

植物を用いた医薬タンパク質の生産に関する研究

林 遼馬 (筑波大学 生物学類)

指導教員：三浦 謙治 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

感染症の治療に用いる重要な医薬タンパク質として中和抗体が挙げられる。中和抗体とは体内に侵入したウイルスや細菌等の特定の病原体に結合することで、それらの宿主細胞への感染・傷害作用を中和する役割を持つ抗体のことである。中和抗体は投与後すぐに体液性免疫を獲得することが可能であるため、迅速な感染症の治療及び感染拡大の抑制を行うことが可能である。

本研究では、中和抗体として複数の A 型インフルエンザウイルスの亜型に対して抗体活性を示すインフルエンザ万能抗体 (IgG) を用いた。また抗体の生産宿主として、将来の生産規模の拡大等を目的として、植物を用いた。使用した植物材料はレタス及びトマトである。

本研究では先行研究にて作成されたインフルエンザ中和抗体を発現するレタス及びトマトの形質転換体からの抗体の精製、及び精製サンプルの収量の測定を目的とした。

また、植物内で生産される糖タンパク質は植物特異的な糖鎖修飾を受ける。抗体が病原体を認識し中和する機能は糖鎖の構造に影響を受けることが知られている。ヒトが生産した抗体の糖鎖は、抗体が体内で機能するために必要な構造をとっている。そのため、植物で生産した抗体の糖鎖の構造解析を行い、必要に応じて糖鎖を植物型からヒト型へと改変することが必要ではないかと考えている。本研究では糖鎖の構造解析を lectin microarray により行う予定である。そこで、糖鎖の構造解析に必要なレクチンをレタスを用いた一過性発現により生産することを 2 つ目の目的とした。

【材料】

1. 中和抗体の生産

導入遺伝子はインフルエンザ万能抗体の H 鎖をコードした *IgGH*、L 鎖をコードした *IgGL* の二つである。それぞれレタスのコドンに改変したものを使用した。

形質転換植物体は先行研究にて作成したレタス (*Lactuca sativa* cv. Red Fire) 及びトマト (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) である。レタスではカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター、トマトでは果実特異的に発現する E8 プロモーターにより発現させた。

2. レクチンの生産

導入遺伝子はインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 由来の *Agglutinin-E* (*PHA-E*)、*PHA-L*、タチナタマメ (*Canavalia ensiformis*) 由来の *Concanavalin-A* (*Con-A*) の 3 種類である。それぞれレタスのコドンに改変したものを用いた。

植物材料としてレタス (*Lactuca sativa* cv. Red Fire) を用いた。

【方法】

1. 中和抗体の生産

抗体の精製はレタスでは葉から、トマトでは果実から行った。超音波破碎によりタンパク質を抽出した後、抗体の C 末端に融合した His-tag を利用した Ni Sepharose カラムによるアフィニティー精製を行った。

精製したサンプルの抗体収量の定量は、大腸菌を用いて作成した濃度既知の H 鎖タンパク質標品を用いて、ウェスタンブロットティングのバンドの濃さを比較することにより行った。

2. レクチンの生産

PHA-E、*PHA-L*、*Con-A* の cDNA をそれぞれ infusion-cloning により一過性発現ベクターに組み込み、3 種類のプラスミドを作成した。塩基配列を確認の後、アグロバクテリウムへ形質転換を行った。

形質転換したアグロバクテリウムを用いてレタスへの agroinfiltration を行った。感染後、数日を経たレタスの葉をサンプリングし、超音波破碎によりタンパク質を抽出した。抽出したサンプルは SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、CBB 染色のバンドの分子量等により、発現の確認を行った。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【今後の予定】

1. 中和抗体の生産

精製したサンプルを用いてインフルエンザウイルスへの抗体活性の試験、及び糖鎖の構造解析を行う。糖鎖の解析結果をもとに植物の糖鎖改変のための新たな形質転換体を作成する。

2. レクチンの生産

発現させたレクチンの精製と糖鎖の構造解析を行う。