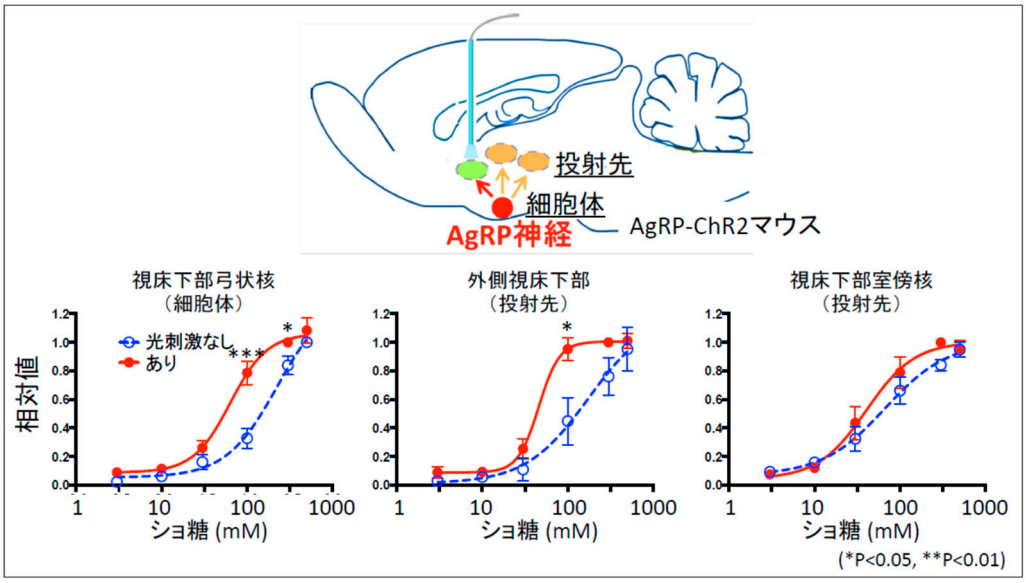
160　視床下部による生理状態依存的な味覚調節機構の解明	中島　健一朗

【目的】食物は栄養と感覚（味覚・嗅覚など）の両方の性質を併せ持つ。しかし、これらを統合してはじめて成立する課題―栄養・生理状態の変化によって味覚や食の嗜好性が変動する原因―は未だ不明な点が多い。この課題を解決するため、本研究では空腹になると甘味に敏感になるというショウジョウバエからヒトにいたるまで観察される現象に注目した。脳内で摂食調節を司る視床下部の活動を光遺伝学などの分子ツールにより制御し、いわば脳内に人工的に空腹や満腹を再現することで、中枢神経系がどのような神経ネットワークを利用して栄養状態依存的に味覚を調節するのか解明を試みた。

【方法】視床下部に存在し様々な部位とネットワークを構築して、摂食を誘導するアグーチ関連ペプチド産生神経（AgRP 神経）は空腹時に脳内で最初に活動する神経である。そこで、この神経の活動を光遺伝学により操作するため、光応答性のイオンチャネルであるチャネルロドプシン 2（ChR2）をコードする組換えアデノ随伴ウイルスを AgRP 神経特異的に Cre を発現する遺伝子改変マウスに導入した。このマウス（図中、AgRP-ChR2 マウス）の AgRP 神経を光刺激により活性化した場合に味覚嗜好性がどのように変化するのかを brief access taste test（味溶液を 10 秒間に舐める回数を計測し、味覚嗜好性を評価する方法）により測定した。また、AgRP 神経の複数ある投射先のうち、どの部位が味覚の調節に関わるのかを AgRP 神経の軸索末端にある ChR2 を光刺激することで検証した。

【結果】まず、1 絶食したマウスの味覚嗜好性を評価したところ、甘味など好ましい味に対する嗜好性が高まるのに対し、苦味など忌避性の味に対する嗜好性が低下することが判明した。そこで、通常状態のマウスにおいて AgRP 神経を光刺激により人工的に活性化させた場合の嗜好性を評価したところ、興味深いことに、生理的な空腹状態と同様の嗜好性の変化が観察された。そこで、AgRP 神経の投射先を 1 ヶ所ずつ光刺激したところ、特に外側視床下部に投射する AgRP 神経が味覚の調節を担うことが明らかになった。また、詳細な解析を行ったところ、外側視床下部にある興奮性神経の活動レベルによって味覚嗜好性が調節されることがわかった。

光遺伝学を用いた視床下部を起点とした味覚調節神経回路の探索



160. 視床下部による生理状態依存的な味覚調節機構の解明

中島　健一朗

自然科学研究機構 生理学研究所 生殖・内分泌系発達機構研究部門

Key words：味覚，視床下部，光遺伝学，食欲

緒　言

食物は糖・タンパク質・脂質などの栄養素でもあるが、味や匂いなどの感覚成分でもある。ヒトを含め動物は、これらを感知し、その価値を評価することで、自身の状態や環境に応じて最適な食行動をとると考えられている。また、このシステムの破綻が過食や拒食といった健康に大きな影響を及ぼす状態を引きおこす。

この一連のプロセスのうち、特に味覚は食物の価値の判断基準を決定づける。糖質、アミノ酸、脂質などの成分は基本的に高栄養価であり好ましい味を呈し、多く摂取される。これに対し、腐敗物や毒物はしばしば強い酸味や苦味を呈し、有害であり忌避される。

一方、この基準は常に一定でないことが知られている。例えば、満腹・空腹といった生理状態の違いに応じて、味の感じ方や食物嗜好性・選択性が変化する。しかし、その原因は不明な点が多い。これは、これまで栄養と味覚の研究が別々になされることが多かったからでもある。

そこで、本研究ではマウスを用い、本能の中枢である視床下部内で摂食亢進を引きおこす神経として知られるアグーチ関連ペプチド産生神経（AgRP 神経［1〜3］）の活動を光遺伝学によりコントロールし、いわば人為的に空腹状態を脳内に再現することで、中枢性による空腹依存的な味覚の調節機構の解析を行った。また、AgRP 神経は脳内の様々な部位と神経ネットワークを構築［4］していることから、特に味覚の調節に関わる神経経路の探索を行った。

方　法

C57BL6/J マウス（B6 マウス）は日本クレア株式会社より購入した。また、AgRP-ires-Cre ノックインマウスは The Jackson Laboratory から購入したものを繁殖して使用した。Cre リコンビナーゼ依存的にチャネルロドプシンを発現できるアデノ随伴ウイルス（AAV-FLEX-ChR2-tdTomato）は The Penn Vector Core（University of Pennsylvania）より購入したものを使用した。また、光ファイバーは Thorlabs から購入したものを適宜、標的部位の深さに合わせて切断して使用した。味覚感受性は brief access taste test と呼ばれる方法［5］を用い、様々な濃度の味溶液を 10 秒間になめる回数（リック数）を定量することで評価した（図 1 左）。味溶液としてはショ糖（甘味）とデナトニウム（苦味）を用いた。使用したマウスは味溶液へのアクセス方法を 3〜4 日間（1 日当たり 30 分）トレーニングして学習させた後に brief access taste test を実施した。明期に 3〜4 時間の軽い絶水を行ったのち実験を行った。苦味溶液を用いる場合は、マウスの溶液摂取欲求を高めるため、高濃度（500 mM）のショ糖溶液との混合液を実験に使用した。

結果および考察

1. 空腹は味覚嗜好性に変化を及ぼす

空腹が味覚感受性に及ぼす影響を検証するため、通常状態と 1 晩絶食後の両方の条件において B6 マウスを用いて Brief access taste test を実施した。その結果、甘味については、空腹状態のマウスでは中間濃度の甘味溶液の嗜好性が高まることが明らかになった。一方、苦味溶液の場合は通常時に比べて苦い溶液でもリック回数が多いままであることが明らかになった（図 1 右）。また、甘味による苦味のマスキング効果の影響を排除するため、1 晩絶水したマウスに苦味溶液を単独で与えたところ、その場合でも空腹時に苦味感受性が低下することを確認した（データは示さない）。以上より、空腹によって嗜好性の味と忌避性の味で逆方向に嗜好の調節がなされることが明らかになった。

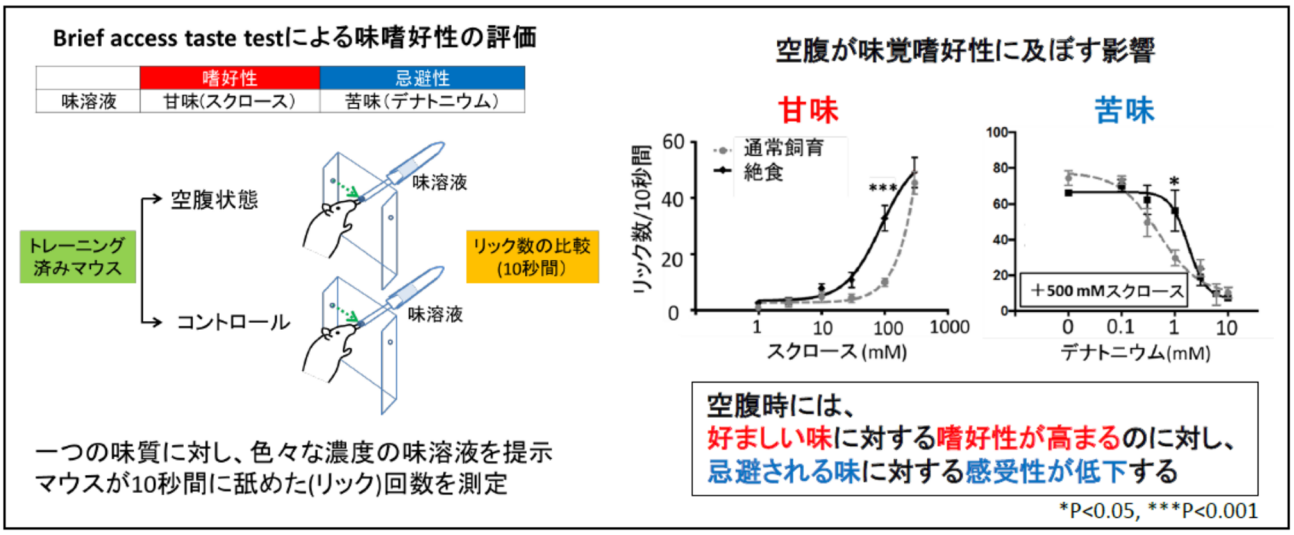


図 1. マウスにおける味覚嗜好性の評価方法

左）Brief access taste test による味覚嗜好性の評価方法。

右）空腹に伴う味覚嗜好性の変化

2. AgRP 神経の活性化は空腹のときと同様の味覚嗜好性の変化を引き起こす

視床下部弓状核に局在するアグーチ関連ペプチド産生神経（AgRP 神経）は、絶食時に脳内で最初に興奮し、脳の様々な部位に投射することで摂食亢進に必要な神経ネットワークの活動を引き起こす [4]。そこで、次に AgRP 神経を起点とした神経ネットワークの活性化が空腹に伴う味覚感受性の変化を引き起こすのかどうかを検証した。

このため、光応答性のイオンチャネルである ChR2 を Cre リコンビナーゼ依存的に発現する組換えアデノ随伴ウイルスを AgRP-ires-Cre ノックインマウスの視床下部に脳定位固定装置を用いて微量注入し、AgRP 神経特異的に ChR2 を発現するマウス（AgRP-ChR2 マウス）を作出した（図 2 左）。このマウスの AgRP 神経のすぐ真上に光ファイバーを挿入し、頭蓋骨に固定させた後、レーザー光源から光を照射することで AgRP 神経を活性化させた。その結果、光刺激を行うとマウスは摂食行動をとる様子が観察された（図 2 左下）

そこで、AgRP-ChR2 マウスにおいて光刺激により AgRP 神経を活性化しつつ、brief access taste test を実施したところ、図 2 右に示すように甘味・苦味に対する嗜好性が変化することが明らかになった。重要な事に、この変化は生理的に空腹な場合（図 1）で見られた変化パターンに良く似ていた。

このことから、空腹時には AgRP 神経を起点とした神経ネットワークが活性化することで味覚感受性が調節されることが明らかになった。

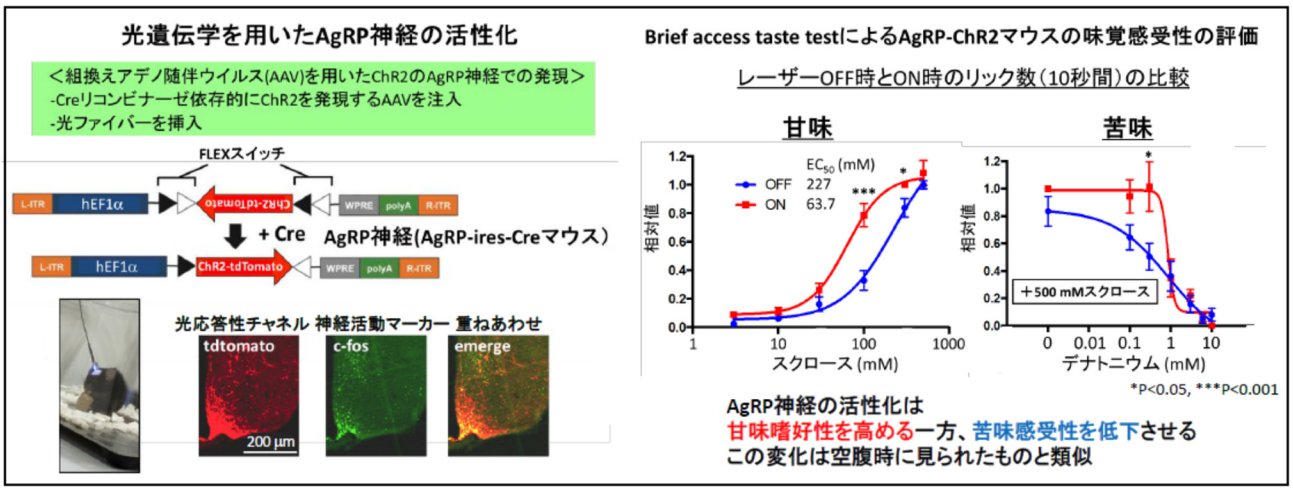


図 2.　AgRP 神経の活性化に伴う味覚嗜好性の変化

左) アデノ随伴ウイルス導入による光応答性チャネル ChR2 を AgRP 神経特異的に発現するマウス (AgRP-ChR2) の作出。

右) 光刺激と Brief access taste test の組み合わせによる味覚嗜好性の評価。

3. 外側視床下部に投射する AgRP 神経が空腹に伴う味覚の変化を引き起こす

AgRP 神経は複数の脳部位と神経ネットワークを構築し、摂食を調節する［4］ことから、どの投射経路が特に空腹に伴う味覚の調節に関わるのかを次に探索した。AgRP 神経の各投射先を 1 ヶ所ずつ光刺激したところ（図 3 にはその代表例を示す)、外側視床下部に投射する AgRP 神経が味覚の調節を担うことが明らかになった。興味深いことに、AgRP 神経の投射先として長年研究されてきている視床下部室傍核を光刺激しても味覚嗜好性の変化はほとんど観察されなかった。また、外側視床下部の神経には様々な種類が存在するが、AgRP との蛍光 2 重免疫染色を行った結果、特に興奮性神経の活動レベルの変化に応じて味覚嗜好性が調節されることがわかった。

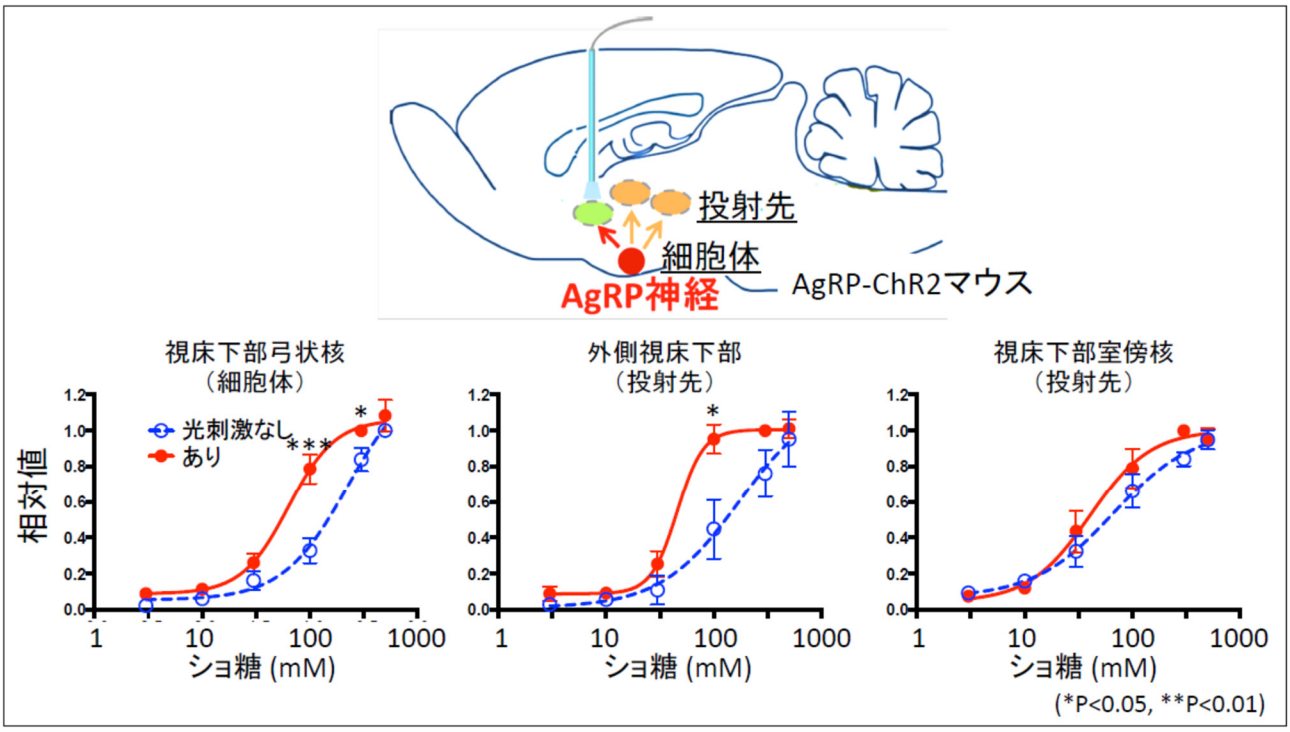


図 3.　AgRP 神経の投射先依存的な味覚の調節

AgRP 神経の細胞体全体を光刺激して活性化した場合に見られたのと同レベルの味覚嗜好性の変化が、外側視床下部に投射する AgRP 神経を選択的に活性化した際にも観察された。

本研究を通じて、空腹によって味覚嗜好性に変化が生じる原因は AgRP 神経による外側視床下部神経の活動制御であることが強く示唆された。進化的な視点から見て、空腹（または飢餓）時に甘味嗜好性が高まる理由は、栄養を積極的に摂取することを促すためと考えられる。また、忌避性の味の感度が低下する理由は、多少腐敗して味の悪くなった食物でも我慢して栄養を摂取するためと考えられる。

基礎医学的には AgRP 神経の活動は複数の糖尿病マウスモデルで恒常的に亢進していることが知られており［6］、本研究で見出した経路の活動と糖代謝疾患の関係の検証が今後の課題である。

文　献

1) Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. Nat Neurosci. 2011 Mar;14(3):351-5. doi: 10.1038/nn.2739. Epub 2010 Jan 5. PMID: 21209617
2) Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL, Lowell BB. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. J Clin Invest. 2011 Apr;121(4):1424-8. doi: 10.1172/JCI46229. PMID: 21364278
3) Nakajima K, Cui Z, Li C, Meister J, Cui Y, Fu O, Smith AS, Jain S, Lowell BB, Krashes MJ, Wess J. Gs-coupled GPCR signalling in AgRP neurons triggers sustained increase in food intake. Nat Commun. 2016 Jan 8;7:10268. doi: 10.1038/ncomms10268. Erratum in: Nat Commun. 2016;7:11019. PMID: 26743492
4) Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. Cell. 2013 Dec 5;155(6):1337-50. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.002. PMID: 24315102
5) Boughter JD Jr, St John SJ, Noel DT, Ndubuizu O, Smith DV. A brief-access test for bitter taste in mice. Chem Senses. 2002 Feb;27(2):133-42. PMID: 11839611
6) Xu J, Bartolome CL, Low CS, Yi X, Chien CH, Wang P, Kong D. Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases. Nature. 2018 Apr;556(7702):505-509. doi: 10.1038/s41586-018-0049-7. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29670283