

## トピックス

## レチニルエステルを加水分解する酵素に関する最近の知見

## Recent knowledge on enzymes that hydrolyze retinylesters

## はじめに

ビタミン A は、その吸収、輸送、貯蔵、利用に際して、さまざまに形を変えることが知られている。そのうち、レチニルエステル (RE) からレチノール (ROL) への変換

は、(1) 小腸における食餌由来 RE の吸収、(2) 肝実質細胞におけるキロミクロンレムナント (CMR)-RE 複合体の処理、(3) 肝星細胞における貯蔵 RE の動員、および (4) 肝臓外ビタミン A 標的細胞における CMR-RE 複合体の処理の 4 つの場で主に行われる (図 1)。本稿では、

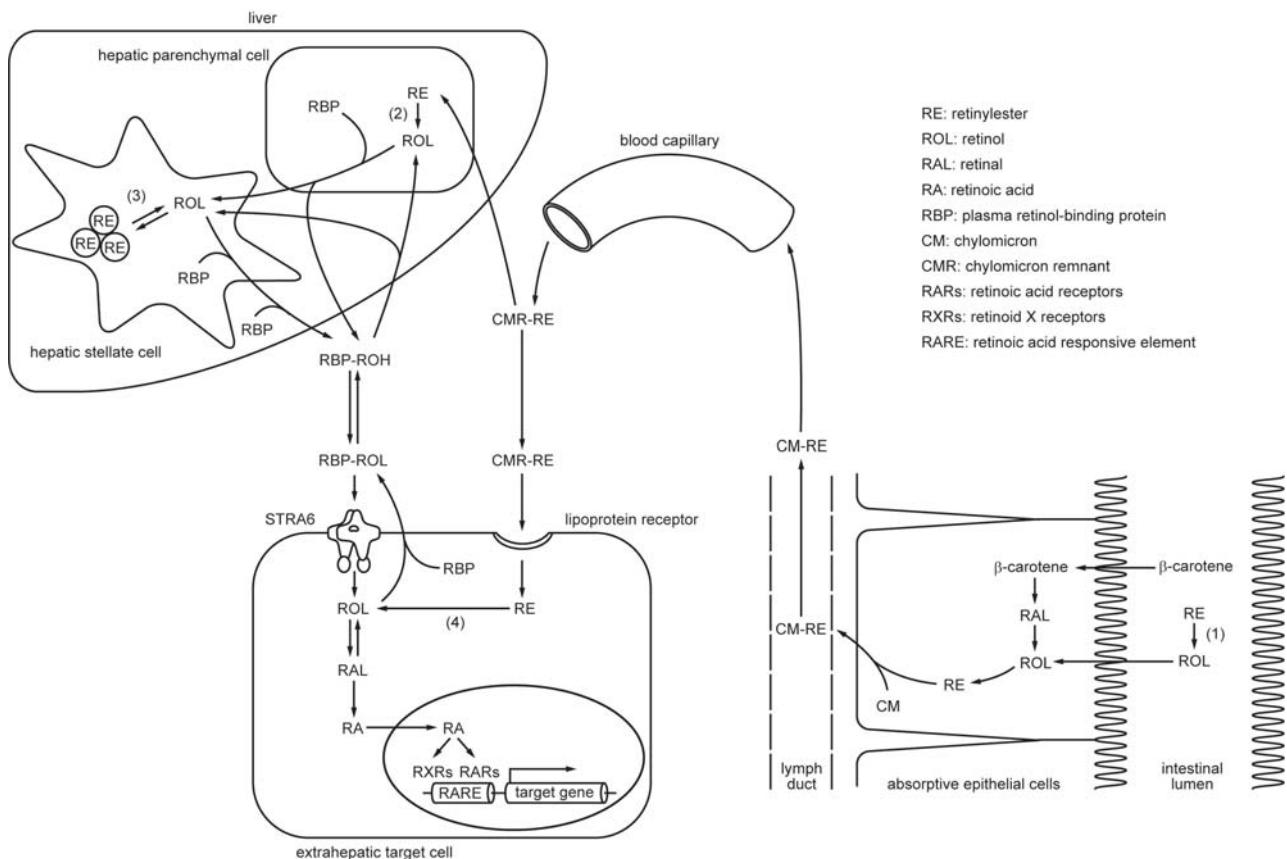


図 1 生体内のビタミン A の吸収、輸送、貯蔵、利用

小腸におけるビタミン A の吸収、リンパ管と血管を経由したビタミン A の輸送、肝臓におけるビタミン A の貯蔵、および肝臓外標的細胞におけるビタミン A の利用を図示した。Blomhoffら<sup>23)</sup>の文献を参考に、現在までの知見を考慮して作成した。レチニルエステル (RE) がレチノール (ROL) に変換される過程を (1) から (4) で示し、本文と対応させた。内容の詳細については本文を参照のこと。RE: レチニルエステル, ROL: レチノール, RAL: レチナル, RA: レチノイン酸, RBP: 血漿レチノール結合タンパク質, CM: キロミクロン, CMR: キロミクロンレムナント, RARs: レチノイン酸受容体, RXRs: レチノイド X 受容体, RARE: レチノイン酸応答配列。

これら4つの場ではたらくRE加水分解酵素(REH)に関するこれまでの知見を紹介する。

### (1) 小腸ではたらくREH

動物性食餌由来REは、小腸内腔で加水分解されROLとして吸収上皮細胞に取り込まれる。ラット腭液のクロマトグラフィー画分から、2つのREH活性ピークが検出された<sup>1)</sup>。一方のピークは、胆汁酸塩存在下でミセルを形成したREを基質とし、もう一方のピークは、胆汁酸塩非存在下のREを基質とした。これら2つの酵素活性ピークの実体は、それぞれ、カルボキシエステルリパーゼ(CEL)および腭臓トリグリセリドリパーゼ(PTL)と呼ばれるものであった<sup>2)</sup>。その後、CEL遺伝子ノックアウトマウスが解析され、コレステロールエステルの吸収が減少した一方で、REの吸収は変化しなかったことから、CELは生理的条件下のRE吸収には関与しないと考えられた<sup>3)4)</sup>。

