

苦味に関連する唾液中タンパク質の検出

馬 場 園 子

Detection of Proteins Concerning Bitter Taste in Saliva

Sonoko BABA

To find out salivary proteins related to bitter taste, quinine sulfate showing fluorescence under UV radiation was utilized. Resting human saliva was collected from normal and abnormal subjects for quinine sulfate threshold. The salivary proteins added 0.08% quinine sulfate solution were separated on 2% agarose gel electrophoresis. After detecting the fluorescent band under UV radiation, it was separated with 18.0% SDS-PAGE and then the proteins were transferred to PVDF membrane to elute. These were analyzed with an amino acid sequencer.

Comparing the peptides of normal subjects with that of abnormal subjects in SDS-PAGE, a band less than 6.5kDa containing quinine sulfate was recognized on normal subjects. One well-defined band identified with CBB staining of the agarose gel corresponds to the fluorescent portion of the gel, suggesting the quinine might bind to a certain peptide in saliva. Two peptides, Histatin 3, 5, or 6 and basic Proline-Rich Peptide P-E, were detected with partial sequence analysis. These two are candidates as bitter-binding peptides, although their functions have not yet been identified.

Key words : human saliva, histatin, proline-rich peptide, quinine sulfate, bitter taste

緒 言

味覚の4基本味のうち、甘味はエネルギー源として、塩味は必要とされるミネラルとして、酸味は腐敗物などのシグナルとして認識されることが知られている¹⁾。これらに対して苦味は一般に閾値が低く、毒物のシグナルをあらわすといわれている²⁾。苦味はカフェインやニコチンなどのアルカロイド類に多く、少量で緊張緩和や食欲増進などの薬理効果を示すことから、食品の嗜好性においては重要な物質といえる。

味覚は、食物が唾液に溶解して味覚受容膜に吸着することにより受容器電位を発生させ、神経を介して中枢へと伝達されて大脳皮質で認知する。

味覚受容器である味蕾は、その先端が味孔として開孔しており、常時、唾液腺由来の粘液で被覆されている。このため、唾液は味覚情報を認識する上で不可欠な口腔内環境である。また、唾液腺を外科的に切除した動物³⁾や、唾液分泌機能低下を伴うシェーグレン症候群⁴⁾では味覚閾値が上昇することが報告されており、唾液が味覚機能に影響を及ぼしていることは明らかである。

この唾液中の無機成分やpHは味覚閾値に影響を及ぼすことが報告^{5,6)}されている。しかし、有機成分、特にタンパク質と味覚との関連については、味蕾の成長や発育に必要な亜鉛を含むガスチン(炭酸脱水酵素Ⅵ)が知られている^{7,8)}ほかは十分に解明されているとはいいがたい。したがって、苦

受付：平成15年3月31日、受理：平成15年4月11日
奥羽大学大学院歯学研究科歯科補綴学専攻
(指導：清野和夫教授)

Ohu University Graduate School of Dentistry,
Prosthetic Dentistry Major
(Director : Prof. Kazuo SEINO)

味物質と関連のあるタンパク質を同定できれば、味覚障害の検査、診断、および嗜好品の開発等に有用となることが考えられる。苦味物質のなかにおいて、強い苦味を呈するアルカロイドの1つであるキニーネ類は、紫外線照射下(UV下)において蛍光を発する特性を持つこと⁹⁾が知られている。そこで、本研究ではこのキニーネの性質を応用して、苦味に関連する唾液中タンパク質の検出を試みた。

材料と方法

1. 唾液の採取

対象として、Pfaffmann¹⁰⁾の味覚官能テストの全口腔法における苦味閾値の平均値を基準とし、硫酸キニーネに対する閾値が0.008mMより低い正常閾値者(3名)と、0.011mM以上を示した高閾値者(4名)の2つのグループの被験者を選択した。

唾液の採取に際しては、被験者間の口腔内環境、特にpHを一定とするため、唾液採取の2時間前¹¹⁾から飲食、喫煙、激しい運動を禁じ、全唾液を氷上の試験管に吐出法にて採取した。採取した全唾液をエッペンドルフチューブ(1.5ml)に分注し、凍結乾燥して-80℃にて保存し、適当濃度に溶解して実験に供した。

2. アガロースゲル電気泳動

硫酸キニーネの蛍光部位の確認にはアガロースゲル電気泳動法を用いた。電気泳動槽はi-Mupid J(コスモ・バイオ、東京)を使用した。苦味物質には硫酸キニーネ(和光純薬工業、大阪)を用いた。泳動バッファーは、バルビタールナトリウム(nacalai tesque, 京都)とグリシン(和光純薬工業、大阪)の緩衝液、泳動床には2%アガロースLM(nacalai tesque, 京都)を用いた。

唾液は、硫酸キニーネ-グリセリン(20%; nacalai tesque, 京都)を含むバルビタールグリシン緩衝液にて適正濃度に希釈し、電気泳動サンプルに供した。電気泳動は、10℃、50V、175分の条件下で行った。しかし、回収できるタンパク質量が少ないため、サンプルの濃縮を目的として複数枚のアガロースゲルから硫酸キニーネ蛍光部位のタンパク質を回収した。蛍光部位のタンパク

質の抽出には、切り出したゲルを細かく刻み、アトプレップ(ATTO, 東京)に入れて-80℃にて1時間凍結した後、再び解凍して遠心分離(14,000r.p.m., 10分間)にて濾過抽出しタンパク質を回収した。抽出液1レーンあたり約300 μ lを回収した後、再び凍結乾燥し、-80℃にて保存して実験に供した。

3. SDS-PAGE

電気泳動は、ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽(AE-6500, ATTO, 東京)、電源装置power Station 1000VC(AE-8750, ATTO, 東京)を使用した。

試薬には、アクリルアミド、ドデシル硫酸ナトリウム(和光純薬工業、大阪)、N-N'メチレンビスアクリルアミド(BIS)、N, N, N', N', 過硫酸アンモニウム(APS)、テトラメチレンジアミン(TEMED)(BIO-RAD, Hercules, CA, U.S.A)、バルビタールナトリウム、トリシン、Tris(Hydroxymethyl)-aminomethane(nacalai tesque, 京都)を用いた。分子量マーカーとしてSDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range(Myosin: 200kDa, β -galactosidase: 116.25kDa, Phosphorylase b: 97.4kDa, Serum albumin: 66.2kDa, Ovalbumin: 45.0kDa, Carbonic anhydrase: 31.0kDa, Trypsin inhibitor: 21.5kDa, Lysozyme: 14.4kDa, Aprotinin: 6.5kDa)(BIO-RAD, Hercules, CA, U.S.A)を使用した。

ゲルの調整はLaemmli¹²⁾法に従い、4.9%SDS-ポリアクリルアミド濃縮ゲル、18.0%SDS-ポリアクリルアミド分離ゲルを用いた。サンプルの調整にはTris-SDS-メルカプト・エタノール緩衝液を、泳動にはTris-グリシン泳動緩衝液よりも低分子量の分離に適するTris-トリシン緩衝液¹³⁾を用いた。サンプル調整の後、室温にてゲル1枚あたり30mA(定電流)の条件下で、プロモフェノールブルー(BPB)がゲル下面から5mmに達するまでSDS-PAGEを行った。ウエスタンブロッティングに先立ち、タンパク質の存在確認のため、硫酸キニーネに対する閾値正常者の唾液をサンプルとしてアガロースゲル電気泳動及びSDS-PAGEを施行し、終了後のゲルに対し銀染色法により染

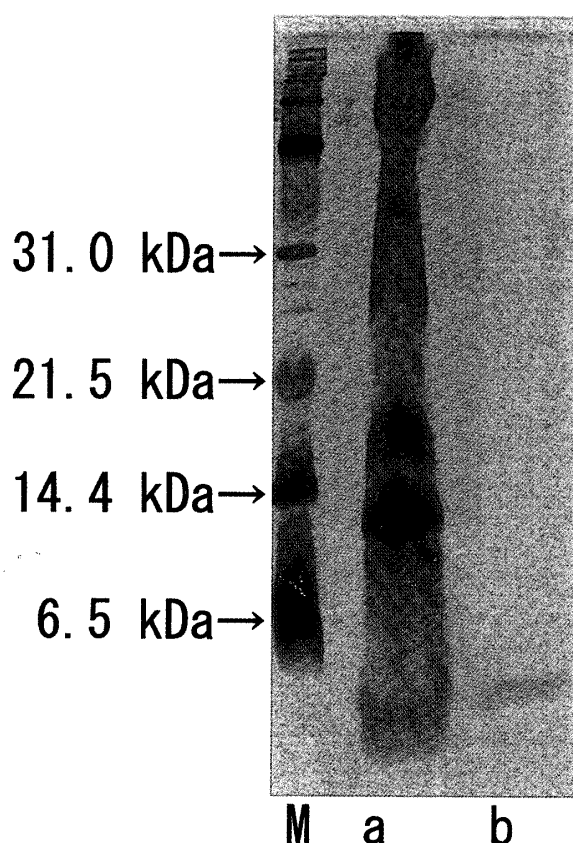


Fig. 1 Electrophoretic patterns between whole saliva and extracted protein being accompanied with quinine.
M : The size marker, a : whole saliva, b : extracted protein.

色を行った。銀染色法はシルバーステインキット (AE-1350, ATTO, 東京) を用いた (Fig. 1)。

銀染色の結果、6.5kDa以下の位置にバンドが確認されたため、高閾値者についても同様の実験を施行した。

4. ウエスタンブロッティング

転写装置はTrans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD, Hercules, CA, U.S.A) を用い、電源装置にはpower Station 1000VC AE-8750 (ATTO, 東京) を使用した。ブロッティング緩衝液には、Tris-グリシン-メタノール緩衝液を使用した。

SDS-PAGE終了後、分離したタンパク質を電氣的にゲルからポリビニリデンジフルオリド膜 (PVDF膜) (immobilon™, Millipore, Bedford, MA, U.S.A) にセミドライ式ウエスタンブロッティング法にて (1.5mA/1 cm², 5時間) 転写した。

ブロッティング終了後、PVDF膜のクーマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行い、染色部位を切り出した。

5. プロテインシーケンス

プロテインシーケンサー (Protein Sequencer 437A, Applied Biosystems, Piscataway, NJ, U.S.A) を用いて、エドマン分解法によりN-末端から18残基についてプロテインシーケンスを行った。

結 果

1. 硫酸キニーネの泳動方向

電気泳動後のゲル内における硫酸キニーネのUV下での蛍光、および泳動方向の確認のため、サンプルを負荷するウェルの位置をゲルの中央として電気泳動を行った。その結果、蛍光部位がゲル中央よりマイナス極方向に位置していることが確認された。よって、アガロースゲルのサンプル・ウェルの位置はプラス極側にすることにした。

2. 硫酸キニーネの適正使用濃度

実験中のサンプル溶解液中へ添加する硫酸キニーネの適正使用濃度を決定するために、硫酸キニーネの濃度を0.16%, 0.08%, 0.04%の3種類に設定し、アガロースゲル電気泳動を行った。その結果、濃度依存的に蛍光強度の変化が観察され (Fig. 2a), 0.16%においては蛍光強度が強いものの蛍光範囲が広いためサンプルの拡散が大きく、0.04%においては蛍光強度が弱く境界が不明瞭であった。これに対し、0.08%では蛍光範囲が狭く、その境界が明瞭であったために、肉眼的な判定のためには適切な濃度であるものと考え、実験で用いる濃度は0.08%とした。

3. サンプル唾液の適正使用濃度

サンプルである全唾液の1レーンあたりの適正使用濃度を検討するために、720 μ l, 360 μ l, 180 μ lの全唾液を凍結乾燥後、0.08%硫酸キニーネを溶解した緩衝液を用い、アガロースゲル電気泳動を行った。その結果、全唾液の容量に依存して蛍光範囲が広くなることが示された (Fig. 2b)。図で明らかなように、電気泳動時におけるサンプルの拡散を最小とするため、蛍光範囲の狭い180 μ lを用いることとした。

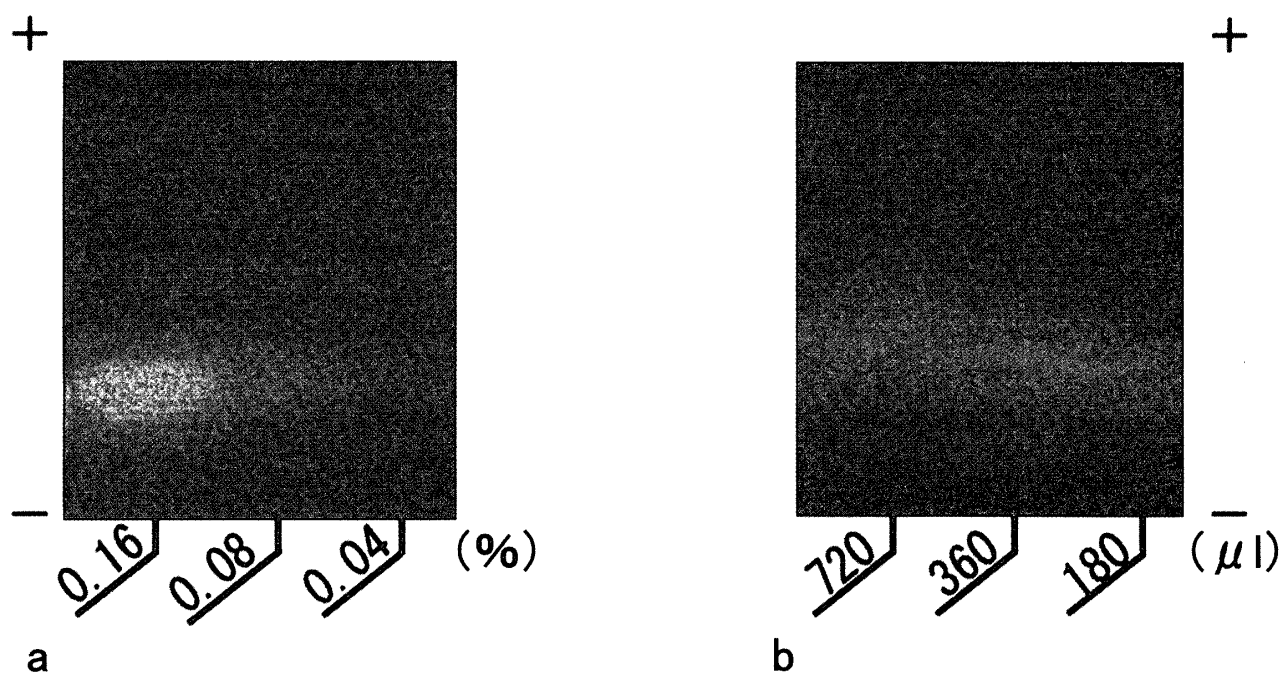


Fig. 2 Determination of adequate concentration of quinine sulfate and whole saliva.
a : quinine sulfate, b : whole saliva.

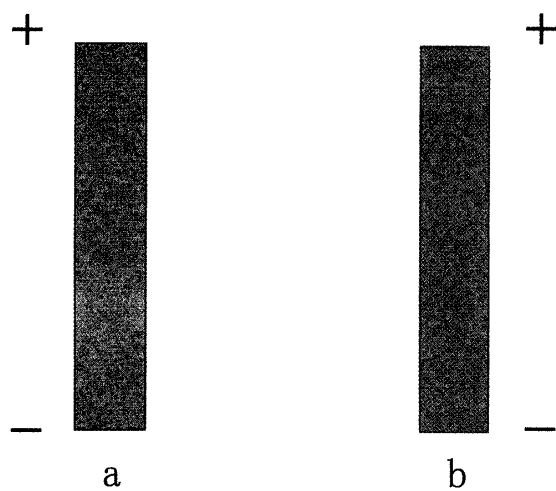


Fig. 3 Coincidence of the loci for fluorescent quinine with that for the CBB stained protein.
a : UV radiation, b : CBB staining.

4. アガロースゲルにおける硫酸キニーネ蛍光部位とCBB染色部位の関係

アガロースゲル電気泳動終了後にゲルをCBB染色した結果、UV下における蛍光部位とタンパク質染色部位が一致していることが示された (Fig. 3)。したがって、硫酸キニーネ蛍光部位にはタンパク質が存在することが確認された。

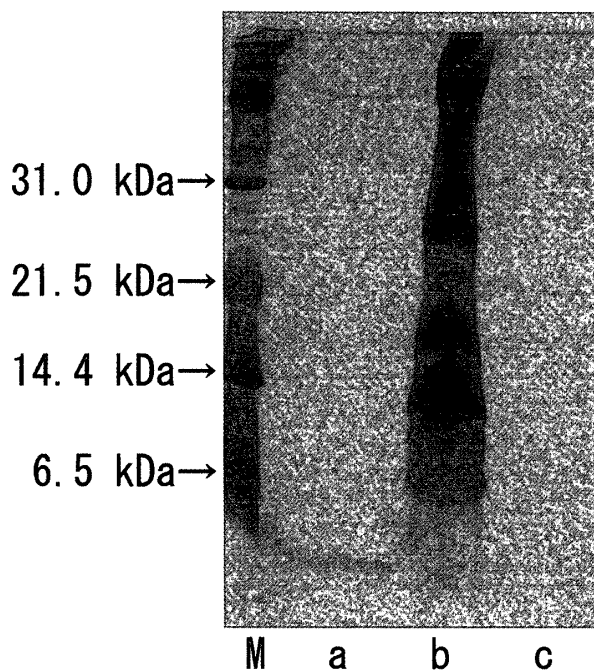


Fig. 4 Comparison of electrophoretic patterns of normal and abnormal subjects for quinine threshold.
M : The size marker, a : normal subject, b : whole saliva, c : abnormal subject.

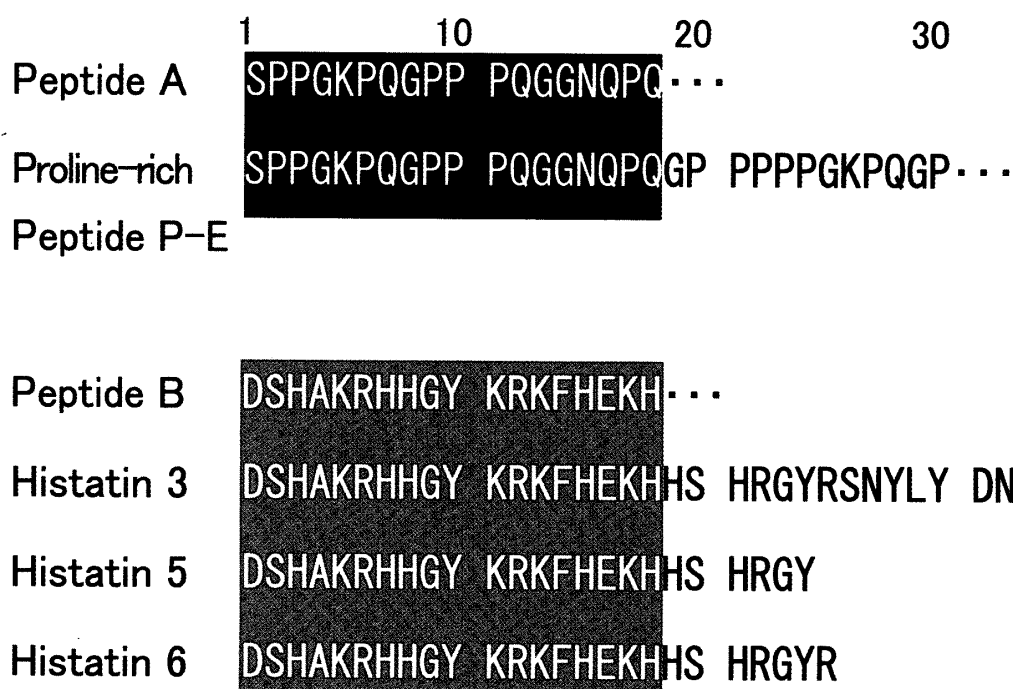


Fig. 5 Sequence homology of peptides A and B.

5. 苦味閾値との関連

味覚官能テストにおいて、硫酸キニーネに対し閾値の異なる成人7名(正常閾値者3名, 高閾値者4名)の唾液をサンプルとしてアガロースゲル電気泳動, SDS-PAGEを施行し, 銀染色を行った。その結果, 正常者においては6.5kDa以下の位置にバンドが確認された。これに対し, 高閾値者においては同部位にバンドが認められず (Fig. 4), 高閾値者はアガロースゲルにおける硫酸キニーネ蛍光部位にタンパク質が存在しないことが示された。

6. プロテインシーケンス

味覚閾値正常者の唾液をサンプルとしてアガロースゲル電気泳動後, UV下において蛍光した部位のタンパク質を回収し, プロテインシーケンスによるアミノ酸配列の解析を行った。その結果, 2つの異なるアミノ酸配列が確認された。それらの配列は[SPPGKPQGPP PQGGNQPQ]と[DSHAKRHHGY KRKFHEKH]であり, それぞれを仮にPeptide A, Peptide Bとした。この2つのアミノ酸配列について, データ・ベースによる相同性検索を行った。その結果, Peptide Aは

Isemura(1982)らの報告によるProline-Rich Peptide P-E¹⁴⁾と, Peptide Bは, Histatin 3, Histatin 5, Histatin 6¹⁵⁾と, それぞれN-末端から18番目のアミノ酸配列において100%の相同性が確認された (Fig. 5)。

考 察

味覚の発現は, 口腔内に取り入れられた食物が唾液に溶解し, 味物質として口腔粘膜上皮に散在する味覚受容器である味蕾を刺激することにより発生する。従って味覚の感受性には唾液の性質の変化や分泌量が反映するといわれている¹⁶⁾。味覚の4基本味のうち, 苦味物質は, 柑橘類に含まれるテルペンやフラバノン配糖体などの植物に由来するものや, 感受性に遺伝的要因が関与する合成化合物PTC¹⁷⁾など, その構造も多種多様であり, 人体に有害なことも多い。このため, 回避的に取り込まれた有害物質を除去するシステムが存在すると考えられてきた¹⁸⁾。つまり苦味物質を唾液タンパク質が結合, あるいは包含することによりマスキング作用をするというシステム¹⁹⁾である。逆に, 唾液タンパク質が疎水性である苦味物質と

結合して味受容膜へ運ぶキャリアーとして働いているという説も提唱されている¹⁶⁾。近年では、ストレスにより苦味に対する感受性が変化する²⁰⁾という報告もあり、苦味と結合する可能性が示唆されるタンパク質が挙げられている^{21, 22)}。

そこで、本研究は苦味に關与する唾液中のタンパク質を検出するため、UV下において蛍光を発する性質を持つ硫酸キニーネと唾液をサンプルとしてアガロースゲル電気泳動を行い、UV下で蛍光を発した部位からタンパク質を抽出し、プロテインシーケンスを行った。その結果、2つのペプチドの存在が明らかとなった。その一方はProlin-Rich Peptide P-E(分子量約6.0kDa)であり、他方はHistatin 3, 5, 6(分子量約3.0kDaから4.0kDa)であった。Prolin-Rich Peptide P-EはProlin-Rich Protein (PRP)の1つとして知られ、構成するアミノ酸の25~40%がプロリンであり、ヒト唾液中タンパク質のおよそ70%を占める。また、唾液のほかに、気道粘膜²³⁾においてその存在が確認されている。PRPは酸性、塩基性、糖鎖含有PRPの3グループに分類²⁴⁾され、この中でProlin-Rich Peptide P-Eは塩基性PRPに分類される。一方、Histatinはヒスチジンに富むペプチド群で、霊長類の唾液にのみ存在する²⁵⁾特異性を持つ。1971年にAzen²⁶⁾によって発見されて以来、電気泳動的に12種類が知られている¹⁵⁾。中でもHistatin 1, 3, 5は総Histatinの85~90%を占める。Histatin 3, 5, 6のアミノ酸配列については、Histatin 5はHistatin 3のN末端から24番目まで、Histatin 6は25番目までが同じである。Histatin 5, 6の形成過程としては、Histatin 3分子として形成されるが、プロテアーゼによって切断されるとする説が有力視されている²⁷⁾。本研究の結果から得られたペプチドのN-末端から18残基までのアミノ酸配列では、Histatin 3, 5, 6の3つにおいて100%の相同性が得られたため、1種類ないしは、複数のHistatinが存在するものと考えられた。

現在、PRPと苦味物質との関係については遺伝学的な観点からの報告がある。マウスにおいては、5つの苦味物質(Quinine, Raffunose undecaacetate, Cycloheximide, Cupper glycinate,

Sucrose octaacetate)の感受性を支配する遺伝子が第6染色体上にあり、この染色体上にPRP遺伝子が連鎖し^{28~31)}、さらにヒトでは第12染色体p13が上記したマウスの第6染色体の相同領域であることが確認されている³²⁾。このことは、PRPと苦味感受性との関連性が示唆され、受容器まで苦味物質を運ぶキャリアータンパク質の候補として考えられている¹⁶⁾。また、交感神経作動薬であるイソプロテレノールの慢性投与によりマウスやラットなど齧歯類の唾液中において、PRP分泌量が増加するが、苦味物質の1つであるタンニンを多く含む飼料を与えた際にもPRPの増加すること³³⁾が報告され苦味物質との何らかの関連が示唆される。しかし、一方ではPRPを増加させたマウスにおいて、タンニン溶液に対する拒絶反応が小さくなるとの報告³⁴⁾や、タンニンが消化障害³⁵⁾や鉄の吸収を障害³⁶⁾し食道癌のリスク因子となり得るとの報告³⁷⁾がある。これらを併せて考えると、PRPは有害物質であるタンニンと結合することで、味覚刺激効果を抑制し、さらに消化器官でのタンニンの吸収を防ぎ、排泄する役割を果たしているといえる。またHistatinについてもPRP同様、タンニン結合能を有することが報告されている。タンニン結合能については、PRPより強い結合力を持ち、タンニンと消化酵素の1つであるアミラーゼが結合することを阻害する働きが報告されている³⁸⁾。したがって本研究におけるプロテインシーケンスから得られた結果から、これら苦味物質とPRPやHistatinはなんらかの関連があることが示唆された。そこで、苦味感受性とPRPやHistatinの関連性について追究するため、硫酸キニーネに対する正常閾値者と高閾値者の唾液中タンパク質の電気泳動パターンについて比較を行った。その結果、高閾値者においては、アガロースゲル回収液をサンプルとしたSDS-PAGEからは、PRPやHistatinと考えられる部位にバンドを確認することができなかった。ヒトではPRPやHistatinは口腔内に常在していることが知られている。したがって、PRPとキニーネ類の遺伝学的な背景や、タンニンの示す毒性とそれを阻害するためのPRPやHistatinのタンニン結合能から推察すると、苦味に対して感受性の低い被

験者では、PRPやHistatinの量が正常者と比較して少ないか、逆にPRPやHistatinの量がもともと少ないために苦味に対する感受性が低くなっている可能性が考えられる。本研究の結果から、これらのペプチド類が苦味のマスキング作用をしている、あるいは苦味受容を行うためのキャリアータンパク質として作用するという2つの可能性が考えられ、これらの解明は、味覚障害の治療法や、苦味のマスキング、嗜好品の開発などに有効であり、今後の課題といえる。

結 論

キニーネがUV下で蛍光発色を呈する性質を応用して、ヒト唾液中の苦味関連タンパク質の検出を試みた結果、以下の結論が得られた。

1. アガロースゲル電気泳動において、硫酸キニーネと同部位にタンパク質が存在することが確認された。

2. SDS-PAGEにおいて硫酸キニーネに対する閾値の正常者においては6.5kDa以下の位置にペプチドのバンドが確認された。しかし、高閾値者においては、これらのペプチドのバンドは確認されず、苦味に対する感受性にこれらのペプチドが関与しているものと考えられた。

3. プロテインシーケンスの結果、確認された2つのペプチドは、それぞれPRPとHistatinの一種であることが強く示唆された。

以上の結果から、2つのペプチドがキニーネなどの苦味物質と唾液中において挙動を共にしていることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導とご校閲をいただきました奥羽大学大学院歯学研究科歯科補綴学第Ⅱ講座清野和夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、専門の立場からご指導をいただきました京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科尾崎まみこ助教授、奥羽大学歯学部口腔生理学講座丸井隆之教授、および奥羽大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座島崎伸子博士に心より感謝致します。本研究の遂行に当たり御協力いただきました歯科補綴学第Ⅱ講座教員各員および被験者の皆様に深謝いたします。

本論文の要旨は第33回奥羽大学歯学会(2002年6月15日

郡山)において発表した。

文 献

- 1) 鳥居邦夫, 沖山 敦: 食物嗜好と栄養. 味覚の科学(小川 尚, 佐藤昌康編); 211-225 朝倉書店 東京 1997.
- 2) 柏柳 誠, 栗原賢三: 苦味の受容とトランスダクション. 神経進歩 **43**; 649-657 1999.
- 3) Catalanotto, F. A. and Sweeney, E. A.: Long-term effects of selective desalivation on taste acuity in rats. Arch Oral Biol **18**; 941-952 1973.
- 4) Henkin, R. I., Talal, N., Larson, A. and Matern, C. F. T.: Abnormalities of taste and smell in sjögren's syndrome. Ann Intern Med **76**; 375-383 1972.
- 5) 山本 隆: 味覚機能を活性化する唾液腺由来の生理活性物質に関する研究. 日歯医学会誌 **10**; 67-73 1991.
- 6) 松尾龍二: 人工唾液による味覚感受性の維持: ラット鼓索神経活動の分析. 味と匂誌 **2**; 211-214 1995.
- 7) Shatzman, A. R. and Henkin, R. I.: Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. Proc Natl Acad Sci U S A **78**; 3867-3871 1981.
- 8) Henkin, R. I., Lippoldt, R. E., Bilstad, J. and Edelhofer, H.: A zinc protein isolated from human parotid saliva. Proc Natl Acad Sci U S A **72**; 488-492 1975.
- 9) Rade, P. and Marschall, O.: Fluoreszenzercheinungen bei chinaalkaloiden. Justus Liebig's Ann chem **382**; 360-364 1911.
- 10) Pfaffmann, C., Bartoshuk, L. M. and Mcburney, D. H.: Handbook of sensory physiology IV chemical senses 2 taste (Ed, Beidler, L. M.); 75-101 Springer-Verlag Berlin 1971.
- 11) Dawes, C.: Factors influencing protein secretion in human saliva. Front Oral physiol **3**; 125-137 1981.
- 12) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**; 680-685 1970.
- 13) 石本剛一, 石浜信之: A-1003トリシン緩衝液を用いたSDS-PAGEによる唾液低分子量蛋白成分の検索. 法医の実際と研 **40**; 69-73 1997.
- 14) Isemura, S., Saitoh, E. and Sanada, K.: Fractionation and characterization of basic proline-rich peptides of human parotid saliva and the amino acid sequence of proline-rich peptide P-E. J Biochem **91**; 2067-2075 1982.
- 15) Troxler, R. F., Offner, G. D., Xu, T., Vanderpek, J. C., et al.: Structural relationship between human salivary histatins. J Dent Res

- 69; 2-6 1990.
- 16) 松尾龍二：唾液と味覚感受性. 味覚の科学(小川尚, 佐藤昌康編); 48-57 朝倉書店 東京 1997.
- 17) Blakeslee, A. F.: Genetics of sensory thresholds: taste for phenyl thio carbamide. *Proc Natl Acad Sci USA* **18**; 120-130 1932.
- 18) 勝川秀夫, ニノ宮裕三：食性と唾液成分—その味覚感受性との関連. 味と匂誌 **5**; 5-14 1998.
- 19) Mehansho, H., Ann, D. K., Butler, L. G., Rogler, J. *et al.*: Induction of proline-rich proteins in hamster salivary glands by isoproterenol treatment and an unusual growth inhibition by tannins. *J Biol Chem* **262**; 12344-12350 1987.
- 20) 水間桂子, 難波和子, 中川 正：気分状態と味覚感受性の関連性研究. 味と匂誌 **1**; 340-343 1994.
- 21) 乾 隆子, 中川 正：長時間および短時間連続精神的作業負荷による苦味感受性への影響—その1—. 味と匂誌 **2**; 456-458 1995.
- 22) 中川 正, 乾 隆子, 尾崎まみこ：長時間および短時間連続精神的作業負荷による苦味感受性への影響—その2：唾液中の蛋白質の変動—. 味と匂誌 **2**; 487-489 1995.
- 23) 水口 清：唾液と歯科臨床との関わり. 日歯医学会誌 **42**; 239-251 1989.
- 24) Kauffman, D. L. and Keller, P. J.: The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. *Arch Oral Biol* **24**; 249-256 1979.
- 25) Azen, E. A.: Properties of salivary basic proteins showing polymorphism. *Biochem Genet* **9**; 69-86 1973.
- 26) Azen, E. A.: Genetic polymorphism of basic proteins from parotid saliva. *Science* **176**; 673-674 1972.
- 27) Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillan, F. M., Levitz, S. M. *et al.*: Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. *J Biol Chem* **263**; 7472-7477 1988.
- 28) Lush, I. E.: The genetics of tasting in mice III. quinine. *Genet Res* **44**; 151-160 1984.
- 29) Lush, I. E.: The genetics of tasting in mice IV. the acetates of raffinose, galactose and β -lactose. *Genet Res* **47**; 117-123 1986.
- 30) Lush, I. E. and Holland, G.: The genetics of tasting in mice V. glycine and cycloheximide. *Genet Res* **52**; 207-212 1988.
- 31) Lush, I. E., Hornigold, N., King, P. and Stoye, J. P.: The genetics of tasting in mice VII. glycine revisited, and the chromosomal location of sac and soa. *Genet Res* **66**; 207-212 1995.
- 32) 松波宏明：哺乳類の味覚受容の分子機構. 実験医学 **18**; 2320-2324 2000.
- 33) Mehansho, H., Clements, S., Sheares, B. T., Smith, S. *et al.*: Induction of proline-rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. *J Biol Chem* **260**; 4418-4423 1985.
- 34) Glendinning, J. I.: Effect of salivary proline-rich proteins on ingestive responses to tannic acid in mice. *Chem Senses* **17**; 1-12 1992.
- 35) Mitjavila, S., Lacombe, C., Carrera, G. and Derache, R.: Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestinal epithelium. *J Nutr* **107**; 2113-2121 1977.
- 36) Ahmed, A. E., Simithard, R. and Ellis, M.: Activities of the enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diet. *Br J Nutr* **65**; 187-197 1991.
- 37) Warner, T. F. and Azen, E. A.: Tannins, salivary proline-rich proteins and oesophageal cancer. *Med Hypotheses* **26**; 99-102 1988.
- 38) Yan, Q. and Bennick, A.: Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochem J* **311**; 341-347 1995.
- 著者への連絡先：馬場園子, (〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座
Reprint requests: Sonoko BABA, Department of Removable Prosthodontics, Ohi University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan