I853878

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I853878 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：109100866 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 01 月 10 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/57 (2006.01)* *C12N15/63 (2006.01)*
C12N9/14 (2006.01) *C12N1/19 (2006.01)*
C12P21/02 (2006.01)

(30)優先權：2019/01/11 歐洲專利局 19151376.1

(71)申請人：瑞士商隆沙有限公司 (瑞士) LONZA LTD (CH)
瑞士

(72)發明人：蓋瑟 布里吉特 GASSER, BRIGITTE (AT)；雷尼格 克里納 REBNEGGER, CORINNA (AT)；弗洛里斯維爾格斯 米雷爾奇塔利 FLORES VILLEGAS, MIRELLE CITLALI (MX)；瑪塔諾維奇 迪爾塔 MATTANOVICH, DIETHARD (AT)

(74)代理人：李世章；彭國洋

(56)參考文獻：

WO 2015/158800A1 WO 2017/021541A1

審查人員：陳婷妤

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：1 共 232 頁

(54)名稱

重組宿主細胞中的碳源調控蛋白質製造

(57)摘要

一種重組宿主細胞，其包含內源性基因，該內源性基因編碼包含被鑑別為 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列的 FLO8 蛋白質或其同源物，該宿主細胞藉由一或多種遺傳修飾來工程化以便與該一或多種遺傳修飾之前的該宿主細胞相比，減少該基因之表現，並且該宿主細胞包含異源表現匣，該異源表現匣包含在表現匣啟動子(ECP)控制下的所關注基因(GOI)，該 ECP 可藉由非甲醇碳源來抑制，及使用該重組宿主細胞來製造所關注蛋白質的方法。

A recombinant host cell comprising an endogenous gene encoding a FLO8 protein comprising the amino acid sequence identified as SEQ ID NO:1 or a homologue thereof, which host cell is engineered by one or more genetic modifications to reduce expression of said gene compared to the host cell prior to said one or more genetic modifications, and which host cell comprises a heterologous expression cassette comprising a gene of interest (GOI) under the control of an expression cassette promoter (ECP) which ECP is repressible by a non-methanol carbon source, and a method of producing a protein of interest using said recombinant host cell.

公告本

I853878

【發明摘要】

【中文發明名稱】重組宿主細胞中的碳源調控蛋白質製造

【英文發明名稱】CARBON-SOURCE REGULATED PROTEIN PRODUCTION IN A RECOMBINANT HOST CELL

【中文】

一種重組宿主細胞，其包含內源性基因，該內源性基因編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物，該宿主細胞藉由一或多種遺傳修飾來工程化以便與該一或多種遺傳修飾之前的該宿主細胞相比，減少該基因之表現，並且該宿主細胞包含異源表現匣，該異源表現匣包含在表現匣啟動子(ECP)控制下的所關注基因(GOI)，該ECP可藉由非甲醇碳源來抑制，及使用該重組宿主細胞來製造所關注蛋白質的方法。

【英文】

A recombinant host cell comprising an endogenous gene encoding a FLO8 protein comprising the amino acid sequence identified as SEQ ID NO:1 or a homologue thereof, which host cell is engineered by one or more genetic modifications to reduce expression of said gene compared to the host cell prior to said one or more genetic modifications, and which host cell comprises a heterologous expression cassette comprising a gene of interest (GOI) under the control of an expression cassette promoter (ECP) which ECP is repressible by a non-methanol carbon source, and a method of producing a protein of interest using said recombinant host cell.

【指定代表圖】第（ 無 ）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】重組宿主細胞中的碳源調控蛋白質製造

【英文發明名稱】CARBON-SOURCE REGULATED PROTEIN PRODUCTION IN A RECOMBINANT HOST CELL

【技術領域】

【0001】 本發明係關於在重組宿主細胞中製造所關注蛋白質(protein of interest; POI)，該宿主細胞包含表現編碼POI之所關注基因(gene of interest; GOI)的異源表現匣，該宿主細胞經工程化以減少FLO8蛋白質之表現。

【先前技術】

【0002】 在重組宿主細胞培養物中製造的蛋白質作為診斷及治療劑已變得愈來愈重要。為此目的，對細胞進行工程化及/或選擇以製造異常高水準的所關注之重組或異源蛋白質。細胞培養條件的優化對於重組或異源蛋白質的成功商業製造很重要。

【0003】 已經在細胞培養中，使用原核及真核宿主細胞來成功地製造出所關注蛋白質(protein of interest; POI)。真核宿主細胞，特別是哺乳動物宿主細胞、酵母或絲狀真菌、或細菌通常用作生物藥物蛋白以及原料化學品的製造宿主。最突出的實例為酵母，如釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)或多形漢遜酵母(*Hansenula*

polymorpha)，絲狀真菌，如泡盛麴黴(*Aspergillus awamori*)或里氏木黴(*Trichoderma reesei*)，或哺乳動物細胞，如CHO細胞。甲基營養型酵母，例如巴斯德畢赤酵母，因有效分泌異源蛋白質而聞名。巴斯德畢赤酵母已被重新分類為新屬類*Komagataella*，並被分成三個物種*K. pastoris*、*K. phaffii*、及*K. pseudopastoris*。通常用於生物技術應用的菌株屬於兩個擬議物種*K. pastoris*及*K. phaffii*。菌株GS115、X-33、CBS2612及CBS7435為*K. phaffii*，而SMD系列蛋白酶缺陷型菌株(例如SMD1168)被分類為*K. pastoris*模式種，該模式種為所有可用巴斯德畢赤酵母菌株的參考菌株(Kurtzman 2009, J Ind Microbiol Biotechnol.36(11):1435-8)。Mattanovich等人(Microbial Cell Factories 2009, 8:29 doi:10.1186/1475-2859-8-29)描述了*K. pastoris*的模式菌株DSMZ 70382的基因組測序，並分析了其分泌組及糖轉運蛋白。

【0004】 WO2015/158808A2揭示了經工程化以過度表現輔助蛋白的重組宿主細胞。

【0005】 WO2015/158800A1揭示了藉由工程化以使某些蛋白質(稱為KO蛋白)表現不足來提高宿主細胞表現及/或分泌POI的能力，此等蛋白質對於宿主細胞而言為內源性的並且已被證明在過度表現時降低了蛋白質產率。因此，已選擇此類KO蛋白質作為剔除標靶以提高產率。轉而

發現在巴斯德畢赤酵母宿主細胞株中使KO蛋白質表現不足可將模型蛋白的產率提高1.2至2.4倍。誘導型(pAOX1)或組成型(pGAP)啟動子已得到使用。KO蛋白質已被鑑別為釀酒酵母FLO8蛋白質的巴斯德畢赤酵母同源物，釀酒酵母HCH1蛋白質的巴斯德畢赤酵母同源物，而KO3為釀酒酵母SCJ1蛋白質的巴斯德畢赤酵母同源物。

【0006】 Rebnegger等人(Applied and Environmental Microbiology 2016, 82(15):4570-4583)描述了巴斯德畢赤酵母*flo8*缺失突變體的葡萄糖有限的恆化器培養物，以防止過濾器堵塞。

【0007】 重組宿主細胞中用於蛋白質製造的啟動子為受調控的(例如，在向培養基中添加甲醇後誘導，由甲醇控制)，或具有持續活性(組成型)。甲醇控制的啟動子會導致技術限制，例如反應器中的廢熱或氧氣供應。

【0008】 WO2013705055 1A1揭示了巴斯德畢赤酵母的一系列碳源可調控啟動子(命名為pG1-pG8)，並且藉由限制細胞培養物中的碳源來誘導蛋白質製造。

【0009】 WO2017021541A1揭示了巴斯德畢赤酵母的碳源可調控啟動子(命名為pG1)的變異體，此等變異體由除了甲醇之外的碳源來調控，亦即不受甲醇控制，例如在生長階段在碳源存在下被抑制，並在製造階段藉由限制碳源而被誘導。

【0010】 Prielhofer等人(Microbial Cell Factories 2013; 12(5):1-10)描述了在不存在甲醇的情況下可調控及誘導的巴斯德畢赤酵母啟動子。

【0011】 Prielhofer 等人 (Biotechnology and Bioengineering.2018;115:2479 - 2488)描述了與野生型啟動子相比，具有大大增強的誘導特性的葡萄糖調控的P_{GTH1}啟動子及工程化的變異體。

【0012】 EP2669375A1揭示了藉由高水準表現MPP1同源物而具有改良的蛋白質表現的酵母。

【0013】 Hye Young Kim 等人(Biochemical and Biophysical Research Communications 2014, 449:202-207)描述了Flo8活化子的兩個結構域在一組靶基因的轉錄活化中的作用，以及藉由與Mss11活化子相互作用而引起的Flo8作用模式。

【0014】 EP2952584A1揭示了藉由過度表現某些多核苷酸而改良的蛋白質製造。

【0015】 EP2258855A1揭示巴斯德畢赤酵母之某些前導序列及分泌信號序列。

【0016】 WO2010099195A1揭示遺傳修飾之巴斯德畢赤酵母菌株及異源蛋白質及伴侶蛋白質之共表現。

【發明內容】

【0017】 目標為改良重組宿主細胞中之蛋白質製造及增加蛋白質產率。本發明的另一個目標為提供在宿主細胞中製

造重組或異源蛋白質之方法，其中在製造過程期間宿主細胞之形態變化風險得以減少。

【0018】 該目標藉由如請求之標的物來解決。

【0019】 根據本發明，提供包含內源性基因的重組宿主細胞，該內源性基因編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1的胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物，該宿主細胞藉由一或多種遺傳性修飾來工程化以便與該一或多種遺傳性修飾之前的宿主細胞相比，減少(或消除)該多核苷酸之表現，並且該宿主細胞包含含有所關注基因(gene of interest; GOI)的異源表現匣以便在表現匣啟動子(expression cassette promoter; ECP)控制下表現此GOI。

【0020】 特定言之，ECP可藉由非甲醇碳源來調控。

【0021】 特定言之，ECP可藉由非甲醇碳源來抑制。

【0022】 特定言之，ECP可藉由抑制碳源，例如並非甲醇之抑制碳源，諸如葡萄糖或甘油來抑制，並且可藉由減少抑制碳源之量來誘導(去抑制)。

【0023】 特定言之，ECP不可藉由甲醇來誘導。

【0024】 特定言之，非甲醇碳源為適合用於宿主細胞培養物中的除了甲醇之外的任何碳源。特定言之，非甲醇碳源並非甲醇。

【0025】 特定言之，非甲醇碳源為除了甲醇之外的碳源。特定言之，ECP不受甲醇控制。雖然細胞培養物或細胞培養基可或可不包含甲醇，但是如本文使用之ECP不藉由任何數量的甲醇來調控，尤其不可藉由甲醇來誘導，因此不受

甲醇控制。特定言之，ECP可完全在無甲醇細胞培養物或細胞培養基中得以誘導。

【0026】 對於本文描述目的，術語「FLO8蛋白質」係指以下兩者，包含被鑑別為SEQ ID NO:1的胺基酸序列的蛋白質，或具有與SEQ ID NO:1之某種同源性的胺基酸序列。然而，該同源序列亦被稱為FLO8同源物。

【0027】 特定言之，FLO8同源物至少具有與SEQ ID NO:1之25%、30%、或35%序列一致性中之任一者，例如，至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%序列一致性中之任一者，或與SEQ ID NO:1之100%一致性。特定言之，序列一致性如本文進一步揭示來確定，例如在比較全長序列時。

【0028】 特定言之，FLO8蛋白質或相應同源物包含LisH結構域，該結構域至少包含與SEQ ID NO:50之50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%序列一致性中之任一者、或與SEQ ID NO:50之100%一致性。

【0029】 根據特定態樣，FLO8蛋白質之LisH結構域至少包含與真核生物體之FLO8蛋白質或相應FLO8異種同源物之任何天然存在LisH結構域之80%、85%、90%、或95%序列一致性中之任一者，或與此天然存在LisH結構域之100%一致性，尤其酵母或真菌之LisH結構域，尤其絲狀真菌，諸如包含以下中之任一者或由以下中之任一者組成之LisH結構域：

a)SEQ ID NO:50，該序列為*K. phaffii*之FLO8蛋白質之LisH結構域(SEQ ID NO:50)；

b)SEQ ID NO:51，該序列為*K. pastoris*之FLO8蛋白質之LisH結構域(BLASTp:與SEQ ID NO:50之96%一致性(23/24 aa))；

c)SEQ ID NO:52，該序列為釀酒酵母菌株之FLO8異種同源物之LisH結構域 (BLASTp:與SEQ ID NO:50之54%一致性(13/24 aa))；

d)SEQ ID NO:53，該序列為另一種釀酒酵母菌株之FLO8異種同源物之LisH結構域(BLASTp:與SEQ ID NO:50之54%一致性(13/24 aa))；

e)SEQ ID NO:54，該序列為解脂耶氏酵母菌株之FLO8異種同源物之LisH結構域(BLASTp:與SEQ ID NO:50之71%一致性(12/17 aa))；

f)SEQ ID NO:55，該序列為多形緒方酵母(*Ogataea polymorpha*)之FLO8異種同源物之LisH結構域(BLASTp:與SEQ ID NO:50之62%一致性(8/13 aa))；或

g)SEQ ID NO:56，該序列為黑麴黴(*Aspergillus niger*)菌株之FLO8異種同源物之LisH結構域(BLASTp:與SEQ ID NO:50之73%一致性(8/11 aa))。

【0030】 通常，FLO8蛋白質之LisH結構域具有25-27個胺基酸之長度及與人類蛋白質LIS1之某種序列一致性，如

在資料庫Pfam，ID編號PF08513，及相應序列中所描述。在分子生物學中，LisH結構域為在大量具有廣泛功能的真核蛋白質中發現的蛋白質結構域。LIS1之N端區中之LisH結構域之結構將其描述為二聚化模體(The dimerization mechanism of LIS1 and its implication for proteins containing the LisH motif.Mateja A, Cierpicki T, Paduch M, Derewenda ZS, Otlewski J. 2006.J Mol Biol.357(2):621-31)。

【0031】 FLO8同源物尤其應理解為對於宿主細胞而言為內源性的，該宿主細胞用作製造如在本文中進一步描述之POI之重組宿主細胞。特定言之，FLO8蛋白質為對於宿主細胞物種之物種而言為內源性的異種同源物。

【0032】 特定言之，若宿主細胞為巴斯德畢赤酵母，尤其分別為*K. pastoris*及*K. phaffii*，則FLO8來源於巴斯德畢赤酵母，尤其*K. pastoris*或*K. phaffii*。或者，FLO8蛋白質包含巴斯德畢赤酵母，尤其*K. pastoris*或*K. phaffii*來源之此FLO8蛋白質之同源(或異種同源)序列，該同源(異種同源)序列對於野生型宿主細胞為內源性的，若來自另一個來源或物種。例如，若宿主細胞為*K. phaffii*，則內源性FLO8蛋白質包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列或由被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列組成。根據另一個實例，若宿主細胞為*K. pastoris*，則內源性FLO8蛋白質包含被鑑別為SEQ ID NO:3之胺

基酸序列或由被鑑別為SEQ ID NO:3之胺基酸序列組成，該序列具有與SEQ ID NO:1之91%一致性。然而，若宿主細胞為不同物種(除了*K. pastoris*及/或*K. phaffii*以外)，則對於宿主細胞而言為內源性的FLO8蛋白質序列為SEQ ID NO:1之同源物，並且出於本文描述目的，此同源物在宿主細胞中之表現(SEQ ID NO:1之異種同源序列)得以減少。

【0033】 特定言之，任何或每個同源序列藉由FLO8蛋白質在相應野生型宿主細胞，如巴斯德畢赤酵母，尤其例如*K. pastoris*或*K. phaffii*中作為轉錄因子，尤其與細胞黏附、絮凝、侵襲性生長或澱粉分解代謝調控有關的DNA結合轉錄活化子的定性功能來表徵，但是與野生型*K. pastoris*或*K. phaffii*中的FLO8蛋白相比，其定量活性可能不同。

【0034】 特定言之，相應同源序列為除了巴斯德畢赤酵母，尤其*K. pastoris*或*K. phaffii*以外之物種，例如，另一種酵母或絲狀真菌細胞，較佳*Komagataella*酵母或畢赤屬、或酵母屬或任何甲基營養酵母。然而，宿主細胞可為動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞、人細胞、植物細胞、細菌細胞、線蟲細胞、無脊椎動物細胞如昆蟲細胞或軟體動物細胞，或幹細胞，並且本文所述的相應FLO8蛋白質及其同源物對於相應宿主細胞而言為內源性的，但其表現減少或消失，如本文所述。

【0035】 特定言之，FLO8蛋白質同源物為內源性的或來源於畢赤屬或內源性的或來源於任何其他酵母、真菌、或細菌，並且具有與SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2之25%序列一致性，在特定情況下至少與SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2之35%、40%、45%、50%、55%、60、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%一致性中之任一者。特定言之，若將外源FLO8蛋白質(或編碼外源FLO8蛋白質之基因)添加至(巴斯德)畢赤酵母或(釀酒)酵母菌株之*flo8*剔除菌株之培養物後為功能性的，則外源FLO8蛋白質被確定為FLO8蛋白質同源物，該剔除菌株不同於外源FLO8蛋白質之來源，由此證明為缺失內源性FLO8蛋白質之功能性替代物。

【0036】 特定言之，FLO8蛋白質來源於巴斯德畢赤酵母，尤其由對於宿主細胞而言為內源性之基因來編碼，其中宿主細胞為巴斯德畢赤酵母。

【0037】 特定言之，FLO8蛋白質來源於法夫駒形氏酵母(*Komagataella phaffii*)，該蛋白質包含SEQ ID NO:1或由SEQ ID NO:1組成。特定言之，此FLO8蛋白質由對於宿主細胞而言為內源性之基因來編碼，其中宿主細胞為法夫駒形氏酵母(*Komagataella phaffii*)。特定言之，FLO8蛋白質藉由被鑑別為SEQ ID NO:2之核苷酸序列來編碼。

【0038】 特定言之，FLO8蛋白質來源於*Komagataella*，該蛋白質包含與SEQ ID NO:1之至少

90%或91%序列一致性。特定言之，FLO8蛋白質來源於巴斯德駒形氏酵母(*Komagataella pastoris*)，該蛋白質包含SEQ ID NO:3或由SEQ ID NO:3組成。特定言之，此FLO8蛋白質由對於宿主細胞而言為內源性之基因來編碼，其中宿主細胞為巴斯德駒形氏酵母(*Komagataella pastoris*)。

【0039】 特定言之，FLO8蛋白質來源於酵母屬，該蛋白質包含與SEQ ID NO:1之至少35%序列一致性。特定言之，FLO8蛋白質來源於釀酒酵母，該蛋白質包含SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6或由SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6組成。特定言之，此FLO8蛋白質由對於宿主細胞而言為內源性之基因來編碼，其中宿主細胞為釀酒酵母。

【0040】 特定言之，FLO8蛋白質來源於耶氏酵母，該蛋白質包含與SEQ ID NO:1之至少40%或44%序列一致性。特定言之，FLO8蛋白質來源於解脂耶氏酵母，該蛋白質包含SEQ ID NO:7或由SEQ ID NO:7組成。特定言之，此FLO8蛋白質由對於宿主細胞而言為內源性之基因來編碼，其中宿主細胞為解脂耶氏酵母。

【0041】 特定言之，FLO8蛋白質來源於Ogataea，該蛋白質包含與SEQ ID NO:1之至少30%或34%序列一致性。特定言之，FLO8蛋白質來源於多形緒方酵母(*Ogataea polymorpha*)，該蛋白質包含SEQ ID NO:8或由SEQ ID NO:8組成。特定言之，此FLO8蛋白質由對於宿主細

胞而言為內源性之基因來編碼，其中宿主細胞為多形緒方酵母(*Ogataea polymorpha*)。

【0042】 特定言之，FLO8蛋白質來源於麵黴，該蛋白質包含與SEQ ID NO:1之至少25%或26%序列一致性。特定言之，FLO8蛋白質來源於黑麵黴，該蛋白質包含SEQ ID NO:9或由SEQ ID NO:9組成。特定言之，此FLO8蛋白質由對於宿主細胞而言為內源性之基因來編碼，其中宿主細胞為黑麵黴。

【0043】 特定言之，宿主細胞藉由包括基因組突變的一或多種遺傳性修飾來遺傳修飾，該或該等基因組突變減少編碼該FLO8蛋白質之該多核苷酸之轉錄及/或轉譯，且/或分別以其他方式減少該多核苷酸之表現及減少該FLO8蛋白質之製造。

【0044】 特定言之，該一或多種遺傳性修飾包含以下各者之破壞、取代、缺失或剔除：(i)一或多種內源性多核苷酸或其一部分；或(ii)表現控制序列。

【0045】 根據特定態樣，該一或多種遺傳性修飾為本文所述宿主細胞之一或多種內源性多核苷酸，諸如編碼多核苷酸，包括例如，編碼FLO8蛋白質之該多核苷酸(或基因)，尤其天然存在於宿主細胞物種、類型或菌株中之野生型(未修飾或原生)蛋白質。

【0046】 根據特定態樣，該一或多種遺傳性修飾為表現控制序列，包括例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄或轉譯啟動及終止序列、或增強子或活化子序列。

【0047】 可以採用多種工程化宿主細胞的方法來減少內源多核苷酸的表現，例如編碼FLO8蛋白質的基因，包括例如破壞編碼FLO8蛋白質的多核苷酸，破壞與該多核苷酸有效連接的啟動子，用具有較低啟動子活性的另一種啟動子代替該啟動子，修飾或調節(例如，活化、上調、失活、抑制或下調)調節此類多核苷酸表現的調控序列，例如使用藉由用於修飾宿主細胞的基於CRISPR的方法中的RNA引導核糖核酸酶來靶向相關序列的相應轉錄調控子，例如選自由啟動子、核糖體結合位點、轉錄啟動或終止序列、轉譯起始或終止序列子、增強子或活化子序列、阻遏或抑制子序列、信號或前導序列組成之群組的調控序列，特別是控制蛋白質表現和/或分泌的彼等序列。

【0048】 特定言之，該一或多種遺傳性修飾包括一或多種基因組突變包括基因或基因組序列之缺失或失活，從而如與沒有此遺傳性修飾之相應宿主相比，減少基因或一部分基因之表現至少50%、60%、70%、80%、90%、或95%，或甚至例如藉由基因之剔除來完全消除其表現。

【0049】 特定言之，一或多種遺傳性修飾包含組成性削弱或以其他方式減少一或多種內源性多核苷酸之表現的基因組突變。

【0050】 特定言之，一或多種遺傳性修飾包含引入一或多種可誘導或可抑制調控序列的基因組突變，該或該等調控序列條件性地削弱或以其他方式減少一或多種內源性多核苷

酸之表現。此等條件性地活性修飾尤其靶向視細胞培養條件而定具有活性及/或得以表現之調控元件及基因。

【0051】 特定言之，減少該一或多種內源性多核苷酸之表現，從而在製造POI時，減少編碼FLO8蛋白質之多核苷酸之表現。特定言之，在遺傳性修飾後，該FLO8蛋白質之表現在製造POI期間之宿主細胞培養條件下得以減少。

【0052】 特定言之，宿主細胞經遺傳修飾以便與沒有該修飾之宿主細胞相比，減少該FLO8蛋白質之量(例如，水準或濃度)至少50%、60%、70%、80%、90%、或95%(mol/mol)中之任一者，或甚至例如藉由基因之剔除來減少100%例如至不可偵測量，由此完全消除FLO8蛋白質之製造。根據特定實施例，宿主細胞經遺傳修飾以便包含(一或多個)基因組序列之一或多個缺失，尤其編碼FLO8蛋白質或其相應同源物之基因組序列。此宿主細胞通常以缺失或剔除菌株形式提供。

【0053】 根據特定實施例，一旦本文所述宿主細胞在細胞培養物中培養，與在此遺傳性修飾之前或沒有此遺傳性修飾之宿主細胞表現或製造之參考量相比，或與在相應宿主細胞培養物中製造之參考量相比，或與在該修飾之前或沒有該修飾之宿主細胞相比，宿主細胞或宿主細胞培養物中之總FLO8蛋白質之量減少至少50%、60%、70%、80%、90%、或95%(mol/mol)中之任一者，或甚至減少例如100%至不可偵測之量。

【0054】 當針對該遺傳性修飾減少該FLO8蛋白質之製造之效應來對本文所述宿主細胞進行比較時，其通常與在此遺傳性修飾之前或沒有此遺傳性修飾之相似宿主細胞比較。通常與沒有此遺傳性修飾之相同宿主細胞物種或類型來進行比較，該宿主細胞物種或類型經工程化以便製造重組或異源POI，尤其在在製造該POI之條件下培養時。然而，亦可與未進一步工程化來製造重組或異源POI之相同宿主細胞物種或類型進行比較。

【0055】 根據特定態樣，該FLO8蛋白質或其相應同源物之減少藉由細胞中之該FLO8蛋白質之量(例如，水準或濃度)之減少來確定。特定言之，該FLO8蛋白質或其相應同源物之量藉由合適方法來確定，諸如使用西方墨點法、免疫螢光成像、流式細胞術或質譜術、尤其其中質譜術為液相層析－質譜術(LC-MS)、或液相層析串聯-質譜術(liquid chromatography mass spectrometry; LC-MS/MS)例如如Doneanu等人(MAbs.2012; 4(1): 24－44)所描述。

【0056】 根據特定態樣，重組宿主細胞僅包含一個或多個異源表現匣，例如該等表現匣之多個拷貝，諸如至少2、3、4、或5個拷貝(基因拷貝數目，GCN)。例如，重組宿主細胞包含多達2、3、4、或五個拷貝。拷貝中之每一者可包含相同或不同序列或由相同或不同序列組成，但是包括可操作連接至GOI之ECP。

【0057】 根據特定態樣，異源表現匣包含多核苷酸之人工融合物或由多核苷酸之人工融合物組成，包括可操作連接至GOI之ECP，並且視情況進一步序列，諸如信號、前導序列、或終止子序列。特定言之，使用對於宿主細胞而言為異源的或人工的表現匣，尤其其中表現匣包含啟動子(ECP)及GOI，其中啟動子及GOI彼此為異源的，在天然狀態下不以此組合出現例如，其中啟動子及GOI中之一者(或僅一者)為人工的或對於另一者及/或本文所述宿主細胞而言為異源的；啟動子為內源性啟動子並且GOI為異源GOI；或啟動子為人工或異源啟動子並且GOI為內源性GOI；其中啟動子及GOI均為人工、異源或來自不同來源，諸如與本文所述宿主細胞相比，來自不同物種或類型(菌株)之細胞。特定言之，在用作本文所述宿主細胞之細胞中，ECP不天然地與該GOI締合及/或不可操作連接至該GOI。

【0058】 根據特定態樣，ECP可在存在生長限制量之非甲醇碳源的情況下，較佳在不存在甲醇的情況下得以誘導；並且可在存在高於生長限制量之過量的非甲醇碳源的情況下得以抑制。特定言之，藉由異源表現匣之GOI表現可藉由可誘導ECP來誘導。

【0059】 較佳地，ECP為碳源可調控的，諸如在細胞培養基或上清液中存在高於1、1.5、2、2.5、或3 g/L中之任一者之量(在本文中被稱為啟動子抑制量)之碳源的情況下得以抑制，並且在細胞培養基或上清液中不存在可偵測之

碳源或存在高達0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、或1.0 g/L中之任一者之量(在本文中被稱為啟動子誘導量)之碳源的情況下得以誘導或去抑制。細胞培養基或上清液中之此等量尤其應理解為在饋送宿主細胞並且被宿主細胞消耗後可偵測之量。通常，當在生長限制條件下製造POI時，藉由添加補充碳源來饋送細胞培養物，但是該碳源之量在POI製造期間被細胞即刻消耗，因此在細胞培養基或上清液中未留下剩餘量或僅留下較低剩餘量，例如高達1.0 g/L之量。

【0060】 特定言之，調控ECP之碳源為任何除了甲醇以外之任何碳源，並且在本文中被稱為非甲醇碳源。

【0061】 特定言之，非甲醇碳源為碳水化合物。

【0062】 特定言之，非甲醇碳源選自醣、多元醇、醇、或前述中之任一者或多者之混合物。

【0063】 特定言之，醣可為單醣中之任一者或多者，諸如己糖，例如葡萄糖、果糖、半乳糖或甘露糖，或雙醣，諸如蔗糖；或醇或多元醇例如乙醇、或任何二醇、或三醇例如甘油，或前述任一者之混合物。特定言之，任何此類非甲醇碳源可以在ECP之控制下製造該POI之量用於細胞培養。

【0064】 根據特定態樣，ECP包含至少一個第一及至少一個第二核心調控區。特定言之，ECP包含至少兩個該等第一及/或第二核心調控區。特定言之，ECP包含有限數目之該等第一及第二核心調控區，其中該第一核心調控區之數

目為僅一個、兩個或三個，並且該第二核心調控區之數目為僅一個、兩個或三個。特定言之，ECP包含相等數目之該等第一及第二核心調控區例如，其中該第一核心調控區之數目為一個，並且該第二核心調控區之數目為一個；其中該第一核心調控區之數目為兩個，並且該第二核心調控區之數目為兩個，或其中該第一核心調控區之數目為三個，並且該第二核心調控區之數目為三個。

【0065】 特定言之，第一核心調控區具有與SEQ ID NO:17之至少75%序列一致性，諸如至少80%、或至少90%序列一致性中之至少任一者，且/或第二核心調控區具有與SEQ ID NO:18之至少75%序列一致性，諸如至少80%、或至少90%序列一致性中之至少任一者。

【0066】 特定言之，第一及第二核心調控區中之每一者具有8-16 nt之長度。

【0067】 特定言之，第一核心調控區具有8至10 nt，尤其9 nt之長度。特定言之，第一核心調控區包含SEQ ID NO:17或由SEQ ID NO:17組成，或被鑑別為SEQ ID NO:17之核苷酸序列之修飾，其中修飾為多達一個或兩個點突變，尤其其中一個點突變為一個核苷酸之取代、插入、或缺失中之任一者。

【0068】 特定言之，第二核心調控區具有14至16 nt，尤其15 nt之長度。特定言之，第二核心調控區包含或組成SEQ ID NO:18，或修飾核苷酸序列被鑑別為SEQ ID

NO:18，其中修飾多達一個，兩個或三個點突變，尤其其中一點突變一個核苷酸之取代、插入、或缺失中之任一者。

【0069】 特定言之，ECP包含呈任何順序，較佳彼此緊鄰的至少一個第一及至少一個第二核心調控區，例如在最接近的第一與第二核心調控區之間具有多達20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、或10 nt中之任一者。

【0070】 特定言之，ECP包含由間隔子連接的一個第一及一個第二核心調控區，尤其藉由具有至少5、6、7、8、9、10 nt中之任一者、及/或多達20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、或10中之任一者之長度的核苷酸序列(在本文中被稱為「間隔子核心區」)來分隔。特定言之，間隔子核心區具有與SEQ ID NO:36之至少75%序列一致性，諸如至少80%、或至少90%序列一致性中之至少任一者，且/或包含SEQ ID NO:36或由SEQ ID NO:36組成，或被鑑別為SEQ ID NO:36之核苷酸序列之修飾，其中修飾為多達一個、兩個、三個四個點突變，尤其其中一個點突變為一個核苷酸之取代、插入、或缺失中之任一者。特定言之，間隔子核心區包含核苷酸序列或由核苷酸序列組成，其中大部分核苷酸(至少50%或至少60%)選自G、C、或T。

【0071】 特定言之，ECP包含至少一個由核苷酸序列組成之區結構域，該核苷酸序列自5'-末端至3'末端由以下三個連續元件組成，(i)第一核心調控區、(ii)間隔子核心區、

及(iii)第二核心調控區，該第二核心調控區在本文中被稱為「主要調控區」。

【0072】 特定言之，ECP包含至少一個或兩個，或僅一個或兩個主要調控區，各調控區包含具有與SEQ ID NO:35之85%、90%、或95%序列一致性中之至少任一者的核苷酸序列或由該核苷酸序列組成。此主要調控區較佳由第一核心調控區、間隔子核心區及第二核心調控區組成。

【0073】 特定言之，ECP包含至少一個至少具有與SEQ ID NO:35之85%、90%、或95%序列一致性中之任一者的多核苷酸序列。

【0074】 特定言之，ECP包含僅一個、兩個或三個如本文描述之主要調控區，尤其其中主要調控區之數目為兩個或三個，其中該等兩個或三個調控區可為彼此相同或不同。特定言之，ECP包含僅兩個主要調控區，該等調控區藉由至少具有50、60、70、80、90、100 nt中之任一者，及/或多達500、450、400、350、或300 nt中之任一者，尤其100與300 nt之間範圍內之長度的核苷酸序列(在本文中被稱為「間隔子主要區」)分隔。特定言之，間隔子主要區包含至少50、60、70、80、90、100 nt中之任一者之長度之核苷酸序列，該核苷酸序列具有SEQ ID NO:37之至少60%序列一致性，諸如至少70%、75%、80%、85%、90%、或95%序列一致性中之至少任一者，且/或包含SEQ ID NO:37或由SEQ ID NO:37組成，或被鑑別為SEQ ID NO:37之核苷酸序列之修飾，其中該修飾為

若干個點突變，該等點突變為一或多個、直至30、25、20、15、或10個點突變中之任一者，尤其其中一個點突變為一個核苷酸之取代、插入、或缺失中之任一者。

【0075】 根據特定態樣，ECP包含至少一個由核苷酸序列組成之T模體，其中大部分核苷酸為胸腺嘧啶(T)，較佳至少50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者為T例如，該核苷酸序列包含SEQ ID NO:19-34中之任一者或由SEQ ID NO:19-34中之任一者組成，視情況該T模體在該T模體之5’或3’末端沒有進一步(或鄰近地)延伸一或多個胸腺嘧啶。

【0076】 特定言之，ECP包含僅一個或兩個該等T模體、或至少兩個該等T模體、直至4個、或3個T模體，其中該等T模體彼此相同或不同。

【0077】 特定言之，ECP包含位於主要調控區上游或下游之T模體中之至少一者，例如，一個(或僅一個或兩個)T模體位於主要調控區上游並且一個(或僅一個或兩個)T模體位於下游。然而，根據特定實施例，ECP在間隔子主要區內包含該等T模體中之至少一者，尤其僅一個或兩個T模體。

【0078】 特定言之，ECP具有至少350、400、450、500、550、600、650、700、850、900、950、或1000 bp例如，多達2000 bp、或多達1500 bp中之任一者之長度。

【0079】 特定言之，ECP包含例如多達包括3’-末端之50、40、30、20、10、9、8、7、6、或5 nt長度之3’-末端

核苷酸序列，該核苷酸序列包含轉譯啟始位點之至少一部分，例如至少具有與SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、或SEQ ID NO:40中之任一者之60%、70%、80%、85%或至少90%一致性中之任一者之序列。轉譯啟始位點可為真核生物中之Kozak共有序列及支援基因表現之合適啟動子序列。

【0080】 根據特定態樣，ECP至少包含與以下各者之60%、65%、70%、75%、或80%序列一致性中之任一者，尤其至少85%、90%、或95%序列一致性中之任一者、或100%一致性：序列SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、或SEQ ID NO:16中之任一者、或SEQ ID NO:41-45中之任一者的例如包含轉錄因子結合位點(TFBS)之區結構域內，及/或包括3’末端之3’末端序列內的至少300(連續)nt，尤其至少300、350、400、450、500、550、600、650、700、850、900、950、或1000 nt中之任一者，直至任何前述核苷酸序列的全部長度，尤其當全部長度少於1000 nt時更是如此。

【0081】 根據特定態樣，ECP包含至少中之任一者與全長序列SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、或SEQ ID NO:16中之任一者、或SEQ ID NO:41-45中之任一者的60%、65%、70%、75%、或80%

序列一致性，尤其至少85%、90%、或95%序列一致性中之任一者，或100%一致性。

【0082】 特定實施例涉及如下ECP，該ECP包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其組成或包含如下核苷酸序列或由該核苷酸序列組成，該核苷酸序列至少具有與全長序列SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、或SEQ ID NO:16中之任一者、或相應地SEQ ID NO:41-45中之任一者的60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%序列一致性中之任一者、或100%一致性。

【0083】 特定言之，ECP啟動子包含具有至少300、400、500、600、700、800、900或1000 bp中之任一者之長度，尤其包括TFBS及/或3’末端的SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11之至少一部分或片段或由其組成。

【0084】 特定言之，ECP之第一及第二核心調控區中之任一者，或ECP之主要調控區含有一或多個TFBS。特定言之，該等第一及第二核心調控區中之每一者，或該等第一及第二核心調控區兩者一起，或ECP之該等主要調控區中之每一者包含被視為具有功能性並且藉由相應轉錄因子來識別的TFBS或至少其一部分。

【0085】 特定言之，TFBS藉由選自由以下組成之群組之轉錄因子中之任何一者或多者來識別：Rgt1(例如，包含SEQ ID NO:47或由SEQ ID NO:47組成)，Cat8-1(例如，

包含SEQ ID NO:48或由SEQ ID NO:48組成)及Cat8-2(例如，包含SEQ ID NO:49或由SEQ ID NO:49組成)。

【0086】 TFBS藉由可針對同一因子而變化的某些共有序列來表徵。特定轉錄因子被鑑別如下：

【0087】 Rgt1為葡萄糖反應性轉錄活化子及抑制子並且其調控多種葡萄糖轉運蛋白(HXT)基因之表現。巴斯德畢赤酵母之Rgt1包含胺基酸序列SEQ ID NO:47。

【0088】 Cat8-1及Cat8-2為結合至碳源反應元件之鋅簇轉錄活化子，該等反應元件為在非發酵生長條件下各種基因之去抑制所必需的。巴斯德畢赤酵母之Cat8-1及Cat8-2包含分別胺基酸序列SEQ ID NO:48及SEQ ID NO:49。

【0089】 根據特定態樣，ECP包含至少兩個、三個、四個、五個、六個、七個或八個TFBS，其中TFBS中之每一者個別地藉由Rgt1、Cat8-1或Cat8-2中之任一者來識別。

【0090】 特定言之，ECP藉由與參考啟動子相比之增加的啟動子強度來表徵，其中

-啟動子強度與參考啟動子之啟動子強度相同或更高，尤其在誘導狀態下增加至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.3倍、3.5倍、3.8倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、或至少6倍中之任一者。

【0091】 特定言之，宿主細胞之原生pGAP啟動子，尤其在用於重組POI製造宿主細胞中為內源性並且天然存在之pGAP啟動子，例如，如用於控制巴斯德畢赤酵母中之GAPDH表現之巴斯德畢赤酵母之原生pGAP啟動子，該啟動子包含SEQ ID NO:46或由SEQ ID NO:46組成，可充當巴斯德畢赤酵母宿主細胞中之參考，以便確定經改良之ECP啟動子強度。此參考啟動子可用於使用相同宿主細胞及表現系統之並行對照實驗中，或作為同一宿主細胞培養物內之內部對照。如與參考啟動子相比，對啟動子功能進行定性之此等對照實驗較佳在巴斯德畢赤酵母宿主細胞培養物中執行，尤其表現模型蛋白質諸如GFP或eGFP之重組巴斯德畢赤酵母。如與參考啟動子強度相比之啟動子強度可藉由以下標準檢定來確定：在待測試之啟動子之控制下表現eGFP之巴斯德畢赤酵母菌株在具有每孔2 mL培養物之24-深孔板中在25℃下、伴以280 rpm之振盪來進行篩檢。葡萄糖饋送珠粒(6mm，Kuhner，CH)用於產生葡萄糖限制性生長條件。針對誘導狀態下之eGFP表現來分析細胞(YP+1饋送珠粒，20-28小時)。

【0092】 根據特定態樣，本文所述ECP之相對啟動子或轉錄強度或速率與用作製造POI之宿主的相同物種或菌株之細胞之原生pGAP啟動子進行比較。

【0093】 特定言之，參考啟動子為宿主細胞之原生pGAP啟動子。例如，作為用於例如控制巴斯德畢赤酵母(GS115)中之GAPDH之表現的巴斯德畢赤酵母中之未修飾、內源性

啟動子序列的巴斯德畢赤酵母之原生pGAP啟動子包含被鑑別為SEQ ID NO:46之序列或由被鑑別為SEQ ID NO:46之序列組成，可用作巴斯德畢赤酵母中之參考啟動子。若巴斯德畢赤酵母用作製造如本文描述POI之重組宿主細胞，則本文所述ECP之轉錄強度或速率便利地與巴斯德畢赤酵母之此原生pGAP啟動子進行比較。

【0094】 巴斯德畢赤酵母(GS115)之例示性原生pGAP啟動子序列(SEQ ID NO:46)

#	名稱	PAS*	PIPA*	GS115描述
pGAP	TDH3	PAS_chr2-1_0437	PIPA02510	甘油醛-3-磷酸去氫酶

*PAS:巴斯德畢赤酵母GS115中之ORF名稱；PIPA:巴斯德畢赤酵母模式菌株DSMZ70382中之ORF名稱

【0095】 根據另一個實例，釀酒酵母之原生pGAP啟動子可用作參考啟動子，該啟動子為用於控制釀酒酵母中之GAPDH之表現的釀酒酵母中之未修飾、內源性啟動子序列。若釀酒酵母用作製造如本文描述POI之重組宿主細胞，則本文所述ECP之轉錄強度或速率便利地與釀酒酵母之此原生pGAP啟動子進行比較。

【0096】 特定言之，啟動子強度藉由諸如模型蛋白質(例如，綠色螢光蛋白GFP，包括例如增強GFP、eGFP基因庫登錄號U57607)之POI之表現水準，及/或如與參考啟動子相比之轉錄強度來確定。較佳地，轉錄分析為定量或半定量的，較佳使用qRT-PCR、DNA微陣列、RNA測序及轉錄組分析。

【0097】 特定言之，ECP進一步藉由啟動子誘導比來表徵，該誘導比藉由與抑制狀態下之低水準相比的完全誘導狀態下之高轉錄強度來表徵。

【0098】 啟動子誘導比尤其係指誘導轉錄，尤其包括進一步轉譯及視情況該POI之表現。轉錄通常確定為啟動子強度之量度並且尤其係指在完全誘導該啟動子後獲得的轉錄物之量。該轉錄物豐度可藉由完全誘導狀態下之轉錄強度來確定，該轉錄強度例如在葡萄糖限制恆化器培養條件下獲得並且相對於參考啟動子之轉錄速率來表述。

【0099】 誘導比為確定ECP之碳源調控之主要參數，並且設定相對於抑制狀態下之啟動子活性或強度的誘導狀態下之啟動子活性或強度。例如，報道蛋白質(例如，GFP或eGFP)之表現水準及/或抑制狀態下之轉錄水準在藉由過量甘油來進行抑制後予以確定，並且模型蛋白質之表現水準及/或轉錄水準藉由限制性葡萄糖饋送來進行誘導後在誘導狀態下予以確定。

【0100】 若例如在少於0.4 g/L、較佳少於0.04 g/L、尤其少於0.02 g/L之葡萄糖濃度下，培養條件提供大約最大誘導，則ECP啟動子被視為去抑制及完全誘導。如與原生pGAP啟動子相比，完全誘導啟動子較佳表現出至少20%、更較佳至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%之轉錄水準/強度及至少100%或甚至至少150%或至少200%之更高轉錄水準/強度。轉錄水準/強度可例如藉由在液體培養物中培養純系後報道基因諸如eGFP之轉錄物

之量來確定。或者，轉錄率可藉由微陣列上之原生控制基因之轉錄強度來確定，其中微陣列資料展示抑制與去抑制狀態之間之表現水準之差異及如與對照相比之完全誘導狀態下之高信號強度。

【0101】 特定言之，誘導比可藉由誘導相比於抑制狀態下之(例如模型蛋白質諸如GFP或eGFP)之表現水準之比率來確定。如與參考啟動子相比之誘導比可藉由以下標準檢定來確定：在待測試之啟動子之控制下表現eGFP之巴斯德畢赤酵母菌株在具有每孔2 mL培養物之24-深孔板中在25℃下、伴以280 rpm之振盪來進行篩檢。葡萄糖饋送珠粒(6mm，Kuhner，CH)用於產生葡萄糖限制性生長條件。針對抑制(YP+1%甘油，指數生長期)及誘導(YP+1饋送珠粒，20-28小時)期間之eGFP表現來分析細胞。

【0102】 特定言之，ECP啟動子具有比在抑制狀態下高至少1.5、2.0、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、或10倍中之任一者的去抑制(誘導)狀態下之啟動子活性或強度(例如，轉錄活性或轉錄強度)。因此，相應誘導率可為至少1.5、2.0、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、或10中之任一者。

【0103】 意外地，結果表明與包含*flo8*基因座並且產生FLO8蛋白質之野生型菌株相比，*flo8*剔除菌株中之本文所述ECP(在完全誘導時，例如在葡萄糖限制性誘導條件下)之轉錄活性(或轉錄強度)高得多，諸如高至少1.5倍、

1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、或10倍中之任一者。發現本文所述宿主細胞中之轉錄強度顯著增加，使得在*flo8*缺失突變體中、在ECP控制下之GOI之表現水準更高。相比之下，來自pGAP或pAOX之轉錄在*flo8*缺失突變體中未增加(如在相似實例中確定)。

【0104】 根據特定態樣，異源表現匣包含在自主複製載體或質體中，或整合至該宿主細胞之染色體中。

【0105】 表現匣可引入宿主細胞中並且作為染色體內元件例如在特定整合位點處整合至宿主細胞基因組(或其染色體中之任一者)或隨機地整合，隨後選擇高產量宿主細胞株。或者，表現匣可整合至染色體外遺傳元件中，諸如質體或人工染色體例如酵母人工染色體(yeast artificial chromosome; YAC)。根據特定實例，表現匣藉由載體，尤其表現載體來引入宿主細胞中，該載體藉由合適轉型技術來引入宿主細胞中。為此目的，GOI可連接至表現載體中。

【0106】 較佳酵母表現載體(較佳用於在酵母中之表現)選自由衍生自以下各者之質體組成之群組：pPICZ、pGAPZ、pPIC9、pPICZalfa、pGAPZalfa、pPIC9K、pGAPHis、pPUZZLE或Golden*Pi*CS。

【0107】 轉染或轉型宿主細胞以便引入載體或質體的技術在此項技術中為熟知的。此等技術可包括電穿孔、細胞質體化、脂質囊泡介導吸收、熱休克介導吸收、磷酸鈣介導

轉染(磷酸鈣/DNA共沉澱)、病毒感染、及尤其使用經修飾之病毒例如像經修飾之腺病毒、顯微注射及電穿孔。

【0108】 如本文描述之轉型體可藉由將表現匣、載體或質體DNA引入宿主中並且選擇表現相關蛋白質或選擇標記物之轉型體來獲得。可藉由通常用於轉型宿主細胞之方法來處理宿主細胞以便引入異源或外來DNA，諸如電脈衝方法、原生質體方法、乙酸鋰方法、及其修改方法。巴斯德畢赤酵母較佳藉由電穿孔來轉型。轉型以便藉由微生物來吸收重組DNA片段的較佳方法包括化學轉型、電穿孔或藉由原生質體化之轉型。

【0109】 特定言之，表現匣包含可操作連接至編碼POI之GOI的ECP，並且視情況進一步包含表現並且製造POI作為分泌蛋白質所必需的信號及前導序列。

【0110】 根據特定態樣，表現匣進一步包含編碼信號肽的核苷酸序列，該信號肽使得能夠分泌POI，較佳其中編碼信號肽之核苷酸序列相鄰於GOI之5'-末端來融合，或直接融合至GOI之5'-末端。

【0111】 特定言之，信號肽選自由以下組成之群組：來自釀酒酵母α-配合因子前原肽之信號序列、來自巴斯德畢赤酵母酸性磷酸酶基因(PHO1)之信號肽及胞外蛋白質X(EPX1)(Heiss, S., V. Puxbaum, C. Gruber, F. Altmann, D. Mattanovich& B. Gasser, Microbiology 2015;161(7):1356-68)。

【0112】 特定言之，可使用如WO2014067926A1所描述之信號及/或前導序列中之任一者，尤其SEQ ID NO:59或SEQ ID NO:60。

【0113】 特定言之，可使用如WO2012152823A1所描述之信號序列，尤其被鑑別為SEQ ID NO:61之釀酒酵母之原生α配合因子之信號序列、或其突變體。

【0114】 根據特定態樣，本文所述宿主細胞可經歷一或多種進一步遺傳性修飾例如以便改良蛋白質製造。

【0115】 特定言之，宿主細胞進一步經工程化以修飾影響用於產生蛋白酶缺陷菌株之蛋白質分解活性的一或多種基因，尤其在羧肽酶Y活性方面有缺陷的菌株。特定實例描述於WO19920175595A1中。具有液泡蛋白酶諸如蛋白酶A或蛋白酶B之功能缺陷的蛋白酶缺陷畢赤菌株之進一步實例描述於US6153424A中。進一步實例為例如藉由ThermoFisher Scientific提供之畢赤菌株，該等菌株具有ade2缺失及/或蛋白酶基因PEP4及PRB1中之一者或兩者之缺失。

【0116】 特定言之，宿主細胞經工程化以修飾至少一種編碼功能性基因產物之核酸序列，該基因產物尤其為選自由以下組成之群組之蛋白酶：PEP4、PRB1、YPS1、YPS2、YMP1、YMP2、YMP1、DAP2、GRH1、PRD1、YSP3、及PRB3，如WO2010099195A1所揭示。

【0117】 特異性地採用編碼輔助因子之基因之過度表現或表現不足來增強GOI之表現，例如如WO2015158800A1所描述。

【0118】 以下基因之過度表現證明可增加巴斯德畢赤酵母中之POI分泌：PP7435_Chr3-0607、PP7435_Chr3-0933、PP7435_Chr2-0220、PP7435_Chr3-0639、PP7435_Chr4-0108、PP7435_Chr1-1232、PP7435_Chr1-1225、PP7435_Chr1-0667、及PP7435_Chr4-0448。

【0119】 以下基因之表現不足證明可增加巴斯德畢赤酵母中之POI分泌：PP7435_Chr1-0176、PP7435_Chr3-1062、及PP7435_Chr4-0252。

【0120】 特定言之，宿主細胞可經工程化以過度表現輔助因子中之任何一者或多者並且增加藉由SEQ ID NO:62-71中之任一者來鑑別之相應蛋白質之製造，由此進一步增加POI產率。POI可為宿主細胞之真核、原核或合成肽、多肽、蛋白、或代謝物中之任一者。

【0121】 特定言之，POI對於宿主細胞物種而言為異源的。

【0122】 特定言之，POI為分泌肽、多肽、或蛋白質，亦即自宿主細胞分泌至細胞培養上清液中。

【0123】 特定言之，POI為真核蛋白質，較佳哺乳動物衍生或相關蛋白質諸如人類蛋白質或包含人類蛋白質序列之蛋白質、或細菌蛋白質或細菌衍生蛋白

【0124】 較佳地，POI為在哺乳動物中起作用之治療性蛋白質。

【0125】 在特定情況下，POI為多聚體蛋白質，尤其為二聚體或四聚體。

【0126】 根據特定態樣，POI為選自由以下組成之群組之肽或蛋白質：抗原結合蛋白質、治療性蛋白質、酶、肽、蛋白質抗生素、毒素融合蛋白質、碳水化合物-蛋白質結合物、結構蛋白質、調控蛋白質、疫苗抗原、生長因子、激素、細胞介素、處理酶、及代謝酶。

