

嗜好性を加味した塩味評価法を利用した塩および塩味代替物候補の評価

日下部 裕子, 河合 崇行

農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

概要 食塩は、ヒトが生きるために不可欠であると同時に食品に「おいしさ」を付与する。しかしながら、その過剰摂取は高血圧などの生活習慣病発症の遠因とも言われており摂取低減が求められている。そこで、長年食塩の代替物の開発が行われてきたが、食塩と同様の嗜好性を保有するものはほとんど得られていない。塩味には少なくとも嗜好性の高い味と低い味の二種類があることが長年にわたる塩味受容の研究から予想されている。我々は、前回の助成において、塩化ナトリウム(NaCl)の摂取制限と利尿薬の摂取によるヒトと同様の塩味嗜好性を有するマウスを利用した動物行動学的手法およびヒトENaC遺伝子を一過的に発現させた培養細胞に対する応答測定を併用することによる塩味評価方法を開発し、塩味増強効果があることが知られているグリシンエチルエステルの評価を行い、両手法間の評価結果の差を確認した。そこで、今年度は、開発した評価法を用いて様々なナトリウム塩に対する評価を行った。

まず、動物行動学的手法を用いて炭酸水素イオンおよび炭酸イオンを持つ Na 塩、カリウム塩を評価した。その結果、15~45 mM の NaCl 溶液に 5 mM 炭酸水素ナトリウム(NaHCO₃)を添加した場合に、リック数の増加が認められ、塩味が 10 mM NaCl 相当増強することが示唆された。5 mM 炭酸水素カリウムを添加した場合には増強効果は見られなかったため、炭酸水素イオンが塩味増強効果を保有するかについては結論づけられなかった。また、同様に 10、30 mM NaHCO₃ を添加したところ、10 mM NaHCO₃ 添加によるリック数の増減は認められず、30 mM NaHCO₃ を添加ではリック数の減少が認められた。これら結果より、低濃度の NaHCO₃ は塩味を増強するが高濃度では塩味を抑制することが示唆された。炭酸ナトリウムの添加では、リック数の増減は認められなかった。

動物行動学的手法による評価と併行して、塩味受容チャネルヒト ENaC 遺伝子を一過的に発現させた培養細胞に対する応答測定によるナトリウム塩の評価を行った。その結果、30 mM NaCl 溶液に対する応答強度と比較して 30 mM クエン酸ナトリウムおよびグルタミン酸ナトリウムに対する応答強度が有意に低かったのに対して、NaHCO₃ に対する応答強度は NaCl 溶液のそれと同等の強さを示すことが観察された。グルタミン酸ナトリウムはうま味を呈するなど、これらの結果とナトリウム塩の塩味との相関は観察されなかった。

以上より、塩味増強には陰イオンの種類や、ナトリウムイオンと陰イオンの比が重要であることが示唆された。これらの最適比の範囲を把握するためには、塩味受容における陰イオンの役割の解明などの研究を進めていくことが必要であると考えられる。

1. 研究目的

食品を「おいしく」食べるために食塩は欠かせない。食塩そのものの塩味ばかりでなく、食塩の添加がもたらす甘味やうま味の増強など、「おいしさ」に重要な役割を果たしている。一方、高血圧など生活習慣病の予防に向けて塩分摂取量を減らすことが求められており、食塩の代替物の

開発が長年行われているが、食塩と同様に「おいしい」塩味を呈する代替物はほとんど得られていない。塩味の味質は少なくとも 2 種類から構成されると見なされている。食塩つまり塩化ナトリウムが引き起こす味だけでなく塩化カリウムなどをはじめとする塩化物も含まれ、塩味には塩化ナトリウムによって引き起こされる味と塩化ナトリウムと塩化カ

リウムの両方によって引き起こされる味である。現在、減塩を目的とした調味料の多くに塩化カリウムが含まれているが、嗜好性は通常のものに比較して低いといわざるを得ない。そこで、我々は、前回(平成22年度)の助成で塩化ナトリウムに対する嗜好性が高いヒトと同様の生理状態のマウスを作出し、このマウスが塩化カリウムを好まず塩味代替物候補として知られるグリシンエチルエステル¹⁾を好むことを示唆する結果を得た。また、前回助成では、ナトリウムイオンを透過させカリウムイオンを透過させないことから嗜好性の高い塩味の受容チャネルである可能性の高いENaC²⁾を導入した培養細胞を作製し、塩化ナトリウムに対して応答することを確認した。

