

塩味とうま味の相乗作を生み出す全脳神経回路の解明

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り、この効果は「おいしさを損なわない減塩」を実現する上で注目されている。しかしながら、この「塩味」と「うま味」の相乗作用は主にヒトにおける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。我々はこれまで、動物モデルにおける、ヒトと類似した塩味とうま味の相乗効果の存在と、それに対するドーパミン放出の関連性を示した。一方で、味覚物質の受容器官である舌(味細胞)において基本的に分離している味覚情報が脳内でどのように統合されているのか、その具体的なメカニズムは依然として明らかになっていない。

本研究では、神経活動ラベリング技術を用いることで、味覚に係わる複数の脳領域に渡って「塩味応答神経」と「うま味応答神経」を標識し、その分離と重複を解析することで、味覚の相乗作用において積極的な役割を果たす脳領域の特定を試みた。

「①神経活動マーカー遺伝子 *cfos* のプロモーター配列を用いた神経活動依存的な遺伝子発現法」、「②Tet-OFFシステムを用いた遺伝子発現操作法」を組み合わせることで、全脳における「塩味応答神経細胞」と「うま味応答神経細胞」を、異なる色の蛍光タンパクで標識した。そして、味覚関連脳領域として知られる孤束核、腕傍核、一次味覚野尾側部、一次味覚野吻側部、二次味覚野(眼窩前頭皮質)における各味覚応答神経の数を定量した。

その結果、どの味覚領域においても塩味とうま味の両方に応答する神経の割合はおよそ 10~20%に収まった。この結果から、塩味とうま味の情報統合は、特定の脳領域によって担われているというより、複数の味覚領域にまたがる分散した神経メカニズムによって担われている可能性が考えられる。

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り、この効果は「おいしさを損なわない減塩」を実現する上で注目されている。しかしながら、この「塩味」と「うま味」の相乗作用は主にヒトにおける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。我々はこれまで、動物モデル

における、ヒトと類似した塩味とうま味の相乗効果の存在と、それに対するドーパミン放出の関連性を示した。一方で、味覚物質の受容器官である舌(味細胞)において基本的に分離している味覚情報が脳内でどのように統合されているのか、その具体的なメカニズムは依然として明らかになっていない。本研究では、神経活動ラベリング技術を用いることで、味覚に係わる複数の脳領域に渡って「塩味応答神経」と「うま味応答神経」を標識し、その分離と重複を解析することで、味覚の相乗作用において積極的な役割を果たす脳領域の特定を試みた。

2. 研究方法

2.1 動物

cfos-tTA/cfos-shGFP 雄性マウス¹⁾を使用した。

2.2 神経活動標識法

「①神経活動マーカー遺伝子 *cfos* のプロモーター配列を用いた神経活動依存的な遺伝子発現法」, 「②Tet-OFF システムを用いた遺伝子発現操作法」を組み合わせることで, 全脳における「塩味応答神経細胞」と「うま味応答神経細胞」を, 異なる色の蛍光タンパクで標識した。

実験では, 「cfos-tTA」および「cfos-shGFP」配列が既に遺伝子導入されている遺伝子改変マウスに, 血液脳関門透過型 AAV ベクター (AAV.PHPeB-TRE-H2B-mCherry)²⁾ を静脈投与することで「TRE-H2B-mCherry」配列を全神経細胞に追加で遺伝子導入した。

本研究で用いた遺伝子改変マウスでは, 通常状態において神経細胞の活動が上昇すると *cfos* プロモーター配列の下流にある tTA, および易分解性蛍光蛋白である shGFP が一過性に発現する。しかし, エサにドキシサイクリン (DOX) が含まれている場合, DOX が tTA-TRE 結合を阻害するため, mCherry は発現しない。一方, エサから DOX を抜いた場合, shGFP の一過性発現に加えて, mCherry の長期発現を誘発することができる。本研究では, この DOX-OFF システムを用いることで, うま味応答神経に mCherry を長期的に発現させ, その上で shGFP を塩味応答神経に発現させることで, 同一個体において異なる味覚応答神経を異なる色の蛍光タンパクで標識した。

具体的な手続きとして, まず, エサから DOX を抜いた後, マウスにうま味を摂取させることで, うま味に反応した神経細胞に mCherry および shGFP を発現させる。重要なことに shGFP は 90 分を発現のピークにすぐ分解される。その後, DOX をエサに戻してから, マウスに塩味を摂取させ, 塩味応答性神経細胞に shGFP を発現させてから脳を取り出した。

