

建立高重組蛋白表達之酵母菌 *Pichia pastoris* 系統

郭亭君¹ 張瀞文¹ 李振綱² 李冠群^{1*}

¹國立臺灣師範大學生命科學系

²國立臺灣科技大學化學工程系

(收稿日期: 2013.2.1, 接受日期: 2013.4.10)

摘 要

利用真核表現系統來製造生產重組蛋白質已被廣泛應用於醫藥、食品與化學工業等方面,嗜甲醇酵母菌 *Pichia pastoris* 是目前最常被用來大量表達重組蛋白質的真核表達系統,但由於不同外源基因在 *P. pastoris* 中經常會有不同的重組蛋白質表達量,為了要建立一個能穩定且大量表達重組蛋白質的系統,有許多研究報告提出增加外源基因在 *P. pastoris* 表達量的方法。本研究採用操縱細胞整體轉錄作用 (global transcription machinery engineering) 的技術,以提升 *Candida rugosa* 重組脂肪酶在 *P. pastoris* 的表達量,藉由隨機突變 *P. pastoris* 的重要轉錄因子 SPT15 (一種 TATA-binding protein),達到改變 *P. pastoris* 的轉錄體(transcriptome),進而影響 *Candida rugosa* 重組脂肪酶(lipase)的表達量。利用高通量(high-throughput)脂肪酶活性測定法,挑出具有高脂肪酶表達量的突變株。目前已從 464 個突變株當中,篩選出 16 個突變株其脂肪酶表達量高於野生型 1.5 倍以上,其中最高的一株表達量為野生型的 2.3 倍。此結果顯示操縱 *P. pastoris* 整體轉錄作用可以提升外源重組蛋白在 *P. pastoris* 的表達量。

關鍵詞: 酵母菌 *Pichia pastoris*、重組蛋白質表達系統、細胞整體轉錄操縱

緒 言

隨著重組 DNA 操作技術的進步,逐漸開發出多樣性的宿主細胞來表達多元化的重組蛋白 (Danilo *et al.*, 2011),這種將外來基因轉殖送入活細胞內,利用活細胞做為蛋白質的生產工廠稱為蛋白質表達系統,具有高價值、低成本的特性,所製造出來的蛋白質產物保有活性,能廣泛應用於醫藥、食品、化工等方面,像是蛋白質藥物就可針對疾病的致病機制做調控,對臨床醫學的研究有良多貢獻;利用酵素的分解能力可改善環境汙染,使用上不會耗費太多社會成本,例如酵素在家庭清潔劑方面的應用已有許多成功的例子 (張春生, 2004)。利用蛋白質表達系統可以得到各式各樣有用的蛋白質產物,可帶來許多經濟效益,因此建構一個表達量高的穩定系統,在未來極具發展潛力,是目前眾多生技公司積極研發的部分,結合發酵技術後,更是未來化工產業的一大重點。

酵母菌 *Pichia pastoris* 蛋白表達系統

嗜甲醇酵母菌 *P. pastoris* 是廣泛使用於生產

重組蛋白 (recombinant protein) 的酵母菌品種 (Macauley-Patrick *et al.*, 2005),相對於昆蟲細胞和哺乳動物細胞而言,其生長速度快,容易做基因操作,是良好的蛋白表達宿主 (Porro *et al.*, 2005)。另外, *P. pastoris* 可進行真核細胞的轉譯後修飾 (posttranslational modifications),包括蛋白質摺疊 (protein folding)、形成雙硫鍵 (disulfide bond formation)、糖基化 (glycosylation) 等,不像原核細胞因為無法進行轉譯後修飾而較易產生沒有活性、不可溶的包涵體 (inclusion body),因此 *P. pastoris* 可作為表達真核細胞蛋白質的選擇 (Higgins and Cregg, 1998)。除此之外,此系統還具有許多優點: (1) 表現載體可提供表達蛋白之分泌訊息 (secretion signal),使重組蛋白分泌至細胞外,加上 *P. pastoris* 本身分泌的內源蛋白 (endogenous proteins) 量少,及培養液中不須添加額外的蛋白質,因此純化步驟簡單,可減少純化時產物的損失 (Higgins and Cregg, 1998)。 (2) 利用活性高的啟動子 (promoter) 可提高蛋白的表現量,啟動子分兩種,受誘導物調控的 (inducible),或非誘導式而能持續表現的 (constitutive),依產生的重組蛋白是否會對宿主細胞生長造成影響可選擇

