

製造蛋白質的 奈米機械人

■ 董嬛 · 趙裕展

在台灣，蛋白質生產逐漸成為一個重要而值得發展的生物科技或生醫製藥領域。在眾多蛋白質生產系統中，桿狀病毒所生產的蛋白質品質極佳，構築速度快且產量高，因而成為蛋白質生產體系中重要的一員。

隨著2008年諾貝爾獎頒給人類乳突病毒可以致癌的發現，葛蘭素史克藥廠也順勢推出第一個用於人類的桿狀病毒蛋白質產品—抗人類乳突病毒的疫苗，這疫苗的上市是桿狀病毒蛋白質生產系統發展史上一個重要的里程碑。

面對生醫製藥和生技產業的大量需求，蛋白質生產已成為本世紀不可或缺的產業，統計顯示將來全球每年都會創造數以十億美元計的商機。在台灣，蛋白質生產也會逐漸成為一個重要而值得發展的生物科技或生醫製藥領域。在眾多蛋白質生產系統中，桿狀病毒所生產的蛋白質品質極佳，構築速度快且產量高，因而成為蛋白質生產體系中重要的一員。

桿狀病毒是一群桿狀構形的昆蟲病毒，具有約80~230kb的雙股DNA基因體。它不是人類病毒，因此安全而容易操作。由於數十年來它已經長期被世界各國核准使用在農業蟲害防治上，以取代對人類和環境較有害的農藥，因此安全性早已受到全球各國認可。近二十多年來，隨著遺傳工程的進展，這病毒經多方面試測，已成為表現外源蛋白的絕佳載體之一。



桿狀病毒極小，但可以用電子顯微鏡觀察，紅色箭頭指的是桿狀病毒。Bar = 200 nm

桿狀病毒極小，就像奈米機械人，可在昆蟲細胞內製造蛋白質，以應用在疫苗、檢驗試劑、工業蛋白、飼料添加物和生物科技實驗室的種種高價位蛋白的需求上，也可以幫忙運送基因進入哺乳類動物的細胞，成為人體基因療法或組織工程中安全又有效的工具。也由於桿狀病毒多方面的重要性和用途，目前在國際公認的刊物上至少已發表1萬篇以上有關這病毒的報告，相當受到重視。

桿狀病毒表現系統

桿狀病毒表現系統是80年代早期，由德州農工大學的夏摩士（M. D. Summers）教授在眾多國際競爭者的激烈競爭中，脫穎而出首先建立完成的。近幾十年來，已成為極受歡迎的高效率、高品質蛋白質生產系統。其優點包括：

（1）桿狀病毒具雙股DNA，在DNA的剪接操作上相當方便。

■ 桿狀病毒極小，就像奈米機械人，可在昆蟲細胞內製造蛋白質，也是人體基因療法或組織工程中安全又有效的工具。

以桿狀病毒生產顆粒化蛋白的新系統，
使用的是一個經濟的基因工程蛋白回收的創新技術。

(2) 病毒基因組有兩個比其他病毒表現超強，但對病毒的生長又非必要的基因—多角體素和 $p10$ 基因。這二基因的起動子可以表現外來基因，且在接入較大外來DNA片段時，並不會影響核多角病毒的組裝。

(3) 桿狀病毒可接受原核或真核類的外來基因，大量生產重組蛋白質，也由於這系統是在昆蟲細胞內生產，因此還具有真核細胞特有的轉譯後修飾作用。所生產出的重組蛋白不論在抗原性、免疫性或生物活性等方面，都和原來的真核蛋白質相似。

(4) 桿狀病毒對脊椎動物或植物都無病原性，世界各國已核准在食品作物上使用，具有相當的安全性。所用來生產的鱗翅目，即蝶蛾類昆蟲細胞，也不會有人畜共通的病原，極為安全。

