容体を介し味細胞を興奮させ、その情報が味神経を介し中枢へと伝達されていく<sup>(1)</sup>。

塩化ナトリウム (NaCl) は、主に塩味を生じさせる物質であるが、スイカに塩をかけたり、お汁粉に塩を入れることで甘味がより強く感じられるように、甘味を増強、もしくは強調するような効果を持つことが経験的にも良く知られている。しかしながら、その基盤となる生理・分子メカニズムについてはまだよく分かっていない。塩味と甘味の受容体から脳へと至る情報ラインはそれぞれ異なると考えられ、そ

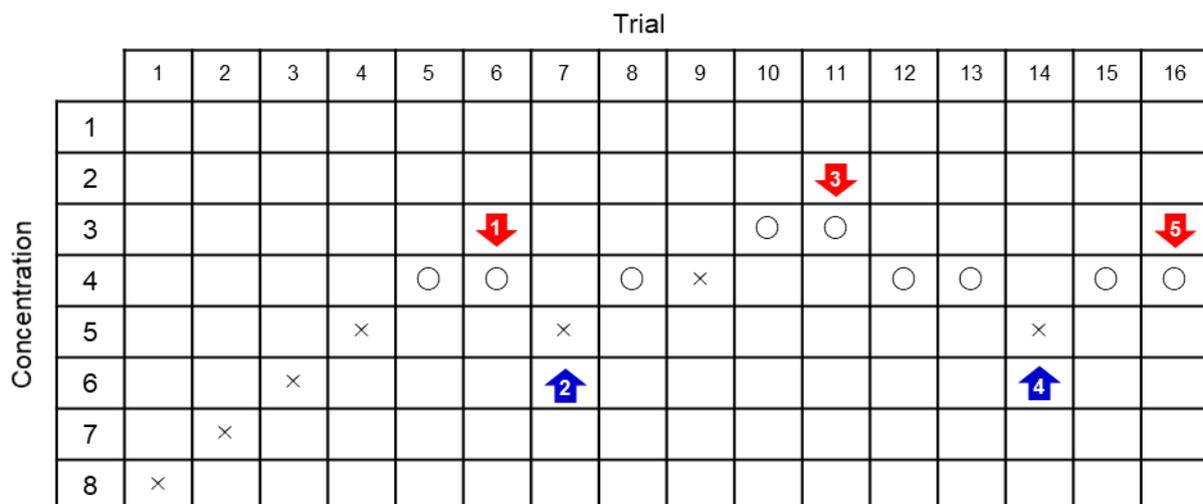
の相互作用は味細胞間、味覚神経間、もしくはさらに高次の中枢レベルで生じる可能性が考えられる。また、受容体レベルや味細胞内での相互作用の可能性も考えられる。我々の予備実験では、NaCl 濃度が塩味認知閾値以下でもショ糖に対する甘味感受性を増大させる結果を得た。これは、塩味受容細胞を活性化しない低濃度 NaCl でも、甘味増強効果を有する可能性を示唆する。すなわち、NaCl による甘味の増強は受容体レベルで生じる可能性が高いと推察される。甘味受容体は T1R2 と T1R3 (T1R2/T1R3) のヘテロ複合体により構成され<sup>(2)</sup>、この受容体の活性が塩の存在により変化する可能性が考えられる。また近年、マウス味蕾内で Na<sup>+</sup>-グルコーストランスポーター (SGLT1) が甘味受容体サブユニット T1R3 と共発現し、糖受容に関与する可能性が示されている<sup>(3)</sup>。SGLT1 は、Na<sup>+</sup>とグルコースを共輸送するため、塩による甘味増強効果が SGLT1 を介し生じる可能性も考えられる。本研究では、ヒト味覚感受性が低濃度塩の添加により変化するか調べると共に、特に T1R2/T1R3 の機能に注目し、HEK 細胞を用いた強制発現系により塩による甘味増強の分子メカニズムについて検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 塩による甘味増強に関するヒト味覚感受性の解析

