

# 塩味とうま味の相乗作用を司る脳内報酬系メカニズム

小澤 貴明

大阪大学蛋白質研究所

**概要** 塩は私たちの健康維持に必須の成分であるのみならず、塩のもたらす「塩味」の持つ食の促進効果は人類の食生活において最も基本的かつ重要な要素である。興味深いことに、別の味覚的要素である「うま味」は塩味の持つ食の嗜好性を増強させる効果があることがヒトにおいて報告されている。しかしながら、この「塩味」と「うま味」の相乗作用は主に官能評価に基づいており、神経・生理学的裏付けが不足している。本研究では、塩摂取制限下にあるマウスにおいて、「食塩水」あるいは「食塩水＋うま味成分(グルタミン酸カリウム(MPG)およびイノシン酸(IMP))」に対する希求行動を測定した。また、その行動中の側坐核におけるドーパミン放出変化を調べることで、塩味とうま味の相乗作用とドーパミン放出量の関連性について検討した。さらに、塩味およびうま味希求行動に対するドーパミン神経活動抑制の効果について調べることで、ドーパミン神経の活動と行動の因果関係を検証した。

本研究では、給餌チューブへの舐め行動(リッキング)を指標としたオペラントリッキング課題における比率累進課題を用いて、塩制限下のマウスが示す塩味報酬希求行動に対するうま味物質添加の効果について検討した。その結果、実験1において、報酬であるNaCl溶液に対するうま味物質(MPG + IMP)添加量の増加により、マウスのリッキング回数が増加することが示された。このことは、うま味物質の添加によって塩味嗜好性が増強される可能性を示している。実験2では、マウスが塩味報酬を摂取している際の側坐核におけるドーパミン放出量の変化を計測した。その結果、「NaCl 単独条件」と比較して報酬性の高い「NaCl＋うま味条件」で高いドーパミン放出が観察された。さらに、ドレッド法を用いて中脳のドーパミン神経の活動を抑制したところ、報酬希求行動が全体的に低下し、うま味物質の引き起こす塩味嗜好性増強効果も消失した。

一連の研究結果から、うま味物質の添加によって塩味嗜好性が増加することが、実験動物であるマウスにおいて初めて明らかにされた。さらに、このうま味の持つ塩味嗜好性増強効果には、中脳ドーパミン神経の活動が重要であることが示された。今後は、塩味・うま味がどのような神経回路の活動を介して脳内ドーパミン放出を引き起こすのか、その神経基盤の解明が期待される。

## 1. 研究目的

塩は私たちの健康維持に必須の成分であるのみならず、塩のもたらす「塩味」の持つ食の促進効果は人類の食生活において最も基本的かつ重要な要素である。興味深いことに、別の味覚的要素である「うま味」は塩味の持つ食の嗜好性を増強させる効果がある。しかしながら、この「塩味」と「うま味」の相乗作用は主に官能評価に基づいており、神経・生理学的裏付けが不足している。脳内報酬系

において主要な役割を果たす神経伝達物質であるドーパミンは、快情動の生起に重要であり、おいしさを伴う経験が引き金となる食物希求行動に中心的な役割を果たすと考えられている。本研究では、塩摂取制限下にあるマウスにおいて、「食塩(NaCl)」あるいは「NaCl＋うま味成分(グルタミン酸カリウム(MPG)およびイノシン酸(IMP))」を含んだ水報酬に対する希求行動を測定した。また、その行動中の側坐核におけるドーパミン放出変化を調べることで、

塩味とうま味の相乗作用とドーパミン放出量の関連性について検討した。さらに、塩味およびうま味希求行動に対するドーパミン神経活動抑制の効果について調べることで、ドーパミン神経の活動と行動の因果関係を検証した。

## 2. 研究方法

### 2.1 共通実験手続き

#### 2.1.1 動物

全ての実験において C57BL/6 系のオスマウス(10 週齢)を使用した。

#### 2.1.2 動物

実験開始の 3 日前に、エサを NaCl フリー飼料(オリエンタル酵母)に置き換えた。また、水は Milli-Q 水に置き換えた。テスト1の終了後、エサは通常の飼育エサ(オリエンタル酵母)、水は水道水に戻した。

