

Development of Specific Inhibitor for Bitter Taste and Mechanism of its Inhibitory Action

(苦味抑制剤の開発とその作用機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

多くの毒物は苦味を呈するので、苦味物質は動物にとっては忌避物質となっている。人間においても、多くの苦味は不快感を与えるため食品工業や製薬業において重要な問題となっている。とくに、「良薬は口に苦し」との諺にあるように、大半の薬は苦味を呈するので、苦味の抑制は薬剤学の分野において克服すべき重大な課題となっている。

本研究では、リン脂質の成分であるホスファチジン酸(PA)と蛋白質から作製したリボ蛋白質が苦味を選択的に抑制する効果を見いだした。PAを含むリボ蛋白質は、苦味の受容サイトをマスキングするという従来にない機能で苦味を抑制することが明かとなった。

リボ蛋白質のカエル味覚応答への作用

脂質-蛋白質複合体(リボ蛋白質)の作製には、脂質としてPA、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルセリン(PS)、トリアシルグリセロール(TG)およびジアシルグリセロール(DG)を用い、蛋白質としては食品由来の蛋白質である β -ラクトグロブリン(LG)、 α -ラクトアルブミン(LA)、オボアルブミン(OVA)、カゼインおよびウシ血清由来アルブミン(BSA)を用いた。リボ蛋白質は、脂質および蛋白質を水中で分散させ凍結乾燥することにより作製した。

リボ蛋白質の味覚に対する効果は、カエル舌咽神経(味覚神経)応答を測定することにより、定量的に評価した。リボ蛋白質の味覚レセプターへの直接的な作用を検討するために、あらかじめリボ蛋白質をカエル舌表面に10分間前処理し、その後リボ蛋白質を含まない味溶液で刺激した。その結果、PAとLGからなるリボ蛋白質(PA-LG)はキニーネ、ババベリン、L-ロイシンのような苦味物質に対する応答を抑制するのに対し、塩味物質(NaCl)、酸味物質(酢酸)、甘味物質(ガラクトース、L-アラニン)の応答は抑制しなかった。このような効果は、PAを含むリボ蛋白質(PA-LA, PA-OVA, PA-Casein)すべてに認められ、苦味抑制効果は蛋白質の種類には依存しないことがわかった。また、PSを含むリボ蛋白質は、弱い抑制作用を示したが、PCやTG, DGを含むリボ蛋白質には抑制作用はなかった。すなわち、苦味の抑制効果の発現にはPAが最も効果的であることが明らかになった。

つぎに、リボ蛋白質(PA-LG)の濃度を変えて、各種苦味応答および塩応答に対する抑制効果を調べた。その結果、NaClの応答はまったく抑制されないのに対して、用いた4種類の苦味物質に対する応答は一律に抑制された。これらの苦味物質は異なる苦味受容サイトで受容されることが考えられているが、その抑制曲線は同じ曲線上に描かれることがわかった。苦味物質は疎水的であることから、その受容サイトも疎水性であることが推測されている。おそらく、リボ蛋白質は味受容膜の疎水領域にある苦味受容サイトを一律にブロックしたものと考えられる。

リボ蛋白質の疎水領域への吸着

リボ蛋白質のカエル舌乳頭表面への吸着を調べた。蛍光ラベルした脂質とLGからリボ蛋白質を作製し、カエル舌表面を処理した後に、舌を洗浄し舌乳頭の切片を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、苦味抑制効果の強いPA-LGは非常によく吸着することがわかった。一方、苦味を抑制しないPC-LGは、ほとんど吸着しなかった。おそらく、PA-LGは舌乳頭表面の疎水性部位に吸着するものと思われる。

そこで、つぎにDSPC (ジステアロイルホスファチジルコリン) を疎水性のモデル膜として用い、各種リボ蛋白質の吸着能を比較した。水晶振動子の表面をDSPC膜でコートし、そこに吸着するリボ蛋白質の量を水晶振動子の周波数変化により評価した。その結果、苦味抑制作用を有するリボ蛋白質ほどDSPC膜へよく吸着することがわかった。DSPC膜表面の正味電荷はゼロであるから、PA-LGのDSPC膜への吸着には疎水的相互作用が働いているものと推察される。

以上の結果は、PAを含むリボ蛋白質が、味受容膜上の疎水的部位に吸着することにより苦味応答を抑制することを示唆する。PAを含むリボ蛋白質は、苦味応答だけを抑制し、他の味質には影響しない。甘味、塩味、酸味、苦味のうち、苦味物質だけが疎水性であり、他の味物質は親水性物質である。したがって、苦味以外の受容サイトは親水的であると思われる。PAを含むリボ蛋白質は味受容膜の疎水性部位に吸着すると考えられるので、親水性の受容部位には影響を与えず、結果として苦味が選択的に抑制されるものと示唆される。

ヒト味覚応答に対するリボ蛋白質の効果

ヒトの味覚に対する効果は等価濃度試験法により定量的に行った。カエル舌咽神経を測定した実験では、舌表面をあらかじめリボ蛋白質で前処理した後に苦味刺激を行ったが、ヒトの場合にはこのような方法は適当でない。ヒトの場合は、苦味溶液の中にリボ蛋白質を添加した溶液の苦味強度を評価した。その結果、カエルを用いた実験と同様に、PAを含むリボ蛋白質に顕著な苦味抑制効果が認められた。3.0%PA-LGを含む各種の味物質への抑制効果を調べたところ、塩味(NaCl)、甘味(蔗糖)には抑制効果は認められなかったのに対し、用いた12種類の苦味をすべて抑制した。なかでも、疎水性の強い苦味物質を強く抑制した。ヒトでの評価の場合は、苦味物質とPA-LGが共存した水溶液の苦味を評価しているため、苦味物質とPA-LGの吸着が考えられる。そこで、各苦味物質がPA-LGにどの程度吸着するかを測定したところ、疎水性の強い苦味物質はPA-LGへ強く吸着することがわかった。したがって、これらの物質の場合は、PA-LGが溶液中で苦味物質へ吸着することが、苦味抑制に大きく寄与しているものと思われる。一方、比較的疎水性の弱い苦味物質はほとんどPA-LGへ吸着しないので、PA-LGが舌表面の苦味受容サイトをマスクすることにより苦味抑制が起こると考えられる。

苦味抑制剤の応用

苦味抑制剤を工業的に生産する場合には、安価に製造することが大きな課題となる。そこで、苦味抑制のkey物質であり、PA-LGに比べ安価にそして簡単に製造できるPAを苦味抑制剤として用いることにした。PAの苦味抑制能を調べたところ、各種の薬物の苦味および食品の苦味を抑制することが明らかとなった。苦味が問題になっている医薬品や食品へ広く応用できるものと思われる。

まとめ

- [1] カエル舌咽神経応答を測定する実験により、PAを含むリボ蛋白質が、苦味を抑制することを見いだした。抑制効果は苦味に選択的であり、酸味、甘味、塩味には抑制効果は認められなかった。
- [2] PAを含むリボ蛋白質でカエル舌表面を前処理し、リボ蛋白質を含まない苦味溶液を与えると、苦味が抑制された。このことは、PAを含むリボ蛋白質が味受容膜の苦味受容サイトへ吸着し、苦味を抑制することを示唆した。
- [3] PAを含むリボ蛋白質の舌乳頭表面および疎水膜への吸着と苦味抑制の間には、良い相関関係があった。このことは、リボ蛋白質は味受容膜の疎水性部位に吸着することにより苦味を抑制することを示唆した。
- [4] ヒトへ応用する場合の苦味抑制の機構
 - 1) PAを含むリボ蛋白質が、味受容膜の苦味受容サイトへ吸着する
 - 2) 苦味物質(疎水性の強い苦味物質の場合)がPAを含むリボ蛋白質に吸着し、苦味物質が味細胞を刺激できないため苦味が抑制される以上の2つの機構により、苦味が抑制されることがわかった。
- [5] 苦味抑制剤として、さまざまな医薬品および食品への応用が可能であることがわかった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	栗原堅三
副査	教授	加茂直樹
副査	助教授	三宅教尚
副査	講師	宮内正二

学位論文題名

Development of Specific Inhibitor for Bitter Taste and Mechanism of its Inhibitory Action

(苦味抑制剤の開発とその作用機構に関する研究)

申請者は、味覚の研究を行ってきたが、このほどホスファチジン酸 (PA) と蛋白質から作製したリポ蛋白質が苦味を選択的に抑制することを見だし、この結果をまとめて学位論文を提出した。

