

小腸上皮トランスポーターの活性調節を介して 脂質代謝改善に寄与する大豆たん白質成分の解析

佐藤隆一郎*

東京大学大学院農学生命科学研究科

Soy Proteins Affect Activities of Small Intestinal Transporters and Improve Lipid Metabolism

Ryuichiro SATO

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

ABSTRACT

Cholesterol efflux from human cultured intestinal cells, Caco-2, was studied. [^3H]cholesterol efflux to the apical side of Caco-2 cells was measured after induction of ABC transporter gene expression by the LXR agonist. Cholesterol efflux to the apical side was enhanced by the agonist and/or the addition of bile acid, but 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. Among several bile acid molecules, chenodeoxycholic acid (CDCA) and deoxycholic acid (DCA) are potent acceptors. Crude peptide molecules digested from soy proteins as well as bile acids, stimulated cholesterol efflux from the intestinal epithelial cells. We also developed a novel assay system for evaluating bile acid absorption through the intestinal bile acid transporter (IBAT). Some soy peptides did not affect bile acid absorption, but appeared to stimulate the farnesoid X receptor (FXR) activity in cells after being absorbed. This stimulating effect of soy peptides on the FXR activity might partly explain the molecular mechanism by which dietary soy proteins reduce serum triacylglycerol and cholesterol levels. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 98-101, 2004.

Key words : cholesterol, bile acid, IBAT, FXR, ABCG5, ABCG8

小腸細胞において細胞内へ吸収されたコレステロールの一部は、再び細胞外へと排出される。この排出に関与するABCトランスポーターの活性を上昇させることは、コレステロール吸収を低下させることになるこ

とから、この排出機構について解析を試みた。また、コレステロールは肝臓で胆汁酸へと異化され、小腸上部で分泌されたのちにその90%以上が小腸下部において再吸収される。この胆汁酸の再吸収に関わる胆汁酸トランスポーターの活性を低下させることにより、再吸収率を低下させ、胆汁酸への異化、体外排泄を上昇

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

させることが期待される。胆汁酸トランスポーター機能を評価するアッセイ系の構築とともに、大豆たん白質ペプチドによるトランスポーター活性調節の可能性について検討を行った。

方 法

培養小腸上皮様細胞からのコレステロール排出

Caco-2細胞を透過膜上に培養し、 $[^3\text{H}]$ コレステロールを取り込ませた後に、経時的に粘膜側に排出される放射活性を測定した。LXRリガンドによりABCトランスポーター発現を亢進させた条件下での排出活性を追跡した。粘膜側培地に排出コレステロールのアクセプターとして機能しうることが予想される、各種胆汁酸を添加し、排出活性への影響を観察した。さらに、大豆たん白質分解ペプチドの排出活性に及ぼす影響を検討した。

胆汁酸トランスポーター輸送活性評価系の構築

胆汁酸トランスポーター、核内受容体FXRを発現していない培養細胞HEK293に、胆汁酸トランスポーター、Gal4 DNA結合領域とFXRの融合たん白質、luciferase遺伝子の上流にGal4結合領域を組み込んだレポーター遺伝子を発現させた。培地中に抱合胆汁酸を添加し、胆汁酸トランスポーターにより細胞内へ取り込まれた胆汁酸をluciferase活性として評価した。

結果と考察

Caco-2細胞からのコレステロール排出

Caco-2細胞をLXRリガンドで処理することにより、ABCA1、ABCG5、ABCG8等の発現が亢進した。粘膜側への $[^3\text{H}]$ コレステロール排出は、ABCA1を介したApoA-1依存的でなく、ABCG5/G8を介した排出である可能性が高い。そこで、ApoA-1に変わり粘膜側培地中で排出コレステロールのアクセプターとして機能する小腸内物質として胆汁酸を想定し、各種胆汁酸によるコレステロール排出促進効果を比較、検討した。その結果、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、デオキシコール酸のグリシンもしくはタウリン抱合型が促進活性が高く、コール酸のグリシンもしくはタウリン抱合型は活性が低かった。グリコCDCAにおいて、コレステロール排出活性は高い濃度依存性を示した (Fig. 1)。以上の結果から、小腸上皮細胞に一旦取り込まれたコレステロールが小腸腔内へと排出される過程において、小腸腔内の胆汁酸がアクセプターとして機能しうることが明らかになった。胆汁酸の機能を代替する食品由来の成分として、脂質代謝改善効果の見られる

