

発表番号 47 (0549)

## グルタミン酸の Na 塩と K 塩の識別回路の可塑性

宮本 武典 (日本女子大学理学部)  
佐藤 亮平 (北里大学医学部)  
宮崎 敏博 (長崎大学歯学部)  
藤原 宏子 (日本女子大学理学部)  
宮崎 彩子 (日本女子大学大学院理学研究科)

うま味物質であるグルタミン酸ナトリウム(MSG)とグルタミン酸カリウム(MPG)はヒトにとってはその味質はかなり異なるが、MPG にイノシン酸ナトリウム(IMP)を添加するとMSGに類似した味質に変化する。味覚感受性が比較的ヒトに類似している近交系マウス、C57BL/6でもMSGとMPGとを識別するが、MPGにIMPを加えたもの(MPG+IMP)とはIMPの濃度に依存して識別できなくなることが味覚嫌悪学習によって明らかになった。また、二瓶法による味覚嗜好性テストでは、マウスはMPGよりMSGを好むが、IMPを添加することによりMPGが好ましい味に変化することが明らかになった。以上の行動学的実験の結果は、IMPを添加することによってMPGの味質がMSGの味質に類似したことを示唆する。

齧歯類味覚系の2次中枢である結合腕傍核(PBN)では、摂取した味質によって特徴的な即初期遺伝子の一つである*c-fos*の発現パターンが生じることが知られている。うま味物質について*c-fos*の発現パターンを調べたと

ころ、MSG摂取後のFos陽性細胞はPBNの前方背内側部に分布したが、MPGは後方部の外側から内側にかけて散在した。ところが、MPGにIMPを添加するとFos陽性細胞の分布は前方背内側部に移動して、MSGと同様のパターンを示した。一方、味覚系の1次中枢である弧束核(NTS)では水平および垂直のパターンには有意差は見られなかったが、MSGとMPG+IMPの味覚情報は前方部に、MPGは後方部に投射されることが明らかになった。したがって、好ましい味と好ましくない味は既にNTSのレベルで前後軸方向の位置情報として識別されており、PBNではこれが更に3次元的に展開されることにより、より詳細な味質情報が位置情報として上位中枢に伝達されると結論される。また、BrDU注入実験において、PBNには情報伝達経路の変更に伴うなんらかの細胞増殖の徴候は認められなかったことから、PBNでの味質変化に伴う経路変更には、ニューロンの新生を伴わないと結論される。



助成番号 0549

## グルタミン酸の Na 塩と K 塩の識別回路の可塑性

宮本 武典 (日本女子大学理学部物質生物科学科)

佐藤 亮平 (北里大学医学部生理学講座)

宮崎 敏博 (長崎大学歯学部口腔解剖学講座)

藤原 宏子 (日本女子大学理学部物質生物科学科)

宮崎 彩子 (日本女子大学大学院理学研究科)

### 1. 目的

グルタミン酸ナトリウム (MSG) とグルタミン酸カリウム (MPG) は、共にうま味物質とされている。塩化物である NaCl と KCl が全く異なる味質であるように、MSG と MPG も異なる味質を呈する (図 1)。ところが、MPG にイノシン酸ナトリウム (IMP) を加えると、両者の味質は類似したものとなる。ヒトと類似したうま味感受性を持つ近郊系マウス (C57BL/6) を用いた味覚嫌悪学習による行動学的方法によって、0.1 M MSG と 0.1 M MPG は識別されるが、0.1 M MSG と 0.1 M MPG + 10 mM IMP は識別されることがわかっている<sup>1)</sup>。

