

CONTENTS

●Review

GABA 合成酵素グルタミン酸
デカルボキシラーゼにみる隠れた
機能：味覚での役割と応用
奈良女子大学生生活環境学部 植野 洋志

漢方診療・再発見 7 中医・韓医と日本漢方
熊本赤十字病院総合内科
熊本大学大学院医学教育部 加島 雅之

●Topics on Chemistry

SAMをゲート絶縁膜に
用いた有機トランジスタの開発
株式会社同仁化学研究所 栢多 利博

三脚型Cu(II)BODIPY錯体を用いた溶液中での
ニトロキシルの直接的および特異的検出
株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文

2010 No.136

ISSN 0385-1516

DOJIN NEWS

ドージンニュース

目次

Review

GABA 合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼにみる隠れた機能：味覚での役割と応用
 奈良女子大学生活環境学部 植野 洋志 …………… 1

漢方診療・再発見

7 中医・韓医と日本漢方
 熊本赤十字病院総合内科
 熊本大学大学院医学教育部 加島 雅之…………… 8

Topics on Chemistry

SAM をゲート絶縁膜に用いた有機トランジスタの開発
 株式会社同仁化学研究所 栢多 利博…………… 10
 三脚型 Cu(II)BODIPY 錯体を用いた溶液中でのニトロキシルの直接および特異的検出
 株式会社同仁化学研究所 岩下 秀文…………… 12

Commercial

新製品

グルタチオン分別定量キット
 GSSG/GSH Quantification Kit …………… 14

試作販売品

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質 MATP+ …… 16

開発中

表面処理用ホスホン酸誘導体…………… 11

開発中

自己組織化単分子膜作製用試薬 …………… 13

お知らせ

学会展示のご案内…………… 15
 第 21 回フォーラム・イン・ドージン開催 …………… 18

新製品案内

グルタチオン分別定量キット

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
GSSG/GSH Quantification Kit	200 tests	50,000	G257

試作品販売

アセチルコリンエステラーゼ特異的基質

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
MATP+	10 mg	20,000	M450



おこしき
 御興来海岸 (熊本県宇土市)
 「日本の渚・百選」に選ばれている。この独特な干潟の光景は、有明海を囲む 4 県 (長崎、佐賀、福岡、熊本) の中でも、ここでしか見ることができない。干潮時には海岸線約 10km、沖合約 2km にわたり見事な砂模様浮かび上がる。

Photo : 永島俊介氏

GABA合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼにみる隠れた機能：味覚での役割と応用



植野 洋志

奈良女子大学 生活環境学部
食物栄養学科

Synopsis:

Glutamate decarboxylase (GAD) has been known as an enzyme that catalyzes a decarboxylation reaction to produce γ -aminobutyrate (GABA) from L-glutamate. GABA is an inhibitory neurotransmitter for mammals; hence, the major role of GAD has been thought to function in the brain including neuronal tissues. Recent findings of GAD in non-neuronal system including skin, stomach and intestine raise a question about the hidden role of this enzyme. Sodium glutamate is an internationally recognized umami compound and a substrate for GAD. We have found GAD67 in the taste buds, specifically in the type III cells that express receptors for acid and salt. In this article, the possible role of GAD in the taste signal transduction is described.

キーワード：GABA、神経伝達物質、味覚改変、塩味増強

1. はじめに

グルタミン酸の代謝酵素の一つにグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) がある。GADは高等動物の中枢神経系に多く発現し、抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) を合成する酵素として発見された¹⁻³⁾ (図1)。当時、活発に研究がなされて、生体での局在性などの研究もなされ、その結果、脳、脾臓、精巣に発現することが報告されている。このような初期の研究成果をもたらした功罪であろうか、それ以降GADの研究は中枢を主体とするものであった。高等動物以外でもGADの存在が知られている。大腸菌、トマトやホウレンソウなどからGADが精製された⁴⁾。しかし、神経組織を持たない大腸菌などでのGADの役割は長いこと不明であったが、酵素学的な性質の解明は大腸菌酵素の研究に負うところが多かったのである。この分野で大きな曲がり角となったのは1990年初頭である。その年には、高等動物のGAD遺伝子が同定され、二つの独立した遺伝子の存在が明らかになったこと⁵⁾、そして、その内の一つ (GAD65) がI型糖尿病患者に発現する自己免疫抗体の標的抗原であることが判明した⁶⁾。遺伝子解析の結果は、それまで積み上げてきたGADの酵素学的知見をほぼリセットするものである。それ以降は、同じGADの研究でも、アイソフォームの違いを明確にしないと意味をなさないものであることが明らかになった。そのような背景のもと、筆者はGADの研究を本格的に再開した訳である。その

際、ただ漠然と研究を始めるのではなく、GADの存在意義、つまり基質がグルタミン酸であることより生体内でのグルタミン酸の分布を意識してGADの生理作用を検討したいと考えた。その意味では、グルタミン酸濃度が高い部位はどこか?ということ考えた結果、口腔内ではないかということに至った。その結果、大変面白い現象に出会えたので、本稿でその研究成果をまとめさせていただく。まだ研究途中ではあるが、味覚という興味深い分野との接点が見えた。については、最初に、GADの高等動物から微生物にいたる概要を紹介し、次に、味覚の紹介と、GADとの関係について解説したい。

