

本質記載：

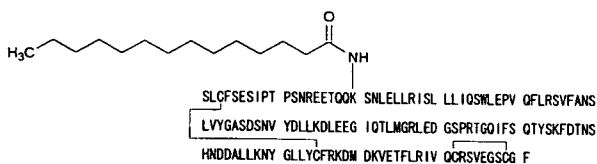
[英名]

● is a recombinant human growth hormone analog corresponding to amino acids 51-191 of human growth hormone, whose Lys at position 90 is substituted by Ser, and whose Lys at position 20 is myristoylated. ● is a modified protein consisting of 141 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒト成長ホルモンの類縁体で、ヒト成長ホルモンの51～191番目のアミノ酸に相当し、90番目のLys残基がSerに置換され、20番目のLys残基がミリストイル化されている。●は、141個のアミノ酸残基からなる修飾タンパク質である

アミノ酸配列、ジスルフィド結合、及び修飾



分子式及び分子量：

$C_{723}H_{1135}N_{189}O_{225}S_6$: 16,267.27

(4) 改変型・修飾(PEG化)型遺伝子組換えヘテロダイマー型ペプチド(不均一)の例 (①c, ②b, ③a及びc, ④a, ⑤c)

インスリンをモデルに、PEG化されたペプチド/タンパク質の記載方法を考える。インスリンはA鎖及びB鎖からなるヘテロダイマーペプチドである。モデルペプチドのA鎖10番目及びB鎖15番目のアミノ酸残基はLysに置換され、平均2～3個のPEGが共有結合している。PEG化予想部位はA鎖のN末端Glyと10番目のLys、並びにB鎖のN末端のPheと15及び

29番目のLysである。このPEG化インスリンの本質記載は以下ようになる。この分子は不均一であるので、本質記載に分子量を約〇〇と記載する。また、分子量に幅がある場合は、〇～〇のように幅記載してもよいものとする。分子式及び分子量欄には、ペプチド部分全体、及びA鎖とB鎖のペプチド部分の分子式及び分子量を記載する。A鎖の分子式及び分子量は、サブユニット内ジスルフィド結合はS-Sとして、またサブユニット間ジスルフィド結合は還元型(SH)として計算する。ペプチド部分全体は、すべてジスルフィド結合しているものとして計算する。アミノ酸配列、PEG化部位及びPEGの構造を記載する。

本質記載：

[英名]

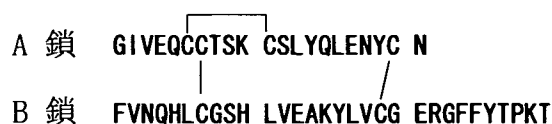
● is a recombinant human insulin analog in which Ile10 in the A-chain and Leu15 in the B-chain are substituted by Lys, and to which an average of 2 to 3 polyethylene glycol polymers (molecular weight: ca. 5,000) are covalently bound (probable attachment sites: A-chain: Gly1, Lys10; B-chain: Phe1, Lys15, Lys29). ● is a pegylated peptide (molecular weight: ca. 15,000 - 20,000) whose peptide moiety is composed of a A-chain consisting of 21 amino acid residues and a B-chain consisting of 30 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒトインスリンの類縁体で、A鎖Ile10及びB鎖Leu15がLysに置換され、平均して2～3個のポリエチレングリコール(平均分子量：約5,000)が結合している(主な結合位置：A鎖Gly1, Lys10; B鎖Phe1, Lys15, Lys29)。●は、21個のアミノ酸残基からなるA鎖及び30個のアミノ酸残基からなるB鎖から構成されるPEG化ペプチド(分子量：約

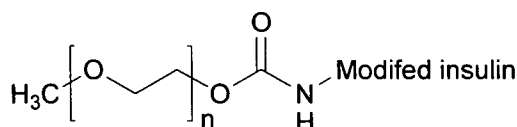
15,000~20,000)である。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合



A 鎖 G1, A 鎖 K10, B 鎖 F1, B 鎖 K15,
B 鎖 K29 : PEG 化部位

PEG 結合



分子式及び分子量 :

C₂₅₇H₃₈₅N₆₇O₇₇S₆ : 5,837.60 (ペプチド部分)

A 鎖 C₉₉H₁₅₄N₂₆O₃₅S₄ : 2,396.70

B 鎖 C₁₅₈H₂₃₅N₄₁O₄₂S₂ : 3,444.94

(5) 遺伝子組換え糖タンパク質の例 (①c, ②a, ④b, ⑤a)

インターフェロンガンマの2箇所を高マンノース型糖鎖と複合型糖鎖が結合している場合、本質記載には産生細胞と分子量を記載する。分子量及び分子式欄には、ペプチド部分の分子式及び分子量を記載する。また、一次構造の脚注に糖鎖結合部位を示し、別に部位毎の主な糖鎖構造を示す。

本質記載 :

[英名]

● is a recombinant human interferon gamma, which is produced in Chinese hamster ovary cells. ● is a glycoprotein (molecular weight: ca.21,000) consisting of 146 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒトインターフェロンガンマで、チャイニーズハムスター卵巣細胞から産生される。●は、146個のアミノ酸からなる糖タンパク質(分子量:約21,000)である。

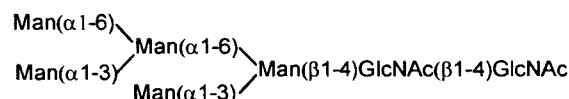
アミノ酸配列 :

CYCDPYVKE AENLKYYFNA GHSDVADNGT LFLGILKNWK EESDRKIMQS
QIVSFYFKLF KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM NVKFFNSNKK KRDDFEKLTN
YSVTDLNVQR KAIHELIQVM AELSPAAKTG KRKRSOMLFR GRRASQ

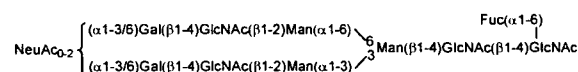
N28, N100 : 糖鎖結合部位

主な糖鎖の推定構造 :

N28



N100



分子量及び分子式 :

C₇₆₁H₁₂₀₆N₂₁₄O₂₂₅S₆ : 17,145.41(タンパク質部分)

(6) 遺伝子組換えヒト化抗体の例 (①c, ②c, ③d, ④b, ⑤c)

ヒト化抗体の場合、本質記載には以下のように、相補性決定部の由来とフレームワーク及び定常部の由来をサブクラス(IgG1~4)及びL鎖(κ鎖またはλ鎖)を含めて記載する。キメラ型の場合は、可変部の由来と定常部の由来をサブクラス(IgG1~4)及びL鎖(κ鎖またはλ鎖)を含めて記載する。N末端のピログルタ

ミン酸形成や C 末端のプロセッシングのように意図しない修飾が一部の分子に生じている場合は、本質記載ではなく、一次構造の脚注に **K459** : プロセッシング (部分的) のように記載する。分子式及び分子量は、修飾されていないものとして計算する。

本質記載 :

[英名]

● is a recombinant humanized monoclonal antibody composed of complementarity-determining regions derived from mouse anti-human ○ monoclonal antibody and framework regions and constant regions derived from human IgG1. ● is produced in Chinese hamster ovary cells. ● is a glycoprotein (molecular weight: ca.155,000 – 160,000) composed of 2 H-chain (γ1-chain) molecules consisting of 459 amino acid residues each and 2 L-chain (κ-chain) molecules consisting of 214 amino acid residues each.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり、マウス抗ヒト○抗体の相補性決定部、並びにヒト IgG1 のフレームワーク及び定常部からなる。●は、CHO 細胞により産生される。●は、459 個のアミノ酸残基からなる H 鎖(γ1 鎖) 2 分子及び 214 個のアミノ酸残基からなる L 鎖(κ鎖) 2 分子で構成される糖タンパク質(分子量: 約 155,000~160,000)である。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合:

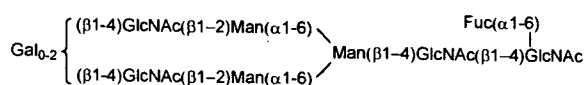
```
ELGMTQSPSS VSASVGRVRT ITCRASHSIS TYLNWYQQPK GKAPKLLIYA
ASLSQSGVPS RFGSGSGSDT FSLTINSLQP EDFATYYCQQ TFSPSGTFGQ
GTKVELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSD ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK LYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC
```

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT SYWMSWRQA PGKGLEWVAN
IKQEGSEKTY VDATKGRFTI TRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREF
ESTMTSVNAD YYYFYMDVWG KGTTVTSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG
TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSVVTV
PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVPEK SCDKTHCTPP CPAPELLGGP
SVFLFPPKPK DTLMI SRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
TKPREEQYNS TYRVVSLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGOPE
NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
KSLSLSPGK
```

H 鎖 E1 : 部分的ピログルタミン酸 ; H 鎖 N309 : 糖鎖結合 ; H 鎖 K459 : 部分的プロセッシング ;

L 鎖 C214 – H 鎖 C232, H 鎖 C238 – H 鎖 C238, H 鎖 C241 – H 鎖 C241 : ジスルフィド結合

主な糖鎖の推定構造 :



分子量及び分子式 :

$C_{6536}H_{10096}N_{1736}O_{2054}S_{48}$: 147,395.62 (タンパク質部分, 4 量体)

H 鎖 $C_{2251}H_{3472}N_{594}O_{693}S_{18}$: 50,520.39

L 鎖 $C_{1017}H_{1580}N_{274}O_{334}S_6$: 23,181.45

(7) 遺伝子組換え改変型融合型二量体 (ホモ) 糖タンパク質の例 (①c, ②c, ③a 及び d, ④b, ⑤b)

N 末端側は受容体タンパク質の細胞外領域

に由来し、C末端側はFcドメインに由来する融合タンパク質で、N末端側から147番目のアミノ酸がSer置換されている場合、本質記載は以下ようになる。この融合タンパク質の6箇所糖鎖が結合しており、その内シアル酸結合糖鎖は活性に影響するものとする。アミノ酸配列とは別に糖鎖結合部位毎に代表的な糖鎖の推定構造を記載し、シアリル糖鎖が結合している3箇所については、シアル酸が結合していることがわかるように記載する。分子式及び分子量は単量体及び二量体について記載する。

本質記載：

[日本名]

●は、遺伝子組換え融合糖タンパク質であり、1～133番目はヒトCD28の細胞外領域、また134～356番目は改変型ヒトIgG1のFcドメインからなり、147番目のアミノ酸残基がSerに置換されている。●は、マウスミエローマ(NS0)細胞から産生される。●は、356個のアミノ酸残基からなるポリペプチド2分子から構成される糖タンパク質(分子量：約90,000)である。

[英名]

● is a recombinant fusion glycoprotein composed of an extracellular domain of human CD28 in positions 1 - 133 and modified Fc domain of human IgG1 at positions 134 - 356, and whose amino acid residue at position 147 is substituted by Ser.
 ● is produced in mouse myeloma (NS0) cells.
 ● is a glycoprotein (molecular weight: ca. 90,000) composed of 2 polypeptide molecules consisting of 356 amino acid residues each.

分子量及び分子式：

$C_{3604}H_{5534}N_{934}O_{1070}S_{34}$: 80,156.33 (タンパク

質部分, 2量体)

単量体 $C_{1802}H_{2769}N_{467}O_{535}S_{17}$:

40,080.18

アミノ酸配列及びジスルフィド結合：

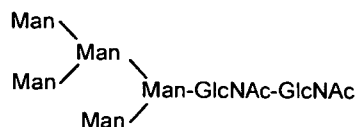
```