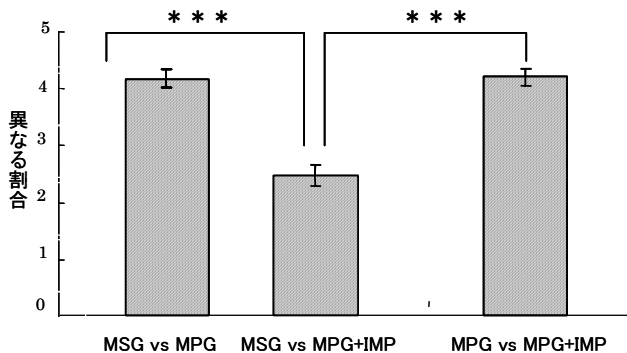


図 1 ヒトのうま味嗜好性

ヒトは MSG (0.1 M) と MPG (0.1 M) は異なる味質として識別するが、MSG と MPG + IMP (5 mM) は類似した味質となることがわかる。n = 22. \*\*\*:  $p < 0.001$

また、細胞活性のマーカーである即初期遺伝子の一つである *c-fos* 発現の指標としての cFos 蛋白の免疫組織学的検出法によって、齧歯類味覚系の2次中枢である脳幹部の結合腕傍核 (PBN) における 0.1 M MSG と 0.1 M MPG に関する伝導路に相違があるということが分かっている<sup>1)</sup>。従って、0.1 M MPG に IMP を加えた時に伝導路に変化が生じることが推測される。本研究では、マウスが MPG の味質が IMP によって変化する時に、どのような伝導路の変化が生じているのかを PBN だけでなく1次中枢

である弧束核 (NTS) でも詳細に検討した。また、近年海馬などではニューロンの新生が生じていること<sup>2)</sup>、これが学習や記憶の際に促進されること<sup>3)</sup>、また様々な内的外的環境によって影響されることなどが知られるようになった<sup>4)</sup>。MPG に IMP を加えることによって伝導路の変化が起こるとすると、これにニューロンあるいはグリアの新生が誘発される可能性が存在する。細胞分裂マーカーである 5-bromo-2-deoxyuridine (BrDU) を用いてこの可能性も検討した。

なお、この研究の一部は既に発表済みである<sup>5)</sup>。

### 2. 方法

#### 2.1 行動学的実験

本実験では二瓶法による味覚嗜好テストと味覚嫌悪学習による味質識別テストを行った。

##### (1) 二瓶法による味覚嗜好テスト:

異なる味質の溶液が入った2つのシリンジを用いて測定を行った。両シリンジの飲み口はできるだけ近くに置いた。左右の位置の差をなくすために 10 分間の測定時間内で 2 分ごとに位置を変えた。

##### (2) 味覚嫌悪学習による味質識別テスト:

マウスを 20 時間絶水、4 時間給水条件下 (蒸留水を使用) におき、給水時間の初めの 10 分間の蒸留水摂取量を測定した。6 日間この条件に慣らした後、嫌悪学習を強固なものにするために条件付けを 2 日間行った。CS に 0.1 M MSG、US に 230 mg/kg LiCl を用いた。初めの 10 分間の MSG 摂取量を測定し、その 20 分後に LiCl を腹腔内注入した。残りの給水時には通常飼育時と同様に蒸留水を与え、再び絶水条件下においた。2 日間の条件付けが終わった翌日にテストを行った。テストでは 10 mM IMP 投与群、0.1 M MPG + IMP (0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM) 投与群に分けて実験を行った。

また、MPG + IMP の味質変化がグルタミン酸、すなわちうま味物質の相乗効果であるかどうかを確かめるための実験を行った。ここでは CS に 0.1 M KCl を与え、テスト

日では0.1 M KClと0.1 M KCl+0.1 mM IMP 投与群に分けて同様にを行った。どの群もCSの摂取量を1として各実験日の摂取量を標準化し、餌は実験期間中自由摂取とした。

## 2. 2 免疫組織学的実験

### (1)c-Fos 蛋白の検出:

20 時間の絶水条件下においたマウスにそれぞれ 0.1 mM MPG + 0.1mM IMP、0.1 M KCl、0.1 M KCl + 0.1 mM IMP の味刺激を1時間呈示した<sup>6)</sup>。呈示終了後すぐに麻酔をし、灌流固定をして脳を取り出した。その後、厚さ 30  $\mu$ m の脳の凍結切片を作成し、SAB 法を用いて *c-fos* のタンパク質産物である c-Fos の免疫染色を行った。0.1 M MSG 投与群、0.1 M MPG 投与群、0.1 M MPG + IMP (10 mM、0.1 mM) 投与群の c-Fos 陽性細胞の分布を計測した。

