

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月2日(02.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/005226 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 1/14 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/023476

(22) 国際出願日: 2024年6月28日(28.06.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-106995 2023年6月29日(29.06.2023) JP
特願 2023-200214 2023年11月27日(27.11.2023) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP). 千代田化工建設株式会社(CHIYODA CORPORATION) [JP/JP]; 〒2208765 神奈川県横浜市西区みなとみらい四丁目 6 番 2 号 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 松尾 幸毅(MATSUO, Kouki); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 松嶋 全人(MATSUSHIMA, Akito); 〒2208765 神奈川県横浜市西区みなとみらい四丁目 6 番 2 号 千代田化工建設株式会社内 Kanagawa (JP). 西田 尚子(NISHIDA, Naoko); 〒2208765 神奈川県横浜市西区みなとみらい四丁目 6 番 2 号 千代田化工建設株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 鎌田 光宜, 外(KAMADA, Mitsunori et al.); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 高島国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR REMOVING PLANT-DERIVED SOLUBLE PROTEIN FROM PLANT-DERIVED EXTRACT

(54) 発明の名称: 植物由来抽出液から植物由来可溶性タンパク質を除去する方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for removing a plant-derived soluble protein from a plant-derived extract, the method comprising the following steps: (1) a step for freezing and thawing a plant-derived extract to cause the insolubilization of a plant-derived soluble protein; and (2) a step for removing the insolubilized protein from the extract.

(57) 要約: 本発明は、以下の工程を含む、植物由来抽出液から植物由来可溶性タンパク質を除去する方法を提供する: (1) 植物由来抽出液を凍結および融解することによって植物由来可溶性タンパク質を不溶化させる工程、および (2) 該抽出液から不溶化タンパク質を除去する工程。



WO 2025/005226 A1

明 細 書

発明の名称：

植物由来抽出液から植物由来可溶性タンパク質を除去する方法

技術分野

[0001] 本発明は、植物由来抽出液から植物由来可溶性タンパク質を除去する方法などに関する。

背景技術

[0002] 植物、動物又は微生物等の生物を利用して物を生産する技術は、原料を化石資源に依存しないバイオマスからの物質生産が可能であるため、炭素循環型社会の実現や持続的経済成長を導くものづくりへの変革が期待されている。その中でも、遺伝子組換え技術を用いた植物による物質生産は、複雑な構造や高分子量のため生産が困難なタンパク質を発現できる可能性があり、医薬品分野、食品分野、ヘルスケア分野等での活用が有望視されているが、商業的な実績が未だ少なく、大量生産するための技術は確立されていない。特に、発現した目的タンパク質の分離精製においては、複数の試薬や多段階の操作が必要であり（特許文献1）、効率的な精製手法の需要は大きい。特に、植物由来抽出液中に大量に含まれるRuBisCOなどの植物由来可溶性タンパク質を効率的に除去できる精製手法の需要は大きい。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特許第6560495号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明の課題は、植物由来抽出液からその中に大量に存在する植物由来可溶性タンパク質を除去するための方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、野生型*Nicotiana benthamiana*および緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を導入した*N. benthamiana*の粗抽出物を遠心分離し、上清（S1）および沈殿（P1）に分けた。さらに、S1を凍結融解処理し、遠心分離し、上清（S2）および沈殿（P2）に分けた。その後、S1とS2に含まれる可溶性タンパク質をSDS-PAGEで分離し、ポリアクリルアミドゲルをクマシーブルーで染色した。その結果、S1に大量に含まれていることが確認された植物由来可溶性タンパク質であるリブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（RuBisCO）が、S2においてほぼ消失していることが確認できた。同時に、遠心分離によって既にP1として沈殿物が除去されたS1を凍結融解処理および遠心分離することによって、新たに沈殿P2が生じたことから、これらがRuBisCOを含む新たな不溶性画分と考えられた。さらに、S1とS2に含まれるGFPの量をウェスタンブロットで解析したところ、凍結融解処理はGFPの可溶性に影響を与えず、上清に残り続けたことが明らかになった。

加えて、発明者らは、10分間程度の短時間の凍結処理でも植物由来可溶性タンパク質を若干ながら除去可能であり、60分間の凍結処理であれば十分な量のRuBisCOの除去が可能となること、外来性タンパク質としてGUSタンパク質やヒトFGF1を用いた場合でも本発明を実施できること、RuBisCO以外にも多種の植物由来可溶性タンパク質が凍結融解処理により除去できることを見出した。以上より、凍結融解処理は、RuBisCOを含む植物由来可溶性タンパク質を不溶化させ、一方でGFP、GUS、又はFGF1等の外来性タンパク質の可溶性には影響を与えず、結果として両者を分離可能であることが明らかになった。また、凍結時間は上記の効果に影響を与えなかった。本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0006] 即ち、本発明は以下の通りである。

[1] 以下の工程を含む、植物由来抽出液から植物由来可溶性タンパク質を除去する方法：

（1）植物由来抽出液を凍結および融解することによって植物由来可溶性タンパク質を不溶化させる工程、および

〔2〕該抽出液から不溶化タンパク質を除去する工程。

〔2〕植物由来可溶性タンパク質がRuBisCOを含む、〔1〕に記載の方法。

〔3〕植物がタバコ属に属する植物である、〔1〕または〔2〕に記載の方法。

〔4〕タバコ属植物が*N. benthamiana*である、〔3〕に記載の方法。

〔5〕植物が凍結および融解によって不溶化しない外来性の可溶性タンパク質を発現している、〔1〕～〔4〕のいずれか1つに記載の方法。

〔6〕凍結期間が1日以上である、〔1〕～〔5〕のいずれか1つに記載の方法。

〔7〕凍結温度が -20°C 以下である、〔1〕～〔6〕のいずれか1つに記載の方法。

〔8〕抽出液から不溶化タンパク質の除去が遠心分離または濾過によって行われる、〔1〕～〔7〕のいずれか1つに記載の方法。

〔9〕工程（1）の前に、植物由来抽出液から不溶性物質を除去する工程をさらに含む、〔1〕～〔8〕のいずれか1つに記載の方法。

〔10〕植物由来抽出液から不溶性物質の除去が遠心分離または濾過によって行われる、〔9〕に記載の方法。

発明の効果

〔0007〕 本明細書において説明される、植物由来抽出液からRuBisCOを含む植物由来可溶性タンパク質を分離する方法によれば、従来は植物で発現した外来性の可溶性タンパク質の分離精製においては、複数の試薬や多段階の操作が必要であったところ、凍結融解処理を経ることによって、植物においてドミナントなタンパク質であるRuBisCOを含む植物由来可溶性タンパク質を不溶化させることによって除去することが可能となり、外来性の可溶性タンパク質を精製する過程の上流においてその存在割合を高めることができる。結果として、外来性の可溶性タンパク質の精製工程を短縮化することが可能となり、本発明はバイオインダストリー分野において有用になりうる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、*N. benthamiana*の葉試料の抽出処理および凍結融解処理のフローチャートを示す。S1は未凍結の粗抽出物を遠心分離して得られる上清、S2はS1を1日または7日凍結後に融解したものを遠心分離して得られる上清、S3は1日凍結後に融解した粗抽出物を遠心分離して得られる上清をそれぞれ示す。

[図2]図2は、野生型*N. benthamiana*の葉およびGFP遺伝子が導入された*N. benthamiana*の葉 (n=3) の粗抽出物および上清を凍結融解処理に供した結果を示す。野生型およびGFP遺伝子導入型のS1～S3およびP1～P3を、可視光下 (A) および青色LED下 (B) で写真撮影した。(C) S1～S3中のタンパク質をSDS-PAGEで分離後、クマシーブルーで染色 (上) またはウェスタンブロット解析 (下) した。Mは分子量マーカー、RuBisCO LはRuBisCOラージサブユニット、RuBisCO SはRuBisCOスモールサブユニットをそれぞれ示す。

[図3]図3は、それぞれの上清に含まれるタンパク質の相対量を示す。(A) ウェスタンブロット解析から推定した組換えGFPの相対量を示す。p値 (有意確率) はそれぞれ、S2について 2.96×10^{-3} 、S3について 2.42×10^{-3} である。(B) RuBisCOの相対量は、クマシーブルー染色したポリアクリルアミドゲルのバンド強度から推定した。p値はそれぞれ、S2について 3.01×10^{-4} 、S3について 6.46×10^{-3} であった。(C) クマシーブルー染色したポリアクリルアミドゲルのバンド強度から、総タンパク質の相対量を推定した。エラーバーは標準偏差を表す (n=3)。

[図4]図4は、野生型*N. benthamiana*の葉およびGFP遺伝子導入型*N. benthamiana*の葉 (n=3) の抽出物の上清それぞれを凍結融解処理に供した結果を示す。野生型およびGFP遺伝子導入型のS1およびS2を、可視光線下 (A) および青色LED下 (B) で写真撮影した。(C) S1およびS2中のタンパク質をSDS-PAGEで分離後、クマシーブルーで染色 (上)、またはウェスタンブロット解析 (下) した。(D) S1、S2(凍結1日)およびS2(凍結7日)におけるGFPの相対量を示す。p値 (有意確率) はそれぞれ、S2(凍結1日)について0.294、S2(凍結7日)について0.456であり有意差は無かった。Mは分子量マーカー、RuBisCO LはRuBisCO

ラージサブユニット、RuBisCO SはRuBisCOスモールサブユニットをそれぞれ示す。

[図5]図5は、短時間の凍結融解処理の効果を示す図である。野生型および3つの独立したGFP発現葉からの粗抽出物を -30°C で10分間または60分間凍結し、その後解凍した。(A)タンパク質SDS-PAGEで分離し、クマシーブルー染色（上）またはウェスタンブロット（下）で検出した。Mは分子量マーカー、RuBisCO LはRuBisCOラージサブユニット、RuBisCO SはRuBisCOスモールサブユニット、S1は未凍結上清、S3は -30°C で10分または60分間凍結した粗抽出液の上清を示す。(B)対応する上清中の全可溶性タンパク質（Total Soluble Proteins；「TSP」と称することがある）とGFPの濃度。

[図6]図6は、短時間の凍結融解処理のGFPの機能に対する影響を示す図である。GFP発現植物からのS1（未凍結）とS3（ -30°C で10分または60分間凍結した粗汁液の上清）の相対GFP蛍光強度を示す。

[図7]図7は、凍結温度として -20°C を用いたときの凍結融解処理の効果を示す図である。野生型および3つの独立したGFP発現葉からの粗抽出物を -20°C で1日間凍結し、その後融解させた。(A)タンパク質をSDS-PAGEで分離し、クマシーブルー染色（上）またはウェスタンブロット（下）で検出した。Mは分子量マーカー、RuBisCO LはRuBisCOラージサブユニット、RuBisCO SはRuBisCOスモールサブユニット、S1は凍結していない上清、S3は、 -20°C で1日間凍結した粗抽出物の上清をそれぞれ示す。(B)対応する上清中のTSPとGFPの濃度。

[図8]図8は、凍結温度として -20°C を用いたときの凍結融解処理のGFPの機能に対する影響を示す図である。GFP発現植物からのS1とS3の相対GFP蛍光強度を示す。S1は未凍結上清、S3は -20°C で1日凍結した粗抽出液の上清である。

[図9]図9は、GUS(β -glucuronidase)タンパク質に対する凍結融解処理の影響を示す図である。野生型および3つの独立したGUS発現葉の粗抽出物を -30°C で60分間凍結し、その後融解した。(A)タンパク質はSDS-PAGEで分離し、クマシーブルー染色（上）またはウェスタンブロット（中）で検出した。GUS染

色の結果も示す（下段）。(B) 対応する上清中のTSP濃度。Mは分子量マーカー、RuBisCO LはRuBisCOラージサブユニット、RuBisCO SはRuBisCOスモールサブユニット、S1は未凍結上清、S3は-30℃で60分間凍結した粗抽出液の上清をそれぞれ示す。

[図10]図10は、ヒトFGF1タンパク質に対する凍結融解処理の影響を示す図である。野生型および3つの独立したFGF1発現葉からの粗抽出物を-30℃で1日間凍結し、その後融解した。(A) タンパク質をSDS-PAGEで分離し、クマシーブルー染色（上）またはウェスタンブロット（下）で検出した。Mは分子量マーカー、RuBisCO LはRuBisCOラージサブユニット、RuBisCO Sは、RuBisCOスモールサブユニット、S1は凍結していない上清、S3は-30℃で1日間凍結した粗抽出液の上清をそれぞれ示す。(B)対応する上清中のTSPとFGF1の濃度。

[図11]図11は、*N. benthamiana*による一過性発現システムにより発現させたヒトII型Collagenタンパク質を抽出し、発現を確認した図である。各種設計したヒトII型Collagenをコードしたアグロバクテリウム（D, D2, F, F2, H, H2株；n=3）感染させた葉から得た粗抽出物を、非還元方式のSDS-PAGEにより分離し、ウェスタンブロットにてヒトII型Collagenを検出した。ネガティブコントロールは、未感染の植物から得た抽出物である「WT」と、GFPをコードしたアグロバクテリウムを感染させた葉から得た抽出物である「GFP」を示す。ポジティブコントロールは、ヒト組織由来のヒトII型Collagenタンパク質とした（「ヒトCOL2(1μg)」で示す）。Mは分子量マーカーを示す。

[図12]図12は、ヒトII型Collagenタンパク質の凍結融解処理の適応を示した結果である。試料は、粗汁液を-30℃で2週間凍結し、その後融解後に遠心分離し得られた上清を分析した。図は、非還元方式のSDS-PAGEにより分離後、ウェスタンブロットにてヒトII型Collagenを検出した分析結果である。（図11と同一条件にて準備した試料を凍結融解処理した；n=2）

発明を実施するための形態

[0009] 本発明は、植物由来抽出液から植物由来可溶性タンパク質を除去する方法（以下、本発明の除去方法）を提供する。

[0010] 本発明の除去方法は、植物由来抽出液を凍結および融解することによって植物由来可溶性タンパク質を不溶化させる工程（以下、工程（１））を含む。

[0011] 工程（１）において、植物由来抽出液が抽出される植物は、特に制限されるものではないが、栽培技術、育種技術または遺伝子導入技術が確立しているモデル植物が想定され、そのような植物としては、シロイヌナズナ属（例、*Arabidopsis thaliana*）、イネ属（例、*Oryza sativa*）、コムギ属（例、*Triticum aestivum*）、ヤマカモジグサ属（例、*Brachypodium distachyon*）、タバコ属（例、*N. benthamiana*）などに属する植物が挙げられる。また、上記の植物は野生型であってもよいし、工程（１）の凍結および融解によって不溶化しない外来性の可溶性タンパク質を発現できる遺伝子組換え型であってもよい。

[0012] 前記の凍結および融解によって不溶化しない外来性の可溶性タンパク質としては、可溶性タンパク質であって、かつ後述する工程（１）の凍結および融解によって不溶化しないタンパク質である限り制限されない。ここで、可溶性タンパク質とは、中性のpH付近において正電荷をもつ塩基性アミノ酸残基、負電荷をもつ酸性アミノ酸残基または極性アミノ酸残基を可溶性タンパク質の表面に当たる箇所に多く有し、塩基性または酸性アミノ酸残基の解離基に水分子が結合（イオン水和）すること、または極性基（OH基など）と水分子間に水素結合が形成されること、によって水分子との親和性が増し、水によく溶けるタンパク質をいう。塩基性アミノ酸としてはLys、Arg、Hisが挙げられる。酸性アミノ酸としてはGlu、Aspが挙げられる。極性アミノ酸としてはセリンやスレオニンなどが挙げられる。また、凍結および融解によって不溶化しないタンパク質とは、凍結および融解によって、可溶性タンパク質の高次構造が変化せず、凝集による不溶化が生じないタンパク質をいう。そのような外来性の可溶性タンパク質としては、例えば、抗体、サイトカイン（IFN- α 、IFN- β 、FGF等）、各種酵素、ウイルスや細菌・がんの抗原タンパク質、コラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質、細胞シグナル関連

タンパク質、アルブミンなどの高付加価値のタンパク質が挙げられる。抗原として、例えばウイルスタンパク質の一部を用いることで、ウイルスに対するワクチンや抗体の開発の際に有用な抗原を大量生産することが可能となる。あるいは、抗がん剤の開発の際に有用ながん抗原を大量生産することもできる。

[0013] 外来性の可溶性タンパク質の発現は一過性発現であっても恒常的発現であってもよい。植物に外来性の可溶性タンパク質を発現させるための手段としては、外来性の可溶性タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを植物細胞に導入する方法、外来性の可溶性タンパク質コードする核酸配列を有するウイルズベクターを用いて導入する方法などが挙げられる。当該植物細胞を培養することによって、外来性の可溶性タンパク質を植物細胞内で発現させることができるものであれば、公知の方法に従ってよい。

[0014] 外来性の可溶性タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターの植物細胞への導入には、自体公知の方法によって行うことができるが、例えば、外来性の可溶性タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターの形態で導入することができる。発現ベクターの導入は、植物の種類に応じ、適当な組織（例、カルス、根、葉、種子、生長点等）に対し、公知の方法（例えば、アグロバクテリウム法、PEG法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、ウィスカー直接導入法等）に従って実施することが可能である。その中でも、アグロバクテリウム法はスケールアップがしやすいことから特に好ましい。また、外来性の可溶性タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターの植物細胞への導入は、外来性の可溶性タンパク質コードする核酸配列を有するウイルズベクターを用いて導入することによっても可能である。ウイルズベクターの導入は、植物の種類に応じ、上記の組織に対し、ウイルズベクター法に従って実施することが可能である。

[0015] 外来性の可溶性タンパク質を植物に恒常的発現させる場合、例えば、タバコ組織（例：タバコ葉）や胚軸の一部を切り取ってアグロバクテリウムに感染させ、発現ベクターが導入された組織や胚軸を培養することによって外来

性の可溶性タンパク質をコードするDNAがゲノムに導入された遺伝子組換え植物細胞を選別する。その後、該細胞からカルスを誘導し、カルスから発根を誘導することで、外来性の可溶性タンパク質を安定発現する遺伝子組換え植物を得ることができる。あるいは、カルスにアグロバクテリウムを感染させてもよい。かかるアグロバクテリウムとしては、典型的には、アグロバクテリウム発現用ベクターのT-DNA断片中に外来性の可溶性タンパク質をコードするDNAを導入したものを用いる。PEG法やエレクトロポレーション法を用いる場合は、適当な細胞や組織から常法に従ってプロトプラストを調製し、これに発現ベクターを導入する。パーティクルガン法の場合は、カルスや、未熟胚、茎頂や腋芽に存在する生長点等に、金微粒子に吸着させた発現ベクターを、パーティクルガンを用いて導入することができる。パーティクルガン法やアグロバクテリウム法では、遺伝子導入された植物がキメラとなる場合が多いので、生殖系列 (germ line) の細胞に高頻度に上記DNAが導入されるような試料細胞を、遺伝子導入のために使用する必要がある。例えば、胚、胚軸切片、胚形成カルス (embryogenic callus)、単離した生長点等が挙げられる。

[0016] 発現ベクターが導入された植物細胞や組織の培養は、その種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。培養に使用される培地としては固形培地 (例、寒天培地、アガロース培地、ゲランガム培地等) が好ましい。また、培地は、遺伝子組換え細胞の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。例えば、基礎培地としてN6培地、MS培地、MSR培地、LS培地、B5培地などが用いられる。培地には、適宜、植物生長物質 (例、オーキシン類、サイトカイニン類等)などを添加してもよい。培地のpHは好ましくは約5～約8である。培養温度は、植物細胞の種類に応じて、通常約20℃～約35℃の範囲内で適宜選択することが可能である。

[0017] 遺伝子組換え植物細胞の選抜は、当業者であれば用いるマーカー遺伝子の種類に合わせて適宜公知の手法により選択して行うことができる。例えば、薬剤耐性遺伝子 (例：カナマイシン耐性遺伝子 (nptII)、ハイグロマイシン

耐性遺伝子（hpt）等の薬剤耐性遺伝子）を用いた場合には、対応する薬剤存在下にて培養することにより、遺伝子組換え植物細胞を選択することが可能である。

[0018] 外来性の可溶性タンパク質を植物に一過性発現させる場合、例えば、アグロバクテリウムが懸濁された懸濁液にタバコ全体を浸漬、密閉、減圧（例：0.09 MPa）処理する方法（バキュームインフィルトレーション法）、またはアグロバクテリウム懸濁液を針無しシリンジにより葉の細胞間隙に浸潤させる方法（シリンジインフィルトレーション法）が挙げられる。処理後、数日間タバコ組織やタバコ全体を培養することによって、アグロバクテリウムが浸潤したタバコ組織において外来性の可溶性タンパク質を一過性発現する植物を得ることが可能である。

[0019] 工程（1）において、植物由来抽出液の取得は、公知の手段に従って実施してよい。本発明において植物由来抽出液とは、「植物組織破砕物に水や緩衝液を加えて得られる懸濁液」をいう。例えば、植物の全部または一部（根、葉、茎または花）を破砕し、水または緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液など）に懸濁することによって植物抽出液を調製することができる。さらに抽出液には界面活性剤（例えば、トリトンX-100TM、ツイーン20TMなど）やタンパク質分解阻害剤が含まれていてもよい。

[0020] 以上の通りにして得られる植物由来抽出液は、内在性および外来性の可溶性タンパク質などの可溶性物質の他、破砕片などの不溶性物質を含む。従って、本発明の除去方法は、工程（1）の前に、植物由来抽出液から不溶性物質を除去する工程をさらに含んでもよい。植物由来抽出液から不溶性物質を除去する工程としては、不溶性物質を除去することができれば特に制限されないが、例えば、遠心分離によって、植物由来抽出液から不溶性物質を除去する工程が好ましく挙げられる。遠心分離の条件は、不溶性物質が沈殿する条件であれば特に制限されないが、例えば、約10,000～約30,000×g、約2～約20分、約0～約4℃などが挙げられる。遠心分離は、可溶性物質の回収率が良いこと、遠心分離機は汎用機器であること、処理時間が短いこと、単純に

分子量に基づいて沈殿物を決定できることなど、簡便で迅速な方法である。

また、植物由来抽出液から不溶性物質を除去する別の工程としては、植物由来抽出液を濾過することによって不溶性物質を除去する工程が挙げられる。

濾過に使用する濾過膜としては、不溶性物質を濾過可能なものであれば特に制限されないが、例えば、ガーゼ、ろ紙などが挙げられる。濾過膜のポアサイズとしては、不溶性物質を濾過可能なサイズであれば特に制限されないが、例えば、 $10\mu\text{m}$ ～ $700\mu\text{m}$ などが挙げられる。得られた沈殿を除去することによって、植物由来抽出液から不溶性物質を予め除去することが可能である。

