

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06673

研究課題名（和文）味細胞における亜鉛の生理的役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the physiological significance of zinc in taste cells

研究代表者

西田 健太郎（NISHIDA, Kentaro）

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：20533805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラット有郭乳頭の味細胞における亜鉛の局在および亜鉛トランスポーターZnT3の発現局在を明らかにした。さらに、亜鉛バイオセンサーによる高感度亜鉛検出系を確立し、単離味細胞からの亜鉛放出性を検討した。その結果、味刺激によって味細胞から亜鉛が放出されることが示され、味蕾における生体内亜鉛が新たな生理的役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味細胞から細胞間隙に放出される亜鉛は、味細胞の機能維持や味細胞から知覚神経終末へのシグナル伝達に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。本研究結果は、これまで考えられてきた味蕾における亜鉛が味細胞の分化・増殖に関わることのみならず、味細胞間及び味細胞-神経終末間に放出されることで、情報伝達機構において新たな生理的役割を担う可能性が考えられた。

本研究は、味刺激により味細胞から亜鉛が放出されることを初めて示した研究成果であり、未だ不明な点が多く残されている味覚の情報伝達経路の解明の一助になると考えられた。

研究成果の概要（英文）： In this study, zinc-positive signals in taste cells were showed by staining with a zinc fluorescence dye ZnAF-2DA in the rat circumvallate papillae. mRNAs for ZnT3 were expressed by isolated taste buds. ZnT3 immunoreactivity was found in type II and III taste cells, but not in type I cells. Moreover, we evaluated zinc release from isolated taste cells using a zinc-sensitive cells. Addition of taste mixture solution activated the zinc-sensitive cells with isolated taste cells. However, the percentage of response significantly decreased following pretreatment with MgEDTA as an extracellular zinc chelator, but not with ZnEDTA as a negative control.

These findings suggest that zinc is released from taste cells into the intercellular area in response to taste stimuli, and zinc may affect signal transmission within taste buds.

研究分野：医療系薬学

キーワード：微量元素

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける亜鉛欠乏症として、味覚障害が知られており、亜鉛補給が一部の味覚障害で有効であると報告されている<sup>1)</sup>。また、亜鉛欠乏食餌を与えたラットにおいて、味蕾数の減少が認められることから、亜鉛は味細胞の分化・増殖に必須の元素である<sup>2-4)</sup>。一方で、図1に示すように、中枢神経系(特に、海馬領域)において、亜鉛は情報伝達物質として重要な役割を有することが明らかになってきており、神経細胞内で亜鉛含有小胞を形成し、刺激によりシナプス間隙に開口放出される<sup>5-7)</sup>。放出された亜鉛は、神経細胞に発現するATP受容体やグルタミン酸受容体に対し、調節分子 allosteric modulator として機能している<sup>8-11)</sup>。ゆえに、味蕾内においても亜鉛が味覚情報伝達に関与している可能性が考えられるが、依然不明である。その理由として、味覚の情報伝達メカニズムの解明が研究途上であるとともに、そのメカニズムにおける亜鉛の関与が検討されていないことが挙げられる。

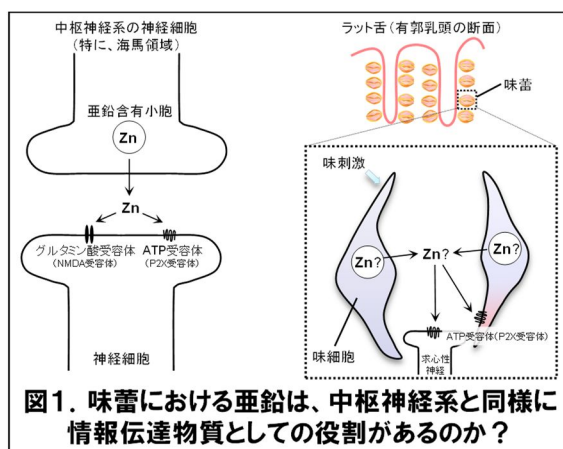


図1. 味蕾における亜鉛は、中枢神経系と同様に情報伝達物質としての役割があるのか？

これまでの検討により、図2に示すように、味蕾における亜鉛の存在を予備的に検討し、(A)亜鉛含有小胞の形成に関わる亜鉛トランスポータ(ZnT3)の mRNA レベルでの発現、(B)亜鉛特異的蛍光プローブを用いて味蕾における味細胞様形態を示す亜鉛シグナル(点線部分)を認めたことから、味蕾における亜鉛の存在が支持された。さらに、(C)味細胞からの亜鉛放出を検出するための亜鉛バイオセンサーを確立している。

(A)亜鉛トランスポータ(ZnT3)の発現 (B)味蕾での亜鉛検出 (C)亜鉛バイオセンサーの確立

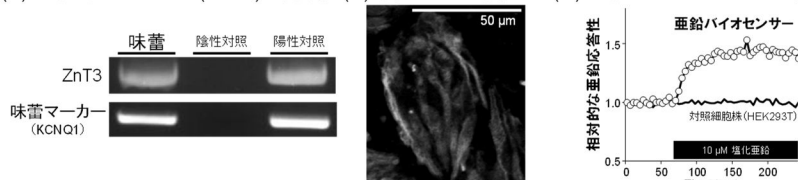


図2. (A,B)“味蕾における亜鉛の存在”を支持する予備データ (C)味細胞からの放出亜鉛を検出する研究ツールの確立

### 2. 研究の目的

本研究では、味細胞における亜鉛の新たな生理的役割を解明することを目的として、亜鉛バイオセンサーを用い味細胞からの亜鉛放出の有無、味細胞における亜鉛局在を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

本研究には9週齢以降のSD系雄性ラット(日本SLC)を用い、ラットは自由給水で固形飼料(MF、オリエンタル酵母工業)を自由摂食下において飼育した。なお、本実験プロトコールは摂南大学及び京都薬科大学動物実験委員会により承認され、「動物実験に関する指針」およびARRIVEガイドラインを遵守し実験を行った。

#### (2) 味蕾及び味細胞の単離

イソフルラン吸入麻酔下にて、ラットを生食灌流後、有郭乳頭含有上皮を1.0 mg/mL collagenase D、2.5 mg/mL dispase II及び1.0 mg/mL trypsin inhibitorの酵素処理により剥離した。さらに、剥離に用いた酵素混合液中にて単離味蕾を倒立顕微鏡(CKX41、OLYMPUS)下で採取した。単離味細胞は、剥離に用いた酵素混合液に37°Cで5分間さらに、室温で5分作用させた後に、分散した味蕾をピペティングすることにより得た。

#### (3) mRNA 検出及び RT-PCR 法

有郭乳頭の total RNA は、剥離した有郭乳頭を含む舌上皮を NucleoSpin RNA<sup>®</sup> XS kit (MACHEREY-NAGEL) を用いて抽出した。RNA 濃度は NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific) にて測定した。また、mRNA の逆転写反応は PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa) を用いた。単離味蕾由来の cDNA は、CellAmp<sup>®</sup> Whole Transcriptome Amplification Kit (Real Time) Ver.2 (TaKaRa) より得た。cDNA 1 μL に対し、10x PCR buffer 2 μL、dNTP mixture 1.6 μL、1st primer の forward 及び reverse primer 0.2 μL ずつ、rTaq DNA polymerase 0.1 μL 及び RNase free H<sub>2</sub>O 14.9 μL 添加し、全量 20 μL にて RT-PCR を行った。さらに、得られた一次増

幅産物 0.5  $\mu$ L を 10x PCR buffer 2  $\mu$ L、dNTP mixture 1.6  $\mu$ L、2nd primer の forward 及び reverse primer 0.2  $\mu$ L ずつ、rTaq DNA polymerase 0.1  $\mu$ L 及び Rnase free H<sub>2</sub>O 15.4  $\mu$ L と混合し、全量 20  $\mu$ L にて nested PCR 法を行うことで遺伝子特異的配列を増幅した。使用した primer の塩基配列及び PCR 条件は省略した。

#### (4) Autometallography (AMG)

Autometallography は、有郭乳頭組織切片を AMG 展開液中で 26°C にて 3 時間反応させ、黒色を呈色させることで可視化した。AMG 展開液は、50% gum arabic 60 mL、citrate buffer 10 mL、5.7% hydroquinone 水溶液 15 mL、0.73% 乳酸銀水溶液 15 mL から構成されている。その後、AMG 展開反応を止めるために 5% sodium thiosulfate 中で 10 分間反応させた。反応終了後、gelatin 膜を剥がすために超純水に移し替え、37°C にて 30 分間洗浄し、ethanol 及び xylene で脱水を行い、オイキット (ORSAtec) にて封入した。画像は moticam 1000 (Shimazu) により撮影した。

#### (5) 免疫組織染色

ラットを 4% paraformaldehyde 溶液にて灌流固定後、舌を摘出し 20 分間追固定を行い、その後クリオスタット (CM1850, Leica) にて有郭乳頭組織の凍結切片 (40  $\mu$ m) を作製した。凍結切片を Sorensen 's PBS 及び PBS で洗浄後、室温にて 1 時間または 4 日に一晩ブロッキング処理を行った。Blocking buffer には 1% goat serum、0.3% triton-X 100 (ICN Biochemicals)、0.3% bovine serum albumin (BSA, Sigma) 及び 0.05% sodium azide (和光純薬) 含有 PBS を用いた。PBS で洗浄し、一次抗体として guinea pig anti-ZnT3 antibody (1:100; 197 004, Synaptic systems) を blocking buffer で希釈し、4 日に一晩以上反応させた。その後 PBS で洗浄し、二次抗体 Alexa Fluor® 488 標識 goat anti-guinea pig IgG antibody (1:1000; A11073, Thermo Fisher Sci.) 及び Hoechst 33258 (10  $\mu$ g/mL, 同仁化学研究所) を blocking buffer で希釈し、4 日に一晩反応させた。その後 PBS で洗浄し、載物して一晩以上風乾させた後 ProLong® Antifade Kit (Thermo Fisher Sci.) を用いて封入した。画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META (Carl Zeiss) により撮影した。抗原吸収実験には市販の抗原ペプチド (抗体 3  $\mu$ L あたり抗原ペプチド 40  $\mu$ g, 197-0P, Synaptic systems) を用いた。

#### (6) 味細胞からの亜鉛放出の評価

味刺激による味細胞からの亜鉛放出を評価する際の細胞内 Ca<sup>2+</sup> レベルの測定は、Fluo-4/AM (同仁化学研究所) を用いて共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META (Carl Zeiss) にて行った。Micro Insert 4 well (indibi) 上で 24 時間培養した hTRPA1 安定発現細胞を recording medium で洗浄後、37°C にて 5  $\mu$ M Fluo-4/AM を 1 時間作用させた。その後、recording medium で再度洗浄し、単離味細胞 (0.25 匹分/well) を含む 6  $\mu$ L の recording medium (最終濃度; 20  $\mu$ M、100  $\mu$ M 又は 1 mM CaEDTA、100  $\mu$ M MgEDTA 又は 100  $\mu$ M ZnEDTA 含む) に置き換え、488 nm の励起波長にて照射し測定を開始した。測定開始から 1 分後に味混合溶液 (最終濃度; 2 mM sucrose、2 mM saccharin sodium、2 mM monosodium glutamate 及び 2  $\mu$ M quinine hydrochloride) を 4  $\mu$ L 添加し、Fluo-4 の蛍光強度を経時的に測定した。測定は 2 秒毎に計 6 分間行った。得られた画像データから各細胞の蛍光強度を算出し、味混合溶液の添加前までの平均蛍光強度を 1 と定義して蛍光強度-時間曲線を作成し、味細胞に味刺激を与えた際の個々の hTRPA1 安定発現細胞内 Ca<sup>2+</sup> レベルの変化を求めた。

