



Title	Production of Human Recombinant Acid-Alpha Glucosidase (GAA) With Paucimannose Structure in Arabidopsis alg3 Cell Culture
Author(s)	Sariyatun, Ratna
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/87727">https://doi.org/10.18910/87727</a>
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 ( RATNA SARIYATUN )	
Title	Production of Human Recombinant Acid-Alpha Glucosidase (GAA) With Paucimannose Structure in <i>Arabidopsis alg3</i> Cell Culture (シロイヌナズナ <i>alg3</i> 培養細胞によるパウチマンノース構造を持つヒト組換え酸性アルファグルコシダーゼ(GAA) の生産)
<p><b>Abstract of Thesis</b></p> <p><b>Chapter 1 General introduction</b></p> <p>Plant cell cultures have emerged as an alternative platform for producing biopharmaceuticals due to their low cost, safety, and ability to control the cultivation and secrete products into culture medium. These features, however, are limited by the low production yield and nonhuman <i>N</i>-glycan structures, including <math>\beta</math>1,2-xylose (Xyl) and <math>\alpha</math>1,3-fucose (Fuc), which may induce allergic reaction. Therefore, it is necessary to engineer the plant cells to produce high yield and generate <i>N</i>-glycans similar to humans.</p> <p><i>Arabidopsis alg3</i> plant, lacking asparagine-linked glycosylation 3 (ALG3) activity, was shown previously to generate predominantly Man3GlcNAc2 (M3 or paucimannose; Man, mannose; GlcNAc, <i>N</i>-acetylglucosamine) with lower plant-specific <i>N</i>-glycans (<math>\beta</math>1,2-Xyl and <math>\alpha</math>1,3-Fuc). In this study, a suspension cell culture was developed from the <i>alg3</i> plant and used for producing human recombinant acid-alpha glucosidase (GAA). The effects of chemical additives to increase GAA production were also examined.</p> <p><b>Chapter 2 Analysis of <i>Arabidopsis alg3</i> cell culture for producing glycoproteins with predominantly paucimannose and lacking plant-specific <i>N</i>-glycans</b></p> <p>Intra- and extracellular <i>N</i>-glycans of <i>Arabidopsis alg3</i> cell culture were characterized. The intracellular <i>N</i>-glycans consisted of M3 (46.5%), GnM3 (37.7%), and Gn2M3 (15.8%), while the extracellular <i>N</i>-glycans comprised mainly M3 (24.5–62.0%) and GnM3 (24.3–70.7%). No plant specific <i>N</i>-glycans were detected. In contrast, the <i>Arabidopsis</i> wild-type cells carried mostly plant-specific <i>N</i>-glycans (41.6–100%).</p> <p>The <i>N</i>-glycan profile of <i>Arabidopsis alg3</i> cell culture is advantageous for producing biopharmaceuticals by offering cellular uptake through M3 interaction with Man receptor (MR) in humans and safety over potential immunogenicity induced by the plant-specific <i>N</i>-glycans.</p> <p><b>Chapter 3 Production of recombinant human acid-alpha glucosidase (GAA) in <i>Arabidopsis alg3</i> cell culture</b></p> <p>Recombinant human GAA is a costly enzyme for the therapy of people with Pompe disease. The therapy, however, is hampered by insufficient delivery of the enzyme to smooth and skeletal muscle cells due to low numbers of mannose-6-phosphate receptor on these cells. In this study, the <i>Arabidopsis alg3</i> cell culture was used to produce GAA with M3 <i>N</i>-glycan in order to mediate enzyme delivery through MR, known to be expressed on skeletal and smooth muscle cells. GAA was produced as 110 kDa precursor, 95 kDa intermediate, and 76 kDa mature forms. The 95 kDa and 76 kDa forms were secreted to the culture medium. GAA was purified from the culture medium using two-step chromatographies with a productivity of <math>60.9 \pm 12.4 \mu\text{g/l}</math>. <i>N</i>-Glycans on 95 kDa GAA (A390, A470, and A882) and 76 kDa GAA (A390 and A470) were characterized and contained mainly M3 structure (51.1–80.1%), without plant-specific structures. Supplementing the culture with NaCl at a final concentration of 50 mM increased GAA production by 3.8-fold (<math>228 \pm 21.1 \mu\text{g/l}</math>). GAA from NaCl-supplemented culture showed similar <i>N</i>-glycan composition, indicating that the NaCl supplementation did not affect GAA <i>N</i>-glycosylation.</p> <p><b>Chapter 4 Conclusions and Perspectives</b></p> <p><i>Arabidopsis alg3</i> cell culture produced mostly M3 <i>N</i>-glycan, known to enable delivery of glycoproteins via MR in humans, and lacked the plant-specific <i>N</i>-glycans. These <i>N</i>-glycan profile could be passed down to a recombinant human GAA produced in the cell culture. The GAA production was increased 3.8-fold in the presence of 50 mM NaCl. These findings highlight the feasibility of using <i>Arabidopsis alg3</i> cell culture for producing glycoproteins with cellular delivery through MR, and that NaCl addition could be an easy and economical way to increase the production yield.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( RATNA SARIYATUN )			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	藤山和仁
	副 査	教授	村中俊哉
	副 査	教授	大政健史

論文審査の結果の要旨

第 1 章の緒論では、植物細胞培養を用いた組換えタンパク質の特徴を述べている。植物細胞培養は、その低い生産コスト、安全性、培養を制御し培地に製品を分泌できることから、バイオ医薬品の有望な生産プラットフォームとして期待されている。しかし、これらの特徴は、低い生産収率と、アレルギー反応を引き起こす可能性のある  $\beta$  1, 2-キシロース (Xyl) と  $\alpha$  1, 3-フコース (Fuc) などの非ヒト型 *N* 型糖鎖構造により制限される。したがって、植物細胞培養を操作して、高収量を実現し、ヒトと同様の *N* 型糖鎖を生成する必要がある。

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) *alg3* 変異植物体は、アスパラギン結合型糖鎖付加 3 (ALG3) 酵素活性に変異があり、主に Man3GlcNAc2 (M3; Man、マンノース; GlcNAc、N-アセチルグルコサミン) 構造を生成し、植物特異的な残基  $\beta$  1, 2-Xyl および  $\alpha$  1, 3-Fuc を持つ *N* 型糖鎖が少ないことが以前に示されていた (Kajiura *et al.*, 2010)。この研究では、*alg3* 変異植物体より懸濁培養細胞を樹立し、ヒトの治療用酵素である酸性アルファグルコシダーゼ (GAA) の生産に用いている。GAA を培地から精製し、その *N* 型糖鎖を解析している。GAA 生産を増加させるための化学添加物の効果も調査している。

第 2 章では、主な構造としてパウチマンノース型糖鎖をもち、植物特異的 *N* 型糖鎖を欠く糖タンパク質を産生するためのシロイヌナズナ *alg3* 変異培養細胞の生成を述べている。シロイヌナズナ *alg3* 変異植物体より懸濁培養細胞を確立し、細胞内および細胞外 *N* 型糖鎖の特性を明らかにしている。シロイヌナズナ *alg3* 変異培養細胞の細胞内 *N* 型糖鎖は、M3 (46.5%)、GnM3 (37.7%)、および Gn2M3 (15.8%) で構成される。一方、シロイヌナズナの *alg3* 変異培養細胞の細胞外 *N* 型糖鎖は、主に M3 (24.5-62.0%) と GnM3 (24.3-70.7%) で構成される。*alg3* 変異培養細胞では、植物特異的な *N* 型糖鎖はイムノブロットでは若干検出できたが、質量分析を用いた分析では検出できない。対照的に、シロイヌナズナの野生型細胞は、主に植物特異的な *N* 型糖鎖 (41.6-100%) を有する。シロイヌナズナ *alg3* 変異培養細胞の *N* 型糖鎖プロファイルは、ヒトの Man 受容体 (MR) と M3 構造との相互作用による細胞取り込みが期待でき、植物特異的 *N* 型糖鎖によって誘導される潜在的な免疫原性に対する安全性が提供されるため、バイオ医薬品の製造に有利である。

第 3 章では、シロイヌナズナ *alg3* 変異培養細胞における組換えヒト酸性- $\alpha$ -グルコシダーゼ (GAA) の産生を述べている。

組換えヒト GAA は、ポンペ病患者の治療に用いる高価な酵素である。しかし、平滑筋および骨格筋細胞における細胞の

取り込みを仲介する Man-6-リン酸受容体 (M6PR) の数が少ないためにこれら細胞への酵素の移送が不十分となり、治療に支障が生じる。この研究では、平滑筋細胞で発現する MR による代替酵素の移送を仲介させることを考え、シロイヌナズナ *alg3* 変異細胞培養を使用して M3 構造の *N* 型糖鎖を持つ GAA の生成を試みている。GAA は 95kD の中間体と 76kD の成熟型として生成され、両方とも培地に分泌される。GAA を培地から 2 段階クロマトグラフィーを使用して精製し、その収量は  $60.9 \pm 12.4 \mu\text{g/l}$  である。95 kD GAA (N390、N470、および N882) および 76 kD GAA (N390 および N470) の糖鎖付加部位の *N* 型糖鎖構造を解析し、その構造は主に M3 構造 (51.1–80.1%) である。植物特異的な *N* 型糖鎖は、どの部位でも見られない。培養液に 50 mM NaCl を追加すると、GAA 産生が 3.8 倍増加し、 $228 \pm 21.1 \mu\text{g/l}$  となる。NaCl を追加した培養で生成された GAA は同様の *N* 型糖鎖構造を示し、NaCl を追加することによる GAA 生成の増加はすることは、GAA の *N* 型糖鎖付加に影響を与えないことを示している。

第 4 章では、結論と展望を述べている。シロイヌナズナの *alg3* 変異培養細胞は、ヒトで MR を介して糖タンパク質の送達を可能にすることが知られる M3 構造の *N* 型糖鎖を主に産生しており、植物特異的な *N* 型糖鎖を欠く。これらの *N* 型糖鎖のプロファイルは、培養細胞で生成される組換えヒト GAA でも確認できる。50 mM NaCl の存在下で GAA 生成は、*N* 型糖鎖組成が変化することなく、3.8 倍に増加している。これらの発見は、MR を介した細胞移送能力を持つ糖タンパク質をシロイヌナズナ *alg3* 変異培養細胞で生産することが実現可能であり、NaCl の添加は生産収量を増やすための簡便で経済的な方法であること示す。ポンペ病細胞または動物モデルにおける GAA 細胞送達を検証するため、さらなる研究が必要である。さらに、*gnt-I* 遺伝子をノックアウト/ダウンすることで GlcNAc 残基が M3 構造に付加することを抑え、*alg3* 変異培養細胞の *N* 型糖鎖の均一性を高めることができる。

以上のように、本論文は、シロイヌナズナ *alg3* 変異培養細胞により、組換えヒト酸性- $\alpha$ -グルコシダーゼ (GAA) を分泌産生する系を確立している。GAA を培地から精製し、糖鎖付加部位の *N* 型糖鎖構造は主に M3 構造 (51.1–80.1%) で、植物特異的な *N* 型糖鎖は確認できない。培養液に 50 mM NaCl を追加すると、GAA 産生が 3.8 倍増加し、*N* 型糖鎖付加に影響を与えないことを示している。シロイヌナズナ *alg3* 変異培養細胞は M3 構造の *N* 型糖鎖構造を持つ医療タンパク質を分泌産生する系を提案している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。