#### 2.1.3 利尿剤処置

体内の塩分濃度を低下させるために利尿剤であるフロセミドを(1)塩水訓練および(2)テスト1における各テスト日の前日に 5 mg/kg の用量(10 ml/kg)で腹腔内投与した<sup>1</sup>。なお、テスト2における各テスト日の前日には同量の生理食塩水を腹腔内投与した。

### 2.2 実験1. 塩分濃度が塩水希求行動に及ぼす影響

#### 2.2.1 事前訓練(5日間)

塩摂取制限下のマウスにフロセミド処置を行った後、行動実験装置内で 3 日間の塩水訓練を行った。行動実験装置は床がグリッド、側面がアクリル板および金属版から構成される箱型で、一つの金属壁に設置された給餌チューブ(以下、チューブ)に対して動物は自由に接近することが可能であった。この装置において、マウスは、一定回数のチューブ舐め行動(以下、リッキング)を行うと報酬として 5  $\mu$ l の報酬がチューブの先端から与えられるオペラントリッキング課題を行った。報酬は、水に NaCl 75 mM および異なる量の MPG + IMP を加えた液体であった。課題において、報酬の獲得に必要なリッキングの回数は訓練 1 日目が 3 回(FR3)、訓練 2-5 日目は 10 回(FR10)であった。各訓練日における 1 回の訓練は報酬を 30 回獲得するか、30 分間が経過すると終了した。

#### 2.2.2 テスト1(塩摂取制限あり)

塩水訓練を行った 2 日後から、塩摂取制限下で行うテスト1を行った。テスト1では、報酬を獲得するたびに報酬獲得に必要なリッキング回数が 1 回ずつ増えていく比率

累進課題(Progressive ration task, PR 課題)を 1 日 1 回、30 分間行った。報酬は 5 種類の異なる濃度の MPG + IMP について、5 日間に渡り計 5 回のテストを行った。テスト間隔は 48 時間以上とした。報酬を用いる順番は個体ごとにカウンターバランスを行った。

#### 2.2.3 テスト2(塩摂取制限なし)

テスト1の終了後、塩摂取制限を解除した状態(2.2.2)で少なくとも 3 日間飼育した後、テスト1と全く同様の手続きでテスト2を行った。

### 2.3 実験2 塩味摂取の引き起こす側坐核ドーパミン放出とうま味物質添加の効果

#### 2.3.1 蛍光ドーパミンセンサーの脳内発現

蛍光ドーパミンセンサーである GRAB-DA はドーパミンが結合すると下流に位置する蛍光蛋白 cpGFP の構造が変化し、蛍光強度が増加する遺伝子改変ドーパミン D2 受容体である<sup>2</sup>。本研究では麻酔下の動物に対して GRAB-DA の遺伝子配列を含むウイルスベクター(AAV9-hSyn1-GRABDA)を側坐核内に微小注入することにより、GRAB-DA を発現させた。また、蛍光イメージ用のファイバーも同時に埋め込んだ。

