

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09519

研究課題名（和文）発生工学的トレーシングを用いた脳内の味覚機能地図の構築

研究課題名（英文）Mapping of cellular functions of taste-relaying neurons in the brain, defined by genetic tracing

研究代表者

杉田 誠 (Sugita, Makoto)

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：50235884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：異なる味細胞で感知される苦味と甘味の情報はいかに脳内に伝わり識別され、対照的な行動・情動応答が惹起されるか、それらの神経機構を解明することを目的とした。苦味もしくは甘味を感知する味細胞にトレーサー（WGA-DsRed）を発現するマウスを用い、苦味もしくは甘味受容味細胞から移行したトレーサーにより標識される苦味経路ニューロンと甘味経路ニューロンの脳内局在を比較した。本研究ではさらに、可視化された苦味経路ニューロンの細胞機能（ニューロン種・シナプス伝達機構・各種刺激反応性）を解明した。そして味覚経路ニューロンの脳内局在と細胞機能がともに表出される脳内味覚機能地図の構築を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚経路を発生工学的トレーシングを用い標識することにより、初めて苦味経路ニューロンもしくは甘味経路ニューロンを可視化限定して、苦味もしくは甘味経路ニューロンのみの細胞機能を解析することができる。苦味・甘味経路ニューロンのニューロン種やシナプス伝達機構の解明を基にして、特定の苦味・甘味経路ニューロンに選択的に作用する薬剤を選出もしくは開発することが可能となる。それにより特定の苦味・甘味経路ニューロンを標的として、味覚異常、味覚識別障害、味覚誘発行動の異常、情動障害、拒食・過食への新しい治療法を創出する道を開く。

研究成果の概要（英文）：Taste information is transmitted to the gustatory cortex and the amygdala via synapses in the solitary tract nuclei and the parabrachial nuclei (PBN) to elicit behavioral and emotional responses. We combined genetic tracing with electrophysiological recordings and immunohistochemistry to functionally characterize bitter taste-relaying neurons in the PBN, the hypothalamus, and the amygdala, which were fluorescently labeled by the transneuronal tracer WGA-DsRed originating from T2R-expressing taste receptor cells. In the PBN, the WGA-DsRed-labeled neurons were located rostrally in the external lateral PBN, and caudally in the medial PBN. The tracer-labeled neurons in the medial and the external lateral PBN exhibited the different responsiveness to neuromodulators in addition to different responses for integration of viscerosensory stimuli. The data indicate the differences in the neuron types and information processing between the neurons in the medial and external lateral PBN.

