

小腸 ABCA1 トランスポーターを介したコレステロール排出を 活性化する大豆たん白質の解析

佐藤隆一郎*

東京大学大学院農学生命科学研究科

Studies on Soy Proteins Stimulating Cholesterol Efflux Driven by the Intestinal ABCA1 Transporter

Ryuichiro SATO

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

Cholesterol efflux from human cultured intestinal (Caco-2) cells was studied. ABCA1, which stimulates cholesterol efflux in a manner similar to HDL from various cells, was expressed in differentiated Caco-2 cells. A nuclear receptor, Liver X Receptor(LXR), was also expressed in these cells. ABCA1 gene expression was augmented by treatment of cells with an LXR agonist. [³H]cholesterol efflux to the apical or basolateral side of Caco-2 cells was measured after induction of ABCA1 expression by the LXR agonist. Cholesterol efflux to the basolateral side was increased by the agonist or the addition of apo A-1, which is involved in formation of HDL by ABCA1, to the culture medium, suggesting that ABCA1 participates in HDL production on this side. Cholesterol efflux to the apical side was increased by the agonist or the addition of bile acid, not apo A-1. This indicates that certain transporters including ABCG5 and G8 induced by LXR stimulate cholesterol efflux to the apical side in a bile acid-dependent manner. We speculate that some peptide molecules digested from soy proteins as well as bile acids might stimulate cholesterol efflux from the intestinal epithelial cells. Alternatively, it is possible that some peptides in the small intestinal tract directly enhance the transport activity of transporters involved in cholesterol efflux. To find out functional soy peptides reducing cholesterol absorption (increasing cholesterol efflux), several kinds of screening are now being carried out. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 63-66, 2003.

Key words : ABCA1, ABCG5, ABCG8, cholesterol efflux, LXR

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

高齢化社会を迎えた日本では、動脈硬化症等の生活習慣病が今後益々増加することが予想される。その予防の一策として、小腸におけるコレステロール吸収を低下させ、脂質代謝を改善する試みが考えられる。小腸における脂質の吸収機構の実体は明らかでないが、近年、吸収とは逆向きの排出活性を担うトランスポーターが小腸上皮に同定され、取り込み・排出の差し引きとして吸収を捉える必要が生じてきた。本研究では、このような小腸における脂質、特にコレステロール排出の分子基盤を明らかにするために、コレステロール排出トランスポーターと想定されているABCA1に着目し、培養小腸細胞における機能発現解析を試みた。最近の報告によれば、小腸に想定される排出トランスポーターの発現を上昇させる薬物により、小腸における見かけのコレステロール吸収が著しく低下する¹⁾。これらの実験事実に基づき、排出トランスポーター活性を促進し、コレステロール吸収低下を導くという新たな発想に立脚し、そのような機能を有した大豆たん白質由来成分を探索する評価系の構築、それを用いた機能性因子の探索・解析を目指して以下の実験を行った。

方 法

ヒトABCA1特異的抗体の作成

ヒトABCA1たん白質アミノ酸79～427をHis-tagの後方に連結した融合たん白質を大腸菌に発現させ、リコンビナントABCA1を調製した。これをウサギに免疫し、抗血清を獲得した。同様にC末端側のペプチドを合成し、これに対する抗血清をウサギより得た。

ヒト小腸上皮様細胞Caco-2を用いたABCA1発現調節実験

Caco-2細胞でのABCA1mRNA発現の確認をノーザンプロット法を用いて行った。分化前後のCaco-2細胞から総RNAを抽出し、ABCA1発現変動について観察した。また、ABCA1は核内受容体LXRの応答遺伝子であることから、内因性リガンドと考えられている22(OH)コレステロール、あるいは合成リガンドを投与し、その発現誘導を解析した。

Caco-2細胞からのコレステロール排出評価系の構築

Caco-2細胞を透過性膜上に培養し、³Hコレステロールを取り込ませた後、経時的に粘膜側、基底膜側に排出される放射性活性を測定した。LXRリガンドによりABCA1発現を亢進させた条件下での排出活性を追跡した。また、粘膜側、基底膜側の双方に、HDL産生に不可欠なアポA-1あるいは胆汁酸を培地に添加し

