

# 植物によるヘパリン合成のための基礎技術

**国立研究開発法人産業技術総合研究所  
生物プロセス研究部門**

**主任研究員 松尾 幸毅**

2024年3月7日

## 本日の発表内容

1. 植物による物質生産、特に組換えタンパク質の生産に関して
2. 植物によるヘパリン合成のための基礎技術

## 様々な生産システムにより生産されるバイオ医薬品（組換えタンパク質）

タンパク質	遺伝子組換え	生産細胞	主な適応疾患
t-PA(アルテプラゼ)	○	BHK（動物細胞）	急性心筋梗塞
グルコセレブロシダーゼ	○	CHO（動物細胞）	ゴーシェ病
成長ホルモン	○	C127（動物細胞）	成長ホルモン分泌不全性低身長症
血液凝固第Ⅷ因子	○	HEK293（動物細胞）	血液凝固第Ⅷ因子欠乏患者における出血傾向の抑制
ヒト抗BlyS抗体	○	NS0（動物細胞）	全身性エリテマトーデス
キメラ型抗TNFα抗体	○	SP2/0（動物細胞）	関節リウマチ、ベーチェット病、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎
リソソーム酸性リパーゼ	○	Tgニワトリ	ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症
尿酸オキシダーゼ	○	酵母	癌化学療法に伴う高尿酸血症
グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ	○	大腸菌	メトトレキサート排泄遅延時の解毒
HPV感染予防ワクチン	○	Hi-5(昆虫細胞)	子宮頸癌の予防
コロナウイルス(SARS-CoV-2)ワクチン	○	ツマジロクサヨトウ由来細胞（昆虫細胞）	SARS-CoV-2による感染症の予防
フェニルアラニンアンモニリアーゼ類縁体	○	<i>Anabaena variabilis</i> (藍藻)	フェニルケトン尿症

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部「承認されたバイオ医薬品」（2024年1月3日 現在）より  
[https://www.nihs.go.jp/dbcb/approved\\_biologicals.html](https://www.nihs.go.jp/dbcb/approved_biologicals.html)

## 植物で生産した組換えタンパク質（試薬）の実用例

植物で生産したタンパク質（試薬）は20年ほど前から販売されている。

### Sigma-Aldrich

製品名	カタログナンバー	植物種
ラクトフェリン ヒト	L1294	イネ
ラクトフェリン ヒト	L4040	イネ
トランスフェリン ヒト	T3705	イネ
アルブミン ヒト	A9731	イネ
アビジン from egg white	A8706	トウモロコシ
Aprotinin, Bovine, Recombinant, <i>Nicotiana</i> sp., Animal-Free	616371	タバコ
Activin A active human	A4362	タバコ
BAFF active human	B0939	タバコ

### Lifasible社

製品名	カタログナンバー	植物種
ヒト血清アルブミン	PP-Osr-001	イネ
ヒトフィブロネクチン	PP-Osr-004	イネ
ヒトフィブロネクチン	PP-Osr-005	イネ
ヒトトランスフェリン	PP-Osr-006	イネ
ヒトFGF2	PP-Osr-007	イネ
ヒトVEGF	PP-Osr-008	イネ
ヒトKGF	PP-Osr-009	イネ
ヒトラクトフェリン	PP-Osr-012	イネ
ヒトリゾチーム	PP-Osr-014	イネ
ヒト $\alpha$ -1 Antitrypsin	PP-Osr-016	イネ

### ORF Genetics

製品名	カタログナンバー	植物種
ヒトEGF	IK0100	オオムギ
ヒトFGF2	IK0200	オオムギ
ヒトVEGF 165	IK0500	オオムギ
ヒトKGF	IK0600	オオムギ
ヒトLIF	IK0700	オオムギ
ヒトGDNF	IK0900	オオムギ
ヒトFlt3 Ligand	IK1700	オオムギ
ヒトG-CSF	IK1800	オオムギ
ヒトIFN $\gamma$	IK2000	オオムギ
ヒトIL-2	IK2100	オオムギ
ヒトIL-3	IK2200	オオムギ
ヒトIL-4	IK2300	オオムギ
ヒトM-CSF	IK2400	オオムギ
ヒトSCF	IK2500	オオムギ
ヒトTNF $\alpha$	IK2600	オオムギ

## 植物で生産した組換えタンパク質の実用例

- ニンジン培養細胞で生産したゴーシェ病治療薬（glucocerebrosidase）が販売（開発：Protalix社、販売：ファイザー）（2012年）。
- タバコ植物体で生産した抗エボラウイルスモノクローナル抗体（3種混合）がエボラウイルス感染者に使用され、良好な結果が得られた（2014年）。
- タバコ植物体で生産したCOVID-19ワクチン「COVIFENZ」がカナダで承認（Medicago社）（2022年）。
- イヌインターフェロンを発現したイチゴ果実を使用したイヌ歯周病軽減薬「インターベリーα」が販売開始（ホクサン、北里研究所、産総研）（2013年）。

## 植物生産医薬品の臨床試験

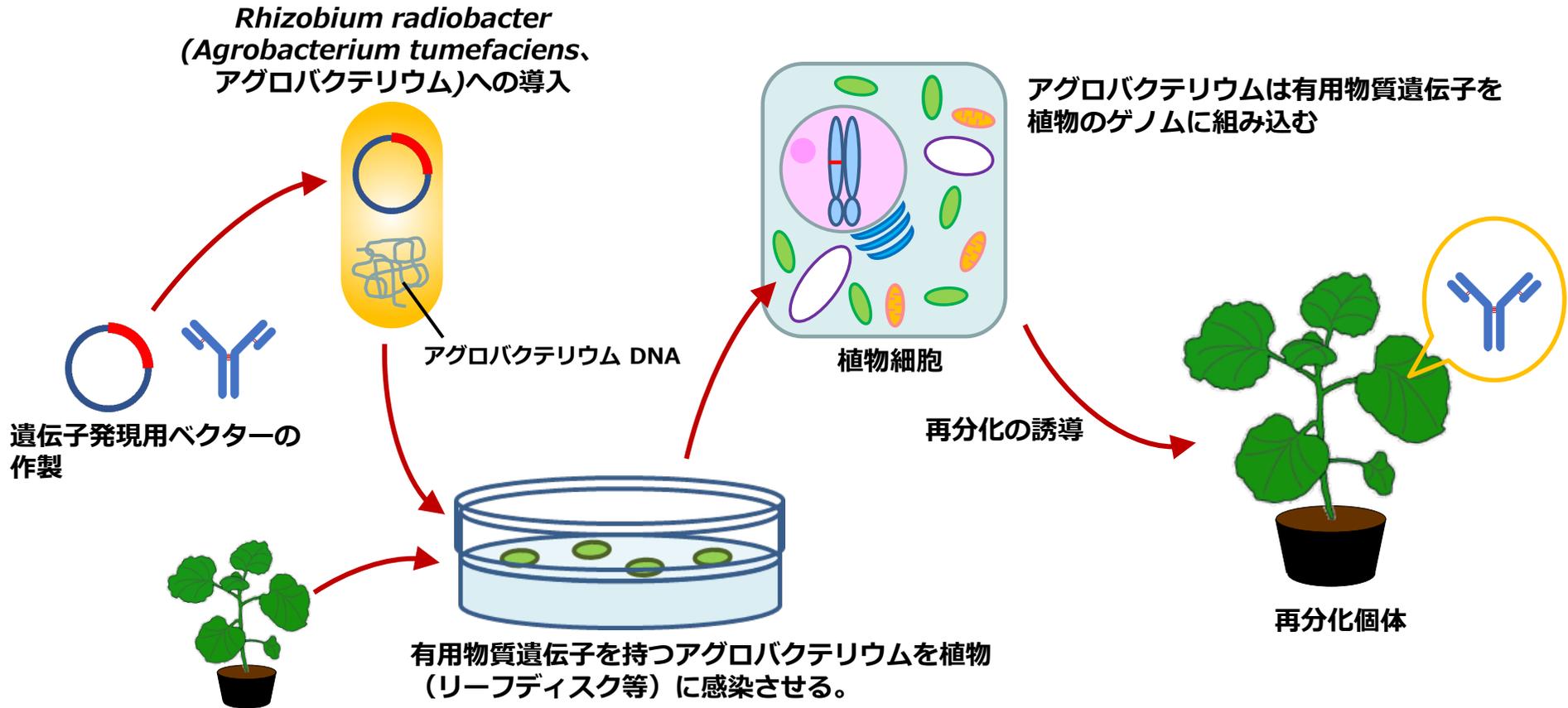
生産物	発現に使用した植物	疾患／病原体	臨床試験	大学、会社等	臨床試験番号
P2G12 antibody	<i>Nicotiana tabacum</i>	ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	Phase I 終了 (2011)	University of Surrey, Guildford, UK	<a href="#">NCT01403792</a>
HAI-05 vaccine	<i>Nicotiana benthamiana</i>	インフルエンザウイルス (H5N1)	Phase I 終了 (2011)	Fraunhofer, Center for Molecular Biotechnology, USA	<a href="#">NCT01250795</a>
Plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase (prGCD)	ニンジン培養細胞	ゴーシェ病	Phase III 終了、FDA 認可 (2012)	Protalix, Karmiel, Israel	<a href="#">NCT00376168</a>
H5-VLP + GLA-AF vaccine	<i>Nicotiana benthamiana</i>	インフルエンザウイルス (H5N1)	Phase I 終了 (2014)	Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, USA	<a href="#">NCT01657929</a>
Autologous FL vaccine	<i>Nicotiana benthamiana</i>	濾胞性リンパ腫	Phase I 終了 (2015)	Icon Genetics, Munchen, Germany	<a href="#">NCT01022255</a>
Pfs25 VLP-FhCMB	<i>Nicotiana benthamiana</i>	マラリア	Phase I 終了 (2015)	Center for Molecular Biotechnology, Plymouth, MI, USA	<a href="#">NCT02013687</a>
PA83-FhCMB	<i>Nicotiana benthamiana</i>	炭疽	Phase I 終了 (2015)	Center for Molecular Biotechnology, Plymouth, MI, USA	<a href="#">NCT02239172</a>
PRX-102	タバコ培養細胞 (BY2 Cell)	ファブリー病	Phase II 終了 (2016)	Protalix, Karmiel, Israel	<a href="#">NCT01769001</a>
ZMApp	<i>Nicotiana benthamiana</i>	エボラウイルス	Phase II 終了 (2017)	National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID), Bethesda, MD, USA	<a href="#">NCT02363322</a>
CP-PRO-CoVLP-024	<i>Nicotiana benthamiana</i>	COVID-19	認可 (Canada, 2022)	Medicago, Quebec, QC, Canada	<a href="#">NCT05040789</a>
KBP-201	<i>Nicotiana benthamiana</i>	COVID-19	Phase II (2021)	Kentucky BioProcessing, Owensboro, KY, USA	<a href="#">NCT04473690</a>



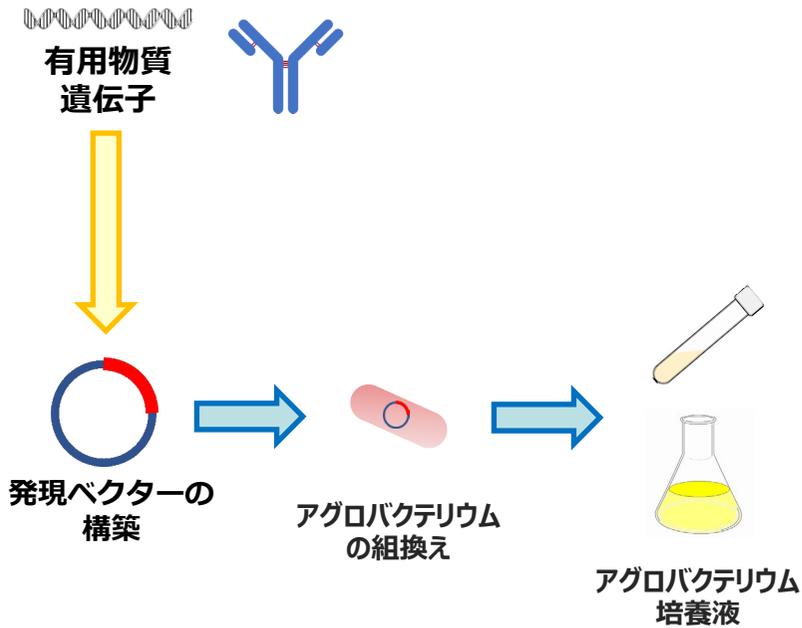
植物による組換えタンパク質生産には、主にタバコ (*Nicotiana benthamiana*) が使用される。

Plant Biotechnol Rep. 2023; 17(1): 53–65. より

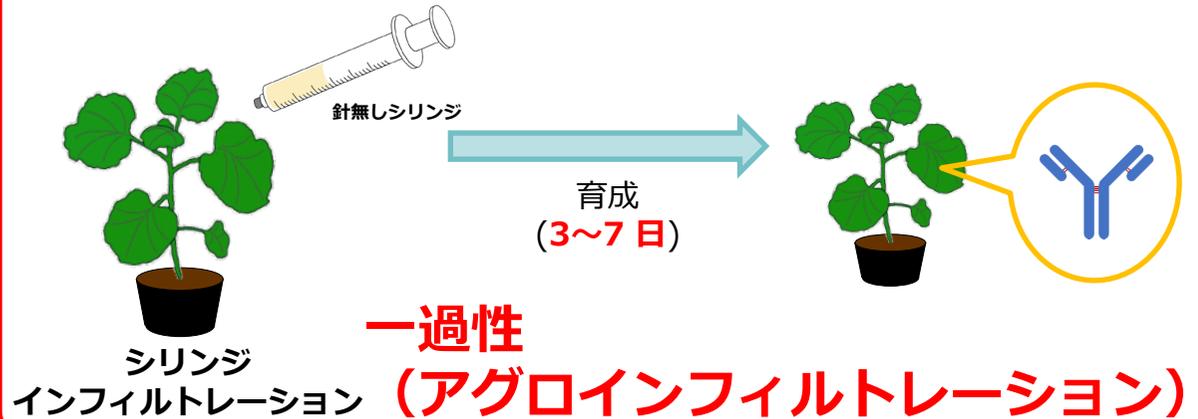
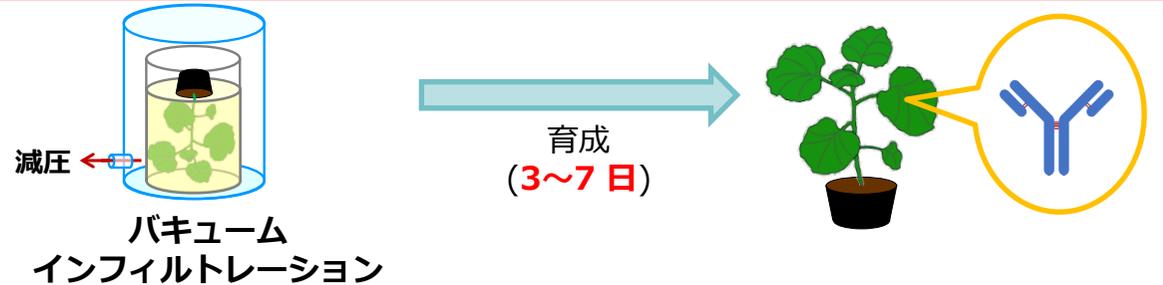
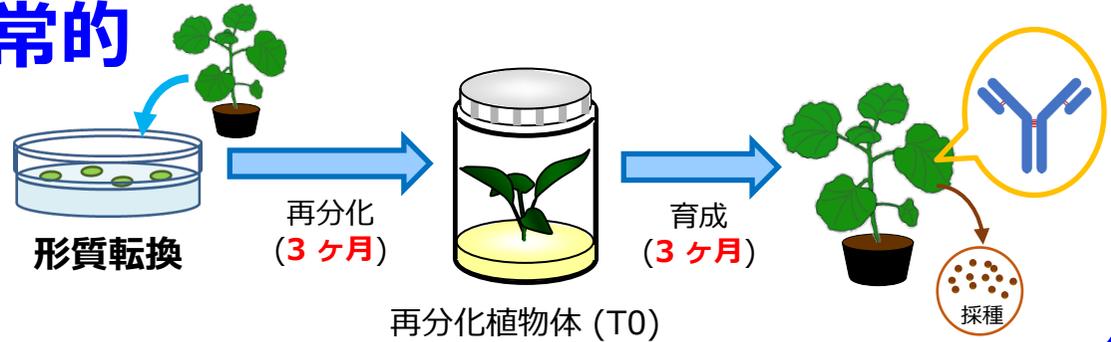
# 一般的な遺伝子組換え植物の作出法



