

老化依存的な塩味感受性変化における唾液タンパク質の関与

成川 真隆¹, 三坂 巧²

¹京都女子大学家政学部, ²東京大学大学院農学生命科学研究科

概要 超高齢社会に突入した現代, 高齢者の健康維持は社会的に重大な関心事である。年を取ると味覚が衰え, 食が細くなる。そのため, 味覚機能の維持は健康な生活を送る上で重要となる。これまでの検討において, 老化により塩味感受性が変化することを見出している。しかし, どのようなメカニズムで老化により塩味感受性が変化してしまうのか, その詳細は不明である。唾液は食物成分を溶かし, 味覚器との接触を促進する働きを持つ。近年, 唾液タンパク質が塩味感受性に影響することが示唆されている。そのため, 老化による唾液タンパク質の組成変化が塩味感受性に影響を与える可能性が考えられた。しかしながら, 老化により唾液組成がどう変化し, その変化が塩味感受性にどのような影響を与えているのかは明らかではない。本研究では, 唾液が老化依存的な塩味感受性変化に及ぼす影響を明らかにするために, 唾液が塩味検知に及ぼす影響の検討と, 老化によって存在量が増加する唾液タンパク質の同定を試みた。

まず, 唾液腺を除去した唾液腺除去マウスを作製し, 塩味感受性を確認した。唾液腺除去群でも塩味溶液に対する感受性は観察された。しかし, 偽手術群と比較して, 除去群では塩味溶液に対して有意に高い嗜好率を示し, 唾液の存在が正常な塩味検知に必要であることを確認した。ついで老化に伴い唾液タンパク質組成が変化し得るかどうかを, 若齢と高齢マウスから採取した唾液サンプルを対象に解析を行った。633種類のタンパク質分子が若齢, 高齢マウスの唾液中から同定された。これらを対象とし, 老化により存在量が増加する分子の抽出を試み, 高齢群で発現量が増加する分子として14分子, 発現量が低下する分子として9分子見出すことに成功した。この結果は, 老化により唾液タンパク質組成が変化することを示唆する。

1. 研究の背景と目的

おいしい食べ物を食べることは, 人生の楽しみの一つである。味覚に障害が起これば, 食欲を失い, 健康を維持することが難しくなる。超高齢社会に突入した現代, 高齢者の健康維持は社会的に重大な関心事である。年を取ると味覚が衰え, 食が細くなる。そのため, 味覚機能の維持は健康な生活を送る上で重要となる。

ヒトを対象とした研究において, 老化により味感受性が低下することが示されている。しかし, どのようなメカニズムで老化により味感受性が低下してしまうのか, その詳細は不明である。これまでに我々は, 老化による味感受性の変化の要因を検討し, 老化依存的に塩味や苦味感受性が著しく変化すること, 一方このとき, 味蕾細胞で発現する味

覚受容体の発現量や味蕾細胞の代謝速度に顕著な変化は認められないことをマウスで見出している^{1, 2)}。この結果は老化依存的な味感受性の変化には味蕾細胞以外の要因が関与する可能性を示唆する。

唾液は食物成分を溶かし, 味覚器との接触を促進する働きを持つ。99%以上は水分から成るが, 電解質や様々なタンパク質が含有される。近年, 唾液中の Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1 (IGHG1)などの量が塩味感受性と相関することが報告され³⁾, 唾液タンパク質が味感受性に影響することが示唆されている。つまり, 老化による唾液タンパク質の組成変化が塩味感受性に影響を与える可能性が考えられる。しかしながら, 老化により唾液組成がどう変化し, その変化が塩味感受性にどのような影響を与

えているのかは明らかではない。そこで本研究では、唾液が老化依存的な塩味感受性変化に及ぼす影響を明らかにするために、まず塩味検知における唾液の関与を検討し、次いで老化によって存在量が増減する唾液タンパク質の同定を試みた。

2. 研究方法

2.1 実験動物 実験動物は C57BL/6J 系統雄マウスを用いた。市販固形食を飼料として与え、飼料と水は *Ad lib* で与えた。

2.2 唾液腺除去マウス 唾液は主に 3 つの大きな唾液腺、耳下腺、顎下腺、舌下腺から分泌される。これら 3 つの唾液腺を除去した唾液腺除去群と、唾液腺を除去しない偽手術を施した偽手術群を設けた。6 週齢で手術を行い、回復期間を経た 8 週齢から味感受性試験を実施した。

2.3 塩味感受性試験 味感受性は 48 時間二瓶選択試験で測定した。48 時間を 1 セットとし、各マウスに 2 本の飲水瓶を提示した。飲水瓶の一方には水、もう一方に塩味溶液を入れ 24 時間自由飲水させた。24 時間後、飲水瓶の位置による偏りを防ぐため、左右を入れ替え、さらに 24 時間自由飲水させた。塩味溶液の飲水量を全体の飲水量で割ることで、塩味に対する嗜好率を求めた。塩味溶液として、10-500 mM NaCl 溶液を用いた。

2.4 唾液タンパク質の採取と測定 麻酔下の若齢(18 週齢)および高齢マウス(115 週齢)の腹腔内にピロカルピン塩酸塩を投与し、投与後 10 分間に分泌された唾液を採取した。採取した唾液中のタンパク質濃度は BCA 法で求めた。次いで、タンパク質濃度が等しくなるよう群毎に唾液をプールし、これを質量分析法による相対定量解析に供した。発現変動したタンパク質分子として、若齢マウスと高齢マウス間の量比が 3.0 以上、もしくは 0.5 未満のものを抽出した。

2.5 統計検定 味感受性試験では二元配置分散分析を行い、その他の測定に関しては *t*-test を行った。

3. 研究結果

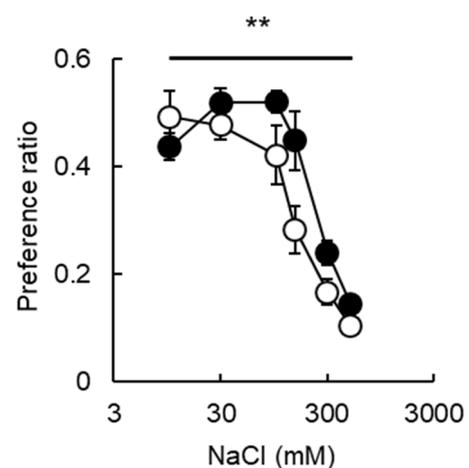
3.1 唾液腺除去による塩味感受性変化

まず、塩味の検知における唾液の役割を明らかにするために、唾液腺を除去した唾液腺除去マウスを作製し、塩味感受性を確認した。唾液腺除去群でも NaCl 濃度に応じた嗜好率の変化が観察され、唾液腺を除去したとしても

NaCl に対する感度が消失しないことを確認した (**Fig. 1**)。一方、偽手術群と除去群間で NaCl に対する嗜好率を比較した際、唾液腺除去群で NaCl 溶液に対して有意に高い嗜好率を示し、唾液腺除去により塩味感受性が変化することがわかった。このことは、唾液の存在が正常な塩味検知に必要な可能性を意味する。このとき、偽手術群、除去群の有郭乳頭味蕾の形態や代表的な味関連分子の発現を比較したが、両者において明確な違いは確認できなかった(データ示さず)。したがって、唾液腺除去は味蕾自体の機能には大きな影響を及ぼさない可能性が考えられた。

3.2 老化に伴う唾液タンパク質の変化

唾液が正常な塩味検知に必要なことが確認されたことから、ついで老化に伴い唾液タンパク質組成が変化し得るかどうかを調査した。まず、唾液中に含まれるタンパク質の種類について検討した結果、両サンプルの唾液中から 633 種類のタンパク質分子が同定された。次いで、これらタンパク質分子を対象として、老化により存在量が増減する分子の抽出を試みた。その結果、高齢群で発現量が増加した分子が 14 分子 (**Table 1**)、高齢群で発現量が低下した分子は 9 分子確認された (**Table 2**)。このように、老化により唾液タンパク質組成が変化する可能性が示唆された。なお、若齢マウスと高齢マウス間の唾液タンパク質濃度は、有意ではないが、高齢群で低下傾向する傾向が認められた (**Fig. 2**)。



