



を含む食品、例えば肉や魚は味付けに塩味を加えることが多い。食欲が低下傾向になる高齢者は、加齢に伴う健康障害から様々な薬剤の服用が多くなり、さらに食事上の制限を受ける場合も少なくないことから、十分な食事の摂取は極めて重要なことである。

特に、加齢に伴う血圧の上昇を抑えるためにナトリウムの摂取量を抑える減塩が推奨されている。現在日本人の平均食塩摂取量は男性 10.9 g、女性 9.3 g で、WHO の推奨する 5 g/日にはほど遠いのが現状である。なぜ減塩の実現が難しいのかといえ、やはり「塩がおいしいから」そして、塩を減らすと食事自体がまずくなってしまうことがあげられる。塩分を減らしてもおいしさを損なわないような様々な工夫はなされてはいるが、定常的に食塩を減じるのは、なかなか困難である。

塩味の受容に関する研究では、低濃度の塩味に応答する分子として ENaC が報告されている<sup>(1)</sup>。しかし、塩味は、低濃度の塩味は嗜好するが、高濃度の塩味は忌避することが知られている。ENaC は、低濃度塩味に応答し、高濃度の塩味には別の受容分子が応答することが示唆されていた<sup>(1)</sup>。私達は長年、塩分の過剰摂取に関する問題に取り組んできた。その中で、クロライドイオンを受容する電位依存性のクロライドイオンチャネル TMC4 を発見した<sup>(2-6)</sup>。発見に至るまでの研究については、ソルト・サイエンス研究財団 2020~2022 年プロジェクト研究「塩味受容・応答における塩化物イオンの役割と分子論的解明」にて助成を受けている。本研究では食品化学的な視点から新規塩味受容分子 TMC4 の応用について研究を進める。

## 2. 研究方法

### 2.1 Whole-cell patch clamp 法

#### 2.1.1 プラスミド及びタンパク質

humanTMC4(hTMC4)を HEK293T 細胞に発現させるために、CMV プロモーターを持つプラスミドベクター pIRE2-AcGFP1 (Clontech 社)を用いた。pIRES2-AcGFP1 の制限酵素 *Eco*R1 サイトと *Not*I の間に hTMC4 (accession NM\_BC02535) のコーディング配列を挿入した発現コンストラクトを、1  $\mu$ g/35 mm dish の割合で遺伝子導入を行った。遺伝子導入試薬には Lipofectamine(商標 LTX Reagent with PLUS&Reagent, Thermo Fisher 社)を用いた。また蛍光指示

を目的として pEGFP-N1 (Clontech 社) 0.1  $\mu$ g/35 mm を同時に導入した。

遺伝子導入をした細胞を 18 mm 丸ガラス(松浪硝子)に播種し、再度インキュベーター内(37°C, CO<sub>2</sub>濃度 5%)で培養した。すべての実験は、HEK293T 細胞に遺伝子導入後 24~36 時間の間に行った。

#### 2.1.2 測定

HEK293T 細胞を用いた whole cell patch-clamp recording において、増幅器として Axopatch 200B (Molecular Devices)を用いて、Digidata 1550 (Axon Instruments, Union City, CA, USA)からデジタルデータを取得した。取得したデータは、ソフトウェア pCLAMP 10.2 (Axon Instruments)を使用し解析を行った。GD-1.5 芯入りガラス管 (NARISHIGE)をマイクロピペットプラ—P-97/IVF (SUTTER 社)を使って加工し、ガラス電極を作成した。電極抵抗は 3-5 M $\Omega$  になるように調整した。測定は、hTMC4 発現細胞の膜電位を-60 mV に固定し、細胞外液に、被験物質を 1 mM で添加した。各細胞外液に対して 10 mV 間隔で-100 mV から+100 mV の step-pulse (400 ms)を与えて I-V 曲線を作成し、異なる細胞外液による hTMC4 の電圧・電流特性を測定した。全ての測定は、25°Cで行った。

