

ヒトZIP4発現促進因子の同定と効果の検証

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 Food Components with the Ability to Increase Human ZIP4 Expression to Improve Zinc Absorption

Taiho KAMBE*

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

ABSTRACT

Zinc is an essential nutrient for human health. It plays critical roles in diverse biological responses as a structural, catalytic, and regulatory component within proteins. Recently, people with marginal zinc deficiency and suboptimal zinc status have been detected in both less developed and industrialized countries. Strategies for increasing zinc absorption are important to prevent marginal zinc deficiency, because the efficiency is estimated to be about 30% in normal conditions. 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 molecule for zinc absorption. Exogenous expression of ZIP4 results in zinc uptake into the cells, suggesting that food factor(s) increasing ZIP4 expression should be a potential enhancer of zinc absorption. In previous studies, we had found that several soybean extracts including soyaflavone HG and soyhealth SA have this effect. Here, we identified a type of soyasaponin from soyhealth SA as an important active component. Moreover, we investigated the molecular mechanism by which soyhealth SA increases ZIP4 expression. Furthermore, we screened soybean extract(s) with the ability to increase human ZIP4 expression using MDCK FLp-InTMT-Rex cells stably expressing human ZIP4, and found some extracts that have the effect. These results strongly suggest that soybean extracts may be potential enhancers of zinc absorption. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 85-89, 2014.

*〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Key words : zinc transporter, ZIP4, zinc absorption, soyhealth SA, soyasaponin, endocytosis

近年、先進諸国において亜鉛欠乏症は共通の栄養問題となりつつある^{1,2)}。亜鉛は、多様な生理作用を果たすため、その不足は、味覚障害、免疫機能低下、創傷治癒力低下などを引き起こす。従って、日々の食事により亜鉛を充足させ、その予防に努めることは非常に重要である^{3,4)}。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^{5,6)}。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、そのような因子については、これまで全く同定されていなかった。

亜鉛は、十二指腸や空腸で体内に吸収されるが⁷⁾、その吸収に必須の役割を果たす輸送たん白質が亜鉛トランスポーター ZIP4である^{8,9)}。ZIP4は腸管上皮細胞の頂端膜に局在し、管腔内の食事由来の亜鉛を上皮細胞内に取り込む役割を果たす^{10,11)}。これまでに実施された様々な解析結果から、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ことが示されており¹²⁾、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。申請者は、これまでの解析で、複数の大豆抽出物がZIP4発現促進活性を有することを見出しており、さらに、ソイヘルスSAより活性因子の一つとしてソヤサポニンと同定することに成功している。本解析では、このソヤサポニンを含むソイヘルスSAの作用メカニズムを詳細に解析すると同時に、ヒトZIP4に対する効果についても解析を実施した。本解析で見出したソヤサポニンの効果が、亜鉛欠乏予防に活用されることが期待される。

方 法

細胞培養と食品添加物のスクリーニング

細胞培養には、10%牛胎児血清を添加したDMEMを用いた¹³⁾。in vitroスクリーニングで使用する細胞株の培養液に様々な大豆抽出物を加えて24時間培養した。細胞を回収した後、全細胞抽出液を調製し、ウェスタンブロット法にてそれぞれの条件下でのZIP4の発現量を定量した。各大豆抽出物の細胞毒性についての評価は、MMT試薬 (Dojindo Laboratories) を用いて実施した。

ソイヘルスSAの作用点の解析

亜鉛欠乏状態で培養することで膜表面 (細胞膜) にZIP4を蓄積させた状態で、亜鉛と同定大豆抽出物を同時に添加した後、経時的に細胞を回収し、細胞膜に発現するZIP4の量を細胞表面ビオチン化標識法を用いて定量した¹³⁾。ビオチン化にはPIERCE社のEZ-Link, a Sulfo-NHS-SS-Biotin reagentを使用した。クラスリンを介したエンドサイトーシスに及ぼす影響についての解析には10 μ g/mL Tf-conjugated with Texas Red (Rockland, Gilbertsville) を1時間作用させた時にエンドサイトーシスされる蛍光を観察して評価した。また、脂質ラフトを介したエンドサイトーシスの評価には、Alexa Fluor 488-conjugated cholera toxin subunit B (CTB, Invitrogen) を用いた。細胞内亜鉛量の変化については、細胞内亜鉛レベルを反映するマーカーとして使用されるメタロチオネインmRNAの発現量をリアルタイムPCRにより定量することで評価した。RT-PCRからリアルタイムPCRまでの操作は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用した。

改良型ヒトZIP4発現促進活性因子スクリーニング系を用いた解析

MDCK FLp-InTMT-Rex細胞にヒトZIP4を導入し、テトラサイクリン存在下でのみヒトZIP4を発現する制御が可能となった株をTranswell Plate上で培養し、腸管上皮を模した極性細胞となるよう分化させた。その培養液にテトラサイクリンを加えてヒトZIP4の発現を低レベル誘導した。テトラサイクリンを除去した後、各種大豆抽出サンプルを添加し、24時間前培養した。次に細胞表面をビオチン標識し、細胞表面へのヒトZIP4の発現量をウェスタンブロット解析にて定量した。

ソイヘルスSA、他的大豆抽出物中に含有されるZIP4発現促進因子の分離・精製

ソイヘルスSA、他的大豆抽出物中に含まれるZIP4発現促進因子の精製のため、粗抽出物を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、単一化合物まで精製できたサンプルについては、NMRなどを用いて構造決定した。

結 果

ソイヘルスSAのZIP4発現促進活性に関する生化学的解析

これまでの解析で、複数の大豆由来食品抽出物にZIP4の発現促進活性が含まれることが見出されていたため、まず、これら活性成分を単離同定することを試みた。幾つかの抽出物から精製を試み、ソイヘルスSAから複数の単一化合物を単離した。その中の一つが高いZIP4発現促進活性を保持していることを確認できたため、各種機器解析にてこの化合物の構造を決定したところ、ソヤサポニンであることが判明した。ソヤサポニンはマウスZIP4の発現量を大きく増加させる活性を持っていたため、続いて、このソヤサポニンを含むソイヘルスSAのZIP4発現促進効果の作用点について詳細に解析した。まず、ソイヘルスSAにZIP4 mRNAの発現レベルを増加させる効果があるかどうか解析したが、mRNA量を変化させる効果については認めることはできなかった (Fig. 1)。通常、ZIP4たん白質は、亜鉛が十分存在する場合、エンドサイトーシスされて細胞内で分解される。そこで、このZIP4の分解に及ぼすソイヘルスSAの効果を解析したところ、予想通り、ソイヘルスSAは、細胞膜上に発現したZIP4のエンドサイトーシスを抑制することでZIP4を分解から回避させ、細胞膜上に留まり発現量を増加させていることが判明した (Fig. 2)。さらに、ソイヘルスSAのエンドサイトーシス抑制効果は、トランスフェリン

レセプターやコレラ毒素Bサブユニットに対してはほとんど影響しなかったことから、ZIP4に対する特異性が高いと考えられる (Fig. 2)。すなわち、ソイヘルスSAは、他の膜たん白質の細胞膜の局在変化にはほとんど影響を与えず、ZIP4の発現量を特異的に増加させることができると予想される。ソイヘルスSAが細胞内の亜鉛量を増加させる効果を持つことも確認できており、ソヤサポニンを含むソイヘルスSAのような大豆抽出物には、消化管でのZIP4を介した亜鉛吸収を促進する効果を持つことが期待される。In vitroの系では、ソイヘルスSAが、ヒトZIP4の発現も増加させることも確認できており、ヒトZIP4に対してもその発現増強効果が期待される。

ヒトZIP4発現促進活性因子スクリーニング系を用いた大豆抽出物の評価

ヒトZIP4を安定発現させたMDCK細胞をTranswell Plate上で培養して腸管上皮を模した極性細胞となるよう分化させた後、調製した種々の大豆抽出物画分に含まれる活性について評価した。種々の抽出物を終濃度0.1%となるように細胞培養液中に添加し、24時間前培養した後、細胞表面をビオチン標識し、細胞表面に蓄積したヒトZIP4の発現量を定量解析した。これまでに、大豆サポニンに加え、大豆イソフラボン類を含むと思われる抽出画分にヒトZIP4の発現を増強する活性があることを見出しており (Fig. 3)、現在、中圧カラムクロマトグラフィーや分取TLC、HPLCなどを用いて、その精製条件を検討しているところである。

