(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4954866号
(P4954866)

(45)発行日　平成24年6月20日(2012.6.20)　(24)登録日　平成24年3月23日(2012.3.23)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12R 1/84	(2006.01)	C12N	1/19	
		C12R	1:84	

請求項の数 18　(全 32 頁)

(21)出願番号　特願2007-510226 (P2007-510226)
(86)(22)出願日　平成17年4月29日 (2005.4.29)
(65)公表番号　特表2007-534330 (P2007-534330A)
(43)公表日　平成19年11月29日 (2007.11.29)
(86)国際出願番号　PCT/IB2005/051415
(87)国際公開番号　WO2005/106010
(87)国際公開日　平成17年11月10日 (2005.11.10)
審査請求日　平成20年4月28日 (2008.4.28)
(31)優先権主張番号　60/566,736
(32)優先日　平成16年4月29日 (2004.4.29)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/620,186
(32)優先日　平成16年10月18日 (2004.10.18)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　503007287
グライコフィ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニューハンプシャー　０３７６６，　レバノン，　ラファイエッテ　ストリート　２１，　スイート　２００
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　ボブローウイツ，ピヨートル
アメリカ合衆国、バーモント・０５００１、ホワイト・リバー・ジヤンクシヨン、ウツドヘイブン・ドライブ・２９２・９・ビー

審査官　戸来　幸男

前置審査　最終頁に続く

(54)【発明の名称】糖タンパク質の作製においてアルファ－マンノシダーゼ抵抗性グリカンを減少させるか又は排除する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

糖タンパク質上のα－マンノシダーゼ抵抗性グリカンの量を減少させた糖タンパク質組成物を宿主細胞ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）において作製する方法であって、Ｎ－グリカンのβ－マンノシル化に関与しているポリペプチドをコードする遺伝子の破壊又は欠失を通して前記宿主細胞を修飾し、前記遺伝子は配列番号：１２に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子であり、前記修飾された宿主細胞が糖タンパク質上のα－マンノシダーゼ抵抗性グリカンの量を減少させた糖タンパク質を作製することを含む前記方法。

【請求項２】

α－マンノシダーゼ抵抗性グリカンが、β－マンノース残基、分枝高マンノース残基、又はα－１，４マンノース残基を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

宿主細胞が、アルファ－１，６－マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の欠失をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

宿主細胞が、マンノシルホスフェート（ｍａｎｎｏｓｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｅ）トランスフェラーゼをコードする遺伝子の欠失をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

配列番号１３、配列番号１４及び配列番号１５からなる群より選択されるアミノ酸配列

を有するポリペプチドをコードする少なくとも一つの遺伝子の破壊又は欠失をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項６】

配列番号１３、配列番号１４及び配列番号１５からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする各遺伝子の少なくとも二つの破壊又は欠失をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項７】

配列番号１３、配列番号１４及び配列番号１５のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の破壊又は欠失をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項８】

前記糖タンパク質が、治療用糖タンパク質である請求項１に記載の方法。

【請求項９】

請求項１～８のいずれか一項に記載の方法により作製された宿主細胞。

【請求項１０】

請求項９に記載の宿主細胞により作製された糖タンパク質組成物。

【請求項１１】

糖タンパク質がＮ結合型グリカン又はＯ結合型グリカンのいずれかを含む、請求項１０に記載の糖タンパク質組成物。

【請求項１２】

α－マンノシダーゼ抵抗性グリカンを欠く治療用糖タンパク質を宿主細胞ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）において作製する方法であって、（ａ）配列番号：１２のアミノ酸配列を有するβ－マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が破壊又は欠失し、かつ治療用糖タンパクをコードする少なくとも一つの核酸分子を含む、宿主細胞ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）を提供し、（ｂ）前記治療用糖タンパク質が作製される環境下で前記宿主細胞を生育し、（ｃ）前記治療用糖タンパク質を回収することを含む前記方法。

【請求項１３】

宿主細胞が、アルファ－１，６－マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の欠失をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

宿主細胞が、マンノシルホスフェート（ｍａｎｎｏｓｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｅ）トランスフェラーゼをコードする遺伝子の欠失をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１５】

配列番号１３、配列番号１４及び配列番号１５からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする少なくとも一つの遺伝子の破壊又は欠失をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１６】

配列番号１３、配列番号１４及び配列番号１５からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする各遺伝子の少なくとも二つの破壊又は欠失をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１７】

配列番号１３、配列番号１４及び配列番号１５のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の破壊又は欠失をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１８】

前記治療用糖タンパク質が、エリスロポエチン、サイトカイン　インターフェロン－α、サイトカイン　インターフェロン－β、サイトカイン　インターフェロン－γ、サイトカイン　インターフェロン－ω、サイトカイン　顆粒球－ＣＳＦ、サイトカイン　ＧＭ－ＣＳＦ、凝固因子　ＶＩＩＩ因子、凝固因子　ＩＸ因子、凝固因子　ヒトプロテインＣ、凝固因子　アンチトロンビンＩＩＩ、凝固因子　トロンビン、可溶性ＩｇＥ受容体ａ鎖、ＩｇＧ、ＩｇＧ断片、ＩｇＧ融合体、ＩｇＭ、インターロイキン、ウロキナーゼ、キマー

ゼ、及び尿素（ｕｒｅａ）トリプシン阻害剤、ＩＧＦ結合タンパク質、上皮増殖因子、成長ホルモン放出因子、アネキシンＶ融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子－２、骨髄系前駆細胞阻害因子（ｍｙｅｌｏｉｄ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｆａｃｔｏｒ）－１、オステオプロテジェリン、α－１－アンチトリプシン、α－フェトプロテイン、ＤＮａｓｅＩＩ、ヒトプラスミノーゲンのクリングル３、グルコセレブロシダーゼ、ＴＮＦ結合タンパク質（ＴＮＦ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）１、卵胞刺激ホルモン、細胞障害性Ｔリンパ球関連抗原（Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｔ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ）４－Ｉｇ、膜貫通活性化カルシウム調整サイクロフィリンリガンド（ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ａｎｄ ｃａｌｃｉｕｍ ｍｏｄｕｌａｔｏｒ ａｎｄ ｃｙｃｌｏｐｈｉｌｉｎ ｌｉｇａｎｄ）、可溶性ＴＮＦ受容体Ｆｃ融合体、グルカゴン様タンパク質（ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｌｉｋｅ ｐｒｏｔｅｉｎ）１、ＩＬ－２受容体アゴニストである請求項８又は１２に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、下等真核生物におけるタンパク質グリコシル化工学の分野に関する。本発明は、さらに、治療用糖タンパク質の作製のための酵母及び糸状菌の宿主細胞の操作に関する。特に、本発明は、糖タンパク質上のα－マンノシダーゼ抵抗性グリカンの減少又は排除、及び酵母細胞のグリカンのα－マンノシダーゼ抵抗性の作成に関与している遺伝子を減少させるか又は排除する方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

組換えヒトタンパク質を作製する能力は、ヒト保健医療を大きく前進させており、依然として活発な薬物発見の分野である。多くの治療用タンパク質が、適切な構造－機能活性及びこの後のヒト血清中での安定性を保証するため、翻訳後のタンパク質の特定のアスパラギン残基へのグリカンの付加（Ｎ－グリコシル化）を必要とする。ヒトにおいて治療的に使用するためには、糖タンパク質は、ヒト様のＮ－グリコシル化を必要とする。ヒト様の糖タンパク質プロセシングを模倣することができる哺乳動物細胞系（例えば、ＣＨＯ細胞、ヒト網膜細胞）は、低いタンパク質力価、長い発酵時間、不均一な産物、及び継続的なウイルス封じ込めを含むいくつかの欠点を有する。従って、短い発酵時間で高いタンパク力価を産生し得るのみならず、ヒト様の糖タンパク質を産生することもできる発現系を使用することが望ましい。

【０００３】

メチロトローフ酵母ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）のような真菌宿主は、治療用タンパク質発現のための明瞭な利点を有しており、例えば、これは、多量の内因性タンパク質を分泌せず、強力な誘導可能プロモーターを有しており、明確な化学的培地において培養され得、かつ高力価の組換えタンパク質を産生し得る（Ｃｒｅｇｇら、２０００）。しかしながら、Ｐ．パストリスにおいて発現されたグリコシル化タンパク質は、「高マンノース」グリカンをもたらす付加的なマンノース糖を含有しており、さらに、糖タンパク質に負の電荷を与えるマンノシルホスフェート（ｍａｎｎｏｓｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｅ）基も含有する。高マンノースグリカン又は電荷を有するマンナンのいずれかを有する糖タンパク質は、ヒトにおいて免疫応答を誘発するリスクが高い（Ｔａｋｅｕｃｈｉ，１９９７；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ ａｎｄ Ｂａｌｌｏｕ，１９７４）。従って、グリコシル化のパターンがヒトのものと同一であるか又は少なくとも類似しているような真菌宿主系において治療用糖タンパク質を作製することが望ましい。

【０００４】

いくつかの真菌宿主は、糖タンパク質のグリカン上に免疫原性のβ－マンノシル化を含有する。抗原性を回避するため、ヒト様糖タンパク質の作製においてはβ－マンノシル化を排除することが望ましい。β－１，２－結合を有するオリゴマンノシドは、最初、ホス

ホジエステル架橋によるカンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）細胞壁ホスホペプチドマンナン（ｐｈｏｓｐｈｏｐｅｐｔｉｄｏｍａｎｎａｎ）に関連してＳｈｉｂａｔａら（１９８５）により記載された。この後、３つの型のβ－１，２結合が、カンジダ細胞壁マンナンの側鎖において同定された。第１は、いくつかのカンジダ種のマンナンの中の共通のエピトープであるホスホジエステル化オリゴ糖部分内に位置しているβ－１，２－結合型マンノ－オリゴマーである（Ｓｈｉｂａｔａら、１９９３ａ）。第２の型は、カンジダ・アルビカンス、トロピカリス（ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）、及びグラブラタ（ｇｌａｂｒａｔａ）のマンナンの中のα－１，２オリゴマンノシル側鎖の非還元末端に付着したβ－１，２－結合型マンノース単位である（Ｋｏｂａｙａｓｈｉら、１９８９，１９９２及び１９９４）。第３の型のβ－１，２結合は、カンジダ・グイリエルモンジー（ｇｕｉｌｌｉｅｒｍｏｎｄｉｉ）において見出され、α－１，３結合型マンノース単位に付着したβ－１，２結合型マンノース単位を含有する（Ｓｈｉｂａｔａら、１９９３ｂ）。これらの発見にも関わらず、β－１，２結合に関する研究は、β－１，２マンノシル－トランスフェラーゼ遺伝子を同定する試みが成功していないために制限されていた。Ｓｕｚｕｋｉら（１９９７）は、カンジダ・グイリエルモンディーにおいてβ－１，２－マンノシルトランスフェラーゼの存在を特徴決定したが、この酵素の遺伝子は未だにクローニングされていない。

【０００５】

Ｃ．アルビカンス酵母においては、ホスホマンナン（ｐｈｏｓｐｈｏｍａｎｎａｎ）複合体の酸不安定領域を構築するβ－オリゴマンノシド及びこの複合体の酸安定領域を構築するα－オリゴマンノシドの両方が、宿主の脾臓及びリンパ節のマクロファージへのこれらの病原性酵母細胞の付着においてアドヘシンとして機能する（Ｃｕｔｌｅｒ，２００１）。興味深いことに、様々な型のカンジダ症に対して防御的な抗体は、β－結合型マンノトリオースを認識するが、より大きなマンノース鎖長のオリゴマンノシドは認識しない（Ｈａｎら、１９９７）。Ｃ．アルビカンスによる深い組織侵襲を発症する患者は、β－結合型オリゴマンノシドに対して特異的な検出可能な抗体力価を有していないが、健康な個体にはこのような抗体が存在することが報告された（Ｊｏｕａｕｌｔら、１９９７）。

【０００６】

Ｐ．パストリス由来の糖タンパク質上のβ－結合型マンノース残基の例は、ほとんど存在しない。１９８６年、Ｋｏｂａｙａｓｈｉらは、β－１，２結合型マンノース残基から主に構成されたマンノオリゴ糖の単離のための、より穏和な条件による修飾されたアセトリシス法を記載した。２００３年には、Ｔｒｉｍｂｌｅらが、Ｐ．パストリスにおいて発現された組換えヒト胆汁塩刺激リパーゼ（ｂｉｌｅ　ｓａｌｔ－ｓｔｉｍｕｌａｔｅｄ　ｌｉｐａｓｅ）（ｈＢＳＳＬ）におけるβ－１，２結合型マンノース残基の存在を報告した。非感染個体における防御抗体の存在により証明されるように、β－結合型マンナンは免疫原性である可能性が高い。さらに、治療用タンパク質上の露出したマンノース基は、マクロファージ細胞上のマンノース受容体により迅速に排斥され、低い薬物効力をもたらす。従って、真菌宿主、例えばＰ．パストリスにおいて発現された異種治療用タンパク質のＮ結合型又はＯ結合型のグリカン上のβ－結合型マンノース残基の存在は、免疫原性の可能性及びクリアランス因子に結合する能力のため、望ましくない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

従って、必要とされているのは、治療用糖タンパク質の作製のための、糖タンパク質上の不要のマンノース残基を除去する方法である。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

従って、本発明は、糖タンパク質上のα－マンノシダーゼ抵抗性グリカンの存在を減少させるか又は排除することを含む、減少した量の高マンノースグリカンを有する糖タンパク質組成物を酵母又は糸状菌の宿主細胞において作製する方法を提供する。ある種の実施

態様において、糖タンパク質上のα－マンノシダーゼ抵抗性グリカンの減少又は排除は、Ｎ－グリカンのマンノシル化に関与している遺伝子の破壊、欠失、又は変異を通して宿主細胞を修飾することにより達成される。このような遺伝子には、例えば、配列番号：１１、又はこのバリアントとして本明細書に記載された遺伝子配列が含まれる。