これらの成果を利用して、本研究では、構築した動物実験系と受容チャネル分子を導入した培養細胞の実験系を用いて様々なナトリウム塩およびグリシンエチルエステル以外の塩味代替物質候補に対する解析を行うことを目的とする。動物と受容チャネル分子を利用した系を併用することにより、嗜好性の評価を行うとともに、その物質の塩味が引き起こされるメカニズムを検証することも可能であり、物質評価を多面的に行うことを特徴とする。さらに、ヒトによる官能評価との比較をすることでその有効性の検証を行うことも目的とする。

2. 研究方法

2.1 動物行動学を用いた重炭酸塩の塩味に対する影響の解析

2.1.1 実験材料

5週齢のC57Bl/6N系統雄性マウスを購入し、1週間予備飼育したのち実験に供した。ナトリウム制限中には、ナトリウムを極力含まない餌として、オリエンタル酵母社製AIN-93G配合試料の塩化ナトリウム分をスクロースに置き換えた粉餌作成し、それに利尿薬スピロラクソンを300mg/kgとなるように添加したものをナトリウム制限食として与えた。飼養水には脱イオン水を用いた。塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム(いずれも試薬特級グレード)はナカライ社、スピロラクソン(純度97%以上)はシグマ社より購入した。

2.1.2 動物飼育

マウスは15 x 25 x 10 cmの金属製ケージ内で4匹ずつ群飼いにし、庫内温度23±1℃、湿度45±5%、6~18時

暗期、18~6時明期の24時間明暗サイクルの飼育庫内で維持した。純パルプ製の床敷を用い、2~3日に一度交換した。ナトリウム制限食を粉餌で与えた状態で2~3週間以上飼育したマウスを実験に供した。

2.1.3 行動学実験塩味強度測定

4時間水供与ののち3時間以上絶水させたマウスを4 x 15 mmの穴を開けた不透明ポリカーボネート製ケージに移して、リック測定装置³⁾にセットした。金属製の玉付き吸い口のついた容器に15、30、45、60 mM塩化ナトリウム溶液および脱イオン水を入れて穴の先から提示した。さらに、15、30、45 mM塩化ナトリウム溶液のそれぞれに試料を混和した試験液を追加調製し、同様に提示した。提示溶液をマウスが舐め始めてから10秒間の舐めた回数(リック数)を測定した。直前に摂取した溶液の影響を小さくするため、各溶液の間に脱イオン水を提示した上、日毎に提示順を替えて測定した。塩化ナトリウム溶液および試験液を一度ずつ提示する実験を1セッションとし、一匹あたり一日3セッション連続で行った。

2.1.4 行動学実験解析方法

塩味に対する欲求度を適切にコントロールするため、解析利用データに様々な制限条件を設定した。水に対するリック数が25以上の場合、そのセッション中は味に関係なく摂取行動を取った可能性が高いので、セッションごと解析ソースから排除した。スピロラクソン入りの餌を与えたナトリウム制限群と対照群との比較する解析では、塩化ナトリウム溶液に対するリック数に制限をつけずに全て有効なデータとした。試料を混和した試験液の塩味強度解析では、60 mM塩化ナトリウム溶液に対するリック数が40未満の場合、そのセッション中は塩味摂取に対するモチベーションが低い状態での摂取行動であった可能性が高いので、セッションごと解析ソースから排除した。予備実験により、塩味強度をより正確に表現できるときの15 mM塩化ナトリウム溶液に対するリック数は40以下、30 mM塩化ナトリウム溶液に対するリック数は10~55、45 mM塩化ナトリウム溶液に対するリック数は25~70であることがわかっていたので、それを逸脱するリック数を示した場合は、セッションごと解析ソースから排除した。まったく舐めなかったとき(リック数0)についてはそのデータのみ解析ソースから排除した。グラフ化する際には、ベースとなる塩化ナトリウム中に含まれる15、30、45、60 mM Naイオン量と炭酸水

素ナトリウム、炭酸ナトリウム由来の Na イオン量を加算した総 Na イオン量を横軸にし、10 秒間のリック数を縦軸に表わした。

2. 2 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞の作製

2. 2. 1 遺伝子材料

ヒト ENaC α 、 β 、 γ 遺伝子：それぞれヒト腎臓 cDNA (クローンテック社) を鋳型に、遺伝子情報を基に PCR を行い全長を得た。

発現ベクター：pEF-DEST51、pcDNA5/FRT (以上インビトロジェン社)、pEAK10 (Edge Biosystems 社) を用いた。また、発現を確認するために N 端に蛍光タンパク GFP タグを付加するベクター pcDNA6.2/N-EmGFP-DEST を用いた。

