

## 論文内容の要旨

論文題目 酢酸の有する呈味発現機構の解析

氏名 石井 翔

酢酸は、一般的な食酢中に 500~1,000 mM 程度の濃度で含まれる有機酸であり、食酢中の主要酸味成分である。様々な素材を原料として作られる食酢は、古来より世界中で使用されており、酸味調味料の代表的存在といえることができる。酢酸には酸味を付与するという効果以外にも、静菌効果や内臓脂肪低減作用等の健康機能も備わっていることが近年示されており、食品衛生や健康促進の観点からも、重要な食品素材である。しかしながら、食酢が酸味調味料として用いられる上で最も重要といえる、酢酸の有する呈味発現機構について、十分に解明されていないのが現状であった。

近年、分子生物学の発展に伴い、味覚受容機構に関する研究領域は目覚ましい発展を遂げ、口腔内における味物質の受容機構において多くの知見が得られてきた。味細胞に発現する味覚受容体において呈味物質が受容されると、味細胞内シグナル伝達、味神経への神経伝達物質の放出、味神経を介した神経連絡を経た後に、脳において味が認知される。ヒトやマウスにおいて甘味受容体はたった 1 種類しか存在せず、この受容体があらゆる甘味物質を受容するといった知見も、これらの解析の過程において示されてきた。しかしながら、酸味の刺激は単一の受容体によって受容されるのではなく、複雑で多元的な機構によって認知されていることがこれまでの知見から示唆されている。酸味の受容機構の全体像の解明が他の基本味と比較して遅れていることの要因として、その認知機構の複雑さが挙げられよう。生体が複数の酸認知機構を備えていることは、酸の存在が生体にとって非常に重要な外来シグナルであることを反映していると推察される。

生体における複雑な酸味受容機構を捉えるため、単純化された実験系における観察結果を蓄積し解釈することは非常に重要である。例えば、各種の酸によって惹起さ

れる酸味は、含まれるプロトンに起因する感覚であるにも関わらず、等しいプロトン濃度(すなわち等 pH) 溶液の酸味強度が、酸の種類によって異なることが、これまでの複数の官能評価により示されている。一般に、等 pH の溶液において、弱酸は強酸よりも酸味強度が高く、弱酸の中でも特に酢酸の酸味強度が高い。そのため、酸味受容の全体像の解明において、酢酸の有する呈味発現機構は、良好なモデルケースであると言える。

また応用的な視点からも、酢酸の呈味発現機構の解明は有意義な研究課題と言える。前述の通り、酢酸には静菌作用および健康機能が認められる。一方で強い酸味は一般的には忌避されることから酢酸を高容量含む食品は嗜好性が損なわれる場合があった。そのような現状において、酸味を効率的に抑制するような物質が見出されたならば、嗜好性に与える影響が少ないままで、高容量の酢酸使用が可能となり、静菌作用や健康機能の恩恵を享受しやすくなる。酢酸の呈味受容を担う受容体の同定がなされれば、受容体を分子標的とする酸味抑制剤の探索が可能となり、食品産業における応用の途が拓かれる。

本論文では酢酸の有する呈味発現機構に着目し、その解明を試みることを目的に研究を実施した。特に、酸味受容体として有力な候補分子として同定されている Polycystic kidney disease (PKD)1L3/PKD2L1 を対象とし、酢酸刺激に対する応答性評価ならびに応答抑制物質の探索について、解析を実施した。更に培養細胞を用いた解析系において、酢酸刺激によって誘起されるものの、クエン酸刺激では誘起されない内因性応答について、その発生要因の同定を試みた。

第 1 章に記載の序論に続き、第 2 章では PKD1L3/PKD2L1 の酢酸刺激に対する応答性評価手法の改良と、応答評価について述べている。PKD1L3/PKD2L1 は一部の味細胞において共発現し、両サブユニットから構成されるイオンチャネルを形成する。このチャネルは、クエン酸を初めとする多様な酸刺激に対して、オフ応答という特徴的な応答を示す。また PKD1L3/PKD2L1 を欠損したノックアウトマウスでは、酸味刺激に対する味神経のオフ応答の一部が抑制されることから、PKD1L3/PKD2L1 が生体における酸味受容に、部分的にはあるものの寄与している可能性が示唆されている。

哺乳類培養細胞に PKD1L3/PKD2L1 を共発現させると、塩酸やクエン酸刺激を行った後に pH を中性に戻すことによって開口し、ナトリウムイオンやカルシウムイオンなどの陽イオンが透過することが、電気生理学的解析やカルシウムイメージングによって示