てコレステロール排出への影響を評価した。

結果と考察

Caco-2細胞におけるABCA1発現

Caco-2細胞はオーバーコンフルエントの状態ですべて2週間程度培養すると小腸上皮様へと分化する。この前後で、各遺伝子の発現パターンをノーザン解析法により検討した (Fig. 1)。Caco-2細胞の分化に伴い、LXR、ABCA1mRNA量は数倍増加した。一方、植物ステロールの排出に関わると考えられているABCG5、ABCG8mRNAは分化前後で変動しなかった。分化Caco-2細胞をそれぞれ、0.1～10 μ Mの範囲のLXR合成リガンドで処理したところ、濃度依存的にABCA1mRNA増加が認められた。同じくLXR応答遺伝子であることが知られているABCG5、ABCG8でも、わずかな上昇が見られた (Fig. 2)。経時的には、mRNA発現は8時間後以降プラトーに達するのに対し、たん白質発現は12時間後以降に発現最大値を迎えた。以上の結果より、Caco-2細胞は (特に分化Caco-2細胞) 十分にLXR応答性を維持しており、ABCA1発現も十分であることから、ABCA1を介した細胞外へのコレステロール排出を評価するのに適した細胞であると結論した。

Caco-2細胞からコレステロール排出

分化Caco-2細胞に放射性コレステロールを48時間取り込ませた後、LXRリガンド、アポA-1存在下、24時間における粘膜側、基底膜側へのコレステロール排出

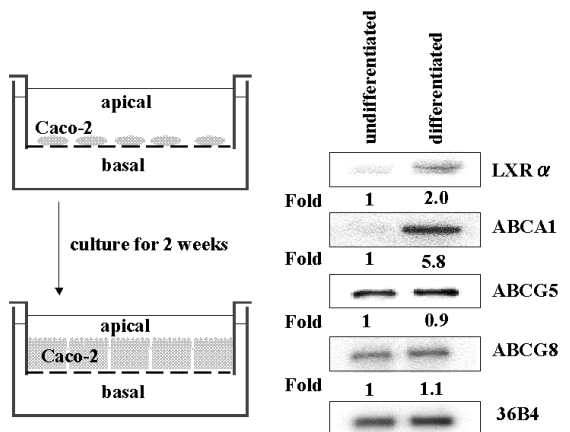


Fig. 1. Gene expression in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells. Total RNA from undifferentiated Caco-2 cells was extracted and Northern blot analysis was carried out.

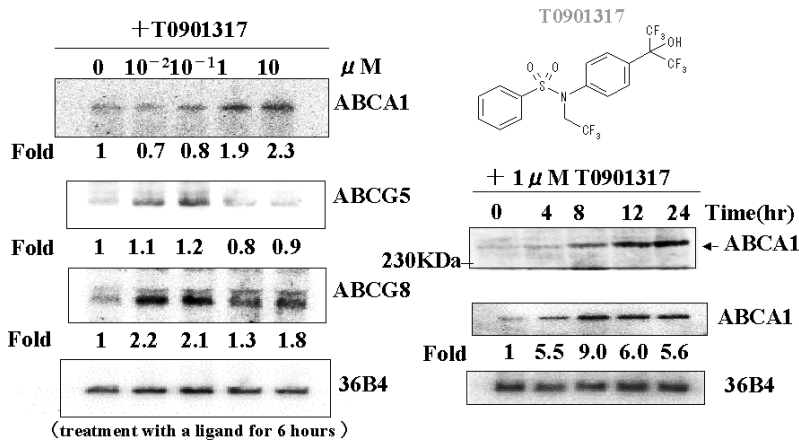


Fig. 2. An LXR ligand stimulates ABCA1 gene expression in differentiated Caco-2 cells. Differentiated Caco-2 cells were cultured with the indicated concentration of an LXR ligand for 6 hr and then total RNA was extracted. A time-dependent increases in ABCA1 mRNA and protein by treatment with 1 μ M T0901317 was analyzed.

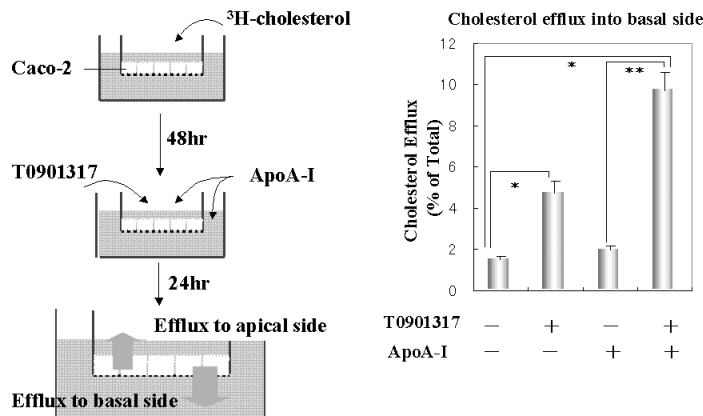


Fig. 3. Cholesterol efflux to the basolateral side was enhanced by an LXR ligand and apo A-1. Cholesterol efflux was indicated as % of total intracellular radioactive cholesterol. Caco-2 cells were cultured with 1 μ M T0901317 or 10 μ g/mL apo A-1. Means \pm S.D., n=3, *P value < 0.05 versus control, **P value < 0.05 versus treatment with ApoA-I alone.

を測定した。粘膜側には取り込み総量の4%程度、基底膜側へは2%程度の排出が確認された (Fig. 3, 4)。基底膜側へHDL産生の際にコレステロールのアクセプターとして機能するアポA-1を加えると、ABCA1発現増加に伴い排出が高まった。一方、粘膜側ではLXRリガンド処理により排出は亢進するものの、アポA-1には応答しなかった。以上の結果より、ABCA1を介したコレステロール排出は主に、基底膜側で起こり、アポA-1を介したHDL産生の形で行われることが明らかになった。

小腸管腔内での排出コレステロールのアクセプターとして想定される胆汁酸を培地に加えたところ、基底膜側では排出に影響を及ぼさなかったが、粘膜側では排出を促進した (Fig. 5)。以上の事実から、LXRリガ

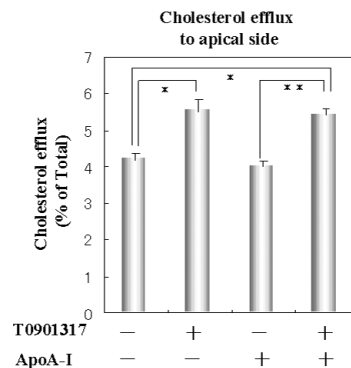


Fig. 4. Cholesterol efflux to the apical side was enhanced by an LXR ligand, but not by apo A-1. Caco-2 cells were treated as described in figure 3 legend. Means \pm S.D., n=3, *P value < 0.05 versus control, **P value < 0.05 versus treatment with ApoA-I alone.

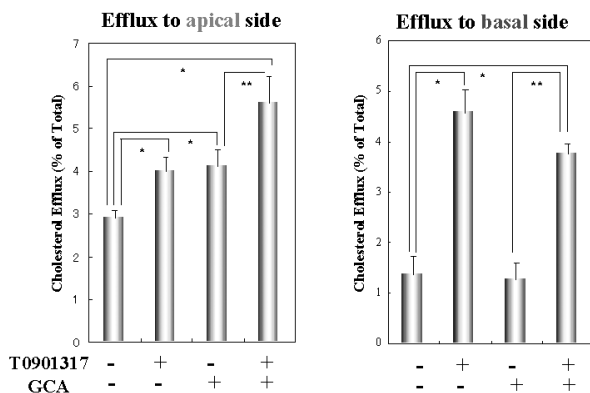


Fig. 5. Cholesterol efflux to the apical side was enhanced by glycocholic acid. Caco-2 cells were cultured with or without 1 mM glycocholic acid (GCA). Means \pm S.D., n=3, *P value < 0.05 versus control, **P value < 0.05 versus treatment with GCA alone.

ンド処理により基底膜側で増大したコレステロール排出は、主としてABCA1によるものと考えられた。一方、粘膜側ではABCA1とは異なる（例えばABCG5/ABCG8）がLXRリガンドにより誘導され、管腔内の胆汁酸等をアクセプターとして排出が行われることが明らかになった。

上記の結果より、（１）胆汁酸と同様の両親媒性を保持した大豆たん白質由来のペプチドには、コレステロール排出を促進する効果が期待される。（２）LXR

を活性化する大豆たん白質由来成分は、HDL産生、コレステロール排出を亢進させ、コレステロール代謝を正に制御する可能性がある。（３）LXRにより発現が亢進する粘膜側コレステロール排出トランスポーターの排出活性を、小腸管腔内から促進する因子を大豆たん白質が含む可能性がある。これらの可能性について、大豆たん白質由来ペプチドについて解析、探索を継続させている。

要 約

小腸上皮細胞からのコレステロール排出活性を評価するために、ヒト小腸上皮様細胞Caco-2を用いた実験を行った。Caco-2細胞は分化させるとLXR、ABCA1発現が上昇した。また、LXRの合成リガンドで細胞を処理すると、ABCA1の発現は増加し、Caco-2細胞がABCA1を介したコレステロール排出を評価するのに適合した細胞であることが確認された。細胞を透過膜上で培養し、LXRリガンドでABCA1発現を上昇させ、粘膜側、基底膜側に排出されるコレステロールを放射活性で追跡する評価系を構築した。その結果、LXRリガンドで細胞を処理するといずれの側にもコレステロールの排出が高まるが、アポA-1によるHDL産生は基底膜側でのみ認められた。また培地に胆汁酸を添加すると粘膜側でのみ、コレステロール排出が増進した。以上の結果より、HDL産生に関与するABCA1は基底膜側でコレステロール排出に寄与し、粘膜側はそれ以外のLXR応答遺伝子（ABCG5、ABCG8等）が排出亢進に寄与するものと推測される。

文 献

- 1) Repa JJ et al (2000): Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimer. *Science*, **289**, 1524-1529.