

國立台灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

以轉錄因子 Mxr1 再程序化的策略加強嗜甲醇酵母菌

*Pichia pastoris* AOX1 啟動子效率

Enhancement of *Pichia pastoris* AOX1 Promoter

Efficiency by Reprogramming the Transcription Factor

Mxr1

張景翔

Ching-Hsiang Chang

指導教授：黃慶臻 博士

Advisor: Ching-Tsan Huang, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July 2017



## 謝誌



時光匆匆、歲月如梭，又到了說掰掰的時候！在 Lab106 的時間應該有 4 年了吧，這段時間說長不長、說短不短，短到讓我覺得自己好像也沒做幾件事就要走了；但也長到足以讓我從一個不想念碩班的大學生，變成想試試能不能繼續在研究之路上前進的碩士生。為什麼會有這樣的轉變呢？我想最主要的原因是在這段時間內，我過得很開心！感謝在這幾年跟我相處的大家！

首先，謝謝我的指導教授—黃慶臻老師！黃教授真的是一個“老師”，從老師那學到很多待人處事的經驗與邏輯，並了解溝通的重要，希望這點我有明顯的進步！還有也謝謝老師願意相信我、願意給我很大的自由，讓我可以做我想做的題目、實驗，這樣一個快樂學習的環境對我真的很重要！同時，感謝吳亘承老師，對我來說吳老師更像是實驗室的大學長，跟我分享了許多寶貴的經驗與新創的想法，讓我更期待未來研究之路的樣子！以及口試委員：陳浩仁、林晉玄、凌嘉鴻老師，謝謝老師們在我論文上給予的建議！

再來則是 Lab106 的前、今、後人：謝謝宛伶學姐每次畢業典禮都有來看我們！謝謝莉欣與巧青學姐，教會我很多實驗、給予我很多幫忙！謝謝玉儒學姐、浩業學長，在醱酵課的過程中，讓我有機會接觸到不一樣的刺激！謝謝俞均與芝榕學姊，讓實驗室更有趣也更溫馨！謝謝昱伶學姊，處理實驗室的許多事情，carry 菇類組！謝謝同屆的大家，凱琳、孟羲和哲銘，從你們身上我都有學到很多東西、看到許多我不足之處！謝謝下一屆的學弟妹們，為實驗室注入不一樣的元素，映希、浩安，酵母菌組就交給你們 carry 啦！越來越進入狀況的尚儒、冠陞繼續加油呀！也感謝其它新進的學弟妹，希望你們也可以在 Lab106 快樂學習！

最後，則是我的家人，讓我可以無憂無慮的完成從小到大的學習，支持我每次選擇要做的事情！

景翔 謹誌 106 年 7 月

## 摘要



*Pichia pastoris* 為嗜甲醇酵母菌的一種，是極具潛力的異源蛋白質表達系統，兼具微生物與真核系統的優勢。搭配甘油培養—甲醇誘導策略，可嚴謹調控 *P. pastoris* 的 *AOX1* 啟動子，並大量生產重組蛋白質。然而，調控過度嚴謹的 *AOX1* 啟動子，使 *P. pastoris* 只能侷限在特定的培養條件，必需以有毒、易燃的甲醇作為唯一碳源時，才可有效率誘導 *AOX1* 啟動子。本研究希望藉由轉錄因子再程序化，改變 *AOX1* 啟動子的調控，以提升 *P. pastoris* 的生產效率。透過建立轉錄活化子 Mxr1 (Methanol expression regulator 1) 的自我正回饋控制迴路(Positive auto-regulation circuit)，降低抑制性碳源對 *AOX1* 啟動子的干擾，並解決 Mxr1 稀釋效應所造成轉錄活性下降。以 *AOX1* 啟動子表現綠色螢光蛋白質基因，並以 *AOX2* 啟動子表現額外的 Mxr1。在不同種類及濃度的碳源培養下，證實此策略可以提升 *AOX1* 啟動子的轉錄活性，並且不會造成細胞生長缺陷。在甘油高於特定濃度時，*AOX1* 啟動子仍保留嚴謹的控制。但當甘油降至特定濃度後，Mxr1 正回饋迴圈的啟動，逐步降低 *AOX1* 啟動子的嚴謹度，去除殘留抑制性碳源對 *AOX1* 啟動子的干擾，進而使 *AOX1* 啟動子能受甘油受限的誘導。然而，提升額外 Mxr1 之拷貝數，無法進一步加強 *AOX1* 啟動子的轉錄效率，顯示 Mxr1 與外源性 *AOX1* 啟動子的最佳比例仍需更深入目標的探討。最後，*AOX1* 啟動子提升的轉錄活性，可能會受限於外泌效率，而影響胞外蛋白質的產量，但未來可以搭配其它策略解決此問題。總而言之，透過轉錄因子再程序化的策略，可以保有 *AOX1* 啟動子原有的優勢，加強甲醇誘導的轉錄活性，同時解決 *AOX1* 啟動子調控過於嚴謹的缺點，使 *P. pastoris* 更具應用性。

關鍵字： *Pichia pastoris*、甲醇、*AOX1* 啟動子、轉錄因子、Mxr1

## Abstract



The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been extensively applied in production of recombinant proteins because it combines the advantages of single cell in microbial and post-translational modification in eukaryotic systems. The *AOX1* promoter ( $P_{AOX1}$ ) is the most common promoter used for heterologous protein expression in *P. pastoris*. A glycerol-methanol-shift induction strategy is applied to achieve high productivity. However, the tightly regulated  $P_{AOX1}$  also led *P. pastoris* expression to restrictive conditions. To improve the efficiency of protein production, we tried to reprogram the transcriptional regulation of  $P_{AOX1}$  in *P. pastoris*. The ectopic Mxr1 expressed by the mild *AOX2* promoter ( $P_{AOX2}$ ) did not cause growth defect. The transcriptional efficiency of  $P_{AOX1}$  was enhanced since the limitation of Mxr1 titration effect was broken by extra Mxr1.  $P_{AOX1}$  became more flexible due to the positive feedback of Mxr1 and was regulated by glycerol. With the extra Mxr1 driven by  $P_{AOX2}$ ,  $P_{AOX1}$  showed better activity without than that with medium replacement. Moreover, glycerol starvation induced GFP production with reprogramming Mxr1 in *P. pastoris*. Increasing copy number of ectopic Mxr1 did not enhanced the efficiency of  $P_{AOX1}$ . These results showed overexpression of Mxr1 by one copy of  $P_{AOX2}$  might be enough to achieve the maximum activity of  $P_{AOX1}$ . Although the improvement of transcriptional efficiency might be limited by secretory ability, these problems could be solved by combination with other strategies. In conclusion, transcriptional reprogramming of Mxr1 improved the efficiency of *P. pastoris* under methanol induction and potentially made *P. pastoris* become methanol-free induction system to eliminate the problems of methanol.

Keywords: *Pichia pastoris*, methanol, *AOX1* promoter, transcription factor, Mxr1

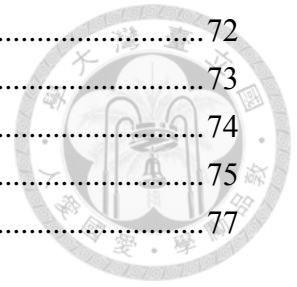
# 目錄



謝誌.....	I
摘要.....	II
Abstract.....	III
目錄.....	IV
圖目錄.....	VII
表目錄.....	VIII
附圖目錄.....	IX
第一章前言.....	1
一、異源表達系統.....	1
二、 <i>Pichia pastoris</i> 嗜甲醇酵母菌表現系統.....	1
1. 具有轉譯後修飾.....	2
2. 具外泌異源蛋白質的能力.....	2
3. 表現量高、調控嚴謹的甲醇誘導系統.....	3
三、 <i>AOX1</i> 啟動子的轉錄調控.....	4
1. <i>MXR1</i> .....	5
2. <i>PRM1</i> .....	7
3. <i>MIT1</i> .....	8
4. <i>NRG1</i> .....	9
四、甲醇誘導系統面臨的困境與解決辦法.....	11
1. 甲醇的負面影響.....	11
2. 過度嚴謹的 <i>AOX1</i> 啟動子.....	12
五、研究動機.....	14
1. 目的.....	14
2. 轉錄調控策略.....	14
3. 目標.....	15
第二章 材料與方法.....	18
一、實驗菌株與培養條件.....	18
1. 細菌.....	18
2. 真菌.....	18
二、培養基.....	19
三、表現載體建構.....	21
1. pPICZ-mEGFP.....	21
2. pPICZ $\alpha$ -mEGFP.....	22
3. pPIC3.5KH.....	22
4. pAOX2KH.....	22

5. pAOX2KH-Mxr1 .....	23
四、嗜甲醇酵母菌電穿孔轉形.....	28
1. <i>P. pastoris</i> 勝任細胞製備.....	28
2. 電穿孔轉形.....	28
五、嗜甲醇酵母菌染色體 DNA 分析.....	30
1. 轉形株染色體簡易分析.....	30
2. 轉形株目標基因拷貝數測定.....	30
六、轉形株培養與分析.....	32
1. 試管誘導.....	32
2. 搖瓶誘導.....	32
3. 醱酵槽誘導.....	32
七、mRNA 表現量分析.....	34
八、蛋白質分析.....	36
1. 聚丙烯醯胺膠體電泳分析.....	36
2. 西方墨點法.....	36
3. AOX 活性分析.....	37
第三章 結果.....	40
一、轉形菌建立與分析.....	40
1. 胞內型綠色螢光蛋白質生產菌株.....	40
2. 外泌型綠色螢光蛋白質生產菌株.....	40
3. Mxr1 再程序化之胞內型綠色螢光蛋白質生產菌株.....	41
3. Mxr1 再程序化之外泌型綠色螢光蛋白質生產菌株.....	41
二、轉錄因子 Mxr1 再程序化對異源蛋白質生產的影響.....	50
1. 額外表現 Mxr1 加強胞內型綠色螢光蛋白質的生產.....	50
2. 額外表現 Mxr1 的效果不隨著拷貝數增加而提升.....	50
3. 額外表現 Mxr1 不會破壞 <i>AOX1</i> 啟動子嚴謹調控的特性.....	51
4. 額外表現 Mxr1 提升 <i>AOX1</i> 啟動子轉錄效率.....	51
5. 額外表現 Mxr1 解除 <i>P. pastoris</i> 甲醇誘導需要置換的限制.....	52
6. 額外表現 Mxr1 賦予 <i>P. pastoris</i> 以碳源受限誘導的能力.....	52
7. 額外表現 Mxr1 改善 <i>P. pastoris</i> 的甲醇代謝能力.....	54
8. 異源蛋白質的生產可能受限於外泌效率.....	54
第四章 討論.....	69
一、額外表現 Mxr1 對 <i>AOX1</i> 啟動子轉錄活性的影響.....	69
二、額外表現 Mxr1 對 <i>AOX1</i> 啟動子碳源控制性的影響.....	70
三、甲醇調控機制之探討.....	71
1. <i>Nrg1</i> 與甘油抑制之關係.....	71
2. <i>Prm1</i> 與氮源之關係.....	72
四、無甲醇誘導系統發展的可能性.....	72

1. 在甘油受限時的 Nrg1 表現量 .....	72
2. Mit1 潛在的轉譯後調控 .....	73
第五章 結論.....	74
第六章 未來展望.....	75
第七章 參考文獻.....	77



## 圖目錄



圖一、 <i>AOX1</i> 啟動子的轉錄調控示意圖.....	10
圖二、 <i>Mxr1</i> 再程序化菌株轉錄調控示意圖.....	16
圖三、本論文之研究架構圖.....	17
圖四、本研究建構之表現載體圖譜.....	24
圖五、以不同培養基篩選 pPICZ-mEGFP 轉形株.....	42
圖六、胞內型 mEGFP 生產菌株標準化螢光強度分析.....	43
圖七、螢光顯微鏡觀察胞內型 mEGFP 生產菌株.....	44
圖八、以不同培養基篩選 pPICZ $\alpha$ -mEGFP 轉形株.....	45
圖九、以不同 G418 抗性濃度篩選 <i>Mxr1</i> 再程序化之 E3 轉形株.....	46
圖十、聚合酶連鎖反應分析 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株染色體 DNA.....	47
圖十一、以不同 G418 抗性濃度篩選 <i>Mxr1</i> 再程序化之 SE12 轉形株.....	48
圖十二、以標準方法誘導 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株.....	56
圖十三、不同拷貝數 <i>Mxr1</i> 轉形株的標準化螢光強度分析.....	57
圖十四、外源性 <i>MXR1</i> 拷貝數與標準化螢光強度之關係圖.....	58
圖十五、 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株在不同甘油下的濁度與標準化螢光強度.....	59
圖十六、 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株在不同碳源下的標準螢光強度.....	60
圖十七、 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株之 mEGFP 與 <i>MXR1</i> mRNA 表現量分析.....	61
圖十八、 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株之 <i>NRG1</i> 、 <i>PRM1</i> 、 <i>MIT1</i> mRNA 表現量分析....	62
圖十九、 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株不置換培養基的標準化螢光強度.....	63
圖二十、以甘油受限誘導 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株.....	64
圖二十一、 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株以醱酵槽進行甘油受限誘導之參數圖.....	65
圖二十二、 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株以醱酵槽進行甲醇誘導之參數圖.....	66
圖二十三、各菌株在不同碳源下的甲醇代謝能力.....	67
圖二十四、分析 <i>Mxr1</i> 再程序化轉形株的胞、內外螢光強度.....	68



## 表目錄

表一、建構表現載體與定序之引子序列.....	25
表二、本研究使用之分生試劑套組.....	27
表三、即時定量聚合酶鏈鎖反應之引子序列.....	35
表四、蛋白質分析所用試劑之組合成分.....	38
表五、本研究建構之轉形株與其外源基因的拷貝數.....	49



## 附圖目錄

附圖一、異源表達系統比較圖.....	81
附圖二、嗜甲醇酵母菌甲醇之利用途徑.....	82



## 第一章前言

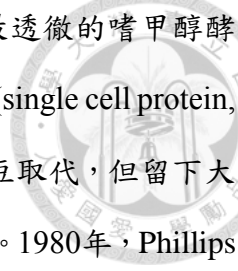


### 一、異源表達系統

異源表達(heterologous expression)是透過基因工程，將外源基因送入特定宿主，並以該宿主的蛋白質合成系統生產重組蛋白質(recombinant protein)。相較於直接從原物種取得蛋白質，透過異源表達系統生產具備以下幾點優勢：(1)原料取得容易、(2)生產成本低廉及(3)操作程序簡單。因此異源表達系統已廣泛應用於學術、農業、工業、生技醫療產業等[1]。而適合用於異源蛋白質表達系統的宿主也發展出許多不同選擇，從原核的大腸桿菌到真核的酵母菌、植物及哺乳細胞等，每種系統都有著各自的優缺點，如附圖一。

### 二、*Pichia pastoris* 嗜甲醇酵母菌表現系統

嗜甲醇酵母菌(methylotrophic yeast)為一類可利用甲醇為唯一碳源的酵母菌，此類酵母菌具有特別的甲醇代謝路徑(methanol utilization pathway)，並在過氧化氫體(peroxisome)進行初步的甲醇代謝，以避免代謝產物的毒性。首先，甲醇先經由酒精氧化酶(alcohol oxidase, AOX, EC 1.1.3.13)氧化成甲醛，並產生副產物—過氧化氫，過氧化氫會進一步由過氧化氫酶(catalase)分解成水與氧氣，而甲醛則經由異化作用(dissimilation)轉換成能量，或是透過同化作用(assimilation)形成生物質量，如附圖二。甲醇代謝路徑受到碳源的調控，在甲醇為唯一碳源的情況下，相關基因會大量表現，以避免甲醇、甲醛過量累積而造成細胞死亡。這些表現量高、調控嚴謹的甲醇代謝基因，加上酵母菌為真核微生物系統的優勢，使嗜甲醇酵母菌成為廣泛使用的異源蛋白質表現平台，其中常見的菌株有*Pichia pastoris*、*Hansenula polymorpha*、*Candida boidinii*等[2-4]。



*P. pastoris*為本研究中使用的異源表達系統，是目前研究最透徹的嗜甲醇酵母菌。在1960年代後期，*P. pastoris*曾被用於生產單細胞蛋白質(single cell protein, SCP)，雖然受到石油危機、甲醇價格上漲的影響，而逐漸被黃豆取代，但留下大規模醱酵製程技術，成為未來工業化生產異源蛋白質的基石[5]。1980年，Phillips Petroleum Company和Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (SIBIA, La Jolla, CA, USA)合作開發*P. pastoris*異源蛋白質表現系統，包含菌種、表現載體及使用流程等[6]，至今已有數千種以上的蛋白質成功的以此系統進行表現[7]，其中有一些重組蛋白質藥物已通過美國FDA (Food and Drug Administration)的核可，包括：胰島素、抗體和B肝疫苗，顯示*P. pastoris*在未來蛋白質藥物領域中扮演重要的角色[8]。

此系統除了具有微生物系統的便宜、快速、產量大等優點[9]，還具有以下幾點優勢：

### 1. 具有轉譯後修飾

相較於原核大腸桿菌系統，*P. pastoris*屬於真核生物，能夠對蛋白質進行糖基化、磷酸化、形成雙硫鍵等轉譯後修飾，更適合用於表現真核生物的異源蛋白質，而且不像釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，會造成蛋白質過度糖基化，使其生產的蛋白質可能導致人體產生過敏反應[10]。因此，同樣為真核微生物表達系統的*P. pastoris*，比*S. cerevisiae*更適合用來生產醫藥用蛋白質[11]。

### 2. 具外泌異源蛋白質的能力

*S. cerevisiae*進行有性生殖時， $\alpha$  mating type的交配信息素 $\alpha$ -factor，會透過外泌訊息 $\alpha$ -mating factor prepro peptide，進入轉譯後轉移外泌途徑(Post-translational translocation)而送至胞外[12]。因此將異源基因的N端接上來自*S. cerevisiae*的外泌訊息，能讓*P. pastoris*將異源蛋白質分泌至胞外[13]，另外因*P. pastoris*外泌性原生

蛋白質極少的特性，可使上清液大部分皆為異源蛋白質，方便後續純化工作。



### 3. 表現量高、調控嚴謹的甲醇誘導系統

酒精氧化酶是甲醇代謝的第一個酵素，但由於此酵素效率不佳，菌體需要表現大量的酵素以代謝甲醇。在 *P. pastoris* 中，有兩種酒精氧化酶，分別為 Aox1 和 Aox2，這兩種酵素皆受到嚴謹的調控，甲醇能誘導其大量表現，卻會被葡萄糖、甘油和乙醇抑制。然而，兩種酵素的表現量並不一致，*AOX1* 啟動子的表現量為 *AOX2* 啟動子的 10 倍以上，進行甲醇誘導時，*AOX1* mRNA 可達細胞內總 mRNA 的 5%，而蛋白質可達總可溶蛋白的 30%[2]。因此，表現量高、調控嚴謹的 *AOX1* 啟動子十分適合用於生產異源蛋白質。



### 三、*AOX1* 啟動子的轉錄調控

*AOX1* 啟動子是 *P. pastoris* 中最常被使用的啟動子，根據其受碳源嚴謹調控的特性，目前也發展出一套誘導模式。然而，科學家對 *AOX1* 啟動子的了解仍停留在微生物生理等巨觀的角度，詳細的分子調控機制並沒有一個完整的論述。此外，在不同嗜甲醇酵母菌之間，面對碳源轉換所採取的策略也不太一樣。相較於 *P. pastoris* 的 *AOX1* 啟動子，*H. polymorpha* 的 *MOX* (methanol oxidase) 啟動子能以更彈性的條件活化，甲醇的誘導效果不會受到甘油的干擾，甚至在甘油受限的情況下，就可達到甲醇誘導 60% 的轉錄活性[14]。然而，此碳源適應的差異，並非因為兩個啟動子序列不同，若是將 *AOX1* 啟動子轉入 *H. polymorpha* 中，就能以甘油受限的方式活化 *AOX1* 啟動子，顯示轉錄因子對甲醇適應的重要性[15]。

近年來，陸續有研究探討 *AOX1* 啟動子的調控機制，啟動子活化過程大致上可以分為兩個階段，第一個階段為去抑制化(derepression)，當環境中的抑制性碳源降低到一定濃度之下，*AOX1* 啟動子的轉錄活性約可達到甲醇誘導的 2%；第二個階段則是甲醇誘導活化(activation)，轉錄活性可高達受葡萄糖抑制時的 1000 多倍[16]。在這兩個調控階段，已知有 4 個轉錄因子參與其中，並且研究較為透徹，分別為 3 個活化子(activator) *Mxr1*、*Mit1*、*Prm1* 與 1 個抑制子(repressor) *Nrg1*，如圖一。



## 1. *MXR1*

2006 年，Lin-Cereghino 等人發現 *MXR1* (PAS\_chr4\_0487) 對於甲醇代謝的重要性，*MXR1* 突變會影響 *P. pastoris* 甲醇代謝路徑與過氧化體形成的相關基因表現，進而使 *P. pastoris* 無法生存於碳源為甲醇的情況。轉錄因子 Mxr1 的序列與 *S. cerevisiae* 的轉錄因子 Adr1 相似，其中又以 N 端區域相同度最高(70% identity)。Adr1 是 *S. cerevisiae* 代謝乙醇、甘油與油酸很重要的轉錄因子，Mxr1 與 Adr1 的相似性意味兩者可能是同源基因，都負責調控碳源代謝相關基因[17]。

Mxr1 由 1156 個胺基酸組成，分子量約為 130 kDa，N 端包含兩個 DNA 結合鋅指 (Type I C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> DNA-binding zinc finger)，透過辨認核心序列 5' CCYC 3'，結合在 *AOX1* 啟動子的 6 個不同位置。因此，若是剔除這 6 個結合位，同樣會導致 *AOX1* 啟動子的轉錄活性下降[18]。此外，若是在 *P. pastoris* 轉入過多外源性 *AOX1* 啟動子，可能導致 Mxr1 稀釋效應。染色體上 Mxr1 結合位會因為外源性基因數量提升而增加，使 Mxr1 的相對濃度被稀釋，進而可能導致 Mxr1 無法結合在所有的結合位，除了使異源蛋白質表現量下降外，甚至會影響到甲醇代謝[19]。而 Mxr1 的轉錄活化區域主要位於第 246 到第 280 號胺基酸之間，此區段由許多疏水性與酸性胺基酸組成，是轉錄活化區域常見的特色。綜合以上兩點，Mxr1 的 N 端 400 個胺基酸(包含 DNA 結合能力與轉錄活化能力)，即可具有 Mxr1 全長的功能，至於剩下區域功能尚未明瞭[20]。

不同於其它嗜甲醇酵母菌，*P. pastoris* 的 *MXR1* 是一個持續性表現的基因，並不會因為碳源不同而有所差異。但是當環境中的碳源缺乏葡萄糖時，Mxr1 會由細胞質移動到細胞核中，此現象指出葡萄糖對 *AOX1* 啟動子的抑制可能是透過影響 Mxr1 在細胞中的位置[17, 21]。而乙醇的抑制則可能是透過磷酸化 Mxr1 的第 215 號胺基酸 Serine，雖然磷酸化的 Mxr1 並不會改變在細胞中的位置，也不會喪失與 *AOX1* 啟動子結合的能力，但磷酸化的區域(胺基酸 212 到 225)會被 14-3-3 家族的蛋白質 C4qzn3 (PAS\_chr2-1\_0809) 結合，進而影響 Mxr1 後續轉錄活化的能力，不過確切的分子機制仍不清楚[20]。而在甘油抑制的部分，雖然 Mxr1 會

