

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04111

研究課題名（和文）舌から脳への塩味表現を担う細胞・神経システムの解明

研究課題名（英文）Neural mechanisms underlying salty taste in the tongue and brain

研究代表者

野村 憲吾（Kengo, Nomura）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10734519

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、塩分過剰摂取の原因となる「美味しい」塩味が生じる末梢細胞メカニズムを解明し、その情報を受けて行動に影響を与える中枢神経回路のロジックを明らかにすることを目的として実施した。具体的には、下記の4つの計画：（Ⅰ）末梢の快塩味細胞の同定と、その情報伝達機構の解明（Ⅱ）光遺伝学を用いて人工的に塩味を創出する技術の開発、（Ⅲ）光標識技術を活用した、ナトリウム味応答ニューロンの同定、（Ⅳ）食塩の摂取をコントロールするための味応答神経の探索に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、塩分過剰摂取の原因となる「好ましい」塩味が生じる仕組みの一端を解明することで、科学的根拠に基づく減塩方策の立案に通ずる。

研究成果の概要（英文）：The Aim of the study was to elucidate the peripheral cellular mechanisms underlying attractive salty taste, which leads to excessive salt intake, and to clarify the neuronal circuit that processes this information and regulate behavior. Specifically, the study pursued four objectives: (I) identifying peripheral cells responsible for the perception of pleasant salty taste and understanding their signaling mechanisms, (II) developing optogenetic techniques to artificially induce salty taste, (III) identifying neurons responsive to sodium taste through photolabeling technology, and (IV) identifying taste-responsive neurons involved in regulating salt intake.

研究分野：生理学

キーワード：食塩 味覚 神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食塩 (NaCl) 摂取過多は循環器疾患の重大なリスク因子である。日本人の食塩摂取量 (10.7g) は日本高血圧学会の減塩目標値 (6g) を大きく上回っているが、その根本原因は NaCl が“美味しい”ことにある。すなわち、舌での NaCl 感知 脳での情報処理 摂取の継続、といった一連の行動を担う細胞基盤を解き明かす研究には、予防医学の観点から社会的な訴求があると考えられる。

学術的「問い」 食べ物の味は、舌の味細胞の活性化が、味神経を通じて脳へ伝達されることで感じられる。NaCl は、“美味しい塩味”と“不快な味”の両方を持ち、2シグナルのバランスが NaCl の味を決めると考えられる。不快な味は KCl など非 Na⁺塩でも生じる一方、“美味しい塩味”は Na⁺塩でのみ生じ、舌の Na⁺センサーである上皮型 Na⁺チャネル (ENaC) を介して感じると考えられている。以下、食塩の美味しさを担う Na⁺の味をナトリウム味と呼ぶ。

しかし、多種多様な ENaC 発現細胞のうち、どの細胞が“美味しい”ナトリウム味をコードする細胞なのか特定できず、研究は停滞している。これが足枷となり、ENaC から脳、行動に至る細胞機構、分子機構の謎が手付かずのまま残されている。

申請者の所属研究グループではこれまでに、甘/うま/苦味の受容細胞に発現する電位依存性 ATP 放出チャネルとして CALHM1/3 チャネルを同定した。さらに、味細胞の活性化 (活動電位の発生) にともなって CALHM1/3 が神経伝達物質 ATP を放出し、味細胞から味神経への情報伝達に必須の分子であることを明らかにしてきた。そして最近、ENaC 発現細胞のうち、CALHM1/3 チャネルを共発現する集団が、“ナトリウム味”をコードする細胞であることを示唆するデータを得た。この知見は、ナトリウム味細胞の同定につながるとともに、ナトリウム味の伝達にも CALHM チャネルが関与する可能性を示唆する。

さらに最近、この味細胞の活動を選択的に制御するための実験系の構築、および必要な遺伝子改変マウスの作出が完了しつつある。この技術は、任意のタイミングと強度で疑似的ナトリウム味を発生させることを可能となり、末梢から中枢に至るナトリウム味のコーディング機構を世界に先駆けて解明する好機をもたらす。

2. 研究の目的

そこで本研究は、末梢から脳へ“美味しい”ナトリウム味を伝達するメカニズムを解明するとともに、その情報を受けて NaCl の摂取行動を制御するための神経回路基盤まで明らかにすることを目的とする

