

塩分過剰摂取に伴う味覚と嗜好性変化:味蕾の生体可視化解析

瀬尾 欣也

自治医科大学分子病態治療研究センター分子病態研究部

概要 日本人が高塩分食を無自覚に過剰摂取してしまう背景には、日々の食習慣による味覚変化の関与が考えられる。もし、我々の食行動が味覚変化に起因するとなれば、味覚を制御することで高塩分摂取を抑え、高血圧やそれに伴う疾患を予防できるのではないかと考えた。

本研究では二光子励起顕微鏡を用いた生体分子イメージング手法をマウスの舌に適用し、味刺激に対する味蕾への味物質移動、カルシウム応答と、それによる血流変化の各ステップを定量的に評価する系を確立した。この味蕾イメージング手法を高塩分負荷マウスに適用し、味覚変容があるかの検討を今後進めていく。また、マウスの二瓶飲水選択実験により味覚識別能を調べたところ、高塩分負荷マウスでは甘味(スクロース)・うま味(グルタミン酸ナトリウム)・苦味(デナトニウム)に対する識別能が低下していた。定量的 PCR 法によりこれら味覚関連遺伝子の発現量を調べたところ、味覚レセプターの遺伝子発現量が大幅に下方修正されていた。以上の結果から、高塩分負荷を行なったマウスでは、味覚変化が中枢ではなく舌上で起きており、これが食行動に影響していることが示唆された。今後、その味覚低下のメカニズムについて検討を進めていく。最終的には、高塩分食摂取による味覚変容が、高血圧などの要因となり得るか、味覚制御による高血圧予防・治療の可能性についても検討していく。

1. 背景

和食は洋食に比して塩分過多であり、その日常的摂取により引き起こされる高血圧は「国民病」として問題視されている。この問題の根源は、日本人が和食を塩分過多であると自覚していないことであると考えられる。舌の味蕾で感じる塩味は本来、「塩分の摂取量を制御するための知覚」であるが、食習慣により塩味感受性・嗜好性が変化すると、日本人に見られるような塩分過剰摂取に対する無自覚が引き起こされる。しかしながら、この味覚感受性・嗜好性変化のメカニズムは明らかでないばかりか、塩味受容・応答のメカニズムすらほとんど分かっていないのが現状である。

本研究では、我々が独自に開発した生体で細胞動態、細胞機能をリアルタイムで可視化・評価できる、「生体二光子イメージング手法」を舌・味蕾に応用し、塩味刺激に対する味蕾の応答をイメージングにより明らかにしようと考えた。味孔への塩物質移動(ナトリウム・カリウム)に始まる、

味細胞の活性(カルシウムシグナル)、血流の動的変化といった一連の応答を捉え、これまで試験管内でしか解析対象とされなかった味細胞応答を、生体で解析した。味覚・嗜好性の形成・変化は、中枢により支配されるだけでなく、それらは味蕾レベルで起きているという仮説のもと、塩分摂取による味蕾応答・嗜好性の変容をマウス飲水行動観察、遺伝子発現解析により検討した。

2. 方法

本研究では、高塩分負荷マウスの味蕾イメージングにより味覚変容を評価し、さらに節水行動観察により、それら味覚変化の意義付けを行った。遺伝子発現解析を通して味覚変化の分子メカニズムを検討した。

2.1 生体二光子イメージングによる舌味蕾の応答解析

蛍光色素(蛍光デキストラン・Hoechst33342)を静注したマウスに対し、麻酔下で顎を切除して舌を露出させた。実験目的によってはその後、舌表面からカルシウム色素

(Rhod2-AM)をローディングし、倒立型二光子励起顕微鏡(Nikon A1R+)の上に設置してイメージングを行った(図1)。舌運動・味物質移動・カルシウム応答・血流測定などの早い動きに対して、レゾナントスキャナを用いた高速撮影(30フレーム/秒)を行った。本手法を高塩分負荷マウス、高塩分・高脂肪食負荷マウス等に適用し、塩味(塩化ナトリウム)・甘味(スクロース)・うま味(グルタミン酸ナトリウム)など、各味物質投与に対する味蕾への味物質移動、カルシウム応答、それに伴う血流変化の各ステップを可視化した。また、味細胞の興奮閾値、タイミングなどのパラメータや、興奮細胞の空間分布も評価した。