存在於細胞核中，但是否仍保有結合 *AOXI* 啟動子的能力，或是否有特殊的轉譯後調控，至今仍無詳細的探討。

在 *AOXI* 啟動子啟動過程中，雖然可分為去抑制化與甲醇活化的兩個階段，但是這兩者之間並仍沒有一個明顯的界線。*Mxr1* 可能在這兩階段都扮演一定的角色，不過 *Mxr1* 目前主要被認為參與去抑制化的過程[22]。*MXR1* 突變而導致 *AOXI* 啟動子轉錄活性的喪失，無法以過量表現 *Mit1* 或 *Prm1* 修復，顯示 *Mxr1* 的功能與其他兩個轉錄活化子並不重疊[23]。*Mxr1* 除了影響甲醇代謝，同時還影響油酸、乙酸的代謝[17, 24]，以胺基酸為碳源的能力也受到 *Mxr1* 的調控[21]，甚至 *P. pastoris* 在利用抑制性碳源甘油、乙醇時的生長速度，都會因為 *MXR1* 突變而降低[17]，因此 *Mxr1* 可能是一個全面性的碳源調控子。此外，*Mxr1* 面對不同碳源時的反應，並不是透過耗時的轉錄活化、改變胞內濃度，而是以快速的轉譯後調控(細胞內位置差異、磷酸化)影響下游基因的表現，因此 *Mxr1* 或許能幫助 *P. pastoris* 在碳源(尤其是葡萄糖)缺乏時快速的去抑制化啟動子，並進一步協同其它的轉錄因子，以適應多樣化的碳源。



## 2. *PRM1*

*CbTrm1* 最早於嗜甲醇酵母菌 *Candida boidinii* 中發現，已知對甲醇代謝扮演重要的角色，並透過序列比較發現與 *P. pastoris* 的同源基因 *PpTrm1* (PAS\_chr4\_0203)的胺基酸序列有 58%的相同度[22]。*PpTrm1* 在後續的研究稱為 *Prm1*，此蛋白質由 989 個胺基酸組成，分子量約為 111 kDa，為  $Zn(II)_2Cys_6$  類型之轉錄因子。*PRM1* 突變的性狀主要在甲醇代謝基因的缺乏，雖然可能會因為缺乏酒精氧化酶與二羥基丙酮合成酶 (dihydroxyacetone synthase, Das)，而使過氧化體體積不正常，但 *PRM1* 突變並不會影響過氧化體的增殖(proliferation)。過氧化體除了用於代謝甲醇，對油酸代謝也十分重要，因此相較於全面性的碳源調控者 *Mxr1*，*Prm1* 可能更專注於甲醇的調控[23]。

*Prm1* 對甲醇代謝影響與環境中氮源有關。相較於營養培養基，*PRM1* 突變株在基礎培養基(minimal medium)中的甲醇代謝缺陷較嚴重，但此現象可能與 *Prm1* 在細胞中的位置無關，*Prm1* 會持續存在於細胞核中，並不會因為環境中的碳、氮不同而改變[22]。並由於 *P. pastoris* 轉錄因子的研究大多是在基礎培養基中進行，氮源對 *Prm1* 功能的影響至今仍不太清楚。

在基礎培養基中，*Prm1* 的表現量會受到甲醇的誘導，但活化倍率並不明顯。因此，*Prm1* 調控 *AOX1* 啟動子可能是在碳源不同時，對啟動子有不同親和力而造成。在 *AOX1* 啟動子上有 2 個 *Prm1* 結合位，兩個位置與 *Prm1* 的結合力會在甲醇為碳源時顯著上升，但確切的機制仍不清楚。除了調控甲醇代謝相關基因外，*Prm1* 也會結合自身啟動子，產生的正回饋控制(positive auto-regulation)對於 *Prm1* 的表現十分重要[23]。

### 3. MIT1

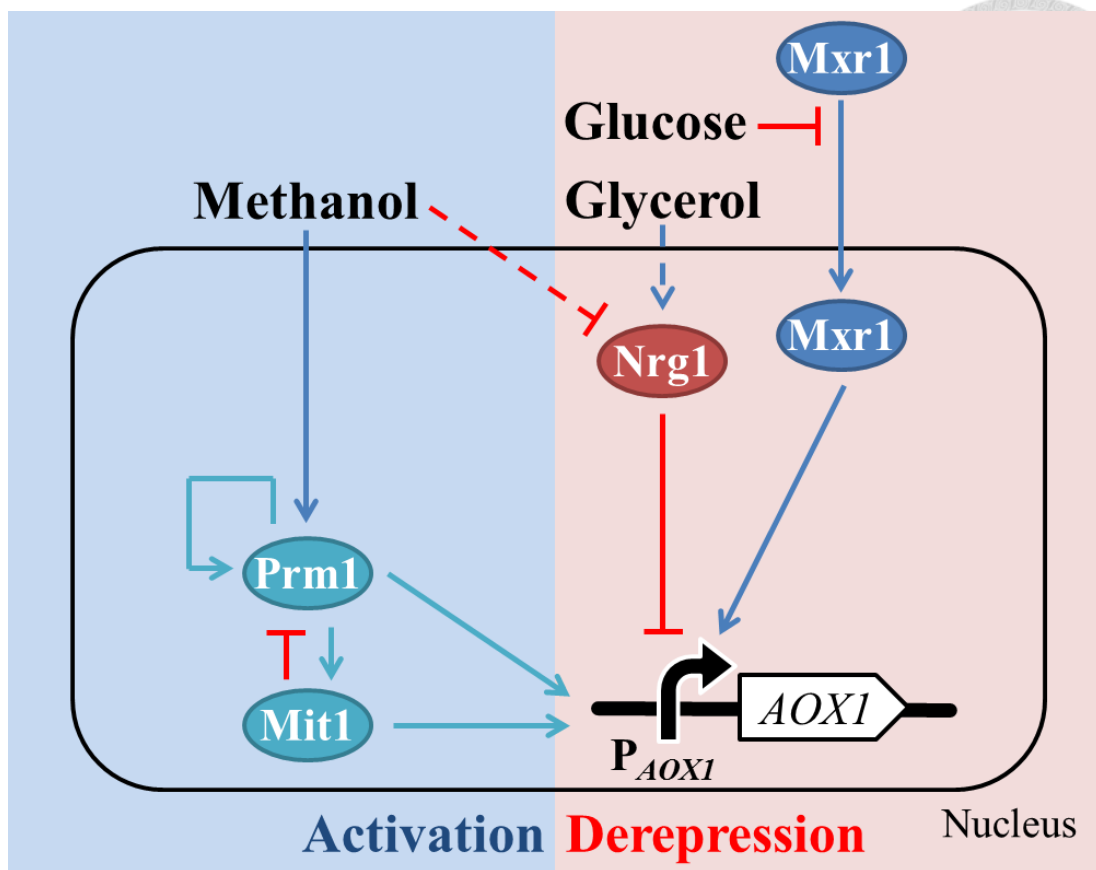
2016年，*MIT1* (PAS\_chr3\_0836)被證明參與 *P. pastoris* 甲醇調控，在 *H. polymorpha* 中存在同源基因 *MPP1*，不過兩者的相似度並不高。*Mit1* 為 Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 類型之轉錄因子，由 888 個胺基酸組成，分子量約為 98 kDa，比 *Mpp1* 多出幾段冗餘的序列，若是剔除這些序列，可使 *P. pastoris AOX1* 啟動子不受甘油抑制，顯示 *Mit1* 與 *Mpp1* 可能有不同的轉譯後調控機制，進而導致 *H. polymorpha* 與 *P. pastoris* 碳源適應的差異[23]。

*MIT1* 與 *PRM1* 有許多相似點，同樣主要參與在甲醇調控。*MIT1* 突變會影響甲醇代謝基因的表現，但不直接影響過氧化體的增殖。*Mit1* 在細胞內位置並不會因碳源而改變，但對 *AOX1* 啟動子上 3 個位置的結合則是在甲醇時最高。然而，*Mit1* 與 *Prm1* 的表現量並不太一樣，在基礎培養基中，*Mit1* 的表現量會受到甲醇強烈的誘導，活化倍率可達 700 倍。對 *AOX1* 啟動子的重要性也不盡相同，缺乏 *Mit1* 的影響比 *Prm1* 明顯，剔除 *AOX1* 啟動子上 *Mit1* 結合位的影響也相對嚴重。此外，過量表現 *Mit1* 可以回補缺乏 *Prm1* 所造成的問題，反之無法，這些現象顯示 *Mit1* 與 *Prm1* 功能的關聯性與層級性[23]。

進一步發現，*Mit1* 與 *Prm1* 會相互調控。*Prm1* 可透過結合 *MIT1* 啟動子，促進 *Mit1* 的生成。但 *Mit1* 卻會抑制 *Prm1* 的表現，不過由於尚未發現 *Mit1* 與 *PRM1* 啟動子結合位，仍無法確定詳細的因果關係。最後，雖已清楚 *Mxr1*、*Prm1*、*Mit1* 在甲醇調控中扮演重要的角色，但由於這 3 個轉錄因子並不具直接的交互作用[23]，且甲醇感應路徑(methanol sensing pathway)也不清楚，因此 *P. pastoris* 如何藉由這三個轉錄因子傳遞甲醇存在的訊號還需要更多的研究。

#### 4. *NRG1*

Mxr1 在甘油為碳源時會進入細胞核中，但 *AOX1* 啟動子仍受到抑制，顯示還有其他機制參與在甘油抑制中。2015 年，*NRG1* (PAS\_chr3\_1242) 被證明在甘油抑制扮演重要的角色，*NRG1* 突變株可在甘油為碳源時，表現甲醇代謝相關的基因。*Nrg1* 由 209 個胺基酸組成，分子量為 23 kDa。不同於 Mxr1，*Nrg1* 會持續在細胞核中，不會因為碳源而改變[25]。*Nrg1* 的表現量會受碳源調控，甘油轉換至甲醇會使表現量下降為原本的 1/3[26]。在 *AOX1* 啟動子上有 5 個 *Nrg1* 的結合位，其中 2 個與 Mxr1 結合位重疊，雖然並不清楚兩個轉錄因子對結合位的親和力，但此現象指出 *Nrg1* 可與 Mxr1 競爭結合位，導致 *AOX1* 啟動子受甘油抑制，但當環境中的碳源轉換成甲醇時，表現量下降的 *Nrg1* 可使此抑制現象消失[25]。



圖一、*AOX1* 啟動子的轉錄調控示意圖

*AOX1* 啟動子的啟動大致上可分為去抑制化與甲醇誘導活化，有 3 個活化子 Mxr1、Mit1、Prm1 與 1 個抑制子 Nrg1 參與在這兩個階段。

Figure 1. The schematic diagram of transcription regulation of *AOX1* promoter. The activation of  $P_{AOX1}$  was separated into two stages, including derepression and activation. Transcription factors involved in  $P_{AOX1}$  regulation were found, including Mxr1, Prm1, and Mit1 as activators, as well as a repressor, Nrg1.



#### 四、甲醇誘導系統面臨的困境與解決辦法

在過去 *P. pastoris* 的醱酵策略主要是先以葡萄糖、甘油培養菌體至高細胞密度，再轉換碳源為甲醇誘導目標蛋白質生產。雖然此方法搭配 *AOX1* 啟動子有著表現量高、嚴謹調控的優勢，然而過度嚴謹的調控與其誘導物甲醇同時也會造成很多的問題。

##### 1. 甲醇的負面影響

甲醇是一種有毒且易燃的物質，因此在工業化生產需要注意安全，避免甲醇的滲漏、殘留甚至是造成火災。對酵母菌而言，除了甲醇本身的毒性外，其代謝產物一甲醛與過氧化氫同樣會對細胞造成傷害[27]。因此在甲醇誘導階段，細胞會因過多的毒性物質而死亡，菌體破裂進一步導致胞內蛋白酶釋出，使目標蛋白質降解[28]。此外，代謝甲醇是一個耗氧、產熱的反應，因此在工業化生產階段，過高的氧氣需求、維持溫度額外的能量花費，都會增加 *P. pastoris* 生產異源蛋白質的難度與成本[29]。

在過去的研究中，試圖透過幾種方式解決代謝甲醇而產生的問題。首先是透過改變 *P. pastoris* 的甲醇利用率，進而降低對甲醇的需求。藉由修改 *P. pastoris* 的 *AOX* 基因，以建構不同甲醇利用率的菌株：野生型的 *P. pastoris* 擁有兩種 *AOX* 基因，為甲醇利用率快的  $Mut^+$  (methanol utilization plus)；或是透過去除 *AOX1*、保留表現量較低的 *AOX2*，建構出甲醇利用率較慢的  $Mut^S$  (methanol utilization slow) 菌株；而  $Mut^-$  (methanol utilization minus) 菌株則是同時去除兩個 *AOX* 基因，而無法以甲醇為單一碳源[5]。儘管  $Mut^+$  菌株甲醇利用率較好，理論上異源蛋白質的產量比較高[30]，但過高的甲醇需求不利於工業化生產，因此  $Mut^S$  菌株的低甲醇利用率反而可降低甲醇代謝的負面影響[29]。

除了菌株的改良，醱酵策略的改進也是過去研究著重的方向，發展出以溶氧值(dissolve oxygen, DO)的增減作為甲醇添加的指標[31]，或是以甲醇監控儀直接


偵測甲醇濃度，藉此維持甲醇在適當的添加速率[32]。然而當培養體積上升時，混勻所需時間增加，會使各種偵測器的反應速度變慢，因此過於複雜的饋料策略並不一定適用於工業化的生產。也有許多研究提出混和添加甲醇與其他碳源的饋料策略，透過適量添加其他碳源，包含抑制性較弱的甘油或是不具抑制性的山梨糖醇，補足降低甲醇添加而缺少的碳源，藉此雖可減輕代謝甲醇的負面影響，但也導致 *AOX* 啟動子轉錄活性下降，或是使成本提升[16, 33, 34]。

## 2. 過度嚴謹的 *AOXI* 啟動子

醱酵策略的改進與 *Mut<sup>S</sup>* 菌株的改良除了遇到上述問題外，過於嚴謹 *AOXI* 啟動子是一個關鍵。混合碳源饋料的瓶頸便是 *AOXI* 啟動子太過於限制，必須要以甲醇為唯一碳源才可有效的生產。甚至在以葡萄糖、甘油培養菌體後，些微抑制性碳源殘留於培養基，都會影響甲醇誘導效果[5]。除了降低異源蛋白質的產量，還可能導致菌體需要更長的時間以表現甲醇代謝基因，因此若是在碳源轉換的階段快速添甲醇，會導致菌體在完全適應甲醇之前，就因甲醇濃度累積過高而死亡，此問題在甲醇代謝速率較慢的 *Mut<sup>S</sup>* 菌株更需嚴謹的處理[35]。抑制性碳源殘留的問題雖然可透過置換培養基解決[36]，但僅限於實驗室的規模，在工業化生產階段，並沒有辦法有效地置換反應槽中的培養基。

隨著合成生物學的發展、甲醇調控機制的發現，陸續開始有研究試圖調整 *AOXI* 啟動子的嚴謹性，透過去除葡萄糖運輸蛋白質 *Hxt1* 或是葡萄糖感應蛋白 *Gss1*，使 *P. pastoris* 無法偵測到環境中的葡萄糖，使 *AOX* 啟動子可以在有葡萄糖的情況下活化[37, 38]。同樣地，透過去除甘油激酶 *Gut1* 或是二羥丙酮激酶 *Dak* 也可以消除對應碳源的抑制性，顯示磷酸化的碳源代謝形式對於碳源的偵測十分重要[39]。雖然這些方法可以初步調整 *AOXI* 啟動子的調控性，但是活化效果仍不如甲醇誘導。此外，缺乏這些基因也會影響碳源的代謝，而導致菌體生長缺陷。

除了調整碳源偵測路徑外，直接改變 *AOXI* 啟動子相關轉錄因子也可以達到



類似的效果。2017 年，Wang 等人透過去除轉錄抑制子 Mig1、Mig2 以及 Nrg1，並同時過量表現 Mit1，使 *P. pastoris* 可以在甘油為碳源時啟動 *AOX1* 啟動子，其活化效果可以達到甲醇誘導的 70%，雖然此方法會降低碳源調控的嚴謹性，不過仍可以透過高濃度的葡萄糖關閉 *AOX1* 啟動子。此團隊進一步根據改造菌株的特性，設計出以葡萄糖—甘油二階段培養策略生產重組蛋白質，產量可以達到野生型菌株以傳統甘油—甲醇培養的 50%，同時由於不需要使用甲醇，可以有效的降低耗氧、產熱的問題[8]。雖然在 Wang 等人的研究中並沒有詳細的探討改造菌株的生長速度，但在過去與轉錄因子的相關研究中，去除 *AOX1* 啟動子的轉錄抑制子，會降低 *P. pastoris* 在甘油、葡萄糖中的生長速度，顯示此策略還有提升的空間[25]。



## 五、研究動機

*Pichia pastoris* 為嗜甲醇酵母菌的一種，是極具潛力的異源蛋白質表達系統，兼具微生物與真核系統的優勢。搭配甘油培養—甲醇誘導策略，可嚴謹調控 *P. pastoris* 的 *AOX1* 啟動子，並大量生產重組蛋白質。然而，調控過度嚴謹的 *AOX1* 啟動子，使 *P. pastoris* 只能侷限在特定的培養條件，必需以有毒、易燃的甲醇作為唯一碳源時，才可有效率誘導 *AOX1* 啟動子。隨著合成生物學的發展，研究人員不需侷限在 *P. pastoris* 原有的特性，透過破壞 *P. pastoris* 偵測、代謝抑制性碳源的機制，可去除碳源對 *AOX1* 啟動子的抑制性。藉由去除轉錄抑制子與過量表現轉錄活化子，也可以改變 *AOX1* 啟動子的特性。雖然這些的方法可讓 *P. pastoris* 以更彈性的條件生產異源蛋白質，但全面性的改變 *P. pastoris* 的碳源調控機制，可能使 *AOX1* 啟動子完全喪失其原本的優勢，甚至造成 *P. pastoris* 的生長缺陷。綜合以上問題，顯示 *P. pastoris* 還有進一步提升的空間。

### 1. 目的

本研究希望藉由不同的方式改變 *P. pastoris* 的碳源調控機制，不採取剔除或持續過量表現基因的策略，而是透過特殊的基因迴路，幫助 *P. pastoris* 在抑制狀態與誘導狀態之間的轉換。讓 *P. pastoris* 在抑制狀態時，可以保有原本的可調控性，並避免造成生長的缺陷；而在誘導狀態時，降低抑制性碳源對 *AOX1* 啟動子的干擾，甚至是進一步加強 *AOX1* 啟動子的表現量。

### 2. 轉錄調控策略

轉錄因子 Mxr1 為本研究主要切入點，相較於其他轉錄活化子，Mxr1 主要參與在 *AOX1* 啟動子的去抑制化，是相對上游的調控者。在不同嗜甲醇酵母菌中，碳源對 Mxr1 的影響也不盡相同，此差異或許是菌種間碳源適應不同的原因之一 [40]。因此透過調整 Mxr1 的表現量，應有助於改善 *AOX1* 啟動子調控過於嚴謹



的問題。此外，增加轉錄活化子 Mxr1 的表現量，同時可解決提升外源基因拷貝數所造成的 Mxr1 稀釋效應，以增加 *AOX1* 啟動子的轉錄活性。額外的 Mxr1 不會以持續性表現的 *GAP* 啟動子或是甲醇誘導的 *AOX1* 啟動子，以保有 *P. pastoris* 受碳源調控的特性，並避免過多的 Mxr1 累積而使 *P. pastoris* 死亡。透過表現量較弱的 *AOX2* 啟動子生產 Mxr1，建立 Mxr1 的自我正回饋控制迴路(positive auto-regulation circuit)，Mxr1 的表現量必須當抑制性碳源降低至一定程度或是環境中有甲醇時，才會藉由正回饋迴路逐漸上升，進而降低 *AOX1* 啟動子的嚴謹性，並提升 *AOX1* 啟動子的轉錄活性，如圖二。

### 3. 目標

為了驗證此策略的可行性，以內生型或外泌型綠色螢光蛋白質作為 *P. pastoris* 生產的目標蛋白質，並加以編輯轉錄因子的表現量。本研究之架構圖如圖三，具體預達成事項為：

- (1) 建構綠色螢光蛋白質生產菌株
- (2) 建構轉錄再程序化之載體
- (3) 以不同培養程序檢驗此策略的成效

- (a) *AOX* 啟動子的轉錄活性

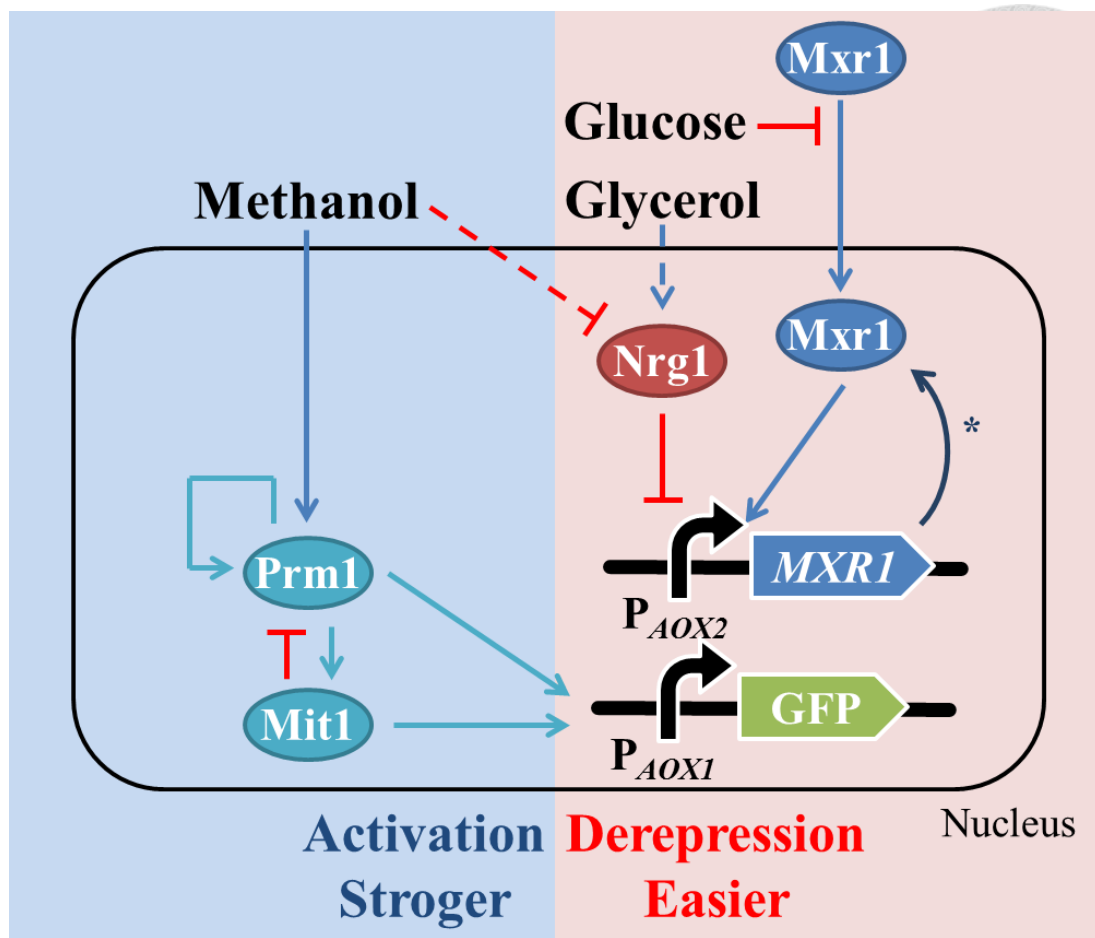
分析綠色螢光強度與異源基因 mRNA 表現量

- (b) *AOX* 啟動子的可調控性

不同濃度、種類的碳源或不同誘導策略對 *AOX* 啟動子的影響

- (c) 對 *P. pastoris* 原生性基因的影響

分析培養過程的濁度、Aox 酵素活性與各轉錄因子的 mRNA 表現量

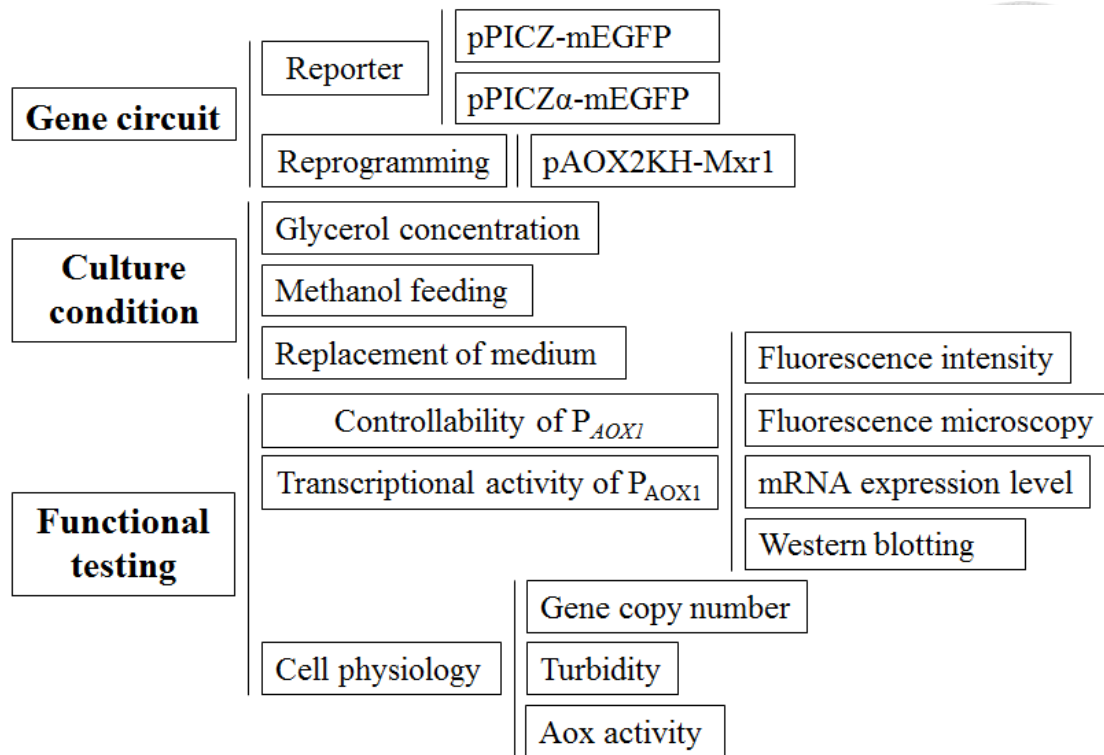


圖二、Mxr1 再程序化菌株轉錄調控示意圖

以 *AOX2* 啟動子建立外源性 Mxr1 之自我正回饋調控，如星號所示。

Figure 2. The schematic diagram of transcription regulation in the cell with reprogramming of Mxr1

