

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 20 年度博士課程進学
氏名 前田 尚廣
指導教員名 三坂 巧

論文題目 味覚伝導路における遺伝子発現プロファイリングを基盤とした味覚識別機構の解析

食品中の呈味物質は口腔内上皮層に分布する味蕾と呼ばれる組織中の味細胞により受容される。5 基本味と呼ばれる甘味、旨味、苦味、酸味、塩味はそれぞれ異なる味細胞により受容され、それらの味の情報は、味蕾に投射する末梢神経である味神経に伝達される。味神経は 3 つの感覚性脳神経節に由来し、その由来は味蕾の空間的分布と対応している。舌前方の茸状乳頭と口蓋の味蕾には顔面神経膝神経節 (Geniculate Ganglion, GG)、舌後方の葉状乳頭と有郭乳頭の味蕾には舌咽神経下神経節 (Petrosal Ganglion, PG)、咽頭の味蕾には迷走神経下神経節 (Nodose Ganglion, NG) にそれぞれ由来する神経が投射している。これらの神経節は伝達する情報が異なる様々な種類の神経細胞から構成されており、どの神経細胞が味情報を伝達するのかについては不明であった。味神経に伝達された味情報は、脳幹の延髄孤束核 (Nucleus of the Solitary Tract, NST)、橋結合腕傍核 (Parabrachial Nucleus, PBN) などを経由し、大脳皮質味覚野で認知される。こうした味覚伝導路の概要については分かっているものの、味蕾で異なる味細胞により受容された異なる味の情報が、異なる伝導路を辿って伝達されるのか、あるいは、複数の味の情報が統合されて伝達されるのかといった中枢における味覚情報の処理機構に関する知見は少ない。

小麦胚芽レクチン (Wheat Germ Agglutinin, WGA) はシナプス間隙のような非常に近接した場所で細胞と細胞の間を移動する性質を持ち、WGA をトランスジーンとして特定の細胞に発現させることで、特定の神経回路を標識することができる。この技術を味覚研究に応用し、当研究

室では、甘味・旨味受容体 T1R3 のプロモーター制御下で WGA を発現するトランスジェニックマウス (t1r3-WGA マウス) を作製し、甘味・旨味細胞から末梢感覚神経節である GG および NPG (マウスでは解剖学的に NG と PG を区別できないので、それらを併せて NPG と表記する) を経て、NST に至るまでの甘味・旨味情報の伝達経路を WGA で標識することに成功している。このようなマウスは、味覚情報の伝達様式の解明に非常に有用である。本研究では、このような背景を踏まえ、味細胞により受容された味の情報がどのような経路を辿って神経系へ伝達され処理されるかといった、味覚のコーディング機構を明らかにすることを目的とした。第 1 章において、甘味・旨味とは異なる味の情報伝達経路を可視化するため、苦味受容体である T2R5 のプロモーター制御下で WGA を発現するトランスジェニックマウス (t2r5-WGA マウス) を作製し、苦味情報伝達経路の可視化を行った。第 2 章では、上記の t1r3-WGA マウス、t2r5-WGA マウスに加え、当研究グループで作製された一部の酸味情報の伝達経路が可視化されたマウス (pkd113-WGA) の 3 種類のマウスを用いて、末梢感覚神経節および NST における WGA 陽性細胞の分子特性を解析することにより、味神経レベルにおける味情報のコーディング機構を解明することを試みた。第 3 章では、中枢における味覚情報の処理に重要な役割を持つと考えられる PBN の遺伝子発現プロフィール解析を行い、感覚情報を伝達する神経細胞の分子特性を明らかにした。

第 1 章 t2r5-WGA マウスによる苦味情報伝達経路の可視化 1)

苦味情報の伝達経路を可視化するため、マウスの苦味受容体の一つである T2R5 遺伝子の開始コドンの 5' 上流約 12.7 kb に WGA のコード領域を連結させたトランスジーンを有するマウス (t2r5-WGA マウス) を 2 系統作出した。そのうちの 1 系統において、苦味細胞特異的に WGA mRNA が発現していることが確認できた。抗 WGA 抗体を用いて、WGA タンパク質の分布を免疫組織化学的に観察した結果、苦味細胞と味蕾に投射する神経繊維に WGA のシグナルが観察されたが、甘味・旨味細胞やシナプス構造を持つ細胞 (すなわち酸味細胞) には WGA のシグナルは観察されなかった。これらのことから、苦味の情報は、甘味・旨味の情報と同様に、シナプス構造を持つ酸味細胞を介さず、直接味神経へ伝達されることが示唆された。次に、末梢感覚神経節や脳幹部における WGA の分布を調べたところ、GG および NPG の一部の細胞において WGA タンパク質のシグナルが観察されたが、NST では観察されなかった。これは、t2r5-WGA マウスの味細胞における WGA の発現量が、t1r3-WGA マウスのそれに比べ少ないことが原因であると考えられる。以上より、本研究において、味神経までの苦味の情報伝達経路が可視化されたマウスを作出することができた。

第 2 章 味覚情報を伝達する神経細胞の分子特性の解析

第 1 章において、末梢感覚神経節までの苦味情報の伝達経路の一部が可視化されたマウスが

作製された。また、当研究グループにおいて、甘味・旨味の情報伝達経路、舌後方で受容される酸味の情報伝達経路が NST まで可視化されたマウス（それぞれ t1r3-WGA, pkd113-WGA マウス）が作製されている。本章では、これらのマウスの末梢感覚神経節および NST における WGA 陽性細胞に発現する遺伝子を探索することにより、味覚情報を伝達する神経細胞に発現するマーカー遺伝子を取得すること、および、甘味・旨味、苦味、酸味の情報を伝達する神経細胞の比較により、味神経レベルにおける味覚コーディング機構を解明することを試みた。末梢感覚神経節に発現する遺伝子は当研究室で行われた DNA マイクロアレイ解析により、味神経細胞が投射すると考えられている rostral NST に発現する遺伝子は Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>) により、それぞれ探索を行い、各組織において *in situ* ハイブリダイゼーション法と抗 WGA 抗体を用いた免疫染色を組み合わせた二重染色を行い、WGA 陽性細胞とマーカー遺伝子と発現分布を比較した。

t1r3-WGA、t2r5-WGA マウスの GG および NPG において、また、pkd113-WGA マウスの NPG において、WGA 陽性細胞のほとんどが P2X2、Scube1、Eya1、Atp2b4 を発現していた。これらは味覚情報を伝達する神経に共通して発現する遺伝子であると考えられ、味神経細胞を特徴づけるマーカー遺伝子を取得することができたと判断した。一方、各味質を伝える神経細胞を区別しうるマーカー遺伝子も同定された。t1r3-WGA マウスの GG では Eya2 発現細胞の約半数が WGA 陽性であったが、t2r5-WGA マウスの GG では Eya2 と WGA の重なりはほとんど観察されなかった。これらのことから、GG では、甘味・旨味情報を伝達する神経と苦味情報を伝達する神経の少なくとも一部は異なることが示唆された。また、t1r3-WGA マウスの NPG において、5-TH3B、VIP をそれぞれ発現する細胞中の WGA 陽性細胞の割合は 8 割程度であったが、t2r5-WGA、pkd113-WGA マウスの NPG において、5-TH3B や VIP を発現する細胞に WGA のシグナルはほとんど観察されなかった。t1r3-WGA、t2r5-WGA マウスの NPG において、WGA 陽性細胞の半数程度が 5-HT3A を発現していたが、pkd113-WGA の NPG における WGA 陽性細胞の 2 割程度の細胞しか 5-HT3A を発現していなかった。このようにそれぞれの味情報を伝達する神経細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを一部見出すことはできたが、味情報の分離・統合の全容を明らかにするには至らず、今後の課題として残されている。

次に t1r3-WGA、pkd113-WGA マウスの NST における WGA 陽性細胞の分子特性の解析を行った。味神経細胞が投射し、上記マウスにおいて WGA タンパク質のシグナルが検出される rostral NST に発現する遺伝子を探索したところ、Tac1、Nnat、Itih3 の 3 つの遺伝子が同領域に高頻度に強く発現していた。これらの遺伝子の発現細胞と WGA の相関を調べた結果、t1r3-WGA、pkd113-WGA マウスともに、NST において、WGA のシグナルと Tac1 のシグナルの分布に重なりが観察され、WGA 陽性細胞の 7-8 割の細胞が Tac1 を発現していた。一方、Nnat および Itih3 を発現する WGA 陽性細胞は観察されなかった。これらから、今までほとんど分かっていなかった NST における味覚ニューロンの分子特性の一端を明らかにすることができたといえる。

第3章 橋結合腕傍核の遺伝子発現特性 2)

PBN は味覚情報を視床などの中枢へと中継する神経核であり、味覚以外に一般臓性感覚、一般体性感覚などの情報も中継することが知られている。PBN は解剖学的に十数個の亜核から構成されているヘテロな神経核であり、その内味覚の伝達を担う神経細胞は vl 亜核、el 亜核などのいくつかの亜核に存在することが電気生理学的な応答記録実験や活動依存的に発現上昇する極初期遺伝子のマッピングなどにより示されている。味覚の伝達に関与する亜核の遺伝子発現特性を知ることは、味覚情報の伝導路を解析する上で非常に有用である。本章では、ラットの PBN および PBN に隣接する体性感覚中継核である三叉神経主知覚核 (Principal Sensory Nucleus of Trigeminal Nerve, Pr5) の遺伝子発現情報を DNA マイクロアレイにより取得し、PBN に特異的に発現する遺伝子を取得することを試みた。PBN に多く発現している遺伝子を抽出し、その中で 40 個の遺伝子について ISH により PBN における発現分布を調べた結果、32 個の遺伝子が PBN に豊富に発現しており、この中には、PBN 全体に発現する遺伝子や PBN の特定の亜核に発現する遺伝子などが存在していた。各亜核における遺伝子発現の頻度を指標としてクラスタリング解析を行い、遺伝子発現特性からそれぞれの亜核の類似性を調べたところ、PBN における亜核の配置と遺伝子発現特性には強い相関があることが示され、味刺激に応答する亜核は遺伝子発現特性が類似していることが示唆された。

本研究は、末梢の味蕾中の味細胞により受容された味の情報を伝達する感覚性脳神経節、NST、および PBN における神経細胞の分子生物学的解析を通じ、甘味・旨味、苦味、酸味を感じ、その情報を中枢へ伝達する仕組みを解明しようとしたものであり、味覚情報を伝達する神経細胞の分子知見を得ることができた。本研究で得られた知見を基盤として、食品の味の認知が生じる仕組みを分子・細胞レベルで理解することが進み、食品科学研究が大きく発展すると確信している。

発表論文

- 1) Ohmoto M, Maeda N, Abe K, Yoshihara Y, Matsumoto I.

Genetic tracing of the neural pathway for bitter taste in t2r5-WGA transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **400(4)**, 734-738 (2010).

- 2) Maeda N, Onimura M, Ohmoto M, Inui T, Yamamoto T, Matsumoto I, Abe K.

Spatial differences in molecular characteristics of the pontine parabrachial nucleus. *Brain Research*. **1296**, 24-34 (2009).