

消化管上皮バリア機能における亜鉛の生理的役割に関する研究

鈴木 卓弥¹, 田辺 創一¹, ラドハクリシュナ・K・ラオ²

¹広島大学大学院生物圏科学研究科, ²テネシー大学ヘルスサイエンスセンター

概要 消化管上皮のタイトジャンクション(TJ)は、異物の侵入を防ぐバリア機能を担う細胞間接着構造であり、この機能の損傷は、炎症を基盤とした消化管疾患につながると考えられている。また近年、必須微量元素の亜鉛が消化管の恒常性維持に重要な役割を持つことが提案されているが、その消化管 TJ バリアにおける役割はほとんどわかっていない。そこで本研究は、消化管の TJ バリアにおける亜鉛の生理的役割を解明すること、その炎症性腸疾患との関わりを探索することを目的とした。

ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞に亜鉛キレート試薬 TPEN (N, N, N', N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine) を作用させて、細胞内亜鉛の欠乏モデルとした。TPEN を作用させた Caco-2 細胞では、経上皮電気抵抗値の低下と蛍光デキストラン透過速度の上昇が認められ、TJ バリアの損傷が認められた。このとき、TJ タンパク質の Claudin-3 と Occludin のタンパク質発現量が低下したが、遺伝子発現量の低下は Claudin-3 のみに認められた。Claudin-3 プロモーターアッセイを行ったところ、TPEN による亜鉛欠乏は Claudin-3 プロモーター活性を低下させること、その低下には Zinc finger モチーフをもつ転写因子 Sp1 と Egr-1 が関わることを示された。一方で、Caco-2 細胞内の Occludin をビオチン標識し、その分解速度を解析したところ、TPEN による亜鉛欠乏は、Occludin 分解速度を上昇していることが示された。また、実験的大腸炎マウスでは、大腸の炎症とバリア損傷が認められ、Occludin と Claudin-3 発現量も顕著に低下した。このとき、大腸上皮の亜鉛トランスポーター ZIP5 の発現量も減少していた。

一連の研究結果から、消化管上皮の細胞内亜鉛は、TJ バリア機能の維持に必須な役割を持ち、その分子機序として、Claudin-3 の転写活性と Occludin のタンパク質分解速度を適正に維持していることが明らかとなった。さらに、大腸炎の発症やバリア機能損傷の要因の 1 つとして、大腸上皮の亜鉛トランスポーター ZIP5 の発現量が低下し、上皮細胞内の亜鉛の恒常性が攪乱している可能性が提案された。

1. 研究目的

ヒトの体内において、亜鉛は鉄に次いで多い必須微量元素金属元素であり、細胞内タンパクの構造の維持、酵素活性の制御などの重要な働きをもつ。また、zinc finger や zinc twist 等と呼ばれる亜鉛イオン結合性のモチーフを有する転写因子は、そのモチーフを介して DNA に結合し、タンパク質の転写を制御すると言われている。従来の研究により、味覚や摂食の制御における亜鉛の役割が明らかになりつつあるが、近年、亜鉛が消化管の免疫機能に役割を持つことや、亜鉛欠乏が消化器疾患を憎悪させることなどが報告され、消化管機能における亜鉛の重要性も提

案され始めている⁽¹⁾。また、亜鉛の細胞内恒常性は、亜鉛トランスポーターである ZIP や ZnT ファミリーにより調節され、これらトランスポーターの機能異常は、種々の疾患の要因となることが推測される。しかしながら、消化管機能における亜鉛の役割、疾患発症と亜鉛トランスポーターとの関連は、いまだ不明な点が多い。

消化管の上皮細胞は、栄養素の吸収に関わるとともに、外界とのインターフェースとして外来抗原・微生物などの侵入を制限するバリア機能の観点からも重要である。このバリア機能が損傷すると、管腔内の炎症性異物が容易に侵入し、消化管組織の炎症を基盤とした各種疾患の引き

