

<令和3年度助成>

食の美味しさを制御する神経回路メカニズムの解明

樽野 陽幸

(京都府立医科大学大学院 医学研究科 細胞生理学)

はじめに

減塩は世界的な健康と経済の課題である。塩の過剰摂取は高血圧・心血管疾患の最大のリスク因子であり、全世界で減塩が推奨されている。日本人の平均塩分摂取量 9.9 g (H29 国民健康・栄養調査) は WHO の目標値 5.0 g を大きく上回り、諸外国と比べても多い。その結果、日本の高血圧総患者数は 993 万人 (H29 患者調査)、年間医療費は 1.8 兆円 (H29 国民医療費) に上る。この現状を背景に現在、世界中で夢の人工塩味料の開発競争が繰り広げられている。我々はこれまでに、末梢における塩味の主たる受容経路を担う塩味細胞の同定とその細胞内トランスダクションおよび神経伝達の分子機構を明らかにしてきた¹⁻⁷⁾。しかし、塩はなぜおいしいのか？ その脳内メカニズムについての科学的理解が欠如しており、現行の経験的な開発戦略では成功の兆しは見えていない。現在、塩のおいしさを創る脳神経回路に関する基礎研究に期待が寄せられており、本研究が明らかにしようとする生命現象である。

なお、本研究における遺伝子組み換え動物を用いた実験は、動物実験計画書および遺伝子組み換え実験計画書を京都府立医科大学の動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会に提出し、承認を受けた上で実施している。

実験 1 光遺伝学的に創出する擬似塩味 (光塩味) の解析

方法 1-1 舌光刺激装置の開発

以下のように機能するマウスリック回数計測装置

を自作した (図 1 右)。舐め行動 (リック行動) の同期シグナルをレーザー装置に入力することで、マウスが給水瓶を舐めると同時に飲水口から口腔内に向けてレーザーが照射される。これを用いることで、リック行動計測と同時にリック行動と同期した舌へのレーザー照射が可能となる。この装置と味蕾の塩味細胞に光遺伝学分子ツールを発現した遺伝子改変マウス (光塩味マウス、後述) を組み合わせることで、光による擬似塩味を創出し、その行動応答および脳内神経細胞応答の解析が可能になる。

方法 1-2 光塩味マウスの作出

塩味を光遺伝学的に操作する技術開発のためには、末梢 (味蕾) における塩味細胞を遺伝学的に同定する必要がある。そこで、マウス茸状乳頭に存在する味蕾細胞を酵素処理によって単離し、およそ 1,000 細胞の単一細胞トランスクリプトーム情報を取得した。このデータを用いたクラスタリング解析により Na⁺センサー分子である ENaC を選択的に発現する塩味細胞集団を見出した。しかし、単一マーカー遺伝子のプロモータ活性を利用して塩味細胞の活動操作をすることは難しいことが判明したため、2つの遺伝子プロモーターの活性依存的に光活性化型カチオンチャネル ChR2 を塩味細胞選択的に発現する遺伝子改変マウスを作出した (以下、光塩味マウス)。

結果と考察

想定通り、光塩味マウスの味蕾の蛍光免疫組織染色により、ChR2 が茸状乳頭の ENaC 発現塩味細胞に発現していた。さらに、麻酔下の光塩味マウスに

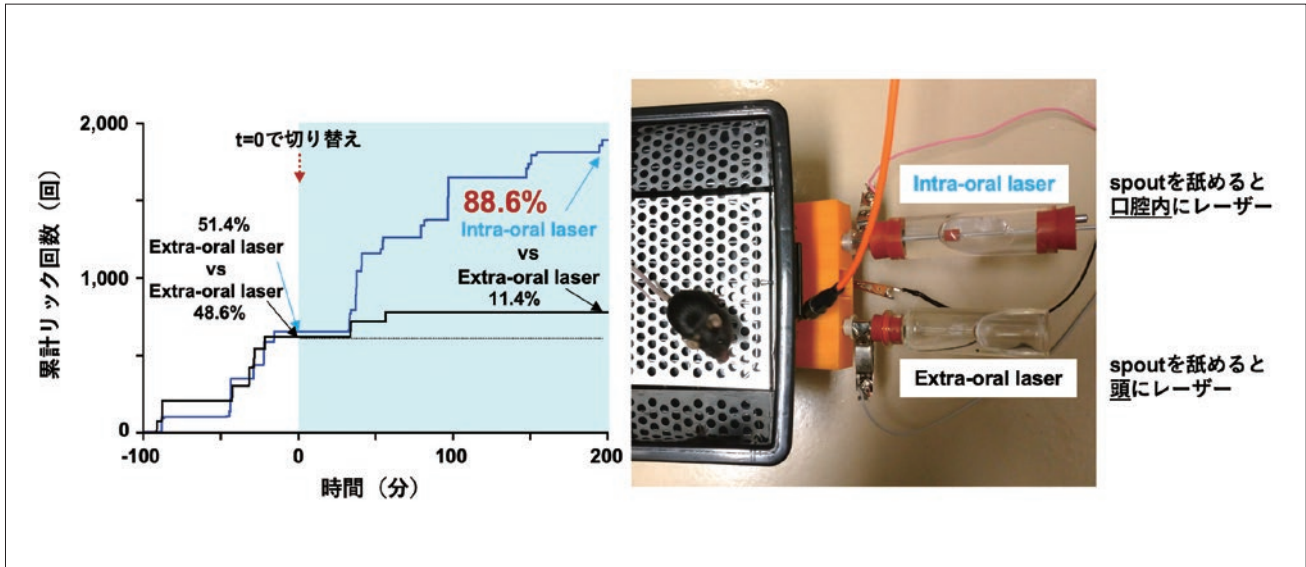


図1 光塩味マウスの行動解析

において鼓索神経活動を電気生理学的に記録しながら舌に青色光を照射すると、レーザー強度依存的な神経活動の増大が観察された。さらに、味覚伝導路核に属する神経細胞の活動を電気生理学的に解析すると、舌の青色光照射で活性化する神経細胞と塩味応答を示す神経細胞が一致していた。また、舌光刺激装置を用いて行動解析を行ったところ、光塩味マウスでは塩欠乏状態において飲水口から出る青色光を好んで舐める（摂取しようとする）行動が観察された（図1左）。一方、ChR2を活性化させない波長の光（黄色光）を好む行動は観察されなかった。これらの結果は、舌への青色光照射によって塩味が擬似的に創出された結果であると解釈できる。

さらに、同じく光塩味マウスにおいて、塩味に対する味覚嫌悪学習を成立させたのち、舌へ青色光を照射すると忌避行動が観察された。つまり、塩味に対する嫌悪学習が青色光へと汎化したものであり、光塩味マウスにおいては青色光が塩味を模倣していることを重ねて示す結果であると解釈することができる。光塩味は塩の摂取を伴わずに感覚だけを惹起することができる、すなわち人工塩味料のモデル動物とも言える。このように光塩味は中枢における塩味入力に対する満足感や嗜好性の神経回路ロジックの解析を行うための有用なツールとなる。

実験2 脳内塩味応答神経細胞の活動計測と遺伝学的同定

方法 2-1 中枢神経細胞の *in vivo* 味覚応答計測技術の確立

口腔への塩味刺激に対する脳内神経細胞の活動応答をリアルタイムで計測するための *in vivo* 測光系を構築した。神経活動の亢進にともなう細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を可視化するための蛍光 Ca^{2+} インジケータとして GCaMP7f を味覚伝導路核の神経細胞に発現させたのち、この部位の近傍に内視鏡レンズを挿入して蛍光顕微鏡で観察しながら口腔内への各種味刺激を行った。

方法 2-2 塩味応答神経細胞の活動依存性標識と分取

脳内の味覚関連神経核において塩味応答を示す神経細胞を遺伝学的に同定するため、これらの細胞を活動依存的に蛍光標識した後、FACSにより分取する技術開発を行った（図2）。具体的には、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて神経細胞選択的に特殊蛍光タンパクを発現させた上で、舌への味刺激を与えることで塩味応答神経細胞の蛍光標識を行った。この動物から標識神経細胞を FACS を用いて選択的に単離し、塩味応答神経細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析を行った。

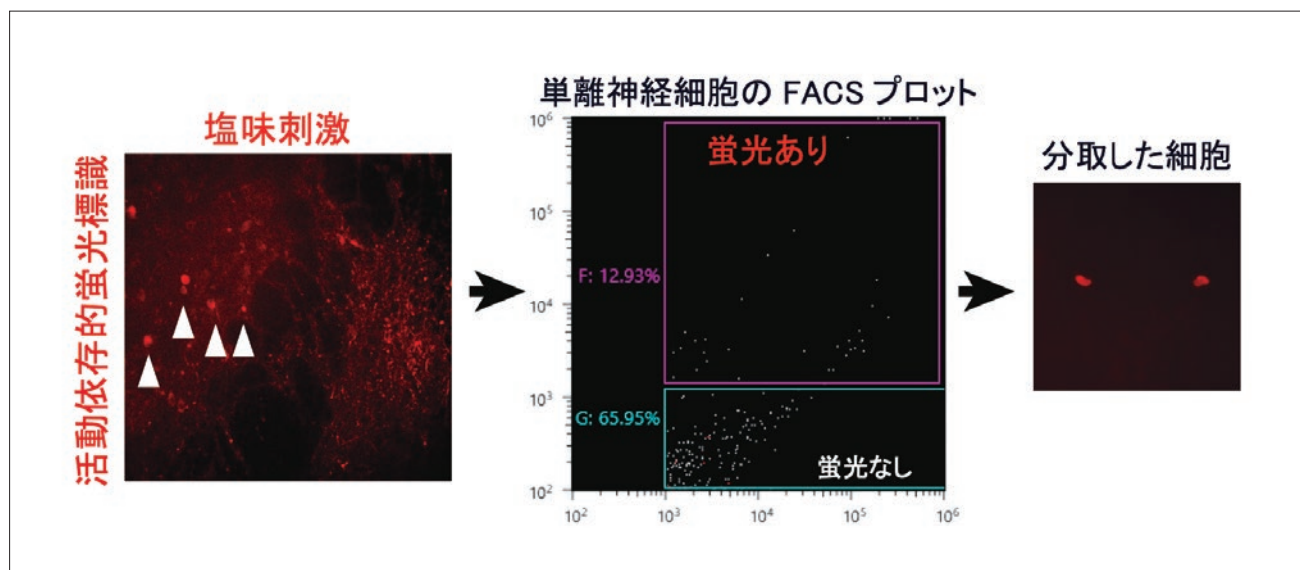


図2 塩味応答神経細胞の活動依存性標識と分取

リプトーム解析を実施した。

さらに、この神経核に存在する神経細胞の種類を網羅的に把握すべく単一細胞トランスクリプトーム解析を行った。神経核から単離した約6,000個の細胞から単一核を抽出し、1細胞ごとの遺伝子発現情報の解析およびそれを基にした細胞分類を行って細胞カタログを得た。

結果と考察

方法2-1で確立した*in vivo*活動計測技術を用いて、塩味刺激に応答して活動レベルが上昇する神経細胞、すなわち塩味応答神経細胞を観察することができた。これにより、塩味応答細胞の脳内局在を網羅的かつ正確に明らかにした。

次に、方法2-2で記述した単一細胞解析技術により、塩味応答神経細胞の遺伝子発現プロファイルを取得した。加えて、神経核に含まれる神経細胞全体の遺伝子発現に基づく細胞カタログも取得しており、これらを比較することによって塩味応答神経細胞を特徴づける遺伝子発現パターンを特定した。

結論

本研究では、塩味を題材として塩のおいしさを創る脳神経回路の解明に向けた技術開発とデータの取得を行った。まず、塩分摂取を伴わずに塩味感覚だけを光遺伝学的に創出する技術として光塩味マウスを開発し、その有用性を多面的に検証した。この技術を用いることで、塩分摂取により惹起される内臓感覚などは独立に、味蕾を介した塩味感覚の脳内表現を解析することが可能となる。

さらに光塩味の技術を応用し、脳内塩味応答神経細胞を標識・単離・解析する技術を開発し、遺伝学的に特定するに至った。遺伝学的に同定された塩味神経細胞の活動制御・投射パターンを解析することで塩味神経回路の選択的な解析が可能となる。

今後、本研究で開発したこれらの技術および取得したデータを活用することで、脳内で塩味がどのように情報処理され、嗜好性が創出されているのか、その神経回路基盤を解明していく。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Taruno A, Gordon MD. 2022. Molecular and Cellular Mechanisms of Salt Taste. *Annu Rev Physiol*
- 2) Taruno A, Nomura K, Kusakizako T, Ma Z, Nureki O, Foskett JK. 2021. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflugers Arch* 473: 3-13
- 3) Nomura K, Nakanishi M, Ishidate F, Iwata K, Taruno A. 2020. All-Electrical Ca(2+)-Independent Signal Transduction Mediates Attractive Sodium Taste in Taste Buds. *Neuron* 106: 816-29 e6
- 4) Demura K, Kusakizako T, Shihoya W, Hiraizumi M, Nomura K, et al. 2020. Cryo-EM structures of calcium homeostasis modulator channels in diverse oligomeric assemblies. *Sci Adv* 6: eaba8105
- 5) Taruno A, Kashio M. 2019. AAV-Mediated Gene Delivery to Taste Cells of the Tongue. *Methods Mol Biol* 1950: 299-307
- 6) Ma Z, Taruno A, Ohmoto M, Jyotaki M, Lim JC, et al. 2018. CALHM3 Is Essential for Rapid Ion Channel-Mediated Purinergic Neurotransmission of GPCR-Mediated Tastes. *Neuron* 98: 547-61 e10
- 7) Taruno A, Vingtdeux V, Ohmoto M, Ma Z, Dvoryanchikov G, et al. 2013. CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 495: 223-6

Elucidation of the neural circuit mechanisms that control the palatability of food

Akiyuki TARUNO

Department of Molecular Cell Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Excessive salt intake is a major risk factor for hypertension and cardiovascular diseases. In Japan, the average salt intake exceeds the WHO target of 5.0 g, leading to large numbers of hypertension patients and high annual medical costs. While artificial salt taste enhancers are being developed globally to reduce salt intake, the brain mechanisms that underlie the palatability of salt remain unknown. Accordingly, basic research into the neural circuits of salt taste is expected to provide new insights. This study aimed to develop techniques and acquire data to understand the brain neural circuits underlying the coding and palatability of tastes, using salt taste as a subject. We developed a technique to create a salt taste sensation using optogenetics without salt intake, and verified its usefulness. This technique enables an analysis of the brain representation of salt taste through taste buds independently of visceral sensations induced by salt intake. Using this technique, we also developed a method to label, isolate, and analyze salt taste-responsive neurons in the brain, and genetically identified them, allowing a selective analysis of the salt taste neural circuit. We plan to use these techniques and the acquired data to understand how salt taste is processed in the brain and how preference is established.