Asterisk representst the positive auto-regulation of extra Mxr1 regulated by  $P_{AOX2}$



圖三、本論文之研究架構圖

Figure 3. The schematic structure of this study

## 第二章 材料與方法



### 一、實驗菌株與培養條件

#### 1. 細菌

本研究用於建構及保存質體之宿主細胞為大腸桿菌 *Escherichia coli* EPI300 (Epicentre Technologies Corp, USA)。以 Luria-Bertani 液態培養基於 37°C、轉速 250 rpm 震盪培養，或另添加 1.5% 洋菜膠固態培養於 37°C。

#### 2. 真菌

本研究使用的重組蛋白質表達菌株為嗜甲醇酵母菌 *Pichia pastoris* KM71H (*Mut<sup>S</sup>, aox1::ARG4, arg4*)，購買自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)。以 YPD 液態培養於 30°C、轉速 250 rpm 震盪培養，或另添加 1.5% 洋菜膠固態培養於 30°C。



## 二、培養基

**Luria-Bertani broth (LB)**：2.5 g LB (Acumedia)溶於 100 mL 蒸餾水，121 °C、20 分鐘高溫高壓滅菌後備用。

**Luria-Bertani agar plate (LA)**：配置 LB 時，另加入 1.5% Bacto agar (Acumedia)，滅菌後降溫至 50 °C 時倒於 9 cm petri dish，待凝固後保存於 4 °C。

**Low salt LB broth (LSLB)**：2 g Lennox L Broth (Alpha Bioscience)溶於 100 mL 蒸餾水，121 °C、20 分鐘高溫高壓滅菌後備用。

**Low salt LB agar plate (LSLA)**：配置 LSLB 時，另加入 1.5% Bacto agar (Acumedia)，滅菌後降溫至 50 °C 時倒於 9 cm petri dish，待凝固後保存於 4 °C。

**10x dextrose (20%, w/v)**：20 g 葡萄糖(dextrose, D-Glucose Anhydrous, Biotech)溶於 100 mL 蒸餾水，121 °C、20 分鐘高溫高壓滅菌後備用。

**YPD broth**：10 g YE (yeast extract, Bio Basic)及 20 g peptone-A (from meat (Bio Basic))溶於 900 mL 蒸餾水，滅菌冷卻後加入 100 mL 10x dextrose。

**YPD agar plate**：配置 YPD 時，另加入 1.5% Bacto agar (Acumedia)，滅菌後降溫至 50 °C 時倒於 9 cm petri dish，待凝固後保存於 4 °C。

**Zeocin stock solution (100 mg/mL (Invitrogen, R250-01))**：避光保存於-20 °C

**G418 stock solution (250 mg/mL)**：2.5 g G418 sulfate 溶於 10 mL 蒸餾水，以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾滅菌後保存於 4 °C。

**Kanamycin stock solution (50 mg/mL)**：500 mg Kanamycin sulfate (USP)溶於 10 mL 蒸餾水，以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾滅菌後保存於 4 °C。

**Ampicillin stock solution (100 mg/mL)**：1 g Ampicillin (Sigma)溶於 10 mL 蒸餾水，以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾滅菌後保存於 4 °C。

**10x 甘油 (10, 20, 40%, w/v)**：10、20 或 40 g 甘油 (Glycerol Anhydrous, J.T.Baker)以蒸餾水配置成 100 mL 溶液，121 °C、20 分鐘高溫高壓滅菌後備用。

**10x 磷酸鉀緩衝液 (Potassium phosphate buffer, 1M, pH 6.0)**：11.81 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

(Amresco)及 2.30 g  $K_2HPO_4$  以蒸餾水配置成 100 mL 溶液，調整 pH=6.0±0.1，121 °C、20 分鐘高溫高壓滅菌後備用。

**500x biotin stock solution (0.02%, w/v)**：20 mg D-biotin (Sigma)溶於 100 mL 蒸餾水，以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾滅菌後保存於 4°C。

**甲醇 (100%, v/v)**：甲醇( $CH_3OH$ , J.T. Baker)以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾滅菌後保存於 4°C。

**10x YNB (13.4%, w/v)**：3.4 g yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate (YNB, Bio Basic)及 10 g  $(NH_4)_2SO_4$ (Amresco)溶於 100 mL 蒸餾水，以 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾滅菌，4°C 避光保存。

**BMDY 培養基**：10 g YE (yeast extract, Biotech)及 20 g peptone-A (from meat (Biotech))溶於 700 mL 蒸餾水，滅菌後加入 100 mL 10x YNB、100 mL 10x 磷酸鉀緩衝液、2 mL 500x biotin、100 mL 10x dextrose。

**BMGY 培養基**：10 g YE (yeast extract, Biotech)及 20 g peptone-A (from meat (Biotech))溶於 700 mL 蒸餾水，滅菌後加入 100 mL 10x YNB、100 mL 10x 磷酸鉀緩衝液、2 mL 500x biotin、100 mL 10x 對應濃度之甘油。

**BMNY 培養基**：10 g YE (yeast extract, Bio Basic)及 20 g peptone-A (from meat (Bio Basic))溶於 800 mL 蒸餾水，滅菌後加入 100 mL 10x YNB、100 mL 10x 磷酸鉀緩衝液、2 mL 500x biotin。

**BMMY 培養基**：使用前於 BMNY 培養基添加 100% 甲醇至適當甲醇濃度。

**BMGMY 培養基**：使用前於 BMGY 培養基添加 100% 甲醇至適當甲醇濃度。

**FBS 醱酵槽培養基**：0.93 g  $CaSO_4$ 、18.2 g  $K_2SO_4$ 、14.9 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、4.13 g KOH、40 mL 甘油、26.7 mL 磷酸(85%)加水定量至 1 L。

**PTM1 (Pichia trace metal 1)**：6 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、0.08 g NaI、3 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.2 g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、0.02 g  $H_3BO_3$ 、0.5 g  $CoCl_2$ 、20 g  $ZnCl_2$ 、65 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.2 g biotin、5 mL  $H_2SO_4$  加水定量至 1 L。



### 三、表現載體建構

本研究所使用的表現載體 pPICZA、pPICZ $\alpha$ A、pPIC3.5K，購買自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)，為嗜甲醇酵母菌 *P. pastoris* 常使用的載體，載體具有酒精氧化酶啟動子 (Alcohol oxidase promoter, AOX)，能藉由甲醇誘導後，驅動下游異源基因表現。pPICZA、pPICZ $\alpha$ A 之篩選標誌為 Zeocin。pPIC3.5K 帶有 HIS4 基因可以回補 histidine 缺陷株，並具有篩選標誌 G418 (Geneticin) 或 Kanamycin。使用之引子序列可參考表一，合成委託明欣 (Mission Biotech) 或基隆米克斯 (Genomics)。將建構完成之載體轉形進大腸桿菌勝任細胞中，菌液塗至含有對應抗生素 (100  $\mu$ g/mL Ampicillin、100  $\mu$ g/mL Zeocin、50  $\mu$ g/mL Kanamycin) 的篩選培養基；待轉形株長出後，進行單一菌落聚合酶鏈鎖反應挑選轉形株，先以牙籤挑取單一菌落點至二次水中，加熱 95 $^{\circ}$ C、10 分鐘破菌後做為模板，以專一性引子進行聚合酶鏈鎖反應，並以電泳確認轉形株是否帶有目標片段，將含有正確片段之菌落抽取質體，送定序以確認序列正確 (Genomic)，建構過程使用之分生試劑套組可參考表二。

#### 1. pPICZ-mEGFP

利用引子 F-*PmlI*-mEGFP、R-mEGFP-stop-*SalI* 於前人質體中擴增出 mEGFP 片段，以限制酶 *PmlI* 與 *SalI* 接入以相同限制酶處理之線狀載體 pPICZA，完成 pPICZ-mEGFP，如圖四(a)，以 5'AOX1 定序確認，進行 *P. pastoris* 轉形時，以 *SacI* 切成線狀。

## 2. pPICZ $\alpha$ -mEGFP

利用引子 F-*EcoRI*-mEGFP、R-mEGFP-stop-*SacI* 於前人質體中擴增出 mEGFP 片段，以限制酶 *EcoRI* 與 *SacI* 接入以相同限制酶處理之線狀載體 pPICZ $\alpha$ A，完成 pPICZ $\alpha$ -mEGFP，如圖四(b)，以 5'AOX1 定序確認，進行 *P. pastoris* 轉形時，以 *SacI* 切成線狀。

## 3. pPIC3.5KH

利用引子 F-*AvrII*-6xHis、R-partialHIS4-*XbaI* 於質體 pPIC3.5K 中擴增出 5'端帶有 6x His tag 的 AOX1 終止子(terminator)，以限制酶 *AvrII* 與 *XbaI* 接入以相同限制酶處理之線狀載體 pPIC3.5K，完成 pPIC3.5KH，如圖四(c)，以 5'AOX1 定序確認。

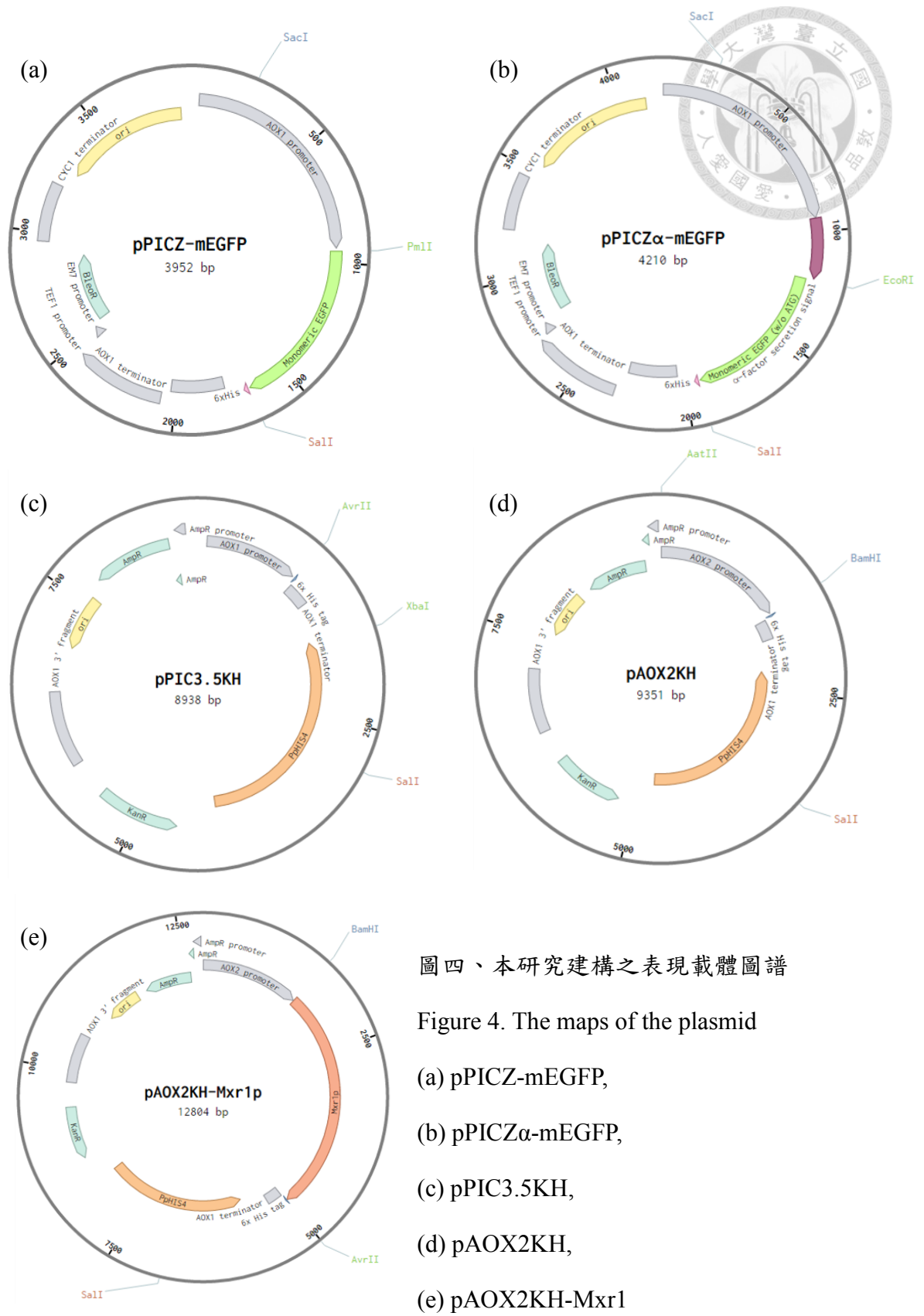
## 4. pAOX2KH

利用引子 F-*AatII*-AOX2、R-AOX2-*BamHI* 於質體 *P. pastrois* 的染色體 DNA 中擴增出 AOX2 啟動子，由於引子對起始 Tm 值較低，採用 Touch up PCR 技術，先以 annealing 溫度 47°C 反應 11 個周期後，再以 58°C 反應 20 個周期。擴增完的片段以 taq polymerase 於末端加 A，接入 yT&A vector，以 M13F、M13R 定序確認。接著以限制酶 *AatII* 與 *BamHI* 處理，並接入以相同限制酶處理之線狀載體 pPIC3.5KH，完成 pAOX2KH，如圖四(d) 進行 *P. pastoris* 轉形時，以 *SacI* 切成線狀。



## 5. pAOX2KH-Mxr1

由於 Mxr1 序列上帶有一個 *SalI* 切位，會影響後續 *P. pastoris* 的轉形，因此以 Overlap PCR 技術，在不影響氨基酸序列的情況下，將 *SalI* 切位去除。利用引子對 F-*Bam*HI-Mxr1、R-*SalI*mutant-Mxr1 與引子對 F-*SalI*mutant-Mxr1、R-MXR1P-*Avr*II，分別擴增出 Mxr1 5'端與 3'端序列，將 PCR 產物純化，並稀釋到適當濃度。混合兩種 PCR 產物做為模板，搭配引子 F-*Bam*HI-Mxr1、R-MXR1P-*Avr*II 擴增出完整 Mxr1 片段，以限制酶 *Bam*HI 與 *Avr*II 接入以相同限制酶處理之線狀載體 pAOX2KH，完成 pAOX2KH-Mxr1，如圖四(e)，以 5'AOX2、3'AOX1、F-*SalI*mutant-Mxr1、R-*SalI*mutant-Mxr1、Mxr1p-interal 定序確認，進行 *P. pastoris* 轉形時，以 *SalI* 切成線狀。



圖四、本研究建構之表現載體圖譜

Figure 4. The maps of the plasmid

(a) pPICZ-mEGFP,

(b) pPICZ $\alpha$ -mEGFP,

(c) pPIC3.5KH,

(d) pAOX2KH,

(e) pAOX2KH-Mxr1

表一、建構表現載體與定序之引子序列



Table 1. The primer used for plasmids construction and sequencing

名稱	序列(5'端到 3'端)
用於建構表現載體的引子	
F- <i>Pml</i> I-mEGFP	CACGTGATGGTGAGCAAGGGC
F- <i>Eco</i> RI-mEGFP	CTAGAATTCGTGAGCAAGGGCG
R-mEGFP-stop- <i>Sal</i> I	ACCGTCGACTTACTTGTACAGCTCG
F- <i>Avr</i> II-6xHis	CCCTAGGCATCATCATCATCATTGATCAA GAGGATGTC
R-partialHIS4- <i>Xba</i> I	CATCTAGATGCTCACCGCAATGCTG
F- <i>Aat</i> II-AOX2	GCGGACGTCTTTTTTTCAGACC
R-AOX2- <i>Bam</i> HI	GCGGGATCCTTTTTTCTCAGTTG
F- <i>Bam</i> HI-mEGFP	GTGGGATCCATGGTGAGCAAGG
R-mEGFP- <i>Avr</i> II	TGGCCTAGGCTTGTACAGCTCG
F- <i>Bam</i> HI-Mxr1	GCGGGATCCATGAGCAATCTACC
R- <i>Sal</i> I mutant-Mxr1	CCCAGTTCTTAGTGGACTCATTCTCATC
F- <i>Sal</i> I mutant-Mxr1	GATGAGAATGAGTCCACTAAGAACTGGG
R-MXR1P- <i>Avr</i> II	GCGCCTAGGGACACCACCATCTA
用於定序的引子	
M13F	CAGTATCGACAAAGGACACACT
M13R	GTTTTCCAGTCACGAC
5' AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC
5' AOX2	GACTACATTGATCTTTTTTAACGAAG

---

Mxr1p-internal

GGTGTGCCCACTCCA ACTCTTC

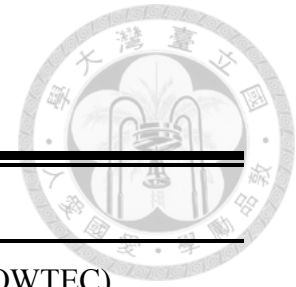
---



表二、本研究使用之分生試劑套組

Table 2. The cloning reagents or kits used in this study

實驗	分生試劑套組
質體抽取	HiYield™ Plasmid Kit <sup>Mini</sup> (ARROWTEC)
DNA 聚合酶鏈鎖反(PCR)	Taq DNA polymerase (ARROWTEC)
	Pfu DNA polymerase (ARROWTEC)
	Pushion DNA polymerase (New England Biolabs)
	Q5 DNA polymerase (New England Biolabs)
PCR 產物純化	HiYield™ Gel/PCR Fragment Extraction Kit (ARROWTEC)
酵素結切與接合	<i>AatII</i> (New England Biolabs)
	<i>AvrII</i> (New England Biolabs)
	<i>BamHI</i> -HF (New England Biolabs)
	<i>BstBI</i> (New England Biolabs)
	<i>EcoRI</i> -HF (New England Biolabs)
	<i>PmlI</i> (New England Biolabs)
	<i>SacI</i> -HF (New England Biolabs)
	<i>SalI</i> -HF (New England Biolabs)
	<i>StuI</i> (New England Biolabs)
YEA T4 DNA ligase (Yeastern biotech)	





#### 四、嗜甲醇酵母菌電穿孔轉形

##### 1. *P. pastoris* 勝任細胞製備

將單一菌落之 *P. pastoris* 以 3 mL YPD，於 30 °C、轉速 250 rpm 活化 20 小時，此時 OD<sub>600</sub> 約 15；取 1 mL 菌液加至 100 mL YPD 中使 OD<sub>600</sub> 介於 0.1~0.2 之間，於 30 °C、轉速 250 rpm 活化 7 小時，此時 OD<sub>600</sub> 約 2；以 3000 g、4 °C 離心 5 分鐘，倒去上清液後加入 50 mL Pre-treat buffer (100 mM LiOAC, 10mM DTT, 0.6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH7.5) 於 30 °C 靜置 30 分鐘。以 1500 g、4 °C 離心 10 分鐘後，以 2 mL 1 M sorbitol 清洗三次，最後以 500 μL 1 M sorbitol 回溶菌體，每管分裝 80μL 後放置冰上備用。

##### 2. 電穿孔轉形

將表現載體以對應限制酶切成線狀後，純化並測量其濃度，取總共 1 μg 線狀質體並與 *P. pastoris* 勝任細胞加至 0.2 mm Gap cuvette (No.620 BTX, San Diego, USA) 中，冰浴 10 分鐘，以 Electro Cell Manipulator ECM630 Electroporation System (BTX, San Diego, CA, USA) 進行電穿孔轉形，條件為 1.5 kV、25 μF、200 Ω，電穿孔完畢以 1 mL 1M sorbitol 稀釋菌體，並於 30 °C 下靜置 60 分鐘，接著根據不同的質體有對應不同的步驟：

###### (1) pPICZ-mEGFP 與 pPICZα-mEGFP

取 250 μL 菌液塗至 YPDSZ 篩選培養基上(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Dextrose, 1 M Sorbitol, 1.5% Agar, 100 μg/mL Zeocin)，於 30 °C 靜置培養 2~3 天。

###### (2) pAOX2KH、pAOX2KH-Mxr1

取 250 μL 菌液塗至 RDB(Z)上(1.34% YNB, 4 x 10<sup>-5</sup>% Biotin, 2% Dextrose, 2%

Agar, 1 M Sorbitol), Zeocin 添加與否根據 *P. pastoris* 勝任細胞是否有帶有 Zeocin 抗性基因。於 30°C 靜置培養 1~2 天。





## 五、嗜甲醇酵母菌染色體 DNA 分析

### 1. 轉形株染色體簡易分析

以牙籤挑取合適大小轉形株之單一菌落，點至 breaking buffer (Epicentre Technologies Corp, USA) 中，以 65°C、30 分鐘，95°C、10 分鐘破菌後做為模板，以專一性引子進行聚合酶鏈鎖反應，並以電泳確認轉形株是否帶有目標基因。

### 2. 轉形株目標基因拷貝數測定

酵母菌以 3 mL YPD、30°C、轉速 250 rpm 培養 20 小時，抽取其染色體 DNA (NautiaZ Bacteria/Fungi DNA Extraction Mini Kit, Nautia Gene)，並測定濃度。

以即時定量聚合酶鏈鎖反應(real-time PCR)測定目標基因之拷貝數，此技術是透過螢光染劑反應出每個 PCR 循環後生成產物之總量，並當某一循環中螢光強度達到閾值時，此時的循環數便稱為 Ct (threshold cycle)，Ct 值的高低會與起始模板濃度成反比，測定出各樣品之 Ct 值後，進一步可以透過絕對定量法、相對定量法，相對—絕對定量法測定未知樣品的濃度。