金となる。実際に、炎症性腸疾患の患者では、消化管透過性の上昇が観察される。この消化管バリア機能を担う主要な構造が、タイトジャンクション(TJ)である。TJは、OccludinやClaudinなどのタンパク質に構成される接着構造であり、上皮細胞の側底膜に集積し、細胞間の異物の侵入を厳密に制御している⁽²⁾。このTJバリアの調節には、生体内の液性因子が中心的な役割を持つ一方で⁽³⁾、消化管の上皮細胞は摂食された食品成分や栄養素に高頻度に曝されることから、これら食品成分による制御の可能性も十分に考えられる。これまでに我々は、一部のポリフェノール類や短鎖の脂肪酸、難消化性糖類などにTJ機能の調節作用を見出している^(4, 5)。しかしながら、必須微量元素の亜鉛による消化管TJバリアへの役割は十分には解明されていない。

このような背景から、亜鉛による消化管TJ機能への役割を明らかにすることは、栄養学的意義が高いことに加え、疾患予防の観点からも極めて重要である。そこで本研究は、まず消化管上皮細胞を用いて、TJバリア機能における細胞内亜鉛の役割を解析し、その分子メカニズムを探索した。さらに実験的大腸炎モデルマウスにおいて、亜鉛関連タンパク質の発現を解析し、亜鉛の恒常性異常と疾病との関連について検討を加えた。

2. 研究方法

2.1 消化管上皮細胞のTJバリア機能における亜鉛の役割

ヒト消化管上皮細胞に細胞内亜鉛キレート試薬 TPEN (N, N, N', N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine、10 μM)を作用させて、細胞内亜鉛の欠乏モデルとした。TJバリア機能の指標として、蛍光デキストラン透過速度(FD-4)と経上皮電気抵抗値(TER)を測定した。TJタンパク質ZO-1、ZO-2、Occludin、JAM-A、Claudin-1/3/4の総発現量と細胞骨格への結合量をイムノブロット法により解析した。また、OccludinとClaudin-3の細胞内局在を蛍光免疫染色法にて観察し、さらに遺伝子発現量を定量PCR法にて解析した。併せて、TPENによる細胞活性への影響を評価するため、WST法によりCaco-2細胞のミトコンドリア活性を測定した。

2.2 TJタンパク質Claudin-3の転写制御における亜鉛の役割

Caco-2細胞からゲノムDNAを精製した後、常法に従いHuman Claudin-3のプロモーター配列(転写開始点から900 bp上流の領域)をクローニングした。ルシフェラーゼ発現ベクターpGL3に当該プロモーター配列を挿入して、hClaudin-3レポータープラスミドpGL3-CL3P(WT)を作成した。pGL3-CL3P(WT)プラスミドを遺伝子導入したCaco-2細胞を用いることにより、Claudin-3プロモーター活性の制御におけるTPENの作用(細胞内亜鉛の役割)を解析した。また、プロモーター配列を転写開始点から470、210、100 bpに短縮したレポータープラスミドも作成し、亜鉛によるプロモーター活性制御に関わる配列を特定した。さらに、転写開始点から100 bp内にZinc fingerモチーフを持つ転写因子Sp1とEgr-1の結合配列が予測されたため、これらの結合配列に変異を導入したレポータープラスミドを作成した。これら変異によるプロモーター活性の変化を解析することにより、Claudin-3転写制御におけるSp1とEgr-1の役割を解析した。

2.3 TJタンパク質Occludinのタンパク質分解における亜鉛の役割

タンパク質のビオチン標識試薬(Sulfo-NHS-Biotin)を用いて、Occludinのタンパク質分解における細胞内亜鉛の役割を解析した。まず、Caco-2細胞をSulfo-NHS-Biotin添加培地でインキュベートすることにより、Caco-2細胞内のタンパク質をビオチンにて標識した。続いて、Caco-2細胞にTPENを作用させ、ストレプトアビジンセファロースビーズを用いて、ビオチン標識タンパク質を回収した。イムノブロット法により残存するビオチン化Occludinを解析した。