【０００９】

ある種の実施態様において、α－マンノシダーゼ抵抗性グリカンには、β－マンノース残基、分枝高マンノース残基、又はα－１，４マンノース残基が含まれ得る。

【００１０】

本発明の宿主細胞は、好ましくは、酵母及び／又は糸状菌を起原とするものである。本発明において有用な宿主細胞には、以下の科、属、及び種が含まれ得る：ピキア・パストリス、ピキア・フィンランジカ（ｆｉｎｌａｎｄｉｃａ）、ピキア・トレハロフィラ（ｔｒｅｈａｌｏｐｈｉｌａ）、ピキア・コクラメ（ｋｏｃｌａｍａｅ）、ピキア・メンブラネファシエンス（ｍｅｍｂｒａｎａｅｆａｃｉｅｎｓ）、ピキア・メタノリカ（ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）、ピキア・ミニュータ（ｍｉｎｕｔａ）（オガテア・ミニュータ（Ｏｇａｔａｅａ　ｍｉｎｕｔａ）、ピキア・リンドネリ（ｌｉｎｄｎｅｒｉ））、ピキア・オプンチエ（ｏｐｕｎｔｉａｅ）、ピキア・サーモトレランス（ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）、ピキ・サリクタリア（Ｐｉｃｈｉ　ｓａｌｉｃｔａｒｉａ）、ピキア・グエルカム（ｇｕｅｒｃｕｍ）、ピキア・ピジペリ（ｐｉｊｐｅｒｉ）、ピキア・スチプチス（ｓｔｉｐｔｉｓ）、ピキアｓｐ．、サッカロミセス・カステリー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃａｓｔｅｌｌｉｉ）、サッカロミセス・セレビシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロミセス・クルイベリ（ｋｌｕｙｖｅｒｉ）、サッカロミセスｓｐ．、ハンセヌラ・ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ　ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、クルイベロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）ｓｐ．、クルイベロミセス・ラクチス（ｌａｃｔｉｓ）、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）、カンジダｓｐ．、アスペルギルス・フミガツス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ）、アスペルギルス・ニヅランス（ｎｉｄｕｌａｎｓ）、アスペルギルス・ニガー（ｎｉｇｅｒ）、アスペルギルス・オリゼ（ｏｒｙｚａｅ）、トリコデルマ・リーセイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）、クリソスポリウム・ルックノウェンス（Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ　ｌｕｃｋｎｏｗｅｎｓｅ）、フザリウム（Ｆｕｓａｒｉｕｍ）ｓｐ．、フザリウム・グラミネウム（ｇｒａｍｉｎｅｕｍ）、フザリウム・ベネナツム（ｖｅｎｅｎａｔｕｍ）、フィスコミトレラ・パテンス（Ｐｈｙｓｃｏｍｉｔｒｅｌｌａ　ｐａｔｅｎｓ）、及びニューロスポラ・クラッサ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）。

【００１１】

ある種の実施態様において、本発明の宿主細胞は、ＯＣＨ１のようなα－１，６－マンノシルトランスフェラーゼ活性をコードする機能的な遺伝子の欠失を含み得る。この他の実施態様において、本発明の宿主細胞は、ＰＮＯ及びＭＮＮ４Ｂのような、マンノシルホスフェートトランスフェラーゼ活性をコードする遺伝子をさらに含み得る。

【００１２】

本発明は、本発明の方法により作製され得る、減少した量の、α－マンノシダーゼに対して不応性の高マンノースグリカン構造を有する糖タンパク質組成物も提供する。このような糖タンパク質組成物は、Ｎ結合型グリカン及び／又はＯ結合型グリカンのいずれかを含み得る。

【００１３】

本発明は、さらに、α－マンノシダーゼ抵抗性グリカンの産生に関与する単離された核酸配列を提供する。これらの単離された核酸配列には、配列番号：１１、又はこのバリアントとして本明細書に記載された配列が含まれる。上記配列との構造的な類似性を示すこの他の核酸配列も、本発明に含まれる。これらには、例えば、配列番号：１１の縮重バリアントが含まれ、これらとの高レベルのヌクレオチド配列同一性を有する核酸配列も含まれ得る。従って、本発明に含まれる核酸分子には、配列番号：１１の配列との少なくとも７２％、７５％、８０％又は８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、９９．９％の同

一性を有する核酸配列が含まれ、配列番号：１１により産生されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列；配列番号：１２、配列番号：１３、配列番号：１４、配列番号：１５により示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドとの少なくとも７２％、７５％、８０％又は８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、９９．９％の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸配列；並びに配列番号：１１として記載された核酸配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする核酸配列も含まれるであろう。本発明は、少なくとも６０連続ヌクレオチド長である、上記核酸配列のいずれかの断片を含む核酸配列も含む。

【００１４】

さらにこの他の実施態様において、本発明は、修飾された酵母又は糸状菌の宿主細胞を提供する。本発明の宿主細胞は、配列番号：１１からなる群より選択される１つ以上の核酸配列の機能的な遺伝子産物の発現が減少するよう修飾されていることを特徴とし得る。ある種の実施態様において、修飾された宿主細胞は、配列番号：１１からなる群より選択される１つ以上の核酸配列に破壊、欠失、又は変異を含む。この他の実施態様において、修飾された宿主細胞は、配列番号：１１、又はこのバリアントからなる群より選択される核酸の機能的な遺伝子産物の発現の細胞阻害剤を含む。本発明にとって有用な発現の細胞阻害剤には、例えば、アンチセンスＤＮＡ及び低分子干渉ＲＮＡが含まれる。

【００１５】

この他の実施態様において、本発明は、減少した量の高マンノースグリカンを有し、α－マンノシダーゼ抵抗性グリカン、例えばβ－マンノシル残基の減少した存在を含む糖タンパク質組成物を発現することができる修飾された酵母又は糸状菌の宿主細胞を含み得る。

【００１６】

（発明を実施する為の最良の形態）

本明細書において他に定義されない限り、本発明に関して使用される科学用語及び技術用語は、当業者により一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、前後関係により必要とされない限り、単数形の用語は複数を含み、複数形の用語は単数を含むであろう。一般に、本明細書に記載される生化学、酵素学、分子生物学、細胞生物学、微生物学、遺伝学、並びにタンパク質及び核酸の化学、並びにハイブリダイゼーションに関して使用される命名法及びこれらの技術は、当分野において周知であり一般的に使用されているものである。本発明の方法及び技術は、一般に、他に示されない限り、当分野において周知の従来の方法に従って、および本明細書の全体にわたって引用され議論される様々な一般的な参照及びより具体的な参照に記載されたようにして、実施される。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）；Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ（１９９２，ａｎｄ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓ ｔｏ ２００２）；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９９０）；Ｔａｙｌｏｒ ａｎｄ Ｄｒｉｃｋａｍｅｒ，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖ．Ｐｒｅｓｓ（２００３）；Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ Ｅｎｚｙｍｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ．，Ｆｒｅｅｈｏｌｄ，ＮＪ；Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｓｅｃｔｉｏｎ Ａ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ＶｏＩ Ｉ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ（１９７６）；Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｓｅｃｔｉｏｎ Ａ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ＶｏＩ ＩＩ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ（１９７６）；Ｅｓｓｅｎｔｉａｌｓ ｏｆ Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９９

）を参照のこと。

【００１７】

本明細書において言及される全ての刊行物、特許、及びこの他の参照は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【００１８】

以下の用語は、他に示されない限り、以下の意味を有することが理解されるべきである：

「ポリヌクレオチド」又は「核酸分子」という用語は、少なくとも１０塩基長のヌクレオチドのポリマー型をさす。この用語には、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ又は合成ＤＮＡ）及びＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ又は合成ＲＮＡ）が含まれ、非天然のヌクレオチドアナログ、非ネイティブのヌクレオシド間結合、又はこの両方を含有するＤＮＡ又はＲＮＡのアナログも含まれる。核酸は任意の位相幾何学的なコンフォメーションで存在し得る。例えば、核酸は、一本鎖、二本鎖、三本鎖、四本鎖、部分二本鎖、分枝型、ヘアピン型（ｈａｉｒｐｉｎｎｅｄ）、環状、又はパッドロック（ｐａｄｌｏｃｋｅｄ）コンフォメーションであり得る。

【００１９】

他に示されない限り、「配列番号：Ｘを含む核酸」とは、少なくとも一部分が、（ｉ）配列番号：Ｘの配列、又は（ｉｉ）配列番号：Ｘに相補的な配列のいずれかを有する核酸をさす。二つの間の選択は、情況により指示される。例えば、核酸がプローブとして使用される場合には、二つの間の選択は、プローブが所望の標的に相補的であるという要件により指示される。

【００２０】

「単離された」又は「実質的に純粋な」核酸又はポリヌクレオチド（例えば、ＲＮＡ、ＤＮＡ、又は混合ポリマー）とは、この天然の宿主細胞においてネイティブのポリヌクレオチドに天然に付随しているこの他の細胞成分、例えば、リボソーム、ポリメラーゼ、及び天然に会合しているゲノム配列から実質的に分離されているものである。この用語には、（１）天然に存在する環境から除去されているか、（２）自然界において「単離されたポリヌクレオチド」が見出されるポリヌクレオチドの全部又は一部と会合していないか、（３）自然界においては連結されていないポリヌクレオチドに機能的に連結されているか、又は（４）自然界には存在しない、核酸又はポリヌクレオチドが包含される。「単離された」又は「実質的に純粋な」という用語は、組換えの、もしくはクローニングされたＤＮＡ単離物、化学合成されたポリヌクレオチドアナログ、又は異種の系により生物学的に合成されたポリヌクレオチドアナログに関しても使用され得る。

【００２１】

しかしながら、「単離された」とは、このように記載された核酸又はポリヌクレオチド自体が、このネイティブの環境から物理的に除去されていることを必ずしも必要としない。例えば、生物のゲノム内の内因性の核酸配列は、この内因性の核酸配列の発現が改変されるよう、異種の配列が内因性の核酸配列の隣に置かれている場合、本明細書において「単離されている」と見なされる。この情況において、異種の配列とは、異種の配列自体が内因性（同一の宿主細胞もしくはこの子孫に起因する）であるか、又は外因性（異なる宿主細胞もしくはこの子孫に起因する）であるかに関わらず、内因性の核酸配列に天然には隣接していない配列である。一例として、宿主細胞のゲノム内の遺伝子のネイティブのプロモーターを、この遺伝子が改変された発現パターンを有するよう、（例えば、相同的組み換えにより）あるプロモーター配列に置換することができる。この場合、この遺伝子は、天然にこれに隣接している配列の少なくとも一部から分離されているため、「単離された」ことになるであろう。

【００２２】

核酸は、ゲノム内の対応する核酸に天然には起こらない修飾を含有する場合にも、「単離されている」と見なされる。例えば、内因性のコーディング配列は、人工的に、例えばヒトの介入により導入された挿入、欠失、又は点変異を含有する場合、「単離されている

」と見なされる。「単離された核酸」には、宿主細胞染色体の異種の部位に組み込まれた核酸、及びエピソームとして存在する核酸構築物も含まれる。さらに、「単離された核酸」は、この他の細胞材料を実質的に含まないかもしれないし、又は組換え技術により作製された場合には培養培地を実質的に含まないかもしれないし、又は化学合成された場合には化学的な前駆物質もしくはこの他の化学物質を実質的に含まないかもしれない。

【００２３】

本明細書において使用される場合、参照核酸配列の「縮重バリアント」という語句には、参照核酸配列から翻訳されるものと同一のアミノ酸配列を提供するよう、標準的な遺伝暗号に従って翻訳され得る核酸配列が包含される。「縮重オリゴヌクレオチド」又は「縮重プライマー」という用語は、１つ以上の特定のセグメントにおいて必ずしも配列は同一ではないが相互に相同である標的核酸配列とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを表すために使用される。

【００２４】

核酸配列に関する「配列同一率」又は「同一」という用語は、最大に一致するよう整列化された場合に同一である２つの配列内の残基をさす。配列同一性比較の長さは、少なくとも約９ヌクレオチド、一般的には少なくとも約２０ヌクレオチド、より一般的には少なくとも約２４ヌクレオチド、典型的には少なくとも約２８ヌクレオチド、より典型的には少なくとも約３２ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約３６ヌクレオチド、又はこれ以上のヌクレオチドのストレッチにかかるかもしれない。ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用され得る当分野において公知の多数の異なるアルゴリズムが存在する。例えば、ポリヌクレオチド配列は、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ １０．０（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）の中のプログラムであるＦＡＳＴＡ、Ｇａｐ、又はＢｅｓｔｆｉｔを使用して比較され得る。ＦＡＳＴＡは、クエリー配列と検索配列と間の最適なオーバーラップの領域の整列化及び配列同一率を提供する。Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８３：６３－９８（１９９０）（参照により全体が本明細書に組み込まれる）。例えば、核酸配列間の配列同一率は、このデフォルトパラメータ（ワードサイズ６及びスコアリングマトリックスのためのＮＯＰＡＭファクター（ｆａｃｔｏｒ））を用いてＦＡＳＴＡを使用して、又は参照により本明細書に組み込まれるＧＣＧバージョン６．１の中に提供されているようなこのデフォルトパラメータを用いてＧａｐを使用して、決定され得る。又は、配列は、コンピュータプログラムＢＬＡＳＴ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０）；Ｇｉｓｈ ａｎｄ Ｓｔａｔｅｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．３：２６６－２７２（１９９３）；Ｍａｄｄｅｎら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：１３１－１４１（１９９６）；Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２（１９９７）；Ｚｈａｎｇ ａｎｄ Ｍａｄｄｅｎ，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．７：６４９－６５６（１９９７））、特に、ｂｌａｓｔｐ又はｔｂｌａｓｔｎ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２（１９９７））を使用して比較され得る。

【００２５】

「実質的な相同性」又は「実質的な類似性」という用語は、核酸又はこの断片をさす場合、適切なヌクレオチドの挿入又は欠失を用いてもう１つの核酸（又はこの相補鎖）と最適に整列化された場合に、前述のようなＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ、又はＧａｐのような周知の配列同一性のアルゴリズムにより測定されるようなヌクレオチド配列同一性が、ヌクレオチド塩基の少なくとも約５０％、より好ましくは６０％、一般的にはヌクレオチド塩基の少なくとも約７０％、より一般的には少なくとも約８０％、好ましくは少なくとも約９０％、より好ましくは少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％に存在することを示す。

【００２６】

又は、核酸又はこの断片が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下で、

もう１つの核酸、もう１つの核酸の１つの鎖、又はこの相補鎖にハイブリダイズする場合、実質的な相同性又は類似性が存在する。核酸ハイブリダイゼーション実験に関する「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」及び「ストリンジェントな洗浄条件」は、多数の異なる物理学的なパラメータによる。核酸ハイブリダイゼーションは、当業者により容易に認識されるであろう、塩濃度、温度、溶媒、ハイブリダイズする種の塩基組成、相補的な領域の長さ、及びハイブリダイズする核酸間のヌクレオチド塩基ミスマッチの数のような条件により影響を受けるであろう。当業者は、ハイブリダイゼーションの特定のストリンジェンシーを達成するためにこれらのパラメータを変動させる方法を承知している。

