

病毒與蝦及其他動物宿主間交互作用之功能基因體學研究

文・圖／羅竹芳（生命科學院院長）

生命科學院同仁長期致力於模式生物（例如線蟲、果蠅、斑馬魚）以及經濟生物（蝦及養殖魚）的功能基因體學研究，各實驗室在不同領域都有很好的研究表現，顯見臺灣大學生命科學院在研究資源、專業知識以及研究人員素質等方面均具有優勢，進一步以合作的方式，整合功能基因體學的相關研究，希望藉此提升臺大生命科學院整體研究層級，並將目標延伸到更特定、且具有高度競爭力主題上。

本計畫以“病毒與動物宿主間交互作用之功能基因體學研究”為研究目標，並強調基礎科學研究與生技產業應用並重。在本計畫中，因新科技研究平台的應用，使得研究成果極具原創性，不只對演化、細胞週期以及細胞的逆境反應等領域具有重要的意義，而且也對醫學、獸醫學等領域有實質貢獻。

由於臺大在過去10年的經驗累積，已建立了堅強的技術平台，並對蝦類病毒性疾病有極深入的了解；透過整合不同領域的6位菁英，正好可將已建構完成的技術和知識，進一步發揮研究能量。

蝦類傳染性的疾病包括病毒、細菌、立克次氏體及寄生蟲之感染症，其中以病毒感染對養蝦產業的危害最大，特別是病毒性白點症。罹患病毒性白點症的蝦體之外骨骼（蝦殼）上經常會出現白點或白斑，

其中又以頭胸部最為明顯，發病期為2~10天，死亡率可高達100%，傳播迅速，是一種相當可怕的病毒性傳染疾病。目前尚無任何報導指出有任何一種蝦類對此症具有抵抗力。因此本計畫選擇以蝦類白點症病毒（簡稱WSSV）為主要研究標的。本病毒是相當特殊的大型雙股DNA（~300kbp）病毒，其感染宿主的策略與其他已知病毒的模式極為不同，是以極具新穎性及挑戰性。

本計畫的重要結果有：（1）透過對病毒本身蛋白質間、宿主蛋白質和病毒蛋白質間的交互作用的進一步瞭解，已發現多項新穎的對抗策略，並對無脊椎動物先天性免疫反應機制提供重要資訊；（2）建立草蝦的遺傳圖譜，連結草蝦44個染色體上的基因，不只可做為研究草蝦基因選殖的資訊和工具，更可藉此釐清白點病毒的致病分子遺傳機制，篩選抗病毒、生長快速的草蝦品系等；（3）選殖出具有促進血細胞生成的細胞激素，有助於進一步探討此細胞激素所參與的調控訊息路徑。

子計畫1：蝦白點病毒擊潰、克服或適應寄主防禦反應機制之功能基因體學研究

主持人：動物學研究所羅竹芳教授

誰才是贏家？病毒與宿主間的戰爭與妥協。病毒有

2個十分重要的策略性目標：其一是完成病毒複製並成功感染，另一方面則是同時對抗宿主的抗病毒防禦反應。爲了活下去，病毒與宿主在攻防戰中產生了共演化機制。由於每一種病毒發展出的對抗宿主的策略，都非常有「原創性」「及「獨特性」，因此現今科學界仍無法全盤瞭解病毒對抗宿主的機制，同樣地對宿主對抗外來入侵者的策略也所知有限。由於病毒必須在活細胞中才能複製增殖，因此病毒與宿主間的關係微妙，他們之間的戰爭與妥協是非常有趣的生物議題。本研究室近10年致力於研究蝦白點症病毒——一種嚴重衝擊世界蝦類養殖產業的大型DNA病毒。其致病力極高，具有廣寄主域並會侵襲多種組織，在逆境時會被誘發而快速增殖。白點症病毒能於蝦體內快速增殖的特性也暗示著其必有可成功擊潰、克服或適應寄主的抗病毒機制的因應策略，因此個人最近研究重點即是利用基因體學及蛋白質體學的研究方法，對白點症病毒及其與寄主之間的交互作用，進行分子層次的總體特性分析，以探究趨同及趨異演化，使白點症病毒能成功擊潰其宿主的分子機制。

