

研究

亜鉛トランスポーター ZIP4
を標的とした亜鉛栄養の改善

京都大学大学院生命科学研究所 橋本彩子 神戸大朋

要旨

近年、本邦においても女性や高齢者を中心に潜在的な亜鉛欠乏が危惧されはじめている。亜鉛が欠乏すると味覚障害や皮膚炎をはじめとして多岐に渡る症状がもたらされ、QOL(生活の質)を低下させる要因となる。そのため、超高齢社会を迎えた本邦では、亜鉛欠乏の予防は、特に重要な課題の一つとなっている。亜鉛の吸収率は約30%と言われるが、亜鉛の摂取量が増加すると、その吸収率は低下することが知られており、亜鉛欠乏の予防には、消化管における亜鉛の吸収効率を高めることが有効であると考えられる。消化管での亜鉛吸収には亜鉛トランスポーター ZIP4 が必須の機能を果たすことが知られており、また、ZIP4 の発現は亜鉛により制御されることが、これまでの解析から明らかになっている。今回、消化管での亜鉛吸収機構についての概説ならびに、ZIP4 に着目した亜鉛栄養改善のためのアプローチについて、著者らの研究グループで得られた知見を中心に紹介する。

はじめに

亜鉛は成人の生体内に約2 g 存在する必須の栄養素である¹⁾。食物から摂取した亜鉛は、小腸の上部で吸収された後、筋肉や骨を中心に全身に広く分布し、種々の生理機能を果たす。亜鉛はタンパク質と結合してその生理機能を発揮するが、その亜鉛との結合性を有するタンパク質の数は3000にも達しており、この事実は、亜鉛の多様な生理機能を端的に示している²⁾。したがって、亜鉛欠乏の症状としては、味覚障害、皮膚炎、脱毛、免疫機能低下、成長遅延、下痢、食欲不振などの非常に多くの症状が知られる。また、高齢になるに伴い、血清亜鉛値が低下することが示されているため、特に高齢者における亜鉛欠乏には注意が必要である。現在、亜鉛欠乏の予防は重要な課題の一つにあげられる。亜鉛の消化管における吸収効率は約30%といわれるが、亜鉛の摂取量が増加すると、その効率は低下することが知られ

る³⁾。そのため、亜鉛欠乏の予防には、亜鉛摂取量を増加させるだけでなく消化管における亜鉛の吸収効率を高めることが有効であると考えられる。生体内の亜鉛ホメオスタシスは、亜鉛トランスポーターにより維持されている⁴⁾。亜鉛トランスポーターは、細胞外または細胞小器官から細胞質内へ亜鉛を輸送する Zrt-, Irt-like protein (ZIP) と、その逆の方向に亜鉛を輸送する Zn transporter (ZnT) に分類され、哺乳類では20種類以上が存在し、それぞれ組織や細胞特異的に発現して機能する⁴⁾。消化管での亜鉛の吸収においては、管腔側から食物由来の亜鉛を腸管上皮細胞内に輸送する ZIP4 と、腸管上皮細胞内から血中側に亜鉛を輸送する ZnT1 が機能する。特に ZIP4 は2002年に先天性亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎の原因遺伝子であると同定され、消化管での亜鉛吸収における重要性が示されてきた^{5,6)}。しかし、これまでに ZIP4 を標的とし、亜鉛吸収を高めるといふアプローチは報告がない。

本稿では、これまでに明らかにされている消化管での亜鉛吸収の調節機構と、その機構に着目した亜鉛栄養の改善アプローチについて概説したい。

1. 腸管における亜鉛の吸収機構

亜鉛は2価の陽イオンで安定して存在するという特徴を有していることから、亜鉛の腸管での吸収過程は、同じ必須微量元素である鉄や銅の吸収過程とは異なる。鉄や銅の場合、食物中ではそれぞれ酸化型で存在するが、腸管上皮細胞内に取り込まれるためには、それぞれが酸化型から還元型に変化する必要がある(図1)。これは、腸管上皮細胞の頂端膜に存在して鉄や銅の取り込みに機能するトランスポーターのdivalent metal transporter 1(DMT1)やcopper transporter 1(CTR1)が、還元型の鉄または銅を輸送するためである^{7,8)}。一方、亜鉛は、2価の亜鉛イオンを輸送するZIP4により腸管上皮細胞内に取り込まれ

るため、吸収過程における酸化還元反応過程は必要としない。この亜鉛吸収の第一段階である腸管上皮細胞の頂端膜での亜鉛取り込みに機能するZIP4の発現制御が、亜鉛吸収において最も重要な要素となる。

ZIP4は、2002年に重篤な亜鉛欠乏症状をもたらす先天性亜鉛欠乏症、腸性肢端皮膚炎acrodermatitis enteropathica(AE)の原因遺伝子として同定され、これまでにAEの患者からは、ZIP4のミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト、遺伝子欠損など30種以上の変異が報告されている^{5,6,9)}。一方、マウスの解析からは、2012年にZIP4コンディショナルノックアウトマウスが作製され、消化管特異的にZIP4を消失させたマウスは過剰量の亜鉛投与なしでは生育することが出来ないことが示された¹⁰⁾。これらのAE患者に認められる症状やノックアウトマウスの表現型から、ZIP4は哺乳類における消化管での亜鉛吸収過程に必須であることが示されている。

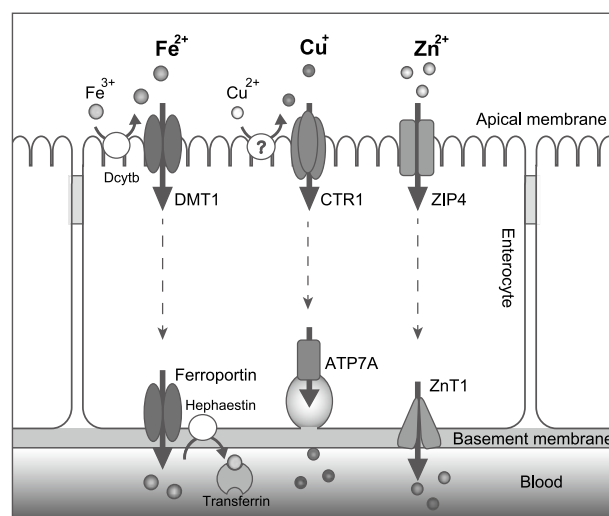


図1 消化管における鉄、亜鉛、銅の吸収機構

消化管での鉄、銅、亜鉛の吸収には、鉄ではDMT1とFerroportinが、銅ではCTR1とATPase, Cu transporting, alpha polypeptide (ATP7A)が、亜鉛ではZIP4とZnT1が主要な働きを担う。鉄や銅は食物中では3価鉄と2価銅の酸化型で存在しており、消化管で吸収される際に、腸管上皮細胞の頂端膜に存在する還元酵素により2価鉄と1価銅にそれぞれ還元された後、DMT1とCTR1により取り込まれる。その後、2価鉄は基底膜側に存在するFerroportinにより門脈側に輸送される。1価銅はATP7Aにより小胞内に取り込まれ、エキソサイトーシスにより門脈側に輸送されると考えられている。亜鉛は2価で安定に存在するため、酸化還元反応を介さず、ZIP4によって腸管上皮細胞内に取り込まれ、基底膜側に存在するZnT1により門脈側に輸送される。

2. ZIP4の発現制御機構

腸管におけるZIP4タンパク質の発現は、亜鉛状態により制御されることが報告されている。亜鉛欠乏時には腸管上皮細胞の管腔側にある頂端膜に蓄積するが、そこに十分量の亜鉛を投与すると、そのタンパク質発現レベルは低下する¹¹⁾。In vivoにおけるZIP4の発現制御に関する解析は進んでおらず、その情報は不足しているが、我々は、ラットを亜鉛欠乏食や低亜鉛食で飼育すると1~2日という早い段階で、腸管でのZIP4タンパク質の発現が増加することを見出している¹²⁾。一方、培養細胞を用いたin vitroでの先行研究により、ZIP4の発現制御機構の一端が明らかにされている^{11,13-21)}。ZIP4の発現は、亜鉛状態により転写後の複数の段階で制御されており、亜鉛欠乏時にはZIP4 mRNAが安定化し、翻訳が促進されると考えられている。また、亜鉛が十分存在する時には、ZIP4は細胞表面から速やかにエンドサイトーシスされ、分解を受けるが、亜鉛欠乏になると、このエンドサイトーシスが抑制され、分解が停止する¹¹⁾。その結果、ZIP4は細胞膜上に蓄積し、亜鉛の取り込みに働くと考えられている。また、長期間の亜鉛欠乏にさらされると、細胞外に存在するZIP4の長いN末端領域が切断(プロセッシング)

を受け、約半分のサイズの断片が検出されることが報告がされている¹⁸⁾。しかし、このプロセッシングについては、その分子機構や生理的意義はまだ明らかにされていない。

3. 亜鉛トランスポーターZIP4を標的とした亜鉛吸収効率向上の試み

我々は、前述のZIP4の機能と発現調節に着目して、ZIP4の発現量を増加させることにより亜鉛吸収が向上するという仮説のもと、このような効果を有する食品因子を探索した(図2A)。まず、腸管上皮細胞と同様に、亜鉛状態によりZIP4の発現を制御する培養細胞としてマウスHepa細胞を見出した。そして、Hepa細胞の培養液に400を超える食品由来の抽出液をそれぞれ添加し、ZIP4の発現量の変化を評価した結果、複数の大豆由来の抽出液にZIP4の発現量を増加させる効果を見出した(図2B)。

