

植物による異種タンパク質生産

太田 喜元、秋田 求

要旨

植物を宿主として生理活性タンパク質や医療用タンパク質を生産する技術が、近年長足の進歩を遂げつつある。植物には異種タンパク質生産系として、低コストでの大量生産、分離精製の容易さ、安全性など多くの利点がある。本総説では植物がもつこのような利点を生かして、生理活性タンパク質や食べるワクチン、抗体、自己免疫疾患治療タンパク質など、主として医療用タンパク質を植物に生産させる *molecular farming* に関する研究の動向を述べる。

1、緒論

ヒトゲノム計画の完成に見られるように、種々の生物の遺伝子解析における最近の進歩は著しく、それに伴って塩基配列が決定された遺伝子にコードされているタンパク質の合成とその機能を明らかにすることが、基礎研究にとっても、また医療その他の応用面でも非常に重要となっている。異種生物に由来するタンパク質を生産する宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物培養細胞および動物個体など数多くあり、それぞれの特徴を生かして用いられているが、近年植物がいくつかの点で極めて優れた生産システムであることが認められ、抗体やワクチン、自己免疫疾患原因タンパク質など医療を目的としたタンパク質の生産に植物を用いる研究が急速に進歩しつつある。この総論では異種タンパク質生産系としての植物の特徴と共に、主として医療用タンパク質生産に関する研究の現状と展望について述べる。

数多くある異種タンパク質生産系の中で、大腸菌は増殖速度が速いこと、安価な培地で大量に増殖できること、遺伝的特性が十分に判っており目的に応じた種々のクローニングベクターが使えるなど有利な点が多い。しかし大腸菌は原核生物であるため、比較的小さく S-S 結合の数も少ない簡単なタンパク質の生産は可能であっても、活性発現にシグナルペプチドの除去や糖鎖の付加など翻訳後の修飾を必要とする複雑なタンパク質の生産は難しいのが一般的である。また多くの場合、大腸菌では合成されたタンパク質が正しい立体構造に折りたたまれず、不溶性且つ生理学的に不活性な状態で封入体 (inclusion body) として細胞内に蓄積されることも、大腸菌を異種タンパク質生産システムとして用いることの制約となっている。最近では DnaK-DnaJ および GroEL-GroES といった大腸菌自身の分子シャペロンを過剰発現させることによって、大量に発現した異種タンパク質の正しい折りたたみを促進させるとか、外膜タンパク質 (OmpA、OmpT) や alkaline phosphatase など大腸菌が細胞外に分泌す

るタンパク質のシグナル配列を接続することによって異種タンパク質を分泌させるなど、糖鎖付加を除けば複雑なタンパク質の生産に大腸菌を利用するための研究も活発である¹⁾。

ヒト生理活性タンパク質などの医療用タンパク質は、糖鎖も含めて天然物と同一のものであることが要求されるが、この条件を満足する生産系としては動物培養細胞あるいは動物個体がある。特に、乳汁に分泌されるタンパク質のプロモーターを用いて、ブタ、ヒツジ、ヤギなどの家畜の乳汁中に目的タンパク質を分泌させる方法は、すでに 10 数種を超える生理活性タンパク質の生産に応用されつつある²⁾。しかし、遺伝子組換え動物の作出は、現時点では効率が低く時間もかかる上に、利用できるのは授乳期間中の雌に限られることや寿命も制約となる。雌雄を問わず生存全期間を通じてタンパク質生産に利用するために、尿に特異的なタンパク質のプロモーターを用いて、尿中に分泌させる試みもなされているが³⁾、動物を宿主とする際には、ウイルスなどの病原体による汚染に対する安全性の確保が重要な要因となる。

これらの生産系に対して、植物の利点としては以下のような事柄を挙げることができる。

(1) 植物は真核生物であり、翻訳後のタンパク質からのシグナル除去、糖鎖付加、正しい立体構造への折りたたみ、細胞外への分泌等の機能は動物と同等である。(2) 植物は優れたタンパク質生産系である。(3) 植物は水、太陽、肥料だけで従来の農業技術を用いて栽培できるので、経済的に最も有利な大量生産システムである。生産コストを比較した例によれば、宿主とする植物によって差はあるものの、大腸菌を用いた場合の 1/10 ~ 1/50 になると試算されている⁴⁾。またデンプンや油脂などを抽出した後に、標的タンパク質を単離できる作物を選べば、コストの大部分は本来の成分によって賄うことができる^{5), 6)}。(4) 栽培作物は食用としての安全性が保証されているものであり、また植物病原菌や植物ウイルスは哺乳動物に対して病原性をもたないことから、植物は極めて安全性の高い生産系である。特に経口ワクチンを生産するには最も適した系と言える。(5) プロモーターを選ぶことによって、発現・蓄積部位をイモ、種子、さらには種子内の特定の小器官に限定できるので、タンパク質の単離と精製が容易である⁷⁾。(6) 長期保存が可能なイモや種子を蓄積部位とすれば、生産されたタンパク質を収穫後直ちに単離する必要はなく、保存あるいは遠隔地への輸送が容易である。このような特徴、特に大量生産が容易であることおよび食べることができるという他の生産システムにはない利点に基づく幅広い分野での応用が具体化しつつある。

2、植物への遺伝子導入

植物を宿主として異種タンパク質を生産するには、大別して 2 通りの方法が用いられる。第一の方法は土壤細菌 *Agrobacterium tumefaciens* の感染機構の巧妙な利用あるいは遺伝子銃によって、植物ゲノムに標的タンパク質の遺伝子を挿入した安定な形質転換植物を作出する

ものである。*A. tumefaciens* の Ti プラスミドに含まれる T-DNA 領域に、標的タンパク質遺伝子を抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーと共に挿入した T-DNA ベクターは最も広く用いられているもので、多くの双子葉植物に適用できる。最近では *A. tumefaciens* の走化性および T-DNA の植物への転移機構活性化に必要なシグナル物質であるアセトシリンゴンを用いることによって、イネやトウモロコシなどの単子葉植物の形質転換も可能となっている^{8, 9)}。*A. tumefaciens* による方法は、葉切片あるいは培養細胞に組換えベクターをもつ *A. tumefaciens* を感染させ、抗生物質耐性により選択した細胞を再分化させて形質転換植物を得るものである。シロイヌナズナなど草丈が比較的小さく多数の種子をつける植物に適用される *in planta* 法は、花序についたつぼみが開花する頃に *A. tumefaciens* を感染させ、稔った種子を選択培地に播種して発芽・成長する組み換え植物を選択するものである。遺伝子銃による方法も一般的で、核遺伝子の組み換えにも利用されるが、最近特に注目されている葉緑体を利用したタンパク質生産において、葉緑体ゲノムに異種遺伝子を導入する唯一とも言える手段となっている。

第二の方法は、標的タンパク質の遺伝子を挿入した tobacco mosaic virus (TMV) や cowpea mosaic virus (CPMV) などの組み換え植物ウイルスを成長した宿主植物に感染させ、ウイルスが増殖する過程で標的タンパク質を生産させるものである。この方法は一過的ではあるけれども、ウイルスの増殖は極めて活発であるので、数週間で植物全体で相当量のタンパク質が生産される^{10, 11)}。植物ウイルスのコートタンパク質の一部をヒトや家畜の病原体の抗原決定基と置換した場合は、表面に抗原決定基を提示したウイルス粒子を大量増殖させることが可能で、種々の病原体に対するワクチン生産の手段として利用されている^{12~15)}。TMV や CPMV も含めて大半の植物ウイルスのゲノムは RNA であるので、逆転写して得られた cDNA を T7 や SP6 などのファージプロモーターの下流につないで大腸菌で複製できるプラスミドにクローニングし、必要な遺伝子組換えを行う。プラスミドを増幅した後、大腸菌の RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写によって感染力をもった RNA とし、傷をつけた葉の表面に擦り込んで感染・増殖させる。

3、生理活性タンパク質

ヒト生理活性タンパク質の植物による生産の幕開けとなったのは、1989 年に Vandekerckhove らが enkephalin を生産した報告であろう¹⁶⁾。この実験では、モルヒネ作用をもつ内因性ペプチドである Leu-enkephalin が、5 アミノ酸 (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) から成る小さなペプチドという理由で選ばれている。種子タンパク質 2S albumin 遺伝子の内部に、トリプシン切断配列をもった enkephalin 遺伝子を挿入した T-DNA ベクターを構築して、シロイヌナズナおよびナタネに導入し、1 g の種子から約 200 nmol のペプチドを得て

