*Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*
Vol. 35, No. 4, 272–277(2007)

# 인산제한상태에서 발현되는 *Pichia pastoris* 유래 유전자 탐색

홍지연[1,3] · 안정오[1] · 박명수[1] · 최순용[3] · 최의성[2] · 정준기[1] · 이홍원[1]*
[1]한국생명공학연구원 산업화공정개발실, [2]한국생명공학연구원 시스템미생물연구센터
[3]한남대학교 생명공학부

**Screening of the Genes Expressed in *Pichia pastoris* Grown in Phosphate-Limited Chemostat Culture.** **Hong, Ji-Yeon[1,3], Jung-Oh Ahn[1], Myoung-Soo Park[1], Soon-Yong Choi[3], Eui-Sung Choi[2], Joon-Ki Jung[1], and Hong-Weon Lee[1]*.** *[1]Biotechnology Process Engineering Department, KRIBB, Daejeon, Korea, [2]Division of Biomaterials Science, KRIBB, Daejeon, Korea, [3]Department of Biological Engineering, Hannam University, Daejeon, Korea* – The physiological responses of microorganisms to specific nutrient limitation can be regulated at the transcriptional levels. In this study, in order to develop the *Pichia pastoris*-derived promoter inducible by nutrient-limited condition, we constructed cDNA libraries using RT-PCR of total RNA from *P. pastoris* in steady-states of phosphate-limited chemostat with different dilution rates. Various genes were detected from cDNA library. Among these genes, the gene encoding putative sodium/phosphate ($Na^+$/Pi) symporter (NPS), high affinity transporter of phosphate, was detected. It was observed that expression of NPS increased in a manner specific to phosphate-limited condition through Northern blot. Therefore, it is thought that the promoter from NPS gene may have the potential as auto-inducible promoter by phosphate-limited culture condition without inducer.

**Key words:** *Pichia pastoris*, phosphate limitation, sodium-phosphate ($Na^+$/Pi) symporter (NPS)

## 서 론

최근 다양한 생명체 유래의 단백질들에 대한 기초 기능분석이나, 의약학적 또는 산업적으로 중요한 단백질의 생산을 위하여, 고효율 대량생산이 가능한 재조합 미생물의 개발이 요구되고 있다. 재조합 단백질 생산에 주로 사용되는 숙주 세포 중 하나인 *Pichia pastoris*는 메탄올을 유일한 탄소원으로 사용할 수 있다[4, 6]. 이러한 특징을 가진 *P. pastoris*를 이용하여 재조합 단백질을 생산하는 경우에는 메탄올 대사에 관여하고, 메탄올에 의해 강력하게 유도되는 알코올 산화효소(alcohol oxidase, AOX)[3, 5, 13]와 포름알데히드 탈수소화효소(formaldehyde dehydrogenase, FLD)[14]를 코딩하는 유전자 유래의 프로모터들이 주로 사용되어왔다. 하지만, 메탄올 대사에 관련된 유전자의 프로모터를 사용할 경우에는 전사를 유도하기 위해서 연소성이 높은 메탄올을 사용해야 하기 때문에 화기에 주의해야 하며, 공장 설비 시 특별한 조치 및 점검이 요구된다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 다양한 미생물에서 강력하게 작동되는 상시발현 프로모터로 알려진 글리세르알데히드-3-인산 탈수소효소(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)와 번역신장인자(translation elongation factor, TEF)유전자 유래의 프로모터들이 개발되었다[1, 6, 16]. 이런 상시발현 프로모터를 사용할 경우에는 단백질의 발현 시점을 조절하는데 어려움이 있어, 균체의 성장을 저해하는 재조합 단백질 발현 시, 균체 성장을 저해하는 등의 문제로 인하여 단백질의 대량생산에 어려운 경우가 있다. 따라서 재조합 단백질의 효율적인 대량생산을 위하여 특정배양 시점에 공정상의 문제가 없는 유도성 물질을 이용하여 재조합 단백질의 발현을 유도하거나, 유도성 물질을 사용하지 않고 특정 시점에 단백질을 자동적으로 과발현 시킬 수 있는 강력한 자동 유도성 프로모터의 개발이 필요하다.