2.4 大腸炎モデルマウスにおける亜鉛関連遺伝子の解析

亜鉛の恒常性異常と消化管TJバリア損傷、疾病との関連を探索するため、実験的大腸炎モデルマウスを用いた動物試験を実施した。Balb/cマウス(オス、6週齢)を馴化後、正常対照群と大腸炎群の2群に分けた。対照群には蒸留水を与え、大腸炎群にはデキストラン硫酸ナトリウム(DSS、2%(w/v))含有水を与え、大腸炎を誘発した。試験期間中、糞の性状と血便、体重減少を指標としたDisease activity index(DAI)を評価した。DSS投与開始から9日目に解剖を実施し、ミエロペルオキシダーゼ活性、大腸反転サック法によるバリア機能を解析した。イムノブロット法によ

り TJ タンパク質 Occludin と Claudin-3 の発現量を解析し、定量 PCR 法にて亜鉛トランスポーター ZIP4、ZIP5、ZnT1、ZnT4 と亜鉛結合タンパク質 Metallothionein-1、-2 の遺伝子発現量を解析した。ZIP5 については、イムノブロット法による解析も実施した。

3. 研究結果

3. 1 消化管上皮の細胞内亜鉛は、TJ バリアの維持に必須な役割を持つ

ヒト消化管上皮 Caco-2 細胞において、亜鉛キレート試薬 TPEN による細胞内亜鉛の欠乏は、TJ バリア機能の指標である TER を時間依存的に減少し、FD-4 透過速度も

顕著に上昇し、TJ バリアに損傷した(図 1A, B)。TPEN を作用させた Caco-2 細胞では、TJ タンパク質のうち、Occludin と Claudin-3 の発現量と細胞骨格結合量が減少していることが認められ(図 2)、その減少は蛍光免疫染色法によっても観察された。さらに TPEN は、Claudin-3 の mRNA 発現量を減少させたが、Occludin の mRNA 発現量は変動しなかった。また WST アッセイにおいて、TPEN による細胞活性への影響は認められなかった。これら結果は、消化管上皮の細胞内亜鉛は、TJ バリアの維持に必須な役割を持つこと、さらに Claudin-3 発現を遺伝子レベルで制御し、Occludin 発現をタンパク質レベルで制御することが明らかとなった。

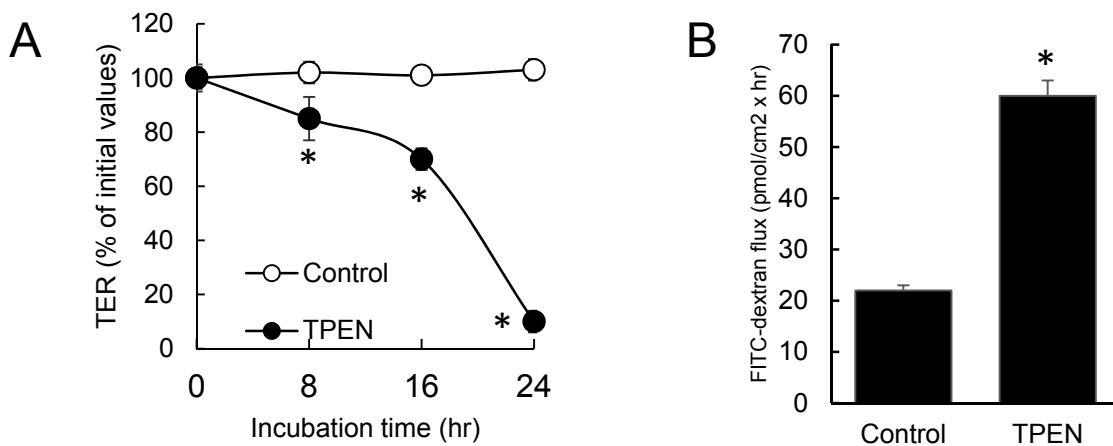


図 1. Caco-2 細胞の消化管バリア機能。Caco-2 細胞に TPEN を作用させ、経上皮電気抵抗値(TER、A)と蛍光デキストラン透過速度(B)を測定した。数値は、平均値±標準誤差として示した (n=4)。*コントロール群に対する統計的有意差 (P<0.05)。

