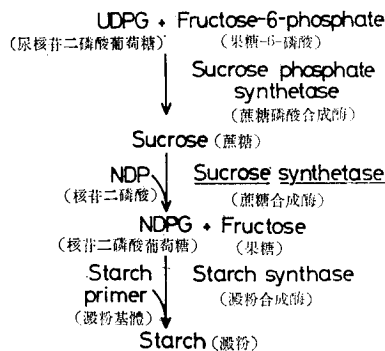


第一章

緒論

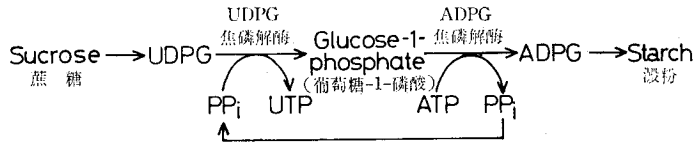
第一節 蔗糖合成酶的生理功能

蔗糖是植物體內主要的能量輸送形式，而澱粉則是最常見的能量貯存形式；蔗糖-澱粉之間的轉換代謝是植物生理上重要的一環〔一般參考文獻 1〕。以下大略表示出蔗糖與澱粉間的轉換途徑及有關的酵素：



其中蔗糖合成酶 (Sucrose synthetase 或 Sucrose synthase, UDP-D-glucose : D-fructose 2- α -glucosyl transferase, EC 2.4.1.13, 略為 SS) 居於關鍵位置。受質之一的核苷二磷酸中以 UDP 對 SS 的 K_m 最低，即 UDP 為最佳反應受質，而 ADP

較差。但在澱粉合成時，澱粉合成酶比較能有效地運用 ADPG 而非 UDPG。因此有人提出 UDPG-ADPG 的轉換途徑⁽²⁾，試圖解決此一困惑：



提出的理由是在生長中的玉米種子，發現下列酵素的量同時增加：(一)蔗糖合成酶，(二)兩種焦磷酸酶，(三)澱粉合成酶。但亦有下列不適當之處⁽³⁾：(一)同時要存在著兩種焦磷酸酶，而其作用方向恰好相反；(二)無機焦磷酸鹽 (PPi) 很容易在組織中水解，故濃度很低，不利此一循環反應。

因此，本實驗室⁽⁴⁾曾以雙標幟蔗糖 (¹⁴C-葡萄糖基，³H-果糖基) 給予生長中植物；另給予自由態 ¹⁴C-葡萄糖及 ³H-果糖 (相等分子比例)，然後追蹤兩種同位素在澱粉中的比例。結果顯示加入 ¹⁴C-葡萄糖與 ³H-果糖的等分子混合物時，兩種單醣被同化為澱粉的比率約略相等，但蔗糖分子中的 ¹⁴C-葡萄糖基被利用合成為澱粉的比率四倍於 ³H-果糖基。這表示在水稻中，蔗糖被 SS 分解成的 UDPG 為合成澱粉的主要來源。另外，若上述 UDPG-ADPG 轉換途徑為正確的話，則給予雙標幟蔗糖的植物中 UDPG, ADPG 及 G-1-P 三者的 ¹⁴C:³H 比例應該相等。結果發現其中 G-1-P 的比例偏低 (0.15)，表示其葡萄糖非來自原來蔗糖中的葡萄糖，而是由其果糖代謝而來。UDPG 及 ADPG 則由原蔗糖的葡萄糖而來，並直接聚合到澱粉中。

不管蔗糖經 SS 分解後代謝成澱粉的途徑為何，SS 在澱粉合成上的角色是相當重要的。尤其 SS 佔成熟中植物澱粉貯藏組織蛋白質的 2~3%，更足顯示出其重要性。

第二節 玉米的蔗糖合成酶研究情形

玉米有一種突變株 *shrunk* (*sh*)，因其種子的澱粉合成量減少而呈萎縮狀；其所含 SS 的活性只及野生株 (*Sh*) 的 2~6%⁽⁵⁾。由此觀察可知蔗糖合成酶的確是植物澱粉合成的關鍵酵素。但 *sh* 株仍有少量的 SS 活性⁽⁶⁾，據報告是原來的 *Sh* 以外的基因所生成者⁽⁷⁾，與 SS 有相同的分子量、四級構造及動力學性質，但在不連續膠體電泳上稍有差異，可以區別出來⁽⁶⁾。以 cDNA 混成技術 (hybridization) 發現此二基因有部分相

似鹽基次序。而 *sh* 株的基因中，其 *Sh* locus 部分或全部被除去⁽⁷⁾。最近則分離得 *Sh* 的 SS-1 及 *sh* 的 SS-2 兩種蔗糖合成酶，二者具有相近但不相同的胺基酸組成，*pI* 亦不同（分別為 5.8 及 5.4），由胜肽圖譜看來，有部分胜肽片段相同，但仍有一些不同的片段⁽⁸⁾。

另外，由於 *sh* 可能是跳動基因 (transposable genetic element, Ds) 所造成的^(9,10)；因此若分離得 *sh* 基因與 *Sh* 基因比較，很可能可以找出跳動基因 Ds⁽¹⁰⁾。因此在分子生物學方面，Starlinger 研究室已抽取得玉米 SS 的 mRNA⁽¹¹⁾，並培植得 cDNA 株⁽¹²⁾，基因庫亦已建立⁽¹³⁾。

由上可知 SS 在玉米方面的研究，已由生化方面進入分子遺傳學層次，這當然歸因於 B. McClintok 數十年來在玉米遺傳方面的貢獻^(14,15)。然而以東方人而言，水稻在農業上的重要性決不亞於玉米之於西方人。鑑於以上所述玉米 SS 研究的蓬勃，加上本研究室這些年來對水稻 SS 的研究心得，我們因此計畫以水稻 SS 為對象，由其生理、生化層次，進入其免疫學、遺傳學與分子生物學領域的研究。首先將對水稻 SS 的純化及生化性質建立一套較完整的資料，並且進行其免疫學方面技術的研究，因為抗體是一種專一性很高而且應用很廣泛的工具。此外，對水稻及玉米兩種不同來源的 SS 進行比較化學上的研究，將是一個有趣的題目。探討二者在分子構造上的異同，對於將來在遺傳學方面的研究，將有莫大助益。

第三節 單株抗體之應用

兩種同功蛋白質因其分子構造及免疫學上有極大相似性，除了利用一些精細的生化方法來鑑別（如胜肽圖譜）⁽¹⁶⁾以外，免疫學技術是相當有力的分析工具。尤其最近十年來發展的細胞融合技術⁽¹⁷⁾，所得單株抗體在鑑別兩種相似抗原構造的異同上，有極大解析力。

傳統抗血清是一羣抗體的混合物，對一個具有多個抗原決定基 (antigenic determinants) 的大分子蛋白質而言，血清中對每一個決定基都有一種或數種抗體可與之結合。每一種抗體均由一個脾細胞株 (B 細胞) 所分泌，亦即一個脾細胞株只產生一種對抗某特定抗原決定基的抗體。若分離出此細胞株加以單獨培養，使之分泌抗體，則可得到只含一種抗體的均質品，即為單株抗體。因為單株抗體只對抗原蛋白質上某專一性決定基有親和性，對抗原上其他決定基則無反應，故可以做為探針 (probe)，摸索分子上各不同決定基構造上的異同。一般抗原決定基的大小，只在數個胺基酸，故其解析力或辨

識分子構造的能力極強。

但事實上單獨的脾細胞株無法在培養基中生長，數代後即死亡。若取可在培養基中生長的骨髓瘤細胞株與脾細胞融合，期使所得融合細胞能兼具分泌特定抗體與在培養基中生長的特性。我們以 NS-1 骨髓瘤細胞株與先經水稻 SS 免疫的 BALB/c 小鼠脾細胞進行融合，產生融合細胞株，取其所產生單株抗體，進行對兩種 SS 構造的檢定。

單株抗體的運用很廣，但目前大多的研究均着重在抗癌或檢驗試劑的製造，在大分子構造的分析方面則較少⁽¹⁸⁻²¹⁾，且均在嚐試階段。我們把單株抗體與胜肽轉印技術⁽²²⁾結合，成爲一個方便而又能深入解析蛋白質構造的工具。

第四節 生物技術 (biotechnology) 與水稻蔗糖合成酶的研究

人類在很早的時候，就已經以生物技術來生產酒類或改良農作物。廣義的生物技術可以定義爲：以人爲的手段或導向，利用動、植物、微生物之本體或其人工變異種，生產得可供人類利用的物質之技術。近十年來，由於基因重組及細胞融合技術被應用於生物機能的改進，使得生物技術更加被重視，並且把範圍縮小到以下數個範疇⁽²³⁾：

- (1) 基因重組技術：在生物的基因中植入一段外來基因，期使能表現之而產生此外來基因所指示之物質。
- (2) 單株抗體技術：如上節所述。
- (3) 蛋白質工程：改變蛋白質（如酵素）的若干胺基酸，以期得到具更高活性的**超級蛋白質或酵素** (Superior protein 或 enzyme)；或可將傳統酵素經固定化改善其穩定性或使其具重覆使用能力。
- (4) 農業應用：利用組織培養、細胞融合或基因重組的方法進行植物的品種改良，以期能得到高產率、抗病力強或能在不利條件下生長的新品種。
- (5) 微生物工程：篩選微生物具有高產率或能生產特殊代謝物的變異株，亦可以基因重組達到此目的。

以上除了(3)以外，有一個共通點，即均以改變生物的遺傳形質來達成改良之目的，其所改變遺傳形質的表現產物包括蛋白質（酵素、荷爾蒙，其他具有生物機能的蛋白質，如干擾素、抗體等），二次代謝物（抗生素、生物鹼等），及有機化合物（乙醇等）。

由上述可知生物技術影響的範圍廣大，其在學術研究及工業應用上的衝擊自不待言。就其將來的發展趨勢而言，一般咸以**基礎植物科學**爲優先⁽²⁴⁾。因此本實驗室在考慮進入現代生物技術研究之時，水稻的蔗糖合成酶很自然地被我們選爲研究對象。其原因

散見上述各節，再綜合條舉如下：

(1) 水稻是東方人的主食作物，供給澱粉為人體主要能量來源。未來的能源及糧食危機仍深深地威脅著人類，尤其在第三世界的國家中更是嚴重。

(2) 水稻澱粉的生合成確與蔗糖合成酶有密切的關係，經由對 SS 的研究，可以針對水稻澱粉的合成與蓄積加以改良。

(3) 本實驗室已對各種植物的蔗糖合成酶有相當的研究經驗^(3,4,25,26,30)，以此為基礎進入生物技術方面的領域較為適當。

(4) 玉米的蔗糖合成酶在歐美已被採為進行植物遺傳工程的研究對象，可供做為比對的參考。

因此，以水稻蔗糖合成酶為目標酵素，我們所提出的研究構想如下(暫分為五期)：

〔第一期〕 最基礎的生化及免疫學研究，儘量收集有關 SS 的資料與免疫學工具，旨在奠定基礎。包括：

(1) 詳細研究水稻 SS 的生物化學性質，並重新檢討其純化條件。

(2) 進行水稻 SS 的免疫學研究，取得其專一性抗體，這對後來的研究是一項重要的工具。

〔第二期〕 以生化及免疫學手法進行與玉米 SS 的比較。

(3) 比較水稻與玉米 SS 的生化學性質。

(4) 建立細胞融合技術，製備抗水稻 SS 的單株抗體，以期能詳細比較兩種 SS 在分子構造上的異同。

〔第三期〕 初步分子生物學的研究，目的在羣株化 (cloning) 得到水稻 SS 的基因及 cDNA⁽²⁷⁾。

(5) 水稻 mRNA 的分離純化，建立 cDNA 庫，以抗體篩出表現有 SS 的大腸菌變異株，抽取 SS 的 cDNA⁽²⁸⁾。

(6) 建立水稻的基因庫，以上述 SS 的 cDNA 為探針，挑出含有水稻 SS 基因的變異株，抽取 SS 基因。

(7) 對上述水稻 SS 基因及 cDNA 進行核酸定序及 R-looping 檢定。

〔第四期〕 水稻的作物遺傳方面調查，找出有澱粉合成缺陷的突變種，或其他特殊遺傳形質，以供做為標誌形質 (marker)。本期工作當與農藝學專家合作。

〔第五期〕 進行上述變異種之分子遺傳學層次分析，比較其基因之異同，確定其缺陷發生的層次是在基因或蛋白質。若確定為基因的缺陷，則以此為模型系統進行基因改良工作⁽²⁹⁾。

第五節 本論文的研究報告範圍

上節所列出的五期研究工作當然不可能在數年內完成。在本論文進行的四年工作當中，第一年進行水稻 SS 的純化與生化性質檢定，第二年開始進行細胞融合的準備工作，並同時進行一般免疫學方面的工作。第三年得到單株抗體，並在最後一年以所得抗體配合最近發展出來的的生化技術，來檢定水稻與玉米 SS 構造上的異同。因此本論文的報告範圍包括上述第一、二期的工作。

在第三、四年裏，我們也開始進行第三期的工作，部分已達成的工作有：

- (1)質體 (plasmid) DNA 的抽取與純化，及其植入大腸菌中。
- (2)DNA 之約制酶 (restriction enzyme) 水解及其與外來 DNA 之連結 (ligation)。
- (3)水稻 SS mRNA 的抽取與純化。
- (4)水稻細胞原生質體的製備。
- (5)水稻染色體 DNA 的抽取。

以上工作因未完全達到第三期的目標，故不列入本論文中。以下各章將敘述第一、二期工作所獲得結果並討論之；有關的實驗方法，均詳細說明各操作步驟，以致文字繁浩，乃別立新章於後，冀期能對其他實驗工作者提供參考。