

大豆由来因子が亜鉛輸送体に及ぼす効果の分子メカニズムの解析

神戸大朋*

京都大学大学院生命科学研究科生体情報応答学分野

Study of the Molecular Mechanism of how Soybean Components Affect the Expression of Zinc Transporter, ZIP4

Taiho KAMBE*

Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies,
Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

Zinc deficiency is a world-wide health problem and recent reports contain estimates that more than 25% of the world population is at risk of zinc deficiency. Hence a strategy enabling efficient zinc absorption is needed. In the intestinal epithelial cells, the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4), which was identified as a responsible gene for the rare, autosomal recessive genetic disease acrodermatitis enteropathica, functions as an essential component for zinc absorption. Exogenous expression of ZIP4 leads zinc uptake into the cells, suggesting that a food factor increasing ZIP4 expression should be a potential enhancer of zinc absorption in the intestinal epithelial cells. We established a rapid screening system using anti-ZIP4 monoclonal antibody and Hepa cells to identify a soybean component increasing ZIP4 expression, and found by the use of this screening system that soyaflavone HG, the initial component of which is isoflavone, includes the factor(s) enhancing ZIP4 expression. In this study, we improved the screening system by expressing secretory alkaline phosphatase under the control of the metallothionein promoter, which enabled us to monitor increases of zinc content in the cells. We confirmed increases of zinc content in the cells treated with soyaflavone HG by the use of this improved system, suggesting that soyaflavone HG stimulates zinc uptake in the cells via enhancement of ZIP4 expression. Furthermore, we investigated the mechanism of how soyaflavone HG increases ZIP4 expression and found that soyaflavone HG inhibits ZIP4 degradation triggered by zinc. These results strongly suggest that soyaflavone HG contains useful factor(s) to enhance zinc absorption. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 58-62, 2011.

* 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Key words : zinc transporter, ZIP4, zinc absorption, soyaflavone HG

近年、先進諸国において亜鉛欠乏症は世界共通の栄養問題となりつつある。我が国でも最近実施された疫学調査において、2～3割に及ぶ人が亜鉛不足の傾向にあることが報告されている^{1,2)}。亜鉛欠乏は、味覚障害、免疫機能低下、創傷治癒力低下などの要因となるため、日々の食事により亜鉛を充足させ、その予防を実践することは極めて重要である。しかしながら、亜鉛の吸収効率は約30%と低く、すべての亜鉛が効率よく吸収されているわけではない。従って、亜鉛の吸収を促進する食品由来の因子を見出すことが重要となるが、これまでそのような因子は全く同定されていなかった。

亜鉛は、主として小腸上皮細胞で吸収されるが、その吸収過程に必須の役割を果たすのが亜鉛トランスポーター ZIP4である^{3,4)}。ZIP4を過剰発現させた細胞では、細胞内の亜鉛含量が増加するため⁵⁾、ZIP4の発現を促進する食品由来因子は、亜鉛欠乏の予防に効果的であると考えられる。著者は、前年度の解析において、大豆抽出物であるソヤフラボンHG中にZIP4の発現を上昇させる活性があることを見出していたため、今年度は、その発現促進活性の制御メカニズムの解析と細胞内への亜鉛取り込み活性についての解析を行い、活性因子の同定を試みた。

方 法

改良型ZIP4発現促進活性因子スクリーニング系の構築

現行のスクリーニング培養細胞株に、細胞内亜鉛濃度に応じて発現が上昇するメタロチオネインプロモーター（マウス MT-I, -236～+36）の制御により分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）を発現する形質を導入し、細胞内亜鉛量の増加をSEAP活性でモニターできるように改良した⁶⁾。SEAPを発現する24株以上のクローンの中から、ZIP4の発現量とSEAP活性の応答性が最も良い株を選別し、改良型スクリーニング細胞（SEAP-Hepa細胞）として使用した。

ZIP4発現促進活性の解析、ならびに、細胞内亜鉛取り込み活性の解析

SEAP-Hepa細胞の培養液中に記載された濃度のソヤフラボンHGを添加し、ZIP4の発現とSEAP活性の変動について解析した。SEAP活性の測定には、細

胞培養液10 μ Lを使用し、100 μ Lの基質溶液（2 mg/mL *p*-nitrophenyl phosphate in 1 M diethanolamine buffer, pH 9.8 containing 0.5 mM MgCl₂）を加えた後、室温に放置し、遊離してくる *p*-nitrophenolの量を吸光計にて測定した（波長=405 nm）⁷⁾。ウシ小腸ALP（TAKARA）を用いて検量線を作成し、各培養上清中のSEAP活性を算出した。ZIP4の発現量の解析は、従来通り抗ZIP4抗体を用いたウェスタンブロット解析にて実施した。

ソヤフラボンHG中に含有されるZIP4発現促進因子の分離・精製

ソヤフラボンHG中に含まれる活性因子の精製のため、水、メタノールに溶解後に粗精製し、この粗精製物をSep-Pakカラム、中圧カラムクロマトグラフィー、TLCにかけてZIP4発現促進活性を示す画分を分離精製した。各精製画分に含有されるZIP4発現促進活性の確認には、上述のウェスタンブロット解析を使用した。