本研究使用相對—絕對定量法，每次實驗會以目標基因與參考基因都為一個拷貝數的對照組菌株，作出兩基因不同濃度對 Ct 值的標準曲線，再以此分別計算出實驗組菌株的目標基因與參考基因的濃度，兩者的比值即為目標基因的拷貝數。計算公式如下：

$$\text{Copy number}_{\text{Target gene}} = \frac{\text{Copy quantity}_{\text{Target gene}}}{\text{Copy quantity}_{\text{Reference gene}}}$$



使用參考基因為 *P. pasotris* 的 1 拷貝基因 *MET2*[41, 42]，測定的目標基因為 AOX1 啟動子、AOX2 啟動子與 *MXR1*，對應的引子如表三。測得之目標基因拷貝數減去內生性的 1 拷貝後，即為外源基因之拷貝數。

PCR 反應配方為 5  $\mu$ L genomic DNA、各 1  $\mu$ L 順反引子 (4  $\mu$ M)，10  $\mu$ L 2xIQ<sup>2</sup> SYBR Green FAST qPCR System Master Mix-HIGH ROX，補水至 20  $\mu$ L。採用 ABI 即時定量儀器進行螢光量的測定，PCR 擴增條件為 95°C, 3 min 進行 1 循環，95°C, 5 sec，65°C, 30 sec 共進行 40 循環。



## 六、轉形株培養與分析

### 1. 試管誘導

將帶有目標基因之轉形株單一菌落接至 3 mL YPD 中，於 30°C、轉速 250 rpm 活化 16 小時，以 3000 g 離心 10 分鐘，用無菌水懸浮菌體並測定 OD<sub>600</sub>，取  $1.5 \times 10^8$  菌體數量(1 OD<sub>600</sub> =  $5 \times 10^7$  CFU/mL)，3000 g 離心 10 分鐘，以不同碳源 X 之 3 mL BMXY 回溶菌體至 OD<sub>600</sub> 等於 1，於 30°C、轉速 250 rpm 培養 10 小時後取樣分析。

### 2. 搖瓶誘導

將帶有目標基因之轉形株單一菌落接至 3 mL YPD 中，於 30 °C、轉速 250 rpm 活化 20 小時，此時 OD<sub>600</sub> 約 15，取適量菌液加至 100 mL BMGY 中使 OD<sub>600</sub> 等於 0.15，於 30 °C、轉速 250 rpm 培養 24 小時，以 3000 g 離心 10 分鐘，將 BMGY 去除，重新以 20 mL 不同碳源之 BMXY 懸浮菌體。每 24 小時加入甲醇至正確的終濃度，每日取樣測定濁度、螢光強度(SpectraMax M2e Microplate Reader, Molecular device)，各轉形株的標準化螢光強度為扣除野生型的背景螢光度後，除以各轉形株的濁度。同時樣品以 3000 g 離心 10 分鐘、保留適量菌體於-80 °C，待之後分析胞內蛋白質、mRNA 表現量。

### 3. 醱酵槽誘導

將帶有目標基因之轉形株單一菌落接至 3 mL YPD 中，於 30 °C、轉速 250 rpm 活化 20 小時，此時 OD<sub>600</sub> 約 15，取適量菌液加至 100 mL BMGY 中使 OD<sub>600</sub> 等於 0.15，於 30 °C、轉速 250 rpm 培養 24 小時，使 OD<sub>600</sub> 約為 16~20，作為種菌接種至醱酵槽中。本實驗使用 5 L 醱酵槽(FS-01-A05, Major Science)，槽內含有 4%甘油為碳源的 2 L FBS 培養基，並添加 8.7 mL 的 PTM1，培養溫度為 30

°C，並以 10% 氨水或 2 N 硫酸調整至 pH=5，通氣量為 2 vvm，攪拌速率為 800 rpm。培養階段分為甘油批次培養(Batch)、甘油饋料培養(Fed-batch)與甲醇誘導。階段轉換主要藉由溶氧值(DO)的變化判斷，當碳源用盡時，菌體耗氧速度降低而使溶氧值上升，表示可以轉換至下一個階段。饋料使用的碳源中含有 12 mL/L 的 PTM1。



## 七、mRNA 表現量分析

以 NautiaZ Bacteria/Fungi RNA Mini Kit (Nautia Gene) 抽取菌體之總 mRNA，測定濃度後，稀釋至 125 ng/μL。8 μL (1000 ng) 樣品加入 1 μL DNase (Promega) 與 1 μL 10x Reaction Buffer 於 37°C 反應 30 分鐘，去除樣品中殘留的染色體 DNA，接著加入 1 μL Stop Solution 於 65°C 反應 10 分鐘終止反應。

此樣品進一步以 ARROW-Script Reverse Transcriptase III (ARROWTEC) 反轉錄成 cDNA，11 μL 的樣品加入 0.2 μL Radom Hexamer (1 μg/μL, ARROWTEC) 與 1.8 μL 之 DEPC 水，於 70°C 反應 10 分鐘後置於冰上冷卻，接著加入 4 μL 5x First-Strand Buffer、1 μL dNTP mix (10 mM)、1 μL RNase inhibitor (40 unit/μL)、1 μL ARROW M-MLV Reverse Transcriptase III (200 unit/μL)，於 25°C 反應 5 分鐘後以 50°C 反應 60 分鐘，最後以 70°C 反應 15 分鐘終止反應，並加入 80 μL ddH<sub>2</sub>O 稀釋致理論 cDNA 濃度 10 ng/μL。

以即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR) 測定目標基因 mRNA 表現量，使用相對定量法 ( $\Delta\Delta C$  法)，以 18s rRNA 作為內控制基因 (Internal control)，各樣品的 mRNA 表現量以參考樣品的倍率呈現。PCR 反應配方為 5 μL cDNA、各 1 μL 順反引子 (4 μM)，10 μL 2xIQ<sup>2</sup> SYBR Green FAST qPCR System Master Mix-HIGH ROX，補水至 20 μL。採用 ABI 即時定量儀器進行螢光量的測定，PCR 擴增條件為 95°C, 3 min 進行 1 循環，95°C, 5 sec，65°C, 30 sec 共進行 40 循環。使用到的引子如表三。

表三、即時定量聚合酶鏈鎖反應之引子序列



Table 3. The primer used for real-time PCR

名稱	序列(5'端到 3'端)
MET2-qF	CGTTCTCGCAACTCTTTCGAAGAA
MET2-qR	CAATGGCATCAGTTATGACGGAAG
AOX1p-qF	TTCTCACACATAAGTGCCAAACG
AOX1p-qR	AAAAGTGGGTGTTGAGGAGAAGAG
AOX2p-qF	CACCCAGCCCTCTTCATCAA
AOX2p-qR	TCGCCCTTGGATGGAAAA
18s rRNA-qF	GAGGATTGACAGGATGAGAGC
18s rRNA-qR	CAAGGTCTCGTTCGTTATCGC
mEGFP-qF	GGCACAAGCTGGAGTACAACT
mEGFP-qR	ATGTTGTGGCGGATCTTGAAG
MXR1-qF	CTGATGCTATGAATGCCAAGGA
MXR1-qR	CTGAATCGTTATTACGACCGGAAT
PRM1-qF	TGGCGGCAAGAAGAACGTATA
PRM1-qR	TGGTTGCTGTGCCTTTGCTA
MIT1-qF	GTGGCACGCTGGAAAGCTAAT
MIT1-qR	ATAGGCCAGCCTGTTGCACA
NRG1-qF	CCCAACACAGCCATCAGAAA
NRG1-qR	GTGAATACGTGTGTGACGAGC



## 八、蛋白質分析

### 1. 聚丙烯醯胺膠體電泳分析

將誘導後的蛋白質產物上清液以 4x loading dye 在 99°C 加熱 10 分鐘，菌體則是取  $2.5 \times 10^8$  以 50  $\mu$ L 4x loading dye 懸浮，在 99°C 加熱 30 分鐘，放室溫備用。配置上層 5% SDS 聚丙烯醯胺焦集膠體，和下層 12% SDS 聚丙烯醯胺分離膠體，架設於直立式電泳槽 (Hoefer™ Dual Gel Caster; Amersham Biosciences, USA)，並在內外槽加入適量 Tris-glycine SDS running buffer。將備好的蛋白質，注入上層焦集膠體齒梳槽內，先以通電 70 伏特，使蛋白質在上下層膠體間聚集形成一直線，提高至 120 伏特後，約 90 分鐘即可取出膠片以 Coomassie brilliant blue R-250 染色。上述使用試劑之配方如表四。

### 2. 西方墨點法

將誘導後的蛋白質產物上清液以 4x loading dye 在 99°C 加熱 10 分鐘，菌體則是取  $2.5 \times 10^8$  以 50  $\mu$ L 4x loading dye 懸浮，在 99°C 加熱 30 分鐘，放室溫備用。配置上層 5% SDS 聚丙烯醯胺焦集膠體，和下層 12% SDS 聚丙烯醯胺分離膠體，架設於直立式電泳槽 (Hoefer™ Dual Gel Caster; Amersham Biosciences, USA)，並在內外槽加入適量 Tris-glycine SDS running buffer。將備好的蛋白質，注入上層焦集膠體齒梳槽內，先以通電 70 伏特，使蛋白質在上下層膠體間聚集形成一直線，提高至 120 伏特後，約 90 分鐘即可取出膠片浸泡於 Transfer buffer 中 5 分鐘，即可進行轉印。將 0.45  $\mu$ m PVDF 轉印膜 (PerkinElmer, USA) 浸泡於 100% 甲醇 10 分鐘，同時也將濾紙浸泡於 Transfer buffer。以濕式電泳轉印槽 (Bio-rad) 進行轉印，由負極至正極依序放置海綿、濾紙兩片、電泳膠片、PVDF 轉印膜、濾紙兩片、海綿，於 400 v、150 mA 條件下轉印 2 小時。轉印完成，將 PVDF

轉印膜浸泡於 gelatin-NET 震盪 60 分鐘。再置換為以 gelatin-NET 稀釋 5000 倍之 rabbit anti-His 一次抗體於 4°C 靜置過夜。以 PBST buffer 震盪清洗三次，每次 10 分鐘。再置換為以 gelatin-NET 稀釋 5000 倍之 goat anti-rabbit IgG HRP conjugate 二次抗體於室溫震盪 60 分鐘，加上 WESTERN LIGHTING™ Plus-ECL 基質溶液，並以 UVP 偵測冷光訊號，上述使用試劑之配方如表四。

### 3. AOX 活性分析

取  $5 \times 10^7$  CFU 菌體分析，離心去除上清液後，以 100  $\mu$ L AOX assay reaction mixture 懸浮，於 30°C 反應 30 到 60 分鐘後，比較顏色深淺，紅色越深表示 AOX 活性越強，上述使用試劑之配方如表四。

表四、蛋白質分析所用試劑之組成成分

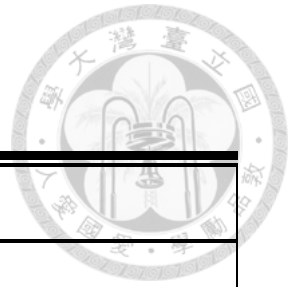


Table 4. The reagents used for protein analysis

試劑名稱	成分
5% SDS 聚丙烯醯胺焦集膠體	5% Acrylamide (29:1) 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.1% SDS (Sodium dodecyl sulfate) 0.1% APS (Ammonium persulfate) 0.1% TEMED (Tetramethylethylenediamine)
12% SDS 聚丙烯醯胺分離膠體	12% Acrylamide (29:1) 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8) 0.1% SDS (Sodium dodecyl sulfate) 0.1% APS (Ammonium persulfate) 0.04% TEMED (Tetramethylethylenediamine)
4x Protein loading dye (pH 6.8)	8% SDS 200 mM Tris-HCl (pH=6.8) 0.4% Bromophenol blue 20% Glycerol 400 mM 2-ME (2-Mercaptoethanol)
Tris-glycine SDS running buffer (pH 8.4)	25 mM Tris 250 mM Glycine 0.01% SDS
Transfer buffer	Tris-glycine SDS running buffer 10% (v/v) methanol
AOX assay reaction mixture	100 mM K-phosphate buffer (pH 7.5) 0.05% chromogen o-dianisidine



	<p>0.25% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)</p> <p>1% (v/v) methanol</p> <p>3 U/ml horseradish peroxidase</p>
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



### 第三章 結果



#### 一、轉形菌建立與分析

##### 1. 胞內型綠色螢光蛋白質生產菌株

將表現載體 pPICZ-mEGFP 以 *SacI* 切成線狀後，以電穿孔轉形送入 *P. pastoris* KM71 勝任細胞，並將菌液塗至 YPDSZ 篩選培養基，待 2~3 天菌落長成後，接著利用不同濃度 zeocin 的 YPDZ 篩選抗性較高的轉形株，如圖五(a)。進一步將可耐受 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zeocin 之轉形株，培養於 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zeocin YPDZ 培養基上與 MD 培養基，挑選出 3 個抗性最強的菌株，並命名為 E1、E2、E3，如圖五(b)，並確定轉形株仍為 Histidine 缺陷株，如圖五(c)。

以搖瓶誘導上述 3 個轉形株與野生形控制組 5 天，每天添加 0.5% 甲醇並取樣分析，測定其標準化螢光強度，E1 與 E3 的螢光強度會隨著誘導天數逐漸上升，而野生形控制組與 E2 的螢光不會，如圖六。樣品同時以螢光顯微鏡觀察，細胞螢光亮度與直接測定其螢光強度相符，如圖七。

能成功表現出綠色螢光蛋白質的菌株 E1 和 E3，進一步以 real-time PCR 測定轉形株之外源基因 mEGFP 拷貝數，其中又以 E3 帶有較高的拷貝數，約有 9 個外源基因，結果如表五。後續實驗會以 E3 作為母株，進一步編輯其轉錄因子的表現量。

##### 2. 外泌型綠色螢光蛋白質生產菌株

將表現載體 pPICZ $\alpha$ -mEGFP 以 *SacI* 切成線狀後，以電穿孔轉形送入 *P. pastoris* KM71 勝任細胞，並將菌液塗至 YPDSZ 篩選培養基，待 2~3 天菌落長成後，接著挑選轉形株培養於幾種不同培養基上，(1) MD 培養基確定轉形株仍為

Histidine 缺陷株，(2) MMH 培养基诱导转形株产生绿色荧光蛋白质，并以蓝光灯观察荧光表现，(3) 不同浓度 zeocin 的 YPDZ 筛选出抗性较高的转形株，根据上述分析方法，挑选出 12 个转形株，依序命名为 SE1~12，如图八。

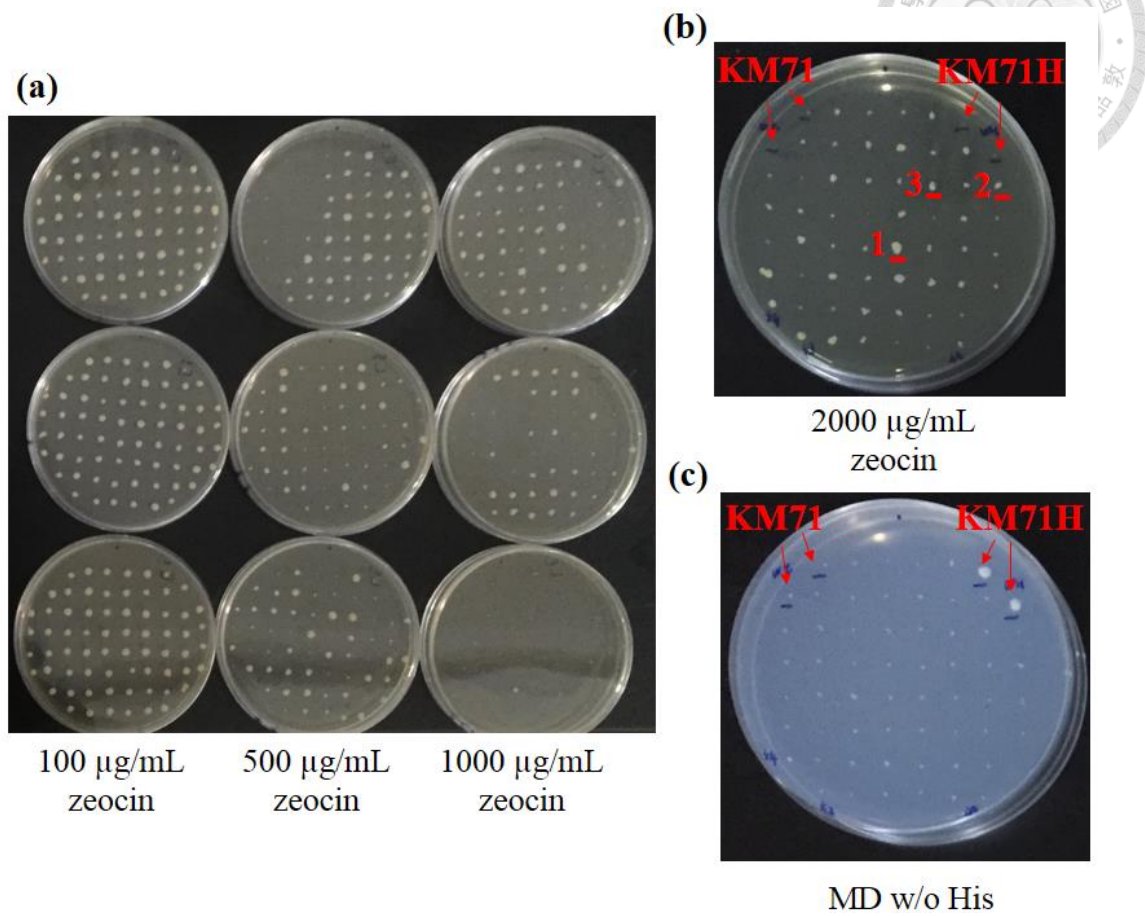
进一步以 real-time PCR 测定转形株 SE5、SE6、SE9、SE12，外源基因  $\alpha$ -mEGFP 的拷贝数以 SE12 最高，结果如表五。后续实验会以 SE12 作为母株，进一步编辑其转录因子的表现量。

### 3. Mxr1 再程序化之胞内型绿色荧光蛋白质生产菌株

将表现载体 pAOX2KH-Mxr1 与控制组载体 pAOX2KH 以 *SaII* 切成线状后，以电穿孔转形送入胞内型绿色荧光蛋白质生产菌株 E3，并将菌液涂至 RDBZ，待 2~3 天菌落长成后，接着利用不同浓度 G418 的 YPDG 筛选转形株，实验组 (pAOX2KH-Mxr1) 挑选出 10 个转形株，依序命名为 E3M1~10，而控制组挑出 1 个转形株，命名为 E3A1，如图九。经由 PCR 分析后，确定转形株 E3A1、E3M1~6、E3M10 中皆都带有正确的外源基因，如图十，同样以 real-time PCR 测定转形株之外源性 Mxr1 拷贝数，结果如表五。

### 3. Mxr1 再程序化之外泌型绿色荧光蛋白质生产菌株

将表现载体 pAOX2KH-Mxr1 与控制组载体 pAOX2KH 以 *SaII* 切成线状后，以电穿孔转形送入外泌型绿色荧光蛋白质生产菌株 SE12，并将菌液涂至 RDBZ，待 2~3 天菌落长成后，接着利用不同浓度 G418 的 YPDG 筛选转形株，实验组 (pAOX2KH-Mxr1) 挑选出 2 个转形株，依序命名为 SE12M1 与 SE12M2，而控制组 (pAOX2KH) 挑出 1 个转形株，命名为 SE12A1，图十一。以 real-time PCR 测定转形株之外源性 Mxr1 拷贝数，结果如表五。



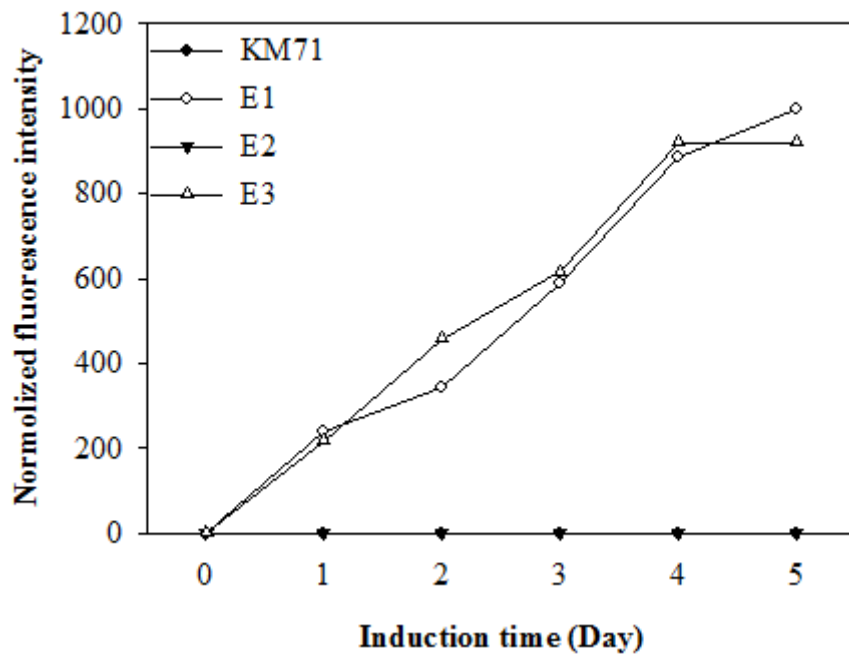
圖五、以不同培養基篩選 pPICZ-mEGFP 轉形株

(a)含有 100、500、1000 µg/mL Zeocin 之 YPD 培養基。(b)含有 2000 µg/mL Zeocin 之 YPD 培養基。(c) MD 培養基。KM71 ( $\text{His}4^-$ )與 KM71H ( $\text{His}4^+$ )為不具 Zeocin 抗性之菌株。1、2、3 為挑選出之轉形株。

Figure 5. Screening of pPICZ-mEGFP transformants by different plates

(a) YPDZ plate (100、500、1000 µg/mL Zeocin). (b) YPDZ plate (2000 µg/mL Zeocin).

