

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

以額外表達 *Hac1* 策略增強 *Komagataella phaffii*

(*Pichia pastoris*) 外泌效率

Enhancement of Secretory Efficiency by Additional

Expression of *Hac1* in *Komagataella phaffii* (*Pichia*

*pastoris*)

游鈞富

Chung-Fu Yu

指導教授：黃慶臻 博士

Advisor: Ching-Tsan Huang, Ph.D.

中華民國 110 年 8 月

August 2021



## 摘要



畢赤氏酵母菌 *Pichia pastoris* 為廣泛應用的異源蛋白質表達系統，兼具單一細胞與真核生物的特點，其優勢為生長快速、培養成本低廉並可進行高密度培養，且具有適當的轉譯後修飾及外泌重組蛋白質的能力。然而，*P. pastoris* 經誘導大量生產異源蛋白質時，往往會因為內質網的折疊效率不足，導致過多的未折疊蛋白質累積於內質網中，造成內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress)，且促使未折疊蛋白質反應 (unfolded protein response, UPR) 發生。位於內質網膜上的 Ire1 (inositol-requiring enzyme 1) 受內質網壓力影響，會活化自身的核酸內切酶活性，切除轉錄因子 *HAC1* mRNA 的內含子。藉此調控其下游基因，協助蛋白質折疊外泌；或促使蛋白質降解來舒緩內質網壓力。

本研究以 E2-Crimson 四聚體紅色螢光蛋白質作為模式蛋白質，發現甲醇誘導 27 小時後，額外表現轉錄因子 Hac1 之菌株其 *HAC1* 基因 mRNA 相對表現量提升了 14.8 倍。觀察螢光量發現，額外表現 Hac1 使 E2-Crimson 的外泌量提升了 1.6 倍。UPR 之相關基因 *KAR2* 的 mRNA 相對表現量提升，為 1.45 倍；內質網相關蛋白質降解途徑 (ER-associated protein degradation) 之相關基因 *HRD1* 及 *UBC1* 的 mRNA 相對表現量則降低，分別為 0.64 倍及 0.47 倍。進一步將此策略應用於諾羅病毒 P 蛋白質的外泌生產。P 粒子 (P particle) 是由諾羅病毒衣殼蛋白質中的突出區 (protruding domain) 組成，可用於生產類病毒顆粒疫苗；具有多抗原呈現的功能，可作為疫苗發展平台。本實驗室在前人 *P. pastoris* 胞內表現諾羅病毒 P 蛋白質的基礎下，已成功地將諾羅病毒 P 蛋白質外泌至胞外。本研究希望藉由額外表現轉錄因子 Hac1 的方式提升諾羅病毒 P 蛋白質之外泌效果，讓其於回收及純化上更有效率，增加 *P. pastoris* 表現系統的

應用性。目前已成功證實額外表現 Hac1 可提升以 *P. pastoris* 生產諾羅病毒 P 蛋白質的外泌效率。



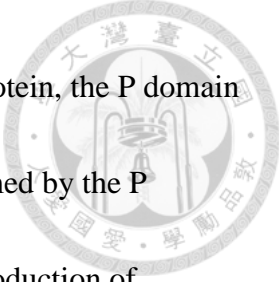
關鍵字：*Pichia pastoris*、外泌、Hac1、異源蛋白質生產、未摺疊蛋白質

## Abstract



*Pichia pastoris* is a widely used heterologous expression system that combines the advantages of single cell and eukaryotes, including rapid growth, low cost, and high-density culture. Moreover, it has the ability of post-translational modification and target protein secretion. However, the secretory efficiency would be affected by unfolded proteins accumulated in the endoplasmic reticulum (ER), so called ER stress, during methanol induction. ER stress activates the endonuclease activity of inositol-requiring enzyme-1 (Ire1) removing the intron of *HAC1* mRNA. Consequently, Hac1, a transcription factor, regulates unfolded protein response (UPR) downstream gene and leads to UPR.

In this study, the secretory efficiency of E2-Crimson, a tetrameric red fluorescent protein, was enhanced by additional expression of Hac1. *HAC1* relative mRNA level elevated 14.8-fold in Hac1-overexpressing strain after 27 h of methanol induction. According to the fluorescence intensity, the extracellular E2-Crimson elevated 1.6-fold by additional expression of Hac1, compared to the control group. The relative mRNA level of *KAR2*, UPR related gene, was upregulated 1.45-fold. By contrast, the relative mRNA level of *HRD1* and *UBC1*, ER-associated protein degradation (ERAD) related genes, were downregulated 0.64-fold and 0.47-fold, respectively. The same strategy was



applied to enhance the production of the extracellular Norovirus P protein, the P domain of Norovirus capsid protein expressed in *P. pastoris*. P particles, formed by the P protein, is promising in development multiple potent vaccine. The production of extracellular P protein has been achieved based on the previous result of intracellular P protein by *P. pastoris*. The concentration of extracellular P protein reached up to 1.6 folds, compared to that without additional expression of Hac1. Both results of E2-Crimson and P protein indicate that the secretory efficiency of target protein produced by *P. pastoris* is enhanced by additional expression of Hac1.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, Secretion, Hac1, Heterologous protein production, Unfolded protein response

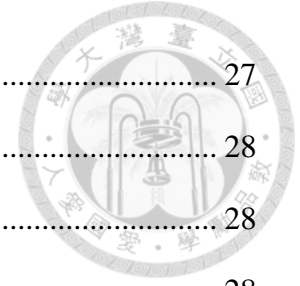
## 目錄



摘要 .....	I
Abstract.....	III
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	IX
第一章 前言 .....	1
一、 異源蛋白質表現系統.....	1
二、 <i>Pichia pastoris</i> 表現系統.....	2
1. <i>Pichia pastoris</i> 被重新分類成 <i>Komagataella phaffii</i> .....	2
2. 表現強力且可受甲醇調控的 $P_{AOX1}$ 啟動子 .....	3
3. 真核表現系統的優勢 .....	3
4. 蛋白質外泌系統.....	4
三、 提升 $P_{AOX1}$ 表現強度的轉錄調控策略 .....	5
四、 <i>P. pastoris</i> 表現系統之外泌瓶頸.....	6
1. 未摺疊蛋白質反應 .....	6
2. 內質網相關蛋白質降解 .....	7
五、 提升外泌效率的策略.....	8
1. 額外表現蛋白質摺疊相關基因 .....	8
2. 外泌訊號序列 .....	9
3. 調整誘導溫度 .....	9
六、 諾羅病毒 P 蛋白質.....	10
1. 諾羅病毒.....	10



2. 類病毒顆粒疫苗 .....	10
3. 多抗原呈現平台 .....	11
七、 研究動機 .....	12
1. 研究策略 .....	14
2. 研究目標 .....	15
第二章 材料與方法 .....	16
一、 實驗菌株與培養條件 .....	16
1. 細菌 .....	16
2. 真菌 .....	16
3. 菌株保存 .....	16
二、 培養基 .....	16
三、 表現載體建構 .....	19
四、 嗜甲醇酵母菌電穿孔轉形 .....	22
1. <i>P. pastoris</i> 勝任細胞製備 .....	22
2. 電穿孔轉形 .....	22
五、 轉型株之抗性篩選 .....	23
六、 <i>Pichia pastoris</i> 轉形株培養與分析 .....	23
1. 96 深孔盤誘導 .....	23
2. 搖瓶誘導 .....	23
3. 醱酵槽生產 .....	24
七、 mRNA 表現量分析 .....	25
八、 蛋白質分析 .....	27
1. 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) .....	27



2. 西方墨點法 .....	27
3. 螢光強度分析 .....	28
4. Bradford 蛋白質定量法 .....	28
5. 酵素結合免疫吸附分析法 .....	28
第三章 結果 .....	32
一、 取得 <i>HAC1</i> 基因編碼序列 .....	32
二、 額外表現 <i>Hac1</i> 對外泌 E2-Crimson 菌株的影響 .....	34
三、 額外表現 <i>Hac1</i> 提升諾羅病毒 P 蛋白質之外泌產量 .....	42
四、 使用醱酵槽大量生產諾羅病毒 P 蛋白質 .....	48
第四章 討論 .....	54
一、 <i>P. pastoris</i> 表現系統外泌效率之瓶頸 .....	54
二、 額外表現 <i>Hac1</i> 之菌株面對內質網壓力時的反應 .....	55
三、 額外表現 <i>Hac1</i> 對菌株外泌目標蛋白質之影響 .....	57
第五章 結論 .....	59
第六章 未來展望 .....	60
第七章 參考文獻 .....	62



## 圖目錄



圖一、本論文之研究架構圖 .....	15
圖二、本論文建構之表現載體圖 .....	20
圖三、瓊脂糖凝膠電泳分析剪切後的 <i>HAC1</i> 基因 .....	33
圖四、 <i>P. pastoris</i> KM71、 $\alpha$ E 及 $\alpha$ EH 上清液螢光量分析 .....	37
圖五、外泌 E2-Crimson 之菌株於誘導過程之濁度變化.....	38
圖六、誘導螢光蛋白質上清液之聚丙烯醯胺膠體電泳比較 .....	39
圖七、 $\alpha$ E 及 $\alpha$ EH 誘導後 <i>HAC1</i> 基因 mRNA 相對表現量分析 .....	40
圖八、 $\alpha$ E 與 $\alpha$ EH 誘導第 3 天之 mRNA 相對表現量分析 .....	41
圖九、以 YPDH 固態培養基初步篩選額外表現 <i>Hac1</i> 之 $\alpha$ P 菌株 .....	44
圖十、搖瓶誘導外泌諾羅病毒 P 蛋白質之菌株於誘導過程之濁度變化.....	45
圖十一、搖瓶誘導諾羅病毒 P 蛋白質上清液之分析 .....	46
圖十二、KM71、 $\alpha$ E 及 $\alpha$ EH 上清液酵素結合免疫吸附法分析 .....	47
圖十三、以菌株 $\alpha$ PH 進行胞外生產諾羅病毒 P 蛋白質之醱酵參數圖.....	50
圖十四、醱酵槽生產 P 蛋白質之聚丙烯醯胺膠體電泳及西方墨點法分析 .....	51
圖十五、 $\alpha$ P 及 $\alpha$ PH 醱酵槽生產諾羅病毒 P 蛋白質之聚丙烯醯胺電泳分析 ....	52
圖十六、醱酵槽誘導外泌諾羅病毒 P 蛋白質之菌株於誘導過程的濁度變化.....	53

## 表目錄



表一、建構表現載體預定序之引子序列 .....	21
表二、即時定量聚合酶鏈鎖反應之引子序列 .....	26
表三、蛋白質分析試劑成分 .....	30
表四、螢光蛋白質外泌量 .....	37
表五、96 孔盤誘導篩選 .....	44
表六、諾羅病毒 P 蛋白質外泌量 .....	47
表七、本研究與前人研究結果比較 .....	56

## 第一章 前言



生物技術往往與製藥、醫療、材料及農業等許多不同領域結合應用。隨著分子生物學的快速發展，基因轉殖已是廣泛使用的生物技術，其中最廣為人知的例子為將胰島素基因轉入大腸桿菌後以大腸桿菌生產胰島素，解決傳統胰島素從牛、豬胰臟萃取，產量稀少且品質不穩定的缺點。利用異源表現系統生產重組蛋白質時，醱酵製程的研發是重要的一環，而 *Pichia pastoris* 異源表現系統即為一種適合高密度培養醱酵的重組蛋白質表現系統。於工業生產階段，以外泌的方式生產重組蛋白質，有助於目標蛋白質的回收及純化，可減少成本且利於商業應用。

### 一、異源蛋白質表現系統

異源表現 (heterologous expression) 是指將完整基因或一部分基因，透過重組 DNA 的技術插入其他不具有該基因的宿主細胞中，藉由宿主轉錄、轉譯出異源蛋白質，這些被應用於異源蛋白質表現的宿主稱為表現系統 (expression system)[1]。相較於由天然物提取目標蛋白質，使用異源蛋白質表現系統具有成本低廉、生產快速及程序簡易等優勢。隨著基因工程技術的成熟，異源蛋白質表現系統被廣泛應用於學術研究、生技醫療、農業及工業等領域。常見的異源蛋白質表現系統有細菌、酵母菌、昆蟲細胞、植物細胞及哺乳動物細胞等，每種系統都有各自的優缺點（附表一），可以根據欲表現之目標蛋白質的特性選擇[2]。其中，酵母菌異源蛋白質表現系統有兩項特色：(1) 酵母菌為單細胞微生物，相較於複雜的多細胞真核生物表現系統有生長快速、培養基簡單、生產成本低廉等優

勢；(2) 酵母菌屬於真核生物，因此相較於原核生物表現系統具備轉譯後修飾的能力，可用於生產結構較複雜的目標蛋白質。在本研究中所使用的 *Pichia pastoris* 即為酵母菌異源蛋白質表現系統[3]。




## 二、*Pichia pastoris* 表現系統

*P. pastoris* 為一種嗜甲醇酵母菌 (Methylotrophic yeast)，能於以甲醇為唯一碳源的環境中生長。如附圖一所示，其過氧化小體 (peroxisome) 中的酒精氧化酶 (Alcohol oxidase, AOX, EC 1.1.3.13) 可將甲醇代謝為甲醛，甲醛則可經由不同代謝路徑，如異化作用 (Dissimilation) 或是同化作用 (Assimilation)，產生能量或是形成生物質 (Biomass)[3-6]。近年來 *P. pastoris* 表現系統被廣泛應用於眾多工業酵素及生醫蛋白的大量生產，是熱門的異源蛋白質表現系統之一。

### 1. *Pichia pastoris* 被重新分類成 *Komagataella phaffii*

1920 年法國真菌及細胞學家 Alexandre Guilliermond 於栗樹 (chestnut tree) 的分泌物中發現 *P. pastoris*，並命名為 *Zygosaccharomyces pastori*[7]。後來 Herman Phaff 於 1950 年代時，自美國加州的橡木 (oak) 陸續分離相關菌株並將其與先前的 *Zygosaccharomyces pastori* 重新命名為 *P. pastoris*[8]。在 1980 年代發現 *P. pastoris* 具有能代謝甲醇並以甲醇作為唯一碳源的特殊能力[9]，之後被 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA, USA) 開發為商業化的嗜甲醇酵母菌表現系統 *Pichia pastoris* Expression Kit。*P. pastoris* 在 1995 年依據核糖體基因序列 (ribosomal gene sequence) 重新被分類為 *Komagataella* 屬[10]，*Komagataella* 屬中的不同物種非常相似，難以用常見的醱酵方式及同化試驗 (assimilation tests)



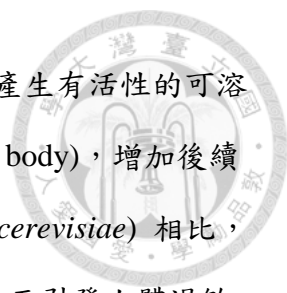
來區分[11]，根據 rRNA (ribosomal RNA) 的大次單元 (large subunit, LSU)、轉譯因子 eEF1 $\alpha$  及 RNA 聚合酶次單元 I 等基因之基因序列，從 *Komagataella* 屬分類出 *K. kurtzmanii*, *K. pastoris*, *K. phaffii*, *K. populi*, *K. pseudopastoris* 及 *K. ulmi*[12]。而 Invitrogen 公司的 *Pichia pastoris* Expression Kit 中所使用的菌株被重新歸類為 *K. phaffii*，但至今 Invitrogen 公司仍以 *P. pastoris* 命名之，因此本研究亦採用其較廣為人知的名稱——*P. pastoris*。

## 2. 表現強力且可受甲醇調控的 P<sub>AOX1</sub> 啟動子

*P. pastoris* 之所以具備代謝甲醇的能力，係因為 *P. pastoris* 有 *AOX1* 及 *AOX2* 兩基因編碼酒精氧化酶 (alcohol oxidases)。由甲醇代謝路徑圖可知 (附圖一)，酒精氧化酶為代謝甲醇的關鍵酵素，但其代謝甲醇的效率不佳，所以 *P. pastoris* 需大量表現該酵素。而 *AOX1* 的啟動子 (P<sub>AOX1</sub>) 表現強度遠高於 *AOX2* 的啟動子，因此 *AOX1* 提供了大部分的酒精氧化酶活性，在以甲醇為唯一碳源時，*AOX1* mRNA 的總量可達細胞內 mRNA 總量的 5%，且蛋白質量可達總可溶蛋白質的 30%[3-6]。當在環境中存在葡萄糖、甘油或乙醇等其它碳源時，*P. pastoris* 會優先利用這些碳源，酒精氧化酶的表現會受到抑制[3]。綜合這些特色可知，P<sub>AOX1</sub> 是一個可受甲醇誘導大量表現，且調控嚴謹的啟動子，因此大部分使用 *P. pastoris* 作為異源蛋白質表現系統的研究及應用中，會以 P<sub>AOX1</sub> 表現目標蛋白質。

## 3. 真核表現系統的優勢

*P. pastoris* 為真核生物，具有醣基化、磷酸化及形成雙硫鍵等轉譯後修飾的能力，相較於原核生物如大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 表現系統，更適合用於生產



真核生物的異源蛋白質。此外，以 *P. pastoris* 表現蛋白質時可產生有活性的可溶蛋白質，不像許多細菌表現系統會在胞內產生內含體 (inclusion body)，增加後續處理成本[4]。與同為真核微生物的釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 相比，*P. pastoris* 的醣基化修飾較為適當，不易造成蛋白質過度醣基化而引發人體過敏反應[13]，因此更適合作為生產醫藥用蛋白質的表現系統[14]。

#### 4. 蛋白質外泌系統

真核細胞在轉譯出蛋白質時，會藉由辨識其 N 端之訊號胜肽，引導該蛋白質到特定的胞器或是經由外泌途徑將其送出細胞。而使用 *P. pastoris* 表現系統外泌生產異源蛋白質時，經常採用在目標蛋白質 N 端加上  $\alpha$  因子的 pre-pro 區域作為訊號胜肽的方式，使目標蛋白被分泌至細胞外。 $\alpha$  因子是來自 *S. cerevisiae* 的交配信息素 (mating pheromone)，如附圖二，*S. cerevisiae* 進行有性生殖時，會將  $\alpha$  因子釋放至環境中，這個分泌蛋白質的過程被應用在以 *P. pastoris* 生產外泌蛋白質。常見的做法是將  $\alpha$  因子前面的 pre-pro 序列結合在目標基因 5' 端，使目標蛋白質被轉譯出 N 端時帶有 pre-pro 外泌訊號胜肽。pre 部分可引導蛋白質進入內質網後被切除，pro 部分則會在蛋白質經適度摺疊，再引導至高基氏體後被 Kex 蛋白質內切酶切除，而 Ste13 蛋白酶則會將外泌訊號胜肽剩餘的 EAEA 部分切除，正確摺疊的蛋白質就會被送出細胞外[15-18]。Invitrogen 公司的商業蛋白質外泌載體如 pPICZ $\alpha$  等，亦使用來自  $\alpha$  因子的 pre-pro 外泌訊號胜肽[19, 20]。由於 *P. pastoris* 內源性的外泌蛋白質很少[4, 5]，因此若能有效地外泌目標蛋白質，則可提高後續純化及回收蛋白質的效率，使 *P. pastoris* 表現系統在工業應用及生產上更便利。



### 三、提升 $P_{AOXI}$ 表現強度的轉錄調控策略

$P_{AOXI}$  是一個調控嚴謹的啟動子，只要培養基存在微量抑制性碳源，如葡萄糖、甘油及乙醇等，就會使甲醇誘導時  $P_{AOXI}$  的表現效率降低，影響目標蛋白質產量[3]。過去使用 *P. pastoris* 表現系統時大多以有毒性且易燃的甲醇作為唯一碳源進行目標異源蛋白質誘導。然而，甲醇代謝後會產生毒性更高的甲醛及過氧化氫，因此甲醇誘導時若添加量過多則會對細胞造成傷害[21]。當這些毒性物質超出細胞代謝的上限累積在細胞內，就會導致菌體死亡，使胞內的蛋白水解酶釋出，分解目標蛋白質影響產量[22]。此外， $P_{AOXI}$  的啟動過程可分為去抑制化與甲醇活化兩個階段，methanol expression regulator 1 (Mxr1) 為參與其中的轉錄因子，能夠提升其轉錄活性[23]。過去在 *P. pastoris* 表現系統的研究及應用中，經常以強力且可受甲醇誘導調控的  $P_{AOXI}$  來表現目標蛋白質，然而這樣卻可能造成菌體染色體中的 Mxr1 結合位增加，細胞內生的活化子 Mxr1 相對不足，引發稀釋效應，使得細胞代謝甲醇及  $P_{AOXI}$  的表現效率受到影響[24]。

為了解決  $P_{AOXI}$  特性所造成的限制，實驗室前人張景翔利用額外表現 Mxr1 的方式，在菌株中建立 Mxr1 的自我正回饋控制迴路 (positive autoregulation circuit)，使細胞內的 Mxr1 增加，解決 Mxr1 的稀釋效應，進而提升  $P_{AOXI}$  轉錄目標基因的效率[25]。此外，研究中發現這個策略讓調控嚴謹的  $P_{AOXI}$  即使在其他碳源存在的情況下也能表現出目標蛋白質，改善  $P_{AOXI}$  過度嚴謹的特性，提供了 *P. pastoris* 甘油誘導製程開發的可能性。




#### 四、*P. pastoris* 表現系統之外泌瓶頸

額外表現活化子 Mxr1 的策略已證實可提升  $P_{AOXI}$  的轉錄效率，提升胞內目標蛋白質的產量，但此策略應用於生產外泌目標蛋白質時，卻無法確保提升外泌蛋白質產量。外泌系統是 *P. pastoris* 表現系統的優勢之一，以外泌的方式生產目標蛋白質可以減少後續蛋白質回收及純化的繁瑣步驟。然而，由於細胞對於蛋白質嚴格的品質控制 (quality control) 系統，蛋白質需經正確摺疊及轉譯後修飾後才能順利輸送至胞外[26-28]。因此當細胞大量表現外泌蛋白質時，容易導致未摺疊或錯誤摺疊蛋白質累積於胞內無法順利外泌，使 *P. pastoris* 表現系統的外泌生產效率低落[29-31]。未摺疊蛋白質反應 (unfolded protein response, UPR) 跟內質網相關蛋白質降解 (ER-associated protein degradation, ERAD) 是控制蛋白質品質的兩種重要反應，對於蛋白質的外泌及維持內質網的穩定有深遠的影響[32]。

##### 1. 未摺疊蛋白質反應

當大量表現目標蛋白質時，容易使得未摺疊或是錯誤摺疊的蛋白質累積於內質網，造成細胞的內質網壓力 (ER stress)，引起未摺疊蛋白質反應，並透過此反應協助細胞處理過多蛋白質累積所形成的壓力。哺乳動物具有三種未折疊蛋白質反應的調控路徑，分別透過三種內質網膜上的穿膜受器來傳遞訊號：activating transcription factor 6 (ATF6)、double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-liked endoplasmic reticulum kinase (PERK) 及 inositol requiring enzyme 1 (IRE1)[33, 34]。相較於哺乳動物，酵母菌之未折疊蛋白質反應已知僅有一種訊息傳遞鏈，係透過嵌於內質網膜上的酵素 Ire1 感應壓力內質網壓力並活化下游路徑[35-37]。






如附圖三，在沒有內質網壓力的情況下，分子伴護蛋白 Kar2/BiP 會與 Ire1 結合；當感應到未摺疊蛋白質在內質網累積時，Kar2/BiP 便會離開 Ire1 以協助蛋白質進行正確摺疊，並藉此調控 Ire1 的活化與非活化狀態[38-41]。Ire1 會進行低聚合作用 (oligomerization)，利用自身 Serine/Threonine kinase 的活性進行自體磷酸化 (trans-autophosphorylation) 並活化位於其 C 端的核糖核酸內切酶結構域 (endoribonuclease domain)[42-45]。HAC1 基因為未摺疊蛋白質反應相關基因之轉錄因子，由於其未成熟 mRNA 之內含子會形成二級結構並阻礙其轉譯，須藉由活化的 Ire1 切除其內含子排除立體障礙，才能表現出具有功能的蛋白質 Hac1[46-49]。P. pastoris 之 HAC1 基因長度為 1237 bp，剪切位點為鹼基 852 及鹼基 1174，因此去除內含子 322 個核苷酸後 HAC1 長度為 915 bp。Hac1 由 305 個胺基酸組成[50]，會進入細胞核並結合於啟動子之未摺疊蛋白質反應元件 (unfolded protein response element, UPRE)，活化下游相關基因表現[47, 48, 51]。

在過去對 *S. cerevisiae* 的研究中，以 DNA 微陣列 (DNA microarray) 發現共有 381 種開放閱讀框 (open reading frame, ORF) 會受到 Ire1/Hac1 的調控而提升表現，其中 208 種是已知相關功能的基因。這些下游基因主要與蛋白質的外泌路徑有關，包含協助蛋白質的摺疊、運輸、修飾及降解等[52]，由此可知當酵母菌累積過多蛋白質於內質網時，會透過未摺疊蛋白質反應提升外泌效率，或將無法外泌及摺疊錯誤的蛋白質降解，藉此降低細胞的內質網壓力。

## 2. 內質網相關蛋白質降解

ERAD 與 UPR 會共同處理內質網中的錯誤摺疊蛋白質及未摺疊蛋白質，二者被視為細胞維持內質網恆定性 (homeostasis) 的兩個重要機制。當未摺疊及錯誤摺疊蛋白質不斷累積，除了會造成內質網壓力外，更可能造成細胞毒性導致菌



體死亡。為了解決超出外泌系統負荷的蛋白質，細胞會辨識錯誤折疊之蛋白質進行逆轉位 (retro-translocation)，使蛋白質由內質網回到細胞質中，並進入泛素-蛋白酶體系統 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 進行降解，這中間具有複雜的合作關係，詳細相互調控機制目前尚未研究透徹[32]。

## 五、提升外泌效率的策略

### 1. 額外表現蛋白質摺疊相關基因

過去研究中顯示，共同表現與蛋白質摺疊相關之基因可以提升目標蛋白質的外泌，而這些基因大多為 UPR 下游調控之基因。例如共同表現 binding immunoglobulin protein (BiP) 或 protein disulfide isomerase (PDI) 等蛋白質[53, 54]，這些蛋白質為內質網常駐蛋白質 (ER resident protein)，與維持內質網功能——正確摺疊蛋白質，關係密切[55-58]。BiP 被歸類在 Hsp 70 蛋白質家族，屬於熱休克蛋白質，其功能與蛋白質摺疊與轉位 (translocation) 機制有關，作為伴護蛋白 (chaperone)，BiP 會結合至疏水性胺基酸區域，避免未成熟之蛋白質與其他未成熟或錯誤折疊之蛋白質相互聚集[59, 60]。PDI 則是真核生物重要的 thioredoxin 超家族 (superfamily) 蛋白質，可以催化雙硫鍵的氧化、還原及異構化[61]，不過一些研究中指出，額外表現 PDI 無法幫助不含雙硫鍵的目標蛋白質提升外泌[53]。



## 2. 外泌訊號序列

除了上述策略外，另一種提升外泌效率策略則是針對外泌訊號序列進行優化。*P. pastoris* 表現系統多以 *S. cerevisiae* 之  $\alpha$  因子作為外泌的訊號序列，不過有人指出這段  $\alpha$  因子的序列容易引發轉譯後轉位 (posttranslational translocation)，即蛋白質在細胞質中完成轉譯並進行摺疊，這會導致蛋白質立體結構過大無法順利進入內質網[62, 63]，因此外泌訊號的優化也是幫助外泌效率提升的一種方式。例如對  $\alpha$  因子進行點突變[64]，或是以 *S. cerevisiae* 寡糖轉移酶 (oligosaccharyltransferase) 次單元的基因 *OST1* 之訊號序列取代部分  $\alpha$  因子[65, 66]，都被證實可以促進蛋白質以共轉譯轉位 (cotranslational translocation) 的方式進入內質網，進而提升外泌效率。

## 3. 調整誘導溫度

有些研究發現，將培養溫度從 30°C 降低至 20-25°C 可以提高酵母菌的蛋白質產量[67-70]。儘管低溫培養會導致目標蛋白質 mRNA 轉錄量下降，也會減緩細胞代謝並減少摺疊相關基因/蛋白質的表現 (hsp70 家族、內質網膜蛋白等)，但整體而言卻可增加外泌目標蛋白質的產量。這主要是因為較低的培養溫度會減慢生長速度，降低細胞轉錄活性，並減輕內質網壓力進而提高異源蛋白質正確摺疊的比率[71]。不過調降溫度提升外泌效率並非適用於所有情形，例如生產嗜熱酶 (hyperthermophilic enzyme) 時發現，將溫度提高為 40°C 反而可以提升產量[72]。因此誘導的最適溫度應視欲生產之目標蛋白質特性而定。



## 六、諾羅病毒 P 蛋白質

諾羅病毒 (Norovirus) 除了會造成食源性 (food-borne) 疾病外，也可應用在疫苗平台的開發。諾羅病毒根據基因序列分成七種基因組 (genogroups)，再根據病毒衣殼 (VP1) 及 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 細分成不同基因型 (genotypes)[73]，全球最廣為流行及研究的人類諾羅病毒為 genogroup II.4 (GII.4)[74]。實驗室前人陳昱伶以分離自台灣本土之 GI.4 型諾羅病毒的病毒株為出發點，使用 *P. pastoris* 表現系統生產其 P 蛋白質，為首篇以酵母菌大量胞內生產諾羅病毒 P 蛋白質及無標籤簡易純化之研究[75]。

### 1. 諾羅病毒

諾羅病毒為杯狀病毒科 (*Caliciviridae*)、諾羅病毒屬 (*Norovirus*)。1968 年諾羅病毒首次爆發於美國俄亥俄州諾沃克 (Norwalk, Ohio) 並以此命名[76]。諾羅病毒疫情通常發生在人口密度高的地方，如學校、醫院、游泳池、遊艇或軍營等，主要感染途徑為糞口傳染，可經由人與人直接傳染，或經由受污染的食物和水間接傳染[77]。全球每年約有 6.84 億人口感染諾羅病毒[78]，其症狀主要為噁心、嘔吐、腹瀉及腹絞痛，也可能引發發燒、倦怠、頭痛及肌肉痠痛等，症狀通常會持續 12-60 小時因個人免疫力而異[79]。

### 2. 類病毒顆粒疫苗

類病毒顆粒 (VLP, virus-like particle) 於 1968 年首次於感染 B 型肝炎的病患血漿中純化出來[80, 81]。類病毒顆粒是由多個次單元 (subunits) 蛋白質組合而成，可自我組裝成與病毒相似的 3D 結構，能誘發免疫反應。類病毒顆粒缺乏病

毒的遺傳物質，相較於傳統疫苗需培養病原菌須先去活或減毒後再呈現至人體刺激免疫系統反應產生抗體，類病毒顆粒疫苗較無安全疑慮[82, 83]。目前許多諾羅病毒疫苗，主要以諾羅病毒類病毒顆粒為基礎，搭配不同的給藥途徑及不同的佐劑發展諾羅病毒疫苗[84]。

諾羅病毒顆粒由 90 個 VP1 二聚體構成，VP1 為其主要結構蛋白，分為兩種區域：殼區 (shell domains) 與突出區 (protruding domains)，兩區域以一個短鉸鍊 (hinge) 連接，位於病毒顆粒頂部之 P domain 能與宿主之受器或輔助受器結合，進而進入宿主細胞感染宿主[85]。過去在諾羅病毒患者的糞便中可觀察到約 30 kDa 之大量可溶蛋白質[86]，經證實為病毒外鞘蛋白質 P domain[87]。研究顯示，這些由 P 蛋白質形成的 P 粒子能被樹突細胞抗原呈現，且引起之體液免疫反應和細胞免疫反應與完整的類病毒顆粒一樣[88]。

### 3. 多抗原呈現平台

類病毒顆粒除了疫苗用途，亦被進一步發展為抗原呈現平台。相較於化學耦合 (chemical conjugation) 黏合目標抗原，以基因融合的方式於類病毒顆粒嵌入目標抗原為目前最常見的方式，因為以相同結構呈現目標抗原有利於製造生產與品質控管[89]。諾羅病毒病毒株 GII.4 型相較於其他病毒株，其 P 蛋白質頂端具有三個環狀結構，經證實皆適合嵌入外來抗原[90]。目前研究指出，外來的胜肽片段抗原，不論被嵌入在 P 蛋白質的單一環狀結構[90-92]或是同時嵌入三個環狀結構[93-95]皆不影響 P 粒子形成。目前以 P 粒子為基礎發展出且已進入臨床動物實驗的雙效疫苗包括諾羅病毒/輪狀病毒[90]及諾羅病毒/流感病毒[92]。




## 七、研究動機

*P. pastoris* 為單細胞微生物，具備生長快速、培養成本低廉的特性，兼具真核生物表現系統的轉譯後修飾的能力，並且能夠將蛋白質外泌，是極具發展潛力的異源蛋白質表現系統。過去研究中，「提升 *P. pastoris* 生產異源蛋白質的效率」之研究主題，大致可以區分成兩類：(1) 提升啟動子表現強度 (2) 提升外泌效率，本實驗室過去從轉錄調控策略著手，成功提高  $P_{AOXI}$  的轉錄效率[25, 96]。然而，受到 *P. pastoris* 本身的外泌效率限制，單獨提升蛋白質轉錄效率的策略無法確保增加外泌蛋白質的生產[97]。

實驗室前人熊浩安嘗試從 UPR 切入，藉由額外表現 Ire1，企圖使內質網膜上的 Ire1 增加，讓菌體面對內質網壓力時反應更快速，能迅速切除 *HAC1* mRNA 的內含子，排除立體障礙後表現出轉錄因子 Hac1，提升未摺疊蛋白質反應，處理胞內大量表現的目標蛋白質。但結果卻顯示 Ire1 的額外表現在誘導後會同時提升 UPR 及 ERAD 兩種反應，讓原本胞內累積的目標蛋白質明顯減少，但胞外蛋白質產量卻無顯著提升，說明 Ire1 可能還會引發其他未被發現的調控路徑；另外，熊浩安的研究並未確定額外表現的 Ire1 是否確實作用於內質網膜上，扮演啟動未摺疊蛋白質反應的開關，抑或是額外表現的 Ire1 反倒增加了內質網壓力[97]。本研究排除前述額外表現 Ire1 的不確定性，直接額外表現剪切後不含內含子之錄因子 Hac1，增加細胞中的 Hac1，使其結合在 UPRE 促進未摺疊蛋白質反應之相關下游基因啟動。

在蛋白質外泌的研究中，Damasceno 等人曾藉著額外表現 BiP 幫助蛋白質摺疊[53]，Val 等人也曾額外表現蛋白質雙硫鍵異構酶 PDI 來幫助雙硫鍵形成[54]。然而，這些額外表現的外泌路徑之相關蛋白質雖能提升異源蛋白質外泌



量，但也指出 PDI 僅能提升含雙硫鍵的目標蛋白質外泌[53]。因此，若是額外表現轉錄因子 Hac1，活化未摺疊蛋白質反應，同時對多個協助蛋白質外泌的相關基因進行活化，而不是單一基因的增強，理論上更能提升菌株的外泌效率。在前人研究中便曾以額外表現 Hac1 的策略有效提升蛋白質外泌產量，不過這些研究並未對該策略提升蛋白質外泌效率的機制，以及對 UPR 與 ERAD 相關基因表現量的影響做進一步的探討[50, 98, 99]。

實驗室前人陳昱伶以胞內生產出之諾羅病毒 P 蛋白質，產量為目前已發表文獻中最高者[75]。本研究擬探討是否能透過額外表現轉錄因子 Hac1 的策略增加諾羅病毒 P 蛋白質的外泌效率，及此策略對 UPR 與 ERAD 相關基因的影響。克服外泌效率的瓶頸是優化 *P. pastoris* 表現平台的重要課題，增加外泌效率將為 *P. pastoris* 異源蛋白質表現系統未來的應用提供更多元的可能性。



## 1. 研究策略

- (1) 抽取 *P. pastoris* 中的 mRNA 後反轉錄成 cDNA，擴增出不含內含子之 *HAC1* 片段，這樣額外表現 Hac1 的菌株不需透過活化的 Ire1 切除內含子排除立體障礙，即可表現出 Hac1。
- (2) 以紅色螢光蛋白質 E2-Crimson 作為報告基因 (reporter gene)，以甲醇誘導同時額外表現 E2-Crimson 及 Hac1，藉由螢光蛋白質方便觀察及分析的特性，使我們在額外表現 Hac1 對外泌效率的影響上有初步的了解，並分析額外表現 Hac1 對相關基因表現量的影響。
- (3) 假如能夠在 E2-Crimson 觀察到外泌效率提升，則進一步將外泌的目標蛋白質由紅色螢光蛋白質改為更具有經濟價值及重要性的諾羅病毒 P 蛋白質。

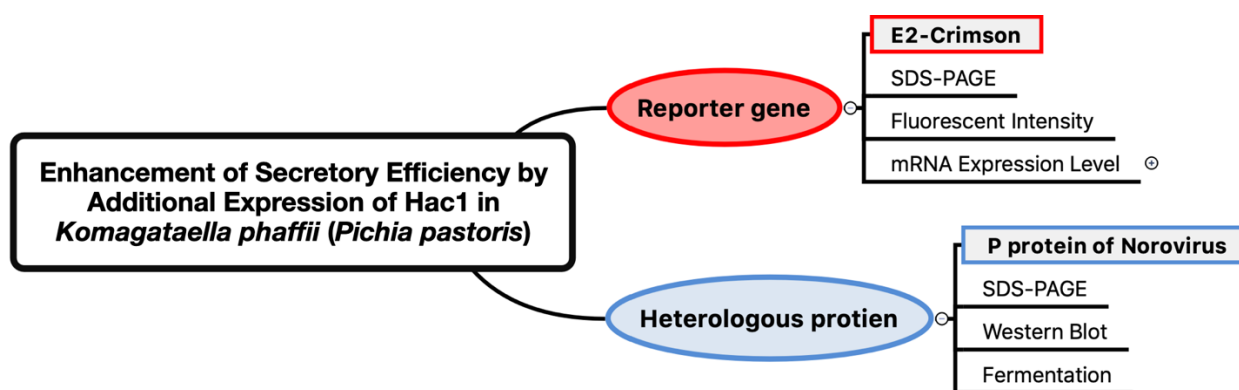




## 2. 研究目標

為了驗證額外表現 Hac1 提升 *P. pastoris* 蛋白質外泌效率策略的可行性，  
本論文之研究架構為圖一，具體目標為：

- (1) 建構額外表現 Hac1 之載體
- (2) 以螢光蛋白質 E2-Crimson 分析額外表現 Hac1 對於外泌效率之影響
- (3) 分析額外表現 Hac1 對於 UPR (*KAR2*) 及 ERAD (*HRD1, UBC1*) 相關基因表現量之影響
- (4) 將 Hac1 應用於提升額外表現諾羅病毒 P 蛋白質之菌株的外泌效率
- (5) 以醱酵槽大量生產諾羅病毒 P 蛋白質



圖一、本論文之研究架構圖

Figure 1. The schematic structure of this research



## 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* DH5 $\alpha$  (Yeastern Biotech Crop, Taiwan, ROC)。使用 Luria-Bertani 液態培養基以轉速 250 rpm 於 37°C 震盪培養；或額外添加 1.5% 洋菜膠於 37°C 固態培養。

#### 2. 真菌

本研使用之重組蛋白質表現系統為 *Pichia pastoris* KM71 (Mut<sup>S</sup>, *arg4 his4 aox1::ARG4*)，購買自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)。使用 YPD 以轉速 250 rpm 於 30°C 震盪培養。

#### 3. 菌株保存

將本研究使用之大腸桿菌及酵母菌菌株培養至指數生長期 (exponential phase) 後，使培養基含有終濃度 25% 之甘油，並置於 -80°C 保存。

### 二、培養基

**Luria-Bertani broth (LB)**：2.5 g LB (Cyrusbioscience, Taiwan, ROC) 溶於 100 mL 純水，121°C、20 分鐘高溫高壓滅菌後室溫保存。

**Luria-Bertani agar plate (LBA)**：於 LB 加入 1.5% Agar (Cyrusbioscience)，滅菌後降溫至 60°C 時倒於 9 cm 培養皿，待凝固後保存於 4°C。

**Low salt LB broth (LSLB)**：2 g Lennox L Broth (Alpha Bioscience, MD, USA) 溶於 100 mL 純水，121°C、20 分鐘高溫高壓滅菌後室溫保存。

**Low salt LB agar plate (LSLBA)**：於 LSLB 加入 1.5% Agar (Cyrusbioscience)，滅菌後降溫至 60°C 時倒於 9 cm 培養皿，待凝固後保存於 4°C。

**10x Dextrose stock (20%, w/v)**：20 g 葡萄糖 (D-Glucose anhydrous, BioShop, ON, Canada) 溶於 100 mL 純水，121°C、20 分鐘高溫高壓滅菌後室溫保存。

**YPD broth (YPD)**：10 g Yeast Extract (Bio Basic, ON, Canada) 及 2 g Peptone-A from meat (Bio Basic) 溶於 90 mL 蒸餾水，滅菌冷卻後加入 10 mL 10x Dextrose。

**YPD agar plate (YPDA)**：於 YPD 加入 1.5% Agar (Cyrusbioscience)，滅菌後降溫至 60°C 時倒於 9 cm 培養皿，待凝固後保存於 4°C。

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

**Hygromycin stock solution (100 mg/mL)**：Hygromycin B (MDBio, Taiwan, ROC) 避光保存於 4°C。

**10x 甘油 (10%, w/v)**：10 g 甘油 (Glycerol Anhydrous, J.T.Baker, NJ, USA) 以純水配置成 100 mL 溶液，121°C、20 分鐘高溫高壓滅菌後室溫保存。

**10x 磷酸鉀緩衝液 (Potassium phosphate buffer, 1 M, pH 6.0)**：11.81 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma, Darmstadt, Germany) 及 2.30 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (J.T.Baker) 以純水配置成 100 mL 溶液，調整 pH 6.0±0.1，121°C、20 分鐘高溫高壓滅菌後室溫保存。

**500x Biotin stock solution (0.02%, w/v)**：20 mg D-biotin (Sigma) 溶於 100 mL 純水，以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾後保存於 4°C。

**甲醇 (100%, v/v)**：甲醇 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , J.T. Baker) 以室溫保存。

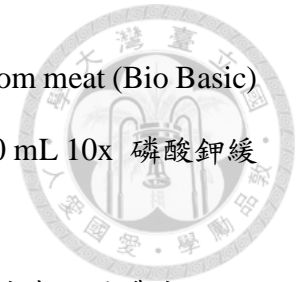
**10x YNB (13.4%, w/v)**：3.4 g Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate (YNB, Bio Basic) 及 10 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Amresco, Taiwan, ROC) 溶於 100 mL 蒸餾水，以 0.22  $\mu\text{m}$  濾膜過濾保存於 4°C。

**BMGY 培養基**：1 g Yeast extract (Bio Basic) 及 2 g Peptone-A from meat (Bio Basic) 溶於 70 mL 純水，滅菌後加入 10 mL 10x YNB (Bio Basic)、10 mL 10x 磷酸鉀緩衝液、200  $\mu\text{L}$  500x Biotin、10 mL 10x 甘油。

**BMNY 培養基**：1 g Yeast extract (Bio Basic) 及 2 g Peptone-A from meat (Bio Basic) 溶於 80 mL 純水，滅菌後加入 10 mL 10x YNB (Bio Basic)、10 mL 10x 磷酸鉀緩衝液、200  $\mu$ L 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。

**PTM1 (Pichia trace metal 1)**：6 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.08 g NaI、3 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.02g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.5 g  $\text{CoCl}_2$ 、20 g  $\text{ZnCl}_2$ 、65g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g biotin、5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  補水至 1 L。



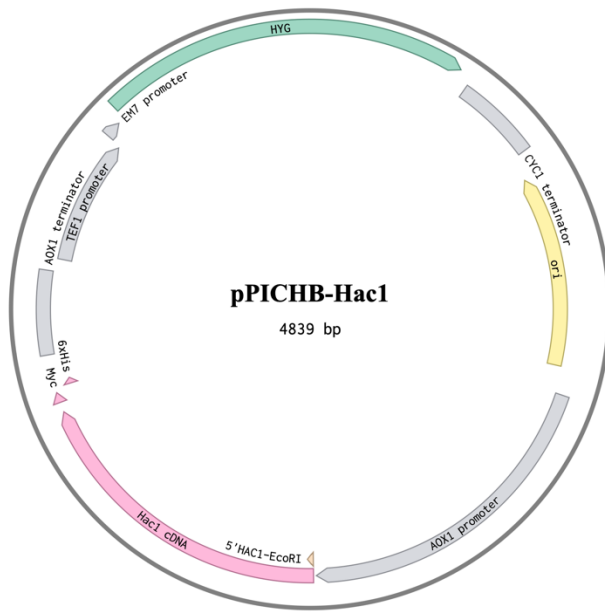


### 三、表現載體建構

本實驗用於表達 *Hac1* 的表現載體 pPICHB 為來自實驗室前人張景翔研究中建構之載體，係將 pPICZB (Invitrogen, CA, USA) 以限制酶 *Bam*HI 及 *Stu*I 反應後插入以相同限制酶反應後之 Hygromycin B 抗性基因片段，使 Zeocin 抗性基因變為 Hygromycin B 抗性基因，命名為 pPICHB。

*HAC1* 為 *P. pastoris* 的內源性基因，為取得 *HAC1* 基因的編碼序列 (coding sequence)，以 3 mL YPD 培養，並添加 1% 甲醇或是添加 1% 甲醇與 5 mM DTT，繼續培養 1 h 後抽取 mRNA 反轉錄成 cDNA，再以引子對 *HAC1*-F-*Eco*RI 及 *HAC1*-R-*Xho*I 將 *HAC1* 基因片段擴增出來。

以限制酶 *Eco*RI 及 *Xho*I 反應後將 *HAC1* 基因片段插入以同樣限制酶反應過之表現載體 pPICHB，建構出帶有 Hygromycin B 抗性基因片段，且以啟動子 *P<sub>AOX1</sub>* 表現 *HAC1* 基因之表現載體 pPICHB-*Hac1* (圖二)。



圖二、本論文建構之表現載體圖

Figure 2. The map of the plasmid pPICHB-Hac1

表一、建構表現載體予定序之引子序列

Table 1. The primer used for plasmid construction and sequencing

名稱	序列 (5' 端到 3' 端)
用於建構載體之引子	
HAC1-F- <i>Eco</i> RI	ACGAGGAATTCATGCCCGTAGATTCTTCTCATAAGA
HAC1-R- <i>Xho</i> I	CGCGGCTCGAGCTATTCCTGGAAGAATACAAAGTC ATTTAAAT
用於定序之引子	
5'AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3'AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATC





#### 四、嗜甲醇酵母菌電穿孔轉形

##### 1. *P. pastoris* 勝任細胞製備

將 *P. pastoris* 單一菌落接種至 3 mL YPD 中，以轉速 250 rpm 於 30°C 活化 24 小時後 OD<sub>600</sub> 約 15。取 1 mL 加入 100 mL YPD 中 OD<sub>600</sub> 約為 0.15，以轉速 250 rpm 於 30°C 培養 6~8 小時後 OD<sub>600</sub> 達 1~2；以 3000 g 離心 6 分鐘，倒去上清液後加入 50 mL Pre-treat buffer (100 mM LiOAc, 10 mM DTT, 0.6 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 於 30°C 靜置 30 分鐘。以 1500 g、4°C 離心 10 分鐘後倒去上清液，加入 2 mL 1 M sorbitol 清洗，反覆清洗三次後以 300  $\mu$ L 1 M sorbitol 回溶菌體，每管分裝 80  $\mu$ L 置於冰上備用或保存於 -80°C。

##### 2. 電穿孔轉形

將 0.2 mm Gap cuvette (No. 620 BTX, San Diego, CA, USA) 置於冰上預冷；將 *P. pastoris* 勝任細胞置於冰上，待其溶解。將欲進行電穿孔轉形之表現載體以相應之限制酶切成線狀，取 1  $\mu$ g 該質體加入勝任細胞中，冰浴 2 分鐘後移入 cuvette 內，以 Electro Cell Manipulator ECM630 Electroporation System (BTX, San Diego, CA, USA) 條件 1.5 kV、25  $\mu$ F、200  $\Omega$  進行電穿孔轉形，完成後加入 900  $\mu$ L 1 M sorbitol 於 30°C 靜置 1 小時。

質體 pPICHB-Hac1 之抗生素抗性為基因為 Hygromycin，因此取上述菌液 200  $\mu$ L 塗盤至 YPDH (1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Dextrose, 1.5% Agar, 100  $\mu$ g/mL Hygromycin)，靜置於 30°C 培養 1~2 天。





## 五、轉型株之抗性篩選

以牙籤從電穿孔轉形實驗之抗生素盤上挑選單一菌，分別點至含有 100、500 及 1000  $\mu\text{g/mL}$  抗生素 Hygromycin 之 YPDH 固態培養基，初步以菌落生長狀況判定基因拷貝數。

## 六、*Pichia pastoris* 轉形株培養與分析

### 1. 96 深孔盤誘導

本研究中 96 深孔盤誘導用於 P protein 轉形株之篩選。在 96 深孔盤中加入 400  $\mu\text{L}$  BMGY，接入欲篩選之轉形株的單一菌落，並黏上購買自 Sigma-Aldrich 的透氣無菌封膜 (AeraSeal™ film)，以轉速 750 rpm 在 30°C 震盪培養 24 小時，以 3000 g 離心 10 分鐘去除上清液，並加入 20 mL BMNY 回溶菌塊後添加 1% 甲醇誘導，以轉速 750 rpm 在 20°C 震盪培養，每 24 小時添加 1% 甲醇。誘導三天後以 3000 g 離心 10 分鐘取上清液進行 Bradford Assay。

### 2. 搖瓶誘導

將單一菌落接種於 3 mL YPDZ 試管中，以轉速 250 rpm 在 30°C 震盪培養 20~24 小時， $\text{OD}_{600}$  約為 15；接種 1 mL 菌液至 100 mL BMGY 使初始  $\text{OD}_{600}$  為 0.15，以轉速 250 rpm 在 30°C 震盪培養 24 小時後，以 3000 g 離心 6 分鐘去除上清液，並加入 20 mL BMNY 回溶菌塊，移入已滅菌的空搖瓶中，取樣 1 mL 作為誘導第零天之樣本後加入 1% 甲醇進行誘導，之後每 24 小時進行取樣及添加甲醇誘導。

表達不同重組蛋白質之菌株，以不同的誘導溫度進行培養。表達 E2-Crimson 之轉形株以轉速 250 rpm 在 30°C 下進行誘導；表達 P protein 之轉形株以轉速 250 rpm 在 20°C 下進行誘導。



### 3. 醱酵槽生產

將單一菌落接種於 3 mL YPDZ 試管中，以轉速 250 rpm 在 30°C 震盪培養 20~24 小時，OD<sub>600</sub> 約為 15；接種 1 mL 菌液至 100 mL YPD 使初始 OD<sub>600</sub> 為 0.15，以轉速 250 rpm 在 30°C 震盪培養使 OD<sub>600</sub> 10 以上，完成種菌準備。將種菌接入含有 2 L BMGY 及 8.7 mL PTM1 的 5 L 醱酵槽 (FS-01-A05, Major Science, Taiwan) 內，使 OD<sub>600</sub> 為 1，開始進行批次培養 (Batch)，並設定培養條件：溫度 30°C、攪拌速率 800 rpm、pH = 5.0、曝氣量 2 vvm。培養過程中以 10% 氨水及 1 N 硫酸將 pH 值控制在 5.0。透過溶氧值 (dissolved oxygen, DO) 監測培養狀況，當醱酵槽內碳源消耗完，溶氧值上升，即可進入下一階段培養。

批次饋料培養 (fed-batch) 時以 50 mL/h 之流速饋入 250 mL 含有 4 mL PTM1 之 50% 甘油，約五小時後結束饋料，當醱酵槽內碳源耗盡時，菌體耗氧速率減緩，溶氧值會再次升高，即可開始甲醇誘導。

開始甲醇誘導前將醱酵槽溫度調降為 20°C 以進行低溫誘導，以含 12 mL/L PTM1 的甲醇進行誘導，以 3 mL/h 的速度饋料。每 24 小時取樣測量 OD<sub>600</sub>、生菌數，取樣之菌液以 13000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液及菌體分離保存於 -80°C，後續進行蛋白質分析。



## 七、mRNA 表現量分析

取出誘導之 *P. pastoris* 樣品約  $10^8$  的細胞，以 NautiaZ Bacteria/Fungi RNA Mini Kit (Nautia Gene, Taiwan) 抽取總 mRNA，測定濃度並稀釋至  $125 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。取  $8 \mu\text{L}$  ( $1000 \text{ ng}$ ) 樣品加入  $1 \mu\text{L}$  DNase (Promega, USA) 與  $1 \mu\text{L}$  10x DNase Buffer 於  $37^\circ\text{C}$  反應 30 分鐘，接著加入  $1 \mu\text{L}$  Stop Solution 於  $65^\circ\text{C}$  反應 10 分鐘終止反應。加入  $0.2 \mu\text{L}$  濃度  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  之 Radom Hexamer ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , ARROWTEC) 與  $1.8 \mu\text{L}$  之 DEPC 水於前述  $11 \mu\text{L}$  的樣品內，於  $70^\circ\text{C}$  反應 10 分鐘後置於冰上冷卻，以 ARROW-Script Reverse Transcriptase III (ARROWTEC, Taiwan) 反轉錄成 cDNA，接著加入  $4 \mu\text{L}$  5x First-Strand Buffer、 $1 \mu\text{L}$  dNTP mix ( $10 \text{ mM}$ )、 $1 \mu\text{L}$  RNase inhibitor ( $40 \text{ unit}/\mu\text{L}$ )、 $1 \mu\text{L}$  ARROW M-MLV Reverse Transcriptase III ( $200 \text{ unit}/\mu\text{L}$ )，以  $25^\circ\text{C}$  反應 5 分鐘後以  $55^\circ\text{C}$  反應 60 分鐘，最後以  $70^\circ\text{C}$  反應 15 分鐘終止反應，並加入  $80 \mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 稀釋使 cDNA 濃度約為  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

本論文以即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR) 測定目標基因 mRNA 之相對表現量，使用相對定量法 ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ )，以 18s rRNA 作為內控制基因 (Internal control)，以無額外表現 Hac1 之菌株作為參考值，樣品中目標基因的 mRNA 表現量以參考樣品的相對倍率呈現。即時定量聚合酶鏈鎖反應配方為  $5 \mu\text{L}$  cDNA、 $1 \mu\text{L}$  順反引子 ( $4 \mu\text{M}$ )， $10 \mu\text{L}$  IQ<sup>2</sup> SYBR Green FAST qPCR System Master Mix-HIGH ROX，最後補水至  $20 \mu\text{L}$ 。採用 ABI 即時定量儀器進行螢光量的測定，PCR 擴增條件為  $95^\circ\text{C}$  反應 3 分鐘，再以  $95^\circ\text{C}$  反應 5 秒、 $65^\circ\text{C}$  反應 30 秒，共進行 40 循環。

表二、即時定量聚合酶鏈鎖反應之引子序列

Table 2. The primer used for real-time qPCR

名稱	序列 (5' 端到 3' 端)	Amplicon size (bp)	Tm (°C)
用於即時定量聚合酶鏈鎖反應 (real-time qPCR) 之引子			
18s rRNA-qF	GAGGATTGACAGGATGAGAGC	111	63.2
18s rRNA-qR	CAAGGTCTCGTTCGTTATCGC		
HAC1-qF	GACACCGACTACATTACTACAGCTCCA	111	68.2
HAC1-qR	AGCGGTAAATGGTGCTGCTGC		
KAR2-qF	TGGTATTCCACCAGCTCCAAG	101	65
KAR2-qR	CAGTTCCTTATCGGTGGCA		
HRD1-qF	AGCTGGTTCCAATTCCCCTGC	90	67.4
HRD1-qR	GATCCGTTCCGAACCGCAGA		
UBC1-qF	TGCCTGGACGCCTATTCTCACA	92	68.7
UBC1-qR	GTGCGTCCTGAGGGTCACTTGG		



## 八、蛋白質分析

### 1. 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)

將蛋白質樣品離心後取上清液，以 3:1 之比例與 4x Protein loading dye 混合，於 99°C 下加熱 10 分鐘。將處理後的樣品注入聚丙烯醯胺膠體之樣品槽中，以電壓 80 V 進行電泳，直到通過 5% SDS 聚丙烯醯胺之焦集膠體，電壓調升至 100 V 進行電泳，使樣品通過 12% SDS 聚丙烯醯胺之分離膠體。將完成電泳的膠片取下放入塑膠盒中，加入 CBR 染色液蓋過膠片，震盪 30 分鐘。將染劑回收重複利用，並倒入脫色液，於抽氣櫃中震盪退染至背景透明。

### 2. 西方墨點法

將完成電泳的膠片取下，並裁剪與之大小相符的 0.45  $\mu\text{m}$  之 PVDF 轉印膜 (PerkinElmer, MA, USA) 放入甲醇中浸泡備用，在 Transfer buffer 中以海綿、濾紙、膠片、PVDF 轉印膜、濾紙、海綿的順序堆疊組裝卡匣，放入濕式電泳轉印槽 (Bio-rad, CA, USA)，使膠片位於負極，PVDF 轉印膜位於正極。以 400 mA 進行轉印 60 分鐘，取出卡匣內的 PVDF 轉印膜，浸泡在 Gelatin-NET 中，置於 4°C 隔夜。將 Gelatin-NET 倒出，加入以 Gelatin-NET 稀釋 5000 倍之一次抗體 monoclonal anti-Norovirus, mouse (ab167024) 於室溫震盪 1 小時後，將一次抗體回收重複使用，並以 PBST 清洗三次，每次於室溫震盪 10 分鐘。將 PBST 倒出，加入以 Gelatin-NET 稀釋 5000 倍之二次抗體 goat anti-mouse IgG, HRP conjugate (PerkinElmer) 於室溫震盪 1 小時後，將二次抗體回收重複使用，並以 PBST 清洗三次，每次於室溫震盪 10 分鐘。將 PVDF 轉印膜放入 UVP BioSpectrum 500 Imaging System 主機中並滴上 Western Lightning *Plus* 試劑 (PerkinElmer, USA) 偵測冷光訊號。



### 3. 螢光強度分析


取 200  $\mu\text{L}$  誘導樣品之上清液置於 96 孔黑色滴定盤中，使用 SpectraMax M2e Microplate Readers 測定 611 nm 激發光，646 nm 放射光。將螢光強度測量值除以濁度 ( $\text{OD}_{600}$ ) 以標準化螢光測量值，並減去背景值 (菌株 KM71 標準化後之數值)。

### 4. Bradford 蛋白質定量法

以 BSA stock 配製濃度為 1、0.5、0.25 及 0.125 mg/mL 之蛋白質標準品，取標準品及未知濃度之蛋白質樣品 5  $\mu\text{L}$ ，以二重複的方式加入 96 孔微量滴定盤，每孔再加入 200  $\mu\text{L}$  Bradford dye (1 $\times$ )，並避免氣泡產生，輕敲盤的一側使液體充分混合，靜置於室溫 5 分鐘，偵測 595 nm 吸光值，作圖畫出標準曲線，確定  $R^2$  達到 0.99 以上後，以此標準曲線檢量未知蛋白質濃度。

### 5. 酵素結合免疫吸附分析法

實驗分析所用之緩衝液以 ddH<sub>2</sub>O 配製。以 Gelatin-NET 配製一次抗體 monoclonal anti-Norovirus, mouse (ab167024)，稀釋 8000 倍；以 Gelatin-NET 配製二次抗體 goat anti-mouse IgG, HRP conjugate (PerkinElmer)，稀釋 8000 倍。配製新鮮 Coating buffer 稀釋待測之上清液樣品；以 Ost1-P 菌株之上清液做檢量線，稀釋成 200、100、50、25、12.5 及 0 ng/mL，並將上述每個樣品取 100  $\mu\text{L}$  以二重複之方式注入 96 孔微量滴定盤 (Nunc, Aarhus, Denmark；Thermo, 442404)。於 4°C 下靜置 16 小時以上後吸除樣品，以 PBST 清洗三次後，加入每孔 300  $\mu\text{L}$  之 Gelatin-NET 於 37°C 靜置 2 小時。吸除 Gelatin-NET 以 PBST 清洗三次後每孔加入 100  $\mu\text{L}$  一次抗體，於 37°C 靜置 1 小時。吸除一次



抗體以 PBST 清洗三次後每孔加入 100  $\mu$ L 二次抗體，於 37°C 靜置 1 小時。  
取適量 TMB 反應基質 (OptELISA, BD, USA) 靜置於室溫下避光退冰至常溫，  
吸除二次抗體以 PBST 清洗三次後每孔加入 100  $\mu$ L TMB 反應基質進行呈色。  
偵測 650 nm 吸光值，當盤中最高數值達到 1 立即加入 50  $\mu$ L stop buffer 終止  
反應，並偵測 450 nm 吸光值，製作檢量線，確定  $R^2$  達到 0.99 以上後，以此  
檢量線推算目標蛋白質濃度。


表三、蛋白質分析試劑成分

Table 3. 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)
Tris-glycine SDS running buffer (pH 8.4)	25 mM Tris-Base 250 mM Glycine 0.01% SDS
4x Protein loading dye	8% SDS 200 mM Tris-HCl (pH=6.8) 0.4% Bromophenol blue 20% Glycerol 400 mM 2-ME (2-Mercaptoethanol)
CBR 染色液	0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 50% (v/v) Methanol 9% (v/v) Acetic acid





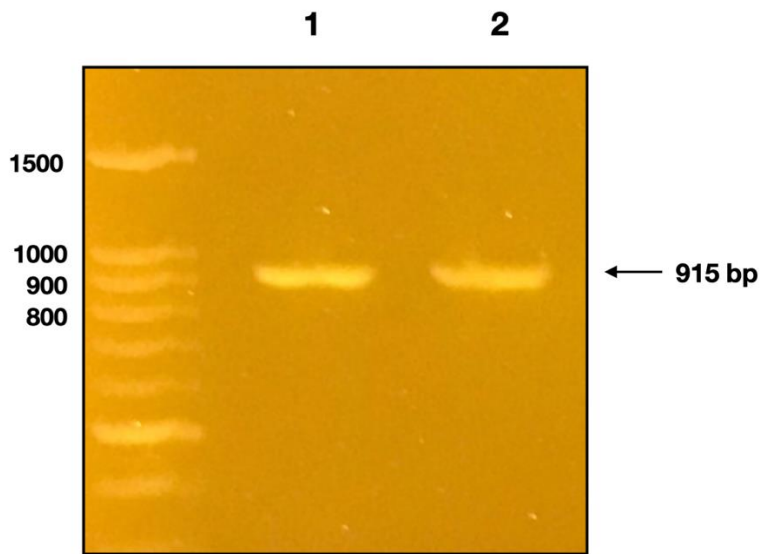
脫色液	10% Acetic acid 20% Methanol
Transfer buffer (pH 8.3)	25 mM Tris-Base 192 mM Glycine 10% (v/v) methanol
Gelatin-NET (pH 8.0)	0.25% Gelatin 0.15 M NaCl 5 mM EDTA • 2Na 50 mM Tris-Base 0.05% (v/v) Tween-20
PBS (pH 7.4)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .
PBST (pH 7.4)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.05% (v/v) Tween-20
Coating buffer (pH 9.5 with NaOH)	15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 85 mM NaHCO <sub>3</sub>
Stop buffer	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 第三章 結果



#### 一、 取得 *HAC1* 基因編碼序列

*P. pastoris* 細胞質存在全長的 *HAC1* mRNA，在有內質網壓力時 Ire1 會活化自身核酸內切酶的活性，切除 *HAC1* mRNA 的內含子，表現出有功能的 Hac1，進入細胞核調控未摺疊蛋白質反應的相關基因。參考前人的方法，加入 DTT 使蛋白質錯誤摺疊，引起未摺疊蛋白質反應，使細胞內存在剪切後的 *HAC1* mRNA[99]。為了確保內質網壓力，以額外添加 1% 甲醇的組別，經過抽取 mRNA 反轉錄成 cDNA 並以引子對 HAC1-F-*EcoRI* 及 HAC1-R-*XhoI* 進行聚合酶連鎖反應擴增後發現，額外添加 1% 甲醇的組別與僅添加 5 mM DTT 的組別同樣可以獲得剪切過的 915 bp 之 *HAC1* 基因片段 (圖三)，後續將此基因片段用於建構表現載體。



圖三、瓊脂糖凝膠電泳分析剪切後的 *HAC1* 基因

編號 1 代表添加 1% 甲醇及 5 mM DTT 培養的組別。

編號 2 代表僅添加 5 mM DTT 培養的組別。

Figure 3. Agarose gel electrophoresis analysis of spliced *HAC1*

Lane 1: the group growth in the presence of 1% methanol and 5 mM DTT.

Lane 2: the group growth in the presence of 5 mM DTT.



## 二、額外表現 Hac1 對外泌 E2-Crimson 菌株的影響

將實驗室前人張景翔建構具有啟動子  $P_{AOX1}$  與 Hygromycin 抗性基因之表現載體 pPICHB，及以聚合酶連鎖反應擴增出之 *HAC1* 基因片段以限制酶 *EcoRI* 及 *XhoI* 反應後接合，建構出 pPICHB-Hac1 表現載體，再以電穿孔轉形法轉入外泌紅色螢光蛋白質 E2-Crimson 菌株 *P. pastoris*  $\alpha E$  中。該菌株由本實驗室簡曼凌建立，將 E2-Crimson 基因片段插入 multiple cloning site 前帶有  $\alpha$  外泌因子之表現載體，並將此表現載體送入 *P. pastoris* KM71 的勝任細胞中，因此生產出之 E2-Crimson 會被分泌至胞外。

將 pPICHB-Hac1 表現載體電穿孔轉形至 *P. pastoris*  $\alpha E$  後以適量菌液進行塗盤，兩天後再將菌盤內的單一菌落點在 YPDH plate 上，確認菌株是否帶有 Hygromycin B 抗性基因，隨機挑選菌株進行搖瓶誘導培養，挑選蛋白質外泌量最高者進行後續實驗分析，並命名為 *P. pastoris*  $\alpha EH$ 。為了探討額外表現 Hac1 對菌株外泌效率的影響，以不表現螢光蛋白質及 Hac1 的菌株 KM71 作為負控制組，表現螢光蛋白質但不表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris*  $\alpha E$  作為正控制組，表現螢光蛋白質及 Hac1 的菌株 *P. pastoris*  $\alpha EH$  作為實驗組，取前述三個菌株同時於 30°C 下進行為期五天的搖瓶誘導，每 24 小時取樣一次並添加 1% 甲醇。

### 1. 額外表現 Hac1 提升 E2-Crimson 之外泌產量

離心後取上清液體進行螢光強度測定 (Ex/Em  $\lambda$ : 611/646)，並以螢光讀值除以 OD<sub>600</sub> 標準化後減去背景值，發現菌株 *P. pastoris*  $\alpha E$  及 *P. pastoris*  $\alpha EH$  的螢光量皆隨著誘導天數增加 (圖四)，且 *P. pastoris*  $\alpha EH$  的螢光強度顯著高於 *P.*

*P. pastoris* αE (表四)，在誘導第五天時 *P. pastoris* αEH 的螢光強度為 *P. pastoris* αE 的 2.6 倍。




額外表現 Hac1 並不影響菌株 *P. pastoris* αE 及 *P. pastoris* αEH 的生長狀況 (圖五)。在誘導結束後取上清液進行聚丙烯醯胺膠體電泳分析，以 CBR 染色後觀察到 25-35 kDa 之間有明顯的蛋白質條帶，其大小與目標蛋白質相近 (25.7 kDa)，且隨著誘導天數增加，蛋白質條帶越來深，此結果與螢光表現量的趨勢相符(圖六)。

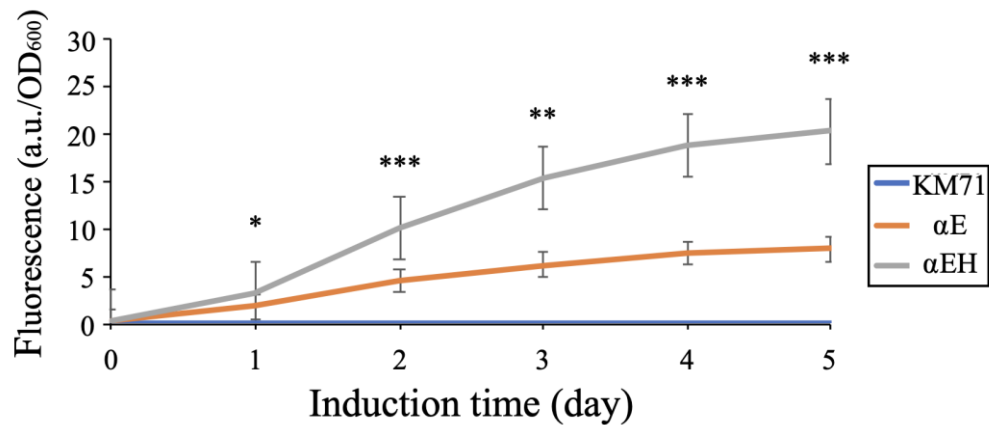
## 2. 額外表現 Hac1 對外泌 E2-Crimson 菌株之 mRNA 表現量的影響

首先，為了確認轉入 pPICHB-Hac1 表現載體對於菌株其 *HAC1* 基因 mRNA 表現量是否高於未額外送入表現載體之菌株。於菌株 *P. pastoris* αE 及 *P. pastoris* αEH 誘導後 27 小時及誘導後 30 小時取樣 200 μL 菌液，離心後去除上清液並加入 200 μL RNase 抑制劑，保存於 -20°C 作為 RNA 樣品，後續進行 RNA 萃取分析。發現額外表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αEH 確實如預期，*HAC1* 基因 mRNA 表現量比未額外表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αE 來得高，在誘導後第 27 小時 *P. pastoris* αEH 之 *HAC1* 基因 mRNA 相對表現量為 *P. pastoris* αE 的 15.8 倍，在誘導後第 30 小時 *P. pastoris* αEH 之 *HAC1* 基因 mRNA 相對表現量為 *P. pastoris* αE 的 12.5 倍(圖七)。

接著，本實驗針對轉錄因子 Hac1 活化之 UPR 下游基因 (*KAR2*) 與 ERAD 相關基因 (*HRD1* 及 *UBC1*) 的基因表現量進行分析。於菌株 *P. pastoris* αE 及 *P. pastoris* αEH 誘導後 72 小時取樣 200 μL 菌液，離心後去除上清液並加入 200 μL RNase 抑制劑，保存於 -20°C 作為 RNA 樣品，後續進行 RNA 萃取分



析。發現額外表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αEH 確實 *KAR2* 基因 mRNA 相對表現量比無額外表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αE 來得高，為 1.45 倍；而 *HRD1* 及 *UBC1* 基因 mRNA 相對表現量則是額外表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αEH 比無額外表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αH 還要低，其中 *HRD1* 為 0.64 倍，*UBC1* 為 0.47 倍(圖八)。



圖四、*P. pastoris* KM71、αE 及 αEH 上清液螢光量分析

以上清液之螢光讀值除以 OD<sub>600</sub> 標準化。D0-D5 代表誘導天數。誤差線為 3 次獨立重複的標準差，顯著水準以非成對 T 檢定分析。\* 為 p<0.05。\*\* 為 p<0.01。\*\*\* 為 p<0.001。

Figure 4. Supernatant fluorescence intensity of *P. pastoris* KM71, αE, and αEH

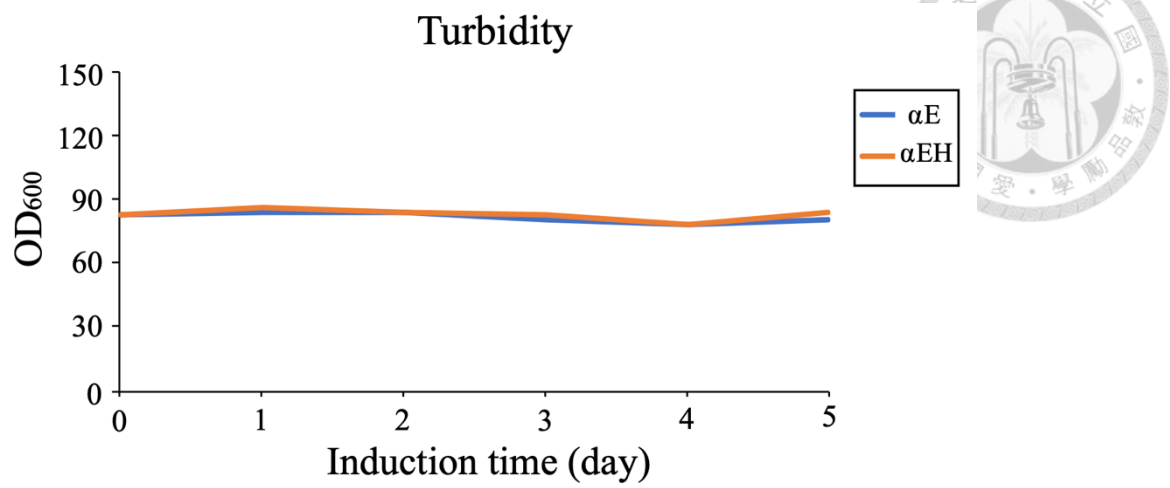
Normalized fluorescence intensity by OD<sub>600</sub>. D0-D5 represent the days after induction. The error bars represent the standard deviation of 3 replicates. The independent sample t-test was used to determine the statistical significance. \*, p<0.05. \*\*, p<0.01. \*\*\*, p<0.001.

表四、螢光蛋白質外泌量

Table 4. Amount of secretory E2-Crimson

Strain	D0	D1	D2	D3	D4	D5
αE	0.19	1.80	4.48	6.23	7.40	7.86
αEH	0.23	3.12	10.07	15.37	18.83	20.33
p 值	0.845	0.0186	0.0007	0.0019	0.0008	0.0003

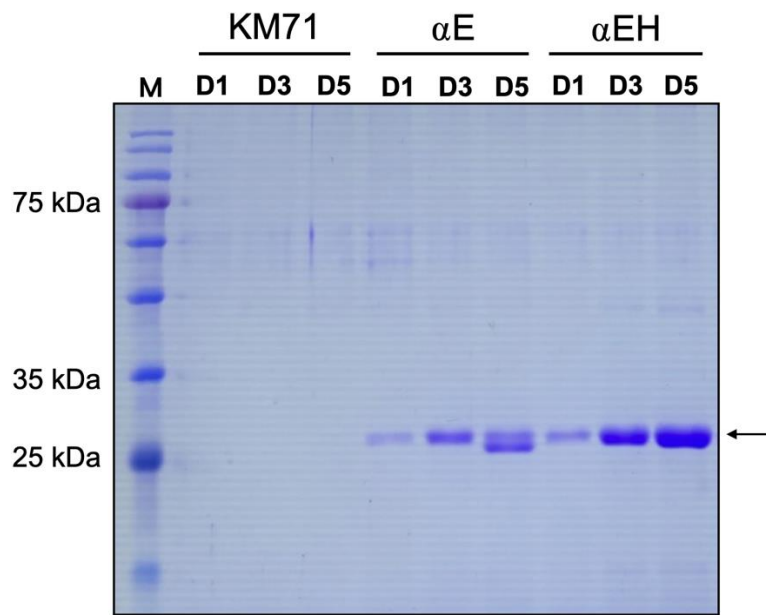
表中為獨立三重複實驗之平均值。單位：AU (arbitrary unit)。



圖五、外泌 E2-Crimson 之菌株於誘導過程之濁度變化

Figure 5. Turbidity of different E2-Crimson-secreting strain during induction



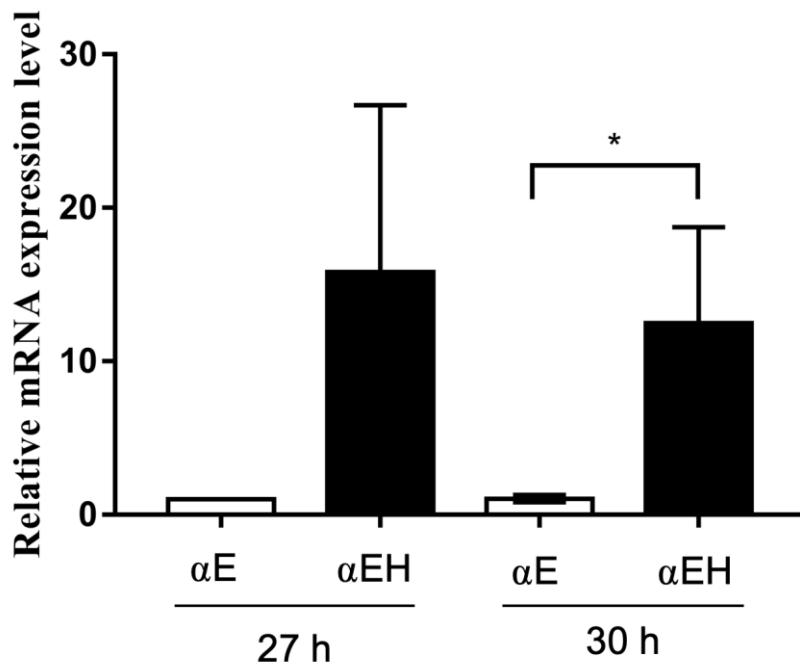


圖六、誘導螢光蛋白質上清液之聚丙烯醯胺膠體電泳比較

聚丙烯醯胺膠體電泳及 CBR 染色分析甲醇誘導後不同菌株螢光蛋白質外泌量。KM71、αE 及 αEH 代表不同 *P. pastoris* 之菌株。D1、D3 及 D5 代表誘導天數。M: protein marker。

Figure 6. SDS-PAGE analysis of extracellular E2-Crimson after induction

SDS-PAGE and CBR staining analysis of supernatant after induction. KM71, αE and αEH represent the different strains of *P. pastoris*. D1, D3 and D5 represent the days after induction. M: protein marker.

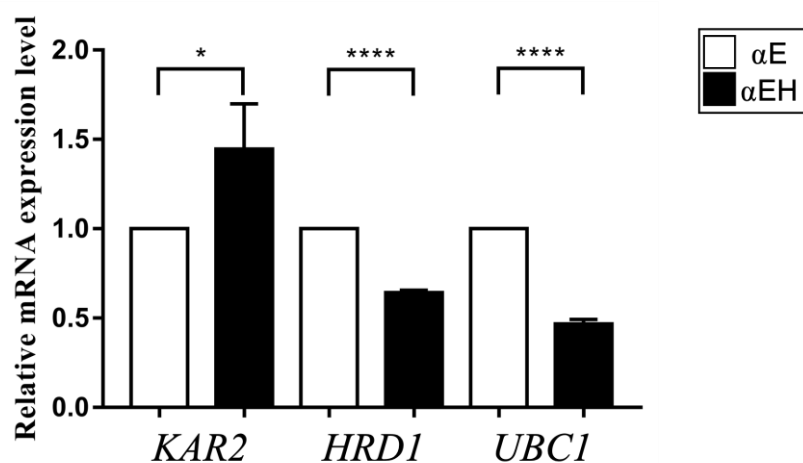


圖七、 $\alpha E$  及  $\alpha EH$  誘導後 *HAC1* 基因 mRNA 相對表現量分析

在誘導 27 小時及 30 小時後取樣進行 *HAC1* 基因 mRNA 相對表現量分析，樣品之 mRNA 表現量以內基因 18s rRNA 標準化。誤差線為 3 次獨立重複的標準差，顯著水準以非成對 T 檢定分析。\* 為  $p < 0.05$ 。

Figure 7. Relative *HAC1* mRNA expression level of  $\alpha E$  and  $\alpha EH$

Sampled after induction 27 h and 20 h. The mRNA expression level was normalized to 18s rRNA in each sample. The error bars represent the standard deviation of 3 replicates. The independent sample t-test was used to determine the statistical significance. \*,  $p < 0.05$ .



圖八、αE 與 αEH 誘導第 3 天之 mRNA 相對表現量分析

在誘導 72 小時後取樣進行 *HAC1*、*HRD1* 及 *UBC1* 之 mRNA 相對表現量分析，樣品之 mRNA 表現量以內基因 18s rRNA 標準化。誤差線為 3 次獨立重複的標準差，顯著水準以非成對 T 檢定分析。\* 為  $p < 0.05$ 。\*\*\*\* 為  $p < 0.0001$ 。

Figure 8. Relative mRNA expression level of αE and αEH after 3 days of induction

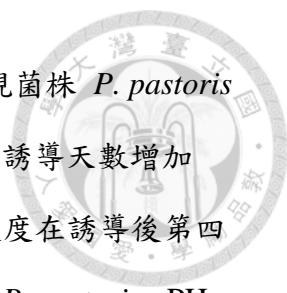
Sampled after induction 72 h. The mRNA expression level of *HAC1*, *HRD1* and *UBC1*. The relative mRNA expression level was normalized by 18s rRNA in each sample. The error bars represent the standard deviation of 3 replicates. The independent sample t-test was used to determine the statistical significance. \*,  $p < 0.05$ . \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .



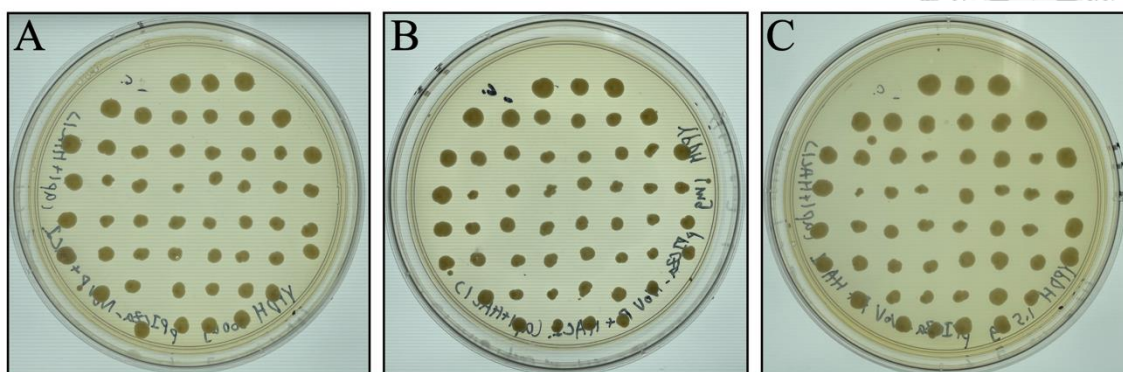
### 三、額外表現 Hac1 提升諾羅病毒 P 蛋白質之外泌產量

將 pPICHB-Hac1 表現載體電穿孔轉形至 *P. pastoris* αP 後取適量菌液塗盤於 YPDH 固態培養基確認菌株是否帶有 Hygromycin B 抗性基因。兩天後再將菌盤內的單一菌落點在不同 Hygromycin B 濃度之 YPDH 固態培養基，以菌落大小進行初步抗性篩選 (圖九)，由於 YPDH 固態培養基的篩選結果不易判別菌落生長差異，因此以 96 孔盤誘導進行誘導篩選，取上清液進行 Bradford 分析外泌之蛋白質濃度 (表五)，以此結果初步篩選外泌量較高的菌株，挑選數值較高的菌株進行搖瓶誘導培養，挑選蛋白質外泌量最高者進行後續實驗分析，並命名為 *P. pastoris* αPH。為了探討額外表現 Hac1 對菌株外泌效率的影響，以不表現諾羅病毒 P 蛋白質及 Hac1 的菌株 KM71 作為負控制組，表現諾羅病毒 P 蛋白質但不表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αP 作為正控制組，表現諾羅病毒 P 蛋白質及 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αPH 作為實驗組，參考過去文獻，在 BMGY 培養時以 30°C 讓菌體生長，但將培養基置換成 BMMY 進行誘導時，調整培養溫度為 20°C，以利蛋白質分泌至細胞外。

額外表現 Hac1 並不影響菌株 *P. pastoris* αP 及 *P. pastoris* αPH 的生長狀況 (圖十)。離心後取上清液進行聚丙烯醯胺膠體電泳分析，以 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR) 染色後觀察到 35-48 kDa 之間有明顯的蛋白質條帶，其大小與目標蛋白質相近 (35.8 kDa)，且隨著誘導天數增加，蛋白質條帶越來深，且發現 *P. pastoris* αPH 菌株大概位於 75 kDa 的位置會有條帶出現 (圖十一 A)。取上清液進行西方墨點法分析後發現，位於 35-48 kDa 之間出現訊號，而 75 kDa 的位置沒有訊號，顯示 75 kDa 的蛋白質條帶並非目標蛋白質 (圖十一 B)。



以酵素結合免疫吸附分析法，減去誘導第零天背景值，發現菌株 *P. pastoris* αP 及 *P. pastoris* αPH 上清液中之諾羅病毒 P 蛋白質濃度隨著誘導天數增加 (圖十二)，且 *P. pastoris* αPH 上清液中之諾羅病毒 P 蛋白質濃度在誘導後第四天及第五天時顯著高於 *P. pastoris* αP (表六)，在誘導第五天時 *P. pastoris* αPH 上清液中之諾羅病毒 P 蛋白質濃度為 *P. pastoris* αP 的 1.6 倍，此結果與聚丙烯醯胺膠體電泳分析之趨勢相符。



圖九、以 YPDH 固態培養基初步篩選額外表現 Hac1 之  $\alpha$ P 菌株

A、B 及 C 分別為濃度 100、500 及 1000  $\mu\text{g/mL}$  之 YPDH 固態培養基。

Figure 9. Screening transformants by YPDH plates

YPDH plates containing 100, 500, and 1000  $\mu\text{g/mL}$  Hygromycin B.

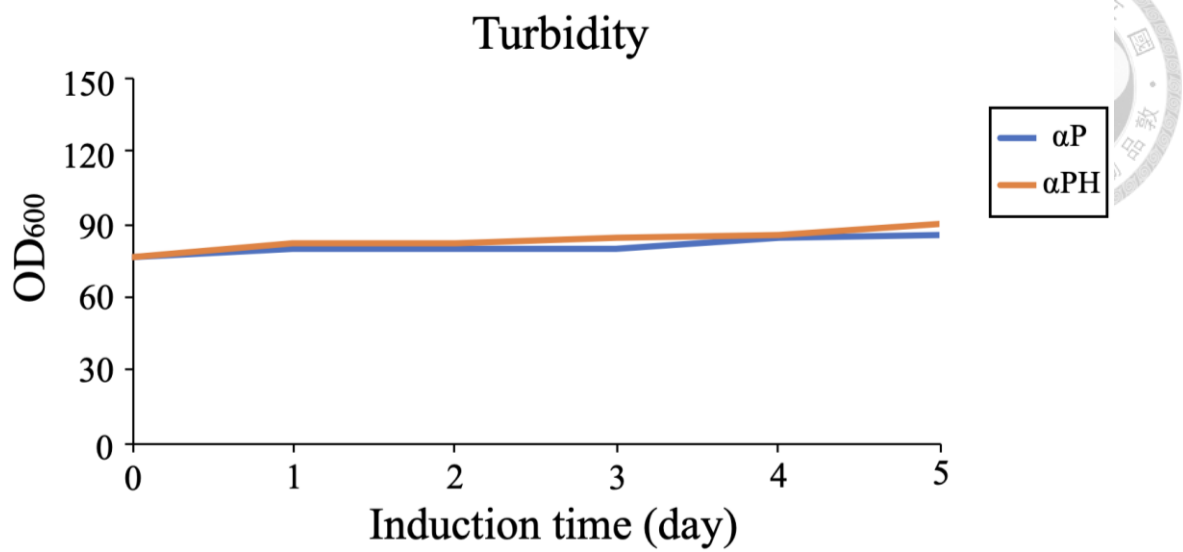
表五、96 孔盤誘導篩選 Bradford 分析

Table 5. Screening transformants by 96-well plate induction and Bradford assay

	1	2	3	4	5	6	7
A	0.4433	0.4581	0.4833	0.4525	0.4425	0.3973	0.4586
B	0.4527	0.4670	0.4657	0.4650	0.4589	0.4128	0.4879
C	0.4722	0.3684	0.4653	0.4695	0.4575	0.4114	0.4810
D	0.4490	0.4353	0.4648	0.4604	0.4678	0.4080	0.4708
E	0.4503	0.4883	0.6414	0.4723	0.4692	0.6016	
F	0.4767	0.5082	0.4719	0.4580	0.4301	0.4876	
G	0.4886	0.4997	0.4873	0.4512	0.4533	0.4695	
H	0.4808	0.4829	0.4813	0.5136	0.4638	0.4820	

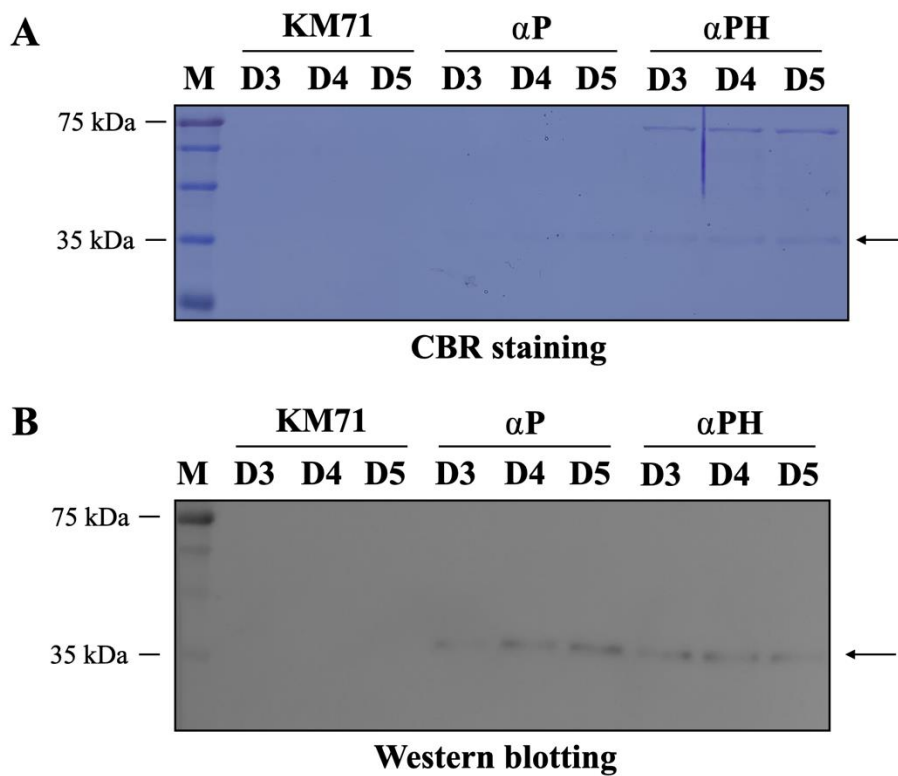
1-7 及 A-H 代表 96 孔盤的配置。表中數值為誘導上清液對 595 nm 的吸光值。

1-7 and A-H represent the order of 96-well plate. The values are absorption of A595.



圖十、搖瓶誘導外泌諾羅病毒 P 蛋白質之菌株於誘導過程之濁度變化

Figure 10. Turbidity of different Norovirus P protein-secreted strain during flask induction



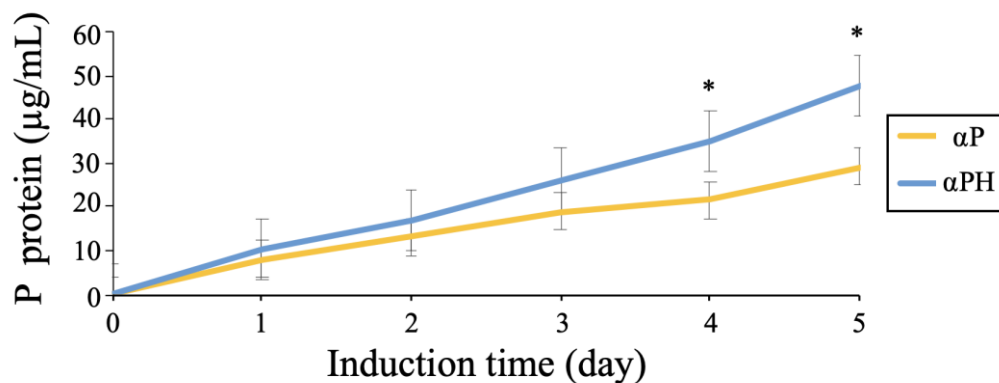
圖十一、搖瓶誘導諾羅病毒 P 蛋白質上清液之分析

聚丙烯醯胺膠體電泳及西方墨點法分析搖平培養誘導後不同菌株諾羅病毒 P 蛋白質外泌量。KM71、αP 及 αPH 代表不同菌株。D3、D4 及 D5 代表誘導天數。M: protein marker。A 為聚丙烯醯胺膠體電泳分析。B 為西方墨點法分析。

Figure 11. Analysis of supernatant P proteins after methanol induction in flask culture.

SDS-PAGE and Western blotting analysis of supernatant after methanol induction in flask culture. KM71, αP and αPH represent the different strains. D3, D4, and D5 represent the days after induction. M: protein marker. A, SDS-PAGE analysis. B, Western blotting analysis.





圖十二、KM71、 $\alpha E$  及  $\alpha EH$  上清液酵素結合免疫吸附法分析

減去誘導第零天背景值。D0-D5 代表誘導天數。誤差線為 3 次獨立重複的標準差，顯著水準以非成對 T 檢定分析。\* 為  $p < 0.05$ 。

Figure 12. ELISA result of Norovirus P protein

Deduction of background value by D0. D0-D5 represent the days after induction. The error bars represent the standard deviation of 3 replicates. The independent sample t-test was used to determine the statistical significance. \*,  $p < 0.05$ .

表六、諾羅病毒 P 蛋白質外泌量

Table 6. Amount of secretory P protein

Strain	D1	D2	D3	D4	D5
$\alpha P$	8.01	13.30	18.93	21.60	29.18
$\alpha PH$	10.42	17.04	26.23	35.00	47.75
p 值	0.1333	0.3825	0.199	0.0332	0.0183


表中為獨立三重複實驗之平均值。單位： $\mu g/mL$ 。



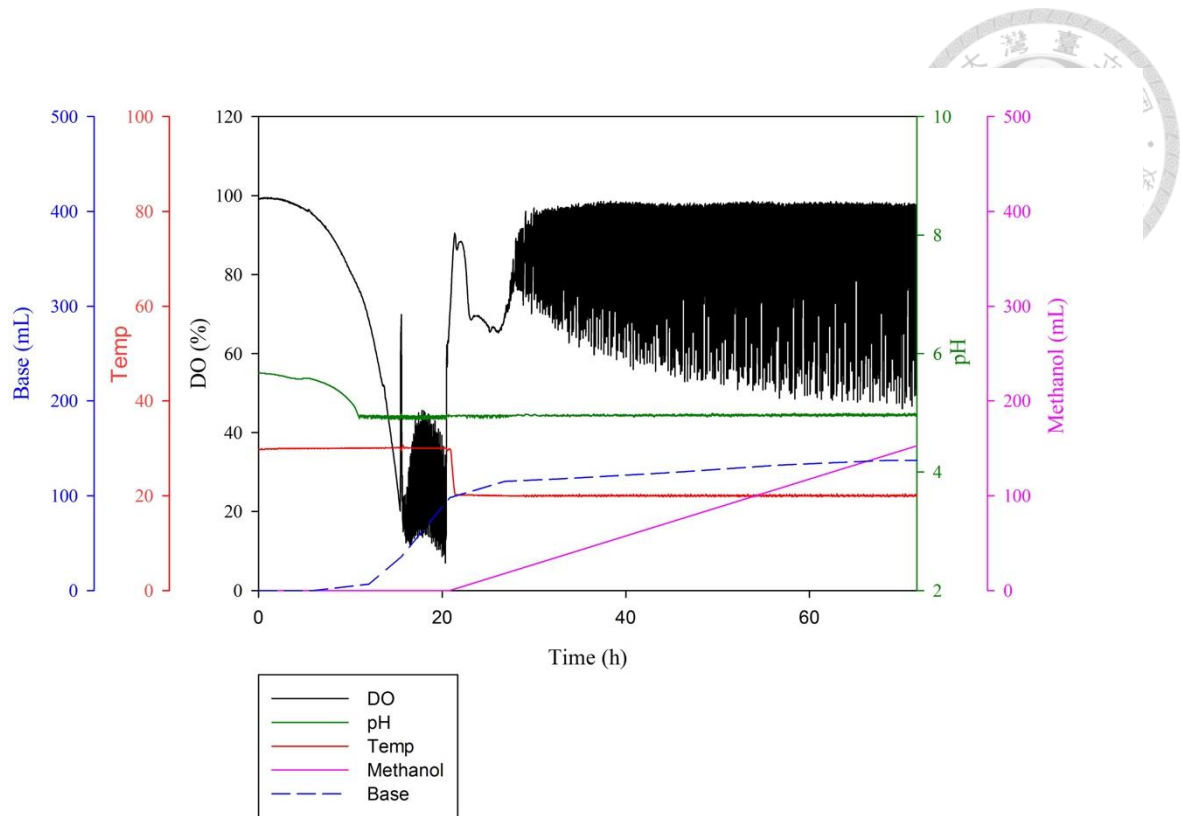
#### 四、使用醱酵槽大量生產諾羅病毒 P 蛋白質

以搖瓶誘導所使用之菌株  $\alpha$ PH 為種菌進行 5 L 醱酵槽培養，以甲醇誘導並分析比較，希望以醱酵槽大量生產 P 蛋白質，驗證額外表現 Hac1 之策略於放大時生產的應用性。以  $\alpha$ P 及  $\alpha$ PH 進行醱酵槽培養時，約 16 小時耗盡槽內的甘油，此時溶氧值 (dissolved oxygen, DO) 急遽上升，稱為 DO spike，發生第一次 DO spike 時開始批次饋料 (fed-batch) 以 50 mL/h 之流速饋入 250 mL 之 50% 甘油，約 5 小時後 DO 值再次快速上升，發生第二次 DO spike，代表批次饋料培養階段結束，此時  $OD_{600}$  約為 135。進入甲醇誘導階段後將醱酵槽溫度調降為 20°C 以進行低溫誘導，以 3 mL/h 的速度饋入甲醇進行誘導。由醱酵參數圖 (圖十三) 可以發現，在批次饋料培養階段時  $OD_{600}$  會快速提升，並且持續添加鹼液維持槽中 pH 值，說明此時饋入的甘油被菌體使用於生長且代謝產生酸，使槽內達到高密度培養的狀態；甲醇誘導階段時  $OD_{600}$  沒有明顯變化，但鹼添加量持續增加，說明此時的碳源有被菌體代謝產生酸但並非用於累積生物質。此外，於批次饋料階段及甲醇誘導階段時，溶氧值會有上下震盪的情況。醱酵槽培養液經離心後取上清液進行後續蛋白質分析發現，於誘導後第六小時可以清楚地看見在 35-48 kDa 之間有明顯蛋白質條帶，與搖瓶誘導結果相同，該位置之蛋白質條帶隨著誘導時間逐漸變深 (圖十四)，說明外泌至培養基當中的諾羅病毒 P 蛋白質隨誘導時間增加而提高，亦說明甲醇誘導階段時，槽內的碳源被用於生產目標蛋白質。此結果證明額外表現 Hac1 之菌株 *P. pastoris*  $\alpha$ PH，可以應用於 5 L 醱酵槽中，以高密度培養的方式外泌生產諾羅病毒 P 蛋白質。

為比較在醱酵槽大規模生產諾羅病毒 P 蛋白質的情況下，額外表現 Hac1 的策略是否如搖瓶培養時一樣奏效，取未額外表現 Hac1 之菌株 *P. pastoris*  $\alpha$ P 以相同醱酵條件進行培養誘導，離心後取上清液進行聚丙烯醯胺膠體電泳分析，

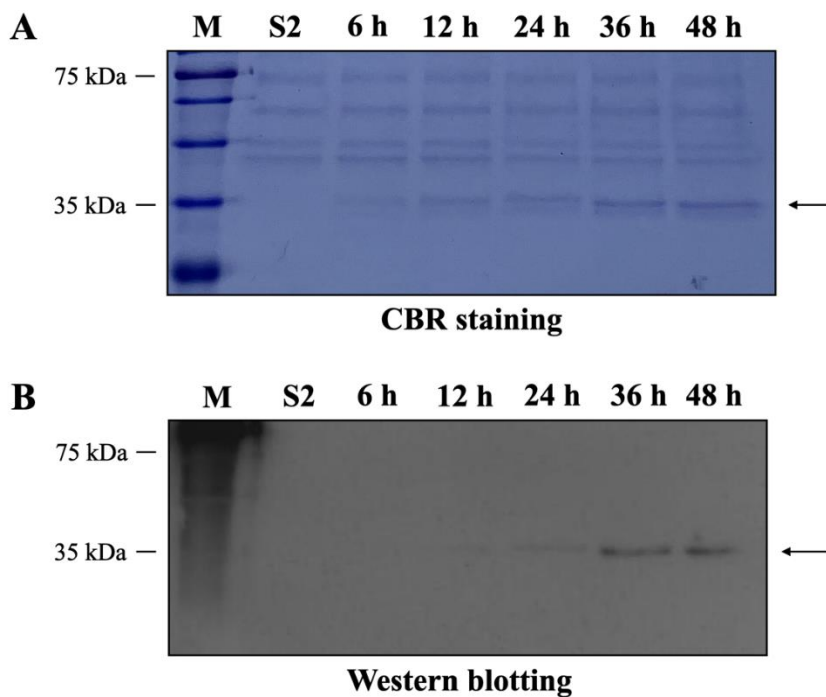


同樣觀察到 35-48 kDa 之間有明顯蛋白質條帶，隨著誘導時間增加目標蛋白質條帶越來越深，且菌株 *P. pastoris* αPH 誘導後 24 小時的目標蛋白質條帶比菌株 *P. pastoris* αP 誘導後 48 小時的目標蛋白質條帶顏色還深，說明菌株 αPH 外泌諾羅病毒 P 蛋白質的產量高於菌株 *P. pastoris* αP (圖十五)。並透過 OD<sub>600</sub> 確認額外表現 Hacl 在醱酵槽培養的規模下亦不影響生長 (圖十六)。此結果證明額外表現 Hacl 增加 *P. pastoris* 表現系統外泌效率的策略確實可以於 5 L 醱酵槽生產的過程中提升目標蛋白質的外泌產量。



圖十三、以菌株  $\alpha$ PH 進行胞外生產諾羅病毒 P 蛋白質之醱酵參數圖

Figure 13. Extracellular production of P protein with strain  $\alpha$ PH in 5L-fermenter



圖十四、醱酵槽生產 P 蛋白質之聚丙烯醯胺膠體電泳及西方墨點法分析

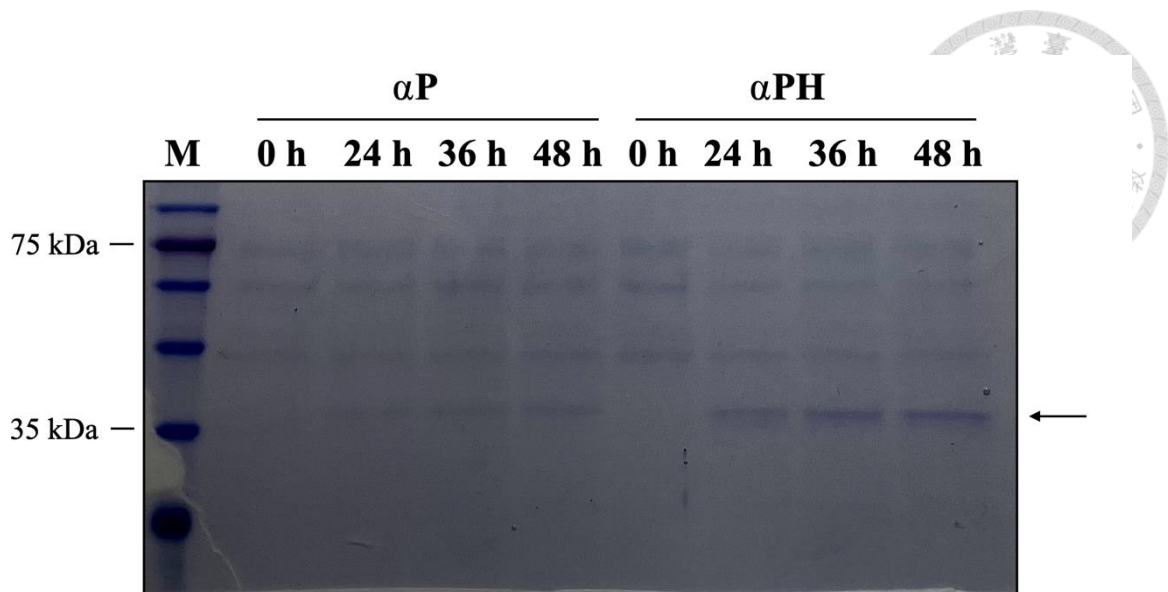
(A) 菌株 *P. pastoris* αPH 甲醇誘導後以聚丙烯醯胺膠體電泳及 CBR 染色分析諾羅病毒 P 蛋白質外泌量。S2: spike 2，代表誘導第零小時。6、12、24、36 及 48 h 代表誘導時間。M: protein marker。

(B) 菌株 *P. pastoris* αPH 甲醇誘導後以西方墨點法分析諾羅病毒 P 蛋白質外泌量。S2: spike 2，代表誘導第零小時。6、12、24、36 及 48 h 代表誘導時間。M: protein marker。

Figure 14. SDS-PAGE and western blotting analysis of extracellular P proteins after methanol induction in fermentation culture. S2: spike 2. 6, 12, 24, 36, and 48 h represent the hours after induction. M: protein marker.

(A) SDS-PAGE and CBR staining analysis of *P. pastoris* αPH supernatant after methanol induction in fermentation culture.

(B) Western blotting analysis of *P. pastoris* αPH supernatant after methanol induction in fermentation culture.

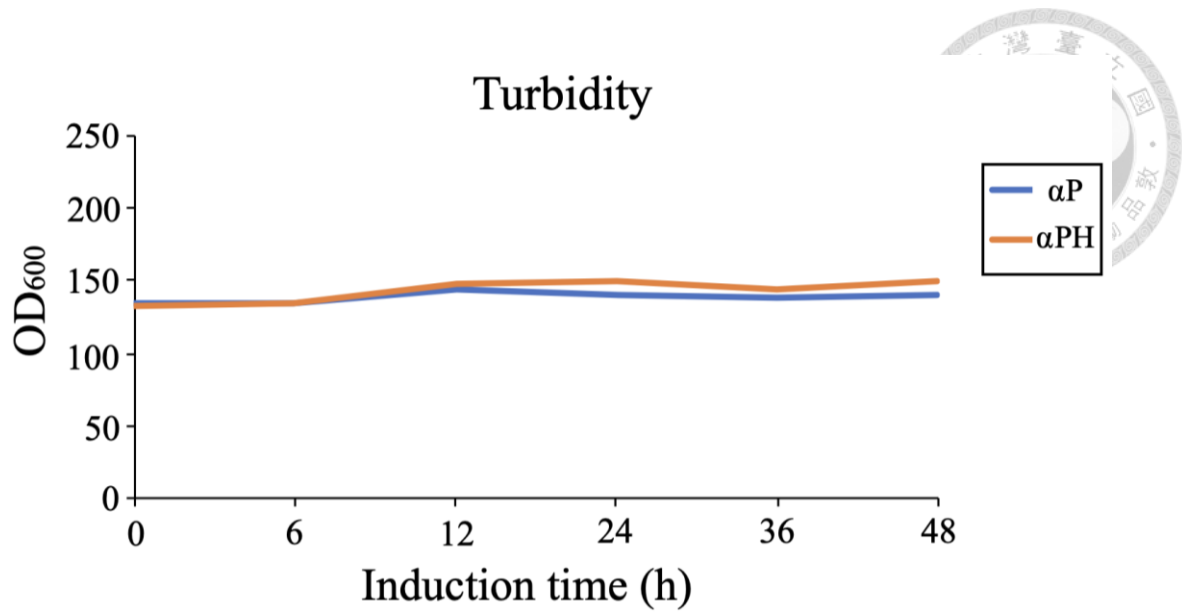


圖十五、 $\alpha P$  及  $\alpha PH$  醱酵槽生產諾羅病毒 P 蛋白質之聚丙烯醯胺電泳分析

菌株 *P. pastoris*  $\alpha P$  及 *P. pastoris*  $\alpha PH$  於醱酵槽培養甲醇誘導後以聚丙烯醯胺膠體電泳及 CBR 染色分析諾羅病毒 P 蛋白質外泌量。6、12、24、36 及 48 h 代表誘導時間。M: protein marker。

Figure 15. SDS-PAGE analysis of extracellular P protein after methanol induction in fermentation culture.

SDS-PAGE and CBR staining analysis of *P. pastoris*  $\alpha P$  and *P. pastoris*  $\alpha PH$  supernatant after methanol induction in fermentation culture. 6, 12, 24, 36, and 48 h represent the hours after induction. M: protein marker.



圖十六、醱酵槽誘導外泌諾羅病毒 P 蛋白質之菌株於誘導過程的濁度變化

Figure 16. Turbidity of different P protein-secreted strain during methanol induction in fermentation culture

## 第四章 討論



### 一、 *P. pastoris* 表現系統外泌效率之瓶頸

本研究與實驗室前人熊浩安的研究雖然都從未摺疊蛋白質反應的角度切入試圖提升 *P. pastoris* 外泌效率，但不同的是，本研究選擇直接表現 Ire1 下游的轉錄因子 Hac1，以更直覺的方式來提升未摺疊蛋白質反應，增加細胞處理內質網壓力的能力。與核酸內切酶 Ire1 相比，Hac1 是轉錄因子，無須考慮是否具有正常酵素活性，或是其作用位置不對沒有鑲嵌在內質網膜上等不確定因素。

提升外泌效率的目的是為了盡可能提升 *P. pastoris* 表現系統外泌生產時的產量，然而本研究中用於表現 Hac1 之啟動子為  $P_{AOX1}$ ，儘管從實驗結果看來外泌效率獲得提升，卻也可能因為轉入過多的  $P_{AOX1}$  增加 *P. pastoris* 染色體上之 Mxr1 結合位，造成 Mxr1 的稀釋效應，使菌體在甲醇誘導時目標蛋白質表現量降低。因此若結合實驗室前人張景翔的研究，共同表現 Mxr1 及 Hac1，不但可以透過額外表現 Mxr1 解決稀釋效應，亦可以進一步測試額外表現 Hac1 的外泌策略，在菌體面對更大量的異源蛋白質表現，累積在內質網中的未摺疊蛋白質大幅增加時，是否亦能突破 *P. pastoris* 表現系統之外泌瓶頸。





## 二、額外表現 *Hac1* 之菌株面對內質網壓力時的反應

### 1. *KAR2*

*Kar2* 為一種分子伴護蛋白質，可與蛋白質結合阻止其在內質網中相互聚集，協助蛋白質正確摺疊，過去也曾有人透過額外表現 *Kar2* 的策略來提升目標蛋白質的外泌效率[53, 100]，在熊浩安的研究發現額外表現 *Ire1* 可以使得 *KAR2* 表現量提升，卻無法有效提升外泌產量。而本研究額外表現 *Hac1* 的菌株 *P. pastoris*  $\alpha$ EH，其 *KAR2* 基因表現量高於控制組 *P. pastoris*  $\alpha$ E，主要係因為 *KAR2* 基因啟動子含有未摺疊蛋白質反應元件 (UPRE)，會與轉錄因子 *Hac1* 結合並受到活化。本研究與熊浩安的研究 *KAR2* 表現量提升的情形相同，但提升外泌效率的成果卻不同，說明 *KAR2* 表現量可以作為未摺疊蛋白質反應程度的參考，卻無法因 *KAR2* 表現量提升就認定外泌產量會跟著提升。此外，亦說明額外表現 *Hac1* 除了提升 *KAR2* 表現量之外，也提升了其他可幫助蛋白質摺疊的相關基因表現，達到促進外泌的效果，至於何種協助外泌的基因與 *KAR2* 一同受到提升，則需進一步研究探討。

### 2. *Hrd1* 與 *Ubc1*

當菌株大量表現異源蛋白質時，容易因為蛋白質來不及正確摺疊而堆積在內質網中造成內質網壓力，當細胞面臨此狀況時，除了會提升蛋白質摺疊效率以利外泌作用；亦能辨識摺疊錯誤或是自體聚集的蛋白質，進行 ERAD，錯誤摺疊之蛋白質被辨識後會以泛素-蛋白酶體系統降解[101]。在本論文中參考實驗室前人作法，以泛素化修飾相關基因 *Hrd1* 與 *Ubc1* 作為 ERAD 活化程度的指標 [97]，發現額外表現轉錄因子 *Hac1* 之菌株 *P. pastoris*  $\alpha$ EH 其 *Hrd1* 與 *Ubc1*

的 mRNA 表現量較低， ERAD 活化程度較低。將熊浩安之研究結果與本研究結果整理成表七，發現與 *KAR2* 基因表現量相比，反而 ERAD 相關基因被活化程度之高低才是外泌產量是否提升的指標，說明適度抑制 ERAD 或許是提升外泌產量的另一個研究方向。

表七、本研究與前人研究結果比較


Table 7. Comparison between previous and current study

	額外表現	<i>KAR2</i> (UPR)	<i>HRD1, UBC1</i> (ERAD)	提升外泌效率
熊浩安[97]	Ire1	提升	提升	否
本研究	Hac1	提升	降低	是



### 三、額外表現 Hac1 對菌株外泌目標蛋白質之影響

本研究以 E2-Crimson 紅色螢光蛋白質作為模式蛋白質，探討額外表現 Hac1 對 *P. pastoris* 表現系統的外泌效率之影響。結果顯示，額外表現 Hac1 的菌株 *P. pastoris* αEH 於上清液測得螢光強度明顯高於未額外表現 Hac1 之 *P. pastoris* αE 菌株，在誘導第五天時 *P. pastoris* αEH 的螢光強度為 *P. pastoris* αE 的 2.6 倍，說明分泌至胞外的 E2-Crimson 較多，外泌效率因 Hac1 有所提升。綜合額外表現 Hac1 對外泌 E2-Crimson 菌株之 mRNA 表現量之影響的結果，推論額外表現 Hac1 的菌株提升 *KAR2* 的 mRNA 表現量後，會增加內質網中蛋白質摺疊的能力，使得 *P. pastoris* 面臨內質網壓力時，正確摺疊蛋白質的效率提升，外泌效率亦因此提升，E2-Crimson 被有效分泌至胞外，最後得到上清液測得較高螢光強度的結果。另一方面，ERAD 相關基因 *HRD1* 及 *UBC1* 的 mRNA 表現量則是 *P. pastoris* αE 高於 *P. pastoris* αEH，推論可能的原因為，蛋白質正確折疊的效率提升的同時，蛋白質累積在內質網中的程度增加，使得未額外表現 Hac1 的菌株內質網壓力比額外表現 Hac1 的菌株還要高，導致 *P. pastoris* αE 啟動 ERAD 的反應更為劇烈，將目標蛋白質分解。ERAD 為紓緩內質網壓力的重要機制，但卻會造成目標蛋白質分解而降低產量，或許嘗試抑制 ERAD 的反應，是除了提升 *PAOX1* 表現效率及提升外泌效率之外另一種提升產量的方法。過去研究中，Neuza 等人發現 ERAD 缺陷的黑黴菌 (*Aspergillus niger*) 菌株在誘導時，UPR 相關基因表現量及胞內異源蛋白質的產量受到提升[102]。因此，以胞內方式生產異源蛋白質時亦可以嘗試抑制 ERAD 達到提升產量的目的，因為相較於外泌，胞內生產理論上也會產生嚴重的內質網壓力，引發細胞的 ERAD，若是抑制 ERAD 的發生則可以避免目標蛋白質在細胞內被降解。



進一步將此額外表現 Hac1 的策略應用於外泌諾羅病毒 P 蛋白質的菌株上，發現此提升外泌效率的策略確實一樣奏效。然而，此策略應用在外泌 E2-Crimson 的菌株及外泌諾羅病毒 P 蛋白質的菌株上時成效不同，說明額外表現 Hac1 的策略提升外泌效率的程度可能根據不同目標蛋白質的特性而有所不同。進行聚丙烯醯胺電泳分析後發現大約在 75 kDa 處，*P. pastoris* αPH 會出現未知條帶；*P. pastoris* αP 則沒有，在文獻中發現相似結果，當引起細胞未摺疊蛋白質反應時，Kar2 會被分泌到細胞外[99, 103, 104]，因此推論本研究中 75 kDa 處之蛋白質條帶為 Kar2。使用醱酵槽進行高密度培養，大量生產諾羅病毒 P 蛋白質，發現與搖瓶結果相似，αPH 菌株上清液中之諾羅病毒 P 蛋白質濃度明顯高於 *P. pastoris* αP，說明本論文以額外表現轉錄因子 Hac1 提升 *P. pastoris* 表現系統之外泌效率，並以醱酵槽大量生產諾羅病毒 P 蛋白質的策略是可行的。然而，在醱酵槽的結果中卻發現許多非預期的蛋白質條帶，比較菌株 *P. pastoris* αP 及 *P. pastoris* αPH 的電泳結果，發現上清液中皆存在雜蛋白，因此認為雜蛋白的出現與額外表現 Hac1 無關。此外，這些非預期的蛋白質條帶沒有隨著誘導天數逐漸增加，說明這些雜蛋白質與甲醇誘導無關，可能為甲醇誘導前的培養步驟產生，是否為 fed-batch 培養時饋入過多甘油使細胞產生大量代謝物導致，則需要進一步研究確認。

## 第五章 結論



*P. pastoris* 表現系統為常見，且被廣泛應用的異源表現系統，然而，外泌效率的瓶頸是限制其發展的重要原因之一。本論文先以 E2-Crimson 紅色螢光蛋白質作為 reporter gene，藉由螢光蛋白質方便觀察及測量的特性，發現額外表現未摺疊蛋白質反應之轉錄因子 Hac1 的策略能夠提升 *P. pastoris* 表現系統的外泌效率，且提升 UPR 相關基因 *KAR2*；抑制 ERAD 相關基因 *HRD1* 與 *UBC1*。進一步將此提升外泌效率的策略應用在外泌生產諾羅病毒 P 蛋白質上，不論在搖瓶或 5 L 醱酵槽進行培養誘導，額外表現 Hac1 之菌株其胞外的諾羅病毒 P 蛋白質產量皆得到提升。總而言之，透過額外表現 Hac1 提升外泌效率的策略確實可行，可以使 *P. pastoris* 表現系統未來在工業化生產蛋白質時，降低目標蛋白質回收及純化步驟，減少生產成本，增加商業價值。

## 第六章 未來展望



本論文的主要目標為以額外表現轉錄因子 *Hac1* 的策略提升 *P. pastoris* 表現系統的外泌效率，以培養基中外泌之蛋白質產量受到提升之結果看來，此策略具發展的可行性，惟許多問題仍待釐清：

### 1. 探討以不同啟動子表現 *Hac1* 之影響

本研究以過去實驗室常用的  $P_{AOX1}$  額外表現 *Hac1* 成功提升 *P. pastoris* 的外泌效率，然而，過多的  $P_{AOX1}$  可能造成稀釋效應導致  $P_{AOX1}$  轉錄活性下降，進而影響目標蛋白質產量[25]。過去研究中曾以不同啟動子如  $P_{GAP}$ [98]，來額外表現 *Hac1*。因此，以不同啟動子額外表現 *Hac1*，探討是否會影響目標蛋白質外泌的產量，是未來可以進一步研究的部分。

### 2. 探討額外表現 *Hac1* 提升外泌效率的應用性

過去研究曾提及，額外表現 *Hac1* 提升外泌效率的策略不能一概而論，表現不同異源蛋白質時需根據不同情況進行評估[99]。額外表現 *Hac1* 將促使未摺疊蛋白質反應的相關基因表現，進而提升內質網中蛋白質摺疊的能力，理論上可以增加任何蛋白質的外泌效率。因此若是遇到此表現策略提升外泌效率情形不理想時，則可探討蛋白質是否卡在內質網中或是其他位置導致外泌失敗，例如在共轉譯轉位 (co-translational translocation) 時，蛋白質累積在細胞核與內質網間[19]，也可能會影響蛋白質分泌，需考慮採取其它外泌策略。

### 3. 嘗試結合不同外泌策略

本研究從未摺疊蛋白質反應切入，以提升未摺疊蛋白質反應的方式改善外泌效率不佳的問題，然而過去研究中除了額外表現未摺疊蛋白質反應之相關基因

外，亦有改善外泌訊號序列或調整誘導溫度等提升外泌效率之策略。例如以 Ost1 之訊號序列取代原本常用的  $\alpha$  因子作為外泌訊號序列[65, 66]，以及降低溫度有利於外泌蛋白質的產量提升[68, 71, 105, 106]。若將本研究結果結合不同提升外泌之策略，則有可能將目標蛋白質外泌產量進一步提高。

## 第七章 參考文獻

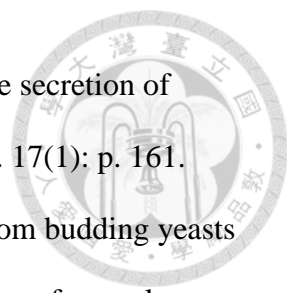


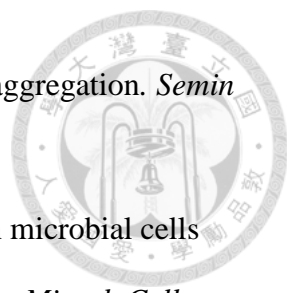
1. M.D. Binder, N. Hirokawa, and U. Windhorst, *Heterologous Expression*, in *Encyclopedia of Neuroscience*, SpringerLink. 2009. p. 1830-1830.
2. Gomes, A.R., et al., An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Adv Anim Vet Sci*, 2016. 4: p. 346-356.
3. Gellissen, G., Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000. 54(6): p. 741-50.
4. Cregg, J.M., et al., Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000. 16(1): p. 23-52.
5. Ahmad, M., et al., Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014. 98(12): p. 5301-17.
6. Damasceno, L.M., et al., Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012. 93(1): p. 31-9.
7. Guilliermond, A., *Zygosaccharomyces Pastori, nouvelle espèce de levures à copulation hétérogamique*. 1920.
8. Phaff, H.J., M.W. Miller, and M. Shifrine, The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1956. 22(1): p. 145-161.
9. Wegner, G.H. and W. Harder, Methylotrophic yeasts-1986. *Microbial Growth on C<sub>1</sub> Compounds*, 1987. p. 131-138.
10. Yamada, Y., et al., The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the

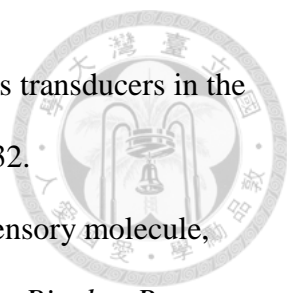






- proposal of *Komagataella* gen. nov. (*Saccharomycetaceae*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995. 59(3): p. 439-44.
11. Kurtzman, C.P., Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009. 36(11): p. 1435-8.
  12. Naumov, G.I., E.S. Naumova, and K.L. Boundy-Mills, Description of *Komagataella mondaviorum* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018. 111(7): p. 1197-1207.
  13. Bill, R.M., Yeast-a panacea for the structure-function analysis of membrane proteins? *Curr Genet*, 2001. 40(3): p. 157-71.
  14. Cregg, J.M., T.S. Vedvick, and W.C. Raschke, Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 1993. 11(8): p. 905-910.
  15. Waters, M.G., E.A. Evans, and G. Blobel, Prepro-alpha-factor has a cleavable signal sequence. *J Biol Chem*, 1988. 263(13): p. 6209-14.
  16. Bevan, A., C. Brenner, and R.S. Fuller, Quantitative assessment of enzyme specificity in vivo: P2 recognition by Kex2 protease defined in a genetic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(18): p. 10384-9.
  17. Wagner, J.C. and D.H. Wolf, Hormone (pheromone) processing enzymes in yeast. The carboxy-terminal processing enzyme of the mating pheromone alpha-factor, carboxypeptidase ysc alpha, is absent in alpha-factor maturation-defective kex1 mutant cells. *FEBS Lett*, 1987. 221(2): p. 423-6.
  18. Lin-Cereghino, G.P., et al., The effect of  $\alpha$ -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 2013. 519(2): p. 311-7.

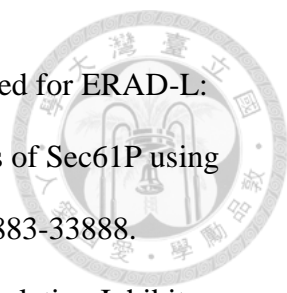
- 
19. Barrero, J.J., et al., An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, 2018. 17(1): p. 161.
20. Fitzgerald, I. and B.S. Glick, Secretion of a foreign protein from budding yeasts is enhanced by cotranslational translocation and by suppression of vacuolar targeting. *Microb Cell Fact*, 2014. 13(1): p. 125.
21. Zhang, W., et al., 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): p. 1-8.
22. Sinha, J., et al., Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnol Bioeng*, 2005. 89(1): p. 102-12.
23. Sahu, U., K. Krishna Rao, and P.N. Rangarajan, Trm1p, a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>-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): p. 158-64.
24. Cámara, E., et al., Increased dosage of AOX1 promoter-regulated expression cassettes leads to transcription attenuation of the methanol metabolism in *Pichia pastoris*. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 44302.
25. Chang, C.H., et al., Enhancing the efficiency of the *Pichia pastoris* AOX1 promoter via the synthetic positive feedback circuit of transcription factor Mxr1. *BMC Biotechnol*, 2018. 18(1): p. 81.
26. Anelli, T. and R. Sitia, Protein quality control in the early secretory pathway. *Embo j*, 2008. 27(2): p. 315-27.
27. Ellgaard, L. and A. Helenius, Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(3): p. 181-191.

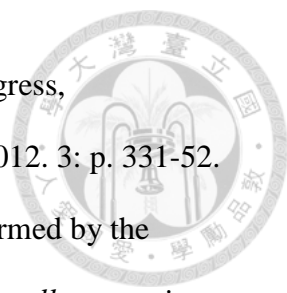
- 
28. Dobson, C.M., Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. 15(1): p. 3-16.
29. Gasser, B., et al., Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb Cell Fact*, 2008. 7: p. 11.
30. Idiris, A., et al., Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. 86(2): p. 403-17.
31. Delic, M., et al., Engineering of protein folding and secretion-strategies to overcome bottlenecks for efficient production of recombinant proteins. *Antioxid Redox Signal*, 2014. 21(3): p. 414-37.
32. Hwang, J. and L. Qi, Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci*, 2018. 43(8): p. 593-605.
33. Chakraborty, R., et al., Comparison and contrast of plant, yeast, and mammalian ER stress and UPR. *Applied Biological Chemistry*, 2016. 59(3): p. 337-347.
34. Chakrabarti, A., A.W. Chen, and J.D. Varner, A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng*, 2011. 108(12): p. 2777-93.
35. Wu, H., B.S. Ng, and G. Thibault, Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Biosci Rep*, 2014. 34(4).
36. Cox, J.S., C.E. Shamu, and P. Walter, Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 1993. 73(6): p. 1197-206.
37. Walter, P. and D. Ron, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011. 334(6059): p. 1081-6.
38. Pincus, D., et al., BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 2010. 8(7): p. e1000415.

- 
39. Bertolotti, A., et al., Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2000. 2(6): p. 326-32.
40. Okamura, K., et al., Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 279(2): p. 445-50.
41. Kimata, Y., et al., A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol*, 2004. 167(3): p. 445-56.
42. Mori, K., et al., A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*, 1993. 74(4): p. 743-56.
43. Shamu, C.E. and P. Walter, Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Embo j*, 1996. 15(12): p. 3028-39.
44. Sidrauski, C. and P. Walter, The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 1997. 90(6): p. 1031-9.
45. Rubio, C., et al., Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *J Cell Biol*, 2011. 193(1): p. 171-84.
46. Cox, J.S. and P. Walter, A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, 1996. 87(3): p. 391-404.
47. Mori, K., et al., Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells*, 1996. 1(9): p. 803-17.


- 
48. Kawahara, T., et al., Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Mol Biol Cell*, 1997. 8(10): p. 1845-62.
49. Rügsegger, U., J.H. Leber, and P. Walter, Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell*, 2001. 107(1): p. 103-14.
50. Whyteside, G., et al., Activation of the unfolded protein response in *Pichia pastoris* requires splicing of a HAC1 mRNA intron and retention of the C-terminal tail of Hac1p. *FEBS Lett*, 2011. 585(7): p. 1037-41.
51. Mori, K., et al., A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *Embo J*, 1992. 11(7): p. 2583-93.
52. Travers, K.J., et al., Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 2000. 101(3): p. 249-58.
53. Damasceno, L.M., et al., Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. 74(2): p. 381-9.
54. Vad, R., et al., Engineering of a *Pichia pastoris* expression system for secretion of high amounts of intact human parathyroid hormone. *J Biotechnol*, 2005. 116(3): p. 251-60.
55. Lodish, H.F., et al., Hepatoma secretory proteins migrate from rough endoplasmic reticulum to Golgi at characteristic rates. *Nature*, 1983. 304(5921): p. 80-3.

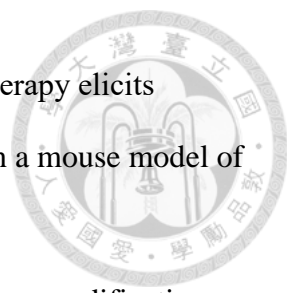
- 
56. Shusta, E.V., et al., Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat Biotechnol*, 1998. 16(8): p. 773-7.
57. Parekh, R., K. Forrester, and D. Wittrup, Multicopy overexpression of bovine pancreatic trypsin inhibitor saturates the protein folding and secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*, 1995. 6(4): p. 537-45.
58. Shuster, J.R., Gene expression in yeast: protein secretion. *Curr Opin Biotechnol*, 1991. 2(5): p. 685-90.
59. Matlack, K.E., et al., BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, 1999. 97(5): p. 553-64.
60. Rowling, P.J. and R.B. Freedman, Folding, assembly, and posttranslational modification of proteins within the lumen of the endoplasmic reticulum. *Subcell Biochem*, 1993. 21: p. 41-80.
61. Wilkinson, B. and H.F. Gilbert, Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1699(1-2): p. 35-44.
62. Ng, D.T., J.D. Brown, and P. Walter, Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology*, 1996. 134(2): p. 269-278.
63. Plath, K., et al., Signal Sequence Recognition in Posttranslational Protein Transport across the Yeast ER Membrane. *Cell*, 1998. 94(6): p. 795-807.
64. Rakestraw, J.A., et al., Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009. 103(6): p. 1192-1201.