[0021] 工程（１）において、植物由来抽出液は凍結処理される。凍結条件は、抽出液が凍結される限り特に制限されないが、例えば、 -30°C ～ -20°C の範囲が挙げられるがこれらに限定されない。また、凍結期間は、植物由来抽出液が凍結する時間であれば制限されないが、例えば、10分間～14日間の範囲が挙げられる。あるいは、液体窒素を用いて瞬間的に抽出液を凍結させてもよい。

一態様において、外来性の可溶性タンパク質が凍結によりその生物学的活性を一部または全部喪失する場合は、凍結期間を短くすることで生物学的活性の喪失を回避できる場合がある。かかる特性を有する外来性の可溶性タンパク質を用いる場合の植物由来抽出液の凍結期間は、通常10分間～12時間、好ましくは10分間～11時間、10分間～10時間、10分間～9時間、10分間～8時間、10分間～7時間、10分間～6時間、10分間～5時間、10分間～4時間、10分間～3時間、10分間～2時間または10分間～1時間とすることができるが、これに限定されない。

[0022] 工程（１）において、凍結処理された植物由来抽出液は融解される。融解条件は、凍結処理された抽出液が融解される限り特に制限されない。融解温度は、例えば 4°C が挙げられる。

[0023] 以上のとおり、植物由来抽出液を凍結および融解させることによって、植物由来抽出液に含まれる植物由来可溶性タンパク質を不溶化させることが可

能である。植物由来可溶性タンパク質としては、例えば、RuBisCO等が挙げられる。RuBisCOは、植物の光合成反応におけるカルビン回路において炭酸固定反応に関与する唯一の酵素であり、リブロース1,5-ビスリン酸に二酸化炭素を固定し2分子の3-ホスホグリセリン酸を生成する反応を触媒する。RuBisCOは植物に最も多く含有されるタンパク質であり、植物からRuBisCO以外のタンパク質を精製する過程において最も除去されるタンパク質である。RuBisCOは通常、8つのラージサブユニットと8つのスモールサブユニットからなるヘテロ16量体として存在し、植物由来抽出液に可溶性タンパク質として存在する。工程（1）の凍結および融解処理は、RuBisCOのラージサブユニット、スモールサブユニットまたはそれらから構成されるヘテロ16量体の高次構造を変化させ、不溶化させていると考えられる。なお、植物が凍結および融解によって不溶化しない外来性の可溶性タンパク質を発現する場合、上記の凍結および融解によっては、植物由来抽出液に含まれる該外来性の可溶性タンパク質は不溶化しないため、植物由来可溶性タンパク質と前記外来性の可溶性タンパク質を分離することができる。

[0024] 本発明の分離方法は、上記の凍結および融解された植物由来抽出液から不溶化タンパク質を除去する工程（以下、工程（2））を含む。

[0025] 凍結および融解された植物由来抽出液から不溶化タンパク質を除去する工程としては、不溶化タンパク質を除去することができれば特に制限されないが、例えば、凍結および融解された植物由来抽出液を遠心分離することによって不溶化タンパク質を除去する工程が好ましく挙げられる。遠心分離の条件は、不溶化タンパク質が沈殿する条件であれば特に制限されないが、例えば、約10,000～約30,000×g、約2～約20分、約0～約4℃などが挙げられる。得られた沈殿を除去することによって、植物由来抽出液から不溶化タンパク質を分離することが可能である。また、凍結および融解された植物由来抽出液から不溶化タンパク質を除去する別の工程としては、凍結および融解された植物由来抽出液を濾過することによって不溶化タンパク質を除去する工程が挙げられる。濾過に使用する濾過膜としては、不溶化タンパク質を濾過可

能なものであれば特に制限されないが、例えば、ガーゼ、ろ紙などが挙げられる。濾過膜のポアサイズとしては、不溶化タンパク質を濾過可能なサイズであれば特に制限されないが、例えば、 $10\mu\text{m}$ ～ $700\mu\text{m}$ が挙げられる。植物が工程（1）の凍結および融解によって不溶化しない外来性の可溶性タンパク質を発現している場合、植物由来抽出液から不溶化したタンパク質を分離し、植物由来抽出液中に含まれる可溶性タンパク質における外来性の可溶性タンパク質の存在割合を上昇させることが可能である。

[0026] 以下に、本発明を実施例により説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0027] 実施例 1

凍結融解処理による植物由来可溶性タンパク質と外来性可溶性タンパク質の分離効果の検証

GFPを発現する植物発現用ベクター（GFP_pBE2113）を導入したアグロバクテリウムを、YEP培地（カナマイシン($50\mu\text{g/mL}$)、ストレプトマイシン($300\mu\text{g/mL}$)、リファンピシン($100\mu\text{g/mL}$)を含む) 3 mL 中で 28°C 、一晚、 220 rpm で振盪培養した。培養液を $5,000\times g$ 、10分、室温 23°C で遠心することでアグロバクテリウムを回収した。回収したアグロバクテリウムを懸濁用バッファ（ 10 mM MES-KOH ($\text{pH } 5.7$)、 10 mM MgCl_2 、 $150\mu\text{M}$ アセトシリンゴン(使用直前に加える)) $5\sim 10\text{ mL}$ 程度に懸濁し、さらに $\text{OD}_{600}=0.5$ となるように同懸濁用バッファで希釈した。懸濁液を2時間ほど静置し、針無し 1 mL シリンジによって*N. benthamiana*の葉の裏側から浸潤させた（シリンジインフィльтраーション法）。おおまかに懸濁液を葉から除いた後、2～3時間程度静置し、チャンバー内で4日間育成（ 23°C 、16時間明期、8時間暗期）した。

[0028] 野生型*N. benthamiana*の葉(100 mg)および上記の通りGFP遺伝子を導入した*N. benthamiana*の葉(100 mg)をそれぞれ、マルチビーズショッカーにより破碎（ $1,700\text{ rpm}$, 30 sec ）し、破碎物を $500\mu\text{L}$ 、 $\text{pH } 7.2$ のリン酸緩衝液（ 0.1% （ v/v ） Tween 20, 1% （ v/v ） プロテアーゼインヒビターカクテル（シグマアル

ドリッチ #P9599)) に懸濁し、それぞれの植物体の粗抽出物とした。得られた粗抽出物を遠心分離(23,000×g, 10 min, 2℃)し、上清(S1)および沈殿(P1)を得た。さらに、別途調製した上清(S1)を-30℃で静置(1日間)後に冷蔵庫内(4℃)で融解させ、遠心分離(23,000×g, 10 min, 2℃)し、上清(S2)および沈殿(P2)を得た。また、別途調製した粗抽出物を-30℃で静置(1日間)後に冷蔵庫内(4℃)で融解させ、遠心分離(23,000×g, 10 min, 2℃)し、上清(S3)および沈殿(P3)を得た。具体的には図1のフローチャートに従った。

[0029] 野生型およびGFP遺伝子を導入した植物体共に、粗抽出物を遠心分離することによって不溶性画分P1を除去したS1を凍結融解処理し、遠心分離した結果、新たな沈殿物P2が生じた(図2A)。このことから、凍結融解処理前に上清に残された可溶性物質の一部が、凍結融解処理によって不溶化したことが示唆された。

[0030] また、青色LED下で上清の色の比較を行ったところ、野生型のS1～S3はいずれも蛍光を示さなかったが、GFP遺伝子を導入した植物体より得られたS1～S3は全てにGFP蛍光が観察され、S1(凍結融解処理前)とS2(凍結融解処理後)の蛍光強度は同程度であった(図2B)。このことから、凍結融解処理前には遠心分離によって沈殿せずに上清に残されたGFPは凍結融解処理によっても不溶化せずに上清に残り続けたこと、およびその結果、凍結融解処理によって不溶化した物質とGFPは分離できたことが示された。

[0031] 野生型およびGFP遺伝子を導入した植物体より得られたS1～S3に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離後、ポリアクリルアミドゲルをクマシーブルーで染色した。その結果、S1では、植物由来可溶性タンパク質であるRuBisCO (L/S) のバンド(約十数kDa (RuBisCO S) 及び50 kDa (RuBisCO L)) が検出されたが、S2およびS3では同バンドが検出されなかった(図2C)。また、GFPを含むS1～S3に含まれるGFPの量をウェスタンブロットで解析したところ、野生型のS1～S3からはいずれもGFPのバンドを検出することはできなかったが、GFP遺伝子導入型のS1～S3からは全てにGFPのバンドを検出し、そのバンド強度もS1～S3間で差が見られなかった。このことから、凍結融解前には上清に

残されたRuBisCO (L/S) が、凍結融解処理によって不溶化した一方、GFPは凍結融解処理によっても不溶化せずに上清に残り続け、結果として、凍結融解処理によってRuBisCO (L/S) とGFPは分離できたことが示された。

[0032] さらに、ウェスタンブロット解析の結果から、GFP遺伝子導入型のS1～S3に含まれる各GFP量を相対的に比較した。その結果、S1におけるGFP量を1とした場合、S2におけるGFP量は0.9を超える量が残されていた（図3A）。一方、クマシーブルー染色の結果から、GFP遺伝子導入型のS1～S3に含まれる各RuBisCO量を相対的に比較した結果、S1におけるRuBisCO量を1とした場合、S2においては0.1未満となった（図3B）。さらにクマシーブルー染色の結果から、GFP遺伝子導入型のS1～S3に含まれる各総タンパク質量を相対的に比較した。その結果、S1における総タンパク質量を1とした場合、S2においては0.3未満となった（図3C）。これらの結果から、凍結融解処理を経ることによって、*N. benthamiana*の葉由来の粗抽出物からは総タンパク質の70%超が除去され、そのうちRuBisCOに限れば90%超が除去されていることが判明した。さらに、一過性に発現させた可溶性タンパク質であるGFPは、凍結融解処理の影響をほとんど受けず、上清に残ることも分かった。従って、凍結融解処理は、簡便かつ迅速に植物の粗抽出物から植物由来可溶性タンパク質を不溶化させ、遠心分離によって容易に沈殿させ、除去可能である。また、外来性の可溶性タンパク質を発現させている場合は、凍結融解処理は容易に目的の可溶性タンパク質の精製率を劇的に向上させることができる。また、凍結融解処理を実施する前に予め植物体の粗抽出物を遠心分離し、不溶性画分を除去するという操作を経ずとも同様の結果が得られた。

[0033] 実施例 2

植物由来可溶性タンパク質と外来性可溶性タンパク質の分離効果に与える凍結期間の検証1

実施例 1 と同様に、野生型*N. benthamiana*の葉(100 mg)およびGFP遺伝子を導入した*N. benthamiana*より得られた葉(100 mg)をそれぞれ、マルチビーズショッカーにより磨砕(1,700 rpm, 30 sec)し、破砕物を500 μ lのリン酸緩

衝液 (0.1% (v/v) Tween 20, プロテアーゼ阻害剤入り) に懸濁し、それぞれの植物体の粗抽出物とした。得られた粗抽出物を間を置かず遠心分離 (23,000 ×g, 10 min, 2°C) し、上清S1および沈殿P1を得た。また、上清S1を-30°Cで静置 (1または7日間) し、冷蔵庫内 (4°C) で融解させ、遠心分離 (23,000 ×g, 10 min, 2°C) し、上清S2 (凍結 1 日)、上清S2 (凍結 7 日) および沈殿P2 (凍結 1 日)、沈殿P2 (凍結 7 日) を得た。

[0034] 可視光下で沈殿の色の比較を行ったところ、野生型およびGFP遺伝子導入型共に、粗抽出物を遠心分離して得られるP1は緑色であるが、S1を遠心分離して得られるP2 (凍結 1 日)、P2 (凍結 7 日) は共に白色であり、差はみられなかった (図 4 A)。このことから、凍結期間は沈殿に影響を与えないことが示唆された。

[0035] また、青色LED下で上清の色の比較を行ったところ、野生型のS1、S2 (凍結 1 日)、S2 (凍結 7 日) はいずれもGFP蛍光を示さなかったが、GFP遺伝子を導入した植物体より得たS1、S2 (凍結 1 日)、S2 (凍結 7 日) は全てに蛍光が観察され、それらの蛍光強度は同程度であった (図 4 B)。このことから、凍結期間はGFPの状態に影響を与えないことが示唆された。

[0036] 野生型およびGFP遺伝子導入型のS1、S2 (凍結 1 日)、S2 (凍結 7 日) に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離後、クマシーブルー染色およびウェスタンブロット解析に供した。その結果、S1では、RuBisCO (L/S) のバンドが検出されたが、S2 (凍結 1 日) およびS2 (凍結 7 日) では同バンドが検出されなかった (図 4 C)。また、野生型のS1、S2 (凍結 1 日)、S2 (凍結 7 日) からはいずれもGFPのバンドを検出することはできなかったが、GFP遺伝子を導入した植物体より得たS1、S2 (凍結 1 日)、S2 (凍結 7 日) からは全てにGFPのバンドを検出し、そのバンド強度もS1、S2 (凍結 1 日)、S2 (凍結 7 日) の間で差が認められなかった。事実、ウェスタンブロット解析の結果から、GFP遺伝子導入型のS1、S2 (凍結 1 日)、S2 (凍結 7 日) に含まれる各GFP量を相対的に比較した結果、各GFP量に差は認められなかった。これらのことから、凍結期間は沈殿やGFPの状態に影響を与えないことが示唆された。凍結処

理によって、植物の粗抽出物からRuBisCOを含むタンパク質を不溶化させ、遠心分離等によって容易に除去できることが示された。また、外来性の可溶性タンパク質を発現させている場合は、凍結処理によって、容易に目的の可溶性タンパク質の精製率を劇的に向上させることが可能であることが示された。

[0037] 実施例 3

植物由来可溶性タンパク質と外来性可溶性タンパク質の分離効果に与える凍結期間の検証2

粗抽出物の凍結期間を10分間または60分間とする以外は実施例 2 と同様の実験を行い、短時間凍結の効果を評価した。結果を図 5 に示す。

[0038] 図 5 に示される通り、10分間の凍結は弱いながらもRuBisCOの除去効果を示した。また、60分間の凍結では、十分なRuBisCOの除去効果を示した。尚、この条件での凍結融解処理において、GFPには影響は見られなかった（図 5（B）および図 6）。

[0039] 実施例 4

植物由来可溶性タンパク質と外来性可溶性タンパク質の分離効果に与える凍結温度の検証

粗抽出物の凍結期間を1日、凍結温度を-20℃とする以外は実施例 3 と同様の実験を行い、凍結温度として-20℃を採用した場合の効果を評価した。結果を図 7 および図 8 に示す。

[0040] 図 7 および図 8 に示される通り、凍結温度を-20℃とした場合でも、凍結温度を-30℃とした場合と同様の結果が得られた。具体的には、上清中の全可溶性タンパク質（Total Soluble Proteins；「TSP」と称することがある）とRuBisCOの量は減少したが、GFPには影響は見られなかった。

[0041] 実施例 5

GFP以外のタンパク質に対する凍結融解処理の影響の検討1(GUS)

一過性に発現させたGUS(β -glucuronidase)に対する凍結融解処理の影響を評価した。GUS発現葉の粗抽出物を-30℃で60分間凍結し、4℃で解凍した。ウ

エスタンプロット分析の結果、S1とS3の全サンプルでGUSの発現が認められ、また、上清にGUS活性が検出された（図9(a)）。凍結60分間であってもTSPは十分に減少した（図9(b)）。これは、より短い凍結時間で、凍結感受性タンパク質を不活性化することなくRuBisCOを除去できることを示唆する。

[0042] 実施例6

GFP以外のタンパク質に対する凍結融解処理の影響の検討2(ヒトFGF1)

一過性に発現させたヒトFGF1に対する凍結融解処理の影響を評価した。FGF1発現葉の粗抽出物を-30℃で1日間凍結し、4℃で解凍した。FGF1はSDS-PAGEとウェスタンプロット分析で検出した（図10(A)）。ELISA分析では、凍結融解処理後のFGF1量にはほとんど変化が見られなかった（図10(B)）。

[0043] 実施例7

GFP以外のタンパク質に対する凍結融解処理の影響の検討3(ヒトCollagen I)

一過性に発現させたヒトCollagen IIに対する凍結融解処理の影響を評価した。ヒトCollagen II発現葉の粗抽出物をウェスタンプロット分析で検出した（図11）。その結果、ヒトCollagen II特異的なバンドが検出された。

[0044] ヒトCollagen II発現葉の粗抽出物を-30℃で2週間凍結後4℃で融解し、ヒトCollagen IIをウェスタンプロット分析で検出した（図12）。その結果、凍結融解後も凍結前の試料と同様にヒトCollagen II特異的なバンドが検出された。

[0045] 実施例8

プロテオーム解析

凍結融解処理の影響を調べるため、野生型植物の凍結融解前後の上清のプロテオーム解析を行った。その結果、試験上清中に695個のタンパク質が同定された。3つのタンパク質の平均存在比は1以上であり、692のタンパク質の存在比は1未満であった。表1に、凍結融解後に量が減少した上位20位までのタンパク質を示す。表1に示すように、凍結融解処理後の上清液中の多くの内在性タンパク質量は、未凍結の上清液に比べて減少していた。特に、リボソ-

ムタンパク質は凍結融解処理後の上清液から効果的に除去された。尚、表中、Abundance Ratioは(abundance after freeze-thaw treatment)/(abundance before freeze-thaw treatment)を意味する。

[0046] [表1-1]

Accession	Gene symbol	Description	Coverage [%]	Average abundance ratio	Coefficient of variation [%]
A0A1S4ALT8	LOC107799053	40S ribosomal protein S26 OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107799053 PE=3 SV=1	21	0.0995	19.32333419
A0A1S3Y5V8	LOC107772468	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107772468 PE=3 SV=1	11	0.1155	28.33431719
A0A1S4DQP2	LOC107832413	50S ribosomal protein L22, chloroplastic OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107832413 PE=3 SV=1	29	0.12125	20.99856009
A0A1S4C2S1	LOC107814537	40S ribosomal protein S2-3-like OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107814537 PE=3 SV=1	48	0.12675	20.0253098
A0A1U7Y628	LOC104241039	Catalase OS=Nicotiana sylvestris OX=4098 GN=LOC104241039 PE=3 SV=1	32	0.1345	20.706899
A0A1S4BWC8	LOC107812523	26S protease regulatory subunit 8 homolog A- like OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107812523 PE=3 SV=1	16	0.13825	21.65456402
A0A1S3YUN7	LOC107779727	40S ribosomal protein S16-like OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107779727 PE=3 SV=1	28	0.1385	16.48045085
A0A1S3XQS4	LOC107767513	Uncharacterized protein LOC107767513 OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107767513 PE=3 SV=1	16	0.14	18.32250763
A0A286RX19	rps8	20S ribosomal protein S8, chloroplastic OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=rps8 PE=3	21	0.144	26.21163667
A0A1J6IAA5	HSC80_0	Heat shock cognate protein 80 OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=HSC80_0 PE=3SV=1	37	0.146	26.01249844

[0047]

[表1-2]

Accession	Gene symbol	Description	Coverage [N]	Average abundance ratio	Coefficient of variation [N]
A0A1S3Z334	LOC107782473	Chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa b. chloroplastic OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107782473 PE=4 SV=1	52	0.149	25.97584226
A0A1J6JW23	RPS24A.1	40S ribosomal protein S24 OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=RPS24A.1 PE=3 SV=1	36	0.15125	20.791435
A0A1J6IV14	RPS25_0	40S ribosomal protein S25 (Fragment) OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=RPS25_0 PE=3 SV=1	13	0.1535	29.29665186
A0A1J6IHN4	RPS9C_2	40s ribosomal protein s9~2 OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=RPS9C_2 PE=3 SV=1	37	0.15475	27.43322462
A0A1S4D0A1	LOC107624561	Ribosomal protein L15 OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107624561 PE=3 SV=1	22	0.1625	25.21575538
A0A314KXC5	RPS2D	40s ribosomal protein s2~4 OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=RPS2D PE=3 SV=1	49	0.165	7.455612985
A0A1S4DFI4	LOC107829071	40S ribosomal protein S15-like OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107829071 PE=3 SV=1	24	0.16525	18.92062273
A0A1S3XI79	LOC107765428	60S ribosomal protein L5-like OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107765428 PE=3 SV=1	17	0.1655	11.5543279
A0A314KK41	RPL38_0	60s ribosomal protein l38 (Fragment) OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=RPL38_0 PE=3 SV=1	14	0.16975	26.72632708
A0A1S4B0Q2	LOC107803255	60S ribosomal protein L6-like isoform X1 OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107803255 PE=3 SV=1	28	0.17075	12.8277753

[0048] SDS-PAGE解析の結果、凍結融解後の上清液に含まれるRuBisCOの大サブユニットおよび小サブユニットの量は、未凍結の上清液と比較して著しく減少していた。凍結試料では、RuBisCOの大サブユニットと小サブユニットの平均存在比は、それぞれ未凍結上清溶液の約10%と20%に減少した（表2）。

[0049]

[表2]

Accession	Gene Symbol	Description	Coverage [%]	Average Abundance Ratio	Coefficient of variation [%]
Q85AQ3		Ribulose biphosphate carboxylase small subunit (Fragment) OS=Nicotiana benthamiana	43	0.3475	21.29301955
V9IN82	rbcs	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic OS=Nicotiana attenuata	33	0.155	36.61349533
Q84QE5	LOC107771723	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic OS=Nicotiana tabacum	41	0.152	41.95422471
P26573	RBCS	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic OS=Nicotiana glumbaginifolia	36	0.151	34.99043085
A0A1J6IDB3	RBCL	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Nicotiana attenuata	14	0.1155	30.26478346
A0A7T7D7W9	rbcl	Ribulose biphosphate carboxylase large chain OS=Nicotiana suaveolens	67	0.09825	42.28004196

[0050] これらの値は、SDS-PAGEで観察されたバンド強度から推定された値よりも高かった。対照的に、凍結融解処理による影響がほとんどないタンパク質は15種類だけであった（それらの平均存在比は90%以上）（表3）。興味深いことに、同定されたタンパク質のほとんどは葉緑体型であった：A0A1U7YAD0（不活性型紫酸ホスファターゼ29アイソフォームX2）とA0A1S3XW44（GDSSLエステラーゼ/リパーゼAPG-like）である（表3）。

[0051]

[表3-1]

Accession	Gene Symbol	Description	Coverage [%]	Average Abundance Ratio	Coefficient of variation [%]
A0A1S3Z1X1	LOC107781865	Ribose-5-phosphate isomerase OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107781865 PE=3 SV=1	48	1.41275	19.90655729
A0A1J6KQ67	IN37_1	2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone methyltransferase, chloroplastic OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=IN37_1 PE=3 SV=1	20	1.03675	26.89640326
A0A1J6KDK3	OSL4	Putative 6-phosphogluconolactonase 4, chloroplastic OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=OSL4 PE=3 SV=1	14	1.0335	20.70761872
A0A1J6I4H2	PPL1	23 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=PPL1 PE=3 SV=1	25	0.99275	2.974956318
A0A1U7VKK3	LOC104214421	2-methylene-furan-3-one reductase OS=Nicotiana sylvestris OX=4096 GN=LOC104214421 PE=3 SV=1	54	0.9805	10.67217287
A0A1S4CXK0	LOC107823581	Thylakoid lumenal 17.9 kDa protein, chloroplastic-like isoform X1 OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107823581 PE=4 SV=1	11	0.9535	14.94472503
A0A1J5IBQ4	CLPT1_1	Atp-dependent ctp protease atp-binding subunit clpt1, chloroplastic OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=CLPT1_1 PE=4 SV=1	27	0.9515	8.698977171
A0A314L6A4	PSBP2	23 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=PSBP2 PE=3 SV=1	54	0.936	14.93766522
I0B7J6	psbP2	23 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II OS=Nicotiana benthamiana OX=4100 GN=psbP2 PE=2 SV=1	58	0.93425	12.19772318
A0A314KUY7	EO_1	2-methylene-furan-3-one reductase OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=EO_1 PE=3 SV=1	56	0.93325	10.90162923
A0A1U7YAD0	LOC104245036	Putative inactive purple acid phosphatase 29 isoform X2 OS=Nicotiana sylvestris OX=4096 GN=LOC104245036 PE=4 SV=1	16	0.92725	20.95584863
A0A314L6V8	FKBP18	Peptidylprolyl isomerase OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=FKBP18 PE=4 SV=1	17	0.9245	15.46605539

[0052] [表3-2]

Accession	Gene Symbol	Description	Coverage [%]	Average Abundance Ratio	Coefficient of variation [%]
A0A1S3XW44	LOC107769403	GDSL esterase/lipase APC-like OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107769403 PE=3 SV=1	18	0.9215	7.025277617
A0A1S4D251	LOC107825140	Ribosome-recycling factor, chloroplastic OS=Nicotiana tabacum OX=4097 GN=LOC107825140 PE=3 SV=1	34	0.915	10.73785555
A0A314KLZ1	LOC107781865	Lactoylglutathione lyase OS=Nicotiana attenuata OX=49451 GN=A4A49_20638 PE=3 SV=1	28	0.90725	17.12457951

産業上の利用可能性

[0053] 従来は植物で発現した外来性の可溶性タンパク質の分離精製においては、複数の試薬や多段階の操作が必要であったところ、本発明によれば、凍結融

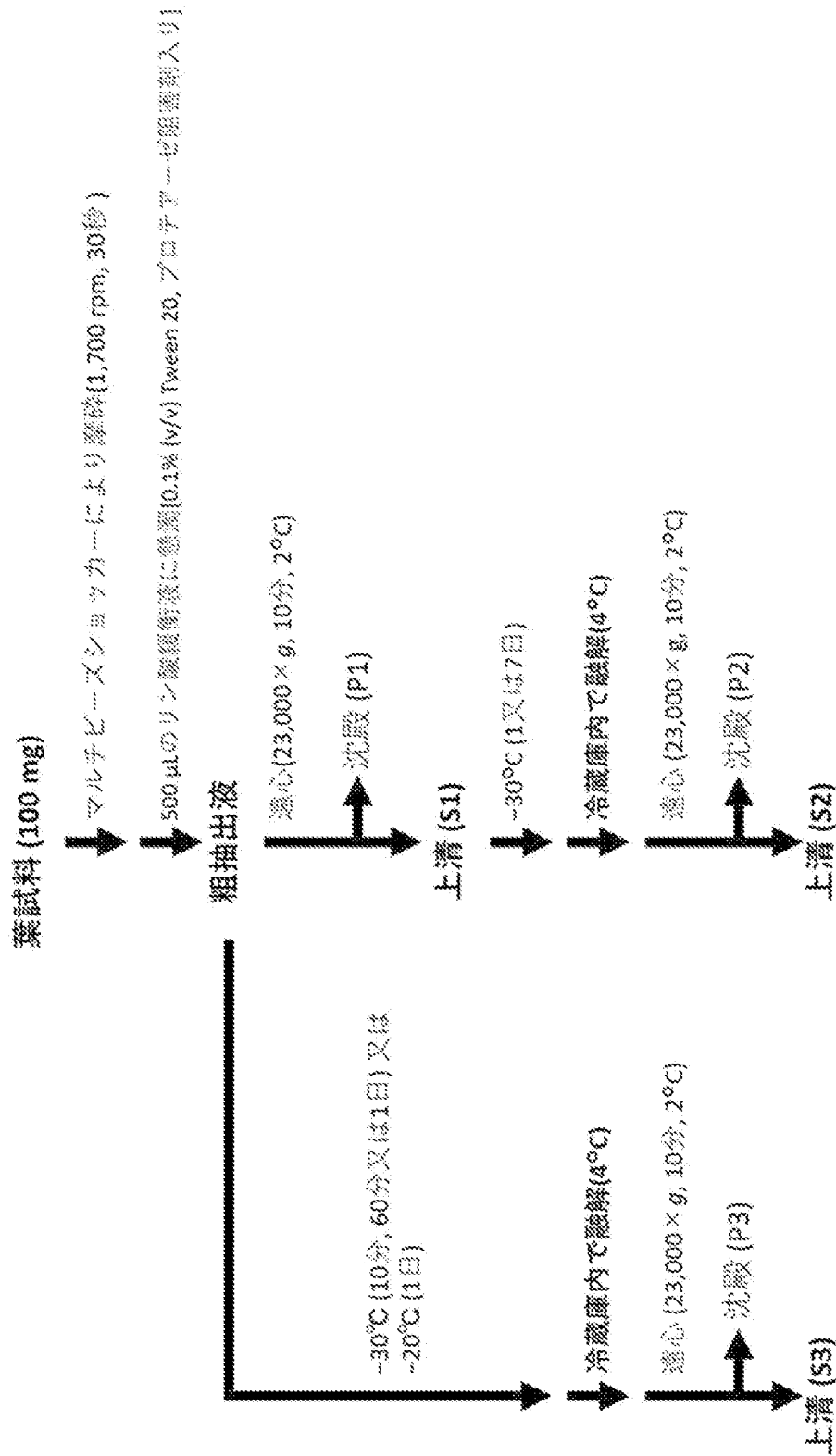
解処理を経ることによって、植物においてドミナントなタンパク質であるRuBisC0を含む植物由来可溶性タンパク質を不溶化させることによって除去することが可能となり、外来性の可溶性タンパク質を精製する過程の上流においてその存在割合を高めることができる。結果として、外来性の可溶性タンパク質の精製工程を短縮化することが可能となり、本発明はバイオインダストリー分野において有用になりうる。

[0054] 本出願は、日本で出願された特願2023-106995（出願日：2023年6月29日）および特願2023-200214（出願日：2023年11月27日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

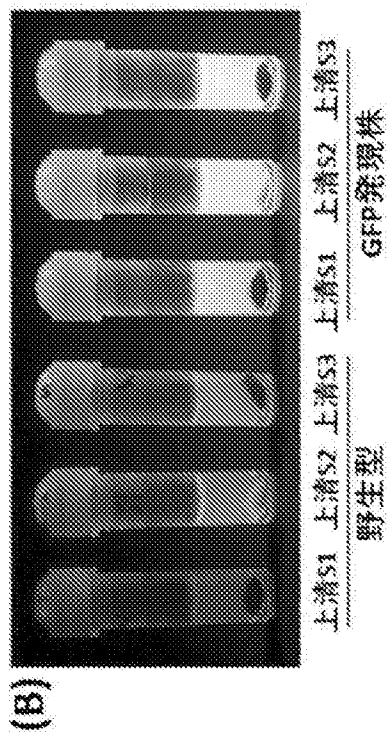
- [請求項1] 以下の工程を含む、植物由来抽出液から植物由来可溶性タンパク質を除去する方法：
- （１）植物由来抽出液を凍結および融解することによって植物由来可溶性タンパク質を不溶化させる工程、および
- （２）該抽出液から不溶化タンパク質を除去する工程。
- [請求項2] 植物由来可溶性タンパク質がRuBisCOを含む、請求項１に記載の方法。
- [請求項3] 植物がタバコ属に属する植物である、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項4] タバコ属植物が*Nicotiana benthamiana*である、請求項３に記載の方法。
- [請求項5] 植物が凍結および融解によって不溶化しない外来性の可溶性タンパク質を発現している、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項6] 凍結期間が1日以上である、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項7] 凍結温度が-20℃以下である、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項8] 抽出液から不溶化タンパク質の除去が遠心分離または濾過によって行われる、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項9] 工程（１）の前に、植物由来抽出液から不溶性物質を除去する工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。
- [請求項10] 植物由来抽出液から不溶性物質の除去が遠心分離または濾過によって行われる、請求項９に記載の方法。

[図1]

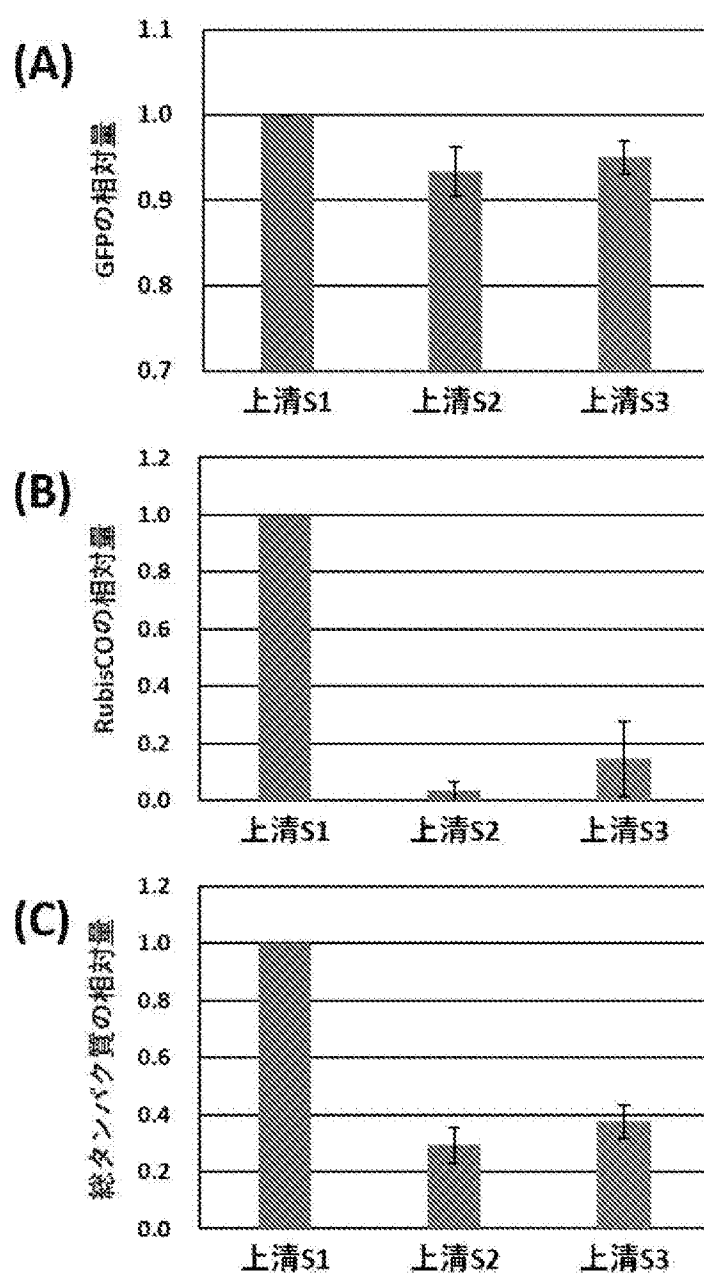


(c)

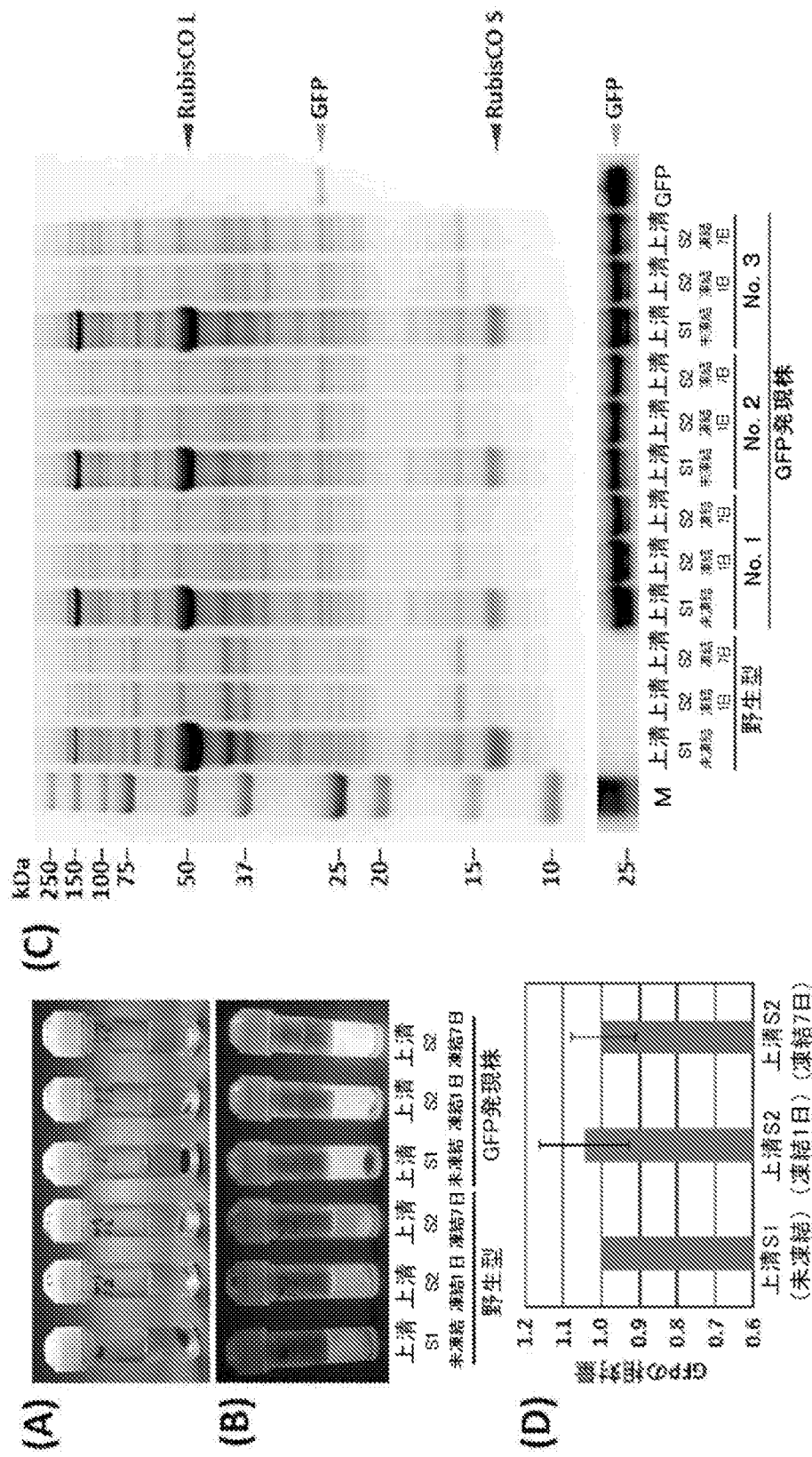
Western blot analysis showing protein expression levels (kDa) for Rubisco L, Rubisco S, and GFP across various lanes (31-100). The lanes are grouped into three sections: No. 1, No. 2, and No. 3. The lanes are labeled '野生型' (wild type) for lanes 31-40, 'No. 1' for lanes 41-50, 'No. 2' for lanes 51-60, and 'No. 3' for lanes 61-70. The lanes are labeled 'GFP' for lanes 31-40, 'Rubisco L' for lanes 41-50, 'Rubisco S' for lanes 51-60, and 'GFP' for lanes 61-70.



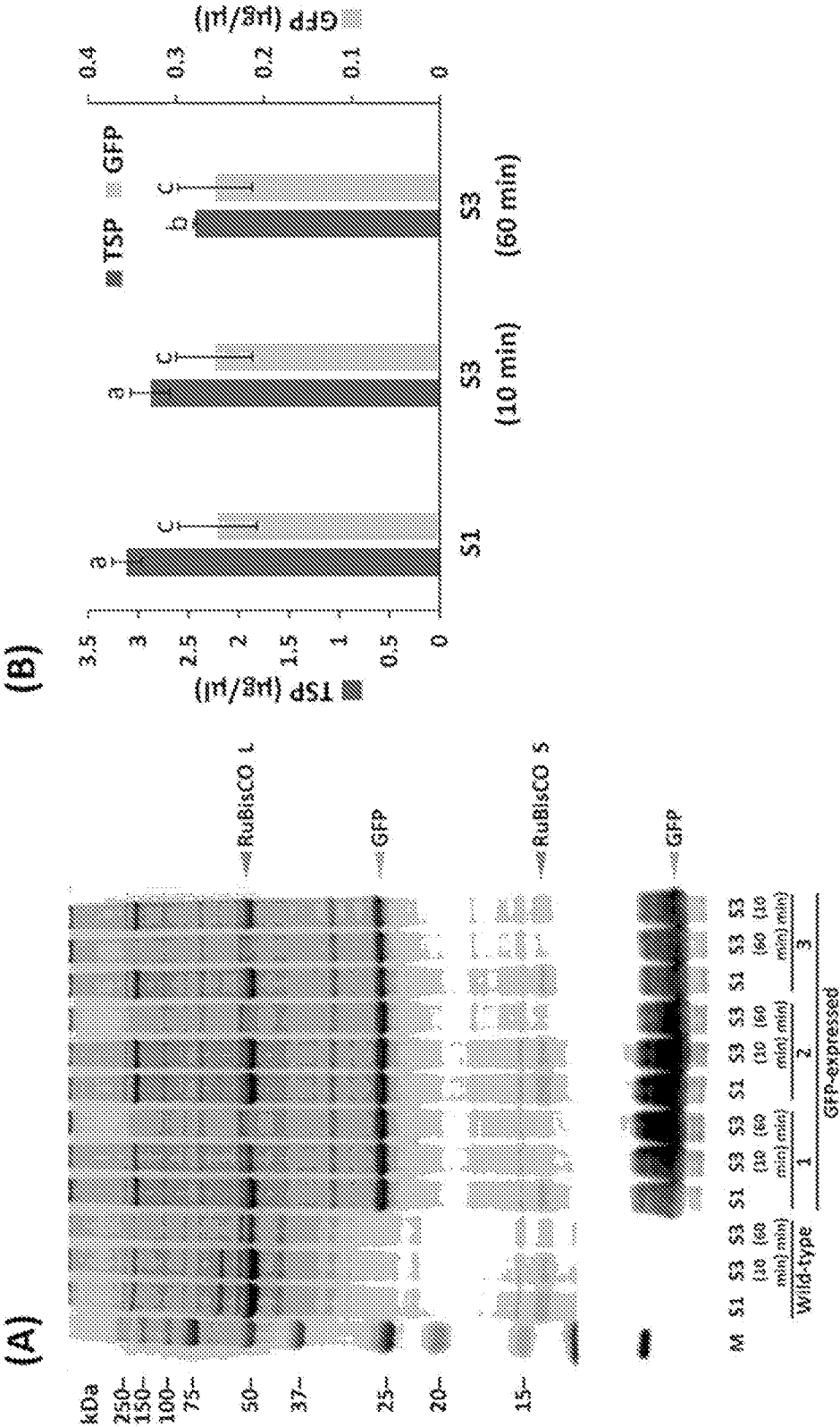
[図3]



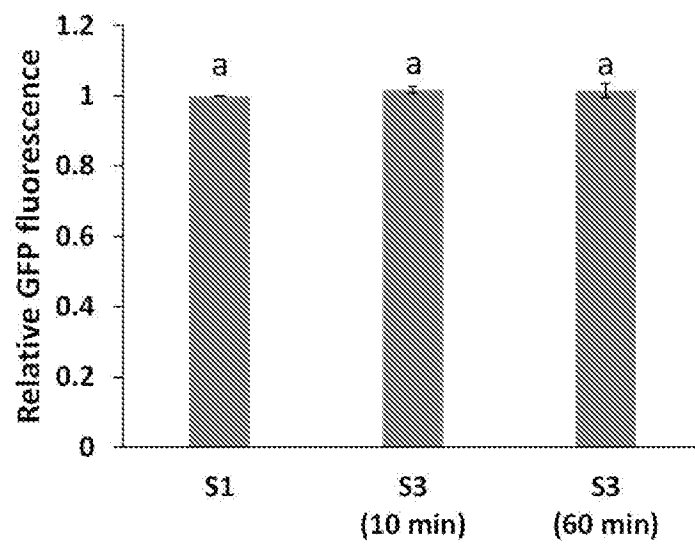
[図4]



[Figure 5]

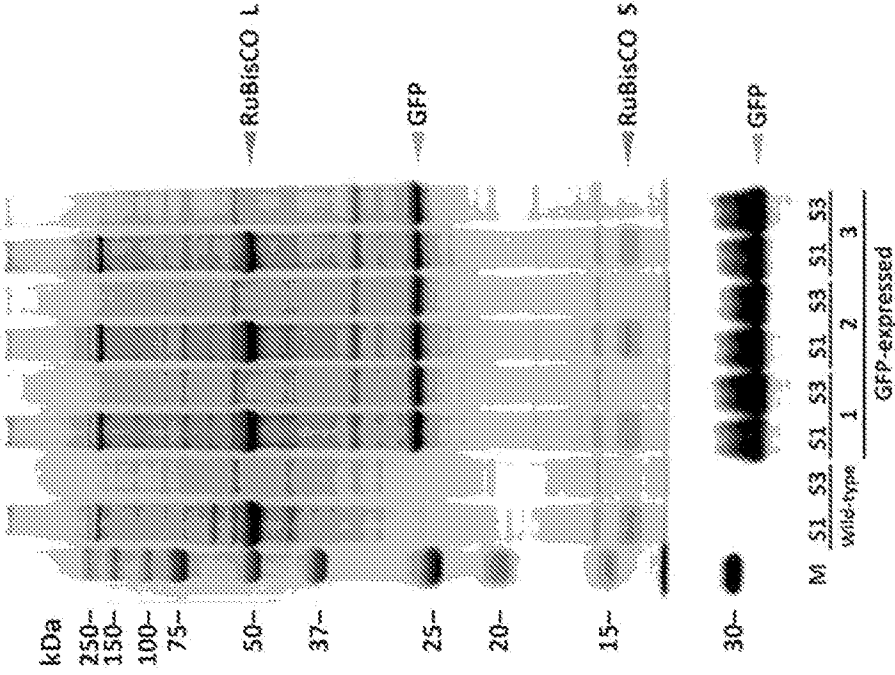


[図6]

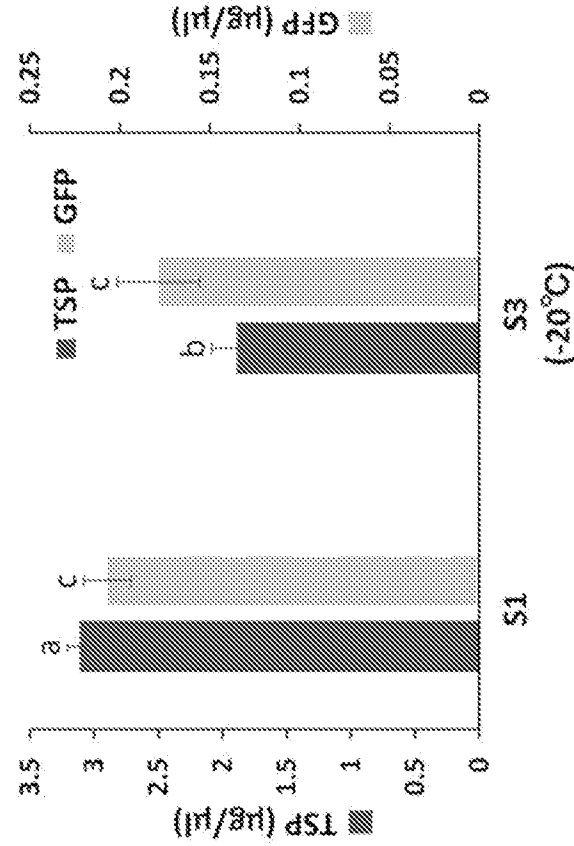


[7]

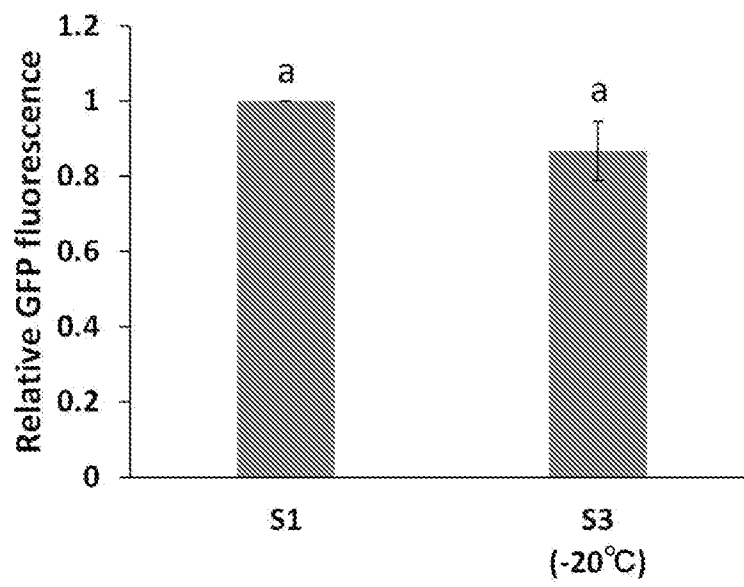
(A)



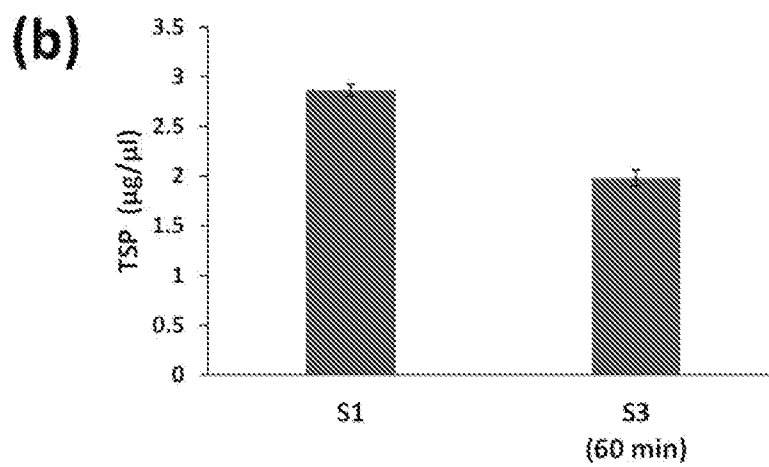
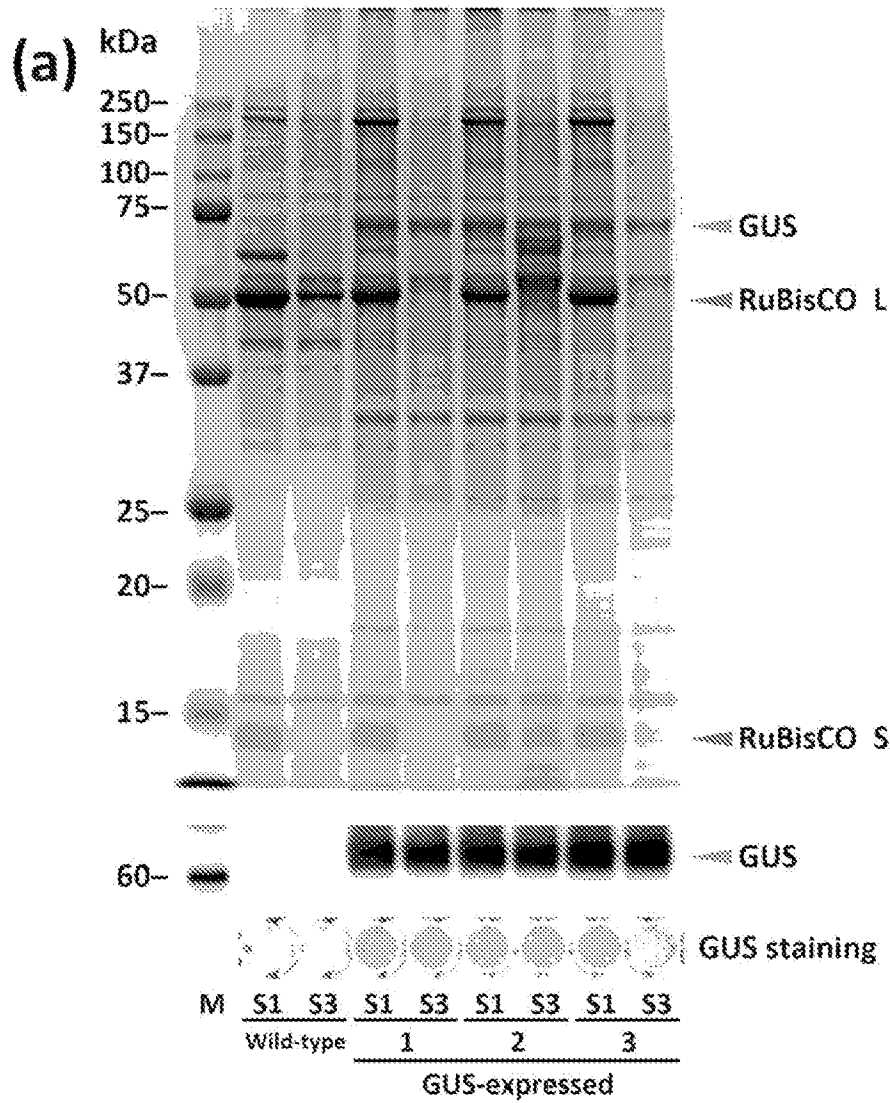
(B)



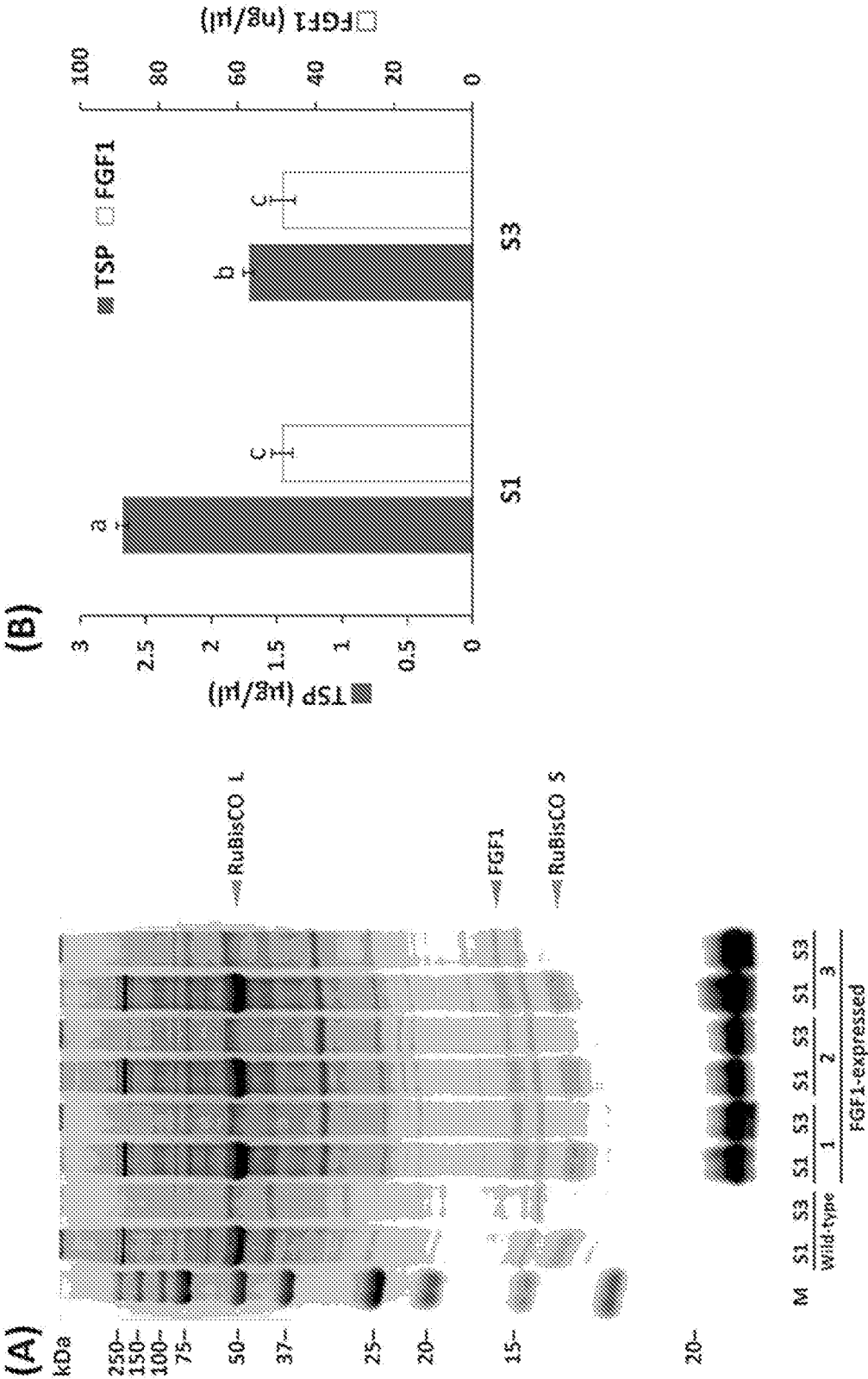
[図8]



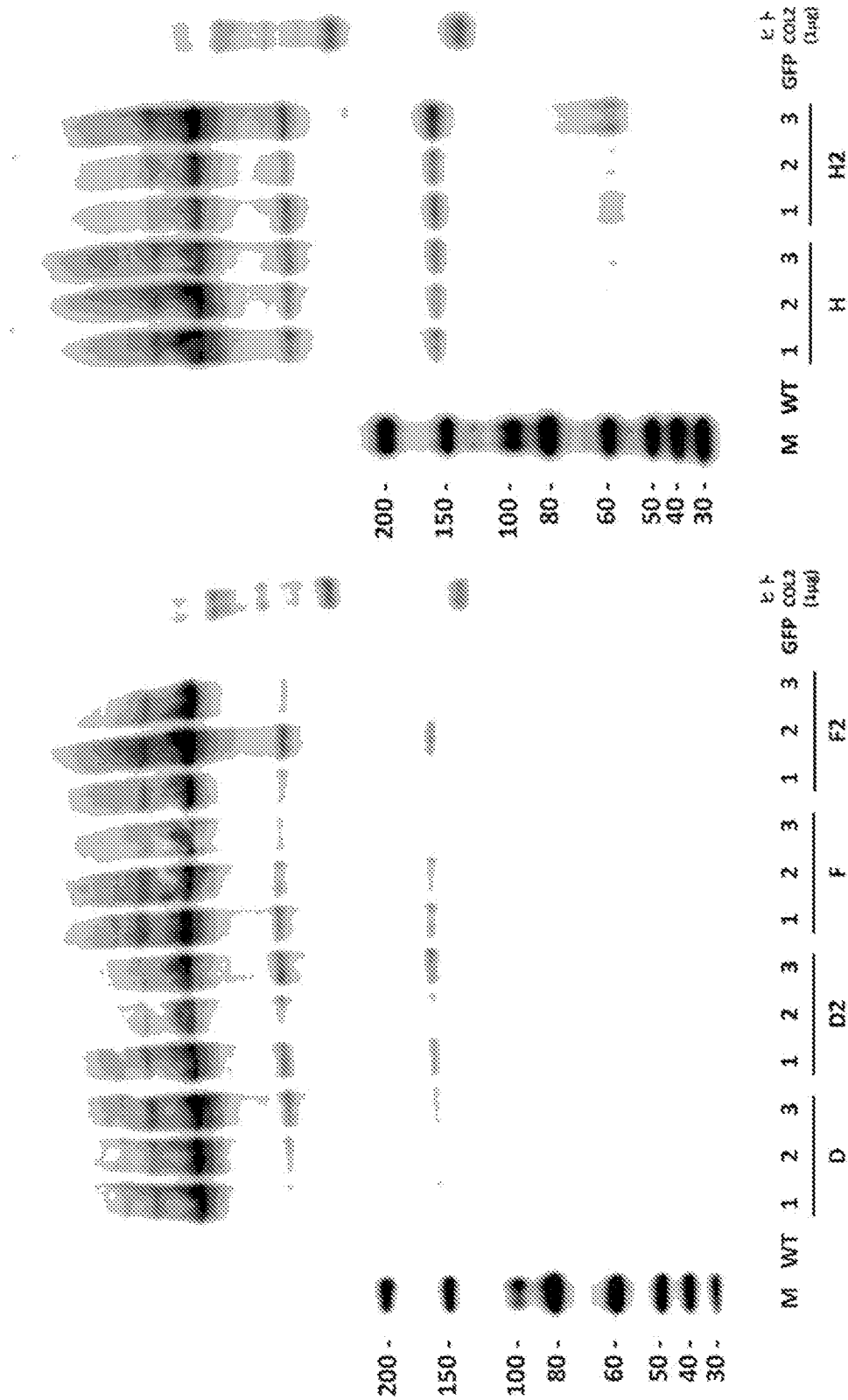
[図9]



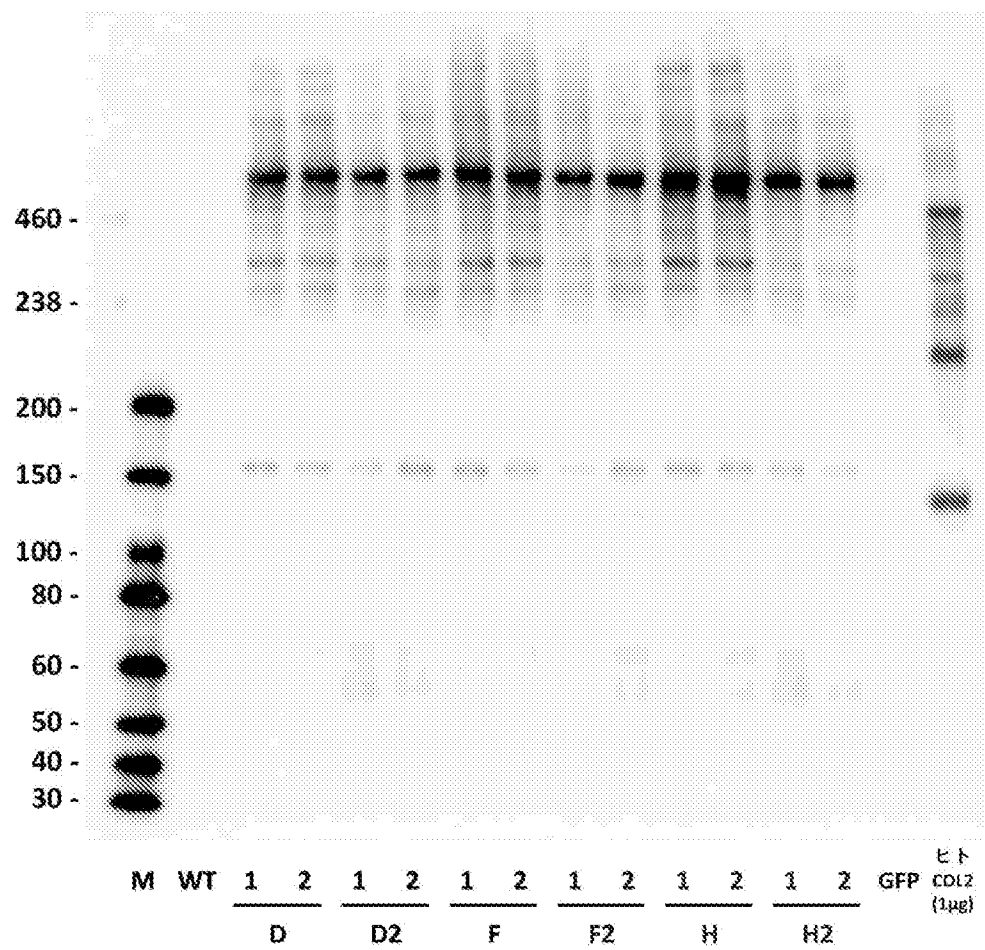
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 1/14</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/88</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/00</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/02</i> (2006.01)i FI: C07K1/14; C12N9/88; C12P21/00 C; C12N15/09 Z; C12P21/02 C According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K1/14; C12N9/88; C12N15/09; C12P21/00; C12P21/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); MEDLINE (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	MATSUSHIMA, A. et al. Removal of plant endogenous proteins from tobacco leaf extract by freeze-thaw treatment for purification of recombinant proteins. PLANT SCIENCE. 10 December 2023, vol. 339, 111953 (10 pages), DOI: 10.1016/j.plantsci.2023.111953 abstract, fig. 2	1-10
A	HASSAN, S. et al. Considerations for extraction of monoclonal antibodies targeted to different subcellular compartments in transgenic tobacco plants. PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL. September 2008, vol. 6, no. 7, pp. 733-748, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00354.x Summary, p. 743, right column, line 36 to p. 744, left column, line 10, p. 745, right column, line 50 to p. 746, left column, line 32	1-10
A	JP 2016-511004 A (R. J. REYNOLDS TOBACCO COMPANY) 14 April 2016 (2016-04-14) claims 1-20	1-10
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 September 2024		Date of mailing of the international search report 17 September 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, Y. J. et al. Depletion of abundant plant RuBisCO protein using the protamine sulfate precipitation method. PROTEOMICS. July 2013, vol. 13, no. 14, pp. 2176-2179, DOI: 10.1002/pmic.201200555 abstract	1-10
A	KRISHNAN, H. B. et al. A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (Glycine max) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. PHYTOCHEMISTRY. 18 September 2009, vol. 70, pp. 1958-1964, DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.08.020 abstract	1-10
A	JP 2018-131414 A (PLANT HIGH TECH INSTITUTE) 23 August 2018 (2018-08-23) paragraphs [0017]-[0018]	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023476

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2016-511004	A	14 April 2016	US 2014/0271952 A1 claims 1-24	
				WO 2014/159617 A1	
				EP 2967129 A1	
				CN 105188422 A	

JP	2018-131414	A	23 August 2018	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C07K 1/14(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12P 21/00(2006.01)i;
C12P 21/02(2006.01)i
FI: C07K1/14; C12N9/88; C12P21/00 C; C12N15/09 Z; C12P21/02 C

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C07K1/14; C12N9/88; C12N15/09; C12P21/00; C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); MEDLINE (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	MATSUSHIMA, A., et al., "Removal of plant endogenous proteins from tobacco leaf extract by freeze-thaw treatment for purification of recombinant proteins.", PLANT SCIENCE, 2023.12.10, Vol.339, 111953 (10 pages), DOI: 10.1016/j.plantsci.2023.111953 Abstract, Figure 2	1-10
A	HASSAN, S., et al., "Considerations for extraction of monoclonal antibodies targeted to different subcellular compartments in transgenic tobacco plants.", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, 2008.09, Vol.6, No.7, pp.733-748, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00354.x Summary, p.743, right-column, line 36 to p.744, left-column, line 10, p.745, right-column, line 50 to p.746, left-column, line 32	1-10
A	JP 2016-511004 A (アール・ジェイ・レイノルズ・タバコ・カンパニー) 14.04.2016 (2016-04-14) 請求項1-20	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"I" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
04.09.2024

国際調査報告の発送日
17.09.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）
野村 英雄 4I 4155
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	KIM, Y.J., et al., "Depletion of abundant plant RuBisCO protein using the protamine sulfate precipitation method.", PROTEOMICS, 2013.07, Vol.13, No.14, pp.2176-2179, DOI: 10.1002/pmic.201200555 Abstract	1-10
A	KRISHNAN, H.B., et al., "A rapid method for depletion of Rubisco from soybean (Glycine max) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins.", PHYTOCHEMISTRY, 2009.09.18, Vol.70, pp.1958-1964, DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.08.020 Abstract	1-10
A	JP 2018-131414 A (株式会社植物ハイテック研究所) 23.08.2018 (2018 - 08 - 23) 段落[0017]-[0018]	1-10

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/023476

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2016-511004	A	14.04.2016	US	2014/0271952	A1	
				Claims 1-24			
				WO	2014/159617	A1	
				EP	2967129	A1	
				CN	105188422	A	

JP	2018-131414	A	23.08.2018	(ファミリーなし)			
