コレステロールの吸収および排出に関与する輸送たん白質の機能に及ぼす大豆たん白質の影響

池田郁男*[1]・工藤真理子[2]・永尾晃治[3]・濱田忠輝[2]・大城陽子[1]・
菅原隆史[1]・山平　崇[1]・今泉勝己[4]・柳田晃良[3]

[1]東北大学大学院農学研究科生体分子機能学分野　[2]九州大学大学院生物資源環境科学府栄養化学分野
[3]佐賀大学農学部食品栄養化学分野　[4]九州大学大学院農学研究院栄養化学分野

Dietary Soy Protein Increases mRNA Expression of ABCG5 and ABCG8 in Liver and Biliary Output of Cholesterol in Rats

Ikuo IKEDA*[1], Mariko KUDO[2], Koji NAGAO[3], Tadateru HAMADA[2], Yoko OSHIRO[1], Takashi SUGAWARA[1], Takashi YAMAHIRA[1], Katsumi IMAIZUMI[4] and Teruyoshi YANAGITA[3]

[1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University Sendai 981-8555
[2]Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University
[3]Faculty of Agriculture, Saga University
[4]Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University

ABSTRACT

Dietary soy protein isolate (SPI) and undigested high molecular fraction of SPI exhaustively digested with proteases (HMF), compared with casein (CAS), increased mRNA expression of ATP-binding cassette transporter (ABC) G5 and ABCG8 in rat liver, but not in the intestine. Biliary excretion of cholesterol was significantly higher in rats fed SPI and HMF than in those fed CAS. Fecal excretion of acidic steroids was higher in rats fed SPI and HMF. The mRNA expression of hepatic cholesterol 7α-hydroxylase (CYP7A1) in the HMF group was significantly higher and that in the SPI group tended to be higher than in the CAS group. In contrast, mRNA expression of hepatic small heterodimer partner (SHP) was significantly lower in the feeding of SPI and HMF. It has been known that the reduction of SHP activates liver receptor homologue (LRH)-1, which binds to the promoter of CYP7A1 and increases its mRNA expression. Since it was recently reported that LRH-1 activates the promoter of ABCG5 and ABCG8, it is thought that the increase of their mRNA expression in the liver was induced by the activation of LRH-1. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 108-112, 2006.

Key words：ATP-binding cassette transporter, Liver receptor homologue-1, rat, small heterodimer partner, soy protein

*〒981-8555　仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

小腸からのコレステロール吸収は，以前は単純拡散に依存すると考えられてきた．しかし，近年，吸収されたコレステロールを小腸上皮細胞から小腸内腔へ排出するATP-binding cassette transporter (ABC) G5およびABCG8が見いだされた[1]．ABCG5/ABCG8はヘテロダイマーを形成して機能すると考えられ，肝臓にも発現し，肝細胞から胆汁へのコレステロール排出にも関与することが指摘されている．また，2004年にはNiemann-Pick C1 like-1（NPC1L1）がコレステロールの小腸上皮細胞への吸収に関与する可能性が示された[1]．しかし，これら輸送たん白質の機能は充分に理解されている訳ではない．また，食品成分がこれら輸送たん白質の発現や機能に影響するかはほとんど明らかとなっていない．

大豆たん白質（SPI）は以前から血漿コレステロール濃度低下作用を有することが知られ，すでにその効果はヒトでも確認されている[2]．実験動物ではSPIを摂食すると糞便への胆汁酸およびコレステロール由来中性ステロイド排泄が増加する．この作用は，SPIが小腸内腔で胆汁酸と結合し胆汁酸の再吸収を阻害すること，および，胆汁酸ミセル形成を阻害することで，胆汁酸ミセルへのコレステロールの溶解を低下させ，コレステロール吸収を抑制することによると考えられる[2]．しかし，SPIが上記の輸送たん白質の機能に影響し，コレステロール低下作用を発揮する可能性については，これまでほとんど調べられていない．本研究では，ABCG5，ABCG8およびNPC1L1の発現に及ぼすSPIおよびその難消化性高分子画分（HMF）の影響を調べ，SPIの新たな機能性を探ることを目的とした．

