

Zinc biosensing system を用いた味細胞における亜鉛の生理的意義の解明

西田 健太郎

摂南大学薬学部統合薬学分野

概要 中枢神経系において、亜鉛は情報伝達分子として重要な役割を担っている。一方、味覚機能において亜鉛は必須の微量元素であることが示されているものの、味蕾において、亜鉛が情報伝達分子として機能するか否かは不明である。これまでに、ラット味細胞における亜鉛の局在並びに小胞型亜鉛トランスポーター zinc transporter 3 (ZnT3) の発現局在に関する予備的知見を得ているが、味細胞における亜鉛の生理的役割については未だ不明である。そこで本研究では、極微量の亜鉛を検出する方法として human transient receptor potential ankyrin 1 (hTRPA1) 安定発現細胞を利用した Zinc biosensing system を確立し、この方法を用いて味細胞から亜鉛が放出されるか否かについて検討を行った。

味蕾は、剥離したラット有郭及び葉状乳頭上皮を酵素混合液にて作用することにより得た。単離味細胞は得られた味蕾をガラスキャピラリーによりピペッティングすることにより得た。そして、味蕾単離法の検証及び味蕾における Znt3 mRNA 発現レベルは reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により確認した。hTRPA1 安定発現細胞は、hTRPA1-pF5A を遺伝子導入した HEK293T 細胞を G-418 存在下で培養することにより構築した。そして、TRPA1 の機能的発現及び亜鉛バイオセンサーとしての機能性を Fura-2/AM を用いて評価した。さらに味刺激に対する味細胞からの亜鉛放出は、hTRPA1 安定発現細胞上に播種した単離味細胞に味刺激を与え、hTRPA1 安定発現細胞内の Ca^{2+} レベルの変化を Fluo-4/AM を用いることで評価した。

単離味蕾において、味細胞マーカー及び Znt3 の mRNA レベルでの発現が認められ、味蕾の単離法が確立できていること、また、その単離味蕾において Znt3 が発現していることが示された。hTRPA1 安定発現細胞に TRPA1 アゴニストである allyl isothiocyanate (AITC) 又は $ZnCl_2$ を作用させると、細胞内 Ca^{2+} レベルが上昇したことから、hTRPA1 安定発現細胞において TRPA1 が機能的に発現していること、また、亜鉛バイオセンサーとして機能することが示された。続いて、味細胞存在下で味刺激を与えた際の hTRPA1 安定発現細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇が認められた細胞の割合は、亜鉛キレート能を有さない ZnEDTA 存在下と比べて差異は認められなかった。しかし、細胞外亜鉛キレート剤である MgEDTA 存在下では、その割合は有意に低かった。以上の結果より、味刺激によって味細胞から亜鉛が放出されていることが示唆された。したがって、味蕾において、亜鉛は味細胞の分化・増殖のみならず、味細胞間及び味細胞-神経終末間に放出されることで、新たな生理的役割を担う可能性が考えられた。

1. 研究目的

中枢神経系において、亜鉛は小胞型亜鉛トランスポーター zinc transporter 3 (ZnT3) を介してグルタミン酸作動性神経細胞の前シナプス小胞にグルタミン酸と共に蓄積され、それが刺激により開口放出される¹⁻³⁾。また、ヒトにおいて亜鉛欠乏になると抑うつ状態や記憶障害が認められることから、亜鉛は中枢神経系における情報伝達分子とし

て脳の機能維持に重要な役割を担っている^{4,7)}。一方で、亜鉛は味覚機能においても重要な役割を担っており、ヒトにおいて、その欠乏は味覚障害を引き起こし、亜鉛補充療法が一部の味覚障害に対し有効であるという報告がある⁸⁾。また、ラットにおける亜鉛欠乏は味蕾数の減少などを認める味覚障害を誘発し、その味蕾数の減少は亜鉛投与により改善することから、亜鉛は味覚機能において必

須の金属元素である⁹⁻¹¹⁾。

これまでの検討により、ラット有郭乳頭の味細胞における亜鉛の局在並びに亜鉛含有小胞の形成に關与する ZnT3 の局在を明らかにした(unpublished data)。しかしながら、味細胞内の亜鉛が味刺激により細胞外へ放出されるか否かについては依然不明である。

