

嗜好性塩味と忌避性塩味の脳内コーディング様式と 体内環境変化に応じた相互制御

杉田 誠

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

概要 5基本味の中で塩味感覚はユニークであり、低濃度の Na^+ には嗜好性を示すが、高濃度の Na^+ には忌避性を示す。また体内環境 (Na^+ 量) の変化に応じ、嗜好性と忌避性の閾値濃度を変化させ、適切な Na^+ 摂取を可能とする。低濃度 Na^+ による嗜好性塩味は上皮性 Na^+ チャネル (ENaC) を発現する味細胞で受容され、嗜好性行動を生じさせる。一方、高濃度 Na^+ による口腔内味刺激は、苦味受容味細胞および酸味受容味細胞を活性化し、忌避性行動を生じさせることが報告された。しかし異なる味細胞で感知される嗜好性塩味および忌避性塩味の情報が脳内ニューロンにいかにかに伝達され、嗜好性や忌避性の行動応答が惹起されるかには不明な点が多い。本研究では、苦味経路を可視化する遺伝子改変マウスを活用し、脳内での嗜好性塩味・忌避性塩味のコーディング様式を解明することを目的とした。

苦味受容味細胞に経ニューロン性トレーサー (WGA-DsRed) を発現するトランスジェニックマウスにおいて、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンは延髄孤束核の後方部、網様体、および橋結合腕傍核の後方 medial 側と前方 external lateral 側に観察された。各脳領域のニューロンでの低濃度塩味・高濃度塩味・苦味情報のコーディング様式を探索するため、WGA-DsRed 標識ニューロンが口腔内の苦味情報以外に低濃度塩味もしくは高濃度塩味情報も伝導するかを、最初期遺伝子 c-fos の発現誘導を指標に探索した。延髄孤束核との橋結合腕傍核 medial 側において、WGA-DsRed 標識ニューロン中で c-fos を発現誘導するニューロンの割合は低濃度塩味刺激時と苦味刺激時で同程度に観察され、高濃度塩味刺激時の割合は少なかった。苦味情報を受け取り処理する橋結合腕傍核 medial 側の WGA-DsRed 標識ニューロンの一部は、延髄孤束核ですでに統合された低濃度塩味情報を受け取ることが示唆された。橋結合腕傍核 external lateral 側において WGA-DsRed 標識ニューロン中で c-fos を発現誘導するニューロンの割合は苦味、低濃度塩味および高濃度塩味刺激時でともに近い値を示した。また内臓感覚不快感を惹起する LiCl の腹腔内投与時においても、本ニューロンは活性化されており、これらの情報は本ニューロンで統合され、情動応答や行動応答の制御に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

1. 研究目的

哺乳類は、塩味、酸味、甘味、苦味、うま味の5つを基本味として認識し、味覚は5基本味の組み合わせで、認知される。味覚刺激は味蕾中の味細胞で最初に感知される。味細胞特異的に発現する味覚受容体に、味物質が結合することにより惹起される味覚情報は、複数のニューロンを介し、脳内の各種ニューロンに投射され、受容・識別される⁽¹⁾。さらに味覚感覚は、特定の神経回路を活性化することで、対照的な、嫌悪性・嗜好性の行動的反射や、快・

不快の情動を惹起する。味覚感覚は対照的な行動と情動を(苦味感覚や高濃度塩味感覚は嫌悪性の行動的応答と不快感を、甘味/うま味感覚や低濃度塩味感覚は嗜好性の行動的応答と快的情動を)惹起することから、「嫌悪性・嗜好性行動の惹起」、「不快・快情動の惹起」が、脳内のいかなる細胞機能・分子基盤のもとに遂行されているかを解明するために、非常に有効な感覚である。苦味受容味細胞は T2R ファミリー(人では 25 種類)をいっせいに共発現して苦味を感知し、それとは異なる味細胞のうちで T1R3

を発現する味細胞が、甘味・うま味を感知する⁽²⁻⁴⁾。

ナトリウムイオン(Na^+)は生体に必須のイオンであり、ヒトは味覚システムを用いて食物中の Na^+ 濃度を感知し、必要量を摂取する。5 基本味の中で塩味感覚はユニークであり、低濃度の Na^+ には嗜好性を示すが、高濃度の Na^+ には忌避性を示す。また体内環境(Na^+ 量)の変化に応じ、嗜好性と忌避性の閾値濃度を変化させ、適切な Na^+ 摂取を可能とする。低濃度 Na^+ による嗜好性塩味は上皮性 Na^+ チャネル(ENaC)を発現する味細胞で受容され、その情報は脳内の特定ニューロンに伝えられ嗜好性行動が生じる⁽⁵⁾。一方、高濃度 Na^+ による口腔内味刺激は、T2Rsを発現する苦味受容味細胞および酸味受容味細胞を活性化し、忌避性行動を生じさせることが報告された⁽⁶⁾。しかし異なる味細胞で感知される嗜好性塩味および忌避性塩味の情報が脳内ニューロンにいかんにかんて伝達され、嗜好性や忌避性の行動応答が惹起されるかには不明な点が多い。また嗜好性塩味を伝えるニューロンと忌避性塩味を伝えるニューロンが相互に活性を制御し、体内環境に応じリアルタイムで塩味に対する嗜好性と忌避性の発現のバランスを調節するか、およびその機構は明らかにされていない。

これまでの自身の研究で、トランスジェニックマウスの作製を通じて、苦味受容体(T2R)もしくは甘味/うま味受容体(T1R3)を発現する味細胞に、それぞれ選択的に経ニューロン性トレーサー(WGA-DsRed 融合タンパク質)を発現させた⁽⁷⁾。そして味細胞から経ニューロン性に輸送されるWGA-DsRedにより標識されたニューロンの脳内局在を追跡可視化することにより、苦味情報および甘味/うま味情報を伝導する脳内神経経路を解析した。苦味伝導路を標識するマウス(mT2R5-WGA マウス)と甘味/うま味伝導路を標識するマウス(mT1R3-WGA マウス)において、トレーサー-トランスジーン(WGA-DsRed)は味細胞から順行性に輸送され、延髄孤束核→橋結合腕傍核→視床後内側腹側核→大脳皮質味覚野・扁桃体中の一部のニューロンと、嗅皮質および大脳皮質体性感覚野(顎・上唇領域)の一部のニューロンで観察された⁽⁷⁾。延髄孤束核・橋結合腕傍核・視床後内側腹側核において、甘味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取るニューロン群は、苦味受容味細胞からの WGA-DsRed を受け取るニューロン群に比べ、より前方に配置していた⁽⁷⁾。可視化された二種の神経経路の異なりによって、苦味と甘味/うま味は脳内で識

別され、苦味感覚は嫌悪性行動と不快感を惹起し、甘味/うま味感覚は嗜好性行動と快的情動を惹起することが示唆された。

本研究では、嗜好性(甘味)および忌避性(苦味)の味覚経路を可視化する遺伝子改変マウスを活用し、脳内での嗜好性塩味・忌避性塩味のコーディング様式を解明するとともに、嗜好性塩味・忌避性塩味を伝導する延髄孤束核ニューロンの①ニューロン種、②活性制御機構、③体内 Na^+ 量に応じた活性修飾機構を明らかにする。さらに忌避性塩味を伝えるニューロンから嗜好性塩味を伝えるニューロンへ至る調節性神経回路の有無を検証し、嗜好性塩味と忌避性塩味を伝えるニューロンがいかんにかんて体内環境(Na^+ 量)の変化に応じ相互に活性を制御し、嗜好 Na^+ 濃度を変化させ至適 Na^+ 摂取を可能にするか、その脳内神経機構を解明する。

2. 研究方法

2.1 味覚経路ニューロンの脳内局在の WGA-DsRed による可視化

これまでの研究で作製した苦味伝導路と甘味/うま味伝導路のそれぞれを可視化する2系統のトランスジェニックマウス(mT2R5-WGA マウスとmT1R3-WGA マウス)を用い研究を遂行した(Fig. 1)。苦味情報を伝導する神経回路を可視化するmT2R5-WGA マウスは、mT2R5を特定の苦味受容味細胞に発現させる特異的プロモーターエレメント、mT2R5-GFP cDNA, IRES 配列, WGA-DsRed cDNA を連結したトランスジーンを有する。本マウスにおいては、内因性の mT2R5 を発現する苦味受容味細胞が、mT2R5-GFPとWGA-DsRedの二種類の融合タンパク質を産生する。そして苦味受容味細胞で発現したWGA-DsRed が順行性に経シナプス性に輸送され、苦味受容味細胞からの情報を受け取るニューロンに順次移行し、上行性経路に沿って、苦味伝導路をトレースする。苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識される苦味伝導路構成ニューロンの脳内局在はDsRed 蛍光を検出することにより明らかにすることができる。甘味/うま味情報を伝導する神経回路を可視化する mT1R3-WGA マウスは、mT1R3 を特定の味細胞に発現させる特異的プロモーターエレメント、mT1R3-GFP cDNA, IRES 配列, WGA-DsRed cDNA を連結したトランスジーンを有し、甘

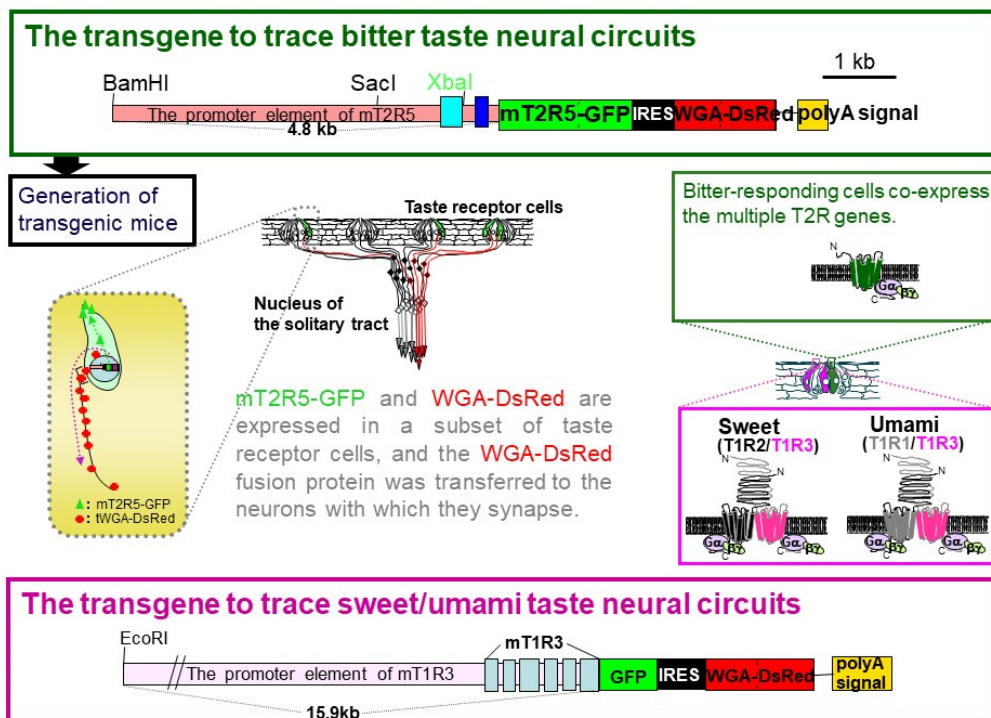


Fig. 1. Schematic diagram indicating the structures of the transgenes to trace the neuronal circuitries for bitter and sweet-umami.

味／うま味受容味細胞で発現した WGA-DsRed が経シナプス性に輸送され、甘味／うま味伝導路をトレースする。トランスジェニックマウスの脳の前頭断連続切片 (30 μm) もしくは水平断連続切片 (30 μm) をフィルムトランスファー法により得て、WGA-DsRed を受け取るニューロンの脳内局在を蛍光顕微鏡下で DsRed 蛍光をもとに検出し明らかにした。そして苦味伝導路構成ニューロンもしくは甘味／うま味伝導路構成ニューロンが脳内でどのような三次元的空間配置を示すかを単一細胞レベルで解析した。

2. 2 WGA-DsRed 標識ニューロンの樹状突起構造の可視化

WGA-DsRed 標識ニューロンの中で、WGA-DsRed は核周囲および樹状突起・軸索・シナプス内で顆粒状に存在していることが観察される。標識されたニューロンがどのように樹状突起・軸索を伸長させているか、その三次元的空間配置を、WGA-DsRed 標識ニューロン内へ蛍光色素 (Lucifer yellow) を、パッチクランプピペットを用いてマイクロインジェクションすることにより明らかにした。

2. 3 WGA-DsRed 標識ニューロンにおけるシナプス伝達機構のホールセルパッチクランプ法による解析

WGA-DsRed で標識された苦味伝導路構成ニューロンの電気生理学的性質を、ホールセルパッチクランプ法を用い解析し、その薬理学的特性よりニューロン種の同定と細胞機能の解析を行った⁽⁸⁾。200 μm 厚の新鮮脳スライス標本を得て、正立型蛍光顕微鏡下で DsRed の蛍光検出と細胞形態の微分干渉観察を組み合わせることで、WGA-DsRed 標識ニューロンの形態を把握し、ホールセルパッチクランプ記録を行った。ホールセルパッチクランプにおいては、ピペット内溶液は 128 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 10 mM glucose, and 2 mM Na_2ATP , 0.5 mM Na_2GTP を、細胞外溶液は 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 25 mM NaHCO_3 , 10 mM glucose を使用し、-80mV での膜電位固定下で、自発的な excitatory postsynaptic current (EPSC) を記録し、薬理学的特性を解析した。

2. 4 WGA-DsRed 標識ニューロンに発現する分子の免疫組織化学的解析

トランスジェニックマウスの脳の前頭断連続切片 (30 μm) もしくは水平断連続切片 (30 μm) をフィルムトランスファー法により得て、DsRed の蛍光検出により同定された WGA-DsRed 標識ニューロンに発現する分子を免疫組織化学的に明らかにし、苦味伝導路構成ニューロンのニューロン種を解析した。

2. 5 WGA-DsRed 標識ニューロンにおける各種刺激による c-fos 発現誘導の検出

WGA-DsRed を受け取る味覚伝導路構成ニューロンがいかなる刺激時に活性化されるかを明らかにするため、各種刺激後に WGA-DsRed 標識ニューロンが c-fos (活性化したニューロンで発現誘導される最初期遺伝子) を発現するか否かを免疫組織化学的に解析した。口腔内に水 (Water)、苦味溶液 (Bitter : 1 mM cycloheximide)、低濃度塩味溶液 (Low Salt : 100 mM NaCl)、高濃度塩味溶液 (High Salt : 1 M NaCl) を投与後、もしくは腹腔内にリン酸緩衝液 (ip PBS)、内臓感覚不快感を惹起する LiCl (ip LiCl : 150 mM LiCl を体重の 2% 量) を投与後、45 分後に脳を摘出し、水平断連続切片 (30 μm) をフィルムトランスファー法により得て、抗 c-fos 抗体と Zenon ラベリングシステム (Invitrogen) を用い、c-fos の発現を免疫組織化学的に検出した。そして WGA-DsRed 標識ニューロンにおいて、各種刺激により c-fos の発現が誘導されているかを解析し、WGA-DsRed 標識ニューロンを活性化させる刺激条件を明らかにした。

3. 研究結果

3. 1 味覚伝導路構成ニューロンの脳内局在の可視化

苦味受容味細胞に経ニューロン性トレーサー (WGA-DsRed) を発現するトランスジェニックマウスにおいて、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンの細胞体が延髄孤束核・網様体・橋結合腕傍核領域でどのような三次元的配置を示すかを、脳の連続切片から DsRed の蛍光を検出することにより解析した。苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed は延髄孤束核の後方に存在するニューロンに移行することが検出された (Fig. 2)。苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed は延髄孤束核ニューロンからさ

らに橋結合腕傍核もしくは網様体のニューロンに移行する。網様体において WGA-DsRed を受け取るニューロンは孤束核の WGA-DsRed 標識ニューロンに近接して、それらの腹側後方 (尾側) の lateral 側に集積して観察された (Fig. 2)。橋結合腕傍核領域において WGA-DsRed を受け取るニューロンは、後方の medial 側と前方の external lateral 側に観察された (Fig. 2)。

3. 2 低濃度塩味・高濃度塩味・苦味情報の脳内コーディング様式の探索

延髄孤束核・網様体・橋結合腕傍核において、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識されるニューロンが、口腔内の苦味情報を選択的に伝導し処理するか、低濃度塩味情報もしくは高濃度塩味情報も伝導し複数種の情報を統合処理するかを、各種刺激後に活性化されるニューロンを最初期遺伝子 c-fos の発現を免疫組織学的に可視化することにより探索した。

延髄孤束核において、無刺激のコントロールに比べ、苦味溶液 (Bitter : 1 mM cycloheximide) による口腔内刺激は、WGA-DsRed 標識ニューロン中で c-fos を発現誘導するニューロンの割合を増加させた。低濃度塩味溶液 (Low Salt : 100 mM NaCl) の口腔内刺激においても c-fos を発現誘導するニューロンが苦味刺激と同程度に観察されたが、高濃度塩味溶液 (High Salt : 1 M NaCl) による刺激においては、c-fos を発現誘導するニューロンが苦味刺激時に比べ少なかった。一方、WGA-DsRed 標識ニューロン中で、内臓感覚不快感を惹起する LiCl (ip LiCl : 150 mM LiCl を体重の 2% 量) の腹腔内投与により c-fos を発現誘導するニューロンは苦味刺激時に比べ少なかった。

延髄孤束核ニューロンからの入力を受ける網様体においては他の脳領域に比較し、無刺激時と各種刺激時ともに、c-fos を発現誘導するニューロンの割合が少なかったが、無刺激のコントロールに比べ、苦味溶液による口腔内刺激は、WGA-DsRed 標識ニューロン中で c-fos を発現誘導するニューロンの割合を増加させた。低濃度塩味溶液の口腔内刺激においても c-fos を発現誘導する WGA-DsRed 標識ニューロンが苦味刺激時より高頻度に観察されたが、高濃度塩味溶液による刺激においては、c-fos を発現誘導するニューロンが苦味刺激時や低濃度塩味刺激時に比べ少なかった。LiCl の腹腔内投与において、網様体の WGA-DsRed 標識ニューロン中で c-fos を



Fig. 2. Location of WGA-DsRed-labeled neurons in the brainstem of mT2R5-WGA mice. Locations of the cell somata of WGA-DsRed-labeled neurons in serial horizontal sections (30 μm), detected by DsRed fluorescence, plotted using green, yellow and orange dots in the section images, and paneled from ventral to dorsal. Single green, yellow, and orange dots represent locations of single WGA-DsRed-labeled neurons in the solitary tract nuclei, the reticular formation, and the parabrachial nuclei, respectively.

発現誘導するニューロンは苦味刺激時に比べ多く観察された。

延髄孤束核ニューロンからの入力を受ける medial 側の橋結合腕傍核において、無刺激のコントロールに比べ、苦味溶液による口腔内刺激は、WGA-DsRed 標識ニューロン中で c-fos を発現誘導するニューロンの割合を増加させた。低濃度塩味溶液の口腔内刺激においても c-fos を発現誘導する WGA-DsRed 標識ニューロンが苦味刺激時と同程度に観察されたが、高濃度塩味溶液による刺激においては、c-fos を発現誘導するニューロンが苦味刺激時や低濃度塩味刺激時に比べ少なかった。medial 側の橋結合腕傍核の WGA-DsRed 標識ニューロン中で LiCl の腹腔内投与により c-fos を発現誘導するニューロンの割合は苦味刺激時に比べ顕著に少なかった。

延髄孤束核ニューロンからの入力を受ける external lateral 側の橋結合腕傍核において、無刺激のコントロールに比べ、苦味溶液による口腔内刺激は、WGA-DsRed 標識ニューロン中で c-fos を発現誘導するニューロンの割合を増加させた。低濃度塩味溶液と高濃度塩味溶液の口腔内刺激においても c-fos を発現誘導する WGA-DsRed 標識ニューロンが苦味刺激時と同程度に観察された。external lateral 側の橋結合腕傍核の WGA-DsRed 標識ニューロン中で LiCl の腹腔内投与により c-fos を発現誘導するニューロンの割合は苦味刺激時と同程度に観察された (Fig. 3)。

3.3 味覚伝導路構成ニューロンの樹状突起構造の解析

延髄孤束核領域後方部において観察される苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取るニューロン (一部は低濃度塩味情報を受け取り統合する) の樹状突起構造を、WGA-DsRed 標識ニューロンに蛍光色素 lucifer yellow を注入することにより明らかにして分類した。延髄孤束核の大多数の WGA-DsRed 標識ニューロンは樹状突起を2方向に伸張させる単純な形態を有しており、rostral 側と caudal 側、もしくは medial 側と lateral 側に長く樹状突起を伸張させていた。

橋結合腕傍核領域において、後方の medial 側と前方の external lateral 側に観察される WGA-DsRed 標識ニューロンは樹状突起を多方向に伸張させる複雑な形態を有

しており、rostral 側と caudal 側に比べ、medial 側と lateral 側に長く樹状突起を伸張させていた。

3.4 味覚伝導路構成ニューロンのニューロン種とシナプス伝達様式の解析

延髄孤束核領域の新鮮脳スライス標本において、WGA-DsRed 標識ニューロンの活性制御機構を、ホールセルパッチクランプ法を用い解析し、どのような神経伝達物質・神経修飾物質による入力をいかなる受容体により受容するかを解析した。延髄孤束核領域において苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取るニューロンの一部は塩味情報を統合するニューロンであり、各種受容体アゴニスト・アンタゴニストの効果より、本ニューロンは神経伝達物質のグルタミン酸による入力を、AMPA 受容体を介して受け取り、そのシナプス伝達は cholecystokinin により増強されることが示唆された。

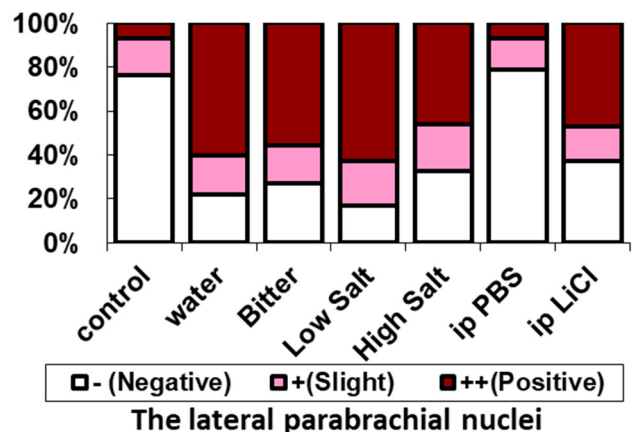


Fig. 3. c-fos induction in WGA-DsRed-labeled NTS neurons. Percentage of c-fos immunoreactive neurons among the WGA-DsRed-labeled neurons in the lateral parabrachial nuclei of mT2R5-WGA mice. c-fos immunoreactivity in WGA-DsRed-labeled neurons was determined after oral application of water (water), oral stimulation with 1 mM cycloheximide (CHX), 100 mM NaCl (Low Salt), and 1 M NaCl (High Salt), and intraperitoneal injection of PBS (ip PBS) and LiCl (ip LiCl), and in the unstimulated group (control). c-fos immunoreactivity was divided into three groups of -, +, and ++.

味覚伝導路構成ニューロンのニューロン種・発現分子を免疫組織化学的に解析した。延髄孤束核領域後方部において観察される苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取るニューロンの一部は塩味情報を受け取り統合するニューロンであり、それらの過半数は tyrosine hydroxylase を発現しており、noradrenaline を神経伝達物質として放出する catecholaminergic (カテコールアミン作動性)ニューロンであることが示唆された。

4. 考 察

苦味受容味細胞に経ニューロン性トレーサー (WGA-DsRed) を発現するトランスジェニックマウスにおいて、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed を受け取る苦味伝導路構成ニューロンの細胞体は延髄孤束核において後方部に集積していた。延髄孤束核ニューロンからの入力を受け取る網様体において WGA-DsRed を受け取るニューロンは孤束核の WGA-DsRed 標識ニューロンに近接して、それらの腹側後方 (尾側) の lateral 側に集積して観察され、橋結合腕傍核領域において WGA-DsRed を受け取るニューロンは、後方の medial 側と前方の external lateral 側に観察された。

延髄孤束核・網様体・橋結合腕傍核領域のニューロンでの低濃度塩味・高濃度塩味・苦味情報のコーディング様式の探索するため、本研究においては WGA-DsRed 標識ニューロン (苦味伝導路構成ニューロン) が、口腔内の苦味情報以外に低濃度塩味情報もしくは高濃度塩味情報も伝導し複数種の情報を統合処理するかを、活性化されたニューロンで誘導される最初期遺伝子 c-fos の発現を指標に探索した。以前の研究で、延髄孤束核ニューロンにおいて、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識されるニューロンが、口腔内の苦味情報を選択的に伝導し処理するか、他の味質や内臓感覚情報等も伝導し複数種の情報を統合処理するかを、各種刺激後に活性化されるニューロンを最初期遺伝子 Zif268 の発現を免疫組織学的に検出することにより明らかにした⁽⁸⁾。苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識される延髄孤束核ニューロンは、口腔内の苦味刺激 (cycloheximide 投与) により活性化され Zif268 を発現誘導した⁽⁸⁾。苦味刺激による神経応答を抑制することが報告されている allyl isothiocyanate の口腔内前投与は cycloheximide 投与によ

る Zif268 の発現誘導を抑制した⁽⁸⁾。一方、口腔内甘味刺激や腹腔内への塩化リチウム投与は Zif268 の発現を誘導せず、苦味受容味細胞から移行した WGA-DsRed により標識される延髄孤束核ニューロンは、口腔内の味細胞で受容された苦味情報を選択的に伝導処理することが示唆された⁽⁸⁾。今回 c-fos 発現を指標に各種刺激により活性化されるニューロンを検出すると、延髄孤束核の WGA-DsRed 標識ニューロン (苦味伝導路構成ニューロン) 中で苦味刺激により c-fos を発現誘導するニューロンの割合は、Zif268 の発現を指標に検出した場合より小さい値となり、WGA-DsRed 標識ニューロンの一部には活性化されなくても c-fos を発現しないニューロンが含まれていることが示唆された。しかしながら苦味情報を受け取り処理する延髄孤束核の WGA-DsRed 標識ニューロンの一部は、低濃度塩味情報も受け取り活性化され c-fos を発現誘導することが明らかとなった。

マウスおよびヒトは低濃度の Na⁺には嗜好性を示すが、高濃度の Na⁺には忌避性を示す。低濃度 Na⁺による嗜好性塩味は ENaC を発現する味細胞で受容され嗜好性行動を生じさせ⁽⁵⁾、高濃度 Na⁺刺激は T2Rs を発現する苦味受容味細胞および酸味受容味細胞を活性化し忌避性行動を生じさせることが報告されている⁽⁶⁾。ゆえに延髄孤束核の WGA-DsRed 標識ニューロン (苦味伝導路構成ニューロン) は低濃度塩味情報よりも高濃度塩味情報を受け取り、高濃度塩味刺激によってより活性化され c-fos 発現誘導が引き起こされると予測したが、予測に反し、高濃度塩味刺激においては WGA-DsRed 標識ニューロン中で c-fos を発現誘導するニューロンが低濃度塩味刺激時や苦味刺激時に比べ少なかった。

同様の傾向は延髄孤束核からの入力を受け取る medial 側の橋結合腕傍核においても観察され、WGA-DsRed 標識ニューロン (苦味伝導路構成ニューロン) 中で c-fos を発現誘導するニューロンの割合は低濃度塩味刺激時と苦味刺激時で同程度に観察され、高濃度塩味刺激時の割合は低濃度塩味刺激時と苦味刺激時に比べ少なかった。ゆえに苦味情報を受け取り処理する橋結合腕傍核 medial 側の WGA-DsRed 標識ニューロンの一部は、延髄孤束核ですでに統合された低濃度塩味情報を受け取り活性化され c-fos を発現誘導することが示唆された。

一方で、延髄孤束核からの入力を受け取る external lateral 側の橋結合腕傍核においては、WGA-DsRed 標識ニューロン(苦味伝導路構成ニューロン)中で c-fos を発現誘導するニューロンの割合は苦味刺激時、低濃度塩味刺激時、および高濃度塩味刺激時でともに近い値を示した。内臓感覚不快感を惹起する LiCl の腹腔内投与時においても、橋結合腕傍核 external lateral 側の WGA-DsRed 標識ニューロンは c-fos を発現誘導し活性化されており、これらの情報は橋結合腕傍核 external lateral 側のニューロンで統合され、情動応答や行動応答の制御に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

延髄孤束核領域において後方部に配置する WGA-DsRed 標識ニューロン(苦味伝導路構成ニューロン)の一部は塩味情報を統合することが示唆され、またそれらのニューロンは tyrosine hydroxylase を発現し、catecholaminergic(カテコールアミン作動性)ニューロンとして次のニューロンに出力することが考えられた。また本ニューロンは神経伝達物質グルタミン酸を介する入力を AMPA 受容体により受け取り、そのシナプス伝達は満腹時に分泌される cholecystokinin により増強されることより、満腹時には塩味により惹起される行動応答もしくは情動応答の一部が増強されることが考えられた。塩味情報を処理するニューロンの活性は摂食行動の恒常性を維持するシステムにより調節されることが示唆された。

5. 今後の課題

延髄孤束核・網様体・橋結合腕傍核ニューロンにおいて、低濃度塩味・高濃度塩味・苦味情報のコーディング様式を明らかにするために、WGA-DsRed 標識ニューロン(苦味伝導路構成ニューロン)中で各種味刺激により活性化されるニューロンを c-fos 発現誘導を指標として探索した。低濃度塩味情報(嗜好性)・高濃度塩味情報(忌避性)・苦味情報(忌避性)・甘味情報(嗜好性)の脳内コーディング様式をより正確に導出するためには、上位中枢からの遠心性(抑制性)入力を遮断した状態で各種刺激を行い、活性化されるニューロンを検出する必要があると考えられる。

生得的に低濃度の Na⁺には嗜好性を示すが、高濃度の Na⁺には忌避性を示す。しかし体内環境(Na⁺量)の変化に

応じ、嗜好性と忌避性の閾値濃度を変化させ、適切な Na⁺ 摂取を可能とする。忌避性塩味を伝えるニューロンから嗜好性塩味を伝えるニューロンへ至る調節性神経回路の有無を検証し、嗜好性塩味と忌避性塩味を伝えるニューロンがいかに体内環境(Na⁺量)の変化に応じ相互に活性を制御し、嗜好 Na⁺濃度を変化させ至適 Na⁺ 摂取を可能にするか、その脳内神経機構を解明したい。

6. 文献

- (1) Lindemann B (2001), Receptors and transduction in taste. *Nature* 413:219-225.
- (2) Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJP (2003), Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293-301.
- (3) Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJP, Zuker CS (2003), The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115:255-266.
- (4) Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJP (2005), The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* 434:225-229.
- (5) Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJP, Zuker CS (2010), The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464:297-301.
- (6) Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJP, Zuker CS (2013), High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494:472-475.
- (7) Sugita M, Shiba Y (2005), Genetic tracing shows segregation of taste neuronal circuitries for bitter and sweet. *Science* 309:781-785.
- (8) Sugita M, Yamamoto K, Hirono C, Shiba Y (2013), Information processing in brainstem bitter taste-relaying neurons defined by genetic tracing. *Neuroscience* 250:166-180.

Information Processing and Mutual Regulation in the Neurons Relaying Attractive and Aversive Salt Tastes

Makoto Sugita

Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University

Summary

Salt taste triggers two contrastive behavioral responses. Low concentrations of salt elicit appetitive and attractive responses, whereas high concentrations evoke aversive responses. The appetitive responses to low concentrations of salt are mediated by taste receptor cells expressing the epithelial sodium channel, ENaC. The aversive responses to high concentrations of salt is reported to be mediated by bitter and sour taste receptor cells. However, it remains elusive how information of the salty taste is translated in the brain into appropriate behavioral responses. Here we combined genetic tracing of aversive bitter taste pathways and immunohistochemical detection of high- and low-salt-responding cells to elucidate the coding mechanisms for aversive and appetitive salty taste in the brainstem. To visualize bitter taste neuronal circuitries, we applied a genetic approach to express the fluorescently labeled transneuronal tracer, tWGA-DsRed, in T2R5-expressing taste receptor cells in mice. tWGA-DsRed originating from bitter taste receptor cells reached the neurons in the posterior aspect of the solitary tract nuclei, and was further transferred to the neurons in the external-lateral and medial subdivisions of the parabrachial nuclei. To examine whether tWGA-DsRed-labeled neurons selectively process bitter taste information or receive the input of high or low concentrations of salt, we investigated the induction of the immediate early gene *c-fos* in the tracer-labeled neurons by oral stimulation with taste solution. Oral stimulation with the bitter solution induced *c-fos* expression in the tWGA-DsRed-labeled neurons in the solitary tract nuclei, and in the external-lateral and medial subdivisions of the parabrachial nuclei. The *c-fos* expression was also induced in the tWGA-DsRed-labeled neurons in the solitary tract nuclei and the parabrachial nuclei by oral stimulation with low concentrations of salt, suggesting that the tracer-labeled neurons may receive convergent input of bitter and salty taste.