

## 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6月11日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580147

研究課題名（和文）モデル小型魚類を用いた食嗜好・忌避に関する味覚シグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文）Investigation of preferable- and aversive-taste signal transduction machinery using model fish species

研究代表者

安岡 顕人（YASUOKA AKIHITO）

前橋工科大学・工学部・准教授

研究者番号：10453028

研究成果の概要（和文）：我々は魚類の味覚レセプターである fT1R と fT2R を同定し、そのエフェクターであるホスホリパーゼ C (mfplc- $\beta$ 2) が好悪の行動を引き起こす中枢への味覚伝達において重要な役割を果たしていることを示してきた。この味覚伝達に関わる神経回路を解析するため、経シナプストレーサーレクチンである WGA を mfplc- $\beta$ 2 の転写制御領域で発現させた遺伝子導入メダカを作出した。このメダカを免疫組織化学染色したところ、WGA タンパク質が脳のいくつかの感覚中継核や運動核に輸送されていることが明らかになった。WGA のシグナルは2次味覚核や視床の幾つかの核で検出された。終脳においては、哺乳類の扁桃体や海馬に相当すると予想される領域も WGA 陽性であった。本研究は特定の末梢感覚細胞に連絡する高次の味神経回路を追跡した最初の事例であり、脊椎動物に共通な味覚情報処理に関わる神経の基本的な枠組みを理解する一助となるであろう。

研究成果の概要（英文）：We have identified fish taste receptor orthologs, fT1R and fT2R and shown that their effector, phospholipase C (plc- $\beta$ 2) plays a key role to transmit taste stimuli to the central nervous system evoking favorable and aversive behavior. To analyze the neuronal circuit for this taste transduction, we generated transgenic medaka expressing a trans-synaptic tracer lectin (WGA) under the control of a medaka plc- $\beta$ 2 gene regulatory region. The immunohistochemical analysis of the transgenic fish revealed that WGA protein can be transferred to the several sensory and motor nuclei in the brain. WGA signals were detected in the secondary gustatory nucleus and the other nuclei in the thalamic regions. In the endbrain, the regions presumably corresponding to the amygdala and the hippocampus of mammals, were also WGA positive. This is the first case of directional tracing of higher order gustatory nerve circuit connected to the specific subpopulation of peripheral sensory cells and may help us to understand the basic neuronal architecture of gustatory information processing common in vertebrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品科学、味覚シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

近年の味覚レセプターの発見により、味覚伝達の分子機構の理解が進みつつある。哺乳類 T1R1/3 ヘテロマーはアミノ酸などの旨味物質、T1R2/3 ヘテロマーはショ糖などの甘味物質、T2R は苦味物質を受容する。また、酸味受容チャネル PKD2L1 も同定されている。最近、我々はメダカとゼブラフィッシュの味覚レセプター fT1R と fT2R を同定し、これらの機能を解析した。fT1R ヘテロマーはアミノ酸で活性化され、甘味物質では活性化されなかった。fT2R は苦味物質デナトニウムで活性化された。また、我々はメダカがアミノ酸を嗜好し、デナトニウムを忌避することを明らかにし、この好き嫌いが、味受容細胞に発現するホスホリパーゼ C (plc- $\beta$ 2) のシグナルを阻害すると失われることを示した。これより、モデル魚類は脊椎動物の原型的な味覚受容系を備えていることが示唆された。

## 2. 研究の目的

小型魚類をモデルとして、味覚情報の伝達過程とその結果引き起こされる生理現象の栄養学的意義を分子遺伝学および行動学的手法により明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) WGA 遺伝子を用いたメダカの味覚神経回路の標識

小麦胚芽レクチン(WGA)はシナプス分泌に従って細胞間を移動する性質を持つタンパク質である。細胞特異的なプロモータで制御された WGA 遺伝子を個体に導入することにより、特定の感覚神経回路を標識することが可能である。既に我々はマウスの味覚系において、味受容細胞(1次)、味覚神経細胞(2次)、さらに延髄の神経細胞(3次)の標識に成功している。既に同定したメダカ PLC- $\beta$ 2 プロモーターと WGA 遺伝子を連結し、メダカに導入する。このメダカにおいては、fT1R と fT2R を発現する味細胞に連絡する神経細胞が標識されることが予想される。

(2) 味覚に関する変異体のスクリーニング

申請者はメダカの感覚神経の形成に関与する変異体の大規模スクリーニングプロジェクトに参加しており、ここで得られた変異体、あるいは変異精子ストックの中に目的とする変異体が含まれる可能性は高い。変異体の形態学的表現型を味覚神経の染色や、すでに開発した味蕾細胞に GFP を発現するトランスジェニックメダカと交配することにより解析する。行動学的表現型についても、既に開発した人工食餌アッセイ系を用いて解析する。

