

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 国立保健医療科学院 口腔保健部
研究者 矢野 明

要旨

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。ヒトやマウスの培養細胞由来抗体と、植物由来抗体とで活性に差が見られず、植物による医療用組換えタンパク質の生産が有効な手法であることが示唆された。

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ことができる。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、人畜共通感染症の懸念がほとんどないことから、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。本研究では3年の研究期間中にヒト型抗体(IgG)等の医療用タンパク質を植物細胞をもちいて産生し、組換え植物の有用性を示すことを目的とする。また、研究を通して植物による生産系の長所、短所を明らかにし、実用的な医薬品製造系として用いるために、どのような改良が必要か基礎的な事実を明らかにする事をめざす。

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クエンスし、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も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。

一方で、マウス Fab の治療薬としての可能性を確かめるために、ヒトを対象とした *S. mutans* の除菌実験を行った。ミュータンス保持者を対象として、口腔内を清掃、同時に抗 *S. mutans* MAb を歯面上に塗布し数ヶ月にわたり口腔内のミュータンスをモニターした。残念ながら、除菌薬としては効果が弱いことが判明し

たが、ミュータンスの検出用抗体として使用できる可能性は高い。このことを確かなものとするため、定量 PCR法を用いたミュータンスの定量法を確立した。

2) 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 を植物細胞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。実際にマウス MAb を用いてヒトを対象としたミュータンス除菌実験を行ったところ、残念ながら完全に除菌出来るほどの効果は見られなかった。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。しかしながらリコンビナント Fab は *S. mutans* の検出には十分使用可能な活性をもつと思われた。タバコ培養細胞を用いて Fab を発現させたところ、分泌シグナルを持たない Fab の発現は検出できず、双子葉植物あるいは単子葉植物由来の分泌シグナルを N 末端に持つ Fab のみ発現が確認できた。双子葉植物の分泌シグナルを付加した Fab がもっとも高い発現を示した。ER リテンションシグナルの C 末端への附加の影響を調べたところ、総抗体量に関しては顕著な違いは見られなかった。ER リテンションシグナルは Fab を細胞内に強くとどめる効果があり、細胞外への分泌を著しく阻害した。精製過程を検討した場合、細胞内の Fab を精製するためには堅い植物細胞を破碎する必要がある、その過程で Fab が失活したり、プロセッシング過程の Fab が混入する可能性が示唆され、Fab の精製には培養液中へ分泌蓄積したものを回収することが有用であることが判明した。抗 HBs 抗体に関しても、ヒト抗体 native の分泌シグナル、あるいは双子葉、単子葉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。この場合、双子葉植物由来分泌シグナル、ヒト分泌シグナル、単子葉植物由来分泌シグナルの順で有効に働き、宿主であるタバコに近い双子葉植物の分泌シグナルがもっとも効率が良いことが判明した。抗 HBs 抗体は Protein A カラムを用いたアフィニティー精製を行ったが、ワンステップで高純度の抗体を得ることが出来た。このときも、培地中に分泌された抗体の精製が、より精製度が高く強い活性をもった抗体を得るために適している事がわかった。ELISA を用いて簡便に活性を比較したところ、ヒト培養細胞を用いて産生した抗 HBs 抗体と植物細胞由来の抗 HBs 抗体は、ほぼ同様の活性を示した。

4. 考察

一連の研究より、抗体のように高分子で多量体化など比較的複雑な構成過程を必要とするタンパク質を植物細胞で生産する場合、細胞外に分泌させることが重要であることが示唆された。他のグループにより、ER リテンションシグナルを付加し、細胞内に蓄積する方法がタンパク質の生産量上げる良い方法として報告されていたが、抗体の場合、ER 以降の分泌過程におけるタンパク質の修飾も重要であり、抗体として完成したタンパク質を生産するためには細胞外に分泌させたものを精製することが必要である。実際、細胞内の抗体を精製すると、精製過程における分解や、未成熟な抗体と思われる分子が多数溶出される傾向が見られた。植物細胞は非常に強く、その破碎にはかなりの労力を要する。一方で植物の細胞培養液はミネラルとス

クローズが主成分で、タンパク質はほとんど存在しない。ここから分泌された抗体を精製することは容易であり、以上の事実からも分泌系は医療用タンパク質の生産に適していると考えられる。

タンパク質の分泌に必要な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られる。しかし、これまでの結果から宿主となる植物に近い種由来のシグナルが他のものに比べて形質転換体の作成効率が高く、タンパク質の生産量も高かった。

5. 研究発表（特に本事業と関連の深いものは○で示した）

口頭発表

○2002年3月植物生理学会年会（岡山）「タバコ培養細胞を用いた抗体産生」

矢野 明¹、竹腰正隆²、花田信弘¹（¹感染研、口腔科学部、²東海大、医学部）

○2002年7月日本植物細胞分子生物学大会（奈良）「タバコ培養細胞を用いたヒト抗体生産」

矢野 明、竹腰 正隆¹、前田 史子¹（保健医療科学院・口腔、¹東海大・医）

論文

Yano, A., Kaneko, N., Ida, H., Yamaguchi, T. and Hanada, N.

Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*.

FEMS Microbiol. Let., 2002, 217 (23-30).

○Takeuchi, H., Fukushima, K., Senpuku, H., Nomura, Y., Kaneko, N., Yano,

A., Morita, E., Imai, S., Nisizawa, T., Kono, Y., Ikemi, T., Toyoshima, Y.,

Hanada, N.

Clinical study of *mutans streptococci* using 3DS and monoclonal antibodies.

Jpn. J. Infect. Dis., 2001, 54 (34-36).

4. 知的所有権の取得状況

特許取得を検討したが、植物の形質転換に関わる部分等で、少なくとも20以上の請求項に触れることが明らかとなり出願を断念した。