2.2 マウス飲水行動観察(二瓶選択試験)

高塩分負荷によりマウスの味覚変化・嗜好性変化が見られるか、飲水行動観察(二瓶選択試験)により評価した。マウスに高塩分水(100mM)を2週間与えたのち、図2のように、ケージ内に真水・味添加水の2つのボトルを設置し、マウスの各ボトルの飲水量を計測した。様々な濃度の味刺激物質(甘味, うま味, 苦味, 酸味)を添加した水で評価し、味添加水の選択比率((preference ratio: 1に近いほど味物質混入水への嗜好性が高いことを示す)を計算する。

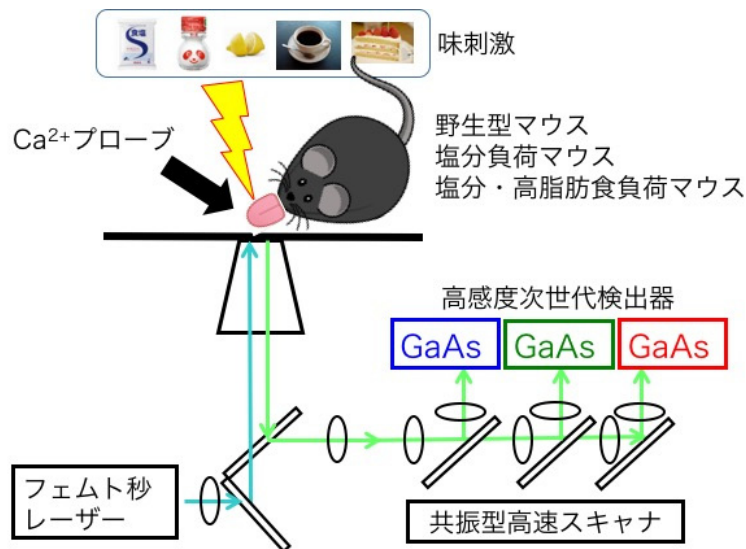


図1. 二光子励起顕微鏡を用いた舌の生体イメージング

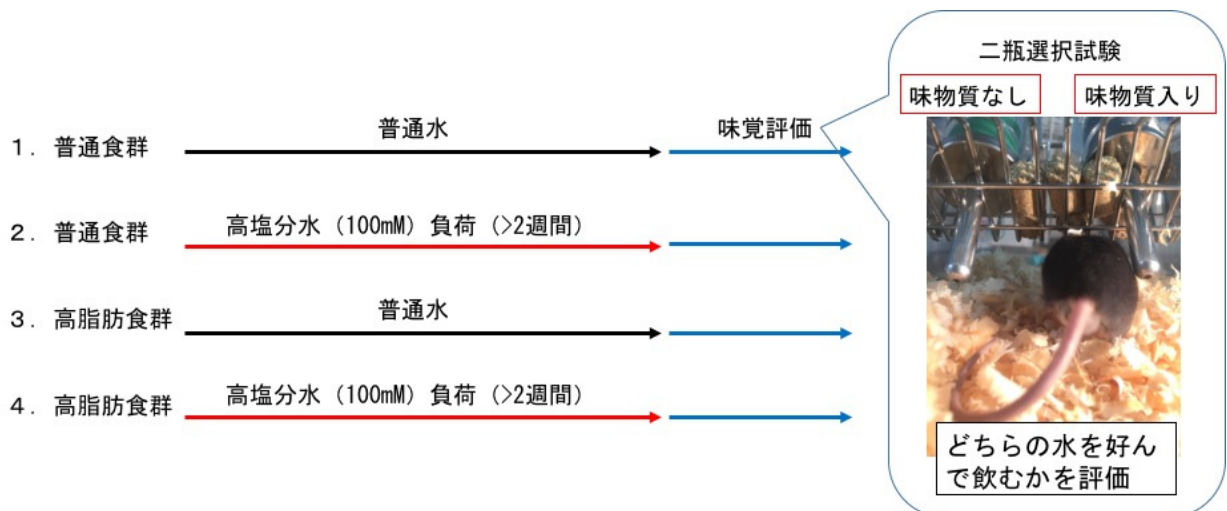


図2. マウス飲水行動観察による塩分負荷による味覚変化の評価

我々はこれまでに、脂肪食負荷によりマウスの嗜好性・味覚感受性が低下することを明らかにしており(未発表), それとの比較検討を行うために高脂肪食マウス群に対する高塩分負荷も行った。各味物質に対する選択性から味覚感受性を評価し, 高塩分負荷マウスにおける味覚変化を明らかにすると共に, 摂食飲水量から各味物質に対する嗜好性と過剰摂取の程度を検討した。

2. 3 定量的 PCR 法による味覚関連遺伝子発現解析

高塩分負荷を行なったマウスを安楽死後, 舌を切除した。酵素処理により上皮組織を舌から剥離し, TRIzol 処理により RNA 抽出し, cDNA 合成を行なった。Taqman プライマーは Applied Biosystems のものを使用した。遺伝子発現量は $\Delta\Delta Ct$ 法により算出し β -actin の遺伝子発現量により正規化した。

3. 結果

3. 1 生体味蓄イメージングによる塩味応答メカニズムの解明

二光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングにより, 舌味蕾の分布・構造を同一視野で巨視的・微視的に可視化する手法を開発した(図 3)。今後, 本手法により高塩分負荷により味蕾の分布・数が変化するかを検討していく。

さらに, 本手法により, 味物質投与に伴うマウスの舐め運動から味蕾応答までを観察した。舐め運動観察では, 二光子励起顕微鏡による観察中に, シリンジポンプにより舌表面に味物質を混入した溶液を流し込み, 舌の反応を高速撮影した(図 4A)。また, 味物質(スクロース 100 mM)溶液に蛍光デキストラン(Rhodamine-B Dextran)を混ぜ,

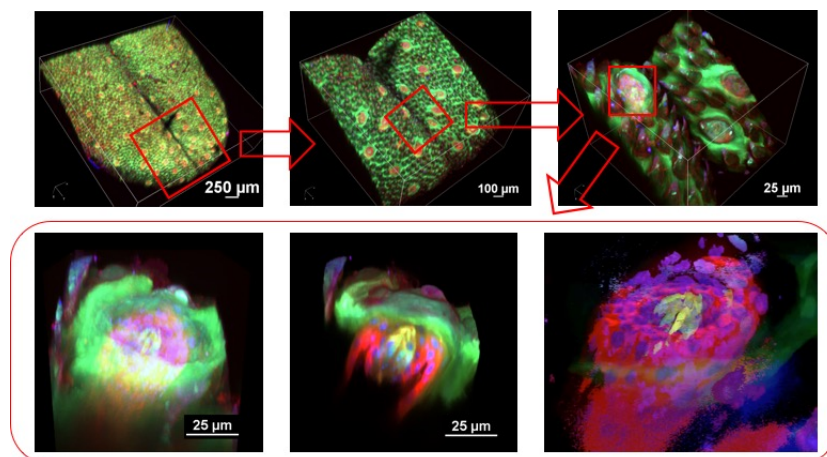


図3. 舌・味蕾のマクロ・マイクロイメージング。青:Hoechst33342(細胞核), 緑:GFP(上皮・味蕾), 赤:Di-4-ANNEPS(細胞膜電位)

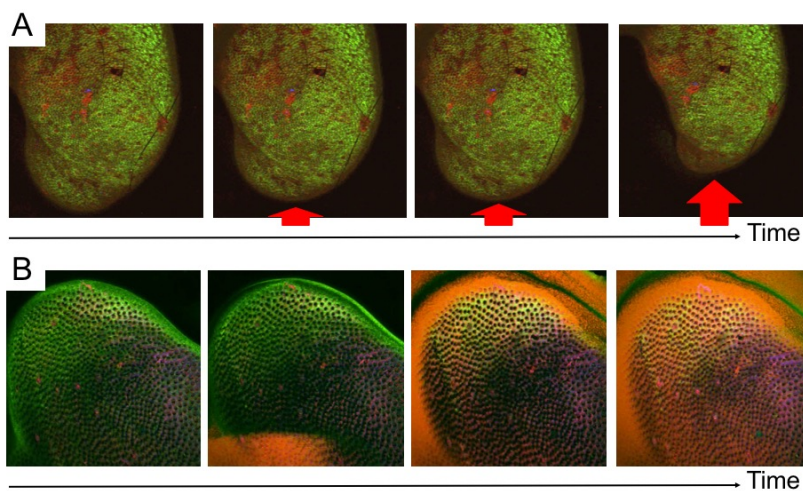


図 4. 舌の生体イメージングによる舐め運動・味物質移動の可視化。A 舌運動。緑:GFP(表皮), 赤:Di-4-ANNEPS(味蕾), B 味物質移動。緑:GFP(表皮), 赤:Di-4-ANNEPS(味蕾), 橙:Rhodamine-B Dextran(味物質)

シリンジポンプにより同様に舌表面に溶液を流し込むことで、味物質の舌表面での動きを観察することを可能にした(図 4B)。本手法を用いて、今後、食塩など味物質が舌表面を移動するタイミングと味蕾応答の関係、時間変化を明らかにしていく。

我々はさらに、各種味物質刺激に対する味蕾の応答を可視化することに成功した。図 5A は甘味刺激(グルコース)に対する味蕾応答で、味蕾を構成する個々の味細胞が味物質に反応して細胞内カルシウム濃度(Rhod2-AM)を上昇させていることを確認した。図 5B は塩味刺激(塩化ナトリウム)に対する応答で、同様に味蕾部分におけるカルシウム応答が観察された。また興味深いことに、味物質

投与をした際には、味蕾の周囲を取り巻く血管の間歇的な血流増加が見られた(図 5C)。今後、高塩分負荷マウスにおいて、味物質の味孔への移動から、味細胞内シグナル(カルシウム)変化・血流変化の一連の反応を可視化解析し、塩分負荷に伴う味覚変容を舌生体レベルで明らかにしていく。

3. 2 塩分過剰摂取による塩味感受性・嗜好性変化のメカニズム解明

長期的な高塩分摂取によって引き起こされる味覚変化が、食行動や嗜好性に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、マウスに対して高塩分飲料(100 mM)による負荷を2週間行い、マウスの嗜好性・摂取量の高次行動観察

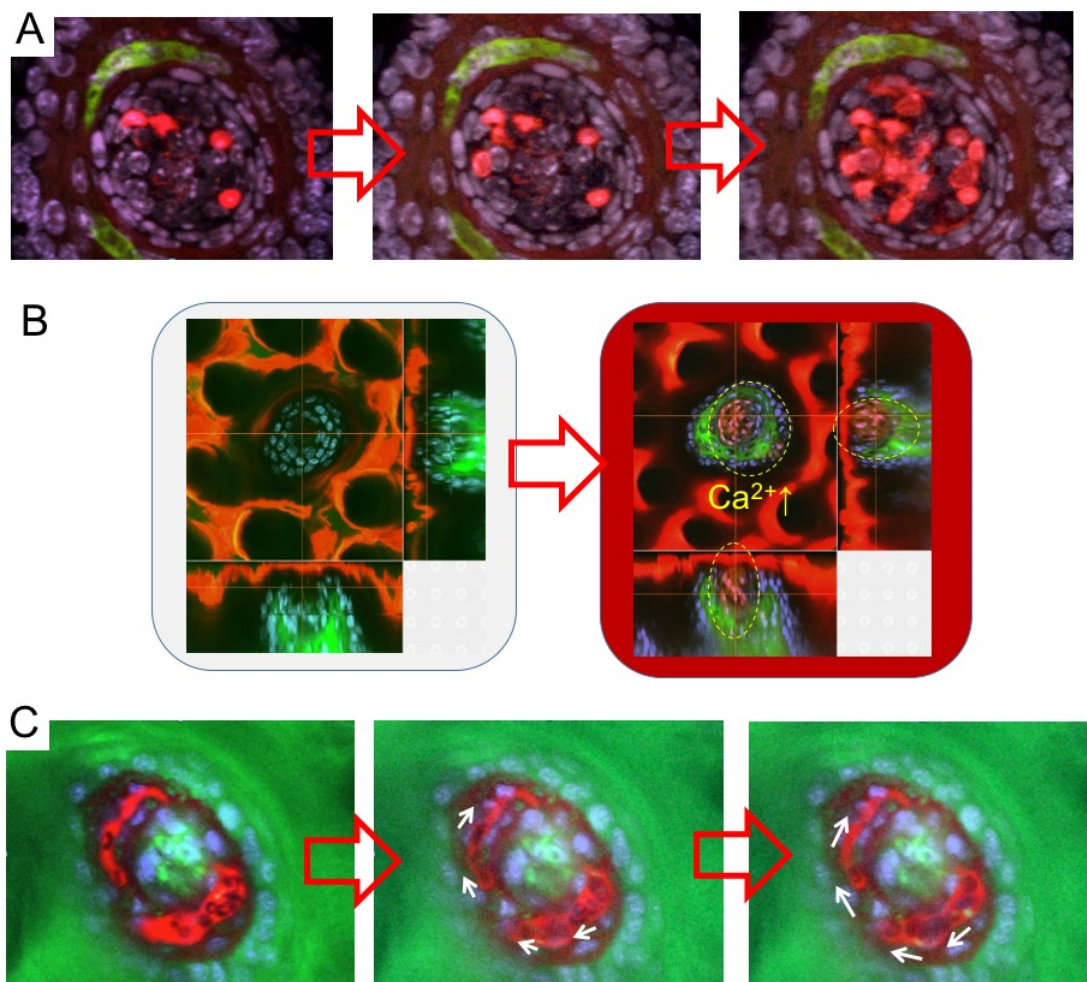


図 5. 舌生体イメージングによる味蕾応答の可視化解析。A 味覚刺激(グルコース)による味蕾のカルシウム応答。紫: Hoechst33342(細胞核), 緑: FITC-Dextran(血流), 赤: Rhod2-AM(カルシウム), B 塩化ナトリウム投与時の味蕾のカルシウム変化。青: Hoechst33342(細胞核), 緑: FITC-Dextran(血流), 赤: Rhod2-AM(カルシウム), C 味刺激直後の味蕾周囲の血流変化。青: Hoechst33342(細胞核), 緑: GFP(上皮・味蕾), 赤: Texas-Red Dextran(血流)

を行った。我々はこれまでに、脂肪食負荷により嗜好性の変化・味覚感受性の低下が起きることを明らかにしており(未発表), 比較検討のため, 高脂肪食負荷マウスに対しても塩分負荷を行い, 嗜好性変化への影響, 味覚感受性への影響を調べた。嗜好性・味覚感受性の評価には二瓶選択試験を行い, 甘味(スクロース 40 mM), 旨味(MSG: グルタミン酸ナトリウム 100 mM), 苦味(デナトニウム 1 mM), 酸味(クエン酸 10 mM)に対して評価した。その結果, 塩分負荷マウスでは酸味への嗜好性・感受性に変化は見られなかったが, 甘味・旨味・苦味に対しては低下していた(図 6)。

さらに, 定量的 PCR により各群の舌表皮・味細胞に発現する味覚関連遺伝子の変化を調べた。高塩分負荷マウス群では普通水群に比べて塩味レセプター候補タンパク ENaC (SCNN1a) の発現量が若干上方修正されていた(図 7A)。その一方で, 甘味・旨味に関するレセプター (T1R1, T1R2, T1R3) の遺伝子発現量が大きく下方修正されており(図 7B), 二瓶選択試験(図 6)で見られた甘味・旨味の感受性低下を支持する結果となった。我々はこれまでに, 高脂肪食負荷群では, 味覚レセプターそのものではなく, その下流タンパクの遺伝子発現量が低下するという結果を得ているが(未発表), 塩味刺激では下流ではなくむしろ味覚関連レセプターそのものの発現量が増加するという結果を得た(図 7B, C)。一方, 酸味関連タンパ

クの遺伝子発現量が大きく上方修正されており(図 7D), 二瓶選択試験の結果との不一致も見られた。

4. 考察

本研究では, 塩味刺激に対する味蕾応答を生体で可視化解析する手法を開発した。また, マウスの行動観察, 遺伝子発現解析により, 塩分過剰摂取により引き起こされる塩味感受性・嗜好性変化が舌・味蕾レベルで起きていることを明らかにした。

本研究から, 摂食衝動・嗜好性は, 摂食・満腹中枢による支配だけでなく, 満足感に寄与する味覚にも強く影響されることが示唆された。すなわち, 高塩分食摂取による味覚機能の低下が, 食に対する満足感を減少させ, 過剰摂取を引き起こし, さらにその習慣化により嗜好性が新たに形成される, というフィードフォワード機構が働いて可能性が考えられた。

今後, 塩味刺激と他味(甘味・うま味・酸味)刺激の相乗効果を考慮し, 味刺激を複数組み合わせる塩味がどのように生理学的・生物学的に定義づけられるか, 総合的な「味」における塩味の役割という観点からも詳細に定量解析していく。さらに, 塩味感受性において, 味蕾に作用する塩味物質の量的依存性を明らかにしていく。一般に, 塩味を美味しいと感じられる許容範囲は他の味刺激に比べて非常に狭く, 非線形的な感受性の変化を示すと考えら

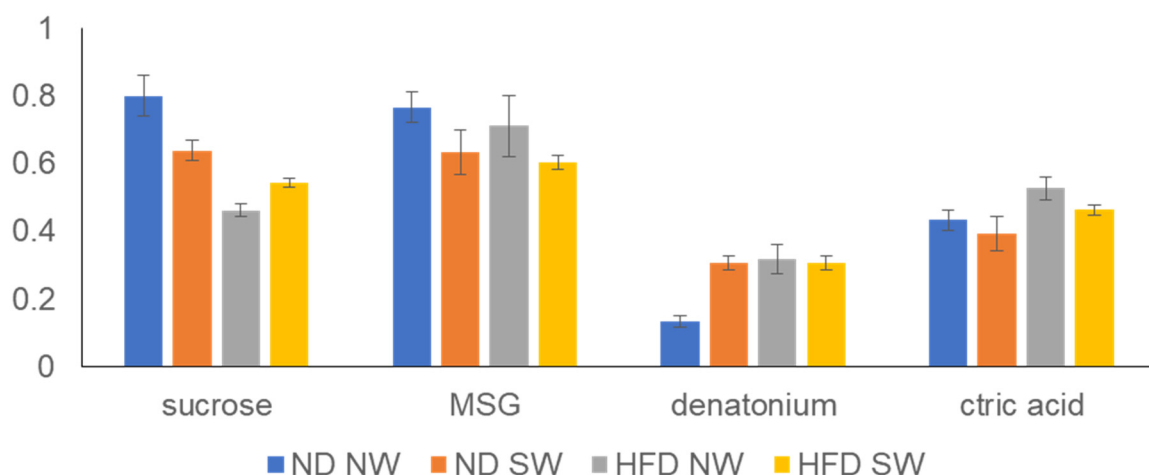


図 6. 二瓶選択実験による嗜好性・感受性変化。ND: 普通食 (Normal Diet), HFD: 高脂肪食 (High Fat Diet), NW : 普通水 (normal water), SW: 塩水 (salt water)

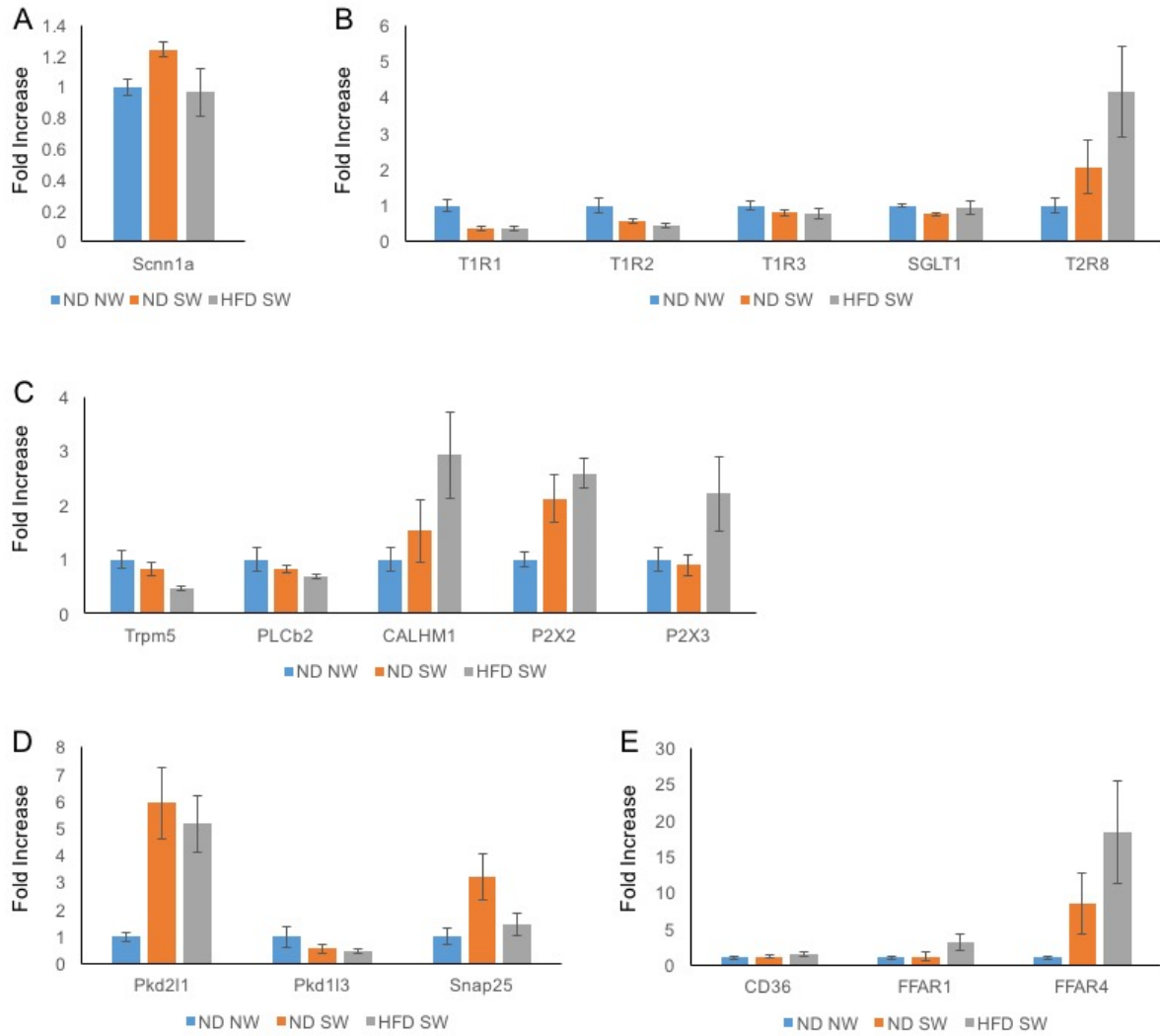


図7. 高塩分負荷, 高塩分+脂肪食負荷に対する味覚関連タンパクの遺伝子発現量変化。
 A 塩味レセプター関連遺伝子, B 甘味・旨味・苦味レセプター関連遺伝子, C 甘味・旨味・苦味の下流シグナル関連遺伝子, D 酸味関連遺伝子, E 脂肪味・脂肪酸レセプター関連遺伝子

れており, その定量化を行っていく。また, 舌における塩物質の作用効率に化学的条件が如何に寄与するか, 液状・固形, 浸透圧による塩感受性の違いを定量評価し比較検討する予定である。本研究結果と今後の研究結果を

踏まえ, 塩分摂取と塩味感受性・嗜好性変化の関係を明らかにすると共に, 感受性・嗜好性の異常を正常化する食事療法の提案を行う。

Alterations of Taste Sense and Preference by Salty Food : In Vivo Imaging of Taste Buds

Kinya Seo

Jichi Medical University, Center for Cell and Molecular Medicine

Summary

The sense of taste can be altered by high-salt intake, which may in turn affect food consumption. To assess this hypothesis, we performed behavioral observation and quantitative PCR in mice treated with high salt water (SW). Two-bottle preference tests revealed that SW mice had reduced ability to perceive sweet, umami and bitter tastes compared with the mice treated with normal water (NW). Notably, this was seen at 2-week of SW treatment, indicating that the direct effect of SW on taste perception. Analysis of taste-related mRNA expression indicated that down-regulation of taste receptors such as T1R1, T2R2 and T2R3 contribute to the degradation of taste sensation in sweet and umami. We are currently performing two-photon microscopy of intact taste-buds to examine if degradation of taste perception can be visualized in taste-bud levels. Further mechanical evidence will be provided in future studies.