

ラット小腸粘膜レチナール還元酵素活性の測定法の確立と 酵素化学的性質

高木茂明・藤井佑子・木村吉伸

(生物資源開発学講座)

Received October 15, 1992

A New Assay Method of Retinal Reductase Activity in Rat Intestinal Mucosa and Its Enzymatic Properties

Shigeaki TAKAGI, Yūko FUJII and Yoshinobu KIMURA

(Department of Bioresources Chemistry)

An in vitro assay method of retinal reductase (RRase) activity in rat intestinal mucosa was established, and the reactions of the retinal in this assay system were examined. The intestinal RRase's main function is to reduce the retinal produced from provitamin A, such as β -carotene, to retinol. When in vitro RRase activity was determined using rat intestinal mucosa homogenate by previously published methods, a poor reproducibility of the specific activity was obtained, because of the rapid inactivation of this activity in homogenate. We found that the RRase activity was moderately stabilized by pre-addition of nicotinamide derivatives, nicotinamide or NADH, to the homogenate buffer. As already reported, GSH was one of the essential cofactors, but it can be replaced by the other thiol reagents, dithiothreitol and mercaptoethanol. EDTA strongly inhibits RRase activity, which is recovered by Ca^{2+} and Mg^{2+} , thus these metal ions may be essential for the activity. Since the K_m value of RRase was $83.3 \mu\text{M}$, more retinal than $200 \mu\text{M}$ was ordinarily used for this assay, in which the over 40 % of substrate retinal was reduced for 120 min incubation. This result suggests that the equilibrium of this reaction largely shifts to the retinal reduction.

緒 言

ラット小腸レチナール還元酵素 (RRase) は1968年に N. H. Fidge¹⁾らによって報告され、opt. pH 6.3で、cofactor として還元型ピリジンヌクレオチドと SH 試薬が必要であり、アルデヒド類を比較的非特異的に還元することを明らかにしている。この酵素はアルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1, 1, 1, 71) に分類されているが、小腸におけるプロビタミン A なかでも β -カロテンの分解とそれに続くレチナールの還元というカロテン→レチナール→レチノール連続反応の主経路に位置しているから、むしろレチナール還元酵素 (Retinal reductase, RRase) と呼ばれるべきものと考えられる。この酵素はラット小腸粘膜の細胞質画分にある。また、ミクロゾーム画分にある RRase が cellular retinol binding protein (II) (CRBP II) に結合したレチノールを強く還元して、生成したレチノールは蛋白質に結合したままであることが報告されており²⁾、これまで報告されて来ている細胞質 RRase と異なるものと考えられる。

我々は緑葉カロテノイドのラット小腸粘膜における酵素分解と続いての一連の吸収・代謝反応を追跡しているが、本報告ではそのうちの β -カロテン分解によって生じたレチナールのレチノールへの反応について、酵素活性の安定化の検討と HPLC を用いた活性測定法の確立し、さらに RRase の酵素化学的性質を明らかにするとともにレチナールの酸化反応についても比較検討した。

材 料 と 方 法

ラット；10週令から14週令のウイスター系メスに CE-2 粉末飼料（日本クレア）を自由摂取させ、と殺前に一夜絶食させた。

酵素試料；ラットをエーテル麻酔後断頭と殺して、すぐ小腸を摘出・切開し生理食塩水で洗浄後、1 mM GSH と 2 mM ニコチンアミド (NA) を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液、pH 6.3 中で粘膜を剝離し、テフロンホモジナイザーによるホモジェネートを 2000 gx 20 min 遠沈して上澄を粗酵素液として供試した。

活性測定方法；レチナールのアセトン溶液に 30 mM コール酸ナトリウムを加えて乳化させ、ロータリーエバポレーターでアセトンを留去し、30 mM コール酸ナトリウムでメスアップし基質として供試した。レチナール濃度はメタノール溶液の $E_{381}^{1\%1\text{cm}}$ 、381 nm = 1530 を用いて測定した。incubation mixture は 2 mM NADH, 2 mM GSH, 200–400 μ M のレチナールと 0.2–0.6 mg/ml 酵素蛋白質及び 12 mM コール酸ナトリウムを含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液、pH 6.3 であり、37°C で反応させた。所定時間後 incubation mixture 1 ml を 4 ml のアセトンに加えて反応を止め、さらに 0.5 ml の 1% BHT エタノール溶液を加えた後 8 ml ヘキサンで 3 回抽出し、また水層は pH 2 にして 8 ml ヘキサンで 3 回抽出し、各抽出液をほとんど乾固まで濃縮してメタノールで 0.5 ml にメスアップして HPLC に供した。蛋白濃度は Lowry 法³⁾に準じて測定した。

HPLC；JASCO 880-PU 型 HPLC システムに JASCO 875-UV 検出器を付け、350 nm でレチノイドを定量した。カラムは Shiseido Capcell Pak C₁₈ SG-120, 4.6 x 250 mm を使い、溶媒はアセトニトリル：1% 酢酸アンモニウム水溶液 = 8 : 2 (initial) のアセトニトリル：イソプロパノール = 6 : 4 (second) に対する割合が 20 min まで 100, 20 min から 30 min にかけて 0 となり、50 min まで続き、51 min に 100 に戻す。流速は 1.1 ml/min。

結 果

1. 酵素の安定性

ラット小腸粘膜 RRase 活性は非常に不安定であり、粗酵素液を 4°C に数時間放置すると活性の 90% 以上が失われる。このような著しい活性低下の原因としてはプロテアーゼによる分解、SH 基の酸化が考えられるが、前者は TLCK, TPCK, ロイペプチンの添加によって変化なく、後者は GSH の存在も効果がないので失活の原因と考えにくい。次にラット小腸粘膜の β -カロテン-15, 15'-dioxygenase 活性安定化に有用であることが分かったニコチンアミド (NA) 又は NADH を 2 mM を添加することによって活性低下を 30–60% に抑えることができた (Table 1)。このことはニコチンアミド基が *in vitro* における本酵素活性の安定化に重要な作用を行うことを示すものである。

2. 活性測定法の確立

1) NADH, GSH 濃度の影響

Cofactor としての NADH と GSH 濃度の RRase 活性に及ぼす影響を調べた結果、酵素蛋白濃度が 0.6 mg/ml のとき NADH と GSH 濃度が共に 1.5 mM のとき最大活性を示した。

Table 1 In vitro stabilization of RRase activity by nicotinamide compounds

Treatment of crude enzyme	Relative activity (%)
No (determination immediately after preparation)	100
No (after standing for 12 hrs at 4 °C)	5
No (after dialysis to buffer ^{a)} for 12 hrs at 4 °C)	2
Addition of 1 mM GSH ^{b)}	4
Addition of 1 mM GSH, 0.7 mM TPCK ^{b)}	7
Addition of 1 mM GSH, 0.7 mM TPCK, 0.9 mM TLCK ^{b)}	8
Addition of 1 mM GSH, 2 mM NA ^{b)}	12
Addition of 1 mM GSH, 2 mM NA, 2 mM NADH ^{b)}	66
Addition of 1 mM GSH NADH ^{b)}	43
Addition of 2 mM NA ^{b)}	5

^{a)}Homogenate buffer, 0.1 M phos. buff., pH 6. 3.

^{b)}Addition to homogenate buffer, and determination after standing for 12 hrs at 4 °C.

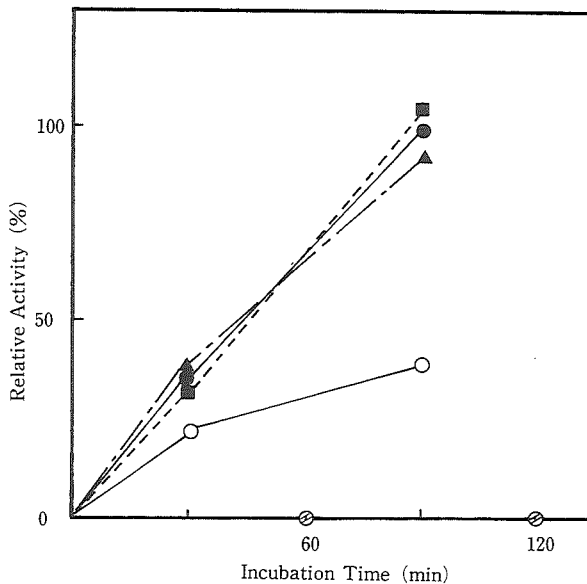


Fig. 1 Effect of thiol reagents on RRase activity. Retinal, 200 μ M; NADH, 2 mM; each thiol reagents, 2 mM; Protein, 0.53 mg/ml. ●—●, GSH+NADH; ■—■, DTT+NADH; ▲—▲, ME+NADH; ○—○, GSH+NADPH; ○—○, GSH+2 mM NA.

したがって、両濃度は各 2 mM で充分であるとした。NADH に代えた NADPH は 2 mM において NADH のときの活性の約 40% を示したことから、ピリジンヌクレオチドとして NADPH は適当でない (Fig. 1)。なお、NA は還元型ピリジンヌクレオチドを置き換えることは出来ない。これらの結果の一部は Fidge ら¹⁾の結果を支持しているが、NA をはじめニコチンアミド基を持つピリジンヌクレオチドが RRase の活性を安定化する効果を示す事柄は新しい知見である。

GSH 以外に SH 試薬としての効果を dithiothreitol (DTT), 及び mercaptoethanol (ME) を用いて調べた。2 mM 濃度において GSH, DTT, ME はいずれも同程度に有効であった (Fig. 1)。システインも有効であることが確認さ

れており¹⁾、これらチオール試薬はいずれも有用であることがわかる。

2) 最適 pH

リン酸カリウム緩衝液を用いて調べた最適 pH は 6.3 であった (Fig. 2)。

3) K_m と V_{max}

RRase 活性の基質濃度依存性を調べた。蛋白質濃度が 0.65 mg/ml のとき V_{max} は 13.3 nmol/hr/mg prot. であり、 K_m は 83.3 μ M であった。したがって、基質レチナール濃度は 200 μ M とした。このような条件における活性の経時的変化、及びそのときの HPLC クロマトグラム

を示す (Fig. 3).

3. 阻害剤及び金属の影響

RRase はリダクターゼであり, Ser, 又は His が H^+ carrier として働いている可能性が考えられるので, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) と diethyl pyrocarbonate (DEP) をもちいて RRase における両アミノ酸残基の活性への影響を調べた. また, 金属要求性も

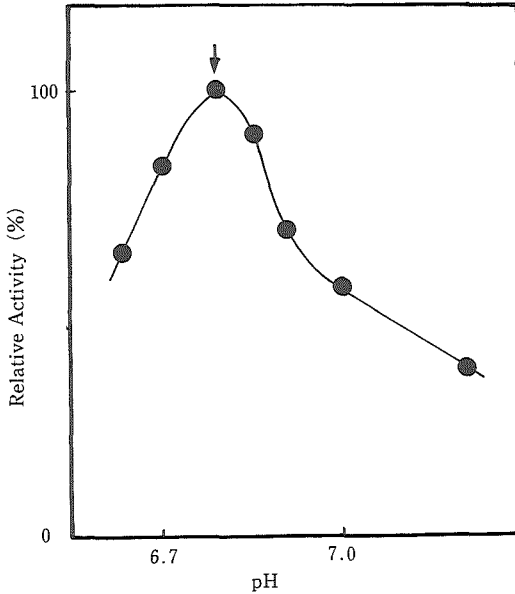


Fig. 2 Effect of pH on RRase activity. Retinal, $342 \mu\text{M}$; GSH, 2 mM; NADH, 2 mM; protein, 0.5 mg/ml. Incubation time, 120 min.

調べた. 結果を Table 2 に示す. PMSF は活性に影響を与えなかったが, DEP は活性を35%低下させたので, 本酵素の活性発現にヒスチジン残基が関与している可能性が示唆された. 0.8 mM EDTA によって活性が86%低下したので, 金属イオンが活性に関与している可能性があり, 調べた金属のうちでは Ca^{2+} と Mg^{2+} の添加は部分的に活性を回復させているから, この両者は本酵素活性に必須であるとも考えられる.

4. ラット小腸粘膜細胞におけるレチナールの還元と酸化

吸収された β -カロテンから生成したレチナールはレチノールへ還元される以外にレチノイン酸への酸化反応を受ける⁴⁾ことが考えられる. 本報告で活性測定方法を確認したレチナール還元反応は小腸粘膜におけるレチナールの代謝の一面を見ているに過ぎない. 小腸ホモジェネート

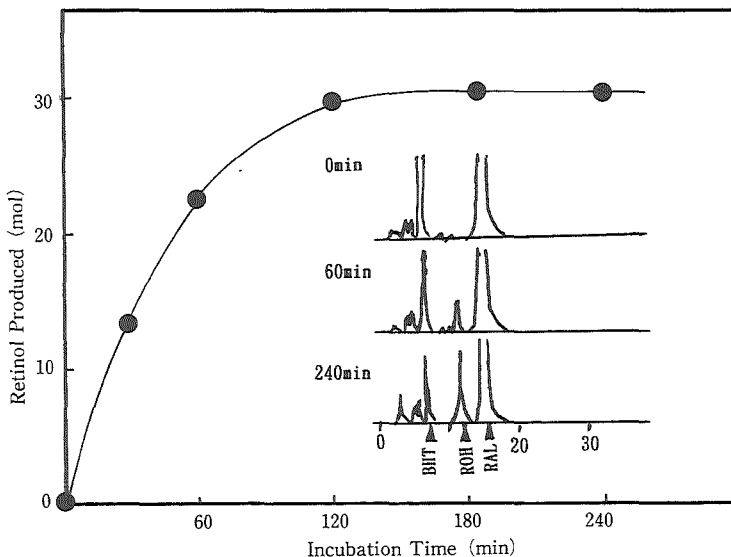


Fig. 3 Time course of rat intestinal RRase. Retinal, $370 \mu\text{M}$; GSH, 2 mM; NADH, 2 mM; protein, 0.78 mg/ml.

Table 2 Effect of some inhibitors and metal ions on rat intestine RRase activity

Inhibitor and metal ion	Relative RRase activity(%)
no	100
0.8 mM PMSF	104
0.2 mM DEP	65
0.8 mM EDTA	14
0.8 mM CaCl ₂	128
0.8 mM EDTA+1.6 mM CaCl ₂	49
0.8 mM MgCl ₂	112
0.8 mM EDTA+1.6 mM MgCl ₂	38
0.8 mM MnCl ₂	111
0.8 mM CoCl ₂	36
0.8 mM MoCl ₂	12
0.8 mM FeCl ₃	0.8
0.8 mM ZnCl ₂	0.5
0.8 mM CuCl ₂	0.0

Table 3 Effect of NADH and NAD⁺ on in vitro reduction and oxidation of retinal in rat intestine crude extract

Pyridine nucleotide	Retinol produced (n mol/hr)	Retinoic acid produced (n mol/hr)	Retinal decreased (n mol/hr)	Yield of products ^{a)} (%)
2 mM NADH	49.5	1.3	136.8	37.0
2 mM NAD ⁺	8.3	8.4	79.7	21.0
no ^{b)}	0.3	0.9	29.1	4.3

^{a)} (Retinol prod. + Retinal prod.) / (Retinal decreased) x 100.

^{b)} No nucleotide added.

を用いた場合ピリジンヌクレオチドとして NADH が存在すればレチノールを生じるが、NAD があればレチノイン酸を生じる⁵⁾。小腸粘膜ホモジェネート中には細胞由来のピリジンヌクレオチドがあると考えられるから、粗酵素を用いて in vitro における β-カロテン由来のレチナールの代謝を考察することは慎重でなければならない。ここでは、RRase の最適 pH、6.3 において各々 NADH 又は NAD を加えた系で反応させたときの生成物を調べた (Table 3 & Fig. 4)。NADH の存在下では、多量のレチノールと少量のレチノイン酸を生じ、NAD の存在下ではレチノイン酸の生成量が増加した。また、NAD 濃度が高くなるとレチノイン酸生成量が増大し、レチノール量が減少している (Fig. 5) から、粗酵素に元から含まれる cofactor がこの反応に影響していることが考えられる。本報告で確立した活性測定法は粗酵素液中の RRase 活性測定に適した条件ではあるが、このようなレチノイン酸生成の副反応が伴っているため、更に詳細な知見は精製酵素を用いた実験によらねばならない。

考 察

β-カロテンが小腸粘膜細胞において、中央解裂により 2 分子のレチナールを生じるのか^{1,6)}、又は 15-15' 以外の結合が切れるのか^{7,8)} (ランダム解裂) について結論が出ていない。生成したレチナールはこの in vitro 実験系において 90 min で 50% 以上がレチノール変換を受けているから、小腸粘膜 RRase の主要な役割がレチナールの還元にあることを強く示唆するもの

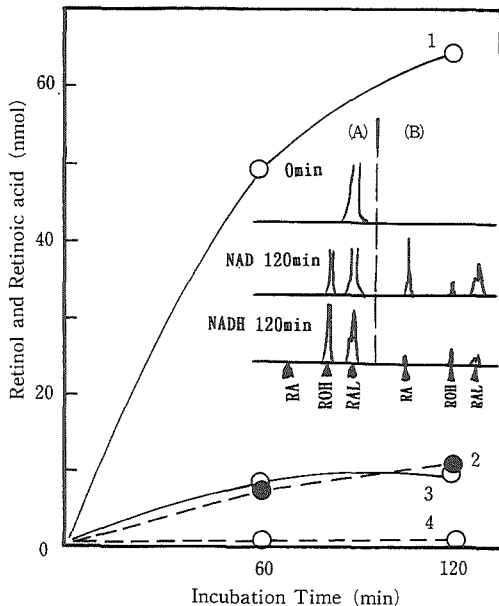


Fig. 4 Effect of pyridinenucleotide (NADH, NAD⁺) on both reduction and oxidation of retinal by rat intestinal enzymes.

Retinal, 250 μ M ; GSH, 2 mM ; NADH, 2 mM ; NAD, 2 mM ; protein, 0.58 mg/ml. (A), chromatogram of retinoids extracted at pH 6.3. (B), chromatogram of retinoids extracted at pH 2.0 after (A) extraction. Curve 1, NADH-retinol ; 2, NAD⁺-retinoic acid ; 3, NAD⁺-retinol ; 4, NADH-retinoic acid.

である。この RRase は細胞質の pH 7.2 において、最適 pH 6.3 の約 1/2 の活性をしめす。このことは RRase が細胞内 pH によって調節を受けていることを示すものであり、レチノール生成後のエステル化と細胞外への移送速度とが密接に結び付いた調節機構の存在することが示唆される。ホモジネートにおける RRase 活性の不安定性についてはまだ充分分かっていない。NA や NADH が活性の安定化に有用である理由については、cofactor のニコチンアミド基が結合する site が蛋白表面にあり、そこにニコチンアミド基が結合していないと RRase 活性を示すための高次構造をとれないためとも考えられる。2 mM NA をホモジナイズ前に加えておくことで、かなりの効果を示しているの、今後、精製酵素を用いることによって、この点が明らかにされていくであろう。

SH 試薬もホモジナイズ時に NA と同時に加えることが必要であり、2 mM 濃度においては GSH, DTT, ME の 3 者がいずれも同じ効果を示しているの、RRase は活性発現に SH 基が必要であることがわかる。

DEP により 35% の活性低下が認められたことから、小腸 RRase は His 残基を活性 site に持つと考えられる。また、EDTA 添加による失活と Ca²⁺ と Mg²⁺ による回復実験から、この酵素が金属酵素であり、金属イオンとして Ca²⁺ と Mg²⁺ が考えられる。そうして、Co²⁺, Mo²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ 及び Cu²⁺ が強い活性阻害を示したが、これは Ca²⁺ 及び Mg²⁺ との競合阻害が考えられる。

粗酵素液に cofactor として NADH を加えるとレチノールが生成し、NAD⁺ を加えるとレチノイン酸と共にレチノールが生成することから、本報告で確立した活性測定条件下ではレチノールの生成が優勢であり、レチノイン酸を生じる酸化酵素活性については RRase とは異なる酵素反応の最適条件があると思われる。しかし、 β -カロテンをラットに投与すると肝臓の全レチノールが急激に増大することから⁹⁾、小腸粘膜におけるレチノールの代謝の流れの方向はレチノールに向いていると考えてよい。今後は β -カロテンを含むカロテノイドとレチノイドの小腸における吸収・分解と移送にかかわる酵素及び輸送蛋白質の関与が調べられれば、上記の事柄は明らかになってくるであろう。

摘 要

ラット小腸粘膜のレチノール還元酵素 (RRase) の in vitro における活性測定法を確立すると共に、その系におけるレチノールの還元及び酸化反応について調べた。小腸の RRase は摂取された β -カロテンなどプロビタミン A から生じるレチノールをレチノールに変える作

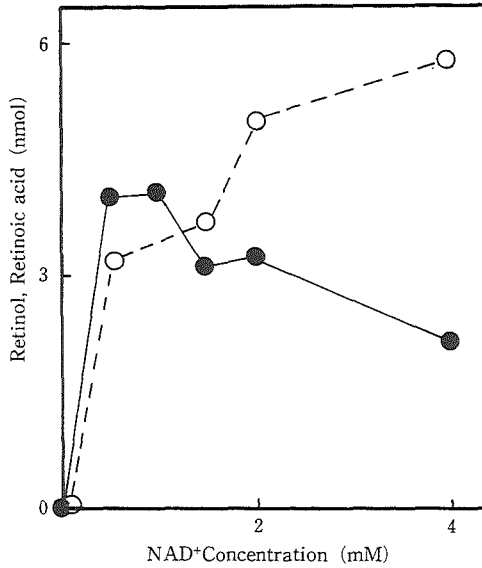


Fig. 5 Effect of NAD⁺ concentration on rat intestinal enzyme activity. Retinal, 220 μ M; GSH, 2 mM; protein, 0.24 mg/ml. Incubation time, 120 min. ○—○, retinoic acid; ●—●, retinol.

用が主たる役割と考えられる酵素である。小腸粘膜ホモジェネートを用いて *in vitro* で RRase 活性を測定すると、比活性の再現性が乏しく、またホモジェネート中での RRase の速やかな失活が起こる。これを防ぐためには、酵素調製用緩衝液にニコチンアミドや NADH などのニコチンアミド誘導体を 2 mM 以上加えるのが有効であることを見いだした。最適 pH は 4.3, cofactor として GSH を要求する点はすでに Goodman らが報告している通りであるが、GSH 以外のチオール試薬も GSH と同様に有効であった。EDTA 添加によって活性を殆ど失うが、Ca²⁺, Mg²⁺の添加で活性が回復することから、これらが金属イオンとして要求されていると思われる。RRase の km 値は 83.3 μ M であり、200 μ M 以上のレチナルを用いて活性測定を行うと 120 min で基質レチナルの 40% 以上が還元される。このことは、レチナル還元反応がレチノール生成に大きく傾いた反応であることを示すもの

である。

文 献

- 1) Fidge N. H. and D. S. Goodman : The enzymatic reduction of retinal to retinol in rat intestine ; *J. Biol. Chem.*, **243**, 4372—4379 (1968)
- 2) Bharati P. K. and D. E. Ong : Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol-binding protein (Type II) by microsomes from rat small intestine ; *J. Biol. Chem.* **263**, 12916—12919 (1988)
- 3) Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **233**, 1407—1411 (1951)
- 4) Napoli J. L. and K. R. Race : Biogenesis of retinoic acid from β -carotene. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17372—17377 (1988)
- 5) Napoli J. L. and K. R. Race : The biogenesis of retinoic acid from retinol by rat tissues *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **255**, 95—101 (1987)
- 6) Lakshman M. R., I. Mychkovsky and M. Attlesey : Enzymatic conversion of all-trans- β -carotene to retinal by a cytosolic enzyme from rabbit and rat intestinal mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9124—9128 (1989)
- 7) Hansen S. and W. Maret : Retinal is not formed *in vitro* by enzymatic contral cleavage of β -carotene. *Biochem.*, **27**, 200—206 (1988)
- 8) Wang X. D., G. W. Tang, J. G. Fox, N. I. Kriskey and R. M. Russell : Enzymatic conversion of β -carotene into β -apocarotenals and retinoids by human, monkey, ferret and rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 8—16 (1991)