

塩味とうま味の相乗作用を生み出す脳内回路メカニズム

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することで、マウスにおける塩味とうま味の相乗作用を評価した。また、ドレッド法を用いて塩味およびうま味、その混合溶液への希求行動に対する前頭前皮質および前頭前皮質から腹側被蓋野への投射経路抑制の効果について調べることで、当該脳領域の活動と報酬希求行動の因果関係を検証した。さらに、光遺伝学による神経操作とドーパミンイメージングを組み合わせることで、前頭前皮質から腹側被蓋野への神経投射活動と、側坐核ドーパミン放出の因果関係についても検討した。

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対するうま味物質添加の効果について検討した。

実験 1 では、この報酬希求行動に対する前頭前皮質抑制の効果について検討した。コントロール群では、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。一方、前頭前皮質を抑制した群ではそのようなうま味の効果は認められなかった。

実験 2 では、逆行性ウイルスベクターを用いることにより、前頭前皮質からドーパミン神経が豊富に存在する腹側被蓋野へ投射する投射神経の活動を抑制した。その結果、コントロール群で認められた塩味に対するうま味物質添加の効果が消失した。

実験 3 では、順行性ウイルスベクターを用いて前頭前皮質から入力を受けている腹側被蓋野ドーパミン神経を光遺伝学的に活性化したところ、腹側被蓋野の主要な投射先である側坐核におけるドーパミン放出の上昇が認められた。

一連の研究結果から、前頭前皮質およびそこから腹側被蓋野ドーパミン神経へ投射する神経の活動によって、塩味とうま味の相乗作用が引き起こされている可能性が示唆された。

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することで、マウスにおける塩味とうま味の相乗作用を評価した。また、DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs)を用いて塩味および塩味とうま味の混合溶液への希求行動に対する前頭前皮質および前頭前皮質から腹側被蓋野への投射経路抑制の効果について調べることで、当該脳領域の活動と報酬希求行動の因果関係を検証した。また、光遺伝学による神経操作とドーパミン光計測を組み合わせることで、前頭前皮質から腹側被蓋野への神経投射の活動と側坐核ドーパミン放出の因果関係を検討し、さらにリアルタイム条件性場所選好課題を用いて前頭前皮質から腹側被蓋野への神経投射活動の報酬効果について調べた。

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 系の雄性マウス(8-10 週齢)を使用した。

2.1.2 塩摂取制限

実験開始の少なくとも 3 日前に、ケージ内のエサを NaCl フリー飼料(オリエンタル酵母)に置き換えた。また、飲み水は Milli-Q 水に置き換えた。

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事前訓練および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¹⁾。

2.2 実験 1. 前頭前野の抑制が塩味およびうま味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5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 μ 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(Fig. 1A)。報酬は、水に NaCl 75 mM あるいはそれに MPG 25 mM + IMP 2.5 mM 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 分間が経過後に終了した。

2.2.2 前頭前皮質における抑制性ドレッド受容体の発現

麻酔下のマウスの前頭前皮質に AAV9-CaMK2-hM4Di-mCherry を投与することで、錐体細胞に抑制性の DREADD である hM4Di 受容体を発現させた²⁾。

2.2.3 前頭前皮質抑制実験

脱塩と 5 日間の事前訓練を行った後、hM4Di 受容体のアゴニストである JHU37160 dihydrochloride(0.3 mg/kg)、あるいは溶媒である Milli-Q(10 ml/kg)投与した上で、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、NaCl 75 mM(Salt Only 条件)および NaCl 75 mM + MPG 25 mM + IMP 2.5 mM(Salt + Umami 条件)を用いた。

2.3 実験 2. 前頭前皮質-腹側被蓋野回路の抑制が塩味およびうま味希求行動に及ぼす影響

2.3.1 前頭前皮質-腹側被蓋野回路における抑制性 DREADD の発現

麻酔下のマウス腹側被蓋野に、逆行性のウイルスベクターである AAVretro-eGFP-cre を投与することで腹側被蓋野に投射する神経細胞に cre を発現させた。さらに同じマウスの前頭前皮質に AAV5-DIO-hM4Di-mCherry を投与することで、cre 依存的に抑制性の hM4Di を発現させた。以上のような 2 種類のウイルスベクター投与の組み合わせにより、腹側被蓋野に投射する前頭前皮質の神経細胞へ hM4Di を発現させた。

2.3.2 前頭前皮質-腹側被蓋野回路の抑制実験

脱塩と 5 日間の事前訓練(2.2.1項)を行った後、hM4Di 受容体のアゴニストである Clozapine N-oxide(CNO, 1 mg/kg)あるいは Milli-Q(10 ml/kg)投与した上で、PR 課題(2.2.3項)を 1 日 1 回、30 分間行った。報酬は、NaCl 75 mM (Salt Only 条件)および NaCl 75 mM + MPG 25 mM + IMP 2.5mM(Salt + Umami 条件)を用いた。

2. 4 実験3. 前頭前皮質－腹側被蓋野回路の活性によるドーパミン放出の検討

2. 4. 1 前頭前皮質－腹側被蓋野回路における活性型光感受性チャネルの発現

DAT(ドーパミントランスポーター)-cre マウスの前頭前皮質に、順行性のウイルスベクターである AAV1-FLEX-flpo を投与することで、前頭前皮質から入力を受けているドーパミン神経細胞において、cre 依存的に flpo を発現させる。同じマウスの腹側被蓋野に AAV5-fDIO-ChR2-mCherry を投与することで、前頭前皮質から入力を受けているドーパミン神経特異的に光感受性の陽イオンチャネルである ChR2 を発現させる。また、光刺激用の光ファイバーも同時に腹側被蓋野に埋め込んだ。

2. 4. 2 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-rDA1h はドーパミンが結合すると下流に位置する赤色蛍光タンパク質 cpmApple 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³⁾。本研究では、麻酔下の動物に対して GRAB-rDA1h の遺伝子配列を含むウイルスベクター(AAV9-hSyn1- GRAB-rDA1h)を側坐核内に微小注入することにより、GRAB-rDA1h を発現させた。また、蛍光イメージング用の光ファイバーも同時に側坐核に埋め込んだ。

2. 4. 3 前頭前皮質－腹側被蓋野回路の活性化によるドーパミン放出の検討

腹側被蓋野に対し450 nm のレーザー光を照射することで前頭前皮質から入力を受けているドーパミン神経(ChR2を発現している)を活性化した。具体的には、10 ms のレーザーパルスを、異なる頻度(5, 10, 20, 50 Hz)で腹側被蓋野に対し照射した。

2. 5 実験4. 前頭前皮質－腹側被蓋野回路活性化の持つ報酬効果の検討

2. 5. 1 リアルタイム条件性場所選好テスト

2 つの実験箱とそれを繋ぐ通路から構成される実験装置を用いる。前頭前皮質から直接入力を受けているドーパミン神経細胞に ChR2 を発現させたマウス(2. 4. 1項)

を実験装置内に放ち、自由に探索させた。実験は 5 日間で構成され、1 日目(Pre-test)と 5 日目(Post-test)は、レーザー照射なしで実験をおこなった。2-4 日目は条件づけ期間とし、片方の実験箱にマウスが進入した際に腹側被蓋野に対して 20 Hz の頻度で 450 nm のレーザー光を照射した。実験では 2 つの実験箱に対する滞在時間の割合を算出した。

3. 研究結果

3. 1 実験 1.

塩味および塩味とうま味の混合溶液に対する希求行動における、前頭前皮質抑制の効果について検討した。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(分散分析, $p < 0.05$)。しかし、前頭前皮質を抑制した条件では、うま味の効果は観察されなかった(Fig. 1A, 1B, 1C)。

3. 2 実験 2.

塩味および塩味とうま味の混合溶液に対する希求行動における、前頭前皮質－腹側被蓋野回路の抑制の効果について検討した。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(分散分析, $p < 0.05$)。しかし、腹側被蓋野に投射する前頭前皮質神経細胞を抑制した条件では、うま味の効果は観察されなかった。(Fig. 1D, 1E, 1F)。

3. 3 実験 3.

光遺伝学を用いて前頭前皮質から投射を受ける腹側被蓋野ドーパミン神経を活性化したところ、刺激頻度依存的に、側坐核における GRAB-rDA1h シグナルが増加した。(Fig. 2A, 2B)。

3. 4 実験 4.

リアルタイム条件性場所選好課題において、2 つの実験箱のうち特定の実験箱にマウスが滞在している際に、前頭前皮質から投射を受ける腹側被蓋野ドーパミン神経を活性化したところ、ドーパミン神経細胞活性化が引き起こされる側の実験箱に対する滞在時間が上昇した(Fig. 2C, 2D, 2E)。

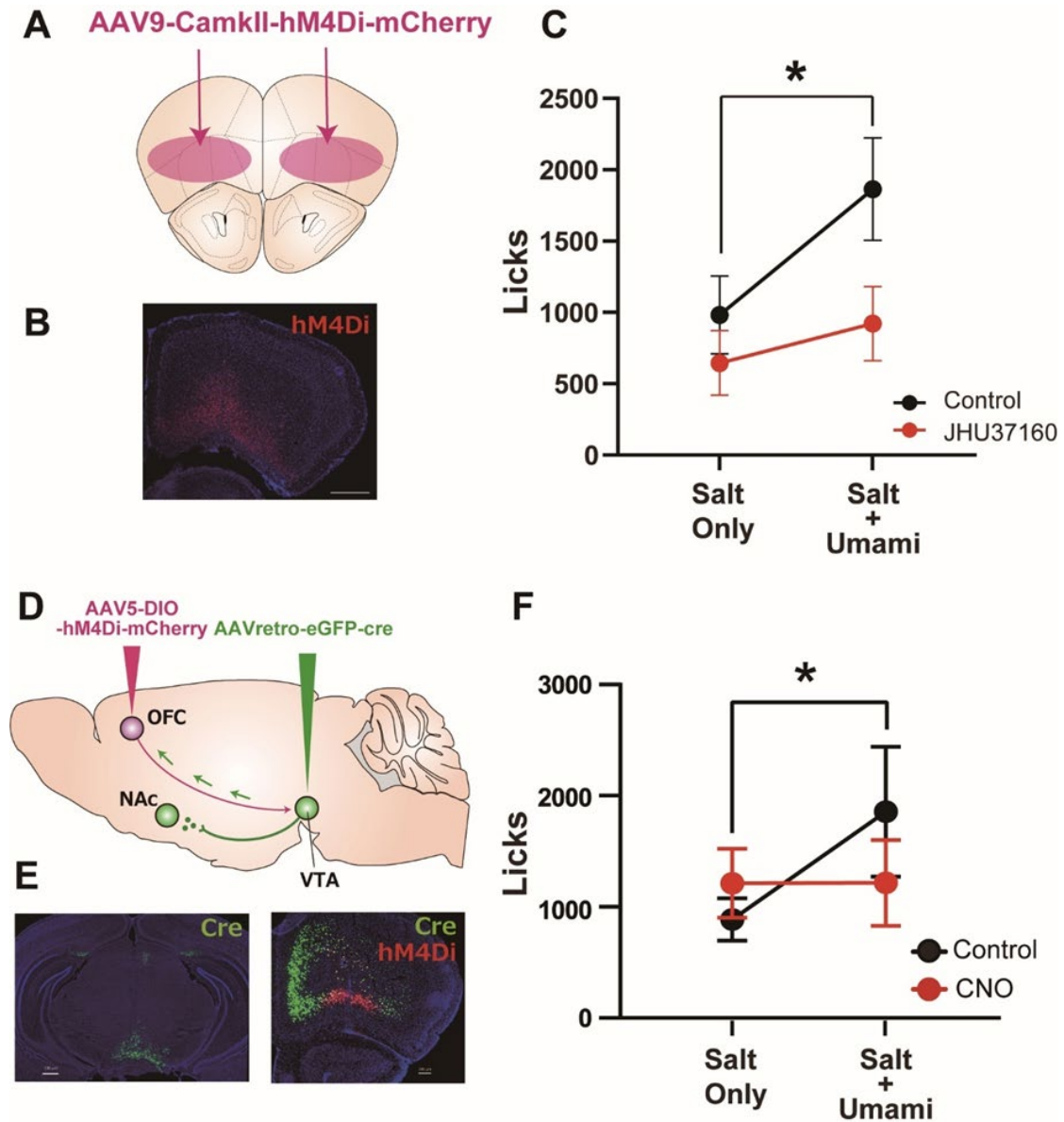


Fig. 1 Results of experiments 1 and 2.

A. Virus injection to the prefrontal cortex.

B. Example picture of hM4Di-mCherry expression.

C. The result of experiment 1. The inhibition of prefrontal cortex reduced the effect of umami to enhance salt-seeking behavior.

D. Virus injections into the prefrontal cortex (OFC), the ventral tegmental area (VTA), and dopaminergic projection to the nucleus accumbens (NAc).

E. The example pictures of cre and hM4Di expression.

F. The result of experiment 2. The inhibition of OFC-VTA pathway reduced the effect of umami to enhance salt-seeking behavior.

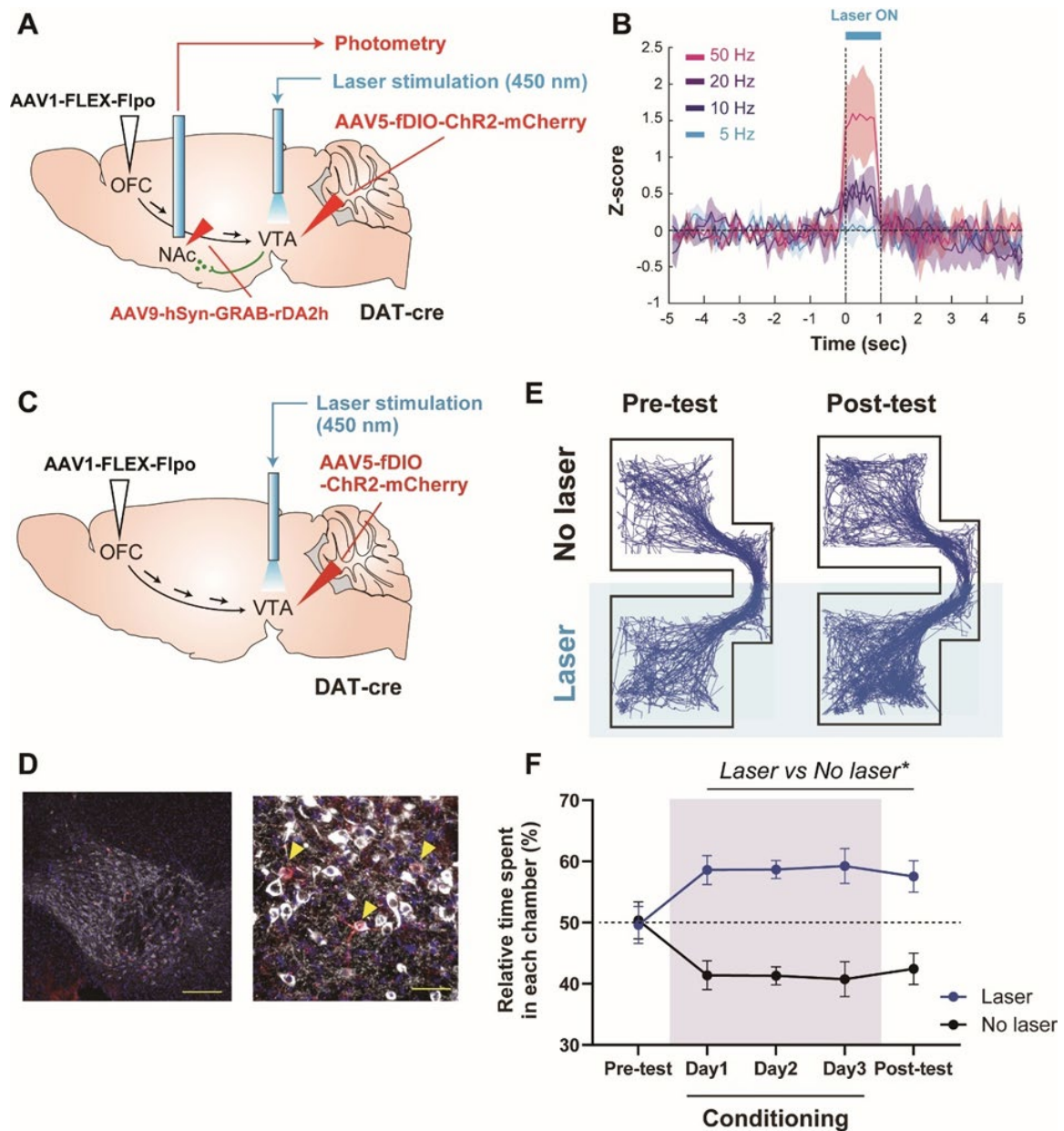


Fig. 2 Results of experiments 3 and 4.

A. Virus injection to the prefrontal cortex.

B. Example picture of hM4Di-mCherry expression.

C. The result of experiment 1. The inhibition of prefrontal cortex reduced the effect of umami to enhance salt-seeking behavior.

D. Virus injections into the prefrontal cortex (OFC), the ventral tegmental area (VTA), and dopaminergic projection to the nucleus accumbens (NAc).

E. The example pictures of cre and hM4Di expression.

F. The result of experiment 2. The inhibition of OFC-VTA pathway reduced the effect of umami to enhance salt-seeking behavior.

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 課題において観察される、うま味の持つ塩味嗜好性増強効果の神経メカニズムに

ついて検討した。実験 1 では DREADD を用いた前頭前皮質の抑制効果について、実験 2 では前頭前皮質—腹側被蓋経路の抑制効果について検討した。さらに、実験 3 では光遺伝学とドーパミン光計測を用いて、前頭前皮質—腹側

被蓋野経路の活動が実際に腹側被蓋野の主要な投射先である側坐核におけるドーパミン放出を引き起こすのかどうかについて検討した。

実験 1 において、コントロール条件では、Salt Only 条件と比較して Salt + Umami 条件においてリック数が上昇した。このことから、うま味の持つ塩味嗜好性増強効果が観察されたと考えられる。一方、前頭前野抑制条件では Salt Only 条件と Salt + Umami 条件の間でリック数の上昇は認められなかった。実験 2 では、ドーパミン神経が密集している腹側被蓋野に投射する前頭前皮質神経細胞の活動を抑制した。その結果、前頭前皮質を抑制した実験 1 と同様に、Salt Only 条件と Salt + Umami 条件の間でリック数の上昇は認められなくなった。実験 1 および 2 の結果から、前頭前皮質およびそこから腹側被蓋野へ投射する神経細胞の活動は、うま味の持つ塩味嗜好性増強効果に重要な役割を果たすことが明らかにされた。

実験 3 では、塩味とうま味の混合刺激によってより活動が上昇していると考えられる全頭前皮質－腹側被蓋野経路の活動が、実際にドーパミン放出を引き起こしているのか検討した。目的遺伝子の前向き輸送を可能にする AAV1, 光感受性陽イオンチャネル ChR2 および蛍光ドーパミンセンサー GRAB-rDA1h を組み合わせることにより、前頭前皮質から直接入力を受けている腹側被蓋野ドーパミン神経細胞を活性化させ、同時に側坐核におけるドーパミン放出を記録したところ、ドーパミン神経に対する刺激頻度依存的に、側坐核におけるドーパミンレベルが上昇した。実験 4 では、リアルタイム条件性場所課題を用いて、前頭前皮質から直接入力をうけるドーパミン神経細胞の活性が持つ報酬効果について

検討したところ、条件づけ中および条件づけ後のどちらにおいても、ドーパミン神経の活性化が引き起こされる側の実験箱に対するマウスの滞在時間が上昇することが分かった。実験 3 および 4 の結果から、前頭前皮質－腹側被蓋野経路の活性化が、実際に側坐核におけるドーパミン放出を引き起こし、さらに報酬性の効果を持つことが明らかになった。

5. 今後の課題

本研究では、特殊なウイルスベクター、DREADD を用いることで、うま味の持つ塩味嗜好性増強効果における前頭前皮質およびそこから腹側被蓋野への神経入力の役割を初めて明らかにすることができた。さらに、光遺伝学およびドーパミン光計測を用いることで、上記の経路の活性化が側坐核におけるドーパミン放出および行動レベルでの報酬性を引き起こしていることを初めて明らかにした。一連の結果は、塩味とうま味の情報が前頭前皮質で統合され、相乗的にドーパミン神経を活性化させることで報酬効果もたらすという神経回路の存在を示唆する。今後は、塩味とうま味という異なる味覚の情報が脳内で相互作用する際に働く、具体的なメカニズム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. Roth, B. L. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694 (2016).
3. 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)

The Neural Circuit Mechanism of the Synergic Effect of Salty and Umami on Food Palatability

Takaaki Ozawa

Institute for protein research, Osaka University

Summary

Facilitating 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 been known to enhance the palatability of salty food in humans. We previously reported that this facilitative effect of umami on salt palatability could be observed also in the experimental animal model such as mice. In the present study, we investigated the neural mechanisms underlying the synergistic effect between the salty and the umami tastes. In the experiment 1, we investigated the effect of chemogenetic inhibition of the prefrontal cortex on salt- and umami-seeking behavior. In the experiment 2, we tested the effect of pathway-specific inhibition between the prefrontal cortex and the ventral tegmental area on salt- and umami-seeking behavior. In the experiment 3, we investigated whether the activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area that receives input from the prefrontal cortex induces dopamine release in the nucleus accumbens which is the main projection target of dopamine neurons in the ventral tegmental area by taking advantage of the optogenetics and fluorescent dopamine sensor. In the experiment 4, we investigated whether the optogenetic activation of the prefrontal cortex to the ventral tegmental area pathway has rewarding effects in the real-time conditioned place preference test.

As a result, we found that (1) the chemogenetic inhibition of the prefrontal cortex and its projection to the ventral tegmental area attenuated the facilitation effect of umami on salt-seeking behavior, (2) the optogenetic activation of the prefrontal cortex to the ventral tegmental area pathway induces the dopamine release in the nucleus accumbens and behavioral rewarding effect. Our results suggest that the prefrontal cortex to the ventral tegmental area pathway and dopaminergic circuit are important for the synergistic effect between the salty and the umami tastes.