

## うま味物質の味質変化に関与する識別経路の神経行動学的解析

宮崎 彩子<sup>1</sup>, 藤原 宏子<sup>2</sup>, 佐藤 亮平<sup>3</sup>, 宮本 武典<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>日本女子大・院理・物質生物機能科学

<sup>2</sup>日本女子大・理・物質生物科学

<sup>3</sup>北里大・医・生理学

(2006年12月21日受理)

**要 旨** グルタミン酸ナトリウム (MSG) とグルタミン酸カリウム (MPG) は、共にうま味物質とされている。塩化物である NaCl と KCl が全く異なる味質であるように、MSG と MPG も異なる味質を呈する。ところが、MPG にイノシン酸ナトリウム (IMP) を加えると、両者の味質は類似したものとなる。ヒトと類似したうま味感受性を持つ近交系マウス (C57BL/6) を用いた味覚嗜好テストにおいて、マウスは MPG よりも MSG と MPG + IMP を嗜好することが確認された。従って、マウスは MSG を MPG よりも好ましい味と識別していると考えられる。味覚嫌悪学習 (CTA) による行動学的方法においても、MSG と MPG, MSG と IMP 単独は識別するが MSG と MPG + IMP は識別せず、添加する IMP の濃度が高いほど CTA の獲得が高くなり、MPG + IMP の味質変化には濃度依存性があることがわかった。また、細胞活性のマーカーである即初期遺伝子の一つである *c-fos* 発現を指標にした免疫組織学的方法によって、味覚の二次中枢である結合腕傍核 (PBN) と一次中枢である弧束核 (NTS) における *c-fos* 発現分布を調べた。その結果、PBN では MSG と MPG とは垂直、水平、前後軸全てにおいて分布に差がみられたが、MPG + IMP は MSG 型の分布に変化した。特に、MSG と MPG + IMP は前方に、MPG は後方に発現していた。NTS では前後軸でのみ PBN と同じ傾向がみられた。以上のことから、①PBN でも NTS でも共通して好ましい味質は前方に、好ましくない味質は後方に *c-fos* の発現がみられる、②NTS では前後一次元分布だった *c-fos* 発現が PBN では三次元分布に複雑に展開する、③うま味物質による *c-fos* 発現パターンは IMP のような添加物による可変性を持つことが示唆された。

**キーワード**：相乗効果、グルタミン酸ナトリウム (MSG)、グルタミン酸カリウム (MPG)、イノシン酸ナトリウム (IMP)、味覚嗜好性、味覚嫌悪学習 (CTA)、結合腕傍核 (PBN)、弧束核 (NTS)

### はじめに

全ての味は塩味、甘味、苦味、酸味の四基本味の適当な組み合わせから成るとされている。しかしある特定の物質によって生じる味は、この四基本味とは異なり独特である。この独特の味を『うま味』と呼び、近年の研究から、うま味は第五の基本味であると考えられてきている。うま味を生じさせる物質はうま味物質と呼ばれ、グルタミン酸やイノシン酸、グアニル酸などである。酸のままであると酸味が伴うため、中和物のグルタミン酸ナトリウム、イノシン酸ナトリウムなどがより強いうま味を呈する。そのためうま味の研究に使われるうま味物質

は中和されたものを扱うことが多い。

うま味の研究はこれまでにイヌ<sup>1)</sup>、マウス<sup>2)</sup>、ラット<sup>3)</sup>などを用いて電気生理学的実験によりなされてきた。これらの実験に用いられたうま味物質はグルタミン酸ナトリウム (MSG)、グルタミン酸カリウム (MPG)、イノシン酸ナトリウム (IMP)、グアニル酸ナトリウム (GMP) などである。それらの研究から、①うま味の感受性には動物種差、系統差があること、②うま味物質同士を混合すると相乗効果があることが示されている。うま味の研究は数多くのうま味物質と動物種を扱って研究されているが、うま味物質の識別機構についてはまだ研究されていない。

今回はグルタミン酸に注目し、MSG と MPG のうま味識別に関与する伝導路の解析を目的とした。塩化物で

ある NaCl と KCl は全く異なる味質を呈する。同様に MSG と MPG も異なる味質である。ところが MPG に IMP または GMP を加えると、MSG に類似した味質に変化することがヒトの官能テストにより分かっている。また、ヒトと類似したうま味感受性を持つ近交系マウス C57BL/6 を用いた行動学的実験により、この系統のマウスは MSG と MPG は識別するが、MSG と MPG + 10 mM IMP は識別しないことがわかっている<sup>4)</sup>。さらに C57BL/6 において、MSG と MPG の脳内伝導路は異なるが MPG への 10 mM の IMP 添加によって、後述する結合腕傍核の *c-fos* 発現パターンが変化し、その伝導路に変化が生じることがわかっている<sup>4)</sup>。しかし、10 mM では IMP 自身味質を呈するのでこの味が MPG 中に含まれるカリウムの味をマスクしている可能性が考えられる。

そこで本研究では、まず二瓶法による味覚嗜好テストによって、ほとんど味質を呈さない低濃度の IMP を用い、マウスが MSG と MPG, MPG + IMP を嗜好によって識別しているかどうかを検証した後、IMP の味が MSG に類似していて MPG のカリウムの味をマスクしていないこと、つまり C57BL/6 が MSG と IMP を識別しているかどうか、味覚嗜好テストと同様の低濃度の IMP を用いても 10 mM IMP での結果と同様に相乗効果が見られるかどうかを味覚嫌悪学習を用いた行動学的実験と免疫組織学的実験によって検証した。更に IMP 添加による相乗効果の濃度依存性についても同様の行動実験によって検証した。

行動学的実験に用いた味覚嫌悪学習 (CTA) とは、新奇な味 (CS : Conditioned Stimuli) を与えた後に LiCl の腹腔内投与などにより内臓に不快感を生じる (US : Unconditioned Stimuli) と以後その味を危険なものとして判断し、嫌うようになる学習のことで、一度ある味質に対して CTA を獲得すると、同様な味質を呈する物質を嫌

