

味覚コーディング機構解明と その応用に向けた酸味情報伝達神経回路の可視化に関する研究

石丸 喜朗

東京大学大学院農学生命科学研究科 特任助教

緒 言

味刺激は、舌前部に散在する茸状乳頭、後部の有郭乳頭、後部側面の葉状乳頭や口蓋などに存在する味蕾という組織で受容される。舌後部の味蕾には舌咽神経(第IX脳神経)、舌前部と口蓋にはそれぞれ顔面神経(第VII脳神経)の分枝である鼓索神経と大錐体神経が投射し、さらに高次の延髄孤束核(NST)へ味覚情報を伝達している。マウスでは舌咽神経の細胞体は迷走神経節状神経節・舌咽神経下神経節(NPG)、顔面神経の細胞体は顔面神経膝神経節(GG)に存在する¹⁾。

近年、末梢の味蕾における味覚受容機構について解明が進み、電子顕微鏡観察に基づいてI~IV型に分類される味細胞のうち、甘・旨・苦味はそれぞれ一部のII型細胞、酸味はシナプス構造を持つIII型細胞で受容さ

れ、甘・旨・苦・酸・塩の5基本味が別々の味細胞で受容されることが示された^{1,2)}。一方、味細胞と味神経間の連絡については、各々の基本味が異なる味神経によって伝えられるか否かという味覚コーディング機構の問題をはじめ、未解明の点が多い。

味神経とさらに高次の神経細胞における味覚コーディング機構の解明を目的として、基本味ごとの味情報伝達神経回路の可視化が試みられている。現在までに甘味と旨味受容体に共通のサブユニットT1R3と苦味受容体T2R5の遺伝子発現制御領域それぞれの制御下に、経シナプストレーサー分子コムギ胚芽レクチン(WGA)を発現させたトランスジェニックマウス(それぞれT1R3-WGA、T2R5-WGAマウス)が作出され、T1R3-WGAマウスではNST、T2R5-WGAマウスではNPGとGGまで

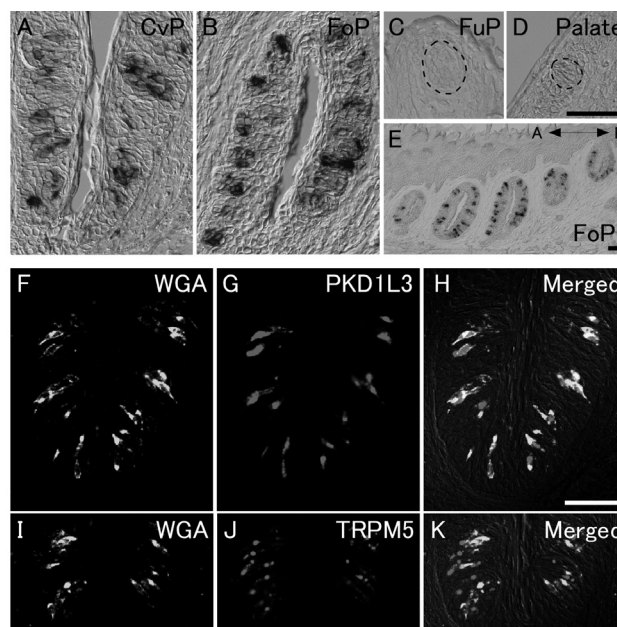


図1 PKD1L3-WGA マウス味蕾における WGA mRNA の発現解析

(A-E) WGA mRNA の発現を有郭乳頭(CvP)(A)、葉状乳頭(FoP)(B, E)、茸状乳頭(FuP)(C)、口蓋(Palate)(D)を用いて調べた。

WGA mRNA は PKD1L3 と同様に、有郭乳頭と葉状乳頭で発現し、茸状乳頭と口蓋では発現しなかった。

(F-K) 有郭乳頭における WGA と PKD1L3 (F-H)、WGA と TRPM5 (I-K) の二重 ISH を行ったところ、WGA 陽性細胞は PKD1L3 発現細胞と一致し(F-H)、TRPM5 発現細胞とは排他的であった(I-K)。スケールバー = 50 μm

(K.Yamamoto, et.al. : *J. Neurochem.* in press より転載)

WGA タンパク質の輸送が観察された^{3,4)}。本研究では、甘味、旨味と苦味に次いで、酸味受容細胞からの神経回路を可視化することを目的とした。

結 果

1. PKD1L3-WGA マウスの作出

酸味を伝達する味神経を可視化するために、酸味受容細胞特異的な WGA 発現を試みた。酸味受容体候補分子 PKD1L3/PKD2L1 は、酸味を受容する III 型細胞特異的に発現する⁵⁾。そこで、PKD1L3 遺伝子の 5' 上流約 10 kb を遺伝子発現制御領域と推定して WGA 発現プロモーターとして用い、その下流に WGA を連結させた Tg ベクターを作製し、マウス胚に導入した。その結果、3 系統の Tg マウスを確立し、2 系統で強い WGA の mRNA 発現が確認できた。

2. 味蕾における WGA の mRNA とタンパク質の分布

PKD1L3-WGA マウスでは、WGA の mRNA とタンパク質はいずれも、有郭・葉状乳頭の一部の味細胞に発現し、茸状乳頭や口蓋の味蕾では発現しないという PKD1L3 と同様の発現様式を示した(図 1、図 2)^{6,7)}。次に、WGA が発現する細胞種を特定するため、WGA と II 型

や III 型細胞マーカー分子の発現細胞を比較した。二重 *in situ* ハイブリダイゼーション法から、WGA の mRNA は PKD1L3 と同じ細胞で発現し、II 型細胞マーカー分子 TRPM5 とは排他的に発現することが分かった(図 1)。また、二重免疫染色を行ったところ、WGA タンパク質のシグナルは、III 型細胞マーカー分子 AADC 陽性細胞では検出されたが、II 型細胞マーカー分子 PLC- β 2 陽性細胞では検出されなかった(図 2)。

以上より、舌後部からの酸味情報伝達神経回路の可視化に使用できるマウスの作出に成功し、PKD1L3 遺伝子の 5' 上流約 10 kb が強い活性と高い特異性を持つプロモーター領域として機能することも明らかとなった。また、III 型細胞から II 型細胞への WGA タンパク質の輸送が起こらないことが示された。

3. 感覚性脳神経節における WGA 陽性細胞の分布と発現相関解析

味神経の細胞体が存在する GG と NPG において、輸送された WGA タンパク質を抗 WGA 抗体を用いた免疫染色法によって検出したところ、片側の NPG 全体で約 300 細胞(約 5%)、片側の GG 全体で約 10 細胞(約 1%) が WGA 陽性であった(図 3)。WGA 陽性細胞数の顕著

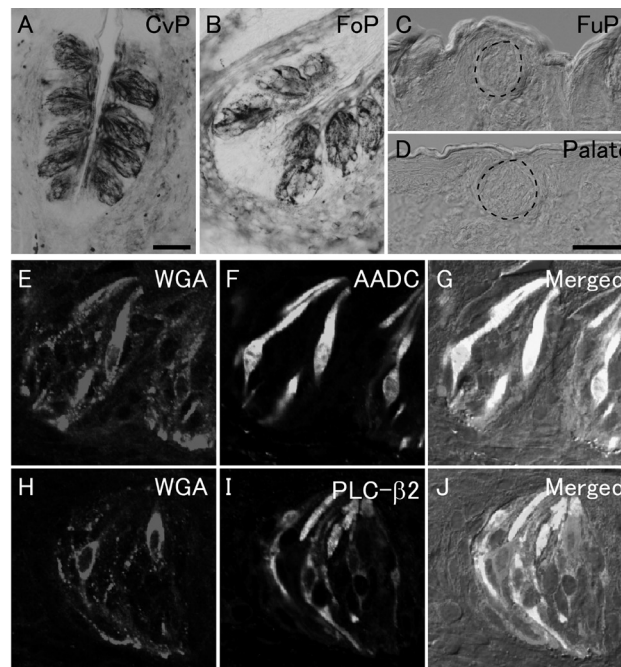


図 2 PKD1L3-WGA マウス味蕾における WGA タンパク質の発現解析

(A-D) WGA タンパク質の発現を有郭乳頭 (CvP) (A)、葉状乳頭 (FoP) (B, E)、茸状乳頭 (FuP) (C)、口蓋 (Palate) (D) を用いて調べた。WGA タンパク質は、有郭乳頭と葉状乳頭で発現し、茸状乳頭と口蓋では発現しなかった。

(E-J) 有郭乳頭における WGA と AADC (E-G)、WGA と PLC- β 2 (H-J) の二重免疫染色を行ったところ、WGA 陽性細胞は AADC 発現細胞と一致し (E-G)、PLC- β 2 発現細胞とは排他的であった (H-J)。スケールバー = 50 μ m

(K.Yamamoto, et.al. : *J. Neurochem.* in press より転載)

な違いは、舌咽神経は有郭乳頭と葉状乳頭に投射し、鼓索神経は主に茸状乳頭に投射することに起因すると考えられる。また、これまでラットで電気生理学的に証明されていた鼓索神経の葉状乳頭への投射⁸⁾を、初めて解剖学的に示すことができた。

WGA 陽性細胞が多く観察された NPG では、舌咽神経束の周囲に多くの WGA 陽性細胞が集まっていた (図 3)。NPG には迷走神経と舌咽神経の細胞体が集合し、解剖学的に分離できないとされているが、舌咽神経に含まれる酸味情報伝達神経の細胞体が局在することから、NPG の中でも舌咽神経と迷走神経の細胞体は、存在する位置が大きく分かれている可能性が示唆された。また、二重免疫染色法を用いて WGA 陽性細胞の遺伝子発現解析を行ったところ、WGA 陽性細胞は味神経での発現が示唆されている P2X2 と P2X3 を発現するが、体性感覚神経で発現する TRPV1 を発現していなかった (図 3)。

4. 脳神経核における WGA 陽性細胞の分布

末梢味細胞と連絡する味神経は延髄孤束核 (NST) に投射し、さらに高次の結合腕傍核 (PbN) へと味情報が伝達されることが知られている¹⁾。そこで、脳切片を用いて免疫染色法を行い、NPG や GG からこれらの神経核へ WGA が輸送されているかを検証した。

NST については、舌咽神経は吻側領域 (rNST) に投射すること⁹⁾や、rNST 冠状断面の中心背側 (RC 領域) に味神経が投射すること¹⁰⁾が示されている。PKD1L3-WGA マウスではこの RC 領域において、WGA タンパク質の強いシグナルが検出されたが、NST の吻側末端部では WGA が検出されなかった (図 4)。また、咽頭からの迷走神経が投射する rNST 内の尾側領域においては、WGA シグナルは観察されなかった (図 4)。さらに高次の PbN については、明確な WGA シグナルは検出できなかった (データは示さない)。

さらに、脳の尾側において、NST や PbN などの味覚伝達神経回路以外の WGA シグナルの位置を検証したところ、網様体 (RF) や三叉神経運動核 (V)、顔面神経核 (VII)、被蓋核 (DTN)、舌下神経核 (XII) でシグナルが見られた (データは示さない)。これらの位置で WGA mRNA は検出されなかったことから、輸送された WGA タンパク質が検出されたと考えられる。

考 察

本研究では、PKD1L3 陽性細胞に経シナプストレーサー WGA を発現するトランスジェニックマウス (PKD1L3-WGA マウス) を作出し、舌後方の III 型細胞を基点とした神経回路の可視化に成功した。

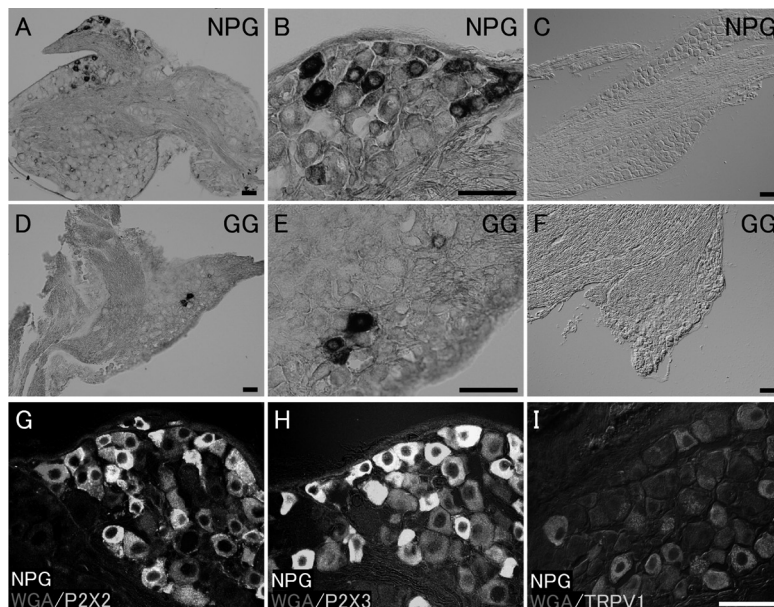


図 3 感覚性脳神経節における WGA タンパク質の検出

(A-F) NPG、GG における抗 WGA 抗体を用いた免疫染色 (A, D)。それぞれの拡大写真を B、E に示す。NPG では舌咽神経束の周囲に WGA 陽性細胞が多く観察された (A, B)。GG でも WGA シグナルが観察された (D, E)。NPG、GG における WGA プローブを用いた ISH (C, F)。WGA の mRNA 発現は見られなかった。

(G-I) NPG における WGA と P2X2、P2X3、TRPV1 との二重免疫染色、P2X2、P2X3 は舌咽神経束の周囲にも発現しており、WGA シグナルを内包した (G, H)。TRPV1 と WGA シグナルは排他的であった (I)。スケールバー = 50 μ m

(K.Yamamoto, et.al. : *J. Neurochem.* in press より転載)

まず、PKD1L3 遺伝子の開始コドン 5' 上流約 10 kb を用いて、有郭乳頭と葉状乳頭の PKD1L3 発現細胞特異的に WGA が発現することが示された。このことから、本研究で使用了領域が舌の PKD1L3 発現細胞における外来遺伝子発現に利用可能であるといえる。

次に、PKD1L3-WGA マウスの感覚性脳神経節において、味細胞から輸送された WGA タンパク質を検出し、NPG では WGA 陽性細胞が舌咽神経束の周囲に多く集まっていることが示され (図 3)、舌咽神経の細胞体が NPG の中で局在する可能性が示唆された。また、PKD1L3-WGA マウスの NPG の WGA 陽性細胞は、TRPV1 を発現しなかった (図 3)。TRPV1 は体性感覚神経に発現する分子で、熱やカプサイシン、さらに酸に反応する^{11,12)}。味覚としての酸味は TRPV1 を介して受容される体性感覚の酸とは、少なくとも末梢の神経節においては別の経路で伝達されていることが示された。さらに、GG でも WGA 陽性細胞が検出された (図 3)。GG には舌の前方 3 分の 2 の味覚を支配する鼓索神経の細胞体が存在する。葉状乳頭への味刺激によって鼓索神経の応答が見られるという結果から、電気生理学的に示唆されていた鼓索神経の葉状乳頭への投射⁸⁾を、解剖学的

にも示すことができた。

さらに高次の NST においては、強い WGA シグナルが観察された。まず、前後軸方向については、NST 吻側の 800 μm の範囲で、シグナルが検出された (図 4)。NST における味神経の投射領域は、吻側から鼓索神経、大錐体神経、舌咽神経の順にそれぞれが重複するように並んでいる⁹⁾。冠状断面では、rNST は吻側中央 (RC) と吻側外側 (RL)、内側 (M)、腹側 (V) 領域に分けられ、RC 領域に味神経が投射する¹⁰⁾。本研究で WGA が検出されたのは、NST の吻側 3 分の 1 ほどの RC 領域で、舌咽神経が投射する領域と一致し、鼓索神経が投射する NST の吻側末端部では WGA が検出されなかった (図 4)。一方、咽頭由来の迷走神経が投射する rNST 内の尾側領域では、PKD1L3-WGA マウスでは WGA シグナルが検出されず (図 4)、PKD1L3 が咽頭には発現しないことが示唆された。

また、NST からの投射を受ける PbN では、WGA シグナルが検出できなかった。WGA タンパク質は近接した細胞間を受動的に輸送されるため、その量は細胞間の移動を経るにしたがって次第に減少する。本研究においては、マウスの嗅神経回路や小脳遠心性回路、T1R3-

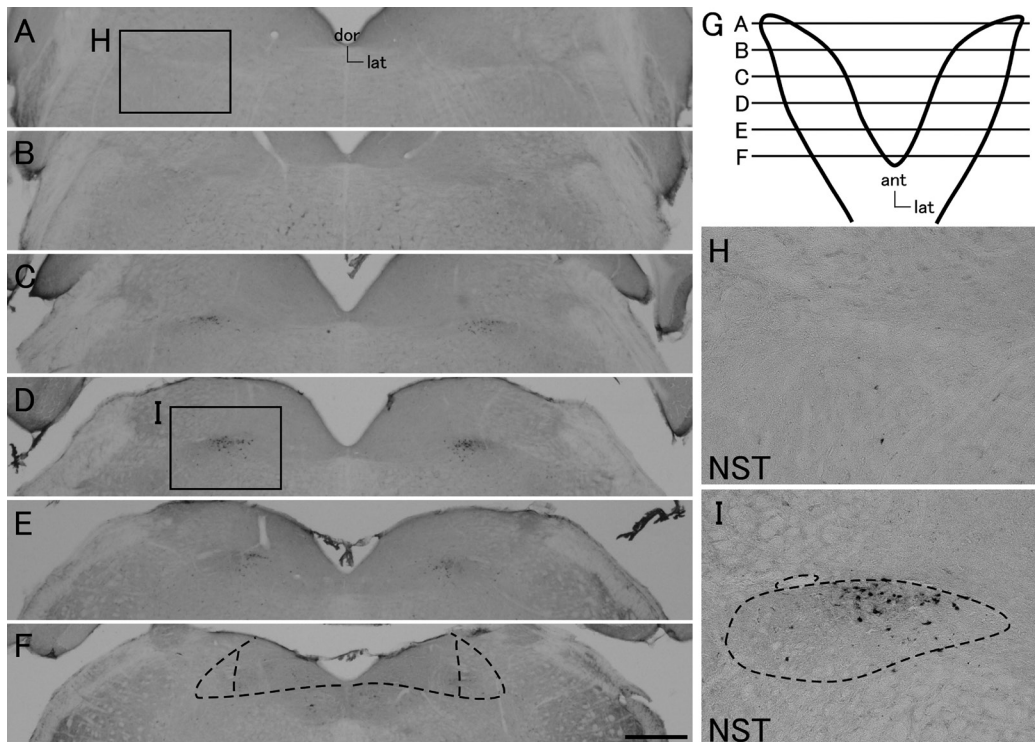


図4 NSTにおけるWGA陽性細胞の分布

(A-F) NST連続切片の抗WGA抗体を用いた免疫染色。WGAのシグナルはNSTの吻側800 μm の範囲(C-E)で観察された。スケールバー=500 μm

(G) マウスNST横断面の模式図。A-Fの切片の位置を直線で示す。(H, I) 黒線(A, D)の拡大図をそれぞれH, Iに示す。

(K.Yamamoto, et.al. : *J. Neurochem.* in press より転載)

WGA マウスの結果^{3,13)}と同様に、味神経回路が2段階先のNSTまで可視化された。

PKD1L3-WGA マウスの脳では、味細胞から大脳味覚野への味覚伝達神経回路以外の神経核においても、WGA シグナルが検出された(データは示さない)。網様体や三叉神経運動核、舌下神経運動核、顔面神経運動核のWGA タンパク質の由来として、PbNでWGA シグナルが検出されないことと、T1R3-WGA マウスでも網様体やこれらの運動核でシグナルが検出されたことから、1次味神経である舌咽神経や鼓索神経から直接網様体や運動核へとWGA が輸送された可能性を考えている。味覚の延髄反射経路についてはrNSTを起点にして検証されたものが多く、1次味神経から網様体や運動核への投射について検証したものは少ない。TGからは運動核へ直接投射することが報告されており^{14,15)}、NPGやGGでも運動核へ直接投射する経路がある可能性が考えられる。

要 約

本研究は、味覚コーディング機構解明の端緒として、酸味受容細胞と連絡する神経を特異的に可視化し、酸味伝達神経回路に関する知見を得ることを目的とした。酸味受容体候補分子であり、有郭・葉状乳頭に発現するPKD1L3の推定エンハンサー/プロモーター領域を用いて、PKD1L3陽性細胞特異的に経シナプストレーサー分子WGA(コムギ胚芽レクチン)を発現する遺伝子導入マウスを作成した。末梢神経節や神経核において、WGAシグナルの分布を詳細に解析したところ、有郭・葉状乳頭に投射する舌咽神経の細胞体が集まる迷走神経下神経節/舌咽神経節状神経節(NPG)と二次味神経の細胞体が存在する延髄孤束核(NST)で、強いシグナルが検出された。つまり、味細胞からNST味覚領域まで、舌後部

の酸味情報伝達神経回路を可視化することに成功した。今後、本研究で作出したPKD1L3-WGAマウスと、T1R3-WGAやT2R5-WGAマウス、さらにそれぞれを交配したマウス間で、各神経節や神経核でのWGA陽性細胞数を比較することによって、味覚コーディング機構解明に繋がりたいと考えている。

謝 辞

本研究を実施するに当たりご支援を頂きました公益財団法人三島海雲記念財団に厚く御礼を申し上げます。

参 考 文 献

- 1) D. A. Yarmolinsky, et al.: *Cell*, **139**, 234-244, 2009.
- 2) Y. Ishimaru: *Odontology*, **97**, 1-7, 2009.
- 3) M. Ohmoto, et al.: *Mol. Cell. Neurosci.*, **38**, 505-517, 2008.
- 4) M. Ohmoto, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **400**, 734-738, 2010.
- 5) S. Kataoka et al.: *Chem. Senses*, **33**, 243-254, 2008.
- 6) A. L. Huang et al.: *Nature*, **442**, 934-938, 2006.
- 7) Y. Ishimaru, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12569-12574, 2006.
- 8) T. Yamamoto and Y. Kawamura: *Brain Res.*, **94**, 447-463, 1975.
- 9) R. B. Hamilton and R. Norgren: *J. Comp. Neurol.*, **222**, 560-577, 1984.
- 10) M. C. Whitehead: *J. Comp. Neurol.*, **276**, 547-572, 1988.
- 11) M. J. Caterina, et al.: *Nature*, **389**, 816-824, 1997.
- 12) M. Tominaga, et al.: *Neuron*, **21**, 531-543, 1998.
- 13) Y. Yoshihara, et al.: *Neuron*, **22**, 33-41, 1999.
- 14) D. Menetrey and A. I. Basbaum: *J. Comp. Neurol.*, **255**, 439-450, 1987.
- 15) C. F. Marfurt and D. M. Rajchert: *J. Comp. Neurol.*, **303**, 489-511, 1991.