### (2)BrDU による細胞増殖の検出:

0.9% NaCl に溶解した 10 mg/ml BrDU を 15 ml ずつ、11 時と 17 時の 2 回、2 日間にわたって計 4 回腹腔内に注入した。その後 20 時間絶水、4 時間給水条件下におき、給水時間の初めの 10 分間の蒸留水摂取量を測定 (6 日間) した。MPG 投与群ではトレーニング後のマウスに 0.1 M MPG + 0.1 mM IMP を呈示した。CTA 群ではトレーニング後のマウスに CS として 0.1 M MPG + 0.1 mM IMP を用いて味覚嫌悪学習を獲得させ、テスト日に 0.1 M MPG + 0.1 mM IMP を呈示した。灌流固定後脳を摘出し、厚さ 30  $\mu$ m の脳の凍結切片を作成して免疫染色を行った。

## 3. 結果

### 3. 1 行動学的実験

#### (1)二瓶法による味覚嗜好テスト:

近郊系マウス C57BL/6 のうま味物質嗜好性は図 1 に示した人の味覚嗜好性とほぼ同じ傾向を示した。すなわち、マウスは 0.1 M MPG よりも 0.1 M MSG を好んだが、MPG に 0.1 mM IMP を加える (MPG+IMP) と嗜好性は変化して、MSG と同等の嗜好性を示した (図 2)。

#### (2)味覚嫌悪学習による味質識別テスト:

CS に 0.1 M MSG を用いた実験で、テスト日に 10 mM IMP を用いた群ではテスト日の摂取量は減らず、条件付け前 (条件付け 1 日目) と後 (テスト日) で摂取量に有意差は見られなかった。つまりマウスは 10 mM IMP を、条件付けされた嫌な味である 0.1 M MSG とは異なる味質として判断したと言える。MPG+IMP に関しては、テスト日に 0.1 M MPG+0.01 mM IMP を用いた群ではテスト日の摂取量は減らず、条件付け前と後で有意差が見られな

かった。しかし、テスト日に 0.1 M MPG+0.1 mM IMP を用いた群と 0.1 M MPG+1 mM IMP を用いた群ではテスト日の摂取量が減り、条件付け前と後で摂取量に有意差がみられた。つまりマウスは 0.1 M MPG への 0.01 mM IMP 添加では条件付けされた嫌な味である 0.1 M MSG とは異なる味質として判断したが、0.1 M 以上の濃度の IMP 添加では同じ味質として判断し、相乗効果による味質の変化が見られたと言える。また、0.1 M MPG に添加する IMP の濃度が高いほどテスト日の摂取量が減少した。そこで、摂取量が減少率  $(1 - (\text{TEST 液摂取量} / \text{MSG 摂取量}))$  を算出し、相乗効果の指標にした。摂取量が少ないほど、つまり MSG と同じ味質だとマウスが判断するほど 1 に近くなる。

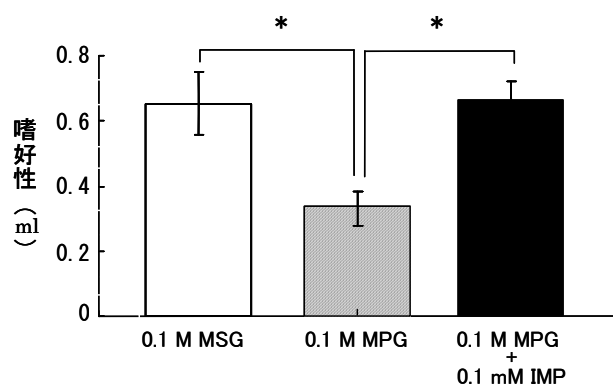


図 2 マウス (C57BL/6) のうま味嗜好性  
マウスもヒト同様 MSG と MPG は異なる味質として識別するが、MSG と MPG + IMP は類似した味質となることがわかる。  
n = 5~8. \*:  $p < 0.05$

図 3 に示したように、0.1 M MPG に添加する IMP の濃度が高いほど相乗効果も高くなると言える。

テスト日に 0.1 M MSG+500  $\mu$ m amiloride を用いた群では、テスト日の摂取量が減少し、条件付け前 (条件付け 1 日目) と後 (テスト日) で有意差が見られた。しかし、テスト日の味が条件付けされた嫌な味であるとマウスが判断した場合、条件付けを 2 回行っているため、条件付け 2 日目の摂取量よりテスト日の摂取量が少なくなるが、この実験においては条件付け 2 日目の MSG 摂取量と比べるとテスト日に摂取量が増加しており、こちらにも有意差が見られた。従って、全体の傾向として、条件付け後では 0.1 M MSG+500  $\mu$ m amiloride を MSG より有意に飲む傾向にあると言える。このことから、マウスは MSG の味を識別する際にナトリウムの影響を受けていると言える。

CS に 0.1 M KCl を与え、テスト日では 0.1 M KCl と 0.1 M KCl+0.1 mM IMP 投与群に分けて行った実験では、両群ともテスト日の摂取量が減り、条件付け前 (条件付け

1日目)と後(テスト日)で摂取量に有意差が見られた。つまりマウスは0.1 M KCl+0.1 mM IMPを条件付けされた嫌な味である0.1 M KClと同じ味質として判断したと言える。従って、0.1 M KClと0.1 mM IMPとの間には、0.1 M MPGと0.1 mM IMPとの間に見られたような味質変化は見られなかったと言える。

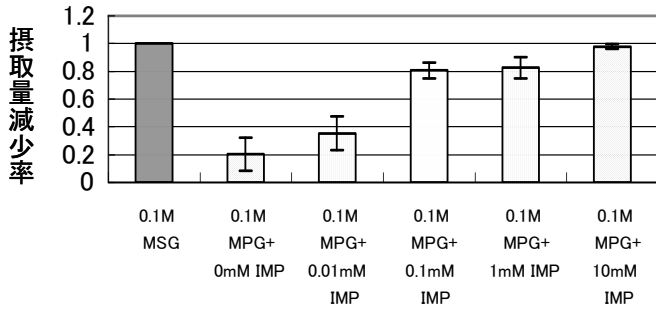


図3 MPGに加えるIMPの濃度を変えた際の相乗効果のグラフ  
減少率 = 1 - (TEST液摂取量/MSG摂取量)とした。MPGに加えるIMPの濃度が高くなるほど相乗効果も高くなる。n=7。

### 3.2 免疫組織学的実験

#### (1)c-Fos蛋白の検出:

PBNは上位脳幹部における味覚情報の伝導路であり、味質ごとに*c-fos*発現の独特のパターンが生じることが知られている<sup>7)</sup>。0.1 M MSGは結合腕傍核の背側外側垂

核の一部分に集中して陽性細胞が存在した(図4A)のに対して、0.1 M MPGでは陽性細胞が背側外側垂核から外部外側垂核にかけて広範囲に現れた(図4B)。そして0.1 M MPG+10 mM IMP、0.1 M MPG+0.1 mM IMPではMSG同様、背側外側垂核の一部分に陽性細胞が集中していた(図4C, D)。c-Fos陽性細胞の分布においても0.1 M MSG投与群、0.1 M MPG+10 mM IMP投与群、0.1 M MPG+0.1 mM IMP投与群と0.1 M MPG投与群の間に有意差が見られた。つまり、MSGおよびMPG+IMPとMPGに関する情報は異なる経路を介して伝達されると考えられる。

この伝達経路を更に詳細に検討するために、水平、垂直および前後軸での*c-fos*発現パターンを定量的に検討した(図5A)。図4からも予想されるように、水平及び垂直軸ではMSG投与群とMPG投与群との間の分布パターンの相違は明らかであった( $p<0.001$ )が、前後軸に沿っても相違が見られた。すなわち、MSG投与群では前方部にMPG投与群では後方部に多く分布した( $p<0.05$ )。ところが、MPGにIMPを加える(MPG+IMP投与群)とMSGタイプに変化した(図5B)。