結 果

前年度の解析で、ソヤフラボンHGはZIP4発現促進活性を含有することが認められていたが、実際にソヤフラボンHGの添加によって細胞内への亜鉛取り込み量が増加するかどうかについては検討できていなかった。従って、もしソヤフラボンHGに亜鉛をキレート除去する活性が含まれていた場合、認められたZIP4の発現促進活性は、ソヤフラボンHG処理による亜鉛の除去によるアーティファクトの結果となり、真の亜鉛吸収促進因子としては作用しないということになる。そこで、従来用いていた細胞株にメタロチオネインプロモーターの制御により分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）を発現する形質を導入し、亜鉛量の変化を同時に追跡できるように改良した細胞株（SEAP-Hepa細胞）を樹立した。SEAP-Hepa細胞を用いて、ソヤフラボンHGが細胞内亜鉛取り込み量を増加させるかどうか評価したところ、期待通りソヤフラボンHGの容量依存的にSEAP活性の増加が観察された（Fig. 1）。すなわち、ソヤフラボンHGには真のZIP4発現促進活性が含まれ、またその活性は細胞内亜鉛量を増加させることが判明した。この結果は、ZIP4の発現を促進させる化合物が存在することを示す初めての結

果であったため、次に同活性を有する化合物の同定を試みた。ソヤフラボンHG粗精製物をSep-Pakカラム、中圧カラムクロマトグラフィー、TLCにかけてZIP4発現促進活性を示す画分をウェスタンブロット解析にて解析したところ、低分子化合物画分に含まれることが判明した (Fig. 2B)。化合物の構造を決定するために、現在、スケールをアップして単離を進めているところである。

ZIP4たん白質の発現量は、細胞内亜鉛量が減少した時に増加する⁸⁾。これは、ZIP4の発現量が亜鉛欠乏時に増加するだけでなく、亜鉛存在時に恒常的に分解されているZIP4たん白質が亜鉛欠乏時には抑制される結果、見かけ上ZIP4たん白質が増加するためである^{4, 5)}。ソヤフラボンHGのZIP4発現促進効果が、どのような

作用機序であるのか解析したところ、亜鉛によるZIP4たん白質の分解を抑制させる効果であることが判明した (Fig. 3)。

考 察

従来用いていたスクリーニング系で認められたZIP4発現促進活性は、実際にZIP4の発現を促進した場合と、亜鉛キレート作用により細胞内の亜鉛量が枯渇し、見かけ上ZIP4の発現が上昇してしまった場合の2つの可能性を区別することができなかった。今回樹立したSEAP-Hepa細胞は、ZIP4の発現量変化と同時に細胞内亜鉛量の変化を追跡できるように改良した株であるため、この問題を解決することが可能となる。実際、

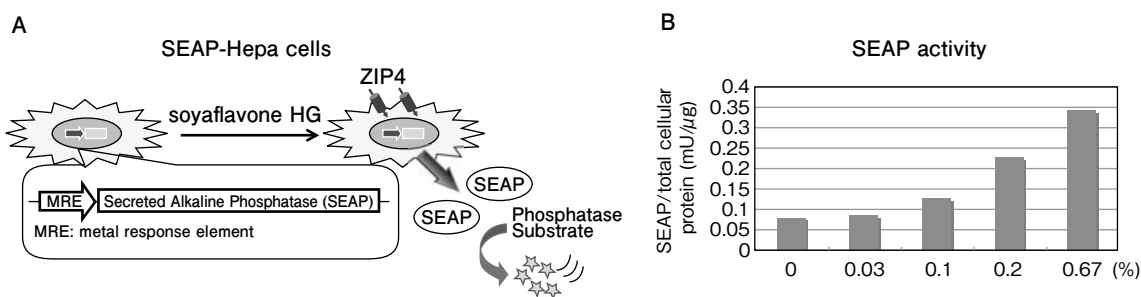


Fig. 1. Soyaflavone HG increases zinc uptake in Hepa cells. A. Conceptual scheme of establishment of SEAP-Hepa cells. B. Soyaflavone HG increases SEAP activity in SEAP-Hepa cells in a dose-dependent manner. SEAP activity in the spent medium was measured and its activity was calculated from a standard curve. SEAP activity is expressed as mU/μg total cellular protein. In SEAP-Hepa cells, SEAP activity indicate increases in zinc content in the cells.

