

## 小腸のビタミン A 吸収・代謝の調節機構に関する研究

～ニワトリヒナ十二指腸とヒト小腸様細胞株 Caco-2 BBe 細胞を用いた場合～

山口 範晃<sup>1)</sup>・高瀬 幸子<sup>2)</sup>・駿河 和仁<sup>1)</sup>

The study of vitamin A absorption and metabolism in chick  
duodenum and human intestinal Caco-2 BBe cells

Noriaki YAMAGUCHI<sup>1)</sup>, Sachiko TAKASE<sup>2)</sup>, Kazuhito SURUGA<sup>1)</sup>

### 要 約

ビタミン A は様々な生理作用を有し、小腸内のビタミン A 吸収・代謝に関わる各種の酵素やタンパク質についての重要性が報告されてきたが、これらの発現がどのような機序で調節されているかは十分に解明されていない。これまでに著者らは、ニワトリヒナ十二指腸及びヒト小腸上皮吸収細胞様細胞株 Caco-2 BBe 細胞を用い、小腸のビタミン A 及び  $\beta$  カロテン吸収・代謝の中心的な役割を演ずる  $\beta$  カロテン中央開裂酵素 ( $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase: BCMO 1) の生理的役割とその発現調節メカニズムについて追究した。その結果、ニワトリヒナの十二指腸の孵化後数日において、レチナールからレチノイン酸を生成する酵素 retinal dehydrogenase type 1 (RALDH 1) と BCMO 1 遺伝子発現が共に増大した。また、ニワトリ十二指腸や Caco-2 BBe 細胞において、各種ホルモンにより BCMO 1 発現が亢進した。これらの研究成果は、小腸内のビタミン A の生体内利用効率や恒常性の調節機構について新たな基礎的知見を提示できると考えている。

キーワード：ビタミン A、BCMO 1、ニワトリ十二指腸、Caco-2 BBe 細胞

### 1. 序 論

脂溶性ビタミンの一種であるビタミン A は細胞の分化・増殖、形態形成、視覚作用、免疫系などにおいて重要な役割を演じ、レチノール、レチナール、レチノイン酸とその類縁化合物を総称してレチノイドと呼ばれている<sup>1)</sup>。ビタミン A の供給源として、いくつかの動物性食品に含まれるレチニルエステルと、主に緑黄色野菜や果物などの植物性食品に含まれるカロテノイドの中で、ビタミン A の前駆体プロビタミン A ( $\beta$  カロテン、 $\alpha$  カロテン、クリプトキサンチン) がある。ビタミン A は、ヒトなどの哺乳類の生体内では合成できないので、これらの食品から摂取しなければならない。現在、温暖化による気候変動や世界人口の急増により、将来的に食糧不足が予測される。現実として、食糧不足に悩まされている開発途上国ではビタミン A の摂取不足による夜盲症や免疫力の低下、さらに乳幼児の発育不良や栄養失調は深刻な問題とされている<sup>2),3)</sup>。その一方で、ビタミン A 過剰摂取による全身倦怠感、頭痛、吐き気などの脳圧亢進などの症状も見られ<sup>4)</sup>、特に妊婦の場合には、胎児奇形が問題になっている<sup>5)</sup>。

そのため、上記のようなビタミン A 栄養問題を改善するためにも、食事から如何にしてビタミン A を効率よく生体内で利用し、その生理作用を発揮するかを究明する必要がある。筆者らはこれまでにヒトの小腸

1) 長崎県立大学 看護栄養学部 栄養健康学科

2) 浜松大学 健康プロデュース学部 健康栄養学科

上皮吸収細胞をモデルとしたヒト小腸上皮吸収細胞様細胞株 Caco-2 BBe 細胞やニワトリ十二指腸を用いて、ビタミン A 吸収・代謝に関わる研究を行ってきた。本稿は、小腸のビタミン A 及び  $\beta$  カロテン吸収・代謝の中心を担う  $\beta$  カロテン中央開裂酵素 ( $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase: BCMO1) に関して、これまでの筆者らの研究成果の概要をまとめた。

## 2. 小腸ビタミン A の吸収・代謝

食餌から摂取されたビタミン A (レチニルエステル) および  $\beta$  カロテンは、図 1 に示すように吸収、代謝、輸送される。食餌由来のカロテノイド(主に  $\beta$  カロテン)は複合ミセル内に取り込まれ、scavenger receptor class B type I (SR-BI) を介して小腸粘膜上皮細胞内に取り込まれる<sup>6)</sup>。この  $\beta$  カロテンは、そのままカイロミクロンに組み込まれ、腸管膜リンパ管へと輸送される経路と、 $\beta$  カロテン中央開裂酵素( $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase: BCMO1) により 2 分子のレチナールに転換する経路がある<sup>7),8)</sup>。 $\beta$  カロテンから転換されたレチナールは、細胞性レチノール結合タンパク質タイプ II (cellular retinol-binding protein type II: CRBP II) と複合体を形成し<sup>9)</sup>、レチナール還元酵素 (retinal reductase) によりレチノール-CRBP II 複合体へ転換される<sup>10),11)</sup>。レチノール-CRBP II 複合体は、長鎖脂肪酸とレシチンレチノールアシル転移酵素 (lecithin retinol acyltransferase: LRAT) によってレチニルエステルを形成する<sup>12),13)</sup>。このレチニルエステルは、マイクロソームトリグリセリド転送タンパク (microsomal triglyceride transfer protein: MTP) の作用によって、他の脂質 (トリグリセリド、リン脂質、コレステロールなど) とともにカイロミクロンに取り込まれて、リンパ管へ輸送され、血液を循環して、各組織へ運ばれる<sup>14)</sup>。一方、レチナール脱水素酵素 (retinal dehydrogenase: RALDH) により、レチナールからビタミン A の生理活性を有するレチノイン酸へ生成される<sup>15)</sup>。9-*cis* レチノイン酸や *all-trans* レチノイン酸は、核内受容体レチノイン酸レセプター (retinoic acid receptor: RAR) 及びレチノイド X レセプター (retinoid X receptor: RXR) のリガンドとして結合することで生理作用を発揮し、様々な遺

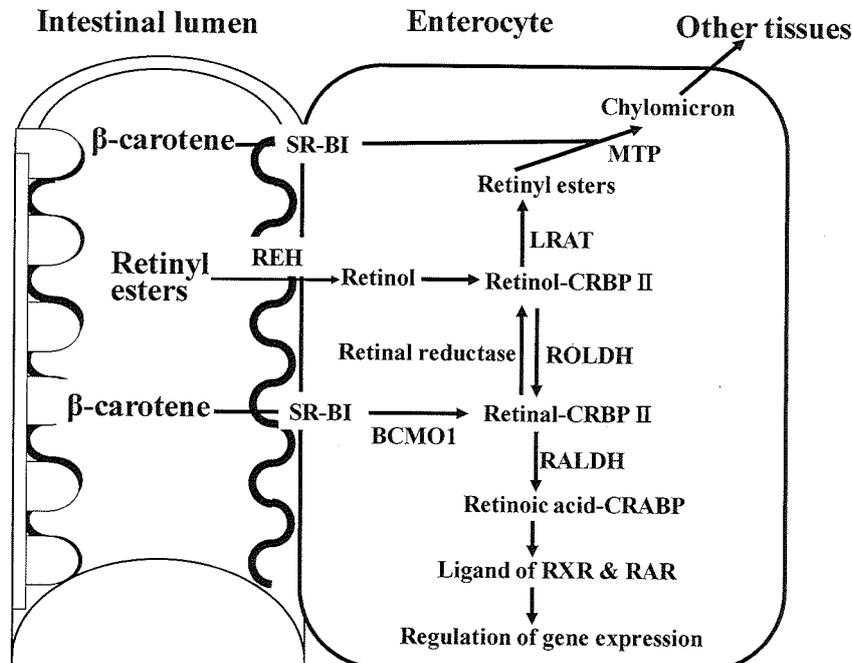


図 1 小腸のビタミン A 及び  $\beta$  カロテンの吸収・代謝

BCMO1:  $\beta$ -carotene 15'15'-monooxygenase, SR-BI: scavenger receptor class B type I, CRBP II: cellular retinol-binding protein type II, LRAT: lecithin retinol acyltransferase, MTP: microsomal triglyceride transfer protein, ROLDH: retinol dehydrogenase, RALDH: retinal dehydrogenase, CRABP: cellular retinoic acid-binding protein, REH: retinylester hydrolase, RAR: retinoic acid receptor, RXR: retinoid X receptor.

伝子発現の転写因子として機能する<sup>16)</sup>。なお、これらのレチノイン酸の中で、9-*cis* レチノイン酸は RAR 及び RXR による転写活性を有するが、*all-trans* レチノイン酸は RAR に対してだけ親和性を示す<sup>17),18)</sup>。一方、食餌由来のレチニルエステルは、レチニルエステル水解酵素 (retinylester hydrolase: REH) によって加水分解されてレチノールとなり、小腸粘膜上皮細胞内に吸収される<sup>19)</sup>。吸収されたレチノールはレチノール-CRBPII 複合体を形成し、レチノール脱水素酵素 (retinol dehydrogenase: ROLDH) によりレチノイン酸へ合成する経路と、LRAT によって再びレチニルエステルを形成し、各組織へ運搬される。