悪するようになる (汎化)。この現象を利用すると、動物の味質識別能を検証できる。ここでは 0.1 M MSG と 0.1 M MPG に様々な濃度の IMP (0 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 10 mM, 1 mM) を添加した味液、また 10 mM IMP 単独の味液を識別しているかどうかを検証した。

免疫組織学的実験では細胞活性のマーカーで即初期遺伝子の一つの *c-fos* 発現を指標に検証した。*c-fos* は細胞性原がん遺伝子の一つで、ニューロンが興奮し、脱分極性のカルシウム流入が生じると急速に誘導され、核内タンパク質としての Fos タンパク質の産生をみる。従って味刺激後の Fos タンパク質を検出することによって、味応答性の脳細胞を捉えることができ、機能的マッピングが可能である。上位脳幹部の味覚の二次中枢である結合腕傍核 (PBN) は、異なる味質ごとに独特の *c-fos* 発現パターンがあることが知られている<sup>5)</sup>。ここでは PBN と味覚の一次中枢である弧束核 (NTS) における *c-fos* 発現パターンを MSG と MPG およびほとんど味質を呈さない濃度の 0.1 mM IMP<sup>6)</sup> を添加した MPG で比較した。

## 材料・方法

ラットはうま味と、塩味・甘味を区別できないことがわかっている。そこで行動実験および免疫組織学的実験にはヒトと似たうま味感受性を持つと言われている (後述図 5 および 6 参照) 近交系マウス (*Mus musculus* C57BL/6) のオス、8~10 週齢を用いた (図 1)。マウスは全て三協ラボサービスより購入し、購入後は温度 23 °C、湿度 70%、明期 7:00~19:00、暗期 19:00~7:00 の恒温室内で、各個体 1 ケージ (23.5 cm×16.5 cm×12.5 cm) につき 1 匹で飼育した。餌は固形飼料、飲料水には蒸留水を与え、実験には上記飼育環境に 24 時間以上慣らしたマウスを使った。

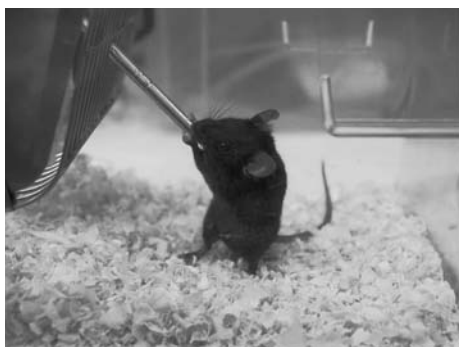


図 1 C57BL/6 と通常飼育環境

温度 23°C、湿度 70%、明期 7:00~19:00、暗期 19:00~7:00 の恒温室内で、各個体 1 ケージ (23.5 cm×16.5 cm×12.5 cm) につき 1 匹で飼育した。餌は固形飼料、飲料水には蒸留水を用いた。

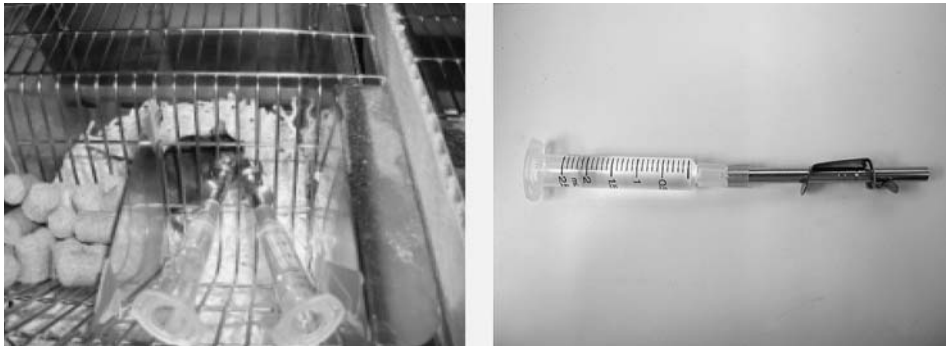


図2 二瓶法による味覚嗜好テスト

左右の位置の影響をなくするため、2分ごとに給水瓶の位置を交換しながら10分間の摂取量を測定した。

#### ヒトに対する味質識別テスト

本学理学部物質生物科学科三年次の生徒（女性、20～22歳）に0.1M MSG, 0.1M MPG および0.1M MPG+0.1mM IMPの味液を浸したろ紙（直径5mm）を舌の前方部に置き、各味質間の違いを5段階評価で回答してもらった。評価の数値が1に近づくほど異なる味であるとした。各味質テストの間には蒸留水で舌をリンスして1分間休んでもらい、前の味質が後の味質テストに影響しないようにした。また実験内容および主旨が被験者の回答に影響しないよう、ブラインドテストとして行った。

#### <行動実験>

##### 二瓶法による味覚嗜好テスト

二瓶法による味覚嗜好テストはトレーニングとテストの2つのステージに分けられる。

##### i. トレーニング（6日間）：4時間給水の条件への馴化。

ある一定の時刻（明期）に給水瓶を2本同時に提示し、10分間の蒸留水摂取量を測定した。測定にはシリンジ（2.5ml）と、特殊なノズルを用いた（図2）。残りの3時間50分は通常飼育時と同様の給水ビンを用いた。その後再び絶水条件下に戻した。24時間自由給餌とした。

##### ii. テスト：各味溶液の飲水量測定。

トレーニングの蒸留水提示時刻と同時刻に0.1M MSGと0.1M MPGの入った瓶を同時に提示し、どちらを好んで摂取するかを測定した。トレーニング、テスト共左右の位置の影響をなくするため、2分ごとに瓶の位置を交換しながら測定した。テスト日に0.1M MSGと0.1M MPG+0.1mM IMPを提示する群も同様にして行った。どの群もテスト日の総摂取量に対する各味液摂取量の割合を算出して嗜好の指標とした。

テスト日における各味液の摂取量を平均±標準誤差で示した。各味液間の摂取量に差があるかどうか検証するために $t$ 検定を行った。 $p$ 値が0.05以下の値を示した際に有意差があるとした。

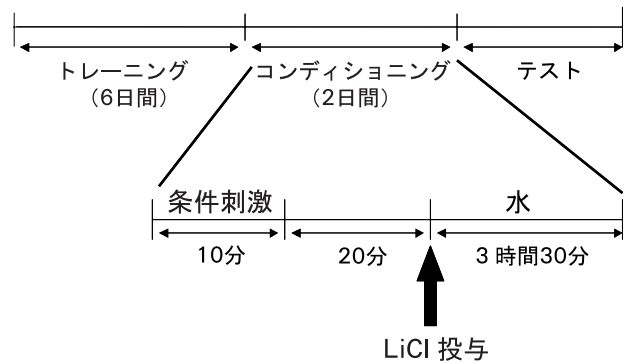


図3 CTA プロトコール

##### 味覚嫌悪学習（CTA）

CTAはトレーニング・コンディショニング・テストの3つのステージに分けられる（図3）。

##### i. トレーニング（6日間）

ある一定の時刻（明期）に蒸留水を与え、10分間の摂取量を測定した。呈示するシリンジが1本である以外は二瓶法のトレーニングと同様の手順である。

##### ii. コンディショニング（2日間：C1, C2）

トレーニングの蒸留水提示時刻と同時刻に0.1M MSGを与え、10分間の摂取量を測定した。20分後にLiCl（230mg/kg体重）を腹腔内注入した。

##### iii. テスト

CSに0.1M MSGを与えたマウスを与える味液の種類ごとの群にランダムに分け、トレーニングの蒸留水提示時刻と同時刻に各群それぞれに0.1M MSG, 0.1M MPGに様々な濃度のIMPを添加した味液（0mM, 0.01mM, 0.1mM, 1mM）, 10mM IMPを与え、10分間の摂取量を測定した。

C1の日のCS, MSG摂取量を平均±標準誤差で示した。それぞれの実験群のC1の日のMSG摂取量を条件付け前摂取量とし、これと二回の条件付け後のテスト日の摂取量との間で差があるかどうか検証するために $t$ 検

定を行った。 $p$  値が0.05以下の値を示した際に有意差があるとした。

#### <免疫組織学的実験>

##### ① 組織切片の作成

20時間絶水の条件下においたマウスに、味液 (0.1 mM IMP, 0.1 mM MPG+0.1 mM IMP) のうち1つを1時間呈示した。呈示終了後すぐに麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。

麻酔にはネンプタル注射液 (50 mg/ml ペントバルビタールナトリウム) を使った。これを10%エタノール+20%プロピレングリコール水溶液で10倍希釈し、

体重25 gあたり0.2 mlを腹腔内注入より麻酔後、脳血管灌流法によって脳を固定した。

固定液には0.1 M PBに溶かした4%パラホルムアルデヒド+0.9% NaClを用いた。また、灌流液は、血液凝固阻止剤であるヘパリンナトリウム注射液 (Novo Heparin, 1,000 units/ml, ノボ・ノルディスク A/S) を0.01 M PBS 100 mlにつき0.3 ml加えた。

灌流固定終了後、摘出した脳を灌流固定に用いた固定液に一晩浸し後固定を行った。さらに、0.1 M PBに溶かした30%ショ糖液に脳を移し、4°Cで48時間インキュベートした。

脳の腹側を下にして、O.C.Tコンパウンド (Tissue-

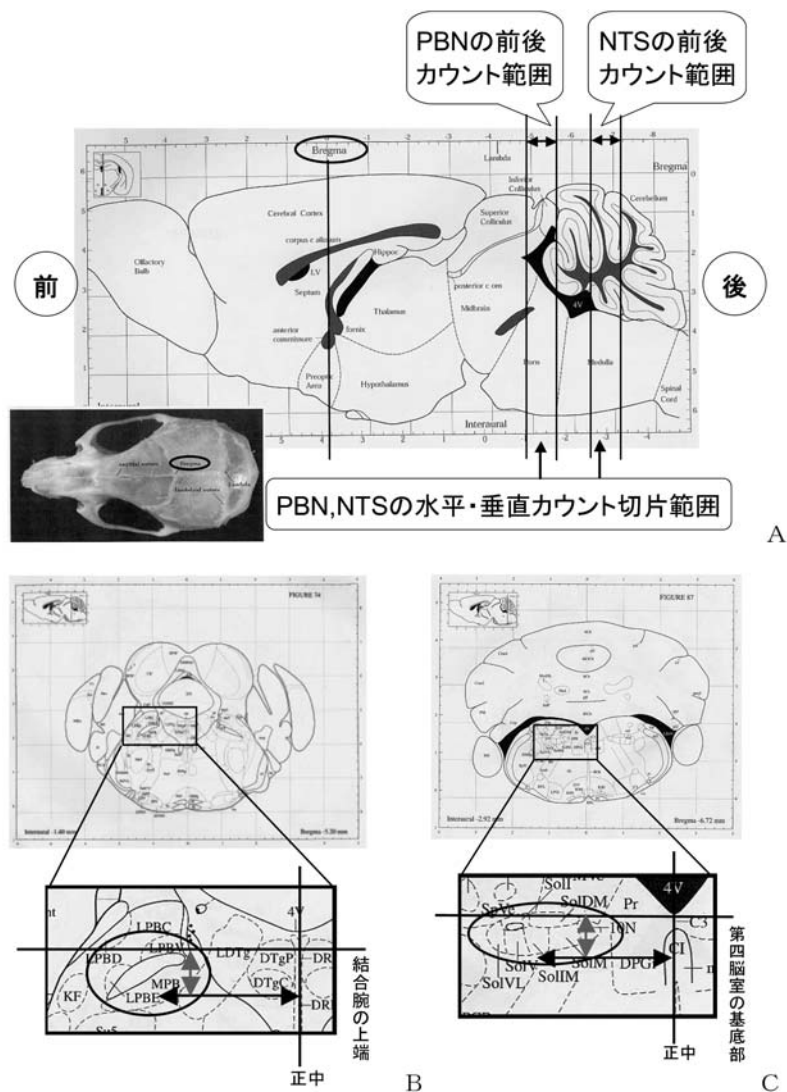


図4 マウス脳の模式図 (Paxinos & B.J. Franklin 2004より改変)

A: 脳の正中での矢状断面, B: PBN 横断面, C: NTS 横断面

Bregma から4.96 mm~5.68 mmを結合腕傍核 (PBN) 前後分布カウント範囲, 6.48 mm~7.2 mmを弧束核 (NTS) 前後分布カウント範囲とした5.2~5.34 mmの切片をPBNの水平・垂直分布カウント, 6.84~6.72 mmの切片をNTSの水平・垂直分布カウント切片とした。



Tek, Sakura Finetechnical Co.) に脳を包埋して凍結した脳から  $30\mu\text{m}$  の連続切片を作成し、マルチプレート中の  $0.01\text{ M}$  PBS に浸した。

## ② SAB 法による免疫染色

脳切片は SAB 法を用いて免疫染色を行った。一次抗体には  $0.01\text{ M}$  PBS で 15,000 倍希釈した c-Fos (K-25): sc-253, Lot# A0603, I201T (Santa Cruz Biotechnology) を使い、ヒストファイン SAB-PO (R) キット (ニチレイ) を用いて行った。また、発色にはジアミノベンチジン (DAB) を使い、ヒストファイン DAB 基質キット (ニチレイ) を使った。

## ③ Fos 陽性細胞の比較

図 4 は脳の模式図である<sup>7)</sup>。光学顕微鏡と CCD カメラで拡大し、Bregma を基準にしてここから  $4.96\text{ mm}$  ~  $5.68\text{ mm}$  を結合腕傍核 (PBN) 前後分布カウント範囲、 $6.48\text{ mm}$  ~  $7.2\text{ mm}$  を弧束核 (NTS) 前後分布カウント範囲とした (図 4 A)。また、 $5.2$  ~  $5.34\text{ mm}$  の切片を PBN の水平・垂直分布カウント、 $6.84$  ~  $6.72\text{ mm}$  の切片を NTS の水平・垂直分布カウント切片とした。PBN の水平分布は切片の正中からの距離  $0.8\text{ mm}$  ~  $1.8\text{ mm}$ 、垂直分布は結合腕の上端から  $0.56\text{ mm}$  の範囲に (図 4 B)、NTS の水平分布は切片の正中からの距離  $0.2\text{ mm}$  ~  $1.6\text{ mm}$ 、垂直分布は第 4 脳室の基底部を基準から  $-0.05\text{ mm}$  ~  $0.25\text{ mm}$  の範囲に (図 4 C) 観察される陽性細胞数をビデオマイクロメーター (微量計測用タブレットメジャーユニット VM-30, オリンパス社製) を用いてカウントした。

Fos 陽性細胞数のカウントによる陽性細胞分布の傾向に差があるかどうかを検証するために  $0.1\text{ M}$  MSG 群と  $0.1\text{ M}$  MPG 群、 $0.1\text{ M}$  MPG +  $0.1\text{ mM}$  IMP 群と  $0.1\text{ M}$  MPG 群でそれぞれ反復測定 of two-way ANOVA による検定を行った。 $p$  値が  $0.05$  以下の値を示した際に有意

差があるとした。また反復測定 of two-way ANOVA で有意差を示した際は、分布範囲ごとの陽性細胞数の割合に差があるかどうか Bonferroni/Dunn 検定を行った。 $p$  値が  $0.05$  以下の値を示した際に有意差があるとした。

## 結 果

### ヒトに対する味質識別テスト

$0.1\text{ M}$  MSG と  $0.1\text{ M}$  MPG 間では多くの被験者が両者は異なる味であると評価したが、 $0.1\text{ M}$  MSG と  $0.1\text{ M}$  MPG +  $0.1\text{ mM}$  IMP 間では両者が異なる味であると評価した被験者が有意に減少した (図 5)。つまり、MSG と MPG が異なる味であるという味質識別能が、MPG への IMP 添加によって有意に減少していると考えられる。

### <行動学的実験>

#### 二瓶法による味覚嗜好テスト

$0.1\text{ M}$  MSG と  $0.1\text{ M}$  MPG を同時に呈示した群では、マウスは  $0.1\text{ M}$  MSG を有意に摂取した (図 6 A)。しかし、 $0.1\text{ M}$  MSG と  $0.1\text{ M}$  MPG +  $0.1\text{ mM}$  IMP を同時に

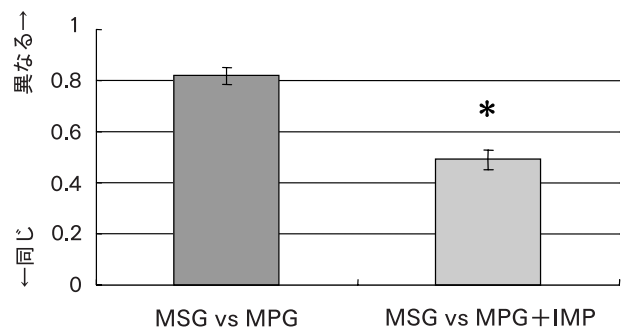


図 5 ヒトの MSG に対する味質識別テスト (\*: $p < 0.05$ )

MSG と MPG が異なる味であるという味質識別能が、MPG への IMP 添加によって有意に減少した。

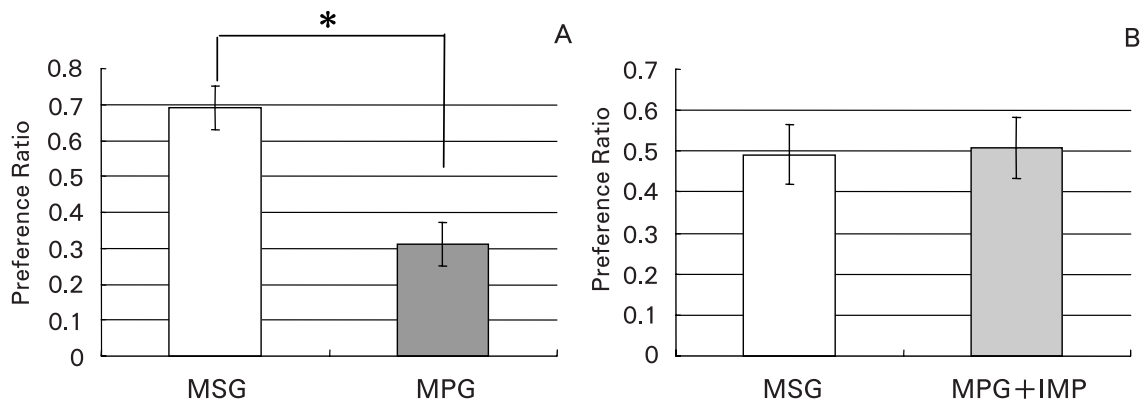


図 6 A~C 二瓶法によるうま味物質間の味覚嗜好テストの結果 (\*: $p < 0.05$ )

MSG と MPG 間の嗜好性が MPG への IMP 添加により変化した。

呈示した群では摂取量は同量程度で、この二つの味液の摂取量の間に有意差はみられなかった（図 6B）。つまりマウスは 0.1 M MSG を 0.1 M MPG よりも好ましい味として識別しているが、0.1 M MSG と 0.1 M MPG + 0.1 mM IMP 間では識別していないと考えられる。従って、マウスはヒトに近い味覚感受性を持つことがこのことからわかる。

#### 味覚嫌悪学習（CTA）

CS, すなわち C1 での MSG 摂取量に対するテスト日の 5 群（0.1 M MPG + 0 mM IMP (=0.1 M MPG) 投与群, 0.1 M MPG + 0.01 mM IMP 投与群, 0.1 M MPG + 0.1 mM IMP 投与群, 0.1 M MPG + 1 mM IMP 投与群, 0.1 M MPG + 10 mM IMP 投与群, そして 10 mM IMP 投与群）について摂取量を表した（図 7）。データには C2 で MSG 摂取量が C1 の 45% 以下になり、CTA の獲得が見られる個体を採用した。

CS と TEST の摂取量間で  $t$  検定を行った結果、0.1 M MPG + 0 mM IMP (=0.1 M MPG) 投与群と 0.1 M

MPG + 0.01 mM IMP 投与群では有意差が見られなかった。つまり、マウスは 0.1 M MPG を条件付けされた嫌な味（MSG の味）ではないと判断したと言え、0.1 M MPG への 0.01 mM IMP 添加でもその判断は変わらなかったと言える。一方、0.1 M MPG + 0.1 mM IMP 投与群と 0.1 M MPG + 1 mM IMP 投与群では有意差が見られた（共に  $p < 0.05$ ）。つまり、MPG への 0.1 mM IMP 添加および 1 mM IMP 添加ではマウスはこれらの味液を条件付けされた嫌な味（MSG の味）であると判断したと言える。

10 mM IMP 単独投与群では CS とテスト日との間に有意差が見られず、マウスは IMP を条件付けされた嫌な味（MSG の味）ではないと判断したと言える。

次に、0.1 M MPG に添加する IMP 濃度と相乗効果の関係を検討した。図 8 は、図 7 の結果を用いて作成したグラフである。条件前の MSG 摂取量に対するテスト日の摂取量の比を計算し、相乗効果の指標とした。この結果から、添加する IMP 濃度が高くなるほど相乗効果も高くなると結論された。

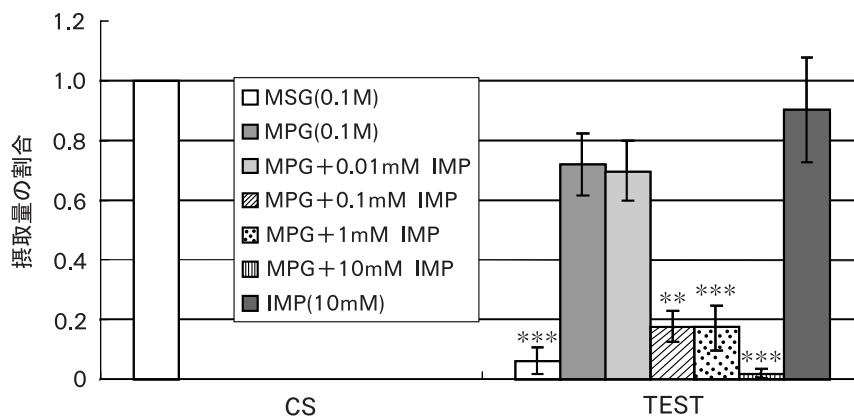


図 7 CTA の結果：条件付け前 MSG 摂取量（CS）に対するテスト日の摂取量（\*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ ）

マウスは MPG に 0.1 mM 以上の IMP を添加した味液を MSG の味と判断したが、MPG および IMP 単独の味液は MSG の味ではないと判断した。

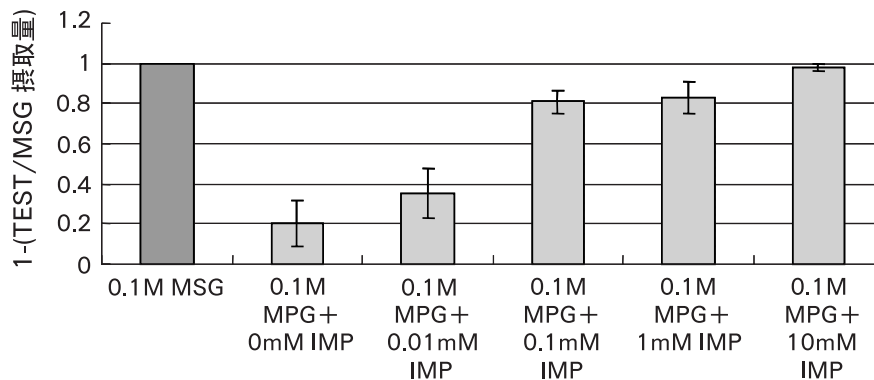


図 8 MPG に混合する IMP 濃度と相乗効果の関係

添加する IMP 濃度が高くなるほど相乗効果も高くなる。

### ＜免疫組織学的実験＞

図9は味覚の二次中枢である結合腕傍核（PBN）の模式図である。図中の黒い点は陽性細胞を示す。図10A～Cはそれぞれ0.1 M MSG, 0.1 M MPG, 0.1 M MPG + 0.1 mM IMP を飲ませたマウスの PBN における *c-fos* 発現のパターンである。図9の模式図の範囲を撮影したものである。