されている。しかし、培養細胞が酢酸刺激に対して内因性の応答を生じるため、酢酸刺激が PKD1L3/PKD2L1 を活性化しうるかどうかについて、実験的に示されてこなかった。そこで、リガンド投与方法や応答解析時間の最適化を行うことで、内因性応答の影響をできるだけ排除した応答記録を実施した。その結果、PKD1L3/PKD2L1 は酢酸刺激に対して、他の酸刺激と同様に、pH 回復後に活性化されることが示された。すなわち、酢酸の示す酸味も、部分的には PKD1L3/PKD2L1 を介して受容されることが示唆された。

第 3 章においては、PKD1L3/PKD2L1 の薬理的性質の解明を目的とし、チャンネル応答を抑制する阻害剤の探索を実施した。これまで本チャンネルに関して、薬理的な性質に関する報告はなされてこなかったが、本研究において PKD1L3/PKD2L1 の活性を調節する化合物について探索を行い、辛味を呈する物質として知られるカプサイシンに、チャンネル活性の抑制能が認められることを明らかにした。カプサイシンの類縁体について幅広く探索した結果、抑制効果を有する類縁体についても多数同定することができた。

培養細胞における評価系において、カプサイシンは PKD1L3/PKD2L1 の酢酸刺激に対する応答を有意に抑制した。またチャンネル阻害における IC<sub>50</sub> 値は  $32.5 \pm 10.2 \mu\text{M}$  であり、このカプサイシン濃度は通常喫食する食品に含まれる濃度を逸脱しないものであった。また、マウスの舌から摘出した味細胞の一部は、酸刺激に対してオフ応答を示すが、カプサイシンはこのオフ応答を抑制することも示すことができたため、カプサイシンが酢酸の酸味を抑制する物質となる可能性が示された。

味覚受容体における薬理的な性質の解明は、味覚受容機構を解析する上においても重要な知見と言え、本解析で明らかにされた結果は、今後の酸味受容機構の全体像解明においても有用なものとなることが期待される。

第 4 章においては、前述した酢酸が誘起する培養細胞内因性応答の発生要因について、解析を実施した。酸刺激に対する内因性応答に関する知見は、生体細胞の様々な酸に対する応答を解釈する上で、重要な知見をもたらす可能性がある。特に、酢酸が他の酸には認められない特異的な性質を有することは、酢酸が他の酸よりも同 pH において強い酸味を呈するという非常に興味深い現象を理解する上でも、重要である。

pH や濃度を厳密に制御した酢酸溶液を準備し、これらを培養細胞に投与した際の

細胞応答を観察した結果、酢酸は非解離型の状態で細胞膜を透過し、細胞内を酸性化することによって内因性応答を誘起することを明らかにすることができた。このとき、クエン酸や塩酸など、親水性が高い酸を投与した際にはこの作用は認められず、蟻酸、プロピオン酸、酪酸のように、酢酸と同様に疎水性が高い酸を投与した際には、内因性応答を誘起しうることが判明した。すなわち、生体細胞における酸刺激受容を考察する上で、pH のみならず、酸分子の化学的性質が細胞の反応性を大きく左右するという、新たな視点を提起することができたといえよう。さらに、酢酸の酸味が他の酸よりも強く発現されることの発生要因として、細胞膜透過能・細胞内酸性化能といった酸の化学的性質が強く関与することをも、同時に示唆することができた。

以上、本研究においては、酢酸の有する呈味発現機構について詳細な解析を試み、PKD1L3/PKD2L1 が酢酸刺激によって活性化されることを明らかにしただけでなく、このチャンネルが酢酸の酸味発現に強く関与するという可能性を示した。また、辛味物質であるカプサイシンによってPKD1L3/PKD2L1 を介した応答が抑制されることを新たに見出しただけでなく、酢酸が特異的に培養細胞に誘起する現象について、その発生要因が細胞内酸性化にあることを示すことができた。

本論文で明らかにされた成果は、酢酸を主成分とする食酢の呈味調味料としての本質を理解する上で、非常に重要な知見となる。また、PKD1L3/PKD2L1 の薬理的性質の解明や、酸の化学的性質が細胞応答に影響することを明らかにした本論文の研究成果は、酸味受容全体像の解明のみならず、酸刺激に対する細胞応答を解析する幅広い研究分野において、大きく寄与する知見となりうる。さらに、食品産業における酢酸の利用用途を広げるうえで、嗜好性を損なわない条件で静菌作用・健康機能を発揮させる可能性を示した、応用上意義をも兼備するものであるといえよう。