

## 唾液タンパク質による塩味修飾作用の検証

成川 真隆

京都女子大学家政学部

**概要** 老化により塩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塩味感受性が低下してしまうのか、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。そのほとんどが水分であるが、有機成分として多様なタンパク質が含まれている。老化と唾液の関係を調査した検討において、唾液の分泌量が加齢に伴い変化する可能性が示唆されている。一方、ある種の唾液タンパク質の量と塩味感受性が相関する可能性が報告されている。これらのことから、老化による唾液タンパク質組成の変化が塩味感受性に影響を及ぼすと仮説立てた。

この仮説を検証するために、我々は高齢と若齢マウスから採取した唾液を対象とし、老化により存在量が増加するタンパク質の同定を試みた。その結果、老化により存在量が増加する分子を複数同定することに成功した。興味深いことに、これら分子中には塩味感受性との相関が示唆されているものが含まれていた。

そこで本研究では、実際にそれら分子が塩味応答を修飾し得るかどうか、塩味受容体のヒト上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) 発現細胞を用いて検討した。

本検討では唾液タンパク質として、老化により存在量が最も増加した分子である **Serotransferin (TF)** と、最も低下した分子である **Seminal vesicle secretory protein 4 (SVS4)** を解析対象とした。ENaC 発現細胞への SVS4 の投与は膜電位に有意な影響を及ぼさなかった。一方で、TF の投与によって有意な膜電位の上昇が観察された。これらの結果は、唾液タンパク質が塩味感受性に影響を及ぼす可能性を示唆すると共に、TF がその要因のひとつになり得ることを示す。

### 1. 研究目的

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。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、マウスを用いて老化による味感受性の変化の要因を検討し、老化依存的に塩味感受性が大きく変化することを見出している<sup>1)</sup>。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かった<sup>1)</sup>。この結果は老化依存的な塩味感受性の変化には味蕾細胞以外の要因が関与することを示唆する。

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。そのほとんどが水分であるが、有機成分として多様なタンパク質が含まれている。老化と唾液の関係を調査した検討において、唾液の分泌量が加齢に伴い変化する可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。一方、唾液中の **Transferrin** や **IgG** などのタンパク質の量が塩味感受性と相関することも報告されている<sup>3)</sup>。これらのことから、老化による唾液タンパク質組成の変化が塩味感受性に影響を及ぼすと仮説立てた。この仮説を立証するために、我々は高齢と若齢マウスから採取した唾液を対象とし、老化により存在量が増加

するタンパク質の同定を試みた<sup>4)</sup>。その結果、老化により存在量が増加する分子を複数同定することに成功した。興味深いことに、これら分子中には塩味感受性との関係が示唆されているものが含まれていた。そこで本研究では、実際にそれら分子が塩味応答を修飾し得るかどうか、塩味受容体発現細胞を用いて検証することを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 タンパク質

唾液タンパク質として、Serotransferrin (TF) および Seminal vesicle secretory protein 4 (SVS4) を対象とした。それぞれ 0.01, 0.1, 1  $\mu\text{g/ml}$  で細胞に投与した。

### 2.2 塩味受容体を用いた応答解析

塩味受容体として、ヒト上皮性 Na チャネル (ENaC) を対象とした。ENaC は  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  サブユニットからなるヘテロ三量体として機能することから、ENaC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  を HEK293T 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて導入した。これを 96 well plate に播種し、24 時間培養した。ついで、膜電位感受性色素を細胞に負荷し、タンパク質投与前後における膜電位の変化を測定した。また、この膜電位変化が ENaC を介した応答かどうかを判断するために、ENaC 阻害剤アミロライドを共投与した際の応答も記録した。蛍光測定および解析にはマイクロプレートリーダーシステム Flexstation III を用いた。

測定には以下の組成のアッセイバッファーを用いた；

130 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM d-glucose (pH 7.4)。

アッセイバッファーには NaCl が 130 mM 含まれることから、タンパク質による塩味応答修飾作用はタンパク質投与による膜電位の変化(相対蛍光強度変化  $\Delta F/F_0$ )として示した。

### 2.3 統計検定

統計検定は GraphPad Prism 6 (MDF 社) を用いて、Bonferroni 法を行った。

## 3. 研究結果

### 3.1 解析対象とした唾液タンパク質

高齢と若齢マウスから採取した唾液を対象とし、老化により存在量が増加する分子の抽出を試みた結果、老化により存在量が増加する分子を複数確認した<sup>4)</sup>。この中から塩味感受性との関係が示唆されるもの抽出し、老化により存在量が最も増加した Serotransferrin (TF) と、最も低下した Seminal vesicle secretory protein 4 (SVS4) を解析対象とした (Table. 1)。

Table. 1 解析対象とした唾液タンパク質

| Description                                | 発現量比<br>(高齢/若齢) |
|--|-----------------|
| Serotransferrin (TF)                       | 3.06            |
| Seminal vesicle secretory protein 4 (SVS4) | 0.23            |

### 3.2 唾液タンパク質による塩味応答修飾作用

まず、TF 投与による塩味応答修飾作用を検討した。その結果、TF 濃度依存的に ENaC 発現細胞の膜電位が上昇した (Fig. 1A 及び 1B)。特に、1  $\mu\text{g/ml}$  TF の投与により膜電位の有意な上昇が認められた (Fig. 1B)。また、この膜電位の上昇は ENaC 阻害剤である 10  $\mu\text{M}$  アミロライドの共投与により抑制された (Fig. 1A)。

次いで、SVS4 投与による塩味応答修飾作用を検討した。しかしながら、SVS4 の投与によって有意な膜電位の変化は認められなかった (Fig. 2A 及び 2B)。これらの結果から、TF が塩味応答修飾作用を有する可能性が考えられた。

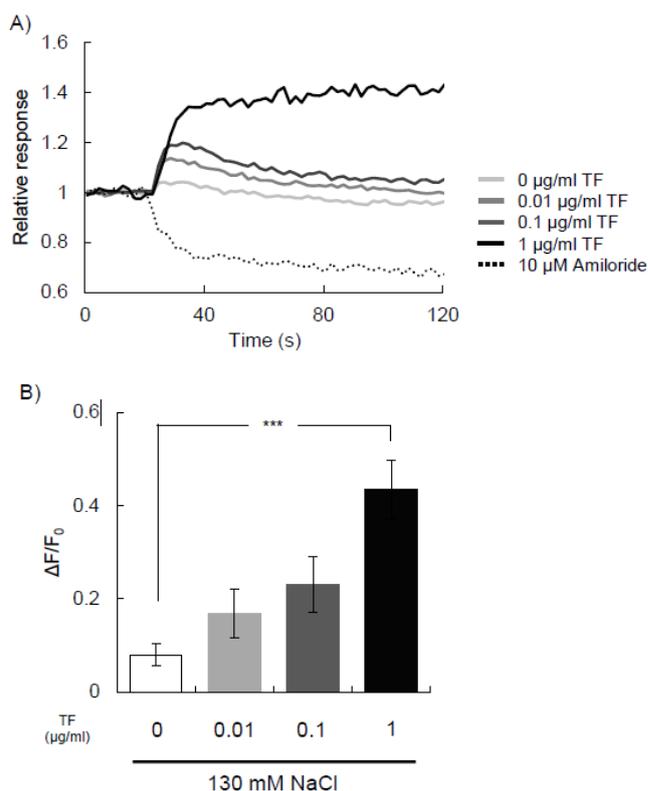
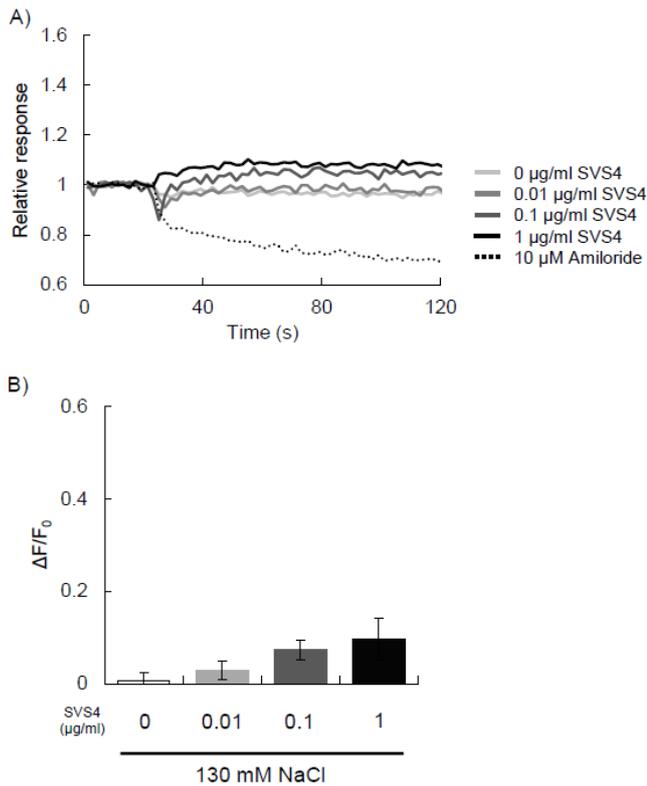


Fig. 1 Serotransferrin (TF) 投与による塩味応答の変化

A) 代表的な応答トレース,

B) 異なる濃度刺激に対する応答強度 (n = 8)



**Fig. 2** Seminal vesicle secretory protein 4 (SVS4) 投与による塩味応答の変化

A) 代表的な応答トレース,  
B) 異なる濃度刺激に対する応答強度 (n = 6)

#### 4. 考察と今後の課題

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とともに、味の検知においても重要な働きをする。実際、唾液腺除去マウスでは塩味嗜好性が著しく変化する<sup>4)</sup>。また、唾液中には塩味感受性と相関するタンパク質が存在することが報告されている<sup>3)</sup>。これら知見は、唾液タンパク質が塩味の受容において役割を果たす可能性を示唆する。そこで、本研究では唾液タンパク質による塩味応答修飾作用を検討することとした。

塩味は嗜好性と忌避性の塩味成分に分けられる。それぞれの受容には異なる塩味受容体, ENaC もしくは TMC4 の関与が示唆されている<sup>5)</sup>。高齢マウスでは若齢マウスに比べ嗜好性の塩味成分が上昇していたことから<sup>1)</sup>、ここでは嗜好性の塩味の発生に関与する ENaC を評価対象とした。唾液タンパク質として、高齢マウスにおいて存在量が最も増加した TF と低下した SVS4 に着目した。そのうち TF の投与によって ENaC の膜電位上昇が確認された。膜電位の上昇は塩味強度の増加を意味する。つまり、TF の

存在によって嗜好性の塩味強度が上昇したと考えることができる。高齢マウスにおいて TF の存在量が増加していたことから、高齢マウスにおける塩味嗜好率上昇の一因として、TF の関与が示唆された。

これまでの検討で、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<sup>1)</sup>。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。唾液タンパク質が味質特異的な味感受性変化の要因になり得るかを明らかにするために、今後 TF が塩味以外の味応答を修飾するかどうかを検討する予定である。また、上記 2 分子の他にも、存在量に変化した分子をいくつか見出している。同様の解析を行い、老化による味感受性変化における唾液タンパク質の寄与について明らかにしたいと考えている。

#### 5. 文献

1. Narukawa M, Kurokawa A, Kohta R and Misaka T: Participation of the peripheral taste system in aging-dependent changes in taste sensitivity. *Neuroscience* 358, 249-260 (2017)
2. Percival RS, Challacombe SJ and Marsh PD: Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res* 73, 1416-20 (1994)
3. Stolle T, Grondinger F, Dunkel A, Meng C, Médard G, Kuster B and Hofmann T: Salivary proteome patterns affecting human salt taste sensitivity. *J Agric Food Chem* 65, 9275-9286 (2017)
4. 成川真隆. and 三坂巧.: 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. 公益財団法人ソルトサイエンス研究財団 2020 年度助成研究報告書集 II 223-226 (2022)
5. Kasahara Y, Narukawa M, Takeuchi A, Tominaga M, Abe K and Asakura T: Molecular logic of salt taste reception in special reference to transmembrane channel-like 4 (TMC4). *J Physiol Sci* 72, 31 (2022)

#### 6. 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へ厚く御礼申し上げます。

## Analysis of the Modification of Salty Taste Response by Salivary Proteins

Masataka Narukawa

Department of Food and Nutrition, Kyoto Women's University

### Summary

Aging induces a change in salty taste sensitivity. However, the mechanism is still unknown. Saliva dissolves food components and facilitates contact between food components and taste organs. Although saliva consists of mostly water, it contains various proteins. A study investigating the relationship between aging and saliva suggests that the amount of saliva secreted can change with age. On the other hand, the amount of some kinds of salivary proteins correlates with salty taste sensitivity. Based on these findings, we hypothesized that changes in salivary protein composition with age affect salty taste sensitivity. To investigate this hypothesis, we used saliva collected from old and young mice to identify proteins that drastically change with age. We succeeded in identifying multiple proteins that drastically change with age. In this study, we investigated whether these proteins modify the salty taste response using cells that express salty taste receptor ENaC. We used two proteins, serotransferin (TF), whose levels increased with age, and seminal vesicle secretory protein 4 (SVS4), whose levels decreased with age. The application of SVS4 to ENaC-expressing cells did not significantly affect membrane potential. On the other hand, a significant increase in membrane potential was observed by TF application. These results suggest that salivary proteins can affect salty taste sensitivity and that TF can be one of the causative factors.