

ACC合成酶基因之選殖及其在 果樹育種上之應用

Cloning of ACC Synthase Genes and Their Application on Fruit Breeding

黃鵬林

Pung-Ling Huang

國立臺灣大學園藝系

關鍵字：果實後熟、乙烯、ACC合成酶基因、cDNA選殖

Key words: fruit ripening、ethylene、ACC synthase gene、cDNA cloning

摘 要

植物荷爾蒙乙烯對植物之影響，自種子發芽以及生長、發育與老化，無不息息相關。對於更年性水果而言，乙烯在誘發果實成熟及後熟過程中，更扮演著極決定性的角色。目前已知在乙烯的生合成路徑中，其速率限制步驟(rate-limiting step)為SAM至ACC之轉換，此反應係由ACC合成酶來催化。理論上，若能控制此反應，即能調節乙烯之產生及控制果實之成熟。因此，如何利用轉殖DNA技術，來調節此關鍵反應之產物ACC，在農業上將有甚大的經濟效益。本文綜述最近利用夏南瓜(zucchini)為模式植物，選殖ACC合成酶的cDNA及其基因之最近發展。並討論利用基因轉殖技術，改變果樹的遺傳組成分，進而達到控制果實後熟之途徑。

前 言

植物荷爾蒙乙烯對植物之影響，自種子發芽以及生長、發育與老化，無不息息相關，諸如葉片老化、離層發生、花瓣萎凋及果實成熟等等(Abeles, 1973)。更年性水果(climacteric fruits)之後熟，乙烯更扮演著引發者(initiator)之重要角色。在更年前期，乙烯之產生量極低，但

在後熟開始時，乙烯會明顯地增加；以乙烯處理未成熟果實，可提前其後熟，若利用乙烯生合成(ethylene biosynthesis)或乙烯作用(ethylene action)之抑制劑來處理，則可抑制其後熟。因此，乙烯被公認為一種後熟荷爾蒙(ripening hormone)(Brady, 1987)。

乙烯生合成之瓶頸反應酵素--ACC合成酶

目前已知乙烯生合成之路徑為： $\text{methionine} \rightarrow \text{S-adenosylmethionine (SAM)} \rightarrow \text{1-amino-cyclopropane carboxylic acid (ACC)} \rightarrow \text{ethylene}$ 。這路徑中之速率限制步驟(rate-limiting step)為SAM至ACC之轉換，此反應係由ACC合成酶進行催化(Yang & Hoffman, 1984)。理論上，若能控制此反應，即能調節乙烯之產生及控制果實之成熟。因此，如何利用生理與生化方法來調節此關鍵反應之產物ACC，為農業界一直在追求的目標之一。近年來，由於轉殖DNA技術(recombinant DNA technology)之快速發展與應用，此關鍵酵素之純化及其相對應基因之選殖已有可能，也為農業界帶來了新的希望，期待直接以分子育種方法，改變作物遺傳組成分，進而達到控制果實後熟之目的。

ACC合成酶基因之選殖

ACC合成酶因為非常不穩定，且在植物體內量很少，早期對於此酵素之純化工作，一直無法成功(Kende, 1989)。直到最近兩年，由於找到誘發大量產生ACC合成酶之系統(induced system)，才首度在prof. Theologis之實驗室(plant Gene Expression Center, USDA-U.C. Berkeley)選殖mRNA成功(Sato & Theologis, 1989; Theologis, Sato & Huang, 1990)。他們發現未完全成熟之夏南瓜果實薄片經共同處理IAA、BA、LiCl、AOA後，ACC合成酶之酵素活性可顯著提高至15-20 nmoles ACC/小時/克鮮重。圖一係他們應用免疫化學篩選法(immunoscreening)選殖夏南瓜ACC合成酶mRNA之策略圖解，其實驗過程包括六個主要步驟：(一)從大量誘發組織(highly induced tissue)中，利用蛋白質純化方法部份純化ACC合成酶；(二)以部份純化過之ACC合成酶製造抗血清(antiserum)；(三)以未誘發組織(uninduced tissue)之總蛋白(total proteins)製作親和層析管柱，純化上述步驟所得之抗血清；(四)利用已純化過之抗血清篩選 λ gt11 cDNA庫(library)；(五)以免疫化學分析方法鑑定篩選得到之cDNA選殖系(clone)；(六)利用大腸桿菌(E. coli)及酵母菌表達載體(expression vector)製造ACC合成酶並分析其酵素活性。

1990年，prof. Van Montagu實驗室(Laboratorium voor Genetica, Rijksuniversiteit Gent, Belgium)應用蛋白質序列分析法(protein sequencing)亦選殖出番茄之ACC合成酶cDNA(Van Der Straeten et al., 1990)。他們所用的方法係首先部份純化ACC合成酶，經SDS/PAGE電泳解析後，回收ACC合成酶，進行胺基酸序列分析，而後利用胺基酸序列資料設計寡核苷酸分子(

oligonucleotide)，並以其為探針(probe)篩選cDNA庫。此策略亦已成功地應用於蘋果(Dong *et al.*, 1991)及冬南瓜(Nakagawa *et al.*, 1991)之ACC合成酶cDNA的選殖上。

目前已有 ACC合成酶cDNA核直酸序列發表的作物，除了上述夏南瓜、冬南瓜、番茄、蘋果之外，尚有應用非同源探針(heterologous probe)交叉雜交法(cross hybridization)所選殖得到之康乃馨(Park *et al.*, 1992)。

有關 ACC合成酶基因之構造、種類及其功能分析，近年來亦有初步的先趨性研究。黃氏等人(Huang *et al.*, 1991)分析夏南瓜該基因之結構，發現此基因係由基因族(gene family)所組成，cp-ACC1A及cp-ACC1B兩基因係以相反方向(reverse orientation)座落於染色體的另一位置上，相距僅5.7 kb；兩基因各含五段顯子(exon)及四段隱子(intron)。cp-ACC1A基因所轉譯之蛋白為Mr=55878(pI=7.07)，而cp-ACC1B基因所轉譯之蛋白為Mr=55922(pI=7.68)。雖然兩基因所表現之蛋白特性非常類似，但兩基因之表現類型完全不同，具有組織及誘導物之差異性。

ACC合成酶基因在果樹育種上之應用

典型之更年性水果如香蕉、番茄、酪梨等，在果實後熟時，組織成分及質地上有顯著地變化，此變化伴隨著呼吸率的增加及乙烯的大量發生，而乙烯的生合成係受 ACC合成酶基因所調控。所以，ACC合成酶mRNA之選殖開啓了運用分子生物學手段操控植物內在乙烯生合成的途徑。理論上，抑制 ACC合成酶基因之表達，將可抑制乙烯的產生量，進而阻止果實的後熟。基因表達的抑制可以經由不同的策略來達成，例如，基因表現之不平衡(imbalance; Meeks-Wagner & Hartwell, 1986)，基因破壞(gene disruption; Scherer & Davis, 1979)，顯性負突變(dominant negative mutation; Herskowitz, 1987)，反義RNA技術(antisense RNA technology; Ecker & Davis, 1986)，核酸酵素(ribozyme; Haseloff & Gerlach, 1988)。

1991年，prof. Theologis實驗室首先應用反義RNA技術，進行番茄之遺傳轉殖，以CaMV 35S 啓動子(promoter)驅動ACC合成酶基因，在植株內表達反義RNA(Oeller *et al.*, 1991)。他們發現經轉殖之番茄植株，其乙烯的產生量明顯地受到抑制，且果實後熟亦顯著地延遲。一般正常的番茄果實，經授粉之後50天開始產生乙烯，隨即有呼吸高峰(respiratory burst)之出現，再約經10天即完全後熟。而轉殖植株所產生之番茄果實，乙烯產生量之99.5%受到抑制。當果實成熟時，經由葉綠素降解(degradation)及茄紅素生合成(lycopene biosynthesis)所造成之正常紅色亦受到抑制。與正常果實相較，漸進的葉綠素降解延遲了大約20天。果實的顏色亦只發育至黃色及桔色之間，番茄果實在植株(120天)及摘離植株後貯放於空氣中(90天)從未發生紅熟及軟化的現象。有趣的是，這些經轉殖過之果實的後熟抑制表現型可以經由外加乙烯反轉過來，意即呼吸高峰的出現，乙烯的大量產生及果實的後熟，可以經由外加乙烯誘導產生。他們進而分析此經由乙烯所誘導之後熟反應，就質地(texture)、顏色(color)、香氣(aroma)及緊實度

(compressibility) 而言，轉殖之番茄經乙烯處理後與正常後熟之果實無異。這些實驗印證了乙烯是後熟荷爾蒙的假說，也提供了一個改善水果品質的新途徑。在人類延緩果實後熟、減少果實損害的目標上，生物科技的應用，將可輔助傳統育種的方法。

結 論

吾國對於果樹之栽培研究、國外引種，曾投入大量之人力與經費。尤其，與果樹產業息息相關之果實後熟生理及果實貯藏技術等之研究成果，亦相當豐碩，若能進一步以分子生物學方法探討果實後熟生理，研究 ACC合成酶基因之表現與果實後熟之相關性，將可建立一套利用分子生物學方法，探討園藝產業問題之模式。

在園藝產業上，運輸過程中果實若過分成熟將造成重大損失，因此ACC合成酶mRNA之選殖，具有無限之應用潛力及經濟效益。很多農業生物技術公司，亦投資大量人力、物力在進行此方面之研究。該基因之選殖若能與轉殖系統(transformation system)相結合，利用反義RNA技術，改變作物遺傳組成份，抑制 ACC合成酶基因之表現，則乙烯合成速率降低，果實生理狀態將因而改變，對於傳統貯藏技術及催熟方法，將起革命性變化。

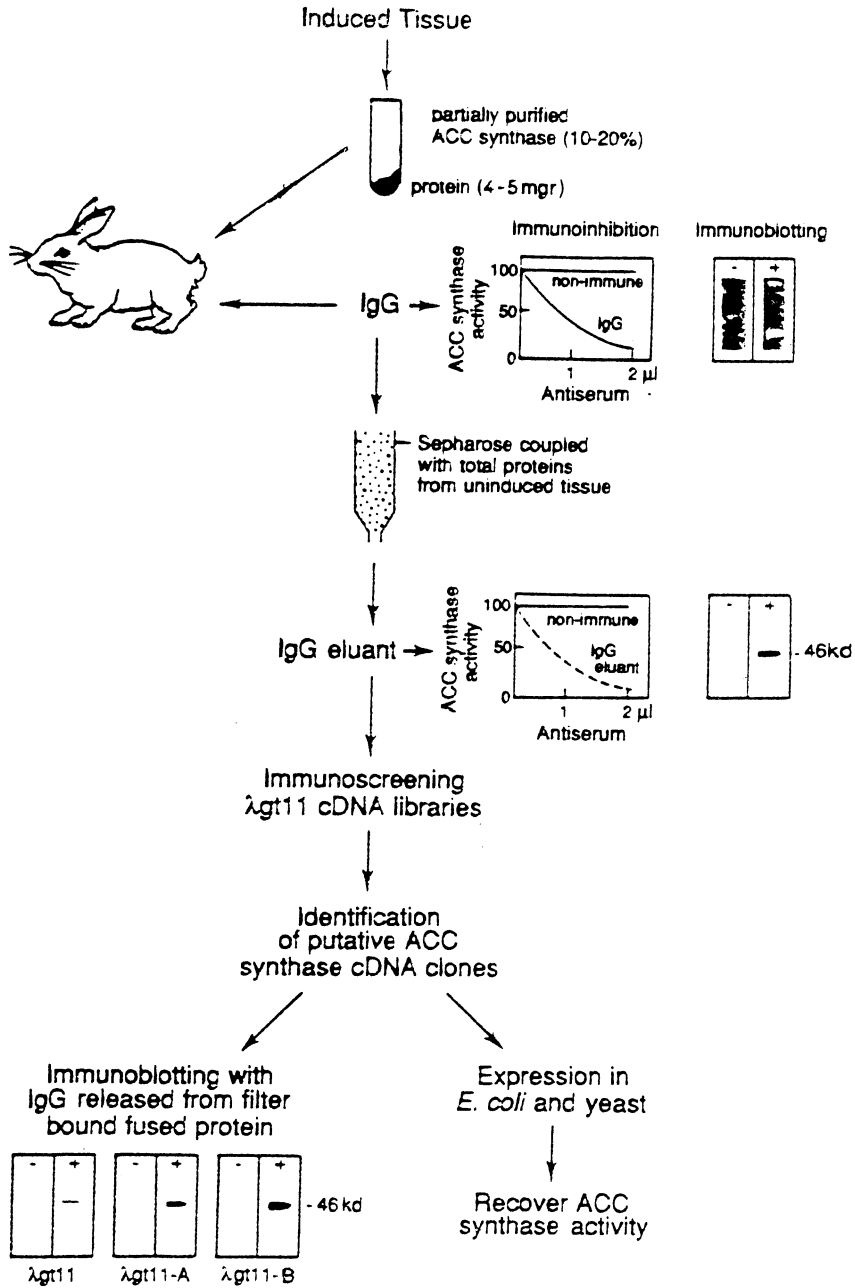
就遠程目標而言，若能更進一步將 ACC合成酶基因轉移至細菌或其他微生物中，以工業化手段大量生產 ACC，進而利用化學方法使之轉變成乙烯，將對乙烯之生產起重大的改變。

參 考 文 獻

1. Abeles, F. B. 1973. Ethylene in plant biology. Academic press, New York. 302pp.
2. Brady, C. J. 1987. Fruit ripening. Ann. Rev. Plant Physiol. 38:155-178.
3. Dong, J. G., W. T. Kim, W. K. Yip, G. A. Thompson, L. Li, A. B. Bennett, and S. F. Yang. 1991. Cloning of cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. Planta 185: 38-45.
4. Ecker, J. R. and R. W. Davis. 1986. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of anti-sense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5372-5376.
5. Haseloff, J. and W. L. Gerlach. 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. Nature 334:585-591.
6. Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. Nature 329:219-222.
7. Huang, P.L., J. E. Parks, W. H. Rottmann, and A. Theologis. 1991. Two genes encoding 1-

aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (Cucurbita pepo) are clustered and similar but differentially regulated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7021-7025.

8. Kende, H. 1989. Enzymes of ethylene biosynthesis. Plant Physiology 91:1-4.
9. Meeks-Wagner, D., and L.H. Hartwell. 1986. Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission. Cell 44:43-52.
10. Nakagawa, N., H. Mori, K. Yamazaki, and H. Imaseki. 1991. Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding. Plant Cell Physiol. 32:1153-1163.
11. Oeller, P. W., M. -W. Lu, L. P. Taylor, D. A. Pike, and A. Theologis. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science 254:437-439.
12. Park, K. Y., A. Drory, and W. R. Woodson. 1992. Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. Plant Molecular Biology 18:377-386.
13. Sato, T., and A. Theologis. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6621-6625.
14. Scherer, S., and R. W. Davis. 1979. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4951-4955.
15. Theologis, A., T. Sato, and P. L. Huang. 1990. Cloning the mRNA of ACC synthase. In: Lamb, C.J. & Beachy, R.N. (eds.) Plant Gene Transfer, UCLA Symp. Mol. Cell Biol., New Series, Volume 129. Alan R. Liss, Inc., New York. p.289-299.
16. Van Der Straeten, K., L. Van Wiemeersch, H. M. Goodman, and M. Van Montagu. 1990. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4859-4863.
17. Yang, S.F., and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:155-189.



圖一 ACC合成酶mRNA之選殖策略

Figure 1. Strategy for cloning the mRNA of ACC synthase (reproduced from Theologis , Sato & Huang; 1990)

summary

It has been recognized that ethylene plays a crucial role in the initiation and development of ripening in climacteric fruits. Moreover, the ACC synthase is the key regulatory enzyme in the biosynthetic pathway of ethylene. It is therefore important to understand how the expression of ACC synthase gene is regulated during fruit ripening. The cloning of its gene will open new horizons of investigation on the molecular mechanism of induction of the ACC synthase activity during fruit ripening. Furthermore, it is of great agronomical interest to be able to control the fruit ripening and to delay overripening for the climacteric fruits. This article reviews the recent progress on the cloning of ACC synthase mRNA and the application of antisense RNA technology to inhibit fruit ripening. The new development raises the prospect that fruit spoilage can be prevented.

討 論

許圳塗：(一)ACC 基因族群在這邊看起來是不是只有兩個COPY或有可能更多？

(二)ACC 若是誘引基因，在整個研究過程裡是否對其Regulatory Sequence有進一步探討。假如是Regulation的話，這些enhancer或 promotor 應該非常重要。

黃鵬林：(一)本研究材料可分離出兩個基因，番茄可分離到至少五個基因。

(二)目前對 ACC基因之調節順序尚未有進一步的分析資料，只知道每一個基因的啓動子(Promoter)皆不一樣。

