

ファイバーフォトメトリー法を用いた脳幹塩味応答神経のイメージング解析と 味の相互作用機構の定量的検証

中島 健一朗

自然科学研究機構生理学研究所生殖・内分泌系発達機構研究部門

概要 適度な濃度の塩味は甘味を増強することが知られている。また、うま味物質を用いると、食塩の使用を抑えつつ、塩味を強めることができる。このような例からもわかるように、塩味と他の味の相互作用は経験的に知られており、その背景にある仕組みについても注目されてきた。しかし、これまでの研究の多くは味覚受容体、味蕾、および味蕾に接続する味神経など末梢組織に集中しており、一部を除き味の相互作用が生じる仕組みは不明な点が多いままである。

その大きな原因は、味の相互作用が、味神経より高次に存在する脳部位で生じるものの、これらの部位の味覚応答神経の実態解明が不十分であるうえ、味覚応答の計測が困難であるためと考えられる。

そこで、本研究ではヒト同様に塩味を識別することのできるマウスを用い、味蕾→味神経→脳幹→視床→大脳皮質といった脳内の味覚情報伝達経路の複数の中継点のうち、脳内で最初に複数の味情報を統合すると考えられる脳幹に注目する。この部位に組換えアデノ随伴ウイルスベクターを用いて蛍光神経活動センサータンパク質を導入後、検出系として光ファイバーをそのすぐ上部に留置し、ファイバーフォトメトリー法という最新のカルシウムイメージング解析を実施する。これにより、実際にマウスが食塩溶液を味わっている際の脳幹の塩味伝達神経(候補)の活動の測定を行った。

マウスが食塩溶液を摂取するとすぐに、神経の興奮に伴う蛍光強度の上昇が観察された。重要な事に、このような変化は同じマウスが水を摂取している場合にはほとんど観察されなかった。また、塩味と他の味を同時に味わった際の影響を評価するため、塩味以外の味に対する応答を計測したところ、苦味溶液を摂取した場合に、応答強度は塩味の場合よりもやや弱いものの、苦味摂取依存的な応答が観察された。

本研究により、脳幹において塩味に反応する神経を見出した。また、これまで官能試験に基づく経験的・定性的な評価が主であった味の計測を、味覚応答神経の活動イメージングによって数値化出来ること、また、味の相互作用を測定できる可能性が強く示唆された。

1. 研究目的

適度な濃度の塩味は甘味を増強することが知られている。また、うま味物質を用いると、食塩の使用を抑えつつ、塩味を強めることができる。このような例からもわかるように、塩味と他の味の相互作用は経験的に知られており、その背景にある仕組みについても注目されてきた。しかし、これまでの研究の多くは味覚受容体、味蕾、および味蕾に接続する味神経など末梢組織に集中しており、一部を除き味の相互作用が生じる仕組みは不明な点が多いままである。

その大きな原因は、味の相互作用が、味神経より高次に存在する脳部位で生じるものの、これらの部位の味覚応答神経の実態解明が不十分であるうえ、味覚応答の計測が困難であるためと考えられる。

そこで、本研究ではヒト同様に塩味を識別することのできるマウスを用い、味蕾→味神経→脳幹→視床→大脳皮質といった脳内の味覚情報伝達経路の複数の中継点のうち、脳内で最初に複数の味情報を統合すると考えられる脳幹に注目した。この部位に組換えアデノ随伴ウイルスベクターを用いて蛍光神経活動センサータンパク質を導入

後、検出系として光ファイバーをそのすぐ上部に留置し、ファイバーフォトメトリー法という最新のカルシウムイメージング解析を実施した。これにより、実際にマウスが食塩溶液を味わっている際の脳幹の塩味伝達神経(候補)の活動の測定を行った。

2. 研究方法

2.1 概要

塩味は味蕾に発現する上皮性ナトリウムチャンネル ENaC などの塩味受容体で感知されるが、他の基本味(甘味・苦味・うま味・酸味)と同様に味神経を介して脳内にその情報が伝達される^(1,2)。これらの情報は、延髄および橋からなる脳幹を経由し、視床や大脳皮質へ伝達され味として認識されると考えられている⁽¹⁾。本研究では、脳内で最初に塩味を受容する脳幹の味覚伝達神経の活動をカルシウムイメージングにより測定するため、カルシウム濃度上

昇に応じて蛍光強度の強まる神経活動センサー GCaMP6s を、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて導入する(図 1A)⁽³⁾。また、光ファイバーを検出系として神経細胞集団の全体の活動変化をバルクで捉えることのできるファイバーフォトメトリーを味溶液摂取時のマウスに対して使用する(図 1B)。

2.2 Brief access taste test による塩味嗜好性の評価

Brief access taste test は 10 秒間という短時間に味溶液を舐める回数(リック数)を計測することで、マウスがその溶液を嗜好または忌避するのかを定量的に測定することができる手法である^(3,4)。これにより、消化後の影響を排除し感覚刺激に対する反応のみを評価出来る。本研究では Hayar らの方法⁽⁴⁾を参考に測定系を構築した。また、味溶液として 30 mM~1,000 mM の塩化ナトリウム溶液を使用した。マウスは高濃度の塩を忌避するため、前日から絶水することで飲水欲求を高めた状態で実験を行った。

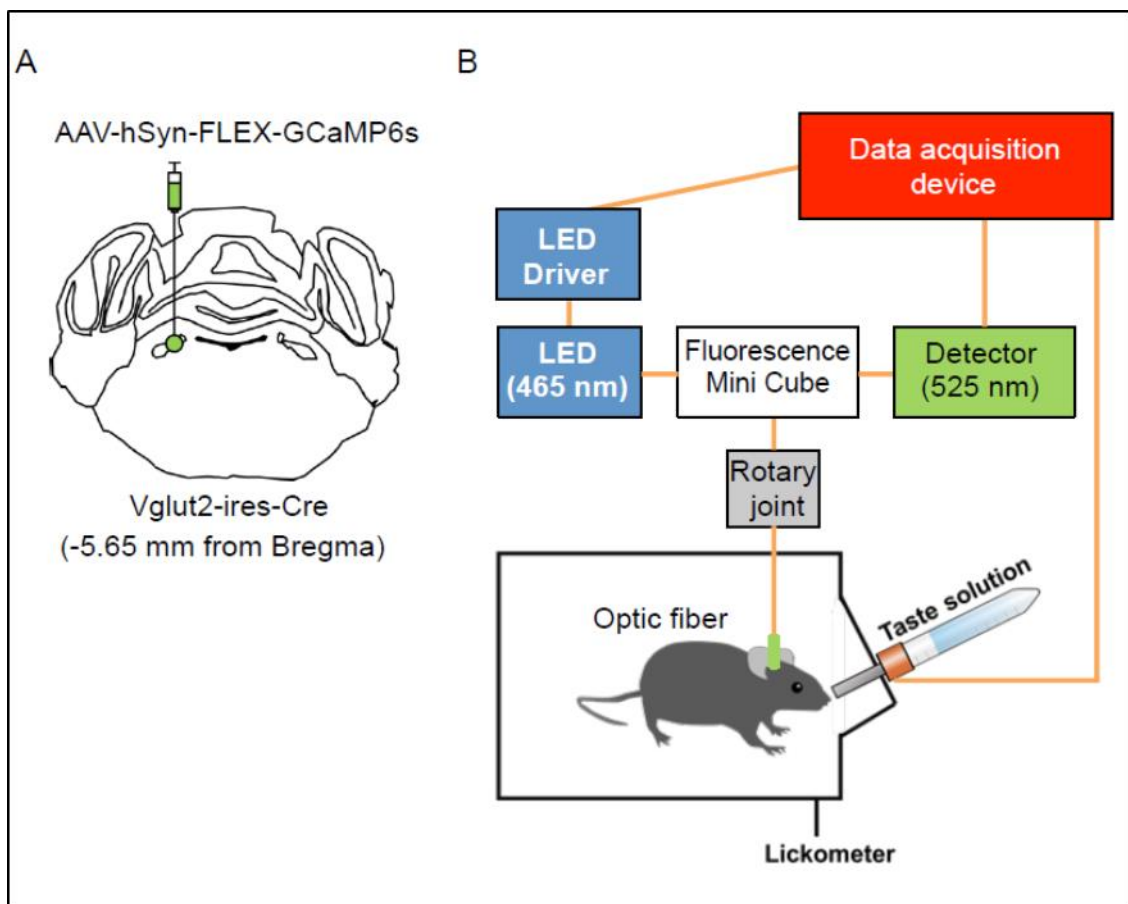


Figure 1. Experimental set up for fiber photometry based calcium imaging of gustatory neurons in the mouse brainstem. (A) Diagram of a coronal mouse brain showing the site of viral vector injection. (B) Diagram of fiber photometry experiments with lick behavior measurement.

2.3 ファイバーフォトメトリー

蛍光神経活動センサータンパク質 GCaMP6s をコードする組換えアデノ随伴ウイルスを脳定位固定装置とマイクロポンプを用いて微量インジェクションし、脳幹の神経細胞選択的に発現させた(図 1A・図 3)⁽⁵⁾。このため、これらの部位で特異的に外来遺伝子を発現することのできる遺伝子組換えマウス(Vglut2-ires-Cre マウス)を使用した。

次に、塩味に応答する脳幹の神経活動をカルシウムイメージングにより測定するため、頭蓋骨に小さな穴を開け、光ファイバーを GCaMP6 導入部位の真上まで挿入後、マウス頭部に固定した。このファイバーは図 1B に模式的に示すように検出器と光源に接続した。申請者らは、この一連の方法で、脳幹の甘味応答神経の活動を可視化する系を既に構築している⁽³⁾。本研究ではこの系を使用し、塩味を摂取した際の神経活動の測定を行った。

2.4 脳切片の作製と抗体染色

マウスは4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で灌流固定を行ったのち、脳を摘出した。4°Cで1晩、追固定を実施した後、30%スクロース溶液に入れ替え、さらに1~2日間4°Cでインキュベートした。その後、-20°Cで冷却したサンプルを、滑走式マイクローム(大和光機)を用いてスライスし、50 μm 厚の脳切片を作製した。作製した切片は共焦点顕微鏡システム(オリンパス)を用いて観察した。GCaMP6s 自身の蛍光を直接観察した。

3. 研究結果

3.1 brief access taste test を用いた塩味嗜好性の定量的評価

マウスの塩味に対する嗜好性を定量的に評価するため、brief access taste test を実施した。この手法では、10秒間という短い間にマウスが溶液を何回舐めたか(リックしたか)を計測することで、その溶液に対する嗜好性を求めることが出来る。

通常、高濃度の食塩溶液をマウスは忌避することから、溶液を摂取するモチベーションを高めるため1晩絶水したのちに実験を実施した。その結果、図 2 に示すように、30 mM から 150 mM の塩化ナトリウム溶液ではリック数に大きな変化は生じなかったが、それより高濃度の溶液の場合は濃度の上昇に伴って、リック数が低下することが明らかになった。

この結果をもとに、1) 塩味を十分感じさせることと、2) 忌避性が強すぎるとマウスが溶液を摂取しないことの2点を考慮し、ファイバーフォトメトリーとリックの同時測定実験においては500 mM の塩化ナトリウム溶液を使用することにした。

3.2 組換えアデノ随伴ウイルスを用いた蛍光神経活動センサーの脳幹部への導入

ファイバーフォトメトリーによる *in vivo* カルシウム実験を実施するため、脳幹内で味神経細胞が密集している部位に蛍光カルシウムセンサーである GCaMP6s を導入することを試みた。

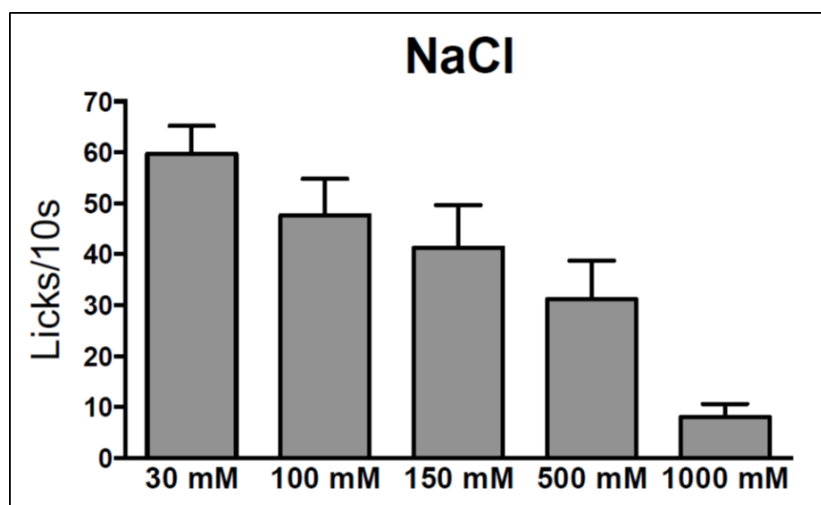


Figure 2. Brief access taste tests. After 23h water deprivation, lick behaviors were monitored. Lick responses to salt taste decrease in a dose dependent manner. Lick numbers were counted within 10 s

過去の電気生理学実験及び解剖学的知見から、マウスなどげっ歯類の脳幹の橋結合腕傍核には味神経が密集する部位が存在することが報告されている⁽⁶⁻⁹⁾。この部分の神経の大半が、興奮性神経であるとの予備実験の結果をもとに、興奮性神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス系統である Vglut2-ires-Cre マウスを実験に使用した。Cre 依存的に GCaMP6s を発現できる組換えアデノ随伴ウイルスをマウスの橋結合傍核に脳定位固定装置を用いて、微量注入した(図 3)。アデノ随伴ウイルスを導入してから、2~4 週間をおき、マウスの体力が十分に回復するようにし、また、導入した GCaMP6s の神経細胞内での発現量がカルシウムイメージングを行うのに十分な量になるまで待った。

ファイバーフォトメリー実験終了後は、マウスの脳を灌流固定し、図 3 に示すように GCaMP6s の発現と光ファイバーの挿入位置が適切かどうかを確認した。その結果、実験に使用したマウスでは、両者とも適切であることがわかった。

3. 3 リック行動測定とファイバーフォトメリーの同時測定実験

マウスに水、食塩水、苦味溶液を提示し、これらをリックしている際の脳幹の神経細胞集団の応答パターンをファイバーフォトメリーにより評価した。

図 4 に示すように Time 0 を溶液のリックを開始した時点として、リック開始後 5 秒間の間のリック数と蛍光強度の変化を図 1 のシステムを用いて同時測定した。

無味の純水を摂取している際には、図 4A に示すように神経の応答はほとんど観察されなかった。一方、食塩水を摂取すると溶液を数回リックした後、大きな応答が観察された(図 4B)。この応答は、リックの継続中、高いレベルのまま保たれる傾向にあった。次に、味物質のコントロールとして、苦味溶液を味わった際の応答を評価した。人工的につくられた無毒であるが強い苦みを呈する 1 mM のデナトニウムを使用した。その結果、500 mM の塩化ナトリウム溶液を味わったときほどの強度ではないものの、大きな応答が観察された(図 4C)。興味深いことに、苦味溶液の場合溶液をリックし終えた後も、神経応答がしばらく続く傾向にあり、溶液の摂取後にも引き続き味が持続している可能性が示唆された。

4. 考 察

本研究では、脳幹において基本味に反応する神経細胞集団のイメージングを行った。その結果、少なくともその中の一部の神経細胞は、塩味や苦味に対して反応することが強く示唆された。

今後、今回測定した神経細胞集団のなかで、塩味およ

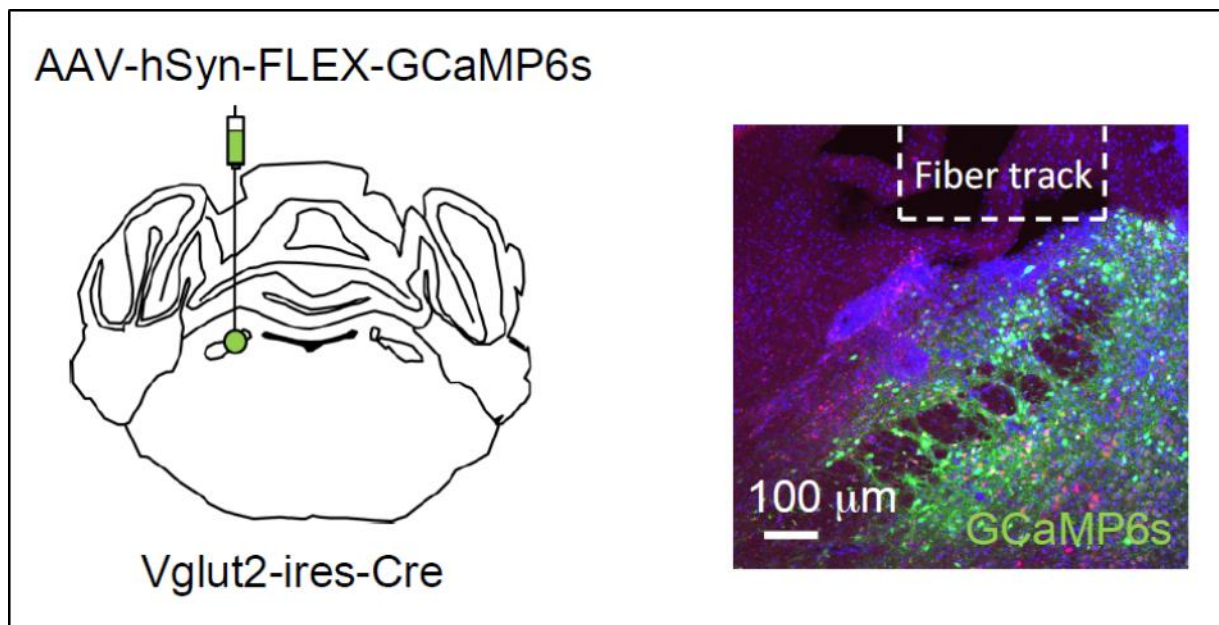


Figure 3. Schematic illustration of adeno-associated virus injection site (left). A mouse coronal section showing GCaMP6s expression (green) and a trace of fiber track (right).

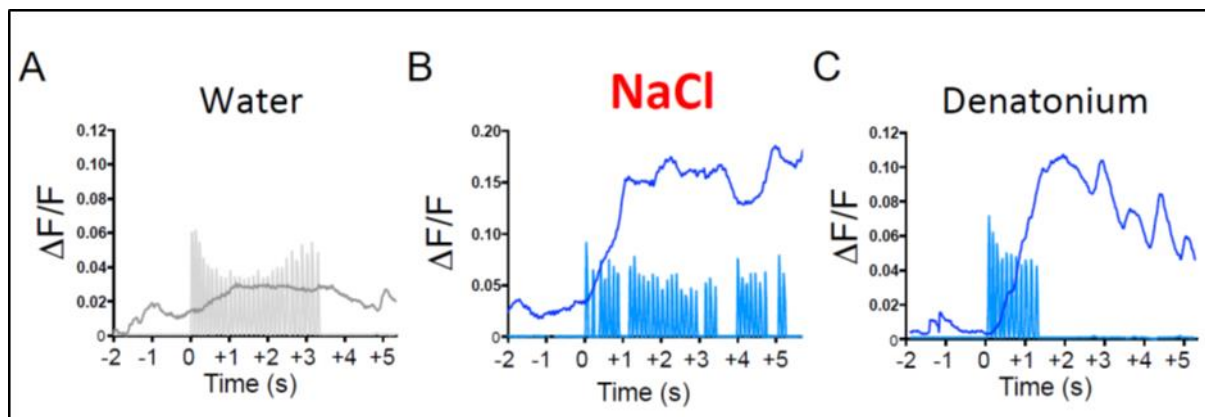


Figure 4. Response profiles of the brainstem neurons to various compounds *in vivo*. (A-E) Bulk fluorescence of GCaMP6s-expressing Vglut2 neurons did not change during water licking (A), but increased by salt taste (B, 500 mM NaCl) and bitter taste (C, 1 mM denatonium) stimuli. Each lick is shown as a sharp peak that starts from time 0.

び苦味に応答する神経細胞を特定するため、単一細胞レベルのカルシウムイメージング実験を実施する計画である。これにより、塩味や苦味に応答する神経細胞の割合や分布が明らかになると思われる。

5. 今後の課題

本研究では、高濃度の塩味の呈する忌避性を評価した。一方、適度な塩味は好まれることが知られている。塩味の好ましい味としての側面をマウスにより評価する場合、利尿剤であるフロセミドなどを用い、予め体内のナトリウムイオンレベルを低下させる処理が必要なことが知られている⁽¹⁰⁾。今後、塩味の好ましい味としての側面については、マウスを低ナトリウム状態に予めしておいてから、評価する必要があると思われる。

また、今回、ファイバーフォトメトリー法で測定した神経活動については以下の点に注目して、現在研究を行っている。

A: 他のフレーバーと塩味の相互作用の解析

他のフレーバーと塩味が共存した際に、塩味応答神経の活動がどの程度変化するのかを定量的に評価する。これにより、塩味を増強する味・匂い・香料成分を探索する。また、甘味応答神経の活動が塩味共存下で増強するかどうかを検証する。

B: 栄養状態との関係

甘味などの味の強度は空腹など栄養状態に応じて変

化することが経験的に知られている。そこで、同様の変化が塩味の場合にも見られるかどうかを検証する。

本研究の成果を端緒として、今後、実際の食物摂取時により近い条件において、味覚を数値化するシステムを構築することができれば、美味しさを定量的に理解することにつながると思われる。

6. 文献等

- 1) Carleton, A., Accolla, R., and Simon, S. A. (2010) Trends Neurosci 33, 326-334
- 2) Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. (2009) Cell 139, 234-244
- 3) Fu O, Iwai Y, Kondoh K, Misaka T, Minokoshi Y and Nakajima K (2019): SatB2-Expressing Neurons in the Parabrachial Nucleus Encode Sweet Taste. Cell Rep, 27, 1650-1656.
- 4) Hayar, A., Bryant, J. L., Boughter, J. D., and Heck, D. H. (2006) J Neurosci Methods 153, 203-207
- 5) Nakajima, K., Cui, Z., Li, C., Meister, J., Cui, Y., Fu, O., Smith, A. S., Jain, S., Lowell, B. B., Krashes, M. J., and Wess, J. (2016) Nat Commun 7, 10268
- 6) Norgren, R., and Pfaffmann, C. (1975) Brain Res 91, 99-117
- 7) Fulwiler, C. E., and Saper, C. B. (1984) Brain Res 319,

229-259

8) Halsell, C. B., and Travers, S. P. (1997) *J Neurophysiol*
78, 920-938

9) Tokita, K., and Boughter, J. D., Jr. (2016) *Neuroscience*

316, 151-166

10) Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.
A., Hummler, E., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2010)

Nature 464, 297-301

In Vivo Calcium Imaging Analysis of Salt Taste Neurons in the Mouse Brainstem

Ken-ichiro Nakajima

National Institutes of Natural Sciences, National Institute for Physiological Sciences,
Division of Endocrinology and Metabolism

Summary

While many studies have revealed the molecular mechanism of peripheral gustatory system including salt taste sensing in recent years, genetic and/or molecular properties of gustatory neurons in the central nervous system have so far less investigated. To address this issue, here we examined whether candidate gustatory neurons localized in parts of the parabrachial nucleus (PBN) in the mouse brainstem can really respond to salt taste using the fiber photometry based *in vivo* calcium imaging. We injected recombinant adeno-associated virus encoding Cre-dependent GCaMP6s fluorescence calcium sensor into the brainstem of Vglut2-ires-Cre mice for fiber photometry. Lick measurement was performed together with fiber photometry. Although bulk responses of GCaMP6s-expressing neurons were almost silent when the mice licked pure water, large responses were observed when they tasted 500 mM NaCl solution. Similar response was observed when they licked bitter taste solution. These results suggest that parts of PBN neurons likely function as gustatory neurons. Further calcium imaging analysis with single cell resolution allows us to identify key neurons for salt taste and bitter taste in the PBN.