大豆たん白質トリプシン分解ペプチドを培地に添加すると、排出促進活性が認められた。対照のカゼイントリプシン分解ペプチドには同様の効果は認められなかった (Fig. 2)。想定されるペプチドとして、 β コングリシニン各サブユニットから両親媒性配列をピックアップし、それらの合成ペプチドを用いた活性実験を行ったが有意な活性は認められなかった。

胆汁酸トランスポーターを介した抱合胆汁酸輸送活性評価系の構築

抱合胆汁酸を培養細胞培地に添加しても、細胞はこれを取り込むことはできない。そこで、胆汁酸トランスポーター遺伝子をHEK293細胞へ導入し、胆汁酸輸送を可能とさせた。Gal4 DNA結合領域の後方へ胆汁酸を結合し活性化するFXR (Farnesoid X Receptor) を

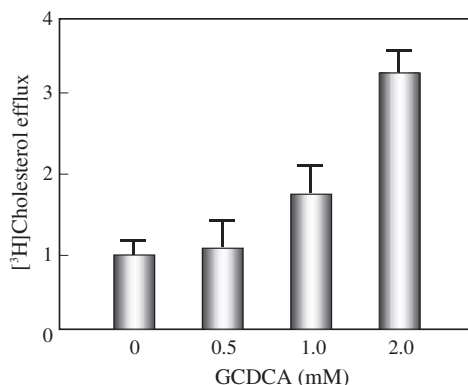


Fig. 1. Cholesterol efflux to the apical side was enhanced by glycochenodeoxycholic acid (GCDCA). Caco-2 cells were cultured with the indicated concentration of GCDCA for 24 h.

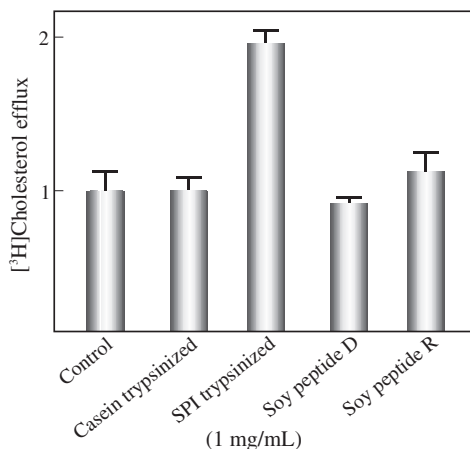


Fig. 2. Cholesterol efflux to the apical side was enhanced by SPI digests. Caco-2 cells were cultured with various kinds of peptides for 24 h.

融合させたたん白質を発現させ、取り込まれた胆汁酸により活性化されたFXRをluciferase活性で測定する評価系を構築した (Fig. 3). この評価系において胆汁酸トランスポーターを発現させないと、luciferase活性は低値で、発現させると活性は10~30倍に上昇した. この系を用いて、大豆たん白質分解ペプチドによる胆汁酸トランスポーター輸送活性への影響について検討を

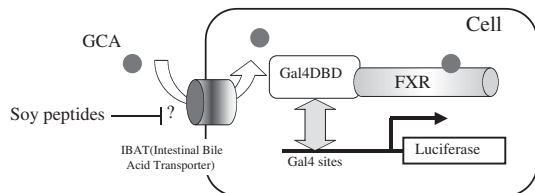


Fig. 3. A reporter assay system to evaluate the function of soy peptides.

進めた. 検討した中で、ハイニユートD3にluciferase活性を上昇させる傾向が認められた (Fig. 4). この結果は、大豆ペプチドがトランスポーター活性を低下させ、胆汁酸吸収を阻害するという想定した可能性と逆のものであった. この効果をさらに検証するために、胆汁酸トランスポーターを細胞に導入せずに非抱合型のCDCAを用いたアッセイを行った. この実験系では、CDCAは単純拡散で細胞内へ取り込まれるが、この条件下でもD3にluciferase活性を上昇させる効果が認められた (Fig. 4). 以上の結果より、D3ペプチドの一部が細胞内へ取り込まれ、胆汁酸によるFXR活性化を亢進させる効果が推察された. FXRの活性化による脂質代謝改善効果が報告されていることから^{1, 2)}、大豆たん白質による効果の一部を、この効果が説明しているのではないかと考えられた. さらに、詳細な分子機構を明らかにする必要がある.

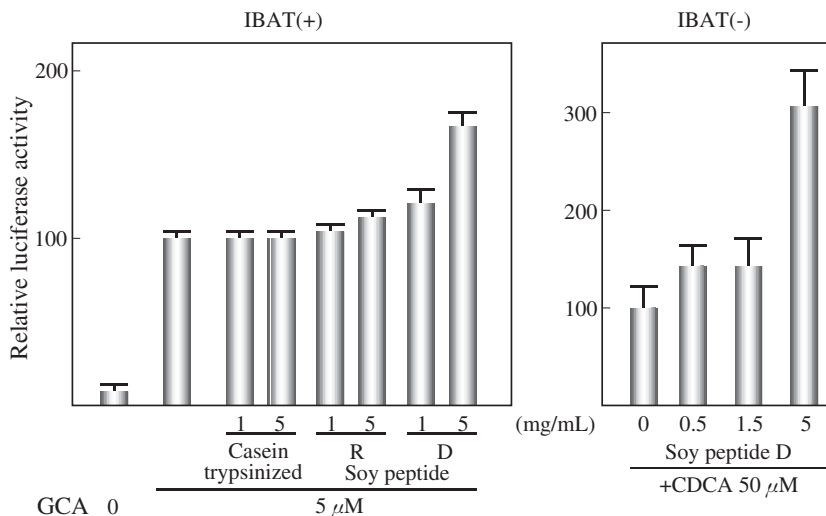


Fig. 4. Soy peptides enhance the farnesoid X receptor activity. Caco-2 cells in the presence or absence of IBAT were cultured with peptides and either glycocholic acid (GCA) or CDCA.

要 約

小腸上皮細胞からの管腔内へのコレステロール排出、小腸下部での胆汁酸トランスポーターによる胆汁酸再吸収をそれぞれ変動させる大豆たん白質由来のペプチドを探索する目的で小腸上皮様細胞Caco-2を用いた評価系を構築した. 上皮細胞における粘膜側へのコレステロール排出にはABCG5/G8輸送体の関与の可能性が高く、生理的条件下におけるコレステロールのアクセプター活性を追跡した. 胆汁酸にこの活性が認められた. また、大豆たん白質分解ペプチド（粗分画）に排出を上昇させる効果が認められた. さらに、胆汁酸トランスポーターによる胆汁酸吸収を負に制御するペプチドの活性を探索したが、その様な効果は認められなかった. むしろ、ハイニユートD3はその一部が細胞内に取り込まれ核内受容体活性を促進する可能性を示唆するデータが得られた. これらの効果は、大豆たん白質の脂質代謝改善効果の一部を説明するものと考えられる.

文 献

- 1) Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA and Willson TM (2000): Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*, **43**, 2971-2974.
- 2) Urizar NL, Liverman AB, Dodds DT, Silva FV, Ordentlich P, Yan Y, Gonzalez FJ, Heyman RA, Mangelsdorf DJ and Moore DD (2002): A natural product that lowers cholesterol as a antagonist ligand for FXR. *Science*, **296**, 1703-1706.