

研究課題別評価書

1. 研究課題名

味覚により惹起される行動と情動の神経回路基盤

2. 氏名

杉田 誠

3. 研究のねらい

苦味感覚は嫌悪性の行動的反応と不快感を、甘味/うま味感覚は嗜好性の行動的反応と快的情動を惹起する。本研究ではそれらの対照的な行動と情動の惹起を可能にする脳内ニューロンの動作原理を明らかにすることを目的とする。

ヒトそして哺乳類は、塩味、酸味、甘味、苦味、うま味の5つを基本味として認識し、味覚は5基本味の組み合わせで、認知される。味覚刺激は味蕾中の味細胞で最初に感知される。味細胞特異的に発現する味覚受容体に、味物質が結合することにより惹起される味覚情報は、複数のニューロンを介し、脳内の各種ニューロンに投射され、受容・識別される。さらに味覚感覚は、特定の神経回路を活性化することで、対照的な、嫌悪性・嗜好性の行動的反射や、快・不快の情動を惹起する。味覚は単純な5味質の情報として脳内に送られ識別されること、また対照的な行動と情動を惹起することから、「感覚識別・認識」、「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GPCRに属するT2Rファミリー(マウスでは35種類、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/うま味情報はどのように脳内ニューロンに伝えられ、対照的な行動と情動が引き起こされるのかを明らかにするため、これまでの自身の研究で、苦味と甘味/うま味情報を伝導する神経回路網を可視化することを試みた。方法として、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「味覚受容体-GFP融合タンパク質」と「経シナプス性トレーサー(WGA-DsRed融合タンパク質)」を発現するトランスジェニックマウスを作製した。そして味細胞から経シナプス性に輸送される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神経回路網の、特に脳内での三次元空間配置を解析した。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)の2系統において、トレーサー(WGA-DsRed)は味細胞から順行性に輸送され延髄弧束核、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で観察された。可視化された二種の神経回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考えられた。

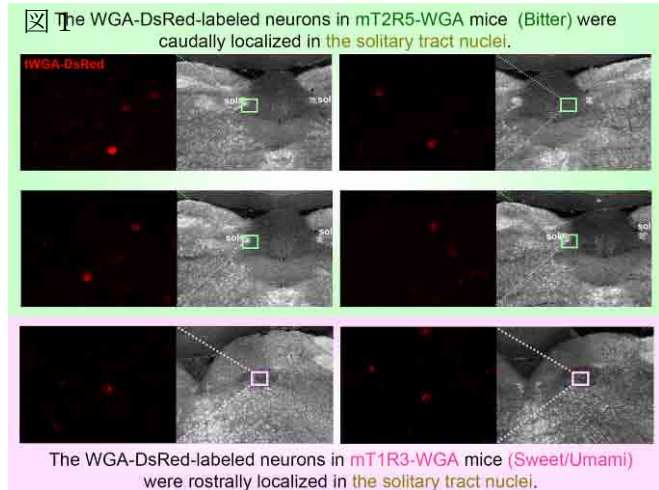
本研究では、可視化された二種の神経回路の異なりが、「嫌悪性/嗜好性行動の惹起」「不快/快情動の惹起」にいかに関与するか明らかにするため、第一に、味細胞から移行したWGA-DsRedにより標識された苦味伝導路構成ニューロンと甘味伝導路構成ニューロンの細胞体・樹状突起の脳内配置を明らかにし、ニューロン種の同定・細胞機能の解析を行う。第二に、WGA-DsRedにより標識されたニューロンを選択的に除去する方法を確立し、特定のWGA-DsRed標識ニューロンを選択的に除去した際に生じる味覚誘発行動の変化を解析することにより、味覚誘発行動・情動の惹起に関与するニューロン群を特定することを目指す。そして味覚伝導路構成ニューロンの中で、いかなるニューロンがいかに機能し、対照的な行動と情動を惹起するか、その動作原理を明らかにする。

4. 研究成果

延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの細胞体の局在

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シナプス性トレーサー (WGA-DsRed) を発現する 2 系統のトランスジェニックマウス (苦味伝導路を可視化する mT2R5-WGA マウスと甘味伝導路を可視化する mT1R3-WGA マウス) において、特定味細胞から経シナプス性に移行した WGA-DsRed により蛍光標識されるニューロン細胞体の脳内局在を脳連続切片から蛍光検出し、それらの三次元的空間配置を単一ニューロンレベルで可視化した。

まず、すべての味覚情報を末梢から受け取る最初の脳部位である延髄孤束核に研究の焦点をあてた。延髄孤束核内において、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を保有する苦味伝導路構成ニューロンの細胞体は、甘味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を保有する甘味伝導路構成ニューロンの細胞体に比べ、後方に分離して集積した (図1)。

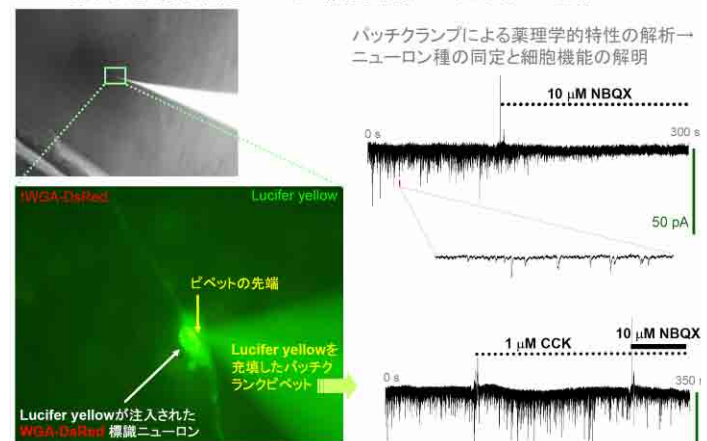


延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの樹状突起構造

味細胞から移行した WGA-DsRed により蛍光標識されるニューロンの中で WGA-DsRed は、その分泌タンパク質としての性質により、ER・ゴルジ体・分泌顆粒内に存在し、主に核周囲に観察される。ゆえに WGA-DsRed の蛍光検出のみでは、標識されたニューロンの樹状突起構造やスパイン構造を把握することができない。そこで WGA-DsRed により蛍光標識される味覚伝導路構成ニューロンの樹状突起構造・スパイン構造を可視化するために、そのニューロン内に、パッチクランプピペットを通して蛍光色素 Lucifer Yellow を注入した (図2)。延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロン 185 例中で、樹状突起を rostralateral 側に伸張するニューロンは 46 例、rostral 側は 55 例 rostromedial 側は 75 例、medial 側は 22 例、caudomedial 側は 44 例、caudal 側は 32 例、caudolateral 側は 45 例、lateral 側は 17 例において観察された。rostral 側と caudal 側に区分した場合には 185 例中で、樹状突起を rostral 側に伸張するニューロンは 70 例、

図 2

苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識された延髄孤束核ニューロンの微小形態 (樹状突起・スパイン構造) 観察とパッチクランプ解析



caudal 側に伸張するニューロンは 21 例、rostral・caudal 両側に伸張するニューロンは 82 例観察された。medial 側と lateral 側に区分した場合には 185 例中で、樹状突起を medial 側に伸張するニューロンは 67 例、lateral 側に伸張するニューロンは 37 例、medial・lateral 両側に伸張するニューロンは 60 例観察された。延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロン 185 例中で 150 例は、その樹状突起を 1 方向もしくは 2 方向に伸張する単純な形態を示していた(図2)。

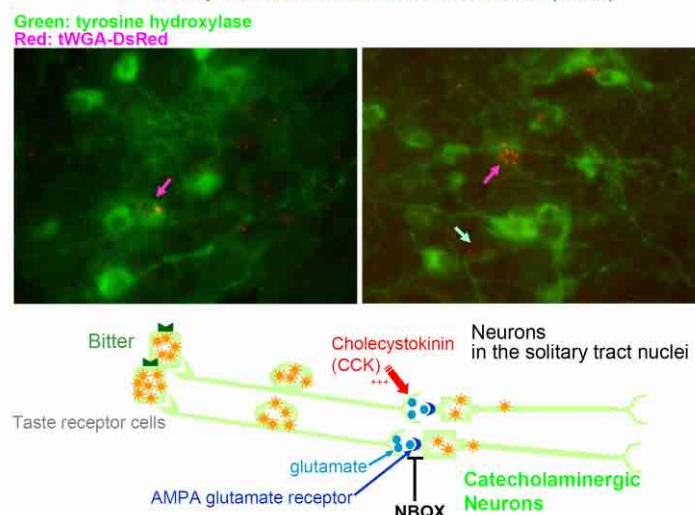
延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの電気生理学的性質・薬理学的特性

WGA-DsRed標識ニューロンが保有する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、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、そしてそれらの入力パターンが、ホルモン・ペプチド等によりどのように修飾・制御されるかを解析した。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 MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 10 mM glucose, and 2 mM Na₂ATP, 0.5mM Na₂GTPを、細胞外溶液は 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 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、解析した。延髄孤束核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記録においては、図2のように、内向きのスパイク性電流(Na⁺ influx current)が観察され、その内向き電流EPSCは、AMPAグルタミン酸受容体のブロッカーNBQXにより抑制された(図2)。ゆえに延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンは、神経伝達物質グルタミン酸の入力をAMPA受容体により受容することが示唆された。またCholecystokinin(CCK)を細胞外液中に添加すると、自発的EPSCの頻度が増加した(図2)。ゆえに、このグルタミン酸作働性のシナプス伝達は、CCKにより増強されることが示唆された。CCKは摂食後満腹時に、小腸から分泌され、ホルモン性に働くことが報告されている。満腹時には、CCKがホルモン性に延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンに作用し、苦味応答の一端を促進することが考えられる。

延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンのニューロン種の同定

延髄孤束核内で WGA-DsRed により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。延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの多くは、抗 Tyrosine hydroxylase 抗体により認識された(図3上、赤矢印)。しかし、延髄孤束核内で WGA-DsRed により標識された苦味伝導路構成ニューロンの内で、少数のニューロンは抗 Tyrosine hydroxylase 抗体により認識されなかった(図3上、青矢印)。また substance P, somatostatin, neuronal nitric oxide synthase (nNOS)に対する抗体では、ともに認識されなかった。延髄孤束核の苦味伝導路構成ニューロンの多くは Tyrosine hydroxylase を発現する Catecholaminergic ニューロンであることが示唆された。

図3
Immunohistochemical characterization of WGA-DsRed-labeled neurons in the solitary tract nuclei of mT2R5-WGA mice (Bitter)



すべての味覚情報を末梢から受け取る最初の脳部位である延髄孤束核において、苦味受容味細胞から移行したWGA-DsRedにより標識される苦味伝導路構成ニューロンの細胞体は、延髄孤束核内で後方に分離して集積し、それらニューロンの多くは双極性に樹状突起を伸長させていることが観察された。延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンは、一次ニューロン(ganglion neurons)からの神経伝達物質グルタミン酸を AMPA 受容体により受容し、そのグルタミン酸作動性のシナプス伝達は Cholecystinin により増強されることが示唆された。また延髄孤束核内の苦味伝導路構成ニューロンの多くは Catecholaminergic ニューロンである。

5. 自己評価

本研究では、「①苦味・甘味受容味細胞から移行したWGA-DsRedにより標識される苦味・甘味伝導路構成ニューロンの細胞体・樹状突起の脳内配置を明らかにし、ニューロン種の同定・細胞機能の解析を行うこと」、そして「②WGA-DsRedにより標識されたニューロンを選択的に除去する方法を確立し、特定のWGA-DsRed標識ニューロンを選択的に除去した際に生じる味覚誘発行動の変化を解析すること」により、味覚誘発行動・情動の惹起に関与するニューロン群を特定し、その動作原理を明らかにすることを目指した。①に関しては、数が限定されたWGA-DsRed標識ニューロンをホールセルパッチクランプで解析していく成功確立が低かったこと、及び同じ脳領域のWGA-DsRed標識ニューロンでも単一ニューロン種からなっているわけではなく、異種混交であり、複数種からなるニューロン種の完全な同定が困難であったことから、データの蓄積に時間を要し、現在、ニューロン種の同定・細胞機能の解析の途中段階です。パッチクランプ解析と免疫組織学的解析を用いて味覚伝導路構成ニューロンのニューロン種の同定を行っているが、ひとつのニューロン種が同定できればそれとシナプスを形成する次のニューロン種が予測しやすいという自身の実験系の特徴をより活かしつつ、神経回路を形成するシナプス前後のニューロンの発生・分化様式を考慮したり、バイアスのないスクリーニングを取り入れながら、ニューロン種同定のための独自の枠組みや戦略を築き、もう少し効率的にニューロン種・細胞機能を解明していかなければならないように感じています。②に関しては、WGA-DsRed標識ニューロンの選択的除去を行うために、WGA-DsRedを標的とするImmunotoxinを構築した。現在Immunotoxinの大腸菌における発現と精製方法の改良を行っている。Immunotoxinを用いて、特定のWGA-DsRed標識ニューロンを選択的に除去した際に生じる味覚誘発行動の変化を解析することを計画していたが、解析には達していない。

6. 研究総括の見解

苦味・甘味伝導路構成ニューロンの細胞体・樹状突起の脳内配置を明らかにし、ニューロン種の同定・細胞機能の解析を進めている。WGA-DsRed標識ニューロンをホールセルパッチクランプで解析していく方法は、確率が低く、また、同じ脳領域のWGA-DsRed標識ニューロンでも、異種混交であり、非常に難しい研究ですが、精力的に解析しているところは評価する。

他方、WGA-DsRed標識ニューロンの選択的除去を行うためのツール、WGA-DsRedを標的とするImmunotoxinの系を構築し、これを用いた成果を期待している。

7. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

①学会発表

1. Sugita, M. and Shiba, Y., Genetic tracing and characterization of the neurons in the nucleus of the solitary tract, receiving specific taste input. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009)(京都)(2009年7月28日)

2. Sugita, M., Characterization of the neurons in the nucleus of the solitary tract, labeled by the transsynaptic tracer originating from specific taste receptor cells. 第6回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(福岡)(2008年12月6日)

3. Sugita, M., The spatial distribution and the molecular characteristics of neurons in the nucleus of the solitary tract, labeled by the transsynaptic tracer originating from specific taste receptor cells. 第5回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機構」(福岡)(2007年11月2日)