

原 著

ABC タンパク質によるコレステロール輸送を活性化させる 発酵関連成分の探索

佐藤 まりん¹, 藤田 真衣², 松尾 道憲^{1,2*}

要 約

目的：ATP-binding cassette (ABC) トランスポータータンパク質の ABCA1, ABCG1, ABCG4 と ABCG5/ABCG8 は体内のコレステロール輸送に働く。これらを活性化できれば、コレステロール排出を促進し動脈硬化予防を期待できる。麹、酵母、酒類の成分が総コレステロール値上昇を抑制する報告、適量の飲酒は高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールを増加させる報告があることから、麹、酵母、酒類を用いて抽出物を作製し、ABC タンパク質を活性化させる成分を探索することを目的とした。

方法：ABC タンパク質を遺伝子導入した BHK 細胞と ABCA1 と ABCG1 を内在的に発現するマクロファージに分化させた THP-1 細胞に、麹、酵母、酒類から抽出して作製したサンプルを添加し、コレステロール排出量を蛍光法と比色法で測定した。活性が上がったものはウェスタンブロッティングでタンパク発現量を定量した。

結果：THP-1 細胞に生麹の熱水抽出物を添加した時、BHK/ABCA1 細胞に生黒麹のエタノール抽出物又は生麹のエタノール抽出物を添加した時にコレステロール排出量が有意に増加した。しかし、ABC タンパク発現量は有意に増加しなかった。

考察：ABC タンパク質量の増加は見られなかったことから、タンパク発現量の増加ではなく、輸送能が上がりコレステロール排出に繋がったと考えられる。

キーワード：コレステロール、動脈硬化、脂質異常症、ABC トランスポータータンパク質

(受付日：2024 年 10 月 16 日 採択日：2025 年 1 月 21 日)

I. 緒論

体内のコレステロールは生合成と食事の取り込みによって供給されている¹⁾。しかし食事からの取り込みが過剰に増加すると、生合成の抑制機構が正常に働かなくなり、コレステロールの過剰蓄積、動脈硬化が進行し、狭心症や心筋梗塞といった冠動脈疾患を患うリスクが高まる²⁾。

ATP-Binding Cassette (ABC) タンパク質の ABCA および ABCG サブファミリーはコレステロールレベルの調節に関わる³⁾。ABCA1 は末梢細胞からの脂質の除去や HDL 形成

に関与し細胞膜から細胞外へコレステロールを排出する。ABCA1 の変異で発症するタンジール病は、血清 HDL コレステロールと apoA-1 が著しく低下し、細胞内のコレステロール排出が障害され、動脈硬化を引き起こす^{4,5)}。ABCG1 は多くの組織に発現しているが、特にマクロファージから過剰のコレステロールを排出し、細胞外へ除去する⁶⁾。ABCG4 は細胞外へのコレステロール排出と、巨核球前駆細胞に多く発現することから血小板量の調節に関与する⁷⁾。ABCG4 の活性が上がると巨核球前駆細胞の増殖が抑制され、結果的に血小板が減少する。動脈硬化は血小板の増加でも悪化するため、ABCG4 の活性を上げることは動脈硬化予防に効果的である⁸⁾。ABCG5/ABCG8 は小腸と肝臓に発現し、ヘテロ二量体で機能する。植物ステロールは小腸で吸収された後に、ABCG5/ABCG8 を介して腸管内に排泄される。ABCG5 または ABCG8 の変異により発症するシトステロール血症は、植物ステロールの排出抑制が起き、蓄積

¹ 京都女子大学大学院 家政学研究科 食物栄養学専攻

² 京都女子大学 家政学部 食物栄養学科

* 連絡先 京都市東山区今熊野北日吉町 35

京都女子大学家政学部食物栄養学科栄養学第 2 研究室

松尾道憲

E-mail : matsuomi@kyoto-wu.ac.jp

することで、血清中に通常ほとんど存在しない植物ステロールが上昇し動脈硬化症を引き起こす⁹⁾。

これらの ABC タンパク質を活性化することができれば、動脈硬化症の予防・治療に応用できると考え、ABC タンパク質を活性化する発酵関連成分を探索することを目的とした。発酵関連成分の機能性は多くの先行研究があり、麴の機能性について、麴の酵素分解物であるピログルタミルペプチドは抗炎症作用を有する報告¹⁰⁾がある。さらに酒類の機能性は、適量のアルコール摂取で HDL コレステロールが増加すると言われており¹¹⁾、メカニズムとして ABCA1 依存的にマクロファージからのコレステロール排出を増加させるという報告や¹²⁾、HDL コレステロールの増加に関与するパラオキシナーゼの活性が、水よりアルコール摂取で上がる報告がある¹³⁾。加えて、赤ワイン中のレスベラトロールの LDL 抗酸化作用¹⁴⁾、酵母の細胞壁グリカンのコレステロール上昇抑制効果¹⁵⁾、酵母培養物の血清コレステロール低下作用¹⁶⁾、酒粕によるラットの血清コレステロール上昇抑制効果¹⁷⁾と、酒類のアルコール以外の成分でも機能性が報告されている。ABC タンパク質と発酵関連成分の先行研究は、麴グルコシルセラミドを肥満マウスに摂取させると ABCG8 の mRNA 量が増加し、肝臓のコレステロールが減少する報告¹⁸⁾があるものの、麴、酵母、酒類の種類の違いで検討した研究はないため、米麴、黒麴、塩麴、甘酒、黒麴から作った甘酒の黒甘酒、酒造に関連する酵母、赤ワイン、白ワイン、スパークリングワイン、にごり酒から 98 種類の抽出物を作成し、ABC タンパク質を活性化させる成分のスクリーニングと、活性化させるメカニズムの検討を行った。

II. 方法

1. サンプル調製

A) 酵母培養

酵母は酒造酵母を中心に独立行政法人酒類総合研究所から 4 種類分譲していただいた。日本酒の協会酵母 No.7 の *S.cerevisiae* (RIB NO.1003)、ビール酵母の *S.pastorianus* (RIB NO.2010)、シェリー酒由来の産膜酵母の *S.bayanus* (RIB NO.3004)、ワインもろみ由来の *S.pombe* (RIB NO.5312) を用いた (表 1)。30℃、24 時間振とうしながら 1 種類につき YE 培地 20 ml 中で培養し、翌日回収した。

B) 酵母抽出

培養した酵母を 2,130 xg (3,000 rpm, himac CF5RE, ローター T3 S6)、5 分間遠心分離した後、菌体を phosphate-buffered saline (PBS) 7 ml で懸濁した。ダウンス型ホモジナイザーで 20 回程度破碎し、ガラス試験管にメタノールクロロホルム抽出用、クロロホルム抽出用、エタノール抽出用、またはアセトン抽出用にそれぞれ 1 ml ずつ分注し、エッペンチューブ 2 本に 1 ml ずつ分注した。エッペンチューブ 2 本のうち 1 本を室温、13,700 xg (12,000 rpm, himac CF15RN, ローター T15 A39)、10 分間遠心分離し、上清を A とした。遠心後の菌体残渣画分を Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 100 µl で懸濁し、E とした。残りの 1 本を 98℃、1 時間インキュベートし、室温、13,700 xg (12,000 rpm, himac CF15RN, ローター T15 A39)、10 分間遠心分離し上清を A2、菌体残渣画分を DMSO 100 µl で懸濁し、E2 とした。メタノールクロロホルム抽出用のガラス試験管にメタノール：クロロホルム = 1:2 を 3.75 ml 加え、懸濁した。さらにクロロホルム 1.25 ml 加えて懸濁し、ミリ Q 水 1.25 ml を加え懸濁した。その他の抽出用のガラス試験管には、クロロホルム、エタノール、またはアセトンをそれぞれ 1.4 ml 加え懸濁した。950 xg (2,000 rpm, himac CF5RE, ローター T3 S6)、10 分間遠心分離し、有機溶媒層をそれぞれ別のガラス試験管に移した。40℃、窒素ガスを吹きつけ有機溶媒を飛ばし、ガラス試験管に DMSO 100 µl を加え、抽出物を溶解した。

C) 酒類抽出

酒類は、赤ワイン (サンジョヴェーゼ / グランヴィラ / イタリア)、五一わいん (五一わいん / 株式会社林農園 / 日本)、白ワイン (パロネスク ブラン / グラン・キュヴェ / フランス)、スパークリングワイン (ロゼドライワイン / リガーリス / イタリア)、純米にごり酒 (夢見るひつじ 純米にごり酒 / 大関株式会社 / 日本) を用いてサンプル作製した。それぞれ 2 g をガラス試験管にとり、エタノール、クロロホルム、またはアセトンを 5 ml ずつ加えた。ボルテックスミキサーで懸濁を 15 分毎に行い、室温で 60 分間静置した。2,130 xg (3,000 rpm, himac CF5RE, ローター T3 S6) で 10 分間遠心分離し、上清を新しいガラス試験管にとった。窒素ガスを吹き付けながら 40℃で乾かし、DMSO 1 ml 加えた後、懸濁した。(抽出前の重量換算で 2 g/ml 抽出液)

表 1 使用した酵母と特徴

RIB No.	Species	Strain	Note
1003	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sake yeast Kyokai No.7	
2010	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Beer yeast	N.Nishikawa
3004	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Pseudo-film yeast Flor Sherry	Red Star ADWY, UCD #519
5312	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Wild-1	ワインもろみ

D) 塩麴, 甘酒, 黒甘酒調製

塩麴は、滅菌したガラスボトルに生麴 50 g, NaCl 15 g, 水 54 ml を入れよくかき混ぜた。常温に置き, 7 日間毎日かき混ぜた。塩角が取れ, 麴が柔らかくなったため冷蔵庫で保存した。甘酒 (黒甘酒) は, 60℃のお湯を準備し, 米麴 (黒麴) 100 g と 150 ml のお湯をよくかき混ぜた。鍋で弱火で温め 65℃にした。魔法瓶にお湯を入れて温めておき, お湯を捨てた後に先ほどの米麴 (黒麴) 100 g とお湯を入れ, 約 8 時間放置した。生麴は糀 qotoriya, 黒麴はみやもと糀店より購入した。

E) 麴抽出

塩麴, 甘酒, 黒甘酒, すり鉢ですりつぶした生麴, 生黒麴を 2 g ずつガラス試験管に量りとり, 水, 熱水, エタノール, クロロホルム, またはアセトン 5 ml ずつ量りとった。ボルテックスミキサーで懸濁を 15 分毎に行い, 熱水抽出は 98℃で, それ以外は室温で 60 分間静置した。2,130 xg (3,000 rpm, himac CF5RE, ローター T3 S6) で 10 分間遠心分離し, 上清を新しいガラス試験管にとった。窒素ガスを吹き付けながら 40℃で乾かし, DMSO 1 ml 加えた後, 懸濁した。DMSO で溶けきらなかった場合, DMSO 回収後のガラス試験管に PBS 1 ml を加え懸濁した。(抽出前の重量換算で 2 g/ml 抽出液) 作成したサンプルを (表 2) に示す。

2. 材料

マウス抗 ABCA1 抗体は以前記載された方法に従って調製した¹⁹⁻²¹⁾。ラビット抗 ABCG1 抗体は Santa Cruz Biotechnology (米国, カリフォルニア州, サンタクルーズ) で購入した。その他の化学物質は, SigmaAldrich, GE Healthcare (英国, リトルチャルフォント), Cayman Chemical (米国, ミシガン州, アナーバー), Thermo Fisher Scientific (米国, マサチューセッツ州, ウォルサム), 和光純薬工業 (日本, 大阪), およびナカライテスク (日本, 京都) から購入した。

3. 細胞培養

THP-1 細胞は, 37℃, 5% CO₂ の加湿インキュベーター内で, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) を含む RPMI-1640 medium 培地で浮遊培養した。

BHK/ABCA1, BHK/ABCG1, BHK/ABCG4, BHK/ABCG5+ABCG8 細胞²²⁾ は 37℃, 5% CO₂ の加湿インキュベーター内で, 10% FBS (v/v) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) で培養した。

4. プラスミドとトランスフェクション

ABCA1 又は ABCG1 を発現する BHK 細胞は故 John Oram 博士から供与いただいた²³⁾。ABCG4 は ABCG4 の発現ベクター (pGENE V5-His A/hABCG4)¹⁹⁾ を BHK 細胞に導入した。1 mg/ml zeocin を含む培地で細胞を培養することにより ABCG4 を発現する安定な細胞株 (BHK/ABCG4) を選抜した。ABCG5 と ABCG8 を発現する細胞株 (BHK/ABCG5+ABCG8) は過去の報告の通り作製された²²⁾。

5. THP-1 細胞を用いたコレステロール排出 assay (サンプル 4 時間添加)

THP-1 細胞を 2.0×10^6 cells/ml で調製し, phorbol 12-myristate 13-acetate を 0.2 µg/ml 添加し 96 well ディッシュもしくは 6 well ディッシュに播種した。3 日間静置し, 分化誘導した。

サンプル 4 時間添加は, 転写制御の影響をほとんど受けず, 翻訳後制御 (リン酸化, シグナル伝達, プロテアーゼへの影響等) による ABC トランポータータンパク質の分解抑制の影響を検討できる。ABCA1 と ABCG1 を発現誘導するために, RPMI-1640 medium + 5 µM T0901317 + 5 µM 9-cis retinoic acid を添加し, 16 ~ 20 時間静置した。DMEM + 0.02% bovine serum albumin (BSA) + 6 mM sodium taurocholate にサンプルを希釈して, 培地交換後 4 時間静置し, 蛍光法, 比色法でコレステロール排出量を測定した。

