OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Production of recombinant β-glucocerebrosidase in wild type and glycoengineered Nicotiana benthamiana using various plant expression systems
Author(s)	Uthailak, Naphatsamon
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85365
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 (UTHAILAK NAPHATSAMON)	
Title	Production of recombinant β-glucocerebrosidase in wild type and glycoengineered *Nicotiana benthamiana* using various plant expression systems (野生型および糖鎖修飾改変型*Nicotiana benthamina*での種々の発現システムによるβ-グルコセレブロシダーゼの生産)

Abstract of Thesis

In Chapter 1, plant-based expression system was introduced as one of attractive platforms for the production of therapeutic glycoproteins with many advantages. However, its nonhuman *N*-glycans have the potential to induce immunogenicity. To overcome this issue, the glycoengineered plants have been used for the production of therapeutic protein with desired *N*-glycan structures. Recombinant β-glucocerebrosidase (GCase) has been used in the treatment of Gaucher disease, a lysosomal storage disorder caused by the deficiency of functional GCase. Since terminal mannose resides on *N*-glycans is essential for the uptake of recombinant GCase into macrophages via mannose receptor, the *gntI*-downregulated *Nicotiana benthamiana* (ΔgntI) plants were used for the production of GCase in this study. This plant was established by the knockdown of *gntI* gene, encoding for the enzyme *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI), and resulted in the terminal mannose *N*-glycan structures. Recombinant GCase was produced and purified in both stable expression (root culture) and transient expression using the wild type and ΔgntI *N. benthamiana* plants.

In Chapter 2, among plant-expression platforms, root culture system was applied, because the system is independent from the climate and provides high biomass in the simple and inexpensive media. Root culture of the transgenic GCase plant established in previous study was successfully generated by the induction of indole-3 acetic acid at the concentration of 1.0 mg/L. Crude activity, specific activity, and productivity of purified GCase produced in transgenic GCase roots were 80 Units/mg total soluble protein (TSP), 1600 Units/mg TSP, and 1 μg/g fresh roots, respectively. The *N*-glycan structure Man3XylFucGlcNAc2 was predominant in purified GCase in all three *N*-glycosylation sites at asparagine 59, 146 and 270.

In Chapter 3, to improve root biomass, indole-3-butyric acid (IBA) were used for the induction of roots. The concentration of IBA and cultivation time were optimized. The ΔgntI-GCase root culture was generated by the induction of IBA under the optimal condition (0.1 mg/L for 4 weeks). Crude activity, specific activity, and productivity of purified $GCase^{\Delta gntI}$ were 96 Units/mg TSP, 1950 Units/mg TSP, and 1.9 μg/g fresh roots, respectively. Notably, GCase possessed abundant mannosidic-type *N*-glycan structure (97.8-100%). The predominant *N*-glycan structure in all three *N*-glycosylation sites was Man5GlcNAc2 (34.6-62.7%).

In Chapter 4, *Agrobacterium-mediated* transient expression was used for the production of recombinant proteins due to the rapid protein production with high expression level. Recombinant GCase was produced as an active protein in WT and ΔgntI plants. Crude activity, specific activity, and productivity of $GCase^{WT}$ were 150 Units/mg TSP, 3300 Units/mg TSP, and 0.45 μg/g of fresh leaves, respectively. The predominant *N*-glycan structure was a GlcNAc2Man3XylFucGlcNAc2. In the case of $GCase^{\Delta gntI}$, the crude activity, specific activity, and productivity were 153 Units/mg TSP, 2000 Units/mg TSP, and 2.6 μg/g of fresh leaves, respectively. The Man5GlcNAc2 was predominant in three *N*-glycosylation sites. Notably, all *N*-glycan structures were detected as a mannosidic type (100%), which contains terminal mannose residues without any plant-specific sugars.

In Chapter 5, four production platforms used in this study were compared and evaluated. The transient production in ΔgntI plant was the most suitable platform for the production of recombinant GCase due to the highest crude enzyme activity, productivity and percentage of mannosidic-type *N*-glycan structure (100%). The *in vivo* enzymatic assay should be performed to confirm the biological properties of GCase.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　UTHAILAK NAPHATSAMON　）		
	(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	本田孝佑

論文審査の結果の要旨

第 1 章の緒論では、植物を用いた組換えタンパク質の特徴を述べている。植物ベースの発現システムは、培養コストが低く、培養等の生産に関する拡張性の高さや、翻訳後修飾があり、ヒト病原体による汚染のリスクがないなど、多くの利点を備え、治療用糖タンパク質の生産にとって魅力的な製造宿主の 1 つである。ただし、それらの非ヒト型 N 型糖鎖は免疫原性応答を誘導する可能性が懸念されている。この問題を克服するため、植物の糖鎖修飾能改変を行い、目的とする糖鎖構造を有する治療用タンパク質を生産している。組換えβ-グルコセレブロシダーゼ（GCase）は、マクロファージの機能的 GCase の欠損によって引き起こされるリソソーム蓄積症であるゴーシェ病の治療に使用されてきた。末端にマンノース残基を持つ糖鎖が存在することが、マンノース受容体を介したマクロファージへの組換え GCase の取込みに不可欠である。この研究では、*GnTI* 遺伝子発現を抑制した *Nicotiana benthamiana*（以下、ベンサミアナタバコ）植物（ΔgntI）を GCase 生産に使用している。この植物は、酵素 *N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I（GnTI）をコードする *GnTI* 遺伝子発現をノックダウンさせて確立され、末端にマンノース残基を持つ N 型糖鎖構造を保持するタンパク質の生産が可能となった（Limkul et al、2016）。

組換え GCase を、野生型とΔgntI ベンサミアナタバコ植物を使用して、安定発現系（根培養）と一過性発現系（インフィルトレーションした葉）の両方で生産し、精製して調査した。この研究では、各システム間の粗抽出液中の酵素活性、比活性、生産性、および N 型糖鎖組成について比較して、生産方法について議論している。

第 2 章では、ベンサミアナタバコの根の培養におけるヒト組換え GCase の生産について検討している。植物発現プラットフォームの中で、根培養は野外栽培条件から独立しており、シンプルで安価な培地の下で高バイオマスを提供する。根培養は、通常、*Agrobacterium rhizogenes* の遺伝子導入により確立されるが、この章では、植物オーキシンホルモンを使用し、根培養を誘導している。以前の研究（Limkul et al、2015）で確立されたトランスジェニック GCase 生産植物（At-GC-HSP＃19）の根培養を、根の成長と発達を促進するインドール-3 酢酸（IAA）の濃度 1 mg/ml にて誘導している。At-GC-HSP＃19 の根で生産した精製 GCase の粗抽出液中の酵素活性、比活性、生産性は、それぞれ約 81.4 ユニット/ mg 総可溶性タンパク質(TSP)、1618.8 ユニット/mg TSP、1.0 μg/g-root だった。Man3XylFucGlcNAc2(M3XFGN2)構造は、精製 GCase のアスパラギン残基 59、146、および 270（N59、N146、および N270）の 3 つの N 型糖鎖付加部位すべてにおいて、主要な N 型糖鎖として確認している。

第 3 章では、糖鎖修飾能改変型ベンサミアナタバコの根の培養による末端マンノース型 N 型糖鎖構造を持つβ-グル

コセレブロシダーゼの生産について調査している。根のバイオマス量を改善するために、IAA とインドール-3-酪酸（IBA）のそれぞれを用いて根を誘導している。 IBA の濃度と培養時間も最適化している。根培養とΔgntI 植物の利点を組み合わせるために、ΔgntI-GCase を生産する根培養を、IBA を最適な条件下（4 週間、0.1 mg/L）で誘導している。根培養により生産した精製 rGCase$^{\Delta gntI}$ の粗抽出液中の酵素活性、比活性、および生産性は、それぞれ約 103.7 ユニット/mg TSP、1956.3 ユニット/mg TSP、および 2.0 μg/g-fresh leaf である。特に、精製 GCase は、97.8-100%の範囲の高いマンノシド型構造の割合で機能を有するタンパク質として生産している。 3 つの N 型糖鎖付加部位（N59、N146、および N270）のすべてに見られる主要な N 型糖鎖構造は、Man5GlcNAc2（M5GN2）で 34.4-62.7%である。

第 4 章では、糖鎖修飾能改変したベンサミアナタバコ植物におけるマンノース型 N 型糖鎖構造を持つヒトβ-グルコセレブロシダーゼの一過性発現系による生産について調査している。

アグロバクテリウムを用いた一過性発現系は、高い発現レベルで迅速に生産できるため、組換え治療用タンパク質の生産に汎用されている。迅速な遺伝子発現については、一過性発現系はパンデミック時にワクチンや薬を生産する能力も有する。この研究では、組換え GCase を、WT およびΔgntI ベンサミアナタバコ植物で活性タンパク質として生産し、精製している。 GCase^{WT} の粗抽出液中の酵素活性、比活性、生産性は、それぞれ約 149.7 ユニット/mg TSP、3300 ユニット/mg TSP、0.45 μg/g-fresh leaf で、主要な N 型糖鎖構造は GN2M3XFGN2 である。 GCase$^{\Delta gntI}$ の場合、粗抽出液中の酵素活性、比活性、生産性は、それぞれ約 153.6 ユニット/ mg TSP、2000 ユニット/ mg TSP、2.6 μg/ g-fresh leaf である。WT 植物とは異なり、M5GN2 が 3 つの N 型糖鎖付加部位で主要構造である。特に、すべての可能な構造は、植物特異的な糖残基を含まず、末端マンノース残基を含むマンノース型が 100%である。

第 5 章では、結論と展望を述べた。組換え GCase を、さまざまなプラットフォームで機能を持つタンパク質として正常に生産でき、および精製している。試験したプラットフォームは、WT およびΔgntIN、またベンサミアナタバコ植物の根の培養およびアグロインフィルトレーションした葉である。各プラットフォームは、粗抽出液中の酵素活性、比活性、生産性などの異なる GCase 特性を提示している。予想通り、ΔgntI 植物において生産した GCase では、植物特異的な糖残基を含まない末端マンノース構造を認めているた。特に、各システムで生産された GCase では、異なる N 型糖鎖のプロファイルが観察している。4 つのプラットフォームの中で、ΔgntI 植物での一過性発現系による生産は、高い粗酵素活性、生産性、およびマンノシド型 N 型糖鎖構造の高い割合（100%）を示し、GCase の生産に最も適したプラットフォームと言える。将来的には、GCase の生物学的特性を確認するために、*in vivo* 酵素アッセイと組換え GCase のマクロファージへの取り込みを行う必要性を述べている。

以上のように、本論文は、野生型とΔgntI の 2 種のベンサミアナタバコ植物を使用して、安定発現系（根培養）と一過性発現系（インフィルトレーションした葉）の両方でゴーシェ病治療用酵素 GCase を生産した。高い粗酵素活性、生産性、および N 型糖鎖構造を比較し、適した植物生産系を提案している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。