パッチクランプ法において用いた細胞内液 (Pipette solution) の組成は NMDG-Cl 134 mM, BAPTA 5 mM, HEPES 10 mM, 及び細胞外液 (Bath solutions) の組成は NaCl 134 mM, KCl 2.9 mM, HEPES 10 mM, D-Glucose 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.1 mM である。細胞内液は、NMDG (N-Methyl-D-glucamine)を用いて pH7.4 に調整し、細胞内液の浸透圧は約 270 m osmol/kg に調整した。細胞外液は、NMDG-OHを用いて pH 7.4 に調整し、細胞外液のすべてについて、浸透圧を約 290 m osmol/kg に調整した。

#### 2.2 被験化合物

実験に供した化合物は、diallyl disulfide (DADS), Eugenol, Allyl isothiocyanate (AITC), Piperine, capsaicin (CAP), Vanillin, Gingerol, Curcumin, Dihydrocapsaicin である。いずれも Fujifilm 和光純薬より購入した。

#### 2.3 データ解析

NPPB や被験物質の添加効果は、+60 mV における被験物質投与前後の電流値を比率  $I_{sample}/I_{NaCl}$  として算出した。

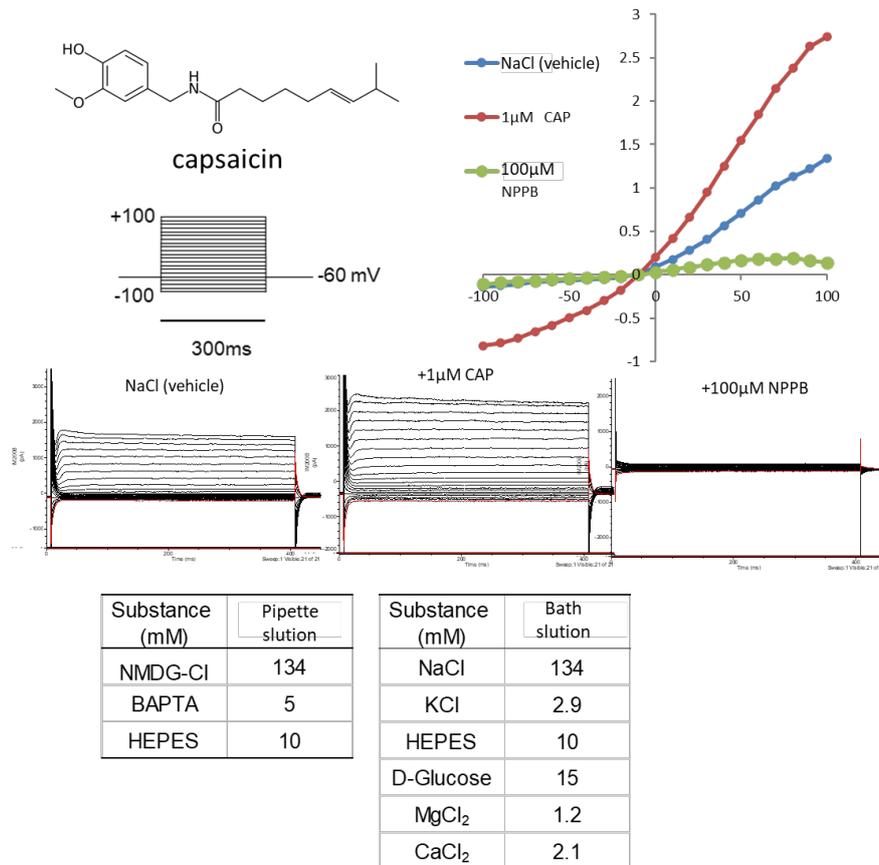
### 3. 研究結果

これまでに、hTMC4 を用いたアッセイ系の構築を行っている<sup>(7)</sup>。その結果、すでに塩味増強剤として知られているアルギニン塩酸塩が TMC4 を活性化することを確認した。さらに研究を進め、アルギニンの類縁体を複数種類合成し、TMC4 に対する作用を検討した。その中から活性度の高かった 3-グアニジニルプロパノールについてヒトによる官能評価を行ったところ、アルギニン塩酸塩と同等以上の塩味増強作用があることを見出した<sup>(8)</sup>。この物質は、hTMC4 の媒介電流を増大させた。

そこで今回は塩増強効果があるとされているカプサイシンを中心とした香辛料の TMC4 に対する作用を検討した。

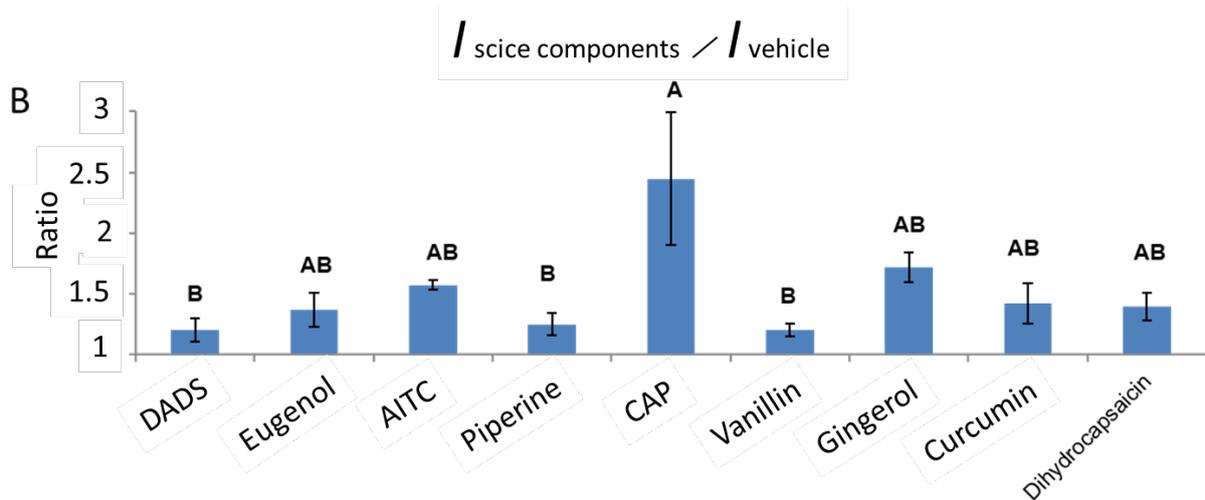
まず、カプサイシンの TMC4 の媒介電流を確認するために、Fig. 1 に示す I-V 曲線を取得した。hTMC4 の外向き電流はクロライドイオンチャネルの阻害剤である NPBB によって完全に抑制される。細胞外液に 134 mM の NaCl が含ま

れると、陽性電位において大きな内向き電流が認められる。このことから TMC4 がクロライドイオンを細胞内に流入していることがわかる。この外液に 1  $\mu$ M のカプサイシンを加えると、赤い線のように細胞内に流入する電流が大きく増加した。この電流の増加あるいは減少比率をその物質が TMC4 を活性化させる度合いとして示すことにより評価をした。+60 mV における電流値を、基準に計算した。すなわち、被験物質を加えた時の電流値を、被験物質を加えていない場合の電流値で除したものを活性化度とした。カプサイシンの場合、このようにその比率は+60 mV では 1.5 になった。9 種類の香辛料を試験したところ、カプサイシンが、最も hTMC4 の媒介電流を増大させた (Fig. 2)。そこで、カプサイシンをリード化合物として、SciFinder を用いてカプサイシンの類縁化合物を検索し、入手可能な化合物 9 種類について香辛料由来化合物と同様の試験を行った (Fig. 3)。その結果、Table 1 に示す様にほとんどすべての化合物で、hTMC4 の媒介電流はカプサイシンと同等であった。



**Fig 1.** Change in TMC4-mediated current by adding capsaicin

Representative I-V relationship of current by step pulses and raw traces. The composition of basic pipette solution and bath solution are in tables.

