

大豆成分を用いた亜鉛栄養改善：
乳児亜鉛欠乏から高齢者亜鉛欠乏まで

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

Improvement in Zinc Nutrition in Infants and Elderly by Soybean Components

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. Since zinc plays critical roles in a variety of biological processes, its deficiency results in various disorders, in particular, in infants and elderly. Thus, investigation of strategies for achieving enough zinc absorption is important to prevent zinc deficiency. The efficiency of zinc absorption in the small intestine from a diet is estimated to be about 30% and it is known to become much less in aging and in zinc supplementation. So, improvement of the efficiency is likely more promising than simple zinc supplementation. The zinc transporter ZIP4 functions as an essential molecule for zinc absorption in the intestinal epithelial cells. Thus, food factor(s) enhancing ZIP4 expression could be a potential enhancer of zinc absorption. We have found that soyasaponin has such activity using mouse Hepa cells, but failed to reveal its effect on human ZIP4 expression, because of lacks of cultivated human cell lines expressing endogenous ZIP4. Here, we showed the positive effect of soyasaponin on human ZIP4 expression using human pancreatic carcinoma AsPC1 cells. These results strongly suggest that soybean extracts are potential enhancers of zinc absorption. In this study, we also searched another soybeans components with the ability to enhance expression of another zinc transporter ZnT2, which functions as an essential route of zinc into breast milk. Since zinc is indispensable for healthy growth and developmental of infants, breast milk has considerably higher levels of zinc to meet infant's requirements. The effective transport of large amounts of zinc into the breast milk by the use of food factor(s) could achieve good health in breast-fed infants during lactation. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 166-170, 2015.

*〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

Key words : ZIP4, zinc absorption, soyasaponin, ZnT2, breast milk

亜鉛は、高齢者や乳幼児にとって極めて重要な微量栄養素であり、欠乏すると、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^{1,2)}。そのため、日々の食事により亜鉛を充足させることは極めて重要である。亜鉛は、十二指腸や空腸で体内に吸収されるが、消化管における亜鉛の吸収効率は元来30%と低く、加齢や亜鉛の摂取量の増加に伴ってさらに低下する^{3,4)}。この亜鉛吸収効率の変化は、消化管から亜鉛吸収を担う輸送たん白質の発現変化によると考えられるが、この輸送たん白質こそが亜鉛トランスポーター ZIP4である^{5,6)}。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^{7,8)}。これまでに我々や他のグループが実施してき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⁹⁾、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た。

我々は、高齢者に数多く認められる亜鉛欠乏を防ぐため、亜鉛吸収を担う亜鉛トランスポーター ZIP4を指標にし、独自に構築したスクリーニング系を用いて、亜鉛吸収効率を上昇させる大豆由来の因子の探索を実施してきた。これまでに、大豆抽出物ソイヘルスSAにマウスZip4活性促進効果があることを見出し、さらに活性因子の一つとして単離したソヤサポニンと同定している。本研究では、まず、このソイヘルスSAやソヤサポニンがマウスZip4の発現を促進させるメカニズムについて解析を実施した。次に、見出したソイヘルスSAやソヤサポニンが、マウスZip4のみならず、ヒトZIP4に対しても有効に作用することを明確に示すため、ヒトZIP4を発現する培養細胞を見出し、その効果を検証した。本研究で見出したソイヘルスSAやソヤサポニンの効果は、今後亜鉛欠乏予防に活用されることが期待される。

また、亜鉛栄養改善をさらに進める目的で、乳幼児の亜鉛欠乏予防に対して大豆因子を活用することを検討した。我々は、母乳中の亜鉛を送り込む亜鉛トランスポーターとしてZnT2を同定していたため¹⁰⁾、ZnT2の亜鉛輸送活性やその発現を促進させる大豆因子の探索もあわせて実施した。

方 法

細胞培養と大豆由来因子の活性評価法

マウスHepa細胞とヒト膀胱がんAsPC1細胞（岡山大学の榎本秀一先生より分与）の培養には、10%牛胎児血清を添加したDMEMを用いた。亜鉛欠乏培地は、血清をキレックス100樹脂（BIO-RAD）で処理して亜鉛を除去した血清を使用することで調整し、亜鉛添加培地は、培養液中に記載した最終濃度となるようにZnSO₄を添加して作成した¹¹⁾。大豆抽出物やソヤサポニンのZIP4発現促進活性評価には、培養液に各サンプルを加えて24時間培養した細胞抽出液を、ウェスタンブロット法にて定量することで実施した。

