

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-275—

執行期限：90年8月01日至91年07月31日

主持人：常玉強 台灣大學農藝系

共同主持人：

計畫參與人員：

一、中文摘要

*Activator (Ac)*轉位子最早於1947年被Barbara McClintock在玉米中發現：她發現*Ac*可自動轉位於基因間並可外作用於(*trans-activate*)另一組非自動轉位子 *Dissociation (Ds)*，趨動*Ds*之轉位。*Ac-Ds*在1984年被德國Starlinger選殖並定序(Müller-Neumann et al. 1984)，經過進一步研究發現：(1)*Ac*由4565-bp組成並含轉座酶(transposase)基因 (2)*Ds*與*Ac*之差別僅在於*Ds*缺少(或突變)了*Ac*之轉位酶(3)一最小之*Ds*僅含*Ac*之兩端各300-bp即可被*Ac*活化而轉位(Haring et al. 1991)。學者利用其在染色體上跳出原位置，而又插入另一基因位置的特性，鈎取一些重要之植物基因，稱基因鈎取(gene tagging)。

轉位子有一種「反劑量效應」(inverse dosage effect)現象，乃因轉位表現*Ac*轉位頻率降低(Scofield et al. 1992)，此現象存在於玉米、菸草、蕃茄，但不存在於阿拉伯芥中(Swinburne et al. 1992)。研究顯示可能是因為轉座核膜上的結果(Heinlein et al. 1994)。為了降低此現象，本實驗利用 nuclear localization signal (NLS)可將蛋白質帶入細胞核中的特性，將玉米*Ac*轉位子中轉位和NLS融合的構建在可誘導的啟動子PR1-a驅動下，送進含非自動轉位子*Ds*的轉殖菸草中，使其表現轉位。當含NLS之轉位基因受到水楊酸(salicylic acid)誘導時，會使得*Ds*跳出Luciferase或 β -glucuronidase報導基因(reporter gene)，利用Luciferase分析和GUS分析可

以測到轉位效率及發生的位置。另外，運用了特定的引子(primer)做不同的聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction)來確認轉殖株中的轉位情形，發現72個獨立轉殖株中有56株已自動轉位。此結果顯示，可能是由於植物內生的水楊酸誘導轉位產生，且在一被轉殖細胞核中表現，驟低了過多轉位事件的情形，使得轉位效率提高。在*Ac*轉位機制的研上，希望此方法能提供一些資訊，並且使轉位子系統更適用於用來鈎取高等植物的基因(gene tagging)。

關鍵詞：可誘導轉位子，可誘導啟動子，基因鈎取

Abstract

Transposable elements *Activator (Ac)* was first discovered in maize by Barbara McClintock (1947). She found that *Ac* transposed autonomously between genes and *trans-activated* another non-autonomous element *Dissociation (Ds)*. *Ac-Ds* was cloned and sequenced by Starlinger (1984). Further studies showed that: (1) *Ac* is 4565 bp long and codes for a single product, the transposase. (2) generally, *Ds* elements are internal deletion derivatives of *Ac* (3) A fully active minimal *Ds* element may contain only 300 bp of each end of *Ac* element. Gene tagging technique using the transposable element as an insertional mutagen for the isolation of important plant genes has been proven to be a useful tool.

A curious aspect of *Ac* transposon is that the accumulation of high levels of the *Ac* transposase may inhibit subsequent transposon excision, which termed as "inverse dosage effect". This effect was saw in

maize, tobacco and tomato but not *Arabidopsis*. It was hypothesized that high level of the transposase might aggregate on the nuclear membrane. As a result of this, the transposase cannot transport into the nuclear to perform the transposition events. In this study, a classical nuclear localization signal (NLS) was fused with the transposase gene under the control of promoter of the inducible gene for pathogenesis-related protein 1a (PR-1a). The purpose of the NLS fusion is to help the entrance of the transposase into the nucleus for the subsequent transposition events. Excision of non-autonomous transposable element (*Ds*) from luciferase (LUC) and β -glucuronidase (GUS) reporter gene constructs was employed to analyze the induction of the *Ac* transposase containing NLS. Spontaneous excision has been primarily identified by polymerase chain reaction in 56 out of 72 independent transgenic tobacco plants. This result suggested that transposase could be transported into the nucleus immediately by induction of the internal salicylic acid stimuli. An alternative inducible transposon strategy for functional genomic is suggested.

Keywords: transposable element, inducible promoter, PR-1a, gene tagging

二、緣由與目的

Activator 轉位子 (*Ac*) 最早在 1947 年被 Barbara McClintock 在玉米中發現：她發現 *Ac* 可自動轉位於基因間並可外作用於 (*trans-activate*) 另一組非自動轉位子 *Dissociation* (*Ds*), 趨動 *Ds* 之轉位。*Ac-Ds* 在 1984 年被德國 Starlinger 選殖並定序 (Mueller-Neumann *et al.* 1984), 經過進一步研究發現：(1) *Ac* 由 4565bp 組成並含有轉位基因 (2) *Ds* 與 *Ac* 之差別僅在於 *Ds* 缺少 (或突變) 了 *Ac* 之轉位基因 (3) 一最小之 *Ds* 僅含 *Ac* 之兩端各 300bp 即可被 *Ac* 活化而轉位 (Haring *et al.* 1991)。近來, 許多學者應用轉位子跳出原位置又插入新位置特性, 已鈎取一些重要之植物基因, 稱基因鈎取 (gene tagging)。成功實例除在玉米外, 其它原無 *Ac* 轉位子之植物如煙草、番茄、阿拉伯芥等亦鈎取出抗病基因、雄不孕基因 (Whitham *et al.* 1994; Jones, *et al.* 1994; Aarts *et al.* 1993)。基因鈎取被認為是研究高等植物分子生物學重要之工具。除 gene tagging 外, 另一種技術稱 gene trap (Sundaresan *et al.* 1995), 亦為應用轉位子特性而發展分離基因之方法。兩者最大不同為典型 transposon tagging 乃轉位子插入基因造成突變後, 觀測基因性狀 (或基因產物) 改變而鈎取基因。gene trap 乃轉位子內側含一無啟動子 *gus* 基因, 當轉位子順向插入某基因造成與 *gus* 基因成融合基因而表現 GUS, 由 GUS 染色偵測出被插入基因之特性, 再選殖有興趣之基因。transposon tagging 乃先鎖定有興趣之基因篩選突變體, gene trap 則乃造成一群突變體後篩選有興趣之基因。兩方法各有

適合篩選之基因, 然而, 不論是 transposon tagging 或 gene trap, 目前成功實例大多應用於阿拉伯芥。以 transposon tagging 為例, 在大基因組之植物 (如番茄之單套細胞約含 7×10^7 -bp) 欲鈎取植物基因則應有下列條件：(1) *Ac* 轉位在該植物中轉位頻率高 (2) 篩選有興趣之 *Ac* 突變植株可在一、二個世代內完成 (3) 針對有興趣基因之性狀設計合適之篩選策略。欲符合上述前二條件則有賴於對 *Ac-Ds* 轉位機制之研究, 尤其最理想基因鈎取系統為：轉位子能在植物再生組織之各細胞同步轉位, 造出最多樣突變株, 而篩選突變株時則不轉位。為了達到這目標, 吾人先前曾研究 *Ac-Ds* 在番茄植物中之轉位機制, 發現 *Ac-Ds* 僅在番茄生活史中萌芽階段轉位頻率高 (80%)。有趣的是, 其它階段轉位頻率低並非因 *Ac* 之轉位不表現或表現量低, 相反地, 其轉位頻率低乃因轉位表現量太高, 稱為「反劑量效應」(inverse dosage effect) (Scofield *et al.* 1992)。此現象亦存在於玉米、煙草、番茄, 但不存在於阿拉伯芥中。其後, 吾人將一來自煙草之可誘導啟動子 PR-1a 與轉位融合並轉殖入煙草 (含非自動轉位子 *Ds*), 觀察 *Ds* 是否因 PR-1a 啟動子受誘導表現轉位而轉位出原位置, 發現融合之 PR-1a 啟動子轉位受水楊酸 (salicylic acid) 處理後的確驅動了 *Ds*, 而且不同誘導方法驅動 *Ds* 轉位頻率不同及在不同組織轉位 (Charnig *et al.* 1995)。

菸草中的反劑量效應 (inverse dosage effect), 乃因轉位表現量太高聚集在核膜上無法進入核中而無法造成轉位。轉位作用是在細胞核中發生, 但轉位乃經生, 因此, 轉位必須穿入之轉位作用。很多蛋白質必須有 NLS (nuclear localization signal) 才能穿入細胞核。*Ac* 轉位 N 端的前 200 個氨基酸含有三段 NLS, 分別在 44-62、159-178、174-206 個氨基酸位置 (Boehm *et al.* 1995), 這些 NLS 的能力是累加的, 當刪除掉 103-807 的氨基酸這個片段時, 發現 NLS 帶領轉位進入細胞核的 (Heinlein *et al.* 1994)。對轉位的活性的 102 個氨基酸 (包括 44-62 的 NLS 位置) 是可被刪除的 (Li and Starlinger 1990)。

轉位 NLS 並不典型。因此, 本實驗中將轉位前端一些無用 NLS SV40, 建構成一含典型 NLS 之轉位, 繼續強轉位穿入細胞核之能力。

三、結果與討論

一、菸草轉殖結果：

將含 pBH39Ts、pBH40Ts 的農桿菌各轉殖到 NB Δ AcA1、nD3 Δ Ac 的菸草植株中 (圖一), 產生四種轉植株分別命名為 L39 (pBH39Ts 送進 NB Δ AcA1 中)、L40 (pBH40Ts 送進 NB Δ AcA1 中)、G39 (pBH39Ts 送進 nD3 Δ Ac 中)、G40 (pBH40Ts 送進 nD3 Δ Ac 中), 前後九次轉殖日期過程如表二, 各

得到 20、52、66、76 株獨立轉植株(independent line)，分別做不同的 PCR 反應及分析結果。在植株長成過程中，發現有幾株的性狀特別，特作以下描述：L39(2)(11)、L40(25)(26)(28)、G39(5)(7)(41)(46)(51)、G40(8)(29)(30)(33)(50)等的植株頂端生長點呈枯萎狀，L39(2)(18)、L40(3)(32)、G39(5)、G40(34)等的植株葉片乾枯捲曲無絨毛，L39(6)的植株葉片小，G39(57)、G40(8)(28)的植株葉片狹長，L40(5)(14)、G39(38)的植株矮小，L40(40)的莖捲曲嚴重，L40(49)的株結的子小，G39(6)(9)(25)的植株開的花器黏的緊、種子飽滿。G39(15)的植株嚴重變形、不開花。

二、轉位結果：

pBH39TsE1~E4、pBH39TsT1~T4、pBH40TsE1~E4、pBH40TsT1~T4 的農桿菌以引子 SV39 和 CSV 一組，SV40 和 CSV 為另一組引子，經過 PCR 大量擴增後得到 SV39 及 SV40 的片段，約 486 及 771 bp，可確定欲轉殖的農桿菌確實含有 NLS 之轉位構築

在 L39 轉植株方面：20 個獨立轉植株中有 11 株分析出已轉位之情形，有 2 株有一部份已轉位、一部份還未轉位，有 7 株沒有測到 *Ds* 存在，在 L40 轉植株方面：52 個獨立轉植株中有 23 株分析出已轉位之情形，有 20 株有一部份已轉位、一部份還未轉位，有 1 株完全未轉位，有 8 株沒有測到 *Ds* 存在。比較 L39 及 L40 植株的轉位效率分別為 65% 及 86.7%，顯示含原本 SV40 的 NLS 比修改過的 NLS 的構築會引起較高的轉位效率。

三、討論：

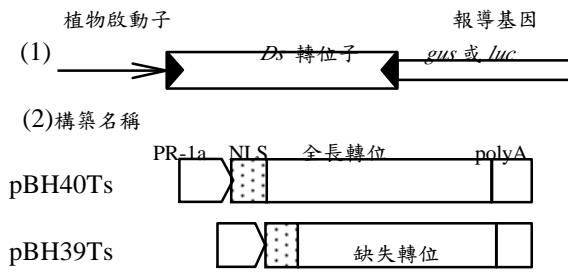
本實驗構築之含 NLS 轉位，將會轉穿入細胞核之能力，也因轉率。欲以 *Ac* 轉位子執行基因釣取的工作，尤以大基因組而言，轉位效率高將可使轉位子有更多的機率跳入欲釣取的基因中，再配合可誘導的啟動子可控制轉位子的不穩定性。在 *Ac* 轉位機制的研究上，希望此方法能提供一些資訊，並且使轉位子系統更適用於用來釣取高等植物的基因。

四、計畫成果自評

本計畫為申請人以新進人員申請之計畫，執行期限自 90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日，計畫進行內容，進度符合預期。

五、參考文獻

1. Aarts, M.G.M., Dirkse, W.G., Stiekema, W.J. and Pereira, A. (1993). Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 363, 715-717.
2. Boehm U, Heinlein M, Behrens U, Kunze R (1995) One of three nuclear localization signals of maize *Activator(Ac)* transposase overlaps the DNA-binding domain. *Plant J.* 7 (3):441-51.
3. Charng, Y.C., Pfitzner, U.M. and Pfitzner, A.J.P. (1995). Fusions of the inducible promoter of the PR-1a gene to the *Activator* transposase gene can transactive excision of a nonautonomous transposable element by external and internal stimuli. *Plant Sci.* 106, 141-155.
4. Haring, M.A., Rommens, C., Nijdamp, H.J.J. and Hille, J. (1991). The use of transgenic plants to understand transposition mechanisms and to develop transposon tagging strategies. *Plant Mol. Biol.* 16, 449-461.
5. Heinlein M, Brattig T, Kunze R (1994) *In vivo* aggregation of maize *Activator (Ac)* transposase in nuclei of maize endosperm and *Petunia* protoplasts. *Plant J* 5: 705-714.
6. Li MG, Starlinger P (1990) Mutational analysis of the N-terminus of the protein of maize transposable element *Ac*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6044-6048.
7. Mueller-Neumann, M., Yoder, J.I. and Starlinger, P. (1984). The DNA sequence of the transposable element of *Ac* of *Zea mays* L. *Mol. Gen. Genet.* 198, 19-24.
8. Scofield, D.R., Harrisio, K., Nurrish, S.J. and Jones, J.D.G. (1992). Promoter fusions to the *Activator* transposase gene confer distinct patterns of *Dissociation* excision in tobacco cotyledons. *Plant Cell* 4, 573-582.
9. Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D.J., Dean, C., Ma, Hong. and Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Dev.* 3, 1797-1810.
10. Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choe, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78, 1101-1115.



圖一：(1) *Ds*::報導基因，被轉殖煙草中已含之重組基因。非自動轉位子 *Ds* 插入一啟動子與報導基因之間。*Ds* 跳出後報導基因才可表現。轉殖植物含 LUC 報導基因定名為 NB AcA1 (b) 轉殖植物含 GUS 報導基因定名為 nD3 Ac。(2) pBH40Ts 及 pBH39Ts 分別為含相同 NLS 但不同長度轉位之構築。