

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592362

研究課題名（和文） 大脳皮質の味覚伝導路構成ニューロンの発生工学的トレーシングと味覚識別様式の解明

研究課題名（英文） The study on neuronal bases of taste cognition in gustatory neurons defined by genetic tracing

研究代表者

杉田 誠（SUGITA MAKOTO）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50235884

研究成果の概要（和文）：

苦味と甘味の情報がどのように脳内の特定のニューロンに伝えられ味覚が識別されるかを明らかにするため、苦味と甘味のそれぞれの情報を伝えるニューロン群をトレーサーを用いて可視化し、それらのニューロン群の性質を比較した。苦味情報と甘味情報は脳内の異なるニューロン群に入力され処理されることにより、識別・認知されていることが考えられた。苦味情報の一部は不快感を惹起する内臓感覚と統合されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To gain insight into how taste recognition is accomplished in the brain, we applied a genetic approach to delineate the neuronal circuitries of sweet and bitter taste by selectively expressing the transneuronal tracer, WGA-DsRed, in either bitter- or sweet-responsive taste receptor cells in mice, and by visualizing the spatial distribution of neurons in the brain, which were labeled by WGA-DsRed originating from each class of taste receptor cells. Locations of the WGA-DsRed-labeled neurons revealed segregation of bitter- and sweet-inputs in the gustatory cortex. Combination of genetic tracing with electrophysiological recordings and immunohistochemistry enables to functionally define the neurons that process specific taste information and that integrate taste and the other viscerosensory information.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生理学、味覚、ニューロン

1. 研究開始当初の背景

哺乳類は、塩味、酸味、甘味、苦味、うま味の5つを基本味として認識し、味覚は5基本味の組み合わせで、認知される。味覚刺激

は味蕾中の味細胞で最初に感知される。味細胞特異的に発現する味覚受容体に、味物質が結合することにより惹起される味覚情報は、複数のニューロンを介し、脳内の各種ニュー

ロンに投射され、受容・識別される。さらに味覚感覚は、特定の神経回路を活性化することで、対照的な、嫌悪性・嗜好性の行動的反射や、快・不快の情動を惹起する。味覚は単純な5味質の情報として脳内に送られ識別されること、また対照的な行動と情動を(苦味感覚は嫌悪性の行動的反応と不快感を、甘味/うま味感覚は嗜好性の行動的反応と快的情動を)惹起することから、感覚識別・認識、嫌悪性・嗜好性行動、快・不快の情動惹起が、脳内のいかなる細胞機能・分子基盤のもとに遂行されているかを解明するために、非常に有効な感覚である。1999年以降、ゲノムプロジェクトの進展も伴い、味覚受容体分子が次々に解明された。そして、味覚受容体分子の解明は、末梢(味細胞)における、味覚受容・識別機構の解明へと導いた。苦味受容味細胞はGPCRに属するT2Rファミリー(マウスでは36種類、人では25種類)をいっせいに共発現して苦味を感知し、それとは異なる味細胞のうちでT1R3を発現する味細胞が、甘味・うま味を感知することが明らかとなった。次段階として、脳における味覚情報処理機構の解明、味覚による情動の惹起機構、味覚学習機構が、精力的に研究されている。

これまでの自身の研究で、トランスジェニックマウスの作製を通じて、苦味受容体もしくは甘味/うま味受容体を発現する味細胞に、それぞれ特異的に味覚受容体-GFP融合タンパク質とWGA-DsRed融合タンパク質を発現させ、味細胞から経シナプス性に輸送されるWGA-DsRedの脳内局在を追跡可視化することにより、苦味および甘味/うま味を伝導する神経回路網の、特に脳内での三次元空間配置を解明した。苦味伝導路を標識するマウス(mT2R5-WGAマウス)と甘味/うま味伝導路を標識するマウス(mT1R3-WGAマウス)において、トレーサートランスジーン(WGA-DsRed)は味細胞から順行性に輸送され延髄孤束核→橋結合腕傍核→視床後内側腹側核→大脳皮質味覚野・扁桃体中の一部のニューロンと、嗅皮質および大脳皮質体性感覚野(顎・上唇領域)の一部のニューロンで観察された。延髄孤束核・橋結合腕傍核・視床後内側腹側核において、甘味受容味細胞からのWGA-DsRedを受けるニューロン群と苦味受容味細胞からのWGA-DsRedを受けるニューロン群に、局在の差異が観察された。苦味と甘味/うま味の識別、苦味刺激と甘味/うま味刺激による対照的な情動と行動の惹起は、苦味と甘味/うま味情報を伝えるニューロンの異なりにより生じる可能性があるが、苦味伝導路を標識するマウス(mT2R5-WGAマウス)と甘味/うま味伝導路を標識するマウス(mT1R3-WGAマウス)を用いることによって、特定の苦味伝導路と甘味/うま味伝導路を、それぞれ分離して可視化することが可能となり、味覚識

別を可能にする脳内神経機構の解明に、有効に活用できることが示唆された。

2. 研究の目的

苦味受容体もしくは甘味/うま味受容体を発現する味細胞に、それぞれ特異的に経シナプス性トレーサーWGA-DsRedを発現するトランスジェニックマウスにおいて、苦味もしくは甘味受容味細胞から移行したWGA-DsRedを受け取るニューロンが、“苦味と甘味/うま味の識別”にいかに関与するかを明らかにする。そのため、(1)WGA-DsRed標識ニューロン(細胞体・樹状突起・軸索)の三次元的空間配置、(2)WGA-DsRed標識ニューロンが保有する細胞機能(ニューロン種と電気生理学的・薬理学的特性)、および(3)入出力先のニューロン種との関連を、苦味・甘味/うま味伝導路構成ニューロンにおいて比較解析する。経シナプス性トレーサー(WGA)を用いて、発生工学的に特殊神経回路を可視化する方法は一般化されつつあるが、自身の研究では、蛍光タンパク質DsRedを融合したWGA(WGA-DsRed)を用いて特定の神経回路を標識することにより、WGA-DsRedで蛍光標識された特定回路内ニューロンの細胞機能を生きた状態(in vivo、脳スライス、単離ニューロン)で解析することができる。標識されたニューロンの性質を電気生理学的・薬理的・免疫組織化学的に詳細に解析することにより、いかなるニューロンによる、いかなる働きが味覚識別・認識に必要であるかを解析する。そして特定のWGA-DsRed標識ニューロンを選択的に除去した際に生じる味覚誘発行動の変化を解析することにより、味覚識別に関与するニューロンを同定し、その細胞の役割を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

苦味伝導路と甘味/うま味伝導路のそれぞれを可視化する2系統のトランスジェニックマウス(mT2R5-WGAマウスとmT1R3-WGAマウス)を用い研究を遂行した。苦味情報を伝導する神経回路を可視化するmT2R5-WGAマウスは、mT2R5を特定の苦味受容味細胞に発現させる特異的プロモーターエレメント、mT2R5-GFP cDNA、IRES配列、WGA-DsRed cDNAを連結したトランスジーンを有する。本マウスにおいては、内因性のmT2R5を発現する苦味受容味細胞が、mT2R5-GFPとWGA-DsRedの二種類の融合タンパク質を産生する。そして苦味受容味細胞で発現したWGA-DsRedが経シナプス性に輸送され、苦味伝導路をトレースする。甘味/うま味情報を伝導する神経回路を可視化するmT1R3-WGAマウスは、mT1R3を特定の味細胞に発現させる特異的プロモーターエレメント、mT1R3-GFP cDNA、IRES配列、WGA-DsRed cDNAを連結したトランスジーン

ンを有し、甘味/うま味受容体細胞で発現した WGA-DsRed が経シナプス性に輸送され、甘味/うま味伝導路をトレースする。トランスジェニックマウスの脳の前頭断連続切片 (30 μm) もしくは水平断連続切片 (30 μm) をフィルムトランスファー法により得て、WGA-DsRed の脳内局在を DsRed の蛍光を蛍光顕微鏡下で検出し可視化することにより、苦味もしくは甘味/うま味受容体細胞から経シナプス性に移行した WGA-DsRed により標識されるニューロン (苦味伝導路構成ニューロンもしくは甘味/うま味伝導路構成ニューロン) が脳内でどのような三次元的空間配置を示すかを調べた。苦味情報と甘味/うま味情報を受け取る細胞に重複があるかどうかを、標識ニューロンの細胞体の脳内での三次元的空間配置を単一細胞レベルで検出し精査した。

トレーサー (WGA-DsRed) は、その分泌タンパク質としての性質から、ニューロンの中で、主に分泌顆粒・Golgi 体・ER の lumen 側に存在する。したがって WGA-DsRed 標識ニューロンの中で、WGA-DsRed は核周囲と、樹状突起・軸索・シナプス内で顆粒状に存在していることが観察されるが、標識されたニューロンがどのように樹状突起・軸索を伸長させているかを、WGA-DsRed の局在のみから、正確に把握することはできない。そこでそのニューロンの樹状突起の三次元的空間配置を、WGA-DsRed 標識ニューロン内へ蛍光色素 (Lucifer yellow) をパッチクランプピペットを用いてマイクロインジェクションすることにより明らかにした。