母乳中に亜鉛を送り込む大豆由来因子の探索

ZnT2の亜鉛輸送活性の評価には、ヒトZnT2を遺伝子導入したニワトリDT40細胞を使用した¹⁰⁾。DT40細胞の培養には、10%牛胎児血清、1%ニワトリ血清、10⁵M β-メルカプトエタノールを添加したRPMI1640を用いた¹²⁾。また、ZnT2の転写活性化に及ぼす因子の探索には、ヒトZnT2プロモーター下流に分泌型ルシフェラーゼ遺伝子（Cypridina Luciferase, Thermo SCIENTIFIC）を組み込んだ遺伝子を恒常的に発現するよう導入したマウス乳腺上皮細胞HC11（名古屋大学の松田幹先生より分与）を用いた。HC11細胞の培養には、上述の培養条件を用い、大豆由来因子の探索は、上述の方法と同様のタイムコースにて実施した。

結 果

内在的にヒトZIP4を発現する細胞株の同定と発現促進活性因子の評価

マウスHepa細胞を用いたこれまでの解析で、ソイヘルスSAからマウスZip4発現促進因子としてソヤサポニンを同定している。ソヤサポニンのZip4発現促進効果は、Zip4のエンドサイトーシス抑制に伴う分解抑制であることを明らかにしていたが、高齢者の亜鉛欠乏を効果的に予防することを実証するためには、この活性がヒトZIP4に対しても有効に作用することを確認することが必要となる。我々はこれまで、ヒトZIP4の解析のために、FLp-InTMT-Rexシステムを用いて、ヒトZIP4を安定発現させたMDCK細胞を用いた解析系

を用いて実施してきたが、細胞表面をビオチン標識など、複雑な操作を必要とするため、作用機構の詳細な解析などには不向きであり、内在性にヒトZIP4を発現するヒト細胞を見出されることが望まれていた。この問題を解決するために、ヒトZIP4を認識できるポリクローナル抗体を用いて、様々なヒト培養細胞株を探索した結果、ヒト膀胱がんAsPC1細胞がヒトZIP4を発現し、さらに、その発現が、亜鉛依存的であることを見出した (Fig. 1A)。AsPC1細胞を用いて、ソヤサポニンの効果を検討した結果、マウスZip4の場合と同様、ヒトZIP4の発現も亜鉛欠乏依存的に増加させること

(Fig. 1B)、および、この増加が細胞表面のヒトZIP4発現増加に由来することを確認している。

さらに、上述のMDCK細胞を用いたスクリーニングから、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いたが、本細胞においても、同様の結果が得られた。解析の結果、ソヤフラボンHGに、ヒトZIP4の発現を強く促進させる効果を有する因子が含まれていることを見出した。ソヤサポニンに続く活性因子の同定を目指し、現在その精製を進めるべく、各種機器解析を実施している。

母乳中に亜鉛を輸送する亜鉛トランスポーターZnT2の発現を促進する大豆因子の探索

亜鉛栄養は高齢者の健康に重要であるだけでなく、乳幼児の健康な発育にも極めて重要である。乳幼児(母乳哺育児)の亜鉛欠乏を予防するためには、母乳中の亜鉛量が十分量維持されることが不可欠であるが⁷⁾、我々は、母乳中亜鉛量が減少したこと(低亜鉛母乳)が原因で亜鉛欠乏に陥った乳児の母親の遺伝子解析を実施し、亜鉛トランスポーターZnT2の変異がこの原因であることを突き止めている¹⁰⁾。これまでに4例のZnT2遺伝子変異を見出しており、この事実は、母乳中への亜鉛輸送にZnT2が必須の役割を果たすことを示している。そこで、母乳中への亜鉛輸送を高め、乳幼児の健康に役立てることを目的に、ZIP4で確立したスクリーニング系を模倣し、DT40細胞を用いたZnT2亜鉛輸送活性評価系、さらにマウス乳腺上皮細胞HC11(名古屋大学の松田幹先生より分与)を用いたZnT2発現促進活性評価系を構築した。これまでの解析で、両評価系を用いて弱い活性を示す大豆抽出画分を認めている (Fig. 2)。母乳哺育児の健康のためには、母乳中の亜鉛量を維持・増加させることが重要であるため、著効を示す因子を見出すことを目指し、引き続き解析を進めている。