KILVLSQPLML VAYDNAVNLS CKYSYNLFSR EFRASLHKGL DSAVEVCVVY
GNYSQQLQVY SKTGFNCDGK LGNESVTFYL QNLYVNQTDI YFCKIECMYP
PPYLDNEKSN GTIIHVKGKH LCPSPLFPGP SKPTCPPCPA PELLGGSSVF
LFPPKPKDTL MISRTPEVTG VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DNLNKGKEYK KVSNKALPAP IEKTISKAKG
QPREPQVYTL PPSREENTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY
KTTPLVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQGN VFSCSYMHEA LHNHYTKSL
SLSPGK
  
```

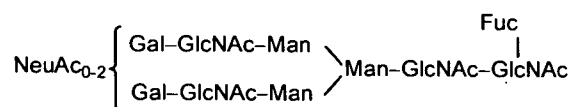
N18, N52, N73, N86, N110, N206: 糖鎖結合;
 K356: 部分的プロセッシング; C135, C138:
 分子間ジスルフィド結合

主な糖鎖及び活性に寄与する主な糖鎖の推定構造：

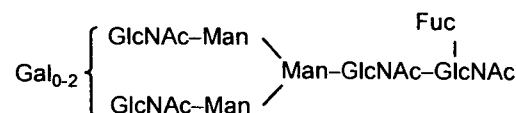
N18, N86



N52, N73, N110



N206



D. 結論

バイオ医薬品の本質、アミノ酸配列等、及び分子式及び分子量を記載するにあたって考慮すべき事項や要素について考察し、モデルペプチド/タンパク質を用いて、記載例を提案した。

E. 研究業績

誌上発表

- 1) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Yukari Matsuishi, Masashi Toyoda, Yoko Katagiri, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akihiro Umezawa, Teruhide Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy product: Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Furrier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1160, 263-269
- 2) Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi: Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein. *The protein Protocols Hand-book. Third Edition.* Published by Humana Press, USA. Edited by John Walker. In press
- 3) Yasuhiko Kizuka, Kyoko Kobayashi, Shinako Kakuda, Nakajima Yukari, Nana Kawasaki, Shougo Oka: Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein of non-sulfated HNK-1 epitope in mouse kidney, *Glycobiology*, in press
- 4) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. *Glycoscience Lab. Manual.*, Ed. Naoyuki Taniguchi, in press
- 5) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* In press
- 6) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. *実験医学増刊号*, 25, 1127-1136 (2007)
- 7) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 抗体の LC/MS. 「抗体医薬品の最前線」105-115, 植田充美監修, シーエムシー (東京) 2007
- 8) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 9 回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 101-109 (2007)
- 9) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 12 回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 1603-1611 (2007)
- 10) 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 15 回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 2187-2194 (2007)
- 11) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 18 回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 101-105 (2008)
- 12) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 21 回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 印刷中
- 13) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能解析」(Functional Glycomics)研究成果公開発表シンポジウム「第3の生命鎖: 糖鎖の謎が今, 解る」(監修: 古川鋼一) 印刷中
- 14) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. 蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性. 印刷中
- 15) 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英: 糖鎖と生物薬品. *Journal Applied Glycoscience*. 印刷中

学会発表:

- 1) 川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿを用いた糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本プロテオーム機構第5回大会 (2007. 7. 30-31) 東京
- 2) 片桐洋子, 佐藤 伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木佑典, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬: ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性. 第 27 回日本糖

- 質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
- 3) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿによる目的部分糖鎖構造を持つ糖タンパク質の特異的同定. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 4) 佐野 琴音, 旭美穂, 浅沼公恵, 伊藤さつき, 橋井則貴, 川崎ナナ, 安川然太, 佐藤ちひろ, 北島健, 小川温子: 組織再生に関わるマトリクス糖タンパク質の活性調節と修復過程における糖鎖変化. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 5) 楽 娜, 伊原友紀, 松下-及川浩子, 中村公亮, 川崎ナナ, 小川温子: プタ腺臓 α -アミラーゼに対する十二指腸刷子縁膜糖タンパク質レセプターの探索. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 6) 野村和子, 林 康宏, 村田大輔, 永石貴之, 水口惣平, 出嶋克史, 福嶋宏史, 松石 紫, 川崎ナナ, 安藤恵子, 三谷昌平, 伊藤 信, 平林義雄, 野村一也: 線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 7) 井上理抄, Kay-Hooi Khoo, 川崎ナナ, Bruce Youg MA, 川寄敏祐, 川寄伸子, : ヒト結腸ガン細胞上に発現するマンナン結合タンパク質 (MBP) の内在性糖鎖リガンド. 第27回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 8) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖と医薬品. 日本応用糖質科学会平成19年度大会 (2007. 8. 30)平塚
 - 9) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 中島 紫, 高倉大輔, 内田恵理子, 押澤 正, 山口照英: ヒトミエロペルオキシダーゼの部位特異的糖鎖構造解析. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 10) 片桐洋子, 佐藤 伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木佑典, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬: ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性と endopeptidase 活性. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 11) 中村里香, 手島玲子, 佐藤里絵, 中島 紫, 川崎ナナ, 山口照英, 澤田純一, 名古屋博之 (養殖研): GM 遺伝子組換えアマゴの安全性研究-アレルゲン性について. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 12) 楽 娜, 伊原友紀, 松下-及川浩子, 中村公亮, 川崎ナナ, 白川 剛, 小川温子: 膵臓 α -アミラーゼに対する内在性レセプターの同定と糖鎖結合部位の予測. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 13) Kotone Sano, Miho Asahi, Kimie Asanuma, Maiko Yanagibashi, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Zenta Yasakawa, Chihiro Sata, Ken Kitajima, Haruko Ogawa: Mechanism of tissue remodeling regulation by the change in glycosylation and biological activity of extracellular matrix glycosylation. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 14) 森田 一平, 角田 品子, 山本 修平, 鮫島 健彦, 川崎 ナナ, 川寄 敏祐, 岡 昌吾: 樹状突起スパイン形成における HNK-1 糖鎖機能に関する研究 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 15) 小林 恭子, 木塚 康彦, 川崎 ナナ, 角田 品子, 岡 昌吾: マウスの腎臓における非硫酸化型 HNK-1 糖鎖を発現する新規タンパク質の同定とその機能に関する研究 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 16) 水口 惣平, 野村 和子, 出嶋 克史, 泉川 友

- 美, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 田村 純一, 中島 紫, 伊藤 さつき, 川崎 ナナ, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 北川 裕之, 菅原 一幸, 野村 一也: モデル生物 *C. elegans* を用いたヘパラン硫酸とコンドロイチンプロテオグリカンの生体内機能解析 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 17) 村田 大輔, 野村 和子, 水口 惣平, 出嶋 克史, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 福島 慶子, 山下 克子, 中島 紫, 伊藤 さつき, 川崎 ナナ, 野村 一也: 線虫 *C. elegans* における GPI アンカーの機能解析 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 18) 野村 和子, 林 康広, 村田 大輔, 永石 貴之, 水口 惣平, 出嶋 克史, 福島 宏史, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 中島 紫, 川崎 ナナ, 伊東 信, 平林 義雄, 野村 一也: 線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 19) 平野 真, Bruce Y. Ma, 川崎 ナナ, 川寄 伸子, 川寄 敏祐: Binding of MBP to Meprins Results in the Inhibition of the Proteolytic Activity of Meprins and the Initiation of the Complement Activation
- 20) 川寄 伸子, 井上 理抄, Kay-Hooi Khoo, 川崎 ナナ, Bruce Yong MA, 川寄 敏祐: ヒト結腸がん細胞より単離されたマンナン結合タンパク質リガンド糖タンパク質の性質 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
- 21) 橋井則貴, 川崎ナナ: シュードプロテオグリカンの検定と構造解析. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究推進事業研究成果発表会「糖鎖の機能解明と医療への応用」お茶の水女子大学糖鎖科学研究教育センターシンポジウム (2007. 11. 21)東京
- 22) 川崎ナナ: LC/MSⁿ を用いた糖蛋白質の特性解析大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質翻訳後修飾」吹田市 (2008. 1. 10, 11)
- 23) 川崎ナナ: 文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能解析」(Functional Glycomics)研究成果公開発表シンポジウム「第3の生命鎖: 糖鎖の謎が今, 解る」有楽町 (2008. 1. 25, 26)
- 24) 川崎ナナ: LC/MS を用いた糖鎖の微量かつ網羅的解析と創薬への応用. 日本薬学会第128年会一般シンポジウム「グライコサイエンスから創薬へ」. 横浜 (2008. 3. 26-28 予定)
- 25) 橋井則貴, 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤さつき, 中島 紫, 高倉大輔, 山口照英: 質量分析法を用いたグリコサミノグリカンの構造特性解析. 日本薬学会第128年会, 横浜 (2008. 3. 26-28 予定)
- 26) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 石川リカ, 高井俊紀, 古賀明子, 岡本寿美子, 山口秀人, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 窪田雅之, 掛樋一晃, 木下充弘, 山口照英: ペプチド及びタンパク質医薬品の質量分析試験の標準化に関する研究. 日本薬学会第128年会, 横浜 (2008. 3. 26-28 予定)
- 27) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: LC/MS を用いた抗体医薬品の特性解析, 日本薬学会第128年会, 横浜 (2008. 3. 26-28 予定)
- 28) 平野 真, Bruce Y. Ma, 川崎ナナ, 川寄伸子, 川寄敏祐: マンナン結合タンパク質による meprin のプロテアーゼ活性調節. 日本薬学会第128年会, 横浜 (2008. 3. 26-28 予定)

トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の
品質評価等に関する研究

分担研究者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第二室長

協力研究者 鈴木琢雄 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

研究要旨

トランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質製造法は、バイオ医薬品の製造コスト削減や、動物由来原料の使用に伴う安全性上の問題を回避し得る方法として注目されている。しかし、植物とヒトではタンパク質の翻訳後修飾の機構が異なるために、トランスジェニック植物で製造された糖タンパク質にはヒトの糖タンパク質には存在しない構造の糖鎖が付加される。そのため、植物特有の糖鎖がヒトに対して免疫原性を示すという安全性上の問題が生じることが懸念され、品質・安全性確保における課題となっている。本年度は、植物由来糖鎖の免疫原性に関する研究の現状を調査し、医薬品としての品質・安全性への影響を検討した。植物由来成分にアレルギー反応を示すヒトの約 20%では血中に植物糖鎖に対する IgE が検出されること、また、トランスジェニック植物で生産した組換えヒト糖タンパク質に対してアレルギー患者血清 IgE が結合性を示し、そのエピトープが糖鎖部分であることが報告されている。植物糖鎖に対する IgE の存在はアレルギー症状との相関が低いとされているが、植物糖鎖を持つ組換えタンパク質をヒトに投与した場合、IgE を持つヒトでアレルギー反応がおこる可能性は否定できない。植物糖鎖は食物として日常的に摂取される植物にも含まれるため、組換えタンパク質医薬品に結合している植物糖鎖の存在は、適用対象を植物成分に対してアレルギー反応を示さないヒトに限定するのであれば経口投与される製品では許容されるが、非経口投与する製品では回避すべきであると考えられる。植物で生産され臨床試験が行われている組換え糖タンパク質のほとんどは経口投与等により適用されるものである。一方で、非経口投与される組換え糖タンパク質の生産にもトランスジェニック植物を応用することを目的に植物に特有な糖鎖を付与しない発現系の開発も進められており、組換えタンパク質医薬品の生産系としてのトランスジェニック植物の有用性のさらなる向上にむけて今後の研究開発の進展が期待される。

A. 研究目的

近年、タンパク質性医薬品の製造方法をめぐって、安全性のさらなる向上と製造コスト削減を求める動きが強くなり、これらの要件を満足しうる方法としてトランスジェニック植物を

用いた組換えタンパク質生産が注目されている。トランスジェニック植物を用いたタンパク質生産では、血清等の動物由来原料を用いる際の安全性上の重要課題である動物ウイルス等のヒト感染性物質混入に関する対策を軽減す

ることができる。また、高価な培地成分や特殊な動物細胞培養設備に代わり、比較的安価な植物栽培による生産が可能であるため、製造コストを大幅に削減することができるとも言われている。海外ではトランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質の中に、既に臨床試験の段階にまで開発が進んだものがあり、医薬品としての実用化も遠くないと予想されるが、これまでにヒトの医薬品として承認された実績がないため、製造されたタンパク質の品質・安全性の確保が今後の課題である。

トランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質における医薬品としての品質・安全性確保のための基本的な考え方は、微生物や動物細胞を用いて製造された従来のタンパク質性医薬品と変わらない。しかし、植物では、タンパク質の翻訳後修飾がヒトや動物と異なること、微生物や動物にはない成分が含まれること、環境から混入する可能性のある混入汚染物質の種類が異なることなどから、植物に特有の問題に注意して評価を行う必要がある。すなわち、トランスジェニック植物を用いて製造されたタンパク質性医薬品の品質・安全性確保においては、目的タンパク質の翻訳後修飾、製造工程由来不純物、混入汚染物質、の3点に関する評価が特に重要であると考えられる。これらのうち製造工程由来不純物および混入汚染物質は、生産宿主として用いられる植物種、栽培法、利用される部位、精製法などにより、評価対象とすべき物質が異なり、個別の製品に応じた対応が必要と考えられる。これに対して、植物に特有な翻訳後修飾の問題は、宿主植物種や目的タンパク質によらず共通した課題である。そこで本年度は、植物に特有の糖鎖が持つ免疫原性に関連する品質・安全性確保における課題を中心に検討する。

B. 研究方法

学術雑誌に掲載された論文、トランスジェニック植物で製造した組換えタンパク質医薬品を開発している企業のホームページ、および、トランスジェニック植物により製造されるタンパク質性医薬品の品質・安全性確保に関する欧米のガイドライン案(*)を参考に調査検討を行った。

(*) “Guideline on the Quality of Biological Active Substances Produced by Stable Transgene Expression in Higher Plants” EMEA¹⁾

“Guidance for Industry: Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals” FDA/USDA²⁾

C. 研究結果

C.1. 組換えタンパク質医薬品の製造に用いられる宿主細胞に関する動向

1980年代以降バイオテクノロジーの進展を背景に実用化された組換えタンパク質医薬品は、低分子化合物医薬品では成し得ない高度な生物活性を持つことから、現代医療には欠かせない存在となっている。組換えタンパク質医薬品の生産には、大腸菌、酵母、あるいはCHO、SP2/O、NS0などの動物細胞が用いられ、例は少ないがヒト由来細胞株が用いられることもある。Fig.1に我が国でこれまでに承認された組換えタンパク質医薬品の承認年を生産宿主別に示した。大腸菌や酵母で生産される製品の開発が一定数であるのに対して、特に最近、動物細胞で生産される製品の増加が顕著である。組換え医薬品の製造では、生産コストや動物由

来原料の不利用の点で大腸菌や酵母の利用に利点があるが、医薬品として有用なタンパク質には構造が複雑なものが多く、また生体内安定性や活性保持に糖鎖が必要なものが多いために、動物細胞あるいはヒト細胞を用いて生産される製品が増えてきていると考えられる。動物細胞を用いた組換えタンパク質医薬品では生産コストが高く、薬価も高額となる。また、血清等の動物由来原料を使用するため、それに伴う安全性面での懸念も少なからずある。近年多くの製品が上市されている抗体医薬品では投与量が高く、1回の投与量が数十 mg～数百 mg にもなるため、生産設備への投資も膨大なものとなっている。

一方、トランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質生産には、糖鎖修飾を含め複雑な構造を持つタンパク質の生産が可能であること、動物由来原料の使用を避けられること、栽培による場合は生産規模の拡大縮小が容易であること、生産コストが低いこと、といった利点がある。そのため、大腸菌、酵母、動物細胞、ヒト細胞に続く新たな生産宿主として、植物の利用に期待が持たれているところである。

C.2. 植物における組換えタンパク質生産と製品開発への応用

これまでにトランスジェニック植物で発現されたタンパク質の例を Table 1 に示す。酵素、ホルモン、サイトカイン、抗体など、様々なタンパク質の発現が試みられている。植物を用いて組換えヒトタンパク質を生産した最初の例は、1986年に組換えタバコで発現された成長ホルモン(ノパリン合成酵素との融合タンパク質として)である³⁾。ヒトタンパク質と同じ配列を持つタンパク質としての第一号は、1990年に組換えタバコと組換えジャガイモでつく

られた血清アルブミンで、シグナルペプチドを植物タンパク質由来のものに置換することにより、タンパク質の細胞外分泌と正しい N 末端プロセッシングに成功したことが報告されている⁴⁾。また、1989年には、組換えタバコを用いたマウス IgG の発現が報告された⁵⁾。IgG の発現系では、H 鎖あるいは L 鎖の遺伝子を導入した組換えタバコを別々に作製し、その交配によって H 鎖と L 鎖を発現する組換えタバコを作製することに成功している。これにより、H 鎖と L 鎖の会合、S-S 結合形成など、抗体分子の成熟に必要なシステムが植物にも存在することが明らかとなり、トランスジェニック植物が抗体の生産に応用可能であることが示された。さらに、1995年には、抗体分子の中でも、2分子の IgA と J 鎖および secretory component からなる複雑な分泌型 IgA の構造を持つ分子 sIgA/G についても、遺伝子組換えと交配の組み合わせにより組換えタバコで生産が可能なが示された⁶⁾。これらの他、現在までに、エリスロポエチン、インターフェロンアルファ、インターロイキン類などのヒトタンパク質や、各種の抗体関連分子、ワクチン用の抗原を発現させた例が多数報告されており、医薬品として有用な種々の組換えタンパク質を植物で作ることが可能であると考えられる^{7,8)}。

トランスジェニック植物を利用して製造された組換えタンパク質医薬品の中で、臨床試験が行われている例を Table 2 に示す。その中には、

- ・ 抗 *S.mutans* 抗体のように、これまでにない有効成分を持つ医薬品を開発しようとするもの
- ・ 胃リパーゼや内因子のように、これまで動物

由来原材料から精製されて用いられていたタンパク質性医薬品を組換えタンパク質医薬品として開発しようとするもの

・ インターフェロンアルファのように、既に臨床で使用されている組換え医薬品と同等/同質あるいは同種同効の製品として開発しようとしているもの

があり、バイオ医薬品開発の様々な局面でトランスジェニック植物の利用が試みられていると言える。抗 *S.mutans* 抗体、胃リパーゼ、内因子、ラクトフェリンは糖タンパク質であるが、いずれも口腔内、経口、あるいは点眼、といった方法で投与されるものであり、有効成分がそのままの形で血中に入ることは考えにくい投与方法となっている。

ウキクサで生産されているインターフェロンアルファについては、サブクラスなどの詳細が明らかでないが、対照薬としてインターフェロンアルファ-2b (イントロン®) を用いた臨床試験が行われていることから考えると、イントロン®と同等/同質のバイオ後続品を目指した開発が行われているとも考えられる。(イントロン®の生産宿主は大腸菌。) ただし、持続性製剤としては、イントロン®では PEG 化したペグイントロン®が上市されているが、ウキクサで生産したインターフェロンアルファでは生分解性ポリマー PolyActive™ を利用した製剤の開発が行われている。

C.3. 植物由来糖タンパク質糖鎖の特徴

ヒトの糖タンパク質を植物で発現させると、ヒトや動物細胞の場合と同じ位置に N 結合型糖鎖が付加されるが、付加される糖鎖の構造が異なる⁹⁾。そのため、植物を用いて生産された糖タンパク質では、免疫原性、生物活性、体内動態等の点でヒトの糖タンパク質とは異なる

可能性がある。ヒト糖タンパク質糖鎖と異なる植物由来糖タンパク質糖鎖の構造上の主な特徴は、

・ コアマンノースに β 1-2 結合したキシロースが存在する

・ 還元末端 N-アセチルグルコサミンに α 1-3 結合したフコースが存在する

・ シアル酸が付加されない

ことである (Fig.2)。N 結合型糖鎖における β 1-2 キシロース、 α 1-3 フコースの付加は、これまでに組換えタンパク質発現に用いられた全ての植物種において起こり得るとされており⁹⁾、植物で発現された組換えタンパク質の糖鎖解析でもその存在が報告されている^{10,11)}。

植物で生産された組換え糖タンパク質の O 結合型糖鎖を解析した例は少ないが、組換えトウモロコシで発現したヒト IgA では、ヒト血清由来 IgA とは異なり、セリンへの糖鎖付加が起こらず、その近傍のプロリンの水酸化と水酸化プロリンへのアラビノースの付加が起こっていることが報告されている¹²⁾。ヒト血清 IgA のヒンジ領域に付加された O 結合型糖鎖は IgA のプロテアーゼによる分解を抑制する働きを持つとされているが、糖鎖構造の違いが IgA の特性にどのような違いをもたらすかは不明である。また、水酸化プロリンを持つ植物由来糖タンパク質 (Hyp-rich glycoproteins: HGRPs) には免疫原性を示すものがあることが知られているため⁹⁾、医薬品としての安全性の点では注意が必要であろう。

C.4. ヒト血中に存在する植物糖鎖に対する抗体

ヒトに対してアレルギー性を示す植物由来成分には、各種のアレルゲンに共通するエピー
— プ Cross-reactive Carbohydrate

Determinants (CCD) があることが知られており、CCD と IgE の結合では、CCD を構成する糖鎖構造のうち β 1-2 キシロースと α 1-3 フコースが重要であるとされている¹³⁻¹⁶⁾。従って、植物糖鎖がヒトに対して抗原性を示し得ることは、アレルギー等に関するこれまでの研究結果から明らかと言える。

CCD に対するヒト血中の抗体とアレルギーの関係に関してはよく研究されており、植物由来成分にアレルギー反応を示すヒトの約 20% では血中に CCD に対する IgE が検出されると報告されている^{14, 17)}。しかし、血中 IgE の存在とアレルギーの臨床症状には相関が少ないとされており、その理由として、抗 CCD IgE 陽性の患者では抗 CCD IgG が共存している場合が多く、IgE とアレルゲンの結合を IgG が阻害するために、IgE を介したアレルギー反応が起こらないこと等が考えられている¹⁸⁾。IgE と共存する IgG のサブクラスについては IgG4 が多いとする報告があり、IgM からのアイソタイプスイッチが起こる際に、Th2 が優位であると IgE と IgG4 が産生されることを反映していると思われる。また、報告は限られているが、トランスジェニック植物で生産した組換えヒト糖タンパク質に対してアレルギー患者血清 IgE が結合性を示し、そのエピトープは糖鎖部分であることが示されている¹⁹⁾。

一方、健常人でも約 50% では β 1-2 キシロースに対する抗体が検出され、約 25% では α 1-3 フコースに対する抗体が検出されたと報告されている²⁰⁾。検出されている抗体のアイソタイプは IgM と IgG である。ヒトは食物として異種タンパク質である植物由来成分を日常的に摂取し、花粉などの植物由来物質にも日常的に曝露されている状況にある。食物として摂取された植物由来糖タンパク質は消化管で分解

されて吸収されるが、一部は免疫原となり得る形で吸収され、抗体産生を惹起しているものと考えられる。また、たとえ免疫原となる形で吸収されたとしても、ホストにアレルギー傾向がなければ IgE は産生されず、植物成分に対して臨床的に症状は見られないものと思われる。

C.5. 植物糖鎖を持つ組換えタンパク質医薬品の安全性

植物糖鎖の免疫原性が組換えタンパク質医薬品の安全性に与える影響は、(1) 投与以前から患者に抗体が存在する場合、(2) 繰り返し投与に伴って抗体が産生される場合、に分けて考えることができる。

C.5.1. 植物糖鎖に対する抗体を持つヒトにトランスジェニック植物由来組換えタンパク質医薬品を投与する際の安全性上の懸念

植物糖鎖に対する IgE を有するヒトに植物糖鎖を持つ組換えタンパク質を投与した場合、IgE と組換えタンパク質との結合により $Fc\epsilon R$ が活性化され、アレルギー反応が起こることが懸念される。血中 IgE レベルはアレルギーの臨床症状との相関が少ないとされているが、特に医薬品が非経口的に投与された場合は、それまでに患者が曝露されていた抗原とは存在様式が濃度や部位の点で異なるため、日常生活での曝露で問題がなくても IgE を介した有害作用がおこる可能性は否定できないであろう。組換えタンパク質の糖鎖結合部位が複数ある場合や、目的物質由来不純物として凝集体がある場合には、抗原と IgE による $Fc\epsilon R$ の架橋が起こりやすく、アレルギー反応が生じやすいと考えられることから、特に注意が必要と思われる。したがって、非経口投与する糖タンパク質医薬品の場合は、植物特有の糖鎖を付加しな

いよう改良した系がなければ、他の生産宿主を選択することが妥当であろう。植物糖鎖を持つ組換えタンパク質をヒトに非経口的に投与するのであれば、事前の IgE のスクリーニングが必須であると考えられる。

植物糖鎖に対する IgE 以外の抗体 (IgG 等) を有するヒトに植物糖鎖を持つ組換えタンパク質を投与した場合、組換えタンパク質の血中半減期短縮等が起こり得ると考えられる。しかし、従来の組換えタンパク質医薬品で知られているように組換えタンパク質医薬品に対する抗体が生じている場合でも抗体が内因性タンパク質の中和活性を持つ場合以外は影響がそれほど大きくないことや、ヒトにはないシアル酸である N グリコリルノイラミン酸の例などを考えると、植物糖鎖に対する IgG の存在は、あまり大きな問題とならない可能性もある。

N グリコリルノイラミン酸は、ヒト以外の動物に存在する非ヒト型のシアル酸として知られ、N グリコリルノイラミン酸に対する抗体は異種成分に対する拒絶反応の原因になり得るとされている²¹⁾。一方で、ヒトは食物として動物由来成分を摂取するため、日常的に N グリコリルノイラミン酸に曝露されている状態にある。また、ほとんどの健常人で N グリコリルノイラミン酸に対する抗体が検出されると報告されている (抗体陽性率 IgA : 16/18、IgM : 14/18、IgG : 17/18)²²⁾。組換えタンパク質医薬品の生産に用いられる細胞の多くは動物細胞であり、動物細胞で生産された糖タンパク質医薬品の糖鎖の一部には N グリコリルノイラミン酸が結合しているとされている²³⁾。動物細胞で生産された組換えタンパク質医薬品には非常に多くの使用例があるが、これまで N グリコリルノイラミン酸の存在に関連する

有害作用は報告されていない²³⁾。

ヒトは N グリコリルノイラミン酸の合成に必要な CMP-NeuAc 水酸化酵素を遺伝的に欠損し、N グリコリルノイラミン酸を合成することができないが、N グリコリルノイラミン酸を細胞に取り込んで糖鎖に付加することはできるため、ヒト細胞・組織にも微量ながら N グリコリルノイラミン酸が検出されている^{22, 24, 25)}。キシロースやフコースはヒト糖鎖にも含まれる糖であるが、結合部位や結合様式がヒトと植物では異なる。この点は、動物特異的な N グリコリルノイラミン酸と、植物特異的な β 1-2 キシロース、 α 1-3 フコースでの相違点である。糖鎖の免疫原性が医薬品の安全性に与える影響は、動物特有の糖鎖である N グリコリルノイラミン酸よりも、植物特有の糖鎖の方が大きいかも知れない。

C.5.2. トランスジェニック植物由来組換えタンパク質医薬品に対して新たに抗体が産生される可能性

植物糖鎖に対する抗体を持たないヒトの場合、急性のアレルギー反応等が起こる懸念は少ないと思われる。しかし、植物由来であるか否かに関わらず、投与された組換えタンパク質に対して新たに抗体が産生される可能性はある。

バイオ医薬品の使用に関するこれまでの経験から、組換えタンパク質医薬品ではアミノ酸配列がヒトタンパク質と同じであっても、ヒトに対して免疫原性を示すことがしばしばあり、単純タンパク質においても糖タンパク質においても、医薬品として投与された組換えタンパク質に対して抗体が産生されることが知られている (Table 3)。組換えタンパク質医薬品では、存在する濃度や部位、時間が生体内タンパク質とは異なることに加えて、製造工程由来

不純物や目的物質関連物質、目的物質由来不純物（特に凝集体）などが共存すること等が免疫原性を示す原因となっていると考えられる。さらに、抗体の出現には患者側の要素も関わり、その原因は極めて複雑である（Fig.3）。

組換えタンパク質医薬品に非ヒト型の植物糖鎖が結合していれば、従来の組換えタンパク質医薬品より抗体が産生される可能性は高いかもしれない。但し、タンパク質部分がヒト由来である分、植物アレルゲンに比べて免疫原性は小さいと推測される。

抗原に対する抗体産生においては、初期にはコンフォメーションエピトープに対する IgM が産生され、抗原提示細胞からの抗原提示を受けた Th 細胞由来のサイトカインにより IgE や IgG へのアイソタイプスイッチが行われる。糖鎖のみでは抗原提示細胞で MHC 分子との複合体として抗原提示されず、抗体が産生されてもアイソタイプは IgM のままであるが、糖鎖がタンパク質に結合している場合は抗原提示細胞内で分解されて糖ペプチドとして抗原提示される。植物の糖タンパク質糖鎖に対する抗体には IgM のみでなく IgE や IgG があることから、抗原提示細胞と T 細胞を介する反応を経て産生されていると考えられ、植物糖鎖の免疫原性は糖鎖のみの構造によるのではなく、植物タンパク質の構造によるところも大きいと考えられる。植物由来アレルゲンの場合はタンパク質部分も異種のものであるため強い免疫原性を示すと考えられるが、タンパク質がヒト由来の配列を持つ場合は植物由来アレルゲンと比較して免疫反応が生じにくい可能性も考えられる。

ヒトタンパク質に植物糖鎖が結合した医薬品を投与した場合に、抗体がどの程度生じるの

かは推測の域を出ないが、先に述べたように、これまでの組換え医薬品で知られているよりは高くなるかもしれない。抗体が産生された場合は、血中半減期の短縮などの影響が考えられるが、植物糖鎖がアジュバントとして作用してタンパク質部分を認識する抗体が生じ、生じた抗体が内因性のタンパク質を中和してしまうと重篤な臨床症状が生じる危険があるため、注意が必要である。患者がアレルギー傾向にある場合、組換えタンパク質に結合した植物糖鎖に対して IgE が生じ、組換えタンパク質に反応して、あるいは、他の植物由来の天然の糖タンパク質に交差反応してアレルギー反応がおこるようなことがあれば、安全性上重要な問題となる。

ヒトに対する免疫原性は動物を用いた非臨床試験で評価することができないが、動物実験の結果は安全性を考える際の情報としては参考になるものである。実験動物と同種のタンパク質に植物糖鎖が結合している場合の免疫原性を調べた報告、すなわちタバコで発現したマウス IgG をマウスに投与した報告では、抗体が産生されなかったとされている²⁶⁾。しかし、この報告で用いられた動物 BALB/c マウスはもともと免疫反応が起こりにくい系統であるため、試験系の妥当性を問う報告もある²⁰⁾。タバコで発現したヒト IgG をウサギに投与した実験では、抗体 (IgG) が産生され、産生された抗体が植物糖鎖を認識することが報告されている¹⁹⁾。この文献では CHO 細胞で発現したヒト IgG との比較を行っており、CHO 細胞由来ヒト IgG と比較してタバコ由来ヒト IgG による抗体産生が高いことが示されており、CHO で発現されたヒト IgG と比較してタバコで発現させたヒト IgG の方が免疫原性が高い

と解釈できる。

C.6. ヒト型糖鎖を持つ組換えタンパク質発現系の開発

これまでの知見から、植物で製造した組換えタンパク質には植物特有の糖鎖が存在しないことが望ましいと考えられる。植物特有の糖鎖構造を持たず、ヒト型の糖鎖を持つ組換えタンパク質の生産系開発に向けた研究が進んでおり、主に、(1)組換えタンパク質の小胞体への局在化による植物特異的糖鎖付加の回避、(2)植物特異的糖鎖を付加する酵素の欠損、(3)ヒト型の糖鎖合成に関わる酵素等の発現、の3種類の試みが行われている。

C.6.1. 組換えタンパク質の小胞体への局在化による植物特異的糖転移反応の回避

タンパク質の糖鎖修飾は小胞体を経てゴルジ体で行われるが、小胞体での糖鎖修飾過程はヒトと植物で共通である。そのため、小胞体に組換えタンパク質を局在化させ、ゴルジ体での糖鎖修飾がおこらないようにすることで植物糖鎖の付加を回避しようという試みが行われている。哺乳類では小胞体へのタンパク質局在にはタンパク質のC末端にある小胞体局在化配列(HDELあるいはKDEL)が働くことが知られているが、植物においても同様である。抗体のL鎖およびH鎖のC末端にKDEL配列を付加することにより、発現されたタンパク質が小胞体に蓄積され、ほぼ90%の糖鎖をハイマンノース型にすることができたと報告されている^{27, 28)}。

植物の小胞体への局在により糖鎖をハイマンノース型のみにした抗体は、小胞体に局在化させずに生産した抗体と比べて、マウスに投与した際の血中半減期が短いことが報告されて

おり、マクロファージにあるマンノース受容体を介した取り込みと分解を受けやすいと考えられている^{29, 30)}。抗体の半減期が短いことは場合によっては利点があるとされ、たとえば、狂犬病の治療のようにワクチンと抗体を同時に投与するような場合は、抗体の半減期が短いことでワクチンの効果が阻害されずに済むのでよいとされている³⁰⁾。

C.6.2. 植物特異的糖鎖を合成する酵素の欠損

ヒトにない糖鎖構造である β 1-2キシロースと α 1-3フコースの付加を回避するため、 β 1-2 xylosyltransferase と α 1-3 fucosyltransferase を欠損させることが試みられている。ウキクサではRNAiによるこれらの酵素の発現抑制が試みられ、コケやシロイヌナズナではこれらの酵素遺伝子をノックアウトした株が作成されている³¹⁻³³⁾。これらの系ではヒトに対して免疫原性を示す糖鎖付加のない組換えタンパク質を作ることが可能と考えられる。

近年のバイオ医薬品開発の主流となっている抗体医薬品では、Fc γ Rを介した抗体依存性細胞障害活性(Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)が薬効発現において重要なものが多い。抗体のADCC活性にはFc領域にあるN結合型糖鎖の構造が影響することが知られており、還元末端のNアセチルグルコサミンに結合する α 1-6フコースを欠損させるとADCC活性が高くなることが知られている^{34, 35)}。 α 1-3フコースと β 1-2キシロースを付加しないように改変されたウキクサやコケの発現系で生産された抗体では、動物細胞で生産された α 1-6フコースを持つ抗体と比較して、30~40倍高いADCC活性を示したことが報告されている^{30, 31, 36)}。

C.6.3. ヒト型の糖鎖合成に関わる酵素等の発現

多くのヒトタンパク質の糖鎖には末端にシアル酸が結合しており、医薬品として有用なタンパク質ではシアル酸がタンパク質の血中濃度の維持に重要であるものが多い。例えばエリスロポエチンの血中半減期は、シアル酸が結合しているものが 5~6 時間であるのに対して、シアル酸を除去したものでは 2 分と、シアル酸の有無で大きな差がある³⁷⁾。ただし、抗体に結合した糖鎖のようにシアル酸含量が少なく、おそらく糖鎖がタンパク質の内側に向いているためにシアル酸の体内動態への影響が小さいものもある。

シアル酸の付加された糖鎖が合成されるためには、シアル酸の合成、活性化、輸送、転移が必要であるが、植物はこれらに関与する酵素を持たない。そのため、植物で発現させた糖タンパク質糖鎖にシアル酸を付加させるためには、(i)GlcNAc から ManNAc を合成する UDP-GlcNAc 2-epimerase、(ii)ManNAc から NeuAc を合成する NeuAc synthase、(iii)NeuAc を活性化する CMP-NeuAc synthase、(iv)CMP-NeuAc をゴルジ体に輸送する CMP-NeuAc transporter、(v)NeuAc を糖鎖に付与する sialyltransferase、という 5 つの酵素を、細胞内の適切な局在部位に発現させる必要がある。これらのうち、epimerase 以外は植物細胞で発現させた例が報告されている³⁰⁾。

D. 考察

組換えタンパク質医薬品のヒトに対する免疫原性は、動物を用いた非臨床試験で評価することが極めて困難であることから、安全性評価

において常に懸念されながらも、臨床試験実施前あるいは市販前に十分な知見を得られないのが現状である。植物糖鎖の場合は、ヒトタンパク質に結合している場合の免疫原性は不明ながら、ヒトに対する植物アレルゲンにおけるエピトープとなり得ることが明らかであることから、組換えタンパク質の糖鎖の構成要素としては回避すべきものであろう。ただし、食物として摂取する植物由来タンパク質にもこれらの糖鎖は含まれているため、組換えタンパク質を経口投与する場合は、これら植物糖鎖に対する IgE を有する患者を除いては問題ない可能性も考えられる。従って、現段階での解釈としては、植物で発現させた糖タンパク質にはヒトに対して免疫原性を示す糖鎖が付加されているものの、経口投与の場合は、食物として摂取していて問題がない患者に対しては許容されるが、非経口投与、特に注射剤としての投与の場合は、ヒト型糖鎖が結合するような製造系を確立する必要がある、と考えるのが妥当であろう。欧米のガイドラインにおける植物糖鎖関連の記載を Table 4 に示した。植物に特有の糖鎖構造に対する配慮が必要であることが述べられており、植物糖鎖を含む場合は安全性への影響を説明するよう求められている。

糖鎖は有効性・安全性への影響のみならず、タンパク質性医薬品の品質の一定性確保の点でも重要である。糖鎖の構造は多様であり、同一タンパク質分子内でも異なる部位に結合している糖鎖の構造は異なる場合がほとんどであり、また、同一のタンパク質の同一の糖鎖結合部位でもタンパク質分子ごとに結合している糖鎖の構造は変わり得る。さらに、このような糖鎖の不均一性は、組換えタンパク質を生産する工程中の種々の要因により変動すること

から、糖鎖構造の不均一性を一定に保ち、恒常性を維持することが糖タンパク質医薬品の品質の一定性確保の上で重要である。

組換えタンパク質医薬品の製造に多くの実績がある動物細胞の発現系においても、血清や培養条件など種々の要因でタンパク質に付加される糖鎖構造が変動し、糖鎖構造を人工的に完全に制御することは困難である。トランスジェニック植物を用いて糖タンパク質を生産する場合にも、品質に関して動物細胞を生産宿主とする場合と同様の配慮が必要であるが、たとえばタバコを用いた組換えタンパク質の生産では、細胞内での局在部位ごとに付加される糖鎖構造が異なることに加えて、同一の植物体においても、若い葉と古い葉では糖鎖修飾パターンが異なると報告されており^{38, 39)}、動物細胞以上に変動幅が大きい可能性もある。特に、糖鎖構造の改変（ヒト型化）を目指して糖転移酵素を発現させた例では、目的とする反応が十分進まずに不均一性がより高くなる例も報告されていることから、品質の一定性確保の点で特に注意が必要であろう^{40, 41)}。

組換えタンパク質医薬品の開発においては、目的タンパク質の特性と生産コストなどの実用面の要素を考えて生産宿主が選択される。生産宿主として植物が適している組換えタンパク質としては、経口投与されるものや、低コストでの生産が実用化のために重要であるものがまず挙げられるであろう。非経口投与される糖タンパク質の生産宿主としてトランスジェニック植物が利用されるには、糖鎖構造の点で改良が必要であると考えられるが、近年多くの品目が開発されているモノクローナル抗体は、トランスジェニック植物による生産が可能と考えられている糖タンパク質の一つである⁴²⁾。

その理由としては、抗体ではほとんどの製品で糖鎖修飾がFc部分のN結合型糖鎖1か所のみであること、糖鎖の機能におけるシアル酸の重要性が低いとされていること、還元末端のNアセチルグルコサミンに結合したフコースが存在しない方がADCC活性が高く植物に特異的な糖鎖の除去のみで医薬品として適した抗体が作製できると考えられること、投与量が高いために生産コスト削減の必要性が高いこと等が挙げられる。

2007年にはトランスジェニック動物（ヤギ）の乳汁中に発現させたアンチトロンビンⅢ（ATryn[®]）がEUで承認され、トランスジェニック動植物を用いた医薬品製造が現実のものとなってきた。新世代バイオ医薬品の一画をなすものとして、トランスジェニック植物を用いて生産された組換えタンパク質医薬品についても、品質・安全性確保のための方策を確立していく必要がある。

E. 結論

トランスジェニック植物で生産された組換え糖タンパク質に結合している糖鎖には、ヒトに対して免疫原性を示し得る植物特有の構造のものが含まれている。組換えタンパク質に結合している植物糖鎖の存在は、適用対象を植物成分に対してアレルギー反応を示さないヒトに限定するのであれば経口投与される製品では許容されると考えられるが、非経口投与する製品では回避すべきである。植物に特有の糖鎖を付与しない発現系の開発も進められており、組換えタンパク質医薬品の生産系としてのトランスジェニック植物の有用性のさらなる向上が期待される。

参考文献

- 1) <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/4831606en.pdf>
- 2) <http://www.fda.gov/cber/gdlns/bioplant.pdf>
- 3) Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke MA, Matzke AJM. The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol.* 6, 347-57, 1986
- 4) Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (N Y).* 8(3), 217-21, 1990
- 5) Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature.* 342(6245), 76-8, 1989
- 6) Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, van Dolleweerd C, Mostov K, Lehner T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science.* 268(5211), 716-9, 1995
- 7) Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol.* 7(2), 152-8, 2004
- 8) Twyman RM, Schillberg S, Fischer R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerg Drugs.* 10(1), 185-218, 2005
- 9) Gomord V, Faye L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 7(2), 171-81, 2004
- 10) Cabanes-Macheteau M, Fitchette-Laine AC, Loutelier-Bourhis C, Lange C, Vine ND, Ma JK, Lerouge P, Faye L. N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology.* 9(4), 365-72, 1999
- 11) Samyn-Petit B, Wajda Dubos JP, Chirat F, Coddeville B, Demaizieres G, Farrer S, Slomianny MC, Theisen M, Delannoy P. Comparative analysis of the site-specific N-glycosylation of human lactoferrin produced in maize and tobacco plants. *Eur J Biochem.* 270(15), 3235-542, 2003
- 12) Karnoup AS, Turkelson V, Anderson WH. O-linked glycosylation in maize-expressed human IgA1. *Glycobiology.* 15(10), 965-81, 2005
- 13) van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, Villalba M, Koppelman S, Aalberse R, Rodriguez R, Faye L, Lerouge P. Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *The Journal of biological chemistry.* 275(15), 11451-8, 2000
- 14) Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *International archives of allergy and immunology.* 142(2), 99-115, 2007
- 15) Wilson IB, Harthill JE, Mullin NP, Ashford DA, Altmann F. Core alpha1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked

- oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts. *Glycobiology*. 8(7), 651-61, 1998
- 16) Wilson IB, Zeleny R, Kolarich D, Staudacher E, Stroop CJ, Kamerling JP, Altmann F. Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core alpha1,3-linked fucose and xylose substitutions. *Glycobiology*. 11(4), 261-74, 2001
- 17) Jin C, Hantusch B, Hemmer W, Stadlmann J, Altmann F. Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 121(1), 185-90 e2, 2008
- 18) Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIb cross-linking. *The Journal of clinical investigation*. 116(3), 833-41, 2006
- 19) Jin C, Altmann F, Strasser R, Mach L, Schahs M, Kunert R, Rademacher T, Glossl J, Steinkellner H. A plant derived human monoclonal antibody induces an anti-carbohydrate immune response in rabbits. *Glycobiology*. 2008
- 20) Bardor M, Faveeuw C, Fitchette AC, Gilbert D, Galas L, Trottein F, Faye L, Lerouge P. Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology*. 13(6), 427-34, 2003
- 21) Zhu A, Hurst R. Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation*. 9(6), 376-81, 2002
- 22) Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(21), 12045-50, 2003
- 23) Dingermann T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnology journal*. 3(1), 90-7, 2008
- 24) Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, Katagiri Y, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *Journal of chromatography*. 1160(1-2), 263-9, 2007
- 25) Nguyen DH, Tangvoranuntakul P, Varki A. Effects of natural human antibodies against a nonhuman sialic acid that metabolically incorporates into activated and malignant immune cells. *J Immunol*. 175(1), 228-36, 2005
- 26) Chargelegue D, Vine ND, J. DC, W. DPM, Ma JKC. A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with

- plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Res.* 9, 187-94, 2000
- 27) Sriraman R, Bardor M, Sack M, Vaquero C, Faye L, Fischer R, Finnern R, Lerouge P. Recombinant anti-hCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core-alpha(1,3)-fucose residues. *Plant biotechnology journal.* 2(4), 279-87, 2004
- 28) Ko K, Tekoah Y, Rudd PM, Harvey DJ, Dwek RA, Spitsin S, Hanlon CA, Rupprecht C, Dietzschold B, Golovkin M, Koprowski H. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13), 8013-8, 2003
- 29) Wright A, Morrison SL. Effect of C2-associated carbohydrate structure on Ig effector function: studies with chimeric mouse-human IgG1 antibodies in glycosylation mutants of Chinese hamster ovary cells. *J Immunol.* 160(7), 3393-402, 1998
- 30) Saint-Jore-Dupas C, Faye L, Gomord V. From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends in biotechnology.* 25(7), 317-23, 2007
- 31) Cox KM, Sterling JD, Regan JT, Gasdaska JR, Frantz KK, Peele CG, Black A, Passmore D, Moldovan-Loomis C, Srinivasan M, Cuisson S, Cardarelli PM, Dickey LF. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature biotechnology.* 24(12), 1591-7, 2006
- 32) Koprivova A, Stemmer C, Altmann F, Hoffmann A, Kopriva S, Gorr G, Reski R, Decker EL. Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant biotechnology journal.* 2(6), 517-23, 2004
- 33) Strasser R, Altmann F, Mach L, Glossl J, Steinkellner H. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking beta1,2-linked xylose and core alpha1,3-linked fucose. *FEBS letters.* 561(1-3), 132-6, 2004
- 34) Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry.* 277(30), 26733-40, 2002
- 35) Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry.* 278(5), 3466-73, 2003
- 36) Schuster M, Jost W, Mudde GC, Wiederikum S, Schwager C, Janzek E,