

## ビタミン B<sub>12</sub> 腸管吸収機構を利用したペプチド性生理活性物質の経口投与方法開発の試み

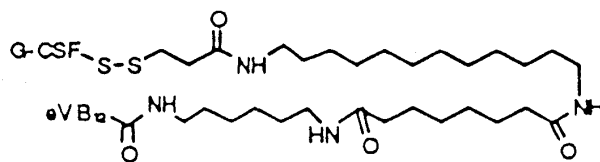
一般に病気の治療に用いられているホルモンなどのペプチド性生理活性物質は、通常非経口的（注射）に投与されている。なぜなら、ペプチド性生理活性物質を経口投与すると胃液、膵液中に含まれるタンパク質分解酵素などにより消化されその効力が失われるか、あるいは消化を免れたとしても微量なペプチド性物質が効率よく腸管から吸収されるとは考えにくいからである。ペプチド性生理活性物質を各種消化酵素から保護し、効率的に腸管から吸収されれば、これら生理活性物質の臨床的な投与がより容易になると考えられる。

ビタミン B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>) の腸管吸収機構は摂取した B<sub>12</sub> が R-バインダーや内因子という結合タンパク質と結合して腸管内を輸送され、回腸下部の内因子受容体を介してエンドサイトシスにより吸収される<sup>1)</sup>。この巧みな微量栄養素の腸管輸送吸収系を利用したペプチド性生理活性物質の経口投与方法の開発が試みられている。

Russell-Jones らは、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) などのペプチド性生理活性物質<sup>2)~4)</sup>と B<sub>12</sub> の複合体を調製して、内因子との親和性や *In vitro* および *In vivo* におけるこれら複合体の生理活性を検討している。B<sub>12</sub> のコリン核プロピオンアミド側鎖を温和に酸加水分解した後、逆相高速液体クロマトグラフィーで B<sub>12</sub> e-モノカルボン酸を調製した。B<sub>12</sub> の3種のコリン核 b-, d-, e-プロピオンアミド側鎖のなかで e-プロピオンアミド側鎖が内因子との結合への関与が最も低いことが報告されている<sup>5)</sup>。この B<sub>12</sub> アナログに短鎖、長鎖のスペーサーを導入した後、結合した G-CSF が生体内で容易に分解されるためにジスルフィド結合などを介して複合体を作成した (図)。このように調製された数種の G-CSF 複合体は内因子との親和性は概して低かったが (2.6~23%)、高等動物を用いた *In vivo* の系においてこれら複合体の生理活性は非常に高かった。また、CaCo-2 細胞を用いた取り込み実験からも内因子に依存してこれら複合体が取り込まれることを報告している。

しかし、B<sub>12</sub> 結合タンパク質 (R-バインダーや内因子) と B<sub>12</sub> を介して結合すればペプチド性生理活性物質が消化酵素の作用を全く受けずに腸管内に輸送さ

図 内因子への親和性と *In vivo* の生理活性が最も高かったビタミン B<sub>12</sub>-G-CSF 複合体 (LC-GBC 1)



eVB<sub>12</sub>: ビタミン B<sub>12</sub> e-モノカルボン酸

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor

れるのか、また、B<sub>12</sub> 複合体と内因子との結合性が低いにもかかわらず、*In vivo* での生理活性が非常に高いのはなぜかなど少し理解しづらい結果もあるが、B<sub>12</sub> 吸収機構を利用したペプチド性生理活性物質の腸管内輸送吸収システムの開発の端緒として期待できる。

(高知女子大家政 渡辺 文雄)

## 文 献

- 1) Seetharma, B.: *In Physiology of Gastrointestinal Tract* (Ed. Johnson, L. R.,) pp. 1997-2026 (1994)
- 2) Russell-Jones, G. J., Westwood, S. W., Habberfield, A. D.: *Bioconj. Chem.*, **6**, 459-465 (1995)
- 3) Russell-Jones, G. J., Westwood, S. W., Farnworth, P. G., Findlay, J. K., Burger, H. G.: *Bioconj. Chem.*, **6**, 34-42 (1995)
- 4) Russell-Jones, G. J.: *In Peptide-based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism* (Eds. Taylor, M., Amidon, G., ACS Publications, Washington) pp. 182-198 (1994)
- 5) Kolthous, J. F., Allen, R. H.: *J. Clin. Invest.*, **60**, 1381-1392 (1977)

## 組織非特異的アルカリホスファターゼの欠損はビタミン B<sub>6</sub> 代謝の不全を引き起こしマウスを死にいたらしめる

ヒトでもネズミでも組織非特異的アルカリホスファターゼ (TNAP) がピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) の血中濃度を左右し、もしもこの酵素の活性が非常に低いと、血中 PLP 濃度が非常に増大することが知られている。しかしながら、この TNAP の機能の重要性に関して、今一つはっきりしない点があった。TNAP の欠損によってハイポホスファチア (HP) となっている動物の症状と体内各組織における B<sub>6</sub> 濃度に関して、様々なデータが報告されているため