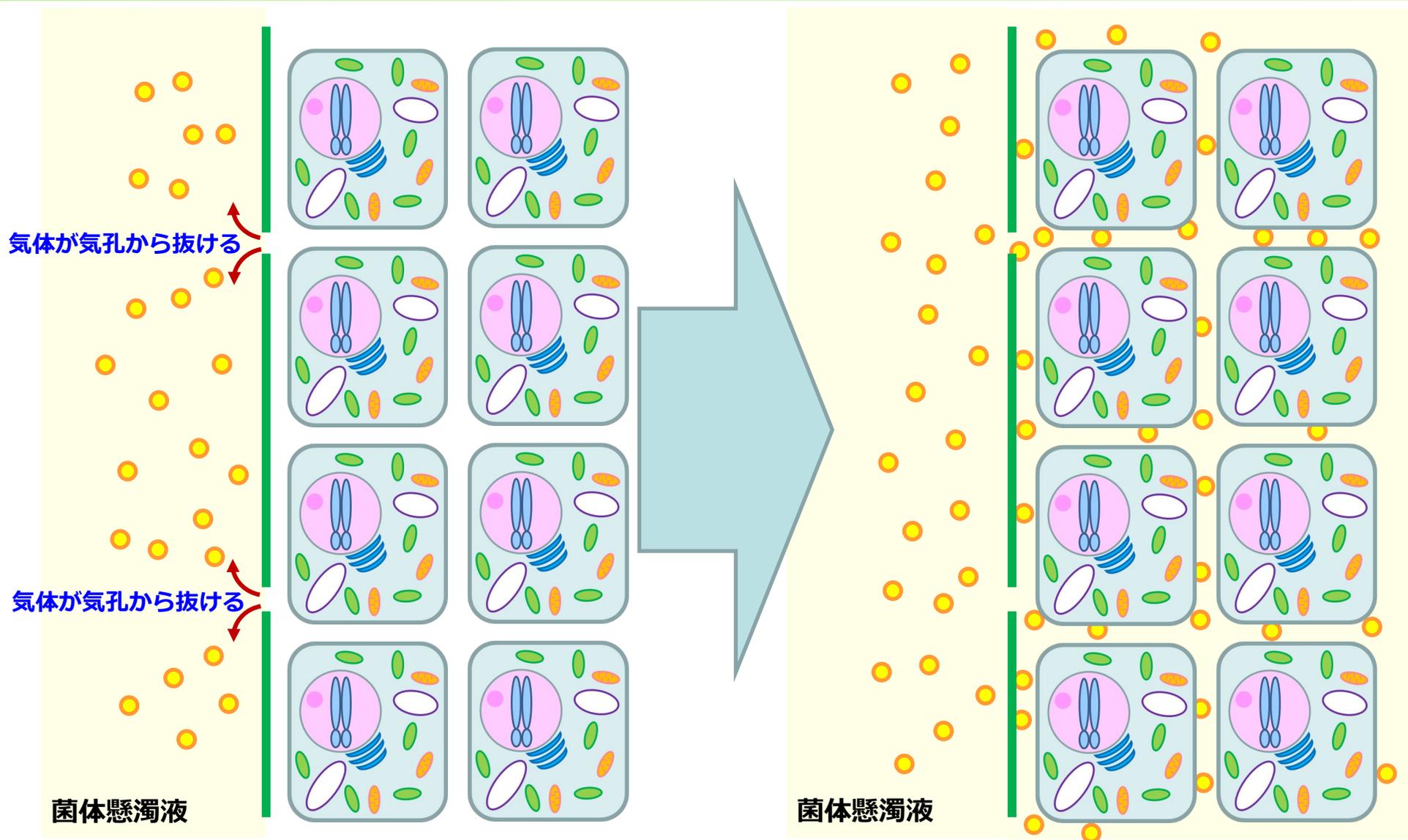
# 植物で組換えタンパク質を生産する方法（恒常的生産と一過性生産）



## 恒常的



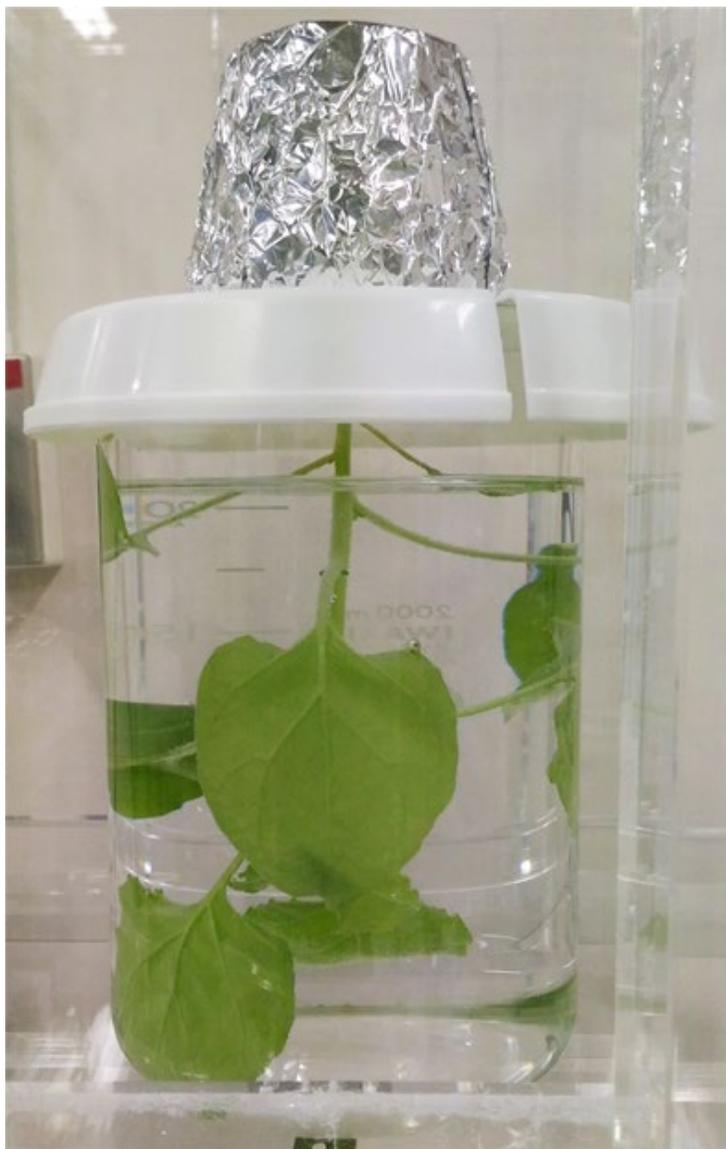
# アグロインフィルトレーション（バキュームインフィルトレーション）の概要



(1) 植物をアグロバクテリウムの液に浸漬し、  
チャンバー内で減圧する。

(2) 減圧状態を解除した際に、菌体液が葉の  
細胞間隙へと浸潤する。

## アグロインフィルトレーションの実際



## GFPの植物発現

恒常的発現



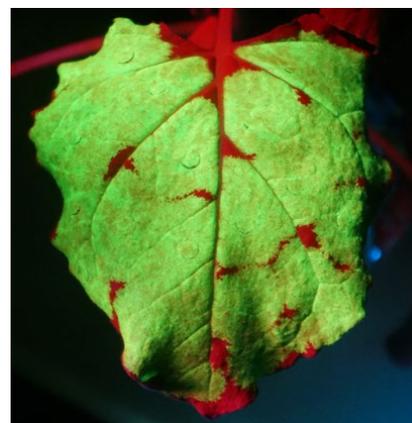
形質転換後  
3か月



一過性発現  
(アグロインフィルトレーション)



野生型

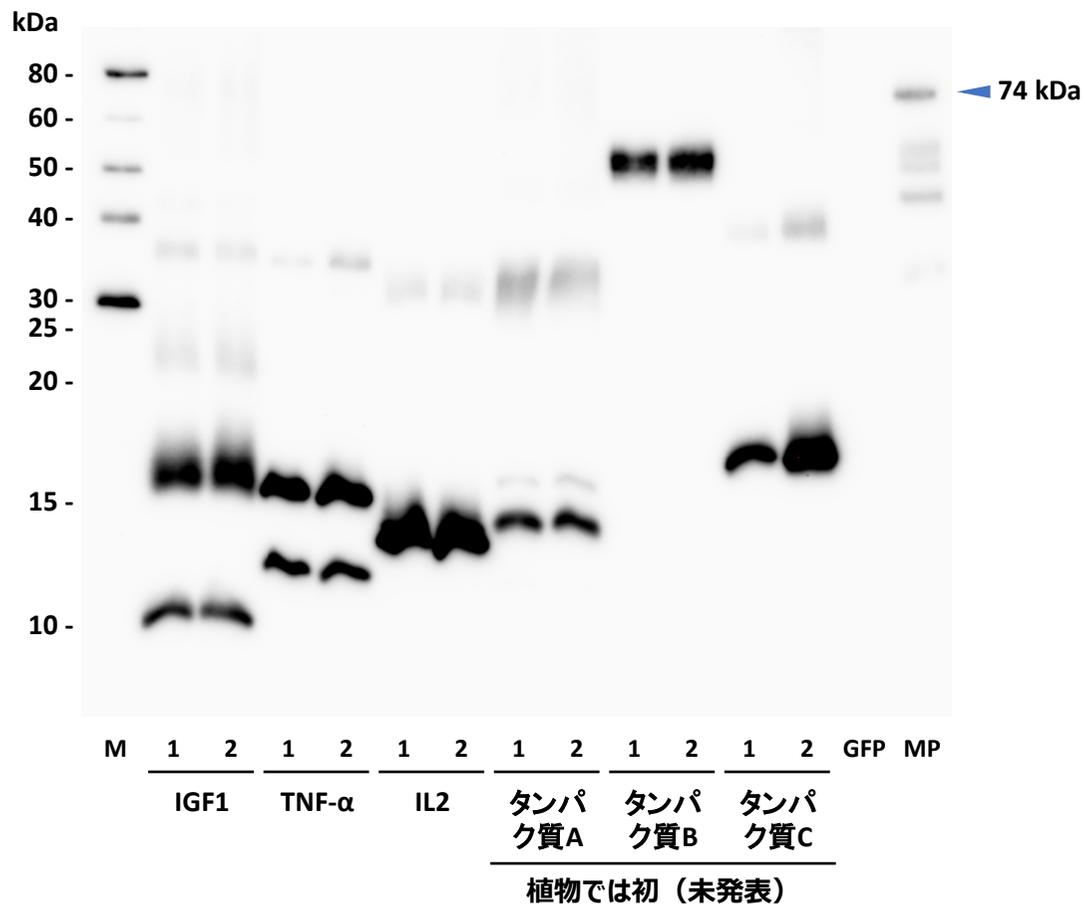


GFP発現

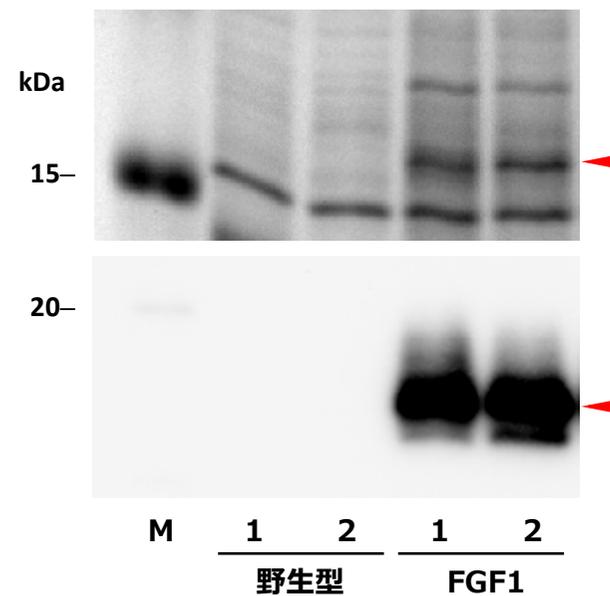
処理後4日目

青色 LED 光下で撮影

# アグロインフィルトレーションによる組換えタンパク質生産（ウエスタンブロット解析）



上：クマジー染色  
下：ウエスタン



千代田化工建設株式会社との共同研究成果

## 組換えタンパク質を植物で作るメリット・デメリット

### メリット

- 複数のタンパク質の複合体の形成が可能（抗体など）。
- タンパク質のフォールディングが正確。
- 翻訳後修飾（糖鎖修飾など）が可能。
- 生産コストが低い（動物培養細胞等に比べ1/10以下）。
- 動物やヒト由来病原体の混入が無い（ウイルス、プリオンなど）。
- 拡大生産が容易。
- 可食植物を用いた場合、「食べるワクチン」や「食べる薬」が作成可能。

### デメリット

- タンパク質が発現可能かはやってみなければわからない（どの発現システムも同じ？）。
- 組換えタンパク質の精製方法が発展途上。
- 植物特有の翻訳後修飾。

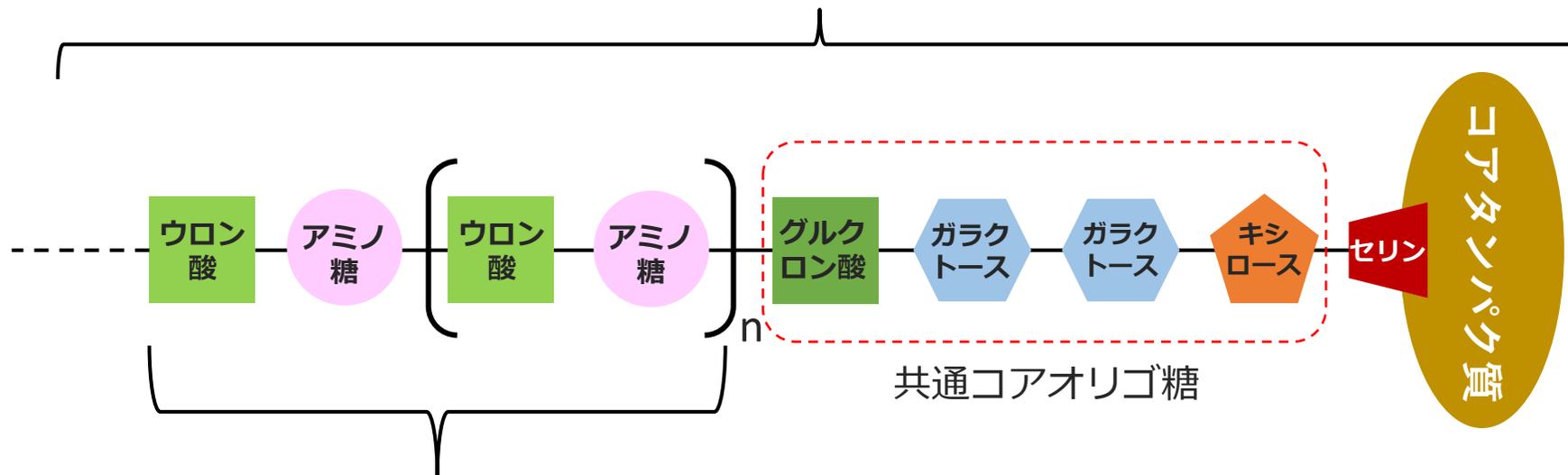
## 本日の発表の内容

1. 植物による物質生産、特に組換えタンパク質の生産に関して
2. 植物によるヘパリン合成のための基礎技術

# プロテオグリカン、グリコサミノグリカンについて

## プロテオグリカン

糖鎖（グリコサミノグリカン）とタンパク質（コアタンパク質）の複合体の総称。



## グリコサミノグリカン

アミノ糖とウロン酸から成る2糖の繰り返し構造により構成される多糖。  
アミノ糖とウロン酸の組み合わせや硫酸化パターン等によりコンドロイチン硫酸、  
ヘパラン硫酸、ヘパリン等に分類される。