PTLとアミノ酸配列が類似したタンパク質として、腭リパーゼ関連タンパク質(PLRP)1および2が報告された<sup>5)</sup>。生理的条件下でPLRP1はREH活性を示さなかったが、PLRP2はREH活性を示した<sup>6)</sup>。腭液に含まれるこれらの酵素は、腭臓の外分泌細胞で合成・分泌され、腭管を經由して総胆管と合流し、ファーター乳頭から十二指腸へと放出される。

一方、ラット小腸粘膜上皮細胞の刷子縁(小腸吸収上皮細胞の頂端面に存在する微絨毛を光学顕微鏡で観察したときの呼称)から、REHが精製された<sup>7)</sup>。この酵素は、ホスホリパーゼ活性を持ち、ラット刷子縁ホスホリパーゼB(PLB)に対する抗体と交差反応したことから、刷子縁PLBそのものと考えられた。以上をまとめると、現在、小腸における食餌由来REの吸収に関与するREHは、PTL、PLRP2およびPLBであると考えられている<sup>8)</sup>。

### (2) 肝実質細胞のREH

小腸で吸収されたビタミンAは、キロミクロン(CM)-RE複合体としてリンパ管に分泌される。CM-REはやがて体循環に入り、毛細血管内腔に存在するリポタンパク質リパーゼ(LPL)により中性脂肪を失い、CMR-REとなる。放射能標識したROLを用いてCMR-RE複合体を作成し、ラット大腿静脈に注射して放射能の分布を追跡したところ、放射能は、まず肝実質細胞に取り込まれ、その後、肝星細胞を含む非実質細胞へ輸送された<sup>9)</sup>。このとき、肝実質細胞から血漿レチノール結合タンパク質(RBP)-ROL複合体が分泌され、エンドサイトーシスによって、肝星細胞に取り込まれると

考えられた<sup>10)</sup>。

肝実質細胞はCMR-REを取り込んでRBP-ROLを分泌することから、肝実質細胞にREHの存在が予想された。実際、肝臓ホモジネートに、胆汁酸塩依存的REH活性と、胆汁酸塩非依存的REH活性が検出された<sup>11)</sup>。胆汁酸塩依存的REH活性の実体は、CELそのものであると考えられたが、CEL遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスで肝臓のREH活性に差がなかったことから、肝実質細胞のREH活性にCELは寄与しないと考えられた<sup>4)12)</sup>。

一方、胆汁酸塩非依存的REH活性は、肝臓ホモジネートのミクロソーム画分のサブ画分である細胞膜およびエンドソーム画分で検出された<sup>13)</sup>。この胆汁酸塩非依存的REH活性には、中性ではたらくものと、酸性ではたらくものが存在した。中性REHは、細胞膜や初期エンドソームなどの中性オルガネラではたらく、酸性REHは、後期エンドソームや多胞体(初期エンドソームから後期エンドソームへの物質の輸送を担う小胞)などの酸性オルガネラではたらくと考えられた。その後、ラット肝臓ミクロソーム画分から2つの中性REH活性ピークが精製され、それぞれエステラーゼ(ES)-10およびES-2に相当すると推定された<sup>14)</sup>。ES-10は三量体ではたらく細胞内カルボキシエステラーゼであり、ES-2は血漿中に存在する分泌型のカルボキシエステラーゼである<sup>15)</sup>。同じ研究グループによるその後の研究により、ES-10は酸性環境でも酵素活性を有し、ES-2よりはるかに大量に肝臓に発現していることから、肝実質細胞のREHとして主要な役割を果たしていると提唱された<sup>16)</sup>。別の研究グループにより、ラット肝臓カルボキシエステラーゼのREH活性が調べられ、レチニルパルミテートを基質とした場合、ES-4が主要なREHであることが示された<sup>17)</sup>。このREH活性は、細胞膜画分で最も強く検出された。さらに別の研究グループにより、ラット肝臓ミクロソーム画分から、6つの異なるカルボキシエステラーゼが精製され、そのうち、ES-10、ES-4、ES-3を含む5つのカルボキシエステラーゼにREH活性が検出された<sup>18)</sup>。また、マウス肝実質細胞の小胞体に局在するES-22もREH活性を持つことが示された<sup>19)</sup>。

上記の酵素のほかに、分泌タンパク質であるLPLや肝性リパーゼ(HL)が、肝実質細胞へのCMRの取り込みのみならず、CMR中のREの加水分解を担う可能性が指摘されている<sup>12)20)</sup>。HLは肝臓特異的な酵素で、肝実質細胞や肝類洞内皮細胞に発現している<sup>21)</sup>。LPLは脂肪組織や心臓、筋肉で主に発現しているが、肝実質細胞やクッパー細胞、肝星細胞にも発現している<sup>21)</sup>。

肝実質細胞において、REHにより生成されたROLはリソソームではなく、小胞体へと輸送された<sup>13)22)</sup>。小胞体へ輸送されたROLは、RBPと結合し、ゴルジ装置を經由して細胞外へ分泌され、肝星細胞へ運ばれると考えられた<sup>23)</sup>。しかしながら、RBP遺伝子ノックアウトマウスで肝星細胞のビタミンA貯蔵が正常であったことから、肝実質細胞から肝星細胞へのビタミンAの輸送に、RBPは関与しないとの説もある<sup>24)25)</sup>。

以上述べたように、肝実質細胞のREHは数多く報告されているが、それぞれの酵素の生理的な意義の解明は今後の課題である。

### (3) 肝星細胞のREH

肝星細胞に取り込まれたROLはREに変換され、脂質滴に貯蔵される。貯蔵REは必要に応じてROLに再変換され動員されるが、血中ではRBP-ROL複合体として存在する。肝臓RBPの98%は肝実質細胞画分に存在するが、肝星細胞画分にも0.7%存在する<sup>26)</sup>。肝星細胞からROLが動員される際、この微量のRBPを利用してRBP-ROL複合体を形成・分泌するのか、あるいは血中のアポRBPが肝星細胞からROLのみを受け取り、細胞外でRBP-ROLを形成するのか、明らかになっていない<sup>27)</sup>。

小腸ではたらくREHとして前述したPLRP2は腭酵素であるが、マウスを暗環境で飼育し明-暗サイクルを破綻させると、肝臓でPLRP2遺伝子の発現が誘導された<sup>28)</sup>。また、ビタミンA欠乏によっても肝臓PLRP2遺伝子の発現が誘導された<sup>29)</sup>。ラット肝星細胞株HSC-T6において、PLRP2のプロコリパーゼであるCLPS遺伝子をノックダウンしたところ、細胞内のREが増加したことから、PLRP2は肝星細胞のREHと考えられた<sup>29)</sup>。

脂肪細胞の主要なトリグリセリドリパーゼは、ホルモン感受性リパーゼ(HSL)と脂肪細胞特異的トリグリセリドリパーゼ(ATGL)である<sup>30)</sup>。これらの酵素が肝星細胞のREHである可能性が検討された。HSLは脂肪組織でREH活性を持つことが示された<sup>31)</sup>。しかしながら、HSLの肝星細胞での発現量はわずかであった<sup>21)</sup>。一方、ATGLは肝星細胞にも発現し、REH活性を示した<sup>32)</sup>。

パタチン様ホスホリパーゼドメイン含有3(PNPLA3)のI148M多型が、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の危険因子であることが見いだされた<sup>33)</sup>。PNPLA3のI148M多型により、肝線維化も促進することが示唆された<sup>34)</sup>。ヒトPNPLA3は肝星細胞に発現し、REH活性を示した<sup>35)</sup>。また、I148M変異により、

PNPLA3のREH活性は減弱した<sup>35)</sup>。一方、マウスPNPLA3は、ヒトPNPLA3と異なりREH活性を示さなかった<sup>32)</sup>。

最近、ATGL、HSL、PNPLA3の阻害剤を用いた実験により、これらの酵素は主要なREHではなく、未知の律速酵素が存在するのではないかとする報告がなされた<sup>36)</sup>。肝星細胞のREHの解明も、今後に残された課題のひとつといえる。

### (4) 肝臓外標的細胞のREH

CMR中のREの少なくとも3分の2は肝臓で処理されるが、腎臓や貯蔵脂肪、骨格筋、小腸、肺、副腎などにも移行する<sup>37)</sup>。骨髄や脾臓も、血中からのCMR-REの除去に寄与する<sup>38)</sup>。肝臓外標的細胞でのREの取り込みと加水分解に関して、Wathneら<sup>39)</sup>は、急性前骨髄球性白血病細胞株HL60にCMR-RE複合体を添加すると、増殖抑制、分化誘導を引き起こすことを示した。このことは、HL60細胞がREを取り込み、レチノイン酸へと変換する能力を持つことを示している。HL60のREHは明らかになっていないが、脂肪組織や骨格筋、心臓において、LPLがCMR-REの取り込みを促進すると報告されている<sup>40)41)</sup>。

### おわりに

ビタミンAの吸収、輸送、貯蔵、利用に際してはたらくREHに関する現在の知見を概説した。生体内でROLをREに変換する酵素は、1つないし2つ(レシチン：レチノールアシル基転移酵素(LRAT)およびジアシルグリセロールアシル基転移酵素(DGAT)1)に集約されている<sup>42)44)</sup>。これに比して、REHの実体に関する知見の複雑さは際立っている。地道な研究によって、徐々にその実体が明らかになっていくことが期待される。

**Key words** : vitamin A, hydrolase, esterase, liver, intestine

Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine 3-25-8, Nishi-Shimbashi, Minato-ku, Tokyo, 105-8461, Japan

Yoshihiro Mezaki

東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座

目崎 喜弘

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2021.8.24 受付)

## 文 献

- 1) Erlanson C, Borgström B (1968) The identity of vitamin A esterase activity of rat pancreatic juice. *Biochim Biophys Acta* **167**, 629-631
- 2) Harrison EH (2005) Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* **25**, 87-103
- 3) Weng W, Li L, van Bennekum AM, Potter SH, Harrison EH, Blaner WS, Breslow JL, Fisher EA (1999) Intestinal absorption of dietary cholesteryl ester is decreased but retinyl ester absorption is normal in carboxyl ester lipase knockout mice. *Biochemistry* **38**, 4143-4149
- 4) van Bennekum AM, Li L, Piantedosi R, Shamir R, Vogel S, Fisher EA, Blaner WS, Harrison EH (1999) Carboxyl ester lipase overexpression in rat hepatoma cells and CEL deficiency in mice have no impact on hepatic uptake or metabolism of chylomicron-retinyl ester. *Biochemistry* **38**, 4150-4156
- 5) Giller T, Buchwald P, Blum-Kaelin D, Hunziker W (1992) Two novel human pancreatic lipase related proteins, hPLRP1 and hPLRP2. Differences in colipase dependence and in lipase activity. *J Biol Chem* **267**, 16509-16516
- 6) Reboul E, Berton A, Moussa M, Kreuzer C, Crenon I, Borel P (2006) Pancreatic lipase and pancreatic lipase-related protein 2, but not pancreatic lipase-related protein 1, hydrolyze retinyl palmitate in physiological conditions. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 4-10
- 7) Rigtrup KM, Kakkad B, Ong DE (1994) Purification and partial characterization of a retinyl ester hydrolase from the brush border of rat small intestine mucosa: probable identity with brush border phospholipase B. *Biochemistry* **33**, 2661-2666
- 8) Quadro L, Giordano E, Costabile BK, Nargis T, Iqbal J, Kim Y, Wassef L, Hussain MM (2020) Interplay between  $\beta$ -carotene and lipoprotein metabolism at the maternal-fetal barrier. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1865**, 158591
- 9) Blomhoff R, Helgerud P, Rasmussen M, Berg T, Norum KR (1982) In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7326-7330
- 10) Senoo H, Smeland S, Malaba L, Bjerknes T, Stang E, Roos N, Berg T, Norum KR, Blomhoff R (1993) Transfer of retinol-binding protein from HepG2 human hepatoma cells to cocultured rat stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3616-3620
- 11) Harrison EH, Gad MZ (1989) Hydrolysis of retinyl palmitate by enzymes of rat pancreas and liver. Differentiation of bile salt-dependent and bile salt-independent, neutral retinyl ester hydrolases in rat liver. *J Biol Chem* **264**, 17142-17147
- 12) D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS (2011) Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients* **3**, 63-103.
- 13) Harrison EH, Gad MZ, Ross AC (1995) Hepatic uptake and metabolism of chylomicron retinyl esters: probable role of plasma membrane/endosomal retinyl ester hydrolases. *J Lipid Res* **36**, 1498-1506
- 14) Sun G, Alexson SE, Harrison EH (1997) Purification and characterization of a neutral, bile salt-independent retinyl ester hydrolase from rat liver microsomes. Relationship To rat carboxylesterase ES-2. *J Biol Chem* **272**, 24488-24493
- 15) Mentlein R, Ronai A, Robbi M, Heymann E, von Deimling O (1987) Genetic identification of rat liver carboxylesterases isolated in different laboratories. *Biochim Biophys Acta* **913**, 27-38
- 16) Linke T, Dawson H, Harrison EH (2005) Isolation and characterization of a microsomal acid retinyl ester hydrolase. *J Biol Chem* **280**, 23287-23294
- 17) Mentlein R, Heymann E (1987) Hydrolysis of retinyl esters by non-specific carboxylesterases from rat liver endoplasmic reticulum. *Biochem J* **245**, 863-867
- 18) Sanghani SP, Davis WI, Dumauil NG, Mahrenholz A, Bosron WF (2002) Identification of microsomal rat liver carboxylesterases and their activity with retinyl palmitate. *Eur J Biochem* **269**, 4387-4398
- 19) Schreiber R, Taschler U, Wolinski H, Seper A, Tamegger SN, Graf M, Kohlwein SD, Haemmerle G, Zimmermann R, Zechner R, Lass A (2009) Esterase 22 and beta-glucuronidase hydrolyze retinoids in mouse liver. *J Lipid Res* **50**, 2514-2523
- 20) Harrison EH (2000) Lipases and carboxylesterases: possible roles in the hepatic utilization of vitamin A. *J Nutr* **130**, 340S-344S
- 21) Mello T, Nakatsuka A, Fears S, Davis W, Tsukamoto H, Bosron WF, Sanghani SP (2008) Expression of carboxylesterase and lipase genes in rat liver cell-types. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 460-464
- 22) Blomhoff R, Eskild W, Kindberg GM, Prydz K, Berg T (1985) Intracellular transport of endocytosed chylomicron [3H]retinyl ester in rat liver parenchymal cells. Evidence for translocation of a [3H]retinoid from endosomes to endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **260**, 13566-13570
- 23) Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR (1990) Transport and storage of vitamin A. *Science* **250**, 399-404
- 24) Quadro L, Blaner WS, Hamberger L, Novikoff PM, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman ME, Colantuoni V (2004) The role of extrahepatic retinol binding protein in the mobilization of retinoid stores. *J Lipid Res* **45**, 1975-1982
- 25) Blaner WS, Li Y, Brun PJ, Yuen JJ, Lee SA, Clugston RD (2016) Vitamin A Absorption, Storage and Mobilization. *Subcell Biochem* **81**, 95-125
- 26) Blaner WS, Hendriks HF, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL, Goodman DS (1985) Retinoids, retinoid-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J Lipid Res* **26**, 1241-1251
- 27) Blomhoff R, Green MH, Norum KR (1992) Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Annu Rev Nutr* **12**, 37-57
- 28) Zhang J, Kaasik K, Blackburn MR, Lee CC (2006) Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. *Nature* **439**, 340-343
- 29) Pang W, Zhang Y, Wang S, Jia A, Dong W, Cai C, Hua Z, Zhang J (2011) The mPlrp2 and mClps genes are involved in the hydrolysis of retinyl esters in the mouse liver. *J Lipid Res* **52**, 934-941



- 30) Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386
- 31) Ström K, Gundersen TE, Hansson O, Lucas S, Fernandez C, Blomhoff R, Holm C (2009) Hormone-sensitive lipase (HSL) is also a retinyl ester hydrolase: evidence from mice lacking HSL. *FASEB J* **23**, 2307-2316
- 32) Taschler U, Schreiber R, Chitraju C, Grabner GF, Romauch M, Wolinski H, Haemmerle G, Breinbauer R, Zechner R, Lass A, Zimmermann R (2015) Adipose triglyceride lipase is involved in the mobilization of triglyceride and retinoid stores of hepatic stellate cells. *Biochim Biophys Acta* **1851**, 937-945
- 33) Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH (2008) Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* **40**, 1461-1465
- 34) Bruschi FV, Claudel T, Tardelli M, Caligiuri A, Stulnig TM, Marra F, Trauner M (2017) The PNPLA3 I148M variant modulates the fibrogenic phenotype of human hepatic stellate cells. *Hepatology* **65**, 1875-1890
- 35) Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, Pingitore P, Hedfalk K, Mancina RM, Burza MA, Indiveri C, Ferro Y, Montalcini T, Maglio C, Dongiovanni P, Fargion S, Rametta R, Pujia A, Andersson L, Ghosal S, Levin M, Wiklund O, Iacovino M, Borén J, Romeo S (2014) PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Hum Mol Genet* **23**, 4077-4085
- 36) Wagner C, Hois V, Pajed L, Pusch LM, Wolinski H, Trauner M, Zimmermann R, Taschler U, Lass A (2020) Lysosomal acid lipase is the major acid retinyl ester hydrolase in cultured human hepatic stellate cells but not essential for retinyl ester degradation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1865**, 158730
- 37) Goodman DW, Huang HS, Shiratori T (1965) Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. *J Lipid Res* **6**, 390-396
- 38) Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, Innerarity TL (1989) Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. *J Biol Chem* **264**, 17931-17938
- 39) Wathne KO, Norum KR, Smeland E, Blomhoff R (1988) Retinol bound to physiological carrier molecules regulates growth and differentiation of myeloid leukemic cells. *J Biol Chem* **263**, 8691-8695
- 40) Blaner WS, Obunike JC, Kurlandsky SB, al-Haideri M, Piantadosi R, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ (1994) Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J Biol Chem* **269**, 16559-16565
- 41) van Bennekum AM, Kako Y, Weinstock PH, Harrison EH, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ, Blaner WS (1999) Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester. *J Lipid Res* **40**, 565-574
- 42) Ruiz A, Winston A, Lim YH, Gilbert BA, Rando RR, Bok D (1999) Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem* **274**, 3834-3841
- 43) Orland MD, Anwar K, Cromley D, Chu CH, Chen L, Billheimer JT, Hussain MM, Cheng D (2005) Acyl coenzyme A dependent retinol esterification by acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1. *Biochim Biophys Acta* **1737**, 76-82
- 44) Yen CL, Monetti M, Burri BJ, Farese RV Jr (2005) The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters. *J Lipid Res* **46**, 1502-1511