

博士論文

小型魚類メダカをモデルとした
味覚情報の伝達・認識に関わる神経細胞の解析

家木 誉史

博士論文

小型魚類メダカをモデルとした
味覚情報の伝達・認識に関わる神経細胞の解析

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻
平成 23 年度博士課程進学
生物機能開発化学研究室
家木 誉史

指導教員 東京大学大学院准教授
三坂 巧

目次	
序論	3
第1章 メダカ味蕾細胞に発現する味覚関連分子の発現相関	
序	14
材料と方法	16
結果	19
考察	23
第2章 メダカ PLC- β 2 発現細胞を起点とした味の情報伝達回路の可視化	
序	27
材料と方法	29
結果	34
考察	41
第3章 即初期遺伝子群 (IEGs) の発現を指標とした味刺激に応答する神経細胞の同定	
序	47
材料と方法	49
結果	52
考察	58
総合討論および今後の展望	62
参考文献	70
論文の要旨	82
謝辞	86

序論

【味覚系】

味覚は、食品中に含まれる呈味物質を口腔内で受容する化学感覚であり、食品を摂取するか否かを決める、生存に密接に関わる重要な感覚である。食品中の呈味物質の味情報は、味蕾と呼ばれる構造中に存在する味細胞で受容される。我々ヒトをはじめとする哺乳類においては、味蕾は口腔内の舌上、咽頭、軟口蓋の上皮に存在する。一つの味蕾は 50 から 150 個程度の細胞からなるつぼみ型の構造をしている (図 0-1)。ヒトや多くの哺乳類が味細胞を介して受容する味質としては、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の 5 つ (5 基本味) が存在する。味蕾で受容された呈味物質の情報は、味神経を介して脳の味覚中枢へ運ばれ、中枢において味として認識されることが知られている。

【哺乳類における味覚受容の分子機構】

分子生物学的な解析により、G タンパク質 α サブユニットであるガストデュージン *Gagust* が発見されたこと (McLaughlin *et al.*, 1992) を皮切りに、マウスやラットの味蕾に発現するシグナル伝達分子が見つかった。それらの発現を解析することにより、味蕾を構成する細胞の機能的な分類が分子レベルで記述できるようになり、味物質ごとに受容される細胞がそれぞれ異なることが明らかになりつつある。

ヒトが認識する 5 基本味のうち、甘味、旨味、苦味の受容体としては、7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) である T1R ファミリー、T2R ファミリーが報告されている (Hoon *et al.*, 1999; Adler *et al.*, 2000; Chandrashekar *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002)。培養細胞を用いたヘテロ発現系による機能解析およびノックアウト (KO) マウスを用いた生理学的な解析より、T1R2 と T1R3 のヘテロマーがショ糖やサッカリン、モネリンなど甘味物質の受容体として機能することが示された (Nelson *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003)。また、T1R1 と T1R3 のヘテロマーが旨味物質である L-グルタミン酸を含めた L-アミノ酸を受容することが明らかとなり、これらを共発現する細胞が旨味の受容に関わることが示された (Li *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003)。さらに、マウスでは T2R ファミリーが約 30 個の遺伝子から成ることが示されており、遺伝学的解析と機能解析により、これらの幾つかはデナトニウム、シクロヘキシミド、PROP (propylthiourea) といった苦味物質を受容することが明らかになっている (Adler *et al.*, 2000; Chandrashekar *et al.*, 2000; Matsunami *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2005)。そして T1R2/T1R3 のヘテロマー、T1R1/T1R3 のヘテロマー、および T2R ファミリーがいずれも別々の味細胞で発現することが示されたので、甘味、旨味、苦味の受容細胞はそれぞれ別々の細胞であることが明らかになった。T1Rs と T2Rs の下流のシグナル伝達経路は、ホスホリパーゼ C- β 2 (PLC- β 2) を介したイノシトールリン脂質代謝系が示されている。PLC- β 2 は、甘・旨味の受容体である T1R ファミリー、苦味受容体である T2R ファミリーを発現する細胞で共発現すること (Miyoshi *et al.*, 2001)、さらに、PLC- β 2 の KO マウスでは、甘味、旨味、苦味の 3 基本味に対する神経応答が観察されな

くなり、行動解析においても嗜好性の味覚に対して応答を示さなくなるという報告 (Zhang *et al.*, 2003) から甘味、旨味、苦味の受容に必須の味覚シグナル伝達因子であることが明らかになった。また、陽イオンチャネルファミリーの一つである TRPM5 (transient receptor potential M5) も PLC- β 2 と共発現し、TRPM5 を KO したマウスにおいては PLC- β 2KO マウスと同様に甘味、旨味、苦味の味応答の消失が見られたことより、TRPM5 も甘味、旨味、苦味の味情報伝達に必須なシグナル伝達分子であることが示された (Zhang *et al.*, 2003)。T1R、T2R から PLC- β 2 へシグナルを伝達する G タンパク質 α サブユニットの候補としては、T2Rs 発現細胞にも発現する G α gust、PLC- β 2 と共発現する G α i2 が挙げられている (Asano-Miyoshi *et al.*, 2000; Miyoshi *et al.*, 2001)。しかし、齧歯類であるマウスや霊長類であるマカク舌後方部の味蕾では、これらの G タンパク質以外に、一部の T1Rs 発現細胞において G α 14 が発現していることが明らかになっており (Tizzano *et al.*, 2008; Ishimaru *et al.*, 2012)、G α 14 も一部の味蕾では味情報伝達に関与している可能性が考えられる。

PLC- β 2 の下流については、3 型 IP₃ 受容体 (IP₃R3) が PLC- β 2 と共発現すること、IP₃R3 の KO マウスでは甘・旨・苦味に対する神経応答が低下すること (Hisatsune *et al.*, 2007)、さらに IP₃ およびカルシウムイオンにより TRPM5 が開口すること (Zhang *et al.*, 2007) から IP₃R3 が TRPM5 へのシグナル伝達を担うと考えられる。以上の解析より、甘・旨・苦味を伝達する経路は、T1R または T2R から 3 量体 G タンパク質を介し PLC- β 2 が活性化され、IP₃ が遊離し IP₃R3 が開いて細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇し、TRPM5 の開口を経て脱分極に至る経路が想定されている。

酸味に関しては、TRP イオンチャネル分子 PKD ファミリーの PKD2L1 および PKD1L3 が受容体の有力候補として同定された (Huang *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2006)。これらの分子は味蕾中で PLC- β 2 発現細胞つまり、甘、旨、苦味の 3 基本味の受容細胞とは別の味細胞で共発現していることが報告されている。ヘテロ発現系での機能解析では、これらの分子の複合体が塩酸やクエン酸などの酸味物質に応答することが示されている (Ishimaru *et al.*, 2006)。また、ジフテリアトキシンの発現誘導により PKD2L1 細胞を消失させたトランスジェニック (Tg) マウスでは、酸味刺激に対する味神経応答がなくなることも示されている (Huang *et al.*, 2006)。しかし、PKD1L3 は舌後部に存在する味蕾においてのみ発現するため、その他の領域において PKD2L1 と共発現して相互作用する分子については不明である。また、最近 PKD2L1 および PKD1L3 を欠損したマウスの神経応答解析により、酸味に対する応答が完全には消失しないことが示されており (Horio *et al.*, 2011)、他にも酸味の受容に関与する分子があることが示唆されている。

塩味については、以前から上皮性ナトリウムチャネルの ENaC (epithelial sodium channel) が関与することが示唆されており、最近、低濃度の塩 (塩化ナトリウム、塩化カリウム) に対してはアミロライド感受性の受容体として、ENaC が関与していることが報告された (Chandrashekar *et al.*, 2010)。この低濃度の塩味の受容を担う味細胞は、他

の4基本味（甘、旨、苦、酸）の受容細胞とは別であることが示されている。一方で、高濃度の塩に対しては、どのような分子が関与しているかは未だに解明されていない。ごく最近、高濃度塩味の受容が T2Rs 発現細胞および PKD2L1 発現細胞を介するという報告がなされた (Oka *et al.*, 2013)。しかし、高濃度の塩味受容のメカニズムに関しての詳細は不明であり、いまだ酸味と塩味の受容に関しては不明な点が多い。

【味覚情報の伝達機構】

味蕾に投射する味神経は3つの感覚神経節に由来し、それぞれの味神経は異なる領域の味蕾に投射することが知られている。舌前部2/3に存在する茸状乳頭や葉状乳頭の一部は鼓索神経、軟口蓋の味蕾は大錐体神経が投射する。いずれも顔面神経（第VII脳神経）の一部である。舌後部1/3に存在する有郭乳頭や葉状乳頭の味蕾は舌咽神経（第IX脳神経）の一部が投射する。喉頭の味蕾は迷走神経（第X脳神経）の一部の上喉頭神経が投射する（図0-2）。それぞれ顔面神経の膝神経節（geniculate ganglion, GG）、舌咽神経の下神経節（petrosal ganglion, PG）、迷走神経の下神経節（nodose ganglion, NG）という神経節に細胞体が存在する。また、これら味覚に関わる神経とは別に、三叉神経（第V脳神経）が味蕾近傍に投射し、味覚の伝達には関与していないが、舌前部2/3の一般体性感覚を伝達していることが示されている。三叉神経の細胞体は三叉神経節に存在する。

味神経から中枢神経系へと運ばれた味覚情報の伝達経路の概略は、既に示されている (Smith and St John, 1999)。げっ歯類においては、味神経から運ばれた味覚情報は全て延髄の孤束核 (Nucleus of the solitary tract, NST) に投射する。NSTからは橋の結合腕傍核 (parabrachial nucleus, PBN) に投射する。PBNからは、視床後内側腹側核小細胞部 (ventral posterior medial nucleus of the thalamus, VPM)、外側視床下部 (lateral hypothalamus, LH)、分界条床核 (bed nucleus of the stria terminalis, BST)、扁桃体中心核 (central nucleus of the amygdala, Amyg) のそれぞれに伝達される。VPMからはさらに大脳皮質味覚野 (gustatory cortex, GC) へと情報が伝達されることが報告されている（図0-3）。

末梢の味蕾においては、先に述べたとおり高濃度塩味を除き、原則として基本味の味情報は別々の味細胞で受容されることが示されている (Adler *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002; Ishimaru *et al.*, 2006; Chandrashekar *et al.*, 2010)。我々が呈味物質を受容した際に、味神経を介して上記の神経核中の神経細胞へ味情報が伝達され、嗜好味、忌避味という認識がなされていると考えられる。しかし、これらの神経核内のどのような神経細胞がどの味の情報伝達・認識に関わっているかについてはほとんど不明である。このように味の情報伝達や認識に関わる神経細胞の同定自体があまりなされていないため、味覚に関わる神経細胞の特徴が現時点では明らかになっていない。また、受容された呈味物質の情報が味覚中枢へ伝達され味として認識されるまでの味情報の統合・分離（味覚情報のコーディング機構）に関しては古くから電気生理学的手法を用いて解析がなされているが、統一見解がなされておらず、詳細は不明である。味刺激に対する単一

神経細胞の応答を記録した実験により、味神経から大脳皮質味覚野の味覚神経細胞の多くは2種類以上の味刺激に対して応答することが知られている。しかし、神経の多くはどの味に対しても等しく応答するのではなく、特定の味に特に強く応答することも示唆されている (Lundy and Contreras, 1999; Verhagen *et al.*, 2003; Sollars *et al.*, 2006)。こうした実験結果から、神経系における味覚情報のコーディング機構に関しては、主に以下の2つの仮説が提唱されている。個々の神経細胞は1種類の基本味の伝達のみを受け持ち、個々の基本味の情報は別々の神経により伝達されるという *labeled line* 仮説 (Frank, 1973; Yarmolinsky *et al.*, 2009) と、個々の神経細胞が複数の味に対して異なる強度で応答し、その神経細胞群の応答パターンによって味情報を認識しているとする *across fiber pattern* 仮説 (Doetsch and Erickson, 1970; Ganchrow and Erickson, 1970) の2つが提唱されている (図 0-4)。近年では、大脳皮質味覚野におけるマウスの大脳の *in vivo* Ca²⁺イメージング解析により味刺激によって、注入した Ca 蛍光指示薬の蛍光強度変化を解析することにより甘味、旨味、苦味、低濃度 NaCl に応答する領域が異なることを示した報告がある (Chen *et al.*, 2011) など *labeled line* 仮説が有力になりつつある。

【即初期遺伝子を用いた味応答神経細胞の解析】

神経系における味覚情報のコーディング機構の解明のための一つのアプローチとして、神経活動依存的に一過的に発現レベルが上昇する *c-fos* などの即初期遺伝子群 (*immediate early genes*, IEGs) を指標とし、味刺激に応答する神経細胞を同定する方法が挙げられる。これは動物に対して感覚刺激を施し、数分から数時間後の中枢神経系における IEGs の mRNA やタンパク質の発現分布を組織学的に解析するという手法である。この手法は主にラットを用いて味覚情報伝達回路の解析にも応用されている (図 0-5)。たとえば、ラットの味覚1次中枢である NST においては、甘味・酸味刺激後に *rostral NST* (NST 前方部) の領域において広範囲に *c-Fos* 発現細胞が観察されたのに対し、苦味刺激後では、内側部の狭い領域に密集して発現細胞が観察されている (Harrer and Travers, 1996; King *et al.*, 1999; Travers *et al.*, 1999; Travers, 2002)。味覚2次中枢である PBN においては、*rostral NST* からの投射を密に受ける PBN 領域のうち、甘味・塩味による刺激で応答する *c-Fos* 発現細胞は背内側に位置する領域に集中し、苦味・酸味による刺激で応答する *c-Fos* 発現細胞は腹外側部に位置する領域に集中することが示されている (Yamamoto *et al.*, 1994)。このように、味覚中枢の一部ではあるが、味の種類による情報経路の分離という中枢神経系における味覚情報コーディング機構の一端の解明に貢献している。

しかし、IEGs の発現を利用した解析では、全ての神経細胞が興奮時に IEGs を発現するわけではないことが示されている (Kovacs, 1998) 点や、味覚の刺激だけに応じて発現が誘導されるわけではない点には注意しなければならない。

【感覚経路の可視化】

神経伝達回路の解析をするためには、古くから HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ)、蛍光色素 (DiI, DiO など)、レクチンなどの神経トレーサーを組織中の特定の部位に直接注入し、トレーサーの移行経路を解析する手法が用いられてきた。このような古典的なトレーサー注入による伝達経路の解析では、起点となる領域をある程度は制限できるものの、細胞単位で特定の細胞集団のみに過不足なく注入し起点とすることは技術的に非常に困難であり、再現性のある解析を行うことも難しい。

そこで近年、遺伝子工学的手法を用いて経シナプス性神経トレーサーの一つである小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin, WGA) を特定の細胞種特異的に発現させて接続している神経回路を解析する技術が開発された。WGA は、小麦胚芽に含まれる糖鎖付加タンパク質であり、糖タンパク質や糖脂質中の N-アセチルグルコサミンやシアル酸に結合する性質を持つ。この遺伝子を細胞種特異的なプロモーターを用いて神経と接続する特定の細胞に発現させると、WGA タンパク質は近傍の神経細胞の細胞膜表面の糖鎖に結合し、細胞内に取り込まれる。その後 WGA タンパク質は神経細胞内を軸索末端まで輸送され、開口分泌によりシナプス間隙に曝露され、2 次神経の膜表面に存在する WGA 結合糖鎖構造へと平衡関係により受け渡される。この技術は、まず嗅覚系の神経回路の解析に用いられており、特定の嗅神経細胞 (olfactory sensory neuron, OSN) において WGA を特異的に発現させ、OSN とシナプス接続している 2 次嗅神経を介し 3 次神経において WGA タンパク質を検出しようことが報告された (Yoshihara *et al.*, 1999; Yoshihara, 2002)。また、WGA と同じく植物レクチンである大麦レクチン (barley lectin, BL) を遺伝子工学的に使用して嗅覚神経回路の解析をした報告もある (Horowitz *et al.*, 1999)。

WGA トランスジーンを用いた可視化技術は味覚の神経回路の解析にも用いられている (図 0-6)。解析例としては、まず、甘味・旨味受容体である T1R3 発現細胞および苦味受容体である T2R5 発現細胞に、それぞれ T1R3-GFP もしくは T2R5-GFP 融合タンパク質と WGA-DsRed 融合タンパク質とを同時に発現させた 2 種の Tg マウスを用いて解析され、甘味・旨味と苦味の味覚情報伝達経路が末梢から中枢まで異なることを示したと報告された (Sugita and Shiba, 2005)。しかし、この報告は写真の解像度が極めて低い上、後で述べるように当研究室および別のグループが同じプロモーター配列を用いて解析した報告とは結果が大きく異なっており、信頼できるデータではないと考えている。当研究室においてはまず、T1R3 発現細胞で WGA を発現させた Tg マウスの解析を行い、脳の味覚 1 次中枢である延髄の孤束核 (NST) までの甘味・旨味情報伝達経路を可視化した (Ohmoto *et al.*, 2008)。同じく T1R3 プロモーターを用いた解析は、別のグループからも報告され、Sugita らの報告ではなく、当研究室の報告が支持された (Damak *et al.*, 2008)。その後も当研究グループでは、T2R5 発現細胞および酸味受容体候補分子 PKD1L3 発現細胞に WGA を発現させた Tg マウスの解析も行い、T2R5 発現細胞を起点とした味神経までの苦味情報伝達経路および、PKD1L3 発現細胞を起点とした味覚 1 次中枢までの酸味情報伝達経路の可視化に成功している (Ohmoto *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2011)。

このように経シナプス性神経トレーサーを遺伝子工学的に利用することで、発現元の味細胞を厳密に特定し、各基本味の情報伝達神経回路の可視化が可能となるため、味覚情報のコーディング機構の解明に有効であると考えられる。しかしながら、現時点ではマウスにおける解析では味覚 1 次中枢までの可視化にとどまっており、味覚高次中枢までの可視化はできていない。また、複数の味質の情報伝達経路の相関も現状では解析が困難であり、味覚の情報伝達・認識に関わる神経細胞の同定や、神経系におけるコーディング機構の解明には課題が多く残されている。

【魚類の味覚系】

哺乳類を用いた味覚研究について今まで述べてきたが、脊椎動物における味覚システムの解析モデルとして、魚類も古くから研究がなされている。

魚類の味蕾は、口腔内だけでなく、口唇や鰓上にも存在し、魚種によっては体表や触鬚（しょくしゅ）にも分布している。メダカにおいては口唇、鰓耙、咽頭部に味蕾が存在していることが既に示されている (Yasuoka *et al.*, 2004; Aihara *et al.*, 2007) (図 0-7)。魚類の味蕾の形状は、魚種により異なり、さらに同一魚種でも存在部位によって異なるが、一般的に梨状の形態をしており、哺乳類の味蕾に比べやや下膨れしている (Reutter, 1971; Hansen *et al.*, 2002)。

魚類の味覚受容体や味覚シグナル伝達分子については、当研究室を中心に解析がなされている。まず、ドジョウの触鬚で PLC-β2 遺伝子の発現を明らかにしたこと (Asano-Miyoshi *et al.*, 2000) に始まり、メダカとゼブラフィッシュの味蕾でも同遺伝子の発現を確認した (Yasuoka *et al.*, 2004; Ishimaru *et al.*, 2005)。さらに、ゲノム情報から哺乳類の T1R 分子および T2R 分子の相同分子を同定し、それぞれ旨味物質であるアミノ酸、苦味物質であるデナトニウムに応答することが示され、これらの分子が味蕾細胞の PLC-β2 に内包されて発現することも明らかにした (Ishimaru *et al.*, 2005; Oike *et al.*, 2007)。また、脱分極に関わる TRPM5 の相同分子も、ゼブラフィッシュにおいて味蕾の PLC-β2 発現細胞に発現することを明らかにした (Yoshida *et al.*, 2007)。また、メダカに関しては、PLC-β2 遺伝子の転写制御領域の取得に既に成功している (Aihara *et al.*, 2007)。この転写制御領域を用いて、PLC-β2 の活性化を抑制する性質のある G タンパク質 Gα₁₂S47C (Slepek *et al.*, 1995) を PLC-β2 発現細胞に発現させることにより、アミノ酸およびデナトニウムの摂食応答に変化が生じることも示した (Aihara *et al.*, 2008)。以上の解析から、魚類においても GPCR から PLC-β2 を介したイノシトールリン脂質シグナル伝達系を経て脱分極に至る、哺乳類と相同な経路の存在が強く示唆される (表 0-1)。ただし、魚類の PLC-β2 発現細胞中では、T1R ファミリー (T1Rs) および T2R ファミリー (T2Rs) の発現細胞が占める割合が低いこと (Ishimaru *et al.*, 2005; Oike *et al.*, 2007; Ohmoto *et al.*, 2011) が示されており、PLC-β2 発現細胞には他の味覚受容体の存在も示唆される。

魚類の味蕾は、哺乳類と同様に脳神経の VII (顔面神経)、IX (舌咽神経)、X (迷走神

経)に支配されている(図 0-7)。味蕾に投射している各神経は、体の前後軸に対応しており、体表および口唇部の味蕾には顔面神経、舌弓および第 1 鰓弓の味蕾には舌咽神経、第 2~4 鰓弓および咽頭部の味蕾には迷走神経が投射している。これらの神経の細胞体はそれぞれ顔面神経節(VIIg)、舌咽神経節(IXg)、迷走神経節(Xg)とよばれる神経節に存在する。興味深いことに、味蕾の機能は、支配している神経により異なっている。顔面神経に支配されている体表や口唇に存在する味蕾は、餌を探し拾い上げるのに関わり、舌咽および迷走神経に支配される味蕾は餌を最終的に飲み込むことに関与することが示されている(Atema, 1971)。

魚類において、味蕾を支配する神経と中枢との連絡に関しては古くから形態学的な解析が行われていた(Herrick, 1901)。その後、神経切除を利用した新しい解剖学的手法により味覚の中枢経路はより一層解明され始めた(Finger, 1976; Finger, 1978; Morita *et al.*, 1980)。さらに、神経トレーサーとなる色素を味覚中枢へ直接注入した実験(Kanwal *et al.*, 1988; Lamb and Caprio, 1993; Kanwal and Finger, 1997; Yoshimoto *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2012)により、いくつかの魚種において味覚中枢への伝達経路が解明されてきた。一般的に、味蕾から VIIg、IXg、Xg の 3 つの神経節を介し、延髄の味覚 1 次中枢である顔面葉(facial lobe, VIII)、迷走葉(vagal lobe, XL)へ投射する。ここから二次味覚路を通り、峡(isthmus)にある第 2 味覚核(secondary gustatory nucleus, NGS)へ投射する。さらに NGS から視床下部の下葉(inferior lobe, LI 哺乳類の視床下部に相同)の分散核(diffuse nucleus of inferior lobe, NDLI)や、糸球体の第 3 味覚核(preglomerular tertiary gustatory nucleus, pTGN)に投射する経路が存在する(図 0-8)。ここまではすべての真骨魚に共通して見られる経路であると考えられている(会田勝美, 2002)。

しかし、高次中枢である終脳へ投射する味覚中枢領域については、いくつか報告例があるものの統一見解が得られていない。ナマズでは、VIII、XL から間脳の nucleus lobobulbaris という領域へ投射が見られ、この領域から終脳の背側野内側部(medial part of the dorsal telencephalic area, Dm)への投射が報告されている(Kanwal *et al.*, 1988)。キンギョでは下葉の外側堤(nucleus diffuse tori lateralis)という領域から Dm への投射が報告されている(Rink and Wullimann, 1998)。一方、スズキ型魚類のティラピアでは、終脳へは、NGS から 2 つの経路で投射していると報告されている(Yoshimoto *et al.*, 1998)。一つは pTGN へ投射し、終脳の背側野内側部の背側部(dorsal region of Dm, dDm)に行く経路である。もう一つは、NGS から外側前脳側を通り直接終脳に入り、終脳背側野中間部(intermediate part of the ventral telencephalic area, Vi)と終脳背側野後部(posterior part of the dorsal telencephalic area, Dp)に終始する経路である。この解析では、NGS からは、視床後核(nucleus of posterior thalamus, NPT)や下葉領域の中心核(central nucleus of inferior lobe, NCLI)、外側再会核(nucleus of lateral recess, NRL)にも投射していると報告している。さらに、解析結果から魚類と哺乳類の味覚伝達経路を比較しており、NGS から pTGN を介し dDm への投射経路は大脳皮質味覚野 GC へ至る経路に相当し、NGS から Vi、Dp

への投射経路は哺乳類における PBN から扁桃体への投射経路に相当すると示唆している。また最近、キンギョにおいては、pTGN と medial preglomerular nucleus (PGm) から dDm へ投射しているという報告がなされており (Kato *et al.*, 2012)、pTGN を介して dDm へ投射する回路は魚類に共通の味覚高次中枢への神経回路であることが示唆されている。しかし、味覚 3 次中枢以降、特に終脳への投射については、魚種により様々な神経核同士の接続が報告されており (Folgueira *et al.*, 2004b; Folgueira *et al.*, 2004a; Kato *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2012)、共通見解が得られず未解明な点が多く残っている。また、メダカやゼブラフィッシュといった小型魚類における味覚伝達経路の解析例は不足しており、魚類の味覚情報伝達神経回路の詳細はいまだ不明であると考えられる。

【モデル動物としての小型魚類メダカの有用性】

メダカやゼブラフィッシュといった小型魚類は、我々ヒトと同じ脊椎動物でありながら、進化的に古く、脊椎動物固有の組織系の解析モデルとして使われてきた。これらの小型魚類は、多産で、世代交代期間が短く、飼育も容易で、遺伝学的な解析に有利である (Streisinger *et al.*, 1981; Wittbrodt *et al.*, 2002)。また、Tg 個体の作出が容易、発生初期は透明なので体内の様子が観察可能、個体サイズが小さいため組織学的な解析による遺伝子の発現分布の検出も比較的容易であるなど、マウスやラットにない実験上有利な点も多い。

神経回路の研究をするにあたっては、体の透明性や個体サイズの小ささから、Ca²⁺の濃度に応じて蛍光強度が変化する蛍光カルシウムセンサーである GCaMP や inverse pericam (IP) (Nagai *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2001) を脳神経細胞に発現させた Tg ゼブラフィッシュを用いた解析が行われている。生きた状態のゼブラフィッシュに感覚刺激を与え、応答する神経細胞の発火を、蛍光カルシウムセンサーの蛍光強度変化によって解析する方法が試みられている (Wachowiak *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2011; Muto *et al.*, 2013)。このように小型魚類は神経回路の研究に有用であると考えられる。

また小型魚類は、個体サイズが小さくニューロン自体も短いため、神経トレーサーが効率よく輸送され、より高次中枢まで到達できることが考えられる。脳のサイズが小さく、神経細胞も哺乳類に比べて少ないため、脳へ運ばれる段階でトレーサーが濃縮され、より高次中枢まで到達する可能性もあると考えられる。特にメダカについては、味蕾の数が約 3200 個であり (unpublished data)、マウスの味蕾の数が約 600 個 (Zhang *et al.*, 2008) であるのに比べて多いことがわかる。このことから、味蕾で発現させた神経トレーサーがより高次中枢まで輸送される可能性が高いと期待される。このようにメダカは味覚の神経回路の詳細な解析には非常に有用な実験動物であり、我々ヒトが味を認識する仕組みを研究するためのモデル動物として有用であると考えられる。

【本研究の目的】

味情報の伝達、認識に関わる中枢の神経細胞についての研究は、電気生理学的な応答実験や IEGs の応答を指標とした実験、WGA を遺伝子工学的に用いることで特定の味覚情報伝達神経回路を可視化する実験などが試みられている。しかし、味情報の伝達、認識に関わる神経細胞の同定に関しては一部しか知らされておらず、いまだ詳細は不明である。このような神経細胞を同定することにより、味の認識に関わる神経細胞の特徴を知ることができ、最終的には我々ヒトが脳で味を認識する仕組みの解明にもつながると考えられる。そこで本研究では、味情報の伝達・認識に関わる神経細胞の同定を目的とした。

前述のように味覚の神経回路の詳細な解析に有効なメダカを実験動物に用いることが得策と考え、メダカの味細胞で受容された味の情報伝達・認識に関わる神経細胞の同定を試みた。具体的には、まずメダカの味覚受容についての分子基盤的な知見を得るため、メダカ味蕾に発現する味覚関連分子の発現様式を調べた。次に、WGA を味蕾に発現する Tg メダカを作成し、接続する神経回路の可視化を行った。最後に、味刺激に対して応答する IEGs を同定し、応答する神経細胞の味質による分布の違いについて解析することで、味情報の伝達・認識に関わる神経細胞の特徴を見出すことを試みた。

表0-1 魚類と哺乳類の味覚シグナル伝達分子の相同性

生物種	魚類				
味質	甘味	旨味	苦味	酸味	塩味
受容体	?	T1R1/T1R3 T1R2/T1R3	T2Rs	?	?
シグナル伝達関連分子	?	PLC-β2, TRPM5			

生物種	哺乳類(マウス)				
味質	甘味	旨味	苦味	酸味	塩味
受容体または受容細胞	T1R2/T1R3	T1R1/T1R3	T2Rs	PKD2L1/ PKD1L3	低濃度は ENaC / 高濃 度はT2Rsや PKD2L1発現 細胞
シグナル伝達関連分子	PLC-β2, TRPM5, IP ₃ R3				

(注) 酸味や塩味は未解明な部分も多く、候補分子も含む

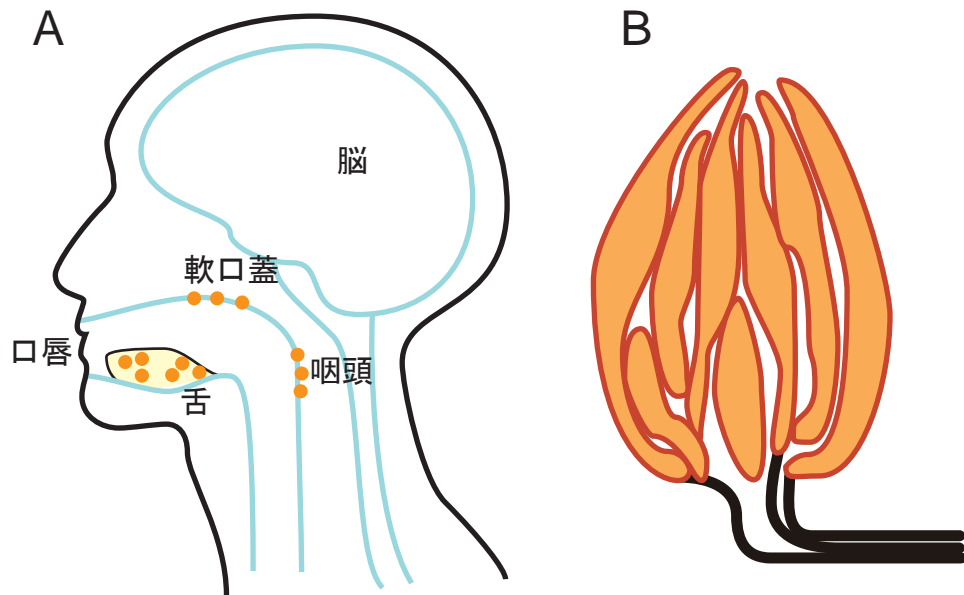


図0-1 ヒトの味蕾存在部および味蕾の模式図

A, ヒトの味蕾存在部の模式図。味蕾存在部は橙色の丸、舌は黄色で示した。
B, 味蕾の構造の模式図。橙色は味蕾細胞を表す。黒線は接続する味神経。

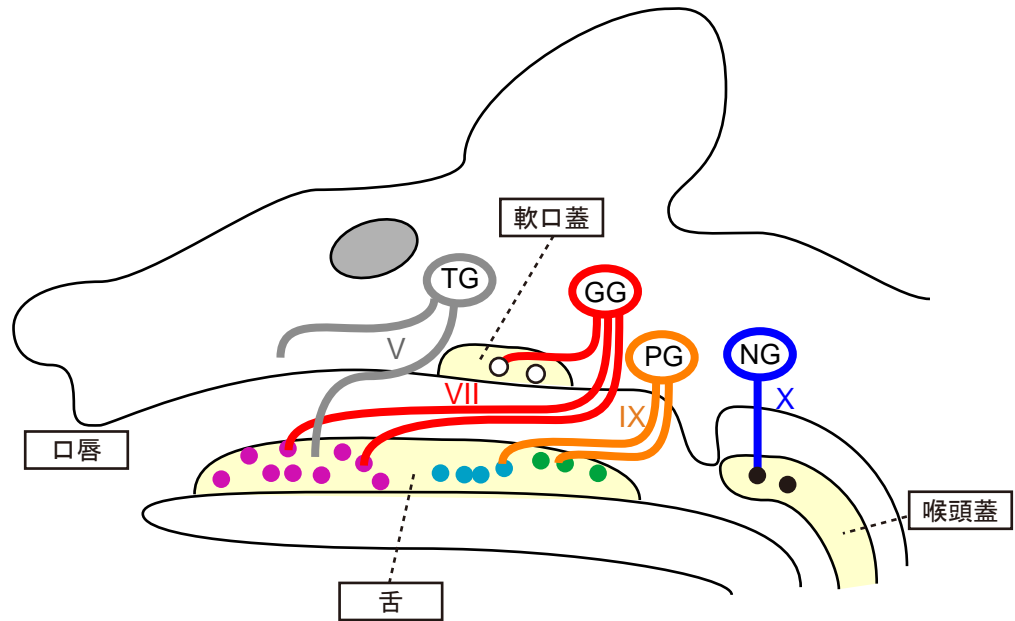


図 0-2 哺乳類における味蕾およびその周辺に投射する感覚神経

マウスの味蕾存在部と味蕾および周辺に投射する神経について示した。

味蕾存在部である舌と軟口蓋、喉頭蓋は黄色で示した。舌中の桃色は茸状乳頭、水色は葉状乳頭、緑は有郭乳頭、白は軟口蓋、黒は喉頭蓋の味蕾。

V: 三叉神経 (灰)、VII: 顔面神経 (鼓索および大錐体神経) (赤)、IX: 舌咽神経 (橙)、X: 迷走神経 (上喉頭神経) (青)。

TG: 三叉神経節 (trigeminal ganglion)、GG: 膝神経節 (geniculate ganglion)、PG: 舌咽神経の下神経節 (petrosal ganglion)、NG: 迷走神経の下神経節 (nodose ganglion)

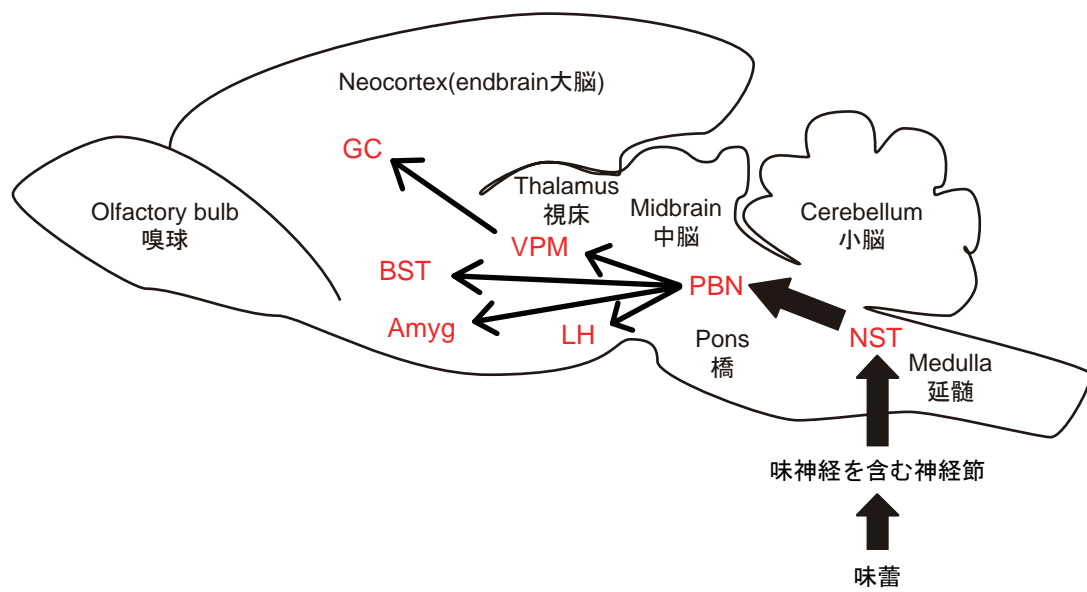


図 0-3 げっ歯類の味覚神経伝達経路

げっ歯類における味覚上行性の投射経路を模式的に表した。味細胞で受容された味情報は、味神経を含む神経節を介し、延髄の孤束核 (NST, nucleus of the solitary tract) の頭部側の細胞に伝達される。その後、橋結合腕傍核 (PBN, parabrachial nucleus) を経由し、視床後内側腹側核小細胞部 (VPM, ventral posterior medial nucleus of the thalamus, parvocellular division)、外側視床下部 (LH, lateral hypothalamus)、分界条床核 (BST, bed nucleus of the stria terminalis)、扁桃体中心角 (Amyg, central nucleus of the amygdala) に伝達され、VPM からはさらに大脳味覚野 (GC, gustatory cortex) へと情報が伝達される。味覚情報が投射される領域は赤字で、脳の構造上の名称は黒字で記した。

図は Smith DV and St John SJ (1999) から引用し、改変。

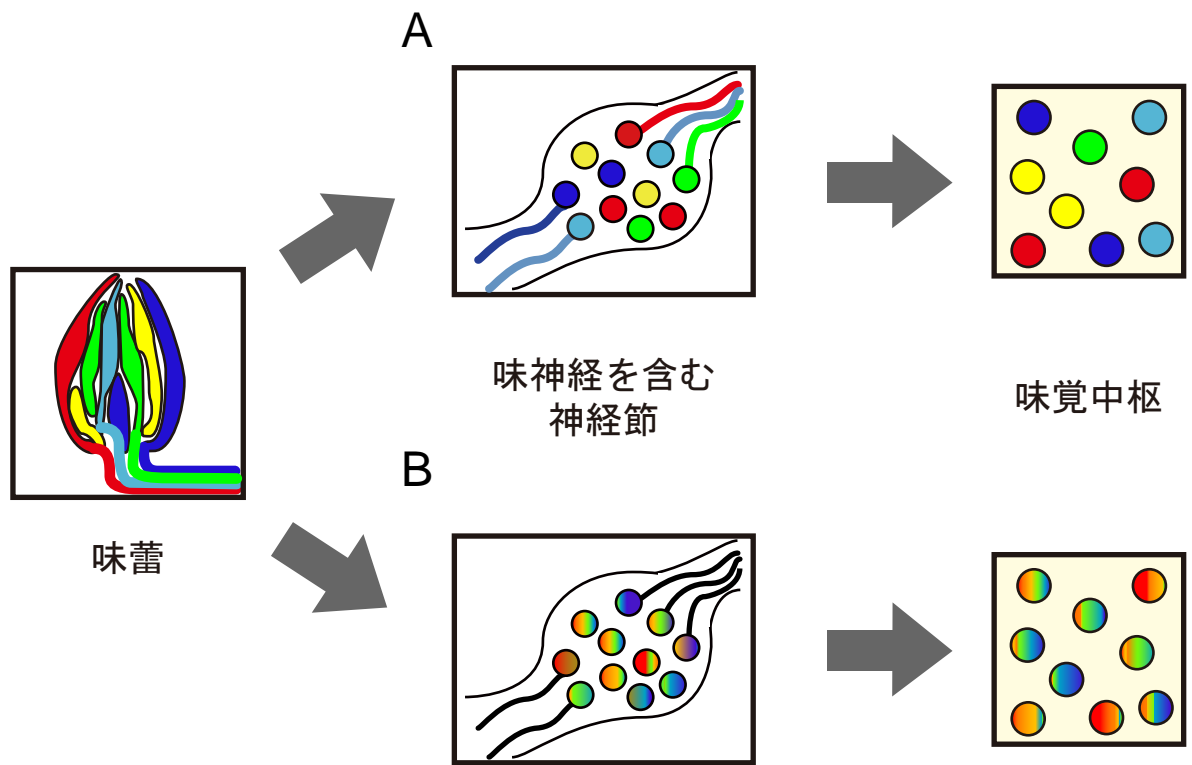


図 0-4 味覚情報のコーディング機構についての 2 つの仮説

A, labeled line 仮説の模式図。

B, across fiber pattern 仮説の模式図。

味蕾において、5 基本味の受容細胞は別々の色で示した。神経節および味覚中枢で色が混ざっているのは味情報が統合されたことを示す。味蕾や神経節から伸びている線は神経線維であり、味情報が統合された場合は黒で示した。

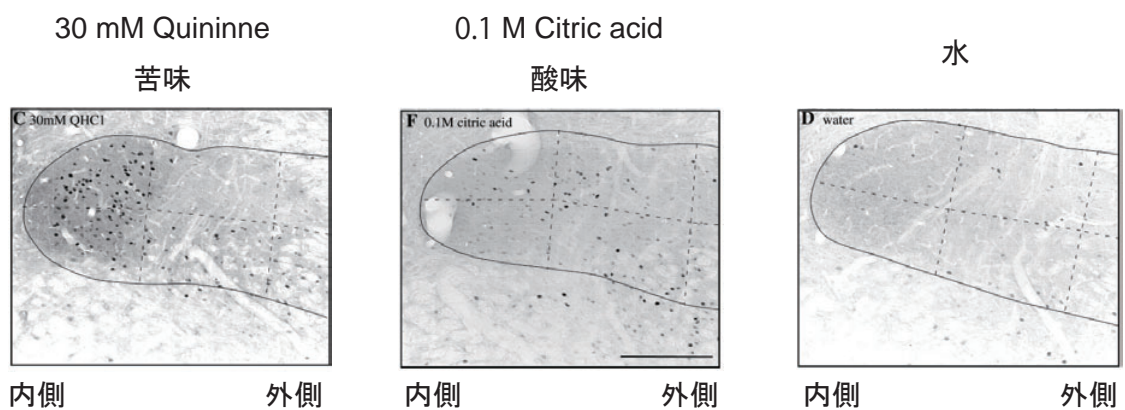


図 0-5 c-fos タンパク質の発現を用いた味刺激応答神経細胞の解析例

異なる味刺激後の rostral NST における c-fos タンパク質シグナルの分布。酸味刺激後に比べて、苦味刺激後で観察される c-fos 陽性細胞はより内側に密集した分布を示す。図は Travers 2002 より引用。

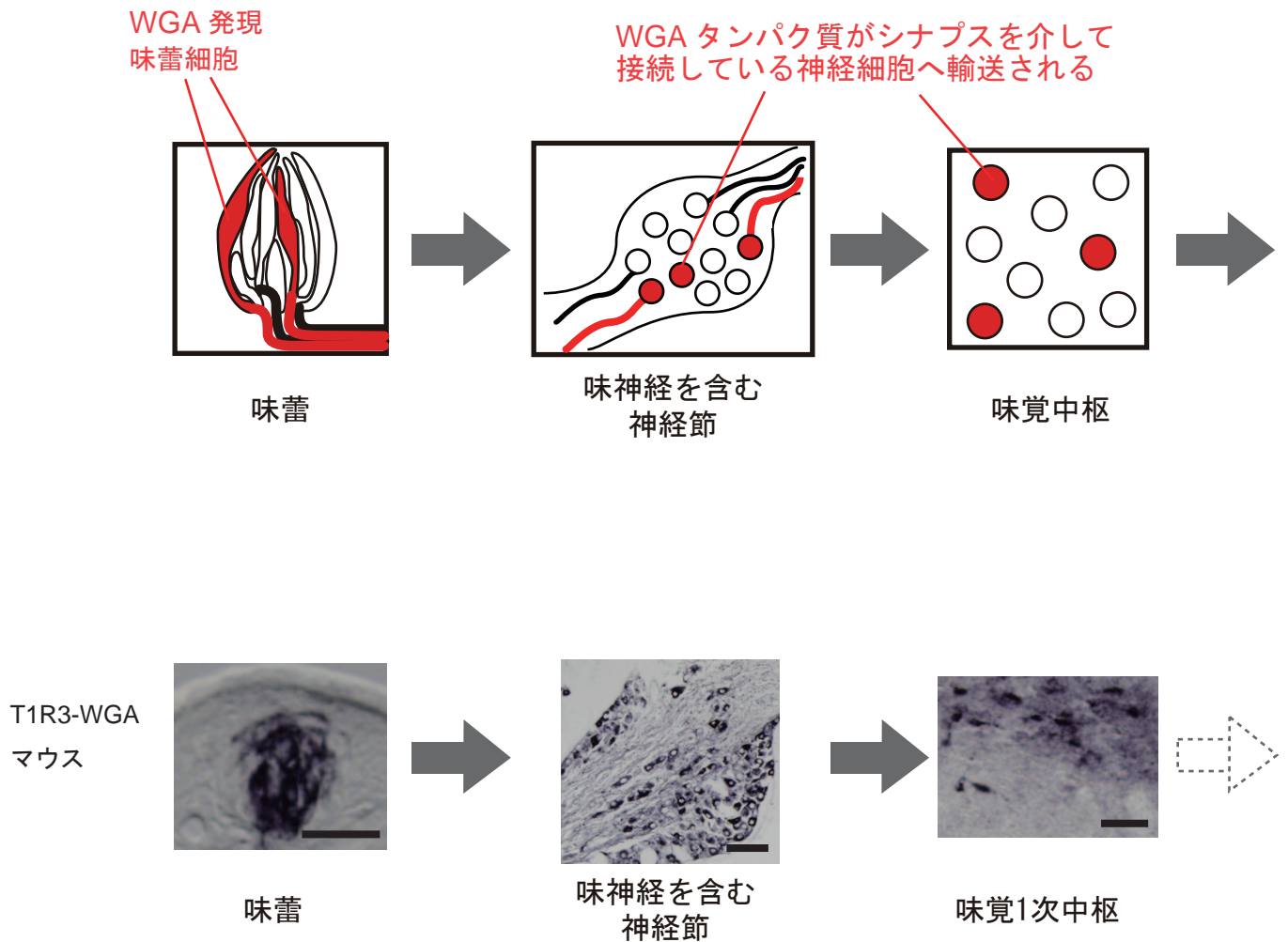


図 0-6 WGA を遺伝子工学的に特定の味蕾細胞に発現させたときの WGA の発現および輸送解析例
 特定の味蕾細胞に WGA トランスジーンを発現するトランスジェニック個体を用いた WGA タンパク質の輸送について、上段に模式図を、下段に実際に T1R3 発現細胞に WGA トランスジーンを発現する T1R3-WGA マウスを用いた解析結果の一部を載せた。写真は Ohmoto et al., 2008 より引用した。味覚 1 次中枢の神経細胞までの可視化に成功している。スケールバーは味蕾が 10 μm 、神経節が 100 μm 、味覚 1 次中枢が 50 μm 。

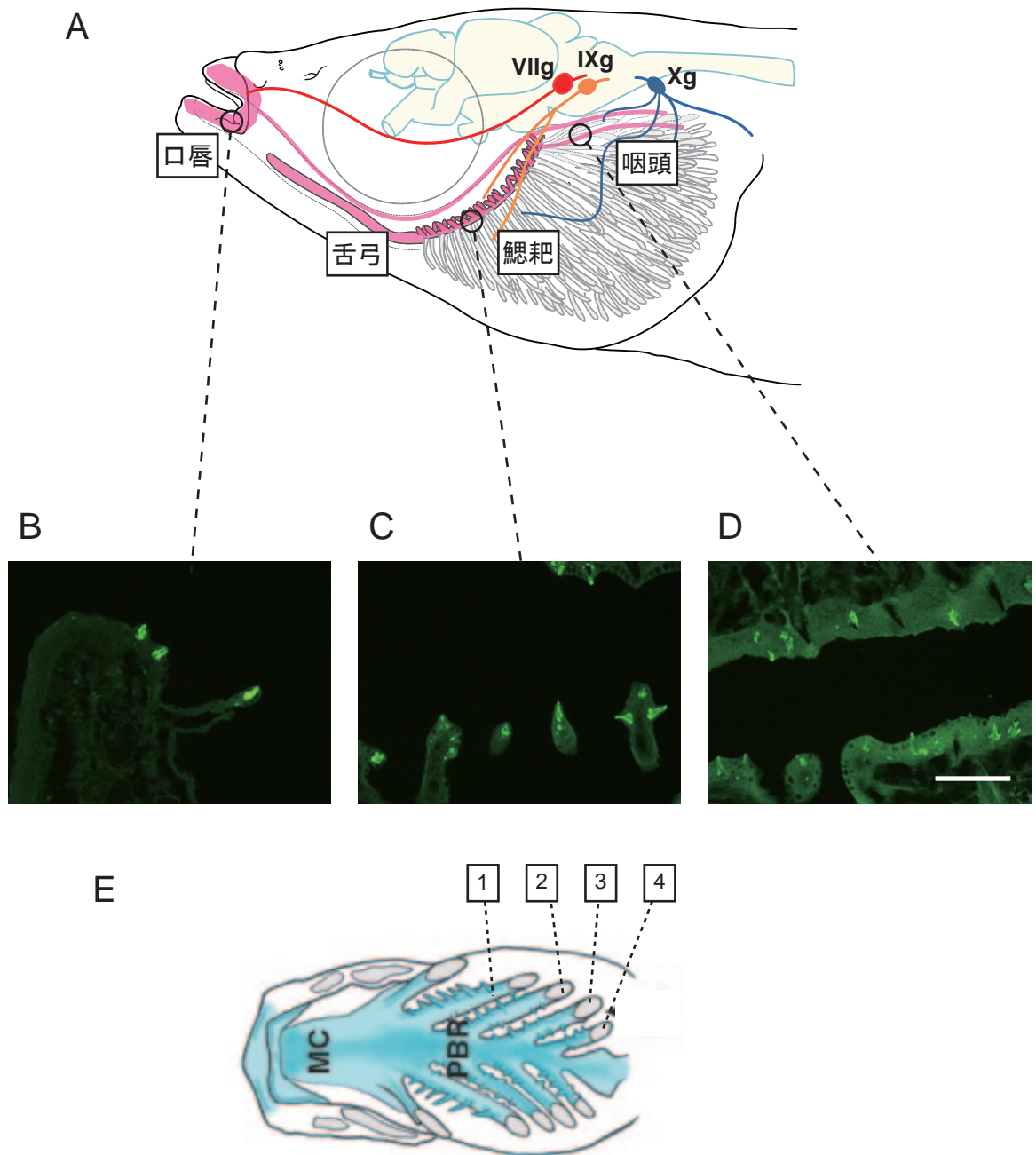


図0-7 魚類における味蕾存在部位と味蕾に投射する神経の分布

A, メダカ頭部を側面から見たときの模式図。桃色のライン上に味蕾は多数存在する。味蕾に投射する神経は顔面神経を赤、舌咽神経を橙、迷走神経を青色で示した。楕円は各神経の細胞体が存在する神経節である。VIIg: 顔面神経節、IXg: 舌咽神経節、Xg: 迷走神経節。

B-D, PLC- β 2発現細胞にGFPを発現するトランスジェニックメダカ (Aihara et al., 2007) においてGFP蛍光を発した味蕾存在部位の拡大図

味蕾の一部の細胞がGFP蛍光(緑)を発している。

E, ゼブラフィッシュを腹側から見た時の模式図。左が前方部。図の1から4はそれぞれ第1鰓弓から第4鰓弓に相当する。鰓弓から出ているひだ状の突起が鰓耙にあたり、味蕾が存在する。図はHansen et al., 2002より引用。

スケールバーは50 μ m (B-D)

第 1 章

メダカ味蕾細胞に発現する味覚関連分子の発現相関

序

近年の分子生物学的解析により、脊椎動物の味蕾細胞で発現している味覚関連分子が同定されつつある。主に霊長類のマカク、齧歯類であるマウスやラット、硬骨魚類のゼブラフィッシュを用いて解析がなされているが、生物種が異なっても共通して発現している分子が複数示されている(表 1-1)。たとえば GPCR 型味覚受容体である T1R および T2R ファミリー、シグナル伝達関連因子である PLC- β 2、PKD2L1 と相互作用して酸味の受容に関与するとされる PKD1L3、さらに G α i2、G α 14、G α gust といった G タンパク質などが挙げられる (Adler *et al.*, 2000; Asano-Miyoshi *et al.*, 2000; Kusakabe *et al.*, 2000; Miyoshi *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2002; Ishimaru *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2006; Shindo *et al.*, 2008; Tizzano *et al.*, 2008; Hevezi *et al.*, 2009; Ohmoto *et al.*, 2011; Ishimaru *et al.*, 2012)。

しかし、味蕾細胞におけるこれらの分子の発現様式は、生物種で異なることが示されている。たとえば、マカクやマウスの PLC- β 2 発現細胞には T1Rs または T2Rs のいずれかが発現しているが (Zhang *et al.*, 2003; Ishimaru *et al.*, 2012)、ゼブラフィッシュにおいては、PLC- β 2 発現細胞中に T1Rs も T2Rs もいずれも発現しない細胞が存在している (Ishimaru *et al.*, 2005; Ohmoto *et al.*, 2011)。G タンパク質については、G α gust と G α 14 は、マカク、マウスにおいて PLC- β 2 発現細胞内で互いに排他的に発現しており、G α 14 は舌後方部の味蕾の一部の T1R 発現細胞に発現し、それ以外の PLC- β 2 発現細胞には G α gust が発現している (Kim *et al.*, 2003; Shindo *et al.*, 2008; Tizzano *et al.*, 2008; Ishimaru *et al.*, 2012)。マカクでは T1R1 の一部が G α 14 と共発現するのに対し、マウスでは T1R2 の一部が G α 14 と共発現するという違いがある。ゼブラフィッシュにおいては、G α ia と G α 14 が PLC- β 2 発現細胞中で排他的に発現しており、G α ia 発現細胞の一部において、T1Rs と T2Rs が発現しているが、G α 14 発現細胞には味覚受容体の発現は観察されていない (Ohmoto *et al.*, 2011)。

さらに、一部の分子に関しては、味蕾が存在している部位、特に体軸の前後によって発現している分子やその割合が異なることが報告されている。たとえば、マウスでは PKD1L3 は舌後方部に存在する有郭乳頭の味蕾で発現しているが舌前方部にある茸状乳頭の味蕾では発現が観察されない (Huang *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2006)。また G タンパク質の分布も生物種ごとに体軸前後で異なることが示されている。先にも述べたとおり、マカク、マウスでは G α 14 が舌後方部の味蕾の T1R 発現細胞の一部のみに存在している。ゼブラフィッシュでは、前方の味蕾で G α 14 発現細胞の割合が高いのに対し、後方の味蕾では G α ia 発現細胞の割合が高くなることが明らかになっている (Ohmoto *et al.*, 2011)。このように、味蕾細胞における味覚関連分子の発現様式は生物種によりかなり異なっており、分子によっては前後軸に沿って分布に差が見られることも示されている。

メダカにおいては、味蕾において PLC- β 2 発現細胞が存在し (Yasuoka *et al.*, 2004; Aihara *et al.*, 2007)、その一部において、T1Rs および T2R1 が発現していることは報告されてい

るものの (Oike *et al.*, 2007)、G タンパク質の発現の有無など、味蕾細胞中での発現様式の詳細は不明である。そこで、メダカをモデルとして味覚研究を行う上で、味覚受容に関する分子基盤的な知見を得ることを目的とし、メダカ味蕾で発現する味覚関連分子の発現相関を二重標識 *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) により解析した。

その結果、メダカでは PLC- β 2 発現細胞は味蕾の約 5 割の細胞で発現しており、PLC- β 2 発現細胞と PKD2L1 発現細胞が基本的に排他的であった。また PLC- β 2 発現細胞は、G α ia 発現細胞と G α 14 発現細胞とに二分され、T1Rs、T2R1 の 2 つの味覚受容体が G α ia 発現細胞特異的に発現していることが示されるなど、他生物種との発現分布の共通性と相違点が明らかになった。このようにメダカの味覚関連分子の発現様式を明らかにすることができ、味覚研究を行う上での分子基盤的な知見を得ることができた。

表1-1 マカク、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、メダカの味蕾細胞に発現する味覚関連分子の共通性

	マカク	マウス	ラット	ゼブラフィッシュ	メダカ
受容体	T1Rs	T1Rs	T1Rs	T1Rs	T1Rs
	T2Rs	T2Rs	T2Rs	T2Rs	T2R1
	PKD1L3	PKD1L3			
		PKD2L1			
Gタンパク質		Gai2	Gai2		不明
	Gagust	Gagust	Gagust		
	Gα14	Gα14		Gα14	
				Gαia	
シグナル伝達関連分子	PLC-β2	PLC-β2	PLC-β2	PLC-β2	PLC-β2

赤字は種間で共通に発現していることが明らかになっている分子

メダカのT2Rは、T2R1しか存在しないためT2R1と表記した

表には味蕾に発現している分子の一部のみ記載した

1. 材料と方法

1-1. 実験動物

メダカは、Cab 系統のヒメダカを野生型 (WT) メダカとして用いた。循環型システム (AQUA 社) を使用し、活性炭フィルターで脱塩素処理後に人工海塩 (ロートマリン; レイシー社) を加え、pH 約 8.0、コンダクタンス約 700 mS/cm に調整した水を水温 28°C に設定し、明期 12 時間、暗期 12 時間の周期で飼育した。餌は、稚魚には 1 日 2 回の粉餌 (スーパー鮎ゴールド 0; 日清丸紅飼料株式会社) を与え、受精後 1 ヶ月以降のメダカには 3% 塩水にて孵化させたブラインシュリンプ (動物プランクトン) と粉餌を 1 日 1 回ずつ与えて飼育した。

1-2. メダカ *Gaia*, *Ga14* 候補遺伝子の取得と分子系統樹作成

メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) の *Gaia* および *Ga14* と推測される遺伝子配列を取得するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および Ensembl Genome Browser のデータベース内に登録されている *Gai* 系、*Gaq* 系の遺伝子ファミリーのメダカオーソログとして予想されている核酸およびアミノ酸配列を取得した。

分子系統樹を作成し、取得した予想配列が *Gaia* と *Ga14* のオーソログであることを示すため、ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ニワトリ (Gg: *Gallus gallus*)、トカゲ (Ac: *Anolis carolinensis*)、カエル (Xt: *Xenopus tropicalis* または Xl: *Xenopus laevis*)、ミドリフグ (Tn: *Tetraodon nigroviridis*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*) における *Gai* 系、*Gaq* 系遺伝子ファミリーについても NCBI のデータベースに登録されている核酸およびアミノ酸配列を取得した。登録されていない動物種の配列については、Ensembl Genome Browser のデータベース内において、マウスの遺伝子配列のオーソログと予想されている配列を取得し、分子系統樹解析に用いた。

分子系統樹の作成は、取得したアミノ酸配列を用いて、Clustal X2 プログラムでアライメントを作成し、その後、分子系統樹解析ソフト MEGA5.2 を用いて行った。

1-3. *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) による解析

1-3-1. プローブの作製

使用した遺伝子の cDNA 領域については表 1-2, 1-3 にまとめた。この鋳型に対し、DIG-RNA labeling mix (Roche Diagnostics 社) と Fluorescein-RNA labeling mix (Roche Diagnostics 社) を標識として使用し、T3 または T7 RNA polymerase (Stratagene 社) により、ジゴキシゲニン (DIG) および Fluorescein で標識したアンチセンス RNA プローブを合成した。合成したプローブはいずれも平均長が約 150 bp になるようにアルカリ溶液中で断片化した。

1-3-2. メダカ頭部の切片作製

ISH 解析には、3 ヶ月齢以上の Cab WT 成魚メダカを使用した。パラホルムアルデヒドを 4%含む PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 8.10 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM) 溶液 (4% PFA/PBS) に室温で 30 分浸した後、胸鰭の直下で切断し、頭部側のみを 4% PFA/PBS に 4°C で約 16 時間浸した。次に 500 mM EDTA に 4°C で 3-4 日入れて脱灰処理した。その後、15%スクロース/PBS に 4°C で 2 時間、30%スクロース/PBS に 4°C で約 16 時間浸して不凍処理を行った。最後に O.C.T.コンパウンド (サクラファインテック社) に浸し、液体窒素で凍結させ、包埋ブロックにし、切片作製時まで -80°C で保存した。10 μm 厚で切片にし、切片は染色時まで -80°C で保存した。

1-3-3. ISH

メダカ切片をドライヤーの冷風で乾かした後、4% PFA/PBS で 10 分間固定した。0.1% DEPC を直前に溶解した PBS に浸し、前処理 15 分間を 2 回行った。その後、TBS で 5 分間洗浄後、TBS で 10 倍希釈した Histo/Zyme (Diagnostic BioSystems 社) で 1 分間酵素処理を行った。その後、再度 TBS で 5 分間洗浄し、4% PFA/PBS で 5 分間再固定した。再固定後、0.25%無水酢酸および 100 mM トリエタノールアミンを含む DEPC 水に 10 分間浸しアセチレーションを行った。その後、DEPC 水で 3 分洗浄後、ドライヤーで切片を風乾させた。風乾後、5×SSC (NaCl 16.6 mM, C₆H₅O₇Na₃ 16.7 mM) で 15 分間洗浄し、80 μg/ml の変性させた魚精巢 DNA (Roche Diagnostics 社) を含む 5×SSC/50% ホルムアミドで、58°C にて 2 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、DIG 標識アンチセンスプローブを含むハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド、5×SSC、5×Denhardt's 溶液 (Nacalai Tesque 社)、1 mg/ml の変性させた魚精巢 DNA、250 μg/ml 酵母 tRNA (Sigma 社)、1 mM DTT) で、58°C にて約 16 時間行った。ハイブリダイゼーション後、5×SSC で 5 分間を 2 回、0.2×SSC で 30 分間を 2 回、58°C にて切片を洗浄した。続いて、室温の TBS 中に 5 分間浸漬し、0.5%ブロッキング剤 (Roche Diagnostics 社) を含む TBS で 1 時間ブロッキングを行い、アルカリホスファターゼ (AP) 結合抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics 社) を 1000 倍希釈で含む同溶液で、室温にて 1 時間抗原抗体反応を行った。15 分間の TBS 洗浄を 3 回を行い、アルカリホスファターゼバッファー (100 mM NaCl、100 mM Tris/HCl pH 9.5、50 mM MgCl₂) に 5 分間浸漬した。NBT (nitroblue tetrazolium chloride) と BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) を発色基質として用い、1 時間から 24 時間遮光して発色させた。発色後はアルカリホスファターゼバッファーと蒸留水で洗浄し、風乾させた後 Fluoromount (Sigma 社) およびマイクロカバーガラス (マツナミ社) で封入した。

1-3-4. 二重 ISH

ハイブリダイゼーションの前までの操作は 1-3-3 と同じである。ハイブリダイゼーシ

ョンは、DIG 標識のプローブと Fluorescein 標識のプローブを混ぜて行った。ハイブリダイゼーション後は、室温の PBS 中に 5 分間浸漬し、0.5%ブロッキング剤 (Roche Diagnostics 社) を含む PBS で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング操作の後、ブロッキング液で 100 倍希釈した HRP (horse raddish peroxidase) 標識抗 FITC 抗体 (DAKO 社) 溶液で 1 時間抗原抗体反応を行った。その後 PBS で 3 回洗浄したのち、0.0015% H_2O_2 を含む amplification バッファー (Invitrogen 社) で 100 倍希釈した TSA-AlexaFluor488 (Invitrogen 社) にて遮光して 30 分反応させた。以後遮光しながら操作を行った。PBS で 2 回洗浄し反応を止めた後、3% H_2O_2 /PBS で 30 分間処理し HRP を失活させた。再度 PBS で 3 回洗浄したのちに、100 倍希釈した HRP 標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics 社) で 1 時間抗原抗体反応させた。その後 PBS で 3 回洗浄したのち、0.0015% H_2O_2 を含む amplification バッファーで 100 倍希釈した TSA-AlexaFluor555 (Invitrogen 社) にて 30 分反応させた。発色後は PBS で 2 回、蒸留水で 1 回洗浄した。その後、蒸留水で 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈した DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を 5 分間反応させ、再度蒸留水で 2 回洗浄した。風乾後、Fluoromount およびマイクロカバーガラスで封入した。観察、および計数は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV10i Olympus 社) を用いて行った。

表1-2 メダカG α iaおよびG α 14のクローニングに用いたプライマー配列

遺伝子名	プライマー配列		cDNA中の領域 (bp)
G α ia	sense	gcggtcgcacGGGGTGTACGCTGAGCAC	20-37
	antisense	cgcgaattcGGTTTTTCTACACACCGTCTTC	1213-1235
G α 14	sense	gcggtcgcacCAAGAGGATCAACGACGC	510-527
	antisense	CTGATGGATCCTGCTTGG	1349-1366

人為的に付加した配列は小文字で示し、制限酵素認識配列は赤字で記した。

表1-3 *in situ* ハイブリダイゼーションに使用したメダカ遺伝子のプローブ配列

遺伝子名	cDNA中の使用断片領域 (bp)	使用したcDNA断片長 (bp)	GenBank accession number	cDNA全長 (bp)
G α ia	20-1235	1216	AB001741	1267
G α 14	510-1366	857	XM_004072567	1530
PLC- β 2	122-3771	3650	AB254242	3844
T1R1	1-2538	2538	AB200905	2538
T1R2a	1-2460	2460	AB200906	2460
T1R2b	1-2439	2439	AB200907	2439
T1R2c	1-2457	2457	AB200908	2457
T1R3	1-2562	2562	AB200909	2562
T2R1	1-978	978	AB290689	978
PKD2L1	1-2503	2503	AB571240	2503

2. 結果

2-1. 脊椎動物の $G\alpha i$ 系、 $G\alpha q$ 系類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹解析

メダカの $G\alpha ia$ 、 $G\alpha 14$ については、まだ同定されていない。これらの分子をクローニングし、味蕾細胞内での発現相関を解析することを目的とし、データベース上の予想配列を探索した。NCBI および Ensembl Genome Browser のデータベース内に登録されている予想配列を用いて $G\alpha i$ 系遺伝子ファミリー ($G\alpha i1$ 、 $G\alpha i2$ 、 $G\alpha i3$) と $G\alpha q$ 系遺伝子ファミリー ($G\alpha 11$ 、 $G\alpha 14$ 、 $G\alpha q$) について、ヒト、マウス、ニワトリ、トカゲ、カエル、ミドリフグ、ゼブラフィッシュ、メダカの 8 種の生物のアミノ酸配列を用いて分子系統樹を作成した。

$G\alpha i$ 系の分子系統樹を作成した結果、メダカの $G\alpha i3$ と予測されていたアミノ酸配列 NP_001116402 が、ゼブラフィッシュの $G\alpha ia$ の配列である NP_942100 に進化系統的に最も近いことが明らかになり、メダカの $G\alpha ia$ 配列であることが予測された (図 1-1) ので、この配列をメダカ $G\alpha ia$ と命名した。

$G\alpha q$ 系の分子系統樹を作成した結果、NCBI のデータベースにおいてメダカの $G\alpha 14$ と予測されていたアミノ酸配列 XP_004072615 が、ゼブラフィッシュの $G\alpha 14$ のアミノ酸配列である XP_683989 に進化系統的に最も近く、メダカの $G\alpha 14$ 配列であることが予測された (図 1-2) ので、この配列をメダカ $G\alpha 14$ と命名した。

2-2. メダカ $G\alpha ia$ と $G\alpha 14$ の味蕾における発現解析

まず 2-1 でメダカの $G\alpha ia$ と $G\alpha 14$ と命名した配列についてクローニングをした。クローニングに用いたプライマー配列を表 1-2 に記載した。クローニングして取得したこれらの遺伝子が、実際にメダカの味蕾細胞に発現しているかを調べるため、メダカ成魚の水平切片および矢状面切片を用いてメダカの味蕾が存在する口唇部、鰓耙、咽頭歯部での発現を ISH によって解析した。その結果、口唇部、鰓耙、咽頭歯部いずれの味蕾においても $G\alpha ia$ と $G\alpha 14$ の発現が観察された (図 1-3 上段、中段)。しかし同時に染色した PLC- $\beta 2$ に比べると (図 1-3 下段)、発現している細胞の数は少なく、強度も弱いと考えられた。

2-3. メダカ味蕾細胞における味覚受容に関連する分子の発現相関解析

メダカの味蕾細胞において、過去の解析から発現が示されている味覚受容体 T1R ファミリー (T1R1、T1R2a、T1R2b、T1R2c、T1R3) および T2R1 (Oike *et al.*, 2007)、エフェクター因子 PLC- $\beta 2$ (Yasuoka *et al.*, 2004)、酸味受容体候補分子 PKD2L1 (unpublished data S. Okada) と、2-1 により取得した $G\alpha ia$ と $G\alpha 14$ の発現相関を知るため、3 か月齢以上のメダカ成魚を用いて二重標識 ISH を行った。T1R ファミリーの 5 遺伝子は解析の際、作製した 5 つのプローブを混ぜて混合プローブとして使用した (以降 T1Rs と呼ぶ)。体軸

前後方向で発現様式に差がある可能性を考慮して、鰓周辺部に存在する味蕾と、それより後方の咽頭歯部に存在する味蕾において解析を行った。各々の解析の計数結果は表 1-4 にまとめた。

2-3-1. PLC- β 2 発現細胞の味蕾細胞における割合

メダカ PLC- β 2 は T1Rs と T2R1 を含む多くの細胞で発現していることは示されているが (Oike *et al.*, 2007)、割合までは示されていない。そこでまず、他の分子の発現細胞の割合の基準にもなると考え、PLC- β 2 が味蕾細胞中に占める割合をおおまかに計数することにした。メダカ味蕾の輪郭を標識するマーカーとなるものがないので、細胞の密集具合や位相差観察の画像における形態から味蕾に含まれる細胞と判別できた細胞のみを扱うことにした。核を染色するマーカーである DAPI を用いて、味蕾内の DAPI 陽性細胞数に対する PLC- β 2 陽性細胞の割合を計数した (図 1-4)。その結果、鰓周辺部、咽頭歯部いずれの味蕾においても約 5 割 (鰓周辺部: 149/273、咽頭歯部: 127/275) の細胞で発現していることが明らかになった (表 1-4)。

2-3-2. PLC- β 2 と PKD2L1 の発現分布

まず、哺乳類であるマウスで排他的に発現している PLC- β 2 と PKD2L1 の発現相関を解析した。その結果、ごくわずかに重なった細胞も存在した (鰓周辺部の PKD2L1 陽性細胞 104 個中 9 個、咽頭歯部の PKD2L1 陽性細胞 36 個中 1 個) が、PLC- β 2 発現細胞と PKD2L1 発現細胞はほぼ排他的に発現していた (図 1-5A)。また、PKD2L1 発現細胞の割合は咽頭歯部の味蕾の方がやや少ない結果となった (表 1-4)。

2-3-3. PLC- β 2 と 2 種の G タンパク質 $G\alpha$ ia、 $G\alpha$ 14 の発現相関

次に PLC- β 2 と 2 種の G タンパク質 $G\alpha$ ia、 $G\alpha$ 14 との発現相関を解析した。まず、PLC- β 2 と $G\alpha$ ia との発現相関を調べた。その結果、 $G\alpha$ ia は、鰓周辺部の味蕾では、PLC- β 2 発現細胞の 3 割強 (72/198) の細胞でしか発現していなかったが、より後方部にある咽頭歯部の味蕾では、約 7 割 (128/181) の細胞で共発現していた (図 1-5B)。次に、PLC- β 2 と $G\alpha$ 14 との発現相関を調べた。その結果、 $G\alpha$ 14 は鰓周辺部では、PLC- β 2 発現細胞の約 7 割強 (90/119) の細胞で共発現しており、咽頭歯部では約 3 割 (45/131) の細胞で共発現していた (図 1-5C、表 1-4)。この結果から、メダカにおいても、ゼブラフィッシュと同様に $G\alpha$ ia が体の後方部の味蕾に多い一方で、 $G\alpha$ 14 は前方部の味蕾に多いことが示された。

さらに、 $G\alpha$ ia と $G\alpha$ 14 の混合プローブを用いて PLC- β 2 との発現相関を調べた。その結果、PLC- β 2 発現細胞の 95%以上の細胞で $G\alpha$ ia または $G\alpha$ 14 のいずれかが発現している (鰓周辺部: 209/212、咽頭歯部: 172/179) ことが示された (図 1-5 D、表 1-4)。

以上の結果から、 $G\alpha$ ia および $G\alpha$ 14 は鰓周辺部、咽頭歯部いずれの味蕾でも PLC- β 2

発現細胞にすべて含まれて発現していることが明らかになった。さらに PLC-β2 発現味蕾細胞は、Gαia 発現細胞と Gα14 発現細胞の 2 種が存在し、体の前方部では Gα14 が、後方部では Gαia が支配的であることが示された。

2-3-4. Gαia と Gα14 の発現相関

Gαia と Gα14 は PLC-β2 発現細胞にすべて含まれて発現していることが明らかになったので、次に Gαia と Gα14 の発現相関を解析した。その結果、鰓周辺部では Gαia が発現した 34 細胞と Gα14 が発現した 77 細胞は完全に排他的であった。同様に咽頭歯部でも、Gαia が発現した 90 細胞と Gα14 が発現した 7 細胞は完全に排他的であった(図 1-5E、表 1-4)。

2-3-3, 2-3-4 の結果から、Gαia と Gα14 は PLC-β2 発現細胞内に発現し、排他的に発現していることが明らかになった。

2-3-5. Gαia と味覚受容体 T1Rs、T2R1 との発現相関

メダカ味覚受容体 T1Rs と T2R1 も Gαia と Gα14 同様に PLC-β2 発現細胞に内包されて発現していることが明らかになっている (Oike *et al.*, 2007)。そこで、次にこれらの味覚受容体と Gαia および Gα14 との発現相関について解析した。まず、Gαia との発現相関を解析した。その結果、Gαia 発現細胞の中では、約 7 割前後の細胞で T1Rs が共発現(鰓周辺部: 55/81、咽頭歯部: 85/108)しており、約 3 割の細胞で T2R1 が共発現(鰓周辺部: 51/154、咽頭歯部: 25/77)していた(図 1-6A, B、表 1-4)。また T1Rs と T2R1 の混合プローブを用いた解析より、Gαia 発現細胞の 9 割以上の細胞で T1Rs または T2R1 を発現(鰓周辺部: 54/60、咽頭歯部: 123/128)していた(図 1-6C、表 1-4)。

以上の結果から、鰓周辺部、咽頭歯部いずれの味蕾においても、T1Rs と T2R1 は Gαia 発現細胞に内包されて発現していたが、味覚受容体を発現していない Gαia 発現細胞も一部存在することが示された。

2-3-6. Gα14 と味覚受容体 T1Rs、T2R1 との発現相関

次に Gα14 と味覚受容体 T1Rs、T2R1 との発現相関について解析した。まず Gα14 と T1Rs の発現相関を調べた結果、鰓周辺部では Gα14 発現細胞 110 個と T1Rs 発現細胞 56 個がすべて排他的に発現していた。咽頭歯部の味蕾においても Gα14 発現細胞 10 個と T1Rs 発現細胞 100 個がすべて排他的に発現していた(図 1-6D、表 1-4)。次に Gα14 と T2R1 の発現相関を調べた。その結果、鰓周辺部では Gα14 発現細胞 89 個と T2R1 発現細胞 8 個のうち、1 細胞のみ共発現していたが、他の細胞はすべて排他的に発現していた。咽頭歯部の味蕾においては、Gα14 発現細胞 34 個と T2R1 発現細胞 13 個がすべて排他的に発現していた(図 1-6E、表 1-4)。以上の結果から、Gα14 と T1Rs および、Gα14

と T2R1 いずれもメダカ味蕾中でほぼすべて排他的に発現していることが明らかになった。

2-3-7. T1Rs と T2R1 の発現相関

メダカの T1Rs と T2R1 はともに PLC- β 2 発現細胞に含まれていることが示されているが、T1Rs と T2R1 の発現相関については不明であった。そこで、T1Rs と T2R1 の発現相関を解析した。その結果、鰓周辺部では、T1Rs 発現細胞 40 個と T2R1 発現細胞 22 個が排他的に、咽頭歯部では、T1Rs 発現細胞 77 個と T2R1 発現細胞 19 個が排他的に発現していた。以上の結果から、T1Rs と T2R1 はメダカ味蕾中ですべて排他的に発現していることが明らかになった (図 1-6F、表 1-4)。

2-3-1~7 の解析結果から、メダカでは PLC- β 2 発現細胞は味蕾の約 5 割の細胞で発現しており、PLC- β 2 発現細胞と PKD2L1 発現細胞が基本的に排他的であった。PLC- β 2 発現細胞は、G α ia 発現細胞と G α 14 発現細胞とに二分され、T1Rs、T2R1 の 2 つの味覚受容体が G α ia 発現細胞特異的に発現していることが明らかになった。また、G α ia 発現細胞と G α 14 発現細胞の体軸前後で発現分布に差があり、前方部で G α 14 が、後方部で G α ia が支配的に発現していることも明らかになった (図 1-7)。上記の結果はゼブラフィッシュと同様であり (Ohmoto *et al.*, 2011)、硬骨魚に共通の特徴である可能性が示された。また、メダカでは G α ia 発現細胞中の味覚受容体発現細胞の割合が高く、ゼブラフィッシュでは一部重なっていた T1Rs と T2Rs が互いに排他的に発現していた。この結果はゼブラフィッシュと異なる点であり、種特異的な特徴と考えられる。このようにメダカの味覚関連分子の発現様式を明らかにすることができ、味覚研究を行う上での分子基盤的な知見を得ることができた。

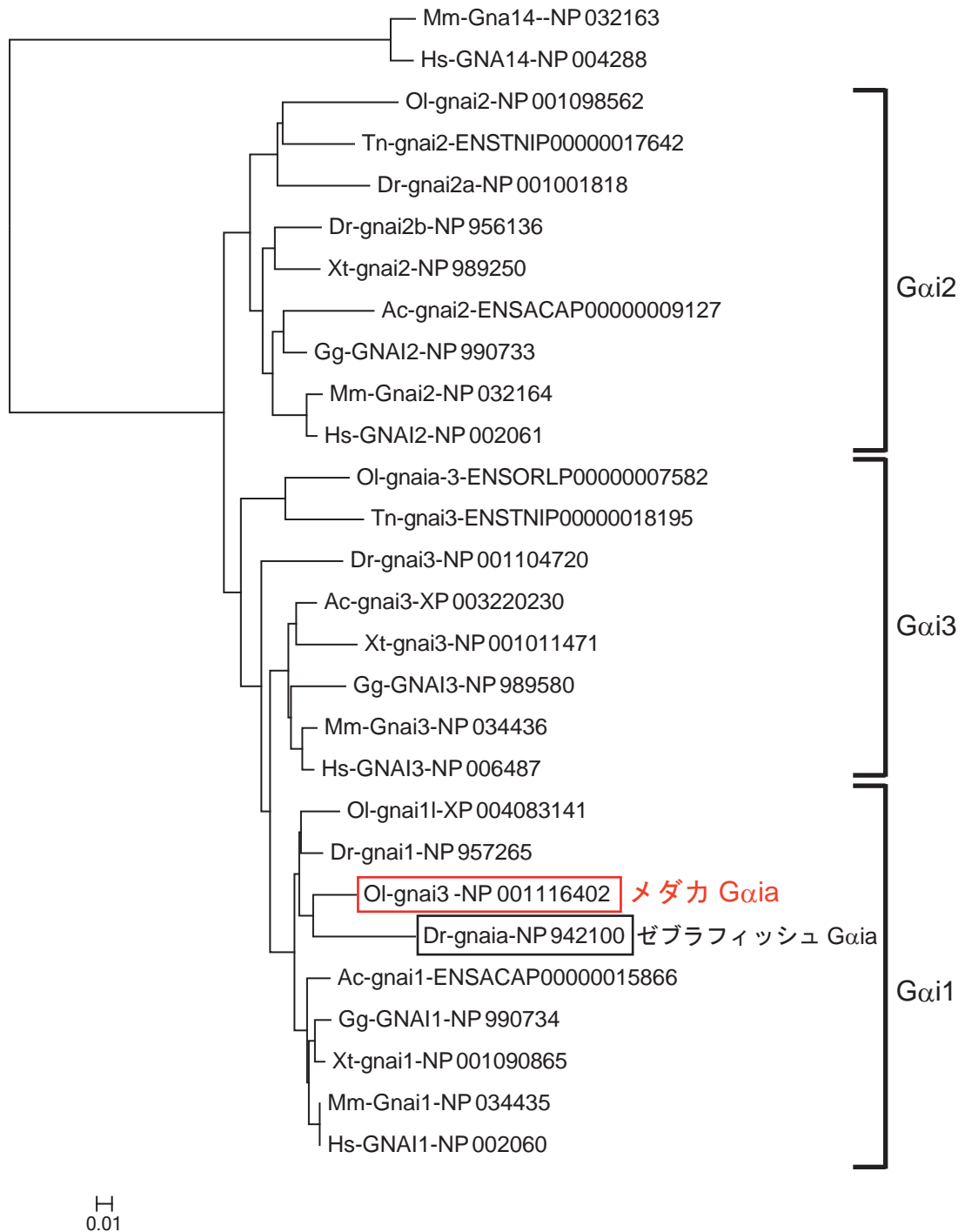


図 1-1 脊椎動物の Gαi 類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹

アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した分子系統樹を示す。

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ニワトリ (Gg: *Gallus gallus*)、トカゲ (Ac: *Anolis carolinensis*)、カエル (Xt: *Xenopus tropicalis* または Xl: *Xenopus laevis*)、ミドリフグ (Tn: *Tetraodon nigroviridis*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。

メダカの Gαi と予測された配列は赤枠で、ゼブラフィッシュの Gαi の配列は黒枠で囲った。アウトグループとして Gna14 (guanine nucleotide binding protein, alpha 14) を使用した。遺伝子名の後ろには National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser でオーソログとして予想されている配列の番号を記載した。スケールバーは 1% のアミノ酸変異を示す。

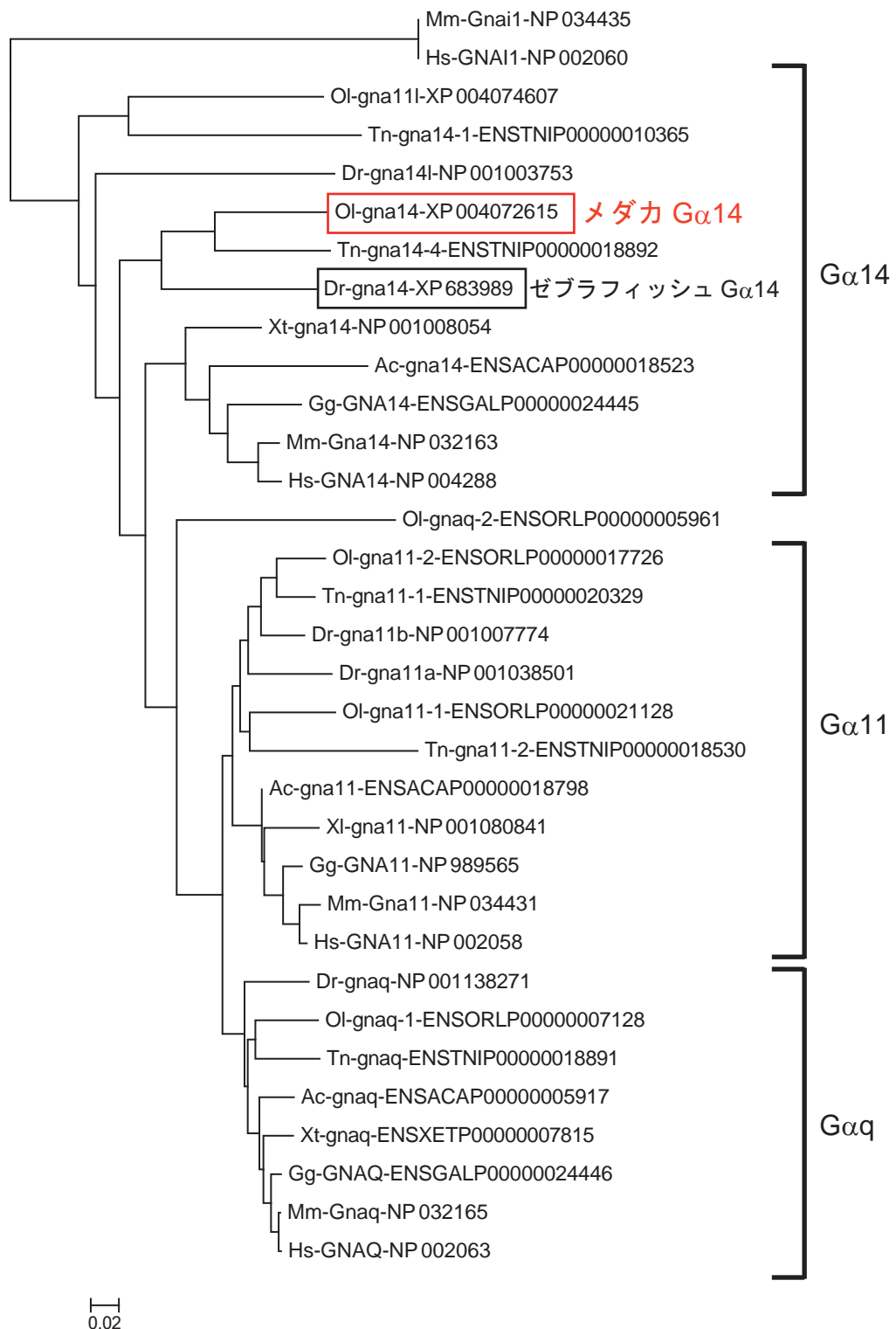


図 1-2 脊椎動物の $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_q$ 類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹

アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した分子系統樹を示す。

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ニワトリ (Gg: *Gallus gallus*)、トカゲ (Ac: *Anolis carolinensis*)、カエル (Xt: *Xenopus tropicalis* または Xl: *Xenopus laevis*)、ミドリフグ (Tn: *Tetraodon nigroviridis*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。

メダカの $G\alpha_{14}$ と予測された配列は赤枠で、ゼブラフィッシュの $G\alpha_{14}$ の配列は黒枠で囲った。アウトグループとして Gnai1 (guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting 1) を使用した。遺伝子名の後ろには NCBI に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser でオーソログとして予想されている配列の番号を記載した。スケールバーは 2% のアミノ酸変異を示す。

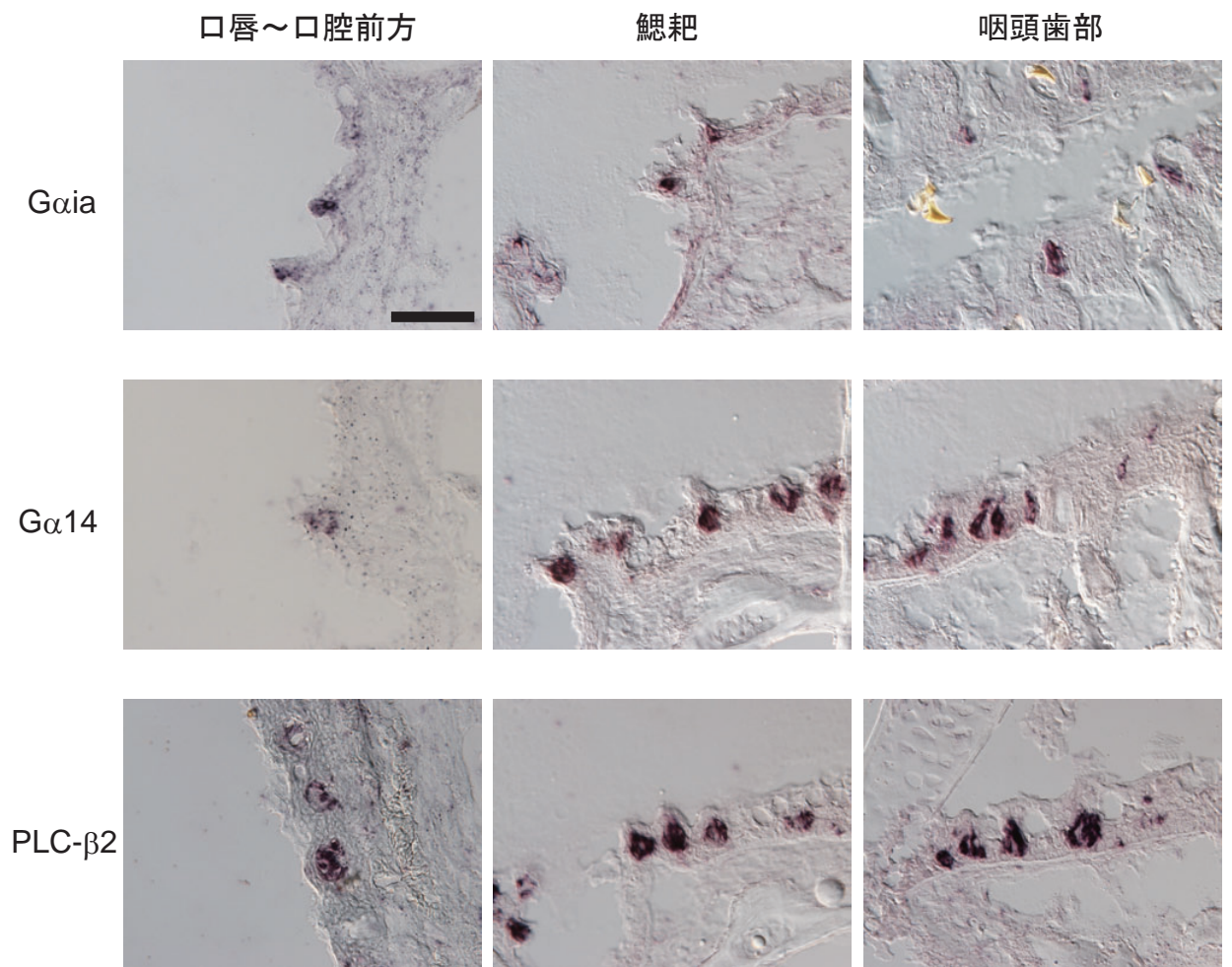


図 1-3 メダカ味蕾存在部における Gαia、Gα14 および PLC-β2 遺伝子の発現分布
 Cab WT メダカ成魚の水平切片および矢状面切片を用いて、味蕾が存在する口唇から口腔前方、鰓耙、咽頭歯部において Gαia、Gα14 および PLC-β2 mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) により解析した。口唇から口腔前方の写真は水平切片、鰓耙と咽頭歯部の写真は矢状面切片である。スケールバーは 50 μm。

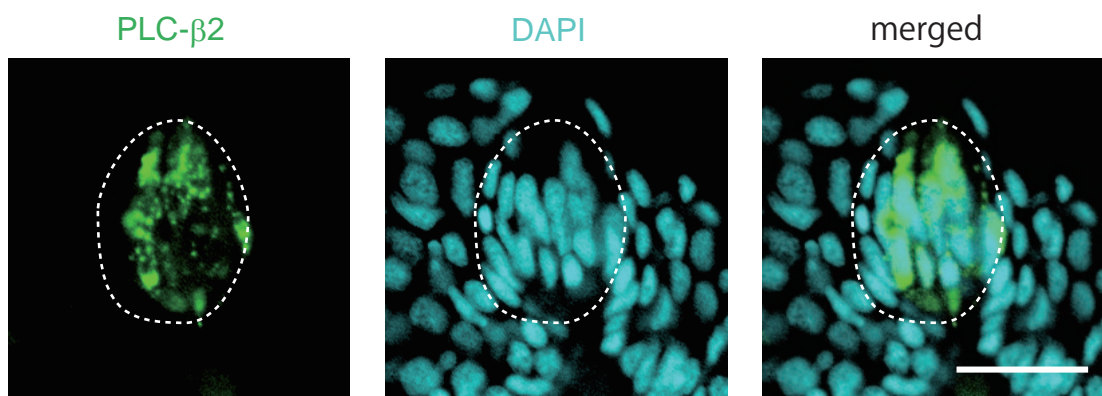


図 1-4 メダカ味蕾細胞内での PLC-β2 発現細胞の割合の解析

Cab WT メダカ成魚の冠状切片を用いて、鰓周辺部、咽頭歯部の味蕾において PLC-β2 mRNA を ISH により蛍光標識し、核を DAPI で染色した。代表として咽頭歯部の味蕾の写真を載せた。

左が PLC-β2 mRNA の発現（緑）

真ん中が DAPI により染色された核（シアン）

右が重ね合わせた像。

味蕾を白破線で囲った。

スケールバーは 20 μm。

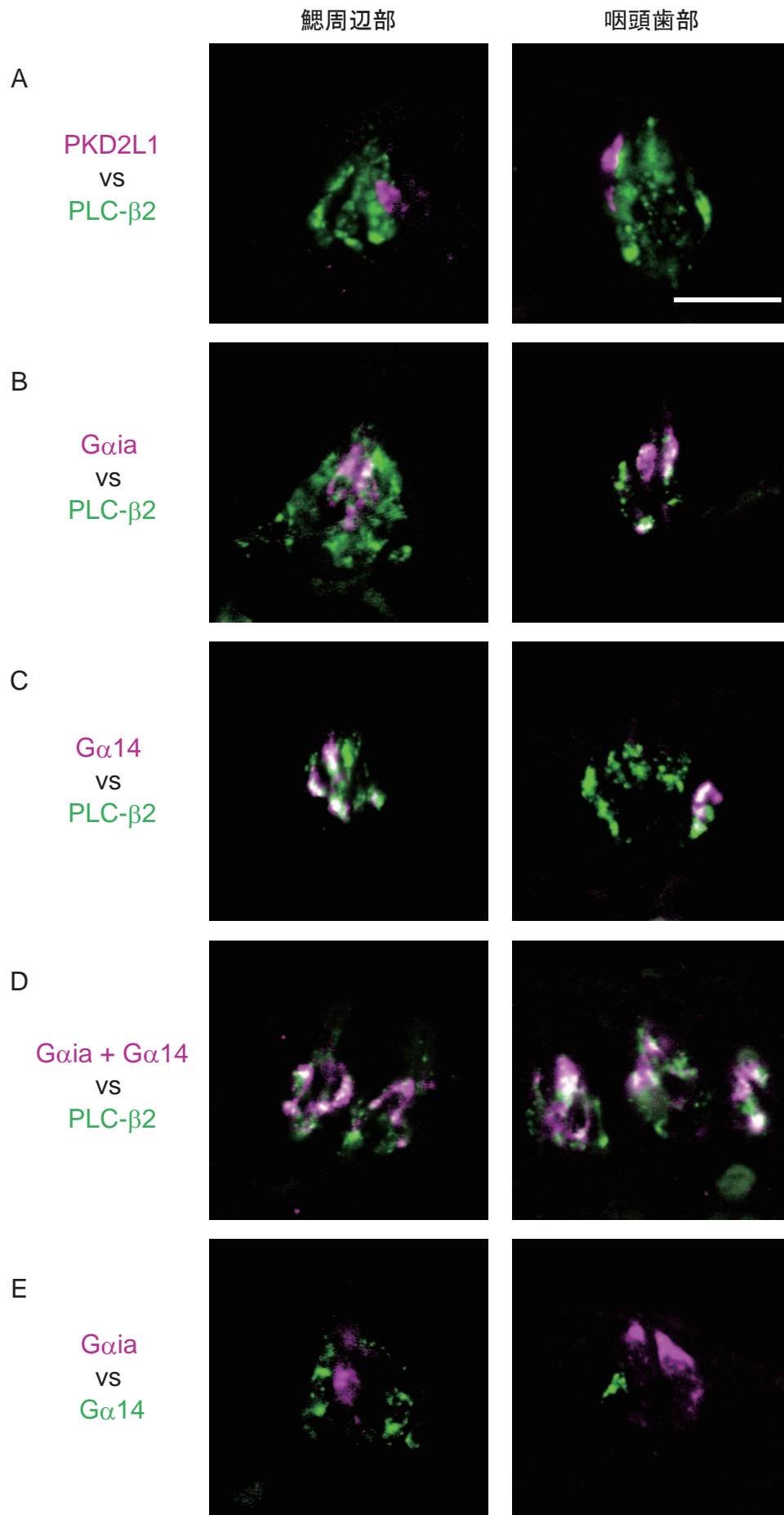


図 1-5 メダカ味蕾細胞内での味覚関連分子の発現相関 -1

Cab WT メダカ成魚の冠状切片を用いて、鰓周辺部、咽頭歯部の味蕾において Gαia、Gα14、PLC-β2、PKD2L1 mRNA の発現相関を二重 ISH により解析した。それぞれ重ね合わせた像を提示した。文字の色は各写真の蛍光の色に対応している。緑とマゼンタの像が重なると白色になる。スケールバーは 20 μm。

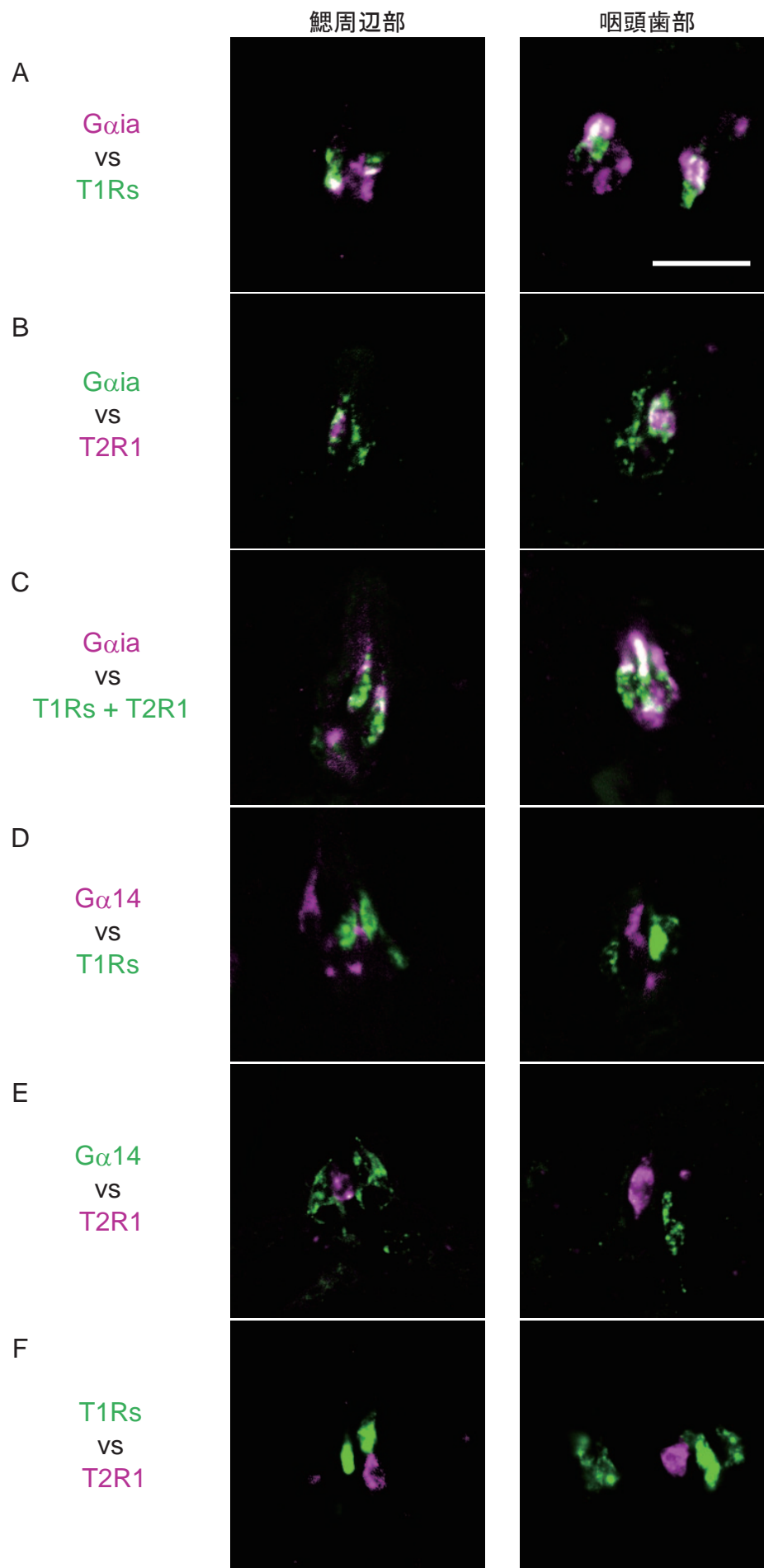
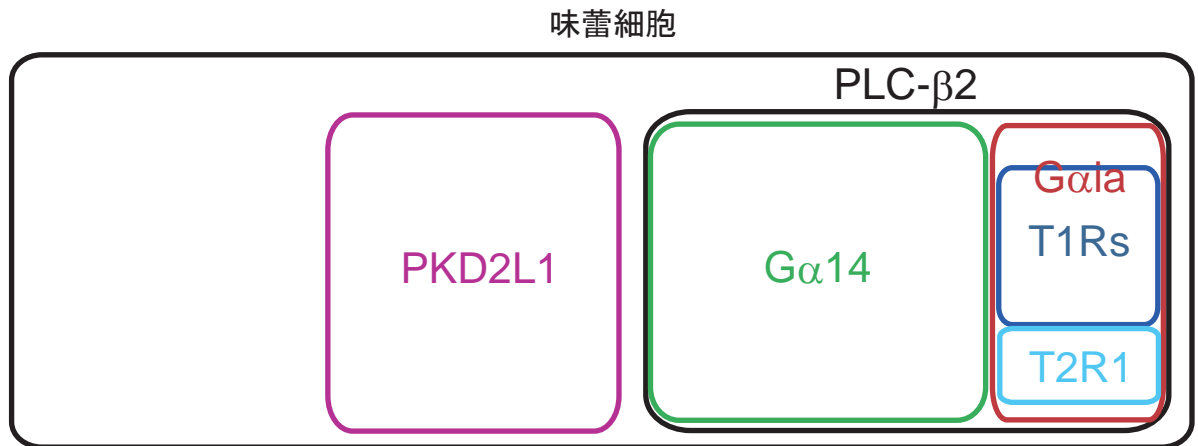


図 1-6 メダカ味蕾細胞内での味覚関連分子の発現相関 -2

Cab WT メダカ成魚の冠状切片を用いて、鰓周辺部、咽頭歯部の味蕾において、Gαia、Gα14、T1Rs、T2R1 mRNA の発現相関を二重 ISH により解析した。

それぞれ重ね合わせた像を提示した。文字の色は各写真の蛍光の色に対応している。緑とマゼンタの像が重なると白色になる。スケールバーは 20 μm。

(A) 鰓周辺部の味蕾



(B) 咽頭歯部の味蕾

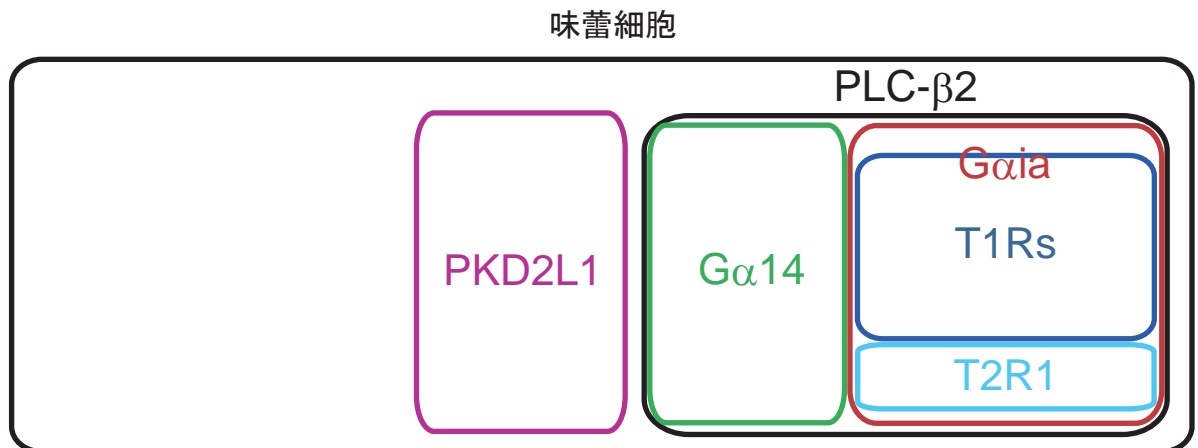


図 1-7 メダカ味蕾細胞内での味覚関連分子の発現相関のまとめ

本研究の結果からメダカの鰓周辺部および咽頭歯部において発現している味覚関連遺伝子の相関図を上を示した。

A は鰓周辺部の味蕾における発現相関図

B は咽頭歯部の味蕾における発現相関図

表1-4 メダカ味蕾細胞における味覚関連遺伝子の発現相関

分子(または物質)		鰓周辺部			
A	B	①A陽性細胞数	②B陽性細胞数	③重なる細胞数	重なる割合 (③/①) (%)
DAPI	PLC-β2	273	149	149	54.6
PLC-β2	PKD2L1	278	104	9	3.2
PLC-β2	Gαia	198	72	72	36.4
	Gα14	119	90	90	75.6
	Gαia+Gα14	212	209	209	98.6
Gαia	Gα14	34	77	0	0.0
	T1Rs	81	56	55	67.9
	T2R1	154	51	51	33.1
	T1Rs + T2R1	60	54	54	90.0
Gα14	T1Rs	110	56	0	0.0
	T2R1	89	8	1	1.1
T1Rs	T2R1	40	22	0	0.0

分子(または物質)		咽頭歯部			
A	B	①A陽性細胞数	②B陽性細胞数	③重なる細胞数	重なる割合 (③/①) (%)
DAPI	PLC-β2	275	127	127	46.2
PLC-β2	PKD2L1	154	36	1	0.6
PLC-β2	Gαia	181	129	128	70.7
	Gα14	131	45	45	34.4
	Gαia+Gα14	179	172	172	96.1
Gαia	Gα14	90	7	0	0.0
	T1Rs	108	86	85	78.7
	T2R1	77	25	25	32.5
	T1Rs + T2R1	128	123	123	96.1
Gα14	T1Rs	10	100	0	0.0
	T2R1	34	13	0	0.0
T1Rs	T2R1	77	19	0	0.0

鰓周辺部も咽頭歯部もメダカ成魚冠状切片において3-5切片を解析して計数した(n=1)

3. 考察

本章における解析から、メダカの味蕾細胞内における、PLC- β 2 発現細胞と PKD2L1 発現細胞の分布、PLC- β 2 発現細胞内での G タンパク質や味覚受容体の発現相関について明らかにすることができた。本章で得られた結果と過去の他生物種での解析結果から示される PLC- β 2 発現細胞における味覚関連分子の発現相関のまとめを図 1-8 に載せた。本解析および過去の他生物種における結果を踏まえて以下の点について考察する。

3-1. メダカの味蕾細胞内での味覚受容体発現細胞の割合について

本章における解析結果から、メダカの味覚受容体発現細胞の割合を計算した。

鰓周辺部の味蕾では、PLC- β 2 発現細胞が約 50%、そのうち *Gα*ia 発現細胞が 35%程度、その 90%の細胞に味覚受容体 T1Rs または T2R1 が発現していた。よって鰓周辺部の約 15%の味蕾細胞において T1Rs または T2R1 が発現していることになる。さらに、T1Rs と T2R1 は約 2:1 の比率で発現していたので 10%が T1Rs、5%が T2R1 ということになる。

咽頭歯部の味蕾では、PLC- β 2 発現細胞が約 50%、そのうち *Gα*ia 発現細胞が 70%程度、そのほぼ全ての細胞に T1Rs または T2R1 が発現していた。よって咽頭歯部の約 35%の味蕾細胞において T1Rs または T2R1 が発現していることになる。T1Rs と T2R1 は約 7:3 の比率で発現していたので 25%が T1Rs、10%が T2R1 ということになる。マウスでは、味蕾の約 40%の細胞で T1Rs または T2Rs が発現している (Ishimaru *et al.*, 2006) ことから、鰓周辺部の味蕾についてはメダカでは T1Rs、T2Rs の割合がかなり少ないことが言える。

また、哺乳類における酸味受容に関わる細胞とされる PKD2L1 発現細胞についても、メダカ味蕾中での割合を計算した。味蕾細胞中の PLC- β 2 発現細胞数との比から計算すると、鰓周辺部では味蕾細胞の約 20%、咽頭歯部では約 10%程度の割合になる。哺乳類では PKD2L1 発現細胞が約 20%程度であるため (Ishimaru *et al.*, 2006)、メダカの咽頭歯部では割合が比較的少ないことが言える。

これらの結果から、メダカでは体軸前方部の味蕾では T1Rs、T2Rs で受容される旨味物質や苦味物質ではなく、酸味物質やその他の味の受容を主にしており、より後方部の味蕾で旨味物質や苦味物質の摂取の判断を主に下している可能性が考えられる。しかし、メダカの PKD2L1 発現細胞が酸味受容に関与しているという報告がないこと、味蕾に投射する神経はいずれも迷走神経であり、差がないことなどから詳細なことは不明である。今後はより前方部にあり、顔面神経が投射している口唇部の味蕾についても発現分布を解析する必要があるであろう。

3-2. メダカとゼブラフィッシュの PLC- β 2 発現細胞における遺伝子発現様式の違い

PLC- β 2 発現細胞における味覚関連分子の発現様式について、Ohmoto ら (2011) の報告によるゼブラフィッシュの結果と本解析におけるメダカでの結果を比較した。まず 2 つの魚種に共通の発現様式として、*Gα*ia と *Gα*14 が互いに排他的に発現している点、*Gα*ia

発現細胞においてのみ味覚受容体が発現している点、体軸の前後で $G\alpha_{i3}$ と $G\alpha_{14}$ の割合が逆転する点が挙げられる。メダカとゼブラフィッシュは同じ硬骨魚類ではあるが、進化系統的には大きく離れていることが知られている (Dahm *et al.*, 2005)。よって、これらの特徴は魚類全般に言える特徴であると考えられる。

一方で、2つの魚種での相違点としては、T1Rs と T2Rs の一部が共発現するかどうか、 $G\alpha_{i3}$ 発現細胞中の味覚受容体発現細胞の割合の差である。メダカでは、マウスやマカクなど他の生物種同様に T1Rs と T2R1 の発現は全て排他的であった。一方、ゼブラフィッシュでは T2R2a, T2R3, T2R4 の混合プローブと T1Rs の混合プローブを用いた ISH により、一部の細胞で重なりが観察されている (Ohmoto *et al.*, 2011)。他の生物では T1Rs と T2Rs が重なるという事例は報告されていない。ゼブラフィッシュでは T2R5 のリガンドとしてデナトニウムが示されているが (Oike *et al.*, 2007)、T2R2a, T2R3, T2R4 のリガンドについては不明である。まずリガンドを同定することにより、ゼブラフィッシュに特有の現象の原因を探ることができると考えられる。また、メダカでは $G\alpha_{i3}$ 発現細胞の9割以上に味覚受容体が発現していたが、ゼブラフィッシュでは割合の記述がなかったものの、写真や模式図では比較的多くの細胞で味覚受容体が発現していないように見える。味覚受容体が存在しない $G\alpha_{i3}$ 発現細胞の機能は不明であるが、Gタンパク質が発現している以上、GPCR の存在は想像される。しかし、ゼブラフィッシュでは嗅覚系の GPCR が味蕾で発現していないことは確認 (Ohmoto *et al.*, 2011) されており、詳細は不明である。今後は、 $G\alpha_{14}$ 発現細胞も含めて共発現しているであろう GPCR を見つけることが必要であろう。

3-3. 魚類の $G\alpha_{i3}$ と $G\alpha_{14}$ の前後方向での発現分布の違い

メダカ、ゼブラフィッシュともに $G\alpha_{i3}$ と $G\alpha_{14}$ の発現には体軸の前後方向で差が見られた。両魚種において $G\alpha_{14}$ は前方部の味蕾で割合が高く、 $G\alpha_{i3}$ は後方部の味蕾で割合が高かった。T1Rs と T2Rs は $G\alpha_{i3}$ 発現細胞の一部のみで発現していることから、口唇に近いところでは、旨味と苦味の受容体自体が少ないと考えられる。特に、3-1 の考察にも記述したが、メダカでは鰓周辺部の味蕾については T1Rs、T2Rs の割合がかなり少なかった。ゼブラフィッシュでは、顔面神経が投射している口唇付近の味蕾と、より後方で舌咽神経や迷走神経が投射している咽頭部と食道部における味蕾を解析しているため、 $G\alpha_{i3}$ と $G\alpha_{14}$ 発現細胞へ投射する脳神経の違いによる差が考えられた。本章の解析では、ともに迷走神経が投射しているメダカの鰓周辺部（第2鰓弓から第4鰓弓が存在する部位）と咽頭歯部の味蕾のみでの解析を行ったので、投射する脳神経の種類による違いは議論できない。今後はメダカの口唇部におけるデータも解析することにより、より厳密な議論ができると考えている。

3-4. 哺乳類と魚類の味蕾細胞における発現分子の違い

魚類における発現関連の特徴を知るため、メダカの結果（本研究）とゼブラフィッシュにおける結果（Ohmoto ら (2011) の報告）に対して、哺乳類（マウス、マカク）での結果（Ishimaru ら(2012)）を比較した。PLC-β2 発現細胞における発現分子について比較すると、哺乳類では、PLC-β2 発現細胞は T1Rs または T2Rs のいずれかを発現している細胞であるのに対して、魚類ではいずれの味覚受容体も発現しない細胞が含まれている。一方で、G タンパク質については、味覚受容体が発現していない細胞にも Gα14 または Gα13 が発現している。Gα13 については魚類のみに発現しているが、Gα14 はマウスやマカクの舌後方部に存在する有郭乳頭の味蕾において一部の T1Rs と共発現している。このことから、魚類では、T1Rs も T2Rs も発現していない Gα14 発現細胞において未知の GPCR が発現し、何らかの味の受容に関わっている可能性が考えられる。哺乳類において甘味の受容体である T1R2/3 ヘテロマーが魚類では T1R1/3 ヘテロマーとともに旨味受容体として機能していること、ゼブラフィッシュの顔面神経において糖に対して応答が見られなかった (Oike *et al.*, 2007) ことから、Gα14 発現細胞が甘味の受容に関与していることは考えにくい。ヒトでは、脂肪酸の受容体として、G タンパク質共役型受容体の GPR120 が味細胞で発現していることが報告されており (Galindo *et al.*, 2011)、マウスでは、この GPR120 は Gαgust と共発現しており、PLC-β2 発現細胞に含まれている (Matsumura *et al.*, 2009)。また、ウナギでは、脂肪酸に対して神経応答があることが示されている (Yoshii *et al.*, 1979)。メダカが脂肪酸に対して味神経応答があるかは不明であるが、上記の知見から、Gα14 発現細胞において脂肪酸の受容を担っている可能性は十分に考えられる。またナマズでは、胆汁酸に対して顔面神経の応答がある (Rolen and Caprio, 2008) ので、胆汁酸の受容に関与している可能性も否定はできない。今後、魚類の Gα14 発現細胞に発現する分子や受容される味質を明らかにすることで、魚類の PLC-β2 発現細胞の特徴が理解できる。これにより、我々哺乳類の PLC-β2 発現細胞との共通点と相違点を見出すことができ、メダカがヒトの味覚研究のモデルとしてどのように利用できるかをより明確に示すことが可能になると考えられる。

一方、酸味受容体候補分子である PKD2L1 についてはメダカでも哺乳類同様に PLC-β2 発現細胞とはほぼ排他的に発現していた。当研究グループの摂食行動解析により、メダカは高濃度になるにつれて酸味を忌避することが示されている (高木陽介 修士論文、齊藤健佑 修士論文)。しかし魚類の PKD2L1 が哺乳類同様に酸味受容体として機能しているかは不明であり、培養細胞を用いた解析を行い、酸の受容に関与するかどうかを調べる必要があるだろう。

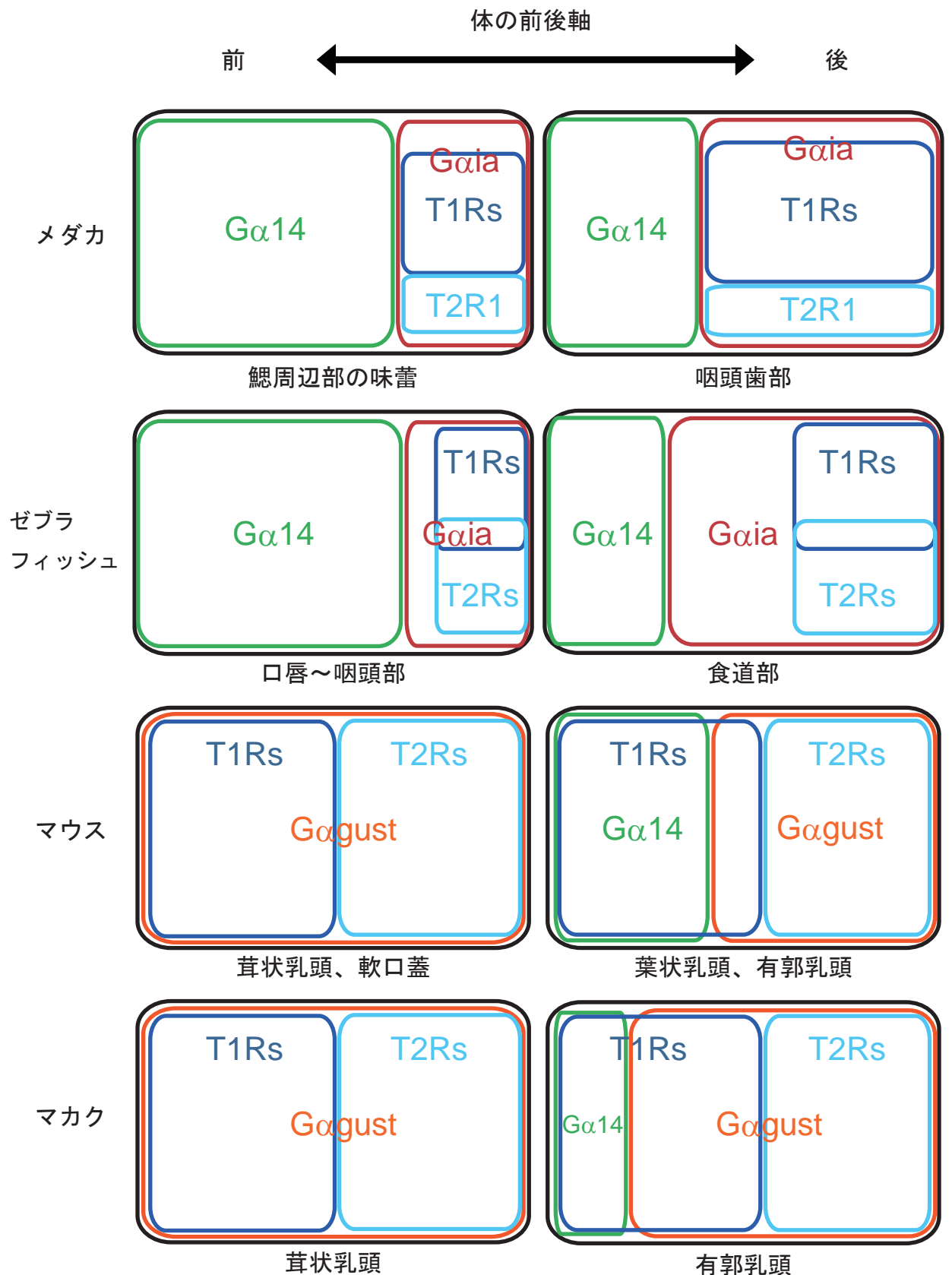


図 1-8 メダカとゼブラフィッシュ、マウス、マカクにおける PLC-β2 発現味蕾細胞における遺伝子の発現様式の比較

メダカとゼブラフィッシュ、マウス、マカクにおける PLC-β2 発現味蕾細胞内での遺伝子の発現相関を模式図で示した。図の一番外の黒枠が PLC-β2 発現味蕾細胞であり、各生物ごとに体の前後軸に対して相対的に前方部と後方部にあたる 2 か所での発現様式を図に記した。メダカの図は本研究の結果から作成し、ゼブラフィッシュとマウスの図は Ohmoto らの解析結果を、マカクは Ishimaru らの解析結果を基に作成した (Ohmoto et al., 2011; Ishimaru et al., 2012)。

第2章

メダカ PLC- β 2 発現細胞を起点とした味の情報伝達回路の可視化

序

味の情報伝達に関わる神経細胞は、古くから特定の神経核へ神経トレーサーである色素を直接注入する方法や電気生理学的な解析により調べられている。序論にも記載したが、齧歯類においては、味神経から中枢神経系へと運ばれた味覚情報の伝達経路の概略は、おおまかに示されている (Smith and St John, 1999)。味神経から運ばれた味覚情報は全て延髄の孤束核 (Nucleus of the solitary tract, NST) に投射する。NST からは橋の結合腕傍核 (parabrachial nucleus, PBN) に投射する。PBN からは、視床後内側腹側核小細胞部 (ventral posterior medial nucleus of the thalamus, VPM)、外側視床下部 (lateral hypothalamus, LH)、分界条床核 (bed nucleus of the stria terminalis, BST)、扁桃体中心核 (central nucleus of the amygdala, Amyg) のそれぞれに伝達される。VPM からはさらに大脳味覚野 (gustatory cortex, GC) へと情報が伝達されることが報告されている (序論 図 0-3)。神経トレーサーの注入実験では、神経核同士のおおまかなつながりは把握できるものの、狙った特定の神経細胞集団にのみ色素を注入することは技術的に困難であり、特定の神経細胞と接続する神経回路のみを詳細に辿るには適していないと考えられる。また、電気生理学的な解析は、刺激に応答する特定の神経核における神経細胞を調べることは適するが、接続する神経回路全体を解析することは非常に困難であると考えられる。

近年では、経シナプス性神経トレーサーである小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin, WGA) を遺伝子工学的に特定の味細胞に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、味の情報を伝達する神経回路網の可視化が試みられている。既に、当研究グループを中心として、甘味・旨味の情報伝達経路および酸味の情報伝達経路の味覚1次中枢までの可視化に成功している (Damak *et al.*, 2008; Ohmoto *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2011)。また、苦味の情報伝達経路についても味神経までの可視化はなされている (Ohmoto *et al.*, 2010)。しかし、現状では味覚1次中枢までの可視化にとどまっており、高次中枢までの可視化には至っていない。味の情報伝達に関わる神経回路網の全容解明のためにはより高次中枢までの可視化が必要である。

我々は味覚情報伝達経路の全容を明らかにし、味の情報伝達・認識に関わる神経細胞の特徴を知るため、マウスに代えて、小型魚類であるメダカを実験動物に用いることにした。メダカは、序論で述べたとおり、味蕾の数が多く、脳のサイズが小さいといった特徴を持つため、神経トレーサーが効率良く輸送される可能性が期待され、味覚の高次中枢までの可視化が期待できると考え使用した。

魚類においては、神経トレーサーの注入実験から味覚中枢同士の接続はいくつか報告がある (Kanwal *et al.*, 1988; Lamb and Caprio, 1993; Kanwal and Finger, 1997; Yoshimoto *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2012)。一般的に、味蕾から VIIg、IXg、Xg の3つの神経節を介し、延髄の味覚1次中枢である顔面葉 (facial lobe, VIII)、迷走葉 (vagal lobe, XI) へ投射する。ここから二次味覚路を通り、峡 (isthmus) にある第2味覚核 (secondary gustatory nucleus, NG2) へ投射する。さらに NG2 から視床下部の下葉 (哺乳類の視床下

部に相同) の分散核 (diffuse nucleus of inferior lobe, NDLI) や、糸球体の第 3 味覚核 (preglomerular tertiary gustatory nucleus, pTGN) に投射する経路が存在する (序論 図 0-8)。終脳への投射経路に関しては、pTGN を介して終脳の背側野内側部の背側部 (dorsal region of the Dm (medial part of the dorsal telencephalic area), dDm) へ投射する回路は魚類に共通の味覚高次中枢への神経回路であることが示唆されている。しかし、味覚 3 次中枢以降、特に終脳への投射については、魚種により様々な神経核同士の接続が報告されており (Folgueira *et al.*, 2004b; Folgueira *et al.*, 2004a; Kato *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2012)、各神経核同士の接続については不明な点も多い。

味細胞で受容された味情報の伝達・認識に関わる神経細胞を同定し、味質ごとの違いや神経細胞の特徴を知ることが我々の最終的な目的である。本章ではその第一歩として、メダカを用いて、特定の味細胞を起点とした味情報伝達回路を高次中枢まで可視化することを試みた。

そこで、味蕾細胞に WGA トランスジーンを発現する Tg メダカの作出および Tg メダカにおける WGA タンパク質の発現と輸送経路を免疫組織化学的解析により行った。WGA トランスジーンを発現を誘導するプロモーターには、第 1 章の解析により、魚類においても T1R や T2R 発現細胞を含む 5 割の味蕾細胞で発現することが示され、既に当研究室で取得済みであるメダカ PLC- β 2 の転写制御領域 (Aihara *et al.*, 2007) を使用した。

作出した Tg メダカにおける WGA の輸送を解析した結果、PLC- β 2 発現味蕾細胞で発現した WGA が、味神経を含む神経節および味覚情報の伝達、処理に関与すると考えられる味覚 3 次中枢、さらに終脳領域の味覚高次中枢の神経細胞にまで輸送されていることが観察された。よってメダカを用いることにより、マウスではできなかった味細胞を起点とした味覚情報の伝達・認識に関わる神経回路の高次中枢までの可視化に成功した。また、経時的な解析を行ったことにより、味覚情報の伝達・認識に関わる神経が、味蕾細胞から味神経を介し、延髄へ投射され、中脳や間脳の複数の味覚中枢を経て、高次中枢である終脳領域の神経核にまで接続するというおおまかな接続様式を示すことができた。

1. 材料および方法

1-1. 実験動物

第1章の1-1同様にCab系統のヒメダカを野生型 (WT) メダカとして用いた。

1-2. トランスジーン構築

バックボーンとしてメダカ PLC-β2 遺伝子 5'上流域 1.6 kb (mfplcb2-1.6k) の3'側にEGFP およびI-Sce Iメガヌクレアーゼ切断認識配列 (Thermes *et al.*, 2002) を両端に加えたカナマイシン耐性遺伝子を連結した mfplcb2-1.6kEGFP<Kan>プラスミド (Aihara *et al.*, 2007) を用いた。

WGA cDNA 配列は、WGA タンパク質の D 型異性体 (Smith and Raikhel, 1989) のコーディングシーケンスから、C 末端のプロペプチド配列 15 アミノ酸を除いた truncated WGA (Yoshihara *et al.*, 1999) について、サブクローニング時に 191 番目のアミノ酸に導入されていた変異を野生型に戻したもの (Ohmoto *et al.*, 2008; Ohmoto *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2011) を使用した。この WGA cDNA 配列をプラスミドから Eco RI および Not I 処理で切り出し、平滑化した。ウサギβ-globin 遺伝子のイントロン (βgl) と 3'-ノンコーディング領域および SV40 ポリ A 付加配列を含む pBStN を EcoR I 処理および平滑化し、これに WGA cDNA 断片を挿入した。このプラスミドの Spe I サイトの部分に、mfplcb2-1.6k を組み込んだプラスミドから Spe I で切り出した mfplcb2-1.6k を挿入した。さらに Not I 処理後、平滑化し Sal I 処理して得た断片を、mfplcb2-1.6kEGFP<Kan>プラスミドを Apa I 処理後平滑化し、Sal I 処理した部分に挿入した (図 2-2 A)。

1-3. メダカ初期胚へのプラスミドの注入

注入するプラスミド DNA 溶液は、0.5 U/μl I-Sce I 酵素、0.5× I-Sce I buffer (Roche Diagnostics 社)、1.5% dextran-rhodamine B (D-18249、Invitrogen 社) および 5 mM MgCl₂ を含むインジェクションバッファーに、図 2-2 A のプラスミド濃度が 20~100 ng/μl になるように調製した。注入用の針は芯入りガラス管 (GD-1、ナリシゲ社) からプレー (PC-10、ナリシゲ社) を用いて作製した。受精直後のメダカ胚をメダカ飼育水 (0.03%人工海水、1 ppm メチレンブルー) を入れたシャーレに採取し、氷上に設置したフローターの上に乗せて冷やすことで発生を遅延させた。1 または 2 細胞期の胚を 4%メチルセルロース溶液中に固定し、実体顕微鏡 (SZX10、オリンパス社) 下で電動マイクロインジェクター (IM-300、ナリシゲ社) を用いて DNA 溶液を微量注入した。注入後直ちに胚をメダカ飼育水中に回収し、28 °C の恒温槽で発生させた。

1-4. メダカ稚魚の選抜

トランスジーンを微量注入した個体および、Tg 個体の継代の際には、孵化後 1 日の仔魚を蛍光顕微鏡で 460~490 nm の励起フィルタと 510 nm の蛍光フィルタを用いて味蓄存

在部である口唇および鰓部で GFP 蛍光を観察し、GFP 蛍光陽性の Tg 個体を選抜した。

1-5. *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) による解析

1-5-1. プローブの作製

基本的な操作は第 1 章 1-3-1 と同じである。

メダカ PLC- β 2 遺伝子の cDNA 配列 (GenBank: AB254242)、WGA 遺伝子の cDNA 配列 (GenBank: M25537)、メダカ PKD2L1 遺伝子の cDNA 配列 (GenBank: AB571240) を pBluescript II SK (+) に挿入して鋳型とした。使用した遺伝子の cDNA 領域については表 2-1 にまとめた。

この節では合成したプローブは平均長が約 500 bp になるようにアルカリ溶液中で断片化した。後述の 1-6-4. IHC と ISH を用いた二重染色における解析のみプローブの平均長が約 150 bp になるようにアルカリ溶液中で断片化した。

1-5-2. メダカ頭部の切片作製

ISH 解析には、受精後 12 日、1 か月齢の稚魚と、3 ヶ月齢以上の成魚の Tg および WT メダカを使用した。成魚については、第 1 章 1-3-2 と同じである。

稚魚 (12 日齢および 1 か月齢) を切片にする際は、尾部を切り落とさずに固定を行った。また、12 日齢の稚魚は脱灰操作も行わずにブロックにした。包埋ブロックはクライオスタットで切片にした。成魚の矢状面切片および水平切片は 10 μ m、成魚脳の冠状切片は 20 μ m、稚魚の冠状切片は 12 μ m 厚の切片にした。切片は染色時まで -80°C で保存した。

1-5-3. ISH

基本的な操作は第 1 章 1-3-3 と同じである。ただし、この節では、アセチレーションは行わずにハイブリダイゼーションを行った。

1-5-4. 二重 ISH の操作

ハイブリダイゼーションの前までの操作は第 1 章 1-3-3 と同じである。ハイブリダイゼーションは、DIG 標識のプローブと Fluorescein 標識のプローブを混ぜて行った。その後は、ブロッキングを第 1 節 1-3-4 と同様の操作を行い、ブロッキング操作の後、ブロッキング液で 1000 倍希釈した HRP (horse raddish peroxidase) 標識抗 Fluorescein 抗体 (Jackson ImmunoReseach 社) 溶液で 1 時間抗原抗体反応を行った。その後 0.05% Tween20 を含む TBS (TBSt) で 3 回洗浄したのち、0.0015% H₂O₂ を含む amplification バッファー (Invitrogen 社) で 100 倍希釈した TSA-AlexaFluor555 (Invitrogen 社) にて遮光して 30 分反応させた。以後遮光しながら操作を行った。TBS で 2 回洗浄し反応を止めた後、1% H₂O₂/TBS で 30 分間処理し HRP を失活させた。再度 TBS で 3 回洗浄したのちに、100 倍

希釈した HRP 標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics 社) で 1 時間抗原抗体反応させた。その後 TBS_t で 3 回洗浄したのち、0.0015% H₂O₂ を含む amplification バッファーで 100 倍希釈した TSA-AlexaFluor488 (Invitrogen 社) にて 30 分反応させた。発色後は TBS で 3 回、蒸留水で 1 回洗浄し、風乾させた後 Fluoromount (Sigma 社) およびマイクロカバーグラスで封入した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (FV500 Olympus 社) を用いて行った。

1-6. 免疫組織染色 (Immunohistochemistry, IHC)

1-6-1. メダカの切片作製

メダカ頭部の切片の作製法については、基本的に 1-5-2 と同じである。脳を摘出し、切片を作製する場合は、摘出した脳を 4% PFA/PBS に約 16 時間浸した後、脱灰操作をせずに不凍処理の操作を行った。稚魚の矢状面切片は 10 μ m 厚にした。

1-6-2. メダカ成魚由来のアセトンパウダーの作製およびアセトンパウダー処理

WT メダカ成魚 4 g 分を予め -80°C に冷やしておいた乳鉢に入れて、液体窒素を加えながら乳棒で 10 分間磨り潰した。遠心管に移し、しばらく室温に静置した。その後、生理食塩水を 16 ml と -20°C のアセトンを 16 ml 加え、よく混合し、4°C で 30 分放置した。10000 x g で 10 分間遠心後、上清を除き、アセトンを 30 ml 加え、よく混合し 4°C で 10 分放置した。再度 10000 x g で 10 分間遠心後、上清を除いた。沈殿をミクロスパーテルでかきとり、濾紙 (Filter Papers 50 Hardened, Whatman 社) の上に載せ、乾燥させた。その後、再度乳鉢と乳棒を使い、さらに細かく磨り潰し、密閉容器に入れて -20°C で保存した。1 次抗体をアセトンパウダー処理する場合、ブロッキング溶液で希釈した抗体溶液にアセトンパウダーを 1% 加え、混合し、4°C で約 16 時間静置させた。その後、遠心させ、上清を 45 μ m のフィルターに通し、抗体の非特異的な結合を除いたものを 1 次抗体として使用した。

1-6-3. IHC

1-6-3-1. 味蕾および神経節での抗 WGA 抗体を用いた IHC

メダカ切片をドライヤーの冷風で乾かした後、4% PFA/PBS に 10 分間浸し固定した。PBS で 3 回洗浄した後、0.2% TritonX100 を含んだ PBS (PBST) で希釈した 5% ウサギ正常血清で 30 分ブロッキングした。その後、1 次抗体としてヤギ抗 WGA 抗体 (Vector 社) を 500~10000 倍希釈 (味蕾では 10000 倍、神経節では 500~1000 倍) で含むブロッキング溶液で常温にて 2 時間抗原抗体反応を行った。PBS で 3 回洗浄した後、2 次抗体として HRP ポリマーで標識された ImmPRESS ウマ抗ヤギ IgG 抗体 (Vector 社) をそのまま使用し、常温で 30 分抗原抗体反応を行った。反応後、PBS で 3 回洗浄し、0.6% 硫酸ニッケルアンモニウムと 0.006% H₂O₂ を含む 0.1% DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) 溶液で 5 分間発色させた。発色後は蒸留水で 4 回洗浄し、風乾させた後 Fluoromount およ

びマイクロカバーグラスで封入した。

1-6-3-2. 脳での抗 WGA 抗体を用いた IHC

メダカ切片をドライヤーの冷風で乾かした後、4% PFA/PBS に 10 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した後、0.3% H₂O₂/PBS で 30 分処理し、内在 HRP 活性を除去した。その後 PBS で 3 回洗浄した後、PBST で希釈した 2.5%ウマ正常血清で 30 分ブロッキングした。その後、アセトンパウダー処理したヤギ抗 WGA 抗体を 1 次抗体として 300 倍希釈して含むブロッキング溶液で常温にて 2 時間抗原抗体反応を行った。PBS で 3 回洗浄した後、2 次抗体として HRP ポリマーで標識された ImmPRESS ウマ抗ヤギ IgG 抗体をそのまま使用し、常温で 30 分抗原抗体反応を行った。PBS で 3 回洗浄した後、0.6%硫酸ニッケルアンモニウムと 0.006% H₂O₂ を含む 0.1% DAB 溶液で 5 分間発色させた。発色後は蒸留水で 4 回洗浄し、風乾させた後 Fluoromount およびマイクロカバーグラスで封入した。

1-6-3-3. 脳での抗 WGA 抗体による IHC およびクレシルバイオレットを用いた Nissl との二重染色

封入までの操作は 1-6-3-2 と同様である。封入後、蒸留水に 12 時間以上浸し、一度カバーグラスをはがし、30%、50%、70%、95%のエタノールにこの順に 2 分ずつ浸し、最後に 100%エタノールに 3 分浸して脱水を行った。その後、95%、70%、50%、30%のエタノールにこの順で 2 分ずつ浸し、蒸留水に 2 分浸して再水和させた。水和後、0.5%のクレシルバイオレット (Aldrich 社) を含む 0.25%酢酸溶液に 10 分間浸し、Nissl 染色を行った。染色後は、95%エタノールで 2 回洗浄後、100%エタノール、50%キシレン/50%エタノール混合液、100%キシレンの順に 3 分ずつ浸し、最後に再度 100%キシレンに 3 分間漬け、脱水させた。風乾後、ベクタマウント (Vector 社) : キシレン = 2:1 の溶液およびマイクロカバーグラスを用いて封入した。

本章の成魚脳における IHC では、1 次抗体であるヤギ抗 WGA 抗体の濃度を 100 倍に希釈して染色すると、脳組織全体が青紫色になりノイズを生じた (データは示さない)。そこで、ノイズが生じずに最も強く WGA タンパク質を検出できる条件として、1 次抗体の濃度を 300 倍に希釈して IHC を行うことにした。また、結果 2-7 においては、IHC により検出されたシグナルが、Nissl 染色で染まる細胞に含まれていた場合には、その細胞に WGA タンパク質が局在していると判断した。

1-6-4. IHC と ISH を用いた二重染色

メダカ切片をドライヤーの冷風で乾かした後、4% PFA/PBS で 10 分間固定した。直前に 0.1% DEPC 処理した PBS で前処理 15 分間を 2 回行い、Target Retrieval Solution (DAKO 社) 溶液に 95°C で 40 分間浸し、抗原賦活化処理を行った。その後、4% PFA/PBS で 5 分間再固定し、5×SSC で 15 分間洗浄した後、ISH の操作と同様にプレハイブリダイゼーション

オンからブロッキングまで行った。ブロッキング後は 100 倍希釈 HRP 標識抗 DIG 抗体で 1 時間抗原抗体反応を行い、TBS_t で 3 回洗浄後、100 倍希釈 TSA-AlexaFluor488 で 30 分反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄した後、ウマ正常血清を含む PBST で 100~300 倍に希釈したヤギ抗 WGA 抗体 (Vector 社) 溶液で常温にて 2 時間抗原抗体反応を行った。PBS で 3 回洗浄した後、200 倍希釈したロバ抗ヤギ IgG AlexaFluor 555 で 1 時間反応させた。反応後は、PBS および蒸留水で洗浄し、風乾させた後 Fluoromount およびマイクロカバーガラスで封入した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (FV500 Olympus 社) を用いて行った。

表2-1 本章の解析で使用した*in situ* ハイブリダイゼーション用のプローブ配列

遺伝子名	GenBank accession number	使用した cDNA断片長 (bp)	cDNA中の 使用断片領域 (bp)	cDNA全長 (bp)
メダカPLC-β2	AB254242	740	1094-1833	3844
WGA	M25537	594	5-598	998
メダカPKD2L1	AB571240	2503	1-2503	2503

2. 結果

2-1. メダカ PLC-β2 遺伝子の発現分布について

本研究は、PLC-β2 遺伝子のプロモーターを用いて、PLC-β2 発現細胞において発現する神経トレーサーWGA の輸送経路を解析することにより、味覚情報伝達神経回路を可視化することが目的である。そこで、まず WGA の発現元となるメダカ PLC-β2 発現細胞の分布について把握しておく必要がある。既に第 1 章の結果から、味蕾細胞中における PLC-β2 発現細胞の割合と他分子との発現相関は示された。しかし PLC-β2 遺伝子は、哺乳類では味蕾以外にも鼻腔内上皮に存在する孤立化学受容細胞 (solitary chemoreceptor cells, SCC) (Finger *et al.*, 2003; Tizzano *et al.*, 2011) および血球系の細胞 (Sun *et al.*, 2007) で発現することが報告されている。メダカでは味蕾細胞以外での PLC-β2 発現細胞の分布は不明であったので解析した。

全身における PLC-β2 の発現を調べるため、過去に作出した PLC-β2 発現細胞に GFP を発現する Tg メダカ (Aihara *et al.*, 2007) の稚魚を用いて蛍光顕微鏡観察によって GFP 蛍光を発する細胞を観察した。その結果、味蕾において GFP 蛍光を発する細胞が非常に多く観察され、蛍光強度も強かった (図 2-1B, C)。味蕾以外の組織では、胸腺において GFP 蛍光が観察された (図 2-1 D)。胸腺での GFP 蛍光は味蕾における蛍光強度より弱く頻度も非常に低かった (図 2-1 B-D)。その他の部位では GFP 蛍光を発する細胞は観察されなかった。次に、観察された胸腺での発現が使用した Tg 個体における異所的な発現ではないことを調べるため、成魚水平切片を用いて胸腺において ISH を行った。その結果、胸腺の一部の細胞において PLC-β2 mRNA の発現が観察された (図 2-1 E)。この結果から、メダカの PLC-β2 発現細胞は味蕾以外にも胸腺に存在することが明らかになった。メダカにおいて PLC-β2 は、哺乳類と同様に、胸腺中のリンパ球やマクロファージなど血球系の細胞に発現していると考えられた。これらの細胞は味覚と関連がなく、シナプスを介して神経細胞へは輸送されないと考えられた。また、味蕾での発現に比べ、胸腺での発現細胞はごくわずかであり、発現量の少なさからも中枢での解析には寄与しないと考えられた。よって、メダカ PLC-β2 遺伝子のプロモーターを使用して、WGA の発現を誘導した Tg メダカにおいては、味蕾細胞を起点とした神経伝達回路の解析が可能であると判断された。

2-2. PLC-β2 発現細胞に WGA を発現させる Tg メダカの作出

味覚神経回路の高次中枢までの可視化を目的として、当研究グループで既に取得済みのメダカ PLC-β2 遺伝子の転写制御領域 1.6 kb (mfplcb2-1.6k) (Aihara *et al.*, 2007) を用いて PLC-β2 発現細胞に WGA を発現する Tg メダカ (PLC-β2-WGA メダカ) の作出を試みた。まず遺伝子導入用プラスミドの作製を行った。mfplcb2-1.6k に、WGA cDNA 配列を連結したカセットと EGFP タンパク質の cDNA 配列を連結したカセットの 2 つを逆向きに挿入したプラスミドを作製した。EGFP タンパク質のカセットは Tg の選抜に使用する

ため挿入した。WGA cDNA 配列の直前には、mRNA の安定化と発現効率の上昇のため、ウサギの β -globin 遺伝子のイントロン (β gl) の配列を挿入し (Huez *et al.*, 1981)、トランスジーン挿入効率の上昇のための I-Sce I メガヌクレアーゼ切断認識配列をカセットの両端に挿入した (Thermes *et al.*, 2002) (図 2-2A)。