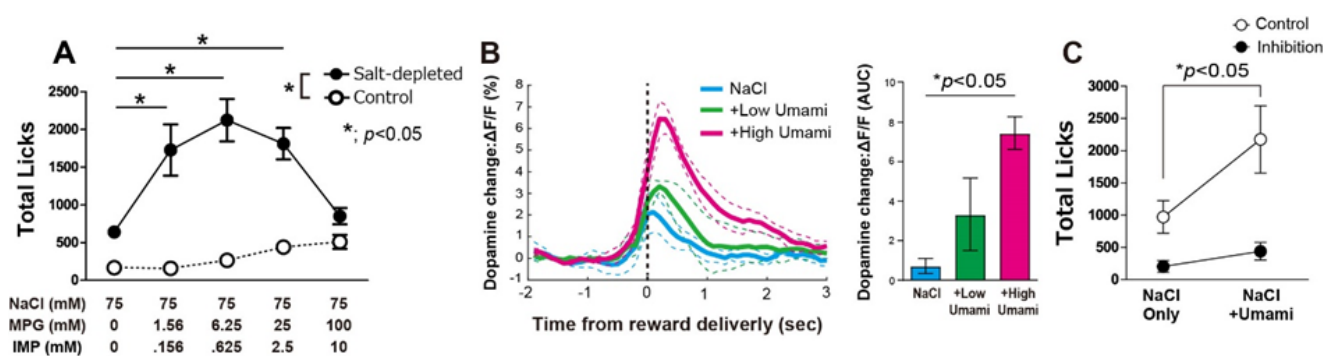
#### 2.3.2 塩水摂取行動中のドーパミンイメージング

手術後 3 週間の回復期間をおいた後、塩制限と利尿剤投与を行い、実験1と同様の手続きで 5 日間の塩水訓練を行った(2.2.1)。その後、15 秒経過ごとに(1)NaCl 75 mM (NaCl 条件)、(2)NaCl 75 mM + MPG 1.56 mM + IMP 0.156 mM (Low Umami 条件)、(3)NaCl 75 mM + MPG 6.25 mM + IMP 0.625 mM (High Umami 条件)混合液のいずれかの報酬が得られるテスト課題を行い、ファイバーフォトメトリー法を用いて、報酬摂取中の側坐核におけるドーパミン変化量を測定した。

### 2.4 実験3. ドーパミン神経の抑制が塩味・うま味希求行動に及ぼす影響

#### 2.4.1 中脳ドーパミン神経特異的な抑制性DREADD受容体の発現

TH(チロシン水酸化酵素)-cre マウスの腹側被蓋野に AAV5-FLEX-hM4Di-mCherry を投与することで、ドーパミン神経特異的に抑制性の DREADD 受容体を発現させた。また、AAV5-FLEX-mCherry を投与して mCherry のみを発現させたマウスを対照群(コントロール)として用いた。



**Figure 1.** Results of experiments 1, 2, and 3.

A. The result of experiment 1. The addition of umami (MPG + IMP) enhanced salt-seeking behavior in the PR task.

B. The result of experiment 2. The addition of umami enhanced salt reward-induced dopamine release in the nucleus accumbens.

C. The result of experiment 3. The inhibition of dopaminergic neuron reduced both salt-seeking behavior and umami's enhancement effect on salt seeking.

## 2. 4. 2 ドーパミン神経抑制実験

実験1と同様に脱塩と5日間の事前訓練を行った(2.2.1)。その後、hM4Di受容体のアゴニストであるCNO(1 mg/kg)投与した上でPR課題を行うドーパミン神経抑制実験を行った。報酬は、NaCl75mM(NaCl条件)およびNaCl75mM+MPG625mM+IMP0.625mM(NaCl+Umami条件)を用いた。

## 3. 研究結果

### 3.1 実験1.

ナトリウム摂取制限下のマウスにおける塩報酬希求行動について、PR課題を用いて検討した。その結果、NaCl溶液に添加するうま味物質(MPG + IMP)の濃度を増加させると、30分あたりのリッキング回数が有意に増加した(分散分析,  $p < 0.05$ ) (Figure 1A)。リッキング回数のピークはMPG 6.25 mM + IMP 0.625 mM添加条件であり、リッキングは逆U字型の用量反応曲線を示した。塩摂取非制限下では、テスト2におけるリッキング回数が全体的に低下した(分散分析,  $p < 0.05$ )。うま味の効果はMPG 100 mM + IMP 10 mMで最大となった。

### 3.2 実験2.

それぞれの塩味・うま味報酬を摂取した際の側坐核におけるドーパミン変化量を比較したところ、うま味物質の添加量が最も高いHigh Umami条件において、食塩NaCl条件よりも有意に高いドーパミン放出が観察された(分散分析,  $p < 0.05$ ) (Figure 1B)。

### 3.3 実験3.

ドレッド法を用いてドーパミン神経を抑制し、PR課題における30分間のリッキング回数に対する影響を検討した。その結果、コントロール条件では、うま味の添加により塩味報酬希求行動が増加した。一方、ドーパミン抑制条件では、塩味報酬に対する希求行動それ自体が減少し、うま味の持つ塩味報酬希求行動の促進効果も消失した(分散分析,  $p < 0.05$ ) (Figure 1C)。

## 4. 考察

本研究では、給餌チューブへのリッキングを指標<sup>3</sup>としたオペラントリッキング課題におけるPR課題を用いて、マウスが示す塩味報酬希求行動に及ぼすうま味物質添加の効果について検討した。また、蛍光ドーパミンイメージング法を用いて塩味・うま味報酬摂取時のドーパミン放出についても検討した。さらに、ドレッド法を用いて塩味・うま味希求行動に対するドーパミン神経活動抑制の効果について調べることで、ドーパミン神経の活動と行動の因果関係を検証した。