NTSでは水平分布や垂直分布にはMSG投与群とMPG投与群との間で統計的な有意差は見られなかった。しかしながら、興味深いことにPBNと同様に前後分布には相違が見られた( $p<0.05$ ) (図5C)。

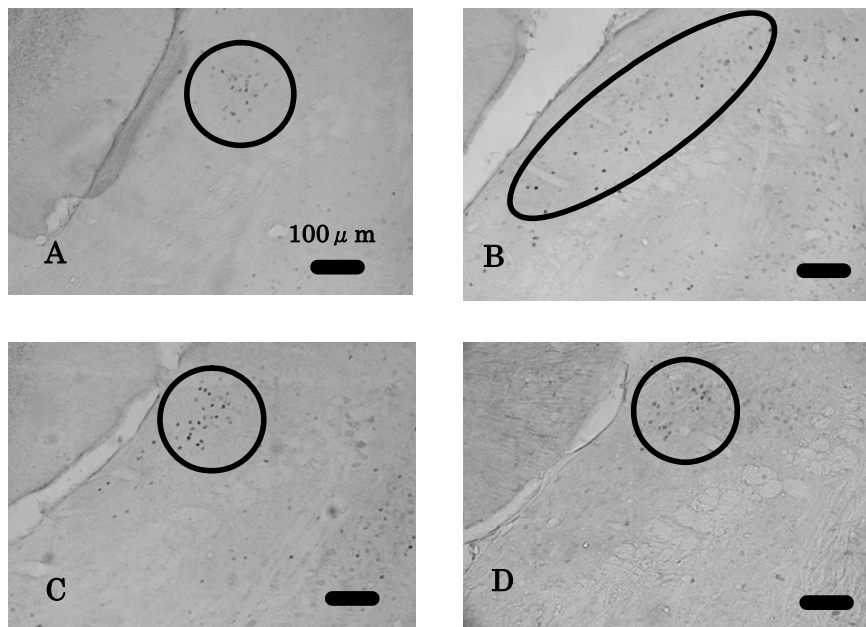


図4 各味液の結合腕傍核(PBN)における*c-fos*発現パターン  
A: 0.1 M MSG, B: 0.1 M MPG, C: 0.1 M MPG + 10 mM IMP, D: 0.1 M MPG + 0.1 mM IMP. MPG群とMSG群とは異なる発現パターンが観察されたが、MPG+IMP群ではどちらのIMP濃度でもMSGと類似した発現パターンが観察された。

