

大豆由来因子が亜鉛吸収に及ぼす影響に関する分子生物学的解析

神戸大朋*

京都大学大学院生命科学研究科

Effects of a Soybean Component on Zinc Absorption Using Molecular Biological Approach

Taiho KAMBE

Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

The zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) is essential for zinc absorption. The *ZIP4* gene is mutated in humans in the rare, autosomal recessive genetic disease acrodermatitis enteropathica, which is well known as the only severe zinc deficiency. ZIP4 is dynamically regulated by multiple post-transcriptional mechanisms. In zinc deficiency, ZIP4 protein levels are increased and localized on the apical membranes after the extracellular amino-terminal half of the protein is proteolytically cleaved. Administration of an oral gavage of zinc caused ZIP4 internalization and degradation in enterocytes. We found that similar responses were observed in ZIP4 expressed in cultured mouse Hepa cells; ZIP4 is induced by zinc deficiency and degraded in response to added zinc. Here, we generated the anti-ZIP4 monoclonal antibody that specifically recognizes ZIP4 and established a rapid screening system using it and Hepa cells to identify a soybean component that increases ZIP4 expression, which should be a potential enhancer of zinc absorption in the intestinal epithelial cells. We found that Soyaflavone HG, the initial component of which is isoflavone, includes the factor(s) enhancing ZIP4 expression by the use of this screening system, suggesting soyaflavone HG may contain a factor(s) enhancing zinc absorption. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 101-104, 2010.

Key words : zinc transporter, ZIP4, Hepa cells, absorption, soy isoflavone

*〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

近年、我が国においても、予想を大きく上回る数の潜在的亜鉛欠乏患者がいることが報告され、健全な社会生活への影響が懸念されるようになった¹⁾。亜鉛欠乏は、味覚異常、免疫機能低下や創傷治癒力の低下の要因となるため、日常の食事から亜鉛を適切に摂取することは非常に重要である。そのため、亜鉛の吸収に影響を与える食品由来因子は、特に注目される。亜鉛の吸収には、小腸特異的に発現する亜鉛トランスポーター ZIP4が重要である。ZIP4遺伝子は、ヒトで唯一確認されている先天性の亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎 (*acrodermatitis enteropathica*) の原因遺伝子であるため、ZIP4は亜鉛吸収において必須の役割を果たす分子となる。通常、ZIP4は小腸上皮細胞の細胞内小器官に存在しているが、亜鉛欠乏時には腸管腔側頂端膜上 (アピカル膜上) に蓄積されて亜鉛吸収に機能し、一方、亜鉛過剰時には速やかに分解を受け、過剰の亜鉛の取り込みを防いでいる^{2~4)}。申請者は、腸管からの亜鉛の吸収に影響を与える食品由来因子を探索する過程で、大豆ポリフェノール・DaidzeinやGenisteinが、亜鉛欠乏時に誘導されるZIP4の発現を顕著に抑制するという結果を得ていた。この結果は、フィチン酸以外の食品因子がZIP4の発現を変化させ、腸管からの亜鉛吸収に大きく影響することを示唆している。本研究では、ZIP4の発現を指標に、ZIP4の発現に影響を与える食品因子の探索に有用なスクリーニング系を構築し、その系を用いて大豆由来因子の亜鉛吸収に及ぼす影響について解析することを試みた。

方 法

抗ZIP4モノクローナル抗体の作成

ZIP4のアミノ末端領域 (シグナル配列を除くN末から第一膜貫通領域の直前まで、28 ~ 328aa) をMBP融合、あるいはGST融合たん白質として大腸菌に発現させ、それぞれの融合たん白質をアフィニティーカラムを用いて高純度に精製した。MBP融合ZIP4たん白質を抗原としてBalb/Cマウスに免疫し、ZIP4を認識するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を樹立した。ハイブリドーマ株の選別には、GST融合ZIP4たん白質を用いたEnzyme linked Immunoassay (EIA) を実施し、最終的にはImmunoblot解析にて、最も特異性の高く、親和力の強い抗ZIP4モノクローナル抗体を産生する株を一株選んだ。実験に用いた抗ZIP4モノクローナル抗体は、マウス腹水より調製した。

ZIP4の発現に影響を及ぼす因子の解析

マウス肝細胞株Hepaの培養液に種々の大豆素材を

添加し、24時間培養した。その後、培養した細胞から全細胞たん白質を回収してウェスタンブロット解析を行い、ZIP4の発現量に変化を与える因子について探索した。

結 果

抗ZIP4モノクローナル抗体の作成

Hepa細胞が発現する内在性のZIP4の量を指標にして亜鉛吸収促進物質の探索を行うには、高感度の抗体が必要となる。そこで、定法に従って、マウスZIP4のN末端領域に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を作成した。抗原としたZIP4のN末端領域に対する特異性を指標にしたEIAにて一次スクリーニングを行い (Fig. 1A and B)、さらに選別した各株の培養上清を用いたImmunoblotにて、最終的に特異性が高く親和力の強い抗ZIP4抗体を産生する一株を樹立した。本株が産生する抗ZIP4抗体は、ImmunoblotでHepa細胞が発現するZIP4を極めて特異的に認識する非常に有用な抗体であった (Fig. 1C and Fig. 2A)。本抗体とHepa細胞を組み合わせ、食品由来因子のZIP4発現促進効果を解析するためのスクリーニング系を構築した (Fig. 2B and C)。

ZIP4の発現に影響を及ぼす大豆由来因子の探索

構築したスクリーニング系を用いて、種々の大豆由来因子の効果について検討を行った。通常培地 (2 ~ 3 μ M亜鉛含量) に種々の大豆素材を添加し、24時間後のZIP4の発現量を解析したところ、ソヤフラボンHG中にZIP4の発現促進効果があることが判明した (Fig. 3A)。このソヤフラボンHGの効果は、培地中の終濃度が0.1%程度で観察でき、さらに濃度依存的であることが判明した (Fig. 3B)。ZIP4の発現を促進する食品由来因子としては、初めての例となる。

考 察

本研究では、当初、ZIP4遺伝子を導入して安定発現させた小腸上皮モデル細胞CaCO2細胞やイヌ腎上皮細胞MDCKを用いて、大豆由来因子の効果を検討することを計画していたが、ZIP4の発現量が細胞の培養条件によって微妙に変化するため、因子の効果をダイレクトに評価できないという問題に直面した。そこで、肝細胞でありながら、腸管上皮細胞と匹敵する感度で亜鉛依存的に内在性のZIP4を発現するマウスHepa細胞を用いたスクリーニング系の樹立を試みた。そのため、ZIP4を特異的に認識する高感度な抗体が必要となった

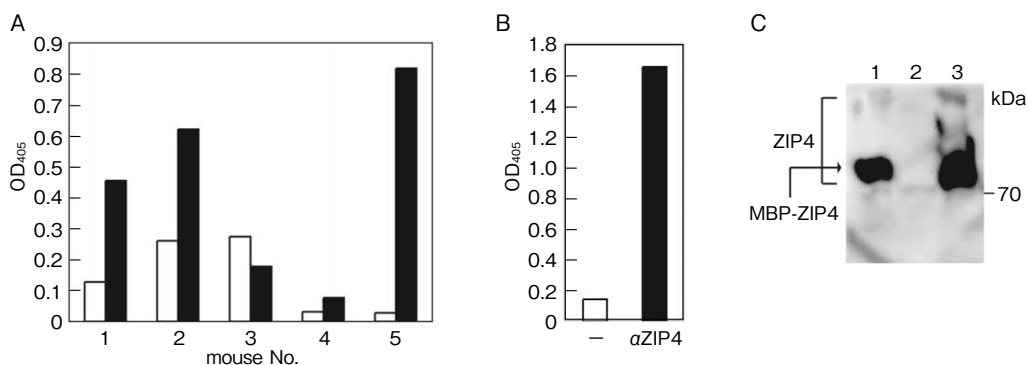


Fig. 1. Generation of anti-ZIP4 monoclonal antibody. A. Representative result of EIA to select a mouse immunized with purified MBP-ZIP4. Their spleens were removed to generate hybridomas. EIA was carried out using the plate where purified GST-ZIP4 was fixed in the well. Mouse serum after 2nd (white bar) and 3rd immunization (black bar) was examined. B and C. Results of EIA and immunoblot analysis using supernatant of the hybridoma producing anti-ZIP4 antibody. EIA was carried out as in A and the following proteins were subjected to immunoblot in C. 1. purified MBP-GST, 2. total cellular protein prepared from MDCK cells, 3. total cellular protein prepared from MDCK cells stably expressing ZIP4.

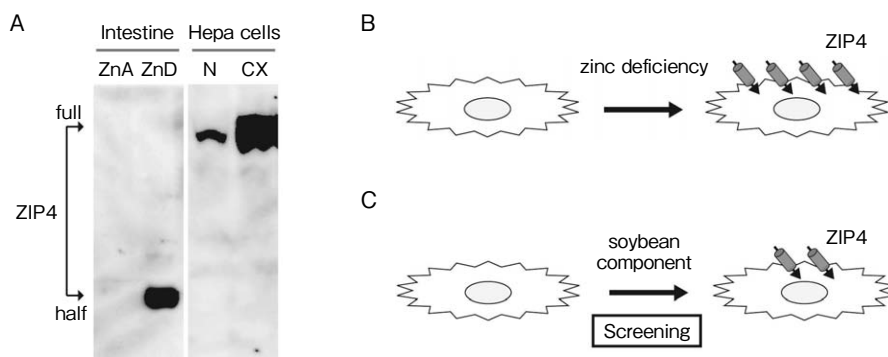


Fig. 2. Conceptual scheme of the screening system established in this study. A. Hepa cells up-regulate ZIP4 protein when cultured in zinc deficient medium in a manner similar to that of the intestinal epithelial cells. Membrane proteins (10 μ g) prepared from the intestinal epithelial cells of mice fed a zinc adequate (ZnA) or zinc deficient (ZnD) diet or Hepa cells cultured in the indicated condition (N; normal medium, CX; zinc deficient medium) for 24 hr were lysed in lysis buffer and then separated with electrophoresis through 8% SDS polyacrylamide gels. The blot was blocked with blocking solution and then incubated with anti-ZIP4 monoclonal antibody. B and C. Conceptual scheme of the screening system established in this study. Hepa cells are useful to identify a soybean component(s) to increase ZIP4 expression. It should be a potential enhancer of zinc absorption in the small intestine.

が、幸運にもZIP4を非常に特異的に認識するモノクローナル抗体が樹立でき、Hepa細胞が発現するZIP4の発現量を指標としたスクリーニング系を構築するに至った。本スクリーニングでは、細胞膜を回収することなく細胞全たん白質を用いて感度良くImmunoblotを行うことが可能であるため、非常に簡便に様々なサンプルの効果を解析できるという利点を持つ。実際に、

種々の大豆由来物質の効果を調べたところ、ソヤフラボンHG中に、ZIP4の発現を促進する活性があることを見出し、現在、解析を進めているところである。ソヤフラボンHGによるZIP4の発現促進は、重度の亜鉛欠乏下 (Fig. 3AのCX培地) で培養した際に認められるZIP4の発現促進に比べると弱い効果であった。しかしながら、このような重度の亜鉛欠乏状態 (～70

nM) が実際の生体で起こるとは考えられないため、ソヤフラボンHGは亜鉛吸収促進活性を持つ大豆素材として十分に期待できると考えている。

食生活の簡便化が進む先進諸国において、慢性型亜鉛欠乏患者数は今後ますます増加することが予想されるため、亜鉛吸収に必須の役割を果たす亜鉛トランスポーターであるZIP4の発現を増強させる因子は、亜鉛吸収量を高めることに極めて有効であると考えられる。我が国では、特に高齢者において亜鉛を不足する傾向が強いことが明らかにされてきており¹⁾、来たるべき超高齢者社会を前に、サプリメントからではなく、食事から亜鉛を適切に摂取する方法を確立することは極めて重要である。今後の解析で、ソヤフラボンHGに見出した活性成分を同定し、その作用機構を解明することは極めて興味深い。

要 約

ZIP4のN末端領域を高感度で認識するモノクローナル抗体を樹立した。このモノクローナル抗体と、肝細胞でありながら腸管上皮細胞に匹敵する感度で亜鉛依存的にZIP4を発現するマウスHepa細胞を用いて、ZIP4発現促進因子の探索に有用な*in vitro*スクリーニング系を構築した。このスクリーニング系を用いて、大豆由来因子のZIP4発現促進活性を検討した結果、ソヤフラボンHG中に有意な発現促進効果を認めた。ZIP4の発現を増加させる食品由来因子はこれまで全く報告されておらず、このソヤフラボンHGの効果は大変注目される。

文 献

- 1) 倉澤隆平, 久堀周次郎 (2008): 地域住民にみる亜鉛欠乏の実態と亜鉛の有効性. *Trace Nutrients Research*, **25**, 1.
- 2) Kambe T, Weaver BP and Andrews GK (2008): The Genetics of Essential Metal Homeostasis during Development. *Genesis*, **46**, 214-228.
- 3) Kambe T and Andrews GK (2009): Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (Slc39a4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 129-139.
- 4) Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T and Andrews GK (2007): Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol. Chem.*, **388**, 1301-1312.

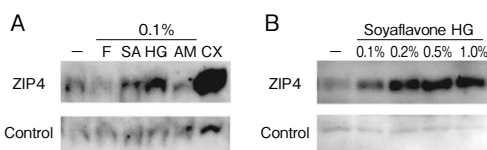


Fig. 3. Soyaflavone HG stimulates ZIP4 expression in Hepa cells. A. Hepa cells were cultured in the presence of the indicated soybean components for 24 hr. -: no addition, F; Fujipro F, SA; Soyhealth SA, HG; Soyaflavone HG, AM; Hinute AM. CX means the culture in the medium supplemented with Chelex-treated FCS (zinc deficient condition). B. Hepa cells were cultured in the presence of the indicated concentration of soyaflavone HG for 24 hr. In A and B, Total cellular proteins (20 μ g) prepared from Hepa cells cultured in the indicated conditions were subjected to immunoblot analysis as in Fig. 2A.