本論文の第一章では、リポ蛋白質のカエル味覚応答への作用を取り上げている。研究で用いたリポ蛋白質は、リン脂質および中性脂質と蛋白質を水中で均一に混合させた後、凍結乾燥することにより作製している。リポ蛋白質の味覚に対する効果は、カエル舌咽神経 (味覚神経) 応答を測定することにより、定量的に評価した。リポ蛋白質の味覚レセプターへの直接的な作用を検討するために、あらかじめリポ蛋白質をカエル舌表面に10分間前処理し、その後リポ蛋白質を含まない味溶液で刺激した。その結果、PAと β -ラクトグロブリン (LG) からなるリポ蛋白質 (PA-LG) は苦味物質に対する応答を抑制するのに対し、塩味物質、酸味物質、甘味物質の応答は抑制しなかった。このような効果は、PAを含むリポ蛋白質すべてに認められ、苦味抑制効果は蛋白質の種類には依存しないことがわかった。また、ホスファチジルセリン (PS) を含むリポ蛋白質は、弱い抑制作用を示したが、ホスファチジルコリン (PC) や中性脂質を含むリポ蛋白質には抑

制作用はなかった。すなわち、苦味の抑制効果の発現にはP Aが最も効果的であることが明らかにした。

つぎに、P Aを含むリポ蛋白質であるP A-L Gの濃度を変えて、各種苦味応答および塩応答に対する抑制効果を調べている。その結果、N a C lの応答はまったく抑制されないのに対して、用いた4種類の苦味物質に対する応答は一様に抑制された。苦味物質は疎水的であることから、その受容サイトも疎水性であることが推測されている。おそらく、リポ蛋白質は味受容膜の疎水領域にある苦味受容サイトを一様にブロックしたものと推定している。

本論文の第二章では、リポ蛋白質の疎水領域への吸着を地理扱っている。まずリポ蛋白質のカエル舌乳頭表面への吸着を調べている。蛍光ラベルした脂質とL Gからリポ蛋白質を作製し、カエル舌表面を処理した後に、舌乳頭の切片を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、苦味抑制効果の強いP A-L Gは非常によく吸着することを明らかにした。一方、苦味を抑制しないP C-L Gは、ほとんど吸着しなかった。おそらく、P A-L Gは舌乳頭表面の疎水性部位に吸着するものと推定している。

そこで、つぎにD S P C（ジステアロイルホスファチジルコリン）を疎水性のモデル膜として用い、各種リポ蛋白質の吸着能を比較した。その結果、苦味抑制作用を有するリポ蛋白質ほどD S P C膜へよく吸着することをみいだした。D S P C膜表面の正味電荷はゼロであるから、P A-L GのD S P C膜への吸着には疎水的相互作用が働いているものと推察した。

以上の結果は、P Aを含むリポ蛋白質が、味受容膜上の疎水的部位に吸着することにより苦味応答を抑制することを示唆する。P Aを含むリポ蛋白質は、苦味応答だけを抑制し、他の味質には影響しない。甘味、塩味、酸味、苦味のうち、苦味物質だけが疎水性であり、他の味物質は親水性物質である。したがって、苦味以外の受容サイトは親水的であると思われる。P Aを含むリポ蛋白質は味受容膜の疎水性部位に吸着すると考えられるので、親水性的な受容部位には影響を与えず、結果として苦味が選択的に抑制されるものと解釈した。

本論文の第三章では、ヒト味覚応答に対するリポ蛋白質の効果

を取り上げている。ヒトの味覚に対する効果は等価濃度試験法により定量的に行なった。ヒトの場合は、苦味溶液の中にリポ蛋白質を添加した溶液の苦味強度を評価した。その結果、カエルを用いた実験と同様に、PAを含むリポ蛋白質は塩味や甘味は抑制しなかったのに対し、用いた12種類の苦味をすべて抑制した。なかでも、疎水性の強い苦味物質を強く抑制した。ヒトでの評価の場合は、苦味物質とPA-LGの吸着が考えられる。そこで、各苦味物質がPA-LGにどの程度吸着するかを測定したところ、疎水性の強い苦味物質はPA-LGへ強く吸着することを明らかにした。したがって、これらの物質の場合は、PA-LGが溶液中で苦味物質へ吸着することが、苦味抑制に大きく寄与しているものと推定した。一方、疎水性の弱い苦味物質はほとんどPA-LGへ吸着しないので、PA-LGが舌表面の苦味受容サイトをマスクすることにより苦味抑制が起こると推定した。

本論文の第四章では、医薬品および食品への応用を取り上げている。医薬品や食品へ応用する場合は、製造に関するコストなどを考慮する必要がある。そこで、実用化には、苦味抑制のキー物質であり、PAを含むリポ蛋白質に比べ安価にそして簡単に製造できるPAを単独で用いたところ、薬物や食品の苦味を抑制することを明らかにした。

これまで、苦味を選択的に抑制する物質は見つかっておらず、今後、医薬品や食品への応用が期待されている。以上のように、申請者は新しい苦味抑制剤を開発し、その作用機構を明らかにした。したがって、本研究は博士（薬学）の学位を授与するに値する論文であると判定した。