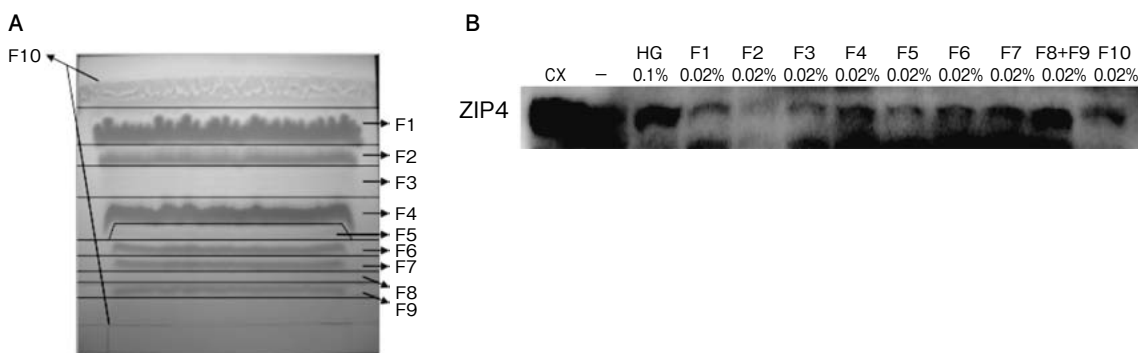


Fig. 2. Component(s) of soyaflavone HG induces ZIP4 expression in Hepa cells. A. Soyaflavone HG (60 mg) was separated into 10 fractions (F1~F10) by TLC using the solvent system ACN/distilled water (30:70). B. The potency of component(s) of each fraction to induce ZIP4 expression was investigated. Fraction 8 and 9 (F8+9) contains component(s) enhancing ZIP4 expression. CX: zinc deficient medium, HG: soyaflavone HG.

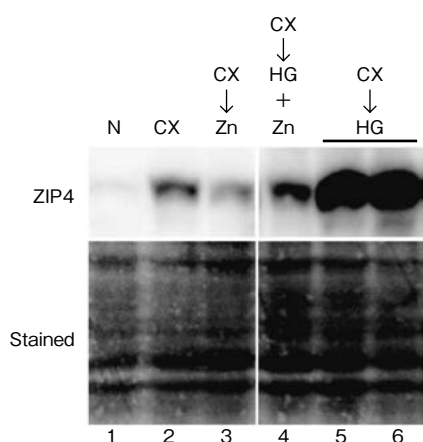


Fig. 3. Soyafavone HG inhibits the degradation of ZIP4 in Hepa cells. Hepa cells cultured in the zinc deficient medium (CX) were treated with 20 μ M ZnSO₄ with (CX→HG+Zn) or without (CX→Zn) Soyafavone HG for 6 h (lanes 3 and 4) or cultured for 30 h in the zinc deficient medium to which Soyafavone HG had been added for the last 6 h (CX→HG, lane 5 and 6). Total cellular protein was analyzed by Western blotting using anti-ZIP4 antibody. Soyafavone HG inhibits the degradation triggered by added zinc to zinc deficient culture (lane 3). N: cultured in the normal medium, CX: cultured in the zinc deficient medium for 24 h.

SEAP-Hepa細胞を用いてソヤフラボンHGの亜鉛取り込み促進活性を確認できたが、さらに本株は、現在実施中の活性因子の単離・同定においても非常に有力なアッセイ系となっている。現在、活性因子の単離・同定には至っていないが、活性因子の性質として、水溶性の低分子化合物であることが判明している。ソヤフラボンHGの持つZIP4発現促進活性は、ZIP4の発現を高めることが見出された初めての例であり、活性を有する化合物の構造決定が待たれるところである。

ソヤフラボンHGのZIP4発現促進効果が、ZIP4タンパク質の分解抑制であったことから、亜鉛存在時にZIP4がエンドサイトーシスを免れ細胞膜上に留まることで、細胞内への亜鉛取り込みに機能しているモデルを予想することが出来る。ソヤフラボンHGに含有されるZIP4発現促進活性は、①水溶性の因子であり、②100℃で10分以上の煮沸によってもその活性を消失しないことが判明しているため、食品由来の亜鉛吸収促進因子として非常に有用な化合物であることが予想される。

要 約

従来スクリーニング系で使用していた細胞株に細胞内亜鉛量をモニターできる形質を導入し、改良型スクリーニング細胞株を樹立した (SEAP-Hepa細胞)。SEAP-Hepa細胞を用いて、ソヤフラボンHGには細胞内への亜鉛取り込み活性が含有されることを確認した。また、このソヤフラボンHGの効果は、ZIP4タンパク質の分解の抑制によりもたらされることを明らかにした。さらに、ソヤフラボンHGから、ZIP4発現促進因子を同定するために精製を試み、水溶性の低分子化合物であることを指示する結果が得られたが、構造決定には至らなかった。

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**, 1-7.
- 2) Maret W and Sandstead HH (2006): Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol*, **20**, 3-18.
- 3) Kambe T, Weaver BP and Andrews GK (2008): The Genetics of Essential Metal Homeostasis during Development. *Genesis*, **46**, 214-228.
- 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.

- 5) 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.
- 6) Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y and Kambe T (2005): Zinc transporters, ZnT₅ and ZnT₇, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are Glycosyl phosphatidyl inositol-anchored to the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem*, **280**, 637-643.
- 7) Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland ML, Faundez V, Hiromura M, Masuda S, Nagao M, Enomoto S and Kambe T (2011): Tissue nonspecific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway. *J Biol Chem*, **286**, 16363-16373.
- 8) Mao X, Kim BE, Wang F, Eide DJ and Petris MJ (2007): A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity. *J Biol Chem*, **282**, 6992-7000.