ZIP4 mRNAの発現量の変化やZIP4タンパク質の分解機構への影響に焦点を絞り、この大豆抽出物がZIP4の発現量を増加させる機構を解析した結果、大豆抽出物はZIP4の転写レベルでの発現には影響せず、細胞表面に存在するZIP4のエンドサイトーシスを抑制して、その分解を停止さ

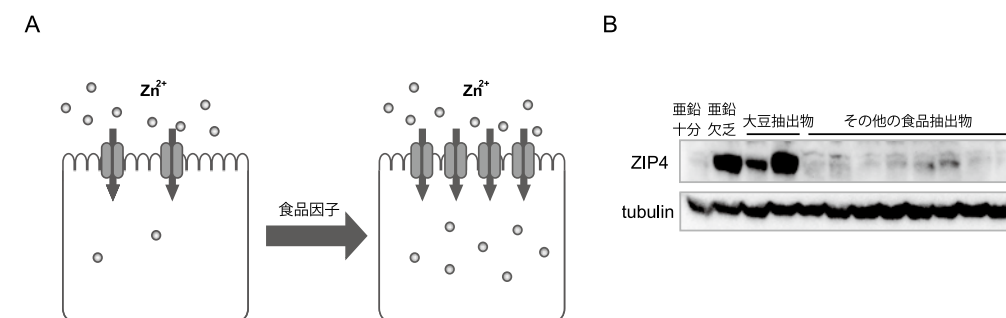


図2 ZIP4を標的とした亜鉛吸収促進因子のスクリーニング

A: スクリーニングのモデル図、ZIP4の発現量を増加させる食品因子は、細胞内への亜鉛の取り込みを増加させる。
B: ZIP4タンパク質の発現量を増加させる活性の有無について評価した結果の一例。実際には、400を超える食品抽出物について評価した。複数の大豆抽出物にZIP4の発現量を増加させる効果を見出した。

せることにより、細胞表面での ZIP4 蓄積量を増加させていることを突きとめた。

この ZIP4 の発現量を増加させる活性成分について単離・精製を進め、得られた単一化合物の構造を解析した結果、活性成分としてソヤサポニン Bb を同定した。ソヤサポニン Bb は、ZIP4 の発現量を増加させると同時に、実際に細胞内亜鉛レベルの指標となるメタロチオネインの mRNA 発現量を増加させる効果を有していた(図 3 A, B)²²⁾。これらの結果により、ソヤサポニン Bb のような ZIP4 の発現量を増加させる食品因子には、亜鉛吸収を高める効果が期待される。

おわりに

超高齢社会を迎えた本邦にとって、亜鉛欠乏の予防対策は無視できない問題である。これまでも亜鉛栄養を改善するための試みはされているが、ZIP4 を標的とした亜鉛吸収効率向上の試みは本解析が初めての例となる。本稿で紹介したような ZIP4-targeting 食品が今後、亜鉛欠乏予防の新たなアプローチにつながるかもしれない。今後、亜鉛含量の多い食材と亜鉛吸収を高める食材を組み合わせることにより、効率的な亜鉛欠乏の予防につながる食の提案が期待される。

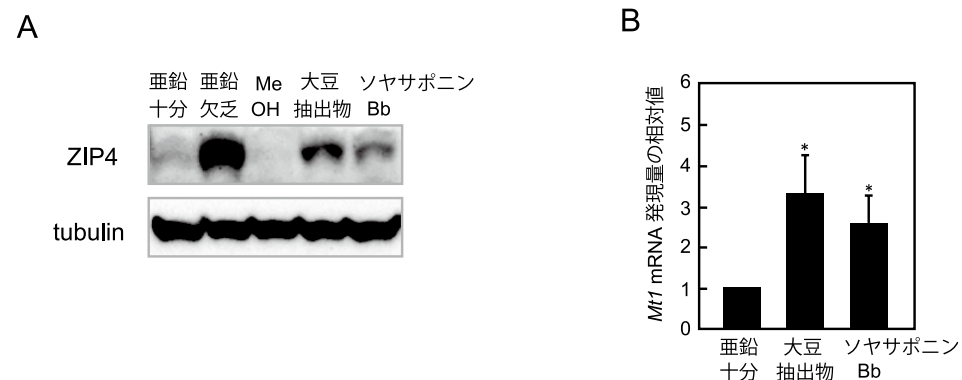


図3 ソヤサポニン Bb は ZIP4 の発現量ならびに細胞内亜鉛レベルを増加させる

A: ソヤサポニン Bb が ZIP4 タンパク質の発現量を変化させることを示した評価結果。

B: ソヤサポニン Bb が細胞内亜鉛レベルを増加させることを示した評価結果。細胞内亜鉛量を反映するメタロチオネイン (Mt1) の mRNA の発現量を定量している。