実験1.において、塩摂取制限下のマウスはNaCl溶液に対するうま味物質添加量の増加により、課題中のリッキング回数が増加することが示された。このことは、うま味物質であるMPG + IMPの添加によって塩味嗜好性が増強される可能性を示している。さらに、実験動物のマウスにおいて、MPG + IMP添加がおいしさを損なわない減塩に役立つ可能性があることも示された。一方、過剰なうま味

物質の添加は、報酬希求行動の促進効果を引き起こさないことが示された。この結果から、塩味とうま味の相乗作用には、適度な量のうま味の添加が必要であることが示唆された。

実験2では、蛍光ドーパミンセンサーである GRAB-DA を用いて、マウスが塩味・うま味報酬を摂取している際の側坐核におけるドーパミン放出量の変化を計測した。実験では、「NaCl 単独条件」と比較して「うま味添加条件」で高いドーパミン放出が観察された。この結果より、リッキングという報酬希求行動(実験1.)だけでなく、ドーパミン放出という報酬系の活動を指標とした場合でも、うま味の持つ塩味嗜好性増強効果が確認されたと考えられる。

実験3では、ドレッド法を用いてドーパミン神経細胞特異的に活動を抑制した。その結果、塩味希求行動それ自体が大きく減少し、うま味の塩味嗜好性増強効果も認められなくなった。この結果から、これまでの実験で着目されてきたカロリー摂取に基づいた報酬希求行動のみならず、塩味に対する希求行動も、ドーパミン神経細胞の活動に依存していることが明らかになった。また興味深いことに、塩味とうま味の相乗作用についても、このドーパミンの神経活動が重要な役割を果たしていることが、初めて明らかになった。

## 5. 今後の課題

本研究ではうま味物質である MPG + IMP の添加によって、塩味嗜好性が増加する可能性がマウスにおいて初めて明らかにされた。また、このうま味の効果はドーパミン放出量の増加という神経活動指標においても観察された。さらに、ドーパミン神経の活動が因果的に塩味およびうま味希求行動を制御していることが示された。一連の結果は、塩味とうま味の情報が脳内で統合され、相乗的にドーパミン神経を活性化させるという神経回路の存在を示唆する。今後は、イメージングやドレッド法を用いて、この神経回路を明らかにすることが期待される。

## 6. 文献

1. Lundy, R. F., Blair, M., Horvath, N. & Norgren, R. Furosemide, sodium appetite, and ingestive behavior. *Physiol. Behav.* 78, 449–458 (2003).
2. Sun, F. et al. A genetically-encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell* 174, 332528 (2018).
3. St. John, S. J. The Perceptual Characteristics of Sodium Chloride to Sodium-Depleted Rats. *Chem. Senses* 42, 93–103 (2017).

## The Involvement of Dopaminergic System in the Synergic Effect of Salty and Umami on Food Palatability

Takaaki Ozawa

Institute for protein research, Osaka University

### Summary

Facilitation effect of salty taste on our eating is important for the quality of our daily meals. Interestingly, umami taste, which is another sense of taste, has known to enhance the palatability of salty food in human. In the present study, the facilitative effect of umami on salt palatability was investigated in the experimental animal model, mice. The dopamine release change in the nucleus accumbens during mice's salty reward consumption and its function on the salt-seeking behavior were also investigated. Salty reward-seeking behavior in mice was assessed using a progressive ratio schedule in the licking-based operant behavior paradigm. In experiment 1, salt-depleted mice showed more licks when the amount of umami tastant, monopotassium glutamate (MPG), and inosinic acid (IMP), mixed with NaCl solution was increased. In experiment 2, accumbal dopamine release was measured by taking advantage of the fluorescent dopamine sensor, GRAB-DA. The dopamine release was increased more after the consumption of NaCl + Umami reward compared to NaCl only reward. In experiment 3, the chemogenetic DREADD inhibition of midbrain dopamine neurons decreased both salt-seeking behavior and the enhancement effect of umami. Results of the present study showed the facilitative effect of umami on salt palatability in mice for the first time. It was also suggested that the activity of dopaminergic neurons functionally regulates both the salt-seeking behavior and the enhancement effect of umami on salt consumption.