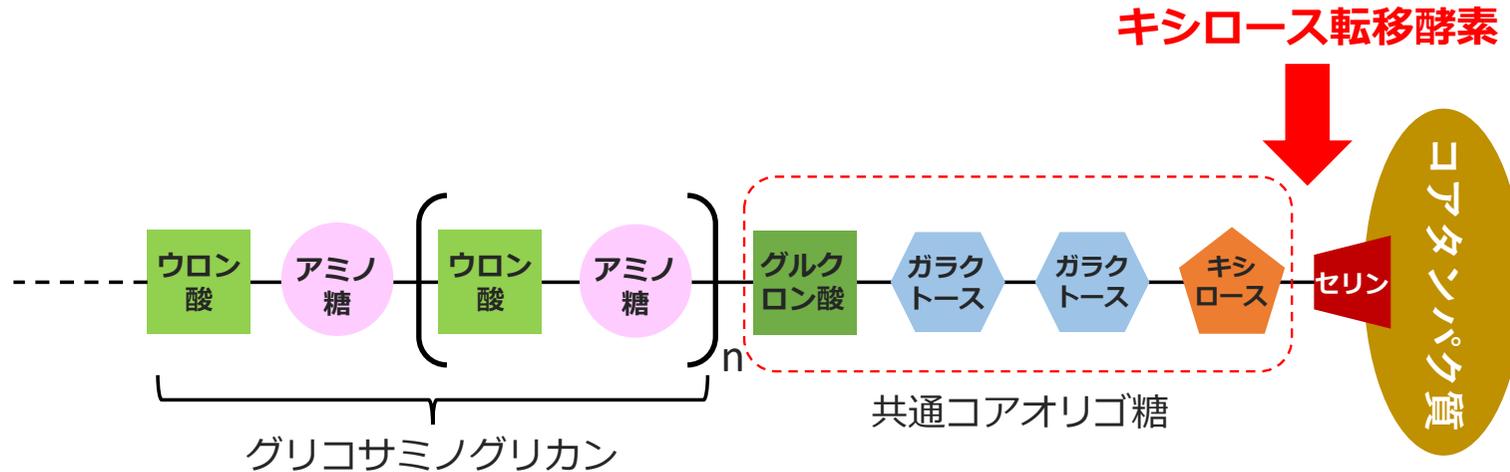
↓  
血液凝固を阻害する物質として幅広く利用されている。

## 従来技術とその問題点

ヘパリン等の動物由来糖鎖は、現在動物組織より抽出・精製することにより得られているが、不純物の混入等が問題となっている。

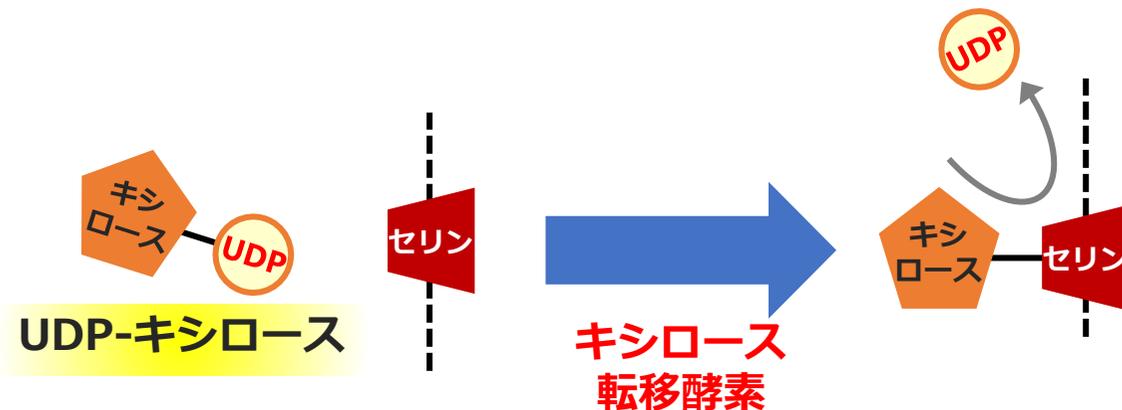
本技術によりヘパリン等の植物生産が可能となれば、アニマルフリーでヘパリン等を生産することが可能となる。

# キシロース転移酵素によりグリコサミノグリカン合成が開始される



## キシロース転移酵素 (XYLT, EC:2.4.2.26)がグリコサミノグリカンの合成には必要

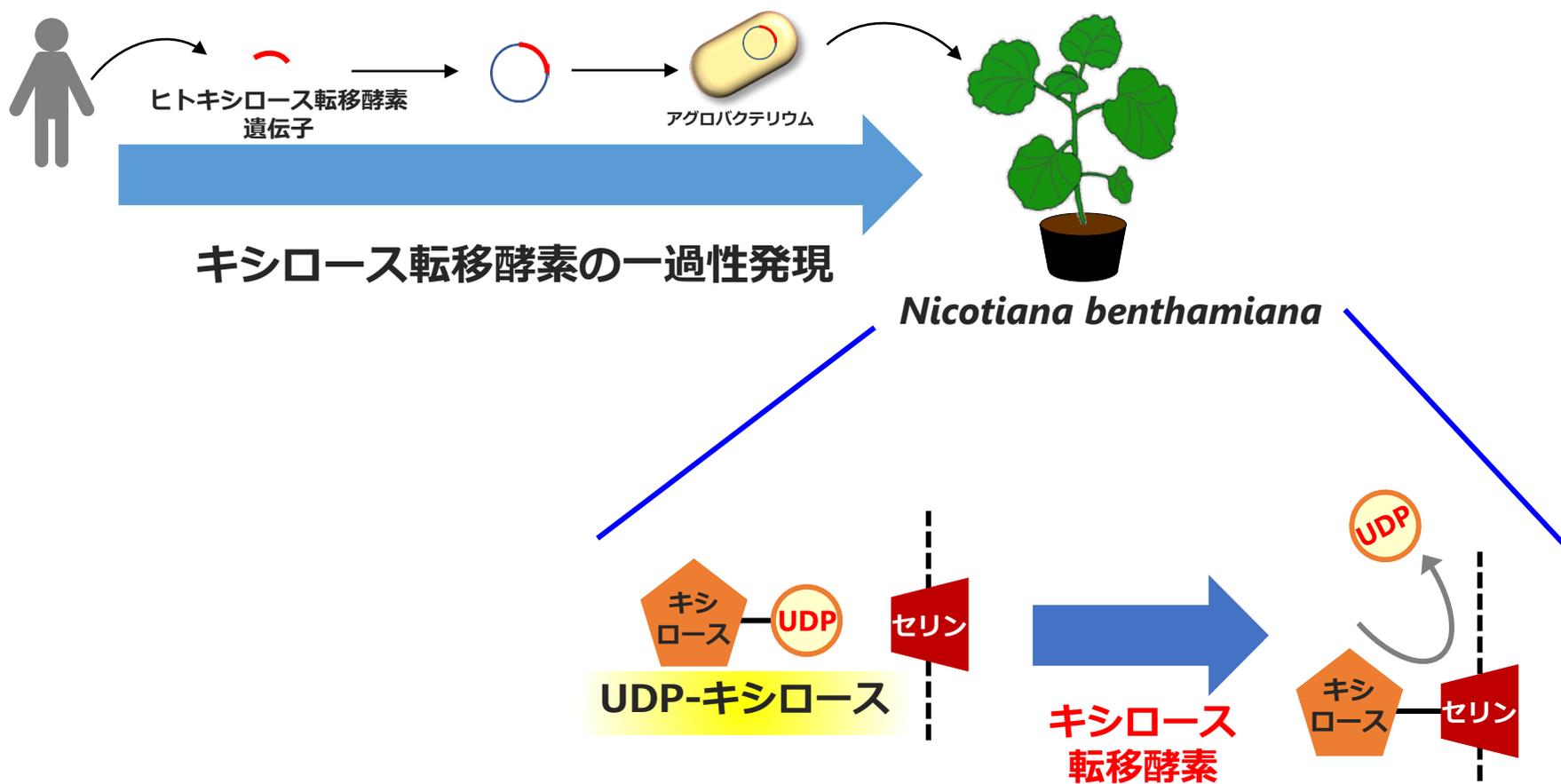
- プロテオグリカンの糖鎖部分合成の第一段階は、タンパク質のセリン残基にキシロースを転移する酵素 (UDP-D-xylose:protein beta-D-xylosyltransferase) が担う。



植物においてセリン-O-キシロース化されたタンパク質は未だ見出されていない。

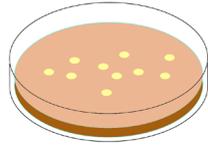
## 植物細胞でのセリン-O-キシロース修飾の確立

- ヒトキシロース転移酵素 (XYLT) をタバコ (*Nicotiana benthamiana*) において一過性発現させることにより、タンパク質に対するセリン-O-キシロース修飾が可能にならないか？

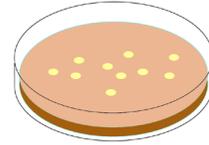


# キシロース転移酵素とセルグリシンの植物における一過性発現

キシロース転移酵素 (XYLT)  
発現用アグロバクテリウム

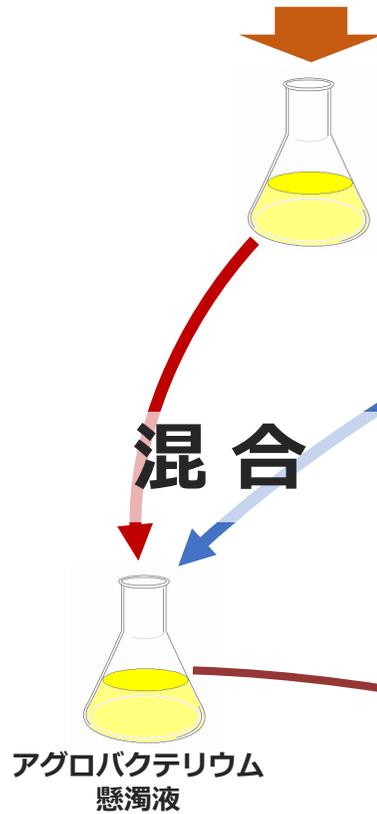


セルグリシン (SRGN) 発現用  
アグロバクテリウム

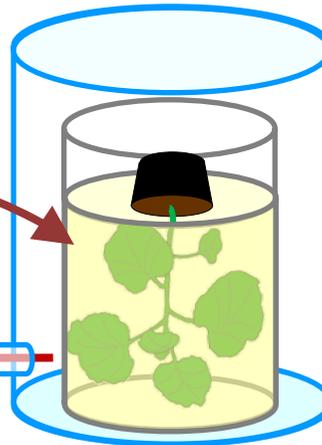


セルグリシン：  
主要なプロテオグリ  
カンコアタンパク質

混合



植物体を鉢ごと逆さにし、  
アグロバクテリウム懸濁液に浸漬。



4日間育成

各タンパク質の発現



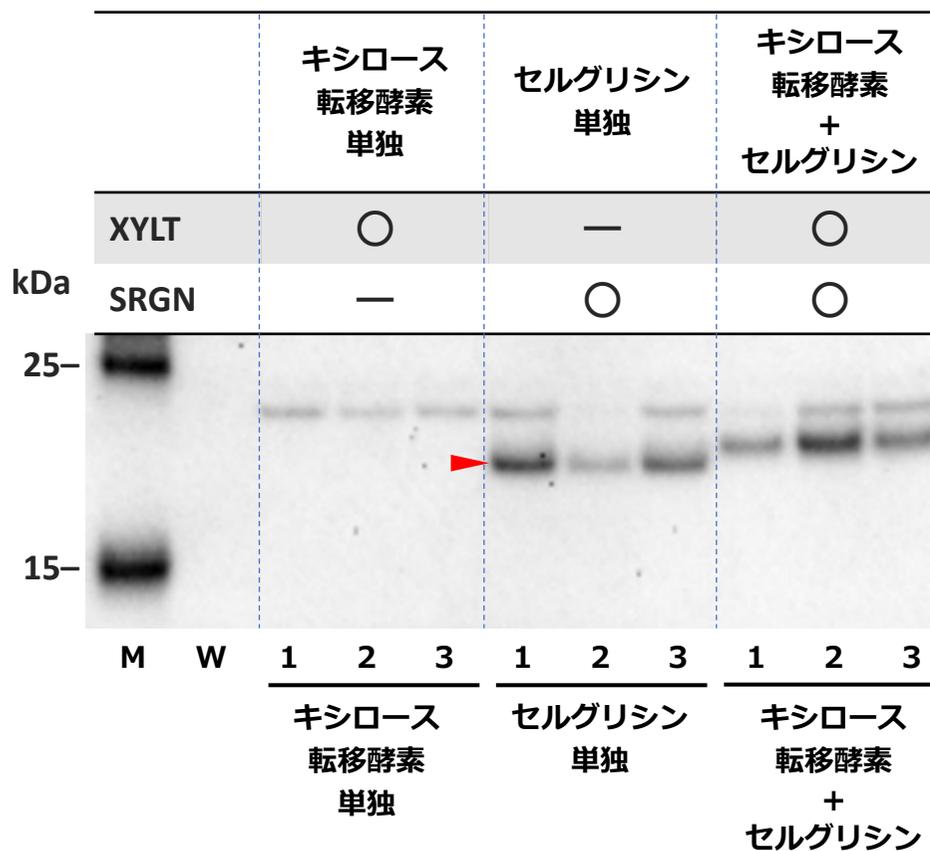
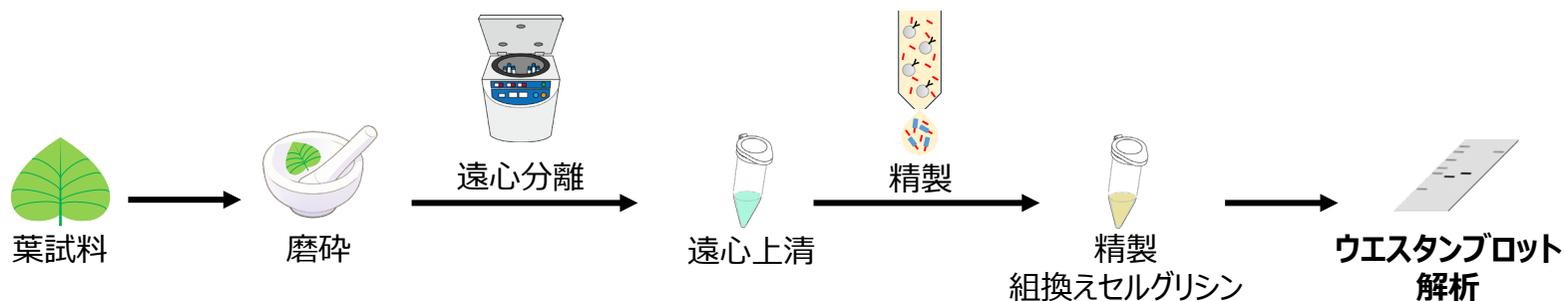
*Nicotiana benthamiana*

セルグリシンに対し  
てキシロース修飾が  
なされるか？

各種解析

減圧し、アグロバクテリウム  
を葉に浸潤させる。  
(バキュームインフィルトレーション法)

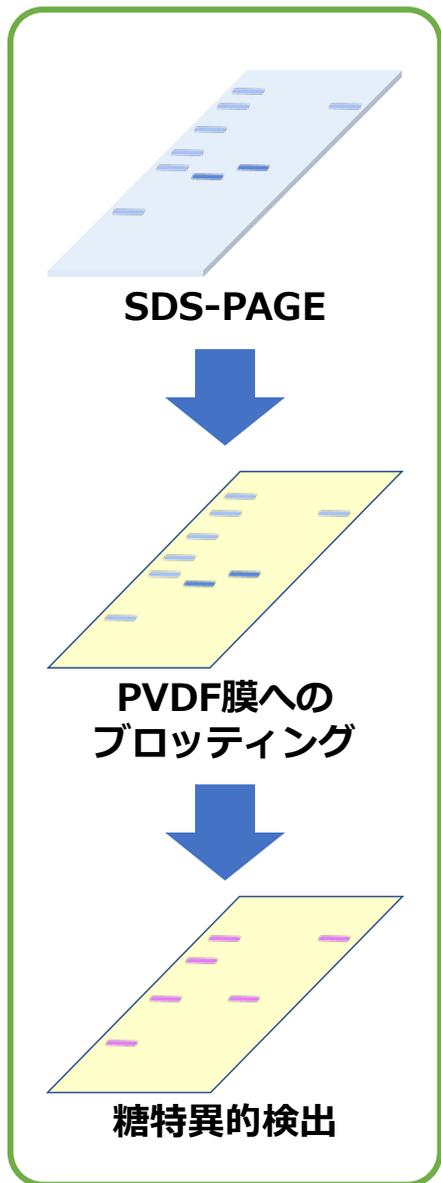
# 植物生産セルグリシンのウエスタンブロット解析



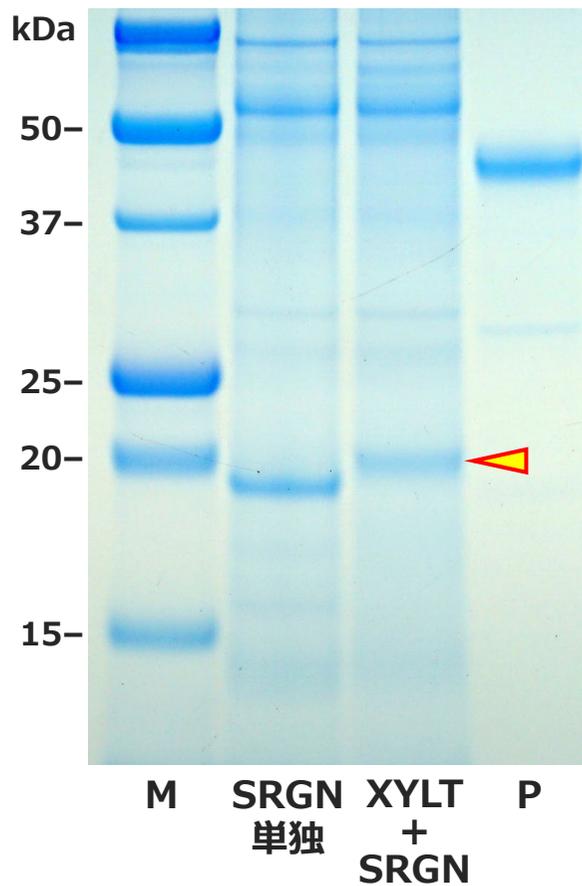
セルグリシンの分子量に変化が認められた  
↓  
セルグリシンに何らかの修飾がされた可能性

J Biosci Bioeng. 2018 Sep;126(3):371-378.より

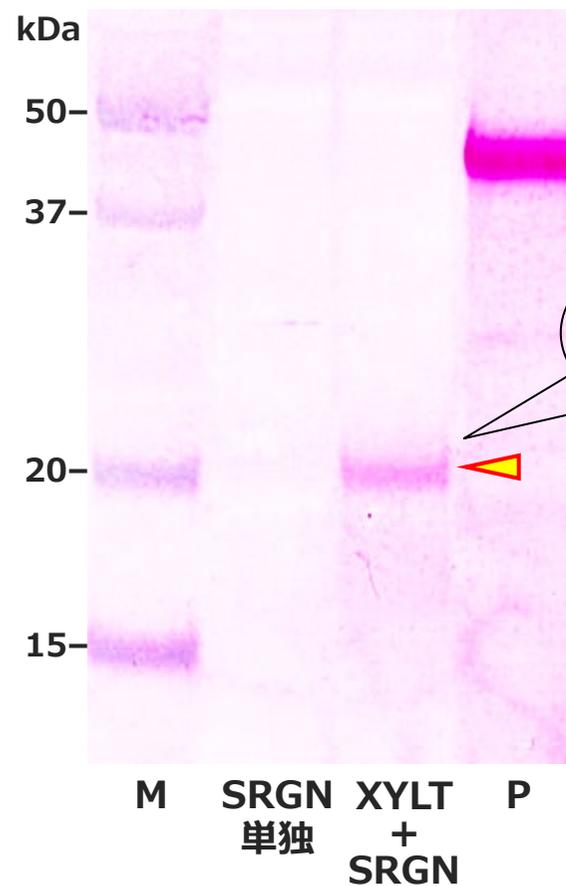
# 植物生産セルグリシンに対する糖鎖修飾解析



クマジー染色

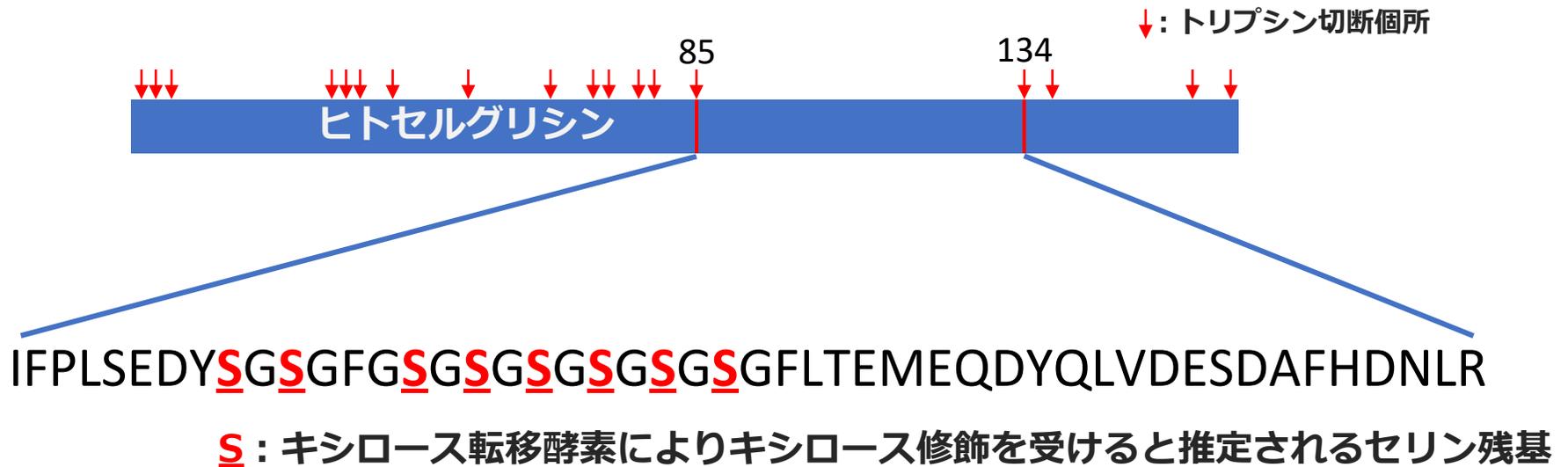
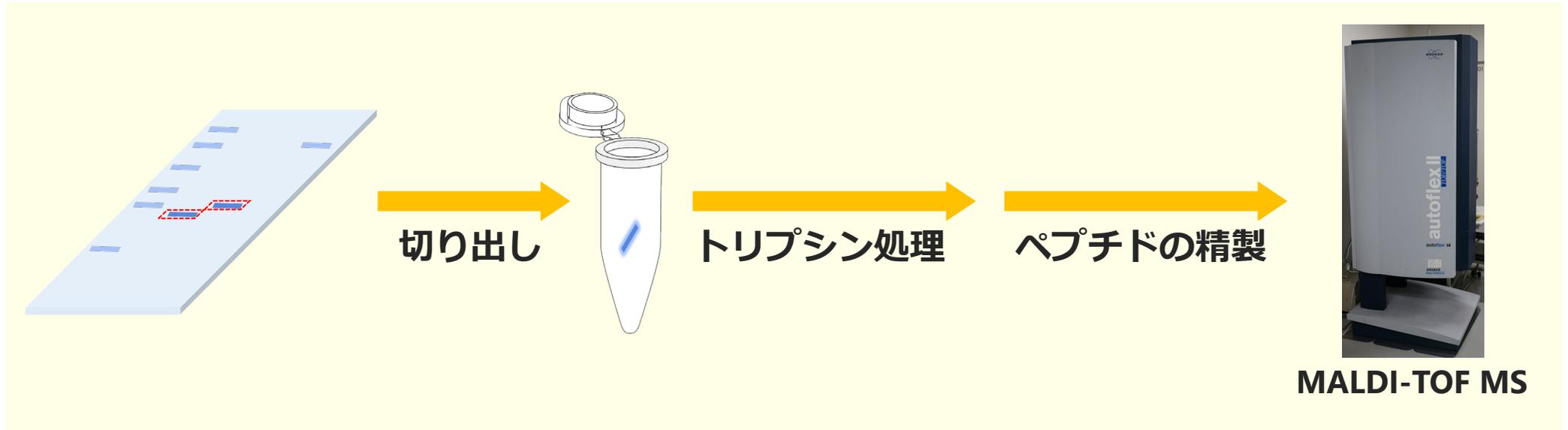


糖特異的検出



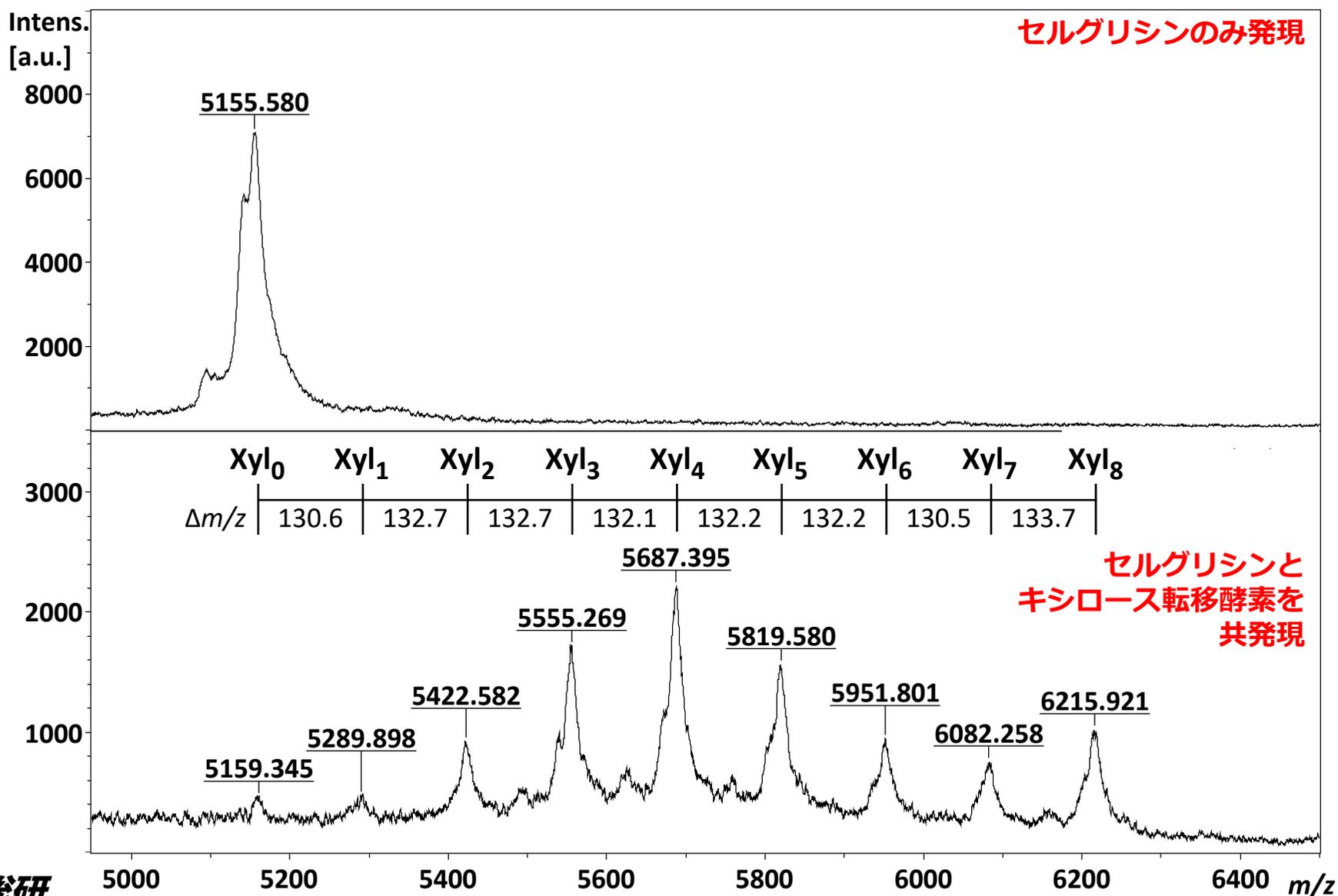
P: ペルオキシダーゼ (糖鎖修飾あり、ポジティブコントロール)

# 植物生産セルグリシン糖鎖修飾解析（トリプシン消化～質量分析）



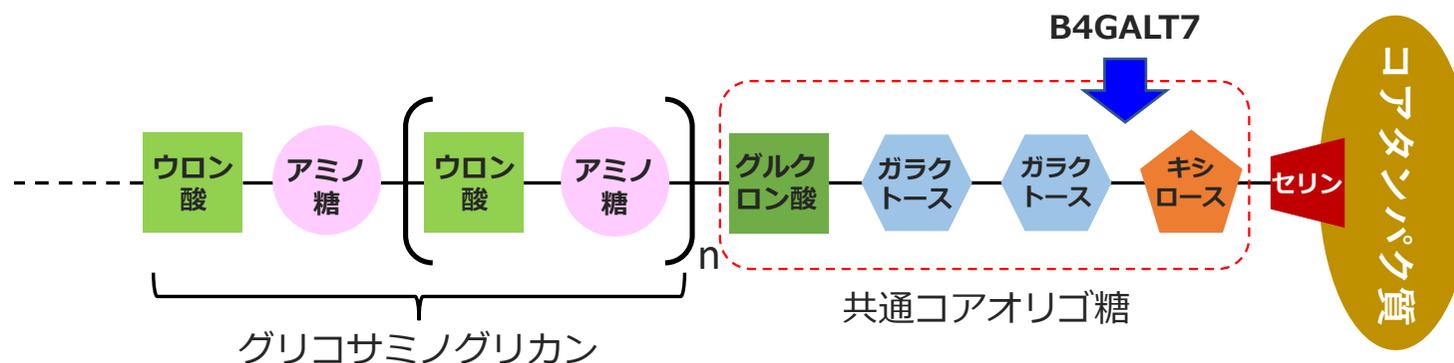
# トリプシン消化物の質量分析結果

IFPLSEDYSGSGFGSGSGSGSGSGSGGFLTEMEQDYQLVDESDAFHDNLR=5138.29



## まとめ

- キシロース転移酵素とセルグリシンを*N. benthamiana*において一過性共発現させた結果、セルグリシンに対するキシロース修飾が認められた。
- セルグリシンのみを*N. benthamiana*で発現させても、キシロース修飾されない。  
→タバコにはキシロース転移酵素と同様の働きをする酵素は発現していない。
- キシロースへのガラクトース付加が認められないため、*N. benthamiana*には xylosylprotein  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase (B4GALT7)も発現していないと推定。



Matsuo K. and Atsumi G.  
Xylosylation of proteins by expression of human xylosyltransferase 2 in plants.  
J. Biosci. Bioeng. (2018) 126 (3): 371 – 378.

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 植物細胞においてキシロース修飾タンパク質を製造する方法、コアオリゴ糖修飾タンパク質を製造する方法、及びプロテオグリカンを製造する方法
- 出願番号 : 特願2018-006334, PCT/JP2019/001544
- 登録番号 : 特許6934666
- 出願人 : 国立研究開発法人 産業技術総合研究所
- 発明者 : 松尾 幸毅

## 実用化に向けた課題

- 現在、更なる糖鎖の伸長に成功している（未発表）。ただし、単純にヒト由来糖転移酵素をそのまま植物に導入してもヘパリン等の合成は達成されないと推定される。
- 今後、各酵素遺伝子を改変等して植物に導入する必要がある。

## 新技術の特徴・従来技術との比較

- アニマルフリーでヘパリン等の生産が可能となり、動物由来の不純物の混入を防ぐことが可能。
- ヘパリン標品やヘパリン類似品に対して、価格面で対抗することは困難？

## 想定される用途

- 医療分野
- 美容分野
- 宗教上の理由等で動物由来製品が利用できない人への提供。

## 企業への期待

- 糖鎖解析の技術を持つ企業との共同研究を希望。
- 今回紹介した特許に関してだけでなく、植物による有用物質生産に関心を持つ企業との共同研究を希望。

## 産学連携の経歴

- 2012年-2013年 O社と共同研究実施
- 2014年-2015年 A社と共同研究実施
- 2017年-2018年 M社と共同研究実施
- 2022年- NEDO助成「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」実施中
- 2023年- 千代田化工建設株式会社と共同研究実施中

# お問い合わせ先

株式会社 AIST Solutions

(産業技術総合研究所 新技術説明会事務局)

URL : <https://www.aist-solutions.co.jp/contact/form.html>