

國立臺灣大生命科學院學分子與細胞生物研究所

碩士論文

Graduate Institute of Molecular and Cell Biology  
College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

葉綠體內膜 stop-transfer 訊號之胺基酸組成與

膜間隙蛋白 Tic22 的運送路徑

Amino acid composition of chloroplast inner membrane stop-transfer signals and import pathway of intermembrane-space protein Tic22

莊孟蓉

Meng-Rong Chuang

指導教授：李秀敏 博士

Advisor: Hsou-min Li, Ph.D.

中華民國 108 年 6 月

June, 2019

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書



葉綠體內膜 stop-transfer 訊號之胺基酸組成與  
膜間隙蛋白 Tic22 的運送路徑  
Amino acid composition of chloroplast inner membrane  
stop-transfer signals and import pathway of  
intermembrane-space protein Tic22

本論文係莊孟蓉君（R06B43011）在國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國 108 年 6 月 13 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

林淑玲

（指導教授）

蔡宜芳

涂世隆

王致恒

系主任、所長

（簽名）

## 致謝



三年前踏入分生所當暑期生時，完全沒有想到，會就此進入 N315 葉綠體的世界。在這個祥和的實驗室裡，我的碩班生活，大部分很快樂。剛開始短暫接觸的俊賢學長、柏凱學長、揚宗學長跟 Lulu 學姐，都帶來了很多的歡樂。相處最多的朱朱學姐，絕對是引領我持續留在 N315 的關鍵，從實驗到生活，都照顧我很多。奕霖學長，雖然木訥，但不論是在飯(酒)量、運動或是實驗，都是很強大且有毅力。峻惟學長，不吝分享各種經驗，還有他的兒子，讓我在很多不確定的時候，有盞明燈。瓊云學姊，常常跟我一樣在實驗室留到很晚，不同的是我大多在耍廢，但她很認真；偶爾聊天，聽到曾經同為異鄉遊子的心聲，很有共鳴。麗貞媽媽，真的就像媽媽一樣照顧整個實驗室，很溫暖，也很可愛。當然，李老師集結了這個 N315，作為實驗室中最沒經驗的小孩，在這種環境下學習，是很幸福的。

仍然連絡的朋友們，絕對是強大的精神支柱，當我無聊走路時的聊天，南下相聚的時候，你們都是我一種生活中的逃生口。碩班同學們其實不確定到底熟不熟，因為一直待在中研院，常常孤獨感很重。但每次去學校跑大地遊戲，都會有善良的同學告訴我路怎麼走，借我休息放東西、帶我去吃好吃的，甚至擔心我太晚回去...。二年級，越來越有同病相憐的感覺，哭訴的內容，也很有共鳴。對，我們其實很熟，同學們。

一兩個月一次，跳上高鐵，常常空手回家，只為了當個幸福的女兒賊，帶走好吃的水果零食。面對家人，廢到無可救藥也沒關係，只因為我還是個任性的學生。走到畢業了，就像當完一次兵一樣吧。呼~「拔麻，挖做冰倒轉來啊」

再次謝謝李老師，不是一個慣老闆，給我好多不一樣的生活體驗，還會跟我聊「冰與火之歌」。也讓我沒有畢業即失業，願意讓我待在實驗室，並找尋人生可能的方向。

感謝天，感謝地，感謝蜂蜜檸檬。雖然我正在重感冒，沒有喝蜂蜜檸檬。

## 中文摘要

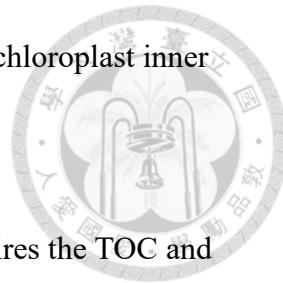
葉綠體具有三個膜系—外膜(outer membrane)、內膜(inner membrane)及類囊膜(thylakoid membrane)，並隔出三個空間，內外膜間隙(intermembrane space)、內膜內部的基質(stroma)與類囊體腔(thylakoid lumen)。蛋白質依據功能不同，會被運送到不同的區域，已知有兩種途徑可將蛋白質送至內膜上，分別是 stop-transfer，及 post-import。先前的研究僅指出，途徑的選擇是由蛋白質的穿膜區域(transmembrane domain, TMD)所決定，但具體上，兩種 TMD 的差異為何尚不明確。遂此，我們選取了 14 個會穿越內膜的蛋白，5 個屬於 stop-transfer，9 屬於 post-import，分析其 TMD 的胺基酸組成，統計後發現在 stop-transfer TMD 中具有較多大的胺基酸，post-import TMD 中則有較多小的胺基酸，故推測胺基酸大小，是一會影響選擇插入內膜途徑的因素。為測試此一假說，選取了以 stop-transfer 插入內膜的蛋白質 TGD2，實驗結果發現將 TGD2 TMD 上的 tryptophan(W)換成 alanine(A) 或是 glycine(G) 後，TGD2 無法完全停在內膜上，將 W 突變成 phenylalanine (F)，則無影響。這些結果支持了我們的假說，TMD 的胺基酸大小，是決定蛋白質送到葉綠體路徑的因素之一。

已知要進入葉綠體內部的蛋白質是透過內外膜上的運輸機組 TOC 與 TIC complexes，而外膜蛋白就只需要 TOC complex，而位在膜間隙的蛋白質 Tic22 是如何進入到葉綠體，是否需要 TOC complex，則至今仍有爭議。在加強了 Tic22 前驅蛋白 (prTic22) 進入到葉綠體的效率後，首先我們透過 time course 及能量的控制，來了解 prTic22 進入葉綠體的最佳條件，再利用 Tic22 與 RBCS 進入葉綠體的競爭，及 prTic22 進入到 translocon complex 缺失的突變株所分離的葉綠體中，來研究 prTic22 進入葉綠體的路徑。在與 RBCS 競爭的實驗中發現 prTic22 會與 prRBCS 競爭，顯示兩者路徑有所重疊。而進行突變株之進入葉綠體實驗時，發現只有在 TOC complex 的突變株(*toc33*、*toc75*)中，觀察到 prTic22 進入葉綠體之效率下降；在 TIC complex 的 *tic20* 突變株中，Tic22 進葉綠體的效率不受影響，甚至 *tic236* 突變株中有上升的情況。這些結果顯示 prTic22 應是透過 TOC complex 穿越外膜，到達膜間隙，無需使用到 TIC complex。

## Abstract

Chloroplasts are composed of three independent membrane systems, including the outer membranes (OM), inner membranes (IM) and thylakoid membranes. These three membranes enclose three soluble areas, the intermembrane space, the stroma and the thylakoid lumen. Proteins need to be delivered to the correct compartment in order to be functional. For membrane proteins insertion into IM, two import pathways have been reported, the “stop-transfer” and the “post-import” pathways. It has been shown that the transmembrane domain (TMD) of each IM protein plays a critical role as the pathway determinant. However what features within TMD endow pathway selection is not known. Analysis of TMDs and surrounding amino acids from nine proteins of the post-import pathway and five proteins of the stop-transfer pathway, we found that there are more large amino acids in TMD of protein using the stop-transfer pathway while smaller amino acids are enriched in the post-import group. Thus, we hypothesize that one of determinants for IM insertion pathway selection is the amino acid size in TMD. We tested our hypothesis using TGD2, a protein using the stop-transfer pathway. After site-directed mutagenesis in TMDs and import assays using isolated pea chloroplasts, we found that TGD2 partly lost its ability to stop at IM after mutating a tryptophan (W) at the N terminus of its TMD into alanine (A) or glycine (G) in TMD, while mutating the W to phenylalanine (F) has no effect. These data

suggest that N terminal amino acid sizes are important for TMD of chloroplast inner membrane proteins to function as a stop-transfer signal.



Protein import into internal compartments of chloroplasts requires the TOC and TIC translocon complexes on the outer and inner membranes. Protein insertion into the OM only needs the TOC complex. Much less is known about how proteins are imported into the intermembrane space. For example, whether the import of Tic22, the best known intermembrane space protein, needs the TOC complex is still in debates. After enhancing the chloroplast import efficiency of Tic22 perprotein (prTic22), I performed import time course and ATP concentration experiments to characterize the import requirement of prTic22. I further performed import competition experiments using prRBCS and prTic22. My result showed that prTic22 import was competed by prRBCS, indicating that their import pathways at least partially overlap. Finally using chloroplasts isolated from translocon complex mutants, I showed that import of prTic22 was decreased in *toc33* and *toc75* mutant chloroplasts, was no changed in *tic20* mutant chloroplasts and was increased in *tic236* mutant chloroplasts. We concluded that prTic22 uses the TOC complex for crossing the OM to arrive at the intermembrane space, and its import does not require the TIC complex.

## 目錄

口試委員審定書 ..... i



致謝 ..... ii

中文摘要 ..... iii

Abstract ..... iv

目錄 ..... vi

前言 ..... 1

材料與方法 ..... 4

1.植物材料 .....	4
2.植物的種植與生長情況 .....	4
3.引子之序列： .....	5
4.小量質體 DNA 抽取 .....	5
5.阿拉伯芥葉綠體抽取 .....	6
6.豌豆葉綠體抽取： .....	7
7.中量質體 DNA 抽取 .....	7
8.活體外轉錄合併轉譯(Coupled in vitro transcription and translation ) .....	8
9.純化包涵體 (inclusion body) 中的重組蛋白質 .....	9
10.活體外前驅蛋白質輸入葉綠體 (in vitro protein import assay).....	10
11.嗜熱菌酶 (Thermolysin) 處理 .....	11
12.強鹼萃取法(alkaline extraction).....	11
13.胰蛋白酶(trypsin)處理 .....	12
14.蛋白質濃度測定 .....	13

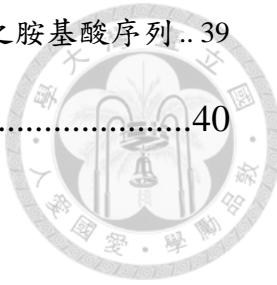
15. 硫酸十二脂聚丙烯醯胺凝膠電泳分析( SDS-PAGE: Sodium Dodecylsulfate-Polyacryamide Gel Electrophoresis) .....	13
16. 西方墨點法 (Western blotting).....	14
17. 凝膠過濾活體外轉錄合併轉譯產物 .....	16
<b>結果.....</b>	<b>17</b>

Stop-transfer 及 post-import 路徑蛋白質之 TMD 氨基酸組成.....	17
Stop-transfer 蛋白質 TGD2 之 TMD 點突變蛋白 .....	17
TGD2 及突變蛋白累積於葉綠體位置的探討 .....	18
prTic22 進入葉綠體所需的時間.....	19
prTic22 進入葉綠體所需的 ATP 濃度 .....	20
prTic22 是否與 prRBCS 使用相似途徑進入葉綠體 .....	21
在 translocon complex 突變株中，prTic22 進入葉綠體之效率.....	21
<b>結論.....</b>	<b>23</b>

<b>圖表.....</b>	<b>26</b>
圖一、葉綠體內膜蛋白插入之路徑示意圖 .....	26
圖二、TMD 氨基酸組成 .....	27
圖三、TGD2 之氨基酸序列及 TMD 點突變 .....	28
圖四、將 prTGD2 及其 TMD 突變之蛋白質輸送至分離葉綠體中 .....	29
圖五、TGD2 及突變蛋白累積於葉綠體可溶區之確認.....	30
圖六、prTic22 進入葉綠體之時間進程 (Time course).....	31
圖七、prTic22 進入葉綠體對於 ATP 之需求.....	32
圖八、prRBCS 與 prTic22 進入葉綠體的競爭 .....	33
圖九、Tic22 進入到葉綠體膜間隙需要 TOC 蛋白 .....	34
圖十、prTic22 進入至膜間隙之示意圖 .....	35
表一、TMD 氨基酸序列 .....	36
表二、使用 post-import pathway 插入內膜及穿越內膜的蛋白質 TMD 與其前後之氨基酸序列 .....	37

表三、使用 stop-transfer pathway 插入內膜之 TMD 與其前後之胺基酸序列.. 39

參考資料.....40



## 前言



葉綠體為植物的一個雙層膜胞器，可以行光合作用，產生養分及合成不同的代謝產物，故於植物之中扮演極為重要的角色。而葉綠體能否正常運作的關鍵之一，在於蛋白質是否正確地進入其中作用。這些蛋白質依據不同的功能會分布在葉綠體的各個部位並發揮其特定功能。而葉綠體構造由內而外分別是外膜(outer membrane, OM)、膜間隙 (intermembrane space, IMS)、內膜 (inner membrane, IM)、基質 (stroma)、類囊體膜 (thylakoid membrane) 及類囊體腔 (thylakoid lumen)。

在葉綠體中大部分的蛋白質都是由細胞核基因轉錄再送至細胞質轉譯合成的，而這些蛋白質的 N 端有一段導引訊息(transit peptide)，這些含有 transit peptide 的蛋白質稱作前驅蛋白(precursor protein)。transit peptide 的功能係將 precursor protein 正確地引導至葉綠體上(Keegstra et al., 1988)，再透過葉綠體外膜及內膜上連接在一起的運輸機組(translocon complex)運送至葉綠體內部。外膜的運輸機組稱為 TOC(translocon at the outer-envelop-membrane of chloroplasts)，內膜部分稱為 TIC(translocon at the inner- envelop-membrane of chloroplasts)(Schnell et al., 1997)，外膜藉由 Toc75 的 POTRA domains 與內膜之 Tic236 連接(Chen et al., 2018)。當外膜 TOC 辨識到 transit peptide 後，precursor protein 會穿過 translocon complex 上的通道 Toc75 與 Tic20 進入葉綠體，到達其所在位置。transit peptide 將被切掉後，precursor protein 變成分子量較小的成熟蛋白(mature protein)。此外在蛋白質從細胞運送到葉綠體內的過程，需要消耗 ATP(Li and Chiu, 2010; Shi and Theg, 2013; Paila et al., 2015)

