(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-502705
(P2006-502705A)
(43)公表日　平成18年1月26日(2006.1.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 14/39	(2006.01)	C07K	14/39		4B064
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 119 頁）

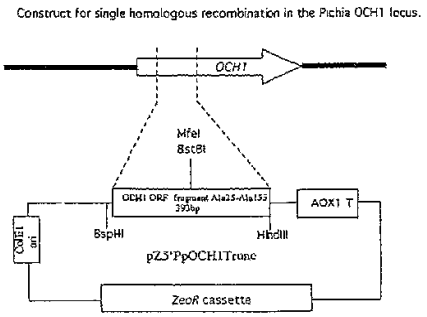
(21)出願番号　特願2004-516676 (P2004-516676)
(86)(22)出願日　平成15年6月25日 (2003.6.25)
(85)翻訳文提出日　平成17年2月9日 (2005.2.9)
(86)国際出願番号　PCT/EP2003/006711
(87)国際公開番号　WO2004/003194
(87)国際公開日　平成16年1月8日 (2004.1.8)
(31)優先権主張番号　10/185,475
(32)優先日　平成14年6月26日 (2002.6.26)
(33)優先権主張国　米国 (US)

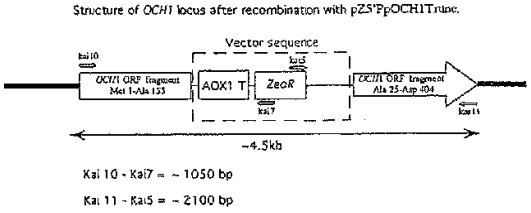
(71)出願人　503004024
フランダース　インターユニバーシティ　インスティテュート　フォア　バイオテクノロジー　（ヴィーアイビー）
ベルギー国　ビー－９０５２　ツヴィュナールデ　リュヴィッシェストラート　１２０
(74)代理人　100083806
弁理士　三好　秀和
(74)代理人　100095500
弁理士　伊藤　正和
(72)発明者　コントレラス、　ローランド
ベルギー国　ビー－９８２０　メレルベケモレンストラート　５３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ピキアパストリス（Ｐｉｃｈｉａｐａｓｔｏｒｉｓ）におけるタンパク質グリコシル化修飾

(57)【要約】
本発明は、ピキア属および特にピキア　パストリスを含む、遺伝子的に操作されたメチロトローフ酵母の株であって、減少または改変されたグリコシル化を伴うタンパク質を産生することのできる株を提供する。このような遺伝子操作されたピキア属株を用いて、減少および／または改変されたグリコシル化で糖タンパク質を産生する方法も提供される。メチロトローフ酵母を形質転換するためにα－１，２－マンノシダーゼＩ、グルコシダーゼII，ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩおよびマンノシダーゼIIに関するコード配列、あるいはＯＣＨ１崩壊配列を含むベクターも本発明によって包含される。該意図するベクターを提供するためのキットも本発明に含まれる。





Kai 10 - Kai7 = ~ 1050 bp
Kai 11 - Kai5 = ~ 2100 bp

【特許請求の範囲】
【請求項１】
メチロトローフ酵母においてα－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分を発現するベクターであって、前記ベクターは、前記α－１，２－マンノシダーゼまたは前記機能部分をコードするヌクレオチド配列を含み、前記ベクターは、前記メチロトローフ酵母において機能的ＯＣＨ１タンパク質の発現を阻害するヌクレオチド配列をさらに含むベクター。
【請求項２】
前記メチロトローフ酵母はピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）である、請求項１のベクター。
【請求項３】
前記ピキア属はピキア　パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）である、請求項２のベクター。
【請求項４】
前記α－１，２－マンノシダーゼまたは前記その機能部分は、真菌種に由来するタンパク質である、請求項１のベクター。
【請求項５】
前記真菌は、トリコデルマ　レーセイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）である、請求項４のベクター。
【請求項６】
前記α－１，２－マンノシダーゼまたは前記その機能部分は、哺乳動物種に由来するタンパク質である、請求項１のベクター。
【請求項７】
前記α－１，２－マンノシダーゼまたは前記その機能部分は、マウスα－１，２－マンノシダーゼＩＡまたはＩＢである、請求項６のベクター。
【請求項８】
前記α－１，２－マンノシダーゼまたは前記その機能部分には、ＥＲ保持シグナルのタグが付けられている、請求項１のベクター。
【請求項９】
前記ＥＲ保持シグナルはペプチドＨＤＥＬを含む請求項８のベクター。
【請求項１０】
前記ＯＣＨ１は真菌種に由来するタンパク質である請求項１のベクター。
【請求項１１】
前記真菌はピキア　パストリスである、請求項１０のベクター。
【請求項１２】
ヌクレオチドコード配列はプロモーターおよび３’終止配列に実施可能に連結されている、請求項１のベクター。
【請求項１３】
前記プロモーターは、ＡＯＸＩ，ＡＯＸII，ＧＡＰ，ＹＰＴ１およびＦＬＤからなる群より選択される遺伝子のプロモーターである、請求項１２のベクター。
【請求項１４】
ｐＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ５’ＰｐＯＣＨｌＭｕｔと表示されるベクター。
【請求項１５】
メチロトローフ酵母株においてＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分を発現するベクターであって、前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたは前記機能部分をコードするヌクレオチド配列を含むベクター。
【請求項１６】
前記メチロトローフ株はピキア属であることを特徴とする請求項１５のベクター。
【請求項１７】
前記ピキア属はピキア　パストリスである、請求項１６のベクター。
【請求項１８】

前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩは、哺乳動物種に由来するタンパク質である、請求項１５のベクター。
【請求項１９】
前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩは、植物、昆虫、線虫および原虫からなる種の群由来のタンパク質である、請求項１５のベクター。
【請求項２０】
前記原虫はリーシュマニア　タレントレ（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ　ｔａｒｅｎｔｏｌａｅ）である、請求項１９のベクター。
【請求項２１】
前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩは、タンパク質工学実験を介して得られるタンパク質である請求項１５のベクター。
【請求項２２】
前記哺乳動物種はヒトである、請求項１８のベクター。
【請求項２３】
前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたは前記その機能部分は、ゴルジ局在化シグナルに実施可能に連結されている、請求項１５のベクター。
【請求項２４】
前記ゴルジ局在化シグナルは、サッカロマイセス　セレビシエ（サッカロマイセス　セレビシエ）－Ｋｒｅ２のＮ末端部分から取り出したペプチドを含む、請求項２３のベクター。
【請求項２５】
前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたは前記その機能部分をコードするヌクレオチド配列は、プロモーターおよび３’終止配列に実施可能に連結されている、請求項１５のベクター。
【請求項２６】
前記プロモーターは、ＡＯＸＩ，ＡＯＸII，ＧＡＰ，ＹＰＴ１およびＦＬＤからなる群から選択される遺伝子のプロモーターである、請求項２５のベクター。
【請求項２７】
α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分をコードするヌクレトチド配列をさらに含む、請求項１５のベクター。
【請求項２８】
ｐＰＩＣ６ＡＫｒｅｃｏＧｎＴＩの表示を有するベクター。
【請求項２９】
前記マンノシダーゼまたは前記機能部分をコードするヌクレオチド配列を含む、メチロトローフ酵母においてマンノシダーゼIIまたはその機能部分を発現するベクター。
【請求項３０】
前記マンノシダーゼIIは、哺乳動物種に由来するタンパク質である、請求項２９のベクター。
【請求項３１】
前記哺乳動物種はヒトである、請求項３０のベクター。
【請求項３２】
前記マンノシダーゼIIまたは前記その機能部分は、ゴルジ局在化シグナルに実施可能に連結されている、請求項２９のベクター。
【請求項３３】
前記ゴルジ局在化シグナルは、サッカロマイセス　セレビシエ　Ｋｒｅ２のＮ末端部分から取り出したペプチドを含む、請求項３２のベクター。
【請求項３４】
前記マンノシダーゼIIまたは前記機能部分をコードするヌクレオチド配列が、プロモーターおよび３’終止配列に実施可能に連結されている、請求項２９のベクター。
【請求項３５】

前記プロモーターは、ＡＯＸＩ，ＡＯＸII，ＧＡＰ，ＹＰＴ１およびＦＬＤからなる群より選択される遺伝子のプロモーターである、請求項３４のベクター。

【請求項３６】

ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩをコードするヌクレオチド配列をさらに含む請求項２９のベクター。

【請求項３７】

α－１，２－マンノシダーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項３６のベクター。

【請求項３８】

ｐＧＡＰＫｒｅＭａｎIIの表示を有するベクター。

【請求項３９】

（ａ）メチロトローフ酵母内で機能するα－１，２－マンノシダーゼ発現単位；（ｂ）メチロトローフ酵母内で機能するグルコシダーゼII発現単位；（ｃ）メチロトローフ酵母内で機能するＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ発現単位；（ｄ）メチロトローフ酵母内で機能するマンノシダーゼII発現単位；または（ｅ）メチロトローフ酵母における機能的ＯＣＨ１タンパク質の発現を阻害するヌクレオチド配列、のうちの少なくとも１つを含むベクター。

【請求項４０】

メチロトローフ酵母から産生されるタンパク質上のグリコシル化を減少または改変する方法であって、前記酵母を請求項１，１４，１５，２８，２９，３８または３９のベクターの任意の１つのよって形質転換することを含む方法。

【請求項４１】

前記酵母はピキア　パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）である、請求項４０の方法。

【請求項４２】

前記酵母は、ＧＳ１１５（ＮＲＲＬ　Ｙ－１５８５１）、ＧＳ１９０（ＮＲＲＬ　Ｙ－１８０１４）、ＰＰＦ１（ＮＲＲＬ　Ｙ－１８０１７）、ＰＰＹ１２－ＯＨ、ＹＧＣ４、またはその誘導体から選択されるピキア　パストリス株である、請求項４０の方法。

【請求項４３】

前記酵母は異種タンパク質を発現する、請求項４０の方法。

【請求項４４】

請求項１、１４、１５、２８、２９、３８または３９のベクターの少なくとも１つによって形質転換された前記株である、メチロトローフ酵母株。

【請求項４５】

ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩを含むベクターおよびα－１，２－マンノシダーゼを含むベクターで形質転換されたメチロトローフ酵母。

【請求項４６】

ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ－α－１，２－マンノシダーゼを含むベクターで形質転換されたメチロトローフ酵母。

【請求項４７】

メチロトローフ酵母から発現される異種糖タンパク質のグリコシル化を減少または改変する方法であって、請求項１、１４、１５、２８、２９、３８または３９のベクターの少なくとも１つで前記メチロトローフ酵母の細胞を形質転換すること、および形質転換細胞から前記糖タンパク質を産生することを含む方法。

【請求項４８】

メチロトローフ酵母において減少または改変されたグリコシル化を伴う糖タンパク質を産生する方法であって、請求項１、１４、１５、２８、２９、３８または３９のベクターの少なくとも１つ、および前記酵母において前記糖タンパク質を発現するヌクレオチドとで前記メチロトローフ酵母を形質転換すること、および形質転換細胞から前記糖タンパク質を産生することを含む方法。

【請求項４９】
請求項４８の方法によって産生される糖タンパク質。
【請求項５０】
前記糖タンパク質は、前記メチロトローフ酵母の野生型株から産生された糖タンパク質に比べて免疫原性が低減している、請求項４９の糖タンパク質。
【請求項５１】
前記糖タンパク質は薬学的組成物の一部である、請求項４９の糖タンパク質。
【請求項５２】
請求項１、１４、１５、２８、２９、３８または３９の任意のベクターを含むキット。
【請求項５３】
メチロトローフ酵母をさらに含む、請求項５２のキット。
【請求項５４】
請求項４５または４６のメチロトローフ酵母を含むキット。
【請求項５５】
前記メチロトローフ酵母はピキア属である、請求項５３または５４のキット。
【請求項５６】
前記ピキア属はピキア　パストリスである、請求項５５のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、低減または改変されたグリコシル化を伴う糖タンパク質を産生する目的で、ピキア属、特にピキア　パストリスを含むメチロトローフ酵母株におけるグリコシル化プロセスを遺伝子的に改変するのに有用な方法およびベクターに関する。本発明は、さらに本方法およびベクターを用いて産生されるメチロトローフ酵母株ならびに、そのような遺伝子的に改変された株から産生される糖タンパク質にも関する。
【背景技術】
【０００２】
ピキア　パストリスを含むメチロトローフ酵母は、商業上または医療上重要な組み換えタンパク質の製造に幅広く用いられてきた。多くの薬学的組成物は、ピキア　パストリスを含むメチロトローフ酵母内で産生される糖タンパク質を含んで構成される。しかしながら、これらの酵母と哺乳動物被検体などの標的生物との間のタンパク質に結合した炭水化物の生合成の違いによって、いくつかの治療用糖タンパク質の製造および医療用途がうまくいかない場合がある。
【０００３】
タンパク質Ｎグリコシル化は、小胞体（ＥＲ）を起源とし、ここで、１４糖の前駆物質Ｎ結合オリゴ糖（$Glc_3Man_9GlcNAc_2$）がドリコール（脂質担体中間体）上で組み立てられ、成長中の初期のポリペプチドの適当なアスパラギンに移送される。これはすべての真核Ｎ結合糖タンパク質に共通する事象である。次にこれらのグリカンは糖タンパク質が十分に成熟しながら大きな修飾を受け、ゴルジ複合体を介してＥＲからそれらの最終目的地である細胞の内部または外部に移動する。３つの最終グルコース残基がグルコシダーゼＩおよびIIによって切り取られ、１つの末端α－１，２－結合マンノース残基が、ＥＲ中の少なくとも１つまたはそれ以上の異なるマンノシダーゼ、例えばＥＲマンノシダーゼによって除去され、その結果オリゴ糖$Man_8GlcNAc_2$が得られる。この糖タンパク質は次にゴルジ装置に送られて、ここで糖部分が様々な修飾を受ける。ゴルジ装置内の糖分枝の修飾に関しては酵母と高等真核生物の間で大きな違いがある。
【０００４】
哺乳動物細胞において、ゴルジ装置内における糖分枝の修飾は、糖が付加されるタンパク質部分に応じて３つの異なる経路で進行する。タンパク質部分としては、（１）糖タンパク質が変化しない場合、（２）糖タンパク質が、糖分枝のマンノースの６位に、ＵＤＰ－Ｎ－アセチルグルコサミン（ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ）内のＮ－アセチルグルコサミン－

１－リン酸部分（ＧｌｃＮＡｃ－１－Ｐ）を付加し、ＧｌｃＮＡｃ部分を除去して糖タンパク質における酸性の糖分枝を形成することによって修飾される場合、または（３）ゴルジマンノシダーゼＩによって３つのマンノース残基を除去してＮ結合グリカンがまず最初に$Man_5GlcNAc_2$に変換され、Ｎ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼＩ（ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはＧｎＴＩ）による１つのＧｌｃＮＡｃを付加し、マンノシダーゼIIによるさらなる２つのマンノース残基の除去により、$Man_5GlcNAc_2$がさらに修飾される場合がある。次に続く末端グリコシル化の間、ＧｌｃＮＡｃ、ガラクトース（Ｇａｌ）、フコース、およびＮ－アセチルノイラミン酸（シアル酸（ＮｅｕＮＡｃ）とも呼ばれる）を含む新しい末端糖の付加で、様々なハイブリッドまたは複合体グリカンが製造される（Ｒ．ＫｏｒｎｆｅｌｄとＳ．Ｋｏｒｎｆｅｌｄ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５４：６３１－６６４，１９８５；ＣｈｉｂａらＪ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：２６２９８－２６３０４，１９９８；Ｈｅｌｅｎｉｕｓ．ＡとＡｅｂｉ Ｍ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９１：２３６４－２３６９，２００１）。

【０００５】

酵母においては、ゴルジ装置内での糖分枝の修飾には、異なるマンノシルトランスフェラーゼによるマンノース残基の一連の付加が伴う（「外部の鎖」グリコシル化）。外部の鎖のグリコシル化の構造は、生物特異的であり、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）においては典型的には５０を越えるマンノース残基を有し、ピキア パストリスにおいて最も一般的には、$Man_{14}GlcNAc_2$よりも小さい構造を有する。高マンノース型のこの酵母特異的外部鎖グリコシル化は、ハイパーグリコシル化（ｈｙｐｅｒｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ）とも呼ばれる。

【０００６】

ハイパーグリコシル化は好ましくない場合が多い。というのもハイパーグリコシル化が、炭水化物の組成および分子量の両方において組み換えタンパク質産物の異種性をもたらし、タンパク質の精製を複雑にするおそれがあるためである。ハイパーグリコシル化されたタンパク質の比活性（単位／重量）は、炭水化物の増加分だけ低下しうる。さらに、外部鎖のグリコシル化は、免疫原性が強く、治療用途においては望ましくない。さらに、大きな外部鎖の糖は、治療用タンパク質の免疫原性決定基を覆ってしまう可能性がある。例えば、Ｐ．パストリス（Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓ）において発現されるインフルエンザノイラミニダーゼ（ＮＡ）は、３０～４０個までのマンノース残基を含むＮ－グリカンでグリコシル化されている。ハイパーグリコシル化されたＮＡは、ＮＡ分子上の様々な免疫優性表面ループがＮ－グリカンによってマスクされているために、マウスにおける免疫原性が低くなっている（Ｍａｒｔｉｎｅｔら．Ｅｕｒ Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２４７：３３２－３３８，１９９７）。

【０００７】

したがって、タンパク質のグリコシル化を操作することができ、哺乳動物様のグリコシル化パターンを有する組み換え糖タンパク質を製造することができる、メチロトローフ酵母株を遺伝子操作することが好ましい。

（発明の概要）

本発明は、メチロトローフ酵母株におけるグリコシル化プロセスを遺伝子的に改変して、減少または改変したグリコシル化を伴う糖タンパク質を産生するのに有用な方法およびベクターを対象とする。本方法およびベクターを用いてつくれたメチロトローフ酵母株、ならびにそのような遺伝子改変株から製造される糖タンパク質も提供する。

【０００８】

１つの実施形態において、本発明は、減少または改変されたグリコシル化を伴う糖タンパク質を産生可能な、遺伝子操作されたメチロトローフ酵母株を作製するために有用なベクターを提供する。

【０００９】

１つの態様において、本発明は、メチロトローフ酵母株において、その酵素活性が、メチロトローフ酵母株によって産生される糖タンパク質におけるグリコシル化の減少または

改変を導く、１つまたはそれ以上のタンパク質を発現することのできる、「ノックイン」ベクターを提供する。

【００１０】

好ましい実施形態において、本発明のノックインベクターは、α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分をコードするヌクレオチド配列を含み、メチロトローフ酵母株中でα－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分を発現することができる。好ましいヌクレオチド配列は、真菌種、より好ましくはトリコデルマ　レーセイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）のα－１，２－マンノシダーゼをコードするヌクレオチド配列である。好ましくは、α－ｌ，２－マンノシダーゼ発現ベクターは、ベクターから発現されたα－ｌ，２－マンノシダーゼまたはその機能部分が、ＥＲ保持シグナルを含むように操作される。好ましいＥＲ保持シグナルはＨＤＥＬである。α－ｌ，２－マンノシダーゼコード配列は、構造的または誘導可能プロモーターおよび３’末端配列に実施可能に連結することができる。ベクターは、組込みベクターまたは複製ベクターであってもよい。特に好ましいα－ｌ，２－マンノシダーゼ発現ベクターは、ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ、ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ、ｐＰＩＣＺＢＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ、ｐＧＡＰＺｍＭａｎＨＤＥＬ、ｐＧＡＰＺｍＭｙｃＭａｎＨＤＥＬ、ｐＰＩＣ９ｍＭｙｃＭａｎＨＤＥＬおよびｐＧＡＰＺｍＭｙｃＭａｎＨＤＥＬを含む。

【００１１】

別の好ましい実施形態において、本発明のノックインベクターは、グルコシダーゼIIまたはその機能部分をコードする配列を含み、メチロトローフ酵母株におけるグルコシダーゼIIまたはその機能部分を発現しうる。好ましいヌクレオチド配列は、真菌種、より好ましくはサッカロマイセス　セレビシエのグルコシダーゼIIをコードするヌクレオチド配列である。好ましくは、グルコシダーゼII発現ベクターを、ベクターから発現されるグルコシダーゼIIまたはその機能部分がＥＲ保持シグナルを含むように設計する。好ましいＥＲ保持シグナルはＨＤＥＬである。グルコシダーゼIIコード配列は、構成的または誘導可能なプロモーターおよび３’終止配列に実施可能に連結することができる。ベクターは、組込みベクターであっても複製ベクターであってもよい。特に好ましいグルコシダーゼII発現ベクターは、ｐＧＡＰＺＡＧＬＳII、ｐＰＩＣＺＡＧＬＳII、ｐＡＯＸ２ＺＡＧＬＳII、ｐＹＰＴＩＺＡＧＬＳII、ｐＧＡＰＡＤＥｇｌｓII、ｐＰＩＣＡＤＥｇｌｓII、ｐＡＯＸ２ＡＤＥｇｌｓII、ｐＹＰＴＩＡＤＥｇｌｓII、ｐＧＡＰＺＡｇｌｓIIＨＤＥＬおよびｐＧＡＰＡＤＥｇｌｓIIＨＤＥＬを含む。

【００１２】

α－１，２－マンノシダーゼ発現単位とグルコシダーゼII発現単位の両方を含む発現ベクターも本発明によって提供される。

【００１３】

「発現単位」は、目的遺伝子を発現することのできるヌクレオチド配列を意味する。一般に発現単位は、発現すべき遺伝子を含み、その遺伝子はプロモーター、末端配列およびしかるべきその他の配列と実施可能に連結している。

【００１４】

好ましい実施形態において、本発明のノックインベクターは、Ｎ－アセチルグルコサミントランスフェラーゼＩ（ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはＧｎＴＩ）またはその機能部分をコードするヌクレオチド配列を含み、メチロトローフ酵母株内でＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたは機能部分を発現することができる。好ましいヌクレオチド配列は、哺乳動物種、たとえばヒトのＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩをコードするヌクレオチド配列である。好ましくは、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ発現ベクターは、該ベクターから発現されたＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分が酵母ゴルジ局在化シグナルを含むように遺伝子操作によって作り出す。好ましい酵母ゴルジ局在化シグナルは、Ｓ．セルビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）Ｋｒｅ２（ＳｃＫｒｅ２）のＮ末端部分から得られるペプチドである。ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩコード配列は、構成的または誘導可能なプロモーターおよび３’終止配列に実施可能に連結す

ることができる。ベクターは、組込みベクターであっても複製ベクターであってもよい。特に好ましいＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ発現ベクターは、ｐＰＩＣ６ＡＫｒｅｃｏｎＧｎＴＩを含む。

【００１５】

別の好ましい実施形態において、本発明のノックインベクターは、マンノシダーゼIIまたはその機能部分をコードする配列を含み、メチロトローフ酵母株内で、マンノシダーゼIIまたはその機能部分を発現することができる。好ましいヌクレオチド配列は、哺乳動物種、たとえばヒトのマンノシダーゼIIをコードするヌクレオチド配列である。好ましくは、マンノシダーゼII発現ベクターは、該ベクターから発現されたマンノシダーゼIIまたはその機能部分が酵母ゴルジ局在化シグナルを含むように遺伝子操作によってつくられる。好ましい酵母ゴルジ局在化シグナルは、ＳｃＫｒｅ２のＮ末端部分から得られるペプチドである。マンノシダーゼIIコード配列は、構造的または誘導可能なプロモーターおよび３’終止配列に実施可能に連結することができる。ベクターは、組込みベクターであっても複製ベクターであってもよい。特に好ましいマンノシダーゼII発現ベクターは、ｐＧＡＰＫｒｅＭａｎIIを含む。

【００１６】

ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ発現単位とマンノシダーゼII発現単位の両方を含む発現ベクターも本発明によって提供される。

【００１７】

α－１，２－マンノシダーゼ発現単位、グルコシダーゼII発現単位、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ発現単位、およびマンノシダーゼII発現単位とのうちの２つまたはそれ以上を含む発現ベクターも本発明によって提供される。

【００１８】

別の実施形態において、本発明は、メチロトローフ酵母株に導入されると、遺伝子を不活性化または崩壊することにより、メチロトローフ酵母株中で産生される糖タンパク質のグリコシル化の減少を容易にする不活性化ベクターを提供する。

【００１９】

１つの実施形態において、本発明は、メチロトローフ酵母株に導入されると、ＯＣＨ１遺伝子を不活性化または崩壊する不活性化ベクターを提供する。好ましいＯＣＨ１不活性化ベクターは、ｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨ１およびｐＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ５’ＰｐＯｃｈ１Ｍｕｔである。

【００２０】

本発明のさらに別の実施形態は、少なくとも「ノックイン単位」および少なくとも「不活性化単位」を含む「ノックイン不活性化」ベクターを提供する。「ノックイン単位」に関しては、その酵素活性が、メチロトローフ酵母株によって産生される糖タンパク質内におけるグリコシル化の減少または改変をもたらすような１つまたはそれ以上のタンパク質を、メチロトローフ酵母株内で発現することのできる発現単位のことをいう。「不活性化単位」は、メチロトローフ酵母株内に導入されると、内在性のＯＣＨ１遺伝子または他のマンノシルトランスフェラーゼ遺伝子を不活性化または破壊する単位を意味する。「ノックインおよび不活性化」ベクターをメチロトローフ酵母株に導入すると、強力なｅｘｄｏｇｅｎｏｕｓ酵素発現と内在性マンノシルトランスフェラーゼ破壊とを同時に達成することができる。好ましいノックインおよび不活性化ベクターはｐＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ５’ＰｐＯＣＨｌＭｕｔである。

【００２１】

本発明の他の実施形態は、本発明の１つまたはそれ以上のベクターを用いて酵母を形質転換することによるメチロトローフ酵母株内でのグリコシル化の改変方法を提供する。

【００２２】

本発明を用いて改変しうるメチロトローフ酵母の株は、限定はされないが、メタノール上で成育することのできる酵母株、例えば、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）、ハンセヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、トルロプシス属（Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ）およびピキア属の

酵母が含まれる。好ましいメチロトローフ酵母は、ピキア属のものである。特に好ましいものは、ピキア　パストリス株ＧＳｌｌ５（ＮＲＲＬ　Ｙ－１５８５１）、ＧＳ１９０（ＮＲＲＬ　Ｙ－１８０ｌ４）、ＰＰＦ１（ＮＲＲＬ　Ｙ－１８０１７）、ＰＰＹ１２ＯＨ、ＹＧＣ４およびそれに由来する株である。本方法を用いて改変できるメチロトローフ酵母株は、１つまたはそれ以上の目的の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作によって作り出されたメチロトローフ酵母株も含まれる。これらの予め遺伝子操作された株から発現した異種タンパク質でのグリコシル化は、このような株を本発明の１つまたはそれ以上のベクターで形質転換することにより減少させることができる。

【００２３】

本方法を実施することによって改変されるメチロトローフ酵母株を、本発明の別の実施形態において提供する。

【００２４】

本発明のさらなる態様は、減少または改変したグリコシル化を伴う糖タンパク質の産生方法を示す。

【００２５】

このような方法に従って、糖タンパク質を発現することのできるヌクレオチド配列を、本発明の１つまたはそれ以上のベクターで予め形質転換したメチロトローフ酵母株内に導入することができる。あるいは、糖タンパク質を発現するように遺伝子操作されたメチロトローフ酵母株を、本発明の１つまたはそれ以上のベクターによって形質転換できる。さらに、メチロトローフ酵母株が目的の糖タンパク質をコードするヌクレオチド配列または本発明の任意のベクターを用いて形質転換しない場合には、そのような酵母株は、糖タンパク質を発現することができるヌクレオチド配列と、本発明の１つまたはそれ以上のベクターの両方を用いて、連続してあるいは同時に形質転換することができる。さらに、メチロトローフ酵母株は、メチロトローフ酵母株内で糖タンパク質を発現できるヌクレオチド配列も含む１つまたはそれ以上の本発明のノックインおよび／または不活性化ベクターによって形質転換してもよい。

【００２６】

本発明の方法を用いて産生される糖タンパク質産物、すなわち、Ｎグリコシル化が減少または改変されたタンパク質もまた本発明の一部である。

【００２７】

１つまたはそれ以上の本発明のベクターを含むキット、または減少または改変されたグリコシル化を伴う糖タンパク質を産生するための１つまたはそれ以上の株もまた提供する。

（本発明の詳細な説明）

ピキア属および特にピキア　パストリスを含むメチロトローフ酵母の小胞体（ＥＲ）を離れる糖タンパク質上の大多数のＮ－グリカンは、$Man_8GlcNAc_2$オリゴ糖構造を有することが立証されている。タンパク質がＥＲからゴルジ装置に輸送された後、さらなるマンノース残基が様々なマンノシルトランスフェラーゼによってこのコアとなる糖部分に付加され、その結果高マンノースコアまたは延長分岐マンナル外部鎖からなるオリゴ糖構造を有する糖タンパク質となる。組み換え体糖タンパク質のこのようなハイパーグリコシル化は多くの場合において望ましくない。したがって、本発明は、メチロトローフ酵母株を遺伝子的に改変することに関する方法およびベクターを提供し、減少または改変したグリコシル化を伴う糖タンパク質を産生する。本発明の方法およびベクターを用いて生成されるメチロトローフ酵母株、ならびにそのような遺伝子的に改変された株から産生される糖タンパク質も提供する。

【００２８】

語句「減少または改変されたグリコシル化」は、目的タンパク質の産生のために用いた宿主酵母株が、遺伝子的に改変された株から発現されたタンパク質が改変されない酵母株由来のタンパク質に比べて、より少ないマンノース残基をもつオリゴ糖側鎖を持つように、遺伝子的に改変されていることを意味する。

【００２９】
本発明に従って遺伝子操作された酵母株は、「哺乳動物様」のオリゴ糖側鎖を有するタンパク質を産生することもできる。語句「哺乳動物様」は、酵母糖タンパク質上の高末端マンノース残基をもつグリカンとは対照的に、当該オリゴ糖が哺乳動物の糖タンパク質上で通常見られる構造のものである、例えば、より少ない末端マンノース残基を有するグリカン、またはハイブリッドあるいは複合型グリコシル化パターンを有するグリカンであることを意味する。典型的な哺乳動物様オリゴ糖構造は、$Man_5GlcNAc_2$、$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$および$GlcNAcMan_3GlcNAc_2$から開始する。枝分かれ構造、例えば、ジ、トリおよびテトラアンテナ構造は、ＧｌｃＮＡｃをオリゴ糖残基の領域へのＧｌｃＮＡｃ－トランスフェラーゼ触媒付加によって合成される。それらの形成に続いて、アンテナ構造は、Ｇａｌ、ＧａｌＮＡｃ、$GlcNA_C$、Ｆｕｃおよびシアル酸残基を含む異なる糖を用いて終結される。

【００３０】
１つの実施形態において、本発明は、メチロトローフ酵母株を遺伝子的に改変して、減少または改変されたグリコシル化を伴う糖タンパク質を産生させるのに有用なベクターを提供する。

【００３１】
１つの態様において、本発明は、「ノックイン」ベクターを提供し、これはメチロトローフ酵母株内で、その酵素活性がメチロトローフ酵母株によって産生される糖タンパク質においてグリコシル化の減少または改変をもたらす１つまたはそれ以上のタンパク質を発現することができる。本発明によれば、このようなタンパク質は、例えば、α－１，２－マンノシダーゼ、グルコシダーゼII、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ（ＧｎＴＩ）、マンノシダーゼII、またはその機能部分が含まれる。

【００３２】
好ましい実施形態において、本発明のベクターは、α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分をコードする配列を含み、メチロトローフ酵母内においてα－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分を発現することができる。

【００３３】
α－１，２－マンノシダーゼは、α－１，２結合マンノース残基を$Man_8GlcNAc_2$の非還元末端において開裂し、糖タンパク質上のこのコアオリゴ糖を$Man_5GlcNAc_2$に変換する。Ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて、$Man_5GlcNAc_2$はあらゆるピキア ゴルジマンノシルトランスフェラーゼに対して非常に貧弱な基質であり、すなわち、マンノース残基はこの糖構造に付加することができない。一方で、$Man_5GlcNAc_2$は、哺乳動物ＮアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩに対する受容体基質であり、哺乳動物糖タンパク質のハイブリッドおよび複合体型糖鎖特性の中間体である。したがって、α－１，２－マンノシダーゼをピキア属などのメチロトローフ酵母に導入することにより、マンノース含量が減少したグリカンを有する糖タンパク質、例えば$Man_5GlcNAc_2$を産生することができる。哺乳動物様オリゴ糖構造の枝分かれは、オリゴ糖を$Man_5GlcNAc_2$に調整した後に起こる。

【００３４】
本発明によれば、本発明の発現ベクターにおいて用いるα－１，２－マンノシダーゼをコードするヌクレオチド配列を任意の種から得ることができる。例えばマウスα－１，２－マンノシダーゼ（Ｈｅｒｓｃｏｖｉｃｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：９８６４－９８７１，１９９４）、ウサギα－１，２－マンノシダーゼ（Ｌａｌら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：９８７２－９８８１，１９９４）またはヒトα－１，２－マンノシダーゼ（Ｔｒｅｍｂｌａｙら、Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ ８：５８５－５９５，１９９８）をコードする哺乳動物遺伝子、ならびに、例えばアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）α－１，２－マンノシダーゼ（ｍｓｄＳ ｇｅｎｅ）、トリコデルマ レーセイ α－１，２－マンノシダーゼ（Ｍａｒａｓら、Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．７７：２５５－２６３，２０００）、またはサッカロマイセス セレビシエのα－１，２－マンノ

シダーゼをコードする真菌遺伝子を含む、多数のα－１，２－マンノシダーゼ遺伝子がクローン化されており、当業者によって入手可能である。タンパク質配列分析から、これまでに同定されている真核生物のα－１，２－マンノシダーゼ間で高度に保存されていることが明らかになっている。

【００３５】

好ましくは、本発明のベクターにおいて使用するヌクレオチド配列は、真菌α－１，２－マンノシダーゼ、より好ましくは、トリコデルマ　レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼ、およびより詳細には、Ｍａｒａｓら、Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．７７：２５５－６３（２０００）によって記載されたトリコデルマ　レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼをコードする。

【００３６】

本発明によれば、ヌクレオチド配列はまた、α－１，２－マンノシダーゼの機能部分のみをコードするものであってもよい。

【００３７】

語句「機能部分」は、完全長タンパク質の酵素活性を実質的に保持しているα－１，２－マンノシダーゼのポリペプチド断片を意味する。「実質的に」は、完全長α－１，２－マンノシダーゼの少なくとも４０％、または好ましくは５０％またはそれ以上の酵素活性が保持されていることを意味する。たとえば、本発明によって示されるように、マウスα－１，２－マンノシダーゼＩＢの触媒ドメインが、マウスα－１，２－マンノシダーゼＩＢの「機能部分」を構成する。当業者であれば、当該技術分野において公知の技術の組み合わせを用いて、α－１，２－マンノシダーゼの機能部分を容易に同定し、作成することができる。酵素活性を与えるのに不可欠または十分なα－１，２－マンノシダーゼ部分の予測は、タンパク質配列の分析に基づいて行うことができる。適当な発現系から発現され、精製された目的のα－１，２－マンノシダーゼの一部の活性は、本明細書で後述するｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏアッセイを用いて確認することができる。

【００３８】

本発明によれば、メチロトローフ酵母株内で発現されたα－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分は、分泌経路において、糖タンパク質上にはすでに$Man_8GlcNAc_2$（α－１，２－マンノシダーゼの基質）が形成されているが、付加的なマンノース残基で糖鎖を延長するゴルジグリコシルトランスフェラーゼには到達していない位置を好ましくはターゲットにしている。

【００３９】

したがって、本発明の好ましい実施形態において、α－１，２－マンノシダーゼ発現ベクターは、該ベクターから発現されるα－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分が、ＥＲ保持シグナルを含むように遺伝子操作によってつくられる。

【００４０】

「ＥＲ保持シグナル」とは、ＥＲに輸送されその内部に保持されるようなペプチド配列を有するタンパク質に示されたペプチド配列を表す。このようなＥＲ保持配列は、ＥＲ内に存在して機能するタンパク質内でよく見られる。

【００４１】

当業者にとっては、ＥＲ保持シグナルには複数の選択肢、例えばＳ．セレビシエ　ＥＲタンパク質ＭＮＳ１の最初の２１個のアミノ酸残基を入手可能である（Ｍａｒｔｉｎｅｔらバイオテクノロジー　レターズ　２０：１１７１－１１７７，１９９８）。本発明において用いる好ましいＥＲ保持シグナルは、ペプチドＨＤＥＬ（配列番号（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ）：１）である。多くの酵母タンパク質のＣ末端において見られるＨＤＥＬペプチド配列は、ＥＲに関する保持／回収シグナルとして機能する（Ｐｅｌｈａｍ　ＥＭＢＯ　Ｊ．７：９１３－９１８，１９８８）。ＨＤＥＬ配列を有するタンパク質は、膜結合受容体（Ｅｒｄ２ｐ）によって結合し、ゴルジ装置からＥＲに戻る逆行輸送経路に入る。

【００４２】

本発明によれば、ＥＲ保持シグナルは、α－１，２－マンノシダーゼのタンパク質配列のなかの任意の位置に配置することができるが、好ましくはα－１，２－マンノシダーゼのＣ末端に配置される。

【００４３】

本発明において用いるα－１，２－マンノシダーゼは、例えば、抗体が利用できるところのエピトープタグ、例えばＭｙｃ，ＨＡ，ＦＬＡＧやＨｉｓ６タグなどの当該分野において周知のものをを挿入することにより、さらに改変することができる。エピトープタグ付きα－１，２－マンノシダーゼは、従来的に精製し、または発現および細胞内局在化の両方に対してまたはモニターすることができる。

【００４４】

ＥＲ保持シグナルおよびエピトープタグは、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド内に、そのようなシグナルまたはタグをコードするヌクレオチド配列を、当該分野に公知の任意の分子生物学技術を用いて、挿入することにより、目的のタンパク質内に容易に導入することができる。

【００４５】

他の好ましい実施形態において、本発明のベクターは、グルコシダーゼIIまたはその機能部分をコードする配列を含み、グルコシダーゼIIまたはその機能部分をメチロトローフ酵母株内で発現することができる。

【００４６】

ＥＲ内においてタンパク質上に移動した初期Ｎ結合オリゴ糖（$Glc_3Man_9GlcNAc_2$）は、ＥＲ内で３グルコース残基を除去する特異的グルコシダーゼおよび１つの特異的α－１，２－結合マンノースによって開裂されることが立証されている。本発明者は、ピキア属において発現されるいくつかの組み換えタンパク質が、当該タンパク質がＥＲからゴルジ装置に向けて離れる際に、糖部分に残留グルコース残基を有することを観察した。糖構造上に存在する残留グルコース分子は、α－１，２－マンノシダーゼによる糖部分の完全な消化を防ぎ、外来性グルコシダーゼの導入によってこれらのグルコース残基を容易に除去できるようになる。

【００４７】

本発明に従えば、グルコシダーゼIIをコードするヌクレオチド配列は、任意の種に由来するものであってよい。グルコシダーゼII遺伝子は、ラット、マウス、ブタおよびヒトを含む数々の哺乳動物種からクローン化されている。これらの哺乳動物種に由来するグルコシダーゼIIタンパク質は、αおよびβサブユニットから成る。αサブユニットは約１１０ｋＤａであり、酵素の触媒活性を含み、いっぽうβサブユニットはＣ末端ＨＤＥＬＥＲ保持配列を有し、酵素のＥＲ局在化に関して重要であるとされている。Ｓ．セレビシエ由来のグルコシダーゼII遺伝子もまたクローン化されている（クロモゾームII上に局在するＯＲＦ　ＹＢＲ２２９ｃ）。この遺伝子は、約１１０ｋＤａのタンパク質をコードし、哺乳動物αサブユニットに対して高度な相同性を示す。

【００４８】

本発明のベクターにおいて使用する好ましいグルコシダーゼII遺伝子は、ピキア　パストリスやＳ．セレビシエなどの真菌種から得たものである。真菌グルコシダーゼII遺伝子の例としては、Ｓ．セレビシエグルコシダーゼII遺伝子が挙げられる。

【００４９】

本発明によれば、ヌクレオチド配列はまた、グルコシダーゼIIの機能部分のみをコードしうる。語句「機能部分」は、完全長タンパク質の酵素活性を実質的に保持するグルコシダーゼIIのポリペプチド断片を意味する。「実質的に」とは、完全長グルコシダーゼIIの酵素活性が少なくとも４０％、あるいは好ましくは少なくとも５０％またはそれ以上保持されていることを意味する。グルコシダーゼIIの機能部分は、当該分野で公知の様々な技術を用いて当業者によって同定、生成可能である。

【００５０】

本発明の好ましい実施形態において、グルコシダーゼIIタンパク質はＥＲ保持シグナル

を含むように遺伝子操作でつくられており、それによりメチロトローフ酵母株内で発現された該タンパク質がＥＲを標的とし、ＥＲにて機能を保持することができる。ＥＲ保持シグナルは、上述のように、例えばＨＤＥＬペプチド配列である。

【００５１】

本発明において用いるグルコシダーゼIIは、例えば、抗体が利用できるところのエピトープタグ、例えばＭｙｃ、ＨＡ、ＦＬＡＧおよびＨｉｓ６タグなどの当該分野で周知のものを挿入することにより、さらに改変することができる。

【００５２】

本発明に従えば、「ノックイン」ベクターは、α－１，２－マンノシダーゼコード配列およびグルコシダーゼIIコード配列のいずれかまたは両方を含みえる。

【００５３】

他の好ましい実施形態において、本発明のベクターは、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分をコードする配列を含み、メチロトローフ酵母株においてＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分を発現することができる。

【００５４】

ＧｌｃＡｃトランスフェラーゼＩは、$Man_5GlcNAc_2$へのβ－１，２－ＧｌｃＮＡｃの付加に関与しており、糖タンパク質上のコアオリゴ糖を$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$に変換する。$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$のマンノース残基は、哺乳動物ゴルジマンノシダーゼIIによってさらに切断されうる。新しい糖が付加されて、哺乳動物糖タンパク質に特徴的なハイブリッドまたは複合型糖分枝が形成される。このように、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩをピキア属などのメチロトローフ酵母内に導入することにより、哺乳動物様グリコシル化パターンを有する糖タンパク質、例えばグリカン$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$を有する糖タンパク質を産生することができる。

【００５５】

本発明に従えば、本発明の発現ベクターにおいて使用するＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ（ＧｎＴＩ）をコードするヌクレオチド配列は、任意の種、例えばウサギ、ラット、ヒト、植物、昆虫、線虫、およびリーシュマニア　タレントレ（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ　ｔａｒｅｎｔｏｌａｅ）などの原虫から取り出してもよいし、あるいは、タンパク質工学実験によって得ることもできる。好ましくは、本発明のベクターにおいて使用するヌクレオチド配列は、ヒトＧｎＴＩをコードし、より好ましくは、配列番号：３４に記載の配列を有するＧｎＴＩをコードする。

【００５６】

本発明によれば、ヌクレオチド配列は、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩの機能部分のみをコードするものであってもよい。

【００５７】

「機能部分」に関しては、完全長タンパク質の酵素活性を実質的に保持するＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩのポリペプチド断片を意味する。「実質的に」に関しては、完全長ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩの少なくとも約４０％、あるいは好ましくは少なくとも５０％またはそれ以上の酵素活性が保持されていることを意味する。たとえば、本発明によって説明されるように、ヒトＧｎＴＩの触媒ドメインは、ヒトＧｎＴＩの「機能部分」を構成する。当業者であれば、技術上公知の技術の組み合わせを用いて、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩの機能部分を、容易に同定および作成することができる。酵素活性を与えるのに必要または十分なＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩの一部の予測は、タンパク質配列の分析に基づいて行うことができる。適当な発現系から発現され精製された目的のＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩの部分の活性は、後述のｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏアッセイを用いて立証することができる。

【００５８】

本発明によれば、メチロトローフ酵母株において発現されるＧｎＴＩまたはその機能部分は、好ましくは$Man_5GlcNAc_2$（ＧｎＴＩの基質）がすでに糖タンパク質上に形成されている分泌経路内の部位を標的とする。好ましくは、ＧｎＴＩまたはその機能部

分は、ゴルジ装置を標的とし、より好ましくは、α－１，２－マンノシダーゼによってまた形質転換された酵母株のゴルジ装置を標的とする。

【００５９】

したがって、本発明の好ましい実施形態において、ＧｎＴＩは、ベクターから発現されたＧｎＴＩまたはその機能部分が酵母ゴルジ局在化シグナルを含むように遺伝子操作によってつくられる。

【００６０】

酵母の「ゴルジ局在化シグナル」は、ゴルジ装置に保持すべくペプチド配列を有したタンパク質を示すペプチド配列のことをいう。このようなゴルジ局在化配列は、ゴルジ装置内に存在し、機能するタンパク質内でよく見られる。

【００６１】

ゴルジ局在化シグナルの選択肢は、当業者によって入手可能である。本発明において用いる好ましいゴルジ局在化シグナルは、サッカロマイセス　セレビシエ　Ｋｒｅ２タンパク質（ＳｃＫｒｅ２）のＮ末端部分から得られるペプチドである。より好ましくは、Ｋｒｅ２遺伝子は、配列番号：３０に記載の配列を有する。特に好ましいゴルジ局在化シグナルは、ＳｃＫｒｅ２タンパク質のアミノ酸１－１００　（配列番号：３５）を有し、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴアクセス番号Ｐ２７８０９　（配列番号：３８）を有するペプチドである。

【００６２】

本発明によれば、ゴルジ局在化シグナルは、ＧｎＴＩ内のどこに配置してもよいが、好ましくは、ＧｎＴＩの末端、より好ましくはＧｎＴＩのＮ末端に配置する。

【００６３】

本発明において使用するＧｎＴＩは、例えば、抗体が利用できるところのエピトープタグ、例えばＭｙｃ、ＨＡ、ＦＬＡＧやＨｉｓ６タグなどの当該分野に周知のものを挿入することにより、さらに改変することができる。エピトープタグ付きＧｎＴＩは、従来のように精製して、発現と細胞内局在性両方をモニターすることができる。

【００６４】

ゴルジ局在化シグナルおよびエピトープタグは、技術上公知の任意の分子生物学技術を用いて、該シグナルまたはタグをコードするヌクレオチド配列を、目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列内に挿入することにより、目的のタンパク質内に容易に導入することができる。

【００６５】

他の好ましい実施形態において、本発明のベクターは、マンノシダーゼIIまたはその機能部分をコードする配列を含み、メチロトローフ酵母株においてマンノシダーゼIIまたはその機能部分を発現することができる。

【００６６】

ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩは、β－１，２－ＧｌｃＮＡｃを$Man_5GlcNAc_2$に付加し、糖タンパク質上のコアオリゴ糖$Man_5GlcNAc_2$を$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$に変換することが確証されている。$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$は、哺乳動物ゴルジマンノシダーゼIIの基質であるとともに、これによりさらに処理されることにより、より多くのマンノース残基を除去できる。その結果得られるオリゴ糖基は、哺乳動物糖タンパク質に特徴的なハイブリッドまたは複合体型の糖分枝を生成するようにさら改変してもよい。このように、マンノシダーゼIIをピキア属、特にピキア　パストリスなどのメチロトローフ酵母内に導入する方法により、マンノース含量が減少された糖タンパク質を産生することができる。こうして得られたタンパク質上のグリコシル化パターンもまた哺乳動物糖タンパク質に特徴的である。

【００６７】

本発明によれば、ゴルジマンノシダーゼIIをコードするヌクレオチド配列は、任意の種から取り出すことができる。マンノシダーゼII遺伝子は数々の哺乳動物種からクローン化されてきた。

【００６８】
本発明のベクターにおいて用いられる好ましいマンノシダーゼII遺伝子は、哺乳動物種に由来する。哺乳動物マンノシダーゼII遺伝子の一例として、アクセス番号３１５２０（配列番号：３４）でＥＭＢＬに公開されているヒトマンノシダーゼIIｃＤＮＡが挙げられる。
【００６９】
本発明によれば、ヌクレオチド配列はまたマンノシダーゼIIの機能部分のみをコードしえる。「機能部分」に関しては、完全長タンパク質の酵素活性を実質的に保持するマンノシダーゼIIのポリペプチド断片を意味する。「実質的に」に関しては、完全長マンノシダーゼIIの少なくとも約４０％、あるいは好ましくは少なくとも５０％またはそれ以上の酵素活性が保持されていることを意味する。当業者であれば、当該分野に公知の様々な技術を用いて、マンノシダーゼIIの機能部分を、同定および作成することができる。
【００７０】
本発明の好ましい実施形態において、マンノシダーゼIIタンパク質はゴルジ局在化シグナルを含むように遺伝子操作作り出され、従ってメチロトローフ酵母株において発現されたタンパク質がゴルジ室を標的とし、この中に保持されることができる。マンノシダーゼIIと関連して用いることのできるゴルジ局在化シグナルは、ＧｎＴＩに関連して上述したもの、例えば、ＳｃＫｒｅ２のＮ末端部分から得たペプチドである。
【００７１】
本発明において用いるマンノシダーゼIIは、例えば、抗体が利用できるところのエピトープタグ、例えばＭｙｃ、ＨＡ、ＦＬＡＧやＨｉｓ６タグなどの当該分野で周知のものをを挿入することにより、さらに改変することができる。
【００７２】
本発明に従えば、「ノックイン」ベクターは、ＧｎＴＩコード配列とマンノシダーゼIIコード配列のいずれかまたは両方含んでいてもよい。
【００７３】
２つまたはそれ以上のα－１，２－マンノシダーゼコード配列、グルコシダーゼIIコード配列、ＧｎＴＩコード配列およびマンノシダーゼIIコード配列を含むベクターも本発明によって提供される。
【００７４】
さらに本発明によれば、発現すべき酵素をコードするヌクレオチド配列（例えば、α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分、あるいはグルコシダーゼIIまたはその機能部分、ＧｎＴＩまたはその機能部分、またはマンノシダーゼIIまたはその機能部分）は、プロモーターおよび３’終止配列に実施可能に連結して配置することができる。
【００７５】
メチロトローフ酵母におけるタンパク質の発現に適したプロモーターは、構成的プロモーターおよび誘導可能プロモーターの両方を含みえる。構成的プロモーターは、例えば、ピキア　パストリス　グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター（「ＧＡＰプロモーター」）およびピキア　パストリス　ＹＰＴ１プロモーター（Ｓｅａｒｓら，Ｙｅａｓｔ　１４：７８３－７９０、１９９８）が含まれる。誘導可能プロモーターの例としては、例えば、ピキア　パストリス　アルコールオキシダーゼＩプロモーター（「ＡＯＸＩプロモーター」）（米国特許第４，８５５，２３１号）、ピキア　パストリス　アルコールオキシダーゼII（「ＡＯＸ２プロモーター」）（Ｏｈｉら，Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ　２４３：４８９－４９９，１９９４）、またはピキア　パストリス　ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼプロモーター（「ＦＬＤプロモーター」）（Ｓｈｅｎら、Ｇｅｎｅ　２１６：９３－１０２，１９９８）が挙げられる。
【００７６】
３’終止配列は、３’から構造遺伝子の終止コドンまでの配列であり、当該配列が実施可能に連結している遺伝子のｍＲＮＡ転写産物を安定化する働きをする、例えばポリアデニル化を導く配列である。３’終止配列は、ピキア属または他のメチロトローフ酵母から

得ることもできる。本発明の実施に有用なピキア　パストリス　３’終止配列の例としては、ＡＯＸ１遺伝子、ｐ４０遺伝子、ＨＩＳ４遺伝子およびＦＬＤ１遺伝子からの終止配列が挙げられる。

【００７７】

本発明のベクターは好ましくは、選択可能マーカー遺伝子を含んでいる。選択可能マーカーは、メチロトローフ酵母株上に選択可能な表現型を与え、形質転換細胞の同定と非形質転換細胞からの選択を可能にする任意の遺伝子であってよい。選択可能マーカー系は、栄養要求性変異メチロトローフ酵母株および宿主の欠陥を補完する野生型遺伝子を含んでいてもよい。このような系の例としては、ｈｉｓ４　ピキア属株を補完するサッカロマイセス　セレビシエ　またはピキア　パストリス　ＨＩＳ４遺伝子、あるいは、ピキア　パストリス　ａｒｇ変異体を補完するために用いてもよいＳ．セレビシエまたはピキア　パストリス　ＡＲＧ４遺伝子、あるいは、ピキア　パストリス　ｕｒａ３　ｒｅｓｐ．ａｄｅｌ変異体を補完するために用いてもよいピキア　パストリス　ＵＲＡ３およびＡＤＥ１が挙げられる。ピキア　パストリスにおいて機能する他の選択可能マーカー遺伝子としては、Ｚｅｏ^{R}遺伝子、Ｇ４１８^{R}遺伝子、ブラスチシジン耐性遺伝子などが挙げられる。

【００７８】

本発明のベクターはまた、自己複製配列（ＡＲＳ）を含んでいてもよい。例えば、米国特許第４，８３７，１４８号は、プラスミドをピキア　パストリス内に維持するための適切な手段を提供する自己複製配列について記載している。米国特許第４，８３７，１４８号の開示は参照により本願に組み入れる。

【００７９】

該ベクターはまた、細菌中で機能する選択可能マーカー遺伝子、ならびに、細菌における複製および染色体外維持に関与する配列を含んでいてもよい。細菌選択性マーカー遺伝子としては、例えば、アンピシリン耐性（Ａｍｐ^{r}）、テトラサイクリン耐性（Ｔｅｔ^{r}）、ネオマイシン耐性、ヒグロマイシン耐性およびゼオシン耐性（Ｚｅｏ^{R}）遺伝子が挙げられる。

【００８０】

本発明によれば、メチロトローフ酵母において発現すべきタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、組込みベクターまたは複製ベクター（複製環状プラスミドなど）内に配置することができる。

【００８１】

組込みベクターは、例えば、参照により本願に組み込まれる米国特許第４，８８２，２７９号に開示されている。組込みベクターは一般に、少なくとも第１の挿入可能ＤＮＡ断片と、選択可能マーカー遺伝子と、第２の挿入可能ＤＮＡ断片とからなる直列に配置された配列を含む。第１および第２の挿入可能なＤＮＡ断片はそれぞれ約２００ヌクレオチドの長さがあり、形質転換すべき種のゲノムＤＮＡの部分と相同的なヌクレオチド配列を有する。発現のための目的の構造遺伝子を含むヌクレオチド配列を、このベクターのマーカー遺伝子の前または後のいずれかの第１および第２挿入可能ＤＮＡ断片の間に挿入する。組込みベクターは、酵母形質転換に先立って直線化し得、宿主細胞ゲノム中での目的のヌクレオチド配列統合を容易にする。

【００８２】

α－１，２－マンノシダーゼコード配列、グルコシダーゼIIコード配列，　ＧｎＴＩコード配列およびマンノシダーゼIIコード配列の１つまたはそれ以上を保持する複製および組込みベクターは、当該分野において通常技術の１つとして知られる標準的な技術であり、例えばＳａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌまたは広く使われている組み換えＤＮＡ技術に関する無数の実験マニュアルに記載されている。

【００８３】

α－１，２－マンノシダーゼ発現配列を保持する本発明の好ましいベクターは、ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ、ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ、ｐＰＩＣＺＢＭＦＭａ

ｎＭｙｃＨＤＥＬ、ｐＧＡＰＺｍＭａｎＨＤＥＬ、ｐＧＡＰＺｍＭｙｃＭａｎＨＤＥＬ、ｐＰＩＣ９ｍＭｙｃＭａｎＨＤＥＬおよびｐＧＡＰＺｍＭｙｃＭａｎＨＤＥＬが含まれ、これらについては以下の実施例においてさらに記載する。

【００８４】

グルコシダーゼII発現配列を保持する本発明の好ましいベクターは、ｐＧＡＰＺＡＧＬＳII、ｐＰＩＣＺＡＧＬＳII、ｐＡＯＸ２ＺＡＧＬＳII、ｐＹＰＴＩＺＡＧＬＳII、ｐＧＡＰＡＤＥ１ｇｌｓII、ｐＰＩＣＡＤＥｌｇｌｓII、ｐＡＯＸ２ＡＤＥｌｇｌｓII、ｐＹＰＴＩＡＤＥ１ｇｌｓII、ｐＧＡＰＺＡｇｌｓIIＨＤＥＬおよびｐＧＡＰＡＤＥ１ｇｌｓIIＨＤＥＬを含み、これらについては以下の実施例においてさらに記載する。

【００８５】

ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ発現配列を保持する本発明の好ましいベクターは、ｐＰＩＣ６ＡｋｒｅｃｏＧｎＴＩを含み、これらについては以下の実施例においてさらに記載する。

【００８６】

マンノシダーゼＩ発現配列を保持する本発明の好ましいベクターは、ｐＧＡＰＫｒｅＭａｎIIを含み、されにこれらについては以下の実施例においてさらに記載する。

【００８７】

他の態様において、本発明は、メチロトローフ酵母株に導入された場合に、遺伝子を不活性化または破壊することにより、メチロトローフ酵母株において産生される糖タンパク質のグリコシル化の減少を容易にする不活性化ベクターを提供する。

【００８８】

１つの実施形態において、本発明は、メチロトローフ酵母株に導入されると、ＯＣＨ１遺伝子を不活性化または破壊する不活性化ベクターを提供する。

【００８９】

Ｓ．セレビシエ　ＯＣＨ１遺伝子はすでにクローン化されている（Ｎａｋａｙａｍａら、ＥＭＢＯ　Ｊ．１１：２５１１－２５１９，１９９２）。この遺伝子は、初期ゴルジ複合体内に局在するα－１，６－マンノシルトランスフェラーゼに結合する膜をコードする。すなわち、Ｎ結合コアオリゴ糖（$Man_5GlcNAc_2$および$Man_8GlcNAc$）へのα－１，６－ポリメラーゼ外側鎖の付加の開始時に機能する　（Ｎａｋａｎｉｓｈｉ－Ｓｈｉｎｄｏら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：２６３３８－２６３４５，１９９３）。

【００９０】

ピキア属の配列は、Ｓ．セレビシエ　ＯＣＨ１との高度な相同性を有するタンパク質をコードする日本特許出願Ｎｏ．０７１４５００５に記載されている。本発明の目的に関し、該配列を、「ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）　ＯＣＨ１遺伝子」と呼ぶことにする。当業者であれば、当該分野の周知の技術を用いて他のメチロトローフ酵母からＯＣＨ１遺伝子を単離することができる。

【００９１】

本発明によれば、メチロトローフ酵母のＯＣＨ１遺伝子の崩壊は、不活性タンパク質の産生をもたらすか、または生成物を全くもたらさない。崩壊は、コード配列中への異種ＤＮＡ配列の挿入の形をとるか、および／またはコード配列のいくつかまたはすべての欠失の形をとる。遺伝子崩壊は、本質的にＲｏｔｈｓｔｅｉｎ　（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，　Ｗｕら編、ｖｏｌ．１０１：２０２－２１１，１９８３）に記載されているような相同組み換えによって発生させることができる。

【００９２】

相同組換えによってＯＣＨ１遺伝子を崩壊させるためには、ＯＣＨ１不活性化ベクターを、選択可能マーカー遺伝子を含むように構築するとよい。選択可能マーカー遺伝子は、５’および３’末端両方において、相同組み換えを媒介するのに十分な長さのＯＣＨ１遺伝子の部分に実施可能に連結する。選択可能なマーカーを、ＵＲＡ３、ＡＲＧ４、ＨＩＳ４、ＡＤＥ１、ＬＥＵ２およびＨＩＳ３遺伝子を含む、宿主細胞の栄養要求性を補足する

か、抗生物質耐性を与える任意の遺伝子の１つとすることができる。他の適当な選択可能マーカーとしては、酵母細胞にクロラムフェニコール耐性を与え、ＣＡＴ遺伝子、または結果として活性β－ガラクトシダーゼの発現により青いコロニーをつくるｌａｃＺ遺伝子が挙げられる。次に、技術上周知の方法を用いて、ＯＣＨ１不活性化ベクターの直線化ＤＮＡ断片を、宿主メチロトローフ酵母細胞内に導入する。線状断片のゲノムへの組み込およびＯＣＨ１遺伝子の崩壊は、選択マーカーに基づいて判定することができ、例えば、サザンブロット分析によって検証することができる。

【００９３】

あるいは、ＯＣＨ１不活性化ベクターは、崩壊すべきＯＣＨ１遺伝子の部分を含むように構築することができ、該部分は、いかなるＯＣＨ１プロモーター配列も含まず、ＯＣＨ１タンパク質をコードしないか、あるいはＯＣＨ１タンパク質の不活性断片をコードするものである。「不活性断片」に関しては、完全長ＯＣＨ１タンパク質の活性の好ましくは、約１０％未満、最も好ましくは約０％しか有さないＯＣＨ１タンパク質の断片を意味する。このようなＯＣＨ１遺伝子の一部を、ＯＣＨ１配列にいかなる既知のプロモーター配列が実施可能に連結されないが、好ましくは終止コドンおよび転写終結配列がＯＣＨ１遺伝子の該一部に実施可能に連結されるような様式でベクター中に挿入する。このベクターは、ＯＣＨ１配列の該一部において実質的に直線化して、当該分野で公知の任意の方法を用いてメチロトローフ酵母株に形質転換することができる。単一相同組み換えによって、この直線化されたベクターをＯＣＨ１遺伝子に組み込む。単一相同組み換えの結果、染色体内に２つのＯＣＨ１配列が作られる。第１のＯＣＨ１配列は、該ベクター由来のＯＣＨ１遺伝子の一部であり、これは宿主メチロトローフ酵母のＯＣＨ１プロモーターの制御下にあり、上述のように、ＯＣＨ１配列は何もコードしないか、あるいはＯＣＨ１タンパク質の不活性断片をコードするために、その状態では活性ＯＣＨ１タンパク質を産生することができない。第２のＯＣＨ１配列は、完全または変異ＯＣＨ１コード配列であり、これはいかなる既知のプロモーター配列にも実施可能に連結されていない、つまり活性ＯＣＨ１タンパク質の合成のためのメッセンジャーが形成されることは考えられない。好ましくは、ＯＣＨ１配列には、ベクターの線形化部位の５’末端およびＯＣＨ１の翻訳開始コドンの３’末端に、不活性化変異が導入される。「不活性化変異」に関しては、終止コドンを導入する変異、フレームシフト変異、またはリーディングフレームの崩壊を引き起こす任意の他の変異、またはＯＣＨ１リーディングフレームの５’切断のことをいう。好ましい不活性化変異は点変異である。好ましくは、実施例８に記載されるようなＯＣＨ１のまさにその５’末端のアミノ酸１２において終止コドンを導入することによる。このような変異は、当該分野で公知の任意の人口変異導入法（ｓｉｔｅ　ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｍｅｔｈｏｄ）を用いてＯＣＨ１配列に導入することができる。他の不活性化変異は、オープンリーディングフレームの５’切断である。上述のような不活性化変異によって、たとえ不活性化ベクター内に５’からＯＣＨ１配列へのプロモーター配列が幾分存在したとしても、機能的ＯＣＨ１タンパク質を一切形成させないようにすることができる。

【００９４】

本発明の好ましいＯＣＨ１不活性化ベクターとしては、ｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨ１、ｐＺ５’ＰｐＯＣＨ１ＴｒｕｎｃおよびｐＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ５’ＰｐＯＣＨｌＭｕｔが挙げられるが、これらについては以下の実施例においてさらに説明する。

【００９５】

必要に応じて、１つまたはそれ以上のα－１，２－マンノシダーゼ発現配列、グルコシダーゼ発現配列、ＧｎＴＩ発現配列、またはマンノシダーゼII発現配列を、ＯＣＨ１遺伝子を崩壊するための同一プラスミド上に保持して、「ノックインおよび不活性化」ベクターを作成してもよい。

【００９６】

好ましい実施形態において、本発明のベクターは、α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分をコードする配列と、内在ＯＣＨ１遺伝子またはその機能部分を崩壊または

不活性化することのできる配列を含んでいる。このようなベクターは、α－１，２－マンノシダーゼまたは機能部分を発現することができ、ピキア属、特にピキア　パストリスを含むメチロトローフ酵母におけるＯＣＨ１遺伝子を崩壊することができる。

【００９７】

本発明の好ましいノックインおよび不活性化ベクターとしては、ｐＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ５’ＰｐＯＣＨ１Ｍｕｔが挙げられ、このベクターについては以下の実施例においてさらに説明する。

【００９８】

さらに、上述のベクターのどれもが、ピキア属、特にピキア　パストリスを含むメチロトローフ酵母において目的の糖タンパク質を発現することのできるヌクレオチド配列をさらに含んでいてもよい。

【００９９】

本発明の他の態様は、メチロトローフ酵母株によって産生されるタンパク質に対して、グリコシル化を減少または改変して、哺乳動物様パターンにメチロトローフ酵母株を改変する方法を対象としている。本方法に従えば、メチロトローフ酵母株は、酵母株を、１つまたはそれ以上で、すなわち上述のような本発明の少なくとも１つのノックインおよび／または不活性化ベクターで形質転換することによって改変される。

【０１００】

本発明の方法を用いて改変可能なメチロトローフ酵母株としては、限定はされないが、メタノールで成育するこのできる酵母、たとえば、カンジタ属、ハンセヌラ属、トルロプシス属（Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ）およびピキア属の酵母が挙げられる。酵母のこのクラスの例となる種のリストは、Ｃ．Ａｎｔｈｏｎｙ（１９８２）、”Ｔｈｅ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｏｆ　Ｍｅｔｈｙｌｏｔｒｏｐｈｓ，２６９”に示されている。ピキア　パストリス，ピキア　メタノリカ（Ｐｉｃｈｉａ　ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ）、ピキア　アノモラ（Ｐｉｃｈｉａ　ａｎｏｍｏｌａ）、ハンセヌラ　ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ　ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）およびカンジダ　ボイジニ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｂｏｉｄｉｎｉｉ）は、本発明の実施において有用なメチロトローフ酵母の例である。好ましいメチロトローフ酵母は、Ｐｉｃｈｉａ属のものである。特に好ましいものは、ピキア　パストリス株ＧＳ１１５（ＮＲＲＬ　Ｙ－１５８５１）；米国特許第４，８１８，７００号に記載のＧＳ１９０（ＮＲＲＬ　Ｙ－１８０１４）；米国特許第４，８１２，４０５号に記載のＰＰＦ１（ＮＲＲＬ　Ｙ－１８０１７）；ＰＰＹ１２０ＨおよびＹＧＣ４；ならびにそれらから誘導される株である。

【０１０１】

本発明の方法を用いて改変可能なメチロトローフ酵母株には、１つまたはそれ以上の目的の異種糖タンパク質を発現するように遺伝子操作されたメチロトローフ酵母株も含まれる。こうした予め操作された株から発現された異種糖タンパク質でのグリコシル化は、本発明の１つまたはそれ以上のベクターによって当該株を形質転換することにより、哺乳動物様に減少または改変することができる。

【０１０２】

本発明のベクターは、Ｃｒｅｇｇら（１９８５）に記載されるようなスフェロプラスト融合法、ＥＰ３１２，９３４に記載されるようにピキア属において使用するために改変した全細胞塩化リチウム形質転換系（ｗｈｏｌｅ－ｃｅｌｌ　ｌｉｔｈｉｕｍ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ　ｙｅａｓｔ　ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ）（Ｉｔｏら．Ａｇｒｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．４８：３４１）などの既知の方法を用いて、メチロトローフ酵母株の細胞に導入することができる。プラスミドまたは線形ベクターの形質転換に有用な他の公開されている方法としては、米国特許第４，９２９，５５５号；Ｈｉｎｎｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７５：１９２９（１９７８）；ＩｔｏらＪ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５３：１６３（１９８３）；米国特許第４，８７９，２３１号；Ｓｒｅｅｋｒｉｓｈｎａら、Ｇｅｎｅ　５９：１１５（１９８７）が挙げられる。ＣｒｅｇｇおよびＲｕｓｓｅｌによって、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏ

ｇｙ：Ｐｉｃｈｉａ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，第３章，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，Ｎ．Ｊ．，２７～３９頁（１９９８）に記載されているように、エレクトロポレーション（ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ）およびＰＥＧ１０００全細胞形質転換法を用いてもよい。

【０１０３】

形質転換された酵母細胞は、限定はされないが、必要な生化学産物の非存在下で形質転換し、（細胞の栄養要求性による）新しい表現型の選択および検出を行った後の栄養要求性細胞を培養すること、あるいは、形質転換体内に含まれる耐性遺伝子の非存在下で酵母に毒性をもつ抗体の存在下で培養することを含む適当な技術を用いることにより選択することができる。形質転換体はまた、例えばサザンブロットまたはＰＣＲ分析によって評定することのできるゲノムへの発現カセットの組み込みによって選択および／または立証することができる。

【０１０４】

１つの実施形態において、メチロトローフ酵母株を、α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分をコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換する。このヌクレオチド配列は、メチロトローフ酵母株においてα－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分を発現することができ、好ましくは、メチロトローフ酵母株のゲノムに組み込まれる。

【０１０５】

メチロトローフ酵母株に導入されたα－１，２－マンノシダーゼの発現は、例えばノーザンブロット分析によるｍＲＮＡレベルと、例えばウェスタンブロット分析によるタンパク質レベルとの両方で確認することができる。タンパク質の細胞内局在化は、細胞亜分画や免疫蛍光実験を含む様々な技術を用いて分析することができる。細胞亜分画実験においては、α－１，２－マンノシダーゼのＥＲ局在化を、この酵素と、既知のＥＲ在留タンパク質（例えば、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ）との共沈降によって判定することができる。ＥＲ局在化は、ＥＲ在留タンパク質に特徴的な免疫蛍光染色パターン、典型的には核周囲染色パターンによって判定することができる。

【０１０６】

メチロトローフ酵母株において発現されたα－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分が、予想されるマンノース刈り込み活性を有するかどうかを確認するために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏとｉｎ　ｖｉｖｏのアッセイを行うことができる。典型的には、ｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成された基質、例えば、$Man_8GlcNAc_2$を、メチロトローフ酵母株から発現され精製された酵素で消化し、そのような酵素が、$Man_8GlcNAc_2$を例えば、$Man_5GlcNAc_2$に刈り込むことができるかどうかを評定することを含む。あるいは、ピキア細胞溶解物内のマンノシダーゼ活性は、酵素に対する発色基質、例えば、ＤＮＰ－α－Ｄ－マンノピラノシド（Ｔ．Ｄｅｓｍｅｄｔ，Ｎ．Ｃａｌｌｅｗａｅｒｔ，Ｒ．ＣｏｎｔｒｅｒａｓとＭ．Ｃｌａｅｙｓｓｅｎｓ，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．印刷中）を用いて検定することができる。ｉｎ　ｖｉｖｏ　アッセイにおいては、α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分を、メチロトローフ酵母内で、当該酵母内においてα－１，２結合したマンノース残基を保持するＮ－グリカンによってグリコシル化されることが知られている糖タンパク質と共発現させる。このようなα－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分の酵素活性は、糖タンパク質のＮ－グリカンの構造内のα－１，２結合したマンノース数の減少に基づいて測定することができる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏアッセイのいずれにおいても、炭水化物基の組成は、下記の実施例において説明する当該分野で周知の技術を用いて判定することができる。

【０１０７】

他の実施形態において、メチロトローフ酵母株は、グルコシダーゼIIまたはその機能部分をコードするヌクレオチド配列を含むベクターによって形質転換する。このヌクレオチド配列は、メチロトローフ酵母株内においてグルコシダーゼIIまたはその機能部分を発現

することができ、好ましくは、メチロトローフ酵母株のゲノムに取り込まれる。

【０１０８】

メチロトローフ酵母株に導入されたグルコシダーゼIIの発現は、例えばノーザンブロット分析によるｍＲＮＡレベルと、例えばウェスタンブロット分析によるタンパク質レベルとの両方で検証することができる。タンパク質の細胞内局在化は、細胞亜分画や免疫蛍光実験を含む様々な技術を用いて分析することができる。

【０１０９】

形質転換されたメチロトローフ酵母株内で発現されたグルコシダーゼIIまたはその機能部分の酵素活性は、様々なアッセイを用いて評価することができる。例えば、グルコシダーゼIIまたはその機能部分をコードする配列で形質転換されたメチロトローフ酵母細胞は、グルコシダーゼの基質、例えば、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－α－Ｄ－グルコピラノシドまたは４－ＭＵ－α－Ｄ－Ｇｌｃを含む個体培地上で成長するように設定することができる。ピキアによって酵素が発現され、細胞外に分泌されると、その酵素によって基質が反応し、青色または蛍光などのコロニーの周囲に検出可能なシグナルが現れる。あるいは、発現されたタンパク質分子を含む液体培地を回収して、試験管内で、基質、例えばｐ－ニトロフェニル－α－Ｄ－グルコピラノシドまたは４－ＭＵ－α－Ｄ－Ｇｌｃとともにインキュベートしてもよい。酵素活性は、遊離された特定の生成物を測定することによって判定することができる。さらに、ｉｎ　ｖｉｖｏ　アッセイを行うことができ、この場合、酵母内で、グルコシダーゼIIを、グルコース残基によってＮ－グリコシル化されていることが知られている糖タンパク質、例えば、インフルエンザ　ノイラミダーゼ（ｉｎｆｌｕｅｎｚａ　ｎｅｕｒａｍｉｎｉｄａｓｅ）とともに共発現させる。グルコシダーゼIIの酵素活性は、糖タンパク質の糖鎖のグルコース含量の減少に基づいて測定することができる。

【０１１０】

１つの実施形態において、ピキア属、特にピキア　パストリスなどのメチロトローフ酵母株を、ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを用いて形質転換する。このヌクレオチド配列は、メチロトローフ酵母株内でＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分を発現することができ、好ましくは、メチロトローフ酵母株のゲノムに組み込まれる。

【０１１１】

メチロトローフ酵母株に導入されたＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩの発現は、例えばノーザンブロット分析によるｍＲＮＡレベルと、例えばウェスタンブロット分析によるタンパク質レベルとの両方で検証することができる。タンパク質の細胞内局在化は、細胞亜分画や免疫蛍光実験を含む様々な技術を用いて分析することができる。

【０１１２】

メチロトローフ酵母株内で発現されたＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分が、予想されるＧｌｃＮＡｃＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$を有するかどうかを確認するために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏの両アッセイを行うことができる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏアッセイの両方において、炭水化物基の組成は、当該分野で周知であり実施例６に示す技術を用いて判定することができる。

【０１１３】

他の実施形態において、ピキア属や、特にピキア　パストリスなどのメチロトローフ酵母株は、マンノシダーゼIIまたはその機能部分をコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換する。このヌクレオチド配列は、メチロトローフ酵母株においてマンノシダーゼIIまたはその機能部分を発現することができ、好ましくはメチロトローフ酵母株のゲノム内に取り込まれる。

【０１１４】

形質転換されたメチロトローフ酵母株内で発現されたマンノシダーゼIIまたはその機能部分の酵素活性の発現は、ゲノム分析やグリカンアッセイなどの様々な技術およびアッセイを用いて評価することができる。

【０１１５】
本発明のさらに別の実施形態において、メチロトローフ酵母株をＯＣＨ１不活性ベクターで形質転換する。ベクターの形質転換および取り込みの結果、酵母株内の内在性のゲノムＯＣＨ１遺伝子が崩壊される。
【０１１６】
本発明のさらに別の実施形態において、メチロトローフ酵母株を、α－１，２－マンノシダーゼ崩壊ＯＣＨ１ベクターなどのノックインおよび不活性化ベクターを用いて形質転換する。ベクターの形質転換および取り込みの結果、酵母株内のゲノムＯＣＨ１遺伝子が崩壊され、酵母内で強力なα－１，２－マンノシダーゼが発現される。
【０１１７】
本発明のさらなる実施形態において、ピキア属や、特にピキア　パストリスなどのメチロトローフ酵母株を、α－１，２－マンノシダーゼ発現ベクター、グルコシダーゼII発現ベクター、ＧｎＴＩ発現ベクター、マンノシダーゼII発現ベクター、ＯＣＨ１不活性化ベクター、またはα－１，２－マンノシダーゼ崩壊ＯＣＨ１ノックインおよび不活性化ベクターのうちの１つまたはそれ以上によって形質転換する。このような改変は、順次連続した形質転換、すなわち、一回に１つのベクターを導入するか、あるいは同時形質転換、すなわち、ベクターを同時に導入するかによって行うことができる。
【０１１８】
好ましくは、ＧｎＴＩをコードするベクターで形質転換された株はまた、α－１，２－マンノシダーゼをコードするベクターを用いて、同時または連続して形質転換される。また好ましくは、マンノシダーゼIIをコードするベクターで形質転換した株はまた、ＧｎＴＩおよびα－１，２－マンノシダーゼをコードするベクターによっても形質転換されている。
【０１１９】
上述のような改変したメチロトローフ酵母株は、必要に応じてさらに改変してもよい。例えば、任意の他の酵母マンノシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をさらに崩壊させることができる。必要に応じて、哺乳動物酵素をコードする遺伝子をまた導入して、ハイブリッドまたは複合体型Ｎ－グリカンを有する糖タンパク質を産生することもできる。
【０１２０】
本発明の方法を用いて、すなわち本発明の１つまたはそれ以上のベクターによる形質転換を行うことにより改変されたメチロトローフ酵母株は、本発明の他の実施形態を構成する。
【０１２１】
本発明の一定の態様、特に細胞内で発現されたα－１，２－マンノシダーゼ活性の導入はまた、上記Ｏ結合グリカンは主にα－１，２－結合したマンノース残基からなることが当該分野で公知のとおり、メチロトローフ酵母において産生される糖タンパク質上にＯ結合したグリカンの減少または改変したグリコシル化を得るのに有用である。本明細書中で用いるＯ結合グリカンとは、糖タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に結合した炭水化物構造のことをいう。
【０１２２】
本発明のさらなる態様は、減少または改変されたグリコシル化、好ましくはメチロトローフ酵母においてハイブリッドまたは複合体グリカンを有する哺乳動物様のグリコシル化のパターンを伴う糖タンパク質、特に、メチロトローフ酵母とは異種の糖タンパク質の生成方法を対象とする。
【０１２３】
本明細書中で用いる「糖タンパク質」は、メチロトローフ酵母において、コンセンサス配列「Ａｓｎ－Ｘａａ－Ｔｈｒ」または「Ａｓｎ－Ｘａａ－Ｓｅｒ」（Ｘａａはプロリン以外のアミノ酸）を有する１つまたはそれ以上のアスパラギン残基上、あるいは１つまたはそれ以上のセリン（またはスレオニン）残基上、またはアスパラギンおよびセリン（ま

たはスレオニン）の両残基上でグリコシル化されたタンパク質を示している。

【０１２４】

「減少または改変されたグリコシル化」という用語は、糖タンパク質上の炭水化物部分の大きさが減少すること、特にマンノース残基が少なくなることをいうか、あるいは、糖タンパク質が本発明に従って改変されたメチロトローフ酵母株において発現された場合に、野生型のメチロトローフ酵母の非改変株とは対照的に、所望の哺乳動物様の糖タンパク質における複合グリカンに改変されていることをいう。

【０１２５】

本発明によれば、減少または改変されたグリコシル化を伴う目的の糖タンパク質の産生は様々な方法で行うことができる。糖タンパク質を発現することのできるヌクレオチド配列は、本発明に従って予め改変されたメチロトローフ酵母株、すなわち本発明の１つまたはそれ以上のベクターで形質転換された株に導入することができ、減少および／または改変されたグリコシル化を伴う糖タンパク質を産生することができる。あるいは、糖タンパク質を発現するようにすでに遺伝子操作されたメチロトローフ酵母株を、本発明の１つまたはそれ以上のベクターで形質転換することもできる。さもなければ、メチロトローフ酵母株が目的の糖タンパク質を発現せず、そしてまた本発明のいずれのベクターでも形質転換されていない株である場合、そのような酵母株は、糖タンパク質を発現することのできるヌクレオチドと、本発明のベクターの１つまたはそれ以上とで、連続してまたは同時に形質転換することもできる。さらに、メチロトローフ酵母株は、メチロトローフ酵母株において糖タンパク質を発現できるようなヌクレオチド配列も含んでいる、本発明のノックインおよび／または不活性化および／またはノックインおよび不活性化ベクターの１つまたはそれ以上によって形質転換することもできる。

【０１２６】

メチロトローフ酵母株において糖タンパク質を発現できるヌクレオチド配列は、５’から３’、つまりプロモーター、糖タンパク質をコードする配列、および３’終止配列を含むように作製することができる。糖タンパク質の発現に適したプロモーターと３’終止配列は、上述の任意のプロモーターおよび３’終止配列を含む。

【０１２７】

糖タンパク質の発現のためのヌクレオチド配列は、さらに付加的な配列、例えば、タンパク質産物の分泌が望まれる場合には、輸送ペプチドをコードするシグナル配列を含んでいてもよい。そのような配列は広く知られており、容易に入手可能であり、例えば、サッカロマイセス　セレビシエ　α接合因子前型（αｍｆ）、ピキア　パストリス　酸ホスファターゼ（ＰＨＯ１）シグナル配列などを含む。

【０１２８】

糖タンパク質の発現に関するヌクレオチド配列は、複製ベクターまたは組み込みベクター（ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ　ｖｅｃｔｏｒ）上に配置することができる。このようなベクターの選択および構築は上述の通りである。

【０１２９】

糖タンパク質を発現できるヌクレオチド配列は、任意の数（少なくとも１つ）のα－１，２－マンノシダーゼ、グルコシダーゼII、ＧｎＴＩ、マンノシダーゼII、不活性化ＯＣＨ１およびα－１，２－マンノシダーゼ－不活性化ＯＣＨ１発現単位をもつプラスミドとして同一の複製プラスミド上に維持させることができる。あるいは、糖タンパク質コード配列を含むヌクレオチド配列は、別のプラスミド上に維持してもよいし、あるいは、宿主ゲノムに組み込んでもよい。

【０１３０】

産生された糖タンパク質は、従来方法により精製することができる。精製プロトコールは、精製すべき特定のタンパク質の性質によって決めることができる。そのような決定は当業者の常識の範囲内である。例えば、細胞培養培地を細胞から分離し、細胞から分泌されたタンパク質を決まりきった単離技術、例えば沈殿、免疫吸着、分画または様々なクロマトグラフ法によって、培地から単離することができる。

【０１３１】
本発明の方法によって産生可能な糖タンパク質は、例えば、バシラス　アミロリクファシエンス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｍｙｌｏｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ）　α－アミラーゼ、Ｓ．セレビシ　エインベルターゼ、トリパノソーマ　クルーズ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｃｒｕｚｉ）トランスシアリダーゼ、ＨＩＶエンベロープタンパク質、インフルエンザウィルスＡヘマグルチニン、インフルエンザノイラミニダーゼ、ウシＩ型ヘルペスウィルス糖タンパク質Ｄ、ヒトアンギオスタチン、ヒトＢ７－１、　Ｂ７－２およびＢ－７受容体ＣＴＬＡ－４、ヒト組織因子、増殖因子（例えば血小板由来増殖因子）、組織プラスミノーゲン活性化因子、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤Ｉ、ウロキナーゼ、ヒトリソソームタンパク質、例えばα－ガラクトシダーゼ、プラスミノーゲン、トロンビン、因子XIIIおよび免疫グロブリンを含む。本発明の遺伝子操作したピキア属の株において発現しうる付加的な有用な糖タンパク質に関し、ＢｒｅｔｔｈａｕｅｒおよびＣａｓｔｅｌｌｉｎｏ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．３０：１９３～２００（１９９９）、ならびにＫｕｋｕｒｕｚｉｎｓｋａら．Ａｎｎ　Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５６：９１５－４４（１９８７）を参照のこと。

【０１３２】
本発明の方法を用いて産生された糖タンパク質、すなわち、減少または改変されたグリコシル化を伴う糖タンパク質もまた本発明の一部である。

【０１３３】
本発明のさらに別の態様は、上述した本発明のノックインベクター、不活性化ベクター、またはノックインおよび不活性ベクターのうちの少なくとも１つを含むキットを提供する。より詳細には、本発明のキットは、以下のベクターの少なくとも１つを含む。メチロトローフ酵母内でα－マンノシダーゼＩを発現することのできるベクター、メチロトローフ酵母内でグルコシダーゼIIを発現することのできるベクター、メチロトローフ酵母内でＧｎＴＩを発現することのできるベクター、メチロトローフ酵母内でマンノシダーゼIIを発現することのできるベクター、およびメチロトローフ酵母内でＯＣＨ１遺伝子を不活性化することのできるベクター。

【０１３４】
該キットはまた、目的の異種糖タンパク質をコードし、これを発現することのできるヌクレオチド配列を含んでいてもよい。そのようなヌクレオチド配列は、上述のようなノックインまたは不活性化のための配列を含む別のベクターまたは同じベクター内で提供することができる。

【０１３５】
さらに、キットはまた、目的の異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を、メチロトローフ酵母内に形質転換して発現されるために続いて挿入することのできるプラスミドベクターを含んでいてもよい。あるいは、キット内のノックイン、不活性化またはノックインおよび不活性化ベクターは、目的の異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を挿入するための便利なクローニング部位を有していてもよい。

【０１３６】
該キットは、上述のノックイン、不活性化またはノックインおよび不活性化ベクターのいずれかによって後に形質転換することのできるメチロトローフ酵母株を含んでいてもよい。該キットは、上述のノックイン、不活性化またはノックインおよび不活性化ベクターの１つまたはそれ以上で形質転換されたメチロトローフ酵母株を含んでいてもよい。さらに、該キットは、目的の異種糖タンパク質をコードし、これを発現することのできるヌクレオチド配列で形質転換されたメチロトローフ酵母株を含んでいてもよい。

【０１３７】
本発明をさらに以下の実施例によって説明する。

【実施例１】

【０１３８】
ＥＲ－ゴルジ境界へのα－１，２－マンノシダーゼの導入

１．１プラスミド

【０１３９】

【表１】

プラスミド	プロモーター	酵素	タグ
pGAPZMFManHDEL	GAP	T.レーセイ α－1,2－マンノシダーゼ	--
pGAPZMFManMycHDEL	GAP	T.レーセイ α－1,2－マンノシダーゼ	Myc
pPICZBMFManMycHDEL	AOX1	T.レーセイ α－1,2－マンノシダーゼ	Myc
pGAPZMFmManHDEL	GAP	マウスマンノシダーゼIB 触媒ドメイン	--
pGAPZMFmMycManHDEL	GAP	マウスマンノシダーゼIB 触媒ドメイン	Myc

トリコデルマ レーセイ α－１，２－マンノシダーゼ遺伝子は、Ｍａｒａｓら（Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．７７；２５５－２６３，２０００）によって単離され、記載されている。該遺伝子の配列は、ＮＣＢＩ Ｇｅｎｂａｎｋにおいてアクセス番号ＡＦ２１２１５３で入手可能である。構築断片は、ｐＰＩＣ９ＭＦｍａｎａｓｅプラスミド（Ｍａｒａｓら（２０００）に記載されているｐＰＰ１ＭＦｍｄｓ１と同じ）を鋳型として用い、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ＰＣＲにより作製した。５’－ＧＡＣＴＧＧＴＴＣＣＡＡＴＴＧＡＣＡＡＧＣ－３’（配列番号：２）および５’－ＡＧＴＣＴＡＧＡＴＴＡＣＡＡＣＴＣＧＴＣＧＴＧＡＧＣＡＡＧＧＴＧＧＣＣＧＣＣＣＣＧ ＴＣＧ－３’（配列番号：３）。得られた産物は、ピキア パストリス ＡＯＸＩプロモーターの３’末端、Ｓ．セレビシエα接合因子の前シグナル配列、フレームにて、シグナル配列を含んだクローン化したトリコデルマ レーセイ α－１，２－マンノシダーゼのオープンリーディングフレーム、ＨＤＥＬに関するコード配列、終止コドンおよび、ＸｂａＩ制限酵素認識部位を含んでいた。該断片をＥｃｏＲＩおよびＸｂａＩで消化して、マンノシダーゼＯＲＦまでの５’側の配列を除去し、続いてＥｃｏＲＩおよびＸｂａＩで消化しておいたベクターｐＧＡＰＺαＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｂａａｍ，オランダ）にクローン化し、次にＳ．セレビシエα接合因子シグナル配列との融合を修復した。得られたプラスミドをｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬと名付け、図１に模式図を示した。ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ内のＭＦＭａｎＨＤＥＬ融合物のＯＲＦ配列を、配列番号：１４に記載した。

【０１４０】

触媒ドメインとＨＤＥＬシグナルの間にｃ－Ｍｙｃタグに関するコード配列を導入するために、Ｔ．レーセイ（Ｔ．ｒｅｅｓｅｉ）、 α－１，２－マンノシダーゼのＯＲＦの３’末端をセンスプライマー５’－ＣＣＡＴＴＧＡＧＧＡＣＧＣＡＴＧＣＣＧＣＧＣＣ－３’（配列番号：４）（ＳｐｈＩ制限酵素認識部位を含む）およびアンチセンスプライマーＧＴＡＴＣＴＡＧＡＴＴＡＣＡＡＣＴＣＧＴＣＧＴＧＣＡＧＡＴＣＣＴＣＴＴＣＴＧＡＧＡＴＧＡＧＴＴＴＴＧＴＴＣＡＧＣＡＡＧＧＴＧＧＣＣＧＣＣＣＣＧＴＣＧＴＧＡＴＧＡＴＧＡＡ（配列番号：５）（ｃ－ＭｙｃタグおよびＨＤＥＬシグナルのコード配列に続き、終止コドンおよびＸｂａＩ制限酵素認識部位を含む）を用いて、ＰＣＲ増幅した。得られたＰＣＲ産物をＳｐｈＩおよびＸｂａＩで消化し、アガロースゲル電気泳動により

精製し、同じ制限酵素で切断しておいたｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬに挿入し、プラスミドｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬを得た。ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬのＯＲＦを、誘導可能なＡＯＸＩプロモーターの制御下におくために、ＢｓｔＢＩおよびＸｂａＩによってｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬから完全ＯＲＦを遊離させ、ｐＰＩＣＺＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｂａａｒｎ，オランダ）にてクローン化し、ｐＰＩＣＺＢＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬを得た。

【０１４１】

Ｃ－末端ＨＤＥＬ－タグに関するコード配列の同時付加によるマウスマンノシダーゼＩＢ触媒ドメインのクローニングは、マウスｃＤＮＡライブラリ（シクロヘキシミドとマウス腫瘍壊死因子によって誘導されたＬ９２９細胞系列から単離したｍＲＮＡ。ｃＤＮＡライブラリの平均の挿入物の長さは２００ｂｐであった）へのＰＣＲによって行った。使用したＰＣＲオリゴヌクレオチドプライマーは、

５’ＡＡＣＴＣＧＡＧＡＴＧＧＡＣＴＣＴＴＣＡＡＡＡＣＡＣＡＡＡＣＧＣ３’（配列番号：６）および５’ＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＴＴＡＣＡＡＣＴＣＧＴＣＧＴＧＴＣＧＧＡＣＡＧＣＡＧＧＡＴＴＡＣＣＴＧＡ３’（配列番号：７）であった。該産物は、５’ＸｈｏＩ部位、およびＣ末端ＨＤＥＬ部位に関するコード配列に続いて、３’末端に終止コドンとＮｏｔＩ部位を含んでいた。該産物は、ＰＣＲ産物およびベクター内のＸｈｏＩ／ＮｏｔＩ部位を介してｐＧＡＰＺαＡにクローン化し、その結果マウスマンノシダーゼ触媒ドメインと、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｉｓｉａｅ）α接合因子シグナル配列とのフレーム融合物を得た。得られた完全オープンリーディングフレームの配列は、配列番号：１５に記載した。

【０１４２】

１．２　酵母形質転換とゲノム組み込み

【０１４３】

【表２】

Table 2

親株	形質転換DNA
GS115 (his4)	pGAPZMFManHDEL
	pPIC9MFManHDEL
	pPIC9mManHDEL
	pPIC9mMycManHDEL
	pGAPZmManHDEL
	pGAPZmMycManHDEL
GS115（pPIC9インフルエンザHAによって補完したhis4）	pGAPZMFManHDEL
	pGAPZmManHDEL
	pGAPZmMycManHDEL
PPY120H（pPIC9sOCH1によって補完したhis4）	pGAPZMFManMycHDEL
	pPICZBMFManMycHDEL
yGC4（pBLURA5' PpOCH1によって補完した his4 arg1 ade2 ura3）	pPIC9インフルエンザノイラミニダーゼ
	pGAPZMFManHDEL
	pPIC9グルコースオキシダーゼ

ピキア　パストリスへのすべての形質転換体を、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎの指示に従ってエレクトロポレーションによって実施した。ゼオシン耐性遺伝子を保持するベクターの形質転換体は、１００μＧ／ｍＬゼオシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｂａａｒｎ，オランダ）および１Ｍソルビトールを含有するＹＰＤ上で選択した。ｐＰＩＣ９誘導体の形質転換体の選択は、ヒスチジンを欠如し１Ｍソルビトールを含有する最小培地上で行った。発現カセットのゲノム組み込みは、酵母Ｍｉｎｉｐｒｅｐ法（Ｎｕｃｌｅｏｎ）を用いてピキア属の株から精製したゲノムＤＮＡ上でＰＣＲを用いて確認した。トリコデルマ　レーセイ遺伝子融合に関するすべての場合において、使用したプライマーは、マンノシダーゼＯＲＦの３'側の半分にアニールするセンスプライマー　５'－ＣＣＡＴＴＧＡＧＧＡＣＧＣＡＴＧＣＣＧＣＧＣＣ－３'（配列番号：８）と、我々の発現構築物のすべてに存在するＡＯＸＩ転写終結因子にアニールするアンチセンスプライマー３'ＡＯＸＩ　５'－ＧＣＡＡＡＴＧＧＣＡＴＴＣＴＧＡＣＡＴＣＣＴ－３'（配列番号：９）であった。マウスマンノシダーゼトランス遺伝子のゲノム組み込みを制御するために、ＧＡＰプロモーターにアニーリングするセンスプライマー５'ＧＡＰ　５'ＧＴＣＣＣＴＡＴＴＴＣＡＡＴＣ

ＡＡＴＴＧＡＡ３’（配列番号：１０）または、ＡＯＸＩプロモーターにアニーリングする５’ＡＯＸＩ ５'ＧＡＣＴＧＧＴＴＣＣＡＡＴＴＧＡＣＡＡＧＣ３’（配列番号：１１）、およびアンチセンスプライマー３’ＡＯＸＩ（上記）を用いて、ＰＣＲを行った。Ｍｙｃタグ付きトリコデルマ レーセイ α－１，２－マンノシダーゼ発現単位を含む発現構築物に関し、全ＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ ＯＲＦ（ＨｉｇｈＰｒｉｍｅ，Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍを用いてラベルした^{32}Ｐ）をプローブとして用いたサザンブロッティングにより、ゲノム組み込みに関するさらなる証拠を得た。

【０１４４】

１．３ α－１，２－マンノシダーゼの発現

細胞内クラスＩマンノシダーゼ活性の測定

溶解物の調製：酵母細胞（Ｐ．パストリス ＧＳ１１５野生型および同じ株のｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬによる形質転換株（Ｃａｌｌｅｗａｅｒｔら，２００１））をＹＰＤ中、１０ｍＬの容積で、$ＯＤ_{６００}$＝２～２．５となるまで培養した。３０００×ｇで５分間の遠心分離によって細胞をペレット状にした後、細胞を滅菌水で２回洗浄し、５００μＬの溶解バッファに再懸濁した。この溶解バッファは、業者が示した希釈のＥＤＴＡ非含有完全プロテアーゼインヒビターカクテル（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ）と１％Ｔｒｉｔｏｎｘ１００を含む１００ｍＭ ＮａＡｃ，ｐＨ５の組成を有する。細胞懸濁液を１．５ｍＬエッペンドルフチューブに移した後、チューブのメニスカスにガラスビーズを加えて、チューブをＲｅｔｓｃｈ細胞破砕機において各攪拌工程の間に過熱を防ぐための１分間の氷上停止を入れながら、１分間ずつ５回攪拌した。最終的に微量遠心分離において５００ｒｐｍで遠心分離することにより細胞デブリスを沈殿させ、上清をタンパク質濃度決定のために用いた（Ｐｉｅｒｃｅ ＢＣＡキット。タンパク質濃度測定法の邪魔をするＴｒｉｔｏｎの濃度を下げるために、測定前に試料を１０倍に希釈）。上述のようにして得られた溶解物内のタンパク質濃度は、平均して約３．５ｍｇ／ｍＬとなるようにした。

【０１４５】

活性測定：３７５μｇのタンパク質を含む試料を、１００ｍＭのＮａＡｃ、ｐＨ５を用いて１５０μＬの体積にし、５０℃で１時間インキュベートした。本調合液においてタンパク質の大部分が変性され、インキュベーション後に乳白溶液の様相を示した。トリコデルマ レーセイ α－１，２－マンノシダーゼは、上記の条件下で熱安定性であった。変性タンパク質は、微量遠心分離の全速力（２００００×ｇ）で１０分間遠心分離することにより沈殿させた。上清を標準的なミクロタイタープレートのウェルに移した。次に、２５０μＭのスワインソニン（特異的II型マンノシダーゼへの阻害剤）と、４ｍＭＤＮＰマンノースと、２ｍＭ$ＣａＣｌ_{２}$を含む５０μＬの使用液を加えた。ブランク対照として、５０マイクロリットルの使用液を添加した１５０μＬの溶解バッファを使用した。５０℃で１時間インキュベートした後、標準的なミクロタイタープレートリーダにおいて４０５ｎｍにおける吸収を測定した。図３１の報告値はブランクを差し引いたものである。

【０１４６】

インフルエンザウィルスヘマグルチニンを発現するＧＳ１１５株におけるα－１，２－マンノシダーゼの発現は、定性的ノーザンブロットによって確認した。ＰＰＹ１２０Ｈ株におけるα－１，２－マンノシダーゼの発現は、抗Ｍｙｃウェスタンブロットによって確認した。

【０１４７】

定性的ノーザンブロット

全ＲＮＡをピキア属の株より精製し、収率を分光光度法によって決定した。ノーザンブロッティングは、標準的な方法に従って実施し、ロードしたＲＮＡの量の評価は、ｒＲＮＡバンドを可視化するブロットのメチレンブルー染色を用いて行った。ブロットは、ＨｉｇｈＰｒｉｍｅ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を用いて^{32}Ｐ標識したマンノシダーゼのＣｌａＩ／ＮａｒＩ断片によって検証した。

【０１４８】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウェスタンブロッティング

全酵母細胞溶解物は、細胞をＰＢＳで２回洗浄した後、同体積の２倍濃度のＬａｅｍｍｌｉ泳動バッファ中で５分間煮沸することにより調製した。ゲル泳動する前に、溶解物を微量遠心分離において簡単にスピンし、上清だけを泳動した。培地に分泌されたタンパク質を分析するために、２００μＬの培地からデオキシコール酸／トリクロロ酢酸を用いて、標準的な方法に従ってタンパク質を沈殿させた。ペレットを２×濃度のＬａｅｍｍｌｉ泳動バッファ中に再溶解し、溶液のｐＨをＴｒｉｓを用いて調整した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った後、ニトロセルロース膜に対する半乾性エレクトロブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングについては、９Ｅ１０抗Ｍｙｃおよび抗ＨＡマウスモノクローナル（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を、１μｇ／ｍＬの濃度で用い、ウサギ抗ＰＤＩ抗血清（Ｓｔｒｅｓｓｇｅｎ）を１／５００の希釈で用いた。二次抗体は、モノクローナルに対してはアルカリホスファターゼ共役ヤギ抗マウスＩｇＧとし、ポリクローナルに対してはペルオキシダーゼ共役ヤギ抗ラビットＩｇＧを用いた（二次抗体はＳｉｇｍａより入手）。検出は、アルカリホスファターゼに関してはＮＢＴ／ＢＣＩＰ系、ペルオキシダーゼに対してはルネッサンス基質（ＮＥＮＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いた。後者のブロット結果の画像化は、Ｌｕｍｉｌａｇｅｒ画像化装置（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）上で行った。

【０１４９】

図４に示した結果は、強力な構成的ＧＡＰプロモーターから発現された場合、また強力な誘導可能ＡＯＸＩプロモーターから発現された場合のいずれにおいても、ＨＤＥＬタグ付きタンパク質の大部分は細胞内に保持されていることを示している。

【０１５０】

１．４　α－１，２－マンノシダーゼの局在化

等密度スクロース密度勾配遠心分離（Ｉｓｏｐｙｃｎｉｃ　ｓｕｃｒｏｓｅ　ｄｅｎｓｉｔｙ　ｇｒａｄｉｅｎｔ　ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｔｉｏｎ）

ＨＤＥＬタグ付きマンノシダーゼの局在性を調べるために、強力な構成的ＧＡＰプロモーターからマンノシダーゼ－Ｍｙｃ－ＨＤＥＬを発現している細胞を用いて、細胞亜分画を行った。

【０１５１】

簡単にいうと、湿重量０．５ｇの酵母細胞に対して、４．５ｇのガラスビーズとともに１ｍＬの溶解バッファ（０．６Ｍソルビトール、１０ｍＭβ－メルカプトエタノール、および５ｍＭ　$MgCl_2$ を含むｐＨ７．５の５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ）中で４×１分間のボルテックス攪拌を行い溶解した。ボルテックス攪拌の合間に、混合物を５分間氷上においた。上清を回収し、ガラスビーズを溶解バッファで１回洗浄し、該洗浄工程の上清を最初の上清に加えた。該溶解物に対して分画遠心分離法を行った。Ｐ１００００ペレットを、溶解バッファ中の０．５ｍＬの６０％スクロース溶液中に可溶化した。該溶液を１４×８９ｍｍのＵｌｔｒａｃｌｅａｒ超遠心チューブ（Ｂｅｃｋｍａｎ）の底にセットした。次に、それぞれ１．５ｍＬの５５、５０、４５、４２．５、４０、および３７．５％のスクロース溶液を注意深く層状に重ねていった。チューブを３５％スクロースで縁まで充填した。等密度スクロース勾配遠心分離は、ＢｅｃｋｍａｎモデルＬ８－７０調製用超遠心分離器内でＢｅｃｋｍａｎ　ＳＷ４１ロータ内で、１８０，０００ｇで１４時間行った。完了後、１ｍＬ画分を上部から回収し、過剰なスクロースから部分的に透析し、真空遠心分離器内で蒸発乾燥させた。ペレットをＬａｅｍｍｌｉバッファ中に再溶解させた後、試料を３連でＳＤＳ－ＰＡＧＥを供し、ウェスタンブロットをそれぞれ抗ＨＡ、抗Ｍｙｃまたは抗ＰＤＩ（「ＰＤＩ」はタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄｉｓｕｌｆｉｄｅ　Ｉｓｏｍｅｒａｓｅ）の略語）で処理した。

【０１５２】

結果は、ＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬタンパク質が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼマーカータンパク質（これもＨＤＥＬシグナル配列のタグが付けられている）とほぼ確実に共沈殿していることを示した（図５）。同じアッセイにおいて、ＨＡタグ付きＯＣＨ１は、勾配全体に分布していたが、マンノシダーゼおよびＰＤＩを含む画分よりも低い密

度を有する画分においてその量が最も多かった。該結果は、ＨＤＥＬシグナルの付加により、マンノシダーゼが予想した位置（ＥＲ－ゴルジ境界）を標的としたことを示した。これに対し、誘導可能なアルコールオキシダーゼＩプロモーター（ＧＡＰプロモーターと同等の強度のもの）から発現された、ＨＤＥＬを含まないマンノシダーゼは、約２０ｍｇ／Ｌの高濃度で分泌された。

【０１５３】

免疫蛍光顕微鏡観察

マンノシダーゼ－Ｍｙｃ－ＨＤＥＬの正確な標的を確かめるために、免疫蛍光顕微鏡実験を行った。

簡単に説明すると、酵母培養物を、（ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬに関しては）ＹＰＤ中で、またはｐＰＩＣＺＢＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬに関してＹＰＧｌｙｃｅｒｏｌ増殖期後にはＹＭＰ中で、$ＯＤ_{６００}$にまで増殖させた。酵母培養にホルムアルデヒドを加えて、４％の最終濃度にし、室温で１０分間インキュベートした。細胞をペレット化し、１ｍＭ $ＭｇＣｌ_{２}$および４％ホルムアルデヒドを含む５０ｍＭのリン酸ナトリウムバッファｐＨ６．５中に再懸濁して、室温で２時間インキュベートした。ペレット化した後、細胞を、１ｍＭ $ＭｇＣｌ_{２}$およびＥＤＴＡ－ｆｒｅｅ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ（商標）プロテアーゼインヒビターカクテル（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を含む１００ｍＭリン酸ナトリウムバッファｐＨ７．５中、$ＯＤ_{６００}$＝１０となるように再懸濁した。１００μＬの細胞懸濁液に、０．６μＬのβ－メルカプトエタノールおよび２０μＬの２０，０００Ｕ／ｍＬのザイモリエース（Ｚｙｍｏｌｙａｓｅ）１００Ｔ（ＩＣＮ）を加えた後、穏やかに攪拌しながら２５分間インキュベートした。細胞をインキュベーションバッファ中で２回洗浄し、ポリリジンでコートしたカバースリップ（通常は紙に開けた穴を強化するために用いられる接着性リングを用いて作製）に加えた。過剰な液体は、綿棒で吸い取り、細胞を２０℃で乾燥させた。すべてのブロッキング、抗体インキュベーションおよび洗浄工程は、０．０５％のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳ中で実施する。一次抗体は、２μｇ／μＬで使用し、蛍光団（分子プローブ）と結合させた二次抗体は、５μｇ／μＬで使用した。核は、核酸染料ＨＯＥＣＨＳＴ３３２５８で染色した。固定および細胞膜透過後、酵母細胞形態の完全性を位相差顕微鏡にて確認し、免疫染色後、スライドグラスをＫｏｄａｋデジタルカメラを搭載したＺｅｉｓｓ Ａｘｉｏｐｈｏｔ蛍光顕微鏡の下で観察した。画像は、Ｍａｃｐｒｏｂｅ４．０ソフトウェアを用いて処理し、Ｃｏｒｅｌ Ｐｈｏｔｏｐａｉｎｔ９．０を用いて作製した。

【０１５４】

ゴルジマーカータンパク質ＯＣＨ１－ＨＡは、文献に記載されているような典型的なゴルジ染色パターン（斑点状の染色）を呈した。マンノシダーゼ－Ｍｙｃ－ＨＤＥＬを認識する９Ｅ１０モノクローナル抗Ｍｙｃ抗体は、細胞質内に多少のばらばらの染色を見せたものの、核周囲染色パターンを呈し、ＥＲを標的とすることがよく示された（図４）。

上記の実験に基づいて、トリコデルマ レーセイ マンノシダーゼ－Ｍｙｃ－ＨＤＥＬは、ＥＲ－ゴルジ境界を標的とすることが結論づけられた。

【実施例２】

【０１５５】

マンノシダーゼ－ＨＤＥＬの組み換え糖タンパク質との共発現

トリパソーマ クルーズ トランスシアリダーゼを備えたマンノシダーゼＨＤＥＬの共発現

Ｃ末端反復ドメインを有さない活性トランスシアリダーゼメンバーをコードするトリパソーマ クルーズ トランスシアリダーゼ遺伝子のクローニングは、Ｌａｒｏｙら（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ２０：３８９，２０００）によって記載されており、この文献は参照により本願に組み込む。このトリパソーマ クルーズ トランスシアリダーゼ遺伝子の配列は、ＮＣＢＩ Ｇｅｎｂａｎｋを通してアクセス番号ＡＪ２７６６７９として入手可能である。Ｐ．パストリスにおける発現に関し、全遺伝子をｐＨＩＬＤ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃ

Ａ）にてクローニングし、ｐＨＩＬＤ２－ＴＳを作製した。分泌を高めるために、トランスシアリダーゼを酵母α接合因子の前分泌シグナルに結合させたｐＰＩＣ９－ＴＳを作製した。プラスミドｐＰＩＣ９－ＴＳＥおよびｐＣＡＧＧＳ－ｐｒｅｐｒｏ－ＴＳＥは、エピトープＥタグを、トランスシアリダーゼのＣ末端に付加して、検出および精製を容易にする場合に作製した。ｐＨＩＬＤ２－ＴＳ、ｐＰＩＣ９－ＴＳＥおよびｐＣＡＧＧＳ－ｐｒｅｐｒｏ－ＴＳＥの構築については、参照により本願に組み入れるＬａｒｏｙら（２０００）に記載されている。構築の際に用いたベクターは、ｐＣＡＧＧＳについては、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｅｌｓｐｏ．ｂｅ／ｂｃｃｍ／ｌｍｂｐ．ｈｔｍ＃ｍａｉｎ（Ｎｏ．ＬＭＢＰ２４５３）、ｐＨＩＬＤ２およびｐＰＩＣ９についてはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（カリフォルニア州、サンディエゴ）、ｐＣＡＮＴＡＢ－５ＥについてはＰｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈより入手可能であった。

【０１５６】

プラスミドｐＰＩＣ９－ＴＳＥはＳｓｔＩを用いて線形にし、製造業者（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の指示に従ってエレクトロポレーションによって、Ｐ．パストリス　ＧＳ１１５（ｈｉｓ４）株に形質転換した。形質転換体の１つは、さらにプラスミドｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬで形質転換し、マンノシダーゼ－ＨＤＥＬとトリパソーマ　クルーズ　トランスシアリダーゼの共発現する株を樹立した。

【０１５７】

発酵およびタンパク質の精製は、Ｌａｒｏｙら（２０００）に記載された手順に従った。

【０１５８】

精製されたトランスシアリダーゼはＣａｌｌｅｗａｅｒｔら、Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１１，４，２７５－２８１、２００１に従った炭水化物分析に供した。簡単にいうと、糖タンパク質を９６ウェルプレートのウェル中でＰＶＤＦ膜に結合させ、還元し、アルキル化し、ペプチド－Ｎ－グリコシダーゼＦ脱グリコシル化を受けた。グリカンは還元的アミノ化により８－アミノ－１，３，６－ピレントリスルホン酸に誘導した。次に、過剰な遊離の標識をＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ１０を充填したスピンカラムを用いて除去し、グリカンを、ＡＢＩ　３７７Ａ　ＤＮＡシーケンサにより３６ｃｍシーケンシングゲル上での電気泳動によって解析し、内蔵のアルゴンレーザーを用いて検出した。３ｍＵ／ｍＬの精製したＴ．レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼ（Ｍａｒａｓら、Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．７７，２５５－６３，２０００に記載）による消化も、２０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ＝５．０）において実施した。１μｇの精製組み換え糖タンパク質から得られるグリカンを基質として使用した。１Ｕのα－１，２－マンノシダーゼを、３７℃、ｐＨ＝５．０、分あたりのパン酵母マンナンから１μモルのマンノースを遊離する酵素量として定義する。

【０１５９】

図６のパネルＢに見られるように、トランスシアリダーゼ上の主たるＮグリカンは、$Man_8GlcNAc_2$であった（ウシＲＮａｓｅ　ＢのＮ－グリカンの分析を表すパネルＦと比較のこと。このプロファイルの最後の１つのピークが$Man_8GlcNAc_2$であり、最初のピークが$Man_5GlcNAc_2$である）。Ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、このグリカンは、α－１，２－マンノシダーゼを用いて、$Man_5GlcNAc_2$を消化可能である（図６，パネルＣ）。マンノシダーゼ－ＨＤＥＬと共発現させたトランスシアリダーゼのＮ－グリカンプロファイルにおいて、主たるピークは、$Man_5GlcNAc_2$に相当する（図６、パネルＤ）。

【０１６０】

インフルエンザＡウィルスヘマグルチニンとのマンノシダーゼＨＤＥＬの共発現

インフルエンザＡウィルスヘマグルチニンは、ピキア　パストリスにおいて、９～１２個のマンノース残基を含む高マンノースＮグリカンによってグリコシル化されていることが知られている（Ｓａｅｌｅｎｓら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６０：１６６－１７５、１９９９）。ヘマグルチニンのＮグリカン上で共発現されたマンノシダーゼの効果

を、後述するＮグリカンプロファイリング方法において評価した。さらに、トリコデルマ酵素（至適温度６０℃）の効率を、至適温度３７℃の哺乳動物マンノシダーゼと比較するために、マウスｃＤＮＡライブラリから得たマウスマンノシダーゼＩＢの触媒ドメインを、ＰＣＲ増幅により、クローン化しＨＤＥＬシグナルのタグを付けた。このＯＲＦをＧＡＰプロモーターの制御下にある、Ｓ．セレビシエα接合因子の前シグナル配列の後にクローン化した。ｍＲＮＡレベルでのマンノシダーゼ－ＨＤＥＬトランス遺伝子の発現は、定性的ノーザンブロッティングによって確認した。

【０１６１】

該ヘマグルチニンを、マンノシダーゼを発現しない対照株、およびトリコデルマ　レーセイマンノシダーゼ－ＨＤＥＬまたはマウスマンノシダーゼＩＢ－ＨＤＥＬを共発現する株から、Ｋｕｌａｋｏｓｋｙら．Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　８：７４１－７４５（１９９８）に記載の手順に従って、発現させ精製した。精製されたヘマグルチンをＳａｅｌｅｎｓら．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６０：１６６－１７５、１９９９によって記載されるように、ＰＮＧアーゼＦによって消化した。タンパク質およびグリカンは、３体積の氷冷アセトンによって沈殿させ、グリカンをペレットから６０％メタノールを用いて抽出した。真空蒸発に続いて、１．２Ｍのクエン酸に溶解した２０ｍＭのＡＰＴＳと、ＤＭＳＯに溶解した１ＭのＮａＣＮＢＨ$_3$との１：１混合液１μＬを加え、２５０μＬのＰＣＲチューブの底で３７℃で１６時間インキュベートすることにより、グリカンを８－アミノ－１，３，６ピレントリスルホン酸で標識した。１０μＬの脱イオン水を加えることによって反応を停止し、該混合物を、マイクロスピンカラム中、スイングバケツロータ内での遠心分離によって乾燥状態に充填された、平坦な樹脂表面を施す１．２ｃｍのＳｅｐｈａｄｅｘＧ１０ベッド上に流した。ローディング後、５０μＬの脱イオン水を樹脂ベッドに注意深く加え、スピンカラムを卓上遠心機で７５０ｇにおいて５秒間手短に遠心分離した。この溶出プロセスを２回繰り返し、すべての溶出液を集め、真空遠心機（ＳＡＶＡＮＴ）において乾燥状態にまで蒸発させた。標識されたグリカンは、ローダミン（ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）で標識した、内部参照標準として機能する、５０％ホルムアミドおよび０．５μＬのＧｅｎｅｓｃａｎ５００（商標名）を含む１．５μＬのゲルローディングバッファ中で再編成させた。この混合物は、１０％のアクリルアミド：ビスアクリルアミドの１９：１混合物（Ｂｉｏｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ，ＵＳＡ）を含むＤＮＡシーケンシングゲル上にローディングし、標準的なＤＮＡシーケンシングバッファ（８９ｍＭ　Ｔｒｉｓ，８９ｍＭホウ酸塩，２．２ｍＭ　ＥＤＴＡ）中で構成した。ゲルの重合は、２００μＬの１０％アンモニウム過硫酸水溶液、および２０μＬのＴＥＭＥＤを加えることにより触媒した。ゲルは、読みとるべき標準的な３６ｃｍウェルの長さを有し、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｍｏｄｅｌ　３７３Ａ　ＤＮＡシーケンシング装置上で使用した。ゲルのプレランは、１０００Ｖで１５分間行い、ローディング後、ゲルを加熱せずに、１２５０Ｖで８時間電気泳動した。この方法により、１ピークあたり１０ｆｍｏｌの検出限界を与える。データは、Ｇｅｎｅｓｃａｎ３．０ソフトウェアで分析した。

【０１６２】

図７に示すように、トリコデルマ　レーセイのα－１，２－マンノシダーゼがＮ－グリカン上に存在するα－１，２－マンノースの数を最も完全に減少させた。マウスマンノシダーゼＩＢ－ＨＤＥＬによってＮグリカン過程は、トリコデルマ　レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼによってよりも低い効率で処理される。

【０１６３】

ヘマグルチニンのＮ－グリカンからα－１，２－マンノシダーゼを効率的に除去できたにもかかわらず、$Man_5GlcNAc_2$は得られなかった。Ｎ－グリカンを３ｍＵの精製トリコデルマ　レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼで消化した後でさえ、最も小さい糖鎖として$Man_6GlcNAc_2$しか得られなかった。これらの結果から、残った残基が、ＯＣＨ１α－１，６－マンノシルトランスフェラーゼの酵素活性を始動することにより得られる、α－１，６結合したマンノシダーゼである可能性が考えられる。ＯＣＨ１

は、ゴルジ装置の非常に初期の部分に局在することが観察されており、マンノシダーゼ－ＨＤＥＬによって$Man_8GlcNAc_2$前駆体から$Man_5GlcNAc_2$に完全に消化される前にヘマグルチニンのＮ－グリカンに作用することができる。このように、α－１，６－マンノシルトランスフェラーゼによってグリカンが効率的に改変されているタンパク質に関しては、トランスフェラーゼをコードするＯＣＨ１遺伝子の不活性化が、$Man_5GlcNAc_2$を有するタンパク質を得るためには望ましい。

【実施例３】

【０１６４】

ピキア属　ＯＣＨ１遺伝子の不活性化

ピキア　パストリス配列は、ＧｅｎＢａｎｋにおいてアクセス番号Ｅ１２４５６として見つけたものであり、参照により本願に組み入れる日本国特許出願番号０７１４５００５に記載されている。この配列は、α－１，６－マンノシルトランスフェラーゼのすべての典型的な特徴を示し、Ｓ．セレビシエのＯＣＨ１と最も相同性が高いことから、本明細書中ではピキア　パストリス　ＯＣＨ１遺伝子と呼ぶ。

【０１６５】

まず最初に、ピキア　パストリス　ＯＣＨ１遺伝子の全ＯＲＦをｐＵＣ１８にＰＣＲクローニングして、プラスミドｐＵＣ１８ｐＯＣＨ１を得た。ｐＵＣ１８ｐＯＣＨ１を、ＨｉｎｄIIIで切断し、Ｔ４ポリメラーゼを用いて末端を平滑化してから、ＸｂａＩで切断し、ピキア　パストリス　ＯＣＨ１遺伝子の５’部分を含む断片を切り出した。この断片を、ＥｃｏＲＩで切断し、Ｔ４ポリメラーゼで末端を平滑化し、ＮｈｅＩで切断しておいたベクターｐＢＬＵＲＡＩＸ（Ｋｅｃｋ　Ｇｒａｄｕａｔｅ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｄｒ．Ｊａｍｅｓ　Ｃｒｅｇｇ，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｋｇｉ．ｅｄｕ／ｈｔｍｌ／ｎｏｎｃｏｒｅ／ｆａｃｕｌｔｙ／ｃｒｅｇｇ／ｃｒｅｇｇ．ｈｔｍより入手可能）中にライゲートした。このライゲーションにより、図８に示したようなｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＰＣＨ１が得られた。

【０１６６】

ピキア属ゲノム内の該ピキア属　ＯＣＨ１遺伝子の崩壊は、図９に示すようにｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨ１を用いて単一相同組み換えによって達成した。単一相同組み換えの結果、ピキア属染色体上のＯＣＨ１遺伝子が２つのＯＣＨ１配列と置き換わる。このＯＣＨ１配列のうちの１つは、全ＯＣＨ１ＯＲＦのうちのほぼ最初の３分の１からなり、もう一方はＯＣＨ１プロモーターを除いた完全なＯＣＨ１ＯＲＦを有する。単一相同組換えは、以下のようにして行った。ピキア属の株ｙＧＣ４の細胞を、単一のＢｓｔＢＩ切断によって線形化したｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨ１を用いたエレクトロポレーションによって形質転換した。約５００個の形質転換体を、１Ｍソルビトール、ビオチン、アルギニン、アデニンおよびヒスチジンを含む最小培地上で得、２７℃でインキュベートした。これらの形質転換体のうちの３２個を拾い、同じ条件下で再度選択した。１２個のクローンについて、カセットが正確にゲノムに取り込まれているかについて、さらにＰＣＲにより分析した。１２個のＵＲＡ原栄養クローンのうちの７個が、正しい座にカセットを含んでいた。

【０１６７】

ＯＣＨ－１不活性化クローンのうちの１つについて、ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬでさらに形質転換し、「超形質転換体（ＳＵＰＥＲＴＲＡＮＳＦＯＲＭＡＮＴＳ）」を作製した。細胞壁グリカン分析において、以下のようにして、ＯＣＨ１不活性化クローンと、ＭａｎＨＤＥＬをも発現している３つの超形質転換体の両方を評価した。酵母細胞を１０ｍＬのＹＰＤにおいて、OD_{600}＝２まで培養し、酵母細胞を２０ｍＭクエン酸ナトリウムバッファｐＨ７中、１２０℃で９０分間オートクレーブし、遠心分離後の上清を回収することにより、マンノプロテインを調製した。この上清から３体積の冷メタノールでタンパク質を沈殿させた。本方法で得られたタンパク質調製物を、Ｃａｌｌｅｗａｅｒｔら（２００１）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　１１，２７５－２８１に記載されるようなＤＳＡ－ＦＡＣＥを用いたＮグリカン分析のために用いた。図１０に示すように、親株ｙＧＣ

４に比べて、ＯＣＨ１不活性化クローン中のＭａｎ$_8$ＧｌｃＮＡｃ$_2$グリカンの量は増加しており、これは、ＯＣＨ１酵素の活性が低下してことを示す。ＨＤＥＬタグ付きα－１，２－マンノシダーゼをまた発現している全部で３つの超形質転換体において、Ｍａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$の産生を観察した。さらに、同じグリカン混合物を３ｍＵ／ｍＬの精製組み換えトリコデルマ　レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼで消化したところ、親株の場合に比べて、ｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨ１で形質転換した株においてより多くのＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$が形成された（図１１，パネル２と３を比較のこと）。

【０１６８】

これらの結果は、Ｍａｎ$_5$グリカンによる糖タンパク質の産生が、ＯＣＨ１遺伝子の不活性化によって容易になったことを示している。

【０１６９】

順方向プライマーＫａｉ１３：５’－ＡＴＣＴＡＡＧＣＴＡＴＡＴＴＣＧＣＣＧＴＴＣＴＧＴＣＡＴＴ－３’（配列番号：４３）および逆方向プライマーＫａｉ１４：５’－ＣＧＡＴＴＡＴＧＧＡＴＧＴＴＡＧＡＴＣＴＧＡＴＣＴＣＡＴＧＡ－３’（配列番号：４４）を用いて、プラスミドｐＰＩＣＺＢ５’ＰｐＯＣＨ１Ｍｕｔ（実施例８に記載したプラスミド構築物）において突然変異生成ＰＣＲを行った。このＰＣＲの結果、ｐＰＩＣＺＢ５’ＰｐＯＣＨ１Ｍｕｔ内の、全ＡＯＸ１プロモーターと、ＯＣＨ１断片の最初の２４アミノ酸に関するコード配列とを欠失する産物が得られた。この産物は、自己ライゲートし、得られたプラスミドをｐＺ５’ＰｐＯＣＨ１Ｔｒｕｎｃ（配列番号：４５）と名付けた。

【０１７０】

このプラスミドを、ＢｓｔＢＩを用いて線形化し、その産物をピキア　パストリスＧＳ１１５およびｙＧＣ４に形質転換した。形質転換体を、ＹＰＤＳ－Ｚｅｏ上で選択し、ゲノム組み込みについて、２回のＰＣＲ反応によって調べた。つまり、プライマー対Ｋａｉ１０（配列番号：４１）／Ｋａｉ　７（配列番号：４０）を用いた１回と、プライマー対Ｋａｉ　５（配列番号：３９）／Ｋａｉ１１（配列番号：４２）を用いた１回。プライマーのハイブリダイゼーション部位は、図３２上で見ることができる。図３２において、形質転換後のＯＣＨ１座における望ましいゲノム位置が示されている。

【０１７１】

これらのＰＣＲを用いて２４個のクローンについて分析し、８個のクローンに関する結果を図３４に示した。２４個のうちの少なくとも８個のクローンが、ＯＣＨ１座に適切に組み込まれたプラスミドを有していることを見いだした。

【０１７２】

適切な組み込みがなされたすべてのクローンは、バナジン酸塩耐性であり（５ｍＭバナジン酸ナトリウムを含むＹＰＤプレート、３０℃での成育）、これはＮ－グリコシル化欠失酵母細胞に関する典型的な特質である（Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１９９１　Ａｐｒ　１５；　８８　（８）：３２０９－１２）。

【実施例４】

【０１７３】

ピキア　パストリスにおけるグルコシダーゼIIの発現

４．１　Ｓ．セレビシエ由来のＧＬＳＩＩαサブユニットＯＲＦの増幅

Ｓ．セレビシエ株ＩＮＶＳ（α、ｌｅｕ２－３、１１２ｈｉｓ３∈１、ｔｒｐｌ－２８９、ｕｒａ３－５２）から、Ｎｕｃｌｅｏｎキット（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を用いてゲノムＤＮＡを調製した。タッチダウン（ｔｏｕｃｈ－ｄｏｗｎ）ＰＣＲ反応を、ゲノムＤＮＡを鋳型として、またＬＡＴａＫａＲａポリメラーゼ（ＩｍＴｅｃ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を用いて実施した。ＰＣＲプライマーの配列は、以下のＳ．セレビシエ　ＧＬＳＩＩ　ＯＲＦの既知の配列に基づいている。

【０１７４】

【化１】

センスプライマー：5' CCG CTC GAG (Xho I) ATG GTC CTT TTG AAA TGG CTC 3'

（配列番号：１２）

アンチセンスプライマー：5' CCG GGC CCA (Apa I) AAA ATA ACT TCC CAA TCT TCA G 3'（配列番号：１３）

【０１７５】

４．２　ピキア　パストリス発現ベクターへのＳ．セレビシエ　グルコシダーゼIIＯＲＦのクローニング

グルコシダーゼII発現ベクターの構築

ＰＣＲ断片はＸｈｏＩ／ＡｐａＩで消化し、ｐＧＡＰＺＡベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にライゲートし、これによりＯＲＦをＧＡＰプロモーターの転写制御下においた。この方法を用いて、ｍｙｃおよびＨｉｓ６タグをグルコシダーゼIIのＣ末端と同フレームにおき、ｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIを作製した。ｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIの完全なＯＲＦの配列を決定し、ＰＣＲ反応中に変異が起こらないようにした。ベクターｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIの配列は、配列番号：１８に記載した。ｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIベクターからのＧＬＳII ＯＲＦを、ベクターｐＰＩＣＺＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローン化して、ｐＰＩＣＺＡＧＬＳIIを作製することにより、ＯＲＦをＡＯＸＩプロモーターの転写制御下においた。ｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIベクターからのＧＬＳIIＯＲＦをベクターｐＡＯＸ２ＺＡにクローン化し、これによりＯＲＦをＡＯＸ２プロモーターの転写制御下においた。このベクターは、ベクターｐＡＯＸ２ＺＢのマルチクローニングサイトを、ｐＰＩＣＺＡのマルチクローニングサイトで置き換えることで作製した。ベクターｐＡＯＸ２ＺＢを、ｐＰＩＣＺＢのＡＯＸ１プロモーターを、ＡＯＸ２遺伝子のＡＯＸ２プロモーター領域によって置き換えることで作製した（Ｍａｒｔｉｎｅｔら，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　２１）。ＡＯＸ２プロモーター領域は、
センスプライマー：５’ＧＡＣＧＡＧＡＴＣＴＴＴＴＴＴＣＡＧＡＣＣＡＴＡＴＧＡＣＣＧＧ　３’（配列番号：２６）と、アンチセンスプライマー：５’ＧＣＧＧＡＡＴＴＣＴＴＴＴＣＴＣＡＧＴＴＧＡＴＴＴＧＴＴＴＧＴ　３’（配列番号：２７）を用いてピキア属ゲノムＤＮＡ上にＰＣＲによって作製した。ｐＧＡＰＺＧＬＳIIベクターからのＧＬＳIIＯＲＦをベクターｐＹＰＴＩＺＡにクローン化して、ｐＹＰＴＩＺＡＧＬＳIIを作製することにより、ＯＲＦをＹＰＴ１プロモーターの転写制御下においた。ｐＰＩＣＺＡのＡＯＸ１プロモーターを、プラスミドｐＩＢ３（ＧｅｎＢａｎｋアクセス番号ＡＦ０２７９６０）（Ｓｅａｒｓら，Ｙｅａｓｔ　１４，７８３－７９０頁、１９９８）上に存在するＹＰＴ１プロモーターで置き換えることにより、ベクターｐＹＰＴＺＡを作製した。すべての構築物は、フレオマイシン耐性遺伝子を含んでいる。得られる最終発現ベクター（ｐＧＡＰＺＡＧＬＳII、ｐＡＯＸ２ＺＡＧＬＳII、ｐＰＩＣＺＡＧＬＳIIおよびｐＹＰＴＩＺＡＧＬＳII）を図１２～１５に記載する。

【０１７６】

同様の発現ベクターを構築し、アンピシリン耐性マーカーおよびピキア属ＡＤＥ１選択マーカーを保持した。原理的には、プラスミドｐＡＯＸ２ＺＡＧＬＳII、ｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIおよびｐＹＰＴ１ＺＡＧＬＳIIのゼオシン耐性発現カセットを、ベクターｐＢＬＡＤＥＩＸ（Ｃｒｅｇｇ，Ｊ．Ｍ．）のアンピシリンおよびピキア属ＡＤＥ１カセットで置き換えて、ベクターｐＡＯＸ２ＡＤＥ１ｇｌｓII，ｐＧＡＰＡＤＥ１ｇｌｓIIおよびｐＹＰＴＬＡＤＥ１ｇｌｓIIを得た。ベクターｐＰＩＣＡＤＥ１ｇｌｓIIは、グルコシダーゼ

IIオープンリーディングフレームをベクターｐＢＬＡＤＥＩＸ（Ｃｒｅｇｇ，Ｊ．Ｍ．）のマルチクローニングサイトに挿入することによって得た。得られた最終発現ベクター（ｐＧＡＰＡＤＥ１ｇｌｓII，ｐＡＯＸ２ＡＤＥ１ｇｌｓII，ｐＰＩＣＡＤＥ１ｇｌｓIIおよびｐＹＰＴＬＡＤＥ１ｇｌｓII）を図１６～２０に示す。

【０１７７】

グルコシダーゼII発現ベクターへのＥＲ保持タグＨＤＥＬの付加

以下のプライマーを用いて、ＨＤＥＬ含有ＰＣＲ断片を作製した。

【０１７８】

【化２】

プライマー1: 5'GCG GGT CGA *C/CA C/GA C/GA A/CT G/TG A/GT* TTT AGC CTT
Sal I H D E L stop
AGA CAT GAC 3' （配列番号:28）
プライマー2: 5'CAG GAG CAAA GCT CGT ACG AG 3' （配列番号:29）
Spl I

【０１７９】

ＰＣＲは、ｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIに対してＴａｑポリメラーゼを用いて６０℃で行った。２２５ｂｐのＰＣＲ断片をＳａｌＩ／ＳｐｌＩで切断し、ＳａｌＩ／ＳｐｌＩで開裂させたｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIベクターにライゲートし、プラスミドｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIＨＤＥＬを得た。プラスミドｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIＨＤＥＬの配列は、配列番号：２４に記載した。構築方法と得られる最終発現ベクター（ｐＧＡＰＡＤＥＬＧＩＳIIＨＤＥＬおよびｐＧＡＰＺＡＧＩＳIIＨＤＥＬ）を、図２０～２１に示す。

【０１８０】

４．３　ピキア　パストリス株の形質転換

Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎによって記載されるような従来のエレクトロポレーション技術を用いて、形質転換を行った。ピキア　パストリス株ＰＰＹ１２－ＯＨの細胞を単一カッターＡｖｒIIで切断しておいたｐＧＡＰＺＧＬＳIIで形質転換した。形質転換体は、ゼオシンに対する耐性に基づいて選択した。

【０１８１】

形質転換体のゲノム分析

ゲノムＤＮＡを、いくつかのゼオシン耐性ピキア属形質転換体から調製した。グルコシダーゼII遺伝子が酵母ゲノム中に組み込まれているかどうかを確認するために、ＰＣＲ反応をゲノムＤＮＡ上で行った。ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（Ｂｏｅｈｉｎｇｅｒ）（２．５ｍＭ　$MgCl_2$，アニーリングは５５℃）を用いてＰＣＲを行った。プライマーは、Ｓ．セレビシエゲノムＤＮＡ上のＯＲＦの増幅のために用いたものと同じものとした。グルコシダーゼIIＯＲＦを示す特異的ＰＣＲ産物の存在によって、ｐＧＡＰＺＡＧＬＳII形質転換体を確認した。

【０１８２】

４．４　ピキア　パストリスにおけるＳ．セレビシエ　グルコシダーゼIIαサブユニットの発現と分泌

転写レベルでの分析

ＲＮＡはゲノム解析後に陽性となった形質転換体から調製した。ＲＮＡは酸フェノールを用いて調製した。各サンプルから、１５μｇのＲＮＡをホルムアルデヒドアガロースゲル上に充填した。電気泳動後、ＲＮＡをＨｙｂｏｎｄＮ膜上にブロットした。膜を、グルコシダーゼIIＯＲＦの３’領域に対応する３４４ｂｐグルコシダーゼII特異的断片からな

る放射性プローブを用いてハイブリダイズさせた。形質転換されていない対照株においてはシグナルは一切検出されなかったが、形質転換体の場合には明確なシグナルが観察された。

【０１８３】

二重膜アッセイを用いたタンパク質レベルでの分析

緩衝化デキストロース培地（ＢＭＤＹ）上にニトロセルロース膜を置いた。このニトロセルロース膜の上に、セルロースアセテート膜を置いた。ｐＧＡＰＺＡＧＬＳＩＩのピキア属形質転換体を、セルロースアセテート上に筋状にまき、数日間培養した。酵母細胞はセルロースアセテート上に残留していたが、分泌タンパク質はこの膜を通過した。したがって分泌タンパク質は、ニトロセルロース膜上に捕捉された。数日後、酵母コロニーを含んだセルロースアセテートを除去した。ニトロセルロース膜について、抗ｍｙｃ抗体を用いてグルコシダーゼIIが存在するかどうかを分析した。ほとんどの形質転換体は、野生型の形質転換されていない株の薄くてほとんど見えないシグナルとは対照的に、明確なシグナルを示した。

【０１８４】

細胞外発現

構築物ｐＧＡＰＺＡＧＬＳＩＩ（ｍｙｃｈｉｓ６）（株１２、１４および１８）のＰＰＹ１２－ＯＨ形質転換体、および構築物ｐＧＡＰＺＡＧＬＳＩＩ（ｍｙｃ）ＨＤＥＬ（Ｈ１，Ｈ２およびＨ３株）の形質転換体を２日間、２×１０ｍＬのＢＭＤＹ培地上で培養した。これらの６つの形質転換体は、初期においてはゲノムレベル（ｇＤＮＡにおけるＰＣＲ）およびＲＮＡレベル（ノーザンブロット）の両方において陽性を示した。培地を遠心分離によって回収し、Ｖｉｖａｓｐｉｎカラムによって約１ｍＬにまで濃縮した。この濃縮物から得られるタンパク質を、ＴＣＡによって沈殿させ、Ｌａｅｍｍｌｉバッファに再懸濁し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析のために充填した。タンパク質をニトロセルロース膜にブロットした。該ブロットは、抗ｍｙｃＡｂとともに一晩インキュベートした。二次Ａｂペルオキシダーゼと結合させた。ルネッサンス発光検出キット（ＮＥＮ）および感光性フィルム（Ｋｏｄａｋ）を用いて、形質転換体１２、１４および１８に対して、ＧＬＳＩＩがこれらの形質転換体から発現され分泌されていることを示す、約１１０ｋＤａの強力なバンドを観察した。形質転換体Ｈ１－３に関してはシグナルは観察されなかったが、これは、ＧＬＳＩＩＯＲＦへＣ末端付加されたＨＤＥＬタグが、タンパク質のＥＲ局在化をもたらし、ＧＬＳＩＩが培養培地中に分泌されるのを防いでいることを示す。

【０１８５】

細胞内発現

６個の形質転換体と、ＷＴ株を５００ｍＬのＢＭＤＹ中で２日間培養した。細胞を遠心分離によって回収し、洗浄し、最小量（５０ｍＭＴｒｉｓ　ＨＣｌ　ｐＨ７．５、５％グリセロール）に再懸濁し、ガラスビーズを用いて破砕した。細胞デブリスを数段階の遠心分離（低速遠心分離（２０００～３０００ｇ））によって除去した。超遠心分離をとおして上清から膜を得た。ペレットをＬａｅｍｍｌｉバッファに再懸濁し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析のために充填した。タンパク質をニトロセルロース膜上にブロットした。細胞内ＧＬＳＩＩ発現は、抗ｍｙｃ　Ａｂおよびペルオキシダーゼ共役二次Ａｂを用いて確認した。発光検出に続いて、約１１０ｋＤａのバンドがＧＬＳＩＩＨＤＥＬ形質転換体（Ｈ１およびＨ３およびＨ２に対する薄いシグナル）の場合には観察されたが、ＷＴ型およびＧＬＳＩＩ発現株の場合には観察されなかった。これらの結果、細胞外発現について得られた結果とともに、異種グルコシダーゼIIは、ＨＤＥＬでタグを付けた場合にＥＲ内に保持されることが示される。

【０１８６】

上記の細胞内タンパク質の調製方法によっては、まだ大きなバックグラウンドシグナルが発生することから、新しい方法が用いられた。野生型株（ＰＰＹ１２－ＯＨ）および２つの形質転換株１８（ＧＬＳＩＩ）およびＨ３（ＧＬＳＩＩＨＤＥＬ）を、２００ｍＬのＢＭＧＹ中で２日間３０℃において、$ＯＤ_{６００}$が約１２に達するまで培養した。細胞を５０

ｍＭ　Ｔｒｉｓ．ＨＣｌ　ｐＨ７．５で洗浄し、１０ｍＬの同じバッファ中に再懸濁した。細胞溶解はフレンチプレスによって行った（３回）。細胞デブリスを３０００ｇで１０分間沈殿させた。得られた上清を、ＢｅｃｋｍａｎＳＷ４１．１ロータ中、３５，０００ｒｐｍで１時間遠心分離して、細胞内膜を沈殿させた。膜ペレットを膜懸濁バッファ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ．ＨＣＩ　ｐＨ７．４－１５０ｍＭ　ＮａＣｌ－１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０－２５ｘ完全プロテアーゼインヒビター（Ｒｏｃｈｅ））中に再懸濁した。この懸濁液に、Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００を１％最終体積となるように加えた。懸濁液を回転ホイール上、４℃で一晩インキュベートした。次に、膜を超遠心分離（Ｂｅｃｋｍａｎ　ＳＷ５０．１ロータ内、４０，０００ｒｐｍで１時間）によって沈殿させた。上清は、一晩で抽出された膜と、発光タンパク質を含む。タンパク質濃度を測定し、３つの株の同量（５００μｇ）をＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析に関して充填した。電気泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜に移した。膜を上述のように抗体を用いてスクリーニングした。この場合、グルコシダーゼIIが細胞内に存在することは、形質転換体Ｈ３（ＨＤＥＬタグ付きＧＬＳII　ＯＲＦを形質転換）において確立されただけでなく、形質転換体１８（非ＨＤＥＬタグ付きＧＬＳIIＯＲＦを形質転換したもの）においても確立された。これは、異種グルコシダーゼαサブユニットが、内在性のピキア属βサブユニットと相互作用していることに起因すると考えられる。折り畳みの問題のため、分泌経路内における異種グルコシダーゼIIのゆっくりなやりとり（ｓｌｏｗ　ｔｒａｆｆｉｃｋｉｎｇ）の結果であるに違いない。少量のタンパク質しか、ＧＬＳII発現株（すなわち株１８）の分泌培地中に発見されなかったため、これは確実なケースである。

【０１８７】

４．５　組み換えグルコシダーゼIIαサブユニットの精製および活性アッセイ

細胞外培地上でのグルコシダーゼIIアッセイ

ＧＬＳIIアッセイは、以下のようにして準備し、陽性対照として市販の酵母α－グルコシダーゼ（Ｓｉｇｍａ）を用いて調べた。

【０１８８】

組成：７０μＬの８０ｍＭリン酸クエン酸バッファｐＨ６．８、７μＬの　２５０ｍＭマンノース、３．５μＬの２５０ｍＭ　２－デオキシ－Ｄ－グルコース、０．８μＬの４－ＭｅＵｍｂｅｌｌｉｆｅｒｙｌ－α－Ｄ－グルコピラシド（１μＭ）。３回のアッセイを行った。つまり、上記アッセイの一回は１ユニットの市販の酵素を用いて、もう一回は酵素を用いずに、もう一回は基質なしで酵素を用いて行った。アッセイ混合物を、３０℃で一晩インキュベートした。ＵＶで照射すると、酵素と基質の両方を含んだ反応混合物だけが蛍光を示した（図２２）。これはこのアッセイがαグルコシダーゼの活性の検出に非常に特異的であったことを示すものである。

【０１８９】

野生型ＰＰＹ１２－ＯＨ，株１８および株Ｈ３は、２×１０ｍＬの培地中で２日間培養した。細胞をスピンダウンし、培地を３００ｍＭＮａＣｌおよび１０ｍＭイミダゾールに調整し、Ｖｉｖａｓｐｉｎカラムを用いて０．５～１ｍＬまで濃縮した。培地をＮｉ－ＮＴＡスピンカラム（Ｑｉａｇｅｎ）上に充填し、業者の推奨にしたがって精製を行った。カラムから２×１００μＬの溶出バッファ（５０ｍＭ　NAH_2PO_4，３００ｍＭＮＡＣｌ，２５０ｍＭイミダゾール、ｐＨ８．０）中にタンパク質を溶出した。各溶出液から、２０μＬを用いてグルコシダーゼII活性を調べた。２０μＬの溶出バッファ中に溶出した０．３３ユニットの市販の酵素を陽性対照として用いた。陽性対照と、培地中に酵素を分泌した株である株１８の溶出液による蛍光を観察した。これらの結果は、ピキア　パストリス　によって分泌された組み換えＳ．セレビシエ　ＧＬＳII　αサブユニットが、機能的に活性な酵素であったことを示している。ＧＬＳIIが細胞内で発現されていることから、野生型（形質転換していない）株でも、株Ｈ３でも活性は認められなかった（図２３）。これらの結果はまた、βサブユニットがタンパク質のα部分の機能に対して必須でないことも示している。

【０１９０】

細胞内全タンパク質におけるグルコシダーゼII活性

セクション４．４（細胞内発現）に記載したようにフレンチプレスにより細胞を破壊することにより、野生型株、形質転換体１８および形質転換体Ｈ３からの膜および発光タンパク質を調整した。等量の全細胞内タンパク質を上述のようなＧＬＳIIアッセイによって調べた。使用した基質により、グルコシダーゼII活性のみならず、全細胞内α－グルコシダーゼ活性（グルコシダーゼＩおよびII、リソソームα－グルコシダーゼなど）を検定した。しかしながら、野生型および形質転換体１８およびＨ３の両方に対してアッセイを行う場合には、２倍高いα－グルコシダーゼ活性が両方の形質転換株において見られた。これらの株は、Ｓ．セレビシエグルコシダーゼIIタンパク質（ＨＤＥＬの有無に関わらず）の発現に関して野生型と異なるので、この活性の２倍の増加は、組み換えタンパク質の活性によるものであるに違いない。タンパク質調製とグルコシダーゼIIアッセイの全手順は、２回ずつ繰り返したが、野生型の非形質転換株と比較しての、全細胞内α－グルコシダーゼ活性の２倍増加は、２つの形質転換体に対して見られた。

【実施例５】

【０１９１】

グルコシダーゼIIとマンノシダーゼを発現するピキア属株の作製

株ＧＳ１１５は、ｐＧＡＰＺＧＬＳIIおよびｐＧＡＰＺＧｌｓIIＨＤＥＬによって形質転換した。ＹＰＤＳｚｅｏ上で形質転換体を選択した。

【０１９２】

株ＹＧＣ４は、それぞれ以下の構築物によって形質転換した。（１）ｐＧＡＰＡＤＥｇｌｓIIおよびｐＧＡＰＡＤＥｇｌｓIIＨＤＥＬ，アデニンを含まない合成ソルビトール培地上で選択；（２）ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ：ＹＰＤＳｚｅｏ上で選択；および（３）ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ／ｐＧＡＰＡＤＥｇｌｓIIＨＤＥＬ：アデニンを含まずゼオシンを含む合成ソルビトール培地上で選択。

【０１９３】

ｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨ１を有し、ＭＦｍａｎｎｏｓｉｄａｓｅＨＤＥＬを発現する株ＹＧＣ４を、ｐＧＡＰＡＤＥｇｌｓIIおよびｐＧＡＰＡＤＥｇｌｓIIＨＤＥＬで形質転換した。形質転換体の選択は、アデニンとウラシルを含まない合成ソルビトール培地上で行った。

【０１９４】

すべての形質転換について、コロニーが得られた。ＰＣＲによって決定されたゲノムに組み込まれた発現ベクターを有する形質転換体が得られた。これらの形質転換体のいくつかからＧＬＳIIの発現が観察された。

【実施例６】

【０１９５】

ピキア　パストリスにおけるＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩの導入

６．１　ベクターの構築

ヒトＧｎＴＩ遺伝子は単離されており、Ｋｕｍａｒら（Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ．Ｓ．Ａ．８７（２４）：９９４８－５２、１９９０）に記載されている。この遺伝子の配列は、ＮＣＢＩ　ＧｅｎＢａｎｋにおいてアクセス番号Ｍ６１８２９として入手可能であり、配列番号：３４として記載する。全長ヒトＧｎＴＩを含むｐＵＣｈＧＮＴＩ（Ｍａｒａｓら、Ｅｕｒ　Ｊ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２４９（３）：７０１－７，１９９７）を、ＳｇｒＡＩおよびＸｂａＩで消化し、Ｋｌｅｎｏｗ酵素によって平滑化した。その結果得られたベクターは、ＧｎＴＩの触媒ドメインを含んでいた。次にこの断片をＳａｃＩおよびＰｖｕＩで消化したプラスミドＹＥｐ３５２Ｋｒｅ２からの挿入断片でライゲートし、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼにより平滑化した。該挿入断片は、ピキア　パストリスのゴルジ装置内における発現タンパク質の局在化に関与しているＳ．セレビシエ　Ｋｒｅ２のＮ末端部分から取り出したペプチドをコードする。結果として得られたプラスミドｐＵＣＫｒｅｃｏｈＧｎＴＩをＥｃｏＲＶおよびＨｉｎｄIIIで切断し、Ｋｌｅｎｏｗ酵素で平滑化した。Ｋｒｅ２とＧｎＴＩとの融合体を含む断片を、ベクターｐＰＩＣ６Ａに

挿入し、該ベクターをＳａｌＩおよびＥｃｏＲＩで消化し、Ｋｌｅｎｏｗ酵素によって平滑化した。最終プラスミドをｐＰＩＣ６ＡＫｒｅｃｏＧｎＴＩと名付け、構築方法を図２４に模式的に示した。ｐＰＩＣ６ＡＫｒｅｃｏＧｎＴＩ（配列番号：３６、オープンリーディングフレーム：２６９９ｂｐ－４０２７ｂｐ）は、プロモーターＡＯＸ１制御下にある融合構築物ＫｒｅｃｏＧｎＴＩとブラスチシジン耐性マーカーを含んでいた。

【０１９６】

６．２　酵母形質転換とゲノム組み込み

ピキア　パストリスに対するすべての形質転換は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎの方法に従って、エレクトロポレーションによって実施した。使用した株は、α－１，２－マンノシダーゼ－ＨＤＥＬとトランスシアリダーゼ（ＴＳ）を含むＧＳ１１５であった。プラスミドｐＰＩＣ６ＡＫｒｅｃｏＧｎｔＩを５’ＡＯＸ領域内のＮｓｉＩ消化によって直線化した。ブラスチシジン耐性遺伝子を保持する形質転換体は、５００μｇ／ｍＬブラスチシジンと１Ｍソルビトールを含むＹＰＤ上で選択した。発現カセットのゲノム組み込みは、酵母ミニプレップ法（Ｎｕｃｌｅｏｎ）に従ってピキア属株から精製したゲノムＤＮＡを用いたＰＣＲによって確認した。５’（配列番号：１１）および３’ＡＯＸ１（配列番号：９）プライマーを用いて、構築物の存在を確認した。

【０１９７】

その結果は、１６２０ｂｐの正確な挿入物が４つすべてのブラスチシジン耐性コロニーから得られたことを示した。対照コロニー（野生型または形質転換されていない株）は、このＰＣＲ断片を有していなかった。

【０１９８】

６．３　グリカン分析

形質転換体および非形質転換生物（ＷＴ型：ＴＳとＭａｎＨＤＥＬとを含むＧＳ　１１５）をＢＭＧＹ中で一晩培養した。ＡＯＸ１プロモーターは、１％ＭｅｔＯＨによって２４時間のあいだ誘導した。細胞外培地を回収し、ＰＢＳに対して透析した。オリゴ糖を単離しＤＳＡ－ＦＡＣＥで分離した。その結果を図２５に示す。$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$がピークで観察された（図２５内の矢印で示す）。本ピークはＷＴ株においては見られなかった。さらに星印（asterix;＊）で示されるピークの増大も観察された。追加のピークと増加したピークのどちらも、タチナタマメβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼ、グリコシダーゼ溶解β－Ｎ－アセチルヘキソサミニル残基による消化後に野生型の状況に戻った（図２６に表示）。

【０１９９】

ＧｌｃＮＡｃの異種タンパク質のグリカンへの転移または$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$に変換された$Man_5GlcNAc_2$の百分率を評価するために、トランスシアリダーゼ（ＴＳ）を精製した。酵母株を３０時間ＢＭＭＹ中で培養した。培地を回収し、抗Ｅタグカラムに流した。その後グリカンを分析した。

【０２００】

３つの異なる株（すなわちＧＳ１１５、ＧＳ１１５ＭａｎＨＤＥＬおよびＧＳ１１５ＭａｎＨＤＥＬＫｒｅ２ＧｎＴＩ）において産生されたトランスシアリダーゼ（ＴＳ）を、アフィニティクロマトグラフィー（抗Ｅタグカラム）によって精製した。ＰＮＧａｓｅＦを用いた消化によりＮ－グリカンを単離し、これをＤＳＡ－ＦＡＣＥによって分析した。図２７に示すように、マンノシダーゼＨＤＥＬおよびＫｒｅ２－ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼを含有するＧＳ１１５において産生されたＴＳからのグリカンにおいて、ほとんど全ての$Man_5GlcNAc_2$が$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$に変換されていた。

【０２０１】

あるいは、３つの異なる株から得たＴＳをＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、ニトロセルロース膜上にブロットした。最初に、等量のタンパク質が充填されていることを示すために、タンパク質を紅色レッド（Ｐｏｎｃｅａｕ　ｒｅｄ）染色により可視化した。次にこれらを、末端ＧｌｃＮＡｃに特異的なレクチンである、ビオチン共役レクチンＧＳIIによ

ってスクリーニングした。レクチンをＰＯＤ共役ストレプトアビジンおよび発光基質によって可視化した。２つのブロットを図２８に示すが、レーン３のバンドだけがレクチンによって染色されていたことがわかる。レーン３はＭａｎＨＤＥＬＫｒｅ$_2$ＧｎＴＩを含む株ＧＳ１１５から産生されたＴＳを示す。これらの結果は、末端ＧｌｃＮＡｃがＭａｎＨＤＥＬＫｒｅ$_2$ＧｎＴＩを有する株にだけ存在することを示している。

【０２０２】

ＧｌｃＮＡｃＮＡｃＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$が存在することのさらなる証拠は、株ＧＳ１１５ＭａｎＨＤＥＬ　Ｋｒｅ２ＧｎＴＩにおいて産生されるＴＳのＮ－グリカン上のエキソグリコシダーゼによる消化から得られた。ＴＳを精製し、そのＮ－グリカンを単離し、ＤＳＡ－ＦＡＣＥによって解析した。タチナタマメβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼによる消化を行った。結果を図２９に示す。

【０２０３】

図２９、パネル２に見られるように、株ＧＳ１１５ＭａｎＨＤＥＬＫｒｅ２ＧｎＴＩにおいて産生されるＴＳからの未消化Ｎグリカンには殆どＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$が存在しない。パネル２と同じグリカンがパネル３に示されるように、β－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼによって消化されるとＭａｎ$_5$ＧｌｃＮＡｃ$_2$とＭａｎ$_6$ＧｌｃＮＡｃ$_2$ピークのいずれも増大した。これは、ＧｌｃＮＡｃが両構造上に存在することを示す。パネル１はオリゴマルトースの参照であり、一方パネル４はＲＮａｓｅ　ＢからのＮ－グリカンの結果である。

【実施例７】

【０２０４】

ピキア属におけるマンノシダーゼIIの発現

７．１　ベクター構築

哺乳動物マンノシダーゼIIは、ＧｎＴＩと同じゴルジ領域に局在している。したがって、ゴルジ内でのタンパク質の局在化に関与しているマンノシダーゼIIのＮ末端部分は、ピキア　パストリスのゴルジ装置内にＧｎＴＩを局在化する場合に行われるように、ＳｃＫｒｅ２のＮ末端部分で置換されている。構築方法は、ピキア　パストリスの選択に関するＡＲＧ４マーカーを有し、ｇａｐプロモーターの制御下にあるＫｒｅ２ＭａｎIIＯＲＦを含むプラスミドを最終的に導くようにたてられた。ヒトマンノシダーゼII遺伝子を含むプラスミドは、ｐＣＤＮＡ３ＭａｎIIであった。この遺伝子の配列は、ＥＭＢＬにおいてアクセス番号Ｕ３１５２０（配列番号：３１）として入手可能である。プラスミドｐＢＬＡＲＧＩＸは、Ｃｅｒｅｇｈｉｎoら．Ｇｅｎｅ２６３（１－２）：１５９－６９，２００１によって公にされている。

【０２０５】

マンノシダーゼｃＤＮＡ断片を、ＰＣＲによって精製した。使用したプライマーは、センスプライマー：５’ＣＧＣＧＧＡＴＣＣＡＴＧＧＣＣＡＡＡＡＡＧＴＴＣＡＣＡＡＡＧＣＡＡＴＴＴＣ３’（配列番号：３２）とアンチセンスプライマー：５’ＧＴＧＴＣＣＣＡＴＴＣＡＴＴＡＧＡＴＴＣ３’（配列番号：３３）であった。次にＰＣＲ断片をＢａｍＨＩおよびＰｆｌＭＩによって消化し、同じ酵素で開裂させたベクターｐＣＤＮＡ３ｍａｎII（２）に挿入した。該産物はｐＣＤＮＡ３ｍａｎII（３）と名付けた。ｐＣＤＮＡ３ｍａｎII（２）は、ｐＣＤＮＡ３ＭａｎIIをＭｓｃＩおよびＳｔｕＩで消化し、続いて自己ライゲーションを行わせることによって作製した。プラスミドＹＥｐ３５２Ｋｒｅ２ＢｇｌIIは、ＢｇｌIIリンカーを、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼで平滑化した、ＳａｃＩによって消化しておいたプラスミドＹＥｐ３５２Ｋｒｅ$_2$に挿入することにより作製した。ＹＥｐ３５２Ｋｒｅ$_2$ＢｇｌIIは、ＰｖｕＩによって切断し、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼによって平滑化することにより、Ｋｒｅ２のＮ末端部分をコードするコード配列を生成した後、ＢｇｌIIによって消化される。Ｋｒｅ２のＮ末端部分のコーディング断片を精製して、ＭｓｃＩおよびＢａｍＨＩによって消化しておいたｐＣＤＮＡ３ｍａｎII（３）のベクターにライゲートした。その結果得られたプラスミドは、ｐＣＤＮＡ３ＫｒｅＭａｎIIと名付けた。ＧＡＰプロモーター（ｐＧＡＰＺＡ）を保持するプラスミドを、Ｎｓｉ　Ｉおよび

ＢａｍＨ　Ｉによって切断し、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼによって平滑化した。ＧＡＰプロモーターを含む断片を、選択マーカーＡＲＧ４を保持し、ＳｐｅＩおよびＡｆｌIIによって開環させ、Ｋｌｅｎｏｗ酵素によって平滑化したベクターｐＢＬＡＲＧＩＸに挿入した。中間プラスミドは、ｐＧＡＰＡＡｒｇと名付けた。ｐＧＡＰＡＡｒｇをさらにＳｆｉＩによって消化し、Ｋｌｅｎｏｗによって平滑化した後、ＸｈｏＩで消化した。得られたベクターを、ＥｃｏＲＶおよびＸｈｏＩで消化したプラスミドｐＣＤＮＡ３ＫｒｅＭａｎIIから作製した挿入物にライゲートした。最終のプラスミドをｐＧＡＰＫｒｅＭａｎIIと名付けた。クローニング方法を図３０Ａと３０Ｂに示す。

【０２０６】

７．２　酵母形質転換とゲノム組み込み

マンノシダーゼＨＤＥＬ（ＭａｎＨＤＥＬ）を株ＹＧＣ－４に導入（ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬで形質転換）した。形質転換細胞のゲノムのキャラクタリゼーションは、Ｇａｐプライマー（配列番号：１０）と３’ＡＯＸプライマー（配列番号：９）を用いてＰＣＲにより行った。２０１０ｂｐのバンドは、ピキア　パストリス形質転換体内の構築物の存在を示した。分泌された細胞壁糖タンパク質に由来するＮ－グリカンは、ＤＳＡ　ＦＡＣＥの方法によって分析した。株ＧＳ１１５において得られた結果と同様に、グリカンは刈り込まれており、$Man_5GlcNAc_2$の存在が観察された。細胞壁糖タンパク質（マンノプロテイン）を、Ｐｅａｔら（Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２９，１９６１）に記載されるように小スケールで調製した。

【０２０７】

その結果得られたＹＧＣ－４ＭａｎＨＤＥＬクローンから、クローン１（Ｍ１）をプラスミドｐＰＩＣ６ＫｒｅｃｏＧｎＴＩで形質転換した。ゲノムＤＮＡを調製し、５’ＡＯＸおよび３’ＡＯＸプライマー（配列番号：１１および９）を用いて、ゲノムへの構築物の取り込みをＰＣＲによって分析した。マンノプロテインの分析から、ＧＳ１１５株における状況に匹敵する$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$の存在が明らかになった。

【０２０８】

クローン４（ＹＧＣ－４　Ｍ１　ＧｎＴＩ４）は、ＰｖｕIIによる消化によって３’ＡＯＸＩ領域においてプラスミドを直線化した後、エレクトロポレーションによってプラスミドｐＧＡＰＫｒｅＭａｎIIによって形質転換した。ＡＲＧ４遺伝子を有する形質転換体を、アルギニンを含まない培地上で選択した。ＤＮＡを調製し、構築物の存在について配列番号：３３および配列番号：１０のプライマーを用いてＰＣＲによって解析した。６１７ｂｐの増幅断片で構築物の存在を示すことが見られた。

【実施例８】

【０２０９】

マンノシダーゼ－ＨＤＥＬ発現とＯＣＨ１不活性化

８．１　ベクターの構築

以下の実験は、マンノシダーゼ－ＨＤＥＬ発現単位と不活性化ＯＣＨ１断片との両方を保持するプラスミドを作製するために実施した。Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社のＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）キットを用いて、ＯＣＨ１　ＣＤＳの極５’部分における点変異を導入し、アミノ酸１２に関するコドンを終止コドンに変えた。これにより、潜在的な暗号プロモーター活性によって生み出されるｍＲＮＡが不活性なタンパク質に翻訳されることになる。使用した鋳型は、ｐＵＣ１８ＰｐＯＣＨ１であった。終止コドンの存在はシーケンシングによって確認した。

【０２１０】

ＡＯＸ１転写終結因子を拾い上げるためのｐＰＩＣＺＢにおけるクローニングは、平滑化したＸｈｏＩ／ＥｃｏＲＩ開環ｐＰＩＣＺＢに、変異ｐＵＣ１８ＰｐＯＣＨ１変異体の平滑化ＨｉｎｄIII断片をライゲートすることによって行った。その結果得られたプラスミドは、ｐＰＩＣＺＢ５’ＰｐＯＣＨ１Ｍｕｔと名付けた。ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬのＧＡＰプロモーター内のＢｓｔＢＩ部位を除去して、組み込みのために、５’ＰｐＯＣＨ１配列内の最終ベクターの線形化を可能にした。ここで、ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤ

ＥＬをＢｓｔＢＩで消化し、Ｔ４ポリメラーゼとｄＸＴＰによって平滑化した。次に、線形化および平滑化したプラスミドを精製し、ＢａｍＨＩで消化した。ベクターおよび遊離された断片（ＭａｎＨＤＥＬオープンリーディングフレームと３’ＡＯＸＩ転写終結因子を含む）をアガロースゲル電気泳動によって分離し、ＤＮＡ断片をゲルから溶出した。断片およびベクターはＴ４ＤＮＡリガーゼを用いて１０：１の比で、１６℃で一晩再度ライゲートした。

【０２１１】

変異５’ＰｐＯＣＨ１－３’ＡＯＸ１断片をＰｓｔＩ／ＢａｍＨＩ消化によって遊離させ、平滑化し、ＢｇｌIIで開環し、平滑化しておいたｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ－ＢｓｔＢＩ内にライゲートした。その結果得られたプラスミドは、ｐＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ５’ＰｐＯＣＨ１Ｍｕｔ（配列番号：４６）と名付けた。このプラスミドのマップを図３３に示す。

【図面の簡単な説明】

【０２１２】

【図１】図１はＨＤＥＬタグ付きトリコデルマ　レーセイ由来のα－１，２－マンノシダーゼ発現カセットを保持するベクターの図であり、当該分野で公知の方法に従ってこれらのベクターを構築する方法を説明したものである。構築計画（スキーム）を通して用いる略語は次の通りである。５’ＡＯＸ１またはＡＯＸ１　Ｐ：ピキア　パストリス　ＡＯＸ１プロモーター配列；Ａｍｐ　Ｒ：アンピシリン耐性遺伝子；ＣｏｌＥｌ：ＣｏｌＥ１複製開始点；３’ＡＯＸ１：ピキア　パストリス　ＡＯＸＩ遺伝子の３’配列；ＨＩＳ４：ピキア　パストリスのＨＩＳ４遺伝子；ＡＯＸ－ＴＴ：ピキア　パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結配列；ＯＲＦ：オープンリーディングフレーム；Ｓ：分泌シグナル；ＰＴＥＦ１：サッカロマイセス　セレビシエ転写延長因子１遺伝子のプロモーター配列；ＰＥＭ７：合成構造的原核プロモーターＥＭ７；ゼオシン：ゼオシン耐性遺伝子；ＣＹＣ１　ＴＴ：Ｓ．セレビシエ　ＣＹＣ１遺伝子の３’末端；ＧＡＰ：ピキア　パストリス　グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター配列；ＰｐＵＲＡ３：ピキア　パストリス　ＵＲＡ３遺伝子。本図からわかるように、トリコデルマ　レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼは、Ｓ．セレビシエのα接合因子分泌シグナル配列に対するコード配列に実施可能に連結されており、さらにまた、コード配列の３'末端において、ＨＤＥＬペプチドに関するコード配列に実施可能に連結されている。全融合構築物は、Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１プロモーター（ｐＰＩＣ９ＭＦＭａｎＨＤＥＬ中）またはＰ．パストリス　ＧＡＰプロモーター（ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ中）のいずれかに実施可能に連結した。

【図２】図２はＨＤＥＬ－タグ付きハツカネズミ（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）　α－１，２－マンノシダーゼＩＢ　発現カセットを保持するベクターを示し、これらのベクターを当該分野で公知の方法に従って構築する方法を記載したものである。図に示されているように、ハツカネズミ　α－１，２－マンノシダーゼＩＢの触媒ドメインは、Ｓ．セレビシエのα接合因子分泌シグナル配列に関するコード配列に実施可能に連結し、さらにコード配列の３’末端においてＨＤＥＬペプチドに関するコード配列と実施可能に連結した。全融合構築物をＰ．パストリス　ＡＯＸ１プロモーター（ｐＰＩＣ９ｍＭａｎＨＤＥＬ中）またはＰ．パストリス　ＧＡＰプロモーター（ｐＧＡＰＺｍＭａｎＨＤＥＬ中）のいずれかに実施可能に連結した。さらに、ｃＭｙｃエピトープタグに関するコード配列を、Ｓ．セレビシエのα接合因子分泌シグナル配列に関するコード配列と、ハツカネズミのα－１，２－マンノシダーゼＩＢの触媒ドメインに関するコード配列との間に挿入することによって、発現カセットの異形を得た。この発現カセットもまた、Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１プロモーター（ｐＰＩＣ９ｍＭｙｃＭａｎＨＤＥＬ中）またはＰ．パストリス　ＧＡＰプロモーター（ｐＧＡＰＺｍＭｙｃＭａｎＨＤＥＬ中）のいずれかに実施可能に連結した。

【図３】図３はＭｙｃＨＤＥＬタグ付きトリコデルマ　レーセイのα－１，２－マンノシダーゼを保持するベクターであり、これらのベクターを得た方法を説明したものである。

その結果得られた融合構築物を再度、Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１プロモーター（ｐＰＩＣＺＢＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ中）またはＰ．ｐｄｓｔｏｒｉｓ　ＧＡＰプロモーター（ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ中）のいずれかに実施可能に連結した。

【図４】図４はＭｙｃＨＤＥＬタグ付きトリコデルマ　レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼの細胞内局在化を実証するとともに、免疫蛍光分析によるＥＲターゲティングを示した図である。パネルＡはウェスタンブロッティング。酵母株は１０ｍＬのＹＰＧ培地中でOD_{600}＝１０になるまで培養し、５倍に希釈し、ＹＰＭ中で４８時間培養した。１／５０培地および１／６５ｔｈの細胞を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびマウスモノクローナル９Ｅ１０抗－Ｍｙｃ抗体を用いたウェスタンブロッティングで分析した。分子量マーカータンパク質の位置を、矢印で示す。レーン１～５：細胞溶解物。１および２：ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ形質転換体。３：非形質転換ＰＰＹ１２ＯＨ（負の対照）。４および５：ｐＰＩＣＺＢＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ形質転換体。レーン６～１０：培地。６：未形質転換ＰＰＹ１２ＯＨ（負の対照）。７および８：ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ形質転換体。９および１０：ｐＰＩＣＺＢＭＦＭａｎＭｙｃＨＤＥＬ形質転換体。パネルＢは免疫蛍光顕微鏡検査法。１：Ｐ．パストリス細胞（ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬで形質転換したＰＰＹ１２ＯＨ株）の１０００倍の位相差画像。核は細胞の右下四分円中の楕円形として見える。２：１と同じ細胞であるが、Ｔ．レーセイ　マンノシダーゼ－Ｍｙｃ－ＨＤＥＬタンパク質の局在化を示すような蛍光顕微鏡測定モードで示したもの。タンパク質は、主に小胞体静止期分布に典型的な、核周囲（核包膜）に円形に分布して局在化している。３：Ｐ．パストリス細胞（ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬで形質転換したＰＰＹ１２ＯＨ株）の１０００倍率の位相差画像。４：同じ細胞を、Ｐ．パストリス　ＰＰＹ１２ＯＨ株におけるゴルジマーカータンパク質ＯＣＨ１－ＨＡの局在化を示すような蛍光顕微鏡測定法で見たもの。１細胞あたりに３～４個の点で、細胞質のいたるところにある点状の分布は、Ｐ．パストリスにおけるシスゴルジ分布に関して典型的である。

【図５】図５はスクロース密度勾配遠心分離における、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをもつ、マンノシダーゼ－ＭｙｃＨＤＥＬの共沈降を描いたものである。一番上のパネルは、ＯＣＨ１－ＨＡゴルジマーカータンパク質のスクロース勾配の異なる画分にわたっての分布を示す。真ん中のパネルは、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼＥＲマーカータンパク質に関する該分布を示したものである。最後に下部のパネルは、同じ画分にわたるＭｙｃＨＤＥＬ－タグ付きトリコデルマ　レーセイａのα－１，２－マンノシダーゼの分布を示したものである。マンノシダーゼ－ＭｙｃＨＤＥＬはほぼ正確にＥＲマーカーＰＤＩの分布と一致することから、ピキア　パストリス酵母細胞のＥＲ内に主に所在しているといえる。

【図６】図６はトリコデルマ　レーセイマンノシダーゼ－ＨＤＥＬと共発現させたトリパソーマ　クルーズ　トランス－シアリダーゼのＮ－グリカン分析を示す。パネルＡ：マルト－オリゴ糖サイズ参照ラダー（ｌａｄｄｅｒ）。グリカンのサイズは、該マルトオリゴ糖の移動と電気泳動移動度を比較することにより、グルコース単位（ＧＵ）にて示した。パネルＢ：ピキア　パストリス内で発現させた組み換え　トリパソーマ　クルーズトランスシアリダーゼから得たＮ－グリカンである。ＧＵ＝９，２にあるピークは、$Man_8GlcNAc_2$に対応する。パネルＣは、パネル２と同じ分析物であるが、３Ｕ／ｍＬの精製した組み換えＴ．レーセイのα－１，２－マンノシダーゼで一晩処理した後のものである。パネルＤ：ピキア　パストリス内で、Ｔ．レーセイマンノシダーゼ－ＨＤＥＬ（ＧＡＰプロモーターの制御下で）と共発現させた組み換えトランスシアリダーゼから得たＮ－グリカン。ＧＵ＝７，６にあるピークは、ＲＮａｓｅ　Ｂのプロファイルにおける$Man_5GlcNAc_2$ピークに対応する（パネルＦ）。パネルＥ：パネルＤと同じ分析物であるが、３ｍＵ／ｍＬの精製組み換えＴ．レーセイのα－１，２－マンノシダーゼで一晩処理した後のものである。パネルＦ：ウシＲＮａｓｅ　Ｂから得たＮ－グリカン。これらのグリカンは、$Man_5GlcNAc_2$から$Man_8GlcNAc_2$で構成される。様々なアイソマーが分割され、これらは$Man_7GlcNAc_2$のピーク数が計上される。

【図７】図７はＨＤＥＬタグ付きトリコデルマ　レーセイのα－１，２－マンノシダーゼ

およびマウスα－１，２－マンノシダーゼＩＢのＨＤＥＬタグ付き触媒ドメインによる、インフルエンザヘマグルチニンＮ－グリカンのプロセッシングを示す。$Man_5GlcNAc_2$参照オリゴ糖を、該分析のスキャン１８５０に流した（図示せず）。パネル１：マルトオリゴ糖サイズ参照ラダー。パネル２：ピキア　パストリスにおいて発現させた組み換えインフルエンザヘマグルチニンから得たＮ－グリカン。スキャン２２５０におけるピークは、$Man_9GlcNAc_2$に相当する。パネル３：Ｔ．レーセイマンノシダーゼ－ＨＤＥＬとともに、ピキア　パストリス中で（ＧＡＰプロモーターの制御下で）共発現させた組み換えヘマグルチニンから得たＮ－グリカン。スキャン１９５０におけるピークは、$Man_6GlcNAc_2$に相当する。パネル４：パネル３に関するものと同様な分析であるが、３０ｍＵの精製組み換えＴ．レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼで一晩処理した後のものである。パネル５：マウスマンノシダーゼＩＢ－ＨＤＥＬとともに、ピキア　パストリス中で（ＧＡＰプロモーターの制御下で）共発現させた組み換えヘマグルチニンから得たＮ－グリカン。パネル６：パネル５に対するものと同様な分析であるが、３０ｍＵの精製組み換えＴ．レーセイ　α－１，２－マンノシダーゼで一晩処理した後のものである。

【図８】図８はベクターｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨｌおよびその構築方法を示す。

【図９】図９はｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨｌを用いた単独相同組換えによって、ピキア　パストリス　ＯＣＨ１遺伝子を破壊するためのスキームを示す。

【図１０】図１０はＯＣＨ１で不活性化したクローン、およびｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬを用いた形質転換により該ＯＣＨ１不活性化クローン由来の３種のクローンの細胞壁糖タンパク質Ｎ－グリカン分析を示す。パネル１は、マルトオリゴ糖混合物の分析を示したものであり、その重合度が、図の最上部の数字で示されている。該分析は、他のパネルに関するサイズ参照の役割をする。すべてのパネルの縦軸には、ピーク強度が相対蛍光単位を示す。パネル２～６：以下の株の細胞壁糖タンパク質Ｎ－グリカンの分析。パネル２：遺伝子操作していないＰ．パストリス株ＹＧＣ４；パネル３、ｐＢＬＵＲＡ５’ＰｐＯＣＨｌで形質転換したＹＧＣ４；パネル４－６：さらに、ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬで形質転換したパネル３の株の３種のクローン。パネル７：ウシＲＮａｓｅ　Ｂ由来のＮ－グリカンであり、$Man_{5-9}GlcNAc_2$の混合物で構成される。パネル２および３の比較とパネル７を参照してわかるように、ｐＢＬＵＲＡ５ＰｐＯＣＨ１を用いた形質転換はＯＣＨ１ｐの$Man_8GlcNAc_2$基質Ｎ－グリカン（パネル２でピーク１と呼ぶ）の強力な増加をもたらす。ピーク２は、ＯＣＨ１ｐの$Man_9GlcNAc_2$産物を示す。さらに、ｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬによる追加形質転換によって、３種の独立したクローンの細胞壁糖タンパク質上の主要なグリカンは、Ｔ．レーセイα－ｌ，２－マンノシダーゼの$Man_8GlcNAc_2$基質分解によりできた$Man_5GlcNAc_2$最終産物（パネル４中のピーク３）である。

【図１１】図１１は図１０と全く同様なグリカン混合物の分析を示したものであるが、ｐＨ＝５．０の２０ｍＭ酢酸ナトリウム中で一晩、３ｍＵ／ｍｌの精製トリコデルマ　レーセイのα－１，２－マンノシダーゼを用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏ消化した後のものである。軸の割り当ては図１０と同じである。親株（パネル２）に比べて、より多くの$Man_5GlcNAc_2$がｐＢＬＵＲＡ５'ＰｐＯＣＨ１形質転換株において（パネル３）形成される。スキャン３９００前のすべてのパネル中のピークは、混入物によるものであり、分析においては無視すべきである。

【図１２】図１２は発現ベクターｐＧＡＰＺＡＧＬＳII（配列番号：１８）を示す。ＰＴＥＦ１：Ｓ．セレビシエ転写延長因子遺伝子のプロモーター。Ｐ　Ｅｍ７：合成原核プロモーター。ゼオシン：ゼオシン耐性マーカー遺伝子。ＣＹＣ１　ＴＴ：Ｓ．セレビシエ　シトクロムＣ１遺伝子の転写終結因子。Ｃｏｌ　Ｅｌ：細菌の複製起点。ＧＡＰ：Ｐ．パストリス　ＧＡＰ遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエグルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図１３】図１３は発現ベクターｐＡＯＸ２ＺＡＧＬＳII（配列番号：１６）を示す。Ｐ　ＴＥＦ１：Ｓ．セレビシエ転写延長因子遺伝子のプロモーター。Ｐ　Ｅｍ７：合成原核

プロモーター。ゼオシン：ゼオシン耐性マーカー遺伝子。ＣＹＣ１　ＴＴ：Ｓ．セレビシエシトクロムＣ１遺伝子の転写終結因子。Ｃｏｌ　Ｅｌ：細菌の複製起点。ＡＯＸ２　Ｐ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ２遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエ．グルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図１４】図１４は発現ベクターｐＰＩＣＺＡＧＬＳII（配列番号：２０）を示す。Ｐ　ＴＥＦ１：Ｓ．セレビシエ転写延長因子遺伝子のプロモーター。Ｐ　Ｅｍ７：合成原核プロモーター。ゼオシン：ゼオシン耐性マーカー遺伝子。ＣＹＣ１　ＴＴ：Ｓ．セレビシエシトクロムＣ１遺伝子の転写終結因子。Ｃｏｌ　Ｅｌ：複製起点。ＡＯＸ１　Ｐ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエ．グルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図１５】図１５は発現ベクターｐＹＰＴ１ＺＡＧＬＳII（（配列番号：２２）を示す。Ｐ　ＴＥＦ１：Ｓ．セレビシエ転写延長因子遺伝子のプロモーター。Ｐ　Ｅｍ７：合成原核プロモーター。ゼオシン：ゼオシン耐性マーカー遺伝子。ＣＹＣ１　ＴＴ：Ｓ．セレビシエシトクロムＣ１遺伝子の転写終結因子。Ｃｏｌ　Ｅｌ：細菌の複製起点。Ｐ　ＹＰＴ１：Ｐ．パストリス　ＹＰＴ１遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエグルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図１６】図１６は発現ベクターｐＧＡＰＡＤＥ１ｇｌｓII（配列番号：１９）を示す。Ａｍｐ　Ｒ：アンピシリン耐性マーカー遺伝子。ＡＤＥ１：Ｐ．パストリス　ＡＤＥ１選択マーカー遺伝子。ＧＡＰ：Ｐ．パストリス　ＧＡＰ遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉｏｅ　グルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図１７】図１７は発現ベクターｐＡＯＸ２ＡＤＥ１ｇｌｓII（配列番号：１７）を示す。Ａｍｐ　Ｒ：アンピシリン耐性マーカー遺伝子。ＡＤＥ１：Ｐ．パストリス　ＡＤＥ１選択マーカー遺伝子。ＡＯＸ２　Ｐ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ２遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエグルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図１８】図１８は発現ベクターｐＰＩＣＡＤＥ１ｇｌｓII（配列番号：２１）を示す図。Ａｍｐ　Ｒ：アンピシリン耐性マーカー遺伝子。ＡＤＥ１：Ｐ．パストリス　ＡＤＥ１選択マーカー遺伝子。ＡＯＸ１　Ｐ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエグルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図１９】図１９は発現ベクターｐＹＰＴ１ＡＤＥ１ｇｌｓII（配列番号：２３）を示す図。Ａｍｐ　Ｒ：アンピシリン耐性マーカー遺伝子。ＡＤＥ１：Ｐ．パストリス　ＡＤＥ１選択マーカー遺伝子。Ｐ　ＹＰＴ１：Ｐ．パストリス　ＹＰＴ１遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエ　グルコシダーゼ　II遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図２０】図２０は発現ベクターｐＧＡＰＡＤＥ１ｇｌｓIIＨＤＥＬ（配列番号：２５）を示す。Ａｍｐ　Ｒ：アンピシリン耐性マーカー遺伝子。ＡＤＥ１：Ｐ．パストリス　ＡＤＥ１選択マーカー遺伝子。ＧＡＰ：Ｐ．パストリス　ＧＡＰ遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエグルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図２１】図２１は発現ベクターｐＧＡＰＺＡｇｌｓIIＨＤＥＬ（配列番号：２４）を示す図。Ｐ　ＴＥＦ１：Ｓ．セレビシエ転写延長因子遺伝子のプロモーター。Ｐ　Ｅｍ７：合成原核プロモーター。ゼオシン：ゼオシン耐性マーカー遺伝子。ＣＹＣ１　ＴＴ：Ｓ．セレビシエシトクロムＣ１遺伝子の転写終結因子。Ｃｏｌ　Ｅ１：細菌の複製起点。　ＧＡＰ：ＧＡＰ遺伝子のプロモーター。ＧＬＳ２：Ｓ．セレビシエグルコシダーゼII遺伝子。ＡＯＸ１　ＴＴ：Ｐ．パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子。

【図２２】図２２は市販の酵母α－グルコシダーゼ（Ｓｉｇｍａ：Ｃａｔ．Ｎｏ．Ｇ－５００３）を用いたＧＬＳII活性アッセイ試験を示す。アッセイ混合物には、リン酸クエン酸バッファｐＨ６．８、マンノース、２－デオキシ－Ｄ－グルコース、基質であるシグマ

社製の４－メチルウンベリフェリル－α－Ｄ－グルコシダーゼおよびα－グルコシダーゼが含まれる。１：３７℃で一晩インキュベートした後のＵＶ光で照射したアッセイ混合物。２：１と同じであるが、この場合は、アッセイ混合物はα－グルコシダーゼを含まない。３：１と同じであるが、この場合、アッセイ混合物は基質を含まない。

【図２３】図２３はピキア パストリスから組み換えによって発現されたＧＬＳIIの活性の結果を示す。すべてのアッセイ混合物は３７℃で一晩インキュベートした後、ＵＶ光で照射した。１：酵母α－グルコシダーゼ（Ｓｉｇｍａ：Ｃａｔ．Ｎｏ．Ｇ－５００３）によるアッセイ；２：株１８（ｐＧＡＰＺＡＧＬＳIIで形質転換したＰＰＹ１２－ＯＨ）の精製培地によるアッセイ；３：ＷＴ ＰＰＹ１２－ＯＨ株の精製培地によるアッセイ；４：株Ｈ３（ｐＧＡＰＺＡｇｌｓIIＨＤＥＬで形質転換したＰＰＹ１２－ＯＨ）の精製培地によるアッセイ。

【図２４】図２４はＳｃＫｒｅ２－タグ付きヒトＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩ（ＧｎＴＩ）発現カセットを保持するベクターを示し、これらのベクターを当該分野で公知の方法に従って構築する方法を記載している。構築スキームを通して用いる略語はそれぞれ次のような意味をもつ。５’ＡＯＸ１またはＡＯＸ１ Ｐ：ピキア パストリス ＡＯＸ１プロモーター配列；Ａｍｐ Ｒ：アンピシリン耐性遺伝子；ＣｏｌＥｌ：ＣｏｌＥｌ複製開始点；３’ＡＯＸ１：ピキア パストリス ＡＯＸＩ遺伝子の３’配列；ＡＯＸ ＴＴ：ピキア パストリス ＡＯＸＩ遺伝子の転写終結配列遺伝子；ＯＲＦ：オープンリーディングフレーム；Ｂｌａｓｔｉｓｉｄｉｎ Ｒ：ブラスチシジン（ｂｌａｓｔｉｓｉｄｉｎ）耐性遺伝子；ＣＹＣ１ ＴＴ：Ｓ．セレビシエ ＣＹＣ１ 遺伝子の３’末端。この図面からわかるように、ヒトＧｎＴＩは、コード配列の５’末端において、ＳｃＫｒｅ２のＮ末端部分から得られたペプチドに対するコード配列に実施可能に連結されている。融合構築物全体は、Ｐ．パストリス ＡＯＸ１プロモーターに実施可能に連結されている。

【図２５】図２５はＰ．パストリスのＧｌｃＮＡｃ－トランスフェラーゼＩを用いた形質転換体によって分泌されたタンパク質由来の天然のＮ－グリカンの分析を示し、ＤＳＡ－ＦＡＣＥ手法を用いて分離した。パネル１は、デキストランの分析を示したものである。この分析は、他のパネルのサイズ参照の役割を果たす。全てのパネルの縦軸には、ピーク強度が相対蛍光単位で与えられている。パネル２～５（Ｔ１～Ｔ４）は、形質転換体１～４由来のＮ－グリカンの分析からの結果を示している。ＷＴまたは非形質転換生物の分析がパネル６に示されている。

【図２６】図２６はＰ．パストリスのＧｌｃＮＡｃ－トランスフェラーゼＩをもつ形質転換体の分泌タンパク質から得た天然のＮ－グリカンをタチナタマメ（Ｊａｃｋ Ｂｅａｎ）β－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼで消化して分析したものである。

【図２７】図２７は異なる３つの株において産生されたトランスシアリダーゼ（ＴＳ）からのＮ－グリカンを分析したものを示す。パネル１：オリゴマルトース参照。パネル２：ＧＳ１１５において産生されるＴＳ由来のグリカン。２つの主たるピークは、$Man_8GlcNAc_2$および$Man_9GlcNAc_2$に由来する。マンノシダーゼＨＤＥＬによって形質転換されたＧＳ１１５において産生されるＴＳは、主に$Man_5GlcNAc_2$を与える一方、パネル３に見られるようにまだなおいくらかの$Man_6GlcNAc_2$および$Man_7GlcNAc_2$ピークは残っていた。しかしながら、マンノシダーゼＨＤＥＬとＫｒｅ２－ＧｌｃＮＡｃ－トランスフェラーゼＩの両方で形質転換されたＧＳ１１５株において産生されたＴＳ由来のグリカンでは、ほとんどすべての$Man_5GlcNAc_2$が$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$に変換されたことを示した（パネル４）。

【図２８】図２８はトランスシアリダーゼ（ＴＳ）のレクチンブロットを示す。上部：３種の異なる株由来のＴＳのレクチンブロット。レーン１：ＧＳ１１５由来のＴＳ、レーン２：ＧＳ１１５ ＭａｎＨＤＥＬ由来のＴＳ、レーン３：ＧＳ１１５ ＭａｎＨＤＥＬ Ｋｒｅ２ＧｎＴＩ。下部：紅色レッド（Ｐｏｎｃｅａｕ ｒｅｄ）で染色した同ブロット。レーン３のバンドのみがレクチンによって染色され、その最終ＧｌｃＮＡｃのみが存在することを示す。

【図２９】タチナタマメβ－Ｎ－アセチルヘキソサミニダーゼで処理したＧｎＴＩ形質転換体のＮ－グリカン分析を示した図である。
【図３０】図３０はＳｒＫｒｅ２タグ付きヒトマンノシダーゼII発現カセットを保持するベクターを示し、これらのベクターを構築する方法を説明している。構築スキームを通して用いる略語は次のような意味をもつ。５’ＡＯＸ１またはＡＯＸ１　Ｐ：ピキア　パストリス　ＡＯＸ１プロモーター配列；Ａｍｐ　Ｒ：アンピシリン耐性遺伝子；Ｃｏ１Ｅ１：Ｃｏ１Ｅ１の複製開始点；３’ＡＯＸｌ：ピキア　パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の３’配列；ＡＲＧ４：ピキア　パストリスのＡＲＧ４遺伝子。ＡＯＸ　ＴＴ：ピキア　パストリス　ＡＯＸ１遺伝子の転写終結因子配列；ＯＲＦ：オープンリーディングフレーム；Ｐ　ＥＭ７：合成構成的原核プロモーターＥＭ７；ゼオシン：ゼオシン耐性遺伝子；ＣＹＣ１　ＴＴ：Ｓ．セレビシエ　ＣＹＣ１遺伝子の３’末端；ＧＡＰ：ピキア　パストリスグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター配列；ＰｐＵＲＡ３：ピキア　パストリス　ＵＲＡ３遺伝子。この図に見られるように、ヒトマンノシダーゼIIを、コード配列の５’末端において、ＳｃＫｒｅ２のＮ末端部分由来のペプチドに関するコード配列に実施可能に連結されている。融合構築物全体を、Ｐ．パストリス　ＧＡＰプロモーターに実施可能に連結した。
【図３１】図３１はｐＧＡＰＺＭＦＭａｎＨＤＥＬで形質転換したピキア　パストリス細胞における細胞内クラスＩマンノシダーゼ活性の測定を示す。ＤＮＰ－Ｍａｎの加水分解を、４０５ｎｍにおける分光分析によって測定した。すべての形質転換体において、ＧＳ１１５親株と比較して、活性に3から４倍の増加が測定された。
【図３２】図３２はｐＺ５’ＰｐＯＣＨｌＴｒｕｎｃによる形質転換でのゲノム再配列のスキームを示す。ｐＺ５’ＰｐＯＣＨｌＴｒｕｎｃは、ピキア属　ＯＣＨ１のアミノ酸２５～１５５に対するプロモーターを含まないコード配列に続いて、３’ＡＯＸＩ転写終結因子を含んでいる。このベクターは、ＯＣＨ１－相同部分内でＢｓｔＢＩと一直線上にあり、ＯＣＨ１遺伝子座内に特異的相同組み換えを誘導する。組み込み後、２つのＯＣＨ１配列部分が生成される。最初のＯＣＨ１配列は、ベクターとの組み換え部位までのゲノムＯＣＨ１配列と、これに続くベクター上に存在するＯＣＨ１配列の部分とでなる。該第１ＯＣＨ１配列は、この状態では宿主メチロトローフ酵母のＯＣＨ１プロモーターの制御下にあるが、上述のように、ＯＣＨ１配列は何もコードしないか、あるいはＯＣＨ１タンパク質の不活性断片をコードするために、活性ＯＣＨ１タンパク質を産生することができない。第２のＯＣＨ１配列は、先を切り取ったＯＣＨ１コード配列（最初の２４アミノ酸を欠失している）である。さらに、この先を切り取ったＯＣＨ１コード配列は、既知のどのプロモーター配列にも実施可能に連結されておらず、活性ＯＣＨ１タンパク質の合成のためにメッセンジャーが形成されることは考えられない。
【図３３】図３３は発現ベクターｐＺＭＦＭａｎＨＤＥＬ５’ＰｐＯＣＨ１Ｍｕｔ（配列番号：４６）を示す。
【図３４】図３４はｐＺ５’ＰｐＯＣＨ１Ｔｒｕｎｃを用いて形質転換したＧＳ１１５クローンの遺伝子分析を示す。ＯＣＨ１遺伝子座内においてプラスミドを正確に組み込んだクローンに関して、プライマー対Ｋａｉ１０／Ｋａｉ　７の予想される生成物の長さは１０５０ｂｐであり、プライマー対Ｋａｉ１１／Ｋａｉ　５に関しては、２１００ｂｐである。クローン１，２，３および８が本要件を満たすことは明らかである。ＯＣＨ１遺伝子座はこれらのクローンにおいて破壊されてしまったと判断される。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1
HDEL (peptide)

SEQ ID NO: 2
5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

SEQ ID NO: 3
5'-AGTCTAGATTACAACTCGTCGTGAGCAAGGTGGCCGCCCCG TCG-3'

SEQ ID NO: 4
CCATTGAGGACGCATGCCGCGCC

SEQ ID NO: 5
GTATCTAGATTACAACTCGTCGTGCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGT
TCAGCAAGGTGGCCGCCCCGTCGTGATGATGAA

SEQ ID NO: 6
AACTCGAGATGGACTCTTCAAAACACAAACGC

SEQ ID NO: 7
TTGCGGCCGCTTACAACTCGTCGTGTCGGACAGCAGGATTACCTGA

SEQ ID NO: 8
CCATTGAGGACGCATGCCGCGCC

SEQ ID NO: 9
GCAAATGGCATTCTGACATCCT

SEQ ID NO: 10
GTCCCTATTTCAATCAATTGAA

SEQ ID NO:11
GACTGGTTCCAATTGACAAGC

SEQ ID NO:12
CCG CTC GAG ATG GTC CTT TTG AAA TGG CTC

SEQ ID NO:13

CCG GGC CCA AAA ATA ACT TCC CAA TCT TCAG

SEQ ID NO: 14

The ORF sequence of the MFManHDEL fusion in pGAPZMFManHDEL:

*atg*agatttccttcaatttttactgctgttttattcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacactacaacagaagatgaa
acggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaaca
gcacaaataacgggttattgtttataaatactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagag
aggctgaagctgaattcgccacaaaacgtggatctcccaaccctacgagggcggcagcagtcaaggccgcattccagac
gtcgtggaacgcttaccaccattttgcctttccccatgacgacctccacccggtcagcaacagctttgatgatgagagaaacg
gctggggctcgtcggcaatcgatggcttggacacggctatcctcatgggggatgccgacattgtgaacacgatccttcagta
tgtaccgcagatcaacttcaccacgactgcggttgccaaccaaggatcctccgtgttcgagaccaacattcggtacctcggt
ggcctgctttctgcctatgacctgttgcgaggtcctttcagctccttggcgacaaaccagaccctggtaaacagccttctgag
gcaggctcaaacactggccaacggcctcaaggttgcgttcaccactcccagcggtgtcccggaccctaccgtcttcttcaac
cctactgtccggagaagtggtgcatctagcaacaacgtcgctgaaattggaagcctggtgctcgagtggacacggttgagc
gacctgacgggaaacccgcagtatgcccagcttgcgcagaagggcgagtcgtatctcctgaatccaaagggaagcccgg
aggcatggcctggcctgattggaacgtttgtcagcacgagcaacggtacctttcaggatagcagcggcagctggtccggc
ctcatggacagcttctacgagtacctgatcaagatgtacctgtacgacccggttgcgtttgcacactacaaggatcgctgggt
ccttggtgccgactcgaccattgggcatctcggctctcacccgtcgacgcgcaaggacttgacctttttgtcttcgtacaacg
gacagtctacgtcgccaaactcaggacatttggccagttttggcggtggcaacttcatcttgggaggcattctcctgaacgag
caaaagtacattgactttggaatcaagcttgccagctcgtactttggcacgtacacccagacggcttctggaatcggccccga
aggcttcgcgtgggtggacagcgtgacgggcgccggcggctcgccgccctcgtcccagtccgggttctactcgtcggca
ggattctgggtgacggcaccgtattacatcctgcggccggagacgctggagagcttgtactacgcataccgcgtcacggg
cgactccaagtggcaggacctggcgtgggaagcgttgagtgccattgaggacgcatgccgcgccggcagcgcgtactcg
tccatcaacgacgtgacgcaggccaacggcgggggtgcctctgacgatatggagagcttctggtttgccgaggcgctcaa
gtatgcgtacctgatctttgcggaggagtcggatgtgcaggtgcaggccaccggcgggaacaaatttgtctttaacacgga
ggcgcacccctttagcatccgttcatcatcacgacggggcggccaccttgctcacgacgagttg*taa*

SEQ ID NO: 15

The ORF sequence of the MFmManHDEL fusion in pGAPZMFmManHDEL:

*at*gagatttccttcaatttttactgctgttttattcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacactacaacagaagatgaa
acggcacaaattccggctgaagctgtcatcggttactcagatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaaca
gcacaaataacgggttattgtttataaatactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagatggact
cttcaaaacacaaacgctttgatctgggcttagaagatgtgttaattcctcacgtagatgccggcaaaggagctaaaaacccc
ggcgtcttcctgatccatggacccgacgaacacagacacagggaagaagaagagcgtctgagaaataagattagagctg
accatgagaaagccctggaagaagcaaaagaaaaattaagaaagtcaagagaggaaatccgtgcagaaattcagacaga
gaaaaacaaagtagcccaagcaatgaagacaaaagagaccagggtactgccgcctgtccctgtcccacaacgtgtaggg
gtcagtggtggggatccagaagacatggagatcaagaagaaaagagacaaaattaaagagatgatgaaacatgcctggg
ataattacagaacatacggatggggacataatgaactaaggcctattgcaaggaaaggccattccactaacatattcggaag
ctcacagatgggtgccaccatagtggatgctttggataccctttatatcatggggcttcatgatgaattcatggatgggcaaag
atggattgaagaaaaccttgatttcagtgtgaattcagaagtgtctgtctttgaagttaacattcgctttattggagggctcctcg
ctgcatattacctgtcaggagaggaaatattcaagactaaagcagtgcagttggctgagaaactccttcctgcctttaacacac
ctactgggattccctgggcaatggtgaacctgaaaagtggagtaggtcgaaactggggctgggcgtctgcaggcagcagc
atcctggctgagttcggcaccctgcacatggagtttgtgcacctcagctacttgaccggtgacttgacttactataataaggtc
atgcacattcggaaactactgcagaaaatggaacgcccaaatggtctttatccaaattatttaaacccaagaacagggcgctg
gggtcagtatcacacatcagttggtggtctgggagatagtttttatgaatacttactgaaagcatggctgacgtcagataaaac
agaccacgaggcaagaaggatgtatgacgatgctgttgaggctatagaaaaacatcttattaagaagtcccgaggaggtct
ggtttttattggagaatggaagaatggacacttggaaaggaagatggggcacttggcctgctttgctgggggaatgcttgcc
cttggagcagatggttccagaaaggataaagctggccactacttagaactaggggcagaaattgcacgaacatgtcatgag
tcatatgacagaactgcattgaaactaggtccggagtcattcaagtttgatggtgcagtggaagccgtggctgtgcggcagg
ctgaaaagtattacatccttcgtccagaagtaattgaaacctattggtatctatggcgatttacccacgacccaagatacaggc
agtggggctgggaagcagcactggctattgagaagtcgtgccgggtcagcggtgggttttctggtgtcaaggatgtatacg
ccccgacccctgtgcatgacgacgtgcagcagagcttttctcttgctgaaacattaaaatacttgtacctgctgttctctggcga
tgaccttctacctttagaccactgggtgtttaacacagaggcgcaccctctgccggtgttgcgcttagccaacagcactctttc
aggtaatcctgctgtccgacacgacgagttg*taa*

SEQ ID NO: 16 pAOX2ZAGLSII

catggccaagttgaccagtgccgttccggtgctcaccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcgagttctggaccgaccgg
ctcgggttctcccgggacttcgtggaggacgacttcgccggtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcatcagcgcggtc
caggaccaggtggtgccggacaacaccctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccgagtggtcg
gaggtcgtgtccacgaacttccgggacgcctccgggccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtgggggcgggga
gttcgccctgcgcgacccggccggcaactgcgtgcacttcgtggccgaggagcaggactgacacgtccgacggcggcc
cacgggtcccaggcctcggagatccgtccccctttccttgtcgatatcatgtaattagttatgtcacgcttacattcacgccct
ccccccacatccgctctaaccgaaaaggaaggagttagacaacctgaagtctaggtccctatttatttttttatagttatgttagt
attaagaacgttatttatatttcaaatttttctttttttttctgtacagacgcgtgtacgcatgtaacattatactgaaaaccttgcttga
gaaggttttgggacgctcgaaggctttaatttgcaagctggagaccaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagga
accgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtca
gaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgac
cctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagt
tcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaact
atcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggt
atgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctg
ctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtt
tgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtgga
acgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagatcagatctttttttcagaccatatgaccggtccatcttctacgggggggat
tatctatgctttgacctctatcttgattcttttatgattcaaatcacttttacgttatttattacttactggttatttacttagcgccttttctg
aaaaacatttactaaaaatcatacatcggcactctcaaacacgacagattgtgatcaagaagcagagacaatcaccactaag
gttgcacatttgagccagtaggctcctaatagaggttcgatacttatttgataatacgacatattgtcttacctctgaatgtgtca
atactctctcgttcttcgtctcgtcagctaaaaatataacacttcgagtaagatacgcccaattgaaggctacgagataccaga
ctatcactagtagaactttgacatctgctaaagcagatcaaatatccatttatccagaatcaattacttcctttagcttgtcgaag
gcatgaaaaagctacatgaaaatccccatccttgaagttttgtcagcttaaaggactccatttcctaaaatttcaagcagtcctct
caactaaatttttttccattcctctgcacccagccctcttcatcaaccgtccagccttctcaaaagtccaatgtaagtagcctgca
aattcaggttacaaccctcaattttccatccaagggcgatccttacaaagttaatatcgaacagcagagactaagcgagtcat
catcaccacccaacgatggtgaaaaactttaagcatagattgatggagggtgtatggcacttggcggctgcattagagtttga
aactatggggtaatacatcacatccggaactgatccgactccgagatcatatgcaaagcacgtgatgtaccccgtaaactgc

tcggattatcgttgcaattcatcgtcttaaacagtacaagaaactttattcatgggtcattggactctgatgaggggcacatttcc
ccaatgatttttgggaaagaaagccgtaagaggacagttaagcgaaagagacaagacaacgaacagcaaaagtgacag
ctgtcagctacctagtggacagttgggagtttccaattggttggttttgaatttttacccatgttgagttgtccttgcttctccttgca
aacaatgcaagttgataagacatcaccttccaagataggctatttttgtcgcataaatttttgtctcggagtgaaaaccccttttat
gtgaacagattacagaagcgtcctacccttcaccggttgagatggggagaaaattaagcgatgaggagacgattattggtat
aaaagaagcaaccaaaatcccttattgtccttttctgatcagcatcaaagaatattgtcttaaaacgggcttttaactacattgttc
ttacacattgcaaacctcttccttctatttcggatcaactgtattgactacattgatctttttaacgaagtttacgacttactaaatcc
ccacaaacaaatcaactgagaaaagaattcacgtggcccagccggccgtctcggatcggtacctcgagatggtccttttga
aatggctcgtatgccaattggtcttctttaccgcttttcgcatgcgtttaccgactatctattaaagaagtgtgcgcaatctgggt
tttgccatagaaacagggtttatgcagaaaatattgccaaatctcatcactgctattacaaagtggacgccgagtctattgcac
acgatcctttagagaatgtgcttcatgctaccataattaaaactataccaagattggagggcgatgatatagccgttcagttccc
attctctctctttttttacaggatcactcagtaaggttcactataaatgagaaagagagaatgccaaccaacagcagcggtttg
ttgatctcttcacaacggttcaatgagacctggaagtacgcattcgacaagaaatttcaagaggaggcgaacaggaccagta
ttccacaattccacttcctaagcaaaaacaaactgtgaactcattctggtcgaaaatatcttcatttttgtcactttcaaactccac
tgcagacacatttcatcttcgaaacggtgatgtatccgtagaaatctttgctgaacctttcaattgaaagtttactggcaaaatg
cgctgaaacttattgtaaacgagcaaaatttcctgaacattgaacatcatagaactaagcaggaaaacttcgcacacgtgctg
ccagaagaaacaactttcaacatgtttaaggacaatttcttgtattcaaagcatgactctatgccttggggcctgaatcggttg
cgctagatttctctttcatgggttctactaatgtctacggtataccggaacatgcgacgtcgctaaggctgatggacacttcagg
tggaaaggaaccctacaggcttttcaacgttgatgtctttgagtacaacatcggtaccagccaaccaatgtacggttcgatcc
cattcatgttttcatcttcgtccacatctatcttttgggtcaatgcagctgacacttgggtagacataaagtatgacaccagtaaa
aataaaacgatgactcattggatctccgaaaatggtgtcatagatgtagtcatgtccctggggccagatattccaactatcattg
acaaatttaccgatttgactggtagacccttttaccgcccatttcctctatagggtaccatcaatgtagatggaatiataatgatg
agatggacgttctcacagtggactctcagatggatgctcatatgattccttacgattttatttggttggacttggagtatacgaac
gacaaaaaatattttacttggaagcagcactcctttcccaatccaaaaaggctgttatccaaattaaaaaagttgggtagaaat
cttgtcgtactaatcgatcctcatttaaagaaagattatgaaatcagtgacagggtaattaatgaaaatgtagcagtcaaggatc
acaatggaaatgactatgtaggtcattgctggccaggtaattctatatggattgataccataagcaaatatggccaaaagattt
ggaagtccttttcgaacggtttatggatctgccggctgatttaactaatttattcatttggaatgatatgaacgagccttcgattt
cgatggcccagagaccacagctccaaaagatttgattcacgacaattacattgaggaaagatccgtccataacatatatggtc

tatcagtgcatgaagctacttacgacgcaataaaatcgatttattcaccatccgataagcgtcctttccttctaacaagggcttttt
ttgccggctctcaacgtactgctgccacatggactggtgacaatgtggccaattgggattacttaaagatttccattcctatggt
tctgtcaaacaacattgctggtatgccatttataggagccgacatagctggctttgctgaggatcctacacctgaattgattgca
cgttggtaccaagcgggcttatggtacccatttttagagcacacgcccatatagacaccaagagaagagaaccatacttatt
caatgaacctttgaagtcgatagtacgtgatattatccaattgagatatttcctgctacctaccttatacaccatgtttcataaatca
agtgtcactggatttccgataatgaatccaatgtttattgaacaccctgaatttgctgaattgtatcatatcgataaccaatttttact
ggagtaattcaggtctattagtcaaacctgtcacggagcctggtcaatcagaaacggaaatggttttcccacccggtatattct
atgaattcgcatctttacactcttttataaacaatggtactgatttgatagaaaagaatatttctgcaccattggataaaattccatt
atttattgaaggcggtcacattatcactatgaaagataagtatagaagatcttcaatgttaatgaaaaacgatccatatgtaatag
ttatagcccctgataccgagggacgagccgttggagatctttatgttgatgatggagaaacttttggctaccaaagaggtgag
tacgtagaaactcagttcattttcgaaaacaatacctaaaaaatgttcgaagtcatattcccgagaatttgacaggcattcacc
acaatactttgaggaataccaatattgaaaaaatcattatcgcaaagaataatttacaacacaacataacgttgaaagacagta
ttaaagtcaaaaaaaatggcgaagaaagttcattgccgactagatcgtcatatgagaatgataataagatcaccattcttaacc
tatcgcttgacataactgaagattgggaagttatttttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgcc
gtcgaccatcatcatcatcattgagttttagccttagacatgactgttcctcagttcaagttgggcacttacgagaagaccg
gtcttgctagattctaatcaagaggatgtcagaatgccatttgcctgagagatgcaggcttcatttttgatacttttttatttgtaac
ctatatagtataggatttttttgtcattttgtttcttctcgtacgagcttgctcctgatcagcctatctcgcagctgatgaatatcttgt
ggtaggggtttgggaaaatcattcgagtttgatgtttttcttggtatttcccactcctcttcagagtacagaagattaagtgagac
cttcgtttgtgcggatcccccacacaccatagcttcaaaatgtttctactccttttttactcttccagattttctcggactccgcgca
tcgccgtaccacttcaaaacacccaagcacagcatactaaattttccctctttcttcctctagggtgtcgttaattacccgtacta
aaggtttggaaaagaaaaaagagaccgcctcgtttcttttttcttcgtcgaaaaaggcaataaaaatttttatcacgtttcttttttctt
gaaatttttttttttttagttttttttctctttcagtgacctccattgatatttaagttaataaacggtcttcaatttctcaagtttcagtttcattt
ttcttgttctattacaacttttttttacttcttgttcattagaaagaaagcatagcaatctaatctaagggcggtgttgacaattaatcat
cggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaac

SEQ ID NO: 17 pAOX2ADE1glsII

tcgaccggctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcac
tgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatca

ggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggc
gtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggact
ataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccg
cctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagct
gggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaaga
cacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttg
aagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaag
agttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaa
aaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttgg
tcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaa
cttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactcc
ccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcac
cggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctcca
tccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacagg
catcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccat
gttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatg
gcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgaga
atagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtg
ctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgt
gcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaa
gggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatagctccaaggcaacaaattgactactcagac
cgacattcattcgttattgattttaaatcaacgataaacggaatggttacttgaatgatttcacttatgatcattgtttactaattacc
taaataggattttatatggaattggaagaataagggaaatttcagatgtctgaaaaaggcgaggagggtactaatcattcaag
cccatttcttgccagtaattgcttcataagcttcaatatacttttctttactcttgatagcaatttctgcatccatggctacgccctctt
tgccattcaatccgttggccgtcaaccaatctctgagaaactgcttatcgtaactctcttgcgatttacccacttggtaagtctttt
gattccaaaatctagaagaatctggagttaaaacttcatctactagtaccaattcattgttttcgtccagtccaaattcgaatttcgt
atcagcaataatgatccccttcaaaagggcgaagtttttgcagcagaatacaactcgaccgccttgacagcgaccttctcac
aaatgtctttacctacaatctcagcagcttgttcaatagagatgttttcatcgtgttcaccctgttcagctttcgttgaaggtgtgaa

aatcggagttggaaaggcgtcgctctcttgaaggttctcgttttcaaccttgactccatggacagtttttgagttcttgtactctttc
catgcacttccagtgatgtaacctctgacaatggcttccaaaggtatcagtctgtgcttttttactatcaaggatcgtccctctaat
tgagatttgtatttttcttcagacagttttgatggtagtaaagcaaagacttccttgtcattagaagcaaccaaatgattctttatgta
gggtgccaaaaaatcaaaccagaaaactgagagctgagtcaaaatctttcccttatcaggaataccgtttgtcataatcacatc
gtaagcggagatacggtcagttgcgacgaacagcaagttgttctcatcgactgcataaatgtctctaacctttccttggcgatt
aaaggtaggattccgtccagatcagtgttcacaatggacatacttggaaggatacagcaaagtgtgttggaagcgatgacac
atggaaaggaatttttcgagtttcctagagtagtatattggggcggtgaaagttcagatgtttaatgcttaatactcttatactcttc
aaagcgcccaagtgtttctgccaacctgacttttttctgaataatgaatcgttcaagtggagtatttaaaccatgattaagttacgt
gatttggcactggataaggtcgaaaaatatccgtattcataaacgattattggtaaaagttacaaaataccactaattacggag
aagcttagtaacagttatcatctcttggtcgattaacgcttacaatttccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaaggg
cgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagggccctcgaggcacaaacgaacgtctcacttaatcttctgtactctgaaga
ggagtgggaaataccaagaaaaacatcaaactcgaatgattttcccaaacccctaccacaagatattcatcagctgcgagat
aggctgatcaggagcaagctcgtacgagaagaaacaaaatgacaaaaaaaatcctatactatataggttacaaataaaaaa
gtatcaaaaatgaagcctgcatctctcaggcaaatggcattctgacatcctcttgattagaatctagcaagaccggtcttctcgt
aagtgcccaacttgaactgaggaacagtcatgtctaaggctaaaactcaatgatgatgatgatgatggtcgacggcgctattc
agatcctcttctgagatgagtttttgttcgggcccaaaaataacttcccaatcttcagttatgtcaagcgataggttaagaatggt
gatcttattatcattctcatatgacgatctagtcggcaatgaactttcttcgccatttttttgactttaatactgtctttcaacgttatgt
tgtgttgtaaattattctttgcgataatgatttttttcaatattggtattcctcaaagtattgtggtgaatgcctgtcaaattctcgggaa
tatgacttcgaacatttttttaaggtattgttttcgaaaatgaactgagtttctacgtactcacctctttggtagccaaaagtttctcca
tcatcaacataaagatctccaacggctcgtccctcggtatcaggggctataactattacatatggatcgtttttcattaacattga
agatcttctatacttatctttcatagtgataatgtgaccgccttcaataaataatggaattttatccaatggtgcagaaatattctttt
ctatcaaatcagtaccattgtttataaaagagtgtaaagatgcgaattcatagaatataccgggtgggaaaaccatttccgtttct
gattgaccaggctccgtgacaggtttgactaatagacctgaattactccagtaaaattggttatcgatatgatacaattcagcaa
attcagggtgttcaataaacattggattcattatcggaaatccagtgacacttgatttatgaaacatggtgtataaggtaggtag
caggaaatatctcaattggataatatcacgtactatcgacttcaaaggttcattgaataagtatggttctcttctcttggtgtctata
tgggcgtgtgctctaaaaaatgggtaccataagcccgcttggtaccaacgtgcaatcaattcaggtgtaggatcctcagcaa
agccagctatgtcggctcctataaatggcataccagcaatgttgtttgacagaaccataggaatggaaatctttaagtaatccc
aattggccacattgtcaccagtccatgtggcagcagtacgttgagagccggcaaaaaaagcccttgttagaaggaaaggac

gcttatcggatggtgaataaatcgattttattgcgtcgtaagtagcttcatgcactgatagaccatatatgttatggacggatcttt
cctcaatgtaattgtcgtgaatcaaatcttttggagctgtggtctctgggccatcgaaaatcgaaggctcgttcatatcattccaa
atgaataaattagttaaatcagccggcagatccataaaccgttcgaaaaaggacttccaaatcttttggccatatttgcttatggt
atcaatccatatagaattacctggccagcaatgacctacatagtcatttccattgtgatccttgactgctacattttcattaattacc
ctgtcactgatttcataatctttctttaaatgaggatcgattagtacgacaagatttctacccaacttttttaatttggataacagcct
ttttggattgggaaaggagtgctgcttccaagtaaaatatttttttgtcgttcgtatactccaagtccaaccaaataaaatcgtaag
gaatcatatgagcatccatctgagagtccactgtgagaacgtccatctcatcattataattccatctacattgatggtaccctata
gaggaaatgggcggtaaaaagggtctaccagtcaaatcggtaaatttgtcaatgatagttggaatatctggccccagggaca
tgactacatctatgacaccattttcggagatccaatgagtcatcgttttatttttactggtgtcatactttatgtctacccaagtgtca
gctgcattgacccaaaagatagatgtggacgaagatgaaaacatgaatgggatcgaaccgtacattggttggctggtaccg
atgttgtactcaaagacatcaacgttgaaaagcctgtagggttcctttccacctgaagtgtccatcagccttagcgacgtcgca
tgttccggtataccgtagacattagtagaacccatgaaagagaaatctagcgcaaccgattcaggccccaaaggcatagag
tcatgctttgaatacaagaaattgtccttaaacatgttgaaagttgtttcttctggcagcacgtgtgcgaagttttcctgcttagttc
tatgatgttcaatgttcaggaaattttgctcgtttacaataagtttcagcgcattttgccagtaaactttcaattgaaaaggttcagc
aaagatttctacggatacatcaccgtttcgaagatgaaatgtgtctgcagtggagtttgaaagtgacaaaaatgaagatattttc
gaccagaatgagttcacagtttgtttttgcttaaggaagtggaattgtggaatactggtcctgttcgcctcctcttgaaatttcttgt
cgaatgcgtacttccaggtctcattgaaccgttgtgaagagatcaacaaaccgctgctgttggttggcattctctctttctcattt
atagtgaaccttactgagtgatcctgtaaaaaagagagagagaatgggaactgaacggctatatcatcgccctccaatcttg
gtatagttttaattatggtagcatgaagcacattctctaaaggatcgtgtgcaatagactcggcgtccactttgtaatagcagtg
atgagatttggcaatattttctgcataaaccctgtttctatggcaaaacccagattgcgcacacttctttaatagatagtcggtaa
acgcatgcgaaaaagcggtaaagaagaccaattggcatacgagccatttcaaaaggaccatctcgaggtaccgatccgag
acggccggctgggccacgtgaattcttttctcagttgatttgtttgtggggatttagtaagtcgtaaacttcgttaaaaaagatca
atgtagtcaatacagttgatccgaaatagaaggaagaggtttgcaatgtgtaagaacaatgtagttaaaagcccgttttaagac
aatattctttgatgctgatcagaaaaggacaataagggattttggttgcttcttttataccaataatcgtctcctcatcgcttaatttt
ctccccatctcaaccggtgaagggtaggacgcttctgtaatctgttcacataaaaggggttttcactccgagacaaaaatttat
gcgacaaaaatagcctatcttggaaggtgatgtcttatcaacttgcattgtttgcaaggagaagcaaggacaactcaacatgg
gtaaaaattcaaaaccaaccaattggaaactcccaactgtccactaggtagctgacagctgtcacttttgctgttcgttgtcttgt
ctctttcgcttaactgtcctcttacggctttctttcccaaaaaatcattggggaaatgtgcccctcatcagagtccaatgacccat

gaataaagtttcttgtactgtttaagacgatgaattgcaacgataatccgagcagtttacggggtacatcacgtgctttgcatat
gatctcggagtcggatcagttccggatgtgatgtattaccccatagtttcaaactctaatgcagccgccaagtgccatacacc
ctccatcaatctatgcttaaagtttttcaccatcgttgggtggtgatgatgactcgcttagtctctgctgttcgatattaactttgtaa
ggatcgcccttggatggaaaattgaggggttgtaacctgaatttgcaggctacttacattggacttttgagaaggctggacgg
ttgatgaagagggctgggtgcagaggaatggaaaaaaatttagttgagaggactgcttgaaatttaggaaatggagtccttt
aagctgacaaaacttcaaggatggggatttttcatgtagcttttcatgccttcgacaagctaaaggaaggtaattgattctggat
aaatggatatttgatctgctttagcagatgtcaaagttctactagtgatagtctggtatctcgtagccttcaattgggcgtatctta
ctcgaagtgttatatttttagctgacgagacgaagaacgagagagtattgacacattcagaggtaagacaatatgtcgtattat
caaaataagtatcgaacctctattaggagcctactggctcaaatgtgcaaccttagtggtgattgtctctgcttcttgatcacaat
ctgtcgtgtttgagagtgccgatgtatgatttttagtaaatgtttttcagaaaaggcgctaagtaaataaccagtaagtaataaat
aacgtaaaagtgatttgaatcataaaagaatcaagatagaggtcaaagcatagataatccccccgtagaagatggaccggtc
atatggtctgaaaaaaagatctgatctcatg

SEQ ID NO: 18 pGAPZAGLSII

tcgagatggtccttttgaaatggctcgtatgccaattggtcttctttaccgcttttcgcatgcgtttaccgactatctattaaagaa
gtgtgcgcaatctgggttttgccatagaaacagggtttatgcagaaaatattgccaaatctcatcactgctattacaaagtgga
cgccgagtctattgcacacgatcctttagagaatgtgcttcatgctaccataattaaaactataccaagattggagggcgatga
tatagccgttcagttcccattctctctctttttttacaggatcactcagtaaggttcactataaatgagaaagagagaatgccaa
ccaacagcagcggtttgttgatctcttcacaacggttcaatgagacctggaagtacgcattcgacaagaaatttcaagagga
ggcgaacaggaccagtattccacaattccacttccttaagcaaaaacaaactgtgaactcattctggtcgaaaatatcttcattt
ttgtcactttcaaactccactgcagacacatttcatcttcgaaacggtgatgtatccgtagaaatctttgctgaacctttcaattg
aaagtttactggcaaaatgcgctgaaacttattgtaaacgagcaaaatttcctgaacattgaacatcatagaactaagcagga
aaacttcgcacacgtgctgccagaagaaacaactttcaacatgtttaaggacaatttcttgtattcaaagcatgactctatgcctt
tggggcctgaatcggttgcgctagatttctctttcatgggttctactaatgtctacggtataccggaacatgcgacgtcgctaag
gctgatggacacttcaggtggaaaggaaccctacaggcttttcaacgttgatgtctttgagtacaacatcggtaccagccaac
caatgtacggttcgatcccattcatgttttcatcttcgtccacatctatcttttgggtcaatgcagctgacacttgggtagacataa
agtatgacaccagtaaaaataaaacgatgactcattggatctccgaaaatggtgtcatagatgtagtcatgtccctggggcca
gatattccaactatcattgacaaatttaccgatttgactggtagacccttttaccgcccatttcctctatagggtaccatcaatgta

gatggaattataatgatgagatggacgttctcacagtggactctcagatggatgctcatatgattccttacgattttatttggttgg
acttggagtatacgaacgacaaaaaatattttacttggaagcagcactcctttcccaatccaaaaaggctgttatccaaattaaa
aaagttgggtagaaatcttgtcgtactaatcgatcctcatttaaagaaagattatgaaatcagtgacagggtaattaatgaaaat
gtagcagtcaaggatcacaatggaaatgactatgtaggtcattgctggccaggtaattctatatggattgataccataagcaaa
tatggccaaaagatttggaagtccttttcgaacggtttatggatctgccggctgatttaactaatttattcatttggaatgatatga
acgagccttcgattttcgatggcccagagaccacagctccaaaagatttgattcacgacaattacattgaggaaagatccgtc
cataacatatatggtctatcagtgcatgaagctacttacgacgcaataaaatcgatttattcaccatccgataagcgtcctttcct
tctaacaagggctttttttgccggctctcaacgtactgctgccacatggactggtgacaatgtggccaattgggattacttaaag
atttccattcctatggttctgtcaaacaacattgctggtatgccatttataggagccgacatagctggctttgctgaggatcctac
acctgaattgattgcacgttggtaccaagcgggcttatggtacccatttttagagcacacgcccatatagacaccaagagaa
gagaaccatacttattcaatgaacctttgaagtcgatagtacgtgatattatccaattgagatatttcctgctacctaccttatacа
ccatgtttcataaatcaagtgtcactggatttccgataatgaatccaatgtttattgaacaccctgaatttgctgaattgtatcatat
cgataaccaattttactggagtaattcaggtctattagtcaaacctgtcacggagcctggtcaatcagaaacggaaatggttttc
ccacccggtatattctatgaattcgcatctttacactcttttataaacaatggtactgatttgatagaaaagaatatttctgcaccat
tggataaaattccattatttattgaaggcggtcacattatcactatgaaagataagtatagaagatcttcaatgttaatgaaaaac
gatccatatgtaatagttatagcccctgataccgagggacgagccgttggagatctttatgttgatgatggagaaacttttggct
accaaagaggtgagtacgtagaaactcagttcattttcgaaaacaataccttaaaaaatgttcgaagtcatattcccgagaattt
gacaggcattcaccacaatactttgaggaataccaatattgaaaaaatcattatcgcaaagaataatttacaacacaacataac
gttgaaagacagtattaaagtcaaaaaaaatggcgaagaaagttcattgccgactagatcgtcatatgagaatgataataaga
tcaccattcttaacctatcgcttgacataactgaagattgggaagttatttttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagagg
atctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagttttagccttagacatgactgttcctcagttcaagttgggcact
tacgagaagaccggtcttgctagattctaatcaagaggatgtcagaatgccatttgcctgagagatgcaggcttcatttttgata
ctttttttatttgtaacctatatagtataggatttttttgtcattttgtttcttctcgtacgagcttgctcctgatcagcctatctcgcagct
gatgaatatcttgtggtaggggtttgggaaaatcattcgagtttgatgtttttcttggtatttcccactcctcttcagagtacagaa
gattaagtgagaccttcgtttgtgcggatcccccacacaccatagcttcaaaatgtttctactccttttttactcttccagattttctc
ggactccgcgcatcgccgtaccacttcaaaacacccaagcacagcatactaaattttccctctttcttcctctagggtgtcgtta
attacccgtactaaaggtttggaaaagaaaaaagagaccgcctcgtttcttttcttcgtcgaaaaaggcaataaaaatttttatc
acgtttctttttcttgaaatttttttttttagttttttctctttcagtgacctccattgatatttaagttaataaacggtcttcaatttctcaa

10 20 30

gtttcagtttcatttttcttgttctattacaacttttttacttcttgttcattagaaagaaagcatagcaatctaatctaagggcggtgt
tgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatggccaagttgaccagtg
ccgttccggtgctcaccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcgagttctggaccgaccggctcgggttctcccgggacttc
gtggaggacgacttcgccggtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcatcagcgcggtccaggaccaggtggtgccgg
acaacaccctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccgagtggtcggaggtcgtgtccacgaacttc
cgggacgcctccgggccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtgggggcgggagttcgccctgcgcgacccgg
ccggcaactgcgtgcacttcgtggccgaggagcaggactgacacgtccgacggcggcccacgggtcccaggcctcgga
gatccgtcccccttttccttttgtcgatatcatgtaattagttatgtcacgcttacattcacgccctcccccacatccgctctaacc
gaaaaggaaggagttagacaacctgaagtctaggtcccctatttatttttttatagttatgttagtattaagaacgttatttatatttca
aatttttctttttttttctgtacagacgcgtgtacgcatgtaacattatactgaaaaccttgcttgagaaggttttgggacgctcgaa
ggctttaatttgcaagctggagaccaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttg
ctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgaca
ggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacct
gtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctcc
aagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccgg
taagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagag
ttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgga
aaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcg
cagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaaggg
attttggtcatgcatgagatcagatcttttttgtagaaatgtcttggtgtcctcgtccaatcaggtagccatctctgaaatatctgg
ctccgttgcaactccgaacgacctgctggcaacgtaaaattctccggggtaaaacttaaatgtggagtaatggaaccagaaa
cgtctcttcccttctctctccttccaccgcccgttaccgtccctaggaaattttactctgctggagagcttcttctacggccccctt
gcagcaatgctcttcccagcattacgttgcgggtaaaacggaggtcgtgtacccgacctagcagcccagggatggaaaag
tcccggccgtcgctggcaataatagcgggcggacgcatgtcatgagattattggaaaccaccagaatcgaatataaaaggc
gaacacctttcccaattttggtttctcctgacccaaagactttaaatttaatttatttgtccctatttcaatcaattgaacaactatttc
gaaacgaggaattcacgtggcccagccggccgtctcggatcggtacc

SEQ ID NO: 19 pGAPADE1glsII

tcgaccggctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcac
tgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatca
ggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcgttgctggc
gtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggact
ataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccg
cctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagct
gggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaaga
cacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttg
aagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaag
agttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaa
aaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttgg
tcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaa
cttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactcc
ccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcac
cggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctcca
tccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacagg
catcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccat
gttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatg
gcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgaga
atagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtg
ctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgt
gcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaa
gggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatagctccaaggcaacaaattgactactcagac
cgacattcattcgttattgattttaaatcaacgataaacggaatggttacttgaatgatttcactttatgatcattgtttactaattacc
taaataggattttatatggaattggaagaataagggaaatttcagatgtctgaaaaaggcgaggagggtactaatcattcaag
cccatttcttgccagtaattgcttcataagcttcaatatacttttctttactcttgatagcaatttctgcatccatggctacgccctctt
tgccattcaatccgttggccgtcaaccaatctctgagaaactgcttatcgtaactctcttgcgatttacccacttggtaagtctttt
gattccaaaatctagaagaatctggagttaaaacttcatctactagtaccaattcattgttttcgtccagtccaaattcgaatttcgt

atcagcaataatgatccccttcaaaagggcgaagtttttgcagcagaatacaactcgaccgccttgacagcgaccttctcac
aaatgtctttacctacaatctcagcagcttgttcaatagagatgttttcatcgtgttcaccctgttcagctttcgttgaaggtgtgaa
aatcggagttggaaaggcgtcgctctcttgaaggttctcgttttcaaccttgactccatggacagtttttgagttcttgtactctttc
catgcacttccagtgatgtaacctctgacaatggcttccaaaggtatcagtctgtgcttttttactatcaaggatcgtccctctaat
tgagatttgtatttttcttcagacagttttgatggtagtaaagcaaagacttccttgtcattagaagcaaccaaatgattctttatgta
gggtgccaaaaaatcaaaccagaaaactgagagctgagtcaaaatctttcccttatcaggaataccgtttgtcataatcacatc
gtaagcggagatacggtcagttgcgacgaacagcaagttgttctcatcgactgcataaatgtctctaacctttccttttggcgatt
aaaggtaggattccgtccagatcagtgttcacaatggacatacttggaaggatacagcaaagtgtgttggaagcgatgacac
atggaaaggaatttttcgagtttcctagagtagtatattggggcggtgaaagttcagatgtttaatgcttaatactcttatactcttc
aaagcgcccaagtgtttctgccaacctgacttttttctgaataatgaatcgttcaagtggagtatttaaaccatgattaagttacgt
gatttggcactggataaggtcgaaaaatatccgtattcataaacgattattggtaaaagttacaaaataccactaattacggag
aagcttagtaacagttatcatctcttggtcgattaacgcttacaatttccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaaggg
cgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagggcctcgaggcacaaacgaacgtctcacttaatcttctgtactctgaaga
ggagtgggaaataccaagaaaaacatcaaactcgaatgattttcccaaacccctaccacaagatattcatcagctgcgagat
aggctgatcaggagcaagctcgtacgagaagaaacaaaatgacaaaaaaaatcctatactatataggttacaaataaaaaa
gtatcaaaaatgaagcctgcatctctcaggcaaatggcattctgacatcctcttgattagaatctagcaagaccggtcttctcgt
aagtgcccaacttgaactgaggaacagtcatgtctaaggctaaaactcaatgatgatgatgatgatggtcgacggcgctattc
agatcctcttctgagatgagtttttgttcgggcccaaaaataacttcccaatcttcagttatgtcaagcgataggttaagaatggt
gatcttattatcattctcatatgacgatctagtcggcaatgaactttcttcgccatttttttttgactttaatactgtctttcaacgttatgt
tgtgttgtaaattattctttgcgataatgatttttttcaatattggtattcctcaaagtattgtggtgaatgcctgtcaaattctcgggaa
tatgacttcgaacatttttttaaggtattgttttcgaaaatgaactgagtttctacgtactcacctctttggtagccaaaagtttctcca
tcatcaacataaagatctccaacggctcgtccctcggtatcaggggctataactattacatatggatcgtttttcattaacattga
agatcttctatacttatctttcatagtgataatgtgaccgccttcaataaataatggaattttatccaatggtgcagaaatattctttt
ctatcaaatcagtaccattgtttataaaagagtgtaaagatgcgaattcatagaatataccgggtgggaaaaccatttccgtttct
gattgaccaggctccgtgacaggtttgactaatagacctgaattactccagtaaaattggttatcgatatgatacaattcagcaa
attcagggtgttcaataaacattggattcattatcggaaatccagtgacacttgatttatgaaacatggtgtataaggtaggtag
caggaaatatctcaattggataatatcacgtactatcgacttcaaaggttcattgaataagtatggttctcttctcttggtgtctata
tgggcgtgtgctctaaaaaatgggtaccataagcccgcttggtaccaacgtgcaatcaattcaggtgtaggatcctcagcaa

agccagctatgtcggctcctataaatggcataccagcaatgttgtttgacagaaccataggaatggaaatctttaagtaatccc
aattggccacattgtcaccagtccatgtggcagcagtacgttgagagccggcaaaaaaagcccttgttagaaggaaaggac
gcttatcggatggtgaataaatcgattttattgcgtcgtaagtagcttcatgcactgatagaccatatatgttatggacggatcttt
cctcaatgtaattgtcgtgaatcaaatcttttggagctgtggtctctgggccatcgaaaatcgaaggctcgttcatatcattccaa
atgaataaattagttaaatcagccggcagatccataaaccgttcgaaaaaggacttccaaatcttttggccatatttgcttatggt
atcaatccatatagaattacctggccagcaatgacctacatagtcatttccattgtgatccttgactgctacattttcattaattacc
ctgtcactgatttcataatctttctttaaatgaggatcgattagtacgacaagatttctacccaacttttttaatttggataacagcct
ttttggattgggaaaggagtgctgcttccaagtaaaatatttttgtcgttcgtatactccaagtccaaccaaataaaatcgtaag
gaatcatatgagcatccatctgagagtccactgtgagaacgtccatctcatcattataattccatctacattgatggtaccctata
gaggaaatgggcggtaaaaagggtctaccagtcaaatcggtaaatttgtcaatgatagttggaatatctggccccagggaca
tgactacatctatgacaccattttcggagatccaatgagtcatcgttttatttttactggtgtcatactttatgtctacccaagtgtca
gctgcattgacccaaaagatagatgtggacgaagatgaaaacatgaatgggatcgaaccgtacattggttggctggtaccg
atgttgtactcaaagacatcaacgttgaaaagcctgtagggttcctttccacctgaagtgtccatcagccttagcgacgtcgca
tgttccggtataccgtagacattagtagaacccatgaaagagaaatctagcgcaaccgattcaggccccaaaggcatagag
tcatgctttgaatacaagaaattgtccttaaacatgttgaaagttgtttcttctggcagcacgtgtgcgaagttttcctgcttagttc
tatgatgttcaatgttcaggaaattttgctcgtttacaataagtttcagcgcatttgccagtaaactttcaattgaaaaggttcagc
aaagatttctacggatacatcaccgtttcgaagatgaaatgtgtctgcagtggagtttgaaagtgacaaaaatgaagatattttc
gaccagaatgagttcacagtttgtttttgcttaaggaagtggaattgtggaatactggtcctgttcgcctcctcttgaaatttcttgt
cgaatgcgtacttccaggtctcattgaaccgttgtgaagagatcaacaaaccgctgctgttggttggcatctctctttctcattt
atagtgaaccttactgagtgatcctgtaaaaaagagagagagaatgggaactgaacggctatatcatcgccctccaatcttg
gtatagttttaattatggtagcatgaagcacattctctaaaggatcgtgtgcaatagactcggcgtccactttgtaatagcagtg
atgagatttggcaatattttctgcataaaccctgtttctatggcaaaacccagattgcgcacacttctttaatagatagtcggtaa
acgcatgcgaaaaagcggtaaagaagaccaattggcatacgagccatttcaaaaggaccatctcgaggtaccgatccgag
acggccggctgggccacgtgaattcctcgtttcgaaatagttgttcaattgattgaaatagggacaaataaattaaatttaaagt
ctttgggtcaggagaaaccaaaattgggaaaggtgttcgccttttatattcgattctggtggtttccaataatctcatgacatgcg
tccgcccgctattattgccagcgacggccgggacttttccatccctgggctgctaggtcgggtacacgacctccgttttaccc
gcaacgtaatgctgggaagagcattgctgcaaggggccgtagaagaagctctccagcagagtaaaatttcctagggacg
gtaacgggcggtggaaggagagagaagggaagagacgtttctggttccattactccacatttaagttttacccccggagaattt

tacgttgccagcaggtcgttcggagttgcaacggagccagatatttcagagatggctacctgattggacgaggacaccaag
acatttctacaaaaaagatctgatctca

SEQ ID NO: 20 pPICZAGLSII

cgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttgtagccttagac
atgactgttcctcagttcaagttgggcacttacgagaagaccggtcttgctagattctaatcaagaggatgtcagaatgccattt
gcctgagagatgcaggcttcatttttgatacttttttatttgtaacctatatagtataggatttttttgtcattttgtttcttctcgtacga
gcttgctcctgatcagcctatctcgcagctgatgaatatcttgtggtagggtttgggaaaatcattcgagtttgatgtttttcttg
gtatttcccactcctcttcagagtacagaagattaagtgagaccttcgtttgtgcggatcccccacacaccatagcttcaaaatg
tttctactccttttttactcttccagattttctcggactccgcgcatcgccgtaccacttcaaaacacccaagcacagcatactaa
attttccctctttcttcctctagggtgtcgttaattacccgtactaaaggtttggaaaagaaaaaagagaccgcctcgtttcttttc
ttcgtcgaaaaaggcaataaaaatttttatcacgtttctttttcttgaaatttttttttttagttttttctctttcagtgacctccattgatat
ttaagttaataaacggtcttcaatttctcaagtttcagtttcatttttcttgttctattacaacttttttacttcttgttcattagaaagaaa
gcatagcaatctaatctaaggggcggtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgag
gaactaaaccatggccaagttgaccagtgccgttccggtgctcaccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcgagttctgga
ccgaccggctcgggttctcccgggacttcgtggaggacgacttcgccggtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcatca
gcgcggtccaggaccaggtggtgccggacaacaccctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccg
agtggtcggaggtcgtgtccacgaacttccgggacgcctccgggccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtggg
ggcgggagttcgccctgcgcgacccggccggcaactgcgtgcacttcgtggccgaggagcaggactgacacgtccgac
ggcggcccacgggtcccaggcctcggagatccgtccccctttccttgtcgatatcatgtaattagttatgtcacgcttacatt
cacgccctccccccacatccgctctaaccgaaaaggaaggagttagacaacctgaagtctaggtcccta ttatttttttatagt
tatgttagtattaagaacgttatttatatttcaaatttttctttttttctgtacagacgcgtgtacgcatgtaacattatactgaaaacc
ttgcttgagaaggttttgggacgctcgaaggctttaatttgcaagctggagaccaacatgtgagcaaaaggccagcaaaag
gccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgc
tcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcct
gttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtagg
tatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatc
cggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcag

agcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatct
gcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtg
gttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgc
tcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagatcagatctaacatccaaagacgaaaggttgaatgaaacct
ttttgccatccgacatccacaggtccattctcacacataagtgccaaacgcaacaggaggggatacactagcagcagaccg
ttgcaaacgcaggacctccactcctcttctcctcaacacccacttttgccatcgaaaaaccagcccagttattgggcttgattg
gagctcgctcattccaattccttctattaggctactaacaccatgactttattagcctgtctatcctggcccccctggcgaggttc
atgtttgtttatttccgaatgcaacaagctccgcattacacccgaacatcactccagatgagggctttctgagtgtggggtcaa
atagtttcatgttccccaaatggcccaaaactgacagtttaaacgctgtcttggaacctaatatgacaaaagcgtgatctcatcc
aagatgaactaagtttggttcgttgaaatgctaacggccagttggtcaaaaagaaacttccaaaagtcggcataccgtttgtct
tgtttggtattgattgacgaatgctcaaaaataatctcattaatgcttagcgcagtctctctatcgcttctgaaccccggtgcacct
gtgccgaaacgcaaatggggaaacacccgcttttggatgattatgcattgtctccacattgtatgcttccaagattctggtgg
gaatactgctgatagcctaacgttcatgatcaaaatttaactgttctaacccctacttgacagcaatatataaacagaaggaag
ctgccctgtcttaaacctttttttttatcatcattattagcttactttcataattgcgactggttccaattgacaagcttttgattttaacg
acttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattattcgaaacgaggaattcacgtggcccagccggccgtctcg
gatcggtacctcgagatggtccttttgaaatggctcgtatgccaattggtcttctttaccgcttttcgcatgcgtttaccgactat
ctattaaagaagtgtgcgcaatctgggttttgccatagaaacagggtttatgcagaaaatattgccaaatctcatcactgctatt
acaaagtggacgccgagtctattgcacacgatcctttagagaatgtgcttcatgctaccataattaaaactataccaagattgg
agggcgatgatatagccgttcagttcccattctctctctcttttttacaggatcactcagtaaggttcactataaatgagaaagag
agaatgccaaccaacagcagcggtttgttgatctcttcacaacggttcaatgagacctggaagtacgcattcgacaagaaatt
tcaagaggaggcgaacaggaccagtattccacaattccacttccttaagcaaaaacaaactgtgaactcattctggtcgaaa
atatcttcatttttgtcactttcaaactccactgcagacacatttcatcttcgaaacggtgatgtatccgtagaaatctttgctgaac
cttttcaattgaaagtttactggcaaaatgcgctgaaacttattgtaaacgagcaaaatttcctgaacattgaacatcatagaact
aagcaggaaaacttcgcacacgtgctgccagaagaaacaactttcaacatgtttaaggacaatttcttgtattcaaagcatga
ctctatgccttggggcctgaatcggttgcgctagatttctctttcatgggttctactaatgtctacggtataccggaacatgcga
cgtcgctaaggctgatggacacttcaggtggaaaggaaccctacaggcttttcaacgttgatgtctttgagtacaacatcggt
accagccaaccaatgtacggttcgatcccattcatgttttcatcttcgtccacatctatcttttgggtcaatgcagctgacacttg
ggtagacataaagtatgacaccagtaaaaataaaacgatgactcattggatctccgaaaatggtgtcatagatgtagtcatgt

ccctggggccagatattccaactatcattgacaaatttaccgatttgactggtagacccttttaccgcccatttcctctataggg
taccatcaatgtagatggaattataatgatgagatggacgttctcacagtggactctcagatggatgctcatatgattccttacg
attttatttggttggacttggagtatacgaacgacaaaaaatattttacttggaagcagcactcctttcccaatccaaaaaggctg
ttatccaaattaaaaaagttgggtagaaatcttgtcgtactaatcgatcctcatttaaagaaagattatgaaatcagtgacagggt
aattaatgaaaatgtagcagtcaaggatcacaatggaaatgactatgtaggtcattgctggccaggtaattctatatggattgat
accataagcaaatatggccaaaagatttggaagtccttttcgaacggtttatggatctgccggctgatttaactaatttattcatt
tggaatgatatgaacgagccttcgattttcgatggcccagagaccacagctccaaaagatttgattcacgacaattacattga
ggaaagatccgtccataacatatatggtctatcagtgcatgaagctacttacgacgcaataaaatcgatttattcaccatccgat
aagcgtcctttccttctaacaagggcttttttgccggctctcaacgtactgctgccacatggactggtgacaatgtggccaatt
gggattacttaaagatttccattcctatggttctgtcaaacaacattgctggtatgccatttataggagccgacatagctggcttt
gctgaggatcctacacctgaattgattgcacgttggtaccaagcgggcttatggtacccatttttagagcacacgcccatata
gacaccaagagaagagaaccatacttattcaatgaacctttgaagtcgatagtacgtgatattatccaattgagatatttcctgc
tacctaccttatacaccatgtttcataaatcaagtgtcactggatttccgataatgaatccaatgtttattgaacaccctgaatttgc
tgaattgtatcatatcgataaccaatttttactggagtaattcaggtctattagtcaaacctgtcacggagcctggtcaatcagaaa
cggaaatggttttcccacccggtatattctatgaattcgcatctttacactcttttataaacaatggtactgatttgatagaaaaga
atatttctgcaccattggataaaattccattatttattgaaggcggtcacattatcactatgaaagataagtatagaagatcttcaa
tgttaatgaaaaacgatccatatgtaatagttatagcccctgataccgagggacgagccgttggagatctttatgttgatgatg
gagaaacttttggctaccaaagaggtgagtacgtagaaactcagttcattttcgaaaacaataccttaaaaaatgttcgaagtc
atattcccgagaatttgacaggcattcaccacaatactttgaggaataccaatattgaaaaaatcattatcgcaaagaataattt
acaacacaacataacgttgaaagacagtattaaagtcaaaaaaaatggcgaagaaagttcattgccgactagatcgtcatat
gagaatgataataagatcaccattcttaacctatcgcttgacataactgaagattgggaagttatttttgggcc

SEQ ID NO: 21 pPICADE1glsII

aaattcctcgtttcgaataattagttgtttttgatcttctcaagttgtcgttaaaagtcgttaaaatcaaaagcttgtcaattggaac
cagtcgcaattatgaaagtaagctaataatgatgataaaaaaaaaggtttaagacagggcagcttccttctgtttatatattgct
gtcaagtaggggttagaacagttaaattttgatcatgaacgttaggctatcagcagtattcccaccagaatcttggaagcatac
aatgtggagacaatgcataatcatccaaaaagcgggtgtttccccatttgcgtttcggcacaggtgcaccggggttcagaag
cgatagagagactgcgctaagcattaatgagattatttttgagcattcgtcaatcaataccaaacaagacaaacggtatgccg

actttggaagtttctttttgaccaactggccgttagcatttcaacgaaccaaacttagttcatcttggatgagatcacgcttttgtc
atattaggttccaagacagcgtttaaactgtcagttttgggccatttggggaacatgaaactatttgaccccacactcagaaag
ccctcatctggagtgatgttcgggtgtaatgcggagcttgttgcattcggaaataaacaaacatgaacctcgccaggggggc
caggatagacaggctaataaagtcatggtgttagtagcctaatagaaggaattggaatgagcgagctccaatcaagcccaat
aactgggctggtttttcgatggcaaaagtgggtgttgaggagaagaggagtggaggtcctgcgtttgcaacggtctgctgct
agtgtatcccctcctgttgcgtttggcacttatgtgtgagaatggacctgtggatgtcggatggcaaaaaggtttcattcaacct
ttcgtctttggatgttgtcgaccggctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctct
ccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacg
gttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaa
ggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcg
aaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgctt
accggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtag
gtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttga
gtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcg
gtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagcca
gttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcag
cagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactc
acgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatcta
aagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatc
catagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccg
cgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctg
caactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgtt
gttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcga
gttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtg
ttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactca
accaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacata
gcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagtt
cgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggc

aaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatagctccaaggcaac
aaattgactactcagaccgacattcattcgttattgattttaaatcaacgataaacggaatggttacttgaatgatttcacttt atga
tcattgtttactaattacctaaataggattttatatggaattggaagaataagggaaatttcagatgtctgaaaaaggcgaggag
ggtactaatcattcaagcccatttcttgccagtaattgcttcataagcttcaatatacttttctttactcttgatagcaatttctgcatc
catggctacgccctctttgccattcaatccgttggccgtcaaccaatctctgagaaactgcttatcgtaactctcttgcgatttac
ccacttggtaagtcttttgattccaaaatctagaagaatctggagttaaaacttcatctactagtaccaattcattgttttcgtccag
tccaaattcgaatttcgtatcagcaataatgatccccttcaaaagggcgaagtttttgcagcagaatacaactcgaccgccttg
acagcgaccttctcacaaatgtctttacctacaatctcagcagcttgttcaatagagatgttttcatcgtgttcaccctgttcagct
ttcgttgaaggtgtgaaaatcggagttggaaaggcgtcgctctcttgaaggttctcgttttcaaccttgactccatggacagtttt
tgagttcttgtactctttccatgcacttccagtgatgtaacctctgacaatggcttccaaaggtatcagtctgtgctttttactatca
aggatcgtccctctaattgagatttgtatttttcttcagacagttttgatggtagtaaagcaaagacttccttgtcattagaagcaa
ccaaatgattctttatgtagggtgccaaaaaatcaaaccagaaaactgagagctgagtcaaaatctttcccttatcaggaatac
cgtttgtcataatcacatcgtaagcggagatacggtcagttgcgacgaacagcaagttgttctcatcgactgcataaatgtctc
taacctttcctttggcgattaaaggtaggattccgtccagatcagtgttcacaatggacatacttggaaggatacagcaaagtg
tgttggaagcgatgacacatggaaaggaatttttcgagtttcctagagtagtatattggggcggtgaaagttcagatgtttaatg
cttaatactcttatactcttcaaagcgcccaagtgtttctgccaacctgacttttttctgaataatgaatcgttcaagtggagtattta
aaccatgattaagttacgtgatttggcactggataaggtcgaaaaatatccgtattcataaacgattattggtaaaagttacaaa
ataccactaattacggagaagcttagtaacagttatcatctcttggtcgattaacgcttacaatttccattcgccattcaggctgc
gcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagggcctcgaggcacaaacgaacgtctcactta
atcttctgtactctgaagaggagtgggaaataccaagaaaaacatcaaactcgaatgattttcccaaacccctaccacaagat
attcatcagctgcgagataggctgatcaggagcaagctcgtacgagaagaaacaaaatgacaaaaaaaatcctatactatat
aggttacaaataaaaaagtatcaaaaatgaagcctgcatctctcaggcaaatggcattctgacatcctcttgattagaatctag
caagaccggtcttctcgtaagtgcccaacttgaactgaggaacagtcatgtctaaggctacaaactcaatgatgatgatgatg
atggtcgacggcgctattcagatcctcttctgagatgagttttgttcgggcccaaaaataacttcccaatcttcagttatgtcaa
gcgataggttaagaatggtgatcttattatcattctcatatgacgatctagtcggcaatgaactttcttcgccatttttttgacttta
atactgtctttcaacgttatgttgtgttgtaaattattctttgcgataatgatttttcaatattggtattcctcaaagtattgtggtgaat
gcctgtcaaattctcgggaatatgacttcgaacatttttaaggtattgttttcgaaaatgaactgagtttctacgtactcacctctt
ggtagccaaaagtttctccatcatcaacataaagatctccaacggctcgtccctcggtatcaggggctataactattacatatg

gatcgtttttcattaacattgaagatcttctatacttatctttcatagtgataatgtgaccgccttcaataaataatggaattttatcca
atggtgcagaaatattcttttctatcaaatcagtaccattgtttataaaagagtgtaaagatgcgaattcatagaatataccgggt
gggaaaaccatttccgtttctgattgaccaggctccgtgacaggtttgactaatagacctgaattactccagtaaaattggttat
cgatatgatacaattcagcaaattcagggtgttcaataaacattggattcattatcggaaatccagtgacacttgatttatgaaac
atggtgtataaggtaggtagcaggaaatatctcaattggataatatcacgtactatcgacttcaaaggttcattgaataagtatg
gttctcttctcttggtgtctatatgggcgtgtgctctaaaaaatgggtaccataagcccgcttggtaccaacgtgcaatcaattca
ggtgtaggatcctcagcaaagccagctatgtcggctcctataaatggcataccagcaatgttgtttgacagaaccataggaat
ggaaatctttaagtaatcccaattggccacattgtcaccagtccatgtggcagcagtacgttgagagccggcaaaaaaagcc
cttgttagaaggaaaggacgcttatcggatggtgaataaatcgattttattgcgtcgtaagtagcttcatgcactgatagaccat
atatgttatggacggatctttcctcaatgtaattgtcgtgaatcaaatcttttggagctgtggtctctgggccatcgaaaatcgaa
ggctcgttcatatcattccaaatgaataaattagttaaatcagccggcagatccataaaccgttcgaaaaaggacttccaaatc
ttttggccatatttgcttatggtatcaatccatatagaattacctggccagcaatgacctacatagtcatttccattgtgatccttga
ctgctacattttcattaattaccctgtcactgatttcataatctttctttaaatgaggatcgattagtacgacaagatttctacccaac
ttttttaatttggataacagccttttggattgggaaaggagtgctgcttccaagtaaaatatttttttgtcgttcgtatactccaagtc
caaccaaataaaatcgtaaggaatcatatgagcatccatctgagagtccactgtgagaacgtccatctcatcattataattccat
ctacattgatggtaccctatagaggaaatgggcggtaaaaagggtctaccagtcaaatcggtaaatttgtcaatgatagttgg
aatatctggccccagggacatgactacatctatgacaccattttcggagatccaatgagtcatcgttttatttttactggtgtcata
ctttatgtctacccaagtgtcagctgcattgacccaaaagatagatgtggacgaagatgaaaacatgaatgggatcgaaccg
tacattggttggctggtaccgatgttgtactcaaagacatcaacgttgaaaagcctgtagggttcctttccacctgaagtgtcca
tcagccttagcgacgtcgcatgttccggtataccgtagacattagtagaacccatgaaagagaaatctagcgcaaccgattc
aggccccaaaggcatagagtcatgctttgaatacaagaaattgtccttaaacatgttgaaagttgtttcttctggcagcacgtgt
gcgaagttttcctgcttagttctatgatgttcaatgttcaggaaattttgctcgtttacaataagtttcagcgcattttgccagtaaa
ctttcaattgaaaaggttcagcaaagatttctacggatacatcaccgtttcgaagatgaaatgtgtctgcagtggagtttgaaag
tgacaaaaatgaagatatttcgaccagaatgagttcacagtttgtttttgcttaaggaagtggaattgtggaatactggtcctgt
tcgcctcctcttgaaatttcttgtcgaatgcgtacttccaggtctcattgaaccgttgtgaagagatcaacaaaccgctgctgttg
gttggcattctctctttctcatttatagtgaaccttactgagtgatcctgtaaaaaagagagagagaatgggaactgaacggcta
tatcatcgccctccaatcttggtatagttttaattatggtagcatgaagcacattctctaaaggatcgtgtgcaatagactcggcg
tccactttgtaatagcagtgatgagatttggcaatattttctgcataaaccctgtttctatggcaaaacccagattgcgcacactt

ctttaatagatagtcggtaaacgcatgcgaaaaagcggtaaagaagaccaattggcatacgagccatttcaaaaggaccatc
tcg

SEQ ID NO: 22 pYPT1ZAGLSII

cgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttgtagccttagac
atgactgttcctcagttcaagttgggcacttacgagaagaccggtcttgctagattctaatcaagaggatgtcagaatgccattt
gcctgagagatgcaggcttcatttttgatacttttttatttgtaacctatatagtataggatttttttgtcattttgtttcttctcgtacga
gcttgctcctgatcagcctatctcgcagctgatgaatatcttgtggtaggggtttgggaaaatcattcgagtttgatgtttttcttg
gtatttcccactcctcttcagagtacagaagattaagtgagaccttcgtttgtgcggatcccccacacaccatagcttcaaaatg
tttctactccttttttactcttccagattttctcggactccgcgcatcgccgtaccacttcaaaacacccaagcacagcatactaa
attttccctctttcttcctctagggtgtcgttaattacccgtactaaaggtttggaaaagaaaaaagagaccgcctcgtttcttttttc
ttcgtcgaaaaaggcaataaaaatttttatcacgtttctttttcttgaaatttttttttttagttttttctctttcagtgacctccattgatat
ttaagttaataaacggtcttcaatttctcaagtttcagtttcatttttcttgttctattacaacttttttacttcttgttcattagaaagaaa
gcatagcaatctaatctaaggggcggtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgag
gaactaaaccatggccaagttgaccagtgccgttccggtgctcaccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcgagttctgga
ccgaccggctcgggttctcccgggacttcgtggaggacgacttcgccggtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcatca
gcgcggtccaggaccaggtggtgccggacaacaccctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccg
agtggtcggaggtcgtgtccacgaacttccgggacgcctccgggccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtggg
ggcgggagttcgccctgcgcgacccggccggcaactgcgtgcacttcgtggccgaggagcaggactgacacgtccgac
ggcggcccacgggtcccaggcctcggagatccgtcccccttttccttttgtcgatatcatgtaattagttatgtcacgcttacatt
cacgccctcccccccacatccgctctaaccgaaaaggaaggagttagacaacctgaagtctaggtccctatttatttttttatagt
tatgttagtattaagaacgttatttatatttcaaatttttctttttttttctgtacagacgcgtgtacgcatgtaacattatactgaaaacc
ttgcttgagaaggttttgggacgctcgaaggctttaatttgcaagctggagaccaacatgtgagcaaaaggccagcaaaag
gccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgc
tcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcct
gttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtagg
tatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatc
cggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcag

agcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatct
gcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtg
gttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgc
tcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagatcagatctatgatgagtcacaatctgcttccacagacgagt
acaaggacaggcaaaaggaattggaagaagttgctaacccaataatgagcaagttctatggagctgctggtggagctcctg
gtggagctcctggtggcttccctggaggtttccctggcggagctggcgcagctggcggtgccccaggtggtgctgccccca
ggcggagacagcggaccaaccgtggaagaagtcgattaagcaattcaacggataaattctggttaatatatataacgtgaat
aggaaattaaggaaattttggatctaataatgtgctgtatgccgacatcgggcatcgtagattgtatagtatcgctgacactata
ataagccagccaaaaccctaaaccagttgccctccactaattagtgtactacccaatcttgcctcttcgggtgtcttttataag
gacagattcacaagctcttgttgcccaatacacacatacacacagagataatagcagtcgaattcacgtggcccagccggc
cgtctcggatcggtacctcgagatggtccttttgaaatggctcgtatgccaattggtcttctttaccgcttttcgcatgcgtttac
cgactatctattaaagaagtgtgcgcaatctgggttttgccatagaaacagggtttatgcagaaaatattgccaaatctcatcac
tgctattacaaagtggacgccgagtctattgcacacgatcctttagagaatgtgcttcatgctaccataattaaaactataccaa
gattggagggcgatgatatagccgttcagttcccattctctctctcttttttacaggatcactcagtaaggttcactataaatgag
aaagagagaatgccaaccaacagcagcggtttgttgatctcttcacaacggttcaatgagacctggaagtacgcattcgaca
agaaatttcaagaggaggcgaacaggaccagtattccacaattccacttccttaagcaaaaacaaactgtgaactcattctgg
tcgaaaatatcttcatttttgtcactttcaaactccactgcagacacatttcatcttcgaaacggtgatgtatccgtagaaatctttg
ctgaaccttttcaattgaaagtttactggcaaaatgcgctgaaacttattgtaaacgagcaaaatttcctgaacattgaacatcat
agaactaagcaggaaaacttcgcacacgtgctgccagaagaaacaactttcaacatgtttaaggacaatttcttgtattcaaa
gcatgactctatgccttggggcctgaatcggttgcgctagatttctctttcatgggttctactaatgtctacggtataccggaac
atgcgacgtcgctaaggctgatggacacttcaggtggaaaggaaccctacaggcttttcaacgttgatgtctttgagtacaac
atcggtaccagccaaccaatgtacggttcgatcccattcatgttttcatcttcgtccacatctatctttgggtcaatgcagctga
cacttgggtagacataaagtatgacaccagtaaaaataaaacgatgactcattggatctccgaaaatggtgtcatagatgtag
tcatgtccctggggccagatattccaactatcattgacaaatttaccgatttgactggtagacccttttaccgcccatttcctcta
tagggtaccatcaatgtagatggaattataatgatgagatggacgttctcacagtggactctcagatggatgctcatatgattcc
ttacgattttatttggttggacttggagtatacgaacgacaaaaaatattttacttggaagcagcactcctttcccaatccaaaaa
ggctgttatccaaattaaaaaagttgggtagaaatcttgtcgtactaatcgatcctcatttaaagaaagattatgaaatcagtgac
agggtaattaatgaaaatgtagcagtcaaggatcacaatggaaatgactatgtaggtcattgctggccaggtaatctatatgg

attgataccataagcaaatatggccaaaagatttggaagtccttttcgaacggtttatggatctgccggctgatttaactaattta
ttcatttggaatgatatgaacgagccttcgattttcgatggcccagagaccacagctccaaaagatttgattcacgacaattac
attgaggaaagatccgtccataacatatatggtctatcagtgcatgaagctacttacgacgcaataaaatcgatttattcaccat
ccgataagcgtcctttccttctaacaagggcttttttgccggctctcaacgtactgctgccacatggactggtgacaatgtggc
caattgggattacttaaagatttccattcctatggttctgtcaaacaacattgctggtatgccatttataggagccgacatagctg
gctttgctgaggatcctacacctgaattgattgcacgttggtaccaagcgggcttatggtacccatttttagagcacacgccc
atatagacaccaagagaagagaaccatacttattcaatgaaccttgaagtcgatagtacgtgatattatccaattgagatattt
cctgctacctaccttatacaccatgtttcataaatcaagtgtcactggatttccgataatgaatccaatgtttattgaacaccctga
atttgctgaattgtatcatatcgataaccaatttactggagtaattcaggtctattagtcaaacctgtcacggagcctggtcaatc
agaaacggaaatggttttcccacccggtatattctatgaattcgcatctttacactcttttataaacaatggtactgatttgataga
aaagaatatttctgcaccattggataaaattccattatttattgaaggcggtcacattatcactatgaaagataagtatagaagat
cttcaatgttaatgaaaaacgatccatatgtaatagttatagcccctgataccgagggacgagccgttggagatctttatgttga
tgatggagaaacttttggctaccaaagaggtgagtacgtagaaactcagttcattttcgaaaacaatacctttaaaaaatgttcg
aagtcatattcccgagaatttgacaggcattcaccacaatactttgaggaataccaatattgaaaaaatcattatcgcaaagaat
aatttacaacacaacataacgttgaaagacagtattaaagtcaaaaaaaatggcgaagaaagttcattgccgactagatcgtc
atatgagaatgataataagatcaccattcttaacctatcgcttgacataactgaagattgggaagttatttttgggcc

SEQ ID NO: 23 pYPT1ADE1gIsII

gtcgaccggctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctca
ctgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatc
aggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctgg
cgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacagga
ctataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtcc
gcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagc
tgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaag
acacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttctt
gaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaa
gagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcaga

aaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatttg
gtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaa
acttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactc
cccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctca
ccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctcc
atccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacag
gcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccca
tgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttat
ggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgag
aatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagt
gctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcg
tgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaa
agggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatagctccaaggcaacaaattgactactcaga
ccgacattcattcgttattgattttaaatcaacgataaacggaatggttacttgaatgatttcactttatgatcattgtttactaattac
ctaaataggatttttatatggaattggaagaataagggaaatttcagatgtctgaaaaaggcgaggagggtactaatcattcaa
gcccatttcttgccagtaattgcttcataagcttcaatatacttttctttactcttgatagcaatttctgcatccatggctacgccctct
ttgccattcaatccgttggccgtcaaccaatctctgagaaactgcttatcgtaactctcttgcgatttacccacttggtaagtctttt
gattccaaaatctagaagaatctggagttaaaacttcatctactagtaccaattcattgttttcgtccagtccaaattcgaatttcgt
atcagcaataatgatccccttcaaaagggcgaagtttttgcagcagaatacaactcgaccgccttgacagcgaccttctcac
aaatgtctttacctacaatctcagcagcttgttcaatagagatgttttcatcgtgttcaccctgttcagctttcgttgaaggtgtgaa
aatcggagttggaaaggcgtcgctctcttgaaggttctcgttttcaaccttgactccatggacagtttttgagttcttgtactctttc
catgcacttccagtgatgtaacctctgacaatggcttccaaaggtatcagtctgtgcttttttactatcaaggatcgtccctctaat
tgagatttgtatttttcttcagacagttttgatggtagtaaagcaaagacttccttgtcattagaagcaaccaaatgattctttatgta
gggtgccaaaaaatcaaaccagaaaactgagagctgagtcaaaatctttcccttatcaggaataccgtttgtcataatcacatc
gtaagcggagatacggtcagttgcgacgaacagcaagttgttctcatcgactgcataaatgtctctaacctttccttggcgatt
aaaggtaggattccgtccagatcagtgttcacaatggacatacttggaaggatacagcaaagtgtgttggaagcgatgacac
atggaaaggaatttttcgagtttcctagagtagtatattggggcggtgaaagttcagatgtttaatgcttaatactcttatactcttc
aaagcgcccaagtgtttctgccaacctgacttttttctgaataatgaatcgttcaagtggagtatttaaaccatgattaagttacgt

gatttggcactggataaggtcgaaaaatatccgtattcataaacgattattggtaaaagttacaaaataccactaattacggag
aagcttagtaacagttatcatctcttggtcgattaacgcttacaatttccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaaggg
cgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagggcctcgaggcacaaacgaacgtctcacttaatcttctgtactctgaaga
ggagtgggaaataccaagaaaaacatcaaactcgaatgattttcccaaacccctaccacaagatattcatcagctgcgagat
aggctgatcaggagcaagctcgtacgagaagaaacaaaatgacaaaaaaaatcctatactatataggttacaaataaaaaa
gtatcaaaaatgaagcctgcatctctcaggcaaatggcattctgacatcctcttgattagaatctagcaagaccggtcttctcgt
aagtgcccaacttgaactgaggaacagtcatgtctaaggctacaaactcaatgatgatgatgatgatggtcgacggcgctatt
cagatcctcttctgagatgagttttgttcgggcccaaaaataacttcccaatcttcagttatgtcaagcgataggttaagaatgg
tgatcttattatcattctcatatgacgatctagtcggcaatgaactttcttcgccatttttttttgactttaatactgtctttcaacgttatg
ttgtgttgtaaattattctttgcgataatgatttttttcaatattggtattcctcaaagtattgtggtgaatgcctgtcaaattctcgggga
atatgacttcgaacatttttttaaggtattgttttcgaaaatgaactgagtttctacgtactcacctctttggtagccaaaagtttctcc
atcatcaacataaagatctccaacggctcgtccctcggtatcaggggctataactattacatatggatcgtttttcattaacattg
aagatcttctatacttatctttcatagtgataatgtgaccgccttcaataaataatggaattttatccaatggtgcagaaatatcttt
tctatcaaatcagtaccattgtttataaaagagtgtaaagatgcgaattcatagaatataccgggtgggaaaaccatttccgtttc
tgattgaccaggctccgtgacaggtttgactaatagacctgaattactccagtaaaattggttatcgatatgatacaattcagca
aattcagggtgttcaataaacattggattcattatcggaaatccagtgacacttgatttatgaaacatggtgtataaggtaggta
gcaggaaatatctcaattggataatatcacgtactatcgacttcaaaggttcattgaataagtatggttctcttcttggtgtctat
atgggcgtgtgctctaaaaaatgggtaccataagcccgcttggtaccaacgtgcaatcaattcaggtgtaggatcctcagca
aagccagctatgtcggctcctataaatggcataccagcaatgttgtttgacagaaccataggaatggaaatctttaagtaatcc
caattggccacattgtcaccagtccatgtggcagcagtacgttgagagccggcaaaaaaagcccttgttagaaggaaagga
cgcttatcggatggtgaataaatcgattttattgcgtcgtaagtagcttcatgcactgatagaccatatatgttatggacggatctt
tcctcaatgtaattgtcgtgaatcaaatcttttggagctgtggtctctgggccatcgaaaatcgaaggctcgttcatatcattcca
aatgaataaattagttaaatcagccggcagatccataaaccgttcgaaaaaggacttccaaatcttttggccatatttgcttatg
gtatcaatccatatagaattacctggccagcaatgacctacatagtcatttccattgtgatccttgactgctacattttcattaatta
ccctgtcactgatttcataatctttctttaaatgaggatcgattagtacgacaagatttctacccaacttttttaatttggataacagc
ctttttggattgggaaaggagtgctgcttccaagtaaaatatttttgtcgttcgtatactccaagtccaaccaaataaaatcgtaa
ggaatcatatgagcatccatctgagagtccactgtgagaacgtccatctcatcattataattccatctacattgatggtaccctat
agaggaaatgggcggtaaaaagggtctaccagtcaaatcggtaaatttgtcaatgatagttggaatatctggccccagggac

atgactacatctatgacaccattttcggagatccaatgagtcatcgttttatttttactggtgtcatactttatgtctacccaagtgtc
agctgcattgacccaaaagatagatgtggacgaagatgaaaacatgaatgggatcgaaccgtacattggttggctggtacc
gatgttgtactcaaagacatcaacgttgaaaagcctgtagggttcctttccacctgaagtgtccatcagccttagcgacgtcgc
atgttccggtataccgtagacattagtagaacccatgaaagagaaatctagcgcaaccgattcaggccccaaaggcataga
gtcatgctttgaatacaagaaattgtccttaaacatgttgaaagttgtttcttctggcagcacgtgtgcgaagttttcctgcttagtt
ctatgatgttcaatgttcaggaaattttgctcgtttacaataagtttcagcgcattttgccagtaaactttcaattgaaaaggttcag
caaagatttctacggatacatcaccgtttcgaagatgaaatgtgtctgcagtggagtttgaaagtgacaaaaatgaagatatttt
cgaccagaatgagttcacagtttgtttttgcttaaggaagtggaattgtggaatactggtcctgttcgcctcctcttgaaatttctt
gtcgaatgcgtacttccaggtctcattgaaccgttgtgaagagatcaacaaaccgctgctgttggttggcattctctctttctcat
ttatagtgaaccttactgagtgatcctgtaaaaaagagagagagaatgggaactgaacggctatatcatcgccctccaatctt
ggtatagttttaattatggtagcatgaagcacattctctaaaggatcgtgtgcaatagactcggcgtccactttgtaatagcagt
gatgagatttggcaatattttctgcataaaccctgtttctatggcaaaacccagattgcgcacacttctttaatagatagtcggta
aacgcatgcgaaaaagcggtaaagaagaccaattggcatacgagccatttcaaaaggaccatctcgaggtaccgatccga
gacggccggctgggccacgtgaattcgactgctattatctctgtgtgtatgtgtattgggcaacaagagcttgtgaatctgt
ccttataaaagacacccgaagaggcaagattgggtagtacactaattagtggagggcaactggtttaggggttttggctggc
ttattatagtgtcagcgatactatacaatctacgatgcccgatgtcggcatacagcacattattagatccaaaatttccttaatttc
ctattcacgttatatatattaaccagaatttatccgttgaattgcttaatcgacttcttccacggttggtccgctgtctccgcctggg
gcagcaccacctggggcaccgccagctgcgccagctccgccagggaaacctccagggaagccaccaggagctccacc
aggagctccaccagcagctccatagaacttgctcattattgggttagcaacttcttccaattccttttgcctgtccttgtactcgtc
tgtggaagcagattgtgactcatcatagatctgatctcat

SEQ ID NO: 24 pGAPZAglsIIHDEL

tcgagatggtccttttgaaatggctcgtatgccaattggtcttctttaccgcttttcgcatgcgtttaccgactatctattaaagaa
gtgtgcgcaatctgggttttgccatagaaacagggtttatgcagaaaatattgccaaatctcatcactgctattacaaagtgga
cgccgagtctattgcacacgatcctttagagaatgtgcttcatgctaccataattaaaactataccaagattggagggcgatga
tatagccgttcagttcccattctctctctttttacaggatcactcagtaaggttcactataaatgagaaagagagaatgccaa
ccaacagcagcggtttgttgatctcttcacaacggttcaatgagacctggaagtacgcattcgacaagaaatttcaagagga
ggcgaacaggaccagtattccacaattccacttccttaagcaaaaacaaactgtgaactcattctggtcgaaaatatcttcattt

ttgtcactttcaaactccactgcagacacatttcatcttcgaaacggtgatgtatccgtagaaatctttgctgaaccttttcaattg
aaagtttactggcaaaatgcgctgaaacttattgtaaacgagcaaaatttcctgaacattgaacatcatagaactaagcagga
aaacttcgcacacgtgctgccagaagaaacaactttcaacatgtttaaggacaatttcttgtattcaaagcatgactctatgcctt
tggggcctgaatcggttgcgctagatttctctttcatgggttctactaatgtctacggtataccggaacatgcgacgtcgctaag
gctgatggacacttcaggtggaaaggaaccctacaggcttttcaacgttgatgtctttgagtacaacatcggtaccagccaac
caatgtacggttcgatcccattcatgttttcatcttcgtccacatctatcttttgggtcaatgcagctgacacttgggtagacataa
agtatgacaccagtaaaaataaaacgatgactcattggatctccgaaaatggtgtcatagatgtagtcatgtccctggggcca
gatattccaactatcattgacaaatttaccgatttgactggtagacccttttaccgcccatttcctctatagggtaccatcaatgta
gatggaattataatgatgagatggacgttctcacagtggactctcagatggatgctcatatgattccttacgattttatttggttgg
acttggagtatacgaacgacaaaaaatattttacttggaagcagcactcctttcccaatccaaaaaggctgttatccaaattaaa
aaagttgggtagaaatcttgtcgtactaatcgatcctcatttaaagaaagattatgaaatcagtgacagggtaattaatgaaaat
gtagcagtcaaggatcacaatggaaatgactatgtaggtcattgctggccaggtaattctatatggattgataccataagcaaa
tatggccaaaagatttggaagtccttttcgaacggtttatggatctgccggctgatttaactaatttattcatttggaatgatatga
acgagccttcgattttcgatggcccagagaccacagctccaaaagatttgattcacgacaattacattgaggaaagatccgtc
cataacatatatggtctatcagtgcatgaagctacttacgacgcaataaaatcgatttattcaccatccgataagcgtcctttcct
tctaacaagggctttttttgccggctctcaacgtactgctgccacatggactggtgacaatgtggccaattgggattacttaaag
atttccattcctatggttctgtcaaacaacattgctggtatgccatttataggagccgacatagctggctttgctgaggatcctac
acctgaattgattgcacgttggtaccaagcgggcttatggtacccatttttttagagcacacgcccatatagacaccaagagaa
gagaaccatacttattcaatgaacctttgaagtcgatagtacgtgatattatccaattgagatatttcctgctacctaccttataca
ccatgtttcataaatcaagtgtcactggatttccgataatgaatccaatgtttattgaacaccctgaatttgctgaattgtatcatat
cgataaccaatttttactggagtaattcaggtctattagtcaaacctgtcacggagcctggtcaatcagaaacggaaatggttttc
ccacccggtatattctatgaattcgcatctttacactcttttataaacaatggtactgatttgatagaaaagaatatttctgcaccat
tggataaaattccattatttattgaaggcggtcacattatcactatgaaagataagtatagaagatcttcaatgttaatgaaaaac
gatccatatgtaatagttatagcccctgataccgagggacgagccgttggagatctttatgttgatgatggagaaacttttggct
accaaagaggtgagtacgtagaaactcagttcattttcgaaaacaatacctaaaaaatgttcgaagtcatattcccgagaattt
gacaggcattcaccacaatactttgaggaataccaatattgaaaaaatcattatcgcaaagaataatttacaacacaacataac
gttgaaagacagtattaaagtcaaaaaaaatggcgaagaaagttcattgccgactagatcgtcatatgagaatgataataaga
tcaccattcttaacctatcgcttgacataactgaagattgggaagttatttttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagagg

atctgaatagcgccgtcgaccacgacgaactgtgagttttagccttagacatgactgttcctcagttcaagttgggcacttacg
agaagaccggtcttgctagattctaatcaagaggatgtcagaatgccatttgcctgagagatgcaggcttcatttttgatacttt
ttatttgtaacctatatagtataggatttttttgtcattttgtttcttctcgtacgagcttgctcctgatcagcctatctcgcagctgat
gaatatcttgtggtaggggtttgggaaaatcattcgagtttgatgtttttcttggtatttcccactcctcttcagagtacagaagatt
aagtgagaccttcgtttgtgcggatcccccacacaccatagcttcaaaatgtttctactccttttttactcttccagattttctcgga
ctccgcgcatcgccgtaccacttcaaaacacccaagcacagcatactaaatttccctctttcttcctctagggtgtcgttaatta
cccgtactaaaggtttggaaaagaaaaaagagaccgcctcgtttcttttttcttcgtcgaaaaaggcaataaaaatttttatcacg
tttctttttcttgaaatttttttttttagttttttttctctttcagtgacctccattgatatttaagttaataaacggtcttcaatttctcaagtttc
agtttcatttttcttgttctattacaacttttttttacttcttgttcattagaaagaaagcatagcaatctaatctaagggcggtgttgac
aattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatggccaagttgaccagtgccgt
tccggtgctcaccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcgagttctggaccgaccggctcgggttctcccgggacttcgtgg
aggacgacttcgccggtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcatcagcgcggtccaggaccaggtggtgccggacaa
caccctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccgagtggtcggaggtcgtgtccacgaacttccgg
gacgcctccgggccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtgggggcgggagttcgccctgcgcgacccggccg
gcaactgcgtgcacttcgtggccgaggagcaggactgacacgtccgacggcggcccacgggtcccaggcctcggagat
ccgtccccctttccttgtcgatatcatgtaattagttatgtcacgcttacattcacgccctcccccacatccgctctaaccgaa
aaggaaggagttagacaacctgaagtctaggtcccctatttatttttttatagttatgttagtattaagaacgttatttatatttcaaatt
tttctttttttttctgtacagacgcgtgtacgcatgtaacattatactgaaaaccttgcttgagaaggttttgggacgctcgaaggct
ttaatttgcaagctggagaccaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctgg
cgtttttccataggctccgccccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacagga
ctataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtcc
gcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagc
tgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaag
acacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttctt
gaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaa
gagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcaga
aaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttg
gtcatgcatgagatcagatctttttgtagaaatgtcttggtgtcctcgtccaatcaggtagccatctctgaaatatctggctccgt

tgcaactccgaacgacctgctggcaacgtaaaattctccggggtaaaacttaaatgtggagtaatggaaccagaaacgtctc
ttcccttctctctccttccaccgcccgttaccgtccctaggaaattttactctgctggagagcttcttctacggccccctgcagc
aatgctcttcccagcattacgttgcgggtaaaacggaggtcgtgtacccgacctagcagcccagggatggaaaagtcccg
gccgtcgctggcaataatagcgggcggacgcatgtcatgagattattggaaaccaccagaatcgaatataaaaggcgaac
accttcccaattttggtttctcctgacccaaagactttaaatttaatttatttgtccctatttcaatcaattgaacaactatttcgaaa
cgaggaattcacgtggcccagccggccgtctcggatcggtacc

SEQ ID NO: 25 pGAPADE1glsIIHDEL

cgtactcacctctttggtagccaaaagtttctccatcatcaacataaagatctccaacggctcgtccctcggtatcaggggctat
aactattacatatggatcgtttttcattaacattgaagatcttctatacttatctttcatagtgataatgtgaccgccttcaataaataa
tggaattttatccaatggtgcagaaatattcttttctatcaaatcagtaccattgtttataaaagagtgtaaagatgcgaattcatag
aatataccgggtgggaaaaccatttccgtttctgattgaccaggctccgtgacaggtttgactaatagacctgaattactccag
taaaattggttatcgatatgatacaattcagcaaattcagggtgttcaataaacattggattcattatcggaaatccagtgacact
tgatttatgaaacatggtgtataaggtaggtagcaggaaatatctcaattggataatatcacgtactatcgacttcaaaggttcat
tgaataagtatggttctcttctcttggtgtctatatgggcgtgtgctctaaaaaatgggtaccataagcccgcttggtaccaacgt
gcaatcaattcaggtgtaggatcctcagcaaagccagctatgtcggctcctataaatggcataccagcaatgttgtttgacag
aaccataggaatggaaatctttaagtaatcccaattggccacattgtcaccagtccatgtggcagcagtacgttgagagccg
gcaaaaaaagcccttgttagaaggaaaggacgcttatcggatggtgaataaatcgattttattgcgtcgtaagtagcttcatgc
actgatagaccatatatgttatggacggatctttcctcaatgtaattgtcgtgaatcaaatcttttggagctgtggtctctgggcca
tcgaaaatcgaaggctcgttcatatcattccaaatgaataaattagttaaatcagccggcagatccataaaccgttcgaaaaag
gacttccaaatcttttggccatatttgcttatggtatcaatccatatagaattacctggccagcaatgacctacatagtcatttccat
tgtgatccttgactgctacattttcattaattaccctgtcactgatttcataatctttctttaaatgaggatcgattagtacgacaaga
tttctacccaacttttttaatttggataacagccttttggattgggaaaggagtgctgcttccaagtaaaatatttttttgtcgttcgta
tactccaagtccaaccaaataaaatcgtaaggaatcatatgagcatccatctgagagtccactgtgagaacgtccatctcatc
attataattccatctacattgatggtaccctatagaggaaatgggcggtaaaaagggtctaccagtcaaatcggtaaatttgtca
atgatagttggaatatctggccccagggacatgactacatctatgacaccattttcggagatccaatgagtcatcgttttatttttta
ctggtgtcatactttatgtctacccaagtgtcagctgcattgacccaaaagatagatgtggacgaagatgaaaacatgaatgg
gatcgaaccgtacattggttggctggtaccgatgttgtactcaaagacatcaacgttgaaaagcctgtagggttcctttccacc

tgaagtgtccatcagccttagcgacgtcgcatgttccggtataccgtagacattagtagaacccatgaaagagaaatctagc
gcaaccgattcaggccccaaaggcatagagtcatgctttgaatacaagaaattgtccttaaacatgttgaaagttgtttcttctg
gcagcacgtgtgcgaagttttcctgcttagttctatgatgttcaatgttcaggaaattttgctcgtttacaataagtttcagcgcatt
ttgccagtaaactttcaattgaaaaggttcagcaaagatttctacggatacatcaccgtttcgaagatgaaatgtgtctgcagtg
gagtttgaaagtgacaaaaatgaagatattttcgaccagaatgagttcacagtttgtttttgcttaaggaagtggaattgtggaat
actggtcctgttcgcctcctcttgaaatttcttgtcgaatgcgtacttccaggtctcattgaaccgttgtgaagagatcaacaaac
cgctgctgttggttggcattctctctttctcatttatagtgaaccttactgagtgatcctgtaaaaaagagagagagaatgggaa
ctgaacggctatatcatcgccctccaatcttggtatagttttaattatggtagcatgaagcacattctctaaaggatcgtgtgcaa
tagactcggcgtccactttgtaatagcagtgatgagatttggcaatattttctgcataaaccctgtttctatggcaaaacccagat
tgcgcacacttctttaatagatagtcggtaaacgcatgcgaaaaagcggtaaagaagaccaattggcatacgagccatttca
aaaggaccatctcgaggtaccgatccgagacggccggctgggccacgtgaattcctcgtttcgaaatagttgttcaattgatt
gaaatagggacaaataaattaaatttaaagtctttgggtcaggagaaaccaaaattgggaaaggtgttcgccttttatattcgat
tctggtggtttccaataatctcatgacatgcgtccgcccgctattattgccagcgacggccgggacttttccatccctgggctg
ctaggtcgggtacacgacctccgttttacccgcaacgtaatgctgggaagagcattgctgcaaggggccgtagaagaag
ctctccagcagagtaaaatttcctagggacggtaacgggcggtggaaggagagagaagggaagagacgtttctggttcca
ttactccacatttaagttttaccccggagaattttacgttgccagcaggtcgttcggagttgcaacggagccagatatttcagag
atggctacctgattggacgaggacaccaagacatttctacaaaaaagatctgatctcatcgaccggctgcattaatgaatcgg
ccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcgg
ctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacat
gtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttttccataggctccgccccctg
acgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccct
ggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggc
gctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgt
tcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagca
gccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctac
actagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaa
acaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctt
tgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatctt

cacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgctta
atcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatac
gggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataa
accagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccggg
aagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtt
tggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctc
cttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactg
tcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagtt
gctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcg
gggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatct
tttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaa
atgttgaatactcatactcttcctttttcaatagctccaaggcaacaaattgactactcagaccgacattcattcgttattgattttaa
atcaacgataaacggaatggttacttgaatgatttcactttatgatcattgtttactaattacctaaataggattttatatggaattgg
aagaataagggaaatttcagatgtctgaaaaaggcgaggagggtactaatcattcaagcccatttcttgccagtaattgcttca
taagcttcaatatacttttctttactcttgatagcaatttctgcatccatggctacgccctctttgccattcaatccgttggccgtcaa
ccaatctctgagaaactgcttatcgtaactctcttgcgatttacccacttggtaagtcttttgattccaaaatctagaagaatctgg
agttaaaacttcatctactagtaccaattcattgttttcgtccagtccaaattcgaatttcgtatcagcaataatgatccccttcaaa
agggcgaagttttttgcagcagaatacaactcgaccgccttgacagcgaccttctcacaaatgtctttacctacaatctcagca
gcttgttcaatagagatgttttcatcgtgttcaccctgttcagctttcgttgaaggtgtgaaaatcggagttggaaaggcgtcgct
ctcttgaaggttctcgttttcaaccttgactccatggacagtttttgagttcttgtactctttccatgcacttccagtgatgtaacctc
tgacaatggcttccaaaggtatcagtctgtgcttttttactatcaaggatcgtccctctaattgagatttgtatttttcttcagacagt
tttgatggtagtaaagcaaagacttccttgtcattagaagcaaccaaatgattctttatgtagggtgccaaaaaatcaaaccag
aaaactgagagctgagtcaaaatctttcccttatcaggaataccgtttgtcataatcacatcgtaagcggagatacggtcagtt
gcgacgaacagcaagttgttctcatcgactgcataaatgtctctaaccttttccttttggcgattaaaggtaggattccgtccagat
cagtgttcacaatggacatacttggaaggatacagcaaagtgtgttggaagcgatgacacatggaaaggaatttttcgagttt
cctagagtagtatattggggcggtgaaagttcagatgtttaatgcttaatactcttatactcttcaaagcgcccaagtgtttctgc
caacctgactttttctgaataatgaatcgttcaagtggagtatttaaaccatgattaagttacgtgatttggcactggataaggtc
gaaaaatatccgtattcataaacgattattggtaaaagttacaaaataccactaattacggagaagcttagtaacagttatcatct

cttggtcgattaacgcttacaatttccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcg
ctattacgccagggcctcgaggcacaaacgaacgtctcacttaatcttctgtactctgaagaggagtgggaaataccaagaa
aaacatcaaactcgaatgattttcccaaacccctaccacaagatattcatcagctgcgagataggctgatcaggagcaagct
cgtacgagaagaaacaaaatgacaaaaaaaatcctatactatataggttacaaataaaaaagtatcaaaaatgaagcctgca
tctctcaggcaaatggcattctgacatcctcttgattagaatctagcaagaccggtcttctcgtaagtgcccaacttgaactgag
gaacagtcatgtctaaggctaaaactcacagttcgtcgtggtcgacggcgctattcagatcctcttctgagatgagttttgttc
gggcccaaaaataacttcccaatcttcagttatgtcaagcgataggttaagaatggtgatcttattatcattctcatatgacgatc
tagtcggcaatgaactttcttcgccatttttttttgactttaatactgtctttcaacgttatgttgtgttgtaaattattctttgcgataatg
atttttttcaatattggtattcctcaaagtattgtggtgaatgcctgtcaaattctcgggaatatgacttcgaacatttttttaaggtattg
ttttcgaaaatgaactgagtttcta

SEQ ID NO: 26
GACGAGATCTTTTTTTCAGACCATATGACCGG

SEQ ID NO: 27
GCGGAATTCTTTTCTCAGTTGATTTGTTTGT

SEQ ID NO: 28
GCG GGT CGA CCA CGA CGA ACT GTG AGT TTT AGC CTT AGA CAT GAC

SEQ ID NO: 29
CAG GAG CAAA GCT CGT ACG AG

SEQ ID NO: 30 ScKre2 cDNA
atggccctctttctcagtaagagacigttgagatttaccgtcattgcaggtgcggttattgttctcctcctaacattgaattccaac
agtagaactcagcaatatattccgagttccatctccgctgcatttgattttacctcaggatctatatcccctgaacaacaagtcat
ctctgaggaaaatgatgctaaaaaattagagcaaagtgctctgaattcagaggcaagcgaagactccgaagccatggatga
agaatccaaggctctgaaagctgccgctgaaaaggcagatgccccgatcgacactaaaacaaccatggattatatcactcc
atcttttgctaacaaagctggtaagccaaaagcttgttacgtcactttggtgagaaacaaggagttgaaaggtttgctaagctc
cattaaatatgtggaaaacaaaattaacaagaaattcccatatccttgggttttcctaaacgatgaaccttttactgaagaattca

aggaagcagtcaccaaagctgtttcttccgaagttaagtttggtattttgcccaaggaacattggtcatatcctgaatggattaat
caaaccaaggctgctgaaattcgtgcagatgctgccaccaaatacatatacggtggctccgaatcttatagacacatgtgtcg
ttaccaatctgggtttttctggagacatgaattattagaagagtacgattggtactggcgtgtggaaccagacatcaagttatac
tgtgatattaattacgacgtttttaagtggatgcaagaaaacgaaaaagtttacggctttaccgtttctattcatgaatatgaagtg
acgatcccaacactatggcaaacgtccatggatttcatcaaaaagaaccccgaatacttagatgaaaacaacctgatgagttt
tctttcgaacgataatggtaaaacatacaatctgtgccatttctggtcaaactttgaaattgcaaacttgaatttgtggaggtcac
cagcctacagagagtattttgacactttggatcatcaaggtggatttttctacgaaagatggggcgatgctcccgttcattctatt
gctgctgctttgtttttgccaaaggataaaatccattatttttcagacattggttaccatcatccaccttatgataactgcccattgg
acaaggaggtctataacagtaacaactgtgaatgtgaccaaggtaatgatttcactttccaaggttactcttgtggtaaggaat
attatgatgctcaagggttggtaaagccaaaaaactggaaaaaattccgtgagtagaaatcttggaacatactgtttctttgtttt
gactttatactttctatttatatttttatttttataactggttaagtacacataggactgcgtatcaaacatataagtgaggcaatccac
attttttttaaagattcgaatatttttattctcattagcgtattccgagaatagttcgaaaaaatataaggtatatcaagagtttttaca
agtgagaggaaagaggaataagctataagcaacaaaagcgtaaaaaaattagctgaagacatagaactatggatgttctca
aagaggtgttgtcactagaccaagataaatttgaccagctgaaggaaacgagccgagataaaacaaatgaaacggatgatc
ctttgaaaactatttgaaggattgtaaatttaaagcgccttcaaacaaagatcagtcaccatttgctaaacttaaatcattacag
gaaactcattctaacaatgaagcggctattaatataattattcctcaattgattgattacttaaccgaattcactaataggttatcaa
attacacacaagatttagacttcattaaaaaaaagtccaatgaattacagtcattgctcgaatacaactccactaaactggcaca
tatctctcctatggttaatgatttgatgattcctcctgaactcattgatgacatcattaaagggaagatcaatgaaagctggcagg
ataatataacattcatagcagataaagaagaaatttataacaagtataggtccaataatctcgatcaagacaacaaggacgca
gaaaattcagcaatgctagcaccaaaggattttgataagttatgtcaactcctggacatcctaaaaaaatgttattctaga

SEQ ID NO: 31 Human mannosidase II

aaaatgaagttaagccgccagttcaccgtgttcggcagtgcgatcttctgtggtgattttctcgctctacctgatgctggacc
ggggtcacttagactaccccaggaacccgcgccgcgagggctccttccctcagggccagctctcaatgttgcaagaaaaa
atagaccatttggagcgtttgctagctgagaataatgagatcatctcaaatattagagactcagtcatcaattgagtgagtctgt
ggaggatggtccgaaaagttcacaaagcaatttcagccaaggtgctggctcacatcttctgccctcacaattatccctctcagt
tgacactgcagactgtctgtttgcttcacaaagtggaagtcacaattcagatgtgcagatgttggatgtttacagtctaatttcttt
tgacaatccagatggtggagtttggaagcaaggatttgacattacttatgaatctaatgaatgggacactgaacccctcaagt

ctttgtggtgcctcattcccataacgacccaggttggttgaagactttcaatgactactttagagacaagactcagtatatttttaa
taacatggtcctaaagctgaaagaagactcacggaggaagtttatttggtctgagatctcttacctttcaaagtggtgggatatt
atagatattcagaagaaggatgctgttaaaagtttaatagaaaatggtcagcttgaaattgtgacaggtggctgggttatgcct
gatgaagctactccacattattttgccttaattgatcaactaattgaaggacatcagtggctggaaaataatataggagtgaaac
ctcggtccggctgggctattgatccctttggacactcaccaacaatggcttatcttctaaaccgtgctggactttctcacatgctt
atccagagagttcattatgcagttaaaaaacactttgcactgcataaaacattggagttttttggagacagaattgggatctgg
gatctgtcacagatattttatgccacatgatgcccttctacagctatgacatccctcacacttgtggacctgatcctaaaatatgc
tgccagtttgattttaaacgtcttcctggaggcagatttggttgtccctggggagtccccccagaaacaatacatcctggaaat
gtccaaagcagggctcggatgctactagatcagtaccgaaagaagtcaaagcttttcgaaccaaagttctcctggctccact
aggagatgatttccgctactgtgaatacacggaatgggatttacagtttaagaattatcagcagcttttgattatatgaattctca
gtccaagtttaaagttaagatacagtttggaactttatcagatttttttgatgcgctggataaagcagatgaaactcagagagac
aagggccaatcgatgttccctgttttaagtggagatttttcacttatgccgatcgagatgatcattactggagtggctattttaca
tccagacccttttacaaacgaatggacagaatcatggaatctcatttaagggctgctgaaattctttactatttcgccctgagac
aagctcacaaatacaagataaataaatttctctcatcatcactttacacggcactgacagaagccagaaggaatttgggactgt
ttcaacatcatgatgctatcacaggaactgcaaaagactgggtggttgtggattatggtaccagacttttcattcgttaatggttt
tggagaagataattggaaattctgcatttcttcttattgggaaggacaaactcacatacgactcttactctcctgataccttcctg
gagatggatttgaaacaaaaatcacaagattctctgccacaaaaaaatataataaggctgagtgcggagccaaggtaccttg
tggtctataatcctttagaacaagaccgaatctcgttggtctcagtctatgtgagttccccgacagtgcaagtgttctctgcttca
ggaaaacctgtggaagttcaagtcagcgcagtttgggatacagcaaatactatttcagaaacagcctatgagatctcttttcga
gcacatataccgccattgggactgaaagtgtataagattttggaatcagcaagttcaaattcacatttagctgattatgtcttgtat
aagaataaagtagaagatagcggaattttcaccataaagaatatgataaatactgaagaaggtataacactagagaactcctt
tgttttacttcggtttgatcaaactggacttatgaagcaaatgatgactaaagaagatggtaaacaccatgaagtaaatgtgcaa
ttttcatggtatggaaccacaattaaaagagacaaaagtggtgcctacctcttcttacctgatggtaatgccaagccttatgttta
cacaacaccgccctttgtcagagtgacacatggaaggatttattcggaagtgacttgcttttttgaccatgttactcatagagtc
cgactataccacatacagggaatagaaggacagtctgtggaagtttccaatattgtggacatccgaaaagtatataaccgtga
gattgcaatgaaaatttcttctgatataaaaagccaaaatagattttatactgacctaaatgggtaccagattcaacctagaatga
cactgagcaaattgcctcttcaagcaaatgtctatcccatgaccacaatggcctatatccaggatgccaaacatcgtttgacac
tgctctctgctcagtcattaggggtttcgagtttgaatagtggtcagattgaagttatcatggatcgaagactcatgcaagatga

taatcgtggccttgagcaaggtatccaggataacaagattacagctaatctatttcgaatactactagaaaaaagaagtgctgt
taatacggaagaagaaaagaagtcggtcagttatccttctctccttagccacataacttcttctctcatgaatcatccagtcattc
caatggcaaataagttctcctcacctacccttgagctgcaaggtgaattctctccattacagtcatctttgccttgtgacattcatc
tggttaatttgagaacaatacagtcaaaggtgggcaatgggcactccaatgaggcagccttgatcctccacagaaaagggtt
tgattgtcggttctctagcaaaggcacagggctgttttgttctactactcagggaaagatattggtacagaaacttttaaacaag
tttattgtcgaaagtctcacaccttcatcactatccttgatgcattcacctcccggcactcagaatataagtgagatcaacttgag
tccaatggaaatcagcacattccgaatccagttgaggtgaacctgactttcacatttggattgagaatcattggcttttatacctt
cttggtttgacgtgcaataaagaagcacattattttagcttctggctactgtgagaacatgaattctgtgattctgtgggttttttctt
ttttctttttaccagtacagtaaga

SEQ ID NO: 32 sense primer

CGCGGATCCATGGCCAAAAAAGTTCACAAAGCAATTTC

SEQ ID NO: 33 antisense primer

GTGTCCCATTCATTAGATTC

SEQ ID NO: 34 human GlcNAc-transferase I

ATGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGGGCTTGTGCTGTGGGGCGCTATCCTCTTT
GTGGCCTGGAATGCCCTGCTGCTCCTCTTCTTCTGGACGCGCCCAGCACCT
GGCAGGCCACCCTCAGTCAGCGCTCTCGATGGCGACCCCGCCAGCCTCAC
CCGGGAAGTGATTCGCCTGGCCCAAGACGCCGAGGTGGAGCTGGAGCGGC
AGCGTGGGCTGCTGCAGCAGATCGGGGATGCCCTGTCGAGCCAGCGGGGG
AGGGTGCCCACCGCGGCCCCTCCCGCCCAGCCGCGTGTGCCTGTGACCCCC
GCGCCGGCGGTGATTCCCATCCTGGTCATCGCCTGTGACCGCAGCACTGTT
CGGCGCTGCCTGGACAAGCTGCTGCATTATCGGCCCTCGGCTGAGCTCTTC
CCCATCATCGTTAGCCAGGACTGCGGGCACGAGGAGACGGCCCAGGCCAT
CGCCTCCTACGGCAGCGCGGTCACGCACATCCGGCAGCCCGACCTGAGCA
GCATTGCGGTGCCGCCGGACCACCGCAAGTTCCAGGGCTACTACAAGATC
GCGCGCCACTACCGCTGGGCGCTGGGCCAGGTCTTCCGGCAGTTTCGCTTC
CCCGCGGCCGTGGTGGTGGAGGATGACCTGGAGGTGGCCCCGGACTTCTT
CGAGTACTTTCGGGCCACCTATCCGCTGCTGAAGGCCGACCCCTCCCTGTG

GTGCGTCTCGGCCTGGAATGACAACGGCAAGGAGCAGATGGTGGACGCCA
GCAGGCCTGAGCTGCTCTACCGCACCGACTTTTTCCCTGGCCTGGGCTGGC
TGCTGTTGGCCGAGCTCTGGGCTGAGCTGGAGCCCAAGTGGCCAAAGGCC
TTCTGGGACGACTGGATGCGGCGGCCGGAGCAGCGGCAGGGGCGGGCCTG
CATACGCCCTGAGATCTCAAGAACGATGACCTTTGGCCGCAAGGGTGTGA
GCCACGGGCAGTTCTTTGACCAGCACCTCAAGTTTATCAAGCTGAACCAGC
AGTTTGTGCACTTCACCCAGCTGGACCTGTCTTACCTGCAGCGGGAGGCCT
ATGACCGAGATTTCCTCGCCCGCGTCTACGGTGCTCCCCAGCTGCAGGTGG
AGAAAGTGAGGACCAATGACCGGAAGGAGCTGGGGGAGGTGCGGGTGCA
GTATACGGGCAGGGACAGCTTCAAGGCTTTCGCCAAGGCTCTGGGTGTCA
TGGATGACCTTAAGTCGGGGGTTCCGAGAGCTGGCTACCGGGGTATTGTC
ACCTTCCAGTTCCGGGGCCGCCGTGTCCACCTGGCGCCCCCACCGACGTGG
GAGGGCTATGATCCTAGCTGGAATATGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGGGCT
TGTGCTGTGGGGCGCTATCCTCTTTGTGGCCTGGAATGCCCTGCTGCTCCTC
TTCTTCTGGACGCGCCCAGCACCTGGCAGGCCACCCTCAGTCAGCGCTCTC
GATGGCGACCCCGCCAGCCTCACCCGGGAAGTGATTCGCCTGGCCCAAGA
CGCCGAGGTGGAGCTGGAGCGGCAGCGTGGGCTGCTGCAGCAGATCGGGG
ATGCCCTGTCGAGCCAGCGGGGGAGGGTGCCCACCGCGGCCCCTCCCGCC
CAGCCGCGTGTGCCTGTGACCCCCGCGCCGGCGGTGATTCCCATCCTGGTC
ATCGCCTGTGACCGCAGCACTGTTCGGCGCTGCCTGGACAAGCTGCTGCAT
TATCGGCCCTCGGCTGAGCTCTTCCCCATCATCGTTAGCCAGGACTGCGGG
CACGAGGAGACGGCCCAGGCCATCGCCTCCTACGGCAGCGCGGTCACGCA
CATCCGGCAGCCCGACCTGAGCAGCATTGCGGTGCCGCCGGACCACCGCA
AGTTCCAGGGCTACTACAAGATCGCGCGCCACTACCGCTGGGCGCTGGGC
CAGGTCTTCCGGCAGTTTCGCTTCCCCGCGGCCGTGGTGGTGGAGGATGAC
CTGGAGGTGGCCCCGGACTTCTTCGAGTACTTTCGGGCCACCTATCCGCTG
CTGAAGGCCGACCCCTCCCTGTGGTGCGTCTCGGCCTGGAATGACAACGG
CAAGGAGCAGATGGTGGACGCCAGCAGGCCTGAGCTGCTCTACCGCACCG

ACTTTTTCCCTGGCCTGGGCTGGCTGCTGTTGGCCGAGCTCTGGGCTGAGC
TGGAGCCCAAGTGGCCAAAGGCCTTCTGGGACGACTGGATGCGGCGGCCG
GAGCAGCGGCAGGGGCGGGCCTGCATACGCCCTGAGATCTCAAGAACGAT
GACCTTTGGCCGCAAGGGTGTGAGCCACGGGCAGTTCTTTGACCAGCACCT
CAAGTTTATCAAGCTGAACCAGCAGTTTGTGCACTTCACCCAGCTGGACCT
GTCTTACCTGCAGCGGGAGGCCTATGACCGAGATTTCCTCGCCCGCGTCTA
CGGTGCTCCCCAGCTGCAGGTGGAGAAAGTGAGGACCAATGACCGGAAGG
AGCTGGGGGAGGTGCGGGTGCAGTATACGGGCAGGGACAGCTTCAAGGCT
TTCGCCAAGGCTCTGGGTGTCATGGATGACCTTAAGTCGGGGGTTCCGAGA
GCTGGCTACCGGGGTATTGTCACCTTCCAGTTCCGGGGCCGCCGTGTCCAC
CTGGCGCCCCCACCGACGTGGGAGGGCTATGATCCTAGCTGGAAT

SEQ ID NO: 35 ScKre2 Golgi localization signal (peptide)

MALFLSKRLLRFTVIAGAVIVLLLTLNSNSRTQQYIPSSISAAFDFTSGSISPEQQVISEENDAKKL
EQSALNSEASEDSEAMDEESKALKAAAEKADAP

SEQ ID NO: 36 pPIC6AKrecoGnTI

GAAATTTTTTTTTTAGTTTTTTTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATATTTAA
GTTAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCT
ATTACAACTTTTTTTACTTCTTGTTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTA
ATCTAAGGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATA
GTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGCCTTTGTCTCA
AGAAGAATCCACCCTCATTGAAAGAGCAACGGCTACAATCAACAGCATCC
CCATCTCTGAAGACTACAGCGTCGCCAGCGCAGCTCTCTCTAGCGACGGCC
GCATCTTCACTGGTGTCAATGTATATCATTTTACTGGGGGACCTTGTGCAG
AACTCGTGGTGCTGGGCACTGCTGCTGCTGCGGCAGCTGGCAACCTGACTT
GTATCGTCGCGATCGGAAATGAGAACAGGGGCATCTTGAGCCCCTGCGGA
CGGTGCCGACAGGTGCTTCTCGATCTGCATCCTGGGATCAAAGCCATAGTG

AAGGACAGTGATGGACAGCCGACGGCAGTTGGGATTCGTGAATTGCTGCC
CTCTGGTTATGTGTGGGAGGGCTAAGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGAC
TGACACGTCCGACGGCGGCCCACGGGTCCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCC
CCTTTTCCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACG
CCCTCCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTG
AAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTT
ATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGT
AACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCT
TTAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC
CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCC
CCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCC
TTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC
GGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCA
GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGT
AAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCA
GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
TACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCA
GTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCAC
CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAA
AAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCA
GTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATCAGATCTAA
CATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCAC
AGGTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTA
GCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACC
CACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCG
CTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTG

TCTATCCTGGCCCCCCTGGCGAGGTTCATGTTTGTTTATTTCCGAATGCAAC
AAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGT
GGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCCAAATGGCCCAAAACTGACAGTTTAAA
CGCTGTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAA
CTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAAACTT
CCAAAAGTCGGCATACCGTTTGTCTTGTTTGGTATTGATTGACGAATGCTC
AAAAATAATCTCATTAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCC
CGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATG
ATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACT
GCTGATAGCCTAACGTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTT
GACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTT
TATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAG
CTTTTGATTTTAACGACTTTTAACGACAACTTGAGAAGATCAAAAAACAAC
TAATTATTCGAAACGAGGAATTATCCATATTCGCAAGCAGTTCCACTCGAA
AGCATGGCCCTCTTTCTCAGTAAGAGACTGTTGAGATTTACCGTCATTGCA
GGTGCGGTTATTGTTCTCCTCCTAACATTGAATTCCAACAGTAGAACTCAG
CAATATATTCCGAGTTCCATCTCCGCTGCATTTGATTTTACCTCAGGATCTA
TATCCCCTGAACAACAAGTCATCTCTGAGGAAAATGATGCTAAAAAAATTA
GAGCAAAGTGCTCTGAATTCAGAGGCAAGCGAAGACTCCGAAGCCATGGA
TGAAGAATCCAAGGCTCTGAAAGCTGCCGCTGAAAAGGCAGATGCCCCGC
CGGCGGTGATTCCCATCCTGGTCATCGCCTGTGACCGCAGCACTGTTCGGC
GCTGCCTGGACAAGCTGCTGCATTATCGGCCCTCGGCTGAGCTCTTCCCCA
TCATCGTTAGCCAGGACTGCGGGCACGAGGAGACGGCCCAGGCCATCGCC
TCCTACGGCAGCGCGGTCACGCACATCCGGCAGCCCGACCTGAGCAGCAT
TGCGGTGCCGCCGGACCACCGCAAGTTCCAGGGCTACTACAAGATCGCGC
GCCACTACCGCTGGGCGCTGGGCCAGGTCTTCCGGCAGTTTCGCTTCCCCG
CGGCCGTGGTGGTGGAGGATGACCTGGAGGTGGCCCCGGACTTCTTCGAG
TACTTTCGGGCCACCTATCCGCTGCTGAAGGCCGACCCCTCCCTGTGGTGC

GTCTCGGCCTGGAATGACAACGGCAAGGAGCAGATGGTGGACGCCAGCAG
GCCTGAGCTGCTCTACCGCACCGACTTTTTCCCTGGCCTGGGCTGGCTGCT
GTTGGCCGAGCTCTGGGCTGAGCTGGAGCCCAAGTGGCCAAAGGCCTTCT
GGGACGACTGGATGCGGCGGCCGGAGCAGCGGCAGGGGCGGGCCTGCAT
ACGCCCTGAGATCTCAAGAACGATGACCTTTGGCCGCAAGGGTGTGAGCC
ACGGGCAGTTCTTTGACCAGCACCTCAAGTTTATCAAGCTGAACCAGCAGT
TTGTGCACTTCACCCAGCTGGACCTGTCTTACCTGCAGCGGGAGGCCTATG
ACCGAGATTTCCTCGCCCGCGTCTACGGTGCTCCCCAGCTGCAGGTGGAGA
AAGTGAGGACCAATGACCGGAAGGAGCTGGGGGAGGTGCGGGTGCAGTA
TACGGGCAGGGACAGCTTCAAGGCTTTCGCCAAGGCTCTGGGTGTCATGG
ATGACCTTAAGTCGGGGGTTCCGAGAGCTGGCTACCGGGGTATTGTCACCT
TCCAGTTCCGGGGCCGCCGTGTCCACCTGGCGCCCCCACCGACGTGGGAG
GGCTATGATCCTAGCTGGAATTAGCACCTGTCGACTGGAGACCTGCAGGC
ATGCAAGCTTCGACCATCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGAC
ATGACTGTTCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCT
AGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGG
CTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTT
GTCATTTTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAG
CTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATTCGAGTTTGATGT
TTTTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGAC
CTTCGTTTGTGCGGATCCCCCACACACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCC
TTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCACTTCA
AAACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTTCCCTCTTTCTTCCTCTAGGGTG
TCGTTAATTACCCGTACTAAAGGTTTGGAAAAGAAAAAAGAGACCGCCTC
GTTTCTTTTTCTTCGTCGAAAAAGGCAATAAAAATTTTTATCACGTTTCTTT
TTCTT

SEQ ID NO: 37 pGAPKreManII

ATCCATATTCGCAAGCAGTTCCACTCGAAAGCATGGCCCTCTTTCTCAGTA
AGAGACTGTTGAGATTTACCGTCATTGCAGGTGCGGTTATTGTTCTCCTCC
TAACATTGAATTCCAACAGTAGAACTCAGCAATATATTCCGAGTTCCATCT
CCGCTGCATTTGATTTTACCTCAGGATCTATATCCCCTGAACAACAAGTCA
TCTCTGAGGAAAATGATGCTAAAAAATTAGAGCAAAGTGCTCTGAATTCA
GAGGCAAGCGAAGACTCCGAAGCCATGGATGAAGAATCCAAGGCTCTGA
AAGCTGCCGCTGAAAAGGCAGATGCCCCGCCAAAAAGTTCACAAAGCAAT
TTCAGCCAAGGTGCTGGCTCACATCTTCTGCCCTCACAATTATCCCTCTCA
GTTGACACTGCAGACTGTCTGTTTGCTTCACAAAGTGGAAGTCACAATTCA
GATGTGCAGATGTTGGATGTTTACAGTCTAATTTCTTTTGACAATCCAGAT
GGTGGAGTTTGGAAGCAAGGATTTGACATTACTTATGAATCTAATGAATG
GGACACTGAACCCCTTCAAGTCTTTGTGGTGCCTCATTCCCATAACGACCC
AGGTTGGTTGAAGACTTTCAATGACTACTTTAGAGACAAGACTCAGTATAT
TTTTAATAACATGGTCCTAAAGCTGAAAGAAGACTCACGGAGGAAGTTTA
TTTGGTCTGAGATCTCTTACCTTTCAAAGTGGTGGGATATTATAGATATTC
AGAAGAAGGATGCTGTTAAAAGTTTAATAGAAAATGGTCAGCTTGAAATT
GTGACAGGTGGCTGGGTTATGCCTGATGAAGCTACTCCACATTATTTTGCC
TTAATTGATCAACTAATTGAAGGACATCAGTGGCTGGAAAATAATATAGG
AGTGAAACCTCGGTCCGGCTGGGCTATTGATCCCTTTGGACACTCACCAAC
AATGGCTTATCTTCTAAACCGTGCTGGACTTTCTCACATGCTTATCCAGAG
AGTTCATTATGCAGTTAAAAAACACTTTGCACTGCATAAAACATTGGAGTT
TTTTTGGAGACAGAATTGGGATCTGGGATCTGTCACAGATATTTTATGCCA
CATGATGCCCTTCTACAGCTATGACATCCCTCACACTTGTGGACCTGATCC
TAAAATATGCTGCCAGTTTGATTTTAAACGTCTTCCTGGAGGCAGATTTGG
TTGTCCCTGGGGAGTCCCCCCAGAAACAATACATCCTGGAAATGTCCAAA
GCAGGGCTCGGATGCTACTAGATCAGTACCGAAAGAAGTCAAAGCTTTTT
CGTACCAAAGTTCTCCTGGCTCCACTAGGAGATGATTTCCGCTACTGTGAA
TACACGGAATGGGATTTACAGTTTAAGAATTATCAGCAGCTTTTTGATTAT

ATGAATTCTCAGTCCAAGTTTAAAGTTAAGATACAGTTTGGAACTTTATCA
GATTTTTTTGATGCGCTGGATAAAGCAGATGAAACTCAGAGAGACAAGGG
CCAGTCGATGTTCCCTGTTTTAAGTGGAGATTTTTTCACTTATGCCGATCGA
GATGATCATTACTGGAGTGGCTATTTTACATCCAGACCCTTTTACAAACGA
ATGGACAGAATCATGGAATCTCATTTAAGGGCTGCTGAAATTCTTTACTAT
TTCGCCCTGAGACAAGCTCACAAATACAAGATAAATAAATTTCTCTCATCA
TCACTTTACACGGCACTGACAGAAGCCAGAAGGAATTTGGGACTGTTTCA
ACATCATGATGCTATCACAGGAACTGCAAAAGACTGGGTGGTTGTGGATT
ATGGTACCAGACTTTTTCATTCGTTAATGGTTTTGGAGAAGATAATTGGAA
ATTCTGCATTTCTTCTTATTTTGAAGGACAAACTCACATACGACTCTTACTC
TCCTGATACCTTCCTGGAGATGGATTTGAAACAAAAATCACAAGATTCTCT
GCCACAAAAAAAATATAATAAGGCTGAGTGCGGAGCCAAGGTACCTTGTGG
TCTATAATCCTTTAGAACAAGACCGAATCTCGTTGGTCTCAGTCTATGTGA
GTTCCCCGACAGTGCAAGTGTTCTCTGCTTCAGGAAAACCTGTGGAAGTTC
AAGTCAGCGCAGTTTGGGATACAGCAAATACTATTTCAGAAACAGCCTAT
GAGATCTCTTTTCGAGCACATATACCGCCATTGGGACTGAAAGTGTATAAG
ATTTTGGAATCAGCAAGTTCAAATTCACATTTAGCTGATTATGTCTTGTAT
AAGAATAAAGTAGAAGATAGCGGAATTTTCACCATAAAGAATATGATAAA
TACTGAAGAAGGTATAACACTAGAGAACTCCTTTGTTTTACTTCGGTTTGA
TCAAACTGGACTTATGAAGCAAATGATGACTAAAGAAGATGGTAAACACC
ATGAAGTAAATGTGCAATTTTCATGGTATGGAACCACAATTAAAAGAGAC
AAAAGTGGTGCCTACCTCTTCTTACCTGATGGTAATGCCAAGCCTTATGTT
TACACAACACCGCCCTTTGTCAGAGTGACACATGGAAGGATTTATTCGGA
AGTGACTTGCTTTTTTGACCATGTTACTCATAGAGTCCGACTATACCACAT
ACAGGGAATAGAAGGACAGTCTGTGGAAGTTTCCAATATTGTGGACATCC
GAAAAGTATATAACCGTGAGATTGCAATGAAAATTTCTTCTGATATAAAA
AGCCAAAATAGATTTTATACTGACCTAAATGGGTACCAGATTCAACCTAG
AATGACACTGAGCAAATTGCCTCTTCAAGCAAATGTCTATCCCATGACCAC

AATGGCCTATATCCAGGATGCCAAACATCGTTTGACACTGCTCTCTGCTCA
GTCTTTAGGGGTTTCGAGTTTGAATAGTGGTCAGATTGAAGTTATCATGGA
TCGAAGACTCATGCAAGATGATAATCGTGGCCTTGAGCAAGGTATCCAGG
ATAACAAGATTACAGCTAATCTATTTCGAATACTACTAGAAAAAAGAAGT
GCTGTTAATACGGAAGAAGAAAAGAAGTCGGTCAGTTATCCTTCTCTCCTT
AGCCACATAACTTCTTCTCTCATGAATCATCCAGTCATTCCAATGGCAAAT
AAGTTCTCACCTACCCTTGAGCTGCAAGGTGAATTCTCTCCATTACAGTCA
TCTTTGCCTTGTGACATTCATCTGGTTAATTTGAGAACAATACAGTCAAAG
GTGGGCAATGGGCACTCCAATGAGGCAGCCTTGATCCTCCACAGAAAAGG
GTTTGATTGTCGGTTCTCTAGCAAAGGCACAGGGCTGTTTTGTTCTACTACT
CAGGGAAAGATATTGGTACAGAAACTTTTAAACAAGTTTATTGTCGAAAG
TCTCACACCTTCATCACTATCCTTGATGCATTCACCTCCCGGCACTCAGAAT
ATAAGTGAGATCAACTTGAGTCCAATGGAAATCAGCACATTCCGAATCCA
GTTGAGGTGAACCTGACTTTCACATTTGGATTGAGAATCATTGGCTTTTAT
ACCTTTCTTGGTTTGACGTGCAATAAAGAAGCACATTATTTTAGCTTCTGG
CTACTGTGAGAACATGAATTCTGTGATTCTGTGGGTTTTTTCTTTTTTCTTTT
ACCAGTACAGTAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGCCGCGGC
GGCCGCCAGCTTGGGCCCGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAA
TAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGAGTTTTAGCCTTAGACAT
GACTGTTCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAG
ATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTT
CATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTC
ATTTTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTG
ATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATTCGAGTTTGATGTTTT
TCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTT
CGTTTGTGCGGATCCATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCG
TAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGA
GCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC

TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAA
GCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACC
GCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTC
GGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAG
CGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGAT
CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACG
AAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT
ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
TCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGT
GTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAA
TGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC
AGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTC
ACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAG
GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGT
TATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT
TTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCG
GCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCAC
ATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGA
AAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACT

CGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGT
GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGAC
ACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATGCTTCTAGTGGTAG
GAATTAATTCTGTACCGGTTTACAGAAGGACGACTCTTGATGCGCCAACCA
CAGTGACAATAGACATAGAGGAAATGACAAAAGGATTATGCGAGGATGCT
GCTGGAGACGATTCAAAGTTTAGTTTAGAAAGGTCCTCCATTTATGCTGAT
AGAATACTAGATACCCGTGAACTTTGTCTCAGGAGATCCGCATCAGACGA
AGGATGTTCCGACCTGCAAATAATCGAAGAAGAGACCCCTAGGCCGTACG
ACAGTCAGTTAGTAGATATTTATACCATTCTGCGAGAAGGTCCCCCAGTAT
AGATAAGAGAGTTTCAATTGTATGTACTATAACAGTTTATTGTATCATTAA
CAAACTCAGTATAAAACCTTCAAGACTCTAGCTTTTCATTCAGTGCATCCA
ATTGCTTTAAAACAGCAGTCTTAGAAGTTCCTCCGGTGGCAGTTCTTTTTTC
AACACTGGCTTCAAAGTCAAACGTTGAAGCCACATCAGCCTCAAAACGGG
AGTCAATGGATTTCAATTGTTCGAGGGACAACTGATCAATACCAGAAAGG
TTCAACTCCTCGGCTTGTCTGACACATTCACCAGAAATGTGGTGAGTTTCT
CTGAATGGAACTCCCCTTCTAACTAAATAGTCGGCAAGATCTGTAGCCAGC
ATATCCATAGTTAGAGCATTCTTCATTCGTTCGGCATCAATGTTCAAGGTA
GAAACTACACCGGATGCTATCAAAATCGAGTGCTCTACAGTGATTAGAGT
ATCAAATAAAGGCTCCTTATCCTCTTGCATATCTTTGTTATAGGTTGACGG
AATGGACTTAATAGACATGAGGAAACCAGCCAAGGCCCCAAAACATCTAC
CAGATTTACCCCTCAATAACTCCAAAGAGTCTGGGTTTTTTTTTTGAGGCA
TCAGAGAAGATCCAGTAGAATAAGCATCTGCCAACTTGATAAATCCAAAC
TCTCCAGTGGAGTAAATGATCAAATCTTCTGAGAATCGAGAAATATGATTC
ATAAACAACGAAGACCAGAACATGGTTTCGACTACAAAATCTCTGTCTGA
AACAGCGGCCAAAGAATTACCAATAACAGAATCAAACCCTAATCTCTCAG
CAATGTATTCACGATCAATTCCATAAGGATGACCAGCCAAAGCTCCAGCTC
CCAATGGGGATTTGTTCAACCTTTTAACGATTTGATTCAGTCTCTCATAATC
TTCAGTGAAATAGGTAGCATACATGCTCAACCAGTGAGACCATCTGATTG

GTTGAGCTCTTTGCAAGTGAGTATAACCGGGCATCAAGACGTCTATTTCCT
GTTCAGCTCTCTTGATGATTACTTGAATGAACTGCTTCAGATAGTCAGCCA
ACTGAGTTAGATTGTCTCTGACATACAACCGCATATCAGTGGCAACTTGAT
CATTTCTAGACCTTCCGGTATGAACCTTACCAGAGATTCCACGACCAATCA
ACTCACCCAAGCGACGTTCATTAGCAGTGTGAATATCCTCATCCCCTGGCT
TCTCAACAAACTTCCCTTCTGCCCACTCTGCTTCAATCAATTTGAGACCAC
GATGAATCTCACTTAGTTCGTCTTTAGTTAGCAAATTAATTTTCTCCAGGCC
CTCAGTGTAAACTTTTGTTCCTTCTAAATCCACCTTGTACATTTTCTTGTCG
TAAGGTAAGGAAGCGTTATACAAATCCATCAAGGGGTCAGTAGCCCCAGT
AAACCTGCCACCCCACAGTTTAAGTCTTTCTTCTTGATTCGACATAGATAG
CTGGTAATAAGTTTAGAACAAAAGGAAAGAGAAGGTAGAATATAGGTGA
AAGAATTGCCAAAAGAGGCAGCGCGGTAAAAAGAAAAATGAATCATCGA
AATTAGTCTAGATTCTCGTATTTCTGTTGGTTATTGTATTATCTAATCAGGG
TAAAACACCTAAGGCTTACATCTCCCAGTGAAACGTGGGTATAATGAACA
GTCTTTCACAGTGAATCTGTCGCACAACCATGCTAAGATACGTTCCGTTCC
TAGACCGTAACCACCGTGAGGGCAGATTAACGCTTACAATTTCCATTCGCC
ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCT
ATTACGCCAGGGCACTAGTGAGATCAGATCTTTTTTGTAGAAATGTCTTGG
TGTCCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAATATCTGGCTCCGTTGCAA
CTCCGAACGACCTGCTGGCAACGTAAAATTCTCCGGGGTAAAACTTAAAT
GTGGAGTAATGGAACCAGAAACGTCTCTTCCCTTCTCTCTCCTTCCACCGC
CCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAGAGCTTCTTCTACGGC
CCCCTTGCAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGT
CGTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAAAGTCCCGGCCGTCGCTG
GCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGGAAACCACCAGA
ATCGAATATAAAAGGCGAACACCTTTCCCAATTTTGGTTTCTCCTGACCCA
AAGACTTTAAATTTAATTTATTTGTCCCTATTTCAATCAATTGAACAACTAT
TTCGAAACGAGGAATTCACGTGGCCC

SEQ ID NO: 38 ScKre2 Protein (amino acid sequence)

MALFLSKRLLRFTVIAGAVIVLLLTLNSNSRTQQYIPSSIAAFDFTSGSISPEQQV
ISEENDAKKLEQSALNSEASEDSEAMDEESKALKAAAEKADAPIDTKTTMDYI
TPSFANKAGKPKACYVTLVRNKELKGLLSSIKYVENKINKKFPYPWVFLNDEP
FTEEFKEAVTKAVSSEVKFGILPKEHWSYPEWINQTKAAEIRADAATKYIYGG
SESYRHMCRYQSGFFWRHELLEEYDWYWRVEPDIKLYCDINYDVFKWMQEN
EKVYGFTVSIHEYEVTIPTLWQTSMDFIKKNPEYLDENNLMSFLSNDNGKTYN
LCHFWSNFEIANLNLWRSPAYREYFDTLDHQGGFFYERWGDAPVHSIAAALF
LPKDKIHYFSDIGYHHPPYDNCPLDKEVYNSNNCECDQGNDFTFQGYSCGKE
YYDAQGLVKPKNWKKFRE

SEQ ID NO: 39 primer Kai5

AAggAgTTAgACAACCTgAAgTCTA

SEQ ID NO: 40 primer Kai7

AAggAgTAgAAACATTTTgAAgCTA

SEQ ID NO: 41 primer Kai10.

CCATggCgAAggCAgATggCAgTT

SEQ ID NO: 42 primer Kai11

AgATCTTTAgTCCTTCCAACTTCCTT

SEQ ID NO: 43 primer Kai13

ATCTAAgCTATATTCgCCgTTTCTgTCATT

SEQ ID NO: 44 primer Kai14

CgATTATggATgTTAgATCTgATCTCATgA

SEQ ID NO: 45 pZ5'PpOCH1Trunc

tcatgagatcagatctaacatccaTAATCGATCTAAgctatattcgccgtttctgtcatttgcgttttgtacggaccct
cacaacaattatcatctccaaaaatagactatgatccattgacgctccgatcacttgatttgaagactttggaagctccttcaca
gttgagtccaggcaccgtagaagataatcttcgaagacaattggagtttcattttccttaccgcagttacgaaccttttccccaa
catatttggcaaacgtggaaagtttctccctctgatagttcctttccgaaaaacttcaaagacttaggtgaaagttggctgcaaa
ggtccccaaattatgatcattttgtgatacccgatgatgcagcatgggaacttattcaccatgaatacgaacgtgtaccagaag
tcttggaagctttgattttaacgacttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaacaactaattattcgcgaaacgaggaattc
acgtggcccagccggccgtctcggatcggtacctcgagccgcggcggccgccagctttctagagaacaaaaactcatctc
agaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttgtagccttagacatgactgttcctcagttcaa
gttgggcacttacgagaagaccggtcttgctagattctaatcaagaggatgtcagaatgccatttgcctgagagatgcaggct
tcatttttgatacttttttatttgtaacctatatagtataggatttttttgtcattttgtttcttctcgtacgagcttgctcctgatcagcct
atctcgcagctgatgaatatcttgtggtaggggtttgggaaaatcattcgagtttgatgtttttcttggtatttcccactcctcttca
gagtacagaagattaagtgagaccttcgtttgtgcggatcccccacacaccatagcttcaaaatgtttctactccttttttactctt
ccagattttctcggactccgcgcatcgccgtaccacttcaaaacacccaagcacagcatactaaattttccctctttcttcctcta
gggtgtcgttaattacccgtactaaaggtttggaaaagaaaaaagagaccgcctcgtttcttttttcttcgtcgaaaaaggcaat
aaaaatttttatcacgtttctttttcttgaaatttttttttttagttttttctctttcagtgacctccattgatatttaagttaataaacggtct
tcaatttctcaagtttcagtttcatttttcttgttctattacaacttttttacttcttgttcattagaaagaaagcatagcaatctaatcta
aggggcggtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatggcca
agttgaccagtgccgttccggtgctcaccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcgagttctggaccgaccggctcgggttc
tcccgggacttcgtggaggacgacttcgccggtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcatcagcgcggtccaggacca
ggtggtgccggacaacaccctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccgagtggtcggaggtcgtg
tccacgaacttccgggacgcctccgggccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtgggggcgggagttcgccctg
cgcgacccggccggcaactgcgtgcacttcgtggccgaggagcaggactgacacgtccgacggcggcccacgggtcc
caggcctcggagatccgtccccctttccttgtcgatatcatgtaattagttatgtcacgcttacattcacgccctcccccca
tccgctctaaccgaaaaggaaggagttagacaacctgaagtctaggtcccctatttatttttttatagttatgttagtattaagaacg
ttatttatatttcaaatttttctttttttctgtacagacgcgtgtacgcatgtaacattatactgaaaaccttgcttgagaaggttttgg

gacgctcgaaggctttaatttgcaagctggagaccaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaa
ggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcg
aaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgctt
accggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtag
gtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttga
gtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcg
gtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagcca
gttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcag
cagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactc
acgttaagggattttgg

SEQ ID NO: 46 pZMFManHDEL5'PpOCH1Mut

ggtcgactctagaatggcgaaggcacatggcagtttgctctagtataatcctcacaatccacccagaaggtattacttctacat
ggctatattcgccgtttctgtcatttgcgttttgtacggaccctcacaacaattatcatctccaaaaatagactatgatccattgac
gctccgatcacttgatttgaagactttggaagctccttcacagttgagtccaggcaccgtagaagataatcttcgaagacaatt
ggagtttcattttccttaccgcagttacgaaccttttccccaacatatttggcaaacgtggaaagtttctccctctgatagttcctt
ccgaaaaacttcaaagacttaggtgaaagttggctgcaaaggtccccaaattatgatcatttgtgatacccgatgatgcagc
atgggaacttattcaccatgaatacgaacgtgtaccagaagtcttggaagcttttgattttaacgacttttaacgacaacttgag
aagatcaaaaaacaactaattattcgcgaaacgaggaattcacgtggcccagccggccgtctcggatcggtacctcgagcc
gcggcggccgccagctttctagagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatc
atcattgagtttgtagccttagacatgactgttcctcagttcaagttgggcacttacgagaagaccggtcttgctagattctaatc
aagaggatgtcagaatgccatttgcctgagagatgcaggcttcatttttgatacttttttatttgtaacctatatagtataggatttt
tttgtcattttgtttcttctcgtacgagcttgctcctgatcagcctatctcgcagctgatgaatatcttgtggtaggggtttgggaaa
atcattcgagtttgatgtttttcttggtatttcccactcctcttcagagtacagaagattaagtgagaccttcgtttgtgcggatcctt
ttttgtagaaatgtcttggtgtcctcgtccaatcaggtagccatctctgaaatatctggctccgttgcaactccgaacgacctgct
ggcaacgtaaaattctccggggtaaaacttaaatgtggagtaatggaaccagaaacgtctcttcccttctctctccttccaccg
cccgttaccgtccctaggaaattttactctgctggagagcttcttctacggccccttgcagcaatgctcttcccagcattacgtt

gcgggtaaaacggaggtcgtgtacccgacctagcagcccagggatggaaaagtcccggccgtcgctggcaataatagcg
ggcggacgcatgtcatgagattattggaaaccaccagaatcgaatataaaaggcgaacacctttcccaattttggtttctcctg
acccaaagactttaaatttaatttatttgtccctatttcaatcaattgaacaactatttcgcgaaacgatgagatttccttcaatttta
ctgctgttttattcgcagcatcctccgcattagctgctccagtcaacactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggct
gaagctgtcatcggttactcagatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttccaacagcacaaataacgggttatt
gtttataaatactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagaggctgaagctgaattcg
ccacaaaacgtggatctcccaaccctacgagggcggcagcagtcaaggccgcattccagacgtcgtggaacgcttacca
ccattttgcctttccccatgacgacctccacccggtcagcaacagctttgatgatgagagaaacggctggggctcgtcggca
atcgatggcttggacacggctatcctcatgggggatgccgacattgtgaacacgatccttcagtatgtaccgcagatcaactt
caccacgactgcggttgccaaccaaggatcctccgtgttcgagaccaacattcggtacctcggtggcctgctttctgcctatg
acctgttgcgaggtcctttcagctccttggcgacaaaccagaccctggtaaacagccttctgaggcaggctcaaacactggc
caacggcctcaaggttgcgttcaccactcccagcggtgtcccggaccctaccgtcttcttcaaccctactgtccggagaagt
ggtgcatctagcaacaacgtcgctgaaattggaagcctggtgctcgagtggacacggttgagcgacctgacgggaaacccc
gcagtatgcccagcttgcgcagaagggcgagtcgtatctcctgaatccaaagggaagcccggaggcatggcctggcctg
attggaacgtttgtcagcacgagcaacggtacctttcaggatagcagcggcagctggtccggcctcatggacagcttctacg
agtacctgatcaagatgtacctgtacgacccggttgcgtttgcacactacaaggatcgctgggtccttggtgccgactcgacc
attgggcatctcggctctcacccgtcgacgcgcaaggacttgacctttttgtcttcgtacaacggacagtctacgtcgccaaa
ctcaggacatttggccagttttggcggtggcaacttcatcttgggaggcattcttcctgaacgagcaaaagtacattgactttgg
aatcaagcttgccagctcgtactttggcacgtacacccagacggcttctggaatcggcccgaaggcttcgcgtgggtgga
cagcgtgacgggcgccggcggctcgccgccctcgtcccagtccgggttctactcgtcggcaggattctgggtgacggca
ccgtattacatcctgcggccggagacgctggagagcttgtactacgcataccgcgtcacgggcgactccaagtggcagga
cctggcgtgggaagcgttgagtgccattgaggacgcatgccgcgccggcagcgcgtactcgtccatcaacgacgtgacg
caggccaacggcgggggtgcctctgacgatatggagagcttctggtttgccgaggcgctcaagtatgcgtacctgatctttg
cggaggagtcggatgtgcaggtgcaggccaccggcgggaacaaatttgtctttaacacggaggcgcacccctttagcatc
cgttcatcatcacgacggggcggccaccttgctcacgacgagttgtaatctagggcggccgccagctttctagaacaaaaa
ctcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagttttagccttagacatgactgttcctc
agttcaagttgggcacttacgagaagaccggtcttgctagattctaatcaagaggatgtcagaatgccatttgcctgagagat
gcaggcttcatttttgatacttttttatttgtaacctatatagtataggatttttttgtcatttgtttcttctcgtacgagcttgctcctga

tcagcctatctcgcagctgatgaatatcttgtggtaggggtttgggaaaatcattcgagtttgatgtttttcttggtatttcccactc
ctcttcagagtacagaagattaagtgagaccttcgtttgtgcggatcccccacacaccatagcttcaaaatgtttctactcctttt
tactcttccagattttctcggactccgcgcatcgccgtaccacttcaaaacacccaagcacagcatactaaattttccctctttct
tcctctagggtgtcgttaattacccgtactaaaggtttggaaaagaaaaaagagaccgcctcgtttctttttcttcgtcgaaaaa
ggcaataaaaatttttatcacgtttcttttttcttgaaatttttttttttagttttttctctttcagtgacctccattgatatttaagttaataa
acggtcttcaatttctcaagtttcagtttcatttttcttgttctattacaacttttttacttcttgttcattagaaagaaagcatagcaat
ctaatctaagggcggtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaacca
tggccaagttgaccagtgccgttccggtgctcaccgcgcgcgacgtcgccggagcggtcgagttctggaccgaccggctc
gggttctcccgggacttcgtggaggacgacttcgccggtgtggtccgggacgacgtgaccctgttcatcagcgcggtcca
ggaccaggtggtgccggacaacaccctggcctgggtgtgggtgcgcggcctggacgagctgtacgccgagtggtcgga
ggtcgtgtccacgaacttccgggacgcctccgggccggccatgaccgagatcggcgagcagccgtgggggcgggagtt
cgccctgcgcgacccggccggcaactgcgtgcacttcgtggccgaggagcaggactgacacgtccgacggcggccca
cgggtcccaggcctcggagatccgtccccctttccttttgtcgatatcatgtaattagttatgtcacgcttacattcacgccctcc
ccccacatccgctctaaccgaaaaggaaggagttagacaacctgaagtctaggtcccctatttatttttttatagttatgttagtatt
aagaacgttatttatatttcaaatttttctttttttttctgtacagacgcgtgtacgcatgtaacattatactgaaaaccttgcttgagaa
ggttttgggacgctcgaaggctttaatttgcaagctggagaccaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacc
gtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcaga
ggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccct
gccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcg
gtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatc
gtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatg
taggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctg
aagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgc
aagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacg
aaaactcacgttaagggattttggtcatgc

【図１】

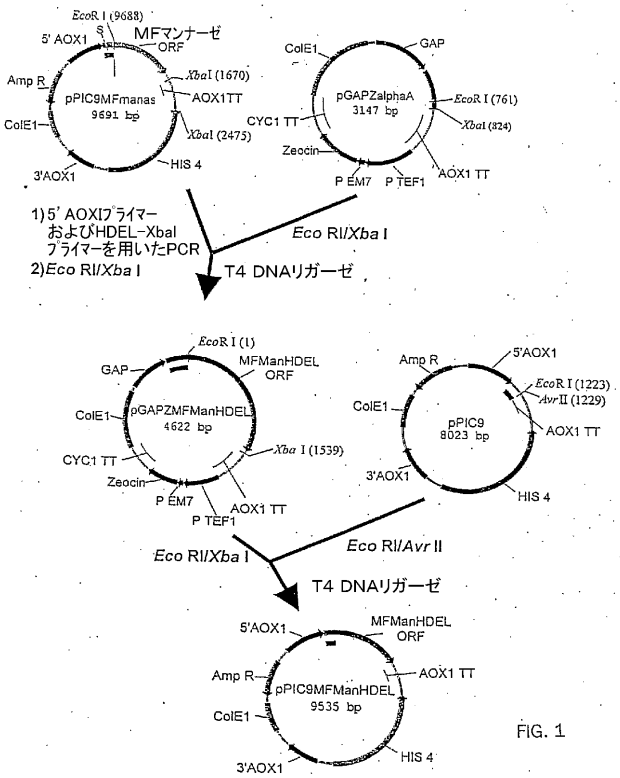


FIG. 1

【図２】

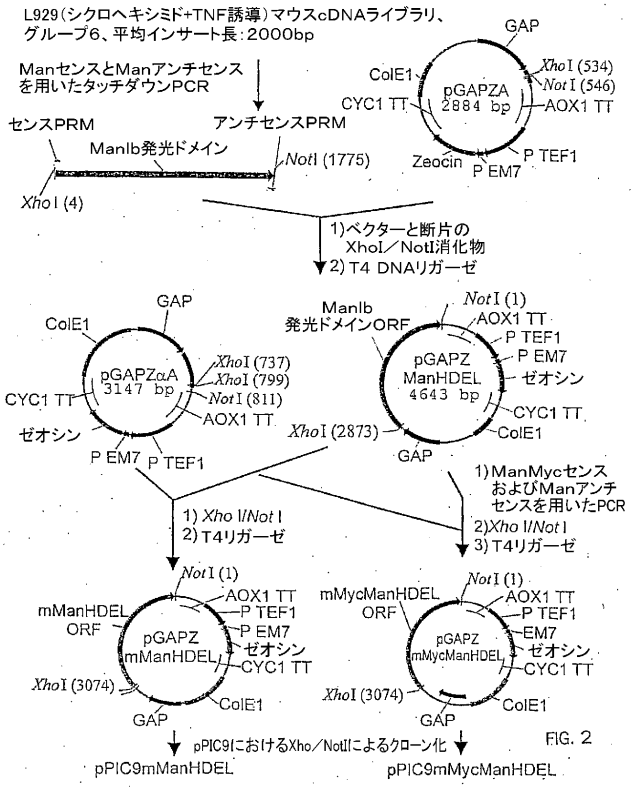


FIG. 2

【図３】

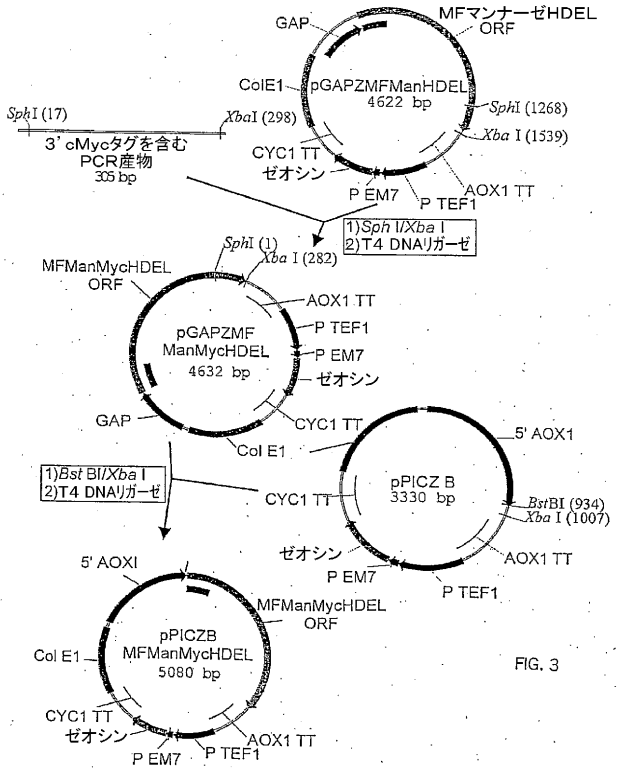


FIG. 3

【図４】

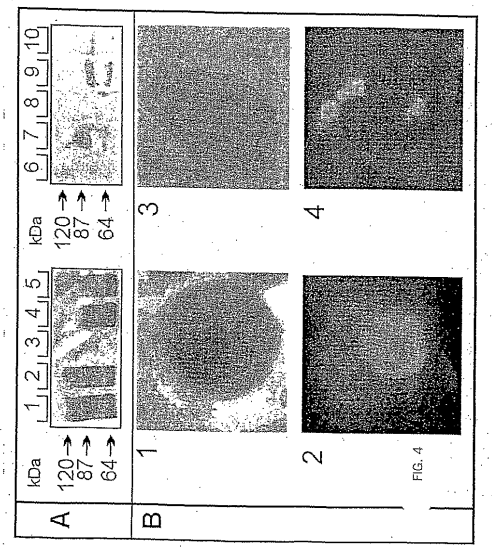


FIG. 4

【図５】

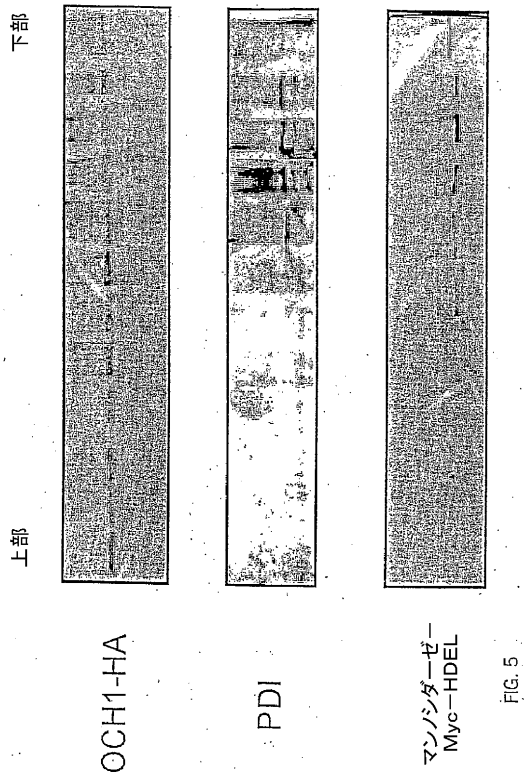
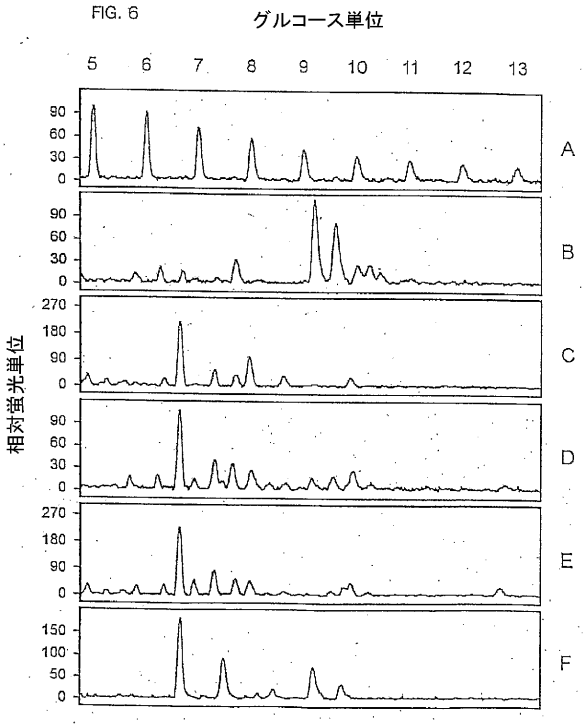
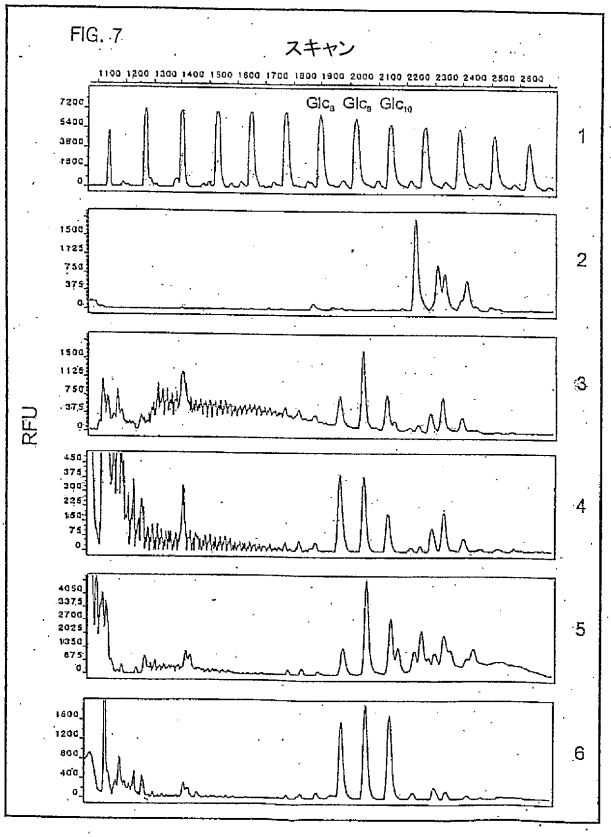


FIG. 5

【図６】



【図７】



【図８】

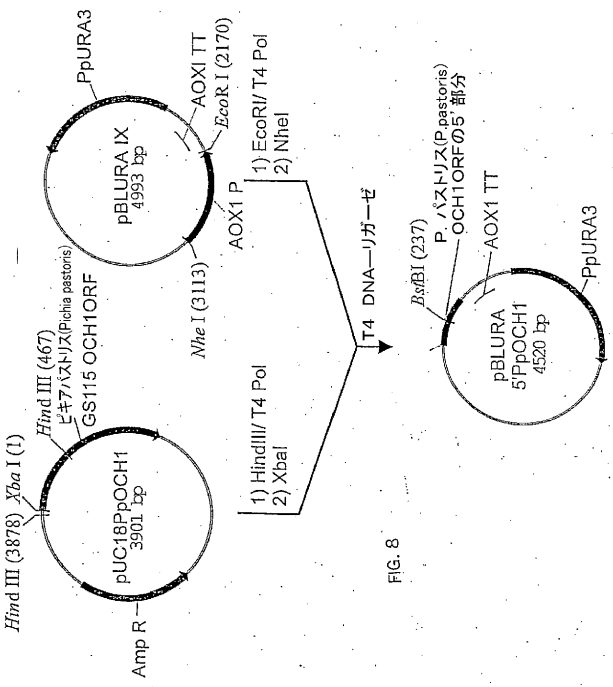


FIG. 8

【図９】

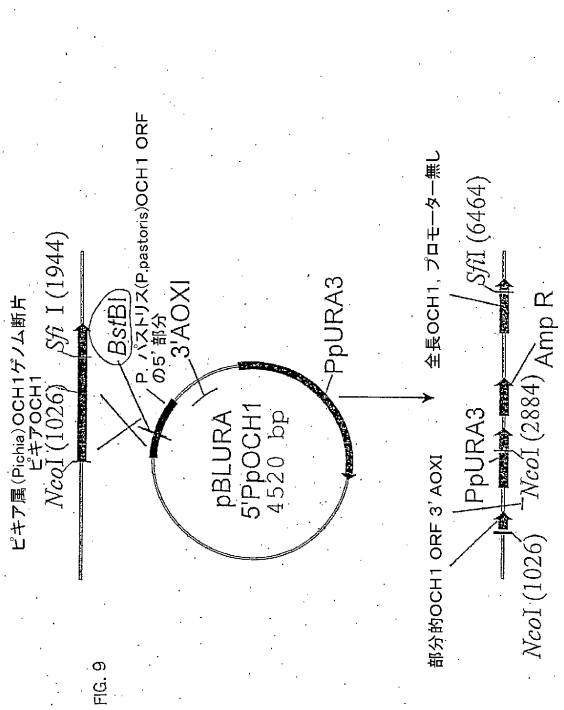


FIG. 9

【図１０】

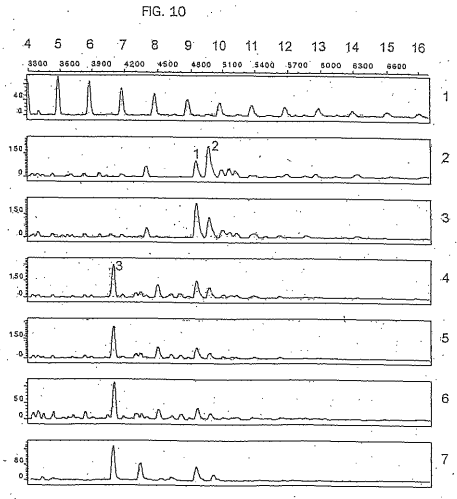


FIG. 10

【図１１】

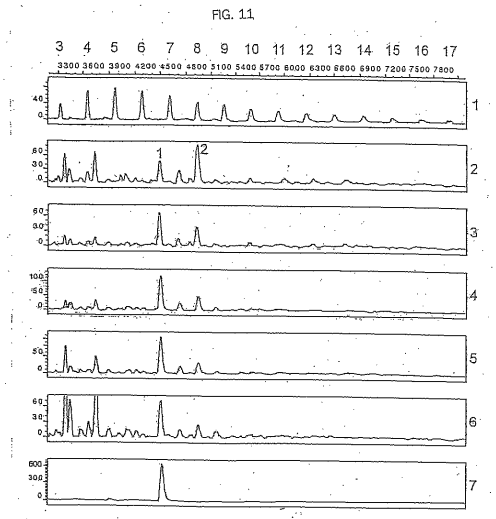


FIG. 11

【図１２】

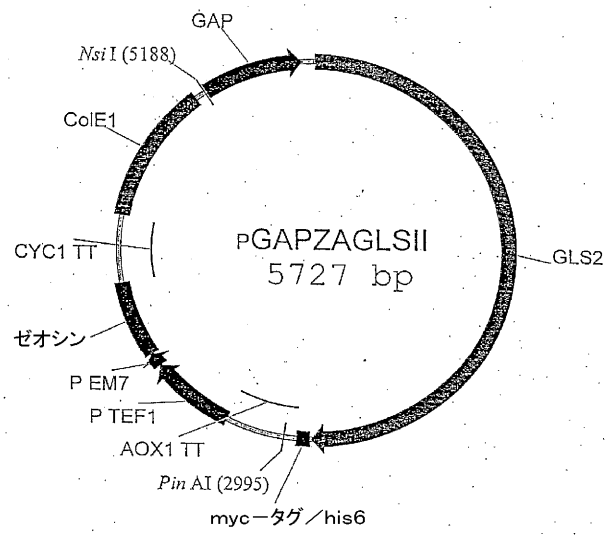


FIG. 12

【図１３】

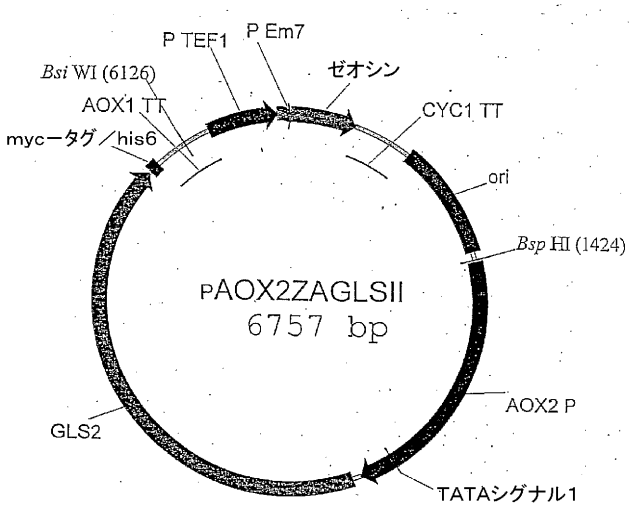


FIG.13

【図１４】

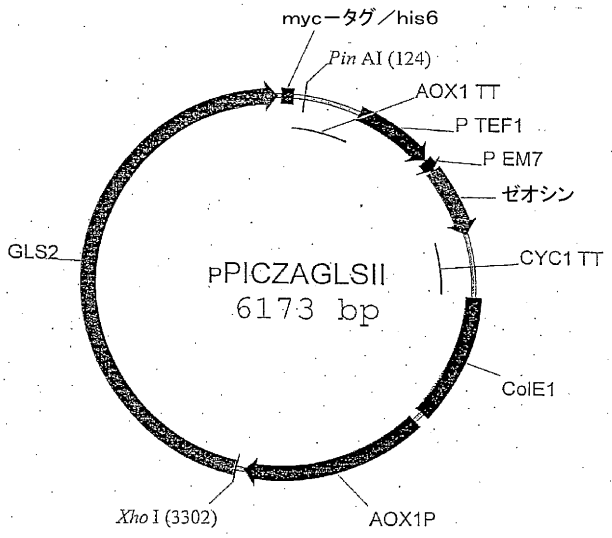


FIG. 14

【図１５】

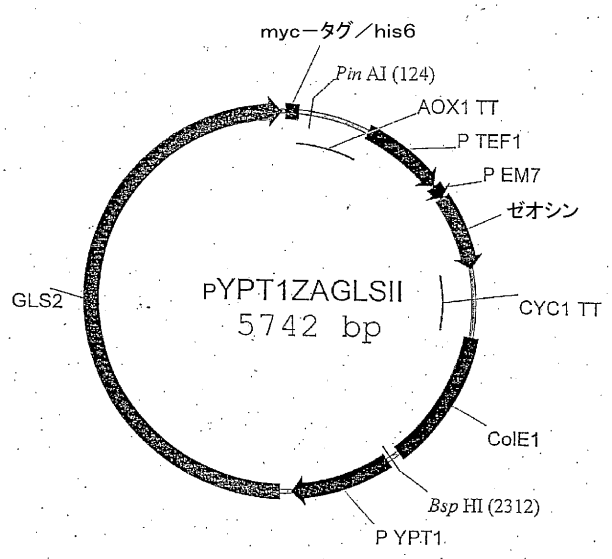


FIG. 15

【図１６】

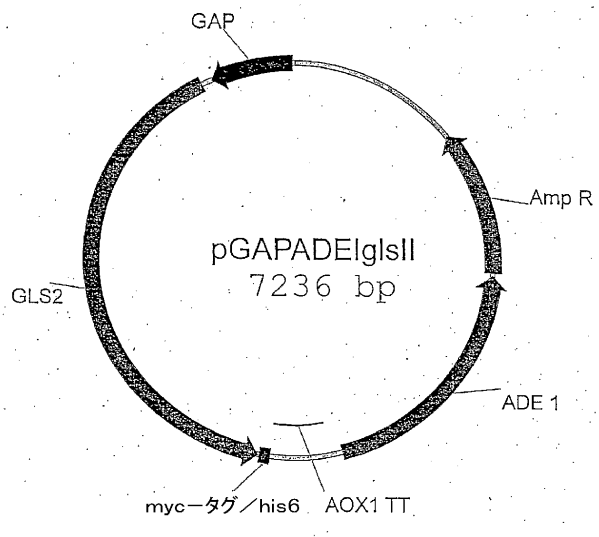


FIG. 16

【図１７】

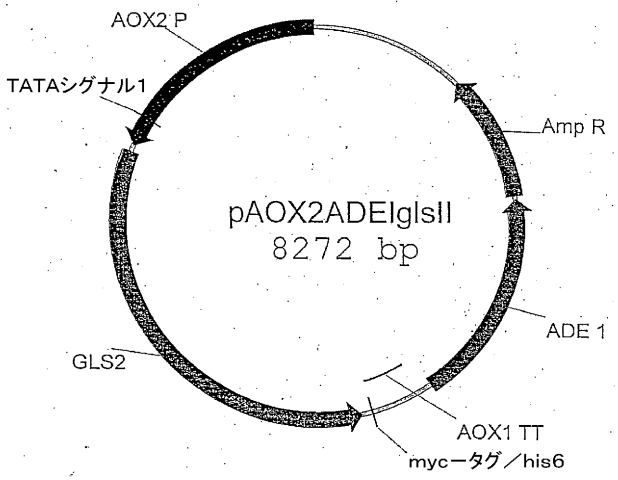


FIG. 17

【図１８】

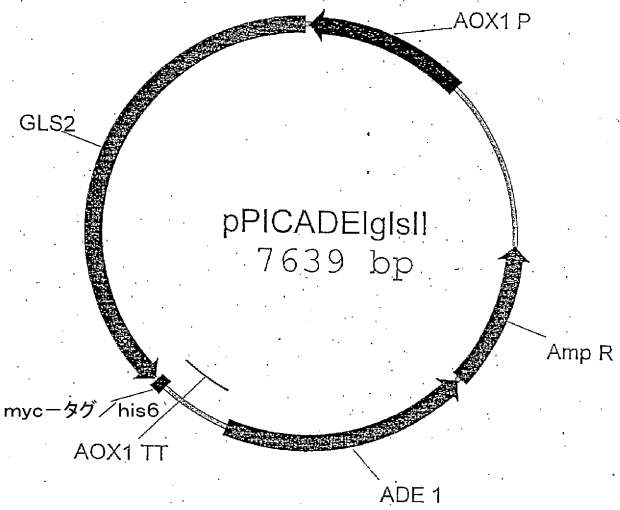


FIG. 18

【図１９】

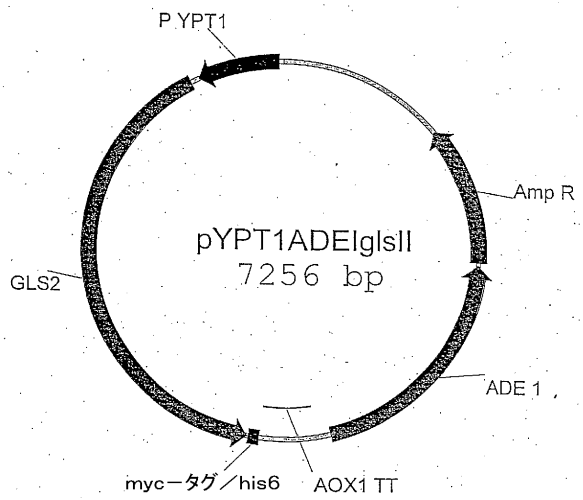


FIG. 19

【図２０】

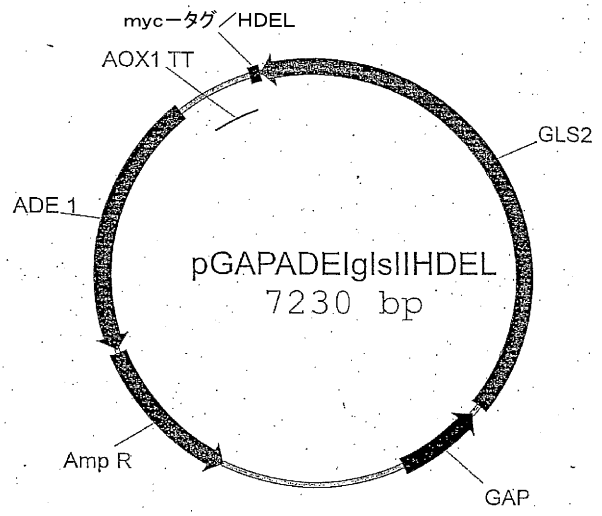


FIG. 20

【図２１】

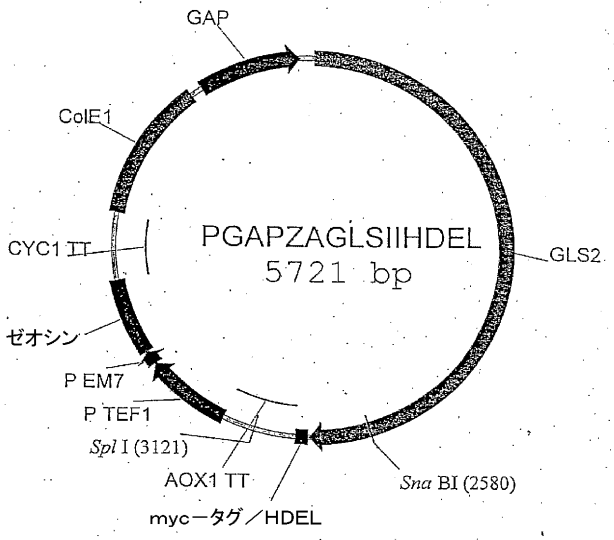


FIG. 21

【図２２】

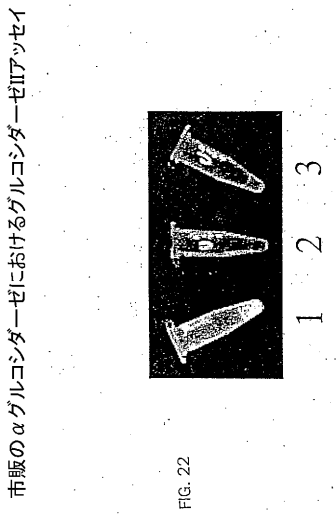


FIG. 22

【図２３】

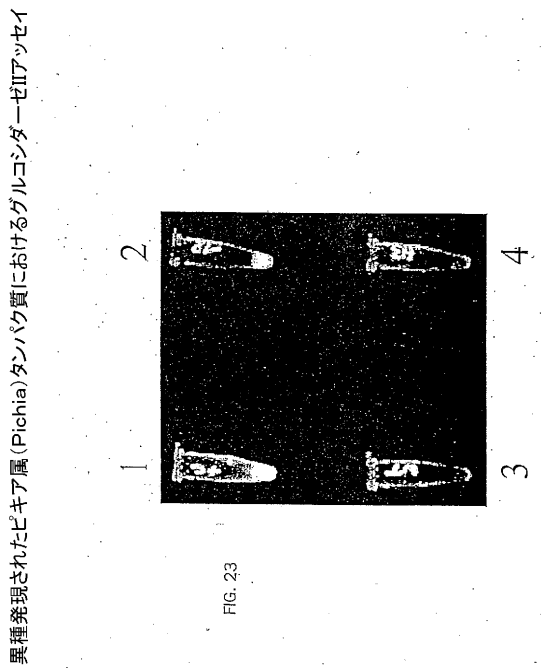


FIG. 23

【図２４】

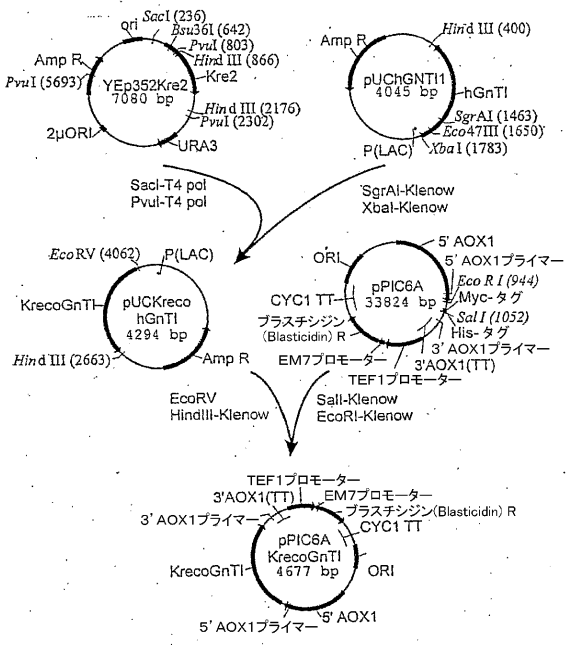


FIG. 24

【図２５】

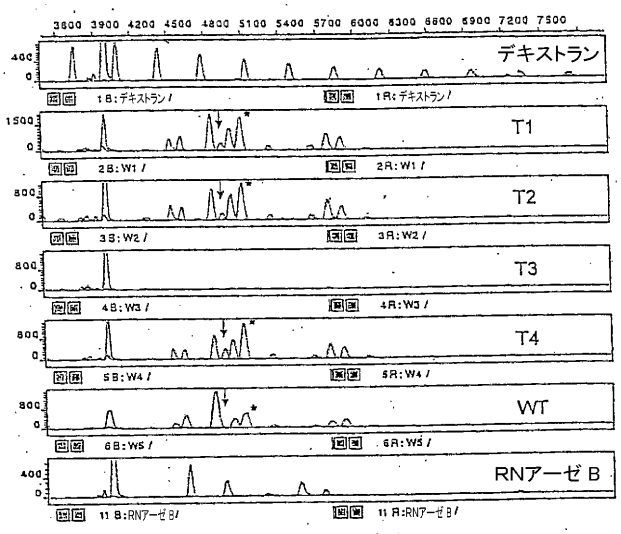


FIG. 25

【図２６】

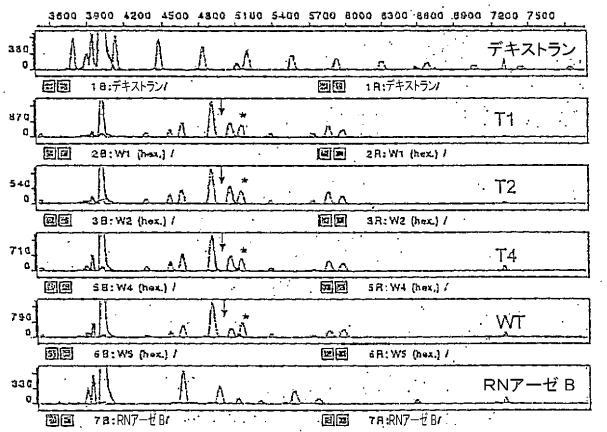


FIG. 26

【図２７】

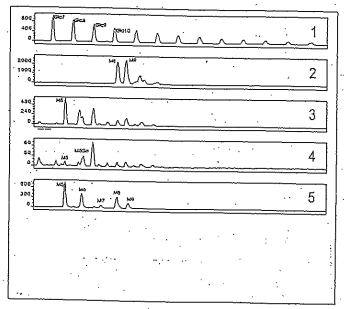


FIG. 27

【図２８】

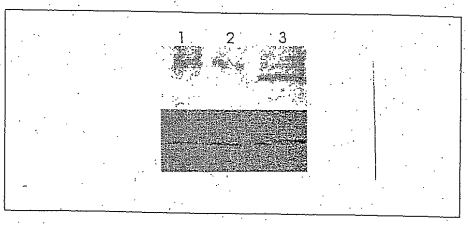


FIG. 28

【図２９】

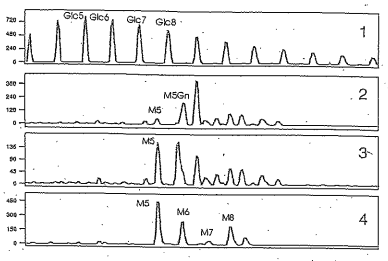


FIG. 29

【図３０Ａ】

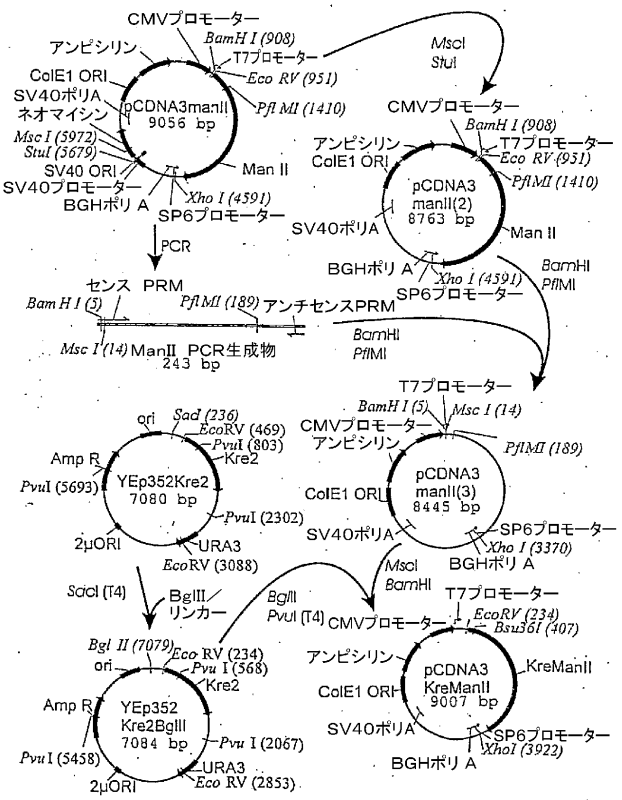


FIG. 30A

【図３０Ｂ】

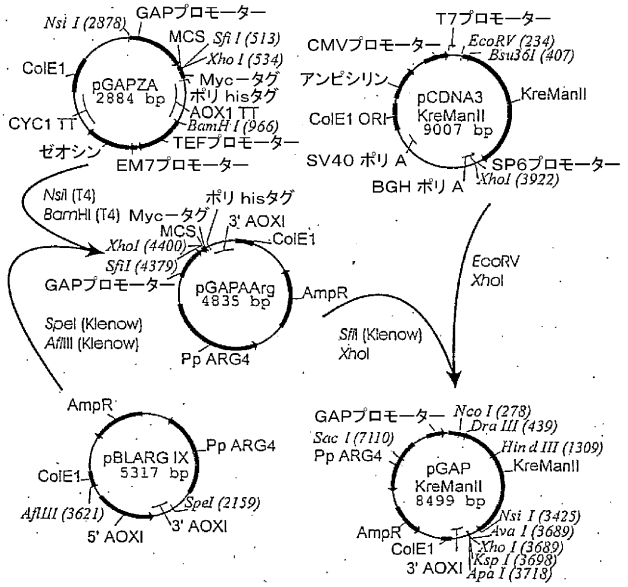


FIG. 30B

【図３１】

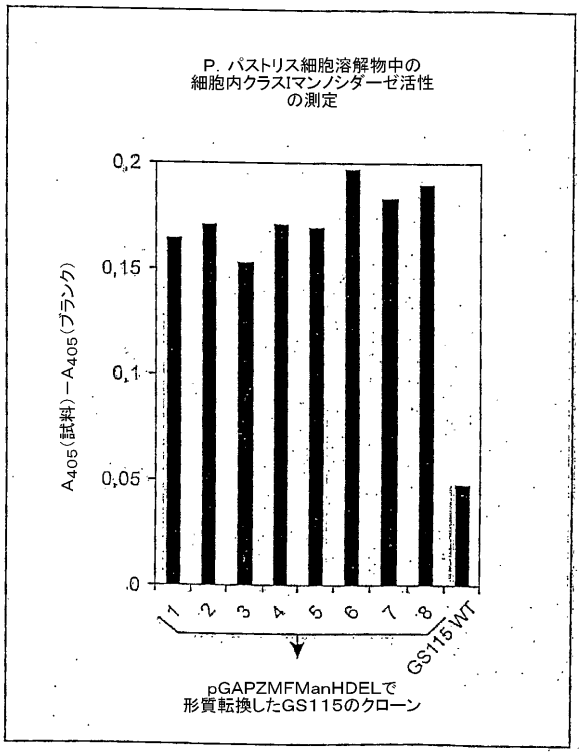


FIG. 31

【図３２】

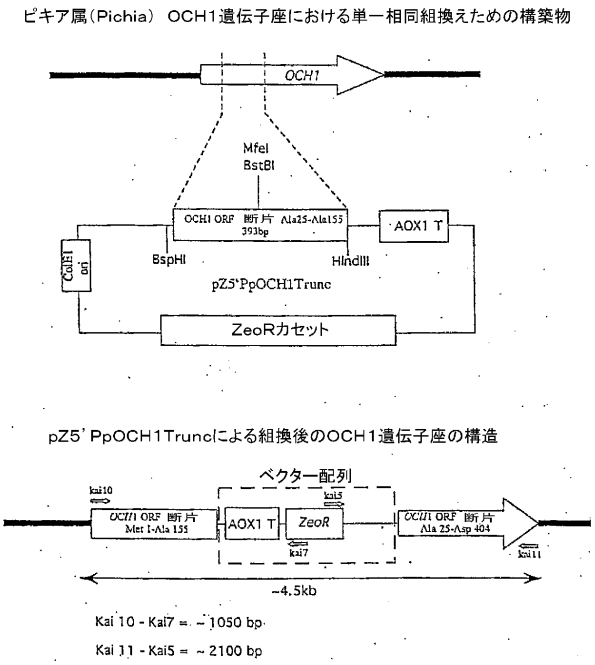


FIG. 32

【図３３】

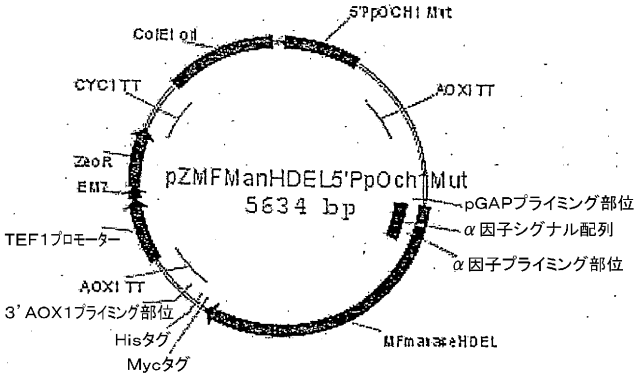


FIG. 33

【図３４】

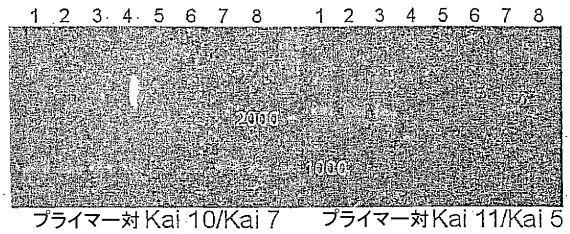


FIG. 34

【手続補正書】
【提出日】平成16年5月25日(2004.5.25)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳動物様グリコシル化パターンを有するタンパク質を産生するためのメチロトローフ酵母株であって、前記株はＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分を発現する、株。
【請求項２】
前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたは前記その機能部分は、前記株の分泌経路内の部位に局在しており、前記部位にある糖タンパク質は$Man_5GlcNAc_2$のオリゴ糖構造を有する、請求項１の株。
【請求項３】
前記部位はゴルジ装置である、請求項２の株。
【請求項４】
$GlcNAcMan_5GlcNAc_2$を有するタンパク質を産生する請求項１から３のいずれかによる株。
【請求項５】
前記メチロトローフ酵母はピキア属である、請求項１から４のいずれかによる株。
【請求項６】
前記株は、α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分も発現する、請求項１から５のいずれかによる株。
【請求項７】
前記α－１，２－マンノシダーゼまたは前記その機能部分は、前記株の小胞体（ＥＲ）内に局在する、請求項６の株。
【請求項８】
前記株はＯＣＨ１遺伝子によってコードされる機能性タンパク質を生成することができない、請求項１から７のいずれかによる株。
【請求項９】
前記株はマンノシダーゼIIまたはその機能部分も発現する、請求項１から８のいずれかによる株。
【請求項１０】
前記マンノシダーゼIIまたは前記その機能部分は、前記株のゴルジ装置内に局在する、請求項９の株。
【請求項１１】
前記株は５マンノース残基よりも少ないオリゴ糖構造を有する糖タンパク質を産生する、請求項１０による株。
【請求項１２】
哺乳動物様グリコシル化パターンを有する糖タンパク質を産生することに関するメチロトローフ酵母株であって、前記株はマンノシダーゼIIまたはその機能部分を発現する、株。
【請求項１３】
前記マンノシダーゼIIまたは前記その機能部分は、前記株のゴルジ装置内に局在している、請求項１２の株。
【請求項１４】
前記株は５マンノース残基よりも少ないオリゴ糖構造を有する糖タンパク質を産生する

、請求項１２または１３による株。
【請求項１５】
前記メチロトローフ酵母はピキア属である、請求項１２から１４のいずれかによる株。
【請求項１６】
前記株は、（ａ）α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分、またはＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分の少なくとも１つを発現する、請求項１２から１５のいずれかによる株。
【請求項１７】
前記α－１，２－マンノシダーゼまたは前記その機能部分はＥＲ内に局在し、前記ＧｌｃＮＡｃ－トランスフェラーゼＩまたは前記その機能部分はゴルジ装置内に局在する、請求項１６による株。
【請求項１８】
前記株はＯＣＨ１遺伝子によってコードされる機能的タンパク質を作ることができない、請求項１２から１７のいずれかによる株。
【請求項１９】
メチロトローフ酵母株内でＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたはその機能部分を発現するためのベクターであって、前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたは前記機能部分をコードするヌクレオチド配列に実施可能に連結された、前記メチロトローフ酵母株内で機能するプロモーターを含み、前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩまたは前記機能部分は、前記株の分泌経路内のある部位に関する遺伝子操作された局在化シグナルを含み、前記部位にある糖タンパク質は$Man_5GlcNAc_2$のオリゴ糖構造を有する、ベクター。
【請求項２０】
前記メチロトローフ株はピキア属である、請求項１９のベクター。
【請求項２１】
前記ＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩは、哺乳動物、植物、昆虫、線虫および原虫からなる群より選ばれる種に由来するタンパク質である、請求項１９のベクター。
【請求項２２】
前記局在化シグナルはゴルジ局在化シグナルである、請求項１９のベクター。
【請求項２３】
α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１９から２２のいずれかによるベクター。
【請求項２４】
メチロトローフ酵母株においてマンノシダーゼIIまたはその機能部分を発現するためのベクターであって、前記マンノシダーゼIIまたは前記機能部分をコードするヌクレオチド配列に実施可能に連結された前記メチロトローフ酵母株において機能するプロモーターを含み、前記マンノシダーゼIIまたは前記機能部分はゴルジ局在化シグナルを含む、ベクター。
【請求項２５】
前記メチロトローフ株はピキア属である、請求項２４のベクター。
【請求項２６】
前記マンノシダーゼIIは、哺乳動物を起源とする、請求項２４のベクター。
【請求項２７】
α－１，２－マンノシダーゼまたはその機能部分をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項２４から２６のいずれかによるベクター。
【請求項２８】
哺乳動物様グリコシル化パターンを有する糖タンパク質を産生するための、請求項１から１８のいずれかによる株の用途。
【請求項２９】
哺乳動物様グリコシル化パターンを有する糖タンパク質を産生するメチロトローフ酵母

株を作製するための、請求項１９から２７のいずれかによるベクターの用途。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/06711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N9/24 C12N15/81 C12P21/00 C12N9/10 //C12R1:84

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 00856 A (FLANDERS INTERUNIVERSITY INST) 3 January 2002 (2002-01-03) page 3, line 19 -page 4, line 4 page 15, line 6 -page 17, line 2 page 18, line 18 -page 20, line 25 page 21, line 3 -page 23, line 14 page 23, line 18 -page 24, line 5 page 27, line 1-5 page 27, line 22 -page 28, line 21 page 30, line 5 -page 31, line 2 examples 1-3 --- -/--	1-14, 39-44, 47-56

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 March 2004	05 03 2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	ALCONADA RODRIG.., A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/06711

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 21038 A (MARAS MARLEEN ;CONTRERAS ROLAND (BE); ALKO GROUP LTD (FI)) 11 July 1996 (1996-07-11) page 26, last paragraph -page 27, paragraph 2 examples 7,15,17 claims 9-14	15-18, 21,22, 25-28, 39-56
X	WO 92 09694 A (HSC RES DEV LP) 11 June 1992 (1992-06-11) page 7-13 page 14, line 9 page 15, paragraph 1	15-18, 21,22, 25-27, 39-44, 47-56
X	WO 02 00879 A (GLYCOFI INC) 3 January 2002 (2002-01-03) table 6 page 17, line 12 -page 18, line 20 page 27, line 27 -page 28, line 14 examples 2,3	15-18, 21-26, 29-36, 38-44, 47-56
X	EP 1 211 310 A (KIRIN BREWERY ;NAT INST OF ADVANCED IND SCIEN (JP)) 5 June 2002 (2002-06-05) example 7	29-31, 34, 38-40, 43,49-52
T	CHOI BYUNG-KWON ET AL: "Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast Pichia pastoris." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 100, no. 9, 29 April 2003 (2003-04-29), pages 5022-5027, XP002267831 April 29, 2003 ISSN: 0027-8424 (ISSN print)	
T	HAMILTON STEPHEN R ET AL: "Production of complex human glycoproteins in yeast." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 301, no. 5637, 29 August 2003 (2003-08-29), pages 1244-1246, XP002267832 ISSN: 0036-8075 (ISSN print)	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/06711

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [ ] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. [X] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT, part of the additional fees are to be refunded.

1. [X] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[X] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 03/06711

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-14 (complete) and 39-44, 47-56 (partially)

A vector expressing an alpha-1,2 mannosidase and a nucleotide sequence which inhibits the expression of the functional Och1p protein in a methylotrophic yeast; a method of modifying or reducing the glycosylation properties of a protein in a methylotrophic yeast comprising transforming said yeast with the above vector; a strain of methylotrophic yeast transformed with the above vector, a method of producing a glycoprotein with reduced or modified glycosylation comprising transforming a methylotrophic yeast with the above vector and producing said glycoprotein from the transformed cells; a glycoprotein produced by said method, a kit comprising the above vector and, optionally, a methylotrophic yeast, in particular, Pichia pastoris.

2. Claims: 15-28 (complete) and 39-44, 47-56 (partially)

As invention 1 but referred to a vector comprising a nucleotide sequence coding for a GlcNAc-transferase I.

3. Claims: 29-38 (complete) and 39-44, 47-56 (partially)

As invention 1 but referred to a vector comprising a nucleotide sequence coding for a mannosidase II

4. Claim : 45 and 46 (complete)

A methylotrophic yeast which comprises a first vector coding for a GlcNAc-transferase I and a second vector coding for an alpha-1,2-mannosidase or transformed with a single vector which codes for both a GlcNAc-transferase I and an alpha-1,2-mannosidase.

International Application No. PCT/EP 03/06711

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1-13 and 39 relate to a vector which contains two structural elements, one of which is defined by reference to a desirable characteristic or property, namely, that it is able to inhbit the expression of the functional OCH1 protein in a methylotrophic yeast. The claims cover vectors containing all elements having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such elementsvectors. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the element within the vector by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the vector comprising a region of the P.pastoris OCH1 gene which is devoid of any promoter region and that codes for an inactive fragment of Och1p.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/06711

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200856 A	03-01-2002	AU 7765801 A	08-01-2002
		CA 2411968 A1	03-01-2002
		EP 1294910 A2	26-03-2003
		WO 0200856 A2	03-01-2002
		JP 2004501635 T	22-01-2004
		US 2002188109 A1	12-12-2002
WO 9621038 A	11-07-1996	US 5834251 A	10-11-1998
		AU 4348696 A	24-07-1996
		EP 0799318 A1	08-10-1997
		WO 9621038 A1	11-07-1996
WO 9209694 A	11-06-1992	AU 8941191 A	25-06-1992
		WO 9209694 A2	11-06-1992
WO 0200879 A	03-01-2002	AU 7684201 A	08-01-2002
		CA 2412701 A1	03-01-2002
		EP 1297172 A2	02-04-2003
		JP 2004501642 T	22-01-2004
		WO 0200879 A2	03-01-2002
		US 2004018590 A1	29-01-2004
		US 2002137134 A1	26-09-2002
EP 1211310 A	05-06-2002	AU 6592800 A	19-03-2001
		CA 2382184 A1	01-03-2001
		EP 1211310 A1	05-06-2002
		CN 1379811 T	13-11-2002
		WO 0114522 A1	01-03-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 カレワート、 ニコ エル. エム.
ベルギー国 ビー－８８１０ リヒテルベルデ ケテルブイサーストラート ９９
(72)発明者 ジーセンズ、 スティーブン シー. ジェイ.
ベルギー国 ビー－９７７０ クルイショウテム ステーンビークストラージェ ８
(72)発明者 カイゴロドフ、 ウラジミル
ベルギー国 ビー－９０００ ジェント レデガンクストラート ３５
(72)発明者 ウォーター、 ベルベッケン
ベルギー国 ビー－９０４０ ジェント－リーデベルグ バンホーレベクストラート ９０

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA10 BA12 CA04 CA20 DA12 EA04 GA14
4B064 AG01 CA06 CA19 CC24 DA01
4B065 AA70Y AA77X AA80Y AA90Y AB01 BA03 CA26 CA44
4H045 AA10 AA20 BA10 CA15 EA20 FA74