○偽手術群, ●唾液腺除去群

Fig. 1. 唾液腺除去マウスの塩味溶液に対する嗜好率
** $p < 0.01$ (Two way ANOVA, 各群 $n = 6$)

Table 1. 高齢群で発現量が増加した分子

Carbonic anhydrase 3
Fatty acid-binding protein, adipocyte
Hemoglobin subunit alpha
Hemoglobin subunit beta-1
Hemopexin
Ig gamma-2A chain C region secreted form
Ig gamma-2B chain C region
Ig kappa chain C region
Ig mu chain C region
Parvalbumin alpha
Protein S100-A9
Serotransferrin
Serum albumin
Small proline-rich protein 2B

Table 2. 高齢群で発現量が低下した分子

Chitinase-like protein 4
Major urinary protein 1
Mucin-like protein 2
Prostate and testis expressed protein 4
Repetin
Seminal vesicle secretory protein 4
Seminal vesicle secretory protein 5
Seminal vesicle secretory protein 6
Uteroglobin

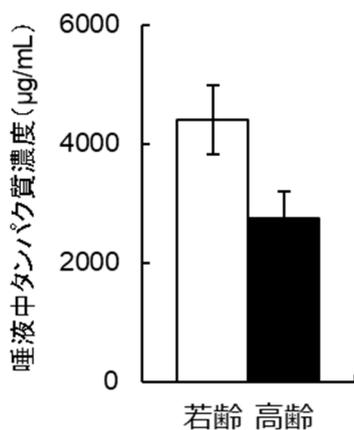


Fig. 2. 唾液中のタンパク質濃度 (若齢群 n=6, 高齢群 n=3)

4. 考察と今後の課題

これまでに我々の検討で、老化による味感受性の変化は、塩味と苦味など一部の味質に対する味感受性のみが変化し、酸味や甘味、うま味に対する感受性は変化しないといったように、老化による影響を受ける味質と影響を受けない味質が存在することを見出している¹⁾。この結果は、味質特異的に影響を与える要因の存在を強く示唆する。

唾液は食物の消化の補助や口腔内環境を維持する機能を有する。老化との関係では、加齢により刺激唾液の分泌量は変化しないものの、安静唾液の分泌量が減少すると報告されている⁴⁾。一方で、唾液中には味質特異的に相互作用するタンパク質が存在することがいくつか報告されている^{3,5-7)}。塩味の場合、塩味感受性と関連のある唾液タンパク質として以下成分がヒトで報告されている³⁾: Deleted in Malignant Brain Tumors 1 protein (DMBT1), Lipocalin 1 (LCN1), Actin Gamma 1 (ACTG1), Coronin 1A (CORO1), Defensin Alpha 3 (DEFA3), IGHG1, IGHG2, IGHG3, Lactotransferrin (LTF), S100 Calcium Binding Protein A8 (S100A8), Small Proline Rich Protein 1A (SPR1A), Transferrin (TF)。したがって、老化により唾液タンパク質の組成が変化した結果、特定の味質に対する感受性に影響を及ぼしたのではないかと考えられた。

唾液腺除去マウスにおいても、塩味に対する濃度依存的な嗜好率の変化が観察された。しかしながら、その嗜好率は偽手術群と比較して、有意に高値、特に、忌避率の低下が認められた。このことは、正常な塩味検知に唾液の存在が必要であることを意味する。同系統のマウス (C57BL/6J 系統) を用いた過去の解析においても、塩味嗜好率は老化によって上昇していた¹⁾。したがって、唾液腺除去マウスの塩味嗜好率の変化は老齢マウスのそれと類似したパターンを示していると言える。このことは、唾液が老化による塩味感受性変化に影響を与える可能性を示唆する。塩味は嗜好性と忌避性の塩味成分から成る^{8,9)}。高齢マウスでは嗜好性の塩味成分が増加していることを観察している¹⁾。今後、唾液腺除去がどちらの塩味成分に影響を与えているのかを、引き続き検討する予定である。

塩味感受性と相互作用する可能性のある唾液タンパク質のうち、Serotransferrin の存在比が高齢群で高値を示していた。DMBT1, CORO1, IGH, LFT, S100A8 に関しては検出されたものの、高齢群と若齢群で同程度の存在量

であり, LCN1, ACTG1, DEFA3, SPR1A は高齢, 若齢群のいずれにおいても検出されなかった。また, これらの分子中には存在比が低下したものは認められなかった。唾液腺を除去することで塩味嗜好率が上昇したことから, 高齢群で存在量が低下したもののうち, 塩味感受性に影響を与える分子が存在する可能性が考えられる。今後は, 存在量の低下した分子に着目して, 引き続き検討を進める予定である。

5. 文献

- 1) Narukawa M, Kurokawa A, Kohta R, and Misaka T, *Neuroscience*, 358, 249-260 (2017).
- 2) Narukawa M, Kamiyoshihara A, Kawae M, Kohta R, and Misaka T, *Exp Gerontol*, 113, 64-73 (2018).
- 3) Stolle T, Grondinger F, Dunkel A, Meng C, Médard G, Kuster B, and Hofmann T, *J Agric Food Chem*, 65, 9275-9286 (2017).
- 4) Percival RS, Challacombe SJ, and Marsh PD, *J Dent Res*, 73, 1416-20 (1994).
- 5) Dsamou M, Palicki O, Septier C, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chagnon MC, and Morzel M, *Chem Senses*, 37, 87-95 (2012).
- 6) Cabras T, Melis M, Castagnola M, Padiglia A, Tepper BJ, Messana I, and Tomassini Barbarossa I, *PLoS One*, 7, e30962 (2012).
- 7) Morzel M, Chabanet C, Schwartz C, Lucchi G, Ducoroy P, and Nicklaus S, *Eur J Pediatr*, 173, 575-82 (2014).
- 8) Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJP, and Zuker CS, *Nature*, 464, 297-301 (2010).
- 9) Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJP, and Zuker CS, *Nature*, 494, 472-475 (2013).

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 研究助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団ならびに関係の皆様
に厚く御礼申し上げます。

Participation of Salivary Proteins on Salt Taste Detection

Masataka Narukawa¹, Takumi Misaka²

¹Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University

²Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Summary

Previous studies have shown that aging modifies salt taste sensitivity. However, the factors affecting the changes in salt taste sensitivity remain unclear. Saliva is considered an important regulator of oral health. Recent studies have shown that salivary components, including proteins, affect salt taste sensitivity. Thus, changes in salivary proteins due to aging may influence salt taste sensitivity. However, it is not clear how the composition of saliva changes with aging and how the changes affect salt taste sensitivity. In this study, to clarify the effect of saliva on age-dependent changes in salt taste sensitivity, we investigated the role of saliva in salt taste detection and attempted to identify salivary proteins that change with aging. We prepared mice whose salivary glands had been removed and measured their salt taste sensitivity. We observed the taste sensitivity of mice toward salty solutions and found that the salivary gland removal group showed a significantly higher preference ratio for salty solutions than the sham group. This indicates that the presence of saliva is necessary for normal detection of salty taste. Thereafter, we analyzed whether the salivary protein composition changes with aging. A total of 633 proteins were identified in saliva samples collected from young and old mice. We attempted to determine which among the molecules change with aging. We identified 14 and 9 molecules whose abundance level increased and decreased in old mice, respectively. This result suggests that the composition of salivary protein changes with aging.