2. GADの高等動物から微生物

グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) は、ビタミンB₆関与の脱炭酸酵素である。アミノ酸配列は遺伝子解析より予想された配列が知られており、ヒスチジンデカルボキシラーゼ (HDC) と芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ (古くはDOPAデカルボキシラーゼ) (ADC) と同じ部類に分類される。ゲノム解析の結果、ほぼすべての生物体にGADと類似のアミノ酸配列をもつタンパク質の存在が予想されている。アミノ酸配列は遺伝子解析より簡便に予想できる。しかし、タンパク質レベルから配列決定した結果、遺伝子解析からの予想とは異なる残基 (多くは

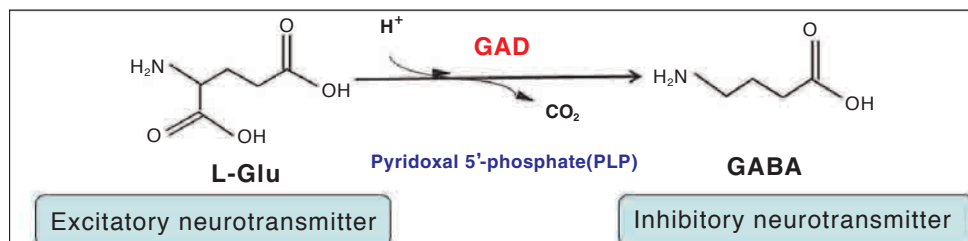


図1 グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の触媒反応

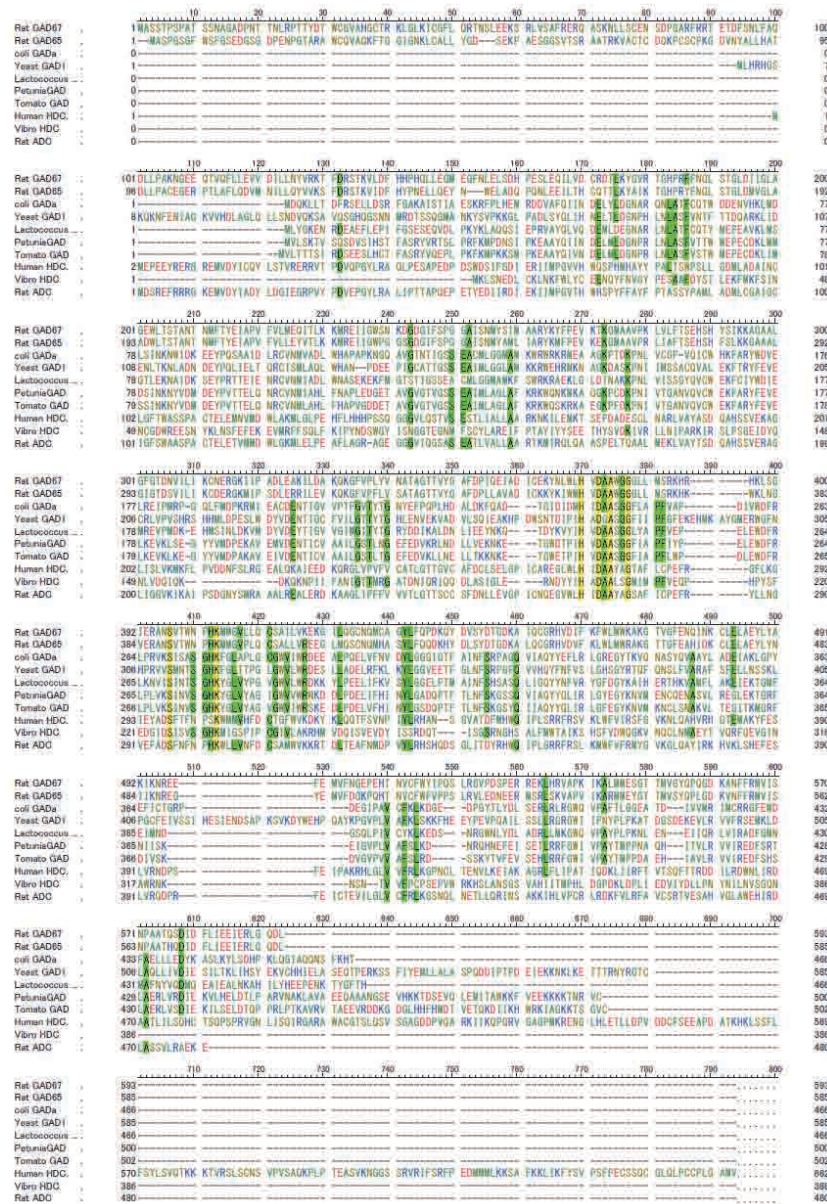


図2 グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)の生物間、および、ヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC)と芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ(ADC)とのアミノ酸相同性の比較

翻訳後修飾)の存在や、成熟化機構などによるN末端やC末端領域の切断機構などは分からないままなので、タンパク質レベルでのアミノ酸解析は必ず考慮すべきである。GADにおいては、まだタンパク質レベルでのアミノ酸配列解析は行われていない(一部、活性中心のアミノ酸配列は報告されている)。

高等動物のGADは1950年代にその存在が分かり、神経伝達物質であるGABAの合成を担うことより重要度が認識され、多くの酵素的性質を明らかにする研究がおこなわれてきた。精製も活発に行われてきたが、分子量やサブユニット構造に関しては統一した見解が得られずにいた⁷⁾。1990年になって、GAD遺伝子のクローニングがなされ、異なる染色体上に独立した遺伝

子としてGADが2つ存在することが判明し、それぞれをアイソフォームと呼ぶことになった。合成されるタンパク質の分子量が65 kDaと67 kDaであることよりそれぞれのアイソフォームはGAD65とGAD67と命名される。

