

## トピックス

## シロイヌナズナに発現させたリコンビナントヒト内因子の有用性 Usefulness of recombinant human intrinsic factor expressed in the plant *Arabidopsis thaliana*

ヒトにおけるビタミン B<sub>12</sub> (以下, VB<sub>12</sub>) の吸収および取り込みの概略は以下の通りである。食物中の VB<sub>12</sub> は多くの場合タンパク質と結合して存在している。ヒトが食物を摂取すると, VB<sub>12</sub> は上部消化管で胃酸と酵素の作用によってタンパク質から遊離し, 唾液腺から分泌されるハプトコリン (haptocorrin, 以下, HC) と結合する。HC-VB<sub>12</sub> は十二指腸で胆汁中の酵素によって消化され, 遊離した VB<sub>12</sub> は次に胃の壁細胞から分泌された内因子 (intrinsic factor, 以下, IF) と結合して IF-VB<sub>12</sub> 複合体 (ホロ IF) を形成する。この複合体は腸管を下降し, 回腸の腸細胞を横切って体内に移行する。IF-VB<sub>12</sub> 複合体はエンドサイトシスによって取り込まれるが, 移行は膜貫通タンパク質アムニオンレス (CUBAM) に結合した IF-VB<sub>12</sub> 受容体 (キュベリン, 以下 CUBN) の介助による。続いて IF はリソソームのタンパク質消化酵素によって分解され, VB<sub>12</sub> は遊離の形, あるいはトランスコバラミン (transcobalamin, 以下, TC) に結合した形で血液中に放出される。VB<sub>12</sub> を必要とする細胞はホロ TC 受容体, すなわち CD320 を発現している。取り込まれた TC-VB<sub>12</sub> の TC はリソソーム酵素によって分解され, 遊離した VB<sub>12</sub> は細胞に利用される。このように IF は食物中の VB<sub>12</sub> を吸収するために重要な役割を担っているが, その IF の性質・性状や作用機序はまだ完全には解明されていない。IF がヒトの胃液 1L (≒ 1 kg) 中にわずか 3 mg 程度しか含まれていない微量成分<sup>1)</sup>であることが研究進展の大きな障害となっている。

以前著者らは, Fedosov ら<sup>2)</sup>がこの微量成分であるヒトの IF 遺伝子を高等植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に組み込んでリコンビナントヒト IF (以下, rhIF) を発現させることに成功したことをこの欄で紹介した<sup>3)</sup>。シロイヌナズナに rhIF を発現させるメリットとして, ①必要経費が大変少ないこと, ②大量に得られること, ③得られる rhIF が VB<sub>12</sub> を結合していない遊離型 (アポ IF) であること, ④得られた rhIF

の安定性が高いことなどがある。シロイヌナズナに発現させた rhIF とヒト胃液中の IF との同一性を調べると, 両者とも SDS-PAGE 上で 50 kDa にタンパク質のバンドを示す, 結合特性に関しては, 両者とも哺乳動物において VB<sub>12</sub> としての生理活性があるコバラミンと強く結合するが, 活性がないコビンアミドとは親和性が低かった, IF に特異的なリセプターである CUBN との結合性では, 両者とも結合の  $K_+$  ( $\text{nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) および  $K_-$  ( $\text{s}^{-1}$ ) がいずれも  $10^{-4}$  オーダーの近似した値を示し CUBN との解離定数 ( $K_d$ ) も両者の間で近似していた, などの結果から, シロイヌナズナを使って発現した rhIF はヒト胃液中の IF と性質や機能が一致していると考えられた。遺伝子組み換え体シロイヌナズナを栽培し, その種子を採取して次代を生育させることを繰り返せば極めて大量の rhIF を得ることが可能なので, rhIF を IF と同一のものとして扱うことができれば利用範囲は大きく広がると考えられる。Fedosov らの rhIF 産生の成功<sup>2)</sup>以降, それを実用的に利用するためにどのような研究がおこなわれているのか, そしてシロイヌナズナ産生 rhIF の特長をどのように活用してきたのかを以下に紹介する。

### rhIF は IF に替わって経口投与した VB<sub>12</sub> 吸収を助ける

冒頭に述べたように, 胃から分泌される IF は消化管で食物中の VB<sub>12</sub> を吸収するために大きな役割を果たしている。したがって, rhIF が IF と同じように腸管における VB<sub>12</sub> 吸収を助けるかどうかは臨床上大きな問題であるが, これを知るためには VB<sub>12</sub> 吸収試験を行って rhIF の効果を調べればよい。VB<sub>12</sub> 吸収試験には従来 Schilling test が広く採用されてきた。この試験法は放射性 <sup>57</sup>Co · VB<sub>12</sub> あるいは <sup>57</sup>Co · VB<sub>12</sub> + IF を経口投与し, <sup>57</sup>Co · VB<sub>12</sub> を単独投与した場合に吸収されず, IF を加えたときに <sup>57</sup>Co · VB<sub>12</sub> が吸収されるなら VB<sub>12</sub> 吸収過程の欠陥は IF の分泌に異常があると判定する

方法である。この試験法は感度が良いが放射性的<sup>57</sup>Coで標識したVB<sub>12</sub>を使用するので近年実施することが困難になりつつあるため、これに代わる試験法が求められ、血清中でVB<sub>12</sub>を結合・輸送するTCが注目された。血液中でVB<sub>12</sub>を結合しているTC(ホロTC)の濃度が、近い過去に経口投与されたVB<sub>12</sub>の吸収量を反映することが示されたので<sup>4)6)</sup>、これをVB<sub>12</sub>吸収の指標として利用するようになってきたのである。Hvasら<sup>7)</sup>はこの方法でrhIFの効果を試験した。VB<sub>12</sub>による治療を受けたことがなかった明白なVB<sub>12</sub>欠乏患者にVB<sub>12</sub>単独を与えた場合、ホロTC濃度の上昇幅はごく僅かだったが、VB<sub>12</sub>とrhIFを同時に与えると上昇幅が3倍に増大した。VB<sub>12</sub>含有量が少ない食餌を摂取してきた被検者、あるいは消化能力の低下などがVB<sub>12</sub>欠乏の理由である被検者では、VB<sub>12</sub>を単独で与えただけで血清中ホロTC濃度が大きく上昇した。先天的CUBN欠損症のように吸収機能に障害がある被検者ではVB<sub>12</sub>単独、およびVB<sub>12</sub>とrhIF同時投与のいずれの場合においても血中ホロTC濃度上昇はみられなかった。以上述べたようにVB<sub>12</sub>吸収過程においてrhIFがIFと同様に生理活性を示すことが認められた。この試験法ではSchilling testに比べて大量のIFを必要とすることが欠点であるが、その問題はrhIFが大量に得られることにより解決できた。注目に値することは、彼らがrhIF標品として使用したのは遺伝子組み換え処理をしたシロイヌナズナの葉の乾燥物そのものであることで、その乾燥物中のIF活性は18か月間貯蔵しても減少しなかったという。今後rhIFを含む遺伝子組み換えシロイヌナズナが悪性貧血の治療へ応用されることが期待される。

### VB<sub>12</sub>測定の際にrhIFをVB<sub>12</sub>結合タンパク質として利用する

臨床医学においてVB<sub>12</sub>を測定する際にもっとも普通に使われる方法は、特異的な結合タンパク質を用いて、試料中のVB<sub>12</sub>と標識した純正のVB<sub>12</sub>が競合的に結合タンパク質と結合することを利用する。VB<sub>12</sub>を特異的に結合するタンパク質は①胃液や胃粘膜中のIF、②血清中のTC、③唾液などに含まれるHCであるが、これら利用する場合いくつかの問題を伴う。そのひとつはこれらのタンパク質を精製することが難しいことである。ヒトIFはヒトにおいて生理的活性があるコバラミンのみを特異的に結合するが、ヒトTCとHCはコバラミン以外の多くの類似体にも結合してしまう。したがってVB<sub>12</sub>測定の際、結合タンパクとしてTCやHCを使用すると、測定結果が不正な高値を示し

てしまう。また、IFを結合タンパク質として使用した場合でも、それにTCやHCが混入していると真の値より高い値が示される<sup>8)</sup>。一方、植物由来のFedosovらのrhIFにはTCやHCが混入することがないので正確な測定値が得られる。rhIFが得られる以前に使用していたVB<sub>12</sub>結合タンパク質は動物由来であるため、抽出したVB<sub>12</sub>結合タンパク質の一部分は内在性のVB<sub>12</sub>で既に飽和されていることが多いので、測定感度を低下させる。VB<sub>12</sub>要求性の代謝経路がない植物は体内にVB<sub>12</sub>を持っていないためFedosovらのrhIFにはVB<sub>12</sub>飽和IFが含まれていない。これらのことから結合タンパク質への競合的結合を利用するVB<sub>12</sub>測定法にはFedosovらのrhIFが理論的に最適であると考えられる。そこで彼らはrhIFを使用して、VB<sub>12</sub>が正しく測定できることを確認する実験を行った。すなわち、競合的結合を利用してVB<sub>12</sub>を測定するタイプのAxos-Shieldキットを使用し、測定キットを使用してVB<sub>12</sub>を測定した結果と、キット中にVB<sub>12</sub>結合タンパク質として含まれているブタIFを磁気ビーズ(Dynabeads)に連結したrhIFで置き換えた場合に得られた結果を比較する実験を行った。その結果、検量線はVB<sub>12</sub>濃度が0-160 pmol/Lの範囲をカバーできた。ヒト血清とVB<sub>12</sub>標準液を試料として用いVB<sub>12</sub>測定結果を比較すると、キットの方法で得られたVB<sub>12</sub>測定結果をx、nhIFで置き換えた場合の測定結果をyとして、ヒト血清(n=71)では $y=1.05x+2.8$  pmol/L(相関係数 $r=0.98$ )、VB<sub>12</sub>標準液(n=25)では $y=0.99x+1.7$  pmol/L( $r=0.99$ )、ヒト血清とVB<sub>12</sub>標準液の両方合わせると $y=1.04x+2.2$  pmol/L( $r=0.98$ )という結果が得られた。さらに、検量線の範囲内での測定内変動はVB<sub>12</sub>の低~高濃度範囲で3~8%であり、本来の測定法キットについて報告されている10%以下という値と同等だった。このようにVB<sub>12</sub>結合タンパク質をrhIFで置き替えて測定した結果は本来のキットで測定した場合と同一と見なされたので、rhIFは競合的結合を利用するVB<sub>12</sub>測定法に使用する結合タンパク質として適していると結論できるとしている。

### IF抗体の測定

最初にヒトのVB<sub>12</sub>吸収におけるIF抗体の関与について概説する。VB<sub>12</sub>欠乏をきたす代表的疾患の一つである悪性貧血に至る原因はVB<sub>12</sub>供給不足の他にVB<sub>12</sub>吸収不全がある。吸収不全の原因はいくつもあるがその一つに悪性貧血患者の血清や胃液にかなり高頻度に検出されるIF抗体による吸収阻害がある。IF抗体は2種類存在し、I型(阻止抗体)はIFのVB<sub>12</sub>結合部位を

ブロックすることで VB<sub>12</sub> 吸収を阻害する。II 型 (結合抗体) は IF-VB<sub>12</sub> 複合体に結合して IF の形態を変化させるので、複合体が回腸のリセプターに結合できなくなり、結局 VB<sub>12</sub> 吸収を阻害する。そのため IF 抗体の検出は悪性貧血の確定診断に重要である。従来は被検血清添加時と非添加時に IF に結合される <sup>57</sup>Co・VB<sub>12</sub> 量の差から I 型抗体の量を測定した。IF に結合した <sup>57</sup>Co-VB<sub>12</sub> と遊離型 <sup>57</sup>Co-VB<sub>12</sub> との分別には、透析法、活性炭素末吸着法、ゲルろ過法などが用いられた。II 型抗体の検出は、IF-<sup>57</sup>Co・VB<sub>12</sub> 複合体に被検血清を加え、抗体分子が結合することにより生ずる分子サイズなどの変化を電気泳動法、免疫拡散法、免疫電気泳動法、ゲルろ過法、免疫共沈法などにより調べた。これらの実験手技は煩雑で時間を要するばかりでなく、近年は放射性アイソトープに対する規制が厳しくなってきたため実施しにくい。そこで Nexø ら<sup>10)</sup> は Fedosov らの作成した rhIF を利用して ELISA 法で IF 抗体を測定する方法を開発した。ELISA 法においてはプレート上のウェルに固定する捕捉試薬として抗体を用いる場合が多いが、Nexø ら<sup>10)</sup> は rhIF をプレート上のウェルに固定し、そこへ IF 抗体を含む検液を加え、rhIF に IF 抗体を結合させた。この方法では、VB<sub>12</sub> を結合していない rhIF を使えば I 型抗体を、VB<sub>12</sub> で飽和した rhIF-VB<sub>12</sub> を使えば II 型抗体を測定することができる。I 型抗体を測定しようとする時、捕捉試薬として VB<sub>12</sub> を結合していない IF、すなわちアポ IF が必要であるがシロイヌナズナに発現させた rhIF は全てアポ IF なので真に好都合である。99 検体のヒト血清中の IF 抗体を rhIF を使って測定したところ、市販の測定法 (Diagnostic Products Corporation) を使って得られた結果と一致し、健康なドナーからの血清では一例を除いて全て抗体陰性の結果が得られた。VB<sub>12</sub> 濃度グループ別 IF 抗体陽性率は、血清 VB<sub>12</sub> レベル <100 pmol/L のグループでは 67%、100-150 pmol/L のグループでは 17%、151-200 pmol/L のグループでは 6%、そして >200 pmol/L のグループでは 1% だった。このように ELISA 法で IF 抗体を測定する場合 rhIF は適切な捕捉試薬であると言える。

### 標的細胞や器官へのターゲティング

疾病の診断や治療のため体内の特定の細胞や器官を高精度で画像化するとともに、そこへ薬物を送達するための「運び屋」の研究が盛んに行われていて、本稿冒頭に記した VB<sub>12</sub> の吸収・取り込み経路をこの分野に利用できるのではないかと考えられてきた。胃腸管において、IF は CUBN を経由する VB<sub>12</sub> 吸収過程で重要

な役割を果たしているが、これまで IF を CUBN 標的指向の「運び屋」として体系的に利用することを検討する研究は行われてこなかった。薬物を運ぶために VB<sub>12</sub> の吸収・取り込み経路を長期間にわたって利用することは、増殖している細胞における VB<sub>12</sub> 取り込みを障害することになるのではないかという懸念があったためである。しかし、CUBN はホロ IF に対するたった一つの既知の受容体で、胃腸管の回腸以外に見いだされているのは腎臓、内耳および卵黄囊のみであり、IF は VB<sub>12</sub> の細胞取り込みにおいて体系的に役目を演じている訳ではない。さらに、VB<sub>12</sub> を結合している IF を使用することにより理論的には VB<sub>12</sub> の吸収・取り込みを障害することは起こらない。

このように IF はターゲティングを目指す研究にとって明るい展望を提供しているように見えることから、Workinger ら<sup>11)</sup> は PET を利用した *in vivo* 画像化と生体内分布研究に植物由来の rhIF を利用することを試みた。この研究を行うためには、(1) 30-50 mg という大量の IF が入手可能であること、(2) その IF がアポ型、すなわち、事前に結合している VB<sub>12</sub> を持たない型で、希望の VB<sub>12</sub> 複合体を結合できることが必要である。Workinger ら<sup>11)</sup> は以上の条件を満たす IF は植物シロイヌナズナにヒト遺伝子を組み込んで発現される rhIF<sup>2)</sup> であると考えた。植物は VB<sub>12</sub> を生理的に利用しないため、植物中ではアポ IF だけが生産され、ホロ IF から VB<sub>12</sub> を除去する手順が不要である。反対に、動物由来の IF の場合には体内に普遍的に存在する VB<sub>12</sub> と結合してホロ型を形成していることが多いので、タンパク質変性等の手段を用いて結合している VB<sub>12</sub> を除去しなければならないが、その際に VB<sub>12</sub> の解離が完全か、IF の再生が完全か、回収率が良いか、などの問題を伴う。

前項までに紹介した rhIF 活用法において、rhIF はヒト胃液中の IF に代わりうるという結果が得られた。しかし rhIF 分子中の糖質を GC/MS で分析すると、 $\alpha$  (1-3)-フコース、キシロース、マンノースおよび n-アセチルグルコサミンが 0.17 : 0.18 : 1.0 : 0.24 の比率で含まれていたが<sup>11)</sup>、ヒト胃液中の IF にマンノースの 1/2 量含まれていることが報告されているガラクトース<sup>1)</sup> が rhIF には検出されなかった。糖タンパク質に存在する糖鎖は受容体認識と関係していると考えられているので、IF と rhIF の間に糖鎖の違いがあれば取りこまれる器官が異なる可能性が大きい。これらの知見をもとに Workinger ら<sup>11)</sup> は rhIF を血液中に投与した場合、その受容体は消化管中における CUBN ではなく、マンノース受容体 CD206 が有力であると



考えた。CD206はフコース、マンノースおよび*n*-アセチルグルコサミンを認識し、体内では肝臓の上皮細胞およびマクロファージに見いだされる受容体である。彼らはrhIFがCD206によって取り込まれることを確認するため、CUBN陰性でCD206陽性のJ774、A1マクロファージ細胞による取り込みをフローサイトメトリーで調べたところ、VB<sub>12</sub>単体は取り込まれず、rhIF-VB<sub>12</sub>は37℃で取り込まれ、4℃で取り込まれなかった。さらに、マンノースの重合体であるマンナンをrhIF-VB<sub>12</sub>より先に系に添加するとrhIF-VB<sub>12</sub>の取り込みが減少したので、rhIFの取込み現象がマンノース介助性のプロセスであることが確認された。

次に血液中に注射したrhIFがどの臓器を標的とするかをPET画像で調べるため放射性<sup>89</sup>Zirconium・VB<sub>12</sub>(<sup>89</sup>Zr・VB<sub>12</sub>)をプローブとして使用した<sup>12)</sup>。Zr・VB<sub>12</sub>とIFの結合を調べると、K<sub>d</sub>は1.57 nMだったが、この値はVB<sub>12</sub>の代表的な形であるシアノコバラミンにおける1.36 nMと類似していたので、VB<sub>12</sub>のIFとの結合特性にZrの結合は変化を与えなかったと判断し、PETによる画像化を行った。胸腺除去雌性ヌードマウスにIF-<sup>89</sup>Zr・VB<sub>12</sub>を尾静脈から注射後PET画像を撮ったところ、<sup>89</sup>Zr・VB<sub>12</sub>は肝臓において著しい取り込みを示した。この時、体内のVB<sub>12</sub>レベルが注射したIF-<sup>89</sup>Zr・VB<sub>12</sub>の体内分布に影響を及ぼすかどうかを調べたが、PET撮像以前に21日間VB<sub>12</sub>欠乏食で飼育し、体内や血液中のVB<sub>12</sub>レベルが低下しているマウスと、

VB<sub>12</sub>を十分に摂取していたマウスの方に差異はみられなかった。この結果のように、内在性のVB<sub>12</sub>レベルによって<sup>89</sup>Zr・VB<sub>12</sub>の肝臓による取り込みが影響されないことから、注射されたrhIFは食餌性VB<sub>12</sub>がIF介在のメカニズムで吸収され、細胞に取り込まれる際に依存するTC介在の取り込みメカニズムとは全く別の経路で取り込まれることが分かった。このことはVB<sub>12</sub>-薬物複合体の「運び屋」としてrhIFが利用できるということを強く示唆している。

rhIF-<sup>89</sup>Zr・VB<sub>12</sub>を注射した後、*ex vivo* (*in vitro*)で<sup>89</sup>Zr・VB<sub>12</sub>の分布を調べた結果、肝臓に特に多く取り込まれており、PET画像で得られた結果を裏付けていた。

以上のように肝臓によるrhIFの取り込みに関する検討の結果、rhIFは必要な薬物を肝臓に送達する「運び屋」として利用できる可能性は大きい。それが充分可能かどうかは、VB<sub>12</sub>に結合した薬物をどの程度容易に、確実に肝臓に置いてくるか、そしてどの細胞がそれを取り込むかということをも明らかにする必要があるが、それらに関する研究は彼らの実験室で進行中であるという<sup>11)</sup>。

遺伝子組み換え技術を用いてシロイヌナズナに産生させたrhIFは、動物由来のIFと変わらないことが明らかになったことで、今後検査や測定が容易になることに貢献すると思われる。また、薬物を結合させたVB<sub>12</sub>をIFに載せて肝臓に薬物を送達する手段として活用することに於いては今後のさらなる発展が期待される。

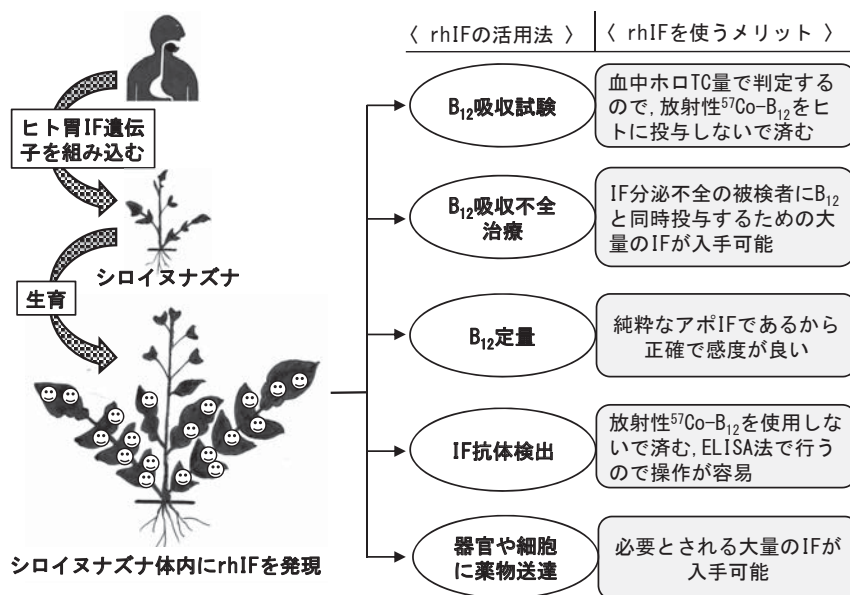


図1 シロイヌナズナに発現させたりコンビナントヒト内因子の活用法と特長

☺ : recombinant human intrinsic factor (rhIF)

**Key words** :human intrinsic factor expressed in plants, huge amount of human intrinsic factor, VB<sub>12</sub>-free intrinsic factor, intrinsic factor free of haptocorrin or transcobalamin

<sup>1</sup>Hokkaido University of Education

<sup>2</sup>Sapporo Medical University

Shoji Yamada<sup>1</sup>, Keiko Yamada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北海道教育大学, <sup>2</sup>元・札幌医科大学

山田 正二<sup>1</sup>, 山田 恵子<sup>2</sup>

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2022.4.21 受付)

## 文 献

- 1) Allen RH, Mehlman CS (1973) Isolation of gastric vitamin B<sub>12</sub>-binding proteins using affinity chromatography I. Purification and properties of human intrinsic factor. *J Biol Chem* **248**, 3660-3669
- 2) Fedosov SN, Laursen NB, Nexø E, Moestrup SK, Petersen TE, Jensen EØ, Berglund L (2003) Human intrinsic factor expressed in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* **270**, 3362-3367
- 3) 山田正二, 山田恵子 (2004) トピックス：ヒトの内因子をシロイヌナズナで大量発現. *ビタミン* **78**, 357-360
- 4) Bor MV, Nexø E, Hvas A-M (2004) Holo-transcobalamin concentration and transcobalamin saturation reflect recent vitamin B<sub>12</sub> absorption better than does serum vitamin B<sub>12</sub>. *Clin Chem* **50**, 1043-1049
- 5) von Castel-Roberts KM, Morkbak AL, Nexø E, Edgemon CA, Maneval DR, Shuster JJ, Valentine JF, Kauwell GPA, Bailey LB (2007) Holo-transcobalamin is an indicator of vitamin B-12 absorption in healthy adults with adequate vitamin B-12 status. *Am J Clin Nutr* **85**, 1057-1061
- 6) Hardlei TF, Mørkbak AL, Bor MV, Bailey LB, Hvas A-M, Nexø E (2010) Assessment of vitamin B(12) absorption based on the accumulation of orally administered cyanocobalamin on transcobalamin. *Clin Chem* **56**, 432-436
- 7) Hvas A-M, Buhl H, Laursen NB, Hesse B, Berglund L, Nexø E (2006) The effect of recombinant human intrinsic factor on the uptake of vitamin B12 in patients with evident vitamin B12 deficiency. *Haematologica* **91**, 805-808
- 8) 山田正二 (1991) トピックス：RIDA で測定されるビタミン B<sub>12</sub> アナログ量は正確か. *ビタミン* **65**, 41-43
- 9) Bor MV, Fedosov SN, Laursen NB, Nexø E. (2003) Recombinant human intrinsic factor expressed in plants is suitable for use in measurement of vitamin B<sub>12</sub>. *Clin Chem* **49**, 2081-2083
- 10) Nexø E, Nooroya B, Hvas AM, Christensen AL, Waters H. (2005) Autoantibodies against intrinsic factor (IF) measured with an ELISA using recombinant human IF as both catching and detecting reagent. *Clin Chem Lab Med* **43**, 351-356
- 11) Workinger JL, Kuda-Wedagedara ANW, Julin MM, White JM, Nexø E, Viola NT, Doyle RP (2019) Systemically administered plant recombinant holo-Intrinsic factor targets the liver and is not affected by endogenous B<sub>12</sub> levels. *Sci Rep* **9**, 12269-12282
- 12) Kuda-Wedagedara ANW, Workinger JL, Nexø E, Doyle RP, Viola-Villegas N (2017) <sup>89</sup>Zr-Cobalamin PET tracer: synthesis, cellular uptake, and use for tumor imaging. *ACS Omega* **2**, 6314-6320