ある。例えば、分娩前後に発症する HP のヒトでは血清中のアルカリホスファターゼ (AP) 活性が極端に低下しており、血漿中にピリドキサル (PL) はほとんど検出されないという報告がある一方、HP となっても血中の PL 濃度や組織中の B<sub>6</sub> 化合物の濃度が正常人とほとんど変わらないという報告もある。

今回、胚性幹細胞を用いる相同組換えによって、TNAP 遺伝子に  $\beta$ -geo 遺伝子が挿入され、TNAP 遺伝子がノックアウトされて、TNAP 活性を全く有しないマウス (TNAP <sup>$\beta$ -geo</sup> マウス) が作成され、TNAP が血流を介した各組織への PL の運搬に必須の働きをしていることが明らかにされた<sup>1)</sup>。

TNAP の無効変異した遺伝子座が生じていることを確認するために、野性株マウスとヘテロとホモ接合体の TNAP <sup>$\beta$ -geo</sup> マウスについて各組織の AP 活性が測定された。骨、肝臓そして心臓の AP 活性はホモ接合体 TNAP <sup>$\beta$ -geo</sup> マウスでは野性株に比べ 1/1000 以下であり、實際上、AP 活性は存在していないといえた。一方、ヘテロ接合体 TNAP <sup>$\beta$ -geo</sup> マ

ウスでは、野性株の約 1/2 の活性が認められた。血清中の AP 活性についてはホモ接合体で野性株の約 5% 程度の活性が認められたが、この活性は小腸において発現される遺伝子的に異なる AP アイソザイムによる活性であると思われた。これらの結果から、TNAP の遺伝子が無効変異していることが確認された。

ホモ接合体 TNAP <sup>$\beta$ -geo</sup> マウス (ホモ変異マウス) は出産後 2 週間までは野生株マウスと比べ体の小さいものも認められたが、正常に生育できた。しかし、2 週間後、体の大きさに関係なく、間代緊張性の伸展、体幹のねじれ、そして迷走症状を発症し、発症から 1 日以内に死亡した。このホモ変異マウスは HP を発症しているため、骨格形成が不全となっていることが予想されたにもかかわらず、生後 2 週間、野性株マウスと骨格構造に違いは認められなかった。

そこで、血清をはじめ各組織中の PLP、PL そしてピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) 濃度が調べられた。表に示すように、ホモ変異マウスの血清中の

表. 野性株マウスとホモとヘテロ接合体 TNAP <sup>$\beta$ -geo</sup> マウス組織中のビタミン B<sub>6</sub> 濃度

組織	野性株 (n=13)	ヘテロ (n=28)	ホモ (n=9)
血清 PLP	183±104	423±118 <sup>a</sup>	3166±1288 <sup>b</sup>
“ PL	874±354	936±254	70±61 <sup>b</sup>
肝臓 PLP	21.7±3.3	22.0±2.9	13.1±2.2 <sup>b</sup>
“ PL	2.0±1.9	3.7±2.0	2.4±2.0
“ PMP	29.9±4.9	25.5±5.9 <sup>a</sup>	24.1±3.5 <sup>a</sup>
脳 PLP	4.5±1.0	4.2±0.8	1.6±0.3 <sup>b</sup>
“ PL	1.2±0.9	1.3±0.8	0.7±0.6
“ PMP	4.9±0.7	4.9±1.0	3.2±0.4 <sup>b</sup>
心臓 PLP	5.4±1.4	5.3±1.2	3.3±0.9 <sup>b</sup>
“ PL	1.2±0.5	1.1±0.7	1.1±0.8
“ PMP	11.1±2.5	9.9±3.1	8.9±1.4
腎臓 PLP	5.3±1.1	5.3±1.0	2.6±0.7 <sup>b</sup>
“ PL	0.3±0.3	0.3±0.4	0.2±0.2
“ PMP	11.1±1.6	11.0±1.9	5.1±0.6 <sup>b</sup>
筋肉 PLP	7.8±1.6	7.6±1.9	4.3±0.7 <sup>b</sup>
“ PL	0.5±0.4	0.6±0.4	0.7±0.4
“ PMP	2.0±0.3	1.9±0.5	1.2±0.1 <sup>b</sup>