GAD遺伝子は16個のエクソンで構成され、エクソン・イントロンの境界は動物種をまたがったGAD間でも、同一の動物種のアイソフォーム間でも類似している(図2)。タンパク質レベルでの相同性は、アイソフォーム間では60%程度であるが、種を超えた同一のアイソフォーム間では80%以上と高い。脱炭酸酵素としての機能には、補酵素であるピリドキサル5'リン酸(PLP)と結合して Schiff塩基をつくるLys残基、α位のカルボ

ン酸を認識するアミノ酸残基 (Argとされる)、そして、側鎖のカルボン酸を認識するアミノ酸残基 (Argであろう) が必要とされる。N末端100残基を欠失したX線結晶構造が近年報告され⁹⁾、アミノ酸基質認識に与関するこれらの残基はN末が欠損した残りの部位 (C末端領域) に存在することが判明した。これにより、GADの場合、N末100残基がなくても活性がフルに表現できることが判り、なぜN末端領域100残基が必要なのかというN末端領域の意義が反対に問われることになった⁹⁾。興味深いことに、GAD,HDCとADCのアミノ酸配列の相同性を比較すると、ADCが一番短くてちょうどGADがN末100残基を失った部分に相当する。また、GADはN末に約100残基長く、HDCは反対にC末が約150残基長い。近年、HDCは成熟化機構により、C末約150残基が切断除去されることで活性型に変化することが判明し、上述のGADのN末欠損型が活性をフルに保持していることと辻褃があう。これらをまとめると、ADCが一番古い形の脱炭酸酵素であり、その後、GADとHDCに進化したことが想像できる。

GADアイソフォームの役割解明は現在活発に進められている。触媒作用部位であるN末端100残基を除いた領域は、部位特異的な発現様式やアイソフォームの違いを説明するには酷似しているため、N末端領域に秘密が隠されているというのが一般的な考えである。GAD65のN末にはCys残基が3箇所存在し、ガン分野で知られているRasタンパク質内のCys残基と同様にpalmitoyl化されていることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。GAD65は膜親和性が高く、GAD67はほとんど膜との親和性がないことが知られているので、palmitoyl化は膜親和性に関与すると想像されたが、部位特異的突然変異法でCys残基を他のアミノ酸に置換しても膜親和性に変化がなかったという報告がなされており、まだ完全には理解されていない。GADはビタミンB₆酵素では珍しくリン酸化される^{11,12)}。リン酸化により活性化、脱リン酸化により不活性化が起きるが、GAD65とGAD67ではリン酸化による活性制御機構が逆転しているという報告がある。小幡らはノックアウトマウスを作製し、GADアイソフォーム間の違いを示した。GAD65ノックアウトマウスでは、生後発作を頻繁に起こし、短命で終えるが、GAD67ノックアウトマウスでは、上あご形成不全という発生異常で生後すぐに呼吸不全で死ぬことが分かった^{13,14)}。これにより、GAD65は神経終末での小胞体関与が、GAD67は細胞質での代謝に何らかの役割を担っていると判断され、アイソフォーム間の役割分担がなされていることが分かる。ちなみに、LDHなどの「アイソザイム」は臓器ごとに発現するサブユニットの比率がM₄、M₃H、M₂H₂、MH₃、H₄という具合に異なるのとは違い、GADアイソフォームでは、同一の細胞にて同時に2種類のGADが発現し、それぞれ異なる役割を担っているという特徴がある (図3)。それでは、どちらのアイソフォームもグルタミン酸を基質としGABAを生成する化学反応を触媒する訳であるが、細胞内では、基質であるグルタミン酸分子はどのような取り分けがなされるのであろうか？また、グルタミン酸分子の供給経路に関しても大きな関心が寄せられているが、まだ理解されているとは言えない。

GADが発生や発作に与関する以外に、糖尿病などの疾患にも関与することが報告されている。I型糖尿病患者では発症の10~20年前より血液中に63~65 kDaタンパク質を標的とする自己免疫抗体が見つかっており、その標的タンパク質がGAD65であるという報告がなされている⁹⁾。I型糖尿病はウイルス感染の可能性があり、候補となるウイルスのコートプロテインの配列の

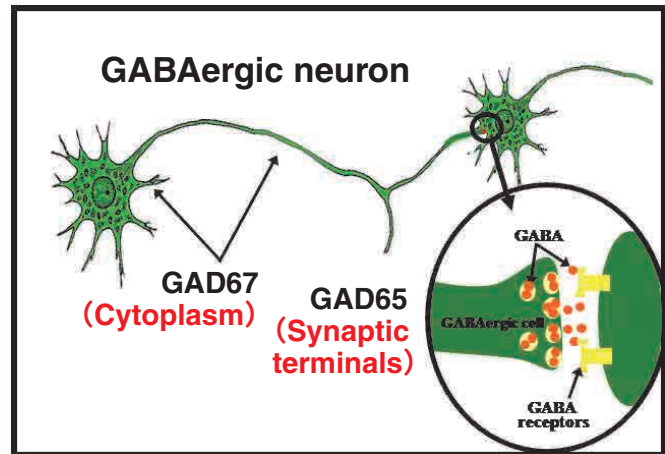


図3 GADアイソフォームの神経細胞内での局在性の想像図

表1 生物種におけるGADアイソフォームの数

Species	Isoforms
Human	2
Mouse	2
Rat	2
Pig	2
Cow	2
<i>S.cerevisiae</i>	1
<i>A.oryzae</i>	8
Rice	5
<i>E.coli</i>	2
<i>C.cinereus</i>	2