MSG は背側外側垂核の一部分に集中して陽性細胞が存在したのに対して、MPG では背側外側垂核から外部外側垂核にかけて広範囲に散在している。そして、0.1 M MPG + 0.1 mM IMP では MSG 同様背側外側垂核の一部分に集中している。

図11A～CはPBNにおける陽性細胞の分布を比較したものである。MPGは水平分布では正中から0.8～1.8 mm, 垂直分布では結合腕の上端から0～0.56 mmの範囲に広く陽性細胞が存在したが, 0.1 M MSG および0.1 M MPG + 0.1 mM IMP は水平分布では正中から1.2～1.6 mm, 垂直分布では結合腕の上端から0～0.2 mmの辺りに集中した。また, 0.1 M MPG と0.1 M MSG, 0.1 M MPG と0.1 M MPG + 0.1 mM IMP 間の分布の傾向を two-way ANOVA で検定した結果, 有意差が見られた (全て  $p < 0.05$ )。つまり0.1 M MPG と0.1 M MSG, 0.1 M

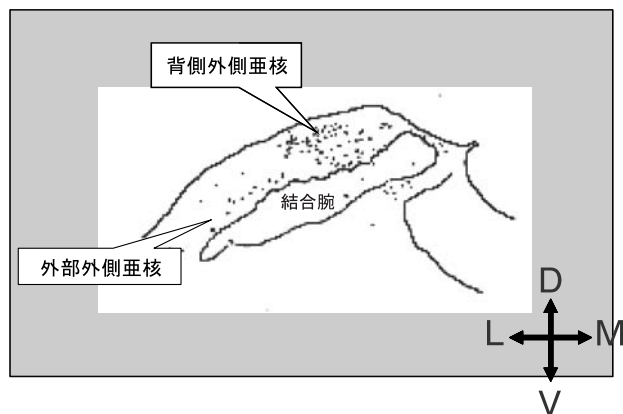


図9 結合腕傍核 (PBN)

MPG と0.1 M MPG + 0.1 mM IMP は異なる陽性細胞の分布を示したと言える。従って, MSG および MPG + IMP と MPG に関する情報は異なる経路を介して伝達され则认为られる。

さらに, 味覚の一次中枢である弧束核においても結合腕傍核同様の実験を行い, 各味質における *c-Fos* 陽性細胞の分布を測定したところ (図12A～C), 水平, 垂直分布においては差がみられなかった。しかし, 0.1 M MSG 投与群と0.1 M MPG + 0.1 mM IMP 投与群は前方に, 0.1 M MPG 投与群は後方に分布している傾向がみられた。従って, MSG および MPG + IMP に関する情報は弧束核で既に MPG とは異なる経路を介して伝達されていると认为られる。

### 考察・まとめ

二瓶法による味覚嗜好テストの結果より, マウスは0.1 M MSG と0.1 M MPG + 0.1 mM IMP を0.1 M MPG よりも好ましい味として識別しているが, 0.1 M MSG と0.1 M MPG + 0.1 mM IMP 間は識別していないと认为られる。従って, 0.1 M MPG の味質が0.1 mM IMP の添加によって0.1 M MSG に類似した味質に変化することが示唆された。

さらにCTAの結果より, マウスは0.1 M MSG と10 mM IMP を識別しているが, 0.1 M MSG と0.1 M MPG に0.1 mM 以上のIMPを添加したものとを識別していないと认为られる。従って, マウスにとって MPG + IMP がMSGと類似した味質になるということをIMPの味質がMSGの味質に類似していたということでは説明できない。また, 添加するIMP濃度が高くなるほどMPGの味質変化も顕著になるという結果が得られたが, その濃度依存性は, IMPと味質が類似しており<sup>8)</sup>, 味の強度も等価である<sup>6)</sup> GMPをMSGに添加した際の鼓索神経応答の増加の仕方と類似していた<sup>2)</sup>。本実験で, 0.01 mM IMP 添加では味質の変化が見られなかったが, このMSG + GMPに関する鼓索神経応答の実験においても0.01 mM

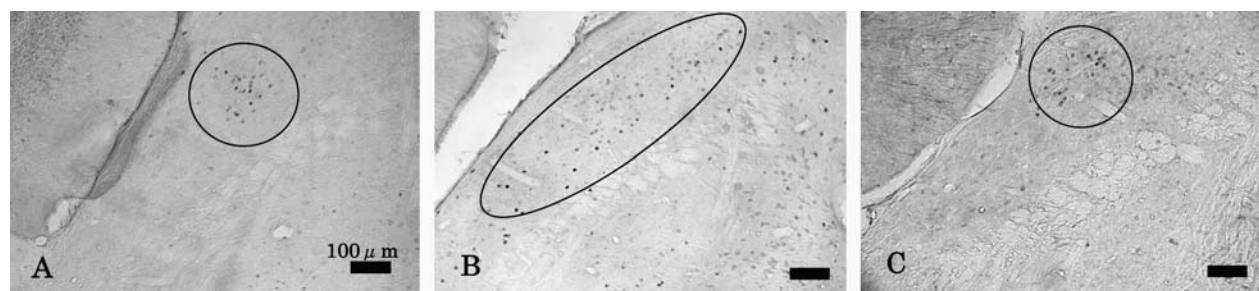


図10 各味液の結合腕傍核における *c-fos* 発現パターン

A : 0.1 M MSG, B : 0.1 M MPG, C : 0.1 M MPG + 0.1 mM IMP  
IMP の添加により広範囲に散在していた MPG のパターンが MSG 型に変化した。

