

平成13年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第1分野

### 先端的創薬技術の開発に関する研究

## 植物による医療用タンパク質生産系開発に関する研究

所 属 国立感染症研究所 口腔科学部

研究者 矢野 明

### 要 旨

植物による医療用タンパク質生産系のモデルとして、マウス Fab 抗体、ヒト IgG 抗体を発現するタバコ培養細胞を作成した。詳細な解析は今後を待たねばならないが、活性をもつ Fab, IgG を発現するクローンを多数得ている。現在、2種のタバコ培養細胞株に数種のコンストラクトを導入し、生産効率等の解析を進めている。

### 1. 研究目的

植物は大量の物質生産能力を持ち、プリオンのようにヒトにとって危険な病原体をほとんど有しない。本研究はこのような性質を持つ植物をもちいて、医薬品となるタンパク質を生産させる系を確立する事を目標としている。過去20年間のバイオテクノロジーの進歩によって様々な植物への遺伝子導入が可能になった。植物は非常に高い物質生産能力をもち、高分子タンパク質を大量に生産する事ができる。バクテリア等とは異なり糖鎖の修飾もおきるため、生物学的に活性を持ったタンパク質を得られる可能性が高い。安全性の観点からも、BSE の様な人畜共通感染症の懸念がないことから、動物からタンパク質を精製する手法に比べ勝っている。このように優れた性質をもつ植物系は、欧米の産業界からいち早く取り入れられ近年中には遺伝子組換え植物によって生産された医薬品が登場することが予想される。一方、我が国では本研究のような研究そのものが、産官学すべての領域においてほとんど行われていない状況である。特筆すべきは、厚生労働省系の予算における唯一の研究が本件であることであろうか。本研究では3年の研究期間中に医薬品になりうるヒト型抗体(IgG)等を発現する植物を作成することを計画している。

### 2. 研究方法

1) 抗 *Streptococcus mutans* 植物抗体の作成。 虫歯の原因菌とされている *S. mutans* および *S. sobrinus* を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (MAb) から mRNA を抽出し、MAb H 鎖、L 鎖それぞれの可変領域と定常領域の一部を含む cDNA を RT-PCR を行って増幅した。おのおのの断片を大腸菌発現用のベクターにクローニングし、これをマスターライブラリーとした。マスターライブラリーを大腸菌に導入し、Fab を発現させ、ELISA によるスクリーニングを行って抗 *S. mutans* 抗体活性が高いクローンを得た。Fab クローンの塩基配列の決定と、マウス MAb との活性の比較を

行った。PCR 法で Fab H/L 両鎖を増幅、ここに植物由来シグナル配列、ER retention 配列を導入、CaMV35S Promoter, omega 配列, Nos Terminator をそれらの前後に配置し H/L 両カセットをタンデムに並べた状態で植物の形質転換用バイナリーベクターへ導入した。このとき、両カセット中の塩基配列をシーケンスし、ミューテーションが無いことを確認している。バイナリーベクターでアグロバクテリウムを形質転換し、PCR にてクローンを確認した上でこれを持ちいてタバコ培養細胞を形質転換した。薬剤耐性を指標にタバコのコロニーを選別し、さらに ELISA によるアッセイを行うことで、Fab 高発現タバコクローンを単離した。

2) ヒト抗 HBs IgG 植物抗体の作成。B 型肝炎ウイルス中和活性を持つヒトモノクローナル抗体 TAPC-301-CL4 由来 cDNA クローン、CL4HW 及び CL4LW を植物継室転換用バイナリーベクターへ導入した。その際、CL4 由来シグナルペプチドをそのまま用いたもの、及び植物由来シグナルペプチドに入れ替えたものを作成し、それぞれ CaMV35S Promoter, omega 配列, Nos Terminator を連結した。このコンストラクトを用いて上記マウス Fab クローン同様にタバコ培養細胞を形質転換した。多数のクローンの中から ELISA アッセイによって抗 HBs 抗体活性の高いクローンを選択した。これら数クローンについて液体培養を行い、Protein A カラムを用いて IgG をアフィニティー精製することで純度の高い植物抗体を得た。

### 3. 研究成果

マウス MAb は齧蝕病原菌といわれている *S. mutans* 及び *S. sobrinus* の持つ菌体表層タンパク質(PAc)に対する抗体であり、齧蝕病原菌の検出及び除菌に用いることができる可能性がある。大腸菌を用いて産生した Fab は ELISA を用いてマウス MAb と活性を比較したところ、若干反応性が弱い結果が出た。これは、定常領域を持たない Fab 抗体であることが原因であると考えられるが厳密には、マウス MAb を Fab に消化したものと比較してみないとわからない。いずれにせよ、リコンビナント Fab は *S. mutans* の検査には十分使用可能な活性をもつと思われる(Fig. 1)。これまでに得られた結果において特筆すべきはシグナルペプチドの影響である。シグナルペプチドをもたない Fab クローンは、どれも活性をしめさず、何らかの分泌経路に載るシグナルペプチドを連結したクローンは活性ある植物抗体を産生することに成功している(Fig. 2)。HBs 抗体に関しても、ヒト抗体 native の分泌シグナル、あるいは植物由来の分泌シグナルをもつ形質転換体を作成することで活性ある抗体を発現させることができた。

### 4. 考察

抗体を産生する哺乳動物培養細胞から、抗体の H 鎖と L 鎖をコードする cDNA をクローニングし、そのまま、あるいはシグナルペプチド部分を植物のもの置き換

えて植物培養細胞に導入すると、元の抗体と同様の活性をもつ植物抗体を得ることができた。植物に抗体、特に H 鎖 L 鎖の 2 つを必要とする Fab、(Fab)<sub>2</sub>、whole 抗体 (IgG 等) を産生させた論文は少ないが、H と L を別々に導入したタバコを掛け合わせることで活性のある抗体を得たという報告、2 つの断片をタンデムに並べて導入した私の研究を考えると、2 つの断片が分泌経路上に発現していれば活性を持った抗体が再構成されるといえよう。しかし、植物細胞中でどの程度抗体の再構成が起きているのかは今後の解析を必要とする。

また、分泌シグナルについて考察すると、一般にアミノ酸配列が厳密に決まっているわけではなく、シグナルとして働きうるアミノ酸の並び方（疎水性クラスターの後に電荷を持ったアミノ酸が来るなど）があるだけで、分泌シグナルの由来が抗体の産生量等に影響を与えないと考えていたが、一連の操作から植物由来のシグナルの一つが他のものに比べて形質転換体の作成効率がよく、細胞の増殖等が良い傾向があった。さらに検討すれば、非常に生産性を上げるシグナル配列を見つけることができるかもしれない。

## 5. まとめ

タバコ培養細胞は、その由来であるハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体と同様の特異性を持つ抗体（マウス Fab、ヒト IgG）を産生した。しかしながら、植物抗体の性質が本当にマウスあるいはヒト抗体と同等であるのかは今後の解析を待たねば結論することができない。今後さらなる解析を必要とする。