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ソイヘルスSA、およびソヤサポニン(ソイヘルスSAより活性因子として同定)の効果について検討を進めた。これまでの解析では、CaCo2細胞など消化管上皮モデル細胞を含むヒト培養細胞においてヒトZIP4を発現する株が見出せておらず、このことが制限となって*in vitro*でのヒトZIP4に対する大豆由来因子の活性を評価することができなかった。マウス

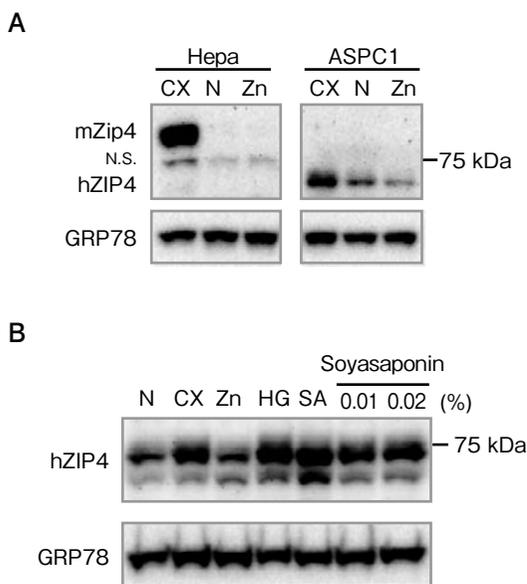


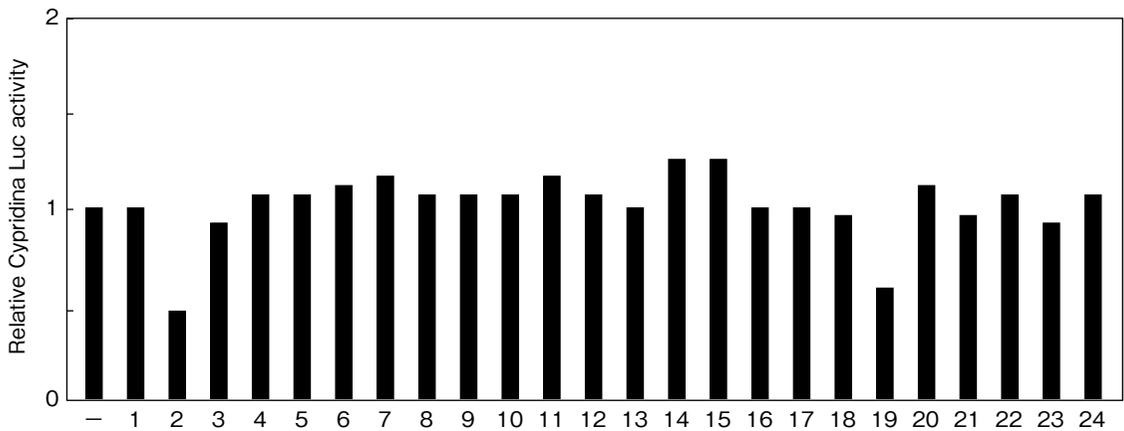
Fig. 1. Soyasaponin enhances human ZIP4 expression in AsPC1 cells. A. AsPC1 cells express endogenous human ZIP4 during zinc-deficient culture. Mouse Hepa cells (positive control) and human AsPC1 cells were cultured in normal medium (N), medium containing 10% Chelex-treated FBS (CX) for the indicated times, or medium supplemented with 20 μ M ZnSO₄ for 48 h. Total cell lysates (20 μ g) prepared from the indicated cells were subjected to immunoblot analysis and mZip4 and hZIP4 were detected by anti-ZIP4 antisera. n.s.; non-specific. B. Soyasaponin enhances hZIP4 expression in AsPC1 cells. AsPC1 cells were treated with indicated soybean extracts including soyasaponin for 48 h. Immunoblot analysis was performed as in A. HG: soyaflavone HG, SA: Soyhealth SA. In A and B, GRP78 is shown as loading control.

Zip4とヒトZIP4は、どちらも消化管からの亜鉛吸収に必須の分子であることが知られているが、両者の分子全体のアミノ酸配列の相同性は70%程度と低い上、大豆由来因子が相互作用すると予想される細胞外領域では、さらに低下して約60%となる。そのため、今回、ヒトZIP4を発現するヒト培養細胞AsPC1を見出し、AsPC1を用いてヒトZIP4発現促進活性を確認できる系を確立した意義は非常に大きい。本系を用いてソヤサポニンがヒトZIP4に対して有効であることを示した本成果は、ソヤサポニンを含む食事が、亜鉛欠乏の予防に大きく貢献できる可能性を示唆しており、近年増加している高齢者の亜鉛欠乏の予防につながる事が期待される。ヒトZIP4の発現促進には、ソヤサポニン

以外大豆由来因子も強い活性を有することが判明しているため、今後は、これら因子を特定し、大豆因子の有用性を明らかにしていきたいと考えている。

また、最近、低亜鉛母乳による乳児亜鉛欠乏症に関連した報告を、国内の皮膚科や小児科関連誌で目にする機会が増えている^{13,14)}。ZnT2は、母乳中への亜鉛輸送に必須となる分子であるため、本解析で特定を目指すZnT2発現促進活性因子は、乳児の健康な発育に有用な効果を持つ可能性が高い。今後も引き続き大豆の有する有用活性について解析を実施し、高齢者や乳幼児の亜鉛栄養の改善に役立てる分子基盤を確立していきたい。

A. Reporter assay



B. Immunoblotting

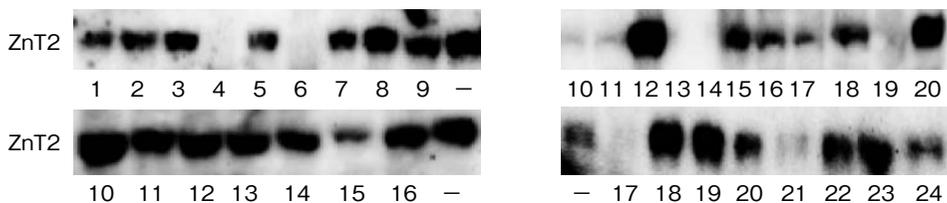


Fig. 2. Evaluation of the activity of soybean extracts on human ZnT2 expression using HC11 cells. A, HC11 cell stably harboring Cypridina Luciferase gene driven by human ZnT2 promoter were treated with soybean extracts at a final concentration of 0.1%. The Cypridina Luciferase was measured, and the relative activity was shown. B, HC11 cells were treated with soybean extracts as in A. Increases of ZnT2 expression in cell lysate prepared from the cells was evaluated by immunoblot analysis using anti-ZnT2 monoclonal antibody. -: not treated.

要 約

ZIP4発現促進因子の一つとしてソイヘルスSAより同定したソヤサポニン類が、ZIP4たん白質の分解を抑制することを分子レベルで明らかにした。続いて、ヒトZIP4を内在的に発現する培養細胞を見出すことに成功し、本株を用いて、ソヤサポニンがヒトZIP4に対しても発現促進活性を有し、細胞膜へのZIP4の局在を増加させることを明らかにした。また、乳幼児（母乳哺育児）の亜鉛欠乏を予防するためには、母乳中の亜鉛量が十分量維持されることが重要であるため、母乳中に亜鉛を供給する亜鉛トランスポーター ZnT2の発現を促進させる大豆因子の探索を行った。これまでに実施した解析で弱い活性を示す抽出画分を認めている。

文 献

- 1) Hambidge, M (2000): Human zinc deficiency. *J Nutr*, **130**, 1344S-1349S.
- 2) Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A and Itsumura N (2015): The Physiological, Biochemical and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev*, **95**, 749-784.
- 3) 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.
- 4) Krebs NF (2000) Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr*, **130**, 1374S-1377S.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 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) Kambe T, Weaver BP and Andrews GK (2008): The Genetics of Essential Metal Homeostasis during Development. *Genesis*, **46**, 214-228.
- 9) 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.
- 10) Itsumura N, Inamo Y, Okazaki F, Teranishi F, Narita H, Kambe T and Kodama H (2013): Compound heterozygous mutations in SLC30A2/ZnT2 results in low milk zinc concentrations: a novel mechanism for zinc deficiency in a breast-fed infant. *PLoS One*, **8**, e64045.
- 11) 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.
- 12) Kambe T (2014): Methods to Evaluate Zinc Transport into and out of the Secretory and Endosomal-Lysosomal Compartments in DT40 Cells. *Methods Enzymol*, **534**, 77-92.
- 13) 平部知恵, 細川知聡, 高原正和, 柴田智子, 竹内聡, 師井洋一, 占部和敬, 古江増隆 (2008) : 低亜鉛母乳による後天性亜鉛欠乏症の1例. 西日皮膚, **70**, 402-405.
- 14) 逸村直也, 神戸大朋 (2014) : 乳児亜鉛欠乏症を引き起こす低亜鉛母乳と亜鉛トランスポーター ZnT2の変異. Biomed Res Trace Elements, **25**, 1-7.