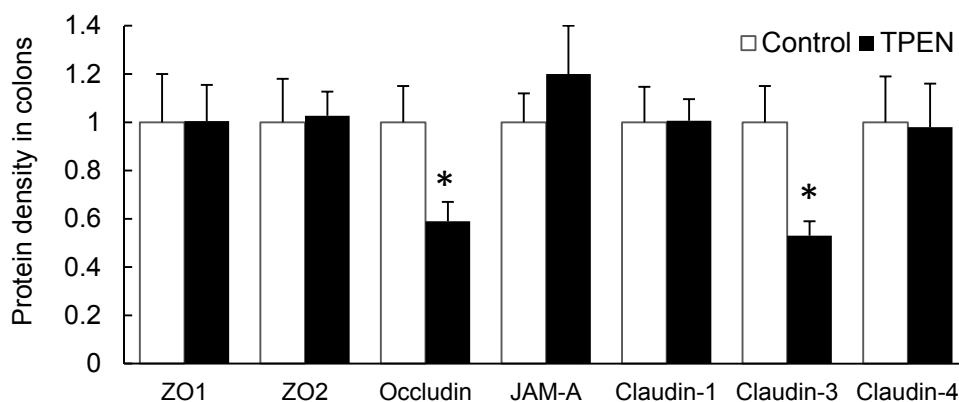


図 2. Caco-2 細胞の TJ タンパク質の総発現量。Caco-2 細胞に TPEN を作用させ、24 時間後に細胞溶解液を調製した。数値は、平均値±標準誤差として示した (n=4)。*コントロール群に対する統計的有意差 (P<0.05)。

3. 2 消化管上皮の細胞内亜鉛は、転写因子 Sp1 と Egr-1 を介して Claudin-3 の転写制御に関わる

細胞内亜鉛の欠乏が TJ タンパク質 Claudin-3 の発現量を遺伝子レベルで減少させることが認められたため、細胞内亜鉛が Claudin-3 の転写制御(プロモーター活性)に重要な役割を持つと推測した。Caco-2 細胞に Claudin-3 レポータープラスミドを遺伝子導入し、プロモーター活性(ルシフェラーゼ活性)を測定したところ、TPEN を作用させた細胞は、ルシフェラーゼ活性の顕著な減少を示した。また、その TPEN による減少は、470、210、100 bp まで短縮させた Claudin-3 プロモーター配列でも同程度に認められ(図 3A)、細胞内亜鉛による Claudin-3 転写制御には、プロモーター配列のうちの転写開始点から 100 bp 以内の配列が重要であることが明らかとなった。さらに、転写因子結合配列検索プログラム JASPAR により、Claudin-3 プロモーターの 100 bp 内に Zinc finger モチーフを持つ転写因子 Sp1 と Egr-1 の結合配列が存在することが予測された。そこで、それら2つの転写因子結合配列に変異を導入したレポ-

ータープラスミドによる Claudin-3 プロモーター活性を測定したところ、野生型に比べて顕著に減少した(図 3B)。これら結果から、消化管上皮細胞内の亜鉛は、Zinc finger タンパク質である Sp1 と Egr-1 を介して、TJ タンパク質 Claudin-3 の発現量を転写レベルで調節することが明らかとなった。

3. 3 消化管上皮細胞内の亜鉛は、Occludin のタンパク質分解速度を制御する

亜鉛欠乏による Occludin タンパク質の減少は、Claudin-3 と異なり、タンパク質レベルで制御されることが示された。そこで、細胞内亜鉛が Occludin のタンパク質分解速度を制御している(抑えている)と推測した。Caco-2 細胞のタンパク質をビオチン標識し、その減衰(残存量)を評価することにより、Occludin タンパク質の分解速度を解析した。結果として、TPEN を作用させた Caco-2 細胞では、Occludin タンパク質の残存量が低下し、分解速度の上昇が認められた。