方　　法

実験動物および飼料

実験は2回行い，いずれの場合も，3週齢の雄Wistarラット（九動（株），佐賀）18匹をペレットで5日間予備飼育した後，カゼイン（CAS）群，SPI群，およびHMF群の3群に分け，実験食を3週間自由摂食させた．食餌へのたん白質添加は，窒素含量が同じになるように，CAS群はカゼイン200 g/kg，SPI群はSPI 215.53 g/kg，HMF群はカゼイン105.5 g/kg＋HMF 105.5 g/kgとした．その他の成分は（g/kg），α-コーンスターチ，132；スクロース，100；セルロース，50；ラード，100；ビタミン混合（AIN-93），10；ミネラル混合（AIN-93G），35；L-シスチン，3；重酒石酸コリン，2.5；t-ブチルヒドロキノン，0.014であり，コーンスターチで，1,000 gに調整した．実験1では，屠殺3日前から2日間の糞を回収した．午前9時から断頭で屠殺し，血清，小腸，肝臓を採取した．十二指腸を含めた小腸は二等分し，前半を空腸，後半を回腸とした．実験2では，午前中にエーテル麻酔下で胆管カニュレーション手術を行い，胆管へのカニューレ挿入直後から1時間の胆汁を回収した．

脂質分析

血清コレステロール濃度は酵素法で，肝臓コレステロール濃度は化学法で測定した．

糞便は凍結乾燥後，内部標準物質として5α-コレスタンおよび23-ノルデオキシコール酸を添加し，中性および酸性ステロイドを熱エタノール抽出した．強アルカリでけん化，脱抱合したのち，中性ステロイドをジエチルエーテルで抽出した．残りの溶液は酸性として，酸性ステロイドをジエチルエーテルで抽出した．中性ステロイドはトリメチルシリル化，酸性ステロイドはメチル化，アセチル化後，ガスクロマトグラフィに供した．胆汁はFolch法で抽出後，けん化し不ケン化物を回収し，ステロールをトリメチルシリル化後，ガスクロマトグラフィに供した．内部標準物質は5α-コレスタンを用いた．

Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction（Real-time RT-PCR）

Total RNAからTaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) を用い，25℃，10 min，48℃，30 min，95℃，5 minの反応条件でcDNA templateを作成した．Real-time RT-PCR測定は，ABI Prism 7000 Sequence Detection System（Applied Biosystems）を用い，50℃，2 min，1cycle，90℃，10 min，1cycle，95℃，15sec，50℃，1 min，55 cycleの条件で増幅を行った．

遺伝子特異的増幅は，TaqMan®Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)，Assays-on-Demand™，Gene Expression Products (Rn00710172_ml：ABCA1，Rn00587092_ml：ABCG5，Rn00590367_ml：ABCG8，Rn01443503_ml：NPC1L1，Rn00581185_ml：LXR-alpha，Rn00564065_ml：CYP7a1，Rn00569117_ml：FAS，Rn00589173_ml：SHP1 (Nr0b2)，Rn01759149_ml：LRH1 (NR5A2)，Hs99999901_s1：18S rRNA，Applied Biosystems）およびTaqMan®MGB Gene Expression Kits（SREBP-1c：forward primer，5'-GCCCACAARGCCATTGAGA-3'；reverse primer，5'-GCAAGACAGCAGATTTATTCAGCTT-3'；TaqMan®MGB probe，5'-FAM-TATCAATGACAAGATTGTG-MGB-3'）を用いて検出した．

統計処理

データは多重比較を行い，FisherのPLSD法で群間の検定を行った．$P<0.05$で有意差ありとした．

結果と考察

成長および摂食量

実験1および2で，ラットの成長および摂食量に有意な差はなかった（データは示していない）．

血清および肝臓コレステロール濃度

血清コレステロール濃度はCAS群に比較し，SPI群では有意に低下し，HMF群でも低下傾向にあった（Fig. 1）．肝臓ではCAS群に比較し，SPIおよびHMF群で有意に低下した（Fig. 1）．本実験は，コレステロール無添加食であったため，HMFの強力なコレステロール低下作用は認められなかった．

糞便への中性および酸性ステロイド排泄

糞中のコレステロール由来中性ステロイド排泄量には3群間で差はなかった（Fig. 2）．酸性ステロイド排泄量はCAS群に比較し，SPI群では有意に高く，HMF群ではSPI群よりもさらに有意に高かった（Fig. 2）．コレステロール無添加-SPI摂食では，糞への中性および酸性ステロイド排泄はいずれも増加するという報告があるが[3]，今回は中性ステロイド排泄が増加しなかった．この理由は明らかではない．

小腸でのmRNA発現量

空腸および回腸のABCG5，ABCG8およびNPC1L1mRNAの発現には3群間で有意差はなかった（データは示していない）．本実験では，これら輸送たん白質の機能を調べた訳ではないが，発現量に変化がないことから，コレステロール吸収に大きく影響するとは考えられなかった．

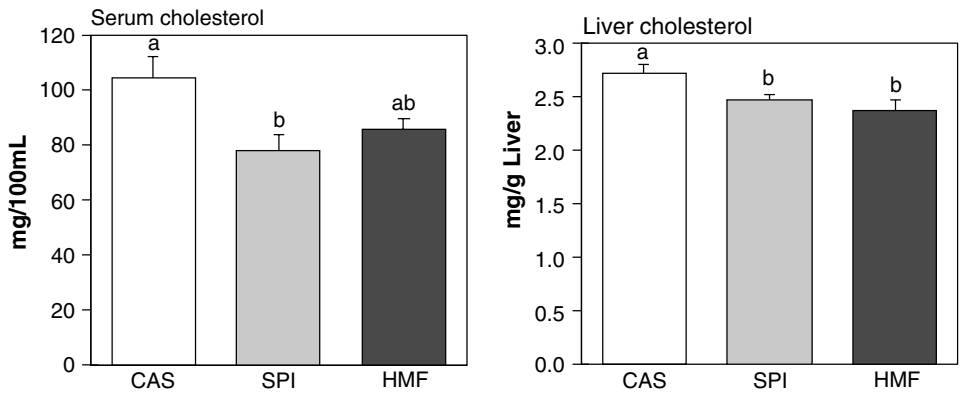

Fig. 1. Effect of dietary proteins on the concentration of cholesterol in serum and liver. Data are mean±SE of 6-7 rats. [ab]Different letters show significant difference at $P<0.05$.

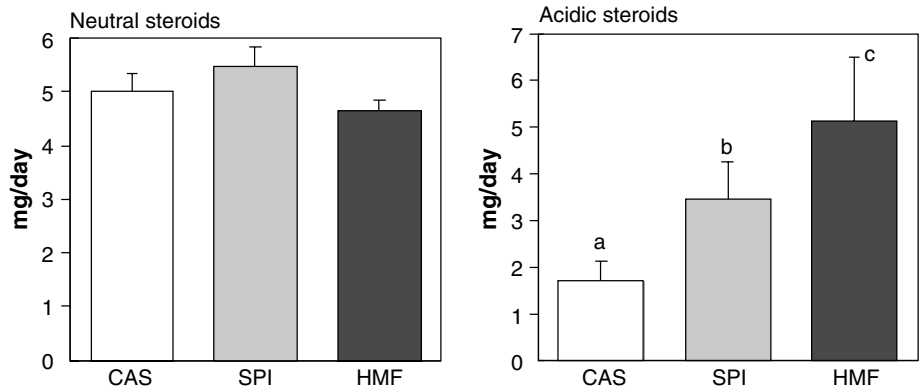

Fig. 2. Effect of dietary proteins on fecal excretion of neutral and acidic steroids. Data are mean±SE of 6-7 rats. [abc]Different letters show significant difference at $P<0.05$.

肝臓でのmRNA発現量

肝臓のABCG5/ABCG8mRNA発現量は，CAS群に比較し，SPIおよびHMF群で有意に高かったが，SPIとHMF群では差はなかった（Fig. 3）．ABCG5/ABCG8の発現はLiver X receptor (LXR) α により調節されている．そこで，LXRαにより同様に調節を受けるsterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c，fatty acid synthase (FAS) および胆汁酸生合成の律速酵素であるcholesterol 7α-hydroxylase (CYP7A1) のmRNA発現量を測定した．FASmRNAはCAS群に比較し，SPIおよびHMF群で有意に低かった（Fig. 4）．また，SREBP-1cmRNAはSPIおよびHMF群で低い傾向にあった．一方，CYP7A1mRNA発現量は，SPI群では高い傾向にあり，HMF群で有意に高かった．LXRαに酸化コレステロールなどのリガンドが結合すると，その下流にある上記たん白質のmRNA発現が増加することが知られている．しかし本実験では，LXRαにより調節を受けるたん白質のmRNA発現には一貫性がなかった．従って，LXRαが刺激され，肝臓のABCG5/ABCG8の発現が増加したとは考えられなかった．

最近，liver receptor homologue (LRH)-1がABCG5/ABCG8のプロモーター領域に結合し，mRNA発現を活性化することが報告された[4]．LRH-1は，LXRαと共にCYP7A1の発現を調節している[5]．CYP7A1のプロモーターへのLRH-1の結合は，CYP7A1mRNAの発現を増加させる．しかし，farnesoid X receptor (FXR) により発現が調節されているsmall heterodimer partner (SHP) がLRH-1に結合するとCYP7A1遺伝子のプロモーターへの結合が阻害されるため，結果的にCYP7A1の発現が抑制される．胆汁酸はFXRのリガンドとなり，SHPmRNAの発現を増加させる．本実験では，胆汁酸の糞への排泄が増加し，腸肝循環で肝臓へもどる胆汁酸量が減少していると考えられるため，FXRに結合する胆汁酸が減少し，SHPの発現が低下している可能性が考えられる．そこで，SHPおよびLRH-1mRNAの発現を測定した（Fig. 4）．SHP-1mRNAはCAS群に比較し，SPIおよびHMF群で有意に低かった（Fig. 4）．一方，LRH-1mRNA発現量には，3群間で差はなかった(データは示していない)．

これらの結果から，以下のことが考えられる．SPIやHMFの摂食により糞への胆汁酸排泄が増加すると，肝臓でFXRが活性化されないためSHPの発現が低下する．そのため，CYP7A1遺伝子のプロモーターへ結合するLRH-1が増え，CYP7A1mRNAの発現が増加する．LRH-1はさらにABCG5/ABCG8のプロモーターへも結合し，それらのmRNA発現を増加させる．このように

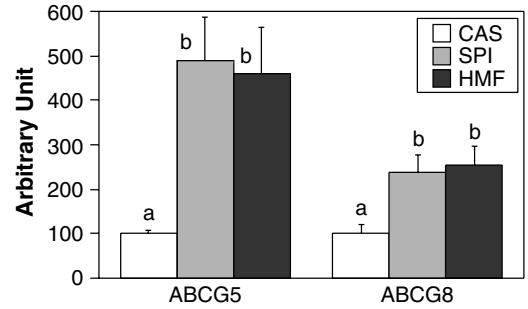

Fig. 3. Effect of dietary proteins on mRNA expression of ABCG5 and ABCG8 in liver. Data are mean±SE of 6-7 rats. [ab]Different letters show significant difference at $P<0.05$.

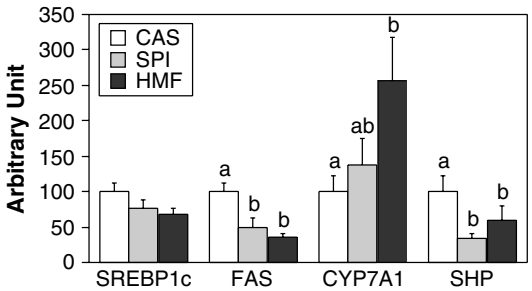

Fig. 4. Effect of dietary proteins on mRNA expression of SREBP1c, FAS, CYP7A1 and SHP in liver. Data are mean±SE of 6-7 rats. [ab]Different letters show significant difference at $P<0.05$. SREBP1c, sterol regulatory element binding protein 1c; FAS, fatty acid synthase; CYP7A1, cholesterol 7α -hydroxylase; SHP, small heterodimer partner.

