

消化管における亜鉛吸収メカニズムの解明とその応用

京都大学大学院生命科学研究科

神戸大朋

はじめに

亜鉛は生命活動において不可欠な役割を果たす必須微量元素の一つである。亜鉛欠乏に陥ると、味覚障害、皮膚炎、口内炎、褥瘡（難治性）、食欲低下などを発症し、生活の質（QOL）が低下する¹⁾。症状がでていない潜在的なものを含め、日本国民の実に 15~25% が亜鉛欠乏と判定されると試算されているため²⁾、日常の食事によって亜鉛を充足させる意義は大きい。食事由来の亜鉛は主に小腸上皮において吸収され、小腸上皮細胞には亜鉛輸送に特化した亜鉛輸送体が発現している。即ち、消化管側のアピカル膜には消化管内腔から細胞内への亜鉛取り込みを担う亜鉛インポーターZIP4 が、血液側の側底膜（バソラテラル膜側）には消化管上皮細胞から血液（門脈）への亜鉛放出を担う亜鉛エクスポーターZNT1 が発現している³⁻⁵⁾。ZIP4 は亜鉛欠乏時にはアピカル膜に蓄積する一方で、亜鉛十分時には速やかに分解される^{6,7)}。また、ZNT1 は亜鉛欠乏時には速やかに分解される一方で、亜鉛十分時には側底膜に蓄積する⁸⁾。これらの結果から、消化管において ZIP4 と ZNT1 は亜鉛量に応じて全く逆の応答を示し、その協調的な発現調整により亜鉛吸収が制御されていることが強く示唆される⁹⁾。しかしながら、亜鉛吸収の場である消化管上皮細胞において、ZIP4 と ZNT1 両分子がどのような機序で連動し、亜鉛吸収を制御しているのかについては、これまで全く明らかにされてこなかった。本研究では、ZIP4 と ZNT1 の協調的な発現制御の分子機序を細胞レベルで解明することを試みた。

方法

1) ヒト ZIP4 遺伝子導入 CaCO₂ 細胞株の樹立

ヒト小腸モデル細胞として汎用される CaCO₂ 細胞に、Tet-on 3G システム (Clontech) をプロトコールにしたがって導入し、その後、C 末端には HA タグを付加できるようにデザインしたヒト ZIP4 遺伝子を導入した。薬剤体制株の取得後、Dox 依存的に ZIP4 が誘導発現される株を選別した。樹立した CaCo₂ 細胞を極性分化させるために 0.4 μm pore サイズの Transwell plate (Greiner Bio-one) を使用した。細胞表面ビオチン化アッセイには、極性分化させた細胞にドキシサイクリン (Dox) を作用させてヒト ZIP4 を誘導発現させ、EZ-Link, a Sulfo-NHS-SS-Biotin reagent (細胞膜非透過性のビオチン化試薬) をアピカル側あるいはバソラテラル側から処理した細胞を使用した。細胞を回収して溶解した後、ストレプトアビジン固定化ビーズを用いて標識されたタンパク質を精製し、

6×SDS sample buffer に溶解後、ウェスタンブロットに供した。

2) ZNT1 欠損 CaCo2 細胞株の樹立

CRISPR/Cas9を使用して、CaCo2細胞に内在的に発現するZNT1を欠損させた株を樹立した。sgRNAに使用した配列は、5'-GGATCCGAGCCGAGGTAATG-3'であり、本配列をpX330-B-Bベクターに導入した¹⁰⁾。常法にしたがって、ゲノム編集された株（欠損株）を樹立した。抗ZNT1抗体を使用したImmunoblotにて欠損株のスクリーニング実施し、ZNT1の発現が消失した株については、ゲノムDNAを回収した後、特異的プライマーを使用してgRNA付近の配列を増幅させ配列を解析し、ゲノム編集されていることを確認した。