#### (7) 統計解析

得られたデータは平均  $\pm$  標準偏差 (SD; standard deviation) にて表示した。有意差検定については、Prism (version 8; GraphPad Inc.) を用いて、母集団が正規分布し、母分散が等しいと仮定して、Dunnett 's 検定を適用し、その際の有意水準は 5% (両側) 未満とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 味蕾における亜鉛由来のシグナルの検出

ラット有郭乳頭の味蕾における亜鉛の有無を亜鉛蛍光プローブ ZnAF-2DA を用いて検討したところ、味細胞様の形態を示す蛍光シグナルが認められた (データは示さず)。続いて、内在性重金属を染色することができる AMG 染色を行い、図 3 に示すように、味細胞様の染色像が認められた。したがって、味細胞において、亜鉛が存在している可能性が示された。

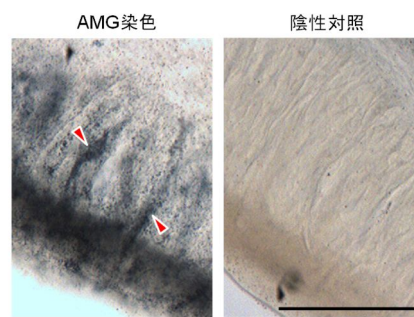


図3 味蕾におけるAMG染色画像

#### (2) 味蕾における亜鉛トランスポーター ZnT3 の発現

ラット単離味蕾における ZnT3 mRNA の発現を RT-PCR 法により検討したところ、単離味蕾及び陽性対照である味蕾を含有する有郭乳頭上皮において、ZnT3、Kcnq1、Ntpdase2、Plcb2、Gnat3 及び Aadc の mRNA レベルでの発現が認められた (図 4)。なお、各種味細胞マーカーとして、I、II 及び III 型味細胞

胞に発現する potassium voltage-gated channel、KQT-like subfamily、member 1 (*Kcnq1*)、I 型味細胞に発現する nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (*Ntpdase2*)、II 型味細胞に発現する phospholipase C beta-2 (*Plcb2*)及び guanine nucleotide-binding protein、alpha transducing 3 (*Gnat3*)、III 型味細胞に発現する aromatic L-amino acid decarboxylase (*Aadc*) を用いた。さらに、ZnT3 のタンパク質発現局在を免疫組織染色法により解析した (図 5)。その結果、味蕾部位において味細胞様の免疫活性が認められ、このシグナルは抗原ペプチドによる吸収実験により消失した。また、各種味細胞マーカーとの共局在性を検討したところ、I 型、II 型および III 型味細胞との共局在率はそれぞれ、 $6.3 \pm 1.2\%$ 、 $47.8 \pm 15.4\%$  および  $42.2 \pm 15.6\%$  となった。以上の結果より、主に II 型および III 型味細胞において ZnT3 が発現していることが示された。

