

平成30年 6月26日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14733

研究課題名(和文) 食べ物の好き嫌いは腹の虫の声に左右されるのか？

研究課題名(英文) How taste-preference is affected by nutritional status?

研究代表者

藍原 祥子 (Aihara, Yoshiko)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：30620877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では身体の状態に応じて感覚が変化する仕組みを、栄養状態と味の認識において解明するため、メダカを用いて栄養状態を評価する系を構築した。摂食状態の異なるメダカを用意し、摘出した肝臓、筋肉から調整した切片を、LC3抗体染色に供し染色像の強度を算出したところ、絶食の時間経過によるオートファジー活性の上昇が確認された。続いて、アガロースを担体としアミノ酸をさまざまな割合で含む人工飼料を作成し、メダカに経口摂取させ3時間後の肝臓のオートファジー活性を評価したところ、アミノ酸非配合飼料を投与した群の活性は高く、単一のアミノ酸、及び複数のアミノ酸を配合した飼料を投与した群の活性は低いことが確認された。

研究成果の概要(英文)：Change of autophagic activity was observed in liver of medaka fish (*Oryzias latipes*) prepared after different fasting time period. Effect of amino acids was tested using a newly developed artificial food, to show only single amino acid (L-Ala, L-Arg, or L-Pro) was enough to alter autophagic activity. These result provide a new measurement for nutritional status in medaka fish, and help to investigate biological mechanism for nutrient requiring.

研究分野：食品科学

キーワード：味覚 メダカ

## 1. 研究開始当初の背景

味覚は食物の要/不要の判断に関与する情報である。そのため味覚は生得的に決定されている嗜好性を発現するだけでなく、身体が要求するものをおいしく感じ、不必要なものに対しては好まなくなるように変化する。これは体内の情報(栄養状態)に応じて外界シグナルを判断する情報伝達系(味覚)を変えてしまう重大な変化であるにも関わらず、どこでどのように生じるのか全くわかっていない。身体の情報は、恒常性の維持に働く間脳へと伝達される。間脳の視床下部には摂食中枢があり、味覚情報も入力するとされている。味覚の情報は、味蕾に投射する脳神経を一次神経とし、延髄孤束核、橋を経て、視床や高次中枢へと運ばれる。一方で、摂食中枢の働きは、体内のエネルギーバランスに応じて摂食の欲求を亢進・抑制することであり、間脳視床下部で産生されるホルモンは、摂食行動の変化を引き起こす。摂食行動の変化には、モチベーションの変化、餌の探索、食物の取り込みなどのステップが存在し、食物の取り込みに関係する情報として味覚による食物の好悪の判断の変化が必須である。つまり、味覚の情報→間脳視床下部→味覚系の変化という言葉がフィードバックの回路が成立している。これまで、味覚の情報がどのように脳に伝達されているかという上行経路については研究が進んできたが、中枢での判断がどのように末梢に影響するのかわかっていなかった。その理由には、未だ脳において味覚に関連する部位が完全にはわかっていないことと、モデルとなるマウスの脳は十分に複雑で解析が難しいという点が挙げられる。

## 2. 研究の目的

動物の行動を変化させる感覚情報の寄与について調べるため、小型魚類であるメダカをモデル生物として利用する。メダカは多産で、ライフサイクルが早く、小型であることから個体を使った研究に適している。メダカは脊椎動物であるという点で、中枢神経系の基本的な構造はヒトやマウスと共通性が高いうえに、神経細胞数が少なく、全体の構造を研究するには利点となる。メダカは以前から、主に遺伝学の分野で用いられてきたが、近年ではゲノム情報が充実し、近交系や遺伝子改変技術の確立など、分子生物学のモデル動物としてのツールが整ってきた。さらにマウスとは異なり、遺伝子改変から行動評価まで、省スペースで実験が行えることも新しい研究を始めるのに適している。本研究では、このような利点を有するメダカを用いて、まずは栄養欠乏時に生じる味覚感受性の変化を末梢、神経レベルで明らかにし、分子メカニズムに迫ることを試みた。それに基づき、目的としたのは以下の二点である。

摂食行動に対応するメダカ脳の機能部位の組織学的な解析。

摂食行動が変化する系における、末梢(味蕾)と中枢での味覚嗜好性の機能変化の有無。

## 3. 研究の方法

研究開始当初に計画していた方法は次のとおり。

### (I) 栄養素依存的に摂食行動が変化する系の構築

味覚は摂食を判断するのに最も影響する器官であるため、嗜好性が変化する最大の要因は体内栄養状態であると予想される。そのため、まずはメダカの体内栄養状態に応じた摂食行動の変化の検出する系を確立する。

### 栄養状態の評価系の構築

栄養状態の違いの指標として、栄養飢餓時に開始される自己分解作用である組織オートファジー進行度を指標とすることを試みる。栄養状態を変化させる方法として、絶食し、栄養価の異なる飼料を与えるという方法をとる。このため化学物質を内包する小型魚類用の飼料を用いる。これは消化されない多糖であるアガロースを高融点の油脂の皮膜で覆ったものであり、水溶性の物質をもある程度の時間保持する担体で、メダカに摂食させることが出来る。魚類の主要なエネルギー源はタンパク質と脂質であることから、この人工飼料にアミノ酸を混入するもの(アミノ酸飼料)、脂肪酸を混入するもの(脂肪酸飼料)、含まないもの(欠乏飼料)の三種を作製する。絶食後のメダカに栄養価の異なるこれらの飼料を与え、組織オートファジー進行度を比較する。

### 摂食行動変化の評価系

摂食行動の変化として、で述べた人工飼料の摂食量を定量して評価する。栄養状態の異なるメダカに対し、アミノ酸飼料、脂肪酸飼料をそれぞれ与え、摂食量を定量し、群間で変化のあるものを探索する。

### (II) 味覚に関わる脳の機能部位の解析

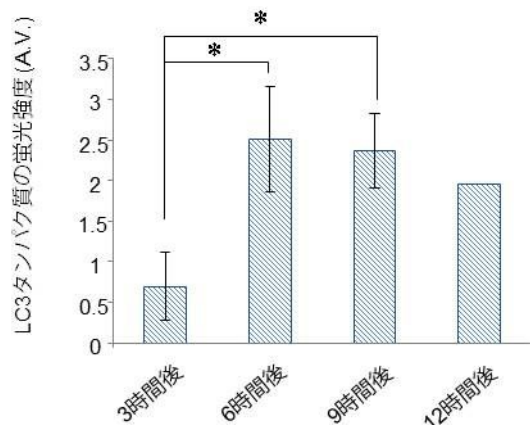
神経の活性化は極初期遺伝子群と呼ばれる転写因子で評価できる。代表的な *c-fos* 遺伝子は、メダカ脳でも同様に使用することができる。これを用いて、栄養欠乏時の味覚関連回路を同定する。前述のとおり、脳内味覚神経回路は組織学的に識別することは難しいが、申請者が以前作出した味覚神経回路を標識した遺伝子改変メダカ(WGAメダカ、*J. Comp. Neurol.* 521, 1781, 2013)を用いてこの難点に対応する。これは味蕾に経シナプストレーサーを発現させた遺伝子改変動物で、味細胞から情報が入力された神経を、抗体染色により可視化する。ラベル前述の摂食行動を変化させる系をWGAメダカに適應させ、栄養欠乏にした個体と通常の個体について脳内の *c-fos* 遺伝子発現を解析し、差分を検出

することより、WGA を発現する高次味覚神経回路のうち味覚嗜好性変化に特異的な応答部位を同定する。

#### 4. 研究成果

##### (I) 栄養素依存的に摂食行動が変化する系の構築

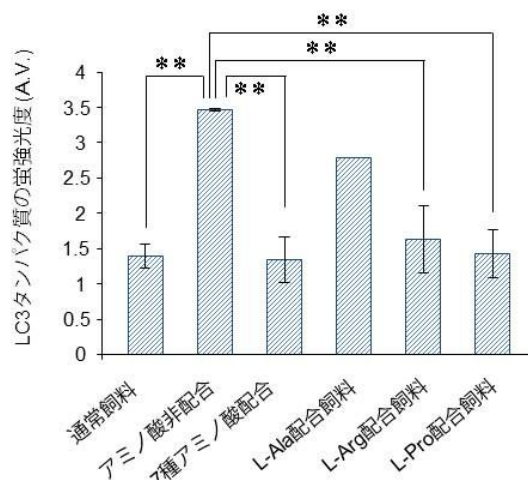
6~7ヶ月齢のメダカ(各群3匹ずつ)に通常飼料を15分間摂食させ、その後新しい水をいれた水槽に移すことで絶食とした。絶食状態を3、6、9、12時間経た個体より肝臓を摘出した。なお、メダカは14時間/10時間の明暗周期下で飼育しているが、この実験は明期に行った。この組織においてオートファジーの指標としてLC3 IIタンパク質を検出することを試みた。まず、ウェスタン法を試したが、解析に足るデータが得られなかった。続いて凍結切片を作成し、この切片についてLC3抗体を用いて蛍光抗体染色を施したところ、解析に十分なシグナルが認められた。得られた写真において蛍光強度を評価するため、カラーCCDカメラで取得した蛍光画像を二値化し、標識されたLC3タンパク質のシグナルのみが認められるようバックグラウンドを調整したうえで、ImageJを用いて画像面積あたりの明度を算出した。この値をオートファジー活性とし比較したところ、絶食後3時間では強度が低下しているものの6時間以降は上昇していることが観察された。したがって、15分間の摂餌では、6時間後には栄養が少ない状態になることが示された。なお、12時間の群は、個体数が揃わなかったため明確な結果は得られていないので、追ってデータを増やす必要がある。



続いて、アガロースを担体としさまざまなアミノ酸を含む人工飼料を作成した。方法は次のとおりである。0.5%アガロース水に各種アミノ酸を乾燥重量換算で5%の重量になるように混合し、乳化、風乾、粉碎した。成体メダカの口に入る丁度良い大きさとして、250~355 μm に分級したものをを用いた。添加するアミノ酸は、多くの魚種で比較的大きな味覚神経応答を得られるL-Ala、L-Arg、L-Proのそれぞれと、魚類における非必須アミノ酸

であるGly、L-Ala、L-Asp、L-Asn、L-Glu、L-Pro、L-Serの混合(7種混合)とした。

24時間絶食したメダカに通常餌、あるいは人工餌を15分間摂取させ、オートファジー活性の違いを検出するため、3時間後の肝臓におけるLC3抗体の蛍光強度を評価した。その結果、通常餌を与えたものは蛍光強度が低いが、栄養素の含まれないアミノ酸非配合飼料を摂取した群では強度は高く、絶食3時間でオートファジー活性が上昇することが示された。アミノ酸を配合した人工飼料の結果を見ると、単一のアミノ酸(L-Arg、L-Pro)および7種のアミノ酸を配合した資料を摂取した群では蛍光強度は低く、L-Alaのみ(個体数が足りないものの)蛍光強度が高いことが示された。L-Alaの実験結果については追ってデータを追加することが必要であるが、この結果は、動物の生体におけるオートファジー制御がアミノ酸の種類によって識別されている可能性を示す。



摂食行動の評価系については、孵化後10日程度の小さなメダカでならば摂食量評価ができるものの、オートファジー評価を行いやすい成体のメダカでは信頼できる系が構築されなかった。

##### (II) 味覚に関わる脳の機能部位の解析

まずは栄養状態の違いによる*c-fos*発現の違いを検出することを試みたが、免疫染色の行えるよい抗体を探し当てられず、実験系の構築には至らなかった。

本研究ではモデル脊椎動物であるメダカを用いて、味覚情報が脳を介して食行動を制御する回路と仕組みを解明すべく実験系の構築を試みた。脳神経回路の解析については実験系の構築に課題が残ったが、栄養状態を比較する系として任意の栄養素を摂食させ、肝臓のオートファジー活性を検出する系を構築し、栄養状態との相関が示唆された。小型魚類であるメダカは、糖や脂質ではなくタンパク質を栄養源とすることから、アミノ酸

やペプチドなどの成分が味覚に及ぼす影響をマウスよりも大きく捉えられる可能性がある。メダカで栄養生理学的な利用を試みた本研究は、今後の当該分野でのメダカの利用の切欠となると考える。

#### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

#### 6．研究組織

(1)研究代表者

藍原 祥子 (AIHARA, Yoshiko)

研究者番号：30620877