WGA-DsRed で標識された苦味伝導路構成ニューロンと甘味/うま味伝導路構成ニューロンの電気生理学的性質を、ホールセルパッチクランプ法を用い解析し、その薬理学的特性より、どのような神経伝達物質による入力をいかなる受容体により受容するか、そしてそのシナプス伝達がいかなる神経ペプチド・ホルモンによりどのように修飾・制御されるかを比較し、苦味伝導路構成ニューロンと甘味/うま味伝導路構成ニューロンの、ニューロン種の同定と細胞機能の解析を行った。250 μm 厚の新鮮脳スライス標本を得て、顕微鏡下で DsRed の蛍光検出と細胞形態の微分干涉観察を組み合わせることで、WGA-DsRed 標識ニューロンの形態を把握し、ホールセルパッチクランプ記録を行った。ホールセルパッチクランプにおいては、ピペット内溶液は 128 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 10 mM glucose, and 2 mM Na₂ATP, 0.5 mM Na₂GTP を、細胞外溶液は 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glucose を使用し、-70mV での膜電位固定下で、自発的な excitatory postsynaptic

current (EPSC) を記録し、薬理学的特性を解析した。

WGA-DsRed により蛍光標識された苦味・甘味/うま味伝導路構成ニューロンのニューロン種・発現分子を免疫組織化学的に解析した。トランスジェニックマウスの脳の前頭断連続切片 (30 μm) もしくは水平断連続切片 (30 μm) をフィルムトランスファー法により得て、WGA-DsRed 標識ニューロンを DsRed の蛍光検出により同定し、Zenon ラベリングシステム (Invitrogen) を用い発現分子を免疫組織化学的に可視化し、苦味・甘味/うま味伝導路構成ニューロンのニューロン種を解析した。

4. 研究成果

mT2R5-WGA マウスと mT1R3-WGA マウスにおいて、苦味もしくは甘味受容体細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンと甘味伝導路構成ニューロンの細胞体が脳皮質内でどのような三次元的空間配置を示すかを、脳の前頭断連続切片・水平断連続切片から WGA-DsRed 標識ニューロンの細胞体の局在を DsRed の蛍光を検出することにより可視化し、単一細胞レベルで、局在を高空間分解能で比較した。細胞体の局在を単一細胞レベルで解析した場合、脳皮質内で、甘味受容体細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る甘味伝導路構成ニューロンの細胞体の局在に比較し、苦味受容体細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンの細胞体の多くは後方に配置した。この局在の差異は、苦味情報と甘味/うま味情報がそれぞれ脳皮質内の異なるニューロン群に入力することを示し、苦味と甘味/うま味の識別を可能にする細胞基盤となることが考えられる。2011 年に Zuker らのグループは、In vivo で各種味覚刺激を行った時に活性化される脳皮質ニューロンの局在を、2 光子カルシウムイメージングを用いて多数のニューロンの活動を同時に観察することにより明らかにし、苦味、甘味、うま味および塩味刺激は、それぞれ脳皮質内の分離したニューロンクラスターを活性化することを示した。その研究結果においても、苦味刺激によって活性化される脳皮質のニューロンクラスターは、甘味とうま味刺激によって活性化されるニューロンクラスターに比較し、後方に位置していることが示されている。苦味情報と甘味/うま味情報は脳皮質内で異なったニューロン群に入力され、異なったニューロン群が活性化されることが、苦味と甘味/うま味の識別・認知に関与することが示唆される。脳皮質味覚野の味覚伝導路構成ニューロンは、橋結合腕傍核および視床後内側腹側核の味覚伝導路構成ニューロンから上行性の入力を受ける。それ

ぞれの経路のニューロンがいかなるニューロン種でどのような役割を果たすのか、大脳皮質の味覚伝導路構成ニューロンは大脳皮質内でどのような神経回路を構築し、味覚情報を処理し味の認知がなされるのか、大脳皮質に到達した味覚情報は、どのように嗅覚情報、体性感覚情報や内臓感覚情報と統合され食物の風味やおいしさを感じさせるのか、大脳皮質に到達した味覚情報は味覚誘発行動・情動の惹起にどのように関与するのか、今後明らかにしていきたい。

