OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Production of human glucocerebrosidase in wild-type and glyco-engineered Nicotiana benthamiana plants
Author(s)	Limkul, Juthamard
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55981
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name （Juthamard LIMKUL）	
Title	Production of Human Glucocerebrosidase in Wild-type and Glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* Plants（野生型および糖鎖改変ベンサミアナタバコ植物におけるヒト由来グルコセレブロシダーゼの生産）

Gaucher's disease is a lysosomal storage disorder caused by mutations in the gene encoding glucocerebrosidase (GCase). It is currently treated by enzyme replacement therapy (ERT) using recombinant GCase expressed in mammalian cells (Cerezyme®). Although Cerezyme® is highly effective, it is one of the most expensive drugs currently available. The demand of therapeutic glycoproteins has dramatically increased over the past years. Most of the recombinant glycoproteins in the market today are produced using mammalian cell lines (Lepenies and Seeberger, 2014). The interest in plant-made pharmaceuticals (PMPs) is heightened due to the safety from contamination by animal viral pathogens. However, the low production yield and the present of plant specific *N*-glycans differing from *N*-glycan structures produced in humans, are the obstacles to practically use plants for pharmaceutical glycoprotein production (Strasser, 2014).This research aims to produce human GCase using *Nicotiana benthamiana* plants with high yield and suitable *N*-glycan structure for human therapy.

The use of expression cassettes to express a foreign gene in plants had a major influence on the production of various proteins. In this study, a translational enhancer and suitable terminator were utilized to obtain a powerful expression system for GCase production in *N. benthamiana* plants. The highest activity was observed in transgenic plants transformed with pAt-GC-HSP combined a 5' untranslated region (5'-UTR) of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (AtADH) with the Arabidopsis heat shock protein (HSP) terminator. The purified GCase obtained by using two types of chromatography, i.e., Concanavalin A and phenyl 650C chromatography. A 1 mg of purified GCase can be obtained from 130-140 g of leaf (about 10 mature plants).

Plant production systems are among the most attractive alternatives for pharmaceutical protein production due to such advantages as high-scalability, and safety from human pathogen contamination. However, the presence of β1,2-xylose and core α1,3-fucose on plant's *N*-glycan structures has been debated for their antigenic activity. In this study, RNA interference (RNAi) technology was used for down-regulation of the endogenous *N*-acetylglucosaminyl transferase I (GNTI) expression in *N. benthamiana.* One glyco-engineered line (*Nb*GNTI-RNAi) showed strong reduction of plant specific *N*-glycans, with only 9.1% of the total *N*-glycan structures contained plant-type *N*-glycans.

The recombinant GCase for ERT in Gaucher's disease patients requires terminal mannose for its therapeutic efficacy. The *Nb*GNTI-RNAi plant was cross-pollinated with transgenic *N. benthamiana* expressing human GCase. The *N*-glycan structures that were presented on all of the four occupied *N*-glycosylation sites of recombinant GCase in *Nb*GNTI-RNAi plants ($GCase^{gnt1}$) showed that the majority (ranging from 73.3% up to 85.5%) of the *N*-glycans had mannose-type structures lacking potential immunugenic β1,2-xylose and α1,3-fucose epitopes. Moreover, $GCase^{gnt1}$ could be taken up into the macrophage cells via mannose receptors, and distributed into the liver and spleen, the target organs in the treatment of Gaucher's disease. Notably, the *Nb*GNTI-RNAi line, producing GCase, was stable and the *Nb*GNTI-RNAi plants were viable and did not show any obvious phenotype. Therefore, it would provide a robust tool for the production of GCase with customized *N*-glycan structures.

In summary, we could express human GCase in *N. benthamiana* plants, as much as 1.45% of human GCase in TSP by using the combination of 5' UTR of Arabidopsis ADH with the Arabidopsis HSP terminator. Glyco-engineered *N. benthamiana* plant was generated by down-regulation of the endogenous GNTI. This is the first successful report on the GNTI-down regulated *N. benthamiana* plants that could change the majority of total *N*-glycans from plant-specific type to high mannose-type. The human GCase mostly contained high mannose-type *N*-glycans without a potentially immunogenic β1,2-xylose and α1,3-fucose epitopes was successfully produced by cross-pollination of glyco-engineered plant with transgenic *N. benthamiana* expressing human GCase. Both $GCase^{gnt1}$ and $GCase^{WT}$ could be taken up into the macrophage cells via mannose receptors, and distributed into the liver and spleen. Therefore, it would provide a robust tool for the production of GCase with customized *N*-glycan structures suitable for Gaucher's disease therapy.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ Juthamard LIMKUL ）

	(職)	氏　名
論文審査担当者		
主 査	教授	藤山和仁
副 査	教授	村中俊哉
副 査	教授	大政健史
副 査	教授	福崎英一郎
副 査	教授	紀ノ岡正博
副 査	教授	福井希一
副 査	教授	仁平卓也

論文審査の結果の要旨

本論文では、糖鎖修飾経路を改変した植物体を作出し、その植物を用いて改変された糖鎖構造を持つヒトリソソーム病治療用酵素酵素の生産に成功し、細胞への取込み活性等を比較検討して本生産系の有効性を示したものである。