いる。その後かなりの数の生理活性タンパク質の生産が報告され(代表的の例を表1に示す)、最近では企業による商業生産への展開も活発である。例えばアメリカでは、ベンチャー企業が斜陽化しつつあるタバコ産業と提携して、世界で最も高価な治療用タンパク質とされているリソソーム酵素の一種で glucocerebroside を分解する glucocerebrosidase (欠損すると重篤な代謝異常障害のゴーシェ病を発症する) の高収率での生産を始めとして、数多くのヒト血清タンパク質、抗ガンタンパク質、ワクチンなどの商業生産を展開しようとしている¹⁷⁾。

異種タンパク質の遺伝子を植物で発現させるプロモーターとしては、cauliflower mosaic virus (CaMV) の 35S RNA プロモーターあるいはユビキチンプロモーターがよく用いられている。これらのプロモーター、特に CaMV 35S プロモーターは、構成的に強く発現するものであるが、発現部位は基本的に植物全体となり、生成物の単離・精製を考えた場合には不都合である。Enkephalin はナタネなどの種子特異的なタンパク質の一部として種子で発現・蓄積されたが¹⁶⁾、これをさらに発展させたのが種子細胞内にある油体 (oil body) への蓄積である¹⁸⁾。種子に含まれる脂肪酸トリグリセリドは、一層の膜で包まれた油体として細胞内に存在するが、この膜の安定性は膜タンパク質の oleosin が親水性の N- および C- 末端を細胞質ゾル側に突き出し、中央の疎水性部分を油体内部に挿入した状態で結合することによって保たれている。従来薬用ヒルから抽出されていた血液凝固抑制作用をもつ hirudin は、oleosin の C- 末端に連結した融合タンパク質としてナタネで生成されているが、油体に含まれるタンパク質は oleosin のみであり、油体は種子を破碎して遠心するとスカムとして表層に浮くので、この一段階の簡単な処理で融合タンパク質をほぼ精製することができる。その後、予め設計しておいた切断部位を加水分解して、oleosin と hirudin を分離することは容易であり、単離・精製という点からすると油体は理想的なキャリアといえる¹⁸⁾。イモや種子に特異的なタンパク質のプロモーターを用いてこれらの貯蔵器官に標的タンパク質を蓄積させることは、分離・精製の容易さだけでなく、収穫後直ちにタンパク質を抽出する必要はなく長期間の保存が可能なことも大きな利点である。農産物として種子等を貯蔵する条件でも、タンパク質の活性はほとんど低下することなく、必要に応じて抽出できることや長距離の輸送が可能なことは、他の生産系にはない特徴である¹⁹⁾。

生理活性タンパク質の生産における重要な要因の一つは収量である。最も一般的な CaMV 35S プロモーターで発現させた場合には、標的タンパク質の収量は全可溶性タンパク質 (tsp) の 0.01 ~ 0.1% と極めて低い(表1)。これはこのプロモーターが恒常的に発現するものの、活性が高いのは植物の成長が活発な組織あるいは時期においてであり、成熟した組織における活性は極めて低いためと考えられる。すなわち、若い組織で生産されたタンパク質は、植物が十分に成長するまでの長期間に亘って植物細胞内に保留されることになり、その間にかなりの部分が分解されてしまう。これを回避するには、イモや種子のようなタンパク質貯蔵

表1 植物で生産された生理活性タンパク質

標的タンパク質	活性・用途	発現植物	プロモーター	収量	文献
Hirudin	血液凝固阻害	タバコ	oleosin		18
Human protein C	血液凝固制御	タバコ	CaMV 35S	0.002% tsp	20
Adenosine deaminase		トウモロコシ	ユビキチン		56
Human α -lactalbumin	母乳タンパク質	タバコ	CaMV 35S	5 μ g/g fresh leaves	57
Erythropoietin	貧血	タバコ培養細胞	CaMV 35S	1 ng/ml medium	58
Aprotinin	セリンプロテアーゼ阻害	トウモロコシ	ユビキチン	0.1% tsp seeds	59
α 1-Antitrypsin	白血球エラスターゼ阻害	イネ培養細胞	イネ Amy3D	ca. 5mg/g dry cell	60
Enkephalins	モルヒネ作用	シロイヌナズナ		113 μ g/g seeds	16
Human serum albumin	肝硬変	ジャガイモ・タバコ	CaMV 35S		6
α -Trichosanthin	抗ウイルス活性	タバコ	RNA virus vector	2% tsp in 2wks	61
Glucocerebrosidase	ゴーシェ病	タバコ	MeGA	10% tsp	62
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	好中球減少症	タバコ			62
Collagen I	結合組織タンパク質	タバコ	CaMV 35S	3 g/100 Kg leaves	63
Somatotropin	ヒト成長ホルモン	タバコ	葉緑体 psbA	7% tsp	23
Somatotropin	ヒト成長ホルモン	タバコ	γ -kafirin	0.16% tsp	64
Human lactoferrin	抗菌活性	ジャガイモ	mas-CaMV 35S	0.1% tsp	65

tsp : total soluble protein

器官で発現するプロモーターを用いるか、組換え植物を収穫後に発現させる誘導型プロモーターを用いればよい。例えば、前述の glucocerebrosidase のタバコでの生産では、*MeGA*TM プロモーターを用いて約 10% tsp の収量が報告されている²⁰⁾。*MeGA*TM (Mechanical Gene Activation) は、植物の防御応答において発現する hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (メバロン酸合成酵素) のプロモーターで、収穫後の植物を破碎する機械的なストレスによって発現し、標的タンパク質は破碎後 8 ~ 24 時間で最大量に達する。

高収量で生産させる他の方法は、標的遺伝子を葉緑体などのプラスチドで発現させることである。高等植物のプラスチドゲノムは 120 ~ 160 kbp の環状二本鎖 DNA で、タバコでは細胞内にある約 100 個の葉緑体のそれぞれが、約 100 コピーのゲノムをもっているの、細胞あたり 10,000 コピーものゲノムが存在することになる²¹⁾。葉緑体を形質転換するには、*psbA* (photosystem II reaction center component) あるいは *rbsL* (ribulose-bisphosphate carboxylase large subunit) のプロモーターの下流に、マーカーおよび標的タンパク質の遺伝子を接続したベクターを遺伝子銃で取り込ませ、相同組換えによって葉緑体ゲノムに挿入する。その後、抗生物質による選択圧の存在下で細胞そして葉緑体が分裂を続けると、最終的にすべての葉緑体ゲノムに組換えが生じた homoplastomic 状態の形質転換体を得られる。T-DNA ベクターを用いた場合、核ゲノムに挿入される遺伝子は 1 ~ 数コピーであり、しかも一定しない挿入位置が原因となって発現量に変動があることと比較すると、葉緑体ゲノムの組換えでは導入される遺伝子のコピー数が非常に多く、更に葉緑体内では生成したタンパク質が分解され難いこともあって、40% tsp を超える標的タンパク質の生産も報告されている²²⁾。葉緑体は本来原核細胞に由来することを考えると、ヒト生理活性タンパク質のように翻訳後に複雑な修飾を必要とするものの生産は難しいかに思われるが、糖鎖を必要としないものであれば、立体構造や S-S 結合の形成も含めて正常な活性をもつタンパク質を得ることができる²³⁾。

治療用生理活性タンパク質は、すべての点で天然物と同一であることが望ましい。植物は動物タンパク質のシグナル配列の除去、S-S 結合も含めた立体構造の形成あるいは糖鎖の付加については、動物と同等の機能をもっているが、付加する糖鎖の構造が異なる。糖タンパク質に付加される糖鎖の構造は複雑で、すべての真核生物は基本的には同じであっても細部ではそれぞれに異なった配糖化を行う。植物でつくらせたヒトタンパク質が天然物と異なる点は、付加される糖鎖の mannose に $\beta 1 \rightarrow 2$ 結合した xylose と、GlcNAc に $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合した fucose が含まれていることである²⁴⁾。このような糖鎖の相違がタンパク質の生理活性に影響することはないが、医療用に長期間投与した場合には予測外のアレルギー源となる可能性が指摘されている。

