

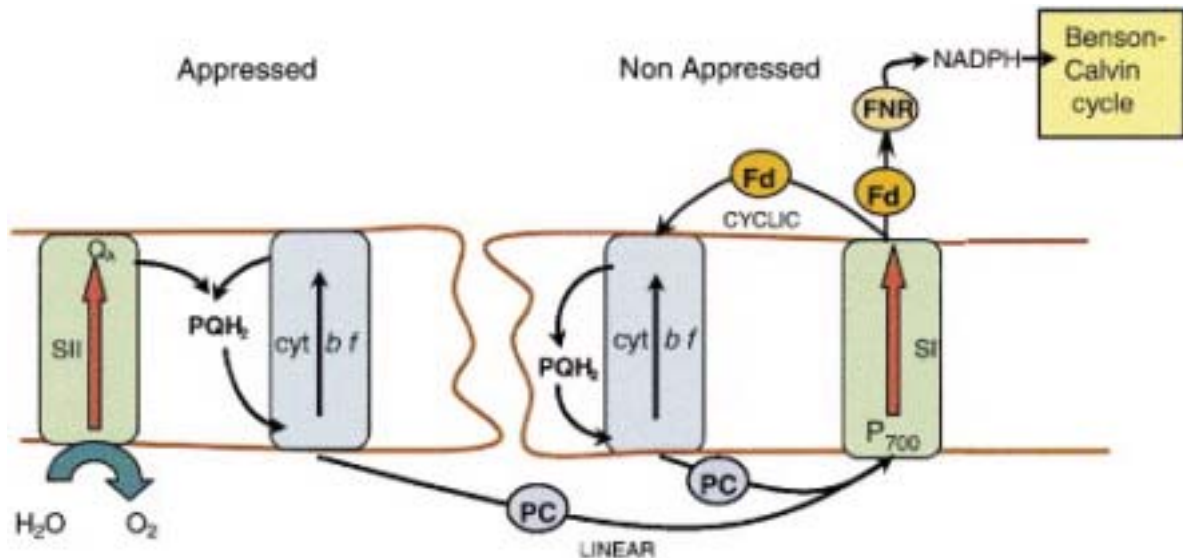
知識天地

光合作用電子傳遞蛋白 (Ferredoxin, Fd) 對植物健康的影響

黃祥恩、馮騰永 (植物暨微生物學研究所博士後研究人員、研究員)

植物受到病原菌感染時，會有許多早期的生理代謝機能出現障礙，例如光合作用 (photosynthesis) 電子傳遞效率下降；二氧化碳 (CO₂) 固定效率變差；糖類代謝路徑 (glycolytic pathway) 被五碳糖代謝路徑 (pentose phosphate pathway) 取代；光呼吸作用 (photorespiration) 上升等，如果這些早期的生理代謝障礙不被排除，很可能會因此引發許多相關的病症，包括植株生長變慢、葉片黃化、發育不良等，甚至會造成植物對一般弱病原性或腐生性微生物的抵抗力弱化。在這裡我們要介紹一個與植物生理代謝息息相關的光合作用電子傳遞蛋白 (Ferredoxin, Fd)，該蛋白質參與了植物最主要能量來源—光合作用的核心反應，同時也是許多基礎生理代謝作用的主要輔酶 (coenzyme)，在我們的研究中發現，Fd 不但參與了植物的基礎生理代謝反應，同時也肩負起對抗病原細菌入侵的抗病機制。進一步透過基因轉殖的技術，可以讓我們改變植物 Fd 含量，藉此增強植物的體質，改善植物抵抗病原細菌的入侵。

Fd 是一個具有硫鐵官能基的蛋白質 (可以是 2Fe-2S、3Fe-3S 或 4Fe-4S)，它普遍存在於大部份的生物。植物的 Fd 具有許多的同功異構酶，以阿拉伯芥為例，有數種以上的 Fd 同功異構酶已經被發現。其中 Fd-1 具有的還原電位大約在 -350~450 mV 之間，它可以自 Photosystem I (PS1) 蛋白體獲得電子，並將電子交給 Fd:NADP⁺ oxidoreductase，藉此將 NADP 還原成 NADPH 及將 ADP 還原成 ATP，此高能階分子將做為供給暗反應合成碳水化合物所需的能源，這個反應也被稱為直線型電子傳遞鍊 (Linear Electron Flow, LEF)。而其同功異構酶 Fd-2，則通常與 Fd-1 共同存在，也具有類似的還原電位，但是該蛋白質比較傾向將自 PS1 獲得的電子交給 cytochrome b6/f complex，此電子傳遞路徑稱為循環型電子傳遞鍊 (Cyclic Electron Flow, CEF)，Fd-3 則存在於植物的根部，Fd-4 雖然在基因相似度上與 Fd-3 相似，但是 Fd-4 被認為會受 NO 誘導表現。除了光合作用的電子傳遞以外，Fd 以輔酶的角色參與了其他許多重要的植物生理代謝反應，包括脂質的生合成、氨基酸的生合成、澱粉的代謝以及卡爾文循環 (Calvin cycle)。而本研究室更發現分離自甜椒的 Fd-1 蛋白質 PFLP 除了上述基本的生理功能外，也參與了植物抗病的反應。



(Pierre Joliot and Anne Joliot 2006 PNAS)

由於早期的研究發現 Fd-1 與植物光合作用有關，因此 Fd-1 在植物體內含量變化與光照的關係很快就被發現，該研究發現除了 Fd-1 基因表現的調控子 (Promoter) 為光啟動型之外，更大的原因在於該基因的 mRNA 結構無法在黑暗的環境中穩定的存在，此現象可能肇因於其本身 5' 端末轉譯片段 (5'UTR)，或基因本身的結構容易被某些核酸分解酵素結合。除了光照條件外，Fd-1 在植物體內的含量，也被發現與許多環境逆境因子有關，例如重金屬、過氧化氫以及老化。在近來的研究中發現，光合作用的相關蛋白質包括 Fd-1 會受到病原菌感染的影響而有所不同，

但是確切是增加還是減少的影響，目前還是隨著個別實驗所用的植物-病原菌模組有所不同而出現不同的結果。在我們的研究中，煙草與阿拉伯芥被用來當做幾個不同的植物-病原菌模組，用來了解植物處理不同細菌性病原後體內 Fd-1 含量改變的切確情況，其中植物被處理能夠成功感染植物的軟腐細菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 後，其體內之 Fd-1 含量會被明顯減少，但是如果處理不能感染該植物的豆科細菌性斑點病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)，則其體內之 Fd-1 的含量會有明顯增加的情形。此現象在某些阿拉伯芥突變株，例如 *npr1* 或水楊酸 (salicylic acid) 分解酵素轉植株 (*nahG*) 上並無法發生。這個結果顯示，植物體內 Fd-1 含量受病原菌改變的這個反應還是受到水楊酸相關的訊號傳遞相關機制所調控。

植物體內 Fd 含量的多寡與其生長有直接的相關性，馬鈴薯表現 Fd-1 反序列 (expression of anti-sense sequence) 基因可以減低植物體內 Fd 的含量，此時植物的葉片會黃化、葉綠素 a/b 比例下降、光合作用以及固定 CO₂ 的能力也同時下降。在我們的研究中，經由反序列基因表現讓植物體內 Fd-1 基因含量下降至原來的 50%，此時植物會出現生長遲緩的現象，但是如果將其提高到 3 倍左右則植物的生長速度會有增快的情況。這種促進生長的作用在植物的根部最為明顯。