うま味物質の味質変化に関する識別経路の神経行動学的解析

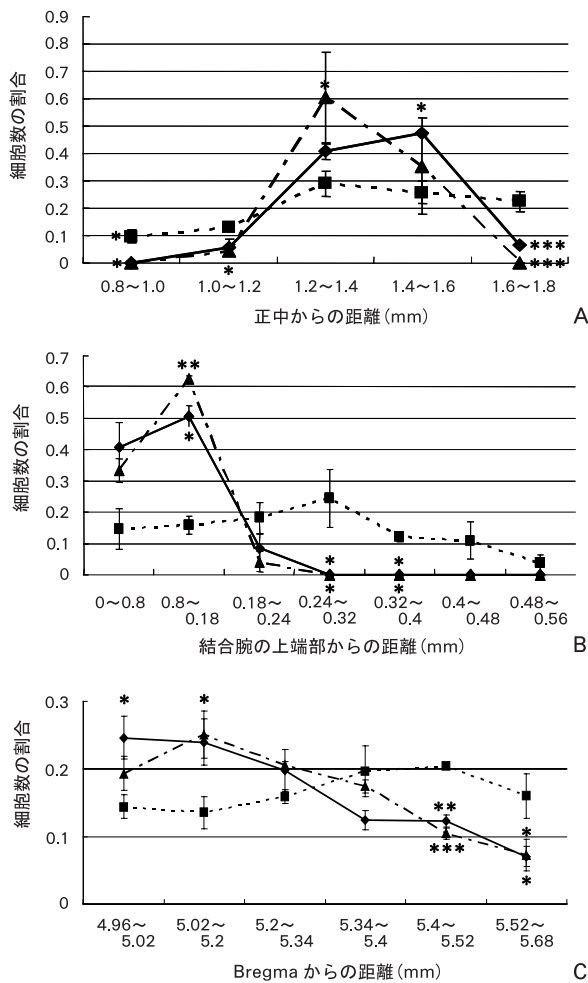


図 11 PBN における *c-Fos* 陽性細胞の前後分布

A: 水平分布, B: 垂直分布, C: 前後分布

( $n=4$ , \*\*\*: $p<0.001$ , \*\*: $p<0.01$ , \*: $p<0.05$ )

陽性細胞の水平, 垂直, 前後分布全てにおいて MSG, MPG+IMP 共に MPG との間に差が見られた。前後分布においては MSG と MPG+IMP は前方に, MPG は後方に陽性細胞が観察された。

GMP 添加では相乗効果が見られなかった。従って, IMP による MPG の味質変化は, IMP によるグルタミン酸の相乗効果の結果として生じることが示唆される。*c-Fos* 陽性細胞に関する免疫組織学的実験の結果も, 行動実験の結果を支持するものであり, 0.1 M MPG の伝導経路が 0.1 mM IMP の添加による味質変化によって変化した可能性が考えられる。従って, うま味物質による *c-fos* 発現は IMP のような添加物による可変性を持つことがわかった。

NTS と PBN 共に前後分布において 0.1 M MSG, 0.1 M MPG+0.1 mM IMP と 0.1 M MPG の間に差が見られたことから, 行動実験の結果と併せて考えると, NTS と PBN では共通して味質に対する嗜好により前後に分か

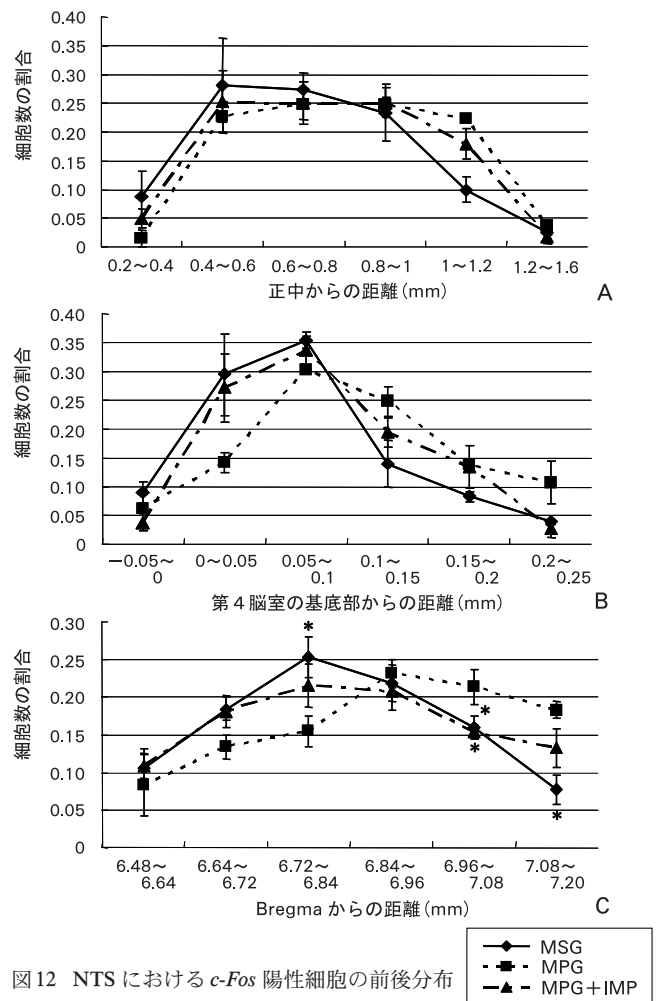


図 12 NTS における *c-Fos* 陽性細胞の前後分布

A: 水平分布, B: 垂直分布, C: 前後分布

( $n=4$ , \*: $p<0.05$ )

水平, 垂直分布では各味質の陽性細胞の分布に差は見られなかったが, 前後分布においては MSG と MPG+IMP は前方に, MPG はやや後方に陽性細胞が観察された。

れて *c-fos* の発現がみられることが示唆された。好ましい味を呈する甘味とうま味の共通の受容体と考えられている T1R3 を介しての入力は NTS, PBN の前方に, 厭わしい味を呈する苦味の受容体である T2R5 を介しての入力は後方に位置していると報告されている<sup>9)</sup>。従って, 0.1 mM IMP の添加による 0.1 M MPG の味質変化は, うま味だけでなく甘味も増強された結果であると考えられる。さらに, NTS では前後分布においてのみ 0.1 M MSG, 0.1 M MPG+0.1 mM IMP と 0.1 M MPG の間に差が見られたが, PBN では前後分布だけでなく水平, 垂直分布でも差が見られ, 味覚の一次中枢である NTS では前後一次元分布だった *c-fos* 発現が二次中枢である PBN では前後, 水平, 垂直の三次元分布に複雑に展開することから, それぞれが異なる味質情報を伝達している可能性が示唆された。



