行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　※

※　應用 PR-1a 啟動子之調節因子構築誘發性轉位子以建立一植物基因釣取系統　※

※　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：■個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：NSC　89－2316－B－002－036－

執行期間：89 年 10 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：常玉強

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- □赴國外出差或研習心得報告一份
- □赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- □出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- □國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台灣大學農藝系

中　華　民　國　90　年　12　月　26　日

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 89－2316－B－002－036－
執行期限：89 年 10 月 01 日至 90 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

轉位子（又稱跳躍因子）已被應用於釣取一些重要之植物基因。然而，成功實例往往限於基因組較小之植物如阿拉伯芥。欲在大基因組之植物釣取植物基因則需許多世代之篩選。本計畫之目的在於了解轉位子之機制並建立一高等植物基因釣取系統。先前，吾人將一來自煙草之可誘導啟動子 PR-1a 與轉位酶融合並轉殖入煙草。轉位酶之活性可受化學藥劑誘導而驅動轉位子，不同誘導方法驅動轉位子轉位頻率不同及在不同組織轉位。進一步研究顯示，當 PR-1a 啟動子中之數個調節因子單獨或重組後再與轉位酶融合並轉殖入煙草，由於此等轉殖煙草受誘導後產生不同量之轉位酶，而造成驅動轉位子轉位頻率亦不同。發現一 111-bp 之調節因子與轉位酶融合後，雖產生最低量之轉位酶 mRNA 卻造成最高效率驅動轉位子能力。據此，在本計畫中，吾人將構築數種「可誘導轉位子」，並轉殖入煙草、番茄及其它高等植物，俾以建立一高等植物基因釣取系統。在此系統中，「可誘導轉位子」可在植物之癒合組織或生殖細胞同步被誘導而在各細胞轉位並分別插入新基因位置。因此，篩選有興趣之突變植株即可從下一代開始。

關鍵詞：可誘導轉位子，可誘導啟動子，基因釣取

Abstract

Transposable element has been proven to be a useful tool as an insertional mutagen for the isolation of important plant genes. The aim of this project is to understand the transposition mechanism of the *Activator-Dissociation* system and to develop gene tagging systems in heterologous plants. Previously, the open reading frame coding for the transposase gene of the maize transposable element *Activator* (*Ac*) was expressed under the control of the promoter of the inducible gene for pathogenesis-related protein 1a (PR-1a). The transposase activity could be induced in plants by a variety of chemicals, e.g. salicylic acid, and consequently triggers the transposition events. Furthermore, several regulatory elements resided in PR-1a promoter have been fused with the transposase gene. These constructs were introduced into transgenic tobacco plants and a variety of transposase activities were generated by treatment with salicylic acid. We found that a 111-bp regulatory element of PR-1a promoter fusion, althouth triggers the least transposase transcripts abundance among 5 constructs, can trigger the highest transposition efficiency. In this project, based on the results described above, several "inducible" transposable elements will be constructed and introduced into tobacco, tomato and other higher plants. A transposon tagging system in plants would be developed, in an attempt to induce the transposition events simultaneously in either calli or floral cell lineages. As a result of this, a population of the progeny is mutagenized with the inducible transposon and the desired insertional mutants could be screened.

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 組成並含有轉位酶基因（2）*Ds* 與 *Ac* 之差別僅在於 *Ds* 缺少（或突變）了 *Ac* 之轉位酶基因（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，已釣取一些重要之植物基因，稱基因釣取（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、阿拉伯芥等亦釣取出抗病基因、雄不孕基因(Whitham *et al.* 1994; Jones, *et al.* 1994; Aarts *et al.* 1993)。基因釣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）改變而釣取基因。 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 7x 10^7-bp）欲釣取植物基因則應有下列條件：(1) *Ac* 轉位子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，尤其最理想基因釣取系統為：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%）（Charng and Pfitzner 1994）。有趣的是，其它階段轉位頻率低並非因 *Ac* 之轉位酶不表現或表現量低，相反地，其轉位頻率低乃因轉位酶表現量太高，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（Swinburne *et al.* 1992）。其後，吾人將一來自煙草之可誘導啟動子 PR-1a 與轉位酶融合並轉殖入煙草（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酶而轉位出原位置， 發現融合之 PR-1a 啟動子轉位酶受水楊酸（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（Charng *et al.* 1995）。

進一步研究顯示，當 PR-1a 啟動子中之數個調節因子單獨或重組後再與轉位酶融合並轉殖入煙草，由於此等轉殖煙草受誘導後產生不同量之轉位酶，而造成驅動轉位子轉位頻率亦不同。發現一 111-bp 之調節因子與轉位酶融合後，雖產生最低量之轉位酶 mRNA 卻造成最高效率驅動轉位子能力（Charng *et al.* 1997）。據此，在本計畫中，吾人將構築數種「可誘導轉位子」，並轉殖入煙草、番茄及其它高等植物，俾以建立一高等植物基因釣取系統。並針對下列議題作深入探討：一、生殖細胞同步被誘導轉位之效率。二、「可誘導轉位子」在蕃茄中之轉位表現。

三、結果與討論

一、生殖細胞同步被誘導轉位之效率。

圖一所示之各構築之煙草轉殖株，目前所做之結果均為體細胞以不同濃度水楊酸誘導後所做之觀察。而依據轉位子能在受誘導後同步轉位之現象，吾人嘗試在植株頂端生長點及生殖細胞同步誘導轉位之實驗。誘導方法將以水楊酸誘導：將 1mM，10mM 或 50mM 水楊酸直接噴灑在煙草花芽，觀察自交第二代植株報導基因之表現，並以 DNA 吸漬法分析來自同一果實各植株中轉位子之位置以測定誘導轉位子在植株頂端生長點及生殖細胞同步誘導轉位之效率。發現在生殖細胞中以 10mM 水楊酸誘導轉位效率最高，在各構築中又以 ATPase、BTPase 及 DTPase 最高（約 5%；其他 CTPase：3%、ETPase：1%）；然而該結果卻略低於先前報告 One-component 之可誘導轉位子（*INAc*）之誘導效率（約 6%）。

上述結果顯示在菸草生殖細胞中，全長之 PR-1a 啟動子與缺失之 PR-1a 啟動子受誘導後所驅動之轉位效率並無太大差別，相較於先前報導，在體細胞（癒合組織細胞）中，BTPase 及 DTPase 構築受誘導後所驅動之轉位效率約 30 倍於 ATPase 構築（全長之 PR-1a 啟動子）。其原因可能為 (1) 水楊酸誘導各構築之轉位酶表現量有組織特異性，(2)「反劑量效應」在不同組織有不同之影響。

二、「可誘導轉位子」在蕃茄中之轉位表現。

先前研究顯示可誘導轉位子 *INAc* 在蕃茄中出現自動轉位之表現（即不誘導而自動轉位）（Charng *et al.* 2000），究其原因可能是「反劑量效應」在蕃茄中所要求之最低轉位酶量不高之影響。因此，本計畫篩選出含 *INAc* 蕃茄轉殖株而未發生自動轉位現象並可受水楊酸誘導之轉殖株。圖二顯示該轉殖株受誘導 *INAc* 轉位後，果實表現 luciferase 之結果。

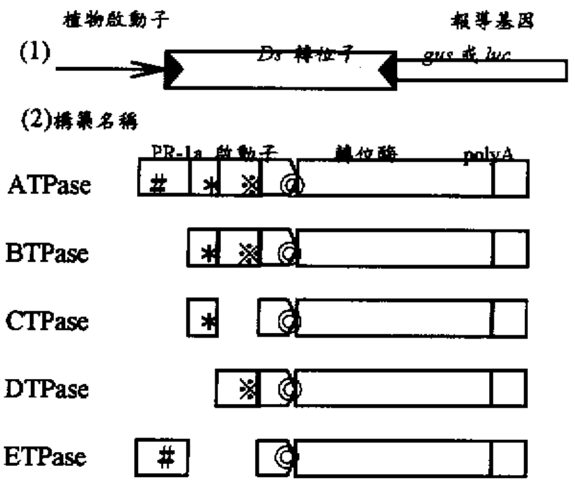
四、計畫成果自評

本計畫為申請人以新進人員申請之第一年計畫，執行期限自 89 年 10 月 01 日至 90 年 07 月 31 日共計十個月，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. Charng, Y.C., Ma, C. Tu, J. and Kuo. T.T. (1997) A 200-bp constructed inducible PR-1a promoter fusion to the *Ac* transposase gene drives higher transposition of a *Ds* element than the native PR-1a promoter fusion drives. Plant Sci.73-86.
3. Charng, Y.C. and Pfitzner, A.J.P. (1994). The firefly luciferase gene as a reporter for *in vivo* detection of *Ac* transposition in tomato plants. Plant Sci. 98, 175-183.

4. 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.
5. Charng, Y.C., Pfitzner, A.J.P., Pfitzner, U.M., Charng-Chang, K.F., Chen, C-m., Tu, J. & Kuo, T.T. (2000) Construction of an inducible transposon, *INAc*, to develop a gene tagging system in higher plants. Molecular Breeding 6: 353-367.
6. 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 taggign strategies. Plant Mol. Biol. 16, 449-461.
7. Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. and Jones, J.D.G. (1994). Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. Science 266, 789-792.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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。(2) 將轉殖入上述含 *Ds*::報導基因煙草之重組基因。ATPase 帶全長之 PR-1a 啟動子，其它則僅帶部分調節因子，#、＊、※及◎分別代表四個調節因子。

圖二：蕃茄轉殖株受誘導 *INAc* 轉位後，果實表現 luciferase 之結果。圖左：正常光照下之蕃茄果實；圖右：黑暗下攝影，只有轉位子受誘導後轉位而表現 luciferase gene 之蕃茄果實能發光。兩果實之蕃茄植株來自同一轉殖株，顯示 *INAc* 在該轉殖株並未發生自動轉位現象。