葉綠體蛋白質被送到葉綠體後，依據其功能不同，將會前往葉綠體不同的部位，但對於葉綠體蛋白進入葉綠體後，如何運送到正確位置，目前研究不多，而對於葉綠體蛋白質如何插入內膜的研究更是稀少。但其實葉綠體內膜上，含有許多重要的蛋白質，如 translocon complex、代謝產物的轉運蛋白

(transporter) 及脂質生合成所需的酵素等，所以研究這些蛋白質如何插入葉綠體內膜，並正常運作是重要的，也就是我論文中的第一個研究部分。

目前已知葉綠體內膜蛋白插入內膜的途徑，主要分為兩種，分別是 stop-transfer 及 post-import 兩種路徑；前者在蛋白質穿過內膜通道時，蛋白質直接停留在內膜上，然後橫向側面移動直接進入內膜。後者則是會整個蛋白質完全通過內膜，進入葉綠體基質，再由葉綠體基質回插至內膜(圖一)。已有研究指出兩種途徑的區別是受到膜蛋白上的穿膜區域 (transmembrane domain, TMD) 所影響(Viana et al., 2010; Froehlich and Keegstra, 2011)，但具體上兩種路徑 TMD 的差別為何，則仍然未知。在我論文的第一部分之中，我首先挑選了十四個膜蛋白其中五個是使用 stop-transfer 路徑進到內膜，九個會完全穿越內膜 針對這些膜蛋白的 TMD 氨基酸組成進行統計後發現，一些比較大的氨基酸，例如 tryptophan、phenylalanine 及 tyrosine，在 stop-transfer 路徑中有較高的比例，故針對了使用 stop-transfer 路徑的蛋白質 TGD2 之 TMD 進行氨基酸大小之重要性的研究。

論文的第二個部分，是針對 Tic22 的運輸路徑做研究。Tic22 是一個在膜間隙的蛋白質，在植物的全株表現量皆差不多。於 1998 年與 Tic20 一起在豆子中被發現(Kouranov et al., 1998)，至今已廿餘年，在阿拉伯芥中有四個同源基因(at1g44446、at3g23710、at4g33350 及 at5g62650)。對於此蛋白質進入到葉綠體內的研究目前皆使用，僅有兩篇論文，分別是由 Tic22 的發現者 Danny J. Schnell 之研究團隊使用豆子的 tic22，在 1999 年所發表(Kouranov et al., 1999)及 Jürgen Soll 實驗室以阿拉伯芥 tic22-4 (at4g33350)進行研究，於 2007 年之發表(Vojta et al., 2007)，兩篇論文結果僅指出一部分 Tic22 相似的特性，但亦有部分結果相左。兩篇論文中提到相似的結果如下：(1) Tic22 的前驅蛋白 (prTic22) 進入葉綠體只需要少量的 ATP，(2) 在極短的時間內，prTic22 就已經進入葉綠體形成 mature Tic22，；兩篇文章中對於 Tic22 進入葉綠體是否需要 translocon

complex 則有所分歧。且兩篇研究中，prTic22 進入葉綠體的效率皆非常低，使得實驗數據的可信度大幅下降。

在我的實驗中，我亦是使用 tic22-4，再置換啟動子加強其進入葉綠體效率後，首先重複確認 prTic22 進入葉綠體需要的時間及能量。再利用 prTic22 與已知使用 translocon 進入葉綠體的蛋白質 prRBCS 進行進入葉綠體的競爭，再使用了幾個 translocon complex mutants，探討 translocon 的缺失，對於 prTic22 進入到葉綠體的影響，以這些實驗來研究 prTic22 進入葉綠體的路徑。

## 材料與方法



### 1. 植物材料

- a. 豌豆(pea, *Pisum sativum* cv Green Arrow)
- b. 阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*): 野生型及突變株，皆為 Col ecotype  
*Columbia* ecotype (Col)。 *mar1* (Windsor et al., 2003; Stanga et al., 2009) , *y3* (Chen et al., 2002) , *127-4* (Gutensohn et al., 2000) 及 *m4*(SAIL 104-F07)

### 2. 植物的種植與生長情況

#### a. 豌豆之種植及生長：

將豌豆種子浸泡於流動清水 8-16 小時後，種植於蛭石中。生長條件為 12 小時光照週期，以日夜恆溫，光照強度為  $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，21°C下生長 7-8 天。

#### b. 阿拉伯芥之消毒與無菌培養

秤取適量種子 (~20mg)，放入 14 mL 養菌管或是 1.5 mL 微量離心管中，加入 95% 酒精浸潤一分鐘後，去除酒精溶液，再加入 25% 高樂氏漂白水 (含 Tween20) 消毒種子 10-15 分鐘。去除漂白水後，以無菌水洗滌種子 3 次，放置於 4°C 黑暗下處理 1-3 天。至無菌操作台中，再以無菌水清洗種子 3-5 次。後以 0.1% soft agar (0.1% Difco agar) 將種子均勻懸浮，並播種於 MS 培養基上 (1× Murashige & Skoog salt mixture 含 Gamborg's B5 Vitamin, 2% sucrose, 0.1% MES 0.3% Gelrite, pH5.8) 上，以透氣膠帶 (Micropore, 3M Health Care, USA) 將培養皿封好，置放於培養箱中。

#### c. 阿拉伯芥生長狀況：

種植於 MS 培養基或種植在以泥炭土、珍珠石及蛭石混合(比例為

10:1:1)的介質中。生長條件為 16 小時光照週期，光照強度  $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，22°C下生長 14-15 天。



### 3. 引子之序列：

#### atTGD2 TMD 點突變之引子序列

引子名稱	DNA 序列 (3'→5')
TGD2-W95A-F1	TTTGGTAAGAGAAGTATCGGGAGGTGGTGGTT
TGD2-W95A-R1	AAACCAACACCACCTTCCCGCATACTCTCTTACCAAAC
TGD2-W116A-F1	TTCTGCTCTTAGCTGGCTGCGTGCAGGTTTCAAATGC
TGD2-W116A-R1	GCATTTGAAAACCTCGCAACGCAGCCCAGCTAAGAGCAAGAA
TGD2-W95G-F2	TTTGGTAAGAGAAGTATTGGGAAGGTGGTGGTT
TGD2-W95G-R2	AAACCAACACCACCTCCCCAATACTCTCTTACCAAAC
TGD2-W95F-F1	TTTGGTAAGAGAAGTATTTGAAGGTGGTGGTTGGTT
TGD2-W95F-R1	AACAAACCAACACCACCTCAAAATACTCTCTTACCAAAC

