

ラット小腸粘膜 β -carotene-15, 15'-dioxygenase の 活性測定法の確立と酵素化学的性質

高木 茂明・渡辺 正徳・中島 明夫・木村 吉伸

(生物資源開発学講座)

Establishment of an Assay Method for β -Carotene-15, 15'-Dioxygenase of Rat Intestine Mucosa and Its Enzymatic Properties

Shigeaki Takagi, Masanori Watanabe, Akio Nakajima
and Yoshinobu Kimura

(Department of Bioresources Chemistry)

A central cleavage at 15, 15' position of β -carotene has not been an established theory in absorption and metabolism, because an exenteric cleavage of β -carotene for producing apocarotenals has been suggested. We considered that this problem was based only on the imperfection of the assay method for β -carotene-15, 15'-dioxygenase (BCDO) activity in vitro, and tried the establishment of this assay method by investigating cofactor activities together with other assay conditions. BCDO activity of rat intestinal mucosa homogenate could not be detected with the known method by Goodman et al. SH reagents (GSH or DTT) and nicotinamide (NA) were essential for BCDO assay. NADH could take place with NA, but the product was retinol instead of retinal. NAD⁺ partially inhibited the enzyme activity. Optimum concentrations of other cofactors were decided under the following conditions : 1 mM GSH, 1 mM Fe²⁺, and 10 mM glycocholate.

From these results, a good reproducibility of the in vitro assay for BCDO activity was obtained, and it was confirmed that the central cleavage theory presented by Goodman was reasonable.

Key words : β -carotene cleavage enzyme, assay method, rat intestine mucosa

緒 言

近年カロテノイドが癌予防に有効であり¹⁾, また活性酸素の消去機能を持つことなどが明らかにされてきている²⁾. 特に, 癌予防においてカロテノイドは化学予防の担い手として位置づけられ, 一般の家庭においても緑黄色野菜に多く含まれる β -カロテン等を積極的に摂取しようとする意識が高まっている. また, 白血球が成熟する過程の前骨髄球の段階で分化が停止する急性前骨髄性白血病 (APL) にレチノイン酸が有効であることが明らかにされるようになり, このためカロテノイドはプロビタミン A としての機

能だけでなく, カロテノイドそのものについての生理機能の重要性が注目されている. しかし, カロテノイドの消化・吸収機構については不明の点が多く残されており, これを明らかにすることはカロテノイドの利用を今後はかるうえで重要と考える.

小腸粘膜における β -カロテン代謝経路については, 15, 15'位における中央開裂によってレチナール2分子が生成する説 (中央開裂説)³⁻⁵⁾と中央以外の部位で開裂を受けアポカロテナールを生成するランダム開裂説⁶⁻⁸⁾がある. この問題はカロテノイド蓄積

Received October 1, 1997

動物と非蓄積動物の存在⁹⁾によってさらに複雑となっている。我々はすでに非蓄積動物であるラットの反転小腸を用いた β -カロテンの吸収代謝機作について報告しているが¹⁰⁾、 β -カロテンは小腸に吸収されたあと素早く中央開裂・還元・エステル化して小腸から輸送されていくことを明らかにした。レチノールの反転小腸内における生成速度は14-36 nmol/g 小腸であり、吸収された β -カロテンのレチノールへの変換率は15-75%であった。これらの結果は中央開裂が優勢であることを示すものと考えられるがランダム開裂の可能性も残っている。

本報告では、ラット小腸粘膜ホモジェネートを用いて、これまで充分には調べられていない β -カロテン-15,15'-dioxygenase (BCDO, E. C. 1.13.11.21)の活性測定法を確立して酵素化学的性質を明らかにすると共に上記2説の開裂部位についての知見を得ることを目的とした。

材料と方法

ラット；10週令から14週令のウイスター系雌ラットに CE-2 粉末飼料 (日本クレア) を自由摂取させ、屠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屠殺して直ちに小腸を摘出・切開し、氷冷生理食塩水で洗浄後、1 mM グルタチオン (GSH) と30 mM ニコチンアミド (NA) を含む氷冷した100 mM K-リン酸緩衝液, pH7.7中で粘膜を剥離し、テフロンホジナイザーによるホモジェネートを0°C, 2000 xg, 20 min 遠沈して上澄を粗酵素液として供試した。

β -カロテン；市販 β -カロテン (和光) をアルミナカラムクロマトグラフィー¹¹⁾によって精製してベンゼン溶液とした後、その0.1mlをとってエタノールで500-1000倍に希釈して Abs.₄₅₃ (E 1% · 1 cm = 2620) を測定し濃度を求めた。その溶液を約400 μ M になるようにベンゼンで希釈してフラスコに入れ、Tween-20を13-15%になるように加えて全体を均質とした後、さらにベンゼンの約1/2容の水を加えて Voltex mixer により乳化 (O/W) させ、ベンゼンを減圧溜去した。残留した Tween-20水溶液可溶性 β -カロテンに0.1 M K-リン酸緩衝液, pH7.7を加えて250 μ M 溶液とする。この溶液0.2mlを0.1 M K-リン酸緩衝液, pH7.7に溶かした下記の化合物を含むコファクター溶液の0.8mlに加えて基質溶液とした：これに含ま

れる各コファクターの濃度は30 mM NA, 10 mM GSH, 12 mM グリココール酸, 0.4mg レシチン, 0.2 mg α -トコフェロール, 1 mM Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ である。

酵素反応；基質溶液1 mlに酵素溶液1 mlを加えて37°Cで反応を行わせる。所定時間後4 mlのアセトンを加えて反応を止め、さらに0.5mlの1%ブチルヒドロキシトルエン (BHT) メタノール溶液を加えて、5 min 後減圧濃縮して0.01% BHT を含むメタノールにて0.5から5 mlに定容として HPLC 試料とする。

HPLC；日本分光880-PU型 HPLC に875-UV 検出器を付けた装置を用いた。カロテノイド分析の場合、カラムはFinepack SIL 300 C₁₈ T-7 (4.6×260 mm) を、溶出は initial solvent (MtOH : H₂O (95 : 5)) と second solvent (アセトン) との濃度勾配溶出で行い、検出は450 nmの吸光度測定により行った。レチノイド分析には資生堂 CAPCELL PAK C₁₈ SG 120 S-5 カラム (4.6×250mm) を使い、溶出は initial solvent がアセトニトリル : 1%酢酸アンモニウム水溶液 (8 : 2), second solvent がアセトニトリル : 2-プロパノール (6 : 4) の濃度勾配溶出で行い、検出は350 nmの吸光度測定により行った。

結 果

活性測定法の確立 Goodman らの報告³⁾に準じて粗酵素液を用い BCDO の活性測定を行ったところ、レチナールとレチノールは共に殆ど検出できなかった。彼らの活性測定条件は次のようである；反応混合物2 ml中に0.1 M K-phos. buff., pH7.7を溶媒として30 μ mol NA, 10 μ mol GSH, 12 μ mol グリココール酸ナトリウム (GC), 400 μ g レシチン, 0.2mg α -トコフェロール, 及び1.0 μ g β -カロテン-¹⁴C (アセトン溶液として供試) を含み、さらに1 mlの小腸粘膜ホモジェネートの可溶性画分を含む。反応は37°C 通気条件で行い、溶媒抽出して β -カロテンとレチナール及びレチノールをアルミナカラムクロマトグラフィーまたは TLC で分画して、レチノイド生成を放射活性で測定している。我々はカロテノイド及びレチノイドの分析を放射活性測定ではなく HPLC によって行ったため、 β -カロテン濃度を25 μ M まで高めて反応させたが、活性を検出することが出来なかった。これは、小腸粘膜ホモジェネートにおける BCDO

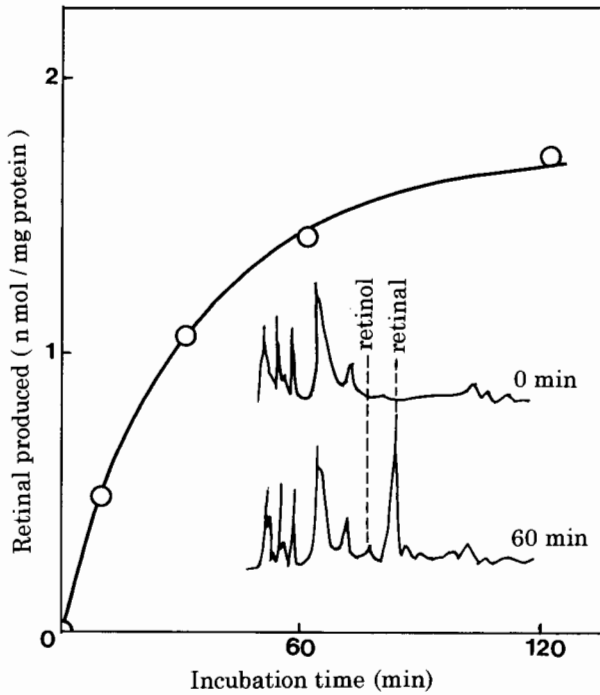


Fig. 1 Time course of rat intestinal BCDO. Protein, 1.2 mg/ml; β -carotene, 44.7 μ M; NA, 30 μ M; GSH, 1 mM; Fe^{2+} , 1 mM.

の失活が原因ではないかと考えた。Goodman ら³⁾は酵素調製についての詳しい説明をしていないため、抽出を含めた酵素調製法を種々検討したところホモジェネート調製用緩衝液に SH 試薬⁵⁾と NA を共に加えることで *in vitro* における BCDO 活性を再現性良く測定出来ることを見いだした。NA の変わりにそのヌクレオチドも有効であることもわかった。我々が確立した活性測定法は方法の項に示されている。

Hansen ら⁶⁾は Goodman らの方法に従って酵素活性を測定した結果 *in vitro* でレチナールは生成しないと報告しており、これが β -カロテンの中央解裂を否定する根拠になっている。また、Singh ら⁷⁾はホモジェネート緩衝液に SH 試薬と NA を加えないで活性測定をしているが、再現性が疑わしい。Lakshman らの報告⁵⁾では SH 試薬として 1 mM ジチオスレート (DTT) を含む緩衝液を酵素調製に用いているが、それだけでは活性は小さく、また活性の経時的低下が著しい。我々はこれに NA またはそのヌクレオチドを加えることによって *in vitro* における BCDO 活性を再現性良く測定出来るようにした。そのときの BCDO 活性の経時変化を Fig. 1 に示す。

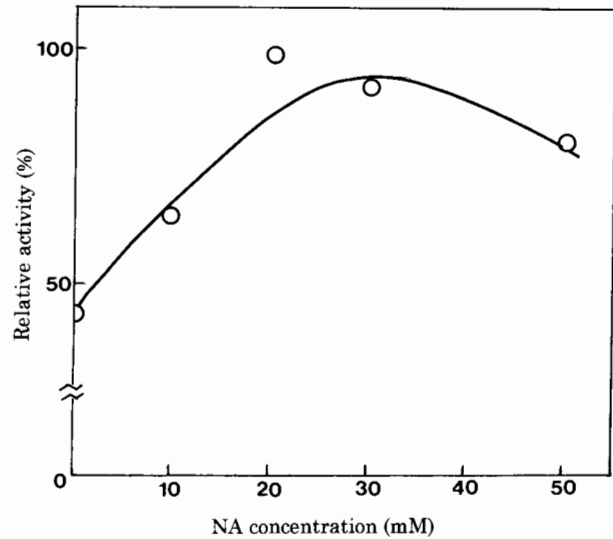


Fig. 2 Effect of NA concentration on rat BCDO. Protein, 0.8 mg/ml; β -carotene, 46 μ M; GSH, 1 mM; Fe^{2+} , 1 mM. Incubation, 120 min at 37 °C. Max. activity, 1.05 nmol retinal/mg protein.

Table 1 Effects of NA, NADH and NAD^+ on rat BCDO activity

Nicotinamide compound*1	Products (nmol/mg protein/120 min)		
	Retinal	Retinol	Retinoic acid
no	tr.	tr.	0
NA	2.03	tr.	0
NADH	1.85	0.20	0
NAD^+	1.00	0	tr.
NA+NADH	2.12	0.1	0
NA+NAD ⁺	1.36	0	0.01

*1, 5 mM respectively.
tr., trace.

BCDO 活性測定系における反応条件の検討

- 1) NA の濃度依存性；酵素調製緩衝液と反応混合物中の NA 濃度を変えて BCDO 活性に及ぼす影響を調べた (Fig. 2)。十分に大きい活性を得るためには 30 mM 以上の NA 濃度を必要とする。
- 2) NA 以外の NA ヌクレオチドが活性に及ぼす影響；NA 以外に NADH 及び NAD^+ の活性に及ぼす影響について調べた (Table 1)。この結果から NA 以外に NADH も BCDO 活性に有用な化合物であったが、 NAD^+ は本酵素活性を阻害した。
- 3) GSH 濃度依存性；GSH を含まない 0.1 M リン酸緩衝液、pH7.7 中で小腸粘膜を剥ぎ取り、それを 2 分して一方は 1 mM GSH を含む緩衝液で、他方は GSH を含まない緩衝液を用いてホモゲナイ

ズして2種類の酵素液を調製し供試した。反応混合物中の GSH 濃度と活性の関係は Fig. 3 のようである。酵素の調製時に GSH を 1 mM 加えておけば高い活性を得ることが出来ると共に、反応混合物に加えた GSH の活性に対する効果が小さいことから、この酵素は活性を示すために SH 基を必要とし、SH 試薬不在の場合には速やかに失活して回復しにくいことを示している。ジチオスライトール (DTT) についても酵素調製時に 2 mM で最大の活性を示した。

- 4) Fe^{2+} の要求性; BCDO は dioxygenase³⁾ であり, dioxygenase は Fe^{2+} を要求することが知られているので, Fe^{2+} の有無による活性を調べた結果から BCDO は Fe^{2+} を必須としていることがわかった (Table 2).
- 5) グリコール酸ナトリウム; 反応混合物中における β -カロテンの乳化剤であるグリコール酸塩の濃度依存性をみると 10 mM で十分であった。

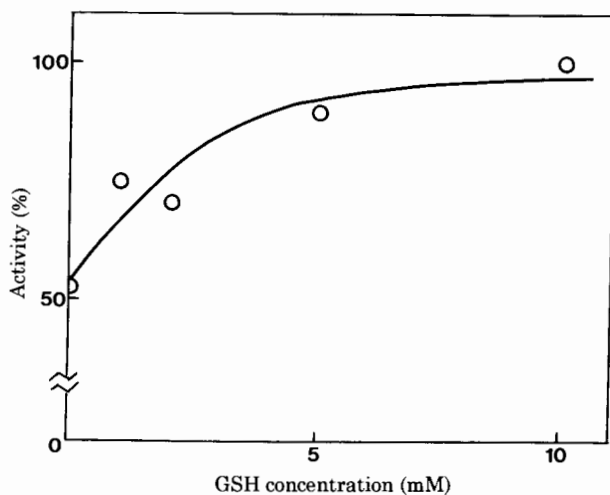


Fig. 3 Effect of GSH on rat intestine BCDO. Protein, 1.1 mg/ml; β -carotene, 50 μ M; NA, 30 μ M; Fe, 1 mM. Incubation, 120 min at 37 °C. Max. activity, 0.64 nmol retinal/mg protein.

Table 2 Effect of ferrous ion on rat BCDO activity

Ferrous compound	Relative activity
no	0
1 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	100
1 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ + 2 mM EDTA	78
3 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ + 2 mM EDTA	114

β -carotene, 25 μ M; NA, 30 mM; GSH, 1 mM

BCDO の酵素学的性質

- 1) 酵素反応の経時的变化 (Time course) ここで確立した BCDO 活性測定法を用いてレチナール生成の経時的变化を調べた (Fig. 1). クロマトグラムにおいて, 大きい量的変動を示しているのはレチナールのピークのみであり, 他に少量のレチノール生成が認められる. このことはレチナールが優先的に β -カロテンから生じていることを示すものであり, ラット小腸粘膜においては β -カロテンが中央解裂していることを in vitro 実験において確認出来た.
- 2) 最適 pH 本酵素の作用最適 pH は 8 前後であり, pH 6 以下及び 9 以上では活性が大きく低下する (Fig. 4). この最適 pH は同じ小腸粘膜に存在するレチナール還元酵素の最適 pH 6.3 と大きく異なっていた. 本実験では pH 7.7 を用いることとした.
- 3) 基質濃度の影響 β -カロテン濃度を変えたときの Lineweaver-Burk プロットを Fig. 5 に示す. その結果, $K_m = 6.82 \mu$ M, $V_{max} = 1.85$ nmol/mg prot/hr であった. 我々の確立した活性測定法では, β -カロテン濃度は約 25 μ M であり, 十分な過剰量を用いている.
- 4) 基質特異性 本酵素は β -カロテンのほか α -カロテンにも作用してレチナールを生成させるが, ゼアキサンチン, カンタキサンチンからのレチナール類縁体の生成は認められなかった.

以上の結果をまとめて今回確立したラット小腸粘膜 BCDO 活性測定法は次のようである (材料と方法の項を参照). ①市販 β -カロテンをアルミナカラムを用いて精製し, Tween-20 水溶液により可溶化して β -カロテン基質溶液を調製する. ②コファクター溶液は 100 mM リン酸緩衝液, pH 7.7 に以下の濃度の化合物を含むものである; 30 mMNA, 10 mM GSH, 10 mMGC, 0.4 mg/ml レシチン, 0.2 mg/ml α -トコフェロール, 2 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$. ③ラット小腸粘膜を氷冷した 100 mM リン酸緩衝液, pH 7.7 (30 mMNA と 1 mM GSH を含む) 中で剥ぎ取り, テフロンホモジナイザーで均質化したあと 0 °C で 2,000 xg, 20 min 遠心沈澱させた上澄を粗酵素液とする. ④小試験管に 0.8 ml のコファクター溶液と 0.2 ml β -カロテン溶液を入れて混合し, 37 °C の水浴に 10 min 浸す. これに予め 37 °C に 5 min 浸しておいた粗酵素液 1 ml を加えてインキュベーションを行わせる. 所定時間後

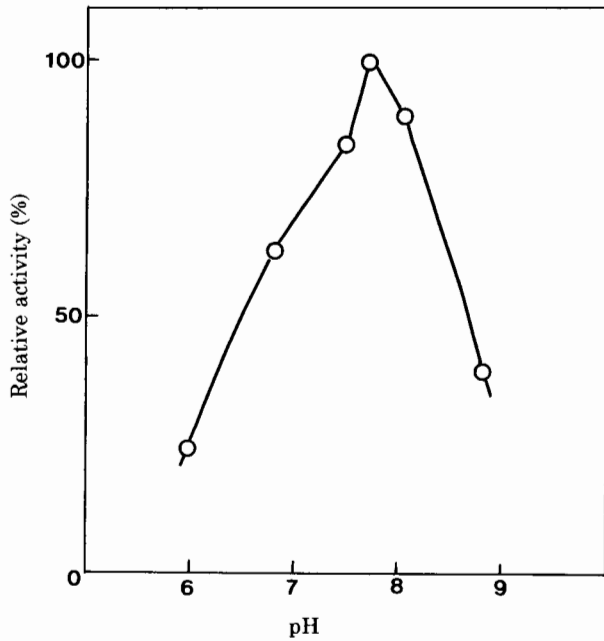


Fig. 4 Optimum pH of rat intestine BCDO. Protein, 0.78 mg/ml; β -carotene, 36 μ M; NA, 30 μ M; GSH, 1 mM; Fe^{2+} , 1 mM. Incubation, 120 min at 37°C. Max. activity, 0.58 nmol/mg protein.

これに 4 ml のアセトンを加えて反応を止め、これに 0.5 ml の 1% BHT メタノール溶液を加えて分液漏斗に移す。8 ml の n-ヘキサンで 3 回抽出し、ヘキサン層を濃縮乾固して 0.01% BHT を含むメタノール溶液とし、HPLC 分析に供する。

考 察

哺乳動物におけるカロテノイドの消化・吸収機作について不明の点が多く残されている。我々はラット反転小腸を用いて β -カロテン開裂様式を調べた結果中央開裂が逐次開裂よりも優勢であるという結論を得ているが¹⁰⁾、さらに *in vitro* において小腸粘膜酵素を用い粘膜吸収後の代謝過程を調べたものである。Goodman ら³⁾が 1960 年代に報告した一連の β -カロテン分解酵素活性測定法には不備な点があり、本酵素活性測定を容易に行えるよう改変を試みた。

BCDO 活性測定に関する報告はこれまでに少なく、Goodman らの報告以外に Singh ら⁴⁾、Hansen ら⁵⁾、Lakshman ら、及び Krinsky ら⁷⁾の報告等があるが、一次分解生成物であるレチナールの生成は僅かであった。このため、 β -カロテンは BCDO によって 15, 15' 部位で切れる中央開裂説と、15, 15' 位以外の箇所

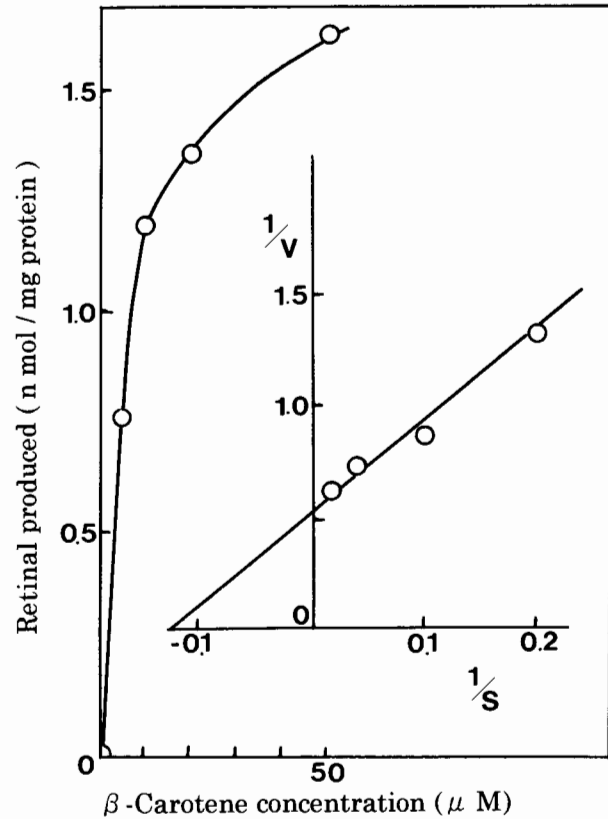


Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of BCDO. Protein, 1.11 mg/ml; NA, 30 μ M; GSH, 2 mM; Fe^{2+} , 1 mM. Incubation time, 90 min.

で切れるランダム開裂説の二説があってもまだはっきりと結論が出ていない。我々は *in situ* における本酵素活性が中央開裂であることを示したこと¹⁰⁾に加えて、*in vitro* における β -カロテンの分解生成物を調べるため BCDO 活性測定を始めたところ、Goodman らの方法では実験の再現性が極めて乏しいことがわかった。BCDO と関連するラット小腸粘膜レチナール還元酵素活性が粘膜ホモジェネート調製後急激に低下して一夜の冷室放置で殆ど活性を失うこと¹²⁾を参考にして、BCDO 活性の再現性が乏しい理由の一つにホモジェネート調製後の酵素の不安定性を挙げて検討した。その結果、ホモジェネート用緩衝液に 1-2 mM ニコチンアミドを加えると再現性のある BCDO 活性測定の出来ることが明らかとなった。NADH または NAD^+ も NA の代わりをするが、NADH の場合レチノールへの還元反応が進み、 NAD^+ 添加ではレチノイン酸への反応も考えられるので、NA が最適であると思われる。ニコチンアミド基が酵素の安定化と活性発現を起こさせる機構は不明で

あるが、NADH や NAD⁺ も効果を示すことから、NA 基がタンパク質に結合することによる酵素タンパク質の高次構造の安定化が関与しているのであろう。また、一般に dioxygenase に要求される Fe²⁺ は BCDO 活性発現にも必須であった。

以上のように酵素活性測定法の確立のうへ、BCDO の酵素の性質を 2, 3 調べた。V_{max} が 1.85 nmol/mg prot/hr であり、この値は文献値⁵⁾と比較して 10 倍以上大きいものとなっており、本報告で確立した活性測定法が従来のものより優れていることを示すものである。今後、酵素の精製がすすめば β-カロテンの開裂機構を含めカロテノイドの吸収・代謝機構がさらに明らかになると考えられる。

要 約

β-カロテンの 15, 15' 位における中央開裂は β-カロテンの吸収・代謝において確立された説となっていない。それは分子端からの逐次開裂も示唆されているからである。このもんだいは *in vitro* における β-carotene-15, 15'dioxygenase (BCDO) 活性測定法が不完全なために起こったのではないかと考え、補因子活性をそれ以外の測定条件と共に検討し、測定方法の確立を目指した。ラット小腸粘膜ホモジェネートの BCDO 活性は Goodman らの既知の方法によっては検出出来なかった。SH 試薬 (GSH, または DTT) 及びニコチンアミド (NA) は BCDO 活性測定に必要であった。NA は NADH に置き換えられるが、生成物はレチナールの代わりにレチノールであった。NAD⁺ は BCDO 活性を一部阻害する。他の補因子の最適濃度をこれらの条件下で決め、1 mM GSH, 1 mM Fe⁺, 10 mM glycocholate とした。

これらの結果から、*in vitro* における BCDO 活性測定が再現性良く行われることになり、Goodman らによって提示された β-カロテンの中央開裂が確認できた。

References

1) Weisburger J. H. ; Nutritional Approach to Cancer

- Prevention with Emphasis on Vitamins, Antioxidants, and Carotenoids. *Am J. Clin. Nutr.*, **53**, 226S (1991)
- 2) Stahelin H. S., K. F. Gey, M. Eichholzer and E. Ludin, β-Carotene and cancer prevention ; the basal study ; *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 265-269 (1991)
- 3) Goodman D. S. and J. A. Olson, The conversion of all-trans β-carotene into retinol ; *Method in Enzym.*, **15**, 462-475 (1969)
- 4) Singh H. and H. R. Cama ; Enzyme Cleavage of Carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 49-61 (1974)
- 5) 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)
- 6) Hansen S. and W. Maret, Retinal is not formed *in vitro* by enzymatic central cleavage of β-carotene ; *Biochem. J.*, **27**, 200-206 (1988)
- 7) Wang X. D. , G. W. Tang, J. G. Fox, N. I. Krinsky and R. M. Russel, Enzymatic conversion of β-carotene into β-apocarotenals and retinoids by human, monkey, and rat tissues ; *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 8-16 (1991)
- 8) Wang X. D., N. I. Krinsky, G. Tang and R. M. Russell, Retinoic acid can be produced from exenteric cleavage of β-carotene in human intestinal mucosa ; *Arch. Biochem. Biophys.*, **293**, 298-304 (1992)
- 9) Goodwin T. W. ; *The Biochemistry of the Carotenoids*. Chapman & Hall (London & New York) vol. II, p173 (1984)
- 10) 高木茂明, 広尾禎久, 大田守也, 木村吉伸, ラット反転小腸における β-カロテンの吸収と代謝挙動 ; *日本栄養・食糧学会誌*, **47**, 287-293 (1994)
- 11) Liaaen-Jensen S. ; *Carotenoids*, Birkhauser Verlag Basel. p 61-72 (1971)
- 12) 高木茂明, 藤井祐子, 木村吉伸, ラット小腸粘膜レチノール還元酵素活性測定法の確立と酵素化学的性質 ; *岡山大学農学術報告*, **81**, 1-7 (1993)