Segawa らは、培養マウスアストロサイトの細胞外に放出された亜鉛の絶対量を測定するため、細胞外液中の亜鉛レベルを誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いた¹²⁾。一方で、味細胞外の亜鉛検出に最適な培養細胞株が存在しないことから、ラットなどの実験動物から摘出した新鮮な味細胞を使用する必要がある。Ma らの報告¹³⁾をもとに計算すると、1匹のラット有郭乳頭に含まれる味細胞数は約 6.0×10^3 個と少ないことから、限られた数の味細胞から放出された亜鉛を ICP-MS で解析することは困難であると予想される。このような問題点を克服するため、Huang らは 5-hydroxytryptamine 2C receptor (5-HT_{2c}) を強制的に発現させた Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いて、味刺激又は脱分極刺激により味細胞から放出された 5-HT を細胞内 Ca²⁺レベルの増加を指標とすることで 5-HT 検出に成功している¹⁴⁾。これは、検出対象物質により活性化受容体を培養細胞に強制発現させ、その受容体の活性化によるセカンドメッセンジャーを指標に検出することにより、極微量の対象物質も検出可能になることを指摘する。

Hu らは、transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) チャンネルが外因性の亜鉛に対してセンサーとして働き、細胞内ドメインで亜鉛を認識することにより TRPA1 が活性化されることを報告した¹⁵⁾。また、細胞膜上には zrt- and irt-like protein 1 (ZIP1) を含めた亜鉛トランスポータが普遍的に発現しており、亜鉛はその細胞内外における濃度勾配に従って促進拡散される¹⁶⁾。さらに、TRPA1 の活性化は細胞内 Ca²⁺レベルを指標に評価できる。細胞外 Ca²⁺レベルは約 1-2 mM であるのに対し、細胞内のそれは約 10⁻⁴ mM であり、細胞内外には約 10,000 倍の濃度差が存在している。これらのことを考え併せると、細胞外に存在する亜鉛は ZIP1 などの亜鉛トランスポータを介して細胞内に取り込まれ、それが TRPA1 を活性化することで、細胞内 Ca²⁺レベルが上昇するというカスケードを利用して、細胞外の微量の亜鉛を検出できる可能性が示唆される。

そこで本研究では、極微量の亜鉛を検出する方法として Zinc biosensing system を確立し、この系を用いて味細胞からの亜鉛放出性の検討を行った。

2. 研究方法

2.1 実験動物

本実験には 9 週齢以降の SD 系雄性ラット(日本 SLC)を用いた。ラットは自由給水で固形飼料(MF, オリエンタル酵母工業)を自由摂食できる環境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」に沿って実験を行った。

2.2 味蕾及び味細胞の単離

ラットを生理食塩水にて灌流後、舌から有郭及び葉状乳頭を含む舌上皮を collagenase D (1.0 mg/mL, Roche), dispase II (2.5 mg/mL, Roche) 及び trypsin inhibitor (1.0 mg/mL, Sigma) の処理により剥離した。剥離した上皮を実体顕微鏡下で有郭及び葉状乳頭周囲の上皮組織をトリミングし、剥離に用いた酵素混合液中にて 10 分間室温で処理し、味細胞の集合単位である単離味蕾を倒立顕微鏡(CKX41, OLYMPUS)下でガラスキャピラリー(World Precision Instruments)にて採取した。単離味細胞は、トリミングした有郭乳頭の剥離上皮を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、分散した味蕾を倒立顕微鏡下でガラスキャピラリーを用いてピペッティングすることにより得た。

2.3 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[®] XS kit (MACHEREY-NAGEL) を用いて抽出した。RNA 濃度は NanoDrop[®] (Thermo Fisher Scientific)にて測定した。また、mRNA の逆転写反応は PrimeScript[™] RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa)を用い 37 °C, 15 分の後 85 °C, 5 秒の条件で行った。単離味蕾由来の cDNA は、CellAmp[®] Whole Transcriptome Amplification Kit (Real Time) Ver.2 (TaKaRa) より得た。

cDNA 1 μL に対し、10 x 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 H₂O 14.9 μL を添加し、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 μL を 10 x PCR buffer 2 μL , dNTP mixture 1.6 μL , 2nd primer の forward 及び reverse primer 0.2 μL ずつ, rTaq DNA polymerase 0.1 μL 及び RNase free H_2O 15.4 μL と混合し、全量 20 μL 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。

