様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号：１２６０１

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：２３６８８０１６

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Research on gustatory conding using novel synaptic tracers

研究代表者

岡田　晋治（Okada, Shinji）

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：５０３７６５６３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　21,000,000円、（間接経費）　6,300,000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、受容された味情報の神経伝達や中枢での認識という味覚情報のコーディング機構は不詳である。その解明のため、本研究では、2種以上の細胞を起点とする情報伝達神経回路の可視化を実現する新規の経シナプス性トレーサー・トランスジーンを開発した。開発したトレーサー・トランスジーンを用いてトランスジェニックメダカを作出することで、2種の異なる味細胞を起点とした情報伝達神経回路の相関を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It has been revealed that gustatory informations for five taste modalities are mediated by distinct taste bud cell populations in peripheral. However, it remains unknown that the coding mechanisms including neural pathways transducing such informations and information processing in the central nervous system. To elucidate these matters, novel trans-synaptic tracer transgenes were developed in this study. These developed tracer transgenes enabled the visualization of neural circuits originating from two distinct cell populations and the analysis on the correlation between these circuits. The correlation between the neural circuits originate from two populations of taste receptor cells were revealed in this study.

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：食品化学　味覚　神経　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運ばれる (labeled line モデル) のか、途中で統合されるのか (across fiber pattern モデル) のかという、味覚情報の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・旨味受容細胞、苦味受容細胞を起点とした伝達経路の可視化に成功している (Ohmoto M. *et al.*, *Mol. Cell. Neurosci.*, 2008; Ohmoto M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010)。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（投稿論文 4)。しかしながら、現在のところ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る。2 種以上の味情報伝達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の必要性に直面している。

２．研究の目的

本研究では、特定の味細胞を起点とした味覚情報伝達経路を可視化し、未だ不詳である脊椎動物の味覚情報コーディング機構を解明すること目的とした。マウスおよびメダカにおいて、2 種以上の基本味の情報伝達経路を区別して可視化し、各経路の相関を明らかにすることを最終目標とした。具体的には、以下の実現を目指した。

(1) 2 種以上の細胞を起点とする情報伝達神経回路の可視化を実現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
(2) 経シナプス性トレーサーを用いた、マウスの味細胞を起点とする情報伝達神経回路の相関関係の解明
(3) 経シナプス性トレーサーを用いた、メダカの味細胞を起点とする情報伝達神経回路の相関関係の解明

３．研究の方法

(1) 新規の経シナプス性トレーサー・トランスジーンの開発
①トレーサー候補の遺伝子配列をベクターに組み込みトランスジェニック (Tg) メダカ作出用コンストラクトを作出した。
②上記コンストラクトの受精卵への微量注入によって Tg メダカを作出した。
③作出した Tg メダカにおけるトレーサー候補 mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによってしらべた。
④作出した Tg メダカにおけるトレーサー候補タンパク質発現・神経輸送を免疫組織化学染色によってしらべた。

(2) 経シナプス性トレーサーを用いた、マウスの基本味情報伝達神経回路の相関関係の解明
①マウス各味細胞種のマーカー遺伝子のプロモーター候補配列を PCR によって取得した。
②上記の候補配列をトレーサー・トランスジーン上流に接続したコンストラクトを作出した。

(3) 経シナプス性トレーサーを用いた、メダカの基本味情報伝達神経回路の相関関係の解明
①メダカ各味細胞種のマーカー遺伝子のプロモーター配列の取得
①-1 メダカ各味細胞種のマーカー遺伝子のプロモーター候補配列を PCR によって取得した。
①-2 上記候補配列を EGFP 遺伝子上流に接続したコンストラクトを作出した。
①-3 上記コンストラクトの受精卵への微量注入によって Tg メダカを作出した。
①-4 作出した Tg メダカの味蕾および全身における EGFP 発現を蛍光顕微鏡観察によってしらべた。
①-5 作出した Tg メダカの味蕾細胞における EGFP mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによってしらべた。
①-6 作出した Tg メダカの味蕾細胞における EGFP mRNA 発現細胞種を各種マーカー遺伝子プローブと EGFP 遺伝子プローブとを用いた二重標識 *in situ* ハイブリダイゼーションによってしらべた。
②メダカの基本味情報伝達神経回路の相関関係の解析
②-1 メダカ各味細胞種のマーカー遺伝子のプロモーター配列をトレーサー・トランスジーン上流に接続したコンストラクトを作出した。
②-2 上記コンストラクトの受精卵への微量注入によって Tg メダカを作出した。
②-3 作出した Tg メダカをトレーサーmRNA・タンパク質発現をもとに選別し、系統化した。系統化した Tg メダカ 2 種を掛けあわせ、二