【００２７】

一般に、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」は、特定の条件のセットの下で、特定のＤＮＡハイブリッドについての融点（T_m）より約２５℃下で実施される。「ストリンジェントな洗浄」は、特定の条件のセットの下で、特定のＤＮＡハイブリッドについてのT_mより約５℃低い温度で実施される。T_mとは、標的配列の５０％が、完全にマッチするプローブにハイブリダイズする温度である。参照により本明細書に組み込まれる、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９），ｐａｇｅ９．５１を参照のこと。本発明の目的のため、液相ハイブリダイゼーションの場合の「ストリンジェントな条件」とは、６５℃における６×ＳＳＣ（ここで、２０×ＳＳＣは、３．０Ｍ ＮａＣｌ及び０．３Ｍクエン酸ナトリウムを含有する）、１％ＳＤＳにおける８から１２時間の水性ハイブリダイゼーション（即ち、ホルムアミドを含まない）、この後の６５℃における０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳにおける２０分間の２回の洗浄と定義される。６５℃におけるハイブリダイゼーションは、ハイブリダイズしている配列の長さ及び同一率を含む多数の要因によって異なる速度で起こるであろうことが、当業者には認識されるであろう。

【００２８】

本発明の核酸（ポリヌクレオチドとも呼ばれる）には、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡのセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方、並びにこれらの合成型及び混合ポリマーが含まれ得る。これらは、化学的もしくは生化学的に修飾されてもよいし、又は当業者により容易に認識されるような非天然のもしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有していてもよい。このような修飾には、例えば、標識、メチル化、天然に存在するヌクレオチドのうちの１つ以上のアナログへの置換、電荷を有しない結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメート等）、電荷を有する結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）、懸垂部分（例えば、ポリペプチド）、インターキレーター（例えば、アクリジン、ソラレン等）、キレート化剤、アルキル化剤、及び修飾された結合（例えば、アルファアノマー核酸等）のようなヌクレオチド間修飾が含まれる。水素結合及びこの他の化学的相互作用を介して指定された配列に結合する能力に関してポリヌクレオチドを模倣する合成分子も含まれる。このような分子は、当分野において公知であり、例えば、分子の骨格内のリン酸結合がペプチド結合に置換されたものを含む。この他の修飾には、例えば、リボース環が、架橋部分又は「ロックド（ｌｏｃｋｅｄ）」核酸に見出される修飾のようなこの他の構造を含有するアナログが含まれ得る。

【００２９】

「変異型」という用語は、核酸配列に適用される場合、核酸配列内のヌクレオチドが、参照核酸配列と比較して挿入、欠失、又は変化しているかもしれないことを意味する。単一の改変が１つの遺伝子座においてなされてもよいし（点変異）、又は単一の遺伝子座において複数のヌクレオチドが挿入、欠失、もしくは変化していてもよい。さらに、１つ以上の改変が、核酸配列内の任意の数の遺伝子座においてなされてもよい。核酸配列は、「エラープローン（ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ）ＰＣＲ」（ＰＣＲ産物の全長にわたって高い

割合で点変異が入手されるよう、ＤＮＡポリメラーゼのコピーの正確さが低い条件の下でＰＣＲを実施する方法；例えば、Ｌｅｕｎｇら、Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，１：１１－１５（１９８９）及びＣａｌｄｗｅｌｌ ａｎｄ Ｊｏｙｃｅ，ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌｉｃ．２：２８－３３（１９９２）を参照のこと）；及び「オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発」（目的のクローニングされたＤＮＡセグメントにおける部位特異的な変異の作成を可能にする方法；例えば、Ｒｅｉｄｈａａｒ－Ｏｌｓｏｎ ａｎｄ Ｓａｕｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４１：５３－５７（１９８８）を参照のこと）のような突然変異誘発技術を含む（これらに制限はされない）当分野において公知の方法により変異させられ得る。

【００３０】

「ベクター」という用語は、本明細書において使用される場合、これと連結されたもう１つの核酸を輸送することができる核酸分子をさすものである。ベクターの１つの型は、付加的なＤＮＡセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖ＤＮＡループをさす「プラスミド」である。この他のベクターには、コスミド、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、及び酵母人工染色体（ＹＡＣ）が含まれる。ベクターのもう１つの型は、付加的なＤＮＡセグメントがウイルスゲノムへとライゲートされ得るウイルスベクター（より詳細に後述される）である。ある種のベクターは、導入された宿主細胞内で自律複製することができる（例えば、宿主細胞において機能する複製起点を有するベクター）。この他のベクターは、宿主細胞へと導入された際、宿主細胞のゲノムへ組み込まれ得、これにより宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある種の好ましいベクターは、これらと機能的に連結された遺伝子の発現を指図することができる。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（又は、単に「発現ベクター」）と呼ばれる。

【００３１】

本明細書において使用される場合、「目的の配列」又は「目的の遺伝子」という用語は、典型的には、宿主細胞において通常産生されないタンパク質をコードする核酸配列をさす。本明細書に開示された方法は、１つ以上の目的の配列又は目的の遺伝子が宿主細胞ゲノムへ組み込まれることを可能にする。好ましい組み込み部位は、ＡＭＲ２遺伝子座である。目的の配列の非制限的な例には、酵素活性を有する１つ以上のポリペプチド、例えば、マンノシルトランスフェラーゼ、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミントランスポーター、ガラクトシルトランスフェラーゼ、及びシアリルトランスフェラーゼのような宿主におけるＮ－グリカン合成に影響を与える酵素をコードする配列が含まれる。

【００３２】

本明細書において使用されるように、「治療用糖タンパク質」という用語には、エリスロポエチン、インターフェロン－α、インターフェロン－β、インターフェロン－γ、インターフェロン－ω、及び顆粒球－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦのようなサイトカイン、ＶＩＩＩ因子、ＩＸ因子、及びヒトプロテインＣ、アンチトロンビンＩＩＩ、トロンビンのような凝固因子、可溶性ＩｇＥ受容体ａ鎖、ＩｇＧ、ＩｇＧ断片、ＩｇＧ融合体、ＩｇＭ、インターロイキン、ウロキナーゼ、キマーゼ、及び尿素（ｕｒｅａ）トリプシン阻害剤、ＩＧＦ結合タンパク質、上皮増殖因子、成長ホルモン放出因子、アネキシンＶ融合タンパク質、アンジオスタチン、血管内皮増殖因子－２、骨髄系前駆細胞阻害因子（ｍｙｅｌｏｉｄ ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ ｆａｃｔｏｒ）－１、オステオプロテジェリン、α－１－アンチトリプシン、α－フェトプロテイン、ＤＮａｓｅＩＩ、ヒトプラスミノーゲンのクリングル３、グルコセレブロシダーゼ、ＴＮＦ結合タンパク質（ＴＮＦ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）１、卵胞刺激ホルモン、細胞障害性Ｔリンパ球関連抗原（Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｔ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ）４－Ｉｇ、膜貫通活性化カルシウム調整サイクロフィリンリガンド（ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ａｎｄ ｃａｌｃｉｕｍ ｍｏｄｕｌａｔｏｒ ａｎｄ ｃｙｃｌｏｐｈｉｌｉｎ ｌｉｇａｎｄ）、可溶性ＴＮＦ受容体Ｆｃ融合体、グルカゴン様タンパク質（ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｌｉｋｅ ｐｒｏｔｅｉｎ）１、Ｉ

Ｌ－２受容体アゴニストが含まれる。

【００３３】

「機能的に連結された」発現調節配列とは、発現調節配列が、目的の遺伝子を調節するよう、目的の遺伝子と連続しているような結合をさし、目的の遺伝子を調節するよう、トランスで、又はある程度の距離を置いて作用する発現調節配列もさす。

【００３４】

「発現調節配列」という用語は、本明細書において使用される場合、これらと機能的に連結されているコーディング配列の発現に影響を与えるのに必要なポリヌクレオチド配列をさす。発現調節配列は、核酸配列の転写、転写後イベント、及び翻訳を調節する配列である。発現調節配列には、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーター配列、及びエンハンサー配列；スプライシングシグナル及びポリアデニル化シグナルのような効率的なＲＮＡプロセシングのためのシグナル；細胞質ｍＲＮＡを安定化する配列；翻訳効率を増強する配列（例えば、リボソーム結合部位）；タンパク質安定性を増強する配列が含まれ；所望により、タンパク質分泌を増強する配列が含まれる。このような調節配列の性質は、宿主生物によって異なり；原核生物において、このような調節配列には、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位、及び転写終結配列が含まれる。「調節配列」という用語には、最小限、この存在が発現にとって不可欠である成分全てが含まれるものとし、この存在が有利である付加的な成分、例えば、リーダー配列及び融合パートナー配列も含まれ得る。

【００３５】

「組換え宿主細胞」（又は単に「宿主細胞」）という用語は、本明細書において使用される場合、組換えベクターが導入されている細胞をさすものとする。このような用語は、特定の対象細胞のみならず、このような細胞の子孫もさすことが理解されるべきである。後続の世代においては、変異又は環境的影響のいずれかによって、ある種の修飾が起こり得るため、このような子孫は、実際は親細胞と同一ではないかもしれないが、これでも本明細書において使用されるような「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。組換え宿主細胞は、培養物中で培養された単離された細胞もしくは細胞系であってもよいし、又は生存している組織もしくは生物に属している細胞であってもよい。

【００３６】

「ペプチド」という用語は、本明細書において使用される場合、短いポリペプチド、例えば、典型的には約５０アミノ酸長未満、より典型的には約３０アミノ酸長未満であるものをさす。この用語には、本明細書において使用される場合、構造的機能を模倣し、従って生物学的機能を模倣するアナログ及びミメティック（ｍｉｍｅｔｉｃｓ）が包含される。

【００３７】

「ポリペプチド」という用語には、天然に存在するタンパク質及び天然には存在しないタンパク質の両方、並びにこれらの断片、変異体、誘導体、及びアナログが包含される。ポリペプチドは、モノマー又はポリマーであり得る。さらに、ポリペプチドは、各々が１つ以上の別個の活性を有する多数の異なるドメインを含み得る。

【００３８】

「単離されたタンパク質」又は「単離されたポリペプチド」という用語は、この起原又は誘導源によって、（１）ネイティブの状態においてこれに付随している天然に会合している成分と会合していないか、（２）自然界においては見出されない純度で存在している（ここで、純度とは他の細胞材料の存在に関して判断され得る）（例えば、同一種に由来する他のタンパク質を含まない）か、（３）異なる種に由来する細胞により発現されたか、又は（４）自然界には存在しない（例えば、自然界には見出されないポリペプチドの断片であるか、又は自然界には見出されないアミノ酸のアナログもしくは誘導体、又は標準的なペプチド結合以外の結合を含む）、タンパク質又はポリペプチドである。従って、化学合成されたか、又は天然に由来する細胞とは異なる細胞系において合成されたポリペプチドは、この天然に関連する成分から「単離」されているであろう。ポリペプチド又はタ

ンパク質は、当分野において周知のタンパク質精製技術を使用して、単離により、天然に関連する成分を実質的に含まないようにされることもできる。このように定義されるように、「単離された」とは、このように記載されたタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、又はオリゴペプチドが、このネイティブの環境から物理的に除去されていることを必ずしも必要としない。

【００３９】

「ポリペプチド断片」という用語は、本明細書において使用される場合、全長ポリペプチドと比較して、欠失、例えば、アミノ末端及び／又はカルボキシ末端の欠失を有するポリペプチドをさす。好ましい実施態様において、ポリペプチド断片は、断片のアミノ酸配列が天然に存在する配列の対応する位置と同一である連続配列である。断片は、典型的には、少なくとも５、６、７、８、９、又は１０アミノ酸長、好ましくは少なくとも１２、１４、１６、又は１８アミノ酸長、より好ましくは少なくとも２０アミノ酸長、より好ましくは少なくとも２５、３０、３５、４０、又は４５アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも５０又は６０アミノ酸長、さらに好ましくは少なくとも７０アミノ酸長である。

【００４０】

「修飾された誘導体」とは、一次構造配列は実質的に相同であるが、例えば、インビボもしくはインビトロの化学的及び生化学的な修飾を含んでいるか、又はネイティブのポリペプチドには見出されないアミノ酸が取り込まれているポリペプチド又はこの断片をさす。このような修飾には、例えば、当業者により容易に認識されるような、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、グリコシル化、ユビキチン化、例えば放射性核種による標識、及び様々な酵素的修飾が含まれる。ポリペプチドを標識するための多様な方法、及びこのような目的のため有用な置換基又は標識は、当分野において周知であり、^{125}Ｉ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、及び^{3}Ｈのような放射性同位体、標識されたアンチリガンド（ａｎｔｉｌｉｇａｎｄ）（例えば、抗体）に結合するリガンド、フルオロフォア、化学発光剤、酵素、及び標識されたリガンドに対する特異的結合対メンバーとして機能し得るアンチリガンドを含む。標識の選択は、必要とされる感度、プライマーとの接合の容易さ、安定性要件、及び利用可能な機器による。ポリペプチドを標識する方法は、当分野において周知である。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ（１９９２，ａｎｄ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓ ｔｏ ２００２）（本明細書に参照により組み込まれる）を参照のこと。

【００４１】

「融合タンパク質」という用語は、異種のアミノ酸配列にカップリングされたポリペプチド又は断片を含むポリペプチドをさす。融合タンパク質は、２つ以上の異なるタンパク質に由来する２つ以上の所望の機能的エレメントを含有するよう構築され得るため、有用である。融合タンパク質は、目的のポリペプチドに由来する少なくとも１０個の連続アミノ酸、より好ましくは少なくとも２０個又は３０個のアミノ酸、さらに好ましくは少なくとも４０個、５０個、又は６０個のアミノ酸、さらに好ましくは少なくとも７５個、１００個、又は１２５個のアミノ酸を含む。本発明のタンパク質を完全に含む融合体は、特に有益である。本発明の融合タンパク質に含まれる異種ポリペプチドは、少なくとも６アミノ酸長、しばしば少なくとも８アミノ酸長、有用には少なくとも１５、２０、及び２５アミノ酸長である。ＩｇＧ Ｆｃ領域のような比較的大きなポリペプチドを含む融合体、及びさらには緑色蛍光タンパク質（「ＧＦＰ」）クロモフォア含有タンパク質のような、完全タンパク質を含む融合体は、特に有益である。融合タンパク質は、異なるタンパク質又はペプチドをコードする核酸配列とインフレームで、ポリペプチド又はこの断片をコードする核酸配列を構築し、次いで、融合タンパク質を発現させることにより、組換え的に作製され得る。又は、融合タンパク質は、ポリペプチド又はこの断片をもう１つのタンパク質と架橋することにより化学的に作製され得る。