口腔内への各種特定味覚刺激後もしくは不快感を惹起する内臓感覚刺激（腹腔内への塩化リチウム投与）後に活性化される脳内ニューロンを、最初期遺伝子 Zif268 の発現を免疫組織学的に検出することにより可視化し、延髄孤束核・橋結合腕傍核・大脳皮質の WGA-DsRed で標識された苦味伝導路構成ニューロン群が、特定味覚情報を選択的に受け取るか、複数の味質情報を受け取るか、内臓感覚情報を統合するか、その入力選択性を精査した。味覚入力を受け取る最初の脳部位である延髄孤束核内においても、甘味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る甘味伝導路構成ニューロンと比較し、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンの細胞体は後方に配置する。延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンは、異種混交のニューロン種からなるが最も多いのは catecholamine ニューロンであり、樹状突起を双極性に伸長するニューロンである。また神経伝達物質グルタミン酸による入力を AMPA 受容体により受容する。延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンは、口腔内甘味刺激や LiCl の腹腔内投与による内臓感覚刺激によっては活性化されず、口腔内苦味刺激により選択的に活性化された。本ニューロンは苦味情報を選択的に受け取り、苦味情報を処理し上位ニューロンに伝導し、識別もしくは苦味誘発行動・情動の惹起に役割を果たすことが示唆された。また延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンの多くは、内臓感覚情報を統合しないことが示唆された。延髄孤束核ニューロンからの入力を受ける橋結合腕傍核においては、苦味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロンは後方 medial 側だけではなく、前方の external lateral 側にも局在する。橋結合腕傍核の苦味伝導路構成ニューロンにおいて、後方 medial 側のニューロンは多極性に樹状突起を伸長するニューロンであり、LiCl の腹腔内投与による内臓感覚刺激によっては活性化されず、口腔内苦味刺激により選択的に活性化された。一方で橋結合腕傍核 external lateral 側に局在する苦味伝導路構成ニューロンは、内臓感覚刺激および口腔内苦味刺激により活性化され、苦味情報と内臓感覚情報

を統合する可能性が示唆された。大脳皮質味覚野は橋結合腕傍核および視床後内側腹側核からの入力を受けるが、特定の味覚情報を選択的に特殊な大脳皮質領域に伝える経路および、味覚情報を内臓感覚情報と統合した後、大脳皮質や扁桃体に伝える経路が存在することが示唆された。橋結合腕傍核 medial 側の苦味伝導路構成ニューロンと external lateral 側の苦味伝導路構成ニューロンでは noradrenaline に対する反応性等、薬理学的特性の差異が観察されており、それぞれに機能的役割が異なることが考えられる。それぞれのニューロンが味覚識別、味覚誘発情動の惹起、味覚誘発行動の惹起のそれぞれに異なる関与をすることが考えられるが、それらニューロンの機能的役割を明らかにするためには、個々のニューロン群を選択的に活性化もしくは不活性化した際に生じる味覚識別能、味覚誘発行動・情動の変化を調べる必要がある。近年 channelrhodopsin や毒素受容体を特定のニューロン種に発現させ、光照射や毒素注入によって特定のニューロンを活性化もしくは除去することによりニューロンの役割が証明されている。それらの方法は優れているが、ニューロン種ごとに遺伝子改変マウスを作製する必要があり、異種混交のニューロン種で構成される味覚伝導路の中で、特定のニューロンの役割を証明していくためには不向きである。WGA-DsRed 標識ニューロンを選択的に除去する方法もしくは活性化する方法を確立することにより、特定の標識ニューロン群を、選択的に除去もしくは活性化した際に生じる、味覚識別能、味覚誘発行動・情動の変化を解析することができるようになり、個々のニューロンの役割を明らかにすることが可能となると考える。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. 廣野力, 杉田誠, 味を感じ唾液が分泌される仕組みに関する最近の知見, 広島歯科医学雑誌, 査読無, 38 巻, 2010, pp1-9
2. Hideyo Yoshida, Chikara Hirono, Chikao Shimamoto, Eriko Daikoku, Takahiro Kubota, Makoto Sugita, Yoshiki Shiba, Takashi Nakahari, Membrane potential modulation of ionomycin-stimulated Ca^{2+} entry via Ca^{2+}/H^{+} exchange and SOC in rat submandibular acinar cells, The Journal of Physiological Sciences, 査読有, 60 巻, 2010, pp363-371
3. 杉田誠, 味覚受容機構と味覚誘発行動・情動の脳内神経機構, 医学のあゆみ, 査読無, 232 巻, 2010, pp62-66

〔学会発表〕（計3件）

1. Makoto Sugita, Genetic tracing of taste representation in the brain reveals its potential interaction with the homeostatic control of feeding, The 59th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2011年10月8日, 広島市

2. 杉田誠, 味覚経路を構成するニューロンの発生工学的トレーシングと機能解析, 第53回歯科基礎医学会学術大会, 2011年9月30日, 岐阜市

3. Makoto Sugita, Genetic tracing and characterization of the neurons in the nucleus of the solitary tract, receiving specific taste input, The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009年7月28日, 京都市

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 誠 (SUGITA MAKOTO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50235884

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：