以上から、末梢神経レベルで好ましい味、好ましくない味が識別されていることが考えられる。従って相乗効果による味質変化がどのような経路で伝達されているかを詳しく調べるために、味覚の末梢神経であり、ラット<sup>10)</sup>やマウス<sup>2)</sup>でうま味の相乗効果を伝えるといわれている鼓索神経を切断したマウスでの同様の実験、またうま味の受容体である T1R1/R3<sup>11)</sup>、および mGluR4<sup>12)</sup> のプロセッサーを用いた同様の実験も計画している。

#### 参考文献

- 1) Kumazawa T and Kurihara K: Large synergism between monosodium glutamate and 5'-nucleotides in canine taste nerve responses. *Am. J. Physiol.* **259**, 420-426 (1990)
- 2) Ninomiya Y, Kurenuma S, Nomura T, Umebayashi H and Kuwamura H: Taste synergism between monosodium glutamate and 5'-ribonucleotide in mice. *Comp. Biochem. Physiol.* **101A**, 97-102 (1992)
- 3) Sako N and Yamamoto T: Analyses of taste nerve response with special reference to possible receptor mechanisms of umami taste in the rat, *Neurosci. Lett.* **261**, 109-112 (1999)
- 4) Miyamoto T, Tsuboi K, Fujiwara Y, Miyazaki A and Eda-Fujiwara H: Detection and discrimination mechanism of MSG and MPG in mouse gustatory system. *ISOT/JASTS 2004 abstracts*, 124 (2004)
- 5) 山本 隆: ブレインサイエンスシリーズ 脳と味覚—おいしく味わう脳のしくみ. 共立出版, 東京, pp.87-89 (1996)
- 6) 栗原堅三, 小野武年, 渡辺明治, 林 裕造: グルタミン酸の科学—うま味から神経伝達まで. 講談社, 東京, p.12 (2000)
- 7) George Paxinos and Keith B.J. Franklin: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, ELSEVIER ACADEMIC PRESS, San Diego, USA (2004)
- 8) 佐藤昌康, 小川 尚: 最新・味覚の科学. 朝倉書店, 東京, p.26 (1997)
- 9) Sugita M and Shiba Y: Genetic tracing shows segregation for bitter and sweet. *science*, **309**, 781-785 (2005)
- 10) Sako N, Harada S and Yamamoto T: Gustatory information of umami substances in three major taste nerves. *Physiol. Behav.* **71**, 193-198 (2000)
- 11) Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba N JP and Zuker CS: The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, **115**, 255-266 (2003)
- 12) Chaudhari N, Landin AM and Roper SD: A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat. Neurosci.* **3**, 113-119 (2000)

# Neuroethological Analysis of the Discrimination Pathways Involved in the Alternation of Taste Quality in Umami Taste

Ayako Miyazaki<sup>1</sup>, Hiroko Eda-Fujiwara<sup>2</sup>, Ryohei Satoh<sup>3</sup> and Takenori Miyamoto<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Division of Material and Biological Sciences, Graduate School of Science, Japan Women's University

<sup>2</sup>Department of Chemical and Biological Sciences, Japan Women's University

<sup>3</sup>Department of Physiology, School of Medicine, Kitasato University

(Received December 21, 2006)

**Abstract:** Monosodium L-glutamate (MSG) and monopotassium L-glutamate (MPG), both of which are employed as umami substances, have considerably different taste qualities in human, but the taste quality of MPG with inosine 5'-monophosphate (IMP) to be close to that of MSG. We have demonstrated using a two-bottle preference test that mice, whose umami sensitivity is comparable with that of human, preferred MSG and MPG with IMP (MPG + IMP) to MPG, and the mice preferred MSG and MPG + IMP similarly. We have also demonstrated using a conditioned taste aversion (CTA) paradigm that mice, whose umami sensitivity is comparable with that of human, discriminated MSG from MPG, but not from MPG with IMP (MPG + IMP). We examined whether mice can discriminate difference of taste qualities among MSG, MPG with various concentrations of IMP (0.01 mM~10 mM), and IMP alone using a CTA paradigm to verify that the change of taste quality results from synergism of umami substances. Results suggest that mice discriminated between MSG and IMP alone, but not between MSG and MPG + IMP with exception of MPG + 0.01 mM IMP. Then, we examined the distribution pattern of umami taste-stimulated Fos-like immunoreactivity (FLI) in the parabrachial nucleus (PBN) and the nucleus of solitary tract (NTS) in mice. In the PBN, we observed a difference between the distribution pattern of MSG-stimulated FLI and that of MPG-stimulated FLI toward horizontal, vertical, and anteroposterior axes, but it was altered by addition of IMP to be similar pattern of MSG-stimulated FLI. Particularly, in anteroposterior axis, the distribution pattern of MSG or MPG + IMP-stimulated FLI was dominant in anterior part of PBN, but that of MPG-stimulated FLI was dominant in posterior part of PBN. In the NTS, we could not observe any difference in horizontal and vertical axes, but in anteroposterior axis, we found a tendency that is similar to that observed in PBN. These results suggest that IMP-induced taste quality change of MPG is accompanied by alternation of pathways toward anteroposterior axis within NTS of taste, followed by the alternation of pathways toward three-dimensional axes within the PBN. These results suggest that IMP-induced taste quality change of MPG is accompanied by alternation of pathways toward anteroposterior axis within NTS of taste, followed by the alternation of pathways toward three-dimensional axes within the PBN.

**Key words:** umami taste, synergism, monosodium L-glutamate (MSG), monopotassium L-glutamate (MPG), inosine 5'-monophosphate (IMP), preference of taste, conditioned taste stimuli (CTA), parabrachial nucleus (PBN), nucleus of solitary tract (NTS)