

# 食の嗜好性における塩味とうま味の相乗作用に対する脳内報酬系の関与

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(グルタミン酸ナトリウム, MSG)」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について検討することで、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。

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及ぼすMSG添加の効果について検討した。実験1において、塩摂取制限下のマウスはNaClの濃度を増やすことにより、より積極的なリッキングを示した。しかし非制限下ではリッキングの回数は全体的に大きく減少した。実験2では、NaCl溶液に対するMSG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、うま味物質であるMSG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。また、NaCl報酬単体で引き起こされるリック回数とNaCl+MSG条件におけるリック回数が同程度の時、ナトリウム含有量はNaCl+MSG条件の方が30%少ない。このことから、MSG添加による減塩効果が明らかにされた。実験3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、試行によっては、「低NaCl条件」と比較して報酬性の高い「高NaCl条件」及び「NaCl+MSG条件」で高いドーパミン放出が観察された。しかし、全体として明確な差はなかった。

一連の研究結果から、うま味物質であるMSGによって、塩味嗜好性が増加する可能性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。また、NaClをMSGに一部置き換えることによって、30%程度の減塩がもたらされることも明らかにされた。今後は、この行動現象と脳内ドーパミン放出の関連性の解析を進めることで、その神経基盤が明らかにされることが期待される。

## 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、ナトリウム摂取制限下にある

マウスに対して、「食塩水」あるいは「食塩水＋うま味成分（グルタミン酸ナトリウム, MSG）」に対する報酬希求行動を測定し、その行動中の側坐核のドーパミンレベルを測定する。この実験により、食塩水のみの場合と比べて、うま味成分入り食塩水を用いた場合の方が、より強い報酬希求行動が示され、さらに高い脳内ドーパミン放出が引き起こされるという仮説を検討する。

## 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 塩摂取制限

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 塩水訓練(3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 NaCl 溶液(75 mM)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(Figure 1A)。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2,3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4種類の異なる濃度の NaCl(75, 150, 300, 600 mM)を用い、4日間に渡り計4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(2.1.2)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.グルタミン酸ナトリウムの添加が塩水希求行動に及ぼす影響

#### 2.3.1 塩水訓練(5日間)

塩摂取制限、利尿剤投与を行った後、実験1と同様の手続き(2.2.1)で3日間の塩水訓練を行い、さらに報酬を NaCl 75 mM とグルタミン酸ナトリウム(Monosodium-glutamate, MSG) 3 mM の混合液に変更し、FR10条件で2日間訓練を行った。

#### 2.3.2 テスト1(塩摂取制限あり)

実験1と同じPR課題を用いて、5日間のテスト日から構成されるテスト1を行った。最初の4日間では、報酬として NaCl, (75mM)に4つの異なる濃度でMSGを添加したものの(30, 60, 120, 180 mM)を用いた。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。テスト1最終日の5日目では報酬として NaCl(300 mM)を用いた。テスト間隔は48時間以上とした。

#### 2.3.3 テスト2(塩摂取制限なし)

テスト1の終了後、塩摂取非制限下で少なくとも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。

### 2.4 実験3.塩水摂取の引き起こす側坐核ドーパミン放出とグルタミン酸ナトリウム添加の効果

#### 2.4.1 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, 蛍光イメージ用の光ファイバーも同時に埋め込んだ。

#### 2. 4. 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 2 と同様の手続きで 5 日間の塩水訓練を行った (2.3.1)。その後, 20 回のリッキング後に, (1) NaCl 75 mM, (2) NaCl 300 mM, (3) NaCl (75 mM) + MSG (120 mM) 混合液のいずれかの報酬が与え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。

### 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 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 1B)。リッキング回数のピークは 300 mM 条件であり, NaCl 濃度は逆 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

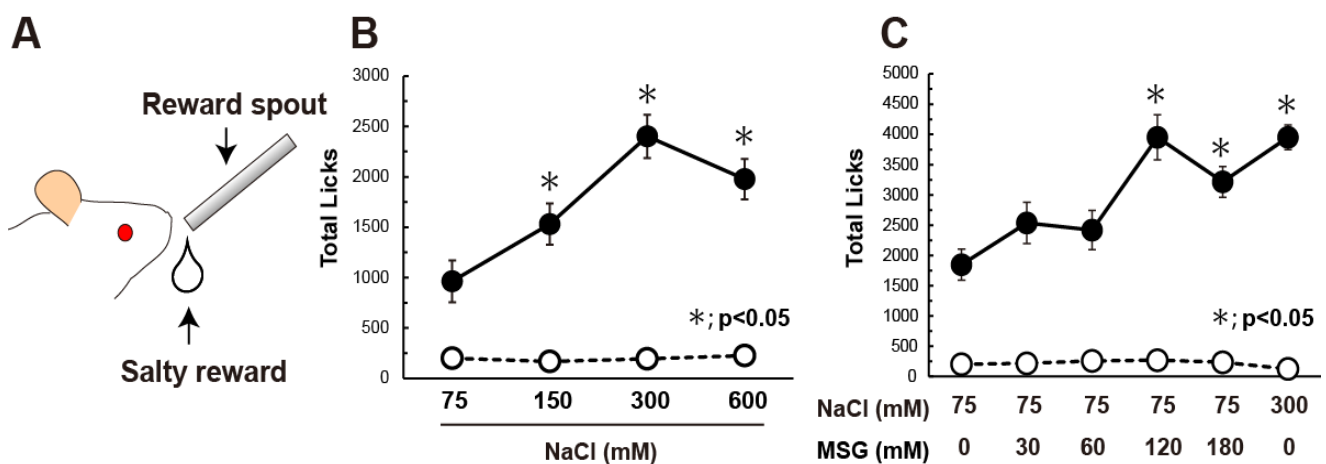
ト 2 におけるリッキング回数は全体的に低下し (分散分析,  $p < 0.05$ ), NaCl 濃度を増加させてもリッキング回数は増加しなかった (Figure 1B)。

#### 3. 2 実験 2

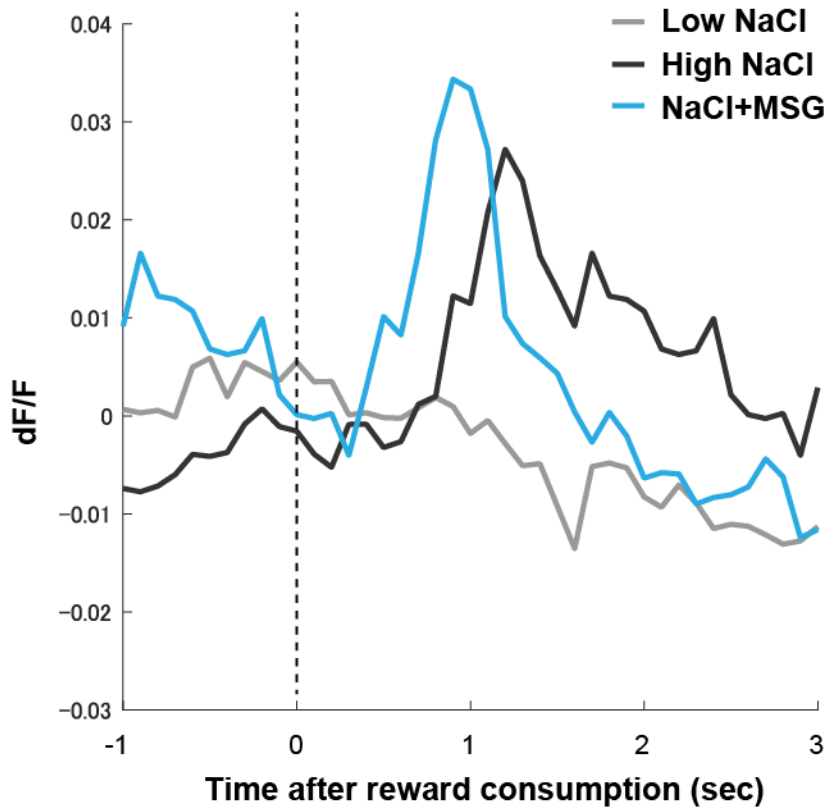
塩水報酬に添加する MSG 濃度を増加させると 30 分あたりのリッキング回数が有意に増加した (分散分析,  $p < 0.05$ )。リッキング回数のピークは NaCl + MSG 120 mM 条件であり, MSG 濃度は逆 U 字型の用量反応曲線を示した (Figure 1C)。また, 実験 1 と同様に, NaCl 300 mM 条件においてマウスは高いリッキングを示した。リッキング回数は NaCl + MSG 120 mM 条件と同程度であった。塩摂取非制限下では, テスト 2 におけるリッキング回数は全体的に低下し (分散分析,  $p < 0.05$ ), NaCl 濃度を増加させてもリッキング回数は増加しなかった (Figure 1C)。

#### 3. 3 実験 3

それぞれの塩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, 試行によっては低 NaCl 条件よりも高 NaCl 条件および NaCl + MSG 条件で高いドーパミン放出が認められた (Figure. 2)。しかし, 全試行の平均値を比較したところ, 統計的に有意な差は認められなかった。



**Figure 1.** The progressive ratio schedule in the licking-based operant paradigm to assess motivation for salty reward in mice. A. Behavioral setup. Mice have to lick to get salty reward coming out through reward spout. B. The increase of NaCl concentration facilitates operant licking to reward spout under the NaCl depleted condition, but not under the repleted condition. C. The increase of MSG addition facilitates operant licking for reward spout under the NaCl depleted condition, but not under the repleted condition.



**Figure 2.** Example trace of dopamine release after salty reward consumption in nucleus accumbens in one trial. Vertical broken line shows the time of first licking after salty reward delivery.

#### 4. 考察

本研究では、給餌チューブへの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PR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及ぼすMSG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報酬摂取時のドーパミン放出についても検討した。

実験1において、塩摂取制限下のマウスはNaClの濃度を増やすことにより、より積極的なリッキングを示した。一方で、リッキングの回数は300 mMでピークとなりそれ以上のNaCl濃度の上昇は逆にマウスのリッキングを低下させた。このNaClの逆U字型用量反応曲線は、ラットを用いた先行研究の結果と一致する<sup>3</sup>。また、塩摂取非制限下ではリッキングの回数は大きく減少した。これらの結果は、本研究で用いたPR課題がマウスにおいて塩味報酬に対する希求行動を評価する課題として適切であることを示している。

実験2では、NaCl溶液に対するMSG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、うま味物質であるMSG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。MSGそれ自体にもナトリウムが含まれているが、NaCl報酬単体で引き起こされる、300 mM条件における最大リック回数とNaCl 75 mM + MSG 120 mM条件におけるリック回数は同程度であり、ナトリウム含有量はNaCl 75 mM + MSG 120 mM条件の方が30%少ない。このことから、MSG添加による減塩効果が実験動物のマウスにおいて明らかにされた。

実験3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。実験においてマウスは20回程度、各報酬を摂取し、試行によっては本研究で想定したような、「低NaCl条件」と比較して「高NaCl条件」及び「NaCl + MSG条件」で高いドーパミン放出が観察された。しかし、全体として明確な差は認められ

なかった。今後は、マウスの個体数を増やし、さらに検討を続けていく必要がある。

## 5. 今後の課題

本研究ではうま味物質である MSG 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、NaCl を MSG に一部置き換えることによって、30%程度の減塩がもたらされることも明らかにされた。今後は、ナトリウムが含まれていないうま味物質であるグルタミン酸カリウムやイノシン酸の添加が塩味報酬希求行動に及ぼす影響について検討することで、マウスにおけるうま味物質の持つ塩味増強効果の一般性についても検討されることが望まれる。

本研究では、MSG の塩味増強効果と側坐核におけるドーパミンの関連性について、一部仮説を支持する結果が認められたものの、全体としては明らかにすることはできな

かった。今後は、MSG の塩味増強効果と、側坐核以外の辺縁系領域や皮質領域におけるドーパミン放出の関連性についても検討する必要があると考えられる。

## 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, 3325–3338 (2018).
3. St. John, S. J. The Perceptual Characteristics of Sodium Chloride to Sodium-Depleted Rats. *Chem. Senses* 42, 93–103 (2017).

# The Role 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 was also investigated. Salty reward seeking behavior in mice was assessed using progressive ratio schedule in the licking-based operant behavior paradigm. In the experiment 1, the number of licks to earn NaCl solution reward was increased as the dose of NaCl was increased in salt depleted mice. However, this was not observed when salt repleted. In the experiment 2, salt depleted mice showed more licks when the amount of umami tastant, monosodium-glutamate (MSG), mixed with NaCl solution was increased. This was not observed in the repleted mice. In the experiment 3, accumbal dopamine release was measured by taking advantage of fluorescent dopamine sensor, GRAB-DA. The dopamine release was increased more after the consumption of high NaCl reward or NaCl + MSG reward compared to low NaCl reward in a certain trial. However, this tendency was not clear when all the trials were analyzed. Results of the present study showed the facilitative effect of umami on salt palatability in mice for the first time. The possible role of accumbal dopamine in this effect needs to be further investigated in the future.