【００４２】

本明細書において使用される場合、「抗体」という用語は、この少なくとも一部が少な

くとも１つの免疫グロブリン遺伝子又はこの断片によりコードされ、かつ所望の標的分子に特異的に結合することができるポリペプチドをさす。この用語には、天然に存在する型が含まれ、断片及び誘導体も含まれる。

【００４３】

「抗体」という用語の範囲内の断片には、標的分子との特異的結合能を保持している限り、様々なプロテアーゼによる消化により作製されたもの、化学的切断及び／又は化学的解離により作製されたもの、並びに組換え的に作製されたものが含まれる。このような断片には、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’　断片、Ｆｖ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、及び単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片が含まれる。

【００４４】

この用語の範囲内の誘導体には、種間キメラヒト化抗体；抗体融合体；ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）（二重特異性抗体）、単鎖ダイアボディ、及びイントラボディ（ｉｎｔｒａｂｏｄｉｅｓ）のようなヘテロマー抗体複合体及び抗体融合体（例えば、Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，（Ｍａｒａｓｃｏ，ｅｄ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，Ｉｎｃ．，１９９８（これの開示は参照により全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと）を含む、配列が修飾されているが、標的分子との特異的結合能を保持している抗体（又はこの断片）が含まれる。

【００４５】

本明細書において使用される場合、抗体は、ネイティブのＢリンパ球の細胞培養物からの採集、ハイブリドーマの培養物からの採集、組換え発現系、及びファージディスプレイを含む公知の技術によって作製され得る。

【００４６】

「非ペプチドアナログ」という用語は、参照ポリペプチドのものと類似している特性を有する化合物をさす。非ペプチド化合物は、「ペプチド・ミメティック（ｐｅｐｔｉｄｅ　ｍｉｍｅｔｉｃ）」又は「ペプチドミメティック（ｐｅｐｔｉｄｏｍｉｍｅｔｉｃ）」とも呼ばれる。例えば、Ｊｏｎｅｓ，Ａｍｉｎｏ　Ａｃｉｄ　ａｎｄ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９９２）；Ｊｕｎｇ，Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　ａｎｄ　Ｎｏｎｐｅｐｔｉｄｅ　Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ：Ａ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ（１９９７）；Ｂｏｄａｎｓｚｋｙら、Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ－－Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｔｅｘｔｂｏｏｋ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ（１９９３）；Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ａ　Ｕｓｅｒｓ　Ｇｕｉｄｅ，（Ｇｒａｎｔ，ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．，１９９２）；Ｅｖａｎｓら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３０：１２２９（１９８７）；Ｆａｕｃｈｅｒｅ，Ｊ．Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ　Ｒｅｓ．１５：２９（１９８６）；Ｖｅｂｅｒ　ａｎｄ　Ｆｒｅｉｄｉｎｇｅｒ，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，８：３９２－３９６（１９８５）；及びこれらの各々において引用された参照（参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。このような化合物は、しばしば、コンピュータ化された分子モデリングの補助によって開発される。本発明の有用ペプチドに構造的に類似しているペプチド・ミメティックは、等価な効果を生ずるために使用され得、従って、本発明の一部であると構想される。

【００４７】

「ポリペプチド変異体」又は「ムテイン（ｍｕｔｅｉｎ）」とは、ネイティブ又は野生型のタンパク質のアミノ酸配列と比較して、１つ以上のアミノ酸の挿入、複製、欠失、再編成、又は置換を含有する配列を有するポリペプチドをさす。ムテインは、天然に存在するタンパク質の配列の中の、ある位置の単一のアミノ酸がもう１つのアミノ酸に変化する１つ以上のアミノ酸点置換、１つ以上のアミノ酸がそれぞれ挿入もしくは欠失される１つ以上の挿入及び／もしくは欠失、並びに／又はアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかもしくは両方におけるアミノ酸配列の切断を有するかもしれない。ムテインは、天然に存在するタンパク質と比較して同一の生物学的活性を有していてもよいが、好ましくは

、異なる生物学的活性を有する。

【００４８】

ムテインは、この野生型カウンターパートとの少なくとも６５％の全体配列相同性を有する。さらに好ましいのは、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、又は９０％の野生型タンパク質との全体配列相同性を有するムテインである。より好ましい実施態様において、ムテインは、少なくとも９５％の配列同一性、さらに好ましくは９８％、さらに好ましくは９９％、さらに好ましくは９９．９％の全体配列同一性を示す。配列相同性は、Ｇａｐ又はＢｅｓｔｆｉｔのような一般的な配列分析アルゴリズムにより測定され得る。

【００４９】

アミノ酸置換には、（１）タンパク質分解に対する感受性を減少させるもの、（２）酸化に対する感受性を減少させるもの、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を改変させるもの、（４）結合親和性又は酵素活性を改変させるもの、並びに（５）このようなアナログのこの他の物理化学的及び機能的な特性を賦与又は修飾するもの：が含まれる。

【００５０】

本明細書において使用される場合、２０の従来のアミノ酸及びこれらの略号は、慣例的用法に従う。参照により本明細書に組み込まれるＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－Ａ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｇｏｌｕｂ ａｎｄ Ｇｒｅｎ ｅｄｓ．，Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，Ｍａｓｓ．，２ｎｄ ｅｄ．１９９１）を参照のこと。２０の従来のアミノ酸の立体異性体（例えば、Ｄ－アミノ酸）、α－，α－二置換アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、及びこの他の特殊なアミノ酸のような非天然アミノ酸も、本発明のポリペプチドのための適切な成分であるかもしれない。特殊なアミノ酸の例には、４－ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタミン酸、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリジン、ε－Ｎ－アセチルリジン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリジン、Ｎ－メチルアルギニン、並びにこの他の類似のアミノ酸及びイミノ酸（例えば、４－ヒドロキシプロリン）が含まれる。本明細書において使用されるポリペプチド表記において、標準的な用法及び慣習に従って、左方末端がアミノ末端に対応し、右方末端がカルボキシ末端に対応する。

【００５１】

あるタンパク質をコードする核酸配列が、第２のタンパク質をコードする核酸配列と類似した配列を有する場合、このタンパク質は、第２のタンパク質との「相同性」を有するか、又は第２のタンパク質と「相同」である。又は、２つのタンパク質が「類似した」アミノ酸配列を有する場合、一方のタンパク質は、第２のタンパク質との相同性を有する。（従って、「相同タンパク質」という用語は、２つのタンパク質が類似したアミノ酸配列を有することを意味するものと定義される。）好ましい実施態様において、相同タンパク質は、野生型タンパク質との少なくとも７２％の配列相同性を示すものであり、より好ましいのは、少なくとも７５％の配列相同性である。さらに好ましいのは、野生型タンパク質との少なくとも８０％、８５％、９０％、又は９５％の配列相同性を示す相同タンパク質である。さらに好ましい実施態様において、相同タンパク質は、少なくとも９６％、９８％、９９％、又は９９．９％の配列同一性を示す。本明細書において使用される場合、（特に、予測された構造的類似性に関する）アミノ酸配列の２つの領域間の相同性は、機能の類似性を暗示するものと解釈される。

【００５２】

「相同」がタンパク質又はペプチドに関して使用される場合、同一でない残基位置は、しばしば、保存的なアミノ酸置換によって異なっていることが認識される。「保存的なアミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基が、類似した化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）を有する側鎖（Ｒ基）を有するもう１つのアミノ酸残基により置換されるものである。一般に、保存的なアミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させないであろう。２つ以上のアミノ酸配列が保存的置換により相互に異なっている場合、配列同一率

又は相同性の程度は、置換の保存的な性質に関して補正するため上方に調整され得る。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Ｐｅａｒｓｏｎ，１９９４，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏ１．Ｂｉｏｌ．２４：３０７－３１ ａｎｄ ２５：３６５－８９（参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【００５３】

以下の６つの群は、各々、相互に保存的な置換であるアミノ酸を含有する：１）セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；４）アルギニン（Ｒ）、リジン（Ｋ）；５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、アラニン（Ａ）、バリン（Ｖ）、及び６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）。

【００５４】

配列同一率とも呼ばれるポリペプチドの配列相同性は、典型的には、配列分析ソフトウェアを使用して測定される。例えば、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｃｅｎｔｅｒ，９１０ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ａｖｅｎｕｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ ５３７０５を参照のこと。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的なアミノ酸置換を含む様々な置換、欠失、及びこの他の修飾に割り当てられた相同性の尺度を使用して、類似した配列をマッチングする。例えば、ＧＣＧは、異なる生物種に由来する相同ポリペプチド、又は野生型タンパク質とこのムテインのような密接に関連したポリペプチドの間の配列相同性又は配列同一性を決定するため、デフォルトパラメータを用いて使用され得る「Ｇａｐ」及び「Ｂｅｓｔｆｉｔ」のようなプログラムを含有する。例えば、ＧＣＧバージョン６．１を参照のこと。

【００５５】

特定のポリペプチド配列を、異なる生物に由来する多数の配列を含有するデータベースと比較する場合、好ましいアルゴリズムは、コンピュータプログラムＢＬＡＳＴ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０）；Ｇｉｓｈ ａｎｄ Ｓｔａｔｅｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．３：２６６－２７２（１９９３）；Ｍａｄｄｅｎら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：１３１－１４１（１９９６）；Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２（１９９７）；Ｚｈａｎｇ ａｎｄ Ｍａｄｄｅｎ，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．７：６４９－６５６（１９９７））、特に、ｂｌａｓｔｐ又はｔｂｌａｓｔｎ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２（１９９７））である。

【００５６】

ＢＬＡＳＴｐのための好ましいパラメータは以下の通りである：

期待値（Ｅｘｐｅｃｔａｔｉｏｎ ｖａｌｕｅ）：１０（デフォルト）；フィルター（Ｆｉｌｔｅｒ）：ｓｅｇ（デフォルト）；ギャップ開始コスト（Ｃｏｓｔ ｔｏ ｏｐｅｎ ａ ｇａｐ）：１１（デフォルト）；ギャップ伸長コスト（Ｃｏｓｔ ｔｏ ｅｘｔｅｎｄ ａ ｇａｐ）：１（デフォルト）；最大アラインメント（Ｍａｘ．ａｌｉｇｎｍｅｎｔｓ）：１００（デフォルト）；ワードサイズ（Ｗｏｒｄ ｓｉｚｅ）：１１（デフォルト）；表示数（Ｎｏ．ｏｆ ｄｅｓｃｒｉｐｔｉｏｎｓ）：１００（デフォルト）；ペナルティマトリックス（Ｐｅｎａｌｔｙ Ｍａｔｒｉｘ）：ＢＬＯＷＳＵＭ６２。

【００５７】

相同性に関して比較されるポリペプチド配列の長さは、少なくとも約１６アミノ酸残基、一般的には少なくとも約２０残基、より一般的には少なくとも約２４残基、典型的には少なくとも約２８残基、好ましくは約３５残基超であろう。多数の異なる生物に由来する配列を含有するデータベースを検索する場合には、アミノ酸配列を比較することが好ましい。アミノ酸配列を使用したデータベース検索は、当分野において公知のｂｌａｓｔｐ以外のアルゴリズムにより測定され得る。例えば、ポリペプチド配列は、ＧＣＧバージョン

６．１の中のプログラムＦＡＳＴＡを使用して比較され得る。ＦＡＳＴＡは、クエリー配列と検索配列と間の最適なオーバーラップの領域の整列化及び配列同一率を提供する。Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８３：６３－９８（１９９０）（参照により全体が本明細書に組み込まれる）。例えば、アミノ酸配列間の配列同一率は、参照により本明細書に組み込まれるＧＣＧバージョン６．１の中に提供されているようなこのデフォルトパラメータ（ワードサイズ２及びＰＡＭ２５０スコアリングマトリックス）を用いてＦＡＳＴＡを使用して決定され得る。

【００５８】

「特異的結合」とは、２つの分子が、環境中のこの他の分子との結合より優先的に相互に結合する能力をさす。典型的には、「特異的結合」は、反応中の偶発的な結合より、少なくとも２倍、より典型的には少なくとも１０倍、しばしば少なくとも１００倍優先される。典型的には、解離定数により定量化されるような特異的結合反応の親和性又はアビディティは、約10^{-7}M以下（例えば、約10^{-8}M、10^{-9}M、又はさらにそれ以下）である。

【００５９】

「領域」という用語は、本明細書において使用される場合、生体分子の一次構造の物理的に連続している部分をさす。タンパク質の場合には、領域は、このタンパク質のアミノ酸配列の連続している部分により定義される。

【００６０】

「ドメイン」という用語は、本明細書において使用される場合、生体分子の公知の又は推測される機能に寄与する生体分子の構造をさす。ドメインは、領域又はこの一部と同一の範囲にあるかもしれず；ドメインは、生体分子の別個の非連続領域を含んでいるかもしれない。タンパク質ドメインの例には、以下に制限はされないが、Ｉｇドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインが含まれる。

【００６１】

本明細書において使用される場合、「分子」という用語は、以下に制限はされないが、低分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチド、核酸、脂質等を含む化合物を意味し、このような化合物は天然であってもよいし又は合成であってもよい。

【００６２】

「高マンノース」という用語は、本明細書において使用される場合、酵母及び／又は糸状菌の種によりネイティブに産生され、一般に８個以上のマンノース残基を有する糖タンパク質上のグリカン構造をさす。

【００６３】

本明細書において使用される場合、「分子」という用語は、以下に制限はされないが、低分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチド、核酸、脂質等を含む化合物を意味し、このような化合物は天然であってもよいし又は合成であってもよい。

【００６４】

「α－マンノシダーゼ抵抗性グリカン」及び「不応性α－マンノースグリカン」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、α－１，２；α－１，３；及び／又はα－１，６－マンノシダーゼのようなアルファ－マンノシダーゼによる切断に対して完全又は部分的に抵抗性の糖タンパク質のグリカン構造をさす。不応性α－マンノースグリカンには、β－マンノース、分枝高マンノース、α－１，４マンノース、又は特徴決定されていないマンノースが含まれ得る。従って、これらのグリカン構造は、高マンノースグリカン構造の増加した存在に寄与する。

