

味覚と体性感覚の統合メカニズムに関する研究

池 永 隆 徳

鹿児島大学大学院理工学研究科 助教

緒 言

動物が食物を味わう際に最も重要な感覚情報は、食物に含まれる化学物質の認識に関わる味覚である。しかしながら、最終的に味、あるいは美味しさの認識は、触覚や嗅覚、あるいは視覚といった他の感覚の情報を脳で統合されたものが知覚される。たとえば、食物の硬さ、柔らかさといった性質は食物の味わいにとって非常に重要な要素であり、その情報は触覚によって検出される。しかしながら、異なる感覚情報が、どのように脳内で処理され、統合されているのかに関しては不明な点が多い。

味覚は動物の口腔内において主に認識される。味覚を受容する感覚器は味蕾と呼ばれる構造であり、受容器細胞(味細胞)を含む紡錘型の細胞が数十個集合して構成されている。哺乳類の味蕾では、基底部には味細胞からの情報を伝達する神経線維が分布している。魚類は水圏で生息する脊椎動物であり、ナマズやコイなどの一部の魚類は、その餌の探索に他の感覚以上に味覚を利用しており、他の脊椎動物に比べて非常に鋭敏な味覚を有することが知られている。このため、脊椎動物における味覚情報処理の神経機構を研究するよいモデルであると考えられる。脊椎動物一般において、味覚情報を脳に送る神経は顔面神経、舌咽神経、迷走神経であり、味蕾はこれらの神経に支配されている。魚類において、例えばゴンズイの触鬚(ヒゲ)においては、味蕾の内部に分布する線維、味蕾のすぐ周囲に分布する線維、味蕾から離れた部位の上皮内に終わる線維の、3種類が存在することが知られている¹⁾。これらがどの神経由来であるかは過去にタラの胸鰭に分布する味蕾を材料とした研究が一例あるのみで²⁾、その詳細は不明である。味蕾に向かう神経は味覚神経であり、それ以外の線維は三叉神経であることが予測されるが、それを厳密に証明した例はない。これは、それぞれの神経のみを標識することが困難であることにも起因すると考えられる。この問題は、目的の神経特異的に蛍光タンパク質を発現するゼブラフィッ

シュを利用することで、より容易にアプローチすることができるようになると考えられる。当該研究の最終的な目標は、魚類、中でもゼブラフィッシュの味覚系をモデルとした、味覚と触覚情報の統合メカニズムの解明である。本実験ではその一環として、ゼブラフィッシュを用いて味蕾およびその周辺の神経が、顔面神経もしくは三叉神経のどちらによって構成されているのかを明らかにすることを目的とした。

実験方法

実験には、野生型のゼブラフィッシュおよび、三叉感覚神経でGFPを発現するトランスジェニック系統を用いた。これらのゼブラフィッシュに麻酔を施し、ピンセットで頭部を切断、単離し、4%パラホルムアルデヒド溶液中で一晩固定した。組織から触鬚を含む組織を単離し、免疫組織化学法に供した。一次抗体に味蕾のマーカーである抗カルレチニン抗体(rabbit polyclonal, Swant/mouse monoclonal, Swant)、神経線維のマーカーである抗アセチル化チューブリン抗体(mouse monoclonal, Sigma)、およびGFP抗体(rabbit polyclonal, Medical and Biological Laboratories)を用いた。二次抗体にはAlexa Fluor 568 Donkey anti-rabbit IgG (H+L) (Life technologies)、Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research)、Alexa Fluor 555 Donkey anti-mouse IgG (Life technologies)をAlexa Fluor 488 Donkey anti-mouse IgG (H+L) (Life technologies)を使用した。免疫組織化学法を施した組織から触鬚を単離し、共焦点レーザー顕微鏡(A1si-90i, Nikon)を用いて画像の取得を行った。

結 果

ゼブラフィッシュの吻部において、触鬚は短いものと長いものとが左右1本ずつ、計4本存在していた。各触鬚を拡大して観察したところ、色素胞の存在が確認され、これらは触鬚の尾側にほぼ一列に並んで配置してい

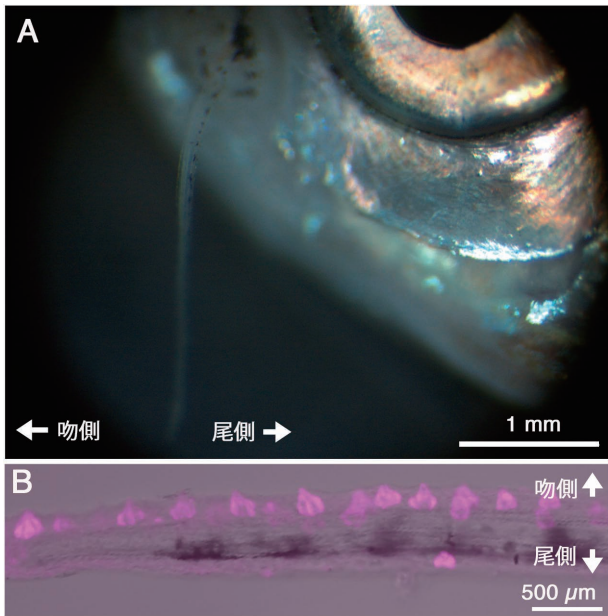


図1 ゼブラフィッシュの触鬚と味蕾の分布

A. 野性型ゼブラフィッシュの触鬚を明視野で観察した像。B. 抗カルレチニン抗体によって標識された触鬚を側面から観察した像。抗体によって標識された構造はマゼンタで示されている。図の上方が吻側で、下方が尾側にあたる。

た。このことから触鬚を頭部から切り離した場合であっても、吻側と尾側との区別が可能になった。次に、ゼブラフィッシュの成魚の触鬚を用いて抗カルレチニン抗体を用いた蛍光免疫組織化学法を行い、その構造を観察した。抗カルレチニン抗体はゼブラフィッシュにおいて味蕾の細胞を標識することが知られている³⁾。その結果、色素胞が分布している尾側とは反対側の吻側に多数の標識された味蕾が並んで分布していた。一方、色素胞の分布している尾側には少数の味蕾しか存在せず、吻側と尾側の中間部には味蕾が存在していなかった (図1)。また触鬚の先端にいくにつれて多くの味蕾が分布していた。

野生型の成魚の触鬚を用いて、神経線維のマーカーである抗アセチル化チューブリン抗体と抗カルレチニン抗体を用いた二重蛍光免疫組織化学法を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図2)。その結果、味蕾の基部にアセチル化チューブリン抗体によって強く標識された神経のクラスター状の構造が観察された。また、味蕾の先端付近と味蕾の外周部、さらに味蕾以外の上皮中に分布する神経の標識が観察された (図2C、D)。

三叉神経節の細胞にGFPを発現するトランスジェ

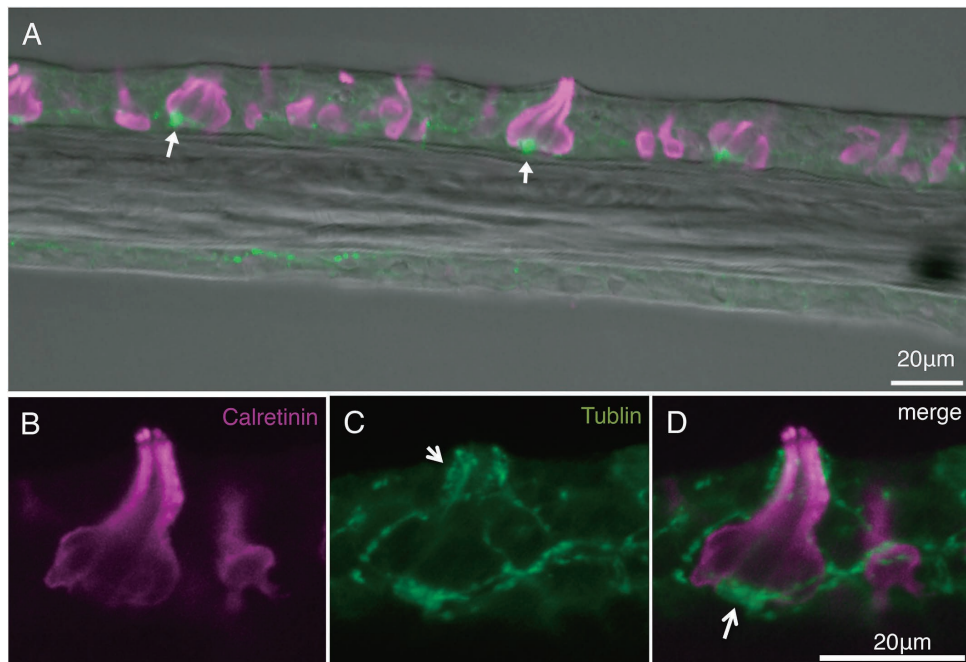


図2 ゼブラフィッシュ触鬚における味蕾と神経の分布

A. 抗カルレチニン抗体 (マゼンタ) と、抗アセチル化チューブリン抗体 (緑) を用いた免疫組織化学法によって標識された触鬚の写真。明視野との重ね合わせの像を示す。矢印は味蕾の基部に存在する神経のクラスターを示す。B. カルレチニン抗体によって標識された味蕾を高倍率で撮影した像。C. 同じ視野において抗アセチル化チューブリン抗体によって標識された神経線維。矢印は味蕾先端部の周囲に分布する神経を示す。D. BとCを重ね合わせた像。矢印は味蕾の基部の神経のクラスターを示す。

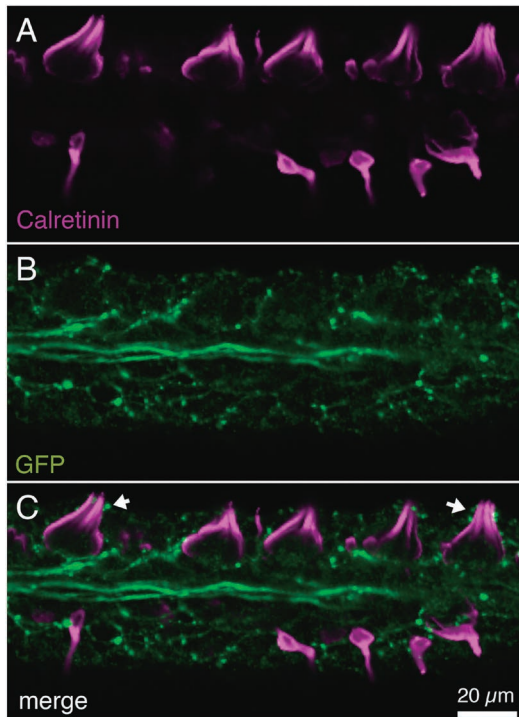


図3 ゼブラフィッシュ触鬚における味蕾と三叉神経の分布

A. カルレチニン抗体によって標識された触鬚を側面から撮影した像。B. 同じ視野において抗GFP抗体によって標識された神経線維。C. AとBを重ね合わせた像。矢印は味蕾の周囲に分布する構造を示す。

ニック系統の成魚の触鬚を用いて、抗カルレチニン抗体と抗GFP抗体を用いた二重蛍光免疫組織化学法を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った(図3)。その結果、味蕾の先端付近と味蕾の外周部、味蕾以外の上皮中に分布する神経の標識が観察された。図2で味蕾の基部に見られたような神経のクラスター状の標識は観察されなかった。

考 察

ゼブラフィッシュの成魚の触鬚において、色素胞が分布している尾側とは反対側の吻側により多くの味蕾が並んで配置しているのが観察された。また、色素胞の分布している尾側には、少数の味蕾が存在し、中間部には味蕾が存在していないのが観察された。これは、ナマズ目魚類であるゴンズイの触鬚での味蕾の配置と同様である¹⁾。このような味蕾の配置は、魚の進行方向側、すなわち餌、あるいはそれらから溶出する化学物質を検出しやすいようになっており、より効率的な摂餌行動に都合がよいと考えられる。

野生型の成魚の触鬚を用いた二重蛍光免疫組織化学

法を行った結果、味蕾の基部に強い神経の標識が確認された。同様の構造はゴンズイの触鬚の味蕾においても観察され¹⁾、これらは味蕾の内部に終末する神経であると考えられる。その他の神経は、味蕾の先端付近と味蕾の外縁に分布しているのが確認された。味蕾のない部分に分布している神経は、味蕾とは離れた部位に終末する神経であると考えられる。ゼブラフィッシュにおいて、味細胞とシナプスを作る神経が味蕾の内部や周囲に分布していることが、電子顕微鏡を用いた観察によって報告されている⁴⁾。同様の構造は、本実験において抗アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫組織化学法によっても標識された。これらの神経はゴンズイの例と同様に、触鬚の深部を走行する神経束から分岐したものだと思われるが¹⁾、今回の実験においては深部の神経束やそこからの分岐の様子を詳しく観察することができなかった。

トランスジェニック系統の触鬚を用いて、味蕾のマーカである抗カルレチニン抗体と抗GFP抗体を用いた二重蛍光免疫組織化学法を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。その結果、味蕾の基部に神経のクラスター構造は確認されなかった。このことから、触鬚に分布する神経が顔面神経と三叉神経の2種類であると予測されることを踏まえると、味蕾の内部に終末する神経は主に顔面神経によって構成されていると考えられる。味蕾の外縁にはGFPを発現する線維が分布しており、また、味蕾とは離れた部位に分布している線維も観察された。以上の結果より、ゼブラフィッシュの触鬚において、三叉神経は主に味蕾の周囲と味蕾以外の上皮中に終末していることが示唆された。今後、顔面神経特異的に蛍光タンパク質を発現する系統を用いて、顔面神経の神経支配様式を観察することを行っていく必要がある。

要 約

味覚と触覚情報の統合メカニズムの解明をめざし、ゼブラフィッシュの触鬚を用いて、味蕾の分布と神経支配のパターンを組織化学的方法によって明らかにすることを試みた。その結果、触鬚において味蕾の基部に終末する神経、味蕾の外縁に沿って分布する神経、味蕾と離れた部位の上皮内に分布する神経の存在を明らかにした。これらのうち、味蕾の基部に終末するものは主に顔面神経由来で、それ以外の神経が三叉神経由来である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり助成金を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Y. Sakata, et al.: *Fish. Sci.*, **67**, 1136–1144, 2001.
- 2) K. Kotrschal, et al.: *J. Comp. Neurol.*, **331**, 407–417, 1993.
- 3) E. E. LeClair, J. Topczewski: *PLoS ONE*, **5**, e8737, 2010.
- 4) A. Hansen, et al.: *Dev. Dyn.*, **223**, 483–496, 2002.