

助成番号 9952

マウス再生味神経と食塩感受性味細胞との特異的シナプス再形成とそれに伴う塩味嗜好行動変化についての研究

助成研究者：二ノ宮 裕三(九州大学大学院歯学研究院)

共同研究者：勝川 秀夫(朝日大学 歯学部)

安松 啓子(九州大学大学院歯学研究院)

塩味(Na塩)の受容にはアミロライド感受性(AS, Amiloride-sensitive) Na⁺チャンネルが関与することがヒトや多くの実験動物で明らかとなっている。また近年、ラットやマウスではそのAS味細胞が舌前部の鼓索神経領域に限定して存在すること、鼓索神経の特定の神経線維群(N-type)と特異的にシナプス形成し、Na塩に選択性の高い味の情報を伝達していることが報告されている。一方、NaClのみならずKClや他の多く塩に対して幅広く応答するA非感受性(AI: Amiloride-insensitive)の塩受容機構の存在も報告されており、それは舌に広く分布し、神経線維群としてE-typeとシナプスすることが提唱されている。しかし、その特異的なシナプス形成の発現機構についての詳細はまだ不明のままである。

そこで、本研究は、味細胞におけるAS及びAIの2種の塩味受容機構の発現とその神経支配における特性と、さらにはそれら特異的神経情報の塩味識別行動との関連について検討するため、マウス鼓索神経切断後の再生過程における食塩応答のアミロライドによる抑制性と、NaClとKClとの弁別行動応答の変化について調べた。

その結果、鼓索神経切断2週後では、鼓索神経に味応答はみられず、冷水に対する応答のみがみられ、行動応答においてもNaClに対する応答閾値が高く、Na-K弁別性も消失していた。すなわち、この時期においては鼓索神経の再生先端は味蕾まで達しておらず味細胞とのシナプス形成に至っていないことが推定される。次に、切断3週後では鼓索神経は塩応答を示し、この時期までに少なくとも一部の神経は味細胞とシナプス形成していることが分った。しかし、Na応答についてはASはなく、したがって塩非選択性のAI受容機構を介する応答であり、行動応答においてもNa-K弁別性が認められなかった。単一神経線維はAIのE-type線維の存在が確認された。切断4週後、神経応答でASが回復していたが、その閾値はcontrolと比べ高く(0.1-0.3M; controlは0.01M)、行動応答においてもNa-K弁別性はその閾値濃度附近で認められた。単一神経線維にはASでしかもNaCl応答閾値が高く、応答頻度も比較的低いN-type線維の存在が確認された。切断1ヶ月以上で、再生鼓索神経のNa応答のASも行動応答におけるNa-K弁別性もcontrolとほぼ同様のレベルまで回復していた。単一神経線維もN-typeとE-typeがほぼ1:1の比で存在していた。以上の結果は、Na特異的なAS受容機構は、塩非選択的なAI受容機構より遅れて再発現すること、そのAS受容機構発現に一致してN-type線維の存在がみとめられ、その時期にAS味細胞とN-type線維の選択的なシナプス形成が推定されること、さらに、それに一致し行動応答のNa-K弁別性の回復がみられることなどから、マウスにおけるAS受容機構からN-type神経線維を介して伝達される塩味情報がNa-K弁別に不可欠であることが示唆された。

助成番号 9952

マウス再生味神経と食塩感受性味細胞との特異的シナプス再形成とそれに伴う塩味嗜好行動変化についての研究

助成研究者：二ノ宮 裕三(九州大学大学院歯学研究院)

共同研究者：勝川 秀夫(朝日大学 歯学部)

安松 啓子(九州大学大学院歯学研究院)