2. 4 HEK293T 細胞への遺伝子導入及び hTRPA1 安定発現細胞の作製

Wizard plus SV Miniprep DNA purification system (Promega)を用いて精製した hTRPA1-pF5A を lipofection 法により HEK293T 細胞に導入した。遺伝子導入試薬には、Lipofectamine 2000 (Life Technologies)を用いた。DNA (0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) を Lipofectamine 2000 (0.5 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) を含む OPTI-MEM にて希釈し、室温にて 20 分間放置した後、この混合液を HEK293T 細胞に添加し 6 時間作用させた後、培地を 10% FBS 含有 DMEM に置き換えて 48 時間培養し、hTRPA1 一過性発現細胞として用いた。また、hTRPA1 安定発現細胞は、遺伝子導入から 24 時間後以降、G-418 sulfate (和光純薬) を終濃度 3 mg/mL 含む 10% FBS 含有 DMEM 中で培養することにより作製した。

2. 5 マイクロプレートリーダーを用いた細胞内 Ca^{2+} レベルの測定

hTRPA1 安定発現細胞の機能解析における細胞内 Ca^{2+} レベルの測定は、Fura-2/AM (同仁化学研究所) を用いてマイクロプレートリーダー (ARVO, Perkin Elmer) にて行った。HEK293T 細胞, hTRPA1 一過性発現細胞又は hTRPA1 安定発現細胞を recording medium (20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 13.8 mM glucose) で 3 回洗浄後, 2 μM Fura-2/AM を 37°C にて 30 分間作用させた。そして、recording medium 中で 1 時間培養した後、recording medium で 2 回洗浄し、hTRPA1 のアゴニストとして 100 μM allyl isothiocyanate (AITC) 並びにカルシウムイオノフォアである 4 μM の ionomycin Ca, 又は hTRPA1 の基質として 10 及び 100 μM ZnCl_2 を順に添加した後、励起波長 340 及び 380 nm における Fura-2 の蛍光強度をいずれも 510 nm にて経時的に測定した。これらの結果に基づき、蛍光強度比 ($R = \text{Fex. 340 nm}/\text{Fex. 380 nm}$) を算出することで細胞内 Ca^{2+} レベルの変化を評価した。

2. 6 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内 Ca^{2+} レベルの測定

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^{2+} 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。味刺激は予備的検討を基に、甘味 (2 mM sucrose 及び 2 mM saccharin sodium), 旨味 (2 mM monosodium glutamate) 及び苦味 (2 μM quinine hydrochloride) の味混合溶液を用いた。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 μM 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 μL の recording medium (最終濃度; 20 μM , 100 μM 又は 1 mM CaEDTA, 100 μM MgEDTA 又は 100 μM ZnEDTA 含む) に置き換え, 488 nm の励起光を照射し、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 μM quinine hydrochloride) を 4 μL 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に基づき、各細胞の蛍光強度を算出し、さらに、味混合溶液の添加前までの平均蛍光強度を 1 とし、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^{2+} レベルの変化を求めた。

2. 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、培養細胞の Ca イメージングを行い、反応した細胞の割合を統計学的に解析している Ishii ら及び Sakurai らの報告^{17,18)}に基づき、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。

3. 研究結果

3. 1 味蕾における Znt3 mRNA 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。この際、各種味細胞マーカーとして、I, II 及び III 型味細胞に発現する 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。その結果、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。以上の結果より、味蕾が単離されていること、さらには、その単離味蕾において *Znt3* が発現していることが示された。

3. 2 HEK293T/hTRPA1 細胞における TRPA1 の機能的発現

hTRPA1 安定発現細胞の機能性を評価するため、Fura-2/AM を用いて細胞内 Ca^{2+} レベルの変化を測定した。この際、TRPA1 アゴニストである AITC の終濃度は $100 \mu\text{M}$ を、また TRPA1 アンタゴニストである HC-030031 の終濃度は $150 \mu\text{M}$ を用いた^{19,20}。カルシウムイオノフォア ionomycin Ca については、予備検討に基づき、終濃度 $4 \mu\text{M}$ を用いた。