2.3 顕微鏡観察

凍結切片を作成し, 蛍光顕微鏡による観察と撮影を行った (倍率 40 倍)。

2.4 蛍光タンパク発現陽性細胞の定量

Image J を用いて, 蛍光強度に対する閾値処理を行った後, シグナルの大きさと真円度に基づいて蛍光タンパク発現陽性細胞を同定した。

3. 研究結果

味覚関連脳領域として知られる孤束核, 腕傍核, 一次味覚野尾側部, 一次味覚野吻側部, 二次味覚野 (眼窩前頭皮質) における shGFP 陽性細胞 (塩味応答神経), mCherry 陽性細胞 (うま味応答神経) について観察, 定量を行った。顕微鏡観察を行ったところ, 塩味応答神経, うま味応答神経に加えて, 塩味とうま味両方に応答する神経細胞 (塩味+うま味神経) の存在が確認された (Fig.1)。そのため, 各脳領域において, これらの 3 種類の細胞数を定量した (Fig.2)。

まず, 低次脳領域として知られる孤束核, 腕傍核における解析を行ったところ, 孤束核では 3887 個中, 塩味神経 37.2%, うま味神経 49.7%, 塩味+うま味神経 13.35%であった。また, 腕傍核では 3270 個中, 塩味神経 33.98%, うま味神経 56.18%, 塩味+うま味神経 13.35%であった。

次に比較的高次の味覚領域として知られる一次味覚野および二次味覚における解析を行ったところ, 一次味覚野尾側部では 3934 個中, 塩味神経 40.16%, うま味神経 39.78%, 塩味+うま味神経 20.06%であった。一次味覚野吻側部では 3092 個中, 塩味神経 34.48%, うま味神経 51.20%, 塩味+うま味神経 14.33%であった。また, 二次味覚野では 2874 個中, 塩味神経 34.38%, うま味神経 49.65%, 塩味+うま味神経 15.97%であった。

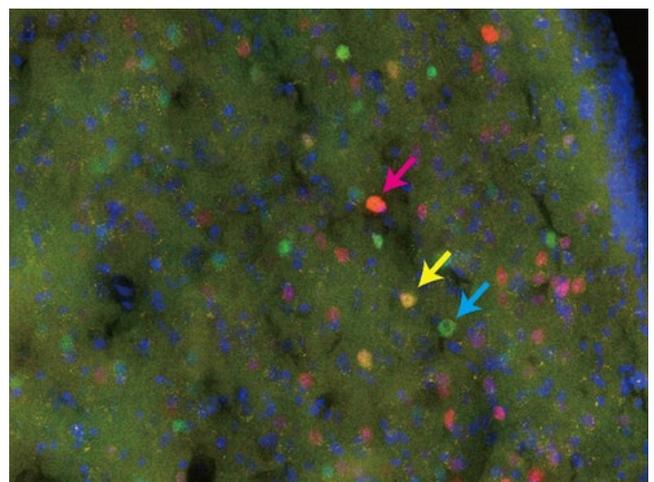


Fig. 1 Example picture of salt-, umami-, salt+umami responsive cells.

Cyan, magenta and yellow arrow heads indicate typical salt-, umami-, salt+umami responsive cells, respectively.

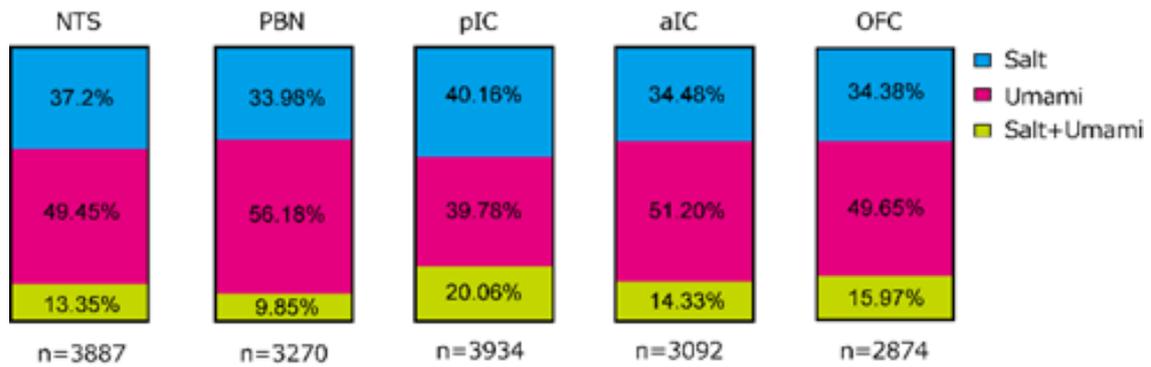


Fig. 2 Proportion of each taste responsive cell in each brain area related to taste perception.

NTS: nucleus tractus solitarius, PBN: parabrachial nucleus, pIC: posterior insular cortex, aIC: anterior insular cortex, OFC: orbitofrontal cortex.

4. 考察

本研究では、「①神経活動マーカー遺伝子 *cfos* のプロモーター配列を用いた神経活動依存的な遺伝子発現法」、 「②Tet-OFF システムを用いた遺伝子発現操作法」を組み合わせることで、全脳における「塩味応答神経細胞」と「うま味応答神経細胞」を、異なる色の蛍光タンパクで標識することで、味覚の統合に関与する脳領域について検討した。

味覚関連領域における塩味応答神経、うま味応答神経、塩味+うま味応答神経の割合を検討したところ、どの味覚領域においても塩味+うま味応答神経の割合はおおよそ10~20%に収まった。この結果から、塩味とうま味の情報統合は特定の脳領域によって担われているというよりは、複数の味覚領域にまたがる分散した神経メカニズムによって担われている可能性が考えられる。

先行研究では、*in-vivo* 細胞外記録法を用いて、味覚関連脳領域における、味覚応答神経の解析が行われてきた。マウス、ラット、サルを用いた先行研究では、本研究で着目した孤束核、腕傍核、一次味覚野尾側部、一次味覚野吻側部、二次味覚野のそれぞれにおいて、単一味覚応答神経と複数の味覚に反応する神経の両方が存在することが知られており、その割合に領域ごとに大きな偏りは認められない³⁻⁵⁾。本研究の結果は、これらの電気生理学実験によって示唆されている神経メカニズムと概ね一致していると考えられる。

5. 今後の課題

本研究では、塩味とうま味の両方に反応する神経の割合が、脳領域ごとに異なることを想定していた。具体的には、低次味覚領域においては単一味覚応答神経が多く、

高次味覚領域では複数の味覚に反応する神経の数が多
い可能性について検討した。しかし、結果としてはそれぞ
れの味覚関連脳領域における単一味覚応答神経と複数
味覚応答神経の割合に大きな違いは無かった。このこ
とは、いわゆる低次味覚領域において既にある程度の味
覚統合が起こっている可能性が考えられる。今後は、低
次味覚領域において既に統合されている味覚情報がど
のように伝達され、動物が感じる「おいしさ」に影響を与
えているのか検討することが必要である。

また、各脳領域における単一味覚応答神経と複数味覚
応答神経がどのような違いによって特徴づけられるのか
検討することも重要である。具体的には、発現遺伝子の違
いや、神経連絡(入力・出力)の違いに着目して研究を進
める必要があると考えられる。

6. 文献

1. Reijmers et al., Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science* 317(5842):1230-3. (2007).
2. Chan et al., Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci.* 20(8): 1172–1179. (2017).
3. Roussin et al., Taste Coding in the Nucleus of the Solitary Tract of the Awake, Freely Licking Rat. *J Neurosci.* 32(31): 10494–10506. (2012).
4. Jarvie et al., *Satb2* neurons in the parabrachial nucleus mediate taste perception. *Nat Commun.* 12(1):224. (2021).
5. Pritchard et al., Gustatory neural responses in the medial orbitofrontal cortex of the old world monkey. *J Neurosci.* 25(26):6047-56. (2005)

Brain-Wide Neural Circuit Controlling Synergistic Effect between Salt and Umami in Mice

Takaaki Ozawa

Institute for protein research, Osaka University

Summary

Salt is not only an essential ingredient for maintaining our health, but its “salty” effect on food is one of the most basic and important elements in the human diet. Interestingly, umami, another taste component, has the effect of enhancing the salty taste of food, and this effect has been attracting attention as a means of achieving “salt reduction without sacrificing tastiness. However, this synergistic effect of salty and umami tastes is mainly based on sensory evaluation in humans, and lacks neurophysiological evidence. We have previously demonstrated the existence of a salty-umami synergy in animal models, similar to that in humans, and the association of dopamine release to this synergy. On the other hand, the specific mechanism of how taste information, which is fundamentally separated on the tongue (taste cells) as the receptive organ of taste substances, is integrated in the brain remains unclear. In this study, we attempted to identify brain regions that play active roles in the synergism of salt and umami by analyzing the separation and overlap between “salt-responsive neurons” and “umami-responsive neurons” across multiple brain regions involved in taste by using neural activity labeling technology

By combining (1) a neural activity-dependent gene expression method using the promoter sequence of the neural activity marker gene *cfos* and (2) a gene expression manipulation method using the Tet-OFF system, we labeled “salt-responsive neurons” and “umami-responsive neurons” in the whole brain with fluorescent proteins with different colors. The number of each taste-responsive neuron in the nucleus tractus solitarius, parabrachial nucleus, posterior and anterior insular cortex, and orbitofrontal cortex, which are known as taste-related brain regions, was then quantified. The results showed that the proportion of neurons responding to both salty and umami tastes was approximately 10-20% in all brain areas. These results suggest that the integration of salty and umami information may be mediated by a distributed neural mechanism across multiple taste areas rather than by a specific brain region.