

## 植物を組換え医用タンパク質生産バイオリクターとして用いるためのチャレンジ



研究ノート

藤山和仁\*

Challenge to use plants as bioreactor for bio-pharmaceuticals

Key words : Plant/Bioreactor/Bio-pharmaceuticals/Glycobiology/IgG

植物バイオテクノロジーの進歩により、バイオ医薬品の生産・供給システムを変えるかもしれない。

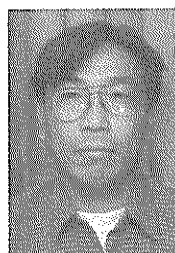
バイオ医薬品の生産は、動物培養細胞を用いたり、遺伝子導入した動物細胞や微生物を含めたさまざまなシステムを使って生産されてきた。今後、エリスロポエチン(EPO)、抗体やインシュリンなどの現存するバイオ医薬品やゲノム解析で発見されるであろう新しい治療用タンパク質に対する需要が近い将来高くなってくると考えられる。それゆえ、遺伝子組み換え生産システムを含めた選択可能な生産手段を慎重に評価し、どのようにすれば経済的に有効なコストでかつ「安全な」組み換えバイオ医薬品が得られるかを決定する必要がある。現在、EPOやグルコセレブロンダーゼのような遺伝子組み換え薬品は市場に出ており、多くの他の組み換えタンパク質はさまざまな臨床試験の段階にある。

これらの組換えバイオ医薬品の商業生産に用いられている大腸菌、酵母、動物細胞システムなど選択肢となる生産システムと植物生産システムについて比較してみる。

「バクテリア」は安価に高収率でタンパク質を得ることができるが、プロテインボディーが形成されることがあり、多くのヒトタンパク質の生理活性に必要とされる複雑な翻訳後修飾を行うことができない。

また、エンドトキシンなど病原体の汚染の可能性が存在する。「酵母」はタンパク質の分泌能を持ち、発現調節可能なプロモーターや容易な増殖特性などの利点を持っている。しかし、低収率、ヒトとは異なる糖鎖構造などの問題が存在する。「昆虫細胞」は現段階では安定的組換え細胞を得ることは難しく、大規模なバイオリクターではバキュロウエルス感染細胞の成長とタンパク質の発現に影響を与えるパラメーターを理解していないためコストが高くなっている。「哺乳類細胞」では、Chinese hamster ovary(CHO)細胞が最も工業的に広く使われている。しかし、組み換え遺伝子の発現レベルが低く、選択したセルラインが不安定なこともあり、スケールアップが困難で、費用もかかることなどが問題となっている。それにもかかわらず、CHO細胞はヒトのタンパク質を生産する時、現在もっとも広く使われているシステムである。「遺伝子組み換え動物」を使って生産されたタンパク質はヒトのタンパク質に構造的に一致する可能性が高い。しかし、宿主のタンパク質と組み換えタンパク質を分別・精製することが難しくなること、大量のヒトタンパク質が宿主動物に毒性を示す可能性があるということ、ウィルスやプリオンが人間のものに近いため安全性の問題などがある。

最後に「植物」であるが、現在まで植物では、ワクチン(HBsAgなど)、抗体(免疫グロブリンやSingle-chain Fvなど)、バイオ医薬品( $\alpha$ -インターフェロンやグルコセレブロンダーゼなど)、ヒトコラーゲン、生分解性プラスチックなどの生産が確認されている。植物の利点として、表1にもあるように植物で生産させたバイオ医薬品には動物細胞や動物で生産させた場合と違い、ヒトに対する病原体やウィルスの汚染の可能性が少ない。次に、生産コスト面でも、CHO細胞や昆虫細胞では血清など高価な培地が



\* Kazuhito FUJIYAMA

1961年8月生

1988年3月大阪大学大学院博士後期課程中途退学

1988年4月大阪大学工学部附属生物学国際交流センター助手

現在、大阪大学生物工学国際交流センター、工学博士、糖鎖工学

TEL 06-6879-7238

FAX 06-6879-7454

E-Mail fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp

表1: 動物・微生物・植物バイオ技術による生産系比較

特 性	動物(細胞培養)	微 生 物	植 物
増 殖 速 度	速 い	*極めて速い	遅 い
生 産 コ ス ト (抗体1g生産コスト)	高 い 50,000円	安 い 170円	*極めて安い 50円
二 酸 化 炭 素 化石エネルギー消費	排 出 有	排 出 有	*吸収・固定 *無
生 産 物 の 安 全 性	狂牛病等管理必要 (プリオンなど)	菌代謝物管理必要 (エンドトキシンなど)	*安 全

\*; 他者に比べて, 優れている

(北海道経済産業局 <http://www.hkd.meti.go.jp/hokii/bio/> より引用・改変)

必要であり, 一般的に生産収率も低いことなどからコストが高くなる. コスト効率の点で, 植物は畑で栽培するだけであるので, 他のどんな生産システムとも競争可能である. 植物での生産に必要なものは, 植物と日光, 土壌及び肥料からの無機塩と水だけでコストが安く, 大量生産ができほとんどインフラを必要としない. スケールアップの点でも, 培養では多額の設備投資を必要としインフラの拡張は限られている. しかし, 植物では, 栽培する植物の量と耕地面積を増やすだけなので速く, 低コストである. 遺伝子組み換え動物も同じくらい簡単ではあるが時間がかかる. また, ワクチンを生産する遺伝子組み換え植物はそのまま食べることで経口ワクチンとして機能することが証明されている<sup>(1)</sup>.

以上のような事実から, バイオ医薬品を生産するためのシステムとして植物は非常に有効であることがわかる. しかし, 植物でヒト由来有用タンパク質を生産させた場合, 問題となるのは翻訳後修飾, 特に糖鎖構造の違いである. 糖鎖とは, 核酸, タンパク質について生命第三の鎖と呼ばれ, 細胞種によって特異的であり, 神経細胞の発生・分化, 受精, ガン転移, 細菌やウイルス感染などに関与している. タンパク質に糖鎖が結合する様式にはアスパラギンに結合するN結合型糖鎖とセリンまたはスレオニンに結合するO結合型糖鎖の2種類がある. ここではN結合型糖鎖に注目する. 動物と植物のN結合型糖鎖は基本骨格は同じであるが, 細部で異なる(図1). 動物では非還元末端にシアル酸が結合し, Nアセチルグルコサミンに $\alpha$ 1-6結合でフコースが結合しているが, 植物ではシアル酸がなく,  $\alpha$ 1-3結合でフコースと $\beta$ 1-2結合でキシロースが結合している. このため, 植物で生産させたヒト由来の糖タンパク質は活性を有しなかったり, 抗原性を示したりする<sup>(2)</sup>.

例えば, 抗体では, ガラクトース残基がタンパク質の安定性など生理学的な役割を果たしていることが報告されている<sup>(3)</sup>. 事実植物で生産させた抗体にはガラクトース残基が付加していないためタンパク質の安定性が変化し, タンパク質分解酵素に対してマウスで生産させたモノクローナル抗体より感受性を示した<sup>(4)</sup>.

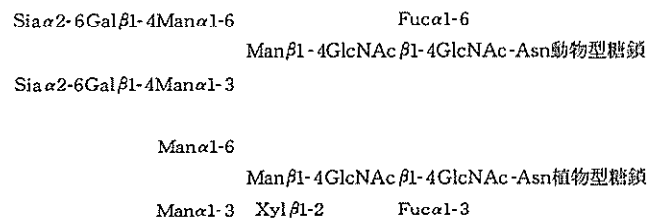


図1 動物型糖鎖と植物型糖鎖の違い

これらの問題を解決するため, 植物に糖転移酵素遺伝子を導入しヒト型糖鎖を植物内で生産させることが考えられる. 私たちは植物内でガラクトース残基が $\beta$ 1-4結合したN結合型糖鎖を生成するため, タバコBY2培養細胞にヒト由来する $\beta$ 1-4ガラクトース転移酵素遺伝子を導入し, ガラクトース残基を持つN結合型糖鎖の合成に成功した(図2). この糖鎖構造はガラクトース残基が付加されていただけでなく, 抗原性が指摘されている $\alpha$ 1-3フコースと $\beta$ 1-2キシロース残基がなかったのである<sup>(5)</sup>. さらに外来タンパク質遺伝子を導入し, ガラクトース残基が付加したタンパク質糖鎖を生産できた<sup>(6)</sup>. これに続いてオランダを中心とするヨーロッパのグループは, 抗体を生産するタバコ植物体に, 私たちと同じヒト由来 $\beta$ 1-4ガラクトース転移酵素遺伝子を導入し, タバコで生産させた抗体の糖鎖がガラクトース残基を保持することを示した<sup>(7)</sup>.

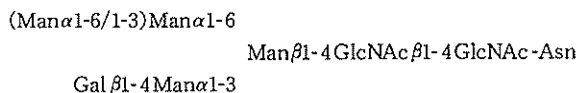


図2 ヒト由来ガラクトース転移酵素遺伝子を導入した植物で得られた糖鎖

以上のようにヒト由来 $\beta$ 1-4ガラクトース転移酵素遺伝子を導入した植物細胞でバイオ医薬タンパク質を生産すれば、ガラクトース残基を持つが糖鎖構造を保持する、抗原性のないヒト適応型の組換えタンパク質が生産できると期待される。

2002年7月カリフォルニア・サンディエゴのベンチャー・EpicYTE社が植物で抗体を生産させる特許を米国で取得した。植物で生産された抗体には植物型糖鎖が付加しており、今後ヒトに投与することを考えてさらなる研究が必要であると述べている。抗体医療の市場は期待されており、Genetic Engineering News(Vol.22, No.7, 2002)によれば2002年現在必要量として863kgと言われている。現在の全世界的な動物細胞培養設備は400,000Lで年間5,200kgが生産可能と試算され、今日設備では問題がない。しかし、2006年には需要が2,700kgとされ、精製効率が50%と見積ってこれだけの量を供給するには1,000,000Lもの設備が必要である。Genentech

社では、250万ドルの設備で年間1,200kgの生産が可能であるとしている。これら抗体ひとつをとっても需要に応じていくために今後更なる設備投資が必要であると思われる。しかし、植物をバイオリアクターとして用いることでこのような問題を解決できるのではないだろうか？

組換え食品の逆風で、日本ではバイオ医薬品を植物で生産する研究を始めている企業がまだないように思う。太陽と土を利用した天然のバイオリアクターである植物を、バイオ医薬の新しい生産システムとして捉えてもよいのではないだろうか？

- (1) Tacket et al., Nat Med. 4, 607-609(1998)
- (2) Wilson et al., Glycobiol. 8, 651-661(1998)
- (3) Dwek et al., J. Anat. 187, 279-292(1995)
- (4) Stevens et al., Plant Physiol. 124, 173-182(2000)
- (5) Palacpac et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 4692-4697(1999)
- (6) Fujiyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, 553-557(2001)
- (7) Bakker et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA. 2001 Feb 27; 98(5) : 2899-904