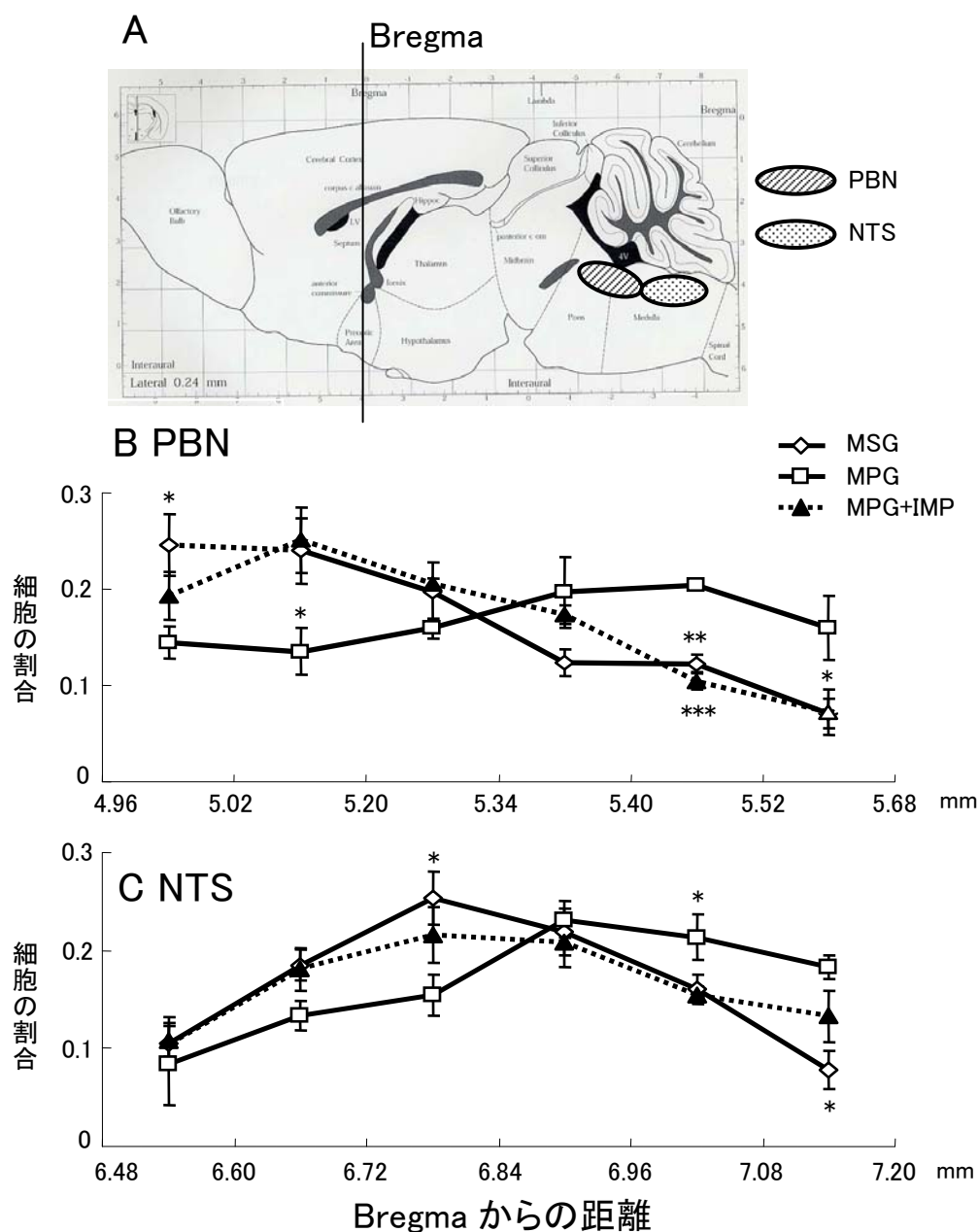


図5 結合腕傍核 (PBN)と弧束核 (NTS)での *c-fos* 発現パターン の前後分布の味質による相違  
 A: Bregma, PBN, NTS の脳内の位置関係。 B: PBN における前後分布。 C: NTS における前後分布。 PBN, NTS のいずれにおいても、MSG は前方部に MPG は後方に多く分布した。 MPG に IMP を加える (MPG+IMP)と MSG タイプに変化した。  
 \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$

(2) BrDU による細胞増殖の検出:

本実験では、MPG 投与群と MPG+IMP による CTA 群のいずれにおいても、PBN では BrDU 陽性細胞は全く見られず、はっきりした細胞増殖の徴候を認めることができなかった。

4. 考察

行動学的実験の結果よりマウスは 0.1 M MSG と 10 mM IMP を識別しているが、0.1 M MSG と 0.1 M

MPG+0.1 mM IMP および MPG+1 mM IMP は識別していないと考えられる。従って、マウスにとって MPG+IMP が MSG と類似した味質になるということも IMP の味質が MSG の味質に類似していたということでは説明できない。さらに 0.1 M KCl+0.1 mM IMP ではテスト日の摂取量が有意に減少し、0.1 M MPG+0.1 mM IMP のような結果は得られなかった。従って、MPG+IMP はうま味物質の相乗効果によって MSG に似た味質に変化したと考えられる。また、添加する IMP 濃度が高くなるほど相乗効果も高く

