

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292064

研究課題名(和文) 味覚情報伝達・処理機構の解明を目指した経シナプス性トレーサーの改良とその利用

研究課題名(英文) Improvement of trans-synaptic tracers for the elucidation of taste coding

研究代表者

岡田 晋治 (Okada, Shinji)

東京大学・農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：50376563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：われわれが感じる5つの基本味の味情報がどのように神経伝達されて処理されるかという味覚情報のコーディング機構は不詳である。本研究では、新規に開発した経シナプス性トレーサー・トランスジーンによって実現された2経路の神経回路可視化技術を用いて、味覚情報のコーディング機構の一端を解明することを目指した。4種の味蕾細胞を起点とする神経回路を可視化に成功し、それら神経回路の関係を味神経のレベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The coding mechanisms including neural pathways that transduce the taste senses information remain unknown. To elucidate these matters, we have developed novel trans-synaptic tracer transgenes that enable the visualization of neural circuits originating from two distinct cell populations simultaneously. The correlation among the neural circuits originate from four populations of taste receptor cells were revealed by the developed visualization technique in this study.

研究分野：食品科学

キーワード：味覚 神経回路 トレーサー

1. 研究開始当初の背景

味覚は、生体にとって栄養となる物質と害となる物質とを判断するための、動物の生存にとって重要な化学感覚である。味覚は、食物中の呈味性化合物(味物質)の受容、情報の神経伝達、および中枢における認識、という一連の機構を経て生じる。脊椎動物では口腔や咽頭などの上皮層に存在する味蕾という器官で味物質が受容され、味蕾に投射する神経(味神経)を介して中枢へと情報が伝達される。

われわれが感じる5つの基本味(甘味、旨味、苦味、酸味、塩味)の味情報は末梢の味蕾では別々の細胞集団で受容されることが明らかになってきた。一方、個々の味情報が味神経から中枢まで独立して伝達・処理されるのか(labeled lineモデル)、途中で統合されるのか(across fiber patternモデル)という、味覚情報のコーディング・デコーディング機構については、未だ決着はついていない。

近年、申請者のグループを中心として、経シナプス性トレーサーである小麦胚芽レクチン(WGA)を遺伝子工学的に味細胞で発現させることで、味覚情報伝達・処理経路の可視化が試みられている。これまでに、マウスにおいては甘味/旨味、苦味、酸味受容細胞を起点とした伝達経路の可視化にそれぞれ成功した(*Mol. Cell. Neurosci.*, 2008; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; *J. Neurochem.*, 2011)。また、申請者はこの手法をヒトと共通の味覚システムを有する小型魚類にも適用し、メダカの旨味/苦味受容細胞(PLC-beta2発現細胞)を起点とした伝達経路の可視化に成功した。しかしながら、遺伝子工学的に使用可能な経シナプス性トレーサーはWGAの1種のみであるため、各々の味情報伝達経路の違い・重なりといった相関関係を検証することは困難であり、2種以上の味情報伝達・処理経路を区別して可視化するため、WGA以外に遺伝子工学的に使用できる新規経シナプス性トレーサー・トランスジーンの必要性に直面していた。

そこで申請者は、科研費若手研究(A)「新規経シナプス性トレーサーによる味覚情報コーディング機構の解明」(H23-H25)において、上記の問題を解決する新規の経シナプス性トレーサー・トランスジーンの開発を行ってきた。トランスジェニック(Tg)メダカを用いたトレーサー探索系を開発し(日本農芸化学会2012年度大会発表)、いくつかのトレーサー候補を検討した。そして現在までに、2つの遺伝子XとYが経シナプス性トレーサー・トランスジーンとして利用可能であることを強く示唆する結果を得ている。この結果を踏まえ、WGA、X、Yの3種のトレーサー遺伝子の利用による基本味情報伝達・処理経路の関係の解析を目指している。味覚システムに関する生理学的・分子生物学的知見の集積が進んでいるマウスを解析対象に選んだ。