미생물은 성장 중에 특정성분이 고갈되면 그 성분을 효과적으로 찾고 대체할 수 있도록 대사가 조절되며, 그러한 대사를 위하여 특정 유전자들이 과발현 되기도 한다[15]. 이러한 유전자 유래의 프로모터는 관련기질이 제한된 경우에 작동되는 자동 유도성 프로모터의 성격을 가지고 있다고 알려져 있다[2, 9, 10, 14]. 한편 연속배양은 배양이 정상상태(steady-state)에 있을 때 배양기 내에 있는 미생물은 동일한 증식속도와 생리적 상태를 가지고 있기 때문에 특정 환경상태에 있는 미생물의 생리연구에 많이 이용되어 왔다. 특히 인산이 제한된 상태에서 증식이 종료된 미생물은 정지기에서도 장시간의 대사활성 유지가 가능하기 때문에 대수증식기에서 발현된 외래단백질의 생산단계를 장시간 유지시킬 수 있다는 장점이 있다. 또한 인산제한은 탄소원이나 질소

*Corresponding author
Tel: 82-42-860-4517, Fax. 82-42-860-4516
E-mail: hwlee@kribb.re.kr

원과 달리 단백질의 생합성에 크게 영향을 주지 않기 때문에, 본 연구에서는 *P. pastoris* 유래의 자동 유도성 프로모터를 개발하기 위하여, 인산이 제한된 연속배양에서 과발현되는 유전자군을 탐색하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구에 사용된 균주는 *P. pastoris* GS115(*his*$^-$)이며, 유전자 조작을 위해서는 *E. coli* DH5$\alpha$ (*sup* E44 *had*R17 *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*$^-$1 *rel*A1)균주를 사용하였다.

### 연속 배양

연속배양을 위한 1차 종균배양은 YPD(Yeast extract 10 g/L, Bacto peptone 20 g/L, Glucose 20 g/L, Agar 20 g/L)평판 배지에서 30°C, 24시간 배양한 콜로니(colony) 들 중 단일 콜로니를 10 mL YPD가 포함되어있는 250 mL baffled flask에 접종하여 교반속도 160 rpm, 30°C, 24시간 진탕배양 하였다. 2차 종균배양은 1차 종균배양액 10 mL을 100 mL 배양 배지(Yeast extract 10 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, KCl 1 g/L, L-Histidine 1 g/L, Glucose 30 g/L)가 포함되어있는 1 L baffled flask에 접종하여 동일 조건에서 12시간 배양하였다. 상기 종균 배양액을 1 L의 배양 배지가 포함된 2.5 L 발효조(Kobiotech. Co. Korea)에 접종하였다. 접종 24시간 후 인산이 제한된 공급배지(Yeast extract 10 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, KCl 1 g/L, L-Histidine 1 g/L, Glucose 80~120 g/L)를 이용하여 희석속도(Dilution rate, *D*) 0.03, 0.08과 0.14 $h^{-1}$로 연속배양을 수행하였다.

### 인산제한조건에서의 과발현 유전자 분석

인산제한조건에서 과발현 되는 유전자의 선정 및 분석은 Fig. 1에 나와 있는 순서대로 수행하였다. 우선, 인산제한조건에서 희석속도 0.03, 0.08과 0.14 $h^{-1}$로 각각 수행된 연속배양을 통해 얻어진 피키아 파스토리스 균체를 채취 즉시 rapid phenol method를 이용하여 total RNA를 분리하였다[8]. 분리된 total RNA로 부터 messenger RNA(mRNA)는 Oligotex Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하였으며, Smart cDNA library synthesis Kit(Clonetech, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA library 제조를 위한 plasmid로 pGAL-1[7]에 *Sfi*I 제한 사이트가 포함된 pYGSF를 사용하였으며, 합성된 cDNA들을 각각 제한효소 *Sfi*I이 처리된 pYGSF에 삽입하였다. 합성된 cDNA library에 의해 형질전환 된 균체들 중에서 무작위로 선정하여 plasmid를 분리한 후 *Sfi*I으로 처리하여 크기가 다른 cDNA들의 염기서열을 분석하였고, 합성된 유전자들을 확인하기 위하여 Genebank의 BlastX(http://www. ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

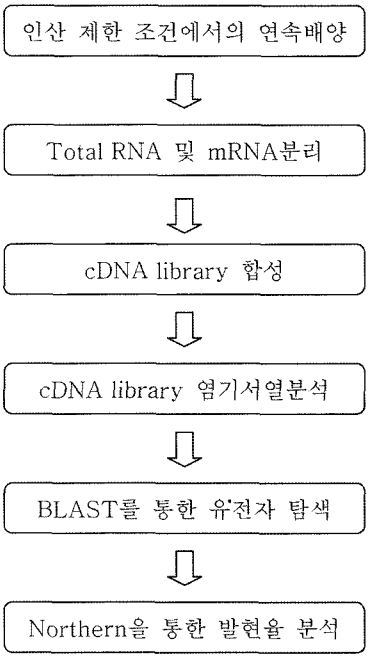


**Fig. 1. Screening methods for the detection of the specific transcript genes of *P. pastoris* to growth limitation by phosphate.**

를 이용하여 유전자 상동성을 분석하였고, 이를 통하여 인산제한조건에서 작동되는 유전자 클러스터(gene cluster)를 확보하였다. 확보된 유전자들 중 인산제한조건에서 유전자의 과발현 여부를 확인하기 위하여 DIG DNA Labeling and Detection Kit(Roche, Germany)을 이용하였고, 확보된 유전자 염기서열이 포함된 일부분을 probe로 사용하여 Northern blot analysis를 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 연속 배양

기존의 전통생리학에 수행되고 있는 시행착오(tail and error)방식의 연구를 지양하고 미생물 유전체 정보 및 분석기술을 활용하여 유전자 단위에서 high-throughput 분석을 통하여 다양한 형태의 유전자를 분석하고 확보하려는 연구가 수행되고 있다. 현재까지 개발된 방법을 살펴보면 microarray를 이용하여 영양제한 조건에서 배양된 *Saccharomyces cerevisiae*의 genome-wide transcriptional response를 규명하였고[15], filamentous fungi 에서 발현율이 높은 다수 유전자들도 확보하였으며[12], 통상적 배양 온도보다 낮은 온도에서 발현되는 cold shock protein의 개발로 대장균의 고효율 단백질 발현 시스템들이 개발되었다고 보고 되어진 바 있다[11].

본 연구에서는 인산제한조건의 연속배양을 통하여 *P. pastoris* 유래의 과발현 유자자들을 확보, 분석하는 실험을 수행하였다. 연속배양은 배양 배지의 종균을 인산이 제한된

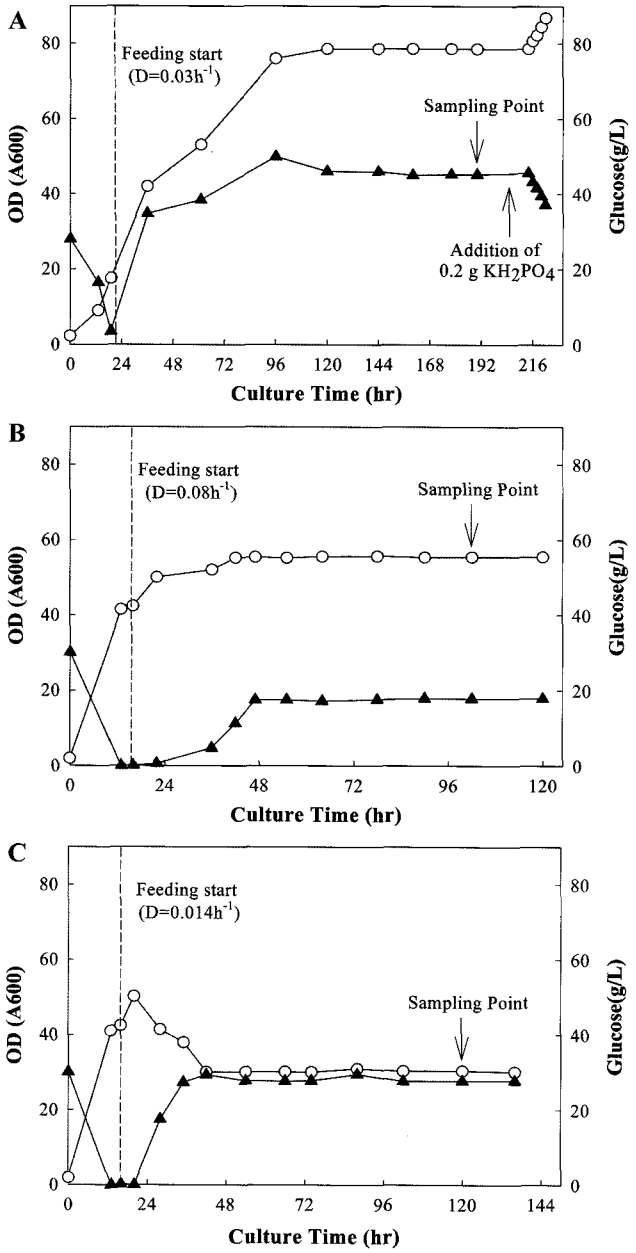


**Fig. 2. Time-profiles of the phosphate-limited chemostat of *P. pastoris* at 0.03 $h^{-1}$ (A), 0.08 $h^{-1}$ (B) and 0.14 $h^{-1}$ (C) of dilution rate.** A dot line indicates the starting times of chemostat. The arrow indicated the time of sampling and second arrow in Fig. 2a indicated the pulse addition of $KH_2PO_4$ 0.2 g. Symbols: ○, optical density (A600); ▲, glucose concentration (g/L).

배양 배지로 옮겨 희석속도를 0.03, 0.08과 0.14 $h^{-1}$로 수행하였고, 각각의 희석속도에 따른 정상상태에 도달시간과 균체농도, 잔여포도당의 측정 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 인산제한상태의 연속배양에서 정상상태임을 확인하기 위하여, 배양이 정상상태에 도달했을 때 배양조에 0.2 g의 $KH_2PO_4$ 첨가 후 2시간 간격으로 균체 성장과 포도당의 농도를 측정하였다. 그 결과, 시간당 균체성장은 2O.D.씩 증가함을 보였고, 이 때 포도당 소비도 시간당 2 g/L씩 증가됨을 보여 인산제한 상태임을 확인하였다(Fig. 2a). 인산이 제한된 상태의 과발현 유전자를 확보분석하기 위하여 주어진 희석속도를 설정 후 3-4일 체류시간이 지난 후 정상상태에 도달했을 때 균체시료를 채취를 하였다.

### 인산제한조건에서의 과발현 유전자 분석

각각의 희석속도에서 수행된 연속배양을 통해 정상상태에서 얻은 균체로부터 total RNA를 분리하였다. 희석속도 0.03, 0.08 그리고 0.14 $h^{-1}$일 때의 total RNA의 농도는 각각 1.45 μg/mL, 1.94 μg/mL 그리고 3.02 μg/mL로 측정되었다. 분리된 total RNA로부터 Oligomer Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 mRNA를 분리하였다. mRNA의 역전사에 의해 DNA가 합성하므로 mRNA의 농도에 따라 유전자의 발현율을 측정할 수 있기 때문에 mRNA의 농도는 본 실험에서 중요하게 작용을 한다. 따라서 희석속도에 따른 과발현 유전자를 분석하기 위하여 mRNA의 농도를 맞춰서 실험을 진행하였다. cDNA library 합성은 Smart cDNA library synthesis Kit(Clontech, USA)를 사용하였고, cDNA library 합성방법은 primer extention방법을 사용하였다. 합성된 cDNA를 각각 1~3 kb과 0.5~1 kb의 크기로 분할 분리하여, *Sfi*I으로 처리된 pYEGF에 삽입시켜, cDNA library를 제조하였다. 합성된 cDNA library들에 의해서 형질전환된 균체들 중에서 무작위로 선정하여 plasmid를 분리하여 제한효소 *Sfi*I을 처리한 결과 다양한 크기의 cDNA들이 확보되었음을 확인하였다. 확보된 cDNA들 중 크기가 다른 cDNA들의 염기서열을 분석한 후 BLAST를 통해 염기서열 상동성을 분석하여 다양한 유전자들이 인산이 제한된 상태에서 발현됨을 알 수 있었다(Table 1). 확보된 유전자들 중에서 희석속도 0.03, 0.08 그리고 0.14 $h^{-1}$의 모든 희석율에서 상시 발현되는 유전자로서 GAPDH, glucokinase의 두 유전자를 확인할 수 있었으며, 0.03과 0.08 $h^{-1}$의 비증식속도에서 발현되는 유전자로서는 triosephosphate isomerase와 3-phosphoglycerate kinase 등 6개의 유전자를 확인할 수 있었으며, 0.08과 0.14 $h^{-1}$의 상대적으로 높은 희석율에서 발현되는 유전자로서는 hexose transporter와 pyruvate decarbosylase 등 4개의 유전자를 확인할 수 있었다(Table 1). 이들 유전자들의 생리적 특징은 탄소원의 대사에 관여된 유전자이거나 세포 내 인산대사에 관여된 유전자들로써, 추가적인 연구를 위하여 이들 유전자군 중 각각의 희석율에서 발현빈도가 높은 3-phosphoglycerate kinase, GAPDH, glucokinase, thiol-specific antioxidant protein, triosephosphate isomerase, hexose transporter, pyruvate decarboxylase의 유전자들을 선별하였다. 특히 인산이 제한될 경우 인산을 세포 내로 uptake하는 Sodium/Phosphate Symporter(NPS)유전자가 희석율 0.03 $h^{-1}$에서 높은 빈도수를 나타내었다(Table 2). 이 중 빈도수가 높은 8종의 유전자의 인산제한조건에서 과발현 여부를 확인하

**Table I. The transcript genes in *P. pastoris* grown in the phosphate-limited chemostat**

| | Dilution rate ($h^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|
| | D=0.03 | D=0.08 | D=0.14 |
| Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | +++ | ++ | ++ |
| glucokinase | + | ++ | ++ |
| triosephosphate isomerase | + | +++ | |
| 3-phosphoglycerate kinase | + | +++ | |
| Outer mitochondrial membrane porin | + | ++ | |
| Hexokinase | + | + | |
| thiol-specific antioxidant protein | + | + | |
| vacuolar ATP synthase subunit | + | + | |
| phosphoglycerate mutase 1 | ++ | | + |
| probable Na+/pi symporter | +++++ | | |
| hypothetical protein YGR086c | + | | |
| citrate synthase | + | | + |
| Histone H4 | + | | + |
| S-adenosylmethionine synthetase 2 | + | | |
| 6-phosphofructo-2-kinase | + | | |
| aconitase | + | | |
| D-arabinitol 2-dehydrogenase | + | | |
| Dihydroxyacetone kinase | + | | |
| EPD 1 protein precursor | + | | |
| Histone H2A | + | | |
| hypothetical protein KIAA0597-human | + | | |
| lipoic acid synthase | + | | |
| proteasomal subunit pre 3 | + | | |
| putative glutamine synthetase | + | | |
| pyruvate dehydrogenase a-subunit | + | | |
| transcription initiation factor | + | | |
| 60s ribosomal protein | | ++++ | + |
| Hexose transporter | | ++++ | + |
| pyruvate decarboxylase | | ++++++ | |
| converts 3-phosphoglycerate | | + | +++ |
| 40S ribosomal protein | | + | + |
| Elongation factor 1- alpha | | + | + |
| fructose biphosphate aldolase | | + | + |
| putative peroxilsomal protein | | + | + |
| acyl-coenzyme A oxidase | | + | |
| Adenosyl homocysteinase | | + | |
| Alcohol dehydrogenase | | + | |
| Alcohol dehydrogenase ll | | + | |
| ATP synthase alpha chain | | + | |
| ATP synthase beta chian | | + | |
| TOR2 | | + | |
| vacuolar protein sorting protein | | + | |
| Hypothetical protein | | | +++++ |
| inorganic phosphate transporter | | | ++ |
| translation initiation factor | | | ++ |
| acid phosphatase | | | + |
| anaphase promoting complex subunit | | | + |
| casein kinase2 beta subunit | | | + |
| centromere binding factor 3d(SKP1p) | | | + |
| exosome complex exonuclease RRP45 | | | + |

The symbol (+) indicates the frequencies of detection in random selection of cDNA library.

**Table 1. Continued.**

| | Dilution rate ($h^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|
| | D=0.03 | D=0.08 | D=0.14 |
| FK506binding protein (proline rotamase) | | | + |
| histone 2B | | | + |
| Mannose-6-phosphate isomerase | | | + |
| phosphoadenosine phosphosulfate reductase | | | + |
| putative cinnamoyl-coa reductase | | | + |
| putative S-adenosyl-L-homocyseine hydrolase | | | + |
| pyruvate decarboxylase | | | + |
| sacchropine dehydrogenase | | | + |
| spermidine synthase | | | + |
| succinate dehydrogenase | | | + |
| Ubiqutin fusion protein | | | + |

The symbol (+) indicates the frequencies of detection in random selection of cDNA library.

**Table 2. Representative genes with higher transcript abundance in *P. pastoris* grown in phosphate-limited chemostat**

| Gene Name | Frequency |
|---|---|
| 3-phosphoglycerate kinase | ++++ |
| Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | +++++ |
| glucokinase | ++++ |
| thiol-specific antioxidant protein | ++ |
| triosephosphate isomerase | +++++ |
| Na+/pi symporter | +++++ |
| Hexose transporter | ++++ |
| pyruvate decarboxylase | ++++++ |

The symbol (+) indicates the frequencies of detection in random selection of cDNA library.

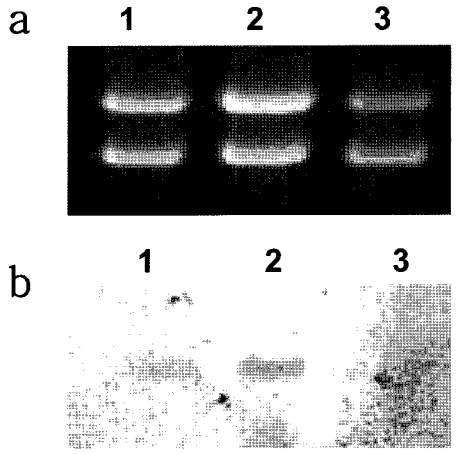


**Fig. 3. Sodium/phosphate sympoter gene expressed in *P. pastoris* under the phosphate-limited condition (a) Isolation of total RNA from *P. pastoris* cultivated in the phosphate-limited chemostat.** Lane 1: total RNA from *P. pastoris* grown on the chemostat at 0.03 $h^{-1}$ of dilution rate, Lane 2: total RNA at 0.08 $h^{-1}$ of dilution rate, Lane 3: total RNA at 0.14 $h^{-1}$ of dilution rate. (b) Northern blot analysis. Isolated total RNA was loaded in each lane and the blot was probed with DIG-labeled sodium/phosphate sympoter genes.

기 위하여 Northern blot analysis를 하였다. Northern blot analysis를 위하여 각각의 희석속도에 따른 total RNA의 농도를 동일한 1.25 μg/ml로 하여 Northern blot analysis를 수행한 결과 NPS가 인산제한조건에서 과발현됨을 확인하였다(Fig. 3). NPS는 인산제한조건에서만 발현되는 유전자임을 확인하기 위하여 칼륨제한조건에서 과발현되는 유전자군을 탐색하였다. 칼륨제한조건에서는 칼륨을 세포내로 uptake하는 유전자들이 발현되고, NPS 유전자는 발현되지 않는 것을 확인하였다.

본 연구에서 얻어진 결과와 같이 NPS는 인산 제한조건에서 과발현 되는 유전자로 알려져 있다. 따라서 인산이 제한되었을 경우 미생물의 증식환경은 단백질합성에 필요한 충분한 양의 탄소원과 질소원을 가지고 있기 때문에 NPS 유전자 유래의 프로모터를 활용한다면, 인산의 제한에 의하여 증식이 정지기에 도달하였을 때 목적하는 유전자의 발현이 자동 유도되어 재조합 단백질의 대량생산이 가능하다고 추측된다. 따라서 NPS 유전자 유래의 프로모터를 이용한 재조합 단백질의 생산 연구가 진행되고 있다[17].

## 요 약

*P. pastoris*는 대장균에 비해 정확한 접힘, 당화, 효율적인 분비기작등의 장점을 가지고 있어 재조합 단백질의 생산을 위한 균주로서 관심을 받고 있다. 또한 재조합 단백질의 효율적인 생산공정 개발을 위하여 배양공정 중 특정 시간이나 조건에서 발현될 수 있는 효율적인 유도성 프로모터의 개발도 중요 관심 분야이다. 본 연구에서는 연속배양을 이용하여 *P. pastoris*의 배양 중 특정 기질이 소모되었을 때 발현되는 자동 유도성 프로모터를 개발하기 위하여, 인산이 고갈되었을 때 과발현 되는 유전자들을 탐색하였다. 인산 제

한 연속배양의 정상상태에서 얻어진 균체로 부터 total RNA와 mRNA를 분리하였고, 이로부터 cDNA를 합성하여 인산제한조건에서 과발현되는 유전자들을 확보하였다. 그 중 빈도수가 높은 8종의 유전자 3-phosphoglycerate kinase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), glucokinase, thiol-specific antioxidant protein, triosephosphate isomerase, sodium/phosphate symporter(NPS) 그리고 pyruvate decarboxylase를 선별하였고, Northern blot analysis를 수행한 결과 인산 섭취에 관련된 NPS 유전자가 인산제한조건에서 과발현 됨을 확인하였다. 본 연구실에서는 자동유도성 프로모터로서 NPS유래의 프로모터의 잠재성을 알아보기 위하여, 관련 유전자를 확보하여 외래 유전자를 이용한 발현연구를 진행 중이다.

## REFERNCES


1. Ahn, J. O, J. Y. Hong, H. W. Lee, M. S. Park, E. G. Lee, C. S. Kim, E. S. Choi, J. K. Jung, and H. W. Lee. 2007. Translation elongation factor 1-á gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 601-608.
2. Ambudkar, S. V., V. Anantharam, and P. C. Maloney. 1990. *UhpT*, the sugar phosphate antipoter of *Escherchia coli*, functions as a monomer. *J. Biol. Chem.* **265**: 12287-12292.
3. Cregg, J. M., K. R. Madden, K. J. Barringer, G. P. Thill, and C. A. Stillman. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1316-1323.
4. Egli, T., M. van Dijken, W. Harder, and A. Fiechter. 1980. Methanol metabolism in yeast: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Arch. Microbiol.* **124**: 115-121.
5. Ellis, S. B., P. F. Brust, P. J. Koutz, A. F. Waters, M. M. Harpold, and T. R. Gingeras. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1111-1121.
6. J. L. Cereghino and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Reviews.* **24**: 45-66.
7. Kim, T. H., J. K. Jung, S. S. Kwak, S. W. Nam, M. J. Chun, and Y. H. Park. 2002. Heterologous expression and secretion of sweet potato peroxidase isoenzyme A1 in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **24**: 279-286.
8. Mark, E. Schmitt, A. Timothy, A. Brown, and L. T. Bernard. 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research.* **18**: 3091.
9. Masanori, B. Y., N. Mamoru, H. Satoshi, and O. Yasuji. 1991. The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3229-3238.
10. Shen S., G. Sulter, T.W. Jeffries, and J.M. Cregg. 1998. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* **216**: 93-102.
11. Berberich T. and T. Kusano. 1997. Cycloheximide induces a subset of low temperature inducible genes in maize. *Mol. Genet. Genomics.* **254**: 275-283.
12. Tina N. S. and P. Merja. 1995. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3650-3655.
13. Tschopp, J. F., P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman, C. A., and T. R. Gingeras. 1987. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 3859 - 3876.
14. Veenhuis, M., M. V. Dijken, and W. Harder. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. *Adv. Microb. Physiol.* **24**: 1-82.
15. Viktor M. B., H.W. Johannes, T. P. Jack, and D.W. Piper. Matthew. 2002. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *J. Biol. Chem.* **31**: 3265
16. Waterham, H. R., M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair, and J. M. Cregg. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene regulation and use of its promoter. *Gene.* **186**: 37-44.
17. 피키아 유래의 NPS 프로모터 및 이를 이용한 이종단백질의 제조방법, 대한민국특허, 717353


**(Received Aug. 2, 2007/Accepted Nov. 1, 2007)**