*通信作者: 李冠群 (Guan-Chun Lee); FAX: 886-2-29312904; E-mail: gcleee@ntnu.edu.tw

適當的啟動子。(3)外來基因可利用同源重組(homologous recombination)插入宿主基因體中，提高外來基因的穩定性。(4)具有菌體高密度的特性，研究指出在適當的發酵環境下，細胞密度可達 500 OD₆₀₀ U ml⁻¹(Cereghino and Cregg, 2000)。(5)尚未發現任何病毒會感染 *P. pastoris*，可避免生產過程或後續處理的汙染(Li *et al.*, 2007)。目前已經有超過一百種不同的重組蛋白成功的被 *P. pastoris* 所表達。儘管 *P. pastoris* 是一個良好的重組蛋白表達系統，但並非所有重組蛋白的表達量都很高，不同基因之間的表達量差異極大，因此如何提高外源基因在 *P. pastoris* 的表達量，成為一個極重要的課題。

細胞整體轉錄操縱(Global transcription machinery engineering, gTME)

過去的基因工程主要是針對單一或少數幾個基因做修改，這些人為的改變在細胞自身調節下，不一定能達到預期的效果(Liu *et al.*, 2008)，也使得多基因間的相互調控的研究受到侷限。gTME 是透過基因工程修改細胞轉錄過程中重要的基因，造成某些代謝途徑中相關的重要基因功能發生改變，利用此法改變轉錄過程的調控，可創造出多樣化的細胞表型(Liu *et al.*, 2010)。目前 gTME 已成功應用於原核及真核系統，順利地提高細胞對環境的耐受度、代謝物產量及受質的利用率(Lanza and Alper, 2011)，其中成功的例子包括，大腸桿菌(*E. coli*)之 σ -factor 和釀酒酵母菌(*S. cerevisiae*)之 TATA-binding protein 的隨機突變(Klein-Marcuschamer and Stephanopoulos, 2008)。Alper 等人就成功利用 gTME 技術修改轉錄因子的調控，增加啤酒酵母菌(*S. cerevisiae*)對乙醇的耐受性，將使得生質燃料的生產更具優勢(Alper *et al.*, 2006)。但對於較複雜的高等真核生物，gTME 能否順利達到目標還有很大的研究空間。

本研究是第一個嘗試操縱 *Pichia pastoris* 的轉錄作用以提高重組蛋白表達量，我們選定 *P. pastoris* 的重要轉錄因子 TATA-binding protein(TBP)之編碼基因 *SPT15* 來進行 gTME 研究，利用 error-prone PCR 製作 *SPT15* 隨機突變庫(mutant library)，再將突變序列構築到 pGAPKC 的表現載體上，轉型至 *E. coli* 細胞內進行大量複製，以限制酶將質體切成線形後，利用同源重組方式將突變庫載體轉型至先前已經轉殖 *C. rugosa* 脂肪酶基因的 *P. pastoris* SMD1168 品系內(Lee *et al.*, 2002)，接著透過大量篩選方式挑選

出重組脂肪酶產量比野生型還高的突變株。

材料與方法

微生物菌種

本實驗使用 *E. coli* DH5 α 品系來大量複製質體，以及穩定的保存質體於細胞中。本實驗使用嗜甲醇酵母菌 *P. pastoris* SMD1168 品系，作為表達重組蛋白的宿主細胞，此品系具有 protease-deficient 的特性，避免生產的重組蛋白遭蛋白酶分解。

TBP 突變庫質體置備

利用 error-prone PCR 方法，根據 *SPT15* 基因(GenBank no.: XM_002490252)設計一對引子，以質體 pGAPKC/TBP (即 pGAPKC/*SPT15* 質體) 為模板進行 error-prone PCR，擴大並隨機突變 TBP 片段。引子 I 序列為：5'-AGGAATTTCGAAACGATGGATCCCTCAAATTGCC-3'，底線標記為限制酶 *EcoR* I 的切位，引子 II 序列為：5'-ATGATGATGGTCGACGCGCTATT-3'，底線標記為限制酶 *Sal* I 的切位。error-prone PCR 之產物進行回收純化，以 *EcoRI* 及 *SalI* 限制酶作用後，再接回 pGAPKC 質體，則得到 pGAPKC/mTBP 之突變庫 (mutant library)。

E. coli 的質體轉型

取 10 μ l 構築好的質體 DNA (pGAPKC/mTBP) 與 200 μ l *E. coli* DH5 α 勝任細胞混合均勻，冰浴 30 分鐘後，進行 42 $^{\circ}$ C heat shock 處理兩分鐘，隨即冰浴兩分鐘，加入 1 毫升 LB 培養液，於 37 $^{\circ}$ C 培養一小時後，塗在 LB 洋菜培養基(含終濃度 30 μ g/ml 的抗生素 kanamycin)上，置於 37 $^{\circ}$ C 培養箱隔夜培養約 16 小時。收集培養基上全部 *E. coli* 轉型株，萃取其質體後，以限制酶 *AvrII* 或 *BspHI* 將質體 DNA 切成線型(linear form)，方可轉型至酵母菌。

酵母菌 *P. pastoris* 的質體轉型

酵母菌 *P. pastoris* SMD1168 勝任細胞的製備方法如下：於 -80 $^{\circ}$ C 菌種保存管取 *P. pastoris* SMD1168，四分劃線於 YPD 洋菜培養基上，置於 30 $^{\circ}$ C 培養箱中培養三天，挑選單一菌落，接種至 10 毫升的 YPD 培養液，於 30 $^{\circ}$ C、200 rpm 條件下培養三天，再從中取 1 毫升菌液接種至 50 毫升的 YPD 培養液，於 30 $^{\circ}$ C、200 rpm 下培養至

OD₆₀₀ 達到 1.2-1.5。培養好的菌液以 3500 rpm 離心 10 分鐘，去除培養液，加入 50 毫升 TE/DTT/LiCl 緩衝液回溶菌體，以 3500 rpm 離心 4 分鐘，去除緩衝液，再加入 1 毫升 TE/DTT/LiCl 緩衝液回溶菌體後移至微量離心管，於 30°C 下靜置培養一小時。接著以 3500 rpm，4 分鐘的離心條件，依序以 1 毫升滅菌水及 1 毫升 1 M sorbitol 清洗細胞，最後加入 500 µl 1 M sorbitol 回溶細胞，置於冰上備用。取 5 µg linear DNA 與 80 µl 的 *P. pastoris* SMD1168 勝任細胞混合均勻，加至事先預冷之 2 mm 電擊管中，於冰上冷卻 5 分鐘，設定 1.5 kV、25 µF、200 ohm、5 msec 之電極參數(電穿孔儀為 MicroPulser Electroporator, Bio-Rad)，進行電穿孔後，立即加入 1 毫升的 1 M sorbitol，隨後將菌液移至 15 ml 離心管內，加入 1 毫升 YPD 培養液，於 30°C、100 rpm 下培養四小時後，塗於含抗生素 G418 終濃度為 250 µg/mL 的 YPD 洋菜培養基上，置於 30°C 培養箱培養三天。

重組蛋白的表達與分析

於 YPD 洋菜培養基(含 250 µg/mL G418)上長出的單一菌落，經過兩次的菌種分離純化後，利用牙籤挑取野生型(wild-type)和突變株的單一菌落於 96 deep-well plate (內含 200 µl glycerol medium) 中，保留一格作為空白對照(blank)，利用透氣封膜隔絕汙染，將 96 deep-well plate 置於 30 °C、200 rpm 下培養三天後，以 3500 rpm 離心 10 分鐘，取上清培養液進行酵素活性分析。重組蛋白之脂肪酶和受質 *p*-nitrophenyl butyrate 作用後會產生黃色的 *p*-nitrophenol 產物，在波長 405 nm 下有最大的吸光值，利用此一呈色的特性可進行酵素活性分析。受質溶液的製備如下，將 3.5 µl 的受質 *p*-nitrophenyl butyrate 溶於 10 毫升之 20 mM Sodium phosphate buffer 與 2.5% Triton X-100 的溶液中，成為終濃度 2 mM 的受質液 (pH 7.0)。取 10µl 之培養液加入 100µl 的受質液，於波長 405 nm 下測量吸光值的變化速率，藉此得到反應最大斜率(ΔOD/min)來推算酵素的活性(unit)。酵素活性的單位(unit)定義為：在適當的反應條件下，每分鐘水解 1 µmole *p*-nitrophenyl butyrate 或產生 1µmole 黃色 *p*-nitrophenol 產物所需的酵素量。

突變株轉型成功之確認

欲了解轉型過程中突變的質體是否有正確插入宿主細胞之染色體 DNA，除了以抗生素為標

記作初步篩選外，亦可藉由 PCR 的方法，進一步對染色體 DNA 上是否具有外來突變載體基因的存在來確定突變株之正確性。首先將突變株以 5 毫升 glycerol medium 培養至 log phase，依據 GeneMark Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit (Cat #DP021) 提供之方法抽取 genomic DNA，以此 genomic DNA 為模板，設計引子對放大外來質體之 kanamycin 基因。引子對序列為：F'ACACCATGGCTAGCCATATTCAA CGGGAAAC; R'GCGACGTCTTAGAAAACTC ATCGAGCATC。

結果

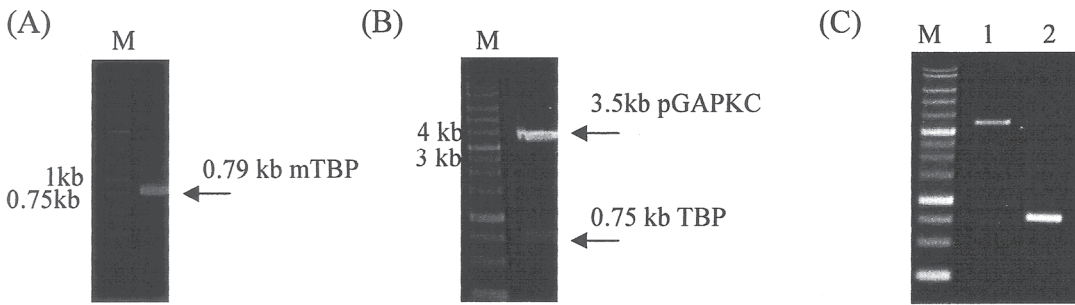
質體的置備

將經 error-prone PCR 隨機突變的 mTBP 片段回收後，與質體 pGAPKC，皆以限制酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 作用後，進行 DNA 黏合，建構成質體 pGAPKC/mTBP，為一個含有 mTBP 片段的環狀質體，其啟動子為 GAP promoter，屬於非誘導型，轉型後可和染色體上的 GAP promoter 進行同源重組，另外，其含有抗 kanamycin 的基因，可以抗生素 kanamycin 做篩選。圖一 A 為 error-prone PCR 完成後 mTBP (790 bp) 產物經電泳分析的結果。圖一 B 為質體 pGAPKC/TBP 以限制酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 作用後經電泳分析的結果。圖一 C 為進行 DNA 黏合前，載體 pGAPKC 和 mTBP 的 DNA 濃度比較電泳分析圖。圖二為構築好的質體 pGAPKC/mTBP 示意圖。