### 3. BCMO 1 発現の生理的意義

BCMO 1 は脊椎動物の細胞質に存在する酵素であり、1 原子の酸素が  $\beta$  カロテンの 15, 15' 位に付加し、エポキシ化され、1 分子の水分子の付加により開裂し、その結果 2 分子のレチナールが生成される<sup>20)</sup>。多くの脊椎動物において、BCMO 1 は小腸上皮吸収細胞で高い酵素活性を示し、その他に肝臓や、肺、脳、腎臓などにも酵素活性が確認されている<sup>21),22)</sup>。また、各種の BCMO 1 遺伝子が同定されたことで、BCMO 1 遺伝子の発現性や発現調節の機序などの遺伝子工学を用いた研究が進められた。ヒトやマウスの BCMO 1 遺伝子の 5' 上流プロモーター解析を行ったところ、脂質代謝に関わる転写因子ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ : PPAR $\gamma$ ) と RXR の二量体の応答領域が確認された<sup>23),24)</sup>。Lindqvist らは、ヒト BCMO 1 遺伝子の変異型 (アミノ酸配列 170 番目のスレオニンがメチオニンに置換した型) では、 $\beta$  カロテンのビタミン A への転換効率が著しく減少し、体内に  $\beta$  カロテンが過剰に蓄積され、低ビタミン A 状態に陥る可能性について報告した<sup>25)</sup>。さらに、BCMO 1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究では、低ビタミン A レベルに陥るだけではなく脂質代謝の恒常性が崩壊し、脂肪肝を発症することも報告されている<sup>26)</sup>。このように、BCMO 1 は体内の  $\beta$  カロテン及びビタミン A レベルを調節するだけでなく、脂質代謝の調節にも関わっていることが示された。

BCMO 1 はビタミン A 恒常性において重要な生理的な調節機能を持ち、 $\beta$  カロテンを過剰に摂取してもビタミン A 過剰による疾患は発生しないと言われている。その根拠とされている研究として、過剰のレチノイン酸やレチニルエステルを投与した場合、ラット小腸の BCMO 1 酵素活性は低くなり、逆に RAR アンタゴニストやシトクローム P450 (レチノイン酸を異化する酵素) の活性化剤を投与したラットでは BCMO 1 活性は上昇した<sup>27)</sup>。最近の研究では、ビタミン A 恒常性を調節する因子の一つとして、小腸に特異的に発現する Intestine specific homeodomain (Isx) が、BCMO 1 及び SR-BI の発現を負に調節し、さらに体内のビタミン A レベルに応じてこれらの遺伝子発現も変動することが報告された<sup>28)</sup>。このことから、Isx は小腸吸収細胞内の  $\beta$  カロテンの取り込みからレチノイドへの転換までの調節に関わる因子であることを示唆している。

著者らの BCMO 1 発現に関わるこれまでの研究は<sup>29)-31)</sup>、ニワトリ胚及びヒナの腸を用いて、発達過程における BCMO 1 遺伝子発現性の変動を解析した。さらに、各組織の成熟化にレチノイン酸の生理作用が必須であり、その合成酵素である RALDH と BCMO 1 遺伝子発現の関連性を検討した。また、ニワトリ小腸及びヒトの小腸上皮吸収細胞をモデルとした Caco-2 BBe 細胞にグルココルチコイドや甲状腺ホルモンを投与し、BCMO 1 遺伝子の発現性を検討した。

#### 4. ニワトリヒナ及びヒト小腸上皮吸収細胞様細胞株 Caco-2 BBe 細胞の BCMO 1 発現に関する研究

##### (1) ニワトリヒナ十二指腸の発達過程における BCMO 1 と RALDH 1 遺伝子発現の関連性

ニワトリ胚およびヒナの発育や各組織発達において、ビタミン A (レチノイン酸) は必須の栄養素である。孵化後 2 日までのニワトリヒナは餌を摂取せず、腸管腔に入り込んだ卵黄から  $\beta$  カロテンまたはレチノールが供給されてレチノイン酸を合成していると考えられている<sup>32)</sup>。また、ニワトリヒナの十二指腸を用いた研究では、BCMO 1 酵素活性は孵化した数日後に急激に上昇し、十二指腸の絨毛細胞の成熟過程期に BCMO 1 酵素活性が誘導されることを報告した<sup>33),34)</sup>。そこで著者らは、孵化前から孵化数日後のニワトリ胚及びヒナの十二指腸を用いて、BCMO 1 遺伝子発現の変動について解析し、さらにレチナールからレチノイン酸を生成する酵素 RALDH 1 と BCMO 1 遺伝子発現の変動との関連性を検討した<sup>30)</sup>。その結果、ニワトリヒナの孵化後において、BCMO 1 遺伝子発現量が増大した (図 2)。同様に、RALDH 1 遺伝子発現量も急激に孵化後に増大した。また、血清  $\beta$  カロテン濃度もニワトリ孵化前後において急激に上昇することが報告されている<sup>32)</sup>。これらのデータから、孵化後数日間は BCMO 1 によって  $\beta$  カロテンから転換されたレチナールからレチノイン酸生成が活発であることが示唆される。このように、孵化前後のニワトリヒナの BCMO 1 発現の生理的役割として、未成熟の小腸を発達させるために、ビタミン A (レチノイン酸) 供給に寄与していることが考えられる。