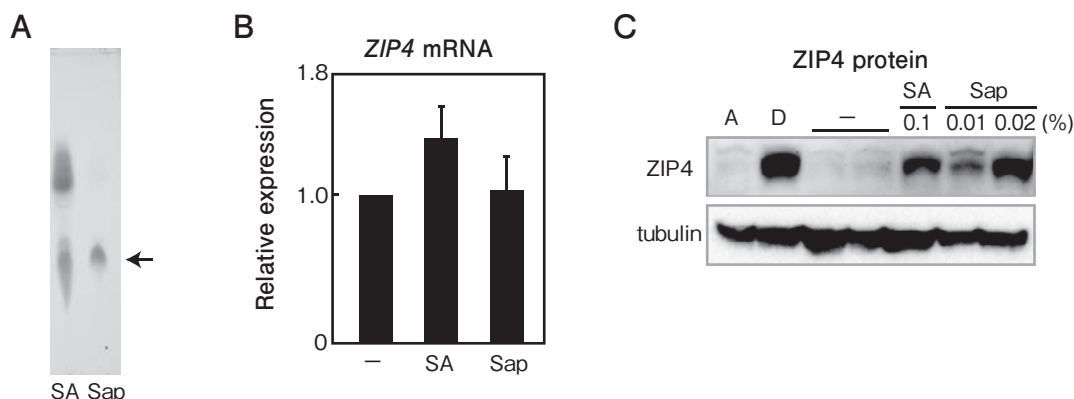


Fig. 1. Soyhealth SA increases ZIP4 protein expression without enhancing ZIP4 mRNA expression. A, Isolated soyasaponin (Sap) showed a single component on reverse-phase TLC. SA, Soyhealth SA. B, Soyhealth SA (SA) and soyasaponin (Sap) do not increase Zip4 mRNA expression. C, Soyasaponin (Sap) enhance ZIP4 expression with a 10-fold lower concentration than soyhealth SA (SA). A, zinc-adequate conditions, D, zinc-deficient conditions.

考 察

本研究では、これまでの解析でZIP4の発現促進活性を認めていた大豆抽出物の中から、ソイヘルスSAを出発点として、活性化化合物の同定に成功した。これは、ZIP4の発現を直接制御する因子として初めての報告である。現在、高齢者を中心に亜鉛欠乏傾向が増加していることを考えると^{14, 15)}、ソヤサポニン類を含む食事は、その予防に大きく貢献できる可能性を秘めている。ソヤサポニンの効果は、ZIP4発現を増加させる濃度においても細胞毒性はほとんど観察されず、発現を増加させる活性が認められたため、亜鉛吸収促進因子としての効果が期待される。現在、ラットを用いた解析にてソヤサポニンの亜鉛吸収に対する有用性に関して解析を実施しており、できるだけ早期にその有用性を確認していきたい。

また、本研究では、ソイヘルスSAのZIP4発現促進効果は、ZIP4を細胞膜上に留まらせる活性に起因することを見出した。ZIP4は、十分な亜鉛存在時には常にエンドサイトーシスされ、細胞内で分解されている。ソイヘルスSAは、ZIP4のエンドサイトーシスを特異的に抑制すると考えられるが、この事実から、ソヤサポニンは細胞膜のみならず、ZIP4に直接相互作用する活性を有する可能性も考えられる。今後は、ZIP4の発現を増加させる他の因子を同定し、複数の化合物の構造活性相関から、その作用メカニズムを明らかにしたいと考えている。