強大的蛋白表現量

桿狀病毒剛進入細胞時，利用和昆蟲細胞相同的機制以早期起動子表現早期所需的蛋白，表現量相當有限。為了大量複製病毒，桿狀病毒和一般病毒一樣，都有晚期起動子以表現較大量的蛋白。但桿狀病毒和其他病毒很大的不同是，它在製造病毒後，還有更晚、但蛋白製造量非常高的兩個極晚期起動子。

這些極晚期起動子，包括 $p10$ 起動子和多角體素蛋白起動子，在昆蟲細胞系統中有非常高的表現活性，這二個起動子在感染的最晚期所表現的蛋白可達總產量30%以上。因此桿狀病毒表現系統最常利用這二個強起動子來個別表現外源蛋白。

非胞裂性桿狀病毒

桿狀病毒感染細胞後會裂解細胞，所生產的基因工程蛋白質便外溢到培養液中，不但難以收集，且細胞裂解後所造成的蛋白水解酶外溢，會破壞已生產外泌的基因工程蛋白質。若生產的蛋白質較不穩定，就容易降解，使得品質降低。為了製造一個不會溶裂細胞的桿狀病毒載體系統，可以把桿狀病毒的 $p35$ 基因去除，使病毒進入潛伏感染，同時以非胞裂性的方法生產蛋白質。

此外，可以使用化學誘變劑讓桿狀病毒基因體突變，配合螢光鑑別方法，篩選出不溶裂細胞的桿狀病毒。這些病毒的起動子強度不亞於野生種病毒，且不會溶裂細胞，不但使蛋白質的品質變得更好，回收量也大為提高，可應用於生產較不穩定的外源蛋白。

基因工程蛋白之分離

生產遺傳工程蛋白質後，回收純化是相當耗錢、耗時而困難的步驟，一直是蛋白體醫學和工業界的難題。為了解決這難題，可以使基因工程蛋白顆粒化，以便把蛋白質從稀釋的培養液或細胞中回收。這些濃縮的蛋白質粒子可以輕易地藉由簡單的細胞破解和輕度離心而分離收集。雖然這些蛋白質透過聚集已形成顆粒狀，但實驗顯示所生產的紅、綠螢光蛋白仍然能發出強烈的螢光，很明顯地它們還能維持正常的結構。

在最常用的細菌生產蛋白質系統中，蛋白質一旦進入包含體（occlusion body）就無活性。但以桿狀病毒生產顆粒化蛋白的新系統所

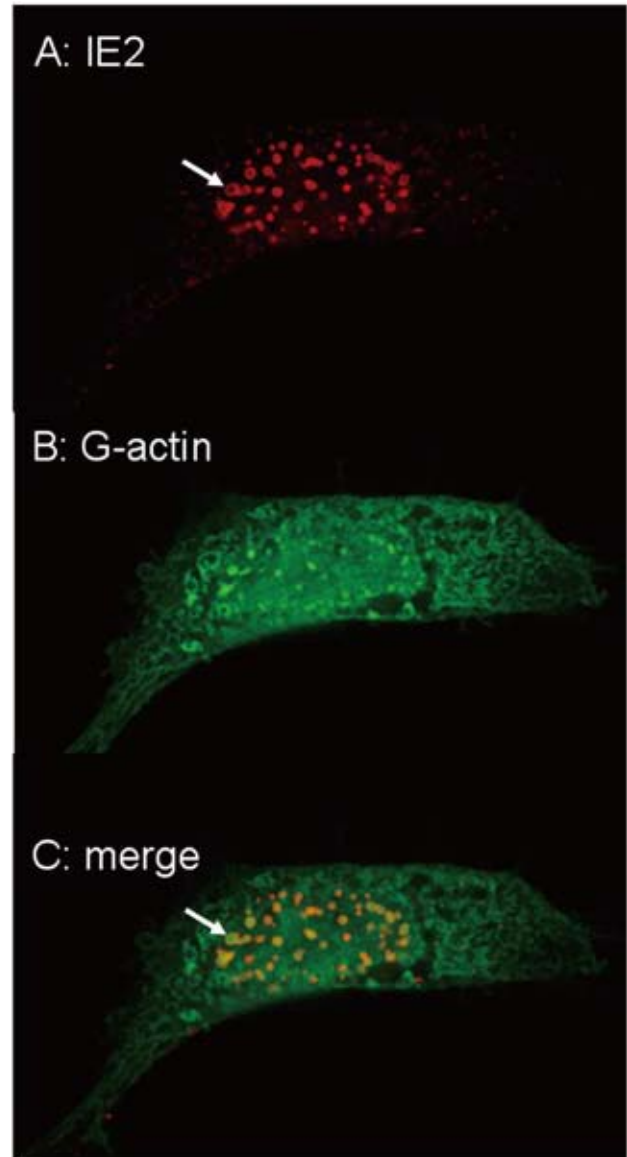
生產的蛋白，粗看和細菌生產的包含體類似，但結果有很大的不同，蛋白仍有活性，也有抗原性，所用的是一個新穎且經濟的回收基因工程蛋白分子的技術。

擬人化蛋白質表現系統

桿狀病毒雖是昆蟲病毒，但1995年起，發現它可以用類似胞飲作用的方式被吞食入某些哺乳類細胞中。桿狀病毒在進入哺乳類細胞後，它的起動子不會表現，但若裝入可被人類細胞認識的起動子，則病毒可在進入一些人類細胞（如肝細胞）後表現外源基因。由於桿狀病毒對人無病原性，也不會增殖，因此安全性比目前基因療法使用的腺病毒、反轉錄病毒等人類病毒高，在新興的人類基因療法和組織工程上的應用有明顯的優勢。

然而，由於寄主範圍的限制，即使使用了可被哺乳類細胞認識並啟動的起動子，基因的表現量仍然過低。為了解決這個問題，可以使用一種桿狀病毒的基因產物IE2激發一些哺乳類的起動子，增進它的表現。經研究發現，IE2活化子激發哺乳類起動子的效果極佳，在光學顯微鏡下觀察，IE2能形成一個獨特的微型空心籠狀結構，強有力地激發CMV起動子生產大量擬人化蛋白。

由於CMV起動子是公認哺乳類細胞表現量相當好的起動子，因此它的增量表現對生物科技產業有重要的助益。這不只讓桿狀病毒進階成爲一個有效運送基因進入人類細胞表現的工具，還讓桿狀病毒可生產高量的擬人化蛋白質，供醫學和實驗室研究使用。



IE2微型籠狀結構。圖中所見是單一細胞核，IE2（紅）會在核內形成數十個微型空心籠狀結構（箭頭所示）（A），其中包含高濃度的單分子肌動蛋白（G-actin）（綠）（B）。把A和B圖合併，可見actin被填入微型空心籠狀結構（箭頭所示）（C）中。

桿狀病毒的安全性比目前基因療法使用的腺病毒、反轉錄病毒等人類病毒高，在新興的人類基因療法和組織工程上的應用有明顯的優勢。



表現基因工程綠螢光蛋白的家蠶

此外，許多化學藥劑也證實能促進桿狀病毒在哺乳細胞系統中的表現。這些化學藥劑大致上可分為兩類：

組蛋白去乙醯基酶抑制劑—組蛋白乙醯基化在細胞內扮演基因調控的角色，是細胞抑制病毒感染的有效防禦機制。但組蛋白去乙醯基酶抑制劑可使組蛋白保持高乙醯化，以防止細胞產生防禦機制而有利病毒製造外源蛋白。

微管（microtubule）聚合抑制劑—微管是細胞骨架，常在病毒侵入時形成屏障，而微管聚合抑制劑可使這結構瓦解，以增進病毒侵入的效率，進而增強目標基因表現。

大量生產基因工程蛋白

發酵槽雖然是目前生產基因工程蛋白最常用的系統，但機器昂貴、複雜而難以操作，

更重要的是我們較無技術主導權。在1985年，已有報導顯示桿狀病毒可利用昆蟲生產大量基因工程蛋白。在1996年，筆者的實驗室以螢光蛋白為標誌，證明昆蟲在被桿狀病毒利用轉化後，可在遍及全身的細胞中生產蛋白質，因此產量甚豐。由於家蠶是東方特有昆蟲，體型又是所有昆蟲中較大的，因此利用牠來生產的效率特別高。

相較於發酵槽使用昂貴而不易大量生產和擴充，家蠶外源蛋白表現系統有著極大的優勢。

家蠶和常用的基因工程蛋白生產工具的細菌、酵母菌比較，屬於高等動物。利用牠來生產人類或動物所需的疫苗、營養物質或生長激素等，都無大腸桿菌或酵母菌生產體系所欠缺的蛋白醱化修飾的問題，也不會有酵母菌生產

利用桿狀病毒載體來表現外源蛋白質的方法的應用潛力， 在香港發生禽流感病毒疫情時，就首次得到證明。



一隻蠶自孵化至五齡熟蠶的飼養期間，只需餵食約20公克桑葉，就可使蠶體重量增加1萬倍之多。（圖片來源：<http://www.everystockphoto.com/>，攝影：Jason Gulledge。）

體系的過度醱化的問題。

利用家蠶蠶體為生產工具，牠的蛋白產量遠高於利用細胞培養的產量。實驗結果顯示，大量生產後，一隻家蠶成本約新台幣幾毛錢，但是可產生約數元至數千元產值的蛋白質。由於家蠶容易飼養，蟲體大，生長發育快，不需要太多的營養添加劑和空間的需求，一隻蠶自孵化至五齡熟蠶的飼養期間，只需餵食約20公克桑葉，就可使蠶體重量增加1萬倍之多。此外，蠶體產生的外源蛋白產物都會分泌或溢至家蠶體液中，有利於蛋白純化的操作。

在生物環境安全方面，這生產系統也有種種優勢。由於一個基因工程的產物要通過各國極嚴苛的審核才得以上市，而家蠶的蛋白質生產系統可說是最符合環保安全的產物，因此是較容易通過各國的要求而上市的产品。原因包括，可感染家蠶的桿狀病毒稱為家蠶桿狀病毒，除了家蠶以外不感染任何昆蟲和生物。家蠶在野外無明顯同種可交配的昆蟲，因此不易有基因汙染的問題。家蠶是完全馴化的昆蟲，脫離人類飼養環境也無法在野外生存；家

蠶的成蛾不會飛，因此無法逃逸。家蠶可完全在有管制的實驗室或廠房內飼養，不似動植物一般須在戶外培養，可減少基因工程產物的暴露。

由於以上的特性，使得家蠶生產的蛋白質成為基因工程生物產品中，最容易通過各國生物安全法規檢驗的一個系統。

展望

利用桿狀病毒載體來表現外源蛋白質的方法的應用潛力，在香港發生禽流感病毒（H5N1）疫情時，就首次得到證明。舉例而言，Protein Science Inc.在美國國家衛生院的要求下，只花了8周，就利用桿狀病毒感染昆蟲細胞，產製出第一批禽流感疫苗，比傳統使用的細胞系快得多。美國GSK公司也以桿狀病毒製作子宮頸癌疫苗在全球銷售，包括台灣。

綜合本篇論點，利用桿狀病毒相關表現系統的優點有：高表現量；可產製蛋白質分子的大小不受限制；蛋白質形成效率高；轉譯後修飾作用完整；表現的蛋白質產物具完整構形和生物活性；可加快產品開發速度；製作重組桿狀病毒表現系統所需的成本，較現行的動物細胞培養或轉殖動物系統更便宜；可即時感染並表現，無細胞系繼代和可能造成的生態汙染問題。因此桿狀病毒在生物科技上的應用性越來越廣，具有極佳的前途。

董嫻·趙裕展
中央研究院分子生物研究所