hTRPA1 安定発現細胞に $100 \mu\text{M}$ AITC を作用させることにより細胞内 Ca^{2+} レベルは上昇し、その増加は $4 \mu\text{M}$ ionomycin Ca によりさらに増強され、このプロファイルは hTRPA1 一過性発現細胞とほぼ同じであった。また、 $150 \mu\text{M}$ HC-030031 存在下で $100 \mu\text{M}$ AITC を作用させた場合の細胞内 Ca^{2+} レベルは、200 秒以降に若干の増加が認められたが、HC-030031 非存在下で AITC を作用させた場合と比べて、その変化の程度は明らかに小さかった。さらに、細胞外 Ca^{2+} 非存在下において $100 \mu\text{M}$ AITC を作用させた際、細胞内 Ca^{2+} レベルはほぼ変化しなかった。したがって、hTRPA1 安定発現細胞において、TRPA1 が機能的に発現しており、細胞内 Ca^{2+} レベルの増加は細胞外からの Ca^{2+} 流入に起因することが示された。

3. 3 亜鉛処置が HEK293T/hTRPA1 細胞の細胞内 Ca^{2+} レベルに与える影響

Fura-2/AM は Ca^{2+} のみならず Zn^{2+} を検出できることから²¹、 Zn^{2+} として ZnCl_2 処置したときの細胞内 Ca^{2+} 及び Zn^{2+} レベルの変化を Ca^{2+} 非存在下と比較することで測定した。このとき、亜鉛イオノフォアである zinc pyrithione

(ZnPy) の終濃度は、Andersson ら²² の TRPA1 を活性化させると報告した濃度に基づき、 $5 \mu\text{M}$ を用いた。hTRPA1 安定発現細胞に 10 及び $100 \mu\text{M}$ ZnCl_2 を作用させることにより、HEK293T 細胞の場合とは異なり、細胞内 Ca^{2+} 及び Zn^{2+} レベルは時間依存的に増加した。 $5 \mu\text{M}$ ZnPy は両細胞における細胞内 Ca^{2+} 及び Zn^{2+} レベルを増加させた。次に、細胞外 Ca^{2+} 非存在下で ZnCl_2 を作用させた際、細胞内 Ca^{2+} 及び Zn^{2+} レベルは変化しなかったことから、添加した Zn^{2+} の Fura-2 ratio 増加への寄与は低いと考えられる。したがって、今回作製した hTRPA1 安定発現細胞は、細胞外の Zn^{2+} レベルの上昇に伴い細胞内の Ca^{2+} レベルを増加させることができる亜鉛バイオセンサーとして機能することが示された。

3. 4 味刺激による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機能することを確認した hTRPA1 安定発現細胞を用いて、味刺激された味細胞から亜鉛が放出されるか否かを hTRPA1 安定発現細胞内 Ca^{2+} レベルを指標に調べた。その結果、味細胞存在下で味刺激を与えたときの、全 hTRPA1 安定発現細胞に対する細胞内 Ca^{2+} レベルが 2 倍以上の上昇が認められた細胞の割合は、 $18.00 \pm 6.36\%$ であった。同様の実験を $100 \mu\text{M}$ MgEDTA を用いて行った場合、その割合は $8.05 \pm 4.46\%$ と有意に低く、これは亜鉛キレート能を有しない $100 \mu\text{M}$ ZnEDTA²³ を作用させた場合 ($12.68 \pm 3.67\%$) と明らかに異なっていた。一方、味細胞非存在下で味刺激のみを与えた場合、並びに味細胞存在下で味刺激を与えなかった場合の細胞内 Ca^{2+} レベルが 2 倍以上増加した細胞の割合は、それぞれ $0.11 \pm 0.19\%$ 及び $3.26 \pm 3.61\%$ 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小さかった。また、今回作製した hTRPA1 安定発現細胞は、カルシウム蛍光プローブとして Fura2/AM を用いることで、細胞内 Ca^{2+} レベルを指標に細胞外の Zn^{2+} レベルの上昇を検出でき、亜鉛バイオセンサーとして機能することを確認している。そのため、カルシウム蛍光プローブとして Fluo-4/AM を用いて検出された細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇は、細胞外 Zn^{2+} レベルの上昇に起因することを示唆する。

以上のことから、味刺激によって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。

4. 考 察

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、Zinc biosensing system を用いて、味刺激によって味細胞から亜鉛が放出されるか否かについて検討を行った。

これまでに我々は、ラット有郭乳頭の味細胞における亜鉛の局在を亜鉛特異的蛍光指示薬 ZnAF-2 DA を用いて示し、また、味覚情報伝達に関わる II 型及び III 型味細胞に ZnT3 が発現することを明らかにしている。さらに本検討により、II 型味細胞を活性化させる味刺激によって味細胞から亜鉛が放出されることが示唆された。したがって、II 型味細胞において、ZnT3 により構成される小胞内に蓄積された亜鉛が味刺激により細胞外に放出されている可能性が考えられる。

味蕾において、II 型味細胞に発現する transient receptor potential melastatin 5 (TRPM5) は、味刺激に起因する細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇により活性化され、脱分極²⁴⁻²⁷⁾、さらには ATP 放出を誘発することで^{28,29)}、味覚の情報伝達に寄与している。放出された ATP は、味細胞近傍の知覚神経終末に発現する ATP 受容体 P2X2/3 で受容され、知覚神経に情報が伝達される³⁰⁾。また、放出された ATP は、II 型味細胞膜上の P2Y1 受容体を活性化させ、さらに ATP 放出を促進させるポジティブオートクリンフィードバック機構³¹⁻³⁴⁾や、P2Y4 受容体を介しての III 型味細胞の活性化、5-HT 及び γ -aminobutyric acid (GABA) の放出を引き起こすことで、II 型味細胞からの ATP 放出を阻害するネガティブパラクリンフィードバック機構^{33,35)}が存在すると報告されており、II 型味細胞における味情報の伝達は様々な因子により制御されている。一方、Uchida ら³⁶⁾、細胞外 Zn^{2+} 処置により mTRPM5 強制発現細胞における TRPM5 電流が用量依存的に抑制されたことから、TRPM5 の活性化が細胞外の亜鉛により抑制されることを報告している。ゆえに、味刺激により II 型味細胞から放出された亜鉛は、TRPM5 のチャンネル活性を阻害することで、後に続く味細胞の脱分極を抑制し、持続的な味刺激による味細胞の過剰な活性化を抑える働きをしている可能性が考えられる。

亜鉛は P2X2 受容体を介して ATP 応答を増強する allosteric modulator としても報告されている³⁷⁻³⁹⁾。そのため、亜鉛は、味細胞近傍の知覚神経終末に発現する P2X2 受容体を介した ATP 応答の増強、さらには II 型味

細胞膜上の P2X2 受容体を介して ATP 放出を促進させるポジティブオートクリンフィードバック機構の増強にも寄与することが考えられる。細胞外の ATP は I 型味細胞膜上に発現する NTPDase2 などのエクトエンザイムにより速やかに代謝され^{40,41)}、アデノシンにまで代謝された後、equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) を介して細胞内にクリアランスされると考えられている⁴²⁾。一方で、細胞外亜鉛は主に亜鉛トランスポーターなどを介して細胞内へクリアランスされる⁴³⁾。これらのことを考え併せると、味刺激により味細胞から放出された亜鉛は、味細胞からの ATP 放出を促進させることで味刺激を受けた際の味細胞間又は味細胞-神経終末間の ATP 量を維持し、さらに、味細胞近傍の知覚神経終末における ATP 応答を増強させることで、味刺激に由来する ATP シグナルを知覚神経終末に伝える役割を補助している可能性が考えられる。

以上のことをまとめると、味刺激により味細胞から放出される亜鉛は、TRPM5 を介して味細胞の過剰な活性化を抑えることで味細胞の機能維持に働くとともに、ATP 受容体を介して味細胞から知覚神経終末への ATP シグナル伝達を補助することで、ATP を介した味覚の情報伝達に寄与している可能性が示唆された。すなわち、味蕾において、亜鉛は味細胞の分化・増殖のみならず、味細胞間及び味細胞-神経終末間に放出されることで、新たな生理的役割を担う可能性が考えられた。本研究は、味刺激によって味細胞から亜鉛が放出されることを初めて示唆する成果であり、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。

5. 今後の課題

味細胞における亜鉛含有小胞を解明するために、免疫電子顕微鏡解析により ZnT3 の小胞での発現局在を明らかにする必要がある。

6. 参考文献

1. Haug FM, Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie*, **8**, 355-368 (1967).
2. Frederickson CJ, Moncrieff DW, Zinc-containing neurons. *Biol Signals*, **3**, 127-139 (1994).

3. Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD, ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14934-14939 (1996).
4. Keller KA, Chu Y, Grider A, Coffield JA, Supplementation with L-histidine during dietary zinc repletion improves short-term memory in zinc-restricted young adult male rats. *J Nutr*, **130**, 1633-1640 (2000).
5. Takeda A, Tamano H, Kan F, Itoh H, Oku N, Anxiety-like behavior of young rats after 2-week zinc deprivation. *Behav Brain Res*, **177**, 1-6 (2007).
6. Tassabehji NM, Corniola RS, Alshingiti A, Levenson CW, Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. *Physiol Behav*, **95**, 365-369 (2008).
7. Whittle N, Hauschild M, Lubec G, Holmes A, Singewald N, Rescue of impaired fear extinction and normalization of cortico-amygdala circuit dysfunction in a genetic mouse model by dietary zinc restriction. *J Neurosci*, **30**, 13586-13596 (2010).
8. Catalanotto FA, The trace metal zinc and taste. *Am J Clin Nutr*, **31**, 1098-1103 (1978).
9. Jakinovich W Jr, Osborn DW, Zinc nutrition and salt preference in rats. *Am J Physiol*, **241**, R233-239 (1981).
10. Chou HC, Chien CL, Huang HL, Lu KS, Effects of zinc deficiency on the vallate papillae and taste buds in rats. *J Formos Med Assoc*, **100**, 326-335 (2001).
11. Hamano H, Yoshinaga K, Eta R, Emori Y, Kawasaki D, Iino Y, Sawada M, Kuroda H, Takei M, Effect of polaprezinc on taste disorders in zinc-deficient rats. *Biofactors*, **28**, 185-193 (2006).
12. Segawa S, Nishiura T, Furuta T, Ohsato Y, Tani M, Nishida K, Nagasawa K, Zinc is released by cultured astrocytes as a gliotransmitter under hypoosmotic stress-loaded conditions and regulates microglial activity. *Life Sci*, **94**, 137-144 (2014).
13. Ma H, Yang R, Thomas SM, Kinnamon JC, Qualitative and quantitative differences between taste buds of the rat and mouse. *BMC Neurosci*, **8**, (2007).
14. Huang YJ, Maruyama Y, Lu KS, Pereira E, Plonsky I, Baur JE, Wu D, Roper SD, Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J Neurosci*, **25**, 843-847 (2005).
15. Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A, Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Bio*, **5**, 183-190 (2009).
16. Gaither LA, Eide DJ, The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem*, **276**, 22258-22264 (2001).
17. Ishii S, Misaka T, Kishi M, Kaga T, Ishimaru Y, Abe K, Acetic acid activates PKD1L3-PKD2L1 channel--a candidate sour taste receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **385**, 346-350 (2009).
18. Sakurai T, Misaka T, Ueno Y, Ishiguro M, Matsuo S, Ishimaru Y, Asakura T, Abe K, The human bitter taste receptor, hTAS2R16, discriminates slight differences in the configuration of disaccharides. *Biochem Biophys Res Commun*, **402**, 595-601 (2010).
19. Babes A, Fischer MJ, Filipovic M, Engel MA, Flonta ML, Reeh PW, The anti-diabetic drug glibenclamide is an agonist of the transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel. *Eur J Pharmacol*, **704**, 15-22 (2013).
20. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM, TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13525-13530 (2007).
21. Vega MT, Villalobos C, Garrido B, Gandía L, Bulbena O, García-Sancho J, García AG, Artalejo AR, Permeation by zinc of bovine chromaffin cell calcium channels: relevance to secretion. *Pflugers Arch*, **429**, 231-239 (1994).
22. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S, Cloiquinol and pyriethione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 8374-8379 (2009).
23. Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW, The role of zinc in selective neuronal death after

