

Title	High level production methods and unique characteristics of intracellular and secreted acid-stable human basic fibroblast growth factor in <i>Nicotiana benthamiana</i>
Author(s)	Macauyag, Aaron Edjohn
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91907
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

Abstract of Thesis

Name (EDJOHN AARON BRIONES MACAUYAG)	
Title	High level production methods and unique characteristics of intracellular and secreted acid-stable human basic fibroblast growth factor in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ニコチアナ ベンサミアナにおける細胞内型および分泌型の酸安定性ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子の高生産法とその特徴に関する研究)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Chapter 1 General Introduction</p> <p>Human basic fibroblast growth factor is a notoriously unstable protein that has bioactivities that include growth regulation, differentiation, migration, and survival of various cell types. This has made bFGF of crucial importance in the regenerative medicine and cosmetic industries. Because of its high demand and the difficulties in expressing this recombinant protein in previous expression platforms, alternative expression systems are becoming of utmost importance. In this dissertation, a high-level production system of an intracellular acid-stable form of bFGF (ASbFGF) in <i>Nicotiana benthamiana</i> was developed. Furthermore, a simpler and more scalable secreted production system in a porous, culture media deprived expression platform, plant cell packs (PCP), was explored.</p> <p>Chapter 2 High level transient production of acid-stable basic fibroblast growth factor in <i>Nicotiana benthamiana</i> leaves</p> <p>A high-level bFGF production system was achieved using <i>Agrobacterium</i>-mediated transient expression system using a ASbFGF which have Cys70Ser and Cys88Ser mutations. The use of this variant doubled the production to reach around 185 µg ASbFGF/g FW of leaves. Furthermore, its rate of degradation/aggregation in leaf crude extracts was found out to be 3-fold slower than the wild type bFGF. Overall, this study demonstrates a high-level transient ASbFGF production system in <i>N. benthamiana</i> leaves, as well as an efficient tag-less purification technique of leaf crude extracts.</p> <p>Chapter 3 Production of secreted acid-stable basic fibroblast growth factor in <i>Nicotiana benthamiana</i> plant cell packs</p> <p>Here, a novel stable transgenic secreted ASbFGF producing plant cell pack system (PCP) was developed. This PCP was derived from stable transgenic secreted ASbFGF producing suspension cells which were created through <i>Agrobacterium</i>-mediated transformation using a fusion of ASbFGF with <i>N. benthamiana</i> extensin signal sequence (SS^{Ext}). Overall, this study shows how the stable transgenic SS^{Ext}ASbFGF producing <i>N. benthamiana</i> PCP could potentially be an efficient method for the industrial production of this protein. In addition, this also provides some novel observations on the truncation of its secreted ASbFGF products and the acquired trait of resilience of the stable transgenic SS^{Ext}ASbFGF producing <i>N. benthamiana</i> cells.</p> <p>Chapter 4 General Conclusions and Perspectives</p> <p>In addition to alternative production systems per se, this study also provided new and useful methods and findings. First, this study shows that bFGF can be purified without a tag in <i>N. benthamiana</i> crude leaf extracts. Secondly, this study developed a new ELISA method for quantifying bFGF in leaf crude extracts. This technology paves the way for a quicker and cheaper quantification method of bFGF produced in plants.</p> <p>In general, this study provided important advancements in the technologies regarding recombinant bFGF production in plants while discovering unique features of the novel production systems. These methods could potentially lead to more efficient production and studies of bFGF in plants.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (EDJOHN AARON BRIONES MACAUYAG)			
	(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			
<p>第 1 章. 緒論</p> <p>ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、不安定なタンパク質であるが、さまざまな細胞の増殖調節、分化、遊走、生存に関わる生物活性を持つ。このため bFGF は、再生医療および化粧品業界で非常に重要である。bFGF は高い需要があるものの、以前の発現プラットフォームでは組換えタンパク質を発現することが難しいため、代替発現システムが最も重要になりつつある。本論文では、ニコチアナ・ベンサミアナ (以下、ベンサミアナタバコ) における細胞内酸安定型 bFGF (ASbFGF) の高レベル生産システムを開発している。さらに、多孔性で培養培地欠損型の発現プラットフォームである植物細胞パック (PCP) を用いて、よりシンプルでスケーラブルな分泌型生産システムについて研究している。</p>			
<p>第 2 章. ベンサミアナタバコ葉における酸安定型 bFGF の一過性発現による高生産</p> <p>Cys70Ser および Cys88Ser の変異を持つ ASbFGF を作成し、アグロバクテリウムを用いた一過性発現系により、高レベルの bFGF 産生を達成した。この変異体を使用すると ASbFGF の生産量が 2 倍になり、葉の新鮮重量 1g あたり約 185 μg の生産に達した。さらに、葉の粗抽出物におけるその分解/凝集速度は、野生型 bFGF よりも 3 倍遅いことを見出した。本研究はベンサミアナタバコ葉における高レベルの一過性 ASbFGF 生産システムと、葉の粗抽出物からのタグのない効率的な精製技術を示している。</p>			
<p>第 3 章. ベンサミアナタバコ植物細胞パックにおける分泌された酸安定型 bFGF の生産</p> <p>安定して ASbFGF 生産ができるトランスジェニック植物細胞パックシステム (PCP) を新しく開発した。この PCP は、アグロバクテリウムによる形質転換によって作成された、ベンサミアナタバコ由来エクステンシンのシグナル配列 (SS^{Ext}) を融合した ASbFGF を発現する懸濁細胞で、安定して分泌型 ASbFGF を生産する。本研究では、安定して SS^{Ext}ASbFGF を生産するトランスジェニックベンサミアナタバコ PCP システムが、このタンパク質の工業生産のための効率的な方法である可能性があることを示している。さらに、この PCP はまた、その分泌された ASbFGF 産物の切断と、SS^{Ext}ASbFGF を産生する安定したトランスジェニックベンサミアナタバコ細胞が獲得した形質に関する新しい観察結果が得られた。</p>			
<p>第 4 章. まとめと今後の展望</p>			

代替生産システム自体に加えて、本研究では新しく bFGF 生産における新しく有用な方法と知見を得た。まず、この研究は、ベンサミアナタバコ葉抽出物よりタグのない bFGF を精製できることを示している。第二に、葉の粗抽出物中の bFGF を定量化するための新しい ELISA 法を開発している。この技術により、植物で生成された bFGF をより迅速で安価な定量化することを可能にしている。

本研究は、植物を用いた組換え bFGF 生産に関する技術に重要な進歩をもたらし、新しい生産システムのもつユニークな特徴を発見した。これらの方法は、植物における bFGF のより効率的な生産と研究につながる可能性がある。

以上のように、本論文はニコチアナ・ベンサミアナによる bFGF 高生産システムの基盤を確立している。まず酸安定型 ASbFGF を構築し一過性発現による高生産系を示した。ASbFGF の生産量が 2 倍になり、葉の新鮮重量 1g あたり約 185 μ g の生産に達した。また、安定して組換えタンパク質を生産できるトランスジェニック植物細胞パッキングシステム (PCP) を新しく開発した。この PCP により、同植物由来タンパク質のシグナルペプチドと融合した bFGF を用いて効率的な方法である可能性があることを示した。以上、本研究で得た酸安定型 ASbFGF の一過性発現による高生産系と、新しく開発した PCP が組換えタンパク質生産プロセスとして応用可能であり、生産した組換え bFGF の社会実装化とつながる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。