2. 2. 2 培養細胞および培養条件

培養細胞：ENaC 遺伝子は CHO K-1 細胞に導入した。培養にはウシ胎児血清 (invitrogen 社) を 10% 加えた DMEM 培地 (invitrogen 社) にプロリンを 34 μ g/ml の割合で添加した培地を用いた。また、ENaC 導入後は ENaC のチャンネル機能を阻害するアミロライド (30 μ M) を添加して培養を行った。

遺伝子導入：ENaC 遺伝子の発現はカチオン性脂質である Lipofectamine LTX (invitrogen 社) を用いて定法に従って行った。遺伝子導入後、18~24 時間後にナトリウム塩の溶液の刺激に対する応答を観察した。

2. 2. 3 ナトリウムイメージング

ENaC による塩味応答は細胞内ナトリウムイオン濃度変化を蛍光色素の発光量で測定するナトリウムイメージング法を用いた。蛍光強度変化の測定および解析には AQUACOSMOS イメージングシステム (浜松ホトニクス社) を用いて行った。ナトリウムイオンを検出する指示薬としては CoroNa Red (invitrogen 社) を用いた。また、測定はハンクス緩衝液中に含まれる塩化ナトリウムを N-メチル-D-グルカミン (NMDG) で置換した溶液を用い、塩化ナトリウムおよびナトリウム塩による刺激は、この溶液の NMDG と塩化ナトリウムの量比を変化させることで行った。細胞内にナトリウムイオンを強制的に流入させるためのイオノフォアとしてグラミシジンおよびモネンシン (いずれも sigma 社) を用いた。

3. 研究結果

3. 1 動物行動学を用いた重炭酸塩の塩味に対する影響の解析

塩味受容における陰イオンの影響を調べるために、炭酸水素イオンおよび炭酸イオンを持つナトリウム塩、カリウム塩を用いてリック試験を行った。まず、5 mM 炭酸水素ナトリウムを 15~45 mM の塩化ナトリウム溶液に添加してリック数の変化を調べた。炭酸水素ナトリウム添加により増加したナトリウムイオン量を補正してグラフを描いたものを Fig. 1-a に示す。その結果、5 mM 炭酸水素イオン添加試験液において、リック数の増加が認められた。このことは、炭酸水素イオンの添加により塩味が増強していることを示唆している。また、増強の大きさは、10 mM 塩化ナトリウム相当であることがグラフを用いた解析より示された。そこで、炭酸水素イオンにのみ着目し、5 mM 炭酸水素カリウムを添加してリック数の変化を調べた。その結果、炭酸水素カリウム添加によるリック数の増減は認められなかった (Fig. 1-b)。これらのことは、カリウムイオンが炭酸水素イオンの効果を打ち消している、あるいは、塩味増強にはナトリウムイオンと陰イオンのバランスが重要であることを示唆している。また、10、30 mM 炭酸水素ナトリウムを添加してリック数の変化を調べた。炭酸水素ナトリウム添加により増加したナトリウムイオン量を補正してグラフを描いたものを Fig. 1-c, d に示す。その結果、10 mM 炭酸水素ナトリウム添加によるリック数の増減は認められず、30 mM 炭酸水素ナトリウムを添加においてはリック数の減少が認められた。これらのことは、低濃度の炭酸ナトリウムは塩味を増強するが、高濃度の炭酸水素ナトリウムは塩味を抑制することを示している。次に、5、10 mM 炭酸ナトリウムを添加してリック数の変化を調べた。炭酸ナトリウム添加により増加したナトリウムイオン量を補正してグラフを描いたものを Fig. 1-e, f に示す。いずれの濃度の添加によってもリック数の増減は認められなかった。さらに、5、10 mM 炭酸カリウムを添加してリック数の変化を調べたものを Fig. 1-g, h に示す。45 mM 塩化ナトリウムに添加した場合にのみわずかなリック数増加が見られた。増強の大きさは、4~6 mM 塩化ナトリウム相当であることがグラフを用いた解析より示された。これらのことは、塩味増強にはナトリウムイオン量、カリウムイオン量、炭酸イオン量の適切なバランスが重要となっている可能性を示している。