【0127】 特定言之，抗原結合蛋白質選自由以下組成之群組

a)抗體或抗體片段，諸如嵌合抗體、人源化抗體、雙特異性抗體、Fab、Fd、scFv、雙功能抗體、三功能抗體、Fv四聚體、小分子抗體、單結構域抗體如VH、VHH、IgNAR、或V-NAR中之任一者；

b)抗體模擬物，諸如阿連菌素(Adnectin)、親和體(Affibody)、親和素(Affilin)、Affimer、親和素(Affitin)、Alphabody、抗運載蛋白(Anticalin)、阿維默斯(Avimer)、迪梵(DARPin)、Fynomer、Kunitz結構域肽、單功能抗體(Monobody)、或NanoCLAMP；或

c)融合蛋白，該等融合蛋白包含一或多個免疫球蛋白折疊結構域、抗體結構域或抗體模擬物。

【0128】 特異性POI為抗原結合分子諸如抗體、或其片段，尤其包含抗原結合結構域之抗體片段。在特異性POI之中

者為抗體諸如單株抗體(mAb)、免疫球蛋白(Ig)或免疫球蛋白G類(IgG)、重鏈抗體(HcAb)、或其片段諸如抗原結合片段(Fab)、Fd、單鏈可變片段(scFv)、或其工程化變異體諸如例如Fv二聚體(雙功能抗體)、Fv三聚體(三功能抗體)、Fv四聚體、或小分子抗體及單結構域抗體如VH、VHH、IgNAR、或V-NAR、或包含免疫球蛋白折疊結構域之任何蛋白質。進一步抗原結合分子可選自抗體模擬物、或(替代)支架蛋白諸如例如工程化Kunitz結構域、阿連菌素、親和體、阿菲林(Affiline)、抗運載蛋白、或迪梵。

【0129】 根據特定態樣，POI為例如BOTOX、Myobloc、Neurobloc、Dysport(或其他血清型肉毒桿菌神經毒素)、阿糖苷酶α(alglucosidase alpha)、達托黴素(daptomycin)、YH-16、絨膜促性腺素α、非格司亭(filgrastim)、西曲瑞克(cetrorelix)、介白素-2、阿地白介素(aldesleukin)、替西白介素(teceleulin)、地尼白介素(denileukin diftitox)、干擾素α-n3(注射劑)、干擾素α-n1、DL-8234、干擾素、Suntory(γ-1a)、干擾素γ、胸腺素α1、他索納明(tasonermin)、DigiFab、ViperaTAb、EchiTAb、CroFab、奈西立肽(nesiritide)、阿巴西普(abatacept)、阿萊法西普(alefacept)、Rebif、阿法艾托特明(eptoterminalfa)、特立帕肽(teriparatide)(骨質疏鬆症)、注射用降血鈣蛋白(骨病)、降血鈣蛋白(鼻

部、骨質疏鬆症)、依那西普(etanercept)、聚戊二醛血紅蛋白250(hemoglobin glutamer 250)(牛)、替加色羅α(drotrecogin alpha)、膠原酶、卡培立肽(carperitide)、重組人類表皮生長因子(局部凝膠劑、傷口癒合)、DWP401、達貝泊汀α(darbepoetin alpha)、促紅細胞生成素Ω、促紅細胞生成素β、促紅細胞生成素α、地西盧定、來匹盧定、比伐盧定、諾那凝血素α、單寧(Mononine)、依他凝血素α(活化)、重組因子VIII+VWF、Recombinate、重組因子VIII、因子VIII(重組)、Alphnmate、辛凝血素α、因子VIII、帕利夫明(palifermin)、靛藍激酶(indikinase)、替奈普酶(tenecteplase)、阿替普酶(alteplase)、帕米替普酶(pamiteplase)、瑞替普酶(reteplase)、奈替普酶(nateplase)、蒙替普酶(monteplase)、促卵泡激素α(follitropin alpha)、rFSH、hpFSH、米卡芬淨(micafungin)、培非格司亭(pegfilgrastim)、來格司亭(lenograstim)、那托司亭(nartograstim)、舍莫瑞林(sermorelin)、升糖素、艾塞那肽(exenatide)、普蘭林肽(pramlintide)、伊米苷酶(imiglucerase)、加硫酶(galsulfase)、促白蛋白(Leucotropin)、莫拉司亭(Molgramostim)、乙酸曲普瑞林(triptorelin acetate)、組胺瑞林(histrelin)(皮下植入物,Hydron)、地洛瑞林(deslorelin)、組胺瑞林、那法瑞林(nafarelin)、亮丙瑞林持續釋放積存物(leuprolide

sustained release depot)(ATRIGEL)、亮丙瑞林植入物(leuprolide implant)(DUROS)、戈舍瑞林(goserelin)、真肌鈣蛋白(Eutropin)、KP-102程式、生長激素、美卡舍明(mecasermin)(生長不足)、依那韋肽(enlfavirtide)、Org-33408、甘精胰島素(insulin glargine)、賴谷胰島素(insulin glulisine)、胰島素(吸入)、賴脯胰島素(insulin lispro)、地特胰島素(insulin deternir)、胰島素(口腔，RapidMist)、美卡舍明-林菲培(mecasermin rinfabate)、阿那白滯素(anakinra)、西莫白介素(celmoleukin)、99 mTc-阿普西肽注射劑(99 mTc-apcitide injection)、myelopid、倍他龍(Betaseron)、乙酸格拉替雷(glatiramer acetate)、Gepon、沙格司亭(sargramostim)、奧普瑞白介素(oprelvekin)、人類白血球-衍生α干擾素、Bilive、胰島素(重組)、重組人類胰島素、門冬胰島素(insulin aspart)、美卡舍明(mecasenin)、羅擾素-A、干擾素-α2、Alfaferone、集成干擾素α-1(interferon alfacon-1)、干擾素α、Avonex重組人類黃體生長激素、鏈道酶α(dornase alpha)、曲弗明(trafermin)、齊考諾肽(ziconotide)、他替瑞林(taltirelin)、阿法地博特明(diboterminalfa)、阿托西班(atosiban)、貝卡普勒明(becaplermin)、依替巴肽(eptifibatide)、Zemaira、CTC-111、Shanvac-B、HPV疫苗(四價)、

奧曲肽(octreotide)、蘭瑞肽(lanreotide)、安西司亭(ancestirn)、阿糖苷酶β、阿糖苷酶α、拉羅尼酶(laronidase)、普瑞肽乙酸銅(prezatide copper acetate)(局部凝膠劑)、拉布立酶(rasburicase)、雷珠單抗(ranibizumab)、Actimmune、PEG-Intron、Tricomin、重組屋塵蟎過敏症脫敏注射劑、重組人類甲狀旁腺素(PTH)1-84(sc,骨質疏鬆症)、促紅細胞生成素δ、轉殖基因抗凝血酶III、大促素(Granditropin)、透明質酸酶、重組胰島素、干擾素-α(口含錠)、GEM-21S、伐普肽(vapreotide)、艾度硫酸酯酶(idursulfase)、奧馬曲拉(omnapatrilat)、重組血清白蛋白、塞妥珠單抗-聚乙二醇(certolizumab pegol)、葡糖苷酶、人類重組C1酯酶抑制劑(血管性水腫)、拉替普酶(lanoteplase)、重組人類生長激素、恩夫韋肽(enfuvirtide)(無針注射劑、Biojector 2000)、VGV-1、干擾素(α)、蘆西納坦(lucinactant)、阿維帕地爾(aviptadil)(吸入,肺病)、艾替班特(icatibant)、艾卡拉肽(ecallantide)、奧米加南(omiganan)、奧羅格拉布(Aurograb)、培西加南乙酸酯(pexigananacetate)、ADI-PEG-20、LDI-200、地加瑞克(degarelix)、cintredelinbesudotox、Favld、MDX-1379、ISAtx-247、利拉魯肽(liraglutide)、特立帕肽(teriparatide)(骨質疏鬆症)、替法可近(tifacogin)、AA4500、T4N5脂質體洗

劑、卡妥索單抗(catumaxomab)、DWP413、ART-123、金黴素(Chrysalin)、去氨普酶(desmoteplase)、阿米替酶(amediplase)、絨促卵泡素α(corifollitropinalpha)、TH-9507、替度魯肽(teduglutide)、Diamyd、DWP-412、生長激素(持續釋放注射劑)、重組G-CSF、胰島素(吸入，AIR)、胰島素(吸入，Technosphere)、胰島素(吸入，AERx)、RGN-303、DiaPep277、干擾素β(C型肝炎病毒感染(HCV))、干擾素α-n3(經口)、貝拉西普(belatacept)、經皮胰島素貼劑、AMG-531、MBP-8298、Xerecept、奧培巴康(opebacan)、AIDSVAX、GV-1001、LymphoScan、豹蛙酶(ranpirnase)、Lipoxysan、蘆舒普肽(lusupultide)、MP52(β-磷酸三鈣載劑，骨骼再生)、黑素瘤疫苗、西普盧塞-T(sipuleucel-T)、CTP-37、Insegia、維特斯彭(vitespen)、人類凝血酶(冷凍，手術出血)、凝血酶、TransMID、阿非普酶(alfimeprase)、普瑞凱希(Puricase)、特利加壓素(terlipressin)(靜脈內，肝腎症候群)、EUR-1008M、重組FGF-I(注射用，血管疾病)、BDM-E、羅格列肽(rotigaptide)、ETC-216、P-113、MBI-594、杜拉黴素(duramycin)(吸入，囊性纖維化)、SCV-07、OPI-45、內皮抑素、血管抑素、ABT-510、Bowman Birk抑制劑濃縮物、XMP-629、99 mTc-Hynic-膜聯蛋白V、卡拉立德F(kahalalide F)、CTCE-9908、替維瑞克

(teverelix)(延長釋放)、奧紮利克斯(ozarelix)、羅米地辛(rornidepsin)、BAY-504798、介白素4、PRX-321、Pepscan、伊博卡德金(iboctadekin)、rh乳鐵蛋白(rhlactoferrin)、TRU-015、IL-21、ATN-161、西侖吉肽(cilengitide)、白蛋白干擾素(Albuferon)、Biphasix、IRX-2、Ω干擾素、PCK-3145、CAP-232、帕瑞肽(pasireotide)、huN901-DMI、卵巢癌免疫治療疫苗、SB-249553、Oncovax-CL、OncoVax-P、BLP-25、CerVax-16、多-表位肽黑素瘤疫苗(MART-1，gp100，酪胺酸酶)、奈米非特(nemifitide)、rAAT(吸入)、rAAT(皮膚)、CGRP(吸入，哮喘)、培那西普(pegsunercept)、胸腺素β4、皮汰德普辛(plitidepsin)、GTP-200、雷莫拉寧(ramoplanin)、GRASPA、OBI-1、AC-100、鮭魚降血鈣蛋白(經口，eligen)、降血鈣蛋白(經口，骨質疏鬆症)、艾沙瑞林(examorelin)、卡莫瑞林(capromorelin)、卡德瓦(Cardeva)、韋拉弗明(velafermin)、131I-TM-601、KK-220、T-10、烏拉立肽(ularitide)、地來司他(depelestat)、hematide、金黴素(局部)、rNAPc2、重組因子V111(聚乙二醇化脂質體)、bFGF、聚乙二醇化重組葡萄球菌激酶變異體、V-10153、SonoLysisProlyse、NeuroVax、CZEN-002、胰島細胞新生療法、rGLP-1、BIM-51077、LY-548806、艾塞那肽(exenatide)(控

制釋放，Medisorb)、AVE-0010、GA-GCB、阿伏瑞林(avorelin)、ACM-9604、乙酸利那洛肽(linaclotideacetate)、CETi-1、Hemospan、VAL(注射用)、快速胰島素(注射用，Viadel)、鼻內胰島素、胰島素(吸入)、胰島素(經口，eligen)、重組甲硫胺醯基人類瘦蛋白、皮特拉金拉皮下注射劑(pitrakinra subcutancous injection)，濕疹)、皮特拉金拉(pitrakinra)(吸入乾粉，哮喘)、Multikine、RG-1068、MM-093、NBI-6024、AT-001、PI-0824、Org-39141、Cpn10(自體免疫疾病/發炎)、塔拉鐵蛋白(talactoferrin)(局部)、rEV-131(眼用)、rEV-131(呼吸道疾病)、經口重組人類胰島素(糖尿病)、RPI-78M、奧普瑞白介素(oprelvekin)(經口)、CYT-99007 CTLA4-Ig、DTY-001、伐拉司特(valategrast)、干擾素α-n3(局部)、IRX-3、RDP-58、Tauferon、膽鹽刺激脂肪酶、Merispase、鹼性磷酸酶、EP-2104R、美拉諾坦-II(Melanotan-II)、布美諾肽(bremelanotide)、ATL-104、重組人類微纖溶酶、AX-200、SEMAX、ACV-1、Xen-2174、CJC-1008、強啡肽A、SI-6603、LAB GHRH、AER-002、BGC-728、瘧疾疫苗(病毒體，PeviPRO)、ALTU-135、細小病毒B19疫苗、流感疫苗(重組神經胺酸酶)、瘧疾/HBV疫苗、炭疽疫苗、Vacc-5q、Vacc-4x、HIV疫苗(經口)、HPV疫苗、Tat

類毒素、YSPSL、CHS-13340、PTH(1-34)脂質體乳劑(Novasome)、Ostabolin-C、PTH類似物(局部，牛皮癬)、MBRI-93.02、MTB72F疫苗(結核)、MVA-Ag85A疫苗(結核)、FARA04、BA-210、重組鼠疫FIV疫苗、AG-702、OxSODrol、rBetV1、Der-p1/Der-p2/Der-p7過敏原-靶向疫苗(塵蟎過敏症)、PR1肽抗原(白血病)、突變型ras疫苗、HPV-16E7脂肽疫苗、拉比林汀疫苗(labyrinthin vaccine)(腺癌)、CML疫苗、WT1-肽疫苗(癌症)、IDD-5、CDX-110、Pentrys、Norelin、CytoFab、P-9808、VT-111、艾羅卡肽(icrocaptide)、替柏明(telbermin)(皮膚，糖尿病性足部潰瘍)、蘆平曲韋(rupintrivir)、reticulose、rGRF、HA、α-半乳糖苷酶A、ACE-011、ALTU-140、CGX-1160、血管緊張素治療疫苗、D-4F、ETC-642、APP-018、rhMBL、SCV-07(經口，結核)、DRF-7295、ABT-828、ErbB2-特異性免疫毒素(抗癌)、DT3SSIL-3、TST-10088、PRO-1762、Combotox、膽囊收縮素-B/胃泌素-受體結合肽、111-hEGF、AE-37、曲尼珠單抗-DM1(trasnizumab-DM1)、拮抗劑G、IL-12(重組)、PM-02734、IMP-321、rhIGF-BP3、BLX-883、CUV-1647(局部)、基於L-19之放射免疫治療(癌症)、Re-188-P-2045、AMG-386、DC/1540/KLH疫苗(癌症)、VX-001、AVE-9633、AC-9301、NY-ESO-1

疫苗(肽)、NA17.A2肽、黑素瘤疫苗(脈衝抗原治療)、前列腺癌疫苗、CBP-501、重組人類乳鐵蛋白(乾眼症)、FX-06、AP-214、WAP-8294A(注射用)、ACP-HIP、SUN-11031、肽YY [3-36](肥胖症，鼻內)、FGLL、阿塞西普(atacicept)、BR3-Fc、BN-003、BA-058、人類甲狀旁腺素1-34(鼻部，骨質疏鬆症)、F-18-CCR1、AT-1100(腹腔疾病/糖尿病)、JPD-003、PTH(7-34)脂質體乳劑(Novasome)、杜拉黴素(眼用，乾眼症)、CAB-2、CTCE-0214、糖基聚乙二醇化促紅細胞生成素、EPO-Fc、CNTO-528、AMG-114、JR-013、因子XIII、氨基康定(aminocandin)、PN-951、716155、SUN-E7001、TH-0318、BAY-73-7977、替維瑞克(teverelix)(即刻釋放)、EP-51216、hGH(控制釋放，Biosphere)、OGP-I、西夫韋肽(sifuvirtide)、TV4710、ALG-889、Org-41259、rhCC10、F-991、胸腺噴丁(thymopentin)(肺病)、r(m)CRP、肝選擇性胰島素、蘇巴林(subalin)、L19-IL-2融合蛋白質、彈性蛋白酶抑制劑、NMK-150、ALTU-139、EN-122004、rhTPO、血小板生成素受體促效劑(血小板減少性病症)、AL-108、AL-208、神經生長因子拮抗劑(疼痛)、SLV-317、CGX-1007、INNO-105、經口特立帕肽(eligen)、GEM-OS1、AC-162352、PRX-302、LFn-p24融合疫苗(Therapore)、EP-1043、肺炎鏈球菌小兒疫苗、瘧疾疫苗、腦膜炎奈瑟氏菌B組疫苗、新生兒

B組鏈球菌疫苗、炭疽疫苗、HCV疫苗(gpE1+gpE2+MF-59)、中耳炎療法、HCV疫苗(核心抗原+ISCOMATRIX)、hPTH(1-34)(經皮,ViaDerm)、768974、SYN-101、PGN-0052、阿維斯可寧(aviscumnine)、BIM-23190、結核疫苗、多-表位酪胺酸酶肽、癌症疫苗、恩卡斯汀(enkastim)、APC-8024、GI-5005、ACC-001、TTS-CD3、血管-靶向TNF(實體腫瘤)、去氨加壓素(口腔控制釋放)、奧那西普(onercept)、或TP-9201、阿達木單抗(adalimumab)(HUMIRA)、英利昔單抗(infliximab)(REMICADE™)、利妥昔單抗(rituximab)(RITUXAN™/MAB THERA™)、依那西普(etanercept)(ENBREL™)、貝伐單抗(bevacizumab)(AVASTIN™)、曲妥珠單抗(trastuzumab)(HERCEPTIN™)、培格列斯汀(pegrilgrastim)(NEULASTA™)、或任何其他合適POI,包括生物仿製藥及生物改進藥。

【0130】 根據特定態樣,宿主細胞可為任何動物細胞、脊椎動物細胞、哺乳動物細胞、人類細胞、植物細胞、線蟲細胞、無脊椎動物細胞諸如昆蟲細胞或軟體動物細胞、來源於前述中之任一者之幹細胞、或真菌細胞或酵母細胞。特定言之,宿主細胞為選自由以下組成之群組之屬的細胞:畢赤酵母、漢遜酵母、*Komagataella*、酵母屬、克魯維酵母、假絲酵母、Ogataea、耶氏酵母、及地絲菌,尤其

釀酒酵母、巴斯德畢赤酵母、*Ogataea minuta*、乳酸克魯維酵母(*Kluyveromces lactis*)、馬克斯克魯維酵母(*Kluyveromes marxianus*)、解脂耶氏酵母或多形漢遜酵母，或絲狀真菌如泡盛麴黴或里氏木黴。較佳地，宿主細胞為甲基營養酵母，較佳巴斯德畢赤酵母。在本文中，巴斯德畢赤酵母同義地用於全部巴斯德駒形氏酵母(*Komagataella pastoris*)、法夫駒形氏酵母(*Komagataella phaffii*)及*Komagataella pseudopastoris*。

【0131】 根據特定態樣，宿主細胞為

a) 選自由以下組成之群組之屬類的酵母細胞：畢赤酵母、漢遜酵母、Komagataella、酵母屬、克魯維酵母、假絲酵母、Ogataea、耶氏酵母、及地絲菌，諸如畢赤酵母屬(例如巴斯德畢赤酵母、甲醇畢赤酵母(Pichia methanolica)、克魯維畢赤酵母(Pichia kluyveri)、及安格斯畢赤酵母(Pichia angusta))、Komagataella屬(例如巴斯德駒形氏酵母(*Komagataella pastoris*)、Komagataella pseudopastoris或法夫駒形氏酵母(*Komagataella phaffii*))、酵母屬(例如釀酒酵母、克魯維酵母(Saccharomyces kluyveri)、葡萄汁酵母(Saccharomyces uvarum))、克魯維酵母屬(例如乳酸克魯維酵母(Kluyveromyces lactis)、馬克斯克魯維酵母(Kluyveromyces marxianus))、假絲酵母屬(例如產朊假絲酵母(Candida utilis)、可可假絲酵母

(Candida cacaoi)、博伊丁假絲酵母(Candida boidinii))、地絲菌屬(例如發酵地絲菌(Geotrichum fermentans))、多形漢遜酵母、解脂耶氏酵母、或粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)；或

b) 絲狀真菌之細胞，諸如泡盛麴黴或里氏木黴。

【0132】 較佳為巴斯德畢赤酵母物種。特定言之，宿主細胞為選自由以下組成之群組的巴斯德畢赤酵母菌株：CBS 704、CBS 2612、CBS 7435、CBS 9173-9189、DSMZ 70877、X-33、GS115、KM71、KM71H及SMD1168。

【0133】 來源：CBS 704 (=NRRL Y-1603 = DSMZ 70382), CBS 2612 (=NRRL Y-7556)、CBS 7435 (=NRRL Y-11430)、CBS 9173-9189 (CBS菌株：CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelculturen, Utrecht, The Netherlands)、及DSMZ 70877 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)；來自Invitrogen之菌株，諸如X-33、GS115、KM71、KM71H及SMD1168。

【0134】 較佳釀酒酵母菌株之實例包括W303、CEN.PK及BY-系列(EUROSCARF保藏)。所有如上所述菌株已經成功用於製造轉型體及表現異源基因。

【0135】 根據特定態樣，真核宿主細胞可為真菌細胞(例如，麴黴(諸如黑麴黴(*A. niger*)、煙麴黴(*A. fumigatus*)、米麴黴(*A. oryzae*)、構巢麴黴(*A.*

nidulans))、頂孢黴(Acremonium)(諸如嗜熱頂孢黴(*A. thermophilum*))、毛殼菌(Chaetomium)(諸如嗜熱毛殼菌(*C. thermophilum*))、金孢菌屬(Chrysosporium)(諸如嗜熱金孢菌(*C. thermophile*))、蟲草(Cordyceps)(諸如蛹蟲草(*C. militaris*))、棒囊殼屬(Corynascus)、櫛黴屬(Ctenomyces)、鐮刀菌(Fusarium)(諸如尖孢鐮刀菌(*F. oxysporum*))、小叢殼(Glomerella)(諸如禾生小叢殼(*G. graminicola*))、肉座菌(Hypocrea)(諸如紅褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*))、瘟菌(Magnaporthe)(諸如稻瘟菌(*M. oryzae*))、毀絲黴(Myceliophthora)(諸如嗜熱毀絲黴(*M. thermophile*))、叢赤殼菌(Nectria)(諸如鞭毛藻叢赤殼菌(*N. haematococca*))、脈孢菌(Neurospora)(諸如粗糙脈孢菌(*N. crassa*))、青黴菌(Penicillium)、側孢黴(Sporotrichum)(諸如嗜熱側孢黴(*S. thermophile*))、梭孢殼黴(Thielavia)(諸如太瑞斯梭孢殼黴(*T. terrestris*)、異宗梭孢殼黴(*T. heterothallica*))、木黴(Trichoderma)(諸如里氏木黴)、或輪枝菌(Verticillium)(諸如大麗輪枝菌(*V. dahlia*))。

【0136】 根據特定態樣，哺乳動物細胞為人類或齧齒動物或牛細胞、細胞株或細胞品系。適合作為本文所述宿主細胞之特定哺乳動物細胞的實例為小鼠骨髓瘤(NSO)-細胞

株、中國倉鼠卵巢(CHO)-細胞株、HT1080、H9、HepG2、MCF7、MDBK Jurkat、MDCK、NIH3T3、PC12、BHK(幼倉鼠腎細胞)、VERO、SP2/0、YB2/0、Y0、C127、L細胞、COS,例如COS1及COS7、QC1-3、HEK-293、VERO、PER.C6、HeLA、EB1、EB2、EB3、溶瘤或融合瘤-細胞株。較佳地哺乳動物細胞為CHO-細胞株。在一個實施例中,細胞為CHO細胞。在一個實施例中,細胞為CHO-K1細胞、CHO-K1 SV細胞、DG44 CHO細胞、DUXB11 CHO細胞、DUKX CHO細胞、CHO-S、CHO FUT8剔除CHO GS剔除細胞、CHO FUT8 GS剔除細胞、CHOZN、或CHO-衍生細胞。CHO GS剔除細胞(例如GSKO細胞)為例如CHO-K1 SV GS剔除細胞。CHO FUT8剔除細胞為例如Potelligent® CHOK1 SV (Lonza Biologics, Inc.)。真核細胞亦包括鳥類細胞、細胞株或細胞品系,諸如例如EBx®細胞、EB14、EB24、EB26、EB66、或EBv13。

【0137】 根據另一個特定態樣,真核細胞為昆蟲細胞(例如,Sf9、Mimic™ Sf9、Sf21、High FiveTM(BT1-TN-5B1-4)、或BT1-Ea88細胞)、藻類細胞(例如,雙眉藻屬(Amphora)、矽藻(Bacillariophyceae)、杜氏藻屬(Dunaliella)、小球藻(Chlorella)、衣藻(Chlamydomonas)、藍藻(Cyanophyta)(藍細菌)、微擬球藻(Nannochloropsis)、螺旋藻(Spirulina)、或棕鞭藻

屬(Ochromonas))、或植物細胞(例如，細胞單子葉植物(例如，玉米、稻米、小麥、或狗尾草)，或雙子葉植物(例如，木薯、馬鈴薯、大豆、番茄、煙草、苜蓿、小立碗蘚(*Physcomitrella patens*)或擬南芥(Arabidopsis))。

【0138】 根據特定態樣，宿主細胞為原核細胞例如細菌細胞。特定言之，宿主細胞為革蘭氏陽性細胞諸如桿菌、鏈黴菌屬鏈球菌、葡萄球菌或乳桿菌。可使用桿菌，例如枯草芽胞桿菌(*B. subtilis*)、解澱粉芽孢桿菌(*B. amyloliquefaciens*)、地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*)、納豆芽孢桿菌(*B. natto*)、或巨大芽孢桿菌(*B. megaterium*)。在實施例中，細胞為枯草芽孢桿菌，諸如枯草芽孢桿菌3NA及枯草芽孢桿菌168。桿菌可自例如Bacillus Genetic Stock Center, Biological Sciences 556, 484 West 12th Avenue, Columbus OH 43210-1214獲得。

【0139】 在一個實施例中，原核細胞為革蘭氏陰性細胞，諸如沙門氏菌屬(Salmonella spp.)或大腸桿菌(Escherichia *coli*)，諸如例如TG1、TG2、W3110、DH1、DHB4、DH5a、HMS174、HMS174(DE3)、NM533、C600、HB101、JM109、MC4100、XL1-Blue及Origami，以及衍生自大腸桿菌B-菌株之彼等，諸如例如BL-21或BL21(DE3)，該等菌株全部為可購得的。

【0140】 根據特定實施例，原核細胞選自由大腸桿菌、枯草芽孢桿菌、及假單胞菌組成之群組。

【0141】 合適宿主細胞為可購得的，例如來自培養物保藏，諸如DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany)或美國菌種保藏中心(American Type Culture Collection; ATCC)。

【0142】 根據特定態樣，本發明提供在可藉由非甲醇碳源(尤其，本文所述ECP)來調控或抑制之啟動子控制下、增加由表現編碼所關注蛋白質(protein of interest; POI)之所關注基因(gene of interest; GOI)的宿主細胞製造之該POI之產率的方法，該方法藉由在該宿主細胞中減少編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1的胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物之基因之表現來進行的，尤其對於宿主細胞而言為內源性的編碼該FLO8蛋白質之基因。

【0143】 特定言之，如與表現該GOI之相似宿主細胞相比，產率增加至少1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3倍、3.5倍、4倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、10.5倍、11倍、11.5倍、或12倍中之任一者，

a)該宿主細胞未經工程化以便減少編碼內源性FLO8蛋白質之該基因之表現，或其中編碼內源性FLO8蛋白質之該基因之表現未改變；及視情況

b)其中控制該GOI之表現的啟動子為組成性啟動子，尤其GAP啟動子，或甲醇可誘導啟動子，尤其AOX1啟動子。

【0144】 特定言之，增加本文所述POI製造之產率之方法使用如在本文中進一步描述之重組宿主細胞。

【0145】 根據進一步特定態樣，本發明提供藉由在製造該POI之條件下培養如在本文中進一步描述之重組宿主細胞來製造由所關注基因(gene of interest; GOI)編碼之所關注蛋白質(protein of interest; POI)的方法。

【0146】 根據進一步特定實施例，本發明提供本文所述宿主細胞用於製造POI之用途。

【0147】 特定言之，宿主細胞為在細胞培養物中培養之細胞株，尤其製造宿主細胞株。

【0148】 根據特定實施例，細胞株在批料、分批補料或連續培養條件下培養。培養物可在微量滴定板、搖瓶、或生物反應器中執行，並且視情況以批料階段作為第一步驟來開始，隨後分批補料相或連續培養階段作為第二步驟。

【0149】 特定言之，方法包含以下步驟：

a) 在生長條件下培養宿主細胞；及進一步步驟

b) 在生長限制條件下在高達1 g/L之第二非甲醇碳源之存在下培養宿主細胞，導致表現該GOI以便製造該POI。

【0150】 特定言之，第二步驟b)在第一步驟a)之後。

【0151】 特定言之，第一碳源為在本文中被稱為基礎碳源之非甲醇碳源。

【0152】 特定言之，在第一步驟中、在生長條件下、在包含例如足以實現細胞培養物中之宿主細胞生長之量的第一碳源的細胞培養基中，培養宿主細胞，視情況直到碳源量得以耗盡為止，並且進一步培養可在生長限制條件下。

【0153】 特定言之，第二碳源為在本文中被稱為補充碳源之非甲醇碳源。

【0154】 特定言之，該第一及/或第二碳源選自醣、多元醇、醇、或前述中之任一者或多者之混合物，如在本文中進一步描述。

【0155】 根據特定實施例，基礎碳源不同於補充碳源，例如在定量及/或定性上不同。定量差異通常提供抑制或去抑制啟動子活性之不同條件。

【0156】 根據進一步特定實施例，基礎及補充碳源包含相同類型之分子或碳水化合物，較佳呈不同濃度。根據進一步特定實施例，碳源為兩種或兩種以上不同碳源之混合物。

【0157】 可使用任何類型之有機碳源，尤其通常用於宿主細胞培養物，尤其用於真核宿主細胞培養物之有機碳源。根據特定實施例，碳源為己糖，諸如葡萄糖、果糖、半乳糖或甘露糖、二糖諸如蔗糖、醇諸如甘油或乙醇、或其混合物。

【0158】 根據尤其較佳實施例，基礎碳源選自由葡萄糖、甘油、乙醇、或其混合物組成之群組。根據較佳實施例，基礎碳源為甘油。

【0159】 根據進一步特定實施例，補充碳源為己糖諸如葡萄糖、果糖、半乳糖及甘露糖、二糖諸如蔗糖、醇諸如甘油或乙醇、或其混合物。根據較佳實施例，補充碳源為葡萄糖。

【0160】 特定言之，

a)基礎碳源選自由葡萄糖、甘油、乙醇、其混合物組成之群組；及

b)補充碳源為己糖諸如葡萄糖、果糖、半乳糖或甘露糖、二糖諸如蔗糖、醇諸如甘油或乙醇、或前述任一者之混合物。

【0161】 該等培養步驟皆尤其包含在該等碳源存在下培養細胞株。例如，該在生長條件下培養宿主細胞(步驟a)使用基礎碳源來執行；並且該在生長限制條件下培養宿主細胞(步驟b)使用補充碳源來執行，該補充碳源例如呈有限數量以使得在培養期間，細胞培養基在細胞培養基或上清液中包含高達1 g/L或甚至不可偵測量之補充碳源(步驟b)。

【0162】 去抑制(或誘導)條件適當地可藉由特定手段來達成。第二步驟b)視情況使用饋送培養基，該饋送培養基在細胞培養基或上清液中不提供補充碳源或提供有限數量之補充碳源。特定言之，饋送培養基為在化學上經限定的並且無甲醇。

【0163】 特定言之，第二步驟b)使用饋送培養基，該饋送培養基提供生長限制量之補充碳源以便將特定生長速率保

持在0.0001 h^{-1}至0.2 h^{-1}，較佳0.005 h^{-1}至0.15 h^{-1}範圍內。

【0164】 饋送培養基可以液體形式或另外以替代形式諸如固體，例如作為錠劑或其他持續釋放方式或氣體來添加至培養基。然而，根據較佳實施例，添加至細胞培養基之補充碳源之有限數量可甚至為零。較佳地，在有限碳基質之條件下，培養基中之補充碳源之可偵測濃度為0-1 g/L，較佳少於0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 g/L中之任一者，較佳少於90、80、70、60、50、40、30、20、或10 mg/L中之任一者，或甚至少於9、8、7、6、5、4、3、2、或1 mg/L，或尤其1-50 mg/L，或1-10 mg/L，尤其較佳1 mg/L或甚至低於以下各者，諸如低於如藉由合適標準檢定來量測之偵測極限，例如在藉由生長細胞培養物耗盡後，作為培養基中之殘餘濃度來確定之偵測極限。

【0165】 在較佳方法中，補充來源之有限數量提供細胞培養物中之殘餘量，該殘餘量低於偵測極限，該偵測極限如在製造階段結束時在發酵液中所確定或較佳在收穫發酵產物後，在發酵過程之輸出中所確定。

【0166】 特定言之，該步驟a)培養在批料階段中執行；並且該步驟b)培養在分批補料或連續培養階段中執行。

【0167】 特定言之，宿主細胞在高生長速率階段期間在包含基礎碳源之富含碳源之培養基中生長(在生長條件下)，步驟a)(例如至少50%、或至少60%、至少70%、至少80%、

至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、或直至最大生長速率)，並且在尤其藉由饋送僅包含在將細胞培養物保持在製造階段中時完全消耗之碳源量的經限定基本培養基來對碳源進行限制的同時，在低生長速率階段期間製造POI(在生長限制條件下)，步驟b)(例如最大生長速率之少於90%、較佳少於80%、少於70%、少於60%,少於50%、或少於40%、少於30%、少於20%、少於10%、少於5%、少於3%、少於2%、少於1%、少於0.5%、少於0.4%、少於0.3%、或少於0.2%)。

【0168】 特定言之，在該等生長限制條件下表現POI，例如藉由在少於最大生長速率之生長速率下，通常在細胞之最大生長速率之少於90%、較佳少於80%、少於70%、少於60%、少於50%、少於40%、少於30%、少於20%、少於10%、少於5%、少於3%、少於2%、少於1%、少於0.5%、少於0.4%、少於0.3%、或少於0.2%下培養細胞株。通常最大生長速率針對各類型之宿主細胞來個別地確定。

【0169】 特定言之，執行批料階段直到最初添加至細胞培養物之基礎碳源被細胞株消耗為止。溶解氧(dissolved oxygen; DO)峰值方法可用於確定批料階段期間之基礎碳源消耗。

【0170】 根據特定實施例，批料階段藉由氧分壓力(pO2)信號之連續減少來表徵並且其中批料階段結束藉由pO2之增加來表徵。通常，在批料階段期間消耗基礎碳源時並且無需如對於批料階段而言典型的添加進一步碳源，氧分壓

力(pO2)信號連續減少直到為止例如低於65%諸如例如30%。在基礎碳源消耗後，pO2可增加至例如超過30%諸如例如超過65%、或更大，指示轉換至使用饋送培養基之分批補料系統以便在碳源限制條件下添加進一步碳源的適當時間點。

【0171】 特定言之，pO2在批料階段期間減少至小於65%或更少飽和度，隨後在批料結束時，增加超過65%或更大飽和度。特定言之，執行批料階段直到為止氧分壓力(pO2)信號之增加超過65%飽和度，尤其超過70%、75%、80%、或85%中之任一者。

【0172】 特定言之，執行批料階段約10至36h。

【0173】 關於培養時間之術語「約」意謂+/-5%或+/-10%。

【0174】 例如，約10至36h之特定批料執行時間可為18至39.6h，尤其19至37.8h。

【0175】 根據特定實施例，批料階段使用40至50 g/L甘油，尤其45 g/L甘油作為批料培養基中之基礎碳源來執行，並且培養在25℃下執行約27至30h，或在30℃下約23至36h，或在25℃與30℃之間之任何溫度下、在23至36h之培養時間期間執行。降低批料培養基中之甘油濃度減少批料階段之長度，同時增加批料培養基中之甘油甚至延長批料階段。作為甘油之替代，可使用例如大約相同量之葡萄糖。

【0176】 在細胞培養及POI表現之典型系統中，尤其其中在批料階段之後為分批補料階段，執行分批補料階段中之培

養約15至80h、約15至70h、約15至60h、約15至50h、約15至45h、約15至40h、約15至35h、約15至30h、約15至35h、約15至25h、或約15至20h中之任一者；較佳約20至40h。特定言之，執行分批補料階段中之培養約80h、約70h、約60h、約55h、約50h、約45h、約40h、約35h、約33h、約30h、約25h、約20h、或約15h中之任一者。

【0177】 導致成功POI製造，由此獲得高產率的少於120h或少於100h或多達80h之任何分批補料培養在本文中被稱為「加速發酵」。特定言之，體積比產物形成速率(rP)為每單位體積(L)及單位時間(h)形成之產物(mg)之量(mg (L h)$^{-1}$)。體積比產物形成速率亦被稱為時空產率(space time yield; STY)或體積生產力。

【0178】 特定言之，執行本文所述方法之分批補料培養以使得時空產率為約30 mg (L h)$^{-1}$ (意謂30 mg (L h)$^{-1}$ +/-5%或+/-10%)。特定言之，在約30h分批補料內達成約30 mg(Lh)$^{-1}$之時空產率，尤其在少於33h、32h、31h、30h、29h、28h、27h、26h、或25h分批補料時間中之任一者內，可達成至少27，28，29，30，31，32，或33 mg(Lh)$^{-1}$中之任一者。

【0179】 特定言之，批料階段作為第一步驟a)來執行，並且分批補料階段作為第二步驟b)來執行。

【0180】 特定言之，第二步驟b)使用分批補料階段中之饋送培養基，該饋送培養基提供生長限制量之補充碳源以便

將特定生長速率保持在0.0001 h^{-1}至0.2 h^{-1}之範圍內，較佳少於0.2、0.15、0.1 h^{-1}或0.15 h^{-1}中之任一者。

【0181】 特定言之，包括批料及分批補料培養步驟兩者之培養方法可尤其使用酵母宿主細胞，例如任何酵母屬或畢赤酵母屬或*Komagataella*屬之酵母，或除了畢赤酵母以外之屬類的酵母，諸如乳酸克魯維斯酵母、魯氏接合酵母(*Z. rouxii*)、樹幹畢赤酵母(*P. stipitis*)、多形漢遜酵母(*H. polymorpha*)、或解脂耶氏酵母(*Y. lipolytica*)、較佳巴斯德畢赤酵母或巴斯德駒形氏酵母(*Komagataella pastoris*)。

【0182】 根據進一步特定態樣，本發明提供在宿主細胞中製造所關注蛋白質(protein of interest; POI)之方法，該方法包含步驟：

a)將宿主細胞遺傳工程化以便減少編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1的胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物之內源性基因之表現；

b)向宿主細胞中引入包含在可操作連接至GOI之表現匣啟動子(expression cassette promoter; ECP)控制下編碼或表現該POI之所關注基因(gene of interest; GOI)的異源表現匣，該ECP可藉由非甲醇碳源來調控或抑制；

c) 在製造該POI之條件下培養該宿主細胞；

d) 視情況將該POI自細胞培養物中分離；及

e) 視情況純化該POI。

【0183】 特定言之，本文所述方法之步驟a)在步驟b)之前、或在步驟b)之後、或與步驟b)同時執行。

【0184】 根據特定態樣，在經工程化以便製造POI之前，宿主細胞首先經遺傳修飾以減少該FLO8蛋白質或其相應同源物之表現。根據特定實例，野生型宿主細胞根據本文所述方法之步驟a)來遺傳修飾。特定言之，在將減少該FLO8蛋白質或其相應同源物之該一或多種遺傳性修飾引入野生型宿主細胞菌株後，提供宿主細胞。

【0185】 根據另一個方面，宿主細胞首先經工程化以便製造異源或重組POI，然後進一步遺傳修飾以減少該FLO8蛋白質或其相應同源物。根據特定實例，野生型宿主細胞可首先工程化以便包含用於POI製造之表現匣。此工程化宿主細胞可然後如本文描述來進一步修飾以減少該FLO8蛋白質或其相應同源物。

【0186】 根據另一個方面，宿主細胞在一個方法步驟中經歷用於POI製造之工程化及減少該FLO8蛋白質或其相應同源物之遺傳修飾兩者，例如，藉由在一或多個反應混合物中使用相應表現匣、試劑及工具。

【0187】 特定言之，該方法使用如在本文中進一步描述之製造重組宿主細胞之方法步驟。

【0188】 特定言之，異源表現匣包含如在本文中進一步描述之ECP。

【0189】 特定言之，POI可藉由以下過程來製造：在合適培養基中培養宿主細胞，自細胞培養物中分離所表現POI，

尤其在分離細胞時，自細胞培養上清液或培養基中分離，並且適合於表現產物之方法來對其進行純化，尤其將POI自細胞中分離時，藉由合適手段來純化。由此，可製造經純化POI製劑。

【圖式簡單說明】

【0190】 第1圖：本文提及之序列

【實施方式】

【0191】 如說明書通篇使用之特定術語具有以下含義。

【0192】 如本文使用之亦稱為「碳基質」之術語「碳源」意謂適合作為微生物之能量來源的可發酵碳基質，通常為來源碳水化合物，諸如能夠由宿主生物體或製造細胞株來代謝之能量來源，尤其選自由單醣、寡糖、多醣、包括甘油之醇組成之群組的來源，該等來源呈純化形式、在基本培養基中或以諸如複合營養材料之原材料形式來提供。碳源可如本文描述作為單一碳源或作為不同碳源之混合物來使用。

【0193】 非甲醇碳源在本文中應理解為一定量的除了甲醇以外任何者的碳源，尤其無甲醇碳源。

【0194】 諸如如本文描述使用之「基礎碳源」通常為適合於細胞生長之碳源，諸如宿主細胞，尤其真核細胞之營養物。基礎碳源可在培養基，諸如基礎培養基或複合培養基中提供，但是亦在含有純化碳源之化學限定培養基中提供。基礎碳源通常以一定數量來提供，以便尤其在培養過程中之

生長階段期間提供細胞生長，例如獲得至少5 g/L細胞幹質量，較佳至少10 g/L細胞幹質量，或至少15 g/L細胞幹質量之細胞密度，例如在標準次培養步驟期間展現超過90%，較佳超過95%之生存能力。

【0195】 基礎碳源通常以過量或過剩量來使用，該過量或過剩量應理解為例如在培養具有高特定生長速率之細胞株期間，諸如在批料或分批補料培養過程中之細胞株之生長階段期間，提供增加生物質之能量的過量。此過剩量尤其超過(如在生長限制條件下所使用之)補充碳源之有限數量，以便達成發酵液中之殘餘濃度，該殘餘濃度為可量測的並且與在饋送有限數量之補充碳源期間相比，通常高至少10倍、較佳至少50倍或至少100倍。

【0196】 諸如本文所述之「補充碳源」通常為尤其在培養過程之製造階段中，促進藉由製造細胞株來製造發酵產物的補充基質。製造階段尤其在生長階段之後，例如在批料、分批補料及連續培養過程中。補充碳源尤其可包含在分批補料過程之進料中。補充碳源通常在碳基質受限條件下用於細胞培養中，亦即使用有限數量之碳源。

【0197】 「有限數量」之碳源或「有限碳源」在本文中理解為尤其係指尤其在受控生長速率少於最大生長速率之培養過程中，碳基質之類型及數量促進藉由製造細胞株來製造發酵產物。製造階段尤其在生長階段之後，例如在批料、分批補料及連續培養過程中。細胞培養過程可使用批料培養、連續培養、及分批補料培養。批料培養為將少量種子

培養液添加至培養基並且在培養期間無需添加額外培養基或排出培養液的情況下，使細胞生長的培養過程。連續培養為在培養期間將培養基連續添加並且排出的培養過程。連續培養亦包括灌注培養。處於批料培養與連續培養之間的中間並且亦被稱為半批料培養物的分批補料培養為在培養期間連續或依序添加培養基之培養過程，但是不同於連續培養，培養液不連續地排出。

【0198】 基於將生長限制營養物基質饋送至培養物的分批補料過程為尤其較佳的。包括單一分批補料或重複分批補料發酵的分批補料策略通常用於生物工業過程以便在生物反應器中達到高細胞密度。碳基質之受控添加直接影響培養物之生長速率並且有助於避免溢出代謝或形成不當代謝副產物。在碳源受限條件下，碳源尤其可包含在分批補料過程之進料中。因此，碳基質以有限數量提供。

【0199】 另外在如本文描述之恆化器或連續培養中，可緊密地控制生長速率。

【0200】 碳源之有限數量在本文中尤其應理解為例如在製造階段或製造模式中，將製造細胞株保持在生長限制條件下所必需的碳源量。此有限數量可用於分批補料過程中，其中碳源包含在饋送培養基中並且以低饋送速率供應至培養物以便例如為了製造POI而維持能量遞送，同時將生物質保持在低特定生長速率下。饋送培養基通常在細胞培養之期間製造階段添加至發酵液。

【0201】 碳源之有限數量可例如藉由細胞培養液中之碳源之殘餘量來確定，該殘餘量低於預定臨限值或甚至低於如在標準(碳水化合物)檢定中量測之偵測極限。通常在收穫發酵產物後，在發酵液中確定殘餘量。

【0202】 碳源之有限數量亦可藉由限定發酵罐之碳源之平均饋送速率來確定，例如根據培養時間的在全部培養過程例如分批補料階段中所添加的數量來確定，以便根據時間來確定計算平均量。此平均饋送速率保持較低以便確保藉由細胞培養物來完全使用補充碳源，例如在0.6 g L^{-1} h^{-1}(每L最初發酵體積及h時間之g碳源)與25 g L^{-1} h^{-1}之間，較佳1.6 g L^{-1} h^{-1}與20 g L^{-1} h^{-1}之間。

【0203】 碳源之有限數量亦可藉由量測特定生長速率來確定，該特定生長速率在製造階段期間保持較低，例如低於最大特定生長速率，例如在預定範圍內，諸如在0.001 h^{-1}至0.20 h^{-1}範圍內，或0.005 h^{-1}至0.20 h^{-1}，較佳0.01 h^{-1}與0.15 h^{-1}之間。

【0204】 特定言之，使用在化學上經限定並且無甲醇的饋送培養基。

【0205】 關於分批補料過程中之細胞培養基諸如基本培養基或饋送培養基的術語「化學限定」意謂適合於製造細胞株之在活體外細胞培養的培養基，其中所有化學組分及(多)肽為已知的。通常，化學限定培養基完全不含動物衍生組分並且表示純的及一致的細胞培養環境。

【0206】 如本文使用之術語「宿主細胞」係指宿主細胞之單一細胞、單一細胞純系、或細胞株。

【0207】 如本文使用之術語「細胞株」係指獲得在一段延長時間內增殖之能力的特定細胞類型之既定純系。細胞株通常用於表現內源性或重組基因、或代謝途徑之產物，以便製造多肽或由此等多肽介導之細胞代謝物。「製造宿主細胞株」或「製造細胞株」通常應理解為在生物反應器中隨時可用於細胞培養以便獲得製造過程產物諸如POI的細胞株。

【0208】 製造如本文描述POI的宿主細胞亦被稱為「製造宿主細胞」，並且相應細胞株被稱為「製造細胞株」。

【0209】 本文所述之特定實施例涉及製造宿主細胞株，該細胞株經工程化以便使編碼FLO8蛋白質之內源性基因表現不足，且/或具有此基因之經減少之表現，並且特徵在於在碳源可調控啟動子(諸如本文所述ECP)，尤其可在無需向細胞培養物添加甲醇的情況下誘導之啟動子的控制下製造POI之高產率。此宿主細胞表明可穩定表現POI而不顯著改變形態。

【0210】 術語「宿主細胞」尤其應用於出於重組目的適合用於製造POI或宿主細胞代謝物的任何真核或原核細胞或生物體。已得到充分認識，術語「宿主細胞」不包括人類。特定言之，如本文描述之宿主細胞為原生(野生型)宿主細胞之人工生物體及衍生物。已得到充分認識，本文所述宿主細胞、方法及用途例如尤其涉及包含一或多種遺傳性修

飾之彼等、該等異源表現匣或構建物、該等轉染或轉型宿主細胞及重組蛋白為非天然存在、「人造」或合成的，並且因此不被視為「自然法則」之結果。

【0211】 如本文相對於宿主細胞來使用之術語「細胞培養物」或「培養(culturing)」或「培養(cultivation)」係指根據行業中已知之方法，尤其在受控生物反應器中，在有利於細胞在活性或靜止狀態中之生長、分化或持續生存力之條件下，將細胞維持在人工例如活體外環境中。

【0212】 當使用合適培養基來培養細胞培養物時，在適合於支援細胞培養物中之細胞培養之條件下，使細胞與培養皿中之培養基或與基質接觸。如本文描述，提供可用於宿主細胞例如真核細胞，尤其酵母或絲狀真菌之生長的培養基。標準細胞培養技術在此項技術中為熟知的。

【0213】 如本文描述細胞培養物尤其使用提供所分泌POI之製造，以便諸如獲得細胞培養基中之POI的技術，該POI可自在本文中被稱為「細胞培養上清液」之細胞生物質中分離，並且可經純化以獲得POI更高純度。當蛋白質(諸如例如，POI)藉由細胞培養物中之宿主細胞來製造及分泌時，在本文中應理解此等蛋白質分泌至細胞培養物上清液中，並且可藉由將細胞培養上清液自宿主細胞生物質中分離，並且視情況進一步純化蛋白質以製造經純化蛋白質製劑來獲得。

【0214】 細胞培養基提供將細胞保持在受控、人工及活體外環境中並且生長必不可少的營養物。細胞培養基之特徵及

組成取決於特定細胞要求而變化。重要參數包括滲透重量莫耳濃度、pH、及營養物調配物。營養物之饋送可根據在此項技術中已知之方法以連續或不連續方式進行。

【0215】 雖然批料過程為用於培養細胞所必需之所有營養物包含在初始培養基中，無需在發酵期間另外供應進一步營養物的細胞培養模式，但是在分批補料過程中，在批料階段之後，發生藉由饋送將一或多種營養物供應至培養物的饋送階段。雖然在大多數過程中，饋送模式為關鍵及重要的，本文描述的宿主細胞及方法不受特定細胞培養模式限制。

【0216】 重組POI可使用本文所述宿主細胞及相應細胞株來製造，藉由在合適培養基中培養、自培養物中分離表現產物或代謝物，並且視情況藉由合適方法對其進行純化。

【0217】 製造如本文描述POI的多種不同方法為較佳的。POI可藉由以下過程來表現、處理並且視情況分泌：用容納編碼相關蛋白質之重組DNA之表現載體來轉染或轉型宿主細胞、製備轉染或轉型細胞之培養物、使培養物生長、誘導轉錄及POI製造、及回收POI。

【0218】 在某些實施例中，細胞培養過程為分批補料過程。特定言之，將用編碼所需重組POI之核酸構建體來轉型之宿主細胞在生長階段中培養並且轉換至製造階段以便製造所需重組POI。

【0219】 在另一實施例中，將本文所述宿主細胞在連續模式中培養，例如使用恆化器。連續發酵過程之特徵在於將新

鮮培養基饋送至生物反應器中之經限定、恆定及連續速率，其中同時以相同經限定、恆定及連續移除速率，將培養液自生物反應器中移除。藉由將培養基、饋送速率及移除速率保持在相同恆定水準，生物反應器中之細胞培養參數及條件保持恆定。

【0220】 如本文描述之穩定細胞培養物尤其應理解為係指如下細胞培養物，該細胞培養物保持遺傳性質，尤其保持POI製造水準較高，例如至少保持在μg水準下，甚至在約20代培養、較佳至少30代、更佳至少40代、最佳至少50代之後亦如此。特定言之，提供穩定重組宿主細胞株，該細胞株在用於工業規模製造時被視為具有極大優勢。

【0221】 本文所述細胞培養物尤其有利於工業製造規模之方法，例如相對於容積及技術系統兩者，以及基於饋送營養物之培養模式而言，尤其分批補料或批料過程，或連續或半連續過程(例如恆化器)。

【0222】 本文所述宿主細胞通常針對其表現用於POI製造之GOI的能力來進行測試，藉由以下測試中之任一者針對POI產率來進行測試：ELISA、活性檢定、HPLC、或其他合適測試，諸如SDS-PAGE及西方墨點技術、或質譜術。

【0223】 為了確定遺傳修飾對於相應細胞培養物中之編碼FLO8蛋白質或其同源物之基因之表現不足或減少的效應以及例如其對於POI製造之效應，可藉由使用分批補料或恆化器發酵，在微量滴定板、搖瓶、或生物反應器中培養

宿主細胞株，與沒有相應細胞中之此類遺傳修飾的菌株進行比較。

【0224】 本文所述製造方法尤其允許實驗或工業規模之發酵。工業過程規模較佳使用至少10 L，尤其至少50 L，較佳至少1 m^3，較佳至少10 m^3，最佳至少100 m^3之體積。

【0225】 工業規模之製造條件為較佳的，該等製造條件係指例如通常使用幾天之處理時間的在100 L至10 m^3或更大之反應器容積中之分批補料培養，或大約50－1000 L或更大之發酵罐容積之連續過程，該過程具有大約0.02－0.15 h^{-1}之稀釋率。

【0226】 用於本文描述目的之裝置、設施及方法尤其適合於用於培養包括原核及/或真核細胞株之任何所需細胞株。此外，在實施例中，裝置、設施及方法適合於培養任何細胞類型包括懸浮細胞或錨定依賴性(黏附)細胞，並且適合於被組配來製造醫藥及生物製藥產物之製造操作，該等產物諸如多肽產物(POI)、核酸產物(例如DNA或RNA)、或細胞及/或病毒諸如用於細胞及/或病毒療法中之彼等細胞及/或病毒。

【0227】 在某些實施例中，細胞表現或製造產物，諸如重組治療或診斷產物。如在本文中更詳細地描述，由細胞製造之產物之實例包括但不限於POI諸如在本文中例示之POI，包括抗體分子(例如，單株抗體、雙特異性抗體)、抗體模擬物(特異性結合至抗原但是在結構上與抗體不相關之多肽分子諸如例如迪梵、親和體、阿連菌素、或

IgNAR)、融合蛋白(例如，Fc融合蛋白、嵌合細胞介素)、其他重組蛋白(例如，糖基化蛋白、酶、激素)、或病毒治療劑(例如，抗癌溶瘤病毒、用於基因療法及病毒免疫療法之病毒載體)、細胞治療劑(例如，多能幹細胞、間質幹細胞及成人幹細胞)、疫苗或脂質囊封顆粒(例如，胞外體、病毒樣顆粒)、RNA(諸如例如siRNA)或DNA(諸如例如質體DNA)、抗生素或胺基酸。在實施例中，裝置、設施及方法可用於製造生物仿製藥。

【0228】 如提及，在某些實施例中，裝置、設施及方法允許製造真核細胞，例如，哺乳動物細胞或低級真核細胞諸如例如酵母細胞或絲狀真菌細胞，或原核細胞諸如革蘭氏陽性或革蘭氏陰性細胞及/或真核或原核細胞之產物，例如，由該等細胞以大規模方式合成之POI包括蛋白質、肽、或抗生素、胺基酸、核酸(諸如DNA或RNA)。除非在本文中另外說明，裝置、設施、及方法可包括任何所需容積或製造能力，包括但不限於小型規模、實驗規模、及成批製造規模能力。

【0229】 另外，並且除非在本文中另外說明，裝置、設施、及方法可包括任何合適反應器，包括但不限於攪拌罐、氣舉、纖維、微纖維、中空纖維、陶瓷基體、流化床、固定床、及/或噴流床生物反應器。如本文使用，「反應器」可包括發酵罐或發酵單元、或任何其他反應容器並且術語「反應器」與「發酵罐」可互換使用。例如，在一些態樣中，示例性生物反應器單元可執行以下一或多者或全部：饋送

營養物及/或碳源、注射合適氣體(例如，氧氣)、發酵或細胞培養基之入口及出口流、分離氣體及液體相、保持溫度、保持氧氣及CO_2水準、保持pH水準、攪動(例如，攪拌)、及/或清洗/滅菌。示例性反應器單元諸如發酵單元可含有單元內之多個反應器，例如單元可具有各單元中之1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90個或100個或更多個生物反應器且/或設施可在設施內含有具有單一或多個反應器之多個單元。在各種實施例中，生物反應器可適合於批料、半分批補料、分批補料、灌注、及/或連續發酵過程。可使用任何合適反應器直徑。在實施例中，生物反應器可具有約100 mL與約50,000 L之間之體積。非限制性實例包括100 mL、250 mL、500 mL、750 mL、1升、2升、3升、4升、5升、6升、7升、8升、9升、10升、15升、20升、25升、30升、40升、50升、60升、70升、80升、90升、100升、150升、200升、250升、300升、350升、400升、450升、500升、550升、600升、650升、700升、750升、800升、850升、900升、950升、1000升、1500升、2000升、2500升、3000升、3500升、4000升、4500升、5000升、6000升、7000升、8000升、9000升、10,000升、15,000升、20,000升、及/或50,000升之體積。另外，合適反應器可為多次使用、一次性使用、拋棄式、或非拋棄式並且可由任何合適材料形成，包括金屬合金諸如不銹

鋼(例如，316L或任何其他合適不銹鋼)及英高鎳、塑膠、及/或玻璃。

【0230】 在實施例中並且除非在本文中另外說明，本文描述的裝置、設施、及方法亦可包括未另外提及之任何合適單元操作及/或設備，諸如用於分離、純化、及隔離此等產物之操作及/或設備。可使用任何合適設施及環境，諸如傳統棒狀建造設施、模組化、行動及臨時設施、或任何其他合適結構、設施、及/或佈局。例如，在一些實施例中，可使用模組化清潔室。另外，並且除非另外說明，本文描述的裝置、系統、及方法可容納及/或執行於單一位置或設施中或替代地容納及/或執行於單獨或多個位置及/或設施處。

【0231】 合適技術可包括以批料階段開始在生物反應器中進行培養，繼之以高特定生長速率下之較短指數分批補料階段，進一步繼之以低特定生長速率下之分批補料階段。另一合適培養技術可包括批料階段，繼之以任何合適特定生長速率或特定生長速率之組合下的分批補料階段，諸如在POI製造時間內，自高生長速率進行至低生長速率，或在POI製造時間內，自低生長速率進行至高生長速率。另一合適培養技術可包括批料階段，繼之以低稀釋率下之連續培養階段。

【0232】 較佳實施例包括提供生物質之批料培養，繼之以高產率POI製造之分批補料培養。

【0233】 較佳在生物反應器中、在獲得至少1 g/L細胞幹重、更佳至少10 g/L細胞幹重、較佳至少20 g/L細胞幹

重、較佳至少30、40、50、60、70、或80 g/L細胞幹重中之任一者之細胞密度的生長條件下培養如本文描述之宿主細胞。以實驗或工業規模來提供生物質製造之此等產率為有利的。

【0234】 允許積累生物質，尤其基礎生長培養基之生長培養基通常包含碳源、氮源、源硫及磷酸源。通常，此培養基進一步包含痕量元素及維生素，並且可進一步包含胺基酸、蛋白胨或酵母萃取物。

【0235】 較佳氮源包括$NH_4H_2PO_4$、或NH_3或$(NH_4)_2SO_4$；

【0236】 較佳硫源包括$MgSO_4$、或$(NH_4)_2SO_4$或K_2SO_4；

【0237】 較佳磷酸源包括$NH_4H_2PO_4$、或H_3PO_4、或NaH_2PO_4、KH_2PO_4、Na_2HPO_4或K_2HPO_4；

【0238】 進一步典型培養基組分包括KCl、$CaCl_2$、及痕量元素諸如：Fe、Co、Cu、Ni、Zn、Mo、Mn、I、B；

【0239】 較佳地，培養基用維生素B_7補充；

【0240】 巴斯德畢赤酵母之典型生長培養基包含甘油、山梨糖醇或葡萄糖、$NH_4H_2PO_4$、$MgSO_4$、KCl、$CaCl_2$、生物素、及痕量元素。

【0241】 在製造階段中，製造培養基尤其與僅有限數量之補充碳源一起使用。

【0242】 較佳地宿主細胞株在具有合適碳源之礦質培養基中培養，由此進一步顯著地簡化分離過程。較佳礦質培養基之實例為含有以下各者之培養基：可利用碳源(例如，葡

葡萄糖、甘油、或山梨糖醇)、含有宏量元素(鉀、鎂、鈣、銨、氯化物、硫酸、磷酸)及痕量元素(銅、碘化物、錳、鉬酸、鈷、鋅、及鐵鹽、及硼酸)之鹽、及視情況例如用於補充營養缺陷的維生素或胺基酸。

【0243】 特定言之,細胞在適合於實現所需POI表現的條件下培養,該POI可取決於表現系統及表現蛋白質之性質自細胞或培養基中純化,例如是否蛋白質融合至信號肽及是否蛋白質為可溶性或膜結合的。如熟習此項技術者理解,培養條件根據包括宿主細胞之類型及所使用特定表現載體之因素而變化。

【0244】 典型製造培養基包含補充碳源、及進一步$NH_4H_2PO_4$、$MgSO_4$、KCl、$CaCl_2$、生物素、及痕量元素。

【0245】 例如添加至發酵物之補充碳源之進料可包含具有多達50 wt%可利用糖之碳源。

【0246】 發酵較佳在3至8範圍內之pH下執行。

【0247】 典型發酵時間為約24至120小時,並且溫度在20℃至35℃,較佳22-30℃範圍內。

【0248】 POI較佳使用製造至少1 mg/L、較佳至少10 mg/L、較佳至少100 mg/L、最佳至少1 g/L之產率之條件來表現。

【0249】 如本文使用之術語「表現」或「表現匣」係指含有可操作鍵聯之所需編碼序列及控制序列的核酸分子,以使得用此等序列轉型或轉染之宿主能夠製造所編碼蛋白質或

宿主細胞代謝物。為了實現轉型，表現系統可包含在載體中；然而，相關DNA亦可整合在宿主細胞染色體中。表現可涉及分泌或非分泌表現產物，包括多肽或代謝物。

【0250】 表現匣便利地作為例如呈「載體」或「質體」形式之表現構建體來提供，該等構建體通常為對經選殖之重組核苷酸序列，亦即重組基因進行轉錄並且在合適宿主生物體中轉譯其mRNA所需要的DNA序列。表現載體或質體通常包含自主複製起點或基因組整合在宿主細胞中之基因座、可選擇標記物(例如，胺基酸合成基因或賦予對於抗生素諸如吉歐黴素(zeocin)、卡那黴素(kanamycin)、G418或潮黴素、諾爾絲菌素(nourseothricin)之抗性的基因)、多個限制酶裂解位點、合適啟動子序列及轉錄終止子，該等組分可操作連接在一起。如本文使用之術語「質體」及「載體」包括自主複製核苷酸序列以及基因組整合核苷酸序列，諸如人工染色體例如，酵母人工染色體(yeast artificial chromosome; YAC)。

【0251】 表現載體可包括但不限於選殖載體、修飾選殖載體及特別設計質體。本文所述較佳表現載體為適合於在真核宿主細胞中表現重組基因之表現載體並且取決於宿主生物體來選擇。合適表現載體通常包含適合於在真核宿主細胞中表現編碼POI之DNA的調控序列。調控序列之實例包括啟動子、操作子、增強子、核糖體結合位點、及控制轉錄及轉譯起始及終止之序列。調控序列通常可操作地連接至待表現之DNA序列。

【0252】 為了允許重組核苷酸序列在宿主細胞中之表現，本文所述表現匣或載體包含ECP，通常為與編碼序列之5’末端相鄰，例如，在所關注基因(gene of interest; GOI)之上游並且與其相鄰之啟動子核苷酸序列，或若使用信號或前導序列，則相應地在該信號及前導序列之上游並且與其相鄰，以促進POI之表現及分泌。啟動子序列通常調控及啟始與其可操作連接之下游核苷酸序列之轉錄，該核苷酸序列尤其包括GOI。

【0253】 本文所述特定表現構建體包含在該啟動子之轉錄控制下可操作連接至編碼POI之核苷酸序列的啟動子。特定言之，啟動子並非原生地與POI之編碼序列締合。

【0254】 本文所述特定表現構建體包含編碼與前導序列連接之POI的多核苷酸，該前導序列導致自宿主細胞中分泌POI。當意欲用於重組表現及分泌之POI為並非天然地分泌並且因此缺少天然分泌前導序列的蛋白質，或該蛋白質之核苷酸序列已經在沒有其天然分泌前導序列的情況下得以選殖時，通常需要在表現載體中存在此分泌前導序列。通常，可使用有效地導致自宿主細胞中分泌POI之任何分泌前導序列。分泌前導序列可來源於酵母來源，例如酵母α-因子諸如釀酒酵母之MFa、或酵母磷酸酶、來自哺乳動物或植物來源、或其他者。

【0255】 在特定實施例中，可使用多選殖載體，該多選殖載體為具有多選殖位點之載體。特定言之，所需異源基因可

整合或併入多選殖位點以便製備表現載體。在多選殖載體的情況下，啟動子通常安置於多選殖位點之上游。

【0256】 本文所述重組宿主細胞尤其經工程化以便減少宿主細胞之內源性FLO8蛋白質或宿主細胞中之相應同源物或異種同源物之量，尤其藉由降低相應編碼基因序列之表現，由此使該基因表現不足。

【0257】 如本文使用之術語「基因表現」，或「表現多核苷酸」意欲涵蓋選自由以下組成之群組之至少一個步驟：DNA轉錄至mRNA中、mRNA處理、mRNA成熟、mRNA輸出、轉譯、蛋白質折疊及/或蛋白質轉移。

【0258】 術語「減少表現」通常係指「表現不足」並且通常係指少於由參考標準展示之表現水準的任何量，該參考標準為經工程化以便減少某種多核苷酸之表現之前的宿主細胞，或以其他方式在未經工程化來降低該多核苷酸之表現的相同類型或物種之宿主細胞中表現。如本文描述減少表現尤其涉及編碼所定義FLO8蛋白質之多核苷酸或基因，尤其對於工程化之前之宿主細胞而言為內源性的基因。特定言之，相應基因產物為如本文描述之所定義FLO8蛋白質。在藉由遺傳修飾來對宿主細胞進行工程化以便減少該基因之表現後，該基因產物或多肽之表現處於水準少於在宿主細胞之遺傳修飾之前或未經遺傳修飾之相似宿主中之相同基因產物或多肽之表現。「少於」包括例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80、90%或更多。術

語「減少表現」或「表現不足」亦涵蓋不表現基因產物或多肽。

【0259】 根據本文所述之特定實施例，宿主細胞經工程化以便減量或剔除(為了使基因或其一部分失活或缺失)編碼FLO8蛋白質(如本文定義，包括例如相應同源物或異種同源物)之內源性宿主細胞基因，或賦予宿主細胞表現或製造該FLO8蛋白質之能力的其他(編碼或非編碼)核苷酸序列。

【0260】 特定言之，提供其中核苷酸序列被破壞的缺失菌株。

【0261】 如本文使用之術語「破壞」係指顯著減少以便完全移除宿主細胞中之一或多種內源性蛋白質之表現，諸如藉由減量或剔除。此舉可諸如藉由質譜術、經由在宿主細胞之細胞培養物或培養基中存在此一或多種內源性蛋白質來量測，其中內源性蛋白質之總含量可少於臨限值或不可偵測。

【0262】 術語「破壞」尤其係指藉由選自由以下組成之群組之至少一個步驟的遺傳工程化之結果：基因緘默、基因減量、基因剔除、遞送顯性負構建體、條件性基因剔除、及/或相對於特定基因之基因改變。

【0263】 在如本文使用之基因表現之情形下的術語「減量」、「減少」或「耗盡」係指與對照細胞中之表現相比，導致給定基因之表現減少之實驗方法。基因之減量可藉由各種實驗手段來達成，諸如將與基因之mRNA之部分雜交，導致其降級之核酸分子(例如，shRNA、RNAi、

miRNA)引入細胞中或以導致減少轉錄、減少mRNA穩定性或減弱mRNA轉譯之方式來改變基因之序列。

【0264】 給定基因之表現之完全抑制被稱為「剔除」。基因之剔除意謂未自該基因合成功能性轉錄物，從而導致喪失通常由此基因提供之功能。基因剔除藉由改變DNA序列來達成，導致基因或其調控序列、或此基因或調控序列之一部分得以破壞或缺失。剔除技術包括使用同源重組技術來使關鍵部分或整個基因序列得以替換、中斷或缺失，或使用DNA-修飾酶諸如鋅指或大範圍核酸酶來將雙鏈斷裂引入靶基因之DNA中，例如Gaj等人(Trends Biotechnol.2013;31(7):397-405)所描述。

【0265】 特定實施例使用在宿主細胞中轉型或轉染之一或多種剔除質體或匣。藉由同源重組，宿主細胞中之靶基因可被破壞。通常重複此程序直到靶基因之所有等位基因穩定移除為止。

【0266】 剔除如本文描述特定基因之一種特定方法為CRISPR-Cas9方法，如例如Weninger等人(J. Biotechnol.2016, 235:139-49)所描述。另一種方法包括分割標記物方法，如例如Heiss等人2013 (Appl Microbiol Biotechnol.97(3):1241-9)所描述。

【0267】 另一實施例涉及藉由使用轉染宿主細胞之小干擾RNA(siRNA)並且靶向輸送編碼由該宿主細胞內源性表現之靶蛋白的mRNA來進行靶mRNA降級。

【0268】 基因之表現可藉由直接干擾基因表現之方法來抑制或減少，該等方法涵蓋但是不限於抑制或減少DNA轉錄，例如，藉由使用特定啟動子相關之抑制子、藉由給定啟動子之位點特異性誘變、藉由啟動子交換、或抑制或減少轉譯，例如，藉由RNAi或非編碼RNA誘導之轉錄後基因緘默。具有經減少之活性之功能異常或非活性基因產物的表現可例如藉由編碼基因內之位點特異性或隨機誘變、插入或缺失來達成。

【0269】 抑制或減少基因產物之活性可例如在蛋白質表現之前或同時，向相應酶投與抑制劑，或將抑制劑與相應酶一起培育來達成。此等抑制劑之實例包括但不限於抑制性肽、抗體、適體、針對該酶之融合蛋白質或抗體模擬物、或其配位體或受體、或具有類似結合活性之抑制性肽或核酸、或小分子。

【0270】 基因緘默、基因減量及基因剔除係指經由遺傳修飾或藉由用具有與mRNA轉錄物或基因互補之序列的寡核苷酸來處理，從而使基因之表現減少之技術。若進行DNA之遺傳修飾，則結果為減量或剔除生物體。若基因表現之變化由寡核苷酸結合至mRNA或臨時結合至基因所造成，此導致基因表現之臨時變化，而不改變染色體DNA並且被稱為瞬時減量。

【0271】 在亦由以上術語涵蓋之瞬時減量中，此寡核苷酸結合至活性基因或其轉錄物經由阻滯轉錄(在基因結合的情況下)、使mRNA轉錄物降級(例如，藉由小干擾

RNA(siRNA)或反義RNA)或阻滯mRNA轉譯，從而導致表現減少。

【0272】 執行基因緘默、減量或剔除之其他方法根據相應文獻為熟習此項技術者已知的，並且其在本發明之情形中之應用被視為例行程序。基因剔除係指藉以使基因之表現完全阻滯的技術，亦即相應基因不起作用，或甚至移除。達成此目標之方法對策為多樣的並且為熟習此項技術者已知的。實例為製造對於給定基因而言呈顯性負性的突變體。此突變體可藉由定點誘變(例如，缺失、部分缺失、插入或核酸取代)、藉由使用合適轉座子、或其他方法來製造，該等方法根據相應文獻為熟習此項技術者已知的，並且其在本發明之情形中之應用被視為例行程序。一個實例為藉由使用靶向鋅指核酸來剔除。相應套組藉由Sigma Aldrich作為「CompoZR knockout ZFN」來提供。另一種方法涵蓋使用轉錄活化子樣效應核酸酶(TALEN)。

【0273】 遞送顯性負性構建體涉及引入編碼功能異常基因表現產物之序列，例如藉由轉染。該編碼序列功能性地偶合至強啟動子，使得功能異常酶之基因表現克服基因表現產物之天然表現，進而導致該基因表現產物之相應活性之實際生理缺陷。

【0274】 條件性基因剔除允許以組織或時間特異性方式來阻滯基因表現。此舉例如藉由將被稱為loxP位點之短序列引入至所關注基因周圍來進行。另外，其他方法根據相應

文獻為熟習此項技術者已知的，並且其在本發明之情形中之應用被視為例行程序。

【0275】 一種其他方法為可產生功能異常基因產物或具有減少活性之基因產物的基因改變。此方法涉及引入讀框移位突變、無義突變(亦即，引入提前終止密碼子)或產生胺基酸取代之突變，該等胺基酸取代使得整個基因產物功能異常、或導致活性減少。此基因改變可例如藉由誘變(例如，缺失、部分缺失、插入或核酸取代)，亦即非特異性(隨機)誘變或定點誘變來製造。描述基因緘默、基因減量、基因剔除、遞送顯性負性構建體、條件性基因剔除、及/或基因改變之實際應用的方案通常可為熟習此項技術者所利用，並且在例行程序範圍內。因此，相對於導致抑制或減少基因表現基因產物，或表現功能異常、或非活性基因產物、或減少活性之所有可想得到的方法，本文提供之技術教導可完全得以實現。

【0276】 本文所述遺傳修飾可使用在此項技術中已知的工具、方法及技術，諸如J. Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)所描述。

【0277】 如本文使用之術語「內源性」意欲包括在對野生型(原生)宿主細胞進行修飾以減少相應內源性基因之表現及/或減少內源性蛋白之製造之前，存在於野生型(原生)宿主

細胞中之彼等分子及序列，尤其內源性基因或蛋白。特定言之，當存在於自然界中時出現於(並且可獲自)特定宿主細胞中的內源性核酸分子(例如，基因)或蛋白質應理解為「宿主細胞內源性」或「內源性宿主細胞」。另外，「內源性表現」核酸或蛋白質之細胞如存在於自然界中之相同特定類型之宿主一般表現該核酸或蛋白質。另外，「內源性製造」或「內源性地製造」核酸、蛋白質、或其他化合物之宿主細胞如存在於自然界中之相同特定類型之宿主細胞一般製造該核酸、蛋白質、或化合物。

【0278】 因此，即使內源性蛋白質不再由宿主細胞來製造，諸如在蛋白質編碼基因得以失活或缺失的宿主細胞之剔除突變體中，蛋白質在本文中仍然被稱為「內源性」。

【0279】 如本文相對於核苷酸序列、構建體諸如表現匣、胺基酸序列或蛋白質來使用之術語「異源」係指對於給定宿主細胞而言為外來的，亦即「外源」，諸如在自然界中不存在於該宿主細胞中之化合物；或天然地存在於給定宿主細胞中，例如，「內源性」，然而，在異源構建體之情形下或例如藉由使用與內源性核酸融合或聯合之異源核酸來整合於此異源構建體中，由此使得構建體為異源的。如內源性存在之異源核苷酸序列亦可在細胞中以非天然量來製造，例如大於預期量或大於天然存在量之量。異源核苷酸序列、或包含異源核苷酸序列之核酸可能在序列方面不同於內源性核苷酸序列但是編碼與內源性存在之蛋白質相同的蛋白質。特定言之，異源核苷酸序列為不以與自然界中

之宿主細胞的相同關係存在之核苷酸序列。任何重組或人工核苷酸序列應理解為異源的。異源多核苷酸之實例為例如為了獲得雜合啟動子而並非原生地與啟動子締合之核苷酸序列，或可操作連接至編碼序列之核苷酸序列，如本文描述。因此，可獲得雜合或嵌合多核苷酸。異源化合物之進一步實例為可操作連接至轉錄控制元件例如啟動子之POI編碼多核苷酸，內源性、天然存在之POI編碼序列通常不可操作地連接至該轉錄控制元件。

【0280】 如本文使用之術語「可操作連接」係指單一核酸分子例如載體、或表現匣上之核苷酸序列之締合，以使得一或多個核苷酸序列之功能受到存在於該核酸分子上之至少一個其他核苷酸序列影響。藉由可操作連接，將核酸序列安置於與同一核酸分子上之另一個核酸序列的功能關係中。例如，當啟動子能夠實現重組基因之編碼序列之表現時，該啟動子可操作地與該編碼序列連接。作為進一步實例，當編碼POI之核酸序列能夠表現呈分泌形式之蛋白質，諸如成熟蛋白質之預成型坯或成熟蛋白質時，編碼信號肽之核酸可操作連接至編碼POI之核酸序列。特定言之，彼此可操作連接之此等核酸可直接連接，亦即在編碼信號肽之核酸與編碼POI之核酸序列之間沒有進一步元件或核酸序列。

【0281】 若啟動子控制編碼序列之轉錄，則「啟動子」序列通常理解為可操作連接至編碼序列。若啟動子序列並非原

生地與編碼序列締合，則其轉錄不受原生(野生型)細胞中之啟動子控制或該等序列與不同連續序列重組。

【0282】 可藉由非甲醇碳源來調控，尤其可抑制並且用於本文描述目的之啟動子在本文中被稱為「ECP」。因此，關於「ECP」之本揭露亦涉及「可藉由非甲醇碳源來調控(或可抑制)之啟動子」，並且反之亦然。

【0283】 如本文描述之ECP尤其啟始、調控、或以其他方式介導或控制POI編碼DNA之表現。啟動子DNA及編碼DNA可來自相同基因或來自不同基因，並且可來自相同或不同生物體。

【0284】 如本文描述之ECP尤其應理解為可調控啟動子，尤其具有在抑制及誘導狀態下之不同啟動子強度的碳源可調控啟動子，尤其非甲醇碳源可調控啟動子，諸如可藉由非甲醇碳源來抑制，並且尤其不可藉由甲醇來誘導之ECP。特定言之，藉由使用在不存在甲醇的情況下具有轉錄活性之ECP，不需要在ECP之轉錄控制下向宿主細胞培養物添加甲醇以供POI製造。

【0285】 ECP之強度尤其係指其轉錄強度，該轉錄強度藉由在該啟動子處以較高或較低頻率出現的轉錄啟始效率來表示。轉錄強度愈高，在該啟動子處發生轉錄愈頻繁。啟動子強度為啟動子之典型特徵，因為其確定給定mRN序列得以轉錄之頻繁程度，實際上向一些基因提供與其他基因相比之更高轉錄優先級，從而產生更高轉錄物濃度。舉例而言，編碼大量需要之蛋白質的基因通常具有相對強的啟

動子。RNA聚合酶每次僅可執行一個轉錄任務並且因此為了高效，必須將其工作按優先級排序。啟動子強度之差異被選擇來允許此優先排序。

【0286】 本文使用之ECP在完全誘導狀態下相對較強，該完全誘導狀態通常理解為大約最大活性之狀態。相對強度通常相對於在本文中被稱為參考啟動子之相似啟動子來確定，該相似啟動子可為標準啟動子，諸如用作宿主細胞之細胞之相應pGAP啟動子。

【0287】 轉錄頻率通常理解為轉錄速率，例如藉由在合適檢定例如RT-PCR或北方印跡中之轉錄物之量來確定。例如，根據本發明之啟動子之轉錄強度在作為巴斯德畢赤酵母之宿主細胞予以確定並且與巴斯德畢赤酵母之原生pGAP啟動子相比較。

【0288】 表現所關注基因之啟動子之強度通常理解為表現強度或支援高表現水準/速率之能力。例如，本發明之啟動子之表現及/或轉錄強度在作為巴斯德畢赤酵母之宿主細胞中予以確定並且與巴斯德畢赤酵母之原生pGAP啟動子相比較。

【0289】 與參考啟動子相比之比較轉錄強度可藉由標準方法來確定，諸如藉由例如使用微陣列來量測轉錄物之數量，或另外在細胞培養物中，諸如藉由量測重組細胞中之相應基因表現產物之數量。特定言之，轉錄速率可藉由微陣列、北方印跡或使用定量即時PCR(qRT-PCR)或使用RNA測序(RNA-seq)之轉錄強度來確定，其中資料展示

具有高生長速率之條件與具有低生長速率之條件之間的表現水準之差異、或使用不同培養基組成物之條件、以及如與參考啟動子相比之高信號強度。

【0290】 表現率可例如藉由報道基因諸如eGFP之表現量來確定。

【0291】 如本文描述之ECP發揮相對高轉錄強度，例如，藉由如與宿主細胞中之原生pGAP啟動子相比的至少15%之轉錄率或轉錄強度來反映，亦被稱為「同源pGAP啟動子」。較佳地，如與原生pGAP啟動子相比，轉錄率或強度為至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者、或甚至更高，諸如至少110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、或200%中之任一者，諸如在出於重組目的而選定作為製造POI之宿主細胞的(例如真核)宿主細胞中所確定。

【0292】 原生pGAP啟動子通常啟始編碼甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAPDH)之gap基因之表現，該啟動子為存在於大多數活生物體中之組成性啟動子。GAPDH(EC 1\2\1\12)，糖酵解及糖質新生之關鍵酶，在分解代謝及合成代謝碳水化合物代謝中發揮關鍵作用。

【0293】 原生pGAP啟動子尤其以與在相同物種或菌株之原生真核細胞中之類似方式、在重組真核細胞中起作用，包括未修飾(非重組)或重組真核細胞。此原生pGAP啟動子通常理解為內源性啟動子，因而，對於宿主細胞而言為

同源的，並且可出於比較目的來充當標準或參考啟動子。如本文描述之啟動子之相對表現或轉錄強度通常與用作製造POI之宿主的相同物種或菌株之細胞之原生pGAP啟動子相比較。

【0294】 相對於可誘導或可抑制調控元件，諸如本文所述啟動子之術語「可調控」係指如下元件：例如在批料培養之生長階段中，在過量物質(諸如細胞培養基中之營養物)存在下，該元件在宿主細胞中得到抑制，並且根據分批補料策略，例如在製造階段中(諸如在減少營養物之量後，或在饋送補充基質後)，該元件得以去抑制，以便誘導較強活性。調控元件可亦被設計成可調控的，以使得在不添加細胞培養添加劑的情況下，該元件為非活性的，並且在此添加劑存在下，該元件為活性的。因此，在此調控元件控制下之POI之表現可在添加此添加劑後誘導。

【0295】 如本文描述之ECP為相對較強可調控啟動子，該啟動子通常在細胞生長條件下(生長階段)得以緘默或抑制，並且在製造條件下(製造階段)得以活化或去抑制，並且因此適合於藉由限制碳源來誘導製造細胞株中之POI製造。

【0296】 特定言之，如本文描述之啟動子為碳源可調控的，具有如在測試中確定之差異啟動子強度，該測試將其在存在葡萄糖及葡萄糖限制時的強度進行比較，證明其在相對高葡萄糖濃度下，較佳在至少10 g/L、較佳至少20 g/L之濃度下仍然得到抑制。特定言之，藉由考量完全誘導啟

動子之葡萄糖臨限值濃度，本文所述啟動子在受限葡萄糖濃度下得到完全誘導，該臨限值通常少於20 g/L、較佳少於10 g/L、少於或多達1 g/L、甚至少於0.1 g/L或少於50 mg/L、較佳在少於40 mg/L之葡萄糖濃度下，具有例如原生、同源pGP啟動子之至少50%的完全轉錄強度。

【0297】 如本文在本揭露之情形內用於例如表徵本文所述碳源可調控啟動子的術語「抑制」或「經抑制」係指對在啟動子之轉錄控制下的所關注基因(編碼所關注蛋白質)之轉錄進行干擾，該啟動子應理解為可抑制的，導致所關注蛋白質藉由細胞之表現得以減少。

【0298】 本文所述ECP之抑制尤其當抑制劑處於細胞培養基中時發生。抑制劑可為某種碳源或例如高於某一臨限量的抑制量之碳源。當抑制劑自培養基中移除，或減少至低於不再具有抑制性之臨限量時，所關注基因或所關注蛋白質之表現被認為「去抑制」。在去抑制後，ECP應理解為得到完全誘導，並且所關注蛋白質之表現通常高於啟動子抑制條件下的藉由細胞之基礎表現水準至少1.5倍。

【0299】 特定言之，與在去抑制或完全誘導ECP後之該基因之轉錄相比，在本文所述ECP控制下之所關注基因之轉錄可被抑制至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、或95%中之任一者，或完全抑制(100%抑制)。

【0300】 將在抑制及去抑制條件下之啟動子強度進行比較之差異啟動子強度確定啟動子之可調控性質及相應誘導

比。根據某些實施例，誘導比應理解為差異啟動子強度，該差異啟動子強度藉由在轉換至低於預定碳源臨限值之誘導條件後的啟始POI製造，並且與抑制狀態下之強度相比較來確定。轉錄強度通常理解為完全誘導狀態下之強度，亦即在去抑制條件下展示大約最大活性。差異啟動子強度例如根據如與抑制條件相比，在去抑制條件下的重組宿主細胞株中之POI製造效率或產率來確定，或另外藉由轉錄物之量來確定。如本文描述之可調控啟動子具有與抑制狀態相比，在去抑制(完全誘導)狀態下至少1.5倍或至少2倍、更佳至少5倍、甚至更佳至少10倍、更佳至少20倍、更佳至少30倍、40倍、50倍、或100倍的較佳差異啟動子強度(誘導比)，亦理解為誘導倍數。

【0301】 如本文使用之術語「誘變」係指如下方法：例如經由插入、缺失及/或取代一或多個核苷酸來提供核苷酸序列之突變體，以便獲得其在非編碼或編碼區中具有至少一個變化的變異體。誘變可經由隨機、半隨機或定點突變。本文所述特定ECP及相應核苷酸序列可用於製造變異體，該等變異體同樣為可用於如本文描述目的之可調控啟動子。此等變異體可藉由合適誘變方法、使用本文提供之ECP核苷酸序列作為母體序列來製造。此誘變方法涵蓋對核酸進行工程化之彼等方法或使用相應母體啟動子序列資訊作為模板來從頭合成核苷酸序列。特定誘變方法採用合理啟動子工程化。

【0302】 本文所述例示性ECP可例如經修飾以產生具有經改變之表現水準及調控性質的啟動子變異體。例如，啟動子文庫可藉由誘變選定啟動子序列來製備，該等啟動子序列可用作母體分子，例如藉由針對變異體在不同發酵策略下之表現來分析變異體並且選擇合適變異體，從而在真核細胞中對基因表現進行微調。變異體之合成文庫可用於例如選擇符合製造選定POI之要求的啟動子。此等變異體可具有(例如，真核)宿主細胞中之增加之表現效率以及在碳源豐富及限制條件下之差異表現。通常，製造具有較高基因多樣性的較大隨機化基因文庫，該多樣性可根據特別需要之基因型或表型來選擇。

【0303】 某些ECP變異體可為本文提供之ECP核苷酸序列之尺寸變異體且/或包含本文所述啟動子之一個以上元件或區，諸如核心調控區、主要調控區、或T模體，且/或包含ECP核苷酸序列之一或多個(相同或不同)片段。

【0304】 特定誘變方法提供按序列的一或多個核苷酸之點突變，尤其串聯點突變，以便諸如改變該啟動子之核苷酸序列內之至少2、3、4、5、6、7、8、9、10個或甚至更多個連續核苷酸。點突變通常為一或多個核苷酸之缺失、插入、及/或取代中之至少一者。啟動子序列可在遠端處，尤其在總共達到全長啟動子序列之50%的5'-區內發生突變，該5'-區可為高度可變的，而不實質上損失啟動子活性。啟動子序列可尤其在主要調控區內突變，但是，與例示性主要調控區及尤其與例示性核心調控區之序列一致性

較高可為較佳的，諸如例如至少80%、85%、90%、或95%中之任一者。在核心或主要調控區中之任一者以外，序列之可變性可較高，並且例如在序列一致性少於80%或少於85%的情況下，ECP仍然具有功能性。

【0305】 核心或主要調控區內之任何突變通常為保守的，亦即諸如保持(或甚至改良)藉由某種轉錄因子之識別。

【0306】 特定言之，本文所述ECP可包含雜合核苷酸序列，該序列例如包含本文所述之核心或主要調控區及另外一或多個區或替代(原生或人工)啟動子序列，諸如不同啟動子例如任何組成性或可調控(或以其他方式可誘導)啟動子之3'-區(尤其3'-末端，該3'-末端包含至少10或15個3'-末端核苷酸序列，包括3'-終端(例如，多達20、25、或30 nt)處之轉譯啟始位點，由此取代ECP啟動子之轉譯啟始位點。

【0307】 本文使用之術語「核苷酸序列」或「核酸序列」係指DNA或RNA。「核酸序列」或「多核苷酸序列」或簡稱為「多核苷酸」係指自5'至3'末端閱讀之去氧核苷酸或核糖核苷酸鹼基之單鏈或雙鏈聚合物。其包括表現匣、自體複製質體、DNA或RNA之傳染性聚合物、及非功能性DNA或RNA。

【0308】 如本文使用之術語「所關注蛋白質(POI)」係指藉助於重組技術在宿主細胞中製造之多肽或蛋白質。更特定言之，蛋白質可為並非天然存在於宿主細胞中之多肽，亦即異源蛋白質，或另外對於宿主細胞而言可為原生的，亦

即宿主細胞之同源蛋白質，但是例如藉由以下各種方式來製造：用含有編碼POI之核酸序列之自體複製載體來轉型，或在藉由重組技術將編碼POI之核酸序列之一或多個拷貝整合至宿主細胞之基因組中後，或對例如啟動子序列的控制編碼POI之基因之表現的一或多種調控序列進行重組修飾。在一些情況下，如本文使用之術語POI亦係指如藉由重組表現蛋白質介導之宿主細胞之任何代謝物產物。

【0309】 如本文使用之術語「支架」描述在尺寸、結構、及來源方面不同的一組多層面的緊湊並且穩定折疊之蛋白質，該等蛋白質充當產生抗原結合分子之起始點。受抗體(免疫球蛋白)之結構-功能關係啟發，此替代蛋白質支架提供穩健、保守結構框架，該框架支援可針對給定(生物)分子標靶之緊密及特異性識別來加以重塑的相互作用位點。

【0310】 如與母體核苷酸或胺基酸序列相比之變異體、同源物或異種同源物之術語「序列一致性」指示兩個或兩個以上序列之一致性程度。兩個或兩個以上胺基酸序列可在相應位置處具有高達100%的某種程度之相同或保守胺基酸殘基。兩個或兩個以上核苷酸序列可在相應位置處具有高達100%的某種程度之相同或保守鹼基對。

【0311】 序列相似性搜索為用於鑑別具有過量(例如，至少50%)序列一致性之同源物的有效及可靠策略。經常使用之序列相似性研究工具為例如BLAST、FASTA、及HMMER。

【0312】 序列相似性搜索可藉由偵測過量相似性、及反映共同祖先之統計上顯著相似性來鑑別此等同源蛋白或基因。同源物可包涵異種同源物，該等異種同源物在本文中應理解為不同生物體中之相同蛋白質，例如，不同生物體或物種中之此蛋白質之變異體。

【0313】 不同生物體或物種中之相同蛋白質之異種同源序列通常對於蛋白質序列而言為同源的，尤其來源於相同屬類之異種同源物之蛋白質序列。通常，異種同源物具有至少約25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、或95%一致性中之任一者，直至100%序列一致性。特定言之，藉由將FLO8蛋白質或編碼FLO8蛋白質之基因用宿主細胞中的經修飾以剔除內源性FLO8蛋白質之異種同源序列來替換，可確定異種同源物。例如，若在巴斯德畢赤酵母或釀酒酵母宿主細胞中，藉由替換已經相應地在此巴斯德畢赤酵母及釀酒酵母宿主細胞中剔除的基因來編碼之內源性FLO8蛋白質，推定FLO8蛋白質具有功能性，則出於本文描述目的，此推定FLO8蛋白質可被視為FLO8蛋白質同源物。

【0314】 包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列或由其組成之FLO8蛋白質來源於*K. phaffii*。已得到充分認識，其他真核或原核宿主細胞中存在同源序列。例如，酵母細胞包含相應同源序列，尤其酵母巴斯德畢赤酵母已被重新分類為新屬類*Komagataella*，並被分成三個物種*K. pastoris*、*K. phaffii*、及*K. pseudopastoris*。特定

同源序列例如存在於*K. pastoris*(例如SEQ ID NO:3，諸如由包含SEQ ID NO:4或由SEQ ID NO:4組成之核苷酸序列編碼)、釀酒酵母(例如，SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6)、解脂耶氏酵母(例如，SEQ ID NO:7)、多形緒方酵母(*Ogataea polymorpha*)(例如，SEQ ID NO:8)、或黑麵黴(例如，SEQ ID NO:9)中。

【0315】 具有本文所述某種序列一致性之FLO8蛋白質之任何同源序列，尤其作為巴斯德畢赤酵母FLO8蛋白質之異種同源物的任何FLO8蛋白質，包含在本文所述FLO8蛋白質之定義中。

【0316】 關於本文所述胺基酸序列、同源物及異種同源物之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比，且不考慮任何保守性取代作為序列一致性之一部分之後，候選序列中與參照多肽序列中之胺基酸殘基相同的胺基酸殘基之百分比。熟習此項技術者可確定用於量測比對之適當參數，包括在所比較之序列全長上實現最大比對所需的任何算法。

【0317】 對於本文所述目的，兩個胺基酸序列之間之序列一致性使用NCBI BLAST程式版本BLASTP 2.8.1藉由以下例示性參數來確定：程式：blastp，字長：6，期望值：10，命中列表大小：100，間隙罰分：11.1，矩陣：BLOSUM62，過濾字串：F，組分調節：條件性組分評分矩陣調節。

【0318】 關於例如啟動子或基因之核苷酸序列之「一致性百分比(%)」定義為在比對序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比，且不考慮任何保守性取代作為序列一致性之一部分之後，候選DNA序列中與DNA序列中之核苷酸相同的核苷酸之百分比。出於確定核苷酸序列一致性百分比目的之比對可以此項技術之技能範圍內之不同方式來達成，例如，使用可公開獲得之電腦軟體。熟習此項技術者可確定用於量測比對之適當參數，包括在所比較之序列全長上實現最大比對所需的任何算法。

【0319】 如本文相對於POI使用之術語「經分離」或「分離」意指此化合物與在天然狀態下與其締合之環境，尤其細胞培養上清液得以充分分離，從而以「純化」或「實質上純」形式存在。但是，「分離」不一定意味著排除具有其他化合物或材料之人工或合成混合物，或存在不干擾基本活性，並且可例如由於不完全純化而導致存在的雜質。經分離之化合物可進一步配製以便製造其製劑，並且出於實際目的仍然加以分離，例如，在用於診斷或治療時，POI可與醫藥學上可接受之載劑或賦形劑混合。

【0320】 如本文使用之術語「純化」係指包含至少50%(mol/mol)，較佳至少60%、70%、80%、90%或95%之化合物(例如，POI)的製劑。純度藉由適合於化合物之方法(例如層析方法、聚丙烯醯胺凝膠電泳、HPLC分析、及其類似方法)來量測。如本文描述之經分離、純化POI可藉由純化細胞培養上清液以減少雜質來獲得。

【0321】 作為獲得重組多肽或蛋白質產物之分離及純化方法，可使用諸如以下方法：使用溶解性差異之方法，諸如鹽析及溶劑沉澱，使用分子量差異之方法，諸如超細過濾及凝膠電泳，使用電荷差異之方法，諸如離子交換層析，使用特定親和力之方法，諸如親和層析，使用疏水性差異之方法，諸如逆相高效能液相層析，及使用等電點差異之方法，諸如等電聚焦。

【0322】 以下標準方法為較佳的：藉由微細過濾或切向流過濾(Tangential Flow Filter; TFF)或離心之細胞(殘骸)分離及清洗，藉由沉澱或熱處理之POI純化，藉由酶促消化之POI活化，藉由層析之POI純化，諸如離子交換(IEX)、疏水性相互作用層析(hydrophobic interaction chromatography; HIC)、親和層析、尺寸排阻層析(size exclusion chromatography; SEC)或HPLC層析，藉由超濾步驟之POI濃縮液沉澱及清洗。

【0323】 高度純化產物本質上不具有污染蛋白，並且較佳具有至少90%、更較佳至少95%、或甚至至少98%、多達100%之純度。純化產物可藉由純化細胞培養上清液或另外自細胞殘骸獲得。

【0324】 經分離及純化之POI可藉由習知方法諸如西方墨點法、HPLC、活性檢定、或ELISA來鑑別。

【0325】 如本文使用之術語「重組」意指「藉由遺傳工程化來製備或為遺傳工程化之結果。重組宿主可經工程化以便

使一或多個核苷酸或核苷酸序列缺失及/或失活，並且可尤其包含含有重組核酸序列之表現載體或選殖載體，尤其使用對於宿主而言為外來之核苷酸序列。重組蛋白藉由在宿主中表現相應重組核酸來製造。相對於如本文使用POI之術語「重組」包括藉由重組手段來製備、表現、產生或分離之POI，諸如自經轉型以表現POI之宿主細胞中分離之POI。根據本發明，可使用此項技術之技能範圍內的習知分子生物學、微生物學、及重組DNA技術。此類技術在文獻中得到充分說明。參見例如Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1982)。

【0326】 某些重組宿主細胞為「工程化」宿主細胞，該等宿主細胞應理解為已經使用遺傳工程化，亦即藉由人為干預來操縱之宿主細胞。當宿主細胞經工程化以減少給定基因或相應蛋白質之表現或使其表現不足時，宿主細胞經操縱以使得與在操縱之前之相同條件下之宿主細胞相比，或與未工程化以使得該基因或蛋白質表現不足之宿主細胞相比，宿主細胞具有不再能夠相應地表現此基因及蛋白質。

【0327】 根據特定實例，已意外地發現宿主細胞中之FLO8編碼基因表現之減少，尤其此基因之缺失對於由非甲醇控制可誘導啟動子(ECP)來控制之基因之表現水準具有積極影響，因而允許更高表現水準而不失去碳源啟動子調控。因此，產生缺失及不缺失編碼FLO8蛋白質之相應內源性基因(*flo8*基因)的細胞並且測試在ECP控制下之基因之強度

及調控。對於作為細胞內或分泌模型蛋白之若干例示性POI而言，證明在相應*flo8*基因缺失之細胞中表現得以增加，此情況可歸因於轉錄水準增加。增加之表現可在小規模篩檢培養及在生物反應器中之受控製造過程兩者中得到證明。因此，已開發出新的表現系統，與先前現有表現系統相比，該系統允許在無甲醇培養基中例如在酵母諸如畢赤酵母中高得多的產物形成。

【0328】 根據特定實例，將FLO8破壞對於非甲醇碳源調控啟動子pG1、pG3、pG4、pG6(藉由除了甲醇之外的碳源來調控)之表現強度的效應與組成性啟動子pGAP或甲醇-誘導啟動子pAOX1相比較。發現所有非甲醇碳源調控啟動子在dFLO8菌株中具有統計上顯著更高轉錄，此情況為意外的並且指示在此等啟動子控制下之增加之表現。相比之下，與野生型相比，在dFLO8突變體中，甲醇-可誘導pAOX1不展示顯著增加之轉錄強度，並且亦不存在對於pGAP之轉錄強度的顯著效應。因此，得出的結論是pGAP或pAOX1啟動子活性不受FLO8表現不足的影響。

【0329】 意外地發現與標準pGAP啟動子相比，在使用不可藉由甲醇來誘導之碳源可抑制啟動子時，在剔除或破壞FLO8後，在細胞培養物中製造所關注蛋白質之所關注異源基因之表現實際上增加。例如，與野生型宿主細胞(沒有*FLO8*破壞)中之表現相比，在d*FLO8*菌株中發現啟動子pG1、pG1-3、pG3、pG4、pG6、pG7、及pG8中之每一者之eGFP螢光增加，該增加在1.2至3.9倍範圍內。

【0330】 以下項目為本文所述之實施例：

【0331】 1.一種重組宿主細胞，其包含內源性基因，該內源性基因編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物，該宿主細胞藉由一或多個遺傳修飾來工程化以便與該一或多種遺傳性修飾之前的宿主細胞相比，減少該基因之表現，並且該宿主細胞包含異源表現匣，該異源表現匣包含在表現匣啟動子(expression cassette promoter; ECP)控制下的所關注基因(gene of interest; GOI)，該ECP可藉由非甲醇碳源來調控。

【0332】 2.項目1之宿主細胞，其中該同源物具有與SEQ ID NO:1之至少25%序列一致性。

【0333】 3.項目1至2中任一項之宿主細胞，其中該一或多種遺傳修飾包含以下各者之破壞、取代、缺失或剔除：(i)一或多種內源性多核苷酸或其一部分；或(ii)表現控制序列。

【0334】 4.項目3之宿主細胞，其中該內源性多核苷酸為編碼該FLO8蛋白質或該同源物之基因。

【0335】 5.項目4之宿主細胞，其中該表現控制序列包含啟動子、核糖體結合位點、轉錄或轉譯啟動及終止序列、或增強子或活化子序列中之任一者。

【0336】 6.項目1至4中任一項之宿主細胞，其中該ECP可在存在生長限制量之非甲醇碳源的情況下，較佳在不存在甲醇的情況下得以誘導；並且可在存在高於該生長限制量之過量的非甲醇碳源的情況下得以抑制。

【0337】 7.項目6之宿主細胞，其中該非甲醇碳源之生長限制量為多達1 g/L細胞培養基。

【0338】 8.項目1至7中任一項之宿主細胞，其中該ECP包含至少一個第一及至少一個第二核心調控區，其中該第一核心調控區具有與SEQ ID NO:17之至少75%序列一致性，並且該第二核心調控區具有與SEQ ID NO:18之至少75%序列一致性。

【0339】 9.項目1至8中任一項之宿主細胞，其中該ECP包含至少一個調控區，該調控區具有與SEQ ID NO:35之至少85%序列一致性。

【0340】 10.項目8或9之宿主細胞，其中該ECP包含該第一及/或第二核心調控區中之至少兩者。

【0341】 11.項目1至10中任一項之宿主細胞，其中該ECP包含至少一個由SEQ ID NO:19-34中之任一者組成之T模體，視情況該T模體在該T模體之5’或3’末端沒有延伸一或多個胸腺嘧啶。

【0342】 12.項目11之宿主細胞，其中該ECP包含該等T模體中之至少兩者。

【0343】 13.項目1至7中任一項之宿主細胞，其中該ECP包含與序列SEQ ID NO:10-16中之任一者、或SEQ ID NO:41-45中之任一者之至少300 nt的至少60%序列一致性。

【0344】 14.項目13之宿主細胞，其中該ECP包含與全長序列SEQ ID NO:10-16中之任一者、或SEQ ID NO:41-45中之任一者的至少60%序列一致性。

【0345】 15.項目13或14之宿主細胞，其中該ECP包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11組成。

【0346】 16.項目1至15中任一項之宿主細胞，其中該表現匣包含在自主複製載體或質體中，或該宿主細胞之染色體內。

【0347】 17.項目1至16中任一項之宿主細胞，其中該表現匣進一步包含編碼信號肽之核苷酸序列，該信號肽使得能夠分泌由該GOI編碼之所關注蛋白質(POI)，較佳其中編碼該信號肽之該核苷酸序列相鄰於該GOI之5'-末端來融合。

【0348】 18.項目1至17中任一項之宿主細胞，其中該GOI編碼所關注蛋白質(POI)，該所關注蛋白質為選自由以下組成之群組之肽或蛋白質：抗原結合蛋白質、治療性蛋白質、酶、肽、蛋白質抗生素、毒素融合蛋白質、碳水化合物-蛋白質結合物、結構蛋白質、調控蛋白質、疫苗抗原、生長因子、激素、細胞介素、處理酶、及代謝酶。

【0349】 19.項目1至18中任一項之宿主細胞，其中該抗原結合蛋白質選自由以下組成之群組

a)抗體或抗體片段，諸如嵌合抗體、人源化抗體、雙特異性抗體、Fab、Fd、scFv、雙功能抗體、三功能抗體、

Fv四聚體、小分子抗體、單結構域抗體如VH、VHH、IgNAR、或V-NAR中之任一者；

b)抗體模擬物，諸如阿連菌素(Adnectin)、親和體(Affibody)、親和素(Affilin)、Affimer、親和素(Affitin)、Alphabody、抗運載蛋白(Anticalin)、阿維默斯(Avimer)、迪梵(DARPin)、Fynomer、Kunitz結構域肽、單功能抗體(Monobody)、或NanoCLAMP；或

c)融合蛋白，該等融合蛋白包含一或多個免疫球蛋白折疊結構域、抗體結構域或抗體模擬物。

【0350】 20.項目1至19中任一項之宿主細胞，該宿主細胞為

a) 選自由以下組成之群組之屬類的酵母細胞：畢赤酵母、漢遜酵母、*Komagataella*、酵母屬、克魯維酵母、假絲酵母、Ogataea、耶氏酵母、及地絲菌，諸如巴斯德畢赤酵母、法夫駒形氏酵母(*Komagataella phaffii*)、巴斯德駒形氏酵母(*Komagataella pastoris*)、*Komagataella pseudopastoris*、釀酒酵母、*Ogataea minuta*、乳酸克魯維酵母、馬克斯克魯維酵母、解脂耶氏酵母或多形漢遜酵母；或

b)絲狀真菌之細胞，諸如泡盛麴黴或里氏木黴。

【0351】 21.一種增加由宿主細胞製造之所關注蛋白質(POI)之產率的方法，該宿主細胞在可藉由非甲醇碳源來調控或抑制之啟動子之控制下、表現編碼該POI之所關注

基因(GOI)，該方法藉由在該宿主細胞中減少編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物之基因的表現來進行。

【0352】 22.一種製造由所關注基因(GOI)編碼之所關注蛋白質(POI)的方法，該方法藉由在製造該POI之條件下培養項目1至20中任一項之宿主細胞來進行。

【0353】 23.項目21或22之方法，該方法包含步驟：

a) 在生長條件下培養該宿主細胞；及進一步步驟

b) 在生長限制條件下、在高達1 g/L之第二非甲醇碳源之存在下培養該宿主細胞，導致表現該GOI以便製造該POI。

【0354】 24.項目23之方法，其中該第一或第二碳源選自醣、多元醇、醇、或前述中之任一者或多者之混合物。

【0355】 25.項目23或24之方法，其中該步驟a)培養在批料階段中執行；並且該步驟b)培養在分批補料或連續培養階段中執行。

【0356】 26.一種在宿主細胞中製造所關注蛋白質(POI)之方法，該方法包含步驟：

a) 將該宿主細胞遺傳工程化以便減少編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物之內源性基因之表現；

b) 向該宿主細胞中引入異源表現匣，該異源表現匣包含在可操作連接至編碼該POI之所關注基因(GOI)的非甲醇碳源可調控啟動子(尤其本文所述ECP)；

c)在製造該POI之條件下培養該宿主細胞；

d)視情況將該POI自細胞培養物中分離；及

e)視情況純化該POI。

【0357】 前述說明書將藉由參考以下實例來更充分理解。然而，此等實例僅僅代表實施本發明之一或多個實施例之方法並且不應詮釋為限制本發明之範圍。

實例

【0358】 以下實例證明破壞該轉錄調控子*FLO8*導致碳調控啟動子諸如pG1、pG3、pG4、pG6、及pG8、及其工程化變異體之更高轉錄活性，從而能夠在碳限制培養條件下實現重組蛋白之增加之生產力。

實例1：構建巴斯德畢赤酵母d*FLO8*菌株

【0359】 巴斯德畢赤酵母野生型菌株CBS7435或CBS2612 (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)用作宿主菌株。

【0360】 為了產生d*FLO8*突變菌株，使用如針對巴斯德畢赤酵母(Gasser等人，2013)來進行調適並且在WO2015158800A1所描述之分割標記物匣方法來破壞基因PP7435_Chr4-0252(*FLO8*)。簡言之，位於ORF之轉譯啟始上游及下游大約200 bp之兩個1.5 kb區結構域分別使用引子A_fw及A_bw以及D_fw及D_bw來擴增

(表1)。使用在引子A_bw及D_fw上的對於抗性標記物匣之相應部分B及C之5’及3’末端而言為同源的突出端，所得片段A及B藉由融合PCR來用於側接KanMX標記物匣(引子B_fw、B_bw、C_fw及C_bw)的兩個約1 kb長並且重疊的部分(435 bp)。將兩個融合片段AB及CD同時轉型至電轉感受態巴斯德畢赤酵母細胞中，如在(Gasser等人，2013)中所描述。成功整合需要三個不同重組事件，導致藉由KanMX匣來置換PP7435_Chr4-0252之5’末端處之0.4 kb片段及其啟動子。

【0361】 正性轉型體之選擇在含有500 µg mL-1遺傳黴素之選擇性YPD-瓊脂板(每升：10 g酵母萃取物、20 g蛋白腖、20 g葡萄糖、20 g瓊脂)上進行。正確的缺失突變體藉由使用位於分割標記物匣外部之引子(Det_fw及Det_bw，表1)的PCR及凝膠電泳來驗證。

表1：用於分割標記物匣構建之引子

引子	序列
A_fw	CGAACATCCATCACCAAAACAC (SEQ ID NO:72)
A_bw	GTTGTCGACCTGCAGCGTACGGTGTTGCCGCGAAATG (SEQ ID NO:73)
D_fw	TAGGTGATATCAGATCCACTGATCAATTTGCCCAAGAGACG (SEQ ID NO:74)
D_bw	GACTGTTGCGATTGCTGGTG (SEQ ID NO:75)
B_fw	CATTTCGCGGCAACACCGTACGCTGCAGGTCGACAAC (SEQ ID

	NO:76)
B_bw	CGGTGAGAATGGCAAAAGCTTAT (SEQ ID NO:77)
C_fw	AAGCCCGATGCGCCAGAGTTG (SEQ ID NO:78)
C_bw	CGTCTCTTGGGCAAATTGATCAGTGGATCTGATATCACCTA (SEQ ID NO:79)
Det_fw	ATCCAGGACACGCTCATCAAG (SEQ ID NO:80)

實例2：*FLO8*破壞對於pG1及pG1-3驅動之細胞內eGFP生產力之效應

a）構建巴斯德畢赤酵母d*FLO8*菌株

【0362】 巴斯德畢赤酵母CBS2612_pG1_eGFP #8（在WO2013050551A1中所描述）及CBS2612_pG1-3_eGFP#1（在WO2017021541A1及Prielhofer等人，2018中描述為CBS2612_pGTH1-D1240）用作宿主菌株。已證明此等菌株整合吉歐黴素抗性匣之單一拷貝以及eGFP表現匣，該表現匣包含葡萄糖調控啟動子pG1（SEQ ID NO:12）或其工程化變異體（pG1-3，SEQ ID NO:10）、GOI及釀酒酵母*CYC1*轉錄終止子。相應d*FLO8*突變型菌株如實例1中所描述來構建。

b）篩檢eGFP生產力

【0363】 對於表現篩檢，將d*FLO8*菌株以及其相應母體菌株及非製造野生型菌株之單一集落接種在含有25 μg mL^{-1}吉歐黴素及500 μg mL^{-1}遺傳黴素（若合適）之2 mL

液體YP培養基(每升：20 g蛋白腖、10 g酵母萃取物)中。預培養物在25℃及280 rpm下在24-DWP中生長約24 h並且隨後用於接種含有50 g L^{-1}多醣及1.5%葡萄糖釋放酶之2 mL合成篩選培養基ASMv6(培養基組成物在以下給出)(實現約0.8 mg mL^{-1} h^{-1}之葡萄糖釋放速率；m2p培養基發展套組)，直至啟始-OD_{600}(誘導條件)為5。對於抑制條件，使用含有2%甘油之ASMv6。然後，主要培養物在25℃及280 rpm下再培育48 h。為了量測eGFP-表現，將細胞在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中稀釋至OD_{600}為0.1並且藉由如在Stadlmayr等人，2010所描述之流式細胞術來分析。對於各樣品，分析15000個細胞。巴斯德畢赤酵母之自體螢光使用巴斯德畢赤酵母野生型細胞來量測並且自信號中減去。正規化eGFP表現水準(與細胞尺寸相關之螢光強度)作為pGAP控制之表現之百分比來給出(表2)。

【0364】 合成篩檢培養基ASMv6每升包含：22.0 g檸檬酸一水化物、6.30 g $(NH4)_2HPO_4$、0.49 g $MgSO_4*7H_2O$、2.64 g KCl、0.0535 g $CaCl_2*2H_2O$、1.470 mL PTM0痕量鹽儲備溶液、0.4 mg生物素；使用KOH(固體)將pH設定為6.5。

【0365】 PTM0痕量鹽儲備溶液每升包含：

6.0 g $CuSO_4*5H2O$、0.08 g NaI、3.36 g $MnSO_4*H_2O$、0.2 g $Na_2MoO_4*2H_2O$、0.02 g

H_3BO_3、0.82 g $CoCl_2*6H_2O$、20.0 g $ZnCl_2$、65.0 g $FeSO_4*7H_2O$及5.0 ml H_2SO_4（95%-98%）。

表2：d*FLO8*對於在pG1或pG1-3控制下之eGFP之表現的影響。顯示在2%甘油（抑制）或限制性葡萄糖（誘導）中48h培養之後的相對於pGAP之eGFP表現水準，以及與野生型中之pG1或pG1-3相比，在誘導條件中之d*FLO8*菌株中之eGFP螢光的增加。

啟動子	宿主細胞	抑制(甘油)	誘導 (限制性葡萄糖)	倍數變化 pG1+d*FLO8* 相比於pG1+wt	倍數變化 pG1-3+d*FLO8* 相比於 pG1-3+wt
pGAP	野生型	100	100	-	-
pG1	野生型	12.31 ± 1.13	250.17 ± 8.73	1.0	-
pG1	d*FLO8*	24.84 ± 3.28	950.92 ± 4.64	3.8	-
pG1	d*FLO8*_loxP	23.14 ± 0.22	983.49 ± 8.48	3.9	-
pG1-3	野生型	8.71 ± 0.46	519.94 ± 53.88	2.1	1.0
pG1-3	d*FLO8*	17.50 ± 0.37	1448.20 ± 20.62	5.8	2.8
pG1-3	d*FLO8*_loxP*	17.86 ± 1.14	1507.22 ± 9.80	6.0	2.9

*藉由如實例2中所描述之方法來製造。

【0366】 *FLO8*之缺失對於pG1驅動之表現具有積極影響，導致在誘導（葡萄糖限制性）條件下幾乎高4倍之eGFP水準（表2）。因此，亦對於本身具有更高本征表現之啟動子

變異體pG1-3來研究破壞*FLO8*之效應。對於啟動子變異體而言，亦展示積極影響，再次實現與來自野生型背景中之相同啟動子之表現相比，d*FLO8*菌株中之eGFP水準高2.5至3倍(表2)。

實例3：*FLO8*破壞對於分泌重組蛋白之$P_{G1.3}$驅動生產力之效應

【0367】 隨後，評價d*FLO8*突變對於分泌模型蛋白之pG1-3驅動表現之影響。為此目的，將vHH或scR之表現匣轉型至CBS2612及CBS2612_d*FLO8*中。

a) 構建巴斯德畢赤酵母d*FLO8*菌株及選擇標記物再循環

【0368】 巴斯德畢赤酵母野生型菌株CBS2612(CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)用作宿主菌株。

【0369】 CBS2612_KanR_d*FLO8*#2如實例1所描述來構建。為了將KanMX選擇標記物匣自基於Cre-loxP重組之基因組中切除，藉由如Gasser等人，2013描述之電穿孔，將CBS2612_KanR_d*FLO8*#2用質體pTAC_Cre_hphMX4來瞬時轉型。pTAC_Cre_hphMX4為質體pYX022(R&D系統)之衍生物並且包含大腸桿菌之複製起點、Cre-重組酶基因之表現匣、潮黴素抗性匣以及ARS/CEN元件。對於其構建，

將pTAC_Cre_kanMX(Marx等人，2008)用*Eco*R91I消化以移除卡那黴素抗性匣。質體pGA26_hphMX4用相同酶消化以便切除潮黴素抗性匣並且合適片段藉由連接反應來融合。

【0370】 正性轉型體之選擇在含有100 μg mL^{-1}潮黴素之YPD-瓊脂上進行。隨後，潮黴素抗性純系再次並行地在YPD-瓊脂(沒有潮黴素以便促進pKTAC-CRE_hygR損耗)以及含有500 μg mL^{-1}遺傳黴素之YPD-瓊脂上劃線培養。喪失其對於遺傳黴素之抗性的菌株進一步藉由PCR及凝膠電泳、使用引子Det_bw及Det_fw(表1)來檢查以便確認KanMX抗性匣自基因組中切除。自相應菌株中，選擇CBS2612_L_d*FLO8*#2_4供進一步使用。

b) 構建在P_{G1-3}之轉錄控制下分泌抗體片段scFv(scR)&vHH的巴斯德畢赤酵母菌株

【0371】 表現質體pPM2d_pAOX_scR及pPM2d_pAOX_vHH為pPUZZLE質體骨架之衍生物(Stadlmayr等人2010)。其包含大腸桿菌(pUC19)之複製起點、吉歐黴素抗性匣、釀酒酵母α-配合因子前原前導序列、所關注之基因(vHH或scR)及釀酒酵母*CYC1*轉錄終止子、以及整合至巴斯德畢赤酵母基因組中之基因座(3´AOX1區)。對於其構建，編碼scFv(scR)及vHH之基因藉由DNA2.0來密碼子最佳化並且作為合成DNA(序列在以下說明)來獲得。His6-標籤C-末端融合至基因以供偵

測。在用*XhoI*及*Bam*HI(對於scR)或*Eco*RV(對於vHH)來限制消化之後，將各基因連接至用*XhoI*及*Bam*HI或*Eco*RV消化之pPM2d_pAOX中。P_{AOX1}藉由P_{G1-3}之置換藉由此等質體以及表現質體pPM1aZ10_pG1-3_eGFP(亦為WO2017021541A1所描述之pPUZZLE衍生物)用*Alw*NI及*Sbf*I來進行限制消化及合適質體片段之融合來進行。衍生自pPM1aZ10_pG1-3_eGFP之片段亦包含用於AOX-終止子的能夠實現靶向整合至此基因座的序列。

【0372】 將所得表現質體pPM1aZ30_pG1-3_scR及pPM1aZ30_pG1-3_vHH用*Asc*I來線性化並且使用如Gasser等人，2013所描述之標準方案，藉由電穿孔來轉型至CBS2612(縮名wt)、CBS2612_KanR_d*FLO8*#2(縮名d*FLO8*)或CBS2612_L_d*FLO8*#2_4(縮名d*FLO8*L)中。

【0373】 正性轉型體之選擇在含有50 μg mL^{-1}吉歐黴素及500 μg mL^{-1}遺傳黴素(若合適)之選擇性YPD-瓊脂上進行。

c)篩檢抗體片段生產力

【0374】 對於表現篩檢，將相應轉型體之單一菌落接種在含有25 μg mL^{-1}吉歐黴素及500 μg mL^{-1}遺傳黴素(若合適)之2 mL液體YP培養基(每升：20 g蛋白胨、10 g酵母萃取物)中並且在25℃下在280 rpm下在24-DWP中生長

約24 h。此等培養物用於接種含有50 g L^{-1}多醣及1.5%葡萄糖-釋放酶(能夠實現約0.8 mg h^{-1} mL^{-1}之葡萄糖釋放速率；m2p培養基發展套組)之2 mL合成篩檢培養基ASMv6(關於組成物，參見實例2)，直至啟始-OD_{600}為8。培養條件類似於預培養條件。48小時之後，將1 mL細胞懸浮液轉移至預稱重1.5 mL離心管並且在室溫下以16100 g離心持續5 min。將上清液小心地轉移至新小瓶並且在-20℃下儲存直到進一步使用為止。將含有球團之離心管再次稱重以確定細胞濕重(WCW)。上清液中之重組分泌蛋白質之定量藉由如下所述之微流控毛細管電泳來進行。

d) 藉由微流控毛細管電泳(mCE)來定量

【0375】 『LabChip GX/GXII系統』(PerkinElmer)用於培養物上清液中之分泌蛋白質效價之定量分析。使用消耗品『Protein Express Lab Chip』(760499, PerkinElmer)及『Protein Express Reagent Kit』(CLS960008, PerkinElmer)。晶片及樣品製備根據製造商之建議來進行。程序之簡述在以下給出。

【0376】 晶片製備。在試劑達到室溫之後，將520及280 µL之Protein Express Gel Matrix轉移至旋轉過濾器.將20 µL Protein Express Dye溶液添加至含有520 µL Gel Matrix之旋轉過濾器。在以翻轉定向來將含有染料之旋轉過濾器短暫渦旋之後，將兩個旋轉過濾器以9300 g

來離心持續10分鐘。為了清洗晶片，將120 μL Milli-Q®水添加至所有現用晶片孔並且將晶片經受儀器清洗程式。在使用Milli-Q®水之兩個進一步沖洗步驟之後，將剩餘流體完全抽吸並且將合適量之過濾Gel Matrix溶液以及Protein Express Lower Marker溶液添加至合適晶片孔。

【0377】 樣品及階梯製備。對於樣品製備，將6 μL樣品與21 μL樣品緩衝液在96-微量滴定板中混合。將樣品在100℃下變性5分鐘並且以1200 g離心持續2分鐘。隨後，添加105 μL之Milli-Q®水。將樣品溶液藉由移液來短暫混合並且再次以1200 g離心持續2分鐘，然後量測。為了製備階梯，將12 μL之Protein Express Ladder在100℃下在PCR管中變性5分鐘。隨後，添加120 μL之Milli-Q®水並且將階梯溶液短暫渦旋，然後在微型離心機中將管旋轉15秒。

【0378】 使用由製造商提供之LabChip軟體進行定量並且相對於BSA標準來比較。

【0379】 表3展示在生物質濃度並無不同的情況下，與野生型相比，d*FLO8*菌株之上清液中之平均scR-效價高1.8倍，導致d*FLO8*菌株之上清液中之高1.86倍之scR產率。在vHH-表現菌株的情況下，亦觀察到在d*FLO8*突變後的平均效價及vHH產率之類似增加(1.7倍)(表4)。

表3：用pPM1aZ30_pG1-3_scR轉型之CBS2612及CB2612_L_d*FLO8*#2_4之24-DWP篩檢之平均WCW、產物效價及產率。每種構建體篩檢20個純系。

菌株	WCW ± SD	效價± SD	產率± SD
	[g L^{-1}]	[mg L^{-1}]	[mg g^{-1}]
wt + pG1-3_scR #1-20	80.8 ± 3.64	29.3 ± 8.99	0.36 ± 0.107
d*FLO8*L + pG1-3_scR #1-20	79.3 ± 2.40	53.0 ± 4.53	0.67 0.057

表4：用pPM1aZ30_pG1-3_vHH轉型之CBS2612及CB2612_KanR_d*FLO8*#2之24-DWP篩檢之平均WCW、產物效價及產率。每種構建體篩檢20個純系。

菌株	WCW ± SD	效價± SD	產率± SD
	[g L^{-1}]	[mg L^{-1}]	[mg g^{-1}]
wt + pG1-3_vHH #1-20	92.4 ± 3.21	56.2 ± 32.70	0.61 ± 0.351
d*FLO8*+pG1-3_vHH #1-20	90.7 ± 4.48	97.0 ± 31.70	1.04 ± 0.360

【0380】 隨後，在選自上述篩檢之四個不同vHH-表現純系(CBS2612_pG1-3_vHH#4、#5、#13及#15)中，藉由使用如實例1所描述之分割-標記物匣方法，將*FLO8*破壞。隨後，採用24-DWP-篩檢模式，對d*FLO8*突變型純系以及相應*FLO8*母體純系針對其生產力來進行篩檢。表5展示在d*FLO8*純系中，vHH效價及產物產率高2至3倍。為了驗證增加之製造水準基於更高轉錄表現，vHH轉錄水準在不同時間點藉由qPCR來定量。在d*FLO8*純系中觀察

到平均2倍更高之vHH表現水準，指示經改良之vHH效價事實上基於pG1-3之更高轉錄活性(參見實例4)。

表5：4種不同vHH-表現菌株以及其相應d*FLO8*菌株之平均WCW及效價。將各母體菌株之四個複製物以及六個相應d*FLO8*菌株加以篩檢。(FC：倍數變化)。

菌株	WCW ± SD	效價± SD	FC
	[g L^{-1}]	[mg L^{-1}]	
pG1-3_vHH #4	81.8 ± 1.25	81.4 ± 6.42	
pG1-3_vHH #4_d*FLO8*#1-6	78.9 ± 0.94	171.9 ± 3.90	2.11
pG1-3_vHH #5	86.6 ± 1.23	37.9 ± 2.22	
pG1-3_vHH #5_d*FLO8*#1-6	79.8 ± 1.51	91.2 ± 4.17	2.41
pG1-3_vHH #13	77.6 ± 1.81	33.6 ± 1.30	
pG1-3_vHH #13_d*FLO8*#1-6	78.9 ± 1.52	101.7 ± 2.05	3.03
pG1-3_vHH #15	80.1 ± 1.23	37.7 ± 2.05	
pG1-3_vHH #15_d*FLO8*#1-6	78.7 ± 3.70	101.1 ± 4.21	2.68

實例4：*FLO8*破壞對於pG1-3控制之vHH-轉錄之效應

【0381】 為了測試是否破壞*FLO8*導致在pG1-3之控制下之基因之轉錄活性增加，將CBS2612_pG1-3_vHH#4及#13以及相應d*FLO8*突變體菌株CBS2612_pG1-3_vHH#4_d*FLO8*_1及#13_d*FLO8*_2(表5；實例3)之6個技術複製物以如實例3所描述之24-DWP形式來培養。2、19及26小時之後，收

穫來自2個複製物之1 mL培養物並且在16100 g及4℃下離心1分鐘並且將上清液丟棄。隨後，將細胞球團重新懸浮於1 mL TRI試劑(Sigma-Aldrich)中並且在-80℃下儲存直到進一步處理為止。

【0382】 RNA分離如實例6所描述來進行。為了移除殘餘DNA，根據製造商之手冊將RNA樣品用DNA-free™-套組(Ambion)來處理。隨後，藉由凝膠電泳以及使用NanoDrop2000(Thermo Scientific)之分光光度分析來分析RNA品質、純度及濃度。

【0383】 cDNA之合成使用Biozym cDNA合成套組根據製造商之手冊來進行。簡言之，將500 ng之總RNA添加至含有反轉錄酶、dNTP、RNA酶抑制劑及合成緩衝液之預混液。對於預敏化，使用寡$d(T)_{23}$ VN(NEB)。反應混合物之培育在55℃下進行60分鐘。隨後，酶之失活藉由將反應混合物在99℃下培育5分鐘來達成。

【0384】 對於定量即時PCR(qPCR)，使用vHH-特異性引子(表6)。藉由與*ACT1*表現水準比較來進行正規化(表6)。對於分析，將1 μL cDNA、水及引子與SensiMix SYBR 2x預混液(Bioline)混合並且在即時PCR循環控制裝置(Rotor-Gene，Qiagen)中分析。

表6：用於vHH-轉錄物分析之定量即時PCR引子

引子	序列
vHH_fw	TGTAACGTGAATGTCGGATTTG(SEQ ID NO:81)

vHH_bw	TAGTGATGGTGGTGGTGATG(SEQ ID NO:82)
Act1_fw	CCTGAGGCTTTGTTCCACCCACT(SEQ ID NO:83)
Act1_bw	GGAACATAGTAGCAC CGGCATAACGA(SEQ ID NO:84)

【0385】 所有樣品以一式三份技術來量測。藉由Rotor-Gene軟體、使用比較定量(QC)方法來執行資料分析。

【0386】 表7展示在d*FLO8*菌株中，在所有分析培養時間點下，平均vHH-轉錄水準增加。

表7：不同篩檢培養時間點處之平均相對vHH-轉錄水準

菌株	相對轉錄物		
	2 h	19 h	26 h
pG1-3_vHH #4	1.00*	1.56	1.65
pG1-3_vHH #4_d*FLO8*_1	1.76	2.14	2.87
pG1-3_vHH #13	1.00*	2.97	2.90
pG1-3_vHH #13_d*FLO8*_2	2.21	3.93	5.10
	*設定至1		

實例5：*FLO8*破壞對於實驗室規模生物反應器分批補料培養物中之pG1-3驅動分泌抗體片段生產力之影響

【0387】 在執行分批補料培養之前，藉由如實例3所描述之Cre-介導重組，將遺傳黴素抗性標記物匣自菌株

CBS2612_pG1-3_vHH#4_d*FLO8*_4(縮名dFLO8_pG1-3_vHH#4_4)(表5，實例3)之基因組中切除。以如實例3(表8)所描述之24-DPW篩檢形式，所得菌株CBS2612_pG1-3_vHH#4_d*FLO8*_4#L1(縮名L_d*FLO8*_pG1-3_vHH#4_4_1)之三個複製物之生產力與其母體菌株之三個複製物之產物水準相比較。CBS2612_pG1-3_vHH#4_d*FLO8*_4#L1之平均生產力保持與其母體菌株類似(0.096之p值)。

表8：CBS2612_d*FLO8*_pG1-3_vHH #4_4及CBS2612_L_d*FLO8*_pG1-3_vHH #4_4_1在24-DWP篩檢中之WCW及效價。

菌株	WCW ± SD	Titer ± SD
	[g L^{-1}]	[mg L^{-1}]
d*FLO8*_pG1-3_vHH #4_4	80.87 ± 1.91	306.34 ± 12.85
*L*_d*FLO8*_pG1-3_vHH #4_4_1	80.40 ± 0.57	329.92 ± 8.48

【0388】在1 L台式生物反應器(SR0700ODLS; Dasgip, Germany)中，使用菌株CBS2612_pG1-3_vHH #4及相應loxed d*FLO8*突變體CBS2612_L_d*FLO8*_pG1-3_vHH #4_4_1來進行分批補料培養。對於預培養，將1 L搖瓶中之含有50 µg mL吉歐黴素之100 mL YPG培養基用1.0 mL冷凍原料接種並且在180 rpm及25℃下培育約24 h。批料培養以0.25 L之工作體積來操作並且進行接種，直至啟始OD_{600}為1.5。

甘油批料培養基組成物在以下給出。在整個過程期間，在溫度控制在30℃下，藉由自動調節攪拌器速度(400與1200 rpm之間)及空氣流(9.5與30 sL h^{-1}之間)來將DO保持在30%，並且藉由自動添加12.5%NH4OH來將pH調控至5.0。在指示批料結束之DO之突然峰值之後，採用導致快速初始生長速率，繼之以逐漸地降低μ之延長階段的線性漸增葡萄糖進料(培養基組成物在以下詳述)，該過程尤其針對基於P_{G1-3}之q_P比μ動力學來進行最佳化(Prielhofer等人，2018)。

【0389】 甘油批料培養基每升包含：

2 g檸檬酸一水化物($C_6H_8O_7*H_2O$)、45 g甘油、12.6 g $(NH_4)_2HPO_4$、0.5 g $MgSO_4*7H_2O$、0.9 g KCl、0.022 g $CaCl_2*2H_2O$、6.6 mL生物素儲備溶液(0.2 g L^{-1})及4.6 mL PTM0痕量鹽儲備溶液(在實例2中所描述)。添加HCl(濃縮)來將pH設定為5。

【0390】 葡萄糖進料培養基每升包含：

495 g葡萄糖一水化物、5.2 g $MgSO_4*7H_2O$、8.4 g KCl、0.28 g $CaCl_2*2H_2O$、11.8mL生物素儲備溶液(0.2 g L^{-1})及10.1 mL PTM0痕量鹽儲備溶液(在實例2中描述)。

【0391】 YDM及分泌重組蛋白在整個過程中之各個時間點加以分析(表9)。對於YDM分析，將1 mL培養液轉移至2 mL預乾燥(在105℃下至少24 h)並且預稱重之離心管。在16100 g下離心5分鐘之後，將上清液小心地轉移至新鮮

小瓶並且在-20℃下儲存直到進一步使用為止。將細胞球團用去離子水洗滌兩次並且在105℃下乾燥至少24 h，然後再次量測重量。

【0392】 藉由如實例3描述之微流控毛細管電泳(GXII，Perkin-Elmer)來分析上清液。

表9：在CBS2612_pG1-3_vHH #4及L_CBS2612_d*FLO8*_pG1-3_vHH #4_4_1之生物反應器分批補料培養期間之YDM及vHH-效價

	pG1-3_vHH #4		*L*_d*FLO8*_pG1-3_vHH #4_4_1	
時間	YDM ± SD	滴度± SD	YDM ± SD	滴度±SD
[h]	[g L^{-1}]	[mg L^{-1}]	[g L^{-1}]	[mg L^{-1}]
0*	22.1 ± 0.06	-	22.8 ± 0.10	-
4	34.3 ± 0.21	31.6 ± 4.85	36.7 ± 0.18	48.8 ± 1.30
8	51.9 ± 0.10	98.7 ± 26.27	57.0 ± 0.99	167.5 ± 18.17
11	63.7 ± 0.50	158.2 ± 35.89	72.7 ± 1.26	275.4 ± 27.80
24	112.2 ± 0.25	203.4 ± 38.20	123.4 ± 1.28	817.2 ± 9.64
28	122.5 ± 0.49	214.0 ± 46.04	136.7 ± 0.71	991.7 ± 76.97
32	134.6 ± 0.64	177.0 ± 32.98	141.8 ± 0.72	1,006.7 ± 25.20

*葡萄糖進料啟動

【0393】 自表9，可發現在整個過程中，d*FLO8*菌株之產物效價始終高於wt-背景菌株。在過程結束時，觀察到生產力之5.7倍增加。另外在分批補料培養中，在整個時程中觀察到d*FLO8*菌株中之增加之vHH轉錄水準。

實例6：*FLO8*破壞對於非甲醇碳調控啟動子之表現強度及調控行為之效應

【0394】 在下一個步驟中，研究*FLO8*之破壞對於處於誘導條件下之其他碳調控啟動子(在WO2013050551A1及Prielhofer等人2013中描述)之轉錄強度之影響。對於在葡萄糖限制條件下之轉錄組分析，使用CBS7435野生型及CBS7436_KanR_d*FLO8*#2。預培養物及主要培養物在24-深孔板(24-DWP)中予以培養。對於第一預培養物，將含有500 µg mL^{-1}遺傳黴素(若合適)之2 mL YPD(每升：10 g酵母萃取物、20 g蛋白腖、20 g葡萄糖)相應地用CBS7435及CBS7435_KanR_dFLO8#2之單一菌落來接種，並且在25℃及280 rpm下生長約24 h。對於第二預培養物，使用經接種直至啟始OD_{600}達到4的2 mL M2(D)培養基(組成物在以下描述)。添加以1.63 $t^{0.74}$ mg/盤(t=時間[h])之非線性速率來釋放葡萄糖之葡萄糖-釋放聚合物珠粒(12mm饋送珠粒，Kuhner，CH)並且培養物在25℃及280 rpm下培育約24 h。對於主要培養物，使用2 mL之M2培養基(沒有葡萄糖之M2(D))。將培養物在280 rpm及25℃下搖動。葡萄糖之緩慢釋放確保葡萄糖限制生長。在3 h主要培養(估計特定生長速率：0.1 h^{-1})之後獲得樣品，立即以2:1比率與預冷固定液(乙醇[無水]中之5%[體積/體積]苯酚)混合，等分至密封管中並且在

16100 g下離心1 min。將球團儲存在-80℃下直到進一步使用為止。

【0395】 M2(D)每升包含：22.0 g葡萄糖一水化物、22.0 g檸檬酸一水化物、3.15 g $(NH_4)_2HPO_4$、0.49 g $MgSO_4*7H2O$、0.80 g KCl、0.0268 g $CaCl_2*2H_2O$、1.47 mL PTM0痕量鹽儲備溶液(描述於實例1中)及0.4 mg生物素；用KOH(固體)將pH設定為5。

【0396】 對於RNA分離，添加1 mL之TRI試劑(Sigma-Aldrich)及500 μL酸洗玻璃珠粒並且將細胞在FastPrep-24(mpbio)中以5.5 m/s速度破壞40秒。然後，添加200 μL之氯仿。隨後，強力地搖動樣品，然後允許在室溫下靜置5-10分鐘。在16100 g及4℃下離心10分鐘以促進相分離之後，將含有RNA之上部無色水相轉移至新鮮管並且添加500 μL異丙醇以使RNA沉澱。10分鐘培育之後，將樣品在16100 g及4℃下離心10分鐘並且將上清液丟棄。將RNA球團用70%乙醇清洗一次、風乾並且重新懸浮於無RNA酶水中。

【0397】 對於轉錄組分析，使用內部設計之巴斯德畢赤酵母特異性寡核苷酸陣列(AMAD-ID 034821，8 ×15K定製陣列；Agilent，USA)(Graf等人；BMC Genomics.2008;9:390.)。cRNA之合成、雜交、以及掃描根據2-色表現陣列之Agilent方案來執行。樣品一式三份地用Cy3及Cy5來標記並且相對於在各種培養條件下

生長之細胞所產生的參考池來進行雜交。對於所有樣品，執行染料調換實驗。

【0398】 陣列資料之正規化步驟及統計分析微包含使用局部加權MA-散點圖平滑化(LOESS)來移除色彩偏差，隨後使用「Aquantile」方法來進行陣列之間正規化。對於鑑別差異表現基因及計算p值，使用具有eBayes校正之線性模型擬合。使用藉由Benjamini&Yekutieli，2001之錯誤發現法(FDR)，針對多個測試來調整P值。具有調整p值<0.05之基因被視為具有統計上顯著差異表現。對於鑑別差異表現基因，另外採用至少0.58 > log2 FC<-0.58之倍數變化截止。

【0399】 所有步驟使用R軟體(Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.2010.Bioinformatics.26:139 - 40.)及limma封包來進行。一組碳調控基因(在碳源調控啟動子控制下之基因)之倍數變化展示於表10中。與野生型相比，在d*FLO8*突變體中，原生*FLO8*基因之表現明確及顯著地減少。對於所有碳源調控基因，可發現d*FLO8*突變體中之增加之轉錄水準，在誘導條件下達到3.7至11.4倍更高轉錄強度。所有此等基因在d*FLO8*突變菌株中具有統計上顯著更高轉錄(調整p值<0.05)。此強烈指示如Prielhofer等人2013及Prielhofer等人2018所描述之所有非甲醇碳調控啟動

子之製造潛力藉由*FLO8*之破壞而得以增強。相比之下，GAP啟動子之表現強度不受*FLO8*之破壞的影響。

表10：d*FLO8*突變體對於*FLO8*基因以及在葡萄糖限制性誘導條件下、在碳-調控啟動子下受控制之基因之轉錄強度的效應。展示與野生型菌株相比之d*FLO8*突變菌株之間之倍數變化(FC)。具有調整p值<0.05之表現變化展示統計上的顯著差異。

基因 ID GS115	基因 ID CBS7435	啟動子序列	啟動子*/基因名稱	FC 表現 d*FLO8* 相比於 wt	經調整之 p 值 d*FLO8* 相比於 wt
PAS_chr1-3_0011	PP7435_Chr1-0007	SEQ ID NO:12	G1*	11.09	7.59E-06
PAS_chr4_0550	PP7435_Chr4-0424	SEQ ID NO:13	G3*	3.66	4.96E-06
PAS_chr4_0043	PP7435_Chr4-0972	SEQ ID NO:14	G4*	11.43	4.40E-07
PAS_chr2-1_0853	PP7435_Chr2-0787	SEQ ID NO:15	G6*	8.82	1.11E-07
PAS_chr2-1_0437	PP7435_Chr2-0858	SEQ ID NO:46	GAP*	1.08	0.786
PAS_chr4_0711	PP7435_Chr4-0252	-	FLO8	<0.29	8.61E-05
	*如 Prielhofer 等人 2013 所描述之啟動子命名法				

實例7：*FLO8*破壞對於甲醇調控啟動子pAOX1之轉錄強度之效應

【0400】 亦對於在甲醇-誘導條件下之巴斯德畢赤酵母標準啟動子諸如pAOX1及pGAP，確定*FLO8*之破壞對於轉錄強度之影響。因此，在pAOX1控制下表現重組Fab片段之菌株CBS7435及相應d*FLO8*突變菌株d*FLO8*#2在基於甲醇之分批補料培養中進行培養。

【0401】 分批補料在具有1.0 L之最大工作體積之1.4 L DASGIP反應器(Eppendorf，Germany)中執行。培養溫度控制在25℃，藉由添加25%氫氧化銨將pH控制在5.0，並且藉由將攪拌器速度控制在400與1200 rpm之間，並且將空氣流控制在24與72 sL/h之間，將溶解氧濃度保持在20%飽和度以上。

【0402】 用於分批補料培養之接種物在含有包含20 g/L甘油及50 μg/mL吉歐黴素之100 mL YP培養基的搖瓶中培養，並且在28℃及180 rpm下培育大約24小時。培養物用於接種生物反應器中之0.4 L啟始體積，直至啟始光密度(600 nm)為1.0。在大約24 h之後，批料結束，並且給予首次(10 mL)補鹽。

【0403】 然後，甘油分批補料溶液以5 mL/h之恆定速率饋送持續5小時。然後，將甲醇脈衝(2 g)及補鹽(10 mL)給予培養物。在培養物中之溶解氧濃度之增加指示甲醇脈衝消耗之後，以1.0 g/h之饋送速率來開始具有甲醇分批補料溶液之恆定進料。對應於~43 g甲醇饋送培養基，每

10 g新形成生物質，給予10 mL補鹽。隨著生物質濃度增加，當由於在停止甲醇饋送一段較短時間時，培養物中之溶解氧突然增加而導致可排除甲醇積聚的可能性時，適當地增加甲醇饋送速率。最終甲醇饋送速率為2.5 g/h。

【0404】 經常地進行取樣。在大約100小時之後，當細胞密度達到超過100 g/L細胞幹重時，收穫培養物。

【0405】 培養基如下：

【0406】 *批料培養基(每升)包含*：2.0 g檸檬酸、12.4 g $(NH_4)_2HPO_4$、0.022 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、0.9 g KCl、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、40 g甘油、4.6 mL PTM1痕量鹽儲備溶液。使用25% HCl將pH設定為5.0。

【0407】 *甘油分批補料溶液(每升)包含*：623 g甘油、12 mL PTM0痕量鹽儲備溶液及40 mg生物素。PTM0組成物在實例2中給出。

【0408】 *純甲醇之甲醇分批補料溶液(每升)包含*：12 mL PTM0痕量鹽儲備溶液及40 mg生物素。

【0409】 *補鹽溶液(每升)包含*：20.8 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、41.6 KCl, 1.04 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$。

【0410】 使用抗人類IgG抗體(ab7497，Abcam)作為塗佈抗體及山羊抗人類IgG(Fab特異性)-鹼性磷酸酶結合抗體(SigmaA8542)作為偵測抗體，藉由ELISA進行完整Fab之定量。人類Fab/Kappa，IgG片段(Bethyl P80-115)以100 ng/mL之啟始濃度用作標準，上清液樣品相應地稀釋。偵測以pNPP(Sigma S0942)

來進行。塗佈、稀釋及清洗緩衝液基於PBS（2 mM KH_2PO_4、10 mM $Na_2HPO_4.2H_2O$、2.7 mM g KCl、8 mM NaCl，pH 7.4)並且相應地用BSA（1%（w/v））及/或Tween20（0.1%（v/v））來完成。

【0411】 關於產物效價，在甲醇分批補料培養結束時(在119 h之後，如WO2015/158800A1所描述)，在d*FLO8*突變體中之pAOX1控制下之Fab製造之增加為最大1.45倍，同時生物質形成稍微減少(10-14%)。

【0412】 在53.5 h之後獲得微陣列樣品(25 h甲醇饋送)並且如實例6所描述來處理。與野生型菌株相比之d*FLO8*突變菌株之間之一組基因之倍數變化展示在表11中。另外，與野生型相比，在d*FLO8*突變體中，*FLO8*轉錄水準顯著更低。與表10展示之非甲醇碳調控基因及啟動子相反，甲醇-可誘導pAOX1在其完全誘導條件下不展示與野生型相比之d*FLO8*突變體中之轉錄強度之顯著增加(因為調整p值大於0.05)。在甲醇生長細胞中，亦沒有對於pGAP之顯著效應。因此，巴斯德畢赤酵母中之此等標準啟動子之轉錄不受*FLO8*之表現不足的影響。

表11：d*FLO8*突變體對於FLO8基因及在甲醇誘導分批補料條件下、在甲醇-可誘導AOX1啟動子受控制之基因之轉錄強度的效應。展示與野生型菌株相比之d*FLO8*突變菌株之間之倍數變化(FC)。具有調整p值<0.05之表現變化展示統計上的顯著差異。

基因 ID GS115	基因 ID CBS7435	啟動子序列	啟動子*/基因名稱	FC 表現 d*FLO8* 相比於 wt	經調整之 p 值 d*FLO8* 相比於 wt
PAS_chr4_0821	PP7435_Chr4-0130		AOX1*	1.36	0.186
PAS_chr2-1_0437	PP7435_Chr2-0858	SEQ ID NO:46	GAP*	1.24	0.400
PAS_chr4_0711	PP7435_Chr4-0252	-	FLO8	<0.3	3.71E-08

實例8：*FLO8*破壞對於由非甲醇碳調控啟動子驅動之細胞內eGFP表現之效應

【0413】 因為在d*FLO8*菌株(參見實例6)中，在誘導條件下，由大多數非甲醇碳調控啟動子(WO2013050551A1；Prielhofer等人2013)驅動之原生基因表現顯著上調，所以亦在WO2013050551A1及Prielhofer等人(2013)所描述之相應eGFP-報道基因菌株中測試*FLO8*之破壞。對於各非甲醇可誘導啟動子，選擇一種容納pPM1aZ10_pG#_eGFP表現載體(CBS2612_pG3_eGFP#1；CBS2612_pG4_eGFP#6；CBS2612_pG6_eGFP#53；X33_pG7_eGFP#1；CBS2612_pG8_eGFP#8)之菌株並且使用實例1所描述之分割-標記物匣方法來破壞*FLO8*。在誘導(葡萄糖限制性)條件下之篩檢培養如實例2所描述來進行，除了多醣及

葡萄糖釋放酶獲自不同供應商(EnPump200, Enpresso)以外。因為新葡萄糖釋放酶之性質不同，所以將濃度調適至對應於約0.6 mg mL^{-1} h^{-1}之恆定葡萄糖-釋放速率的0.4%。在每種情況下，篩檢相應母體以及至少7種相應d*FLO8*菌株之兩個複製物。eGFP生產力如實例2所描述來確定，除了值未相對於細胞尺寸來正規化以外。表12展示*FLO8*之破壞導致各啟動子之eGFP螢光增加，在pG3及pG8的情況下，分別達到1.7倍與1.2倍之間，並且在pG4及pG7的情況下為2.3倍，並且在pG6的情況下為2.2倍。此進一步突出*FLO8*破壞增強除了pG1及pG1衍生物以外之其他非甲醇碳調控啟動子之潛力。

【0414】 此等結果證實在d*FLO8*宿主細胞中之pG1或pG1衍生物(pG1-3)控制下之增加之eGFP表現，與野生型宿主細胞中之此等表現形成相比。表2示出*FLO8*之破壞導致eGFP螢光增加，在pG1及pG1-3的情況下分別為3.8(或3.9)及2.8(或2.9)倍。

表12：d*FLO8*在非甲醇碳調控啟動子控制下之eGFP之表現的影響。顯示在限制性葡萄糖(誘導)條件下48h培養之後，作為pGAP表現之百分比的eGFP表現水準以及與母體野生型菌株相比之相應d*FLO8*_pG#_eGFP菌株之倍數變化。

啟動子	宿主細胞	相對於 pGAPeGFP 之表現± SD	FC *dFLO8/wt*
pGAP	wt	100 ± 2.2 %	

pG3	wt	20 ± 0.7 %	
pG3	*dFLO8*	33 ± 4.5 %	1.7
pG4	wt	42 ± 1.1 %	
pG4	*dFLO8*	96 ± 9.0 %	2.3
pG6	wt	76 ± 0.0 %	
pG6	*dFLO8*	164 ± 1.4 %	2.2
pG7	wt	697 ± 1.0%	
pG7	*dFLO8*	1591± 2%	2.3
pG8	wt	20 ± 3.1%	
pG8	*dFLO8*	24± 3.4%	1.2

【0415】 參考文獻：

Benjamini Y & Yekutieli D (2001) The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency. *The Annals of Statistics* 29: 1165-1188.

Gasser B, Prielhofer R, Marx H, Maurer M, Nocon J, Steiger M, Puxbaum V, Sauer M & Mattanovich D (2013) *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol* 8: 191-208.

Marx H, Mattanovich D & Sauer M (2008) Overexpression of the riboflavin biosynthetic

pathway in Pichia pastoris. *Microb Cell Fact* 7: 23.

Prielhofer R, Reichinger M, Wagner N, Claes K, Kiziak C, Gasser B & Mattanovich D (2018) Superior protein titers in half the fermentation time: Promoter and process engineering for the glucose-regulated GTH1 promoter of Pichia pastoris. *Biotechnol Bioeng*.

Stadlmayr G, Mecklenbrauker A, Rothmuller M, Maurer M, Sauer M, Mattanovich D & Gasser B (2010) Identification and characterisation of novel Pichia pastoris promoters for heterologous protein production. *J Biotechnol* 150: 519-529.

【符號說明】

【0416】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊(請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

國外寄存資訊(請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

無

【序列表】

<110> 瑞士商隆沙有限公司(Lonza Ltd)

<120> 重組宿主細胞中的碳源調控蛋白質製造

<130> LO008TW

<160> 86

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 806
<212> PRT
<213> 法夫駒形氏酵母

<400> 1

```
Met Asn Lys Pro Asn Gly Ser Glu Gln Gln Pro Pro Ser Arg Gly Met
1               5                  10                  15

Lys Gln Glu Ser Gly Gly Pro Val Thr Ser Ser Thr Thr Pro Gly Thr
            20                  25                  30

Asn Thr Gly Leu Glu Asn Ser His Ser Met Gly Ala Asp Met Glu Pro
        35                  40                  45

Asp Val Gly Ala Thr Ser Pro Arg His Leu Leu Asn Gly Tyr Ile Tyr
    50                  55                  60

Asp Tyr Leu Val Lys Ser Asn Met Gln Asn Leu Ala Asp Gln Phe Ala
65                  70                  75                  80

Gln Glu Thr Glu Leu Leu Glu Thr Asp Leu Thr Val Pro Met Asp Thr
                85                  90                  95

Pro Ser Gly Tyr Leu Leu Glu Trp Trp Met Val Phe Trp Asp Leu Phe
            100                 105                 110

Asn Ala Arg Leu Lys Gln Arg Gly Ser Gln Lys Ala His Gln Tyr Ile
        115                 120                 125

Gln Leu Asn Met Leu Arg Gln Gln Gln Gln Arg Thr Met Arg Asn Thr
    130                 135                 140

Ala Arg Val Gln Lys Val Pro Leu Arg Pro His Thr Gln Ser Ser Pro
145                 150                 155                 160
```

Ser Met Ser Gln Thr Phe Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Gln Ala Gln
165 170 175

Gly Gln Gln His Ala Gln Ala Gln Ala Gln Val Gln Ala His Gln Gln
180 185 190

Ala Gln His His Ala Gln Ala Gln Val Pro Val Gln Pro Gln Gln His
195 200 205

Gln Leu Gly Gly Gln Thr Gln Gln Gln Gln Ser Ile Asn Thr Gly Ser
210 215 220

Pro Ala Gly Pro Asn Ala Ile Asn Ser Arg Val Gln His Leu Ala Gln
225 230 235 240

Gln Gln Met Asn His Leu Arg Gln Gln Ala Thr Ala Thr Thr Gln Gln
245 250 255

Pro Ile Pro Gln Gln Asn Ile Pro Ser Asn Gln Gln Gly Pro Thr Gly
260 265 270

Pro Tyr Pro Thr Ser Pro Ser Arg Arg Pro Arg Leu Leu Ser Asn Glu
275 280 285

Ser Gly Ala Ser Ala Pro Ser Val Met Thr Lys Ser Gln Leu Gln Gly
290 295 300

Val Pro Pro Ser Gln Gln Pro His Gln Gln Gln Gly Gln Gln Val Gly
305 310 315 320

Pro Pro Asn Gln His Gln Gly Gln Ser Ser Ser Phe Tyr Ser Gly Met
325 330 335

Pro Pro Gln Gly Val Val Val Pro His Gln Phe Asn Pro Gln Gln Tyr
340 345 350

Ala Asn Met Leu Ala Arg Gln Gln His Val Gln Ala Gln Gln Gln Val
355 360 365

Gln Leu Gln Gln Val Gln His Val Gln Gln Arg Gln Gln Gln Asp Gln
370 375 380

Gln Gln His Arg Leu Ser Ala Gly Ser Pro Gly His Pro Ser Phe Gly
385 390 395 400

Val Phe Gln Gln Pro Pro Pro Met Ser Asn His Asn Gln Val Met Ile
405 410 415

Asn Gln Gln Gly Glu Thr Phe Phe Asp Pro His Ser Pro Tyr Ala Gln
420 425 430

Pro Asn Gly Tyr Pro Gln Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
435 440 445

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
450 455 460

Gln Lys Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Arg Gln Pro Gln Arg Gln Gln
465 470 475 480

Ala Met Ala Met Ala Pro Leu Pro His Ser Thr Ser Ala Ala Gly Thr
485 490 495

Pro His Ser Ser Thr Thr Pro Arg Phe Ser Gln Pro Gly Pro Val Tyr
500 505 510

Gln Gln Pro Leu Pro Ala Ser Gln Pro Gln His Ser Pro Pro Ser Ser
515 520 525

Ile Gln Gln Pro Glu Leu Val Pro Thr Pro Gly Ser Gln His Gln Gln
530 535 540

Ile Ala Gln Pro Gln Ser Gln Ser Gln His Gln Gln Ser Gln Gln Ser
545 550 555 560

Gln Ser Ser Ala Ser Lys Ile Val Gly Ile Gln Glu Tyr Gln Lys Glu
565 570 575

Leu Met Met Leu Glu Lys Gln Asn Lys Gln Arg His Asp Met Ala Cys
580 585 590

Lys Lys Gly Ser Gly His Phe Ser Asn Phe Asp Pro Ile Pro Glu His
595 600 605

Thr Pro Pro Glu Pro Lys Phe Asn Val Asn Val Met Leu Pro Pro Gln
610 615 620

Asn Ser Ala Val Val Thr Lys Asn Thr Pro Gly Thr Ser Pro Gly Thr
625 630 635 640

Gln Thr Gln Asn Thr Ala His Ser Thr Gly Asn Thr Ser Ala Gly Ser
645 650 655

Thr Pro Asn Asn Val Ala Pro Val Arg Lys Lys Lys Glu Pro Ala Lys
660 665 670

Lys Lys Ala Lys Lys Ala Thr Glu Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Gln
675 680 685

Thr Pro Ile Ala Ala Arg Thr His Gln Asn Ser Thr Gly Gly Ile Pro
690 695 700

Gly Asn Asn Ala Ala Thr Lys Arg Arg Lys Arg Glu Pro Leu Val Asp
705 710 715 720

Gln Thr Val Ser Pro Asn Leu Asn Glu Ala Ser Lys Ser Thr Lys Thr
725 730 735

Gly Lys Ile Ser Ser Gln Thr Asp Phe Thr Gly Ser Asp Asn Gly Phe
740 745 750

Leu Gln Asp Phe Gly Asp Gly Thr Gly Pro Pro Thr Gly Thr Asp Asp
755 760 765

Met Glu Phe Asp Phe Asn Ser Phe Leu Asn Asn Glu Thr Gly Glu Pro
770 775 780

Asn Ser Ser Thr Ile His Phe Asp Asn Val Phe Asn Trp Gly Glu Gly
785 790 795 800

Thr Glu Ala Gly Asp Leu
805

<210> 2
<211> 2421
<212> DNA
<213> 法夫駒形氏酵母

<400> 2

atgaacaagc caaacgggtc tgaacaacaa ccaccgtcac gcggaatgaa gcaagagtca 60

ggaggcccag ttacttcatc tacgacgccg ggtaccaata ctggcctaga aaactctcat 120

tccatggggg cggatatgga gcctgatgtt ggtgctacct ctcctcgcca tcttcttaat 180

gggtacattt acgattattt agtcaaatct aacatgcaaa atttggctga tcaatttgcc 240

caagagacgg agctcttaga aacagacttg acagtaccaa tggatacgcc ttcaggctat 300

cttctagaat ggtggatggt attctgggac cttttcaatg cccgcctaaa gcaacggggt 360

tcacagaagg cccaccagta tattcagttg aacatgctac gacaacagca acagaggacc 420

atgcgaaata cagcccgtgt tcaaaaagtc ccgttgaggc cacacaccca atcatctcct 480

tcaatgtcac agacttttat tccacagcag cctcaacagc aagcacaggg acaacagcac 540

gcccaggctc aagcccaagt gcaagcacat cagcaagccc aacaccacgc gcaggcacaa 600

gtgccagtgc aaccgcaaca gcaccagcta ggaggccaaa ctcaacagca gcaatccatt 660

aacactgggt ctcctgcggg tccaaatgct atcaactcgc gtgttcaaca cttagcacaa 720

caacagatga atcaccttcg ccagcaggcg actgccacta cgcaacaacc tatcccgcaa 780

cagaatatcc catcaaacca acagggtcct acaggcccct atcctacttc cccttcaaga 840

agaccgagat tactgtctaa cgaatcgggt gcaagtgcac cctctgtaat gacaaagtca 900

cagctccaag gagtccctcc ctcacaacaa ccacaccagc agcaaggtca gcaggtaggc 960

ccccctaatc aacatcaagg tcaatcttct tccttttatt cgggcatgcc tcctcaaggg 1020

gtcgtggttc ctcatcagtt caatcctcag cagtatgcca atatgctagc aagacaacag 1080

catgtacaag ctcaacaaca ggttcagtta caacaggtcc aacatgtaca acagagacaa 1140

cagcaagacc aacaacaaca ccgcctgtcc gccggttcac cggggcaccc ttcatttggc 1200

gtttttcaac aacctcctcc gatgtcaaac cataatcagg tcatgatcaa tcagcaggga 1260

gaaacttttt ttgatccaca ttctccatat gctcaaccta acgggtaccc ccagccacag 1320

caacaacaac aacaacagca acaacaacaa caacagcagc aaccgcaaca gcagcagcag 1380

cagcagcagc aacagaagca gcaaccacca ccaccaccac gacagcctca gcgccaacaa 1440

gcgatggcca tggctcctct gcctcactct acttctgccg ccggtactcc tcactcgtcc 1500

accacaccta gattctcgca acctggtcct gtttatcagc agcctttacc tgcatctcaa 1560

ccgcaacatt ctccgccttc ttctattcag cagccggagc tagttccaac tccagggtca 1620

caacatcagc aaatagcaca accacaatca cagagccaac accagcaatc gcaacagtct 1680

caatcaagtg cttctaaaat tgtaggtata caggagtatc agaaagagct aatgatgctt 1740

gagaaacaga acaaacagcg tcatgacatg gcatgtaaga agggaagcgg gcatttttct 1800

aactttgatc caattccaga gcacacaccg cccgaaccaa aatttaatgt gaatgtaatg 1860

ctccctcccc agaactctgc agtggtcacg aagaatactc ccggaacttc acctggtaca 1920

caaactcaaa acactgcaca tagtactggt aacacttctg cggggtctac accaaataat 1980

gtcgcacctg tacgaaagaa aaaggagcca gctaaaaaga aggcaaagaa agctactgag 2040

cccccgactc ccactactcc acagactcca attgcagcta ggacacatca aaactctaca 2100

ggcggcattc ctggtaataa tgctgctact aagcgacgaa aacgggagcc gctggttgat 2160

caaactgttt cacctaacct taacgaagct tccaagtcaa caaagaccgg aaaaatttca 2220

tctcaaactg actttacagg ttctgacaat ggattcttac aggattttgg cgatggaact 2280

ggtcctccca ctggaaccga tgatatggaa tttgatttta acagttttct taataacgaa 2340

actggcgaac ctaatagttc aaccattcat tttgacaatg tattcaattg gggagaaggt 2400

accgaagccg gagatttata g 2421

<210> 3
<211> 804
<212> PRT
<213> 巴斯德駒形氏酵母

<400> 3

Met Asn Lys Pro Asn Gly Ser Gly Gln Gln Pro Pro Ser Arg Gly Met
1 5 10 15

Lys Gln Asp Pro Gly Gly Pro Val Thr Ser Ser Thr Thr Pro Gly Thr
20 25 30

Asn Thr Gly Phe Glu Asn Ser His Ser Met Gly Ala Asp Val Glu Pro
35 40 45

Asp Val Gly Ala Ala Ser Pro Arg His Ile Leu Asn Gly Tyr Ile His
50 55 60

Asp Tyr Leu Val Lys Ser Asn Met Gln Asn Leu Ala Asp Gln Phe Ala
65 70 75 80

Gln Glu Ser Asp Leu Leu Glu Thr Asp Leu Thr Val Pro Met Asp Thr
85 90 95

Pro Thr Gly Tyr Leu Leu Glu Trp Trp Met Val Phe Trp Asp Leu Phe
100 105 110

Asn Ala Arg Leu Lys Gln Arg Gly Ser Gln Lys Ala His Gln Tyr Ile
115 120 125

Gln Leu Asn Met Leu Arg Gln Gln Gln Gln Arg Thr Met Arg Asn Thr
130 135 140

Ala Arg Val Gln Lys Val Pro Leu Arg Pro His Thr Gln Ser Ser Pro
145 150 155 160

Ser Met Ser Gln Thr Phe Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Gln Ala Gln
165 170 175

Ala Gln Ala Gln Gln His Ala Gln Ala Gln Ala Gln Val Gln Ala His
180 185 190

Gln Gln Ala Gln His His Ala Gln Ala Gln Val Pro Met Gln Ser Gln
195 200 205

Pro His Gln Gln Gly Gly Gln Thr Gln Gln Gln Gln Pro Ile Asn Thr
210 215 220

Gly Ser Pro Ala Gly Pro Asn Ala Ile Asn Ser Arg Val Gln His Leu
225 230 235 240

Ala Gln Gln Gln Met Asn His Leu Arg Gln Gln Ala Thr Ala Thr Thr
245 250 255

Gln Gln Pro Ile Pro Gln Gln Asn Ile Pro Ser Asn Gln Gln Gly Pro
260 265 270

Ala Gly Pro Tyr Pro Thr Ser Pro Ser Arg Arg Pro Arg Leu Leu Ser
275 280 285

Asn Glu Ser Gly Ala Ser Ala Pro Ser Val Met Thr Lys Ser Gln Leu
290 295 300

Gln Gly Gly Pro Pro Ser Gln Gln Pro His Gln Gln Gln Ala Gln Gln
305 310 315 320

Val Gly Pro Pro Asn Gln His Gln Gly Gln Ser Ser Ser Phe Tyr Ser
325 330 335

Gly Met Pro Pro Gln Gly Val Val Val Pro His Gln Phe Asn Pro Gln
340 345 350

Gln Tyr Ala Asn Met Leu Ala Arg Gln Gln His Val Gln Ala Gln Gln
355 360 365

Gln Val Gln Leu Gln Gln Val Pro His Val Gln Gln Arg Gln Gln Gln
370 375 380

Asp Gln Gln Gln His Arg Leu Ser Ala Gly Ser Pro Gly His Pro Ser
385 390 395 400

Phe Gly Val Phe Gln Gln Pro Pro Pro Met Ser Asn His Asn Gln Val
405 410 415

Met Ile Asn Gln Gln Gly Glu Thr Phe Phe Asp Pro His Ser Pro Tyr
420 425 430

Ala Gln Pro Asn Gly Tyr Pro Gln Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
435 440 445

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
450 455 460

Lys Gln Gln Gln Pro Pro Pro Arg Gln Pro Gln Arg Gln Gln Ala Met
465 470 475 480

Ala Thr Ala Pro Leu Pro His Ser Thr Ser Ala Ser Gly Thr Pro His
485 490 495

Thr Ala Thr Thr Pro Arg Phe Ser Gln Pro Gly Pro Val Tyr Gln Gln
500 505 510

Pro Leu Pro Ala Ser Gln Pro Gln His Ser Pro Pro Thr Ser Ile Gln
515 520 525

Gln Gln Glu Pro Ile Pro Thr Pro Gly Ser Gln His Gln Gln Ile Ala
530 535 540

Gln Pro Gln Ser Gln Asn Gln His Gln Gln Pro Gln Gln Pro Gln Ala

545 550 555 560

Ser Ala Ser Lys Met Val Gly Ile Gln Glu Tyr Gln Lys Glu Leu Met
565 570 575

Met Leu Glu Lys Gln Asn Lys Gln Arg His Asp Met Ala Ile Lys Lys
580 585 590

Gly Ser Gly His Phe Ser Asn Phe Asp Pro Ile Pro Glu His Thr Gln
595 600 605

Thr Glu Pro Lys Phe Asn Val Asn Val Met Leu Pro Pro Gln Asn Ser
610 615 620

Ala Val Ala Thr Lys Asn Thr Pro Gly Thr Ser Pro Gly Thr Gln Thr
625 630 635 640

Gln Asn Thr Ala His Ser Thr Gly Asn Thr Ser Ala Gly Ser Thr Pro
645 650 655

Asn Asn Val Val Pro Val Arg Lys Lys Lys Glu Pro Ser Lys Lys Lys
660 665 670

Ser Lys Lys Ala Thr Glu Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Gln Thr Pro
675 680 685

Ile Ala Ala Arg Ala His Gln Asn Ser Thr Gly Gly Ile Ser Gly Asn
690 695 700

Asn Ala Ala Thr Lys Arg Arg Lys Arg Glu Pro Leu Val Asp Gln Thr
705 710 715 720

Val Ser Pro Asn Leu Asn Glu Ala Ser Lys Ser Thr Lys Pro Gly Lys
725 730 735

Ile Ser Ser Gln Asn Asp Phe Thr Gly Ser Asp Asn Gly Phe Leu Gln
740 745 750

Asp Phe Gly Asp Gly Thr Gly Pro Pro Thr Gly Thr Asp Asp Met Glu
755 760 765

Phe Asp Phe Asn Ser Phe Leu Asn Asn Glu Thr Gly Glu Pro Asn Ser
770 775 780

Ser Thr Ile His Phe Asp Asn Val Phe Asn Trp Gly Glu Gly Thr Glu
785 790 795 800

Ala Gly Asp Leu

<210> 4
<211> 2415
<212> DNA
<213> 巴斯德駒形氏酵母

<400> 4
atgaacaagc caaacgggtc tggacaacaa ccaccgtcac gcggaatgaa gcaagaccca 60

ggaggcccag ttacctcatc tacgacaccc ggtaccaata ctggctttga aaactctcat 120

tccatgggag cggatgtgga gcctgatgtt ggtgccgcct ctcctcgcca tattcttaat 180

gggtacattc atgattactt agtcaaatct aatatgcaaa atttggccga tcaatttgct 240

caagagtcgg atctcttaga aacagaccta acggtaccaa tggatacacc tacaggctat 300

cttttagagt ggtggatggt attttgggac cttttcaatg cccgcctaaa gcaacgaggt 360

tcacagaagg ctcatcagta tattcagttg aacatgctac gacaacaaca gcagaggact 420

atgcgaaata cagcccgtgt tcagaaagtc ccgttgagac cacacaccca atcatctcct 480

tcaatgtcac agacctttat tccacagcag cctcaacagc aagcacaggc acaggcacag 540

cagcacgccc aagctcaagc gcaagtccag gctcatcagc aagcacagca tcatgcgcag 600

gctcaagtgc caatgcaatc gcaaccacat cagcaaggag gccaaactca acaacagcaa 660

cccattaaca ctgggtctcc tgcggggcca aatgctatca actctcgtgt gcaacactta 720

gcgcaacaac agatgaatca tcttcgccag caggcaactg ccactaccca gcaacctatc 780

ccgcaacaga atattccatc aaaccagcag ggccctgcgg gcccttatcc tacatcgcct 840

tcaagaagac cgagattact gtctaacgaa tcgggtgcaa gtgcaccctc tgtaatgacg 900

aagtcacagc tccaaggagg tcctccatca caacaaccac accaacagca agctcagcag 960

gtaggacccc ccaatcaaca tcaaggccag tcctcttcct tttattcggg catgcctcct 1020

caaggagttg tggttcctca tcagttcaat cctcagcagt atgccaatat gctagcaaga 1080

caacagcatg tgcaagctca acaacaggtt cagttacagc aggttccaca tgtgcaacaa 1140

agacaacagc aagaccaaca acaacaccgc ttgtcagccg gttcaccagg gcatccttca 1200

tttggcgttt ttcaacaacc tcctccgatg tcaaaccata atcaggtcat gatcaaccag 1260

cagggagaaa ccttttttga tcctcattca ccatatgctc aacctaatgg gtacccccag 1320

ccacagcaac aacaacaaca gcagcaacaa caacaacaac aacaacaaca gcagcagcag 1380

cagcaacaac agaagcagca acagccacca ccaagacagc ctcagcgcca acaagcgatg 1440

gctacggctc ctttgcctca ttctacttct gcctcgggta ctcctcacac ggccaccaca 1500

cctagattct cccagcctgg tcctgtttat cagcagcctt tacctgcatc tcaaccgcaa 1560

cattctccgc ctacttctat tcagcaacag gaaccaattc caactcctgg gtcacaacat 1620

cagcaaatag cacaaccgca atcacagaat caacaccagc aaccgcagca acctcaagca 1680

agtgcttcta aaatggtggg tatacaggag taccagaaag agttaatgat gcttgagaag 1740

cagaacaaac aacgtcatga catggcaatt aagaagggaa gcggacattt ctctaatttt 1800

gatccaattc cagagcacac acagactgaa ccaaaattca atgtgaacgt aatgctccct 1860

ccccagaact ctgcagtggc cacgaagaat actcctggaa cttctcctgg tacgcaaact 1920

caaaacactg cacacagtac tggcaacact tctgctgggt ctacaccgaa taatgttgta 1980

ccagttcgaa aaaagaagga gccatctaaa aagaaatcaa agaaggctac cgaacctcca 2040

actcctacta ctccacagac accaattgca gctagggcac atcaaaactc tacgggcggc 2100

atttcaggta ataatgctgc tactaagcga cgaaaaaggg agccgctggt cgaccaaaca 2160

gtttcaccta accttaacga agcttcgaaa tcaacaaagc ctgggaaaat ctcatctcaa 2220

aatgacttta caggttctga caatggattt ttacaggatt ttggcgatgg aacaggtccc 2280

cccactggaa ctgacgatat ggagtttgat tttaacagtt ttctcaacaa cgaaactggt 2340

gaacctaata gttcaaccat tcattttgac aatgtattta attgggggga gggtactgaa 2400

gccggggatc tatag 2415

<210> 5
<211> 799
<212> PRT
<213> 釀酒酵母

<400> 5

Met Ser Tyr Lys Val Asn Ser Ser Tyr Pro Asp Ser Ile Pro Pro Thr
1 5 10 15

Glu Gln Pro Tyr Met Ala Ser Gln Tyr Lys Gln Asp Leu Gln Ser Asn
20 25 30

Ile Ala Met Ala Thr Asn Ser Glu Gln Gln Arg Gln Gln Gln Gln Gln
35 40 45

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Trp Ile Asn Gln Pro Thr Ala Glu Asn
50 55 60

Ser Asp Leu Lys Glu Lys Met Asn Cys Lys Asn Thr Leu Asn Glu Tyr
65 70 75 80

Ile Phe Asp Phe Leu Thr Lys Ser Ser Leu Lys Asn Thr Ala Ala Ala
85 90 95

Phe Ala Gln Asp Ala His Leu Asp Arg Asp Lys Gly Gln Asn Pro Val
100 105 110

Asp Gly Pro Lys Ser Lys Glu Asn Asn Gly Asn Gln Asn Thr Phe Ser
115 120 125

Lys Val Val Asp Thr Pro Gln Gly Phe Leu Tyr Glu Trp Trp Gln Ile
130 135 140

Phe Trp Asp Ile Phe Asn Thr Ser Ser Ser Arg Gly Gly Ser Glu Phe
145 150 155 160

Ala Gln Gln Tyr Tyr Gln Leu Val Leu Gln Glu Gln Arg Gln Glu Gln
165 170 175

Ile Tyr Arg Ser Leu Ala Val His Ala Ala Arg Leu Gln His Asp Ala
180 185 190

Glu Arg Arg Gly Glu Tyr Ser Asn Glu Asp Ile Asp Pro Met His Leu
195 200 205

Ala Ala Met Met Leu Gly Asn Pro Met Ala Pro Ala Val Gln Met Arg
210 215 220

Asn Val Asn Met Asn Pro Ile Pro Ile Pro Met Val Gly Asn Pro Ile
225 230 235 240

Val Asn Asn Phe Ser Ile Pro Pro Tyr Asn Asn Ala Asn Pro Thr Thr
245 250 255

Gly Ala Thr Ala Val Ala Pro Thr Ala Pro Pro Ser Gly Asp Phe Thr

260 265 270

Asn Val Gly Pro Thr Gln Asn Arg Ser Gln Asn Val Thr Gly Trp Pro
275 280 285

Val Tyr Asn Tyr Pro Met Gln Pro Thr Thr Glu Asn Pro Val Gly Asn
290 295 300

Pro Cys Asn Asn Asn Thr Thr Asn Asn Thr Thr Asn Asn Lys Ser Pro
305 310 315 320

Val Asn Gln Pro Lys Ser Leu Lys Thr Met His Ser Thr Asp Lys Pro
325 330 335

Asn Asn Val Pro Thr Ser Lys Ser Thr Arg Ser Arg Ser Ala Thr Ser
340 345 350

Lys Ala Lys Gly Lys Val Lys Ala Gly Leu Val Ala Lys Arg Arg Arg
355 360 365

Lys Asn Asn Thr Ala Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Asn Ala Cys Ser
370 375 380

Pro Asn Ile Thr Thr Pro Gly Ser Thr Thr Ser Glu Pro Ala Met Val
385 390 395 400

Gly Ser Arg Val Asn Lys Thr Pro Arg Ser Asp Ile Ala Thr Asn Phe
405 410 415

Arg Asn Gln Ala Ile Ile Phe Gly Glu Glu Asp Ile Tyr Ser Asn Ser
420 425 430

Lys Ser Ser Pro Ser Leu Asp Gly Ala Ser Pro Ser Ala Leu Ala Ser
435 440 445

Lys Gln Pro Thr Lys Val Arg Lys Asn Thr Lys Lys Ala Ser Thr Ser
450 455 460

Ala Phe Pro Val Glu Ser Thr Asn Lys Leu Gly Gly Asn Ser Val Val
465 470 475 480

Thr Gly Lys Lys Arg Ser Pro Pro Asn Thr Arg Val Ser Arg Arg Lys
485 490 495

Ser Thr Pro Ser Val Ile Leu Asn Ala Asp Ala Thr Lys Asp Glu Asn
500 505 510

Asn Met Leu Arg Thr Phe Ser Asn Thr Ile Ala Pro Asn Ile His Ser
515 520 525

Ala Pro Pro Thr Lys Thr Ala Asn Ser Leu Pro Phe Pro Gly Ile Asn
530 535 540

Leu Gly Ser Phe Asn Lys Pro Ala Val Ser Ser Pro Leu Ser Ser Val
545 550 555 560

Thr Glu Ser Cys Phe Asp Pro Glu Ser Gly Lys Ile Ala Gly Lys Asn
565 570 575

Gly Pro Lys Arg Ala Val Asn Ser Lys Val Ser Ala Ser Ser Pro Leu
580 585 590

Ser Ile Ala Thr Pro Arg Ser Gly Asp Ala Gln Lys Gln Arg Ser Ser
595 600 605

Lys Val Pro Gly Asn Val Val Ile Lys Pro Pro His Gly Phe Ser Thr
610 615 620

Thr Asn Leu Asn Ile Thr Leu Lys Asn Ser Lys Ile Ile Thr Ser Gln
625 630 635 640

Asn Asn Thr Val Ser Gln Glu Leu Pro Asn Gly Gly Asn Ile Leu Glu
645 650 655

Ala Gln Val Gly Asn Asp Ser Arg Ser Ser Lys Gly Asn Arg Asn Thr
660 665 670

Leu Ser Thr Pro Glu Glu Lys Lys Pro Ser Ser Asn Asn Gln Gly Tyr
675 680 685

Asp Phe Asp Ala Leu Lys Asn Ser Ser Ser Leu Leu Phe Pro Asn Gln
690 695 700

Ala Tyr Ala Ser Asn Asn Arg Thr Pro Asn Glu Asn Ser Asn Val Ala
705 710 715 720

Asp Glu Thr Ser Ala Ser Thr Asn Ser Gly Asp Asn Asp Asn Thr Leu
725 730 735

Ile Gln Pro Ser Ser Asn Val Gly Thr Thr Leu Gly Pro Gln Gln Thr
740 745 750

Ser Thr Asn Glu Asn Gln Asn Val His Ser Gln Asn Leu Lys Phe Gly
755 760 765

Asn Ile Gly Met Val Glu Asp Gln Gly Pro Asp Tyr Asp Leu Asn Leu
770 775 780

Leu Asp Thr Asn Glu Asn Asp Phe Asn Phe Ile Asn Trp Glu Gly
785 790 795

<210> 6
<211> 791
<212> PRT
<213> 釀酒酵母

<400> 6

Met Ser Tyr Lys Val Asn Ser Ser Tyr Pro Asp Ser Ile Pro Pro Thr
1 5 10 15

Glu Gln Pro Tyr Met Ala Ser Gln Tyr Lys Gln Asp Leu Gln Ser Asn
20 25 30

Ile Ala Met Ala Thr Asn Ser Glu Gln Gln Arg Gln Gln Gln Gln Trp
35 40 45

Ile Asn Gln Pro Thr Ala Glu Asn Ser Asp Leu Lys Glu Lys Met Asn
50 55 60

Cys Lys Asn Thr Leu Asn Glu Tyr Ile Phe Asp Phe Leu Thr Lys Ser
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asn Thr Ala Ala Ala Phe Ala Gln Asp Ala His Leu Asp
85 90 95

Arg Asp Lys Gly Gln Asn Pro Ile Asp Gly Pro Lys Ser Lys Glu Asn
100 105 110

Asn Gly Asn Gln Asn Thr Phe Ser Lys Val Val Asp Thr Pro Gln Gly

115 120 125

Phe Leu Tyr Glu Trp Trp Gln Ile Phe Trp Asp Ile Phe Asn Thr Ser
130 135 140

Ser Ser Arg Gly Gly Ser Glu Phe Ala Gln Gln Tyr Tyr Gln Leu Val
145 150 155 160

Leu Gln Glu Gln Arg Gln Glu Gln Ile Tyr Arg Ser Leu Ala Ala His
165 170 175

Ala Ala Arg Leu Gln His Asp Ala Glu Arg Arg Gly Glu Tyr Ser Asn
180 185 190

Glu Asp Ile Asp Pro Met His Leu Ala Ala Met Met Leu Gly Asn Pro
195 200 205

Met Ala Pro Ala Val Gln Met Arg Asn Val Asn Met Asn Pro Ile Pro
210 215 220

Ile Pro Met Val Gly Asn Pro Ile Val Asn Asn Phe Ser Ile Pro Pro
225 230 235 240

Tyr Asn Asn Ala Asn Pro Thr Thr Gly Ala Thr Ala Val Ala Pro Thr
245 250 255

Ala Pro Pro Ser Gly Asp Phe Ala Asn Val Gly Pro Thr Gln Asn Arg
260 265 270

Ser Gln Asn Val Thr Gly Trp Pro Val Tyr Asn Tyr Pro Met Gln Pro
275 280 285

Thr Thr Glu Asn Pro Val Gly Asn Pro Cys Asn Asn Asn Thr Thr Asn
290 295 300

Asn Thr Thr Asn Asn Lys Ser Pro Val Asn Gln Pro Lys Ser Leu Lys
305 310 315 320

Thr Met His Ser Thr Asp Lys Pro Asn Asn Val Pro Thr Ser Lys Ser
325 330 335

Thr Arg Ser Arg Ser Ala Thr Ser Lys Ala Lys Gly Lys Val Lys Ala
340 345 350

Gly Leu Val Ala Lys Arg Arg Arg Lys Asn Asn Thr Ala Thr Val Ser
355 360 365

Ala Gly Ser Thr Asn Ala Gly Ser Pro Asn Ile Thr Thr Pro Gly Ser
370 375 380

Thr Thr Ser Glu Pro Ala Met Val Gly Ser Arg Val Asn Lys Thr Pro
385 390 395 400

Arg Ser Asp Ile Ala Thr Asn Phe Arg Asn Gln Ala Ile Ile Phe Gly
405 410 415

Glu Glu Asp Ile Tyr Ser Asn Ser Lys Ser Ser Pro Ser Leu Asp Gly
420 425 430

Ala Ser Pro Ser Ala Leu Val Ser Lys Gln Pro Thr Lys Val Arg Lys
435 440 445

Asn Thr Lys Lys Ala Ser Thr Ser Ala Phe Pro Val Glu Ser Ala Asn
450 455 460

Lys Leu Gly Gly Asn Ser Val Val Thr Gly Lys Lys Arg Ser Pro Pro
465 470 475 480

Asn Thr Arg Val Leu Arg Arg Lys Ser Thr Pro Ser Val Ile Leu Asn
485 490 495

Ala Asp Ala Thr Lys Asp Glu Asn Asn Met Leu Arg Thr Phe Ser Asn
500 505 510

Thr Thr Ala Pro Asn Ile His Ser Ala Pro Pro Thr Lys Thr Ala Asn
515 520 525

Ser Leu Pro Phe Pro Gly Ile Asn Leu Gly Ser Phe Asn Lys Pro Ala
530 535 540

Val Ser Ser Pro Leu Ser Ser Val Thr Glu Ser Cys Phe Asp Pro Glu
545 550 555 560

Ser Gly Lys Ile Ala Gly Lys Asn Gly Pro Lys Arg Ala Val Asn Ser
565 570 575

Lys Val Ser Ala Ser Ser Pro Leu Ser Ile Ala Thr Pro Pro Ser Gly
580 585 590

Asp Ala Gln Glu Gln Arg Ser Ser Asn Val Pro Gly Asn Val Val Ile
595 600 605

Lys Pro Pro His Gly Phe Ser Thr Thr Asn Leu Asn Ile Thr Leu Lys
610 615 620

Ser Ser Lys Ile Ile Thr Ser Gln Asn Asn Thr Ala Phe Gln Glu Leu
625 630 635 640

Pro Asn Gly Gly Asn Ile Leu Glu Ala Gln Val Gly Asn Asp Ser Arg
645 650 655

Ser Ser Lys Gly Asn Arg Asp Thr Leu Ser Thr Pro Glu Glu Lys Lys
660 665 670

Pro Ser Ser Asn Asn Gln Gly Tyr Asp Phe Asp Ala Leu Lys Asn Ser
675 680 685

Ser Ser Leu Leu Phe Pro Asn Gln Ala Tyr Ala Ser Asn Asn Arg Thr
690 695 700

Pro Asn Glu Asn Ser Asn Val Ala Asp Glu Thr Ser Ala Ser Thr Asn
705 710 715 720

Asn Gly Asp Asn Asp Asn Thr Leu Ile Gln Pro Ser Ser Asn Val Gly
725 730 735

Thr Thr Leu Gly Pro Gln Gln Thr Ser Thr Asn Glu Asn Gln Asn Val
740 745 750

His Ser Gln Asn Leu Lys Phe Gly Asn Ile Gly Met Val Glu Asp Gln
755 760 765

Gly Pro Asp Tyr Asp Leu Asn Leu Leu Asp Thr Asn Glu Asn Asp Phe
770 775 780

Asn Phe Ile Asn Trp Glu Gly
785 790

<210> 7
<211> 768
<212> PRT
<213> 解脂耶氏酵母

<400> 7

Met Pro Ala Lys Ser Asp Lys Glu Leu Leu Asn Ala Tyr Ile Tyr Asp
1 5 10 15

Tyr Leu Leu Lys His Asn Met His Asp Ser Ala Arg Thr Phe Gly Ala
20 25 30

Glu Ala Lys Val Val Pro Asn Val Lys Lys Glu Asp Asp Lys Asp Leu
35 40 45

Pro Lys Pro Leu Ile Pro Ile Asp Ala Pro Gln Gly Phe Leu Tyr Glu
50 55 60

Trp Trp Ala Leu Phe Trp Asp Ile Tyr Ser Ala Arg Gly Ser Lys Gly
65 70 75 80

Gly Gly Ser Val Pro Ala Gln Gln Tyr Val Gln Gly Thr Met Arg Leu
85 90 95

Arg Gln Glu His Ala Ala Arg Ala Gln Leu Gln Gln Gln His Gln Ala
100 105 110

Gln Gln His Ala Gln Ala Gln Ala Ala Ala Gln Val Gln Gly Gln Ala
115 120 125

Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Asn Pro Thr Gln Gly Pro Gln Pro Gln
130 135 140

Gly His Met Gly Met Pro Gly Gln Gly Pro His Gln Pro Gly Gly Pro
145 150 155 160

Phe Met Asn Gly Asn Met Met Phe Pro Pro Gly Gln Met Arg Met Gly
165 170 175

Gln Leu Pro Gln His Leu Gln Gln Gln Gly Thr Gly Val Ala Gly Ala
180 185 190

Asn Pro Ser Asp Asp Ser Ser Ser Pro Gly Gly Thr Ser Pro Ala Lys
195 200 205

Arg Gln Arg Leu Ser Pro Asp Met Gly Gly Gln Ser His Pro Glu Gln
210 215 220

Gln Gly Gln His Met Met Gly Thr Pro Asn Pro Asn Asn Pro Val Phe
225 230 235 240

Asn Ser Gln Val Met Gln Gln Leu Lys Ala Ser Gln Gly Gln Met Pro
245 250 255

Asn Leu Gln Gln Gln Gln Gln Ala Gln Leu Gln Gln Tyr Ser Asn Thr
260 265 270

Leu Ser Leu Ala Gln Gln Arg Ala Met Met Asn Ala Lys Gly Gly Pro
275 280 285

Asn Gly Gln Pro Gly Gln Pro Gly Gln Pro Gly Gln Pro Gly Gln Pro
290 295 300

Gly Gln Pro Gly Gln Pro Gly Gln Pro Gly Gln Pro Leu Pro Met Gly
305 310 315 320

Tyr Glu Gly Met Glu Pro Gly Phe Met Gly Gly Asn Gly Leu Ile Leu
325 330 335

Asn Ala Gln Gln Met Arg Gln Gln Gln Ala Gly Ser Gly Gly Ala Ala
340 345 350

Gly Ser Gly Gln Leu Asn Gly Asn Ser Asn Ala Leu His Asp Tyr Gln
355 360 365

Met Gln Leu Met Leu Leu Glu Gln Gln Asn Lys Lys Arg Leu Met Val
370 375 380

Ala Arg Gln Glu Gln Gln Glu Gly Gln Pro Arg Ala Glu Gly Gln Ala
385 390 395 400

Ala Ala Ala Gly Ala Asn Pro Gly Ala Arg Met Ser Gly Gln Phe Lys
405 410 415

Arg Pro Gly Ser Ser Pro Val Val Gly Asn Ile Gly Asp Gly Arg Arg
420 425 430

Val Thr Pro Lys Leu Pro Asn Gln Pro Ser Pro Leu Ile Asp Ala Asn
435 440 445

Arg Ala Ser Pro Leu Gln Ser Asn Phe Asn Gly Gln Gly Asp Phe Asn
450 455 460

Val Val Val Gly Pro Ser Gly Gln Met Met Arg Met Gln Gln Pro Gln
465 470 475 480

Gln Gln Gly Gly Pro Pro Gln Gln Gln Gly Gln Gln Gln Gly Gly Pro
485 490 495

Gly Gln Gln Gln Gly Gly Pro Gly Gln Gln Pro Gln Gln Gly Gln Gln
500 505 510

Gln Gly Gln Gln Gly Gly Pro Gln Gly Gly Gln His Arg Phe Asp Asp
515 520 525

Pro Gln Gln Leu Pro Gln Ser Gln Asn Gly Gly Pro Gln Pro Gly Ser
530 535 540

Ala Pro Gly Gln Leu Pro Gln Thr Gln Gly Gly Pro Gln Arg Pro Pro
545 550 555 560

Ser Arg Val Ser Gln Met Pro Pro Pro Gly Val Gln Gly Gly Gln Arg
565 570 575

Thr Gln Pro Ser Ser Pro Gly Gln Ala Ser Asn Pro Gly Ser Gly Gly
580 585 590

Ser Ser Gly Ser Ala Pro Gly Gly Thr Thr Pro Thr Gln Ala Asn Lys
595 600 605

Gln Leu Lys Gly Lys Lys Ala Glu Pro Lys Lys Arg Ala Lys Lys Gly
610 615 620

Asn Gln Pro Val Thr Pro Lys Ala Val Ser Glu Ser Pro Thr Pro Thr
625 630 635 640

Thr Pro Ala Thr Pro Ser Ala Ala Ser Asn Gln Ser Leu Leu Ser Lys
645 650 655

Ala Thr Asn Phe Ala Ala Asn Asn Lys Gln Ala Gln Ala Ala Ala His
660 665 670

Ala Gln Ala Gln Ala Gln Ala Ala Ala Gln Ala Gln Ser Gln Met His
675 680 685

Met Gly Gly Met Gly Gly Ser Ser Ser Gly Leu Glu Leu Asp Val Asn
690 695 700

Gly Gly Met Gly Leu Asp Asn Asp Ser Ser Ser Phe Leu Asn Asp Phe
705 710 715 720

Ser Thr Gly Asn Glu Gly Asp Val Gly Asp Met Asp Phe Asp Phe Asn
725 730 735

Ser Phe Leu Asn Thr Asp Asp Asn Ala Ala Gly Ala Leu Lys Phe Asp
740 745 750

Ser Gly Ser Ala Phe Gly Trp Gly Glu Gly Val Glu Ala Met Asn Glu
755 760 765

<210> 8
<211> 598
<212> PRT
<213> 多形緒方酵母

<400> 8

Met Ser Gln Asn Ala Thr Pro Gln Thr Thr Glu Gly His Met Ser Met
1 5 10 15

Asn Asp Gln Gln Ser Asn Ser Ser Ser Gly Thr Asn Asn Thr Glu His
20 25 30

Pro Ser Ser Ser Ser Val Ser Ser Val Pro Thr Val Ser Asp Ser Thr
35 40 45

Ala Val Asn Ser Arg Glu Leu Leu Asn Ala Tyr Val Tyr Asp Phe Ile
50 55 60

Leu Lys Ser Gly Phe Thr Ala Thr Ala Ser Ala Phe Phe Lys Glu Ala
65 70 75 80

Asn Ile Pro Val Ile His Ser Glu Lys Arg Pro Thr Asn Ser Pro Ser
85 90 95

Ser Ser Ala Thr Gly Thr Ser Asp Leu Pro Ala Ser Phe Met Thr Met
100 105 110

Asp Ala Pro Gln Gly Phe Leu Tyr Glu Trp Trp Gln Ile Phe Trp Asp
115 120 125

Val Phe Asn Ala Arg Thr Gln Arg Gly Gly Thr Thr Asn Ala Thr Gln
130 135 140

Tyr Tyr His Tyr Val Asn Leu Lys Gln Lys Gln Asp His Leu Met Ser
145 150 155 160

Gln Gln Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Ser Thr Val Met Asn Gly Asn
165 170 175

Asn Thr Ser Met Ser Gly Ala Pro Val Thr Ser Ala Ala Gln Asp Ile
180 185 190

Gly Val Leu Met Pro Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala Gln Met
195 200 205

Ala His Pro Pro Gln Gln Val Pro Met Ala Gln Gln Gln Arg Val Asn
210 215 220

Ala Arg Met Gln Gln Pro Gln Gln Gln Gln Ser Gln Ser Met Pro Met
225 230 235 240

His Pro Gln Ala Ala Ala Gln Ala Gln Met Asn Thr Leu Arg Gln Gln
245 250 255

Gln Ile Ala Gln Gln Ala Gln Ala Ala Gln Val Ala Ala Gln Ala Val
260 265 270

Ser Gln Arg Gly Ser Pro Ser Lys Arg Gln Arg Met Asp Ala Ala Gly
275 280 285

Asn Gly Ser Ala Thr Glu Ile Asn Gln Thr Ser Ser Pro Asn Ile Ala
290 295 300

Met Asn Ser Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Pro Pro Met Pro
305 310 315 320

Met Pro Gln Gly Met Met Ile Pro Asn Gln Phe Gly Val Pro Gln Gln
325 330 335

Tyr Ala Met Phe Ala Ala Ala Gln Ala Ala Gln Gln Gly Gln Ser Gln
340 345 350

Gln Lys Phe Asn Gln Tyr Met Ile Pro Asn Phe Gln Asn Gln Pro Gln
355 360 365

Gln Pro Gln Gln Gln Met Leu Met His Gln Gln Met His Gln Gln Ser
370 375 380

Val His Met Gln His Asp Gln Gln His Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asn
385 390 395 400

Val Pro Gln His Ser Gln Thr Phe Ser Asn Pro Asn Asp Phe Phe His
405 410 415

Glu Met Pro Lys Gln Asn Asn Pro Gly Thr Ala Arg Val Asn Asp Thr
420 425 430

Ala Ile Lys Asp Tyr Glu Lys Gln Leu Arg Leu Met Glu Ser Gln Asn
435 440 445

Arg Arg Arg Leu Asp Val His Arg Asn Val Ser Asp Ser Lys Asp Pro
450 455 460

Asn Ser Pro Gly Ser Ala Gln Phe Thr Glu Tyr Ser Ala Met Leu Asn
465 470 475 480

Gln Met Pro Pro Gln His Ala Ala Ala Ser Ile Met Gln Gln Arg Ala
485 490 495

Ser Pro Ala Thr Lys Ala Ser Pro Thr Thr Lys Ser Pro Ala Asn Gly
500 505 510

Ala Pro Pro Ala Asn Gly Lys Gln Lys Lys Ala Pro Arg Lys Ala Arg
515 520 525

Lys Asn Ser Ser Ser Val Pro Ala Thr Pro Leu Thr Pro Ala Asn Asn
530 535 540

Gln Pro Thr Pro Gln Thr Asn Ile Pro Pro Thr Pro Gln Asn Thr Thr
545 550 555 560

Pro Gln Gln Thr Pro Gln Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ser Gln Val Met
565 570 575

Ala Gly Lys Lys Gly Ile Lys Arg Lys Asn Arg Gly Arg Ala Ile Tyr
580 585 590

Pro Ile Glu Tyr Ser Arg
595

<210> 9
<211> 771
<212> PRT
<213> 黑麴黴

<400> 9

Met Asn Gln Met Asn Gln Met Asn Met Ala Gly Met Asn Pro Gly Ala
1 5 10 15

Gly Gly Pro Val Gly Gly Val Pro Met Ile Asn Asn Gly Ser Ala Ala
20 25 30

Pro Arg Asn Glu Gln Asn Ile Asn Asn Ile Pro Glu Asn Met Ile Asn
35 40 45

Asn Leu Asn Thr Tyr Ile Tyr Asp Tyr Phe Leu Lys Arg Gly Tyr His
50 55 60

Asp Cys Ala Arg Ala Leu Val Lys Asp Glu Ser Ile Lys Leu Asn Thr
65 70 75 80

Glu Pro Pro Ile Lys Thr Ser Pro Gly His Arg Arg Asp Ala Asp Val
85 90 95

Asn Gly Val Asp Gly Asp Thr Met Met Thr Asp Gly Lys Asp Gly Asp
100 105 110

Lys Leu Lys Ile Pro Asp Asp Leu Pro Arg Pro Asn Leu Pro Ser Glu
115 120 125

Gly Gln Gln Ser Ser Phe Leu Leu Asp Trp Phe Ser Leu Phe Trp Asp
130 135 140

```
Phe Phe Trp Ala Gln Arg Lys Lys Gly Asn Ser Asn Asp Val Arg Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Leu Thr His Thr Gln Asn Met Met Arg Leu Arg Glu Gln His Gln
                165                 170                 175

Asn Gln Leu Leu Arg Gln Gln Pro Leu Met Asn Gly Gln Met Gly Gln
            180                 185                 190

Met Asn Ile Arg Arg Asn Gly Met Val Pro Pro Asn Leu Gln Lys Thr
        195                 200                 205

Val Leu Gln Asn Asn Thr Thr Gly Leu Ser Gln Gln Gln Leu Ala Gln
    210                 215                 220

Met His Lys Asn Gln Gln Val Gln Met Met Gln Gln Met Gln Arg Glu
225                 230                 235                 240

His Ser Asp Met Asp Met Asn Gly His Arg Pro Gln Ser Pro Ala Ser
                245                 250                 255

Ala Glu Asn Ala Pro Ser Pro Ser Lys Arg Pro Arg Leu Glu Gly Gly
            260                 265                 270

Pro Met Asn Gly Gln Gln Leu Ala Pro Asn Gly Arg Gly Gln Ala Gln
        275                 280                 285

Gly Ile Pro Gly Gln Pro Thr Pro Gln Ala Leu Leu Met Gln Asn Gly
    290                 295                 300

Leu Asn Arg Ala Met Asn Pro Asn Gln Phe Gln Ala Phe Gln Gln Ser
305                 310                 315                 320

Gly Pro Ala Ala Gln Gln Lys Gln Met Gln Gly Met Pro Asn Gly Met
                325                 330                 335

Met Asn Pro Ala Asn Val Met Ala Asn Pro Gln Thr Glu Met Val Ser
            340                 345                 350

Ile Pro Glu Gly Gln Val Tyr Pro Ile Asn Gly Asp Tyr Tyr Gly Ala
        355                 360                 365
```

Asn Gly Gln Met Ala Gln Val Arg Thr Gly Met Gln Thr Pro Gly Gly
370 375 380

Gln His Gly Asn His Ala Leu Gln Asp Tyr Gln Met Gln Leu Met Leu
385 390 395 400

Leu Glu Gln Gln Asn Lys Arg Arg Leu Met Met Ala Arg Gln Glu Gln
405 410 415

Asp Ser Met Ala Arg Pro Asp Gly Gln Pro Gln Met Pro Gly Gln Gln
420 425 430

Leu Pro Pro Gly Thr Ser Pro Gln Gly Ser Arg Ala Gly Thr Ser Pro
435 440 445

Asn Pro Asn Asp Gln Met Lys Arg Gly Thr Pro Lys Met Pro Gln Thr
450 455 460

Gly Leu Pro Gly Ser Pro Ser Ala Ala Asp Ala Met Ala Gln Gly Arg
465 470 475 480

Gly Ser Pro Ala Ser Met Asn Phe Pro Gly Gly Gln Met Pro Pro Glu
485 490 495

Met Ala Gly Pro Gln Phe Phe Val Lys Asn Met Ala Asp Gly Met Ala
500 505 510

Ala Pro Asn Gly Met Arg Pro Pro Ser Ser Asn Pro Ala Phe Ser Thr
515 520 525

Pro Gln Met Gly Gln Pro Ile Gln Ala Gly Ala Asn Arg Met Pro Asn
530 535 540

Gly Gly Trp Gln Pro Gln Gln Gly Ala Gln Gly Gln Pro Met Ala Pro
545 550 555 560

Gln Gln Ser Pro Ala Thr Gln Pro Gln Ser Thr Gly Thr Pro Gln Glu
565 570 575

Arg Asn Ala Met Pro Pro Pro Gln Ala Pro Pro Ala Pro Gly Ala Asn
580 585 590

Val Gly Arg Thr Gln Pro Pro Ser Pro Gln Thr Ala Ala Pro Pro Thr
595 600 605

Pro Gln Gln Gly Asn Lys Pro Ala Pro Lys Lys Lys Glu Thr Lys Asp
610 615 620

Ser Arg Lys Arg Pro Lys Lys Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
625 630 635 640

Gln Ala Asn Thr Ala Ala Thr Pro Ser Ser Glu Ala Glu His Pro Pro
645 650 655

Thr Pro Thr Pro Ser Thr Pro Ile Thr Pro Gln His Pro Asn Ser Phe
660 665 670

Asn Lys Thr Gly Ala Asn Ala Thr Thr Ser Ala Pro Gln Gln Pro Thr
675 680 685

Ser Ala Pro Ala Pro Pro Pro Leu Val Gln Gln Pro Pro Asp Gln Thr
690 695 700

Gln Gln Pro Phe Asn Glu Leu Ser Ile Pro Asp Ala Ser Ala Phe Asn
705 710 715 720

Leu Asp Phe Ser Ala Leu Glu Asn Pro Asp Ile Leu Glu Asn Phe Asp
725 730 735

Phe Asp Thr Phe Leu Asn Thr Asp Ala Asp Thr Ala Gly Phe Gly Phe
740 745 750

Asp Pro Asn Thr Ser Tyr Pro Thr Asp Gly Val Glu Thr Gly Ala Gly
755 760 765

Asp Gly Leu
770

<210> 10
<211> 1240
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 10

caaacatttg ctccccctag tctccaggga aatgtaaaat atactgctaa tagaaaacag 60

taagacgctc agttgtcagg ataattacgt tcgactgtag taaaacagga atctgtattg 120

ttagaaagaa cgagagtttt ttacggcgcc gccatattgg gccgtgtgaa aacagcttga 180

aaccccacta ctttcaaagg ttctgttgct atacacgaac catgtttaac caacctcgct 240

tttgacttga ctgaagtcat cggttaacaa tcaagtaccc tagtctgtct gaatgctcct 300

ttccatattc agtaggtgtt tcttgcactt ttgcatgcac tgcggaagaa ttagccaata 360

gcgcgtttca tatgcgcttt taccccctct tttgtcaagc gcaaaatgcc tgtaagattt 420

ggtgggggtg tgagccgtta gctgaagtac aacaggctaa ttccctgaaa aaactgcagc 480

tcagggattc ccactatttg gtattctgat atgtttttcc tgatatgcat caaaactcta 540

atctaaaacc tgaatctccg ctatttttt ttttttttga tgaccccgtt ttcgtgacaa 600

attaatttcc aacggggtct tgtccggata agagaatttt gtttgattat ccgttcggat 660

aaatggacgc ctgctccata tttttccggt tattacccca cctggaagtg cccagaattt 720

tccggggatt acggataata cggtggtctg gattaattaa tacgagatct cagggattcc 780

cactatttgg tattctgata tgtttttcct gatatgcatc aaaactctaa tctaaaacct 840

gaatctccgc tatttttttt ttttttgat gaccccgttt tcgtgacaaa ttaatttcca 900

acggggtctt gtccggataa gagaattttg tttgattatc cgttcggata aatggacgcc 960

tgctccatat ttttccggtt attaccccac ctggaagtgc ccagaatttt ccggggatta 1020

cggataatac ggtggtctgg attaattaat acgccaagtc ttacattttg ttgcagtctc 1080

gtgcgagtat gtgcaataat aaacaagatg agccaattta ttggattagt tgcagcttga 1140

ccccgccata gctaggcata gccaagtgct atgggtgtta gatgatgcac ttggatgcag 1200

tgagttttgg agtataaaag atccttaaaa ttccaccctt 1240

<210> 11
<211> 1425
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 11
caaacatttg ctccccctag tctccaggga aatgtaaaat atactgctaa tagaaaacag 60

taagacgctc agttgtcagg ataattacgt tcgactgtag taaaacagga atctgtattg 120

ttagaaagaa cgagagtttt ttacggcgcc gccatattgg gccgtgtgaa aacagcttga 180

aaccccacta ctttcaaagg ttctgttgct atacacgaac catgtttaac caacctcgct 240

tttgacttga ctgaagtcat cggttaacaa tcaagtaccc tagtctgtct gaatgctcct 300

ttccatattc agtaggtgtt tcttgcactt ttgcatgcac tgcggaagaa ttagccaata 360

gcgcgtttca tatgcgcttt tacccccctct tttgtcaagc gcaaaatgcc tgtaagattt 420

ggtgggggtg tgagccgtta gctgaagtac aacaggctaa ttccctgaaa aaactgcagc 480

tcagggattc ccactatttg gtattctgat atgtttttcc tgatatgcat caaaactcta 540

atctaaaacc tgaatctccg ctatttttt ttttttgat gaccccgttt tcgtgacaaa 600

ttaatttcca acggggtctt gtccggataa gagaattttg tttgattatc cgttcggata 660

aatggacgcc tgctccatat ttttccggtt attaccccac ctggaagtgc ccagaatttt 720

ccggggatta cggataatac ggtggtctgg attaattaat acgccaagtc ttacattttg 780

ttgcagtctc gtgcgagtat gtgcaataat aaacaagatg agccaattta ttggattagt 840

tgcagcttga ccccgccata gctaggcata gccaagtgct atgggtgtta gatgatgcac 900

ttggatgcag tgagttttgg agtataaaag atccttaaaa ttccaccctt agatctcagg 960

gattcccact atttggtatt ctgatatgtt tttcctgata tgcatcaaaa ctctaatcta 1020

aaacctgaat ctccgctatt ttttttttt ttgatgaccc cgttttcgtg acaaattaat 1080

ttccaacggg gtcttgtccg gataagagaa ttttgtttga ttatccgttc ggataaatgg 1140

acgcctgctc catatttttc cggttattac cccacctgga agtgcccaga attttccggg 1200

gattacggat aatacggtgg tctggattaa ttaatacgcc aagtcttaca ttttgttgca 1260

gtctcgtgcg agtatgtgca ataataaaca agatgagcca atttattgga ttagttgcag 1320

cttgaccccg ccatagctag gcatagccaa gtgctatggg tgttagatga tgcacttgga 1380

tgcagtgagt tttggagtat aaaagatcct taaaattcca ccctt 1425

<210> 12
<211> 966
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<220>
<221> misc_特徵
<222> (592)..(593)
<223> n為T或不存在

<400> 12
caaacatttg ctccccctag tctccaggga aatgtaaaat atactgctaa tagaaaacag 60

taagacgctc agttgtcagg ataattacgt tcgactgtag taaaacagga atctgtattg 120

ttagaaagaa cgagagtttt ttacggcgcc gccatattgg gccgtgtgaa aacagcttga 180

aaccccacta ctttcaaagg ttctgttgct atacacgaac catgtttaac caacctcgct 240

tttgacttga ctgaagtcat cggttaacaa tcaagtaccc tagtctgtct gaatgctcct 300

ttccatattc agtaggtgtt tcttgcactt ttgcatgcac tgcggaagaa ttagccaata 360

gcgcgtttca tatgcgcttt tacccccctct tttgtcaagc gcaaaatgcc tgtaagattt 420

ggtgggggtg tgagccgtta gctgaagtac aacaggctaa ttccctgaaa aaactgcaga 480

tagacttcaa gatctcaggg attcccacta tttggtattc tgatatgttt ttcctgatat 540

gcatcaaaac tctaatctaa aacctgaatc tccgctattt ttttttttt tnngatgacc 600

ccgttttcgt gacaaattaa tttccaacgg ggtcttgtcc ggataagaga attttgtttg 660

attatccgtt cggataaatg gacgcctgct ccatattttt ccggttatta ccccacctgg 720

aagtgcccag aattttccgg ggattacgga taatacggtg gtctggatta attaatacgc 780

caagtcttac attttgttgc agtctcgtgc gagtatgtgc aataataaac aagatgagcc 840

aatttattgg attagttgca gcttgacccc gccatagcta ggcatagcca agtgctatgg 900

gtgttagatg atgcacttgg atgcagtgag ttttggagta taaaagatcc ttaaaattcc 960

accctt 966

<210> 13
<211> 1000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 13
gtaaatagcg gcagcaatcc agtaaccttt tctgaatagc agagccttaa ctaaaataat 60

ggccagggta aaaaattcga aatttgacac caaaaataaa gacttgtcgt tataagtctt 120

aacaaagtcc gcaattttgg agctaacggt ggcggttgct gggatattca ataatggtag 180

aatgttgctg cgggtatatg acagagcgtg aaacacactg aacaaggtaa atggaacaac 240

agcaattgca atatgggggga ggatagtcaa gaacaaagca gcaatggcaa agtactgaat 300

attctccaaa gccaaaaggt ccagtggttt caacgacaaa gtcttgttgg tatagctttg 360

gaacaaaagg acaccgaaag actcgacagc gcccacaaat acagcgttgt agaagaacga 420

attgattgct ccagagcttc taatagtcag aagatacccc aaacctccga gcaacgttag 480

cacatgacct aagaaccagg cgaagtgaag agtctggaat aacgacaccc agtcagtttt 540

tcctgagctc ctggtgggat tggtagaagc atttgatttg cttggagtgg ttttatttga 600

agatggtgtt gaagccattg ttgctaaaga gtcggagttt tgcttttagg gtttgttaag 660

caaaggagga aaaactgcgc cgtttgaagt cccaggtagt ttcgcgtgtg aggccagcca 720

gggaaagctt ccttcggtac tttttttttct tttgcaggtt ccggacggat taagcttcgg 780

gttatgaggg gggcggtagc caattccgga cacaatattg cgtcgcagct agtcaccccg 840

ccataaatat acgcaggatt gaggtaataa catcgatagt cttagtaatt aatacaattc 900

agtggcgaat ttggcaacat gacgtaaggc ccactgttgt ctataaaagg ggatgaattt 960

tcatgttttt gaggcctccc ggacaattta ttgaactcaa 1000

<210> 14
<211> 1000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 14
tggactgttc aatttgaagt cgatgctgac gatgtcaaga gagatgctca attatatttg 60

tcatttgctg gttacactgg aaacgctact tttgttggcg gaaactctac cagtttggcc 120

gtccatgtaa acgatgtcgt tctgggccgt gaccgtttca acacgaacat aaccaatgac 180

aaatccactt acaggtctag ttcatatgga ggcaattggt accttacttc tttggatgtc 240

ccaagtgggg ctttaacgtc tggtactaac aatgtctcgt ttgtcactac aaactccgag 300

gtaaataaag gattcttgtg ggattctctc aagtttgttt ggaagttgta acaggtttat 360

aagcatatcg tgcgcttgtc cacaattgaa tcatttattg ttgcgagata catgaacaaa 420

gtgtgaactg ggacccatta ctacaattcc cacgcaaccg ttgtttcaaa gcccatattt 480

tttgacaatt gtttcgttac acccccagtt tgatgtacat cgcttgcaat gatgtgtgtc 540

ccggagtatt ttccatattc agcttgaatt cgtatactca accaatatct gggggtatac 600

ttttatgtaa cctatacaaa tcaactatac tatttcacct ttcgaccaat catctcccat 660

cttgttaagt tttgcttcct atatccctga ccctgacatc acccatgatt ccgctcaacg 720

gttctcctct acatcgtccc tcttttggag agggtgttca gtttgacatt caaattaccc 780

cccgccatca cgcgcaaccg agaccgcacc cccgaatttt cacaaattac cccacaccct 840

atactccacc actatgaggg ttattagaac tgatcacgta taaataccac cgcaagttcc 900

caagggatcg tgttcttctt ctccaattgc aatcatattt ctgactcttt ctagttcaga 960

ttaattcctt tacacttgct tttttccctt acctttatcc 1000

<210> 15
<211> 1001
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 15
agaccagcag tttaactacg caaatccaca ggaatttcta catcacaata ccaatggtaa 60

taccacgacg tcaaggaatg gaaacgacga cttggaggaa gacttcgtca acctcttgcg 120

gagtacccga ggctaagaca ataagaagaa aaaaaaaaga aaagcggtgg gggagggatt 180

attaaataag gattatgtaa ccccagggta ccgttctata catatttaag gattatttag 240

gacaatcgat gaaatcggca tcaaactgga tgggagtata gtgtccggat aatcggataa 300

atcatcttgc gaggagccgc ttggttggtt ggtgagagga gtgaaatatg tgtctcctca 360

cccaagaatc gcgatatcag caccctgtgg gggacactat tggcctccct cccaaacctt 420

cgatgtggta gtgctttatt atattgatta cattgattac atagctaaac cctgcctggt 480

tgcaagttga gctccgaatt ccaatattag taaaatgcct gcaagataac ctcggtatgg 540

cgtccgaccc cgcttaatta ttttaactcc tttccaacga ggacttcgta atttttgatt 600

agggagttga gaaacggggg gtcttgatac ctcctcgatt tcagatccca ccccctctca 660

gtcccaagtg ggacccccct cggccgtgaa atgcgcgcac tttagttttt ttcgcatgta 720

aacgccggtg tccgtcaatt aaaagtcgca gactagggtg aactttacca tttttgtcgc 780

actccgtctc ctcggaatag gggtgtagta attctgcagt agtgcaattt ttaccccgcc 840

aaggggggggc gaaaagagac gacctcatca cgcattctcc agtcgctctc tacgcctaca 900

gcaccgacgt agttaacttt ctcccatata taaagcaatt gccattcccc tgaaaacttt 960

aacctctgct ttttcttgat ttttccttgc ccaaagaaaa g 1001

<210> 16
<211> 1000

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 16
ctgcacaacc attgccagta aggacgaaga gaaggcccca ctacccaaaa ttcaggataa 60

cgtcttcata ccatgcagcg acgcctacaa gacgctgtca agacatgcca acttcaacga 120

agtgaacttt aacacattga tcgggaaatt gaccaccaag ggaatgctgg ttgaggctgg 180

aagcgttgcc agtgtcctga gggaactgga ccgaaagttt agtaatgcat aagaggatat 240

atataggaat gcagtaataa tattagtacc cattaagtgg gctaagccat tggaaggccg 300

tctgactgat ggtggtgttc ttctcattta gatagtgcat ttgcaactac cgtctgagat 360

tgagtttgat gtgaagctcc agcgccaaaa cagtataaga accttatctc cgcattattg 420

ttcttgcgta aaagtttgtg tgaagaaaca ggggtagttg cgcagattag ttgtaatatg 480

cgcataggat gggtcattga cttctttcct cgaaagagcc acaccgttag ctaaaaaagg 540

acgcgcatct accccaaaat agaatgtggg gaaataggac gcgcaacttc ctctcaatca 600

ctggacgtca gaaaaacaaa tgcgcaatcg agtcaccctc cgtgataccc tccgtgatac 660

cccctctccg tctattctga cagcgtctcc ccatgacgtt tcaatctact tagaaaagat 720

ttcgtttttt tttccttcaa ttacacgatc tcatcttctg caagggtctg gaggacatca 780

ccaatctgcg actccataac ttagtcctga gtttatattt acgcttcatc tgatgagtag 840

gaagaaaaag tttcacgaaa ttcccccgcc aacttgccct tcggaataag cagccactct 900

ccttctgccc atagtaagct tgcgcgaggc cccaacttgg ccagaaactt taaatatgcc 960

aaacaatctc ccccaatcta agttctccct cttctaaaaa 1000

<210> 17
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 調控區

<400> 17
ataaatgga 9

<210> 18
<211> 15
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 調控區

<400> 18
catatttttc cggtt 15

<210> 19
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 19
tatttttttt ttttt 15

<210> 20
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 20
ttttttttt ttttt 15

<210> 21
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 21
tatttttttt tttttt 16

<210> 22
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 22
ttttttttt tttttt 16

<210> 23
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 23
tatttttttt ttttttt 17

<210> 24
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 24
ttttttttt ttttttt 17

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 25
tatttttttt tttttttt 18

<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 26
ttttttttt tttttttt 18

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 27

tatttttttt tttttttt 19

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 28
ttttttttt tttttttt 19

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 29
tatttttttt ttttttttt 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 30
ttttttttt ttttttttt 20

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 31
tatttttttt ttttttttt t 21

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 模體

<400> 32
ttttttttt ttttttttt t 21

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 33
tatttttttt ttttttttt tt 22

<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 模體

<400> 34
ttttttttt ttttttttt tt 22

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 主要調控區

<400> 35
ataaatggac gcctgctcca tatttttccg gtt 33

<210> 36
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 間隔子核心區

<400> 36
cgcctgctc 9

<210> 37
<211> 255
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 間隔子主要區

<400> 37
attaccccac ctggaagtgc ccagaatttt ccggggatta cggataatac ggtggtctgg 60

attaattaat acgagatctc agggattccc actatttggt attctgatat gtttttcctg 120

atatgcatca aaactctaat ctaaaacctg aatctccgct ttttttttt ttttgatga 180

ccccgttttc gtgacaaatt aatttccaac ggggtcttgt ccggataaga gaattttgtt 240

tgattatccg ttcgg 255

<210> 38
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 轉譯啟始位點

<400> 38
ttccaccctt 10

<210> 39
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 轉譯啟始位點

<400> 39
ttcgaaacg 9

<210> 40
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 轉譯啟始位點

<220>
<221> misc_特徵
<222> (7)..(7)
<223> 位置7處之R為A或G，較佳為A

<400> 40
gccgccrcc 9

<210> 41
<211> 859
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 41
ggaatctgta ttgttagaaa gaacgagagt tttttacggc gccgccatat tgggccgtgt 60

gaaaacagct tgaaacccca ctactttcaa aggttctgtt gctatacacg aaccatgttt 120

aaccaacctc gcttttgact tgactgaagt catcggttaa caatcaagta ccctagtctg 180

tctgaatgct cctttccata ttcagtaggt gtttcttgca cttttgcatg cactgcggaa 240

gaattagcca atagcgcgtt tcatatgcgc ttttaccccc tcttttgtca agcgcaaaat 300

gcctgtaaga tttggtgggg gtgtgagccg ttagctgaag tacaacaggc taattccctg 360

aaaaaactgc agatagactt caagatctca gggattccca ctatttggta ttctgatatg 420

tttttcctga tatgcatcaa aactctaatc taaaacctga atctccgcta ttttttttt 480

ttttttgatg accccgtttt cgtgacaaat taatttccaa cggggtcttg tccggataag 540

agaattttgt ttgattatcc gttcggataa atggacgcct gctccatatt tttccggtta 600

ttaccccacc tggaagtgcc cagaattttc cggggattac ggataatacg gtggtctgga 660

ttaattaata cgccaagtct tacattttgt tgcagtctcg tgcgagtatg tgcaataata 720

aacaagatga gccaatttat tggattagtt gcagcttgac cccgccatag ctaggcatag 780

ccaagtgcta tgggtgttag atgatgcact tggatgcagt gagttttgga gtataaaaga 840

tccttaaaat tccaccctt 859

<210> 42
<211> 664
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 42
ccatattcag taggtgtttc ttgcactttt gcatgcactg cggaagaatt agccaatagc 60

gcgtttcata tgcgctttta ccccctcttt tgtcaagcgc aaaatgcctg taagatttgg 120

tgggggtgtg agccgttagc tgaagtacaa caggctaatt ccctgaaaaa actgcagata 180

gacttcaaga tctcagggat tcccactatt tggtattctg atatgttttt cctgatatgc 240

atcaaaactc taatctaaaa cctgaatctc cgctattttt ttttttttt tgatgacccc 300

gttttcgtga caaattaatt tccaacgggg tcttgtccgg ataagagaat tttgtttgat 360

tatccgttcg gataaatgga cgcctgctcc atatttttcc ggttattacc ccacctggaa 420

gtgcccagaa ttttccgggg attacggata atacggtggt ctggattaat taatacgcca 480

agtcttacat tttgttgcag tctcgtgcga gtatgtgcaa taataaacaa gatgagccaa 540

tttattggat tagttgcagc ttgaccccgc catagctagg catagccaag tgctatgggt 600

gttagatgat gcacttggat gcagtgagtt ttggagtata aaagatcctt aaaattccac 660

cctt 664

<210> 43
<211> 493
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 43
ctgcagatag acttcaagat ctcagggatt cccactattt ggtattctga tatgttttc 60

ctgatatgca tcaaaactct aatctaaaac ctgaatctcc gctatttttt ttttttttt 120

gatgaccccg ttttcgtgac aaattaattt ccaacggggt cttgtccgga taagagaatt 180

ttgtttgatt atccgttcgg ataaatggac gcctgctcca tatttttccg gttattaccc 240

cacctggaag tgcccagaat tttccgggga ttacggataa tacggtggtc tggattaatt 300

aatacgccaa gtcttacatt ttgttgcagt ctcgtgcgag tatgtgcaat aataaacaag 360

atgagccaat ttattggatt agttgcagct tgaccccgcc atagctaggc atagccaagt 420

gctatgggtg ttagatgatg cacttggatg cagtgagttt tggagtataa aagatcctta 480

aaattccacc ctt 493

<210> 44
<211> 370
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 44
gaccccgttt tcgtgacaaa ttaatttcca acggggtctt gtccggataa gagaattttg 60

tttgattatc cgttcggata aatggacgcc tgctccatat ttttccggtt attaccccac 120

ctggaagtgc ccagaatttt ccggggatta cggataatac ggtggtctgg attaattaat 180

acgccaagtc ttacattttg ttgcagtctc gtgcgagtat gtgcaataat aaacaagatg 240

agccaattta ttggattagt tgcagcttga ccccgccata gctaggcata gccaagtgct 300

atgggtgtta gatgatgcac ttggatgcag tgagttttgg agtataaaag atccttaaaa 360

ttccaccctt 370

<210> 45
<211> 328
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 啟動子

<400> 45
ccggataaga gaattttgtt tgattatccg ttcggataaa tggacgcctg ctccatattt 60

ttccggttat taccccacct ggaagtgccc agaattttcc ggggattacg gataatacgg 120

tggtctggat taattaatac gccaagtctt acattttgtt gcagtctcgt gcgagtatgt 180

gcaataataa acaagatgag ccaatttatt ggattagttg cagcttgacc ccgccatagc 240

taggcatagc caagtgctat gggtgttaga tgatgcactt ggatgcagtg agttttggag 300

tataaaagat ccttaaaatt ccaccctt 328

<210> 46
<211> 1000
<212> DNA
<213> 巴斯德畢赤酵母

<400> 46
ctgctactct ggtcccaagt gaaccacctt ttggacccta ttgaccggac cttaacttgc 60

caaacctaaa cgcttaatgc ctcagacgtt ttaatgcctc tcaacacctc caaggttgct 120

ttcttgagca tgcctactag gaactttaac gaactgtggg gttgcagaca gtttcaggcg 180

tgtcccgacc aatatggcct actagactct ctgaaaaatc acagttttcc agtagttccg 240

atcaaattac catcgaaatg gtcccataaa cggacatttg acatccgttc ctgaattata 300

gtcttccacc gtggatcatg gtgttccttt ttttcccaaa gaatatcagc atcccttaac 360

tacgttaggt cagtgatgac aatggaccaa attgttgcaa ggtttttctt tttctttcat 420

cggcacattt cagcctcaca tgcgactatt atcgatcaat gaaatccatc aagattgaaa 480

tcttaaaatt gccccttca cttgacagga tccttttttg tagaaatgtc ttggtgtcct 540

cgtccaatca ggtagccatc tctgaaatat ctggctccgt tgcaactccg aacgacctgc 600

tggcaacgta aaattctccg gggtaaaact taaatgtgga gtaatggaac cagaaacgtc 660

tcttcccttc tctctccttc caccgcccgt taccgtccct aggaaatttt actctgctgg 720

agagcttctt ctacggcccc cttgcagcaa tgctcttccc agcattacgt tgcgggtaaa 780

acggaggtcg tgtacccgac ctagcagccc agggatggaa aagtcccggc cgtcgctggc 840

aataatagcg ggcggacgca tgtcatgaga ttattggaaa ccaccagaat cgaatataaa 900

aggcgaacac ctttcccaat tttggtttct cctgacccaa agactttaaa tttaatttat 960

ttgtccctat ttcaatcaat tgaacaacta tcaaaacaca 1000

<210> 47
<211> 756
<212> PRT
<213> 巴斯德畢赤酵母

<400> 47

Met Ile Pro Thr Ile Asp Pro Lys Asp Pro Glu Leu Val Ser Glu Asp
1 5 10 15

Thr Ala Gln Ser Ala Ser Ala Arg Lys Arg Ser Lys Val Ser Arg Ala
20 25 30

Cys Asp Glu Cys Arg Arg Lys Lys Ile Lys Cys Asp Ala Thr Phe Leu
35 40 45

Ala Asn Ser Asn Thr Leu Leu Lys Pro Cys Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr
50 55 60

Asn Cys Ser Cys Ser Phe Thr Arg Val Pro Leu Lys Arg Gly Pro Ser
65 70 75 80

Lys Gly Phe Ala Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Arg Arg Arg Ser Ser
85 90 95

Ser Val His Ser Val Ser Ser Ser Gln Ser Val Thr Ser Pro Val Pro
100 105 110

Ser His Ala Ser Leu Pro Ile Pro Pro Ala Asn Pro Val Ser Leu Pro
115 120 125

Arg Leu Asn Val Pro Gly Asp Gly Leu Leu Ser Pro Lys Ala Val Pro
130 135 140

Pro Thr Asn Leu Phe Trp Lys Val Pro Tyr Glu Leu Pro Ser Phe Ser
145 150 155 160

Asp Arg Arg Ser Ser Val Ala Ser Ala Asp Ser Phe Arg Arg Pro Ser
165 170 175

Ile Tyr Gln Ser Asp Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Ser Ala Thr Gly Ser
180 185 190

Gln Arg Asn Ser Ile Ser Gln Ala Pro Arg Gln Arg Asn Leu Ser Pro
195 200 205

Ala Leu Ser Val Ser Ser Thr Ser Ser Leu Asn Asn Arg Ile Lys Ser
210 215 220

Leu Asn Met Val Ala Ser Thr Leu Glu Ser Asn Ile His Asn Tyr Tyr
225 230 235 240

Ser Gln Gly Phe Asn Ser Ser Leu Pro Ile Leu Pro Leu Asp Glu Arg
245 250 255

Ile Leu Ser Thr Leu Leu Ser Asn Val Ser Asn Gly Ser Ser Ser Ala
260 265 270

Ser Trp Asp Ala Ile Arg Ser Pro Ile Leu Glu Leu Phe Asp Lys Ser
275 280 285

Ile Leu Met Leu Leu Arg Ser Tyr Glu Ser Gln Phe Asn Phe Asn Asp
290 295 300

Leu Leu Asp His Val Thr Glu Met Gln Ser Ile Tyr Pro Arg Ile Arg
305 310 315 320

Ser His Leu Leu Ser Asp Glu Leu Leu Lys Leu Ile Phe Leu Met Ser
325 330 335

Gly Val Leu Thr Asp Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Gly Gln Pro Tyr Ser
340 345 350

Thr Gly Leu Ser Ile Thr Val Ser Val Phe Asn Asp Trp Lys Thr Tyr
355 360 365

Glu Asn Val Gln Arg Val Leu Val Ile Asn Arg Ala Gly Ser Leu Asp
370 375 380

Leu Asp Tyr Asp Ser Leu Pro Phe Leu Phe Ala Arg Cys Tyr Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ala Thr Leu Asp Leu Ile Tyr Ser Leu Ser Phe Ser Ser Pro Arg
405 410 415

Leu Ile Ser Ser Phe Ala Asn Leu Pro Ile Leu Asp Ile Val Gln Lys
420 425 430

Cys Gly Ile Thr Lys Asp Ala Lys Leu Asp Glu Thr Pro Leu Pro Val
435 440 445

Leu Asp Gln Phe Leu Asn Cys Phe Leu Pro Gly Asp Thr Tyr Pro Thr
450 455 460

Ala Leu Asn Thr Leu Lys Thr Gly Leu Val Leu Leu Asp Phe Thr Asn
465 470 475 480

Asn Arg Ser Thr Thr Leu Arg Phe Pro Phe Ile Asn Ile His Asp Asp
485 490 495

Asn His Met Thr Gly Leu Ser His Leu Leu Ser Asn Val Ser Asp Phe
500 505 510

Met Ser Gln Phe Thr Glu Val His Ser Asp Ser Lys Asp Ser Gln Leu
515 520 525

Leu Phe Leu Arg Cys Ile Trp Ala Phe Trp Glu Ile Gly Ser Val Leu
530 535 540

Ser Glu Leu Ile Asp His Phe Ile Ser Ser Ser Ala Asn Ser Gln Val
545 550 555 560

Gly Asp Lys Asp Ala Ser Phe Phe Tyr Glu His Gln Leu Lys Val Thr
565 570 575

Thr Leu Leu Gly Thr Phe Ser Asn Ile Ala Ser Ala Phe Leu Thr Ser
580 585 590

Ser Thr Thr Ala Ala Ser His Pro Pro Pro Ser Ile Ser Pro Phe His
595 600 605

Ile Ile Ser Met Val Glu Ser Phe Lys Met Val Gln Phe Leu Asn Lys
610 615 620

Leu Ile Ala Ser Phe Ile Ser Leu Asn Glu Lys Leu Glu Lys Arg Glu
625 630 635 640

Leu Glu Asp Glu Leu Ser Lys Cys Lys Glu Glu Leu Asn Asn Leu Asn
645 650 655

Glu Arg Phe Gln Ala Val Ser Ser Val Gln Thr Leu Pro Val Val His
660 665 670

Val Leu Phe Arg Asp Leu Val Phe Ser Ser Asn Arg Leu Asp Thr Gln
675 680 685

Arg Asp Arg Ala Ser Ser Val Val Ser Ala Thr Thr Thr Thr Ser Thr
690 695 700

Ala Thr Thr Thr Ala Thr Thr Lys Lys Ser Ser Phe Gly Asn Leu Leu
705 710 715 720

His Ser Asp Glu Glu Asn Ile Leu Pro Thr Val Ile Asp Trp Cys Lys
725 730 735

Glu Gln Lys His Ser Ala Glu Met Phe Leu Asn Lys Asn Asp Leu Asn
740 745 750

Gly Trp Leu Tyr
755

<210> 48
<211> 1036
<212> PRT
<213> 巴斯德畢赤酵母

<400> 48

Met Met Pro Glu Glu Gln Val Thr Ser Pro Gln Arg Lys His Gln Lys
1 5 10 15

Ser Lys Ala Lys Thr Ile Arg Ala Pro Gly Ser Ser Ile Glu Arg Val
20 25 30

Ala Gln Ala Cys Asp Arg Cys Arg Ser Lys Lys Thr Arg Cys Asp Gly
35 40 45

Lys Arg Pro Gln Cys Ser Gln Cys Ala Ala Val Gly Phe Glu Cys Lys
50 55 60

Ile Ser Asp Lys Leu Ser Arg Arg Ala Phe Pro Arg Gly Tyr Thr Glu
65 70 75 80

Thr Leu Glu Glu Arg Ile Arg Glu Leu Glu Phe Glu Asn Lys Lys Leu
85 90 95

His Lys Leu Ile Asp Leu Lys Asn Glu Gln Val Glu Ile Lys Asn Arg
100 105 110

Ile Asp Gln Glu Ser Thr Leu Thr Asn Glu Asn Leu Thr Leu Leu Asn
115 120 125

Lys Glu Gln Glu Val Ser His Ser Gly Asn Ile His His His Ala Asp
130 135 140

Gly Glu Pro Cys Asn Cys Ala Asn Ser Val Ser Ala Arg Pro Val Ser
145 150 155 160

Ile Ala Gly Ser Val Asp Ile Asp Thr Thr Asp Leu Ser Asp Glu Asp
165 170 175

Asp Ser Leu Tyr Ser Ala Ala Ser Tyr Asn Ala Lys Tyr His Gln Thr
180 185 190

Gly Thr Ser Gly Pro Glu Met Val Arg Leu Ser Gln Arg Tyr Ser Ser
195 200 205

Gly Asn Phe Asn Asp Pro Leu Ser Phe Glu Gln Ser Asn Ala Pro Gly
210 215 220

Ala Ala Ala Ala Ile Ser Ile Gln Asn Lys Met Arg Thr Gln Thr Phe
225 230 235 240

Val Asn Leu Ala Asn Leu Val Ala Met Ser Ile Pro Arg Thr Thr Glu
245 250 255

Glu Thr Leu Phe Ile Ala Ser Leu Leu Ala Lys Ile Cys Asn Val His
260 265 270

Gly Phe Gln Ser Lys Ala Pro Ile Leu Thr Ala Lys Ser Ile Ala Leu
275 280 285

Leu Lys Asp Lys Tyr Asn Tyr Gly Asn Asp Glu Val Phe Ala Asn Ile
290 295 300

Thr Leu Lys Asn Val Asn Phe Asn Lys Leu Thr Ser Gln Gln Ser Gln
305 310 315 320

Gln Phe Phe Gln Ser Leu Asn Leu Pro Asn Gln Val Asn Leu Asp Leu
325 330 335

Phe Ile Thr Thr Phe Phe Asn Thr Trp Asn Asn Phe Ile Pro Ile Ile
340 345 350

Asn Arg His Ile Phe Met Ser Ser Tyr Ile Lys Phe Asn Lys Ser Arg
355 360 365

Glu Thr Met Phe Thr Asp Asn Ser Met Phe Gly Asn Glu Lys Phe Gly
370 375 380

Glu Ile Leu Leu Leu Ile Thr Thr Met Val Met Leu Ser Gln Glu Arg
385 390 395 400

Asn Asn Asn Arg Glu Ala Val Pro Ser Ser Ser Tyr Lys Lys Asp Ser
405 410 415

Thr Pro His Pro His Arg Pro Asp Ala Ser Ser Gln Ser Asn Val Glu
420 425 430

Ile Leu Gln Tyr Tyr Asp His Leu Ile His Glu Phe Ile Lys Ser Asn
435 440 445

Ile Ser Asp Asp Cys Ser Leu Pro Thr Leu Glu Ser Leu Ser Leu Gln
450 455 460

Leu Leu Tyr Cys Leu Ala Ile Gly Asp Leu Thr Thr Ser Tyr Glu Leu
465 470 475 480

Arg Gly Lys Ile Ile Thr Met Gly Gln Gln Leu Arg Leu His Arg Cys
485 490 495

Pro Ser Ala Val Leu Gly Thr Asn Gly Ser Lys Val Ser Gln Met Gln
500 505 510

Gln Gly Glu Arg Arg Ile Leu Phe Trp Cys Ile Tyr Ile Leu Asp Thr
515 520 525

Phe Ser Ala Leu Ile Leu Gly Val Pro Arg Leu Leu Lys Asp Tyr Glu
530 535 540

Ile Glu Cys Ala Leu Pro Phe Ser Asn Glu Ser Asn Asn Ala Asn Val
545 550 555 560

Lys Gly Ser Ile Glu Asn Thr Thr Asn Thr Val Ile Ile Asn Asn Ile
565 570 575

Lys Leu Ser Leu Ala Gly Lys Val Ser Asp Cys Ala Leu Ala Val Met
580 585 590

Arg Tyr Ser Lys Val Leu Gly Asn Ile Leu Asp Ser Ile Phe Gln Arg
595 600 605

Ser Ser Ile Asn Asn Pro Ser Val Val Ser Lys Ser Thr Asn Ile Thr
610 615 620

Glu Glu Thr Cys Leu Leu His Glu His Ala Leu Asp Leu Trp Arg Arg
625 630 635 640

Glu Leu Ser Pro His Ile Asn Val Asp Leu Asp Lys Ser Pro Gly Gly
645 650 655

Val Glu Tyr Glu Arg Leu Ser Asp Asn Gln Leu Thr Ile Leu Phe Leu
660 665 670

Tyr Tyr His Ala Lys Ile Leu Ile Tyr Leu Pro Leu Met Ala Asn Glu
675 680 685

Ser Ser Gln Ser Arg Ser Ser Ala Ser Tyr Ile Asn Ile Gln Gln Ser

690 695 700

Thr Thr Ser Ile Leu Ala Ile Ala Asn Thr Leu Ala Thr Lys Glu Arg
705 710 715 720

Asn Phe Tyr Phe Leu Pro Leu Pro Val Asn Leu Ser Arg Glu Lys Val
725 730 735

Arg Leu Ala Phe Leu Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Tyr Ala Arg Gly
740 745 750

Gly Ala Leu Phe Gln Glu Ser Lys Ile Leu Leu Ala Ser Val Ile Asn
755 760 765

Glu Leu Lys Ile Glu Thr Ser Ile Gly Met Leu Gly Cys Leu Ser Val
770 775 780

Pro Cys Met Glu Ala Val Asp Asn Ala Met Glu Gln Ile Met Ala Leu
785 790 795 800

Pro Gly Lys Val Ser Ser Val Asn Gly Ser Asn Ser Glu Met Lys Arg
805 810 815

Ser Ser Ser Lys Arg Lys Ser Ser Pro Leu Arg Gln Asp Ile Ser Gly
820 825 830

Asp Glu Arg Lys Ser His Asn Ile Glu Val Ser Asp Ser Arg Thr Pro
835 840 845

Ser Val Gln Ser Ser Leu Tyr Pro Gln Pro Asn Gln Met His His Pro
850 855 860

Asn Ile Ile Lys Ser Glu Asn Asn Glu Gln Met Ile Pro Glu Asn Asp
865 870 875 880

Thr Pro Gly Ala Ile Asn Asp Ile Phe Thr Ser His Ser Pro Pro Gly
885 890 895

Thr Val Thr Ser Met Lys Glu Glu Asp Leu Pro Ile Lys Val Pro Ile
900 905 910

Leu Leu Gln Thr Gln Gln Arg Gln Ile Tyr Asn Asn Asn Pro Asn His
915 920 925

Ser Leu Phe Ser Gln Gln Pro Gly Thr Gln Val Leu Ser Gly Gln Gln
930 935 940

Met Pro Gly Pro Ser Ser Thr Asp Gln Gln Phe Lys Arg Ile Thr Thr
945 950 955 960

Pro Asp Gly Leu Asp Ser Leu Met Met Gln Asp Phe Gly Val Asp Ala
965 970 975

Ser Leu Gly Leu Pro Met Leu Asp Phe Asp Phe Asn Phe Asp Phe Glu
980 985 990

Asn Val Gln Asn Asn Tyr Ser Gln Ser Asn Val Ser Pro Pro Asn Ser
995 1000 1005

Glu Ser Val Pro Ser Ser Ile Gln Gly Thr His Ser Asn Asp Pro
1010 1015 1020

Lys Asp Ser Gln Val Ser Ala Gly Ser Leu Phe Gly Leu
1025 1030 1035

<210> 49
<211> 887
<212> PRT
<213> 巴斯德畢赤酵母

<400> 49

Met Lys Glu Asn Gln Ala Ser Asn Lys Phe Asn Leu Ile Lys Asn Pro
1 5 10 15

Ile Thr Gly Lys Pro Arg Ile Ser Gln Ala Cys Asp Arg Cys Arg Ile
20 25 30

Lys Lys Ile Lys Cys Asp Gly Thr Leu Pro Ser Cys Thr Asn Cys Ser
35 40 45

Lys Ile Gly Phe Val Cys Lys Ile Ser Asp Arg Leu Thr Arg Ser Ser
50 55 60

Phe Pro Lys Gly Tyr Thr Lys Asn Leu Glu Gln Lys Leu Ile Asp Met
65 70 75 80

Glu Leu Asp Arg Asn Arg Leu Met Leu Glu Leu Asn Arg Ile Lys Lys
85 90 95

Glu Gly Phe Asp Gly Thr Asn Asn Asn Ile Ala Met Ala Ser Ser Val
100 105 110

Ser Ser Ser Glu Asn Leu Lys Ser Asp Asp Ser Ser Glu Cys Gln Ser
115 120 125

Val Thr Val Ser Leu Ser Ser Thr Ser Gly Pro Ser Leu Ser Pro Glu
130 135 140

Pro Lys Gln Asp Asp Phe Arg Phe Arg Val Gly Met Asp Gly Ser Phe
145 150 155 160

Val Leu Asn Gln Phe Leu Gln Ser Pro Leu Met Asp Tyr Ile Lys Ser
165 170 175

Leu Asn Val Leu Gln Phe Asn Gly Cys Ala Asn Phe Asp Gln Ser Phe
180 185 190

Asn Asp Asp Pro Leu Val Leu Asn Lys Tyr His Met Asn Leu Asn Arg
195 200 205

Phe Leu Asn Leu Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Leu Pro Leu Ile His Arg
210 215 220

Asn Ser Asn Thr Leu Asn Glu Lys Phe Ala Glu Asp Asn Asn Ser Leu
225 230 235 240

Asp Ser Leu Ile Trp Lys Phe Phe Thr Asn Tyr Asn Lys Leu Ile Pro
245 250 255

Ile Leu Glu Phe Asp Ser Phe Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Phe Ile His
260 265 270

Lys Tyr Tyr Ser Asn Asn Gln Val Phe Val Asp Gly Phe Arg Lys Tyr
275 280 285

Phe Glu Phe Ser Glu Phe Glu Gln Cys Phe Ile Val Lys Leu Ile Leu
290 295 300

Ile Leu Lys Phe Thr Leu Pro Val Ile His Asp Thr Ser Val Pro Ser

305 310 315 320

Glu Ile Tyr Arg Leu Ile Ser Met Asp Ser Leu Gln Arg Leu Phe Gly
325 330 335

Asn Ile Asp Phe Leu Lys Pro Ser Thr Asp Lys Val Ser Ile Leu Leu
340 345 350

Leu Val Leu His Tyr Met Val Leu Tyr Glu Ser Pro Lys Ser Leu Leu
355 360 365

Asp Thr Gln Asp Glu Ala Gln Lys Tyr Asp Glu Phe Ile Gly Asn Leu
370 375 380

Leu Ser Thr Ala Val His His Ile Thr Ser Leu Arg Leu His Ile Asp
385 390 395 400

Pro Arg Lys Leu Gln Phe Pro Arg Pro Leu Pro Ser Asn Gly Asn Arg
405 410 415

Leu Arg Ile Lys Leu Ser Trp Cys Tyr Lys Leu Ile Ser Lys Leu Phe
420 425 430

Arg Val Ile Tyr Asn Ile Asp Asn Asp Ser Leu Tyr Ser Leu Asp Asp
435 440 445

Ser His Leu Pro Glu Leu Gln Ser Ile Ser Ile Leu His Glu Glu Leu
450 455 460

Asp Val Thr Ile Gln Phe Asn Asn Leu Leu Asn Leu Ile Pro Asn Asn
465 470 475 480

Phe His Ser Leu Arg Asp Lys Gln Ser Leu Ser Lys Ile Lys Thr Gln
485 490 495

Leu Leu Glu Trp His Lys Asn Phe Asn Thr Glu Phe Val Glu His Phe
500 505 510

Asn Leu Asn Asp Thr Asp Ser Asp Glu Leu Ser Ala Glu Lys Ile Asn
515 520 525

Val Leu Arg Ser Lys Leu Ile Ser Leu Asn Arg Leu Asn Cys Tyr Asn
530 535 540

Ser Tyr Phe Gln Leu Val Ile Glu Leu Gln Leu Lys Glu Asn Leu Asp
545 550 555 560

Ser Val Val Ser Gly Ile Phe Gly Leu Ser Asn Glu Met Leu Ile Asp
565 570 575

Asn Lys Ser Ser Thr Glu Leu Leu Asn Thr Leu Gln Gln Thr Pro Ile
580 585 590

Ile His Gln Ser Ser Ile Leu Val Ser Leu Cys Tyr Arg Ile Gln Thr
595 600 605

Gly Asn Leu Gln Asp Glu Ile Cys Ser Ile Leu Val Asn Asn Tyr Glu
610 615 620

Lys Leu Leu Gln Cys Asn Asp Ala Gly Leu Pro Ile Lys Ile Leu Pro
625 630 635 640

Gln Leu Val His Tyr Phe Lys Gly Lys Ile Ser Thr Asn Leu Ser Asn
645 650 655

Ser Ala Ala His Glu Asp Leu Met Asn Met Phe Thr Leu Asn Asp Asn
660 665 670

Leu Ser Thr Thr Thr Thr Asp Leu Asp Ser Phe Ile Ile Pro Pro Lys
675 680 685

Arg Lys Gln Asp Gln Thr Leu Pro Ile Gly Thr Lys Arg Ser Lys Ser
690 695 700

Ala Ser Thr Ser Ser Val Ile Ser Ser Asp Asp Cys Ser Leu Phe Ser
705 710 715 720

Asn Ser Leu Ser Val Pro Thr Thr Phe Ser Gly Ser Ser Ile Ser Val
725 730 735

Gly Met Asp Asn Pro Pro Ser Ser Leu Phe Gly Ser Tyr Lys Arg Pro
740 745 750

Ser Ser Ile Val Lys Gln Glu Pro Thr Ile Asn Pro Arg Ser Asn Gly
755 760 765

Thr Asn Thr Asp Ser Asn Leu Phe Asp Thr Phe Asn Asp Ser Ile Lys
770 775 780

Gly Ser Leu Asn Asn Gly Leu Lys Lys Leu Lys Asp Ile Arg Cys Asn
785 790 795 800

Ser Val Val Glu Arg Ser His Ser Ser Gln Arg Asn Asp Phe Leu Met
805 810 815

Asp Gln Glu Asp Ser Ile Thr Lys Glu Thr Ile Asn Phe Ser Glu Leu
820 825 830

Phe Thr Cys Gly Thr Pro Thr Ala Ser Gln Ser Ile Asp Arg Ser Pro
835 840 845

Lys Ser Leu Leu Leu Asn Asp Leu Ala Ile Ala Pro Asp Thr Leu Val
850 855 860

Ile Lys Pro Asp Ala Glu Asp Leu Asp Arg Leu Lys Asn Lys Ile Arg
865 870 875 880

Ser Val Lys Ser Thr Val His
885

<210> 50
<211> 26
<212> PRT
<213> 法夫駒形氏酵母

<400> 50

Leu Leu Asn Gly Tyr Ile Tyr Asp Tyr Leu Val Lys Ser Asn Met Gln
1 5 10 15

Asn Leu Ala Asp Gln Phe Ala Gln Glu Thr
20 25

<210> 51
<211> 25
<212> PRT
<213> 巴斯德駒形氏酵母

<400> 51

Leu Asn Gly Tyr Ile His Asp Tyr Leu Val Lys Ser Asn Met Gln Asn
1 5 10 15

Leu Ala Asp Gln Phe Ala Gln Glu Ser
20 25

<210> 52
<211> 25
<212> PRT
<213> 釀酒酵母

<400> 52

Leu Asn Glu Tyr Ile Phe Asp Phe Leu Thr Lys Ser Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

Thr Ala Ala Ala Phe Ala Gln Asp Ala
20 25

<210> 53
<211> 25
<212> PRT
<213> 釀酒酵母

<400> 53

Leu Asn Glu Tyr Ile Phe Asp Phe Leu Thr Lys Ser Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

Thr Ala Ala Ala Phe Ala Gln Asp Ala
20 25

<210> 54
<211> 27
<212> PRT
<213> 解脂耶氏酵母

<400> 54

Glu Leu Leu Asn Ala Tyr Ile Tyr Asp Tyr Leu Leu Lys His Asn Met
1 5 10 15

His Asp Ser Ala Arg Thr Phe Gly Ala Glu Ala
20 25

<210> 55
<211> 27
<212> PRT
<213> 多形緒方酵母

<400> 55

Glu Leu Leu Asn Ala Tyr Val Tyr Asp Phe Ile Leu Lys Ser Gly Phe
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ala Ser Ala Phe Phe Lys Glu Ala
20 25

<210> 56
<211> 26
<212> PRT
<213> 黑麵黴

<400> 56

Asn Asn Leu Asn Thr Tyr Ile Tyr Asp Tyr Phe Leu Lys Arg Gly Tyr
1 5 10 15

His Asp Cys Ala Arg Ala Leu Val Lys Asp
20 25

<210> 57
<211> 774
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> scR 序列

<400> 57
caggaacaac taatggagtc tgggggtggt ttggttaccc tgggtggttc tcttaagctt 60

tcatgtaagg cctctggtat tgatttttcg cactacggta tctcctgggt tagacaagct 120

cctggaaaag gtctggaatg gatcgcttac atttacccaa attacggttc tgttgactat 180

gcctcctggg tcaatggtag gttcactatt tcccttgaca acgctcagaa cacggtattc 240

ctacagatga tctccctaac cgctgctgat actgcaacct acttctgtgc tcgtgacaga 300

ggttactact ctggctctcg tggaactaga cttgacttat ggggacaagg tactctcgtt 360

accatctcta gtggtggagg tggttctgga ggaggaggtt ccggcggagg tggtagcgag 420

ctggtcatga ctcaaacccc tccatcccta tctgcatcag tcggtgaaac cgttagaatt 480

agatgccttg catctgagtt cttgttcaac ggtgtgtcct ggtatcaaca aaagcctggt 540

aagcctccaa agtttctcat ttctggtgcc tcaaacctcg aatctggagt gccaccaaga 600

ttttccggat ctggctctgg tactgactac actctgacaa ttggtggtgt tcaagctgag 660

gatgttgcta cctactattg tctcggtggt tactcaggat cttccggcct aactttcggt 720

gccggtacaa acgtcgagat caaaggtgga catcaccacc accatcacta atag 774

<210> 58
<211> 837
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> vHH 序列

<400> 58
caggttcagc tgcaggagtc cggtggtggt ctggttcaag ccggtggttc attaagattg 60

tcctgtgctg cctctggtag aactttcact tctttcgcaa tgggttggtt tagacaagca 120

cctggaaaag agagagagtt tgttgcttct atctccagat ccggtacttt aactagatac 180

gctgactctg ccaagggtag attcactatt tctgttgaca acgccaagaa cactgtttct 240

ttgcaaatgg acaaccttaa cccagatgac accgcagtct attactgtgc cgctgacttg 300

cacagaccat acggtccagg aacccaaaga tccgatgagt acgattcttg gggtcaggga 360

actcaagtca ctgtctcttc aggtggtgga tctggtggtg gaggttcagg tggtggagga 420

tccggtggtg gtggttctgg tggtggtgga tctggtggag gtgaagttca acttgtcgaa 480

tccggtggtg cacttgtcca acctggtgga tctcttagac tttcttgtgc cgcctccggt 540

tttcctgtta accgttactc tatgcgttgg tacagacaag cccctggaaa agaacgtgaa 600

tgggttgccg gaatgtcctc agctggtgac agatcctcct acgaagattc tgtgaaggga 660

cgtttcacca tctccagaga tgacgcccgt aacaccgttt accttcaaat gaactccctt 720

aagcctgagg atactgccgt ctactattgt aacgtgaatg tcggatttga atactgggga 780

cagggaaccc aagttactgt ctcttccggt ggacatcacc accaccatca ctaatag 837

<210> 59
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> signal sequence

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (3)..(3)
<223> 位置3處之X為F或L

<220>
<221> MISC_特徵

<222> (16)..(16)
<223> 位置16處之X為A或T

<400> 59

Met Lys Xaa Ser Thr Asn Leu Ile Leu Ala Ile Ala Ala Ala Ser Xaa
1 5 10 15

Val Val Ser Ala
20

<210> 60
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (3)..(3)
<223> 位置3處之X為F或L

<220>
<221> MISC_特徵
<222> (16)..(16)
<223> 位置16處之X為A或T

<400> 60

Met Lys Xaa Ser Thr Asn Leu Ile Leu Ala Ile Ala Ala Ala Ser Xaa
1 5 10 15

Val Val Ser Ala Ala Pro Val Ala Pro Ala Glu Glu Ala Ala Asn His
20 25 30

Leu His Lys Arg
35

<210> 61
<211> 85
<212> PRT
<213> 釀酒酵母

<400> 61

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg
85

<210> 62
<211> 274
<212> PRT
<213> 巴斯德駒形氏酵母

<400> 62

Met Ser Ser Asp Ala Val Glu Gln Leu Glu Asn Phe Gln Leu Ile Lys
1 5 10 15

Phe Asp Arg Phe Asp Pro Ser Thr Gln Ser Thr Ile Arg Ile Ala Arg
20 25 30

Ser Pro Lys Pro Ile Pro Val Lys Val Val Ile Val Gly Asp Gly Gly
35 40 45

Cys Gly Lys Thr Cys Leu Leu Asn Val Phe Ala Thr Gly Thr Phe Pro
50 55 60

Glu Ala Tyr Val Pro Thr Ile Ile Glu Asn Val Val Ile Thr Leu Val
65 70 75 80

Thr Pro Thr Gly Gln Ile Ala Ala Val Thr Leu Trp Asp Thr Ala Gly
85 90 95

Gln Glu Glu Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Ser Asp Val Asp
100 105 110

Val Val Leu Leu Cys Tyr Ser Ile Asp Asn Leu Ser Thr Phe His Asn
115 120 125

Val Ala Asp Lys Trp Tyr Pro Glu Val Ala His Phe Cys Pro Asn Thr
130 135 140

Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Ser Asp Met Arg Arg His Gln Lys
145 150 155 160

Ser Gln Pro His Phe Val Ser Pro Gln Asp Ser Ser Gln Leu Ala Arg
165 170 175

Gln Met Gly Ala Val Met Asn Ile Glu Cys Ser Ala Lys Glu Val Ser
180 185 190

Asn Val Asn Ile Val Phe Asp Ala Ala Val Ser Tyr Cys Leu Ser Asn
195 200 205

Ser Arg Pro Lys Thr Arg Gly Asp Asn Asp Asn Asn Arg Ser Asn Arg
210 215 220

Arg Leu Ser Arg Ala Lys Arg Ala Ser Met Phe Ile Arg Gly Lys Asp
225 230 235 240

Val Ser Ser Thr Ser Gly Asn Ser Arg Glu Glu Leu Val Glu Tyr Asp
245 250 255

Gln Asp Gly Leu Ala Ile Ile Pro Asp Arg Lys Lys Arg Lys Cys Ser
260 265 270

Ile Ile

<210> 63
<211> 95
<212> PRT
<213> 巴斯德駒形氏酵母

<400> 63

Met Leu Asn Lys Leu Phe Ile Ala Ile Leu Ile Val Ile Thr Ala Val
1 5 10 15

Ile Gly Glu Thr Thr Thr Ser Ser Thr Thr Ala Ser Leu Ser Glu Ser
20 25 30

Pro Thr Leu Val Trp Val Thr Gly Thr Asp Ala Ser Gly Arg Leu Ala
35 40 45

Thr Thr Gln Ser Ala Tyr Thr Gln Gln Phe Ser Gln Leu Tyr Ser Ser
50 55 60

Ile Ala Ser Pro Ser Ser Gly Ser Ile Gly Leu Gly Thr Ile Gln Gly
65 70 75 80

Thr Val Gly Ile Val Arg Thr Tyr Glu Thr Ile Thr Leu Ala Ser
85 90 95

<210> 64
<211> 86
<212> PRT
<213> 巴斯德畢形氏酵母

<400> 64

Met Ser Thr Ala Ile Pro Gly Gly Gln Arg Thr Leu Ala Lys Arg Arg
1 5 10 15

Ala Ala Asn Leu Asp Lys Lys Gln Asp Glu Pro Thr Ser Ala Arg Ser
20 25 30

Ala Gly Ala Gly Gly Ser Ser Ser Thr Met Leu Lys Leu Tyr Thr Asp
35 40 45

Glu Ala Gln Gly Leu Lys Val Asp Pro Leu Ile Val Leu Val Leu Ala
50 55 60

Val Gly Phe Ile Phe Ser Val Ile Gly Leu His Val Val Ala Lys Leu
65 70 75 80

Thr Gly Lys Leu Ile Asn
85

<210> 65
<211> 361
<212> PRT
<213> 巴斯德畢形氏酵母

<400> 65

Met Thr Pro Arg Ser His Ile Phe Phe Asp Ile Ser Ile Asn Asn Gln
1 5 10 15

Pro Ala Gly Arg Ile Ile Phe Glu Leu Phe Asn Asp Ile Val Pro Lys
20 25 30

Thr Ala Glu Asn Phe Arg Ala Leu Ser Thr Gly Glu Lys Gly Ile Gly
35 40 45

Lys Ser Gly Lys Pro Leu His Tyr Lys Gly Ser Thr Phe His Arg Ile
50 55 60

Ile Lys Asp Phe Met Val Gln Gly Gly Asp Phe Thr Asn Gly Asn Gly
65 70 75 80

Thr Gly Gly Glu Ser Ile Tyr Gly Glu Lys Phe Glu Asp Glu Asn Phe
85 90 95

Gln Leu Thr His Asp Lys Pro Phe Leu Leu Ser Met Ala Asn Ala Gly
100 105 110

Pro Gly Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Pro Thr Pro
115 120 125