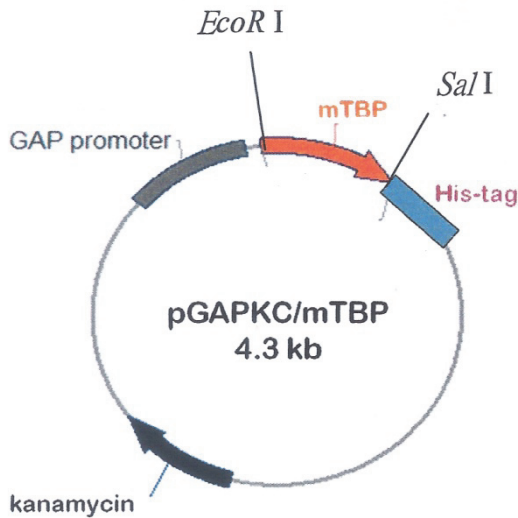
質體的轉型

構築好的質體 pGAPKC/mTBP 先轉型至 *E. coli*，塗在含有抗生素 kanamycin 的 LB 培養基上，培養基成功長出菌落，確定帶有抗 kanamycin 基因的 pGAPKC/mTBP 質體轉型成功。除了實驗組外，另外做了三組對照組，一組是利用未經突變的 TBP 片段和載體 pGAPKC 進行 DNA 黏合後轉型 *E. coli*，一組是只添加載體 pGAPKC，不加 mTBP，同樣經 DNA 黏合的步驟後轉型，最後一組則是以水取代質體的轉型。圖三 (A)~(D) 為 *E. coli* 轉型的結果，由對照組可知載體不會自行黏合(圖三、C)，可判定質體成功送入 *E. coli* 內(圖三、A 與 B)，且 *E. coli* 勝任細胞與培養基未受到汙染(圖三、D)。

製備好的 pGAPKC/mTBP 突變庫經限制酶 *Avr*II 或 *Bsp*HI 作用成線型質體(linear form)後，



圖一、(A) 利用 error-prone PCR 隨機突變 TBP 片段，電泳分析 error-prone PCR 的結果。(B) 質體 pGAPKC/TBP 以限制酶 *EcoRI* 和 *SalI* 作用後進行電泳分析的結果。(C) 進行 DNA 黏合前，載體 pGAPKC 和 mTBP 的 DNA 濃度比較電泳分析圖。Lane 1 與 Lane 2 分別為 *EcoRI* 和 *SalI* 切割後的載體 pGAPKC 與 mTBP。
Figure 1. (A) Amplification of mTBP by error-prone PCR. (B) Electrophoresis of the digestion of pGAPKC/TBP plasmid by *EcoRI* and *SalI*. (C) Electrophoresis of digested pGAPKC (Lane 1) and mTBP (Lane 2).

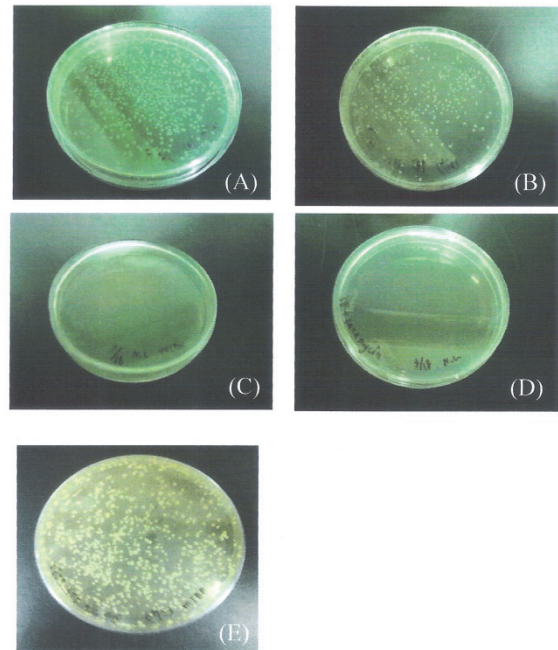


圖二、質體 pGAPKC/mTBP 示意圖。
Figure 2. The plasmid construction of pGAPKC/mTBP.

經電穿孔轉型送入帶有質體 pGAPZαC-LIP2 的 *P. pastoris* 細胞內，塗於含有抗生素 G418 的 YPD 培養基上，三天後，培養基上長出上百個 *P. pastoris* 菌落，圖三 (E) 為 *P. pastoris* 轉型 pGAPKC/mTBP 的結果。