增加植物體內 Fd 含量除能提升植物生長勢外，另一個明顯的影響就是增強該作物對於病原微生物的抗病能力。例如在水稻中提升其 Fd 含量可以增加對於 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 所引起白葉枯病的抗性；在蘭花、彩色海芋、青花菜、煙草、阿拉伯芥等植物可以對抗 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 所引起的軟腐病；在番茄則可提升對抗 *Ralstonia solanacearum* 所引起青枯病的能力。另外經由煙草及阿拉伯芥的研究顯示，增量植物體內 Fd 含量所引發的抗病反應，仍然是經由傳統已被研究很清楚過敏性反應 (Hypersensitive response, HR) 的訊息傳導路徑。利用三種不同的 HR 抑制劑 benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone (z-VAD-fmk)、l-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amido (4-guanidino) butane (E64) 與 Diphenylene iodonium (DPI) 均可以有效的抑制此抗病反應。此抗病反應須要 *npr1* 的參與也會被 SA 分解酵素 *nahG* gene 及所阻斷。另一方面我們也將不同的病原接種於僅含 50%量 Fd-1 之反序列轉基因植株，雖然該反序列轉植株對於 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 與 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 的反應與一般野生型植株並無明顯差異。但是腐生性細菌 *P. fluorescens* 在此反序列轉基因植株上，繁殖速度可以是一般野生型的數十倍以上。這些結果顯示，植物體內 Fd-1 含量的多寡會決定它與微生物之間的關係。除此之外，Fd-1 也可以利用其半胱氨酸 (cysteine residue) 組成的 2Fe-2S 官能基與微生物競爭鐵離子，因此可以在合成培養基中有效地抑制細菌的生長。藉由將 Fd-1 異位增量於植物的細胞質中的表達策略，可以有效的讓植物病原菌因為缺乏鐵離子，而無法感染植物。

目前在農作物基因轉殖工程中一個很大的爭議在於抗抗生素基因 (antibiotics resistance gene) 的使用，許多人擔心大量的使用抗抗生素基因於農作物中，會讓微生物增加許多獲得抗抗生素基因的機會，同時大多數的抗抗生素基因均來自微生物，大量食用這些抗抗生素基因產物，讓許多然擔心會對人體的健康造成重大威脅。因此我們利用 Fd-1 可以對抗細菌性病害的特性發展了一個替代抗抗生素基因的策略。經由蘭花基因轉殖的實際操作，證明了 Fd-1 確實可以成功的用來篩選轉殖植物，其篩選效率並不亞於現在常用之抗抗生素基因例如 neomycin phosphotransferase gene (*npt II*)。

雖然在前面的論述中我們提到了運用 Fd-1 可以改善植物體質，增強植物抗病能力，改良轉殖技術等多項好處，但是在實際操作與運用方面還是有許多有待改進的地方。首先在增量表現 Fd-1 時會有協同抑制 (co-suppression) 的問題。另外在某些轉殖株中，部份植株也會發生組織專一性的協同抑制的現象，例如在我們的番茄轉殖株中，其根系可以成功增量表現 Fd-1，但是其葉部之 Fd-1 含量反而比未轉殖株減少。此現象會讓轉殖番茄僅能對抗根部病原的入侵，卻無法對抗葉部病原。最後 Fd-1 基因的 mRNA 在幼年的植株上的穩定性較一般其它基因低，因此我們可以成功的提高 Fd-1 轉基因成熟植株對於細菌性病害的抗病能力。但是卻無法讓這些轉基因植物的幼苗表現出抗病性。

改善植物體質能夠提升對於微生物免疫力，一直是一個很普遍存在的想法。在這邊我們利用植物光合作用電子傳遞相關蛋白質 Fd-1 作為一個例子，試著說明一個能量提供系統相關的蛋白質如何參與植物的抗病機制，在我們的推測中，首先病原菌要成功入侵植物必須試著去減少光合作用相關蛋白質的量 (1)，因為光合作用中產生的電子為激活態氧分子的重要來源，此分子是植物抗病反應的重要元素。如果植物保護了自己的 Fd-1 相關蛋白質不被病原菌所減少，甚至透過抗病訊號傳遞系統去增加了 Fd-1 相關蛋白質的量，那麼這些 Fd-1 蛋白質就有機會被病原菌活化的 kinase 所磷酸化 (2)，進而去影響植物體內的氧化還原反應 (3)，最後誘導產生過敏性反應，提升植

物對於病原菌的抗性能力 (4)。這個假說提供了一個重要的想法，光合作用相關蛋白質不僅只關係到他的基礎代謝效率，這些因子也同時參與了植物對抗病原細菌的抗病機制。