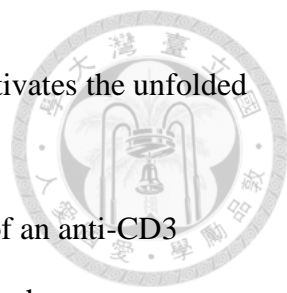
- 
65. Willer, M., G.M.A. Forte, and C.J. Stirling, Sec61p Is Required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY. *J Biol Chem*, 2008. 283(49): p. 33883-33888.
66. Forte, G.M.A., M.R. Pool, and C.J. Stirling, N-Terminal Acetylation Inhibits Protein Targeting to the Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biol*, 2011. 9(5): p. e1001073.
67. Hackel, B.J., et al., Production of soluble and active transferrin receptor-targeting single-chain antibody using *Saccharomyces cerevisiae*. *Pharm Res*, 2006. 23(4): p. 790-797.
68. Li, Z., et al., Low-Temperature Increases the Yield of Biologically Active Herring Antifreeze Protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2001. 21(3): p. 438-445.
69. Lin, H., et al., Enhancing the production of Fc fusion protein in fed-batch fermentation of *Pichia pastoris* by design of experiments. *Biotechnol Prog*, 2007. 23(3): p. 621-625.
70. Shi, X., et al., Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2003. 28(2): p. 321-330.
71. Gasser, B., et al., Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions. *BMC Genomics*, 2007. 8(1): p. 179.
72. Smith, J.D., N.E. Richardson, and A.S. Robinson, Elevated expression temperature in a mesophilic host results in increased secretion of a hyperthermophilic enzyme and decreased cell stress. *Biochim et Biophys Acta Proteins Proteom*, 2005. 1752(1): p. 18-25.
73. Bull, R.A., M.M. Tanaka, and P.A. White, Norovirus recombination. *J Gen Virol*, 2007. 88(Pt 12): p. 3347-3359.

- 
74. Li, J., et al., New interventions against human norovirus: progress, opportunities, and challenges. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2012. 3: p. 331-52.
75. Chen, Y.L., P.J. Chang, and C.T. Huang, Small P particles formed by the Taiwan-native norovirus P domain overexpressed in *Komagataella pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018. 102(22): p. 9707-9718.
76. Conly, J. and B. Johnston, Norwalk virus - Off and running. *Can J Infect Dis*, 2003. 14(1): p. 11-3.
77. Moore, M.D., R.M. Goulter, and L.A. Jaykus, Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2015. 6: p. 411-33.
78. Lopman, B.A., et al., The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS Med*, 2016. 13(4): p. e1001999.
79. Koopmans, M., Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis*, 2008. 21(5): p. 544-52.
80. Bayer, M.E., B.S. Blumberg, and B. Werner, Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature*, 1968. 218(5146): p. 1057-9.
81. Serino, L., Seib, L., and Pizza, M., *Design of New Vaccines in Genomic and Post-genomic Era*, in *Innovation in Vaccinology: from design, through to delivery and testing*, S. Baschieri, Editor. 2012, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 3-15.
82. Grimm, S.K. and M.E. Ackerman, Vaccine design: emerging concepts and renewed optimism. *Curr Opin Biotechnol*, 2013. 24(6): p. 1078-88.
83. Rebeaud, F. and M. Bachmann, *Virus-Like Particles as Efficient Delivery Platform to Induce a Potent Immune Response*, in *Innovation in Vaccinology:*



- 
- from design, through to delivery and testing*, S. Baschieri, Editor. 2012, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 87-122.
84. Atmar, R.L., S. Ramani, and M.K. Estes, Human noroviruses: recent advances in a 50-year history. *Curr Opin Infect Dis*, 2018. 31(5): p. 422-432.
  85. Prasad, B.V., et al., X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 1999. 286(5438): p. 287-90.
  86. Greenberg, H.B., et al., Proteins of Norwalk virus. *J Virol*, 1981. 37(3): p. 994-999.
  87. Hardy, M.E., et al., Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. *J Virol*, 1995. 69(3): p. 1693-1698.
  88. Fang, H., et al., Norovirus P particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity. *PLoS One*, 2013. 8(4): p. e63269.
  89. Bárcena, J. and E. Blanco, Design of novel vaccines based on virus-like particles or chimeric virions. *Subcell Biochem*, 2013. 68: p. 631-65.
  90. Tan, M., et al., Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J Virol*, 2011. 85(2): p. 753-64.
  91. Tan, M. and X. Jiang, Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus, rotavirus and influenza virus. *Nanomedicine (Lond)*, 2012. 7(6): p. 889-97.
  92. Xia, M., et al., A candidate dual vaccine against influenza and noroviruses. *Vaccine*, 2011. 29(44): p. 7670-7.
  93. Fu, L., et al., Characterization of NoV P particle-based chimeric protein vaccines developed from two different expression systems. *Protein Expr Purif*, 2017. 130: p. 28-34.

- 
94. Fu, L., et al., Norovirus P particle-based active A $\beta$  immunotherapy elicits sufficient immunogenicity and improves cognitive capacity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 41041.
95. Li, Y., et al., Establishment of a novel method without sequence modification for developing NoV P particle-based chimeric vaccines. *Protein Expr Purif*, 2016. 121: p. 73-80.
96. Hsieh, S.-Y., Enhancing AOX1 promoter efficiency of *Konagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) using CRISPRi and CRISPRa. *National Taiwan University Master Thesis*, 2020.
97. Hsiung, H.-A., Effects of Additional Ire1 Expression on Secretory Efficiency of Anti-EGFR ScFv in *Pichia pastoris*. *National Taiwan University Master Thesis*, 2018.
98. Huang, M., et al., Regulating unfolded protein response activator HAC1p for production of thermostable raw-starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylase in *Pichia pastoris*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2017. 40(3): p. 341-350.
99. Guerfal, M., et al., The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microb Cell Fact*, 2010. 9: p. 49.
100. Yang, J., et al., Effect of cooperation of chaperones and gene dosage on the expression of porcine PGLYRP-1 in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016. 100(12): p. 5453-65.
101. Meusser, B., et al., ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, 2005. 7(8): p. 766-72.
102. Carvalho, N.D.S.P., et al., Effects of a defective ERAD pathway on growth and heterologous protein production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011. 89(2): p. 357-373.

- 
103. Belden, W.J. and C. Barlowe, Deletion of yeast p24 genes activates the unfolded protein response. *Mol Biol Cell*, 2001. 12(4): p. 957-69.
104. Liu, Y.Y., J.H. Woo, and D.M. Neville, Jr., Overexpression of an anti-CD3 immunotoxin increases expression and secretion of molecular chaperone BiP/Kar2p by *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*, 2005. 71(9): p. 5332-40.
105. Saraste, J., G.E. Palade, and M.G. Farquhar, Temperature-sensitive steps in the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1986. 83(17): p. 6425-6429.
106. Dragosits, M., et al., The Effect of Temperature on the Proteome of Recombinant *Pichia pastoris*. *J Proteome Res*, 2009. 8(3): p. 1380-1392.
107. Zepeda, A., A. Pessoa, and J. Farias, Carbon metabolism influenced for promoters and temperature used in the heterologous protein production using *Pichia pastoris* yeast. *Braz J Microbiol*, 2018. 49 Suppl 1.
108. R S Fuller, a. R E Sterne, and J. Thorner, Enzymes Required for Yeast Prohormone Processing. *Annu Rev Physiol*, 1988. 50(1): p. 345-362.

附表一、不同異源蛋白質表現系統的優缺點



Supplementary Table 1. Merits and demerits of different host systems for expression of recombinant proteins[2]

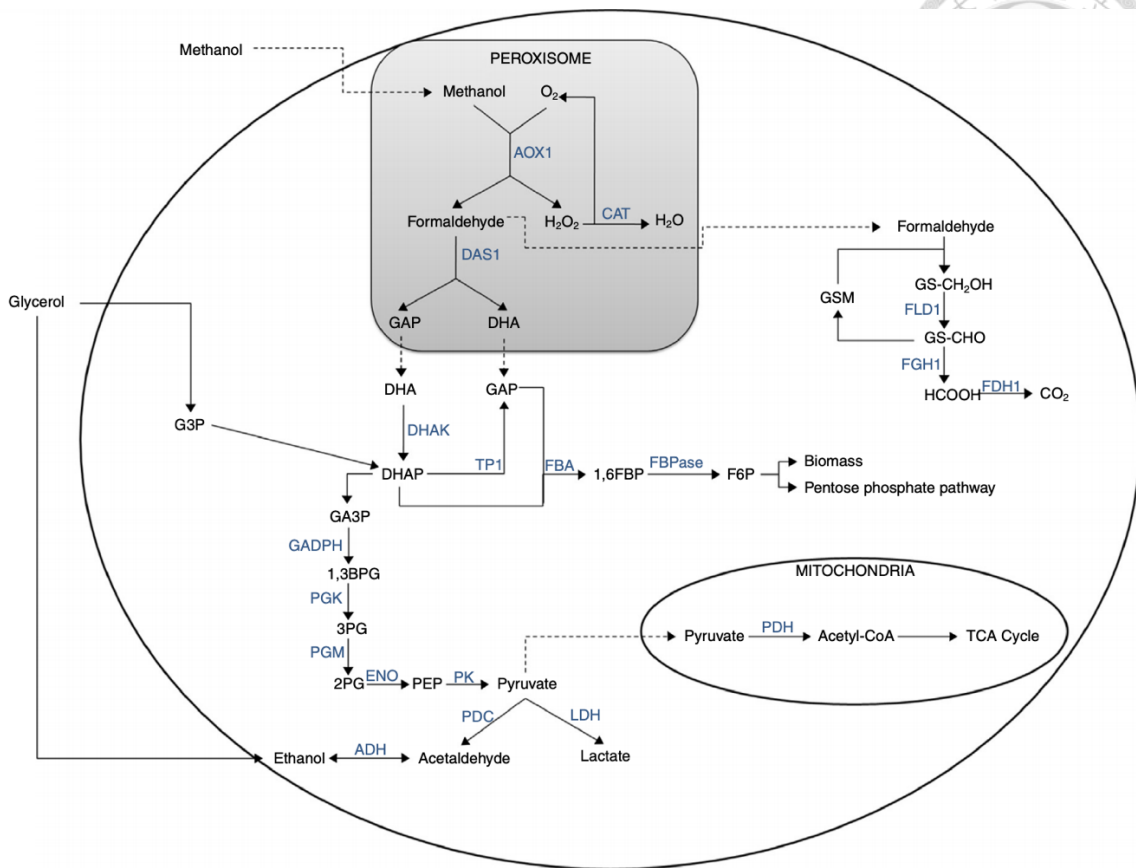
Host system	Merits	Demerits
<i>Escherichia coli</i>	Easy Quick Economical Rapid growth rate Capacity for continuous fermentation	Does not possess necessary machinery for removing introns from transcripts Foreign gene might contain sequences that act as termination signals resulting in premature termination and loss of gene expression Codon bias Lack of post translational modifications Glycosylation is extremely uncommon in bacteria Production of proteins in the insoluble form or in the form of inclusion bodies Degradation of proteins Accumulation of endotoxins
<i>Bacillus subtilis</i>	Does not produce LPS/endotoxins Can be transformed readily with many bacteriophages and plasmids Capable of secreting functional extracellular proteins directly into the culture medium	Production of extracellular proteases which can recognize and degrade heterologous proteins Instability of plasmids Reduced or non expression of the protein of interest
Yeast system	Rapid growth in low cost medium Appropriate post-translational modifications Safety of the system is guaranteed No endotoxins production	Hyperglycosylation of proteins Codon bias Inefficient in secreting the proteins into growth medium leading to intracellular retention
Filamentous fungus	High-level of expression	Complex Lack of knowledge on physiology
Baculovirus / Insect system	High level of expression Appropriate posttranslational modifications Safe for vertebrates Excellent tool for recombinant glycoprotein production	Continuous expression not possible More demanding culture conditions
Mammalian cells / system	Proper protein folding Appropriate post-translational modifications and product assembly Proper glycosylation	High cost Complicated technology Potential contamination with animal viruses
Transgenic plants	Easy scaling up at low cost Proteins can be localized to different organs at different growth stages High yield	Expression levels are target dependent Functional assays yet to be developed
Transgenic animals	Proper protein folding Appropriate post-translational modifications and product assembly Proper glycosylation	Relatively longer production period Low yield Higher costs

附表二、*Pichia pastoris* 菌種表

Supplementary Table 2. Strains table of *Pichia pastoris*

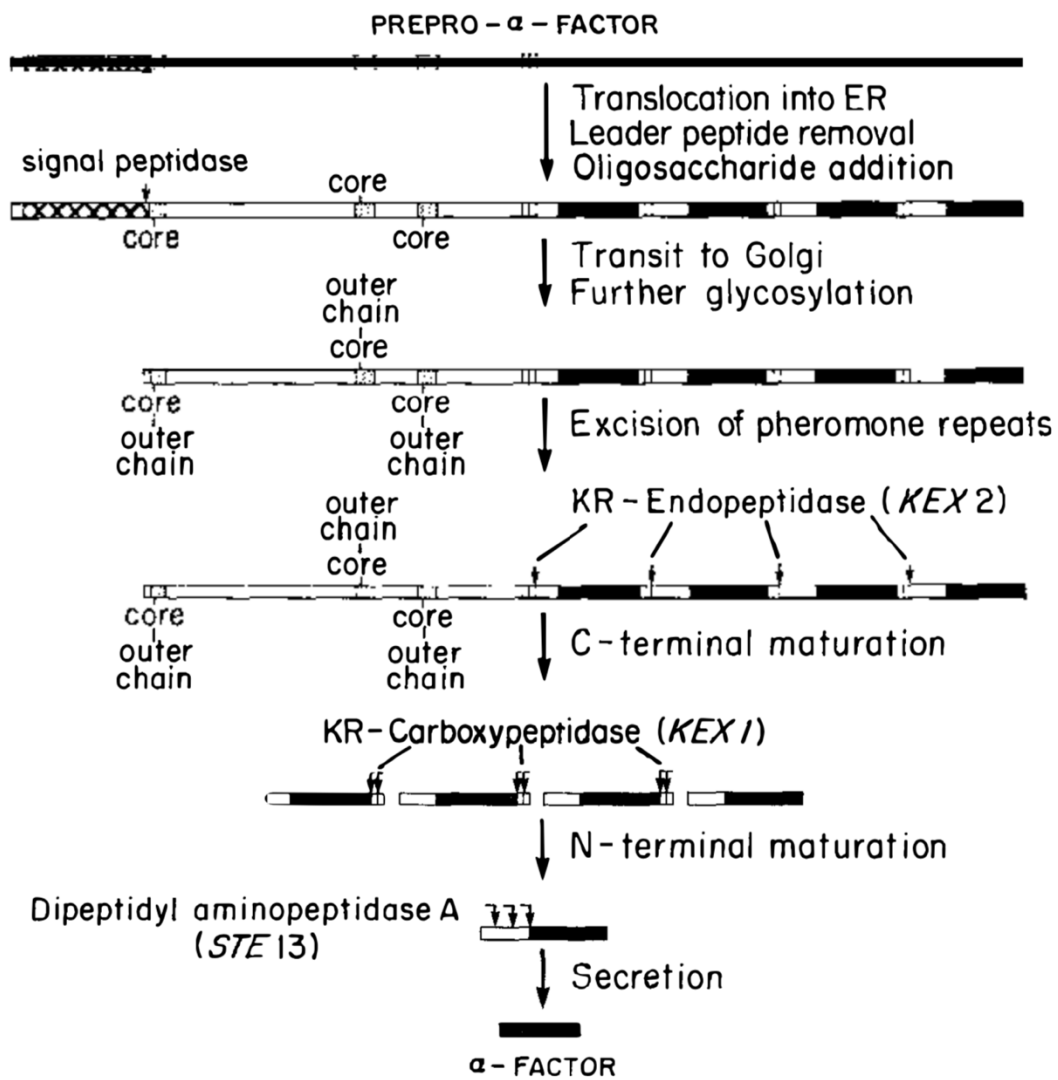


菌株名稱	說明	來源
KM71	無額外表現目標蛋白質。 實驗中作為控制組。	Invitrogen
$\alpha$ E	外泌 E2-Crimson。	簡曼凌
$\alpha$ EH	外泌 E2-Crimson。 額外表現 Hac1。	本篇研究
$\alpha$ P	外泌 P 蛋白質。	陳昱伶[75]
$\alpha$ PH	外泌 P 蛋白質。 額外表現 Hac1。	本篇研究
Ost1-P	以 Ost1 為外泌訊號之外泌 P 蛋白質菌株。 用於取得 ELISA 分析之標準品。	簡曼凌



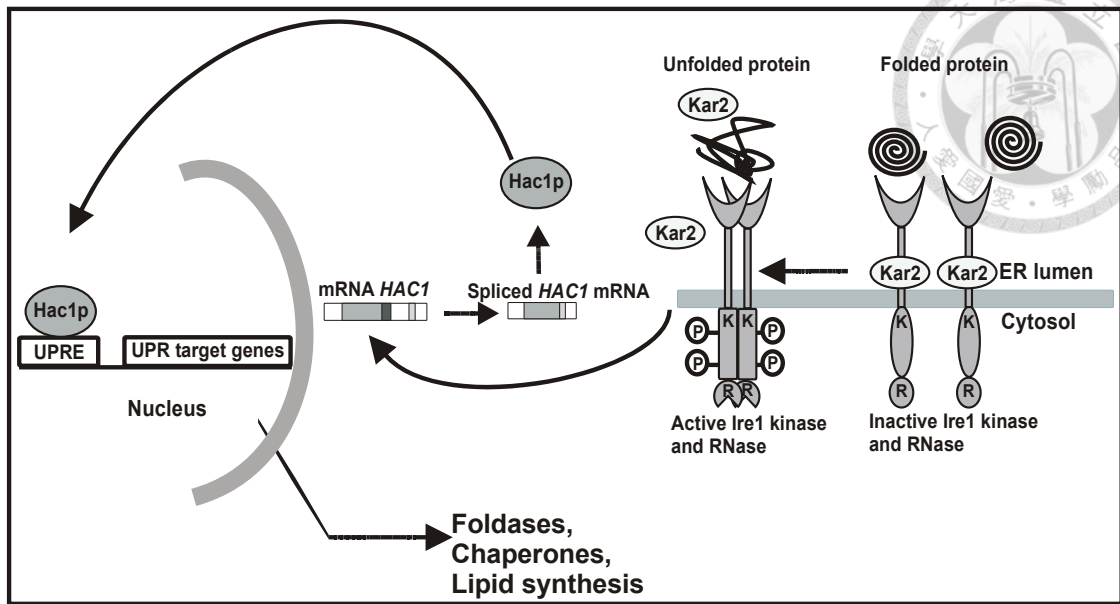
附圖一、*P. pastoris* 的碳源代謝途徑

Supplementary Figure 3. Metabolic network of simplified carbon of *P. pastoris*[107]



附圖二、*S. cerevisiae* 中  $\alpha$  因子 pre-pro 前驅物的修飾途徑

Supplementary Figure 3. Pathway of post-translational processing of pre-pro- $\alpha$ -factor precursor in yeast[108]



附圖三、*S. cerevisiae* 中的未折疊蛋白質反應

Supplementary Figure 4. The unfolded protein response in the yeast *S. cerevisiae*[99]