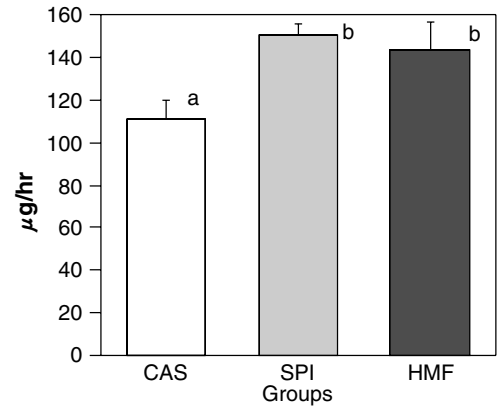

Fig. 5. Effect of dietary proteins on biliary excretion of cholesterol. Data are mean±SE of 6-7 rats. [ab]Different letters show significant difference at $P<0.05$. After bile duct cannulation, bile was collected for 1 hr.

考えれば，肝臓でのみABCG5/ABCG8mRNAの発現が増加し，小腸で変化しなかった現象もうまく説明できる．

胆汁へのコレステロールの排泄

実験１で，肝臓のABCG5/ABCG8mRNAの発現が増加したことから，実験２では，実験１と全く同条件でラットを飼育し，胆汁へのコレステロール排泄量を測定した．その結果，CAS群に比べ，SPIおよびHMF群ではコレステロール排泄量が有意に高かった（Fig. 5）．ラットでのSPI摂食による胆汁へのコレステロール排泄の増加は，Tanakaらによっても報告されている[6]．このコレステロール排泄の増加は，肝臓でのABCG5およびABCG8の発現増加に起因する可能性が高い．

以上述べてきたように，SPIおよびHMFはCAS摂取に比べ，肝臓のABCG5/ABCG8mRNA発現を増加させた．しかし，この現象は，SPIやHMFが胆汁酸排泄を増加させた結果に付随して起こった可能性が高い．胆汁へのコレステロール排泄の増加は，血漿コレステロール濃度低下の一要因となりうることから，この胆汁コレステロール排泄増加作用は，SPIやHMFの血漿コレステロール濃度低下作用の一因と考えられる．

要　　約

SPIおよびHMFの摂食ではCASに比較し，小腸のABCG5/ABCG8およびNPC1L1mRNAの発現には変化がなかったが，肝臓のABCG5/ABCG8mRNA発現は有意に高かった．胆汁へのコレステロール排泄はSPIおよびHMF群で高く，ABCG5/ABCG8発現の増加が関与すると考えられた．SPIやHMF摂食で糞への酸性ステロイド排泄量が増加し，肝臓のCYP7A1mRNAの発現が増加傾向にあったことから，胆汁酸排泄増加に伴うFXRを介した胆汁酸生合成系の活性化が示唆された．この経路でLRH-1の活性化が起こり，LRH-1により誘導されるABCG5/ABCG8の発現が高まったと考えられた．しかし，大豆たん白質が直接的に輸送たん白質発現に関与する証拠は得られなかった．

文　　献

1) Hui DY and Howles PN (2005): Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol*, **16**, 183-192.
2) Potter SM (1995): Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr*, **125**, 606S-611S.
3) Nagata Y, Tanaka K and Sugano M (1981): Further studies on the hypocholesterolemic effect of soybean protein in rats. *Br J Nutr*, **45**, 233-241.
4) Freeman LA, Kennedy A, Wu J, Bark S, Remaley AT, Santamarina-Fojo S. and Brewer Jr HB (2004): The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter. *J Lipid Res*, **45**, 1197-1206.
5) Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM and Kliewer SA (2000): A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*, **6**, 517-526.
6) Tanaka K, Aso B and Sugano M (1984): Biliary steroid excretion in rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixtures. *J Nutr*, **114**, 26-32.