4、ワクチン－ Edible vaccine －

植物を宿主としてワクチンを生産する戦略は、1990年代始めに WHO が発展途上国における予防接種普及を目的として、冷蔵設備を必要としない安価な経口ワクチンの開発を呼びかけたことから始まっている^{25, 26)}。現在予防接種には主として死菌ワクチンあるいは弱毒ワクチンが用いられているが、高価であることと保存や輸送に冷蔵設備を必要とするため、発展途上国での普及が困難であり、下痢性大腸炎、ジフテリア、百日咳、ハシカ、狂犬病などで年間数百万人（大半は子ども）が死亡している。サブユニットワクチンは病原体を構成するタンパク質の一部を抗原（vaccinogen）とするもので、ウイルスや細菌を用いる従来のワクチンと比較すると安全性はるかに高い。しかし、これまでのサブユニットワクチンでは生産コストが高い、冷蔵設備を必要とする、あるいは経口投与すると分解されるなどの問題を解決することが難しかった。

病原体は汚染された水や食物、空気と直接接する消化器や呼吸器あるいは生殖器の粘膜を介して感染する場合が多い。外界と接する第一線で病気を予防するには、粘膜の免疫系を活性化して分泌型の IgA (S-IgA) を生産させるのが有効であるが、一般に粘膜免疫系の応答は注射よりも経口で抗原を投与する方がより強く刺激される。小腸にあるパイエル板のような腸付属リンパ組織の表面細胞 (M 細胞) に取り込まれた抗原は断片化され、抗原提示細胞およびヘルパー T 細胞を介して B 細胞を活性化することによって、粘膜表面に S-IgA が分泌される。しかし、サブユニットワクチンあるいは可溶性抗原を経口で投与すると、小腸のリンパ組織に到達するまでに分解されるので、多量に投与しない限り免疫系を十分に活性化することはできず、経口ワクチンは分解され難い粒子あるいは巨大分子の一部に抗原を提示したものであることが必要となる。これまでに植物を用いて十数種のヒトおよび家畜の病原体に対するワクチンの生産が報告されているが、いずれも経口ワクチンに適した構造をもつものである (表 2)。

植物を用いてワクチンを生産するには、大別して 3 つの方法がある。すなわち、(1) 抗原タンパク質自身を発現させる方法、(2) 発現した抗原タンパク質の自己集合により粒子あるいは巨大分子とする方法、(3) 植物ウイルスのキャプシドに抗原決定基を挿入する方法である。

狂犬病ウイルスやハシカウイルスに対するワクチンは、可溶性の抗原タンパク質を植物で発現させたものである。狂犬病ウイルスエンベロープの糖タンパク質を CaMV 35S プロモーターによりトマトで²⁷⁾、あるいはハシカウイルス表面にある糖タンパク質の hemagglutinin を同じプロモーターによりタバコで発現させているが²⁸⁾、いずれの場合も生成された抗原タンパク質の含量は極めて低く、従って経口で与えた時の投与量も決して多量ではないにも拘わらず、免疫が誘導されている。これらの結果は、可溶性抗原のようなサブユニットワク

チンを経口投与すると有効でないという考えとは一致しないものであるが、経口ワクチンの新しい展開を期待させるものである。重要な家畜伝染病である口蹄疫ウイルスの抗原タンパク質を発現しているアルファルファをそのまま食べさせることによって、免疫を誘導できたことは²⁹⁾、植物組織が抗原の小腸リンパ組織への到達を助ける有効なキャリアとなることを示唆している。

表2 植物で生産されたワクチン

標的となる病原体	抗原	宿主植物	収量	文献
可溶性抗原タンパク質				
狂犬病ウイルス	ウイルス表面の糖タンパク質	トマト	1.0% tsp	27
麻疹ウイルス	hemagglutinin	タバコ		28
抗原タンパク質の集合体				
B型肝炎ウイルス	表面抗原タンパク質	タバコ	0.01% tsp	25
		ルピナス、レタス	0.01% FW	31
		タバコ	0.01% FW	66
Norwalk virus	キャプシドタンパク質	タバコ、ジャガイモ	0.30% tsp	32
コレラ菌	コレラ毒素Bサブユニット	ジャガイモ	0.30% tsp	67
病原性大腸菌	毒素Bサブユニット	ジャガイモ	0.20% tsp	34
組み換え植物ウイルス				
緑膿菌	外膜タンパク質の抗原ペプチド	CPMV/ササゲマメ	1.0~1.2mg/g 葉	14
呼吸合胞体ウイルス	外膜Gタンパク質のペプチド	AIMV/タバコ	0.5mg/g 葉	15
黄色ブドウ球菌	フィブロンекチン結合	CPMV/ササゲマメ	1.2mg/g 葉	38
	タンパク質のD2モチーフ			
ヒト免疫不全ウイルス	ウイルスの抗原ペプチド	AIMV/タバコ		68
狂犬病ウイルス	ウイルスの抗原ペプチド	AIMV/ホウレンソウ		69
マラリア病原虫	4~6アミノ酸のエピトープ	TMV/タバコ		13

tsp : total soluble protein

FW : fresh weight

次に植物で発現した抗原が自己集合して粒子を形成するものとしては、B型肝炎ウイルスに対するワクチンが最も代表的な例であろう。このウイルスはコアとエンベロープから成る直径 42nm の粒子 (Dane 粒子) であるが、非顕性感染をしているキャリアの血清中には、遺伝子をもたない直径 22nm の非感染性の空の粒子が存在する。この小さな粒子は B型肝炎ウイルスエンベロープの表面抗原タンパク質 (HBsAg) だけが、細胞膜上に自己集合して形成されているものであり、現在使用されている B型肝炎ワクチンは HBsAg を酵母で発現・精製したものである。CaMV 35S プロモーターの制御下にある HBsAg をタバコで発現させると、直径 10 ~ 40nm (平均 22nm) の粒子が形成され²⁵⁾、この粒子は B 細胞および T 細胞に対する HBsAg の抗原決定基を保持していることが証明された³⁰⁾。動物実験で免疫原性が証明された後、1999 年に HBsAg を発現している新鮮な組換えレタスを健康なボランティアに食べさせたところ、強い免疫が誘導されたことによって、経口投与による B型肝炎ワクチンの接種、更には食べるワクチンの有効性が証明されている³¹⁾。この時食べたレタスは最初に 200g、2 ヶ月後に 150g の 2 回で、HBsAg 含量は 0.1 ~ 0.5mg/100g であり、経口投与によれば極めて微量の抗原でも有効であることを示している。

エンベロープをもたない Norwalk virus は、北米で多発する旅行者下痢症の原因ウイルスであるが、このウイルスのキャプシドタンパク質 (NVCP) を植物で発現させると、NVCP 二量体 90 個で構成された直径 38nm の空のキャプシドが得られる。NVCP を発現している生のジャガイモを摂食したマウスで、抗 NVCP IgG および IgA の産生が証明されている³²⁾。

コレラ菌および病原性大腸菌による激しい下痢は、それぞれコレラ毒素 (CT) および熱に不安定なエンテロトキシン (LT) が原因物質となって起きる。これらの毒素はいずれも A、B 2 つのサブユニットから成る非常によく似た構造と作用機構をもつもので、B サブユニット (CTB あるいは LTB) が形成する五量体が、小腸上皮細胞のレセプターである GM1 ganglioside に結合して生じた小孔を通して、A サブユニットが細胞内に入る。A サブユニットがもつ ADP ribosyl transferase 活性によって cAMP 濃度が上昇し、イオンバランスが崩壊する結果、細胞から多量の水が失われて激しい下痢を起こす。CT あるいは毒性のない CTB を経口投与する免疫が誘導されるが、これは全身および粘膜で生成される抗体が CTB 五量体の形成あるいは上皮細胞への結合を阻害する結果、A サブユニットの細胞への侵入が阻害されることによると考えられる。

B サブユニットワクチンをバクテリアや酵母で生産することもできるが、経口投与に必要な量を得るための大量培養と精製に要するコストは大きい。ジャガイモで発現した CTB は細胞内で自己集合して五量体を形成し、イモおよび葉 1g 当たり約 30 μ g (0.3% tsp) 蓄積する。このジャガイモをマウスに食べさせると、血清および粘膜での IgG と IgA 産生が誘導され、CT をほぼ完全に中和すると共に、下痢症状も大幅に軽減した³³⁾。病原性大腸菌に対

しても、ジャガイモで最高 0.19% tsp の LTB 5 量体が生産されている³⁴⁾。彼等は 14 名のボランティアに LTB 産生ジャガイモを生で食べさせて、抗 LT IgG および IgA が有効に誘導されることを確認している³⁵⁾。もっともボランティアの数名は生のジャガイモを食べたために吐き気を催したそうであるが。

CTB が腸付属リンパ組織の M 細胞を含む消化管上皮細胞の GM1 ganglioside に選択的に強く結合することを利用すると、CTB に抗原を接続したキメラタンパク質が免疫系に効果的に作用することが予測される。この考えに基づくワクチンはまだ報告されていないが、後述する自己免疫疾患治療を目的とする自己タンパク質の生産において、その有効性が報告されている。

上に述べた 2 つの方法は、抗原タンパク質の遺伝子を植物ゲノムに挿入したものであるが、これに対して植物ウイルス表面に抗原を挿入する方法はまったく違った構想に基づくものである。基本的な戦略は、ウイルス粒子の外殻を構成するキャプシドタンパク質の適当な位置に、標的となる病原体のエピトープ（抗原決定基）を挿入して、キャプシド表面に露出させるものである。植物ウイルス遺伝子の組換えは上述の異種タンパク質生産の場合と同様であり、エピトープとの置換あるいは挿入によってキャプシドタンパク質の一部を変更したウイルス DNA を *in vitro* 転写して感染性の RNA とする。これを成長した植物に感染させた後のウイルスの増殖は極めて速く、2～3 週間で植物全体に拡がる。ワクチンの生産は一過的ではあるが、植物ウイルスは動物に対して病原性がなく、大量生産も可能なことからワクチン生産の有効な手段になりつつある。但し、置換あるいは挿入するエピトープの大きさや位置がキャプシドの構築、ひいてはウイルスの増殖速度に強く影響することを考慮する必要がある。

これまでに有効性が実証された組み換えウイルスは CPMV、TMV および alfalfa mosaic virus (AIMV) を用いたものである。植物ウイルスのキャプシドの構造—ウイルスの形状—はさまざまであり、エピトープペプチドを挿入できる位置とその大きさは異なる。例えば、CPMV は Large (L) と Small (S) の 2 種のサブユニットが、各 60 コピー集合して構成された正 20 面体（直径 28nm）のキャプシドをもっている。電子顕微鏡でキャプシドの構造を解析した結果に基づいて、S あるいは L あるいは両方のキャプシドから突き出している部分にペプチドを挿入すると、ウイルス粒子一個あたり 60～120 のエピトープを提示することができる^{12, 14)}。口蹄疫ウイルス（エピトープは 19 アミノ酸のペプチド）、human rhinovirus（14 アミノ酸）あるいは human immunodeficiency virus (HIV、22 アミノ酸)のエピトープを挿入した組換え RNA を用いると、新鮮葉 1 kg から 1.2～1.5g のウイルス粒子が得られ¹²⁾、HIV エピトープをもつウイルスをマウスに注射すると、極めて効果的に抗 HIV 抗体の産性が誘導された³⁶⁾。

TMV は棒状ウイルスで、表面に突出しているキャプシドタンパク質の C 末端に、25 アミノ酸以下のエピトープを接続することができる。但し、すべてをキメラにするとキャプシドが構築できないので、キャプシドタンパク質の C 末端に leaky な停止コドンを選び、これにペプチドを接続して一部だけをキメラタンパク質とすることが必要である³⁷⁾。AIMV も基本的には棒状であるが、収納する RNA の大きさに応じて大きさが変化する柔軟性があるので、表面に突出する N 末端にかなりの大きさのペプチドを接続することができるが、上気道感染症ウイルス (human respiratory syncytial virus) のエピトープを用いて示されている¹⁵⁾。

これらの方法により生産されるワクチンは、WHO の呼びかけに応えるものであろうか。自己増殖する病原体を用いて生産する従来のワクチンは、有効ではあるものの毒力復帰変異の危険性があり、DNA ワクチンは被接種者のゲノムに組み込まれる恐れがあることに比較すると、安全性の点では植物を用いて生産するサブユニットワクチンは格段に優れている。これまでに生産されたワクチンは、少なくとも動物実験ではすべてについて血清中あるいは粘膜での抗体産生を誘導することが証明されており、有効性については従来のものとほぼ同等と言える。発展途上国での予防接種普及を目的とする場合には価格、熱安定性、簡便な接種が課題となるが、ワクチンを生産する組み換え植物の種子や苗を用いて現地で栽培すれば、コールドチェーンによる保存や輸送の問題は解決できる。経口投与、特に食べるワクチンとしての特徴を生かすことができれば、冷蔵の問題と同時に医師を必要としない簡便な接種も可能となる。そのためにはジャガイモのように加熱調理を要する作物ではなく、生食できる植物を宿主とすることが必要である。これまでにホウレンソウやレタスでの生産が報告されているが、子どもを主な対象とするためにはバナナなどの果実が最も望ましいであろう。また、粘膜系の免疫を誘導するには経口投与だけでなく、鼻粘膜に投与 (点鼻あるいは噴霧) しても有効で、鼻粘膜だけでなく気管支、小腸、膣の粘膜でも抗原特異的な IgG および IgA が誘導されることが、黄色ブドウ球菌の抗原を提示したキメラウイルスワクチンを用いて確認されている³⁸⁾。これも簡便な投与手段の一つとなるであろう。

価格に影響する最大の要因は収量であり、安定した高収量を確保することが今後の課題である。キメラウイルスの場合は、生葉 1 kg 当たり 1 ~ 1.5 g のウイルス粒子 (アミノ酸 20 個のエピトープであれば、約 20 ~ 30mg のペプチドを含む) がわずか 2 ~ 3 週間で得られるが、その都度感染させる作業が必要である。組換え植物では、ほとんどの場合 0.01 ~ 0.4% tsp の収量で十分なものではないが、今後プロモーターの選択や小胞体での蓄積、コドンの最適化などを検討することによって収量を高めることは可能であると考えられている。実用化に向けて解決しなければならないのは、組換え植物では標的遺伝子の挿入位置による position effect があるため、個体ごとに生産量が異なることである。含量が一定しないと投

与する（食べさせる）植物量を決めることは難しく、十分な接種効果が得られない可能性がある。また、あまり議論されていないことではあるが、ワクチンを産生する食用作物を非組換え体と区別する上での徹底した管理は困難と予測され、現地住民が無制限に摂食することになると、逆に免疫寛容が起きてしまう可能性が危惧されている²⁶⁾。これは後述する自己免疫疾患の治療を目的として、自己タンパク質をつくる植物を食べさせる戦略の裏返しであり、慎重な検討を要する課題であろう。

5、抗体— Plantibody —

1975年に発表されたモノクローナル抗体（mAb）生産は、医学や生化学を中心とする諸分野に革命的な影響をもたらした。1980年代初期に mAb をガン治療に用いることが検討され始めた当初は、期待したほどの成果は得られなかったけれどもその後の発展は著しく、特に免疫学上問題があったマウスのものではなくヒト型抗体が生産できるようになって、現在では 10 種を超える mAb がアメリカで治療薬として認可されている。抗体はガン治療だけでなく、ウイルスや細菌感染症の治療、自己免疫疾患の治療、あるいは基礎生命科学の研究において今や必須のものであり、今後膨大な種類と量の抗体が必要になると考えられている。抗体は軽鎖と重鎖各 2 本から成る基本構造をもつが、組換え抗体（rAb）は必ずしもフルサイズである必要はなく、使用する目的に応じて多彩なバリエーションが可能である。例えば、1 番目の定常領域を含む重鎖の可変ドメインと軽鎖を結合したもの（Fab）や、両鎖の可変ドメイン同士をリンカーで結合したもの（single chain Fv、scFv）のように小型化したものは、抗原結合活性のみを利用する診断や治療に適している。これにイムノトキシンや放射性同位体、酵素を結合することもできる。異なった抗原に対する 2 種の抗体の可変部を組み合わせた bispecific Ab（bsAb）は、T 細胞や貪食細胞などの作用細胞と標的細胞（ガン細胞など）との選択的な結合を促進するものであり、フルサイズ抗体の作用で認められる補体活性化による副作用を伴わない点で注目されている³⁹⁾（図 1 参照）。

抗体は種々の宿主を用いて生産することができる⁴⁰⁾。バクテリアは活性や安定性に糖鎖を必要としない scFv などの小型化した抗体の生産に使えるが、正しい立体構造をつくれなため封入体となったり分解されることが原因で、収量は極めて低い。酵母も検討されているが、酵母の糖鎖構造は哺乳類のものとは大きく異なる。Chinese hamster ovary（CHO）細胞などの哺乳類培養細胞を用いれば、任意の IgG 抗体を 1～2g/L の収量で生産することができる。組換え動物のミルクに分泌させることも活発に進められているし、最近ではニワトリの卵を用いても効率良く（100mg/egg）抗体を生産できることが報告されている⁴¹⁾。植物を宿主として mAb を生産できることが最初に報告されたのは 1989 年である⁴²⁾。それぞれ軽鎖の κ 鎖と重鎖の γ 鎖を発現するタバコを交配して得られた植物では、同時に発現し

た両鎖からフルサイズのイムノグロブリンが 1.3% tsp の収量で生産され、ハイブリドーマで生産したものと同等の抗原結合活性をもつことが確認された。各サブユニットを発現する組換え植物の交配によって、正しく機能する抗体の組み立てが行われることは、植物が種々のタイプの抗体 (plantibody) を生産できる優れたシステムであることを示す。

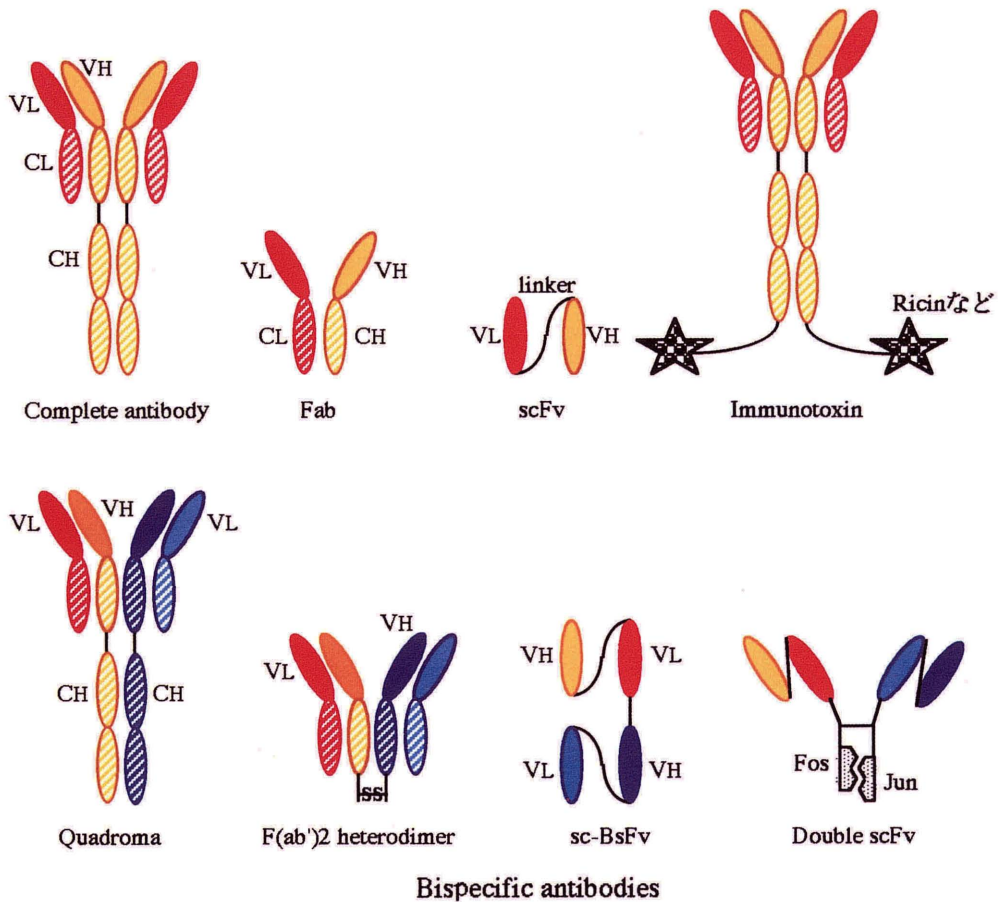


図1 植物で生産できる種々の組み換え抗体

典型的な例は分泌型のイムノグロブリン (SIgA) の生産であろう (図2 参照)。だ液、涙、呼吸器や腸粘膜の分泌液に含まれる主要な抗体は SIgA で、2つの IgA 単量体とそれをつなぐ J 鎖および分泌に関わる分泌成分 (Sc) の合計 10 ヶのポリペプチドから構成されている。哺乳動物における SIgA の生産には、IgA 二量体をつくるプラズマ細胞と、Sc を生産し組み立てた SIgA をトランスサイトシスによって分泌管内腔に放出する分泌上皮細胞の 2 種類の細胞が関わっている。虫歯の原因となる *Streptococcus mutans* に対する抗体の軽鎖を発現している植物に重鎖を発現するものを交配すると、IgA 単量体 (約 210kDa) が生産される。これに J 鎖を発現するものをかけ合わせると二量体 (約 400kDa)、次いで Sc 発現体と交配

して約 470kDa の SIgA が得られた⁴³⁾。動物では SIgA の産生に 2 種類の細胞が必要であるのに対して植物では 1 種類の細胞ですべてのサブユニットを合成し、折りたたみ、複雑な構造を構築することができる上に、Sc 鎖の結合がプロテアーゼによる分解を阻止することも理由となって、収量は 200 ～ 500mg/kg 新鮮葉と非常に高い。このことから植物小胞体に存在する foldases および chaperonins は、哺乳動物のものと同じ機能をもつことが明らかである。この SIgA の抗原は *S. mutans* のコロニー形成に関わるタンパク質であり、歯に塗布すると長期間非常に有効にコロニー形成を阻止できることが人体実験で確認されている⁴⁴⁾。

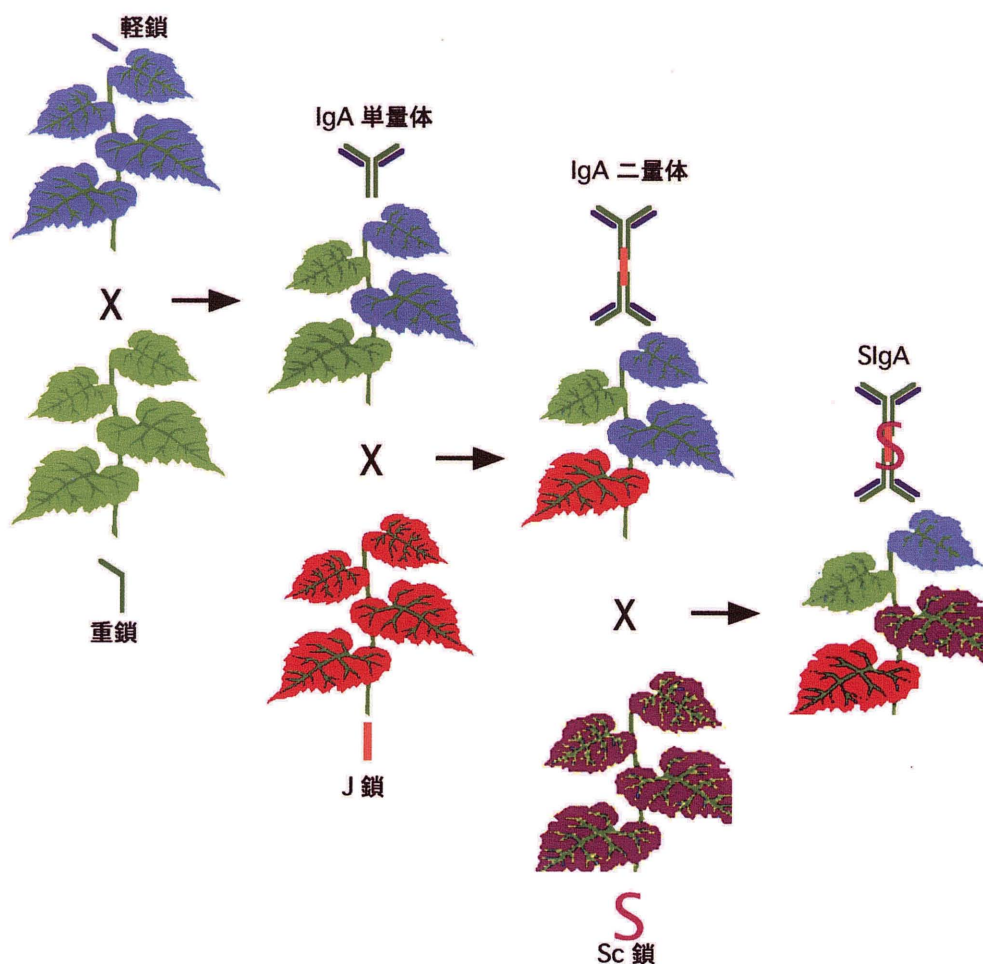


図2 分泌型 IgA 生産植物の作出

組換え抗体遺伝子の発現に用いるプロモーターは他の生理活性タンパク質と同様のものがあり、植物全体で強く発現する CaMV 35S やユビキチンプロモーターあるいは種子特異的タンパク質（マメ科の legumin や USP - unknown seed protein）のプロモーターで発現さ

せた場合の scFv の収量は、0.1 ~ 1% tsp 程度である。ところが scFv の C 末端に KDEL のような小胞体保留シグナルを付加すると、収量は 4 ~ 6.8% tsp まで増加する⁴⁵⁾。これは小胞体内では正確な折りたたみが促進されること、およびプロテアーゼによる分解が軽減されることが理由とされている。更に小胞体に蓄積した抗体は、室温で乾燥したタバコ葉で 1 週間以上、あるいは乾燥タバコ種子では 1 年以上タンパク質量や活性に変化がないなど、長期間安定に保存できることも大きな利点である。

安定した形質転換植物による生産以外に、*A. tumefaciens* あるいは植物ウイルスベクターを用いて組み換え抗体を一過的に発現させることも可能で、これにはいくつかのメリットがある。例えば、ガン胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen CEA) を目的とした例では、フルサイズの抗 CEA ヒト / マウスキメラ抗体あるいは scFv の遺伝子を含む T-DNA ベクターをもった *A. tumefaciens* をタバコの葉に減圧浸潤させて、約 60 時間で約 1mg/kg 葉の抗体を得ている⁴⁶⁾。フルサイズの抗体をつくらせるには、それぞれ軽鎖および重鎖の遺伝子をもつ菌体を同時に浸潤させればよい。この方法によれば形質転換植物を作出するに先立って、得られる抗体の評価とベクターの改善を迅速に行うことができる。

B 細胞リンパ腫の治療には、腫瘍化した B 細胞表面に提示されている特異的な細胞表面イムノグロブリン (Ig) を抗原とし、これに対する抗体 (抗イディオタイプ抗体) を誘導するワクチンを投与する方法が有効である。しかし腫瘍化した B 細胞が提示するイムノグロブリンは患者ごとに異なるものであり、治療には相当量のワクチンとなる Ig を必要とするので、従来方法では短期間で必要量を生産することは極めて困難であった。マウス B 細胞リンパ腫の Ig の可変部に由来する scFv の N 末端にイネの α -アミラーゼの分泌シグナルを接続した遺伝子コンストラクトを TMV ベクターにクローニングした後、*in vitro* 転写したウイルス RNA をタバコに感染させると、約 2 週間で植物全体に病徴が広がる。収穫した葉の細胞間隙に分泌されているタンパク質を抽出することによって、約 30mg/kg の scFv が得られた¹¹⁾。この scFv をマウスに免疫すると、効率よく抗イディオタイプ抗体が誘導され、致死量の腫瘍細胞の移植によってもほとんどのマウスが生存し続けた。抗原 Ig の遺伝子をクローニングしてから約 4 週間で組換え抗体を入手することができるのは植物ウイルスベクターならではの速さで、ヒトに応用できるようになれば患者にとって大きな福音となるであろう。

このように抗体の一過的生産には速さという利点があるが、大量に必要となる場合は組換え植物による生産が唯一の手段となるのではないか。例えばアメリカにおける大腸ガン患者は毎年 65 万人発生しており、一人に 10 ~ 200mg の抗体を使用するなら、年間 6.5 ~ 130kg もの抗体が必要となる⁴⁶⁾。このような需要を満たすには、1 エーカーあたり 5 ~ 10kg の組換えタンパク質の生産能力をもつタバコのような組換え植物を利用することが必要となる。

6、自己タンパク質－自己免疫疾患の治療

免疫系の働きが、結果的に生体にとって有害となるのがアレルギーであり、自己の成分に対してアレルギー反応を起こす自己アレルギーが原因となって何らかの病態が起きるのが自己免疫疾患である。I型糖尿病、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎など自己免疫疾患は非常に種類が多く、いずれも有効な治療法がない難病である。近年これらの疾患の治療に、免疫系の標的となっている自己タンパク質を経口投与して免疫寛容を誘導すると有効であることが、病態動物を用いた研究で明らかにされつつある⁴⁷⁾。免疫系は食物や腸内常在細菌群に由来する抗原に対しては応答しないが、これはこれらの抗原が腸付属リンパ組織を絶えず刺激することによって免疫寛容が起きている、すなわち非自己を自己と看做す機構が働いていると考えられる。この考えに基づけば、免疫系が自己抗原に対して不適切な応答をすることによって起きる疾患の治療に、同じ抗原－自己タンパク質－を経口投与することにより粘膜リンパ組織に提示して経口免疫寛容 (oral tolerance) を誘導することが有効であるというのは頷けることである。経口免疫寛容が誘導される機構は非常に複雑で私の理解を超えるものであるが、この治療法の問題は原因となる自己タンパク質を大量に手に入れることにあり、植物を宿主とする生産システムがこの問題を解決できると期待されている。

適切な病態動物があることと原因タンパク質が明らかになっていることが理由となって、最も研究が進んでいる自己免疫疾患はI型糖尿病である。I型糖尿病あるいはインスリン依存性糖尿病は、インスリンを産生す膵臓ランゲルハンス島 β 細胞がT細胞によって破壊されて起きるが、標的となるのはインスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) など数種の β 細胞タンパク質である⁴⁸⁾。CTB－インスリンのキメラ遺伝子のC末端に小胞体保留シグナルKDELを付加してジャガイモで発現させると、CTB－インスリンの五量体が0.1% tspの収量で得られる。CTBは腸付属リンパ組織細胞のGM1 gangliosideに選択的に強く結合して、抗原であるインスリンをリンパ細胞に効率よく提示させる役割をもつ。生後3週間頃からランゲルハンス島のリンパ球浸潤によりインスリン依存性糖尿病を自然発症するNODマウスに、この融合タンパク質を含むジャガイモを食べさせると、リンパ球浸潤、従って糖尿病発症が大幅に軽減された⁴⁹⁾。同様の結果は、GADを生産するジャガイモを投与した場合にも得られている⁵⁰⁾。糖尿病以外にも実験的アレルギー性脳脊髄炎 (抗原はミエリン塩基性タンパク質)⁵¹⁾ などいくつかの自己免疫疾患について自己抗原の経口投与が効果的であることは報告されているが⁵²⁾、投与する抗原の量あるいは摂取する方法－大量を一度にあるいは微量を繰返して－によって誘導される免疫寛容の機構が異なるため、抗原産生植物を食べることによる治療法を確立するには安定した含量を保証することが今後の課題となる。

7、宿主植物の比較

これまでの研究で異種タンパク質の生産に用いられている植物はタバコが圧倒的に多い。これはタバコが *A. tumefaciens* や植物ウイルスの感染機構を利用するベクターによる遺伝子導入と、遺伝子操作を施した細胞から植物体への再分化が容易であるという実験植物としての条件を備えていることが理由であるが、実生産に際しては目的および生産性に及ぼす種々の要因を考慮して宿主植物を慎重に選択することが必要となる。タバコはアルカロイドを含むので、標的タンパク質を生産する植物を直接用いる「食べるワクチン」には不適切であり、レタスやバナナなどの生食できる食用作物を選ぶ必要がある。しかし、タンパク質を低分子量のアルカロイドと分離・精製することは容易であり、タバコ栽培農家と共同してタバコによる生理活性タンパク質を生産するビジネスも成立している。特に前述した収穫後に発現させる MeGATM プロモーターを用いる生産システムは高収量もさることながら、農場ではなく衛生管理の行き届く施設で、標的タンパク質の合成、分離、精製の一連の過程を行える点で優れていると考えられる。

一方、ナタネなどの油脂作物あるいはジャガイモなどでは、長期間の保存が可能であると同時に、油脂あるいはデンプンといった本来の成分を分離した残分から標的タンパク質をタンパク質を単離することができるという利点がある。例えば、ヒト血清アルブミン (HSA) をジャガイモ塊茎貯蔵タンパク質 patatin のプロモーターで発現させた報告における試算によると、HSA 発現量が 1 ~ 2% tsp、ジャガイモ収穫量が 50t/ha であれば、デンプンの売却代金で約 12kg/ha の HSA を単離する経費が賄えることになる⁶⁾。

タバコやレタス、ハウレンソウなどの一年生草本を用いる場合には、種子の保存期間に応じて組換え植物の seed bank を常に更新する必要があるが、生殖の過程で遺伝形質の分離が起きることに伴って後代におけるタンパク質の生産性に大きなばらつきが生じるが短所である。この問題は多年生植物やジャガイモのように栄養繁殖する植物を宿主とすることによって回避できる⁵³⁾。組織培養法による生産も可能で、懸濁培養細胞あるいは *A. rhizogenes* の感染で誘導される毛状根を宿主とした例が報告されている^{54, 55)}。培養組織を用いると合成された標的タンパク質を液体培地に分泌させることが可能で、生成物の分離が容易であるという利点と同時に、わが国のように組換え植物の露地栽培に対する規制が厳しい国では、コストへの影響を除けば有用な生産手段となるかも知れない。

8、将来への展望

ポストゲノムの時代にあって、さまざまな機能をもつタンパク質の予防医学も含めた医療分野における重要性は増々大きくなるものと予測される。同時にタンパク質は単に医療だけでなく産業用酵素、生分解プラスチック原料や新規繊維、あるいはナノテクノロジーと連動

した分子デバイスなど広範な産業分野においても欠くことのできないものとなりつつある。数多くある異種タンパク質生産システムの中で、植物は安価、大量、安全などの点で他に優るとも劣らないことは明白である。タンパク質に付加される糖鎖構造の相違は活性に影響しないとは言え好ましいものではないが、植物の糖鎖修飾機構を改変することも成功しており、免疫学的にも問題のない生理活性タンパク質の生産が可能となるであろう。残念なことは、特に植物を用いた有用タンパク質の生産に関する技術の多くが、主としてアメリカにおいて特許化されていることであって、何をやっても既存の特許に抵触する可能性が拭えないことにある。日本における植物バイオを育てるには、奇想天外と言えるほど独創性のあるアイディアの必要性を痛感している。例えば、カイコ細胞質多角体病ウイルスが生産するタンパク質集合体の多角体に、任意の遺伝子に基づくタンパク質を封入できることを新しいタイプのワクチン開発に応用することも一つであろう（太田、秋田 未発表）。

一方、有用タンパク質を生産する遺伝子組換え植物の栽培も解決しなければならない問題である。遺伝子組換え植物を一般農地で栽培した場合に環境の遺伝子汚染が生じる可能性を完全に否定することはできず、慎重にならざるを得ないであろう。アメリカにおけるバイオテクノロジー規制は、製品をつくるプロセスではなく、製品自身の特性と安全性に基づいて実施すべきであるということを基本原則としているので、タバコなどを用いた医療用タンパク質の生産も可能なのであるが、日本では閉鎖系あるいは隔離圃場での栽培のみが許されている。このような法的規制と同時に、医療用タンパク質については安全性の確保が最も重要である。植物自身あるいは植物ウイルスは無害であっても、栽培環境や条件が原因となって安全性に疑いが生じることがあってはならない。

このような視点から見ると、植物工場を遺伝子組換え植物による付加価値の高い医療用タンパク質生産システムとして活用する可能性が考えられる。植物工場は、廃水処理から昆虫によるものも含めた花粉の飛散もない閉鎖系であること、コントロールされた清潔な栽培環境が確保されていることなど医療用に限らず有用タンパク質を生産するのに必要な条件を満たしている。また、生成したタンパク質を養液に分泌させれば、分離・精製などに要するコストを削減できるし、仮に遺伝子操作を施した細胞から植物体への再分化が難しい場合は、細胞培養あるいは不定根やシュートなどの器官培養による生産もできることは植物工場ならではの強みであろう。

引用文献

- 1) Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opinion in Bio-technol.*, 10, 411 - 421.
- 2) Rudolph, N.S. (1999) Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnol.*, 17, 367 - 374.

- 3) Kerr, D.E., Liang, F., Bondioli, K.R., Zhao, H., Kreibich, G., Wall, R.J. and Sun, T-T. (1998) The bladder as a bioreactor: Urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nature Biotechnol.*, 16, 75 - 79.
- 4) Kusnadi, A., Nikolov, Z.L. and Howard, J.A. (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.*, 56, 473 - 484.
- 5) Moloney, M.M. (1995) "Molecular farming" in plants: achievements and prospects. *Biotechnol. Eng.*, 9, 3 - 9.
- 6) Sijmons, P.C., Dekker, B.M.M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T.C., Van Den Elzen, P.J.M. and Hoekema, A. (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technol.*, 8, 217 - 221.
- 7) Parmenter, D.L., Boothe, J.G., van Rooijen, G.J.H., Yeung, E.C. and Moloney, M.M. (1995) Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol. Biol.*, 29, 1167 - 1180.
- 8) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L. mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6, 271 - 282.
- 9) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 14, 745 - 750.
- 10) Donson, J., Kearney, C.M., Hilf, M.E. and Dawson, W.O. (1991) Systemic expression of a bacetrial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 7204 - 7208.
- 11) McCormick, A.A., Kumagai, M., Hanley, K., Turpen, T.H., Hakim, I., Grill, L.K., Tuse, D., Levy, S. and Levy, R. (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 703 - 708.
- 12) Porta, C., Spall, V.E., Loveland, J., Johnson, J.E., Barker, P.J. and Lomonosoff, G.P. (1994) Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology*, 202, 949 - 955.
- 13) Turpen, T.H., Reinl, S.J., Charoenvit, Y., Hoffman, S.L., Fallarme, V and Grill, L.K. (1995) Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Bio/Technol.*, 3, 53 - 57 .
- 14) Brennan, F.R., Jones, T.D., Gilleland, L.B., Bellaby, T., Xu, F., North, P.C., Thompson, A., Staczek, J., Lin, T., Johnson, J.E., Hamilton, W.D.O. and Gilleland Jr., H.E. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiology*, 145, 211 - 220 .
- 15) Belanger H., Fleysh, N., Cox, S., Bartman, G., Deka, D., Trudel, M., Koprowski, H. and Yusibov, V. (2000) Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB J.*, 14, 2323 - 2328 .
- 16) Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Van Lijsebettens, M., Botterman, J., De Block, M., Vandewiele, M., De Clercq, A., Leemans, J., Van Montagu, M. and Krebbers, E. (1989) Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *Bio/Technol.*, 7, 929 - 932.
- 17) Mckown, R.L. (2002) Using tobacco to produce transgenic proteins. <http://www.croptech.com>

- 18) Chaudhary, S., Parmenter, D.L. and Moloney, M.M. (1998) Transgenic *Brassica carinata* as a vehicle for the production of recombinant proteins in seeds. *Plant Cell Reports*, 17, 195 - 200.
- 19) Pen, J., Verwoerd, T.C., van Paridon, P.A., Beudeker, R.F., van den Elzen, P.J.M., Geerse, K., van der Klis, J.D., Versteegh, H.A.J., van Ooyen A.J.J. and Hoekema, A. (1993) Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technol.*, 11, 811 - 814.
- 20) Cramer, C.L., Weissenborn, D.L., Oishi, K.K., Grabau, E.A., Bennett, S., Ponce, E., Grabowski, G.A. and Radin, D.N. (1996) Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann. New York Acad. Sci.*, 792, 62 - 71.
- 21) Ruf, S., Hermann, M., Berger, I.J., Carrer, H. and Bock, R. (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnol.*, 19, 870 - 875.
- 22) De Cosa, B., Moar, W., Lee, S-B., Miller, M. and Daniell, H. (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Bio-technol.*, 19, 71 - 74.
- 23) Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T.J., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J.A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G. and Russell, D.A. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnol.* 18, 333 - 338.
- 24) Chrispeels, M.J. and Faye, L. (1996) The production of recombinant glycoproteins with defined non-immunogenic glycans. In : Owen, M.R.L. and Pen, J. (Eds.), *Transgenic plants : A production system for industrial and pharmaceutical proteins*. Willy. pp. 99 - 113.
- 25) Mason, H.S., Lam, D.M-K. and Arntzen, C.H. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 11745 - 11749.
- 26) Langridge, W.H.R. (2000) Edible vaccines. *Sci. Am.*, 66 - 71.
- 27) McGarvey, P.B., Hammond, J., Dienelt, M.M., Hooper, D.C., Fu, Z.F., Dietzschold, B., Koprowski, H. and Michaels F.H. (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Bio/Technol.*, 13, 1484 - 1487.
- 28) Huang, Z., Dry, I., Webster, D., Strugnell, R. and Wesselingh, S. (2001) Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 19, 2163 - 2171.
- 29) Wigdorovitz, A., Carrillo, C., Dus Santos, M.J., Trono, K., Peralta, A., Gomez, M.C., Rios, R.D., Franzone, P.M., Sadir, A.M., Escribano, J.M. and Borca, M.V. (1999) Induction of a protective response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, 255, 347 - 353.
- 30) Thanavala, Y., Yang, Y-F., Lyons, P., Mason, H.S. and Arntzen, C. (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3358 - 3361.
- 31) Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A. and Legocki, A.B. (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J.*, 13, 1796 - 1799.

- 32) Mason, H.S., Ball, J.H., Shi, J.-J., Estes, M.K. and Arntzen, C.J. (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5335 - 5340.
- 33) Arakawa, T., Chong, D.K.X. and Langridge, W.H.R. (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnol.*, 16, 292 - 297.
- 34) Mason, H.S., Haq, T.A., Clements, J.D. and Arntzen, C.J. (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT) : potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*, 16, 1336 - 1343.
- 35) Tacket, C.O., Mason, H.S., Losonsky, G., Clements, J.D., Levine, M.M. and Arntzen, C.J. (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Medicine*, 4, 607 - 609.
- 36) McLain, L., Durrani, Z., Wisniewski, L.A., Porta, C., Lomonossoff, G.P. and Dimmock, N.J. (1996) Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine*, 14, 799 - 810.
- 37) Sugiyama, Y., Hamamoto, H., Takemoto, S., Watanabe, Y. and Okada, Y. (1995) Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Let.*, 359, 247 - 250.
- 38) Brennan, F.R., Bellaby, T., Helliwell, S.M., Jones, T.D., Kamstrup, S., Dalsgaard, K., Flock, J.-I. and Hamilton, W.D.O. (1999) Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. *J. Virol.*, 73, 930 - 938.
- 39) Van Spriël, A.B., Van Ojik, H.H. and Van de Winkel J.G.J. (2000) Immunotherapeutic perspective for bispecific antibodies. *Immunology Today*, 21, 391 - 397.
- 40) Chadd, H.E. and Chamow, S.M. (2000) Therapeutic antibody expression technology. *Curr. Opinions Biotechnol.* 12, 188 - 194.
- 41) Morrow, K.J.J. (2000) Antibody-production technologies. *Genet. Eng. News*, 20, 1 - 55.
- 42) Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, 76 - 78.
- 43) Ma, J.K.-C., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N.D., Wang, F., Stabila, P., Van Dolleweerd, C., Mostov, K. and Lehner, T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 268, 716 - 719.
- 44) Ma, J.K.-C., Hikmat, B.Y., Wycoff, K., Vine, N.D., Chargelegue, D., Yu, L., Hein, M.B. and Lehner T. (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Medicine.*, 4, 601 - 606.
- 45) Fiedler, U., Phillips, J., Artsaenko, O. and Conrad, U. (1997) Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnol.*, 3, 205 - 216.
- 46) Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S. and Fischer, R. (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 11128 - 11133.
- 47) Weiner H.L. (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- β -secreting regulatory cells. *Microbes and Infection*, 3, 947 - 954.
- 48) Ma, S. and Jevnikar, A.M. (1999) Autoantigens produced in plants for oral tolerance therapy of autoimmune diseases. In: *Chemicals via higher plant bioengineering*. Shahidi, F. et al. (eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 179 - 194.

- 49) Arakawa, T., Yu, J., Chong, D.K.X., Hough, J., Engen, P.C. and Langridge, H.R. (1998) A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nature Biotechnol.*, 16, 934 - 938.
- 50) Ma, S.-W., Zhao, D.-L., Yin, Z.-Q., Mukherjee, R., Singh, B., Qin, H.-Y., Stiller, C.R. and Jevnikar, A.M. : (1997) Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nature Medicine*, 3, 793 - 796.
- 51) Sun, J.-B., Rask, C., Olsson, T., Holmgren, J. and Czerkinsky, C. (1996) Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7196 - 7201.
- 52) Weiner, H.L. (1997) Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu. Rev. Med.*, 48, 341 - 351.
- 53) Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J.-M., Bazin, R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R. and Vezia L.P. (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotech. Bioeng.*, 64, 135 - 143.
- 54) Fisher R., Liao, Y.-C. and Drossard, J. (1999) Affinity-purification of a TMV-specific recombinant full-size antibody from a transgenic tobacco suspension culture. *J. Immunol. Method*, 226, 1 - 10.
- 55) Wongsamuth, R. and Doran, P.M. (1997) Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotech. Bioeng.* 54, 401 - 415.
- 56) Petolino, J.F., Young, S., Hopkins N., Sukhapinda, K., Woosley, A., Hayes, C. and Pelcher, L. (2000) Expression of murine adenosine deaminase (ADA) in transgenic maize. *Transgenic Res.*, 9, 1 - 9.
- 57) Takase, K. and Hagiwara, K. (1998) Expression of human α -lactalbumin in transgenic tobacco. *J. Biochem.*, 123, 440 - 444.
- 58) Matsumoto, S., Ikura, K., Ueda, M. and Sasaki, R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol. Biol.*, 27, 1163- 1172.
- 59) Zhong, G.-Y., Peterson, D., Delaney, D.E., Bailey, M., Witcher, D.R., Register III, J.C., Bond, D., Li, C.-P., Marshall, L., Kulisek, E., Ritland, D., Meyer, T., Hood, E.E. and Howard, J.A. (1999) Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Mol. Breeding*, 5, 345 - 356.
- 60) Terashima, M., Murai, Y., Kawamura, M., Nakanishi, S., Stolz, T., Chen, L., Drohan, W., Rodriguez, R.L. and Katoh, S. (1999) Production of functional human α 1-antitrypsin by plant cell culture. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 516 - 523.
- 61) Kumagai, M.H., Turpen, T.H., Weinzettl, N., Della-Cioppa, G., Turpen, A.M., Donson, J., Hilf, M.E., Grantham, G.L., Dawson, W.O., Chow, T.P., Piatak, Jr, M. and Grill, L.K. (1993) Rapid, high-level expression of biologically active α -trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 427 - 430.
- 62) Cramer C., Boothe, J.G. and Oishi, K.K. (1999) Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr. Topics Microbil. Immunol.*, 240, 95 - 118.
- 63) Ruggiero, F., Exposito, J.-Y., Bournat, P., Gruber, V., Perret, S., Comte, J., Olganier, B., Garrone, R. and Theisen, M. (2000) Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett.*, 469, 132 - 136.

- 64) Leite, A., Kemper, E.L., da Silva M.J., Luchessi, A.D., Siloto, R.M.P., Bonaccorsi, E.D., El-Dorry, H.F. and Arruda, P. (2000) Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Mol. Breeding*, 6, 47 - 53.
- 65) Chong, D.K.X. and Langridge, W.H.R. (2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Res.*, 9, 71 - 78.
- 66) Richter, L.J., Thanavala, Y., Arntzen, C.J. and Mason, H.S. (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnol.*, 18, 1167 - 1171.
- 67) Arakawa, T., Chong, D.K.X., Merritt, J.L. and Langridge, W.H.R. (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res.*, 6, 403 - 413.
- 68) Yusibov, V., Modelska, A., Steplewski, K., Agadjanyan, M., Weiner, D., Hooper, D.C. and Koprowski, H. (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94 , 5784 - 5788.
- 69) Modelska, A., Dietzschold, B., Sleysh, N., Fu, Z.F., Steplewski, K., Hooper, D.C., Koprowski, H. and Yusibov, V. (1998) Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 2481 - 2485.

英文抄録

Production of recombinant proteins in plants

Yoshimoto Ohta and Motomu Akita

The utilization of transgenic plants for production of recombinant proteins and peptides of pharmaceutical interest has gained increasing attention over past decades. Plant expression systems have many potential advantages for producing these proteins. First, production cost is low. A large amount of raw material containing the target proteins are produced on an agricultural scale. Only sun light, water and fertilizer are required. Second, purification is easy or not necessary. The proteins can be expressed and accumulated in a particular compartment such as seeds or tubers. Edible plants may be utilized, in some cases, to deliver the protein directly. Third, plants are convinced to be safe hosts. Plant do not serve as hosts for human pathogens, and plant viruses are not pathogenic to humans.

In this review, we discuss recent development in "molecular farming" for the production of biopharmaceuticals, edible vaccines, antibodies, and autoantigens for treatment of autoimmune diseases in transgenic plants.