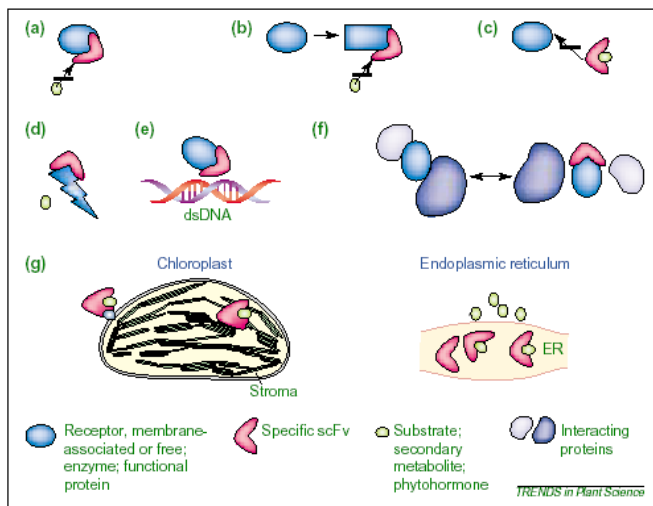


Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody

Introduction :

代謝工程(Metabolic engineering)的研究重點是在於: 1. 設法增加各種作物的特定產物的產量增加, 這些產物包括像是糖類、蛋白質或是油脂等。2. 改善作物對環境壓力的忍受度, 像是耐寒跟抗旱等。3. 提高作物對疾病的抵抗能力, 例如在玉米中植入一段 Bt 的基因來對抗鱗翅目的蟲害。為了達到作物的產量增加, 調整植物體內的代謝酵素的活性是必要的策略。在過去對於植物性狀的改變多是利用突變或是 homology-dependent gene silencing。前面一個方法是利用對於酵素的結構基因 (structural gene) 或是調控酵素的基因 (regulatory element) 做突變來達到性狀的改變。而後者的機轉則是植物原先利用來抵抗病毒或是跳躍基因 (transposable element), 其方式是利用一段序列相似的雙股 RNA, 其長度約莫 25 bp, 利用這 25 bp 長度的 RNA 專一地辨識細胞內同源的 RNA 後進行分解。但是這兩種方法都有其限制, 因此開始有人想到一種觀念來調控植物內代謝酵素的活性, 這觀念就是抗體跟抗原結合而衍生出的免疫調節 (immunomodulation)



免疫調節的原理很簡單，以抗體抗原的結合為出發，利用抗體跟抗原專一地結合後達到影響訊息傳遞跟細胞的活性或是中和病原的入侵。而這些調節以代謝的觀點看來目前主要是針對 down-regulation 的部份，也就是讓植物的代謝途徑能夠專注在我們希望得到的產物上，而不是對人類而言無價值的副產品。

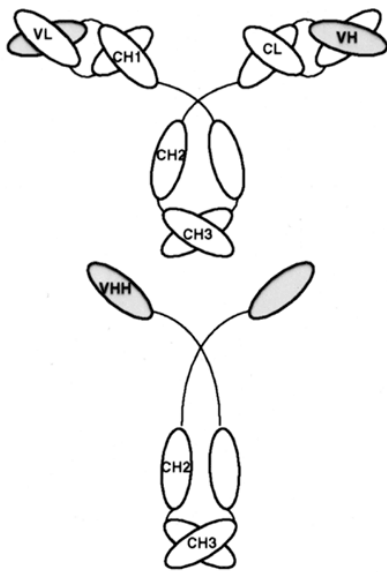
免疫調節其作用機轉可以是利用抗體阻斷酵素跟受質間的結合(a 跟 c)，以累積愈增加的受質；抗體的結合會影響酵素的蛋白質摺疊(b and d)；抗體跟 regulatory factor 的結合來阻斷與 DNA 的結合(e)；或是透過抗體與單體蛋白質的結合影響其形成 complex (f)；最後還有在植物細胞內生合成蛋白質時利用抗體與新生成的 polypeptide 結合來影響其 sorting 或是後轉錄修飾作用等(g)。

總地來說，以抗體做為免疫調節酵素活性需要注意兩個重要的地方，分別是抗體在細胞內的穩定程度以及跟抗體是否能專一地與欲發生結合的抗原做結合。

Results :

有了免疫調節的觀念後就需要找到要調節的標的，在作者的研究中要 down-regulation 標的是馬鈴薯內的 starch-branching enzyme A and B (SBE A and B)，因為 SBE 的作用是把澱粉轉化具有支鏈的 amylopectin 儲存，而不是我們想要的直鏈澱粉。因此作者想要透過對 SBE 做 down-regulation 來達到更多的直鏈澱粉累積。但是問題是如何能確保抗體可以在細胞專一地辨識 SBE 跟抗體如何能在穿透細胞而進到 cytosol 或是 plastid 而進行上述的免疫調節機轉。此外抗體在細胞內一旦遇到還原的環境(reducing environment)時，heavy chain 與 light chain 的雙硫鍵恐怕會被還原而無法維持 Y 字型的結構。因此在作者的研究裡頭採用的抗體結構是源自於駱駝體內的抗體。在 Hamers-Casterman 等人發表在 1993 的 Nature 上的研究報告指出，他們在駱駝的體內找到不需 light chain 的抗體。一般來說抗體的結構是由兩個 heavy chain 跟兩個 light chain 透過雙硫鍵鍵結後形成完整的 Y 字型抗體結構。但是這種完整的抗體結構要拿來運用時有幾個困難點：首先，抗體結構太大，兩個 heavy chain 跟兩個 light chain 加起來的分子量大約是 160 KDa，這樣的大小幾乎無法讓抗體進到細胞內，相反地從駱駝來的抗體結構因為缺少 light chain 跟 CH1 等結構，取而代

之的是 proline-rich 的 linker，因此分子量大為減少到只剩 10~15 KDa。第二，也就是剛剛提及的一旦在細胞內是還原的環境下，就算完整的抗體可以進到細胞內，但是雙硫鍵的還原會讓抗體無法進行抗原的結合工作，一旦無法結合也就無法影響細胞的生理活性；而從駱駝來的抗體分子因為不需要與 light chain 結合，所以也就不需要雙硫鍵來維持結構，所以不會產生雙硫鍵還原的問題。因此，本篇的作者引用先前的研究，利用從駱駝來的抗體結構避開分子量過大與雙硫鍵還原的難題來設計表現載體送入植物細胞內，並且影響植物細胞的活性。



作者收先得確定以駱駝抗體為分子設計藍本的 VHH 抗體確實可以專一地辨識 SBE，於是作者利用 phage display 做抗體表現，並且篩選到對 SBE 具專一性的抗體，因為有專一地結合到 SBE 的 active site 才能阻斷 SBE 的酵素作用。此外作者也針對一旦 SBE 跟抗體結合後活性的影響做試驗，結果證明 SBE 跟抗體結合後其活性明顯受到影響。接下來作者必須確定抗體是否會可以在細胞裡頭表現來執行其與 SBE 結合的任務，於是作者設計表現載體並且 transform 到植物細胞，並且從葉子萃取的樣品在 Western blotting 分析下的確看見抗體的訊號，因此抗體的確是可以植物的細胞裡頭表現。但是除了進到細胞裡頭更重要的是抗體與 SBE 結合後是否會改變澱粉的含量，結果發現一旦抗體在細胞內表現後，並且能跟 SBE 專一地結合可以提高直

鏈澱粉的含量達 20~74%

Discussion :

對於基因改造作物(Genetic modified organism)在基因 down-regulation 在過去有人提到上述兩種方法，也就是突變跟 gene silencing。但是以突變的方法來說，除非該基因在細胞體內是必需且無家族基因的存在，否則即使是突變一個基因，但是其他代謝途徑上的家族基因可以彌補除功能上的缺失。至於 gene silencing，Vance 等人在 2001 發表在 Science 的研究報告指出，RNA interference 其機轉是源自於植物為了抵抗病毒的入侵而演化出來的。但是從 Vance 的研究報告指出因為植物病毒的突變似乎造成 RNA interference 的機轉會有失效趨勢。因此本篇作者採用熟知已久的抗體抗原的關係做為人為 down-regulation 的方法，一來抗體的專一性夠。二來抗體不會在植物內引發脊椎動物體內的免疫反應，因此只要送進具專一性的抗體基因就能達到目的。三來透過從駱駝來的抗體讓我們知道抗體的結構跟大小是可以跟以往不同的，特別是當抗體的運用時會面臨大小限制的困境，駱駝抗體可以做為小分子抗體的設計藍本。最後我個人感覺這篇 paper 觀念很明確，姑且不論實際效用為何？但是從這裡也許可以讓被大家對所熟知的觀念做一種想法上轉變即可應用的開端。

Reference :

- Udo & Uwe *Nature Biotechnology* (2003) **21**, 35 - 36
- Conrad, U. & Manteuffel, R. *Trends Plant Sci.* (2001) **6**, 399–402
- Hamers-Casterman, C.C. *et al. Nature* (1993) **363**, 446–448
- Riechmann, L. & Muijldermans, S. *J. Immunol. Methods* (1999) **231**, 25–38
- Vance, V. & Vaucheret, H. *Science* (2001) **292**, 2277–2280