



Title	Production of recombinant human acid sphingomyelinase in <i>Nicotiana benthamiana</i>
Author(s)	Panyawechamontri, Kulachatr
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105408
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (PANYAWECHAMONTRI KULACHATR)

Title

Production of recombinant human acid sphingomyelinase in *Nicotiana benthamiana*
(ニコチアナベンサミアナ植物による組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼの生産)

Abstract of Thesis

In Chapter 1, acid sphingomyelinase (ASM) hydrolyzes sphingomyelin into phosphocholine and ceramide, and its deficiency causes lipid buildup, particularly in Niemann-Pick disease (NPD). Xenpozyme®, the first FDA-approved recombinant ASM for NPD type B, offers enzyme replacement therapy (ERT) but is costly, limiting patient access. Plant-based systems offer an alternative for biopharmaceutical production with many advantages. *Nicotiana benthamiana* has been successfully used to produce various therapeutic proteins and vaccines. This study investigates the production of recombinant human ASM in *N. benthamiana*, aiming to address current challenges in plant-based expression and purification and to advance a more accessible ERT for NPD type B.

Chapter 2 describes the production of recombinant human ASM in *N. benthamiana* using *Agrobacterium*-mediated transient expression. Three different ASM constructs were tested: (1) a full-length ASM with its native signal peptide, (2) a full-length ASM with a plant-derived extensin signal peptide (ExtSp), and (3) a truncated ASM with ExtSp. Co-expression with the p19 suppressor enhanced protein accumulation, and proteins were extracted using the apoplastic wash fluid (AWF) method. Recombinant ASM showed substantial enzymatic activity – 4.01 ± 0.11 mU/mg total soluble protein (TSP) in whole leaf extracts and 7.64 ± 0.49 mU/mg TSP in apoplast fractions – compared with wild-type (1.49 ± 0.05 mU/mg and 1.59 ± 0.11 mU/mg TSP) and empty vector (1.65 ± 0.02 mU/mg and 1.66 ± 0.07 mU/mg TSP). This confirms *N. benthamiana* can successfully produce functional recombinant ASM, highlighting its potential for research and therapeutic applications in the future.

Chapter 3 describes a simple, practical method to purify recombinant human ASM produced in *N. benthamiana*. A two-step, tag-free process using AWF followed by Sulfopropyl-550C and DEAE Sepharose™ CL-6B ion exchange chromatography preserved enzyme activity while minimizing protein loss. After purification, the ASM yield reached approximately 3.5 mg/kg of fresh leaf weight, with a 49.14% recovery rate and a 21.2-fold purification enhancement. The purified enzyme exhibited a specific activity of 128.18 ± 4.18 mU/mg, verifying that the plant-derived ASM was functionally active. N-terminal amino acid analysis further confirmed the identity and proper processing of the purified enzyme. Overall, the results highlight the potential of plant-based systems for large-scale recombinant protein production.

Chapter 4 focuses on enhancing recombinant human ASM production in *N. benthamiana* through vector and infiltration optimization. A minimized pBI121 vector (mpBI121), was developed by removing non-essential bacterial sequences such as the *lac* promoter/operator and *tetR* gene to reduce vector size and improve expression efficiency. This modification increased *GUS* and *ASM* mRNA expression levels by 2.02- and 2.05-fold and boosted *GUS* and *ASM* enzyme activities by 1.76- and 1.75-fold compared with the original pBI121. Testing eight infiltration cases showed that co-expression with p19 and the addition of acetosyringone and ascorbic acid maximized ASM expression. Under this optimized condition, ASM accumulated mainly in the apoplast with a specific activity of 545.56 ± 4.28 μ U/mg – about 2.9-fold higher than under standard conditions. Together, these results demonstrate that vector minimization combined with infiltration buffer optimization significantly enhances recombinant ASM yield in *N. benthamiana*.

Chapter 5 demonstrates the successful production and purification of functional human ASM in *N. benthamiana*, highlighting plant-based systems as scalable alternatives to conventional platforms. Using a minimized expression vector and optimized agroinfiltration conditions enhanced yield and enzyme activity, supporting the potential of plant-made pharmaceuticals (PMP) for affordable ERT. Future work will focus on further enhancing yields, scalability, and efficiency, positioning plant-based production as a cost-effective alternative for therapeutic protein manufacturing and increased accessibility of biopharmaceuticals.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (PANYAWECHAMONTRI KULACHATR)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤山和仁
	副 査	教授	關 光
	副 査	教授	内山 進

論文審査の結果の要旨

第 1 章の総論では、酸性スフィンゴミエリナーゼについて述べ、続いて植物を用いた組換えタンパク質の生産の特徴を述べている。酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) は、スフィンゴミエリンをホスホコリンとセラミドに加水分解する酵素である。ASM 活性の欠失は脂質の蓄積および多臓器機能障害を引き起こし、特にニーマン・ピック病 (Niemann-Pick disease : NPD) において顕著である。酵素補充療法 (enzyme replacement therapy : ERT) は NPD B 型に対する有望な治療戦略として注目されており、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で生産された組換えヒト ASM である Xenpozyme® (オリブダーゼ アルファ) は、全身症状を緩和する初の承認治療薬である。Xenpozyme® が米国食品医薬品局 (FDA) により承認されたことは、この希少疾患の治療における大きな節目となった。しかしながら、Xenpozyme® は非常に高価であり、患者の治療アクセスにおいて大きな障壁となっていることから、より低コストである製造プラットフォームの開発が求められている。植物発現系は、高いスケラビリティとヒト病原体汚染のリスクが低いという利点を有し、バイオ医薬品生産の有望な代替手段として注目されている。その中でも、*Nicotiana benthamiana* は急速な生育と高い一過性発現収量を示すことから、特に有効な発現宿主として確立されている。このプラットフォームは、これまでに多くの治療用タンパク質やワクチンの生産に利用されており、組換えヒト ASM の生産においても高い可能性がある。そこで本研究では、*N. benthamiana* を発現プラットフォームとして用い、可溶性組換えヒト ASM の生産を検討した。本研究は、植物体により、機能を有する組換え ASM の生産における課題を解決し、その精製戦略を最適化することにより、NPD B 型に向けた ERT の開発に貢献することを目的としている。

第 2 章では、アグロバクテリウムが媒介する一過性発現系を用いて、*Nicotiana benthamiana* 植物体におけるヒト ASM の生産について述べている。発現効率、局在性および酵素機能の最適化を目的として、3 種類の ASM の発現ベクターを設計・比較している。具体的に発現させる ASM は、ネイティブなシグナルペプチドを有する全長 ASM、植物由来エクステンシンシグナルペプチド (ExtSp) を融合した全長 ASM、ならびに ExtSp を融合した改変型 ASM である。タンパク質蓄積量を向上させるため、これらの ASM 遺伝子を p19 サプレッサー遺伝子と共発現させ、組換えタンパク質をアポプラスト洗浄液 (apoplastic wash fluid : AWF) 法により回収している。植物体で発現した組換え ASM は期待通りの酵素活性を示している。一方で、野生型植物および空ベクターを導入した植物ではごく低い活性しか検出されず、これは植物内在性スフィンゴミエリナーゼに由来するものと考えている。組換え ASM の粗酵素活性は、全抽出物で 4.01 ± 0.11 mU/mg 全可溶性タンパク質 (TSP)、アポプラスト抽出物で 7.64 ± 0.49 mU/mg TSP と、野生型および空ベクターを植物で発現させたものと比較して顕著に高い結果を得ている。本研究により、*N. benthamiana* が機能的な組換え ASM を生産可能であることが示され、将来的な研究および治療応用における有用性を明らかにしている。