3. 研究の方法

3-1. 動物

実験に使用したマウスは、生後 21 日目に離乳し、尾端から遺伝子型を決定した。マウスは 12 時間明暗サイクル (午前 8 時点灯) の条件下で飼育し、実験に必要な場合を除き、飼料と飲用水は自由に摂取させた。行動試験に使用するマウスはプラスチックケージ (136 32083115 mm, CL-0113-02, CLEA Japan, Tokyo, Japan) で単独飼育した。また、実験には 14 週齢以上のマウスを使用した。

3-2. 味覚応答行動の解析 (Brief-access リックテスト)

リックテスト装置 (LKT-16, Melquest 社) を用い、先行研究と同様の手法でマウスの味覚応答行動を評価した^(1,2)。具体的には、マウスに各種味覚試験溶液あるいは対象溶液として水を入れた飲水瓶、あるいは飲み口先端にプラスチック光ファイバー取り付け付けた飲水瓶を提示し、飲水瓶をリックした (溶液を舐めとった) 時点から 5 秒間の舐め回数を計測した。5 秒後に飲水瓶の提示を終了し、8 秒後に別の溶液を入れた飲水瓶を提示した。これを繰り返して各種溶液をランダムにマウスへ提示し、溶液間での舐め回数を比較することで味覚応答を評価した。マウスは事前に訓練しておき、テスト装置内で 5 秒間の飲水を繰り返しおこなえることを学習させた。実験をおこなう際には、マウスをあらかじめ 24 時間の絶水あるいは 24 時間の塩分欠乏状態にしておいた。塩分欠乏状態にする場合には、飼料を低塩分食に変更することに加えて、利尿剤であるフロセミドを投与した (50 mg/kg BW, 腹腔内投与)。

舌への光照射をおこなう場合には、飲み口先端にプラスチック光ファイバー取り付け付けた飲水瓶を提示した。光ファイバーはマウスが飲み口を舐めた際に舌に光が照射されるよう、飲み口中心に設置したが、ファイバーに舌が直接接触しない位置であり。光照射はマウスの舌が飲み口に接触した時点から 1 秒間おこない、445 nm の青色レーザー光を実験に応じて 1~40 mW の範囲で調節した。その際、レーザー光は持続的に照射、あるいは 50% の ON/OFF サイクルで 5 Hz~40 Hz の周期的な照射をおこなった。

3-3. 求心性味神経応答の計測

先行研究と同様の手法でマウスの求心性味神経(鼓索神経)の応答を評価した^(1,2)。具体的には、マウスをUrethaneの腹腔内投与(1.0~1.5 g/kg BW)によって麻酔したのち、鼓索神経線維を剖出して中枢側で切断し、末梢側の線維を白金電極と接続した。神経線維の乾燥を防ぐ目的で線維と電極の接続部はミネラルオイル中に浸漬した。リファレンス電極は咬筋に接続した。神経活動はアンプ(DAM-80, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)で低周波と高周波をそれぞれ10Hzと1,000Hzのカットオフで除去し、10,000倍に増幅したものをサンプリングレート10kHzで記録した(PowerLab; AD Instruments, Colorado Springs, CO, USA)。記録後、低周波カットオフ100Hzでさらにフィルターをかけたのち、Lab Chartソフトウェア(AD Instruments)を用いて時定数1.0sで積分した。舌への光照射をおこなう場合には、マウスの舌表面から1.0 mm離れた位置にプラスチック光ファイバーの先端を設置した。光照射はマウスの舌が飲み口に接触した時点から1秒間おこない、445 nmの青色レーザー光を実験に応じて1~40 mWの範囲で調節した。その際、レーザー光は持続的に照射、あるいは50%のON/OFFサイクルで5 Hz~40 Hzの周期的照射をおこなった。神経応答は、100 mMのNH₄Cl溶液を舌に添加した際の応答を1.0として標準化した。

4. 研究成果

() 末梢塩味細胞の同定と、その情報伝達機構の解明

『仮説: ENaC と CALHM を共発現する細胞が、ナトリウム味をコードする』を検証した。この細胞は、ENaC を介した Na⁺流入に伴って活動電位を生じ、CALHM チャネルを介した電位依存性 ATP 放出をおこなうことで、ATP 受容体を発現する味神経へ情報を伝達すると考えられる。

-A. 細胞レベルでの検証 まず、この細胞が他の味細胞(甘味など)と異なる集団であるか、マウス舌組織の各種味細胞マーカーを免疫染色して確認した。次に、電気生理学的解析をおこない、ENaC 電流 電位依存性 Na⁺チャネル電流 CALHM チャネル電流 のカスケードを検証した。

-B. 個体レベルでの検証 個体の味神経応答/行動応答を調べ、当該味細胞がナトリウム味を担うこと、および末梢味神経への情報伝達に CALHM チャネルが関与するか調べた。実験には、CALHM 発現細胞で ENaC サブユニットを欠損する ENaC-ckO マウスを使用した。神経応答の検証では、求心性味神経(鼓索神経)の電気活動を測定した。行動応答の検証では、NaCl 溶液を提示する給水管を舐める回数を計測し、嗜好行動を評価した。この一連の研究の結果、ナトリウム味を担う舌の味蕾細胞を同定し、その細胞内情報伝達機構、神経伝達機構を解明した。

() 光を用いて人工的に塩味を創出する技術の開発

この計画では、末梢味細胞の操作に光遺伝学を取り入れ、同定した細胞がナトリウム味を生み出す細胞であることを証明する。ナトリウム味細胞が ENaC 活性を持つことは、ENaC 構成サブユニットの と を共発現することを示す。そこで、ENaC -Cre ; ; ENaC -tTA ダブルノックインマウスと Ai134 マウスを交配した。Ai134 は、Cre と tTA が共発現する細胞で、光感受性陽イオンチャンネル(ChR2)を発現する。この“塩味 ChR2 マウス”の舌に青色光を照射すると、ChR2 が開口して陽イオンが流入し、ナトリウム細胞を選択的に活性化させることができる。CALHM 発現細胞で ChR2 を発現するマウス(ナトリウム味を含む多種味細胞に ChR2 を発現する)を塩分欠乏状態にして Na⁺を欲求させると、青色光を発する飲み口を好んで舐めるか調べた。さらに、“塩味 ChR2 マウス”を用いた行動実験によって、ナトリウム味のみが選択的に発生しているか調べた。

() 活動ニューロンの光標識法を活用した、Na 応答ニューロンの同定

味覚の情報伝達を担う神経回路に関して、甘味や苦味の情報は、一次味覚野を経て認識/情動/行動が制御されるのに対し、ナトリウム味の情報は、結合腕傍核 PBN から多様に分岐し、認識/情動/行動を司る各脳領域に情報が伝達されると考えられる(Exp Physiol. 93:177, 2008)。そこで、脳深部イメージングと活動ニューロンの光標識を組み合わせ、PBN でナトリウム味の味を担うニューロンを探索した。活動依存的標識技術を用いて標識した塩味応答細胞を FACS で分取し、一細胞トランスクリプトーム解析(RNA-Seq)をおこなった。

() 食塩の摂取を制御するための味応答神経の探索

ナトリウム味の味に反応して、その摂取行動を制御する神経回路は未だ不明である。この原因は方法論にあり、従来のアプローチ(脳の破壊/薬剤投与など)のように、ある脳領域を広く抑制するような実験では、この問題を解くことはできない。そこで申請者は、最新の光遺伝学アプローチを取り入れ、特定の神経回路を形成するニューロンだけを任意のタイミングで操作する実験をおこない、この問題を解決する。

-A. PBN ニューロンの投射先の探索

光遺伝学ツール(ChR2)を Cre 依存的に発現するウイルス(AAV-hSyn-DIO-ChR2-EYFP)を、Vglut2-Cre マウスの PBN に感染させた。これにより、PBN の興奮性(Vglut2 陽性)ニューロンの細胞体と神経線維に ChR2-EYFP が発現するので、EYFP 陽性線維の分布をもとに投射先を探索し、快情動や報酬予測に関与することが知られている神経核、すなわち塩の摂取行動の促進に関与する

候補神経核を得た。

-B. 塩分摂取を誘導する PBN 神経回路の探索

その後、PBN の投射先（神経核 X）に青色光を照射し、PBN 的に抑制する実験をおこない、回路の検証をおこなった。

神経核 X の神経回路だけを選択

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〕

〔その他〕

-

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
---------	---------