

桿狀病毒表現載體之發展與應用

靳子蓉 高穗生

前 言

桿狀病毒(baculovirus)除了是目前有機農業上極具潛力的生物農藥外，也是當今醫學及工業上生產重要外源蛋白的載體系統。由於外源蛋白的生產屬於我國在經濟發展規劃上十分重要的方向及目標，是關鍵性的生物技術。因此，桿狀病毒的研究發展在未來的生物技術及農業科技化將扮演著十分重要的角色。

桿狀病毒為昆蟲的病原體，主要為感染鱗翅目昆蟲。其分類上可分成 A、B、C 三群，其中核多角體病毒(nucleopolyhedrovirus；NPV)即為 A 群。自 1983 年核多角體病毒被開發成真核細胞表現載體(eukaryotic expressing vector)，並成功的製造出具有生物活性的人類 β -干擾素(β -interferon) (Smith *et al.*, 1983)後，即被廣泛的探討與研究。核多角體病毒可發展成為表現載體乃是因為核多角體病毒的基因組中所含的多角體蛋白基因(*polh gene*)及 p10 基因，皆為非必要的結構性基因，都具有很強的啟動子(promoter)，因此核多角體病毒缺乏這些基因，並不會影響核多角體病毒在昆蟲細胞及幼蟲體內的複製與增殖，故當選殖出該結構性基因(如多角體蛋白基因及 p10 基因)，並利用限制酵素切割此結構性基因後，再接入目標外來基因(foreign gene)，其目標外來基因即可在該強勢啟動子的驅動下大量表現。桿狀病毒表現載體系統已成功的表現出上百種具生物活性的蛋白，如干擾素(α 或 β -interferon)和疫苗(雞華氏囊病毒結構蛋白抗原、E 型肝炎表面抗原)等。

桿狀病毒表現載體系統的發展

桿狀病毒表現載體系統(baculovirus expressing vector system；BEVS)是 80 年代早期由 Smith & Summers (1983)所建立的，近 20 年來已成為生產和研究各種原核、真核蛋白的有力工具。此載體系統主要是由桿狀病毒屬中 A 群的核多角體病毒所發展而來。此昆蟲核多角體病毒的遺傳物質為雙股超螺旋環狀的 DNA，分子量約 80~100 百萬道耳頓(dalton)，宿

主侷限在無脊椎動物。其病毒顆粒呈桿狀，大小約為(40~60)x(200~400)nm。桿狀病毒感染寄主後，會啟動多角體蛋白基因產生大量的多角體蛋白(polyhedrin)；在寄主細胞中的細胞核內出現明顯的包涵體(occlusion body；OB)或稱多角體(polyhedral inclusion body；PIB)(Fig.1)因此又稱為核多角體病毒。

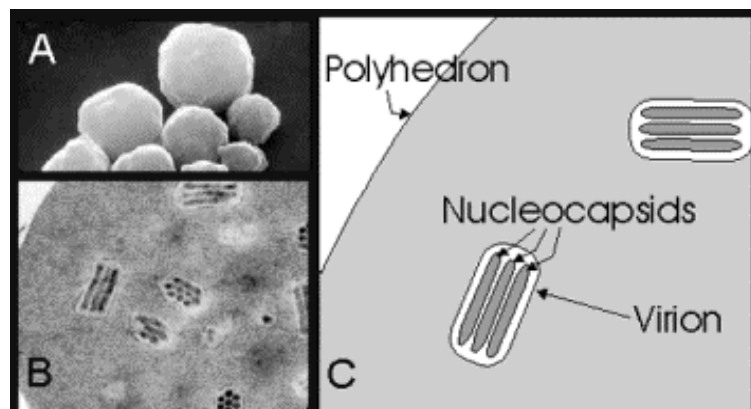


Fig. 1. Electro- microscopy shown the polyhedrin (A) and virion (B) of baculovirus, (C) schematic representation of polyhedrin and virion.

(取自<http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/pathogenos/baculovirus.html>)

目前利用核多角體病毒所建立之桿狀病毒表現載體已被應用在生物農藥、外源蛋白和基因療法(gene therapy)的發展。已知核多角體病毒基因組中含有 P10 及 Polyhedrin 二強勢啟動子，此二強勢啟動子在昆蟲細胞系統中具有高表現的活性，在感染的最晚期其蛋白產量可達 30% 以上 (Fig.2)，因此桿狀病毒表現載體系統常利用 P10 及 Polyhedrin 二強勢啟動子來啟動外源基因的表現。

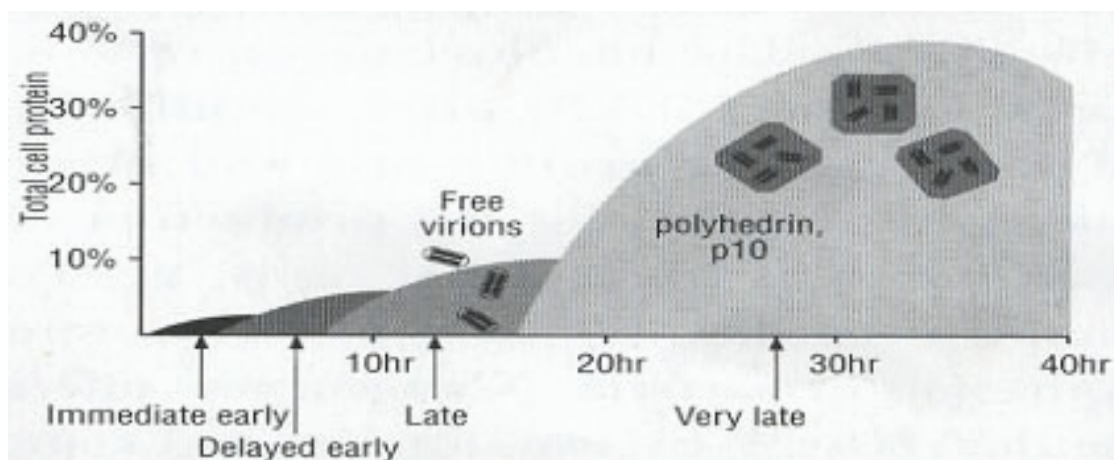


Fig.2 Time course of protein expression in insect cells using baculovirus vectors

(取自Invitrogen 對BEVS 載體表現蛋白之試驗結果)

此桿狀病毒表現載體系統主要是分為兩大類，一類是用於表現單個外源基因的表現載體，另一類表現載體則是用於插入並表現兩個或多個外源基因(Wang *et al.* 1991, Weyer and Possee 1991, Maeda 1994, Merrington *et al.* 1999)。其中一些轉移載體已發展成適用於表現融合蛋白，例如 pBlueBac His 系列載體(Invitrogen 公司)，在多角體蛋白起始密碼 ATG 的下游編碼 6 個組胺酸殘基區段(Fig.3)，讓表現的融合蛋白產物通過 Ni-NTA 親和性的層析管柱即可獲得純化。此外桿狀病毒轉移載體也可構築成表現的外源蛋白與麩胱胺酸-S-轉移酵素(Glutathione-S-transferase; GST)融合，然後用麩胱胺酸親和性管柱純化。除連接二個外源蛋白的表現載體外，另，連接三個與四個外源蛋白的表現載體也已被建立，此類桿狀病毒表現載體特別適合用於探討同時表現不同蛋白與結構和功能的關係。例如表現載體 pAcAB3 和 pAcAB4 (PharMingen 公司)可以在桿狀病毒感染昆蟲細胞內同時表現哺乳類動物病毒，如 C 型肝炎病毒的 3 個或 4 個結構蛋白，並且之後此 3 個或 4 個結構蛋白能正確折疊組裝成類病毒粒子(virus-like particle)。

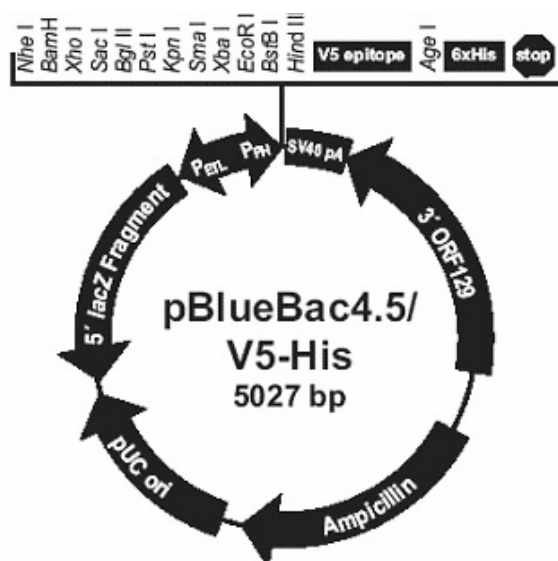


Fig. 3 Invitrogen 的 pBlueBac4.6/V5-His

另一突破性的發展是應用酵母菌人工染色體系統(yeast artificial chromosome; YAC)和桿狀病毒建構形成穿梭載體(bacmid)。此乃於桿狀病毒基因組插入酵母菌複製時必須的 DNA 組件(如 ARS 序列、CEN 序列和 VRA3 序列)使桿狀病毒基因組構築成一個穿梭載體，使其可同時在桿狀病毒表現系統及酵母菌表現系統中複製。Luckow *et al.* (1993)發展另一與應用酵母菌中相似的方法，則是將桿狀病毒基因和大腸桿菌建構形成穿梭載體，此乃借助一個 mini-F 複製子重組到多角體蛋白基因座位(locus)構築而成，例如已商品化的 Bac-to-Bac 系統(Invitrogen 公司)。上述 2 種

方法分別在酵母細胞和大腸桿菌內產生重組桿狀病毒而無須病毒空斑 (plaque) 純化過程。因此，鑑定與純化一個重組病毒所需的時間，可由常規方法的 4~6 周縮短到 7~10 天左右。此為應用桿狀病毒與酵母菌或大腸桿菌所形成的穿梭載體的優點就是可快速分離多個重組病毒，另一優點為所花費的經費較少。

近來研究指出當去除桿狀病毒基因組內的某些基因，可增加外源基因的表現量，例如去除桿狀病毒基因組內的半胱氨酸蛋白酵素(cysteine)及幾丁酵素(chitinase)等基因均能增進重組蛋白的穩定性，此乃因這些基因產物與細胞分解代謝途徑有關。另一方面，也有研究指出含有先導序列(leader sequence)的桿狀病毒表現載體，可增強對重組蛋白的表現，例如含有大腸桿菌 *trpE* 基因的 24bp 先導序列的桿狀病毒表現載體，可以增強愛滋病毒(HIV)整合酵素(integrase)的表現 2~5 倍。由於分子生物技術的迅速發展,因此利用基因工程改造桿狀病毒表現載體，也將日新月異，而桿狀病毒表現載體將提供最佳表現外源蛋白的途徑。

桿狀病毒表現載體系統之應用

桿狀病毒表現載體系統屬於真核細胞表現系統，目前已成功的表現多種不同的蛋白，所以桿狀病毒載體系統在外源蛋白之量產上有十分重大的貢獻。經由與轉基因動物、植物及哺乳動物細胞、酵母菌和細菌等五大外源蛋白表現系統的比較(Fig.4)，可發現桿狀病毒表現載體系統可平衡其他各表現系統的優缺點，為一適當的外源蛋白表現系統。此表現載體系統表現之外源蛋白較轉染(transform)哺乳動物細胞及轉殖動物或植物(transgenic animals and plants)所需的經費低及時間上也較快速，其蛋白質的糖基化(glycosylation)及正確折疊(folding)作用也較細菌及酵母菌佳。

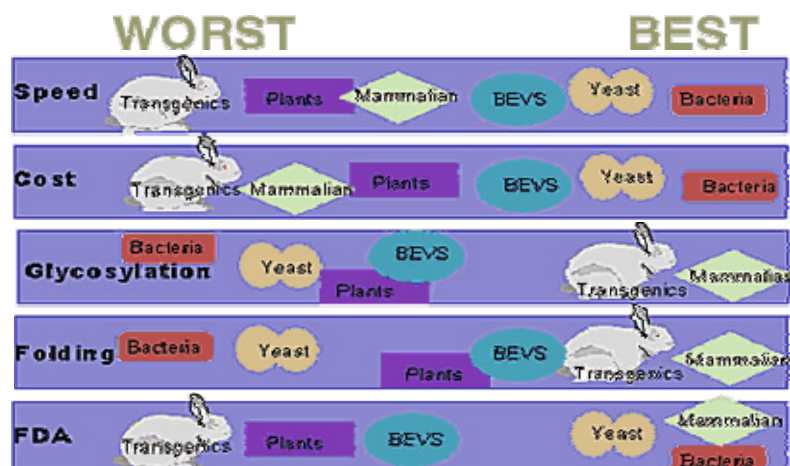


Fig 4. Compare the BEVS with five kinds of different expression systems
(取自http://www.proteinsciences.com/technology/technology_why.htm)

目前最常被使用作為桿狀病毒載體的核多角體病毒為加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(AcMNPV)及家蠶核多角體病毒(BmMNPV)，因為加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(AcMNPV)及家蠶核多角體病毒(BmMNPV)的基因組序列已完全被解序，可以進行相關所需的基因工程修飾，使得該載體在表現外源蛋白的應用上及資訊上更為快速和完整。因此已有許多醫療上所需的外源蛋白成功的利用 AcMNPV 及 BmMNPV 表現載體所表現 (Table 1)。該載體除了成功的表現上述外源蛋白外，也成功的研發出有效的動物疫苗，例如：1998, Song *et.al.*, 利用桿狀病毒表現系統成功的研發出鳥禽流感病毒疫苗(avian influenza)，2000 Wang *et.al.* 則是表現華氏囊病毒結構蛋白抗原(infectious bursal virus capsid protein; rVP2)產生次單位疫苗、1995 Hofmann *et.al.*, 初步完成利用桿狀病毒表現載體進行人類肝疾病的基因療法(gene therapy)的體外試驗，同時也發展出第一型人類免疫缺陷病毒(HIV-1) p55 結構蛋白的次單位疫苗及 1997 年 Zhang *et.al.* 研發 E 型肝炎表面抗原疫苗等。

Table 1.

Baculovirus expressing vector system	Protein expression
BmMNPV	Hepatitis B virus surface antigen, Human β -interferon, Human growth hormone, Human granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Human interleukin-2, Human butyrylcholinesterase, <i>Momordica charantia</i> trypsin inhibitorII, Canine parvovirus VP2, Human acidic and Basic fibroblast growth factors, Bovine interferon- γ .
AcMNPV	Human activin C protein, Human butyrylcholinesterase, Human adenosine deaminase, p30 protein of African swine fever virus, Phosphoryl triacylglycerol lipase, β subunit of human chorionic gonadotropin, Active influenza virus hemagglutinin, Hepatocyte growth factor.

取自 Deepak Sehgal, Punjab Singh Malik, Shahid Jameel. 2003. Protein expression and purification 27, 27-34.

歸納利用桿狀病毒表現載體來生產外源蛋白之優點：

一、高效率表現(efficiency expression)

由於桿狀病毒基因擁有特別強的啟動子能高效率地啟動外源基因的表現，使它的外源蛋白產量甚高。另該病毒具較大的基因組約 100 百萬道頓(dalton)，故可以容納插入近 10kbp 大的外源基因片段。

二、表現多樣性蛋白(versatile protein expression)

能完成蛋白質轉錄後的加工修飾，其中包括糖基化、磷酸化等。此蛋白質修飾後的作用也比細菌、酵母菌表現系統佳，且具有切除訊息蛋

白序列(signal peptide)的作用，使蛋白質能做正確的折疊。

三、具經濟上的效益(economic benefits)

從製作到生產所需的時間及經費遠比動物或植物系統低，因此預期此桿狀病毒在生產外源蛋白上較具有經濟上的效益。

四、安全性(safety)

昆蟲重組桿狀病毒被認為是遺傳學上安全的表現載體，已被用來研發與疫苗有關的蛋白抗原表現。

因此，利用桿狀病毒載體系統攜帶外源蛋白基因，此方法不但具備完善性，同時也具備極佳的應用性。

結 論

隨著生技產業的日益開發，近 3 年來全球生物科技大幅成長，生物技術及基因工程已是當前科技發展的重要趨勢，故與生物技術及基因工程有關的方法或工具都具開發的潛能。而桿狀病毒表現載體系統是一個極具發展性的外源蛋白表現系統，近 20 年來國內外已有許多農業生物技術及醫藥的開發與應用係是利用該系統進行。因此無疑的，在未來的科技發展上，桿狀病毒表現載體系統將扮演著重要的角色，目前的研究趨勢除了尋求更多的外源蛋白基因表現外，亦趨向探討影響桿狀病毒表現載體表現率的調節因子，預期桿狀病毒表現載體系統技術將不斷的被創新及應用在外源蛋白的量產製備，屆時將為表現外源蛋白帶來更大的發展空間及商機。

Reference

1. Cha H.J., Dalal N.G., Vakharia V.N., Bentley W. Expression and purification of human interleukin-2 simplified as a fusion with green fluorescent protein in suspended Sf-9 insect cells. *J.Biotechnol.* (1999) 69 : 9-17.
2. He J., Tam A.W., Yarbough P.O., Reyes G.R., Carl M. Expression and diagnostic utility of hepatitis E virus putative structural proteins expressed in insect cells. *J. Clin. Microbiol.* (1993) 31 : 2167-2173.
3. Higashihashi N., Arai Y., Ejo T., Horiuchi T., Saeki Y., Sakano K., Sato Y. K., Takashina S., Takahashi T. High-level expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen in silkworm using a baculovirus vector. *J.Virol. Methods* (1991)35 : 159-167.
4. Hofmann C. *et al.*, Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. (1995) *PNAS* 92 : 10099-10103.

5. Maeda S. *et al.*, Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Ann. Rev. Entomol.*(1989)34 : 351-372.
6. Maeda S., Kamita S. G., and Kondo A. Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6 kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *Journal of Virology* (1993)67 : 6234-6234.
7. Maeda S., Kawai T., Obinata M., Fujiwara H., Horiuchi T., Saeki Y., Sato Y. , Furusawa M. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* (1985) 315 : 592-594.
8. Wang M.Y. *et al.*, Self-assembly of the infectious bursal disease virus capsid protein, rVP2, expressed in insect cells and purification of immunogenic chimeric rVP2H particles by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Biotechnol Bioeng* (2000) 67 : 104-111.
9. Zhang Y., McAtee P., Yarbough P.O., Tam A. W., Fuerst T. Expression, characterization and immunoactivities of soluble hepatitis E virus putative capsid protein species expressed in insect cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (1997) 4 : 423-428.
10. Zhou N., Zhang Y., Jing W., Li, Z. Wu X. High expression of HBV S gene in *Bombyx mori* cell culture and in silkworm. *Clin. J. Biotechnol.* (1995) 11 : 149-156.