第 3 章 *Nicotiana benthamiana* 植物体で生産したタグフリー型ヒト酸性スフィンゴミエリナーゼの簡便かつ実用的な精製手法の開発について述べている。酵素活性を保持しつつ処理時間を短縮し、タンパク質損失を最小限に抑えた

植物由来精製プロセスを確立することが目的である。そのため、タグフリー精製戦略を設計し、工程数を２段階に抑えることでタンパク質分解のリスクを低減している。AWFを出発材料として、Sulfopropyl-550C 及び DEAE Sepharose™ CL-6B を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより ASM を精製している。その結果、精製後の ASM 収量は新鮮葉重量 1 kg あたり約 3.5 mg に達し、回収率は 49.14%、精製度は 21.2 倍である。精製された酵素は 128.18 ± 4.18 mU/mg の比活性を示し、植物由来 ASM が機能的に活性を保持していることを確認している。さらに、N 末端アミノ酸配列解析により、精製酵素の同一性および適切なプロセッシングを確認している。これらの結果は、植物発現系が大規模組換えタンパク質生産に適したプラットフォームであることを示している。

第４章では、*Nicotiana benthamiana* 植物体におけるタンパク質収量向上のための小型化発現ベクターの設計を述べている。そのため、ベクター設計およびアグロインフィルトレーション条件の最適化を通じて、*N. benthamiana* における組換えヒト ASM 生産の向上を検討している。非必須な細菌配列である *lac* プロモーター／オペレーターおよび *tetR* 遺伝子を除去することで、pBI121 ベクターを小型化した mpBI121 を作製し、ベクターサイズの縮小による発現効率の向上を図っている。この改変により、GUS および ASM の mRNA 発現量はそれぞれ 2.02 倍および 2.05 倍に増加し、酵素活性もそれぞれ 1.76 倍および 1.75 倍に向上している。さらに、８種類の浸潤溶液条件を検討した結果、p19 の共発現に加えてアセトシリンゴンおよびアスコルビン酸を添加した条件で、最も高い ASM 発現が得られている。この最適条件下では、ASM は主にアポプラストに蓄積し、比活性は 545.56 ± 4.28 μ U/mg に達し、標準条件と比較して約 2.9 倍増加している。これらの結果から、ベクター小型化と浸潤条件の最適化を組み合わせることで、*N. benthamiana* における組換え ASM 収量が大幅に向上することを示している。

第５章では、本研究の総括および展望を述べている。本研究では、*N. benthamiana* を用いて植物由来ヒト ASM を機能的な酵素として生産・精製することに成功し、植物発現系が従来の発現プラットフォームに代わるスケーラブルな選択肢であることを示している。発現ベクターの小型化およびアグロインフィルトレーション条件の最適化を行うことで、収量および酵素活性が向上し、植物由来医薬品 (plant-made pharmaceuticals : PMP) が低コストな酵素補充療法の実現が有望であることを示唆している。今後は、大規模治療用タンパク質生産に向けた植物発現系のさらなる改良を進め、コスト効率を維持しつつ収量と生産効率の向上を目指す。発現および精製戦略を最適化することにより、植物を使った組換えタンパク質生産方法は動物細胞や昆虫細胞に代わる持続可能なプラットフォームとして、治療用タンパク質製造への応用拡大とバイオ医薬品へのアクセス向上に貢献することが期待される。

以上のように、本論文は、アグロバクテリウム媒介一過性発現系を用いて、*N. benthamiana* により、組換えヒト酸性スフィンゴミエリナーゼの生産する系を確立している。続いて、生産したヒト酸性スフィンゴミエリナーゼの簡便かつ実用的な精製手法の開発している。さらに、*Nicotiana benthamiana* 植物体におけるタンパク質収量向上のための小型化発現ベクターの設計を示している。この成果は、植物発現系の発現および精製戦略を最適化し、動物細胞などに代わる持続可能なプラットフォームとして植物による組換えタンパク質生産方法が治療用タンパク質製造に貢献することが期待される

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。