重 Tg メダカを作出した。
②-4 二重 Tg メダカの薄切切片に対して二重免疫組織化学染色を行い、2 種のトレーサータンパク質を検出し、各回路の相関を解析した。

４．研究成果

まず、トランスジェニックメダカを用いた新規経シナプス性トレーサー・トランスジーンの評価系の改善を目指し、コンストラクト構成の変更、遺伝子注入量の最適化、解析時期の検討などを行い、評価系を確立した。この評価系によって約 2-3 週間でトレーサー・トランスジーンの評価が可能となり、評価の効率化が実現した。

次に、この評価系を用いて、トレーサー・トランスジーン候補を 2 種選定して、これらについて発現コンストラクトを作製し、検討を行ったところ、両者共にトレーサー・トランスジーンとして利用可能であることが強く示唆された。

2 種の新規経シナプス性トレーサー・トランスジーンと、既知のトランスジーンである小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin, WGA) との性質の違いをしらべることを目的に、同一プロモーターで 3 種のトレーサー・トランスジーンを発現する Tg メダカ系統の作出を行った。系統化した Tg メダカに対して各種染色を行い、その輸送活性を評価した。2 種の新規経シナプス性トレーサー・トランスジーンは、WGA よりは弱いが、十分な活性を有していることを明らかにした。

また計 3 種の経シナプス性トレーサー・トランスジーンを用いて、情報伝達神経回路の相関解析が行えるかを検討した。メダカホスホリパーゼ C-beta 2 (mfplcb2) プロモーターでトランスジーンを発現誘導した Tg メダカ系統と、t1r1 プロモーター（本研究で取得）で異なるトランスジーンを発現誘導した Tg メダカ系統とを掛けあわせて二重 Tg メダカを作出した。それらを各種染色に供した。その結果、各トレーサーを別々に検出出来る系を確立し、情報伝達神経回路の相関解析が可能であることが強く示唆された。

これらの結果から、本研究の核となる新規トレーサー・トランスジーンの開発に成功したと考えている。新規トレーサー・トランスジーンの開発によって複数の情報伝達神経回路の相関の解析が可能となった。これらのトレーサー・トランスジーンは味覚と同じ化学感覚である嗅覚や視覚のコーディング機構の解明や、脳の神経回路形成の解明などに大きく寄与することが予想される。

今後は味覚情報コーディングに関する知見の蓄積が進んでいるマウスを対象にした研究を計画している。本研究で作製したコンストラクトを用いて、Tg マウスを作出する。さらに二重 Tg マウスを作出して、そのマウスを用いて、味覚情報伝達神経回路の相関解析を行い、味覚情報コーディング機構の解明を進めたい。

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 16 件）

① Toda, Y., Nakagita, T., Hayakawa, T., Okada, S., Narukawa, M., Imai, H., Ishimaru, Y., and Misaka, T., Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor)., *J. Biol. Chem.* 288, 36863-36877, 2013. DOI:10.1074/jbc.M113.494443. 査読有

② Kamei, A., Watanabe, Y., Kondo, K., Okada, S., Shinozaki, F., Ishijima, T., Nakai, Y., Kondo, T., Arai, S., and Abe, K., Influence of a short-term iron-deficient diet on hepatic gene expression profiles in rats., *PLoS ONE* 8, e65732, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0065732. 査読有

③ Maeda, N., Kawakami, S., Ohmoto, M., Coutre, J. L., Vinyes-Pares, G., Arigoni, F., Okada, S., Abe, K., Aizawa, H., and Misaka, T., Differential Expression Analysis throughout the Weaning Period in the Mouse Cerebral Cortex., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 437-443, 2013. DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.150. 査読有

④ Ieki, T., Okada, S., Aihara, Y., Ohmoto, M., Abe, K., Yasuoka, A., and Misaka, T., Transgenic labeling of higher-order neuronal circuits linked to phospholipase C-beta2-expressing taste bud cells in medaka fish., *J. Comp. Neurol.* 521, 1781-1802, 2013. DOI:10.1002/cne.23256. 査読有

⑤ Kobayashi, S., Katsuyama, S., Wagatsuma, T., Okada, S., and Tanabe, S., Identification of a new IgE-binding epitope of peanut oleosin that cross-reacts with buckwheat., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 1182-1188, 2012. DOI:10.1271/bbb.120063. 査読有

⑥ 岡田 晋治, 亜鉛欠乏と味覚障害・食行動異常, *生物の科学　遺伝* 66, 643-648, 2012. http://ci.nii.ac.jp/naid/40019473291 査読無

⑦ Okada, S., Abuyama, M., Yamamoto, R., Kondo, T., Narukawa, M., and Misaka, T., Dietary zinc status reversibly alters both the feeding behaviors of the rats and gene expression patterns in

diencephalon., *Biofactors* 38, 203-218, 2012. DOI:10.1002/biof.1007. 査読有

⑧ Ishii, S., Kishi, M., Yamagami, K., Okada, S., Abe, K., and Misaka, T., The use of Mammalian cultured cells loaded with a fluorescent dye shows specific membrane penetration of undissociated acetic Acid., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 523-529, 2012. DOI:10.1271/bbb.110824. 査読有

⑨ Ishii, S., Kurokawa, A., Kishi, M., Yamagami, K., Okada, S., Ishimaru, Y., and Misaka, T., The response of PKD1L3 / PKD2L1 to acid stimuli is inhibited by capsaicin and its pungent analogs., *FEBS J.* 279, 1857-1870, 2012. DOI:10.1111/j.1742-4658.2012.08566.x. 査読有

⑩ Suyama, T., Okada, S., Ishijima, T., Iida, K., Abe, K., and Nakai, Y., High phosphorus diet-induced changes in NaPi-IIb phosphate transporter expression in the rat kidney: DNA microarray analysis., *PLoS ONE* 7, e29483, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0029483. 査読有

⑪ Fujiwara, S., Imada, T., Nakagita, T., Okada, S., Nammoku, T., Abe, K., and Misaka, T., Sweeteners interacting with the transmembrane domain of the human sweet-taste receptor induce sweet-taste synergisms in binary mixtures., *Food Chem.* 130, 561-568, 2012. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.07.073. 査読有

⑫ Toda, Y., Okada, S., and Misaka, T., Establishment of a new cell-based assay to measure the activity of sweeteners in fluorescent food extracts., *J. Agric. Food Chem.* 59, 12131-12138, 2011. DOI:10.1021/jf2029835. 査読有

⑬ Ueno, Y., Sakurai, T., Okada, S., Abe, K., and Misaka, T., Human Bitter Taste Receptors hTAS2R8 and hTAS2R39 with Differential Functions to Recognize Bitter Peptides., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 1188-1190, 2011. DOI:10.1271/bbb.100893. 査読有

⑭ Nakai, Y., Sato, B., Ushiama, S., Okada, S., Abe, K., and Arai, S., Hepatic oxidoreduction-related genes are upregulated by administration of hydrogen-saturated drinking water. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 774-776, 2011. DOI:10.1271/bbb.100819. 査読有

⑮ Ohmoto, M., Okada, S., Nakamura, S., Abe, K., and Matsumoto, I., Mutually exclusive expression of Galphaia and Galpha14 reveals diversification of taste receptor cells in zebrafish., *J. Comp. Neurol.* 519, 1616-1629, 2011. DOI:10.1002/cne.22589. 査読有

⑯ Izuchi, R., Nakai, Y., Takahashi, H., Ushiama, S., Okada, S., Misaka, T., and Abe, K., Hepatic gene expression of the insulin signaling pathway is altered by administration of persimmon peel extract: a DNA microarray study using type 2 diabetic goto-kakizaki rats., *J. Agric. Food Chem.* 59, 3320-3329, 2011. DOI:10.1021/jf102422z. 査読有

〔学会発表〕（計 16 件）

① 戸田 安香、中北 智哉、岡田 晋治、成川 真隆、石丸 喜朗、三坂 巧，旨味受容体 T1R1/T1R3 の L-Glu 活性を決定する因子の同定，*日本農芸化学会 2014 年度大会*、2014/3/27-30、明治大学生田キャンパス（神奈川）

② 吉本 靖東、岡田 晋治、山上 圭吾、三坂 巧,マウス有郭乳頭における味蕾マーカーとしての Ulex europaeus agglutinin-1 の有用性，*日本農芸化学会 2014 年度大会*、2014/3/27-30、明治大学生田キャンパス（神奈川）

③ 池永 直弥、吉田 晃子、家木 誉史、岡田 晋治、三坂 巧，メダカ味覚受容体 T1R1 の転写制御配列の取得，*日本農芸化学会 2014 年度大会*、2014/3/27-30、明治大学生田キャンパス（神奈川）

④ 家木 誉史、池永 直弥、吉田 晃子、岡田 晋治、三坂 巧，メダカにおける味覚関連遺伝子群の発現様式，*日本農芸化学会 2014 年度大会*、2014/3/27-30、明治大学生田キャンパス（神奈川）

⑤ 山本 遼、岡田 晋治、三坂 巧，短期亜鉛欠乏におけるラットの味嗜好性変化の解析，*日本農芸化学会 2013 年度大会*、2013/3/24-28、東北大学川内北キャンパス（宮城）

⑥ 幸田 理恵、成川 真隆、山本 遼、岡田 晋治、三坂 巧，食餌性鉄欠乏ラットにおける味嗜好性の変化，*日本農芸化学会 2013 年度大会*、2013/3/24-28、東北大学川内北キャンパス（宮城）

⑦ Abe, K., Okada, S. and Misaka, T., Taste system in fish., *XVI International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT 2012)*, Jun 23-27, 2012, Stockholm, Sweden.

⑧ Toda, Y., Okada, S., and Misaka, T., Establishment of a new cell-based assay to measure the sweetness intensities of ligands including fluorescent substances., *XVI International Symposium on Olfaction*

and Taste (ISOT 2012), Jun 23-27, 2012, Stockholm, Sweden.

⑨ Ieki, T., Okada, S., Aihara, Y., Ohmoto, M., Abe, K., Yasuoka, A., and Misaka, T., Transgenic labeling of the gustatory neural pathway originating from phospholipase C-□2-expressing taste receptor cells in medaka fish., *AChemS XXXIII Annual Meeting*, Apr 13-17, 2011, St. Pete Beach, FL, USA.

⑩ 伊藤 俊輔、川上 晋平、應本 真、岡田 晋治、藍澤 広行、三坂 巧，脳味覚野・体性感覚野における SNAP25 遺伝子発現の離乳マウスにおける経時的変化，*日本農芸化学会 2012 年度大会*、2012/3/22-26、京都女子大学（京都）

⑪ 池永 直弥、家木 誉史、岡田 晋治、三坂 巧，メダカを用いた新規経シナプス性トレーサー探索系の開発，*日本農芸化学会 2012 年度大会*、2012/3/22-26、京都女子大学（京都）

⑫ 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-□2 発現細胞を起点とした経シナプス性トレーサー輸送の経時的解析，*日本農芸化学会 2012 年度大会*、2012/3/22-26、京都女子大学（京都）

⑬ 藤原 聡、中北 智哉、岡田 晋治、齋藤 佳奈、南木 昂、阿部 啓子、三坂 巧，フレーバー化合物によるヒト甘味受容体活性化機構の解析，*日本農芸化学会 2012 年度大会*、2012/3/22-26、京都女子大学（京都）

⑭ 齊藤 健佑、高木 陽介、岡田 晋治、三坂 巧，塩封入人工餌を用いた小型魚類の塩味嗜好性の解析，*日本農芸化学会 2012 年度大会*、2012/3/22-26、京都女子大学（京都）

⑮ 山本 遼、岡田 晋治、三坂 巧，短期食餌性亜鉛欠乏がもたらすラットの味嗜好性変化の解析，*日本農芸化学会 2012 年度大会*、2012/3/22-26、京都女子大学（京都）

⑯ 勝山 真多、岡田 晋治、小林 彰子、田辺 創一，ピーナッツおよびソバアレルゲンの IgE 結合交叉性エピトープの解析，*日本農芸化学会 2012 年度大会*、2012/3/22-26、京都女子大学（京都）

〔図書〕（計 2 件）

① 岡田 晋治ら執筆，新・櫻井　総合食品事典（櫻井芳人監修、荒井綜一・倉田忠男・田島眞編集）、同文書院、2012．1183 ページ

② 岡田 晋治ら，食物と栄養学基礎シリーズ 7　基礎栄養学（吉田勉監修、佐藤隆一郎・加藤久典編）、学文社、2012．160 ページ

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

① 小型魚類メダカをモデルとした味の情報伝達・処理に関わる神経回路の標識
http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2013/20130415-1.html

② 旨味受容体 T1R1/T1R3 のアミノ酸選択性を決定する分子メカニズムの同定
http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2013/20130415-1.html

③ 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