本研究では、低濃度塩による甘味増強効果を検討する

ため、健常成人男女(男性 14 名、女性 8 名、年齢 21–44 歳、BMI:18.5 以上 25 以下)を対象に、ステアケース法にて味覚認知閾値を測定した(**Figure 1**)。まず、被験者に低濃度の味溶液(1 ml)を全口腔法により与え、蒸留水にて良くうがいた後、味質について回答させた。味質が不明な場合は、1 段階濃度の高い溶液を与え、蒸留水にて良くうがいた後、同様に味質について回答させた。このようにして上昇系列で味質が分かるまで濃度を増加させ、同濃度で 2 回連続味質が判別できる濃度を求めた。次に、濃度を 1 段階ずつ下げ、下降系列にて味質が分からなくなる濃度を求めた。この操作を 5 点の折り返しを得るまで行い、最初の 1 点を除いた 4 点を平均化することで、各被験者の各溶液に対する認知閾値を求めた。実験で使用した味溶液を **Table 1** に示す。被験者は、各試験日において最大 6 種の溶液(塩添加および塩無添加溶液を各 3 種)について味覚認知閾値を求めた。各試験間には 10 分以上のインターバルを設けた。また、同一被験者で別の溶液群に対する味覚認知閾値を求めるため、別日に試験を行ったが、その間は最低 1 日のインターバルを設けた。加える塩の濃度は、申請者らのこれまでのデータ(未発表)で、健常成人男女の NaCl の認知閾値が 13.6±10.8 mM (平均±SD, n=244)であり、そのうち約 90%が味を認知できなかった 3 mM を用いた。最高濃度の溶液で味が不明であった被験者のデータは除外した。



**Figure 1.** An example of determination of taste recognition threshold by stair-case method. Taste recognition threshold was determined as mean concentration of 4 peaks (indicated by arrows No.2-No.5)

**Table 1.** Taste solutions (mM)

| Tastant       | Conc1 | Conc2 | Conc3 | Conc4  | Conc5   | Conc6   | Conc7   | Conc8   |
|---------------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Sucrose       | 100   | 50    | 25    | 12.5   | 6.25    | 3.13    | 1.56    | 0.78    |
| Glucose       | 400   | 200   | 100   | 50     | 25      | 12.5    | 6.25    | 3.13    |
| Aspartame     | 1     | 0.5   | 0.25  | 0.125  | 0.0625  | 0.0313  | 0.0156  | 0.0078  |
| HCl           | 10    | 5     | 2.5   | 1.25   | 0.625   | 0.313   | 0.156   | 0.078   |
| quinine-HCl   | 0.1   | 0.05  | 0.025 | 0.0125 | 0.00625 | 0.00313 | 0.00156 | 0.00078 |
| MSG+0.5mM IMP | 1.56  | 0.78  | 0.39  | 0.2    | 0.1     | 0.05    | 0.025   | 0.0125  |

Additive: 3 mM NaCl, 3 mM NMDG-Cl, 3 mM KCl, 3 mM NaHCO<sub>3</sub>

## 2. 2 人工味細胞系を用いた塩による甘味増強分子機構の解析

Na<sup>+</sup>による甘味増強効果が甘味受容体 T1R2/T1R3 を介し生じるかを検討するため、HEK 細胞 (Human Embryonic Kidney cells 293) にヒト T1R2/T1R3 を強制発現させた人工味細胞系を利用した<sup>(4)</sup>。HEK 細胞にヒト T1R2, T1R3 および Ga16-gust44 を強制発現させ、カルシウム感受性色素 (Fluo4) を導入し、カルシウムイメージング法により受容体機能解析を行った。応答記録時に用いる細胞外溶液中の Na<sup>+</sup> を全て N-methyl-D-glucamine (NMDG) で置換した Na<sup>+</sup>-free バス溶液、および 3 mM または 10 mM Na<sup>+</sup> を含む NMDG 溶液 (3 mM Na<sup>+</sup> バス溶液、10 mM Na<sup>+</sup> バス溶液) において、アスパルテーム (APM)、シュクラロース (Sucra) で刺激し、生じた蛍光強度変化 ( $\Delta F/F$ ) を記録した。また、コントロールとして、同様の実験を HEK 細胞の内在性受容体刺激 [イソプロテレノール (Iso)] を用い行った。さらに、HEK293 細胞に苦味受容体ヒト T2R38 および Ga16-gust44 を強制発現させ、刺激としてフェニルチオウレア (PTC) を用いた実験を行った。

## 3. 研究結果

### 3. 1 ヒト味覚認知閾値に対する低濃度塩の影響

味の認知ができない、または難しい低濃度 (3 mM) の NaCl を用い、塩味以外の基本味に対する味覚認知閾値に対する塩添加の影響を調べた (Figure 2)。基本味刺激のうち、うま味溶液として用いたグルタミン酸ナトリウム (MSG) は Na<sup>+</sup> を含んでいるため、イノシン酸ナトリウム (IMP) を加えたうま味相乗効果に対する NaCl の影響について調べた。ショ糖 (Suc) に対する甘味認知閾値は、多