6. THP-1 細胞を用いたコレステロール排出 assay (サンプル 24 時間添加)

THP-1 細胞を 2.0×10^6 cells/ml で調製し, phorbol 12-myristate 13-acetate を 0.2 µg/ml 添加し 96 well ディッシュもしくは 6 well ディッシュに播種した。3 日間静置し, 分化誘導した。

サンプル 24 時間添加は, サンプルが ABCA1, ABCG1 を転写発現誘導するのか検討するために, RPMI-1640 medium + 0.02% BSA に 5 µM T0901317 + 5 µM 9-cis retinoic acid ではなく, サンプルを希釈して, 培地交換し 24 時間静置した。その後, DMEM + 0.02% BSA + 6 mM sodium taurocholate に培地交換し 37℃, 4 時間静置後, 蛍光法, 比色法でコレステロール排出量を測定した。

7. BHK 細胞を用いたコレステロール排出 assay (サンプル 4 時間添加)

BHK 細胞は DMEM + 10% FBS で 1.0×10^6 cells/ml で 96 well ディッシュもしくは 6 well ディッシュに播種し, 遺伝子導入された ABC タンパク質を発現誘導するために, DMEM + 0.02% BSA + 10 nM mifepristone に培地交換した。16 ~ 20 時間静置後, DMEM + 0.02% BSA + 6 mM sodium taurocholate にサンプルを希釈して培地交換し, 37℃, 4 時

表2 作製したサンプル一覧

抽出したサンプルを DMSO で懸濁したものを (DMSO)、PBS で懸濁したものを (PBS) と表す。

【<i>S.cerevisiae</i> 抽出物】	【<i>S.bayanus</i> 抽出物】	【赤ワイン抽出物】	【黒甘酒抽出物】
<i>S.cerevisiae</i> / 培地上清	<i>S.bayanus</i> / 培地上清	赤ワイン / エタノール抽出物 (DMSO)	黒甘酒 / 水抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / A (PBS)	<i>S.bayanus</i> / A (PBS)	赤ワイン / クロロホルム抽出物 (DMSO)	黒甘酒 / 熱水抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / A2 (PBS)	<i>S.bayanus</i> / A2 (PBS)	赤ワイン / アセトン抽出物 (DMSO)	黒甘酒 / エタノール抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / E (DMSO)	<i>S.bayanus</i> / E (DMSO)		黒甘酒 / クロロホルム抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / E2 (DMSO)	<i>S.bayanus</i> / E2 (DMSO)	【五一わいん抽出物】	黒甘酒 / アセトン抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / エタノール抽出物 (DMSO)	<i>S.bayanus</i> / エタノール抽出物 (DMSO)	五一わいん / エタノール抽出物 (DMSO)	黒甘酒 / アセトン抽出物 (PBS)
<i>S.cerevisiae</i> / クロロホルム抽出物 (DMSO)	<i>S.bayanus</i> / クロロホルム抽出物 (DMSO)	五一わいん / クロロホルム抽出物 (DMSO)	
<i>S.cerevisiae</i> / アセトン抽出物 (DMSO)	<i>S.bayanus</i> / アセトン抽出物 (DMSO)	五一わいん / アセトン抽出物 (DMSO)	【塩麴抽出物】
<i>S.cerevisiae</i> / メタノールクロロホルム抽出物 (DMSO)	<i>S.bayanus</i> / メタノールクロロホルム抽出物 (DMSO)		塩麴 / 水抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / エタノール抽出物 (PBS)	<i>S.bayanus</i> / エタノール抽出物 (PBS)	【白ワイン抽出物】	塩麴 / 熱水抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / クロロホルム抽出物 (PBS)	<i>S.bayanus</i> / クロロホルム抽出物 (PBS)	白ワイン / エタノール抽出物 (DMSO)	塩麴 / エタノール抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / アセトン抽出物 (PBS)	<i>S.bayanus</i> / アセトン抽出物 (PBS)	白ワイン / クロロホルム抽出物 (DMSO)	塩麴 / クロロホルム抽出物 (DMSO)
<i>S.cerevisiae</i> / メタノールクロロホルム抽出物 (PBS)	<i>S.bayanus</i> / メタノールクロロホルム抽出物 (PBS)	白ワイン / アセトン抽出物 (DMSO)	塩麴 / アセトン抽出物 (DMSO)
			塩麴 / 水抽出物 (PBS)
【<i>S.pastrianus</i> 抽出物】	【<i>S.pombe</i> 抽出物】	【スパークリングワイン抽出物】	塩麴 / 熱水抽出物 (PBS)
<i>S.pastrianus</i> / 培地上清	<i>S.pombe</i> / 培地上清	スパークリングワイン / エタノール抽出物 (DMSO)	塩麴 / エタノール抽出物 (PBS)
<i>S.pastrianus</i> / A (PBS)	<i>S.pombe</i> / A (PBS)	スパークリングワイン / クロロホルム抽出物 (DMSO)	
<i>S.pastrianus</i> / A2 (PBS)	<i>S.pombe</i> / A2 (PBS)	スパークリングワイン / アセトン抽出物 (DMSO)	【生麴抽出物】
<i>S.pastrianus</i> / E (DMSO)	<i>S.pombe</i> / E (DMSO)		生麴 / 水抽出物 (DMSO)
<i>S.pastrianus</i> / E2 (DMSO)	<i>S.pombe</i> / E2 (DMSO)	【にごり酒抽出物】	生麴 / 熱水抽出物 (DMSO)
<i>S.pastrianus</i> / エタノール抽出物 (DMSO)	<i>S.pombe</i> / エタノール抽出物 (DMSO)	にごり酒 / エタノール抽出物 (DMSO)	生麴 / エタノール抽出物 (DMSO)
<i>S.pastrianus</i> / クロロホルム抽出物 (DMSO)	<i>S.pombe</i> / クロロホルム抽出物 (DMSO)	にごり酒 / クロロホルム抽出物 (DMSO)	生麴 / クロロホルム抽出物 (DMSO)
<i>S.pastrianus</i> / アセトン抽出物 (DMSO)	<i>S.pombe</i> / アセトン抽出物 (DMSO)	にごり酒 / アセトン抽出物 (DMSO)	生麴 / アセトン抽出物 (DMSO)
<i>S.pastrianus</i> / メタノールクロロホルム抽出物 (DMSO)	<i>S.pombe</i> / メタノールクロロホルム抽出物 (DMSO)		生麴 / 熱水抽出物 (PBS)
<i>S.pastrianus</i> / エタノール抽出物 (PBS)	<i>S.pombe</i> / エタノール抽出物 (PBS)	【甘酒抽出物】	
<i>S.pastrianus</i> / クロロホルム抽出物 (PBS)	<i>S.pombe</i> / クロロホルム抽出物 (PBS)	甘酒 / 水抽出物 (DMSO)	【生黒麴抽出物】
<i>S.pastrianus</i> / アセトン抽出物 (PBS)	<i>S.pombe</i> / アセトン抽出物 (PBS)	甘酒 / 熱水抽出物 (DMSO)	生黒麴 / 水抽出物 (DMSO)
<i>S.pastrianus</i> / メタノールクロロホルム抽出物 (PBS)	<i>S.pombe</i> / メタノールクロロホルム抽出物 (PBS)	甘酒 / エタノール抽出物 (DMSO)	生黒麴 / エタノール抽出物 (DMSO)
		甘酒 / クロロホルム抽出物 (DMSO)	生黒麴 / クロロホルム抽出物 (DMSO)
		甘酒 / アセトン抽出物 (DMSO)	生黒麴 / アセトン抽出物 (DMSO)
		甘酒 / 水抽出物 (PBS)	
		甘酒 / 熱水抽出物 (PBS)	