単位は組織湿重量 1g 当りのナノモルである。マウスは同腹で生後10日から14日のものである。

<sup>a</sup>: 野性株マウスと有意 ( $p < 0.05$ ) に差があるもの。

<sup>b</sup>: 野性株マウスあるいはヘテロ変異マウスとの差が有意 ( $p < 0.05$ ) であるもの。文献1)から引用した。

PLP 濃度は野性株マウスに比べ、約20倍にも上昇している。一方、PL の濃度は約 1/10 に低下している。また、ホモ変異マウスでは、脳をはじめとして調べた全ての組織で PLP 濃度が低下している。PMP 濃度も心臓以外の組織では全て有意に低下している。つまり、TNAP は細胞外の PL 濃度を調節することで、各種組織細胞内の PLP と PMP 濃度を、間接的にはあるが確実に調節する機能を有していることが分かる。つまり、TNAP を欠損しているマウスは体内（血漿）中に大量の PLP を保有しているにも関わらず、B<sub>6</sub> 欠乏症となっているのである。

脳において PLP レベルの低下が著しかったため、脳内の  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 濃度が測定された。GABA は B<sub>6</sub> 依存性酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素の作用で合成される。この酵素は B<sub>6</sub> 欠乏によって活性が低下するので、生成物である GABA の濃度が低下している可能性があったからである。その結果、実際、ホモ変異マウスでは野性株マウスに比べ、脳内の GABA 濃度が約 1/2 に低下していることがわかった。この低下が生後2週間目に観察される上記症状の発症の大きな原因と考えられた。

ホモ変異マウスは PL の腹腔内投与によって、生存期間が大幅に改善された。ただし、マウスの系統による違いがあり、ある系統のマウスでは PL を投与しても26日以上に延命することはできなかった。PL で大幅に延命効果の認められたホモ変異マウスに対して、PL に比べ、PN はあまり有効ではなかった。一般に、動物において遊離の PN が PL に直接的に代謝されることはほとんど無く、PN は一旦リン酸化されて、PNP となった後、PNP オキシダーゼによって PLP に酸化されることが知られている。この結果はこの知見と矛盾しない。

PL によって延命されたホモ変異マウスは高脂肪の固形食を餌にしていると、25日から60日の間に麻痺を発症し死亡した。このマウスでは、門歯が正常な形とならず、折れてしまうものもあった。そこで、餌を高脂肪の半流動食にしたところ、これらマウスは麻痺を起こさず、従って死亡することもなくなった。この麻痺の原因は特定できないが、一つの可能性として血中 PLP 濃度の異常な増加が考えられる。PLP がホルモン受容体や酵素を含め、各種の重要な生理機能を果たすタンパク質と結合し、それらの働きを阻害することが知られているので、このような考え方も可能である。高脂肪食は TNAP ではない別の AP アイソザ

イムの腸管内の活性を増大させることが知られている。したがって、この半流動食をとることで血中の AP 活性が僅かではあるが上昇し、その結果として血中の PLP 濃度が下がることで麻痺が防止されていると考えられる。

これらの結果により、TNAP の生理機能が明らかとなった。さらに、表に示したように各組織内での B<sub>6</sub> 濃度は血中の PLP 濃度の変動に応じて必ずしも一様な変動をしていないことが分かった。つまり、各組織での B<sub>6</sub> 濃度の調節は組織別に独自に決められていると思われる。今後、この組織別の B<sub>6</sub> 濃度調節機構の解明が求められる。

(高知大農 生物資源科学 八木 年晴)

## 文 献

- Waymire, K. G., Mahuren, J. D., Jaje, J. M., Guilarte, T. R., Coburn, S. P., MacGregor, G. R. : Nature Genetics, 11, 45-50 (1995)

## 赤血球中トランスケトラーゼ、同 グルタチオン還元酵素活性測定法 の意義

近年、わが国ではビタミン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> の欠乏症は稀であるが、糸川<sup>1)</sup>によれば病院職員を対象に血中 B<sub>1</sub> 濃度を測定し、約10%の潜在性欠乏が確認されたと報告している。また、安田ら<sup>2)</sup>は女子大生を対象とした調査で、B<sub>1</sub> で4.8%、B<sub>2</sub> で19.0%の潜在性欠乏症が存在したとの報告があり、橋詰<sup>3)</sup>は健常者で潜在性 B<sub>1</sub> 欠乏症24%、潜在性 B<sub>2</sub> 欠乏症3.4%、糖尿病患者で潜在性 B<sub>1</sub> 欠乏症54.5%、潜在性 B<sub>2</sub> 欠乏症10.8%であると報告している。潜在性 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 欠乏症の診断として全血総 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 濃度の測定は大切である。また溶赤血球トランスケトラーゼ (ETK)、同グルタチオン還元酵素 (EGR) 活性、TDP、FAD 効果は個人差が少なく異常値の判別が容易な点で有利であり、体内 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 飽和量を知る上で有用であるとの意見がある<sup>2)</sup>。しかし ETK の測定値は報告者によって様々であり、表示方法も異なる。赤血球内酵素の表示方法は主に赤血球内容積により表示する方法と血色素量により表示する方法に大別される。

従来 ETK は主に前者の表示方法で、EGR は後者の表示方法に従うのが通例であるが、同一検体による測定上表示方法を同一にすることが望ましいと思われる。