結果

樹立した CaCo2 細胞において、Dox 依存的にヒト ZIP4 が誘導されることを確認後、アピカル側からの ZIP4 が取り込んだ亜鉛によって、バソラテラル膜の ZNT1 の発現増加に結びつくかどうか解析した。細胞表面ビオチン化アッセイの結果から、ZNT1 の発現の増加が、アピカル膜に薬剤依存的に誘導させた ZIP4 の量に応じて生じていることが確認された。本結果は、消化管上皮細胞において「アピカル膜での ZIP4 の発現増加→細胞内への亜鉛取込増加→バソラテラル膜での ZNT1 の発現増加」というベクトリアル輸送制御が働くことを明示しており、消化管での亜鉛吸収におけるメカニズムとして重要な知見であった。

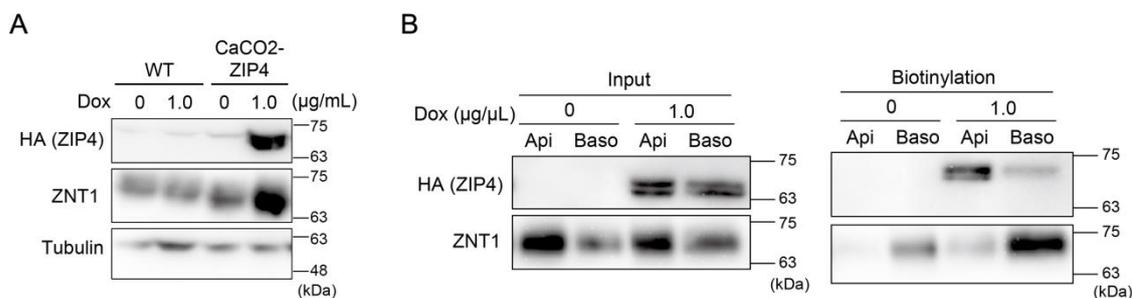


図1. A. Western blot による ZIP4 の誘導の確認とそれに応じた ZNT1 発現の上昇。B. 極性分化させた CaCo2 細胞においては、Dox 添加によりアピカル膜 (Api) に ZIP4 を誘導させるとバソラテラル膜 (Baso) の ZNT1 の発現が増加する。

次に、ZIP4 を介して CaCo2 細胞によって取り込まれた亜鉛が、ZNT1 を介してバソラテラル側から排出されることを明示するために、CaCo2 細胞に内在的に発現する ZNT1 を消失させた株の樹立を試みた。CRISPR/Cas9 を使用して ZNT1 遺伝子を編集し

た結果、ZNT1 の発現を完全に消失する株を取得することに成功した。ZNT1 が欠損すると細胞内の亜鉛を排出できなくなるために、細胞内亜鉛量に比例して発現が増減するメタロチオネイン (MT) の発現が増加することが予想された。解析の結果、樹立株において MT の発現が著しく増加しており、ZNT1 欠損の影響が正しく反映されていた。現在、本株を極性分化させた状況でバソラテラル側からの亜鉛排出に関する解析を実施している。