- transient global cerebral ischemia. *Science*, **272**, 1013-1016 (1996).
24. Pérez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, Max M, Margolskee RF, A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci*, **5**, 1169-1176 (2002).
 25. Liu D, Liman ER, Intracellular Ca^{2+} and the phospholipid PIP_2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15160-15165 (2003).
 26. Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ, Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, **112**, 293-301 (2003).
 27. Zhang Z, Zhao Z, Margolskee R, Liman E, The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci*, **27**, 5777-5786 (2007).
 28. Huang YA, Roper SD, Intracellular Ca^{2+} and TRPM5-mediated membrane depolarization produce ATP secretion from taste receptor cells. *J Physiol*, **588**, 2343-2350 (2010).
 29. Murata Y, Yasuo T, Yoshida R, Obata K, Yanagawa Y, Margolskee RF, Ninomiya Y, Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels. *J Neurophysiol*. **104**, 896-901, (2010).
 30. Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, Kinnamon SC, ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*, **310**, 1495-1499 (2005).
 31. Kataoka S, Toyono T, Seta Y, Ogura T, Toyoshima K, Expression of P2Y1 receptors in rat taste buds. *Histochem Cell Biol*, **121**, 419-426 (2004).
 32. Hayato R, Ohtubo Y, Yoshii K, Functional expression of ionotropic purinergic receptors on mouse taste bud cells. *J Physiol*, **584**, 473-488 (2007).
 33. Huang YA, Dando R, Roper SD, Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *J Neurosci*, **29**, 13909-13918 (2009).
 34. Huang YA, Stone LM, Pereira E, Yang R, Kinnamon JC, Dvoryanchikov G, Chaudhari N, Finger TE, Kinnamon SC, Roper SD, Knocking out P2X receptors reduces transmitter secretion in taste buds. *J Neurosci*, **31**, 13654-13661 (2011).
 35. Dvoryanchikov G, Huang YA, Barro-Soria R, Chaudhari N, Roper SD, GABA, its receptors, and GABAergic inhibition in mouse taste buds. *J Neurosci*, **31**, 5782-5791 (2011).
 36. Uchida K, Tominaga M, Extracellular zinc ion regulates transient receptor potential melastatin 5 (TRPM5) channel activation through its interaction with a pore loop domain. *J Biol Chem*, **288**, 25950-25955 (2013).
 37. Wildman SS, King BF, Burnstock G, Zn^{2+} modulation of ATP-responses at recombinant P2X2 receptors and its dependence on extracellular pH. *Br J Pharmacol*, **123**, 1214-1220 (1998).
 38. Xiong K, Peoples RW, Montgomery JP, Chiang Y, Stewart RR, Weight FF, Li C, Differential modulation by copper and zinc of P2X2 and P2X4 receptor function. *J Neurophysiol*, **81**, 2088-2094 (1999).
 39. Ma B, Ruan HZ, Burnstock G, Dunn PM, Differential expression of P2X receptors on neurons from different parasympathetic ganglia. *Neuropharmacology*, **48**, 766-777 (2005).
 40. Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sévigny J, Finger TE, Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol*, **497**, 1-12 (2006).
 41. Vandenbeuch A, Anderson CB, Parnes J, Enjyoji K, Robson SC, Finger TE, Kinnamon SC, Role of the ectonucleotidase NTPDase2 in taste bud function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 14789-14794 (2013).
 42. Nishida K, Kitada T, Kato J, Dohi Y, Nagasawa K, Expression of equilibrative nucleoside transporter 1 in rat circumvallate papillae. *Neurosci Lett*, **533**, 104-108 (2013).
 43. Segawa S, Shibamoto M, Ogawa M, Miyake S,

Mizumoto K, Ohishi A, Nishida K, Nagasawa K, The effect of divalent metal cations on zinc uptake by

mouse Zrt/Irt-like protein 1 (ZIP1). *Life Sci*, **113**, 40-44 (2014).

Elucidation of the Physiological Significance of Zinc in Taste Cells Using a Zinc Biosensing System

Kentaro Nishida

Department of Integrative Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University

Summary

Zinc is an essential trace element and its deficiency results in dysgeusia. It is a neurotransmitter in the central nervous system and is accumulated in zinc transporter 3 (ZnT3)-expressing vesicles in the hippocampus. We previously examined the distribution of zinc and expression profiles of ZnT3 in taste cells. Zinc-positive signals were demonstrated using a zinc fluorescence dye (ZnAF-2DA) and autometallography staining in the cells of taste buds. ZnT3 immunoreactivity was detected in PLC- β 2- and IP₃R3-positive type II and AADC-positive type III taste cells, but not in type I cells. However, the role of zinc in transmitting taste signals in rat taste buds remains unknown. In this study, we evaluated zinc release from isolated taste cells using a zinc biosensing system. mRNAs for ZnT3 were expressed by isolated taste buds. Taste stimuli activated the zinc-sensitive cells with isolated taste cells; however, the response ratio decreased significantly following pretreatment with MgEDTA as an extracellular zinc chelator, but not with ZnEDTA. These findings suggest that upon stimulation, zinc is released by the taste cells into the intercellular space, and it might play a role in signal transmission within taste buds.