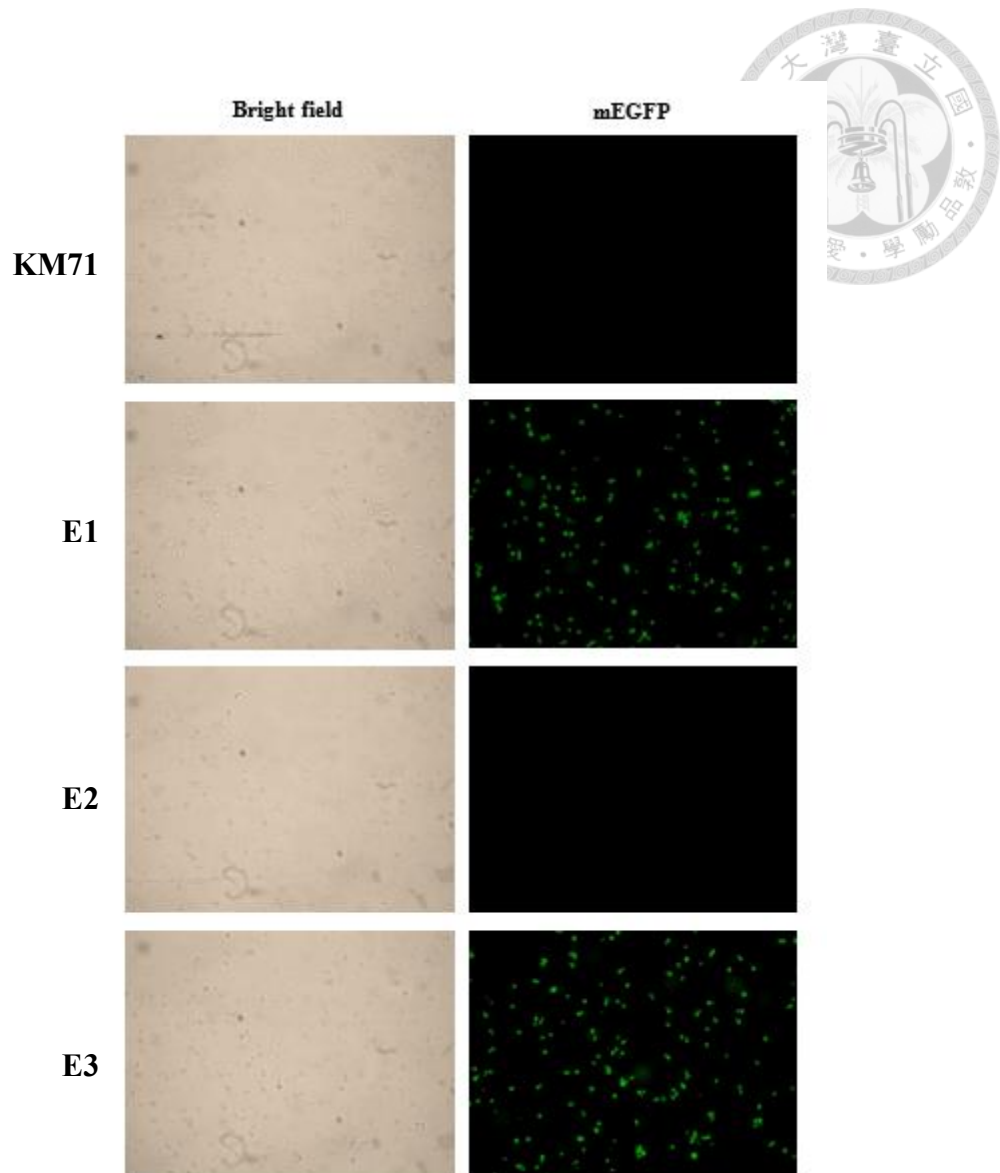
(c) MD plate. KM71 ( $\text{His}4^-$ ) and KM71H ( $\text{His}4^+$ ) were not resistant to zeocin. The strain 1, 2, and 3 were picked for further experiments.



圖六、胞內型 mEGFP 生產菌株標準化螢光強度分析

以搖瓶誘導挑選出 3 株轉形株，每天添加 0.5% 甲醇並誘導 5 天，其中 KM71 為沒有螢光的控制組。

Figure 6. The normaolized fluorescent intensity of intracellular mEGFP  
 Fluorescent intensity of transformants cultured in flask with 0.5% methanol. KM71 was control group and did not express fluorescent intensity.

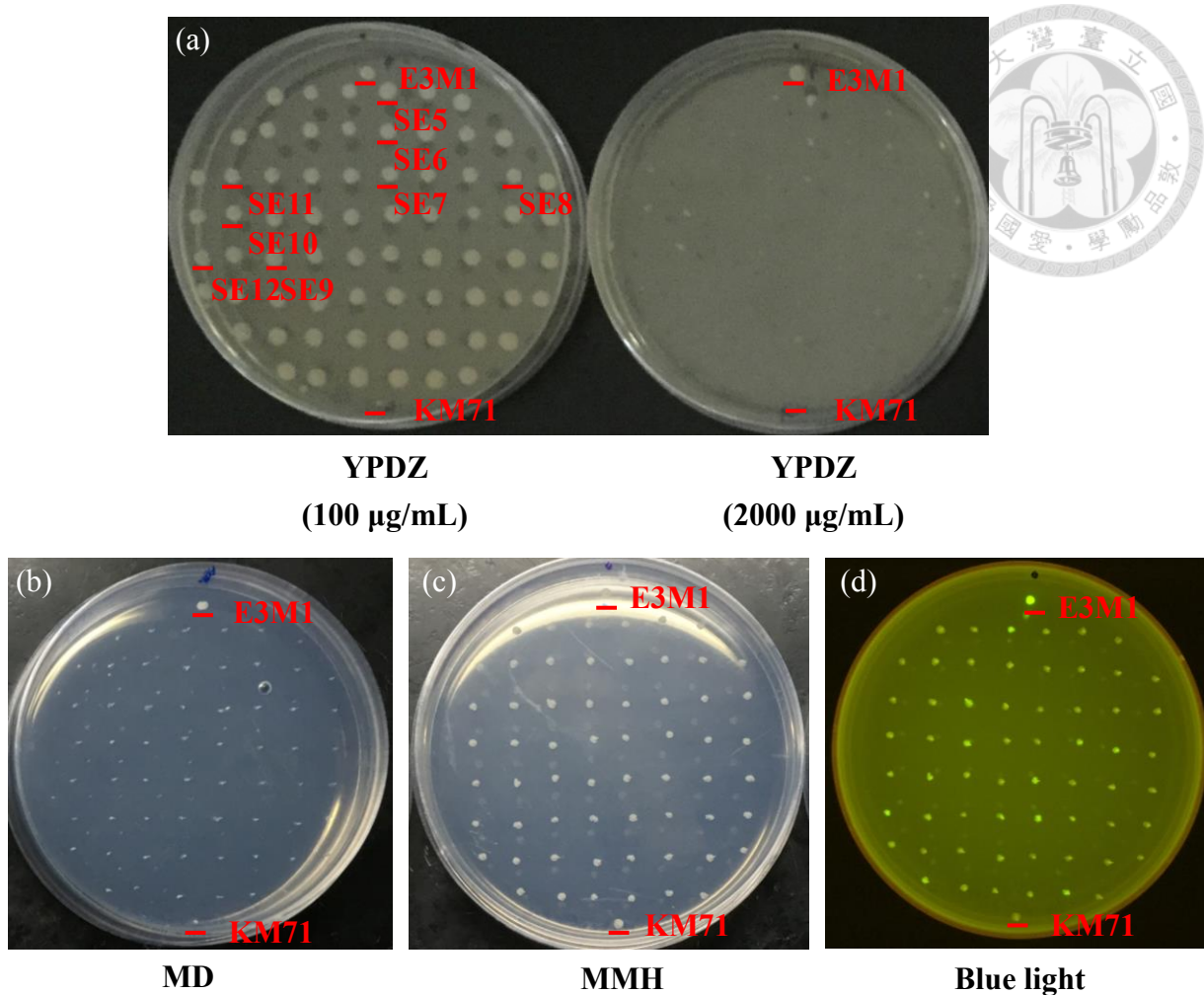


圖七、螢光顯微鏡觀察胞內型 mEGFP 生產菌株

藍光激發 (450-490 nm)，曝光 1/4 秒下，400 倍放大觀察甲醇誘導第 5 天之轉形株。左圖為對應之明視野結果。

Figure 7. Result of transformants observed by fluorescent microscopy

After five days induction, the cells at 400x magnification were excited by blue light (450-490 nm) and the images were captured under 1/4 seconds.



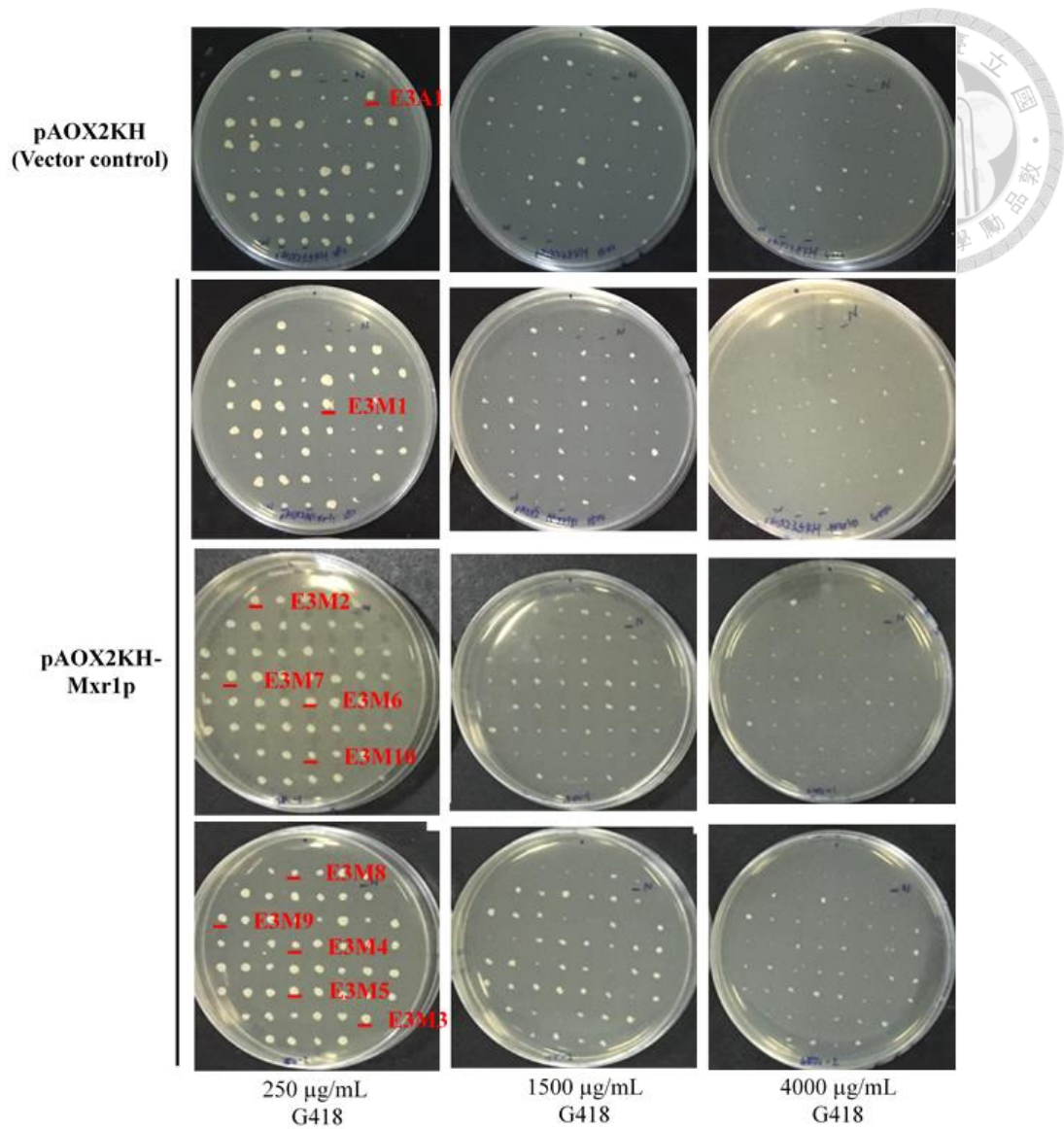
圖八、以不同培養基篩選 pPICZ $\alpha$ -mEGFP 轉形株

(a)含有 100 和 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Zeocin 之 YPD 培養基。(b) MD 培養基。(c) MMH 培養基。(d)藍光激發下的 MMH 培養基。KM71 ( $\text{His}4^-$ )為不具 Zeocin 抗性與螢光之負控制組。E3M1 ( $\text{His}4^+$ )為具 Zeocin 抗性與螢光之正控制組。SE1~12 為挑選出之轉形株。

Figure 8. Screening of pPICZ $\alpha$ -mEGFP transformants by different plates

(a) YPDZ plate (100、2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Zeocin). (b) MD plate. (c) MMH plate. (d) MMH plate under blue light. KM71 ( $\text{His}4^-$ ) was negative control which was not resistant to zeocin and did not express mEGFP. E3M1 ( $\text{His}4^+$ ) was positive control which resistant to zeocin and did not express mEGFP. SE1~12 were picked for further experiments.



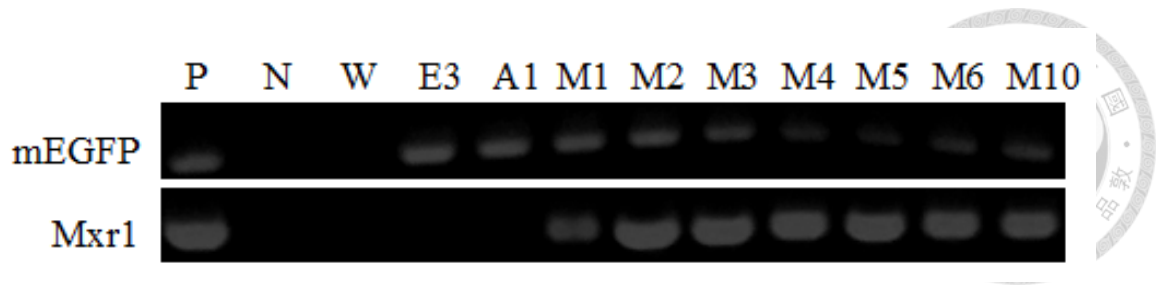


圖九、以不同 G418 抗性濃度篩選 Mxr1 再程序化之 E3 轉形株含有 250、1500、4000 µg/mL G418 之 YPD 培養基。

Figure 9. G418 tolerance plate assay

YPDG plate (250, 1500, 4000 µg/mL G418).



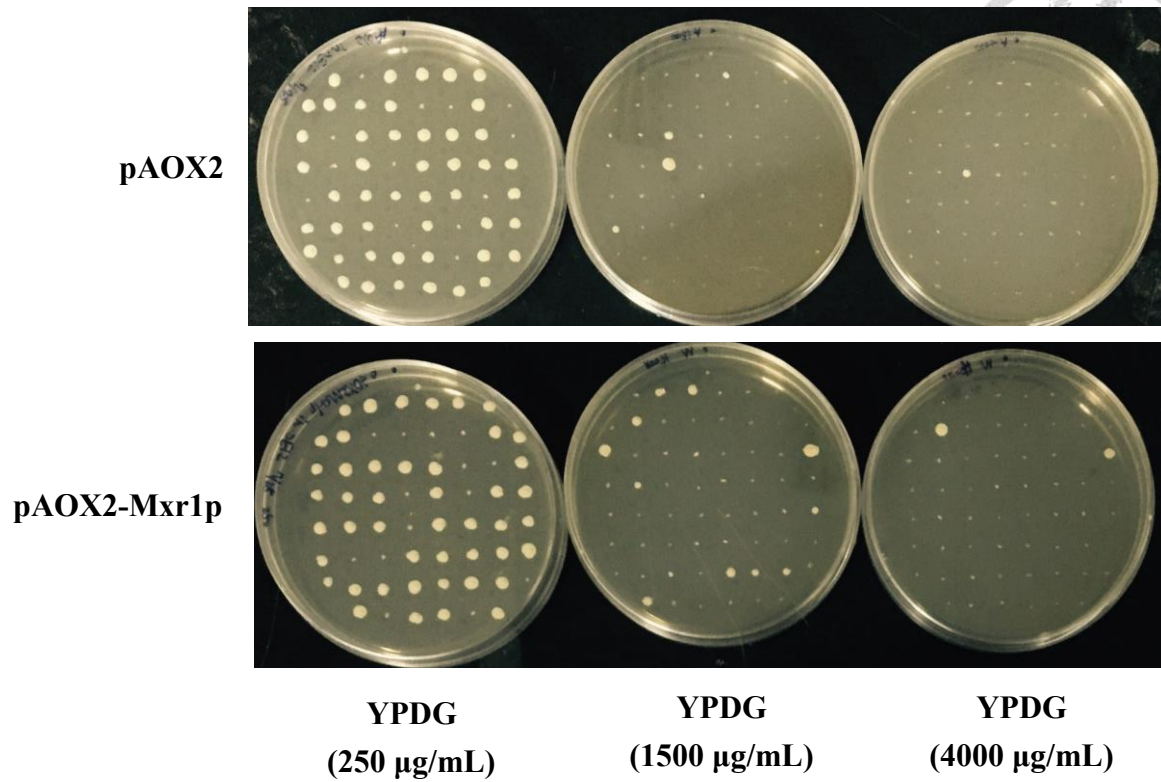


圖十、聚合酶連鎖反應分析 Mxr1 再程序化轉形株染色體 DNA

轉形株染色體 DNA 以引子對 F-*EcoRI*-mEGFP 與 R-mEGFP-stop-*SalI* 偵測外源性 mEGFP，或以引子對 F-*SalI*mutant-Mxr1 與 3' AOX1 偵測外源性 Mxr1，確認轉形株帶有正確的遺傳訊息。P 代表添加質體為模板股之正控制組；N 代表添加水為模板之負控制組；W 代表野生型 *P. pastoris* 之染色體為模板之負控制組。

Figure 10. Colony PCR of transformants

The mEGFP fragment was amplified by F-*EcoRI*-mEGFP/R-mEGFP-stop-*SalI* primer pairs and the ectopic Mxr1 fragment was amplified by F-*SalI*mutant-Mxr1/3' AOX1 primer pairs. Lane P: plasmid, positive control; lane N: ddH<sub>2</sub>O, negative control; lane W: wild type, negative control.



圖十一、以不同 G418 抗性濃度篩選 Mxr1 再程序化之 SE12 轉形株含有 250、1500、4000 µg/mL G418 之 YPD 培養基。

Figure 11. G418 tolerance plate assay

YPDG plate (250, 1500, 4000 µg/mL G418).

表五、本研究建構之轉形株與其外源基因的拷貝數

Table 5. The gene copy number of transformants constructed in this study.

	轉形株	mEGFP	外源性 <i>MXR1</i>	HIS4
胞內型綠色螢光蛋白質 生產菌株	E1	6	-	-
	E3	9	-	-
調控 <i>Mxr1</i> 之胞內型綠 色螢光蛋白質生產菌株	E3A1	9	0	1
	E3M1	9	1	1
	E3M2	9	3	3
	E3M3	9	2	2
	E3M4	9	2	2
	E3M5	9	1	1
	E3M6	9	1	1
	E3M10	9	1	1
外泌型綠色螢光蛋白質 生產菌株	SE5	1	-	-
	SE6	5	-	-
	SE9	6	-	-
	SE12	6	-	-
調控 <i>Mxr1</i> 之外泌型綠 色螢光蛋白質生產菌株	SE12A1	6	0	1
	SE12M1	6	1	1
	SE12M2	6	3	3



## 二、轉錄因子 Mxr1 再程序化對異源蛋白質生產的影響

### 1. 額外表現 Mxr1 加強胞內型綠色螢光蛋白質的生產

以搖瓶誘導調控 Mxr1 實驗組之轉形株 E3M1 與控制組 E3A1，先以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成培養基 BMMY 並誘導 4 天，每天添加 0.5% 甲醇與取樣分析，測定濁度與標準化螢光強度，實驗組與控制組的濁度並沒有顯著差異，顯示以 *AOX2* 啟動子表現額外的 Mxr1 並不會影響細胞生長，如圖十二(a)。從誘導第 0 天至第 4 天，實驗組的螢光強度皆顯著高於控制組，表示 Mxr1 或許能幫助異源蛋白質 mEGFP 生產。然而，在添加甲醇之前，實驗組就已經產生螢光，指出額外的 Mxr1 可能使 *AOX1* 啟動子失去其嚴謹調控的特性，如圖十二(b)。誘導第 4 天樣品以西方墨點法分析胞內蛋白質組成，可測到 mEGFP 表現於實驗組與控制組中，並在實驗組同時可偵測到帶有 His-tag 的外源性 Mxr1，而在控制組則中沒有，圖十二(c)。

### 2. 額外表現 Mxr1 的效果不隨著拷貝數增加而提升

以搖瓶誘導帶有不同拷貝數之 Mxr1 實驗組轉形株 E3M1~6、E3M10 與控制組 E3A1，先以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成培養基 BMMY (0.5% methanol) 並誘導 24 小時，於第 0、6、24 小時取樣測定標準化螢光強度。雖然在第 24 小時，轉形株 E3M5、E3M6 的螢光強度與控制組並無顯著差異，但在整個誘導過程，絕大部分的實驗組轉形株螢光強度皆顯著高於控制組，表示不管轉形株帶有幾拷貝的外源性 Mxr1，都會提升異源蛋白質 mEGFP 的生產，如圖十三。然而，分析在第 0 與 6 小時，Mxr1 拷貝數與螢光強度的關係，兩者的相關性不明顯，顯示以 *AOX2* 啟動子表現 Mxr1 的效果，可能不會隨著拷貝數增加而有所提升，如圖十四。

### 3. 額外表現 Mxr1 不會破壞 *AOX1* 啟動子嚴謹調控的特性

以不同甘油濃度之 BMGY 培養 Mxr1 實驗組轉形株 E3M1 與控制組 E3A1，24 小時後取樣測定濁度與標準化螢光強度。在不同甘油濃度的情況下，實驗組與控制組的濁度皆沒有顯著差異，再次確認以 *AOX2* 啟動子表現額外的 Mxr1 並不會影響細胞生長，而濁度會隨著甘油濃度提升而增加的現象，指出 1%、2% 的甘油可能在 24 小時中可能被消耗至特定濃度之下，所以菌體無法繼續成長。而在螢光強度的部分，只有實驗組在 1% 甘油的情況下，mEGFP 會顯著的表現。綜合以上結果，額外表現 Mxr1 並不會完全使 *AOX1* 啟動子失去控制，但若是環境中的甘油在特定的濃度之下，*AOX1* 啟動子的會因為額外的 Mxr1 而啟動，如圖十五。

根據以上結果，在誘導調控 Mxr1 實驗組之轉形株 E3M1 與控制組 E3A1 時，透過提升 BMGY 甘油濃度至 2%，避免兩組別 *AOX1* 啟動子活化時間不一，接著置換到 BMMY (1% methanol) 或是不額外添加碳源的 BMNY 中誘導 3 小時。在添加甲醇的情況，實驗組的螢光強度顯著高於控制組，可達控制組的 2.05 倍，表示額外表現 Mxr1 可以提升異源蛋白質的生產效率。而在沒有碳源的情況下，實驗組的螢光強度同樣顯著高於控制組，甚至可達到控制組在甲醇誘導下的 41.7%，再次確認 *AOX1* 啟動子的調控型式會因為額外的 Mxr1 而改變，而能以碳源受限活化，如圖十六。

### 4. 額外表現 Mxr1 提升 *AOX1* 啟動子轉錄效率

將 Mxr1 實驗組轉形株 E3M1 與控制組 E3A1 培養於不同碳源的培養基中，分別為 BMGY (2% glycerol)、BMMY (1% methanol) 與不含碳源的 BMNY，3 小時後，取樣測定 Mxr1 與 mEGFP 的 mRNA 表現量。控制組的 Mxr1 不會因為碳源不同而有差異，而實驗組卻會在甲醇誘導與碳源受限下顯著上升，其中又以甲醇誘導時的活化倍率最高，如圖十七(a)。在 mEGFP 的部分，相較於沒有碳源時，

其表現量會受到甲醇的誘導，並受到甘油的抑制，並且實驗組在甲醇與碳源受限時，可以進一步提升的 mEGFP 活化倍率，如圖十七(b)。綜合以上結果，透過 AOX2 啟動子表現額外的 Mxr1，可以改變 Mxr1 的表現形式，使其會因為碳源不同而有表現量的差異，並且進一步提升甲醇誘導下 AOX1 啟動子的轉錄效率，同時賦予 AOX1 啟動子因碳源受限而活化的能力，但在碳源為甘油時，實驗組與控制組 Mxr1 的表現量並不會有所差異，使 AOX1 啟動子能保有受甘油抑制的特性。

除了 Mxr1 與 mEGFP 外，同時測定了其他轉錄因子 Nrg1、Mit1、Prm1 的表現量，相較於原生性的 Mxr1，這三個轉錄因子的表現量都會因為碳源不同而有所差異，但是它們變化的趨勢卻不太相同。Nrg1 會受到甲醇的抑制，而在甘油與碳源受限時有相同的表現量，如圖十八(a)；Mit1 則是受到甘油的抑制，在甲醇與碳源受限時有一樣的表現量，如圖十八(b)；相對的，Prm1 在甲醇與碳源受限時表現量一致，卻可以受到甘油的誘導，如圖十八(c)。最後，比較控制組與實驗組的差異，Nrg1 和 Prm1 並沒有顯著的不同，顯示 Mxr1 可能不具備調控 Nrg1、Prm1 的能力；然而，在 Mit1 的結果指出 Mxr1 可能對 Mit1 的表現有所影響。

## 5. 額外表現 Mxr1 解除 *P. pastoris* 甲醇誘導需要置換的限制

以搖瓶誘導調控 Mxr1 實驗組之轉形株 E3M1 與控制組 E3A1，先以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，菌體 5 倍濃縮於原本的培養基中，每天添加 0.5% 甲醇與取樣測定標準化螢光強度，並與正常程序培養的組別比較，置換與否會顯著影響控制組轉形株，然而實驗組的螢光強度並不會因為置換而顯著提升，顯示額外表現 Mxr1 可以降低 AOX1 啟動子的限制，進而降低培養基中殘存甘油的影響，如圖十九。

## 6. 額外表現 Mxr1 賦予 *P. pastoris* 以碳源受限誘導的能力

以搖瓶誘導調控 Mxr1 實驗組之轉形株 E3M1 與控制組 E3A1，先以 BMGY (2% glycerol) 培養菌體 24 小時，避免兩組別 *AOX1* 啟動子活化時間不一，接著置換到 BMNY 以碳源受限誘導 3 天，每天添加 0.33% 甘油並取樣測定標準化螢光強度。除了第 0 天外，實驗組的螢光強度皆顯著高於控制組，並且可以隨著誘導天數而累積，顯示額外表現 Mxr1 的情況下，*AOX1* 啟動子因碳源受限而活化的能力有潛力發展成新的誘導模式，如圖二十。

進一步將轉形株 E3M1 以 5 L 醱酵槽培養，並搭配甘油受限誘導策略，測定其生菌數、濁度、與標準化螢光強度。以含 4% 甘油之 FBS 批次培養，此階段菌體會快速生長，16.7 小時後，碳源耗盡、DO 數值上升後進入甘油饋料階段，以 3 種不同饋料速率添加 50% 甘油，(1) 16.7 到 23 小時，每小時添加 33.4 mL 甘油；(2) 23 到 47.2 小時，每小時添加 6.2 mL 甘油；(3) 47.2 到 96 小時，由於 *P. pastoris* 在碳源受限時會產鹼，因此將甘油做為酸將 pH 控制在 5 上下，此階段甘油添加量約為 52 mL。於階段(1)，菌體仍然快速生長，並且開始生產綠色螢光蛋白質；到了階段(2)，菌體降低生長速率，螢光蛋白質表現速度也逐漸下降；階段(3)前半步，由於 pH 還未上升至 5.05，因此沒有添加任何的甘油，因此開始表現異源蛋白質，但是當甘油開始添加後，螢光累積的狀況又消失；培養 4 天後，標準螢光強度在沒有添加甲醇的情況下可達到 534.9，如圖二十一。

將轉形株 E3M1 以 5 L 醱酵槽培養，搭配傳統的醱酵策略培養。以含 4% 甘油之 FBS 批次培養，此階段菌體會快速生長，17.7 小時後，碳源耗盡、DO 數值上升後進入甘油饋料批次培養階段。於 17.7 到 22.9 小時之間，添加 250 mL 50% 甘油，將菌體培養至高細胞密度，由於此階段的甘油饋料速率快，可以使培養基的甘油維持在特定濃度之上，所以並不會表現出綠色螢光蛋白質，待碳源耗盡、DO 數值上升後進入甲醇階段。甲醇誘導初期，緩慢提升添加速率，於 26.7 小時後，維持每小時添加 8.4 mL 的速率直至 50.9 小時，最終標準化螢光強度可達 1064，如圖二十二。綜合以上結果，雖然額外表現 Mxr1 的轉形株確實能以碳源受限的方式誘導，但產量仍不及甲醇誘導。



## 7. 額外表現 Mxr1 改善 *P. pastoris* 的甲醇代謝能力

以試管誘導野生形菌株、調控 Mxr1 實驗組之轉形株 E3M1 與控制組 E3A1，先以 YPD 培養菌體 16 小時，避免碳源耗盡而使兩組別 *AOX1* 啟動子活化時間不一。菌體以水清洗，去除殘餘葡萄糖後，以不同碳源的 BMDY (2% dextrose)、BMGY (1% glycerol)、BMMY (0.5% methanol) 回溶菌體，培養 10 小時後，測定 AOX 酵素活性。3 種菌株的甲醇代謝能力皆會受到葡萄糖與甘油的抑制，顯示額外表現 Mxr1 並不會破壞碳源對甲醇代謝基因的調控。在甲醇誘導下，野生形菌株具有正常的代謝能力，轉形株 E3A1 會因為 Mxr1 稀釋效應而使代謝能力下降。此能力缺陷在轉形株 E3M1 能以增加 Mxr1 的表現量回補，顯示額外表現 Mxr1 可以解決 Mxr1 稀釋效應的問題，如圖二十三。

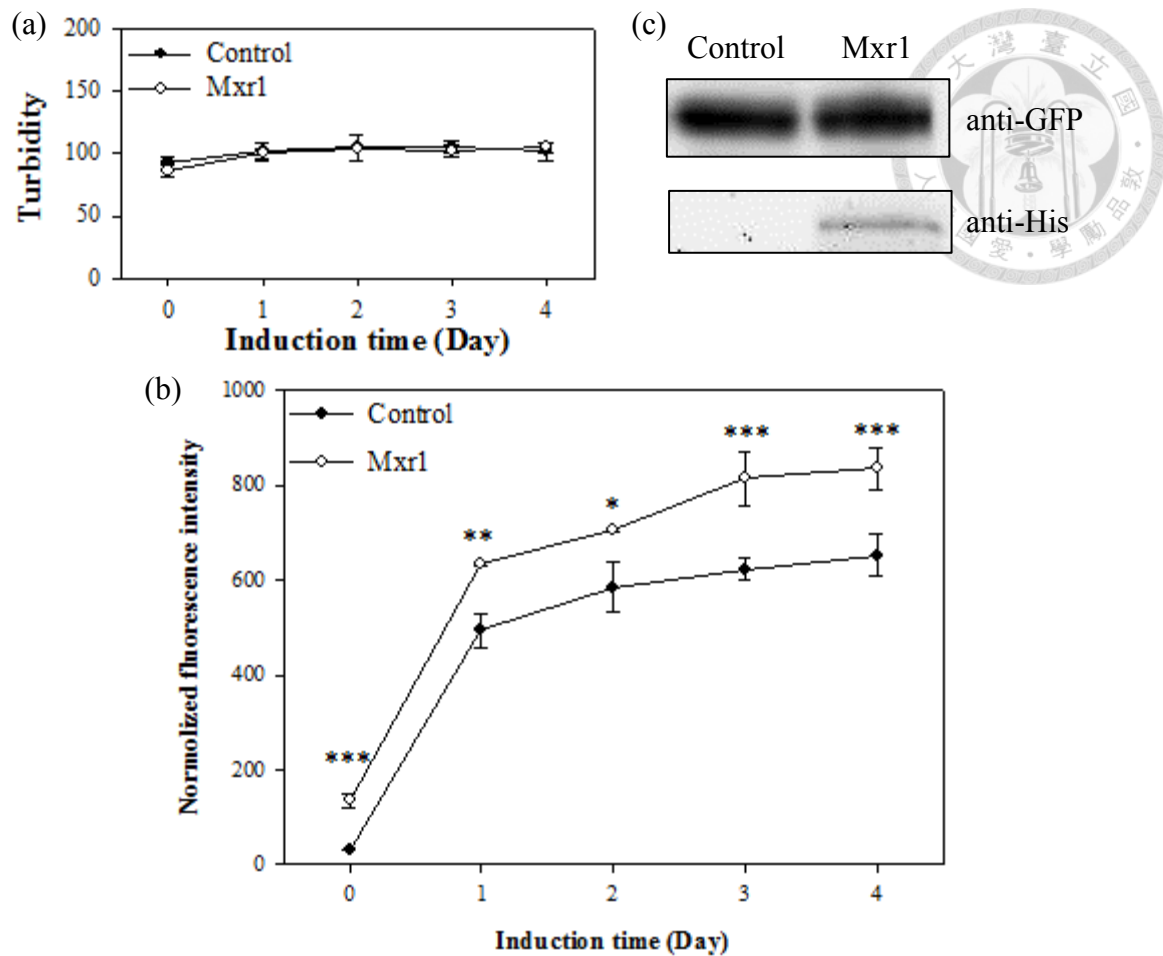
進一步比較碳源受限或同時存在甲醇與甘油時，對調控 Mxr1 實驗組之轉形株 E3M1 與控制組 E3A1 的影響。控制組的甲醇代謝能力無法以碳源受限誘導，並且甲醇誘導效果會受到甘油的干擾。控制組的甲醇代謝能力能以碳源受限誘導，並且甲醇誘導效果不會受到甘油的干擾。額外表現 Mxr1 可以降低甲醇代謝基因調控的限制，能以更彈性的條件起動，並不受甘油的干擾，如圖二十三。綜合以上結果，額外表現 Mxr1 對內生性甲醇代謝能力的影響，與外源性綠色螢光蛋白質生產的改變相似。

## 8. 異源蛋白質的生產可能受限於外泌效率

以搖瓶誘導調控 Mxr1 實驗組之外泌型轉形株 SE12M1、SE12M2 與控制組 SE12A1，先以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成培養基 BMMY 並誘導 3 天，每天添加 0.5% 甲醇與取樣分析，測定其胞內與上清液之標準化螢光強度。胞內螢光強度與先前生產胞內型蛋白質結果相似，額外表現 Mxr1 提升蛋



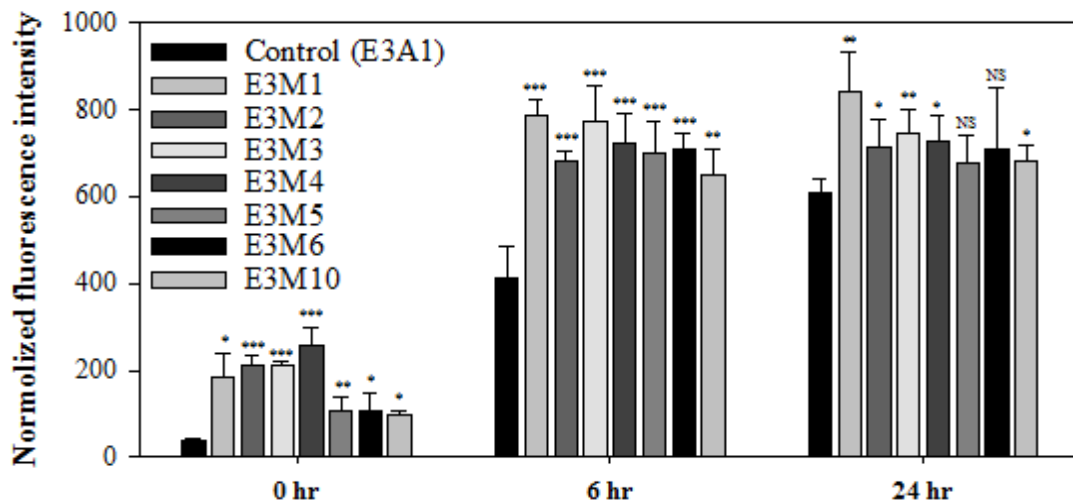
白質生產效率，並改變 *AOXI* 啟動子啟動的條件。然而，在上清液螢光強度的結果，第 0 天的外泌型 mEGFP 可能在置換的過程被移除，而無法增測到因碳源受限而表現的部份，但是在誘導 1~3 天，實驗組與控制組並沒有太大的差異，如圖二十四。結合胞內外螢光的結果，額外表現 Mxr1 提升之生產效率可能會受到外泌效率的限制，而使異源蛋白質累積在胞內。



圖十二、以標準方法誘導 Mxr1 再程序化轉形株

以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成培養基 BMMY 並誘導 4 天，每天添加 0.5% 甲醇與取樣分析。(a) 濁度分析。(b) 標準化螢光強度分析。(c) 西方墨點法偵測 mEGFP 與帶有 6x His-tag 的外源性 Mxr1。誤差線為 3 次獨立生物性重複的標準差，顯著水準以非成對 T 檢定分析。\* 為  $p < 0.05$ ；\*\* 為  $p < 0.01$ ；\*\*\* 為  $p < 0.005$ 。

Figure 12. Induction the Mxr1 reprogrammed transformant by standard procedure  
 After cultured in BMGY (1% glycerol), the cells was replaced in BMMY and induced by 0.5% methanol per day. (a) Turbidity. (b) Normalized fluorescence intensity. (c) Western blotting of mEGFP or ectopic Mxr1 with 6x His-tag. The error bars represent the standard deviation of three biological replicates. The independent-sample t-test was used to determine the statistical significance. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ .

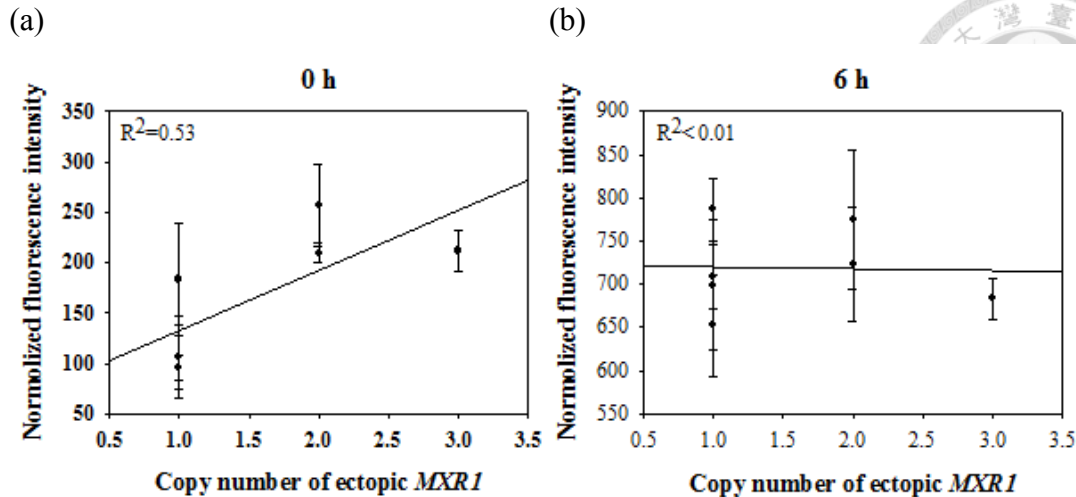


圖十三、不同拷貝數 Mxr1 轉形株的標準化螢光強度分析

以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成培養基 BMMY 並以 0.5% 誘導 24 小時。誤差線為 3 次獨立生物性重複的表準差，與控制組相比的顯著水準以非成對 T 檢定分析。NS 為  $p > 0.05$ ；\* 為  $p < 0.05$ ；\*\* 為  $p < 0.01$ ；\*\*\* 為  $p < 0.005$ 。

Figure 13. The normaolized fluorescence intensity of tranformants with different copy numbers of ectopic Mxr1

After cultured in BMGY (1% glycerol), the cells was replaced in BMMY and induced by 0.5% methanol. The error bars represent the standard deviation of three biological replicates. The independent-sample t-test was used to determine the statistical significance compared to control group. NS,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ .

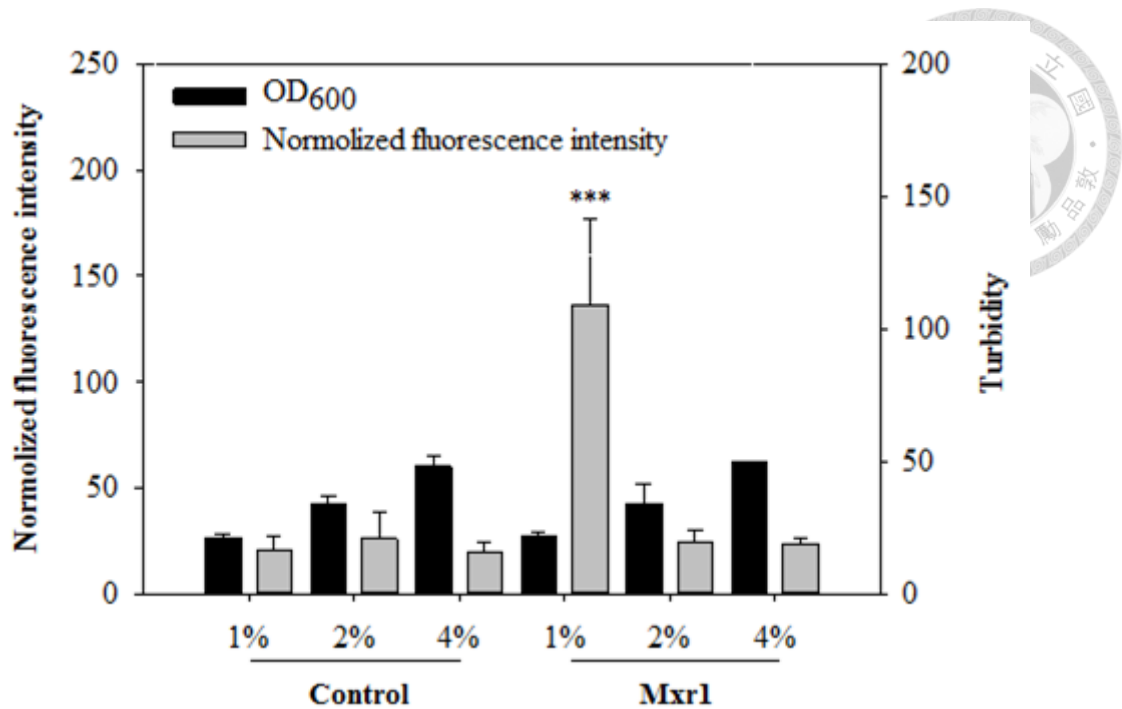


圖十四、外源性 *MXR1* 拷貝數與標準化螢光強度之關係圖

以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成培養基 BMMY 並以 0.5% 甲醇誘導。(a) 0 小時的樣品。(b) 6 小時的樣品。X 軸為轉形株的外源性 *MXR1* 拷貝數，Y 軸為轉形株標準化螢光強度，誤差線為 3 次獨立生物性重複的表準差，R 平方值顯示兩者的相關係。

Figure 14. The correlation between copy number of ectopic Mxr1 and normalized fluorescence intensity

After cultured in BMGY (1% glycerol), the cells was replaced in BMMY and induced by 0.5% methanol. (a) The cells before induction. (b) The cells induced for 6 hours. X-axis represent the copy number of ectopic Mxr1. Y-axis represent the normalized fluorescence intensity. The error bars represent the standard deviation of three biological replicates. R squared represent the coefficient of determination.

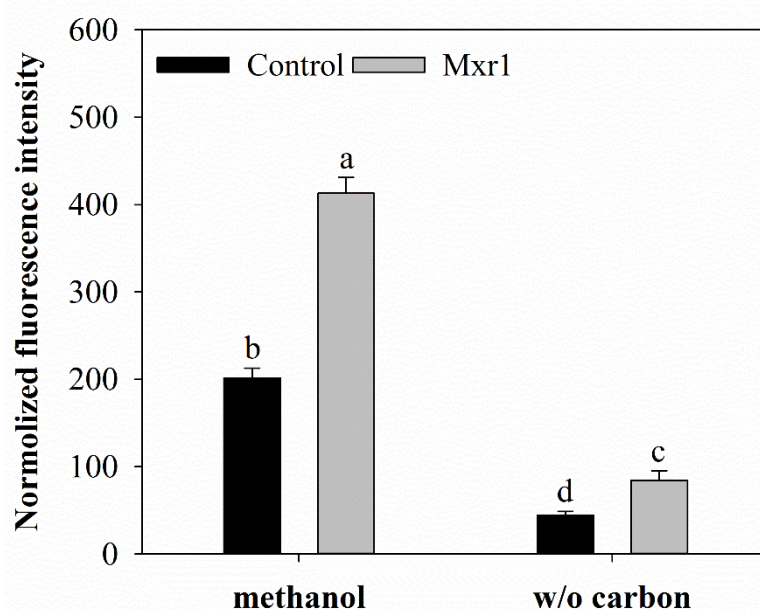


圖十五、Mxr1 再程序化轉形株在不同甘油下的濁度與標準化螢光強度

以不同濃度 BMGY 培養菌體 24 小時，取樣分析濁與度標準化螢光強度。誤差線為 3 次獨立生物性重複的表準差，組間差異以 2 因子變方分析確認，進一步以 Tukey Test 進行事後檢定。\*\*\*為  $p < 0.005$ 。

Figure 15. The turbidity and normalized fluorescence intensity of Mxr1 reprogramed tranformants cultured in different concentration of glycerol

Detection the turbidity and normalized fluorescence intensity of the cells grown in different concentration of glycerol for 24 hours. The error bars represent the standard deviation of three biological replicates. The two-way ANOVA and Turkey test were used to determine the statistical significance. \*\*\*,  $p < 0.005$ .

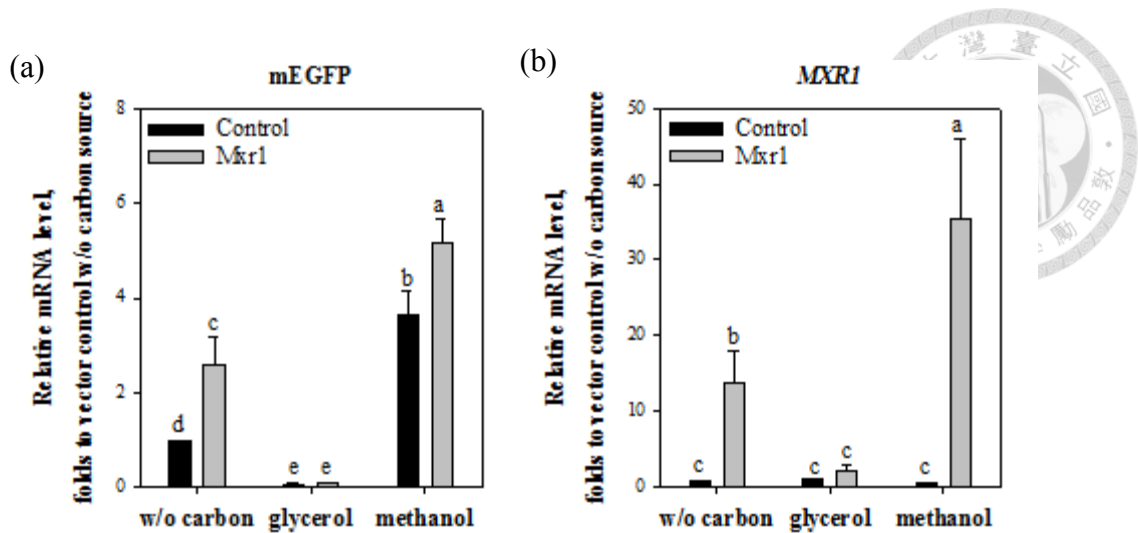


圖十六、Mxr1 再程序化轉形株在不同碳源下的標準螢光強度

以 BMGY (2% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成不同碳源的培養基 BMXY，3 小時後取樣分析標準化螢光強度。誤差線為 3 次獨立生物性重複的標準差，組間差異以 2 因子變方分析確認，進一步以 Tukey Test 進行事後檢定。字母不同表示兩組別具有顯著差異。

Figure 16. The normalized fluorescence intensity of Mxr1 reprogrammed transformants cultured in different carbon sources

After cultured in BMGY (2% glycerol), the cells was replaced in BMXY. Detection the normalized fluorescence intensity of the cells grown in different carbon sources for 3 hours. The error bars represent the standard deviation of three biological replicates. The two-way ANOVA and Turkey test were used to determine the statistical significance. The groups with different alphabet are significantly different.



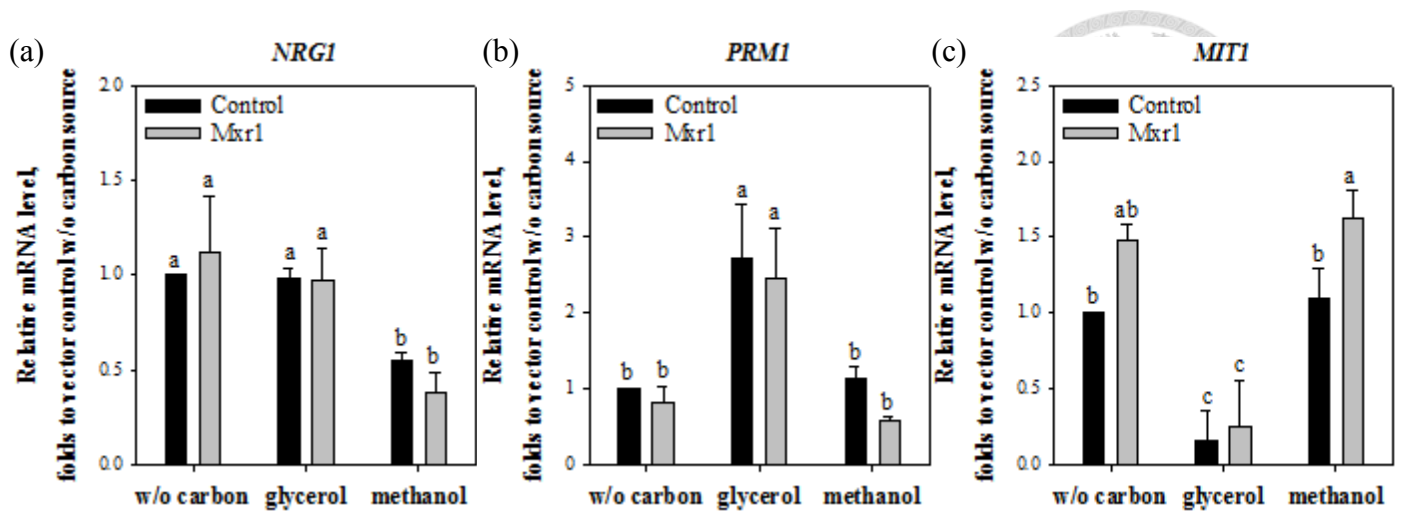
圖十七、Mxr1 再程序化轉形株之 mEGFP 與 *MXR1* mRNA 表現量分析

轉形株培養在不同碳源的 BMXY 中，3 小時後取樣分析。(a) mEGFP、(b) *MXR1*。

樣品 mRNA 表現量以內控制基因 18s rRNA 標準化，各基因的相對表現量以控制組在沒有碳源時的表現量為標準。誤差線為 3 次獨立生物性重複的標準差，組間差異以 2 因子變方分析確認，進一步以 Tukey Test 進行事後檢定。字母不同表示兩組別具有顯著差異。

Figure 21. The mRNA expression level of mEGFP and *MXR1* in Mxr1 reprogrammed transformants

The mRNA were extracted from the cells cultured in different carbon sources for 3 hours. (a) mEGFP. (b) *MXR1*. The mRNA levels were normalized to 18s rRNA in each sample. The relative expression level for each gene was normalized to the control grown in the carbon-free condition. The error bars represent the standard deviation of three biological replicates. The two-way ANOVA and Turkey test were used to determine the statistical significance. The groups with different alphabet are significantly different.

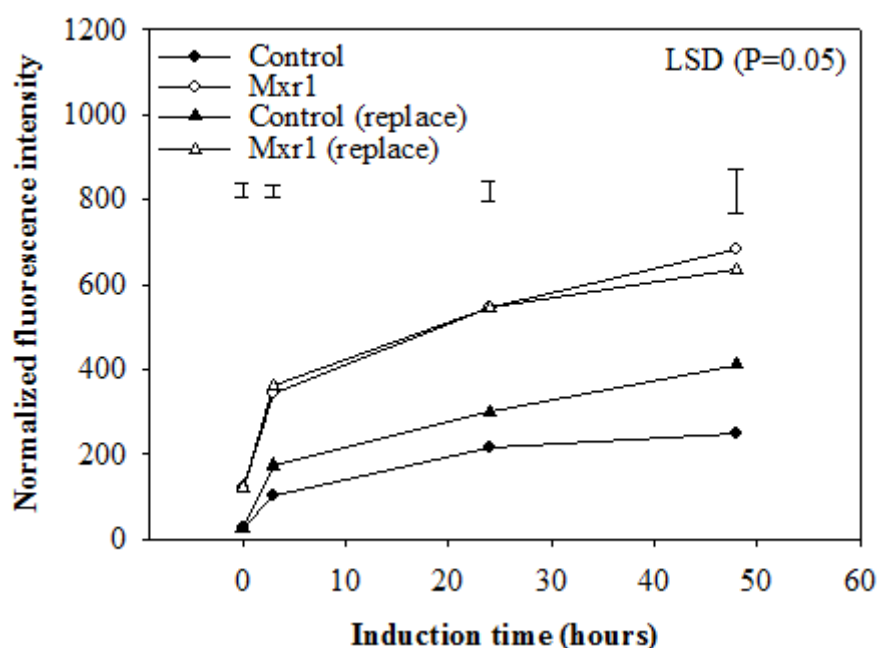


圖十八、Mxr1 再程序化轉形株之 *NRG1*、*PRM1*、*MITI* mRNA 表現量分析  
轉形株培養在不同碳源的 BMXY 中，3 小時後取樣分析。(a) *NRG1*、(b) *PRM1*、  
(c) *MITI*。樣品 mRNA 表現量以內控制基因 18s rRNA 標準化，各基因的相對表現量以控制組在沒有碳源時的表現量為標準。誤差線為 3 次獨立生物性重複的標準差，組間差異以 2 因子變方分析確認，進一步以 Tukey Test 進行事後檢定。字母不同表示兩組別具有顯著差異。

Figure 18. The mRNA expression level of *NRG1*, *PRM1*, and *MITI* in Mxr1 reprogrammed transformants

The mRNA were extracted from the cells cultured in different carbon sources for 3 hours. (a) *NRG1*. (b) *PRM1*. (c) *MITI*. The mRNA levels were normalized to 18s rRNA in each sample. The relative expression level for each gene was normalized to the control grown in the carbon-free condition. The error bars represent the standard deviation of three biological replicates. The two-way ANOVA and Turkey test were used to determine the statistical significance. The groups with different alphabet are significantly different.



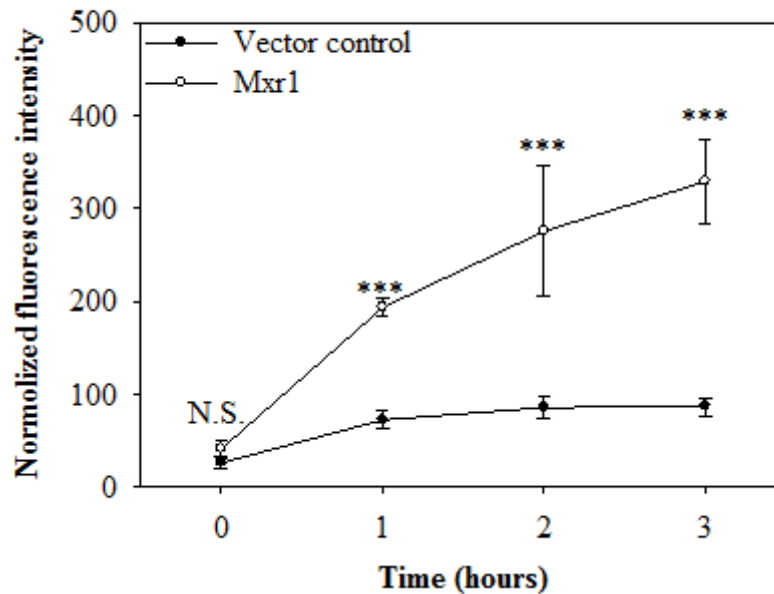


圖十九、Mxr1 再程序化轉形株不置換培養基的標準化螢光強度

以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，5 倍濃縮於原本的培養基 BMMY，每天添加 0.5% 甲醇與取樣分析標準化螢光強度。最小顯著誤差線為 3 次獨立生物性重複的結果，以 2 因子變方分析，進一步以 LSD 進行事後檢定 ( $P = 0.05$ )。

Figure 19. Induction the Mxr1 reprogramed transformant without replacement of medium

After cultured in BMGY (2% glycerol), the cells was concentrated in original medium and induced by 0.5% methanol per day. The results represent the mean of three independent biological replicates. The two-way ANOVA and LSD test were used to determine the least significance difference ( $P = 0.05$ ).

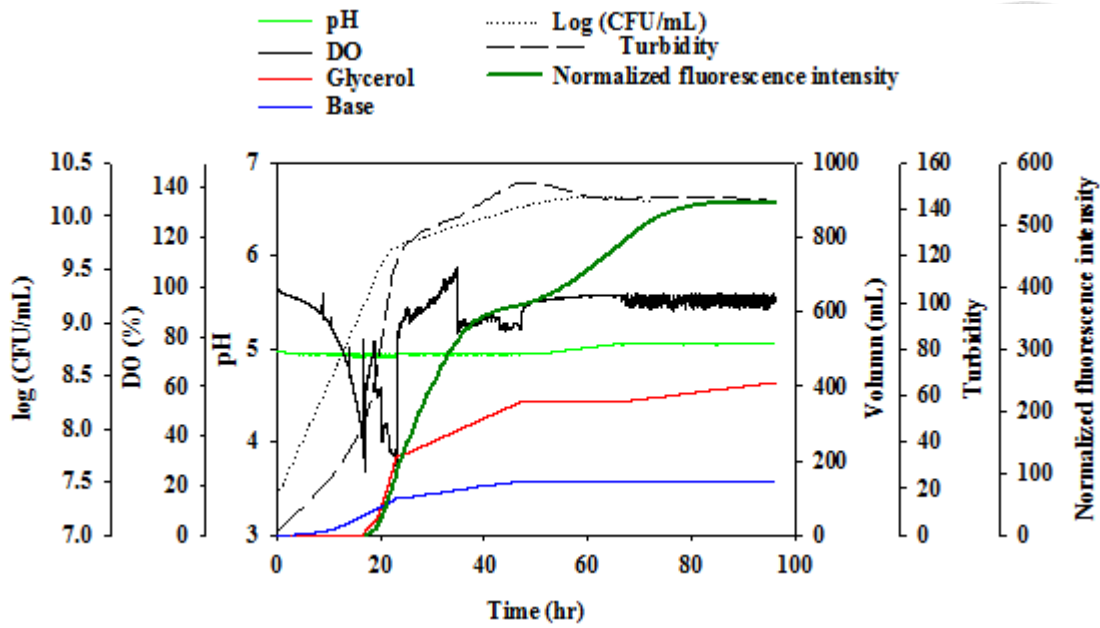


圖二十、以甘油受限誘導 Mxr1 再程序化轉形株

以 BMGY (2% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成培養基 BMGY 並誘導 4 天，每天添加 0.33% 甘油與取樣分析標準化螢光強度分析。誤差線為 3 次獨立生物性重複的標準差，顯著水準以非成對 T 檢定分析。NS 為  $p > 0.05$ ；\*\*\* 為  $p < 0.005$ 。

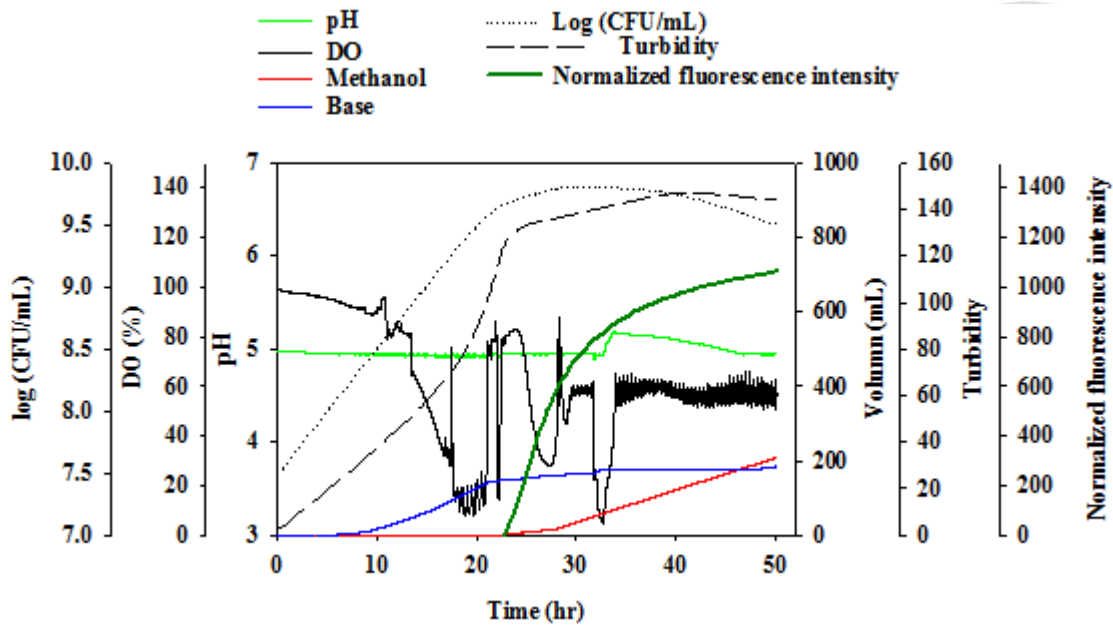
Figure 20. Induction the Mxr1 reprogramed tranformant by glycerol starvation

After cultured in BMGY (2% glycerol), the cells was replaced in BMGY and induced by 0.33% glycerol per day. The error bars represent the standard deviation of three biological replicates. The independent-sample t-test was used to determine the statistical significance. NS,  $p > 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ .



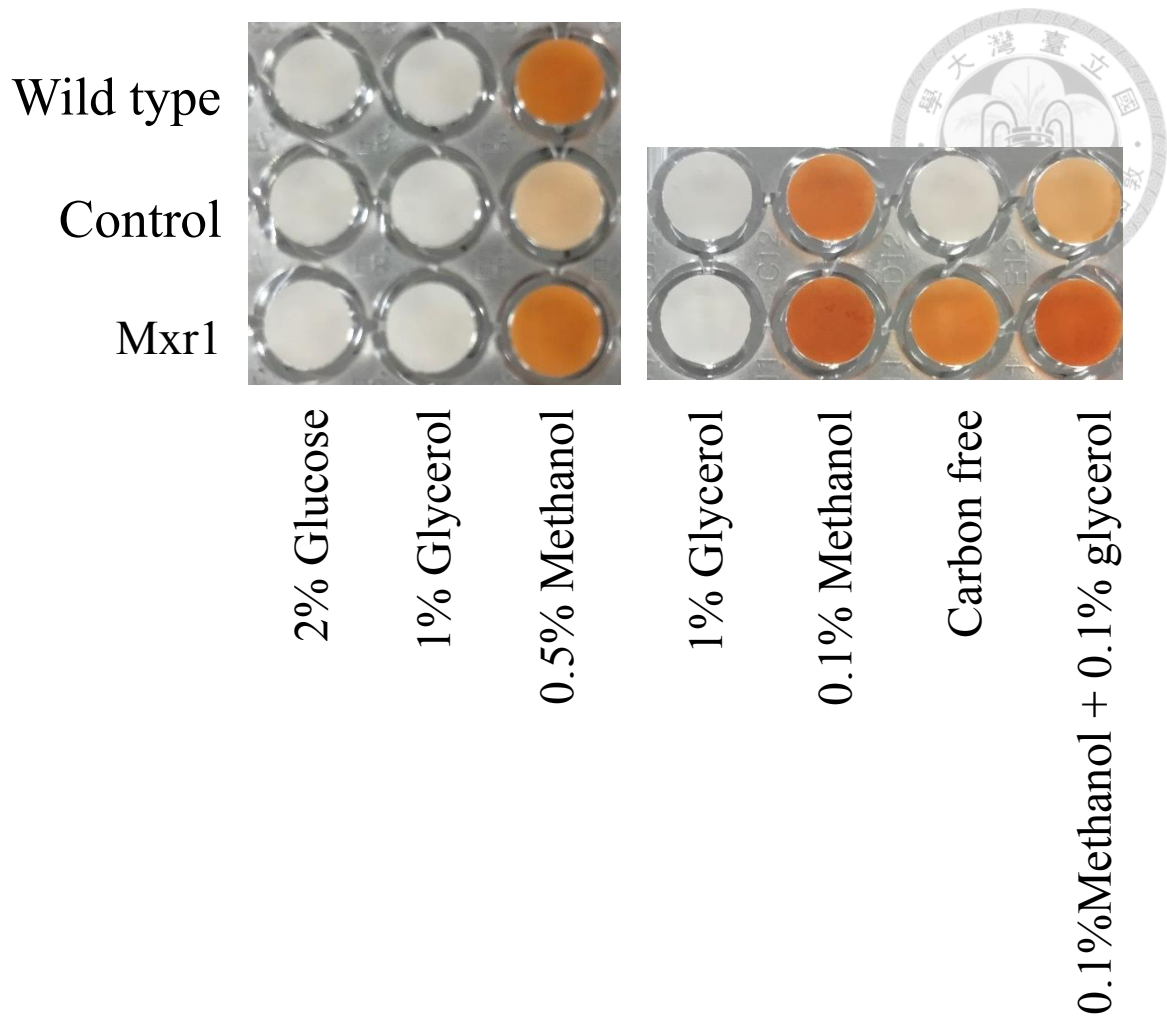
圖二十一、Mxr1 再程序化轉形株以醱酵槽進行甘油受限誘導之參數圖

Figure 21. Mxr1 reprogrammed transformant induced by glycerol starvation with fermenter control.



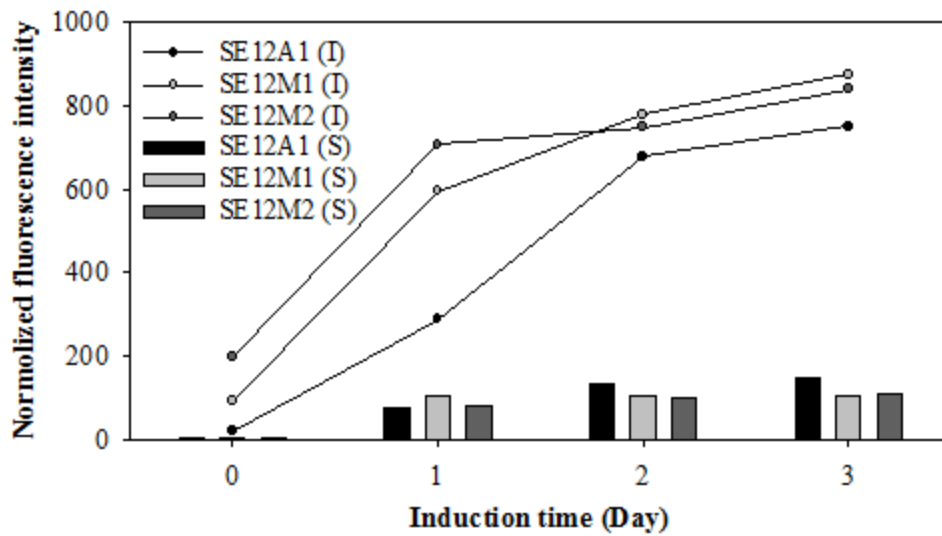
圖二十二、Mxr1 再程序化轉形株以醱酵槽進行甲醇誘導之參數圖

Figure 22. Mxr1 reprogramed transformant induced by methanol induction with fermenter control.



圖二十三、各菌株在不同碳源下的甲醇代謝能力

Figure 23. The AOX activity of different cells in response to different carbon sources



圖二十四、分析 Mxr1 再程序化轉形株的胞、內外螢光強度

以 BMGY (1% glycerol) 培養菌體 24 小時，置換成培養基 BMMY 並誘導 3 天，每天添加 0.5% 甲醇與取樣分析。長條圖為上清液之胞外標準化螢光度。摺線圖為胞內標準化螢光度。

Figure 24. The secretory or intracellular normalized fluorescence intensity in the Mxr1 reprogrammed transformants

After cultured in BMGY (1% glycerol), the cells was replaced in BMMY and induced by 0.5% methanol per day. Bar plots represent the normalized fluorescence intensity in supernatant. Line and scatter plots represent the intracellular normalized fluorescence intensity.

## 第四章 討論



### 一、額外表現 Mxr1 對 AOX1 啟動子轉錄活性的影響

在建構 *P. pastors* 轉形株時，常期望藉由提升目標基因的拷貝數，以得到目標蛋白質產量較高的轉形株，因此會花費許多財力、人力在篩選轉形株上。透過傳統的抗生素抗性篩選，或是新興的高通量篩選，也許可以得到目標基因拷貝數較高的轉形株，但其實不一定會有比較好的表現量。造成產量不如預期的一大原因是轉錄因子稀釋效應，在調控複雜的啟動子上，會具有許多轉錄因子的結合，必須當正確數量的轉錄因子與其結合，才能發揮最好的轉錄活性。同時，在細胞中的各個轉錄因子會受到嚴謹的調控，避免過多或過少而影響到細胞的生理反應，並且經由長年的演化，轉錄因子的表現量可能會剛剛好滿足細胞的需求，避免資源的浪費。因此，當太多的外源性 *AOX1* 啟動子被送入 *P. pastors* 中，很有可能會打破細胞內維妙的平衡，進而使轉錄因子無法活化所有的基因，除了使高拷貝數的策略不如預期外、甚至還會影響細胞本身的生理活性。

進一步比較在 *AOX1* 啟動子上轉錄因子的結合位，最多的 Mxr1 有 6 個結合位，而 Prm1 與 Mit1 則分別有 2 個與 5 個；在調控的基因數量上，Mxr1 遠超過 Prm1 與 Mit1，Mxr1 會影響大部分的甲醇代謝基因、過氧化體合成基因，甚至油酸、乙酸的代謝與利用胺基酸為碳源的能力都跟 Mxr1 有關，然而，Prm1 與 Mit1 只調控一部份的甲醇代謝基因，*AOX2* 便是一個不受 Prm1 與 Mit1 調控的甲醇代謝基因。因此，Mxr1 不足可能為高拷貝數菌株表現不如預期的主因

而本研究中使用的胞內性綠色螢光蛋白質生產轉形株，為帶有 9 個外源基因的高拷貝轉形株，雖然目標基因的數量高於 6 拷貝的轉形株，但是兩者在螢光強度上沒有明顯的差別，顯示 9 拷貝轉形株可能受限於 Mxr1 稀釋效應。相較於野生形菌株，該轉形株也會因為過多的外源性基因，而使甲醇代謝能力下降。因此透過 *AOX2* 啟動子生產額外的轉錄因子 Mxr1，可以在甲醇的誘導下使表現量上

升至原本的 60 倍，提升 *AOX1* 啟動子的轉錄活性，並改善甲醇代謝能力。此外，進一步增加外源性 *Mxr1* 的拷貝數，並沒有使 *AOX1* 啟動子的表現量更高，顯示 1 拷貝 *AOX2* 啟動子生產的 *Mxr1*，或許就能滿足 9 個外源性 *AOX1* 啟動子的需求。不過本研究的結果，仍無法找出 *Mxr1* 的表現量與外源性 *AOX1* 啟動子的數量之間的關係，應該要選用一個表現量更低的啟動子生產額外的 *Mxr1*，才可以看到改變 *Mxr1* 拷貝數的影響，並且搭配更多種拷貝數的外源性 *AOX1* 啟動子，方能全面性的探討此問題。

## 二、額外表現 *Mxr1* 對 *AOX1* 啟動子碳源控制性的影響

不同的嗜甲醇酵母菌的酒精氧化酶啟動子在碳源調控下的行為並不太一樣，*H. polymorpha* 的 *MOX* 啟動子在甘油受限時的轉錄活性，可以達到甲醇誘導的 60%；在同樣的情況下，*C. boidinii* 的 *AOD* 啟動子也可以達到甲醇誘導時的 30%；然而，*P. pastoris* 的 *AOX1* 啟動子卻只有 2% 的轉錄活性。過去的研究指出，碳源適應行為的差異主要與細胞內的調控機制有關，進一步比較各菌種的轉錄因子差異，*MXR1* 的同源基因在碳源調控下的表現量有明顯的不同。在 *H. polymorpha* 中，*MXR1* 的同源基因 *HPODL00650* 會受到甲醇的誘導，活化倍率可以高達 80 倍；在 *C. boidinii* 中，*MXR1* 的同源基因 *TRM2* 也會受到甲醇的誘導，但活化倍率只有 5 倍；最後，*P. pastoris* 的 *MXR1* 則是持續性表現。顯示酒精氧化酶啟動子在甘油受限的轉錄活性，可能與 *MXR1* 的活化程度有關。

由於 *HPODL00650* 同時是甲醇調控活化子，受甲醇誘導的活化機制可能是來自於自我正回饋控制。當甘油濃度逐漸降低，某些轉錄抑制子的表現量隨之降低，使細胞核中的 *HPODL00650* 有機會結合在自身的啟動子，促進自身的表現，逐漸累積的 *HPODL00650* 可打破轉錄抑制子與活化子之間的平衡，最終導致酒精氧化酶的表現。然而，在過去的研究中，並沒探討過在甘油受限的情況下，*H. polymorpha* 中 *HPODL00650* 的表現量，也沒有 *HPODL00650* 詳細機制的探討。因此，以上內容僅為本研究推測的機制。不過，在生物體中確實常透過轉錄活化



子的自我正回饋控制，讓細胞可以在兩種不同的狀態間轉換，並維持在某一邊。像是常見的伺機性感染真菌 *Candida albicans*，就可以藉由轉錄因子 Wor1 的正回饋迴路，而從 white cell 轉換成 opaque cell[43]。

本研究藉由 *AOX2* 啟動子生產額外的 Mxr1，賦與 *MXR1* 受甲醇的活化的能力，使 *AOX1* 啟動子在甘油受限的情況下，可持續表現出綠色螢光蛋白質。根據不同碳源時 mRNA 的分析結果，顯示此策略同時提升甲醇誘導與甘油受限時的 Mxr1 表現量。由於 Mxr1 是 *AOX2* 啟動子的轉錄活化子，以 *AOX2* 啟動子生產 Mxr1 可看作 Mxr1 的自我正回饋調控。隨著環境中的抑制性訊號逐漸下降時，Mxr1 的就有機會結合至 *AOX2* 啟動子，使 Mxr1 的表現量因正回饋迴路的啟動而逐漸上升，逐步的去抑制化 *AOX1* 啟動子，最終導致 *P. pastoris* 可以在沒有甲醇的情況下產生目標蛋白質。

### 三、甲醇調控機制之探討

#### 1. Nrg1 與甘油抑制之關係

在過去研究中，已知轉錄抑制子 Nrg1 在甘油與甲醇中的表現量並不一致，但不清楚詳細的機制。根據本研究中 mRNA 的分析結果，發現 Nrg1 表現量下降的主因可能是受到甲醇的抑制，而並非取決於甘油的有無。雖然在同時存在甲醇與甘油的條件下，本研究並沒有實驗探討 Nrg1 的表現量，但根據現有的結果，可推論 Nrg1 在此情況中會受到甲醇的抑制。然而，*AOX1* 啟動子的轉錄活性在同時存在甲醇與甘油時，仍會受到抑制，顯示表現量下降的 Nrg1 不足以讓 *AOX1* 啟動子去抑制化，*AOX1* 啟動子可能存在更複雜的轉錄調控。此外，Nrg1 的結合位只重疊 6 個 Mxr1 結合位中的 2 個，暗示有其它的轉錄抑制子存在，並且可競爭其它 4 個 Mxr1 結合位。綜合以上幾點，推論在 *P. pastoris* 中存在某轉錄抑制子，可受到甘油的調控並且會影響到 Mxr1 與 *AOX1* 啟動子的結合能力。因此，*AOX1* 啟動子的去抑制化可視為 Mxr1 與轉錄抑制子們(包含 Nrg1)之間的平衡，並且由於原生性 Mxr1 的表現量是固定的，所以 *AOX1* 啟動子轉錄活性的變化可

能主要來自轉錄抑制子們的影響。當環境中存在甲醇時，Nrg1 的表現量會受到抑制；環境中沒有甘油時，可能會有其它的轉錄抑制子的表現量降低。因此，必需同時達成以上兩種條件，Mxr1 才可以順利的結合至 6 個結合位，去抑制化以 *AOXI* 啟動子。在本研究中，透過額外增加的 Mxr1，打破 Mxr1 與轉錄抑制子們之間的平衡，進而達成幫助啟動子去抑制化的功效，呼應以上之假說，但詳細的機制仍需更進一步釐清。

## 2. Prm1 與氮源之關係

在過去探討 *P. pastoris* 基因表現量之研究主要在基礎培養基中進行[22, 23]，而本研究則是在氮源充足的營養培養基。此氮源差異可能是導致 Prm1 在不同碳源下的變化趨勢，本研究與過去研究不同的原因。在基礎培養基中，Prm1 會受到甲醇誘導；而在營養培養基，Prm1 則是在碳源為甘油時有最高的表現量，此差異或許能解釋氮源與 Prm1 對甲醇代謝影響的關聯。相較於基礎培養基，在氮源充足、甲醇為碳源時，Prm1 的低表現量暗示 Prm1 在此情況的重要性較低，進一步可能導致 *PRM1* 突變株的甲醇代謝缺陷較輕微[22]，不過確切的因果關係仍需進一步釐清。

## 四、無甲醇誘導系統發展的可能性

透過調控 Mxr1，有機會使 *P. pastoris* 發展成無甲醇誘導系統(methanol-free induction system)，但目前表現量仍不如預期，僅有控制組菌株以甲醇誘導的 40% 生產效率。根據不同碳源時 mRNA 的分析結果，或許能結合其它轉錄因子的調控，提升 *AOXI* 啟動子在甘油受限下的轉錄活性。

### 1. 在甘油受限時的 Nrg1 表現量

Nrg1 表現量下降的主因可能是來自甲醇的抑制，導致在甘油受限的情況下，過多的 Nrg1 可能會與 Mxr1 競爭，進而降低 *AOXI* 啟動子的轉錄活性。因此，

若是能在甘油受限時，降低 Nrg1 表現量或許可以提升 *AOXI* 啟動子的表現量。

*P. pastoris* 不具有 RNA 干擾的相關機制，缺乏一個有效的工具用於降低特定基因的表現。直接突變 *NRG1* 基因，雖然有助於提 *AOXI* 啟動子在甘油中的轉錄活性，但同時也會降低 *P. pastoris* 在甘油為碳源時的生長速率，並使 *AOXI* 啟動子失去調控性。因此，還需要發展一個條件式誘導降低 Nrg1 表現量的合成基因迴路。

## 2. Mit1 潛在的轉譯後調控

除了去抑制化外，甲醇誘導活化對於 *AOXI* 啟動子的轉錄活性也十分重要。因此在甘油受限下，可能是缺乏甲醇誘導的相關機制，而使表現量不如預期。然而，根據本研究中 mRNA 的分析結果，發現參與在甲醇活化的轉錄因子 Mit1，在甘油受限下的表現量與甲醇誘導時並沒有顯著差異，顯示 Mit1 表現量的變化主要是因為甘油的抑制，並非取決於甲醇的有無。因此，甲醇活化的訊號並不是藉由改變 Mit1 的表現量影響下游的 *AOXI* 啟動子，而是透過其它的機制影響。在過去研究也有發現類似的結果，相較於在 *H. polymorpha* 中的同源基因 Mpp1，Mit1 多出幾段冗餘的序列。若是在 Mpp1 突變 *P. pastoris* 回補 Mpp1 或是冗餘序列刪減的 Mit1，可以降低甘油對 *AOXI* 啟動子抑制性，顯示 Mit1 與 Mpp1 可能有不同的轉譯後調控機制。因此，若是能在 *P. pastoris* 表現序列刪減的 Mit1，以逃脫某些轉譯後調控，或許能在甘油受限下，增強 *AOXI* 啟動子的轉錄效率。

## 第五章 結論



*Pichia pastoris* 為一廣泛應用的異源蛋白質表達系統，但由於控過度嚴謹的 *AOX1* 啟動子，使 *P. pastoris* 無法有更好的發展性。雖然過去研究嘗試以合成生物學的策略改變 *AOX1* 啟動子的可調控性，但同時也會造成細胞生長缺陷、或是造成 *AOX1* 啟動子喪失其原本的優勢。因此本研究成功以轉錄因子再程序化的策略，透過 *AOX2* 啟動子生產額外的 Mxr1，在不會造成菌體生長缺陷的情況下，解決 Mxr1 稀釋效應的影響，並提升 *AOX1* 啟動子的轉錄活性，並賦與 *AOX1* 啟動子階段式轉換調控嚴謹度的能力，在甘油高於特定濃度時，*AOX1* 啟動子仍可以保持在關閉的狀態，但是當甘油降低至特定濃度後，*AOX1* 啟動子會因為正回饋迴圈的 Mxr1，而逐步降低碳源的抑制性，進而使 *P. pastoris* 不再需要以置換培養基，去除環境中殘留的抑制性碳源，同時使 *P. pastoris* 可以碳源受限誘導。總而言之，透過轉錄因子再程序化的策略，可以使 *P. pastoris* 更具應用性。

## 第六章 未來展望



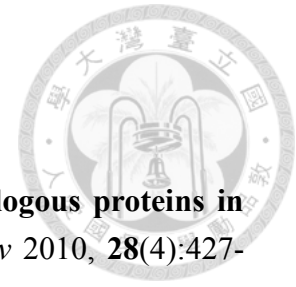
本研究藉由轉錄因子再程序化的策略，成功的改變 *P. pastoris* *AOX1* 啟動子的特性，但仍有許多詳細的機制值得探討。雖然 Mxr1 轉形株能以碳源受限誘導目標蛋白質的生產，但效率仍不及甲醇誘導。因此具有進一步提升的空間。最後，額外表現 Mxr1 可以提升 *AOX1* 啟動子的轉錄活性，但增加的異源蛋白質可能會受限於外泌速率，而不能提升胞外產物的表現量。顯示外泌速率為蛋白質生產的關鍵步驟之一。未來可以根據本研究的成果，進一步探討轉錄因子與蛋白質生產的關聯，以增進對嗜甲醇酵母菌的了解，並提升嗜甲醇酵母菌在醫藥用蛋白質領域的發展性，例如：

1. 了解 *H. polymorpha* 的 HPODL00650 在不同碳源的表現量，並確認是否存在 HPODL00650 的自我正回饋調控。進一步以蛋白質序列或啟動子序列的角度，比較 *H. polymorpha* 的 HPODL00650 與 *P. pastoris* 的 Mxr1 的差異，了解兩基因表現的差異是藉由何種機制而造成。以基因工程的策略，在 HPODL00650 突變的 *H. polymorpha* 回補 Mxr1，或是在 Mxr1 突變的 *P. pastoris* 回補 HPODL00650，觀察對甲醇代謝基因調控的影響。透過上述實驗了解 *H. polymorpha* 與 *P. pastoris* 碳源適應的差異，確實是與 Mxr1、HPODL00650 不同的表現形式有關，並增進對嗜甲醇酵母菌的了解。
2. 除了一個自我正回饋調控的 Mxr1，進一步增加更多合成生物學的基因迴路，以增進碳源受限的誘導效率。建立一個以 Mxr1 活化的 CRISPR 干擾技術[44]，受 Mxr1 誘導的 dCas9 可藉由 sgRNA 的導引，結合在 Nrg1 的啟動子或開放閱讀框架(Open reading frame)上，進而阻礙基因的轉錄，使 Nrg1 可以在碳源受限時降低表現量，進一步降低對 *AOX1* 啟動子的干擾。或是在 *P. pastoris* 表

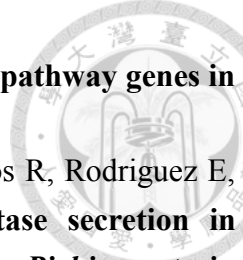
現序列刪減的 Mit1 或是 Mpp1，幫助 *P. pastoris* 逃脫某些甲醇調控機制。在碳源受限時，同樣會有甲醇活化的訊號以加強 *AOXI* 啟動子的轉錄活性。除了 *AOXI* 啟動子的轉錄活性外，碳源受限的饋料策略、培養基組成都需要進一步探討，以達到最高的生產效率。



## 第七章 參考文獻



1. Desai PN, Shrivastava N, Padh H: **Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression.** *Biotechnol Adv* 2010, **28**(4):427-435.
2. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR: **Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*.** *Mol Biotechnol* 2000, **16**(1):23-52.
3. Yurimoto H, Sakai Y: **Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*.** *Biotechnol Appl Biochem* 2009, **53**(Pt 2):85-92.
4. Gellissen G, Hollenberg CP: **Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review.** *Gene* 1997, **190**(1):87-97.
5. Gellissen G: **Heterologous protein production in methylotrophic yeasts.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **54**(6):741-750.
6. Damasceno LM HC, & Batt CA: **Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, **93**(1):31-39.
7. Prinz B ea: **Establishing a versatile fermentation and purification procedure for human proteins expressed in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* for structural genomics.** *Journal of Structural and Functional Genomics* 2004, **5**(1-2):29-44.
8. Wang J, Wang X, Shi L, Qi F, Zhang P, Zhang Y, Zhou X, Song Z, Cai M: **Methanol-Independent Protein Expression by *AOX1* Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*.** *Sci Rep* 2017, **7**:41850.
9. H RMP: **Expression systems for production of heterologous proteins.** *Current Science India* 2001, **80**(9):1121-1128.
10. RM B: **Yeast - a panacea for the structure-function analysis of membrane proteins?** *Curr Genet* 2001, **40**(3):157-171.
11. Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC: **Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*.** *Bio/technology* 1993, **11**(8):905-910.
12. Johnson N, Powis K, High S: **Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, **1833**(11):2403-2409.
13. Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ, Romanos MA: **The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic**

- 
- yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 1993, **136**(1-2):111-119.
14. Hartner FS, Glieder A: **Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts**. *Microb Cell Fact* 2006, **5**:39.
  15. Rodriguez L, Narciandi RE, Roca H, Cremata J, Montesinos R, Rodriguez E, Grillo JM, Muzio V, Herrera LS, Delgado JM: **Invertase secretion in *Hansenula polymorpha* under the *AOX1* promoter from *Pichia pastoris***. *Yeast* 1996, **12**(9):815-822.
  16. Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR: **Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris***. *Nucleic Acids Research* 1987, **15**(9):3859-3876.
  17. Lin-Cereghino GP, Godfrey L, de la Cruz BJ, Johnson S, Khuongsathiene S, Tolstorukov I, Yan M, Lin-Cereghino J, Veenhuis M, Subramani S *et al*: **Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris***. *Mol Cell Biol* 2006, **26**(3):883-897.
  18. Kranthi BV, Kumar R, Kumar NV, Rao DN, Rangarajan PN: **Identification of key DNA elements involved in promoter recognition by Mxr1p, a master regulator of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris***. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009, **1789**(6-8):460-468.
  19. Camara E, Landes N, Albiol J, Gasser B, Mattanovich D, Ferrer P: **Increased dosage of *AOX1* promoter-regulated expression cassettes leads to transcription attenuation of the methanol metabolism in *Pichia pastoris***. *Sci Rep* 2017, **7**:44302.
  20. Parua PK, Ryan PM, Trang K, Young ET: ***Pichia pastoris* 14-3-3 regulates transcriptional activity of the methanol inducible transcription factor Mxr1 by direct interaction**. *Molecular Microbiology* 2012, **85**(2):282-298.
  21. Sahu U, Rangarajan PN: **Methanol Expression Regulator 1 (Mxr1p) Is Essential for the Utilization of Amino Acids as the Sole Source of Carbon by the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris***. *The Journal of Biological Chemistry* 2016, **291**(39):20588-20601.
  22. Sahu U, Krishna Rao K, Rangarajan PN: **Trm1p, a Zn(II)(2)Cys(6)-type transcription factor, is essential for the transcriptional activation of genes of methanol utilization pathway, in *Pichia pastoris***. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, **451**(1):158-164.
  23. Wang X, Wang Q, Wang J, Bai P, Shi L, Shen W, Zhou M, Zhou X, Zhang Y, Cai M: **Mit1 Transcription Factor Mediates Methanol Signaling and Regulates the Alcohol Oxidase 1 (*AOX1*) Promoter in *Pichia pastoris***. *The Journal of Biological Chemistry* 2016, **291**(12):6245-6261.
  24. Sahu U, Rangarajan PN: **Regulation of Acetate Metabolism and Acetyl Co-a**



- Synthetase 1 (ACS1) Expression by Methanol Expression Regulator 1 (Mxr1p) in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biological Chemistry* 2016, **291**(7):3648-3657.**
25. Wang X, Cai M, Shi L, Wang Q, Zhu J, Wang J, Zhou M, Zhou X, Zhang Y: **PpNrg1 is a transcriptional repressor for glucose and glycerol repression of AOX1 promoter in methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 2016, **38**(2):291-298.**
26. Liang S, Wang B, Pan L, Ye Y, He M, Han S, Zheng S, Wang X, Lin Y: **Comprehensive structural annotation of *Pichia pastoris* transcriptome and the response to various carbon sources using deep paired-end RNA sequencing. *BMC Genomics* 2012, **13**:738.**
27. Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM: **Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol Bioeng* 2000, **70**(1):1-8.**
28. Sinha J, Plantz BA, Inan M, Meagher MM: **Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylophilic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnol Bioeng* 2005, **89**(1):102-112.**
29. Chiruvolu V, Cregg JM, Meagher MM: **Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 1997, **21**(4):277-283.**
30. Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ: **Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 1992, **8**(6):423-488.**
31. Stratton J, Chiruvolu V, Meagher M: **High cell-density fermentation. *Methods Mol Biol* 1998, **103**:107-120.**
32. Trinh LB, Phue JN, Shiloach J: **Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 2003, **82**(4):438-444.**
33. Jungo C, Marison I, von Stockar U: **Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *J Biotechnol* 2007, **128**(4):824-837.**
34. Jungo C, Schenk J, Pasquier M, Marison IW, von Stockar U: **A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2007, **131**(1):57-66.**
35. Zhang W, Inan M, Meagher MM: **Fermentation strategies for recombinant**

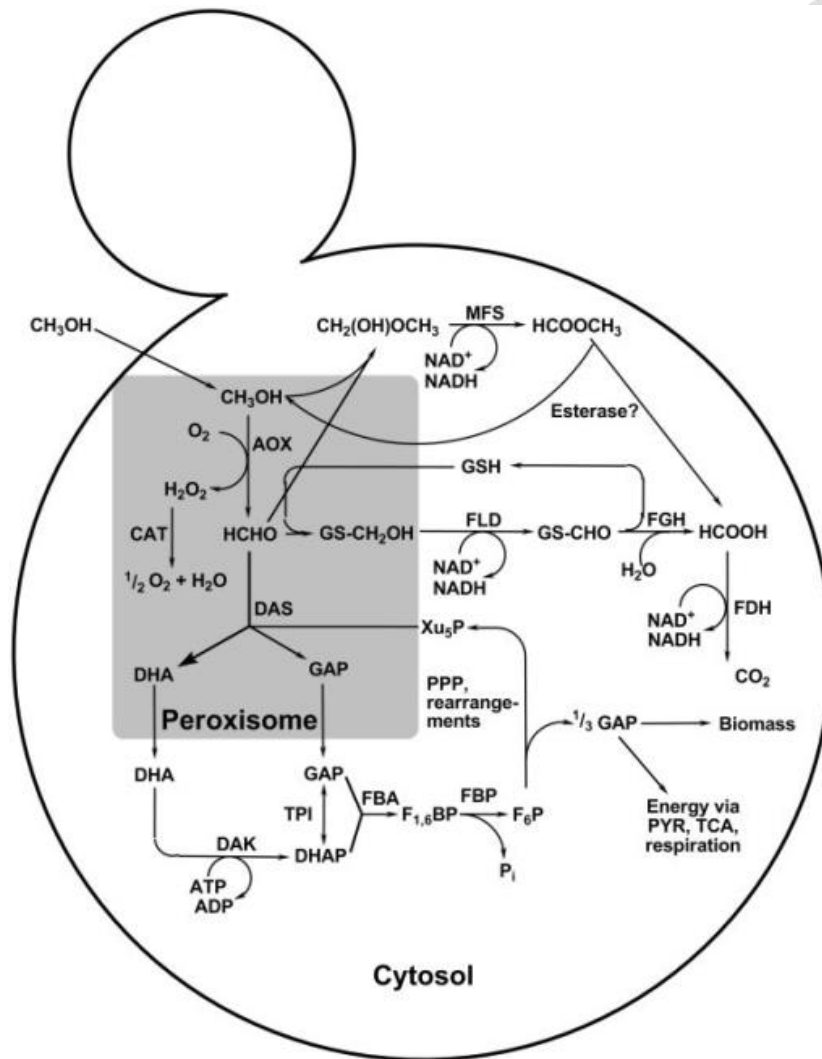
- protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2000, **5**(4):275-287.
36. Chen C-C, Wu P-H, Huang C-T, Cheng K-J: **A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase.** *Enzyme and Microbial Technology* 2004, **35**(4):315-320.
37. Zhang P, Zhang W, Zhou X, Bai P, Cregg JM, Zhang Y: **Catabolite repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**(18):6108-6118.
38. Polupanov AS, Nazarko VY, Sibirny AA: **Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression.** *Int J Biochem Cell Biol* 2012, **44**(11):1906-1918.
39. Shen W, Xue Y, Liu Y, Kong C, Wang X, Huang M, Cai M, Zhou X, Zhang Y, Zhou M: **A novel methanol-free *Pichia pastoris* system for recombinant protein expression.** *Microb Cell Fact* 2016, **15**(1):178.
40. Ravin NV, Eldarov MA, Kadnikov VV, Beletsky AV, Schneider J, Mardanova ES, Smekalova EM, Zvereva MI, Dontsova OA, Mardanov AV *et al*: **Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1.** *BMC Genomics* 2013, **14**:837.
41. Abad S, Kitz K, Hormann A, Schreiner U, Hartner FS, Glieder A: **Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*.** *Biotechnol J* 2010, **5**(4):413-420.
42. Huang Y, Chen Y, Mo D, Cong P, He Z: **Attenuated secretion of the thermostable xylanase xynB from *Pichia pastoris* using synthesized sequences optimized from the preferred codon usage in yeast.** *J Microbiol Biotechnol* 2012, **22**(3):316-325.
43. Zordan RE, Galgoczy DJ, Johnson AD: **Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(34):12807-12812.
44. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA: **Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression.** *Cell* 2013, **152**(5):1173-1183.
45. Nevalainen KM, Te'o VS, Bergquist PL: **Heterologous protein expression in filamentous fungi.** *Trends in Biotechnology* 2005, **23**(9):468-474.

Characteristics	Escherichia coli	Filamentous fungi	Yeast	Insect cells	Mammalian cells	Plant cell culture
Cell growth	Hours to days	Days to 1 week	Days to 1 week	Days to 1 week	Weeks	Months
Cost of growth medium	Low to medium	Low to medium	Low to medium	High	High	Medium to high
Expression level	Low to high	Low to high	Low to high	Low to high	Low to high	Low
Secretion capability	Secretion to periplasm	Secretion to medium	Secretion to medium	Secretion to medium	Secretion to medium	Secretion to medium
<b>Post-translational modifications</b>						
Protein folding	Refolding usually required	Refolding might be required	Refolding might be required	Proper folding	Proper folding	Proper folding
N-linked glycosylation	None	Mammalian-type core, no sialic acid, non-human sugars added	High mannose, no sialic acid, non-human sugars added	Complex, no sialic acid non-human sugars added	Complex, non-human sugars added, e.g. by murine cells	Complex, no sialic acid non-human sugars added
O-linked glycosylation, phosphorylation, acetylation, acylation	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes



附圖一、異源表達系統比較圖

Supplementary Figure 1. Salient characteristics of liquid culture-based expression systems used for the production of heterologous proteins [45]



附圖二、嗜甲醇酵母菌甲醇之利用途徑

Supplementary Figure 2. Methanol utilization pathway in methylotrophic yeast [14]