なるという結果が得られたが、その相乗効果の増加の仕方はIMPと味質が類似しており<sup>8)</sup>、味の強度も等価である<sup>9)</sup>GMPをMSGに添加した際の神経応答の増加の仕方<sup>10)</sup>と類似していた。本実験では0.01 M IMP添加では相乗効果が見られなかったが、GMPを用いた先行研究においても0.01 M GMP添加では相乗効果が見られていなかった。従って、IMPおよびGMPでは、0.01 mM~0.1 mMの間に相乗効果を生じる臨界濃度が存在すると予想される。また、0.1 M MSG+500  $\mu$ m amilorideを用いた実験により、マウスがMSGの味を識別する際にMSGに含まれるナトリウムの影響も受けていることがわかった。

c-Fos 陽性細胞の免疫組織学的実験の結果も行動学的実験の結果を支持するものである。0.1 M MPGに関する味覚の伝導経路が低濃度の0.1 mM IMPの添加によって変化した可能性が考えられる。一方、0.1 M KCl投与群は0.1 M MPG投与群と類似した発現パターンを示したことにより、MPGとKClは類似した味質であり、両者の味質はカリウムの影響を強く受けていると考えられる。一方、MPG+IMPではIMPによってグルタミン酸の味質が増強されたために全体としての味質が変化した可能性が考えられる。KClではこのような変化が見られなかった。従って、MPG+IMPの味質変化は陽イオンではなくうま味物質の相乗効果によるものであることが免疫組織学的実験からも示唆される。

PBNとNTSのいずれにおいても前後分布にMSGとMPGのパターンの相違が見られたことは興味深い。最近、甘味と苦味の間でも味覚の伝導路の各中枢において同様な前後分布の相違が見られ、甘味関連ニューロンが苦味関連ニューロンよりも有意に前方部に位置することが示された<sup>11)</sup>。すなわち、このことは好ましい味と好ましくない味の伝導路が味覚中枢の各部位で前後に分かれて伝えられることを意味しており、本実験の結果と一致する。

更に、本実験ではNTSで既に前後分布が生じ始めていることが明らかになった。従来、NTSはその前後軸に沿って舌や咽喉頭部を含む内臓感覚の地理的分布を示すこと考えられている<sup>7)</sup>。従って、舌に関してはNTSの前方が鼓索神経支配領域を、それに続いて舌咽神経支配領域と迷走神経支配領域の味覚情報の分布を反映していると予想される。今回の我々の結果はMSGとMPG+IMPに関する味覚情報はより前方部に、MPGのそれはより後方に投射すると考えられるので、IMPによる相乗作用は鼓索神経領域で生じると結論される。今後、鼓索神経あるいは舌咽神経の切断実験によってこのことを検証する必要がある。

本実験においては、PBNでもNTSでもはっきりした細胞増殖の徴候を認めることができなかった。しかしながら、BrDUの投与量や投与方法など改良すべき点があるため、この可能性を追求するとともに、*c-fos*を発現している細胞がどのような性質の細胞か、すなわちどのような伝達様式を持つニューロンであるのかを検討する必要がある。

以上の結果から、(1)低濃度の0.1 mM IMP添加でもうま味物質の相乗効果によってMPGの味覚情報の伝導経路に変更が生じること、(2)MSGおよびMPG+IMPの味覚情報とMPGの味覚情報は異なる経路によって伝達されること、(3)NTSとPBNのいずれにおいてもより好ましい味であるMSGとMPG+IMPの味覚情報が前方部へ、あまり好ましくない味であるMPGの味覚情報が後方部へ投射される、(4)PBNでは味覚情報は更に水平および垂直方向を含めた3次元に展開することにより、より詳細な味覚情報が位置情報として上位中枢に伝達されると結論される。

## 文献

- 1) Miyamoto T, Tsuboi K, Fujiwara Y, Miyazaki A, and Eda-Fujiwara H: Detection and discrimination mechanism of MSG and MPG in mouse gustatory system. *ISOT/JASTS 2004 abstracts*, 124 (2004)
- 2) Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 383, 493-495 (1997)
- 3) Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ: Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* 2, 260-265 (1999)
- 4) Guzman-Marin R, Suntsova N, Methippara M, Greiffenstein R, Szymusiak R, McGinty D: Sleep deprivation suppresses neurogenesis in the adult hippocampus of rats. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2111-2116 (2005)
- 5) 宮崎彩子, 宮本武典, 藤原宏子, 佐藤亮平: マウスのうま味識別に関与する伝導路の解析, *味と匂誌* 12: 477-480 (2005)
- 6) Spencer, CM; Houpt, TA: Dynamics of *c-fos* and ICER mRNA expression in rat forebrain following lithium chloride injection. *Mol. Brain Res.* 93, 2, 113-126 (2001)
- 7) 山本隆: ブレインサイエンスシリーズ<sup>®</sup> 脳と味覚—おいしく味わう脳のしくみ, 共立出版, 東京, pp.87-89

(1996)

- 8) 佐藤昌康, 小川尚:最新・味覚の科学, 朝倉書店, 東京, p.26 (1997)
- 9) 栗原賢三, 小野武年, 渡辺明治, 林 裕造:グルタミン酸の科学—うま味から神経伝達まで, 講談社, 東京, p.12 (2000)
- 10) Ninomiya Y, Kurenuma S, Nomura T, Umebayasi T, Hirosada Kuwamura: Taste synergism between monosodium glutamate and 5'-ribonucleotide in mice. *Comp. Biochem. Physiol. 101A*, 97-102 (1992)
- 11) Sugita M, Shiba Y: Genetic tracing shows segregation of taste neuronal circuitries for bitter and sweet. *Science* 309: 781-785 (2005)



0549

## Plasticity in discrimination circuitries for taste qualities of sodium and potassium glutamate

T. Miyamoto<sup>1,2</sup>, R. Satoh<sup>3</sup>, T. Miyazaki<sup>4</sup>, H. Eda-Fujiwara<sup>1</sup>, A. Miyazaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. Chem. Biol. Sci., Fac. Sci. and <sup>2</sup>Div. Mater. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Women's Univ., Tokyo, 112-8681, Japan; <sup>3</sup>Dept. Physiol., Sch. Med., Kitasato Univ., Kanagawa, 228-8555, Japan;

<sup>4</sup>Dept. Oral Histol., Sch. Dent., Nagasaki Univ., Nagasaki, 825-8588, Japan

### Summary

Umami substances, monosodium L-glutamate (MSG) and monopotassium L-glutamate (MPG) represent considerably different taste qualities from each other in human. However, the taste quality of MPG with inosine 5'-monophosphate (IMP) seems to be close to that of MSG because we found using a conditioned taste aversion (CTA) paradigm that C57BL/6 mice, whose umami sensitivity is relatively similar to that of human, discriminated MSG from MPG, but dose-dependently failed to discriminate MSG from MPG with IMP (MPG+IMP). Taste preference tests using the two-bottle procedure also confirmed that C57BL/6 mice favored MSG and MPG+IMP more than MPG. The distribution pattern of MPG-stimulated Fos-like immunoreactivity (FLI) in the parabrachial nucleus (PBN) and the nucleus of solitary tract (NTS) was altered by addition of IMP to be similar pattern of MSG-stimulated FLI: MSG-stimulated FLI tended to distribute in anteromedial part of PBN and NTS, but MPG-induced FLI, which dispersedly located in the posterior part of PBN and NTS, shifted to anteromedial part of PBN and NTS with addition of IMP. Furthermore, MPG-stimulated FLI was modulated also toward horizontal and vertical axes in PBN but not in NTS by addition of IMP. These results suggest that IMP-induced taste quality change of MPG is accompanied by the alteration of pathways toward antero-posterior axis within NTS, followed by the alteration of pathways toward three-dimensional axes within the PBN. It is concluded that more detailed information of taste qualities are transmitted to the higher order portion of the central nervous system. In addition, we could not observe any sign of the cell proliferation in PBN using 5-bromo-2-deoxyuridine (BrDU) injection method at present, indicating that the adult neurogenesis does not contribute to the alteration of discrimination circuitries for umami taste by IMP.