

大脳皮質第一次味覚野における味覚情報処理機構の解明

豊田博紀

大阪大学大学院歯学研究科口腔生理学教室 准教授

緒言

大脳皮質第一次味覚野(島皮質)は、末梢からの味覚情報を受けるだけでなく脳に蓄積された味覚情報の想起に関与しているため、味覚の受容・認知において非常に重要な脳部位である。しかし、島皮質神経回路の機能的特性はいまだほとんど解明されておらず、どのような情報処理機構により味覚情報と他の感覚情報が統合され、味覚認知が賦活されるのかは不明である。島皮質第2/3層では、侵害受容性ニューロンが多く存在し、第5/6層では、味覚刺激、内臓感覚、温・冷覚、触覚に应答するニューロンが多く存在する^{1,2)}。いわゆる「味」とは、味覚そのものだけでなく、「歯ごたえ」や「舌触り」、「熱い・冷たい」といった感覚情報や香辛料等による“痛覚情報”が統合されることにより生じるため、第2/3層と第5/6層において処理される感覚情報の統合が、味覚認知のために重要であると考えられる。

膜電位測光法を用いた先行研究により、島皮質では機能的カラムが存在し、同一カラム内に存在する錐体細胞群の活動の同期化や脱同期化が、第2/3層と第5/6層間で強く起こることが明らかになっている³⁾。島皮質ではこのような神経回路な特性を有しているため、様々な感覚情報が、同一カラム内で速やかに処理されているものと考えられる。しかし、島皮質における錐体細胞群の活動の同期化や脱同期化を制御する分子基盤、つまり、味覚情報処理に関与する分子基盤に関しては不明な点が多い。

TRPV1 (transient receptor potential vanilloid receptor 1) はカプサイシンの受容体であり、熱刺激によって活性化されることが知られている⁴⁾。TRPV1受容体は末梢感覚神経に多く発現しているため、我々がカプサイシンを含むスパイスフードを味わう際、舌や口腔粘膜に存在するTRPV1受容体を介して、味覚や侵害受容感覚が発生しているものと考えられる。また、TRPV1受容体は中枢神経系においても発現しており、島皮質において強く発現している⁵⁾。しかしながら、島皮質に発

現しているTRPV1受容体がどのような役割を果たしているかは不明である。そこで本研究では、島皮質におけるTRPV1受容体の電気生理学的特徴および興奮伝播に及ぼす影響を検討することによって、味覚情報処理に果たす役割について考察した。

実験方法

1. 島皮質におけるTRPV1受容体の発現分布の検討

実験には、生後15~22日齢のWistar系ラットを使用した。麻酔下にてPBSで灌流後、脳を摘出した。大脳皮質を凍結用包埋材に包埋し、ドライアイス上で凍結した。クリオスタット(CM3050S)にて、島皮質を含む厚さ20 μ mの連続冠状断脳幹切片を作製し、フォイル付きスライドガラス上に貼付した。切片を30秒間風乾した後、70%エタノールで1分間固定し、RNase free蒸留水で洗浄後に0.05%トルイジンブルー溶液で染色を行った。その後、RNase free蒸留水で洗浄後に5分間風乾した。本実験では、このように固定、染色を行ったスライドガラスを用いて、レーザーマイクロダイセクションシステム(Leica)による細胞採取を行った。スライドガラスは、組織を貼り付けた面を下向きに顕微鏡ステージにセットした。光学顕微鏡画像をPCモニターで確認しながら細胞採取部位である島皮質第2/3層および第5層を同定し、マウス操作により切り抜く部位を選択した後、UVレーザーにて当該部位を切り取った。RNeasy Micro Kit(Qiagen)を用いて、採取したサンプルからtotal RNAを抽出した。抽出ステップの途中で、DNase I set(Qiagen)を用いてカラム上でゲノムDNAを除去した。抽出されたtotal RNAを鋳型として、Sensiscript(Qiagen)を用いて逆転写反応によりcDNAを合成した。逆転写反応は37度で60分間行い、その後93度で5分間行った。次に、合成したcDNAを鋳型とし、TRPV1に特異的なプライマー(Forward: GACATGCCACCCAGCAGG、Reverse: TCAATTCACACACCTCCC)を用いてPCR(熱変性; 93度、60秒間; アニーリング; 60度、

60秒間：伸長反応；72度、60秒間のステップを30サイクル）を行った。

2. 島皮質錐体細胞におけるカプサイシン投与に対する電流応答の解析

実験には生後13～16日齢のWistar系ラットを用いた。麻酔下で断頭後、直ちに脳を摘出し、95%酸素および5%二酸化炭素の混合ガスを飽和させたスクロースを含む氷冷人工脳脊髄液中に5分間浸漬した。脳ブロックから脳幹部を残してトリミングした後、2.5%アガロースゲルで包埋し、マイクロスライサー（Super Zero 1）を用いて島皮質を含む厚さ250 μm の冠状断脳幹スライス標本作製した。その後、室温の人工脳脊髄液中で1時間以上スライス標本を回復させた。人工脳脊髄液を持続的に灌流させた記録用チャンバーへ標本を移し、島皮質錐体細胞を赤外線微分干渉顕微鏡（BX51-W1）弱拡大視野（100倍）にて同定した。顕微鏡下（600倍）にて、島皮質第2/3層錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。電気信号は、パッチクランプ用増幅器（Axopatch 200B）にて増幅し、専用ソフトウェア（Axograph 4.5）を用いて解析した。人工脳脊髄液は、126 mM NaCl、10 mM D-glucose、26 mM NaHCO₃、2.0 (0.5) mM CaCl₂、1.0 mM MgCl₂の組成とした。パッチ電極内には、セシウムを主成分とする内液（140 mM CsCl、10 mM HEPES-Na、2 mM Mg-ATP、0.3 mM GTP-Na₃、10 mM EGTA）を充填した。パッチ電極の作製には、微小ガラス電極作製器（P97）を用いた。電流応答を記録する際、1 μM MTTX、100 μM Ni⁺、500 μM Cd²⁺を添加した。記録細胞から50～100 μm 離れた位置にパフ電極を設置し、気圧式微量注出装置（Picopump PV820）を用いてカプサイシンを5秒間投与した。その際、ランプパルス（-100～+50 mV）を与え、カプサイシン投与前後での電流応答を観察した。カプサイシン溶液は、人工脳脊髄液にカプサイシンを20 μM になるように溶解したものをpH 7.3に調整して使用した。検定にはANOVA（analysis of variance）を使用し、各検定の有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 光学的膜電位測定

膜電位感受性色素を用いた神経活動の光学的測定は、時間的・空間的解像度に優れ、多シナプス性の興奮伝播を計測することができるため、局所神経ネットワークの解析に適している。膜電位感受性色素（voltage-sensitive dye RH414）を含む人工脳脊髄液中にて、島皮質を含む

水平断脳スライス標本を1時間インキュベーションした。色素を負荷したスライス標本を正立型ノマルスキー微分干渉顕微鏡（BX51WI）下に設置した記録用チャンバーに移した。顕微鏡に装着した150 Wキセノンランプから発せられる励起光（533 \pm 3 nm）を、ダイクロイックミラーおよび10倍水浸対物レンズ（0.3NA）を介してスライス標本に投射した。発生した蛍光（716 \pm 4 nm）を80 \times 80ピクセルCCDカメラ（NeuroCCD-sm）でサンプリングレート1 kHzにて測定した。CCDカメラの光学的計測可能領域は1.6 \times 1.6 mmであり、1ピクセルあたり20 \times 20 μm となる。光学的信号の変化を専用システム（Opti Plex）で記録、処理した。刺激電極は、島皮質の不全顆粒皮質から無顆粒皮質移行部第IV層に刺入した。興奮伝播の時空間的パターンを解析するため、計測した光学的信号は空間的平均化を行い、信号強度に応じて擬似カラーを付与した。

結果および考察

1. 島皮質におけるTRPV1受容体の発現分布

温度受容に関わる分子であるTRP（Transient Receptor Potential）受容体には、6つのTRP受容体サブタイプ；TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8、TRPA1が知られている。これらの受容体は、主として一次感覚ニューロンの神経終末に発現すると考えられていたが、最近の知見により、中枢神経系のニューロンにも多く発現していることが明らかとなった⁵⁾。特に、大脳皮質においてもTRPV1受容体の発現が報告されているため⁵⁾、TRPV1受容体が味覚情報処理に重要な機能を担っている可能性が示唆される。そこで、生後15～22日齢のWistar系ラットを使用し、島皮質第2/3層および第5層におけるTRPV1 mRNAの発現分布を解析した。レーザーマイクロダイセクション（LMD）法により凍結組織切片から組織を採取し、RT-PCRにより解析した結果、島皮質第2/3層および第5/6層において、TRPV1受容体の発現を確認することができた。