間静置後、培地を回収し、蛍光法、比色法でコレステロール排出量を測定した。

8. コレステロール排出 assay (蛍光法)

1 U/ml cholesterol oxidase/PBS, 2 U/ml horseradish peroxidase, 0.5 mM 10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazine を含む 0.1% Triton X-100 + 5 mM sodium cholate/PBS 50 μ l を回収後の培地 50 μ l に添加し、37°C, 30 分インキュベート後、励起波長 560 nm, 蛍光波長 610 nm で測定した²⁴⁾。

9. コレステロール排出 assay (比色法)

培地の 4 倍量のメタノール:クロロホルム=1:2 をガラス試験管に入れ、ボルテックスミキサーで 1 分間懸濁し、4°C で一晩静置した。下層を別の試験管にとり、ミリ Q 水を 1 ml 入れ懸濁し 2,130 xg (3,000 rpm, himac CF5RE, ローター T3 S6), 10 分間、室温で遠心分離した。上層を取り除き、窒素を吹きかけ乾燥させた。メタノール:クロロホルム=1:2 を 300 μ l を 3 回に分けてボルテックスミキサーで懸濁後添加し、polypropylene 96 well plate に移し替えた。乾燥機で乾かし、イソプロパノールを 20 μ l 添加後 5 分間室温で静置した。遊離コレステロール E-テストワコーを 150 μ l 添加し室温で 5 分間、37°C で 5 分間静置した後、コレステロール排出量を測定波長 562 nm で測定した。

10. BCA Protein Assay

培地を取り除いたあとの細胞を PBS で 2 回洗浄した後、100 μ g/ml (*p*-Amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride hydrochloride, 10 μ g/ml Leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin を 1% (v/v) triton X-100/PBS に溶解し 50 μ l を細胞に添加後、細胞抽出液をセルスクレーパーで剥離した。氷上で 30 分間静置し、20,100 xg (14,500 rpm, himac CF15RN, ローター T15 A39), 15 分間、4°C で遠心分離し、上清を新しいエッペンチューブに移し、BCA protein assay キットを用いてタンパク質量を測定した。

コレステロール排出量をタンパク質量で除し、溶媒コントロールである DMSO, もしくは PBS 添加時のコレステロール排出を 1 としてコレステロール排出比活性を求めた。

11. ウェスタンブロッティング

細胞抽出液をタンパク質 20 μ g になるように調製し、10% SDS-PAGE ゲルで分離し、PVDF メンブレンに転写した。Blocking One でブロッキング後、一次抗体はマウス抗 ABCA1 抗体 (1:5000 希釈) 又はラビット抗 ABCG1 抗体 (1:1000 希釈) を使用し、二次抗体は抗マウス IgG-HRP 抗体 (1:5000 希釈) 又は抗ラビット IgG-HRP (1:5000 希釈)

を使用した。Immuno Star[®] Zeta もしくは Immuno Star[®] LD で化学発光させ、WSE-6100 Lumino Graph I (ATTO 株式会社) で撮影し、CS Analyzer4 (ATTO 株式会社) で定量した。ABCA1, ABCG1 の測定値をローディングコントロールのアクチンの測定値で除し補正をした。

12. 統計分析

データは平均 $\pm$ 標準偏差で示した。統計比較は、IBM SPSS ver28.0.1.0 を用い dunnett 法もしくは Student's t-test で検定した。*P* 値が 0.05 未満を有意とした。

Ⅲ. 結果

発酵関連成分より ABC タンパク質の活性を上げる成分を探索するため、酵母、酒類、麴由来の 98 種の抽出サンプル (表 2) を、THP-1 細胞 (サンプル 24 時間添加), THP-1 細胞 (サンプル 4 時間添加), BHK/ABCA1, BHK/ABCG1, BHK/ABCG4, BHK/ABCG5 + ABCG8 細胞に添加し、588 通りの組み合わせについて培地中のコレステロール量を測定した。コントロールである溶媒の DMSO もしくは PBS 添加時の培地中のコレステロール量と比較して 1.5 倍以上の活性があることを条件にサンプルを選別した。1 次スクリーニングは、抽出前の重量換算で 2 g/ml のサンプル抽出液を 100 倍希釈で 20 mg/ml になるように培地に添加し、蛍光法を用いてコレステロール排出量の測定をした。1 次スクリーニングでコントロールと比較して 1.5 倍以上の活性があるサンプルを 2 次スクリーニングした。2 次スクリーニングはサンプル希釈濃度を変え、蛍光法でコレステロール排出量の測定を行った。2 次スクリーニングでコントロールと比較して 1.5 倍以上の活性が見られたサンプルを 3 次スクリーニングした。3 次スクリーニングでは、蛍光法、比色法でコレステロール排出量を測定し、BCA Protein assay で測定したタンパク質濃度で除してコレステロール排出量の補正を行った。

1. 酵母、酒類のコレステロール排出 assay

蛍光法での 1 次スクリーニングで、THP-1 細胞に *S.pombe*/ 培地上清, *S.pastrianus*/A2 (PBS) を 24 時間添加した時と、BHK/ABCA1 細胞に *S.bayanus*/ エタノール抽出物 (DMSO) を添加した時、BHK/ABCG5 + ABCG8 細胞に *S.pombe*/ 培地上清を添加した時に、コレステロール排出量がコントロールと比較して 1.5 倍以上上がったが、2 次スクリーニングで再現性は見られなかった (data not shown)。酒類については、いずれも活性は見られなかった (data not shown)。