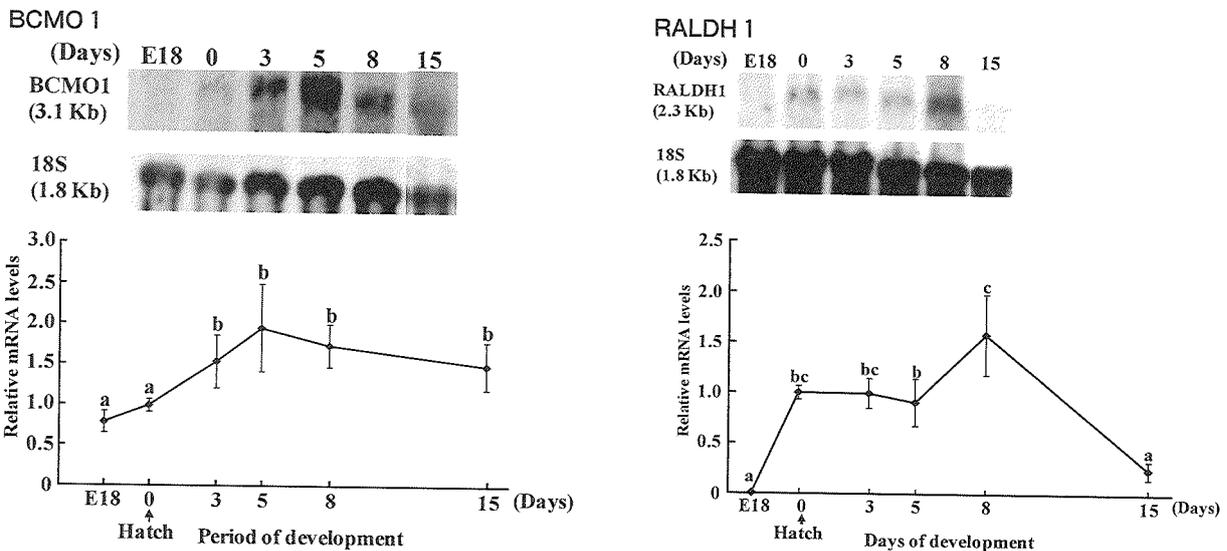


図 2 ニワトリヒナ孵化前後の十二指腸 BCMO 1 と RALDH 1 遺伝子発現の変動

BCMO 1 と RALDH 1 mRNA 発現量は、ノーザンプロット法により解析し、18S rRNA 発現量で補正した相対値をグラフ化した (平均値  $\pm$  SEM, n=11-12)。E18は18日胚 (孵化 2 日前) を示す。異なるアルファベットは有意差を示す ( $p < 0.05$ , Duncan's test)。

##### (2) ニワトリ十二指腸の BCMO 1 遺伝子発現に及ぼすヒドロコルチゾンの影響

副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドや甲状腺ホルモンは、小腸上皮吸収細胞の分化・成熟において重要な生理的役割を果たしている<sup>35)</sup>。先述したように、ニワトリヒナ十二指腸の BCMO 1 発現は孵化後急激に上昇する。従って、ニワトリヒナ十二指腸において、これらのホルモンの作用によって BCMO 1 発現がどのように影響するかを検討した<sup>30)</sup>。まず、孵化前後のニワトリヒナを用いて、ニワトリの生理的グルココルチコイドである血清ヒドロコルチゾン (hydrocortisone: HC) 濃度変動を測定したところ、BCMO 1 発現変動と類似していることが分かった (図 3A)。次に、ニワトリ胚 (受精卵) に HC 投与したところ、孵化

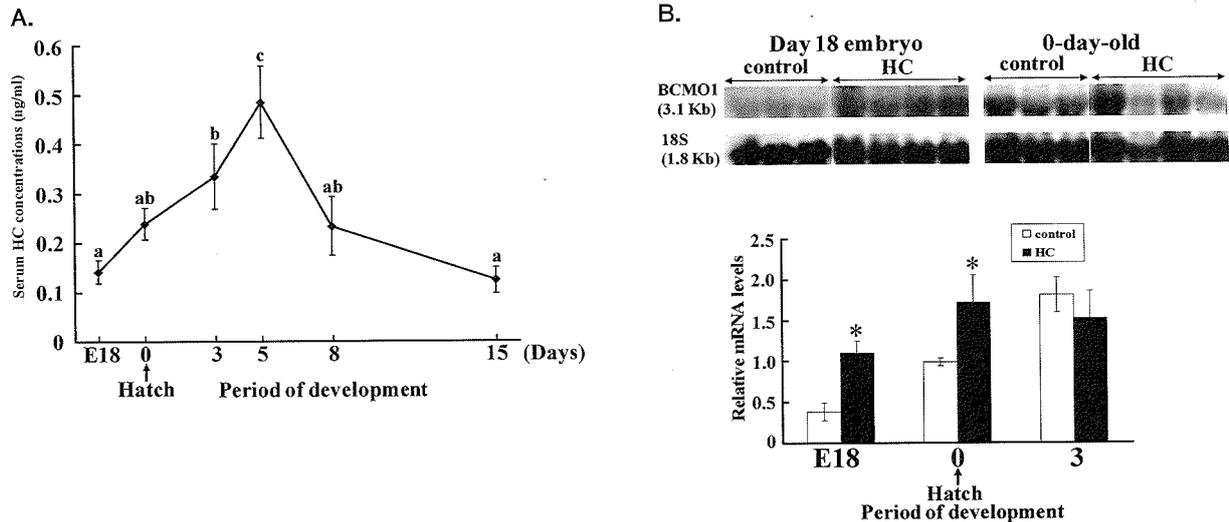


図3 ハイドロコルチゾンは孵化前後のニワトリヒナ十二指腸の BCMO 1 遺伝子発現を誘導する

(A)ニワトリヒナ孵化前後の血清ハイドロコルチゾン (HC) の濃度変動を ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) によって測定した (平均値±SEM, n=9-15)。異なるアルファベットは有意差を示す ( $p < 0.05$ , Duncan's test)。(B)ハイドロコルチゾンによるニワトリヒナ孵化前後の十二指腸 BCMO 1 遺伝子発現への影響。BCMO 1 と RALDH 1 mRNA 発現量は、ノーザンブロット法により解析し、18S rRNA 発現量で補正した相対値をグラフ化した (平均値±SEM, n=6-9)。E18は18日胚 (孵化2日前)を示す。\*:  $p < 0.05$  (Student's t-test)。

2日前 (ニワトリ胚18日) 及び孵化当日で BCMO 1 遺伝子発現量が増大した (図3B)。これらの結果から、HCは BCMO 1 発現を遺伝子レベルで誘導することが示唆された。また、HC投与群では、甲状腺ホルモンの活性型であるトリヨードサイロニン ( $T_3$ ) の血清濃度も上昇していた<sup>29)</sup>。これらの結果から、孵化前後におけるニワトリ十二指腸の BCMO 1 発現誘導には HC 及び  $T_3$  などのホルモン因子によって調節されている可能性を考えた。

### (3) Caco-2 BBe 細胞のビタミン A 吸収・代謝に及ぼす $T_3$ の影響

Caco-2 BBe 細胞は、Caco-2細胞からサブクローニングされた細胞である。小腸吸収細胞は、未分化のクリプト細胞から増殖し、絨毛先端へと分化・成熟する過程を有する特徴がある。Caco-2 BBe 細胞はヒトの小腸吸収細胞の形態学的に良く似た特徴を示すモデルとして用いられている<sup>36)</sup>。また、BCMO 1 酵素活性は Caco-2細胞では検出できないが、Caco-2 BBe 細胞では BCMO 1 酵素活性及び遺伝子発現量ともに Caco-2細胞に比べてかなり高い<sup>6), 31), 37)</sup>。従って、著者らはヒト小腸吸収細胞のビタミン A 及び  $\beta$  カロテン吸収・代謝に関わる研究では Caco-2 BBe 細胞を用いている。

上記の結果のように、ニワトリヒナ十二指腸での BCMO 1 発現は、HC や  $T_3$  の影響によって亢進される可能性を示した。そこで、著者らは Caco-2 BBe 細胞を用いて、 $T_3$  及び合成グルココルチコイドであるデキサメタゾンによる BCMO 1 発現への影響について検討した<sup>31)</sup>。その結果、デキサメタゾンで処理した Caco-2 BBe 細胞では BCMO 1 発現は変動しなかったが、 $T_3$  で処理した場合、濃度依存的に BCMO 1 遺伝子発現量が増大した (図4A)。さらに Caco-2 BBe 細胞が未分化の状態よりも、コンフルエント7日後の成熟した状態で顕著に BCMO 1 遺伝子発現量が増大することが分かった (図4B)。また、転写阻害剤であるアクチノマイシン D と  $T_3$  で同時に処理した細胞中では、 $T_3$  による BCMO 1 発現量の増大を抑制した (図4C)。これらの結果から、BCMO 1 発現は転写レベルで  $T_3$  によって調節される可能性を示した。同時に  $T_3$  で処理した Caco-2 BBe 細胞は、LRAT 遺伝子発現量も増大したことから (図4D)、 $T_3$  は  $\beta$  カロテンからビタミン A の転換、更にはその腸管吸収に関わる遺伝子発現を調節している可能性を示した。しかし、BCMO 1 発現が  $T_3$  をリガンドとする甲状腺ホルモン受容体 (thyroid hormone receptor: TR) を介して直接調節されているかは明

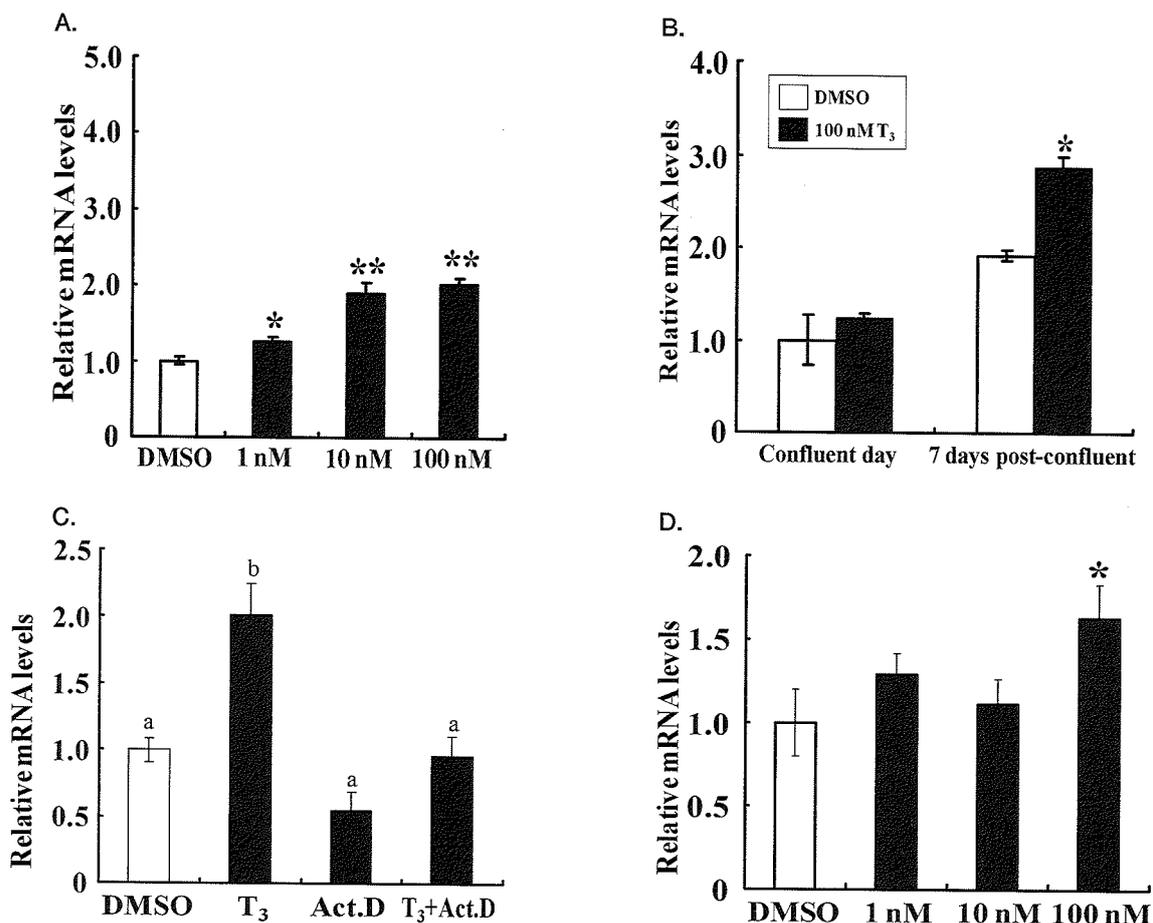


図4 Caco-2 BBe 細胞の T<sub>3</sub>による BCMO 1 及び LRAT 遺伝子発現への影響

(A)Caco-2 BBe 細胞をジメチルスルホキシド (DMSO) 及び 1-100nM T<sub>3</sub>で24時間処理したとき BCMO 1 遺伝子発現量。(b)コンフルエント (細胞が培養器面を覆い尽くした状態) 当日及びコンフルエント 7 日後の Caco-2 BBe 細胞を DMSO 及び 100nM T<sub>3</sub>で24時間処理したときの BCMO 1 遺伝子発現量。(C)Caco-2 BBe 細胞を DMSO、100nM T<sub>3</sub> 及び 5 µg/ml アクチノマイシン D で24時間処理したときの BCMO 1 遺伝子発現量。(D)Caco-2 BBe 細胞を DMSO 及び 100nM T<sub>3</sub>で24時間処理したときの LRAT 遺伝子発現量。(A)–(D)の BCMO 1 及び LRAT 遺伝子発現量は、リアルタイム RT-PCR によって測定し、内部標準 ribosomal protein, large, P 0 (RPLP 0) で補正した相対値をグラフ化した (平均値±SEM, n=4)。\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 (Student's t-test)。

確になっていない。今後、BCMO 1 プロモーター領域内の TR 結合領域の同定や TR 発現ベクターを用いたトランスフェクションなどの遺伝子工学的な手法を用いた更なる研究が必要とされる。

このように、ホルモンによる BCMO 1 遺伝子発現の調節機序はヒトやニワトリなどの種によって異なることが考えられるが、小腸でのビタミン A 吸収・代謝を調節する上でこれらのホルモンは必要不可欠であると考えられる。

以上のように、我々はニワトリヒナおよび Caco-2 BBe 細胞を用いて BCMO 1 発現の調節機序について研究してきた。ニワトリヒナの発達のために、十二指腸での BCMO 1 発現はビタミン A (レチノイン酸) 供給源のための重要な生理的役割を有していることが考えられる。また、ニワトリと Caco-2 BBe 細胞を用い、各種ホルモンを投与した結果から、ニワトリとヒトの間には BCMO 1 発現誘導のメカニズムに種差があるかもしれない。それについては更に追究していく必要がある。現在、我々は、Caco-2 BBe 細胞を用いた研究を中心に進展しており、Hepatocyte nuclear factor-4α (HNF-4α) 及び HNF-1α による BCMO 1 遺伝子発現が遺伝子転写レベルで調節されていることを見出した。これらの転写因子やホルモンは、互いに競合または相互的に BCMO 1 発現を制御することで、小腸内でのビタミン A の利用と吸収・代謝、及び各組織への輸送を調節し、各生体内のビタミン A の恒常性の維持に寄与している可能性が考えられる。このように、

我々のニワトリヒナおよび Caco-2 BBe 細胞を用いた研究成果は、ビタミン A 生体内利用効率やその代謝の恒常性について新たな基礎的知見を揭示できると考えている。

## 5. ま と め

ビタミン A は小腸の成熟化や小腸吸収細胞の増殖・分化において必要不可欠な生理作用を有する。ニワトリヒナの孵化期における十二指腸では、BCMO 1 遺伝子発現が増大し、同様に RALDH 1 遺伝子発現の変動も認められた。これは、十二指腸の機能発達、成熟のために  $\beta$  カロテンから由来するレチノイン酸生成に必要であると考えられる。また、BCMO 1 発現はニワトリ十二指腸やヒトの小腸吸収細胞をモデルとした Caco-2 BBe 細胞において、それぞれヒドロコルチゾン及び  $T_3$  により BCMO 1 発現を亢進することが示された。

## 引 用 文 献

1. 武藤泰敏：レチノイド・カロテノイド ー体内代謝と発癌予防ー、1-4、南山堂、東京、1997。
2. Miller M, Humphrey J, Johnson E, Marinda E, Brookmeyer R, Katz J: Why do children become vitamin A deficient? *J Nutr* 132: 2867S-2880S, 2002.
3. Sommer A, Davidson FR: Anecy Accords: Assessment and control of vitamin A deficiency: the Anecy Accords. *J Nutr* 132: 2845S-2850S, 2002.
4. Silverman AK, Ellis CN, Voorhees JJ: Hypervitaminosis A syndrome: a paradigm of retinoid side effects. *J Am Acad Dermatol* 16: 1027-1039, 1987.
5. Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen US, Mannino S, Milunsky A: Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med*, 333, 1369-1373, 1995.
6. During A, Dawson AD, Harrison EH: Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporter SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with Ezetimibe. *J Nutr* 135: 2305-2312, 2005.
7. Glover J: The conversion of  $\beta$ -carotene into vitamin A. *Vitam Horm* 18: 371-386, 1960.
8. Goodman DS, Blomstrand R, Werner B, Huang HS, Shiratori T. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and  $\beta$ -carotene in man. *J Clin Invest* 45: 1615-1623, 1966.
9. Ong DE: A novel retinol-binding protein from rat. Purification and partial characterization. *J Biol Chem* 259: 1476-1482, 1984.
10. Crosas B, Hyndman DJ, Gallego O, Martras S, Pares X, Flynn TG: Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem J* 373: 973-979, 2003.
11. Kakkad BP, Ong DE: Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J Biol Chem* 263: 12916-12919, 1988.
12. MacDonald PN, Ong DE: Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J Biol Chem* 263: 12478-12482, 1988.
13. Ong DE, Kakkad B, MacDonald PN: Acyl-CoA-dependent esterification of retinol bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J Biol Chem* 262: 2729-2736, 1987.
14. Harrison EH: Mechanism of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25: 87-103, 2005.
15. Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, Dräger UC: Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem* 15: 15-22, 1996.
16. Chambon P: A decade of molecular biology of retinoic acid receptors *FASEB J* 10: 940-954, 1996.
17. Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A, Grippo JF: 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR $\alpha$ . *Nature* 355: 359-361, 1992.
18. Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo JF, Chambon P, Levin AA: Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 30-34, 1993.
19. Rigtrup KM, Ong DE: A retinyl ester hydrolase activity intrinsic to the brush border membrane of rat small intestine. *Biochemistry* 31, 2920-2926, 1992.
20. Leuenberger MS, Engeloch-Jarret C, and Woggon WD: The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of  $\beta$ -carotene to retinal. *Angew Chem Int Ed* 40: 2614-2617, 2001.
21. During A, Nagao A, Hoshino C, Terao J: Assay of  $\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure liquid chro-

- matography. *Anal Biochem* 241: 199-205, 1996.
22. Duszka C, Grolier P, Azim EM, Alexandre-Gouabau MC, Borel P, Azais-Braesco V: Rat intestinal  $\beta$ -carotene dioxygenase activity is located primarily in the cytosol of mature jejunal enterocytes. *J Nutr* 126: 2550-2556, 1996.
  23. Boulanger A, McLemore P, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Yu SS, Gentleman S, Redmond TM: Identification of  $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *FASEB J* 17: 1304-1306, 2003.
  24. Gong X, Tsai SW, Yan B, Rubin LP: Cooperation between MEF2 and PPAR $\gamma$  in human intestinal  $\beta$ , $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase gene expression. *BMC Mol Biol* 7: 7, 2006.
  25. Lindqvist A, Sharvill J, Sharvill DE, Andersson S: Loss-of-function mutation in carotenoid 15,15'-monooxygenase identified in a patient with hypercarotenemia and hypovitaminosis A. *J Nutr* 137: 2346-2350, 2007.
  26. Hessel S, Eichinger A, Isken A, Amengual J, Hunzelmann S, Hoeller U, Elste V, Hunziker W, Goralczyk R, Oberhauser V, von Lintig J, Wyss A: CMO 1 deficiency abolishes vitamin A production from  $\beta$ -carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem* 282: 33553-33561, 2007.
  27. Bachmann H, Desbarats A, Pattison P, Sedgewick M, Riss G, Wyss A, Cardinault N, Duszka C, Goralczyk R, Grolier P: Feedback regulation of  $\beta$ , $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J Nutr* 132: 3616-3622, 2002.
  28. Seino Y, Miki T, Kiyonari H, Abe T, Fujimoto W, Kimura K, Takeuchi A, Takahashi Y, Oiso Y, Iwanaga T, Seino S: Isx participates in the maintenance of vitamin A metabolism by regulation of  $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase (Bcmo 1) expression. *J Biol Chem* 283: 4905-4911, 2008.
  29. 山口範晃：県立長崎シーボルト大学大学院 修士学位論文 “The study of development gene expression of  $\beta$ -carotene cleavage enzyme and retinoic acid signaling in chick duodenum and liver.”、2005。
  30. Yamaguchi N, Yamamoto T, Suruga K, Takase S: Developmental changes in gene expressions of  $\beta$ -carotene cleavage enzyme and retinoic acid synthesizing enzymes in the chick duodenum. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148: 690-697, 2007.
  31. Yamaguchi N, Suruga K: Triiodothyronine stimulates CMO 1 gene expression in human intestinal Caco-2 BBe cells. *Life Sci* 82: 789-796, 2008.
  32. Takase S, Suruga K, Suzuki R, Goda T: Relationship between perinatal appearance of cellular retinol-binding protein, type II and retinal reductase activity in chick liver. *Life Sci* 58: 135-144, 1996.
  33. Tajima S, Goda T, Takase S: Coordinated distribution patterns of three enzyme activities involved in the absorption and metabolism of  $\beta$ -carotene and vitamin A along the villus-crypt axis of chick duodenum. *Life Sci* 65: 841-848, 1999.
  34. Tajima S, Goda T, Takase S: Co-ordinated induction of  $\beta$ -carotene cleavage enzyme and retinal reductase in the duodenum of the developing chicks. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 128: 425-434, 2001.
  35. Henning SJ: Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol* 241: G199-G214, 1981.
  36. Peterson MD, Mooseker MS: An in vitro model for the analysis of intestinal brush border assembly. I. Ultrastructural analysis of cell contact-induced brush border assembly in Caco-2 BBe cells. *J Cell Sci* 105: 445-460, 1993.
  37. During A, Albaugh G, Smith JC Jr: Characterization of  $\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase activity in TC7 clone of human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 467-474, 1998.