2. 島皮質ニューロンにおけるカプサイシン応答電流

島皮質を含むスライス標本作製し、第2/3層および第5/6層に存在する錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。電圧固定下で保持電位を-60 mVとし、TRPV1チャンネルのアゴニストであるカプサイシン（20 μM ）を5秒間パフ投与したときの電流応答を記録した。その際、脱分極性のランプパルス（-100～+50

mV) を与えることにより、カプサイシン投与前後でのコンダクタンスを比較した。また、細胞外カルシウム濃度を0.5 mMまたは、2.0 mMにして電流応答を観察した。

細胞外カルシウム濃度が2.0 mMのときにおける第2/3層錐体細胞からの記録を図1Aに示す。カプサイシンの投与回数が増えるにつれ、カプサイシンにより生じる内向き電流が大きくなるとともに、ランプパルスにตอบสนองする電流応答が増加していた。これらの結果から、第2/3層錐体細胞に発現しているTRPV1受容体は、脱感作されにくい性質を持つことが明らかとなった。後根神経節や三叉神経節神経細胞に発現するTRPV1受容体は、脱感作する性質が知られているため、島皮質第2/3層錐体細胞に発現しているTRPV1受容体とは性質が異なる可能性が示唆された。平均化したコンダクタンスのグラフを図1Bに示す。細胞外カルシウム濃度が0.5 mM

のとき得られた結果が青線、2.0 mMのとき得られた結果が赤線で示されている。カプサイシンの投与回数が増えるにつれてコンダクタンスが増加しており、細胞外カルシウム濃度が2.0 mMのときの方が、0.5 mMのときよりも大きなコンダクタンス変化が認められた。

TRPV1チャネルの脱感作を促進させる酵素として、カルシウム/カルモジュリン-依存性ホスファターゼ(カルシニューリン)^{6,7)}やカルモジュリン^{8,9)}が知られている。その一方では、脱感作を抑制する酵素として、プロテインキナーゼA¹⁰⁾、プロテインキナーゼC¹¹⁾およびカルモジュリンキナーゼII⁷⁾が知られている。したがって、島皮質第2/3層錐体細胞に発現するTRPV1受容体と後根神経節や三叉神経節神経細胞に発現するTRPV1受容体では、これらの酵素活性が異なる可能性が示唆される。

