

## 成長過程における塩分摂取量の制限が味覚神経回路の発達に及ぼす影響

池永 隆徳

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

**概要** 味覚は化学感覚の一種であり、生物が味を認識するために、味覚情報は味細胞によって受容された後に神経へと伝達され、最終的に脳へと運ばれる。従って、正確な味覚情報の認識のためには、味覚情報を伝達する感覚神経が発生の過程において正しく配線されることが重要である。過去の哺乳類による研究により、発生過程においてナトリウムを制限した摂餌を行うと、中枢における味覚神経の終末領域が通常と比べて大きくなることが知られており、このことは初期発生において塩分を初めとする適切な栄養を摂取し、それらからの適切な刺激を受けることが適切な神経回路の形成に重要であることを示唆している。しかしながら、このような低ナトリウム摂取状態での異常な神経回路形成がどのような過程でなされるかに関する詳細は明らかではない。本実験では、近年モデル生物として確立されたゼブラフィッシュを用いて、末梢と中枢をつなぐ味覚神経の構造を単一細胞レベルで観察する方法を確立することを目的として、赤外線レーザーの局所照射と、熱ショック蛋白質の応答を利用することにより、顕微鏡を使って生体内の単一細胞、もしくは極めて少数の細胞だけを加熱することで、それらの細胞だけで遺伝子発現を誘導するという IR-LEGO 法をゼブラフィッシュ仔稚魚の味覚神経において応用し、それらを特異的に蛍光蛋白質で標識することを試みた。

実験には熱ショックタンパク質プロモーターの下流に *gal4* 配列を組み込んだもの、*UAS* 配列の下流に *GFP* を組み込んだもの、*HuC* プロモーターの下流に *RFP* 配列を組み込んだ外来遺伝子をそれぞれ導入した三重トランスジェニックシステムを用いた。まずは、顔面、舌咽、迷走の各味覚神経の神経節の位置を *RFP* を指標に顕微鏡下で同定し、さらに熱ショックによる *GFP* の誘導が効果的に行われる時期を特定した。

次にこれらの条件を用いて、実際に任意の神経節を狙って熱照射を行った。その結果、顔面、舌咽神経においてはそれぞれ特異的な *GFP* の発現を誘導することに成功した。また、舌咽神経および迷走神経両方での発現が誘導できた例も観察できた。いずれの場合も、中枢に伸びる軸索、脳内での神経終末様構造、および末梢に向かう軸索が明瞭に観察された。今後はナトリウムを始めとする各種の味刺激物質の発生初期における適切な摂取が、どのように神経回路の正常な形成に寄与するかを検証する研究への、これらの技術の応用が期待される。

### 1. 研究目的

味覚は化学感覚の一種であり、元来は特定の物質が体内に摂取可能であるかどうかの選択に関わる感覚であり、生物の恒常性の維持に極めて重要な役割を果たす。味覚情報は味細胞によって受容された後に感覚神経へと伝達され、最終的に脳へと運ばれることで生物は味を認識できる。従って、正確な味覚情報の認識のためには、味覚情報を伝達する感覚神経が発生の過程において末梢と中枢で正しく配線されることが重要である。このような感覚

情報伝達に関わる神経回路形成に関わる分子機構などは、同じ化学感覚である嗅覚では非常に良く調べられているが、味覚に関しては未だに詳細が明らかになっていない。

過去の哺乳類による研究により、発生過程においてナトリウムを制限した摂餌を行うと、中枢における味覚神経の終末領域が通常と比べて大きくなることが知られている (Krimm and Hill, 1997; Mangold and Hill, 2007)。また、ナトリウムだけでなく、蛋白質摂取の制限においても同様

の傾向があることが報告されている(Krimm, 2007)。これらのことは、初期発生において塩分を初めとする栄養分を適切な量摂取することによる、適切な刺激の受容が適切な神経回路の形成に重要であることを示唆している。しかしながら、これまでの哺乳類での研究では、このような低塩分摂取状態での神経回路形成の異常がどのように進んでいくのかに関しては明らかではない。それは、哺乳類における研究では発生過程における神経の伸長などをリアルタイムで観察することが不可能だからである。