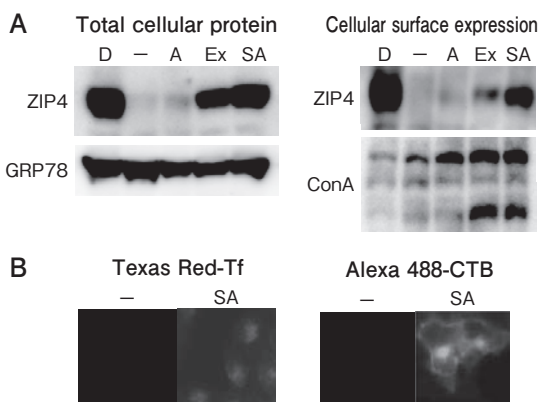


Fig. 2. Soyhealth SA enhances the cell surface abundance of ZIP4, but does not significantly affect expression of transferrin and cholera toxin subunit B. A, Soyhealth SA (SA) and soybean extracts (Ex) enhance the cell surface abundance of ZIP4 protein. Biotinylated proteins were prepared from the cells cultured in the indicated conditions and were subjected to immunoblot analysis using anti-ZIP4. GRP78 and ConA are shown as loading controls. A, zinc-adequate conditions, D, zinc-deficient conditions. B, Soyhealth SA (SA) does not inhibit general endocytosis. Note that fluorescent signals can be detected in the intracellular vesicles, and thus endocytosis of Texas Red-conjugated transferrin (Tf, left) and Alexa Fluor 488-conjugated cholera toxin subunit B (CTB, right) are also not significantly blocked by soyhealth SA (SA).

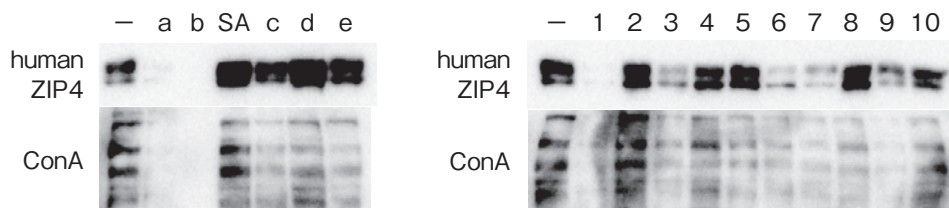


Fig. 3. Evaluation of the activity of soybean extracts on human ZIP4 expression. MDCK FLp-InTMT-Rex cells stably expressing human ZIP4-HA were treated with soybean extracts including Soyhealth SA (SA). Human ZIP4 expression in cell lysate prepared from the cells was evaluated by immunoblot analysis. ConA is shown as loading control. a-e and 1-10, soybean extracts.

要 約

従来、見出していたZIP4発現促進因子についての解析を進め、活性因子の一つとしてソイヘルスSAに含有されるソヤサポニン類を同定した。このソヤサポニンを含む大豆抽出物は、ヒトZIP4の発現を増加させ、また細胞毒性をほとんど示さないことを明らかにした。エンドサイトーシスに及ぼす効果を詳細に解析した結果、ZIP4の発現促進効果は、ZIP4特異的であることが判明した。ソヤサポニンを含むソイヘルスSAはヒトZIP4に対しても発現を増加させる活性を有していたことから、亜鉛吸収促進因子としての効果が期待される。

文 献

- 1) Hambidge, M (2000): Human zinc deficiency. *J Nutr*, **130**, 1344S-1349S.
- 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) Prasad AS (1991): Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am J Clin Nutr*, **53**, 403-412.
- 4) Mocchegiani E and Malavolta M (2011): Zinc and aging, in: Zinc in human health, eds by Rink L, 325-346, IOS Press, Amsterdam.
- 5) Gallaher DD, Johnson PE, Hunt JR, Lykken GI, and Marchello MJ (1988): Bioavailability in humans of zinc from beef: Intrinsic vs extrinsic labels. *Am J Clin Nutr*, **48**, 350-354.
- 6) Krebs NF (2000) Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr*, **130**, 1374S-1377S.
- 7) Kambe T, Hashimoto A and Fujimoto S (2014): Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases” *Cell. Mol Life Sci*, **71**, 3281-3295.
- 8) Kury S, Dreno B, Bezieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R and Moisan JP (2002): Identification of slc39a4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet*, **31**, 239-240.
- 9) Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J and Gitschier J (2002): A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet*, **71**, 66-73.
- 10) Kambe T, Weaver BP and Andrews GK (2008): The Genetics of Essential Metal Homeostasis during Development. *Genesis*, **46**, 214-228.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Haase H, Mocchegiani E and Rink L (2006) Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology*, **7**, 421-428.
- 15) Kogirima M, Kurasawa R, Kubori S, Sarukura N, Nakamori M, Okada S, Kamioka H and Yamamoto S (2007) Ratio of low serum zinc levels in elderly japanese people living in the central part of japan. *Eur J Clin Nutr*, **61**, 375-381.