OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	CRISPR/Cas9-mediated knockouts of ALG3 and GNTI in Nicotiana benthamiana lead to predominant mannosidic N-glycans lacking plant-specific epitopes
Author(s)	Bataa, Dolgormaa
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105411
rights	
Note	

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 （BATAA DOLGORMAA）	
Title	CRISPR/Cas9-mediated knockouts of *ALG3* and *GNTI* in *Nicotiana benthamiana* lead to predominant mannosidic *N*-glycans lacking plant-specific epitopes (CRISPR/Cas9 による *Nicotiana benthamiana* の *ALG3* および *GNTI* 遺伝子ノックアウトは、植物特異的エピトープを欠くマンノシド型 *N*-グリカンの生成を導く)

Abstract of Thesis

Chapter 1: General introduction

Various host organisms have been utilized to produce recombinant therapeutic monoclonal antibodies, enzymes, vaccines, and hormones. An efficient production is vital for meeting fast expanding global healthcare needs. *Nicotiana benthamiana* has emerged as a potential alternative expression host that offers low cost, ease of scaling up, absence of animal and human pathogens, and ability to perform post-translational modifications. But its development has been partly impeded by the presence of plant-specific *N*-glycosylation which causes possible immunogenicity to humans. *N*-Glycosylation affects the efficacy, safety, and pharmacokinetic properties of pharmaceutical proteins. With the expanding capabilities of gene editing technologies, *N*-glycosylation pathway of *N. benthamiana* has been engineered to remove plant specific epitopes β1,2-xylose and α1,3-fucose and produce more humanized *N*-glycan structures. However, depending on the requirements of the target proteins, humanized *N*-glycans are not always desirable, especially in the case of lysosomal enzymes that require high-mannose *N*-glycans for their transport to lysosomes. Furthermore, from a quality control perspective, *N*-glycan heterogeneity remains a critical challenge that need to be overcome.

Therefore, this research aimed to produce more homogenous mannosylated *N*-glycans in *N. benthamiana* by targeting the key enzymes involved in *N*-glycan branching, α1,3-mannosyltransferase (ALG3) and *N*-acetylglucosaminyltransferase I (GNTI) genes with multiplex CRISPR/Cas9 genome editing tool. *N*-Glycan profile and phenotypes of the generated single (*alg3* or *gntI*) and double (*alg3gntI*) knockout mutants were characterized. To further assess the impact of the engineered *N*-glycosylation pathway, two therapeutic proteins, Varlilumab (an anti-CD27 antibody) and β-glucocerebrosidase (GCase), were transiently expressed in the wild-type (WT) and mutant plants as model *N*-glycoproteins, and the *N*-glycosylation patterns were analyzed. The results revealed valuable insight into *N*-glycosylation machinery of *N. benthamiana* and its capability as a production host for biopharmaceuticals.

Chapter 2: Development of *N. benthamiana* with more homogenous *N*-glycan profile by targeting ALG3 *and* GNTI enzymes with multiplex CRISPR/Cas9 genome editing tool

Firstly, the candidate genes of ALG3 and GNTI enzymes were identified in *N. benthamiana* and targeted with multiplex CRISPR/Cas9 editing tools. After several rounds of *Agrobacterium* mediated stable transformation, plantlet generation, and thorough screening, T_3 single (*alg3* or *gntI*) and double (*alg3gntI*) mutants were obtained. The whole *N*-glycan analysis revealed disruption of *ALG3* did not alter the *N*-glycan profile substantially, except a trace of immature ER-resident *N*-glycans. As expected, the disruption of *GNTI* resulted in predominant $Man_5GlcNAc_2$ *N*-glycans. Lastly, double disruption of *ALG3* and *GNTI* resulted in short-mannnosidic *N*-glycans with 77.0% of these being $Man_3GlcNAc_2$. The result suggested disruption of *GNTI* arrested *N*-glycan maturation in the *trans*-Golgi leading to absence of plant-specific *N*-glycans. On the other hand, double disruption detained the *N*-glycan synthesis in the ER and Golgi, resulting highly uniform trimannosyl *N*-glycans in *N. benthamiana.*

Moreover, morphological phenotypes were assessed to determine whether loss of function in glycosylation enzymes resulted in visible developmental changes. Although, *alg3* and *gntI* mutant lines showed normal growth under standard conditions, double disruption of *ALG3* and *GNTI* led to altered leaf morphology, dwarf phenotype,

and root growth abnormality. The root growth impairment in *alg3gntI* was partially rescued by ascorbic acid supplementation suggesting the possible ER stress-derived oxidative stress in the mutant. These results show how the certain changes in *N*-glycosylation led to growth defects in certain species, highlighting the intricate relationship between plant *N*-glycosylation machinery and physiology.

Chapter 3: Production of recombinant therapeutic proteins in *N. benthamiana alg3, gntI, alg3gntI* mutants

In this chapter, two representative pharmaceuticals, Varlilumab and GCase were expressed in the mutants to assess how the engineered *N*-glycosylation machinery works on two distinct proteins. *N*-Glycan composition of the proteins expressed in *gntI* plant was mainly $Man_5GlcNAc_2$ at all sites suggesting that *gntI* can be a well-suited platform for lysosomal enzyme production. On the other hand, both proteins expressed in *alg3gntI* predominantly carried trimannosidic *N*-glycans. Interestingly, substantial amount of glucosylated immature ER *N*-glycans were detected in the Varlilumab expressed in *alg3* and *alg3gntI* mutants but not detected in the GCase. Moreover, the non-*N*-glycosylated heavy chain amount was higher in *alg3gntI* and *alg3* than WT and *gntI* plants. This observation suggested insufficient transfer of oligosaccharides and possible ER stress due to loss of ALG3 enzyme. Additionally, spatially buried feature of antibody *N*-glycans may have contributed to the presence of immature glucosylated structures by limiting the access of ER glycosidases.

Chapter 4: General conclusion and future perspective

In this study, multiplex CRISPR/Cas9 gene editing tool was adapted to manipulate the *N*-glycosylation pathway of *N. benthamiana* by targeting the *ALG3* and *GNTI* genes. Through extensive selection and identification, *N. benthamiana alg3*, *gntI*, and *alg3gntI* knockout mutant plants were successfully obtained. Disruption of either *ALG3* or *GNTI* individually did not affect the overall growth and the morphology. On the other hand, double disruption of the *ALG3* and *GNTI* caused possible ER stress and other physiological changes leading to dwarf phenotype, impaired root growth, curled leaves. Highly homogenous mannosidic *N*-glycan profile was achieved in *N. benthamiana gntI and alg3gntI*, making them suitable expression host for lysosomal enzyme therapeutics, especially after further optimization.

Future work will focus on the generation of the null mutants by cross-pollination with *N. benthamiana* WT. Development of suspension cell culture derived from *alg3gntI* mutant may address the growth abnormality related challenges. Moreover, *in vitro* activity of the recombinant therapeutics produced in these mutants should be evaluated and compared with other host systems to further assess the potential of these mutants.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ BATAA DOLGORMAA ）		
	（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	本田　孝佑

論文審査の結果の要旨

第 1 章の緒論では、植物 *Nicotiana benthamiana* を用いた組換え治療用タンパク質生産、植物における糖鎖修飾の概要について述べている。組換え治療用タンパク質であるモノクローナル抗体、酵素、ワクチン、ホルモンの生産には、さまざまな宿主生物が利用されている。急速に拡大する世界的な医療ニーズに対応するためには、効率的な生産体制の確立が不可欠である。*N. benthamiana* は、低コストでスケールアップが容易であり、動物およびヒト由来病原体を含まず、さらに翻訳後修飾能力を有することから、有望な代替発現宿主として注目されている。しかしながら、植物特異的な *N*-結合型糖鎖修飾の存在が、ヒトに対する潜在的な免疫原性の可能性があるため、その発展が遅れている。*N*-結合型糖鎖修飾は、医薬品タンパク質の有効性、安全性、および薬物動態特性に大きな影響を及ぼす。近年のゲノム編集技術の進展により、*N. benthamiana* の *N*-結合型糖鎖修飾経路を改変でき、植物特異的糖鎖エピトープである β 1,2-キシロースおよび α 1,3-フコースを除去し、よりヒト型に近い *N*-結合型糖鎖構造を産生することが可能となっている。しかしながら、標的タンパク質の特性によっては、ヒト型化糖鎖が常に望ましいとは限らない。特にリソソーム酵素の場合、リソソームへの輸送には高マンノース型 *N*-結合型糖鎖が必要である。また、品質管理の観点からも、*N*-結合型糖鎖の不均一性は依然として克服すべき重要な課題である。

そこで本研究では、*N*-結合型糖鎖の分岐に関与する主要酵素である α 1,3-マンノシルトランスフェラーゼ（ALG3）および *N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I（GNTI）遺伝子を、マルチプレックス CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術の対象とし、*N. benthamiana* においてより均一なマンノース型糖鎖の産生を目指している。作製した単独欠損変異体（alg3 または gntI）および二重欠損変異体（alg3gntI）の *N*-結合型糖鎖プロファイルおよび表現型を解析している。さらに、改変された *N*-結合型糖鎖修飾経路の影響を評価するため、2 種類の治療用タンパク質、すなわち抗 CD27 抗体 Varlilumab および β-グルコセレブロシダーゼ（GCase）をモデル *N*-結合型糖鎖修飾タンパク質として野生型（WT）および変異体植物で一過性発現させ、その *N*-結合型糖鎖構造プロファイルを解析している。本研究の結果は、*N. benthamiana* における *N*-結合型糖鎖修飾機構およびバイオ医薬品生産宿主としての可能性に関する有益な知見を提供するものである。

第 2 章では、ALG3 および GNTI を対象としてマルチプレックス CRISPR/Cas9 を用いてゲノム編集を行い、均一な *N*-結合型糖鎖構造プロファイルを有する *N. benthamiana* の開発を試みている。まず、*N. benthamiana* における ALG3 および GNTI 酵素の候補遺伝子を同定し、マルチプレックス CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツールの対象にしている。アグロバクテリウムを媒介にした安定的な形質転換、植物体再生、および厳密なスクリーニングを複数回実施した結果、T3 世代の単独欠損変異体（alg3 または gntI）および二重欠損変異体（alg3gntI）を取得している。全 *N*-結合型糖鎖構造解析の結果、ALG3 の欠損は未成熟な小胞体（ER）局在型 *N*-結合型糖鎖構造がわずかに検出された以外、全体的な *N*-結合型糖鎖構造プロファイルに大きな変化が見られない。一方、GNTI の欠損では、予想通り $Man_5GlcNAc_2$ 型 *N*-結合型糖鎖

が優勢である。さらに、ALG3 および GNTI の二重欠損では、短鎖マンノース型糖鎖が形成され、その 77.0%が $Man_3GlcNAc_2$ である。これらの結果は、GNTI の欠損がトランスゴルジ体における *N*-結合型糖鎖成熟を停止させ、植物特異的 *N*-結合型糖鎖の形成を阻止することを示唆している。一方、二重欠損では ER およびゴルジ体の段階で *N*-結合型糖鎖合成が停止し、*N. benthamiana* において高度に均一なトリマンノース型糖鎖が生成されている。

さらに、糖鎖修飾酵素の機能喪失が植物の形態形成に及ぼす影響を検討するため、形態学的表現型を評価している。その結果、alg3 および gntI 単独変異体は標準的な条件下で正常な生育を示しているが、ALG3 および GNTI の二重欠損では葉形の変化、矮性表現型、および根の成長異常を観察している。alg3gntI 変異体における根の成長障害は、アスコルビン酸の添加により部分的に回復したことから、変異体では ER ストレスに由来する酸化ストレスが生じている可能性が示唆されている。これらの結果は、*N*-結合型糖鎖の変化が種特異的に生育障害を引き起こす可能性を示し、植物の *N*-結合型糖鎖修飾機構と生理機能との密接な関係を明らかにしている。

第 3 章では、*N. benthamiana* alg3、gntI、alg3gntI 変異体において、２つの組換え治療用タンパク質の生産を試み、組換え治療用タンパク質の糖鎖構造が期待した糖鎖構造を改変できたことを述べている。改変された *N*-結合型糖鎖修飾機構が、Varlilumab および GCase を各変異体で発現させ、特性が異なるタンパク質にどのように糖鎖修飾するを評価している。gntI 変異体で発現したタンパク質の *N*-結合型糖鎖プロファイルは、すべての部位で主に $Man_5GlcNAc_2$ 型であり、gntI 変異体がリソソーム酵素生産に適したプラットフォームとなり得ることが示唆されている。一方、alg3gntI 変異体で発現した両タンパク質は、主としてトリマンノース型糖鎖を有している。

興味深いことに、alg3 および alg3gntI 変異体で発現した Varlilumab では、未成熟なグルコース付加型 ER 由来 N-糖鎖が相当量検出されたが、GCase では検出されていない。また、*N*-結合型糖鎖修飾されていない抗体重鎖の割合は、WT および gntI 植物と比較して alg3 および alg3gntI で高かった。このことは、ALG3 酵素の欠損によりオリゴ糖転移が不十分となり、ER ストレスが生じている可能性を示唆している。さらに、抗体の N-糖鎖が立体的に埋もれた構造を有することが、ER グリコシダーゼのアクセスを制限し、未成熟なグルコース付加型構造の残存に寄与した可能性も考えられる。

第 4 章では、総括および今後の展望を述べている。マルチプレックス CRISPR/Cas9 ゲノム遺伝子編集技術を用いて *N. benthamiana* の *N*-結合型糖鎖修飾経路を改変し、ALG3 および GNTI 遺伝子を標的化している。厳密な選抜および解析を経て、alg3、gntI、および alg3gntI 欠損変異体を取得することに成功している。ALG3 または GNTI の単独欠損は、植物の生育および形態に大きな影響を与えなかった。一方、ALG3 および GNTI の二重欠損は、ER ストレスの発生およびその他の生理学的変化を引き起こし、矮性、根の成長阻害、葉の巻縮といった表現型をもたらしている。gntI および alg3gntI 変異体では高度に均一なマンノース型 *N*-結合型糖鎖プロファイルが得られ、さらなる最適化を行うことで、リソソーム酵素治療薬の発現宿主として有望であると考えられる。

今後は、野生型 *N. benthamiana* との交配により完全欠損変異体の作出を進める予定である。また、alg3gntI 変異体由来の懸濁培養細胞系の開発により、生育異常に関連する課題の克服が期待される。さらに、これらの変異体で生産された組換え治療用タンパク質の in vitro 活性を評価し、他の発現宿主系と比較検討することで、本変異体系の実用的可能性をより詳細に明らかにする必要がある。

以上のように、本論文はゲノム遺伝子編集技術を用いて *N. benthamiana* の *N*-結合型糖鎖修飾経路を改変し、変異体植物で糖鎖構造が改変され、期待する糖鎖を持った組換え医療用タンパク質を生産できることが期待できる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。