1. 研究目的

味覚の受容識別機構の研究は近年の分子生物学的手法の発展に伴い急激に進展しつつある。塩味の受容機構においても、その主たる膜成分としてアミロライド感受性[AS, 非感受性:Amiloride-insensitive(AI)] Na⁺チャネルの関与が明らかとなり、その味細胞における発現、細胞内シグナルトランスダクション機構も明らかになりつつある。しかし、それが塩味の情報として味細胞から特定の味神経線維へどのように伝達されるのかについてはまだ全く不明である。味蕾は神経からの栄養因子により維持されており、神経支配を断つと消失する。一方、味細胞は上皮細胞由来でその寿命は約10日と短く、その周期でターンオーバーする。したがって、味神経は新生してくる味細胞と絶えず新たなシナプスをつくりながら一定の味覚情報を中枢に伝えることになる。したがって、塩味情報の伝達においても、味細胞のAS及びAI-Na受容機構発現と神経支配関連のメカニズムを解明する必要がある。

筆者らは過去、ラットAS及びAI味細胞がそれぞれ特定の神経線維群(N-type及びE-type)と特異的なシナプス形成をおこなっている可能性について報告した(1)。近年さらに、マウスを用い、AS味細胞をその中に含む茸状乳頭味蕾の支配神経である鼓索神経とAS細胞を持たずAI細胞のみを保有する有郭乳頭、葉状乳頭味蕾の支配神経である舌咽神経をつなぎ変え、再生後、舌の支配神経変化に伴うASの変化について検索し(2)、AS及びAI-Na受容機構の発現は味神経中のN-type及びE-type線維群とのシナプス形成により、相互依存的に起こっている可能性を示唆する結果を得ている。また、AS-Na受容機構から起こりN-typeに伝えられる塩味情報は食塩とKClとの識別に極めて重要な役割を果たしていることが示唆されている(3,4)。

そこで、本研究は、味細胞におけるAS及びAIの2種の塩味受容機構の発現とその神経支配、すなわちシナプス形成における特異性と、さらにはそれら特異的神経情報の塩味識別行動との関連について検討するため、マウス鼓索神経切断後の再生過程における食塩応答のアミロライドによる抑制性と、食塩とKClとの弁別行動応答の変化について調べた。

2. 実験方法

2.1. 実験動物

動物にはAS-Na受容機構を保有する系統であるC57BL/6CrSlcマウスを用いた。動物は無処置コントロール群と実験群に分け、実験群は切断後13-18日(2週前後)、19-24日(3週前後)、25-30日(4週前後)、32日以上(1ヶ月以上)の4群に分け、それらの各群の行動応答と鼓索神経応答を測定した。行動及び神経応答の測定実験は、それぞれ異なる個体で行ったが、数匹については行動実験終了後、神経応答を測定し、両実験に用いた。

2.2. 鼓索神経の切断手術

実験群動物をネンプタル麻酔下(40-50mg/kg)で固定し、通法に従い左右鼓索神経を顎下三角の内側翼突筋下で露出し、鼓室横で右側は神経束約1mmをcrushし、左側は切断した。

2.3. 行動応答の測定(条件づけ味覚嫌悪学習)

各群マウスを実験開始1日から5日目まで絶水条件下におき、一日一回テストケージ内でリック記録システムを介して蒸留水を飲むようトレーニングした。一日目はテストケージ内に一時間放置して蒸留水を自由に摂取させた。2-5日目はトレーニング時間を30分間とし、蒸留水の提示とリック数測定(10秒間)を30秒間隔で30-50回繰り返した。6日目に条件刺激溶液として0.1M NaClを繰り返し与え飲ませた後、塩化リチウム(230mg/kg)を腹腔内投与した。この条件づけを行った日を神経切断後の日数として表した。7日目は回復日とし、テストケージ内で蒸留水のみを30分間提示した。8-10日目はテスト期間とし、蒸留水と0.1M NaClを交互に5回繰り返し提示した時のリックに基づき嫌悪学習獲得の有無を調べた。その後、種々のテスト溶液に対するリック数を測定した。

テスト溶液は0.01-1.0M NaCl, 0.01-1.0M KClとそれらの30 μ Mアミロライドの混合液、0.1M NH₄Cl, 0.3M sucrose, 0.1M MSG, 0.3mM HCl, 0.1mM 塩酸キニーネ、0.02M サッカリン、0.1M D-フェニルアラニンを用いた。