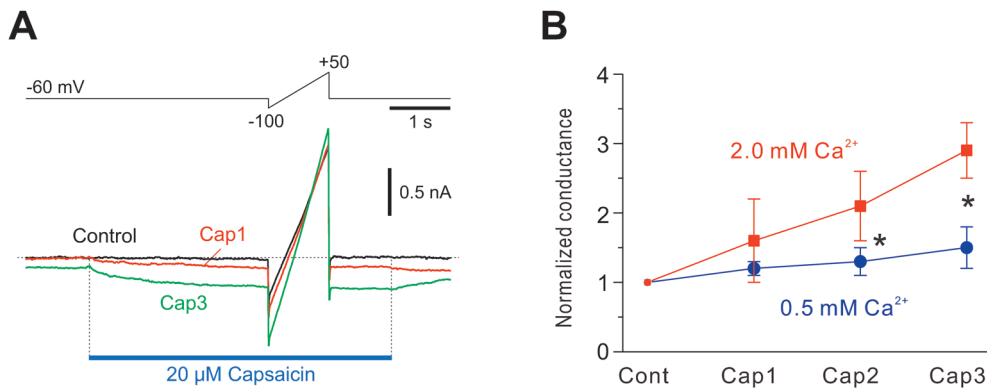


図1 カプサイシンパフ投与に対する味覚野第3層錐体細胞の電流応答

A. カプサイシンパフ投与に対する電流応答。B. ランプパルス投与時に生じた電流応答から算出されたコンダクタンス。コントロールに対して正規化した値を示す。

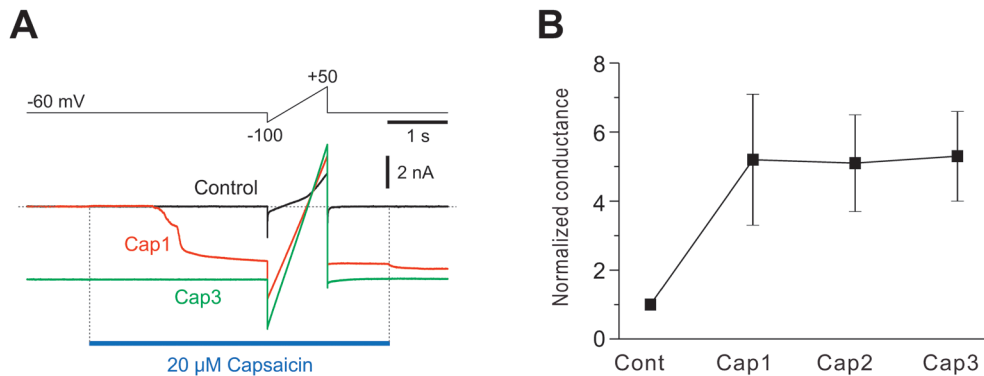


図2 カプサイシン応答電流に対するPKC活性化の効果

A. 10 μM PMA存在下における電流応答。B. 10 μM PMA存在下におけるコンダクタンス変化。コントロールに対して正規化した値を示す。

3. カプサイシン応答電流に対するPKC活性化の影響

カプサイシン応答電流は、PKCの活性化により増強することが知られている^{7,12,13})。また、カプサイシン応答電流の脱感作が、PKCの活性化により抑制されることが報告されている¹⁰)。そこで、PKC活性化薬であるPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 存在下で、第2/3層錐体細胞におけるカプサイシン応答電流を記録した。PMA存在下において、細胞外カルシウム濃度が2.0 mMのときに得られた結果を示す(図2A)。一回目のカプサイシン投与により大きな内向き電流が観察された。カプサイシン投与オフセット後も、内向き電流が観察され、基線レベルには回復しなかった。そのため、二回目および三回目のカプサイシン投与では、ランプパルスに対する応答電流は、一回目とほとんど変化していなかった。平均化したコンダクタンスのグラフを図2Bに示す。一回目のカプサイシン投与によりコンダクタンスが大きく増加していたが、二回目および三回目のカプサイシン投与では、コンダクタンスは、一回目とほとんど変化していなかった。これらの結果から、PKCの活性化により、TRPV1受容体の活性化が生じていることが明らかとなった。

4. 味覚野第4層刺激により誘発された興奮に対するカプサイシンの効果

これまで我々は、不全顆粒島皮質第4層に電気刺激を与えると、第4層に引き起こされた興奮が第2/3層および第5/6層の両方向に伝播し、カラム状の興奮を示すことを明らかにした³)。そこで、島皮質味覚野に発現しているTRPV1受容体の活性化により、島皮質に生じる興奮伝播様式がどのように変化するかを観察した。味覚野を含む島皮質水平断スライスの明視野像を図3Aに示す。不全顆粒島皮質第4層に刺激電極を設置した。カプサイシン非存在下で電気刺激を与えると、第4層で生じた興奮は第2/3層および第5/6層の両方向に伝播し、カラム状の興奮を示した(図3B)。一方、カプサイシン存在下で電気刺激を与えると、カラム状の興奮は消失せず、時間の経過とともに吻尾方向に広がり、味覚野全体に興奮が広がっていた(図3C)。これらの結果から、TRPV1受容体の活性化により、味覚情報処理が速やかに行われる可能性が示唆された。