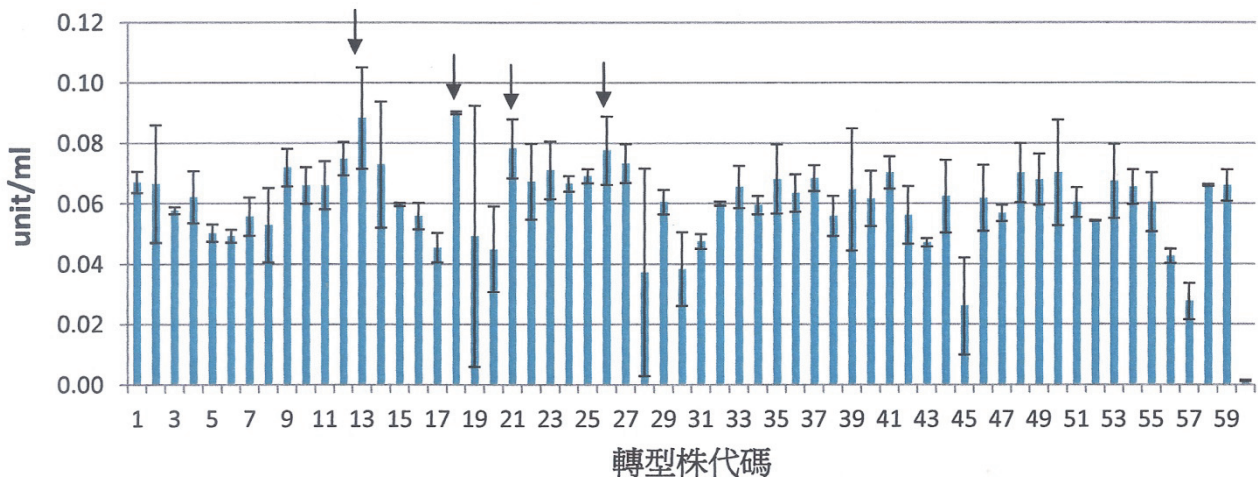
重組蛋白表達量的分析

將突變的 TBP 基因轉殖入帶有外源脂肪酶基因的 *P. pastoris* 細胞內，每個突變株經二次菌落純化的步驟後，置於 96 deep-well plate 中培養三天，培養液離心後取蛋白上清液進行脂肪酶的活性分析。本研究針對 464 個突變株進行分析，每一株皆做二重複的培養及蛋白質表達，發現酵素活性於 96 deep-well plate 中培養至第三天時會達到穩定的狀態，其中有 16 個突變株的蛋白活性比野生型平均值(0.05 unit/mL)高出 1.5 倍。其



圖三、*E. coli* 與 *P. pastoris* 的轉型結果。(A) 為 mTBP 和載體 pGAPKC 黏合後轉型至 *E. coli* DH5α 細胞內；(B) 為黏合反應之正控制組，即 TBP 和載體 pGAPKC 黏合後轉型至 *E. coli* DH5α 細胞內；(C) 為黏合反應之負控制組，即 *EcoRI* 和 *SalI* 切割後的載體 pGAPKC 經黏合酶黏合後，轉型至 *E. coli* 細胞內；(D) 為轉型作用之負控制組，即以 dd H₂O 取代 DNA 轉型至 *E. coli* 細胞內的結果。(E) 為 pGAPKC/mTBP 轉型至 *P. pastoris* 的結果。

Figure 3. The transformation of *E. coli* DH5α and *P. pastoris*. A: ligation of vector pGAPKC and mTBP ; B: Positive control of ligation of vector pGAPKC and TBP ; C: Negative control of ligation of vector pGAPKC ; D: Negative control of transformation. *E. coli* DH5α is transformed with dd H₂O instead of DNA ; E: pGAPKC/mTBP transformants of *P. pastoris*.



圖四、大量篩選突變株脂肪酶的表達量。此圖為 464 個突變株當中部分篩選結果，no.1 轉型株為野生型，no. 2-59 為突變株，no. 60 為 blank 對照組。箭頭所指為脂肪酶表達量高出野生型 1.5 倍以上者。

Figure 4. The lipase production screen of the mutants by high-throughput lipase activity assay. This figure showed the activities of partial mutants among the selected 464 mutants. The no.1 is the wild-type, the no.2-59 are the mutants and the no. 60 is blank., The arrows indicate the mutants with at least 1.5-fold activities than the wild type.

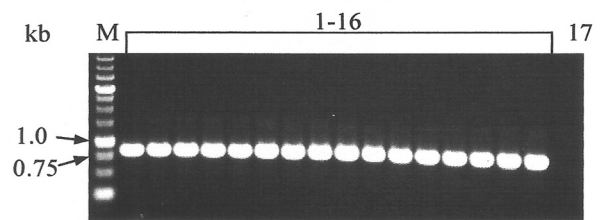
中測得活性最高的一株突變株活性為 0.1139 unit/mL，約為野生型的 2.3 倍。圖四為部分突變株蛋白表達量大量篩選的分析結果。

高表達量突變株轉型成功之確認

針對挑選到的 16 個有提高表達量 1.5 倍以上的突變株，抽取其 genomic DNA，以 PCR 方法放大宿主本身沒有之 Kanamycin 基因，其片段大小為 819 bp。結果如圖五，16 個突變株皆可自其 genomic DNA 中放大偵測到 kanamycin 基因的存在，代表 mTBP 基因確實已成功轉型至 *P. pastoris*，而不帶有外來基因之宿主 *P. pastoris* SMD1168 則無偵測到 kanamycin 基因(圖五、Lane17)。由此可知所挑選到的 16 個突變株其質體都已成功的插入宿主細胞之染色體 DNA 上。

討論

本研究在建立一套能快速篩選出高表達外源重組蛋白之酵母菌 *P. pastoris* 的方法，所應用的技術為 gTME，其原理是在一株已轉型外源基因之酵母菌 *P. pastoris* 中，透過突變基本轉錄因子 TBP，來改變細胞整體的轉錄作用，由於 TBP 是許多基因表達時所必需的，因此它的改變所造成的影響是全面性的，可能會同時影響 *P. pastoris* 多種基因的表現，而非僅限於影響外源基因的表達，而且這種全面性的影響有可能會促進或降低 *P. pastoris* 表達外源重組蛋白的效率，因此必須



圖五、以 PCR 方法增幅 16 個突變株染色體 DNA 的 kanamycin 片段之電泳結果，kanamycin 片段大小為 819 bp。Lane1~Lane16 為 16 個突變株的結果，Lane 17 為 *P. pastoris* SMD1168，為未轉型株對照組。

Figure 5. Electrophoresis result of amplifying the kanamycin gene by PCR. Lane1-16: mutants, lane17: negative control, *P. pastoris* SMD1168.

搭配一套能快速大量篩選突變株的方法，以挑選出具有高表達外源蛋白能力的突變株。

本技術是否成功的關鍵，有很大的一部份是在突變株的篩選分析。理論上控制每一突變株在相同的生理狀態下，來評估重組蛋白表達量才會有意義，然而 gTME 技術顯然會以不同的程度來改變不同突變株的生理狀態，導致有不同的生長速率，因此在評估不同突變株培養液中重組蛋白表達量時，必須同時考慮菌液濃度(即細胞數量)的差異，亦即同一蛋白表達量會因為其來自不同的菌液濃度，而有不同的解讀，事實上低細胞數的突變株是具有較佳的表達量。

此外，同一突變株的重組蛋白表達量必須要有高再現性，穩定的培養條件可以減少表達量的

誤差，包括菌落取樣培養時，菌落活性的差異、取樣細胞數的多寡，都必須穩定控制。可以透過劃線法進行菌落純化，再從中挑選單一新鮮菌落培養。此外，在沾取菌落至培養液時，也會受到人為沾取的力道不同會造成不同的接菌數，為了減少初步大量篩選的實驗誤差，應盡量用牙籤沾取出同樣大小的接菌數，或是先進行菌量一致化培養，降低培養初期接菌數的差異，使之達到相同的起始生長條件，以減少實驗誤差。

本研究中的高表達量的突變株已確認有 mTBP 轉型插入宿主的染色體中，惟 mTBP 蛋白是否有在突變株中表達，仍需進一步的蛋白質分析，由於所建構的 pGAPKC/mTBP 質體，在 TBP 之 C 端接上 6 個 Histidine 胺基酸，故可利用蛋白純化或是 Western blotting 的方法確認這些突變株有確實表達 TBP，相關實驗目前正進中。同時，鑑定 *SPT15* 基因突變的位置，找出各突變株的突變點，有助於了解突變 mTBP 蛋白的可能作用機制，突變點位於 TBP 蛋白的 N 端或 C 端，將可能導致 TBP 與其他蛋白間交互作用或 TBP 與 DNA 分子之交互作用發生改變。

本研究結果顯示，藉由操縱 *P. pastoris* 整體轉錄作用是可以提升外源重組蛋白在 *P. pastoris* 的表達量，此技術應可應用於其它外源基因的表達，亦即針對各種外源重組蛋白，只要有適當的活性測定方法，皆可以此技術快速篩選出高表達量的突變株。

誌謝

感謝行政院國家科學委員會 (NSC 101-2311-B-003-003 and (NSC 98-2311-B-003-002-MY3) 以及國立臺灣師範大學 (NTNU100-D-02) 提供經費完成本研究。

參考文獻

Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR and Stephanopoulos G. 2006. Engineering Yeast Transcription Machinery for Improved Ethanol Tolerance and Production. *Science* 314(5805): 1565-1568.

Cereghino JL and Cregg JM. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24(1): 45-66.

Higgins DR and Cregg JM. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. *Mol. Biol.* 103: 1-15.

Klein-Marcuschamer D and Stephanopoulos G. 2008. Assessing the potential of mutational strategies to elicit new phenotypes in industrial strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(7): 2319-2324.

Lanza AM and Alper HS. 2011. Global Strain Engineering by Mutant Transcription Factors. *Methods Mol. Biol.* 765: 253-274.

Lee GC, Lee LC, Sava V and Shaw JF. 2002. Multiple mutagenesis of non-universal serine codons of the *Candida rugosa* LIP2 gene and biochemical characterization of purified recombinant LIP2 lipase overexpressed in *Pichia pastoris*. *Biochem. J.* 366: 603-611.

Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N and Renugopalakrishnan V. 2007. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142(2): 105-124.

Liu H, Xu L, Yan M, Lai C and Ouyang P. 2008. gTME for Construction of Recombinant Yeast Co-fermenting Xylose and Glucose. *Chin. J. Biotechnol.* 24(6): 1010-1015.

Liu H, Yan M, Lai C, Xu L and Ouyang P. 2010. gTME for Improved Xylose Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(2): 574-582.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B and Harvey LM. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22(4): 249-270.

Porro D, Gasser B, Fossati T, Maurer M, Branduardi P, Sauer M and Mattanovich D. 2011. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89(4): 939-948.

Porro D, Sauer M, Branduardi P and Mattanovich D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Mol. Biotechnol.* 31(3): 245-259.

Establishment of a *Pichia pastoris* System to Highly Express Recombinant Protein

Ting-Chun Kuo¹, Jing-Wen Chang¹, Cheng-Kang Lee², Guan-Chun Lee^{1*}

¹Department of Life Science, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

²Department of Chemical Engineering, National Taiwan University of Science and Technology
Taipei, Taiwan

(Received: 1 February 2013, accepted: 10 April 2013)

ABSTRACT

Production of recombinant proteins in eukaryotic system has been widely applied in pharmaceutical, food and chemical industries. *Pichia pastoris* is one of the mostly used eukaryotic systems to overexpress the recombinant protein. However, not all foreign genes can highly express in *P. pastoris* system. Many reports tried to establish a reliable high-level expression system of *P. pastoris*. In this study, we used global transcription machinery engineering (gTME) approach to improve the expression level of the *Candida rugosa* lipase (CRL) in *P. pastoris*. Random mutagenesis of the transcription factor SPT15 (the *P. pastoris* TATA-binding protein) was performed to reprogram the transcriptome and to affect the CRL production in *P. pastoris*. By high-throughput lipase activity assay, 464 mutants were screened to obtain 16 mutants whose lipase productions were improved at least 1.5-fold than the wild type. The highest one displayed 2.3-fold activity than the wild type. It suggests that the expression level of foreign genes could be improved in *P. pastoris* system through gTME approach.

Key words: *Pichia pastoris*, recombinant protein expression system, global transcription machinery engineering

*Corresponding author: Guan-Chun Lee; FAX: 886-2-29312904; E-mail: glee@ntnu.edu.tw