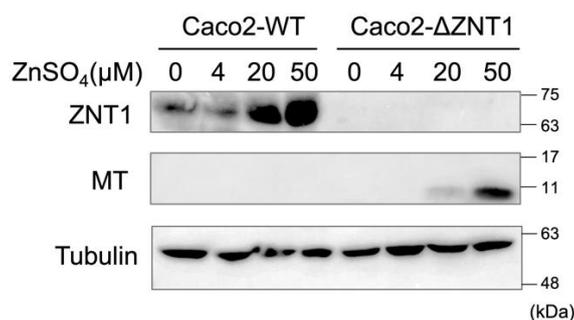


図2. ZNT1 の発現が消失した CaCo2 細胞では、MT の高亜鉛に対する感受性が増加している。Tubulin はローディングコントロールとして泳動。

考察

ZIP4 の変異は、先天性亜鉛欠乏症である腸性肢端皮膚炎 (Acrodermatitis enteropathica, AE) を引き起こす¹¹⁾。AE 患者が亜鉛恒常性を維持するには、日常量に推奨される亜鉛摂取量の 15~30 倍量の亜鉛摂取が必要となることから¹²⁾、亜鉛吸収過程においては、他の亜鉛トランスポーターが ZIP4 の機能を代替することはできないことがわかる。すなわち、ZIP4 は亜鉛吸収において必要不可欠な分子である。一方、ZNT1 は哺乳類で初めに同定された亜鉛トランスポーターであるが、その制御機構に関しては長らく明らかにされてこなかった。最近、我々のグループが、ZNT1 の発現量が亜鉛レベルに応答して鋭敏に変化すること、およびその応答が ZIP4 と逆であることを報告し⁸⁾、ZNT1 の亜鉛ホメオスタシス維持における重要性が再認識されてきたところである。ZNT1 は ZIP4 と同様に消化管上皮細胞に発現するが、ZIP4 がアピカル膜に局在するのに大して、ZNT1 はバソラテラル膜に局在することから、ZIP4 と ZNT1 の亜鉛レベルに依存した発現連動が亜鉛吸収を厳密に制御していることが想定される。本研究では、この発現連動に関して CaCo2 細胞を使用して解明することを試みたところ、ZIP4 が取り込んだ亜鉛によって ZNT1 の発現が増加することを強く示唆する結果を得ることに成功した。この結果は、消化管での亜鉛吸収過程では、上皮細胞内でのベクトリアル輸送制御「アピカル膜での ZIP4 の発現抑制→細胞内への亜鉛取込減少→バソラテラル膜での ZNT1 の発現低下」が機能していることを意味する (図3)。

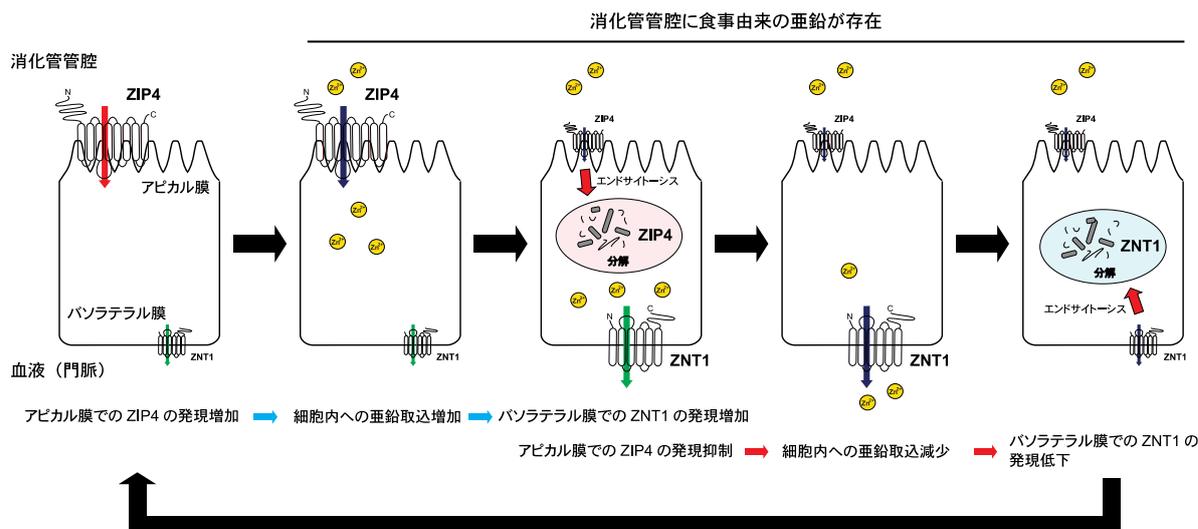


図3. 消化管上皮細胞における ZIP4 と ZNT1 の発現制御を介した亜鉛吸収制御のモデル

消化管での亜鉛の吸収効率は通常 30%程度とされ、その値は亜鉛欠乏時には増加することが知られる^{12, 13)}。この吸収率の変化は、ZIP4 の発現と相関することが知られている。このことを考えると、日常の食事で亜鉛吸収効率を高めるには、ZIP4 の発現を増加させることが重要であり、これを実現させることができれば、亜鉛欠乏予防につながる可能性が高い^{14, 15)}。本研究の成果からも、ZIP4 を標的にする因子が最も効果的であること確認された。今後は、本成果を用いて、ZIP4 の発現を増加させる食品因子の探索を進め、亜鉛吸収効率の増加に結びつく活性を有する食品因子の同定を目指したい。