◆文献

- Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S : Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cell Mol Life Sci* 71 : 3281-3295, 2014
- Maret W, Li Y : Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* 109 : 4682-4707, 2009
- Krebs NF : Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr* 130 : 1374S-1377S, 2000
- Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, et al : The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev* 95 : 749-784, 2015
- Kury S, Dreno B, Bezieau S, et al : Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet* 31 : 239-240, 2002
- Wang K, Zhou B, Kuo YM, et al : A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet* 71 : 66-73, 2002
- De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J : Regulation of iron acquisition and storage : consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 : 72-81, 2008
- Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ : Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 4 : 176-185, 2008
- Schmitt S, Kury S, Giraud M, et al : An update on mutations of the SLC39A4 gene in acrodermatitis enteropathica. *Hum Mutat* 30 : 926-933, 2009
- Geiser J, Venken KJ, De Lisle RC, et al : A mouse model of acrodermatitis enteropathica : loss of intestine zinc transporter ZIP4 (Slc39a4) disrupts the stem cell niche and intestine integrity. *PLoS Genet* 8 : e1002766, 2012
- Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T, et al : 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, 2007
- Hashimoto A, Nakagawa M, Tsujimura N, et al : Properties of Zip4 accumulation during zinc deficiency and its usefulness to evaluate zinc status : A study of the effects of zinc deficiency during lactation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* : 310 : R459-468, 2016
- Dufner-Beattie J, Wang F, Kuo YM, et al : The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. *J Biol Chem* 278 : 33474-33481, 2003
- Wang F, Kim BE, Dufner-Beattie J, et al : Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter. *Hum Mol Genet* 13 : 563-571, 2004
- Dufner-Beattie J, Kuo YM, Gitschier J, et al : The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5. *J Biol Chem* 279 : 49082-49090, 2004
- Kim BE, Wang F, Dufner-Beattie J, et al : Zn²⁺-stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane. *J Biol Chem* 279 : 4523-4530, 2004
- Mao X, Kim BE, Wang F, et al : 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, 2007
- Kambe T, Andrews GK : 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, 2009
- Liuzzi JP, Guo L, Chang SM, et al : Kruppel-like factor 4 regulates adaptive expression of the zinc transporter Zip4 in mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296 : G517-523, 2009
- Antala S, Dempski RE : The human ZIP4 transporter has two distinct binding affinities and mediates transport of multiple transition metals. *Biochemistry* 51 : 963-973, 2012
- Antala S, Ovchinnikov S, Kamisetty H, et al : Computation and Functional Studies Provide a Model for the Structure of the Zinc Transporter hZIP4. *J Biol Chem* 290 : 17796-17805, 2015
- Hashimoto A, Ohkura K, Takahashi M, et al : Soybean extracts increase cell surface ZIP4 abundance and cellular zinc levels : a potential novel strategy to enhance zinc absorption by ZIP4-targeting. *Biochem J* 472 : 183-193, 2015

英文抄録

Ayako Hashimoto

Zinc has essential physiological functions as a structural, catalytic and signaling component in diverse biological processes. Thus, zinc deficiency causes many symptoms including taste disorder, dermatitis, immune dysfunction and growth retardation. To improve human health, preventing zinc deficiency is of importance. However, absorption of dietary zinc in the small intestine is estimated to be about 30% in normal conditions, and food-based strategies enabling efficient zinc absorption from the diet should be extensively investigated. In the intestinal epithelial cell, zinc transporter ZIP4, which accumulates at the apical membrane during zinc deficiency, is the most important for zinc absorption. Over-expression of ZIP4 increases the cellular zinc levels, suggesting that food factors increasing apical-surface ZIP4 abundance could be an enhancer for zinc absorption. We explored such food factors and identified an active component from soybean extracts. ZIP4-targeting may become a novel strategy to enhance zinc absorption.

◆橋本彩子略歴

2011 年	京都女子大学家政学部食物栄養学科卒業 京都大学大学院生命科学研究科博士前期課程入学
2013 年	同研究科博士前期課程修了、同研究科博士後期課程入学
2014 年	日本学術振興会特別研究員 DC2
2016 年	京都大学大学院生命科学研究科博士後期課程修了 博士 (生命科学) 静岡県立大学食品栄養科学部 助教