【００６５】

他に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語及び科学用語は、全て、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解されるのと同一の意味を有する。例示的な方法及び材料が以下に記載されるが、本明細書に記載されたものと類似しているか又は等しい方法及び材料も、本発明の実施において使用され得、当業者には明白であろう。本明細書において言及された全ての刊行物及びこの他の参照は、参照により完全に組み込ま

れる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が適用されるであろう。材料、方法、及び例は、例示的なものに過ぎず、制限的なものではない。

【００６６】

本明細書及び特許請求の範囲の全体にわたって、「を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という単語又は「を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」もしくは「を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」のような活用形は、明示された整数又は整数の群の包含を意味するものであって、この他の整数又は整数の群の排除を意味するものではないことが理解されるであろう。

【００６７】

α－マンノシダーゼ抵抗性遺伝子の同定

真菌の系においてヒト様糖タンパク質を発現させる試みにおいては、非ヒトグリコシル化の排除が望まれる。真菌のグリコシル化は、高マンノース／非ヒトグリカンを特徴とする。マンノシル化の型の決定は、一般的に、不要なグリコシル化イベントの排除における第一段階である。Ｐ．パストリスにおけるＯＣＨ１の欠失は、過剰マンノシル化の減少をもたらした（Ｃｈｏｉら、２００３）。ネガティブＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳによる分析は、これらのマンノース基に関連した負の電荷の存在を明らかにした。この後の推定マンノシルホスフェートトランスフェラーゼ遺伝子ＰＮＯ１及びＭＮＮ４Ｂの欠失は、マンノシルホスフェートを欠く株をもたらした（図２Ａ）（米国特許第７，２５９，００７号）。α－１，２マンノシダーゼ及びタチナタマメマンノシダーゼによる残存するマンノース基の消化は、さらに、マンナンのサイズを減少させた（図２Ｂ、図３）（実施例１）。これらの遺伝子の破壊及びα－マンノシダーゼによる消化にも関わらず、２０％ものＮ－グリカンが抵抗性のままであった。糖組成分析、並びにα－１，２マンノシダーゼ及びタチナタマメマンノシダーゼ（α－１，２／α－１，３／α－１，６）に対するこれらのマンノース基の抵抗性から、これらのマンノース構造は、分枝β－マンノース、高マンノース、α－１，４マンノース、又は特徴決定されていないマンノースであると推測された。

【００６８】

まず、これらの抵抗性マンナンがマンノシルトランスフェラーゼ活性に起因するとの仮説が立てられ、従って、これらの抵抗性マンナンの原因遺伝子（又は複数の遺伝子）は、この他のマンノシルトランスフェラーゼ遺伝子とのある程度の相同性を有するであろうと推測された。サッカロミセス・セレビシエＭＮＮ４遺伝子からのＣ末端配列を、Ｐ．パストリスゲノムを探索するために使用した（実施例２）。推定ＩＩ型膜タンパク質をコードする（従って、ゴルジ膜上に見出され得る）遺伝子を選択することにより、破壊された場合に、α－１，２マンノシダーゼによる消化後の抵抗性マンナンが排除される遺伝子が同定された（図２Ｄ）。本発明者らは、この遺伝子をＡＭＲ２（アルファマンノシダーゼ抵抗性（ａｌｐｈａ－ｍａｎｎｏｓｉｄａｓｅ　ｒｅｓｉｓｔａｎｔ））と命名した。従って、本発明は、図１に示されるような糖タンパク質のマンノシル化に関与しているＰ．パストリス遺伝子を開示する。

【００６９】

核酸配列

本発明の１つの態様において、公知のα－マンノシダーゼに対して抵抗性のＮ－グリカンのマンノシル化に関与している遺伝子が、Ｐ．パストリスにおいて同定され配列決定される（図１、実施例２）。１つの実施態様において、Ｐ．パストリスＡＭＲ２遺伝子及びこのバリアントをコードする核酸配列が提供される。Ｐ．パストリスＡＭＲ２遺伝子の破壊は、酵母株における糖タンパク質上のα－マンノシダーゼ抵抗性グリカンの減少又は排除のため特に有用である。もう１つの実施態様において、本発明は、配列番号：１１との少なくとも７２％の同一性を有するＰ．パストリスＡＭＲ２遺伝子のバリアントである配列を含む又はからなる核酸分子を提供する。この核酸配列は、好ましくは、少なくとも７５％、８０％、又は８５％の野生型遺伝子との同一性を有する。さらに好ましくは、この核酸配列は、９０％、９５％、９８％、９９％、９９．９％、又はさらにそれ以上の配列番号：１１との同一性を有する。

【００７０】

本発明のこの他の実施態様によると、本発明の核酸分子は、図１に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。配列番号：１２と少なくとも７２％同一のポリペプチド配列をコードする核酸分子も提供される。典型的には、本発明の核酸分子は、少なくとも７５％、８０％、又は８５％の配列番号：１２との同一性を有するポリペプチド配列をコードする。さらに好ましくは、コードされたポリペプチドは、９０％、９５％、９８％、９９％、９９．９％、又はさらにそれ以上の配列番号：１２との同一性を有する。

【００７１】

本発明のもう１つの態様において、Ｎ－グリカンのα－マンノシダーゼ抵抗性マンノシル化に関与しているＡＭＲ２遺伝子は、Ｐ．パストリスのこの他の３つの遺伝子、ＡＭＲ１、ＡＭＲ３、ＡＭＲ４と相同であり（図５）、以下の種の遺伝子と相同な領域を有する：カンジダ・アルビカンスの１１の遺伝子（８つは図５に示されている）；サッカロミセス・カステリーＮＲＲＬ　Ｙ－１２６３０株の８つの遺伝子；サッカロミセス・クルイベリＮＲＲＬ　Ｙ－１２６５１株の２つの遺伝子、及びアスペルギルス・フミガツスの３つの遺伝子（実施例３）。この他の種の不応性α－マンノースグリカンの減少又は排除のため、当業者は、所定の種のゲノムからＡＭＲ２ホモログを同定し、この１つ又は複数の相同遺伝子を破壊することができる。当業者は、所定の種に見出される全ての相同遺伝子又は相同遺伝子の組み合わせを破壊することが必要であるかもしれないことを理解する。より具体的には、当業者は、この他の種におけるα－マンノシダーゼ抵抗性Ｎ－グリカンを減少させるか又は排除するためには、保存配列からの縮重プライマーが、ＡＭｒ２ホモログのＰＣＲクローニングのために設計され得ることを認識する。又は、ＡＭＲ２ホモログのハイブリダイゼーションのためのプローブが構築されてもよい。

【００７２】

宿主細胞

本発明のもう１つの態様において、通常α－マンノシダーゼ抵抗性グリカンを有する糖タンパク質を産生する宿主細胞が、α－マンノシダーゼ抵抗性Ｎ－グリカンを含まない糖タンパク質を産生するよう操作された。１つの実施態様において、通常マンノシダーゼ抵抗性グリカンを有する治療用糖タンパク質を産生する宿主細胞が、マンノシダーゼ抵抗性グリカンを含まない治療用糖タンパク質を産生するよう操作された。好ましい実施態様において、本発明の宿主細胞は、宿主細胞におけるグリカン上のα－マンノシル化が、変異を欠く宿主細胞と比較して減少するよう、本発明の単離された核酸の破壊、欠失、又は変異により、組換えにより変異させられた。より好ましくは、Ｎ－グリカン上のα－マンノシダーゼ抵抗性が排除される。本発明の宿主細胞は、好ましくは、ピキア・パストリス又はピキア・メタノリカであるが、この他の宿主細胞、特に、酵母細胞も、本発明の範囲内に包含される。

【００７３】

いくつかの実施態様において、酵母宿主細胞内のＡＭＲ２遺伝子は、実施例３に記述され、図４に示されるＰＣＲノックアウト戦略により破壊される。本発明のこの他の実施態様において、α－マンノシダーゼ抵抗活性を欠損している宿主細胞は、本発明の核酸分子及び／又は方法を使用して、宿主細胞ゲノムに１つ以上の目的の配列又は遺伝子を組み込むために使用される。好ましい実施態様において、目的の配列又は遺伝子は宿主細胞の内因性遺伝子を破壊するために組み込まれる。例えば、ＡＭＲ２遺伝子が、目的の配列により破壊される。組み込みを含有する宿主細胞は、選択マーカーにより容易に同定され、酵母における選択マーカーは、一般的に、特定のアミノ酸もしくはヌクレオチドを欠く培地での形質転換細胞の増殖を可能にする栄養要求性遺伝子、又は対応する抗生物質を含有する培地での増殖を可能にする抗生物質耐性遺伝子である。

【００７４】

本発明のもう１つの態様において、本発明の核酸分子又はベクターにより形質転換された宿主細胞及びこの子孫が、提供される。本発明のいくつかの実施態様において、これらの細胞は、自由に複製するベクターであってもよいが、そうでなくてもよいベクターの上に本発明の核酸配列を保持している。本発明のこの他の実施態様において、核酸は宿主細

胞のゲノムに組み込まれている。

【００７５】

糖タンパク質のグリカン上のα－マンノース抵抗性に関与している活性をコードする破壊されるＡＭＲ２遺伝子は、好ましくは、ピキア属に属する酵母株に由来する。本発明に係るピキア属に属する酵母には、例えば、ピキア・パストリス、ピキア・フィンランジカ、ピキア・トレハロフィラ、ピキア・コクラメ、ピキア・メンブラネファシエンス、ピキア・メタノリカ、ピキア・ミニュータ（オガテア・ミニュータ、ピキア・リンドネリ）、ピキア・オプンチエ、ピキア・サーモトレランス、ピキ・サリクタリア、ピキア・グエルカム、ピキア・ピジペリ、ピキア・スチプチス、ピキアｓｐ．、及びこの他の酵母が含まれるが、これらに制限はされない。さらにもう１つの実施態様において、以下の宿主の１つにおいてＡＭＲ２活性及び／又は相同性を保持する遺伝子が破壊され得る：サッカロミセス・カステリー、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・クルイベリ、サッカロミセスｓｐ．、ハンセヌラ・ポリモルファ、クルイベロミセスｓｐ．、クルイベロミセス・ラクチス、カンジダ・アルビカンス、カンジダｓｐ．、アスペルギルス・フミガツス、アスペルギルス・ニヅランス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリゼ、トリコデルマ・リーセイ、クリソスポリウム・ルックノウェンス、フザリウムｓｐ．、フザリウム・グラミネウム、フザリウム・ベネナツム、フィスコミトレラ・パテンス、及びニューロスポラ・クラッサ。

【００７６】

β－マンノシル化活性をコードするＡＭＲ２遺伝子

このＡＭＲ２遺伝子のホモログを有するいくつかの酵母種は、β－マンノシル化活性も有することが観察された。従って、本発明のもう１つの態様において、ＡＭＲ２遺伝子はβ－マンノシルトランスフェラーゼ活性をコードする。１つの実施態様において、Ｐ．パストリス又はこの他の真菌種において、β－マンノシルトランスフェラーゼ活性をコードするＡＭＲ２が、個々に、かつ／又はこのホモログと組み合わせて破壊され、糖タンパク質上のα－マンノシル化抵抗性グリカンの減少又は排除をもたらす。

【００７７】

Ｏ－グリカン上のβ－マンノシル化の存在は、Ｔｒｉｍｂｌｅら、２００３による報告に記述されている。従って、さらなる実施態様において、Ｐ．パストリス及びこの他の種におけるα－マンノシダーゼ抵抗性Ｏ－グリカンが、ＡＭＲ２遺伝子及びこのホモログの破壊により減少させられるか又は排除される。

【００７８】

以下は、本発明の組成物及び方法を例示する実施例である。これらの実施例は、制限的なものと解釈されるべきではなく、実施例は例示のためにのみ含まれる。

【実施例１】

【００７９】

タチナタマメマンノシダーゼ及びα－１，２マンノシダーゼによるＮ－グリカンの消化

標準的なＮ結合型オリゴ糖（２０ｍｇ）を、１００ｍｌのＨＰＬＣグレード水で再構成した。この一部１０ｍｌを、０．６ｍｌシリコン処理チューブに添加した。試料を蒸発乾固させた。試料に、タチナタマメマンノシダーゼ（０．０３Ｕ）又はトリコデルマ・リーセイ（ｒｅｓｅｅｉ）由来のα－１，２マンノシダーゼ（０．０３ｍＵ、Ｄｒ Ｃｏｎｔｒｅｒａｓ Ｒ，Ｕｎｉｔ ｏｆ Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｈｅｎｔ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｇｈｅｎｔ，Ｂｅｌｇｉｕｍからの寄贈）と共に、１０ｍｌの５０ｍＭ酢酸アンモニウムを添加した。試料を、３７℃で、１６から２４時間、酵素と共にインキュベートした。次いで、試料を蒸発乾固させた。試料を１０ｍｌの水で再構成した。この後、試料を、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ ＭＳにより分析した。

【００８０】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

グリカンの分子量を、遅延引き出しを使用して、ボイジャー（Ｖｏｙａｇｅｒ）ＤＥＰＲＯリニア（ｌｉｎｅａｒ）ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）質量分析計を使用して決定した。各ウェルからの乾燥グリカンを、１５ｕＬの水に溶解させ、０．５ｕＬをステンレスのサンプルプレート上にスポットし、０．５ｕＬのＳ－ＤＨＢマトリックス（９ｍｇ／ｍＬのジヒドロキシ安息香酸、ｌｍｇ／ｍＬの５－メトキシサリチル酸を含む１：１水／アセトニトリル０．１％ＴＦＡ）と混合し、乾燥させた。

【００８１】

イオンは、４ｎｓのパルス時間でパルス状の窒素レーザー（３３７ｎｍ）を照射することにより発生された。装置を、１２５ｎｓの遅延時間及び２０ｋＶの加速電圧で、遅延引き出しモードで作動させた。グリッド電圧は９３．００％であり、ガイドワイヤ電圧は０．１０％であり、内部圧力は５×１０－７トル未満であり、低質量ゲート（ｌｏｗ　ｍａｓｓ　ｇａｔｅ）は８７５Ｄａであった。スペクトルは１００から２００のレーザーパルスの和から作製され、２ＧＨｚデジタイザーにより取得された。$Man_5GlcNAc_2$オリゴ糖を外部分子量標準として使用した。全てのスペクトルが、ポジティブイオンモードで装置により作製された。スペクトルの推定質量精度（ｍａｓｓ　ａｃｃｕｒａｃｙ）は、０．５％であった。

【実施例２】

【００８２】

ピキア・パストリス由来のＡＭＲ２遺伝子の同定及び配列分析

リジン及びグルタミン酸がリッチな反復配列を含有するサッカロミセス・セレビシエＭＮＮ４遺伝子（ジェンバンク（Ｇｅｎｂａｎｋ）登録＃Ｐ３６０４４）のＣ末端部分を、Ｐ．パストリスゲノム配列（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｃｈｉｃａｇｏ，ＩＬ）に対してブラスト検索（ｂｌａｓｔ）するためのプローブとして使用した。類似したリジン及びグルタミン酸がリッチなリピートを有するタンパク質をコードするＯＲＦを含むいくつかのＤＮＡ断片が同定された。このうちの１つのＯＲＦは、Ｓ．セレビシエＭｎｎ４ｐに構造的に類似している、推定Ｎ末端膜貫通ドメイン並びにリジン及びグルタミン酸がリッチなＣ末端尾部を含む６４４アミノ酸のタンパク質をコードすることが見出された。変異型の対立遺伝子を保持している株の表現型分析に基づき、この遺伝子をＡＭＲ２（アルファ－マンノシダーゼ抵抗性）と命名した。この後のＰ．パストリスゲノム配列のブラスト検索は、さらに３つのＡＭＲ２と密接に関連した遺伝子の存在を明らかにした。

【実施例３】

【００８３】

Ｐ．パストリスＹＡＳ１３７株（Δｏｃｈｌ，Δｐｎｏｌ，Δｍｎｎ４ｂ）（米国特許第７，２５９，００７号）を、ＡＭＲ２遺伝子ノックアウト実験のための宿主として使用した。ＹＡＳ１３７は、外側の鎖を含まない無電荷のＮ－グリカンを産生する（図２Ａ）。α－１，２－マンノシダーゼ（図２Ｂ）及び（α－１，２／α－１，３／α－１，６活性を有する）タチナタマメマンノシダーゼにより消化されると、株ＹＡＳ１３７から精製されたＮ－グリカンの有意な割合が、$Man_5GlcNAc_2$に変換され得る。しかしながら、２０％ものＮ－グリカンが、これらのα－マンノシダーゼに対して不応性である（図３）。ａｍｒ２欠失対立遺伝子（ａｍｒ２：：Kan^R）をＰＣＲオーバーラップ法により作成した（図４）。プライマーＰＢＳ１－２－Ｃ３（配列番号：１）（５’－ＴＡＡＴＡＧＴＧＧＡＧＡＡＡ－ＣＴＴＧＣＡＡＡＧＧ－３’）とＰＢＳ２－ＫＯ２（配列番号：２）（５’－ＧＴＧＣＴＡＣＣＴＡＡＡＴ－ＣＧＴＡＴＧＴＧＴＣＧＴＴＧＡＡＧＣＴＴＣＣＣＡＡＴＧＡＴＡＧＣ－３’）との対、及びプライマーＰＢＳ１－２－ＫＯ３（配列番号：３）（５’－ＣＴＣＣＣＴＡＴＡＧＴＧＡＧＴＣＧＴＡＴＴＣＡＴＡＴＧＡＴ－ＧＧＧＴＧＴＴＴＧＣＴＣＡＣＴＣ－３’）とＰＢＳ１－２－ＫＯ４（配列番号：４）（５’－ＣＴＴＧＧ－ＴＴＣＡＡＣＧＣＡＧＣＡＣＴＴＴＧ－ＡＣ－３’）との対を、ゲノムＤＮＡからＡＭＲ２遺伝子の５’及び３’隣接領域を増幅するために使用した（ゲノム

ＤＮＡはＮＲＲＬ－Ｙ１１４３０株から単離された）。プライマーＰＲ２９（配列番号：５）（５’－ＣＡＣＡＴＡＣＧＡＴＴＴＡＧ－ＧＴＧＡＣＡＣ－３’）とＰＲ３２（配列番号：６）（５’－ＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧ－ＧＡＧ－３’）との対を、ベクターｐＵＧ６（Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ ａｎｄ ＭｃＣｕｓｋｅｒ，１９９９）からＫａｎ（Ｇ４１８）耐性マーカーを増幅するために使用した。この後、１回目のＰＣＲ反応からの３つの産物全てを用いた第２の反応において、プライマーＰＢＳ１－２－Ｃ３及びＰＢＳ１－２－ＫＯ４を使用し、オーバーラップ産物を作製した。得られた融合ＰＣＲ産物を、ＹＡＳ１３７株を形質転換するために使用した。形質転換のためのＤＮＡは、０．３Ｍの最終濃度で酢酸ナトリウムを添加することにより調製した。次いで、１００パーセント氷冷エタノールを、７０％の最終濃度でＤＮＡ試料に添加した。ＤＮＡを遠心分離（１２０００ｇ×１０分）によりペレット化し、７０％氷冷エタノールにより２回洗浄した。ＤＮＡを乾燥させ、次いで、５０ｍｌの１０ｍＭトリス、ｐＨ８．０に再懸濁させた。ＹＡＳ１３７は、およそ２から６のＯ．Ｄ．になるまで、ＢＭＧＹ（緩衝最小グリセロール：１００ｍＭリン酸カリウム、ｐＨ６．０；１．３４％酵母ニトロゲンベース（ｙｅａｓｔ ｎｉｔｒｏｇｅｎ ｂａｓｅ）；４×１０$^{-5}$％ビオチン；１％グリセロール）において酵母培養物を増幅することにより調製した。１Ｍソルビトールで３回洗浄し、およそ１から２ｍｌの１Ｍソルビトールに再懸濁させることにより、酵母をエレクトロコンピテント（ｅｌｅｃｔｒｏｃｏｍｐｅｔｅｎｔ）にした。ＤＮＡ（１から２ｍｇ）を５０ｍｌのコンピテント酵母と混合し、１分間、氷上でインキュベートした。次いで、以下のパラメータを使用して、ＢＴＸエレクトロセルマニピュレーター（Ｅｌｅｃｔｒｏｃｅｌｌ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｏｒ）６００により、酵母を電気穿孔した：１．５ｋＶ、１２９オーム、及び２５ｍＦ。１ミリリットルのＹＰＤＳ（１％酵母抽出物、２％ペプトン、２％デキストロース、１Ｍソルビトール）を、電気穿孔された細胞に添加した。この後、形質転換された酵母を、選択寒天プレート上に播種した。形質転換体を、２００ｍｇ／ｍｌのＧ４１８硫酸塩、ＧＩＢＣＯ（商標）を含有するＹＰＤ培地上で選択した。欠失対立遺伝子ａｍｒ２：：Ｋａｎ^{R}の適切な組み込みを、ＰＣＲにより確認した。ノックアウトのスクリーニングは、ノックアウト構築物の５’部分及び３’部分両方のＰＣＲ増幅により実施した。ＰＢＳ１－Ｃ５（配列番号：７）（５’－ＴＴＴＴＣＣＴＣＡ－ＡＧＣＣＴＴＣＡＡＡ－ＧＡＣＡＧ－３’）およびＰＴＥＦ（配列番号：８）（５’－ＡＧＣＴＧＣＧＣＡ－ＣＧＴＣＡＡＧＡＣＴＧＴＣＡＡ－ＧＧ－３’）プライマーをノックアウト構築物の５’部分をスクリーニングするために使用し、ＰＢＳ１－２－Ｃ２（配列番号：９）（５’－ＴＡＣＣＧＡＴＡＣＡＴＡＣ－ＧＴＡＧＣＣＡＡＣＡＣ－３’）およびＫＡＮ１０（配列番号：１０）（５’－ＴＣＧＣＴＡＴＡＣＴＧＣＴＧ－ＴＣＧＡＴＴＣＧＡＴＡＣ－３’）プライマーをノックアウト構築物の３’部分をスクリーニングするために使用した。プライマーＰＴＥＦ及びＫＡＮ１０は、薬物耐性マーカー配列の５’及び３’末端にそれぞれアニーリングし；ＰＢＳ１－Ｃ５及びＰＢＳ１－２－Ｃ２は、ノックアウト構築物において使用されたＤＮＡの５’及び３’領域に隣接するゲノム内の配列に対して相補的であるため、両方のスクリーニングにおけるＰＣＲ産物の観察は、ＡＭＲ２遺伝子のノックアウトの成功の指標となる。新たな（Δｏｃｈ１，Δｐｎｏ１，Δｍｎｎ４ｂ，Δａｍｒ２）株を、ＰＢＰ１３０と名付けた。

【００８４】

ＰＣＲ増幅

エッペンドルフマスターサイクラー（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ Ｍａｓｔｅｒｃｙｃｌｅｒ）を全てのＰＣＲ反応のため使用した。ＰＣＲ反応は、鋳型ＤＮＡ、１２５ｍＭ ｄＮＴＰ、各０．２ｍＭの順方向プライマー及び逆方向プライマー、Ｅｘ Ｔａｑポリメラーゼ緩衝液（Ｔａｋａｒａ Ｂｉｏ Ｉｎｃ．）、並びにＥｘ Ｔａｑポリメラーゼ（Ｔａｋａｒａ Ｂｉｏ Ｉｎｃ．）を含有していた。予測されたＡＭＲ２遺伝子の５’側、予測されたＡＭＲ２遺伝子の３’側のＤＮＡ断片、及び薬物耐性マーカーを、９４℃２分の初期変性工程、９８℃１０秒、５２℃１０秒、７２℃２分の３０サイクル、７２℃１０分の最終伸長工程により増幅した。ＰＣＲ試料をアガロースゲル電気泳動により分離し、キア

ゲン（Ｑｉａｇｅｎ）のゲル抽出キット（Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ）を使用して、ＤＮＡバンドを抽出し、精製した。全てのＤＮＡ精製を、１０ｍＭトリス、ｐＨ８．０で溶出した。

【００８５】

検索及び整列化

ＮＣＢＩにおいて完全及び不完全な真菌ゲノムに由来する配列を入手するためＢＬＡＳＴ検索を実施し、発明の詳細に記述されたようなＡＭＲ２ホモログを同定した。図５に示される整列化は、Ｍｅｇａｌｉｇｎプログラム（ＤＮＡＳｔａｒ）及びＣｌｕｓｔａｌＷアルゴリズムを使用して構築された。

【実施例４】

【００８６】

Ｐ．パストリスにおけるα－マンノシダーゼ抵抗性Ｎ－グリカンの決定

ＹＡＳ１３７及びＰＢＰ１３０のＮ結合型グリカンを、メタノールにより誘導可能なＡＯＸ１プロモーターの調節下で発現されたＨｉｓタグ化レポータータンパク質の分泌により分析した。レポータータンパク質Ｋ３は、単一のＮ結合型グリコシル化部位を含有する。簡単に説明すると、ＢＭＧＹを含有する振とうフラスコに、ＹＡＳ－１３０の新鮮な培養物を接種し、およそ２０のＯ．Ｄ．になるまで培養した。培養物を遠心分離し、細胞ペレットをＢＭＭＹ（緩衝最小メタノール：１％グリセロールの代わりに０．５％メタノールを含む以外はＢＭＧＹと同一）により洗浄した。細胞ペレットを、元のＢＭＧＹ培養物の１／５の容量でＢＭＭＹに再懸濁させ、２４時間、振とう機に置いた。遠心分離によりバイオマスをペレット化し、培養培地を新鮮なチューブに移すことにより、分泌されたタンパク質を採集した。次いで、Ｈｉｓタグ化Ｋ３タンパク質を、Ｎｉ－アフィニティーカラム上で精製し、ＰＮＧａｓｅ（Ｃｈｏｉら、２００３）により消化した。

【実施例５】

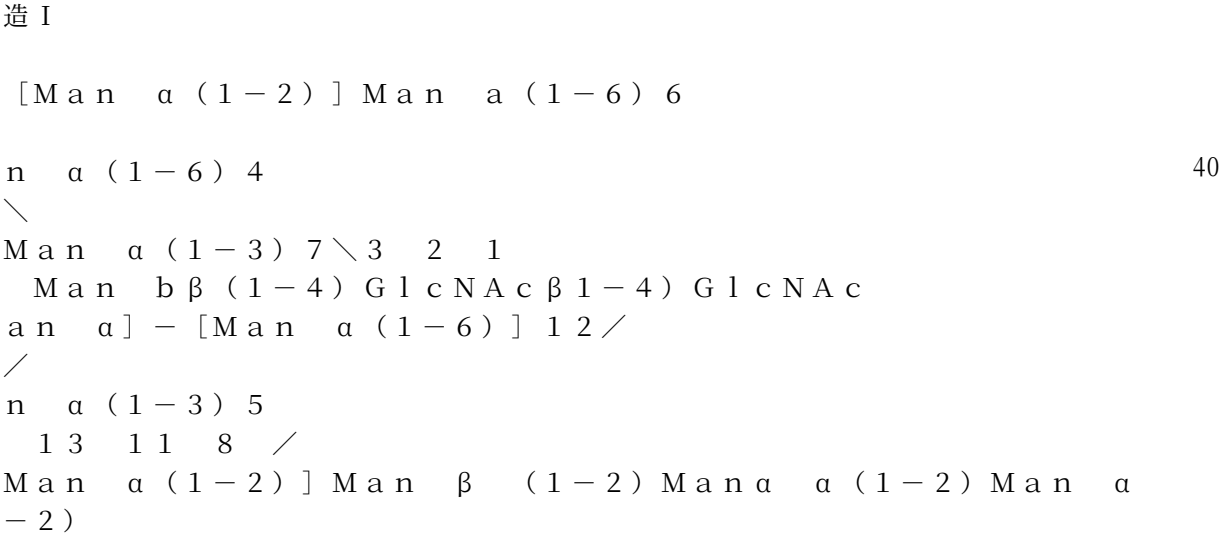
【００８７】

Ｍａｎ１０及びＭａｎ１１／１２の分析

α－マンノシダーゼ消化に対して不応性のグリカンの構造分析は、コアマンノースオリゴ糖に結合した少なくとも１つのβ１，２－マンノシル残基を開示した。構造Ｉは、この鎖に決定的に連結され得、高マンノース構造の不可欠な部分である可能性が高い分枝５の上に示された提唱されたβ－マンノシル残基１３を示している。以下のグリカン構造（構造Ｉ）上の残基は、付加的な数（１３、１４、１５）を任意に追加して、Ｚｉｅｇｌｅｒら（Ｚｉｅｇｌｅｒ，Ｆ．Ｄ．，Ｊ．Ｃａｖａｎａｇｈ，Ｃ．Ｌｕｂｏｗｓｋｉ，Ｒ．Ｂ．Ｔｒｉｍｂｌｅ，１９９９，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　９：４９７－５０５）による論文に基づき番号付けされた。

【００８８】

構造Ｉ



【００８９】

３つの試料からのデータを、β－マンノシル残基の存在について分析した。
試料１：「ｍａｎ１０」－これは、ｍａｎ９／１０混合物として記載された最初の試料であった。
【００９０】
試料２：「ｍａｎ１１」－これは、推定された５０％ｍａｎ１１、１５％ｍａｎ１２を有するＰ４画分６３から６６からのｍａｎ１１／ｍａｎ１２混合物として記載された第２の調製物であった。
【００９１】
試料３：「ｍａｎ１０＿ｄｉｇｅｓｔ」－これは、最初のｍａｎ１１／ｍａｎ１２混合物が、ｍａｎ９又はｍａｎ１０へとトリムバック（ｔｒｉｍ　ｂａｃｋ）するため、α-１，２－マンノシダーゼにより処理された、第３の調製物であった。
【００９２】
コアｍａｎ８／ｍａｎ９混合物を含有する第４の試料も調査した。
【００９３】
試料をＤ２Ｏから凍結乾燥させ、２００ｕＬ又は５００ｕＬのＤ２Ｏに再溶解させた。
【００９４】
ＮＭＲデータは、２５Ｃで、バリアンイノバ（Ｖａｒｉａｎ　Ｉｎｏｖａ）６００ＭＨｚ及び８００ＭＨｚ分光計で収集された。
【００９５】
バリアンライブラリー（グラジエントＣＯＳＹ、ＴＯＣＳＹ、ＮＯＥＳＹ、グラジエントＨＳＱＣ及びＨＭＢＣ）からの標準実験を、特徴決定のため使用した。
【００９６】
β－マンノシル残基の証拠：
３つの試料は、全て、β－アノマーと一致するＮＭＲシグナルを有する。３つのスペクトル特性が、この主張を支持する：化学シフト、Ｈ１－Ｈ２スカラーカップリング、及び分子内ＮＯＥ測定。
【００９７】
プロトン化学シフト。
【００９８】
α－マンノシル残基のアノマープロトンの化学シフト値は、典型的には５．０ｐｐｍ超であり、β－マンノシル残基は、一般的に５．０ｐｐｍ未満である。α－マンノシル残基３、４、及び１２のような例外が存在し、従って、これは単独ではアノマー配置を立証しない。
【００９９】
４つの試料のプロトン１Ｄスペクトルのアノマー領域を示す分析は、１１に１－２結合したβ－マンノシル残基に対応する２つのピーク１３及び１３ｔを明らかにした。ここで、１３ｔは末端残基であり、１３はα－マンノシル残基１４によりさらに置換されていると思われる。５ｐｐｍ未満の化学シフト領域にコア残基３及び４並びに残基１２のみを示すＺｉｅｇｌｅｒら、において見出された高マンノース構造からのＮＭＲデータと、これらのスペクトルを比較することができる。
【０１００】
Ｔｒｉｎｅｌら、ＪＢＣ　１９９９及びＮｉｔｚら、ＪＢＣ　２００２に報告されたデータに精密に対応する、残基１３からの別個のＨ１、Ｈ２、Ｈ３、Ｈ４、及びＨ５シグナルを示す２Ｄ　ＴＯＣＳＹデータから、付加的な化学シフトが抽出された。末端残基１３ｔからのシグナルは、よく分離されていないが、類似したシフトを有する（表１参照）。
【０１０１】
２Ｄ　ＴＯＣＳＹ（プロトン－プロトン相関マップ）は、β－Ｍａｎ１３残基に属するクロスピーク（ｃｒｏｓｓｐｅａｋｓ）を示した（データは示されていない）。β－マンノシル残基の化学シフト及び文献の値を、表１に列挙する。
【０１０２】

【表１】

表 1

	H1	H2	H3	H4	H5
b-man **13**	1. 90	1. 35	1. 75	1. 64	1. 40
b-man **13t**	1. 86	1. 27	1. 67	1. 47	1. 40
Trinel ら	1. 90-5	1. 16-4	1. 63-3	1. 47-3	1. 41
	.05	.41	.73	.59	
Nitz ら	1. 95	1. 42	1. 62	1. 56	

【０１０３】

α－マンノシル残基の化学シフトは、一般に、同一の次数を有するが、Ｈ２の値は典型的にはおよそ０．１ｐｐｍ低く、Ｈ３はおよそ０．１ｐｐｍ高く、Ｈ５はおよそ０．２ｐｐｍ高い。

【０１０４】

ＮＯＥクロスピーク

β－アノマープロトンは、ピラノース環のＨ３及びＨ５と同一の面上にあり、約２．４オングストローム離れているが、α－アノマープロトンは、反対面上にあり、Ｈ３又はＨ５のいずれかから４オングストロームにより近い。従って、β－アノマーにおいてはＨ１とＨ３及びＨ５との間の強いＮＯＥシグナルが予想される。これは、スペクトルが、空間相互作用を通して生じ、高度に距離依存性であるＮＯＥクロスピークを示す、ＮＯＥＳＹデータ（示されていない）に明白に示されている。４．８９５ｐｐｍにおける水平線は、β－ｍａｎ１３残基のＨ１に対応する（示されていないデータ）。上パネルにおけるＴＯＣＳＹ実験により決定されるように、垂直線は、これらのピークの特定の共鳴への割り当てを確認する。強いピークＨ３及びＨ５は、Ｈ１とＨ３又はＨ５との間の残基内ＮＯＥによるものであり、これは、β－アノマーの割り当てを確認する（示されていないデータ）。

【０１０５】

Ｈ１－Ｈ２スカラー結合（ピークの「分裂」）

共鳴の「分裂」及び多重線構造を生じさせるプロトンスカラー結合の大きさは、関与しているプロトンの相対的な方向と関係がある。従って、これは、アノマー配置の指標となり得る。

【０１０６】

α－マンノシル残基におけるＨ１－Ｈ２スカラー結合は、約１．５Ｈｚであり、β－アノマーは＜１Ｈｚである。極めて狭い線を有するスペクトルにおいて、α－アノマーの分裂は見ることができるが、β－アノマーは小さすぎるため、シグナルが一重線のように見える。これらのデータにおいて、線幅は最適ではなく、従って、いずれのピークのセットも一重線のように見える。しかしながら、２Ｄ　ＴＯＣＳＹ（データは示されていない）におけるピークのパターン及び強度も、結合の大きさにも依存する。ＴＯＣＳＹスペクトルからのある領域は、どこで水平線がＨ１シグナルに対応するか、及びクロスピークがそれぞれの残基内の他のプロトンに由来することを示している。第１に、β－Ｍａｎ残基（

３、１３、１３ｔ）に連結されたＨ２領域のピークは、α－Ｍａｎピーク（例えば、４）より低い強度である。強度は、シグナル転移の効率、従って、結合定数のサイズのおよその指標である。

【０１０７】

α－アノマーは、Ｈ１からＨ３まで、時にはＨ４までの付加的なクロスピークも示しており－これは、Ｈ１及びＨ２との間のスカラー結合が、Ｈ２を超えてシグナルを転移させるほどに十分に大きいことを意味している。他方、β－アノマーは、Ｈ１－Ｈ２クロスピークのみを示す；これは、カップリングが小さく、シグナルの転移が極めて非効率的であり、環内の他のプロトンに継続しないためである。１３、１３ｔ、及び３についてのパターンは同一であるが、この他のマンノシル残基とは明白に異なっている。

【０１０８】

β－マンノシル１３（ｔ）の結合位置の証拠。

【０１０９】

Ｈ１及びＨ２の化学シフトの変化。

【０１１０】

公知の高マンノース構造について、Ｈ１及びＨ２プロトン化学シフトを、標準的な文献の値と比較することは、構造に到達するために一般的に十分である。この場合、変則のシグナルのため、結合を確立するために、より多くの努力を要した。しかしながら、Ｍａｎ８／９スペクトルについて示されたような、コア構造に割り当てられ得るいくつかのピークが存在した。Ｍａｎ８／９及びＭａｎ９／１０のスペクトル（示されていないデータ）を比較すると、β－マンノシル残基として上に記載された新たなシグナル１３及び１３ｔを含む多くの差異が存在する。

【０１１１】

試料Ｍａｎ９／１０及びＭａｎ１１／１２のスペクトルを比較すると、９に類似している末端α－マンノシル残基が戻っていた。これは、Ｍａｎ９／１０スペクトルの中の６、１２と表示されたピークが、もう１つのα－マンノースとの置換によりシフトすると予想されるため、末端６である可能性が高いことを示唆するであろう。これは、マンノシダーゼにより消化された試料、Ｍａｎ１０－ｄｉｇｅｓｔにおいて元の位置に戻る。Ｍａｎ１１及びＭａｎ１０－ｄｉｇｅｓｔ試料からの炭素－プロトン相関データ（示されていないＨＳＱＣ、ＨＭＢＣスペクトル）は、この残基が１－６結合で接続されていることを確認する。

【０１１２】

１４と表示されたシグナルは、典型的なＭａｎ９構造に見られるような、置換されたマンノシル残基７ではなく、１３に結合したα－マンノシル残基であることが提唱される。これは、下記のＮＯＥデータに基づく。しかしながら、アノマープロトンの化学シフトを説明するためには、これはおそらくさらに置換されている。

【０１１３】

ＮＯＥデータの分析。

【０１１４】

結合部位を決定するための第一のデータは、空間的に近いプロトンを示すＮＯＥスペクトルからである。従って、残基内ＮＯＥクロスピークに加えて、残基間クロスピークを観察することもでき、これは一般的に結合位置を示す。Ｍａｎ（１－２）結合の場合、同一残基内のＨ１及びＨ２との間、グリコシド結合した残基のＨ１とＨ２との間にクロスピークが観察され、しばしば、グリコシド結合した残基のＨ１とＨ１との間にも観察される。

【０１１５】

ｍａｎ１０試料のＮＯＥＳＹ及びＴＯＣＳＹスペクトルからの領域を分析した（データは示されていない）。上パネルにおいて、ピークは、同定されたマンノシル残基のＨ１とＨ２との間の相関を表す。中央パネルにおいて、１１と表示されたシグナルは、この割り当てと一致して、マンノシル残基８のＨ１とＨ２との間のＮＯＥ相関（ボックス）を示す。残基１３及び１３ｔのアノマープロトンからのＮＯＥクロスピークを調査した場合、マ

ンノシル残基１１のＨ２との相関が存在する。これは、β－マンノシル残基を、コアオリゴ糖の１－３分枝に連結する。下パネルは、１３ｔのＨ１と１１のＨ１との間のさらなる強いＮＯＥ相関を示しており、やはりβ（１－２）結合と一致している。

【０１１６】

この構造的な断片は、マンノシル残基１１のＨ２の異常な化学シフトによってさらに支持される；この値は、β－ｍａｎにより２－置換されたα－マンノシル残基についての４．２６ｐｐｍという化学シフトを示している、Ｔｒｉｍｂｌｅら（Ｔｒｉｍｂｌｅ，Ｒ．Ｂ．，Ｃ．Ｌｕｂｏｗｓｋｉ，Ｃ．Ｈａｕｅｒ ＩＩＩ，Ｒ．Ｓｔａｃｋ，Ｌ．ＭｃＮａｕｇｈｔｏｎ，Ｔ．Ｇｅｍｍｉｌｌ，ａｎｄ Ｓ．Ａｎａｎｄ Ｋｕｍａｒ，２００４，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １４：２６５－２７４））からのデータと一致している。さらに、プロトン－炭素相関データ（ＨＳＱＣ及びＨＭＢＣスペクトル、示されていない）は、マンノシル１１（例えば、８及び５も）のＣ２の炭素化学シフトがグリコシド結合内の炭素に特徴的な高い値（およそ８２から８４ｐｐｍ）にあることを示している。

【０１１７】

少なくとも１つのβ－マンノシル残基がコアマンノースオリゴ糖と１－２結合していることが示され得ると結論付けられる。β－マンノシル残基のための複数の結合部位が存在するかもしれず、これら自体が置換されているかもしれない。

【０１１８】

【表２】

（参考文献）

Choi, B-K. *et al.* 2003. Use of combinatorial genetic libraries to humanize *N*-linked glycosylation in yeast *Pichia pastoris*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100; 5022-5027.

Cregg, J.M. *et al.* 2000. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. *Mol. Biotechnol*. 16; 23-52.

Cutler, J.E. 2001 *N*-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med. Mycology*. 39; S75-S86.

Han, Y., Kanbe, T., Cherniak, R. and Cutler, J.E. 1997. Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect. Immun.* 65; 4100-4107.

Joualt, T., Delaunoy, C. Sendid, B., Ajana, R. and Poulain, D. 1997. Differential humoral response against α-and β-linked mannose residues associated with tissue invasion by *Candida albicans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4; 328-333.

Kobayashi, H., Shibata, N. and Suzuki, S. 1986. Acetolysis of *Pichia pastoris* IFO 0948 Strain Mannan Containing α-1,2 and β-1,2 Linkages Using Acetolysis medium of Low Sulfuric Acid Concentration. *Arch. Biochem. Biophys.* 245; 494-508.

Kobayashi, H *et al.* 1989. Structural study of phosphomannan of yeast-form cells of *Candida albicans* J-1012 strain with special reference to application of mild acetolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 272; 364-375.

Kobayashi, H. *et al.* 1992. Structural study of a cell wall mannan-protein complex of the pathogenic yeast *Candida glabrata* IFO 0622 strain. *Arch. Biochem. Biophys.*

294; 662-669.

Kobayashi, H. *et al.* 1994. Structural modification of cell wall mannans of *Candida albicans* serotype A strains grown in yeast extract-Sabouraud liquid medium under acidic conditions. *Infect. Immun.* 62; 968-973.

Rosenfeld, L. and Ballou, C. 1974. Genetic Control of Yeast Mannan Structure. *J. Biol. Chem.* 249; 2319-2321.

Shibata, N., Ichikawa , T., Tojo, M. *et al.* 1985. Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792 and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch. Biochem. Biophys.* 243; 338-348.

Shibata, N., Hisamichi, K., Kobayashi, H., and Suzuki, S. 1993a. Complete assignment of 1H and 13C nuclear magnetic resonance chemical shifts of beta-1,2-linked mannooligosaccharides isolated from the phosphomannan of the pathogenic yeast *Candida albicans* NIH B-792 strain. *Arch Biochem Biophys.* 302; 113-117.

Shibata, N., Hisamichi, K., Kobayashi, H., and Suzuki, S. 1993b. Structural study of a cell-wall mannan of *Saccharomyces kluyveri* IFO 1685 strain. Presence of a branched side chain and beta-1,2-linkage. *Eur J Biochem.* 217; 1-12.

Suzuki, A. *et al.* 1997. Charcterization of *b*-1,2 Mannosyltransferase in *Candida guilliermondii* and Its Utilization in the Synthesis of Novel Oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 272; 16822-16828.

Takeuchi, Makato. 1997. Trial for Molecular Breeding of Yeast for the Production of Glycoprotein Therapeutics. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* 9; S29-S35.

Trimble, R.B. *et al.* 2004. Characterization of *N*- and *O*- linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris. Glycobiology.* 14; 265-274.

【図面の簡単な説明】

【０１１９】

【図１】Ｐ．パストリスＡＭＲ２遺伝子の核酸配列（配列番号：１１）及びアミノ酸配列（配列番号：１２）を示す。

【図２】Ａ．Ｐ．パストリスＹＡＳ１３７（Δｏｃｈ１，Δｐｎｏ１，Δｍｎｎ４ｂ）のＮ－グリカンを示すＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ。Ｂ．α－１，２マンノシダーゼによる消化後のＰ．パストリスＹＡＳ１３７のＮ－グリカンを示すＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ。Ｃ．Ｐ．パストリスＰＢＰ１３０（Δｏｃｈ１，Δｐｎｏ１，Δｍｎｎ４ｂ，Δａｍｒ２）のＮ－グリカンを示すＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ。Ｄ．α－１，２マンノシダーゼによる消化後のＰ．パストリスＰＢＰ１３０（Δｏｃｈ１，Δｐｎｏ１，Δｍｎｎ４ｂ，Δａｍｒ２）のＮ－グリカンを示すＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳ。

【図３】α－１，２マンノシダーゼ及びタチナタマメマンノシダーゼによる消化後のＰ．パストリスＹＡＳ１３７のＮ－グリカンのＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳスペクトル。

【図４】薬物耐性マーカー、カナマイシンを使用したＰ．パストリスＡＭＲ２の融合ＰＣＲノックアウト戦略を例示する。

【図５－１】Ｐ．パストリスＡＭＲ２遺伝子の推定アミノ酸配列が、カンジダ・アルビカンス由来のＡＭＲ２ホモログのアミノ酸配列と整列化されて示されている。ＡＭＲ２ｐ（配列番号：１２）、ＡＭＲ１ｐ（配列番号：１３）、ＡＭＲ３ｐ（配列番号：１４）、ＡＭＲ４ｐ（配列番号：１５）、ＣａＯＲＦ１（配列番号：１６）、ＣａＯＲＦ２（配列番

号：１７）、ＣａＯＲＦ３（配列番号：１８）、ＣａＯＲＦ４（配列番号：１９）、ＣａＯＲＦ５（配列番号：２０）、ＣａＯＲＦ６（配列番号：２１）、ＣａＯＲＦ７（配列番号：２２）、ＣａＯＲＦ８（配列番号：２３）。

【図５－２】Ｐ．パストリスＡＭＲ２遺伝子の推定アミノ酸配列が、カンジダ・アルビカンス由来のＡＭＲ２ホモログのアミノ酸配列と整列化されて示されている。ＡＭＲ２ｐ（配列番号：１２）、ＡＭＲ１ｐ（配列番号：１３）、ＡＭＲ３ｐ（配列番号：１４）、ＡＭＲ４ｐ（配列番号：１５）、ＣａＯＲＦ１（配列番号：１６）、ＣａＯＲＦ２（配列番号：１７）、ＣａＯＲＦ３（配列番号：１８）、ＣａＯＲＦ４（配列番号：１９）、ＣａＯＲＦ５（配列番号：２０）、ＣａＯＲＦ６（配列番号：２１）、ＣａＯＲＦ７（配列番号：２２）、ＣａＯＲＦ８（配列番号：２３）。

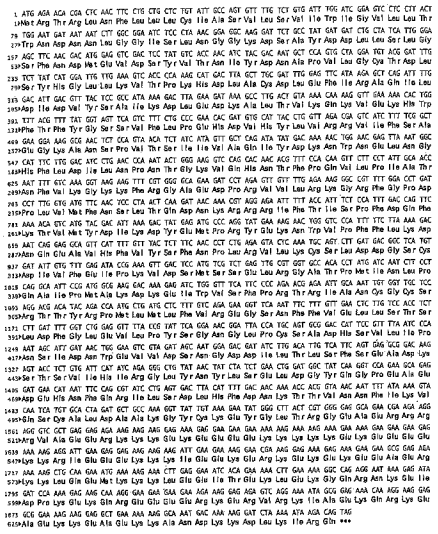
【図５－３】Ｐ．パストリスＡＭＲ２遺伝子の推定アミノ酸配列が、カンジダ・アルビカンス由来のＡＭＲ２ホモログのアミノ酸配列と整列化されて示されている。ＡＭＲ２ｐ（配列番号：１２）、ＡＭＲ１ｐ（配列番号：１３）、ＡＭＲ３ｐ（配列番号：１４）、ＡＭＲ４ｐ（配列番号：１５）、ＣａＯＲＦ１（配列番号：１６）、ＣａＯＲＦ２（配列番号：１７）、ＣａＯＲＦ３（配列番号：１８）、ＣａＯＲＦ４（配列番号：１９）、ＣａＯＲＦ５（配列番号：２０）、ＣａＯＲＦ６（配列番号：２１）、ＣａＯＲＦ７（配列番号：２２）、ＣａＯＲＦ８（配列番号：２３）。

【図５－４】Ｐ．パストリスＡＭＲ２遺伝子の推定アミノ酸配列が、カンジダ・アルビカンス由来のＡＭＲ２ホモログのアミノ酸配列と整列化されて示されている。ＡＭＲ２ｐ（配列番号：１２）、ＡＭＲ１ｐ（配列番号：１３）、ＡＭＲ３ｐ（配列番号：１４）、ＡＭＲ４ｐ（配列番号：１５）、ＣａＯＲＦ１（配列番号：１６）、ＣａＯＲＦ２（配列番号：１７）、ＣａＯＲＦ３（配列番号：１８）、ＣａＯＲＦ４（配列番号：１９）、ＣａＯＲＦ５（配列番号：２０）、ＣａＯＲＦ６（配列番号：２１）、ＣａＯＲＦ７（配列番号：２２）、ＣａＯＲＦ８（配列番号：２３）。

【図５－５】Ｐ．パストリスＡＭＲ２遺伝子の推定アミノ酸配列が、カンジダ・アルビカンス由来のＡＭＲ２ホモログのアミノ酸配列と整列化されて示されている。ＡＭＲ２ｐ（配列番号：１２）、ＡＭＲ１ｐ（配列番号：１３）、ＡＭＲ３ｐ（配列番号：１４）、ＡＭＲ４ｐ（配列番号：１５）、ＣａＯＲＦ１（配列番号：１６）、ＣａＯＲＦ２（配列番号：１７）、ＣａＯＲＦ３（配列番号：１８）、ＣａＯＲＦ４（配列番号：１９）、ＣａＯＲＦ５（配列番号：２０）、ＣａＯＲＦ６（配列番号：２１）、ＣａＯＲＦ７（配列番号：２２）、ＣａＯＲＦ８（配列番号：２３）。

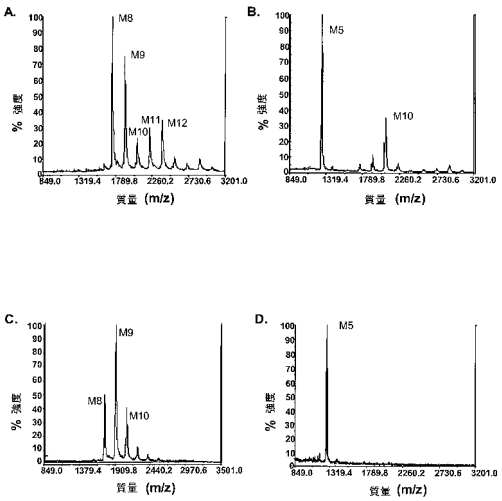
【図１】

FIGURE 1



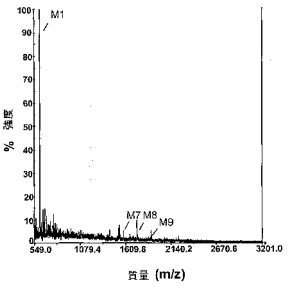
【図２】

FIGURE 2



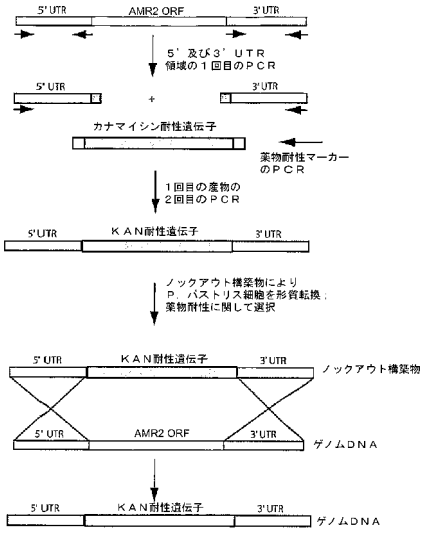
【図３】

FIGURE 3

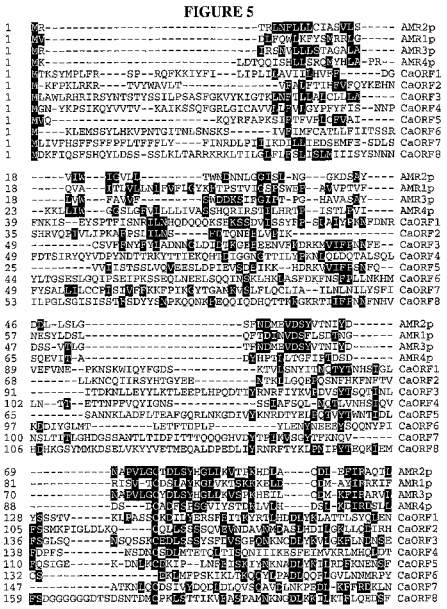


【図４】

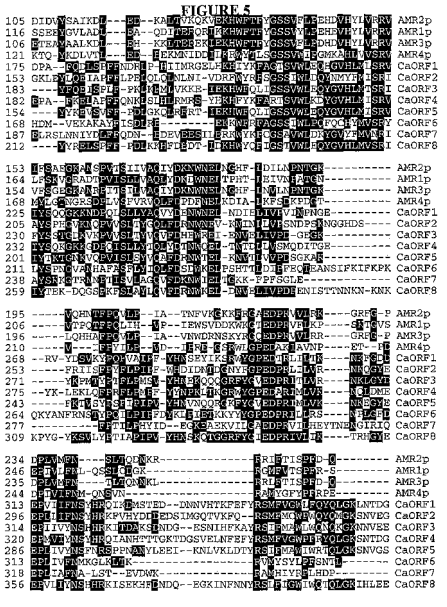
FIGURE 4



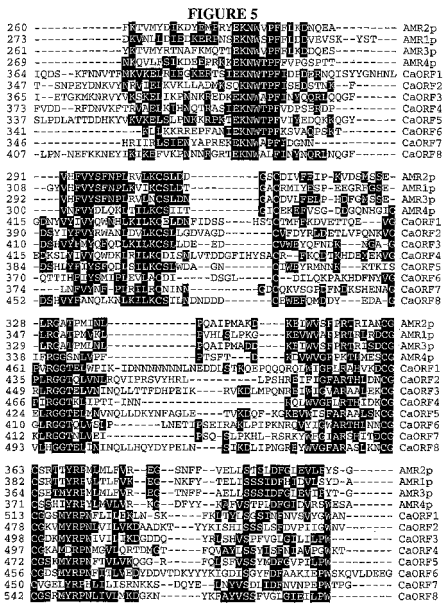
【図５－１】



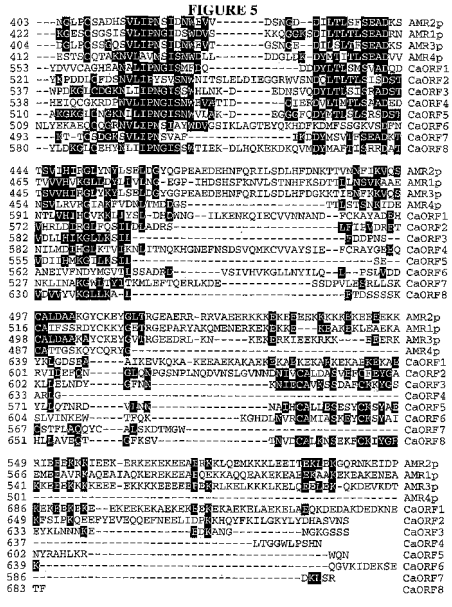
【図５－２】



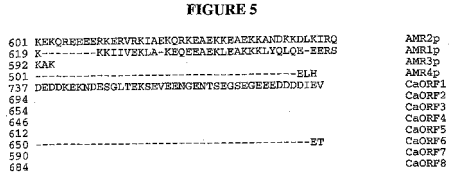
【図５－３】



【図５－４】



【図５－５】



【配列表】
0004954866000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特表２００４－５０１６４２（ＪＰ，Ａ）
J. Biol. Chem., １９９０年, vol.265, no.12, pp.7042-7049
Biochem. J., １９９４年, vol.299, no.1, pp.23-27
J. Biol. Chem., １９９７年, vol.272, no.27, pp.16822-16828
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, ２００３年, vol.100, no.9, pp.5022-5027

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
C12N 1/19
C12P 21/02
UniProt/GeneSeq
GenBank/GeneSeq
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed