

I232238

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

日本

1999年08月19日 特願平11-233215 ☐有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於：食品工業發展研究所

寄存日期： 2000.8.17

，寄存號碼： CCRC 920023
CCRC 920024
CCRC 920025
CCRC 920026

裝

訂

線

五、發明說明(1)

技術區域

本發明係提供一利用新穎酵母變異株及使用該變異株之糖質工程方法之糖鏈及糖蛋白質的製造方法，其中該酵母變異株可生產一種糖蛋白質，其在該蛋白質的天門冬酸殘基上，附加有與哺乳類細胞所生產之糖鏈相同之糖鏈構造之糖鏈。

背景技術

存在於自然界之蛋白質中，有由胺基酸單獨構成之單純蛋白質，以及結合有糖鏈、脂質、磷酸等的複合蛋白質二種類，已知有關細胞激素類，其幾乎都是糖蛋白質，其中，紅血球生成素(EPO)及組織胞漿素原(Plasminogen)活性化因子(TPA)等，則已明白確知將其糖鏈去除時，其將不再具有原來之生物活性(木幡陽，蛋白質核酸酵素，36，775-788 (1991))。基此，可以預料糖鏈係在生物活性的表現上扮演重要的角色，但由於糖鏈的構造與生物活性之相關性未必明確之故，目前急需開發一種技術，其可以完全自由地改變控制附加於蛋白質部分之糖鏈的構造(糖的種類、結合位置、鏈長等)。

糖蛋白質的糖鏈中，可大別為Asn結合型、黏蛋白型、O-GlcNAc型、GPI錨型、蛋白多糖型等(竹內誠、糖質生物技術序列5，糖質技術，木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編，講談社科學，191-208 (1994))，其各自具有固定之生合成經路，並負責個別之生理機能。其中，有關Asn結合型糖鏈的生合成經路，已有相當多的知識，並被詳細地解析了。

Asn結合型糖鏈的生合成，係由N-乙醯胺基葡萄糖、甘露

五、發明說明(2)

糖、以及葡萄糖所構成之前軀體，在脂質載體中間體的上
面所合成，其首先以小胞體(ER)轉移至糖蛋白質的特定序
列(Asn-X-Ser或Thr)上。然後，接受進一步處理
(Processing)(葡萄糖殘基及特定甘露糖殘基之切斷)，從而
合成由甘露糖8殘基與N-乙醯胺基葡萄糖2殘基所構成之
M8高甘露糖型糖鏈($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$)。含有這種高甘露糖型
糖鏈之蛋白質會被運送至高爾基體，接受各種的修飾，但
在此高爾基體之修飾，則酵母與哺乳動物有相當大的不同
(Gemmill, T.R., Trimble, R.B., Biochim. Biophys. Acta., 1426,
227 (1999))。

哺乳類細胞中，在多數的情況下， α -甘露糖苷酶會作用
於高甘露糖型糖鏈上，而切斷甘露糖的數個殘基。在此過
程中所生成之糖鏈($\text{Man}_{5-8}\text{GlcNAc}_2$)，是一種被稱為高甘露
糖型之糖鏈。在經過甘露糖切斷3個殘基的M5高甘露糖型
糖鏈($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$)上，N-乙醯胺基葡萄糖轉移酶(GnT)I
進行作用，轉移1個殘基之N-乙醯胺基葡萄糖，而生成由
 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ 所構成之糖鏈。如此所生成之糖鏈被稱
為混成(Hybrid)型。進一步， α -甘露糖苷酶II、GnT-II一
作用時，就會形成稱為 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 的複合
(Complex)型糖鏈構造，而後，高達數十種的糖轉移酵素群
進行作用，附加N-乙醯胺基葡萄糖、半乳糖、唾液酸等，
形成了各種的哺乳類型糖鏈(圖1)。在哺乳類可見到高甘露
糖型、混成型、複合型的任一種糖鏈，然而，因為蛋白質
之故，其結合之糖鏈會有所不同，或者即使在一個蛋白質
內，亦會有型式不同的糖鏈相結合。這些糖鏈，因為其型

五、發明說明(3)

式以及結合之糖鏈的種類，會具有糖蛋白質的生合成、細胞內辨識、抗原性隱蔽、生體內安定性、器官尋標特性等優秀的功能(遠藤玉夫，糖鎖工學，產業調查會，64-72(1992))。

以基因重組動物細胞作為宿主所生產之歷史上第一個糖蛋白質型醫藥品的紅血球生成素，糖鏈在其之重要性亦被提及。紅血球生成素之糖鏈在其與受體結合時會發生抑制的功能，並顯示其係決定性地參與活性構造之保持、以及體內動態的改善，而為藥理活性的表現之整體上，所必須且不可欠缺者(Takeuchi and Kobata, Glycobiology, 1, 337-346 (1991))。進一步，糖鏈的構造、種類、分枝數目(因為結合於 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 之 GlcNAc 所形成之分枝數目)，其與紅血球生成素之藥理效果間亦被發現具有強烈的相關性(Takeuchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7819-7822 (1989))。亦有報告指出，若是分枝構造不發達的紅血球生成素，在腎臟的清除率就很快速，主要原因就是其體內滯留時間過短所致(Misaizu et al., Blood, 86, 4097-4104 (1995))。這些類似的例子在胎球蛋白等的血清糖蛋白亦可見到，若除去糖鏈末端的唾液酸而露出半乳糖時，就會因為肝細胞表面的外源凝集素而被認識，從而由血液中迅速地消失(Ashwell and Harford, Annu. Rev. Biochem., 51, 531-554 (1982); Morell et al., J. Biol. Chem., 243, 155-159 (1968))。

聚集於人類溶酶體的酵素群的多數，一旦被送到生合成的高爾基體上時，磷酸基就會被附加於其高甘露糖型糖鏈

五、發明說明(4)

的非還原末端的甘露糖的第6個位置上，這會使其成為溶酶體酵素專一性認識標誌。然後，透過與其高親和性受體的甘露糖-6-磷酸受體(MPR)的相結合，可與其他的蛋白質區分開來，並被運送至前驅溶酶體，而在酸性條件下由MPR解離之後，進一步被運送至溶酶體(von Rigura and Hasilik, *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 167-193 (1984))。已知這種溶酶體酵素專一性磷酸基的附加反應，可由2種酵素反應進行，在這些基因有遺傳上的缺陷時，前往溶酶體的尋標機制就會出現異常，而產生通稱為溶酶體疾病的嚴重病狀(Leroy and DeMars, *Science*, 157, 804-806 (1967))。因此，哺乳類型糖鏈，一言以蔽之，可說是其構造與其功能有相當大的關係。

另一方面，在酵母上，甘露糖於M8高甘露糖型糖鏈上附加了數個殘基至100個以上的殘基，而生成了甘露糖型糖鏈(外糖鏈)。酵母菌屬(*Saccharomyces*)屬酵母上的外糖鏈之生合成，係被認為以如圖2、3所示的經路來進行(Ballou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3368-3372 (1990))。亦即，在M8高甘露糖型糖鏈上，首先係以 α -1,6結合使甘露糖被附加於其上，並發生延長開始反應(圖2，反應I，B)。目前已確認進行此反應的酵素是編碼OCH1基因的蛋白質(Nakayama et al., *EMBO J.*, 11, 2511-2519 (1992))。進一步，由於 α -1,6結合使甘露糖發生了逐次加長的反應(圖2，II)，並形成作為外糖鏈之骨架的聚 α -1,6結合甘露糖之結合(圖2，E)。在此 α -1,6結合之甘露糖上，存在有 α -1,2結合之甘露糖分枝(圖2，3：C，F，H)，而在此分枝 α -1,2結合之甘露糖的前端，進一步附加有 α -1,3結合之甘露

五、發明說明 (5)

糖(圖2, 3: D, G, H, I)。此 α -1,3結合之甘露糖的附加,係由於MNN1基因產物所致者(Nakanishi-Shindo et al., J. Biol. Chem., 268, 26338-26345 (1993))。又,在高甘露糖型糖鏈部分以及外糖鏈部分上,已知亦生成有甘露糖-1-磷酸所附加的酸性糖鏈(圖2, *;相對應於前述式(I)中的*的可能磷酸化部位)。已知此反應係由於MNN6基因所編碼的基因所致者(Wang et al., J. Biol. Chem., 272, 18117-18124 (1997)),並進一步了解編碼正向控制此轉位反應之蛋白質係基因MNN4(Odani et al., Glycobiology, 6, 805-810 (1996); Odani et al., FEBS letters, 420, 186-190 (1997))。

在許多的情況下,外糖鏈會生成不均質的蛋白質產物,而使得蛋白質的純化變得困難,並降低比活性(Bekkers et al., Biochim. Biophys. Acta, 1089, 345-351 (1991))。進一步,由於糖鏈的構造有很大的不同,酵母所生產之糖蛋白質,並沒有被檢測出與哺乳類所衍生者具有相同之生物活性,而且對於哺乳類動物等具有很強的免疫原性。基此,在作為使生產哺乳類衍生之有用糖蛋白質的宿主方面,酵母就變得不適合。從而,開發具有與哺乳類衍生者相同之生物活性的糖蛋白質,亦即,開發可生產含有哺乳類型的糖鏈之糖蛋白質的酵母,就成為學會以及產業界所殷切期盼的目標了。

因此,為使用酵母生產哺乳類型糖鏈,首先,其重要者係須使前述酵母特有的糖蛋白質糖鏈修飾之甘露糖,不要發生多數附加反應,不要附加外糖鏈,並分離糖鏈合成係以M8高甘露糖型糖鏈所停止之具有糖鏈生合成系之變異株

五、發明說明 (6)

。然後，在此哺乳類型糖鏈的前驅體之M8高甘露糖型糖鏈上，將哺乳類型糖鏈之生合成系基因導入上述酵母變異株，就可以達成了。

基此，為得到自始外糖鏈有缺失之糖蛋白質，茲檢討使用酵母外糖鏈生成系酵素群之缺失株。為得到缺失株，有利用藥劑及紫外線照射等自然變異的取得基因突變株之方法，以及人為的破壞標的基因之方法。

關於前者，到目前為止有各種的報告。舉例來說，mnn2變異株，其在由外糖鏈的 α -1,6骨架生出 α -1,2間的結合的分枝階段，具有變異；mnn1變異株，則在分枝前端生成 α -1,3結合的甘露糖階段，具有變異。然而，這些變異株由於在外糖鏈的骨架之 α -1,6甘露糖結合上，不具有缺失之故，其不論何者均生成有長的外糖鏈。又，mnn7, 8, 9, 10變異株等，其被分離者係只具有4~15個分子左右的 α -1,6甘露糖結合之變異株，該等變異株只是外糖鏈短，但是高甘露糖型糖鏈之糖鏈加長並沒有停止(Ballou et al., J. Biol. Chem., 255, 5986-5991 (1980); Ballou et al., J. Biol. Chem., 264, 11857~11864 (1989))。外糖鏈之附加缺失，其蛋白質由小胞體至高爾基體之運送現象，即使在具有溫度敏感性的sec18等的分泌變異株等，亦可以觀察得到。然而，由於sec變異株其蛋白質分泌本身，會因為高溫而被抑制，因此與糖蛋白質之分泌生產的目的並不相符。

因此，由於這些變異株無法將標的之高甘露糖型糖鏈完全地生合成之故，將其作為可生成哺乳類糖鏈的宿主酵母就極不適合。

五、發明說明(7)

另一方面，酵母上的小胞體(ER)中的糖鏈生合成經路，其經由將生合成的各階段有缺失之變異株加以分離，在進行生化學的解析而明瞭。其中，alg(asparagine-linked glycosylation)變異株，由於 $[^3\text{H}]$ 甘露糖被捕獲至糖鏈上的情形較具有外糖鏈的野生型細胞更少之故，藉由濃縮有避開放射線所導致之損傷・死亡的變異株，就可以技巧性地將其篩選分離出來。其中，alg3變異在非容許溫度下，會蓄積 Dol-pp-GlcNAc₂-Man₅(Dol-pp 為多萜醇焦磷酸)(Tanner, W. et al., Biochim. Biophys. Acta., 906, 8199 (1987))。又，地神等人則使用 Δ ochlmnn1alg3 三重變異株而進行解析(地神等，蛋白質核酸酵素，Vol. 39, No. 4, p.657 (1994))。將甘露聚糖蛋白質糖鏈以 PA(2 吡啶胺)進行螢光標定之後，分析，顯示其主要成分具有與 Man₈GlcNAc₂-PA 及 Man₅GlcNAc₂-PA 一致的二個峰部。其中，前者由 α -1,2-甘露糖苷酶消化及 FAB-MS 的結果，判定係與 ER 核心糖鏈具有同一性。另一方面，後者則由於 α -1,2-甘露糖苷酶消化，Man 二個分子被除去而生產 Man₅GlcNAc₂-PA，而藉由將 α -1,6 結合之 Man 進行專一性地切斷處理(部分乙酸解作用)，就可以只除去 Man 一個分子。基於這些結果，判定該三重變異株所生產之 Man₅GlcNAc₂-PA 的糖鏈，係前述式(II)所示之不完全核心型糖鏈構造。又，至於此三重變異株不只 Man₅GlcNAc₂，亦同時生成 Man₈GlcNAc₂ 的理由，是因為在多萜醇焦磷酸上，蓄積 Man₅GlcNAc₂-pp-Dol 的 alg3 變異之性質「滲漏」(leaky)所致。

另一方面，關於後者，由於近年來基因工程的技術之進

五、發明說明(8)

步，已經可以構築複數以上的標的基因破壞之缺失變異株。

已知在酵母中具有營養要求變異株，該營養要求變異株有 leu2 變異、trp1 變異、ura3 變異、ade2 變異、his3 變異等(大嶋泰治編著，生物化學實驗法39，酵母分子遺傳學實驗法，119-144 (1996))。若導入沒有變異的原來的基因時，就可以解除這些變異株的營養要求性，而不必在培養基中加入必要成分就可以使其生育。基於此原理可以進行酵母基因之破壞(圖4)。此方法中，首先係利用試管內之操作，將質體上的標的基因DNA切分成段，或使其部分缺失，再插入適當的選擇性標記基因DNA，並在標的基因的上游部分和下游部分之間，夾著選擇性標記，就可以製作成構造體。其次，將具有此構造之現狀DNA導入酵母細胞，在導入片段的兩邊與染色體上的標的基因間的共同部分上，進行2次的重組反應，而製作成取代有夾帶了選擇性標記的DNA構成體之酵母細胞(Rothstein, Methods Enzymol., 101, 202-211 (1983))。在此方法下，為破壞1個基因則需要1個選擇性標記。

外糖鏈有缺失之酵母株的分子育種，其已經記載於特開平6-277086及特開平9-266792上。但是，已知在以特開平6-277086所記載之二重變異株($\Delta och1 \Delta mnn1$)生產之糖蛋白質糖鏈上，含有不具有磷酸殘基之酸性糖鏈。此酸性糖鏈係人類等哺乳類衍生之糖鏈上所不存在者，而被認為會在哺乳類的體內被認識成異物，並具有抗原性(Ballou, Methods Enzymol., 185, 440-470 (1990))。因此，進一步將正面控制甘露糖-1-磷酸轉移的基因(MNN4)與進行O-結合

五、發明說明(9)

型糖鏈的延長反應之甘露糖轉移酵素基因(KRE2)的功能，加以破壞，而製作成四重變異株(特開平9-266792)。其記載之酵母株所生產之糖蛋白質的糖鏈，已知其具有標的之M8高甘露糖型糖鏈。進一步，在此經破壞的酵母上，導入麴菌(*Aspergillus saitoi*)衍生之 α -1,2-甘露糖苷酶基因，確知其係具有甘露糖被切斷1~數個殘基之高甘露糖型糖鏈($\text{Man}_{5-8}\text{GlcNAc}_2$)(Chiba et al, J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998))。

又，新間等人又進一步製作了導入有alg3變異之他種的四重變異株(Shimma Y. et al., Mol. Gen. Genet., 256, 469-480 (1997); Wang et al., J. Biol. Chem. 272, 18117-18124 (1997)；新間陽一，地神芳文，第32回酵母遺傳學討論會要旨集，p.64 (1999)；Shimma Y. et al., Abstracts of XIX International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, p. 443 (1999))。

再者，這些酵母株所生產之糖蛋白質的糖鏈，其在哺乳類亦有存在且不具有抗原性，而由紅血球生成素的例子亦可以明白，含有高甘露糖型糖鏈之糖蛋白質，由其糖鏈構造推測，係不具有與哺乳類細胞生產之糖蛋白質相等之活性。又，此四重變異株藉由標的基因之破壞，產生劣性基因變異的宿主，其四個選擇標記(*leu2*, *ure3*, *lys2*, *trp1*)以後就不能再使用了。進一步，剩下的營養要求性標記中的一個，由於並非為突變而是被人為破壞，所以也不能利用染色體上的這些標記基因座之相同性，而重組至酵母染色體上。因此，對於這些酵母株，就很難將用於生產哺乳類型

五、發明說明(10)

糖鏈之糖鏈加水分解酵素基因群、糖轉移酵素基因群、糖核苷酸運送體基因群等基因，以及生產有用的糖蛋白質的基因，加以複數個的導入。如前所述，為生產哺乳類型的糖連鎖必須的糖轉移酵素群有十幾個之多，若將此酵母細胞作為宿主，由糖鏈構造的角度來思考，其控制改變上將極不合適。

本發明之課題，係用以克服Asn-結合型糖蛋白質的酵母在生產時，上述的全部問題，從而提供與人類及其他哺乳類動物所生產之高甘露糖型、混成型、複合型同一之糖鏈構造的糖類，以及使用含有該糖鏈的糖蛋白質之酵母而製造的方法。

發明之開啟

本發明者們為解決上述課題而進行深入檢討之結果，發現了可繼續保持選擇性標記的營養要求性變異株，亦即最終地不需要導入與營養要求性互補之基因，而在酵母上將其專一地生合成外糖鏈之基因中，藉由破壞進行最初的延長附加反應之 α -1,6甘露糖苷酶的編碼基因(OCH1)、在糖鏈的非還原末端上附加甘露糖之 α -1,3甘露糖苷酶的編碼基因(MNN1)、以及控制甘露糖-1-磷酸的附加之基因(MNN4)，所作成的新穎酵母變異株(營養要求性三重變異株)，就可以生產具有與哺乳類型糖鏈同一之糖鏈構造的糖鏈，又或者，在該變異株上，將各種哺乳類型糖鏈的生合成系基因導入時，就可以生產各種哺乳類型糖鏈。

亦即，本發明係有關於以下之(1)~(14)。

(1)一種具有糖蛋白質生產能力之酵母變異株，其係含有

11

$$\begin{array}{c}
 * \\
 \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \quad \backslash \\
 \qquad \qquad \qquad 6 \\
 \qquad \qquad \qquad 3 \text{Man}\alpha 1 \quad \backslash \\
 \text{Man}\alpha 1 \quad / \quad \qquad \qquad 6 \\
 \qquad \qquad \qquad 3 \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \quad (\text{I}) \\
 \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \quad / \\
 *
 \end{array}$$

(2) 一種具有糖蛋白質生產能力之酵母變異株，其係含有上式(I)所示的寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈，且其特徵為最終地不導入營養要求性之互補基因，而為具有破壞OCH1基因之och1變異($\Delta och1$)、破壞MNN1基因之mnn1變異($\Delta mnn1$)、破壞MNN4基因之mnn4變異($\Delta mnn4$)的變異形質，以及至少一個以上的營養要求性變異形質。

(4) 上述(3)記載之酵母變異株，其係屬於酵母菌(Saccharomyces)屬之酵母。

(6) 上述(5)記載之酵母變異株，其係屬於啤酒酵母菌

五、發明說明 (12)

(*Saccharomyces cerevisiae*) TIY19株。

(7)一種寡糖鏈之製造法，其特徵係將上述(1)~(6)的任一者所記載之酵母變異株培養於培養基中，將含有上述式(I)所表示之寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，再由該培養物採取該糖蛋白質，並由所採取之糖蛋白質回收該寡糖鏈。

(8)一種糖蛋白質之製造法，其特徵係將上述(1)~(6)的任一者所記載之酵母變異株培養於培養基中，將含有上述式(I)所表示之寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，再由該培養物採取該糖蛋白質。

(9)一種糖蛋白質之製造法，其特徵係由含有編碼哺乳類衍生之天門冬酸結合型糖蛋白質基因之重組質體，將利用該質體進行轉形後所得到上述(1)~(6)的任一者所記載之酵母變異株，進一步培養於培養基中，再將含有上述式(I)所表示之寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，而由該培養物採取該糖蛋白質。

(10)一種酵母變異株，其係在具有och1變異、mnn1變異、mnn4變異的變異形質之酵母變異株上，將哺乳類型糖鏈之生合成系基因至少導入二個以上者。

(11)一種酵母變異株，其係在上述(1)~(6)的任一者所記載之酵母變異株上，將哺乳類型糖鏈的生合成系基因至少導入一個以上者。

(12)一種寡糖鏈之製造法，其特徵係將上述(10)或(11)所記載之酵母變異株培養於培養基中，將含有寡糖鏈作為

五、發明說明(13)

天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，再由該培養物採取該糖蛋白質，並由所採取之糖蛋白質回收該寡糖鏈。

(13)一種糖蛋白質之製造法，其特徵係將上述(10)或(11)所記載之酵母變異株培養於培養基中，將含有寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，再由該培養物採取該糖蛋白質。

(14)一種糖蛋白質之製造法，其特徵係由含有編碼哺乳類衍生之天門冬酸結合型糖蛋白質基因之重組質體，將利用該質體進行轉形後所得到上述(10)或(11)所記載之酵母變異株，進一步培養於培養基中，再將含有寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，而由該培養物採取該糖蛋白質。

本發明者們，進一步，藉由破壞上述酵母 α -1,6甘露糖苷酶的編碼基因(OCH1)、在糖鏈的非還原末端上附加甘露糖之 α -1,3甘露糖苷酶的編碼基因(MNN1)、以及控制甘露糖-1-磷酸的附加之基因(MNN4)，所作成的上述酵母變異株(營養要求性三重變異株)上，將參與在ER上的糖鏈生合成之基因(ALG3)加以破壞，而得到新穎的酵母變異株(營養要求性四重變異株)，從而可以不導入哺乳類型糖鏈生合成系基因之一的 α -甘露糖苷酶II基因，而將其他的哺乳類型糖鏈的生合成系基因導入時，就可以生產各種哺乳類型糖鏈。

亦即，本發明係，進一步，有關於以下之(15)~(30)。

(15)一種具有糖蛋白質生產能力之酵母變異株，其係含

14

$$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \\ \diagdown \\ \text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1-2\text{Man}\alpha 1 \end{array} \begin{array}{c} 6 \\ 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \quad (\text{II})$$

(20) 上述(19)記載之酵母變異株，其係屬於啤酒酵母菌

五、發明說明 (15)

(*Saccharomyces cerevisiae*) YS134-4 A 株。

(21) 一種寡糖鏈之製造法，其特徵係將上述(15)~(20)的任一者所記載之酵母變異株培養於培養基中，將含有上述式(II)所表示之寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，再由該培養物採取該糖蛋白質，並由所採取之糖蛋白質回收該寡糖鏈。

(22) 一種糖蛋白質之製造法，其特徵係將上述(15)~(20)的任一者所記載之酵母變異株培養於培養基中，將含有上述式(II)所表示之寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，再由該培養物採取該糖蛋白質。

(23) 一種糖蛋白質之製造法，其特徵係由含有編碼哺乳類衍生之天門冬酸結合型糖蛋白質基因之重組質體，將利用該質體進行轉形後所得到上述(15)~(20)的任一者所記載之酵母變異株，進一步培養於培養基中，再將含有上述式(II)所表示之寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，而由該培養物採取該糖蛋白質。

(24) 一種酵母變異株，其係在具有 *och1* 變異、*mnn1* 變異、*mnn4* 變異、*alg3* 變異的變異形質之酵母變異株上，將哺乳類型糖鏈之生合成系基因至少導入二個以上者。

(25) 一種酵母變異株，其係在上述(15)~(20)的任一者所記載之酵母變異株上，將哺乳類型糖鏈的生合成系基因至少導入一個以上者。

(26) 一種寡糖鏈之製造法，其特徵係將上述(24)或(25)

五、發明說明 (16)

所記載之酵母變異株培養於培養基中，將含有寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，再由該培養物採取該糖蛋白質，並由所採取之糖蛋白質回收該寡糖鏈。

(27)一種糖蛋白質之製造法，其特徵係將上述(24)或(25)所記載之酵母變異株培養於培養基中，將含有寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，再由該培養物採取該糖蛋白質。

(28)一種糖蛋白質之製造法，其特徵係由含有編碼哺乳類衍生之天門冬酸結合型糖蛋白質基因之重組質體，將利用該質體進行轉形後所得到上述(24)或(25)所記載之酵母變異株，進一步培養於培養基中，再將含有寡糖鏈作為天門冬酸結合型糖鏈的糖蛋白質，使其在培養物中生成蓄積，而由該培養物採取該糖蛋白質。

(29)一種酵母株，其係導入有 α -甘露糖苷酶II基因，並具有 α -甘露糖苷酶II活性。

(30)一種 α -甘露糖苷酶II之製造法，其特徵為在培養基上培養上述(29)所記載之酵母株，並採取在培養物中所生成蓄積之 α -甘露糖苷酶II。

本說明書，係包含本申請案之優先權基礎的日本國專利申請平成11年第233215號之說明書及/或其附圖所記載之內容。

附圖之簡單說明

圖1係表示哺乳類動物的一般性的N-結合型糖鏈之生合成經路。

五、發明說明 (17)

圖2係表示酵母(*S.cerevisiae*)之N-結合型糖鏈之生合成經路。圖中，H、C、E則各自表示圖3之I、D、F。

圖3係表示酵母(*S.cerevisiae*)之N-結合型糖鏈之生合成經路(接續圖)。

圖4係表示過去之酵母基因之破壞方法。

圖5係表示最終地不導入營養要求性之互補基因，而破壞基因之方法。

圖6係表示TIY19株細胞表層甘露聚糖蛋白質糖鏈之構造解析情形。

圖7係表示導入有 α -1,2甘露糖苷酶基因之TIY19株的細胞表層甘露聚糖蛋白質糖鏈在Amide-80管柱之構造解析情形。

a：TIY19株的甘露聚糖蛋白質之糖鏈

b：導入有 α -1,2甘露糖苷酶之TIY19株的細胞表層甘露聚糖蛋白質之糖鏈

圖8係表示導入有 α -1,2甘露糖苷酶基因之TIY19株的細胞表層甘露聚糖蛋白質糖鏈在ODS-80T_M管柱之構造解析情形。

a：式(III)所表示之構造的標準糖鏈

b：在圖6所分取之劃分

圖9係表示GnT-I活性測定之結果。

圖10係表示導入有 α -1,2甘露糖苷酶基因及GnT-I基因之TIY19株的細胞表層甘露聚糖蛋白質糖鏈在Amide-80管柱之構造解析情形。

A：只有導入載體之TIY19株的糖鏈構造解析

五、發明說明 (18)

B：導入有 α -1,2 甘露糖苷酶基因及 GnT-I 基因之 TIY19 株的糖鏈構造解析

a：Man₅GlcNAc₂-PA

b：GlcNAcMan₅GlcNAc₂-PA

c：Man₆GlcNAc₂-PA

d：Man₇GlcNAc₂-PA

e：Man₈GlcNAc₂-PA

圖 11 係表示導入有 α -1,2 甘露糖苷酶基因及 GnT-I 基因之 TIY19 株的細胞表層甘露聚糖蛋白質糖鏈在 ODS-80T_M 管柱之構造解析情形。

a：標準品之混合物

b：圖 10. B 所分取之劃分

圖 12 係表示導入有 α -甘露糖苷酶基因 II 之 YPH500 株的細胞萃取液，其進行西方點漬解析之結果。

A：只導入載體 (pYEX-BX-3HA) 之 YPH500 株的細胞萃取液，其進行西方點漬解析之結果

B：導入包含嵌合 α -甘露糖苷酶基因 II 之載體 (pYEOM2-HA) 之 YPH500 株的細胞萃取液，其進行西方點漬解析之結果

圖 13 係表示導入有 α -甘露糖苷酶基因 II 之 YPH500 株的細胞萃取液，其進行 α -甘露糖苷酶活性測定之結果。

A：只導入載體 (pYEX-BX-3HA) 之 YPH500 株的活性測定結果

B：導入包含嵌合 α -甘露糖苷酶基因 II 之載體 (pYEOM2-HA) 之 YPH500 株，其進行活性測定之結果

a：GlcNAcMan₅GlcNAc₂-PA

五、發明說明 (19)

b : GlcNAcMan₃GlcNAc₂-PA

圖 14 係表示導入有 FGF 基因之 TIY48 株(上段)、以及導入有 FGF 基因及 α -1,2 甘露糖苷酶基因之 TIY53 株(下段)之 FGF 糖鏈，其在 Amido-80 管柱之構造解析情形。

符號之說明

GlcNAc, GN : N-乙醯胺基葡萄糖

Man, M : 甘露糖

PA : 2-胺基吡啶化

序列表之簡單說明

序列編號1係表示用於增幅 MNN1 基因之 5' 區域的引子 A。

序列編號2係表示用於增幅 MNN1 基因之 5' 區域的引子 B。

序列編號3係表示用於增幅 MNN1 基因之 3' 區域的引子 C。

序列編號4係表示用於增幅 MNN1 基因之 3' 區域的引子 D。

序列編號5係表示用於增幅 MNN4 基因之 3' 區域的引子 E。

序列編號6係表示用於增幅 MNN4 基因之 3' 區域的引子 F。

序列編號7係表示用於增幅 MNN4 基因之 5' 區域的引子 G。

序列編號8係表示用於增幅 MNN4 基因之 5' 區域的引子 H。

序列編號9係表示用於增幅 ALG3 基因之 5' 區域的引子 I。

序列編號10係表示用於增幅 ALG3 基因之 5' 區域的引子 J。

序列編號11係表示用於增幅 ALG3 基因之 3' 區域的引子 K。

序列編號12係表示用於增幅 ALG3 基因之 3' 區域的引子 L。

序列編號13係表示用於增幅 α -甘露糖苷酶 II 基因之 N 末端區域的引子 M。

序列編號14係表示用於增幅 α -甘露糖苷酶 II 基因之 N 末端區域的引子 N。

五、發明說明(20)

序列編號15係表示用於增幅 α -甘露糖苷酶II基因之中央部區域的引子O。

序列編號16係表示用於增幅 α -甘露糖苷酶II基因之中央部區域的引子P。

序列編號17係表示用於增幅 α -甘露糖苷酶II基因之C末端區域的引子Q。

序列編號18係表示用於增幅 α -甘露糖苷酶II基因之C末端區域的引子R。

序列編號19係表示將HA-tag重複3次結合之編碼基因，其雙股DNA之序列S。

序列編號20係表示編碼OCH1基因的膜貫通區域的雙股DNA之序列T。

序列編號21係表示用於增幅 α -甘露糖苷酶II基因觸酶區域的一部份之引子U。

序列編號22係表示用於增幅 α -甘露糖苷酶II基因觸酶區域的一部份之引子V。

序列編號23係表示用於增幅人類UDP-GlcNAc Transporter基因之引子W。

序列編號24係表示用於增幅人類UDP-GlcNAc Transporter基因之引子X。

序列編號25係表示用於增幅人類prepro α -factor及FGF基因之引子Y。

序列編號26係表示用於增幅人類prepro α -factor及FGF基因之引子Z。

實施發明之型態

五、發明說明 (21)

以下，茲詳細說明本發明。

本發明之酵母變異株所必須之變異形質，係酵母特有之外糖鏈生合成系基因的變異，具體而言，則為och1變異、mnn1變異、mnn4變異，或者och1變異、mnn1變異、mnn4變異、alg3變異。

亦即，只要是上述之變異，其可為自然變異株或者人工變異株。

又，在本發明之酵母變異株上，用於導入外來基因之營養要求性變異形質，其須為使用之酵母株所規定者，具體而言，係由ura3變異、his3變異、leu2變異、ade2變異、trp1變異、can1變異所選擇者。營養要求性變異形質的數目，其應視導入之基因的數目而定，但一般而言，為導入一個基因則必須一個營養要求性變異形質。若導入複數的基因時，導入的基因片段過長，其導入效率會降低，而且表現效率亦會降低，所以營養要求性變異形質的數目，其應隨著導入基因的數目增加。

本發明中，所謂的「營養要求性之互補基因」，係指胺基酸、核酸等的生體成分之合成系基因。因為變異形質係加入而使這些基因無法操作之故，互補基因就是指負責原來功能之基因。從而，就是希望得到原來的酵母株所衍生之基因。

又，所謂的「最終地不導入營養要求性的互補基因」，係指為破壞一個或一個以上的基因(導入變異形質)，而利用一個或一個以上的選擇標記，(亦即，營養要求性變異形質)，在破壞後亦留下與被破壞基因數目相同個數之該形質

五、發明說明 (22)

，因此可以在下一次破壞基因時，重複地使用同一個形質之意(參照圖5)。

本發明中之酵母變異株，其保持有用於導入外來基因之營養要求性變異形質，同時，其酵母特有之外糖鏈生合成系基因已被破壞(以下，稱為營養要求性變異株)，係如以下所製作。

首先，在標的基因的破壞上所必須之DNA基因片段之分離，係利用啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)之基因組，由於其染色體上的任何一個基因座皆為已知(Goffeau et al., *Nature*, 387 (suppl.), 1-105 (1997))，就可以由美國ATCC(American Type Culture Collection)等公家機構，受讓含有標的基因附近的基因片段(ATCC Recombinant DNA materials, 3rd edition, 1993)。又，再利用一般的方法，則可以萃取基因組DNA，並選擇該標的基因。上述中，由啤酒酵母菌萃取基因組DNA，例如可根據Cryer等人的方法(*Methods in Cell Biology*, 12, 39-44 (1975))以及P. Philippsen等人的方法(*Methods Enzymol.*, 194, 169-182 (1991))。

標的基因則根據PCR法使其增幅之後，再進行基因破壞。PCR法係於細胞外(*in vitro*)將DNA的特定片段，利用其區域兩端之意義。反意義引子、耐熱性DNA聚合酶、DNA增幅系統等的組合，以2~3小時使其增幅至數十萬倍以上之技術，而為了增幅該標的基因，可將作為引子的25~30mer的合成單股DNA，當作模板基因組DNA而使用。

本發明中之標的基因之破壞，基本上係根據Rothstein,

五、發明說明 (23)

Methods Enzymol., 101, 202-211 (1983)所揭示之方法。本方法，首先係將質體上之標的基因DNA分段或使其部分缺失，然後插入適當之選擇標記基因DNA，而製成一個在標的基因的上游部分及下游部分之間夾有選擇標記之構造體，然後，並將此構造體導入酵母細胞中。藉由上述之操作，在導入片段(夾有選擇標記的DNA構造體)的兩端及染色體上的標的基因之間的相同部分上，進行二次的重組反應，而將染色體上的標的基因取代成為導入片段。

具體來說，茲舉MNN1基因破壞株的製作為例來說明。由Alani等人所構築之在URA3基因的兩端，結合有沙門桿菌之hisG基因DNA片段之質體(Alani et al., Genetics, 116, 541-545 (1987))，將其以限制酵素切成hisG-URA3-hisG型式，插入質體上之標的基因中，而構築成經過破壞之對立基因。使用此質體而得到與染色體之標的基因取代之基因破壞株。染色體上所插入之URA3基因係以hisG切開，再利用hisG序列間的相同重組反應，而與一複製份的hisG同時由染色體脫落。染色體的標的基因上仍尚存一複製份的被破壞hisG片段，從而宿主細胞係呈現Ura表現型(圖5)。此hisG間的相同性重組反應，可利用5-氟乳清酸(5-FOA)而達成。ura3變異株係對於5-FOA具有抗性(Boeke et al., Mol. Gen. Genet., 197, 345-346 (1984); Boeke et al., Methods Enzymol., 154, 165-174 (1987))，而具有Ura3⁺表現型之細胞株在5-FOA培養基上則不能生育。因此，就可以以添加有5-FOA之培養基，來分離具有抗性形質之菌株，然後再以URA3來操作。

五、發明說明 (24)

以下，在此MNN1基因破壞株上，以相同方法進行MNN4基因破壞，以及OCH1基因破壞，而得到本發明目的之營養要求性三重變異株($\triangle och1 \triangle mnn1 \triangle mnn4$)。再進一步，以相同之方法，進行ALG3基因破壞，更可以得到本發明之營養要求性四重變異株($\triangle och1 \triangle mnn1 \triangle mnn4 \triangle alg3$)。

因此，在利用上述方法進行的人為基因破壞之「人為破壞株」上，原來酵母株所具有之營養要求性變異形質，其並不會因為基因破壞操作而受到損害。所以，該人為變異株所具有之營養要求性變異形質的個數，不論是三重變異株或是四重變異株，都會與原來的酵母株所具有之營養要求性變異形質的個數相同，至少也會具有一個以上。

另一方面，在不利用上述方法而係自然產生之基因破壞的「自然變異株」中，由於不是使用上述方法之故，所以和營養要求性變異形質的個數增減無關。

欲作成生產本發明之M8高甘露糖糖鏈的酵母變異株，過去之方法，皆是使用保有6個營養要求性變異形質的酵母株以便破壞OCH1、MNN1、MNN4基因，但如此一來，因為營養要求性變異形質只剩下3個的緣故，該變異株所具有之營養要求性變異形質的個數，至少必須4個以上。

又，在OCH1、MNN1、MNN4基因變異上，更進一步想做成具有ALG3基因變異的生產M8高甘露糖糖鏈的酵母變異株，過去之方法，可以利用mnn1變異、alg3變異的自然變異株，並且因為必須破壞OCH1、MNN4基因之故，而使用2個營養要求性變異形質。因此，若使用上述保有6個營養要求性變異形質的酵母株時，因為營養要求性變異形質只剩

五、發明說明 (25)

下4個的緣故，該變異株的營養要求性變異形質個數至少就須有5個以上。

又，上述操作中的選擇標記，不只是URA3等的營養要求性標記，亦可使用對於G418、媒染培酸綠(caerulenin)、奧雷歐素、賽奧素、刀豆胺酸、放線菌酮、四環黴素等的藥劑具有抗性之標記等。又，具有對於甲醇及乙醇等的溶劑之抗性、對於甘油及鹽等的滲透壓抗性、或對於銅等的金屬離子抗性等之基因，亦可以進行基因之導入及破壞。

在上述操作中，將DNA導入細胞及使用其所進行之轉形方法，一般的方法，舉例來說，載體若是使用病毒時，利用將該病毒感染大腸菌宿主之方法，可以很有效率地將DNA置入宿主中。又，使用質體來使酵母轉形之方法，則以鋰鹽處理使其自然地成為容易抓取DNA之狀態，從而置入質體之方法，以及以電擊方式將DNA導入細胞內之方法(Becker and Guarente, Methods Enzymol., 194, 182-187 (1991))。

又，在上述之操作中，該DNA之純化、分離等皆係以一般方法，例如在大腸菌的情形，可以鹼性/SDS法以及乙醇沉澱來進行DNA之萃取，再進一步以RNase處理、PEG沉澱法等，就可以將DNA純化。又，基因的DNA序列的決定等亦是使用一般的方法，例如二去氧法(Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467 (1977))等。進一步，上述DNA鹼基序列之決定，即使使用市售之定序套組等亦可以很容易地得到。

如上所製備之營養要求性變異株，其可以生產高甘露糖

五、發明說明 (26)

型之哺乳類型糖鏈，甚至在生產雜合型、複合型的糖鏈哺乳類型糖鏈上，可以在該變異株中導入酵母特有之糖鏈加水分解酵素基因群、糖轉移酵素基因群。又，原來糖鏈酵素的生合成，如前所述，因為可以在ER、高爾基體中進行之故，作為糖鏈原料之糖苷運送體就必須存在於這些器官之中，然而，在酵母內這些糖苷運送體並不存在，而即使有存在，在這些糖鏈之生合成器官中亦只有存在微量而已。因此，就必須有糖苷運送體基因群，其可將細胞質內所生合成之糖苷，使其由細胞質向ER、高爾基體內移動。

基此，在本發明中，茲將屬於上述之糖鏈加水分解酵素基因群、糖轉移酵素基因群、糖苷運送體基因群之基因，稱為「哺乳類型糖鏈之生合成系基因」。

糖鏈加水分解酵素基因群，例如有 α -甘露糖苷酶(α -mannosidase I, α -mannosidase II)等的基因；糖轉移酵素基因群例如有N-乙醯胺基葡萄糖轉移酶(GnT-I、GnT-II、GnT-III、GnT-IV、GnT-V)、半乳糖轉移酶(GalT)、岩藻糖轉移酶(FucT)等的基因；糖苷運送體基因群例如有UDP-GlcNAc運送體、UDP-Gal運送體等的基因。這些基因可以從哺乳類衍生之基因中分離，或者以合成方法亦可得到。

上述之「哺乳類型糖鏈之生合成系基因」，係將屬於上述之1種或2種以上之基因群的基因，只導入會生產標的糖鏈者之必要個數。導入基因若為複數以上時，這些基因可以是屬於同種的基因群，亦可以屬於彼此不同之基因群。

上述之營養要求性變異株，或者，在該營養要求性變異株上導入有上述之外來基因群的變異株，其若在培養基培

五、發明說明 (27)

養時，就可以在酵母細胞內或細胞外，生產糖蛋白質，其中，酵母特有之外糖鏈的含量很低，並含有與哺乳類細胞所生產之高甘露糖型糖鏈($\text{Man}_{5-8}\text{GlcNAc}_2$)、混成型糖鏈($\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$)、複合型糖鏈($\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 等)具有相同之Asn結合型糖鏈。

具體來說，營養要求性變異株若使用三重變異株($\Delta\text{och1}\Delta\text{mnn1}\Delta\text{mnn4}$)時，藉由在該變異株上導入 α -甘露糖苷酶I基因以及GnT-I基因，可以生產混成型糖鏈，又，藉由導入哺乳類型糖鏈之生合成系基因(α -甘露糖苷酶II、GnT-II、GalT、UDP-GlcNAc運送體、UDP-Gal運送體基因)，就可以生產雙股複合型糖鏈($\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$)。

進一步，藉由導入GnT-IV、GnT-V基因，亦可以生產三股複合型糖鏈、四股複合型糖鏈。

又，若營養要求性變異株係使用四重變異株($\Delta\text{och1}\Delta\text{mnn1}\Delta\text{mnn4}\Delta\text{alg3}$)時，則不導入 α -甘露糖苷酶II基因，而藉由導入哺乳類型糖鏈之生合成系基因(α -甘露糖苷酶I、GnT-I、GnT-II、GalT、UDP-GlcNAc運送體、UDP-Gal運送體基因)，就可以生產雙股複合型糖鏈($\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2$)。

為得到高產率之糖鏈以及蛋白質，必須上述酵素在適當的器官(例如高爾基體)之中，可以高度表現。因此，使用與酵母的密碼使用頻度相符合之基因就相當有效。又，為使酵素侷限於適當的器官中，附加酵母之訊息序列等亦相當有效。關於基因的導入，可考慮者有使用 $2\mu\text{m}$ 質體型式(YEp型式)、染色體重組型式(YIp型式)載體之方法，其亦

五、發明說明 (28)

可根據目的之不同而分開使用。YEp型式的載體因為可將基因以多複製數導入之故，所以可使基因大量表現。另一方面，YIp型式之載體由於可以使基因存在於染色體之中，所以可以安定地保持基因。為表現基因所需要之啟動子，如GAPDH、PGK等的構成性表現啟動子，GAL1、CUP1等的誘導表現啟動子等，並無特別之限制，但以在糖鏈的生產上係構成性表現啟動子為佳。不過，若是將糖鏈加水分解酵素、糖轉移酵素、糖苷運送體基因以一種或複數表現之情形，因為會影響到酵母增殖之故，此時必須考慮到誘導啟動子的使用，以及導入基因之順序等。

又，本發明中之營養要求性變異株，除如上述利用人工基因破壞法得到變異株以外，亦可以利用藥劑及紫外線照射、自然變異而得到變異株。這種自然變異株亦相同地，可利用導入前述之哺乳類型糖鏈之生合成系基因(屬於糖鏈加水分解酵素基因群、糖轉移酵素基因群、糖苷運送體群之基因)，而生產哺乳類型糖鏈及具有哺乳類型糖鏈之糖蛋白質。

進一步，為生產具有上述糖鏈之異種生物衍生之糖蛋白質，可將上述酵母變異株當作宿主，而將編碼標的糖蛋白質之基因(cDNA等)，於可以在酵母中表現之啟動子的下游製作接續基因，再利用相同重組反應重組至上述酵母宿主中；或者，藉由插入質體而使上述宿主轉形，而製作上述宿主之轉形體，將這些利用習知方法進行培養，就可以在酵母細胞內或細胞外，回收所生產之標的糖蛋白質。

上述酵母變異株之培養，可依據酵母培養上所常用之方

五、發明說明(29)

法來進行。舉例來說，可添加Difco公司所供應之各種培養基成分，再利用質體的複製、保持上所必須之標記，以及扣除掉可(另行)供應之胺基酸的合成培養基(含有碳源、氮源、無機鹽類、胺基酸、維生素等)等來進行。

由上述之培養物(培養液、培養菌體)分離純化糖蛋白質，可使用一般的蛋白質之分離、純化方法。

舉例來說，在培養結束之後，將細胞以離心分離加以回收，並懸浮於水系的緩衝液中之後，利用超音波破壞機、高壓破壞機、曼頓高林均質器、戴諾研磨器等，將細胞破壞而得到無細胞萃取液。在該無細胞萃取液離心分離所得之上清液中，再利用一般的蛋白質分離純化法(亦即，溶劑萃取法、硫銨等的鹽析法、脫鹽法、有機溶劑等的沉澱法、二甲胺乙基(DEAE)-賽法洛斯等樹脂的陰離子交換層析法、S-賽法洛斯FF(法馬西亞公司製)等樹脂的陽離子交換樹脂法、丁基賽法洛斯、及苯基賽法洛斯等樹脂的厭水性層析法、使用分子篩的凝膠過濾法、His Bind樹脂(Novagen公司製)等的親和性層析法、色層聚集法、等電點電泳等的電泳法)，將其單獨地或組合地使用，就可以得到純化之製品。

實施例

以下，茲舉實施例以具體地說明本發明。但，這些實施例並不限定本發明之技術範圍。

[實施例1]具有哺乳類型糖鏈生產能力之酵母變異株($\Delta mnn1\Delta mnn4\Delta och1$ 營養要求性三重變異株)的育種

(1) $\Delta mnn1$ 營養要求性變異株之製備及其性質

五、發明說明 (30)

由已經有報告之pNK51(Alani et al., Genetics, 116, 541-545 (1987))，在URA3基因兩端上有沙門氏桿菌hisG基因以直接重複所結合之「匣子」(HUH)，以BglII與BamHI切斷，再插入大腸菌質體pSP73之BamHI部位。將此質體命名為pSP73-HUH。

MNN1基因位於酵母第5號染色體動原體附近，該MNN1基因之DNA鹼基序列已經以L23753登錄於GenBank資料庫中(Yip et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9, 2723-2727 (1994))。將MNN1基因之5'區域使用引子A(GGATCCGAAGAAAACCT AATACATTGAAGT：序列編號1)以及引子B(GCATGCCCTT TGGTTTAATATAAATCTCCGG AGTGC：序列編號2)，並且，將其3'區域使用引子C(GCATGCTACATAACTCCAATCAG CAGCAAATATGTC：序列編號3)以及引子D(GCGGCCGCGT GTTCTGTTCGGGTAACGTTTAAACCAAT：序列編號4)，各自進行PCR增幅。將這些DNA片段重組到具有HIS3標記之質體pHYH之SphI部位，而製作成pHYH之 Δ mnn1。為使用HUH「匣子」破壞MNN1基因之故，由pHYH Δ mnn1取得1.8Kb之SphI片段，而構築成在pSP73-HUH之SphI部位插入有pSP73- Δ mnn1::HUH。將此質體以NotI部位加以切斷使成為直鏈狀，再利用醋酸鋰法(Ito et al., J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983))對野生株W303-1A(MATa leu2-3, 112his3-11, 15 ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100)進行轉形。轉形之後，將其接種於含有SD-Ura(2%葡萄糖、0.67%Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco公司製))、扣除尿嘧啶

五、發明說明 (31)

之核酸鹼基、以及胺基酸混合物(20-400毫克/升)培養基之培養皿上，30℃下培養2天，而得到轉形體。

由轉形體製備基因組DNA，再以PCR法確認尿嘧啶標記確已重組至MNN1區域之染色體中，而作為TIY1株。

將此株以含有5-FOA之YSD培養基(1%酵母萃取液、2%葡萄糖、腺嘌呤(40毫克/升)、尿嘧啶(20毫克/升))進行選擇，而得到URA3基因脫落株。使用與上述方法相同之PCR法，確認URA3基因有脫落之 $mnn1$ 破壞株。將含有 $\Delta mnn1$:hisG之此株作為TIY3株。

MNN1破壞株由於非還原末端之 α -1,3結合之甘露糖有缺失之故，所以接受N-結合型修飾之轉化酶的移動度，已知會比野生株更快。在YPAD培養基中所培養之野生株以及TIY3株，將其各自再懸浮於含有蔗糖0.2%之營養培養基(1%酵母萃取液、2% Bacto蛋白胨、腺嘌呤(40毫克/升))中，並培養3小時。回收菌體之後，懸浮於SDS樣品緩衝液中，並以玻璃珠磨碎之後，使用上清液進行6% SDS聚丙醯胺電泳。轉化酶之檢測則於使用蔗糖誘導之後，以三苯基雙偶氮鹽進行活性染色(Ballou, Methods Enzymol., 185, 440-470 (1990))。其結果，確認TIY3株所生產之轉化酶，其移動度較野生株更快。

(2) $\Delta mnn1 \Delta mnn4$ 營養要求性二重變異株之製備及其性質

$\Delta mnn4$ 基因係位於酵母第11號染色體，該MNN4基因之DNA鹼基序列已經以D83006登錄於GenBank資料庫中(Odani et al., Glycobiology, 6, 805-810 (1996))。將MNN4基因之3' 區 域 使 用 引 子

五、發明說明 (32)

E(AGATGCATACTAGTGGGCCCATTGTGATTG GAAT : 序列編號 5) 以及引子 F(CCCCCGAATTCGTGTGAAG GAATAGTGACG : 序列編號 6), 並且, 將其 5' 區域使用引子 G(CCCCCGAATTCAAGTCGGAGAACCTGACTG : 序列編號 7) 以及引子 H(ATGGGCCCCTAGTATGCATCTCGCGTGGC ATGG : 序列編號 8), 各自進行 PCR 增幅。將這些 DNA 片段重組到具有 HUH 匣子之前述 pSP73-HUH 之 EcoRI 部位, 而製作成 pSP73- Δ mnn4::HUH。將此質體以 SpeI 部位加以切斷使成為直鏈狀, 再利用醋酸鋰法對 TIY3 株進行轉形。轉形之後, 將其接種於含有 SD-Ura 培養基上, 30 °C 下培養 2 天, 而得到轉形體。

由轉形體製備基因組 DNA, 再以 PCR 法確認尿嘧啶標記確已重組至 MNN4 區域之染色體中, 而作為 TIY9 株。

將此株以含有 5-FOA 之 YSD 培養基進行選擇, 而得到 URA3 基因脫落株。使用與上述方法相同之 PCR 法, 確認 URA3 基因有脫落之 mnn4 破壞株。將含有 Δ mnn1::hisG Δ mnn4::hisG 之此株作為 TIY11 株。

糖鏈中之磷酸基之有無, 可以亞茜安藍(alcian blue)染色而分別。亞茜安藍係一種會與正電荷、負電荷結合之色素。因此, 將酵母細胞懸浮於 pH3 的緩衝液中, 加入 0.1% 的亞茜安藍 8GX(西格馬公司製, code No. A3157)時, 糖鏈中只要具有磷酸基者便會染色成為藍色, 不具有磷酸基者則成為白色。 Δ mnn4 破壞株由於其細胞表層之糖鏈幾乎不具有磷酸基之故, 對於亞茜安藍不會有染色反應。將野生株

五、發明說明 (33)

、TIY3及TIY11培養於營養培養基中，再將各自之細胞以亞
茜安藍染色之結果，確認只有TIY11不會有藍色之染色反應。

(3) $\triangle mnn1 \triangle mnn4 \triangle och1$ 營養要求性三重變異株之製備及其性質

$\triangle och1$ 基因係位於酵母第7號染色體，該 $\triangle och1$ 基因之DNA鹼基序列已經以D11095登錄於GenBank資料庫中(Nakayama et al., EMBOJ., 11, 2511-2519 (1992))。將含有已經構築好之OCH1基因全長的pBL-OCH1(Nakayama et al., EMBOJ., 11, 2511-2519 (1992))的OCH1基因內部之AatII-HpaI部位，加以切斷，再由已經成為平滑末端之pNKY51插入HUH匣子，製作成pBL- $\triangle och1::HUH$ 。將此質體以SalI及BamHI切斷而切下含有 $\triangle och1::HUH$ 之區域，並以醋酸鉀法對TIY11株進行轉形。轉形之後，將其接種於含有0.3M KCl之SD-Ura培養基上，30℃下培養2天，而得到轉形體。

由轉形體製備基因組DNA，再以PCR法確認尿嘧啶標記確已重組至 $\triangle OCH1$ 區域之染色體中，而作為TIY17株。

將此株以含有5-FOA及0.3M KCl之YSD培養基進行選擇，而得到URA3基因脫落株。使用與上述方法相同之PCR法，確認URA3基因有脫落之och1破壞株。將含有 $\triangle mnn1::hisG$ $\triangle mnn4::hisG$ $\triangle och1::hisG$ 之此株作為TIY19株。

此營養要求性三重變異株TIY19株，已於2000年8月17日寄存於食品工業發展研究所(CCRC 920023)。

含有och1破壞之TIY19株，其因為形成高甘露糖型糖鏈之故，已知其轉化酶之移動度比起野生株、TIY3株、TIY11株更快。基此，為確認och1破壞株之糖鏈長之效果，茲利用

五、發明說明 (34)

野生株、TIY3株、TIY11株、TIY19株，以上述之方法檢測其轉化酶。其結果，確認其移動度之快慢依序為野生株、TIY3株、TIY11株、TIY19株。

[實施例2]具有哺乳類型糖鏈生產能力之酵母變異株 ($\Delta mnn1 \Delta mnn4 \Delta och1 \Delta alg3$ 營養要求性四重變異株)的製作及其性質

ALG3基因位於酵母第2號染色體附近，該ALG3基因之DNA鹼基序列已經以Z35844登錄於GenBank資料庫中(Feldmann et al., EMBO J., 13, 5795-5809 (1994))。將ALG3基因之5'區域使用引子I(GCGGCCGCGAGACCTGAATCTTC GACACGCAAGAAAAA：序列編號9)以及引子J(GAATTCGC TTTCGAACAAAATCAAAAGGGGCATAAC：序列編號10)，並且，將其3'區域使用引子K(GAATTCCTATCCACCAAAC TCACAAGCAAGCA：序列編號11)以及引子L(GCGGCCGCC GAGAGGGTGAACGGTGCTAACTCAGGATT：序列編號12)，各自進行PCR增幅。將這些DNA片段重組到具有HUH匣子之pSP73-HUH之EcoRI部位，而製作成pSP73-alg3::HUH。將此質體以NotI部位加以切斷使成為直鏈狀，再利用醋酸鋰法對TIY19株進行轉形。轉形之後，將其接種於含有SD-Ura之培養基上，30℃下培養2天，而得到轉形體。

由轉形體製備基因組DNA，再以PCR法確認尿嘧啶標記確已重組至ALG3區域之染色體中，而作為YS134株。

將此株以含有5-FOA之SD培養基進行選擇，而得到URA3基因脫落株。使用與上述方法相同之PCR法，確認URA3基

五、發明說明 (35)

因有脫落之 *alg3* 破壞株。將含有 $\triangle mnn1::hisG$ $\triangle mnn4::hisG$ $\triangle och1::hisG$ $\triangle alg3::hisG$ 之此株作為 YS134-4A 株。

此營養要求性四重變異株 YS134-4A 株，已於 2000 年 8 月 17 日寄存於食品工業發展研究所 (CCRC 920024)。

含有 *alg3* 破壞之此 YS134-4A 株，其因為糖鏈長較短之故，已知其轉化酶之移動度比起野生株、TIY3 株、TIY11 株、TIY19 株更快。基此，為確認 *alg3* 破壞株之糖鏈長之效果，茲利用野生株、TIY3 株、TIY11 株、TIY19 株、YS134-4A 株，以上述實施例 1(1) 之方法檢測其轉化酶。其結果，確認其移動度之快慢依序為野生株、TIY3 株、TIY11 株、TIY19 株、YS134-4A 株。

[實施例 3] 由 $\triangle mnn1\triangle mnn4\triangle och1$ 營養要求性三重變異株分離細胞表層之甘露聚糖蛋白質及其含有糖鏈的構造解析

伴刀豆球蛋白 A 係一種外源凝集素，其對於含有 α -D-Man(其 C-3、C-4、C-6 位置之羥基未被取代)2 個殘基以上之糖鏈具有親和性，將其固定於管柱中時，就可以將酵母細胞壁多糖之聚葡萄糖及甲殼質等，與甘露聚糖蛋白質加以分離。首先，將細胞表層之甘露聚糖蛋白質由 TIY19 株的菌體進行分離 (Peat et al., J. Chem. Soc., 29 (1961))。

將含有 0.3M KCl 的 YPAD 培養液 50 毫升倒入 500 毫升之平口燒瓶中，30℃ 下培養 24 小時，離心分離以收集菌體，再懸浮於 10 毫升之 100 mM 檸檬酸鈉緩衝液 (pH 7.0) 中，於殺菌釜中 121℃ 下加熱 1 小時。冷卻後，離心分離，收集上清液，固態物質則再加入 10 毫升之水同樣地進行加熱，離心分離，收集上清液。再對於全部之萃取液，注入 3 倍量之乙

五、發明說明 (36)

醇中。所產生之白色沉澱物質使其乾燥。將其以伴刀豆球蛋白A(ConA)管柱用緩衝液(含有0.15 M氯化鈉、0.5 mM氯化鈣之0.1 M磷酸鈉緩衝液(pH 7.2))進行溶解，供注於ConA-瓊脂凝膠管柱(0.6×2公分，霍年合作社製)中，以ConA管柱用緩衝液洗淨之後，再以含有0.2M之 α -甲基甘露糖苷的ConA管柱用緩衝液進行溶離。將所得到之劃分進行透析，進行冷凍乾燥，得到甘露聚糖蛋白質。

然後，對於所得到之甘露聚糖蛋白質，以酵素處理而切開其Asn結合型糖鏈。亦即，將該冷凍乾燥樣品溶解於100 μ l之N-糖苷酶F用緩衝液(含有0.5% SDS、0.35% 2-硫醇乙醇之0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 8.0))中，並煮沸處理5分鐘。待冷卻回到室溫之後，加入50 μ l之7.5% Nonidet P-40、138 μ l之水、12 μ l之N-糖苷酶F(貝林加公司製)，以37℃處理16小時。以BioRad AG501-X8管柱進行脫鹽後，加入等量的苯酚：氯仿(1：1)，並激烈搖晃，除去其界面活性劑及蛋白質，而作成糖鏈成品。

為將所得到之糖鏈以螢光標示(吡啶胺化，亦稱PA化)之故，係進行如下之操作。將糖鏈製品濃縮乾固後，加入40 μ l之偶合試劑(552毫克之2-胺基吡啶溶解於200 μ l之醋酸中)，將其密封，於90℃下處理60分鐘。待其冷卻至室溫之後，加入140 μ l之還原試劑(200毫克之布蘭·二甲基胺複合體溶解於50 μ l之水與80 μ l之醋酸中)，將其密封，於80℃下處理80分鐘。反應後，加入氨水200毫升，再以等量加入苯酚：氯仿(1：1)，並激烈搖晃，回收其含有PA化寡糖之水層。將其重複七次，除去未反應之2-胺基吡啶。上清

五、發明說明 (37)

液則以 $0.22\ \mu\text{m}$ 之濾膜過濾，而作成 PA 化之寡糖製品。

在使用醯胺管柱之 HPLC 中，PA 化之寡糖可依其鏈長加以分離。管柱係使用 TSK Gel Amide-80 ($4.6 \times 250\text{mm}$ ，東梭公司製)，溶劑則以 200 mM 醋酸-三甲基胺緩衝液 (pH 7.0) 及乙腈的 35 : 65 混合液 (A 液)、200 mM 醋酸-三甲基胺緩衝液 (pH 7.0) 及乙腈的 50 : 50 混合液 (B 液)，加以製備。

事先將管柱以溶劑 A 在 1.0 毫升/分鐘的流速下，加以平衡化，在供注試劑之後，立刻將溶劑 B 的比率於 25 分鐘內，以直線地使其上升至 50%，其後，將溶劑 A 與溶劑 B 在 50 : 50 的比率下，再流動 5 分鐘，而溶離出 PA 化之寡糖。其結果如圖 6 所示。 $\triangle\text{och1}\triangle\text{mnn1}\triangle\text{mnn4}$ 營養要求性三重變異株 TIY19 株所生產之甘露聚糖蛋白質的糖鏈，其醯胺管柱主要係一個峰部。此峰部，其與 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 製品 (寶酒造公司製) 的溶離位置是一致的。因此，表示在 TIY19 株所生產之甘露聚糖蛋白質上，其明確地，附加有 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ 的高甘露糖型糖鏈。

[實施例 4] $\triangle\text{och1}\triangle\text{mnn1}\triangle\text{mnn4}$ 營養要求性三重變異株上 α -甘露糖苷酶 I

基因之導入

為了在酵母上生合成與哺乳類型糖鏈更近之糖鏈，可以將控制其初次反應之 α -甘露糖苷酶 I (α -1,2-甘露糖苷酶) 基因導入營養要求性三重變異株上，而使其表現。由此，高甘露糖型糖鏈會變得更短，就可以生合成哺乳類混成型或者哺乳類複合型之前驅體的 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 糖鏈。

使用已經確認會表現之 *Aspergillus saitoi* 衍生之 α -1,2-甘

五、發明說明 (38)

露糖苷酶的小胞體型表現質體pGAMH1(Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998))，而將TIY19株以醋酸鋰法進行轉形。控制組則使用不含 α -1,2-甘露糖苷酶基因的單獨載體pG3來進行轉形。轉形後，將其接種於SD-Trp(2%葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco公司製)、扣除掉色胺酸的核酸鹼基以及胺基酸混合物(20-400毫克/升))培養基上，於30℃下培養2天，得到轉形體。所得到之轉形體作為TIY19pGAMH1。

與實施例3相同，由所得到之轉形體製備糖鏈，並進行HPLC分析。

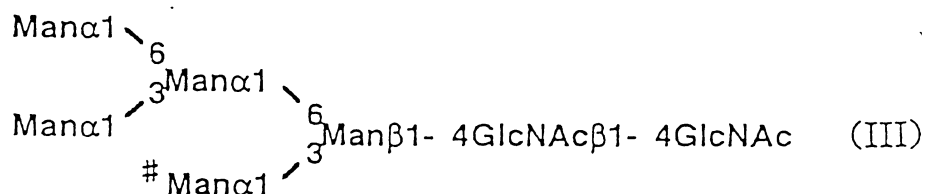
醯胺管柱的分析結果係示於圖7。只有載體的控制組中，係與實施例3相同，主要為一個峰部(圖7，a)，並與Man₈GlcNAc₂-PA製品(寶酒造公司製)的溶離位置是一致的。另一方面，含有 α -1,2-甘露糖苷酶基因之TIY19pGAMH1中，主要可見到四個峰部(圖7，b)。這些峰部依其溶離快慢順序，係與Man₅GlcNAc₂-PA、Man₆GlcNAc₂-PA、Man₇GlcNAc₂-PA、Man₈GlcNAc₂-PA製品的溶離位置一致。這些並被稱為人類型高甘露糖型糖鏈。

然後，分取最早溶離之Man₅GlcNAc₂-PA劃分，並供注至逆相管柱中。

該使用逆相管柱之HPLC，其PA化寡糖可依據構造而進行分離。管柱係使用TSK Gel ODS-80T_M(4.6×150 mm，東梭公司製)，溶劑則以100 mM醋酸銨緩衝液(pH 4.0)(A液)、含有0.5% 1-丁醇之100 mM醋酸銨緩衝液(pH 4.0)(B液)，加

以製備。

事先將管柱以溶劑A與溶劑B在95：5混合比率下，在1.2毫升/分鐘的流速下，加以平衡化，在供注試劑之後，立刻將溶劑B的比率於20分鐘內，以直線地使其上升至50%，而溶離出PA化之寡糖。其結果如圖8所示。該分取之糖鏈劃分，其在逆相管柱中主要係一個峰部(圖8，a)，此峰部係下述式(III)：



(式中，Man係表示甘露糖，GlcNAc則表示N-乙醯胺基葡萄糖。#表示GnT-I作用部位。)

其並與具有上述構造之 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 製品(寶酒造公司製)的溶離位置是一致的(圖8, b)。在TIY19pGAMH1株所生產之甘露聚糖蛋白質中, 確認其係含有混成型・複合型的前驅體之 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 型糖鏈。

[實施例5] 混成型糖鏈(GlcNAcMan₅GlcNAc₂)製品之合成

首先，為確認檢討混成型糖鏈(GlcNAcMan₅GlcNAc₂)之合成，茲於細胞外使用GnT-I的酵素反應來合成標的糖鏈。GnT-I之基質專一性係極為嚴格，已知相對於前述式(III)所表示之糖鏈構造，其只有在#位置的甘露糖殘基以 β -1,2進行結合而轉移GlcNAc。

五、發明說明 (40)

吉田等人已成功將大鼠 GnT-I 基因表現於酵母之上 (Yoshida et al., Glycobiology, 9, 53-58 (1999))。將此基因接續於多複製數質體的 pG3 之 GAP-DH 啟動子的下游之後，以 SmaI-NaeI 切斷，並切下包含啟動子以及其接續之 GnT-I 的 ORF、終結子的區域。然後，將此片段導入多複製數質體的 pYO354 的 SmaI 部位。將此質體命名為 pYOG4。使用此質體，再以醋酸鋰法對於野生型酵母 YPH500 株進行轉形。在轉形之後，將其接種於 SD-Trp (2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製)、扣除掉色胺酸的核酸鹼基以及胺基酸混合物 (20-400 毫克/升)) 培養基上，於 30℃ 下培養 2 天，得到轉形體。所得到之轉形體作為 YPH500/pYOG4。

將其以 500 毫升之 SD-Trp (2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製)、扣除掉色胺酸的核酸鹼基以及胺基酸混合物 (20-400 毫克/升)) 容易進行液態培養，然後收集菌體。以冷水洗淨之後，懸浮於 5.7 毫升之球狀原生質體培養基 (含有 1M 山梨醇的 50 mM 磷酸鉀 (pH 7.5)) 中，再於 300 μ l 之球狀原生質體培養基中，加入 2-硫醇乙醇 9 μ l 以及 12 毫克之異構酶 100T 使其溶解，並於 30℃ 下保持 45 分鐘。加入 1M 山梨醇 15 毫升，離心，再將沉澱以 1M 山梨醇 15 毫升加以洗淨及集菌。在此沉澱上，加入 4 毫升之 lysis 緩衝液 (含有 250 mM 山梨醇、2 μ g/ml 抗木瓜酶、2 μ g/ml chymostatin、3 μ g/ml 亮肽素、3 μ g/ml 胃蛋白酶抑制素、1 mM 苯甲脒、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM PMSF 之 10 Mm 三乙醇胺 ((pH 7.2) 溶液)，以均質器將細胞破

五、發明說明 (41)

壞，再以200×g離心回收上清液，將其沉澱劃分懸浮於lysis緩衝液150 μ l中，作為GnT-I的酵素溶液。又，本製品上沒有檢測出其他的GnT活性。

然後，進行標的糖鏈之合成。將PA所標定之Man₅GlcNAc₂糖鏈(由寶酒造購得)作為受體基質，將其分注至200 pmol容積之管中。蒸發乾固之後，在此管中，加入上述製備的GnT-I酵素溶液8.2 μ l、0.2M MnCl₂ 2 μ l、9.8 μ l的GnT-I緩衝液(0.17M MES (pH 6.0)、1.7% Triton X-100、0.34%牛血清白蛋白、8.47 mM AMP、1.69 mM UDP-GlcNAc、169 mM GlcNAc)，於37℃下反應3小時。煮沸5分鐘使其反應停止後，以0.22 μ m的濾膜過濾，再供注於HPLC中。

管柱係使用TSKGel ODS-80T_M (4.6×250 mm，東梭公司製)，溶劑則以含有0.15% 1-丁醇之100 mM醋酸銨緩衝液(pH 6.0)加以製備。事先將管柱以溶劑在1.2毫升/分鐘的流速下，加以平衡化，在供注試劑之後，溶離出PA化之寡糖。其結果如圖9所示。反應物在逆相管柱中主要有2個峰部，其中較早溶離之峰部係與Man₅GlcNAc₂-PA製品(寶酒造公司製，前述式(III)所示之構造)的溶離位置是一致的。因此，這被認為是未反應之受體基質。

另一方面，茲分取較慢溶離出之峰部，於純化之後，以TOF-MS進行質量分析。使用ThermoQuest公司製LASERMAT2000，另基質則使用含有2.5%的2,5-二羥基苯甲酸、40%乙腈之0.01%磷酸二鈉，以進行解析。其結果，前述之峰部劃分的質量係與預測之分子質量($m/z=1521$ (H^+); $m/z=1541$ (Na^+))相當。

42

(式中，Man係表示甘露糖，GlcNAc則表示N-乙醯胺基葡萄糖。)

[實施例6] $\Delta och1 \Delta mnn1 \Delta mnn4$ 營養要求性三重變異株上
 α -甘露糖苷酶I基因及GnT-I基因之導入

使用實施例4使用之 *Aspergillus saitoi* 衍生之 α -1,2-甘露糖苷酶的小胞體型表現質體 pGAMH1 (Chiba et al., J. Biol. Chem., 273, 26298-26304 (1998))，以 SmaI-NaeI 切斷，並切下包含啟動子以及其接續之 α -1,2-甘露糖苷酶的 ORF、終結子的區域。然後，將此片段導入 pYOG4 的 SmaI 部位。將此質體命名為 pYOMG4。使用此質體，再以醋酸鋰法對於 TIY19 株進行轉形。在轉形之後，將其接種於 SD-Trp (2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製)、扣除掉色胺酸的核酸鹼基以及胺基酸混合物 (20-400

五、發明說明 (43)

毫克/升))培養基上，於30℃下培養2天，得到轉形體。所得到之轉形體作為TIY19pYOMG4。

此導入有 α -甘露糖苷酶I基因及GnT-I基因、可產生混成型糖鏈之營養要求性三重變異株TIY19pYOMG4株，已於2000年8月17日寄存於食品工業發展研究所(CCRC 920025)。

與實施例3相同，由所得到之轉形體製備糖鏈，並進行HPLC分析。

醯胺管柱的分析結果係示於圖10。只有載體的控制組中，係與實施例3相同，主要為一個峰部(圖10，a)，並與Man₈GlcNAc₂-PA製品(寶酒造公司製)的溶離位置是一致的。另一方面，含有 α -1,2-甘露糖苷酶基因及GnT-I基因之TIY19pYOMG4中，主要可見到五個峰部(圖10，B)。這些峰部中，有四個(圖10，B；峰部a, c, d, e)係與Man₅GlcNAc₂-PA、Man₆GlcNAc₂-PA、Man₇GlcNAc₂-PA、Man₈GlcNAc₂-PA製品的溶離位置一致。這些並被稱為人類型高甘露糖型糖鏈。進一步，若只導入 α -1,2-甘露糖苷酶基因時，出現一個沒有見過的新峰部(圖10，B；峰部b)。此峰部的溶離位置，係與實施例5所製備之混成型GlcNAcMan₅GlcNAc₂糖鏈標準品的溶離位置一致。進一步，分取此峰部，與實施例3相同地，供注至逆相管柱中。管柱、溶劑及條件係以實施例5所示之方法進行。該分取之糖鏈劃分，其在逆相管柱中主要係一個峰部(圖11)，其再度地與GlcNAcMan₅GlcNAc₂-PA製品的溶離位置是一致的。因此，在TIY19pYOMG4株所生產之甘露聚糖蛋白質中，確認其

五、發明說明 (44)

係含有混成型之GlcNAcMan₅GlcNAc₂-PA型糖鏈。

[實施例7]人類肝臟 α -甘露糖苷酶II在酵母中之表現

α -甘露糖苷酶II係一種在高爾基體內，將混成型糖鏈改變成單股複合型糖鏈的酵素。

人類肝臟 α -甘露糖苷酶II基因序列已經以U31520登錄於GenBank資料庫中(Misago et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 11766-11770 (1995))。將Clontech公司之人類肝臟Marathon-Ready cDNA作為模板，使用編碼 α -甘露糖苷酶II的N末端區域部分之引子M(CGCCGCCGAGCTCTAAAAAATGAAGTTAAGCCGCC：序列編號13)以及引子N(ATCCCACCACTTTGAAAGGT：序列編號14)，並且，使用編碼中央部分之引子O(GAAGACTCACGGAGGAAGTT：序列編號15)以及引子P(ATGGCGGTATATGTGCTCGA：序列編號16)，以及使用編碼C末端區域部分之引子Q(CGCAGTTTGGGATACAGCAA：序列編號17)以及引子R(ATTATTATTAGCGGCCGCCCCTCAACTGGATTCG：序列編號18)，各自進行PCR增幅。所得到之DNA片段導入pCRScript之SrfI部位，於確認序列之後，重新接續於BglII部位以使全部的編碼區域都成為正確序列。將此質體命名為pCRMAN2。

為確認標的之蛋白質表現，於 α -甘露糖苷酶II基因的3'末端上，使編碼流行性感冒病毒紅血球凝集素抗原決定部位的30bp所構成之Hatag，重複3次結合而製作成基因，並構築成載體。亦即，將序列S(序列編號19)所構成之雙股DNA進行化學合成，並插入表現用質體的pYEX-BX之BamHI與EcoRI部位之間。將此質體命名為pYEX-BX-3HA。

五、發明說明 (45)

然後，由 pCRMAN2 以 BamHI 與 EcoRI 將編碼 α -甘露糖苷酶 II 的部分切下，再插入 pYEX-BX-3HA 之 SacI 與 NotI 部位之間。將此質體命名為 pYEMAN2-HA。

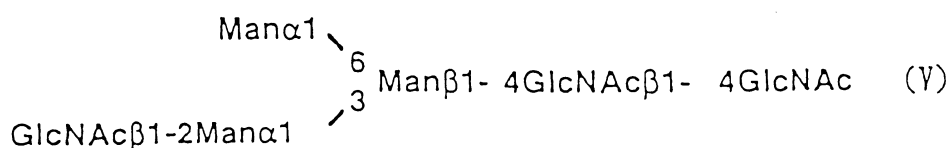
為提昇在酵母上之表現量之故，將 α -甘露糖苷酶 II 的膜貫通區域之編碼部分，取代成為酵母之 α -1,6-甘露糖轉移酶的編碼基因 (OCH1) 之膜貫通區域部分。亦即，將序列 T (序列編號 20) 所構成之雙股 DNA 進行化學合成，插入 pBluescript 之 SacI 與 EcoRI 部位之間。將此質體命名為 pBOCH1。另一方面，將 pYMAN2-HA 作為模板，以編碼 α -甘露糖苷酶 II 的觸酶區域部分之一部，利用引子 U (TTAG ACTACCCATGGAACCCGCGCCGCGAGGGCTCCTTC：序列編號 21) 以及引子 V (CAGGAGAACTTTGGTTCGAAAAAGC TTTGACTTCTT：序列編號 22) 進行增幅。在確認此序列之後，以 NcoI 及 HindIII 加以切斷，並插入 pBOCH1 的 NcoI 及 HindIII 部位之間。然後，由此質體，以 SacI 及 PstI 切下該片段，而在 pYEMAN2-HA 的 SacI 及 PstI 之間進行取代。將此質體命名為 pYEOM2-HA。

宿主則使用 *S. cerevisiae* 野生型酵母 YPH500，並使用醋酸鋰法進行轉形。控制組係使用 pYEX-BX-3HA。轉形之後，將其接種於含有 SD-Ura (2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製))、扣除尿嘧啶之核酸鹼基，以及胺基酸混合物 (20-400 毫克/升) 培養基之培養皿上，30℃ 下培養 2 天，而得到轉形體。

經轉形之酵母於 30℃ 下，以 SD-Ura 培養基培養至 OD₆₆₀=0.8 之後，添加適當量之硫酸銅，再培養 2 小時。集

46

然後，將實施例5所製作的混成型糖鏈(式(IV)所表示之構造)作為基質，測定 α -甘露糖苷酶II之酵素活性。將混成型糖鏈(式(IV)所表示之構造)100 pmol於樣品管內乾燥之後，在同一管內加入0.2 M MnCl_2 、1 M GlcNAc 、1 M 醋酸鈉緩衝液(pH 5.6)各2 μl ，水8 μl ，以及細胞萃取液8 μl 之後，開始酵素反應。於37 $^{\circ}\text{C}$ 下保溫一夜之後，煮沸以停止該反應，利用離心除去不溶性劃分之後，以HPLC進行解析。又，HPLC分析之條件係根據實施例5者。其結果，若將表現 α -甘露糖苷酶II之酵母的細胞萃取液作為酵素來源時，則與控制組相比較，其40分鐘之峰部明顯地增加(圖13，B)。此40分鐘的峰部，因為與PA-糖鏈標準品(寶酒造PA-糖鏈022)之酵素消化物中，其所得到之下述式(V)所表示之單股複合型糖鏈(Oguri et al., J. Biol. Chem., 272, 22721-22727 (1997))的溶離位置一致，所以確認係 α -甘露糖苷酶II之活性。



裝訂線

五、發明說明 (47)

(式中，Man係表示甘露糖，GlcNAc則表示N-乙醯胺基葡萄糖。)

[實施例8]導入有生產雙股複合型糖鏈所必須之基因的营养要求性三重變異株之製作

吉田等人已報告人類GnT-II基因在酵母上之表現(Yoshida S. et al., Abstracts of the meeting on Yeast Cell Biology, p.279, Cold Spring Harbor Laboratory (1997))。由此表現用載體pSY114-GnT-II將含有啟動子的GnT-II基因區域以XbaI切下，再插入pBluescript SK的XbaI部位。將此質體命名為pBlueGnT2。然後，將實施例6所示之質體pYOG4，以BamHI、XbaI將含有啟動子之GnT-I基因區域切下，插入pBlueGT2之BamHI、XbaI部位中。由此質體以BssHII將標的片段切下之後，以DNA T4聚合酶使末端平滑化，再將片段插入具有ADE2作為標記之pASZ10質體(Stotz & Linder, Gene, 95, 91-98 (1990))的SmaI部位。將此質體命名為pASZGN12。以HpaI使pASZGN12成為直鏈狀，再將實施例1所製作之營養要求性三重變異株TIY19株，以醋酸鋰法進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有0.3 M KCl的SD-Ade(2%葡萄糖、0.67%Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco公司製))、扣除腺嘌呤之核酸鹼基、以及胺基酸混合物(20-400毫克/升)培養基之培養皿上，30℃下培養2天，而得到轉形體。由轉形體製備基因組DNA，再利用PCR法確認GnT-I及GnT-II基因確已重組至ADE2區域之染色體中，

五、發明說明 (48)

而作為 YCY22 株。使用 YCY22 株的細胞萃取液來測定其各自的酵素活性，而確認 GnT-I 及 GnT-II 之表現。

另一方面，人類 β -1,4-GalT 在酵母之表現，已如前述由吉田等人所報告 (Yoshida S. et al., Abstracts of the meeting on Yeast Cell Biology, p.279, Cold Spring Harbor Laboratory (1997))。由此表現用載體 pGalT13C，以 SalI、XhoI 將含有啟動子之 β -1,4-GalT 基因區域切下，再插入 pRS403 之 SalI、XhoI 部位中。將此質體命名為 pRSGAL1。又，人類 UDP-Gal 運送體 (Ugt2p) 在酵母之表現，則已由貝沼等人所報告 (Kainuma et al., Glycobiology, 9, 133-141 (1999))。由此基因 (UGT2) 之表現用質體 YEp352-GAP-UGT2，以 BamHI 將含有啟動子之基因區域切下，再插入 pRSGAL1 之 BamHI 部位。將此質體命名為 pRSGATP1。以 NdeI 使 pRSGATP1 成為直鏈狀，再利用醋酸鋰法對於 YCY22 株進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有 0.3 M KCl 的 SD-His (2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製))、扣除組胺酸之核酸鹼基、以及胺基酸混合物 (20-400 毫克/升) 培養基之培養皿上，30°C 下培養 2 天，而得到轉形體。由轉形體製備基因組 DNA，再利用 PCR 法確認 β -1,4-GalT 及 UGT2 基因確已重組至 HIS3 區域之染色體中，而作為 YCY42 株。使用 YCY42 株的細胞萃取液來測定其各自的酵素活性，而確認 β -1,4-GalT 及 Ugt2p 之表現。

然後，由人類肝臟 α -甘露糖苷酶 II 之表現用載體 pYEOM2-HA，以 SacI、SphI 將含有 HA-tag 之基因片段切下，再以 DNA T4 聚合酶使其末端成為平滑化。將此片段插入

五、發明說明 (49)

pAUR123之SmaI部位。確認其係接續於啟動子的順時鐘方向之後，以BamHI將含有啟動子的 α -甘露糖苷酶II基因區域切下，並插入pRS406的BamHI部位中。以NdeI使此質體成為直鏈狀，再利用醋酸鋰法對於前述之YCY42株進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有0.3 M KCl的SD-Ura(2%葡萄糖、0.67%Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco公司製))、扣除尿嘧啶之核酸鹼基、以及胺基酸混合物(20-400毫克/升)培養基之培養皿上，30℃下培養2天，而得到轉形體。由轉形體製備基因組DNA，再利用PCR法確認基因確已重組至URA3區域之染色體中，而作為YCY52株。使用YCY52株的細胞萃取液來測定其各自的酵素活性，而確認 α -甘露糖苷酶II之表現。

由實施例4所示之 α -1,2-甘露糖苷酶之表現用載體pGAMH1，以NaeI及SmaI，將含有啟動子區域之 α -1,2-甘露糖苷酶基因片段切下，再插入pYO325載體之SmaI部位。將此質體命名為pYOM5。進一步，導入在供給基質至高爾基體時所必須之UDP-GlcNAc運送體基因。人類UDP-GlcNAc運送體在酵母之表現，係由石田所報告(Ishida et al., J. Biochem., 1261, 68-77 (1999))。將此表現用載體作為模板，使用引子W(AGAGCGGCCGCAAAATGTTTCGCCAACCTAA：序列編號23)以及引子X(TTTTGTCGACTAGACGCGTGAAGCATGCCC：序列編號24)，並各自以PCR將UDP-GlcNAc運送體基因區域增幅。於確認此序列之後，以NotI及SalI切斷，並取代成pG3-N之NotI及SalI的部位間。然後，由此質體

五、發明說明 (50)

以 NaeI 及 SmaI，將含有啟動子區域之 UDP-GlcNAc 運送體基因片段切下，插入 pYOMR5 的 SmaI 部位。將此質體命名為 pYOMR5。使用此質體以醋酸鋰法對於前述之 YCY52 株進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有 0.3 M KCl 的 SD-Leu (2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製))、扣除白胺酸之核酸鹼基、以及胺基酸混合物 (20-400 毫克/升) 培養基之培養皿上，30℃ 下培養 2 天，而得到轉形體。將此轉形體作為 YCY73 株。使用 YCY73 株之細胞萃取液以測定酵素活性，並確認 α -1,2-甘露糖苷酶及 UDP-GlcNAc 運送體之表現。

又，製作可將 msdS 及 hUGTrel2 整合之質體。以 SmaI、NaeI 將 PGAMH 切斷而切下 GAP 啟動子及 msdS 序列，並插入 pRS404 之 PvuII 部位。將此質體命名為 msdS-pRS404。將 GAP 啟動子下游插入有 hUGTrel2 的質體，hUGTrel2-pG3 以 SmaI、NaeI 切斷而切下 GAP 啟動子及 hUGTrel2 序列，再插入 msdS-pRS404 的 PstI 部位。將此質體命名為 HM-pRS404。將 HM-pRS404 之 TRP1 內之 BstXI 切斷，並以醋酸鋰法對 YCY42 株進行轉形。將轉形體以 5 毫升之 YPAD+0.3M KCl，於 30℃ 下培養 2 天。並以 PCR 法確認 msdS 及 hUGTrel2 確已重組至 TRP1 染色體中。又，使用細胞萃取液來測定其酵素活性，而確認兩株之 α -1,2-甘露糖苷酶及 UDP-GlcNAc 運送體之表現。茲將 YCY42 株上整合有 msdS 及 hUGTrel2 之細胞株稱為 TIY63 株。

進一步，由人類肝臟 α -甘露糖苷酶 II 的表現用載體 pYEOM2-HA，以 SacI、SphI 切下含有 HA-tag 之基因片段，

五、發明說明 (51)

並以 DNA T4 聚合酶使其末端平滑化。將此片段插入 pAUR123 的 SmaI 部位中。確認其係接續於啟動子的順時鐘方向之後，以 BamHI 將含有啟動子的 α -甘露糖苷酶 II 基因區域切下，並插入 pRS406 的 BamHI 部位中。以 NdeI 使此質體成為直鏈狀，再利用醋酸鋰法對於 TIY63 株進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有 0.3 M KCl 的 SD-Ura(2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製))、扣除尿嘧啶之核酸鹼基、以及胺基酸混合物(20-400 毫克/升)培養基之培養皿上，30℃ 下培養 2 天，而得到轉形體。由轉形體製備基因組 DNA，再利用 PCR 法確認基因確已重組至 URA3 區域之染色體中，而作為 MSY3 株。使用 MSY3 株的細胞萃取液來測定其酵素活性，而確認 α -甘露糖苷酶 II 之表現。

此經導入 α -甘露糖苷酶 II 基因之營養要求性三重變異株 MSY3 株，已於 2000 年 8 月 17 日寄存於食品工業發展研究所 (CCRC 920026)。

[實施例 9] 導入有生產雙股複合型糖鏈所必須之基因的营养要求性四重變異株之製作

首先，將實施例 8 所製作之質體 pASZGN12 以 HpaI 使其呈現直鏈狀，並以醋酸鋰法對於實施例 2 所製備之營養要求性四重變異株 YS134-4A 株進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有 0.3 M KCl 的 SD-Ade(2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製))、扣除腺嘌呤之核酸鹼基、以及胺基酸混合物(20-400 毫克/升)培養基之培養皿上，30℃ 下培養 2 天，而得到轉形體。由轉形體製備

五、發明說明 (52)

基因組DNA，再利用PCR法確認GnT-I及GnT-II基因確已重組至ADE2區域之染色體中，而作為YCY122株。使用YCY122株的細胞萃取液來測定其各自的酵素活性，而確認GnT-I及GnT-II之表現。

然後，將實施例8所製備之pRSGATP1以NdeI使其呈現直鏈狀，並以醋酸鋰法對於YCY122株進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有0.3 M KCl的SD-His(2%葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco公司製))、扣除組胺酸之核酸鹼基、以及胺基酸混合物(20-400毫克/升)培養基之培養皿上，30℃下培養2天，而得到轉形體。由轉形體製備基因組DNA，再利用PCR法確認 β -1,4-GalT及UGT2基因確已重組至HIS3區域之染色體中，而作為YCY142株。使用YCY142株的細胞萃取液來測定其各自的酵素活性，而確認 β -1,4-GalT及Ugt2p之表現。

然後，使用實施例8所示之質體pYOMR5以醋酸鋰法對於YCY142株進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有0.3 M KCl的SD-Leu(2%葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco公司製))、扣除白胺酸之核酸鹼基、以及胺基酸混合物(20-400毫克/升)培養基之培養皿上，30℃下培養2天，而得到轉形體。將此轉形體作為YCY163株。使用YCY163株之細胞萃取液以測定酵素活性，並確認 α -1,2-甘露糖苷酶及UDP-GlcNAc運送體之表現。

關於此YCY163株，為觀察其酵母細胞表層之甘露聚糖蛋白質的糖鏈構造之變化，茲進行外源凝集素染色性之變化。已知伴刀豆球蛋白A含有特定之甘露糖3殘基，並以高甘

五、發明說明 (53)

露糖型、混成型、雙股複合型糖鏈等進行結合，但在親和性方面，則已知高甘露糖型糖鏈比起混成型、雙股複合型糖鏈更高。基此，將Texas-red標示之伴刀豆球蛋白A溶液與收集來之酵母細胞加以混合，於4℃、偶爾攪拌下放置24小時。以PBS洗淨之後，再以含有10 mM α -甲基甘露糖苷之PBS洗淨，於螢光顯微鏡下進行觀察。其結果，確認YS134-4A株在洗淨之後，其細胞周圍亦有螢光染色，但YCY163株則在細胞周圍明顯地其可見螢光減少許多。此事實顯示YCY163株的高甘露糖型糖鏈減少，而生成複合型糖鏈。

[實施例10]具有哺乳類型糖鏈生產能力之酵母變異株中的人類纖維芽細胞成長因子(FGF)之生產及糖鏈構造之改變

FGF6-1嵌合基因(secFGF (N35))係由生命工學工業技術研究所的米田敦子小姐所分讓(Yoneda et al., BioTechniques, 27, 576-590 (1999))。以SmaI、NaeI將SecFGF(N35)/PBS切斷並切下FGF，而插入pGEM2- α 36之HindIII部位。將此質體命名為pFGF α 23。將pFGF α 23以EcoRI切斷，並切下prepro α 因子與FGF區域，再插入pUC119質體之EcoRI部位。將此質體命名為FGF-pUC119。為除去 α 因子之EAEA序列，茲使用引子Y(CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC：序列編號25)以及引子Z(ATGGGCGGCTCTTTTATCCAAAGATAC：序列編號26)，並各自以PCR進行增幅。將此DNA片段重組至pUC18的EcoRI部位，而製作成pAF02質體。將pFGF01以NaeI、SmaI切斷而切下FGF，再插入pAF02之NaeI、SmaI部位。將此質體命名為pAF03。將pAF03以EcoRI

五、發明說明 (54)

切斷並切下 prepro α 因子與 FGF 區域，重組於 YEp352GAP 質體之 GAP 啟動子下游，而製作成重組質體 pAF03。將 pAFF2 以 Aat II、HpaI 切斷，再切下 2 μ m 區域，而構築成酵母整合用質體 pAFF3。然後，將 pAFF3 以 ApaI、AccI 切斷，再切下 GAP 啟動子與 FGF 序列，而插入具有 LEU2 標記之質體 pYO325 的 PvuII 部位上。進一步，將質體的 2 μ m 區域以 SpeI 切斷除去。將此質體命名為 pAFF9。將 pAFF9 內之 EcoRV 切斷並使其呈現直鏈狀，將酵母 (TIY19 株、YCY42 株) 利用醋酸鋰法進行轉形。在轉形之後，將其接種於含有 0.3 M KCl 的 SD-Leu (2% 葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco 公司製))、扣除白胺酸之核酸鹼基、以及胺基酸混合物 (20-400 毫克/升) 培養基之培養皿上，30°C 下培養 2 天，而各自得到轉形體。

將這些轉形體以 5 毫升的 YPAD+0.3M KCl，於 30°C 下培養 3 天，再於培養上清液中加入 50 μ l 的肝素賽法洛斯懸浮液 (法馬西亞公司製)，於 4°C 下震盪一夜，使 FGF 被吸附於肝素賽法洛斯。其後，以離心回收肝素賽法洛斯，並以 SDS 樣品緩衝液煮沸之後，將上清液供注至 SDS-PAGE。使用抗 FGF 抗體以進行西方點漬反應，而確認 FGF 有表現。進一步，以 PCR 法，確認 FGF 確已重組至 LEU2 的染色體中，茲將 FGF 整合至 TIY19 株稱為 TIY48 株，而 FGF 整合至 YCY42 株者則稱為 TIY49 株。

進一步，為使蛋白質可以安定地且有效率地表現之故，茲製作用於整合 msdS 之質體。msdS 係以 EcoRI 將插入於 GAP 啟動子下游之質體 pGAMH 切斷，製成除去 2 μ m 區域之質體

五、發明說明 (55)

。將此質體命名為pImsdS。將pImsdS之TRP1內之XbaI切斷，再以醋酸鋰法對於TIY48(△mnn1::hisG △mnn4::hisG △och1::hisG FGF::LEU2)、TIY49(△mnn1::hisG △mnn4::hisG △och1::hisG FGF::LEU2 ade::[GnT-I & GnTII] his3::[β-1,4GalT & UGT2])進行轉形。所得到之轉形體以5毫升之YPAD+0.3M KCl，於30℃下培養3天，於培養液中加入50 μl的肝素賽法洛斯(法馬西亞製)，於4℃下震盪一夜，以使FGF吸著於肝素賽法洛斯。其後，回收肝素賽法洛斯，以FGF之抗體進行西方墨漬反應，並確認msdS有表現。進一步，利用PCR法，確認msdS確已重組至TRP1的染色體中。茲將TIY48株上整合有msdS之細胞株稱為TIY53株，而TIY49株上整合有msdS之細胞株作為TIY54株。

然後，製作用於整合msdS及hUGTrel2之質體。將pGAMH以SmaI、NaeI切斷，切下GAP啟動子及msdS序列，並插入pRS404的PvuII部位。將此質體命名為msdS-pRS404。以SmaI、NaeI將GAP啟動子下游插入有hUGTrel2的質體hUGTrel2-pG3切斷，切下GAP啟動子以及hUGTrel2序列，再插入msdS-pRS404的PstI部位。將此質體命名為HM-pRS404。將HM-pRS404的TRP1的BstXI部位切斷，再以醋酸鋰法對於TIY48株、TIY49株進行轉形。所得到之轉形體以5毫升之YPAD+0.3M KCl，於30℃下培養3天，於培養上清液中加入50 μl的肝素賽法洛斯懸浮液(法馬西亞製)，於4℃下震盪一夜，以使FGF吸著於肝素賽法洛斯。其後，離心回收肝素賽法洛斯，以SDS樣品緩衝液煮沸之後，供注於SDS-PAGE中。使用抗FGF抗體進行西方墨漬反應，並確認

五、發明說明 (56)

FGF 確已表現。進一步，利用 PCR 法，確認 msdS 以及 hUGTrel2 確已重組至 TRP1 的染色體中。茲將 TIY48 株上整合有 msdS 以及 hUGTrel2 之細胞株稱為 TIY59 株，而 TIY49 株上整合有 msdS 以及 hUGTrel2 之細胞株作為 TIY60 株。

為製備糖鏈，茲使用在 LEU2 的染色體上整合有 FGF 的 TIY48 及 TIY53 株，並由 3 升之培養液中純化 FGF。以 3 升之 YPAD+0.3M KCl，於 30℃ 下培養 3 天後，離心，在除去細胞之培養液中加入 2 毫升之肝素賽法洛斯，於 4℃ 下震盪一夜，以使 FGF 吸著於肝素賽法洛斯。填充於管柱之中，以 PBS+0.01% CHAPS、PBS+2.5 M NaCl+0.01% CHAPS 作為溶劑，利用鹽濃度之上升使 FGF 由肝素賽法洛斯中溶離出來。

將純化之 FGF 約 150 μ g 供注於逆相管柱中，進行脫鹽。管柱係使用 Mrpc c2/c18 pc3.2/3 管(法馬西亞公司製)，溶劑則為 0.1% 三氟醋酸以及 0.1% 三氟醋酸-60% 乙腈，而由逆相管柱中進行溶離。

由管柱中所溶離之樣品，將其乾燥，並進行聯氨分解。在真空狀態下，加入 2 毫升之聯氨，於 110℃ 處理 60 分鐘。其後，冷卻至室溫，以進行 N-乙醯化。加入 250 μ l 之 0.2 M 醋酸銨及 25 μ l 之無水醋酸，充分攪拌，於室溫下放置 30 分鐘。進一步，再加入 250 μ l 之 0.2 M 醋酸銨及 25 μ l 之無水醋酸，充分攪拌，再於室溫下放置 30 分鐘。將反應液濃縮乾固，而作為糖鏈製備品。

為將得到之糖鏈螢光標示(吡啶胺化)之故，茲進行以下之操作。將糖鏈製備品濃縮乾固後，加入 20 μ l 之偶合試劑(300 毫克之 2-胺基吡啶溶解於 100 μ l 醋酸中)，密封，於 90

五、發明說明 (57)

℃下處理60分鐘。其後，加入20 μ l之還原試劑(10毫克之布蘭·二甲基胺複合體溶解於50 μ l之醋酸中)，密封，於80℃下處理60分鐘。反應後，加入20 μ l之三甲基胺-甲醇並充分攪拌之後，進一步，再加入40 μ l之甲苯充分攪拌之後，於60℃下，氮氣流下濃縮乾固10分鐘。其後，在反應液中，加入20 μ l之甲醇充分攪拌，再加入40之甲苯充分攪拌之後，於60℃下，氮氣流下濃縮乾固10分鐘。重複此過程三次，並加入50 μ l之甲苯於殘渣之上，於60℃下，氮氣流下濃縮乾固10分鐘。反應後，以HW-40凝膠過濾管柱進行處理，以除去未反應之2-胺基吡啶。

糖鏈構造解析係以使用胺管的HPLC來進行。管柱為Asahipak NH2P-50 (4.6 mm $\times$ 250 mm)，溶劑則為200 mM醋酸-三甲基胺緩衝液(pH 7.3)與乙腈的7：3混合液(A液)，以及200 mM醋酸-三甲基胺緩衝液(pH 7.3)與乙腈的2：8混合液(B液)，來製備得到。

事先以溶劑A在1.0毫升/分鐘的流速下，將管柱加以平衡化，在試劑注入之後，立刻在50分鐘之內，將溶劑B的比率直線地提昇至100%，其後，在溶劑B的比率為100%的情形下繼續流動20分鐘，而將PA化寡糖溶離出來。其分析結果係示於圖14。TIY48衍生者係與實施例2之結果相同，主要為一個峰部(圖14，上段)，並與Man8GlcNAc2-PA製品(寶酒造公司製)的溶離位置為一致的。另一方面，在含有 α -1,2-甘露糖苷酶基因的TIY53株中，主要可見到一個峰部(圖14，下段)。此峰部係與Man5GlcNAc2-PA製品的溶離位置為一致的。因此，在TIY53株中所被表現之人類糖蛋

五、發明說明 (58)

白質的FGF，其明顯地被確認為係具有幾乎100%的混成型

- 複合型的前驅體之Man5GlcNAc2型糖鏈。

進一步，利用SacI、SphI，由人類肝臟 α -1,2-甘露糖苷酶II的表現用載體pYEOM2-HA，將其中包含有HA-tag的基因片段切下，並以DNA T4聚合酶使其末端平滑化。將該片段插入pAUR123的SmaI部位。於確認其係接續於啟動子的順時鐘方向上之後，以BamHI將包含有啟動子的 α -甘露糖苷酶II基因區域切下，插入pRS406的BamHI部位中。以NdeI使該質體呈現直鏈狀，再以醋酸鋰法對該TIY60株進行轉形。轉形之後，將其接種於含有SD-Ura(2%葡萄糖、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco公司製))、扣除尿嘧啶之核酸鹼基、以及胺基酸混合物(20-400毫克/升)培養基之培養皿上，30℃下培養2天，而得到轉形體。由轉形體製備基因組DNA，再以PCR法確認該基因確已重組至URA3區域之染色體中，而作為MSY1株。使用MSY1株之細胞萃取液來測定酵素活性，而確認 α -甘露糖苷酶II之表現。

產業上可利用性

利用本發明所育種之新穎的營養要求性三重變異株、營養要求性四重變異株時，就可以將具有與人類等哺乳類細胞所生產之高甘露糖型同一之中性糖鏈、或者具有同一之中性糖鏈的糖蛋白質，以大量且純度優良地加以生產。又，藉由在該變異株上導入哺乳類型糖鏈之生合成系基因，就可以有效率地生產具有高甘露糖型、混成型、複合型等的哺乳類型糖鏈、或者具有哺乳類型糖鏈的蛋白質。

I23223877/

公告本

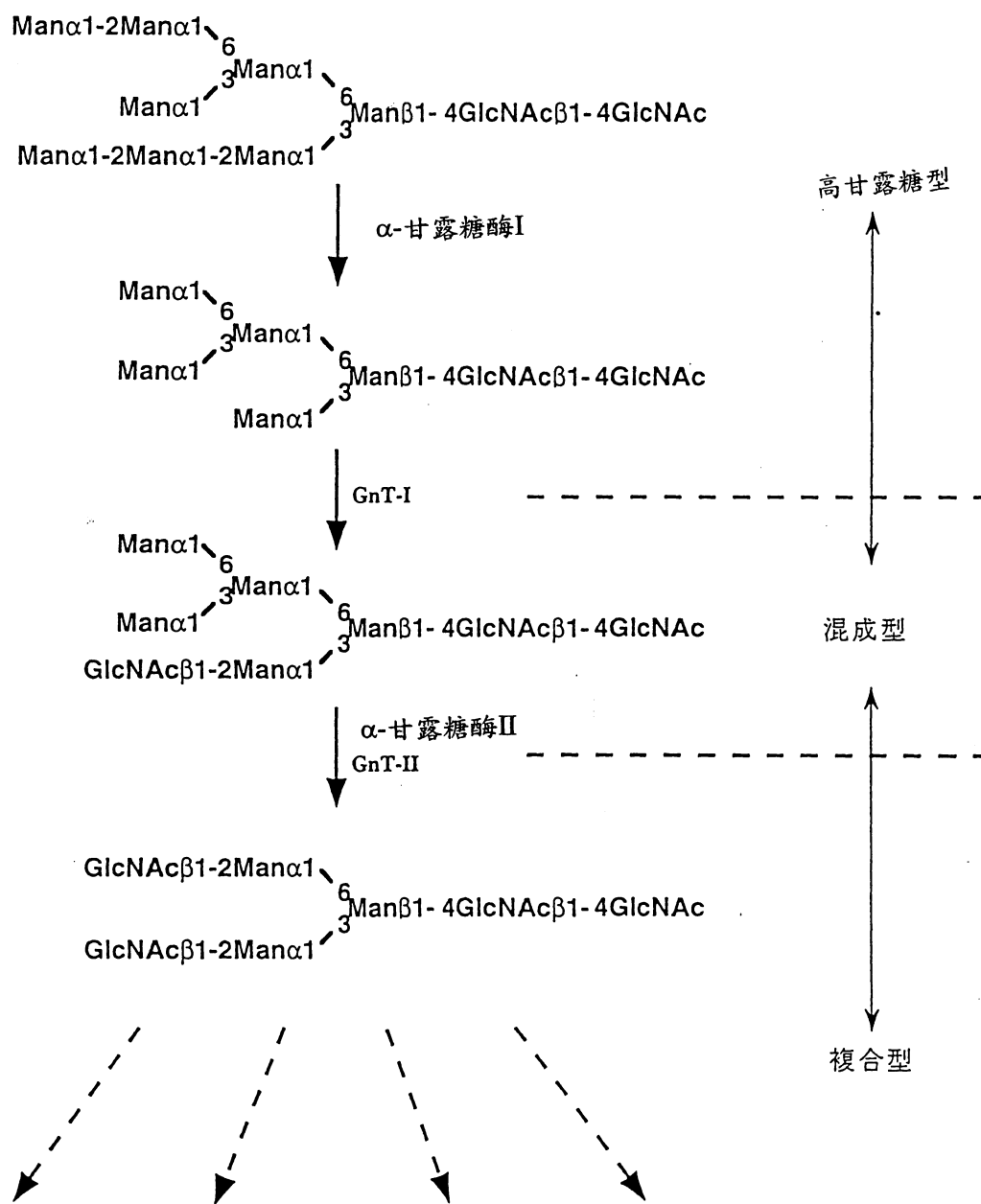
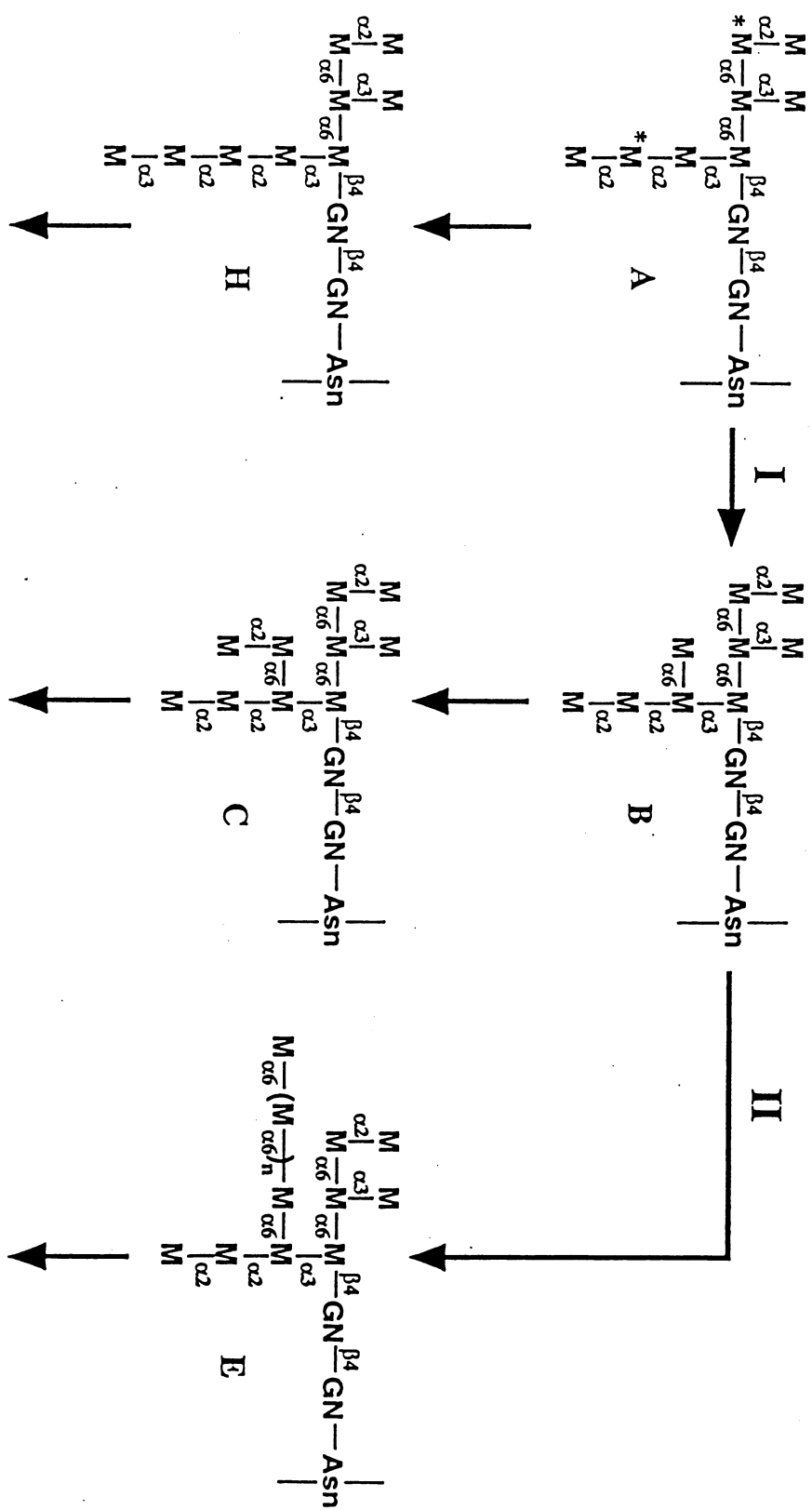
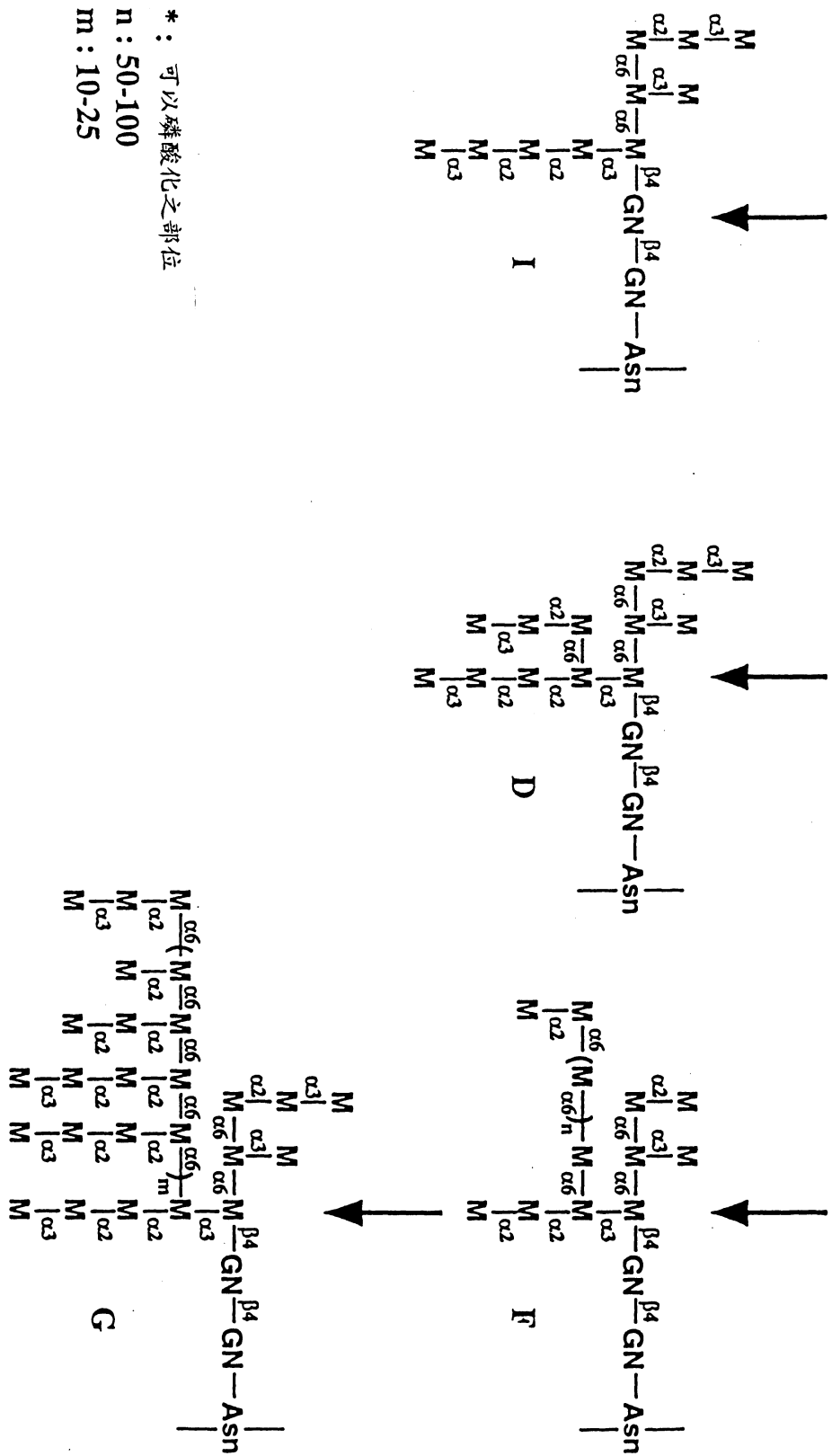


圖 1



* : 可以磷酸化之部位
 n : 50-100
 m : 10-25



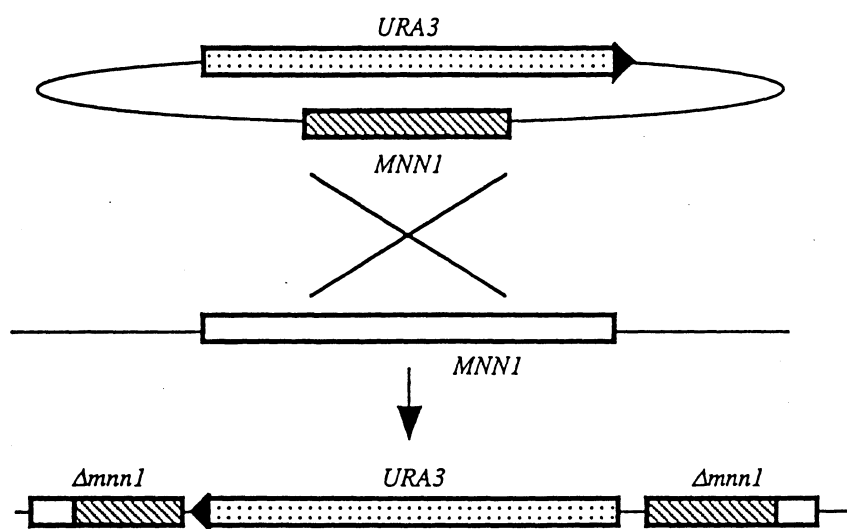


圖 4

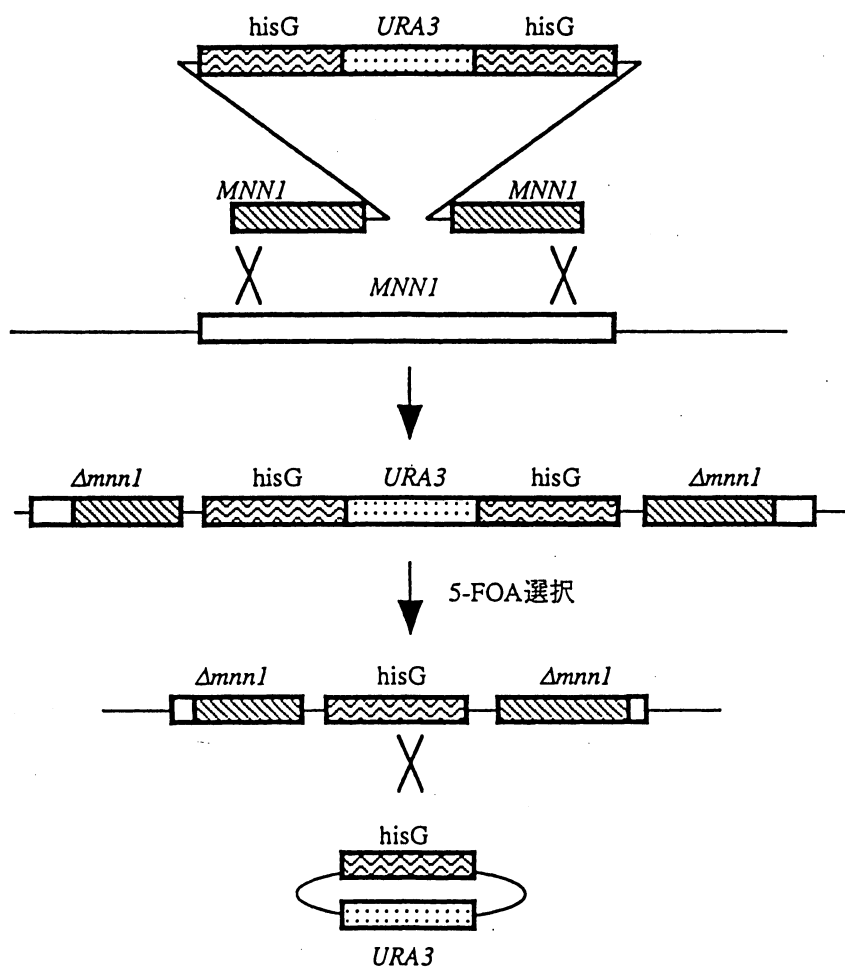


圖 5

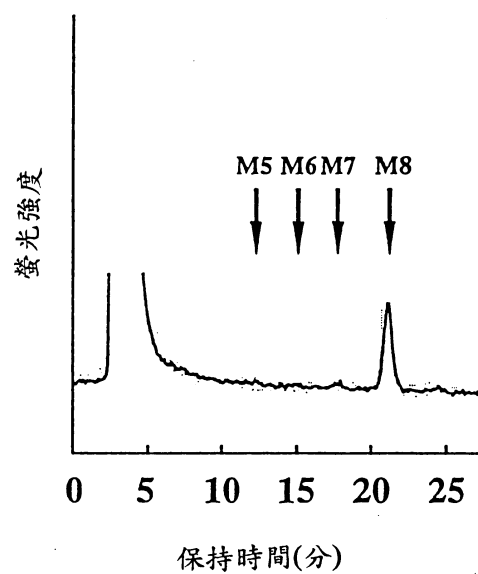


圖 6

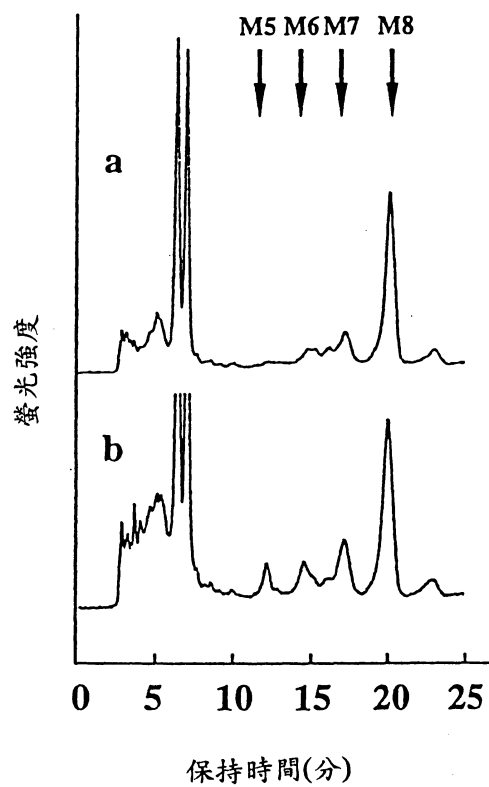


圖 7

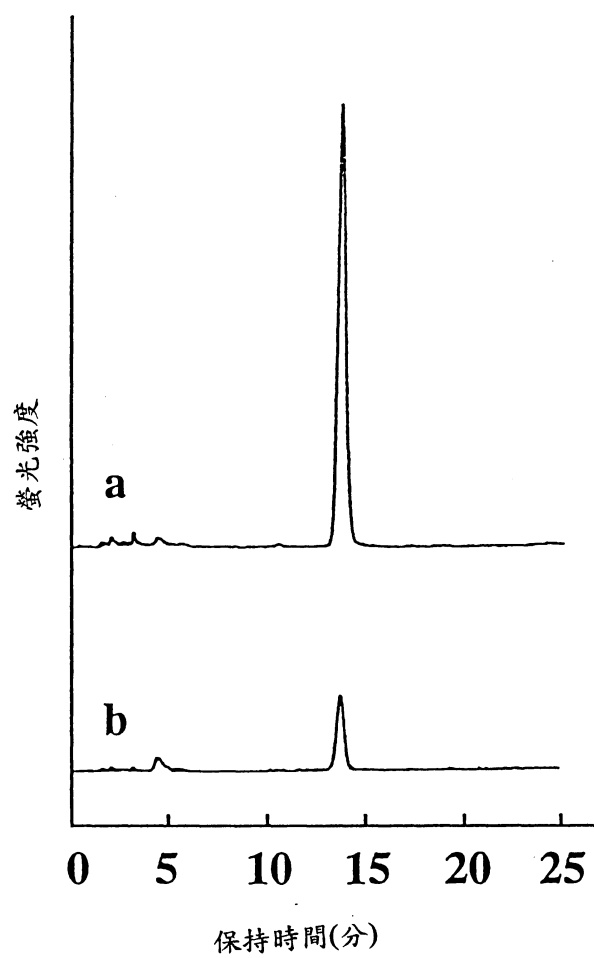


圖 8

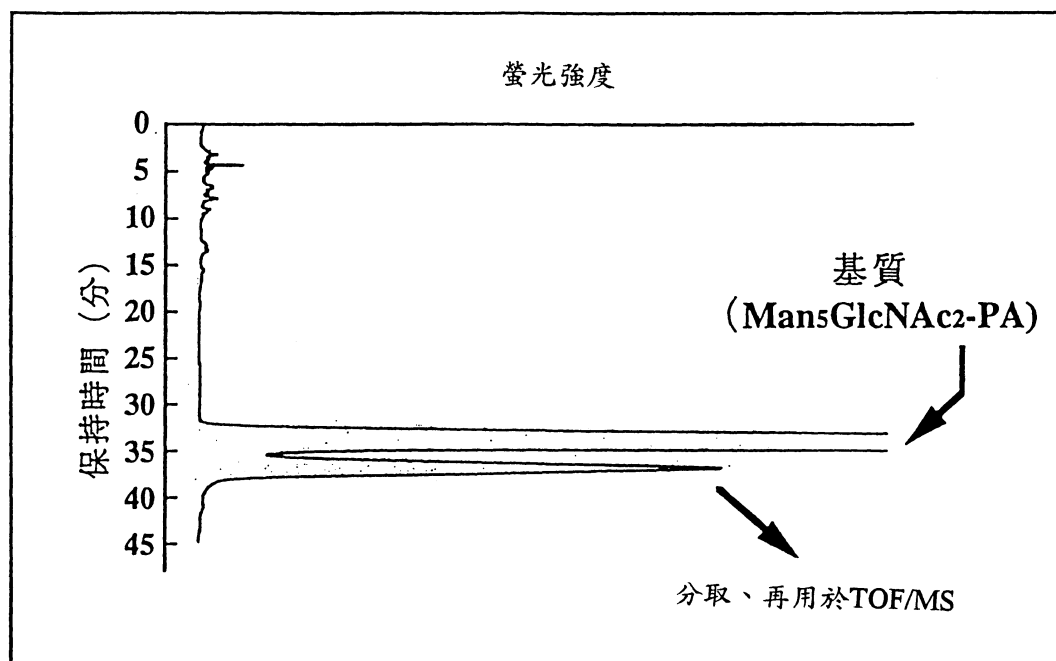


圖 9

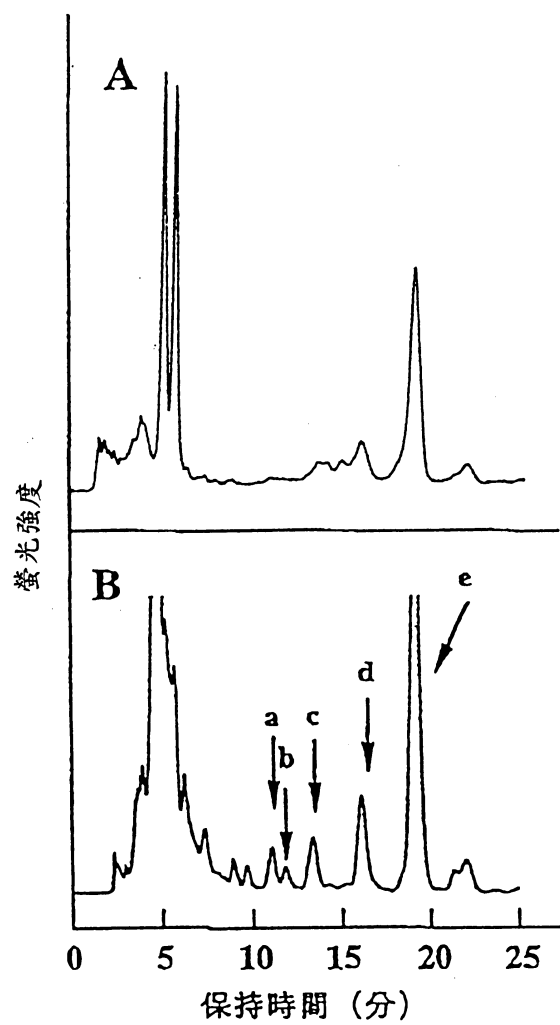


圖 10

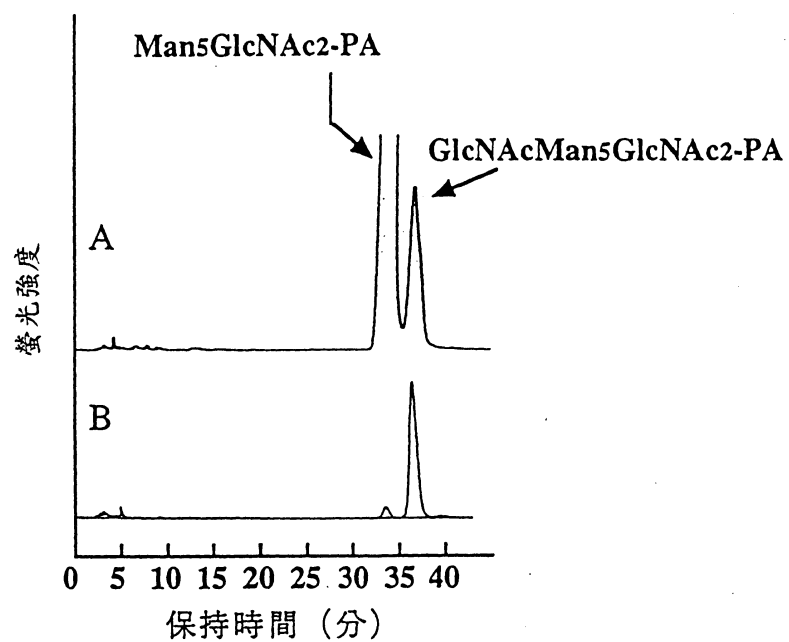


圖 11

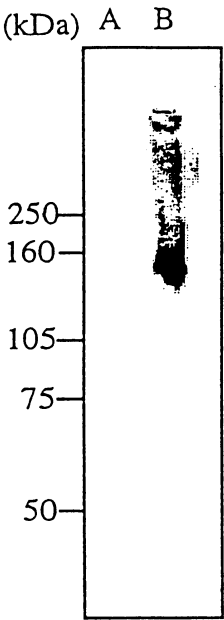


圖 12

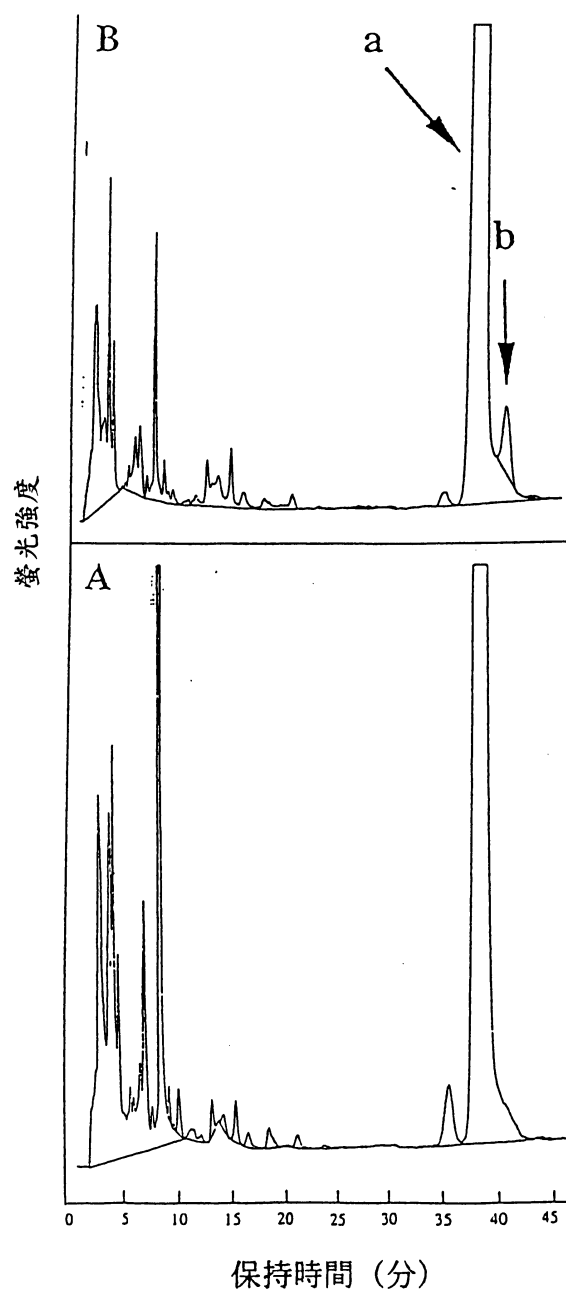


圖 13

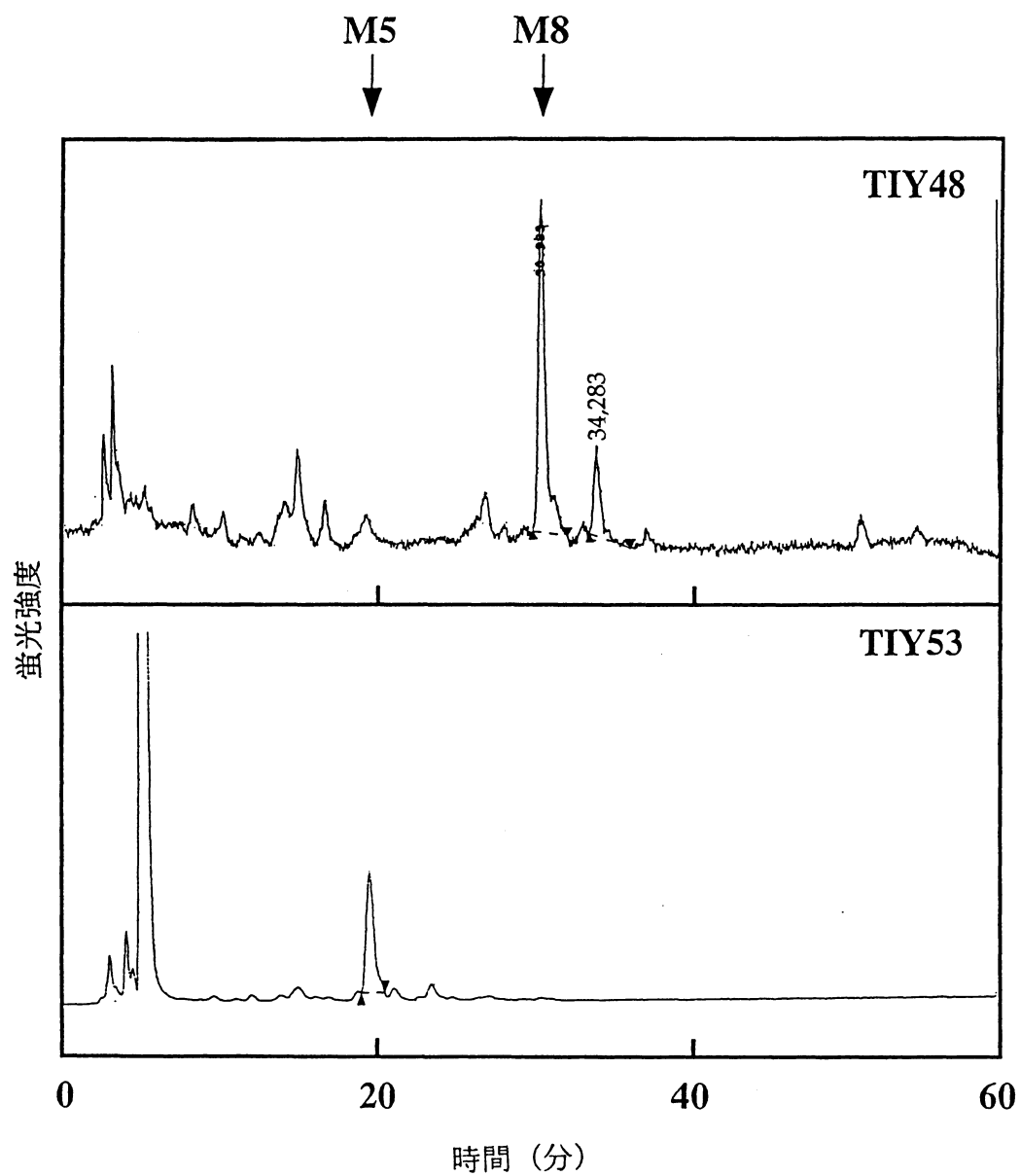


圖 14

申請日期	89.8.18
案 號	089116771
類 別	C2N/q, C2P 2/c

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

中文說明替換頁(93年9月)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 新 型 名 稱	中 文	新穎酵母變異株及含有哺乳類型糖鏈的糖蛋白質的 製造方法
	英 文	NOVEL YEAST MUTANT STRAINS AND METHOD FOR PREPARING GLYCOPROTEIN WITH MAMMALIAN-TYPED SUGAR CHAINS
二、發明 創 作 人	姓 名	1.千葉 靖典 2.貝沼 真美 3.竹內 誠 4.川島 永子 5.吉田 聰 6.山野 重幸 7.地神 芳文 8.石井 智子 9.新間 陽一
	國 籍	均日本
三、申請人	住、居所	1.-6. 日本國神奈川縣橫濱市金澤區福浦1-13-5 麒麟麥酒股份有限公司基盤技術研究所內 7. 日本國茨城縣牛久市中央3-24-2 8. 日本國茨城縣筑波市下廣岡1055-588 9. 日本國茨城縣筑波市吾妻1-408-301
	姓 名 (名 稱)	1.日商麒麟麥酒股份有限公司 2.日本國通商產業省工業技術院
三、申請人	國 籍	均日本
	住、居所 (事務所)	1.日本國東京都中央區新川二丁目10番1號 2.日本國東京都千代田區霞關1丁目3番1
三、申請人	代 表 人 姓 名	1.佐藤 安弘 2. 村 皓二

I232238

第 082116771 號專利申請案
序列表替換本(92 年 11 月)

A7
B7

修正
92 年 11 月 11 日

序列表

<110> 日商麒麟啤酒股份有限公司

日本國通商產業省工業技術院

<120> 新穎酵母變異株及含有哺乳類型糖鏈的糖蛋白質的製造方法

<130> PH-1034-TW

<140> 089116771

<141> 2000.8.18

<150> JP11-233215

<151> 1999.8.19

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 1

GGATCCGAAG AAAACCTAAT ACATTGAAGT

30

裝

訂

線

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 2

GCATGCCCTT TGGTTTAATA TAAATCTCCG GAGTGC

36

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 3

GCATGCTACA TAACTCCAAT CAGCAGCAAA TATGTC

36

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成DNA

<400> 4

GCGGCCGCGT GTTCTGTTTCG GGTAACGTTT AAACCAAT

38

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成DNA

<400> 5

AGATGCATAC TAGTGGGCCC ATTGTGATTG GAAT

34

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成DNA

<400> 6

CCCCCGAATT CGTGTGAAGG AATAGTGACG

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213>人工序列

<220> 30

<223>人工序列之描述：合成DNA

<400> 7

CCCCCGAATT CAAGTCGGAG AACCTGACTG

30

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成DNA

<400> 8

ATGGGCCCAC TAGTATGCAT CTCGCGTGGC ATGG

34

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成DNA

<400> 9

GCGGCCGCGA GACCTGAATC TTCGACACGC AAGAAAAA

38

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 10

GAATTCGCTT TCGAACAAAA TCAAAAGGGG CATAAC

36

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>人工序列之描述：合成DNA

<400> 11

GAATTCCTAT CCACCAAAC TACAAGCAAG CA

32

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 12

GCGGCCGCCG AGAGGGTGAA CGGTGCTAAC TCAGGATT

38

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 13

CGCCGCCGAG CTCTAAAAAA ATGAAGTTAA GCCGCC

36

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 14

ATCCCACCAC TTTGAAAGGT

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 15

GAAGACTCAC GGAGGAAGTT

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 16

ATGGCGGTAT ATGTGCTCGA

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 17

CGCAGTTTGG GATACAGCAA

20

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400>18

ATTATTATTA GCGGCCGCCC CTCAACTGGA TTCG

34

<210> 19

<211> 162

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 19

GGATCCGAGC TCCACCGCGG TGGCGGCCGC ATGTTTTACC CATACGATGT TCCTGACTAT 60
GCGGGCTATC CCTATGACGT CCCGGACTAT GCAGGATATC CATATGACGT TCCAGATTAC 120
GCAGCTACTA GTGGGCATGC TTCACGCGTC TAGTGAGAAT TC 162

<210> 20

<211> 176

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 20

GAGCTCAAAA AGAAAGCAAG TAAAAGAAAG AAGAGATCAT GTCTAGGAAG TTGTCCCACC 60
TGATCGCTAC AAGGAAATCA AAAACAATAG TCGTAACCGT ACTTCTTATT TATTCTTTGT 120
TGACATTTCA CTTGTCAAAC AAAAGGCTGC TTTCTCAGTT TTACCCATGG GAATTC 176

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 21

TTAGACTACC CATGGAACCC GCGCCGCGAG GGCTCCTTC 39

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 22

CAGGAGAACT TTGGTTCGAA AAAGCTTTGA CTTCTT 36

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 23

AGAGCGGCCG CAAAATGTTC GCCAACCTAA 30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 24

TTTGTGCGAC TAGACGCGTG AAGCATGCCC

30

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 25

CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGAC

24

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成DNA

<400> 26

ATGGGCCCGGC TCTTTTATCC AAAGATAC

28

四、中文發明摘要(發明之名稱：新穎酵母變異株及含有哺乳類型糖鏈的糖蛋白質的製造方法)

本發明係提供一利用新穎酵母變異株及使用該變異株之糖質工程方法之糖鏈及糖蛋白質的製造方法，其中該酵母變異株可生產一種糖蛋白質，其在該蛋白質的天門冬酸殘基上，附加有與哺乳類細胞所生產之糖鏈相同之糖鏈構造之糖鏈。

利用本發明所育種之新穎的營養要求性三重變異株、營養要求性四重變異株時，就可以將具有與人類等哺乳類細胞所生產之高甘露糖型同一之中性糖鏈、或者具有同一之中性糖鏈的糖蛋白質，以大量且純度優良地加以生產。又，藉由在該變異株上導入哺乳類型糖鏈之生合成系基因，就可以有效率地生產具有高甘露糖型、混成型、複合型等的哺乳類型糖鏈、或者具有哺乳類型糖鏈的蛋白質。

英文發明摘要(發明之名稱：NOVEL YEAST MUTANT STRAINS AND METHOD FOR PREPARING GLYCOPROTEIN WITH MAMMALIAN-TYPED SUGAR CHAINS)

The present invention provides a novel yeast mutant strain which can be utilized to produce a glycoprotein by adding a sugar chains with the same structure as the sugar chains produced by mammalian cells to the asparagines residue of protein, and a method for preparing the sugar chains and the glycoprotein by using said mutant strains with glycotecnological approach.

The novel bred auxotrophic triple mutant strain or auxotrophic quadruple mutant strain according to the present invention, it is possible to produce a neutral sugar chain the same as the high-mannose type sugar chains which produced by the mammalian cells like human being, or a glycoprotein containing said neutral sugar chains in quantity and higher purity. Also, it is possible to produce a mammalian-typed sugar chain of high-mannose type, hybrid type or complex type, or a glycoprotein containing said sugar chains efficiently by transducing the mutant strains into a biosynthetic gene of mammalian-typed sugar chains.

六、申請專利範圍

將 α -甘露糖苷酶I基因、GnT-I基因、 α -甘露糖苷酶II基因及GnT-II基因導入作為變異導入對象之野生酵母變異株之步驟。

5. 如申請專利範圍第4項之方法，該酵母變異株係保持選自ura3變異、his3變異、leu2變異、ade2變異、trp1變異及can1變異之至少一者的營養要求性。
6. 如申請專利範圍第4項之方法，該酵母變異株係保持ura3變異。
7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中 α -甘露糖苷酶I基因係衍生自麴菌(*Aspergillus saitoi*)。
8. 如申請專利範圍第4項之方法，其中 α -甘露糖苷酶I基因係衍生自麴菌(*Aspergillus saitoi*)。
9. 一種酵母變異株之製造方法，其係包含：
對於具有生合成對酵母為特異性之外糖鏈之基因的ALG3基因、MNN1基因、MNN4基因及OCH1基因之作為變異導入對象之野生酵母株，破壞該等基因之步驟；及
將 α -甘露糖苷酶I基因導入作為變異導入對象之野生酵母變異株之步驟。
10. 如申請專利範圍第9項之方法，該酵母變異株係保持選自ura3變異、his3變異、leu2變異、ade2變異、trp1變異及can1變異之至少一者的營養要求性。
11. 如申請專利範圍第9項之方法，該酵母變異株係保持ura3變異。

六、申請專利範圍

12. 一種酵母變異株之製造方法，其係包含：

對於具有生合成對酵母為特異性之外糖鏈之基因的
ALG3 基因、MNN1 基因、MNN3 基因及 OCH1 基因之
作為變異導入對象之野生酵母株，破壞該等基因之步驟
；及

將 α -甘露糖苷酶 I 基因、GnT-I 基因及 GnT-II 基因導入
作為變異導入對象的酵母變異株之步驟。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，該酵母變異株係保持選
自 ura3 變異、his3 變異、leu2 變異、ade2 變異、trp1 變
異及 can1 變異之至少一者的營養要求性。

14. 如申請專利範圍第 12 項之方法，該酵母變異株係保持
ura3 變異。

15. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中 α -甘露糖苷酶 I 基
因係衍生自麴菌(*Aspergillus saitoi*)。

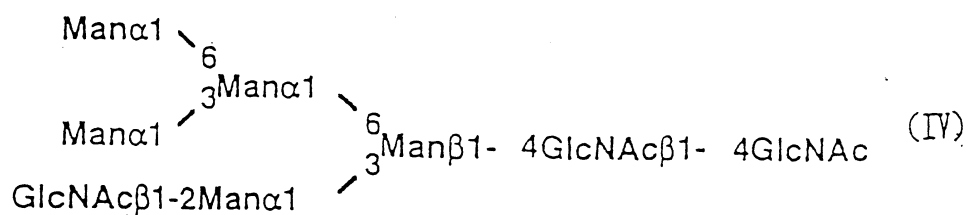
16. 如申請專利範圍第 12 項之製造方法，其中 α -甘露糖苷
酶 I 基因係衍生自麴菌(*Aspergillus saitoi*)。

17. 一種酵母變異株之製造方法，其特徵為使用可再生之營
養要求性標記尿嘧啶，破壞生合成對於酵母為特異性之
外糖鏈之基因 OCH1。

18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該尿嘧啶為 ura3。

19. 一種糖蛋白之製造方法，其特徵為將藉由申請專利範圍
第 1 項之方法所製造之酵母變異株培養於培養基中，於
培養基中生成累積具有下式(IV)之糖鏈之糖蛋白後，再
自該培養物中採取該蛋白：

六、申請專利範圍



(式中，Man係表示甘露糖，GlcNAc為N-乙醯胺基葡萄糖)。