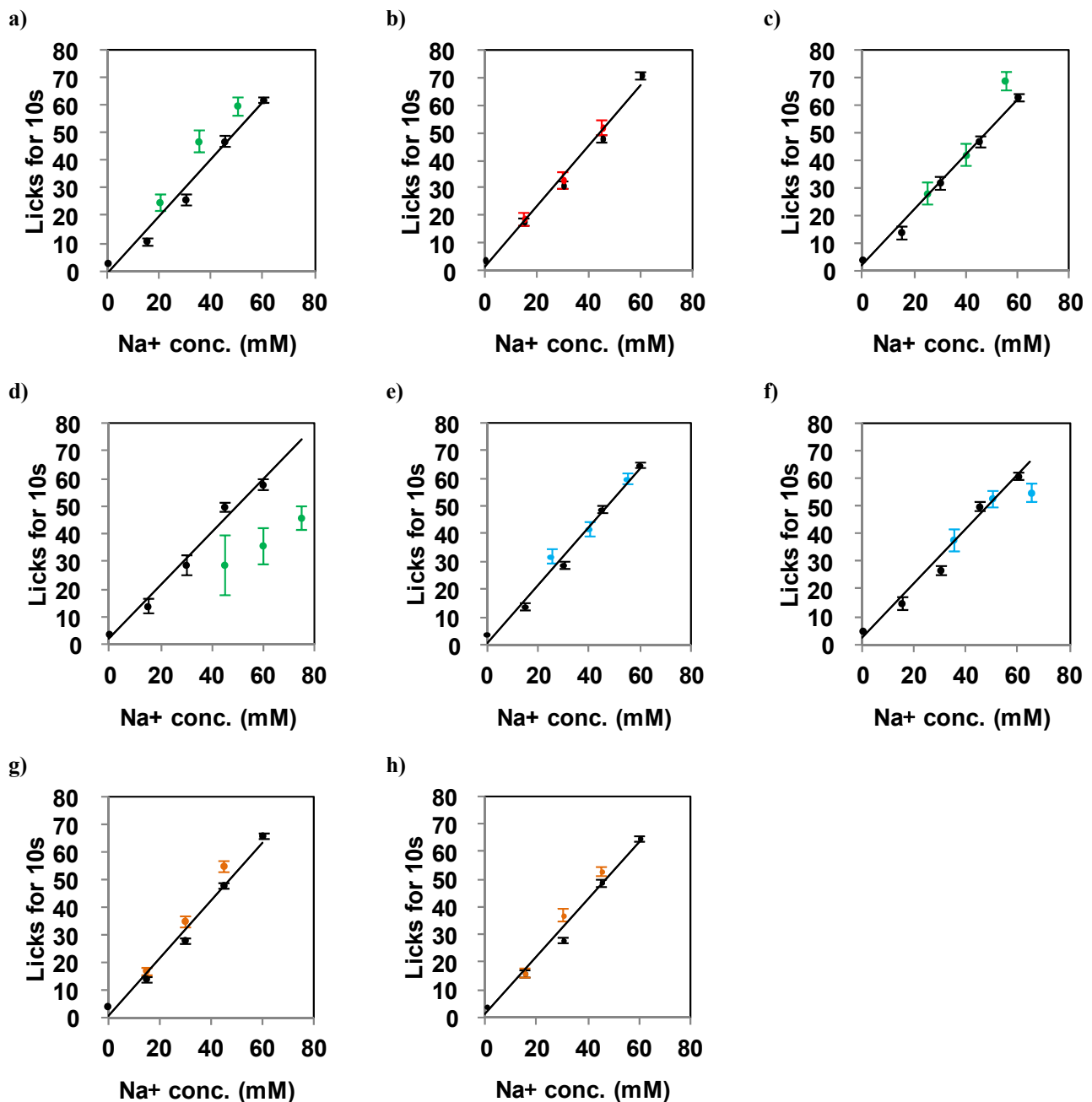


Fig. 1. Licking analysis to various salty solution. a. Licks to 5 mM NaHCO₃-add. solu. (n=27-47). b. Licks to 5 mM KHCO₃-add. solu. (n=43-78). c. Licks to 10 mM NaHCO₃-add. solu. (n=20-32). d. Licks to 30 mM NaHCO₃-add. solu. (n=7-21). e. Licks to 5 mM Na₂CO₃-add. solu. (n=42-89). f. Licks to 10 mM Na₂CO₃-add. solu. (n=21-38). g. Licks to 5 mM K₂CO₃-add. solu. (n=88-147). h. Licks to 10 mM K₂CO₃-add. solu. (n=62-116). ●: NaCl solu., ●: NaHCO₃-add. solu., ●: KHCO₃-add. solu., ●: Na₂CO₃-add. solu., ●: K₂CO₃-add. solu.. Values are Average ± SE.