くの被験者で 3 mM NaCl を添加した方が低く、平均認知閾値も Suc のみ (10<sup>1.2</sup> mM) より 3 mM NaCl を添加した方 (10<sup>0.99</sup> mM) が低く、両者に統計学的有意差が見られた (ウィルコクソン符号検定, P<0.01, Figure 2A)。すなわち、3 mM NaCl を加えることで、Suc に対する甘味認知閾値が低下したと考えられる。同様に、多くの被験者で APM やグルコース (Glc) に対する甘味認知閾値も 3 mM NaCl を添加することで低下し、平均認知閾値も NaCl 添加の方が有意に低く (10<sup>-0.9</sup> mM vs 10<sup>-1.02</sup> mM for APM, 10<sup>1.76</sup> mM vs 10<sup>1.6</sup> mM for Glc)、両者に統計学的有意差が見られた (ウィルコクソン符号検定, P<0.05, Figure 2B,C)。一方、HCl に対する酸味認知閾値、キニーネ (QHCl) に対する苦味認知閾値、MSG+IMP に対するうま味認知閾値は 3 mM NaCl を加えても大きな差は見られず (10<sup>-0.41</sup> mM vs 10<sup>-0.42</sup> mM for HCl, 10<sup>-2.6</sup> mM vs 10<sup>-2.51</sup> mM for QHCl, 10<sup>-1.03</sup> mM vs 10<sup>-1.1</sup> mM for MSG +IMP)、統計学的有意差も認められなかった (ウィルコクソン符号検定, P>0.05, Figure 2D-F)。このように、ヒト甘味認知閾値は低濃度 NaCl を加えることで低下し、その効果は他の味質では見られないと考えられる。

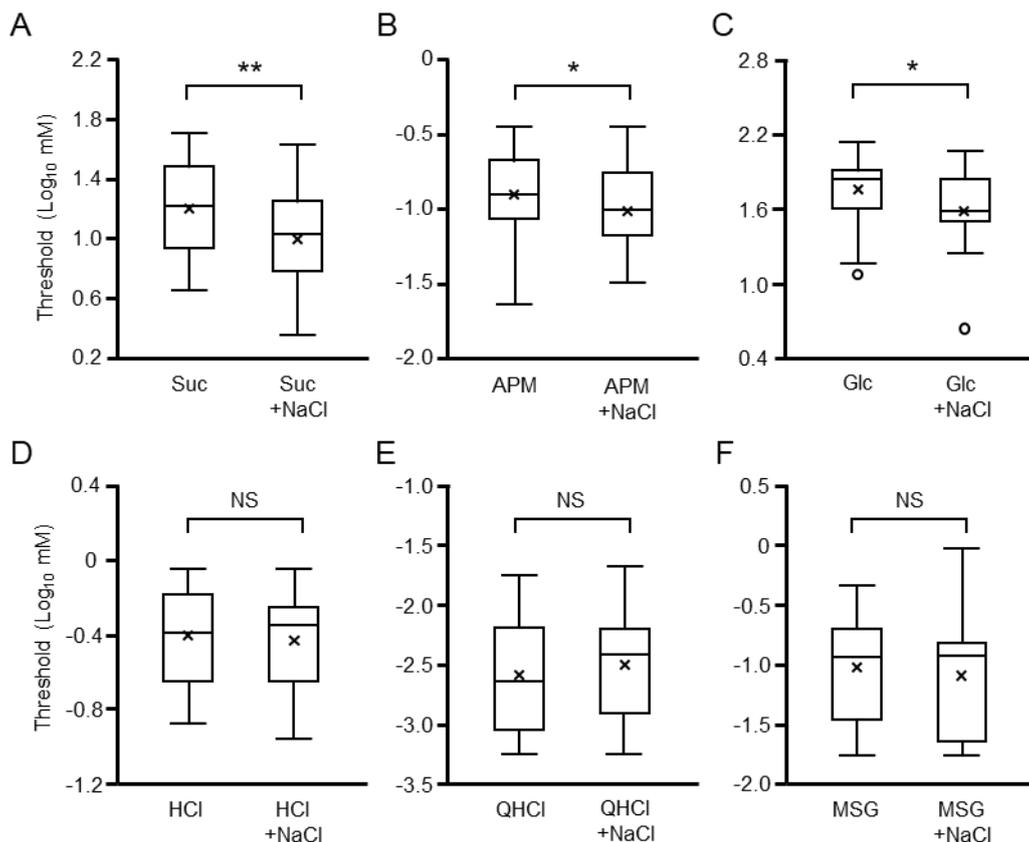
NaCl 以外の塩添加の影響を調べるため、NMDG-Cl, KCl または NaHCO<sub>3</sub> を添加した場合の Suc, APM, Glc に対する甘味認知閾値について測定した。3 mM NMDG-Cl を添加した場合、Suc に対する甘味認知閾値は多くの被験者で低下し、平均認知閾値も NMDG-Cl 添加の方が低く (10<sup>1.34</sup> mM vs 10<sup>1.18</sup> mM)、両者に統計学的有意差が見られたが (ウィルコクソン符号検定, P<0.05, Figure 3A)、APM と Glc ではそのような有意差は認められなかった (10<sup>-0.95</sup> mM vs 10<sup>-0.96</sup> mM for AMP, 10<sup>1.68</sup> mM