以上のようにして作製したプラスミドを WT メダカ初期胚に微量注入し、得られた個体のうち、味蕾が存在する口唇と鰓部において GFP 蛍光を発する細胞の頻度が特に高かった 5 個体をファウンダー (G0 世代) として使用し、WT メダカと交配して F1 世代のメダカを得た。この F1 世代メダカで GFP 蛍光を発する個体が得られたファウンダー 3 個体由来の F1 世代メダカのうち、GFP 蛍光を発する個体を 1 個体ずつ取得し、各々 WT メダカと交配させて F2 世代のメダカを得た。これら 3 つの系統を、g3, g4, g5 と名付けた。この 3 系統の F2 世代稚魚の味蕾細胞での GFP 蛍光の強度は、g3 と g5 の 2 系統で強かったため、今後の解析ではこの 2 系統を使用した。ただし図に使用したのはこのうち g3 系統のみとした。以降の解析では F2~F5 世代の Tg メダカを使用した。

系統化した Tg メダカにおいて、WGA mRNA が味蕾細胞内で、PLC- β 2 発現細胞特異的に発現しているかを ISH により解析した。3 か月齢の Tg メダカおよび WT メダカの矢状面切片を用いて解析した結果、Tg メダカにおいては口唇、鰓耙、咽頭歯部いずれの味蕾においても WGA mRNA の発現が観察された (図 2-2B)。一方で、WT メダカでは発現が観察されなかった。この結果から、WGA mRNA が味蕾細胞で発現していることが示された。

続いて、この発現が PLC- β 2 発現細胞特異的であるかどうかを調べるため、3 か月齢の Tg メダカ成魚に対して二重標識 ISH を行い、WGA mRNA と、内在 PLC- β 2 遺伝子および第 1 章での解析から PLC- β 2 と基本的に排他的に発現する PKD2L1 遺伝子との発現の重なりを調べた。その結果、WGA mRNA は内在 PLC- β 2 mRNA 発現細胞特異的に発現していることが観察された (図 2-3 上段)。さらに WGA mRNA は PKD2L1 とは排他的に発現していた (図 2-3 下段)。以上の結果から、作出した Tg メダカは PLC- β 2 発現味蕾細胞特異的に WGA mRNA を発現しており、PLC- β 2 発現味蕾細胞に WGA mRNA を発現するメダカ (PLC- β 2-WGA メダカ) の作出に成功した。

2-3. PLC- β 2-WGA メダカの WGA タンパク質の味蕾における発現分布の解析

続いて WGA タンパク質の発現が検出されるかを調べるため、メダカの矢状面切片について、抗 WGA 抗体を用いた免疫組織染色 (IHC) を行い味蕾での WGA タンパク質の発現解析を試みた。まず系統化された F2 世代メダカの成長途中である 1 か月齢の稚魚を用いて解析を行った。その結果、一部の味蕾細胞において WGA タンパク質の発現が観察された (図 2-4A-i)。よって、作出した PLC- β 2-WGA メダカは WGA タンパク質を発現しており、このメダカは味蕾細胞を起点とした神経伝達回路の解析に有効なメダカであることが示された。

そこでこの Tg メダカの成魚（6 か月齢）においても IHC を行い WGA タンパク質の発現、輸送を解析することを試みた。まず、味蕾において解析した結果、6 か月齢の成魚の味蕾では、WGA タンパク質は非常に強く発現していた（図 2-4A-ii）。鰓周辺部の味蕾においては、味蕾と接続している神経線維も非常に強く染まることが観察され、WGA タンパク質の神経線維への輸送が示唆された（図 2-4A-ii）。

ここで、WGA タンパク質の味蕾内での発現細胞を解析するため、IHC と ISH を組み合わせた二重染色を行い、WGA タンパク質と WGA および PKD2L1 mRNA の発現を解析した。その結果、WGA タンパク質は WGA mRNA 発現細胞と一致したが、PKD2L1 mRNA 発現細胞とは重なりが見られなかった（図 2-5）。以上から、PLC-β2 発現味蕾細胞で発現した WGA タンパク質は少なくとも PKD2L1 発現味蕾細胞には輸送されないことが示された。マウスでの解析で観察されている結果と同様に、メダカにおいても WGA タンパク質は隣接する別の味蕾細胞へは輸送されず直接神経線維へ運ばれている可能性が示唆された（Ohmoto *et al.*, 2008; Ohmoto *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2011）。

2-5. 味神経を含む神経節における WGA タンパク質の輸送解析

味蕾において WGA タンパク質の発現が観察されたので、次に味蕾に投射している味神経においても IHC により WGA タンパク質の検出を試みた。味蕾の解析で用いた 1 か月齢の稚魚と 6 か月齢の成魚ともに解析した結果、味神経が含まれている神経節の一つである迷走神経節（Xg）において、どちらも WGA タンパク質陽性細胞が観察された（図 2-4 B）。味蕾の時と同様に稚魚よりも成魚の方が、WGA 陽性細胞が鮮明に観察された。

この結果から、味蕾で発現した WGA タンパク質が味神経へ輸送され、成長した方が WGA の輸送量が増える可能性が示唆された。

2-6. 味覚中枢における WGA タンパク質の輸送解析

2-5 により WGA の味神経への輸送が示唆された。次に味覚中枢への WGA タンパク質の輸送を期待して味神経と接続している味覚 1 次中枢、さらに味覚 1 次中枢と接続している味覚 2 次中枢において WGA タンパク質の局在を解析した。1 か月齢の稚魚の頭部および 6 か月齢の成魚の冠状切片を用いて IHC を行った。メダカの脳の神経核の名称は、特に記載がなければ Ishikawa ら（1999）のメダカ脳アトラスの表記に準じることにした。

まず、1 か月齢の稚魚において解析した結果、Xg と接続している味覚 1 次中枢である延髄の迷走葉（vagal lobe, XL）において WGA タンパク質がごくわずかに検出された（図 2-6A-i）。また、同一切片上の迷走神経運動核（vagal motor nucleus, NXm）（図 2-6A-ii）および網様体（reticular formation, RF）（図 2-6A-iii）の細胞でも WGA タンパク質が検出された。しかし、味覚 2 次中枢である峽（中脳と延髄の間）の第 2 味覚核（secondary gustatory nucleus, NGS）においては、WGA タンパク質は検出されなかった（図 2-6C）。

次に、6 か月齢の成魚においても稚魚同様に解析した。その結果、XL において稚魚の

場合よりもはっきりとした WGA 陽性細胞が検出され、WGA タンパク質の輸送が示された (図 2-6B-i)。さらに NXm と RF においても WGA タンパク質が検出され、稚魚よりも染色像は濃く鮮明であった (図 2-6B-ii, iii)。さらに NGS においても解析した結果、稚魚では検出できなかった WGA タンパク質が検出された (図 2-6D)。

以上の結果から、稚魚よりも成魚の方が WGA の発現量が多く、より高次中枢まで WGA が検出された。よって味蕾で発現した WGA タンパク質は、時間を経るごとにシナプスを介して徐々に高次中枢まで輸送されることが示唆された。つまり経時的な解析を行うことで、WGA タンパク質が輸送される神経核の順番を辿ることができ、味情報伝達回路の詳細が把握できると考えた。そこで成長段階が異なるメダカを用いて WGA の局在を詳細に解析することにした。

2-7. PLC- β 2-WGA メダカを用いた WGA の経時的な輸送解析

2-3 から 2-6 の解析結果から、経時的な解析を行うことで、味情報伝達回路の詳細が把握できると考えた。そこで、成長による WGA の発現および輸送の差をはっきりさせるため、より成長段階の早い時期と成長段階の遅い時期の Tg メダカを用いて詳細な解析を行うことにした。そこで、より成長段階の早い時期であり孵化後 1, 2 日程度である 12 日齢の稚魚、成長が終わっている段階である 9 か月齢の成魚を用いることにした。さらに、中間の段階として、性成熟した比較的若い段階の 3 か月齢の成魚も加え、成長段階が大きく異なる 3 点を用いて WGA の輸送経路を詳細に解析した。

2-7-1. 12 日齢の Tg メダカ稚魚における WGA の発現および輸送解析

まず、12 日齢の稚魚において、WGA の発現および輸送を IHC により解析した。その結果、12 日齢の稚魚の味蕾では WGA タンパク質の発現が観察された (図 2-7B)。鰓周辺部の味蕾においては、味蕾と接続している神経線維への WGA の輸送も観察された (図 2-7A 矢印)。次に、味神経を含む 3 つの神経節である顔面 (VIIg)、舌咽 (IXg)、迷走 (Xg) 神経節においても観察したところ、いずれの神経節においても一部の細胞で WGA が検出された (図 2-7A, C-F)。続いて中枢においても解析した結果、延髄領域にある迷走葉 (XL) において WGA 陽性細胞が観察された (図 2-8A, B)。また、同一切片上の XL よりもやや外側かつ腹側に位置する領域においても WGA 陽性細胞が観察された (図 2-8A, C)。さらに網様体 RF においても WGA 陽性細胞が観察された (図 2-8D, E)。しかし、延髄以外の脳領域においては、WGA は観察されなかった。

2-7-2. 3 か月齢の Tg メダカ成魚における WGA の発現および輸送解析

次に、3 か月齢の成魚において、WGA の発現および輸送を IHC により解析した。その結果、味蕾において WGA タンパク質の非常に強い発現および周辺の神経線維への輸送が観察された (図 2-9A, B)。味神経においては、12 日齢で既に観察されていた味神経を

含む3つの神経節 VIIg、IXg、Xg において一部の細胞で WGA が観察され (図 2-9D-F)、さらに三叉神経の神経節 (Vg) においても WGA 陽性細胞が一部観察された (図 2-9C)。これらの神経節については、WGA 陰性細胞も観察されたことから、WGA は複数の神経節中の神経細胞へ選択的に輸送されていることが示された。しかし、各神経節において、WGA 陽性細胞と陰性細胞は分散されて存在しており、空間的な発現分布パターンは明らかにはできなかった。また、味神経を含む3つの神経節 VIIg、IXg、Xg においては、神経節中の神経細胞における WGA 陽性細胞の割合を計数した。その結果、VIIg では約 60% の細胞 (130/218, $59.6 \pm 6.3\%$ (n=3))、IXg では約 60% の細胞 (115/183, $62.8 \pm 1.3\%$ (n=3))、Xg では約 50% の細胞 (346/721, $48.0 \pm 7.1\%$ (n=4)) が陽性であることが示された。

続いて、中枢における WGA の輸送を解析した。WGA が神経細胞に含まれることを明確にするため、以降の解析では、Nissl 染色も行い、二重染色した切片で解析した。Nissl 染色により染まる部分は神経細胞であるので、これに含まれる WGA 陽性細胞に関して今後解析することにした。二重染色の結果、12 日齢と同様に延髄領域において、味覚 1 次中枢 XL (図 2-10A, B)、NXm (図 2-10A, C)、RF (図 2-10A, D) で WGA タンパク質 (黒いドット状のシグナル) が Nissl 染色により着色された神経細胞 (紫色) に含まれて存在していることが観察された。これらの神経核に加えて 3 か月齢の成魚で新たに、延髄の味覚 1 次中枢の一つである顔面葉 (facial lobe, VIII) においても WGA 陽性細胞が観察された (図 2-10E, F)。さらに前方部の切片を解析した結果、味覚 2 次中枢 NGS において WGA 陽性細胞が観察された (図 2-11A, B)。また、NGS のやや後方寄りの切片において第 2 内耳神経核 (secondary octaval population, SO) で WGA 陽性細胞が観察された (図 2-10G, H)。この領域は Anken and Bourrat (1998) のメダカ脳アトラスでは、顔面神経感覚核 (sensory nucleus of the facial nerve, NVII) と呼ばれる顔面神経の中核となっていた。そこで、VIII から SO にかけての冠状切片を連続して解析した結果、この 2 つの神経核は途切れることなく WGA 陽性細胞が前後方向に存在していた (データは示さない)。よって SO は VIII の一部であり、顔面神経から投射する味覚中枢の一部と判断した。さらに、より前方部の脳においても観察した結果、中脳の脳室付近の神経核に WGA が検出された (図 2-11C, D)。この核は、Anken and Bourrat (1998) のメダカ脳アトラスにおいて、背側被蓋核 (dorsal tegmental nucleus, DT) と記載されていた。間脳領域では、隆起腹側核 (ventral tuberal nucleus, NVT) (図 2-11E, F)、終脳領域では、終脳腹側野上交連部 (supracommissural part of the ventral telencephalic area, Vs) (図 2-11G, H)、終脳腹側野腹側部 (ventral part of the ventral telencephalic area, Vv) (図 2-11G, I) において微弱ではあるが WGA が検出される細胞が存在した。

ここで、神経節や脳の中核において観察された WGA が、その場所でのトランスジェーンの異所的な発現ではなく、味蕾から輸送されたものであることを示すため、神経節および脳の中核において WGA mRNA の発現を ISH により解析した。その結果、いずれの神経節においても WGA mRNA の発現は見られなかった (図 2-12A-D)。脳においては、

2-7-3. において9か月齢のメダカで観察した領域も含めていずれの神経核でもWGAは検出されなかった。その一部の結果を図2-12E-Hに記載した。次に、脳で検出されたWGAが、脳内物質と抗体が非特異的に反応して得られたアーティファクトである可能性を排除するため、WTのメダカ3か月齢成魚においてIHCによる解析を行った。その結果、本研究で解析したいずれの脳領域においてもシグナルは検出されなかった。結果の一部を図2-13に載せた。

以上の結果から、神経節や脳の中樞で検出されたWGAタンパク質は味蕾発現由来であり、味神経を介して輸送されて検出されたことが強く示唆された。

2-7-3.9 か月齢のTgメダカ成魚におけるWGAの発現および輸送解析

最後に、より成長した段階の9か月齢の成魚において、脳におけるWGAの輸送をIHCにより解析した。

延髄領域では、3か月齢のメダカで既にWGAの輸送が観察されているVIII (図2-14F, G)、XL (図2-14A, B)、NXm (図2-14A, C)、RF (図2-14A, D)において同様に輸送が観察された。さらに、三叉神経下行根 (descending trigeminal tract, tV) (図2-14A, E)、内側核 (medial nucleus, MN) (図2-14F, H)において新たにWGA陽性細胞が検出された。次に、前後方向での分布を詳細に把握するため、水平切片を用いて解析した。その結果、延髄領域の背側では、第4脳室に沿って内側部にXLの陽性細胞が前後方向に広く分布していた (図2-15A-D)。さらにXLの分布に沿って外側部ではtV (図2-15A, E, F)においてもWGAが観察された。tVはIshikawaら(1999)によると三叉神経の求心性線維とされているが、Anken and Bourrat(1998)のメダカ脳アトラスにおいて、NTv (nucleus of the descending trigeminal nerve tract) という神経核として記載されており、Nisslで染色された細胞群に含まれることから神経核であると判断した。また、より腹側部の水平切片による解析から、XL同様にNXmも第4脳室に沿って内側部の前後方向に広く分布していた (図2-15G-J)。

延髄から中脳にかけては、3か月齢メダカと同様にSO (NVIIIs) (図2-14I, J)、NGS (図2-16A, B)においてWGA陽性細胞が観察された。味覚2次中枢であるNGSにおいては、WGAは内側部の腹側 (図2-16B)と外側部に分布することが明らかになった。これらに加えて、縫線核 (nucleus of raphe, NRPH) (図2-16A, C)、脳室周辺灰色地帯 (stratum periventriculare, SPV) (図2-16A, D)、乳頭体 (mammillary corpus, CM) (図2-16E, G)において新たにWGA陽性細胞が観察された。

さらに、視床下部の下葉分散核 (diffuse nucleus of the inferior lobe, NDLI) (図2-16E, F)、糸球体第3味覚核 (preglomerular tertiary gustatory nucleus, pTGN) (図2-17A, B)、脳室周囲後核 (periventricular posterior nucleus, NPPv) (図2-17A, C)、前隆起核 (anterior tuberal nucleus, NAT) (図2-17A, D)においてもWGA陽性細胞が観察され、シグナル強度が比較的強かった。NDLIとpTGNは間脳の味覚3次中枢であると示唆されている

(Wullimann, 1988; Yoshimoto *et al.*, 1998)。NDLIは視床下部の表層部に広く分布していたが、pTGNは、核自体が非常に狭く、神経核内での分布を明らかにすることはできなかった。また、DT (図 2-16E, H)、NVT (図 2-17A, E) においては3か月齢のメダカと同様にWGA陽性細胞が観察された。

続いて、より高次中枢である終脳領域において解析した。その結果、3か月齢のメダカでは観察されていなかった神経核である、終脳背側野後部 (posterior part of the dorsal telencephalic area, Dp) (図 2-17F, G)、視索前核マグノ細胞部 (magnocellular preoptic nucleus, POm) (図 2-17F, H)、視索前核小細胞性部 (parvocellular preoptic nucleus, POp) (図 2-17F, I)、終脳腹側野後部 (posterior part of the ventral telencephalic area, Vp) (図 2-17F, J)、終脳背側野内側部の背側部 (dorsal region of the Dm (medial part of the dorsal telencephalic area), dDm) (図 2-18A, B)、終脳背側野内側部の腹側部 (ventral region of the Dm, vDm) (図 2-18A, C)、終脳背側野外側部の腹側部 (ventral region of the Dl (lateral part of the dorsal telencephalic area), vDl) (図 2-18A, D) において、新たにWGA陽性細胞が観察された。Vs (図 2-18A, E) と Vv (図 2-18A, F) においては3か月齢のメダカ同様に陽性細胞が観察され、より強く染まっていた。Dp、vDlは表層の腹側部において強く染まる陽性細胞が観察された。また、終脳領域では、前後方向で隣接している神経核においてWGA陽性細胞が連続して観察された (Dp から vDl にかけて、POm と POp から Vv にかけて、Vp から Vs にかけて)。dDmは、哺乳類における味覚の高次中枢である大脳皮質味覚野に相当すると示唆される領域である (Yoshimoto *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2012)。

このように味覚の1次から3次中枢に加えて、dDmにおいてもWGA陽性細胞が観察されたことから、PLC- β 2-WGAメダカを用いることにより、マウスではできなかった味細胞を起点とした味覚情報の伝達・認識に関わる神経回路の高次中枢までの可視化に成功した。

以上の2-7の解析結果から、経時的な解析を行うことにより、味細胞で受け取った情報は、まず味神経および延髄へ投射し、そこから中脳や間脳の複数の神経核を経て、高次中枢である終脳領域へ接続するという味情報の伝達・認識に関わる神経のおおまかな接続様式を示すことができた (図 2-19)。

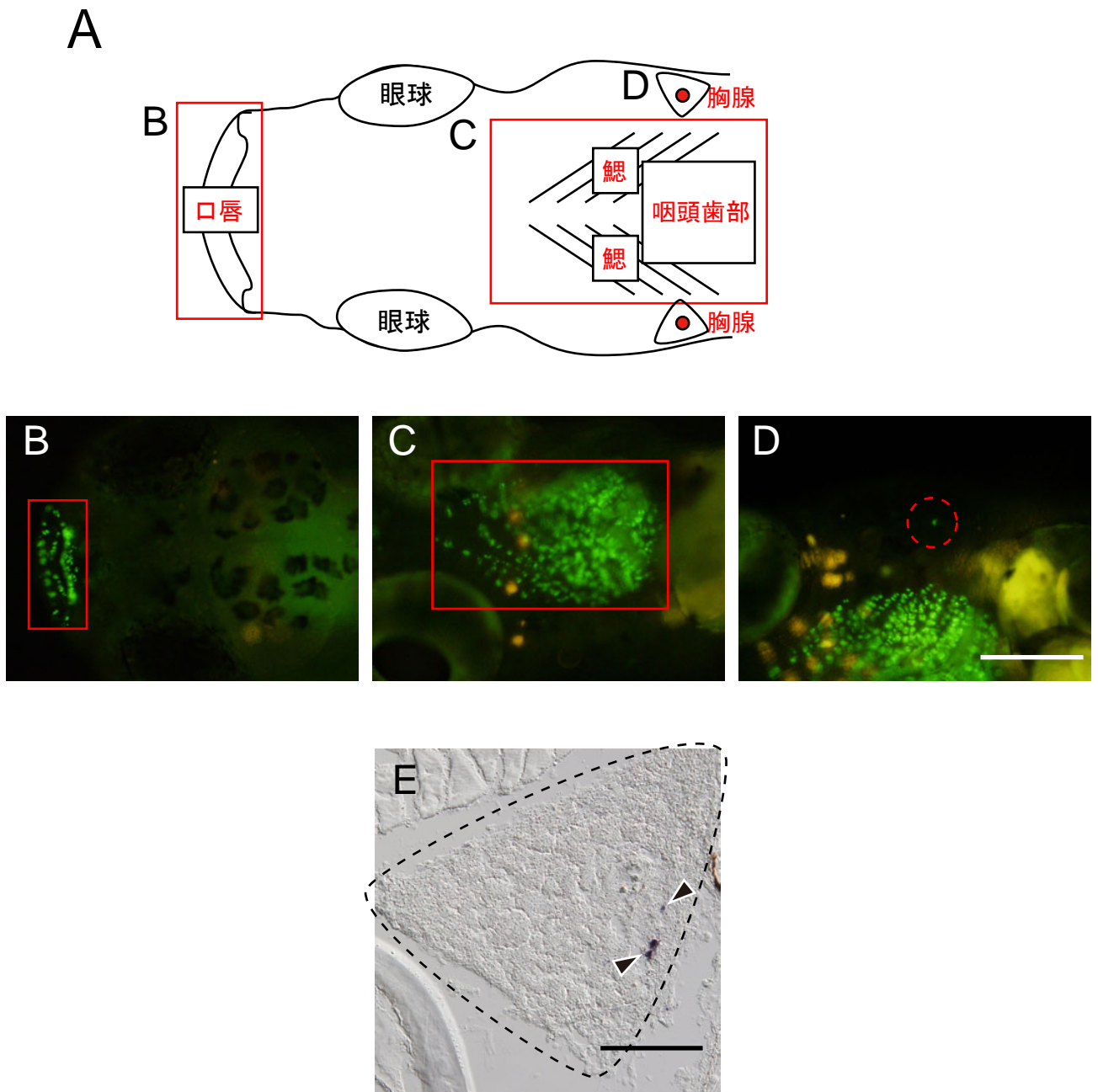


図 2-1 味蕾以外におけるメダカ PLC- β 2 発現部位の観察

A, 背面から見たメダカ頭部の模式図。左側が前方。PLC- β 2 発現部位は赤字で示した。赤枠はそれぞれ B, C の写真内の赤枠に対応。赤丸は D の写真内の赤破線内の蛍光を発している細胞に対応。

B-D, PLC- β 2 発現味蕾細胞で GFP を発現するトランスジェニック (Tg) メダカ (Aihara et al., 2007) の受精後 10 日のメダカ稚魚の GFP 蛍光写真。

B, 背側から見たメダカ頭部写真。C, D, 腹側から見たメダカ頭部写真。

赤枠内は B が口唇の味蕾の GFP 蛍光、C が鳃部から咽頭歯部にかけての味蕾の GFP 蛍光、D が胸腺における GFP 蛍光。いずれもメダカは左が前方。

E, WT メダカ成魚の水平切片の胸腺における PLC- β 2 プローブを用いた ISH。胸腺の輪郭は黒破線で囲った。黒やじりは胸腺の PLC- β 2 発現細胞。

スケールバーは D は 500 μ m (B-D)、E は 100 μ m

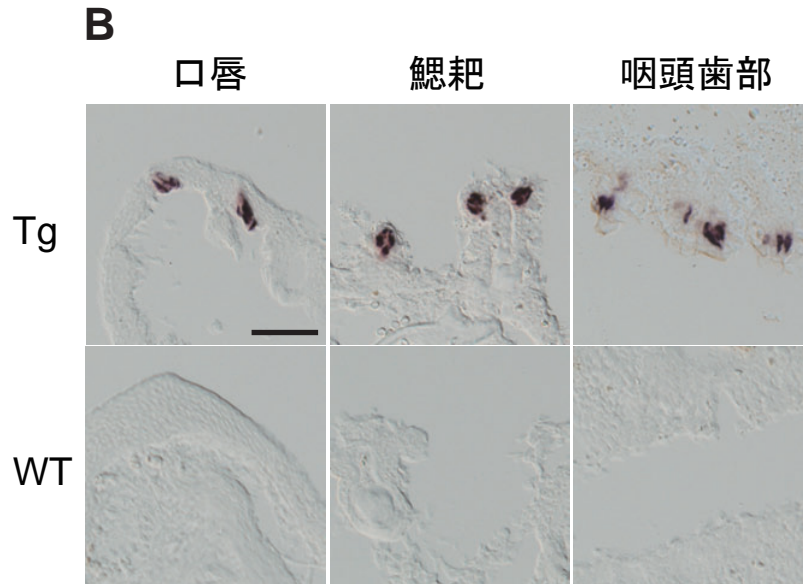
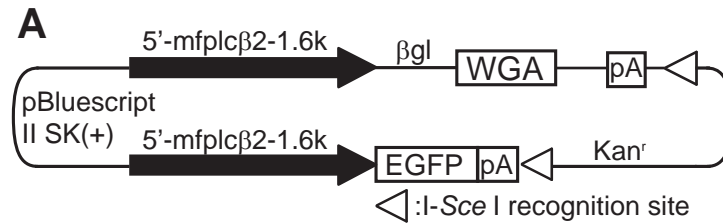


図 2-2 WGA 発現用コンストラクトと PLC-β2-WGA Tg メダカの WGA mRNA の発現解析

A. メダカ初期胚に注入したトランスジーンプラスミド

pBluescript II SK (+) ベクターをバックボーンとし、mfPLC-β2 上流域 1.6 kb (5' -mfplcβ2-1.6k) (Aihara et al., 2007) に、WGA を連結したカセットと EGFP を連結したカセットとを逆向きに挿入した。WGA の cDNA 配列の直前にはウサギ β-globin イントロン (βgl) の配列をつないだ。

pA: SV40 ポリ A 配列。Kan^r: カナマイシン耐性遺伝子の配列。白三角: I-Sce I メガヌクレアーゼ切断認識配列

B. PLC-β2-WGA Tg メダカの味蕾における WGA mRNA の発現

g3 系統の Tg メダカおよび WT メダカ成魚の矢状面切片を用いて、味蕾が存在する口唇、鰓耙、咽頭歯部における WGA mRNA の発現を ISH により解析した。スケールバーは 50 μm

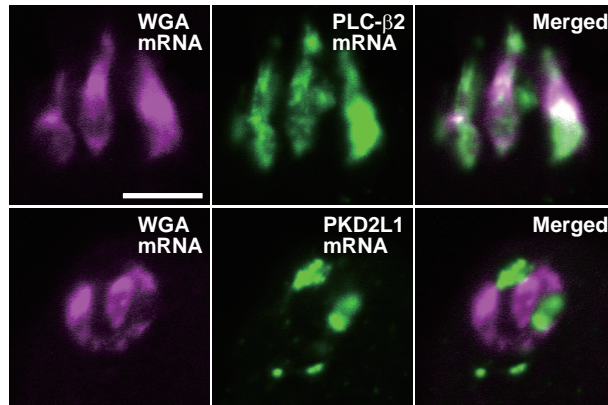


図 2-3 Tg メダカにおける WGA mRNA の味蕾細胞内での発現分布
 g3 系統の Tg メダカ成魚の矢状面切片の味蕾において、WGA、PLC- β 2、
 PKD2L1 のプローブを用いた二重標識 ISH を行った。代表として鰓耙の味蕾
 の染色像を載せた。

マゼンタ， WGA mRNA の発現

緑， PLC- β 2 mRNA の発現（上段）、PKD2L1 mRNA の発現（下段）

スケールバーは 10 μ m。

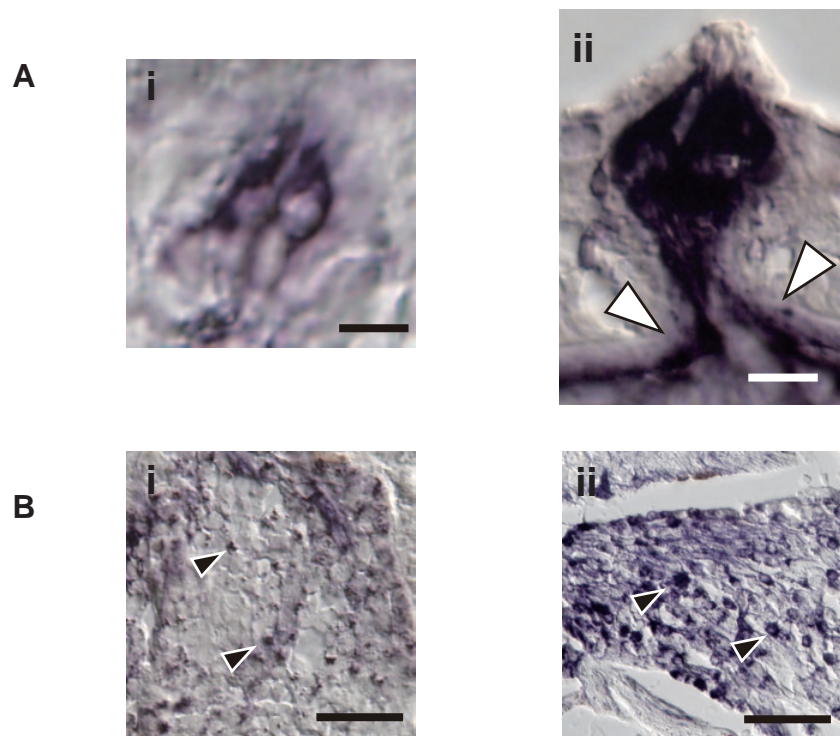


図 2-4 Tg メダカの稚魚と成魚における WGA タンパク質の発現および輸送解析 -1
(味蕾と味神経)

g3 系統の Tg メダカの 1 か月齢の稚魚と 6 か月齢の成魚の矢状面切片を用いた免疫組織染色 (IHC) により WGA タンパク質の発現および輸送解析を行った。

A, メダカ鰓周辺部の味蕾における WGA タンパク質の発現

i, 稚魚の味蕾

ii, 成魚の味蕾

B, メダカの迷走神経節 (Xg) における WGA タンパク質の局在

i, 稚魚の Xg

ii, 成魚の Xg

白やじりは味蕾と接続する神経線維、黒やじりは WGA タンパク質陽性細胞。

スケールバーは A が 10 μ m、B が 50 μ m

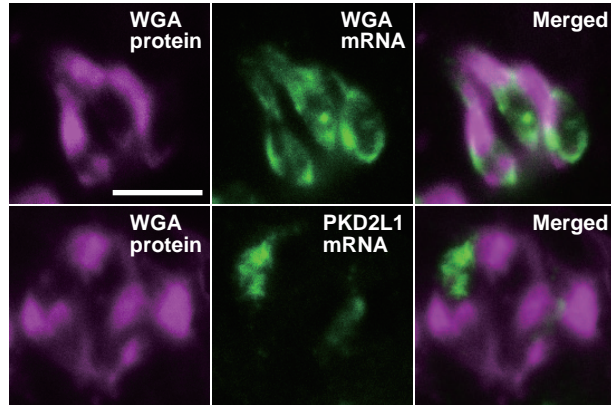


図 2-5 Tg メダカにおける WGA タンパク質の味蕾細胞内での発現分布
g3 系統の Tg メダカ成魚の矢状面切片の味蕾において、ISH と IHC を組み合わせて WGA および PKD2L1 mRNA と WGA タンパク質の二重染色を行った。
マゼンタ , WGA タンパク質の発現
緑 , WGA mRNA の発現 (上段)、PKD2L1 mRNA の発現 (下段)
スケールバーは 10 μ m。

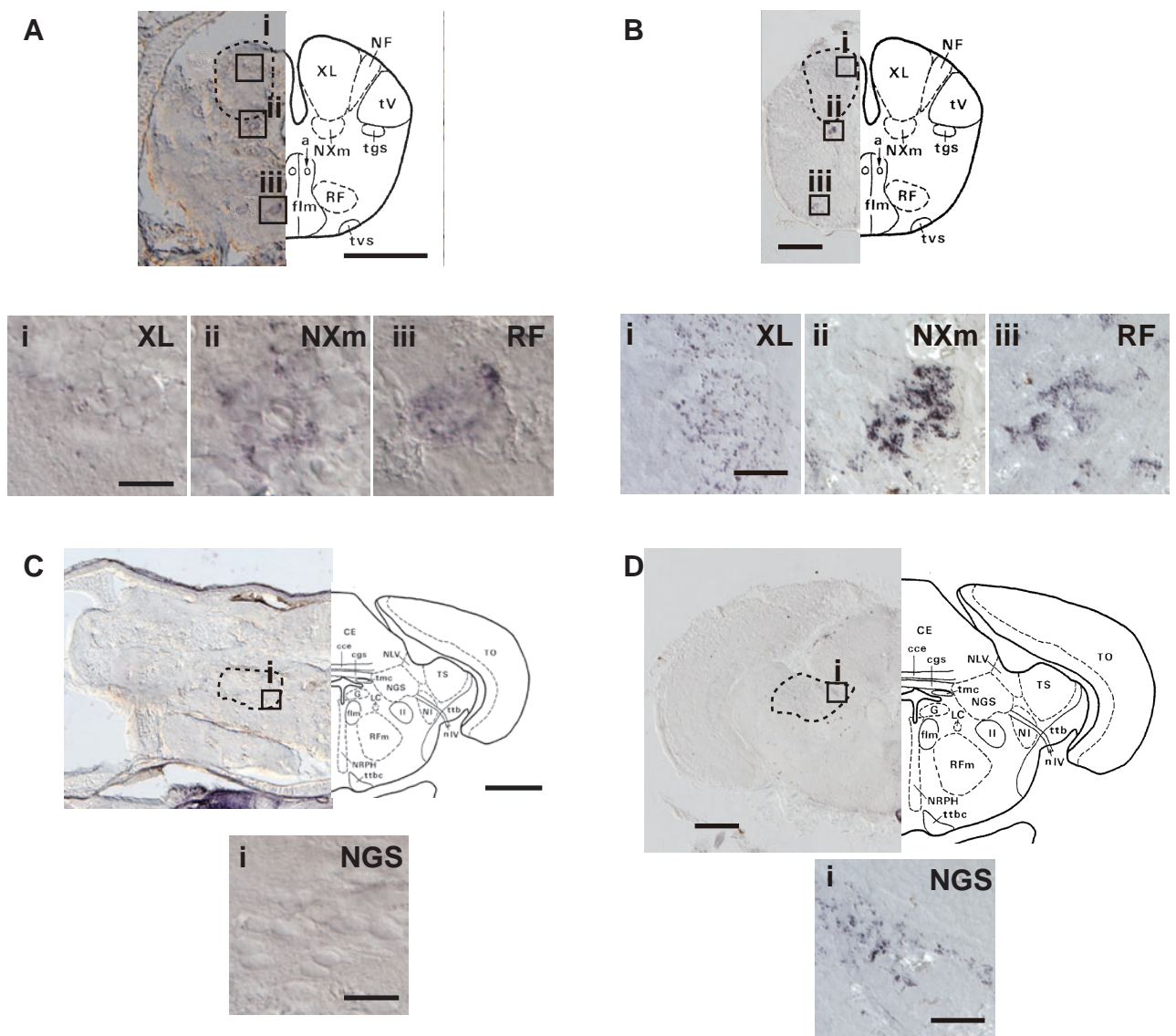


図 2-6 Tg メダカの稚魚と成魚における WGA タンパク質の発現および輸送解析 -2 (味覚中枢)
 g3 系統の Tg メダカの 1 か月齢の稚魚および 6 か月齢の成魚を用いて WGA タンパク質の中核への輸送を解析した。メダカ頭部または脳冠状切片に対し抗 WGA 抗体を用いて IHC を行った。上段は、左側に低倍率で見たメダカ切片の写真を、右側に領域の模式図 (Ishikawa et al., 1999 より引用) を載せた。下段に低倍率の写真の黒枠部の拡大図を載せた。
 A, 味覚 1 次中枢である迷走葉 (XL) を含む稚魚の冠状切片の写真
 B, XL を含む成魚の脳冠状切片の写真
 C, 味覚 2 次中枢である第 2 味覚核 (NGS) を含む稚魚の冠状切片の写真
 D, NGS を含む成魚の脳冠状切片の写真
 XL と NGS の神経核の領域は破線で囲った。
 XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、RF: 網様体、NGS: 第 2 味覚核
 スケールバーは A, C の低倍率が 100 μm 、高倍率が 10 μm 、B, D の低倍率が 200 μm 、高倍率が 20 μm 。

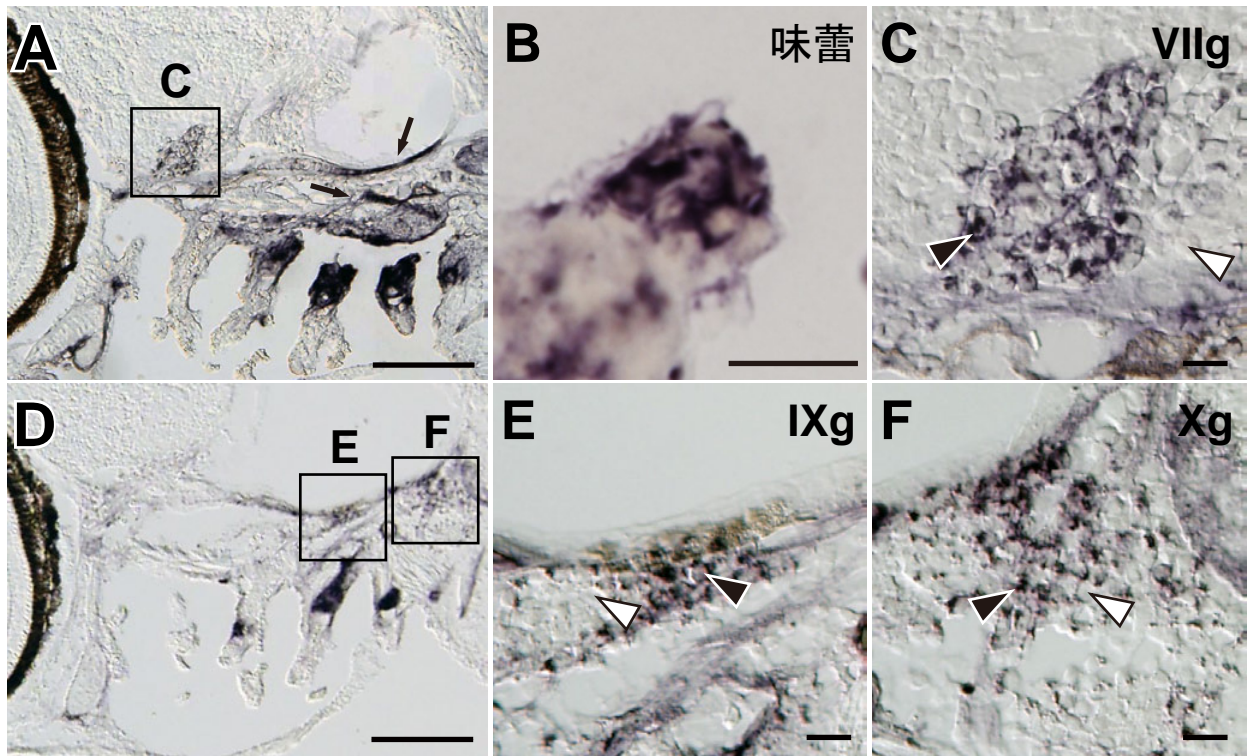


図 2-7 Tg メダカ稚魚（12 日齢）の味蕾および味神経における WGA タンパク質の発現
および輸送

A, D, g3 系統の Tg メダカ稚魚（12 日齢）の矢状面切片において、抗 WGA 抗体を用いた IHC により解析した。D は A よりも外側部の切片を使用した。

黒枠はそれぞれ C, E, F の拡大図に対応している。

B, Tg メダカ稚魚 (12 日齢) の鰓耙の味蕾における WGA タンパク質の発現

C, 顔面神経節 (VIIg) の拡大図

E, 舌咽神経節 (IXg) の拡大図

F, 迷走神経節 (Xg) の拡大図

黒矢印 : WGA タンパク質の輸送が観察された神経線維

黒やじり : WGA タンパク質陽性神経細胞

白やじり : WGA タンパク質陰性神経細胞

スケールバーは A, D が 100 μm 、B, C, E, F が 10 μm

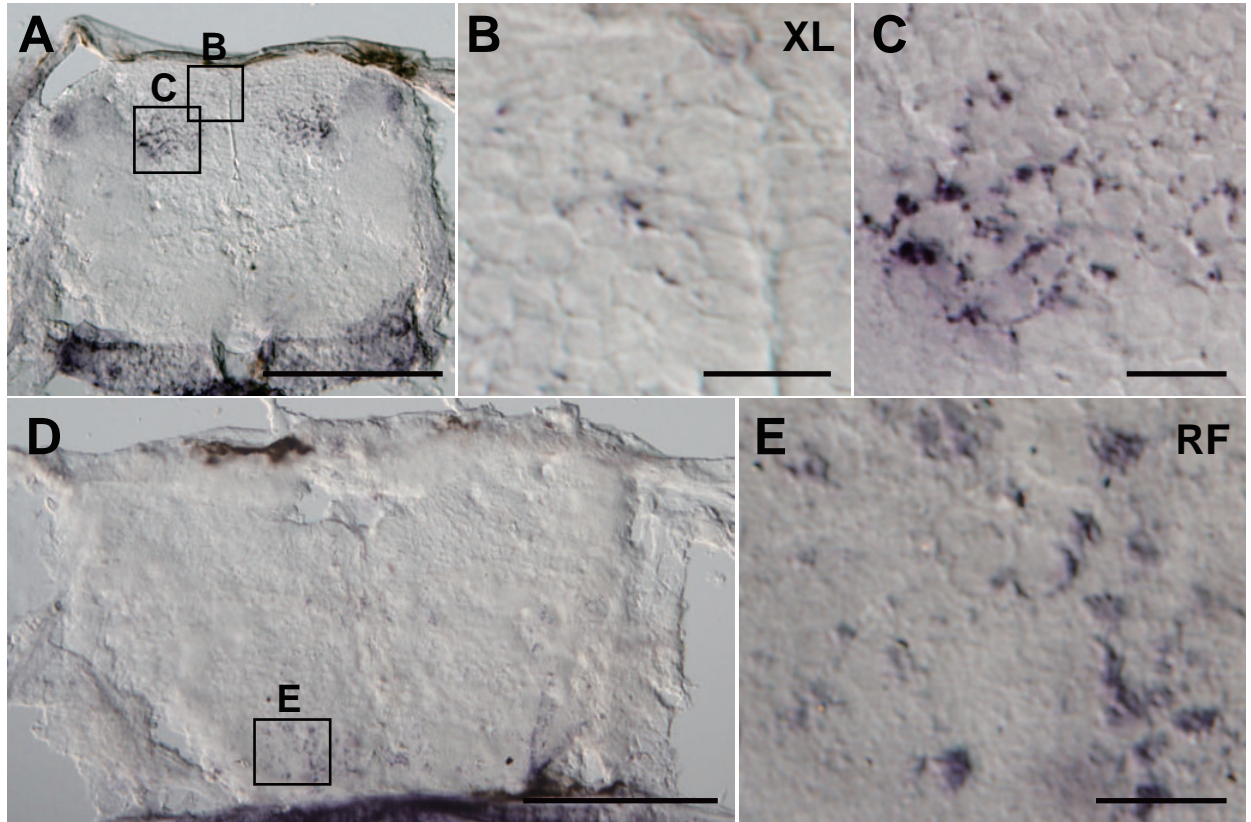


図 2-8 Tg メダカ稚魚（12 日齢）の脳における WGA タンパク質の発現および輸送
 A, D, g3 系統の Tg メダカ稚魚（12 日齢）の延髄領域を含む冠状切片において、抗
 WGA 抗体を用いた IHC により解析した。D は A よりも前方部の切片。

黒枠はそれぞれ B, C, E の拡大図に対応している。

B, 迷走葉 (XL) における WGA タンパク質の局在

C, B よりも外側寄りの腹側に位置する領域における WGA タンパク質の局在

E, 網様体 (RF) における WGA タンパク質の局在

スケールバーは A, D が 100 μm 、B, C, E が 10 μm

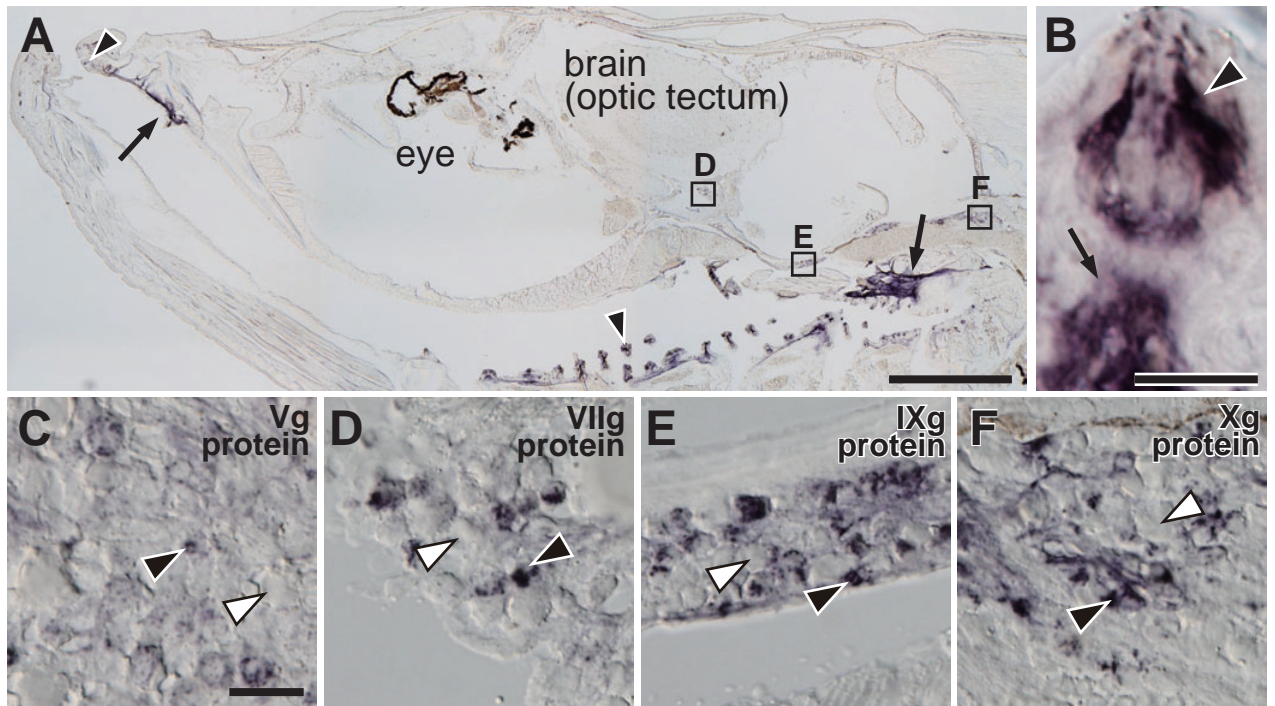


図 2-9 Tg メダカ成魚（3 か月齢）の味蕾および味神経における WGA タンパク質の発現および輸送

A, g3 系統の Tg メダカ成魚（3 か月齢）の矢状面切片において、抗 WGA 抗体を用いた IHC により解析した。

黒枠はそれぞれ D, E, F の拡大図に対応している。

B, Tg メダカ成魚（3 か月齢）の鰓耙の味蕾における WGA タンパク質の発現

C, 三叉神経節 (Vg) の拡大図

D, 顔面神経節 (VIIg) の拡大図

E, 舌咽神経節 (IXg) の拡大図

F, 迷走神経節 (Xg) の拡大図

黒矢印 : WGA タンパク質の輸送が観察された神経線維

黒やじり (A, B): WGA タンパク質発現味蕾細胞

黒やじり (C-F): WGA タンパク質陽性神経細胞

白やじり : WGA タンパク質陰性神経細胞

スケールバーは A が 500 μm 、B が 10 μm 、C が 20 μm (C- F)

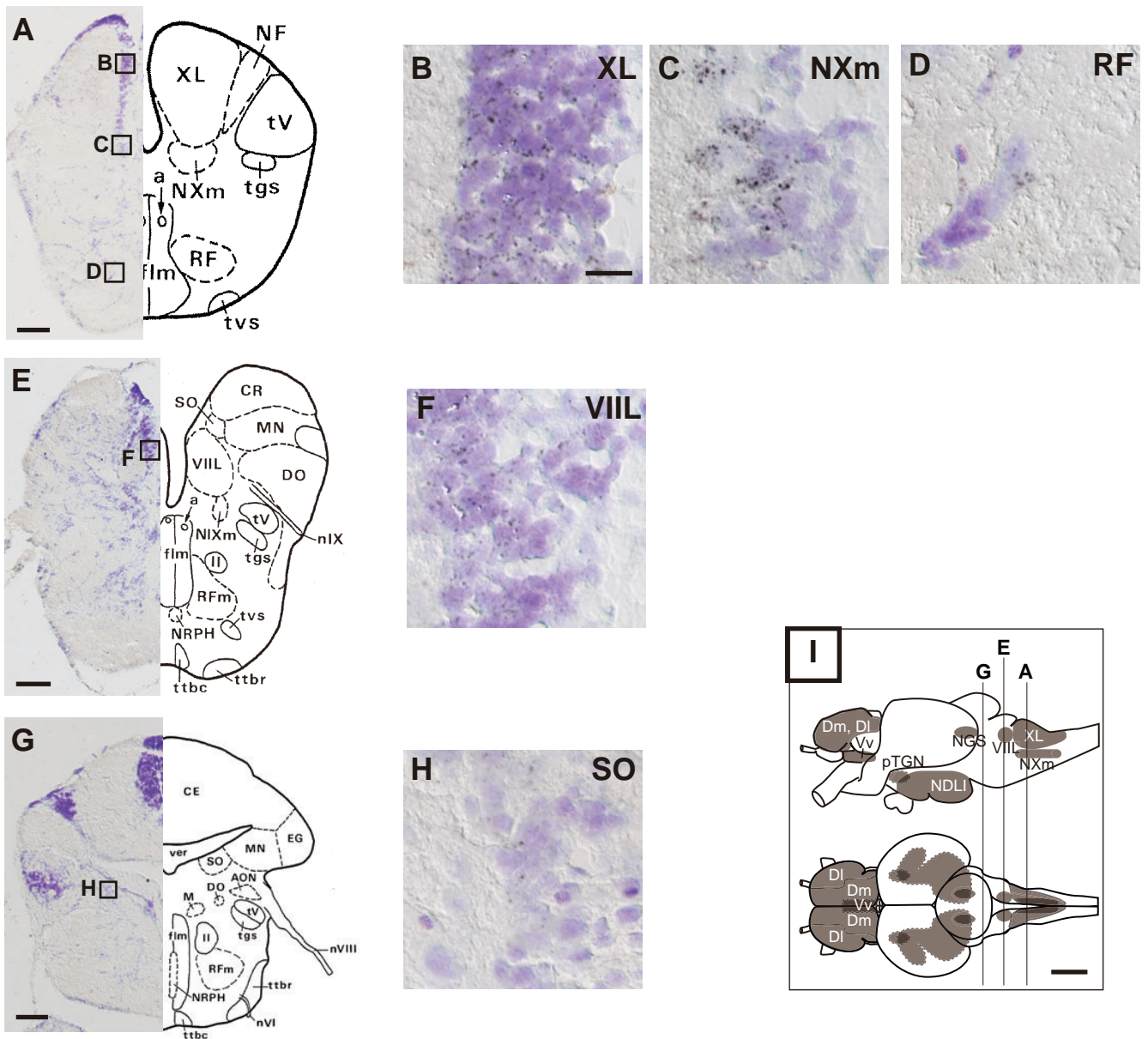


図 2-10 Tg メダカ成魚 (3 か月齢) の脳冠状切片における WGA タンパク質の局在解析 -1
Tg メダカ成魚 (3 か月齢) 脳冠状切片に対し、抗 WGA 抗体を用いた IHC および Nissl 染色を行った。左の図 (A, E, G) は、左側に低倍率で見た g3 系統のメダカ切片の写真を、右側に領域の模式図 (Ishikawa et al., 1999 より引用) を載せた。写真の切片の位置については I に示した。右の拡大写真 (B, C, D, F, H) は、左の低倍率写真の黒枠の拡大図を載せた。青紫が Nissl 染色による着色。黒いドット上のシグナルが輸送された WGA タンパク質による着色。I, メダカ成魚の脳において、過去の解析からメダカの味覚中枢と示唆される領域および終脳のいくつかの神経核をグレーで示した。2 つ以上の領域が重なった部分は色が濃くなって示されている。領域の位置は Ishikawa et al., 1999 を参照して作製した。左が前方。上段は左側面から見た図。下段は上から見た図。上方にあるアルファベットは写真の番号に対応する。VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、RF: 網様体、SO: 第 2 内耳神経核、NGS: 第 2 味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第 3 味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは左の低倍率写真が 100 μm (A, E, G)、右の拡大写真が 10 μm (B, C, D, F, H)、I が 500 μm 。

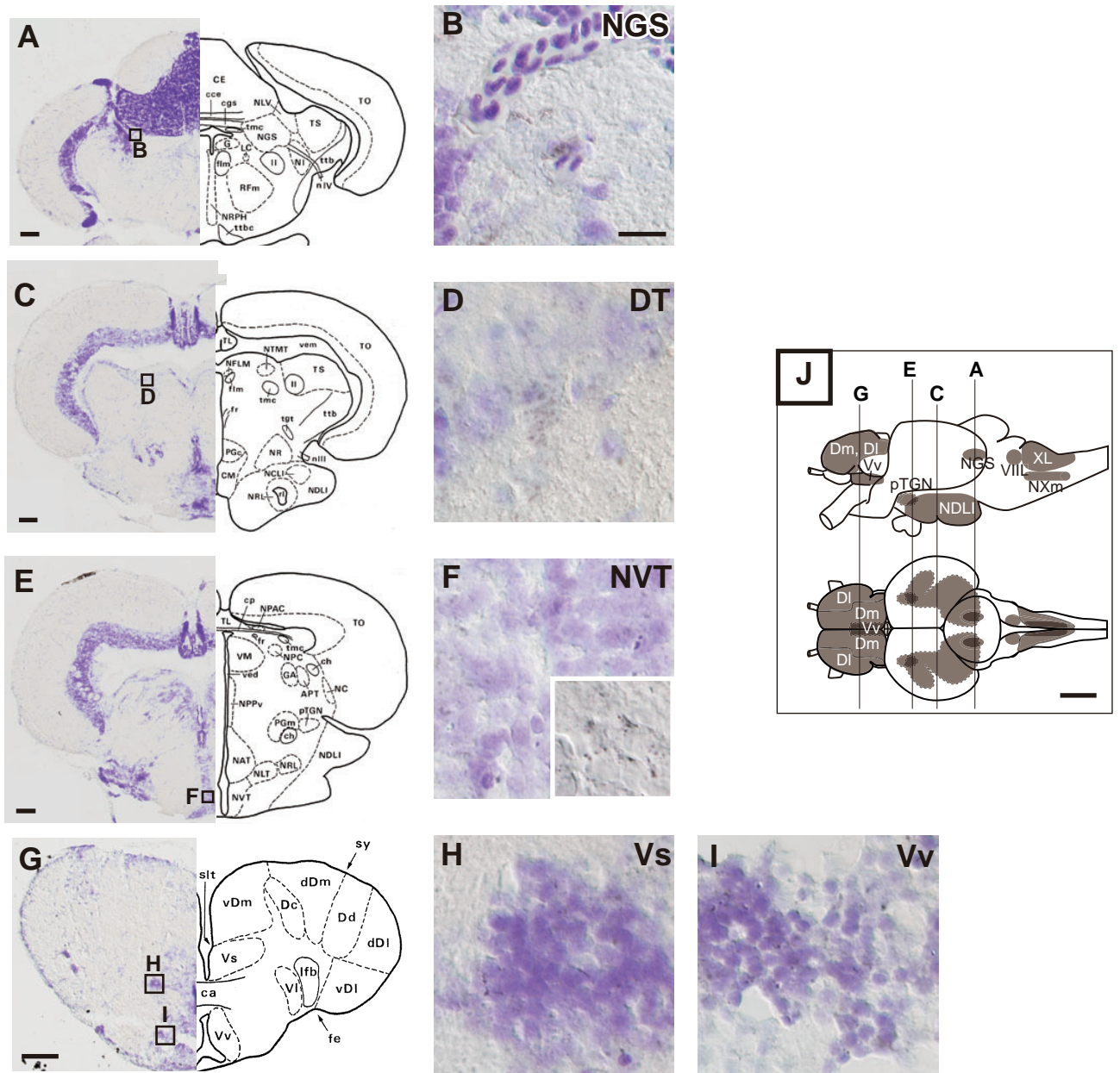


図 2-11 Tg メダカ成魚（3 か月齢）の脳冠状切片における WGA タンパク質の局在解析 -2
 Tg メダカ成魚（3 か月齢）脳冠状切片に対し、抗 WGA 抗体を用いた IHC および Nissl 染色を行った。

図の見方は図 2-10 と同様である。F の右下の写真は、隣接切片の同一神経核の領域を Nissl 染色せずに IHC のみ行った染色写真である。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第 2 味覚核、DT: 背側被蓋核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第 3 味覚核、NVT: 隆起腹側核、Vs: 終脳腹側野上交連部、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部

スケールバーは左の低倍率写真が 100 μm (A, C, E, G)、右の拡大写真が 10 μm (B, D, F, H, I)、J が 500 μm 。

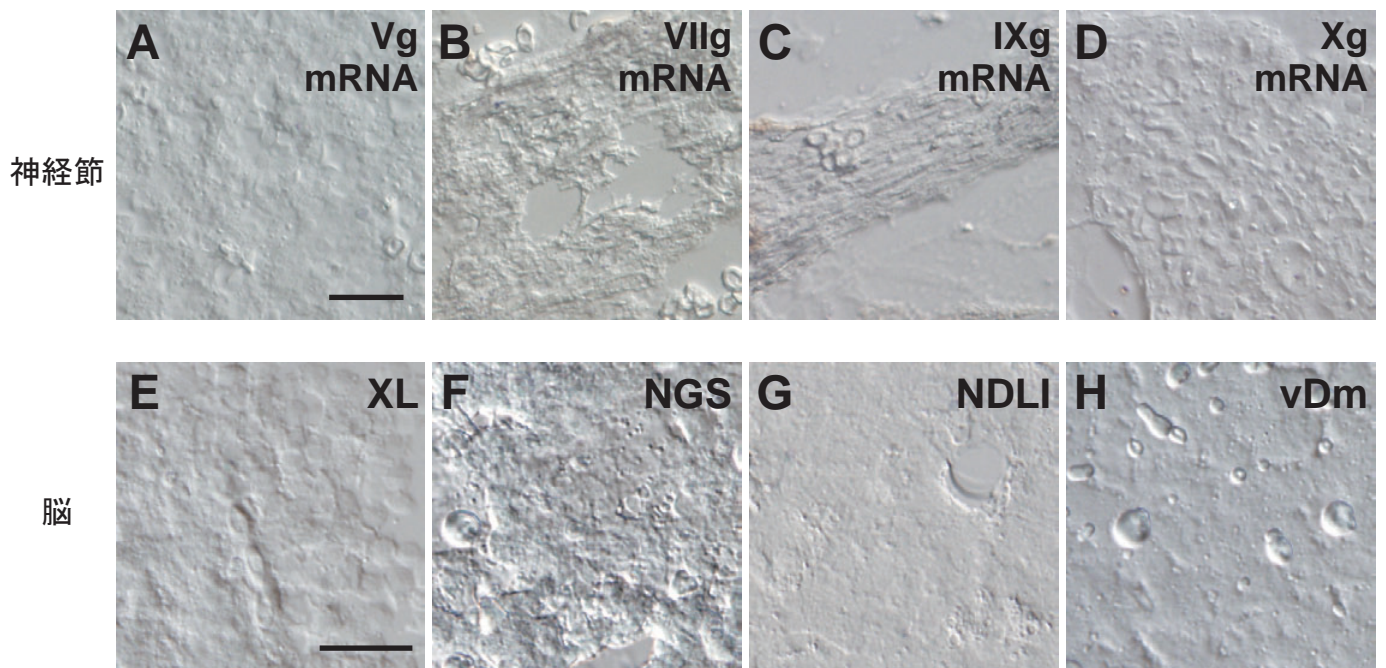


図 2-12 Tg メダカ成魚（3 か月齢）の味神経および脳における WGA mRNA の発現解析
 A-D, g3 系統の Tg メダカ成魚（3 か月齢）の矢状面切片において、味神経での WGA mRNA の発現を ISH により解析した。

- A, 三叉神経節 (Vg) の拡大図
- B, 顔面神経節 (VIIg) の拡大図
- C, 舌咽神経節 (IXg) の拡大図
- D, 迷走神経節 (Xg) の拡大図

E-H, g3 系統の Tg メダカ成魚（3 か月齢）の脳冠状切片において、WGA mRNA の発現を ISH により解析した。

- E, 迷走葉 (XL) の拡大図
- F, 第 2 味覚核 (NGS) の拡大図
- G, 下葉分散核 (NDLI) の拡大図
- H, 終脳背側野内側部の腹側部 (vDm) の拡大図

スケールバーは A が 20 μm (A-D), E が 20 μm (E-H)

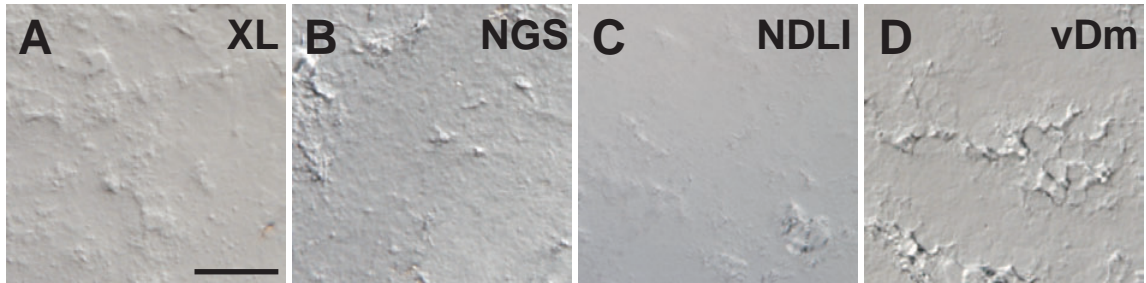


図 2-13 WT メダカ成魚脳における抗 WGA 抗体を用いた免疫組織染色像

3 か月齢の WT メダカにおいて抗 WGA 抗体を用いた IHC により WGA の局在の有無を解析した。

A, 迷走葉 (XL) の拡大図

B, 第 2 味覚核 (NGS) の拡大図

C, 下葉分散核 (NDLI) の拡大図

D, 終脳背側野内側部の腹側部 (vDm) の拡大図

スケールバーは 20 μm (A-D)

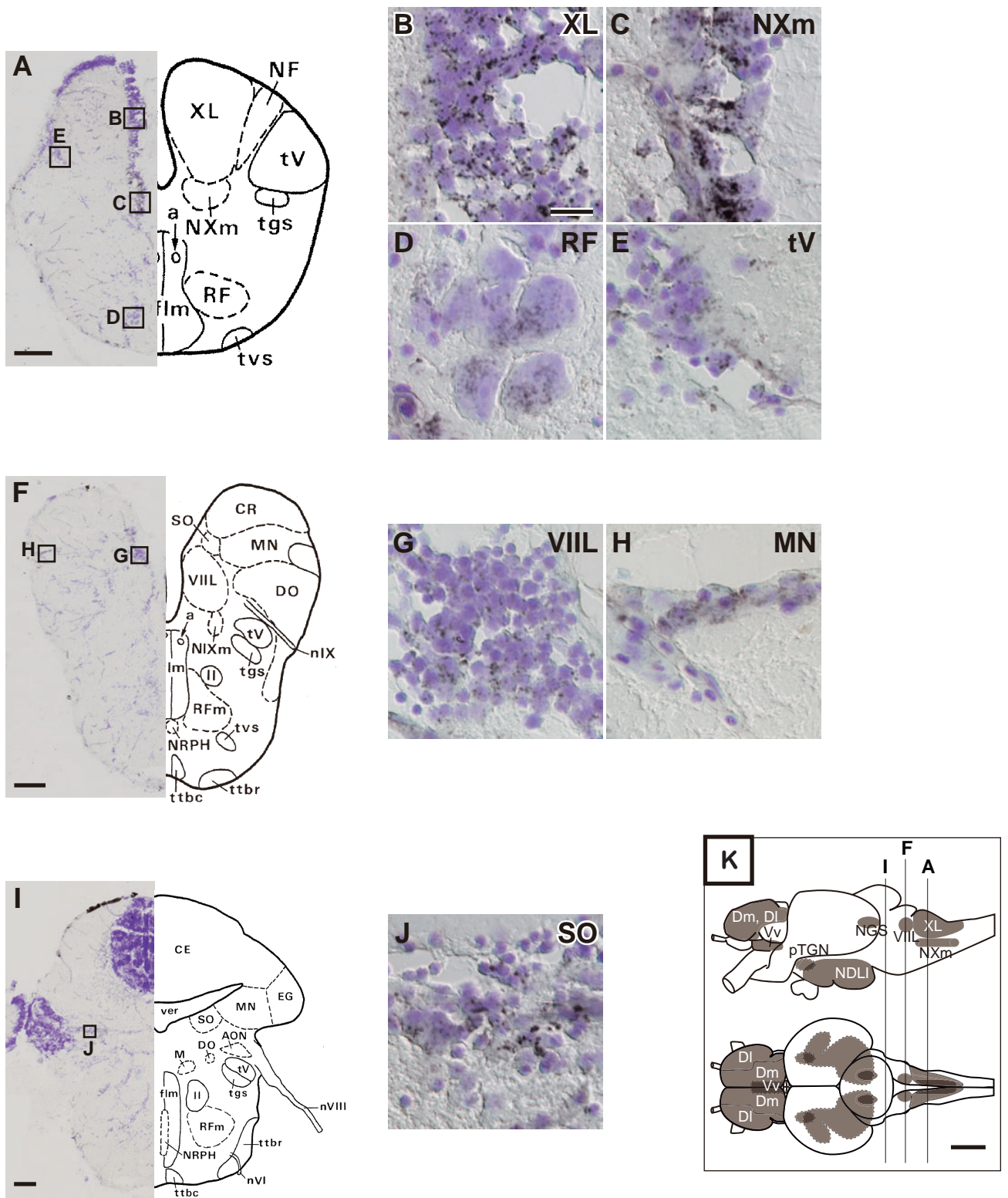


図 2-14 Tg メダカ成魚（9 か月齢）の脳冠状切片における WGA タンパク質の局在解析 -1
Tg メダカ成魚（9 か月齢）脳冠状切片に対し、抗 WGA 抗体を用いた IHC および Nissl 染色を行った。

図の見方は図 2-10 と同様である。

VIIIL: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、RF: 網様体、tV: 三叉神経下行根、MN: 内側核、SO: 第 2 内耳神経核、NGS: 第 2 味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第 3 味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部

スケールバーは左の低倍率写真が 100 μm (A, F, I)、右の拡大写真が 10 μm (B, C, D, E, G, H, J)、K が 500 μm 。

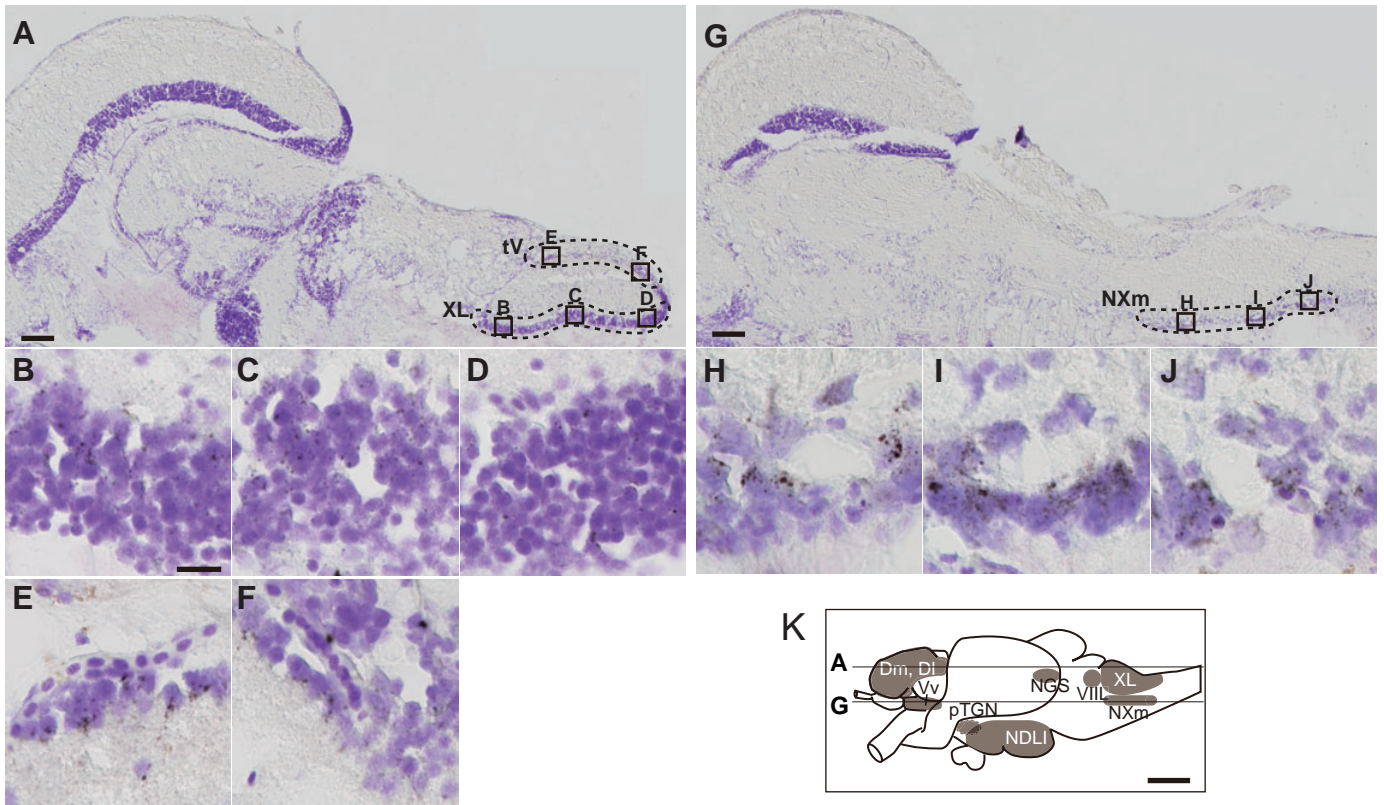


図 2-15 Tg メダカ成魚（9 か月齢）の脳水平切片における WGA タンパク質の分布解析
Tg メダカ成魚（9 か月齢）脳水平切片に対し、抗 WGA 抗体を用いた IHC および Nissl 染色を行った。

A, XL を含む脳水平切片の写真。XL と tV の領域は破線で囲った。写真の切片の位置は K に線で記した。

G, NXm を含む脳水平切片の写真。NXm の領域は破線で囲った。写真の切片の位置は K に線で記した。

B, C, D: XL 内の WGA 陽性細胞の拡大図

E, F: tV における WGA 陽性細胞の拡大図

H, I, J: NXm 内の WGA 陽性細胞の拡大図

K, メダカ成魚の脳において、過去の解析からメダカの味覚中枢と示唆される領域および終脳のいくつかの神経核をグレーで示した。2 つ以上の領域が重なった部分は色が濃くなって示されている。領域の位置は Ishikawa et al., 1999 を参照して作製した。

左が前方。左側面から見た図。左のアルファベットは写真の番号に対応する。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第 2 味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第 3 味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部

スケールバーは A, G が 100 μ m、B が 10 μ m (B, C, D, E, F, H, I, J)、K が 500 μ m。

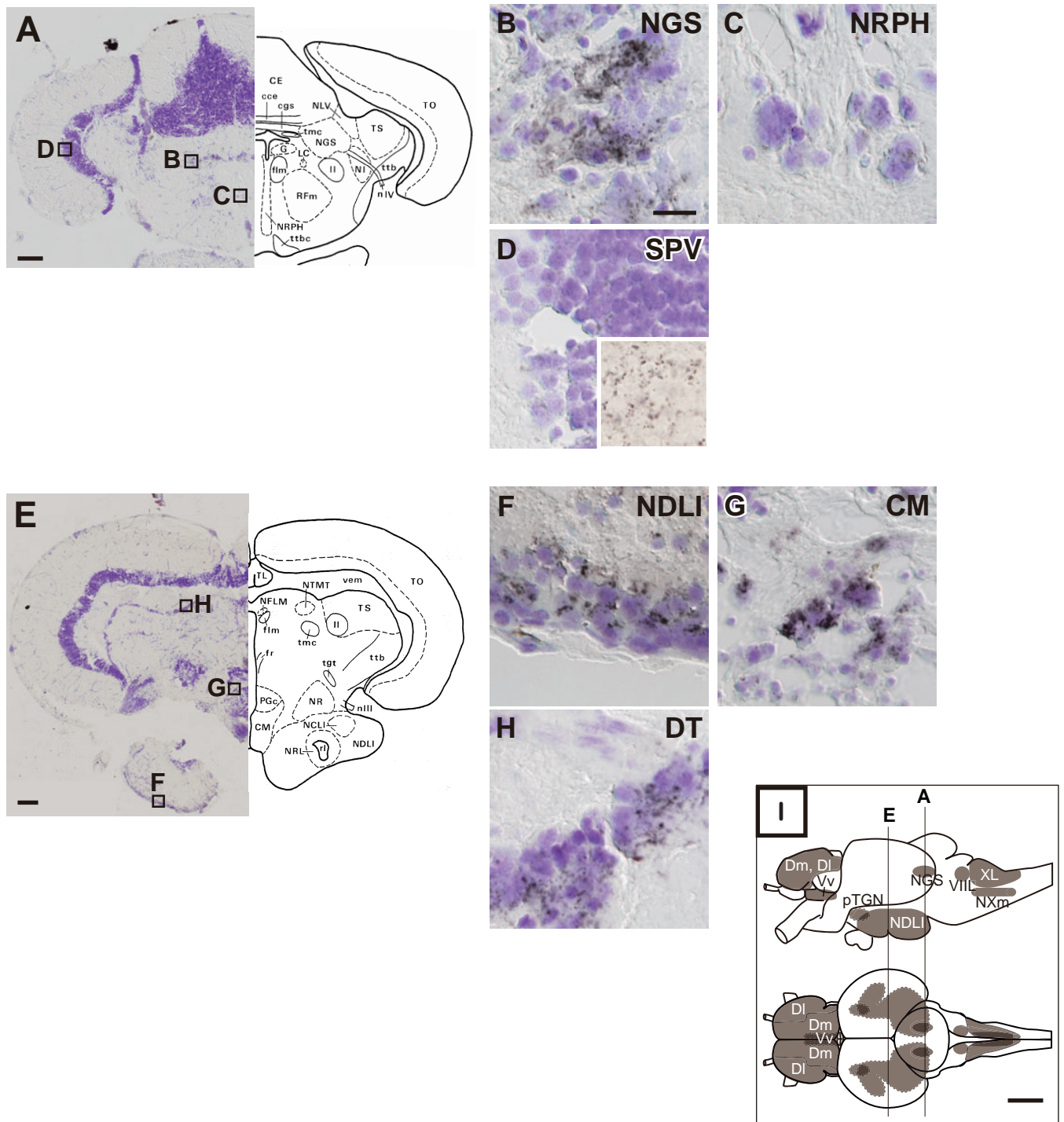


図 2-16 Tg メダカ成魚（9 か月齢）の脳冠状切片における WGA タンパク質の局在解析 -2
Tg メダカ成魚（9 か月齢）脳冠状切片に対し、抗 WGA 抗体を用いた IHC および Nissl 染色を行った。

図の見方は図 2-10 と同様である。D の右下の写真は、隣接切片の同一神経核の領域を Nissl 染色せずに IHC のみ行った染色写真である。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第 2 味覚核、NRPH: 縫線核、SPV: 脳室周辺灰色地帯、NDLI: 下葉分散核、CM: 乳頭体、DT: 背側被蓋核、pTGN: 糸球体第 3 味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは左の低倍率写真が 100 μm (A, E)、右の拡大写真が 10 μm (B, C, D, F, G, H)、I が 500 μm 。

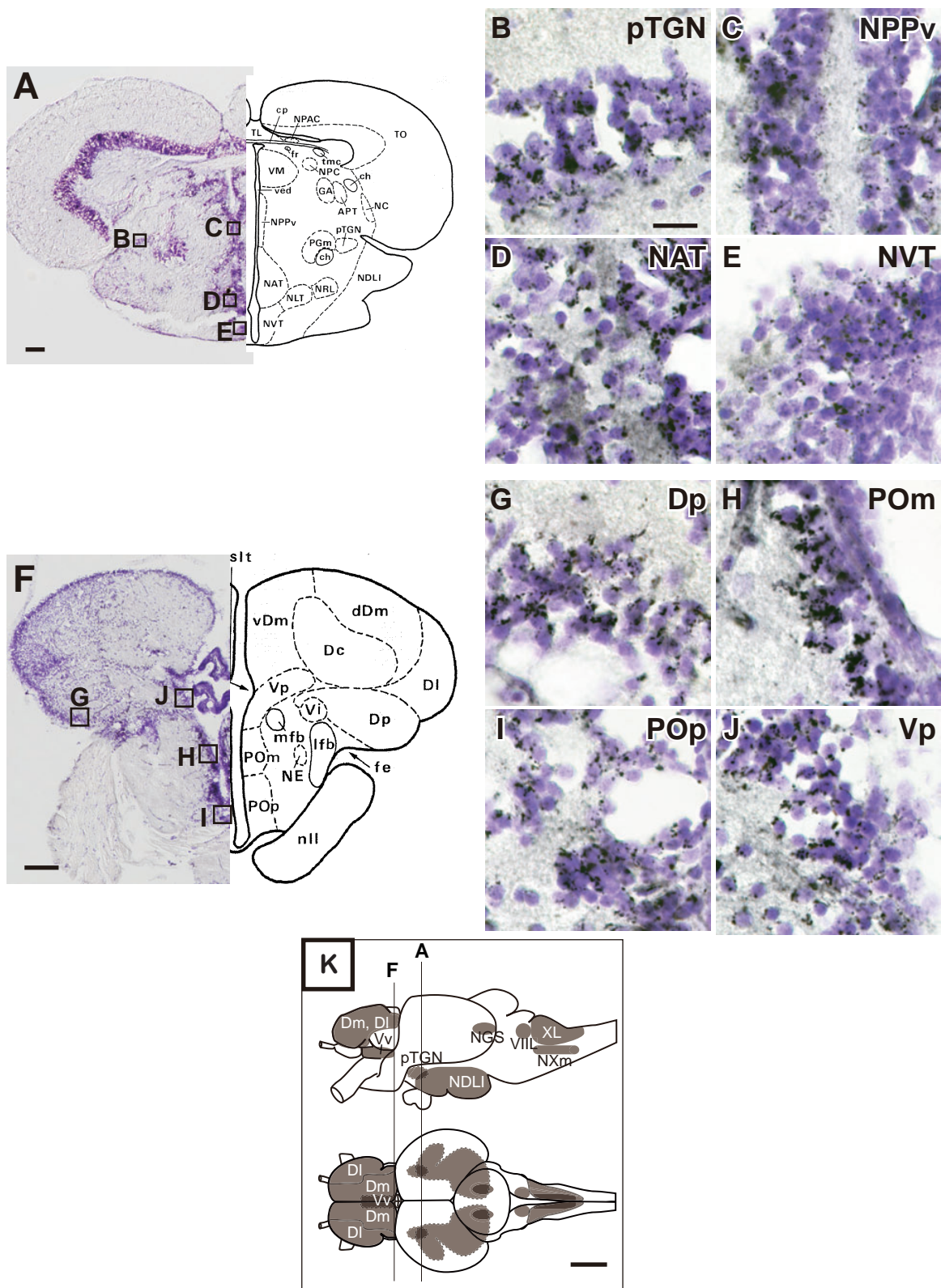


図 2-17 Tg メダカ成魚（9 か月齢）の脳冠状切片における WGA タンパク質の局在解析 -3
 Tg メダカ成魚（9 か月齢）脳冠状切片に対し、抗 WGA 抗体を用いた IHC および Nissl 染色を行った。

図の見方は図 2-10 と同様である。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第 2 味覚核、NDLI: 下葉分散核、
 pTGN: 糸球体第 3 味覚核、NPPv: 脳室周囲後核、NAT: 前隆起核、NVT: 隆起腹側核、Dp: 終脳
 背側野後部、POM: 視索前核マグノ細胞部、POp: 視索前核小細胞性部、Vp: 終脳腹側野後部、
 DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部

スケールバーは左の低倍率写真が 100 μm (A, F)、右の拡大写真が 10 μm (B, C, D, E, G, H, I, J)、K が 500 μm 。

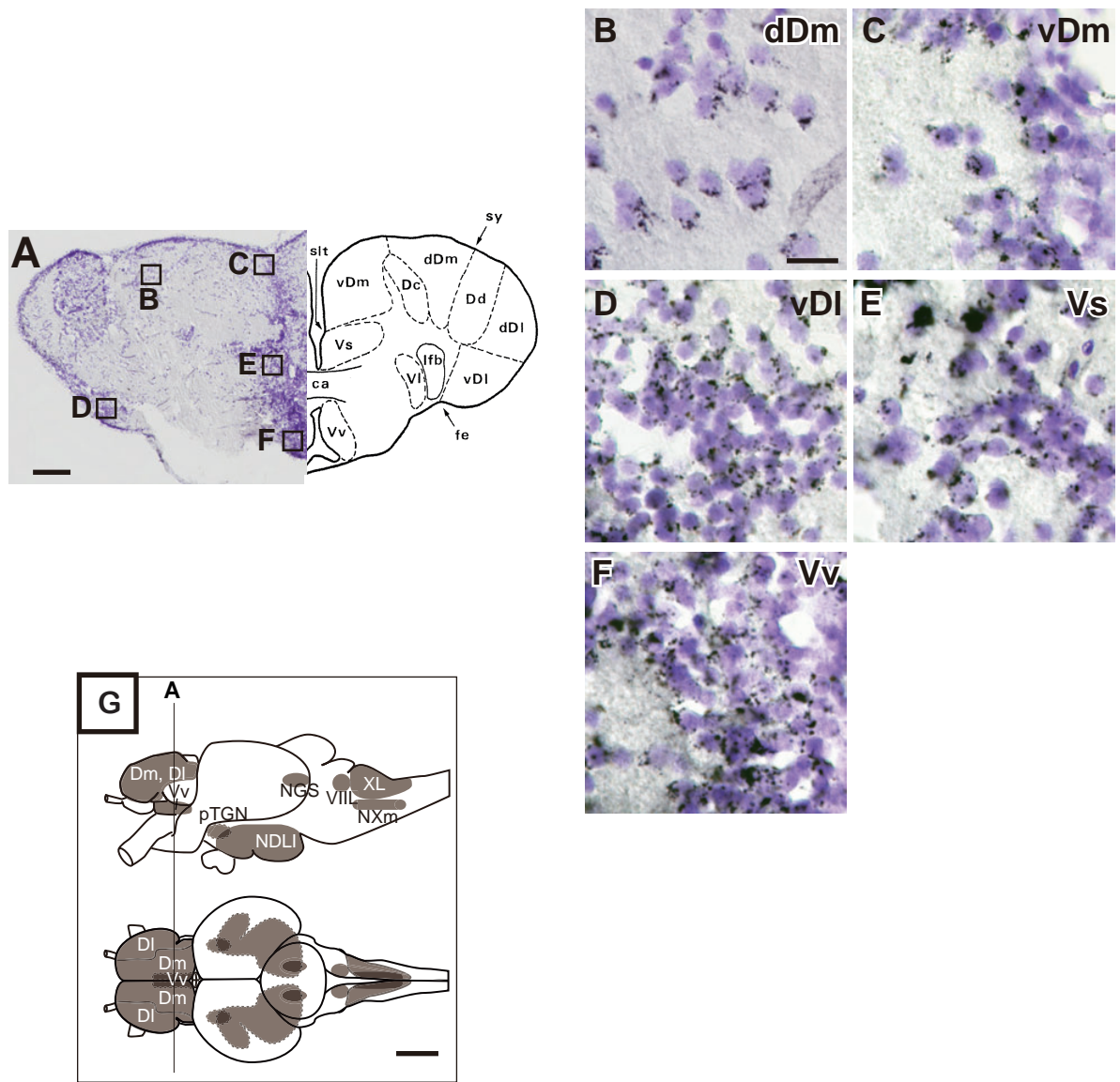


図 2-18 Tg メダカ成魚（9 か月齢）の脳冠状切片における WGA タンパク質の局在解析 -4
Tg メダカ成魚（9 か月齢）脳冠状切片に対し、抗 WGA 抗体を用いた IHC および Nissl 染色を行った。

図の見方は図 2-10 と同様である。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第 2 味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第 3 味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、dDm: 終脳背側野内側部の背側部、vDm: 終脳背側野内側部の腹側部、vDI: 終脳背側野外側部の腹側部、Vs: 終脳腹側野上交連部

スケールバーは左の低倍率写真が 100 μm (A)、右の拡大写真が 10 μm (B, C, D, E, F)、G が 500 μm 。

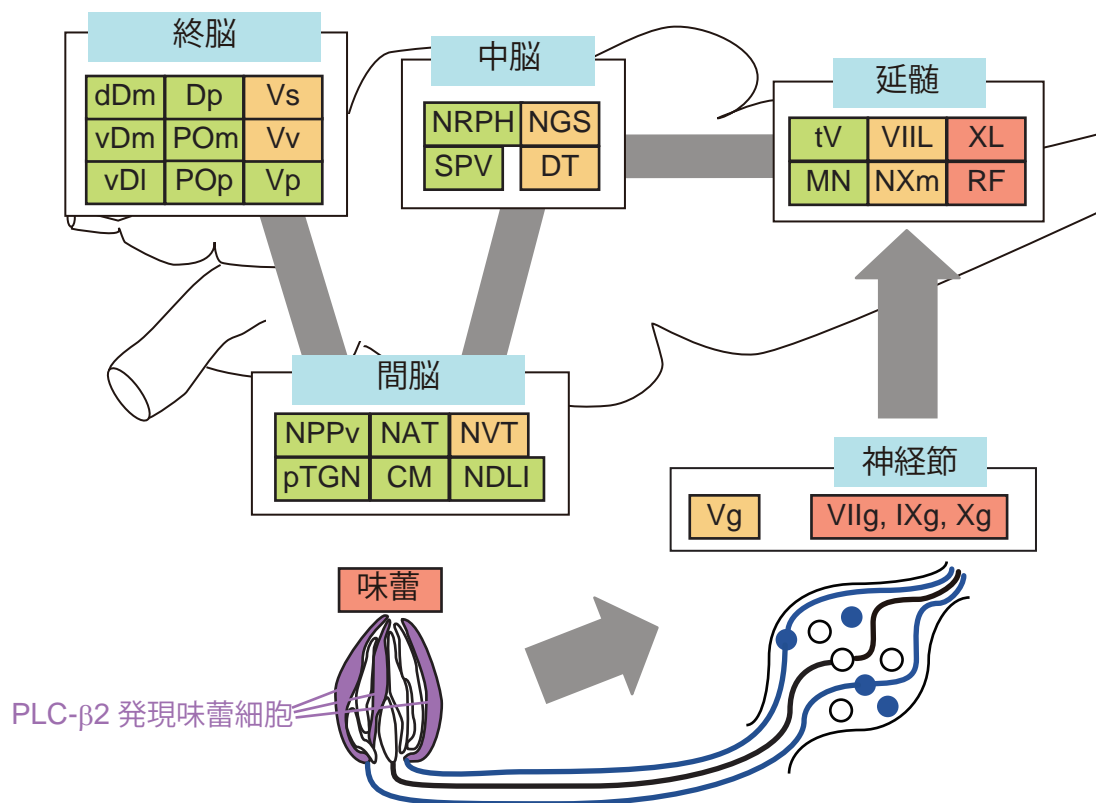


図 2-19 PLC-β2-WGA メダカにおける WGA タンパク質の経時的な輸送

本実験から予想される WGA タンパク質のおおよその輸送経路を灰色の矢印と線で示した。

紫 : WGA タンパク質発現細胞 (PLC-β2 発現味蕾細胞)

青 : WGA タンパク質が輸送された味神経

赤 : 12 日齢で WGA タンパク質が検出された領域

橙 : 3 か月齢の Tg メダカで新たに WGA タンパク質が検出された領域

緑 : 9 か月齢の Tg メダカで新たに WGA タンパク質が検出された領域

水色 : 構造の名称

VIIg: 顔面神経節, IXg: 舌咽神経節, Xg: 迷走神経節, XL: 迷走葉, RF: 網様体

Vg: 三叉神経節, VIIL: 顔面葉, NXm: 迷走神経運動核, NGS: 第 2 味覚核, DT: 背側被蓋核, NVT: 隆起腹側核, Vs: 終脳腹側野上交連部, Vv: 終脳腹側野腹側部

tV: 三叉神経下行根, MN: 内側核, NRPH: 縫線核, SPV: 脳室周辺灰色地帯, NDLI: 下葉分散核, CM: 乳頭体, NAT: 前隆起核, NPPv: 脳室周囲後核, pTGN: 糸球体第 3 味覚核, Vp: 終脳腹側野後部, Dp: 終脳背側野後部, POm: 視索前核マグノ細胞部, POp: 視索前核小細胞性部, dDm: 終脳背側野内側部の背側部, vDm: 終脳背側野内側部の腹側部, vDI: 終脳背側野外側部の腹側部

3. 考察

本研究は、PLC- β 2-WGA メダカを用いることで、マウスではできなかった味蕾から味覚高次中枢までの神経回路の可視化に成功した。この結果と過去の魚類の色素注入による解析結果、および遺伝子工学的に T1R3 発現味細胞に WGA を発現させたマウスを用いた解析結果との比較を表 2-2 にまとめた。今回の解析結果および過去の知見との比較をしながら以下に考察を述べる。

3-1. 高次中枢まで WGA が輸送されたことについて

本研究では、過去のマウスにおける WGA を特定の味細胞に発現させた神経回路の解析 (Damak *et al.*, 2008; Ohmoto *et al.*, 2008; Ohmoto *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2011) に比べ、より高次中枢の神経細胞まで可視化することに成功した。その理由としては、2点考えられる。

まず1点目としては、小型魚類であるメダカを実験動物として使用した点である。本実験を開始する前に、メダカはマウスに比べて脳のサイズが小さく神経が短いという特徴があるため、神経トレーサーの輸送効率が良いと推測した。実際に脳の体積はマウスの約 125 分の 1 である。さらに、マウスでは味蕾の数が約 600 個前後であるのに対し (Zhang *et al.*, 2008)、メダカの成魚では約 3200 個程度である (unpublished data)。よって、WGA タンパク質を発現する細胞数が多い一方で、輸送される先の体積が小さいため、輸送により WGA が濃縮され、効率よく高次中枢まで輸送されている可能性が考えられる。また、ニューロンが短いため輸送距離が短いことも効率を良くしている可能性がある。

2点目としては、WGA の発現を誘導するプロモーターとして PLC- β 2 の転写制御領域を用いた点である。第 1 章における解析結果から、PLC- β 2 は味蕾細胞中の約 5 割の細胞で発現している。過去に遺伝子工学的に味細胞に WGA を発現させたマウスでの解析では T1R3、T2R5、PKD1L3 発現細胞を起点として解析している。T1R3、T2R5 は、PLC- β 2 発現細胞の一部であり、PKD1L3 は哺乳類において約 20% の細胞で発現している (Ishimaru *et al.*, 2006)。以上から、本研究で用いた PLC- β 2-WGA は過去の解析に比べて味蕾中のより多くの割合の細胞で WGA が発現しており、輸送される WGA の発現量が多かったことが考えられる。

3-2. 検出された WGA のシグナル強度の部位による違い

本研究においては末梢組織である味蕾から、高次中枢である終脳領域の神経核まで WGA タンパク質が検出された。しかし、WGA のシグナル強度については部位により大きく異なっていた。

まず、末梢と中枢における違いについて考察した。末梢組織である味蕾では複数の味蕾細胞が塊のようになって検出された (図 2-4A, 2-7B, 2-9B)。一方で、中枢においては WGA タンパク質のシグナルは細胞全体では観察されず、顆粒状のシグナルとして神経細

胞の一部で検出された (図 2-8, 10, 11, 14-18)。味蕾細胞は、本研究での WGA タンパク質の発現元であるため非常に多くの量の WGA が検出され、細胞の切れ目が見えず塊のように見えたと考えられる。WGA は特定の糖鎖 (N-アセチルグルコサミンまたはシアル酸) に結合し、エンドサイトーシスにより神経細胞に取り込まれ、樹状突起や軸索を通り、シナプス間隙まで運ばれる。シナプス間隙においてエキソサイトーシスにより放出され、ポストシナプス (または非常に近接する神経細胞) に存在する糖鎖に結合し、シナプス接続する次の神経細胞 (または非常に近接する神経細胞) に取り込まれる (Yoshihara, 2002)。このように小胞輸送を介して運ばれるため、中枢では、味蕾で発現し輸送された WGA が小胞に取り込まれた状態で顆粒状に観察されていると考えられる。

次に、中枢の神経核同士のシグナル強度の違いについて考察した。まず、延髄の NXm において同じ切片上の XL や RF に比べて強いシグナルが観察された (図 2-10, 14, 15)。NXm は迷走神経の運動核であり、餌の嚥下行動などの反射経路上の脳における終着点である (Finger, 2009) ので、輸送された WGA がこの神経核に蓄積している可能性が考えられる。9 か月齢の成魚において観察された終脳領域の複数の神経核 (dDm, vDm, vDI, Dp) (図 2-17, 18) における WGA 陽性細胞は、ほぼ均一な染色強度であった。WGA はシナプスを介するごとに輸送量が減り染色強度は弱くなると考えられるが、これらの高次中枢の神経核は、複数の神経核と相互に接続しているため、WGA タンパク質がいくつかの神経核から分散して運ばれ、ほぼ均一な強度に見えている可能性が考えられた。これらの神経核同士の接続の詳細を解析するには、狂犬病ウイルスを用いた単一シナプスのみを標識する技術 (Miyamichi *et al.*, 2011) を利用するなど別の方法が必要だと考えられる。

3-3. 魚類と哺乳類の味覚 1 次中枢における WGA 標識細胞の分布の比較

本章における解析結果と過去の魚類における解析結果を比較すると (表 2-2)、過去の色素注入による解析では、限定された一部の神経核同士の接続しか解析できていない (Kanwal and Finger, 1997; Yoshimoto *et al.*, 1998; Folgueira *et al.*, 2004b; Folgueira *et al.*, 2004a; Finger, 2009)。しかし本解析では、マウスにおける味覚 1 次中枢、2 次中枢、3 次中枢に対応しているとされるメダカの味覚 1 次中枢、2 次中枢、3 次中枢の神経核を、味蕾細胞を起点としていずれも可視化することができた点が非常に大きいと考えられる。

次に PLC- β 2-WGA メダカにおける WGA タンパク質の味覚中枢の神経核内での分布について、遺伝子工学的に T1R3 または PKD1L3 発現細胞に WGA を発現させたマウス (各々 T1R3-WGA, PKD1L3-WGA マウスとする) における過去の解析結果と比較した (Ohmoto *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2011)。PLC- β 2-WGA メダカでは、味覚 1 次中枢においては、VIII の内側部、XL の内側の表層部に前後方向に広く分布していた。XL の方が成長の初期から WGA が検出され、かつ VIII よりも染色強度は相対的に強かった。一方、マウスでは、味覚の求心性繊維が支配することが示されている味覚 1 次中枢 NST の頭側の中央

部 (Whitehead, 1988) において解析した結果、T1R3-WGA マウスでは、前後方向にかけて広く WGA 陽性細胞が検出されているのに対し、PKD1L3-WGA マウスでは、この領域の尾側部にのみ WGA 陽性細胞が観察されている。T1R3 が舌の前方から後方にかけて発現しているのに対し、PKD1L3 は舌前方部に発現せず、後方部に発現している (Ishimaru *et al.*, 2006)。過去の色素注入や電気生理学的な解析から推測すると、NST に投射する味覚神経は体の前後方向の部位に対応して NST に投射していることが示唆される (Hamilton and Norgren, 1984; Corson *et al.*, 2012)。メダカにおいては、VIII へは顔面神経が、XL へは舌咽および迷走神経が投射している。よって、PLC- β 2-WGA メダカにおける VIII と XL の染色強度の違いは、顔面神経が投射している口唇部の味蕾と、舌咽・迷走神経が投射している鰓および咽頭歯部の味蕾の割合に比例している可能性が考えられる。実際に味蕾の数は図 2-1B, C から、口唇部よりも鰓および咽頭歯部の方が多い。よってメダカにおいても味覚 1 次中枢における味情報伝達神経の投射様式が哺乳類同様に体軸前後に沿っていることが示唆された。

3-4. 本研究で標識された味覚中枢について

色素注入による過去の解析から、魚類の視床下部に存在する下葉分散核 (NDLI) や、視床領域に存在する糸球体第 3 味覚核 (pTGN)、視床後核 (posterior thalamic nucleus, NPT) などが味覚 3 次中枢と考えられている (Lamb and Caprio, 1993; Yoshimoto *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2011)。形態的に NDLI は哺乳類における外側視床下部 (LH) であると考えられる。pTGN は、ナマズにおいては nucleus lobobulbaris と呼ばれる神経核の小細胞部に形態的に対応している (Kato *et al.*, 2011)。この神経核は視床後内側腹側核小細胞部 (VPM) と相同的な構造であることが示されている (Kanwal *et al.*, 1988)。よって pTGN は VPM に対応すると考えられる。哺乳類では VPM から大脳皮質味覚野 (GC) へ投射することが報告されている (Smith and St John, 1999)。魚類においては、pTGN から終脳背側野内側部の背側部 (dDm) へ投射しており、dDm が GC に対応しているとする報告がある (Yoshimoto *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2012)。PLC- β 2-WGA メダカにおいても dDm において WGA が検出されたことから GC までの神経回路を可視化できたと示唆できる。しかし、dDm 以外の終脳領域のいくつかの神経核にも味覚神経は投射しているため (Yoshimoto *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2012)、dDm が GC に相当する領域であるのか、また GC に相当する領域自体が魚類に存在するののかについては不明である。

3-5. 終脳領域の WGA が標識された神経核

終脳領域は、嗅覚や味覚、視覚など複数の感覚系からの情報を受け取り統合する領域であり哺乳類の大脳に対応する。しかし、発生の過程で細胞の移動の仕方が硬骨魚類と哺乳類とでは対照的であるため、この領域における神経核の対応は、非常に困難である。魚類では、外転 (eversion) と呼ばれる終脳の背側部分が反り返る変化が生じるが、哺乳

類では、外反 (evagination) と呼ばれる脳室部分が左右に膨れる変化が生じる (Nieuwenhuys, 2009)。この結果、背側の神経核の位置は左右で逆転していることが示されている。

しかしながら、近年の分子生物学的解析により、終脳のいくつかの神経核では哺乳類に対応する領域が明らかになっている。たとえば、哺乳類の扁桃体 (Amyg) や海馬 (Hip) は魚類ではそれぞれ vDm と vDI に対応していると考えられている (Northcutt, 2006; Mueller and Wullmann, 2009)。しかし、Yoshimoto ら (1998) は Dp が哺乳類の Amyg に対応していると主張している。哺乳類の Amyg は複数の感覚からの入力があり、情動行動を支配している脳領域であり (Davis, 1992; Herry *et al.*, 2008)、食物の嗜好性の評価にも重要な働きがあると示されている (Inui-Yamamoto *et al.*, 2010)。哺乳類では Amyg によって誘導された情動行動は縫線核 (NRPH) にあるセロトニン作動性ニューロンによって影響を受けている。本研究の結果から、Amyg に対応するとされる vDm あるいは Dp と NRPH において WGA 陽性細胞が検出されたことから、哺乳類と同様の NRPH と扁桃体との神経回路が硬骨魚類でも存在することが示唆された。

一方、海馬 (Hip) に対応するとされる vDI についても、本研究では WGA 陽性細胞が観察された。哺乳類では条件付けされた摂食行動を起こす際に Hip が関連していると報告されている (Manrique *et al.*, 2007; Stouffer and White, 2007)。魚類においても摂食における記憶学習に vDI の関与が考えられる。

3-6. メダカの SCC の存在について

マウスでは、孤立化学受容細胞 (SCC) と呼ばれる感覚器が鼻腔内上皮に存在することが知られている。SCC には、三叉神経が投射しており (Finger *et al.*, 2003; Ohmoto *et al.*, 2008)、PLC- β 2 の発現も示されている (Tizzano *et al.*, 2011)。PLC- β 2-WGA メダカにおいて、三叉神経の中枢である tV、三叉神経の神経節である Vg において WGA 陽性細胞が観察されている (図 2-9C, 14E, 15E, F) ことから、これらの部位への WGA の輸送は SCC 由来である可能性が考えられた。しかし、2-1 における解析から、このような細胞の存在はメダカでは見出されなかった。よって三叉神経への WGA の輸送経路についての詳細は不明であり、今後三叉神経へ投射する WGA の発現元の細胞が味蕾以外に存在するのかどうかを特定する必要があるであろう。

3-7. NXm と RF における WGA の染色強度の強さについて

いくつかの運動核およびそれに関連する神経核である RF において WGA の染色強度が強いことがマウスとメダカの解析により示されている。PLC- β 2-WGA メダカにおいては、NXm と RF において、マウスでは、三叉、顔面、舌下神経の運動核 (各々 5N, 7N, 12N) および RF において観察されている。陸生動物では、口腔内で餌を飲み込むか判断するが、魚類では、鰓弓において判断している (Finger, 2009)。メダカでは大半の味蕾が鰓耙から咽頭歯部にかけて存在しており (図 2-1B, C)、この領域の味蕾からは XL を介し、

RF と NXm に情報が送られ、摂食するかどうかの反射応答が起こる (Finger, 2009)。魚類ではこの回路が発達していることが NXm と RF における WGA の染色強度の強さに起因していると考えられる。

3-8. WGA の輸送が観察されたその他の神経核について

本研究では、過去の解析からは直接味覚と関連がないと考えられる神経核にも WGA が検出された。3-6 の三叉系の中核以外では、NAT、NVT、SPV、MN、DT、CM、NPPv、POm、POp、Vs、Vp、Vv が挙げられる。これらの神経核に WGA が輸送されたことについて、考えられることを以下に述べる。

NAT、NVT は生殖腺刺激ホルモン (GnRH) により制御されており (Marchant *et al.*, 1989; Mitani *et al.*, 2010)、これらの繊維は SPV に投射していることが示されている (Yamamoto, 2003)。また、NAT は機械受容に関わる視床領域であり、魚類に特有の機械受容に関わる神経である側線神経や、聴覚神経の入力が報告されている (Finger and Bullock, 1982; Striedter, 1991)。MN は聴側線神経領域の背側部に位置し、RF や tV との接続が報告されている (Gonzalez *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2010)。DT は Vv との神経接続が報告されている (Rink and Wullimann, 2004)。CM と NPPv は味覚 3 次中枢である NDLI との神経接続が示されている (Sawai *et al.*, 2000)。POm と POp は哺乳類における視床下部室傍核に相当し、コルチコトロピン放出ホルモンを放出し、ストレス応答などに関わる視床下部-下垂体-副腎系と呼ばれる、視床下部・下垂体・副腎の間でフィードバックのある相互作用を行い制御している神経内分泌系に含まれる神経核である (Amir-Zilberstein *et al.*, 2012)。

これらの神経核においては、終脳における味覚高次中枢やその他の中枢を経て輸送されたのか、味覚中枢の途中の経路から接続されたのか不明な核も存在する。しかし、本研究の結果から、これらの神経核はいずれも味覚中枢と相互連絡があることは示唆される。

表 2-2 本研究で WGA タンパク質が検出された中枢領域と哺乳類における過去の報告との比較

機能 / 脳の構造	メダカ						マウス			
	神経核名		今回の解析 (PLC-β2 制御下)			色素注入法による過去の解析*	神経核名		Ohmoto et al (T1R3 制御下)	Damak et al (T1R3 制御下)
			12 dpf	3 mo	9 mo					
味覚 1 次中継核 / 延髄	XL	迷走葉	+	+	+	● ● ▲	NST	延髄孤束核	+	+
	VIII / NVIIIs (SO)	顔面葉	-	+	+	● ● ▲				
味覚 2 次中継核 / 後脳	NGS	第 2 味覚核	-	+	+	▽▽●▲▲	PBN	橋結合腕傍核		
味覚 3 次中継核 / 間脳	NDLI	下葉分散核	-	-	+	▽	LH	外側視床下部		
	pTGN	糸球体第 3 味覚核	-	-	+	▽●●▲	VPM	視床後内側腹側核小細胞部		
高次中枢 / 終脳	dDm	終脳背側野内側部の背側部	-	-	+	▽	GC	大脳味覚野		
	vDm	終脳背側野内側部の腹側部	-	-	+	▽	Amyg	扁桃体中心核		
	vDI	終脳背側野外側部の腹側部	-	-	+	▽	Hip	海馬		
	Dp	終脳背側野後部	-	-	+	▽▽	Pir	梨状葉		
	Vs	終脳背側野上交連部	-	+	+	▽				
	Vp	終脳腹側野後部	-	-	+	▽				
	Vv	終脳腹側野腹側部	-	+	+	▽▽				
三叉神経 / 後脳	tV / NTv	三叉神経下行根	-	-	+	▽	Sp5	三叉神経脊髄路核	+	+
							Pr5	三叉神経主知覚核	+	
多機能 / 全領域	RF	網様体	+	+	+	▽▽	pcRF	小細胞性網様体	+	
							gcRF	大細胞性網様体		+
	NRPH	縫線核	-	-	+		NRPH	縫線核	+	+
	SPV	脳室周辺灰色地帯	-	-	+		PGZ3	脳室周辺灰色地帯		
	DT	背側被蓋核	-	+	+		DT	背側被蓋核		
	CM	乳頭体	-	-	+		CM	乳頭体		
	NPPv	脳室周囲後核	-	-	+		NPPv	脳室周囲後核		
	POm	視索前核マグノ細胞部	-	-	+		PO	視索前野		
POp	視索前核小細胞性部	-	-	+						
運動核 / 全領域	NVm	三叉神経運動核	-	-	-	▽	5N	三叉神経運動核	+	
	NVIm	顔面神経運動核	N.D.	N.D.	N.D.		7N	顔面神経運動核	+	
	NXm	迷走神経運動核	-	+	+	▽	10N	迷走神経運動核		
							12N	舌下神経運動核	+	
側線神経 / 全領域	MN	内側核	-	-	+					
聴覚神経 / 間脳	NAT	前隆起核	-	-	+	▽▽▽	VN	前庭神経核		+
ホルモン分泌 / 間脳	NVT	隆起腹側核	-	+	+					

+ : WGA 陽性細胞が見られた神経核

- : WGA 陽性細胞が見られなかった神経核

N.D.: 今回の解析では不明 (アトラスに記載がなかったため)

* 色素注入した部位...XL (Finger, 2009), VIII (Kanwal and Finger, 1997), XL, VIII, NGS, pTGN (Yoshimoto et al., 1998), NGS, pTGN, Vp, Vs, Vv (Folgueira et al., 2004a), preoptic area (Pom または POp), Dp, Dm, vDI (Folgueira et al., 2004b).

黒丸 : 色素を注入した領域、白三角 : 色素が検出された領域

12 dpf: 12 日齢の Tg 稚魚

3 mo: 3 か月齢の Tg 成魚

9 mo: 9 か月齢の Tg 成魚

第3章

即初期遺伝子群（IEGs）の発現を指標とした

味刺激に応答する神経細胞の同定

序

第2章で、味覚情報の伝達・認識に関わる神経細胞群の高次中枢までの可視化に成功した。次に、個々の基本味の情報の伝達・認識に関わる神経細胞の同定を目指し、IEGsの発現を指標とし、味刺激に対して特異的に応答する神経細胞の解析を行った。

味刺激に応答する神経細胞は、IEGsの一つである *c-fos* mRNA や *c-Fos* タンパク質の発現を用いてラットの味覚1次中枢 NST や味覚2次中枢 PBN において解析がなされている。NST においては、甘味・旨味刺激後に rostral NST の領域において広範囲に *c-Fos* 発現細胞が観察されたのに対し、苦味刺激後では、内側部の狭い領域に密集して発現細胞が観察された (Harrer and Travers, 1996; King *et al.*, 1999; Travers *et al.*, 1999; Travers, 2002)。PBN においては、rostral NST からの投射を密に受ける PBN 領域のうち、甘味・塩味による刺激で応答する *c-Fos* 発現細胞は背内側に位置する領域に集中し、苦味・酸味による刺激で応答する *c-Fos* 発現細胞は腹外側部に位置する領域に集中することが示されている (Yamamoto *et al.*, 1994)。その他の IEGs としては、神経可塑性の分子マーカーとして利用され、長期記憶の形成に関与している *Arc* (*Arg3.1*) の発現を指標にした解析も行われている (Bramham *et al.*, 2008)。ラットに対して味刺激を与え、大脳皮質味覚野 GC における *Arc* (*Arg3.1*) の発現レベルの変化を解析する実験も行われている (Saddoris *et al.*, 2009; Inberg *et al.*, 2013)。このように哺乳類では味覚中枢で IEGs を指標にした、味応答神経細胞の解析は過去にいくつも報告されている。

一方、魚類においては、ごく最近ゼブラフィッシュにおいて苦味や酸味といった忌避味に対して *egr1* の発現が誘導されることが示された (Boyer *et al.*, 2013)。しかし、メダカでは味刺激に対して応答する IEGs の知見がなかったため、まず味刺激に応答するマーカー遺伝子として利用できる IEGs の選抜を行った。既に電気刺激などによりマウスおよびラットの脳で mRNA の発現上昇が観察されている IEGs について、メダカの予想オーソログ配列を計 33 遺伝子取得し、クローニングした。このうち、呈味物質入りの餌を摂取後に味覚中枢 XL で再現的に発現が観察される遺伝子を選抜することにした。ISH を行い解析した結果、*c-fos* と *egr1-2* の 2 遺伝子が旨味、苦味いずれの呈味物質の摂取によっても再現的に発現することが示された。また、*fosb-1*、*fosb-2* は苦味物質入りの餌によって再現的に発現することが示された。

次に、味の情報伝達・認識に関わる神経細胞の味質による分布の差を調べるため、摂取する餌の味質による *c-fos* と *egr1-2* の味覚中枢での発現の違いを詳細に解析した。その結果、この 2 遺伝子は呈味物質を含まない餌 (NT 餌) を摂取させた場合でも、旨味や苦味物質入り餌を摂取した場合と同様に味覚中枢で発現が観察された。特に、味覚以外の神経の投射報告がない味覚中枢である NGS においても発現が観察されたことから、*c-fos* と *egr1-2* が味覚刺激に応答する IEGs として利用できることが示唆された。また NGS での発現は NT 餌を摂取させた場合でも見られたため、NT 餌中の成分がメダカに味刺激を引き起こしていることが示唆された。さらに、体性感覚や嗅覚などの神経入力がある神

経核にも両遺伝子の発現が観察されたことから、味覚以外の感覚刺激に起因した発現も存在することが考えられた。

以上の結果から、摂取する味質による発現細胞分布の違いを明らかにできなかったが、味覚刺激に応答する IEGs を同定することに成功した。今後は、IEGs の発現誘導を引き起こされない NT 餌の作製や、体性感覚や嗅覚を介した応答が生じずに味覚刺激を与える方法を開発することが課題として残された。

1. 材料および方法

1-1. 実験動物

使用したメダカは第1章と同様である。

1-2. メダカの即初期遺伝子候補配列の探索

哺乳類（マウスまたはラット）において電気刺激などを与えることにより、脳での mRNA の発現が確認されている即初期遺伝子群 (IEGs) 19 種 (c-fos, c-myc, fosB, c-jun, junB, junD, egr-1, egr-2, NGFI-B, Arc, Homer1, rheb, RGS2, SNK, ActivinbetaA, Narp, tPA, Arcadlin, Neuritin) (Cole *et al.*, 1989; Watson and Milbrandt, 1989; Cole *et al.*, 1990; Wisden *et al.*, 1990; Hope *et al.*, 1992; Qian *et al.*, 1993; Worley *et al.*, 1993; Yamagata *et al.*, 1994; Andreasson and Worley, 1995; Link *et al.*, 1995; Tsui *et al.*, 1996; Brakeman *et al.*, 1997; Naeve *et al.*, 1997; Ingi *et al.*, 1998; Kauselmann *et al.*, 1999; Yamagata *et al.*, 1999; Okuno, 2011) のメダカ (Ol: *Oryzias latipes*) オーソログと推測される遺伝子配列を取得するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されているメダカの遺伝子配列を検索した。NCBI に登録されていない遺伝子については、Ensembl Genome Browser のデータベースで、マウスの遺伝子配列を検索し、その遺伝子のメダカオーソログと予想されている核酸およびアミノ酸配列を取得した。

データベースから取得した予想配列に関しては、求める遺伝子のオーソログであることを確認するため、分子系統樹を作成した。そのため、ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*) の遺伝子についても NCBI のデータベースに登録されている核酸およびアミノ酸配列を取得した。登録されていない動物種の配列については、Ensembl Genome Browser のデータベースにおいて、マウスの遺伝子配列のオーソログと予想されている配列を取得し、分子系統樹解析に用いた。分子系統樹の作成の際には、アウトグループとして使用する配列は、取得したい遺伝子のマウスにおける配列を query にして、NCBI の protein BLAST プログラムを用いて検索し、同一ファミリーではなく相同性が高いと判断された配列を用いた。ただし、arcadlin (protocadherin) 遺伝子ファミリーについては、ファミリーの数が非常に多かったため、ファミリー内の遺伝子のみで系統樹を作成した。

分子系統樹の作成には、取得したアミノ酸配列を用いて、Clustal X2 プログラムでアラインメントを作成し、その後、分子系統樹解析ソフト MEGA5.2 を用いて行った。

1-3. 呈味物質含有蛍光餌の作製

メダカに味刺激を与える方法として、既に当研究室において、摂食行動解析により嗜好および忌避行動の判断ができることが明らかになっている呈味物質含有蛍光餌 (Aihara *et al.*, 2008) を利用することを試みた。Aihara らはデンプンを担体として餌を作製したが、今回はより簡便に作製できるアガロースを担体とした蛍光餌 (高木陽介修士論

文、齊藤健佑修士論文参照)を使用することにした。作製の手順のおおまかな流れは図 3-1 に記載した。

まず、加温し融解させた精製高融点パーム油(金田油店) 5 ml を 50 ml 遠沈管に移した。これに蛍光色素である 1,1'-ダイドデシル 3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン過塩素酸塩(DiIC₁₂(3)、Molecular ProbesTMD-383、Invitrogen 社)の 1 mM エタノール溶液 125 μ l を添加し、DiIC₁₂(3)分散相とした。分散相はヒートブロックで 70°C に保温した。

蒸留水 18 ml に低電気浸透度のアガロース(関東化学) 1.0 g を加えホットスターラー上で一様にゲル状になるまで加熱、攪拌した。これにポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(Tween20、関東化学) 0.5 g を加え攪拌し、連続相とした。これ以降、乳化が終わるまでの操作は全て 70°C のヒートブロックに入れて行った。

分散相に連続相を加え、高速ホモジナイザーポリトロン PT1300D(Kinematica 社)を用いて 20,000 rpm の速度で 2 分間攪拌し、乳化した。ここに目的の味物質水溶液の 10 倍濃度の水溶液を 2 ml 加えて、ただちにポリトロンで更に 30 秒間乳化した。目的の味物質水溶液としては、旨味物質であるアミノ酸混合餌(AA 餌)作製の場合、100 mM の L-Ala、L-Ser、L-Pro、L-Arg の混合溶液を加えた。苦味物質であるデナトニウム餌(DN 餌)作製の場合、100 mM デナトニウム溶液を加えた。これらの物質は培養細胞を用いたメダカの味覚受容体での応答や摂食行動解析により各々嗜好または忌避するリガンドであることが明らかになっている(Oike *et al.*, 2007; Aihara *et al.*, 2008)。呈味物質を含まない餌(NT 餌)の作製の場合は味物質水溶液の代わりに蒸留水を加えた。

室温のクッキングシート上に上記の乳化させた液状の蛍光餌を薄く塗布した。37°C のインキュベータ内に入れ、72 時間乾燥させた。乾燥させてフィルム状になった餌をクッキングシートから剥がし、コーヒーマルおよび乳鉢を用いて粉碎した。その後、篩で分級し、直径 150-212 μ m の粒子を回収した。回収後は暗所で乾燥保存した。

1-4. 呈味物質含有蛍光餌の投与

通常の粉末餌を食べた直後の約 1 か月齢のメダカを、飼育している水槽から、1 x Yamamoto buffer 液(蒸留水 1000 ml に NaCl 1.0 g、KCl 0.03 g、CaCl₂·2H₂O 0.04 g、MgCl₂·6H₂O 0.10 g、NaHCO₃ 0.20 g を加えて pH7.3 に調整)(Rembold *et al.*, 2006)を入れた直径 90 mm シャーレに移した。その後、水質の悪化を防ぐため、シャーレごと数回 buffer を交換しながら、24 時間絶食させた。餌を摂食させない群(NF 群)は 24 時間後に氷冷した 4% PFA/PBS に直接入れて固定した。餌を摂食させる個体は、24 時間絶食後に呈味物質含有蛍光餌(AA 餌、DN 餌、NT 餌)をミクロスパーテルで 1 杯(約 2 mg)散布し、3 分間摂食させた。その後、直ちにメダカを別のシャーレに移し、餌投与から一定時間(10、30、60 分)後に氷冷した 4% PFA/PBS に入れて固定した。固定したメダカは、約 1 時間後に倒立顕微鏡により、520-550 nm の励起フィルターと 580 nm の吸収フィルター

を用いて DiIC₁₂(3)蛍光を検出した画像を取得し、餌の摂取の有無を判断した (DP80 カメラ Olympus 社)。摂食群については腹部に蛍光が観察された個体のみを解析に用いることにした (図 3-2)。

1-5. *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) による解析

1-5-1. プローブの作製

使用した遺伝子の cDNA 領域については表 3-1 にまとめた。操作自体は第 1 章の材料と方法 1-3-1. プローブの作製 と同様の操作を行った。

1-5-2. メダカの切片作製

ISH 解析には、1-4. 呈味物質含有蛍光餌の投与 の実験で使用した Cab WT の 1 か月齢メダカを使用した。氷冷 4% PFA/PBS に 1 時間浸し、倒立顕微鏡で写真観察したメダカをさらに 4% PFA/PBS に入れて 4°C で約 16 時間浸した。次に 500 mM EDTA に 4°C で 2 日入れて脱灰処理した。その後、15%スクロース/PBS に 4°C で 2 時間、30%スクロース/PBS に 4°C で 16 時間浸して不凍処理を行った。最後に O.C.T.コンパウンド (サクラファインテック社) に浸し、液体窒素で凍結させ、包埋ブロックにし、切片作製時まで -80°C で保存した。10 μm 厚で切片にし、切片は染色時まで -80°C で保存した。

1-5-3. ISH

この操作は、第 1 章の材料と方法 1-3-3. ISH と同様の操作を行った。

なお、本章での発色時間は、結果 2-2 では 5 時間、2-3 および 2-5 では 9 時間とした。本章では、NF 群において、発色 5 時間では *c-fos* の発現が観察されず、発色 9 時間でようやく検出される程度の発現の場合、その細胞を微弱な陽性細胞と判断した。微弱な陽性細胞より染色強度が強く、5 時間の発色時間でも十分検出できる発現の場合は、明確な陽性細胞と判断した。また 2-3 と 2-5 の解析では、ドット状の非常に細かいシグナルは、発色時間を延ばしたことにより生じたノイズである可能性が考えられたため、陽性細胞と判断しなかった。

1-5-4. 二重 ISH

この操作は第 1 章の材料と方法 1-3-4. 二重 ISH と基本的には同様の操作を行った。ただし感度増強のため、TSA-AlexaFluor488 および TSA-AlexaFluor555 (いずれも Invitrogen 社) を 100 倍希釈するバッファーを、0.0015% H₂O₂ を含む amplification バッファー (Invitrogen 社) から 1 x Plus Amplification Diluent (Perkin Elmer 社) に変更した。

表3-1 *in situ* ハイブリダイゼーションに使用したプライマー配列と使用したcDNAプローブ長

遺伝子名	プライマー配列		cDNA中の 使用断片 領域 (bp)	使用した cDNA プローブ長 (kbp)	GenBank accession number またはEnsembl genome browser内の登録番号
c-fos	sense	gcggtcgcagGATGTTACCCGCTTCAG	148-165	1.1	NM_001252234
	antisense	cgcggatccCAGGGTGGGTGAGTTTAGAG	1209-1228		
c-myc	sense	gcggtcgcagAAGATTTACCCGCTTCCG	254-271	0.8	ENSORLT00000008816
	antisense	cgcggatccTCGCCTTCTCAGGATCAC	1039-1057		
c-myc20	sense	gcggtcgcagGACTACGACTATGACTCCCTCC	37-58	1.1	JN634762
	antisense	cgcggatccCGCCTTCTCAGGATCAC	1141-1158		
fosb-1	sense	gcggtcgcagGGAAGCTCGTCTCCATCC	43-60	0.6	ENSORLT00000008366
	antisense	cgcggaattcGCTGGTCTGGTATGGAATC	654-673		
fosb-2	sense	gcggtcgcagTCATTCGTTCACACTGTCCAC	1-20	0.4	ENSORLT00000008367
	antisense	cgcggatccATGGAATCTTGAATTCGG	406-424		
c-jun-1	sense	gcggtcgcagGATGAAACTACTTTCTATGACGAC	12-36	1.0	ENSORLT00000018224
	antisense	cgcggatccAGAAGGTCTGGAGCTGCTG	958-976		
c-jun-2	sense	gcggtcgcagATGTCTAGAAAAATGGAAGCG	10-30	0.9	ENSORLT00000012662
	antisense	cgcggatccTTGGAGCTGCTGTGTGAG	904-921		
junb-1	sense	gcggtcgcagATGGAACAACCTTTTATGACG	13-34	1.0	ENSORLT00000018213
	antisense	cgcggatccTCATGACTTTCTGTTTGAGCTG	934-955		
junb-2	sense	gcggtcgcagTCTCTGAAGCTGGCATCC	303-320	0.2	ENSORLT00000019448
	antisense	cgcggatccATGGACACGTTAGGAGGAGG	480-499		
junb/c	sense	gcggtcgcagATGGAGACGCCTTTCTACC	1-19	0.9	ENSORLP00000023474
	antisense	cgcggatccTTTGAGCTGAGCTACCTGC	882-900		
jund	sense	gcggtcgcagCTGCTTAAGCTGGCCTCTC	193-211	0.6	ENSORLT00000010526
	antisense	cgcggatccGGCTCTTACAGCTCTTGAC	775-793		
egr1-1	sense	gcggtcgcagCCGTACGACCACCTTACTG	106-124	1.2	ENSORLT00000006861
	antisense	cgcggatccCCGAGGAAGGAAAGGAAG	1262-1279		
egr1-2	sense	gcggtcgcagAGAAGCCGTTCCAGTGTC	1000-1018	0.3	ENSORLT00000000940
	antisense	cgcggatccGGAGGAGTAGGATGAATCTGG	1225-1245		
egr2-1	sense	gcggtcgcagTGAATCCGGTGAATCTCG	29-46	1.2	ENSORLT00000018303
	antisense	cgcggatccCTCCTTCTGCCTCAGGTG	1234-1251		
egr2-2	sense	gcggtcgcagGTTCAGCGGAAAGTTTTCG	282-300	0.9	ENSORLT00000002596
	antisense	cgcggatccCTCCTTCTGCCTGAGGTG	1195-1212		
ngfi-b-1	sense	gcggtcgcagCTCTCTACATCCTCCCTGCC	121-140	1.6	ENSORLT00000019479
	antisense	cgcggatccCATAAAGATCTTCTCCACTATCGG	1717-1740		
ngfi-b-2	sense	gcggtcgcagAGCAGTTTACGAGCTCTG	43-61	1.7	ENSORLT00000019139
	antisense	cgcggatccAAAGATCTTCTCCACGATTGG	1678-1698		
homer1a	sense	gcggtcgcagTCATCAACAGCACCATCAC	161-179	0.9	ENSORLT00000003076
	antisense	cgcggaattcATCAGCTTGACCAGCGTG	1062-1079		
homer1b	sense	gcggtcgcagCCATGTCTTCCAGATTGACC	174-193	1.0	ENSORLT00000011336
	antisense	cgcggatccCCAAGGTGTCTCTGAGCTC	1174-1192		
rheb-1	sense	gcggtcgcagGAGTACAACCTGCAGCTGG	238-256	0.4	ENSORLT00000004586
	antisense	cgcggatccTACATCACGGAGCAAGGG	618-635		
rheb-2	sense	gcggtcgcagAAAATACAGGAAAATCGCCG	312-331	0.6	ENSORLT00000001941
	antisense	cgcggatccATCACGGTGCCTTTTCTC	832-851		
rgs2	sense	gcggtcgcagCCTTCGGCTATATCTTAAGTCAG	264-287	0.3	ENSORLT00000015355
	antisense	cgcggatccGTCGGAATGGATGAACCTG	538-556		
snk	sense	gcggtcgcagGTCTCTGGACTGAAATACCTGC	475-496	1.3	ENSORLT00000005968
	antisense	cgcggatccGTGTGATCGTGGTAGAAGTTGAC	1774-1796		
activinba-1	sense	gcggtcgcagGTTGGAGTGATTGGATTATCG	2-22	0.3	AB116641
	antisense	cgcggatccATCATGTCTGGATGCCTTC	237-257		
activinba-2	sense	gcggtcgcagAACGCCATCAAGAAGCTG	34-51	0.7	EU159463
	antisense	cgcggatccCCCTCACAGTAGTTGGC	718-735		
nptx2-1	sense	gcggtcgcagGCCTCCCAGCTCTAATG	476-493	0.9	ENSORLT00000011869
	antisense	cgcggatccTTCGAGATTTCCAGAGC	1324-1341		
nptx2-2	sense	gcggtcgcagAGAGGAGCTCAGAAACACCCG	222-241	1.0	ENSORLT00000004111
	antisense	cgcggatccATGTAGGAGCTGCAGTTTGC	1243-1262		
tpa	sense	gcggtcgcagGAGGAGCTCGTTTTTACAGAG	86-106	1.5	ENSORLT00000002927
	antisense	cgcggatccCAAGAGGACCACCAGAGTC	1579-1597		
arcadlin-1	sense	GTCAGGATCGTCGACCAG	1681-1698	0.8	ENSORLT00000013953
	antisense	GGTGGTGTAGGAATCCCC	2517-2535		
arcadlin-2	sense	cgcggaattcGTAACGACAAATGCCCCAG	958-976	0.9	ENSORLT00000022245
	antisense	GGTCAGTGAGGGGATCC	1897-1914		
arcadlin-3	sense	CATTTCCACGGTCGACTCTC	852-871	1.6	ENSORLT00000022242
	antisense	cgcggatccTTTCCCGCTGTCTCTCAC	2443-2460		
neuritin1-1	sense	gcggtcgcagGTGTTCAAAGGCTTCTCCG	109-127	0.2	ENSORLT00000019548
	antisense	cgcggatccACACAGTTCAAACAAACTCCC	322-342		
neuritin1-2	sense	gcggtcgcagACAAAGATTTTCTGATTGTGTC	104-127	0.2	ENSORLT00000004102
	antisense	cgcggatccGGCTGCAAAGGTCAAACAG	319-337		

人為的に付加した配列は小文字で示し、制限酵素認識配列は赤字で記した

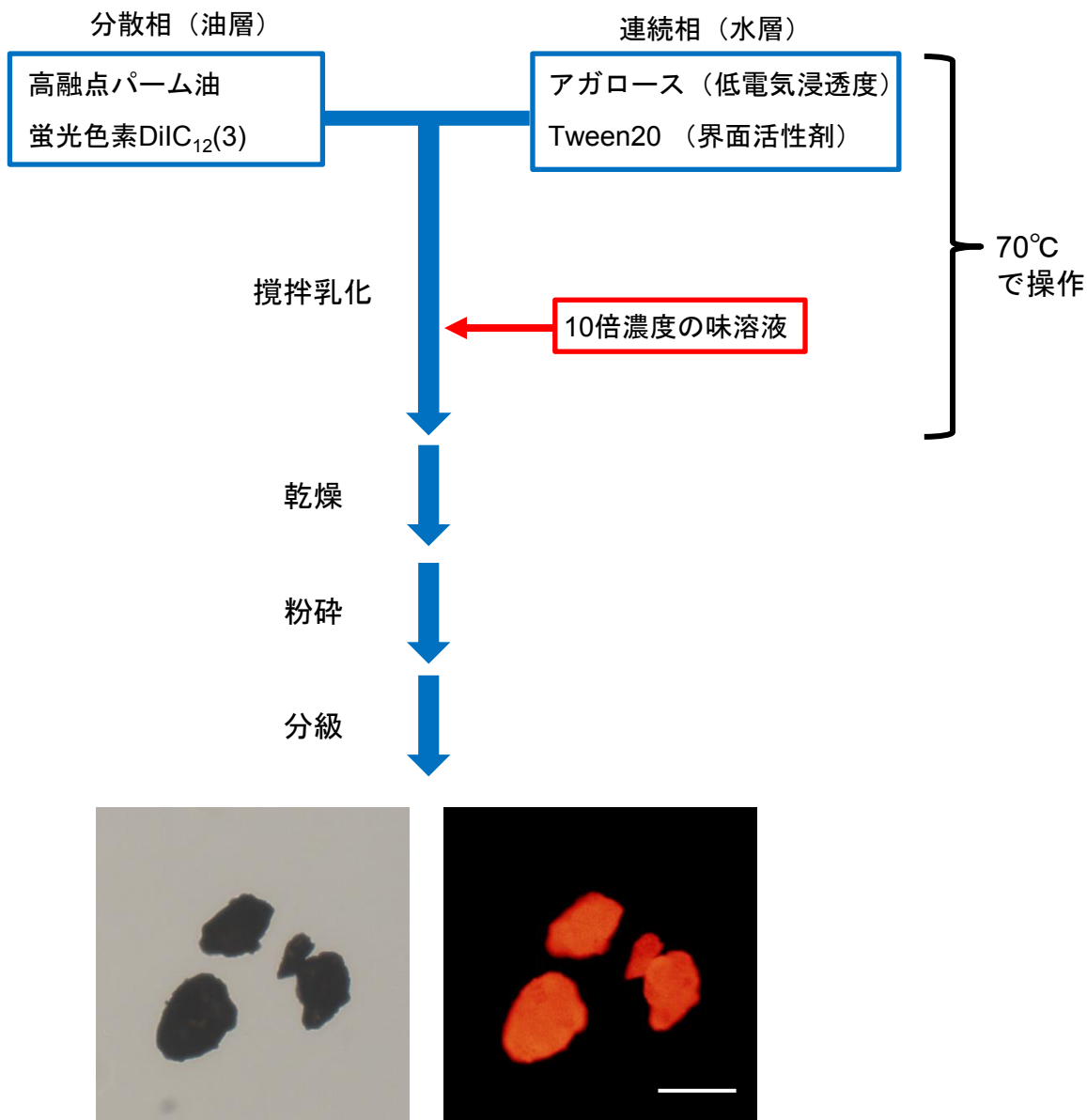


図3-1 呈味物質含有蛍光餌の作製手順

はじめに、70°Cに加熱した状態で、分散相である油層に蛍光色素DiIc₁₂(3)を加え、連続相である水層には界面活性剤であるTween20を加え、両相を混合させ乳化した。

以降は室温で乾燥、粉碎、分級をし、蛍光餌を作製した。

10倍濃度の味溶液としては、アミノ酸混合餌 (AA餌) 作製の場合、100 mMのL-Ala、L-Ser、L-Pro、L-Argの混合溶液を加えた。デナトニウム餌 (DN餌) 作製の場合、100 mMデナトニウム溶液を加えた。呈味物質を含まない餌 (NT餌) の作製の場合は、味溶液ではなく蒸留水を加えた。

下段の写真は左が分級後取得した150 μm-212 μmの粒径である蛍光餌の明視野の写真。右は蛍光写真。520-550 nmの励起フィルターと580 nmの吸収フィルターを用いてDiIc₁₂(3)の蛍光を検出した。

スケールバーは200 μm。

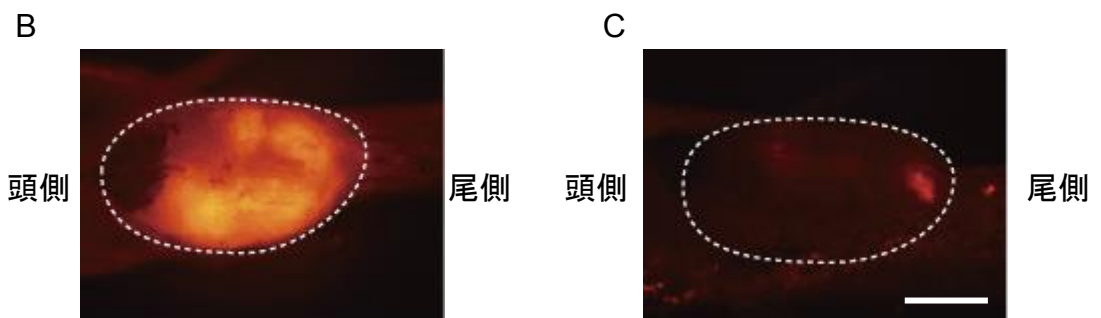
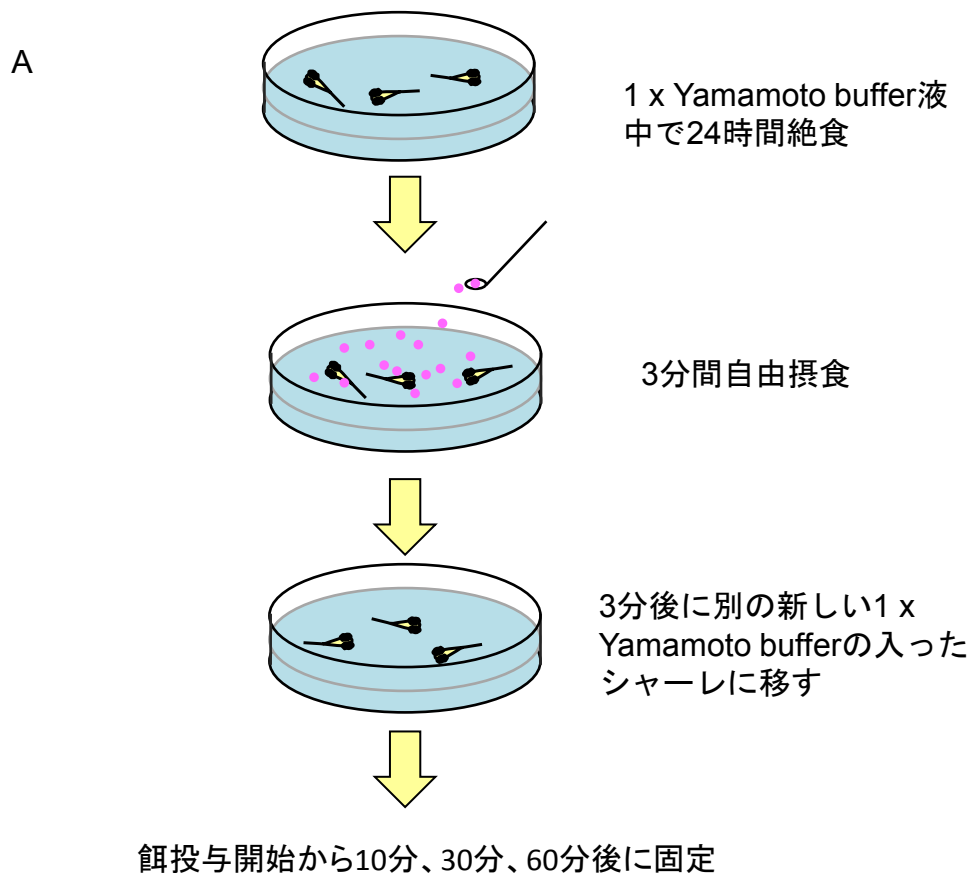


図3-2 呈味物質含有蛍光餌の投与方法と、メダカ腹部の蛍光写真

A, 蛍光餌のメダカへの投与方法の流れ。

B, 餌を摂取したメダカの固定後の腹部蛍光写真。

C, 餌を摂取していないメダカの固定後の腹部蛍光写真。

B, Cはいずれも520-550 nmの励起フィルターと580 nmの吸収フィルターを用いてDiIC₁₂(3)蛍光を検出した画像。破線はメダカの腹部の位置を表す。腹側から観察した。

スケールバーは500 μm (B, C)。

2. 結果

2-1. 味刺激特異的に応答するメダカの即初期遺伝子候補配列の取得

まずメダカにおいて味刺激特異的に応答する神経細胞のマーカーとして利用できる IEGs の取得を試みた。そこで、哺乳類の脳で神経活動特異的に mRNA の発現上昇が報告されている IEGs のうち、c-fos, c-myc, fosB, c-jun, junB, junD, egr-1, egr-2, NGFI-B, Arc, Homer1, rheb, RGS2, SNK, Activin β A, Narp, tPA, Arcadlin, Neuritin の 19 遺伝子 (表 3-2) について、NCBI と Ensembl Genome Browser のデータベースを用いてメダカのオーソログ配列の探索を行った。

メダカにおける予想配列および他の動物種におけるオーソログ配列を用いて分子系統樹を作成した。その結果、メダカのオーソログとして予想されていた配列が複数ある遺伝子も含めて 33 遺伝子の配列を取得した (図 3-3~3-9)。取得した IEGs の遺伝子名は、c-fos, c-myc, c-myc20, fosb-1, fosb-2, c-jun-1, c-jun-2, junb-1, junb-2, junb/c, jund, egr1-1, egr1-2, egr2-1, egr2-2, ngfi-b-1, ngfi-b-2, homer1a, homer1b, rheb-1, rheb-2, rgs2, snk, activinba-1, activinba-2, nptx2-1, nptx2-2, tpa, arcadlin-1, arcadlin-2, arcadlin-3, neuritin1-1, neuritin1-2 と命名した (表 3-3)。オーソログとして複数の配列が得られた場合、遺伝子名の後に番号として -1, -2, -3 と数字を入れて表記した。c-myc20 に関しては NCBI に登録された遺伝子名であったのでそのまま使用した。ENSORLP00000023474 の配列は、系統樹解析の結果、jun ファミリーに属するが、junB と c-jun のどちらの枝にも含まれなかったため、junb/c と命名した (図 3-4A)。nptx2 については、Ensembl Genome Browser のデータベース内に 4 つ含まれていた予想配列のうち、nptx2-predicted とされた 2 つの予想配列 (ENSORLP00000013159、ENSORLP00000016767) が、系統樹解析の結果、nptx2 の枝から外れていたためこの 2 遺伝子についてはクローニングをしなかった (図 3-8A)。Arc についてはメダカオーソログを見出すことが出来なかった。Ensembl Genome Browser データベースで検索した結果、ゼブラフィッシュなど他の魚種においても予想オーソログ配列がなかったため、魚類には Arc のオーソログが存在していないと考えられた。

2-2. 延髄の味覚中枢において呈味物質摂取により発現する IEGs の選抜

上記の系統樹解析から取得したメダカの IEGs33 遺伝子をクローニングし、呈味物質の摂取により味覚中枢で特異的に発現する遺伝子の選抜を行うことにした。遺伝子の選抜方法としては、絶食させたメダカに対して味刺激を与え、ISH によって味覚中枢において再現的に mRNA の発現が観察される IEGs を選抜することを試みた。味刺激を与える方法として、摂食の有無を蛍光観察により容易に判別可能である呈味物質含有蛍光餌 (図 3-1) をメダカに摂食させることにした。呈味物質としては、メダカ T1R のリガンドとして同定されている旨味物質の 4 種のアミノ酸混合物 (L-Ala、L-Ser、L-Pro、L-Arg) (Oike *et al.*, 2007) または、T2R のリガンドとして同定されている苦味

物質のデナトニウム (Oike *et al.*, 2007) を加えて蛍光餌を作製した (各々AA 餌、DN 餌とした)。アミノ酸およびデナトニウムは摂食行動解析により、メダカが嗜好および忌避することも示されている (Aihara *et al.*, 2008)。用いるメダカは、メダカ腹部の蛍光が顕微鏡観察で外から容易に判別できるサイズである 1 か月齢のメダカにした。1 x Yamamoto buffer を入れたシャーレ上で 24 時間絶食させた 1 か月齢のメダカに対して AA 餌または DN 餌を投与し、3 分間自由摂食させた (図 3-2)。3 分後直ちにメダカを別のシャーレに移し、餌投与から 10、30、60 分後に 4%PFA/PBS で固定をしたメダカを用意した。餌の名前と固定までの時間を合わせて各々AA10 群、AA30 群、AA60 群、DN10 群、DN30 群、DN60 群と呼ぶことにした。これら 6 群と餌を投与していない群 (NF 群とした) の計 7 群について、各群 2 個体ずつ ISH による発現解析を行った。解析する味覚中枢は、魚類では発達して肥大しているため、観察が容易である延髄の味覚 1 次中枢である迷走葉 (XL) とした。XL は前後方向に広く分布している (第 2 章 図 2-15) ため、前方部と後方部の 2 断面 (図 3-10) について観察することにした。選抜の条件としては、NF 群では発現が見られず、AA 餌または DN 餌を摂取した群で再現的に発現が検出されることとした。解析の結果、上記の条件を満たす遺伝子として *c-fos*、*egr1-2*、*fosb-1*、*fosb-2* の 4 遺伝子を同定した。

AA 餌、DN 餌いずれにおいても摂取後に再現的に発現が観察された遺伝子として、*c-fos* と *egr1-2* の 2 遺伝子が同定された。*c-fos* は、AA30 群、DN30 群において再現的に 2 個体とも発現が観察され、AA30 群の 1 個体を除き、XL の前方部、後方部ともに発現が観察された (図 3-11)。また、AA60 群、DN60 群においても各々 1 個体ずつ発現が観察された。*egr1-2* については、AA30 群、DN30 群ともに解析した 2 個体で再現的に発現が観察された。AA30 群では前方部、後方部ともに発現が観察されたが、DN30 群では前方部のみに発現が観察され、AA30 群に比べ発現が微弱であった (図 3-12)。

次に DN 餌摂取群においてのみ再現的に応答が観察された遺伝子として、*fosb-1* と *fosb-2* の 2 遺伝子が同定された (図 3-13, 14)。*fosb-1* は DN60 群の 2 個体と DN30 群の 1 個体で応答が観察された。また、*fosb-2* は、DN60 群の 2 個体と DN10 群の 1 個体で応答が観察された。

上記 4 遺伝子以外では、NF 群で発現が観察されず、餌を摂取した群においても再現的な発現は観察されなかったが、餌摂取により 1 個体でも発現が見られた遺伝子として、*c-myc*、*ngfi-b-1*、*nptx2-1*、*arcadlin-3* の 4 遺伝子が同定された (図 3-15~3-18)。*c-myc* は AA10 群と AA30 群の各 1 個体、*ngfi-b-1* は AA30 群の 1 個体、*nptx2-1* は AA60 群と DN10 群の各 1 個体、*arcadlin-3* は AA60 群の 1 個体のみで発現が観察された。しかし、これらの 4 遺伝子に関しては、応答に再現性が見られず、詳細な解析が困難であると考え、今後の解析には用いなかった。

残りの 25 遺伝子のうち、餌を摂食した 6 群のいずれにおいても発現が観察されない IEGs として、*junb/c*、*rheb-1*、*rheb-2*、*rgs2*、*activinba-1*、*activinba-2*、*nptx2-2*、*tpa*、*neuritin1-2*

の9遺伝子が存在した(図3-19~3-21)。また、NF群で発現が観察されたIEGsとして、*c-myc20*, *c-jun-1*, *c-jun-2*, *junb-1*, *junb-2*, *jund*, *egr1-1*, *egr2-1*, *egr2-2*, *ngfi-b-2*, *homer1a*, *homer1b*, *snk*, *arcadlin-1*, *arcadlin-2*, *neuritin1-1*の16遺伝子が存在した(図3-22, 23)。これらの25遺伝子は摂食に無関係に発現する、または摂食後に発現が観察されないIEGsであり、味特異的な応答を観察できないと考え、今後の解析から除外した。IEGsの選抜の結果は表3-4にまとめた。

以上の結果から、*c-fos*と*egr1-2*は、旨味、苦味いずれの呈味物質の摂取によっても応答する神経細胞マーカーとして利用できると考えた。また、*fosb-1*と*fosb-2*は、苦味物質の摂取により応答する神経細胞マーカーとして利用できる可能性が示された。

2-3. 選抜したIEGsの呈味物質摂取後の発現細胞の味質による違いの解析

2-2の解析により、*c-fos*と*egr1-2*の2遺伝子を用いることで、味覚中枢領域で味刺激により応答する細胞の味質による違いを詳細に解析することができると考えた。しかし、2-2の解析では、*c-fos*と*egr1-2*の発現が摂食によって誘導されていることは示されたが、味の刺激に起因するものであるかまでは明らかではない。そこで、次に呈味物質を含まない餌(NT餌)を摂取した群も加えて解析を行った。両遺伝子とも餌摂取から30分後に明確な発現が観察されていた(図3-11, 12)ため、AA餌、DN餌、NT餌を摂取させ、30分後に固定した3群(AA30群、DN30群、NT30群とした)を解析に用いることにした。これら3群とNF群について、各群2個体ずつ用いて味覚中枢での発現細胞分布をISHにより詳細に解析した。今回の解析は、発現誘導される細胞を明確に検出するため、2-2の場合より発色時間を長くした。その結果、ドット状の非常に弱いシグナルが観察される切片が見られたが、ノイズを検出している可能性が考えられたため、応答した細胞には加えなかった。

まず*c-fos*の発現を解析した結果、AA30群、DN30群、NT30群いずれにおいても味覚1次中枢であるVIII、XLの前方部と後方部、味覚2次中枢であるNGSの外側部、味覚3次中枢であるNDLIの後方部において発現細胞が観察された(図3-24~3-28)。これらの味覚中枢においては、餌を摂取した3群内で発現細胞分布を比べると、DN30群ではXLの後方部で発現細胞が非常に少ない個体が存在した(図3-24、表3-5)。また、AA30群ではNDLIの後方部で発現細胞が内側部に密に分布している個体が存在した(図3-28)。このように個体ごとに一部特徴はみられたが、味覚中枢内における発現細胞数や発現細胞領域についての群ごとの明確な差は認められなかった(表3-5)。また、XLの切片上に存在し、第2章でWGA陽性細胞が観察された神経核である迷走神経運動核NXmと三叉神経下行根tV(またはNTv)において、AA30群、DN30群、NT30群いずれも*c-fos*発現細胞が観察された個体が存在した(図3-24, 25青破線)。以上の結果から、*c-fos*は摂食により複数の味覚中枢や味覚関連領域の神経細胞で発現することが明らかになった。さらに、味覚以外の感覚神経からの直接の投射が報告され

ていない NGS における c-fos 発現細胞は味覚の刺激に起因して応答した細胞であると考えられた。以上から、味覚刺激によって応答する IEGs として c-fos を取得でき、味覚刺激により応答する神経細胞を一部同定することに成功した。しかし、NT30 群でも呈味物質を含む餌を摂取した場合と同様に応答細胞が観察されたので、摂食時に味覚以外の刺激が入力されることにより応答している細胞がある可能性が考えられた。

そこで、その他の中枢領域に関しても c-fos の発現分布を詳細に解析した。その結果、AA30 群、DN30 群、NT30 群いずれにおいても、三叉神経や側線神経など複数の神経の入力が報告 (Xue *et al.*, 2006a) されている半円隆起 (torus semicircularis, TS) (図 3-29) や、NGS からの投射が報告 (Kato *et al.*, 2012) されている外側隆起分散核 (diffuse nucleus of torus lateralis, NDTL) (図 3-30) で c-fos 陽性細胞が観察される個体が存在した。さらに脳前方部の間脳や終脳領域においても観察した。その結果、間脳前部では、AA30 群、DN30 群、NT30 群いずれにおいても前隆起核 (NAT) から隆起腹側核 (NVT) にかけて背腹軸に沿って連続した c-fos 陽性細胞が観察される個体が存在した (図 3-31)。終脳後部では、AA30 群、DN30 群、NT30 群いずれも終脳背側野内側部の腹側部 (vDm) から終脳腹側野後部 (Vp)、視索前核マグノ細胞部 (POm)、視索前核小細胞性部 (POp) にかけて、背腹軸に沿って連続した c-fos 陽性細胞が全ての個体で観察された (図 3-32)。また、終脳背側野後部 (Dp) から終脳背側野外側部 (lateral part of the dorsal telencephalic area, DI) にかけて (図 3-33)、終脳腹側野背側部 (dorsal part of the ventral telencephalic area, Vd) から終脳腹側野腹側部 (Vv) にかけてもそれぞれ背腹軸に沿って連続した c-fos 陽性細胞が観察される個体が存在した (図 3-35)。そして哺乳類の脳皮質味覚野に対応するとされる終脳背側野内側部の背側部 (dDm) においても AA30 群、DN30 群、NT30 群いずれの個体でも発現細胞が観察された (図 3-34)。1 個体の結果ではあるが、嗅覚の中枢である嗅球 (olfactory bulb, BO) においても AA30 群、DN30 群、NT30 群いずれの群でも陽性細胞が観察された (図 3-36)。3 群での発現細胞分布の違いについては、個体間の差が大きく、今回の解析だけでは群ごとの明確な傾向は示せなかった。一方、NF 群においては、TS や一部の終脳領域においては微弱な発現細胞が観察される個体が存在した (図 3-28-32, 34-36) が、餌を摂取した群で見られる明確な陽性細胞は観察されなかった。

以上の結果から、NF 群では応答細胞が観察されていない味覚中枢である XL、VIII、NGS においては餌の摂取により c-fos の発現が誘導されたことが示された。しかし、摂取する餌の味質による応答細胞の分布の差を見出すには至らなかった。また、c-fos 陽性細胞は味覚中枢以外にも様々な神経核において陽性細胞が観察された。特に、三叉神経の中枢である tV、1 個体ではあるが嗅覚の中枢である BO にも発現が観察されたことから体性感覚や嗅覚など味覚以外の感覚を介した刺激に起因して応答した細胞も含まれていると考えられた。

次に、egr1-2 においても発現を解析した。その結果、AA30 群、DN30 群、NT30 群

ともに *c-fos* の発現が観察された味覚中枢領域で発現が観察される個体が存在した (図 3-37~3-41)。味覚以外の神経入力の情報がない NGS においては DN30 群では発現が検出できなかったが AA30 群と NT30 群では発現が観察される個体が存在した (図 3-40)。以上から、味覚刺激によって応答する IEGs として *egr1-2* も有用であることが示唆された。その他の中枢領域に関しても、*c-fos* の発現と同様に、TS、NDTL、NAT、NVT、vDm、Vp、POm、POp、DI、Dp、dDm、Vd、Vv において発現が観察される個体が存在しており (図 3-42~3-46)、*egr1-2* 陽性細胞は、*c-fos* が発現する神経核に局在することが示された。しかし、ISH による染色強度が *c-fos* に比べて全体的に弱く、個体によって陽性細胞が検出できない領域も存在した。*c-fos* と *egr1-2* の発現が観察された神経核については表 3-6 にまとめた。

以上の解析結果から、味刺激に対して応答する神経細胞の味質による分布の違いを明らかにできなかったが、味刺激に対して発現誘導される IEGs を 2 種取得することに成功した。しかし、NT 餌摂取群でも味覚中枢において呈味物質を含む餌を摂取した群と似たような発現分布を示したことから、呈味物質として加えた成分以外の餌中の成分がメダカには味として認識されている可能性が考えられた。また、味覚以外の感覚を介した IEGs の発現も示唆された。今後は、他の感覚系の応答ができるだけ生じない刺激の与え方を検討し、かつメダカが味として認識しない成分を用いた NT 餌を開発し、味覚特異的に応答する神経細胞を選別することが課題として残された。

2-4. 餌摂取後の *c-fos* 発現細胞と *egr1-2* 発現細胞の発現相関

2-3 までの解析により、*c-fos* と *egr1-2* が味覚刺激に対して発現誘導される IEGs として有効な遺伝子であることが示された。しかし、両遺伝子の発現が見られた細胞が同一であるかは不明であるので、二重標識 ISH を行い、*c-fos* と *egr1-2* の味覚中枢での発現細胞が一致しているかを解析した。染色強度が強い NDLI において解析を行った。DN30 群において行った結果、*c-fos* 陽性細胞 23 個と *egr1-2* 陽性細胞 22 個が観察され、*egr1-2* 陽性細胞 22 個は全て *c-fos* 陽性細胞に含まれていた (図 3-47)。*c-fos* のみ発現した細胞が 1 個存在したが、*egr1-2* は染色強度が *c-fos* に比べて弱いため、検出できなかった細胞もあると考えられる。よって、NDLI において、DN 餌の摂取により発現誘導された *c-fos* 陽性細胞と *egr1-2* 陽性細胞は基本的に同一であり、*egr1-2* においてのみ発現が見られない神経核は染色強度の問題で検出できていない可能性が考えられた。

2-5. *fosb-1*、*fosb-2* の NT 餌に対する応答

2-2 の解析から、DN 餌にのみ応答する IEGs として *fosb-1*、*fosb-2* が取得されている。これらの遺伝子は AA 餌に対しては発現が観察されなかったことから、DN 餌特異的に応答し、NT 餌の摂取により応答しない可能性が考えられた。そこで ISH により NT 餌摂取後の XL での発現を解析した。両遺伝子ともに DN60 群で再現的に発現が観察さ

れていたもので、今回はNT 餌摂取後 60 分後に固定した群 (NT60 群とした) と DN60 群を用いて解析した。この解析も 2-3 と同様に発現細胞を明確に確認するため、2-2 の場合より発色時間を長くした。

その結果、*fosb-1*、*fosb-2* ともに、XL の前方、後方いずれの領域でも DN60 群、NT60 群ともに発現が観察された (図 3-48)。よって、*fosb-1* と *fosb-2* も、*c-fos* や *egr1-2* とともに NT 餌中の何らかの成分に対して応答している可能性が示唆された。よって、2-2 の選抜では AA 餌に応答しなかった点に関しては、餌の味質による応答の差ではなく、発色時間が短かったために検出されなかった可能性が考えられた。

表3-2 本解析でメダカのオーソログ配列の取得を試みたIEGsの機能の名称

機能	gene	正式名称
転写因子	c-fos	cellular oncogene fos
	c-myc	myelocytomatosis oncogene
	fosB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
	c-jun	jun proto-oncogene
	junB	Jun-B oncogene
	junD	Jun-D proto oncogene
	egr-1	Early growth response protein 1 / Zif268 (zinc finger protein 225) / NGFI-A (nerve growth factor-induced protein A)
	egr-2	Early growth response protein 2
ポストシナプスタンパク質	NGFI-B	nerve Growth factor 1B / Nur77 / NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1)
	Arc	activity regulated cytoskeletal-associated protein
細胞内シグナリング	Homer1	homer homolog 1 (Drosophila)
	rheb	Ras homolog enriched in brain
	RGS2	regulator of G-protein signaling 2
分泌因子	SNK (Plk2)	polo like kinase 2
	Activin betaA	
	Narp	neuronal activity-regulated pentraxin
膜タンパク質	tPA	tissue plasminogen activator, tPA / PLAT
	Arcadlin	protocadherin-8 (PCDH8)
	Neuritin	

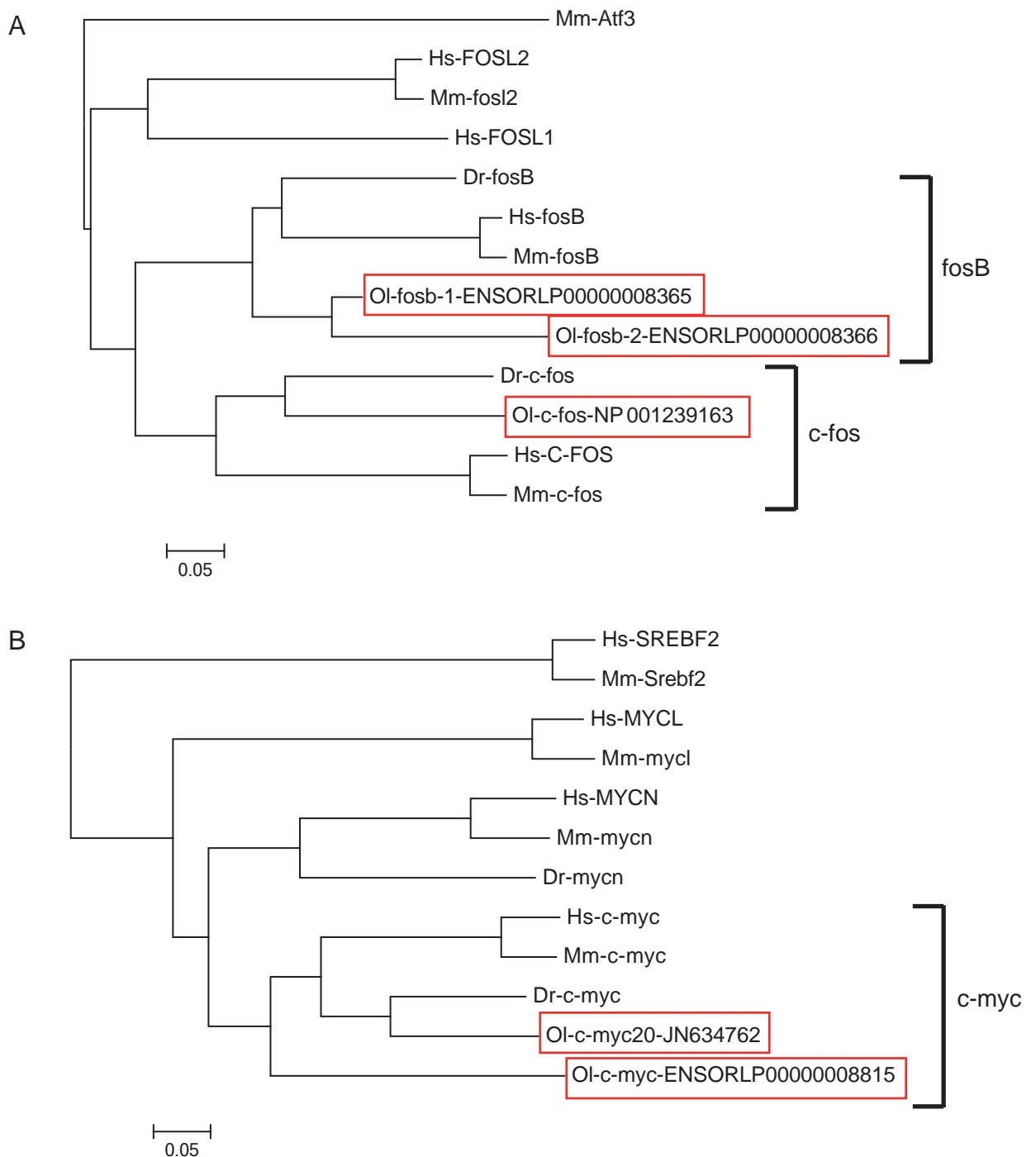


図 3-3 解析に使用した即初期遺伝子群 (IEGs) の類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹 -1
アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した分子系統樹を示す。

A. fos 遺伝子ファミリーの系統樹

B. myc (myelocytomatosis oncogene) 遺伝子ファミリーの系統樹

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) の 4 種の生物のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。

それぞれアウトグループとして Atf3 (activating transcription factor 3)、Srebf2 (sterol regulatory element binding factor 2) を使用した。解析に使用した遺伝子は赤枠で囲った。メダカ (Ol) の遺伝子名の後ろには National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser の Genome assembly: MEDAKA1 における相同性の高い配列の番号を記載した。スケールバーは 5% のアミノ酸変異を示す。

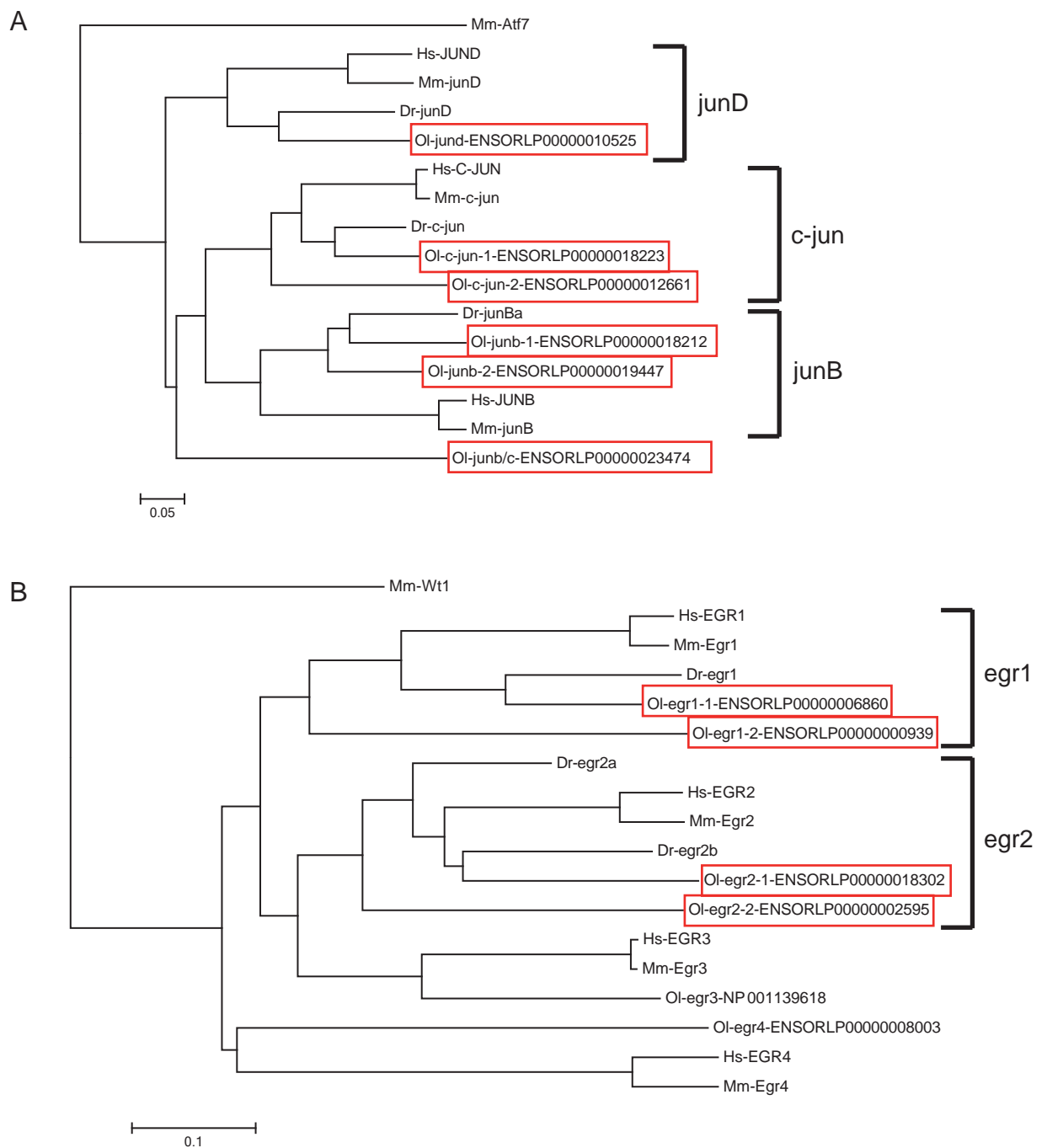


図 3-4 解析に使用した即初期遺伝子群 (IEGs) の類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹 -2
アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した分子系統樹を示す。

A. jun 遺伝子ファミリーの系統樹

B. egr (Early growth response protein) 遺伝子ファミリーの系統樹

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) の 4 種の生物のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。

それぞれアウトグループとして Atf7 (activating transcription factor 7)、Wt1 (Wilms tumor homolog 1) を使用した。解析に使用した遺伝子は赤枠で囲った。メダカの遺伝子名の後には NCBI に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser の Genome assembly: MEDAKA1 における相溶性の高い配列の番号を記載した。スケールバーは 5% (0.05), 10% (0.1) のアミノ酸変異を示す。

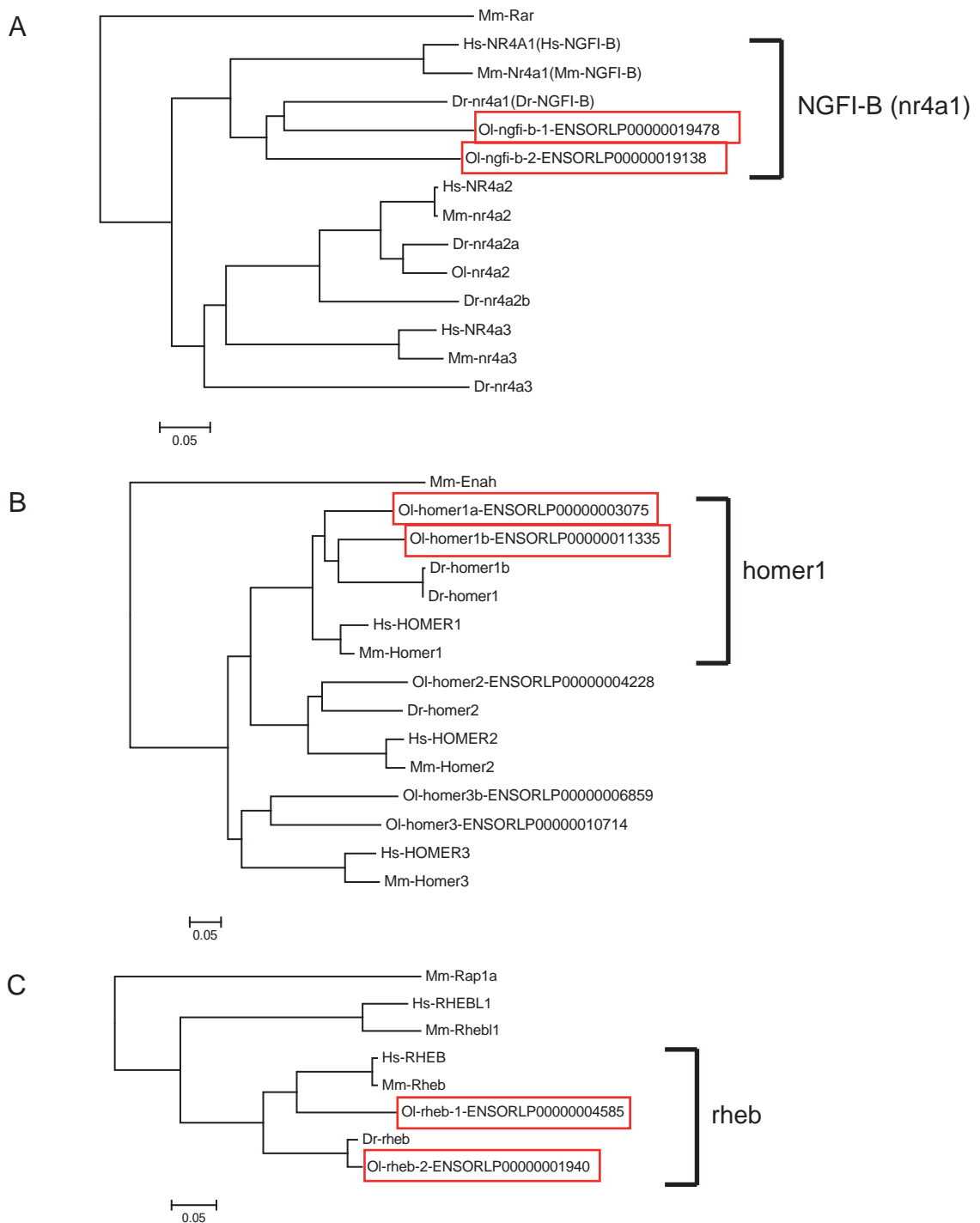


図 3-5 解析に使用した即初期遺伝子群 (IEGs) の類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹 -3
アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した分子系統樹を示す。

A. nr4a (nuclear receptor subfamily 4 group A member) 遺伝子ファミリーの系統樹

B. homer (homer protein homolog) 遺伝子ファミリーの系統樹

C. rheb (Ras homolog enriched in brain) 遺伝子ファミリーの系統樹

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) の 4 種の生物のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。

それぞれアウトグループとして Rar (retinoic acid receptor gamma)、Enah (protein enabled homolog isoform 3)、Rap1a (ras-related protein Rap-1A precursor) を使用した。解析に使用した遺伝子は赤枠で囲った。メダカの遺伝子名の後ろには NCBI に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser の Genome assembly: MEDAKA1 における相同性の高い配列の番号を記載した。スケールバーは 5% (0.05) のアミノ酸変異を示す。

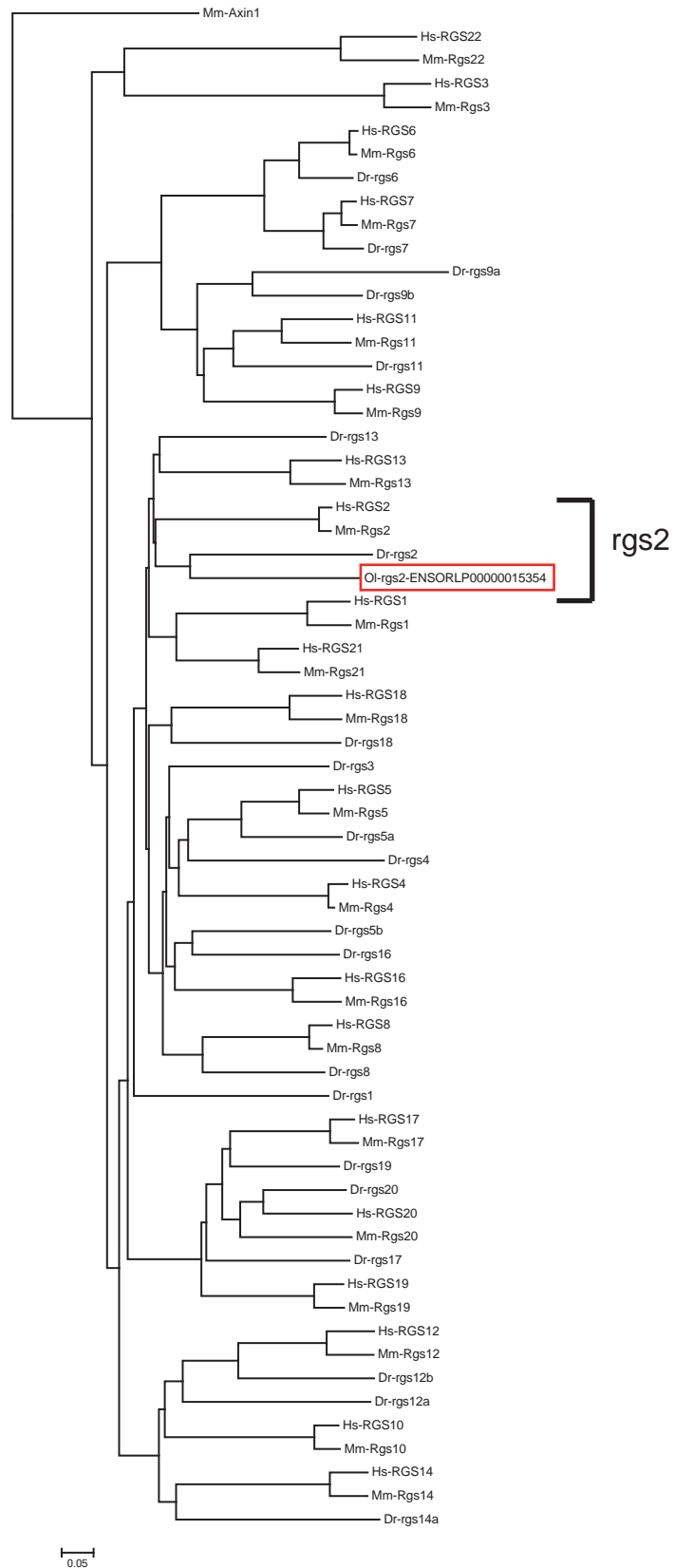


図 3-6 解析に使用した即初期遺伝子群 (IEGs) の類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹 -4

アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した rgs (regulator of G-protein signaling) 遺伝子ファミリーの分子系統樹を示す。

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) の 4 種の生物のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。

アウトグループとして axin-1 を使用した。解析に使用した遺伝子は赤枠で囲った。メダカの遺伝子名の後ろには NCBI に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser の Genome assembly: MEDAKA1 における相同性の高い配列の番号を記載した。スケールバーは 5% のアミノ酸変異を示す。

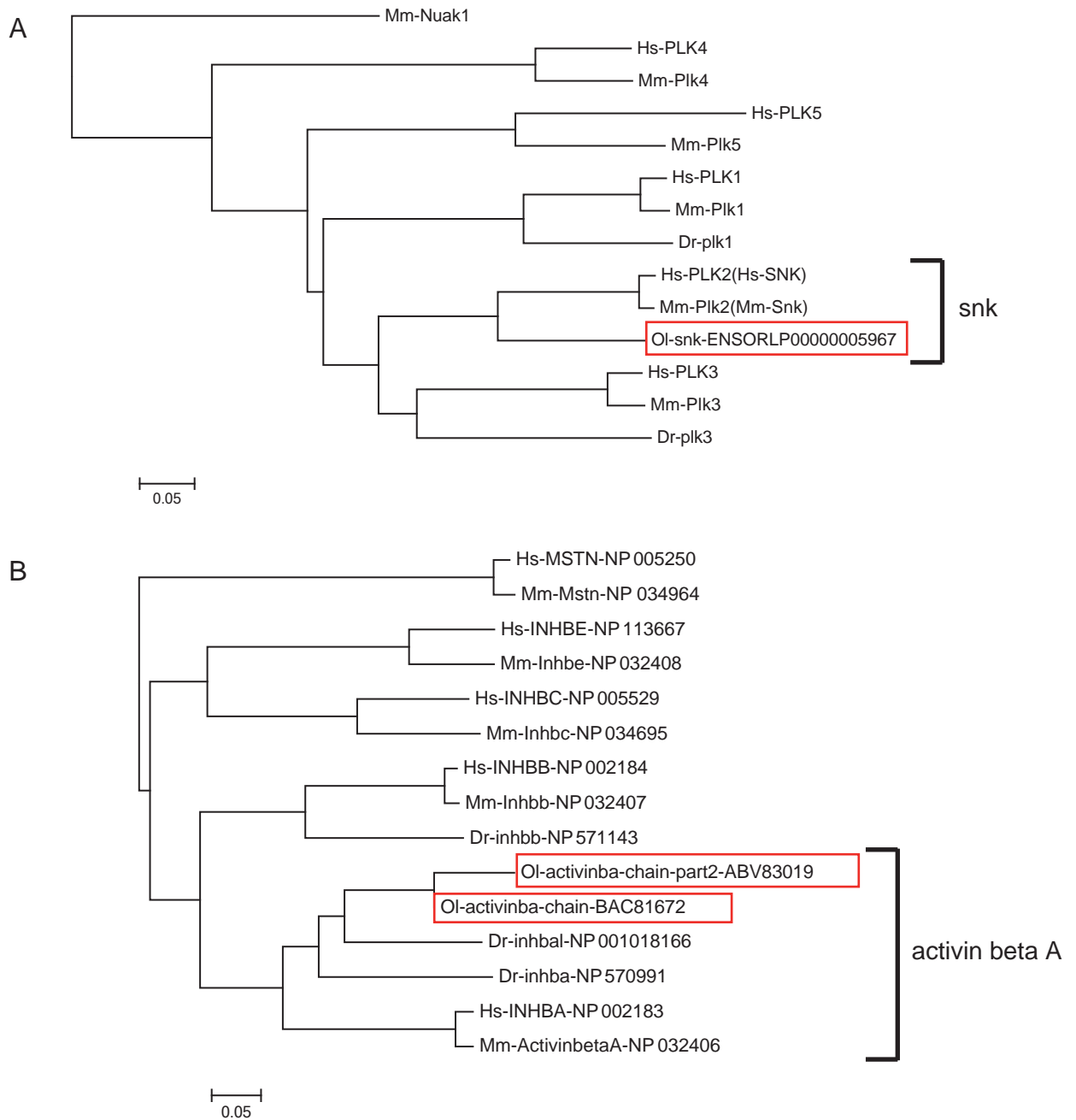


図 3-7 解析に使用した即初期遺伝子群 (IEGs) の類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹 -5 アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した分子系統樹を示す。

A. plk (polo-like kinase) 遺伝子ファミリーの系統樹

B. activin beta (inhibin beta) 遺伝子ファミリーの系統樹

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) の 4 種の生物のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。それぞれアウトグループとして Nuak (NUAK family SNF1-like kinase 1)、Mstn (Myostatin) を使用した。解析に使用した遺伝子は赤枠で囲った。メダカ遺伝子名の後ろには NCBI に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser の Genome assembly: MEDAKA1 における相同性の高い配列の番号を記載した。スケールバーは 5% のアミノ酸変異を示す。

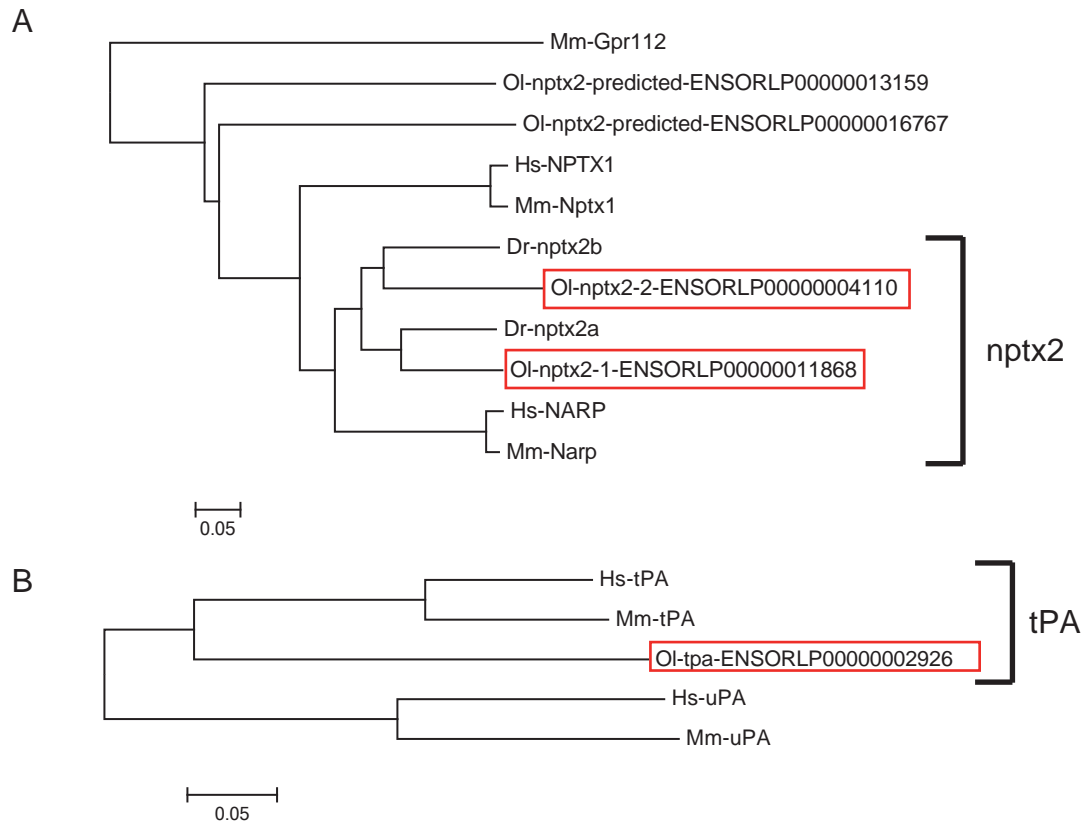


図 3-8 解析に使用した即初期遺伝子群 (IEGs) の類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹 -6
アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した分子系統樹を示す。

A. narp (neuronal activity-regulated pentraxin) 遺伝子ファミリーの系統樹

B. tPA (tissue-type plasminogen activator preproprotein) 遺伝子の系統樹

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio relio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) の 4 種の生物のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。それぞれアウトグループとして Gpr112 (G protein-coupled receptor 112)、uPA (urokinase-type plasminogen activator isoform 1 preproprotein) を使用した。解析に使用した遺伝子は赤枠で囲った。メダカの遺伝子名の後には NCBI に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser の Genome assembly: MEDAKA1 における相同性の高い配列の番号を記載した。スケールバーは 5% のアミノ酸変異を示す。

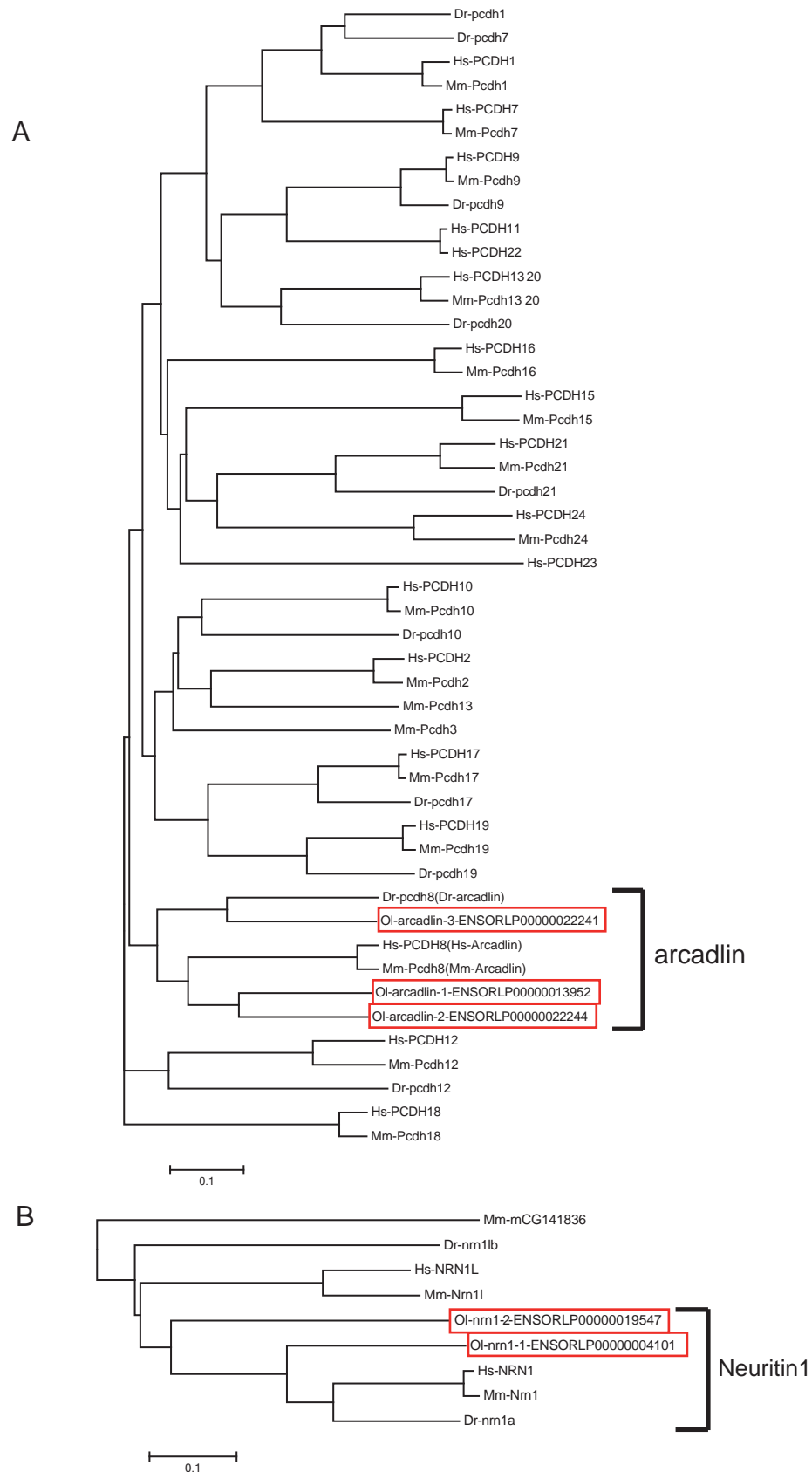


図 3-9 解析に使用した即初期遺伝子群 (IEGs) の類縁遺伝子ファミリーの分子系統樹 -7
アミノ酸配列の全長を基に、近接結合法 (NJ 法) によって作成した分子系統樹を示す。

A. PCDH (protocadherin) 遺伝子ファミリーの系統樹

B. Neuritin 遺伝子ファミリーの系統樹

ヒト (Hs: *Homo sapiens*)、マウス (Mm: *Mus musculus*)、ゼブラフィッシュ (Dr: *Danio rerio*)、メダカ (Ol: *Oryzias latipes*) の 4 種の生物のアミノ酸配列を基に系統樹を作成した。B のアウトグループとして mCG141836 と登録されているアミノ酸配列を使用した。解析に使用した遺伝子は赤枠で囲った。メダカのアミノ酸配列の後には NCBI に登録されている配列の場合、その accession number を、登録されていない場合は Ensembl genome browser の Genome assembly: MEDAKA1 における相同性の高い配列の番号を記載した。スケールバーは 10% (0.1) のアミノ酸変異を示す。

表3-3 本解析で取得したメダカIEGsの名称

機能	哺乳類におけるIEGsの名称	取得したメダカIEGsの名称
転写因子	c-fos	c-fos
	c-myc	c-myc
		c-myc20
	fosB	fosb-1
		fosb-2
	c-jun	c-jun-1
		c-jun-2
	junB	junb-1
		junb-2
		junb/c
junD	jund	
egr-1	egr1-1	
	egr1-2	
egr-2	egr2-1	
	egr2-2	
NGFI-B	ngfi-b-1	
	ngfi-b-2	
ポストシナプスタンパク質	Homer1	homer1a
		homer1b
細胞内シグナリング	rheb	rheb-1
		rheb-2
	RSG2	rgs2
SNK (PIk2)	snk	
分泌因子	Activin betaA	activinba-1
		activinba-2
	Narp	nptx2-1
nptx2-2		
tPA	tpa	
膜タンパク質	Arcadlin	arcadlin-1
		arcadlin-2
		arcadlin-3
	Neuritin	neuritin1-1
neuritin1-2		

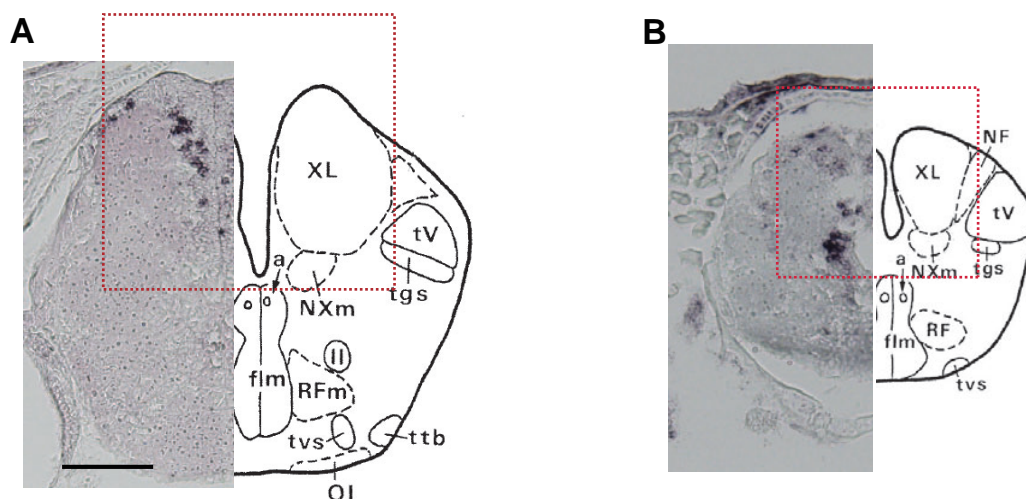
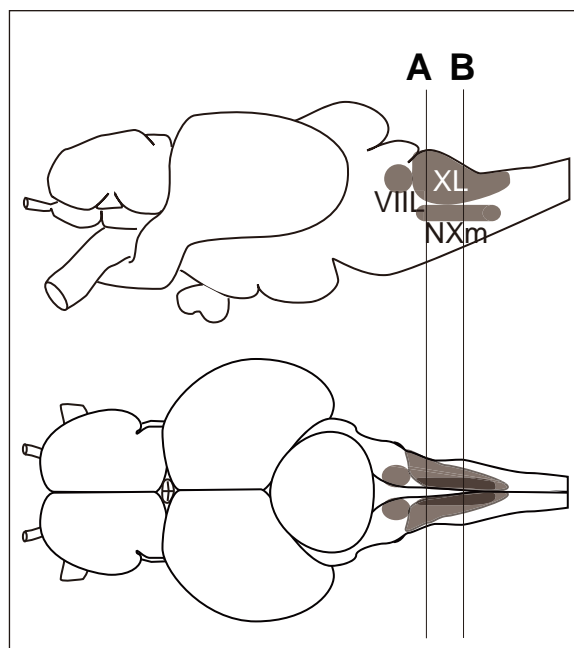


図 3-10 呈味物質摂取により味覚中枢で発現する IEGs の選抜に用いる脳領域の図
 上部にメダカ脳の模式図を載せた。左側面から見た図。下段は上から見た図。A, B は各々下
 段の冠状切片の断面にあたる。下段の写真はこれ以降の解析で用いた解析結果から一部引用
 した。A, B の右側の模式図は第 2 章同様に Ishikawa らのメダカ脳アトラスを引用した。
 A, XL 前方部 (XLant) を含むメダカ冠状切片
 B, XL 後方部 (XLpost) を含むメダカ冠状切片
 以降の解析 (図 3-11 ~ 23) は A, B の赤破線の部位を解析対象とした。
 VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核
 スケールバーは 100 μ m

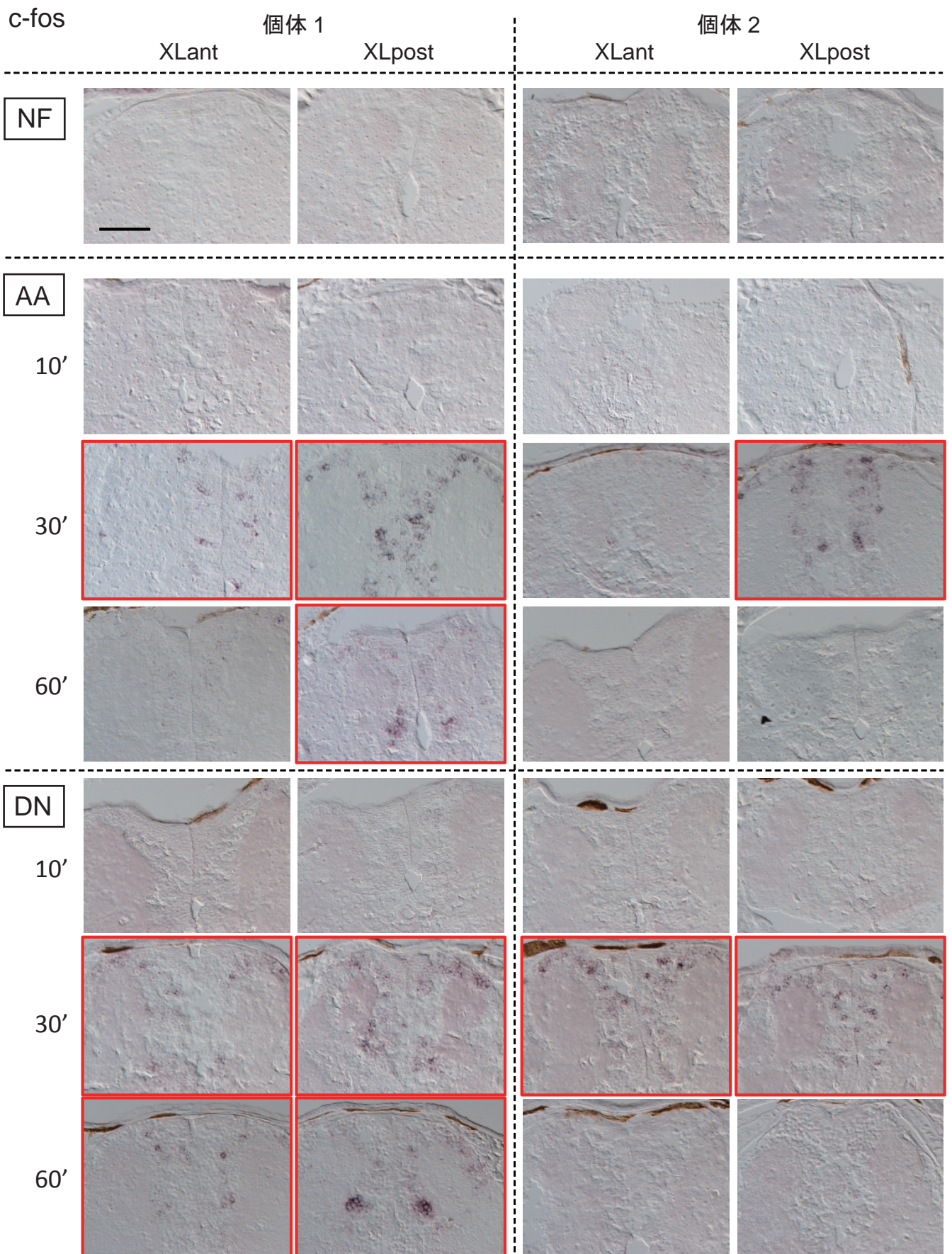


図 3-11 延髄の味覚中枢における c-fos の発現解析 (AA 餌、DN 餌投与群の両方で、再現的に発現が観察された遺伝子 -1) 1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、c-fos の発現の有無を解析した。

NF, 24 時間絶食後、餌を与えずに固定した群

AA, 24 時間絶食後、アミノ酸含有餌を摂取させ、10 分後、30 分後、60 分後に固定した群

DN, 24 時間絶食後、デナトニウム含有餌を摂取させ、10 分後、30 分後、60 分後に固定した群

XL の前方 (XLant) と XL の後方 (XLpost) の 2 か所を観察し、各群 2 個体ずつ解析した。

餌摂取後固定までの時間に合わせて各々 10'、30'、60' と表記した。発現が観察された写真は赤枠で囲った。

スケールバーは 50 μm

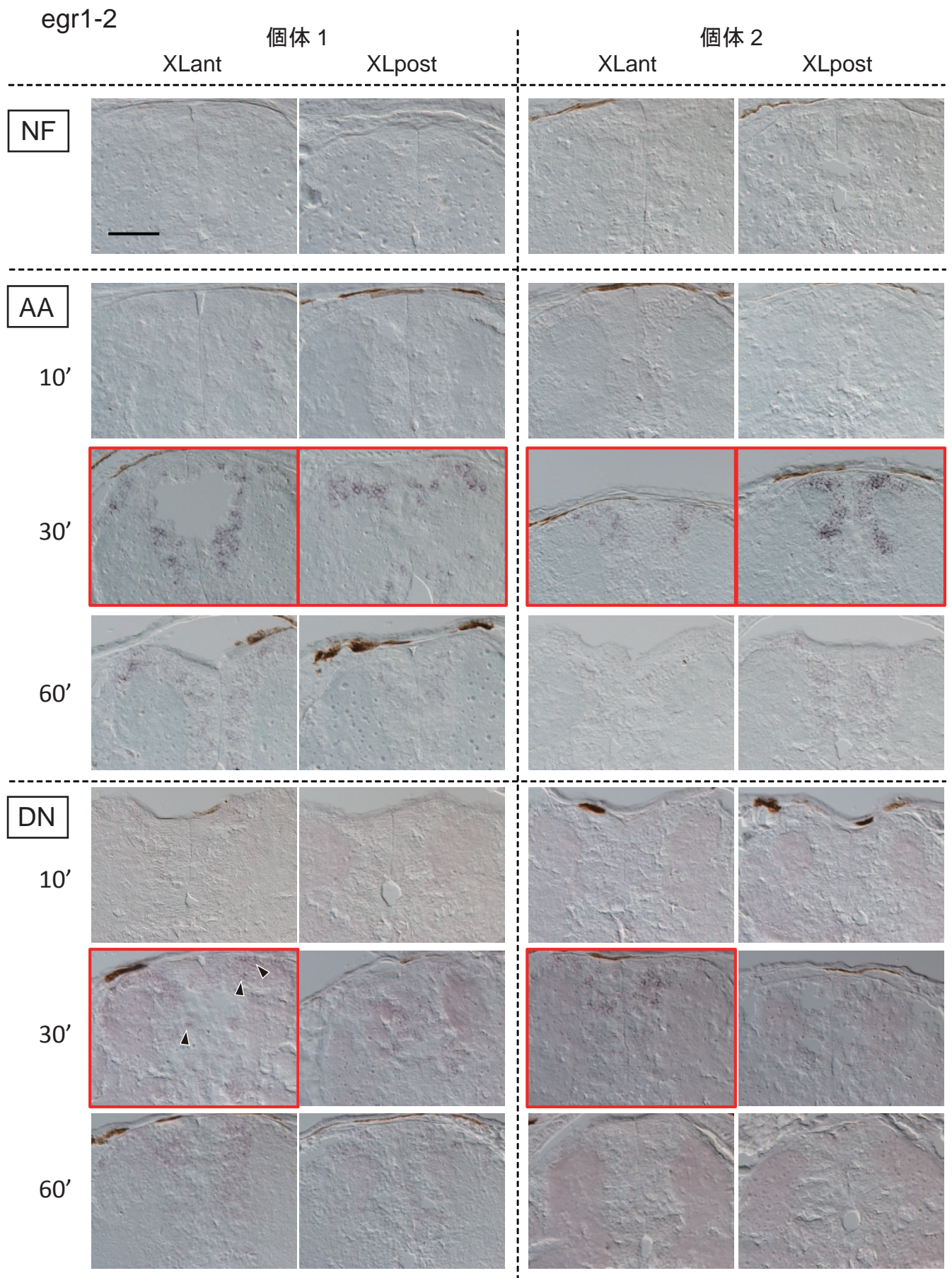


図 3-12 延髄の味覚中枢における *egr1-2* の発現解析 (AA 餌、DN 餌投与群の両方で、再現的に発現が観察された遺伝子 -2)

1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、*egr1-2* の発現の有無を解析した。

図の説明は図 3-11 と同様である。

発現が観察された写真は赤枠で囲った。発現がわかりにくい写真には陽性細胞と判断した部分にやじりを入れた。スケールバーは 50 μm

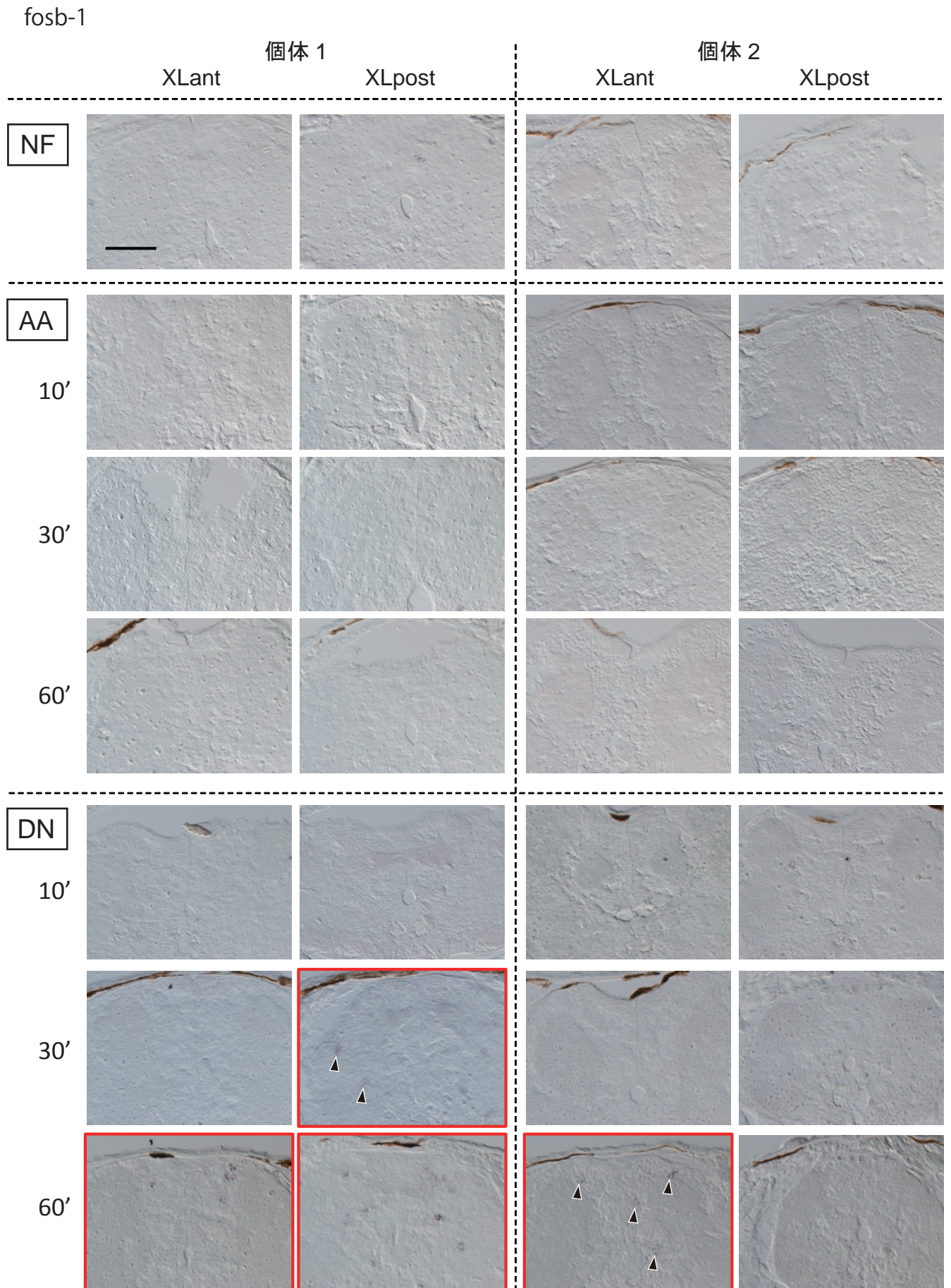


図 3-13 延髄の味覚中枢における fosb-1 の発現解析 (DN 餌投与群で、再現的に発現が観察された遺伝子 -1)
 1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、fosb-1 の発現の有無を解析した。
 図の説明は図 3-11 と同様である。
 発現が観察された写真は赤枠で囲った。
 スケールバーは 50 μ m

fosb-2

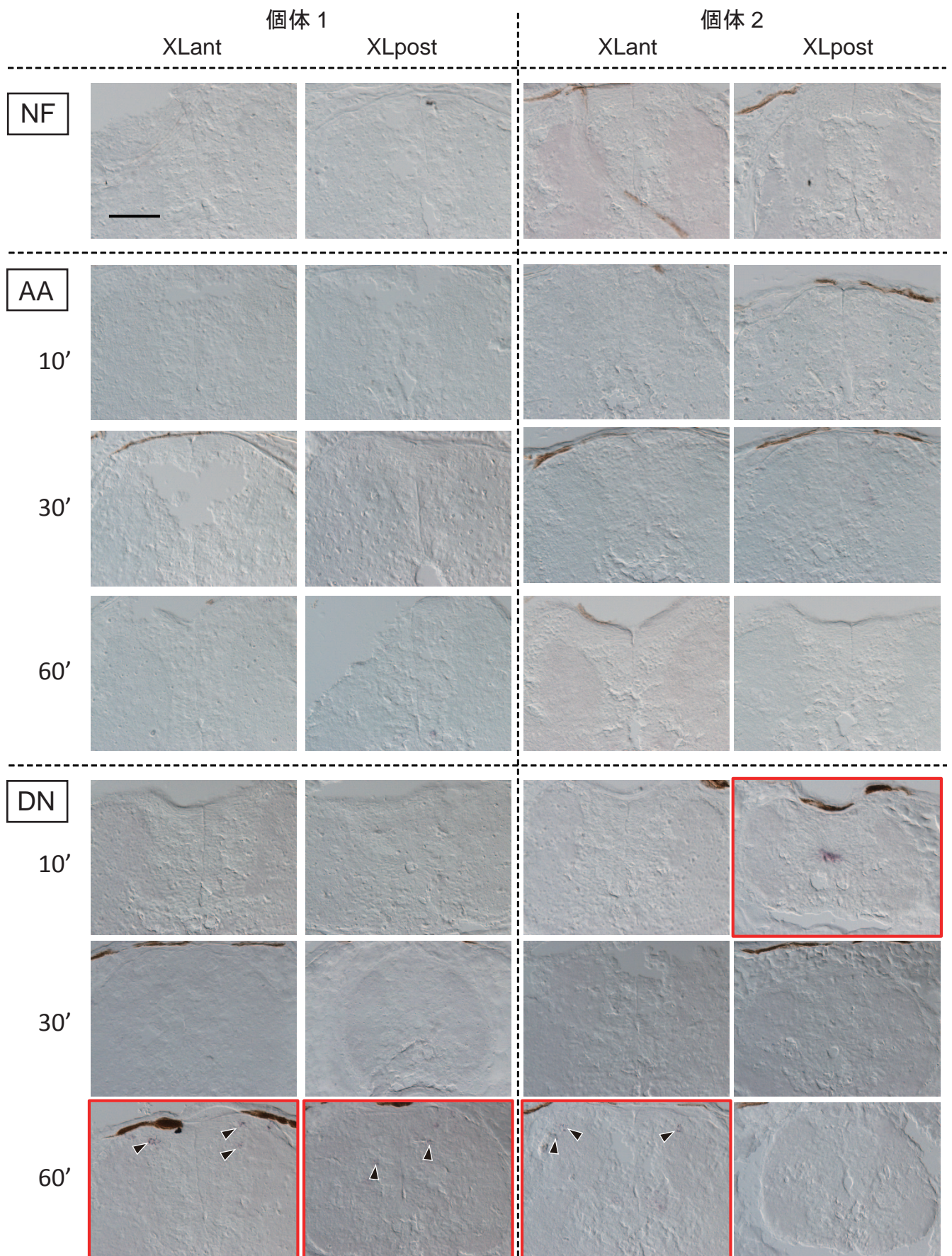


図 3-14 延髄の味覚中枢における fosb-2 の発現解析 (DN 餌投与群で、再現的に発現が観察された遺伝子 -2) 1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、fosb-2 の発現の有無を解析した。

図の説明は図 3-11 と同様である。

発現が観察された写真は赤枠で囲った。発現がわかりにくい写真には陽性細胞と判断した部分にやじりを入れた。

スケールバーは 50 μm

c-myc

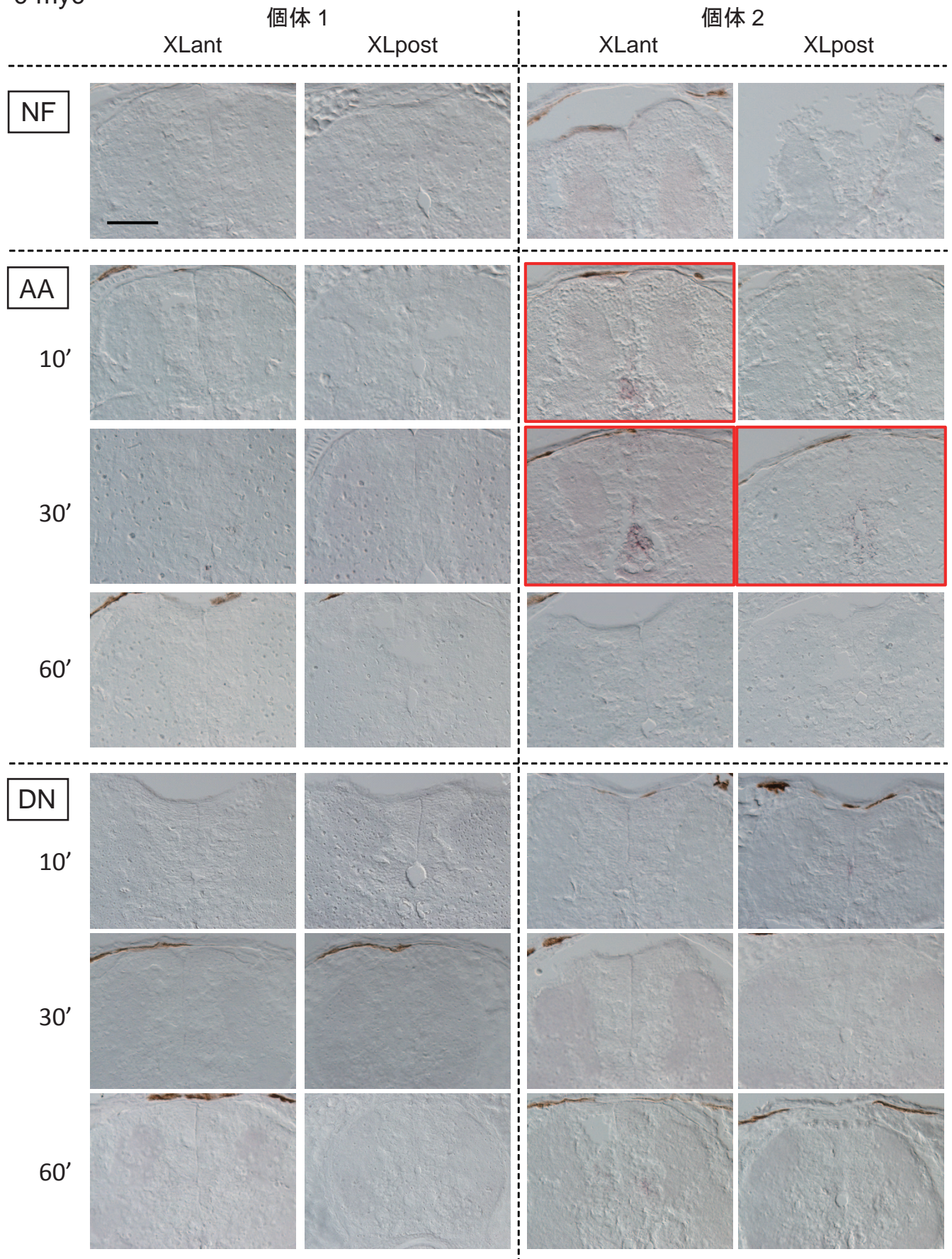


図 3-15 延髄の味覚中枢における c-myc の発現解析 (再的に発現が観察されなかったが餌摂取により応答する個体が存在した遺伝子 -1)

1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、c-myc の発現の有無を解析した。

図の説明は図 3-11 と同様である。

発現が観察された写真は赤枠で囲った。

スケールバーは 50 μm

ngfi-b-1

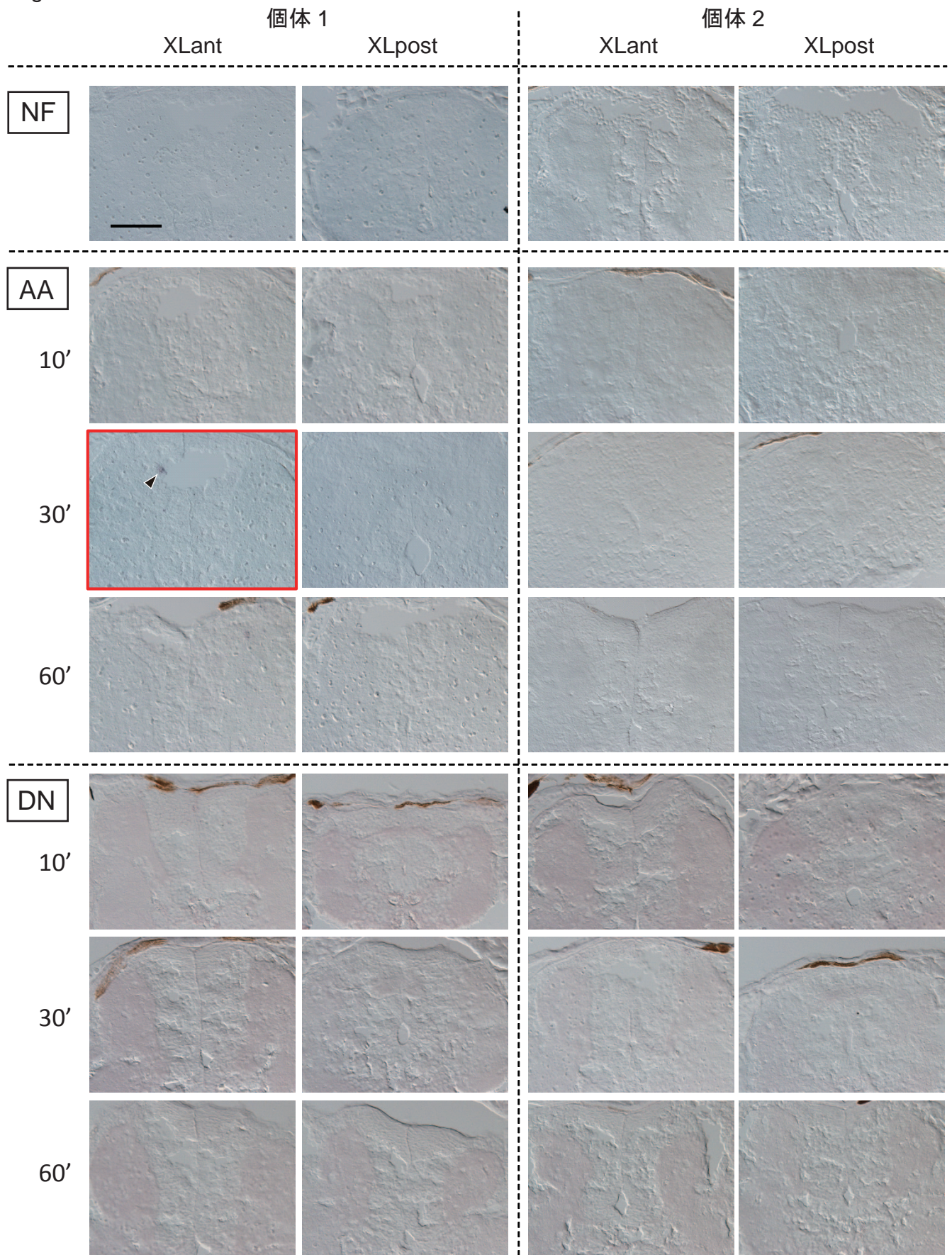


図 3-16 延髄の味覚中枢における ngfi-b-1 の発現解析 (再現的に発現が観察されなかったが餌摂取により応答する個体が存在した遺伝子 -2)

1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、ngfi-b-1 の発現の有無を解析した。

図の説明は図 3-11 と同様である。

発現が観察された写真は赤枠で囲った。発現がわかりにくい写真には陽性細胞と判断した部分にやじりを入れた。

スケールバーは 50 μm

nptx2-1

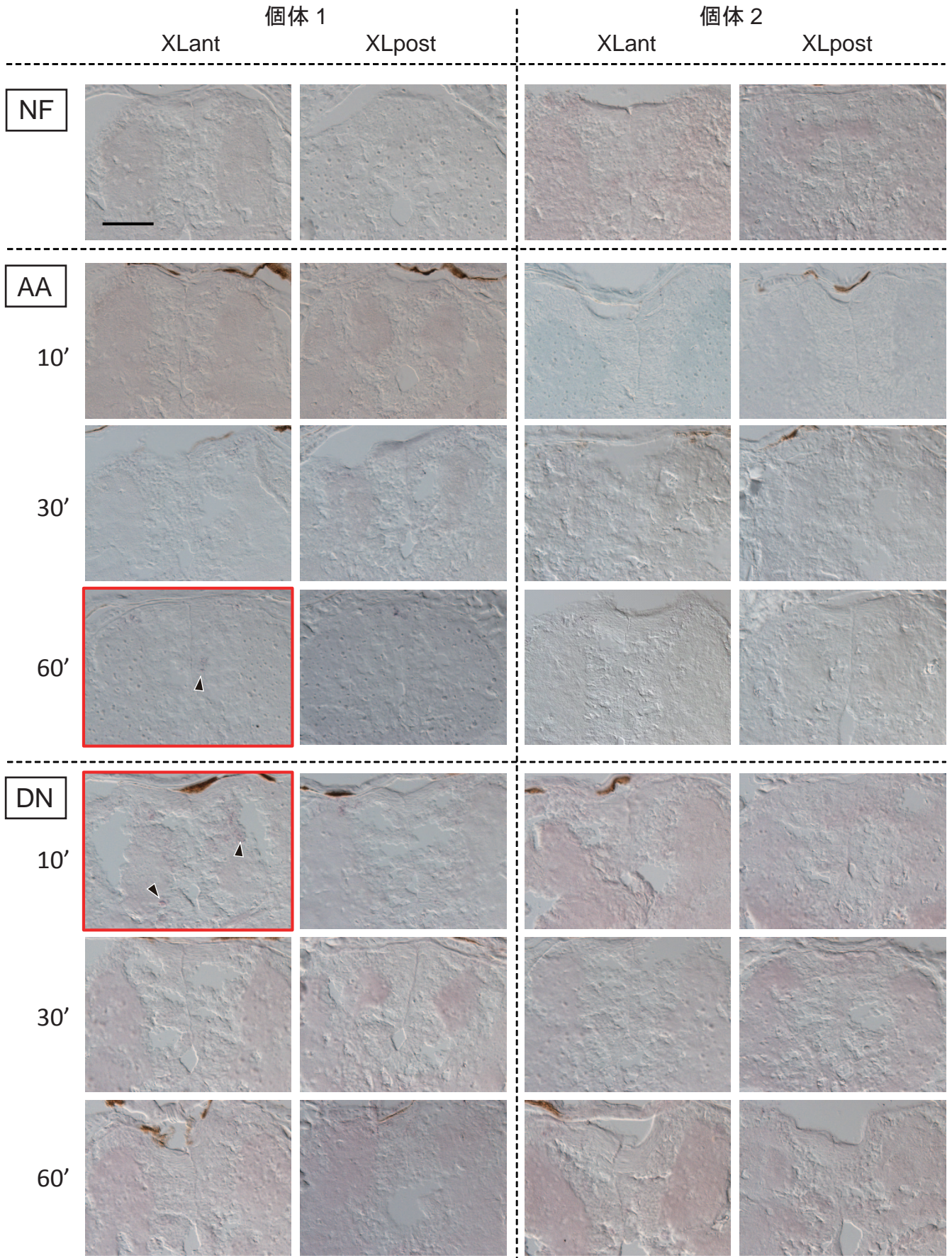


図 3-17 延髄の味覚中枢における nptx2-1 の発現解析 (再現的に発現が観察されなかったが、餌摂取により応答する個体が存在した遺伝子 -3)

1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、nptx2-1 の発現の有無を解析した。

図の説明は図 3-11 と同様である。

発現が観察された写真は赤枠で囲った。発現がわかりにくい写真には陽性細胞と判断した部分にやじりを入れた。

スケールバーは 50 μ m

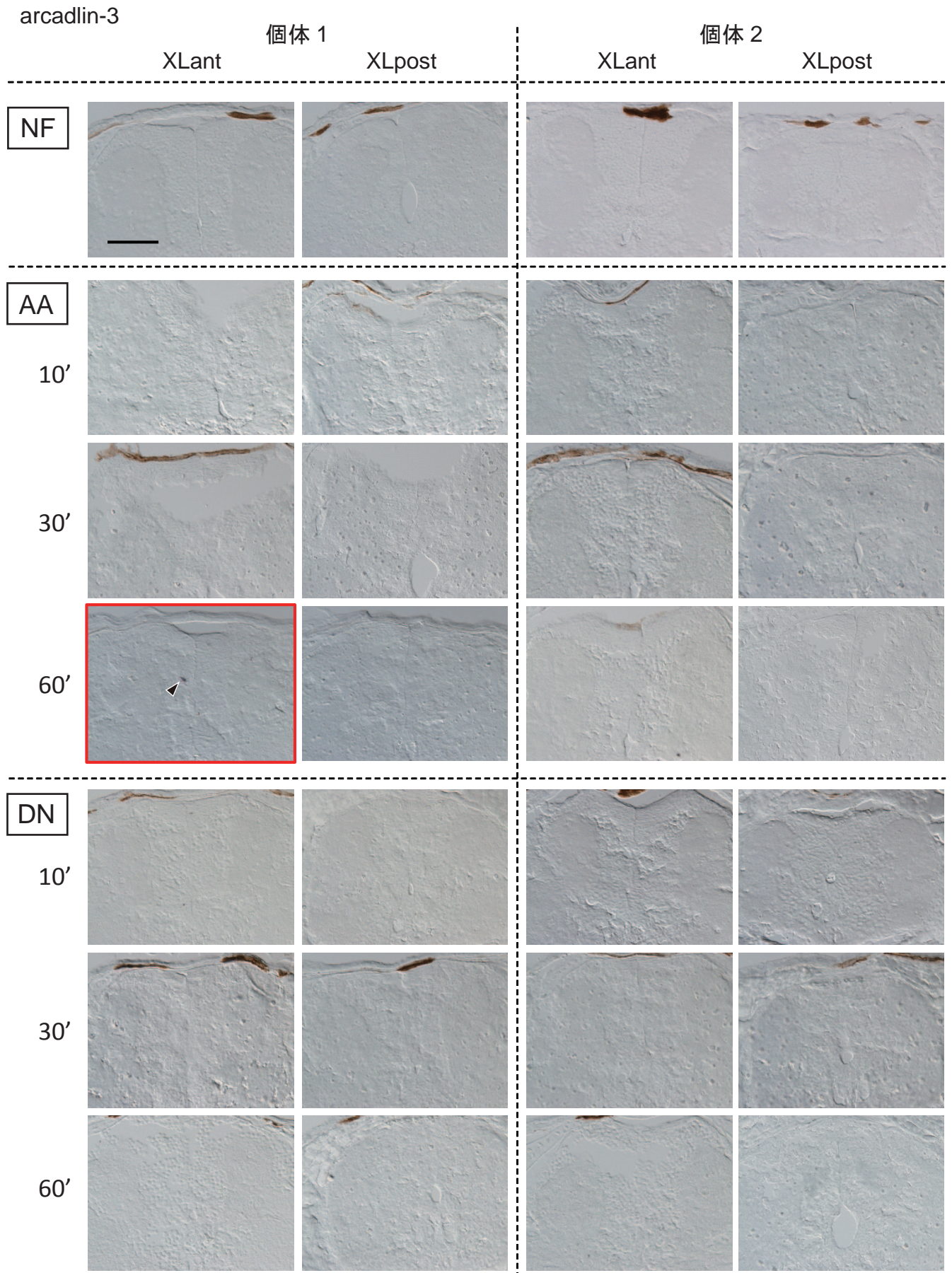


図 3-18 延髄の味覚中枢における arcadlin-3 の発現解析（再現的に発現が観察されなかったが、餌摂取により応答する個体が存在した遺伝子 -4）

1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、arcadlin-3 の発現の有無を解析した。図の説明は図 3-11 と同様である。

発現が観察された写真は赤枠で囲った。発現がわかりにくい写真には陽性細胞と判断した部分にやじりを入れた。

スケールバーは 50 μ m

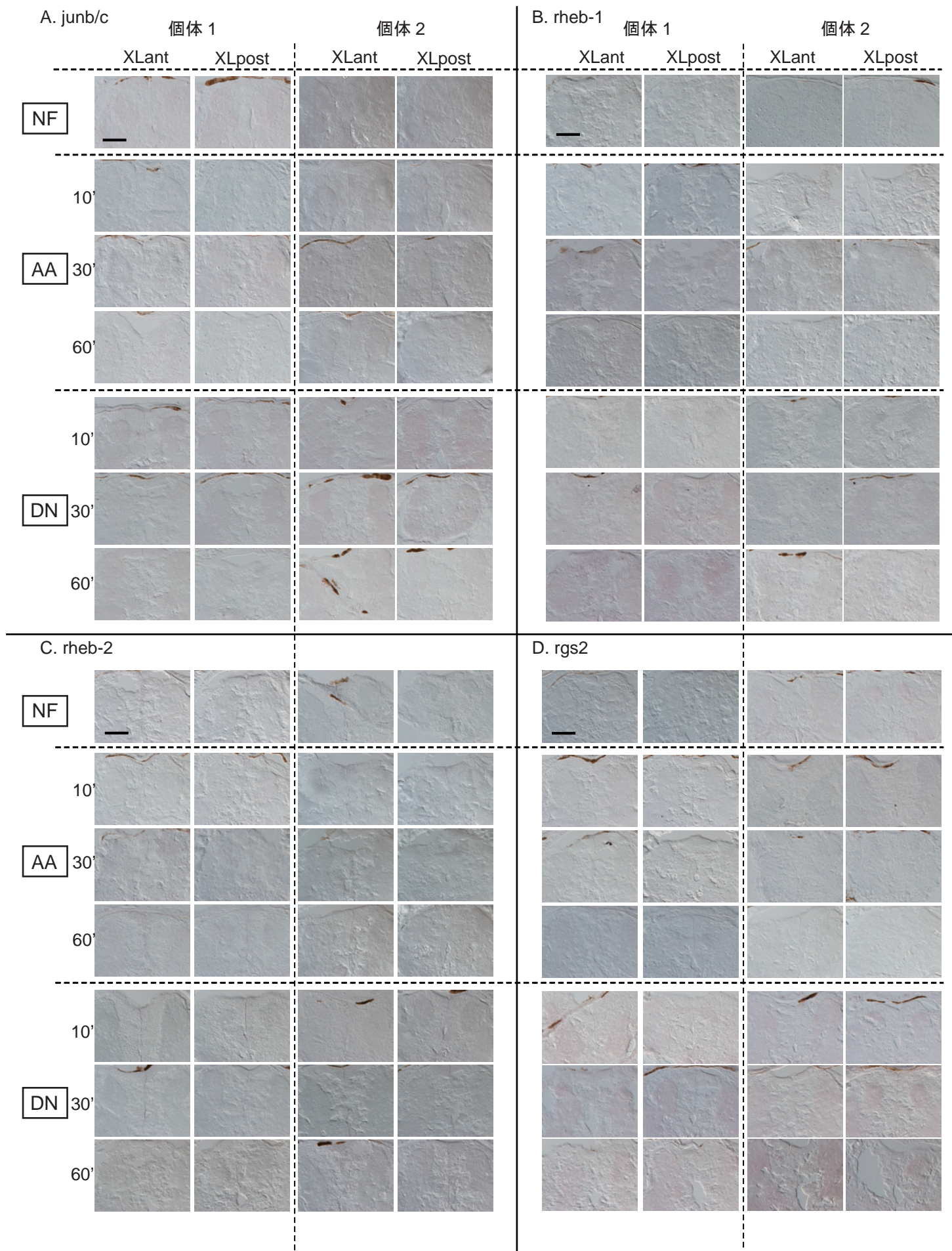


図 3-19 延髄の味覚中枢における *junb/c*, *rheb-1*, *rheb-2*, *rgs2* の発現解析 (全ての群で応答が観察されなかった遺伝子群 -1)

1か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、*junb/c*(左上段, A), *rheb-1*(右上段, B), *rheb-2*(左下段, C), *rgs2* (右下段, D) の発現の有無を解析した。解析した群は図 3-11 ~ 18 までと同様に NF, AA10, AA30, AA60, DN10, DN30, DN60 群の計 7 群である。基本的な図の説明は図 3-11 と同様である。

スケールバーは 50 μ m

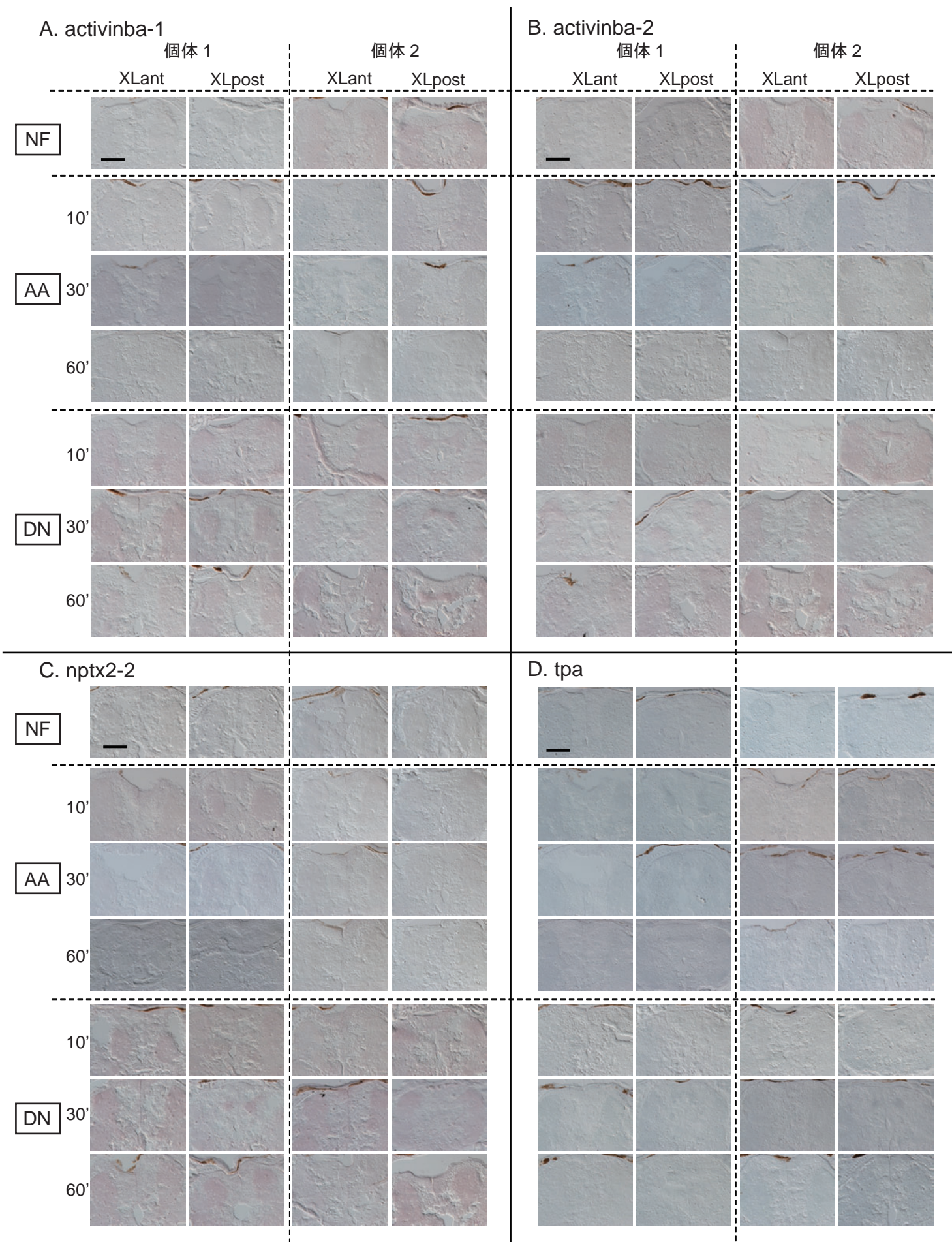


図 3-20 延髄の味覚中枢における *activinba-1*, *activinba-2*, *nptx2-2*, *tpa* の発現解析 (全ての群で応答が観察されなかった遺伝子群 -2)

1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、*activinba-1* (左上段, A), *activinba-2* (右上段, B), *nptx2-2* (左下段, C), *tpa* (右下段, D) の発現の有無を解析した。解析した群は図 3-11 ~ 18 までと同様に NF, AA10, AA30, AA60, DN10, DN30, DN60 群の計 7 群である。基本的な図の説明は図 3-11 と同様である。

スケールバーは 50 μ m

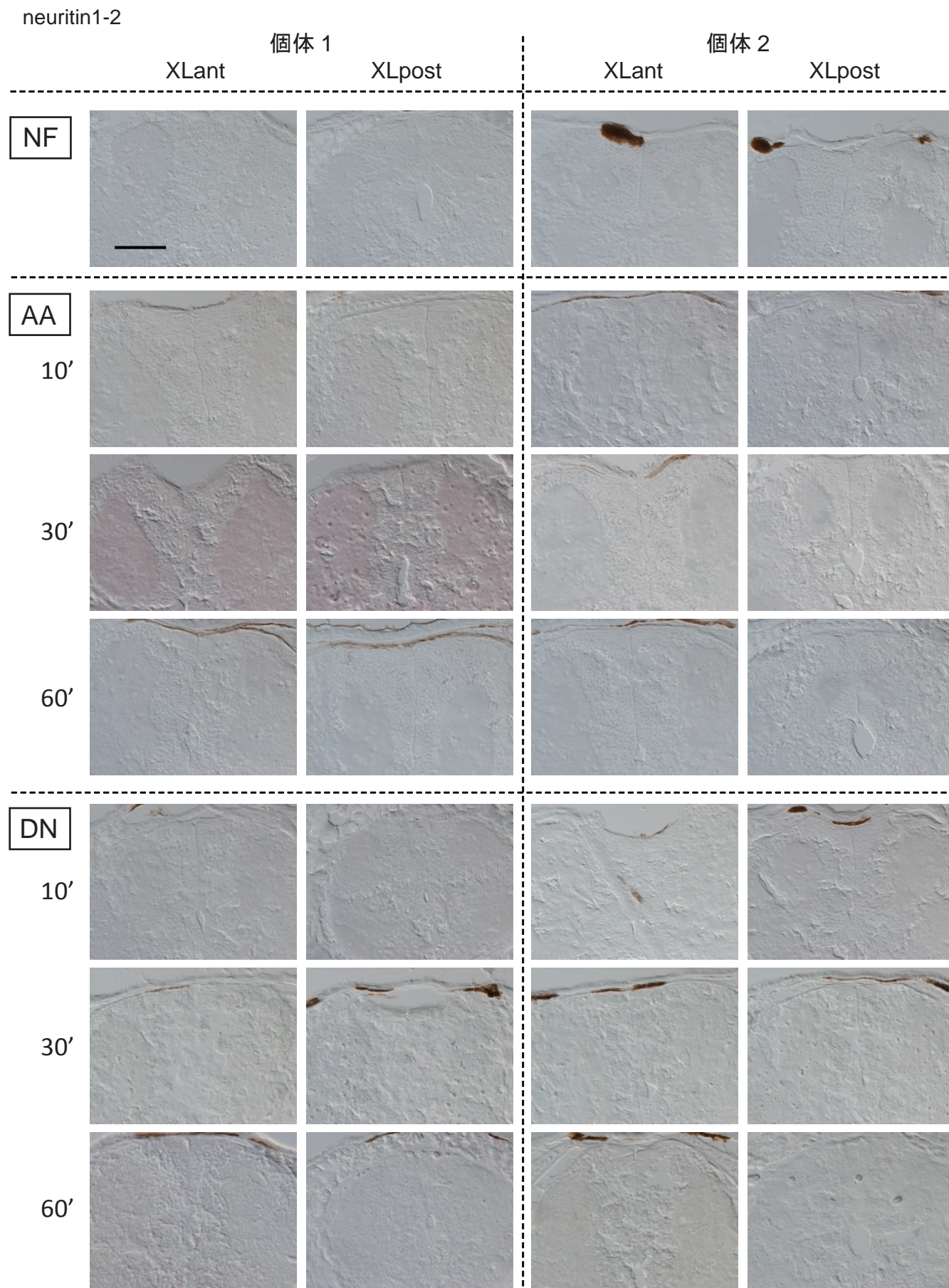


図 3-21 延髄の味覚中枢における neuritin1-2 の発現解析 (全ての群で応答が観察されなかった遺伝子群 -3)
 1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、neuritin1-2 の発現の有無を解析した。
 解析した群は図 3-11 ~ 18 までと同様に NF, AA10, AA30, AA60, DN10, DN30, DN60 群の計 7 群である。
 基本的な図の説明は図 3-11 と同様である。
 スケールバーは 50 μ m

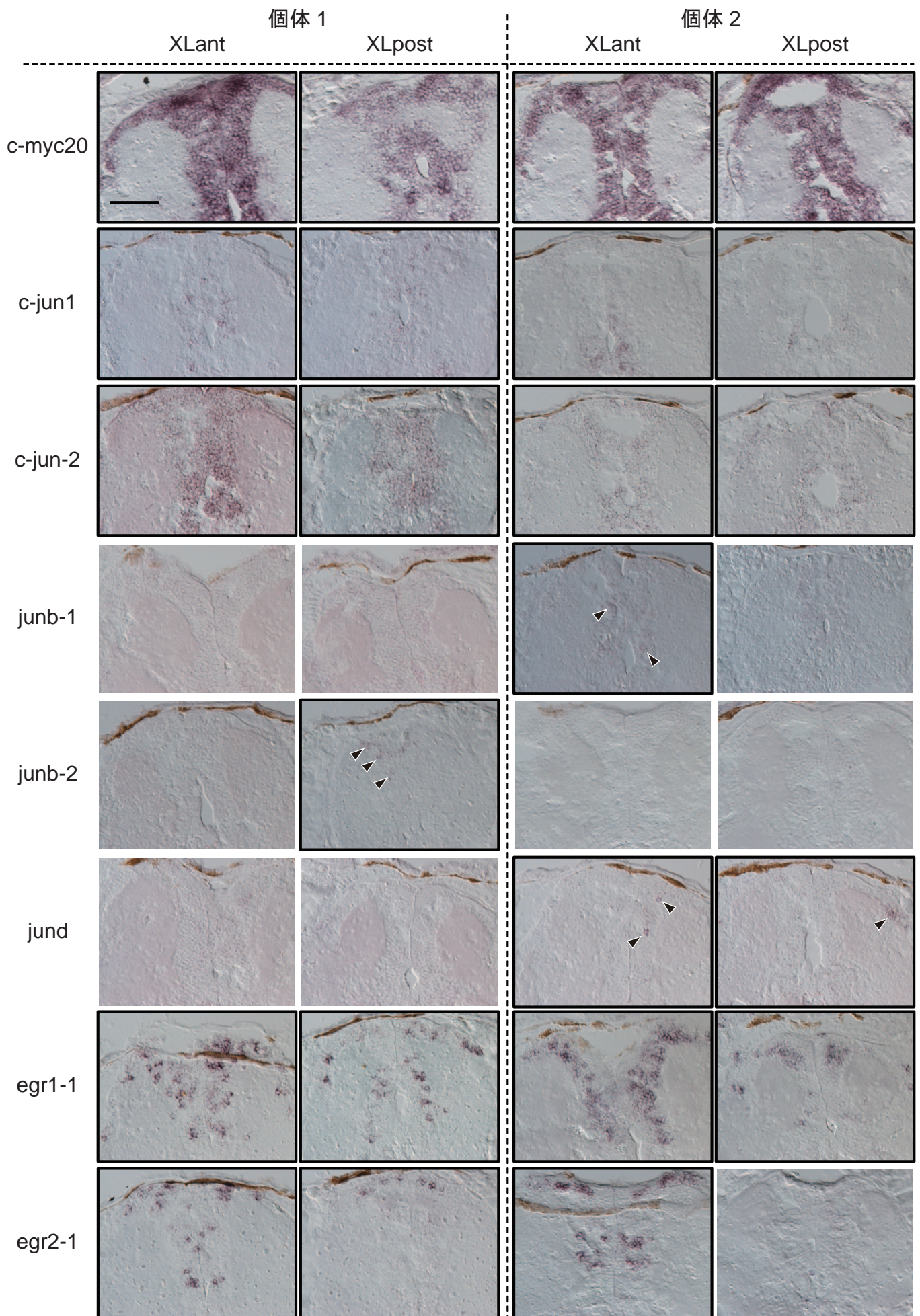


図 3-22 延髄の味覚中枢における IEGs の発現解析 (NF 群の 1 個体以上で発現が観察された遺伝子群 -1)

1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、c-myc20, c-jun1, c-jun2, junb-1, junb-2, jund, egr1-1, egr2-1 の発現の有無を解析した。NF 群において観察した結果のみを載せた。他の遺伝子と同様に XL の前方 (XLant) と XL の後方 (XLpost) を解析した。発現が観察された写真は黒枠で囲い、発現がわかりにくい写真には陽性細胞と判断した細胞にやじりを入れた。スケールバーは 50 μ m

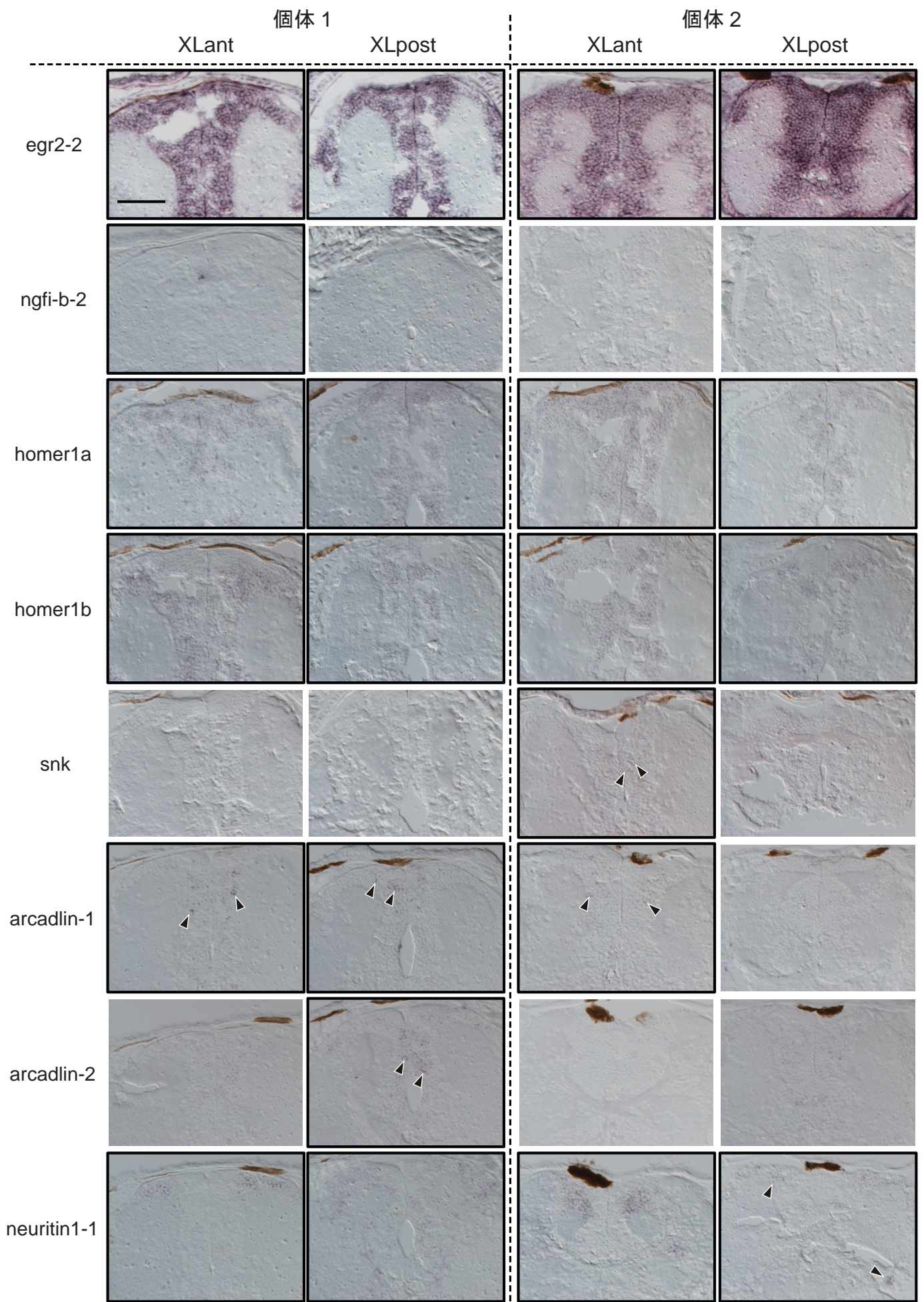


図 3-23 延髄の味覚中枢における IEGs の発現解析 (NF 群の 1 個体以上で発現が観察された遺伝子群 -2)
 1 か月齢メダカの味覚中枢 XL を含む冠状切片を用いて ISH を行い、egr2-2, ngfi-b-2, homer1a, homer1b, snk, arcadlin-1, arcadlin-2, neuritin1-1 の発現の有無を解析した。NF 群において観察した結果のみを載せた。他の遺伝子と同様に XL の前方 (XLant) と XL の後方 (XLpost) を解析した。発現が観察された写真は黒枠で囲い、発現がわかりにくい写真には陽性細胞と判断した細胞にやじりを入れた。スケールバーは 50 μ m

表3-4 呈味物質摂取により発現するIEGsの選抜の結果

哺乳類における IEGsの名称	取得したメダカ IEGsの名称	NF		AA餌						DN餌					
				投与後10'		投与後30'		投与後60'		投与後10'		投与後30'		投与後60'	
		個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2
c-fos	c-fos	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
c-myc	c-myc	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	c-myc20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fosB	fosb-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	fosb-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
c-jun	c-jun-1	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
	c-jun-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
junB	junb-1	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
	junb-2	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	junb/c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
junD	jund	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
egr-1	egr1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	egr1-2	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
egr-2	egr2-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	egr2-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NGFI-B	ngfi-b-1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ngfi-b-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Homer1	homer1a	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	homer1b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
rheb	rheb-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	rheb-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RSG2	rgs2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNK (PIk2)	snk	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Activin betaA	activinba-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	activinba-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Narp	nptx2-1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	nptx2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tPA	tpa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arcadlin	arcadlin-1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	arcadlin-2	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
	arcadlin-3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Neuritin	neuritin1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	neuritin1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: XLの前方部または後方部において陽性細胞が観察された個体

-: XLの前方部、後方部いずれにおいても陽性細胞が観察されなかった個体

NF群では発現が観察されず、かつAA餌およびDN餌両方の餌を摂取した場合でも再現的に発現が観察された遺伝子

NF群では発現が観察されず、かつAA餌またはDN餌どちらかを摂取した場合のみ再現的に発現が観察された遺伝子

上記以外で、NF群では発現が観察されず、餌を摂取したいずれかの群において少なくとも1個体において発現が観察された遺伝子

どの群でも一つも明確な発現が観察されなかった遺伝子

NF群において発現細胞が観察された遺伝子

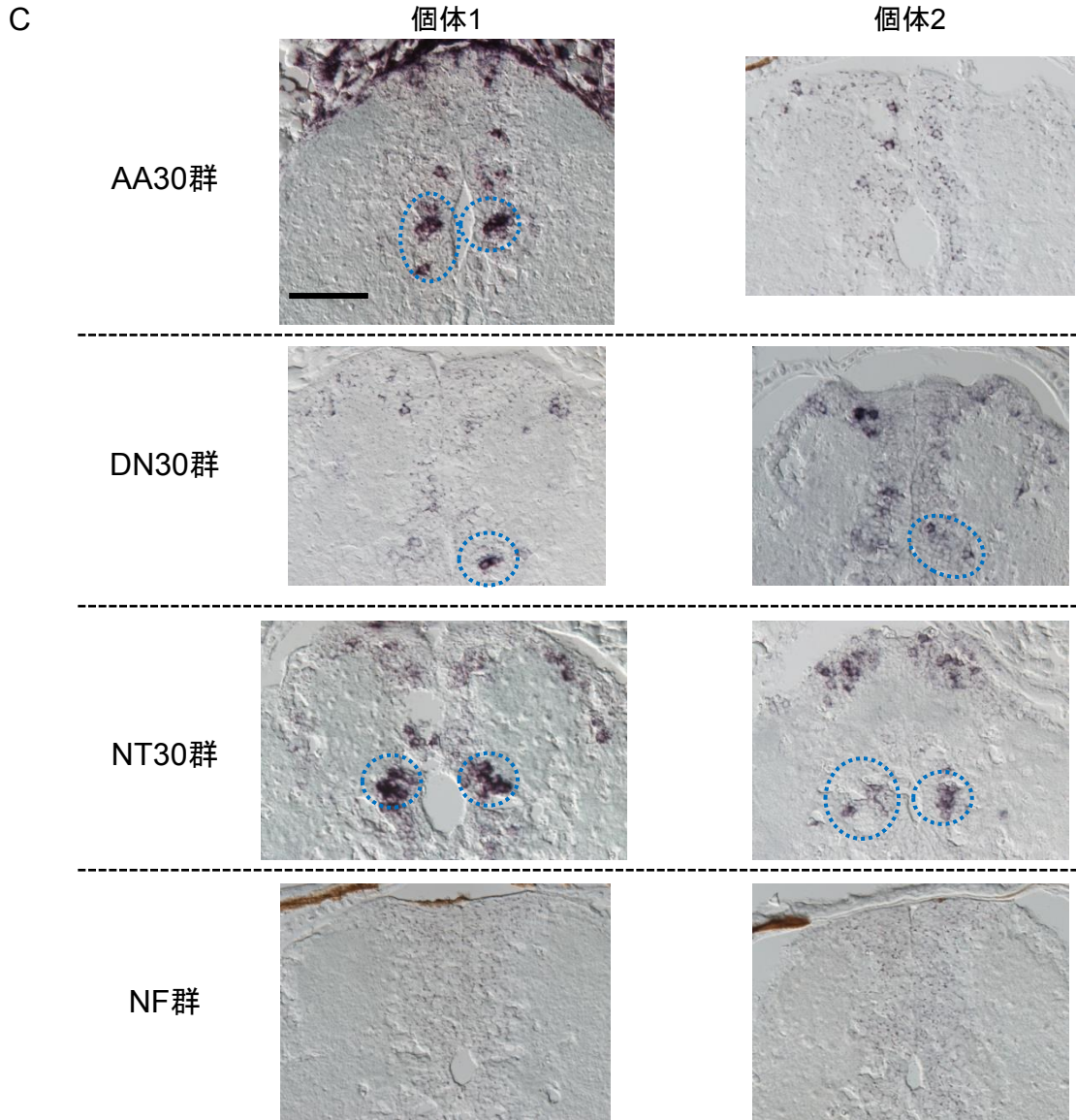
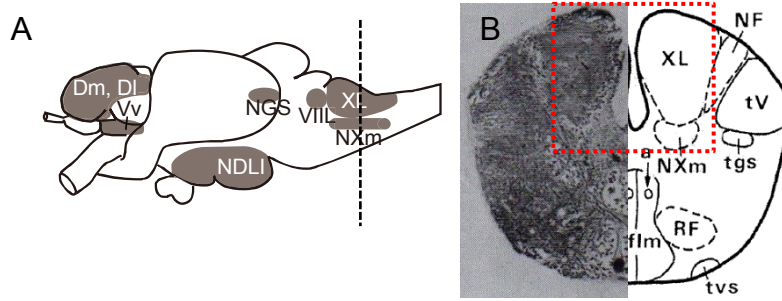


図3-24 c-fosの味覚中枢での発現解析-1 (XLの後方部とNXm)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてXL後方部とNXmを含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果はCに記載した。解析した脳切片の位置がわかるように脳の側面から見た模式図 (A) と冠状切片の写真 (B) を上部に載せた。Aでは、過去の解析からメダカの味覚中枢と示唆される領域および終脳のいくつかの神経核をグレーで示した (以降図3-46まで同様)。領域の位置はIshikawa et al., 1999を参照して作製した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。青破線はNXmにおける陽性細胞。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは50 μm

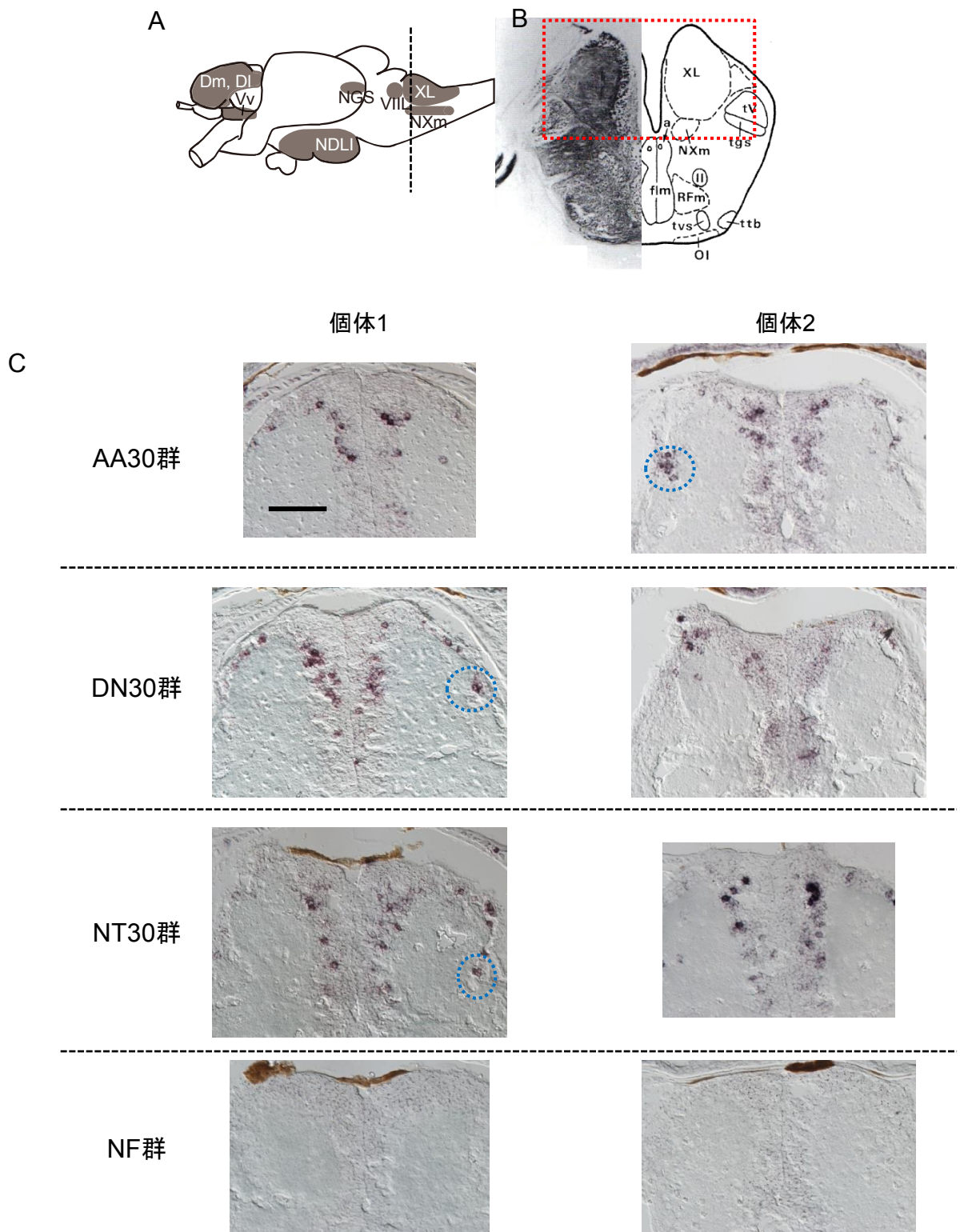


図3-25 c-fosの味覚中枢での発現解析-2 (XLの前方部とtv)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてXL前方部とtvを含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果はCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図(A)と冠状切片の模式図(B)を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。青破線はtvにおける陽性細胞。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、tv: 三叉神経下行根
スケールバーは50 μm

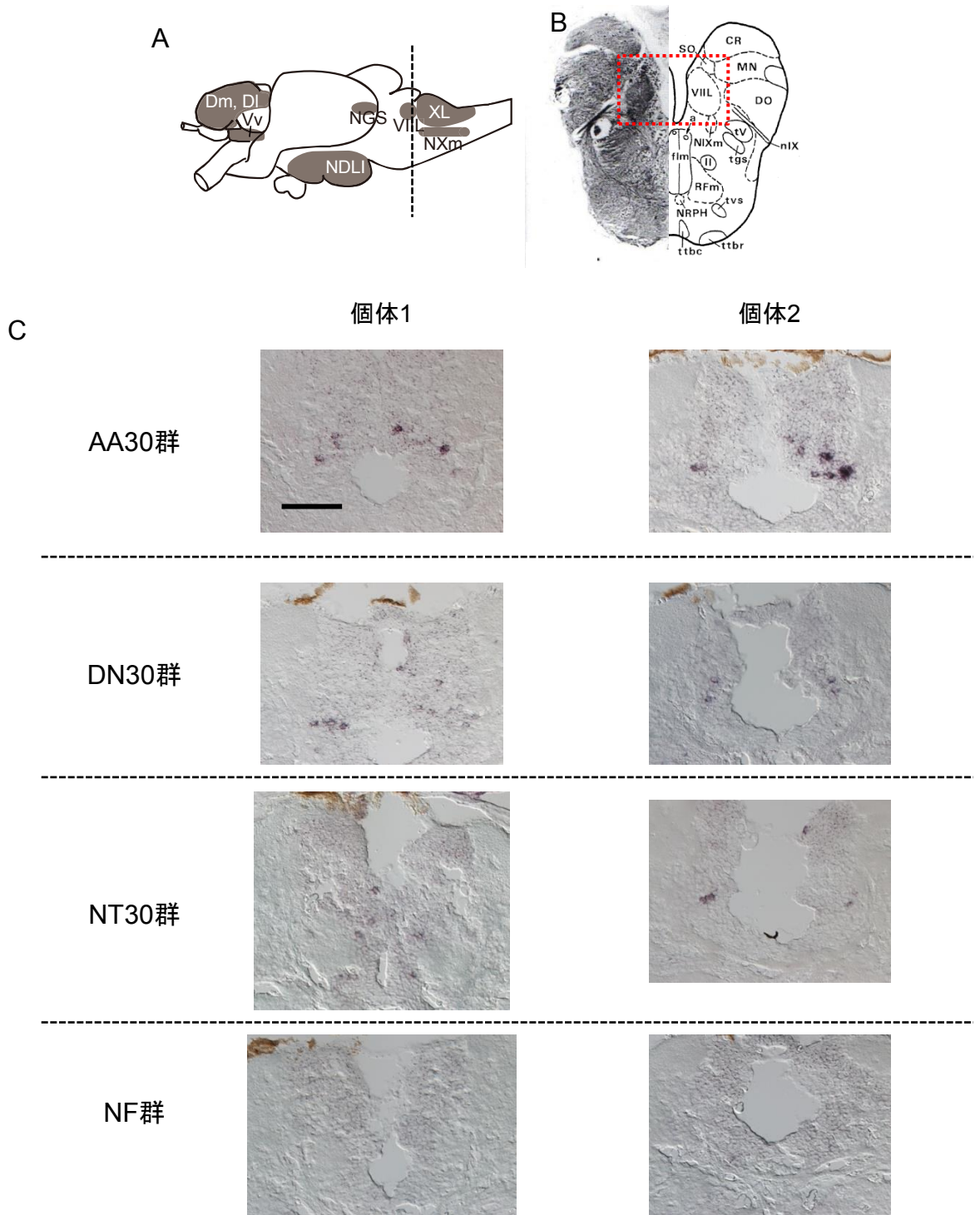


図3-26 c-fosの味覚中枢での発現解析-3 (VII)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてVIIを含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果はCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図 (A) と冠状切片の模式図 (B) を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。

VII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは50 μm

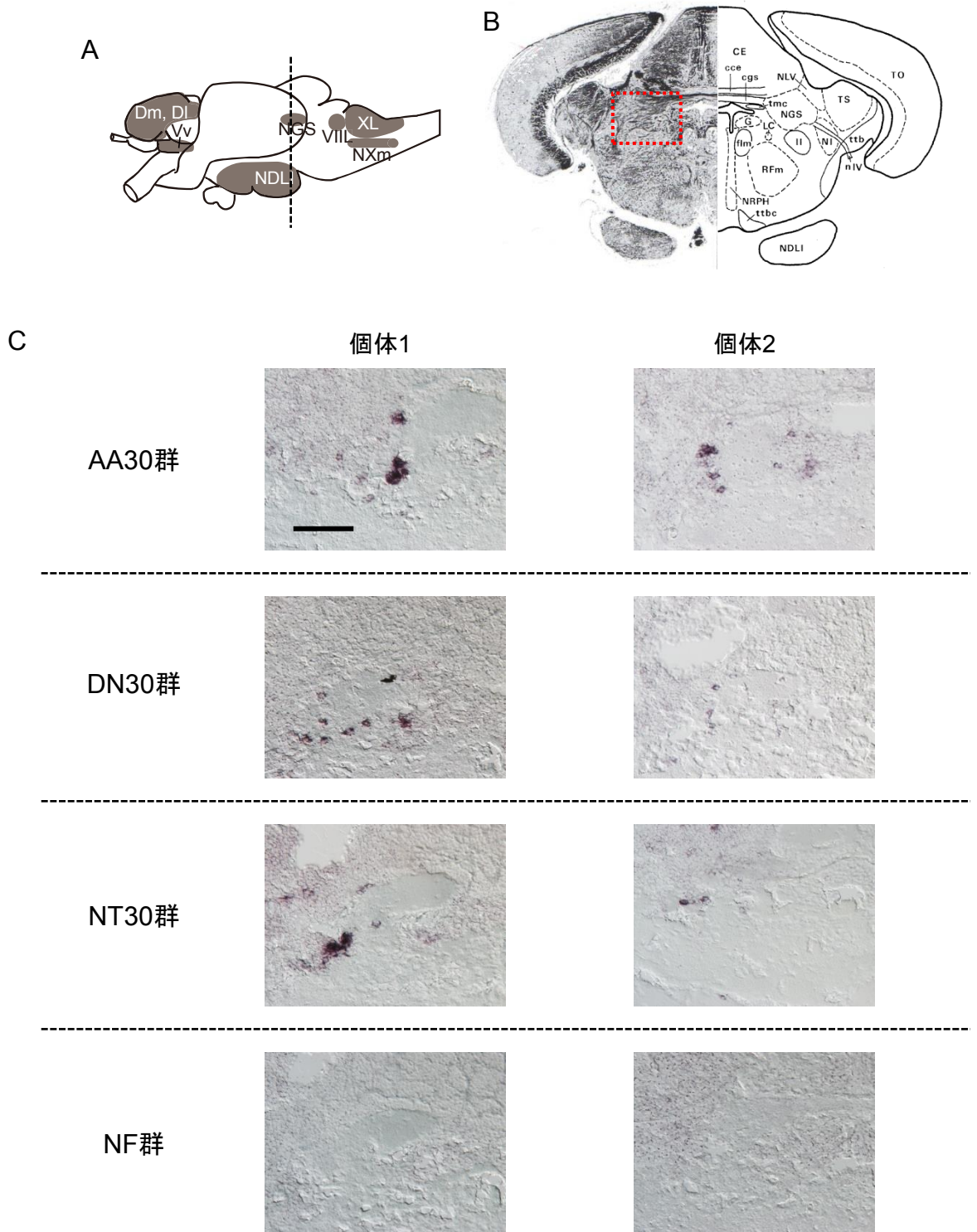


図3-27 c-fosの味覚中枢での発現解析-4 (NGS)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてNGSを含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果はCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図(A)と冠状切片の模式図(B)を上部に載せた。BはIshikawらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは50 μm

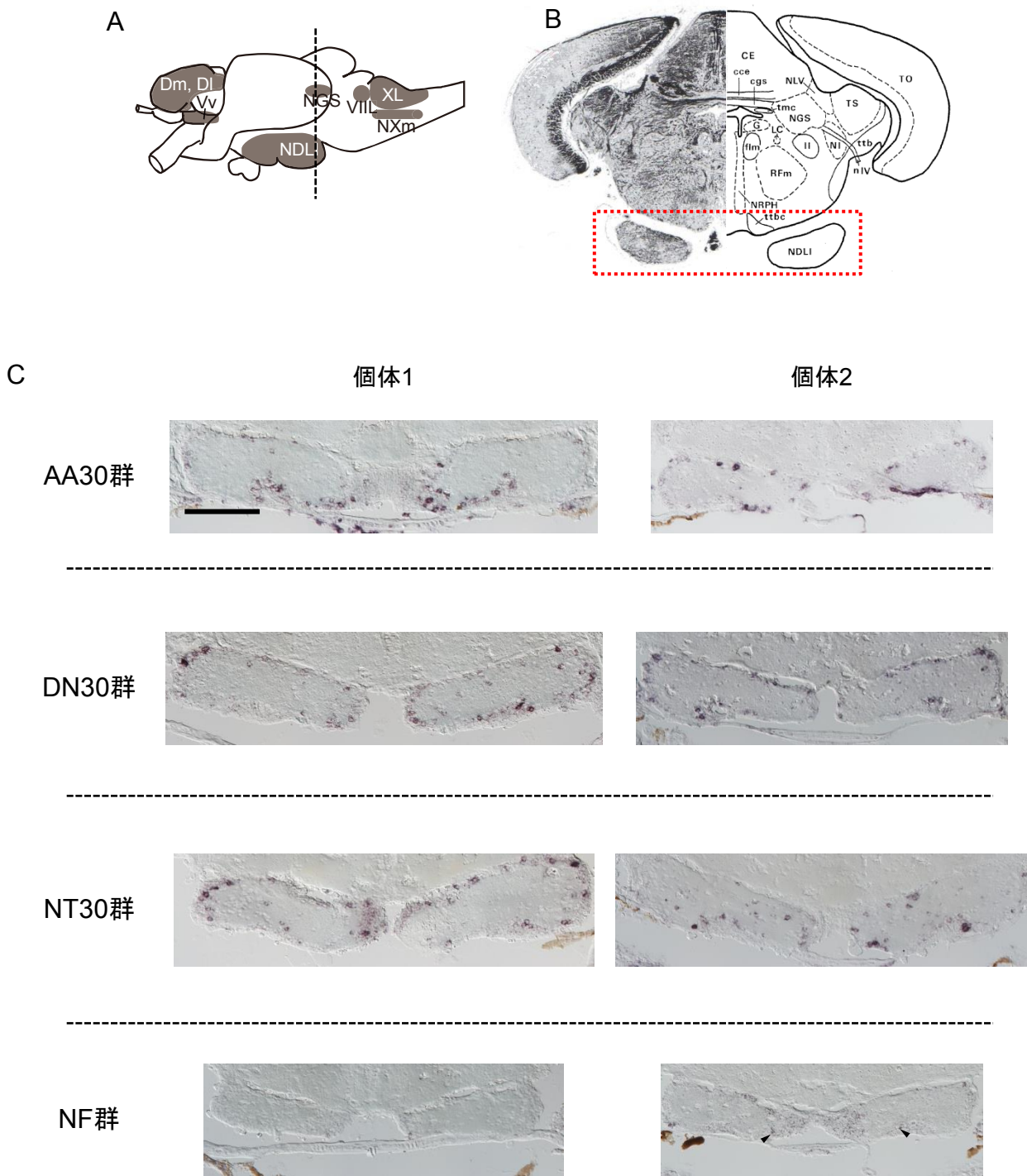


図3-28 c-fosの味覚中枢での発現解析-5 (NDLI)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてNDLI後方部を含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果はCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図(A)と冠状切片の模式図(B)を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは100 μ m

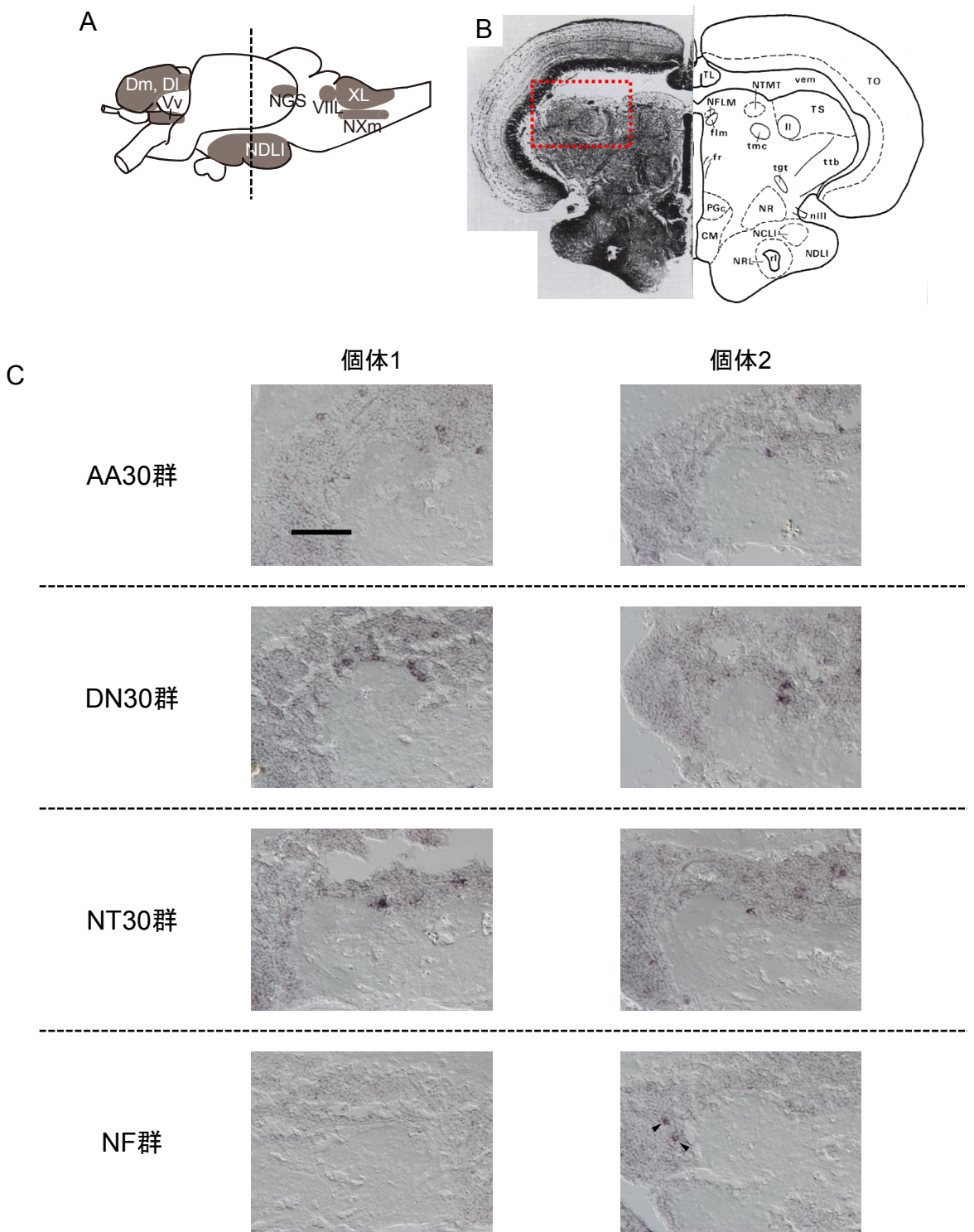


図3-29 c-fosの味覚中枢以外での発現解析-1 (TS)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてTS（半円隆起）を含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果はCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図(A)と冠状切片の模式図(B)を上部に載せた。BはIshikawaraらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、TS: 半円隆起
スケールバーは50 μm

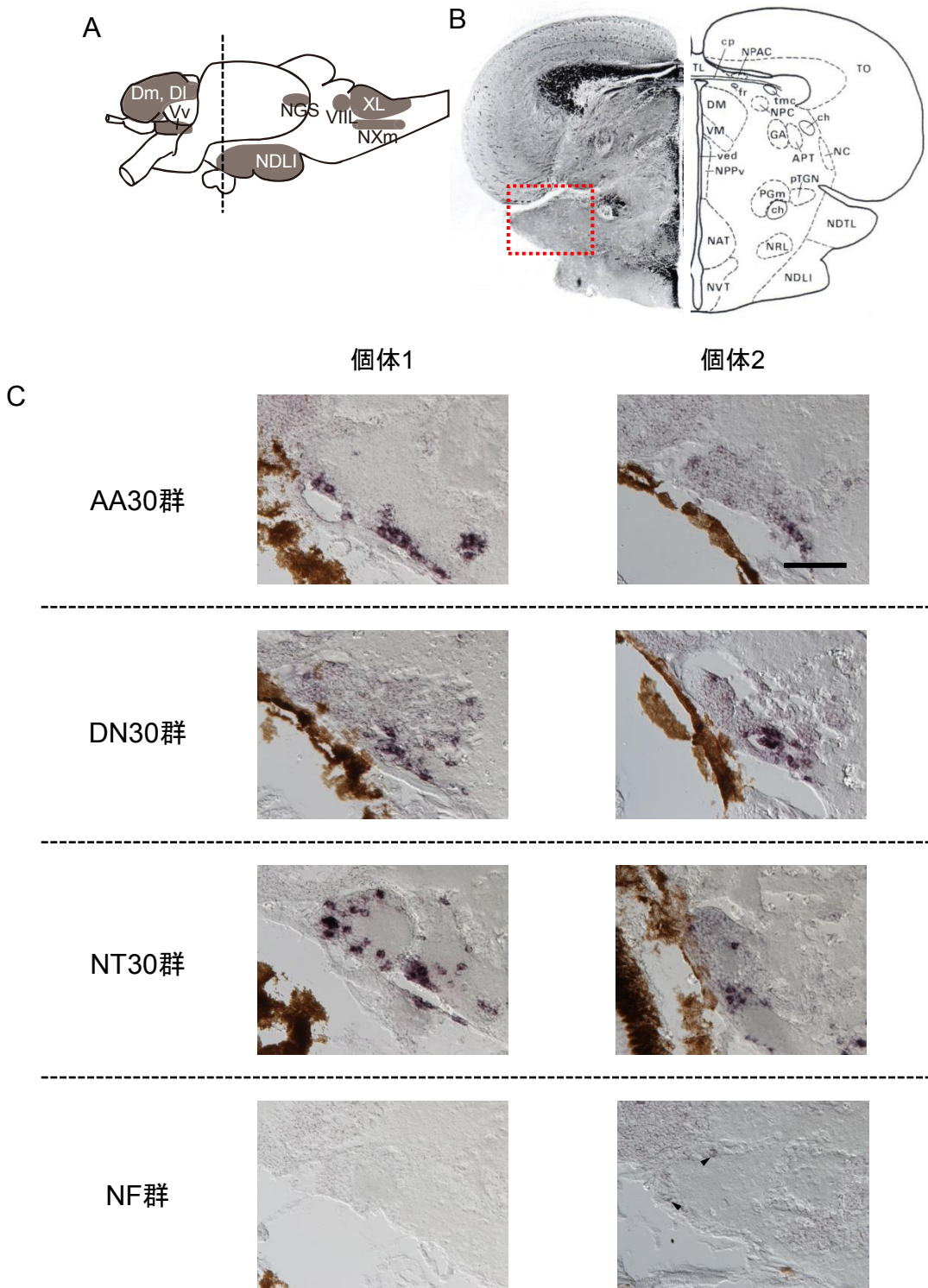


図3-30 c-fosの味覚中枢以外での発現解析-2 (NDTL)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてNDTL (外側隆起分散核) を含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果はCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図 (A) と冠状切片の模式図 (B) を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。写真の左側にある茶色の部分は眼の周辺の色素であり、ISHによる発色ではない。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、NDTL: 外側隆起分散核

スケールバーは50 μm

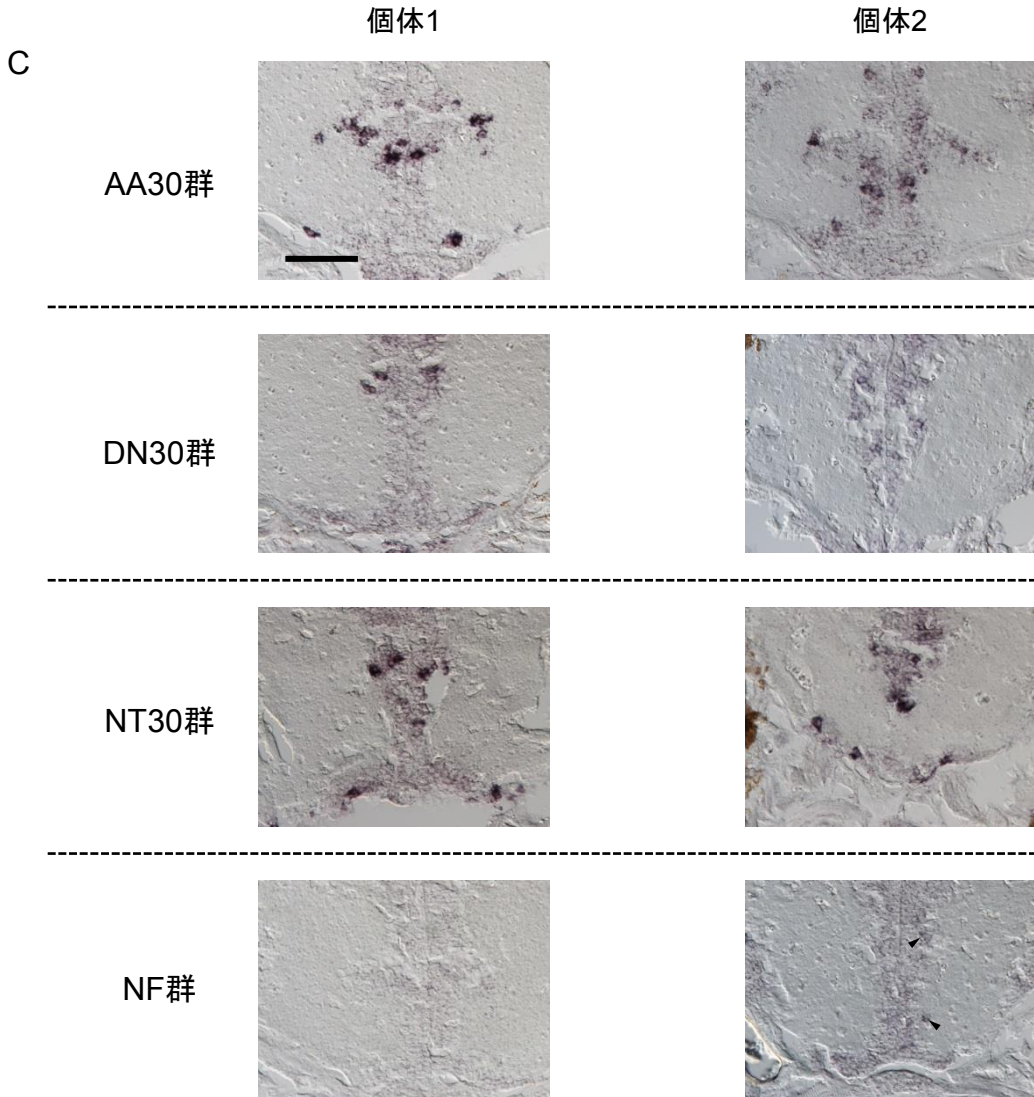
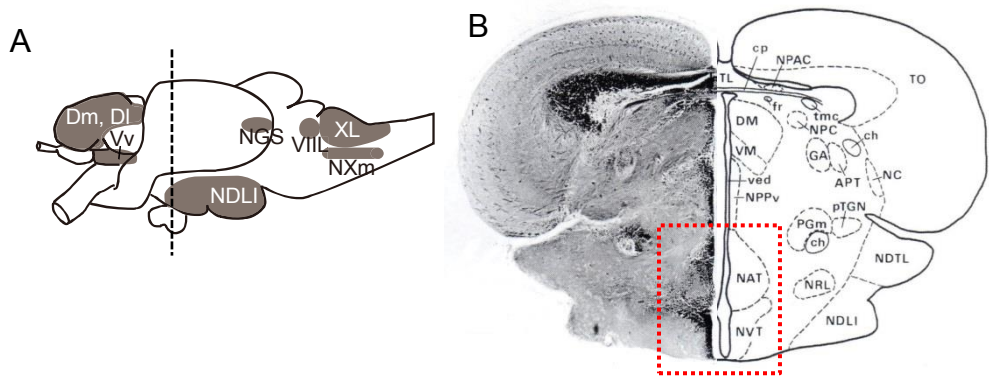


図3-31 c-fosの味覚中枢以外での発現解析-3 (NAT, NVT)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてNAT、NVTを含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果はCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図(A)と冠状切片の模式図(B)を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 系球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、NAT: 前隆起核、NVT: 隆起腹側核

スケールバーは50 μ m

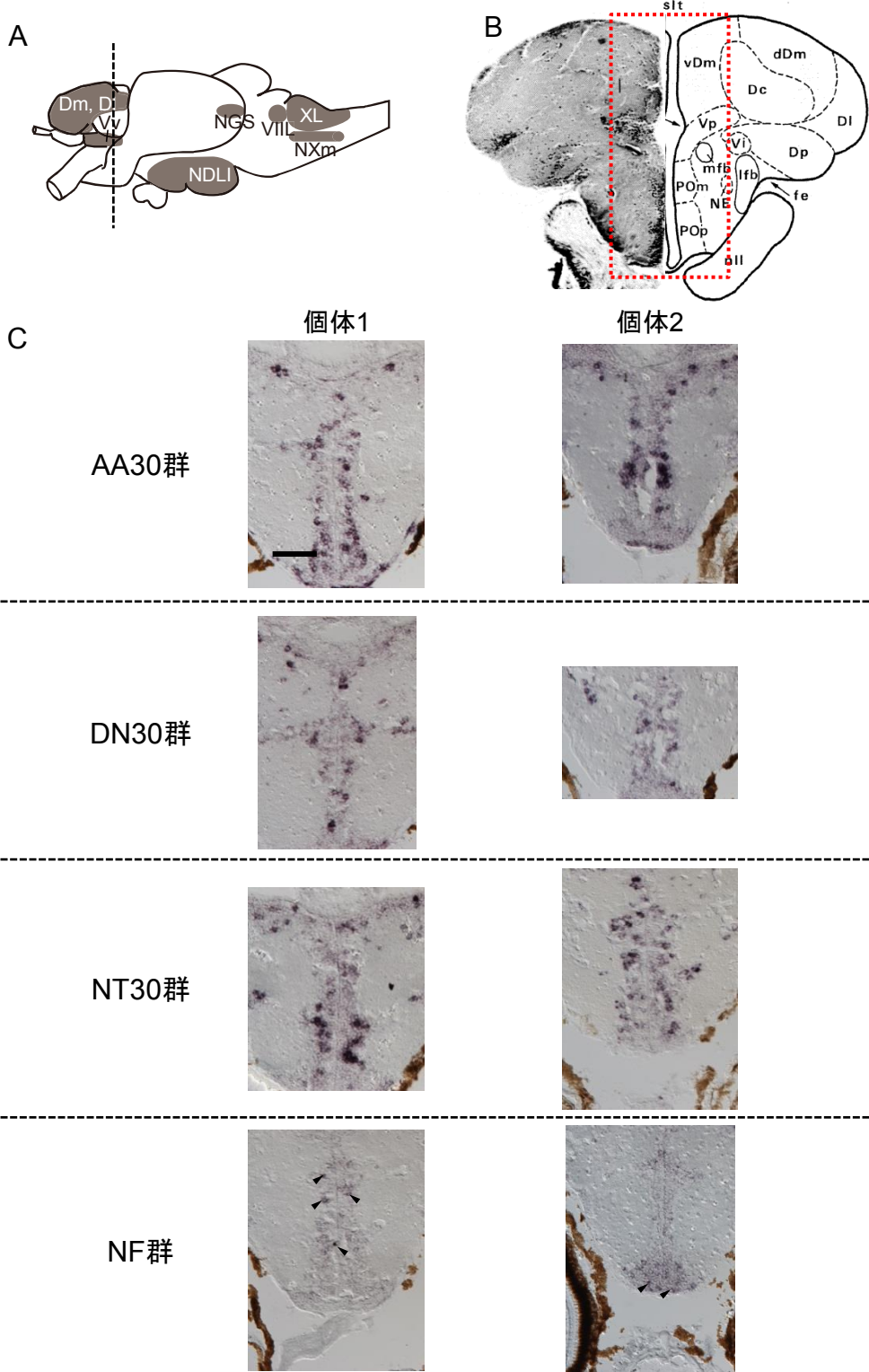


図3-32 c-fosの味覚中枢以外での発現解析-4（終脳領域後部（中央部））

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いて終脳後部の中央部（vDm, Vp, POm, POp）を含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果をCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図（A）と冠状切片の模式図（B）を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。写真にある茶色の部分は眼の周辺の色素であり、ISHによる発色ではない。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、vDm: 終脳背側野内側部の腹側部、Vp: 終脳腹側野後部、POm: 視索前核マグノ細胞部、POp: 視索前核小細胞性部
スケールバーは50 μm

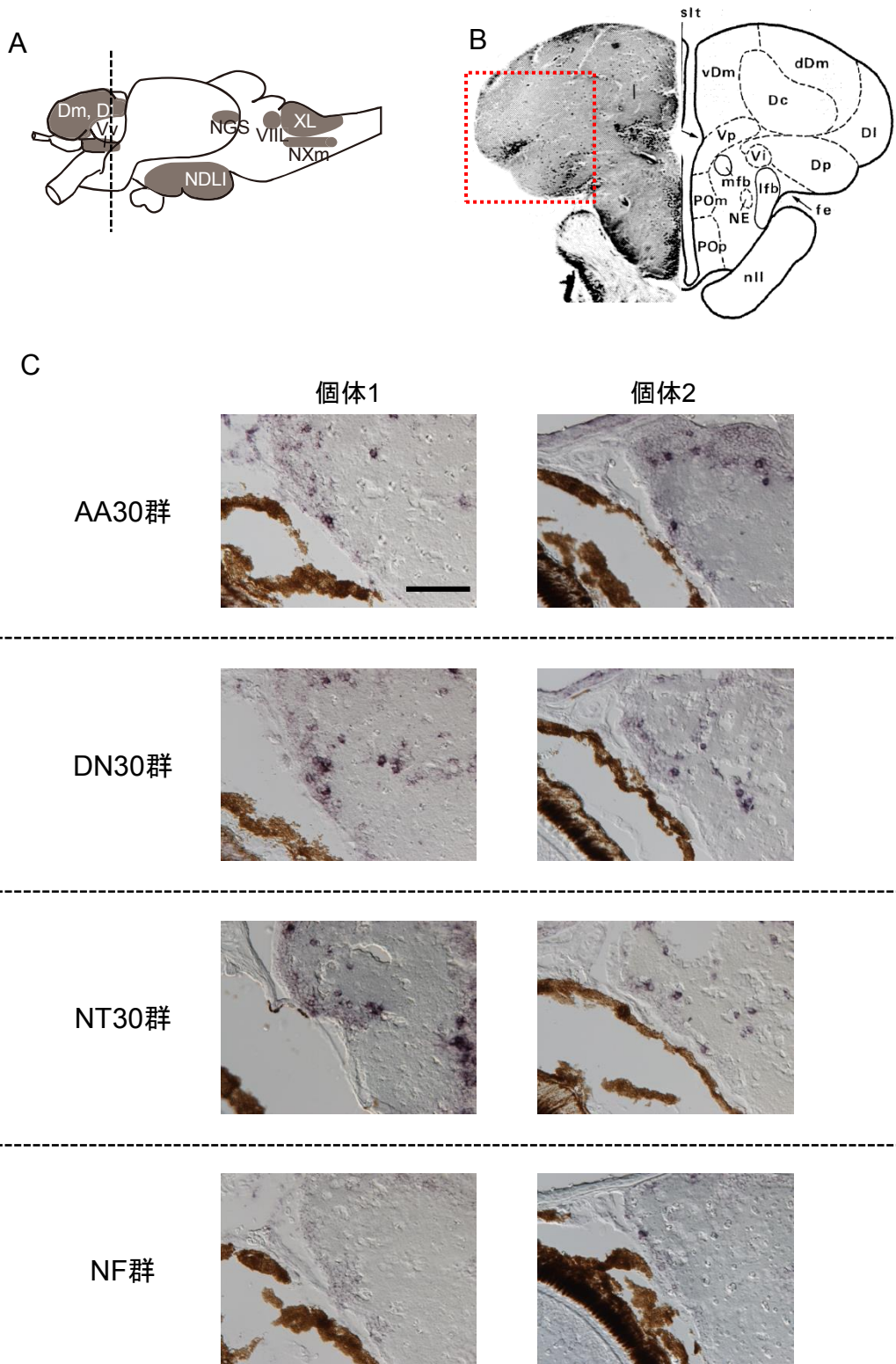


図3-33 c-fosの味覚中枢以外での発現解析-5（終脳領域後部（外側部））

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いて終脳後部の外側部（DI, Dp）を含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果をCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図（A）と冠状切片の模式図（B）を上部に載せた。BはIshikawaraらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。写真にある茶色の部分は眼の周辺の色素であり、ISHによる発色ではない。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、Dp: 終脳背側野後部
スケールバーは50 μm

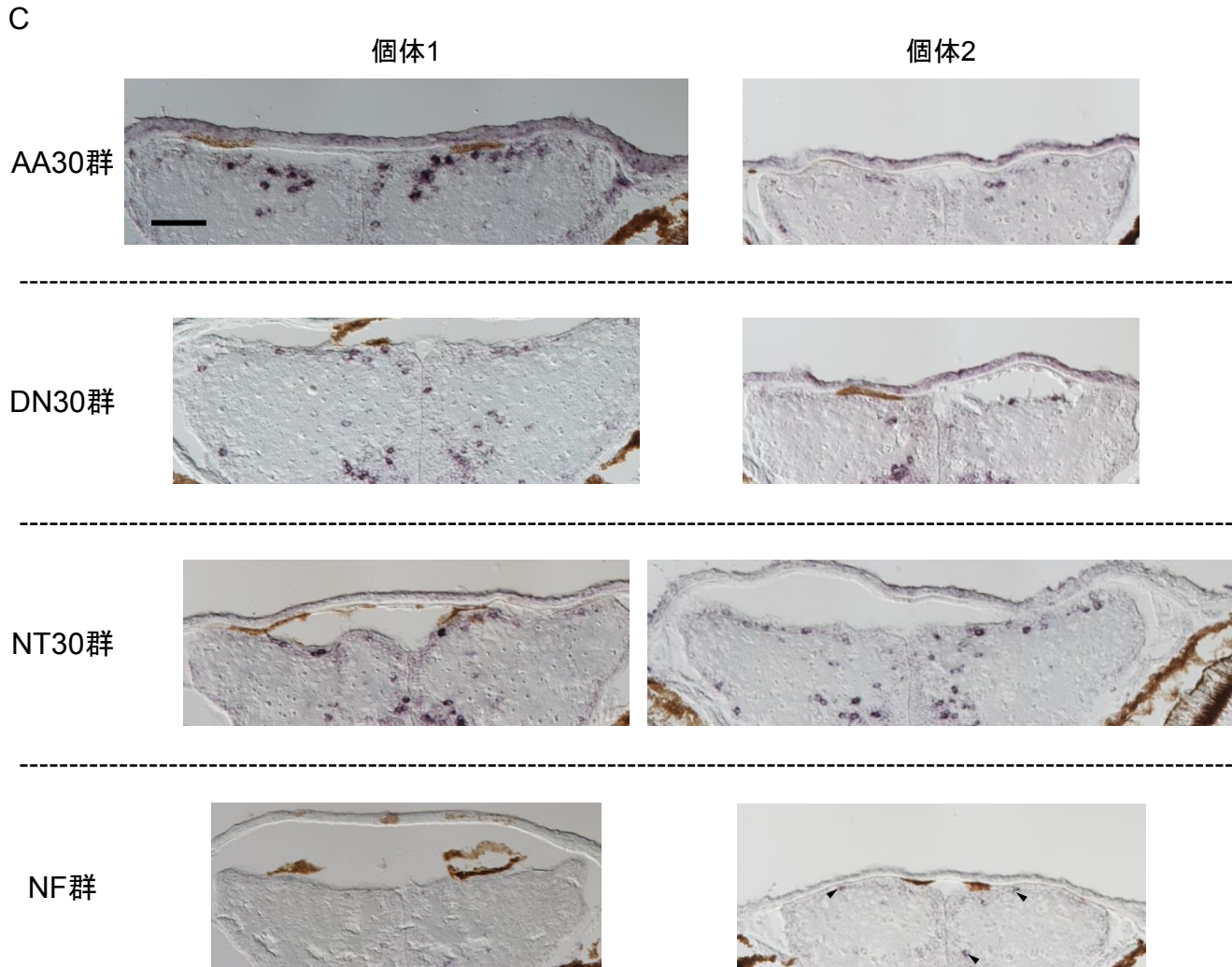
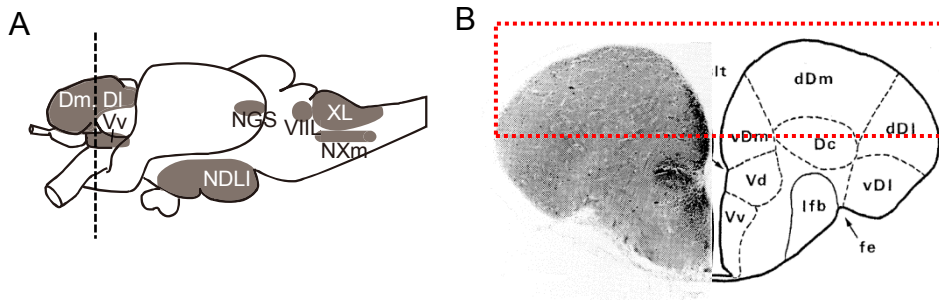


図3-34 c-fosの味覚中枢以外での発現解析-6（終脳領域前部（背側部））

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いて終脳前部の背側部（dDm）を含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果をCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図（A）と冠状切片の模式図（B）を上部に載せた。BはIshikawaraらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。写真にある茶色の部分は眼の周辺の色素であり、ISHによる発色ではない。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、dDm: 終脳背側野内側部の背側部

スケールバーは50 μ m

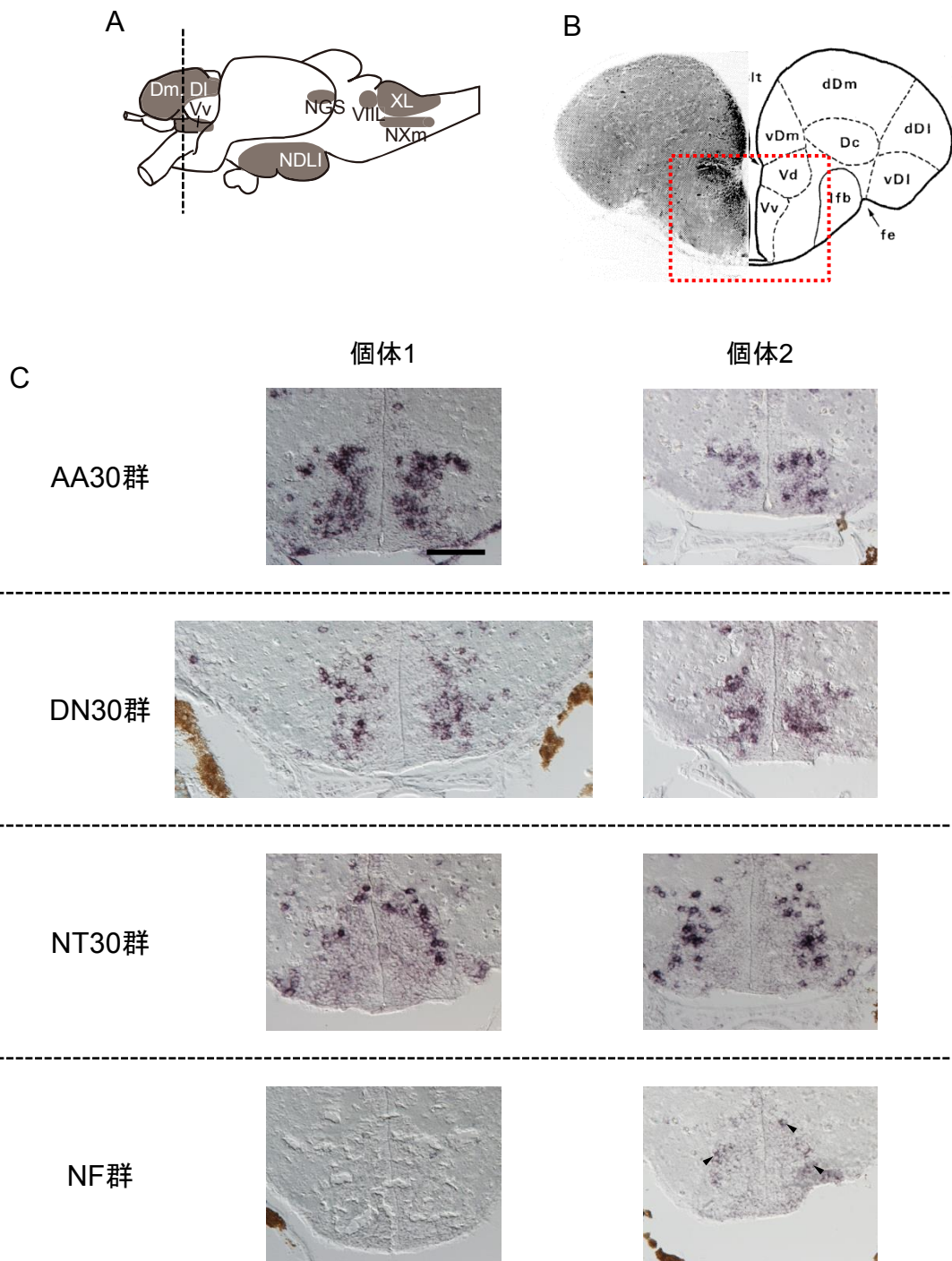
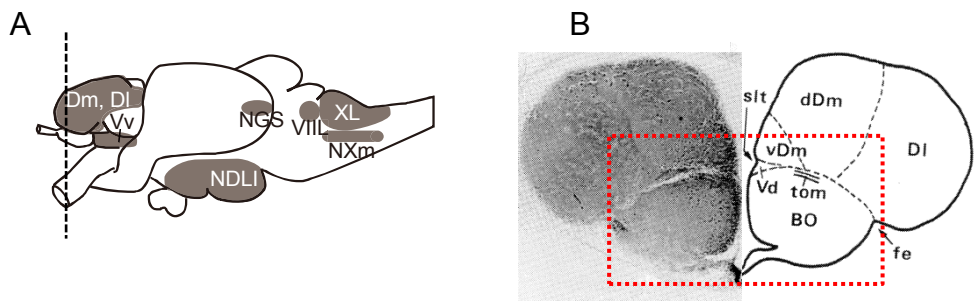


図3-35 c-fosの味覚中枢以外での発現解析-7（終脳領域前部（腹側部））

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いて終脳前部の腹側部（Vd, Vv）を含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。結果をCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図（A）と冠状切片の模式図（B）を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱的な発現と判断した細胞。写真にある茶色の部分は眼の周辺の色素であり、ISHによる発色ではない。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、Vd: 終脳腹側野背側部

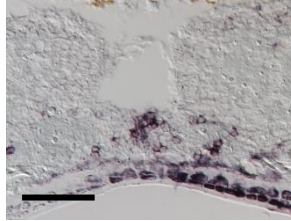
スケールバーは50 μm



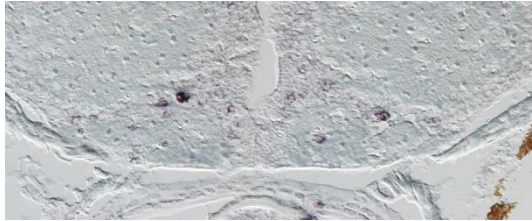
個体1

C

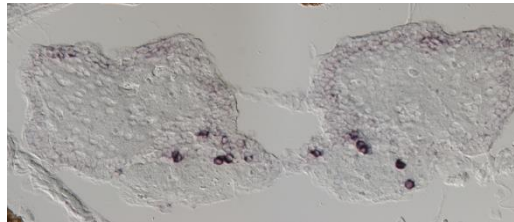
AA30群



DN30群



NT30群



NF群

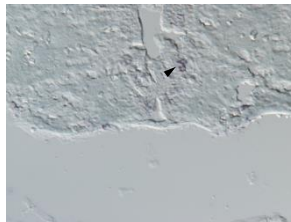


図3-36 c-fosの味覚中枢以外での発現解析-8 (嗅球)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いて嗅球 (BO) を含む冠状切片に対してISHを行い、c-fosの発現細胞分布を解析した。解析は1個体のみを行い、結果はCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図 (A) と冠状切片の模式図 (B) を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。写真にある茶色の部分は眼の周辺の色素であり、ISHによる発色ではない。VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、BO: 嗅球
スケールバーは50 μm

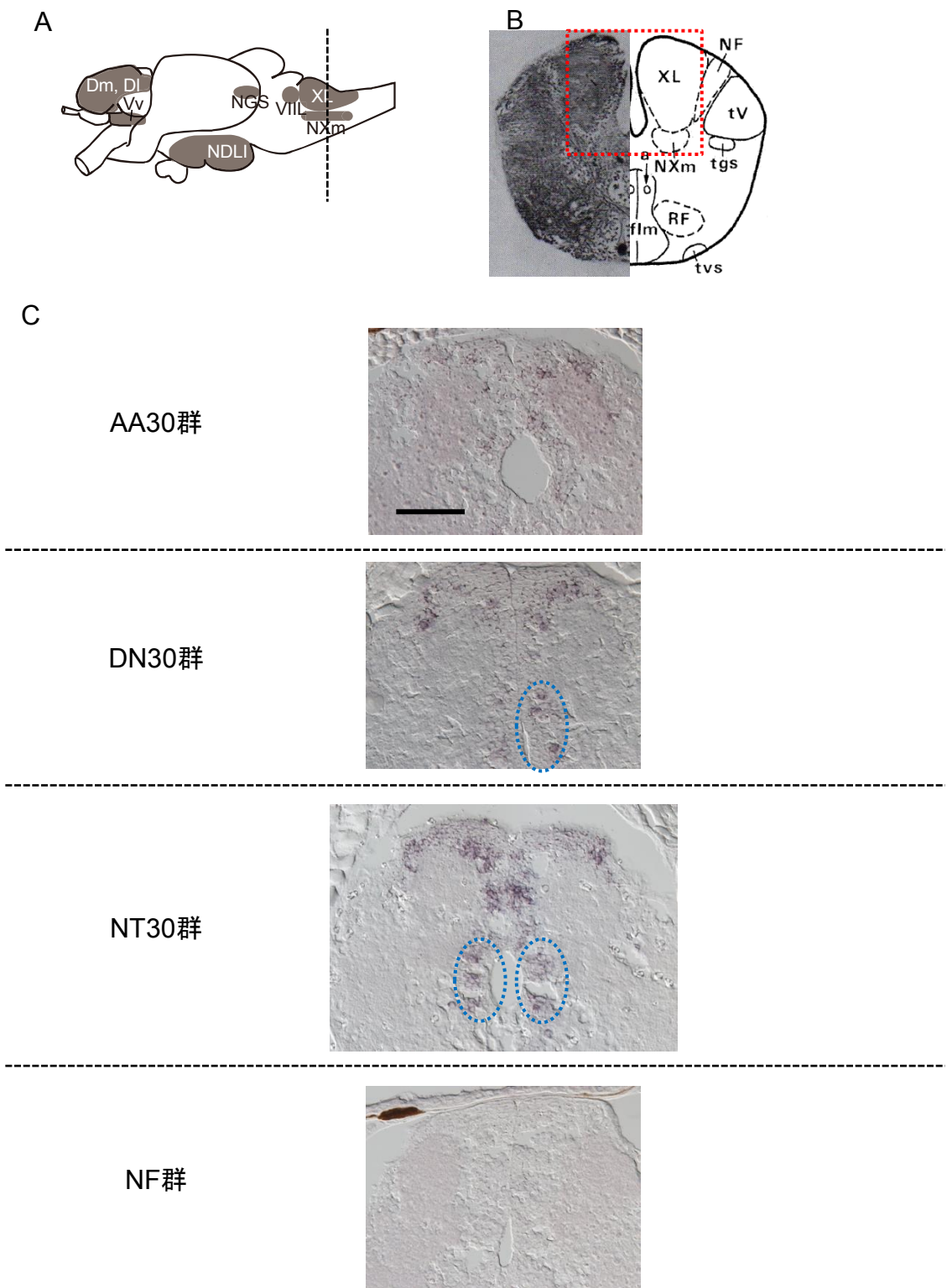


図3-37 egr1-2の味覚中枢での発現解析-1 (XLの後方部とNXm)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてXL後方部とNXmを含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。解析した脳切片の位置がわかるように脳の側面から見た模式図 (A) と冠状切片の写真 (B) を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。青破線はNXmにおける陽性細胞。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは50 μ m

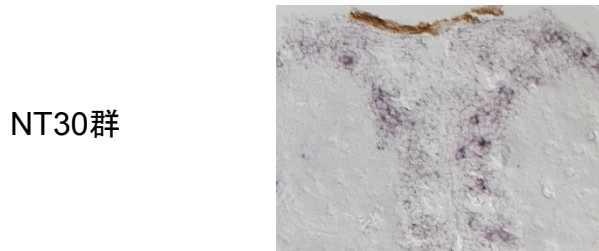
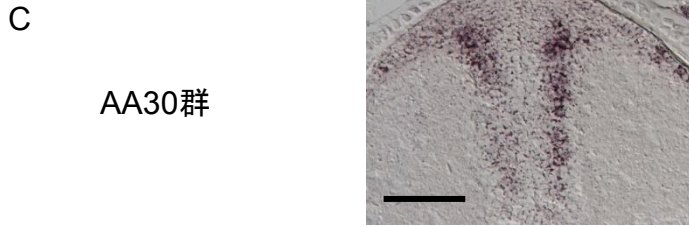
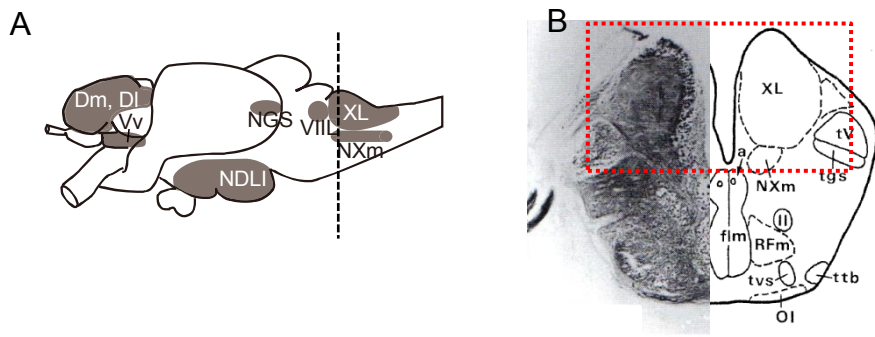


図3-38 egr1-2の味覚中枢での発現解析-2 (XLの前方部)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてXL前方部を含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。解析した脳切片の位置がわかるように脳の側面から見た模式図 (A) と冠状切片の写真 (B) を上部に載せた。BはIshikawaraらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは50 μ m

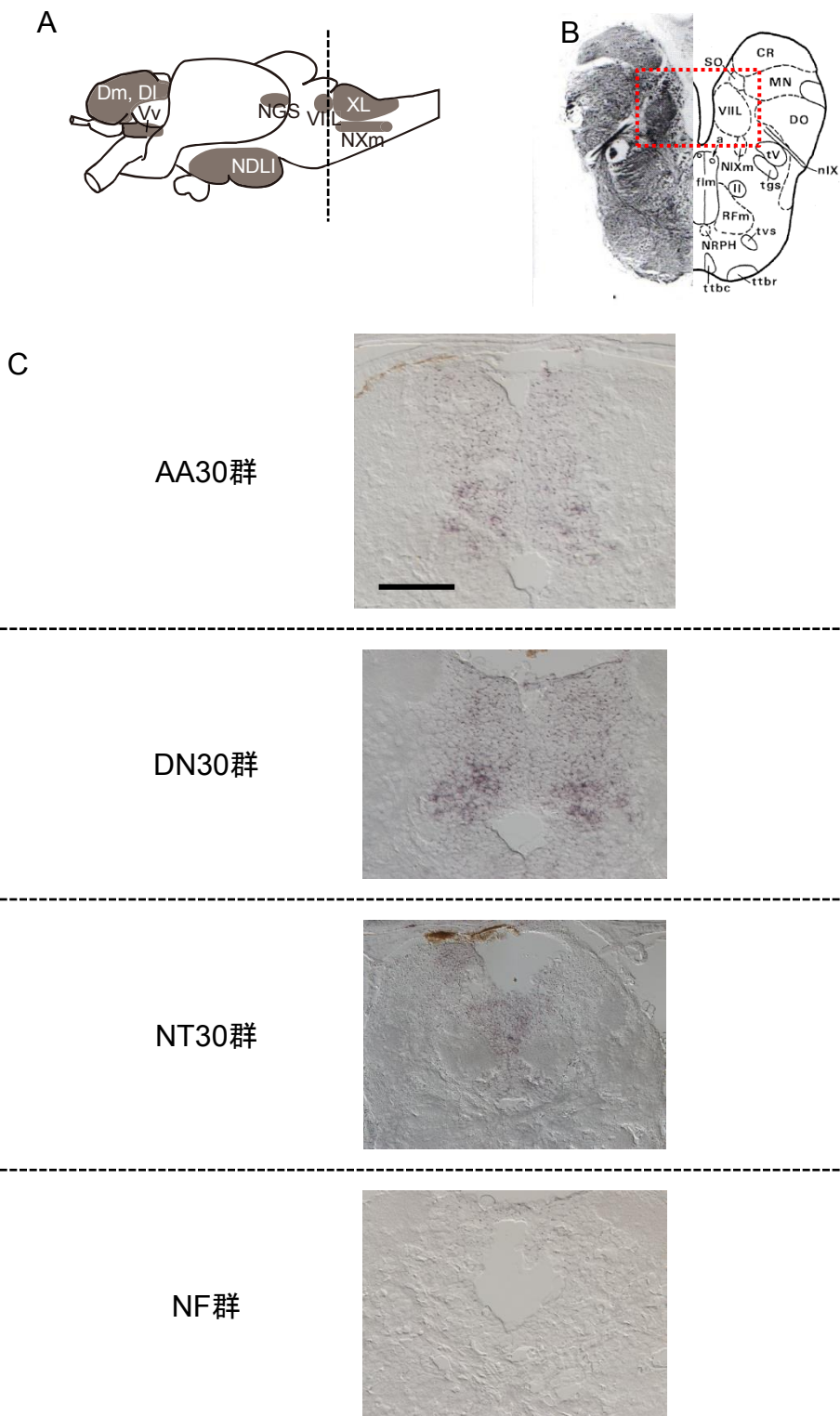


図3-39 egr1-2の味覚中枢での発現解析-3 (VIIIL)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてVIIILを含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。解析した脳切片の位置がわかるように脳の側面から見た模式図 (A) と冠状切片の写真 (B) を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。

VIIIL: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは50 μ m

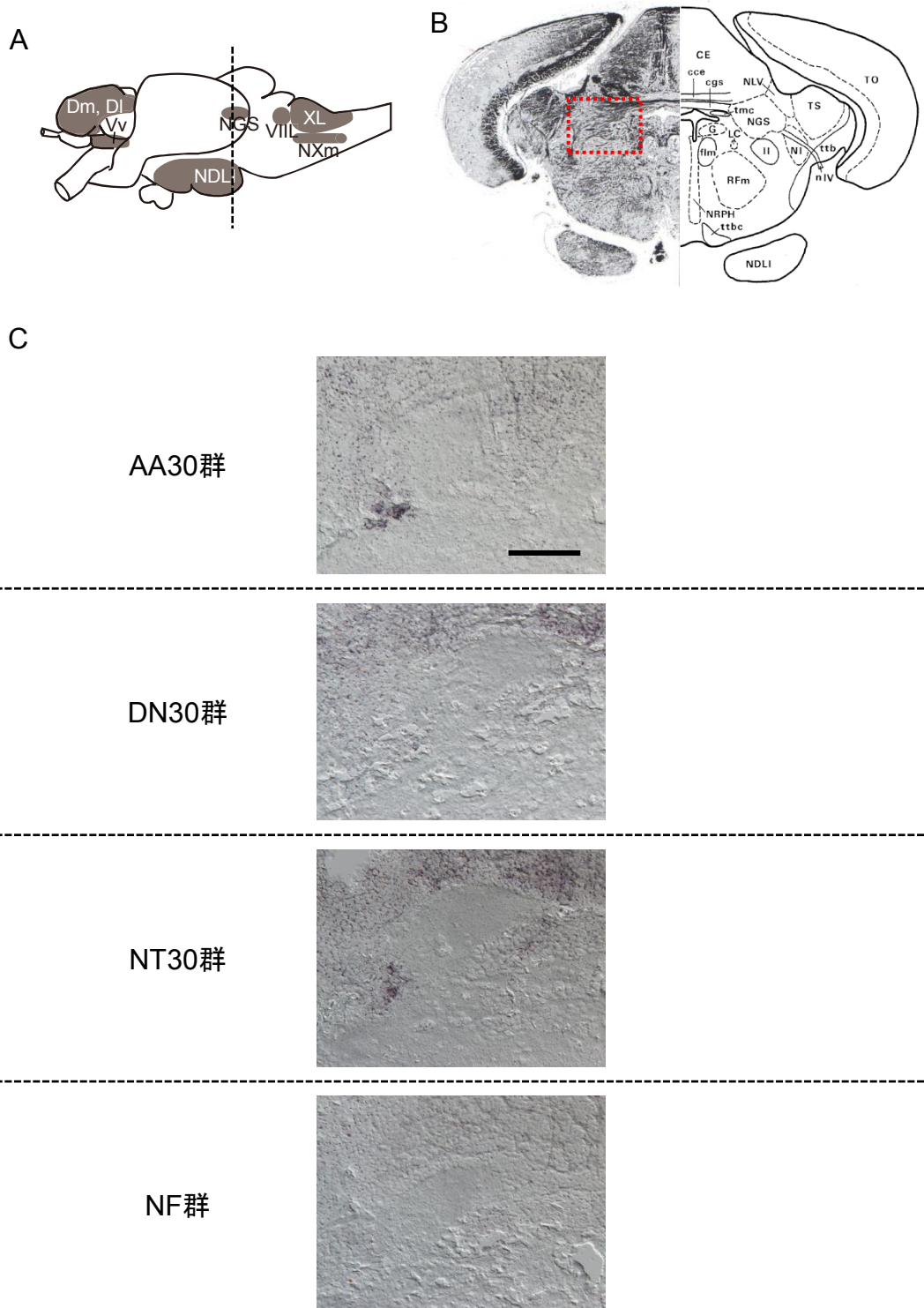
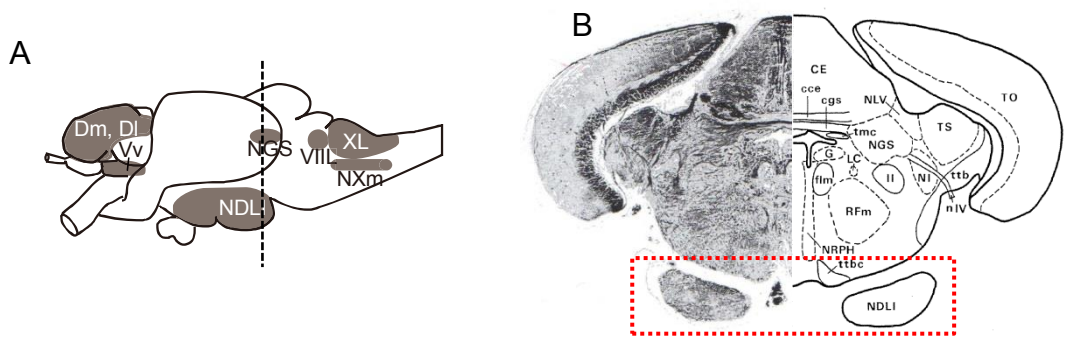


図3-40 egr1-2の味覚中枢での発現解析-4 (NGS)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてNGSを含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。解析した脳切片の位置がわかるように脳の側面から見た模式図 (A) と冠状切片の写真 (B) を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは50 μ m

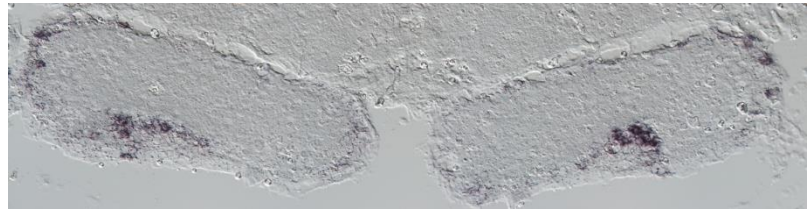


C

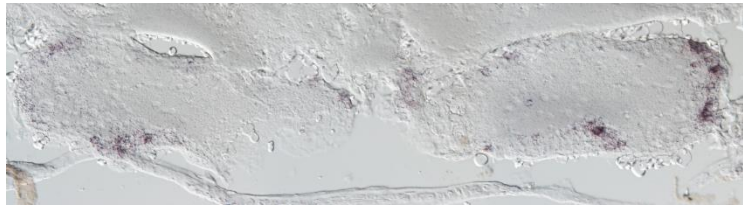
AA30群



DN30群



NT30群



NF群

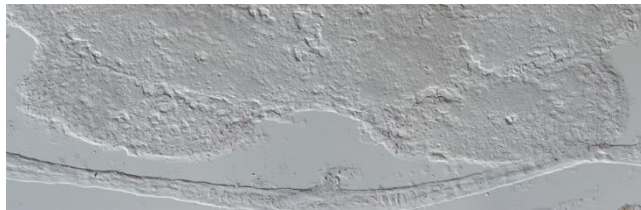


図3-41 egr1-2の味覚中枢での発現解析-5 (NDLI)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてNDLIを含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。解析した脳切片の位置がわかるように脳の側面から見た模式図(A)と冠状切片の写真(B)を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部
スケールバーは100 μm

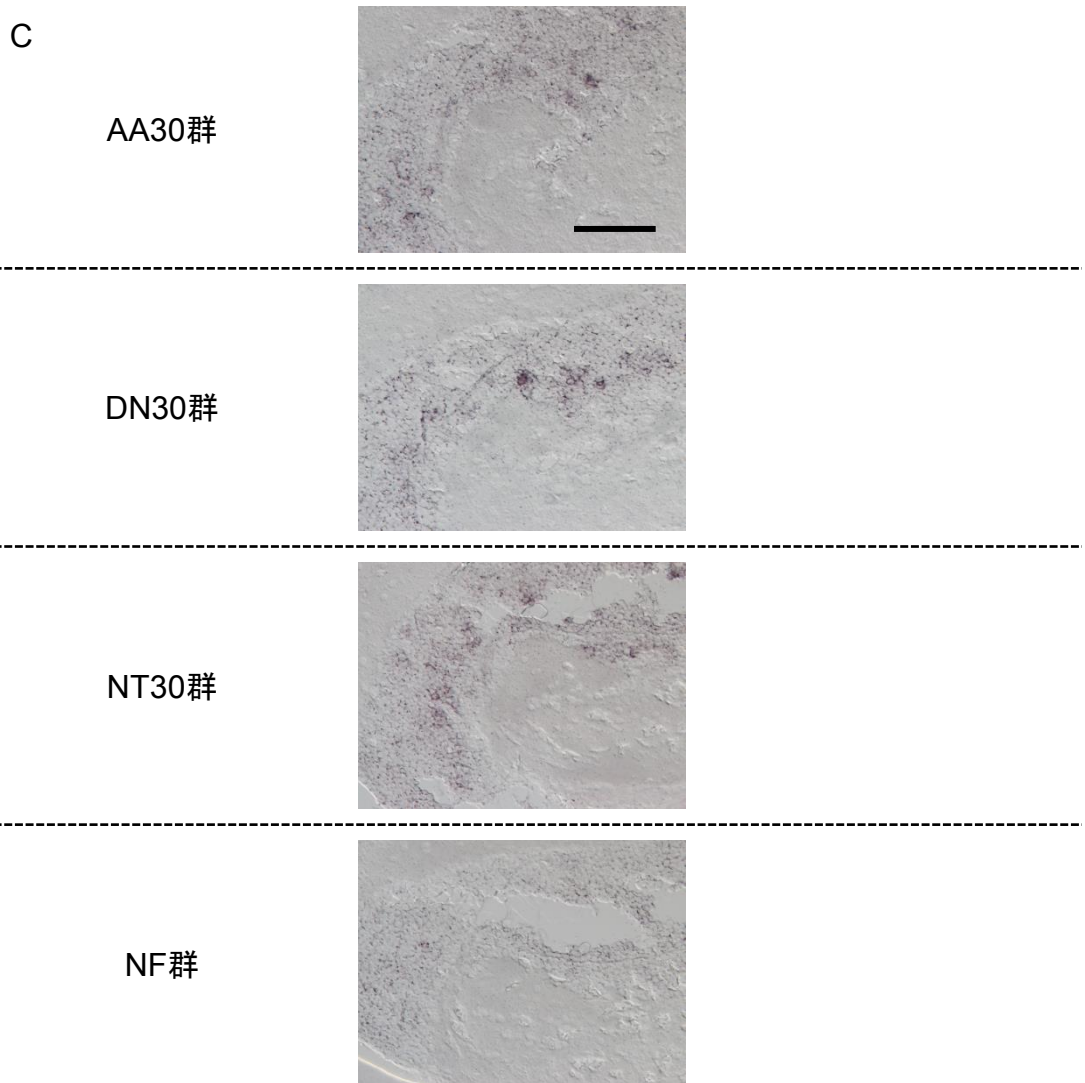
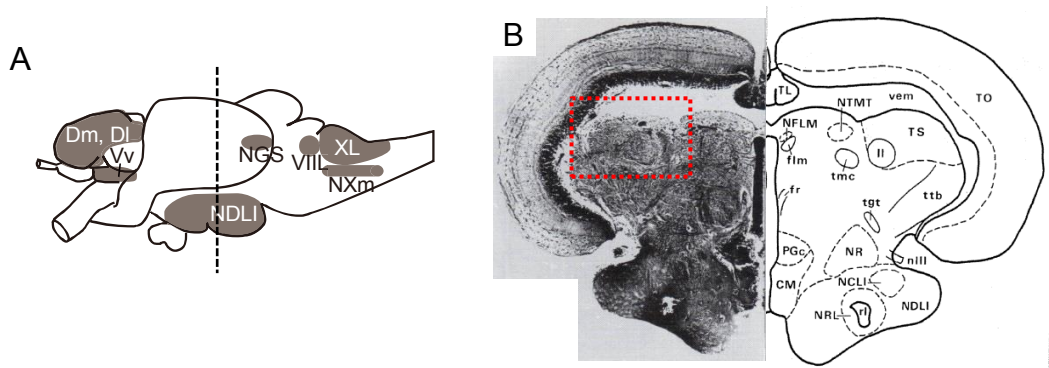


図3-42 egr1-2の味覚中枢以外での発現解析-1 (TS)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてTS（半円隆起）を含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。解析した脳切片の位置がわかるように脳の側面から見た模式図(A)と冠状切片の写真(B)を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、TS: 半円隆起

スケールバーは50 μ m

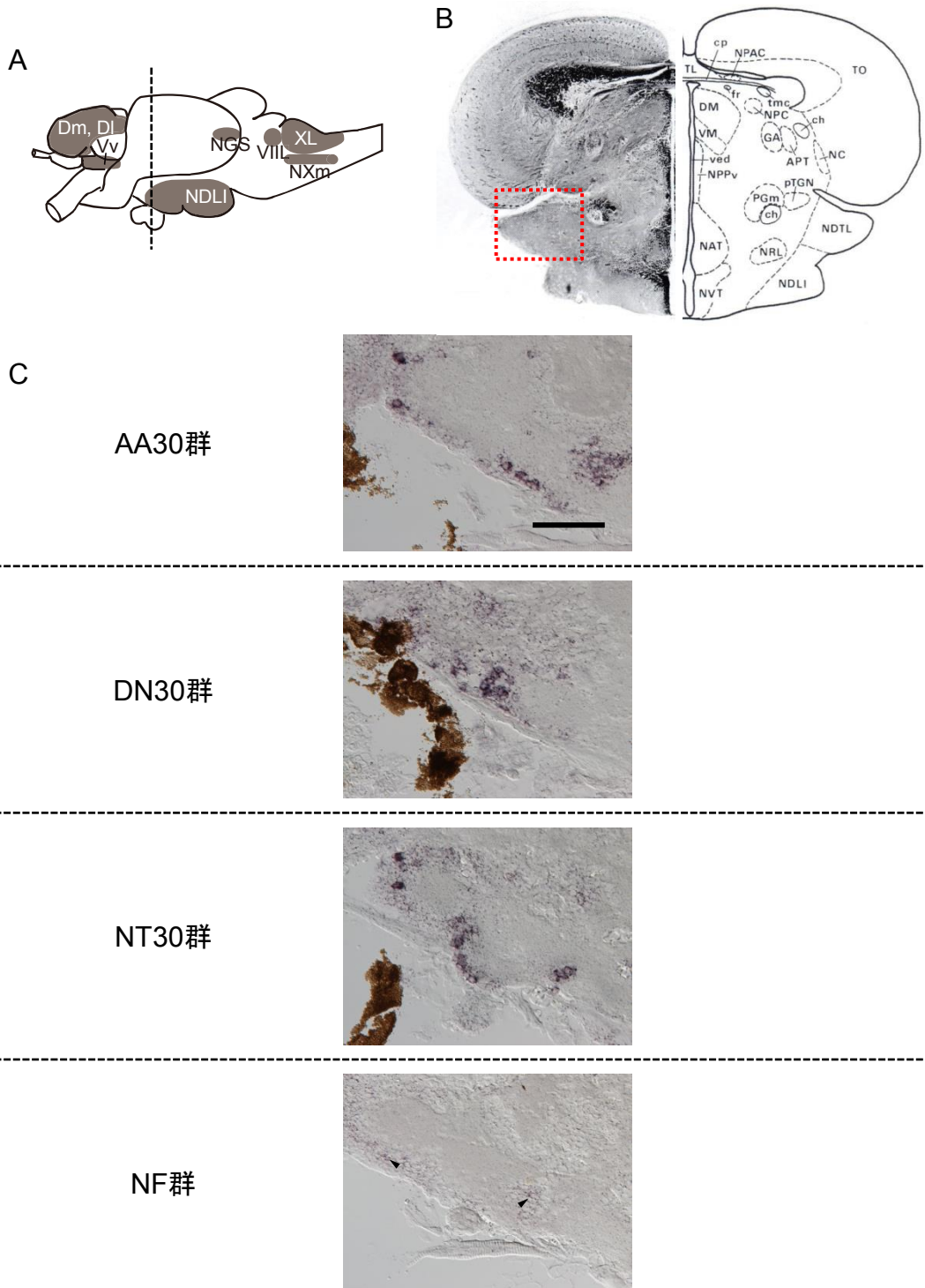


図3-43 egr1-2の味覚中枢以外での発現解析-2 (NDTL)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてNDTL (外側隆起分散核) を含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。解析した脳切片の位置がわかるように脳の側面から見た模式図 (A) と冠状切片の写真 (B) を上部に載せた。BはIshikawaraらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 系球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、NDTL: 外側隆起分散核

スケールバーは50 μm

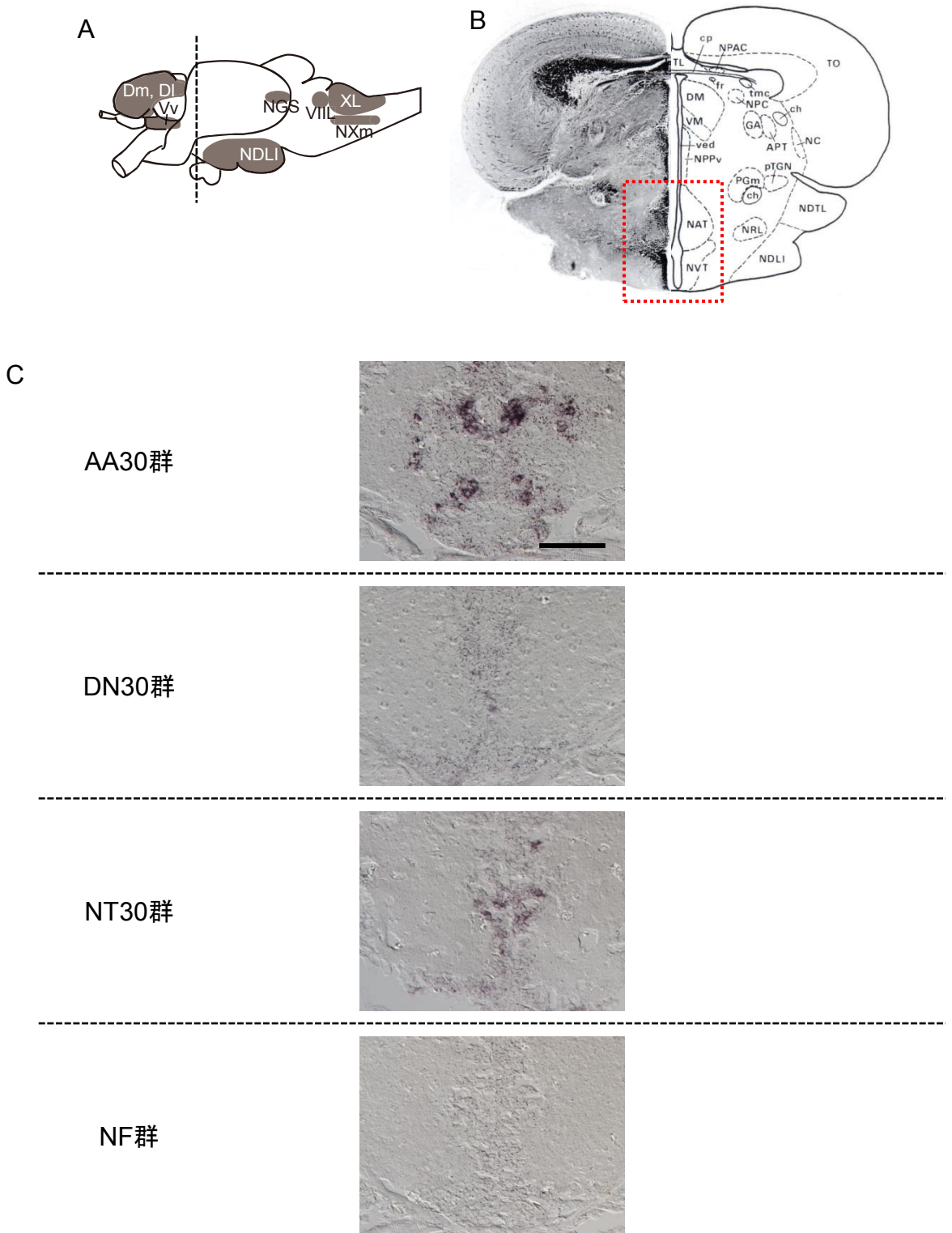


図3-44 egr1-2の味覚中枢以外での発現解析-3 (NAT, NVT)

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いてNAT, NVTを含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図 (A) と冠状切片の模式図 (B) を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示した部分をCで観察した。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、Dl: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、NAT: 前隆起核、NVT: 隆起腹側核

スケールバーは50 μ m

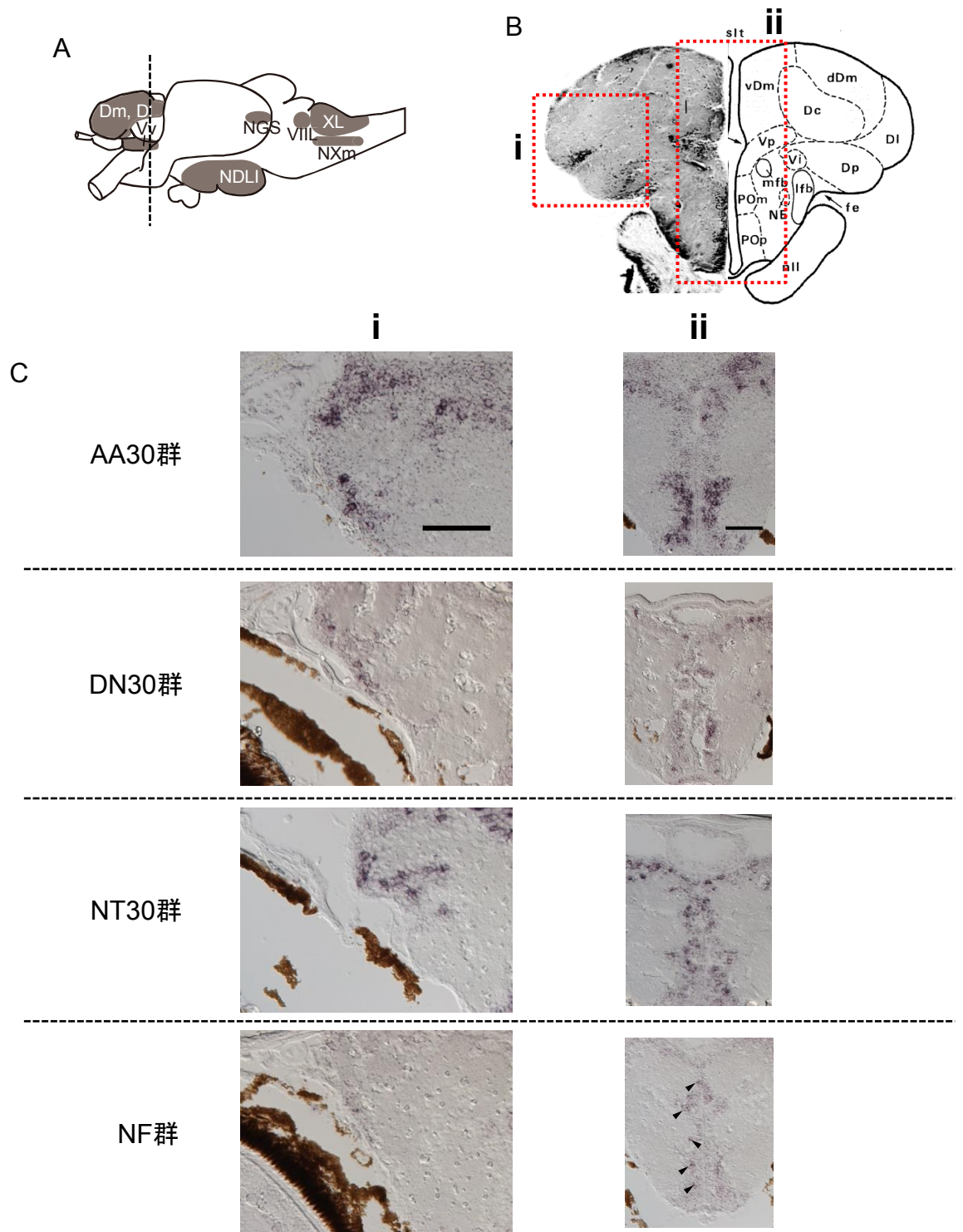


図3-45 egr1-2の味覚中枢以外での発現解析-4（終脳領域後部）

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いて終脳後部（vDm, Vp, POm, POp, DI, Dp）を含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図（A）と冠状切片の模式図（B）を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示したi, iiの部分にCで観察した。やじりはNF群における微弱な発現と判断した細胞。写真にある茶色の部分は眼の周辺の色素であり、ISHによる発色ではない。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部の腹側部、Vp: 終脳腹側野後部、POm: 視索前核マグノ細胞部、POp: 視索前核小細胞性部、Dp: 終脳背側野後部

スケールバーはCのi, iiともに50 μm

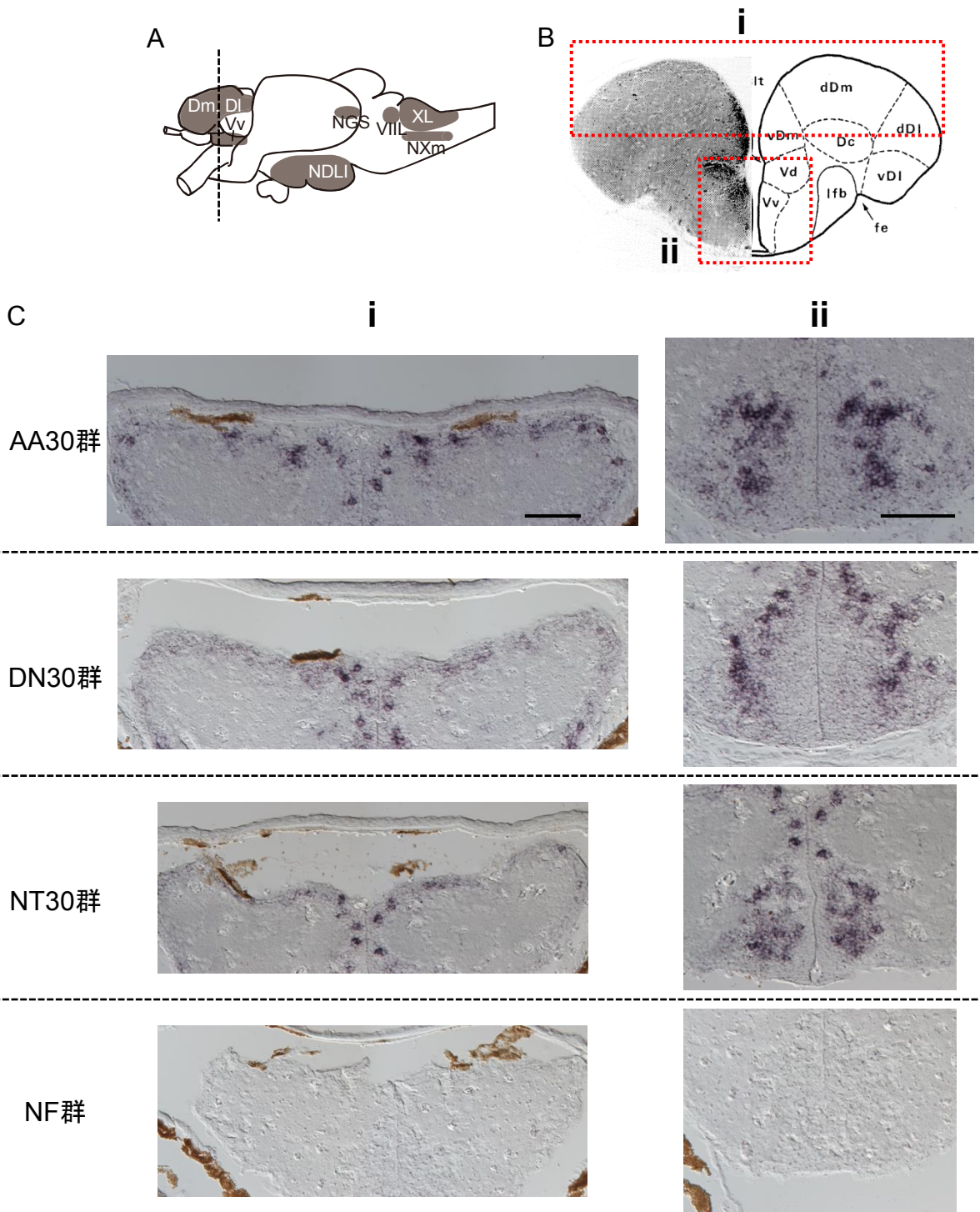


図3-46 egr1-2の味覚中枢以外での発現解析-5（終脳領域前部）

1か月齢メダカのAA30、DN30、NT30、NFの4群を用いて終脳前部（dDm, Vd, Vv）を含む冠状切片に対してISHを行い、egr1-2の発現細胞分布を解析した。1個体の結果のみをCに記載した。Cの解析に用いた脳切片の位置がわかるように脳の左側面から見た模式図（A）と冠状切片の模式図（B）を上部に載せた。BはIshikawaらのメダカ脳アトラスにおける脳染色写真と模式図を引用した。Aの図の破線はBの冠状切片の位置。Bの赤破線で示したi, iiの部分をもCで観察した。写真にある茶色の部分は眼の周辺の色素であり、ISHによる発色ではない。

VIII: 顔面葉、XL: 迷走葉、NXm: 迷走神経運動核、NGS: 第2味覚核、NDLI: 下葉分散核、pTGN: 糸球体第3味覚核、DI: 終脳背側野外側部、Dm: 終脳背側野内側部の背側部、Vv: 終脳腹側野腹側部、Vd: 終脳腹側野背側部

スケールバーはCのi, iiともに50 μ m

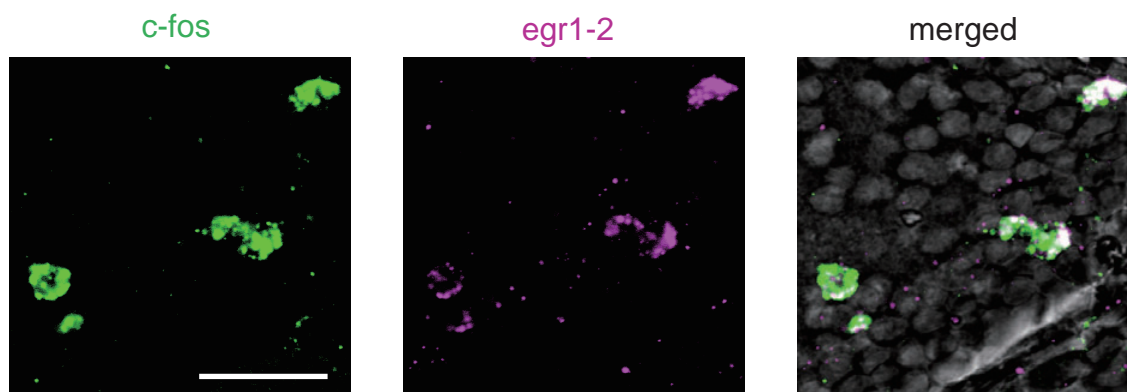


図 3-47 DN30 群の NDLI における c-fos と egr1-2 の発現相関解析

DN30 群に対して c-fos と egr1-2 のプローブを用いた二重標識 ISH を味覚中枢である NDLI において行った。

緑, c-fos mRNA の発現

マゼンタ, egr1-2 mRNA の発現

右の写真は左の 2 つの蛍光写真および位相差観察した像を重ね合わせた。

スケールバーは 20 μm 。

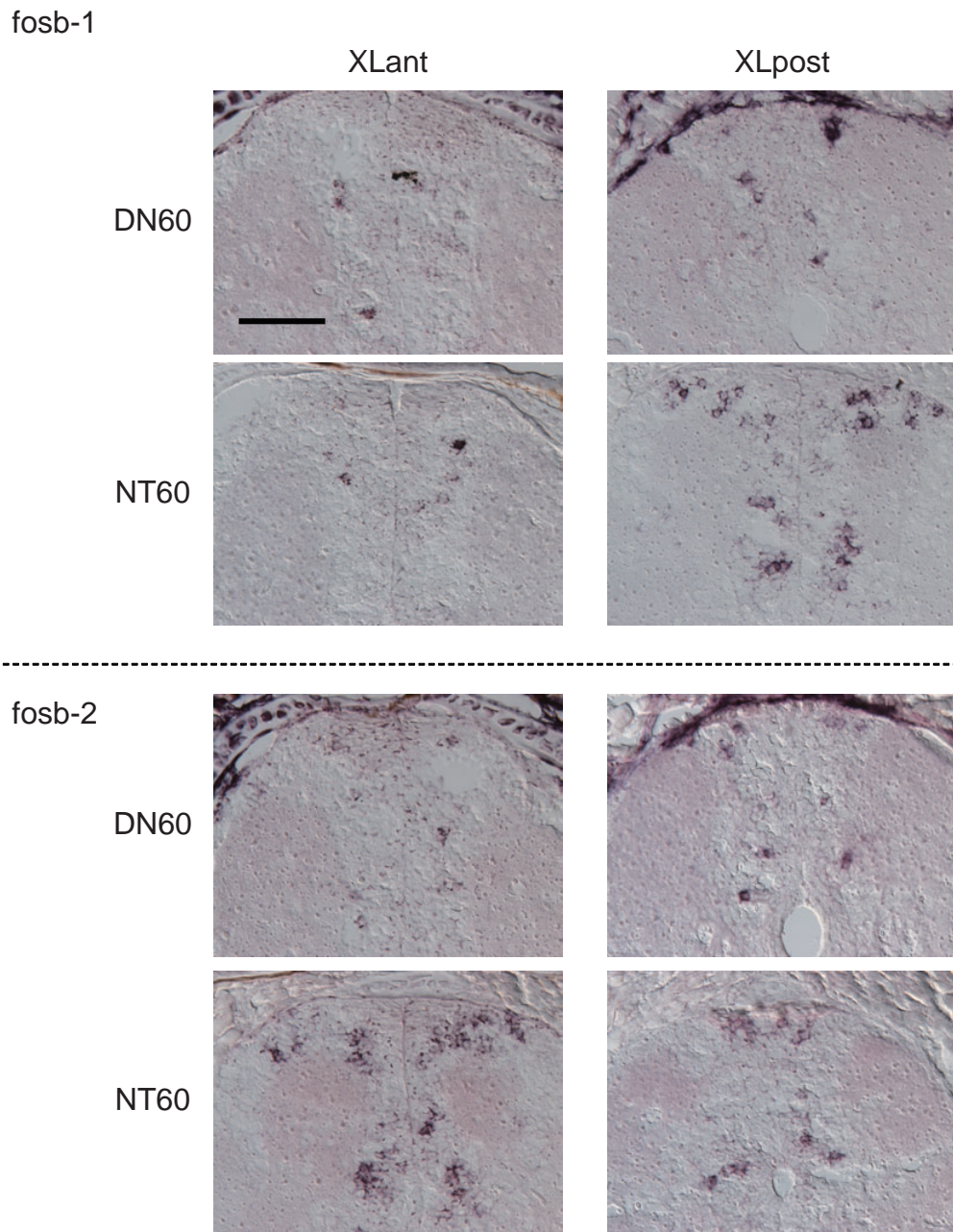


図 3-48 fosb-1 と fosb-2 の DN 餌、NT 餌摂食後の発現解析

1 か月齢のメダカに対して DN 餌および NT 餌摂食後 60 分で固定し、味覚中枢 XL において ISH で fosb-1 と fosb-2 の発現を解析した。XL の前方 (XLant) と XL の後方 (XLpost) の 2 か所を観察した。

スケールバーは 50 μ m。

表3-5 味覚中枢におけるc-fos発現細胞の数

群	XL (後方部)		NXm		XL (前方部)		tV/NTv		VIIL		NGS		NDLI (後方部)	
	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2
AA30	17	22	13	2	20	18	6	8	7	9	11	9	28	21
DN30	3	17	7	4	29	26	11	3	7	4	13	5	26	26
NT30	23	18	13	9	24	25	9	11	6	4	11	6	26	29
NF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

XL,NXm,tV,VIILは各個体2切片ずつ。NGSとNDLIは各個体1切片ずつ計数。

表3-6 c-fosおよびegr1-2の発現が誘導された神経核領域

c-fos

神経核	AA餌		DN餌		NT餌		NF	
	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2
XL(後方部)	+	+	+	+	+	+	-	-
XL(前方部)	+	+	+	+	+	+	-	-
VIII	+	+	+	+	+	+	-	-
NXm	+	±	+	+	+	+	-	-
tV/NTv	±	+	+	±	+	+	-	-
NGS(外側部)	+	+	+	+	+	+	-	-
NDLI(後方部)	+	+	+	+	+	+	-	±
TS	+	+	+	+	+	+	-	±
NDTL	+	+	+	+	+	+	-	±
NAT	+	+	+	-	+	+	-	±
NVT	+	+	-	-	+	+	-	±
Dp	+	+	+	+	+	+	-	-
DI	+	+	+	+	+	+	-	-
vDm	+	+	+	+	+	+	-	-
Vp	+	+	+	+	+	+	-	-
POm	+	+	+	+	+	+	±	-
POp	+	+	+	+	+	+	±	±
dDm	+	+	+	+	+	+	-	±
Vd	+	-	+	+	+	+	-	±
Vv	+	+	+	+	+	+	-	±
BO	+	ND	+	ND	+	ND	±	ND

egr1-2

神経核	AA餌		DN餌		NT餌		NF	
	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2	個体1	個体2
XL(後方部)	±	+	+	-	+	+	-	-
XL(前方部)	+	+	+	±	+	+	-	-
VIII	+	+	+	±	+	-	-	-
NXm	±	+	+	-	+	-	-	-
tV/NTv	-	-	-	-	+	-	-	-
NGS(外側部)	+	+	-	-	+	-	-	-
NDLI(後方部)	+	+	+	+	+	+	-	-
TS	+	-	+	-	±	-	-	-
NDTL	+	+	+	+	+	±	±	-
NAT	+	+	±	-	+	+	-	-
NVT	+	-	-	-	±	+	-	-
Dp	+	-	±	+	-	±	-	-
DI	+	+	±	+	+	±	-	-
vDm	+	±	+	+	+	+	-	-
Vp	±	±	±	±	+	±	±	±
POm	+	±	+	+	+	±	±	-
POp	+	±	±	+	+	±	±	-
dDm	+	-	±	±	±	±	-	-
Vd	+	-	+	+	+	-	-	-
Vv	+	+	+	±	+	-	-	-
BO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

- +
 - ±
 -
 - ND
- + 明確な陽性細胞が観察された神経核
 ± 微弱な陽性細胞が観察された神経核
 - 陽性細胞が観察されない神経核
 ND 本解析では観察していない神経核

本解析ではドット状のシグナルはノイズまたは定常的な発現と考え、陽性細胞とは判別しなかった。

3. 考察

本章の解析から、味刺激に対して応答する神経細胞の味質による分布の違いを明らかにできなかったが、味覚刺激に対して発現誘導される IEGs として、*c-fos* と *egr1-2* の 2 種を取得することに成功した。*fosb-1*、*fosb-2* も摂食により発現誘導される IEGs であると考えられた。しかし、NT 餌の摂取でも応答が見られたこと、味覚以外の中枢においても発現した細胞が観察されたことなど課題も見つかった。これらの結果を踏まえて本研究結果から考察できることについて以下に述べる。

3-1. 餌の摂取により発現が観察された IEGs について

本章での解析から、メダカにおいて味覚刺激に対して発現誘導される IEGs として、*c-fos* と *egr1-2* の 2 種を取得できた。また、*fosb-1* と *fosb-2* も摂食により発現誘導されることが示された。

c-fos については、ラットにおいて、既に味覚中枢で味刺激により発現誘導されることが示されている (Yamamoto *et al.*, 1994; Harrer and Travers, 1996; King *et al.*, 1999; Travers *et al.*, 1999; Travers, 2002)。*egr1* は、神経可塑性や長期記憶の保持に必要であることが示されている (Jones *et al.*, 2001; Bozon *et al.*, 2003) のに加え、匂い刺激によって発現誘導されることが報告されている。マウスの鋤鼻器官において、性フェロモンに対して *c-fos* よりも多くの神経細胞で発現誘導されることが示されているほか (Isogai *et al.*, 2011)、*c-fos* とともに、味覚増強嗅覚嫌悪学習によりラットの扁桃体や海馬、島皮質で匂い刺激により発現誘導されることが示されている (Dardou *et al.*, 2006)。そして、ごく最近メダカと同じ硬骨魚類であるゼブラフィッシュにおいて、苦味や酸味といった忌避味に対して *egr1* の発現が誘導されることが示されている (Boyer *et al.*, 2013)。

これらの結果から、本研究により取得した IEGs は、哺乳類や他の魚種においても味覚刺激によって発現誘導されることが示されており、メダカでも同様の解析ができることを示していると考えられる。メダカ脳における IEGs の発現を指標とした本章の解析が、哺乳類であるヒトの味の認識に関わる神経細胞の解析モデルとしても有用である可能性も考えられる。しかし、両遺伝子ともに嗅覚など他の感覚刺激に対しても発現誘導されることが示されているので、解析する際には他の感覚系からの刺激の入力をできる限りなくす方法を考える必要があるだろう。

fosb については、味刺激によって発現誘導されるという知見には乏しいが、マウスに対して LiCl の腹腔内投与により味覚中枢である NST や PBN において発現細胞が増加することが示されている (Swank, 1999)。よって、本章で発現誘導された *fosb-1*、*fosb-2* も味覚中枢において、より詳細な解析をすれば *c-fos* や *egr1-2* と同様に味覚刺激によって応答するメダカ IEGs として利用できる可能性が示唆される。

一方、哺乳類で味覚刺激によって発現誘導される IEGs として使用されている Arc がメダカには存在しなかった。メダカだけではなく、ゼブラフィッシュなど他の魚種でもデ

ータベース上に予想配列がなかったことから進化の途中で新たに生じた遺伝子であると考えられる。記憶の形成に関わる遺伝子であり、大脳が発達している哺乳類において複雑な機能を担っていることが示唆される。

3-2. 味刺激により応答した神経核について

本章における解析では、餌の摂取により、味覚中枢である XL、VIII、NGS、NDLI の他にも多くの神経核で *c-fos* や *egr1-2* の発現が観察された。具体的には、NXm、tV、TS、NDTL、NAT、NVT、Dp、Dl、vDm、Vp、POm、POp、dDm、Vd、Vv、BO である。これらの神経核において IEGs の発現が見られたことについて以下の考察を述べる。

まず、NDTL はキンギョにおいて味覚中枢である NGS や pTGN と直接接続しており、味覚神経回路中の主要な神経核であることが最近示されている (Kato *et al.*, 2012)。よってこの領域での応答細胞は味覚刺激によって IEGs の発現が誘導されたと示唆される。

TS は、体性感覚や側線感覚、聴覚など様々な神経の入力がなされている中枢である (Finger and Tong, 1984; Kiyohara *et al.*, 1986; Oka *et al.*, 1986; Finger, 2000; Xue *et al.*, 2006a; Xue *et al.*, 2006b)。今回の実験では、摂食行動に伴う口腔内への機械的な刺激により体性感覚への入力があったと考えられる。三叉神経の中枢である tV においても発現誘導が見られていることから体性感覚への刺激入力はなされているだろう。側線感覚は、水流や水圧などを感じ取る機械受容性の感覚で魚類に特有のものである。今回の実験では、餌をまいたときに多少水面が動くが、水流がないシャーレ内で餌を投与しており、水圧の変化もないので、側線感覚への入力はそれほど大きく寄与しないと考えられる。また、NF 群と餌を投与した群とで音による入力に差はないと考えられるので、聴覚への入力はないと考えられる。

NAT、NVT、POm、POp においては、第 2 章においても WGA の輸送が観察されているので、餌の摂取による味覚に起因した刺激がこれらの神経核へ入力されている可能性が考えられる。また一方で、NAT は、TS との神経接続があることが知られている (Striedter, 1991)。よって TS を介して体性感覚や側線感覚からの入力が NAT へ来ている可能性も考えられる。POm と POp は、視覚の神経が投射しているので、餌を見たことにより視覚系へ刺激が入力され、これらの神経核で IEGs の発現誘導がなされている可能性も考えられる。

終脳領域においては、複数の感覚神経が相互連絡していると考えられるので、判断が難しいが、味覚の高次中枢とされる dDm において IEGs の発現が誘導されていること、さらに Dp、Dl、vDm、Vp、Vv においては第 2 章において WGA の輸送がなされていることから味蕾との神経接続があり、味覚刺激に起因して発現誘導がなされた神経細胞も多いと考えられる。しかし Vd においては WGA の輸送も観察されなかった領域なので、味覚以外の刺激由来で IEGs の発現が誘導された可能性も考えられる。しか

し、Vd と NGS の神経接続は報告されているので (Folgueira *et al.*, 2004b; Folgueira *et al.*, 2004a)、味覚に起因した応答である可能性も十分考えられる。

また、BO については、嗅覚の中枢であるので、嗅覚刺激に起因して IEGs の発現が誘導されたと考えられ、餌中の何らかの成分に対してメダカの嗅神経細胞が応答していると考えられる。

3-3. 味刺激により応答した細胞の哺乳類との相違

ラットでは味覚 1 次中枢 NST および 2 次中枢 PBN において、c-fos の発現を指標として、味刺激によって応答する神経細胞の発現分布の解析がなされている (Yamamoto *et al.*, 1994; Harrer and Travers, 1996; King *et al.*, 1999; Travers *et al.*, 1999; Travers, 2002)。rostral NST の領域において、甘味・旨味刺激後に広範囲に c-Fos 発現細胞が観察されたのに対し、苦味刺激後では、内側部の狭い領域に密集して発現細胞が観察されている。PBN においては、rostral NST からの投射を密に受ける PBN 領域のうち、甘味・塩味による刺激で応答する c-Fos 発現細胞は背内側領域に集中し、苦味・酸味による刺激で応答する c-Fos 発現細胞は腹外側部領域に集中することが示されている

本章において、メダカの味覚 1 次中枢 XL、VIII では、AA 餌、DN 餌いずれを摂取した場合でも前後方向、背腹方向でも比較的広く c-fos の発現が誘導されていた (図 3-24 ~26)。味覚 2 次中枢 NGS では、AA 餌、DN 餌ともに外側部に強い陽性細胞が観察された (図 3-27)。c-fos 発現細胞の計数結果についても表 3-5 に載せたが、XL 後方部や NXm については個体による差が大きく、群ごとの特徴が示せなかった。さらに本章での解析では、NT 餌自体の摂食で応答する細胞が多数存在するため、その分を考慮しなければならず、比較が非常に困難である。しかし、NGS においては、DN 餌での c-fos 発現細胞のシグナル強度が AA 餌や NT 餌群に比べて比較的弱かったこと、さらに *egr1-2* に関しては、解析した 2 個体ともに DN 群では NGS での発現が観察されなかったことから、NGS において苦味刺激に応答する神経細胞は、旨味刺激に応答する神経細胞とは発現パターンが異なる可能性が示唆された。しかし、NT 餌に反応している神経細胞が非常に多く、アミノ酸、デナトニウムに起因して応答した細胞を判別できないため、ラットにおける過去の報告との比較は残念ながら今回の解析ではできなかった。

3-4. NT 餌摂取群で IEGs の発現が観察されたことについて

本解析では、NT 餌摂取群においても AA 餌や DN 餌摂取群と同様に IEGs の発現細胞が多数観察されてしまったため、味刺激に対して応答する神経細胞の味質による分布の違いを明らかにできなかった。NT 餌摂取群でこのように IEGs の発現が誘導されてしまった理由としては、2 点が考えられる。

1 点目としては、餌を摂取する際に味覚以外の刺激に起因した IEGs の発現が存在する点である。3-2 の考察より、実際に体性感覚や嗅覚などの中枢においても IEGs の発現が

観察されていることから、ある程度、味覚以外からの刺激の入力が存在し、それに起因して発現している細胞はあると推測される。NT 餌において発現した細胞の一部は味覚以外の刺激に起因した細胞であろう。

2 点目としては、メダカが NT 餌自体に何らかの味があると認識している可能性があるという点である。作製した NT 餌はメダカに投与する前に実際に味見をしており、人間では味を感じない餌にしてある。しかし、メダカがこの餌を無味と感じているかどうかは不明である。Aihara ら(2008)の解析では、NT 餌が苦味物質入りの餌よりも摂食量が有意に多く、旨味物質入りの餌よりも有意に少ないことは示されているが、NT 餌自体に対して実際に味を感じていないとは言い切れない。今回使用した NT 餌には、アガロース、高融点精製パーム油、蛍光色素である DiIC₁₂(3)、界面活性剤の Tween20、水のみが含まれている。ウナギでは、脂肪酸に対して神経応答があることが示されていることから (Yoshii *et al.*, 1979)、パーム油中に含まれる脂肪酸に対してメダカが味として認識するものが存在し、それに起因して IEGs の発現誘導が引き起こされている可能性が考えられる。油は乳化する際に必要となるので、もしメダカが脂肪酸の味を受容しているのであれば、蛍光餌の使用自体が困難になる可能性がある。その場合には、味刺激を行う際に、味溶液をピペットで直接口に投与するなど別の刺激の与え方を検討する必要がある。いずれにしてもメダカの脂肪酸の受容細胞の有無を解明することが必要であろう。

また、界面活性剤である Tween20 は、高濃度で使用すると、人間の舌では苦味を感じた。メダカではこの苦味を受容しているかどうか不明であるが、今後は別の界面活性剤の使用も検討することも必要であろう。

3-5. c-fos、egr1-2、fosb-1、fosb-2 以外の IEGs について

本解析の 2-2 より IEGs の選抜を行った。その結果、再現性良く摂食により発現が観察された遺伝子として c-fos、egr1-2、fosb-1、fosb-2 の 4 つが得られた。この他にも、c-myc、ngfi-b-1、nptx2-1、arcadlin-3 の 4 遺伝子については、再現性は取れなかったが摂食により応答している可能性がある (図 3-15~18)。また、餌を摂食した 6 群のいずれにおいても発現が観察されない遺伝子として、junb/c、rheb-1、rheb-2、rgs2、activinba-1、activinba-2、nptx2-2、tpa、neuritin1-2 の 9 遺伝子が示されたが (図 3-19~3-21)、今回の選抜ではノイズが出ないように ISH における発色時間を短くして解析した。よってこれらの 9 遺伝子においても微弱に応答している可能性は否定できない。また、味覚 1 次中枢である XL においてのみ観察して選抜したため、その他の味覚中枢の神経細胞において応答が観察される可能性も考えられる。よって、これらの遺伝子に関しては観察部位や刺激の種類によっては神経細胞マーカーとして利用できる場合も考えられる。

総合討論および今後の展望

本研究は、メダカをモデル動物として用いることにより、味情報の伝達・認識に関わる神経細胞の同定を目指したものである。その前提として、まず第1章において、メダカの味覚関連分子の発現相関を解析し、受容細胞レベルでの分子基盤的な知見を得ることに成功した。次に、第2章において、PLC-β2-WGA メダカを作出し、WGA タンパク質の輸送経路を解析することにより、マウスでは達成できなかった味の情報伝達・認識に関わる神経回路の高次中枢までの可視化に成功した。そして第3章においては、味覚刺激により発現誘導される IEGs を複数種同定できたが、味刺激に対して応答する神経細胞の味質による分布の違いを明らかにできなかった。本研究で得られた結果について、総合的により深く考察できる点および、今後メダカを用いてどのような味覚神経研究の進め方ができるかについて以下に述べたいと思う。

1. PLC-β2 発現細胞および PLC-β2 発現細胞を起点とした味覚神経回路中の神経細胞の占める割合について

第1章における解析結果から、メダカ PLC-β2 は、迷走神経が投射している鰓周辺部および咽頭歯部の味蕾では約 50%の味蕾細胞で発現していることが示された（第1章 2-3-1）。さらに第2章における結果から、PLC-β2-WGA メダカにおける迷走神経の神経節 Xg において WGA 陽性細胞が約 50%程度であった（第2章 2-7-2）。しかし、迷走神経へは内臓から投射している神経も含まれている点、迷走神経が投射している味覚1次中枢の XL では体性感覚神経も含まれている点 (Oka *et al.*, 1986) を考慮すると、Xg に含まれる神経細胞群は味蕾細胞群以上に多種多様な細胞集団であると推測される。このことを踏まえると、味蕾細胞内の PLC-β2 発現細胞と Xg 内の PLC-β2 発現細胞と接続する神経細胞の割合がほぼ同じであることは、一つの味蕾細胞に対して接続する神経が複数あることを示唆している。今後は PLC-β2 以外の味蕾細胞を起点とした神経回路を解析することで、この現象が PLC-β2 発現細胞に特有のものなのか明らかになると考えられる。

また、PLC-β2-WGA メダカの味覚中枢における WGA 陽性細胞の割合についても解析を行いたかったが、検出された WGA が顆粒状で小さく、WGA が輸送された細胞を明確に判断することができなかった。さらに隣接する神経核との境界の判断が困難な神経核（終脳の陽性細胞が連続して観察された領域（第2章 図 2-18））も多かったことから計数は断念した。今後、WGA のシグナルを増強することや神経核同士の境目を明確にできるマーカー分子を見出すことなど技術的な改良が必要である。

2. WGA が輸送された神経核と IEGs の発現が観察された神経核の違い

第2章において、PLC-β2-WGA メダカの中枢で WGA が検出された神経核（第2章 表 2-2）と、第3章で餌の摂取により c-fos の発現が観察された神経核（第3章 表 3-6）について比較をした。その結果、共通して陽性細胞が観察された神経核は、XL、VIII、NGS、

NDLI、dDm、vDm、DI (vDI)、Dp、Vp、Vv、NXm、tV、NAT、NVT、POm、POp である。WGA の輸送のみ観察された神経核は、pTGN、Vs、RF、NRPH、SPV、DT、CM、NPPv、MN である。c-fos の発現のみが観察された神経核は、Vd、TS、NDTL、BO である (表 4-1)。

まず、c-fos の発現のみ見られた神経核に比べて、共通して陽性細胞が観察された神経核が多く占められていることから、摂食により c-fos の発現が観察された神経細胞の多くは味蕾細胞由来の味覚刺激を介した発現が示唆される。しかし、第 3 章の考察でも触れたが、TS については体性感覚や側線感覚、聴覚の神経が、BO には嗅覚の神経が投射していることから味覚以外の刺激の入力による IEGs 発現細胞もある程度存在すると考えられる。

一方、WGA の輸送のみ観察された神経核は、pTGN 以外は味覚中枢ではなく機能も複数持つ神経核が多かった (第 2 章 表 2-2)。機能との関連は不明であるが、哺乳類では IEGs が発現誘導されるまでの時間が脳の部位によって異なることが報告されており (Morgan *et al.*, 1987; Link *et al.*, 1995)、これらの神経核では他の味覚中枢に比べて IEGs が発現するまでの時間が遅い (または早い) ため、今回の解析で調べた餌摂取後 30 分では発現が観察されなかった可能性がある。RF については、迷走神経を介した反射経路上の神経核でもあり (Finger, 2009)、味覚神経回路において重要な神経核であると考えられる。さらに味覚以外にも体性感覚 (Oka *et al.*, 1986) や動眼・滑車・外転神経の投射も報告されており (Torres *et al.*, 1992)、味覚やその他の感覚系を介した刺激が入力されている可能性が十分考えられるが、IEGs の発現が観察されなかった。c-fos は全ての神経細胞において興奮時に発現するわけではない (Kovacs, 1998) ことが示されているため、刺激の入力があっても発現が観察されなかった可能性はある。今回解析した c-fos、egr1-2 以外の IEGs (fosb-1、fosb-2 など) を用いた解析を行うなど別のアプローチによる解析の必要があるだろう。

3. 当初想定していた WGA と IEGs の神経核内での陽性細胞の分布の違い

第 2 章で PLC-β2-WGA メダカにおいて可視化された神経細胞は、PLC-β2 を起点とするため、T1Rs (旨味受容) および T2R1 (苦味受容) を含む味蕾細胞と接続している神経細胞である。一方、第 3 章における IEGs 発現細胞は、当初の予定では、AA 餌摂取群では T1Rs を介した応答、DN 餌摂取群では T2R1 を介した応答によって発現誘導された細胞であると想定していた。この想定通りであれば、AA 餌摂取群や DN 餌摂取群において味覚刺激によって IEGs の発現が観察された味覚中枢の神経細胞は、基本的に PLC-β2-WGA メダカにおいて可視化された神経細胞の一部であると推測される。よって、味覚中枢における 2 章と 3 章での陽性細胞の局在を比較することで、味ごとに応答する神経細胞の分布の違い (この場合は旨味と苦味の情報伝達に関わる神経細胞の違い) を把握することができると考えていた。

しかし、第3章での解析では、実際には、NT 餌でも発現が観察されていること、体性感覚や嗅覚の中枢でも発現が観察されていることから考えて、T1Rs や T2R1 を介した応答以外にも含まれていることが示唆される。よって、厳密な議論をするためには、摂食させる餌の成分を AA、DN 以外はメダカが全く味として認識しないものに代え、他の感覚系からの刺激も極力減らす方法を検討し、再度解析を行う必要がある。

ただし、上記のことを踏まえたうえで、味覚以外の神経の直接の投射が報告されていないため、味覚に起因した発現のみが観察されていると考えられる NGS について議論する。NGS では、PLC-β2-WGA メダカにおいて WGA が内側部の腹側(第2章 図 2-16A, B) と外側部(第2章 図 2-11A, B) に分布が分かっていた。一方、AA 餌摂取により発現した *c-fos* は、NGS 領域の外側部のみに局在していた(第3章 図 3-27)。この分布は *egr1-2* においても同様である(第3章 図 3-40)。DN 餌摂取により発現した *c-fos* も NGS 領域の外側部に多かった。*egr1-2* については、DN 餌摂取群では発現が観察されなかった。また NT 餌摂取群でも、両遺伝子の発現は、NGS 領域の外側部に局在していた。この結果から、WGA 陽性細胞のみ観察された NGS の内側部の腹側領域は、旨味と苦味の味情報伝達には関係がない神経細胞(PLC-β2 発現細胞のうち T1Rs や T2R1 を発現していない細胞と接続している神経細胞)である可能性が示唆される。また、外側部の神経細胞の一部は、旨味や苦味の味情報伝達に関係していることが示唆される。

4. WGA と IEGs との二重染色について

3 で述べた味覚中枢における 2 章と 3 章での陽性細胞の局在を解析するうえで、より明確に比較をする方法として、PLC-β2-WGA メダカに対して、AA 餌や DN 餌を摂食させ、IEGs の発現が誘導される神経細胞と WGA で標識された神経細胞の重なりを二重染色により解析することが考えられる。

結果には記載しなかったが、実際に ISH と IHC の二重蛍光染色を行い、AA 餌、DN 餌、NT 餌を摂食させた PLC-β2-WGA メダカに対して XL において WGA タンパク質と *c-fos* mRNA の二重検出を試みた。しかし、1 か月齢のメダカでは WGA タンパク質の輸送量自体が中枢ではまだ少なく、WGA の検出がほとんどできなかった。また、*c-fos* の発現も XL では微弱で検出が困難であった。ISH と IHC の二重蛍光染色は技術的に困難であったので、抗 *c-fos* 抗体と抗 WGA 抗体を用いた二重免疫組織染色も試みた。メダカにおいてウェスタンブロッティングでタンパク質が検出されており (Okuyama *et al.*, 2011)、かつゼブラフィッシュの嗅神経細胞の切片において IHC により発現が観察された抗 *c-fos* 抗体 (Hussain *et al.*, 2013) を用いて染色を行ったが、現状ではメダカの脳では *c-fos* タンパク質のシグナルが検出できていない。ゼブラフィッシュとは切片の固定条件が異なるため、メダカの脳でタンパク質が検出される抗原の賦活化条件のさらなる検討が必要である。

いずれの染色も技術的な改善が必要であるが、それに加えて、解析するメダカをより

成長させた個体にする必要がある。第2章における解析から、WGAは成長が進むにつれてより高次中枢まで輸送がなされ、染色強度も強くなる。よって、9か月齢のPLC-β2-WGAメダカに対して、AA餌、DN餌、NT餌を摂取させることにより、XLのみならずNGS、NDLI、dDmといったより高次の味覚中枢でもWGAとIEGsの陽性細胞の相関を解析することができる。また成魚では、体の透明性が失われており、腹部の蛍光が容易に観察できないので、餌を摂取したことが容易にわかるように摂食状況をカメラで記録しておくなどの方法が必要であろう。

5. 哺乳類と比較してメダカを用いた味覚神経研究の利点

本研究の第2章から、遺伝子工学的に神経トレーサーを発現させることにより、味覚に関連する神経回路をマウスよりも高次中枢まで解析することができるという点で、メダカは我々ヒトを含む脊椎動物の味覚神経回路の研究において、モデル動物として非常に有用であることが示された。今後はこの利点を活かして、異なる味細胞を起点とした味情報伝達神経回路を複数種解析し、味ごとに輸送される神経細胞がどのように異なるかを解析することで神経系における味覚情報コーディング機構の解明につながると考えられる（詳細は6-1, 2に記載）。

また、第3章から、IEGsを用いた味刺激に応答する神経細胞の解析については、味質による応答細胞の違いを明らかにできなかった。しかし、今後餌の組成を変更してNT餌での味覚応答がなくなるように改良し、解析領域をNGSのような味覚神経のみが投射する中枢に限定すれば、味質によるIEGs発現細胞分布の差を解析することは十分に可能であると考えられる。過去のラットにおける外科手術によりカニューレを装着させ、強制的に味刺激を与えるといった解析(Grill and Norgren, 1978)に比べて、メダカでは蛍光餌を作製し、投与するだけでIEGsの応答を解析できるという点で簡便に実験が行え、哺乳類での解析に比べて有利であると考えられる。

メダカを用いる利点としてその他には、体の透明性と個体サイズの小ささが挙げられる。序論でも触れたが、これらの利点を活かすことで、ゼブラフィッシュを用いて他の感覚系において既になされている蛍光カルシウムセンサーを用いた解析を検討している(Wachowiak *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2011; Muto *et al.*, 2013)。具体的には、味刺激によって応答する神経細胞を生きた状態で観察するという解析である（詳細は6-3に記載）。

6. メダカを用いた味覚神経研究における今後の展望

6-1. WGAに標識タグをつけて染め分ける解析

本研究において、第2章の解析から、味蕾の数が多く、脳のサイズが小さいメダカが味覚の神経伝達回路の解析に有効であることが示された。この特徴を活かして、PLC-β2-WGAメダカ同様に、味蕾細胞に発現する別の遺伝子のプロモーターを取得し、

WGA トランスジーンを発現する Tg メダカを作出し、特定の味細胞を起点とした味情報伝達回路を可視化することが有効であろう。しかし、別のプロモーターの制御化で WGA トランスジーンを発現するメダカ同士を交配し、二重 Tg メダカを作出したとしても、陽性神経細胞数の変化は観察されるかもしれないが、同一の中枢領域内で可視化された神経細胞がどの基本味に由来した WGA タンパク質なのかは不明である。つまり、神経系における味覚情報のコーディング機構を解明するには可視化された神経細胞がどの基本味由来の細胞かを識別する必要がある。識別するためには、二重 Tg 個体内で別々に検出可能なトランスジーンを開発することが求められる。

そこで、トランスジーンの開発については、WGA トランスジーンを改変する 2 パターンの方法が考えられる。1 つには、短いタグ配列を WGA cDNA 配列につなぎ、タグ抗体を用いて染色し、WGA タンパク質の輸送を解析するという方法である (図 4-1)。タグ配列を WGA cDNA 配列に連結したコンストラクトを、異なる 2 つのタグ配列を用いて 2 種作製できれば各タグ配列の抗体で染色することにより容易に染め分けることが可能である。しかし、His、Myc、HA などのタグ配列がメダカ組織に非特異的結合をしないことをまず確認する必要がある。さらに、使用可能なタグ配列の WGA cDNA 配列への連結部位も検討が必要である。WGA の糖鎖結合領域の構造を変化させず、かつタグ配列が表面に出て抗体に認識されるような部分に連結しないと機能しないと考えられる。タグ配列や連結部位を検討するためには、多数のトランスジーンのコストラクトを作製し、Tg 個体を多種類作出しなければならないと考えられる。メダカは Tg 個体の作出が容易であるので、このような Tg 個体の大量作出および選抜には適している。さらに本研究により、受精後 12 日には WGA タンパク質の神経節への輸送が観察されているので (第 2 章 図 2-7)、プラスミド注入から 12 日で選抜が可能であると考えられ、選抜にかかる日数も短く、効率も非常に良いと考えられる。

改変のもう 1 つの方法は、GFP のような蛍光タンパク質の cDNA を WGA 遺伝子配列と融合させてトランスジーンを構築し、WGA タンパク質の輸送を蛍光タンパク質の発する蛍光で観察するという方法である。この方法ができれば染色する必要がなく、生きたままの状態が発する蛍光により経路の可視化が可能となる。しかし他の研究グループにより、WGA cDNA 配列のアミノ末端およびカルボキシル末端に多様な蛍光タンパク質を融合させて解析が行われているが、Sugita and Shiba (2005) の報告を除き、いずれの場合も WGA タンパク質と蛍光タンパク質が分離し、別々の挙動を示し、困難を極めているようである (Yoshihara, 2010)。今後このような融合トランスジーンを作製するには蛍光タンパク質を連結させる部分を WGA cDNA 配列の末端以外で検討しなければならない。しかし先ほど述べた短いタグ配列に比べ、蛍光タンパク質自体が大きいので、WGA タンパク質と蛍光タンパク質が分離する可能性や WGA タンパク質の立体構造にも影響を与える可能性を考慮しなければならず、使用可能なトランスジーンを作製はタグ配列以上に困難であると考えられる。

6-2. 新規神経トレーサーを用いた解析

6-1 における解析のように WGA の配列を改変させて解析する方法のほかに、WGA に代わる新規の経シナプス性神経トレーサーを取得することができれば解析は非常に容易である。WGA の神経トレーサーとしての性質は、植物レクチンの特徴である特定の糖鎖に付加するという性質である。既にマウスでは、大麦レクチン (barley lectin) を用いて嗅覚系神経伝達回路を解析した報告があるので (Horowitz *et al.*, 1999)、WGA 以外の植物レクチンで WGA 同様にメダカの神経回路を輸送される性質があるものを探索することが有効であろう。現在、当研究グループでは新たな神経トレーサー候補物質の探索を試みている (池永直弥 修士論文)。

6-3. 色素欠損メダカを用いた味応答細胞の *in vivo* イメージング解析

5 にも述べたようにメダカの透明性と個体サイズの小ささを活かした解析として、色素欠損メダカを用いた味応答神経細胞の *in vivo* 解析を試みている。具体的には、体の 3 種の色素が欠損している See-Through II 系統のメダカ (Wakamatsu *et al.*, 2001) に対して、 Ca^{2+} の濃度に応じて蛍光強度が変化する改変型 GFP である GCaMP (Nakai *et al.*, 2001) を脳神経細胞に発現させた Tg メダカを作出し、味溶液を添加した際の脳神経細胞における GCaMP の蛍光強度変化を解析している (図 4-2)。透明性が高く、脳の厚みもマウスやラットに比べてはるかに薄いメダカ稚魚 (約 15~20 日齢) を使用しており、共焦点レーザー顕微鏡を用いることで脳における蛍光強度変化を十分解析できると考えている。メダカでは、味覚高次中枢とされる dDm や味覚 1 次中枢 XL、VIII が背側の表層部に隆起して存在しているため、蛍光強度変化が見やすく、特に解析しやすい領域であると考えている。マウスでは、既に味覚高次中枢 GC のごく表層部においては味刺激によって応答する神経細胞のマッピングがなされている点 (Accolla *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011)、味覚 1 次中枢 NST が表層部に位置していないため解析が困難である点を考慮すると、XL や VIII において解析することにより脊椎動物における味の認識に関わる神経細胞の味質による差を明らかにする一助になると考えられる。現在は XL において味溶液を投与した際に応答する細胞の蛍光強度変化を解析するための系を作成している段階である。このメダカは産業技術総合研究所の弓場俊輔博士より供与していただき解析を行っている。

本研究では、メダカを用いることにより、マウスでは達成できなかった味の情報伝達・認識に関わる神経回路の高次中枢までの可視化に成功した。また、味覚刺激により発現する IEGs を複数種同定できた。このようにメダカをモデルとして、我々ヒトを含む脊椎動物の味覚神経研究における一定の成果を得ることができた。しかし、味の情報伝達、認識に関わる神経細胞の特徴を把握し、味質ごとの違いを明らかにするにはまだまだ課題があり、上記のような解析を行う必要がある。本研究で得られた知見および今後行う

上記の研究成果が脊椎動物における味覚神経研究の発展につながり、最終的にヒトが脳で味を認識する仕組みの解明の一助となることを期待したい。

表4-1 WGA陽性細胞とc-fos陽性細胞が検出された神経核の比較

機能	略称	名称	WGA	c-fos
味覚1次中枢	XL	迷走葉	+	+
	VIII (NVIIIs)	顔面葉	+	+
味覚2次中枢	NGS	第2味覚核	+	+
味覚3次中枢	NDLI	下葉分散核	+	+
	pTGN	糸球体第3味覚核	+	
終脳の高次中枢	dDm	終脳背側野内側部の背側部	+	+
	vDm	終脳背側野内側部の腹側部	+	+
	vDI	終脳背側野外側部の腹側部	+	+
	Dp	終脳背側野後部	+	+
	Vd	終脳腹側野背側部		+
	Vs	終脳腹側野上交連部	+	
	Vp	終脳腹側野後部	+	+
	Vv	終脳腹側野腹側部	+	+
三叉神経	tV (NTv)	三叉神経下行根	+	+
運動核	NXm	迷走神経運動核	+	+
その他	RF	網様体	+	
	NRPH	縫線核	+	
	SPV	脳室周辺灰色地帯	+	
	DT	背側被蓋核	+	
	CM	乳頭体	+	
	NPPv	脳室周囲後核	+	
	POm	視索前核マグノ細胞部	+	+
	POp	視索前核小細胞性部	+	+
	MN	内側核	+	
	NAT	前隆起核	+	+
	NVT	隆起腹側核	+	+
	TS	半円隆起		+
	NDTL	外側隆起分散核		+
BO	嗅球		+	

(注1)WGAの欄は9か月齢のTgメダカで検出された神経核について、c-fosの欄は餌を摂取した群の少なくとも1個体においてc-fosの発現が観察された神経核について+と表記した。

(注2)c-fosのvDIの欄は、DIとして検出したものを指す。

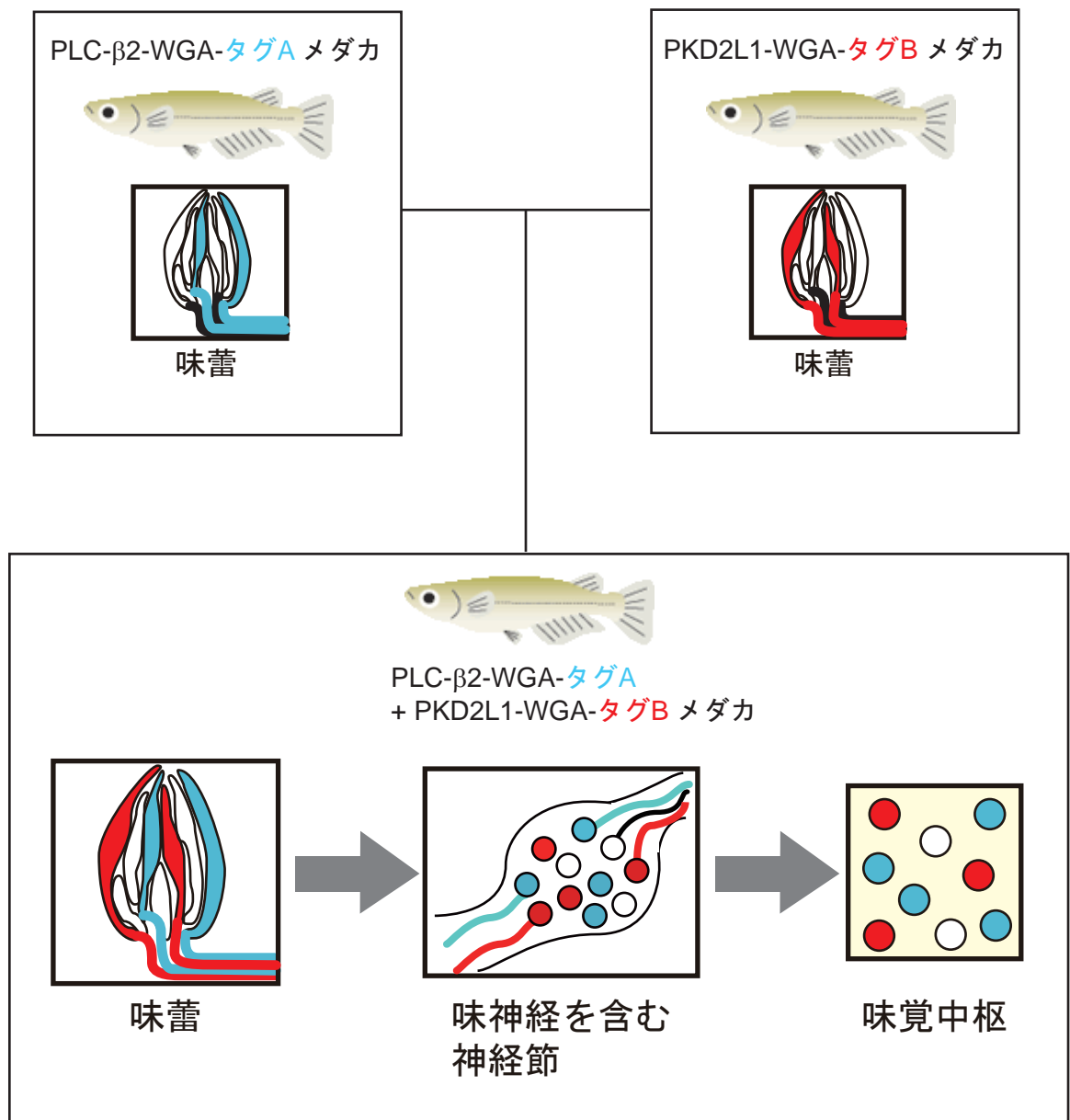


図4-1 タグ配列をWGA cDNA配列につなぎ、味覚情報伝達経路を染め分ける方法
ある味質の味細胞にタグ付きWGAトランスジーンを発現するTgメダカを2種作出する。2種のメダカは味質とタグがそれぞれ異なるように設計する。この2種のメダカを交配して二重Tgメダカを作出し、このメダカに対し、2つのタグ抗体を用いた二重IHCを行うことで味蕾から味覚中枢までのWGAタンパク質陽性細胞の重なりを観察することができる。

PLC-β2-WGA-タグA メダカ: PLC-β2発現細胞にタグA配列をつないだWGAタンパク質を発現するTgメダカ
PKD2L1-WGA-タグB メダカ: PKD2L1発現細胞にタグB配列をつないだWGAタンパク質を発現するTgメダカ

味蕾の図では、青はPLC-β2発現味蕾細胞および接続する味神経、赤はPKD2L1発現味蕾細胞および接続する味神経。神経節と味覚中枢では、青はPLC-β2発現味蕾細胞と接続している神経細胞と味神経。赤はPKD2L1発現味蕾細胞と接続する神経細胞と味神経。

labeled line仮説を元に図を作成した。

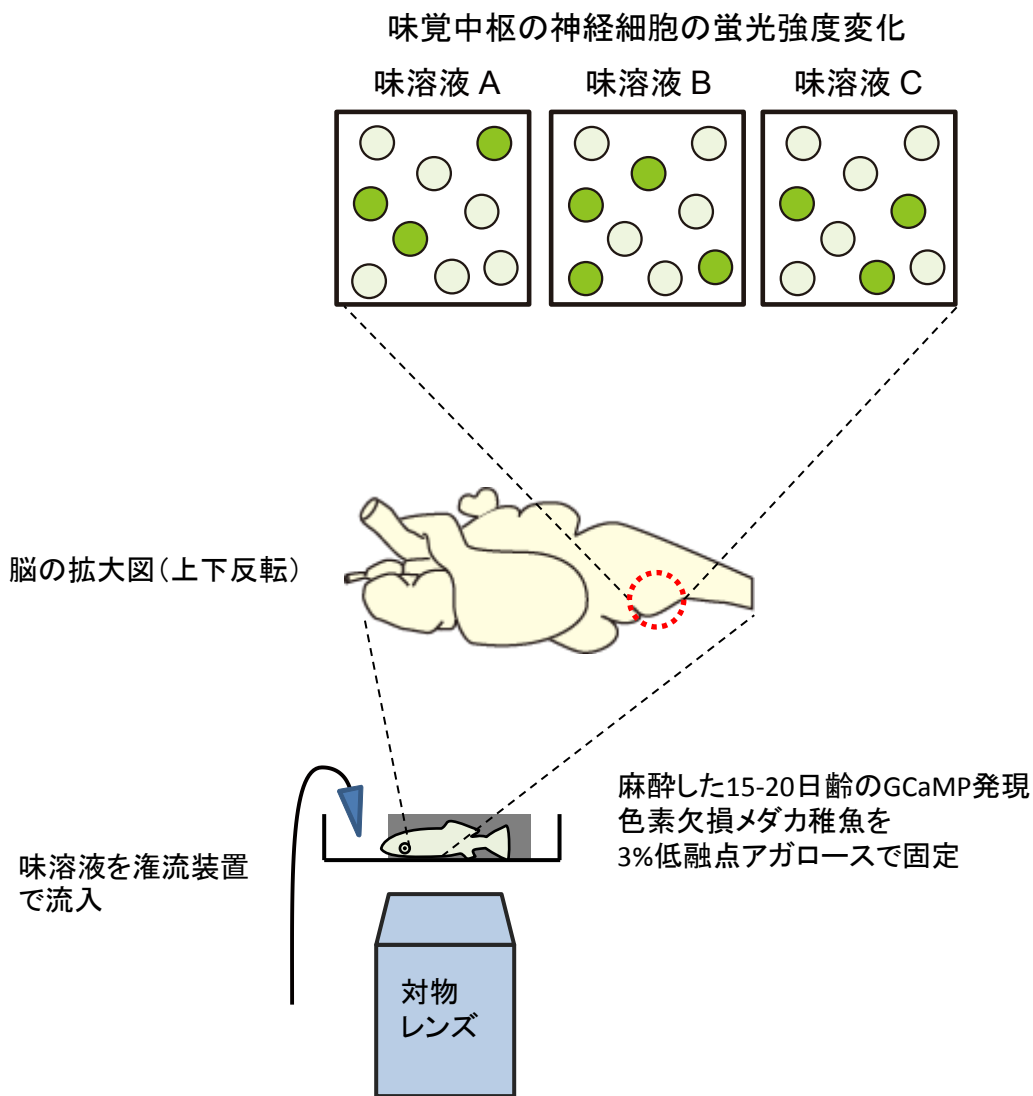


図4-2 色素欠損メダカを用いたメダカの味応答神経細胞の*in vivo* イメージングの方法

麻醉した15-20日齢のGCaMP発現色素欠損メダカ稚魚を、背側を下に向け、低融点アガロースで固定させた。味溶液をペリスタポンプを用いて一定流速で流入させ、延髄の味覚中枢領域XL(赤破線部)でのGFP蛍光強度変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

黄緑: GCaMPの蛍光が弱い細胞

濃い緑: 味溶液により応答し、 Ca^{2+} 濃度が上昇したことでGCaMPの蛍光が強くなった細胞

【参考文献】

- Accolla R, Bathellier B, Petersen CC, Carleton A. 2007. Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *J Neurosci* 27:1396-1404.
- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, Zuker CS. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100:693-702.
- Aihara Y, Yasuoka A, Iwamoto S, Yoshida Y, Misaka T, Abe K. 2008. Construction of a taste-blind medaka fish and quantitative assay of its preference-aversion behavior. *Genes Brain Behav* 7:924-932.
- Aihara Y, Yasuoka A, Yoshida Y, Ohmoto M, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Furutani-Seiki M, Matsumoto I, Abe K. 2007. Transgenic labeling of taste receptor cells in model fish under the control of the 5'-upstream region of medaka *phospholipase C-beta 2* gene. *Gene Expr Patterns* 7:149-157.
- Amir-Zilberstein L, Blechman J, Sztainberg Y, Norton WH, Reuveny A, Borodovsky N, Tahor M, Bonkowsky JL, Bally-Cuif L, Chen A, Levkowitz G. 2012. Homeodomain protein otp and activity-dependent splicing modulate neuronal adaptation to stress. *Neuron* 73:279-291.
- Andreasson K, Worley PF. 1995. Induction of beta-A activin expression by synaptic activity and during neocortical development. *Neuroscience* 69:781-796.
- Anken R, Bourrat F. 1998. Brain atlas of the medakafish *Oryzias latipes*.
- Asano-Miyoshi M, Abe K, Emori Y. 2000. Co-expression of calcium signaling components in vertebrate taste bud cells. *Neurosci Lett* 283:61-64.
- Atema J. 1971. Structures and functions of the sense of taste in the catfish (*Ictalurus natalis*). *Brain Behav Evol* 4:273-294.
- Boyer B, Ernest S, Rosa F. 2013. Egr-1 induction provides a genetic response to food aversion in zebrafish. *Front Behav Neurosci* 7:51.
- Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S. 2003. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:805-814.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Haganir RL, Worley PF. 1997. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:284-288.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF. 2008. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28:11760-11767.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS. 2010. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*

464:297-301.

- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100:703-711.
- Chen X, Gabitto M, Peng Y, Ryba NJ, Zuker CS. 2011. A gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain. *Science* 333:1262-1266.
- Cole AJ, Abu-Shakra S, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. 1990. Rapid rise in transcription factor mRNAs in rat brain after electroshock-induced seizures. *J Neurochem* 55:1920-1927.
- Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. 1989. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340:474-476.
- Corson J, Aldridge A, Wilmoth K, Erisir A. 2012. A survey of oral cavity afferents to the rat nucleus tractus solitarius. *J Comp Neurol* 520:495-527.
- Dahm R, Geisler R, Nusslein-Volhard C. 2005. Zebrafish (*Danio rerio*) Genome and Genetics. *Encyclopedia Mol Cell Biol Mol Med* 2nd Ed 15:593-626.
- Damak S, Mosinger B, Margolskee RF. 2008. Transsynaptic transport of wheat germ agglutinin expressed in a subset of type II taste cells of transgenic mice. *BMC Neurosci* 9:96.
- Dardou D, Datiche F, Cattarelli M. 2006. Fos and Egr1 expression in the rat brain in response to olfactory cue after taste-potentiated odor aversion retrieval. *Learn Mem* 13:150-160.
- Davis M. 1992. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 13:35-41.
- Doetsch GS, Erickson RP. 1970. Synaptic processing of taste-quality information in the nucleus tractus solitarius of the rat. *J Neurophysiol* 33:490-507.
- Finger TE. 1976. Gustatory pathways in the bullhead catfish. 1. Connections of the anterior ganglion. *J Comp Neurol* 165:513-526.
- Finger TE. 1978. Gustatory pathways in the bullhead catfish. II. Facial lobe connections. *J Comp Neurol* 180:691-705.
- Finger TE. 2000. Ascending spinal systems in the fish, *Prionotus carolinus*. *J Comp Neurol* 422:106-122.
- Finger TE. 2009. Evolution of gustatory reflex systems in the brainstems of fishes. *Integr Zool* 4:53-63.
- Finger TE, Bottger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H, Silver WL. 2003. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8981-8986.

- Finger TE, Bullock TH. 1982. Thalamic center for the lateral line system in the catfish *Ictalurus nebulosus*: evoked potential evidence. *J Neurobiol* 13:39-47.
- Finger TE, Tong SL. 1984. Central organization of eighth nerve and mechanosensory lateral line systems in the brainstem of ictalurid catfish. *J Comp Neurol* 229:129-151.
- Folgueira M, Anadon R, Yanez J. 2004a. An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I: Olfactory bulb and ventral area. *J Comp Neurol* 480:180-203.
- Folgueira M, Anadon R, Yanez J. 2004b. Experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II: Dorsal area and preoptic region. *J Comp Neurol* 480:204-233.
- Frank M. 1973. An analysis of hamster afferent taste nerve response functions. *J Gen Physiol* 61:588-618.
- Galindo MM, Voigt N, Stein J, van Lengerich J, Raguse JD, Hofmann T, Meyerhof W, Behrens M. 2011. G Protein-Coupled Receptors in Human Fat Taste Perception. *Chem Senses*.
- Ganchrow JR, Erickson RP. 1970. Neural correlates of gustatory intensity and quality. *J Neurophysiol* 33:768-783.
- Gonzalez MJ, Manso MJ, Anadon R. 1997. Octavolateral neurons projecting to the middle and posterior rhombencephalic reticular nuclei of larval lamprey: a retrograde horseradish peroxidase labeling study. *J Comp Neurol* 384:396-408.
- Grill HJ, Norgren R. 1978. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res* 143:263-279.
- Hamilton RB, Norgren R. 1984. Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol* 222:560-577.
- Hansen A, Reutter K, Zeiske E. 2002. Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev Dyn* 223:483-496.
- Harrer MI, Travers SP. 1996. Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the solitary tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine. *Brain Res* 711:125-137.
- Herrick CJ. 1901. The cranial nerves and cutaneous sense organs of the north american siluroid fishes. *J Comp Neurol* 11:177-249.
- Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Muller C, Luthi A. 2008. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* 454:600-606.
- Hevezi P, Moyer BD, Lu M, Gao N, White E, Echeverri F, Kalabat D, Soto H, Laita B, Li C, Yeh SA, Zoller M, Zlotnik A. 2009. Genome-wide analysis of gene expression in

- primate taste buds reveals links to diverse processes. *PLoS One* 4:e6395.
- Hisatsune C, Yasumatsu K, Takahashi-Iwanaga H, Ogawa N, Kuroda Y, Yoshida R, Ninomiya Y, Mikoshiba K. 2007. Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 282:37225-37231.
- Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, Zuker CS. 1999. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96:541-551.
- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ. 1992. Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5764-5768.
- Horio N, Yoshida R, Yasumatsu K, Yanagawa Y, Ishimaru Y, Matsunami H, Ninomiya Y. 2011. Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLoS One* 6:e20007.
- Horowitz LF, Montmayeur JP, Echelard Y, Buck LB. 1999. A genetic approach to trace neural circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3194-3199.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ, Zuker CS. 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442:934-938.
- Huez G, Bruck C, Cleuter Y. 1981. Translational stability of native and deadenylylated rabbit globin mRNA injected into HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:908-911.
- Hussain A, Saraiva LR, Ferrero DM, Ahuja G, Krishna VS, Liberles SD, Korsching SI. 2013. High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:19579-19584.
- Inberg S, Elkobi A, Edri E, Rosenblum K. 2013. Taste familiarity is inversely correlated with Arc/Arg3.1 hemispheric lateralization. *J Neurosci* 33:11734-11743.
- Ingi T, Krumins AM, Chidiac P, Brothers GM, Chung S, Snow BE, Barnes CA, Lanahan AA, Siderovski DP, Ross EM, Gilman AG, Worley PF. 1998. Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J Neurosci* 18:7178-7188.
- Inui-Yamamoto C, Yoshioka Y, Inui T, Sasaki KS, Ooi Y, Ueda K, Seiyama A, Ohzawa I. 2010. The brain mapping of the retrieval of conditioned taste aversion memory using manganese-enhanced magnetic resonance imaging in rats. *Neuroscience* 167:199-204.
- Ishikawa Y, Yoshimoto Y, Ito H. 1999. A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *The Fish Biology Journal Medaka* 10:1-26.
- Ishimaru Y, Abe M, Asakura T, Imai H, Abe K. 2012. Expression analysis of taste signal

- transduction molecules in the fungiform and circumvallate papillae of the rhesus macaque, *Macaca mulatta*. *PLoS One* 7:e45426.
- Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H. 2006. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12569-12574.
- Ishimaru Y, Okada S, Naito H, Nagai T, Yasuoka A, Matsumoto I, Abe K. 2005. Two families of candidate taste receptors in fishes. *Mech Dev* 122:1310-1321.
- Isogai Y, Si S, Pont-Lezica L, Tan T, Kapoor V, Murthy VN, Dulac C. 2011. Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature* 478:241-245.
- Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S. 2001. A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 4:289-296.
- Kanwal JS, Finger TE. 1997. Parallel medullary gustatospinal pathways in a catfish: possible neural substrates for taste-mediated food search. *J Neurosci* 17:4873-4885.
- Kanwal JS, Finger TE, Caprio J. 1988. Forebrain connections of the gustatory system in ictalurid catfishes. *J Comp Neurol* 278:353-376.
- Kato T, Yamada Y, Yamamoto N. 2011. General visceral and gustatory connections of the posterior thalamic nucleus of goldfish. *J Comp Neurol* 519:3102-3123.
- Kato T, Yamada Y, Yamamoto N. 2012. Ascending gustatory pathways to the telencephalon in goldfish. *J Comp Neurol* 520:2475-2499.
- Kauselmann G, Weiler M, Wulff P, Jessberger S, Konietzko U, Scafidi J, Staubli U, Bereiter-Hahn J, Strebhardt K, Kuhl D. 1999. The polo-like protein kinases *Fnk* and *Snk* associate with a Ca^{2+} - and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. *EMBO J* 18:5528-5539.
- Kim MR, Kusakabe Y, Miura H, Shindo Y, Ninomiya Y, Hino A. 2003. Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun* 312:500-506.
- King CT, Travers SP, Rowland NE, Garcea M, Spector AC. 1999. Glossopharyngeal nerve transection eliminates quinine-stimulated fos-like immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract: implications for a functional topography of gustatory nerve input in rats. *J Neurosci* 19:3107-3121.
- Kiyohara S, Houman H, Yamashita S, Caprio J, Marui T. 1986. Morphological evidence for a direct projection of trigeminal nerve fibers to the primary gustatory center in the sea catfish *Plotosus anguillaris*. *Brain Res* 379:353-357.
- Kovacs KJ. 1998. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional

- map. *Neurochem Int* 33:287-297.
- Kusakabe Y, Yasuoka A, Asano-Miyoshi M, Iwabuchi K, Matsumoto I, Arai S, Emori Y, Abe K. 2000. Comprehensive study on G protein alpha-subunits in taste bud cells, with special reference to the occurrence of Galphai2 as a major Galpha species. *Chem Senses* 25:525-531.
- Lamb CF, Caprio J. 1993. Diencephalic gustatory connections in the channel catfish. *J Comp Neurol* 337:400-418.
- Li J, Mack JA, Souren M, Yaksi E, Higashijima S, Mione M, Fetcho JR, Friedrich RW. 2005. Early development of functional spatial maps in the zebrafish olfactory bulb. *J Neurosci* 25:5784-5795.
- Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. 2002. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4692-4696.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. 1995. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5734-5738.
- Lundy RF, Jr., Contreras RJ. 1999. Gustatory neuron types in rat geniculate ganglion. *J Neurophysiol* 82:2970-2988.
- Manrique T, Moron I, Ballesteros MA, Guerrero RM, Gallo M. 2007. Hippocampus, ageing, and taste memories. *Chem Senses* 32:111-117.
- Marchant TA, Dulka JG, Peter RE. 1989. Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary content of immunoreactive somatostatin in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Gen Comp Endocrinol* 73:458-468.
- Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T, Kitabayashi N, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T. 2009. Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci Lett* 450:186-190.
- Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB. 2000. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404:601-604.
- McLaughlin SK, McKinnon PJ, Margolskee RF. 1992. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357:563-569.
- Mitani Y, Kanda S, Akazome Y, Zempo B, Oka Y. 2010. Hypothalamic Kiss1 but not Kiss2 neurons are involved in estrogen feedback in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 151:1751-1759.
- Miyamichi K, Amat F, Moussavi F, Wang C, Wickersham I, Wall NR, Taniguchi H, Tasic B, Huang ZJ, He Z, Callaway EM, Horowitz MA, Luo L. 2011. Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. *Nature* 472:191-196.
- Miyoshi MA, Abe K, Emori Y. 2001. IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed

- with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chem Senses* 26:259-265.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237:192-197.
- Morita Y, Ito H, Masai H. 1980. Central gustatory paths in the crucian carp, *Carassius carassius*. *J Comp Neurol* 191:119-132.
- Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJ. 2005. The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* 434:225-229.
- Mueller T, Wullimann MF. 2009. An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain Behav Evol* 74:30-42.
- Muto A, Ohkura M, Abe G, Nakai J, Kawakami K. 2013. Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Curr Biol* 23:307-311.
- Muto A, Ohkura M, Kotani T, Higashijima S, Nakai J, Kawakami K. 2011. Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5425-5430.
- Naeve GS, Ramakrishnan M, Kramer R, Hevroni D, Citri Y, Theill LE. 1997. Neuritin: a gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2648-2653.
- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. 2001. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3197-3202.
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K. 2001. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19:137-141.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS. 2002. An amino-acid taste receptor. *Nature* 416:199-202.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106:381-390.
- Nieuwenhuys R. 2009. The forebrain of actinopterygians revisited. *Brain Behav Evol* 73:229-252.
- Northcutt RG. 2006. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. *J Comp Neurol* 494:903-943.
- Ohmoto M, Maeda N, Abe K, Yoshihara Y, Matsumoto I. 2010. Genetic tracing of the neural pathway for bitter taste in t2r5-WGA transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 400:734-738.
- Ohmoto M, Matsumoto I, Yasuoka A, Yoshihara Y, Abe K. 2008. Genetic tracing of the gustatory and trigeminal neural pathways originating from T1R3-expressing taste receptor cells and solitary chemoreceptor cells. *Mol Cell Neurosci*

38:505-517.

- Ohmoto M, Okada S, Nakamura S, Abe K, Matsumoto I. 2011. Mutually exclusive expression of Galphaia and Galpha14 reveals diversification of taste receptor cells in zebrafish. *J Comp Neurol* 519:1616-1629.
- Oike H, Nagai T, Furuyama A, Okada S, Aihara Y, Ishimaru Y, Marui T, Matsumoto I, Misaka T, Abe K. 2007. Characterization of ligands for fish taste receptors. *J Neurosci* 27:5584-5592.
- Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJ, Zuker CS. 2013. High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494:472-475.
- Oka Y, Satou M, Ueda K. 1986. Ascending pathways from the spinal cord in the hime salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*). *J Comp Neurol* 254:104-112.
- Okuno H. 2011. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res* 69:175-186.
- Okuyama T, Suehiro Y, Imada H, Shimada A, Naruse K, Takeda H, Kubo T, Takeuchi H. 2011. Induction of c-fos transcription in the medaka brain (*Oryzias latipes*) in response to mating stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 404:453-457.
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D. 1993. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361:453-457.
- Rembold M, Lahiri K, Foulkes NS, Wittbrodt J. 2006. Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct. *Nat Protoc* 1:1133-1139.
- Reutter K. 1971. [The taste-buds of *Amiurus nebulosus* (Lesueur). Morphological and histochemical investigations]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 120:280-308.
- Rink E, Wullimann MF. 1998. Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate DiI application to the hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *J Comp Neurol* 394:152-170.
- Rink E, Wullimann MF. 2004. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res* 1011:206-220.
- Rolen SH, Caprio J. 2008. Bile salts are effective taste stimuli in channel catfish. *J Exp Biol* 211:2786-2791.
- Saddoris MP, Holland PC, Gallagher M. 2009. Associatively learned representations of taste outcomes activate taste-encoding neural ensembles in gustatory cortex. *J Neurosci* 29:15386-15396.
- Sawai N, Yamamoto N, Yoshimoto M, Ito H. 2000. Fiber connections of the corpus

- mamillare in a percomorph teleost, tilapia *Oreochromis niloticus*. *Brain Behav Evol* 55:1-13.
- Shindo Y, Miura H, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ninomiya Y, Hino A, Kanda T, Kusakabe Y. 2008. G alpha14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun* 376:504-508.
- Slepak VZ, Katz A, Simon MI. 1995. Functional analysis of a dominant negative mutant of G alpha i2. *J Biol Chem* 270:4037-4041.
- Smith DV, St John SJ. 1999. Neural coding of gustatory information. *Curr Opin Neurobiol* 9:427-435.
- Smith JJ, Raikhel NV. 1989. Nucleotide sequences of cDNA clones encoding wheat germ agglutinin isolectins A and D. *Plant Mol Biol* 13:601-603.
- Sollars SI, Walker BR, Thaw AK, Hill DL. 2006. Age-related decrease of the chorda tympani nerve terminal field in the nucleus of the solitary tract is prevented by dietary sodium restriction during development. *Neuroscience* 137:1229-1236.
- Stouffer EM, White NM. 2007. Roles of learning and motivation in preference behavior: mediation by entorhinal cortex, dorsal and ventral hippocampus. *Hippocampus* 17:147-160.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291:293-296.
- Striedter GF. 1991. Auditory, electrosensory, and mechanosensory lateral line pathways through the forebrain in channel catfishes. *J Comp Neurol* 312:311-331.
- Sugita M, Shiba Y. 2005. Genetic tracing shows segregation of taste neuronal circuitries for bitter and sweet. *Science* 309:781-785.
- Sun L, Mao G, Kunapuli SP, Dhanasekaran DN, Rao AK. 2007. Alternative splice variants of phospholipase C-beta2 are expressed in platelets: effect on Galphaq-dependent activation and localization. *Platelets* 18:217-223.
- Swank MW. 1999. Coordinate regulation of Fos and Jun proteins in mouse brain by LiCl. *Neuroreport* 10:3685-3689.
- Thermes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, Wittbrodt J, Joly JS. 2002. I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev* 118:91-98.
- Tizzano M, Cristofolletti M, Sbarbati A, Finger TE. 2011. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med* 11:3.
- Tizzano M, Dvoryanchikov G, Barrows JK, Kim S, Chaudhari N, Finger TE. 2008. Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue.

- BMC Neurosci 9:110.
- Torres B, Pastor AM, Cabrera B, Salas C, Delgado-Garcia JM. 1992. Afferents to the oculomotor nucleus in the goldfish (*Carassius auratus*) as revealed by retrograde labeling with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 324:449-461.
- Travers JB, Urbanek K, Grill HJ. 1999. Fos-like immunoreactivity in the brain stem following oral quinine stimulation in decerebrate rats. *Am J Physiol* 277:R384-394.
- Travers SP. 2002. Quinine and citric acid elicit distinctive Fos-like immunoreactivity in the rat nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1798-1810.
- Tsui CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Barnes C, Worley PF. 1996. Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *J Neurosci* 16:2463-2478.
- Verhagen JV, Giza BK, Scott TR. 2003. Responses to taste stimulation in the ventroposteromedial nucleus of the thalamus in rats. *J Neurophysiol* 89:265-275.
- Wachowiak M, Denk W, Friedrich RW. 2004. Functional organization of sensory input to the olfactory bulb glomerulus analyzed by two-photon calcium imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9097-9102.
- Wakamatsu Y, Pristiyazhnyuk S, Kinoshita M, Tanaka M, Ozato K. 2001. The see-through medaka: a fish model that is transparent throughout life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10046-10050.
- Watson MA, Milbrandt J. 1989. The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol Cell Biol* 9:4213-4219.
- Whitehead MC. 1988. Neuronal architecture of the nucleus of the solitary tract in the hamster. *J Comp Neurol* 276:547-572.
- Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TV, Hunt SP. 1990. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron* 4:603-614.
- Wittbrodt J, Shima A, Scharl M. 2002. Medaka--a model organism from the far East. *Nat Rev Genet* 3:53-64.
- Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA. 1993. Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* 13:4776-4786.
- Wullmann MF. 1988. The tertiary gustatory center in sunfishes is not nucleus glomerulosus. *Neurosci Lett* 86:6-10.

- Xue HG, Yamamoto N, Yang CY, Kerem G, Yoshimoto M, Sawai N, Ito H, Ozawa H. 2006a. Projections of the sensory trigeminal nucleus in a percomorph teleost, tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Comp Neurol* 495:279-298.
- Xue HG, Yang CY, Ito H, Yamamoto N, Ozawa H. 2006b. Primary and secondary sensory trigeminal projections in a cyprinid teleost, carp (*Cyprinus carpio*). *J Comp Neurol* 499:626-644.
- Yamagata K, Andreasson KI, Sugiura H, Maru E, Dominique M, Irie Y, Miki N, Hayashi Y, Yoshioka M, Kaneko K, Kato H, Worley PF. 1999. Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J Biol Chem* 274:19473-11979.
- Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D, Worley PF. 1994. *rheb*, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem* 269:16333-16339.
- Yamamoto K, Ishimaru Y, Ohmoto M, Matsumoto I, Asakura T, Abe K. 2011. Genetic tracing of the gustatory neural pathway originating from Pkd113-expressing type III taste cells in circumvallate and foliate papillae. *J Neurochem* 119:497-506.
- Yamamoto N. 2003. Three gonadotropin-releasing hormone neuronal groups with special reference to teleosts. *Anat Sci Int* 78:139-155.
- Yamamoto N, Kato T, Okada Y, Somiya H. 2010. Somatosensory nucleus in the torus semicircularis of cyprinid teleosts. *J Comp Neurol* 518:2475-2502.
- Yamamoto T, Shimura T, Sakai N, Ozaki N. 1994. Representation of hedonics and quality of taste stimuli in the parabrachial nucleus of the rat. *Physiol Behav* 56:1197-1202.
- Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJ. 2009. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 139:234-244.
- Yasuoka A, Aihara Y, Matsumoto I, Abe K. 2004. Phospholipase C-beta 2 as a mammalian taste signaling marker is expressed in the multiple gustatory tissues of medaka fish, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121:985-989.
- Yoshida Y, Saitoh K, Aihara Y, Okada S, Misaka T, Abe K. 2007. Transient receptor potential channel M5 and phospholipaseC-beta2 colocalizing in zebrafish taste receptor cells. *Neuroreport* 18:1517-1520.
- Yoshihara Y. 2002. Visualizing selective neural pathways with WGA transgene: combination of neuroanatomy with gene technology. *Neurosci Res* 44:133-140.
- Yoshihara Y. 2010. [Visualization of selective transsynaptic neural pathways using a genetic method]. *Brain Nerve* 62:233-242.
- Yoshihara Y, Mizuno T, Nakahira M, Kawasaki M, Watanabe Y, Kagamiyama H, Jishage

- K, Ueda O, Suzuki H, Tabuchi K, Sawamoto K, Okano H, Noda T, Mori K. 1999. A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene. *Neuron* 22:33-41.
- Yoshii K, Kamo N, Kurihara K, Kobatake Y. 1979. Gustatory responses of eel palatine receptors to amino acids and carboxylic acids. *J Gen Physiol* 74:301-317.
- Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu M, Yamamoto N, Ito H. 1998. Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis* (Tilapia) *niloticus*. *J Comp Neurol* 392:209-226.
- Zhang GH, Zhang HY, Deng SP, Qin YM, Wang TH. 2008. Quantitative study of taste bud distribution within the oral cavity of the postnatal mouse. *Arch Oral Biol* 53:583-589.
- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ. 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293-301.
- Zhang Z, Zhao Z, Margolskee R, Liman E. 2007. The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci* 27:5777-5786.
- Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, Zuker CS. 2003. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115:255-266.

会田勝美 『魚類生理学の基礎』2002 恒星社厚生閣
高木陽介 修士論文
齊藤健佑 修士論文
池永直弥 修士論文

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 23 年度博士課程進学
氏 名 家木 誉史
指導教員名 三坂 巧

論文題目

小型魚類メダカをモデルとした味覚情報の伝達・認識に関わる神経細胞の解析

食品中の呈味物質は、味蕾中の味細胞で受容される。味細胞で受容された味の情報は神経を介して脳の味覚中枢へ伝達され、味として認識される。近年の分子生物学的解析により、末梢の味蕾では味の受容に関わる分子が明らかになりつつある。一方中枢では、味刺激によって特異的に発現レベルが上昇する即初期遺伝子群 (immediate early genes: IEGs) を指標とした解析により、ラットの一部の味覚中枢では味刺激に応答する神経細胞の分布が示されているが、味の情報伝達・認識に関わる神経細胞の詳細については未だ不明な点が多い。最近では、経シナプス性神経トレーサーである小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin, WGA) を特定の味細胞に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、味の情報を伝達する神経回路網の可視化が試みられている。しかし、現状では味覚 1 次中枢までの可視化にとどまっており、味の情報伝達に関わる神経回路網の全容解明のためには、より高次中枢までの可視化が必要である。

我々は脊椎動物における味の情報伝達・認識に関わる神経細胞の詳細を解明するためのモデル動物として、小型魚類であるメダカに着目した。メダカは、マウスに比べて味蕾の数が多く、さらに脳のサイズが小さく神経が短いという特徴があるため、神経トレーサーの輸送効率が良いと推測した。また個体サイズが小さいため、遺伝子やタンパク質の局在を脳全体で網羅的に解析することが容易であり、味覚中枢神経の解析に有用な実験動物である。当研究グループでは、既に Tg メダカの作出技術や人工餌を用いた摂食行動評価系が確立されている。

そこで本研究では、メダカを用いて味細胞で受容された味の情報伝達・認識に関わる神経細胞の同定を目的とした。まず、分子基盤的な知見を得るため、メダカ味蕾に発現する味覚関連分子の発現様式を調べた。次に、神経トレーサーを味蕾に発現する Tg メダカを作成し、接続する神経回路の可視化を行った。最後に、人工餌を用いて味刺激に応答する IEGs を同定し、異なる味質に応答する神経細胞の分布の違いについて解析した。

第1章 メダカ味蕾細胞に発現する味覚関連分子の発現相関

味蕾に発現する味覚関連分子の発現様式は、生物種で異なることが示されている。魚類のゼブラフィッシュでは、GPCR 型味覚受容体ファミリーである T1R、T2R はエフェクター因子であるホスホリパーゼ C- β 2 (PLC- β 2) 発現細胞の一部で発現している。PLC- β 2 発現細胞は G タンパク質の G α ia 発現細胞と G α 14 発現細胞に二分され、T1R、T2R は G α ia 発現細胞のみに発現している。一方、哺乳類では PLC- β 2 は T1R、T2R のいずれかと共発現している。メダカ味蕾において、このような発現様式の詳細は不明である。そこで、メダカをモデルとして味覚研究を行う上での分子基盤的な知見を得るため、メダカ味蕾で発現する味覚関連分子の発現相関を二重標識 *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) により解析した。

その結果、メダカの PLC- β 2 発現細胞は、味蕾の約 5 割を占め、G α ia 発現細胞と G α 14 発現細胞とに二分されていた。T1R と T2R は G α ia 発現細胞特異的に発現し、互いの発現は排他的であった。両方で G α ia 発現細胞の 9 割以上を占めたが、一部いずれの味覚受容体も発現しない細胞が存在した。体軸前後で比較すると、鰓周辺部の味蕾では G α 14 発現細胞の割合が高く、より後方に存在する咽頭歯部の味蕾では G α ia 発現細胞の割合が高くなっていった。以上より、メダカの味覚関連分子の発現相関が明らかになり、分子基盤的な知見を得ることができた。

第2章 メダカ PLC- β 2 発現細胞を起点とした味の情報伝達回路の可視化

第1章より、メダカ PLC- β 2 は 5 割の味蕾細胞に発現することが示され、他の分子との発現相関も明らかになった。次に、味覚神経回路の高次中枢までの可視化を目的として、既に取得済みである PLC- β 2 遺伝子のプロモーターを用いて PLC- β 2 発現細胞に経シナプス性神経トレーサー WGA を発現する Tg メダカ (PLC- β 2-WGA メダカ) を作成した。作成した Tg メダカに対して、抗 WGA 抗体を用いた免疫組織染色 (IHC) を行い、WGA タンパク質の発現と輸送を解析した。

稚魚と成魚に対して解析した結果、成魚ではより高次中枢の神経核に WGA が観察された。よって、WGA は時間を経るごとにシナプスを介して徐々に高次中枢まで輸送されることが示された。そこで経時的な解析を行うことで、輸送される神経核の順番を辿ることができ、味情報伝達回路の詳細が把握できると考え、12 日齢、3 か月齢、9 か月齢と成長段階が異なるメダカを用いて解析を行った。

12日齢の稚魚で解析した結果、味蕾で非常に強いWGAの発現が観察され、味神経を含む3つの神経節でWGA陽性細胞が観察された。さらに、味覚1次中枢である迷走葉(XL)を含む延髄の複数の神経核でWGAが観察された。しかし、延髄以外の脳領域ではWGAは観察されなかった。

3か月齢の成魚を用いて解析を行った結果、12日齢で既に局在が観察された領域に加えて、新たにもう一つの味覚1次中枢である顔面葉(VIII)、峽の味覚2次中枢である第2味覚核(NGS)、間脳と終脳の一部の神経核でWGAが観察された。

9か月齢の成魚の脳を用いて解析した結果、3か月齢までに局在が観察された神経核に加えて、新たに間脳の味覚3次中枢である下葉分散核(NDLI)・糸球体第3味覚核(pTGN)の細胞にWGAが検出された。哺乳類の味覚高次中枢である大脳皮質味覚野に対応するとされる終脳の背側野内側部の背側部(dDm)の細胞でもWGAが検出された。

以上より、PLC-β2-WGAメダカを用いることで、マウスではできなかった味蕾から味覚高次中枢までの神経回路の可視化に成功した。また、経時的な解析を行うことで味蕾から味神経、延髄を介し、中脳や間脳を経て、高次中枢である終脳へ接続するという味情報の伝達・認識に関わる神経のおおまかな接続様式を示すことができた。

第3章 即初期遺伝子群(IEGs)の発現を指標とした味刺激に応答する神経細胞の同定

第2章で、メダカを用いて味の情報伝達・認識に関わる神経回路の可視化に成功した。次に、味刺激に応じて発現するIEGsを利用し、異なる味質に応答する神経細胞の分布の違いを解明することを目指した。

味刺激に応答する神経細胞は、IEGsであるc-fosの発現を用いてラットの味覚中枢で解析がなされていた。しかしメダカではIEGsを用いた味応答神経細胞に関する知見がなかったため、味刺激に応答するメダカのIEGsの探索を行った。まず、マウスやラットの脳で電気刺激などによりmRNAが発現上昇することが知られているIEGsについて、メダカの予想オーソログ配列を33遺伝子取得し、クローニングした。味刺激を与える方法として、摂食の有無を蛍光観察により容易に判別可能である蛍光標識人工餌をメダカに摂食させることにした。メダカT1Rのリガンドである旨味物質のアミノ酸または、T2Rのリガンドである苦味物質のデナトニウムを呈味物質として加えて人工餌を作製した(各々AA餌、DN餌と呼ぶ)。1か月齢のメダカを24時間絶食させた後、餌を摂取させ、10分、30分、60分後にパラホルムアルデヒドで固定した群および、コントロール群として24時間絶食後、餌を摂取させずに固定した群(NF群)を用意した。NF群では発現が見られず、AA餌またはDN餌を摂取した群で再現的に発現が検出される遺伝子を探索した。各群2個体ずつ味覚中枢XLにおいてISHを行った結果、上記の条件を満たす遺伝子としてc-fos、egr1-2、fosb-1、fosb-2の4遺伝子を同定した。c-fos、egr1-2はAA餌、DN餌いずれの摂取によっても発現し、両遺伝子ともに30分後に固定した群で再現的に発現が見られた。fosb-1、fosb-2はDN餌の摂取によってのみ発現し、ともに60分後に

固定した群で再現的に発現が見られた。以上より、**c-fos** と **egr1-2** は、旨味、苦味いずれの呈味物質の摂取によっても応答する神経細胞マーカーとして利用できると考え、今後の解析に用いることにした。

c-fos と **egr1-2** が味刺激によって発現することを調べるため、呈味物質を含まない餌（NT 餌）を摂取した群も加えて解析を行った。AA 餌、DN 餌、NT 餌を摂取させ、30 分後に固定した 3 群と NF 群について、中枢での IEGs 発現細胞の分布を詳細に解析した。その結果 **c-fos** は、餌を摂取した 3 群中の一部の個体で発現細胞の分布に差が見られたが、3 群いずれも味覚中枢である XL、VIII、NGS、NDLI において発現が観察された。その他の領域では、体性感覚の中枢や、嗅覚の中枢である嗅球においても 3 群ともに発現が観察された。一方 NF 群では、ほとんどの脳領域において明確な陽性細胞は観察されなかった。以上より、摂食により観察された **c-fos** 陽性細胞は、体性感覚や嗅覚を介した刺激に起因して応答した細胞も含まれると考えられた。しかし、体性感覚や嗅覚からの神経接続に関する報告がない NGS でも発現が観察されたことから、3 群ともに味覚による刺激で発現した細胞があることが示された。次に、**egr1-2** について解析した結果、餌を摂取した 3 群ともに味覚中枢での発現が観察されたが、個体によっては陽性細胞が検出できない領域も存在した。しかし **egr1-2** 陽性細胞は、**c-fos** が発現した神経核に局在しており、NGS においても一部の個体で観察された。

以上の結果から、異なる味質に応答する神経細胞の分布を明らかにすることはできなかったが、**c-fos** と **egr1-2** が味覚刺激に応答する IEGs として利用できることが示された。また、NT 餌の摂取でも応答が見られたことから、餌中の呈味物質以外の成分がメダカには味として認識されていることが示唆された。今後は、体性感覚や嗅覚を介した応答が生じずに味覚刺激を与える方法を開発し、味覚特異的に応答する神経細胞を選別することが課題として残された。

まとめ

本研究ではメダカを用いることにより、マウスでは達成できなかった味の情報伝達・認識に関わる神経回路の高次中枢までの可視化に成功した。また、味覚刺激により発現する IEGs を同定できた。本研究で得られたこれらの知見が、脊椎動物における味覚神経研究の解明の一助となることが期待される。

発表論文

1. [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)

謝辞

本研究は、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 生物機能開発化学研究室にて行われました。6年間の長きにわたり、多くの方々のご指導、ご鞭撻により成し遂げることが出来ました。この場をお借りして感謝の意を述べさせていただきます。

三坂巧 准教授には、本研究の実施の機会を与えていただいただけでなく、頼りない私に対して、いつも何気ない点で気を配っていただきました。そのおかげで日々のびのびと研究に邁進することができました。また、研究で行き詰まった時には、常に端的で的確な助言をしてくださる本当に心強い存在でした。心より御礼申し上げます。

本研究科 寄附講座 阿部啓子 特任教授には、研究室に入る際、とても温かく迎え入れていただきました。その後も力強いお言葉を幾度となくかけていただき、励まされてきました。当研究室の教授を退職されてからも、研究や就職活動等、様々な助言をしていただいたおかげでここまで辿りつくことができました。心より感謝申し上げます。

岡田晋治 助教には、5年以上もの間、実験の技術的なご指導をしていただき、研究の進め方を常に一緒に考えていただきました。理解の遅い私に対しても優しく、ときに厳しく、我慢しながら親身に接していただきました。そのおかげで最後まで挫けることなく、楽しく研究室生活を過ごすことができました。心より感謝いたします。

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー (KAST) 安岡顕人 研究員には、平日は研究室に不在でお忙しいにも関わらず、熱い研究の議論を毎週のようにしていただきました。特に英語論文投稿や国際学会での発表の際には、未熟な私をいろいろな面でサポートしていただきました。厚く御礼申し上げます。

神戸大学大学院 藍原祥子 助教には、私が研究室に入った最初の3か月間、実験方法を一から熱心にご指導していただきました。わずか3か月でしたが、研究の世界に入る第一歩の時期であり、非常に貴重な時間でした。卒業後も何度も温かいお言葉を頂戴し、精神的な支えになっていました。深く感謝いたします。

モネル化学感覚研究所 應本真 研究員には、私の甘いデータ解析に対して、厳しくかつ貴重な意見を与えていただきました。アメリカに行かれてからもメールで何度も助言をしていただき、研究をフォローしていただきました。深く感謝いたします。

放射線医学総合研究所 石川裕二 上席研究員には、メダカ成魚の脳の神経核を特定する際に、形態的な特徴について貴重なご意見を多々いただき、かつ私の誤認識の部分を指摘していただきました。本当に感謝いたします。

本研究科 水圏生物科学専攻 水族生理学研究室 大久保範聡 准教授には、メダカ稚魚における脳の構造に関して貴重な助言をいただきました。大変感謝いたします。

成川真隆 特任助教には、研究上の助言をいただいただけでなく、軟弱な私を精神的かつ肉体的に鍛えていただき、日々の研究室生活をよりアクティブで充実したものにしていただきました。感謝申し上げます。

東京農業大学 荒井綜一 客員教授には、お忙しいにもかかわらず先輩方の代から研

究の議論に参加していただき、魚の餌作製法に関して貴重な助言をしていただきました。また食品科学についての講義をしていただき、学問の奥深さを教えていただきました。心より感謝申し上げます。

当研究室で小型魚類と一緒に扱っていた吉田由紀 博士、先輩の高木陽介 氏には私が研究を遂行する上で大変お世話になりました。感謝申し上げます。後輩の齊藤健佑さん、池永直弥さん、横井京子さんには日々魚の世話や研究のサポートをしていただいただけでなく、毎日の会話ややり取りを通じて、物理的にも精神的にも助けてもらいました。感謝いたします。東京バイオテクノロジー専門学校の北島美樹さん、三浦香織さんには、実験と魚の世話を一生懸命していただき、支えていただきました。感謝いたします。学術支援職員の吉田晃子さんには実験、魚の世話など様々な仕事をサポートしていただきました。感謝いたします。技術補佐員の我部敬子さん、中田三津子さんには、時間のかかる魚の飼育を毎日協力していただきました。6年間本当にありがとうございました。

6年間を過ごした生物機能開発化学研究室の皆様、さらにソフトボールや飲み会の席でお世話になった当研究科寄付講座の機能性食品ゲノミクス、味覚サイエンス、食の安全・安心・健康領域の研究室の皆様、大変お世話になりました。いつも温かく接していただいたことを厚く御礼申し上げます。

そして私の6年間の実験により、尊いメダカの命を数多く犠牲にしまいました。彼らの冥福をお祈りするとともに、感謝の意を表したいと思います。

最後になりましたが、私を経済的、精神的にいつも支えてくれ、今日まで学生でいることを許してくれた家族に感謝いたします。

平成 25 年 12 月 25 日