

鄰位－甲基轉化酉每的基因表現與木質素合成之關係

The relationship between *O*-methyltransferase gene expression  
and lignin biosynthesis

施意敏\*、廖成康\*\*、盧虎生\*\*\*、朱鈞\*\*\*

Shy Yih-Min\*、Liao Cherng-Kang\*\*、Lur Huu-Sheng\*\*\*、Chu Chun\*\*\*

關鍵詞：木質素；牧草；基因轉殖

Key words：Lignin；Forage；Gene transfer

### 緒言

木質素是由酚類化合物聚合而成的大型聚合物，是地球上第二大量的有機化合物，其重要性僅次於纖維素。主要分佈在植物的維管束組織，使陸生維管束植物得以維持細胞壁的機械強度、水分的運送及保護植物免於被微生物分解。但在生資能源的利用上仍有一些負面影響。例如造紙工業上紙漿的純化，需將包裹在纖維素外圍的木質素藉化學方法去除，以獲得較純淨的纖維素及較高的造紙品質。木質素的去除，一方面增加化學物質及能源的投入，另一方面也造成環境的污染，所以在造紙工業上希望能利用木質素含量較低的木本植物以節約成本。在農業畜牧生產上，由於反芻動物的瘤胃微生物能有效分解植物細胞壁，因此反芻動物生長所需的能量來源，主要依賴禾本科牧草提供的纖維，其中含木質素的植物組織幾乎無法被瘤胃微生物分解

---

\* 台灣省畜產試驗所新竹分所助理研究員

\*\* 國立嘉義技術學院農藝系副教授

\*\*\* 國立台灣大學農藝學系教授

(Akin, 1989)。一旦以化學藥劑處理破壞木質素(Cameron *et al.*, 1991; Kerley *et al.*, 1988)，或育成木質素含量較低的突變種(Barriere *et al.*, 1994; Fritz *et al.*, 1990)，皆可明顯促進纖維消化率及牛隻採食量。因此如何利用基因工程改變木質素合成途徑，達到降低木質素含量或改變木質素的組成分，以符合經濟需求，是目前較為重要的研究課題。

本文主要針對木質素合成途徑中，如何藉由基因轉殖技術達到調控 *O*-methyltransferase 基因表現的目的，及其應用在牧草生產上的可行性做一說明，期對將來利用生物技術改善本省牧草品質之研究有所助益。

#### (一)木質素合成途徑

木質素主要由 *p*-coumaryl alcohol、coniferyl alcohol 及 sinapyl alcohol 互相聚合而成的大型聚合物，此三種醇類形成的途徑如圖一所示，首先由 L-phenylalanine 形成 *p*-coumaric acid、ferulic acid 及 sinapic acid，再分別經 4-coumarate:CoA ligase (4CL)、cinnamoyl-CoA reductase (CCR)、cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)，將酚酸還原為醇類方進行聚合。Ferulic acid 及 sinapic acid 則分別來自 *p*-coumaric acid 苯環上 3 及 3,5 的位置進行甲基化，主要參與甲基化的酵素為 *O*-methyltransferase (OMT)(Campbell and Sederoff, 1996; Whetten and Sederoff, 1995)。在被子植物，其 OMT 具雙重功能稱 bio-OMT，可以分別將 caffeic acid 及 5-hydroxyferulic acid 甲基化，但裸子植物的 OMT 則只能以 caffeic acid 為受質，不能將 5-hydroxyferulic acid 甲基化形成 sinapic acid，有別於被子植物(Higuchi, 1990)。另一個甲基化途徑則是 caffeic acid 加入 CoA 形成 caffeoyl-CoA 後，藉由

caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase (CCoA-OMT) 形成 feruloyl-CoA，或由 5-hydroxyferuloyl-CoA 經 CCoA-OMT 形成 sinapoyl-CoA (Ye *et al.*, 1994)。

由於 sinapic acid 苯環上 C3 及 C5 的位置被甲基取代，因此僅剩 C4 的位置有活性可與其它分子結合，相對的 *p*-coumaric acid 在 C3 及 C5 的位置並未甲基化，因此在 C3、C4 及 C5 的位置皆能與其它醇類共價結合。就分子結合的穩定性而言，*p*-coumaric acid > ferulic acid > sinapic acid (Whetten and Sederoff, 1995)。由於酚酸甲基化的程度，往往影響木質素的結構及其被分解的容易度，因此欲改善木質素的結構組成，*O*-methyltransferase 則是最先需考慮的酵素。

## (二)木質素的酚酸組成對牧草品質之影響

一般而言，隨成熟期增加 *p*-coumaric acid 與 ferulic acid 的比例逐漸增加 (Burritt *et al.*, 1984; Fritz *et al.*, 1990; Grabber *et al.*, 1991)。*p*-coumaric acid 以成熟組織的含量較高，而 ferulic acid 則以未成熟組織的含量較高；豆科牧草的 *p*-coumaric acid 及 ferulic acid 濃度則較禾本科牧草低 (Buxton and Russell, 1988)。由於 *p*-coumaric acid 的消化速率較 ferulic acid 低，且不消化的比率佔 50% 以上 (Bourquin and Fahey, 1994)，因此當牧草組織的 *p*-coumaric acid 含量較多時，通常會降低消化率 (Jung, 1989)。

自然界中的玉米、高粱、蘇丹草若帶有 brown midrib (*bmr*) 基因，很容易由幼苗期，其葉片中肋的部分為紅棕色的表現型辨別 (Barriere *et al.*, 1994; Fritz *et al.*, 1981)。

*Bmr* 突變種消化率較高的原因，可能與木質素含量低有關，尤其構成木質素的 *p-coummaric acid* 含量較正常種低約 1/2，而 *ferulic acid* 含量並無明顯改變，使得 *ferulic acid* 與 *p-coummaric acid* 比值由正常種的 0.34 增加至 0.75 (Cherney *et al.*, 1986)。*p-coummaric acid* 與 *ferulic acid* 比率的改變可能與消化率的改善有密切關係。另一方面，高粱種子以 *diethyl sulfite* 處理也能誘導 *bmr* 突變種的產生 (Porter *et al.*, 1978)，將帶此突變基因的高粱與正常種雜交後仍能表現高消化率的特性 (Fritz *et al.*, 1981)。表示此突變基因可藉由傳統育種方式保留，並傳衍至後代。

### (三) 基因轉殖技術應用在木質素合成途徑的研究

雖然由 *bmr* 突變種與正常種比較，得知牧草消化率的改善可能與 *p-coummaric acid* 及 *ferulic acid* 濃度上的改變有關，其合成木質素的相關酵素在 *bmr* 突變種的表現是否與正常種相同？關於此點，以傳統分離酵素蛋白質的研究方式很難一探究竟，隨著生物技術的進步已在玉米 *bmr* 突變種的研究上有很大的進展。Vignols *et al.*, (1995) 取正常種 OMT 基因的 *intro* 部分，以 PCR (polymerase chain reaction) 將核酸倍增後，分別加上 5'端 (XS1) 或 3'端 (SS1) 當作探針，並以 *bm3-1* cDNA 上 B5 element 的 LTR (long terminal repeat) 當作對照用的探針，分別與突變種 *bm1*、*bm2* 及 *bm3* 的 RNA 雜交，其結果如圖 2B 所示，以 XS1 當探針時，正常種、*bm1* 與 *bm2* 皆有 OMT mRNA 的合成，但 *bm3* 無此段 OMT mRNA 的合成，若以 SS1 當探針則與正常種、

*bm1* 及 *bm2* 雜交的程度較低，表示 5'端的基因序列與 OMT 基因的表現較 3'端重要，對照組部分(LTR)仍可針測到 *bm3* cDNA 中 B5 element 的 mRNA 合成。由於 OMT 基因的表現以根部最活絡，因此以 XS1 當探針，分別與突變種與正常種根部萃取的 RNA 雜交，結果仍無法測得突變種 OMT mRNA 的表現(圖 2 C)，表示突變種的 OMT mRNA 並未合成。由上述的結果推測，*bm3* 突變種可能因 OMT 基因 5'端約~600 核酸的缺失而造成木質素合成受阻。

Dwivedi *et al.*, (1994)將白楊木(*aspen*)OMT 基因的 antisense 序列，加上 CMV 35S 的 enhancer、promoter 及 terminator (圖 3)，藉由 *Agrobacterium tumifaciens* 轉殖至煙草，對煙草植株的外型並無明顯的影響，經 Southern 跟 Northern 的分析，證明 antisense OMT 基因有轉殖至煙草(圖 5)，分析木質素酸類的組合由 vanillin 及 vanillic acid (V content)的變化可了解 guaiacyl type 的結合量，即由 ferulic acid 衍生而來的變化量；由 syringaldehyde 及 syringic acid (S content)可了解由 sinapic acid 衍生而來的化合物。由於 OMT 酵素主要使 5-hydroxyferulic acid 甲基化形成 sinapic acid，由 S/V 的比值可了解，轉殖植物 OMT 酵素活性被改變的程度。由表一的結果得知，antisense 轉殖植物(A1~A4)的 S content 皆比對照組低(C1~C2)，尤其 A3 的 S:V 值明顯較對照組(C1 及 C2)低，表示在 ferulic acid 甲基化的過程中，OMT 基因的表現被抑制，因此使 syringaldehyde 及 syringic acid 的含量較對照組低。Atanassova *et al.*, (1995)以葉盤法將 OMT c-DNA 作不同長度的轉殖至煙草，結果只

有將全段 cDNA 進行轉殖才能使性狀傳衍至後代。用 OMT antisense 的轉殖，可有效抑至 5-hydroxyferulic acid 甲基化形成 sinapic acid 的過程，由受質 5-hydroxyferulic acid 累積的情形及 OMT 酵素活性的分析，可了解 antisense mRNA 的應用確實可抑致 OMT 基因的表現，改變了木質素的合成途徑。