### 4. 小量質體 DNA 抽取：以 Mini Plus™ Ultrapure Plasmid Extraction System (GE Healthcare, UK)試劑組製備。

取 2-3 mL 的 LB 液態培養基於 14 mL 養菌管中，加入適當抗生素 (50 mg/mL)，並接種菌種，在 37°C 培養箱中震盪培養 14-16 小時。將菌液分裝至 1.5 mL 微量離心管，以  $15,000 \times g$  離心 1 分鐘後倒除上清液，加入 200  $\mu\text{L}$  MX1 試劑將沉澱菌塊打散，再加入 200  $\mu\text{L}$  MX2 試劑，以翻轉方式混合均勻，室溫下靜置 2~5 分鐘後，加入 350  $\mu\text{L}$  MX3 試劑，以翻轉方式混合均勻，再以  $10,000 \times g$  離心 10 分鐘。吸取上清液至 mini column 上，以  $7,000 \times g$  離心 1 分鐘後，倒除濾液，再加入 500  $\mu\text{L}$  WN 試劑到 mini column 上， $7,000 \times g$  離心 1 分鐘，倒除離心下來的液體，再加入 700  $\mu\text{L}$

WS 試劑到 mini column 上， $7,000\times g$  離心 1 分鐘，倒除濾液後，再將 mini column 以  $10,000\times g$  離心 3 分鐘，去除殘留液體。將 mini column tube 裝於新的 1.5 mL 微量離心管，加入  $20 \mu\text{L}$  的無菌水至 mini column 上，於室溫下靜置 3~5 分鐘後，以  $10,000\times g$  離心 3 分鐘，將 DNA 溶液收集於微量離心管中。以超微量分光光度計(NanoDrop Spectrophotometer) A<sub>260/280</sub> 測量 DNA 濃度，保存於-20°C。

5. 阿拉伯芥葉綠體抽取：

a. 建立 50% Percoll 梯度溶液

取 50 mL 離心管，加入 15 mL 的 2× Arabidopsis grinding buffer (2× AGR : 100 mM Hepes-KOH pH8.0, 0.66 M sorbital, 4 mM EDTA, 2% BSA) 及 15 mL 100% Percoll 均勻混合，以  $37,073\times g$ ，於 4°C 下，離心 30 分鐘。此梯度可依物質密度分層，由上至下 Percoll 密度由低至高。

b. 葉綠體之分離：

將生長在 MS 培養基上的 14 天大的阿拉伯芥葉片剪下，置入裝有 1×AGR 的燒杯中。收集葉片，以果汁機打碎後。以雙層 Miracloth ( Calbiochem, Inc., La, Jolla, CA, USA) 去除植物殘渣，收集濾液，並將濾液分裝至數個 50 mL 離心管中。在 4°C 下，以  $3,000\times g$  離心 3 分鐘後，去除上清液，在將沉澱下來的葉綠體，以少許的 1×AGR 打散葉綠體，並將葉綠體懸浮液加至步驟 5-a 的 Percoll 梯度溶液上層，以  $7,700\times g$  離心 10 分鐘 (KUBOTA. Swinging-bucket rotor: RS-200G)。離心後，Percoll 梯度溶液中會有上下兩層綠色條帶，其中上層綠色條帶，為已經破損的葉綠體，下層則為完整的葉綠體。移除上層破損葉綠體後，小心吸取下層完整之葉綠體至含有少許一倍 import buffer ( 1×

IB : 50 mM Hepes-KOH, pH8.0, 0.33 M sorbitol) 的 50 mL 離心管中，再將 1×IB 加至八分滿，以 1500×g 在 4°C 下離心 5 分鐘，以洗去殘存的 Percoll 溶液。去除上清液後，以 20 mL 1×IB 懸浮葉綠體，再依據 5-c 公式計算葉綠素濃度。抽取葉綠體的過程，需於冰上進行，以維持葉綠體之完整性及活性。

c. 測量葉綠素濃度：

準備三個 1.5 mL 微量離心管，分別加入 800  $\mu$ L 丙酮，其中一管加入 200  $\mu$ L 無菌水，作為 blank；另外兩管分別加入 80  $\mu$ L 及 40  $\mu$ L 的葉綠體懸浮液(5-b 中所得)後，分別加入 120  $\mu$ L 及 160  $\mu$ L 之無菌水，混合均勻後，在室溫下以 21,130×g 離心 3 分鐘，使蛋白質沉澱，將上清液倒入比色管 (cuvette)，並以分光光度計 (DU 800 Spectrophotometer) 測量  $A_{652}$  的讀值，再依據其讀值，將葉綠體懸浮於 1×IB 中，將葉綠體濃度調整為 1 mg 葉綠素/mL。計算公式： $1/36 \times (A_{652} \text{ 讀值}) \times \text{比色管中葉綠體體積}^{-1} (\text{mL}) \times \text{葉綠體懸浮體積} (\text{mL}) = \text{葉綠素濃度為 } 1 \text{ mg/mL 之體積}。$

6. 豌豆葉綠體抽取：

剪下 8~9 天大的豌豆苗，以 1× grinding buffer (1×GR : 0.5 M Hepes-KOH pH7.3, 0.33 M sorbital, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 0.1% BSA) 進行葉綠體的抽取。葉片打碎方法，改用 Polytron 轉速 7,000 rpm，打 20 下進行。其餘方法同阿拉伯芥之葉綠體抽取。

7. 中量質體 DNA 抽取：以 Midi Plus™ Ultrapure Plasmid Extraction System (GE Healthcare, UK) 試劑組製備

取 50~100 mL LB 液態培養基，倒入無菌的 250 mL 錐形瓶中，加入適當之

抗生素(50 mg/mL)，並接種菌種，於 37°C 培養箱震盪培養 14~16 小時。將菌液倒入 250 mL 離心瓶中，於 4°C 下，6,000×g 離心 15 分鐘後，倒除上清液，加入 4 mL 含 RNase A 之 VP1 試劑，將菌塊打散，移至 50 mL 離心管，再加入 4 mL VP2 試劑，以翻轉方式混合均勻，靜至於室溫下 5 分鐘後，加入 4 mL VP3 試劑，混合均勻，以 20,000×g 在 4°C 下離心 20 分鐘。將 Midi Ultraflow<sup>TM</sup> 管柱取出，依序加入 3 mL 95% 酒精及 5 mL VPN 試劑，分別以重力過濾法，浸潤並活化管柱中的樹脂顆粒。將離心後的上清液加入管柱中，以重力過濾法過濾，使 DNA 與管柱內樹脂顆粒結合。加入 15 mL VPN 試劑清洗管柱，再以 5 mL VPE 試劑，將管柱中的 DNA 沖提而出，收集於新的 50 mL 離心管中。加入 3.5 mL 的異丙醇，混合均勻使 DNA 沉澱，分裝後以 20,800×g 於 4°C 下離心 30 分鐘，去除上清液，加入 70% 酒精清洗 DNA，以 20,800×g 於 4°C 下離心 10 分鐘，去除上清液，以真空濃縮機抽乾酒精，以無菌水回溶沉澱的 DNA，再以超微量分光光度計(NanoDrop Spectrophotometer) A<sub>260/280</sub> 測量 DNA 濃度，保存於-20°C。

8. 活體外轉錄合併轉譯(Coupled in vitro transcription and translation)：
  - a. prTGD2、prTGD2 mutants、prRBCS 的前驅蛋白以 TNT Wheat Germ Extract (TNT SP6 Coupled Wheat Germ Extract System, Promega, USA) 進行活體外轉錄轉譯，並以 <sup>35</sup>S-methionine 進行蛋白質標定。50 μL 反應成分如下：25 μL TNT Wheat Germ Extract、2 μL TNT buffer、1 μL 無 methionine 的胺基酸混合物(amino acid mix without methionine)、1 μL SP6 聚合酶、1 μL RNasin、0.5~1 μg/μL 質體 DNA(取用量依蛋白質種類有所不同)、6 μL 35S-methionine，再補無菌二次離子水至總體積 50 μL。混合均勻且置於 30°C 水浴槽中反應 2 小時後，加入 50 μL



50 mM cold methionine /2× IB (含 2 mM DTT)混合均勻。

b. prTic22 之前驅蛋白以 TNT Reticulocyte Lysate System (TNT SP6-Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega, USA ) 進行活體外轉錄轉譯，並以  $^{35}\text{S}$ -methionine 進行標記。50  $\mu\text{L}$  反應成分如下: 25  $\mu\text{L}$  TNT Reticulocyte Lysate 、2  $\mu\text{L}$  TNT buffer 、1  $\mu\text{L}$  無 methionine 的胺基酸混合物 (amino acid mix without methionine ) 、1  $\mu\text{L}$  SP6 聚合酶 、1  $\mu\text{L}$  RNasin 、0.5~1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  質體 DNA (取用量依蛋白質種類有所不同) 、6  $\mu\text{L}$   $^{35}\text{S}$ -methionine ，再補無菌二次離子水至總體積 50  $\mu\text{L}$  。混合均勻且置於 30°C 水浴槽中 2 小時後，加入 50  $\mu\text{L}$  50 mM cold methionine /2× IB (含 2 mM DTT) 。

9. 純化包涵體 (inclusion body) 中的重組蛋白質：

先進行少量培養，將 10 mL 的 LB 液態培養基倒入 150 mL 無菌的錐形瓶，加入適當的抗生素 (50 mg/mL) ，並接種菌種，在 37°C 培養箱震盪培養 12~16 小時後，再進行大量培養，將 10 mL 菌液倒入 5L 無菌的錐形瓶，內含 1 L 的 LB 液態培養及適當的抗生素 (50 mg/mL) ，於 37°C 震盪培養，每小時取 100  $\mu\text{L}$  測 OD<sub>600</sub> 吸光值，當 OD<sub>600</sub>  $\geq 0.6$  時，即可加入 isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) 至最終濃度為 0.1 mM，再繼續培養 3 小時。以 12,000×g (SA600,11,000 rpm) 離心 5 分鐘，將細菌離心下來，倒除上清液後。將菌塊懸浮於 Lysis 試劑 (50 mM Tris-HCl pH8.0 、100 mM NaCl 、1 mM EDTA) 中，使用 microfluidizer 將細菌打破後，分裝至微量離心管，以 12,000×g 離心 15 分鐘，分別收集上清液及沉澱物，沉澱物依次以含 1% Triton X-100 、500 mM NaCl 、10% glycerol 、4 M urea 或 8 M urea 之 Lysis 試劑溶液，回溶、離心並收取上清液，每種溶液洗兩次後，換下一個溶液。將以上各步驟所收取之上清液，以膠體電泳及 Coomassie

brilliant blue (CBR : 0.25% Coomassie brilliant blue R-250、50% 甲醇及 10% 醋酸) 染色再以退染劑 (45% 甲醇及 10% 醋酸) 進行退染。



10. 活體外前驅蛋白質輸入葉綠體 (in vitro protein import assay) :

150  $\mu$ L 反應之製備如下: 50  $\mu$ L 1 mg 葉綠素/mL 的葉綠體、0~15  $\mu$ L 100 mM ATP (最終濃度依據實驗需求為 0~5 mM 之間)、10~50  $\mu$ L 活體外轉譯轉錄前驅蛋白 (依訊號強度決定用量)，再補 1 $\times$  IB 至總體積為 150  $\mu$ L。將溶液混合均勻，室溫下放置 0~30 分鐘使其反應 (反應時間長短將依據實驗設計不同及前驅蛋白種類所決定) 使其反應，反應結束後，加入 1 mL 預冷過的 1 $\times$  IB 均勻混合，用以稀釋前驅蛋白及 ATP 濃度，並置於冰上，以停止反應。依據實驗需求分裝及離心，或是將葉綠體加入含 1 mL 40% Pecroll 的離心管中，以 swinging-bucket rotor，2,900 $\times$ g 離心 6 分鐘，以回收完整葉綠體。吸除上清液後，以 1 mL 1 $\times$  IB 再懸浮葉綠體 (清洗殘餘的 Pecroll)，去除上清後，以少量 1 $\times$  IB 懸浮葉綠體。取 1  $\mu$ L 樣品測定蛋白質濃度(方法 14)，測定完畢後，加入等量體積的 2 $\times$  sample buffer (SB)，置於 100°C 沸水中 5~10 分鐘，使蛋白質變性，以利進行電泳膠體分析，冰存於-80°C。

a. 時間控制：

將活體外轉譯轉錄之蛋白質與葉綠體混合均勻，使 ATP 濃度最終為 3 mM，於室溫下反應 0、2、7、13、20 或 30 分鐘，取適量樣品放入含有 1 mL 預冷的 1 $\times$  IB 1.5 mL 的微量離心管中，與之均勻混合，以中止反應。反應結束後，以嗜熱菌酶處理 (詳見後敘之方法 11)。

b. ATP 濃度控制：

將活體外轉譯轉錄之蛋白質與葉綠體混合均勻，ATP 最終濃度為 0、0.05、0.25、0.5、1、或 5 mM，進行實驗，於室溫下反應時間 30 分

鐘。反應結束後，以嗜熱菌酶處理(詳見後敘之方法 11)。此實驗所使用之活體外轉譯轉錄產物，需經方法 17.之步驟進行過濾，以去除 ATP。

c. 葉綠體蛋白質進入葉綠體之通道競爭實驗：

將活體外轉譯轉錄之蛋白質與葉綠體混合均勻，同時加入 0、0.5 或 1 mM 的 prRBCS 或是 RBCS 重組蛋白(詳見方法 9)，並將溶液中 urea 調整至相同濃度，ATP 最終濃度為 5 mM，於室溫下反應 30 分鐘。反應結束後，以嗜熱菌酶處理 (詳見後敘之方法 11)。

11. 嗜熱菌酶 (Thermolysin) 處理：

在結束活體外前驅蛋白質進入到葉綠體 (詳見方法 10)後。將葉綠體分裝成兩管，分別為控制組與對照組。兩管皆以  $3,000 \times g$ ，在  $4^{\circ}\text{C}$  下，離心 3 分鐘。去除上清液後，在控制組直接加入  $1 \times \text{IB}$  將葉綠體懸浮；對照組則加入含有  $0.1\text{mM CaCl}_2$  及  $0.2\text{ mg/mL 嗜熱菌酶}/1 \times \text{IB}$ ，將葉綠體懸浮，並置於冰上，且黑暗進行反應 30 分鐘。反應結束後加入 EDTA，使嗜熱菌酶停止反應 (最終 EDTA 濃度為  $8.33\text{ mM}$ )，將樣品加入含  $1\text{ mL 40\% Pecroll (含 5 mM EDTA)}/1 \times \text{IB}$  的  $1.5\text{ mL 微量離心管中}$ ，以 swinging-bucket rotor， $2,900 \times g$  離心 6 分鐘，以回收完整葉綠體，除去上清液後，再以  $1\text{ mL 1} \times \text{IB (含 5 mM EDTA)}$  將葉綠體懸浮，隨後以  $3,000 \times g$ ，3 分鐘離心，去除上清液後，以少量  $1 \times \text{IB}$  將葉綠體再懸浮。取  $1\text{ } \mu\text{L 樣品測定蛋白質濃度}$  (詳見後敘之方法 14)，測定完畢後，加入等量體積的  $2 \times \text{SB}$ ，置於  $100^{\circ}\text{C}$  沸水中 5~10 分鐘，使蛋白質變性，以利進行電泳膠體分析，冰存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

12. 強鹼萃取法(alkaline extraction)

在結束活體外前驅蛋白質進入到葉綠體反應後，將所回收之完整葉綠體，

直接以 200  $\mu$ L 強鹼萃取液 (alkaline extraction buffer: 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH11.5) 懸浮葉綠體，並置於冰上作用 30 分鐘。隨後將葉綠體吸取至超高速離心管中，在 4°C 下，以 100,000 $\times$ g 進行離心 30 分鐘。超高速離心後所得之上清液，即進行“可溶”蛋白質之收集：吸取 90% 上清液，至 1.5 mL 微量離心管中，再加入等體積之 20% TCA 進行混合，置於冰上 30 分鐘，使蛋白質析出後，於 4°C 下，以 20,800 $\times$ g 離心 30 分鐘，除去上清液後。加入 1 mL 預冷的丙酮，再於 4°C 下，以 20,800 $\times$ g 離心 10 分鐘。去除上清後，將樣品風乾，再以 2 $\times$  Protein Extraction buffer (1M Tris-HCl, pH8.45, 20% SDS, 0.5 M EDTA, ddH<sub>2</sub>O) 回溶沉澱物，再加入等量體積的 2 $\times$  SB 回溶即可。離心後之沉澱物，即進行“膜”蛋白之收集：去除多餘上清液後，加入 400  $\mu$ L 強鹼萃取液，懸浮沉澱物後，在 4°C 下，以 100,000 $\times$ g 離心 10 分鐘，去除上清液，並加入適量之 2 $\times$  Protein Extraction buffer 回溶沉澱物；取 1  $\mu$ L 測定蛋白濃度(詳見方法 14)，測定完畢後，加入等量體積的 2 $\times$  SB，可溶蛋白及沉澱蛋白樣品，可溶蛋白及膜蛋白樣品皆需置於 100°C 沸水中 5~10 分鐘，使蛋白質變性，以利進行電泳膠體分析，冰存於-80°C。

### 13. 胰蛋白酶(trypsin)處理

在結束活體外前驅蛋白質進入到葉綠體 (詳見方法 10) 後。將葉綠體分裝成兩管，分別為控制組與對照組。兩管皆以 3,000 $\times$ g，在 4°C 下，離心 3 分鐘。去除上清液後，在控制組直接加入 1 $\times$  IB，將葉綠體懸浮；對照組加入 0.2 mg/mL 胰蛋白酶/1 $\times$ IB 懸浮葉綠體。並於室溫下，於黑暗中反應 1 小時。隨後控制組及對照組皆加入含胰蛋白酶抑制劑之 1 $\times$ IB (胰蛋白酶抑制劑之最終濃度為 3.33 mg/mL)。隨後將樣品加至含 1 mL 40% Pecroll/ 1 $\times$  IB 之微量離心管中(含 400  $\mu$ g/ $\mu$ L 胰蛋白酶抑制劑)，以 swinging-bucket rotor，在 4°C

下，以 2900×g 離心 6 分鐘，去除上清後，再加入 1 mL 1×IB (含 400  $\mu$ g/ $\mu$ L 脫蛋白抑酶制劑) 將葉綠體懸浮，隨後以 3000×g 離心 3 分鐘，去除上清後，以少量 1×IB，懸浮葉綠體。取 1  $\mu$ L 樣品測定蛋白質濃度 (詳見方法 14)，測定完畢後，再加入等量體積 2×SB，置於 100°C 沸水中 5~10 分鐘，使蛋白質變性，以利進行電泳膠體分析，冰存於-80°C。

#### 14. 蛋白質濃度測定

以 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo, Rockford, IL, USA) 測定樣品蛋白質濃度。在 96 孔盤中分別加入 0, 2, 4, 6, 8  $\mu$ L 2 mg/mL 小牛血清蛋白 (BSA: bovine serum albumin) 作為標準品，並加入 1  $\mu$ L 與溶解待測樣品相同的試劑於標準品中，補水至總體積為 10  $\mu$ L。接著於新的孔洞中，加入 1  $\mu$ L 待測樣品，並補水至 10  $\mu$ L。將 BCA 試劑 A (bicinchoninic acid) 與 BCA 試劑 B (CuSO<sub>4</sub>)，以體積比為 50:1 混合均勻後，取 200  $\mu$ L 加至每個孔洞中，並混合均勻，置於 37°C 進行反應半小時，以全自動微量盤分析 (microplate reader model 550, BioRad, Hercules, CA, USA) 測量 OD<sub>562</sub> 的吸光值。以標準樣品測得之吸光值，計算出回歸方程式後，即可算出待測樣品的蛋白質濃度。

#### 15. 硫酸十二脂聚丙烯醯胺凝膠電泳分析 (SDS-PAGE: Sodium Dodecylsulfate-Polyacryamide Gel Electrophoresis) :

##### a. 架設電泳槽：

將凝膠電泳片 (4~12% NuPAGE Bis-Tris gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 上的齒梳 (well comb) 取出，用水將孔洞中的保存液沖洗乾淨後，架於直立式電泳槽，在電泳槽中倒入緩衝液 (1×MES running buffer: 50 mM Tris base, 2% SDS, 1 mM EDTA)。



b. 樣品製備：

於待測樣品中加入等體積的 2xSB，混合均勻後，置於 100°C 沸水中加熱 5~10 分鐘，即可注入凝膠片孔洞中。

c. 電泳條件：

以電壓 135 伏特進行電泳 50~100 分鐘 (依待分析之蛋白質大小而定)。

d. 蛋白質固定及染色：

i. 取出凝膠片，將膠片浸泡於 100% 醋酸中 15 分鐘，再以自來水洗淨膠片。

ii. 或取出凝膠片後浸泡於 0.25% CBR 30 分鐘後，將染劑倒除，加入退染液，退染後以清水洗淨膠片。

e. 凝膠片乾燥與蛋白質訊號影像分析：

將凝膠片置於膠片乾燥機 (BioRad gel dryer model 583, Gaithersbrug, MD, USA)，在 85°C 下抽氣至真空並加熱 20 分鐘後，取出乾燥凝膠片，將乾燥膠片置於壓片匣中，並放入 TransScreen LE intensifying screen (Eastman koda Company, Rochester, NY, USA) 下，於暗房中，將底片放入 TransScreen LE intensifying screen，將壓片匣存放於 -80°C 中，進行曝光(曝光時間，將依據待蛋白質訊號強弱而定)後，再進行底片沖洗及顯影。

16. 西方墨點法 (Western blotting)：

a. SDS-PAGE 電泳分析：

同方法 15-a~15-c。

b. 凝膠片轉漬(gel transfer)：

轉漬一片凝膠片，需要準備 6 片海綿、2 片 3 MM 濾紙及 1 片

polyvinylidene flouride 膜 (PVDF, Immobilin P, Millipore, Bedford, MA, USA) 一片。將海綿與濾紙，浸泡於轉漬緩衝溶液 (NuPAGE Transfer Buffer : 25 mM Bicine, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA, 10% 甲醇) 中備用。PVDF 膜先浸泡於 100% 甲醇 30 秒後，再浸泡至轉漬緩衝溶液中備用。於轉漬槽中，依序放入 3 片海綿、1 片 3 MM 濾紙、凝膠片(正面朝下)、PVDF membrane、1 片 3MM 濾紙、3 片海綿。將轉漬槽組裝後，夾緊並放入電泳槽中，並於轉漬槽中加滿轉漬緩衝液，將電泳槽接上電源供應器，以 30 伏特電壓，進行轉漬 1 小時。

c. Blocking :

將轉漬後的 PVDF 膜浸泡於 blocking buffer (5% 脫脂奶粉，溶於 TBS buffer；TBS buffer: 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl)，於室溫中搖晃 30 分鐘 (或是 4°C, O/N)，再以 TBS buffer 清洗。

d. 抗體雜交(antibody hybridization)：

一次抗體以抗體緩衝液 (antibody dilution buffer: 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween20) 稀釋 1000~5000 倍 (依抗體效率好壞，決定稀釋倍數) 後，將 PVDF 膜浸泡於含一次抗體之稀釋液中，於室溫下作用 30 分鐘至 1 小時。去除液體後，以 1×TBS-T 試劑 (TBS, 0.1% Tween20) 清洗 PVDF 膜三次，每次五分鐘；之後 PVDF 膜，再以 1×TBS 洗一次。接下來將 PVDF 膜浸泡於含二次抗體的抗體緩衝液中 (二次抗體為 alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit 或 anti-mouse IgG，稀釋 1000 倍後使用)，室溫下作用 30~60 分鐘。去除液體後，以 1×TBS-T 清洗 PVDF 膜三次，每次五分鐘；之後 PVDF 膜再以 1×TBS-TS(1×TBS, 0.1% Tween20, 0.05% SDS)，清洗 5 分鐘，後將 PVDF 膜浸泡在 1×TBS 中。

e. 呈色：



i. NBT/BCIP 呈色法：

於 10 mL 呈色液 (color buffer: 0.1 M Tris-HCl, pH8.5, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) 中加入 20 μL 150 mg/mL 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) 溶於 70% dimethyl formamide (DMF) 中，及 30 μL 50 mg/mL 5-bromo-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP) 溶於 100% DMF 中，混合均勻後，將 PVDF 膜浸泡於呈色液中，待藍紫色條帶出現後，再移置水中，終止反應，並晾乾保存。

ii. 冷光呈色法：

在抗體雜交步驟中，二次抗體更換為 horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgG、anti-rat IgG 或 anti-rabbit IgG，其餘步驟同方法 16-d。最後 PVDF 膜以 GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent 進行呈色。呈色前，取出適量試劑 A 與試劑 B 以 1：1 (v/v) 進行混合，呈色試劑均勻混合後，直接加到 PVDF 膜上，並將 PVDF 膜放入冷光螢光影像擷取系統 (UVP BioSpectrum600)，依訊號強度調整曝光時間。

17. 凝膠過濾活體外轉錄合併轉譯產物：

製作凝膠管柱：將 Sephadex G-25 泡水隔夜後，注入底下鋪有玻璃棉的針筒中，離心後去除水分，再加入 Sephadex G-25 並離心，直至管柱約高 5 cm，加入適量 1×IB 清洗管柱 3 次，再以 2% BSA / 1×IB 洗管柱 1 次。管柱製作完成後，加入活體外轉錄合併轉譯產物 300 μL，離心後，收集過濾液即可。

