

利用基因轉殖植物生產重組蛋白

紀 科 衡¹⁾

關鍵字：基因轉殖、重組蛋白

摘要：植物細胞核和葉綠體的基因組可經由農桿菌基因轉殖法或葉綠體基因轉殖法生產重組蛋白。外源基因轉殖所使用的表現載體，必須選擇可適用於廣汎寄主範圍的複製起始序列(*ori*)，包括格蘭氏陰性菌 *E. coli* 和農桿菌 *Agrobacterium*。啓動子是調控轉錄作用的表現強度和時機的關鍵要素，以持續表現、誘導表現或組織特异性表現啓動子可調節重組蛋白在植物特定器官或生育階段表現。配合適當的順式調控序列(*cis-elements*)、反式作用因子(*Trans-acting factors*)或內含子增強效應(*Intron-mediated enhancement, IME*)等，可以加強外源基因的表現量。特定 5'非轉錄前導序列(5'-UTR)及起始密碼區序列對 mRNA 的轉譯效率具促進效果，修改 GC 含量和密碼偏好性(*codon usage bias*)可提高在標的植物的重組蛋白表現量。經由導向運輸將重組蛋白運送至內質網或蛋白質體等胞器可降低蛋白遭受到分解破壞，設計融合蛋白亦可增加蛋白穩定性進而加強重組蛋白的累積量。以轉殖植物表現外源基因已有許多報導，目前主要仍受限於外源基因在植物體中的低表現量，本文將針對植物表現系統的效率限制步驟，探討加強外源基因在植物表現和穩定重組蛋白在植物累積的策略。

前 言

以植物生產重組蛋白的分子農場概念已應用在製造工業用酵素、疫苗和抗體等醫葯用蛋白、生物活性胜肽、可分解塑膠和植物二次代謝物。蛋白合成是緊密調節的過程，在生物體中生產重組蛋白涉及蛋白的穩定性，且蛋白活性常需經適當的轉譯後修飾方能具有正常功能，包括醣基化，磷酸化和正確折疊。重組蛋白可藉由昆蟲、酵母菌和真菌生產，然而這些表現系統在成本、規模、純度和轉譯後修飾上受到限制。轉基因動物和轉基因植物的表現系統亦已被開發，而利用植物生產重組蛋白是一個具有發展潛力的表現系統，其優

1) 國立中興大學園藝學系博士班學生，通訊作者。

勢包括低生產成本、低設備資本、不具人類及動物病原、具有適當轉譯後修飾、可生產特定結構和具生物活性的目標蛋白。

一、植物表現系統

植物全株或組織培養細胞均可作為異源基因的表現寄主以生產重組蛋白，相較於其它真核生物系統雖然具有多樣的後轉譯修飾，但是其操作昂貴且生育期長。植物經人類利用為食物和醫藥來源，因此，植物在重組蛋白的生產上可以提供作為安全外源基因表現系統的另一種選擇。

(一)、植物表現系統的優點

利用植物作為分子農場(molecular farming)生產重組蛋白相較於利用細菌、酵母菌和動物細胞培養可以避免受人類病原、致瘤性 DNA 序列(oncogenic DNA sequences)、普恩蛋白(Prion)和內毒素(endotoxins)等污染。植物表現系統具有相當多優點，包括：安全性，植物非動物病毒或病原菌的寄主，植物細胞沒有動物的病毒和病原菌繁衍，對於生產葯用蛋白尤其重要，其所生產的葯用蛋白亦較少受人類病原微生物的污染(Shadwick and Doran, 2005)；相較於傳統的哺乳動物細胞培養和微生物發酵，它是一個節省的系統，依據目標蛋白的種類、產量和使用的作物不同，目標蛋白的生產成本只有微生物系統的 2-10%，動物細胞培養的千分之一(Chen *et al.*, 2005)。栽培更多植株便可達經濟生產規模，由實驗室至農場可控制蛋白的品質和產量；目標蛋白可在不同細胞或組織中表現，例如在種子或塊莖中，有利於長時間儲藏，不需冷藏便於運送，抗體穩定性可達三年以上(Twyman *et al.*, 2005)。當需要下游加工處理時也較簡單和較不昂貴，尤其當蛋白表現在種子等特定組織時(Seon *et al.*, 2002)；蛋白可以在植物可食用的部分表現，並可作為食用疫苗生食，減少純化和注射的成本和不便；植物可進行大部分的後轉譯修飾作用，生產相似於動物細胞 N-聚糖(N-glycan)的糖蛋白(glycoproteins)。

(二)、植物表現系統的限制

利用植物作為生產重組蛋白的表現系統，至今仍有蛋白表現量低、表現蛋白累積量低和糖苷化型式與人類具差異性，限制此系統由開發研究進展至商業生產。重組蛋白的表現量至少必須達到總蛋白的 1 % 才符合商業利用。植物的後轉譯修飾(post-translational modification, PTM)，包括經由分泌途徑在內質網和高爾基體進行 N-linked 糖基化(glycosylation)，或在高爾基體進行 O-linked 糖基化，在內質網中的伴護蛋白(chaperone)可幫助蛋白折疊。利用植物和動物生產蛋白的主要差異在於蛋白的糖苷化，植物具有未在哺乳動物系統發現的 α -(1,3)岩藻糖(α -(1,3) fucose)和 β -(1,2)木糖(β -(1,2) xylose) (Sethuraman and Stadheim, 2006)；且非人類的後轉譯修飾，亦造成植物生產蛋白缺少通常可在人類發現的末端半乳糖(terminal galactose)和唾液酸殘基(sialic acid residues) (Gomord and Faye,

2004)。因此，植物生產的醣蛋白(glycoproteins)會導致免疫抗原力(immunogenicity)。開發植物生產重組蛋白必須抑制植物特有但非所要的糖分子的結合，並設計加入新的糖分子以獲得適合人類的醣蛋白結構。

二、加強外源基因在轉殖植物的表現

開發植物表現系統生產平台的主要關鍵是需要有最佳的重組蛋白表現量，為了在轉殖植物表現目標蛋白，利用適當的轉殖技術，藉由合適的載體可以將個別的 DNA 序列整併至植物基因組，此基因經由轉錄、轉譯和後轉譯修飾，一些蛋白表現的速率限制步驟可以被改善，進而提高目標蛋白的表現。

(一)、理想的表現載體

農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 Ti 質體上 T-DNA 具有將 DNA 轉形至植物細胞的特性，將 Ti 質體上參與 T-DNA 傳送的致毒 *vir* 基因分開置於另一複製子(replicon)下，其餘部分經改造為可在 *Escherichia coli* 和 *A. tumefaciens* 進行複製且不具致毒性(disarmed)的 Ti 質體，並具有修改過的 T-DNA，稱為雙元載體(binary vector)，為目前基因轉殖所使用的載體。理想的植物表現載體應該具有：(1)廣大的寄主範圍 *ori*(複製起始點)，包括格蘭氏陰性菌 *E. coli* 和 *Agrobacterium* (Hellens *et al.*, 2000)；(2)高複製拷貝數質體 *ori*，例如 pBR322 的 Col E1 *ori*，以利在 *E. coli* 中產生大量 DNA。但若欲轉殖大於 15 kb 的大片段 DNA，可使用低複製拷貝數 *ori*，例如 IncP 或 F factor *ori* (Komori *et al.*, 2007)；(3)長度短，以 10-13 kb 替代原來的 250 kb；(4)高轉殖效率；(5)廣泛的選殖位置(cloning site)。

(二)、基因轉殖方法

利用基因轉殖植物生產重組蛋白符合大規模生產的要求，選擇適當的基因轉殖方法必須考慮標的植物的種類和穩定基因轉殖所需要的時間，通常基因轉殖植物品系的建立至少需 3-9 個月進行篩選和再生的過程(Twyman *et al.*, 2003)，植物基因轉殖的方法包括：以農桿菌(*Agrobacterium*)、基因槍(particle bombardment)或電穿孔(electroporation)等方式將目標基因整併至標的植物細胞的細胞核或葉綠體基因組使其穩定表現重組蛋白，並遺傳至後裔。

1. 植物細胞核基因轉殖

(1). 農桿菌基因轉殖

利用農桿菌 *A. tumefaciens* 和 *A. rhizogenes* 可將外源基因導入植物細胞核染色體 DNA，分別具有 Ti 質體和 Ri 質體，質體中具有 T-DNA (transferred DNA)，T-DNA 的側翼為二個 25 bp 順向重複(direct repeat)的左邊界(left border, LB)和右邊界(right border, RB)，為 T-DNA 傳遞的順式信號元件(cis element signal)。細胞核轉殖一般是利用土壤革蘭氏陰性病源菌農桿菌(*A. tumefaciens*)，滅毒的農桿菌常被利用做為多種雙子葉和某些單子葉的轉殖載體

(Lessard *et al.*, 2002)，目標基因可以構築在 T-DNA 中轉形至寄主細胞(Tzfira and Citovsky, 2006)。經過修飾的雙元載體 pTiBo542 具有以源自強致病菌系 *A. tumefaciens* strain A281 的 *virB*、*virG*、*virC* 基因，此雙元載體對於不易轉殖的物種可以提高轉殖效率，特別是單子葉穀類作物(Komari, 1990)。

(2). 短暫表現系統

此外，短暫表現系統提供快速且方便的利用植物生產重組蛋白平台(Rybicki, 2010)。將農桿菌重組載體經由葉片真空滲入(agroinfiltration)，使 T-DNA 短暫轉形到許多細胞中，短時間內可以使重組蛋白大量表現，外源基因並無穩定轉殖到染色體 DNA，此方法已應用在生產臨床用的生物醫藥(Pogue *et al.*, 2010)，但這個技術較無法滿足商業規模生產(D'Aoust *et al.*, 2009)。另一個短暫表現技術是使用植物病毒作為表現載體將外源基因帶進植物細胞，但亦並未整併至染色體中，植物病毒例如菸草嵌紋病毒(tobacco mosaic virus, TMV)或馬鈴薯病毒 X (PVX)，以病毒感染植物已經使用在幾種葯用蛋白的生產上，包括疫苗和抗體(McCormick *et al.*, 2008)。

2. 植物葉綠體基因轉殖

葉綠體基因轉殖系統係將外源基因主要利用基因槍轟擊方式導入到葉綠體 DNA (cpDNA)，利用葉綠體作為生物反應器生產重組蛋白或生物醫療蛋白。由於葉綠體基因表現的機制具原核生物特質，且外源基因以同源重組方式整併至葉綠體基因組，因此必須構築植物物種特異的轉殖載體。在葉綠體所合成的重組蛋白，無法進行如同在內質網中的後轉譯修飾，因此，如同細菌表現系統，葉綠體基因轉殖可能限制了獲得具生物活性蛋白的種類。大部分植物葉綠體基因為母系遺傳，多數植物花粉缺乏葉綠體 DNA，可以提供自然的轉殖基因阻遏。因為在單一個光合作用細胞有許多葉綠體，因此有高的轉殖基因拷貝數，可以累積高重組蛋白表現量(Leelavathi and Reddy, 2003)。

(三)、轉錄作用(transcription)

轉錄是生產重組蛋白的早期調節步驟，因此很多研究著重在提高轉錄層次，包括選擇適當的啟動子、加強轉錄因子結合、使用增強子(enhancer)、應用內含子增強效應(intron-mediated enhancement, IME)、避免受轉殖基因整併區域的染色質結構及調控序列或拷貝數(copy number)和表觀遺傳效應(epigenetic effects)的影響所導致的基因靜默(TGS)等。

1. 啟動子

啟動子是調控轉錄作用的表現強度、位置和時機的關鍵要素，啟動子包含基因與 RNA 聚合酶結合的區域，負責轉錄起始和調節。啟動子通常可以區分為三類：持續表現、誘導表現和組織特異性表現。

(1). 持續表現啟動子

持續表現啟動子(Constitutive promoter)會在植物全株表現重組蛋白不受環境和發育因子的影響，雙子葉植物較常採用的持續表現啟動子是 CaMV35S 啟動子和其所衍生的啟動子(Kay *et al.*, 1987)，應用在單子葉植物包括源自玉米和水稻 ubiquitin、水稻 actin、水稻

cytochrome 和 histone H2B 基因的啓動子。當使用持續表現啓動子時，若轉殖基因在植株所有生育階段均過度表現，重組蛋白則可能干擾植物本身代謝而造成毒害。在不同的植物組織間，不同的持續表現啓動子所誘導的表現程度亦有所差異，例如，CaMV35S 啓動子在葉片組織有高的表現量，而在種子組織的表現量則相當低；相對的，ubiquitin 啓動子在葉片和種子皆有較高的表現量(Stoger *et al.*, 2000)。

(2). 組織特異性啓動子

較強的組織特異性啓動子(tissue-specific promoter)可以提供較高的表現，蛋白在目標組織以外表現的結果，會造成寄主系統的代謝負擔。因此，將重組蛋白對寄主的毒性減至最小，組織特異啓動子對此便提供附加的優點。以開發口服疫苗為例，是直接利用植物可食用部分，組織特異啓動子是首要的選擇，此類應用在植物特定器官表現外源蛋白的啓動子包括番茄果實專一性 E8 啓動子，僅在種子專一性表現的啓動子則有玉米 globulin-1 啓動子、水稻 glutelin 啓動子，應用在葉綠體基因轉殖的葉綠體專一性表現啓動子有 16S 核糖體 RNA 啓動子(*Prrn*)或光合作用反應中心 D1 蛋白的 *psbA* 基因啓動子。

(3). 可誘導啓動子

當轉殖基因的表現以持續表現啓動子調控時，重組蛋白的生產對植物生長和發育形成危害，或當轉殖基因必須在特定植物組織或生育階段表現時，此時可以使用可誘導啓動子(Inducible promoter)，使得僅在特定誘導因子存在下進行表現，否則不表現。有效率的誘導表現系統的條件包括：啓動子對誘導必須快速反應、移除誘導物後啓動子要迅速關閉、對植物不具毒性、可以大規模應用。應用於基因轉殖植物生產重組蛋白的可誘導啓動子依據調控啓動子的誘導物可區分為：(1) 代謝型誘導啓動子，例如水稻 α -澱粉水解酵素 (α -amylase 3D, RAmy3D)啓動子，利用停止蔗糖供給以活化啓動子，可以高度表現生產藥用蛋白，包括人類 α 1-抗胰蛋白酶 (α 1-antitrypsin, rAAT) (McDonald *et al.*, 2005)、可以大量表現人類乳鐵蛋白(lactoferrin) (Jo *et al.*, 2006)。(2) 物理性誘導啓動子，其誘導因子包括溫度、乾旱、光照和機械傷害，例如利用傷害誘導的 polygalacturonase-inhibiting protein I 基因啓動子限制抗菌蛋白在真菌感染而受傷的區域表現，可達到避免對基因轉殖植物所產生的細胞毒害(Corrado *et al.*, 2005)。(3) 化學物質誘導啓動子，包括利用雌二醇(estradiol)、地塞米松(dexamethasone)、糖皮質激素(glucocorticoid)、乙醇(ethanol)，XVE 係融合雌激素受體(estrogen receptor, E)的轉錄活化子(transcription activator)，啓動子上嵌合 XVE 的轉殖水稻利用 17- β -雌二醇(17- β -estradiol)可誘導基因表現(Okuzaki *et al.*, 2011)。

2. 順式調控序列(cis-elements)和反式作用因子(Trans-acting factors)

順式調控序列可以調控基因表現，包括啓動子、增強子(enhancer)、反應元件(responsive elements)等。阿拉伯芥缺水逆境反應基因 *ERD1* (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 1)須有二個順式調控序列協同誘導其基因表現，包括轉錄因子辨識序列 ZFHDRS (ZFHD recognition sequence)和 NACRS (NAC recognition sequence)各為轉錄因子 ZFHD1 和 NAC 的結合位置。Tran *et al.* (2007)報導分別構築二個轉殖載體，其一

為表現報導基因 *uidA* (GUS)，其啓動子為融合順式調控序列 ZFHDRS 和 NACRS 的 ERD1 啓動子；其二為表現轉錄因子 ZFHD1 和 NAC 基因，其啓動子為 CaMV 35S，將此二個表現載體共轉染(co-transfection)至阿拉伯芥 T87 原生質體，可以顯著活化報導基因 GUS 表現(7)。葉綠體基因轉殖常利用內生或異源調控序列促進目標基因提高表現量，在非轉譯區(untranslated regions, UTRs)順式調控序列常形成二級結構，幫助葉綠體 mRNA 與細胞核編碼的 RNA 結合蛋白(nucleus-encoded RBPs)結合(Merhige *et al.*, 2005)。

反式作用元件可以直接結合至啓動子驅動轉殖基因表現或與其它轉錄因子交互作用並促進其結合至啓動子，此類轉錄因子在基因轉殖植物經由共表現啓動順式作用啓動子(cis-acting promoter)，然而為使共表現對轉錄作用具正向加強效果，必須寄主植物在自然條件下此轉錄因子缺乏或較低表現量。將啓動目標基因的水稻球蛋白啓動子(globulin promoter)與其轉錄因子 REB (rice endosperm bZIP)共同轉殖可提高 3.7 倍溶菌酶(lysozyme)表現量(Yang *et al.*, 2001)。

3. 內含子增強效應(Intron-mediated enhancement, IME)

大部分真核生物基因具有非編碼的內含子，經轉錄作用僅出現在 pre-mRNA，而不存在於轉錄後剪切(splicing)過的成熟 RNA。植物細胞核約 80% 基因具有內含子(Reddy, 2001)，許多內含子具有增強基因表現功能(Clancy and Hannah, 2002)，稱為內含子增強效應(Intron-mediated enhancement, IME)。Rose and Last (1997)比較具有及不具有內含子的相同基因，顯示可達 10 倍的表現差異。通常單子葉植物的內含子增強效應高於雙子葉植物。內含子在基因的位置決定其對表現量增進的大小，位於不同位置對基因表現的增強程度不一，內含子距離啓動子愈遠則其增強效應愈小，當其位於 3'端非編碼區(3' UTR)則可能喪失增進的效益(Bourdon *et al.*, 2001)。Samadder *et al.* (2008)報導利用具有水稻聚泛素(polyubiquitin)基因 *rubi3* 之 5'端調節序列，包含 0.9 kb 啓動子、67 bp 非編碼外顯子 1(exon 1)及 1.1 kb 的 5' UTR 內含子，獲得達 29 倍轉殖報導基因 GUS 的加強表現效果。內含子位於 5' UTR 並鄰近啓始密碼 ATG 可能非隨機分佈，某些例子，最鄰近啓動子的內含子具有順式作用元件(cis-acting elements) (Vitale *et al.*, 2003)。因此，增強效應亦有可能作用在 DNA 層次，但尚未被證實。

(四)、轉譯作用(translation)

影響蛋白產量除了 mRNA 量外，轉譯速率和蛋白降解速率亦是影響因素。許多不同策略應用於促進外源基因之 mRNA 的轉譯效率，包括增加轉譯起始效率，最佳化密碼偏好、減少後轉譯作用過程中蛋白降解。

1. 轉譯起始

植物轉殖載體中 5'和 3'-非轉譯區(UTR)會影響 mRNA 加工修飾和 mRNA 的穩定性，轉殖基因的 5'-UTR 或前導序列可協助 5'加帽(5'-capping)和轉譯起始。

(1). 5'非轉錄前導序列

轉錄起始機制是透過核糖體次單位 40S 與真核生物起始因子(eukaryotic initiation

factors, eIFs)搜尋機制，經由辨識並結合至 mRNA 的 5'端的 m7G 帽(5' cap)，然後往下延著非轉譯前導序列搜尋第一個 AUG 密碼(Kozak, 2002)。這個過程的任一步驟均會受到 5'非轉錄前導序列(5' untranslated leader sequence)結構和 AUG 影響，並會限制起始速率。在植物表現系統的基因構築中加入 5'非轉錄前導序列可以增進轉譯起始，促進其下游之轉殖基因的轉譯效率(Kang *et al.*, 2004)。此類 5' UTR 轉譯元件的應用，包括源自病毒：菸草蝕紋病毒(tobacco etch virus, TEV)、菸草嵌紋病毒(tobacco mosaic virus, TMV) Omega(Ω)、及源自植物：水稻聚泛素(polyubiquitin)基因 *RUB13*、菜豆(common bean) *arc5-1* 等。

(2). 起始密碼區

核糖體小亞基(small ribosomal subunit)找到 mRNA 適當序列區上的起始密碼是轉譯作用速率決定步驟(Kawaguchi and Bailey-Serres 2002)，植物系統通常以 AUG 為起始密碼(79 個高等植物基因中佔 92%)(Joshi, 1987)。表現系統中為了增加異源基因在寄主植物的轉譯作用，任何位於轉錄起始點附近的序列應該修飾為符合植物的 Kozak 保守序列。植物在起始 AUG 周圍的保守序列 AACAAUGGC、UAAACAAUGGCU 和 GCCAUGGCG 與動物 CACCAUGG 不同(Lutcke *et al.*, 1987)。利用植物高度表現基因之保守序列 ACC 或 ACA 構築於異源基因起始密碼前，在起始密碼後接 GCTTCC TCC 可以最佳化基因表現(Sharma and Sharma, 2009)。水稻和阿拉伯芥於起始密碼區修飾符合(A/G)(a/c)(a/g) AUG and (A/G)(u/C)(g/C) AUG 可以加強轉譯速率(Sugio *et al.*, 2010)。

(3). GC 含量和密碼偏好性

密碼使用偏好(Codon usage bias, CUB)使得不同物種包括原核生物或真核生物對於特定胺基酸的同義密碼子(synonym codon)之使用頻率不一，此亦影響基因組的%GC。單子葉和雙子葉植物對於密碼使用的偏好並不相同，甚至在相同植物的細胞核及質體間亦有很大的差異。同義密碼子的第一和第二位置鹼基固定，只在第三個鹼基不同(wobble)，基因組中有較高的%GC 則常用的密碼子第三個鹼基常為 G 或 C，%GC 較低的基因組其常用的密碼子最後一個鹼基偏好 A 或 T(Muto and Osawa, 1987)。因此，GC 含量和密碼使用偏好影響轉殖異源基因在寄主植物的表現(Zhang *et al.* 2007)。雙子葉植物例如阿拉伯芥發現當有最佳轉譯效率，特別是高度表現的持續表現基因(housekeeping genes)其同義密碼子與 tRNA 拷貝數間具有正相關(Mukhopadhyay *et al.*, 2008)。在特定寄主中增加轉譯效率的方法是利用最佳化密碼偏好，藉由改變核苷酸序列但不改變胺基酸序列以適應個別的寄主。利用這個策略，CP4-EPSPS 為源自農桿菌(*Agrobacterium*)菌系 CP4 且已應用在商業作物的抗除草劑嘉磷塞(glyphosate)基因 CP4-EPSPS，水稻轉殖經密碼偏好最佳化的 *mCP4-EPSPS* 基因，基因修改考量水稻的 GC 含量約~55%，但高 A/U 比會造成低 mRNA 穩定性和低蛋白表現量(De Rocher *et al.*, 1998)，而自然 CP4-EPSPS 的 GC 含量 67%且偏好高 GC3 (84%)，且其密碼子適應指數(codon adaptive index, CAI)為 0.847，故將 G/C 比折衷修改為 52%，但不使用稀有密碼，CAI 為 0.751，經轉殖密碼最佳化 *mCP4-EPSPS* 的水稻可以耐受 1%的商用除草劑嘉磷塞(Roundup) (Chhapekar *et al.*, 2014)。

三、穩定重組蛋白在植物累積

植物細胞大部分的蛋白合成在細胞質，分泌蛋白會藉由其 N 端訊息胜肽或穿膜結構區運送至內質網、高爾基氏體、葉綠體等胞器或分泌至胞外，並經由形成雙硫鍵、糖基化等轉譯後(post-translational)修飾形成成熟蛋白。異源蛋白在轉殖植物體中不正確的折疊或缺少適當的雙硫鍵增加被蛋白酶分解的可能性(Smith *et al.*, 2002)。改善重組蛋白在植物中高量累積是影響利用此優良表現系統的關鍵步驟，為獲得高重組蛋白產量，導入外源基因的轉殖植物所生產的重組蛋白可經由導向運送(targeting)輸送至次細胞間隔(compartment)穩定累積，或融合另一穩定蛋白增加重組蛋白的穩定性。

(一)、重組蛋白之次細胞(subcellular)導向運輸

細胞核編碼的重組蛋白可經由訊息序列(signal sequence)導向運送(targeting)至特定次細胞位置，缺少訊息序列的重組蛋白則累積在細胞質。基因轉殖植物所合成的重組蛋白可利用訊息序列將其運送至內質網、蛋白儲藏液胞。重組蛋白依據其所到達之次細胞間隔進行轉譯後修飾、折疊和累積。因此，導向運送須考量目標蛋白特性採用適合訊息序列，使目標蛋白分選(sorting)至適當的次細胞間隔，進而穩定累積以獲得較高重組蛋白產量。

1. 導向運送重組蛋白至內質網

重組蛋白分泌到質外體或細胞外空間的蛋白傾向發生蛋白水解，利用內質網駐留信號(ER retrieval signal)將其留在內質網進行蛋白合成較在細胞質合成可以減少重組蛋白受到水解。植物細胞內質網內的蛋白酶含量非常少，可以提供一個相當具保護的環境，並使蛋白的水解降至最低。其原因為在內質網內具有分子伴護蛋白(molecular chaperones)，可以協助新生蛋白正確的折疊和組裝。某些內質網停留蛋白具駐留信號序列，包括位於 C 端的四胜肽 KDEL 和 HDEL 可被高基氏體上的受體辨識並與其結合，再由高基氏體將蛋白定位至內質網，利用 KDEL 導向運送重組蛋白至內質網停留較經由分泌途徑(secretory pathway)所獲得的表現量增加 10-100 倍(Yasuda *et al.*, 2006)。

2. 導向運送重組蛋白至液胞

植物蛋白質貯存液胞(protein storage vacuoles, PSVs)為源自內質網的胞囊(cisterns)，可以穩定累積和貯藏蛋白(Zheng *et al.*, 1992)，因為此類胞器不會和裂解型液胞(lytic vacuoles)進行膜融合，故缺少氨基胜肽酶(amino peptidases)，可以避免重組蛋白被分解。Cunha *et al.* (2010) 報導利用蕙苡醇溶蛋白(α -coixin)的子葉液胞訊息胜肽，將人類胰島素原(proinsulin)基因轉殖到大豆種子，此重組蛋白高度穩定的累積在種子子葉之液胞，種子經 7 年室溫貯藏仍可偵測到人類胰島素原。

(二)、融合蛋白 (fusion protein)

蛋白融合可以增加目標蛋白結構穩定性、避免蛋白水解和提高蛋白表現量(Streatfield, 2007)，並有助於目標蛋白的分離和純化。已有報導，於 β -葡萄糖醛酸苷酶(β -Glucuronidase, GUS)的 C 端以融合蛋白策略接上植物的泛素蛋白(Ubiquitin, Ub)之轉殖馬鈴薯，增加 10

倍重組蛋白 GUS 表現量(Garbarino *et al.*, 1995)。轉殖 γ -麥膠蛋白(γ -gliadin)之菸草，經融合 δ -玉米蛋白(δ -zein)之 γ -gliadin- δ -zein 融合蛋白可以形成蛋白質體並提高蛋白累積量達 1.5%總可溶性蛋白含量，而接有綠色螢光蛋白(GFP)之 γ -gliadin-GFP 融合蛋白雖無法形成蛋白質體，但可以提高蛋白累積量達 7%總可溶性蛋白含量(Sun *et al.*, 2015)。重組蛋白在不具貯藏功能的組織例如葉片，經由蛋白融合可以形成由內質網衍生的蛋白質體，可供應用的融合蛋白包括類彈性蛋白(elastin-like polypeptides, ELP)和真菌疏水蛋白(hydrophobin, HFBI)。ELPs 係多重複的五肽序列(Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, VPGXG)，利用蛋白融合技術轉殖流感病毒紅血球凝集素(Hemagglutinin)，轉殖 hemagglutinin-ELP 的菸草葉片或種子可以增加重組蛋白累積，但 hemagglutinin- HFBI 並未明顯增加表現量(Phan *et al.*, 2014)。因此，融合蛋白技術可提供改善轉殖植物增加重組蛋白累積量。

結 論

全球基因轉殖作物的栽培面積持續以每年 3-4%的速率成長，2014 年為 1 億 8 千萬公頃，在 28 個國家有 1 千 8 百萬農民從事基因轉殖作物的生產(James, 2014)。植物具有生產重組蛋白的優勢，包括快速生產及規模化、低生產成本、正確蛋白折疊和組裝和食用安全性。為了增加重組蛋白的商業利用，應用 基因轉殖 植物作為分子農場逐漸成為生產重組蛋白上具發展潛力的選擇。植物表現系統可以取代動物細胞培養和微生物系統以進行大規模的重組蛋白生產。然而，選擇植物成為重組蛋白表現系統，必須加強外源基因在植物表現和穩定重組蛋白在植物累積，以提高重組蛋白在植物中的生產量和累積量。因此，建立基因轉殖植物成為異源蛋白生產平台，須針對植物重組蛋白生產過程的限制步驟運用相關技術克服，包括：載體選擇、轉殖系統建立、轉殖基因的整併、轉錄作用之啓動子及順式調控序列和內含子的作用、5'非轉錄前導序列和起始密碼區序列在轉譯起始效率所肩負的功能、密碼最佳化、導向運送重組蛋白加強蛋白穩定性及降低蛋白水解和重組蛋白的正確醮基化。此外，轉殖基因作物自釋出至農業規模栽培過程中仍有生物安全性及對環境的衝擊等問題須進行風險評估與管理，利用植物生產重組蛋白的表現系統，必須加強重組蛋白產量並解決生物安全性問題，方能成為可被接受的商業生產平台。

参 考 文 献

- Bourdon, V., A. Harvey, and D. M. Lonsdale. 2001. Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. *EMBO Rep.* 2: 394–8.
- Chen M., M. Liu, Z. Wang, J. Song, Q. Qi, and P. G. Wang. 2005. Modification of plant N-glycans processing: the future of producing therapeutic proteins in transgenic plants. *Med. Res. Reviews* 25: 343–60.
- Chhapekar, S., S. Raghavendrarao, G. Pavan, C. Ramakrishna, V. K. Singh, M. L. Phanindra, G. Dhandapani, R. Sreevathsa, and P. Ananda Kumar. 2014. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate. *Plant Cell Rep.* 34(5): 721-731.
- Corrado, G., P. D. Bovi, R. Ciliento, L. Gaudio, A. Di Maro, et al. 2005. Inducible expression of a *Phytolacca heterotepala* ribosome-inactivating protein leads to enhanced resistance against major fungal pathogens in tobacco. *Phytopathology* 95(2): 206–15.
- Cunha, N. B., A. C. Araújo, A. Leite, A. M. Murad, G. R. Vianna, and E. L. Rech. 2010. Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds. *Genet. Mol. Res.* 9(2): 1163-1170.
- Curi, G., R. L. Chan, and D. H. Gonzales. 2005. The leader intron of *Arabidopsis thaliana* genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5c promotes high level expression by increasing transcript abundance and translation efficiency. *J. Exp. Bot.* 56: 2563–2571.
- D'Aoust, M. A., P. O. Lavoie, J. Belles-Isles, N. Bechtold, M. Martel, and L. P. Vézina. 2009. Transient expression of antibodies in plants using syringe agroinfiltration. *Meth. Mol. Biol.* 483: 41–50.
- De Rocher, E. J., Vargo-Gogola T. C., S. H. Diehn, and P. J. Green. 1998. Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiol* 117: 1445–1461.
- Garbarino, J. E., T. Oosumi, and W. R. Belknap. 1995. Isolation of a polyubiquitin promoter and its expression in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* 109: 1371–8.
- Giani, S., A. Altana, P. Campanoni, L. Morello, and D. Breviario. 2009. In transgenic rice, alpha- and beta-tubulin regulatory sequences control GUS expression amount and distribution through intron mediated enhancement and intron dependent spatial expression. *Transgenic Res.* 18: 151–162.
- Hellens R., P. A. Mullineaux, and H. Klee. 2000. Guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors: technical focus. *Trends Plant Sci.* 5(10): 446–51.
- James, C. 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Briefs No.

49. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jeong, Y. M., J. H. Mun, H. Kim, S. Y. Lee, and S. G. Kim. 2007. An upstream region in the first intron of petunia actin depolymerizing factor 1 affects tissue-specific expression in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 50: 230–239.
- Jo, S. H., S. Y. Kwon, D. S. Park, K. S. Yang, J. W. Kim, K. T. Lee, S. S. Kwak, and H. S. Lee. 2006. High-yield production of functional human lactoferrin in transgenic cell cultures of Siberian ginseng (*Acanthopanax senticosus*). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 11: 442–448.
- Joshi, C. P. 1987. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acid Res.* 15(16): 6643–6653.
- Kawaguchi, R. and J. Bailey-Serres. 2002. Regulation of translation initiation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 460–465.
- Kay, R., A. Chan, M. Daly, and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299–1302.
- Komari, T. 1990. Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Rep.* 9(6): 303–306.
- Komori T., T. Imayama, N. Kato, Y. Ishida, J. Ueki, and T. Komari. 2007. Current status of binary vectors and super binary vectors. *Plant Physiol.* 145: 1155–1160.
- Kozak, M. 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299: 1–34.
- Leelavathi, S. and V. S. Reddy. 2003. Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Mol. Breeding.* 11: 49–58.
- Lessard, P. A., H. Kulaveerasingam, G. M. York, A. Strong, and A. J. Sinskey. 2002. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab. Eng.* 4(1): 67–79.
- Lutcke, H. A., K. C. Chow, F. S. Mickel, K. A. Moss, H. F. Kern, and G. A. Scheele. 1987. Selection of AUG initiation codon differs in plants and animals. *EMBO J.* 6(1): 43–48.
- McCormick, A. A., S. Reddy, S. J. Reinl, T. I. Cameron, D. K. Czerwinski, F. Vojdani, K. M. Hanley, S. J. Garger, E. L. White, J. Novak, J. Barrett, R. B. Holtz, D. Tuse, and R. Levy. 2008. Plant-produced idiotype vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(29): 10131–10136.
- McDonald, K. A., L. M. Hong, D. M. Trombly, Q. Xie, and A. P. Jackman. 2005. Production of human alpha-1-antitrypsin from transgenic rice cell culture in a membrane bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 21: 728–734.

- Merhige, P. M., D. Both-Kim, M. D. Robida, and M. J. Hollingsworth. 2005. RNA protein complexes that form in the spinach chloroplast atpI 5' untranslated region can be divided into two subcomplexes, each comprised of unique cis-elements and trans-factors. *Curr. Genet.* 48: 256–264.
- Mukhopadhyay, P., S. Basak, and T. C. Ghosh. 2008. Differential selective constraints shaping codon usage pattern of housekeeping and tissue-specific homologous genes of rice and arabidopsis. *DNA Res.* 15: 347–356.
- Muto, A. and S. Osawa. 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *PNAS* 84:166–69.
- Okuzaki, A., K. Konagaya, Y. Nanasato, M. Tsuda, and Y. Tabei. 2011. Estrogen-inducible GFP expression patterns in rice (*Oryza sativa L.*). *Plant Cell Rep.* 30:529-538.
- Phan, H. T., B. Hause, G. Hause, E. Arcalis, E. Stoger, et al. 2014. Influence of elastin-like polypeptide and hydrophobin on recombinant hemagglutinin accumulations in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE* 9(6): e99347. doi:10.1371/journal.pone.0099347.
- Pogue, G. P., F. Vojdani, K. E. Palmer, E. Hiatt, S. Hume, J. Phelps, L. Long, N. Bohorova, D. Kim, M. Pauly, J. Velasco, K. Whaley, L. Zeitlin, S. J. Garger, E. White, Y. Bai, H. Haydon, and B. Bratcher. 2010. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnol. J.* 8: 638–654.
- Reddy, A. S. N. 2001. Nuclear pre-mRNA splicing in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20: 523–571.
- Rybicki E. P. 2010. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol. J.* 8: 620–637.
- Samadder, P., E. Sivamani, J. Lu, X. Li, and R. Qu. 2008. Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5' UTR intron of rice *rubi3* gene in transgenic rice cells. *Mol. Genet. Genomics.* 279: 429–439.
- Seon, J. H., S. J. Szarka, and M. M. Moloney. 2002. A unique strategy for recovering recombinant proteins from molecular farming: affinity capture on engineered oilbodies. *Plant Biotechnol. J.* 4:95-101.
- Sethuraman, N. and T. A. Stadheim. 2006. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17(4): 341–346.
- Shadwick, F. S. and P. M. Doran. 2005. Foreign protein expression using plant cell suspension and hairy root cultures. In: *Molecular Farming: Plant-Made Pharmaceuticals and Technical Proteins*. Fischer, R., S. Schillberg (eds.). John Wiley & Sons Inc., New York. Pp. 13-26.
- Smith, M. L., M. E. Keegan, H. S. Mason, and M. L. Shuler. 2002. Factors important in the extraction, stability and *in vitro* assembly of the hepatitis B surface antigen derived from

- recombinant plant systems. *Biotechnol. Prog.* 18: 538–550.
- Stoger, E., C. Vaquero, E. Torres, M. Sack, L. Nicholson, J. Drossard, S. Williams, D. Keen, Y. Perrin, P. Christou, R. Fischer. 2000. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol. Biol.* 42: 583–590.
- Sugio, T., H. Matsuura, T. Matsui, M. Matsunaga, T. Noshō, S. Kanaya, A. Shinmyo, and K. Kato. 2010. Effect of the sequence context of the AUG initiation codon on the rate of translation in dicotyledonous and monocotyledonous plant cells. *J. Biosci. Bioeng.* 109: 170–173.
- Sun, X., C. L. Chi-Ham, T. Cohen-Davidyan, C. DeBen, G. Getachow, E. DePeters, D. Putnam, and A. Bennett. 2015. Protein accumulation and rumen stability of wheat γ -gliadin fusion proteins in tobacco and alfalfa. *Plant Biotechnol. J.* 13(7): 974–982.
- Tran, L.-S. P., K. Nakashima, Y. Sakuma, Y. Osakabe, F. Qin, S. D. Simpson, K. Maruyama, Y. Fujita, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERDI* gene in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 49:46–63.
- Twyman, R. M., S. Schillberg, and R. Fischer. 2005. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert. Opin. Emerg. Drugs* 10(1): 185–218.
- Twyman, R. M., E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou, and R. Fischer. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 21(12): 570–578.
- Tzfira, T., and V. Citovsky. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 147–54.
- Veluthambi, K., A. K. Gupta, and A. Sharma. 2003. The current status of plant transformation technologies. *Curr. Sci.* 84(3): 368–80.
- Vitale, A., R. J. Wu, Z. Cheng, and R. B. Meagher. 2003. Multiple conserved 5' elements are required for high-level pollen expression of the *Arabidopsis* reproductive actin ACT1. *Plant Mol. Bio.* 52: 1135–1151.
- Yang, D., L. Wu, Y.-S. Hwang, L. Chen, and N. Huang. 2001. Expression of the REB transcriptional activator in rice grains improves the yield of recombinant proteins whose genes are controlled by a Reb-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:11438–11443.
- Yasuda, H., Y. Hayashi, T. Jomori, and F. Takaiwa. 2006. The correlation between expression and localization of a foreign gene product in rice endosperm. *Plant Cell Physiol.* 47:756–63.
- Zhang, L. H., L. X. Weng, and Z. D. Jiang. 2007. *Sugarcane*. Springer, Berlin.

Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants

Ke-Heng Chi ¹⁾

Key Word: Transgenic plant, Recombinant protein

Summary

Plant nucleus and chloroplast genomes can produce recombinant proteins *via* *Agrobacterium* transformation or transplastomic methods. Heterologous gene expression vectors must be chosen to ensure for suitable broad-host-range origin of replication (*ori*), including the Gram-negative bacteria *E. coli* and *Agrobacterium*. Promoter is a key element for regulating strength of gene expression and timing of transcription. Using constitutive promoter, inducible promoter or tissue-specific promoter can regulate recombinant protein expression in specific organs or plant growth stages. When used with suitable cis-element, trans-acting factors or Intron-mediated enhancement (IME), the levels of heterologous gene expression can be enhanced. Translational efficiency can be promoted by specific 5' untranslated leader sequence and the sequences of start codon region. Modifications of GC contents and codon usage bias may also increase the levels of recombinant protein expression in transgenic plants. Proteolysis of recombinant protein can be reduced *via* targeting the recombinant protein to the endoplasmic reticulum or protein body. Design of the fusion protein may also increase protein stability and to improve the accumulation of recombinant proteins.

The use of transgenic plants as a recombinant protein expression system is currently still limited to the low level of heterologous gene expression, this article focus on limiting steps in transgenic plant expression system, strategies for improving the expression of heterologous genes, and methods for stabilizing the recombinant protein in transgenic plants.

1) Student in Ph.D. Program, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.
Corresponding author.