## 4. 研究成果

(1) mfp1c- $\beta$ 2-WGA 遺伝子を導入したトランスジェニックメダカを作製し、味蕾での細胞特異的な発現の確認を行ったところ、アミノ酸受容細胞と苦味物質受容細胞を含む内在の plc- $\beta$ 2 発現細胞にのみ WGA タンパク質が検出された。酸味を受容すると予想される PKD2L1 発現細胞には検出されなかった。また、脳における異所的発現は mRNA、タンパク質ともに検出されなかった(学会発表 4、5)。このメダカの脳における WGA タンパク質の分布を詳細に解析した。延髄には、味蕾に連絡する感覚脳神経の一次中継核である顔面葉と迷走葉が存在する。ここに WGA が検出された。また延髄の腹側に存在する網様体や運動核にも強いシグナルが見られた。この経路は摂食時の反射に関与しており、哺乳類の延髄孤束核、網様体、運動核に対応していると考えられる。中脳においては、視床や視床下部の一部に WGA 陽性な細胞が存在した。興味深いことに、高次な中枢の存在する終脳においても、複数の部位に WGA が輸送されていた。最近の研究によると、これらの部位は哺乳類の扁桃体(好悪などの意味付けに関与)や海馬(記憶に関与)に相当すると考えられている。このことは、メダカにおける味覚情報の処理が、哺乳類と基本的に同様の高次な中枢を介して行われていることを示唆する。また、末梢の特定の味受容細胞から高次の神経核につながる神経回路を標識した点でも、本結果は初めての事例である(学会発表 1-3、Journal of comparative neurology 二次審査中)。

(2) 以上の研究と並行して、側線神経に異常を示すメダカの変異体として同定された yanagi (yan) について、その味覚系神経の形態学的解析を行った。すでに yan の原因遺伝子はケモカイン受容体 CXCR7 であることが明らかになっており、ホモ個体は生存可能である。yan ホモ個体幼魚の神経系をホールマウント蛍光標識し、共焦点顕微鏡で観察したところ、顔面神経と迷走神経に形態異常を持つことが明らかになった。yan 変異体を用いた味覚伝達系への順遺伝学的なアプローチが可能であると考えられる。

## 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 2 件)

[学会発表] (計 12 件)

① 家木誉史、岡田晋治、藍原祥子、應本真、阿部啓子、安岡顕人、三坂巧、「メダカ PLC-

β2 発現細胞を起点とした経シナプス性トランスミッター輸送の経時的解析」、日本農芸化学会、2012/03/24 京都

② Takashi Iekil, Shinji Okada, Yoshiko Aihara, Makoto Ohmoto, Keiko Abel, Akihito Yasuoka, Takumi Misaka "Transgenic labeling of the gustatory neural pathway originating from phospholipase C-β2-expressing taste receptor cells in medaka fish" The association for chemoreception sciences annual meeting, Apr. 14 2011 Tampa, Florida, USA

③ 家木誉史、岡田晋治、藍原祥子、應本真、阿部啓子、安岡顕人、三坂巧、「トランスジェニックメダカを用いた高次味覚中枢領域の標識」、日本農芸化学会、2011/03/26 京都

④ Akihito Yasuoka, Takashi Iekil, Shinji Okada, Yoshiko Aihara, Makoto Ohmoto, Keiko Abe, and Takumi Misaka "Transgenic labeling of a neuronal circuit connected to phospholipase C-β2-expressing taste bud cells in the model fish, medaka, reveals the presence of a common gustatory transduction pathway conserved among teleosts and mammals." The 8th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception Nov. 6 2010 Fukuoka, Fukuoka, Japan

⑤ 高木陽介、齊藤健佑、岡田晋治、小林裕幸、市川創作、安岡顕人、三坂巧、阿部啓子、「酸封入人工餌を用いたモデル魚類の酸味嗜好性評価系の開発」、日本農芸化学会、2010/03/29 東京

⑥ 家木誉史、岡田晋治、藍原祥子、安岡顕人、應本真、三坂巧、阿部啓子、「経シナプスレーザーを用いたメダカの味覚情報伝達経路の可視化」、日本農芸化学会、2010/03/28 東京

[図書] (計1件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安岡 顕人 (YASUOKA AKIHITO)

前橋工科大学・工学部・准教授

研究者番号：10453028