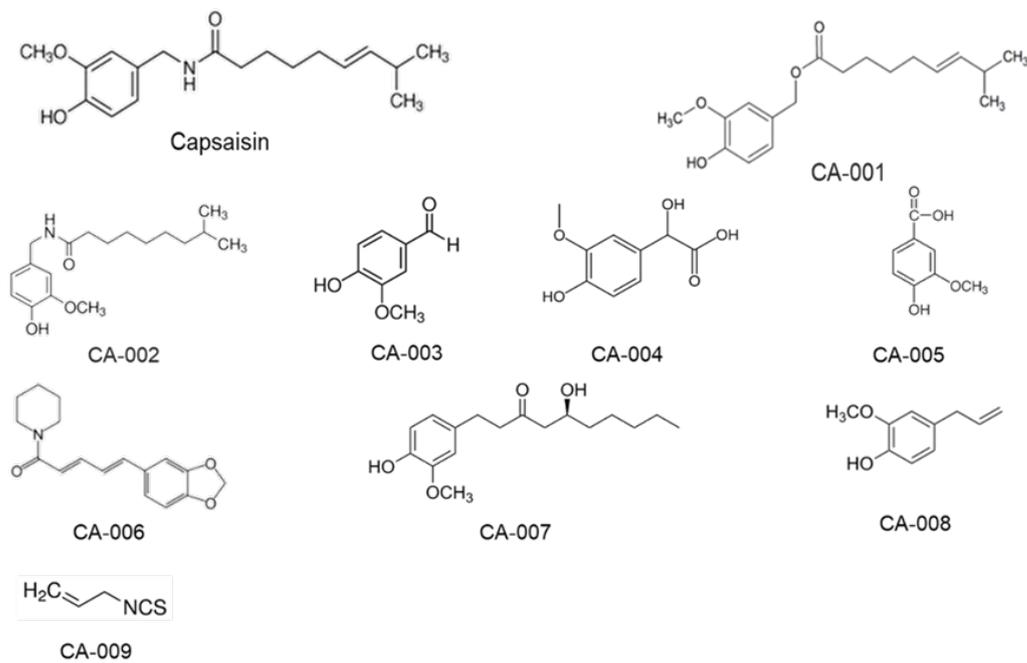


**Fig 2.** Effect of several spice components.

Relative enhancing ratio was calculated using the formula  $I_{\text{spice components}} / I_{\text{vehicle}}$  at +60 mV.

The same letters are not significantly different; Tukey-Kramer HSD test;  $P < 0.05$

DADS: diallyl disulfide, AITC: allyl isothiocyanate, CAP: capsaicin



**Fig 3.** Structure of capsaicin analogues

**Table 1.** Relative ratio of capsaicin analogues calculated by the formula  $I \text{ analogues} / I \text{ vehicle}$  at +60 mV

	AVE	SE	N
Vehicle	1.00	0.00	4
Capsaicin	1.31	0.12	4
CA-001	1.29	0.15	4
CA-002	1.00	0.09	4
CA-003	1.06	0.12	4
CA-004	0.94	0.05	4
CA-005	0.98	0.05	4
CA-006	1.07	0.14	4
CA-007	1.22	0.05	4
CA-008	0.98	0.17	4
CA-009	1.00	0.05	4

#### 4. 考察

本研究では、hTMC4を用いた whole cell-patch 法を用いて hTMC4 の媒介する電流を増大させる化合物のスクリーニングを行い、カプサイシンに電流を増大させる作用があることを見い出した。その他の香辛料に含まれる成分では、媒介電流の増加は見い出せず、カプサイシンの類縁化合物 9 種類についても、同様に、hTMC4 の活性化は検出されなかった。本スクリーニング法は、hTMC4 の媒介電流を測定することで、塩味増強効果を有する物質のスクリーニングの可能性を示すものであるが、今回は、カプサイシンよりも活性の高い物質は見い出せなかった。本法は、トランジェントな系であるため、実験ごとに電流値の変動もあり、一度に多数の被験化合物の活性を測定することは難しかった。

#### 5. 今後の課題

電気生理学的手法を用いて hTMC4 の媒介する電流を測定する本法は、多くの化合物のスクリーニングには不向きであり、今後、hTMC4 の安定発現株などの作成を目指す必要があると思われる。

#### 6. 文献

1. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464:297–301 (2010)
2. Yoichi Kasahara, Masataka Narukawa, Yohiro Ishimaru, Shinji Kanda, Chie Umatani, Yasunori Takayama, Makoto

Tominaga, Yoshitaka Oka, Kaori Kondo, Takashi Kondo, Ayako Takeuchi, Takumi Misaka, Keiko Abe and Tomiko Asakura\*. TMC4 is novel chloride channel involved in high-concentration salt taste sensation. *J Physiol. Sci.* 71(1), 23 (2021)

3. Yoichi Kasahara, Masataka Narukawa, Yoshikazu Saito, Keiko Abe and Tomiko Asakura. The complexities of salt taste reception: insights into the role of TMC4 in chloride taste detection. *Front. Mol. Neurosci.* 17, 1468438 (2024)
4. Yoichi Kasahara, Masataka Narukawa, Ayako Takeuchi, Makoto Tominaga, Keiko Abe and Tomiko Asakura. Molecular logic of salt taste reception in special reference to transmembrane channel-like 4 (TMC4) *J. Physiol. Sci.* 72(1), 31-32 (2022)
5. Masataka Narukawa, Aya Masago, Momo Murata, Yoshikazu Saito, Yoichi Kasahara, Keiko Abe and Tomiko Asakura. Mouse TMC4 is involved in the detection of chloride taste of salts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 88(2), 203-205 (2023)
6. Yoichi Kasahara, Masataka Narukawa, Shinji Kanda, Makoto Tominaga, Keiko Abe, Takumi Misaka and Tomiko Asakura\*. Transmembrane Channel-like 4 is involved in pH and temperature-dependent modulation of salty taste. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 85(11), 2295-2299 (2021)

7. Yoichi Kasahara, Masataka Narukawa, Tomoya Nakagita, Keiko Abe, Takumi Misaka and Tomiko Asakura\*. Ibuprofen inhibits oral NaCl response through transmembrane channel-like 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **573**, 76-79 (2021)
8. Yoichi Kasahara, Haruyuki Yamashita, Masataka Narukawa, Keiko Abe and Tomiko Asakura\*. 3-Guanidinyl Propanol Enhances Salt Taste via TMC4-Mediated Current. *ACS FoodSci. Technol.* **2** (8), 1213–1216 (2022)

# Measurement of Salty Taste Enhancing Activity Using Novel Salt Taste Receptor TMC4.

Tomiko Asakura

The Open University of Japan

## Summary

The average of salt intake is 10.9 g/day for men and 9.3 g/day for women, far from the WHO recommended 5 g/day in Japan. Reduce of salt intake is difficult, because salt is tasty so reducing salt makes the food itself taste bad. Although various ideas have been devised to reduce salt without compromising the taste, it is quite difficult to consistently reduce salt intake.

In research on salt taste reception, ENaC was reported that it responds to low concentrations of salt. It is known that low concentrations of salt are preferred, but high concentrations of salt are avoided. It has been suggested that ENaC responds to low concentrations of salt, while a different receptor molecule responds to high concentrations of salt. In this situation, we found the voltage-dependent chloride ion channel TMC4, which responds to high concentrations of salt and receives chloride ions. In this study, from the view point of food chemistry, we screened for substances that enhance saltiness using the new salt taste receptor, TMC4.

The research method was to express human TMC4 (hTMC4) in HEK293T cells and we performed electrophysiological analysis using the whole-cell patch clamp method. Capsaicin, which has already been reported to have a salt taste enhancing effect, was used as a test sample. It is known that hTMC4 generates an outward current at positive potentials, and the change in the magnitude of this outward current was used as an index of the test substance's activation of hTMC4. As a result, the addition of 1  $\mu$ M capsaicin increased the current at +60 mV by 1.5 times compared to vehicle. No other spice components showed a high value. We then searched for capsaicin-related compounds using SciFinder and investigated the activation level of the nine available compounds, but none showed a current greater than that of capsaicin.