

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味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 メダカを作出し、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-β2 (PLC-β2) 発現細胞の一部で発現している。PLC-β2 発現細胞は G タンパク質の Gα_i 発現細胞と Gα₁₄ 発現細胞に二分され、T1R、T2R は Gα_i 発現細胞のみに発現している。一方、哺乳類では PLC-β2 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-β2 発現細胞は、味蕾の約 5 割を占め、Gα_i 発現細胞と Gα₁₄ 発現細胞とに二分されていた。T1R と T2R は Gα_i 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 Gα_i 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 Gα₁₄ 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 Gα_i 発現細胞の割合が高くなっていた。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-β2 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-β2 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-β2 遺伝子のプロモーターを用いて PLC-β2 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-β2-WGA メダカ) を作出した。作出した 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)、峡の味覚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餌の摂取によつてのみ発現し、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つても応答する神経細胞マーカー

一として利用できることを考え、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)