白點症病毒爲一具有高侵襲性之蝦類致病原，其所造成的蝦類白點症嚴重衝擊了包含我國在內許多國家的蝦類養殖產業。白點症病毒爲Nimaviridea病毒科、Whispovirus屬之模式種病毒，爲一大型DNA病毒，其

病毒顆粒由核蛋白鞘(nucleocapsid)、膜外衣(tegument)及套膜(envelop)所組成。此病毒非常獨特，其感染策略與其他已知病毒不同，儘管如此，白點症病毒仍需在功能上滿足與其他病毒成功感染所需的條件，因此我們深入探究病毒與宿主間的交互作用的趨同及趨異演化。目前白點症病毒基因體已完成定序及解碼，此外，藉由3個最大的蝦類EST研究計畫，共計約有4萬多筆蝦類基因序列被發表（由多至少，分別爲本研究室發表之15,981筆，國外發表之13,656筆及10,100筆），這些成果，使得我們得以利用基因體學及蛋白質體學的研究方法對此病毒及其與寄主之間的交互作用，進行分子層次的總體特性分析，這些分析方法的可行性已被成功驗證並藉此發現許多重要的白點症病毒基因，例如病毒極早期基因、病毒構造成性蛋白及許多具有重要功能的非構造成性蛋白。本研究室發現白點症病毒感染會調控許多宿主基因的表現，宿主基因表現的改變，不只反映出蝦類宿主對抗病毒感染的反應，也暗示著白點症病毒擊潰寄主細胞正常功能以利于其增殖的可能機制。已知受病毒感染細胞常藉由細胞凋亡反應以限制病毒增殖，雖然蝦類誘發細胞凋亡作用的因子並不清楚，但我們發現受白點症病毒感染的細胞其細胞凋亡作用會被抑制。白點症病毒WSSV449的基因產物可直接抑制蝦類的一種促使細胞凋亡的創蛋白酶

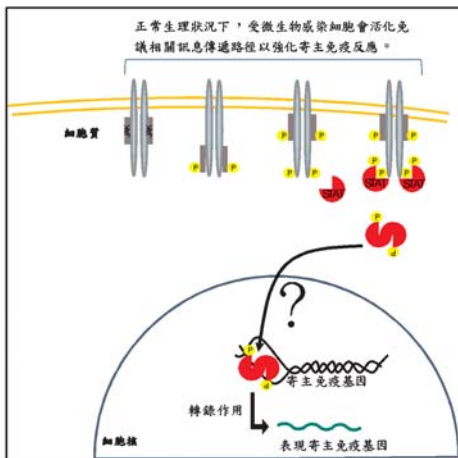


圖 1a

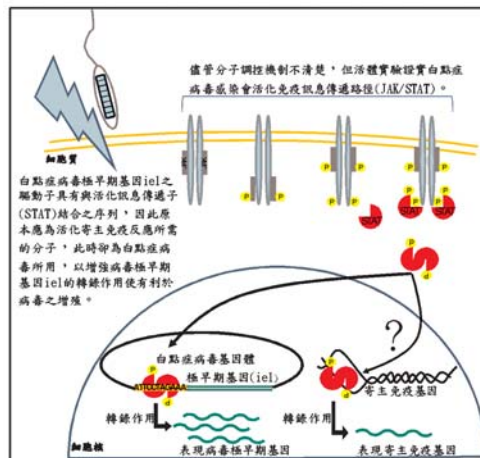


圖 1b

圖 1：白點症病毒利用活化的STAT以增進其極早期基因的表現之示意圖。圖 1a 為病毒感染前，圖 1b 為病毒感染後。



(Caspase)的活性，以達到阻斷細胞凋亡反應的進行。此外，已知許多訊息傳遞路徑在宿主免疫反應中扮演重要的角色，其中JAK/STAT 訊息傳遞路徑常被活化以誘發寄主的抗病毒反應，但白點症病毒卻會利用活化的JAK/STAT 訊息傳遞路徑以增進其極早期基因的表現，造成病毒的快速增殖。亦即在病毒與宿主間的戰爭中，蝦白點病毒用對方的武器強化自己。

子計畫 2：研究蝦白點毒蛋白質體交互作用網絡及其影響蝦類受感染過程之機制

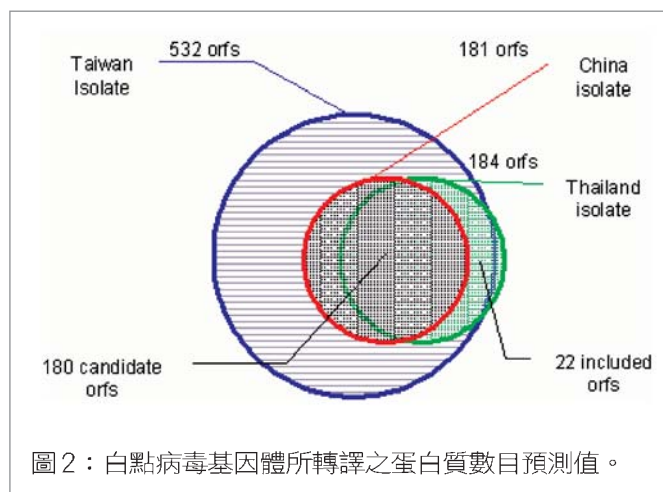
主持人：生命科學系黃偉邦副教授

隨著科技進步，以前要耗費數個月的時間才能完成的去氧核糖核酸序列分析工作，現在已經可以在 1 天之內完成，因此許多生物物種的基因體組成序列在最近幾年陸續被解析公布，面對如此眾多的基因體資訊，科學家常無從著手進一步探索基因與生理功能之間的相關性，為了因應這些因局並對眾多基因體計畫的成果發揮最有效的運用，許多新興的實驗技術因應而生，其中以整個基因體層次進行大規模的蛋白質交互作用分析即為一例，這種新興的實驗技術及研究成果，構成了蛋白質交互作用體研究領域。

蛋白質交互作用體技術廣泛的運用在許多生物學研究課題上，從基礎生命現象的探討到病原菌與宿主間的交互作用都有研究實例。本項子計畫一研究蝦白點

病毒蛋白質體交互作用網絡及其影響蝦類受感染過程之機制，目標在利用蝦白點病毒已完成解析的基因體資訊，進行酵母菌雙雜交實驗，以期建立由白點病毒基因體所轉譯表現的蛋白質間之相互作用關係圖譜，經由分析這些蛋白質間的交互作用，可獲致有用的資訊，以利瞭解白點病毒感染宿主的機制，協助今後發展有效對抗白點病毒感染之方法及建立後續治療步驟。

白點病毒基因體所轉譯的蛋白質數目，經由臺灣、中國與泰國的學者依據不同的分析條件，分別預測出不同的結果，其中又以本項群體計畫主持人—羅竹芳教授所領導的實驗室所分析的結果最為完整，涵蓋了其他國家學者所預測的大多數蛋白質（圖 2）。本子計畫選擇這些預測結果的最大公約數，針對 202 個預測的白點病毒蛋白質進行酵母菌雙雜交實驗，目前已完成質體的建構及其基本特性之分析，在篩選去除具有自發性誘導報導基因表現的病毒蛋白質後，其餘通過初步測試的病毒蛋白質正在進行一對一的交互實驗分析，在實驗完成後根據結果，將建構白點病毒蛋白質的交互作用圖譜，其資訊可提供進一步實驗題材，以瞭解白點病毒感染宿主的作用機制。由於此計畫係針對白點病毒基因體進行分析，因此將突破過去一次僅對一個或少數蛋白質研究的方法，其結果將有助全面瞭解白點病毒的特性。



子計畫 3：白點病毒蛋白蝦類宿主反應及其調節機制之研究

主持人：動物學研究所李士傑助理教授

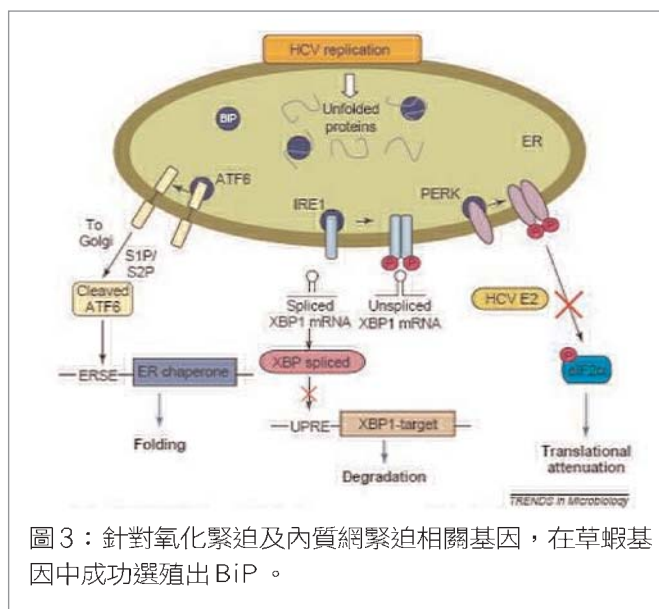
蝦白點病毒(WSSV)為臺灣極為嚴重的蝦類疾病，造成蝦類養殖業者相當大之損失。為解決此一問題，對WSSV 本身及其與宿主間之相互反應之瞭解為設計可能防疫機制的基石。經過多年的努力，目前世界上已有 3 株獨立分離之 WSSV 植株且其基因體亦被完全定序，其中臺灣分離之 WSSV 基因體含 307kb 及超過 500 個開放解讀框(open reading frame)。WSSV 基因體包含

有結構及非結構性蛋白區，其中包括39個以上之結構蛋白及一些非結構性蛋白已被找出並定性，但其功能卻未知。然而過去的努力僅專注於 WSSV 之診斷及預防，而在蝦白點病毒所引發之宿主反應，我們卻所知不多！因此本計畫之主要目標將專注於研究蝦白點病毒所引發之宿主反應及其調節機制。為完成此一目標，我們首先針對氧化緊迫及內質網緊迫相關基因（如圖 3）在草蝦基因中選殖，已成功地在草蝦中選殖出了 BiP 基因。BiP 是一熱休克蛋白，其在內質網緊迫反應中居於樞紐地位，調控內質網緊迫中各個基因的反應機制，我們將持續探討在草蝦基因中與 BiP 有交互作用之基因，以建立草蝦內質網緊迫反應機制圖，並瞭解 WSSV 在感染過程中對此等基因之影響，以為設計預防及治療 WSSV 感染方法之參考。

子計畫 4：利用功能蛋白質體學和線蟲研究宿主和病毒中 DNA 濃縮和包裹所需的分子

主持人：分子與細胞學研究所吳益群教授

遺傳物質位於染色體上，當細胞分裂時，染色體會先行複製再進行分離，新生的 2 個子細胞各有一套與母細胞同樣的染色體。染色體的分離必須受到嚴密的監控，一旦染色體的分離發生異常，如分離不均勻或甚至斷裂，就會造成細胞和生物體的死亡，或細胞轉型和腫瘤的產生。TLK-1 是一種在演化中相當重要且



穩定保存的蛋白質，在線蟲、果蠅與哺乳類都有類似的蛋白，目前的研究只知道 TLK-1 與維持細胞分裂有很大的關係，但真正的控制機制仍是未知。在我們的研究中發現，在染色體分離過程中，TLK-1 會影響中節蛋白 (centromere protein) 在染色體兩極面的分布位置（圖 4），進而使染色體正確的分離，且與最重要的中節蛋白 HCP-3 有直接的交互作用，並將其磷酸化，由此可知 TLK-1 可能是 HCP-3 的調控者，此外我們還發現 TLK-1 也會跟染色體濃縮蛋白 condensin 進行交互作用。因此我們推論，TLK-1 的功能與染色體結構的正確性有很大的關係，極有可能藉由控制 HCP-3 和

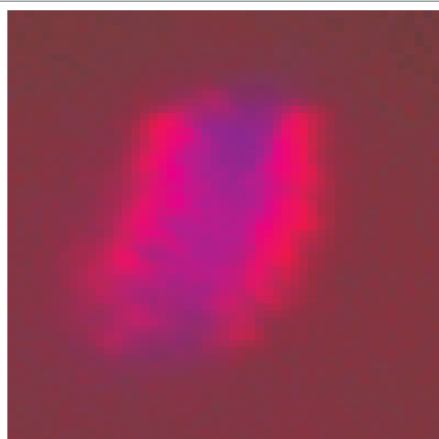


圖 4a

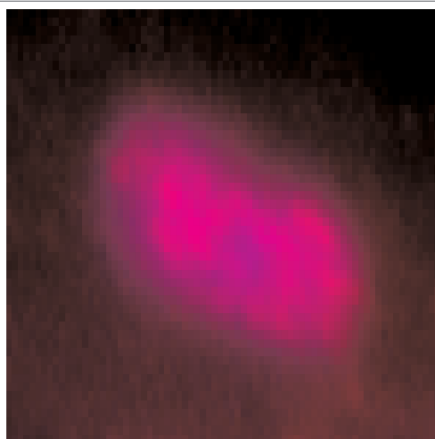


圖 4b

圖 4：TLK-1 會影響中節蛋白 HCP-3 在染色體兩極面的分布位置。圖中藍色部分為正在進行有絲分裂的染色體，紅色區域為 HCP-3 中節蛋白分布位置。正常的染色體具有方向性分布的 HCP-3，如圖 4a；TLK-1 異常的染色體 HCP-3 分布散亂，如圖 4b。



condensin，使複製染色體在細胞分裂時能與中心體 (centrosome) 形成正確的連結，進而確保染色體正確的分離。

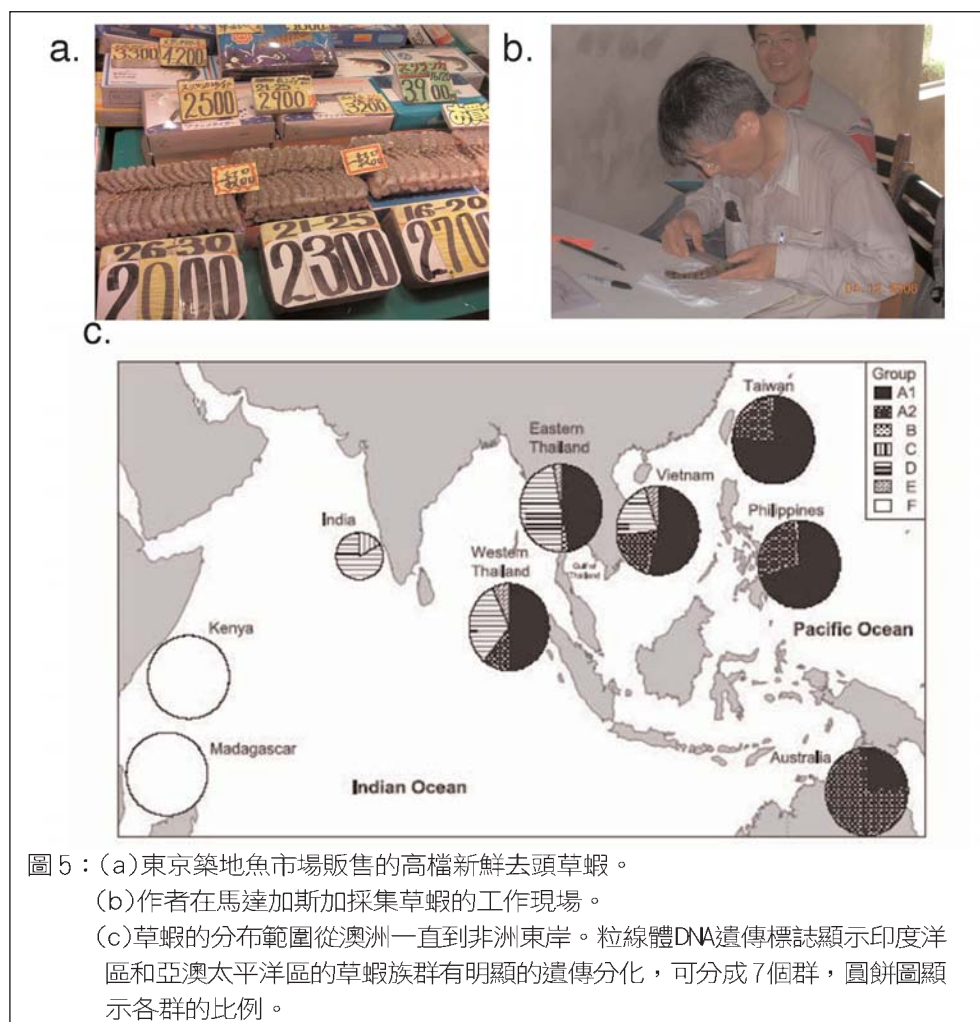
子計畫 5：利用草蝦 5x fosmid 基因庫篩選功能性基因以及宿主反應之基因路徑

主持人：動物學研究所于宏燦教授兼所長

月亮蝦餅是近來很流行的滇緬、泰國餐館招牌菜。蝦餅當然是用蝦肉炸的，但是為什麼和月亮聯想在一起，卻是件令人不解的事。不過從 5 年前開始，我看到蝦子就聯想到基因、基因體。對我而言，那是非常具體的聯結，絕對不像月亮和蝦餅這般無厘頭。臺灣曾經是養蝦王國，養的是高價位的草蝦，生產量在

1987 年達到高峰，年產量將近 10 萬噸。不過，今天你吃到的草蝦幾乎完全是進口貨，從越南、泰國來的。原因是養殖草蝦受到蝦白點病毒的攻擊引發疫病，凡受到感染的蝦池，短期之內就死的一乾二淨。所以國科會啟動一草蝦基因體研究，團隊包括生科院動物研究所的郭光雄、羅竹芳、丘臺生和于宏燦等 4 人。或許你覺得奇怪，病毒攻蝦，為什麼不直接研究病毒，反而研究蝦子。其實草蝦基因體計畫最關心的是病毒攻擊蝦子細胞的途徑和機制，又蝦子如何啟動關鍵基因去反應，包括免疫的基因等。研究草蝦基因體自然成為必然的事。臺大研發處也再給予生科院補助，擴大研究範圍和增加團隊成員，冀望生科院的草蝦基因體研究成為世界頂尖的旗艦計畫。

動物族群的特性是有基因多型性，就是基因在動物個體之間是有差異的，這些差異是經年累月在自然界的適應演化、適應不同環境的結果，而且和地理分布最有關係。因此研究野生草蝦基因體多型就是一個重要的步驟。我們採用了粒線體 DNA 和一種重複的 DNA 序列 (microsatellite) 作為遺傳標記，遍採全世界的野生草蝦來分析，從澳洲到東非的肯亞和馬達加斯加島。研究發現草蝦有明顯的地理遺傳結構，亞澳太平洋地區和印度洋地區的草蝦尤其在遺傳上有差異。我們研究所開發出來的 microsatellite，是一種特別有用的遺傳標記，可以用來建立草蝦的遺傳圖譜，連結草蝦 44 個染色體上的基



因。這個圖譜是研究草蝦基因不可缺少的資訊和工具。企望利用這些研究所得，理解白點病毒的致病分子遺傳機制，以及篩選抗病的草蝦、篩選生長快速的草蝦遺傳品系等。

草蝦是人類食物中動物蛋白的重要來源，是美味的食品，更是高價的商品。草蝦基因體研究是利用現代生物科技去保障人類未來食物生產的關鍵研究，隨著天然資源的枯竭，自然是日趨迫切和重要了。

子計畫 6：草蝦免疫基因及其功能之研究

主持人：動物學研究所宋延齡教授

細胞激素(cytokine)是一群溝通細胞與細胞間的物質，當細胞激素與標的細胞上的受器結合，可引發訊息傳遞路徑，表現標的細胞特定基因，藉以調控標的細胞活化、增生及分化的能力，亦可調節其他細胞激素的分泌，進而影響整體的細胞交互作用網路。

在造血過程中有許多細胞激素扮演著活化細胞產生傳遞訊息的角色，而這些訊息可促使幹細胞或前驅細胞進入特定的分化路線，最後分化成不同的免疫細胞。在蝦類中仍未發現任何具有類似細胞激素的分子，因此發現蝦子細胞激素將有助於瞭解蝦子細胞間的溝通及訊息傳遞機制，或蝦細胞培養。

本研究從草蝦血球cDNA library中選殖出一個分子，全長具有1,509 bp的核苷酸，包含143 bp的5'端非轉譯區和375 bp的載碼區，以及991 bp的3'端非轉譯區。載碼區含124個胺基酸，包括一段21個胺基酸組成的訊息勝肽；推測成熟的蛋白質分子量為11,294 Da，pI值為5.18，具有prokineticin domain和類上皮生長因子的次功能區塊(Epidermal Growth Factor-like subdomain)及5對雙硫鍵。

昆蟲細胞—桿狀病毒表現系統所合成的重組蛋白，以基質輔助雷射脫附游離質譜法(MALDI-MS/MS spectrometry)，分析重組蛋白的片段胺基酸序列組成分子量，再與資料庫中各種蛋白質分子量做比對，確認所得重組蛋白確實為選殖出的目標產物。另外，以電

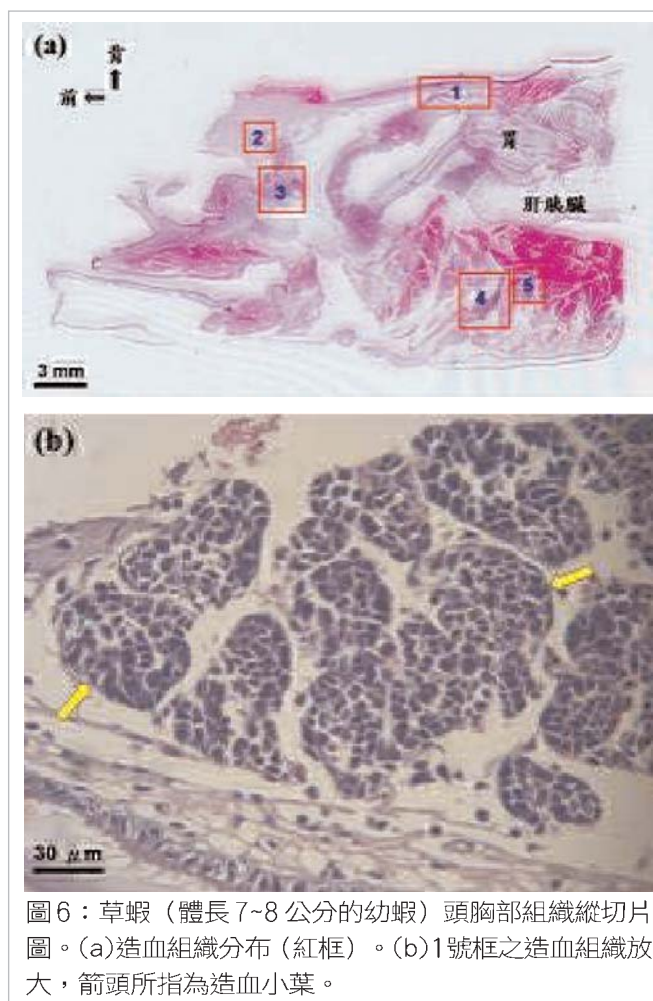


圖 6：草蝦（體長 7~8 公分的幼蝦）頭胸部組織縱切片圖。(a)造血組織分布（紅框）。(b)1 號框之造血組織放大，箭頭所指為造血小葉。

灑游離質譜法(ESI-MS)比較 C 端帶有 6 個組織胺酸標籤的重組蛋白之分子量，顯示此重組蛋白的確形成 5 對雙硫鍵。

根據反轉錄—聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)結果顯示，此蛋白分子在草蝦組織分布及表現量依序為腸、血球、神經、角質層下的上皮組織、肝胰臟、心臟、腮、眼柄、肌肉及淋巴器官。

運用貝氏估計法(Bayesian estimation)分析得知此蛋白分子與淡水螯蝦的甲殼激素(astakine)屬同一個群簇(cluster)，又與脊椎動物 Wnt 訊息路徑的 Dickkopf 具有親緣關係；因此推測我們選殖出的分子可能也具有促進造血及血管生合成的能力，或參與調控訊息路徑；目前將此分子暫取名為對蝦激素(penaeakine)。(本專欄策畫／研究發展處)