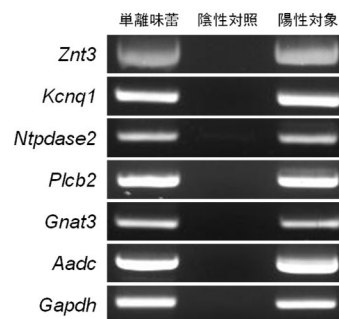


図4 味蕾におけるZnT3のmRNA発現

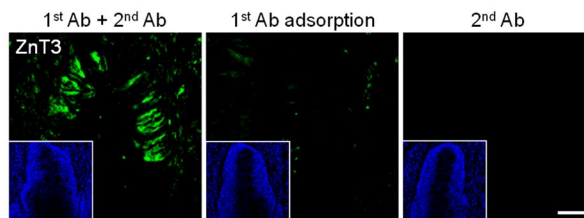


図5 味蕾におけるZnT3の発現局在

### (3) 亜鉛バイオセンサーを用いた味細胞からの亜鉛放出の評価

亜鉛バイオセンサーとして hTRPA1 安定発現細胞を用い、味細胞から亜鉛放出性の有無を検討した結果、図 6 に示すように、味細胞存在下で味刺激を与えたときの亜鉛バイオセンサーが反応した割合は、 $18.0 \pm 6.4\%$  であった。同様の実験を  $100 \mu\text{M}$  MgEDTA 存在下で行った場合、その割合は  $8.1 \pm 4.5\%$  と有意に低かった。これは亜鉛キレート能を有さない  $100 \mu\text{M}$  ZnEDTA<sup>12)</sup> 存在下の場合 ( $12.7 \pm 3.7\%$ ) と異なっていた。一方で、味細胞非存在下味刺激のみの場合、並びに味細胞存在下で非味刺激の場合での割合は、それぞれ  $0.1 \pm 0.2\%$  及び  $3.3 \pm 3.6\%$  であり、これらの値は味細胞存在下で味刺激した場合より有意に低かった。したがって、味刺激により味細胞から細胞外へ亜鉛が放出されることが示唆された。

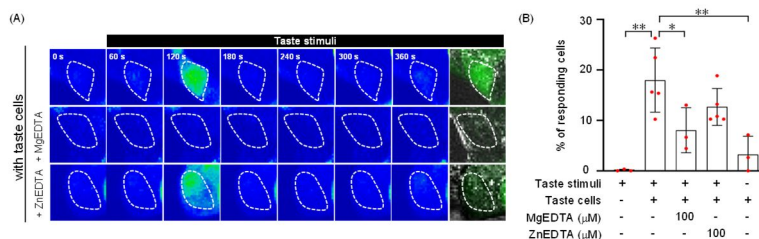


図6 亜鉛バイオセンサーを用いた味細胞からの亜鉛放出の評価

味蕾における亜鉛は味細胞の分化や増殖のみならず、味細胞間及び味細胞-神経終末間隙に放出されることで、新たな生理的役割を担う可能性が考えられた。本研究成果は、味刺激により味細胞からの亜鉛放出を初めて示した成果であり、未だ不明な点が多い味覚の情報伝達経路の解明の一助になることが期待される。

### 参考文献

- Catalanotto FA. *Am J Clin Nutr*, **31**, 1098-1103 (1978).
- Jakinovich W Jr, Osborn DW. *Am J Physiol*, **241**, R233-239 (1981).
- Chou HC, et al. *J Formos Med Assoc*, **100**, 326-335 (2001).
- Hamano H, et al. *Biofactors*, **28**, 185-193 (2006).
- Haug FM, . *Histochemie*, **8**, 355-368 (1967).
- Frederickson CJ, Moncrieff DW, . *Biol Signals*, **3**, 127-139 (1994).
- Palmiter RD, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14934-14939 (1996).
- Keller KA, et al. *J Nutr*, **130**, 1633-1640 (2000).
- Takeda A, et al. *Behav Brain Res*, **177**, 1-6 (2007).
- Tassabehji NM, et al. *Physiol Behav*, **95**, 365-369 (2008).
- Whittle N, et al. *J Neurosci*, **30**, 13586-13596 (2010).
- Koh JY, et al. *Science*, **272**, 1013-1016 (1996).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kentaro Nishida, Saho Bansho, Akiko Ikukawa, Teruyo Kubota, Akihiro Ohishi, Kazuki Nagasawa	4. 巻 66
2. 論文標題 Expression profile of the zinc transporter ZnT3 in taste cells of rat circumvallate papillae and its role in zinc release, a potential mechanism for taste stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Histochemistry	6. 最初と最後の頁 3534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4081/ejh.2022.3534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	長澤 一樹  (Nagasawa Kazuki)  (30228001)	京都薬科大学・薬学部・教授    (34306)	2021年6月に研究分担者削除
研究分担者	大石 晃弘  (Ohishi Akihiro)  (70780089)	京都薬科大学・薬学部・助教    (34306)	2021年6月に研究分担者削除

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------