植物負極性 RNA 病毒逆向遺傳系統發展之現況與展望

張賀雄[1]　古新梅[2]　詹富智[1, 3]

[1.] 台中市 國立中興大學 植物病理學系
[2.] 台中市 國立中興大學 農藝學系
[3.] 聯絡作者，電子郵件：fjjan@nchu.edu.tw；傳眞：+886-4-2285-4145
接受日期：中華民國 99 年 3 月 12 日

摘　要

張賀雄、古新梅、詹富智. 2009. 植物負極性 RNA 病毒逆向遺傳系統發展之現況與展望. 植病會刊 18: 201-216.

逆向遺傳系統 (reverse genetics) 在分子病毒學上，專指透過cDNA 構築表現基因體RNA 而產生病毒的研究系統。自 1994 年第一個負極性 RNA 病毒 (negative-strand RNA virus) 從 cDNA 構築產生後，逆向遺傳系統從而成爲負極性 RNA 病毒研究上一個普遍、可靠且有力的工具，用來深入研究病毒的生活史、病毒蛋白的功能性角色以及病毒與寄主間的交互作用。然而截至目前爲止，仍未有植物負極性 RNA 病毒被建立起有效率地、可供分子層次或基因體功能學研究的逆向遺傳系統。在這篇文章中，我們彙整了近年來負極性 RNA 病毒被建立逆向遺傳系統的相關研究，並針對它們的發展與應用進行討論；動物負極性 RNA 病毒逆向遺傳系統建立的成就與經驗，將有助於我們發展、建立植物負極性 RNA 病毒的逆向傳系統，並在進一步的深入研究中做出巨大的貢獻。

關鍵詞：逆向遺傳系統、負極性RNA 病毒、番茄斑萎病毒屬病毒

緒　言

負極性RNA 病毒 (negative-strand RNA virus) 是分布廣泛的一群病毒，依其基因體組成可分爲單條基因體 RNA (non-segmented genome) 及多條基因體 RNA (segmented genome) 兩大類，而根據國際病毒命名分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV) 2009 年分類公告 (http://www.ictvonline.org)，共分爲八個病毒科以及三個獨立未分類的病毒屬。具有單一條基因體 RNA 的病毒包括被分類於 *Mononegavirales* 病毒目中的 *Borna-*、*Filo-*、*Paramyxo-* 和 *Rhabdoviridae* 四個病毒科，以及一個未被分類於任何病毒科的 *Deltavirus* 屬；多條基因體 RNA 病毒包括具有兩條基因體 RNA 的 *Arenaviridae* 科病毒、具有三條基因體 RNA 的 *Bunyaviridae* 科病毒、具有三至四條基因體 RNA 的 *Ophioviridae* 科病毒、具有六至八條基因體 RNA 的 *Orthomyxoviridae* 科病毒，以及未被分類於任何病毒科、擁有兩條基因體 RNA 的 *Varicosavirus* 屬病毒，擁有四至六條基因體的 *Tenuivirus* 屬病毒 (22) (表一)。負極性RNA 病毒除了分布廣泛，其中很大一部分的病毒，在植物、動物甚至人身上都造成了很重大的危害 (49, 53, 89)，關於這些負極性 RNA 病毒各種領域的研究，包括更有效率的偵測鑑定技術之開發、致病機制的探討、病毒與寄主的交互作用、以及預防治療的技術與疫苗的開發，無不被積極地深入探討。

負極性RNA病毒複製及基因表現策略

負極性 RNA 病毒大部分具有脂質外套膜 (envelope)，在套膜上鑲嵌著突起的醣蛋白 (glycoprotein)，脂質外套膜內包裹著病毒複製及基因表現的主要功能單位－核酸蛋白複合體 (ribonucleoprotein complex, RNP)；RNP 的組成爲病毒的基因體 RNA 與核鞘蛋白 (nucleoprotein, N protein) 緊密纏繞並與病毒

表一、負極性RNA 病毒分類

Table 1. Classification of negative-strand RNA viruses

Virus order	Virus family or unassigned genus	Genome configuration	Host	Representative examples
Mononegavirales	*Bornaviridae*	1 negative-sense segment	*Vertebrates*	*Borna disease virus*
	Filoviridae	1 negative-sense segment	*Vertebrates*	*Ebola virus*
	Paramyxoviridae	1 negative-sense segment	*Vertebrates*	*Measles virus*
	Rhabdoviridae	1 negative-sense segment	*Vertebrates* *Plants* *Invertebrates*	*Rabies virus*, *Sonchus yellow net virus*
	Arenaviridae	2 negative-/positive-sense segments	*Vertebrates*	*Lassa virus*
	Bunyaviridae	3 negative-/positive-sense segments	*Vertebrates* *Plants* *Invertebrates*	*Bunyamwera virus*, *Hantaan virus*, *Tomato spotted wilt virus*
	Ophioviridae	3~4 negative-/positive-sense segments	*Plants*	*Citrus psorosis virus*
	Orthomyxoviridae	6~8 negative-sense segments	*Vertebrates* *Invertebrates*	*Influenza A virus*
	Delta virus	1 negative-sense circular	*Vertebrates*	*Hepatitis delta virus*
	Varicosavirus	2 negative-sense segments	*Plants*	*Lettuce big-vein associated virus*
	Tenuivirus	4~6 negative-/positive-sense segments	*Plants* *Invertebrates*	*Rice strip virus*

的核酸聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase/ replicase, L protein) 結合的核酸－蛋白質複合體。負極性 RNA 動物病毒藉由病毒顆粒表面突起的醣蛋白與寄主細胞表面的受器 (receptor) 辨識並結合 [52, 53]；負極性 RNA 植物病毒的表面醣蛋白則不是用來與寄主植物細胞進行辨識，而是用來感染媒介昆蟲細胞的辨識器 [106]。感染寄主後病毒將其 RNPs 釋放至細胞質內，並啓動複製與基因表現機制。

L 蛋白具有複製酶的特性，能夠複製病毒股基因體 RNA (virus-sense genomic RNA, vRNA) 或反病毒股基因體 RNA (anti-genomic RNA, cRNA)，合成 cRNA 或 vRNA，而不論是 vRNA 或 cRNA，都需要與 N 蛋白緊密纏繞才能被L蛋白辨識進行複製；除此之外，L 蛋白亦同時具有轉錄酶的特性，負極性 RNA 病毒的基因體 RNA 並不能作爲訊息 RNA (messenger RNA, mRNA) 表現蛋白，mRNA 須由與 N 蛋白緊密纏繞的 vRNA 或 cRNA 經 L 蛋白進行轉錄作用 (transcription) 產生。病毒 RNA 不論是要進行複製或轉錄作用，都必須與 N 蛋白纏繞在一起，才能被病毒的 L 蛋白所辨識；即病毒的基因體 RNA 或反基因體 RNA 要作爲模板進行複製或轉錄時，需要 N 蛋白和 L 蛋白的共同參與 [31, 53, 56, 77]。換句話說，病毒的 RNA 單獨存在時，不論是 vRNA 或是 cRNA 均無法進行表現，即不具有感染能力；此現象不同於一般正極性 RNA 病毒 (positive-sense RNA virus)，其基因體 RNA 同時可做爲 mRNA 表現蛋白的情形不同，這一點差異也成了負極性 RNA 病毒建立逆向遺傳系統 (reverse genetics system) 的難度遠高於正極性 RNA 病毒的原因。

RNA病毒的逆向遺傳系統

逆向遺傳系統一詞常用於建立 RNA 病毒的具感染力 DNA 構築 (infectious DNA clone) 之研究系統上，其在分子病毒學上的意義係用來描述病毒的產生是經由被選殖的 cDNA 構築上轉錄出的基因體 RNA 所表現之系統 [77]。由於分子生物學技術的發展，雖能夠在 DNA 層次上進行修飾、剪接、切除、插入等技術，但仍無法對 RNA 進行任意修飾動作；因此若要完全操作 RNA 病毒，需先選殖其基因體的 cDNA 構築，轉而從 DNA 層次上著手，也就是建立 RNA 病毒的逆向遺傳系統。

由於正極性 RNA 病毒其 vRNA 本身即可作爲 mRNA 表現病毒蛋白，以啓動自身完整的複製及基因表現機制，因此要建立正極性 RNA 病毒的逆向遺傳系統，只要選殖其基因體全序列，將其構築於適當的啓動子 (promoter) 下，以接種 DNA 的方式在寄主細胞內表現病毒 RNA，或在生體外 (*in vitro*) 進行轉錄作用產

生病毒RNA，再以RNA進行接種即可造成感染；正因爲正極性RNA病毒基因表現與複製機制較爲單純，所以正極性RNA病毒爲最早被建立起逆向遺傳系統的病毒；第一個被建立起逆向遺傳系統的RNA病毒，是1978年時建立的Qβ噬菌體(Qβ phage)的逆向遺傳系統[100]，第一個動物RNA病毒則是1981年時建立的小兒麻痺病毒(*Poliovirus*)的逆向遺傳系統[92]，植物RNA病毒則是1986年時建立的雀麥草嵌紋病毒(*Brome mosaic virus*)的逆向遺傳系統[28]。相對的，負極性RNA病毒在進行複製、轉錄表現基因時除了病毒RNA，至少還要有病毒的N蛋白及L蛋白同時存在，才能啓動完整的表現機制，然而除了N蛋白與L蛋白之外，是否還需要其他病毒蛋白的協助，便是逆向遺傳系統建立前的重要研究目標。

建立負極性RNA病毒逆向遺傳系統

探討參與病毒複製所必須的病毒蛋白

在建立逆向遺傳系統之前，建立一個有效率的微型複製體系統(minireplicon system)是必要的；使用適當的啓動子來表現病毒RNA或virus-like RNA，將RNA或DNA構築接種至寄主細胞中，並使之啓動複製及基因表現的活性；微型複製體系統是進行分子病毒學研究最基本的操作系統。

1989年，Luytjes等人首次建立了可以對負極性RNA病毒－流行性感冒A病毒(*Influenza A virus*, FluAV)進行修飾的表現系統[65]。Luytjes等人將報導基因－氯黴素乙醯轉移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)以反向方式構築於FluAV基因體RNA的5' 端和3' 端非轉譯區(untranslatable region, UTR)序列之間，再把整段序列構築在T7啓動子(T7 promoter)的調控之下；將此一構築在生體外進行轉錄作用產生擬病毒RNA (virus-like RNA)，與純化取得的N蛋白及複製酶混和，使其組成RNP聚合物後，接種至已先感染FluAV的培養細胞株系(cultured cell line)。感染複製後產生的FluAV，一部分病毒帶有原來的八條基因體RNA，另有一部分則是八條基因體中參雜了一條由DNA構築所表現virus-like RNA之重組病毒[65]。這種配合協助病毒(helper virus)進行表現的操作系統，雖然同樣可以對病毒序列或基因進行修飾及研究，但是卻必須有有效率的篩選方式來獲得目標重組病毒，且必須有良好的對照組以去除協助病毒所造成研究上各方面的影響。上述FluAV的修飾表現系統，便是一種藉由協助病毒來啓動的微型複製體系統；就建立負極性RNA病毒逆向遺傳系統來說，除了藉由協助病毒之外，另外的方法就是藉由病毒蛋白的表現來啓動微型複製體系統。

Pattnaik和Wertz是最早建立以DNA構築質體來啓動的微型複製體系統(plasmid-based minireplicon system)[86]。他們將*Rhabdovirus*屬的口腔囊泡病毒(*Vesicular stomatitis virus*, VSV)的所有病毒基因分別選殖到質體上，受T7啓動子調控，這些可以表現病毒蛋白的質體，以不同組合與無法複製表現的VSV RNA共同接種寄主細胞，同時接種可以表現T7 RNA聚合酶的重組牛痘病毒(*Vaccinia virus*, VV)協助質體上病毒蛋白的表現，觀察當何種病毒蛋白的組合可以使VSV RNA進行複製；實驗結果指出，VSV RNA的複製增殖需要L蛋白、N蛋白及磷酸蛋白(phosphoprotein)的存在[86]。在不同病毒上應用相同的策略，許多研究結果均指出*Rhabdovirus*和*Paramyxovirus*屬病毒基因體複製的啓動，需要L、N及P蛋白的存在[11, 15, 17, 83, 86]，後續的研究指出P蛋白雖然與複製酶或轉錄酶活性無關，但它能提升N蛋白與病毒vRNA或cRNA間結合的專一性，也使L蛋白與N-RNA的交互作用更有效率[45]。同樣是單條基因體、屬於*Filoviridae*科*Marburg virus*和*Ebola virus*的研究指出，filoviruses的複製同樣是需要其L蛋白、N蛋白及磷酸蛋白(VP35 of *Marburg virus*, VP30 of *Ebola virus*)的存在[71,72]。

1995年Dunn等人以具有三條基因體*Bunyaviridae*科的*Bunyamwera virus* (BUNV)爲對象[20]，將所有病毒基因分別選殖到質體上，另外將CAT基因以反向序列構築於BUNV S RNA的5' 端和3' 端UTR之間，所有基因及virus-like RNA構築均受T7啓動子調控；將構築有virus-like RNA序列的質體與不同組合的病毒蛋白表現質體搭配，再與可以表現T7 RNA聚合酶的重組VV共同接種寄主細胞，觀察當何種病毒蛋白表現時可造成CAT基因的表現；結果顯示，virus-like RNA的複製和CAT基因的表現，必須要有病毒的L及N蛋白存在[20]；相同的結論在其他bunyaviruses上也被發現[26, 64]，此外，具有兩條基因體RNA的arenviruses (*Arenaviridae*科)複製及基因表現所必須的病毒蛋白，也同樣是L及N蛋白[61]。在*Orthomyxoviridae*科influenza viruses的研究指出，influenza viruses的複製與基因表現除了病毒基因體RNA，同時必須有複製酶與N蛋白的存在，而influenza viruses的複製酶是由PA、PB1和PB2三個次單元蛋白(subunit)所組成，所以對influenza viruses而言其必須蛋白則有PA、PB1、PB2及N四個病毒蛋白[42, 43, 44, 85, 98]。

利用原核生物 T7 RNA 聚合酶表現系統建立逆向遺傳系統

當參與負極性 RNA 病毒複製及基因表現所必須的病毒蛋白被確認後，從建立微型複製體系統到建立逆向遺傳系統看起來只差一步之遙，將微型複製體系統中攜帶報導基因的 virus-like RNA 構築，轉變爲病毒基因體 RNA 的構築就能完成逆向遺傳系統的建立，然而這一步之遙也花費了三年的時間完成。1994 年 Schnell 等人首先建立第一個負極性 RNA 病毒的逆向遺傳系統 (97)。Schnell 等人以狂犬病毒 (*Rabies virus*, RV) 爲研究對象，對寄主細胞共同接種可以表現 T7 RNA 聚合酶的 VV，和受 T7 啓動子調控、構築有 L 蛋白、N 蛋白、P 蛋白及 RV 全長度 cRNA 序列的質體，最後在被感染的細胞株系中獲得完整的、具有感染力的 RV 病毒顆粒。這一次系統建立成功，Schnell 等人認爲重點應是在於研究中使用了正極性的 cRNA，而非負極性的 vRNA；他們認爲，正極性的 cRNA 與 L、N、P 蛋白表現載體所表現出來的 mRNA，不會因爲互相黏合而降低彼此的表現效率 (97)。從第一個逆向遺傳系統被建立之後，短時間內關於具有單條基因體 filo-、paramyxo-和 rhabdoviruses 的逆向遺傳系統如雨後春筍般被建立 (表二)，也有多篇評論文章被發表 (18, 31, 67, 73, 77, 82)。儘管使用負極性的 vRNA 構築可能會降低逆向遺傳系統的表現效率，仍然有一些研究學者以負極性的 vRNA 進行逆向遺傳系統的建立 (21, 50, 75)。這些系統的構築都是由 T7 啓動子進行調控，需要藉助能表現 T7 RNA 聚合酶的 VV 來啓動一開始的 RNA 表現，當目標病毒顆粒被表現出來之後，仍須想辦法將 VV 從中

表二、目前已建立可由 cDNA 構築產生具感染力病毒顆粒的負極性RNA 病毒

Table 2. Negative-strand RNA viruses generated from cDNA clones

Family	Genus	Species	Reference
Bornaviridae	*Bornavirus*	*Borna disease virus* (BDV)	(68,88)
Filoviridae	*Ebola-like virus*	*Ebola virus*	(75,101)
Rhabdoviridae	*Lyssavirus*	*Rabies virus* (RV)	(47,48,97)
	Vesiculovirus	*Vesicular stomatitis virus* (VSV)	(59,105)
Paramyxoviridae	*Metapneumovirus*	*Human metapneumovirus*	(38)
	Morbillivirus	*Canine distemper virus*	(34)
		Measles virus	(68,93,95,99)
		Rinderpest virus	(3)
	Pneumovirus	*Avian pneumovirus*	(74)
		Bovine respiratory syncytial virus	(10)
		Human respiratory syncytial virus	(14)
	Respirovirus	*Bovine parainfluenza virus* type 3	(35)
		Human parainfluenza virus type 3	(21,39)
		Sendai virus	(33,50)
	Rubulavirus	*Human parainfluenza virus* type 2	(51)
		Mumps virus	(13)
		Newcastle disease virus	(55,87,94)
		Simian virus type 5	(37)
Arenaviridae	*Arenavirus*	*Juin virus*	(2)
		Lassa fever virus	(36)
		Lymphocytic choriomeningitis virus	(23,60)
		Pichinde virus	(58)
		Tacaribe virus	(57)
Bunyaviridae	*Hantavirus*	*Hantaan virus*	(24)
	Nairovirus	*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*	(25)
	Phlebovirus	*Rift Valley fever virus*	(46)
		Uukuiemi virus	(26,81)
	Orthobunyavirus	*Akabane virus*	(79)
		Bunyamwera virus (BUNV)	(9)
		La Crosse virus	(8)
Orthomyxoviridae	*Influenzavirus A*	*Influenza A virus* (FluAV)	(19,27,76)
	Thogotovirus	*Thogoto virus*	(102)

分離，造成了另一個麻煩；因此便有研究學者改良了以 VV 作爲協助病毒的系統，建立了可以表現 T7 RNA 聚合酶但卻無法增殖的突變 VV [93, 95]，使得目標病毒產生後的分析更加容易。

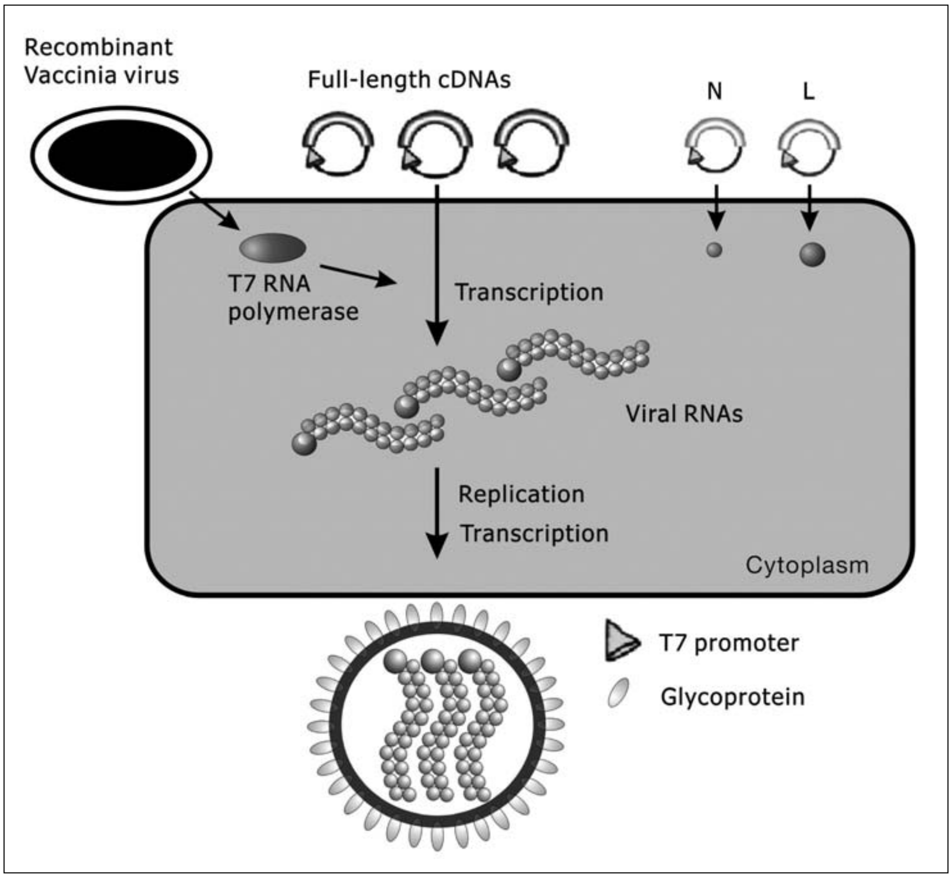
到了 1996 年，負極性 RNA 病毒逆向遺傳系統的研究有了重大的突破，Elliott 的團隊建立了第一個多條基因體負極性 RNA 病毒的逆向遺傳系統[9]。遵循著前人的研究經驗，Bridgen 和Elliott以 *Bunyamwera virus* (BUNV) 爲對象建立逆向遺傳系統。在這項研究中，Bridgen 和 Elliott 除了將病毒複製表現所需的 L 和 N 蛋白基因分別構築在質體上之外，也分別構築BUNV的三條基因體 RNA (L、M、S RNA) 於質體上，受 T7 RNA 啓動子調控；5 個 DNA 構築配合可以表現 T7 RNA 聚合酶的 VV 同時進行接種，最後在感染的細胞株系中獲得具有感染力且完整的 BUNV 病毒顆粒 (圖一)。BUNV 逆向遺傳系統的建立，證明了 Schnell 等人所發表的策略[97]，同樣可以應用在多條基因體負極性RNA 病毒上。

利用眞核生物 RNA 聚合酶表現系統建立逆向遺傳系統

Influenza A virus (FluAV) 是屬於 *Orthomyxoviridae* 科的病毒，具有八條基因體 RNA (表一)，其病毒複製酶與 N 蛋白具有親核性，在感染寄主細胞後病毒 RNA 複製及轉錄的過程均在細胞核中進行，而先前研究所使用的原核生物 T7 啓動子表現系統，無論是先進行生體外轉錄後再以 RNA 接種寄主細胞，或以 DNA 構築接種寄主細胞後借助能表現 T7 RNA 複製酶的 VV 表現病毒 RNA，這兩種方法的表現位置都在細胞質中，顯然並不適用於 FluAV。爲了克服這項困難，Hobom 的研究團隊建立了以RNA 聚合酶 I (RNA polymerase I) 的表現系統[78, 107]。RNA 聚合酶 I 在眞核生物體內專司 rRNA 與部分 tRNA 的轉錄，與 T7 RNA聚合酶相似之處在於，其所合成之 RNA 產物不具有 5' 端蓋帽狀保護結構 (5' cap) 及 3' 端多聚腺嘌呤尾 [3' poly(A) tail] 的結構，在結構上與病毒 RNA 相同；且利用寄主細胞的 RNA 聚合酶 I 可以讓 RNA 在細胞核內合成，符合 FluAV 的特性。應用 RNA 聚合酶 I 的表現系統，在 1999 年 Neumann 等人建立了 FluAV 的逆向遺傳系統[76]。FluAV 的八條基因體 RNA 分別構築在不同質體上，以RNA 聚合酶I 的啓動子調控，而 FluAV 複製及基因表現所必須的聚合酶及 N 蛋白，則分別構築在四個質體上以 RNA 聚合酶 II 的啓動子 (cytomegalovirus promoter) 調控，12 個 DNA 構築共同接種至寄主細胞的細胞核，由於複製酶及 N 蛋白具有親核性，在細胞質中合成並組裝後會被送回到細胞核中協助病毒 RNA 的複製，進而啓動各個病毒基因的表現，最後在細胞質組成完整且具有感染力的 FluAV 病毒顆粒[27, 76]。由於FluAV 每一條基因體 RNA 均只編譯一個病毒基因，再加上同時接種越多質體越不容易將所有質體接種至同一細胞中，因此有學者改良發展出雙啓動子系統 (圖二)，將編譯有病毒表現所必須蛋白基因的基因體 RNA 構築於兩個啓動子之間，使其在接種至寄主細胞後，一個構築能夠由兩個方向分別表現出病毒 RNA 以及病毒蛋白的 mRNA，而達到減少接種質體數量的目的，使得 FluAV 的逆向遺傳系統所需的 12 個 DNA 構築減少爲 8 個DNA 構築[40]。同樣具有在細胞核複製特性的病毒還有 *Bornaviridae* 科的病毒，bornaviruses 具有單條基因體 RNA，且其基因體組成和基因排列狀況均與 rhabdoviruses 極爲相似，便是因爲其位於細胞核複製的特性而被獨立分類爲一個病毒科；因此，2003 年 Perez 等人參考 FluAV 的研究，以 RNA 聚合酶 I 的病毒 RNA 表現系統建立了 *Borna disease virus* (BDV) 的逆向遺傳系統[88]。

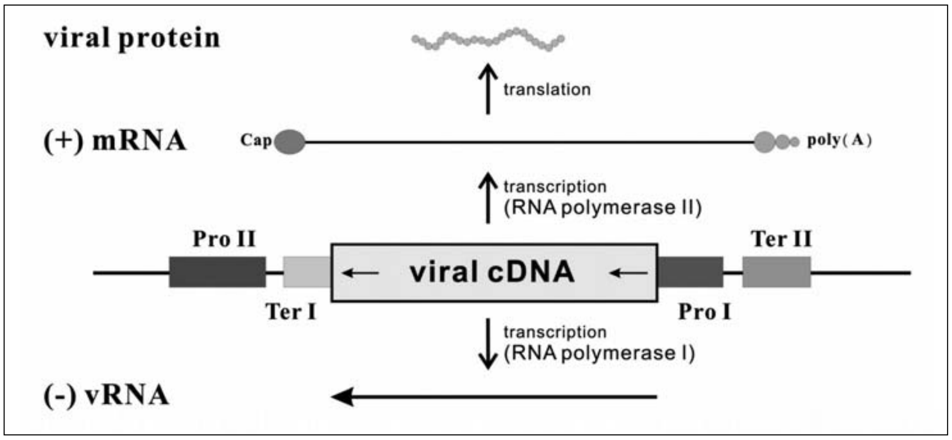
雖然大部分負極性 RNA 病毒不具有位於細胞核複製表現的特性，但由於 RNA 聚合酶 I 所合成的 RNA 與負極性RNA 病毒基因體RNA 最爲相似，且RNA 聚合酶I 啓動子所使用的是寄主細胞的 RNA 聚合酶 I，相對於使用 T7 RNA 聚合酶啓動子減少了接種時需要同時接種能表現聚合酶之重組病毒的操作複雜性，因此藉由 RNA 聚合酶 I 啓動子表現系統建立的逆向遺傳系統也普及到了其他負極性 RNA 病毒[24, 25, 26]。但是 RNA 聚合酶 I 啓動子在不同物種間專一性高，通用性低，跨種使用常造成表現率下降，因此 de Wit 等學者反其道而行，爲 T7 RNA 聚合酶加上細胞核累積的運送訊息胜肽片段序列 (nuclear-localization signal)，讓 T7 RNA 聚合酶得以進入細胞核工作，建立起以 T7 RNA 聚合酶啓動之FluAV 逆向遺傳系統[19]。

RNA 聚合酶 II 啓動子同樣是藉助寄主細胞的聚合酶，除了有同樣的操作便利性之外，部分 RNA 聚合酶 II 啓動子是來自 DNA 病毒基因表現的啓動子，其被研究之透徹更在 RNA 聚合酶 I 啓動子之上，且來自病毒的啓動子 (例如 *Cytomegalovirus*) 序列短、取得容易、轉錄效率高且穩定，更降低了實驗操作的難度；但是 RNA 聚合酶 II 合成之 RNA 其結構上的特色，成爲它使用上最大的缺陷，以往由於 T7 RNA 聚合酶及 RNA 聚合酶 I 所合成 RNA 與病毒 RNA 較接近，因此 ribozyme 的使用顯得可有可無，但是RNA 聚合酶 II 在眞核生物細胞內專司 mRNA 的合成，所合成的 RNA 會被加上 5' cap 及 3' poly (A) tail 的結構，此時



圖一、多片段基因體 *Bunyamwera virus* 逆向遺傳系統的建立策略。

Fig. 1. Schematic diagram of the reverse genetics system for the *Bunyamwera virus*. Host cells are co-transfected with protein expression plasmids of the N and L proteins and with plasmids containing full-length viral cDNA, all under the control of the T7 RNA polymerase promoter. Following infection with recombinant *Vaccinia virus* which enables the expression of T7 RNA polymerase, vRNAs and mRNAs are synthesized. The N and L proteins initiate the virus replication cycle.



圖二、單一構築可以同時表現vRNA 及 mRNA 的 RNA 聚合酶 I 和 II 雙啓動子表現系統。

Fig. 2. Schematic diagram of the RNA polymerase I-RNA polymerase II bi-transcription system for expressing vRNA and mRNA. The cDNA of an influenza virus genomic segment is constructed between the RNA polymerase I promoter (Pro I) and RNA polymerase I terminator (Ter I). The Pro I expression cassette is flanked by the RNA polymerase II promoter (Pro II) and terminator (Ter II). Transcription with the Pro I, negative-sense vRNA is synthesized by cellular RNA polymerase I. Cellular RNA polymerase II synthesizes mRNA through Pro II, and the mRNA is translated into viral proteins.

ribozyme 的使用變成了一種必須的策略；Inoue 等人在 2003 年以選殖自 *Cytomegalovirus* 的 RNA 聚合酶 II 啓動子的表現系統，搭配 ribozyme 的構築，建立了 RV 的逆向遺傳系統[47]，Martin 等人將此策略應用於建立 BDV 及麻疹病毒 (Measles virus) 的逆向遺傳系統上[68]，並指出使用 RNA 聚合酶 II 啓動子系統產生具感染力病毒的效率較使用 RNA 聚合酶 I 啓動子系統提高了 20 倍[68]。

逆向遺傳系統建立後帶動負極性 RNA 病毒的研究潛力

分子生物學的發展讓生物學家得以在 DNA 層次上進行重組及修飾，使得 DNA 序列上的意義得以被清楚了解，然而這樣的重組及修飾技術，並無法應用在 RNA 上，因此，建立負極性 RNA 病毒的逆向遺傳系統，正意味著病毒學家可以眞正對負極性 RNA 病毒從 DNA 層次上進行修飾與重組，是研究上不可或缺的工具，也是深入研究或應用負極性RNA 病毒的門檻。

逆向遺傳系統的建立，最直接的影響便是負極性 RNA 病毒功能性基因體學的研究，因爲逆向遺傳系統的建立而得以完全開展。由於 DNA 構築的建立，讓病毒學家可以直接對病毒序列的基因區、非基因區進行突變、剪切、置換或重組等修飾操作，除了可以直接了解該病毒基因的功能、序列扮演的角色、摺疊結構作用原因，亦可了解病毒基因與寄主細胞間的交互作用。以往從觀察序列的組合，僅可以判斷 bunyaviruses 基因體 RNA 5' 端與 3' 端 UTR 序列互補可形成鍋柄狀 (panhandle structure) 的結構，但是直到逆向遺傳系統的建立，病毒學家才藉由突變眞正了解到 bunyavirus RNAs 鍋柄狀互補區域是必須存在的結構[6]，兩端 UTR 序列專一性地決定三條基因體 RNAs 上基因表現的效率[5]，而且其互相配對後的二級結構重要性遠高於是否完全互補[54]；鍋柄狀區域的序列對N蛋白辨識與結合病毒 RNA 是必須的[70]，且序列重組實驗指出，N 蛋白形成的三聚體對來自不同屬 bunyavirus 鍋柄狀區域結合效率大幅下降[69]；針對基因體序列突變加入轉譯停止碼發現轉錄產生的 mRNA 長度變短，顯示 bunyavirus 轉錄產生 mRNA 與轉譯同時發生，轉譯作用的進行確保轉錄能完整作用[4]。這些功能性基因體學的研究，在逆向遺傳系統被建立之前是無法被完成的，逆向遺傳系統的建立使得研究的範圍更加寬廣、深入及透徹。

其次，病毒本身可以被利用當作載體，甚至可以發展作爲開發疫苗使用。RNA 病毒被建立起逆向遺傳系統之前，就已經先建立了微型複製體系統，這樣一個使用報導基因作爲觀察的方式，就是一種病毒載體的應用方向；RV[16]、VSV[96] 在建立逆向遺傳系統之後馬上就有作爲載體表現外源基因的例子，FluAV 在逆向遺傳系統建立之前，微型複製體系統成形之初，便已扮演了病毒載體的角色[32]。作爲疫苗的開發，最常用的要屬流感病毒，Webby 等人以無毒力 H1N1 influenza virus 的逆向遺傳系統爲基礎，重組置換 H5N1 與表面抗原有關兩條基因體的基因，以產生弱毒性重組病毒，注射至雞蛋胚胎生產對抗 H5N1 的疫苗[104]；逆向遺傳系統不僅可以以重組方式開發疫苗[7, 103]，也可以用突變方式產生減毒性病毒株 (attenuated virus) 開發疫苗[2, 31, 82]。

植物負極性RNA病毒逆向遺傳系統之發展

Jackson 的研究團隊在 2007 年美國植物病理學會年會上，首次發表了他們在苦苣菜黃網病毒 (*Sonchus yellow net virus*, SYNV) 上的初步研究成果[29]。SYNV 是 *Rhabdovirideae* 科 *Cytorhabdovirus* 屬的植物病毒，具有單一條負極性基因體RNA；根據動物 rhabdoviruses 的研究指出，rhabdovirus 啓動複製及基因表現需要 N、P 及 L 三種病毒蛋白協助[15, 17, 86]。Ganesan 等人將綠色螢光蛋白基因 (enhanced green fluorescent gene, eGFP) 與紅色螢光蛋白基因 (recombinant red fluorescent gene, DsRed)，以病毒 N 基因與P基因間的基因聯結序列 (gene junction sequence) 連接後，反向構築於病毒基因體 5'、3' UTR 之間，再將此片段以 cRNA 方向構築於 35S 啓動子下游；以農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 在圓葉菸草 (*Nicotiana benthamiana*) 上進行短暫表現 (transient expression) 時發現，當 virus-like RNA 的構築與表現 N、P、L 蛋白的構築共同接種時，可以觀察到 eGFP 的表現，但是當 virus-like RNA 的構築接種於 SYNV 感染的圓葉菸草時，eGFP 雖會表現卻不會隨著病毒移行 (movement)[29, 30]；此外，在2009 年 Ganesan 參加美國植物病理學會年會的研究成果口頭報告時指出，eGFP 基因雖然會表現，但是位於下游的 DsRed 基因卻沒有表現，而 virus-like RNA 與所有病毒蛋白共同表現時，eGFP 的表現也不會擴散至鄰近細胞。這些研究成果看似病毒蛋白的表現得以協助 virus-like RNA 在植物細胞中複製表現，但是卻沒有充分的證據說明 SYNV 的微型複製體 (minireplicon) 系統已被確實建立，而距離建立 SYNV 的逆向遺傳系統仍有一些困難需要排除。

番茄斑萎病毒屬之研究現況

植物負極性 RNA 病毒包括分類於 *Rhabdoviridae*

科的 *Cytorhabdovirus* 和 *Nucleorhabdovirus* 屬、*Bunyaviridae* 科的 *Tospovirus* 屬、*Ophioviridae* 科的 *Ophiovirus* 屬以及未分類至任何病毒科的 *Tenuivirus* 屬和 *Varicosavirus* 屬共六個病毒屬的病毒；其中不乏分布廣泛、危害甚重的病毒種類。*Tospovirus* 屬病毒是 *Bunyaviridae* 科中唯一可感染植物的病毒屬，以番茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 為其代表種，故中文稱其為番茄斑萎病毒屬；tospoviruses 的分布從熱帶、亞熱帶到溫帶地區均有發現，受危害作物種類繁多，以 TSWV 為例，目前已知其寄主範圍超過 84 科 1090 種植物[84]，造成全球每年超過十億美元的經濟損失[1]。

Tospoviruses 與其它 bunyaviruses 一樣具有三條基因體 RNA，依其大小分別命名為 L、M 及 S RNA。L RNA 為負極性 RNA (negative-sense RNA)，在 cRNA 方向上編譯一個病毒複製酶 (L protein)；S RNA 為雙極性 RNA (ambi-sense RNA)，在 vRNA 方向上編譯一個非結構性蛋白 S (non-structural protein, NSs protein)，在 cRNA 方向上編譯一個 N 蛋白；M RNA 也是雙極性 RNA，在 vRNA 方向上編譯一個非結構性蛋白 M (non-structural protein M, NSm protein)，在 cRNA 方向上編譯一個醣蛋白前驅物 (glycoprotein precursor, GN/GC protein)，其中 NSm 基因是 tospoviruses 特有，而在其它動物 bunyaviruses 所沒有的 (*Orthobunyavirus* 屬病毒雖有一相同命名的基因，但其基因編譯及表現策略均與 *Tospovirus* 屬病毒不同)。

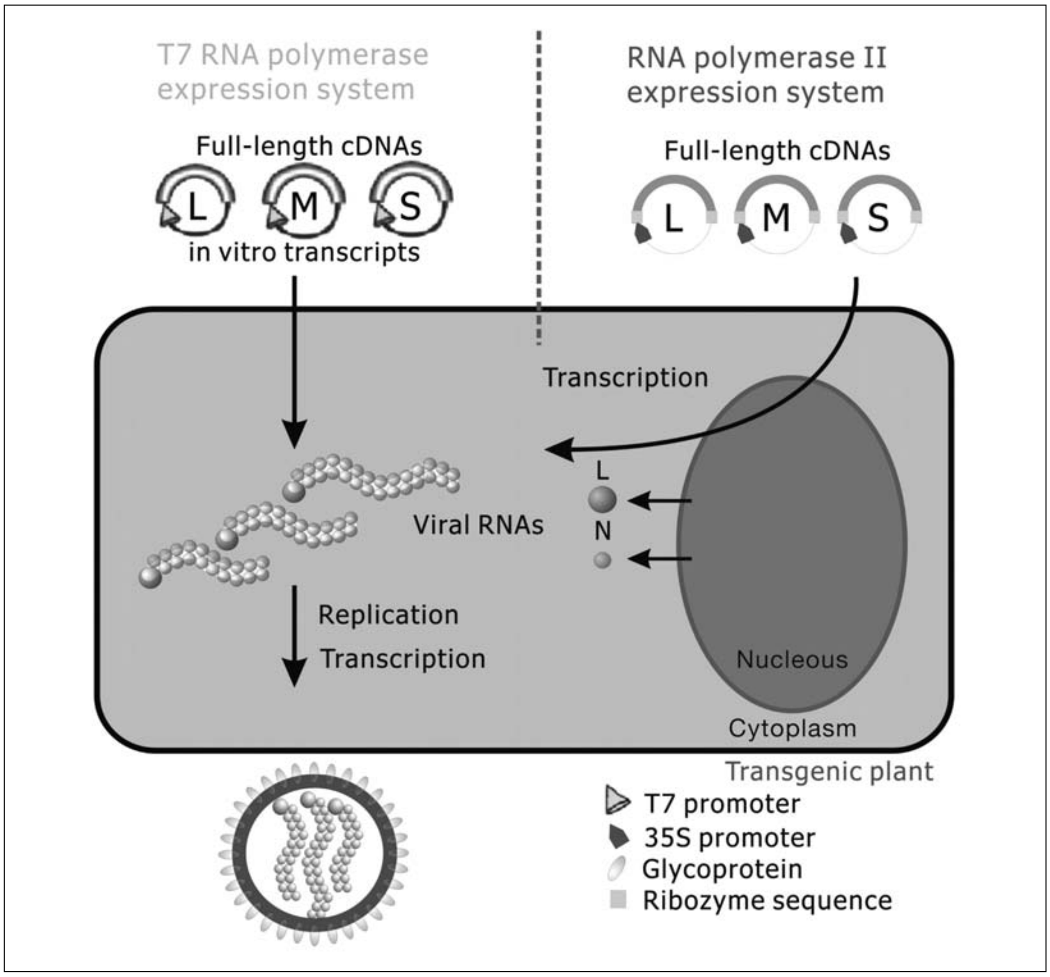
Tospovirus 病毒蛋白的基本功能大致上都已經有了粗淺的了解。1998 年 Moyer 的研究團隊發展出了基因體重分配 (reassortment) 的系統[90]，用以研究病毒基因的功能以及病毒與寄主間的交互作用。基因體重配的系統是利用共同接種兩個同種但不同性狀病毒分離株於一系統性寄主，從而在系統葉上獲得基因體發生重新組合分配的病毒株，再利用單斑寄主分離獲得純系重配病毒株，根據重配病毒株接種後性狀的變化，來判斷與此一性狀相關聯的病毒基因體或基因；自然界中發現，利用重分配方式 TSWV 讓自己獲得擊潰N基因轉基因植物抗性的能力[91]、而 TSWV 擊潰 *Sw5* 抗性植物的性狀已知與 M RNA 有關[41]、擊潰帶有 *Tsw* 抗性基因辣椒的性狀則與 NSs 基因有關[66]；此一策略同樣應用在西瓜銀斑病毒 (*Watermelon silver mottle virus*, WSMoV) 的研究上，Okuda 等人以重分配策略證明不同 WSMoV 分離株在番杏 (*Tetragonia expansa*) 上造成病徵差異的關鍵位於 S RNA 上[80]。*Tospovirus* 基因功能的另一個有效率研究系統，是 Adkins 的研究團隊所建立的病毒載體表現系統[62]；Adkins 的研究團隊以菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 作為載體表現 TSWV NSm 蛋白，發現 NSm 蛋白可以回復有移動缺陷 TMV 的移動能力，從而證明了 NSm 蛋白與病毒於細胞間移動功能的關聯性[62]；Li 等人進一步利用此一 TMV 病毒載體表現系統表現不同突變的 NSm 蛋白，界定了 NSm 蛋白參與細胞小管 (tubule) 形成、病毒移動與病徵發展有關的功能性區域[63]。

在沒有逆向遺傳系統可供研究的情形下，除了以轉基因植物表現病毒蛋白進行功能探討之外，上述基因體重分配系統與病毒載體表現系統，是目前研究 tospovirus 病毒基因功能較為有效率的研究系統之一。然而，基因體重分配系統需要自然突變株，研究策略及方向顯得被動，若要主動產生突變株，則會因為無法控制突變位置，造成研究操作的複雜性及困難度；利用病毒載體表現欲探討的病毒基因之研究策略，則受限於表現單一病毒蛋白，難以進行全方位的功能性研究，且得到的結果難免受到病毒載體存在之影響。從種種限制看來，建立逆向遺傳系統是能深入且更方便地研究 tospoviruses 及其它負極性植物 RNA 病毒所必須的方向。

建立番茄斑萎病毒屬病毒逆向遺傳系統的策略與展望

正因為植物病毒學家瞭解逆向遺傳系統對於研究負極性 RNA 病毒的重要性，許多研究團隊均投入人力物力於其中。以動物負極性 RNA 病毒的研究成果為藍本，循著相同的系統策略，期望在植物負極性 RNA 病毒上建立可以作為全方位研究工具的逆向遺傳系統，本研究室以台灣本土重要瓜類病毒－西瓜銀斑病毒 (WSMoV) 為研究對象，亦嘗試建立 tospoviruses 的逆向遺傳系統。參考動物 bunyaviruses 的逆向遺傳系統，要建立 tospoviruses 的逆向遺傳系統所使用的策略，可以從原核生物 RNA 聚合酶表現系統及真核生物 RNA 聚合酶兩個方向同時著手 (圖三)。

從動物 bunyaviruses 的研究指出，病毒N和L蛋白為病毒啓動複製與基因表現所必須的蛋白，但是 tospoviruses 有一個其他動物 bunyaviruses 所沒有的 NSm 蛋白，同樣也需要列入分析的對象；動物負極性 RNA 病毒的逆向遺傳系統，均是以接種蛋白表現載體的方式使寄主細胞表現病毒蛋白，有鑑於增加接種種類將會增加操作變因的理由，加上轉基因植物技術目前已相當成熟，因此在建立植物負極性 RNA 病毒逆向遺傳系統時，除了以農桿菌感染短暫表現的方式表現病毒蛋白之外，還可以選用基因轉殖的方式產生穩定表現病毒蛋白的轉基因植物作為研究平台。微型複製



圖三、建立 tospoviruses 逆向遺傳系統可使用 T7 RNA 聚合酶或 RNA 聚合酶 II 的表現系統。
Fig. 3. Expression systems for developing a reverse genetics system of tospoviruses. A transgenic or agro-infiltrated plant, expressing the N and L proteins, is used as a platform for developing the reverse genetics system. In the T7 RNA polymerase expression system, vRNAs are *in vitro* transcribed and co-inoculated to the plant expressing viral proteins. In contrast, three vRNAs are *in vivo* transcribed with 35S promoter-driven full-length cDNA constructs that are agro-infiltrated onto the platform plants. The viral proteins bind to vRNAs and initiate the virus replication cycle.

體系統的建立，可使用 T7 啓動子調控帶有報導基因的 virus-like RNA 構築之生體外轉錄產物接種於表現病毒蛋白的轉基因植物上；或使用 35S 啓動子調控的 RNA 聚合酶 II 表現系統，藉由農桿菌感染方式接種於表現病毒蛋白的植物上；待確認各種病毒蛋白的存在，對於微型複製體複製及基因表現的必需性後，便將帶有報導基因的 virus-like RNA 構築取代為病毒基因體 cDNA 構築，進行下一步由 cDNA 構築產生病毒的關鍵步驟。同樣地，病毒基因體的cDNA 構築若以 T7 啓動子調控，則在生體外進行轉錄，三條病毒基因體 RNA 轉錄產物混合後共同接種於表現病毒蛋白的植物上；或將 35S 啓動子調控的病毒基因體 cDNA 構築，透過農桿菌接種至表現病毒蛋白的植物上；期望在系統葉上觀察到病徵產生，以確定完整且具有活性的 tospovirus 病毒顆粒被一連串的 cDNA 構築所產生，建立 tospovirus 的逆向遺傳系統。

結　論

看到動物負極性 RNA 病毒的研究因為逆向遺傳系統建立，得以對病毒基因體進行修飾、突變等操作，而使得研究層面更寬廣且深入，從事植物負極性 RNA 病毒研究的學者同樣也希望能開拓自身的研究領域；然而，自 1994 年第一個動物負極性 RNA病毒[97]、1996 年第一個多條基因體動物負極性RNA病毒的逆向遺傳系統被建立[9]，超過 13 年的時間裡，包括在七個病毒屬裡、不管是單條或多條基因體、也不論是使用原核或真核生物的 RNA 表現系統，已有至少 32 種的負極

性RNA 病毒被建立起逆向遺傳系統 (表二)，其中卻沒有一種是感染植物的負極性RNA 病毒，顯然植物負極性RNA 病毒的研究，除了投入相對較少外，其中存在的難度可能也相當地高。

在建立逆向遺傳系統之前，有許多前置實驗需要被完善準備，除了各條病毒基因體RNA 的cDNA 構築，還有病毒蛋白表現載體的構築、轉基因植物的產生等，除了這些正在進行的研究工作，我們已經完成了部份病毒蛋白的植物基因轉殖(unpublished)，以及可以偵測病毒蛋白抗體的製備[12]。若能建立tospovirus 的逆向遺傳系統，除了能更直接且有效率地研究病毒基因體功能，對於了解病毒與寄主間的交互作用也能更加透徹，在發展病害防治或產生抗病植物上提供了研究的利器，此外也能讓台灣在植物負極性RNA 病毒的研究居於世界領導地位。

謝 辭

本實驗室於「建立番茄斑萎病毒屬西瓜銀斑病毒逆向遺傳系統」之相關研究，承行政院國家科學委員會計畫 (NSC94-2313-B-005-003；NSC98-2313-B-005-026-MY3) 經費補助，特此致謝。

引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Adkins, S. 2000. Tomato spotted wilt virus - positive step towards negative success. Mol. Plant Pathol. 1: 151-157.
2. Albariño, C. G., Bergeron, É., Erickson, B. R., Khristova, M. L., Rollin, P. E., and Nichol, S. T. 2009. Efficient reverse genetics generation of infectious Junin viruses differing in glycoprotein processing. J. Virol. 83: 5606-5614.
3. Baron, M. D., and Barrett, T. 1997. Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. J. Virol. 71: 1265-1271.
4. Barr, J. N. 2007. Bunyavirus mRNA synthesis is coupled to translation to prevent premature transcription termination. RNA 13: 1-6.
5. Barr, J. N., Elliott, R. M., Dunn, E. F., and Wertz, G. W. 2003. Segment-specific terminal sequences of Bunyamwera bunyavirus regulate genome replication. Virology 311: 326-338.
6. Barr, J. N., and Wertz, G. W. 2004. Bunyamwera Bunyavirus RNA Synthesis Requires Cooperation of 3'- and 5'-Terminal Sequences. J. Virol. 78: 1129-1138.
7. Billeter, M. A., Naim, H. Y., and Udem, S. A. 2009. Reverse genetics of measles virus and resulting multivalent recombinant vaccines: applications of recombinant measles viruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 329: 129-162.
8. Blakqori, G., Kochs, G., Haller, O., and Weber, F. 2003. Functional L polymerase of La Crosse virus allows in vivo reconstitution of recombinant nucleocapsids. J. Gen. Virol. 84: 1207-1214.
9. Bridgen, A., and Elliott, R. M. 1996. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404.
10. Buchholz, U. J., Finke, S., and Conzelmann, K.-K. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. J. Virol. 73: 251-5784.
11. Calain, P., Curran, J., Kolakofsky, D., and Roux, L. 1992. Molecular cloning of natural paramyxovirus copy-back defective interfering RNAs and their expression from DNA. Virology 191: 62-71.
12. Chang, H.-H., Tseng, H.-H., Yeh, S.-D., Ku, H.-M., and Jan, F.-J. 2009. Generation of monoclonal antibody against the replicase of *Watermelon silver mottle virus* and its application on the detection of L protein expression in planta. Plant Pathol. Bull. 18: 237-246 (In Chinese).
13. Clarke, D. K., Sidhu, M. S., Johnson, J. E., and Udem, S. A. 2000. Rescue of mumps virus from cDNA. J. Virol. 74: 4831-4838.
14. Collins, P. L., Hill, M. G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R. M., and Murphy, B. R. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 11563-15784.
15. Collins, P. L., Mink, M. A., and Stec, D. S. 1991. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9663-9667.
16. Conzelmann, K.-K. 1996. Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. J. Gen. Virol. 77: 381-389.
17. Conzelmann, K.-K., Cox, J. H., and Thiel, H. J. 1991. An L (polymerase)-deficient rabies virus defective interfering particle RNA is replicated and transcribed by heterologous helper virus L proteins. Virology 184: 655-663.
18. Conzelmann, K.-K., and Meyer, G. 1996. Genetic

engineering of animal RNA viruses. Trends Microbiol. 4: 386-393.

19. de Wit, E., Spronken, M. I. J., Vervaet, G., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E., and Fouchier, R. A. M. 2007. A reverse-genetics system for *Influenza A virus* using T7 RNA polymerase. J. Gen. Virol. 88: 1281-1287.
20. Dunn, E. F., Pritlove, D. C., Jin, H., and Elliott, R. M. 1995. Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. Virology 211: 133-143.
21. Durbin, A. P., Hall, S. L., Siew, J. W., Whitehead, S. S., Collins, P. L., and Murphy, B. R. 1997. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. Virology 235: 323-332.
22. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L. A., eds. 2005. Virus Taxonomy: classification and nomenclature. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
23. Flatz, L., Bergthaler, A., de la Torre, J. C., and Pinschewer, D. D. 2006. Recovery of an arenavirus entirely from RNA polymerase I/II-driven cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4663-4668.
24. Flick, K., Hooper, J. W., Schmaljohn, C. S., Pettersson, R. F., Feldmann, H., and Flick, R. 2003. Rescue of Hantaan virus minigenomes. Virology 306: 219-224.
25. Flick, R., Flick, K., Feldmann, H., and Elgh, F. 2003. Reverse genetics for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J. Virol. 77: 5997-6006.
26. Flick, R., and Pettersson, R. F. 2001. Reverse genetics system for Uukuniemi virus (*Bunyaviridae*): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. J. Virol. 75: 1643-1655.
27. Fodor, E., Devenish, L., Engelhardt, O. G., Palese, P., Brownlee, G. G., and Garcia-Sastre, A. 1999. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J. Virol. 73: 9679-5784.
28. French, R., Janda, M., and Ahlquist, P. 1986. Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells. Science 231: 1294-1297.
29. Ganesan, U., Bragg, J. N., Deng, M., Marr, S. K., and Jackson, A. O. 2007. GFP expression from a *Sonchus yellow net nucleorhabdovirus* replicon. Phytopathology 97: S38.
30. Ganesan, U., Bragg, J. N., Deng, M., Marr, S. K., and Jackson, A. O. 2009. GFP expression from a biologically active minireplicon of *Sonchus yellow net virus*. Phytopathology 99: S39.
31. García-Sastre, A. 1998. Negative-strand RNA viruses: applications to biotechnology. Trends Biotechnol. 16: 230-235.
32. García-Sastre, A., and Palese, P. 1995. Influenza virus vectors. Biologicals 23: 171-178.
33. Garcin, D., Pelet, T., Calain, P., Roux, L., Curran, J., and Kolakofsky, D. 1995. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. EMBO J. 14: 6087-5784.
34. Gassen, U., Collins, F. M., Duprex, W. P., and Rima, B. K. 2000. Establishment of a rescue system for canine distemper virus. J. Virol. 74: 10737-10744.
35. Haller, A. A., Miller, T., Mitiku, M., and Coelingh, K. 2000. Expression of the surface glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by bovine parainfluenza virus type 3, a novel attenuated virus vaccine vector. J. Virol. 74: 11626-14838.
36. Hass, M., Gölnitz, U., Müller, S., Becker-Ziaja, B., and Günther, S. 2004. Replicon system for Lassa virus. J. Virol. 78: 13793-13803.
37. He, B., Paterson, R. G., Ward, C. D., and Lamb, R. A. 1997. Recovery of infectious SV5 from cloned DNA and expression of a foreign gene. Virology 237: 249-260.
38. Herfst, S., de Graaf, M., Schickli, J. H., Tang, R. S., Kaur, J., Yang, C. F., Spaete, R. R., Haller, A. A., van den Hoogen, B. G., Osterhaus, A. D. M. E., and Fouchier, R. A. M. 2004. Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA. J. Virol. 78: 8264-8270.
39. Hoffman, M. A., and Banerjee, A. K. 1997. An infectious clone of human parainfluenza virus type 3. J. Virol. 71: 4272-4277.
40. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., and Webster, R. G. 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6108-6410.
41. Hoffmann, K., Qiu, W. P., and Moyer, J. W. 2001. Overcoming host- and pathogen-mediated resistance in tomato and tobacco maps to the M RNA of Tomato spotted wilt virus. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 242-249.
42. Honda, A., Mukaigawa, J., Yokoiyama, A., Kato, A., Ueda, S., Nagata, K., Krystal, M., Nayak, D. P., and Ishihama, A. 1990. Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. J. Biochem. 107: 624-628.
43. Honda, A., Ueda, K., Nagata, K., and Ishihama, A. 1987. Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. J. Biochem. 102: 1241-1249.

44. Honda, A., Ueda, K., Nagata, K., and Ishihama, A. 1988. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. J. Biochem. 104: 1021-1026.
45. Horikami, S. M., Curran, J., Kolakofsky, D., and Moyer, S. A. 1992. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. J. Virol. 66: 4901-5784.
46. Ikegami, T., Won, S., Peters, C. J., and Makino, S. 2006. Rescue of infectious Rift Valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. J. Virol. 80: 2933-2940.
47. Inoue, K., Shoji, Y., Kurane, I., Iijima, T., Sakai, T., and Morimoto, K. 2003. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. J. Virol. Methods 107: 229-236.
48. Ito, N., Takayama, M., Yamada, K., Sugiyama, M., and Minamoto, N. 2001. Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice. J. Virol. 75: 9121-9128.
49. Jan, F. J., Chen, T. C., and Yeh, S. D. 2003. Occurrence, importance, taxonomy, and control of thrips-borne tospoviruses. Pages 339-421 *in*: Advances in Plant Disease Management, Huang H. C., and Acharya S. N. eds. Reacher Signpost, Kerala, India.
50. Kato, A., Sakai, Y., Shioda, T., Kondo, T., Nakanishi, M., and Nagai, Y. 1996. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. Genes Cells 1: 569-579.
51. Kawano, M., Kaito, M., Kozuka, Y., Komada, H., Noda, N., Nanba, K., Tsurudome, M., Ito, M., Nishio, M., and Ito, Y. 2001. Recovery of infectious human parainfluenza type 2 virus from cDNA clones and properties of the defective virus without V-specific cysteine-rich domain. Virology 284: 99-112.
52. Kawaoka, Y., ed. 2004. Biology of negative strand RNA virus: The power of reverse genetics. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
53. Knipe, D. M., and Howley, P. M., eds. 2001. Fields Virology, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
54. Kohl, A., Dunn, E. F., Lowen, A. C., and Elliott, R. M. 2004. Complementarity, sequence and structural elements within the 3' and 5' non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. J. Gen. Virol. 85: 3269-3278.
55. Krishnamurthy, S., Huang, Z., and Samal, S. K. 2000. Recovery of a virulent strain of Newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. Virology 278: 168-182.
56. Kukkonen, S. K. J., Vaheri, A., and Plyusnim, A. 2005. L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. Arch. Virol. 150: 533-556.
57. López, N., Jácamo, R., and Franze-Fernández, M. T. 2001. Transcription and RNA replication of Tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. J. Virol. 75: 12241-12251.
58. Lan, S., Schelde, L. M., Wang, J., Kumar, N., Ly, H., and Liang, Y. 2009. Development of infectious clones for virulent and a virulent Pichinde viruses: a model virus to study arenavirus-induced hemorrhagic fevers. J. Virol. 83: 6357-6362.
59. Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A., and Rose, J. K. 1995. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-5784.
60. Lee, K. J., and de la Torre, J. C. 2002. Reverse genetics of arenaviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 262: 175-193.
61. Lee, K. J., Novella, I. S., Teng, M. N., Oldstone, M. B. A., and de la Torre, J. C. 2000. NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. J. Virol. 74: 3470-3477.
62. Lewandowski, D. J., and Adkins, S. 2005. The tubule-forming NSm protein from *Tomato spotted wilt virus* complements cell-to-cell and long-distance movement of *Tobacco mosaic virus* hybrids. Virology 342: 26-37.
63. Li, W., Lewandowski, D. J., Hilf, M. E., and Adkins, S. 2009. Identification of domains of the Tomato spotted wilt vieus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. Virology 390: 110-121.
64. Lopez, N., Muller, R., Prehaud, C., and Bouloy, M. 1995. The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. J. Virol. 69: 3972-3979.
65. Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Pavin, J. D., and Palese, P. 1989. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. Cell 59: 1107-1113.
66. Margaria, P., Ciuffo, M., Pacifico, D., and Turina, M. 2007. Evidence that the nonstructral protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the Tsw gene. Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 547-558.
67. Marriott, A. C., and Easton, A. J. 1999. Reverse

genetics of the *Paramyxoviridae*. Advances in Virus Res. 53: 321-340.

68. Martin, A., Staeheli, P., and Schneider, U. 2006. RNA polymerase II-controlled expression of antigenomic RNA enhances the rescue efficacies of two different members of the *Mononegavirales* independently of the site of viral genome replication. J. Virol. 80: 5708-5715.
69. Mir, M. A., Brown, B., Hjelle, B., Duran, W. A., and Panganiban, A. T. 2006. Hantavirus N protein exhibits genus-specific recognition of the viral RNA panhandle. J. Virol. 80: 11283-11292.
70. Mir, M. A., and Panganiban, A. T. 2005. The hantavirus nucleocapsid protein recognizes specific feactures of the viral RNA panhandle and is altered in conformation upon RNA binding. J. Virol. 79: 1824-1835.
71. Muhlberger, E., Lotfering, B., Klenk, H. D., and Becker, S. 1998. Three of the four nucleocapsid proteins of marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. J. Virol. 72: 8756-8764.
72. Muhlberger, E., Weik, M., Volchkov, V. E., Klenk, H.-D., and Becker, S. 1999. Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. J. Virol. 73: 2333-2342.
73. Nagai, Y., and Kato, A. 1999. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. Microbiol. Immunol. 43: 613-624.
74. Naylor, C. J., Brown, P. A., Edworthy, N., Ling, R., Jones, R. C., Savage, C. E., and Easton, A. J. 2004. Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. J. Gen. Virol. 85: 3219-3227.
75. Neumann, G., Feldmann, H., Watanabe, S., Lukashevich, I., and Kawaoka, Y. 2002. Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. J. Virol. 76: 406-410.
76. Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., and Kawaoka, Y. 1999. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9345-5784.
77. Neumann, G., Whitt, M. A., and Kawaoka, Y. 2002. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? J. Gen. Virol. 83: 2635-2662.
78. Neumann, G., Zobel, A., and Hobom, G. 1994. RNA polymerase I-mediated expression of influenza viral RNA molecules. Virology 202: 477-479.
79. Ogawa, Y., Sugiura, K., Kato, K., Tohya, Y., and Akashi, H. 2007. Rescue of Akabane virus (family *Bunyaviridae*) entirely from cloned cDNAs by using RNA polymerase I. J. Gen. Virol. 88: 3385-3390.
80. Okuda, M., Taba, S., and Hanada, K. 2003. The S RNA segment determines symptom differences on *Tetragonia expansa* between two Watermelon silver mottle virus isolates. Physiol. Mol. Plant Pathol. 62: 327-332.
81. Ő̋verby, A. K., Popov, V., Neve, E. P. A., and Pettersson, R. F. 2006. Generation and analysis of infectious virus-like particles of Uukuniemi virus (*Bunyaviridae*): a useful system for studying bunyaviral packaging and budding. J. Virol. 80: 10428-10435.
82. Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O. G., Pleschka, S., and García-Sastre, A. 1996. Negative-strand RNA viruses: Genetic engineering and applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11354-11358.
83. Park, K. H., Huang, T., Correia, F. F., and Krystal, M. 1991. Rescue of a foreign gene by sendai virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5537-5541.
84. Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C., and Marchoux, G. 2003. An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. J. Plant Pathol. 85: 227-264.
85. Parvin, J. D., Palese, P., Honda, A., Ishihama, A., and Krystal, M. 1989. Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase. J. Virol. 63: 5142-5152.
86. Pattnaik, A. K., and Wertz, G. W. 1991. Cells that express all five proteins of vesicular stomatitis virus from cloned cDNAs support replication, assembly, and budding of defective interfering particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1379-5620.
87. Peeters, B. P. H., de Leeuw, O. S., Koch, G., and Gielkens, A. L. J. 1999. Rescue of Newcastle Disease Virus from Cloned cDNA: Evidence that Cleavability of the Fusion Protein Is a Major Determinant for Virulence. J. Virol. 73: 5001-5009.
88. Perez, M., Sanchez, A., Cubitt, B., Rosario, D., and de la Torre, J. C. 2003. A reverse genetics system for Borna disease virus. J. Gen. Virol. 84: 3099-3104.
89. Prins, M., and Goldbach, R. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional mehtods of control. Trends Microbiol. 6: 31-35.
90. Qiu, W. P., Geske, S. M., Hickey, C. M., and Moyer, J. W. 1998. Tomato spotted wilt tospovirus genome reassortment and genome segment-specific adaptation. Virology 244: 186-194.
91. Qiu, W. P., and Moyer, J. W. 1999. Tomato spotted wilt

tospovirus adapts to the TSWV N gene-derived resistance by genome reassortment. Phytopathology 89: 575-582.

92. Racaniello, V. R., and Baltimore, D. 1981. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. Science 214: 916-919.

93. Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G., and Billeter, M. A. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. EMBO J. 14: 5773-5784.

94. Romer-Oberdorfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U. J., and Mettenleiter, T. C. 1999. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. J. Gen. Virol. 80: 2987-2995.

95. Schneider, H., Spielhofer, P., Kaelin, K., Dotsch, C., Radecke, F., Sutter, G., and Billeter, M. A. 1997. Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector. J. Virol. Methods 64: 57-64.

96. Schnell, M. J., Buonocore, L., Kretzschmar, E., Johnson, E., and Rose, J. K. 1996. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11359-15784.

97. Schnell, M. J., Mebatsion, T., and Conzelmann, K. K. 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. EMBO J. 13: 4195-5784.

98. Szewczyk, B., Laver, W. G., and Summers, D. F. 1988. Purification, thioredoxin renaturation, and reconstituted activity of the three subunits of the influenza A virus RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7907-7911.

99. Takeda, M., Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Nagai, Y., and Tashiro, M. 2000. Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. J. Virol. 74: 6643-6647.

100. Taniguchi, T., Palmieri, M., and Weissmann, C. 1978. QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. Nature 247: 223-228.

101. Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Muhlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O., and Klenk, H. D. 2001. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. Science 291: 1965-1969.

102. Wagner, E., Engelhardt, O. G., Gruber, S., Haller, O., and Kochs, G. 2001. Rescue of recombinant Thogoto virus from cloned cDNA. J. Virol. 75: 9282-9286.

103. Wang, S., Liu, Q., Pu, J., Li, Y., Keleta, L., Hu, Y. W., and Brown, E. G. 2008. Simplified recombinational approach for influenza A virus reverse genetic. J. Virol. Methods 151: 74-78.

104. Webby, R. J., Perez, D. R., Coleman, J. S., Guan, Y., Knight, J. H., Govorkova, E. A., McClain-Moss, L. R., Peiris, J. S., Rehg, J. E., Tuomanen, E. I., and Webster, R. G. 2004. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. The Lancet 363: 1099-1103.

105. Whelan, S. P. J., Ball, L. A., Barr, J. N., and Wertz, G. T. W. 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-5784.

106. Wijkamp, I. 1995. Virus-vector relationships in the transmission of tospoviruses. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

107. Zobel, A., Neumann, G., and Hobom, G. 1993. RNA polymerase I catalysed transcription of insert viral cDNA. Nucl. Acids Res. 21: 3607-3614.

Mr. Ho-Hsiung Chang

Mr. Chang received his B. S. degree in plant pathology from National Chung Hsing University (NCHU), Taichung, Taiwan in 2001. He is currently a Ph. D. candidate under the direction of Dr. Jan working on the developing a reverse genetics system for *Watermelon silver mottle tospovirus* and the functional study of the nuclear shuttle protein of *Tomato leaf curl New Delhi begomovirus*.

Dr. Hsin-Mei Ku

Dr. Ku is currently an assistant professor at the Department of Agronomy, National Chung Hsing University (NCHU), Taichung, Taiwan. She received her B.S. in plant pathology from NCHU in 1987. In 1998, he earned a Ph.D. degree in Plant Biology from Cornell University, USA. Her major expertise is in the plant molecular genetics with special emphasis on map-based cloning of tomato fruit shape QTLs. In recent years, she has investigated the conversion of male sterility system from GMS to CMS in pepper. She has also developed molecular markers for bruchid (*Callosobruchus chinensis* L.) resistance gene in mungbean. Currently, she is working on functional characterization of resistance genes against *Papaya ringspot virus* found in *Cucumis metuliferus*.

Dr. Fuh-Jyh Jan

Dr. Jan is currently an associate professor at the Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University (NCHU), Taichung, Taiwan. He received both his B.S. and M.S. degrees in plant pathology from NCHU in 1986 and 1988. In 1998, he earned a Ph.D. degree in molecular plant pathology from Cornell University, USA. His major expertise is in the molecular biology of plant viruses with special emphasis on tospoviruses and potyviruses. He has also involved in identification and characterization of plant viruses infecting ornamental plants including *Phalaenopsis* orchids, calla lily, carnation and lisianthus in Taiwan. He has developed a transgenic approach for generating multiple resistance by a chimeric construct that can trigger post-transcriptional gene silencing against different viruses. Currently, he is using this approach for the control of major viruses affecting cucurbitaceous and solanaceous crops.

ABSTRACT

Chang, H.-H. [1], Ku, H.-M. [2], and Jan, F.-J. [1,3]. 2009. Current progress and prospect of the reverse genetics of plant negative-strand RNA viruses. Plant Pathol. Bull. 18: 201-216. ([1] Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; [2] Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan; [3] Corresponding author, E-mail: fjjan@nchu.edu.tw, Fax: +886-4-2285-4145)

The term, reverse genetics, is used in molecular virology to describe the generation of viruses owning its genome derived from cDNA clones. Since the first development of a negative-strand RNA virus entirely from cDNA clones in 1994, the reverse genetics system becomes a popular, reliable and powerful tool for the negative-strand RNA viruses to dissect the virus life cycle, the role of viral proteins and the interaction between viruses and hosts. To date, there is still no efficient routine reverse genetics system for detailed molecular investigation and functional genomics elucidation of any member of the plant negative-strand RNA viruses. In this article, we reviewed the recent studies related to generating reverse genetics systems for negative-strand RNA viruses, and discussed the development and application of the reverse genetics. The implementation and experience of developing the reverse genetics of the animal negative-strand RNA viruses will help us to develop that of the plant negative-strand RNA viruses and contribute enormously for the profound study.

Key words: reverse genetics, negative-strand RNA virus, Tospovirus