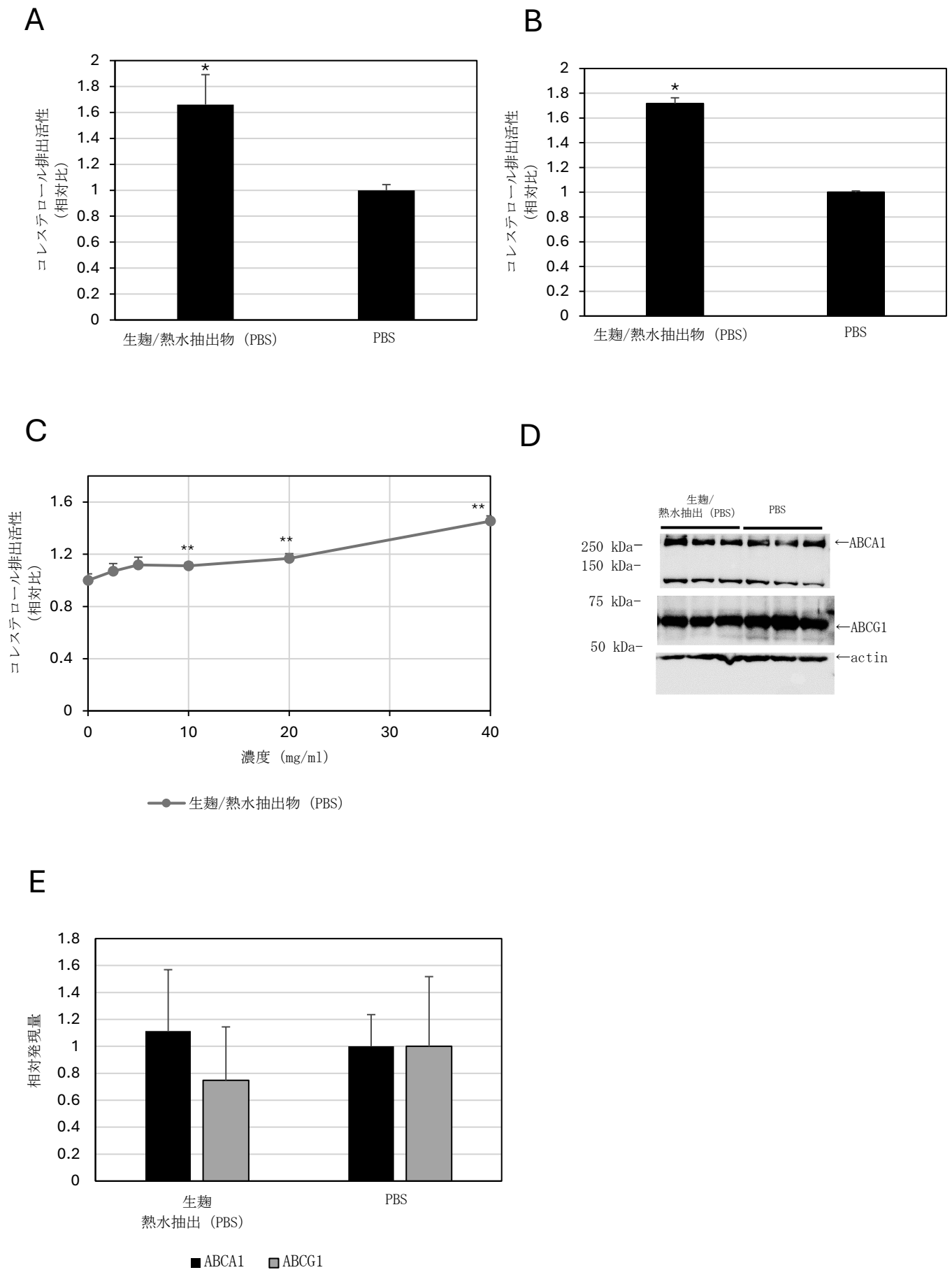


図1 THP-1細胞に生麴/熱水抽出物 (PBS) を添加した時のコレステロール排出活性と ABCA1, ABCG1 発現量

(A) 蛍光法によるコレステロール排出 assay 結果

THP-1 細胞を 2.0×10^6 cells/ml となるように播種し、生麴 / 熱水抽出物 (PBS) を終濃度 20 mg/ml (抽出前の重量換算) で添加し、4 時間後に蛍光法で測定した。その結果得られたコレステロール排出量を BCA protein assay で算出したタンパク質量で除し、溶媒である PBS のコレステロール排出を 1 とした相対値を評価した。6 連のデータの平均値 $\pm$ SD を示す。* $P < 0.05$

(B) 比色法によるコレステロール排出 assay 結果

THP-1 細胞を 2.0×10^6 cells/ml となるように播種し、生麴 / 熱水抽出物 (PBS) を終濃度 20 mg/ml (抽出前の重量換算) で添加し、4 時間後に比色法で測定した。その結果得られたコレステロール排出量を BCA protein assay で算出したタンパク質量で除し、溶媒である PBS のコレステロール排出を 1 とした相対値を評価した。3 連のデータの平均値 $\pm$ SD を示す。* $P < 0.05$

(C) 蛍光法による濃度依存性の検討

THP-1 細胞を 2.0×10^6 cells/ml となるように播種し、生麴 / 熱水抽出物 (PBS) を終濃度 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 0 mg/ml (抽出前の重量換算) で添加し、4 時間後に蛍光法で測定した。溶媒である PBS のコレステロール排出を 1 とした相対値を評価した。3 連のデータの平均値 $\pm$ SD を示す。** $P < 0.01$

(D) ウェスタンブロッティング結果

コレステロール排出量測定後の細胞抽出液を SDS-PAGE した。サンプルは 3 連ずつ流した。一次抗体はマウス抗 ABCA1 抗体又はラビット抗 ABCG1 抗体、二次抗体は抗マウス IgG-HRP 抗体又は抗ラビット IgG-HRP 抗体を使用した。Immuno Star® Zeta もしくは Immuno Star® LD で化学発光させ、WSE-6100 Lumino Graph I (ATTO 株式会社) で撮影した。

(E) ABCA1, ABCG1 相対発現量

メンブレン上のバンドの濃さを CS Analyzer4 (ATTO 株式会社) で定量し、ABCA1, ABCG1 の測定値をローディングコントロールのアクチンの測定値で除し、タンパク量の補正をした。溶媒である PBS のタンパク発現量を 1 とした相対値を評価した。3 連のデータの平均値 $\pm$ SD を示す。

2. 麴のコレステロール排出 assay

3 次スクリーニングで、THP-1 細胞に生麴 / 熱水抽出物 (PBS) を抽出前の麴重量換算 20 mg/ml で、4 時間添加した時、コントロールと比較して、蛍光法で 1.7 倍 (図 1.A), 比色法で 1.7 倍のコレステロール排出量の有意な増加が見られた (図 1.B)。サンプル濃度を変えてコレステロール排出を測定したところ、濃度依存性が見られた (図 1.C)。続いて、BHK/ABCA1 細胞に生黒麴 / エタノール抽出物 (DMSO) を 20 mg/ml, 4 時間添加した時、コントロールと比較して、蛍光法では 1.3 倍 (図 2.A), 比色法では 1.2 倍のコレステロール排出量が見られた (図 2.B)。生麴 / エタノール抽出物 (DMSO) を 20 mg/ml, 4 時間添加した時、コントロールと比較して、蛍光法では 1.7 倍 (図 2.A), 比色法では 1.3 倍の有意なコレステロール排出量が見られた (図 2.B)。サンプル濃度を変えてコレステロール排出を測定したところ、濃度依存性が見られた (図 2.C)。いずれもタンパク発現量に有意な変化はなかった (図 1.D,E, 図 2.D,E)。

サンプル 4 時間, 24 時間添加では、ABC タンパク質の活性を上げる抽出物は見つからなかった。

THP-1 細胞に生麴 / 熱水抽出物 (PBS) を 4 時間添加した時、有意にコレステロール排出が増加したが (図 1.A,B), タンパク発現量に変化はなかった (図 1.E)。BHK/ABCA1 細胞に生黒麴 / エタノール抽出物 (DMSO) 又は、生麴 / エタノール抽出物 (DMSO) を 4 時間添加した時に、有意にコレステロール排出が増加したが (図 2.A,B), タンパク発現量に変化はなかった (図 2.E)。タンパク発現量に変化はないのにコレステロール排出が増加していることから、コレステロール排出増加のメカニズムとして、抽出物が細胞膜の膜環境に影響を与え、ABC タンパク質の輸送能を上げた可能性と、細胞内局在に作用しコレステロール排出量が増加した可能性が考えられる。もしくは転写にほとんど影響しない 4 時間添加のため、翻訳後制御に作用し ABC タンパク質の細胞内局在に影響したことで、結果的に ABC タンパク質の活性を上げた可能性が考えられる。

IV. 考察

ABC タンパク質を活性化させる発酵関連成分とそのメカニズム

酵母, 酒類のサンプルを ABC タンパク質に 4 時間もしくは 24 時間添加したところ、コレステロール排出の増加は見られなかった (data not shown)。酒類の抽出物を作製する段階でアルコールは揮発するため、酵母に由来する成分を含む酒中の成分が ABC タンパク質の活性を上げるのかを検討する研究となったが、本研究で抽出した酵母, 酒類の

ABC タンパク質の活性を上げると予想される麴中の機能性成分

3 次スクリーニングまで進んだサンプルは、生黒麴と生麴であり、いずれも生の麴だった。甘酒や塩麴の状態ではなく生の麴で ABC タンパク質の活性が上がったことから、生麴の段階での酵素が有効成分である可能性、もしくは甘酒を作る段階で増殖した乳酸菌や空気中の酵母などの雑菌により麴カビが死滅する可能性、酵素活性が下がる等の可能性が考えられる。また、甘酒や塩麴は生麴と比較して添

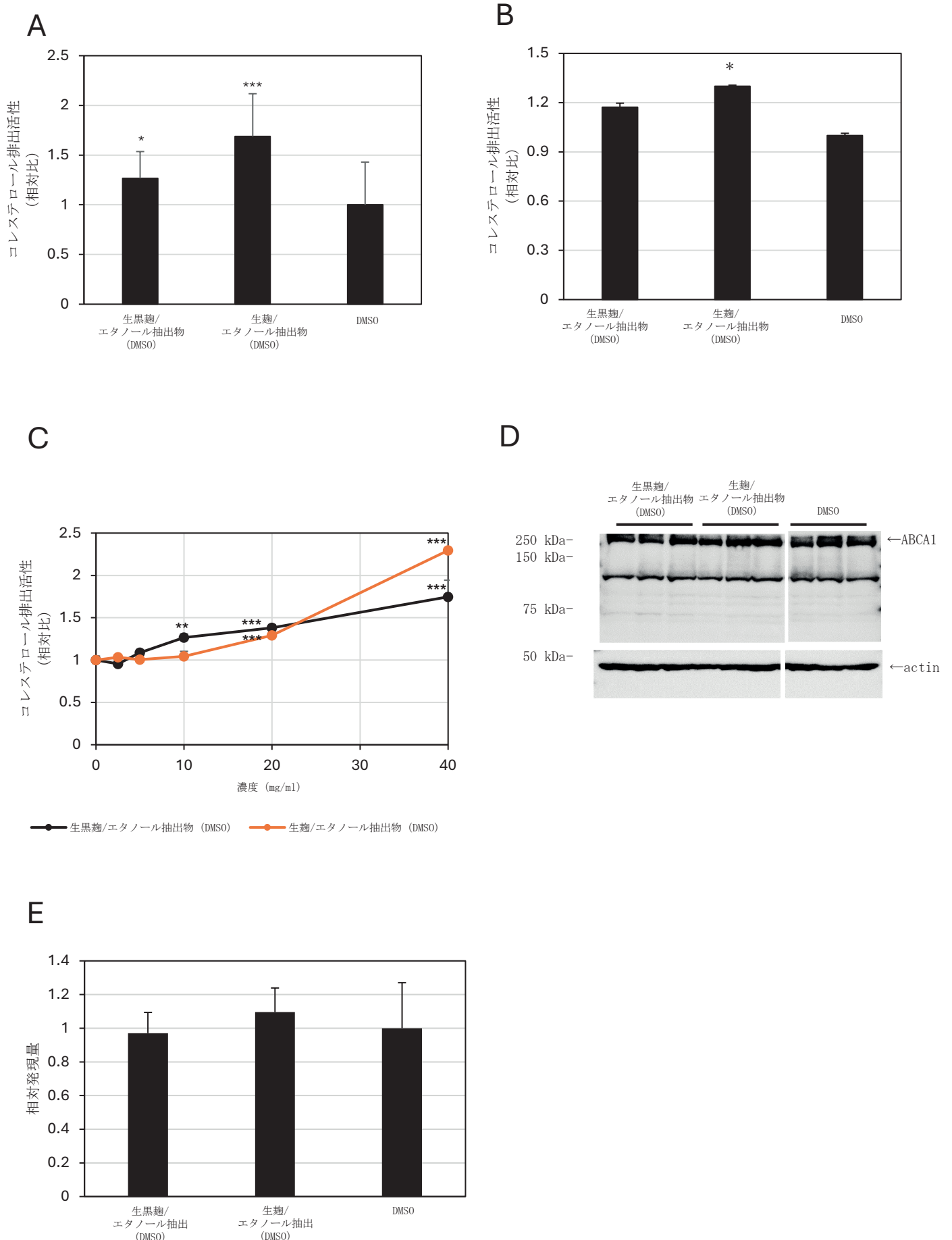


図2 BHK/ABCA1細胞に生黒麹/エタノール抽出物（DMSO）又は生麹/エタノール抽出物（DMSO）を添加した時のコレステロール排出活性とABCA1発現量

(A) 蛍光法によるコレステロール排出 assay 結果

BHK/ABCA1 細胞を 1.0×10^6 cells/ml となるように播種し、生黒麹/エタノール抽出物 (DMSO)、生麹/エタノール抽出物 (DMSO) を終濃度 20 mg/ml (抽出前の重量換算) で添加し、4 時間後に蛍光法で測定した。その結果得られたコレステロール排出量を BCA protein assay で算出したタンパク質量で除し、溶媒である DMSO のコレステロール排出を 1 とした相対値を評価した。12 連のデータの平均値 $\pm$ SD を示す。 $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$

(B) 比色法によるコレステロール排出 assay 結果

BHK/ABCA1 細胞を 1.0×10^6 cells/ml となるように播種し、生黒麹/エタノール抽出物 (DMSO)、生麹/エタノール抽出物 (DMSO) を終濃度 20 mg/ml (抽出前の重量換算) で添加し、4 時間後に比色法で測定した。その結果得られたコレステロール排出量を BCA protein assay で算出したタンパク質量で除し、溶媒である DMSO のコレステロール排出を 1 とした相対値を評価した。3 連のデータの平均値 $\pm$ SD を示す。 $^*P < 0.05$

(C) 蛍光法による濃度依存性の検討

BHK/ABCA1 細胞を 1.0×10^6 cells/ml となるように播種し、生黒麹/エタノール抽出物 (DMSO)、生麹/エタノール抽出物 (DMSO) を終濃度 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 0 mg/ml (抽出前の重量換算) で添加し、4 時間後に蛍光法で測定した。3 連のデータの平均値 $\pm$ SD を示す。 $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

(D) ウェスタンブロッティング結果

コレステロール排出量測定後の細胞抽出液を SDS-PAGE した。サンプルは 3 連ずつ流した。一次抗体はマウス抗 ABCA1 抗体、二次抗体は抗マウス IgG-HRP 抗体を使用して Immuno Star[®] Zeta もしくは Immuno Star[®] LD で化学発光させ、WSE-6100 Lumino Graph I (ATTO 株式会社) で撮影した。

(E) ABCA1 相対発現量

メンブレン上のバンドの濃さを CS Analyzer4 (ATTO 株式会社) で定量し、ABCA1 の測定値をローディングコントロールのアクチンの測定値で除し、タンパク量の補正をした。溶媒である DMSO のタンパク発現量を 1 とした相対値を評価した。3 連のデータの平均値 $\pm$ SD を示す。

加時の麹の濃度が薄くなり、生麹ほど ABC タンパク質の活性に影響しなかった可能性も考えられる。本研究では甘酒の抽出物で ABC タンパク質の活性の上昇は見られなかったが、甘酒はヒトでの便通改善、LDL コレステロール低減効果、動物実験で肥満抑制効果の報告がある²⁵⁾。

麹の酵素分解物であるピログルタミルペプチドには抗炎症作用が報告されており^{10, 27, 28)}、今回、ABC タンパク質の活性を上げる可能性があることを見出された麹の抽出物である、生麹/熱水抽出物 (PBS) や生黒麹/エタノール抽出物 (DMSO)、生麹/エタノール抽出物 (DMSO) にもピログルタミルロイシンが含まれ、何らかの機能性を示す可能性もある。さらに、本研究では、ABC タンパク質の活性を上げる発酵関連の抽出物として、熱水もしくはエタノール抽出物が見出された。クロロホルムやアセトン抽出物ではコレステロール排出の増加が見られなかったことから、疎水性というより親水性の成分であると考えられる。また本研究では一般的になじみがない黒麹も用いた。黒麹は、泡盛や焼酎に使われることの多い麹で、クエン酸を多く含み雑菌の繁殖を抑えることができることから、高温多湿でもろみが腐敗しやすい九州・沖縄での酒造りに使われてきた^{29, 30)}。生麹と生黒麹の差についても検討する必要がある。今後は、メタボローム解析を行い麹中の活性を上げる成分の特定を行いたい。

本研究の限界

今回、蛍光法と比色法をコレステロール排出量の測定に

用いたが、サンプルの自家蛍光の影響で、蛍光法と比色法で同じ値にならなかった。HPLC などを使用してコレステロール排出量の測定し再現性を確認する必要がある。

本研究では発酵関連の 98 種類の抽出物から、生黒麹と生麹の中に、ABC タンパク質の活性を上げる可能性のある成分が含まれていることを発見した。今後のさらなる研究で生黒麹、生麹のどのような成分が ABC タンパク質に関わってくるのか、メカニズムや成分をつきとめることで脂質異常症の患者を含めた一次予防段階で健康的な食生活を提案できることを期待される。

利益相反 (COI)

本研究に関連して、開示すべき COI はない。

謝辞

ABCA1 又は ABCG1 を発現する BHK 細胞を故 John Oram 博士から供与いただいた。酵母株は独立行政法人酒類総合研究所から供与いただいた。

参考文献

- 1) Takanari Nakano, Ikuro Inoue, Takayuki Murakoshi: A Newly Integrated Model for Intestinal Cholesterol Absorption and Efflux Reappraises How Plant Sterol Intake Reduces Circulating Cholesterol Levels. *Nutrients* (2019)

- Volume 11 Issue 2, doi: 10.3390/nu11020310
- 2) Daniel J. Rader, Alan Daugherty : Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* (2008) 451: p904–913, doi: 10.1038/nature06796
 - 3) 稲垣暢也, 植田和光, 鈴木洋史ほか: ABC トランスポーター: 生体制御の ABC 遺伝子から疾患まで 診断と治療社 (2002) p1–7.
 - 4) 楠原洋之編: トランスポーターと疾患研究の最前線, 医歯薬出版株式会社 (2014) p16–29.
 - 5) Masatsune Ogura : HDL, cholesterol efflux, and ABCA1: Free from good and evil dualism. *J. Pharmacol. Sci.* (2022), Volume 150, Issue 2: p81–89, doi: 10.1016/j.jphs.2022.07.004
 - 6) Michinori Matsuo : ATP-Binding Cassette Proteins Involved in Glucose and Lipid Homeostasis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2010), Volume 74, Issue 5: p899–907 doi:10.1271/bbb.90921
 - 7) Zoltán Hegyi , László Homolya: Functional Cooperativity between ABCG4 and ABCG1 Isoforms. *PLoS One* (2016) 11(5), doi: 10.1371/journal.pone.0156516
 - 8) Andrew J Murphy, Nora Bijl, Laurent Yvan-Charvet, et al. : Cholesterol efflux in megakaryocyte progenitors suppresses platelet production and thrombocytosis . *Nat. Med.* (2013) volume 19: p586–594, doi: 10.1038/nm.3150
 - 9) 楠原洋之編: トランスポーターと疾患研究の最前線, 医歯薬出版株式会社 (2014) p16–29.
 - 10) 鄭 屹峰, 白子紗希, 佐藤健司: 麹発酵により生じたペプチドおよびアミノ酸代謝物の機能 日本醸造協会誌 (2022), 117 巻 1 号 : p6–17, doi: <https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan.117.6>
 - 11) 若林一郎: アルコールと循環器疾患に関する最近の研究 成果: 生活衛生 (2011), 55 巻 1 号 : p34–45, doi: <https://doi.org/10.11468/seikatsueisei.55.34>
 - 12) J. W. J. Beulens, A. Sierksma, A. van Tol, et al : Moderate alcohol consumption increases cholesterol efflux mediated by ABCA1. *J. Lipid Res* (2004), volume 45, Issue 9: p1716–1723, doi: 10.1194/jlr.M400109-JLR200
 - 13) Martijn S. van der Gaag, Arie van Tol, Leo M. Scheek, et al.: Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men , *Atherosclerosis* (1999), volume 147, Issue2, p405–410, doi: 10.1016/s0021-9150(99)00243-9.
 - 14) 佐藤充克: ワインと健康. 日本醸造協会誌 (1997), 92 巻, 2 号 : p96–107, doi:<https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan1988.92.96>
 - 15) E.A.ROBBINS, R.D.SEELEY: CHOLESTEROL LOWERING EFFECT OF DIETARY YEAST AND YEAST FRACTIONS. *J. Food Sci* (1977), Volume 42, Issue 3: p694–698, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb12581.x>
 - 16) 岸田忠昭: *Saccharomyces cerevisiae* 培養物の血清コレステロール低下作用について, 栄養と食糧 (1973), Vol.26, NO.6: p371–375.
 - 17) 持田和美, 栗林喬, 斉藤憲司ら: ラットのコレステロール代謝改善効果を有する 酒粕粉末の調製. 日本食品科学工学会誌 (2000), 47 巻, 2 号 : p78–84, doi: <https://doi.org/10.3136/nskkk.47.78>
 - 18) Hiroshi Hamajima, Masaru Tanaka, Miyuki Miyagawa, et al.: Koji glycosylceramide commonly contained in Japanese traditional fermented foods alters cholesterol metabolism in obese mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem* (2019), Volume 83, Issue 8: p1514–1522, doi: 10.1080/09168451.2018.1562877
 - 19) Takashi HIRATA, Morio OKABE, Aya KOBAYASHI, et al.: Molecular Mechanisms of Subcellular Localization of ABCG5 and ABCG8. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2009), Volume 73, Issue 3: p619–626, doi: 10.1271/bbb.80694
 - 20) Shizuko TACHIBANA, Maki HIRANO, Takashi HIRATA, et al.: Cholesterol and Plant Sterol Efflux from Cultured Intestinal Epithelial Cells Is Mediated by ATP-Binding Cassette Transporters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2007), Volume 71, Issue 8: p1886–1895, doi: <https://doi.org/10.1271/bbb.70109>
 - 21) Tappei Takada, Yoshihide Yamanashi, Kentaro Konishi, et al.: NPC1L1 is a key regulator of intestinal vitamin K absorption and a modulator of warfarin therapy. *Sci Transl Med.* (2015), Vol 7, Issue 275: p275ra23, doi: 10.1126/scitranslmed.3010329
 - 22) Michinori Matsuo, Yutaka Ogata, Yoshihide Yamanashi, et al.: ABCG5 and ABCG8 Are Involved in Vitamin K Transport. *Nutrients* (2023), 15(4), 998 doi: 10.3390/nu15040998
 - 23) Ashley M. Vaughan, John F. Oram: ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J Lipid Res* (2003), Volume 44, Issue 7: p1373–1380, doi: 10.1194/jlr.M300078-JLR200
 - 24) Drake M. Amundson, Mingjie Zhou: Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *J. Biochem. Bioph. Methods* (1999), Volume 38, Issue 1: p43–52, doi:

- 10.1016/s0165-022x(98)00036-0
- 25) 高橋雅弥, 尾関健二: 市販甘酒中のレジスタントプロテインである プロラミン量の測定. 日本醸造協会誌 (2021), 117 巻 10 号 : p719–723 doi: <https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan.116.719>
- 26) Tamami Kiyono, Kiyoo Hirooka, Yoshihiro Yamamoto, et al.: Identification of Pyroglutamyl Peptides in Japanese Rice Wine (Sake): Presence of Hepatoprotective PyroGlu-Leu. J. Agric. Food Chem (2013), Vol 61, Issue 47: p11660–11667, doi: 10.1021/jf404381w
- 27) Kenji Sato , Yukari Egashira, Shin Ono, et al. : Identification of a hepatoprotective peptide in wheat gluten hydrolysate against D-galactosamine-induced acute hepatitis in rats. J. Agric. Food Chem (2013) Volume 61, Issue 26, doi: 10.1021/jf400914e
- 28) Sayori Wada , Kenji Sato, Ryoko Ohta, et al.: Ingestion of low dose pyroglutamyl leucine improves dextran sulfate sodium-induced colitis and intestinal microbiota in mice. J. Agric. Food Chem (2013) Volume 61, Issue 37, doi: 10.1021/jf402515a.
- 29) 山田修: 黒麴菌の系統解析と OTA 非生産性, Mycotoxins (2013), 63 巻 2 号 : p187–190, doi: <https://doi.org/10.2520/myco.63.187>
- 30) 加藤範久: ごぼう麴と麴菌プロテアーゼのビフィズス菌増加作用 日本醸造協会誌 (2019) 119 巻 12 号 : p750–757.

Screening of fermentation-related components that increase cholesterol transport mediated by ABC proteins

Marin Sato¹, Mai Fujita², Michinori Matsuo^{1,2*}

¹ Department of Food and Nutrition, Graduate School of Home Economics, Kyoto Women's University

² Department of Food and Nutrition, Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University

Abstract

Purpose: ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins ABCA1, ABCG1, ABCG4, and ABCG5/ABCG8 are involved in cholesterol transport in human body. The activation of ABC proteins promotes cholesterol efflux and prevents atherosclerosis. Previous studies have reported that the functional components of koji, yeast, and alcoholic beverages suppress elevated total cholesterol levels, while moderate alcohol consumption increases HDL cholesterol levels. Therefore, this study aimed to investigate the components of koji, yeast, and alcoholic beverages that activate ABC proteins.

Methods: BHK cells transfected with ABC protein genes and THP-1 cells differentiated into macrophages and endogenously expressing ABCA1 and ABCG1 were incubated with extracts from koji, yeast, and alcoholic beverages. Subsequently, cholesterol efflux from the cells was quantified using fluorescent and colorimetric methods. Those with increased activity were quantified for protein expression using Western blotting.

Results: Cholesterol efflux increased significantly when the hot water extract of raw koji was added to THP-1 cells, and when the ethanol extract of raw black koji or ethanol extract of raw koji was added to BHK/ABCA1 cells. However, the expression levels of ABC proteins did not exhibit significant differences.

Discussion: These findings suggest that increased transport efficiency, rather than elevated protein expression, was responsible for the observed increase in cholesterol efflux.

Key words: Cholesterol, Atherosclerosis, Dyslipidemia, ABC transporter protein