vs  $10^{1.57}$  mM for Glc, ウィルコクソン符号検定,  $P>0.1$ , **Figure 3B,C**). 3 mM KCl を添加した場合, Suc および Glc に対する甘味認知閾値は多くの被験者で低下し, 平均認知閾値も KCl 添加の方が低く ( $10^{1.2}$  mM vs  $10^{1.0}$  mM for Suc,  $10^{1.79}$  mM vs  $10^{1.64}$  mM for Glc), 両者に統計学的有意差が見られたが(ウィルコクソン符号検定,  $P<0.05$  または  $P<0.01$ , **Figure 4A,C**), APM ではそのような有意差は見られなかった ( $10^{-0.86}$  mM vs  $10^{-0.97}$  mM, ウィルコクソン符号検定,  $P>0.1$ , **Figure 4B**). 3 mM  $\text{NaHCO}_3$  を添加した場合, Suc および Glc に対する認知閾値は多くの被験者で低下し, 平均認知閾値も  $\text{NaHCO}_3$  添加の方が低く ( $10^{1.1}$  mM vs  $10^{0.83}$  mM for Suc,  $10^{1.57}$  mM vs  $10^{1.30}$  mM for Glc), 両者に統計学的有意差が見られたが(ウィルコクソン符号検定,  $P<0.05$ , **Figure 5A,C**), APM ではそのような有意差は見られなかった ( $10^{-1.09}$  mM vs  $10^{-1.14}$  mM, ウィル

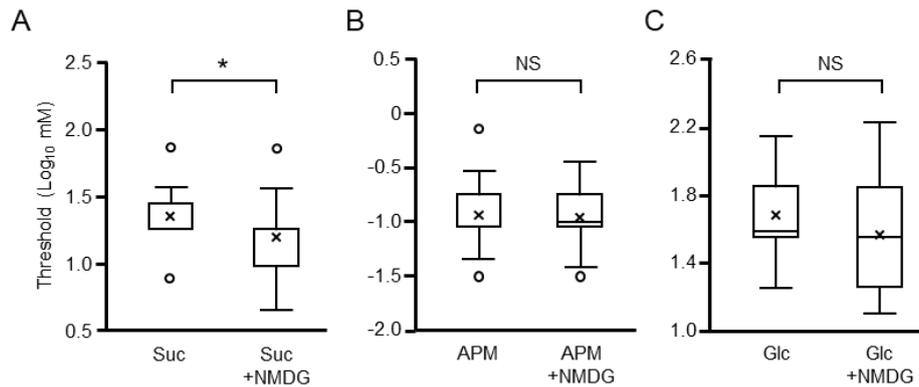
コクソン符号検定,  $P>0.1$ , **Figure 5B**).

### 3. 2. 人工味細胞系を用いた塩による甘味増強分子機構の解析

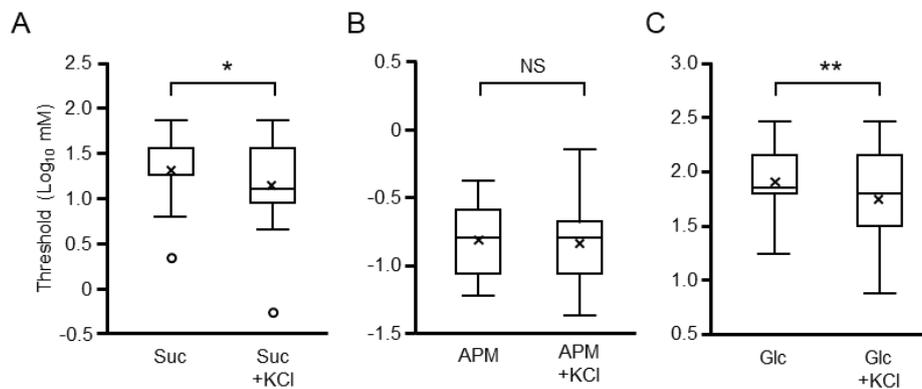
甘味受容体 T1R2/T1R3 を介した応答に対する  $\text{Na}^+$  の影響を検討するため, HEK 細胞にヒト T1R2/T1R3 を発現させ, 受容体機能解析を行った。まず, 細胞外溶液に  $\text{Na}^+$  イオンを含まない Na-free バス溶液中で HEK 細胞のカルシウム応答が記録できるか検討するため, HEK 細胞に  $\text{G}\alpha_{16}$ -gust44 を発現させ, 内在性受容体(アドレナリン  $\beta$  受容体)を活性化する Iso で刺激した (**Figure 6**)。Na-free バス溶液中でも, HEK 細胞は 1  $\mu\text{M}$  Iso へ応答を示したが, Iso 刺激にわずかな  $\text{Na}^+$  イオンを添加するだけで応答の減少が見られた (one way ANOVA,  $P<0.001$ , **Figure 6A,B**)。一方, HEK 細胞を 0, 3, 10 mM の  $\text{Na}^+$  を含むバス溶液に順応させたのちに Iso 刺激をした場合には,  $\text{Na}^+$  による応



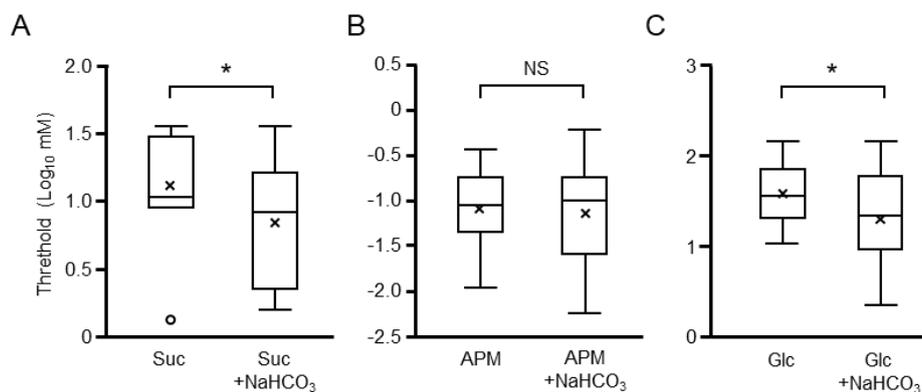
**Figure 2.** The effect of addition of 3 mM NaCl on taste recognition thresholds. Tested solutions were sucrose (A, n=22), aspartame (B, n=22), glucose (C, n=22), HCl (D, n=14), quinine-HCl (E, n=13) and monosodium glutamate + inosine-5'-monophosphate (F, n=13) with or without 3mM NaCl. X mark in the box plot indicates the mean threshold for all participants. NS: no significant difference, \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$  (Wilcoxon signed-rank test)



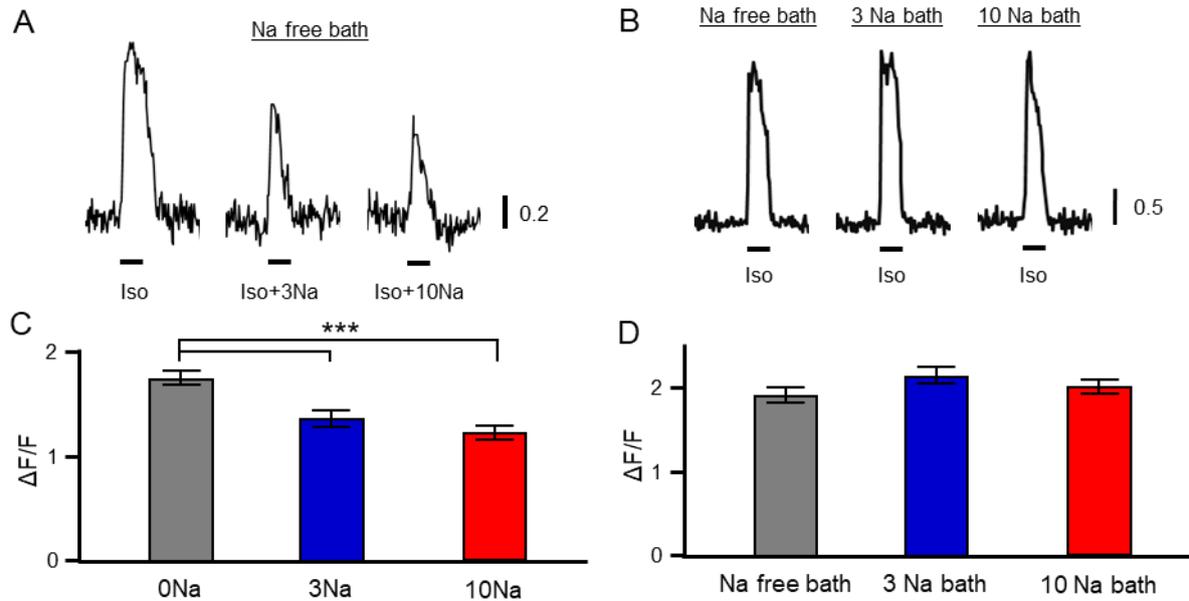
**Figure 3.** The effect of addition of N-methyl-D-glucamine (NMDG)-Cl on taste recognition thresholds for sweeteners. Tested solutions were sucrose (A, n=16), aspartame (B, n=16) and glucose (C, n=16) with or without 3 mM NMDG-Cl. X mark in the box plot indicates the mean threshold for all participants. NS: no significant difference, \*: P<0.05 (Wilcoxon signed-rank test)



**Figure 4.** The effect of addition of KCl on taste recognition thresholds for sweeteners. Tested solutions were sucrose (A, n=20), aspartame (B, n=20) and glucose (C, n=20) with or without 3 mM KCl. X mark in the box plot indicates the mean threshold for all participants. NS: no significant difference, \*: P<0.05, \*\*: P<0.01 (Wilcoxon signed-rank test)



**Figure 5.** The effect of addition of NaHCO<sub>3</sub> on taste recognition thresholds for sweeteners. Tested solutions were sucrose (A, n=12), aspartame (B, n=12) and glucose (C, n=12) with or without 3 mM NaHCO<sub>3</sub>. X mark in the box plot indicates the mean threshold for all participants. NS: no significant difference, \*: P<0.05 (Wilcoxon signed-rank test)



**Figure 6.** HEK cell responses to isoproterenol (Iso) in Na free and low Na bath solutions. A. Sample recordings of HEK cell responses to 1  $\mu$ M Iso in Na free bath solution. Iso was applied with 0, 3 or 10 mM Na ion. Horizontal bars indicate Iso stimulation (30 sec). B. Summarized data for HEK cell responses to 1  $\mu$ M Iso with 0, 3 or 10 mM Na ion in Na-free bath solution (n=35). C. Sample recordings of HEK cell responses to 1  $\mu$ M Iso in Na free, 3 mM Na and 10 mM Na bath solution. Horizontal bars indicate Iso stimulation (30 sec). D. Summarized data for HEK cell responses to 1  $\mu$ M Iso in Na free, 3 mM Na and 10 mM Na bath solution (n=33). Values are means  $\pm$  SE. \*\*\*: P<0.001 (post hoc Tukey HDS test)

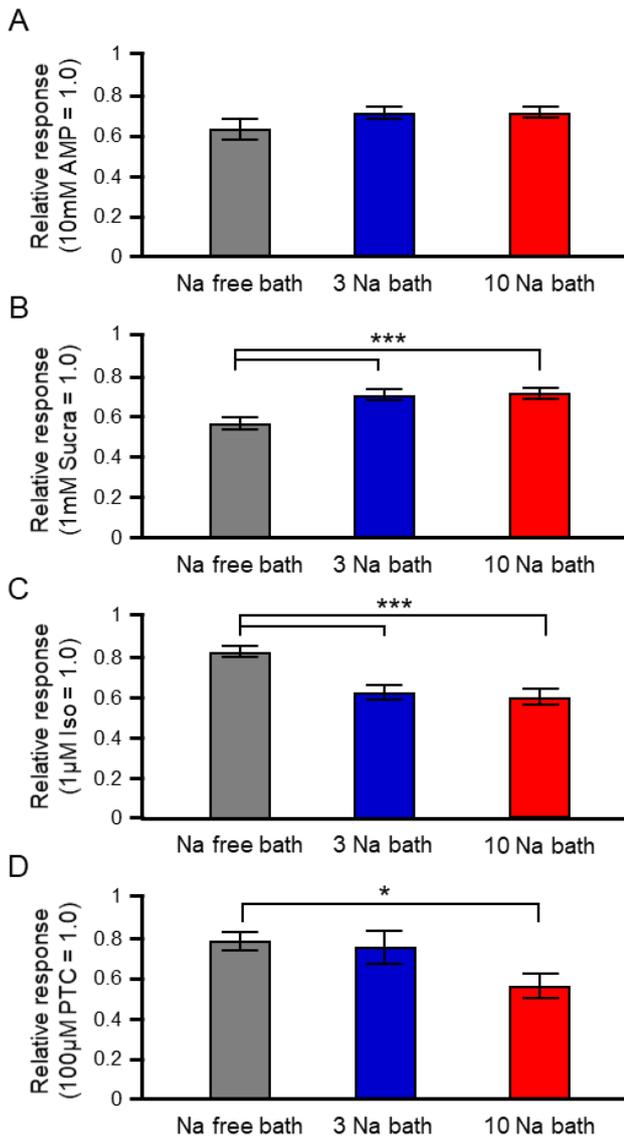
答減少が見られなかった (one way ANOVA, P>0. 1, **Figure 6C,D**)。このため、以下の実験ではバス溶液に、3 または 10 mM の Na<sup>+</sup>を含む条件で味刺激を行うことで、Na<sup>+</sup>の影響について検討した。

甘味受容体ヒト T1R2/T1R3 および Ga16-gust44 を発現させた HEK 細胞は APM に応答した。バス溶液が 0, 3, 10 mM の Na<sup>+</sup>を含む条件間での 1 mM APM に対する応答には有意差は見られなかった (one-way ANOVA, P > 0.05, **Figure 7A**)。別の人工甘味料である Sucra で刺激した場合、バス溶液が 0, 3, 10 mM の Na<sup>+</sup>を含む条件間での Sucra 応答には有意差が見られ (one-way ANOVA, P<0.001), Na 添加で Sucra 応答が増大する傾向が見られた (**Figure 7B**)。一方、Ga16-gust44 を発現させた HEK 細胞に対する Iso 応答でもバス溶液が 0, 3, 10 mM の Na<sup>+</sup>を含む条件間で有意差が見られたが (one-way ANOVA, P<0.001), Na 添加で Iso 応答が減少する傾向が見られた (**Figure 7C**)。同様に、苦味受容体ヒト T2R38 と Ga16-gust44 を発現させた HEK 細胞に対する PTC 応答でもバス溶液が 0, 3, 10 mM の Na<sup>+</sup>を含む条件間で有意

差が見られ (one-way ANOVA, P<0.05), Na 添加で PTC 応答が減少する傾向が見られた (**Figure 7D**)。

#### 4. 考 察

本研究では、経験的によく知られている塩による甘味増強について解析を行った。ヒトの味覚感受性テストでは、ほぼ味の認識ができない低濃度の NaCl (3 mM) を加えるだけで、Suc, Glc, APM に対する甘味認知閾値が低下した (**Figure 2A-C**)。一方、NaCl 添加は酸味 (HCl), 苦味 (QHCl), うま味 (MSG+IMP) 認知閾値に影響を与えなかった (**Figure 2D-F**)。これは低濃度 NaCl 添加の効果が甘味に限定されることを示す。また、人工甘味料である APM に対する甘味認知閾値は NaCl 添加でのみ低下し、糖である Suc, Glc に対する甘味認知閾値は他の塩類 [NMDG-Cl (Suc のみ), KCl, NaHCO<sub>3</sub>] の添加でも低下する傾向が見られた。これは、甘味受容に複数のシステムが関わる可能性を示唆する。APM は甘味受容体 T1R2/T1R3 により受容されると考えられる<sup>(6)</sup>が、マウスでは Suc や Glc に対する甘味受容には糖輸送体 (SGLT,



**Figure 7.** HEK cell responses in Na free and low Na solutions stimulated with APM, Sucra, Iso or PTC. Summarized data for HEK cell responses to 1 mM APM (A, n=53-73), 0.1 mM Sucra (B, n=42-56), 0.1 µM Iso (C, n=37-47) or 10 µM PTC (D, n=10-15) in Na free, 3 or 10 mM Na bath solution. Values are means ± SE. \*: P<0.05, \*\*\*: P<0.001 (post hoc Tukey HSD test)

GLUT)や $\alpha$ グルコシダーゼが関与する可能性が示されている<sup>(3,6)</sup>。これら複数の受容システムに対する塩類の効果がそれぞれ異なるために、甘味物質間で塩類の作用の違いが生じた可能性が考えられる。

NaCl 添加による甘味認知閾値の低下が APM でも見られたことから、その効果はヒト T1R2/T1R3 を介して生じると

推測された。そこで、HEK 細胞を用いた強制発現系を用い、ヒト T1R2/T1R3 の甘味物質受容に対する Na<sup>+</sup>の効果を解析しようと試みた。Na を NMDG に置換した Na-free 溶液中でも HEK 細胞の 1µM Iso に対するカルシウム応答は記録できたが、刺激に Na<sup>+</sup>を加えると大幅に応答が減弱した (Figure 6)。この現象がどのようなメカニズムにより生じるかは不明であるが、甘味刺激への Na 添加の効果を直接的に解析することが出来ないことが想定された。そこで、バス溶液に Na を添加し、順応させた後に刺激に対する応答を記録すると、0, 3, 10 mM Na バス溶液中で同等のカルシウム応答が記録できた。そのため、Na の効果は HEK 細胞をそれぞれの Na を含むバス溶液で順応させた時の応答強度を比較することで検証することとした。

ヒト T1R2/T1R3 を発現する HEK 細胞の APM に対する応答は 0, 3, 10 mM の Na を含むバス溶液中で有意差が見られなかったが、若干 Na 添加時の応答が大きい傾向が見られた (Figure 7A)。また別の人工甘味料である Sucra の刺激に対する応答は Na 含有バス溶液中で有意に増大した (Figure 7B)。一方、Iso に対する応答や、ヒト T2R38 を発現する HEK 細胞の応答は Na 含有バス溶液中で有意に減少した。これは、Na-free バス溶液中で Na を添加した刺激を与えた場合と近似している。これらの結果は、通常とは異なる、細胞外液に Na が存在しない状況下では、HEK 細胞のカルシウム応答は Na の存在により阻害される可能性を示唆する。APM 刺激で Na 添加の効果が有意に見られなかったことは、Na によるカルシウム応答阻害効果が Na の甘味受容体活性化効果を相殺したため生じた可能性がある。以上の結果から、Na はヒト T1R2/T1R3 に作用し、甘味物質に対する応答を増大させるのではないかと考えられる。

## 5. 今後の課題

ヒトの甘味受容に T1R2/T1R3 以外の受容システムが関与するかはまだ明らかとはなっていない。塩が T1R2/T1R3 以外の甘味受容システムにも作用し、甘味増強作用を発揮する可能性も残る。また、HEK 細胞の実験から、受容体に対する Na などのイオン添加の効果を直接検討する事が難しいことが示された。今後、受容体タンパク質と塩との相互作用を分子レベルで解析する構造解析試験などを行うことで、Na の甘味受容体に対する影響を

直接的に調べる必要がある。

## 6. 文献

- (1) Iwata S, Yoshida R, Ninomiya Y. (2014) Taste transductions in taste receptor cells: basic tastes and moreover. *Curr Pharm Des.* 20: 2684-92
- (2) Sanematsu K, Yoshida R, Shigemura N, Ninomiya Y. (2014) Structure, function, and signaling of taste G-protein-coupled receptors. *Curr Pharm Biotechnol.* 15: 951-61.
- (3) Yee KK, Sukumaran SK, Kotha R, Gilbertson TA, Margolskee RF. (2011) Glucose transporters and ATP-gated  $K^+$  (KATP) metabolic sensors are present in type 1 taste receptor 3 (T1r3)-expressing taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 5431-6.
- (4) Sanematsu K, Kusakabe Y, Shigemura N, Hirokawa T, Nakamura S, Imoto T, Ninomiya Y. (2014) Molecular mechanisms for sweet-suppressing effect of gymnemic acids. *J Biol Chem.* 289, 25711-20.
- (5) Li X1, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 4692-6.
- (6) Sukumaran SK, Yee KK, Iwata S, Kotha R, Quezada-Calvillo R, Nichols BL, Mohan S, Pinto BM, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF. (2016) Taste cell-expressed  $\alpha$ -glucosidase enzymes contribute to gustatory responses to disaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113, 6035-40

## Mechanisms for Sweet Enhancement by Addition of Salt

Ryusuke Yoshida<sup>1</sup>, Keisuke Sanematsu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Physiology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, <sup>2</sup>Section of Oral Neuroscience, Graduate School of Dental Science, Kyushu University

### Summary

It is well known that sweet taste is enhanced by addition of NaCl, however physiological/molecular mechanisms for sweet enhancement by addition of NaCl is not elucidated. Sweet receptor forms heterodimeric complex of T1R2 and T1R3. Therefore, sweet enhancement by salt may be caused by modulation of T1R2/T1R3 activity by salt. To test this possibility, the effects of addition of salt to tastants on taste recognition thresholds in humans and human T1R2/T1R3 activity in heterologous expression system were analyzed. In human taste sensitivity tests, sweet recognition thresholds for sucrose, glucose and aspartame were significantly lowered by addition of 3 mM NaCl, which was almost tasteless to participants. In contrast, recognition thresholds for bitter (quinine), sour (HCl) and umami (monosodium glutamate + inosine-5'-monophosphate) were not affected by addition of 3 mM NaCl. Other salts such as N-methyl-D-gluconate chloride (NMDG-Cl), KCl and NaHCO<sub>3</sub> also lowered sweet recognition threshold for sucrose and glucose but not for aspartame. These results suggest that the addition of salt selectively enhances sweet taste sensitivity in humans and that there are multiple sweet receptor systems in humans. In heterologous expression system using human embryonic kidney (HEK) cells, HEK cells were able to respond to their intrinsic receptor agonist isoproterenol even in Na free bath solution, which did not contain Na<sup>+</sup> by substitution of NMDG. However, HEK cell response to isoproterenol was significantly reduced by addition of low concentration of Na<sup>+</sup>, indicating that the effect of Na<sup>+</sup> could not be assessed directly by simple addition of Na<sup>+</sup>. Alternatively, the effect of Na<sup>+</sup> was assessed by adapting HEK cells to Na free and low Na containing bath solution. In such experiments, response of HEK cells expressing human T1R2/T1R3 to sucralose but not to aspartame was significantly larger in low Na containing bath solution. On the other hand, HEK cell response to isoproterenol and response of HEK cells expressing human bitter receptor T2R38 to phenylthiocarbamide were significantly smaller in low Na containing bath solution. In conclusion, Na ion may affect T1R2/T1R3 activity, which would lead to enhanced sweet responses.