これまで島皮質の神経回路を対象とした研究は非常に少なく、その分子メカニズムまで明らかにした研究はほとんどない。したがって、本研究は味覚野特異的な神経

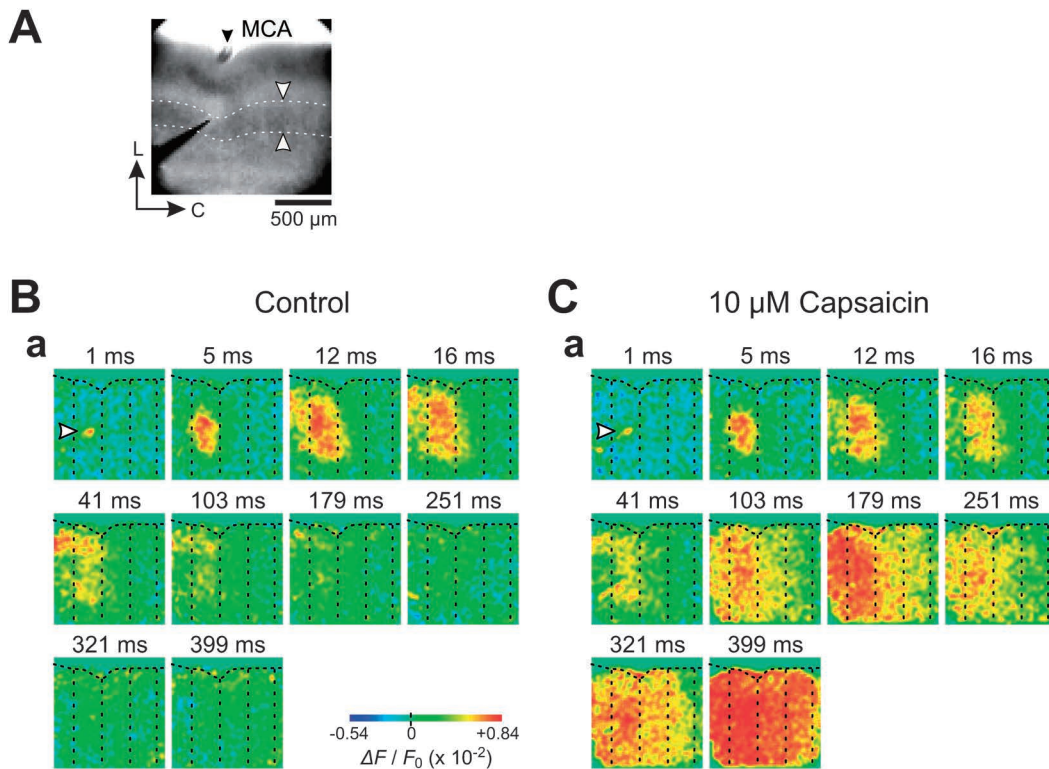


図3 カプサイシンにより味覚野第4層刺激により誘発された興奮が増強する

A. 味覚野の明視野像。刺激電極は中大脳動脈(MCA)吻側200 μ mに設置。白矢頭は味覚野と自律機能関連領野の境界を示している。B. カプサイシン非存在下(a)および存在下(b)における第4層微小電気刺激によって生じた興奮の疑似カラーイメージ。

機構がどのような分子メカニズムによって成立するのかという課題に足がかりを与える点において極めて重要であると考えられる。今後さらに、島皮質における TRPV1 チャンネルが味覚情報処理に果たす役割について検討を行う必要があると考えられる。

要 約

TRPV1 受容体は中枢神経系においても発現が認められ、島皮質において強く発現している。しかしながら、島皮質に発現している TRPV1 チャンネルの機能的役割に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、島皮質における TRPV1 受容体の電気生理学的特徴を解析し、また、興奮伝播に及ぼす影響を検討することによって、味覚情報処理に果たす役割について考察した。島皮質における TRPV1 受容体の発現分布を検討したところ、第 2/3 層および第 5 層において TRPV1 mRNA の発現が確認された。次に、第 2/3 層錐体細胞におけるカプサイシン応答電流を観察したところ、カプサイシンの投与回数が増えるにつれ、カプサイシンにより引き起こされる内向き電流が大きくなったことから、第 2/3 層錐体細胞に発現している TRPV1 受容体は、脱感作されにくい性質を持つことが明らかとなった。また、PMA 存在下では、第 2/3 層錐体細胞におけるカプサイシン応答電流が著し

く増大したことから、PKC の活性化により、TRPV1 受容体の活性化が生じていた。さらに、島皮質に生じる興奮伝播における TRPV1 受容体の役割を検討したところ、TRPV1 受容体の活性化により、興奮伝播増強が生じていた。これらの結果から、TRPV1 受容体の活性化により、味覚情報処理が速やかに行われる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御援助を賜っ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。

文 献

- 1) E. Kosar, et al.: *Brain Res.*, **379**, 329–341, 1986.
- 2) T. Yamamoto, et al.: *J. Neurophysiol.*, **51**, 616–635, 1984.
- 3) H. Sato, et al.: *J. Neurosci.*, **28**, 3076–3089, 2008.
- 4) M. Tominaga, et al.: *Pflugers Arch.*, **451**, 143–150, 2005.
- 5) A. Liapi, et al.: *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 825–834, 2005.
- 6) R. J. Docherty, et al.: *Pflugers Arch.*, **431**, 828–837, 1996.
- 7) J. Jung, et al.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 7048–7054, 2004.
- 8) M. Numazaki, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8002–8006, 2003.
- 9) T. Rosenbaum, et al.: *J. Gen. Physiol.*, **123**, 53–62, 2004.
- 10) D. P. Mohapatra, et al.: *J. Biol. Chem.*, **278**, 50080–50090, 2003.
- 11) S. Mandadi, et al.: *Cell Calcium*, **35**, 471–478, 2004.
- 12) V. Vellani, et al.: *J. Physiol.*, **534**, 813–825, 2001.
- 13) Y. Zhou, et al.: *Neuropharmacology*, **41**, 601–608, 2001.