#### (四)結語

隨著木質素合成途徑中 PAL、CAD、OTM 等相關基因已陸續被純化，其表現的機制也有深入的探討(Whetten and Sederoff, 1995)。若能藉由基因轉殖技術改變木質素合成途徑的酵素活性，達到降低木質素含量或改變木質素組成分，不論對紙漿的純化或牧草品質的改善，皆有突破性的進展。尤其本省栽培面積最廣的盤固草 (*Digitaria decumbens*)具再生性強、染色體數少、能快速生長等優點，以生物技術改善其品質的可行性相當高。國外應用生物技術改善草皮草(Turfgrass)的研究已有相當時日(Chai and Sticklen, 1998)，唯目前本省有關這方面的研究幾乎闕如，有待投入更多的研究予以開創新格局。

## 參考文獻

1. Akin, D. E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agron. J.* 81:17-25.
2. 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. *Plant J.* 8:465-477.
3. Barriere, Y., O. Argillier, B. Chabbert, M. T. Tollier, and B. Monties. 1994. Breeding silage maize with brown-midrib genes: Feeding value and biochemical characteristics. *Agronom.* 14:11-21.
4. Bourquin, L. D., and G. C. Fahey, Jr. 1994. Ruminant digestion and glycosyl linkage patterns of cell wall components from leaf and stem fractions of alfalfa, orchardgrass, and wheat straw. *J. Anim. Sci.* 72:1362-1374.
5. Burritt, E. A., A. S. Bittner, J. C. Street, and M. J. Anderson. 1984. Correlations of phenolic acids and xylose content of cell wall with in vitro dry matter digestibility of three maturing grasses. *J. Dairy Sci.* 67:1209-1213.
6. Buxton, D. R. and J. R. Russell. 1988. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Sci.* 28:553-558.
7. Cameron, M. G., J. D. Cremin, Jr., G. C. Fahey, Jr., J. H. Clark, L. L. Berger, and N. R. Merchen. 1991. Chemically treated oat hulls in diets for dairy heifers and wethers: effects on intake and digestion. *J. Dairy Sci.* 74:190-210.
8. Campbell, M. M. and R.R Sederoff. 1996. Variation in lignin content and composition, mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol.* 110:3-13.
9. Chai, B. and M. B. Sticklen. 1998. Applications of biotechnology in turfgrass genetic improvement. *Crop Sci.* 38:1320-1338.
10. Cherney, J. H., K. J. Moore, J. J. Volenec, and J. D. Axtell. 1986. Rate and extent of digestion of cell wall components of *brown-midrib* sorghum species. *Crop Sci.* 26:1055-1059.
11. Dwivedi, U.P., W.H. Campbell, J. Yu., R.S.S. Datla, R.C. Bugos, V. L. Chiang, and G. K. Podila. 1994. Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense *O*-methyltransferase gene from *Populus*. *Plant Mol. Bio.* 26:61-71.
12. Florene, V., J. Rigau, M. A. Torres, M. Capellades, and P. Puigdomenech. 1995. The *brown midrib3 (bm3)* mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid *o*-methyltransferase. *Plant Cell* 7:407-416.
13. Fritz, J. O., K. J. Moore, and E. H. Jaster. 1990. Digestion kinetics and cell

wall composition of brown midrib sorghum × sudangrass morphological components. *Crop Sci.* 30:213-219.

14. Fritz, J. O., R. P. Cantrell, V. L. Lechtenberg, J. D. Axtell, and J. M. Hertel. 1981. *Brown midrib* mutants in sudangrass and grain sorghum. *Crop Sci.* 21: 706-709.
15. Grabber, J. H., G. A. Jung, and R. R. Hill, Jr. 1991. Chemical composition of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated from orchardgrass and switchgrass. *Crop Sci.* 31:1058-1065.
16. Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24:23-63.
17. Jung, H. G. 1989. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agron. J.* 81:33-38.
18. Kerley, M. S., K. A. Garleb, G. C. Fahey, Jr., L. L. Berger, K. J. Moore, G. N. Phillips, and J. M. Gould. 1988. Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment of cotton and wheat straw on cellulose crystallinity and on composition and site and extent of disappearance of wheat straw cell wall phenolic and monosaccharides by sheep. *J. Anim. Sci.* 66:3235-3244.
19. Porter, K. S., J. D. Axtell, V. L. Lechtenberg, and V. F. Colenbrander. 1978. Phenotype, fiber composition, and *in vitro* dry matter disappearance of chemically induced brown midrib (*bmr*) mutants of sorghum. *Crop Sci.* 18:205-208.
20. Vignola, F. J. Rigau, M. A. Torres, M. Capellades, and P. Puigdomenech. 1995. The *brown midrib3 (bm3)* mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid *O*-methyltransferase. *Plant Cell* 7:407-416.
21. Whetten, R. and R. Sederoff. 1995. Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7:1001-1013.
22. Ye Z-H, R. E. Kneusel, U. Matern, J. E. Varner. 1994. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell* 6:1427-1439.