近年モデル生物として確立された小型魚類ゼブラフィッシュは、その仔稚魚期の体が透明であり、その発生が体外で進むこと、さらに遺伝子工学の技術の応用が容易なこと、などの利点を生かし、特定の神経細胞にGFPなどの蛍光蛋白質を発現させ、それを指標に神経の軸索の伸長をリアルタイムで観察する、というような研究が盛んになされている。これまでの研究では、特定の遺伝子プロモーターの発現を利用して蛍光タンパク質の発現が誘導されてきたが、この方法では特定の神経細胞集団全体が標識されるため、単一細胞レベルでの解析が困難であった。しかしながら、神経の軸索の伸長やその配線メカニズムの詳細を知るためには、極めて少ない数の神経細胞での解析が必要である。近年、赤外線レーザーの局所照射と、熱ショック蛋白質の応答を利用することにより、顕微鏡を使って生体内の単一細胞、もしくは極めて少数の細胞だけを加熱することで、それらの細胞だけで遺伝子発現を誘導するというIR-LEGO法が開発され(Kamei *et al.*, 2009)、この技術はゼブラフィッシュにも応用されている(Deguchi *et al.*, 2009)。本研究では、このIR-LEGO法をゼブラフィッシュの味覚情報伝達に関与する感覚細胞に応用し、それらを特異的に蛍光蛋白質で標識することを試みた。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験材料

本実験では、Tg(*HuC:mCherry*)、Tg(*CM-isll:GFP*)のシングルトランスジェニック系統、および Tg(*hsp70:gal4*)/Tg(*UAS:GFP*) のダブルトランスジェニック系統の成魚同士を掛け合わせて得られた仔稚魚を実験に用いた。成魚は、兵庫県立大学播磨科学公園都市キャンパスの生体材料センターで飼育した。水温 28°C、午前 9 時から午後 11 時までの 14 時間を明条件、残りの 10 時間を暗条件で飼

育し、朝夕それぞれ 1 回ずつ餌としてブラインシュリンプを与えた。掛け合わせによって得られた受精卵および仔稚魚は実験室内にある 28°C のインキュベーター内で飼育した。

### 2.2 IR-LEGO 法による熱刺激

生後 48 時間の Tg(*hsp70:gal4*)/Tg(*UAS:GFP*)/Tg(*HuC:mCherry*) の三重トランスジェニック系統の仔魚を、0.016 mg/ml の ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt 溶液で麻酔した後、カバーガラス上で 1% 濃度の低融点アガロース(Low melting agarose, LMP, Sigma)に、カバーガラスに対して仔魚の側面が接するように包埋した。これを反転させてスライドグラスに載せた後、IR-LEGO 顕微鏡のステージにセットした。使用した仔魚は感覚神経節に mCherry (RFP)を発現しており、ローダミンフィルターを介して RFP の蛍光を肉眼で確認しながら目的の神経節を視野の中心に位置させ、ピントを合わせた。顕微鏡のフィルターを可視光用のものに切り替え、赤外線レーザーの照射を行った。レーザーは 40 mW の強度で、照射時間は 1~2 秒間であった。レーザーの照射後、仔魚を LMP から取り出し、共焦点顕微鏡で観察するまでインキュベーター内で飼育した。

### 2.3 共焦点レーザー顕微鏡による観察

目的のサンプルを、2.2と同様の方法によってアガロースに包埋、およびスライドグラスへのマウントを行い、共焦点レーザー顕微鏡(FV-300, オリンパス)のステージにセットした。488 nm、および 543 nm の波長のレーザーを励起光とし、それぞれによって励起される GFP および RFP の蛍光を撮影した。

## 3. 研究結果

### 3.1 ゼブラフィッシュ稚魚における顔面、舌咽、迷走神経節の観察

本研究では、IR-LEGO 法を行う際に蛍光蛋白質の発現を指標として、目的の神経節を同定することを計画している。その際に、全神経細胞で発現する HuC 遺伝子のプロモーター活性を利用して、全神経で赤色蛍光タンパク質である mCherry (RFP)を発現するトランスジェニック系統である Tg(*HuC:mCherry*) を利用する。この系統において、どの構造が味覚情報を伝達する感覚神経節であるかを同定することを試みた。Tg(*CM-isll:GFP*)系統は脳及び脊