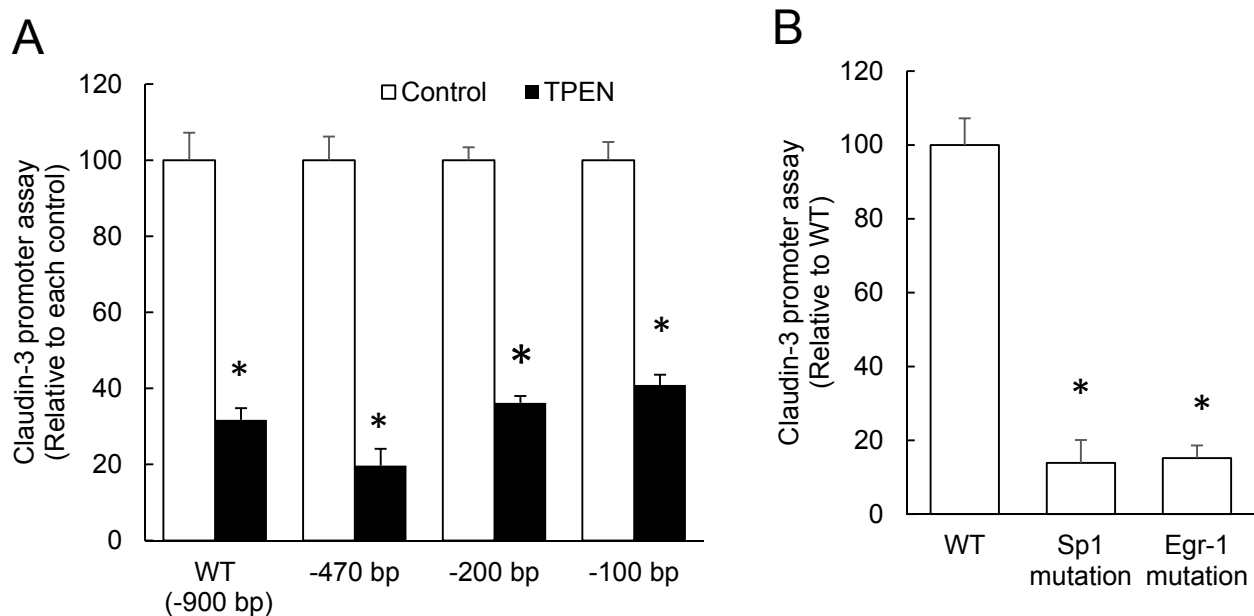


図 3. Caco-2 細胞における Claudin-3 プロモーター活性。A. Caco-2 細胞に pGL3-CL3P (WT, -470, -200, -100) を遺伝子導入したのち、TPEN を作用させた。B. Caco-2 細胞に pGL3-CL3P (WT, Sp1 mutation, Egr-1 mutation) を遺伝子導入したのち、TPEN を作用させた。24 時間後に細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。数値は、平均値±標準誤差として示した(n=4)。*コントロール群あるいは野生型に対する統計的有意差(P<0.05)。

3. 4 大腸炎マウスでは、大腸 TJ バリアの損傷に伴い、 亜鉛トランスポーターZIP5 の発現量が減少する

消化管における亜鉛の恒常性異常とバリア損傷、疾病との関連を探るため、実験的大腸炎モデルマウスにおける解析を実施した。試験開始 5 日目から、大腸炎群では便性の異常、血便が認められ、DAI スコアが上昇した(図 4A)。大腸炎群では、組織炎症の指標であるミエロペルオキシダーゼの顕著な上昇と、腸炎に特徴的な大腸組織の短縮が観察された。大腸反転サック法によるバリア機能評価において、大腸炎群は蛍光デキストラン透過速度の上

昇を示し、大腸バリア機能が損傷していることが認められた。大腸炎群の病変部位では、TJ タンパク質 Occludin と Claudin-3 の発現量が大きく減少するとともに(図 4B)、亜鉛トランスポーター ZIP5 と亜鉛結合タンパク質 Metallothionein-1 の遺伝子発現量も減少していた(図 5)。大腸炎群における ZIP5 発現量低下は、タンパク質レベルでも認められた。他の亜鉛トランスポーターや Metallothionein-2 の遺伝子発現量には、群間に差は認められなかった。

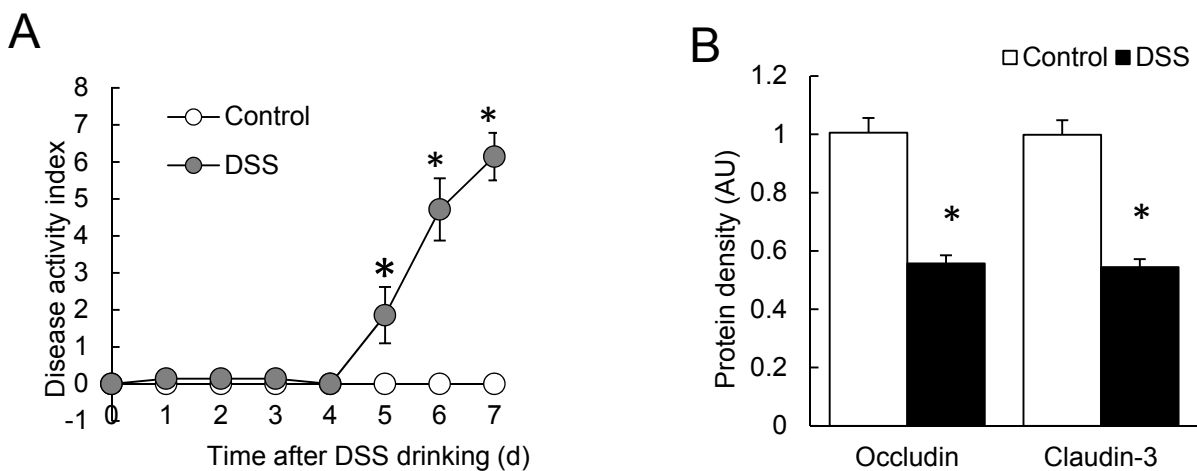


図 4. 大腸炎マウスの Disease activity index (DAI) と TJ 発現量。DAI (A) は、糞の性状、血便、体重減少を基準に算出した。試験終了後の大腸組織を用いて、Occludin と Claudin-3 発現量を解析した (B)。数値は、平均値 ± 標準誤差として示した (n=6)。*コントロール群に対する統計的有意差 (P<0.05)。

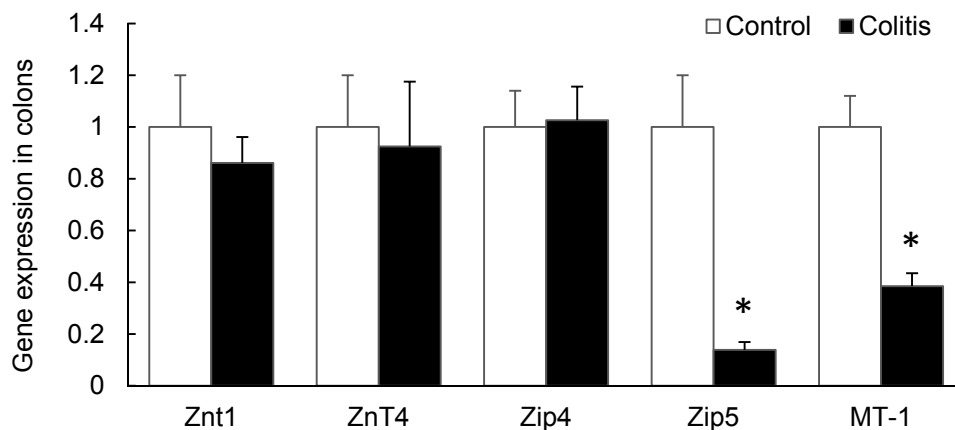


図 5. 大腸炎マウスの亜鉛関連タンパク質の遺伝子発現量。試験終了後の大腸組織を用いて、亜鉛トランスポーターとメタロチオネインの発現量を解析した (B)。数値は、平均値 ± 標準誤差として示した (n=6)。*コントロール群に対する統計的有意差 (P<0.05)。

4. 考 察

消化管の上皮は、生体内と体外の環境を隔てるのに極めて重要であり、その機能の損傷は炎症を基盤とした疾患の要因となる。過去の研究により、多くの液性因子やシグナル分子による消化管バリア機能の制御機構が報告されているが、食品成分や栄養素によるその制御は十分には明らかとなっていない⁽³⁾。必須微量元素である亜鉛は、各種細胞内タンパク質の構造の維持、酵素活性の制御に重要な役割を持つとともに、亜鉛結合モチーフを持つ転写因子の活性にも必須な役割を持つ。本研究は、消化管上皮の細胞内亜鉛が TJ バリア機能の維持に重要な役割を持つことを示すとともに、消化管における亜鉛の恒常性異常が炎症性腸疾患の発症や進展に関わる可能性を見出した。

消化管の上皮細胞内の亜鉛は、TJ タンパク質の Occludin と Claudin-3 の発現量の制御に必須な役割を持つようである。Occludin は、TJ 構造の膜貫通型タンパク質として初めて同定された分子であり、生体内のほとんど全ての TJ 構造に発現している⁽⁶⁾。マウスにおいて、Occludin の欠損は致死性ではないものの、複数の上皮構造の異常や炎症を引き起こす⁽⁷⁾。一方で、Claudin ファミリーは少なくとも 27 種のアイソフォームにより構成され、各組織に特徴的な発現パターンを見せる。消化管にも複数の Claudin ファミリーが発現するが、なかでも Claudin-3 の発現量は比較的高く、消化管バリア機能への寄与は大きいと推測される⁽⁸⁾。興味深いことに、Occludin と Claudin-3 の発現制御における亜鉛の関わり方は全く異なっていた。Occludin については、細胞内の亜鉛を欠乏させたとき、その分解速度の上昇が認められた。Claudin-3 に関しては、細胞内亜鉛は、Zinc finger モチーフを持つ転写因子 Sp1 と Egr-1 を介して、そのプロモーター活性と転写活性の維持に必須な役割を持つことが見出された。

これまでに、Occludin の発現制御に関する研究がいくつか報告されているが、それらの多くは転写制御に関するものである。消化管上皮の細胞内亜鉛は、Occludin の遺伝子発現量の調節には関与しないが、少なくともその分解速度やターンオーバーを適正に維持するのに重要な役割を持っているようである。一般的には、細胞内タンパク質は、プロテアソーム系とリソソーム系により分解が制御されている。本研究は、亜鉛の欠乏により、いずれかあ

るいは両方の系が活発となり、Occludin の分解速度を高めたと考えられる。また、Occludin の翻訳調節における亜鉛の関わりも今後検討する必要があるだろう。

炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎とクローン病に代表される難治性疾患である。それらの発症要因は十分には解明されていないものの、消化管バリアが損傷し、異物侵入により慢性的な炎症を引き起こされることが1つの要因として提案されている。実際に、患者の病変部位において TJ 構造が損傷されていること、さらに患者の親縁類者において、見かけ上は健康にも関わらず、消化管の透過性が上昇していることも報告されている⁽⁹⁾。本研究では、亜鉛の恒常性異常、大腸バリア機能、および炎症性腸疾患との関わりを探索するため、実験的大腸炎モデルマウスを使用した。結果として、大腸炎マウスの病変部位において、TJ タンパク質 Occludin と Claudin-3 の減少に併せて、亜鉛トランスポーターの1つ ZIP5 が顕著に低下していることが観察された。消化管上皮細胞には複数の亜鉛トランスポーターが発現しており、ZIP5 は細胞の基底膜側に局在し、血液中から細胞内へ亜鉛を供給する役割を持つ。大腸では、管腔側からの亜鉛の取り込みは活発ではないと考えられていることから、上皮細胞内の亜鉛の恒常性維持において、ZIP5 の寄与は大きいと推測される。我々の結果は、上皮細胞の ZIP5 低下とそれによる亜鉛の恒常性の攪乱が、大腸バリアの損傷、大腸炎の発症と進展に一定の役割を持つことを提案していると考えられる。