## 6. 研究発表

発表準備中

## 7. 知的所有権の取得状況

知的所有権の取得可能性について検討中

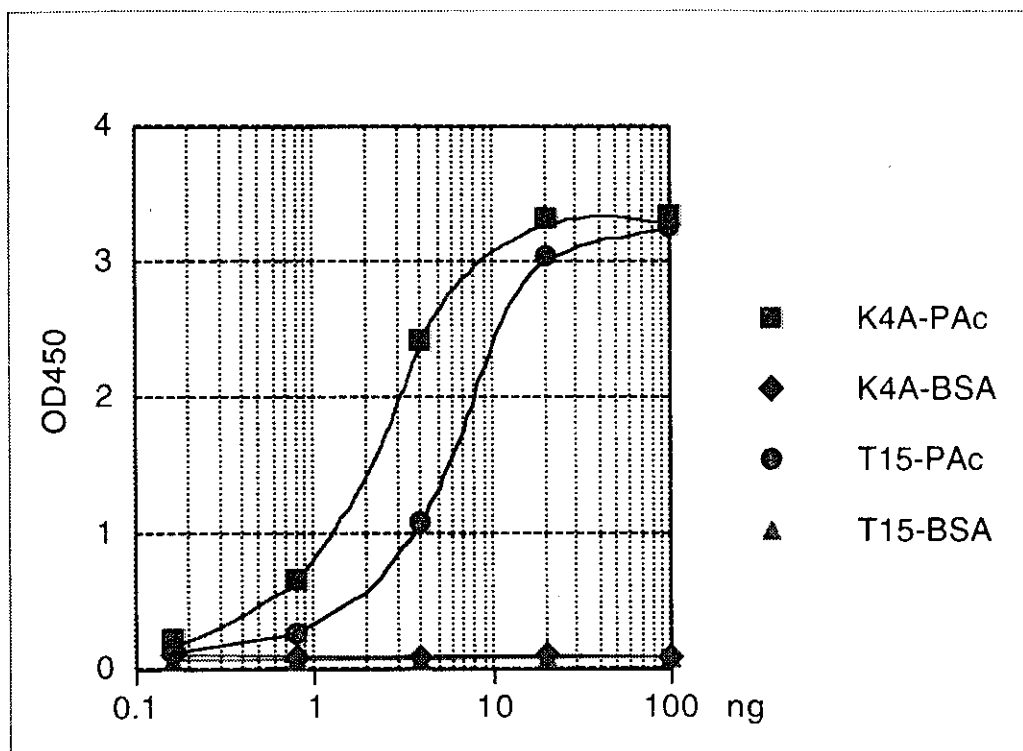


Fig. 1 マウスモノクローナル抗体 K4A と大腸菌で産生したリコンビナント Fab 抗体 T15 について、*S. mutans* の表面抗原 Pac と BSA に対する結合活性を ELISA 法を用いて比較した。マウス由来抗体と近い活性を持つことが示された。

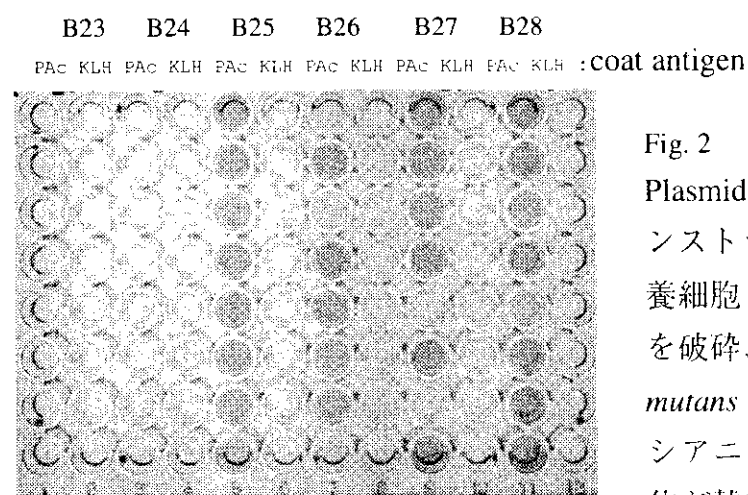


Fig. 2 Plasmid No.23 から No.28 までの各コンストラクトで形質転換したタバコ培養細胞 B23~B28 シリーズのコロニーを破碎、上清を ELISA にかけて抗 *S. mutans* Pac 抗体活性と、抗 KLH(ヘモシアニン)活性を調べた。Pac 特異抗体が賛成されていることが確認できる。

Plasmid constructions

- B23 35SPΩ-T15H-NosT-35SPΩ-T15L-NosT
- B24 35SPΩ-T15H-KDEL-NosT-35SPΩ-T15L-KDEL-NosT
- B25 35SPΩ-CalSP-T15H-NosT-35SPΩ-CalSP-T15L-NosT
- B26 35SPΩ-CalSP-T15H-KDEL-NosT-35SPΩ-CalSP-T15L-KDEL-NosT
- B27 35SPΩ-HTHSP-T15H-NosT-35SPΩ-HTHSP-T15L-NosT
- B28 35SPΩ-HTHSP-T15H-KDEL-NosT-35SPΩ-HTHSP-T15L-KDEL-NosT

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社