His Leu Asp Asn Lys His Val Val Phe Gly Lys Val Ile Ala Gly Lys
130 135 140

Ala Thr Val Arg Lys Ile Glu Arg Asn Ser Glu Gly Glu Ala Pro Ile
145 150 155 160

Glu Pro Val Val Ile Glu Asp Cys Gly Glu Leu Pro Glu Asp Ala Asp
165 170 175

Leu Thr Ile Ser Asp Glu Thr Gly Asp Lys Tyr Glu Glu Val Leu Lys
180 185 190

Asp Asn Glu Asn Ile Asp Ile Asp Asp Phe Glu Gln Val Tyr Gln Ala
195 200 205

Ile Thr Glu Ile Lys Glu Leu Gly Thr Lys Tyr Phe Lys Asn Gly Asp
210 215 220

Thr Lys Ile Ala Phe Glu Lys Tyr Gln Lys Ala Ala Asn Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Glu Tyr Ile Pro Ser Asp Leu Ser Glu Glu Gln Ser Ser Lys Leu Glu
245 250 255

Leu Leu Lys Thr Ser Val Phe Ser Asn Val Ala Leu Ala Gly Leu Lys
260 265 270

Val Ser Lys Phe Lys Asp Thr Ile Lys Tyr Ala Thr Leu Val Ile Glu
275 280 285

Asp Glu Ser Ala Asp Ala Lys Ala Lys Ser Lys Gly Tyr Tyr Arg Arg
290 295 300

Gly Ser Ala Tyr Ser Ser Leu Lys Asp Glu Asp Ser Ala Ile Ser Asp
305 310 315 320

Phe Gln Lys Ala Leu Glu Leu Ser Pro Gly Asp Pro Ala Ile Ser Gln
325 330 335

Ser Leu Gln Arg Thr Thr Lys Ala Arg Lys Asp Arg Leu Ala Lys Glu
340 345 350

Lys Ala Ala Leu Ser Lys Phe Phe Glu
355 360

<210> 66
<211> 127
<212> PRT
<213> 巴斯德畢赤氏酵母

<400> 66

Met Thr Asn Trp Lys Ala Ile Leu Thr Pro Ala Gln Tyr Gln Val Leu
1 5 10 15

Arg Leu Gly Gly Thr Glu Arg Pro Tyr Thr Gly Gln Tyr Val Asn Phe
20 25 30

Lys Lys Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ser Gly Cys Gln Thr Pro Leu Tyr
35 40 45

Lys Ser Gly Thr Lys Phe Asp Ser Ser Cys Gly Trp Pro Ala Phe Tyr
50 55 60

Glu Ala Leu Pro Gly Ala Val Lys Arg Ile Glu Asp Asn Ser Leu Gly
65 70 75 80

Met Arg Arg Ile Glu Ile Arg Cys Ser Lys Cys Asp Gly His Leu Gly
85 90 95

His Val Phe Glu Gly Glu Gly Phe Asp Thr Pro Thr Asp Ser Arg His
100 105 110

Cys Val Asn Ser Ile Ser Leu Lys Phe Gln Gly Glu Glu Glu Asn
115 120 125

<210> 67
<211> 546
<212> PRT
<213> 巴斯德畢赤氏酵母

<400> 67

Met Ser His Leu Leu Leu Arg Asp Ser Phe Trp Gly Arg Thr Ile Tyr
1 5 10 15

His Leu Ser Lys His Arg Tyr Phe Ser Phe Pro Glu Glu Lys Asp Gly
20 25 30

Phe Ile Ala Pro Glu Lys Tyr Tyr Leu Asn Met Asp Gln Val Ser Ile
35 40 45

His Ala Glu Ser Glu Lys Asn Ile Val Glu Gly Leu Val Asp Thr Ser
50 55 60

Asn Ser Ser Leu Glu Glu Val Lys Thr Thr Arg Val Ile Val Asp Trp
65 70 75 80

Asp Glu Tyr Asp Gln Lys Glu Asn Pro Gln Asn Trp Ser Ser Leu Leu
85 90 95

Lys Cys Phe Val Val Phe Glu Val Gly Ile Leu Thr Val Ala Val Tyr
100 105 110

Met Gly Ser Ala Ile Tyr Thr Pro Gly Ile Glu Asp Ile Met Arg Asp
115 120 125

Leu Asn Val Ser Arg Thr Val Ala Thr Leu Pro Leu Thr Leu Phe Val
130 135 140

Ile Gly Tyr Ala Val Gly Pro Met Ile Phe Ser Pro Met Ser Glu His
145 150 155 160

Pro Ala Ile Gly Arg Thr Thr Ile Tyr Val Trp Thr Leu Phe Ile Phe
165 170 175

Ala Ile Leu Gln Ile Pro Thr Ala Leu Thr Thr Asn Ile Ala Gly Phe
180 185 190

Cys Ile Leu Arg Phe Ile Gly Gly Phe Phe Ala Ser Pro Ala Leu Ala
195 200 205

Thr Gly Pro Ala Ser Val Gly Asp Val Ile Ala Ile Pro His Leu Pro
210 215 220

Val Gly Leu Gly Leu Trp Ser Ile Cys Ala Val Cys Gly Pro Ser Leu
225 230 235 240

Gly Pro Leu Phe Gly Ala Ile Phe Ser Gln Leu Val Ser Trp Arg Trp
245 250 255

Cys Phe Trp Phe Leu Leu Ile Thr Ser Gly Thr Leu Phe Ile Val Leu
260 265 270

Gly Phe Thr Leu Pro Glu Thr Tyr Val Pro Thr Leu Leu Tyr Arg Lys
275 280 285

Ala Arg Arg Leu Arg Ala Leu Thr Lys Asn Glu Leu Ile Ile Ser Lys
290 295 300

Gly Glu Leu Asp Ile Gln Asp Arg Thr Ala Lys Glu Val Leu Ile Glu
305 310 315 320

Cys Leu Trp Arg Pro Val Asp Ile Ser Phe Arg Asp Pro Val Val Leu
325 330 335

Met Ile Asn Leu Tyr Ile Ser Met Val Tyr Ser Ile Trp Tyr Ile Trp
340 345 350

Phe Glu Ala Phe Pro Ile Val Phe Leu Glu Ile Tyr Gly Phe Ser Leu
355 360 365

Ile Gly Met Gly Ala Ser Phe Ala Gly Ile Leu Ile Gly Val Leu Ile

370 375 380

Cys Ser Ala Cys Tyr Cys Tyr Ala Cys His Val Thr Phe Ala Arg Arg
385 390 395 400

Ile Ile Ala Asn Glu Thr Ile His Pro Glu Phe Phe Val Pro Gly Ala
405 410 415

Ile Ile Gly Gly Cys Ile Met Pro Thr Gly Ile Phe Ile Leu Gly Trp
420 425 430

Thr Ala Thr Lys Ser Val His Trp Ile Val Pro Ile Ile Gly Ser Gly
435 440 445

Leu Phe Ala Ala Gly Gly Tyr Leu Ile Phe Gln Thr Leu Phe Asn Tyr
450 455 460

Leu Ala Met Ser Phe Pro Arg Tyr Met Ala Ser Ala Phe Ala Gly Asn
465 470 475 480

Asp Leu Phe Arg Ser Phe Ser Ala Ser Val Phe Pro Leu Phe Gly His
485 490 495

Ala Leu Tyr Ala Asn Leu Gly Ser Glu Lys Phe Pro Val Gly Trp Gly
500 505 510

Ser Ser Val Leu Gly Phe Ile Thr Val Ala Met Ile Ala Ile Pro Val
515 520 525

Thr Phe Met Arg Tyr Gly Pro Arg Leu Arg Ala Asn Ser Arg Tyr Ala
530 535 540

Gly Pro
545

<210> 68
<211> 355
<212> PRT
<213> 巴斯德畢形氏酵母

<400> 68

Met Thr Asp Tyr Val Thr Ser Lys Arg Pro Asp Asn Val Leu Asn Trp
1 5 10 15

Thr Ser Ile His Val Ser Ser Trp Ile Gly Glu Thr Ile Pro Glu Ile
20 25 30

Asp Pro Ser Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu His Asp Ile Ala Gly Asp
35 40 45

Val Leu Pro Tyr Leu Lys Ser Glu Asp Leu Lys Glu Ile Gly Ile Asn
50 55 60

Glu Leu Lys His Arg Ile Ser Ile Lys Lys Asn Ile His Glu Leu Leu
65 70 75 80

Val Ser Asn Glu Lys His Ile Asp Thr Ser Ile Leu Ser Asp Thr Ala
85 90 95

Thr Glu Leu Gly Thr Leu Ile Leu Thr Asn Lys Phe Ile Thr Gln Met
100 105 110

Ala Asn Arg Lys Asn Val Val Asp Asp Ser Thr His His Ser Asn Asn
115 120 125

Arg Arg Leu Thr Glu Gln Phe Asn Lys Leu Arg Lys Asp Leu Leu Pro
130 135 140

Ile Phe Lys Trp Ile Lys Glu Thr Gln Pro Leu Pro Thr Pro Glu Asn
145 150 155 160

Thr His Phe Ala Asn Met Gly Ser Val Pro Ala Ser Pro Val Glu His
165 170 175

Thr Ser Gly Glu Ser Thr Leu Ser Asn Pro Ser Leu Ser Thr Ile Asn
180 185 190

Ala Gly Glu Gly Val Asn Ser Ala Val Ala Gly Gln Ser Leu Gly Arg
195 200 205

Lys Pro Thr Leu Ser Ser Arg Arg Gln Ser His Ala Leu Ser Pro Thr
210 215 220

Gly Glu His Leu Asn Val Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser Thr Gly Asn Phe
225 230 235 240

Glu Thr Leu Asn Gly Glu Arg Pro Asn Leu Arg Ser Ala Ser Ser Gly
245 250 255

Ser Gln Glu His Thr Glu Asn Glu Leu Leu Lys Pro Leu Arg Val Lys
260 265 270

Ala Asp Glu Pro Cys Tyr Lys Val Ile Gln Asn Ala Met Lys Arg His
275 280 285

Gly Leu Ser Val Asp Asp Trp Arg Lys Tyr Ala Leu Val Ile Cys Tyr
290 295 300

Gly Asp Glu Glu Arg Val Leu Gly Leu His Glu Lys Pro Gly Ser Ile
305 310 315 320

Phe Lys Glu Leu Lys Asp Gln Lys Gln Asn Pro Ala Ile Met Leu Arg
325 330 335

Gln Ile Asp Thr Asn Asn Asp Asp Gln Asn His Ile Glu Thr Pro Gly
340 345 350

Gly Arg Leu
355

<210> 69
<211> 1027
<212> PRT
<213> 巴斯德駒形氏酵母

<400> 69

Met Thr Thr Asn Gly Gln Lys Arg Gln Lys Thr Arg Lys Pro Leu Leu
1 5 10 15

Ile Asn Ala Phe Val Met Gly Cys Ala Gly Leu Gln Asn Pro Gly Leu
20 25 30

Trp Lys His Pro Lys Asp Ser Ser His Arg Phe Asn Gln Ile Asp His
35 40 45

Trp Thr Tyr Leu Ala Lys Leu Ala Glu Lys Gly Lys Phe Asn Ala Leu
50 55 60

Phe Ile Ala Asp Val Leu Gly Gly Tyr Asp Val Tyr Lys Gly Pro Glu
65 70 75 80

Asn Leu Ala Thr Pro Ala Val Ala Gly Ala Gln Trp Pro Val Thr Glu
85 90 95

Pro Ser Ala Val Val Ser Ala Met Ala Ala Val Thr Thr Asn Leu Ala
100 105 110

Phe Gly Val Thr Phe Ser Thr Ile Ser Glu Ala Pro Tyr His Phe Ala
115 120 125

Arg Arg Leu Ser Thr Leu Asp His Leu Thr Lys Gly Arg Ile Gly Trp
130 135 140

Asn Val Val Ser Ser Tyr Leu Glu Ser Ala Ala Arg Asn Leu Leu Asn
145 150 155 160

Gly Glu Lys Leu Asp Glu His Asp Gln Arg Tyr Leu Lys Ala Glu Glu
165 170 175

Tyr Ile Gln Ile Val Tyr Glu Leu Leu Leu Ser Ser Trp Arg Asp Asp
180 185 190

Ala Val Val Leu Asp Lys Lys Ala Gly Val Tyr Thr Asp Pro Thr Arg
195 200 205

Phe Arg Lys Ile Asn Phe Glu Gly Lys Phe Phe Lys Val Pro Gly Pro
210 215 220

His Ile Val Asp Pro Thr Pro Gln Arg Leu Pro Val Ile Leu Gln Ala
225 230 235 240

Gly Thr Ser Lys Val Gly Lys Glu Phe Ala Ala Lys His Ala Glu Ile
245 250 255

Val Phe Val Ile Ser Phe Ser Pro Asp Asp Leu Lys Pro Lys Ile Ala
260 265 270

Glu Val Arg Gln Leu Ala Lys Glu Lys Phe Gly Arg Asn His Asp Asp
275 280 285

Ile Lys Phe Val Ala Leu Ala Thr Pro Val Ile Gly Ala Thr His Glu
290 295 300

Leu Ala Glu Glu Lys Tyr Gln Glu Leu Leu Ser Tyr Gly Asp Ile Glu
305 310 315 320

Gly Ala Gln Ala Leu Phe Gly Gly Trp Thr Gly Ile Asp Leu Ser Gln
325 330 335

Tyr Gly Glu Asp Glu Glu Leu Gly Asn Val Ser Ser Asn Ala Met Arg
340 345 350

Gly Ala Val Gln Asn Trp Thr Lys Ala Ile Pro Asn Glu Lys Arg Trp
355 360 365

Thr Arg Lys Val Ile Ala Lys Gln Ile Thr Val Gly Gly Leu Gly Pro
370 375 380

Ala Phe Val Gly Thr Pro Glu Glu Ile Ala Asp Glu Leu Glu His Trp
385 390 395 400

Ser Asp His Ala Gly Leu Asp Gly Phe Asn Phe Thr Tyr Ala Val Asn
405 410 415

Pro Leu Ser Phe Glu Glu Ile Val Glu Asp Leu Ile Pro Val Leu Gln
420 425 430

Arg Arg Gly Leu Ala Gln Lys Glu Tyr Pro Asn Pro Glu Thr Gly Ser
435 440 445

Thr Phe Arg Lys Asn Leu Phe Gly Thr Asp Phe Val Pro Ser Thr His
450 455 460

Pro Ala Tyr Asn Leu Arg Trp Arg Ala Gly Val Ser Lys Glu Glu Phe
465 470 475 480

Glu Lys Ser Leu Asn Ala Thr Thr Asn Trp Tyr Ser Ser Phe Ala Arg
485 490 495

Ser Gly Ala Leu Gly Glu Leu His Asn Thr Cys Arg Ile Leu Tyr Leu
500 505 510

Gln Ile Val Lys Tyr Lys Tyr Arg Leu Arg Val Arg Ser Glu Gly Asn
515 520 525

Ser Ile Pro Phe Ala Lys Met Thr Lys Glu Asn Glu Ala Lys Arg Gln
530 535 540

Lys Thr Ser Gln Pro Lys Ala Lys Lys Gln Leu Ile Ile Asn Ala Phe
545 550 555 560

Met Ser Gly Ser Ser Gly Asn Gln Ser Pro Gly Leu Trp Ser Tyr Pro
565 570 575

Gly Asp Lys Ser Thr Glu Tyr Thr Thr Leu Asp Tyr Trp Val Glu Leu
580 585 590

Ala Gln Lys Leu Glu Lys Ala Lys Phe His Ser Ile Phe Ile Ala Asp
595 600 605

Val Leu Gly Gly Tyr Asp Val Tyr Asn Gly Pro Gly Asn Tyr Ser Ala
610 615 620

Ala Ala Lys Ser Gly Ala Gln Phe Pro Met Ile Glu Pro Ser Ala Ala
625 630 635 640

Val Thr Ala Met Ala Ala Ala Thr Lys Ser Ile Thr Phe Gly Val Thr
645 650 655

Phe Ser Thr Ile Ser Glu Ala Pro Tyr His Phe Ala Arg Arg Leu Gly
660 665 670

Thr Leu Asp Leu Leu Thr Asn Gly Arg Val Gly Trp Asn Ile Val Ser
675 680 685

Ser Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Arg Asn Leu Leu Asn Gly Glu Pro Leu
690 695 700

Pro Leu His Ala Asp Arg Tyr Lys Arg Ala Glu Glu Phe Leu Gln Val
705 710 715 720

Val Tyr Arg Leu Phe Leu Ser Ser Trp Arg Asp Asp Ala Tyr Lys Leu
725 730 735

Asp Lys Lys Thr Arg Thr Phe Ala Asp Pro Lys Leu Ile Arg Thr Ile
740 745 750

Asp His Val Gly Glu Phe Phe Asn Val Pro Gly Pro Gln Phe Leu Pro

755 760 765

Pro Thr Pro Gln Arg Leu Pro Leu Ile Leu Gln Ala Gly Thr Ser Lys
770 775 780

Val Gly Met Asp Tyr Ala Ala Lys His Ala Glu Val Val Phe Leu Ala
785 790 795 800

Ser Phe Asp Pro Glu Ser Leu Gln Glu Lys Ile Lys Thr Val Arg Asp
805 810 815

Ile Ala Glu Thr Lys Tyr Asn Arg Pro Arg Asp Ser Ile Lys Phe Leu
820 825 830

Ile Leu Ile Thr Val Val Ile Ala Asp Thr His Glu Asp Ala Val Lys
835 840 845

Arg Tyr Glu Asp Leu Ala Ser Tyr Ala Asp Leu Glu Gly Ala Gln Ala
850 855 860

Leu Phe Ser Gly Trp Thr Gly Ile Asp Ile Gly Lys Tyr Gly Glu Asp
865 870 875 880

Glu Pro Leu Glu His Val Glu Ser Asn Ala Ile Lys Ser His Val Lys
885 890 895

Asn Trp Thr Lys Phe Lys Asp Asn Lys Pro Arg Ala Arg Lys Asp Ile
900 905 910

Ala Lys Gln Ile Gly Val Gly Gly Ser Gly Pro Leu Leu Val Gly Ser
915 920 925

Val Gln Glu Ile Ala Asp Glu Leu Glu Arg Trp Ala Glu Val Ser Asp
930 935 940

Leu Asp Gly Phe Asn Phe Ala Tyr Ala Asp Tyr Pro Gln Thr Phe Asp
945 950 955 960

Asp Ile Ile Glu Lys Leu Leu Pro Glu Leu Asn Lys Arg Gly Val Phe
965 970 975

Trp Asp Asp Tyr Lys Ile Pro Gly Gly Thr Phe Arg Glu Ser Val Phe
980 985 990

Gly Arg Lys Phe Val Asp Lys Asp His Pro Ala Tyr Asp Leu Arg Trp
995 1000 1005

Arg Ser Asp Gln Thr Arg Glu Glu Phe Glu Lys Lys Leu Ala Glu
1010 1015 1020

Leu Glu Lys Lys
1025

<210> 70
<211> 194
<212> PRT
<213> 巴斯德駒形氏酵母

<400> 70

Met Arg Phe Ser Asn Val Val Leu Thr Ala Ile Ala Ala Ala Gly Val
1 5 10 15

Gln Ala Asp Glu Ala Leu Tyr Thr Val Phe Tyr Asn Asp Val Thr Glu
20 25 30

Asn Ala Gln Glu Tyr Leu Ser Tyr Ile Gln Ala Asn Thr Ala Ala Gly
35 40 45

Phe Thr Asp Leu Leu Ser Leu Tyr Thr Glu Leu Ala Thr Tyr Thr Asp
50 55 60

Asp Ser Tyr Thr Ser Ile Phe Thr Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ser Glu
65 70 75 80

Leu Ser Ser Phe Val Val Asn Leu Pro Trp Tyr Ser Ser Arg Ile Glu
85 90 95

Pro Gln Val Ala Ala Ala Glu Thr Gly Glu Ser Glu Glu Glu Ser Glu
100 105 110

Thr Gly Glu Ser Glu Glu Glu Ser Glu Thr Gly Glu Glu Thr Glu Thr
115 120 125

Glu Thr Gly Ser Glu Ser Glu Ser Glu Ser Glu Ser Glu Thr Ser Ala
130 135 140

Thr Gly Thr Gly Thr Gly Thr Ser Ala Ser Glu Ser Ala Glu Thr Glu
145 150 155 160

Thr Ser Thr Asp Ala Ala Val Ser Ile Asp His Pro Lys Ser Thr Leu
165 170 175

Leu Met Gly Leu Thr Ala Ala Val Val Ser Ile Thr Phe Gly Val Phe
180 185 190

Ala Leu

<210> 71
<211> 478
<212> PRT
<213> 巴斯德畢形氏酵母

<400> 71

Met Ser Ser Phe Arg Val Leu Asp Leu Val Lys Pro Phe Thr Pro Phe
1 5 10 15

Leu Pro Glu Val Ile Ser Pro Glu Arg Lys Val Pro Phe Gln Gln Lys
20 25 30

Leu Met Trp Thr Gly Val Thr Leu Leu Ile Phe Leu Val Met Ser Glu
35 40 45

Ile Pro Leu Tyr Gly Ile Thr Ser Ser Asp Ser Ser Asp Pro Leu Phe
50 55 60

Trp Leu Arg Met Met Leu Ala Ser Asn Arg Gly Thr Leu Met Glu Leu
65 70 75 80

Gly Ile Ser Pro Ile Val Thr Ser Gly Met Val Phe Gln Leu Leu Gln
85 90 95

Gly Ile Gln Ile Leu Asp Val Asn Met Glu Asn Lys Ala Asp Arg Glu
100 105 110

Leu Phe Gln Thr Ala Gln Lys Val Phe Ala Ile Leu Leu Ser Ile Gly
115 120 125

Gln Ala Thr Val Tyr Val Leu Thr Gly Met Tyr Gly Pro Pro Gly Glu
130 135 140

Leu Gly Val Gly Val Cys Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu Val Phe Ala
145 150 155 160

Gly Ile Val Val Ile Leu Leu Asp Glu Leu Leu Gln Lys Gly Tyr Gly
165 170 175

Leu Gly Ser Gly Ile Ser Leu Phe Met Ala Thr Asn Ile Cys Glu Gln
180 185 190

Ile Phe Trp Lys Thr Phe Ala Pro Thr Thr Val Asn Arg Gly Arg Gly
195 200 205

Lys Glu Phe Glu Gly Ala Phe Ile Ser Phe Phe His Leu Ile Leu Thr
210 215 220

Lys Lys Asp Lys Lys Arg Ala Leu Leu Glu Ser Phe Tyr Arg Asp Asn
225 230 235 240

Ala Pro Asn Met Phe Gln Val Ile Ala Thr Leu Val Val Phe Phe Thr
245 250 255

Val Val Tyr Leu Gln Gly Phe Arg Leu Glu Ile Pro Val Lys Ser Thr
260 265 270

Arg Gln Arg Gly Pro Tyr Gly Thr Tyr Pro Ile Arg Leu Phe Tyr Thr
275 280 285

Ser Asn Met Pro Ile Met Leu Gln Ser Ala Leu Thr Ser Asn Ile Phe
290 295 300

Ile Ile Ser Gln Met Leu Tyr Ser His Phe Pro Asp Asn Ala Phe Val
305 310 315 320

Lys Leu Ile Gly Thr Trp Glu Ala Gln Pro Gly Ser Ala Gln Leu Phe
325 330 335

Ala Ala Ser Gly Leu Ala Tyr Tyr Met Gln Pro Pro Met Ser Leu Ser
340 345 350

Gln Ala Leu Leu Asp Pro Ile Lys Thr Val Val Tyr Val Val Phe Val
355 360 365

Leu Thr Thr Cys Ala Ile Phe Ser Lys Thr Trp Ile Glu Ile Ser Gly
370 375 380

Ser Ser Pro Arg Asp Val Ala Lys Gln Phe Lys Asp Gln Gly Leu Val
385 390 395 400

Ile Ala Gly His Arg Asp Ala Thr Val Tyr Lys Glu Leu Lys Lys Ile
405 410 415

Ile Pro Thr Ala Ala Ala Phe Gly Gly Ala Thr Ile Gly Ala Leu Ser
420 425 430

Val Val Ser Asp Leu Leu Gly Thr Leu Gly Ser Gly Thr Ser Ile Leu
435 440 445

Leu Ala Val Thr Thr Ile Tyr Gly Tyr Tyr Glu Leu Ala Val Lys Glu
450 455 460

Gly Gly Phe Ser Lys Gly Gly Pro Ser Gly Phe Val Asp Leu
465 470 475

<210> 72
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 72
cgaacatcca tcaccaaaac ac 22

<210> 73
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 73
gttgtcgacc tgcagcgtac ggtgttgccg cgaaatg 37

<210> 74
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 74
taggtgatat cagatccact gatcaatttg cccaagagac g 41

<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 75
gactgttgcg attgctggtg 20

<210> 76
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 76
catttcgcgg caacaccgta cgctgcaggt cgacaac 37

<210> 77
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 77
cggtgagaat ggcaaaagct tat 23

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 78
aagcccgatg cgccagagtt g 21

<210> 79

<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 79
cgtctcttgg gcaaattgat cagtggatct gatatcacct a 41

<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 80
atccaggaca cgctcatcaa g 21

<210> 81
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 81
tgtaacgtga atgtcggatt tg 22

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 82
tagtgatggt ggtggtgatg 20

<210> 83
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 83
cctgaggctt tgttccaccc act 23

<210> 84
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 84
ggaacatagt agcaccggca taacga 26

<210> 85
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 轉譯啟始位點

<400> 85
cctgcaggcc 10

<210> 86
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 轉譯啟始位點

<220>
<221> misc_特徵
<222> (1)..(6)
<223> 位置1-6處之n為任何核酸，較佳為A

<220>
<221> misc_特徵
<222> (8)..(9)
<223> 位置8-9處之n為任何核酸，較佳為A

<400> 86
nnnnnnann 9

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種重組宿主細胞，其包含內源性基因，該內源性基因編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物，該宿主細胞藉由一或多種遺傳修飾來工程化以便與該一或多種遺傳修飾之前的該宿主細胞相比，減少該基因之表現，並且該宿主細胞包含異源表現匣，該異源表現匣包含在表現匣啟動子(ECP)控制下的所關注基因(GOI)，該ECP可藉由非甲醇碳源來抑制，其中該ECP包含

(i) SEQ ID NO:10-16中之任一者，或

(ii) SEQ ID NO:41-45中之任一者，或

(iii)與包括SEQ ID NO:10-16或SEQ ID NO:41-45中任一者之3'-末端至少350 nt的一區域至少85%序列一致性。

【請求項2】 如請求項1所述之重組宿主細胞，其中該ECP包含與包括SEQ ID NO:10-16或SEQ ID NO:41-45中任一者之3'-末端至少350 nt的一區域至少90%序列一致性。

【請求項3】 如請求項2所述之重組宿主細胞，其中該ECP包含與SEQ ID NO:10-16或SEQ ID NO:41-45至少90%序列一致性。

【請求項4】 如請求項3所述之重組宿主細胞，其中該ECP由SEQ ID NO:10所組成。

【請求項5】 如請求項1或2所述之重組宿主細胞，其中

該一或多種遺傳修飾包含以下各者之破壞、取代、缺失或剔除：(i)編碼該FLO8蛋白質的該內源性基因或其一部分；或(ii)表現控制序列，其中該表現控制序列選自由以下組成之群組：啟動子、核糖體結合位點、轉錄或轉譯啟動及終止序列、增強子及活化子序列。

【請求項6】 如請求項1或2所述之重組宿主細胞，其中編碼該FLO8蛋白質或該同源物之該內源性基因藉由該一或多種遺傳修飾來剔除。

【請求項7】 如請求項1或2所述之重組宿主細胞，其中該ECP可在存在生長限制量之非甲醇碳源的情況下以及在不存在甲醇的情況下得以誘導；並且可在存在高於該生長限制量之過量的非甲醇碳源的情況下得以抑制。

【請求項8】 如請求項1或2所述之重組宿主細胞，其中該表現匣進一步包含編碼信號肽之核苷酸序列，該信號肽使得由該GOI編碼之所關注蛋白質(POI)能夠分泌，其中編碼該信號肽之該核苷酸序列相鄰於該GOI之5’-末端來融合。

【請求項9】 如請求項1或2所述之重組宿主細胞，其中該GOI編碼所關注蛋白質(POI)，該所關注蛋白質為選自由以下組成之群組之肽或蛋白質：抗原結合蛋白質、治療性蛋白質、酶、肽、蛋白質抗生素、毒素融合蛋白質、碳水化合物-蛋白質結合物、結構蛋白質、調控蛋白質、疫苗抗原、生長因子、激素及細胞介素。

【請求項10】如請求項9所述之重組宿主細胞，其中該酶

是處理酶或代謝酶。

【請求項11】如請求項1或2所述之重組宿主細胞，該重組宿主細胞為

a)選自由以下組成之群組之屬類的酵母細胞：巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)、法夫駒形氏酵母(*Komagataella phaffii*)、巴斯德駒形氏酵母(*Komagataella pastoris*)、偽巴斯德駒形氏酵母(*Komagataella pseudopastoris*)、釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、微變種歐卡塔酵母(*Ogataea minuta*)、乳酸克魯維酵母(*Kluyveromces lactis*)、馬克斯克魯維酵母(*Kluyveromes marxianus*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)或多形漢遜酵母(*Hansenula polymorpha*)；或

b)絲狀真菌之細胞，其中該絲狀真菌之細胞為泡盛麴黴(*Aspergillus awamori*)或里氏木黴(*Trichoderma reesei*)。

【請求項12】一種增加由宿主細胞製造之所關注蛋白質(POI)之產率的方法，該宿主細胞在可藉由非甲醇碳源來抑制之啟動子之控制下，表現編碼該POI之所關注基因(GOI)，該方法藉由在該宿主細胞中減少編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物之內源性基因的表現來進行。

【請求項13】一種製造由所關注基因(GOI)編碼之所關

注蛋白質(POI)的方法，該方法藉由在製造該POI之條件下培養如請求項1至11中任一項所述之重組宿主細胞來進行。

【請求項14】如請求項12或13所述之方法，該方法包含以下步驟：

a)在生長條件下培養該重組宿主細胞；及

b)在高達1 g/L之第二非甲醇碳源之存在的生長限制條件下培養該重組宿主細胞，導致表現該GOI以便製造該POI，其中該步驟a)培養是在批料階段中執行；並且該步驟b)培養是在分批補料或連續培養階段中執行。

【請求項15】如請求項14所述之方法，其中該第一或第二碳源選自醣、醇、或前述中之任一者或多者之混合物。

【請求項16】如請求項15所述之方法，其中該醇為多元醇。

【請求項17】一種在宿主細胞中製造所關注蛋白質(POI)之方法，該方法包含以下步驟：

a)將該宿主細胞遺傳工程化以便減少編碼包含被鑑別為SEQ ID NO:1之胺基酸序列的FLO8蛋白質或其同源物之內源性基因之表現；

b)向該宿主細胞中引入包含所關注基因(GOI)的異源表現匣，該所關注基因在可操作地連接至該GOI之表現匣啟動子(ECP)控制下表現該POI，該ECP可藉由非甲醇碳源來抑制，以及該ECP包含

(i) SEQ ID NO:10-16中之任一者，或

(ii) SEQ ID NO:41-45中之任一者，或

(iii)與包括SEQ ID NO:10-16或SEQ ID NO:41-45中任一者之3'-末端至少350 nt的一區域至少85%序列一致性；

c)在製造該POI之條件下培養該宿主細胞；

d)視情況將該POI自該細胞培養物中分離；及

e)視情況純化該POI。

【請求項18】如請求項17所述之方法，其中該ECP包含與SEQ ID NO:10-16或SEQ ID NO:41-45中任一者之3'-末端至少350 nt的一區域至少90%序列一致性。

【請求項19】如請求項18所述之方法，其中該ECP包含與SEQ ID NO:10-16或SEQ ID NO:41-45至少90%序列一致性。

【請求項20】如請求項19所述之方法，其中該ECP由SEQ ID NO:10所組成。

【發明圖式】

第1圖:

胺基酸序列，FLO8蛋白質法夫駒形氏酵母，SEQ ID NO:1

>XP_002494151/PP7435_Chr4-0252/PAS_chr4_0711 (Flo8_法夫駒形氏酵母 CBS7435/GS115) LisH結構域加下劃線

MNKPNGSEQQPPSRGMKQESGGPVTSSTTPGTNTGLENSHSMGADMEPDVGATSPRHLLNGYIYDYLVKSNMQNLA
DQFAQETELLETDLTVPMDTPSGYLLEWWMVFWDLFNARLKQRGSQKAHQYIQLNMLRQQQQRTMRNTARVQKVPL
RPHTQSSPSMSQTFIPQQPQQQAQGQQHAQAQAQVQAHQQAQHHAQAQVPVQPQQHQLGGQTQQQQSINTGSPAGP
NAINSRVQHLAQQQMNHLRQQATATTQQPIPQQNIPSNQQGPTGPYPTSPSRRPRLLSNESGASAPSVMTKSQLQG
VPPSQQPHQQQGQQVGPPNQHQGQSSSFYSGMPPQGVVVPHQFNPQQYANMLARQQHVQAQQQVQLQQVQHVQQRQ
QQDQQQHRLSAGSPGHPSFGVFQQPPPMSNHNQVMINQQGETFFDPHSPYAQPNGYPQPQQQQQQQQQQQQQQPQ
QQQQQQQQQKQQPPPPPRQPQRQQAMAMAPLPHSTSAAGTPHSSTTPRFSQPGPVYQQPLPASQPQHSPPSSIQQP
ELVPTPGSQHQQIAQPQSQSQHQQSQQSQSSASKIVGIQEYQKELMMLEKQNKQRHDMACKKGSGHFSNFDPIPEH
TPPEPKFNVNVMLPPQNSAVVTKNTPGTSPGTQTQNTAHSTGNTSAGSTPNNVAPVRKKKEPAKKKAKKATEPPTP
TTPQTPIAARTHQNSTGGIPGNNAATKRRKREPLVDQTVSPNLNEASKSTKTGKISSQTDFTGSDNGFLQDFGDGT
GPPTGTDDMEFDFNSFLNNETGEPNSSTIHFDNVFNWGEGTEAGDL

核苷酸序列，*flo8*基因法夫駒形氏酵母，SEQ ID NO:2

>XM_002494106.1 Komagataella phaffii GS115預測蛋白質 (PAS_chr4_0711)，部分mRNA

ATGAACAAGCCAAACGGGTCTGAACAACAACCACCGTCACGCGGAATGAAGCAAGAGTCAGGAGGCCCAG
TTACTTCATCTACGACGCCGGGTACCAATACTGGCCTAGAAAACTCTCATTCCATGGGGGCGGATATGGA
GCCTGATGTTGGTGCTACCTCTCCTCGCCATCTTCTTAATGGGTACATTTACGATTATTTAGTCAAATCT
AACATGCAAAATTTGGCTGATCAATTTGCCCAAGAGACGGAGCTCTTAGAAACAGACTTGACAGTACCAA
TGGATACGCCTTCAGGCTATCTTCTAGAATGGTGGATGGTATTCTGGGACCTTTTCAATGCCCGCCTAAA
GCAACGGGGTTCACAGAAGGCCCACCAGTATATTCAGTTGAACATGCTACGACAACAGCAACAGAGGACC
ATGCGAAATACAGCCCGTGTTCAAAAAGTCCCGTTGAGGCCACACACCCAATCATCTCCTTCAATGTCAC
AGACTTTTATTCCACAGCAGCCTCAACAGCAAGCACAGGGACAACAGCACGCCCAGGCTCAAGCCCAAGT
GCAAGCACATCAGCAAGCCCAACACCACGCGCAGGCACAAGTGCCAGTGCAACCGCAACAGCACCAGCTA
GGAGGCCAAACTCAACAGCAGCAATCCATTAACACTGGGTCTCCTGCGGGTCCAAATGCTATCAACTCGC
GTGTTCAACACTTAGCACAACAACAGATGAATCACCTTCGCCAGCAGGCGACTGCCACTACGCAACAACC
TATCCCGCAACAGAATATCCCATCAAACCAACAGGGTCCTACAGGCCCTTATCCTACTTCCCCTTCAAGA
AGACCGAGATTACTGTCTAACGAATCGGGTGCAAGTGCACCCTCTGTAATGACAAAGTCACAGCTCCAAG
GAGTCCCTCCCTCACAACAACCACACCAGCAGCAAGGTCAGCAGGTAGGCCCCCCTAATCAACATCAAGG
TCAATCTTCTTCCTTTTATTCGGGCATGCCTCCTCAAGGGGTCGTGGTTCCTCATCAGTTCAATCCTCAG
CAGTATGCCAATATGCTAGCAAGACAACAGCATGTACAAGCTCAACAACAGGTTCAGTTACAACAGGTCC
AACATGTACAACAGAGACAACAGCAAGACCAACAACAACACCGCCTGTCCGCCGGTTCACCGGGGCACCC
TTCATTTGGCGTTTTTCAACAACCTCCTCCGATGTCAAACCATAATCAGGTCATGATCAATCAGCAGGGA
GAAACTTTTTTTGATCCACATTCTCCATATGCTCAACCTAACGGGTACCCCCAGCCACAGCAACAACAAC
AACAACAGCAACAACAACAACAACAGCAGCAACCGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGAAGCA
GCAACCACCACCACCACCACGACAGCCTCAGCGCCAACAAGCGATGGCCATGGCTCCTCTGCCTCACTCT
ACTTCTGCCGCCGGTACTCCTCACTCGTCCACCACACCTAGATTCTCGCAACCTGGTCCTGTTTATCAGC
AGCCTTTACCTGCATCTCAACCGCAACATTCTCCGCCTTCTTCTATTCAGCAGCCGGAGCTAGTTCCAAC
TCCAGGGTCACAACATCAGCAAATAGCACAACCACAATCACAGAGCCAACACCAGCAATCGCAACAGTCT
CAATCAAGTGCTTCTAAAATTGTAGGTATACAGGAGTATCAGAAAGAGCTAATGATGCTTGAGAAACAGA
ACAAACAGCGTCATGACATGGCATGTAAGAAGGGAAGCGGGCATTTTTCTAACTTTGATCCAATTCCAGA
GCACACACCGCCCGAACCAAAATTTAATGTGAATGTAATGCTCCCTCCCCAGAACTCTGCAGTGGTCACG
AAGAATACTCCCGGAACTTCACCTGGTACACAAACTCAAAACACTGCACATAGTACTGGTAACACTTCTG
CGGGGTCTACACCAAATAATGTCGCACCTGTACGAAAGAAAAAGGAGCCAGCTAAAAAGAAGGCAAAGAA
AGCTACTGAGCCCCCGACTCCCACTACTCCACAGACTCCAATTGCAGCTAGGACACATCAAAACTCTACA
GGCGGCATTCCTGGTAATAATGCTGCTACTAAGCGACGAAAACGGGAGCCGCTGGTTGATCAAACTGTTT
CACCTAACCTTAACGAAGCTTCCAAGTCAACAAAGACCGGAAAAATTTCATCTCAAACTGACTTTACAGG
TTCTGACAATGGATTCTTACAGGATTTTGGCGATGGAACTGGTCCTCCCACTGGAACCGATGATATGGAA
TTTGATTTTAACAGTTTTCTTAATAACGAAACTGGCGAACCTAATAGTTCAACCATTCATTTTGACAATG
TATTCAATTGGGGAGAAGGTACCGAAGCCGGAGATTTATAG

第1圖(續圖)

胺基酸序列，FLO8蛋白質巴斯德駒形氏酵母，SEQ ID NO:3

>ANZ77695.1 BA75_04606T0 [Komagataella pastoris] LisH結構域加下劃線

MNKPNGSGQQPPSRGMKQDPGGPVTSSTTPGTNTGFENSHSMGADVEPDVGAASPRHILNGYIHDYLVKSNMQNLA
DQFAQESDLLETDLTVPMDTPTGYLLEWWMVFWDLFNARLKQRGSQKAHQYIQLNMLRQQQQRTMRNTARVQKVPL
RPHTQSSPSMSQTFIPQQPQQQAQAQAQQHAQAQAQVQAHQQAQHHAQAQVPMQSQPHQQGGQTQQQQPINTGSPA
GPNAINSRVQHLAQQQMNHLRQQATATTQQPIPQQNIPSNQQGPAGPYPTSPSRRPRLLSNESGASAPSVMTKSQL
QGGPPSQQPHQQQAQQVGPPNQHQGQSSSFYSGMPPQGVVVPHQFNPQQYANMLARQQHVQAQQQVQLQQVPHVQQ
RQQQDQQQHRLSAGSPGHPSFGVFQQPPPMSNHNQVMINQQGETFFDPHSPYAQPNGYPQPQQQQQQQQQQQQQQQ
QQQQQQQQKQQQPPPRQPQRQQAMATAPLPHSTSASGTPHTATTPRFSQPGPVYQQPLPASQPQHSPPTSIQQQEP
IPTPGSQHQQIAQPQSQNQHQQPQQPQASASKMVGIQEYQKELMMLEKQNKQRHDMAIKKGSGHFSNFDPIPEHTQ
TEPKFNVNVMLPPQNSAVATKNTPGTSPGTQTQNTAHSTGNTSAGSTPNNVVPVRKKKEPSKKKSKKATEPPTPTT
PQTPIAARAHQNSTGGISGNNAATKRRKREPLVDQTVSPNLNEASKSTKPGKISSQNDFTGSDNGFLQDFGDGTGP
PTGTDDMEFDFNSFLNNETGEPNSSTIHFDNVFNWGEGTEAGDL

核苷酸序列，FLO8蛋白質巴斯德駒形氏酵母，SEQ ID NO:4
>CP014587.1:1153190-1155604 巴斯德駒形氏酵母菌株ATCC 28485
染色體4序列

ATGAACAAGCCAAACGGGTCTGGACAACAACCACCGTCACGCGGAATGAAGCAAGACCCAGGAGGCCCAG
TTACCTCATCTACGACACCCGGTACCAATACTGGCTTTGAAAACTCTCATTCCATGGGAGCGGATGTGGA
GCCTGATGTTGGTGCCGCCTCTCCTCGCCATATTCTTAATGGGTACATTCATGATTACTTAGTCAAATCT
AATATGCAAAATTTGGCCGATCAATTTGCTCAAGAGTCGGATCTCTTAGAAACAGACCTAACGGTACCAA
TGGATACACCTACAGGCTATCTTTTAGAGTGGTGGATGGTATTTTGGGACCTTTTCAATGCCCGCCTAAA
GCAACGAGGTTCACAGAAGGCTCATCAGTATATTCAGTTGAACATGCTACGACAACAACAGCAGAGGACT
ATGCGAAATACAGCCCGTGTTCAGAAAGTCCCGTTGAGACCACACACCCAATCATCTCCTTCAATGTCAC
AGACCTTTATTCCACAGCAGCCTCAACAGCAAGCACAGGCACAGGCACAGCAGCACGCCCAAGCTCAAGC
GCAAGTCCAGGCTCATCAGCAAGCACAGCATCATGCGCAGGCTCAAGTGCCAATGCAATCGCAACCACAT
CAGCAAGGAGGCCAAACTCAACAACAGCAACCCATTAACACTGGGTCTCCTGCGGGGCCAAATGCTATCA
ACTCTCGTGTGCAACACTTAGCGCAACAACAGATGAATCATCTTCGCCAGCAGGCAACTGCCACTACCCA
GCAACCTATCCCGCAACAGAATATTCCATCAAACCAGCAGGGCCCTGCGGGCCCTTATCCTACATCGCCT
TCAAGAAGACCGAGATTACTGTCTAACGAATCGGGTGCAAGTGCACCCTCTGTAATGACGAAGTCACAGC
TCCAAGGAGGTCCTCCATCACAACAACCACACCAACAGCAAGCTCAGCAGGTAGGACCCCCCAATCAACA
TCAAGGCCAGTCCTCTTCCTTTTATTCGGGCATGCCTCCTCAAGGAGTTGTGGTTCCTCATCAGTTCAAT
CCTCAGCAGTATGCCAATATGCTAGCAAGACAACAGCATGTGCAAGCTCAACAACAGGTTCAGTTACAGC
AGGTTCCACATGTGCAACAAAGACAACAGCAAGACCAACAACAACACCGCTTGTCAGCCGGTTCACCAGG
GCATCCTTCATTTGGCGTTTTTCAACAACCTCCTCCGATGTCAAACCATAATCAGGTCATGATCAACCAG
CAGGGAGAAACCTTTTTTGATCCTCATTCACCATATGCTCAACCTAATGGGTACCCCCAGCCACAGCAAC
AACAACAACAGCAGCAACAACAACAACAACAACAACAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAGAAGCAGCA
ACAGCCACCACCAAGACAGCCTCAGCGCCAACAAGCGATGGCTACGGCTCCTTTGCCTCATTCTACTTCT
GCCTCGGGTACTCCTCACACGGCCACCACACCTAGATTCTCCCAGCCTGGTCCTGTTTATCAGCAGCCTT
TACCTGCATCTCAACCGCAACATTCTCCGCCTACTTCTATTCAGCAACAGGAACCAATTCCAACTCCTGG
GTCACAACATCAGCAAATAGCACAACCGCAATCACAGAATCAACACCAGCAACCGCAGCAACCTCAAGCA
AGTGCTTCTAAAATGGTGGGTATACAGGAGTACCAGAAAGAGTTAATGATGCTTGAGAAGCAGAACAAAC
AACGTCATGACATGGCAATTAAGAAGGGAAGCGGACATTTCTCTAATTTTGATCCAATTCCAGAGCACAC
ACAGACTGAACCAAAATTCAATGTGAACGTAATGCTCCCTCCCCAGAACTCTGCAGTGGCCACGAAGAAT
ACTCCTGGAACTTCTCCTGGTACGCAAACTCAAAACACTGCACACAGTACTGGCAACACTTCTGCTGGGT
CTACACCGAATAATGTTGTACCAGTTCGAAAAAAGAAGGAGCCATCTAAAAAGAAATCAAAGAAGGCTAC
CGAACCTCCAACTCCTACTACTCCACAGACACCAATTGCAGCTAGGGCACATCAAAACTCTACGGGCGGC
ATTTCAGGTAATAATGCTGCTACTAAGCGACGAAAAAGGGAGCCGCTGGTCGACCAAACAGTTTCACCTA
ACCTTAACGAAGCTTCGAAATCAACAAAGCCTGGGAAAATCTCATCTCAAAATGACTTTACAGGTTCTGA
CAATGGATTTTTACAGGATTTTGGCGATGGAACAGGTCCCCCCACTGGAACTGACGATATGGAGTTTGAT
TTTAACAGTTTTCTCAACAACGAAACTGGTGAACCTAATAGTTCAACCATTCATTTTGACAATGTATTTA
ATTGGGGGGAGGGTACTGAAGCCGGGGATCTATAG

第1圖(續圖)

釀酒酵母之FLO8異種同源物(菌株ATCC 204508 / S288c)，SEQ ID NO:5

>sp | p40068 | FLO8_酵母轉錄活化子FLO8 OS=釀酒酵母
(菌株ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=FLO8 PE=5 SV=2
LisH結構域加下劃線

MSYKVNSSYPDSIPPTEQPYMASQYKQDLQSNIAMATNSEQQRQQQQQQQQQQQQWINQPTAENSDLKEKMNCKNT
LNEYIFDFLTKSSLKNTAAAFAQDAHLDRDKGQNPVDGPKSKENNGNQNTFSKVVDTPQGFLYEWWQIFWDIFNTS
SSRGGSEFAQQYYQLVLQEQRQEQIYRSLAVHAARLQHDAERRGEYSNEDIDPMHLAAMMLGNPMAPAVQMRNVNM
NPIPIPMVGNPIVNNFSIPPYNNANPTTGATAVAPTAPPSGDFTNVGPTQNRSQNVTGWPVYNYPMQPTTENPVGN
PCNNNTTNNTTNNKSPVNQPKSLKTMHSTDKPNNVPTSKSTRSRSATSKAKGKVKAGLVAKRRRKNNTATVSAGST
NACSPNITTPGSTTSEPAMVGSRVNKTPRSDIATNFRNQAIIFGEEDIYSNSKSSPSLDGASPSALASKQPTKVRK
NTKKASTSAFPVESTNKLGGNSVVTGKKRSPPNTRVSRRKSTPSVILNADATKDENNMLRTFSNTIAPNIHSAPPT
KTANSLPFPGINLGSFNKPAVSSPLSSVTESCFDPESGKIAGKNGPKRAVNSKVSASSPLSIATPRSGDAQKQRSS
KVPGNVVIKPPHGFSTTNLNITLKNSKIITSQNNTVSQELPNGGNILEAQVGNDSRSSKGNRNTLSTPEEKKPSSN
NQGYDFDALKNSSSLLFPNQAYASNNRTPNENSNVADETSASTNSGDNDNTLIQPSSNVGTTLGPQQTSTNENQNV
HSQNLKFGNIGMVEDQGPDYDLNLLDTNENDFNFINWEG

釀酒酵母之FLO8異種同源物(CEN.PK113-7D)，SEQ ID NO:6

>EIW10903.1 Flo8p [釀酒酵母CEN.PK113-7D]
LisH結構域加下劃線

MSYKVNSSYPDSIPPTEQPYMASQYKQDLQSNIAMATNSEQQRQQQQWINQPTAENSDLKEKMNCKNTLNEYIFDF
LTKSSLKNTAAAFAQDAHLDRDKGQNPIDGPKSKENNGNQNTFSKVVDTPQGFLYEWWQIFWDIFNTSSSRGGSEF
AQQYYQLVLQEQRQEQIYRSLAAHAARLQHDAERRGEYSNEDIDPMHLAAMMLGNPMAPAVQMRNVNMNPIPIPMV
GNPIVNNFSIPPYNNANPTTGATAVAPTAPPSGDFANVGPTQNRSQNVTGWPVYNYPMQPTTENPVGNPCNNNTTN
NTTNNKSPVNQPKSLKTMHSTDKPNNVPTSKSTRSRSATSKAKGKVKAGLVAKRRRKNNTATVSAGSTNAGSPNIT
TPGSTTSEPAMVGSRVNKTPRSDIATNFRNQAIIFGEEDIYSNSKSSPSLDGASPSALVSKQPTKVRKNTKKASTS
AFPVESANKLGGNSVVTGKKRSPPNTRVLRRKSTPSVILNADATKDENNMLRTFSNTTAPNIHSAPPTKTANSLPF
PGINLGSFNKPAVSSPLSSVTESCFDPESGKIAGKNGPKRAVNSKVSASSPLSIATPPSGDAQEQRSSNVPGNVVI
KPPHGFSTTNLNITLKSSKIITSQNNTAFQELPNGGNILEAQVGNDSRSSKGNRDTLSTPEEKKPSSNNQGYDFDA
LKNSSSLLFPNQAYASNNRTPNENSNVADETSASTNNGDNDNTLIQPSSNVGTTLGPQQTSTNENQNVHSQNLKFG
NIGMVEDQGPDYDLNLLDTNENDFNFINWEG

解脂耶氏酵母之FLO8異種同源物(CLIB122)，SEQ ID NO:7

>XP_503484.1 YALI0E03102p [解脂耶氏酵母CLIB122]
LisH結構域加下劃線

MPAKSDKELLNAYIYDYLLKHNMHDSARTFGAEAKVVPNVKKEDDKDLPKPLIPIDAPQGFLYEWWALFWDIYSAR
GSKGGGSVPAQQYVQGTMRLRQEHAARAQLQQQHQAQQHAQAQAAAQVQGQAQGQGQGQNPTQGPQPQGHMGMPGQ
GPHQPGGPFMNGNMMFPPGQMRMGQLPQHLQQQGTGVAGANPSDDSSSPGGTSPAKRQRLSPDMGGQSHPEQQGQH
MMGTPNPNNPVFNSQVMQQLKASQGQMPNLQQQQQAQLQQYSNTLSLAQQRAMMNAKGGPNGQPGQPGQPGQPGQP
GQPGQPGQPGQPLPMGYEGMEPGFMGGNGLILNAQQMRQQQAGSGGAAGSGQLNGNSNALHDYQMQLMLLEQQNKK
RLMVARQEQQEGQPRAEGQAAAAGANPGARMSGQFKRPGSSPVVGNIGDGRRVTPKLPNQPSPLIDANRASPLQSN
FNGQGDFNVVVGPSGQMMRMQQPQQQGGPPQQQGQQQGGPGQQQGGPGQQPQQGQQQGQQGGPQGGQHRFDDPQQL
PQSQNGGPQPGSAPGQLPQTQGGPQRPPSRVSQMPPPGVQGGQRTQPSSPGQASNPGSGGSSGSAPGGTTPTQANK
QLKGKKAEPKKRAKKGNQPVTPKAVSESPTPTTPATPSAASNQSLLSKATNFAANNKQAQAAAHAQAQAQAAAQAQ
SQMHMGGMGGSSSGLELDVNGGMGLDNDSSSFLNDFSTGNEGDVGDMDFDFNSFLNTDDNAAGALKFDSGSAFGWG
EGVEAMNE

第1圖(續圖)

多形緒方酵母之FLO8異種同源物，SEQ ID NO:8

>XP_018209309.1預測蛋白質OGAPODRAFT_77715 [多形緒方酵母]
LisH結構域加下劃線

MSQNATPQTTEGHMSMNDQQSNSSSGTNNTEHPSSSSVSSVPTVSDSTAVNSRELLNAYVYDFILKSGFTATASAF
FKEANIPVIHSEKRPTNSPSSSATGTSDLPASFMTMDAPQGFLYEWWQIFWDVFNARTQRGGTTNATQYYHYVNLK
QKQDHLMSQQAAAVAAASTVMNGNNTSMSGAPVTSAAQDIGVLMPQQQQQQQQAQMAHPPQQVPMAQQQRVNARMQ
QPQQQQSQSMPMHPQAAAQAQMNTLRQQQIAQQAQAAQVAAQAVSQRGSPSKRQRMDAAGNGSATEINQTSSPNIA
MNSQQQQQQQQHPPMPMPQGMMIPNQFGVPQQYAMFAAAQAAQQGQSQQKFNQYMIPNFQNQPQQPQQQMLMHQQM
HQQSVHMQHDQQHPPPPPPNVPQHSQTFSNPNDFFHEMPKQNNPGTARVNDTAIKDYEKQLRLMESQNRRRLDVHR
NVSDSKDPNSPGSAQFTEYSAMLNQMPPQHAAASIMQQRASPATKASPTTKSPANGAPPANGKQKKAPRKARKNSS
SVPATPLTPANNQPTPQTNIPPTPQNTTPQQTPQSSAAAASQVMAGKKGIKRKNRGRAIYPIEYSR

黑麴黴之FLO8異種同源物(CBS 513.88)，SEQ ID NO:9

黑麴黴

>XP_001395127.2 cAMP-依賴性蛋白激酶途徑蛋白質(Som1)
[黑麴黴CBS 513.88]
LisH結構域加下劃線

MNQMNQMNMAGMNPGAGGPVGGVPMINNGSAAPRNEQNINNIPENMINNLNTYIYDYFLKRGYHDCARALVKDESI
KLNTEPPIKTSPGHRRDADVNGVDGDTMMTDGKDGDKLKIPDDLPRPNLPSEGQQSSFLLDWFSLFWDFFWAQRKK
GNSNDVRSYLTHTQNMMRLREQHQNQLLRQQPLMNGQMGQMNIRRNGMVPPNLQKTVLQNNTTGLSQQQLAQMHKN
QQVQMMQQMQREHSDMDMNGHRPQSPASAENAPSPSKRPRLEGGPMNGQQLAPNGRGQAQGIPGQPTPQALLMQNG
LNRAMNPNQFQAFQQSGPAAQQKQMQGMPNGMMNPANVMANPQTEMVSIPEGQVYPINGDYYGANGQMAQVRTGMQ
TPGGQHGNHALQDYQMQLMLLEQQNKRRLMMARQEQDSMARPDGQPQMPGQQLPPGTSPQGSRAGTSPNPNDQMKR
GTPKMPQTGLPGSPSAADAMAQGRGSPASMNFPGGQMPPEMAGPQFFVKNMADGMAAPNGMRPPSSNPAFSTPQMG
QPIQAGANRMPNGGWQPQQGAQGQPMAPQQSPATQPQSTGTPQERNAMPPPQAPPAPGANVGRTQPPSPQTAAPPT
PQQGNKPAPKKKETKDSRKRPKKGAAAAAAAAQANTAATPSSEAEHPPTPTPSTPITPQHPNSFNKTGANATTSAP
QQPTSAPAPPPLVQQPPDQTQQPFNELSIPDASAFNLDFSALENPDILENFDFDTFLNTDADTAGFGFDPNTSYPT
DGVETGAGDGL

第1圖(續圖)

SEQ ID NO:10 [pG1-3, pGTH1-D1240]

T模體：斜體並且加下劃線；第一及第二核心調控區：斜體、加雙下劃線，
第一與第二核心調控區之間的間隔子核心區：斜體；轉譯啟始位點：虛線；
粗體：重複調控區；

CAAACATTTGCTCCCCCTAGTCTCCAGGGAAATGTAAAATATACTGCTAATAGAAAACAGTAAGACGCTCAGTTGT
CAGGATAATTACGTTCGACTGTAGTAAAACAGGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACGAGAGTTTTTTACGGCGCCGC
CATATTGGGCCGTGTGAAAACAGCTTGAAACCCCACTACTTTCAAAGGTTCTGTTGCTATACACGAACCATGTTTA
ACCAACCTCGCTTTTGACTTGACTGAAGTCATCGGTTAACAATCAAGTACCCTAGTCTGTCTGAATGCTCCTTTCC
ATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCACTTTTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGCCAATAGCGCGTTTCATATGCGCTTT
TACCCCCTCTTTTGTCAAGCGCAAAATGCCTGTAAGATTTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACAGG
CTAATTCCCTGAAAAAACTGCAGCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTTTTCCTGATATGCATCA
AAACTCTAATCTAAAACCTGAATCTCCGC*TATTTTTTTTTTTTTTT*GATGACCCCGTTTTCGTGACAAATTAATTT
CCAACGGGGTCTTGT**CCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGG*ATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTT
TCCGGTT*ATTACCCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATA**CGGTGGTCTGGATTAATTAA
TACGAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTTTTCCTGATATGCATCAAAACTCTAATCTAAA
ACCTGAATCTCCGC*TATTTTTTTTTTTTTTT*GATGACCCCGTTTTCGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGT
**CCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGG*ATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTTCCGGTT*ATTACCCC
ACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATAC**GGTGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTAC
ATTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGA
CCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATA
AAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

SEQ ID NO:11 [pG1-D1427, pG1-4 (PG1-D1427-2xTA(T)14]:

包含兩個作為(T)n (n=14)之T模體的實例，各模體延伸先前TA (將T模體在其5'-末端延伸，
從而成為TA(T)n模體)]

T模體：斜體並且加下劃線；第一及第二核心調控區：斜體、加雙下劃線，
第一與第二核心調控區之間的間隔子核心區：斜體；轉譯啟始位點：虛線；
粗體：重複調控區；

CAAACATTTGCTCCCCCTAGTCTCCAGGGAAATGTAAAATATACTGCTAATAGAAAACAGTAAGACGCTCAGTTGT
CAGGATAATTACGTTCGACTGTAGTAAAACAGGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACGAGAGTTTTTTACGGCGCCGC
CATATTGGGCCGTGTGAAAACAGCTTGAAACCCCACTACTTTCAAAGGTTCTGTTGCTATACACGAACCATGTTTA
ACCAACCTCGCTTTTGACTTGACTGAAGTCATCGGTTAACAATCAAGTACCCTAGTCTGTCTGAATGCTCCTTTCC
ATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCACTTTTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGCCAATAGCGCGTTTCATATGCGCTTT
TACCCCCTCTTTTGTCAAGCGCAAAATGCCTGTAAGATTTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACAGG
CTAATTCCCTGAAAAAACTGCAGCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTTTTCCTGATATGCATCA
AAACTCTAATCTAAAACCTGAATCTCCGC*TATTTTTTTTTTTTTTT*GATGACCCCGTTTTCGTGACAAATTAATTTC
CAACGGGGTCTTGT**CCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGG*ATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTT
CCGGTT*ATTACCCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATA**CGGTGGTCTGGATTAATTAAT
ACGCCAAGTCTTACATTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAAACAAGATGAGCCAATTTATTGGAT
TAGTTGCAGCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGATGCAGTG
AGTTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCTTAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATG
TTTTTCCTGATATGCATCAAAACTCTAATCTAAAACCTGAATCTCCGC*TATTTTTTTTTTTTTTT*GATGACCCCGTT
TTCGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGT**CCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGG*ATAAATGG
A*CGCCTGCTCCATATTTTTCCGGTT*ATTACCCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATA**CG
GTGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACATTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAAACAAG
ATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGAT
GATGCACTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

第1圖(續圖)

pG1, SEQ ID NO:12

CAAACATTTGCTCCCCCTAGTCTCCAGGGAAATGTAAAATATACTGCTAATAGAAAACAGTAAGACGCTCAGTTGT
CAGGATAATTACGTTCGACTGTAGTAAAACAGGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACGAGAGTTTTTTACGGCGCCGC
CATATTGGGCCGTGTGAAAACAGCTTGAAACCCCACTACTTTCAAAGGTTCTGTTGCTATACACGAACCATGTTTA
ACCAACCTCGCTTTTGACTTGACTGAAGTCATCGGTTAACAATCAAGTACCCTAGTCTGTCTGAATGCTCCTTTCC
ATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCACTTTTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGCCAATAGCGCGTTTCATATGCGCTTT
TACCCCCTCTTTTGTCAAGCGCAAAATGCCTGTAAGATTTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACAGG
CTAATTCCCTGAAAAAACTGCAGATAGACTTCAAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTTTT
CCTGATATGCATCAAAACTCTAATCTAAAACCTGAATCTCCGCTATTTTTTTTTTTTTTnnGATGACCCCGTTTTC
GTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGTCCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGGATAAATGGACG
CCTGCTCCATATTTTTCCGGTTATTACCCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATACGGTG
GTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACATTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAAACAAGATG
AGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGAT
GCACTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

其中位置592及593處之n為T或不存在

pG3, SEQ ID NO:13

GTAAATAGCGGCAGCAATCCAGTAACCTTTTCTGAATAGCAGAGCCTTAACTAAAATAATGGCCAGGGTAAAAAAT
TCGAAATTTGACACCAAAAATAAAGACTTGTCGTTATAAGTCTTAACAAAGTCCGCAATTTTGGAGCTAACGGTGG
CGGTTGCTGGGATATTCAATAATGGTAGAATGTTGCTGCGGGTATATGACAGAGCGTGAAACACACTGAACAAGGT
AAATGGAACAACAGCAATTGCAATATGGGGGAGGATAGTCAAGAACAAAGCAGCAATGGCAAAGTACTGAATATTC
TCCAAAGCCAAAAGGTCCAGTGGTTTCAACGACAAAGTCTTGTTGGTATAGCTTTGGAACAAAAGGACACCGAAAG
ACTCGACAGCGCCCACAAATACAGCGTTGTAGAAGAACGAATTGATTGCTCCAGAGCTTCTAATAGTCAGAAGATA
CCCCAAACCTCCGAGCAACGTTAGCACATGACCTAAGAACCAGGCGAAGTGAAGAGTCTGGAATAACGACACCCAG
TCAGTTTTTCCTGAGCTCCTGGTGGGATTGGTAGAAGCATTTGATTTGCTTGGAGTGGTTTTATTTGAAGATGGTG
TTGAAGCCATTGTTGCTAAAGAGTCGGAGTTTTGCTTTTAGGGTTTGTTAAGCAAAGGAGGAAAAACTGCGCCGTT
TGAAGTCCCAGGTAGTTTCGCGTGTGAGGCCAGCCAGGGAAAGCTTCCTTCGGTACTTTTTTTTCTTTTGCAGGTT
CCGGACGGATTAAGCTTCGGGTTATGAGGGGGGCGGTAGCCAATTCCGGACACAATATTGCGTCGCAGCTAGTCAC
CCCGCCATAAATATACGCAGGATTGAGGTAATAACATCGATAGTCTTAGTAATTAATACAATTCAGTGGCGAATTT
GGCAACATGACGTAAGGCCCACTGTTGTCTATAAAAGGGGATGAATTTTCATGTTTTTGAGGCCTCCCGGACAATT
TATTGAACTCAA

pG4, SEQ ID NO:14

TGGACTGTTCAATTTGAAGTCGATGCTGACGATGTCAAGAGAGATGCTCAATTATATTTGTCATTTGCTGGTTACA
CTGGAAACGCTACTTTTGTTGGCGGAAACTCTACCAGTTTGGCCGTCCATGTAAACGATGTCGTTCTGGGCCGTGA
CCGTTTCAACACGAACATAACCAATGACAAATCCACTTACAGGTCTAGTTCATATGGAGGCAATTGGTACCTTACT
TCTTTGGATGTCCCAAGTGGGGCTTTAACGTCTGGTACTAACAATGTCTCGTTTGTCACTACAAACTCCGAGGTAA
ATAAAGGATTCTTGTGGGATTCTCTCAAGTTTGTTTGGAAGTTGTAACAGGTTTATAAGCATATCGTGCGCTTGTC
CACAATTGAATCATTTATTGTTGCGAGATACATGAACAAAGTGTGAACTGGGACCCATTACTACAATTCCCACGCA
ACCGTTGTTTCAAAGCCCATATTTTTTGACAATTGTTTCGTTACACCCCCAGTTTGATGTACATCGCTTGCAATGA
TGTGTGTCCCGGAGTATTTTCCATATTCAGCTTGAATTCGTATACTCAACCAATATCTGGGGGTATACTTTTATGT
AACCTATACAAATCAACTATACTATTTCACCTTTCGACCAATCATCTCCCATCTTGTTAAGTTTTGCTTCCTATAT
CCCTGACCCTGACATCACCCATGATTCCGCTCAACGGTTCTCCTCTACATCGTCCCTCTTTTGGAGAGGGTGTTCA
GTTTGACATTCAAATTACCCCCCGCCATCACGCGCAACCGAGACCGCACCCCCGAATTTTCACAAATTACCCCACA
CCCTATACTCCACCACTATGAGGGTTATTAGAACTGATCACGTATAAATACCACCGCAAGTTCCCAAGGGATCGTG
TTCTTCTTCTCCAATTGCAATCATATTTCTGACTCTTTCTAGTTCAGATTAATTCCTTTACACTTGCTTTTTTCCC
TTACCTTTATCC

第1圖(續圖)

pG6, SEQ ID NO:15

AGACCAGCAGTTTAACTACGCAAATCCACAGGAATTTCTACATCACAATACCAATGGTAATACCACGACGTCAAGG
AATGGAAACGACGACTTGGAGGAAGACTTCGTCAACCTCTTGCGGAGTACCCGAGGCTAAGACAATAAGAAGAAAA
AAAAAAGAAAAGCGGTGGGGGAGGGATTATTAAATAAGGATTATGTAACCCCAGGGTACCGTTCTATACATATTTA
AGGATTATTTAGGACAATCGATGAAATCGGCATCAAACTGGATGGGAGTATAGTGTCCGGATAATCGGATAAATCA
TCTTGCGAGGAGCCGCTTGGTTGGTTGGTGAGAGGAGTGAAATATGTGTCTCCTCACCCAAGAATCGCGATATCAG
CACCCTGTGGGGGACACTATTGGCCTCCCTCCCAAACCTTCGATGTGGTAGTGCTTTATTATATTGATTACATTGA
TTACATAGCTAAACCCTGCCTGGTTGCAAGTTGAGCTCCGAATTCCAATATTAGTAAAATGCCTGCAAGATAACCT
CGGTATGGCGTCCGACCCCGCTTAATTATTTTAACTCCTTTCCAACGAGGACTTCGTAATTTTTGATTAGGGAGTT
GAGAAACGGGGGGTCTTGATACCTCCTCGATTTCAGATCCCACCCCCTCTCAGTCCCAAGTGGGACCCCCCTCGGC
CGTGAAATGCGCGCACTTTAGTTTTTTTCGCATGTAAACGCCGGTGTCCGTCAATTAAAAGTCGCAGACTAGGGTG
AACTTTACCATTTTTGTCGCACTCCGTCTCCTCGGAATAGGGGTGTAGTAATTCTGCAGTAGTGCAATTTTTACCC
CGCCAAGGGGGGGCGAAAAGAGACGACCTCATCACGCATTCTCCAGTCGCTCTCTACGCCTACAGCACCGACGTAG
TTAACTTTCTCCCATATATAAAGCAATTGCCATTCCCCTGAAAACTTTAACCTCTGCTTTTTCTTGATTTTTCCTT
GCCCAAAGAAAAG

pG8, SEQ ID NO:16

CTGCACAACCATTGCCAGTAAGGACGAAGAGAAGGCCCCACTACCCAAAATTCAGGATAACGTCTTCATACCATGC
AGCGACGCCTACAAGACGCTGTCAAGACATGCCAACTTCAACGAAGTGAACTTTAACACATTGATCGGGAAATTGA
CCACCAAGGGAATGCTGGTTGAGGCTGGAAGCGTTGCCAGTGTCCTGAGGGAACTGGACCGAAAGTTTAGTAATGC
ATAAGAGGATATATATAGGAATGCAGTAATAATATTAGTACCCATTAAGTGGGCTAAGCCATTGGAAGGCCGTCTG
ACTGATGGTGGTGTTCTTCTCATTTAGATAGTGCATTTGCAACTACCGTCTGAGATTGAGTTTGATGTGAAGCTCC
AGCGCCAAAACAGTATAAGAACCTTATCTCCGCATTATTGTTCTTGCGTAAAAGTTTGTGTGAAGAAACAGGGGTA
GTTGCGCAGATTAGTTGTAATATGCGCATAGGATGGGTCATTGACTTCTTTCCTCGAAAGAGCCACACCGTTAGCT
AAAAAAGGACGCGCATCTACCCCAAAATAGAATGTGGGGAAATAGGACGCGCAACTTCCTCTCAATCACTGGACGT
CAGAAAAACAAATGCGCAATCGAGTCACCCTCCGTGATACCCTCCGTGATACCCCCTCTCCGTCTATTCTGACAGC
GTCTCCCCATGACGTTTCAATCTACTTAGAAAAGATTTCGTTTTTTTTTCCTTCAATTACACGATCTCATCTTCTG
CAAGGGTCTGGAGGACATCACCAATCTGCGACTCCATAACTTAGTCCTGAGTTTATATTTACGCTTCATCTGATGA
GTAGGAAGAAAAAGTTTCACGAAATTCCCCCGCCAACTTGCCCTTCGGAATAAGCAGCCACTCTCCTTCTGCCCAT
AGTAAGCTTGCGCGAGGCCCCAACTTGGCCAGAAACTTTAAATATGCCAAACAATCTCCCCCAATCTAAGTTCTCC
CTCTTCTAAAAA

第一核心調控區，SEQ ID NO:17

ATAAATGGA

第二核心調控區，SEQ ID NO:18

CATATTTTTCCGGTT

第1圖(續圖)

藉由SEQ ID NO:19-34中之任一者來鑑別之T模體

- TA$(T)_{13}$: SEQ ID NO:19: *TATTTTTTTTTTTT*
- $(T)_{15}$: SEQ ID NO:20 *TTTTTTTTTTTTT*
- TA$(T)_{14}$: SEQ ID NO:21: *TATTTTTTTTTTTTT*
- $(T)_{16}$: SEQ ID NO:22: *TTTTTTTTTTTTTT*
- TA$(T)_{15}$: SEQ ID NO:23: *TATTTTTTTTTTTTTT*
- $(T)_{17}$: SEQ ID NO:24: *TTTTTTTTTTTTTTT*
- TA$(T)_{16}$: SEQ ID NO:25: *TATTTTTTTTTTTTTTT*
- $(T)_{18}$: SEQ ID NO:26: *TTTTTTTTTTTTTTTT*
- TA$(T)_{17}$: SEQ ID NO:27: *TATTTTTTTTTTTTTTTT*
- $(T)_{19}$: SEQ ID NO:28: *TTTTTTTTTTTTTTTTT*
- TA$(T)_{18}$: SEQ ID NO:29: *TATTTTTTTTTTTTTTTTT*
- $(T)_{20}$: SEQ ID NO:30: *TTTTTTTTTTTTTTTTTT*
- TA$(T)_{19}$: SEQ ID NO:31: *TATTTTTTTTTTTTTTTTTT*
- $(T)_{21}$: SEQ ID NO:32: *TTTTTTTTTTTTTTTTTTT*
- TA$(T)_{20}$: SEQ ID NO:33: *TATTTTTTTTTTTTTTTTTTT*
- $(T)_{22}$: SEQ ID NO:34: *TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT*

主要調控區：(SEQ ID NO:35)：ATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTTCCGGTT

(包括第一及第二核心區，SEQ ID NO:17及18，加下劃線)

間隔子核心區：(SEQ ID NO:36)：CGCCTGCTC

間隔子主要區：(SEQ ID NO:37)：[包括T16模體，斜體並且加下劃線]

ATTACCCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATACGA
GATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTTTTCCTGATATGCATCAAAACTCTAATCTAAAACCTGA
ATCTCCGC*TTTTTTTTTTTTTTT*GATGACCCCGTTTTCGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGT**CCGGATAA**
GAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGG

(pG1之)例示性轉譯啟始位點：(SEQ ID NO:38)： TTCCACCCTT

(pAOX1之)例示性轉譯啟始位點：(SEQ ID NO:39)： TTCGAAACG

第1圖(續圖)

例示性轉譯啟始位點(真核生物之共有序列)：

(SEQ ID NO:40):

gccgccRcc

其中位置7處之R為A或G，較佳A
[大寫字母指示高度保守鹼基；R=嘌呤 (A或G，其中A在此處為更時常出現的)，亦參見Kozak M (1987).「An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs」. Nucleic Acids Res. 15(20): 8125-8148.]

例示性轉譯啟始位點(例如，用於pPUZZLE載體中)：

(SEQ ID NO:85): CCTGCAGGCC

例示性轉譯啟始位點(巴斯德畢赤酵母之共有序列)：

(SEQ ID NO:86):

nnnnnnAnn

其中
位置1-6處之n為任何核酸，較佳A；
位置8-9處之n為任何核酸，較佳A

pG1a (SEQ ID NO:41)

GGAATCTGTATTGTTAGAAAGAACGAGAGTTTTTTACGGCGCCGCCATATTGGGCCGTGTGAAAACAGCTTGAAAC
CCCACTACTTTCAAAGGTTCTGTTGCTATACACGAACCATGTTTAACCAACCTCGCTTTTGACTTGACTGAAGTCA
TCGGTTAACAATCAAGTACCCTAGTCTGTCTGAATGCTCCTTTCCATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCACTTTTGCA
TGCACTGCGGAAGAATTAGCCAATAGCGCGTTTCATATGCGCTTTTACCCCCTCTTTTGTCAAGCGCAAAATGCCT
GTAAGATTTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACAGGCTAATTCCCTGAAAAAACTGCAGATAGACTT
CAAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTTTTCCTGATATGCATCAAAACTCTAATCTAAAAC
CTGAATCTCCGCTATTTTTTTTTTTTTTTTGATGACCCCGTTTTCGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGTC
CGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGGATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTTCCGGTTATTACCCCA
CCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACA
TTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGAC
CCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATAA
AAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

pG1b (SEQ ID NO:42)

CCATATTCAGTAGGTGTTTCTTGCACTTTTGCATGCACTGCGGAAGAATTAGCCAATAGCGCGTTTCATATGCGCT
TTTACCCCCTCTTTTGTCAAGCGCAAAATGCCTGTAAGATTTGGTGGGGGTGTGAGCCGTTAGCTGAAGTACAACA
GGCTAATTCCCTGAAAAAACTGCAGATAGACTTCAAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTT
TTCCTGATATGCATCAAAACTCTAATCTAAAACCTGAATCTCCGCTATTTTTTTTTTTTTTTGATGACCCCGTTT
TCGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGTCCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGGATAAATGGA
CGCCTGCTCCATATTTTTCCGGTTATTACCCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATACGG
TGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACATTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAAACAAGA
TGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATG
ATGCACTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

第1圖(續圖)

pG1c (SEQ ID NO:43)

CTGCAGATAGACTTCAAGATCTCAGGGATTCCCACTATTTGGTATTCTGATATGTTTTTCCTGATATGCATCAAAA
CTCTAATCTAAAACCTGAATCTCCGCTATTTTTTTTTTTTTTTGATGACCCCGTTTTCGTGACAAATTAATTTCC
AACGGGGTCTTGTCCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGGATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTTC
CGGTTATTACCCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGGATTACGGATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATA
CGCCAAGTCTTACATTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATT
AGTTGCAGCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGATGCAGTGA
GTTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

pG1d (SEQ ID NO:44)

GACCCCGTTTTCGTGACAAATTAATTTCCAACGGGGTCTTGTCCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCG
GATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTTCCGGTTATTACCCCACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACG
GATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTACATTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATA
ATAAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGACCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGG
GTGTTAGATGATGCACTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATAAAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

pG1e (SEQ ID NO:45)

CCGGATAAGAGAATTTTGTTTGATTATCCGTTCGGATAAATGGACGCCTGCTCCATATTTTTCCGGTTATTACCCC
ACCTGGAAGTGCCCAGAATTTTCCGGGGATTACGGATAATACGGTGGTCTGGATTAATTAATACGCCAAGTCTTAC
ATTTTGTTGCAGTCTCGTGCGAGTATGTGCAATAATAAACAAGATGAGCCAATTTATTGGATTAGTTGCAGCTTGA
CCCCGCCATAGCTAGGCATAGCCAAGTGCTATGGGTGTTAGATGATGCACTTGGATGCAGTGAGTTTTGGAGTATA
AAAGATCCTTAAAATTCCACCCTT

巴斯德畢赤酵母(GS115)之原生pGAP啟動子序列：SEQ ID NO:46

CTGCTACTCTGGTCCCAAGTGAACCACCTTTTGGACCCTATTGACCGGACCTTAACTTGCCAAACCTAAACGCTTA
ATGCCTCAGACGTTTTAATGCCTCTCAACACCTCCAAGGTTGCTTTCTTGAGCATGCCTACTAGGAACTTTAACGA
ACTGTGGGGTTGCAGACAGTTTCAGGCGTGTCCCGACCAATATGGCCTACTAGACTCTCTGAAAAATCACAGTTTT
CCAGTAGTTCCGATCAAATTACCATCGAAATGGTCCCATAAACGGACATTTGACATCCGTTCCTGAATTATAGTCT
TCCACCGTGGATCATGGTGTTCCTTTTTTTCCCAAAGAATATCAGCATCCCTTAACTACGTTAGGTCAGTGATGAC
AATGGACCAAATTGTTGCAAGGTTTTTCTTTTTCTTTCATCGGCACATTTCAGCCTCACATGCGACTATTATCGAT
CAATGAAATCCATCAAGATTGAAATCTTAAAATTGCCCCTTTCACTTGACAGGATCCTTTTTTGTAGAAATGTCTT
GGTGTCCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACG
TAAAATTCTCCGGGGTAAAACTTAAATGTGGAGTAATGGAACCAGAAACGTCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACC
GCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGCCCCCTTGCAGCAATGCTCTTCCC
AGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCGTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGC
TGGCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGGAAACCACCAGAATCGAATATAAAAGGCGAACACCT
TTCCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTTATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAAC
TATCAAAACACA

第1圖(續圖)

巴斯德畢赤酵母(PAS_chr1-3_0233)之Rgt1：SEQ ID NO:47

MIPTIDPKDPELVSEDTAQSASARKRSKVSRACDECRRKKIKCDATFLANSNTLLKPCTNCYKYNCSCSFTRVPLK
RGPSKGFARDGSGYERRRSSSVHSVSSSQSVTSPVPSHASLPIPPANPVSLPRLNVPGDGLLSPKAVPPTNLFWKV
PYELPSFSDRRSSVASADSFRRPSIYQSDSEDDFYSATGSQRNSISQAPRQRNLSPALSVSSTSSLNNRIKSLNMV
ASTLESNIHNYYSQGFNSSLPILPLDERILSTLLSNVSNGSSSASWDAIRSPILELFDKSILMLLRSYESQFNFND
LLDHVTEMQSIYPRIRSHLLSDELLKLIFLMSGVLTDYALILTGQPYSTGLSITVSVFNDWKTYENVQRVLVINRA
GSLDLDYDSLPFLFARCYLSLATLDLIYSLSFSSPRLISSFANLPILDIVQKCGITKDAKLDETPLPVLDQFLNCF
LPGDTYPTALNTLKTGLVLLDFTNNRSTTLRFPFINIHDDNHMTGLSHLLSNVSDFMSQFTEVHSDSKDSQLLFLR
CIWAFWEIGSVLSELIDHFISSSANSQVGDKDASFFYEHQLKVTTLLGTFSNIASAFLTSSTTAASHPPPSISPFH
IISMVESFKMVQFLNKLIASFISLNEKLEKRELEDELSKCKEELNNLNERFQAVSSVQTLPVVHVLFRDLVFSSNR
LDTQRDRASSVVSATTTTSTATTTATTKKSSFGNLLHSDEENILPTVIDWCKEQKHSAEMFLNKNDLNGWLY

巴斯德畢赤酵母(PAS_chr2-1_0757)之Cat8-1：SEQ ID NO:48

MMPEEQVTSPQRKHQKSKAKTIRAPGSSIERVAQACDRCRSKKTRCDGKRPQCSQCAAVGFECKISDKLSRRAFPR
GYTETLEERIRELEFENKKLHKLIDLKNEQVEIKNRIDQESTLTNENLTLLNKEQEVSHSGNIHHHADGEPCNCAN
SVSARPVSIAGSVDIDTTDLSDEDDSLYSAASYNAKYHQTGTSGPEMVRLSQRYSSGNFNDPLSFEQSNAPGAAAA
ISIQNKMRTQTFVNLANLVAMSIPRTTEETLFIASLLAKICNVHGFQSKAPILTAKSIALLKDKYNYGNDEVFANI
TLKNVNFNKLTSQQSQQFFQSLNLPNQVNLDLFITTFFNTWNNFIPIINRHIFMSSYIKFNKSRETMFTDNSMFGN
EKFGEILLLITTMVMLSQERNNNREAVPSSSYKKDSTPHPHRPDASSQSNVEILQYYDHLIHEFIKSNISDDCSLP
TLESLSLQLLYCLAIGDLTTSYELRGKIITMGQQLRLHRCPSAVLGTNGSKVSQMQQGERRILFWCIYILDTFSAL
ILGVPRLLKDYEIECALPFSNESNNANVKGSIENTTNTVIINNIKLSLAGKVSDCALAVMRYSKVLGNILDSIFQR
SSINNPSVVSKSTNITEETCLLHEHALDLWRRELSPHINVDLDKSPGGVEYERLSDNQLTILFLYYHAKILIYLPL
MANESSQSRSSASYINIQQSTTSILAIANTLATKERNFYFLPLPVNLSREKVRLAFLSAKGSLEYARGGALFQESK
ILLASVINELKIETSIGMLGCLSVPCMEAVDNAMEQIMALPGKVSSVNGSNSEMKRSSSKRKSSPLRQDISGDERK
SHNIEVSDSRTPSVQSSLYPQPNQMHHPNIIKSENNEQMIPENDTPGAINDIFTSHSPPGTVTSMKEEDLPIKVPI
LLQTQQRQIYNNNPNHSLFSQQPGTQVLSGQQMPGPSSTDQQFKRITTPDGLDSLMMQDFGVDASLGLPMLDFDFN
FDFENVQNNYSQSNVSPPNSESVPSSIQGTHSNDPKDSQVSAGSLFGL

巴斯德畢赤酵母(PAS_chr4_0540)之Cat8-2：SEQ ID NO:49

MKENQASNKFNLIKNPITGKPRISQACDRCRIKKIKCDGTLPSCTNCSKIGFVCKISDRLTRSSFPKGYTKNLEQK
LIDMELDRNRLMLELNRIKKEGFDGTNNNIAMASSVSSSENLKSDDSSECQSVTVSLSSTSGPSLSPEPKQDDFRF
RVGMDGSFVLNQFLQSPLMDYIKSLNVLQFNGCANFDQSFNDDPLVLNKYHMNLNRFLNLIFYKLLLPLIHRNSNT
LNEKFAEDNNSLDSLIWKFFTNYNKLIPILEFDSFYKDYLQFIHKYYSNNQVFVDGFRKYFEFSEFEQCFIVKLIL
ILKFTLPVIHDTSVPSEIYRLISMDSLQRLFGNIDFLKPSTDKVSILLLVLHYMVLYESPKSLLDTQDEAQKYDEF
IGNLLSTAVHHITSLRLHIDPRKLQFPRPLPSNGNRLRIKLSWCYKLISKLFRVIYNIDNDSLYSLDDSHLPELQS
ISILHEELDVTIQFNNLLNLIPNNFHSLRDKQSLSKIKTQLLEWHKNFNTEFVEHFNLNDTDSDELSAEKINVLRS
KLISLNRLNCYNSYFQLVIELQLKENLDSVVSGIFGLSNEMLIDNKSSTELLNTLQQTPIIHQSSILVSLCYRIQT
GNLQDEICSILVNNYEKLLQCNDAGLPIKILPQLVHYFKGKISTNLSNSAAHEDLMNMFTLNDNLSTTTTDLDSFI
IPPKRKQDQTLPIGTKRSKSASTSSVISSDDCSLFSNSLSVPTTFSGSSISVGMDNPPSSLFGSYKRPSSIVKQEP
TINPRSNGTNTDSNLFDTFNDSIKGSLNNGLKKLKDIRCNSVVERSHSSQRNDFLMDQEDSITKETINFSELFTCG
TPTASQSIDRSPKSLLLNDLAIAPDTLVIKPDAEDLDRLKNKIRSVKSTVH

*K. phaffii*之FLO8蛋白質之LisH結構域(SEQ ID NO:50)

LLNGYIYDYLVKSNMQNLADQFAQET

*K. pastoris*之FLO8蛋白質之LisH結構域(SEQ ID NO: 51)

LNGYIHDYLVKSNMQNLADQFAQES
BLASTp: 96% identity to SEQ ID NO :50 (23/24 aa)

第1圖(續圖)

釀酒酵母之FLO8異種同源物之LisH結構域 (菌株ATCC 204508 / S288c)
(SEQ ID NO:52)

LNEYIFDFLTKSSLKNTAAAFAQDA
BLASTp：與SEQ ID NO:50之54%一致性(13/24 aa)

釀酒酵母(CEN.PK113-7D)之FLO8異種同源物之LisH結構域，(SEQ ID NO:53)

LNEYIFDFLTKSSLKNTAAAFAQDA
BLASTp：與SEQ ID NO:50之54%一致性(13/24 aa)

解脂耶氏酵母(CLIB122)之FLO8異種同源物之LisH結構域，(SEQ ID NO:54)

ELLNAYIYDYLLKHNMHDSARTFGAEA
BLASTp：與SEQ ID NO:50之71%一致性(12/17 aa)

多形緒方酵母之FLO8異種同源物之LisH結構域，(SEQ ID NO:55)

ELLNAYVYDFILKSGFTATASAFFKEA
BLASTp：與SEQ ID NO:50之62%一致性(8/13aa)

黑麴黴(CBS 513.88)之FLO8異種同源物之LisH結構域，(SEQ ID NO:56)

NNLNTYIYDYFLKRGYHDCARALVKD
BLASTp：與SEQ ID NO:50之73%一致性(8/11aa)

序列scR (SEQ ID NO:57)：
CAGGAACAACTAATGGAGTCTGGGGGTGGTTTGGTTACCCTGGGTGGTTCTCTTAAGCTTTCATGTAAGGCCTCTG
GTATTGATTTTTCGCACTACGGTATCTCCTGGGTTAGACAAGCTCCTGGAAAAGGTCTGGAATGGATCGCTTACAT
TTACCCAAATTACGGTTCTGTTGACTATGCCTCCTGGGTCAATGGTAGGTTCACTATTTCCCTTGACAACGCTCAG
AACACGGTATTCCTACAGATGATCTCCCTAACCGCTGCTGATACTGCAACCTACTTCTGTGCTCGTGACAGAGGTT
ACTACTCTGGCTCTCGTGGAACTAGACTTGACTTATGGGGACAAGGTACTCTCGTTACCATCTCTAGTGGTGGAGG
TGGTTCTGGAGGAGGAGGTTCCGGCGGAGGTGGTAGCGAGCTGGTCATGACTCAAACCCCTCCATCCCTATCTGCA
TCAGTCGGTGAAACCGTTAGAATTAGATGCCTTGCATCTGAGTTCTTGTTCAACGGTGTGTCCTGGTATCAACAAA
AGCCTGGTAAGCCTCCAAAGTTTCTCATTTCTGGTGCCTCAAACCTCGAATCTGGAGTGCCACCAAGATTTTCCGG
ATCTGGCTCTGGTACTGACTACACTCTGACAATTGGTGGTGTTCAAGCTGAGGATGTTGCTACCTACTATTGTCTC
GGTGGTTACTCAGGATCTTCCGGCCTAACTTTCGGTGCCGGTACAAACGTCGAGATCAAAGGTGGACATCACCACC
ACCATCACTAATAG

序列vHH (SEQ ID NO:58)：
CAGGTTCAGCTGCAGGAGTCCGGTGGTGGTCTGGTTCAAGCCGGTGGTTCATTAAGATTGTCCTGTGCTGCCTCTG
GTAGAACTTTCACTTCTTTCGCAATGGGTTGGTTTAGACAAGCACCTGGAAAAGAGAGAGAGTTTGTTGCTTCTAT
CTCCAGATCCGGTACTTTAACTAGATACGCTGACTCTGCCAAGGGTAGATTCACTATTTCTGTTGACAACGCCAAG
AACACTGTTTCTTTGCAAATGGACAACCTTAACCCAGATGACACCGCAGTCTATTACTGTGCCGCTGACTTGCACA
GACCATACGGTCCAGGAACCCAAAGATCCGATGAGTACGATTCTTGGGGTCAGGGAACTCAAGTCACTGTCTCTTC
AGGTGGTGGATCTGGTGGTGGAGGTTCAGGTGGTGGAGGATCCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGATCTGGT
GGAGGTGAAGTTCAACTTGTCGAATCCGGTGGTGCACTTGTCCAACCTGGTGGATCTCTTAGACTTTCTTGTGCCG
CCTCCGGTTTTCCTGTTAACCGTTACTCTATGCGTTGGTACAGACAAGCCCCTGGAAAAGAACGTGAATGGGTTGC
CGGAATGTCCTCAGCTGGTGACAGATCCTCCTACGAAGATTCTGTGAAGGGACGTTTCACCATCTCCAGAGATGAC
GCCCGTAACACCGTTTACCTTCAAATGAACTCCCTTAAGCCTGAGGATACTGCCGTCTACTATTGTAACGTGAATG
TCGGATTTGAATACTGGGGACAGGGAACCCAAGTTACTGTCTCTTCCGGTGGACATCACCACCACCATCACTAATA
G

第1圖(續圖)

信號序列(SEQ ID NO:59)：

MK**X**STNLILAIAAAS**X**VVSA，其中
位置3處之X為F或L；並且
位置16處之X為A或T。

前導序列(SEQ ID NO:60)：

MK**X**STNLILAIAAAS**X**VVSAAPVAPAEEAANHLHKR，其中
位置3處之X為F或L；並且
位置16處之X為A或T。

信號序列，aMF，釀酒酵母(SEQ ID NO:61)：

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAK
EEGVSLEKR.

輔助因子1, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:62)：
MSSDAVEQLE NFQLIKFDRF DPSTQSTIRI ARSPKPIPVK VVIVGDGGCG
KTCLLNVFAT GTFPEAYVPT IIENVVITLV TPTGQIAAVT LWDTAGQEEY
DRLRPLSYSD VDVVLLCYSI DNLSTFHNVA DKWYPEVAHF CPNTPIILVG
TKSDMRRHQK SQPHFVSPQD SSQLARQMGA VMNIECSAKE VSNVNIVFDA
AVSYCLSNSR PKTRGDNDNN RSNRRLSRAK RASMFIRGKD VSSTSGNSRE
ELVEYDQDGL AIIPDRKKRK CSII

輔助因子2, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:63)：
MLNKLFIAIL IVITAVIGET TTSSTTASLS ESPTLVWVTG TDASGRLATT
QSAYTQQFSQ LYSSIASPSS GSIGLGTIQG TVGIVRTYET ITLAS

輔助因子3, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:64)：
MSTAIPGGQR TLAKRRAANL DKKQDEPTSA RSAGAGGSSS TMLKLYTDEA
QGLKVDPLIV LVLAVGFIFS VIGLHVVAKL TGKLIN

輔助因子4, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:65：
MTPRSHIFFD ISINNQPAGR IIFELFNDIV PKTAENFRAL STGEKGIGKS
GKPLHYKGST FHRIIKDFMV QGGDFTNGNG TGGESIYGEK FEDENFQLTH
DKPFLLSMAN AGPGTNGSQF FITTVPTPHL DNKHVVFGKV IAGKATVRKI
ERNSEGEAPI EPVVIEDCGE LPEDADLTIS DETGDKYEEV LKDNENIDID
DFEQVYQAIT EIKELGTKYF KNGDTKIAFE KYQKAANYLL EYIPSDLSEE
QSSKLELLKT SVFSNVALAG LKVSKFKDTI KYATLVIEDE SADAKAKSKG
YYRRGSAYSS LKDEDSAISD FQKALELSPG DPAISQSLQR TTKARKDRLA
KEKAALSKFF E

輔助因子5, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:66)：
MTNWKAILTP AQYQVLRLGG TERPYTGQYV NFKKNGTYLC SGCQTPLYKS
GTKFDSSCGW PAFYEALPGA VKRIEDNSLG MRRIEIRCSK CDGHLGHVFE
GEGFDTPTDS RHCVNSISLK FQGEEEN

第1圖(續圖)

輔助因子6, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:67)：

MSHLLLRDSF WGRTIYHLSK HRYFSFPEEK DGFIAPEKYY LNMDQVSIHA
ESEKNIVEGL VDTSNSSLEE VKTTRVIVDW DEYDQKENPQ NWSSLLKCFV
VFEVGILTVA VYMGSAIYTP GIEDIMRDLN VSRTVATLPL TLFVIGYAVG
PMIFSPMSEH PAIGRTTIYV WTLFIFAILQ IPTALTTNIA GFCILRFIGG
FFASPALATG PASVGDVIAI PHLPVGLGLW SICAVCGPSL GPLFGAIFSQ
LVSWRWCFWF LLITSGTLFI VLGFTLPETY VPTLLYRKAR RLRALTKNEL
IISKGELDIQ DRTAKEVLIE CLWRPVDISF RDPVVLMINL YISMVYSIWY
IWFEAFPIVF LEIYGFSLIG MGASFAGILI GVLICSACYC YACHVTFARR
IIANETIHPE FFVPGAIIGG CIMPTGIFIL GWTATKSVHW IVPIIGSGLF
AAGGYLIFQT LFNYLAMSFP RYMASAFAGN DLFRSFSASV FPLFGHALYA
NLGSEKFPVG WGSSVLGFIT VAMIAIPVTF MRYGPRLRAN SRYAGP

輔助因子7, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:68)：

MTDYVTSKRP DNVLNWTSIH VSSWIGETIP EIDPSLLQNF LEHDIAGDVL
PYLKSEDLKE IGINELKHRI SIKKNIHELL VSNEKHIDTS ILSDTATELG
TLILTNKFIT QMANRKNVVD DSTHHSNNRR LTEQFNKLRK DLLPIFKWIK
ETQPLPTPEN THFANMGSVP ASPVEHTSGE STLSNPSLST INAGEGVNSA
VAGQSLGRKP TLSSRRQSHA LSPTGEHLNV SSSSPSTGNF ETLNGERPNL
RSASSGSQEH TENELLKPLR VKADEPCYKV IQNAMKRHGL SVDDWRKYAL
VICYGDEERV LGLHEKPGSI FKELKDQKQN PAIMLRQIDT NNDDQNHIET
PGGRL

輔助因子8, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:69)：

MTTNGQKRQK TRKPLLINAF VMGCAGLQNP GLWKHPKDSS HRFNQIDHWT
YLAKLAEKGK FNALFIADVL GGYDVYKGPE NLATPAVAGA QWPVTEPSAV
VSAMAAVTTN LAFGVTFSTI SEAPYHFARR LSTLDHLTKG RIGWNVVSSY
LESAARNLLN GEKLDEHDQR YLKAEEYIQI VYELLLSSWR DDAVVLDKKA
GVYTDPTRFR KINFEGKFFK VPGPHIVDPT PQRLPVILQA GTSKVGKEFA
AKHAEIVFVI SFSPDDLKPK IAEVRQLAKE KFGRNHDDIK FVALATPVIG
ATHELAEEKY QELLSYGDIE GAQALFGGWT GIDLSQYGED EELGNVSSNA
MRGAVQNWTK AIPNEKRWTR KVIAKQITVG GLGPAFVGTP EEIADELEHW
SDHAGLDGFN FTYAVNPLSF EEIVEDLIPV LQRRGLAQKE YPNPETGSTF
RKNLFGTDFV PSTHPAYNLR WRAGVSKEEF EKSLNATTNW YSSFARSGAL
GELHNTCRIL YLQIVKYKYR LRVRSEGNSI PFAKMTKENE AKRQKTSQPK
AKKQLIINAF MSGSSGNQSP GLWSYPGDKS TEYTTLDYWV ELAQKLEKAK
FHSIFIADVL GGYDVYNGPG NYSAAAKSGA QFPMIEPSAA VTAMAAATKS
ITFGVTFSTI SEAPYHFARR LGTLDLLTNG RVGWNIVSSY LDSAARNLLN
GEPLPLHADR YKRAEEFLQV VYRLFLSSWR DDAYKLDKKT RTFADPKLIR
TIDHVGEFFN VPGPQFLPPT PQRLPLILQA GTSKVGMDYA AKHAEVVFLA
SFDPESLQEK IKTVRDIAET KYNRPRDSIK FLILITVVIA DTHEDAVKRY
EDLASYADLE GAQALFSGWT GIDIGKYGED EPLEHVESNA IKSHVKNWTK
FKDNKPRARK DIAKQIGVGG SGPLLVGSVQ EIADELERWA EVSDLDGFNF
AYADYPQTFD DIIEKLLPEL NKRGVFWDDY KIPGGTFRES VFGRKFVDKD
HPAYDLRWRS DQTREEFEKK LAELEKK

輔助因子9, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:70)：

MRFSNVVLTA IAAAGVQADE ALYTVFYNDV TENAQEYLSY IQANTAAGFT
DLLSLYTELA TYTDDSYTSI FTEEDFPASE LSSFVVNLPW YSSRIEPQVA
AAETGESEEE SETGESEEES ETGEETETET GSESESESES ETSATGTGTG
TSASESAETE TSTDAAVSID HPKSTLLMGL TAAVVSITFG VFAL

第1圖(續圖)

輔助因子10, 巴斯德駒形氏酵母(SEQ ID NO:71)：

MSSFRVLDLV KPFTPFLPEV ISPERKVPFQ QKLMWTGVTL LIFLVMSEIP
LYGITSSDSS DPLFWLRMML ASNRGTLMEL GISPIVTSGM VFQLLQGIQI
LDVNMENKAD RELFQTAQKV FAILLSIGQA TVYVLTGMYG PPGELGVGVC
LLLVLQLVFA GIVVILLDEL LQKGYGLGSG ISLFMATNIC EQIFWKTFAP
TTVNRGRGKE FEGAFISFFH LILTKKDKKR ALLESFYRDN APNMFQVIAT
LVVFFTVVYL QGFRLEIPVK STRQRGPYGT YPIRLFYTSN MPIMLQSALT
SNIFIISQML YSHFPDNAFV KLIGTWEAQP GSAQLFAASG LAYYMQPPMS
LSQALLDPIK TVVYVVFVLT TCAIFSKTWI EISGSSPRDV AKQFKDQGLV
IAGHRDATVY KELKKIIPTA AAFGGATIGA LSVVSDLLGT LGSGTSILLA
VTTIYGYYEL AVKEGGFSKG GPSGFVDL