第一章では、本研究の背景及び目的について説明している。ゴーシェ病はグルコセレブロシダーゼ（GCase）酵素遺伝子の変異によるリソソーム蓄積障害である。現在、哺乳動物細胞で生産された組換えの GCase を用いた酵素補充療法（ERT）による治療法がなされているが、これは利用可能な最も高価な薬剤の一つである。組換え医療用タンパク質の生産に用いられる哺乳動物細胞系の問題点を示し、その代替法として植物を用いた生産系の特徴を述べている。さらに、医療用タンパク質は糖鎖修飾を受けていることが多く、生産宿主である動物細胞および植物細胞の糖鎖修飾の相違について示している。植物型糖鎖修飾を受けた医療用タンパク質が持つ問題の可能性について言及し、その上で、植物のもつ糖鎖修飾経路を改変する技術を開発し、医療用タンパク質生産の目的に適した組換えベンサミアナタバコ植物を作出し、その植物で組換え GCase 生産を試みる有効性を示して、本研究の目的を述べている。

第二章では、ベンサミアナタバコ植物における GCase の効率的生産を目指し、最も効果的に組換え GCase を生産する遺伝子発現カセットを選択している。植物において効率的に外来遺伝子を発現する遺伝子カセットである翻訳エンハンサーおよびターミネーターを用い、6 種の発現ベクターの組合せを作成してベンサミアナタバコ植物に導入している。そして、目的遺伝子を安定的に発現する T_2 世代ベンサミアナタバコ植物体の葉の抽出液を用いて、酵素活性およびウェスタン解析を行い、GCase の生産性を比較している。その結果、シロイヌナズナ由来アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（AtADH）の 5'非翻訳領域（5'-UTR）と熱ショックタンパク質（HSP）ターミネーターを組合わせた AT-GC-HSP ベクターを持つベンサミアナタバコ植物（NbAT-GC-HSP#19）が最も GCase の高生産を示す結果を得ている。続いて、130-140 g の葉から、組換え GCase をの 2 つのクロマトグラフィーを用いて精製し、精製組換え GCase を 1 mg 得る収率で調製できることを示している。

第三章では、植物生産システムの糖鎖修飾機能を改変し、ヒトに近いヒト型糖鎖合成システムをベンサミアナタバコ植物に構築した過程を述べている。植物由来糖タンパク質で見られるβ1,2 キシロースとコアα1,3 フコースを持つ糖植物型鎖構造は、植物生産システムを利用した外来タンパク質生産の場合でも付加され、抗原性が懸念されている。研究では、ベンサミアナタバコ植物内在性の N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I（GNTI）に注目し、RNA 干渉（RNAi）技術を用いて GNTI 遺伝子の発現抑制技術を開発している。得られた糖鎖改変ベンサミアナタバコ植物（NbGNTI-RNAi#7）では、植物型糖鎖の存在量が野生型ベンサミアナタバコ植物由来糖鎖構造の 89.3%であるのに対して、糖鎖構造のわずか 9.1%まで物型糖鎖付加量を顕著に減少させる、また非還元末端がマンノースである糖鎖を合成

できる糖鎖改変ベンサミアナタバコ植物の作出に成功している。

第四章では、糖鎖改変ベンサミアナタバコ植物で生産した組換え GCase の機能、すなわち生物学的活性について調査している。ゴーシェ病患者の ERT のためには組換え GCase の非還元末端がマンノースであることが好ましい。そこで、第二章、第三章に手構築した 2 種の植物（NbAT-GC-HSP#19 および NbGNTI-RNAi#7）を交配し、植物における糖鎖改変型 GCase の生産について述べている。交配したベンサミアナタバコ植物より、GCase の工っそ活性測定およびウェスタン解析を行い、GCase 高生産性を示す植物 $NbGC^{gntI}$ を選抜している。T_2 世代 $NbGC^{gntI}$ より精製した GCase 糖鎖改変型 GCase（$GCase^{gntI}$）について、糖鎖付加部位毎の糖鎖修飾プロファイルを調査し、各糖鎖が 73.3%から最大 85.5%までの範囲で非還元末端にマンノースを有することを示している。同時に、キシロースもしくはフコースを持つ植物型糖鎖含量が 14.5%から 26.7%にまで減少したことを報告している。さらに、$GCase^{gntI}$ はマンノース受容体を介してマクロファージ細胞内に取り込まれ、またマウスを用いた投与実験では肝臓および脾臓に蓄積し、ゴーシェ病の治療における標的器官に局在することを示している。

第五章では本論文の結果をまとめ、考察している。本論文で構築した植物における組換え医療用タンパク質生産の有効性、糖鎖改変型組換えタンパク質生産系の優位性を述べ、今後の医療タンパク質の植物による生産系の具体的な応用例および展望について議論している。

以上のように、本論文は医療用タンパク質生産系としての植物の実用性を述べ、糖鎖修飾改変技術の開発という生物工学的手法により機能改変有用植物を作出し、その植物を用いて生産した GCase の生物学的効果を示している。本成果は植物における医療用糖タンパク質生産への応用の基盤技術となることが十分に期待される、よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。