一部がGAD65と相同性があることで抗原性をもったのではないかと考えられている。膵臓のβ細胞で発現するGAD65が主たる標的となり、その結果、β細胞が壊れ、インスリンの合成系が破壊されることで糖尿病の発症につながるとされる。GAD65タンパク質の早期検出はI型糖尿病患者の早期発見につながるとして、簡便なそして高感度の検査試薬の開発が進んでいる。

GADは高等動物以外でも多くの生物が備えていることがゲノム解析の結果理解されてきた。GADが存在することは、すなわちGABAの存在も意味し、そこで生じる大きな疑問は、神経伝達物質であるGABAは、神経組織を持たない非神経系組織や細胞でどのような役割をしているのか？である。植物体は6量体タンパク質であるGADを発現するが、一部ではC末端領域が長く、その部分にカルモジュリン結合部位を持つことが報告されている。植物体でのGABAの役割はまだ検討すべき課題であるが、GABA合成機構がCa⁺⁺イオンにより制御されていることは興味深い。微生物界ではGADはほぼすべてにおいて存在が確認されている。特に興味深いことは、複数の遺伝子が備わって

いることと、産生されるタンパク質のサブユニット構成である。表1に示すように、大腸菌 (*E. coli*) ではGAD_AとGAD_Bの2種が、麹菌ではGAD1~8の8種が、キノコ (*C. cinereus*) では2種という具合に複数個のGAD遺伝子の存在がゲノム解析の結果明らかになっている。また、サブユニット構成に関しては、大腸菌やパン酵母 (*S. cerevisiae*) は6量体、乳酸菌は2量体という報告があるが、他の微生物由来のGADについての報告は少ない。多量体サブユニット構造をもつGADの酵素学的・生理学的研究はほとんどなされておらず、今後の課題とも言える。

古くより大腸菌由来のGADの研究は活発になされていたが、神経組織を持たない微生物におけるGADの役割は理解されてこなかった。しかし、近年、GADおよびGABAが酵母においては抗酸化機構に、大腸菌や乳酸菌では酸耐性機構に関与するとの報告がなされ、新たなGADの役割が明らかになってきている¹⁵⁻¹⁸⁾。

3. グルタミン酸デカルボキシラーゼの味蕾での発現

GADの非神経系組織での局在化に注目されている。近年、食の分野ではGABAが特保に認定され、GABA入りのチョコレート、ヨーグルト、味噌汁、飲料水を始めさまざまな製品が開発されて販売されている。GABAの生理効果は、血圧上昇抑制、利尿作用や成長ホルモンの誘発による細胞の活性化といった生活習慣病予防やリラクゼーション効果をうたっている。ところが、生体内での作用機序がまだ完全に理解されておらず、基本的なGADの局在性の検討が必要になっている。

従来、高等動物ではGABAの働きは神経伝達作用に注目され、脳の他では高い発現レベルを観察される膵臓や精巣が主たる研究対象であった。ところが非神経系での働きに注目していくことで、他の臓器での局在性を知る必要があるが、ほとんど理解されていない状態であった。そこで当研究室では、組織免疫化学染色法を用いて舌下腺、皮膚、胃、腸でのGADの局在性を京都府立医科大学河田光博教授、一丸ファルコス (株) 長谷川順一・伊藤賢一博士らとともに検討し、これら臓器にGADの発現を報告してきた¹⁹⁻²²⁾。また、分子生物学手法であるRT-PCRによりmRNAの存在も明らかにした。これまで酵素の組織における局在性の研究は数多くなされてきたが、酵素学的な見地での検討は少ないと考えられる。それは、酵素反応を行うに必要な基質濃度、つまりK_m値を考慮した基質レベルでの酵素の分布を考えるということである。実は、細胞内での基質の濃度分布を正確に測定することは大変困難である。これにより、通常は、基質濃度を考えずに酵素タンパク質の存在の有無を検討することになる。GADの場合、基質であるグルタミン酸が基質レベルで存在する部位といえば、口腔内であろう。グルタミン酸 (グルタミン酸ソーダと同義に使う) は、100年前に池田菊苗博士が昆布から抽出したうま味物質である。グルタミン酸ソーダの結晶である「味の素」をふりかけた食材を口にしたりすると、口腔内には基質レベルのグルタミン酸が存在することになる。人体では、大量のグルタミン酸を単にうま味物質としてうま味受容体と結合し、その信号を脳に送ってうま味を認識するだけに用いて、残りのグルタミン酸は機械的に胃や腸に送りこんでいるだけであろうか？グルタミン酸は何か他にも目的があって使われるということを考えて場合、代謝酵素の存在の有無を検討することは一つの要点ではないかと考えた。

我々は舌にはGAD抗体により染色される部位が存在し、それが味蕾であることを見出し、RT-PCRにてGADの発現の可能性を検討してきた。その折、生理学研究所の小幡邦彦教授と柳川右千夫助教授が作製されたGAD67/GFPノックインマウスに出会うことになった^{23,24)}。大阪医科大学渡辺正仁助教授との共同研究にて、味蕾でのGAD67の発現を検討してきたので、ここで紹介する。それにあたり、まずは、基本的な味蕾の仕組みについて触れておこう。

ヒトの場合、舌には有郭乳頭、葉状乳頭、耳状乳頭、糸状乳頭という4種類の乳頭があり、そのなかで糸状乳頭だけが味を感じる味蕾を持たないとされる。一般に一つの乳頭の中には数百といわれる細長い味蕾が集まっており、その様子は玉ねぎのようである。細長い味蕾細胞の形は特徴的で、乳頭から取り出すと球状の通常形に戻ることで、形態の形成機構に関連した研究は現在活発になされている状態である。また、細胞の寿命も10日と短いといわれており、早いターンオーバーと味の感知能力・記憶との関係などもまだまだ解明すべき課題は多いとされる。乳頭の位置関係は顕微鏡観察によりマッピングがなされているが、乳頭自身はすべての味質 (五味) を感知できるとされている。味を実際に感知する部分は、味物質との結合部位をもつ受容体が担っている。現在、ゲノム解析が完了したことにより、味物質と結合する受容体が遺伝子レベルで分かっており、代表的な受容体は培養細胞に発現させて味物質との応答機構を検討できるようになっている。