5. 今後の課題

飽食の時代と呼ばれる現代において、亜鉛は不足しやすい栄養素の1つであり、潜在的な欠乏が身体の恒常性異常や疾患の要因となりうることは十分に考えられる。本研究では、亜鉛の新たな生理学的役割として、消化管 TJ バリアを正常に維持することを見出した。消化管の TJ バリアの損傷は、消化管疾患のみならず、近年では糖尿病、メタボリックシンドローム、肝障害などの多くの疾患の要因となることが報告されている。健康維持や疾病発症における亜鉛の役割を明らかにするためには、亜鉛自体の生理的機能を探索するとともに、その恒常性の維持に関わる亜鉛トランスポーターや亜鉛貯蔵タンパク質などの関わりも併せて検討していく必要がある。

6. 文献

1. Iwaya H, Kashiwaya M, Shinoki A *et al.* (2011) Marginal zinc deficiency exacerbates experimental colitis induced by dextran. *J Nutr* **141**, 1077-1082.
2. Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 799-809.
3. Suzuki T (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* **70**, 631-659.
4. Suzuki T, Tanabe S, Hara H (2011) Kaempferol enhances intestinal barrier function through the cytoskeletal association and expression of tight junction proteins in Caco-2 cells. *J Nutr* **141**, 87-94.
5. Suzuki T, Yoshida S, Hara H (2008) Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *Br J Nutr* **100**, 297-305.
6. Furuse M, Hirase T, Itoh M *et al.* (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**, 1777-1788.
7. Saitou M, Furuse M, Sasaki H *et al.* (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**, 4131-4142.
8. Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE *et al.* (2006) Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns* **6**, 581-588.
9. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E *et al.* (1986) Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* **105**, 883-885.

Roles of Zinc on Intestinal Barrier Function

Takuya Suzuki¹, Soichi Tanabe¹, Radhakrishna K Rao²

¹ Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

² Health Science Center, University of Tennessee

Summary

Tight junctions (TJs) represent the major component of intestinal barrier function. In the impaired intestinal TJ barrier, the noxious substances permeate through the epithelium and induce chronic activation of intestinal immune system. Recent studies demonstrate that zinc, an essential trace element, has a crucial role in maintaining the intestinal homeostasis, however, its role for intestinal TJ barrier remains unclear. This study aimed to understand the physiological roles of zinc for intestinal TJ barrier and its interaction with pathogenesis of inflammatory bowel diseases.

The intracellular zinc was depleted using a zinc chelating agent, TPEN (N, N, N', N'-Tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine) in human intestinal Caco-2 cells. The cellular zinc depletion induced the decreased transepithelial electrical resistance and increased dextran flux, indicating the impairment of TJ barrier. Immunoblot analysis showed that the TPEN treatment decreased the 2 TJ proteins, claudin-3 and occludin, at the protein levels in cells. Quantitative PCR analysis showed that TPEN decreased the mRNA level of claudin-3, but not occludin. The luciferase reporter assays revealed that 2 transcription factors, Sp1 and Egr-1, carrying zinc finger motifs in the molecules, have the important roles in the zinc-mediated transcriptional regulation of claudin-3. Whereas, a cell surface biotinylation technique showed that the zinc depletion increased the cellular degradation of occludin at the protein level. Further, the decrease in intestinal ZIP5, a zinc transporter, was observed in colitic mice with showing the impaired expressions of claudin-3 and occludin.

Taken together, the intestinal zinc has crucial roles on maintaining the TJ barrier integrity. Zinc regulates the transcriptional activity of claudin-3 and survival ability of occludin protein in cells. In addition, our results suggest that the decreased ZIP5 is possibly involved in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases.