

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659826

研究課題名(和文) 味覚誘発情動の神経回路基盤の解明と心の科学への展開

研究課題名(英文) The neuronal mechanisms underlying the taste-evoked emotional responses

研究代表者

杉田 誠 (SUGITA, Makoto)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：50235884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：苦味と甘味感覚は対象的な情動を惹起し、苦味感覚は不快感を、甘味感覚は快的情動を惹起する。異なる味細胞で感知された苦味情報と甘味情報がいかに脳内ニューロンに伝えられ、対照的な情動が惹起されるかを明らかにするために、発生工学的アプローチを用いて苦味情報および甘味情報を伝えるニューロンの脳内局在を可視化し比較した。特に苦味情報を伝えるニューロンについて、活性制御機構・ニューロン種・感覚情報処理様式を解析した。橋結合腕傍核において苦味情報を伝えるニューロンは、後方medial側と前方external lateral側に分布し、この2種のニューロン群における異なる活性制御様式が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To gain insight into how bitter and sweet taste information is translated in the brain into binary responses of emotion, we visualized the neuronal circuitries of bitter and sweet tastes by selectively expressing the fluorescent transneuronal tracer, WGA-DsRed, in either bitter- or sweet-responsive taste receptor cells in mice. The genetic tracing showed segregation of bitter and sweet taste pathways. To functionally characterize the bitter taste-relaying neurons, which were labeled by WGA-DsRed originating from bitter taste receptor cells, we combined genetic tracing with electrophysiological and immunohistochemical analyses, and mapping the induction of the immediate early gene by taste stimuli and aversion-eliciting stimuli from the gut. Our data suggest that the different types of bitter taste-relaying neurons are clustered in distinct locations in the parabrachial nucleus, showing the architectural solution in the parabrachial nucleus that processes taste information.

研究分野：医歯薬学

キーワード：味覚 情動 ニューロン

1. 研究開始当初の背景

味覚感覚は対照的な行動と情動を惹起することから、「嫌悪性・嗜好性行動の惹起」、「快・不快情動の惹起」が、脳内のいかなる細胞機能・分子基盤のもとに遂行されているかを解明するために、非常に有効な感覚である。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伝達経路は延髄孤束核ニューロン、さらに橋結合腕傍核ニューロンを経由し、視床・大脳皮質味覚野・扁桃体等のニューロンに送られ、識別されるとともに、対照的な情動が惹起される。橋結合腕傍核・大脳皮質味覚野、扁桃体の特定ニューロンの活性の変化が、情動の惹起に重要な役割を果たすことが、最近の研究により明らかになりつつある。

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 (T2R) もしくは甘味/うま味受容体 (T1R3) を発現する味細胞に、それぞれ選択的に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。そして味細胞から経ニューロン性に輸送される WGA-DsRed により標識されたニューロンの脳内局在を追跡可視化することにより、苦味情報および甘味/うま味情報を伝導する脳内神経経路を解析した。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、嗅皮質および大脳皮質体性感覚野 (顎・上唇領域) 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移行した WGA-DsRed を受け取るニューロン群は、苦味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロン群に比べ、より前方に配置していた。可視化された二種の神経経路の異なりによって、苦味と甘味/うま味は脳内で識別され、苦味感覚は嫌悪性行動と不快感を惹起し、甘味/うま味感覚は嗜好性行動と快的情動を惹起することが示唆された。

経シナプス性トレーサー (WGA) を用いて、発生工学的に特殊神経回路を可視化する方法は一般化されつつあるが、自身の研究では、蛍光タンパク質 DsRed を融合した WGA (WGA-DsRed) を用いて特定の神経回路を標識することにより、WGA-DsRed で蛍光標識された特定回路内ニューロンの細胞機能を生きた状態で解析することができる。標識された生きたニューロンの細胞機能を電気生理学的に解析することにより、いかなるニューロンによる、いかなる働きが苦味・甘味による不快・快情動の惹起に必要であるか洞察を

得ることができると考えられる。

2. 研究の目的

味覚により惹起される情動をモデルとし、情動の生成様式を明らかにする。特に苦味により嫌悪性不快情動がどのように生成されるか、その動作原理を明らかにする。そのため第一に、苦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、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る脳内ニューロンの局在を明らかにし、甘味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る脳内ニューロンの局在と比較する。苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンの橋・扁桃体内での局在・微小形態・保有する細胞機能を解析し、どのようなニューロン種が存在するか分類する。苦味伝導路構成ニューロン細胞体が橋・扁桃体内でどのような三次元的空間配置を示すかを DsRed の蛍光により明らかにするとともに、そのニューロンの樹状突起・スパイン構造を、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。橋・扁桃体領域の新鮮脳スライス標本において、苦味伝導路構成ニューロンの活性制御機構をホールセルパッチクランプ法を用い解析し、どのような神経伝達物質による入力をいかなる受容体により受容するか、そしてそれらがホルモン・神経ペプチド等によりどのように調節されるかを解析し、ニューロン種の同定と細胞機能の解明を行なう。

また WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンの中で、感覚入力を嫌悪性不快情動の生成へと変換する責任的役割を果たすニューロン (群) の候補を 2 つのストラテジー (味覚嫌悪学習モデル、多種不快刺激反応ニューロンの探索) を用いて同定する。同定したニューロンの中で、特定のニューロン群を除去もしくは活性化した際に生じる情動連関行動の変化を解析し、嫌悪性不快情動の生成に関与するニューロンを特定する。本ニューロンの細胞機能を解析し、不快情動の生成にいかに関与するかを解明することを目指す。

3. 研究の方法

これまでの研究で作製した苦味伝導路と甘味/うま味伝導路のそれぞれを可視化する 2 系統のトランスジェニックマウス (mT2R5-WGA マウスと mT1R3-WGA マウス) を用い研究を遂行した。苦味情報を伝導する神経回路を可視化する mT2R5-WGA マウスは、mT2R5 を特定の苦味受容味細胞に発現させる特異的プロモーターエレメント、mT2R5-GFP cDNA、IRES 配列、WGA-DsRed cDNA を連結したトランスジーンを有する。本マウスにおいては、内因性の mT2R5 を発現する苦味受容味細胞が、mT2R5-GFP と WGA-DsRed の二種類の融合タンパク質を産生する。そして

苦味受容味細胞で発現した WGA-DsRed が順行性に経シナプス性に輸送され、苦味受容味細胞からの情報を受け取るニューロンに順次移行し、上行性経路に沿って、苦味伝導路をトレースする。苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識される苦味伝導路構成ニューロンの脳内局在は DsRed 蛍光を検出することにより明らかにすることができる。甘味/うま味情報を伝導する神経回路を可視化する mT1R3-WGA マウスは、mT1R3 を特定の味細胞に発現させる特異的プロモーターエレメント、mT1R3-GFP cDNA、IRES 配列、WGA-DsRed cDNA を連結したトランスジーンを有し、甘味/うま味受容味細胞で発現した WGA-DsRed が経シナプス性に輸送され、甘味/うま味伝導路をトレースする。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 の脳内局在を DsRed の蛍光を蛍光顕微鏡下で検出し可視化することにより、苦味伝導路構成ニューロンもしくは甘味/うま味伝導路構成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。

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。標識されたニューロンがどのように樹状突起・軸索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。

WGA-DsRed で標識された苦味伝導路構成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、苦味伝導路構成ニューロンの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, and 2 mM Na_2ATP , 0.5 mM Na_2GTP 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、-70mV 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 により蛍光標識された苦味伝導路構成ニューロンのニューロン種・発現分子を免疫組織化学的に解析した。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、免疫組織化学的に発現分子の局在を可視化した。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明らかにし、苦味伝導路構成ニューロンのニューロン種を解析した。

WGA-DsRed を受け取る味覚伝導路構成ニューロンがいかなる刺激時に活性化されるかを明らかにするため、各種刺激後に WGA-DsRed 標識ニューロンが Zif268 (活性化したニューロンで発現誘導される最初期遺伝子) を発現するかを免疫組織化学的に解析した。口腔内や腹腔内に各種刺激薬を投与後、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 Zif268 抗体と Zenon ラベリングシステム (Invitrogen) を用い、Zif268 の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 Zif268 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。

4. 研究成果

苦味受容味細胞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、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンの細胞体が橋結合腕傍核領域でどのような三次元的配置を示すかを、脳の連続切片から DsRed の蛍光を検出することにより解析した。苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed は延髄孤束核の後方に存在するニューロンに移行し、延髄孤束核ニューロンからさらに橋結合腕傍核もしくは網様体のニューロンに移行する。橋結合腕傍核領域において WGA-DsRed を受け取るニューロンは、後方の medial 側と前方の external lateral 側に観察された。延髄孤束核と橋結合腕傍核ニューロンにおいて、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識されるニューロンが、口腔内の苦味情報を選択的に伝導し処理するか、他の味質や内臓感覚情報等も伝導し複数種の情報を統合処理するかを、各種刺激後に活性化されるニューロンを最初期遺伝子 Zif268 の発現を免疫組織学的に検出することにより可視化し検出した。苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識される延髄孤束核ニューロンは、口腔内の苦味刺激 (cycloheximide 投与) により活性化され Zif268 の発現誘導が観察され、苦味刺激による神経応答を抑制することが報告されている allyl isothiocyanate の口腔内前投与は cycloheximide 投与による Zif268 の発現誘導を抑制した。一方、胃内への cycloheximide 投与は Zif268 の発現を惹起しないため、WGA-DsRed により標識される延髄孤束核ニューロンは消化管での受容情報ではなく、口腔内の味細胞で受容された苦味情報を伝導処理することが示唆された。口腔内甘味刺激や

腹腔内への塩化リチウム投与は Zif268 の発現を誘導せず、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識される延髄孤束核ニューロンは、口腔内の味細胞で受容された苦味情報を選択的に伝導処理することが示唆された。一方、延髄孤束核からの情報を受け取る橋結合腕傍核の WGA-DsRed 標識ニューロンにおいては、苦味情報を選択的に伝導するニューロンと、苦味情報とその他の内臓感覚等の情報を統合するニューロンが、後方 medial 側と前方 external lateral 側において異なる分布を示すことが示唆された。

橋結合腕傍核領域において、後方の medial 側と前方の external lateral 側に観察される苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取るニューロンの樹状突起構造を、WGA-DsRed 標識ニューロンに蛍光色素 lucifer yellow を注入することにより明らかにして分類した。橋結合腕傍核の苦味伝導路構成ニューロンは樹状突起を多方向に伸張させる複雑な形態を有しており、rostral 側と caudal 側に比べ、medial 側と lateral 側に長く樹状突起を伸張させていた。

橋結合腕傍核領域の新鮮脳スライス標本において、苦味伝導路構成ニューロンの活性制御機構をホールセルパッチクランプ法を用い解析し、どのような神経伝達物質・神経修飾物質による入力をいかなる受容体により受容するかを解析した。後方 medial 側のニューロンはノルアドレナリンに反応性を示すとともに、神経伝達物質グルタミン酸の入力を受け取ることが観察された。前方 external lateral 側のニューロンはノルアドレナリンへの反応性を示さず、-melanocyte stimulating hormone により活性化され、後方 medial 側の苦味伝導路構成ニューロンと前方 external lateral 側の苦味伝導路構成ニューロンでは、異なる神経伝達物質もしくは神経修飾物質によりシナプス伝達や伝達修飾が行われることが示唆された。後方 medial 側の苦味伝導路構成ニューロンのホールセルパッチクランプ解析においては、2種の減衰速度の異なる興奮性シナプス後電流 (EPSC) が観察され、各種受容体アゴニスト・アンタゴニストの効果より、本ニューロンは神経伝達物質のグルタミン酸とノルアドレナリンによる入力を AMPA 受容体と 1 受容体を介して受け取り、それぞれ減衰速度の速い EPSC と遅い EPSC を誘発することが示唆された。また一部の苦味伝導路構成ニューロンにおいて、1 受容体遮断薬の投与は、減衰速度の早い EPSC の電流量を増大させることが観察され、ノルアドレナリンは本ニューロンのシナプス伝達入力に少なくとも 2 種の様式で関与することが示唆された。

甘味受容味細胞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、甘味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識される甘味伝導

路構成ニューロンの橋結合腕傍核と扁桃体での三次元的空間配置を解析し、苦味伝導路構成ニューロンと比較した。橋結合腕傍核領域において、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンは、後方 medial 側と前方 external lateral 側に観察される一方、甘味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る甘味伝導路構成ニューロンは前方 medial 側に観察される。扁桃体において、苦味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロンは basolateral amygdala と basomedial amygdala に、甘味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロンは basolateral amygdala に観察され、両者の局在に一部重複がみられた。Medial amygdala において苦味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロンは、甘味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロンに比べ後方に配置したが、Cortical amygdala において苦味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロンは、甘味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロンに比べ前方に配置した。それらのニューロンの中で、異なるニューロン群が苦味と甘味刺激による対照的な情動連関行動の発現に関与することが考えられる。

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 3件)

Ta To Tran, Kei Tobiume, Chikara Hirono, Shinichi Fujimoto, Kuniko Mizuta, Kazumi Kubozono, Hiroshi Inoue, Mitsuo Itakura, Makoto Sugita, Nobuyuki Kamata, TMEM16E (GDD1) exhibits protein instability and distinct characteristics in chloride channel/pore forming ability, Journal of Cellular Physiology, 査読有, Vol. 229, 2014, pp181-190

Makoto Sugita, Kuniyo Yamamoto, Chikara Hirono, Yoshiaki Shiba, Information processing in brainstem bitter taste-relaying neurons defined by genetic tracing, Neuroscience, 査読有, Vol. 250, 2013, pp166-180

Makoto Sugita, Kuniyo Yamamoto, Chikara Hirono, Yoshiaki Shiba, Functional dissection of sweet and bitter taste pathways, Journal of Oral Biosciences, 査読有, Vol. 55, 2013, pp66-72

[学会発表](計 4件)

Makoto Sugita, Kuniyo Yamamoto, Chikara Hirono, Yoshiaki Shiba, Genetic tracing reveals the architectural

solution in the parabrachial nucleus that processes and gates emotional memory, 第92回日本生理学会大会, 2015年3月22日, 神戸国際会議場(神戸市)

Makoto Sugita, Kuniyo Yamamoto, Chikara Hirono, Yoshiki Shiba, Cellular characteristics of brainstem bitter taste-relaying neurons visualized by genetic tracing, 第47回広島大学歯学会総会, 2014年6月21日, 広島大学(広島市)

Makoto Sugita, Kuniyo Yamamoto, Chikara Hirono, Yoshiki Shiba, Information processing in the brainstem neurons defined by genetic tracing of taste representation, 第91回日本生理学会大会, 2014年3月17日, 鹿児島大学(鹿児島市)

Makoto Sugita, Kuniyo Yamamoto, Chikara Hirono, Yoshiki Shiba, Genetic tracing reveals the neuron types relaying bitter taste information, The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2013年11月2日, 九州大学(福岡市)

〔図書〕(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 誠 (SUGITA, Makoto)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：50235884

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：