ヒトの五味は、「甘味」「苦味」「うま味」「酸味」「塩味」とされる。甘味・苦み・うま味受容体はGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、典型的な膜貫通型のヘテロ二量体タンパク質である。酸味と塩味はリガンド結合型イオンチャンネルで、複合体タンパク質で構成されている。GPCRの場合は、多種にわたるリガンド (味物質) が細胞外に表現されている部分に結合し、その結合が味の情報として細胞内に伝達され、細胞内のリン酸化カスケードを活性化することで次々と情報伝達される。リガンドの結合は、細胞内のCa⁺⁺濃度を変化させ、また電気信号の電位差を生じさせることも研究されている。味蕾にはGPCRを発現させているII型細胞、イオンチャンネルを発現させているIII型細胞の他に、細胞同士を保持させるI型細胞と幹細胞と考えられるIV型細胞に大別され、一つの乳頭にはI~IV型細胞が均等に分布しているのではないかと考えられている。興味深いことに、電子顕微鏡による観察では、脳とつながっている味神経の一端は味蕾に到達しているが、III型としか物理的な接触はなく、II型とは直接の接点を持たないことである。現在、II型が受け取った味の信号はどのようにして味神経に伝達されるか？という問題に注目されている。II型からはATPのような伝達物質が放出され、それが味神経に伝達されることが一部で考えられている。一方、II型の情報がIII型細胞を経由する考えも支持されている。後者の場合、昔から調理の分野で知られている少量の塩の存在がうま味や甘味を引き出す「対比効果」を説明できるからであろう。どちらにしても、味の情報伝達機構の研究は今後ますます重要となるであろう^{25, 26)}。

GAD67/GFPノックインマウスの舌にUVライトを照射すると、中央に強い緑色に光る部分が観察できた (図4)。この部分は、マウスに一か所存在する有郭乳頭であり、縦にスライスした切片を蛍光顕微鏡観察すると、細長く緑色に発色する細胞が観察され、味蕾であると判断できた。抗GABA抗体と抗GAD67抗体で染色される細胞と蛍光発色する細胞との重ね合

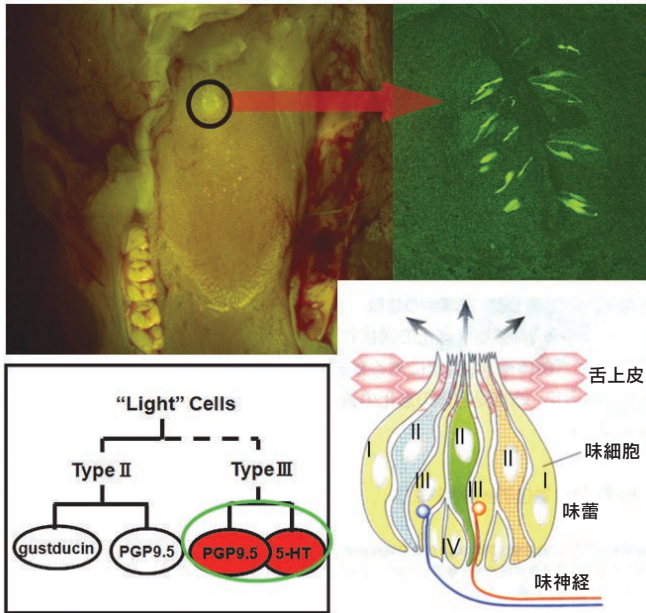


図4 GAD67/GFPノックインマウスの舌の解析図と局在する味蕾細胞の説明図

わせにより、蛍光を発する細胞はGAD67を発現し、GABAを産生することより、細胞内ではGADは活性型で発現していること、生産されたGABAは何らかの生理作用をもつことが想像できた。蛍光を発する細胞を指標として、さらに詳細な検討が可能となったが、まずは、味蕾細胞の種類を決定する作業に入った。II型、III型に特異的なマーカータンパク質が存在することより、これらのマーカータンパク質を組織免疫化学染色すると、III型に特異的なマーカーと蛍光の分布が一致することが判明し、GAD67発現細胞はIII型味蕾細胞であることが明らかになった^{27,28)}。

GABAの情報伝達機構の解析より、GABAにはGABA_A、GABA_B、そしてGABA_Cの3種類の受容体が知られている。その中で、GABA_AとGABA_Cはクロライドイオンチャンネル型受容体であり、GABA_BはGPCR型であることが知られている。クロライドイオンチャンネル型受容体は5つのヘテロサブユニット構造をとるが、各サブユニットには α 1~6, β 1~4, γ 1~4, σ , ϵ , ρ 1~4が準備されており、少なくとも α と β は1個ずつ備わっていると考えられている。味蕾の蛍光発色部分を切り出し、mRNA抽出後cDNA化し、RT-PCRによりサブユニットの存在を探索すると、GABA受容体に相当するサブユニット群の存在を明らかにすることができた(未発表)。これらの結果より、味蕾にてGABAが合成され、GABAをリガンドとしたクロライドイオンチャンネルもしくはGABA受容体の活動が想定できることになる。

4. 官能試験によるGABAの効果を見る

我々は、GABAが味蕾で発現することで、はたして味覚への関与はあるのか?という疑問に答えるために、官能試験による検討を行った。一般に味覚のような個人差もある感覚機能を定

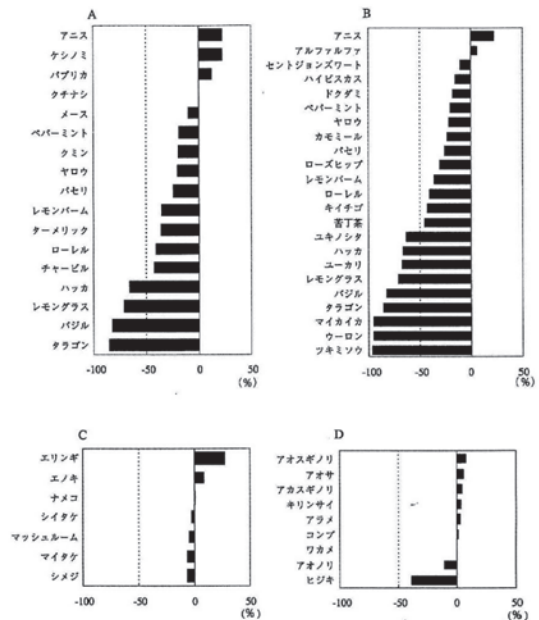


図5 天然物(香辛料, 茶, キノコ, 藻類)の抽出物が与えるGAD活性への効果 A: 香辛料, B: 茶, C: キノコ, D: 藻
プラスの数値は活性化の度合い、マイナスの数値は阻害の度合いを示す。

量的に評価することは困難である。ましてや、動物実験では得ることができない。まずは、GABAそのものが味質を呈するの否かを検討したところ、無味無臭と思われたが、多くが酸味に近い味を感じ、苦み、塩味、甘味の順で味質を表現している。また、基本五味に与える影響では、GABAの添加で塩味とうま味が強調される傾向にあることが判明した^{29,30)}。GABAがIII型味蕾に備わっている酸味と塩味の受容体を介して感じる感覚を提供していることは興味深く、GABAの味覚への関与が強く示唆できると考える。

これまで塩味はNaClのうち、Na⁺が主たる役割を担っていると考えられたが、NaClとNaIでは味質が異なるという報告などがあり、クロライドイオンの効果は否定できない。そこで、味蕾細胞内でのGABAの働きをさらに明らかにする一端として、GABA合成システムに揺らぎを与えることを計画した。つまり、GABA合成酵素であるGADの活性に変化を与える物質の味覚への効果を検討することにある。その第一歩として、組換え体GADタンパク質の酵素活性への香辛料抽出物の効果を検討した(図5)。

GADを大腸菌もしくはパン酵母に組込み、誘導発現させた組換え体タンパク質を用い、香辛料や生薬の抽出物がどのようにGAD活性に影響するかを検討した。その結果、これら天然物抽出物はGAD活性を大きく阻害したり、活性化することが判明した。この結果は少なからずの驚きである。我々が口にする食材の成分には、GABA合成に関わる酵素の活性に多様な影響を与えるというものがある^{31,32)}。GADの局在性が味蕾、胃、腸など食成分と直接接する部位であることを考慮すると、GABA量の変動が細胞レベルで何らかの効果(腸の運動、ホルモンや胃酸分泌など)を示す可能性を示唆する。もちろん、今後、実験的に証明してする必要はあるが、まだまだ研究が進んでいない領

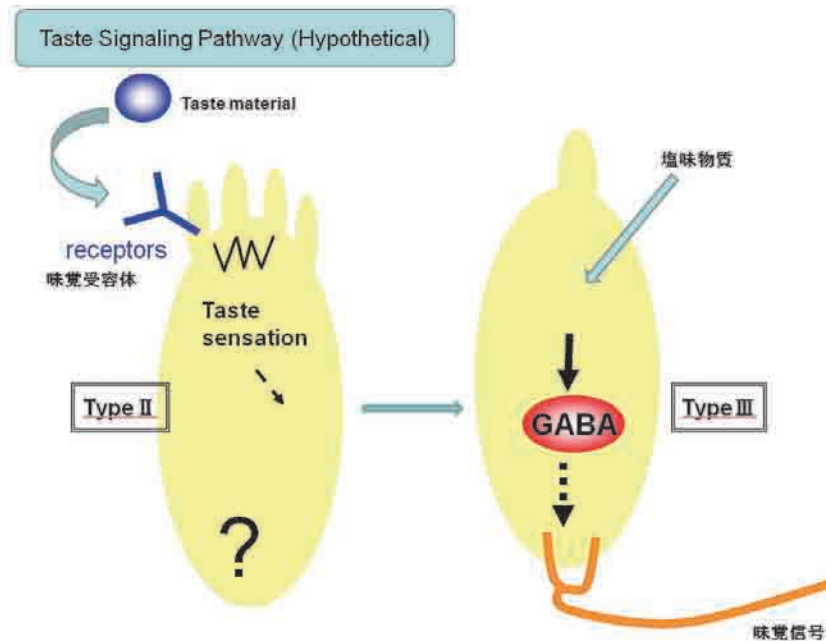


図6 味の対比効果の想像図

域のように思える。

図6には、II型とIII型味蕾細胞を中心とした味の情報伝達経路を想定している。II型細胞にはうま味や甘味受容がなされ、III型には塩味の受容がなされる。うま味や甘味を強調させるには、少量の塩を入れるという「味の対比効果」はこのような関係から説明できるのであろうか？また、味蕾細胞内でのリン酸化カスケードを介する情報伝達経路の存在は示唆されているが、まだタンパク質・タンパク質間相互作用のレベルではほとんど手つかずの状態である。そこで、GAD67がIII型細胞内で機能していることを加味すると、GADの酵素活性を上昇させたり下げたりできる因子の存在は味覚の信号伝達経路に大きな影響を与え、味質を変化させる可能性があると考えられる。このような因子を食品成分から求めることは可能であろうか？もし、食品成分が味蕾細胞内まで侵入できるならば、図7のようなスキームが描かれる。現在、GAD活性を試験管レベルで活性化する食品成分を抽出し、官能試験で味覚への効果を検討しており、その結果次第ではこの仮説を証明できるかもしれないと期待している。

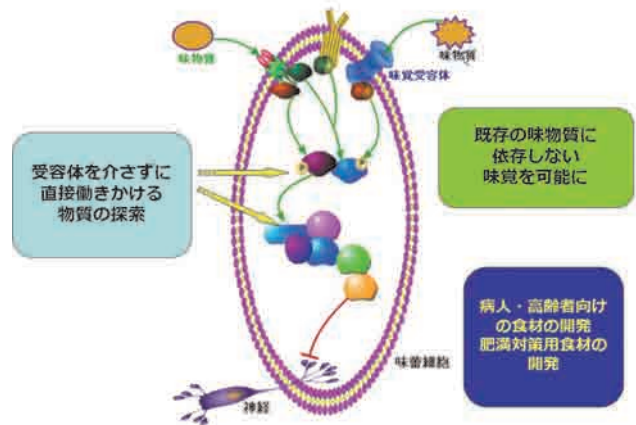


図7 塩味増強効果への取り組み

作用を観察するに至っている（未発表）。GABAを産生する酵素としてだけでなく、いろんな角度からのGADの働きに注目してしばらく活動したい。

5. おわりに

GADの酵素としての反応機構に興味をもって大腸菌由来のGADの自殺基質の研究から研究生活に入ったが、その後、遺伝子工学の技術を用いることで高等動物由来のGADの酵素学的研究が可能になり、さらに、抗体やRT-PCRの技術が使えるようになったことでいろんな臓器や細胞でのGADの局在化の検討をおこなえるようになった。その結果、今回は紹介できなかった血球におけるスプライシング異常の現象を見出すなど、GADには多くの謎めいた現象が付きまとっているようである。今回紹介した味覚との関係は、現在、細胞内でのタンパク質間相互作用としていくつかの非常識？と思えるGAD・タンパク質間相互

謝辞

本研究を進めるにあたり共同研究していただいた大阪医科大学渡辺正仁博士、生理学研究所小幡邦彦博士、柳川右千夫博士、京都府立医科大学河田光博博士、一丸ファルコス(株)長谷川順一博士、伊藤賢一博士に感謝申し上げたい。

また、研究の初期より浦上食品・食文化振興財団、中堅研究奨励会、奈良女子大学プロジェクト経費、うま味研究会、(株)永谷園より助成金の援助を頂戴した。

末筆ながら、本研究を推進してくれた研究室の学生諸君に、特に、中村 友美、久木 久美子、和田 和子、伊藤 美奈、赤松 香奈子、岩堀 みね子、浅井 麻衣子の皆さんに感謝申し上げます。

[参考文献]

- 1) J. Awapara, A. J. Landua, R. Fuerst, B. Seale, Free γ -aminobutyric acid in brain, *J. Biol. Chem.*, **1950**, *187*, 35-39.
- 2) E. Roberts, S. Frankel, γ -Aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid, *J. Biol. Chem.*, **1950**, *187*, 56-63.
- 3) E. Roberts, S. Frankel, Glutamic acid decarboxylase in brain, *J. Biol. Chem.*, **1951**, *188*, 789-95.
- 4) T. Matsumoto, I. Yamaura, M. Funatsu, Physical properties of glutamate decarboxylase from squash, *Agric. Bio. Chem.*, **1990**, *54*, 3001-03.
- 5) M. G. Erlander, N. J. K. Tillakaratne, S. Feldblum, N. Patel, A. J. Tobin, Two genes encode distinct glutamate decarboxylases, *Neuron*, **1991**, *7*, 91-100.
- 6) S. Baekkeskov, H-J. Aanstoot, S. Christgau, A. Reetz, M. Solimena, M. Cascalho, *et al.*, Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase, *Nature*, **1990**, *347*, 151-56.
- 7) H. Ueno, Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase, *J. Mol. Catalysis B.: Enzymatic*, **2000**, *10*, 67-79.
- 8) G. Fenalti, R. H. Law, A. M. Buckle, C. Langendorf, K. Tuck, C. J. Rosado, *et al.*, GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2007**, *14* (4), 280-6.
- 9) S. Christgau, H-J. Aanstoot, H. Schierbeck, K. Begley, S. Tullin, K. Hejnaes, *et al.*, Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic β -cells by palmitoylation in the NH2-terminal domain, *J. Cell. Biol.*, **1992**, *118*, 309-20.
- 10) Y. Shi, B. Veit, S. Baekkeskov, Amino acid residues 24-31 but not palmitoylation of cysteines 30 and 45 are required for membrane anchoring of glutamic acid decarboxylase, GAD65, *J. Cell. Biol.*, **1994**, *124* (6), 927-34.
- 11) J. Wei, J.Y. Wu, Post-translational Regulation of L-Glutamic Acid Decarboxylase in the Brain, *Neurochemical research*, **2008**.
- 12) M. Namchuk, L. Lindsay, C. W. Turck, J. Kanaani, S. Baekkeskov, Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10, and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase 65 α , *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272* (3), 1548-57.
- 13) H. Asada, Y. Kawamura, K. Maruyama, H. Kume, R-G. Ding, N. Kanbara, *et al.*, Cleft palate and decreased brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 6496-99.
- 14) H. Asada, Y. Kawamura, K. Maruyama, H. Kume, R-G. Ding, F. Y. Ji, *et al.*, Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, *229*, 891-95.
- 15) A. Tramonti, M. De Canio, Delany I, Scarlato V, D. De Biase, Mechanisms of transcription activation exerted by GadX and GadW at the gadA and gadBC gene promoters of the glutamate-based acid resistance system in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **2006**, *188*(23), 8118-27.
- 16) N. Stewart, J. Feng, X. Liu, D. Chaudhuri, J. W. Foster, M. Drolet, *et al.*, Loss of topoisomerase I function affects the RpoS-dependent and GAD systems of acid resistance in *Escherichia coli*, *Microbiology*, **2005**, *151* (Pt 8), 2783-91.
- 17) G. Capitani, D. De Biase, C. Aurizi, H. Gut, F. Bossa, M. G. Grutter, Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase, *EMBO J.*, **2003**, *22* (16), 4027-37.
- 18) S. T. Coleman, T. K. Fang, S. A. Rovinsky, F. J. Turano, W. S. Moye-Rowley, Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276* (1), 244-50.
- 19) K. Ito, K. Tanaka, Y. Nishibe, J. Hasegawa, H. Ueno, GABA-synthesizing enzyme, GAD67, from dermal fibroblasts: evidence for a new skin function, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2007**, *1770* (2), 291-6.
- 20) K. Akamatsu, Y. Nakamura, H. Hayasaki, K. Kanabara, K. Maemura, Y. Yanagawa, *et al.*, Cells expressing GABA synthetic enzyme, glutamate decarboxylase, in stomach and intestine: RT-PCR and immunohistochemistry studies, *J. Biol. Macromol.*, **2007**, *7*, 55-62.
- 21) M. Iwahori, K. Akamatsu, S. Kurohara, K. Yokoigawa, H. Ueno, H. Ogawa, *et al.*, Immunohistochemical study of the localization of glutamate decarboxylase in rodent's submandibular gland, *J. Biol. Macromol.*, **2002**, *2*, 76-77.
- 22) K. Ito, Y. Katsuyama, N. Banno, J. Hasegawa, H. Ueno, Localization and characterization of glutamate decarboxylase in the skin, *XXI IFSCC International Congressed*, **2002**, 102.
- 23) K. Obata, GABAergic neurons revealed in the gene knock-out and knock-in mice, *Tanpakushitsu kakusan koso* **2004**, *49* (3 Suppl), 295-300.
- 24) N. Tamamaki, Y. Yanagawa, R. Tomioka, J. Miyazaki, K. Obata, T. Kaneko, Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse, *J. Comp. Neurol.*, **2003**, *467* (1), 60-79.
- 25) K. Abe, Studies on taste: molecular biology and food science, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2008**, *72* (7), 1647-56.
- 26) Y. Ninomiya, 食の調節情報としての味覚とおいしさのシグナリング. 化学と生物, **2007**, *45* (6), 419-25.
- 27) Y. Nakamura, Y. Yanagawa, K. Obata, M. Watanabe, H. Ueno, GABA is produced in taste bud, *Chem. Senses*, **2007**, *32*, J19.
- 28) Y. Nakamura, Y. Yanagawa, K. Obata, M. Watanabe, H. Ueno, GABA is produced in taste bud, *40th Annual Meeting of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell (JASTS XL)*, ed, Fukuoka, Japan: *Chem. Senses*, **2007**, J1-J25 (No. 69).
- 29) K. Wada, Y. Nitta, H. Ueno, Effect of GABA on taste sensory as judged by taste test, *家政学研究(奈良)*, **2006**, *53* (1), 1-6.
- 30) K. Hisaki, K. Wada, K. Shinohara, Y. Nakamura, H. Ueno, Contribution of GABA to taste sensation evaluated by taste test and effect of compounds in spices on the activity of GABA synthetic enzyme, *Japanese Taste and Smell J.*, **2007**, *14* (3): 435-38.
- 31) H. Ueno, K. Akamatsu, K. Yoshioka, S. Kurohara, M. Iwahori, K. Tone, *et al.*, Study of regulatory properties of spice and herb extracts on glutamate decarboxylase and site-specific expression of glutamate decarboxylase in digestive system, *Proceedings of 3rd China-Japan International Conference on Vitamins*, **2004**, 146-56.
- 32) S. Kurohara, M. Asai, M. Hayashi, K. Yokoigawa, H. Ueno, Microanalysis of GABA: An application for evaluating GABA production in yeast strains and the effect of spice extracts on glutamate decarboxylase activity, *J. Biol. Macromol.*, **2001**, *1*, 45-48.

著者プロフィール

氏名：植野 洋志 (UENO, Hiroshi)
 所属：奈良女子大学生生活環境学部食物栄養学科
 住所：〒630-8506 奈良市北魚屋西町
 TEL：0742-20-3493
 E-mail：hueno@cc.nara-wu.ac.jp

出身学校：京都大学工学部・米国ブランダイス大学大学院・米国アイオワ州立大学大学院, Ph.D.

現在の研究テーマ：塩味増強効果とGABA合成酵素 (GAD) の活性制御機構との関連の研究；GADアイソフォームの機能性の研究；GADの生物種による遺伝子多様性の研究；ヒスタミン合成酵素 (HDC) の活性化と活性制御機構の研究；消化酵素の活性発現様式と応用研究