

研究終了報告書

「食塩の美味しさを担う多細胞情報統合システムの解明」

研究期間：2020年11月～2022年3月

研究者：野村 憲吾

1. 研究のねらい

【背景】私たち生命は食物中の塩(NaCl)を検出する化学感覚(塩味)を備え、生命活動に必要な塩分の確保に活用してきた。一方、飽食の現代では、塩味をおいしく感じる事が原因となって塩分摂取が過剰になっており、循環器疾患の発症リスクを増大させている。したがって、舌でNaClを感知しておいしい塩味を生み出す細胞基盤を解明し、塩分摂取量の制御を目指す研究には、予防医学の観点から社会的な訴求がある。

【構想の経緯】我々はこれまでに、食塩中のナトリウムの味を生み出すメカニズムの詳細を解明してきた(Nomura K et al., *Neuron*, 2020)。すなわち、ナトリウムのおいしい味を担う味蕾細胞(ナトリウム細胞)を同定し、その細胞内情報伝達メカニズム、求心性味神経への神経伝達メカニズムを報告した。その研究の成果と最近の予備実験から、ナトリウムとは別にクロライドを感知して食塩のおいしい味を生み出す経路が存在する手がかりを得た。すなわち、食塩のおいしさは2つの化学感覚によって作られると考えられる。

【目的】『独自仮説: 塩のおいしさは、ナトリウムとクロライドの情報が統合されて生まれる』の検証を目指す。そのために、センサー(味蕾)と情報処理装置(脳)の両面からアプローチをおこなう。センサー(味蕾)に対しては、①特定の機能を持つ細胞を同定するための基盤技術、および②味細胞の活動を選択的に操作する基盤技術の開発をおこなう。情報処理装置(脳)に対しては、多細胞センサーからの情報(ナトリウムとクロライド)を脳内でどのように処理し、塩味嗜好行動を生み出しているのか明らかにする。

【期待される成果】本研究によって、クロライド感知機構を解明するための科学技術基盤を整備することができれば、最終的に塩の多細胞センサー機構の全貌解明につながると考えている。それに加えて、脳における塩の情報処理機構を明らかにすることで、塩の摂取行動をコントロールするために、塩の多細胞センサーそれぞれをどのように制御すべきか理解することができると考えている。これは、創薬や食品科学など多分野の研究開発の促進につながり、『おいしい減塩社会』の実現を通じて国民の健康増進に資する研究であると考えている。

2. 研究成果

(1) 概要

研究の目標: 特定の機能を持つ細胞を同定/操作するための技術戦略を確立することで、クロライド感知細胞を同定し、塩味を司る細胞機構を解明する。最終的に、塩味を増強する化学物質減塩素材の標的分子候補を得る。

本研究計画では、上記の目標を達成するため、下記(I)～(III)の項目を推進した。

Aim(Ⅰ) ナトリウム細胞がクロライドを感知する可能性の検証

Aim(Ⅱ) おいしい塩味を生じるクロライド細胞を同定／操作するための技術開発

Aim(Ⅲ) ナトリウム味とクロライド味の脳内処理機構の解明

その結果、下記(Ⅰ)～(Ⅲ)の成果を得た。

【成果(Ⅰ)】

ナトリウム細胞を選択的に自在に活性化させることができる独自のマウス(光 Na 味マウス)を用いて、ナトリウム味とクロライド味が異なる細胞から独立して生じる という塩味コーディングロジックを見出した。

【成果(Ⅱ)】

特殊蛍光タンパク質 CaMPARI2 と2光子レーザー顕微鏡を用いて、特定の機能を持つ味蕾細胞を同定する手法の考案および実行環境を整備した。

【成果(Ⅲ)】

まず、脳内で特定の味刺激に応答した細胞を標識し、その細胞を選択的に分取して遺伝子発現パターンを解析する技術を構築した。さらに、塩の摂取行動に必須の神経回路を同定した。

今後は、成果ⅠとⅡを基盤として味蕾におけるクロライド感知細胞の同定をおこなうとともに、成果Ⅲを起点として塩の脳内情報処理におけるナトリウム／クロライドの役割、および塩のおいしさを作り出し変容させる仕組みを明らかにしていくことで、ACT-X『生命と化学』出身の研究者として国民の健康増進に資する研究を推進していきたい。

(2) 詳細

Aim(Ⅰ) ナトリウム細胞がクロライドを感知する可能性の検証

・コンディショナル Calhm3KO マウスの作製、および行動解析実験による塩味応答の評価

まず、ナトリウム細胞がクロライドも感知する可能性を検証した。そのために、ナトリウム細胞の神経伝達を担う CALHM1/CALHM3 ヘテロ多量体チャネルの機能を細胞特異的に欠損するマウスの作製を試みた。この実験では、ENaC 発現細胞で遺伝子組み換え酵素 Cre を発現する ENaC α -Cre マウスと、Cre 依存的に *Calhm3* 第3エクソンを欠失する *Calhm3*-floxed マウス(米国モネル化学感覚研究所より導入)を交配し、ナトリウム細胞選択的な CALHM3cKO マウスを作製した。作出されたマウスを用いて実験をおこなったところ、食塩を好む行動応答にまったく影響が見られなかった(図1)。本マウスで欠損する領域は CALHM3 タンパク質の C 末端側配列であるため、同様の領域を欠損する CALHM3 変異体

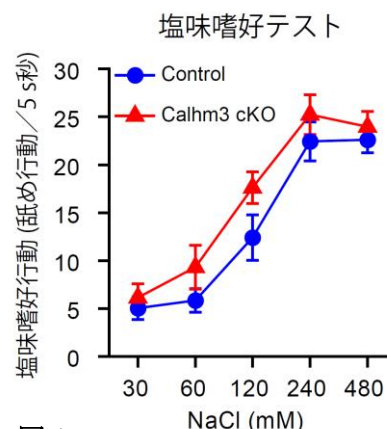


図1

ENaC 発現細胞特異的な *Calhm3* 変異マウスの塩味嗜好行動

Control (*Calhm3*-floxed) マウスと *Calhm3* コンディショナル KO マウス (ENaC-Cre::*Calhm3*-floxed) マウスの塩味嗜好行動を比較した

(CALHM3 Δ C)を培養細胞に発現させて機能の検証をおこなったところ、(CALHM3 Δ C)の機能は正常であった(図2)。すなわち、作製されたコンディショナル KO マウスにおいては、*Calhm3*第3エクソンの欠失しているものの正常な機能を持ったCALHM3 Δ Cが発現していると考えられた。しかしながら、下記 Aim2において実施した『ナトリウム細胞の選択的光操作実験(後述)』によって、本項目の目的を達成する成果が得られた。すなわち、ナトリウムとクロライドの感知細胞はまったく別であることが見出された。

Aim(Ⅱ)美味しい塩味を生じるクロライド細胞の同定と操作

本項目では、クロライドに応答する味蕾細胞を同定／操作するための技術開発をおこなった。

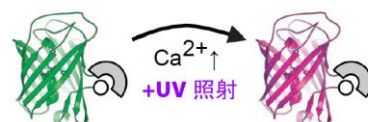
(Ⅱ-A)クロライド応答細胞の *in vivo* 可視化技術の開発

クロライド細胞を同定するために、味蕾のクロライド応答細胞を可視化する技術の開発をおこなった。本項目では、色変換蛍光タンパク質 CaMPARI2 を用いる。CaMPARI2 は、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した状態で UV 光を照射すると、蛍光波長が赤色シフトする性質を持つ(図3)。Cre 依存的に CaMPARI2 を発現するマウスを導入し、*Calhm1-Cre* マウス(導入済)との交配を開始した。作出されたマウスの味蕾を *ex vivo* イメージングにより観察し、味蕾特異的に CaMPARI2 の緑色蛍光を確認した。

まず、麻酔下のマウス舌に味覚溶液を与えながら、UV レーザーを舌表面に照射する方法の検証をおこなったが、CaMPARI2 の十分な色変換は確認されなかった。その原因として、舌上皮内に埋没するように存在する味蕾細胞に対して、通常のレーザー照射システムでは十分な強度の UV 刺激を達成できないことが考えられた。レーザー光を舌表面に照射するためには、光源と舌の間に溶液が流れるための一定の距離を空ける必要があるが、このことも刺激強度のロスにつながる。また、高パワーの UV レーザーを照射することによる細胞への光毒性が細胞機能を損なわせる。

そこでこの問題を解決するため、多光子レーザー顕微鏡を用いた2光子励起システムを使用した方法へ計画を変更した。このシステムを用いることで、生体深部への刺激が可能となり、かつ光毒性を低減させることが可能となる。すべての機器がそろった2年次年度末から本システムのセットアップに着手した。その際、味覚刺激にともなう屈折率の変化、焦点面のズレなど解決すべき重要な課題があるため、ACT-X 研究期間内には顕微鏡システム構築と、後述する脳における情報処理機構の解明に注力する方針に転換した。今後は、ACT-X 研究の成果の1つとして達成見込みのこの味蕾刺激システムを用いてクロライド応答細胞の同定をおこない、波及成果として発表したい。

図 2



Ca²⁺ シグナルを記憶する
特殊な蛍光色素 CaMPARI2

(Front Synaptic Neurosci.,11:16 改変)

(Ⅱ-B)クロライド応答細胞のマーカー遺伝子の探索

上述の理由により、ACT-X 研究期間終了後におこなう。

(II-C)人工クロライド味を創出するための光操作技術の開発

上述の理由により、人工クロライド味を創出するマウスの作製はACT-X研究期間終了後におこなう。一方、光感受性分子を用いた光による人工味覚駆動システムの構築を下記の通り推進できた。具体的には、ナトリウム味を創出するマウスを用い、ナトリウムの味と塩(NaCl)の味の違いに関する知見を得たため、間接的にクロライド味の持つ情報の性質に関する手がかりを得ることに成功した。

Na細胞のNaセンサーは上皮型Naチャンネル(ENaC)であるため、ENaC発現細胞で選択的に光感受性陽イオンチャンネル(ChR2)を発現するマウス“光Na味マウス”を用いた。この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、Na細胞を選択的に活性化させることができる(図2)。その結果、舌への光照射によりNa味が発生することが組織学/神経応答/行動応答のレベルで強く示唆された(未発表)。具体的には、味蕾ではChR2発現細胞はNa味以外の味細胞(甘/うま/苦/酸味細胞)とは排他的に存在した。さらに、舌への光照射に応答して活動する中枢神経細胞は、舌へのNaCl刺激にも応答した(未発表)。そして、このマウスを塩欠乏状態にしてNaを欲求させると、青色光の舌への照射を積極的に求める行動応答を示した(未発表)。さらに、クロライドを含まないNa塩を摂取させた直後に内臓痛を与えることで味と生理的危険性を連合学習させて“ナトリウムの味”を選択的に嫌悪するよう学習したマウスは、光刺激を嫌悪した。すなわち、この光Na味は生理的なナトリウムの味と質的に近似しており、クロライドの味は生じていない、すなわちナトリウムの味とクロライドの味は異なる細胞が創出すると考えられた(論文投稿準備中)。

Aim(III)ナトリウム味とクロライド味の統合機構の解明

塩のおいしさに関与する脳領域の探索

塩味由来のおいしさを担う脳内メカニズムを明らかにするため、脳内で味覚情報の伝達をおこなう神経回路の各中継領域を抑制する化学遺伝学実験をおこなった。具体的には、人工GPCRであるhM4Diを脳内に発現させたマウスにhM4Diの合成リガンドであるDCZを投与することで、任意のタイミングで可逆的な神経活動抑制をおこなった。その結果、味覚回路の中で塩味に反応した摂取行動に関与する領域が明らかになった。

そこで次に、塩味情報を摂取行動に変換する神経回路を明らかにするため、神経回路選択的な光操作をおこなった。抑制性の光操作ツールeNpHR3.0を発現させた後、投射先を選択的に光抑制しながら行動を解析したところ、特定回路の選択的な抑制によって食塩の摂取量が減少した。すなわち、この神経回路が塩味に反応してその摂取を促す行動に必須であることが明らかとなり、塩の嗜好性形成(おいしさ)を担う神経回路である可能性が示唆された。

塩味応答ニューロン同定のための技術確立

さらに、活動依存的細胞標識技術を用いて塩味ニューロンおよび水味ニューロンの遺伝学的な同定に取り組んだ。まず、味覚領域に存在する神経細胞の種類を網羅的に解析すべく、一細胞トランスクリプトーム解析をおこなった。約6,000個の細胞から単一核を抽出し、1細胞ごとの遺伝子発現情報の解析およびそれを基にした細胞の分類に成功し、細胞カタログを得

た。この細胞の中から塩味ニューロンを同定すべく、特殊蛍光タンパクCaMPARI2を用いた実験をおこなった。CaMPARI2は一定濃度以上のCa²⁺存在下で紫外光(UV)が照射されると永続的に緑色蛍光分子から赤色蛍光に変換される。この性質を用いて、塩味ニューロンを赤色CaMPARI2で標識した。具体的には、ウイルス(AAV-hSyn-CaMPARI2)を用いてCaMPARI2を発現させた上で、舌への味刺激とこれに同期したUV照射を行った。この動物から細胞を単離し、まずは塩味に反応した神経細胞の1細胞トランスクリプトーム解析をおこなった。このようにして、細胞カタログの中から特定の味刺激に反応した神経細胞を特定するための技術基盤および情報基盤を確立した。

3. 今後の展開

今後は、①味蕾における塩味感知機構の解明、②脳における塩味の情報処理機構の解明に加え、ACT-X 研究から派生的に着想した、③生体内外の情報統合による塩のおいしさ調整機構の解明を3本の矢として研究を展開していきたい。

①味蕾における塩味感知機構の解明 については、ACT-X 研究で整備した味蕾標識法を基盤技術として展開し、2年以内にクロライド感知細胞を同定し、5年以内にクロライド感知細胞とナトリウム感知細胞の同時操作による塩味感覚の創出を実現したい。さらに、クロライド感知に関わる分子の探索も平衡して進め、10年以内に人工塩味料のシーズ開発につながる成果を発表したい。

②③については、3年以内に塩のおいしさの創出と変容機構に関する研究成果をまとめて発表したい。さらにその後、ACT-X 研究から着想した研究領域である、『生体内外の化学物質情報を統合して感情・行動・自律応答を出力することで、生命維持に最適な体内／体外環境を自ら構築する脳の仕組み』をコンセプトに独自の生理学研究を展開していきたい。最終的には、体内／体外への化学的アプローチによって、“人々がおのずと健康増進につながる行動を選択する社会”の実装に貢献していきたい。

4. 自己評価

クロライド感知細胞の同定については当初の想定から遅延したが、計画の方法に固執せず、現状を真摯に受け止めて柔軟に方向転換を図ったことで、長期的な視点から見ればクロライド感知細胞の同定に最短で近づいている途上にあると考えている。また、クロライド感知細胞の同定計画が進展しない期間には、脳内機構の研究に注力することで想定外の結果を得ることができ、今後の自信の軸の1つとなる研究領域の芽生えが得られたと考えている。

他の ACT-X 研究者の持つ技術の中に導入・連携したいと感じるものがあったが、コロナ禍に伴う移動制限の影響もあり直接的な行動に移すことはできなかった点は、今後改善すべき課題である。また、ACT-X 研究の期間内に論文の発表など形に残る成果を残すことはできなかったが、その分、今後の展開につながる研究の基盤を複数の領域で固めることができたと評価している。今後は、これらの研究を展開し、ACT-X から芽生えた研究として発表していくことで、『生命と化学』領域の発展に貢献できると考えている。



5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・学会発表①

野村憲吾、早津徳人、相馬祥吾、岡崎康司、樽野陽幸『ナトリウム味に関する諸問題への多角的アプローチによる取り組み』2022年度 日本味と匂学会 第56回大会