2.4. 鼓索神経応答の測定

動物をネンプタル麻酔下(40-50mg/kg)で固定し、気管カニューレを装着後、右側鼓索神経を周囲の組織から分離、露出させた後、銀電極にのせ舌味刺激に対する全神経線維束の応答を記録した。味溶液は0.01M HClと0.02M 塩酸キニーネ以外は行動実験と同一のものを用いた。味溶液は約0.5ml/秒で約30秒与えた。舌洗浄には蒸留水を用い約1分間行った。味応答の大きさは刺激開始後5, 10, 20秒の時点で測定し、それらの平均値を0.1M NH₄Clに対する応答の相対値として求め、算出した。単一神経線維の応答は刺激後5秒間及び10秒間のインパルス数を刺激前の自発放電頻度を差し引き、正味の応答値として算出した。

3. 結果

3.1. 条件づけ味覚嫌悪学習による食塩とKClの弁別性の神経再生による回復

Fig. 1は各群の0.1M NaClに嫌悪条件づけした後のNaCl, KCl それらのアミロライド混合液に対する10秒間のリック数を基に濃度応答曲線を求めたものであ

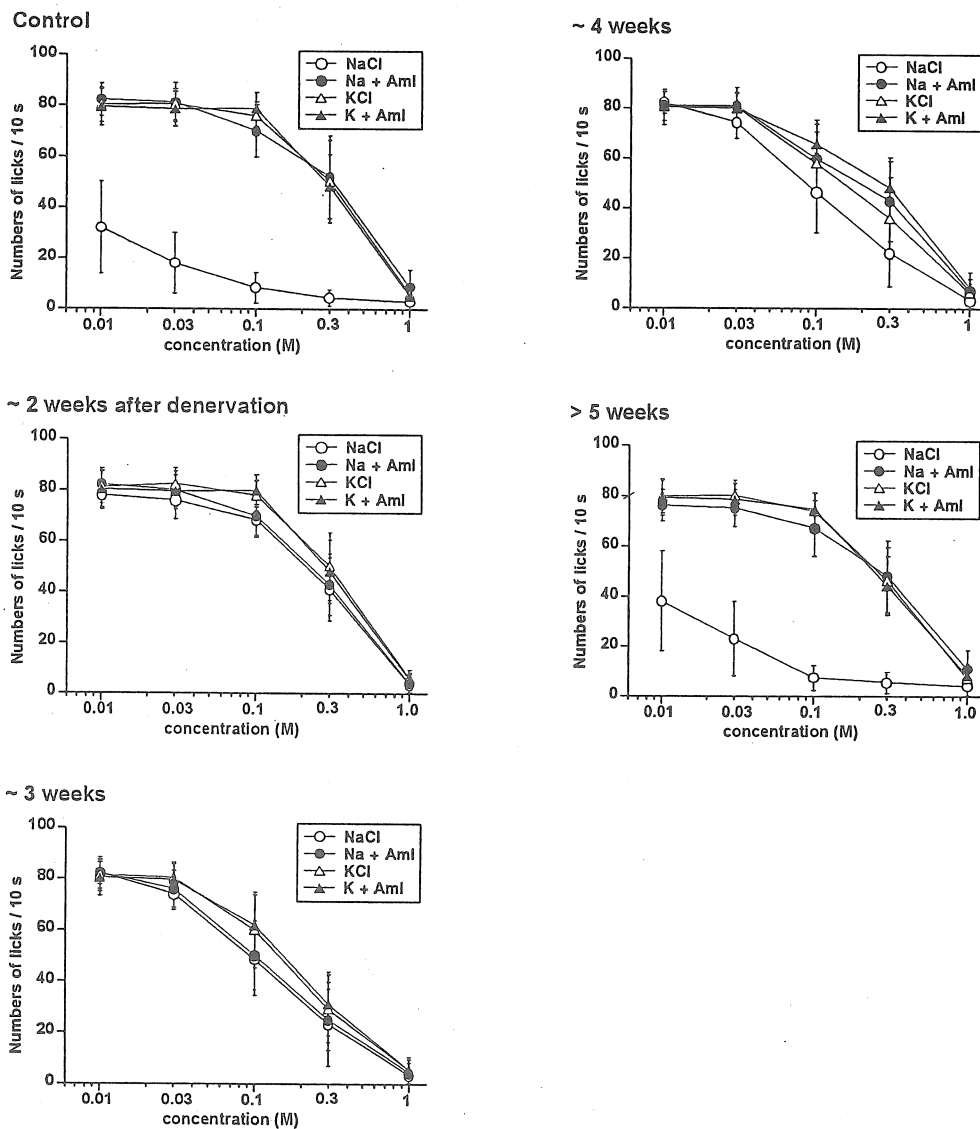


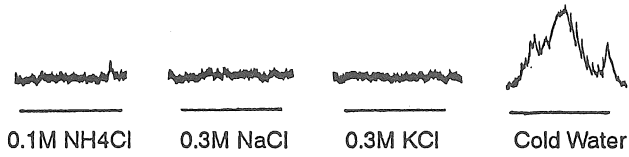
Fig.1 Concentration-response curves for NaCl, NaCl with 30 μ M amiloride (Na + Aml), KCl and KCl with 30 μ M amiloride (K + Aml) in control, mice around 2, 3, 4, and more than 5 weeks after denervation of the chorda tympani nerve. These mice were conditioned to avoid 0.1 M NaCl. Responses were measured as numbers of licks per 10 s

る。intactコントロール群ではNaClに対するリック数は0.01 - 1.0Mの用いたすべての濃度範囲で低い値を示したが、KClに対しては0.01 - 0.1Mでは蒸留水と同様に80リック/10秒前後の高い値を示し、0.3Mで若干減少し、1.0Mではほとんどリックをしないことが分った。1.0Mに関しては、アミロライド混合液を含むすべての塩溶液でマウスはほとんどリックしておらず、学習効果とは関係なく動物の飲めない濃度であることが示唆される。しかし、0.3M以下の濃度ではコントロール群はNaClとKClを明らかに区別しており、アミロライド混合によりその識別性が低下し、KClと同じレベルまでリック数が増加することが分った。すなわち、アミロライドはNaClの選択的な受容機構を抑制し、KClとの識別性に関わる神経情報が大きく減少したことを示唆している。鼓索神経切断2週前後では0.1M NaClに対する嫌悪学習効果がほとんどみられず、さらにNaClに対する相対的な感受性の低下により、NaClに対するリック数が増加している。切断3週前後では0.1M NaClに対する嫌悪条件づけ効果が若干みられ、リック数が50/秒まで減少しているが、KClとの識別性とアミロライドによる効果は認められなかった。切断4週前後ではKClとの識別性が若干回復し、その識別性のアミロライドによる低下がみとめられ、味細胞においてアミロライド感受性が回復していることが示唆された。切断1ヶ月以上ではコントロールとほぼ同様の応答が得られており、ほぼ完全な回復に至っていることが類推された。

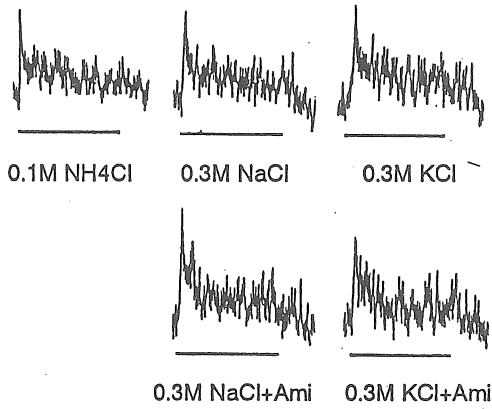
3. 2. 再生鼓索神経の応答

切断2週前後の群では、味刺激に対する明確な鼓索神経応答を示す個体は極めて限られており(1/5匹)、5℃の冷水や舌の蝕刺激に応答するものが多かった(Fig. 2)。切断3週前後の群では味応答を示し、0.1Mの塩溶液ではその応答の順位がNH₄Cl > KCl > NaClとなるものが多く、アミロライドによるNaCl応答の明確な抑制効果は認められなかった。切断4週前後の群では塩応答はNH₄Cl > NaCl > KClの順に大きく、0.3M以上の濃度のNaClに対する応答がアミロライドにより抑制されるものが多く存在した。しかし、0.03M NaClの応答がアミロライドにより明確に抑制された例はなかった。単一神経線維の応答の記録においてもNaClに応答を示し、KClに対する応答が小さい線維(N-type)では一般にNaClに対する応答の閾値が高く、インパルス頻度も低かった。切断1ヶ月以上の群では塩応答はNH₄Cl > NaCl > KClの順となりコントロールと同様の傾向を示した。NaCl応答のアミロライドによる抑制効果もあり、0.03M NaCl応答でも明確に認められた。単一神経線維もアミロライド感受性のN-typeと非感受性のE-typeに分類され、コントロールと同様の応答特異性を示し、塩応答はほぼ完全な回復が認められた。

2w after denervation



3w



4w

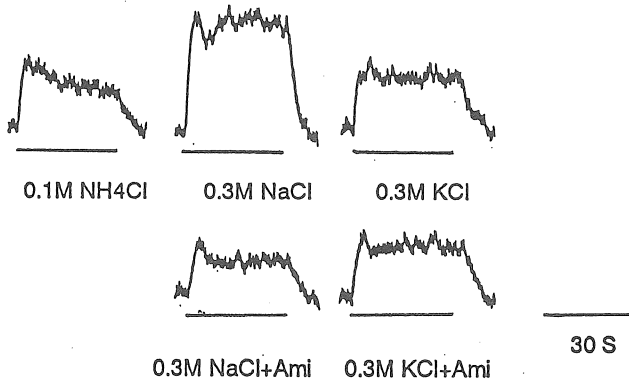


Fig.2 Responses of regenerated chorda tympani nerve to salts and their mixture with amiloride in mice around 2, 3 and 4 weeks after denervation of the chorda tympani nerve

4. 考察

筆者らは過去にマウスの鼓索神経及び舌咽神経の食塩応答のアミロライドによる抑制性を調べ、アミロライド感受性(AS)は鼓索神経にのみ見られることを示した(5)。同様の結果がその後ラットにおいても認められ(6, 7)、ASが神経支配により異なることが明らかになっている。本研究ではその鼓索神経を両側性に切断すると食塩に対する感受性とKClとの弁別性が著しく低下することを明らかにした。このことは、AS受容機構からの情報が食塩とKClの弁別に重要な役割を果たしており、その情報は鼓索神経領域から起こっていることを再確認するものである。鼓索神経切断後の味応答の回復過程については、過去gerbilを用いた研究があり(8)、食塩応答よりNH₄Cl応答の回復が先行することや神経crush後15日で食塩応答のほぼ完全な回復が見られたとの報告がある。本研究では塩応答の回復の順位については一致したものの、回復速度に関しては、gerbilの例より明らかに遅い結果となっている。その差については、今のところ種差や神経切断の方法などが考えられる。特に、gerbilの場合は片側の神経切断であり、両側切断より栄養因子などの供給等その回復が早まる可能性がある。我々のマウスを用いた予備実験でもそのことを示唆する結果が得られている。本研究では神経切断後の経過が行動実験と神経生理実験で一致しており、回復には、切断2週前後の鼓索神経に味応答がみられない時期、3週前後の塩応答はみられるがASはなく食塩とKClの弁別が出来ない時期、4週前後のASがあり、弁別性も回復したが、その閾値が高い時期、を経ることが明らかになった。また、例数は多くないものの、ASのN-typeとAIのE-typeの発現性と分離比、さらにはN-typeのNaClに対する閾値、応答頻度の増加傾向など、その切断後の時間経過に両種の実験結果で矛盾はみられない。したがって、食塩とKClの弁別に味細胞におけるASNa⁺チャンネルの発現、そのN-typeによる神経支配と情報伝達、情報量を上げるためのインパルス頻度の増加などが各時期における変化となっており、その間で味細胞におけるチャンネル数の増加、単一神経線維の支配細胞数の増加など起こっていることが示唆される。

5. 今後の課題

本研究の結果から、神経切断後の再生過程において、まずAI味細胞とE-type腺維が出現し、ついでAS味細胞とN-typeが現れることが分った。この事実は、両種のNa受容メカニズムはそれぞれ異なる時間経過で、独立して発現する可能性を示唆している。その味細胞においてそれぞれの受容メカニズムが発現し、特定の神経線維と選択的にシナプスが形成される時期にシナプス周辺でどのようなダイナミックな現象がおこなっているのか、その特異性を決定する因子は何であるのか、今後の研究で明らかにする必要がある。

6. 文献

- 1) Ninomiya, Y. and Funakoshi, M. *Brain Res.*, 445: 319-325 (1988)
- 2) Ninomiya, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5347-5350 (1998)
- 3) Ninomiya, Y. *J. Neurophysiol.*, 76: 3550-3554 (1997)
- 4) Specter, A.C., Guagliardo, N.A. and John, S.J. *J. Neurosci.*, 16: 8115-8122 (1996)
- 5) Ninomiya, Y., Tanimukai, T., Yoshida, S. and Funakoshi, M. *Physiol Behav.*, 49: 913-918 (1991)
- 6) Formaker, B.K. and Hill, D.L. *Physiol Behav.*, 50: 765-769, (1991)
- 7) Doolin, R.E. and Gilbertson, T.A. *J. Gen. Physiol.*, 107: 545-554 (1996)
- 8) Cheal, M., Dickey, W.P., Jones, L.B. and Oakley, B. *J. Comp. Neurol.*, 172:627-645 (1977)

Synaptic reformation between salt-sensitive taste cells and axons after denervation of mouse chorda tympani nerve and recovery of behavioral discriminability between sodium and potassium salts

Yuzo Ninomiya, Hideo Katsukawa* and Keiko Yasumatsu

Department of Oral Physiology, Kyushu University Graduate School of Dentistry, and *Department of Oral Physiology, Asahi University School of Dentistry

Summary

Synaptic reformation between taste cells and axons after denervation of the chorda tympani nerve was studied by examining recovery of behavioral discrimination between sodium and potassium salts and taste responses of regenerated chorda tympani nerve to salts and other taste stimuli in mice. In intact control mice, aversion condition to NaCl did not generalize to KCl. This discrimination disappeared when NaCl solution was mixed with amiloride, Na⁺ channel inhibitor. Single chorda tympani fibers (N-type fibers), specifically sensitive to NaCl, innervate amiloride-sensitive (AS), sodium responsive taste receptor cells, whereas E-type fibers, broadly responsive to various salts, innervate amiloride-insensitive (AI) taste cells. This suggests the importance of AS-N-type fibers for behavioral discrimination between sodium and potassium salts. About two weeks after denervation of the chorda tympani nerve, behavioral discrimination between NaCl and KCl disappeared, and no significant responses to taste stimuli were observed in the chorda tympani. At about 3 weeks after denervation responses to salts recovered in both behavioral and neural measurements. However, no AS and the salt discrimination exhibited. At about 4 weeks after denervation, mice became discriminative between NaCl and KCl, and showed AS in NaCl responses of the regenerated nerve, although threshold of NaCl responses for AS was still considerably higher (0.1-0.3M) than control (0.01M). After more than a month, mice showed complete recovery in AS in neural responses and behavioral salt discrimination. These results suggest that behavioral discrimination between NaCl and KCl is parallel with AS in sodium-responsive taste cells. Synaptic reformation between AS taste cells and N-type regenerated axons may start from about 4 weeks and take more than a month for their complete synaptic reformation.