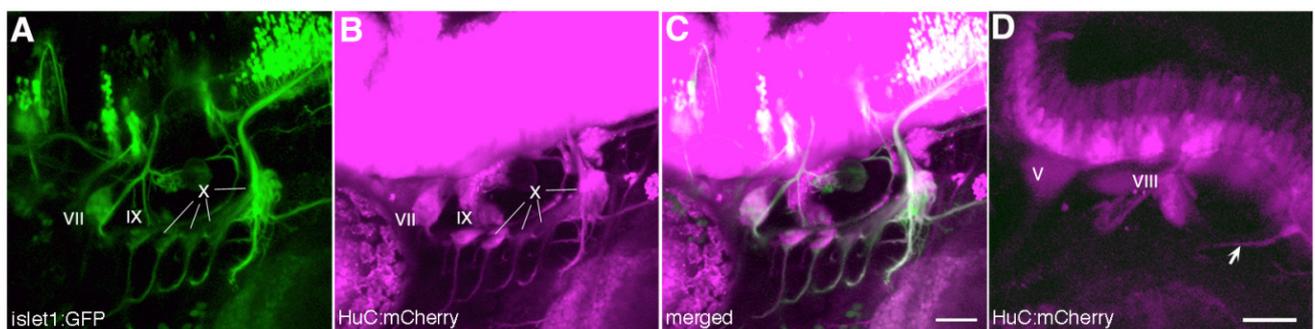
髄の運動ニューロンを GFP によって可視化することを目的として作成されたトランスジェニック系統であるが、同時に味覚情報を伝達する顔面、舌咽、迷走神経節でも GFP を発現することが知られている (Higashijima *et al.*, 2000)。そこで、Tg(*HuC:mCherry*) 系統と Tg(*CM-isll:GFP*) 系統を掛け合わせることで得られる仔稚魚において、RFP を発現する細胞のどれが味覚感覚神経節であるかの同定を試みた。生後 72 時間の稚魚において、過去の文献を参考に (Higashijima *et al.*, 2000) GFP を発現する顔面 (VII)、舌咽 (IX)、迷走神経節 (X) を同定した (Fig. 1A)。RFP の蛍光も同時に観察し、Tg(*HuC:mCherry*) 系統におけるこれらの神経節の位置を確認した (Fig. 1B, C)。今後の実験は、この RFP の発現を指標として、IR-LEGO 法において赤外線レーザーを照射する神経節の決定、およびその結果 GFP がどの神経節で発現しているかの確認を行った。

### 3. 2 熱ショック応答の時期特異性

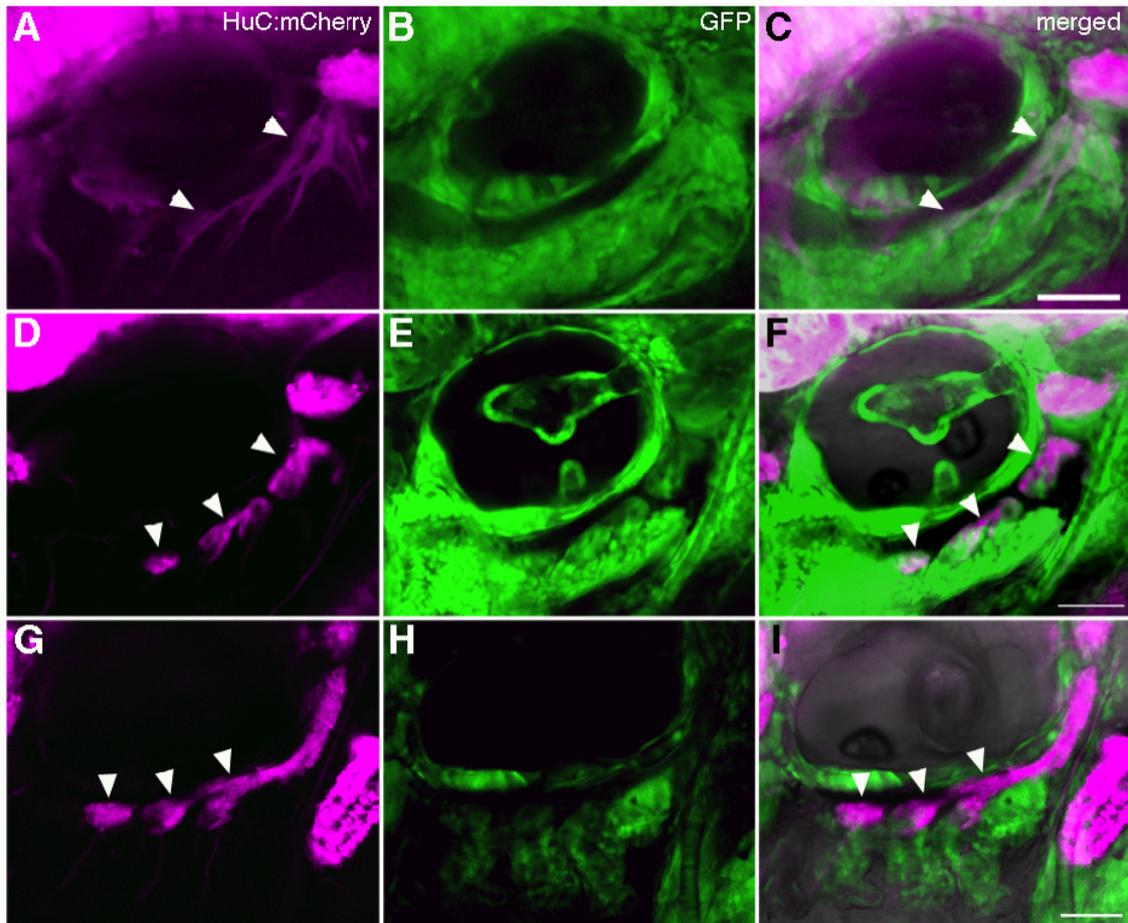
上述のように、IR-LEGO 法は熱ショック蛋白質 (hsp) の応答を利用して、特定の遺伝子発現を誘導するという原理を用いている。熱ショック蛋白質には分子量の異なるサブタイプが存在し、本研究で利用したトランスジェニック系統は、それらの一つである hsp70 のプロモーター領域の下流に転写調節因子である gal4 の配列をつないだ外来遺伝子の挿入を持つ (Tg(*hsp70:gal4*))。この hsp70 の応答には、時期特異性があることが知られている。そこで、IR-LEGO 法を行うにあたり、どの発生ステージの仔稚魚を用いるのが適当であるかを検討するために、発生段階の異なる仔稚魚に 37°C、30 分の温浴処理によって熱ショッ

クを与え、それに伴う遺伝子誘導の様子を観察した。本実験では熱ショックの結果発現が誘導されるレポーターとして GFP を用いた。このために、Tg(*UAS:GFP*) 系統を用いた。Tg(*hsp70:gal4*)/Tg(*UAS:GFP*) の二重トランスジェニック系統において、熱ショックによって GAL4 蛋白質の発現が誘導され、それらは UAS 配列を認識し、活性化する。UAS 配列の下流に GFP をコードする遺伝子を導入しておくことで、熱ショックの結果 GFP の発現が誘導される。

Tg(*hsp70:gal4*)/Tg(*UAS:GFP*)/Tg(*HuC:mCherry*) の三重トランスジェニック系統において、生後 36 時間の時点で温浴処理によって胚全体に熱ショックを与え、生後 48 時間胚における GFP の発現パターンを観察した。その結果、迷走神経節において GFP の発現が確認できた (Fig. 2A-C)。また、受精後 60 時間 (受精後 2 日目) の胚においても同様の処理を行い、78 時間胚 (3 日目胚) の時点で観察を行ったところ、迷走神経節において明瞭な GFP の発現が確認できた (Fig. 2D-F)。これらの傾向は、顔面、舌咽神経節においても同様であった。しかしながら、受精後 3 日目胚を温浴処理し、4 日目に観察した結果、GFP を発現している迷走神経節の領域は減少しており (Fig. 2G-I)、この時期の熱処理は迷走神経節における遺伝子誘導が能率的に行われない可能性が示唆された。この傾向は他の二つの神経節においても同様であった。以上の結果より、より若い時期での熱処理によって効率のよい GFP の発現を誘導できることが明らかとなった。しかしながら、生後 36 時間の Tg(*HuC:mCherry*) 仔魚において、三叉神経、あるいは聴側線神経節の構造は RFP の発現を指標として観察できるが、顔面、舌咽、迷走神経節に関してはその構



**Figure 1.** Tg(*CM-isll:GFP*) および Tg(*HuC:mCherry*) 系統における各感覚神経節での蛍光蛋白質の発現パターン。A-C. 生後 72 時間胚。D. 生後 36 時間胚。D における矢印は迷走神経の軸索を示す。V: 三叉神経節。VII: 顔面神経節。VIII: 内耳・側線神経節。スケールバーは 50  $\mu$ m。



**Figure 2.** *Tg(hsp70:gal4)/Tg(UAS:GFP)/Tg(HuC:mCherry)* 系統における、温浴処理の伴う迷走神経節での GFP の発現パターン。A-C. 生後 36 時間の時点で温浴処理した仔魚の、生後 48 時間の時点での蛍光像。D-F. 同様に生後 60 時間で温浴処理、78 時間で観察したもの。G-H. 生後 3 日目で温浴処理、4 日目に観察したもの。各図の矢頭は迷走神経節を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

造を確認することができない(**Fig. 1D**)。これは、この時期においてこれらの感覚神経節がまだ未発達であるか、あるいは構造そのものは存在しているが RFP がまだ発現していないかのいずれかの原因が考えられる。従って、今回の観察結果をふまえると、IR-LEGO 法による熱処理は生後約 48 時間以降から 2 日目に行うことが望ましいと考え、以降の実験を行った。

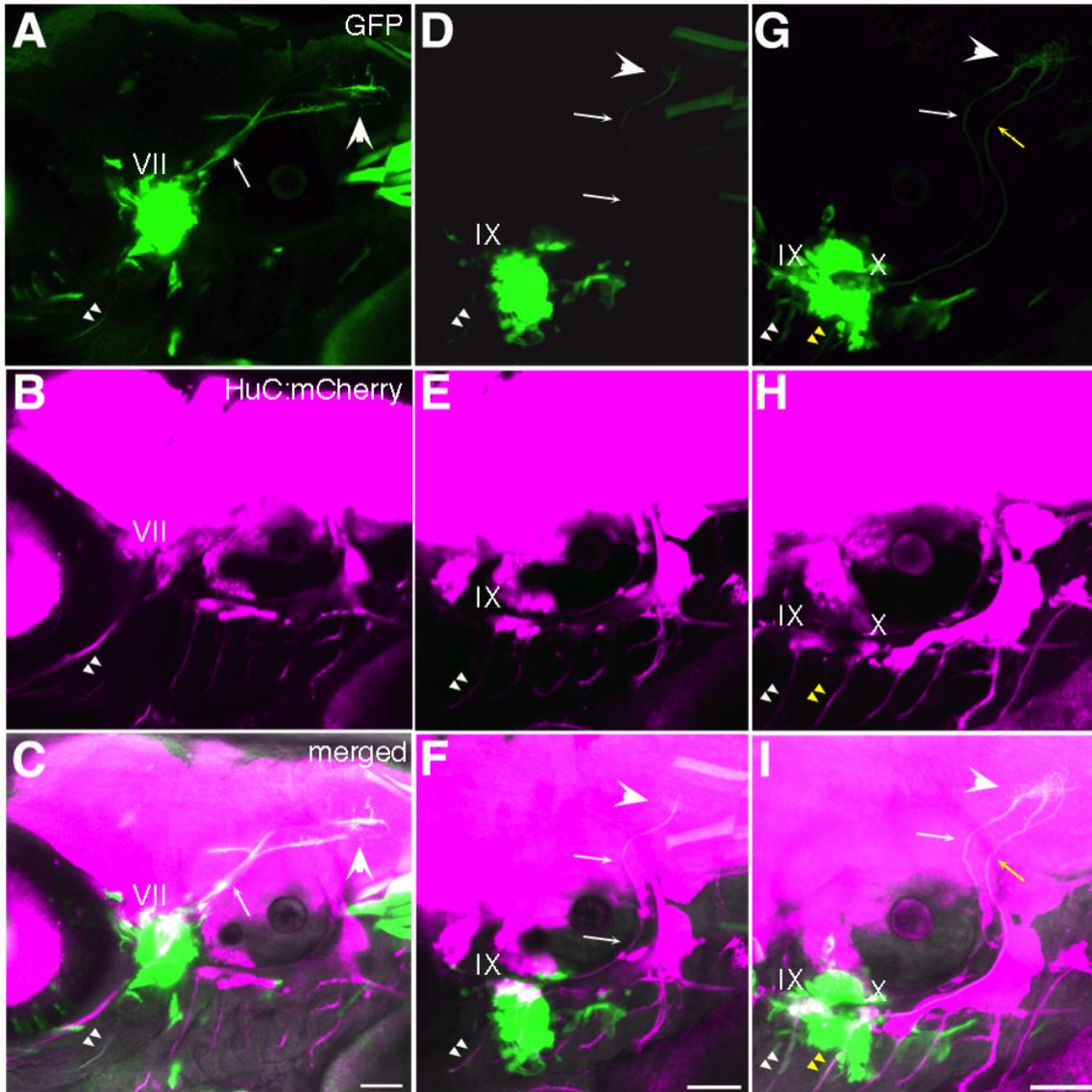
### 3. 3 IR-LEGO 法による味覚に関わる神経節での遺伝子発現誘導

これまでの実験結果をふまえ、生後 48 時間の *Tg(hsp70:gal4)/Tg(UAS:GFP)/Tg(HuC:mCherry)* トランスジェニック系統の仔魚において、各感覚神経節を蛍光顕微鏡下で RFP の発現を指標に同定し、それらに対して赤外線レーザーの局所的な照射を行った。その結果、各神

経節において GFP の発現を誘導することができ、中枢に伸びる軸索とその終末を観察することができた。その結果を **Fig. 3** に示す。

顔面神経節に 40 mW、1 秒間という条件の照射を 2 回行った結果、顔面神経節の周辺領域において GFP の発現を誘導できた(**Fig. 3A, C**)。RFP の発現と比較した結果、この部位には顔面神経節が存在しており、他の感覚神経節は存在しなかった(**Fig. 3B, C**)。GFP によって標識された脳に伸びる軸索と(**Fig. 3A**, 矢印)、脳内での軸索の分岐および終末様の構造が観察された(**Fig. 3A**, 矢頭)。また、RFP のシグナルと重なる末梢へと伸びる軸索も観察された(**Fig. 3A-C**, 二重小型矢頭)。この軸索の遠位までの追跡は今回の実験においては行うことができなかった。

40 mW、1 秒間という条件の照射により、同様の GFP の



**Figure 3.** *Tg(hsp70:gal4)/Tg(UAS:GFP)/Tg(HuC:mCherry)* 系統の各神経節において、IR-LEGO 法によって誘導された GFP の発現パターン。A-C. 生後 48 時間の時点で 40 mW、1 秒間のレーザー照射を 2 回行った結果、顔面神経節において誘導された GFP の、生後 85 時間胚における発現パターン。D-F. 同様に 40 mW、1 秒間のレーザー照射によって誘導された 77 時間胚の舌咽神経節での GFP の発現。G-H. 40 mW、1 秒間のレーザー照射を迷走神経に対して行った結果。GFP の発現は 76 時間胚の舌咽、迷走神経節の両方で見られた。矢印：中枢に伸びる軸索。矢頭：脳における終末様構造。二重小型矢頭：末梢に伸びる軸索。G と I における黄色の矢印及び矢頭は迷走神経由来のものを示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$ 。

発現を舌咽神経節においても観察することが可能であった (Fig. 3D-F)。顔面神経節の場合と同様、中枢に伸びる軸索、脳内での終末様構造、さらに末梢に向かう軸索が観察された。Tg(*CM-isII:GFP*) の観察により、舌咽神経の軸索束と迷走神経の軸索束は耳胞の後方に沿うようにして脳に向かうという同様の経路をたどるが、舌咽神経束は

迷走神経束とは分離しており、吻側側を走ることが確認できる (Fig. 1A)。この構造は Tg(*HuC:mCherry*) においても観察できる。今回の IR-LEGO によって発現が誘導された GFP は、舌咽神経束でのみ観察することができた (Fig. 3A, C)。このことは、GFP の発現は隣接している迷走神経節の細胞においては誘導されていないことを示す。

本実験において、迷走神経節のみでの GFP の発現は観察できなかったが、舌咽神経節と迷走神経節の両方で GFP が発現している例が観察された (Fig. 3G-I)。40mW、1 秒間の条件で最も吻側に位置する迷走神経節をターゲットとしてレーザーの照射を行ったが、結果として熱ショック応答が近傍の舌咽神経節でも起きてしまったと考えられる。この際、舌咽神経と迷走神経の神経束はこれまでの観察と同様に別々の経路を走っていることが明瞭に確認できるが、その終末領域は重なっていた (Fig. 3A, C, 4)。この終末領域は、生後 76 時間の時点での共焦点レーザー顕微鏡での観察後、稚魚をインキュベーター内で再び飼育した後、生後 103 時間の時点でも再び観察することが可能であった (Fig. 4)。これにより、本法によって誘導された GFP の発現を指標として、神経終末の形態の変化や発達を計時的に追跡することが可能であることが示された。

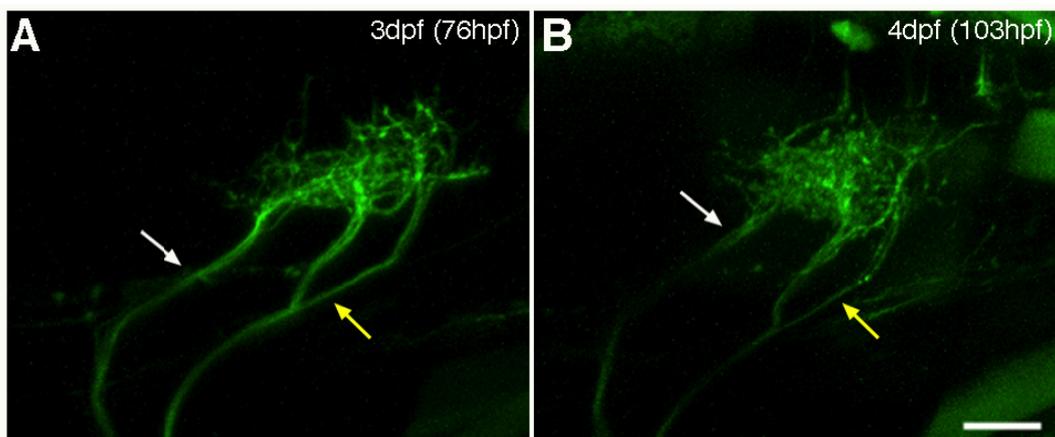
#### 4. 考察

本実験の結果、IR-LEGO 法による局所的な遺伝子の発現誘導が、ゼブラフィッシュ仔魚の顔面、舌咽、および迷走各神経節の細胞において可能であることが示された。今回の実験では、あらかじめ GFP とは異なる波長の蛍光タンパク質である RFP をあらかじめ各神経節に発現するトランスジェニック系統を用いることにより、闇雲ではなく任意の神経節を狙ってレーザーの照射を行うことができた。一部の例外はあったが、ほとんどのケースにおいて GFP の発現は狙った神経節においてなされていた。これまで

の研究において、ゼブラフィッシュにおける特定の神経細胞の集団の一部の細胞だけを特異的に標識するためには、1. ガラス電極による色素の注入、2. 蛍光タンパク質を発現している細胞の一部の、野性型個体への移植、3. 初期胚への DNA コンストラクトの注入によるランダムな蛍光タンパク質の発現、などといった方法が用いられてきた。これらのうち、1と2に関しては非常に精密な技術を必要とし、それに伴って一個体の実験に要する時間も非常に長くなるため、能率のよい実験を行うには不向きである。3の方法は簡便であるが、狙った領域や細胞での蛍光タンパク質の発現を誘導することはできないので、ある程度サンプルを用意しても観察したい部位が標識されていないこともあり得る。本研究の方法では、サンプルをある程度の数まとめて包埋して顕微鏡下にセットしてしまえば、1 個体におけるレーザー照射の処理は 30 秒もかからない。従って、比較的短時間で多くの個体での実験が可能であり、かつ狙った領域での発現が誘導できるので、トータルでの実験の能率はこれまでの方法と比べても格段に上であると言える。

#### 5. 今後の課題

本実験において、レーザー照射領域での GFP の発現は神経節以外の組織でも見られた (Fig. 3)。これらは RFP を発現していないので神経以外の組織であると考えられるので、最終的にこのような組織での GFP の発現は軸索やその終末の観察を妨げるものではないが、例えば神経



**Figure 4.** A. Figure 3G の神経終末領域の拡大図。生後 76 時間胚におけるイメージ。B. 同じ個体の同じ領域を、生後 103 時間の時点において撮影したイメージ。白矢印は舌咽神経由来、黄矢印は迷走神経由来の軸索をそれぞれ示す。スケールバーは 20  $\mu$ m。

節内のいくつかの細胞が標識されているか、といったことを確認することを困難としてしまう。また、今回の実験条件下では複数の軸索が標識されていた。当初の目的である、単一細胞レベル、あるいはそれに匹敵する極めて少ない数の神経細胞だけを標識するためには、今後レーザーの出力を小さくする、あるいは照射時間を短くすることによって、より限られた領域だけでの熱ショックを与える条件を確立する必要がある。

今回の実験において、各神経節から伸びる軸索と、その終末領域は中枢側において非常に明瞭に観察された。一方、末梢へ伸びる軸索に関しても、神経節の近傍部位では確認することができた。哺乳類に対するゼブラフィッシュの稚魚を用いる利点の一つとして、その透明な体故に同一の感覚神経細胞に由来する中枢側と末梢側の両方の構造をホールマウントで観察できることが挙げられる。従って、今後末梢方面への投射経路をより詳細に観察できるような条件の確立を目指す必要がある。

今回実験に用いた *Tg(hsp70:gal4)/Tg(UAS:GFP)* の組み合わせにおいて、大部分の脳の領域や今回の実験のターゲットであった感覚神経節の周辺では熱処理を加えたときのみ GFP の発現が見られたが、例えば胴体の筋細胞や脳の後部において、熱処理とは関係のない非特異的な GFP の発現が見られた (Fig. 3A, 4B など)。このような非特異的な発現はその後の観察を妨げる可能性があり、今後別のトランスジェニックシステムを用いることも視野に入れる必要がある。例えば、GFP 同様に通常は緑色の蛍光を発する蛍光タンパク質、Keade をコードする遺伝子を UAS 配列の下流に組み込んだシステムを用いた場合は、このような非特異的な発現は起きないことが報告されている (Deguchi *et al.*, 2009)。また、Fig. 1 より分かるように、熱照射の際の目印として用いた *Tg(HuC:mCherry)* システムよりも、*Tg(CM-isll:GFP)* システムの方が標識されている神経構造が少なく、かつ GFP の発現もより明瞭なので、レーザー照射の際の目印として用いるには適している。現在国立遺伝学研究所より UAS-RFP システムを提供していただき、飼育している。これを *Tg(UAS:GFP)* の代わりに用いることで、*Tg(CM-isll:GFP)* と組み合わせた実験が可能になる。

目的の項でも述べたように、発生段階における適切な

ナトリウムを始めとする栄養の摂取は正常な味覚神経回路の構築に必要であることが知られており、本研究で確立された簡便且つ正確な標識法により、一つ一つの神経単位での正常時および異常時の回路形成のパターンを観察することができるようになることが期待される。近年、ゼブラフィッシュの顔面神経が各種の塩味物質 (一価陽イオン) に対して応答することが実験的に示されている (古山ら, 2010)。今後、本実験の成果を利用して、塩味刺激及びその他の味覚刺激の、感覚神経回路に及ぼす影響について調べていくことを予定している。

## 引用文献

- Deguchi T, Itoh M, Urawa H, Matsumoto T, Nakayama S, Kawasaki T, Kitano T, Oda S, Mitani H, Takahashi T, Todo T, Sato J, Okada K, Hatta K, Yuba S, Kamei Y (2009) Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and *Arabidopsis thaliana*. *Dev Growth Differ* 51:769-75.
- Higashijima S, Hotta Y, Okamoto H (2000) Visualization of cranial motor neurons in live transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under the control of the *Islet-1* promoter/enhancer. *J Neurosci* 20:206-218.
- Kamei Y, Suzuki M, Watanabe K, Fujimori K, Kawasaki T, Deguchi T, Yoneda Y, Todo T, Takagi S, Funatsu T, Yuba S (2009) Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells in vivo. *Nat Methods* 6:79-81.
- Krimm RF (2007) Factors that regulate embryonic gustatory development. *BMC Neurosci* 8:S4.
- Krimm RF, Hill DL (1997) Early prenatal critical period for chorda tympani nerve terminal field development. *J Comp Neurol* 378:254-264.
- Mangold JE, Hill DL (2007) Extensive reorganization of primary afferent projections into the gustatory brainstem induced by feeding a sodium-restricted diet during development: less is more. *J Neurosci* 27:4650-4662.
- 古山昭, 大須賀健二, 宗形芳英 (2010) 一価陽イオンに対する淡水魚の味覚神経応答. 日本味と匂い学会第 44 回大会プログラム・予稿集, p64

## Effects of Restriction of Salt Intake in Early Developmental Stage for the Organization of Neural Circuit for Gustatory Sense Processing

Takanori Ikenaga

Graduate School of Life Science, University of Hyogo

### Summary

The gustatory sense plays a pivotal role in the determination of palatability of potential food items. Received signals with the peripheral taste cells are transmitted to the gustatory neurons and finally conveyed to the brain via these neurons. For correct recognition of gustatory information, therefore, it is very important to wire gustatory nerve correctly within the developmental processes. Some previous studies indicated that restriction of dietary sodium during early embryonic period results in an enlarged gustatory terminal field in mammals. However, detail process and mechanisms of such abnormal neural development is unclear. To clarify these questions, it is critical to develop the methodology to visualize the structure of single or restricted number of gustatory neurons and observe them in living animal. This study tried to apply the IR-LEGO system, which utilizes infrared-laser irradiation to heat the cells and induction heat shock-mediated expression of transgenes in targeted single cells, for gustatory neurons of the zebrafish embryos or larvae to label them specifically by fluorescent proteins. Triple transgenic fish (*Tg(hsp70:gal4)/Tg(UAS:GFP)/Tg(HuC:mCherry)*) were used in this study. First, locations of RFP expressing gustatory ganglions (facial, grossopharyngeal, and vagal) were confirmed under the microscopic observation and suitable stage for heat shock to induce the transgene products (GFP) effectively were determined. According to these conditions, infrared-laser irradiated to neurons of each gustatory nerve ganglions in zebrafish embryos. As a result, GFP expression of ganglion neurons of facial and grossopharyngeal nerve were induced respectively. Co-expression of GFP both in grossopharyngeal and vagal ganglions were also observed. In these embryos, axons going to both central nervous system and peripheral area, and nerve terminal field in the brain were clearly visualized by GFP. This technique is very useful to observe the detailed structure of restricted number of gustatory neurons *in vivo* and to analyze the effects of restricted nutrition including sodium for establishment of normal gustatory nerve networks in detail.