参考文献

- 1). Kodama, H., Tanaka, M., Naito, Y., Katayama, K., and Moriyama, M.: Japan's Practical Guidelines for Zinc Deficiency with a Particular Focus on Taste Disorders, Inflammatory Bowel Disease, and Liver Cirrhosis. *Int J Mol Sci* 21, 2941, 2020
- 2). Kumssa, DB., Joy, EJ., Ander, EL., Watts, MJ., Young, SD., Walker, S. *et al.*: Dietary calcium and zinc deficiency risks are decreasing but remain prevalent. *Sci Rep* 5, 10974, 2015
- 3). Hashimoto, A., and Kambe, T.: Mg, Zn and Cu Transport Proteins: A Brief Overview from Physiological and Molecular Perspectives. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 61 Suppl, S116-118, 2015
- 4). Nishito, Y., and Kambe, T.: Absorption Mechanisms of Iron, Copper, and Zinc: An Overview. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 64, 1-7, 2018
- 5). Nishito, Y., Luo, S., and Kambe, T. (Hamilton K.L., Devor D.C. (eds)): Zinc

- Transporters Involved in Vectorial Zinc Transport in Intestinal Epithelial Cells. *Studies of Epithelial Transporters and Ion Channels*, p447-465, Springer, (2020)
- 6). Kambe, T., and 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
 - 7). Hashimoto, A., Nakagawa, M., Tsujimura, N., Miyazaki, S., Kizu, K., Goto, T. *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
 - 8). Nishito, Y., and Kambe, T.: Zinc transporter 1 (ZNT1) expression on the cell surface is elaborately controlled by cellular zinc levels. *J Biol Chem* 294, 15686-15697, 2019
 - 9). Nagamatsu, S., Nishito, Y., Yuasa, H., Yamamoto, N., Komori, T., Suzuki, T. *et al.*: Sophisticated expression responses of ZNT1 and MT in response to changes in the expression of ZIPs. *Sci Rep* 12, 7334, 2022
 - 10). Wagatsuma, T., Suzuki, E., Shiotsu, M., Sogo, A., Nishito, Y., Ando, H., *et al.*: Pigmentation and TYRP1 expression are mediated by zinc through the early secretory pathway-resident ZNT proteins. *Commun Biol*. 6, 403, 2023
 - 11). Kasana, S., Din, J., and Maret, W.: Genetic causes and gene-nutrient interactions in mammalian zinc deficiencies: acrodermatitis enteropathica and transient neonatal zinc deficiency as examples. *J Trace Elem Med Biol*. 29, 47-62, 2015
 - 12). August, D., Janghorbani, M., and Young, VR.: Determination of zinc and copper absorption at three dietary Zn-Cu ratios by using stable isotope methods in young adult and elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 50, 1457-1463, 1989
 - 13). Gallaher, DD., Johnson, PE., Hunt, JR., Lykken, GI., and Marchello, MJ.: Bioavailability in humans of zinc from beef: intrinsic vs extrinsic labels. *Am J Clin Nutr* 48, 350-354, 1988
 - 14). Hashimoto, A., Ohkura, K., Takahashi, M., Kizu, K., Narita, H., Enomoto, S. *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
 - 15). Nishito, Y., Hashimoto, A., Kambe, T.: Simple *in vitro* method to evaluate ZIP zinc transport ability through zinc transporter 1 and metallothionein expression measurements. *Methods Enzymol*. 687, 207-239, 2023