2. 研究の目的

3種の経シナプス性トレーサー・トランスジーンによって2種以上の味細胞を起点とした味覚情報伝達・処理経路を可視化、その経路の相関を解析し、未だ不詳である脊椎動物の味覚情報コーディング・デコーディング機構を解明する。

3. 研究の方法

(1)メダカ味細胞特異的に発現を誘導する転写制御領域の取得

メダカ苦味受容体 *mft2r1* 遺伝子の5'上流領域のゲノム情報を解析し、転写制御領域候補を設定した。この領域のDNA断片を取得し、その下流にレポーターとして *egfp* 遺伝子を連結したコンストラクトを作製し、メダカ初期胚に注入した。

(2)新規経シナプス性トレーサーX、Yの性能比較

mplc 2発現味細胞にWGAを発現させた系統(plc-W)とXまたはYを発現させた系統(plc-X, plc-Y)とを交配し、2種の二重Tgメダカ(plc-W×plc-X, plc-W×plc-Y)を作出した。これらの二重Tgメダカに対して二重免疫組織染色(IHC)を行い、トレーサーの味神経への輸送を解析した。

(3)経シナプス性トレーサーを用いた味覚情報伝導路の関係解析

同一個体中の複数種の味細胞に由来する神経回路を、経シナプス性トレーサーを用いて可視化することで、味覚情報伝導路の相関解析を行った。*mft1r1* 発現味細胞にWGAまたはXを発現させた系統(t1r1-W, t1r1-X)と *mft2r1* 発現味細胞にYを発現させた系統(t2r1-Y)とを交配し、2種の二重Tgメダカ(t1r1-W×t2r1-Y, t1r1-X×t2r1-Y)を作出した。これらの二重Tgメダカに対し二重IHCを行い、トレーサーの味蕾での発現および味神経への輸送を解析した。

(4)蛍光タンパク質融合型トレーサーを用いた解析

トレーサー(WGA、X、Y)とEGFPを接続したカセット、トレーサー-EGFPとEGFP-トレーサー、をそれぞれ5'-*mplc* 2の下流に接続した発現コンストラクトをメダカ初期胚に注入した。

4. 研究成果

当初計画では、味覚システムに関する生理学的・分子生物学的知見の集積が進んでいるマウスを解析対象に本研究を遂行する予定であった。そのため、これを実現するTgマウスの作出を進めていた。具体的には、その発現制御領域を用いて味覚受容体発現細胞に異所的にトレーサー・トランスジーンを発現誘導するTgマウス作出を試みていた。し

かし、予備検討として、マウス脳内での味覚受容体 mRNA 発現を解析したところ、脳内の多くの神経細胞において味覚受容体 mRNA の発現が観察された。またその後、味覚受容体 mRNA は味神経細胞においても発現していることが報告された (Voigt A. *et al.*, 2015)。このことから、マウスにおいて、味覚受容体発現制御領域を用いたトレーサー・トランスジーン発現誘導によっては、目的を達成できないことが明らかになった。

一方、メダカにおいて各味覚受容体およびそのシグナル伝達因子の mRNA 発現を全身で解析したところ、味覚受容器以外での発現は観察されなかった。このことから、味覚システムに関する生理学的・分子生物学的知見の集積には遅れがあるものの、本研究の目的達成には、メダカを解析対象にすることが望ましいと考え、その後の解析を進めた。

(1) メダカ味細胞特異的に発現を誘導する転写制御領域の取得

mft2r1 の 5' 上流領域を用いた Tg メダカの G0 世代稚魚において、一部の味細胞特異的に EGFP の蛍光が観察された (図 1)。さらに、*egfp* と *mft2r1* のプロンプトを用いて二重 *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、*egfp* mRNA は内在 *mft2r1* mRNA と同一の味細胞群に共発現していた。以上の結果から、*mft2r1* 発現味細胞特異的に機能する転写制御領域 5' -*mft2r1* の取得に成功した。

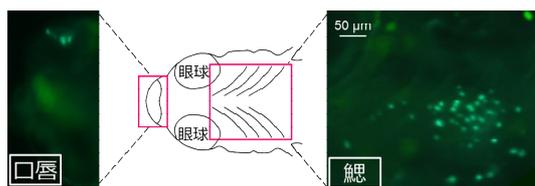


図 1. 5'-*mft2r1* 転写制御領域を用いた EGFP の発現誘導

(2) 新規経シナプス性トレーサー X, Y の性能比較

二重 Tg メダカ *plc-W* × *plc-X*, *plc-W* × *plc-Y* のいずれの味神経においても、ほぼ全ての WGA 陽性細胞に X, Y が検出された。すなわち、X, Y は味神経において IHC で WGA とほぼ同等の検出感度で使用できるトレーサーであると判断した。

さらに、X, Y の中枢への輸送能を調べるため、*plc-X* 系統、*plc-Y* 系統の冠状脳切片を用い IHC を行った。その結果、WGA が終脳領域の味覚高次中枢まで輸送されるのに対し、X および Y はともに味神経の次の投射先である延髄やそれ以上の味覚中枢において検出されなかった。以上のことから、X, Y は味神経までのトレーサーとして WGA と同様に機能することが確かめられた。

(3) 経シナプス性トレーサーを用いた味覚情報伝導路の関係解析

2 種の二重 Tg メダカ (*t1r1-W* × *t2r1-Y*,

t1r1-X × *t2r1-Y*) を作出した。いずれの二重 Tg メダカの味神経においても *mft1r1* 発現味細胞由来のトレーサー陽性細胞と *mft2r1* 発現味細胞由来のトレーサー陽性細胞は排他的に存在していた。これは末梢の味蕾における *mft1r1* と *mft2r1* の発現相関に一致する。以上の結果から、*mft1r1* による旨味情報の受容と *mft2r1* による苦味情報の受容とは異なる味細胞で行われた後に、異なる味神経を介して伝達されることが示唆された。

(4) 蛍光タンパク質融合型トレーサーを用いた解析

EGFP-トレーサーコンストラクトを注入した Tg メダカのみ、G0 世代稚魚において、一部の味細胞特異的に EGFP の蛍光が観察された。得られた G0 個体を系統化したものの、味蕾存在部位以外では EGFP 蛍光は観察されず、さらに薄切切片の IHC によっても味神経にはトレーサーおよび EGFP が検出されなかった。

本研究では、複数の経シナプス性トレーサーを異なる味細胞種に発現させることで、一部の旨味と苦味の味覚情報伝導路の相関解析に成功した。また新規トレーサーである X と Y が味神経において識別可能であり、既存のトレーサーである WGA と併用可能であることが明らかとなった。今後、さらなる転写制御領域の取得や三重 Tg メダカ作出等によって、複数の味覚情報伝導路の相関解析が進み、味覚情報コーディング機構全容の解明へとつながることが期待される。

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)

Soulika, M., Kaushik, A. L., Mathieu, B., Lourenco, R., Komisarczuk, A. Z., Romano, S. A., Jouary, A., Lardennois, A., Tissot, N., Okada, S., Abe, K., Becker, T. S., and Kapsimali, M., Diversity in cell motility reveals the dynamic nature of the formation of zebrafish taste sensory organs., *Development* 143, 2012-2024, 2016. DOI: 10.1242/dev.134817 査読有

Yoshimoto, J., Okada, S., Kishi, M., and Misaka, T., Ulex europaeus agglutinin-1 is a reliable taste bud marker for in situ hybridization analyses., *J. Histochem. Cytochem.* 64, 205-215, 2016. DOI: 10.1369/0022155415626987 査読有

Okada, S., The taste system of small fish species., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1039-1043, 2015. DOI: 10.1080/09168451.2015.1023251 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

矢後 拓己、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、マグネシウム欠乏食摂取ラット大腿骨における遺伝子発現解析、**日本農芸化学会 2017 年度大会**、2017/3/18、京都女子大学(京都府・京都市)

鳴神 未稀、矢後 拓己、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、リン供給源の形態の違いが、高リン食摂取ラットの骨代謝に及ぼす影響の包括的検討、**日本農芸化学会 2017 年度大会**、2017/3/18、京都女子大学(京都府・京都市)

宇都宮 さち、澤井 真梨子、原 由真、速水 耕介、韓 力、内田 健志、岡田 晋治、岸田 太郎、魚肉及び畜肉のタンパク質摂取は筋重量を増加させる、**第 49 回 日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会**、2016/11/12、徳島大学藤本キャンパス(徳島県・徳島市)

澤井 真梨子、原 由真、速水 耕介、韓 力、内田 健志、岡田 晋治、岸田 太郎、魚肉および畜肉タンパク質摂取は筋重量を増加させるが魚肉タンパク質組成アミノ酸混合物の摂取は筋重量を増加させない、**日本アミノ酸学会 10 周年記念大会**、2016/9/13、東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都・文京区)

矢後 拓己、生貝 咲貴、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、マグネシウム摂取不足がラット大腿骨に及ぼす影響：QCT 法を用いた解析、**第 70 回 日本栄養・食糧学会**、2016/5/15、武庫川女子大学中央キャンパス(兵庫県・神戸市)

石島 智子、生貝 咲貴、矢後 拓己、阿部 啓子、岡田 晋治、高リン食摂取ラット大腿骨における遺伝子発現解析、**第 70 回 日本栄養・食糧学会**、2016/5/15、武庫川女子大学中央キャンパス(兵庫県・神戸市)

澤井 真梨子、原 由真、速水 耕介、韓 力、岡田 晋治、岸田 太郎、魚肉タンパク質摂取は飼料中のアルギニン及び分岐鎖アミノ酸含量に関係なく筋重量を増加させる、**日本栄養・食糧学会 2016 年度大会**、2016/5/15、武庫川女子大学中央キャンパス(兵庫県・神戸市)

橋詰 力、岡田 晋治、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎、筋萎縮時における ActRIIB 遺伝子発現制御機構の解析、**第 70 回 日本栄養・食糧学会**、2016/5/15、武庫川女子大学中央キャンパス(兵庫県・神戸市)

横井 京子、池永 直弥、三坂 巧、岡田 晋治、メダカを用いた新規経シナプス性トレーサーの開発、**日本農芸化学会 2016 年度大会**、2016/3/27-30、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

若泉 宏樹、川崎 隆史、弓場 俊輔、阿部 啓子、岡田 晋治、**小型魚類を用いた味覚情報伝達・処理のイメージング解析**、日

本農芸化学会 2016 年度大会、2016/3/27-30、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

矢後 拓己、生貝 咲貴、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、マグネシウム摂取不足が骨代謝に及ぼす影響の包括的検討、**日本農芸化学会 2016 年度大会**、2016/3/27-30、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

岸田 太郎、原 由真、澤井 真梨子、山本 晋平、速水 耕介、韓 力、岡田 晋治、魚肉タンパク質摂取による筋重量増加 - 他のタンパク質源との比較およびアルギニンの関与の検討 -、**日本農芸化学会 2016 年度大会**、2016/3/27-30、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

井土 良一、甲木 孝弘、豊田 集、石島 智子、岡田 晋治、3T3-L1 脂肪細胞に対するボモル酸の脂肪蓄積抑制機構の解明、**日本農芸化学会 2016 年度大会**、2016/3/27-30、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

横井 京子、三坂 巧、岡田 晋治、メダカ味覚受容体の転写制御配列の取得、**日本農芸化学会 2015 年度大会**、2015/3/27-30、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

高須 亮佑、ホナーギエ クレア、近藤 隆、阿部 啓子、三坂 巧、白髭 克彦、安岡 顕人、岡田 晋治、食品ポリフェノールによる世代を超えての代謝改善に関わるエピジェネティクス修飾、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015/3/27-30、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

〔図書〕(計 1 件)

岡田 晋治ら、食物と栄養学基礎シリーズ7 基礎栄養学 第二版(吉田勉監修、佐藤隆一郎・加藤久典編)学文社、2017、164 ページ

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院 農学生命科学研究科 ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ilsi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 晋治 (Shinji Okada)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：50376563

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし