

血中コレステロール濃度調節機構に関する 最近の分子生物学的研究（総説）

—コレステロールの胆汁酸への異化を中心として—

古市 幸生

三重大学生物資源学部

Recent Progress in Molecular Biology of Cholesterol Homeostasis, Focused on the Metabolic Change of Cholesterol to Bile Acids (Review)

Yukio FURUICHI

Faculty of Bioresources, Mie University

Abstract

In this article, the mechanisms for maintaining a homeostasis in blood cholesterol level in mammals, focusing on metabolic change of cholesterol to bile acids, are reviewed. Blood cholesterol is maintained at a constant level by many factors. One of the important factors is a hepatic conversion of cellular cholesterol to bile acids, which play important roles in the digestion and absorption of dietary lipids in the gastrointestinal tract. On the synthesis of bile acids from cholesterol, cholesterol 7 α -hydroxylase plays a key role in the process. Recent progresses in the mechanisms for keeping a constant blood cholesterol level, an outline of bile acid synthesis, purification and assay methods of the enzyme are reviewed. The hormonal and dietary regulations in the expression of mRNA for the enzyme are also discussed.

Key words : cholesterol 7 α -hydroxylase, cholesterol, bile acids, regulation, mRNA, cDNA, purification, assay method

はじめに

近年、日本人の食生活の欧風化が著しくなった結果、米の消費量の減少により炭水化物摂取量が顕著に減少する一方で畜肉・乳製品の消費増加によって動物性タンパク質と脂肪の摂取量が増加している。疫学的調査によれ

ば、このような食生活の変化に伴って、血液中のコレステロール濃度が上昇し、動脈硬化に基づく虚血性心疾患に罹る人の割合も増している。従って、血液中のコレステロール濃度を適切な値に調節することは栄養学的見地からもまた臨床並びに基礎医学の立場からも非常に重要な研究課題となっている。しかし、このコレステロール濃度は低すぎる場合には脳出血、高すぎればアテローム動脈硬化症の原因になることが疫学的に明らかにされており、適度な濃度を保持することの重要性が最近認識さ

平成7年10月30日受理

〒514 津市上浜町1515 furuichi@bio.mie-u.ac.jp

れるようになってきた。しかし、これまでは高すぎる血液中コレステロール濃度を低下させることのみを主眼においた研究が主に行われている。なぜならば、コレステロールは上述の動脈硬化の他に、高脂血症、高リポタンパク質血症、心筋梗塞、胆石症などの成人病の原因物質となることが知られてきているからである¹⁾。

他方で、コレステロールは非常に重要な役割を果たしている必須の生体成分であることも判明してきている。すなわち、哺乳動物では、コレステロールは生体膜の構成成分であるとともに脂肪の消化吸収にはなくてはならない胆汁酸の原料として、また副腎皮質ホルモンや性ホルモンなどのいわゆるステロイドホルモンおよびカルシウム代謝と密接な関係があるビタミンD（詳しくは、コレステロール生合成の前駆物質である7-Dehydrocholesterolの紫外線照射によりビタミンD₃が生じる）の合成原料として認識されてきている。

さて、血液中のコレステロール濃度の恒常性は、

- 1) コレステロールの食餌からの摂取量と Acyl CoA Cholesterol Acyltransferase (ACAT) 活性
 - 2) 体内でのアセチル CoA（あるいは acetate といってもよい）を出発原料とする生合成
 - 3) 細胞膜に存在する低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体 (レセプター) を介しての血液中から細胞内・組織内への LDL の取り込み (レセプター介在エンドサイトーシス)
 - 4) 肝臓における胆汁酸への異化
- の4つの要因によって主に調節されている。そこで、本小論では、まず最初にこれら4つの血清コレステロール濃度調節要因について概説した後、コレステロールの胆汁酸への異化に焦点を絞りに論ずることにしたい。

血清コレステロール濃度調節要因

- 1) 食餌性コレステロールの摂取量と吸収量の割合を支配する ACAT 活性

平均的な日本人一日当たりのコレステロールの食餌からの摂取量は400-500 mgであり、その内200-300 mgが消化管より吸収されると見積もられている。このように、吸収率は共存する胆汁酸やトリアシルグリセロールなどの脂肪成分の質や量にも依存するが、平均約50-60%であり、栄養素としては吸収率が非常に低い部類に

属するものである。なお、この吸収は小腸吸収上皮細胞内に存在する ACAT 活性で律速されている²⁾。なぜならば、食餌性のコレステロールは全て遊離型で腸管粘膜より吸収され、吸収細胞内で再びエステル化される必要がある、この反応が ACAT により行われるからである。

- 2) アセチル CoA からのコレステロールの生合成速度

コレステロールの体内での生合成量は平均的な成人で一日当たり1000 mg位であるとされており、一日当たり体重 kg 当たり約10 mgである。体重 kg 当たりの一日量で、マウスやウサギでは50 mg、SD系ラットでは120 mgであり、この合成速度は若い時程大きい。たとえば雌SD系ラットの胎児では450 mg、成長したものは120 mg、雌ニュージーランドホワイト種ウサギの胎児では140 mg、新生児では90 mg、成長したものは50 mgである³⁾。このコレステロール生合成量は食餌中に存在するコレステロール量の他に以下のような種々の因子によって調節されていることが知られている。

- 1) アセチル CoA を出発原料とするコレステロール生合成過程に関与する3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase の遺伝子は細胞内のコレステロール量によって転写レベルでの調節を受けている。すなわち、細胞内の蓄積コレステロール量が多くなると、HMG-CoA reductase の発現量が減少するという down-regulation を受ける。この HMG-CoA reductase は HMG-CoA からメヴァロン酸 (mevalonate) への還元を触媒する酵素であり、コレステロール生合成の第一の律速酵素である。2) 食餌中のコレステロール含量で肝臓でのコレステロール合成は大きく抑制され、小腸では軽度に抑えられるもののその他の肝臓外組織での合成は殆ど影響を受けないとされている⁴⁻⁶⁾。このことは水溶性の食物繊維などを与えて小腸からのコレステロールや胆汁酸の吸収を阻害あるいは排泄を促進すると、肝臓でのコレステロール合成は大きく、小腸では軽度に促進されるが、肝臓外組織での合成は殆ど影響をうけない⁴⁻⁸⁾ ことから良く理解できる。

- 3) LDL レセプターを介した LDL の細胞内への取り込み

一般に脂質は水に難溶性であるが故に血液中ではリポタンパク質というコレステロール、タンパク質 (アポリポタンパク質あるいはアポタンパク質と称される)、リン脂質およびトリアシルグリセロールから成る複合体を

形成して水溶性となり運搬されている。これらは疎水性のトリアシルグリセロールおよびエステル化コレステロールを中心部に、親水基を有するリン脂質と遊離型コレステロールおよびアポタンパク質を表面に配置した球状体の形である。このリポタンパク質には、低密度リポタンパク質 (LDL)、高密度リポタンパク質 (HDL)、超高密度リポタンパク質 (VLDL)、キロミクロン、中間密度リポタンパク質 (IDL) の4種があり、これらは超遠心分離における浮上密度によって分類されたものである。ヒトでは血液中のコレステロールの主たる運搬形態であるリポタンパク質は LDL であり、この LDL は細胞膜に存在する LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれる。すなわち、receptor-mediated endocytosis によって細胞内に取り込まれることが明らかにされている。なお、リポタンパク質の血液中に占める割合は、ラットでは HDL が、ウサギでは LDL が高いように、動物種により違いが認められる。

上述のように、LDL は LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれるが、この経路は LDL-pathway と称されている⁹⁾。これは、Brown and Goldstein によって、家族性高コレステロール血症の研究過程において見いだされた、血液中コレステロールを細胞に取り込む機構である。すなわち、LDL 受容体と呼ばれる膜蛋白質に、血液中の主要なコレステロール輸送リポタンパク質である LDL が結合して、LDL は受容体とともに細胞内に取り込まれる。この LDL-レセプターの発現は細胞内蓄積コレステロール量によって調節されている。すなわち、細胞内のコレステロール量が多くなれば、LDL-レセプターの発現量は減少し、逆に細胞内のコレステロール量が減少すると発現量は多くなるように調節される。

4) コレステロールの胆汁酸への異化

体内のコレステロールは肝臓で胆汁酸に異化され、肝管・胆嚢 (ヒト、マウス、ウサギでは胆嚢があるが、ラット、ウマなどではこれを欠く) を経由して十二指腸の Vater 乳頭より腸管内腔に胆汁の構成成分として分泌 (排泄といってもよいだろう) されている。この胆汁酸は小腸内で両親媒性の界面活性剤としてトリアシルグリセロール、油溶性ビタミン、コレステロールなどの食餌性脂質と混合ミセルを形成して、それらの消化管よりの吸収を促進する役割を果たしている。なお、コレステロールから胆汁酸への変換は肝臓においてのみ行われる。こ

のような胆汁酸の生成過程は、哺乳動物におけるコレステロール代謝と排泄を調節する最も重要な経路である^{10, 11)}。

以上のような調節機構で血液中のコレステロール濃度の恒常性は維持されている。

人体でのコレステロールの収支は次のように見積もられている。

人体におけるコレステロールの収支 (一日当たり)

体内の総コレステロール量: 約 170 g

(血清コレステロールプールの大きさは 6-10 g である。従って、体内のコレステロール総量の 10 % にも満たないこの量が動脈硬化症などの疾病の発症と関連をもつということになる。)

人体に入る量 (約 1200 mg)

(1) 食事からの摂取: 約 200 mg

(2) 生合成: 約 1000 mg

人体から出る量 (約 1200 mg)

(1) 糞中排泄中性ステロイド: 約 800 mg

(コレステロールおよびその腸内細菌代謝産物)

(2) 糞中排泄胆汁酸: 約 300 mg

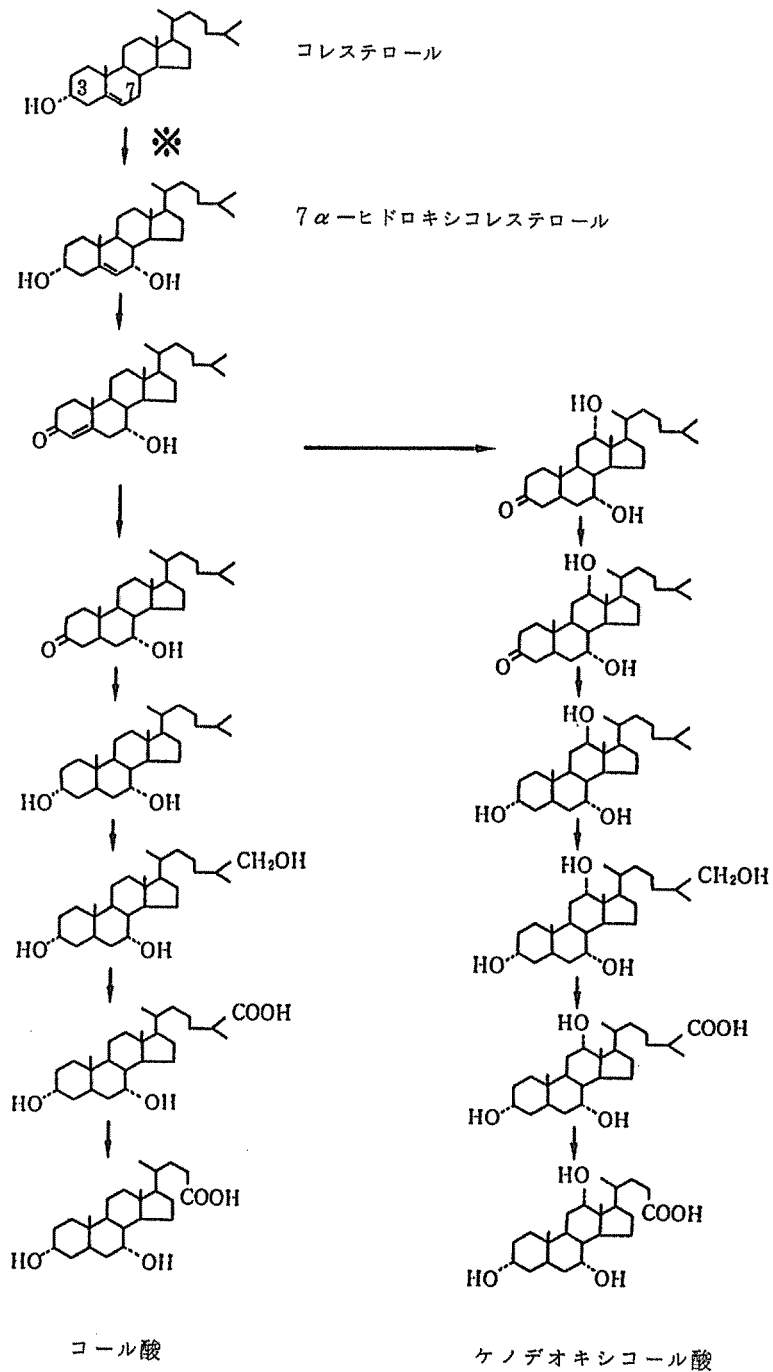
(3) ステロイドホルモンへの代謝: 約 50 mg

(4) 皮膚・消化管壁細胞の脱落: 微量

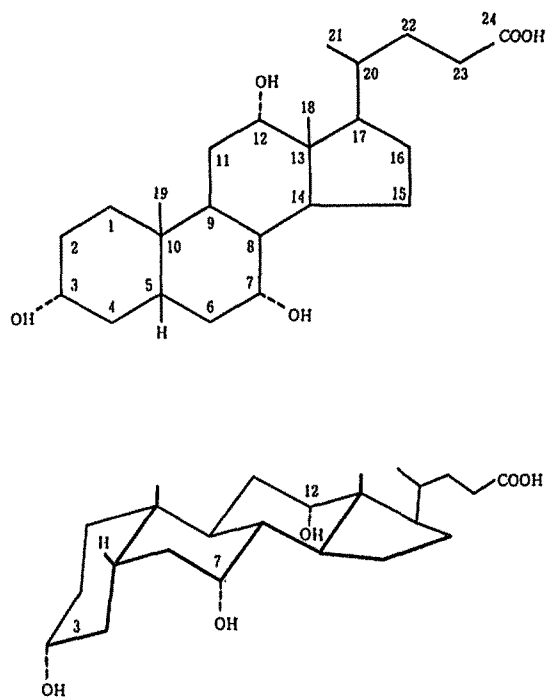
このように、コレステロールはタンパク質、脂肪酸や糖質のように代謝 (燃焼) されず、ステロイドの基本骨格をもったままで体中に存在し、糞中への排泄が主体であるため体外への除去が困難である。さらに、血管壁や体の末梢に蓄積しているコレステロールが体外に除去されるためには、必ず肝臓を経由して胆汁として消化管内腔に排泄されるか、肝臓で胆汁酸に異化されなければならないということも体外への除去を困難にしている。

胆汁酸の生合成の概略

コレステロールの胆汁酸への変換の過程に関しては、我国や欧米の研究者を中心として、古く 1950 年代から活発に研究が進められ、第 1 図に示すような過程が解明されるに至った¹⁾。なお、第 2 図にコール酸の化学構造と立体構造を示した。第 1 図に示すように、胆汁酸はコレステロールを出発原料として肝臓で生合成されており、この変化の過程には現在判明しているだけでも少なくとも 14 種類の酵素が関与していることが明らかにされて



第1図 コレステロールから一次胆汁酸への異化経路。
 主要な段階について示した。*で示した反応 cholesterol 7 α -hydroxylase が関与している。



第2図 コール酸の化学構造（上図）と立体構造（下図）。

いる¹²⁾。この代謝過程において、第一段目 cholesterol 7 α -hydroxylase (EC 1. 14. 13. 17) (以下C7H) による触媒反応が律速段階となっていることが明らかにされてきている^{13,14)}。

このC7Hは、ステロイド核であるcyclopentanoperhydrophenanthrene環の7 α 位の水酸化反応を触媒する cytochrome P-450 酵素であって、肝臓実質細胞の小胞体に局在している。したがって、この7 α 位水酸化反応は肝臓ミクロソームだけで特異的に行なわれる。さらに、反応には分子状酸素、補酵素としてのNADPH、および cytochrome P-450 reductase を必要とし^{15, 16)}、いわゆる mixed-function monooxygenase ファミリーの一員である。

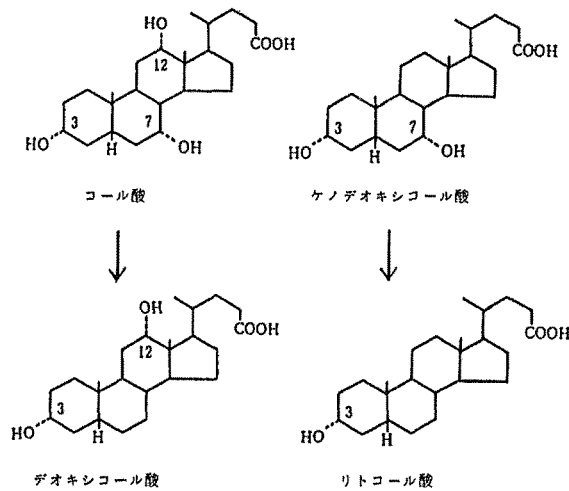
ところで、胆汁酸合成の過程は大きく二つに分けて考えることができる。すなわち、コレステロールの cyclopentanoperhydrophenanthrene 環構造のC-7位に axial (α) configuration に水酸基を導入する過程と炭素8個からなる側鎖を酸化・短縮する過程である。なお、最初にコレステロールの側鎖の末端である27位

に水酸基が導入されるという経路があるという研究報告があるが¹⁷⁾、これまで得られた知見からして、一般にはコレステロール異化の最初の反応は7位の α 位への水酸基の導入であると考えてよいであろう。

コレステロールの胆汁酸への変化は疎水性の物質を親水性の物質に変えて排泄するという意味をもつが、これにより体内コレステロールの大部分（ほぼ90%）はコール酸 (cholic acid) およびケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid) などの一次胆汁酸に変換（これをコレステロールの異化と称する）された後、胆汁に混ざり、腸管内に排泄される。この胆汁酸は栄養学的には腸管内で脂溶性のビタミンや脂質などの消化吸収を助けるという重要な役割を果たしている。腸管内に排泄された胆汁酸は、動物種によって異なるが、腸内細菌の作用により二次胆汁酸に変換される。コール酸からはデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸からはリトコール酸が生じる（図3）。このような一次ならびに二次胆汁酸の総量の約95%は回腸から吸収された後門脈経由で肝臓に運び戻され、再度胆汁として腸管内に排泄される。このような繰返しは腸肝循環 (entero-hepatic circulation) と呼ばれ、胆汁酸の効率的な再利用の方法となっている。ヒトでは一日6-12回の循環があると見積もられ、12-24gの胆汁酸に相当すると考えられている¹⁸⁾。

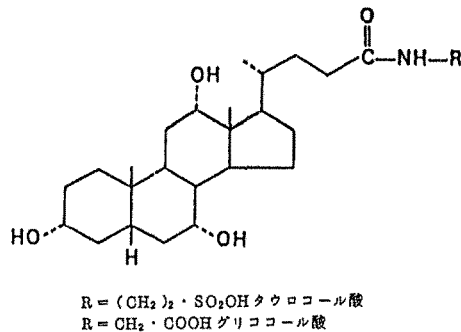
ヒト肝臓における一日当たりのコレステロールの収支は、生合成600mg、LDL-レセプターを介しての取り込み300mg、直接コレステロールとしての排泄600mg、胆汁酸への変換100-400mgと見積もられ収支が保たれている¹⁹⁾。

肝臓実質細胞からは、一次胆汁酸はグリシンあるいはタウリンと結合（抱合と称することが多い）した形すなわちグリココール酸およびタウロコール酸として分泌される（図4）。この抱合過程は肝臓細胞から胆汁酸が胆汁中に分泌されるために必須と考えられている。最終的には分泌された胆汁酸の98%が抱合型であり、成人におけるグリシン：タウリン比は3：1で、グリシン型の比率が高い。また、この比率は成長段階¹⁹⁾や動物種で異なることも認められている。なお、再吸収された二次胆汁酸は肝臓で一次胆汁酸に逆変換される場合があるが、これには動物によってかなりの違いが認められており、ヒトではケト基のみが肝臓で水酸基に変換されるといわ



第3図 一次胆汁酸（コール酸，ケノデオキシコール酸）から二次胆汁酸（デオキシコール酸，リトコール酸）への変化。

大腸内嫌気性菌による7 α 脱水酸化反応により，コール酸からデオキシコール酸，ケノデオキシコール酸からリトコール酸が生じる。



第4図 抱合胆汁酸の化学構造。

コール酸のグリシンおよびタウリン抱合型について示した。ケノデオキシコール酸の抱合型については12位が脱水酸化しているほかは同じである。

れている。

以上のように，コレステロールから胆汁酸に至るには各種の興味ある反応段階があり，それらの反応に関与する酵素や酵素の遺伝子レベルでの研究も多々ある。また，C7Hの活性およびmRNA発現の調節要因に関する研究報告も相当な数にのぼる。本小論では第一段階に関与するC7Hに的を絞って紹介することにする。また，調節機構の項に関しても代表的な研究成果について紹介することにしたい。

Cholesterol 7 α -hydroxylaseの精製と性質

C7Hは肝臓中での存在量が少なく，膜酵素であり，さらにそれ自身非常に不安定であるということから精製法が困難で，長い間の挑戦にも拘わらず成功しなかった。はじめて精製に成功したのはOgishima等であり，ラット肝臓からであった²⁰⁾。彼等は，精製酵素の分子量が52kDaで，P450のスーパーファミリーのメンバーであることを示した。さらに，彼等はコレステロールおよび

5 alpha-H 型であるコレスタノールには活性を示すが他のステロイドに対しては活性を示さないということも明らかにしている。C7H の基質特異性について Ogishima 等は次のように説明している²⁰⁾。

1) 5 alpha-H 構造のような平面的な構造が必要である。2) 3 位に β 水酸基が必要である。3) 5 位に二重結合が必要である。その後、ヒトとラット²¹⁾、ラット²²⁾、ウサギ²³⁾ などの動物から本酵素の精製が報告されている。

Cholesterol 7 α -hydroxylase の活性測定法

既に「胆汁酸の生合成の概略」の項でのべたように、本酵素は膜酵素で、肝臓実質細胞の小胞体に局在するため、たとえば、肝臓組織中の酵素活性を測定するには、超遠心によりミクロソーム画分を調整し、これを酵素液として活性を測定することが多い。

初期には、活性測定として、¹⁴C-cholesterol を基質として用い、生成物をクロマトグラフィーで測定する方法²⁴⁾ や 7α -³H cholesterol を基質として、反応液中に遊離する ³H₂O を測定する方法も開発された²⁵⁾。後者の方法については、筆者らも試みたが、再現性のある値を得るのが困難であった。ここでは省略するが、アイソトープラベルのコレステロールを基質とし、生成物を薄層クロマトグラフィーで展開して測定する方法等、数多くの方法が発表されているが、中でも近年 Ogishima and Okuda によって開発された方法は比較的便利である。この方法の原理は、反応系に外から放射活性を有したコレステロールを加えることなく、ミクロソーム画分にもともと存在しているコレステロールを基質にして酵素反応を行なわせ、順相のシリカを担体とした HPLC を用いて測定するものである²⁶⁾。

なお、逆相 HPLC を用いた測定法^{27, 28)} や分離肝細胞での活性を測定する方法が Princen 等によって報告されており²⁹⁾、その他種々の改良法も発表されている³⁰⁻³²⁾。

C7H 遺伝子のクローニング

C7H の遺伝子に関する研究は、タンパク質の一次構造の解析や調節機構を明らかにすることを目的として数多く行われてきている。

Nishimoto 等および Jelinek and Russell によれば、ラットの C7H ゲノムは 1 個で、転写開始部位はコドン ATG の 61bp 上流に存在することが示された。さらに、ヒトの遺伝子の構造はラットに類似し、6 個のエクソンからなり、11kbp の長さであることも明らかとなった³³⁻³⁵⁾。

一方、Noshiro 等は、ラットの cDNA をプローブとして、ヒト cDNA をクローニングした。その結果によると、cDNA の翻訳領域 (open reading frame, ORF) は 1512bp で、504 個のアミノ酸からなる分子量 57,630 のタンパク質をコードしていることが示された。さらに、ラットの cDNA とは 82% という高い相同性を有することが明らかにされた³⁶⁾。

最近、ウサギの C7H の遺伝子の cDNA の ORF 領域を含む部分のクローニングと塩基配列が Kai 等によって初めて報告された。彼等によれば、ウサギの C7H の cDNA の ORF は 1503bp で 501 個のアミノ酸残基をコードしており、分子量は 58,097 であることが明らかにされた。さらに同報告では、cytochrome P450 のヘム結合ドメインの共通して保存されている塩基配列は 434-454 アミノ酸残基にあることも示されている³⁷⁾。このウサギ C7H のアミノ酸配列は、ラット¹¹⁾ およびヒト³⁸⁾ のそれらとそれぞれ 81% および 82% とかなり高い相同性を有するものである。

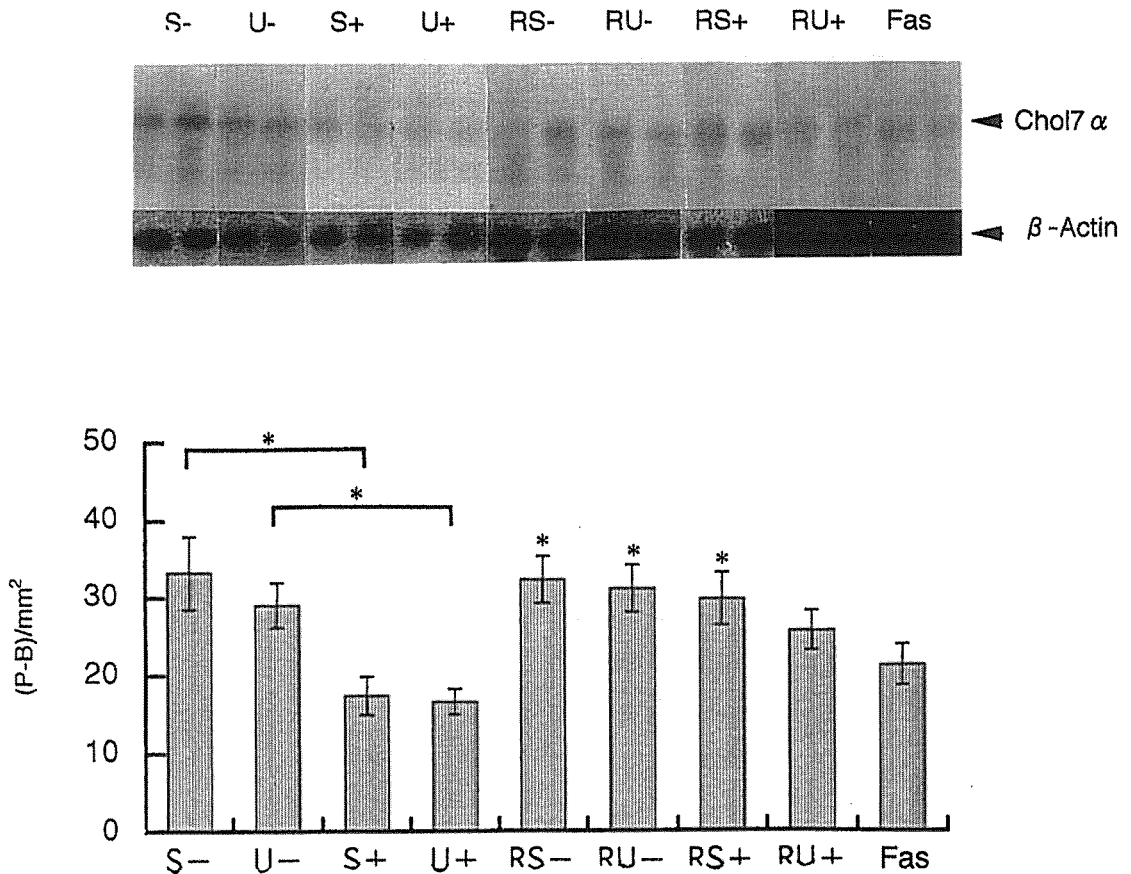
また、ウサギ C7HcDNA の ORF の塩基配列は、ラットとヒトのそれらとそれぞれ 82%、86% の相同性を示している³⁷⁾。さらに、ヘム結合ドメインもヒト、ウサギ、ラットという 3 種の動物でよく保存されており、ウサギでの Ile-448 が、ラットでは Val-451 に、ヒトではウサギの Gln-449 が His-452 に置き換えられていることも明らかになった³⁷⁾。

Noshiro 等は、彼等が精製した酵素に対する特異的な抗体を用いて、ラット肝臓 cDNA ライブラリーより、完全な C7HcDNA のクローニングに成功している³⁸⁾。得られた cDNA は全長 3,545bp で、1,509bp の ORF を有し、503 個のアミノ酸をコードし、分子量は 56,880 であることを示した。さらに、非常に長い AT 配列に富んだ 3'-非翻訳領域を有することも明らかにしている¹¹⁾。彼等は、mRNA 発現量、酵素タンパク質量、酵素活性の 3 者は日内変動することを認め、午前 10 時に低く、午後 10 時に高いことを示した。さらに、絶食す

ると、全体的にこれらの3種は低下するが、日内変動は消えないことを示した。また、コレステラミンを投与すると、午前10時のこれら3種の値は上昇するが、午後10時の値については影響を及ぼさないことも認めている。mRNA 発現量とタンパク量および酵素活性の間の高い相関は、日内変動を示すメカニズムが転写調節によるものであることを示すものと推論している。さらに、タンパク量とRNA 発現量の大きな日内変動から、それらが非常に高い代謝回転をしていることを推論してい

る。なお、筆者等も、ラットでは絶食によって、mRNA 発現量が顕著に低下することを認め、さらにコレステロール負荷食の再摂取では飽和および不飽和脂肪食共に継続摂取の場合より発現量が高くなることを初めて示した(第5図)³⁹⁾。

なお、Jelinek等⁴⁰⁾およびLi等⁴¹⁾も、ラットC7Hc DNAは、アミノ503個で56,880-56,890Daの分子量のタンパク質をコードしていることを明らかにしている。Li等がC7H発現を転写後調節としているのに対し、他の



第5図 摂取条件によるラット肝臓 cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA 発現量の変化³⁹⁾。

上段はノーザンブロットング、下段はそれを数値化したものを示している。ただし、S, Uはそれぞれ飽和脂肪食、不飽和脂肪食を表し、+, -は食餌へのコレステロール添加の有無を意味している。Fasは絶食を表し、Rは72時間絶食した後各食餌を24時間再摂取させたことを意味している。

大部分の研究グループが転写調節 pre-translational regulation と考えている。この相違点の証明は今後の興味深い問題点である。

ところで、ラット肝臓では、4種類の異なる C7H の mRNA が発現していることが報告されており、プロセッシングの上から非常に興味深いものである。そのうち比較的多い3つの mRNA は 3.6, 2.4, 1.7kbp の大きさである。筆者等もノーザンブロットングでこれらに相当する3本の発現バンドを検出している³⁹⁾。Jelinek 等は、このようにサイズの異なる mRNA が生じるのは、非翻訳領域 (non-coding region) の3種類の変異によるものと推測している⁴⁰⁾。

なお、近年 C7H 遺伝子を大腸菌に組み込んで発現させるという研究もみられる^{42, 43)}。特に、ヒトの場合には酵素の性質の検討などに利用の価値が非常に大きいものであると考えられる。

ここでは特に取り上げなかったが、Cohen 等は C7H 遺伝子がヒトの染色体の 8q11-q12 に存在することを明らかにしている⁴⁴⁾。また、ウサギ⁴⁵⁾、ラットの 5'-flanking sequence⁴⁶⁾、ラット³⁴⁾、ハムスター⁴⁷⁾、マウス⁴⁸⁾ の C7H 遺伝子発現調節に関する報告がある。

Cholesterol 7 α -hydroxylase の日内変動

C7H の活性、タンパク量および mRNA 発現量は日内変動を示し、夜間に高く、昼間低いことが、数種の動物で証明されている。すなわち、ラット以外の動物では、マウス⁴⁹⁾、ウサギ³⁷⁾ で観察されており、ヒトでは現在に至るまで日内変動を示した報告は見当たらない。

ウサギについては、最近 Kai 等はラットと比較検討し、C7H の活性と mRNA 発現量には synchronous (ウサギとラットは同調したように同じパターンを示している意) な日内変動があることを認め、活性についての検討は比較的測定しやすい mRNA によって行えばよいということを提唱している。また、この酵素の日内変動が pre-translational であることも推測している³⁷⁾。

ラットで日内変動を示した報告としては、Noshiro 等¹¹⁾ によるものをはじめとして、数多くあり、どの報告も一致して酵素活性あるいは mRNA 発現量は夜間に高く昼間低いことを認めている^{22, 41, 50-52)}。

興味深いことに、Gielen 等は既に 1975 年に cycloheximide や actinomycin D のようなタンパク質合成阻害剤をもちいて C7H の日内変動にはタンパク質と RNA の双方の合成が関与していることを示している⁵³⁾。

なお、コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA reductase も mRNA レベルで日内変動を示すことが明らかにされている⁵⁴⁾。このように、コレステロール代謝に密接な関係を有する2つの酵素に典型的な日内変動という現象が認められることは非常に興味深い。

Cholesterol 7 α -hydroxylase の活性と発現の調節

C7H の活性と発現は腸管循環によって肝臓に戻る胆汁酸の量と種類、ホルモン、食物繊維をはじめとする食餌成分等の種々の因子によって調節されていることが数多くの研究により明らかにされてきている。なお、これらの研究のほとんどにラットが実験動物として用いられている。

胆汁酸を結合するイオン交換樹脂 cholestyramine (家族性高コレステロール血症の治療に用いられることで知られている) を経口的に動物に与える⁵⁵⁾ あるいは bile diversion のような外科的手術によって¹⁰⁾、腸管循環を阻止すると、肝臓に戻る胆汁酸の量が減少する。その結果、C7H の活性が上昇し、コレステロールの胆汁酸への異化が増加する。この異化が増加し、それによって細胞内のコレステロールが減少すると、既に LDL 経路の項でも述べたように、コレステロール生合成過程の律速酵素である HMG-CoA reductase 活性ならびに LDL 受容体の発現量が増加することになる⁹⁾。

一方、コレステロールを添加した飼料を実験動物に与えると、HMG-CoA reductase の発現が抑えられるとともに C7H が誘導されることが知られている^{41, 56, 57)}。従って、この誘導は胆汁酸生成を促進し、その排泄を促進することになる⁵⁸⁾。また飼料に胆汁酸を混合して与えると C7H の酵素活性は低下することが示されている⁵⁹⁾。なお、コール酸やケノデオキシコール酸のような胆汁酸は C7H の mRNA 発現を低下させ、さらに抗体と結合する C7H タンパク質を減少させることも報告されている^{40, 60)}。

しかし、全ての胆汁酸が C7H を抑制するわけでは

ないらしい。たとえば、Shefer等はコール酸やケノデオキシコール酸の 7β -hydroxy epimerであるウルソコール酸やウルソデオキシコール酸はC7Hの発現を調節しないことを観察している⁶⁰⁾。

なお、食餌性コレステロールは肝臓におけるC7HのmRNA量やタンパク質を増加させることが知られている^{21, 40)}。また、thyroidホルモンなどのホルモンによって調節されていることも多くの研究によって明らかにされてきている^{61, 62)}。

報告例は少ないが、リン酸化やS-S結合形成がC7Hの酵素活性調節に関係しているという研究結果もみられ⁶³⁻⁶⁵⁾、今後より詳しく検討されていくものと考えられる。その他C7Hの調節に関して多くの研究が行われている^{11, 40, 41, 66)}。

最後に、最近発表されたChiang and Stroup⁶⁷⁾のC7Hのプロモータ領域のbile acid-responsive elementに関する研究、Thompson等⁶⁸⁾によるC7Hプロモータ領域の研究、Lee等⁶⁹⁾のmultiple functional DBP siteが日内変動に関係しているという研究等はC7Hの発現機構の一端を明らかにしたものであり、今後ますますこの種の研究が進展するものと考えられる。

あ と が き

コレステロールの代謝に関する研究は疾病の予防、純粋な生化学的立場、栄養学的立場など様々な観点から膨大な研究報告が発表されてきている。小論では、筆者が現在取り組んでいるコレステロールを中心とした脂質代謝に関する研究の過程で参照した研究報告を中心に取上げた。この分野の重要なものについては網羅するよう配慮した積もりであるが、漏れているものもあるかも知れないことをお断りしたい。

文 献

- 1) DANIELSSON, H. and J. SJÖVALL. Bile acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 44: 233-253 (1975).
- 2) SUCKLING, K. E. and E. F. STANG. Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.*, 26: 647-671 (1985).
- 3) DIETSCHY, J. M., S. D. TURLEY, and D. K. SPADY. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.*, 34: 1637-1659 (1993).
- 4) DIETSCHY, J. M. and M. D. SIPERSTEIN. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. *J. Lipid Res.*, 8: 97-104 (1967).
- 5) JESKE, D. J. and J. M. DIETSCHY. Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using [³H] water. *J. Lipid Res.*, 21: 364-376 (1980).
- 6) TURLEY, S. D., B. P. DAGGY and J. M. DIETSCHY. Cholesterol-lowering action of psyllium mucilloid in the hamster: sites and possible mechanisms of action. *Metabolism*, 40: 1063-1073 (1991).
- 7) DIETSCHY, J. M. The role of bile acids in controlling the rate of intestinal cholesterologenesis. *J. Clin. Invest.*, 47: 286-300 (1968).
- 8) GRUNDY, S. M., E. H. AHRENS, Jr., and G. SALEN. Interruption of the enterohepatic circulation of bile acids in man: Comparative effects of cholestyramine and ileal exclusion on cholesterol metabolism. *J. Lab. Clin. Med.*, 78: 94-121 (1971).
- 9) BROWN, M. S. and J. L. GOLDSTEIN. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232: 34-47 (1986).
- 10) DANIELSSON, H., K. EINARSSON, and G. JOHANSSON. Effect of biliary drainage on individual reactions in the conversion of cholesterol to taurocholic acid. Bile acids and Steroids 180. *Eur. J. Biochem.*, 2: 44-49 (1967).
- 11) NOSHIO, M., M. NISHIMOTO, and K. OKUDA. Rat liver cholesterol 7α -hydroxylase. Pretranslational regulation for circadian rhythm. *J. Biol. Chem.*, 265: 10036-10041 (1990).
- 12) RUSSELL, D. W. and K. D. R. SETCHELL. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*, 31: 4737-4749 (1992).
- 13) MYANT, N. B. and K. A. MITROPOULOS. Cholesterol 7α -hydroxylase. *J. Lipid Res.*, 18: 135-153 (1977).
- 14) DAVIS, R. A., S. DUELAND, and J. D. TRAWICK. Bile acid synthesis and the enterohepatic circulation: Processes regulating total-body cholesterol homeostasis. LUSIS A. J., J. I. ROTTER, and R. S. SPARKES (eds): *Molecular Genetics of Coronary Artery Disease. Candidate Genes and Processes in Atherosclerosis. Monogr. Hum. Genet. Basel*,

- Karger*, vol 14, pp. 208-227 (1992).
- 15) JOHANSSON G. Oxidation of cholesterol, 3-hydroxy-5-pregnen-20-one and 3-hydroxy-5-androsten-17-one by rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 21: 68-79 (1971).
 - 16) WADA, F., K. HIRATA, K. NAKAO, Y. SAKAMOTO. Participation of the microsomal electron transport system involving cytochrome P-450 in 7 α -hydroxylation of cholesterol. *J. Biochem. (Tokyo)*, 66: 699-703 (1969).
 - 17) SHODA, J., A. TOLL, M. AXELSON, F. PIEPER, K. WIKVALL, K. and J. SJÖVALL, Formation of 7 α - and 7 β -hydroxylated bile acid precursors from 27-hydroxycholesterol in human liver microsomes and mitochondria. *Hepatology*, 17: 395-403 (1993).
 - 18) 菅野道広, 今泉勝巳. コレステロール. pp. 122-136, 三共出版 (1986).
 - 19) SETCHELL, K. D. R., R. DUMASWALA, C. COLOMBO, and M. RONCHI. Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile. *J. Biol. Chem.*, 263: 16637-16644 (1988).
 - 20) OGISHIMA, T., S. DEGUCHI, and K. OKUDA. Purification and characterization of cholesterol 7 α -hydroxylase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 262: 7646-7650 (1987).
 - 21) NGUYEN, L. B., S. SHEFER, G. SALEN, G. NESS, R. D. TANAKA, V. PACKIN, P. THOMAS, V. SHORE, and A. BATTÀ. Purification of cholesterol 7 α -hydroxylase from human and rat liver and production of inhibiting polyclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, 265: 4541-4546 (1990).
 - 22) CHIANG, J. Y. L., W. F. MILLER, and GUEY-MEEI LIN. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver. Purification of cholesterol 7 α -hydroxylase and the immunochemical evidence for the induction of cholesterol 7 α -hydroxylase by cholestyramine and circadian rhythm. *J. Biol. Chem.*, 265: 3889-3897 (1990).
 - 23) MIKI, N., R. MIURA, and Y. MIYAKE. Purification and characterization of cholesterol 7 α -hydroxylase cytochrome P-450 of untreated rabbit liver microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)*, 101: 1087-1094 (1987).
 - 24) SHEFER, S., S. HAUSER, and E. H. MOSBACH. 7 α -hydroxylation of cholestanol by rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 9: 328-333 (1968).
 - 25) GIELEN, J., J. VAN CANTFORT, and J. RENSON. Biochemical study of cholesterol 7 α -hydroxylase from rat liver. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.*, 76: 930-932 (1968).
 - 26) OGISHIMA, T. and K. OKUDA. An improved method for assay of cholesterol 7 α -hydroxylase activity. *Anal. Biochem.*, 158: 228-232 (1986).
 - 27) CHIANG, J. Y. L. Reverse-phase high-performance liquid chromatography assay of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Methods in Enzymology*, 206: 483-491 (1991).
 - 28) HYLEMON, P. B., E. J. STUDER, W. M. PANDAK, D. M. HEUMAN, Z. R. VLAHCEVIC, and J. Y. L. CHIANG. Simultaneous measurement of cholesterol 7 α -hydroxylase activity by reverse-phase high-performance liquid chromatography using both endogenous and exogenous (4-¹⁴C) cholesterol as substrate. *Anal. Biochem.*, 182: 212-216 (1989).
 - 29) PRINCEN, H. M. G., P. MEIJER, J. KWEKKEBOOM, and H. J. M. KEMPEN. Assay of cholesterol 7 α -hydroxylase activity in rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Anal. Biochem.*, 171: 158-165 (1988).
 - 30) YAMASHITA, H., S. KUROKI, and F. NAKAYAMA. Assay of cholesterol 7 α -hydroxylase utilizing a silica cartridge column and 5 α -cholestane-3 β , 7 β -diol as an internal standard. *J. Chromatogr.*, 496: 255-268 (1989).
 - 31) JUNKER, L. H. and J. A. STORY. An improved assay for cholesterol 7 α -hydroxylase activity using phospholipid liposome solubilized substrate. *Lipids*, 20: 712-718 (1985).
 - 32) IMAIZUMI, K., K. HIRATA, S. YASNI, and M. SUGANO. Propionate enhances synthesis and secretion of bile acids in primary cultured rat hepatocytes via succinyl CoA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56: 1894-1896 (1992).
 - 33) NISHIMOTO, M., O. GOTOH, K. OKUDA, and M. NOSHIRO. Structural analysis of the genes encoding rat cholesterol 7 α -hydroxylase, the key enzyme for bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 266: 6467-6471 (1991).
 - 34) JELINEK, D. F. and D. W. RUSSELL. Structure of the rat gene encoding cholesterol 7 α -hydroxylase. *Biochemistry*, 29: 7781-7785 (1990).
 - 35) NISHIMOTO, M., M. NOSHIRO, and K. OKUDA. Structure of the gene encoding human liver

- cholesterol 7 α -hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1172: 147-150 (1993).
- 36) NOSHIRO, M., M. NISHIMOTO, and K. OKUDA. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human cholesterol 7 α -hydroxylase. *FEBS Lett.*, 268: 137-140 (1990).
- 37) KAI, M., T. ETO, K. KONDO, Y. SETOGUCHI, Y. MAEDA, S. HIGASHI, and T. SETOGUCHI. Synchronous circadian rhythms of mRNA levels and activities of cholesterol 7 α -hydroxylase in the rabbit and rat. *J. Lipid Res.*, 36: 367-374 (1995).
- 38) NOSHIRO, M., M. NISHIMOTO, and K. OKUDA. Molecular cloning of cDNA for cholesterol 7 α -hydroxylase from rat liver microsomes. *FEBS Lett.*, 257: 97-100 (1989).
- 39) 佐野秀人・古市幸生・梅川逸人・高橋孝雄・田中 実. 飽和および不飽和脂肪の継続摂取と絶食 - 再摂取ラットにおける脂質代謝の比較, 平成7年度日本農芸化学会(札幌市). 講演要旨集 pp. 147 (1995).
- 40) JELINEK, D. F., S. ANDERSSON, C. A. SLAUGHTER, and D. W. RUSSELL. Cloning and regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 265: 8190-8197 (1990).
- 41) LI, Y. C., D. P. WENG, and J. Y. L. CHIANG. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver: cloning, sequencing and regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA. *J. Biol. Chem.*, 265: 12012-12019 (1990).
- 42) KARAM, W. G. and J. Y. L. CHIANG. Expression and purification of human cholesterol 7 α -hydroxylase in *Escherichia coli*. *J. Lipid Res.*, 35: 1222-1231 (1994).
- 43) LI, Y. C. and J. Y. L. CHIANG. The expression of a catalytically active cholesterol 7 α -hydroxylase cytochrome P450 in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 266: 19186-19191 (1991).
- 44) COHEN J. C., J. J. CALI, D. F. JELINEK, M. MEHARABIAN, R. S. SPARKES, T. T. LUSIS, D. W. RUSSELL, and H. H. HOBBS. Cloning of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7) and localization to chromosome 8q11-q12. *Genomics*, 14: 153-161 (1992).
- 45) POORMAN, J. A., R. A. BUCK, S. A. SMITH, M. L. OVERTURF, and Ds L. MITCHELL. Bile acid excretion and cholesterol 7 α -hydroxylase expression in hypercholesterolemia-resistant rabbits. *J. Lipid Res.* 34: 1675-1685 (1993).
- 46) CHIANG, J. Y. L., T. P. YANG, and D. P. WANG. Cloning and 5'-flanking sequence of a rat cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1132: 337-339 (1992).
- 47) CRESTANI, M., G. GALLI, and J. Y. L. CHIANG. Genomic cloning, sequencing, and analysis of the hamster cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7). *Archiv. Biochem. Biophys.*, 306: 451-460 (1993).
- 48) TZUNG, KEH-WEEI, K. ISHIMURA-OKA, S. KIHARA, K. OKA, and L. CHAN. Structure of the mouse cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Genomics*, 21: 244-247 (1994).
- 49) VAN CANTFORT, J. and J. E. GIELEN. Comparison of rat and mouse circadian rhythm of cholesterol 7 α -hydroxylase activity. *J. Steroid Biochem.*, 10: 647-651 (1979).
- 50) SUNDSETH, S. S. and D. J. WAXMAN. Hepatic P-450 cholesterol 7 α -hydroxylase. Regulation *in vivo* of the protein and mRNA level in response to mevalonate, diurnal rhythm, and bile acid feedback. *J. Biol. Chem.*, 265: 15090-15095 (1990).
- 51) DANIELSSON, H. Relationship between diurnal variations in biosynthesis of cholesterol and bile acids. *Steroids*, 20: 63-72 (1972).
- 52) LEE, Y. -H., J. A. ALBERTA, F. J. GONZALEZ, and D. J. WAXMAN. Multiple functional DBP sites on the promoter of the cholesterol 7 α -hydroxylase P450 gene, CYP7. Proposed role in diurnal regulation of liver gene expression. *J. Biol. Chem.*, 269: 14681-14689 (1994).
- 53) GIELEN, J., J. VAN CANTFORT, B. ROBAYE and J. RENSON. Rat-liver cholesterol 7 α -hydroxylase. 3. New results about its circadian rhythm. *Eur. J. Biochem.*, 55: 41-48 (1975).
- 54) CLARKE, C. F., A. M. FOGELMAN, and P. A. EDWARDS. Diurnal rhythm of rat liver mRNAs encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Correlation of functional and total mRNA levels with enzyme activity and protein. *J. Biol. Chem.*, 259: 10439-10447 (1984).
- 55) HUFF, J. W., J. L. GILFILLAN, and V. M. HUNT. Effect of cholestyramine, a bile acid binding polymer, on plasma cholesterol and fecal bile acid excretion in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 114 : 352-355 (1963).
- 56) DUCKWORTH, P. F., Z. R. VLAHCEVIC, E. J. STUDER,

- E. C. GURLEY, D. M. HEUMAN, Z. H. BEG, and P. B. HYLEMON. Effect of hydrophobic bile acids on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and mRNA levels in the rat. *J. Biol. Chem.*, 266: 9413-9418 (1991).
- 57) PANDAK, W. M., Y. C. LI, J. Y. L. CHIANG, E. J. STUDER, E. C. GURLEY, D. M. HEUMAN, Z. R. VLAHCEVIC and P. B. HYLEMON. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA and transcriptional activity by taurocholate and cholesterol in the chronic biliary diverted rat. *J. Biol. Chem.*, 266: 3416-3421 (1991).
- 58) BJÖRKHEM, I., G. EGGERTSEN, and U. ANDERSSON. On the mechanism of stimulation of cholesterol 7 α -hydroxylase by dietary cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, 1085: 329-335 (1991).
- 59) SHEFER, S., S. HAUSER, I. BEKERSKY, and E. H. MOSBACH. Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J. Lipid Res.*, 11: 404-411 (1970).
- 60) SHEFER, S., L. B. NGUYEN, G. SALEN, G. C. NESS, S. S. TINT, A. K. BATT, S. HAUSER, and I. RANI. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase by hepatic 7 α -hydroxylated bile acid flux and newly synthesized cholesterol supply. *J. Biol. Chem.*, 266: 2693-2696 (1991).
- 61) NESS, G. C., L. C. PENDLETON, Y. C. LI, and J. Y. L. CHIANG. Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 1150-1156 (1990).
- 62) GIELEN, J. E., J. VAN CANTFORT, and P. KREMERS. Genetic and hormonal regulation of steroid hydroxylases and drug metabolizing enzymes in rat liver. *Arch. Toxicol.*, 36: 255-266 (1976).
- 63) GOODWIN, C. D., B. W. COOPER, and S. MARGOLIS. Rat liver cholesterol 7 α -hydroxylase. Modulation of enzyme activity by changes in phosphorylation state. *J. Biol. Chem.*, 257: 4469-4472 (1982).
- 64) DANIELSSON, H., I. KALLES, and K. WIKVALL. Regulation of hydroxylations in biosynthesis of bile acids. Isolation of a protein from rat liver cytosol stimulating reconstituted cholesterol 7 α -hydroxylase activity. *J. Biol. Chem.*, 259: 4258-4262 (1984).
- 65) KALLES, I. and K. WIKVALL. Role of sulfhydryl groups in catalytic activity of purified cholesterol 7 α -hydroxylase system from rabbit and rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 100: 1361-1369 (1981).
- 66) CHIANG, J. Y. L. and Y. C. LI. Regulation of bile acid synthesis: purification, cloning and regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase. Bile acids as therapeutic agents; from basic science to clinical practice. *Falk Symposium*, 58: 29-44 (1991).
- 67) CHIANG, J. Y. L. and D. STROUP. Identification and characterization of a putative bile acid-responsive element in cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoter. *J. Biol. Chem.*, 269: 17502-17507 (1994).
- 68) THOMPSON, J. F., M. E. LIRA, D. B. LLOYD, L. S. HAYES, S. WILLIAMS, and L. ELSENBOS. Cholesterol 7 α -hydroxylase promoter separated from cyclophilin pseudogene by Alu sequence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1168: 239-242 (1993).
- 69) LEE, Y.-H., J. A. ALBERTA, F. J. GONZALEZ, and D. J. WAXMAN. Multiple functional DBP sites on the promoter of the cholesterol 7 α -hydroxylase P450 gene, CYP7. Proposed role in diurnal regulation of liver gene expression. *J. Biol. Chem.*, 269: 14681-14689 (1994).