

# 利用植物病毒載體表現外源基因

趙佳鴻

## 摘 要

利用植物病毒載體(viral vectors)可持續表現外源蛋白(foreign protein)的特性提供了一個大量生產具商業重要性蛋白質有用的工具，例如抗體(antibodies)和疫苗抗原(vaccine antigens)之生產。近年來，此技術已經取得相當的發展，無論是在第一代的載體(即採用完整的病毒)(full virus)和第二代載體(重組病毒)(deconstructed virus)。第一代“完整的病毒”載體的戰略是以病毒鞘蛋白(coat protein)融合(fusions)的方式來表現較長的外源蛋白(至少 140 個氨基酸)；此外，新一代的載體設計，係利用一個具專一性反應的氨基酸裸露在病毒的表面，便於將(單獨製造)外源蛋白以化學耦合方式裸露在病毒的表面，可易於純化外源蛋白，這種可耦合外源蛋白(抗原)到植物病毒表面的方法將可應用於開發新形式的疫苗。然而商業化生產過程，需要高產量，迅速擴大和快速製造外源蛋白，最近已經開發利用“重組病毒”方法(magnification)，這個過程是依賴農桿菌作為載體，將一種或多種病毒核酸(RNA)副本複製成 DNA，傳遞到植物細胞 DNA 中，目前已實驗證明，可表現許多外源蛋白質，包括完整的免疫球蛋白 G 抗體(immunoglobulin G antibodies)。依據外源蛋白表現策略將病毒載體主要區分為 4 類，(一)基因置換型(gene replacement)、(二)基因插入型(gene insertion)、(三)鞘蛋白融合型(epitope fusion)、(四)互補型(complementation system)。植物生產的蛋白質，係以真核生物的表現機制進行表現，具有：(一)藉由病毒的感染，使外源基因在寄主植物全株表現；(二)有效率地表現外源基因，達到高數量的表現單位(copy number)；(三)基因表現不受植物基因體 DNA 上的位置效應(position effects)影響等 3 項優點。

## 前 言

利用植物病毒做為基因載體(gene vector)，用以將外來基因導入植物體內進行表現的研究源於 1980 年代。病毒載體的表現系統，是利用已選殖具感染力

(infectious)的全長度病毒 DNA 構築做為載體，以插入(insertion)或取代(replacement)的方式，將欲表現的 DNA 構築於載體上，再將此病毒接種至系統性寄主(systemic host)植物上，隨著病毒在寄主體內表現、複製、系統性移動，所攜帶的外來基因將能在植物體內大量的表現。至今已有多種病毒被開發做為病毒載體，並廣泛運用於病毒基因功能研究、抗病應用及蛋白質生產等。在基因功能研究上，目前利用病毒載體表現的外源蛋白包括：報導基因(reporter gene)(即結合在另一個基因的下流，當做判斷上游基因是否表達的標記基因)，用以研究病毒複製、表現的機制；或來自植物或其他病毒的基因，以進行基因體功能研究；另外，在醫學實用上的應用包括：病原物表面抗原的表現。病毒複製、表現的機制；基因體功能研究，病原物表面抗原的表現、過敏源蛋白的表現、干擾素(interferon)的合成等。

## 內 容

植物作為生物工廠生產的發展，在製藥用途的蛋白產物和其他行業已經在近幾年蓬勃發展。儘管許多這樣的蛋白是通過建立轉基因植物，這是一個耗時的而昂貴的過程。然而，植物病毒載體用於表現異源蛋白質是有效的替代方法。當病毒含著我們想要製備的蛋白質基因引入到宿主植物，病毒複製工程持續進行下，我們想要製備的蛋白質數量也會顯著增加。病毒載體的使用有幾個優點：蛋白質產物可更快速和高產率生產，因為病毒載體基因不會嵌入植物基因組中，並不會形成一個遺傳性狀，而傳至下一代。在過去三年，植物載體的技術已經取得了重大進展。Gleba, Y.等學者將病毒載體表現外原蛋白的技術分 2 階段，(一)第一代病毒載體(First-generation viral vectors)：第一代病毒載體的基本功能就是同時表現野生型病毒的所有基因及我們想要表現蛋白(標的蛋白)的基因序列。標的蛋白質的表達需利用一個強有力的(重複)病毒啟動子，如植物病毒外殼蛋白次基因組啟動子，或者標的蛋白融合在病毒外殼蛋白去表現(用於表現小蛋白片段，例如抗體的抗原辨識區)。標的蛋白基因被送至植物細胞中表現需依靠具感染能力的基因體，例如完整的植物病毒。這個方式因需大量接種因此需準備大量病毒源及機械接種用金剛砂，而且媒介植物病毒也需具備高感染率、增殖、複製、細胞間移動及病毒顆粒組裝特性，因此在工業大量生產之運用上仍有一些限制與困難。(二)第二代病毒載體(Second-generation vector)：上述方法的局限性是顯而易見的，而且若插入大於

1 KB 基因片段通常無法表現蛋白，直到最近研究報告指出，只有短抗原辨識基因片段融合到病毒外殼蛋白基因內可有效地表現；而且病毒的傳播是逐步感染，在不同的樹葉不同速度進展，通常收穫植物在下位部部分葉片會有未感染的情形，且病毒產量通常是不穩定，因此許多感染的組織不會表現標的蛋白。這些限制促使病毒載體研究重新思考新的外源蛋白表現系統。而不是原先使用完整的病毒基因組，而是解構病毒的功能，重建建構一個組合式的系統，目的就只要能有效表現標的蛋白，所需的病毒元件基因序列被執行即可，而關掉不必使用其他病毒成分所提供的功能。不同的載體系統通過分子生物技術修改，例如通過引入沉默突變除去潛在剪接位點，或改變密碼子，並添加多種植物內含子 - 高活性合成的 T-DNA 模板的構築等。當這些構築好的載體系統若能使用農桿菌，進行有效的主動複製應可發生在幾乎所有的(>93%)的細胞。在這些技術所構築的載體系統基本上，一個簡單的概念就是，構築病毒載體系統並利用具有高滲透度農桿菌(農桿菌轉染效率)瞬態放大病毒載體遞送到整個植物組織。整個過程是滲透整個成熟的植物葉片組織。這種情況下，農桿菌取代傳統的病毒的功能。

1996 年 Scholthof 等人依據外源蛋白表現策略將病毒載體主要區分為 4 類，(一)基因置換型(gene replacement)：主要是將外源蛋白基因與病毒基因做置換，通常是以病毒之鞘蛋白基因置換。(二)基因插入型(gene insertion)：主要在不影響病毒複製與移動的位置將外源蛋白基因插入。(三)鞘蛋白融合型(epitope fusion)：主要將一段表位(epitope)與病毒鞘蛋白 C'端融合，使之裸露於病毒顆粒表面，主要用途為提供表面抗原以利血清或抗體之製備。(四)互補型(complementation system)：將外源基因插入缺失性病毒基因體(defective viral component)或衛星核酸(satellite RNA)中，藉由與協助者病毒(helper virus)共同感染時表現位於缺失性病毒基因體或衛星核酸上的外源蛋白。以植物生產的蛋白質，係以真核生物的表現機制進行表現，而利用原核生物(細菌)表現蛋白質的系統缺乏後轉譯修飾作用(post-translational modification)功能，是其缺點。另利用動物的細胞表現外源蛋白，可能會存在雜有對人類有共通傳染危害病原的風險。

2002 年 Hull 指出利用植物病毒作為表現載體，在植物體內表現外源基因，具有以上的優點：1.可藉由病毒的感染，使外源基因在寄主植物全株性的表現。2.可以有效率地表現外源基因，達到高數量的表現單位(copy number)。3.基因表現不受植物基因體 DNA 上的位置效應(position effects)影響。不過在使用上仍有一些限制

例如：1.病毒或外源基因無法與寄主植物 DNA 一起遺傳至子代。除了少數幾種可由種子傳播的病毒之外，大部分植物病毒無法在植物中保留至子代，每一次當植物生長受限制或死亡時，便需要重新在新的植株上接種，以獲得更多表現產物，因此以病毒載體表現外源基因的策略無法應用在育種上。2.對於一年生的作物，則必須每年或每季重新種植植株及接種病毒。3.重組病毒(recombinant virus)可能回復成野生種病毒(wild type virus)。病毒經過長時間的演化，已經將本身的基因體改良至最小、最有效率的程度，重組至病毒基因體的外源基因對於病毒而言，反而是個可去除的外源基因，因此經過幾次的再接種或經過幾次的複製後，目標基因有很大的可能性會被病毒去除。4.作為表現載體的病毒需經突變成爲弱系病毒，以增加實用價值。利用植物病毒載體表現外源基因的技術若能在使用之前完整的規劃策略及環境，加上適當的構築，選擇最適合的目標植物，將可把此技術發揮最大的功效。

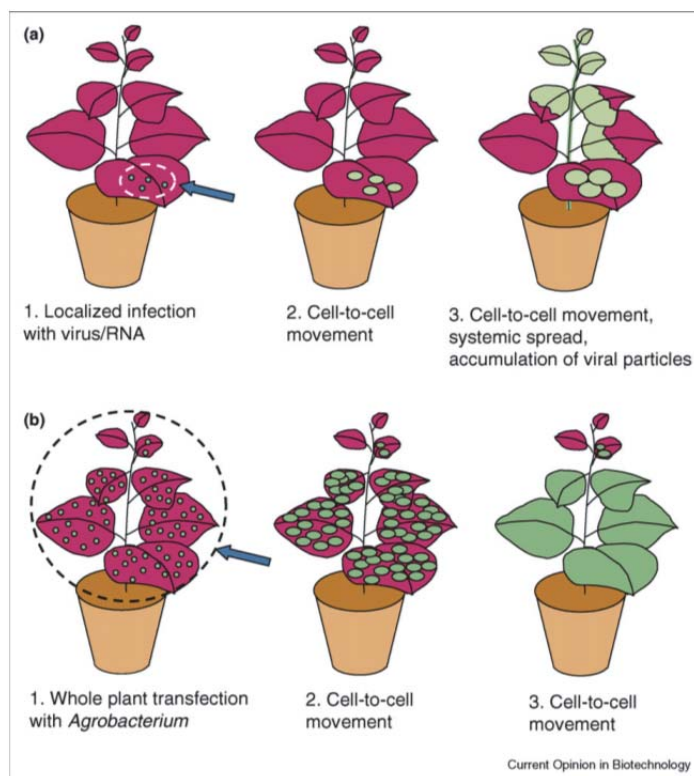


圖 1. (a)第 1 代病毒載體及(b)第 2 代病毒載體在植物葉片感染及分佈發展圖。

(Gleba, Y. et al., 2007)



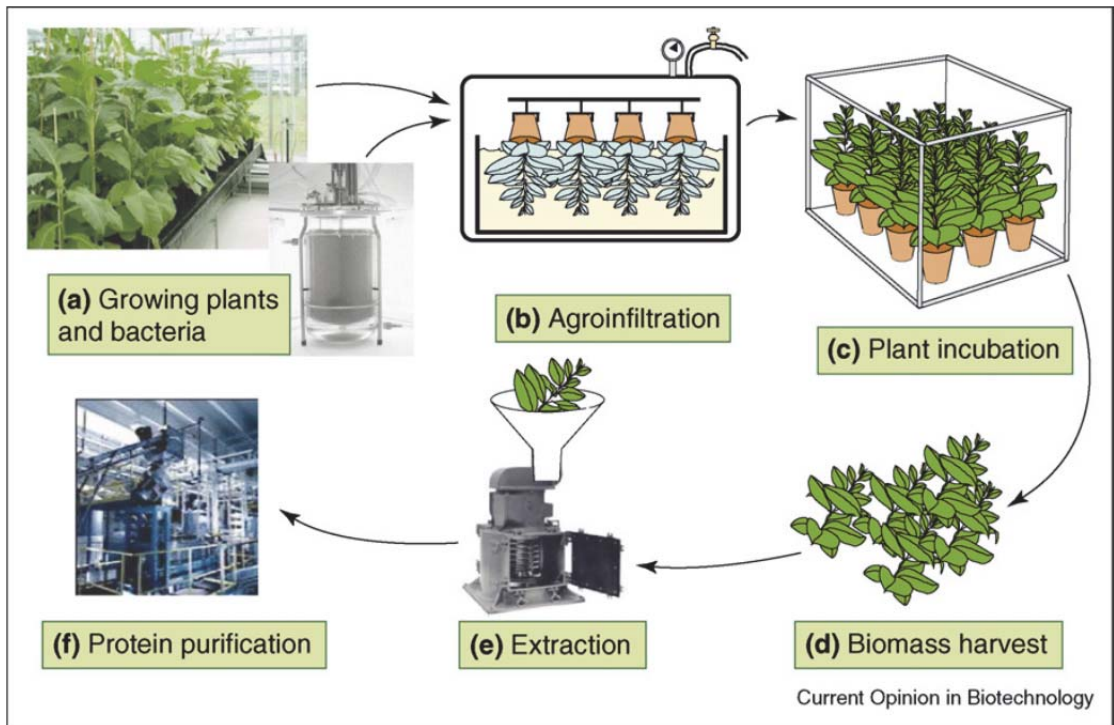


圖 2. 利用農桿菌滲入法(Agroinfiltration)在植物葉片產生重組蛋白質(recombinant protein)技術圖示。(Gleba, Y. *et al.*, 2007)

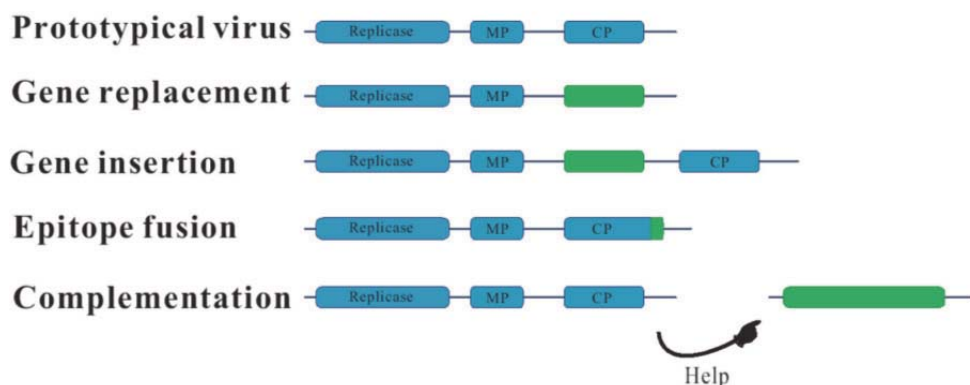


圖 3. 利用病毒載體表現外來基因的策略。藍色為病毒基因，綠色表示外來基因，圖中顯示外來基因以不同表現策略藉由病毒載體表現。(Scholthof *et al.*, 1996)

## 結 語

病毒載體的構築與技術研發，提供學術研究及經濟效益上的潛力。以植物所生產的蛋白質，係以高等真核生物的表現機制進行表現，不會有用細菌表現系統所生產的蛋白缺乏後轉譯修飾作用(post-translational modification)的考量，也沒有以動物細胞表現蛋白系統，可能雜有對人類有危害的人畜共通傳染病原的風險。2002 年，有學者指出，使用病毒載體表現或生產外源基因產物時，還要考慮下列的可能性，1.重組病毒是否有可能在田間或設施使用，經由植物間的接觸或其它傳播方式傳出外界。2.對於目標寄主植物是否造成嚴重病徵或僅造成微弱病徵。3.評估此病毒是否具有廣大寄主範圍；如果寄主範圍小，應用範圍可能受限，若寄主範圍廣泛，應考量是否容易散佈至自然界之安全性評估。4.持續接種時，病毒載體的表現效率及接種源的保存方式和時效。事前完整的規劃策略及環境評估，加上完整的構築及適當的目標作物，可將病毒載體表現外源基因的技術運用到產業規模上。

## 參考文獻

1. Chiang, C. H. and S. D. Yeh. 1997. Infectivity assays of *in vitro* and *in vivo* transcript of *papaya ringspot potyvirus*. Bot. Bull. Acad. Sin. 38: 153-163.
2. Chen, K. C., C. H. Chiang, J. A. J. Raja, F. L. Liu, C. H. Tai and S. D. Yeh. 2008. A single amino acid of NIaPro of Papaya ringspot virus determines host specificity for infection of papaya. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1046-1057.
3. Franconi, R., P. Roggero, P. Pirazzi, F. J. Arias and A. Desiderio. 1999. Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses. *Immunotechnology* 4: 189-201.
4. Giritch A, S. Marillonnet, C. Engler, G. van Eldik, J. Botterman, V. Klimyuk and Y. Gleba. 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14701-14706.
5. Gleba, Y., V. Kimyuk and S. Marillonnet. 2005. Magniffection-a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23: 2042-2048.

6. Gleba, Y., V. Kimyuk and S. Marillonnet. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 134-141.
7. Hsu, C. H., S. S. Lin, F. L. Liu, W. C. Su and S. D. Yeh. 2004. Oral administration of mite allergen expressed by *zucchini yellow mosaic virus* in cucurbit species down-regulates allergen-induced airway inflammation and immunoglobulin E synthesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113: 1079-1085.
8. Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. Fourth edition. Academic Press. London, UK.
9. Lin, S. S. 2001. Assessment of genetic variability, characterization of genome organization construction of infectious transcripts, development of viral vector, and generation of valuable attenuated strains of a Taiwan strain of *zucchini yellow mosaic virus*. Ph. D. Dissertation, Graduate Institute of Agricultural Biotechnology, National Chung Hsing University.
10. Scholthof, H. B. and K. B. G. Scholthof. 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 299-323.
11. Yang, C. D., J. T. Liao, C. Y. Lai, M. H. Jong, C. M. Liang, Y. Liang, N. S. Lin, Y. H. Hsu and S. M. Liang. 2007. Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes. *BMC Biotechnology* 7: 62.