研究分野：口腔生理学

キーワード：味覚 情動 味覚誘発行動

1. 研究開始当初の背景

苦味受容味細胞は T2R ファミリー(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。異なる味細胞で感知される苦味と甘味の情報はいかに脳内へ伝達され、苦味と甘味は識別され、苦味感覚は忌避性行動と不快情動を惹起し、甘味感覚は嗜好性行動と快的情動を惹起するのであろうか。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、それぞれ選択的に味覚受容体-GFP 融合タンパク質と経ニューロン性トレーサー(WGA-DsRed 融合タンパク質)を発現させた。そして味細胞から分泌され経ニューロン性に輸送される WGA-DsRed の脳内局在を上行性経路に沿って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脳内での三次元空間配置を解明した(Sugita et al., Science, 309: 781-, 2005)。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、網様体および視床下部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入力を受けるニューロン群は、苦味受容味細胞からの入力を受けるニューロン群に比べ、より前方に配置していた。したがって苦味経路ニューロンと甘味経路ニューロンの脳内局在の異なりが可視化され、この二種の神経回路の異なりが苦味と甘味の識別の基盤になると考えられた。苦味感覚は忌避性行動と不快情動を惹起し、甘味感覚は嗜好性行動と快的情動を惹起する。その対照的な応答を可能にするために、いかに各脳領野に局在する苦味ニューロン同士、および甘味ニューロン同士が選択的に連結し神経回路を構築するのには現時点で不明な点が多い。また各脳領野の苦味と甘味経路ニューロンのニューロン種は何であり、各脳領野間のニューロン間でいかなるシナプス伝達と伝達修飾が行われ、苦味経路と甘味経路で異なりがあるのかどうかも、多くの点でいまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでに作製した上述の 2 系統のトランスジェニックマウスを用い、発生工学的トレーシングにより苦味経路ニューロンと甘味経路ニューロンの脳内局在を可視化し、苦味・甘味経路ニューロンの細胞機能(ニューロン種・シナプス伝達機構・微細形態・神経回路構築様式)を解明する。そして苦味・甘味経路ニューロンの脳内局在と細胞機能がともに表出される「脳内味覚機能地図」を構築する。この発生工学的トレーシングを用いることにより、初めて苦味経路ニューロンもしくは甘味経路ニューロンを可視化限定して、苦味もしくは甘味経路ニューロンのみの細胞機能を解析することができる。また本研究では蛍光タンパク質 DsRed を融合した経ニューロン性トレーサーWGA(WGA-DsRed)を用い神経経路をトレースしているため、WGA-DsRed で蛍光標識された苦味・甘味経路ニューロンの細胞機能を単一細胞レベルで生きた状態で解析し、かつ単離し発現分子を比較解析することが可能となる。ゆえに従来の方法では発見できなかった細胞機能を苦味もしくは甘味経路ニューロンのみに限定して明らかにできる。本研究では苦味・甘味経路ニューロンの細胞機能を単一細胞レベルで明らかにし、それらニューロンの役割(不快・快情動や忌避性・嗜好性行動の発現に果たす役割)を導出する際に有用な脳内味覚機能地図を創製する。

3. 研究の方法

(1) 発生工学的トレーシングと苦味・甘味経路ニューロンの脳内局在の可視化

苦味受容味細胞もしくは甘味受容味細胞に選択的に経ニューロン性トレーサー(WGA-DsRed)を発現するトランスジェニックマウスにおいて、橋・扁桃体・網様体・視床下部の各脳領域で味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味・甘味経路ニューロンの三次元的空間配置を比較解析した。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 を受け取るニューロンの脳内局在を蛍光顕微鏡下で DsRed 蛍光をもとに検出し明らかにした。そして苦味経路ニューロンもしくは甘味/うま味経路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単一細胞レベルで解析した。

(2) WGA-DsRed 標識ニューロンに発現する分子の免疫組織化学的解析

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、DsRed の蛍光検出により同定された WGA-DsRed 標識ニューロンに発現する分子を免疫組織化学的に明らかにし、苦味経路ニューロンのニューロン種を解析した。

(3) ホールセルパッチクランプ法による WGA-DsRed 標識ニューロンのシナプス伝達機構の解析

WGA-DsRed で標識された苦味経路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ニューロン種の同定と細胞機能の解析を行った。200 μm 厚の新鮮脳スライス標本を得て、正立型蛍光顕微鏡下で DsRed の蛍光検出と細胞形態の微分干渉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 MgCl_2 , 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 10 mM glucose, 2 mM Na_2ATP , 0.5mM Na_2GTP , 1mM Lucifer Yellow を、細胞外溶液は 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 25 mM NaHCO_3 , 10 mM glucose を使用し、-80mV 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 標識ニューロンの中で、WGA-DsRed は核周囲および樹状突起・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。ホールセルパッチクランプ時において同時に、標識されたニューロンがどのように樹状突起を伸長させているか、そ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。

(4) 各種 in vivo 刺激により活性化される WGA-DsRed 標識ニューロンの c-fos 発現を指標とした検出

各種 in vivo 刺激後に WGA-DsRed 標識ニューロンが c-fos (活性化したニューロンで発現誘導される最初期遺伝子) を発現するか否かを免疫組織化学的に検出し、味覚経路ニューロンがいかなる in vivo 刺激時に活性化されるかを明らかにした。口腔内に水 (Water)、苦味溶液 (1 mM cycloheximide)、甘味溶液 (1 M Sucrose)、もしくは腹腔内にリン酸緩衝液 (ip PBS)、内臓感覚不快感を惹起する LiCl (ip LiCl : 150 mM LiCl を体重の 2% 量) を投与後、45 分後に脳を摘出し、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、抗 c-fos 抗体を用い、c-fos 発現を免疫組織化学的に検出した。そして WGA-DsRed 標識ニューロンにおいて、各種刺激により c-fos の発現が誘導されているかを解析し、WGA-DsRed 標識ニューロンを活性化させる刺激条件を明らかにした。

(5) 味覚嫌悪学習の獲得時の味覚経路ニューロンの可塑性の検討

味覚嫌悪学習 (生得的に嗜好性を示す甘いサッカリン溶液【味覚による条件刺激 (CS)】を飲ませた直後に内臓不快感を生じさせる LiCl を腹腔内投与【内臓感覚による無条件刺激 (US)】することにより、両刺激を連合させると、その後サッカリン溶液 (CS) に忌避性を示す) の獲得の前で、味覚による条件刺激 (CS) への反応性に変化が生じるかを探究した。則ち、嫌悪感を惹起する苦味の情報を受け取る、WGA-DsRed により標識された扁桃体苦味ニューロンについて、サッカリン甘味刺激 (CS) により活性化されるか否かを最初期遺伝子 Zif268 の発現誘導を指標にして検出し、学習獲得前後でいかなる差異が生じるかを精査した。

4. 研究成果

(1) 苦味経路ニューロンの橋・扁桃体・網様体・視床下部の各脳領域における局在

苦味受容細胞に選択的に経ニューロン性トレーサー (WGA-DsRed) を発現するトランスジェニックマウスにおいて、橋・扁桃体・網様体・視床下部の各脳領域で味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味経路ニューロンの三次元的空間配置を単一細胞レベルで解析した。WGA-DsRed により標識される苦味経路ニューロンの細胞体が、橋・扁桃体・網様体・視床下部の脳領域内でどのような三次元的空間配置を示すかを DsRed の蛍光検出により明らかにした。苦味経路ニューロンは橋結合腕傍核においては後方の medial 側と前方の external lateral 側に局在しており、網様体では延髄孤束核後方の苦味経路ニューロンに近接した領域に集積していた。苦味経路ニューロンは扁桃体においては medial amygdala 領域に集積しており、視床下部では paraventricular nucleus 領域に集積していた。次に可視化された苦味経路ニューロンの細胞機能を単一細胞レベルで解析し、苦味経路ニューロンの橋・扁桃体・視床下部内での局在と細胞機能との対応を解析した。

(2) 橋結合腕傍核の後方 medial 側と前方 external lateral 側に局在する苦味経路ニューロンの細胞機能の比較

WGA-DsRed で標識される苦味経路ニューロンは橋結合腕傍核においては後方の medial 側と前方の external lateral 側に局在している。橋結合腕傍核の苦味経路ニューロンの発現分子 (Melanocortin 4 receptor (MC4R), 1-adrenergic receptor, 2-adrenergic receptor, mGluR7, mGluR1, CGRP, Substance P, Somatostatin, Tyrosine hydroxylase, Glutamate decarboxylase, VGLUT2) を免疫組織化学的に検出し、ニューロン種を規定する分子やシグナル伝達に關与する分子の発現を、後方 medial 側と前方 external lateral 側の苦味経路ニューロンで比較した。橋結合腕傍核の前方の external lateral 側に局在するニューロンの一部は CGRP を発現するニューロンであり、CGRP を分泌し、シナプス伝達もしくはシナプス伝達修飾を行うニューロンであることが考えられた。また前方 external lateral 側の苦味経路ニューロンの一部には MC4R を発現するニューロンが観察され、neuromodulator である -MSH により機能調節されることが示唆された。また前方 external lateral 側の苦味経路ニューロンの一部には

VGLUT2 発現が観察され、グルタミン酸を伝達物質として放出する興奮性ニューロンであることが示唆された。

橋を含む新鮮脳スライス標本において、苦味経路ニューロンの樹状突起構造を WGA-DsRed 標識ニューロン内へ蛍光色素を注入することにより明らかにするとともに、苦味経路ニューロンのシナプス伝達の分子機構とその修飾機構をホールセルパッチクランプ法により解析した。橋結合腕傍核では後方の medial 側と前方の external lateral 側の苦味経路ニューロンにおいて neuromodulator への応答性に違いが観察された。

後方 medial 側と前方 external lateral 側の苦味経路ニューロンが苦味情報を選択的に受け取り処理するか、他の味覚情報や内臓感覚情報も受け取り情報統合を行うかを、各種刺激で活性化されるニューロンを c-fos 発現を指標として検出し分析した。後方 medial 側の苦味経路ニューロンは苦味情報を選択的に受け取り処理するのに比較し、前方 external lateral 側の苦味経路ニューロンは苦味刺激および内臓感覚不快感を惹起する刺激でともに活性化され、両情報を統合し処理することが示唆された。

以上より、後方 medial 側と前方 external lateral 側の苦味経路ニューロンには、ニューロン種・シナプス伝達及び伝達修飾・刺激応答選択性に違いが観察され、異なる細胞機能を有することが明らかとなった。ゆえに後方 medial 側と前方 external lateral 側の苦味経路ニューロンは異なる役割を有することが示唆される。

(3) Medial amygdala 領域に局在する苦味経路ニューロンにおいて味覚嫌悪学習の獲得時に観察される可塑性

扁桃体においては WGA-DsRed により標識される苦味経路ニューロンは medial amygdala 領域に集積している。この medial amygdala 領域の苦味経路ニューロンについて、味覚嫌悪学習の獲得前後で味覚による条件刺激(CS)への反応性に変化が生じるかを最初期遺伝子 Zif268 の発現を免疫組織化学的に検出することにより探究した。Medial amygdala 内の苦味経路ニューロンにおいては、味覚嫌悪学習獲得前に比較し、学習獲得後にサッカリン甘味刺激(CS)で活性化されるようになるニューロンが顕著に増加することが、Zif268 の発現誘導の免疫組織化学的検出により明らかとなった。

Medial amygdala 内の苦味経路ニューロンは味覚嫌悪学習の消去獲得(memory extinction)後にも、サッカリン甘味刺激(CS)で顕著に活性化されることが持続した。Medial amygdala において、味覚嫌悪学習獲得後にのみ甘味刺激(CS)で活性化されるようになるニューロンは、学習獲得時に機能変化を起こし、学習獲得に責任的役割を果たすニューロンの候補と考えられる。ゆえに Medial amygdala の苦味経路ニューロンについて、学習獲得時に機能変化を起こし、活性化パターンを変化させる機構を今後明らかにすることは、とても重要である。

(4) 苦味経路ニューロンの視床下部内局在と保有する細胞機能との関連

味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味経路ニューロンは視床下部領域において、61.9%は Paraventricular nucleus (PVN)、10.3%は Medial preoptic nucleus (MPO)、9.5%は Periventricular nucleus, preoptic part (PvPo)で検出された。視床下部 PVN 領域に局在するニューロンの一部は corticotropin-releasing hormone (CRH)を発現するニューロンであることが検出された。MPO 領域に局在する苦味経路ニューロンに比較し、PVN 領域に局在する苦味経路ニューロンは口腔内水刺激に比べ苦味刺激で顕著に活性化されることが c-fos 発現誘導の検出により明らかとなり、視床下部 PVN 領域に局在する苦味経路ニューロンは、苦味刺激によるストレス応答に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉田 誠、北川道憲
2. 発表標題 カルバコールにより誘発される顎下腺水分泌の細胞外グルコース濃度依存性
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Sugita, Kuniyo Yamamoto
2. 発表標題 Information processing in brainstem bitter taste-relaying neurons
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田 誠
2. 発表標題 発生工学的トレーシングを基盤とした橋結合腕傍核の苦味経路ニューロンの機能同定
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学大学院医系科学研究科口腔生理学研究室ホームページ
<https://oralphysiology.wixsite.com/hiroshima>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------