3. 2 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞を利用した多検体の塩味応答測定方法の検討

昨年度、本助成により、ENaC を介した塩味応答を観察するための実験条件(培養細胞、遺伝子の導入方法)を確立し、ENaC 遺伝子を CHO 細胞に一過的に発現させ、

ナトリウムイメージング法で応答を測定する条件の最適化を行った。そこで、本年度は、96 ウェルを用いた多検体応答測定の方法検討と、塩化ナトリウム以外のナトリウム塩の味と ENaC に対する応答強度について解析を行った。まず、96 ウェルを用いた多検体のサンプルに対する応答測

定を試みた。昨年度はナトリウムイメージングを倒立顕微鏡に35 mmシャーレをセットする方法で測定を行ったため、一日に測定出来るサンプル数が6~8サンプル程度に限定された。96ウェルを用いた方法でナトリウム応答の測定が可能になれば、一日に測定出来るサンプル数が数百となり、応答測定の効率性が飛躍的に向上する。そこで、一過的にENaC遺伝子を導入したCHO細胞と導入していないCHO細胞を用いて、30 mM塩化ナトリウムに対する応答を測定した。その結果、ENaC遺伝子の導入の有無とは無関係な非特異的な応答が観察されることが明らかになり、本法による適切な応答測定は不可能であることが示された(**Fig. 2**)。そこで、以後の実験は昨年度と同様に倒立顕

微鏡に35 mmシャーレをセットする方法で測定を行った。

3.3 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞のナトリウム塩に対する応答

塩味受容体と見なされている ENaC はナトリウムイオンを透過させるイオンチャネルであり、塩化ナトリウムに含まれるナトリウムイオンが塩味の形成に重要であることを示唆している。一方、ナトリウム塩は全て塩化ナトリウムと同様の塩味を呈する訳ではない。たとえば、炭酸水素ナトリウム(重曹)は苦味を呈することが知られている。そこで、様々なナトリウム塩に対する溶液を作製し、ENaC を導入した培養細胞に適用することで、ENaC と塩味の関係の解析を行った。ナトリウム塩は、炭酸水素ナトリウム、クエン酸

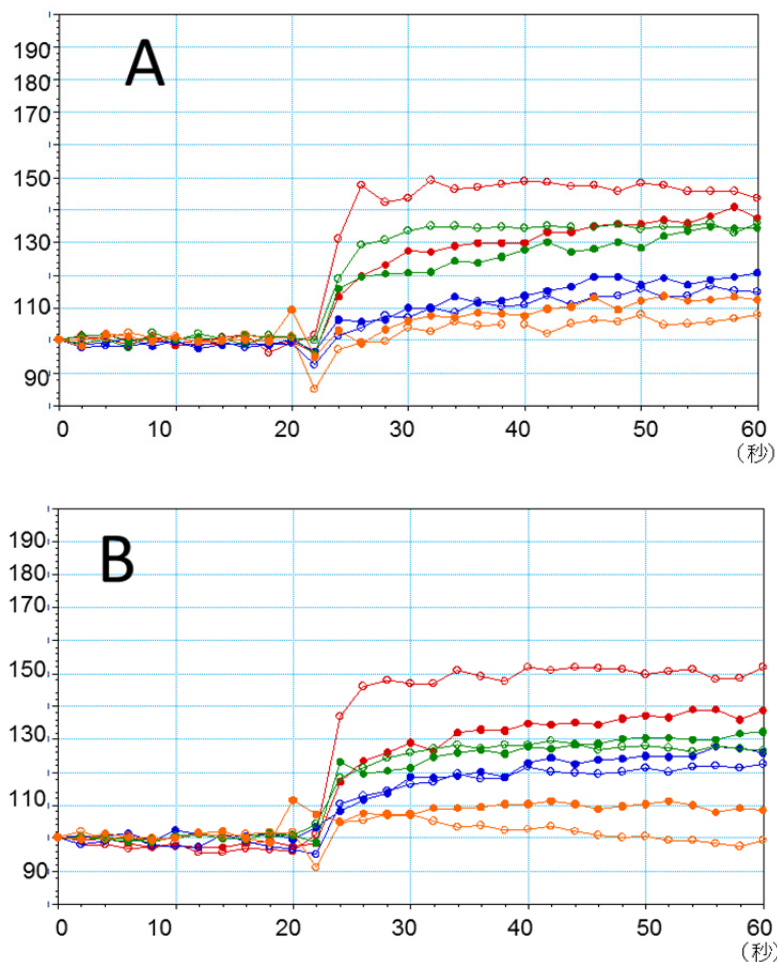


Fig. 2. Measurement of the response to sodium salt in CHO cells expressed ENaC gene using 96 well fluorescence plate reader. The plot shows the ratio of the amount of the fluorescence based on that at the 0 sec (0 sec=100). Red : response to 30 mM NaCl, Blue: response to 10 mM Na₃Citrate, Green: response to 30 mM MSG, Orange: response to 30 mM NaHCO₃. A. Response to sodium salt in CHO cells expressed ENaC gene., B. Response to sodium salt in CHO cells expressed vector (pEF-DEST51).

ナトリウム、グルタミン酸ナトリウムを用いた。塩化ナトリウムの実験時と同様、HEPESで緩衝させた溶液にそれぞれのナトリウム塩をナトリウムイオンの濃度が30 mMになるように溶解させ、pHを7.4に調節した。それぞれの溶液は、炭酸水素ナトリウム溶液が苦味を伴った塩味または酸味、クエン酸ナトリウム溶液が刺激を伴った酸味または塩味、グルタミン酸ナトリウム溶液がうま味を呈しており、30 mM塩化ナトリウム溶液を含む緩衝溶液と同等の強さの塩味を呈する溶液はなかった。これらの溶液に対するENaCを導入した培養細胞の応答強度を測定したところ、30 mM塩化ナトリウム溶液に対する応答強度と比較してクエン酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウムに対する応答強度が有意に低かった。一方、炭酸水素ナトリウムに対する応答強度は塩化ナトリウム溶液のそれと同等の強さを示した(Fig. 3)。

4. 考察

4.1 動物行動学を用いた重炭酸塩の塩味に対する影響の解析

昨年度の報告書で、利尿薬スピロノラクトを常時摂取させることで慢性的なナトリウム欠乏状態にし、塩味に敏感

なマウスを作成し、そのマウスが塩化ナトリウム60 mM以下の低濃度域において10秒間のリック数と濃度に直線的な正相関を見せることを報告した。今年度は、そのマウスを利用して、炭酸水素イオン、炭酸イオンの影響を調べた結果を示した。塩味はナトリウムイオンのみを通すチャネルであるENaC、とナトリウムイオンとカリウムイオン両方を通すチャネルであるTRPV1によって受容・認識されると考えられている^{2,4)}。それらのイオンチャネルを発現する細胞には、異なる味覚神経線維(N線維, E線維)がつながっており、塩化ナトリウムの味覚情報信号は2種の神経線維、塩化カリウムの味覚情報信号はE線維のみで伝えられている⁵⁾。味覚神経応答実験の結果では、ENaCの阻害剤であるBenzamilを与えるとN線維の情報が逸失し⁶⁾、TRPV1の阻害剤であるSB-366791を与えるとE線維の情報が逸失することが報告されている⁷⁾。さらに、2種の阻害剤を与えた場合、味覚神経は塩化ナトリウムにも塩化カリウムにも全く応答しなくなることも知られている⁸⁾。このことは、味覚神経は塩味の陽イオン情報しか伝えておらず、塩化物イオンの情報はほとんど伝えられていないことを示している。しかし、我々は、塩化ナトリウムと同濃度のナトリ

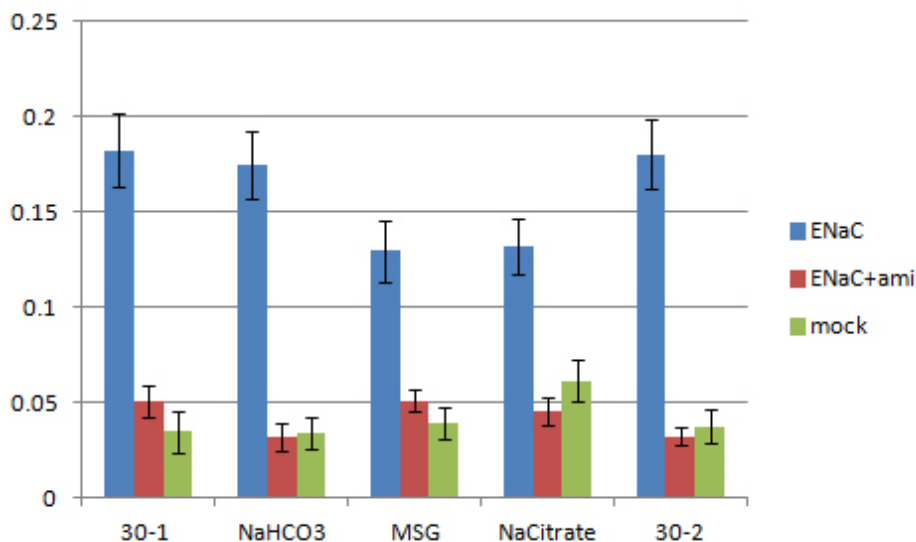


Fig. 3. Response to Glycine ethyl ester in CHO cells expressed ENaC gene. 20 CHO cells expressing ENaC gene were chosen for each measurement. The ratio was calculated as normalized difference to baseline recorded before stimulation (F/F0). ENaC: CHO cells coexpressing human ENaC α , β , γ subunit genes. ENaC+ami: CHO cells coexpressing human ENaC α , β , γ subunit genes with 10 μ M amiloride. mock: CHO cells expressing control vector (pEF-DEST51). 30-1: The first stimulation of 30 mM NaCl. 30-2: The second stimulation of 30 mM NaCl. NaHCO₃: 30 mM NaHCO₃. MSG: 30 mM monosodium glutamate. NaCitrate: 10 mM Na₃Citrate.

ウム酢酸塩やグルタミン酸塩などに、塩化ナトリウムと同レベルの塩味を感じない。よって、塩味の発生には塩化物イオンも非常に重要な役割を持っている可能性が高い。以上より、本研究により、塩化物イオン以外にも塩味を維持できるもの、塩味を増強するもの、抑制するものがあることが明らかにされた。

4. 2 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞を利用した多検体の塩味応答測定方法の検討

本項目では、96 ウェルを用いた多検体のサンプルに対する応答測定を試みたが、ENaC の有無に関わらない非特異的な応答が観察されたため、実験条件の確立に至らなかった。原因としては、ENaC が導入される細胞数の割合が著しく低いことが挙げられる。ENaC は 3 種類の分子から構成されているため⁹⁾、3 種類の遺伝子が導入されていないと応答は観察できないためと考えられる。3 種類の遺伝子を同時に同程度発現させられる発現ベクターの構築や、恒常的に ENaC 遺伝子を発現する培養細胞の作製法の確立を行うことにより、ENaC が導入されている細胞数の割合を高くすることが可能になると考えられる。また、より感度の良いナトリウムイオンに対する蛍光指示薬を用いることも、応答測定を可能にする可能性がある。

4. 3 塩味受容体候補 ENaC を導入した培養細胞のナトリウム塩に対する応答

この項目では、ENaC は塩味センサーとして機能するのか、それともナトリウムイオンのセンサーとして機能するのかという点に焦点を当てて実験を行った。グルタミン酸ナトリウムはうま味を呈するが、ENaC に対しても応答した。30 mM グルタミン酸ナトリウムの ENaC に対する応答は塩化ナトリウムと比較して有意に低かったが、塩化ナトリウムの 7 割程度の応答を示し、ネガティブコントロールと比較して有意に大きかった。また、炭酸水素ナトリウムやクエン酸ナトリウム溶液は、刺激を伴うため、官能表現として酸っぱいあるいは塩辛いとるように見受けられが、ENaC に対しては、炭酸水素ナトリウムは塩化ナトリウムと同等の応答強度を、クエン酸ナトリウムは塩化ナトリウムの 7 割程度の応答を呈した。以上の結果から考察すると、クエン酸ナトリウムやグルタミン酸ナトリウムは 20 mM 相当の塩味を呈することとなるが、両者とも 20 mM の塩化ナトリウムに相当する塩味は感じられず、特に MSG は塩味ではなくうま味を呈した。よって、ENaC のナトリウム塩溶液に対する応答は、塩

味のセンサーとしての役割よりも、ナトリウムイオンのセンサーの役割を持つことを示していると考えられる。

5. 今後の課題

5. 1 動物行動学を用いた重炭酸塩の塩味に対する影響の解析について

本研究より、塩味増強にはナトリウムイオン量、カリウムイオン量、炭酸イオン量のバランスが重要であることが示されたが、特に、低濃度の炭酸水素ナトリウムがなぜ塩味増強に働き、高濃度になると塩味抑制に働くのかを明らかにしていく必要があると思われる。

5. 2 ENaC 遺伝子を導入した培養細胞を用いた塩味評価について:

現在、塩味受容に関わる分子としては ENaC のみが明らかになっているが、塩化物イオンに対する受容体など陰イオン受容との関係の解明とその利用が、今後の分子を用いた塩味評価には必要であると考えられる。また、CHO 細胞への一過的な ENaC 遺伝子の導入は、導入される細胞数の割合が低いだけでなく、刺激溶液に対する応答の安定性が良くない。よって、安定的に遺伝子を導入した細胞の作製法の検討が今後必要である。

文 献

- 1) Kawasaki Y, Seki T, Tamura M, Kikuchi E, Tada M, Okai H: Glycine methyl or ethyl ester hydrochloride as the simplest examples of salty peptides and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* 52, 2679-2681 (1988)
- 2) Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ and Zuker CS: The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, 464, 297-301 (2010)
- 3) 河合崇行 動物行動学に基づいた美味しさの評価. およびリック計測器の開発 食糧 49, 1-20 (2011)
- 4) Lyall V, Heck GL, Vinnikova AK, Ghosh S, Phan TH, Alam RI, Russell OF, Malik SA, Bigbee JW and DeSimone JA: The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4692-4696 (2002)
- 5) Ninomiya Y and Funakoshi M: Amiloride inhibition of responses of rat single chorda tympani fibers to chemical

- and electrical tongue stimulations. *Brain Res*, 445, 319-325 (1988).
- 6) Lundy RF Jr, Pittman DW and Contreras RJ: Role for epithelial Na⁺ channels and putative Na⁺/H⁺ exchangers in salt taste transduction in rats. *Am J Physiol*. 273 (6 Pt 2), R1923-1931 (1997)
- 7) Lyall V, Heck GL, Vinnikova AK, Ghosh S, Phan TH, Alam RI, Russell OF, Malik SA, Bigbee JW and DeSimone JA: The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J Physiol*. 273 (Pt 1), 147-159 (2004)
- 8) Lyall V, Phan TH, Mummalaneni S, Mansouri M, Heck GL, Kobal G and DeSimone JA: Effect of nicotine on chorda tympani responses to salty and sour stimuli. *J Neurophysiol*. 98, 1662-1674 (2007).
- 9) Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD and Rossier BC: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367, 463-467 (1994).

Evaluation of Salts and Salt Substitutes Using Evaluation Methods for Salty Taste with Palatability

Yuko Kusakabe, Takayuki Kawai

National Agriculture and Food Research Organization, National Food Research Institute

Summary

Salt is essential for enhancing the palatability of food. However, excessive salt intake has been regarded as a remote cause of lifestyle-related conditions such as high blood pressure, and therefore, salt intake should be controlled. Research on the development of a salt substitute has been performed, but a substitute with palatability equivalent to that of salt has not yet been developed. Salty taste is divided into at least 2 types: one type affects palatability and the other does not. In our previous year's project, we developed methods for evaluating saltiness from the viewpoint of palatability by using ethology- and molecular physiology-based techniques, and evaluated the saltiness of the salty taste enhancer using these techniques. In this year's project, we evaluated the saltiness of various sodium salts in order to elucidate the role that anions of sodium salts play in enhancing salty taste.

Initially, we evaluated saltiness in connection with palatability for various salts by using an ethological technique. We counted the number of times that the mouse licked the solution as an indicator of the favorability of the solutions. The addition of 5 mM NaHCO_3 to 15–45 mM NaCl increased the number of licks. This effect was equal to that obtained on addition of 10 mM NaCl to the 15–45 mM NaCl solution. In contrast, addition of 5 mM K_2CO_3 did not increase the number of licks. Therefore, we did not conclude that HCO_3^- enhanced salty taste. Moreover, addition of 10 mM NaHCO_3 did not increase the number of licks and addition of 30 mM NaHCO_3 decreased it, suggesting that high NaHCO_3 concentrations inhibit salty taste perception.

In parallel, we evaluated various sodium salts by using cultured cells transiently expressing ENaC. We observed that the response to 30 mM NaHCO_3 was nearly equal to that obtained for 30 mM NaCl. In contrast, the responses to 30 mM sodium citrate and 30 mM MSG were weaker than that to 30 mM NaCl. These results suggested that the ENaC responses did not correspond to the intensities of salty tastes for these sodium salts.

These results indicate that the type of anion and the ratio of sodium ions to anions might be important for enhancing salty taste. Further studies are required to obtain more information on the role of anions in the occurrence of salty taste in order to determine the optimal ratio of sodium ions to anions for enhancing salty taste.