

紅檜 Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase 基因之選殖及其轉基因菸草木質素分析

林彥良¹ 王升陽² 曲芳華³

(收件日期：民國 97 年 2 月 25 日、接受日期：民國 97 年 7 月 27 日)

【摘要】木質素為植物細胞壁內含量僅次於纖維素之生物聚合物，而甲基轉移酵素（*O*-methyltransferase, OMT）在其生成反應中扮演了相當重要的角色。本研究於紅檜試材中，選殖出 526 個鹼基對之 Caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase (*CCoAOMT*) 片段基因序列，再經由 5' 和 3' RACE (Rapid Amplify of cDNA End) 及 Genome walking，共獲得計有 1721 個鹼基對，包含啟動子及基因全長，命名為 *CfCCoAOMT*。其中，蛋白質轉譯區有 750 個鹼基對，可產生具有 249 個胺基酸之蛋白質。利用北方雜合分析結果發現，*CCoAOMT* 以發育中木質部的表現量最高。續將 *CfCCoAOMT* 基因轉入大腸桿菌大量表現其重組蛋白，並製作成多株抗體以進行免疫雜合反應。由於木本植物與草本植物具有不盡相同的木質素生成機制，在轉基因的試驗當中發現木質素生成的總量於正義股 *CfCCoAOMT* 的轉植株中並無太大改變，而反義股的轉植株中有些微升高的趨勢；然而無論正義股或反義股的菸草轉植株，在木質素單體 G/S 的比值上皆有明顯增加的趨勢。

【關鍵詞】紅檜、G/S 比率、木質素、甲基轉移酵素、轉基因菸草

MOLECULAR CLONING OF CAFFEOYL-COA 3-O-METHYLTRANSFERASE GENE FROM *CHAMAECYPARIS FORMOSENSIS* AND ITS EFFECTS ON LIGNIN CONTENT IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS

Yan-Liang Lin¹ Sheng-Yang Wang² Fang-Hua Chu³

(Received: February 25, 2008; Accepted: July 27, 2008)

¹ 國立台灣大學森林環境暨資源學系碩士。

Master, School of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University.

² 國立中興大學森林學系副教授。

Associate Professor, School of Forestry, National Chung Hsing University.

³ 國立台灣大學森林環境暨資源學系助理教授，通訊作者。

Assistant Professor, School of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University, Corresponding Author, No.1, Sec. 4, Roosevelt Road, 106 Taipei, Taiwan.

【Abstract】 Lignin is the second abundant biopolymer and less than cellulose present in the plant cell wall. *O*-Methyltransferase (OMT) plays as a key enzyme for stepwise biosynthesis of lignin. In this study, 526 base pair DNA fragment of OMT were obtained from *Chamaecyparis formosensis*. Then the 5' and 3' RACE (Rapid Amplify of cDNA End) coupled with the Genome walking were used to clone the full length of *CCoAOMT*, named *CfCCoAOMT*. After combining the sequence data, there is a total of 1721 bps in full length including promoter sequence. The coding region of this DNA fragment was 750 bps, which encodes a protein of 249 amino acids. Moreover, the developing xylem from *C. formosensis* has the most abundance expression pattern by Northern blotting analysis. The *CfCCoAOMT* was constructed into the *E. coli* to produce a *CfCCoAOMT* recombinant protein and then the polyclonal antibody was prepared. Finally, the *CfCCoAOMT*'s coding region of *C. formosensis* was transformed into tobacco, a type of herbaceous plant, by using *Agrobacterium*-mediated transgenic method. Due to the biosynthesis pathways of lignin in woody plant and herbaceous plant are quite different, there is no significant difference in the total lignin content in sense transgenic tobacco, but in antisense transgenic line had slightly increased. On the other hand, the G/S ratio increased dramatically in both transgenic lines.

【Key words】 *Chamaecyparis formosensis*, G/S ratio, Lignin, *O*-methyltransferase, Transgenic tobacco

I、前言

木質素 Lignin (來自拉丁文中的 *lignum*, 為木材的意思) 是地球上含量第二豐富的天然高分子化合物, 僅次於纖維素 (Cellulose)。木質素約佔木材乾重的 20% ~ 30%, 可見木質素在生態圈中所扮演的角色是十分重要的。木質素歸屬於植物的二次代謝物, 與能量的代謝、遺傳訊息的傳遞無關, 但是在植物的支持組織和部分的運輸組織中, 木質素的填充對於細胞的次級生長卻有不可或缺的功能, 也能對外界病原菌之入侵達到抵禦的作用 (Baucher *et al.*, 1998; Dixon, 2001; Hu *et al.*, 1999; Vance *et al.*, 1980)。因此, 對於木質素的研究也從一開始只單純研究其化學性質, 而慢慢轉為研究其細胞層級的生理代謝與分子生物學層級之基因調控 (Raven *et al.*, 1999)。

木質素主要由三種木質醇類單體

(Monolignol) 聚合而成, 即對—香豆醇 (*p*-Coumaryl alcohol)、針葉醇 (Coniferyl alcohol)、芥子醇 (Sinapyl alcohol), 經過聚合而形成三度空間之網狀巨分子化合物, 此三種化合物之最大的差別在於苯環上所帶有之甲氧基 (Methoxyl group) 數量與鍵結位置。此外, 木質素又可以依不同的組成單元命名為: *p*-Hydroxyphenyl lignin (H lignin)、Guaiacyl lignin (G lignin)、Syringyl lignin (S lignin), 隨著物種、組織、細胞型態、細胞壁組成與生活環境的不同, 上述三種化合物的相對含量也不盡相同, 但是可以概括性的歸納出: 裸子植物以 G lignin 為主要構成, 而被子植物為 G+S lignin, 草本植物多 H+G+S lignin (Borejan *et al.*, 2003; Sederoff *et al.*, 1999)。近 20 年來, 在經過許多研究團隊的努力下, 對於木質素生合成路徑, 特別是在木質素單體的生合成方面上, 已可瞭解其大致的輪廓 (Chen *et al.*, 2006; Li *et al.*,

2003; Zhang and Chiang, 1997; Chiang, 2002, 2006)。其中，甲氧基轉移酵素 (*O*-methyltransferase, OMT) 扮演了相當重要的角色 (Ho *et al.*, 2002)。由 OMT 基因所生成的酵素，主要的功能為對苯基化合物進行甲基 (methyl group) 的轉移，而在木質素生成途徑中，主要存在著兩種的 OMT，即 Caffeic acid *O*-methyltransferase (以下簡稱為 *COMT*)，與 Caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase (以下簡稱為 *CCoAOMT*)，而針對不同的催化對象則有不同的特定酵素，如 *CCoAOMT* 可將 caffeoyl CoA 催化生成 feruloyl CoA 或是將 5-hydroxyferuloyl CoA 催化生成 sinapoyl CoA (Burlat *et al.*, 2001; Humphreys and Chapple, 2002)。

紅檜 (*Chamaecyparis formosensis*) 是第一個被以福爾摩沙之拉丁文為命名之植物，並曾被樹木學巨擘金平亮三譽為東亞第一大針葉樹 (郭寶章, 1995)。截至目前為止，臺灣林業研究人員已針對臺灣紅檜之相關主題，包括：分佈、生育地、造林撫育、組織培養、木材性質與利用等，累積了相當豐碩的成果。另外，有些學者利用分子標記的策略來研究紅檜之種源、遺傳變異及分子親源關係等問題 (黃麗虹等, 2000; Hwang *et al.*, 2001)，但就紅檜木材形成及木質素之生成機制等問題，迄今尚未有研究論及。為探討紅檜木質素合成的反應，本研究首先進行紅檜 *CCoAOMT* 基因之鈎取，並分析其序列、蛋白質表現與轉基因研究，以探討 *CCoAOMT* 在紅檜所扮演之角色與在模式植物—菸草中的表現狀況。

II、材料與方法

(I) 試驗材料

本試驗所採用的材料為 12 年株齡之紅檜，採自國立台灣大學實驗林溪頭營林區，將取樣的材料最外部已經死亡剝落的表皮刮除，再依形成層為界向外收取發育中韌皮部，向內刮取發育中木質部，剪成小塊，並隨即以液態氮凍之，最後儲存於 -80°C 冰箱備用。

(II) 樹皮總量 RNA 抽取與反轉錄反應

將儲存於 -80°C 之材料取出，並在液態氮中磨成細粉狀後，依照 Chang *et al.* (1993) 的方法萃取樹皮中的 total RNA。利用 SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 反轉錄酵素合成單股的 cDNA，再利用 Ex Taq (TaKaRa) 進行 Polymerase chain reaction (PCR) 反應，合成雙股之 dsDNA，作為後續實驗之材料。

(III) *CCoAOMT* 基因全長序列之鈎取

1. 專一性序列之鈎取

由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 基因資料庫中收集多種已發表之草本和木本植物的 *CCoAOMT* 序列，並依具有高保守性的序列設計一對引子，分別命名為：

CCoMT-F : 5'-CA(G/A)AG(T/C)GATGC
(T/C)CT(C/T)TA(T/C)CA(G/A)-3'
CCoMT-R : 5'-GG(A/C/T)GC(C/A)ACCAC
(A/G)GA(T/G)CC(A/G)TTCCA-3'

利用此對引子配合核酸增幅器，用先前反應所合成的 dsDNA 做為材料，進行 PCR，

反應條件為 94°C 1 min, (94°C 30 s, X °C 30 s, 72°C 1 min, X 隨著實驗不同進行調整) 進行 35 個循環後, 72°C 反應 7 min, 最後保持在 4°C 結束 PCR 程序。PCR 反應產物經過 1.2% 的洋菜膠電泳, 進行初步之分離, 並建構至 pGEM-T Easy (Promega) 載體上, 轉入 High Efficiency DH5 α Competent cell (GeneMark) 中, 利用含有 Ampicillin、IPTG 及 X-Gal 的 LB 固態培養基來進行篩選, 並抽取的質體提供 ABI 377 自動定序儀 (Perkin Elmer) 依照 T7 或是 SP6 primer 為起始點進行基因定序, 得到序列資料。

2. CCoAOMT 基因之 5' 端與 3' 端序列之鈞取

利用先前實驗所得之保守性序列, 設計針對序列 5' 端與 3' 端兩個方向進行 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 與 Genome Walking 所需之引子, 並依照 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 與 BD GenomeWalker™ Universal Kit 之步驟, 經過 PCR 反應增幅出特定之序列片段, 並選殖到 pGEM-T easy 質體中, 定序後得到序列資料。

(IV) 南方雜合分析

將 15 μ g 之基因體核酸分別利用 *Hind*III、*Eco*RI、*Dra*I 進行限制酵素切割, 利用洋菜膠體進行電泳, 並利用毛細轉印法將核酸轉印固定至尼龍膜上, 利用先前實驗所得之基因全長, 依照 DIG labeling kit (Roche) 合成一段探針, 提供後續雜合反應; 具有專一性反應之探針可被 Anti-DIG-AP 抗體 (Roche) 所辨識, 進而與 CDP-Star, ready-to-use (Roche) 產生反

應並顯影於底片 (Kodak BioMax MR film) 上。

(V) 北方雜合分析

將 15 μ g 之不同部位 total RNA 進行變性洋菜膠體電泳, 隨後利用毛細轉印法將 RNA 轉印固定至尼龍膜上, 利用先前實驗所得到之基因全長, 依照 DIG labeling kit (Roche) 在蛋白質轉譯區中合成一段探針, 提供後續雜合反應; 具有專一性反應之探針可被 Anti-DIG-AP 抗體 (Roche) 所辨識, 進而與 CDP-Star, ready-to-use (Roche) 產生反應並顯影於底片 (Kodak BioMax MR film) 上。

(VI) 重組蛋白質表現、純化、多株抗體之製作與免疫雜合反應

選用 pET-20b(+) (Novagene) 作為蛋白質表現之載體, 並依照紅檜 *CCoAOMT* 基因序列資料, 將可轉錄出胺基酸之序列建構至 pET-20b(+) 中, 再轉入蛋白質表現宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 並依照廠商之建議進行 IPTG 誘導生成重組蛋白。

經過誘導之菌體, 利用超音波裝置 (TOMY) 破菌, 待菌液明顯呈澄清狀後, 利用冷凍離心機以 8,000 x g 將可溶性蛋白與不可溶性蛋白 (Inclusion body) 分開, 隨即將可溶性蛋白通以 His-select Nickel Affinity Resin (SIGMA), 並參照廠商之建議進行純化具有 His-tag 的重組蛋白, 將 3 mg 之純化 *CCoAOMT* 溶於 1X PBS buffer 委託濁水溪生物技術公司進行兔子之多株抗體製作。

根據 Laemmli (1970) 的方法, 用 Bio-Rad Mini-PROTAN 裝置, 製備 0.75

mm, 12%之 Discontinuous polyacrylamide gel 以進行 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, 結束後利用全濕式電轉印槽, 將蛋白轉印至 PVDF 膜上, 利用 Anti-CCoAOMT 做為一次抗體, AP-conjugated Anti-rabbit antibody 作為二次抗體, 進行免疫雜合分析, 最後利用 BCIP/NBT (SIGMA) 溶液呈色。

(VII) 菸草基因轉殖

依紅檜之 CCoAOMT 基因可轉錄出胺基酸序列 (ORF) 之頭尾設計兩對引子, 分別提供正義股 (sense) 以及反義股 (antisense) 轉殖載體之建構。將正義股與反義股之 PCR 產物建構至 pHANNINBAL (Wesley *et al.*, 2001) 質體上, 利用 *NotI* 限制酵素可將帶有 35S promoter 之正義股與反義股片段剪下, 剪下之片段再接合至 pART27 (Gleave, 1992) 上, 將成功接合之質體轉型入農桿菌 LBA4404 中以供後續感染菸草進行基因轉殖。

菸草轉殖使用的材料是 *Nicotiana tabacum* cv. W38 並依照 Horsch 等人 (1985) 發表之實驗方法, 切取約 1 cm 見方之菸草葉片, 利用解剖刀在葉片上製造些許傷口, 隨後以農桿菌液感染菸草葉片, 將葉片放置在含有抗生素之 TSM 培養基 (MS with vitamin + 0.1 mg/L NAA + 1 mg/L BA + 3% sucrose + 1% phyto-agar, pH5.7) 中, 成功轉基因者可以抵抗抗生素之篩選, 並自刻畫傷口處長出芽體, 待芽體可分離之時, 移至新的抗生素培養基中重複篩選, 最後移至 TRM 培養基 (TSM 不含 BA) 中, 可正常生長並發根重新生成一個新的植株即為轉植株, 正常發根之植株可移植至一

般培養土中, 在溫室中持續生長以提供後續實驗使用。

(VIII) 木質素的測定

將生長於溫室之兩個月株齡之菸草植株取成熟葉片抽取基因體核酸, 隨後去除葉片留下莖的部份, 距地上部 10 cm 之後收取約 10 cm 之菸草的莖部進行木質素之測定, 初步剪碎莖部組織後以高速磨碎機打成碎片, 隨後將組織碎片加入甲醇, 置於超音波振盪 10 min, 重複 3 次, 直到上層液體成無色狀, 再將打碎之組織再次放置於 105°C 烘箱除水, 將打碎之組織利用震盪磨粉機磨成細粉狀, 以 Klason 法 (黃彥三等, 2001) 定量木質素含量, 並利用 Pyrolysis GC-MS 法 (Camarero *et al.*, 1999) 分析 G/S 單體比例。

Pyrolysis GC-MS 分析條件如下, 取乾重 0.2 mg 之細粉放入 Pyrolysis GC-MS (Agilent) 中, 測定條件設定為: Pyrolysis 熱降解使用 PY-2020 D, 溫度為 550°C, GC 為 6890N, 質譜儀為 5973N MSD 並以 70 eV 測定, 分離管係使用 DB5 (30 m × 250 μm × 0.30 μm)。溫度條件的設定為: 起始溫度 50°C 保持 2 min, 以 4°C/min 上升到 275°C。注射孔溫度 270°C, 氣體使用氦氣, 分流比 20:1, 流速: 20 mL/min。於化合物鑑定方面則使用 Wiley (V 7.0) Nist mass spectrometer library (V 2.0) 及標準品 (SIGMA)。

III、結果

(I) 紅檜 CCoAOMT 基因序列之選殖

本文成功地整合選殖所得到之所有序

列片段，獲得紅檜 *CCoAOMT* mRNA 之全長序列，共計 1103 個鹼基對（圖 1）

(GenBank accession number: DQ305976)，其中包含 5' 端和 3' 端非轉譯序列各 79 與 274 個鹼基對，可轉譯蛋白序列共計 750 個鹼基對，並可轉譯出具有 249 個胺基酸之蛋白質，經由蛋白質資料庫 (ExPasy、Motif Scan) 之預測，胺基酸序列中第 78 至 193 個胺基酸為 SAM-binding motif，此蛋白質功能區塊的主要目的在與 SAM (S-adenosyl-L-methionine) 做結合，並提供甲基轉移酶進行催化時所需的 Methyl group 之來源 (Ferrer *et al.*, 2005)。整合 Genome Walking 之結果，可得到基因之啟動子序列共 588 個鹼基對，此部分之序列經由資料庫 (Plant cis-acting regulatory DNA elements) 比對分析，發現 promoter 可能具有之功能節錄如表 1，包括熱休克、GA 調控、重金屬反應、光反應、水逆境、病原菌入侵、創傷與防禦機制等等相關之可能之區塊。

(II) *CfCCoAOMT* 基因在紅檜中的拷貝數

為增加南方雜合分析之專一性，探針之製備選用 C 端蛋白質轉譯區與一段 3' 端非轉譯區 (3'UTR)，進行探針製備，雜合結果顯示：依照 *HindIII*、*EcoRI* 與 *DraI* 之實驗結果所出現帶狀數目可以代表 *CCoAOMT* 基因在基因體核酸中所具有之拷貝數 (copy number)，由圖 2 之結果，可以觀察到經由三種限制酵素所處理過後的核酸，經過探針之雜合反應出現之條帶都為 2 條，顯示 *CfCCoAOMT* 基因在紅檜的基因體核酸中可能具有 2 個拷貝數。

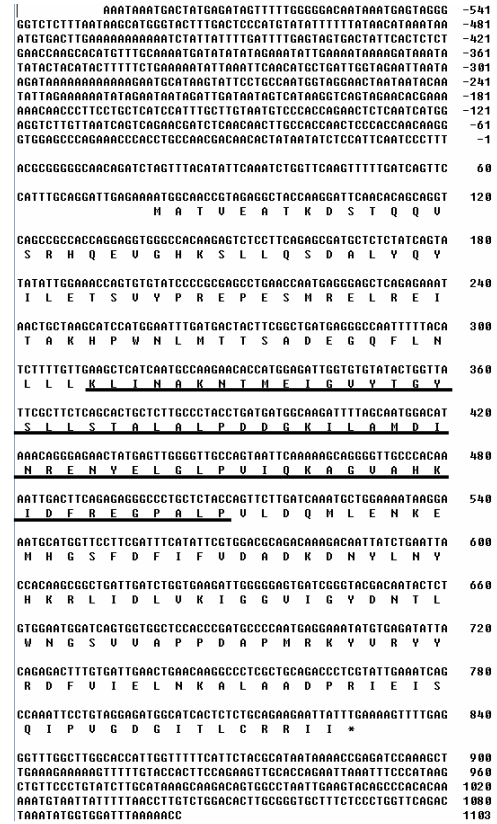


圖 1 *CCoAOMT* 之基因與蛋白質轉譯區示意圖，底線區域推測為 SAM-binding motif

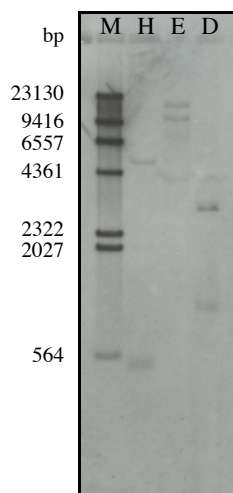
Fig. 1 DNA sequence of *CCoAOMT* and the coding sequence of *CCoAOMT*. Underline indicates SAM-binding motif

(III) *CfCCoAOMT* 基因在紅檜不同組織之表現

利用北方雜合分析，針對 12 年生之紅檜的發育中木質部、發育中韌皮部、葉子、側枝、1 年生葉子、1 年生根部進行 *CfCCoAOMT* 基因表現量差異之觀察，結果如圖 3，其中以發育中木質部的表現量最高，側枝次之，發育中韌皮部最弱而葉子與根部則幾乎沒有表現。

表 1 *CCoAOMT* 之 promoter 由 PLACE 所推測具有之功能區塊Table 1 Functions of *CCoAOMT* gene's promoter region predicted by PLACE analysis

Box	Position (bp)	Description
CCAAT	-264	Heat shock element
CAREOSREP	-78	Gibberellin regulate
CURECORECR	-520	Copper response element
GAREAT	-116	Gibberellin response element
GT1CONSENSUS	-184,-212,-235,-299,-341, -368,-378,-471	Light-regulated
GT1GMSCAM4	-184,-235,-341,-471	Pathogen and salt induced
MYBPZM	-260	MYB-related element
MYCONSENSUSAT	-44,-159,-412	Water stress
WBOXPCWRKY1	-516	Early defense
WBOXHVIS01	-436,-477,-541,-581	Defense system
WBOXNTERF3	-436,-477,-541,-581	Wounding response



M : DIG-labeled marker (bp)、H、E、D 分別為 *Hind*III、*Eco*RI、*Dra*I 限制酵素處理過之紅檜基因體核酸。

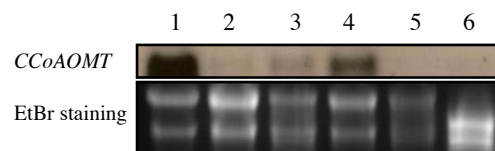
圖 2 利用南方式雜合法分析 *CCoAOMT* 在紅檜基因體核酸之存在情況

Fig. 2 Southern analysis of *CCoAOMT* in *C. formosensis*'s genomic DNA

(IV) 轉殖 *CfCCoAOMT* 基因在菸草中的表現

1. 轉基因菸草實驗

轉基因菸草依照實驗設計，共選殖出



使用 15 ug 之總量 RNA 進行後續實驗，Lane 1 為收集於十二年生之發育中木質部，Lane 2 為十二年生之發育中韌皮部，Lane 3 為十二年生之葉片，Lane 4 為十二年生之側枝，Lane 5 為一年生紅檜之葉片，Lane 6 為一年生之紅檜的根部組織。

圖 3 利用北方雜合法分析紅檜不同部位之 *CCoAOMT* 表現程度

Fig. 3 Northern analysis of different tissues in *C. formosensis*

正義股序列轉殖株 10 個品系 (line)、反義股序列轉殖株 8 個品系、和單獨轉入空質體之對照組 (pART27) 與野生型之植株，種植於溫室中以供實驗使用。

2. 轉殖菸草中 *CfCCoAOMT* 基因之表現

利用北方雜合法分析觀察轉入菸草植株 *CCoAOMT* 基因之表現程度，結果示於圖 4，其中正義股的轉殖株中，除 s5 轉殖株表現的 RNA 有些許的降解情況外，其他

的轉殖株都經由 35S 啟動子的驅動而達到大量表現之狀況 (圖 4a)；在反義股的轉殖株中，除 an1、an2、an9 的表現較為低落，其他的 5 個轉殖株皆有較多的表現 (圖 4b)。免疫雜合分析之結果如圖 5，在蛋白質的表現程度上，正義股轉殖株與北方雜合分析皆可偵測到表現，而反義股轉殖株並未測得 *CjCCoAOMT* 表現之蛋白質。

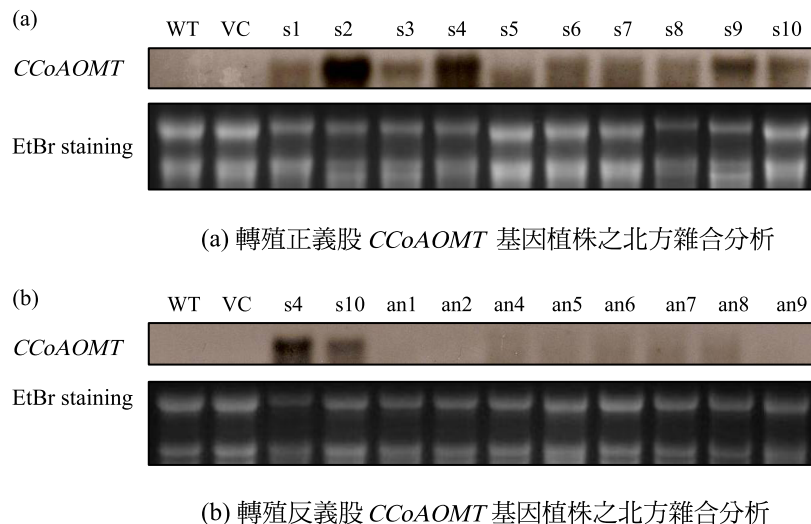
3. 轉殖菸草中木質素合成

轉殖菸草之木質素合成狀況，從正義股轉殖株中選取 5 個品系，從反義股轉殖株中選取 4 個品系。利用 Klason's lignin method 來測定總量木質素，結果如表 2，野生型 (WT) 與空質體對照組 (VC) 的木質素含量約為乾重之 8.5%，在正義股轉殖株中除了 s1 品系的木質素含量大大的低於其他品系外，其他品系的木質素含量皆為 8~9% 左右，與野生型之木質素含量並無

顯著的差異；在反義股的轉殖株中，除 an2 較低，其他三個品系皆為 10% 左右，和野生型的 8.5% 相比，木質素含量提升約佔原本總重之五分之一。利用 Pyrolysis GC-MS 來測定 G lignin 與 S lignin 的含量比例，結果整理如表 3，所列出之多種木質素單元的值分別代表 G lignin 與 S lignin 的含量，將圖形資料加以積分並計算出相對面積後可以得到 G/S 的比值。野生型與空質體對照組的比值約為 1.1，正義股的轉殖株中除了 s2 轉殖株的 G/S 比值較其他轉殖株為低外，s1、s3 與 s4 的比值皆高於 1.3，s6 的比值更高達 1.5，an1、an2 與 an5 的比值都高於 1.3。

IV、討論

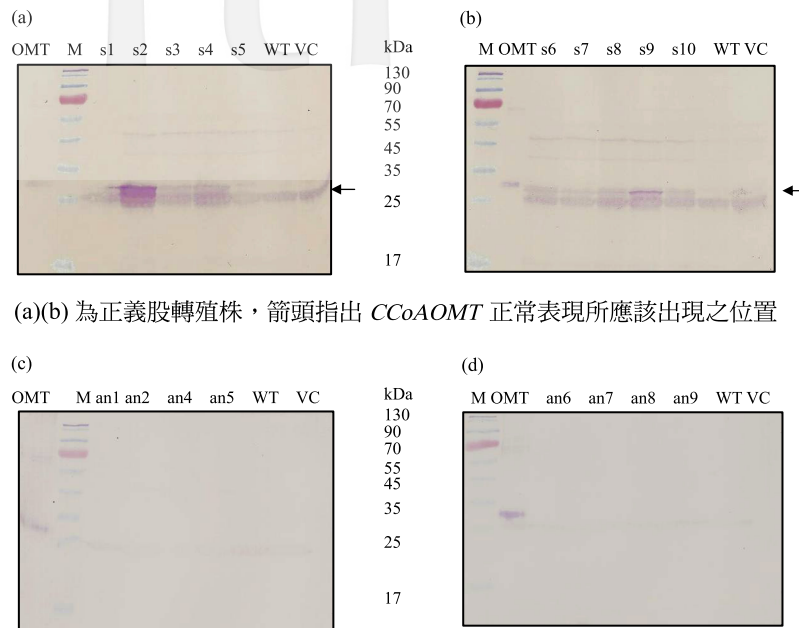
本研究從基因資料庫選取已知物種的 *CCoAOMT* 基因資料，加以比對分析，選



WT：野生型、VC：空質體對照組、s1-s10：正義股轉殖株、an1-an9：反義股轉殖株

圖 4 利用北方雜合法觀察轉殖菸草之 *CCoAOMT* 的表現

Fig. 4 Northern analysis of *CCoAOMT* gene expression pattern in transgenic tobacco plants



(a)(b) 為正義股轉殖株，箭頭指出 *CCoAOMT* 正常表現所應該出現之位置

(c)(d) 為反義股轉殖株

OMT：由大腸桿菌表現並經過純化之蛋白、M：protein marker (kDa)、WT：野生型、VC：空質體對照組、s1-s10：正義股轉殖株、an1-an9：反義股轉殖株

圖 5 轉基因菸草之 *CCoAOMT* 蛋白質免疫雜合分析

Fig. 5 Western analysis of *CCoAOMT* in transgenic tobacco plants

表 2 利用 Klason's lignin method 所得到之各轉殖株的木質素含量

Table 2 Klason lignin content of transgenic tobacco plants

Transgenic line	Klason lignin content
WT	8.56% ± 1.98
VC	9.02% ± 0.37
s1	6.25% ± 0.28
s2	9.45% ± 3.2
s3	8.43% ± 2.6
s4	9.06% ± 0.45
s6	9.34% ± 0.32
an1	10.81% ± 0.05
an2	9.49% ± 0.29
an4	10.43% ± 3.55
an5	10.58% ± 1.12

WT：野生型、VC：空質體對照組、s1~s6：正義股之轉殖株、an1~an5：反義股之轉殖株。

取一段在 DNA 序列與胺基酸序列皆具有高保守性的區塊，設計出一組簡併性引子對 (Degenerate primer)，此對引子成功地在紅檜鈎取出 *CCoAOMT* 的保守性序列。由 Genome Walking 所得到之 Promoter 的序列經由資料庫 (Plant cis-acting regulatory DNA elements) 之分析結果推測，*CCoAOMT* 基因調控可能與 GA 有關 (Sutoh and Yamauchi, 2003)；另外，在鹽類逆境或是外界物理傷害都有可能會調控 *CCoAOMT* 基因之表現。Tamagnone 等人 (1998) 年針對 MYB Transcription factor 進行轉殖菸草的實驗，發現此 Transcription factor 可影響整體苯基丙烷合成途徑 (Phenylpropanoid pathway)，並造成木質

表 3 Pyrolysis GC-MS peak 所對應之化合物名稱及面積
Table 3 Compound names and related area show in pyrolysis GC-MS

Peaks	Compounds	Lines												
		WT	VC	s1	s2	s3	s4	s6	an1	an2	an4	an5		
G1	Guaiacol	3734889	2429829	4004010	4888436	3923367	3405669	1717834	6576285	3235677	5586681	9698051		
G2	4-Methylguaiacol	1441578	749188	1673523	1168382	907688	1020365	658526	1655287	1013501	1371244	2709393		
G3	4-Vinylguaiacol	3980226	2940180	4608480	5483732	4261083	4808354	2314748	7366548	4148187	6034305	14225544		
G4	Eugenol	1590441	576768	1119513	3153154	1203929	1395615	66338	2229068	718671	570680	4064441		
G5	Vanillin	1059984	840567	1728027	998373	583126	915776	737483	1326932	911571	471652	3156767		
G6	t-Isocugenol	2026682	1268778	2253932	2057308	1891244	1968987	982339	3061593	1822106	3339476	4877243		
G7	t-Conferyl alcohol	6320000	4481241	9569352	7536167	1472710	6550104	3634920	12782585	7198212	978390	20754487		
G lignin total area		20153800	10107534	24956837	25285552	14243147	20064870	10112188	34998298	19047925	18352428	59485926		
S1	Syringol	4513609	2595457	4279810	6220125	3611789	4186845	1658455	6687205	3593357	4565444	10161102		
S2	4-Methylsyringol	1267508	607181	1226146	1422602	852503	998618	520789	1813071	940948	1232137	3453131		
S3	4-Vinylsyringol	4917291	3074267	5688423	6675702	3767827	4223966	2231830	7864631	4152114	5503200	12649975		
S4	4-Allylsyringol	619638	288025	541101	752341	453496	466207	2032236	905336	411976	865900	1681116		
S5	Syringaldehyde	1356928	477016	1056173	396540	310944	670270	347737	1216209	624493	334259	2100930		
S6	t-4-Propenylsyringol	2097304	1133461	2005216	2609434	1703798	1813534	847479	3076434	1618713	2475786	4935975		
S7	t-Sinapyl alcohol	2262778	1057736	3130471	4087962	2111	2029668	834926	4835961	2196039	74058	7430523		
S lignin total area		17035056	9233143	17927340	22164706	10702468	14389108	6644452	26398847	13537640	15050784	42412752		
G/S		1.183	1.094	1.392	1.141	1.331	1.394	1.522	1.326	1.407	1.219	1.402		

素生合成之差異與造成植物生長上之改變與木質素生合成途徑息息相關。另外，Kawaoka 等人 (2000) 也發現一個與調控苯基丙烷生合成途徑相關的 LIM-related transcription factor，其在轉基因菸草的研究中也改變了木質素的生成狀況。而 *CCoAOMT* 除包含於苯基丙烷生合成途徑主要生成木質素之外，也和其他的二次代謝物之生成密切相關；Yang 等人 (2004) 也發現 *CCoAOMT* 包含於植物抗菌素 (Phytoalexin) 的生合成途徑中，其他尚有 Gibberellin response element、Wounding response、Light-regulated 與 Pathogen and salt induced 等推測性的 promoter 區塊存在，在鹽類逆境與外界物理傷害下皆有可能會調控木質素之生合成。在說明植物之整體二次代謝物的生合成乃形成一個複雜之網絡 (Metabolic grid) 且息息相關 (Dixon, 2001)。

經由南方雜合分析可以瞭解 *CCoAOMT* 基因在紅檜染色體的存在狀況，由三種限制酵素所處理過後之基因體核酸，經過 DIG-labeled probe 進行雜合反應，結果推測紅檜染色體中的 *CCoAOMT* 為兩個拷貝數，在 Loblolly pine (*Pinus taeda*) 的染色體中為一個拷貝 (Li *et al.*, 1999)，但在同屬的 Scot pine (*Pinus sylvestris*) 中卻高達十二個拷貝數，並推測 *CCoAOMT* 有 Gene family 的存在 (Chiron *et al.*, 2000)。同樣在染色體中出現五個拷貝數且推測具有 Gene family 的還包括百日草 (Ye *et al.*, 1994)。然而，基因的拷貝數多寡並不能絕對代表基因的表現量，必須考慮生長發育之情況與不同組織之專一

性。

利用北方雜合分析法比較紅檜不同部位及不同樹齡之 *CCoAOMT* 的表現程度，結果發現 *CCoAOMT* 以發育中木質部表現最高，這是由於發育中的木質部需新生許多次生細胞壁，因此該部位之 *CCoAOMT* 有較高的表現量，側枝表現量次之，同樣的結果亦在 Loblolly pine 的研究中發現 (Li *et al.*, 1999)。至於紅檜針葉的表現則是以 12 年生大於 1 年，表現量最弱的則是發育中的韌皮部。Inoue 的研究指出 (Inoue *et al.*, 1998)，Zinnia 的韌皮部也有 *CCoAOMT* 的表現，且根部表現量相較於莖部呈現稍弱的情況，又或許是因為根部組織所含的酚化物較多，抽取 RNA 不易，也易造成 RNA 的降解，導致雜合效率變差。

過去數十年，以農桿菌 (*Agrobacterium* sp.) 為媒介所進行的基因轉殖實驗，藉以探討基因特性之研究抑或是改良作物之利用方式，已成為分生實驗室的基本技術。在木質素的生合成途徑上，草本植物 (菸草) 所偏好產生的為 H+G+S lignin，這和裸子植物所偏好產生的為 G lignin 不同 (Atanassova *et al.*, 1995; Borejan *et al.*, 2003; Sederoff *et al.*, 1999)，本研究將紅檜之 *CCoAOMT* 轉入菸草植物中，並利用 CaMV 35S promoter 驅動下游基因加以大量表現 *CCoAOMT*，理論上，大量酵素的催化下 *CCoAOMT* 之下游產物勢必會增加，進而在 G/S 比值上會比原先的野生型菸草來得高，一如預期的結果，正義股轉殖株之 G/S 比值都較野生型來得高。然而，*CCoAOMT* 在木質素生合成所催化的是第一階段甲基轉移，仍有可能因為下游

產物或是催化酵素的作用而進行第二次的甲基轉移，如此一來合成路徑走向生成部分的 S lignin (Humphreys and Chapple, 2002)，因此在 s2 的轉植株中雖然蛋白質具有較高的表現量，但是 G/S 比值卻和野生型一般。另外，基因轉殖實驗中利用轉入與目標基因反向之序列，亦即利用產生反義股之 mRNA 藉以降低或抑制原本基因之表現量的策略中，本研究轉入紅檜之反義股的 *CCoAOMT*，理論上若能成功抑制原本就存在於菸草內之 *CCoAOMT* 的表現則應當會獲得 G/S 比值降低的結果，然而在本試驗的反義股轉植株中 G/S 比值皆比野生型來得高，推測可能由於紅檜與菸草 (GenBank accession number: U62735) 之 *CCoAOMT* 基因的相似度只有 76%，並無法順利達到抑制的效果；另外一方面也有可能是因為轉入的反義股確實達到抑制的效用，但是木質素之生成途徑是錯綜而複雜的，抑制了 *CCoAOMT* 之活性，但是卻間接調控了其他酵素之活性使得 G lignin 的合成路徑由原本的路徑改變為 *COMT* → 4CL → CCR → CAD，而產生 G lignin (Humphreys and Chapple, 2002)。利用轉入 antisense 的策略以降低 *CCoAOMT* 之活性，在菸草中會造成 G 與 S lignin 的降低，但是 G/S 比值卻無明顯的變動，同時因為轉基因影響整體之生長狀況 (Pincon *et al.*, 2001)，同樣的實驗設計在苜蓿的轉基因實驗中則會使得 G lignin 大幅降低 (Guo *et al.*, 2001)。在紅檜的 *CCoAOMT* 轉基因於菸草實驗中，木質素的總量變化並沒有顯著的改變；在草本或木本植物中，抑制 *COMT* 酵素活性以降低木質素生成之總量，對後續 S lignin 之生成具有大量抑制的結

果，但是對於整體之木質素含量卻沒有明顯的改變 (Atanassova *et al.*, 1995; Doorselaere *et al.*, 1995)，若是要降低整體植物的木質素總量，從木質素生成途徑經 Phenylpropanoid pathway 的第一個酵素 PAL 與 C4H 作為調控的標的物，可以收取較高的成效 (Sewalt *et al.*, 1997)。

V、結論

本研究成功選殖到紅檜之 *CCoAOMT* 全長基因，其中蛋白質轉譯區共 750 個鹼基對，可成功轉譯出具有 249 個胺基酸之蛋白質。利用大腸桿菌表現重組蛋白，並藉此重組蛋白成功製作出多株抗體。進一步分析結果得知 *CCoAOMT* 在紅檜植株中表現狀況以發育中之木質部最為旺盛。利用農桿菌轉殖的策略，本研究成功地將 *CCoAOMT* 基因轉殖入菸草中，並在正義股處理與反義股轉植株中得到 G/S lignin 比值升高之結果。木質素為植物細胞壁中之主要成分之一，瞭解木質素的生成途徑，可增加對木質素生成的認識，更可經由瞭解生成途徑來對木質素的生成加以修飾並控制。雖然木質素的生成途徑已逐漸被釐清，但對於木質素的生成途徑，也由於不同的酵素、化合物和分析技術不斷被提出、改良而持續的被修正，可見對於整體的合成途徑仍有很多不確定的部分。此外，不少的研究常利用轉基因的方式加以改變或調控木質素之生成。研究也指出木質素之生成會受到生長環境、細胞型態甚至是不同的細胞壁組成而有不同的組成與含量，究竟是如何對木質素生成那麼龐大且複雜的生成系統進行調控，卻

是鮮少瞭解的，瞭解如何調控木質素之合成也是未來發展值得探討的一個領域。本研究首次自柏科樹種中，選殖出於木質素合成過程中極為重要的酵素 Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase，柏科樹種多為重要且珍貴之經濟樹種，相信本研究所得之成果，對未來研究本科林木之木材形成及木質素之合成，有重要之參考價值。

VI、致謝

本文承蒙行政院國家科學委員會提供研究經費 (NSC 94-2313-B-005-071)，台灣大學實驗林管理處提供實驗材料以及林業試驗所何振隆先生和中興大學森林學系蘇裕昌主任協助 Pyrolysis-GC/MS 分析；在此致上十二萬分的謝意。

VII、引用文獻

郭寶章 (1995) 臺灣貴重針葉五木。中華林學會叢書 956 號。510 pp.

黃麗虹、黃士穎、林讚標 (2000) 紅檜與台灣扁柏的葉綠體 DNA 遺傳變異及族群分化。台灣林業科學 15: 229-23。

黃彥三、陳欣欣、王升陽、張上鎮 (2001) 樹木生長應力之研究(II): 柳杉材化學成分與生長應力之關係。中華林學季刊 34(1): 101-109。

Atanassova, R., N. Favet, F. Martz, B. Chabbert, M-T Tollier, B. Monties, B. Fritig, and M. Legrand (1995) Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing *O*-methyltransferase sequences

in sense and antisense orientation. The Plant Journal 8: 465-477.

Baucher, M., B. Monties, M. V. Montagu, and W. Boerjan (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. Critical Reviews in Plant Sciences 17: 125-197.

Boerjan, W., J. Ralph, and M. Baucher (2003) Lignin biosynthesis. Annual Review of Plant Biology 54: 519-546.

Burlat, V., M. Kwon, L. B. Davin, and N. G. Lewis (2001) Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. Phytochemistry 57: 883-897.

Camarero, S., P. Bocchini, G. C. Galletti, and A. T. Martínez (1999) Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry analysis of phenolic and etherified units in natural and industrial lignins. Rapid Communications in Mass Spectrometry 13: 630-636.

Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney (1993) A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter 11: 113-116.

Chiang, V. L. (2002) From rags to riches. Nature Biotechnology 20: 557-558.

Chiang, V. L. (2006) Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. Environmental Chemistry Letters 4: 143-146.

Chiron, H., A. Drouet, A-C. Claudot, C. Eckerskorn, M. Trost, W. Heller, D. Ernst, and H. Sandermann Jr (2000) Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional *O*-methyltransferase with pinosylvin me-

- thyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Molecular Biology* 44: 733-745.
- Chen Z. Z., Y. C. Chen, Y. H. Chou, and Y. Lin (2006) cDNA cloning and molecular characterization of 4-coumarate: coenzyme A ligase in *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan Journal of Forest Science* 21: 87-100.
- Dixon, R. A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Doorselaere, J. V., M. Baucher, E. Chognot, B. Chabbert, M-T Tollier, M. Petit-Conil, J. C. Leple, G. Pilate, D. Cornu, and B. Monties (1995) A novel lignin in poplar tree with a reduced caffeic acid/ferulic acid *O*-methyltransferase activity. *The Plant Journal* 8: 855-864.
- Ferrer, J. L., C. Zubieta, R. A. Dixon and J. P. Noel (2005) Crystal structures of Alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase. *Plant Physiology* 137: 1009-1017.
- Gleave, A. P (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organizational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into plant genome. *Plant Molecular Biology* 20: 1203-1207.
- Guo, D., F. Chen, K. Inoue, J. W. Blount, and R. A. Dixon (2001) Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *The Plant Cell* 13: 73-88.
- Ho, C. K., Y. C. Chen, and Z. Z. Chen (2002) cDNA Cloning and sequence analysis of 5-hydroxyconiferaldehyde *O*-methyltransferase from *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan Journal of Forest Science* 17: 429-38.
- Horsch, R. B., J. E. Fry, N. L. Hoffman, D. Eichholtz, S. G. Rogers, and R. T. Fraley (1985) A simple method of transferring genes into plants. *Science* 277: 1229-1231.
- Hu, W. J., S. A. Harding, J. Lung, J. L. Popko, J. Ralph, D. D. Stokke, C. J. Tsai, and V. L. Chiang (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology* 17: 808-812.
- Humphreys, J. M., and C. Chapple (2002) Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 224-229.
- Hwang, S. Y, H. W. Lin, Y. S. Kuo, and T. P. Lin (2001) RAPD variation in relation to population differentiation of *Chamaecyparis formosensis* and *Chamaecyparis taiwanensis*. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 42: 173-179.
- Inoue, K., V. J. H. Sewalt, G. M. Balance, W. Ni, C. Stürzer, and R. A. Dixon (1998) Developmental expression and substrate specificities of Alfalfa caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiology* 117: 761-770.
- Kawaoka, S., W. Laosinchai, T. Itoh, X. Cui,

- C. R. Linder, and R. M. Brown Jr. (2000) Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *The Plant Journal* 22: 289-301.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li, L., Y. Osakabe, C. P. Joshi, and V. L. Chiang (1999) Secondary xylem-specific expression of caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase plays an important role in the methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Plant Molecular Biology* 40: 555-565.
- Li L., Y. Zhou, X. Cheng, J. Sun, J. M. Marita, J. Ralph, and V. L. Chiang (2003) Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene co-transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 4939-4944.
- Pincon, G., S. Maury, L. Hoffmann, P. Geoffroy, C. Lapierre, B. Pollet, and M. Legend (2001) Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* 57: 1167-1176.
- Raven, P. H., R. F. Evert, and S. E. Eichhorn (1999) *Biology of Plants*. Sixth edition. W.H. Freeman and Company/Worth Publishers. 554-670.
- Sederoff, R. R., J. J. MacKay, J. Ralph, and R. D. Hatfield (1999) Unexpected variation in lignin. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 145-152.
- Sewalt, V. J. H., W. Ni, J. W. Blount, H. G. Jung, P. A. Howles, S. A. Masoud, S. A. Lamb, and R. A. Dixon (1997) Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulation in expression of phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology* 115: 41-50.
- Sutoh, K., and D. Yamauchi (2003) Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. *Plant Journal* 34: 635-645.
- Tamagnone, L., A. Merida, A. Parr, S. Mackey, F. A. Culianex-Macia, K. Roberts, and C. Martin (1998) The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *The Plant Cell* 10: 135-154.
- Vanes, C. P., T. K. Kirk, and R. T. Sherwood (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18: 259-288.
- Wesley, S. V., C. A. Helliwell, N. A. Smith, M. Wang, D. T. Rouse, O. Liu, P. S. Goodling, S. P. Singh, D. Abbott, P. A. Stoutjesdijk, S. P. Robinson, A. P. Gleave, A. G. Green, and P. M. Waterhouse (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27: 581-590.
- Ye, Z. H., R. E. Kneusel, U. Matern and J. E.

Varner (1994) An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *The Plant Cell* 6: 1427-1439.

Zhang X. H., and V. L. Chiang (1997) Molecular cloning of 4-coumarate: coen-

zyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood. *Plant Physiology* 113: 65-74.