## 結果



### Stop-transfer 及 post-import 路徑蛋白質之 TMD 氨基酸組成

在 stop-transfer 選出五個蛋白質。post-import 的部分，因為已知使用此路徑的蛋白質僅有兩個，故加入七個亦會穿越內膜經過葉綠體基質之 thylakoid 蛋白 (表一)。為了擴大資料庫，除了阿拉伯芥，另外加入三個物種 (葡萄，白楊樹，番茄) 的同源基因之氨基酸序列進行統計。TMD 資料依據 Aramemnon website (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/request.ep>) 所預測而得，選擇預測分數大於 0.6 之區域為穿膜區域。因為資料運算結果常有變動，故計算時在預測區域前後各延伸五個氨基酸進行統計(表二、表三)。觀察了親疏水性、極性、帶電性或是依據官能基等許多特性分類，可以發現兩種路徑之間並沒有特別明顯的差別。但依據胺基酸大小(Richards, 1974)排序後的統計可以發現到，stop-transfer 的 TMD 組成具有較多大的胺基酸，post-import 的 TMD 則是由小的胺基酸組成比例較高(圖二)。尤其是 stop-transfer 的 TMD，常在兩側有較大的胺基酸(表一)。依據上述的統計分析，設立假說：「stop-transfer 的 TMD 需要有較多大的胺基酸」。

### Stop-transfer 蛋白質 TGD2 之 TMD 點突變蛋白

由資料庫中所預測 TGD2 之 TMD 區域中，接近 N 端及 C 端都有一個 tryptophan (Trp, W) 分別位於第 95 號及 116 號胺基酸 (圖三 A)。我將兩個胺基酸透過 site direct mutagenesis 突變為 alanine (Ala, A)，得到 TGD2(W95A)、TGD2(W116A) 以及 double mutant TGD2(W95A/W116A) (圖三 B)。以活體外轉錄合併轉譯得到之前驅蛋白產物，進行葉綠體蛋白質進入葉綠體實驗；在實驗結束後，蒐集完整葉綠體，透過 alkaline extraction 分離出膜系 (沉澱物，pellet, P) 與可溶部分 (soluble fraction, S)。TGD2 因使用 stop-transfer 路徑，故在 soluble fraction 幾乎沒有訊號(圖四，lane

4)，主要訊號是在 pellet 有 mature TGD2 的出現 (lane 3)。而在 TGD2(W116A)中，也與 TGD2 相似的結果 (lanes 11 及 12)。但在 TGD2(W95A)中可以看到 soluble fraction 出現了 mature TGD2 的訊號 (lane 8)，double mutant TGD2(W95A/W116A)中也有相似訊號產生 (lane 16)。第二階段我另外設計引子，將 TGD2 第 95 號胺基酸突變成 glycine (Gly, G) 及 phenylalanine (Phe, F)，以驗證胺基酸大小對於 TGD2 路徑決定的重要性。在 TGD2(W95G) 中，與 TGD2(W95A)相同，soluble fraction 也有明顯的訊號，而 TGD2(W95F) 在 soluble fraction 中的訊號則大幅下降。因此可以確定，TGD2 的 TMD N-terminus 的胺基酸大小，對於此 TMD 是否能正常作為一個 stop-transfer signal 是很重要的。

### TGD2 及突變蛋白累積於葉綠體位置的探討

我下一步欲確認出現在可溶區的 mature TGD2(W95A) 是在膜間隙或是葉綠體基質。如在膜間隙則表示，因胺基酸變小，無法牢固地插在內膜上，而滑出至膜間隙；若在葉綠體基質則表示，胺基酸變小，無法停留在內膜，並完全穿越內膜，而到達葉綠體基質。因此我對於 TGD2 及 TGD2(W95A) 進入過後的葉綠體進行 trypsin 處理，trypsin 能夠將內膜以外的蛋白質降解(Froehlich, 2011)，前人 membrane topology 的實驗結果指出，TGD2 為一內膜蛋白，大部分區域位在膜間隙(Awai et al., 2006)，所以應會被 trypsin 切除一部分。若可溶區域的 mature TGD2(W95A) 是停留在膜間隙，則於 trypsin 處理後，應被降解；而若可溶區域的 mature TGD2(W95A) 進入葉綠體基質，則無法被 trypsin 降解。但我的實驗結果發現，即使是 wild-type 的 TGD2 也無法被 trypsin 切掉 (圖五，lane 4)，因此無法以可溶區出現的 mature TGD2(W95A) 對 trypsin 之抗性，來判斷其位置。為確認 trypsin 對於膜蛋白降解的效率如何，取上述實驗樣品，進

行 western blotting，以外膜上 Toc75 及內膜上 Tic110 作為對照，發現 trypsin 之降解效率並無異狀（圖五），而 TGD2 確實無法被 trypsin 降解。回顧文獻中亦指出，TGD2 具備此異常之特性(Awai et al., 2006)。故無法確認可溶區的 mature TGD2(W95A) 的位置。

### prTic22 進入葉綠體所需的時間

以合成的前驅蛋白質，進行進入葉綠體的實驗，進入葉綠體的蛋白質的量，會隨著時間增加而累積。起初，進入的速率很高，mature protein 累積的量是成線性增加的狀態。一段時間後，速率趨緩，最終 mature protein 累積的量不再增加。我需要找出當 prTic22 進到葉綠體後，能夠大量累積 mature Tic22 的時間點，以確保之後實驗定量的準確性；且需要在 mature Tic22 累積於葉綠體中仍是線性成長的區間，如此往後的實驗，才能夠比較在不同處理方式下，進入葉綠體效率之差異。故首先進行 時間進程實驗，結果如圖六。的確，當 prTic22 進入葉綠體後，transit-peptide 被切除，形成 mature 的 Tic22，隨著時間的增加，mature Tic22 累積在葉綠體的量也會上升，約 20 分鐘後趨近於停止。為確保 Tic22 是真正地進入葉綠體，我將各時間點的部分葉綠體，處理能夠分解葉綠體外膜以外蛋白質的蛋白酶 thermolysin。在經過 thermolysin 的處理後 prTic22 因尚未進入葉綠體，所以被完全的降解。令我驚訝的是，mature 的 Tic22 訊號居然也大幅下降，但仍有部分的 mature Tic22 是完全進入葉綠體的，且也隨著時間增加。故可以推之，prTic22 進入葉綠體的量，是會隨著時間上升的（圖六 lane 3~7），但部分 transit-peptide 被切除的 Tic22 並沒有進入到葉綠體。而我的研究是想知道 prTic22，是否透過 translocon complex 進到葉綠體內的膜間隙，故接下來的實驗都會以 thermolysin 處理，以確保看到的 mature Tic22 是真正進入到葉綠體膜間隙。

## prTic22 進入葉綠體所需的 ATP 濃度

在先前的研究中發現到，蛋白質進入葉綠體內部，如葉綠體基質及 thylakoid，需要 1 mM 以上的 ATP (Keegstra et al., 1989)，而外膜蛋白在插入葉綠體外膜的過程中則不太需要 ATP，對 prTic22 進入膜間隙所需 ATP 的量，前面兩篇研究顯示，只需很低濃度的 ATP，prTic22 即可完全進入至膜間隙(Kouranov et al., 1999; Vojta et al., 2007)。但因兩者 prTic22 進入到葉綠體的效率都非常差，且對於蛋白質進入過後的葉綠體，並未處理 thermolysin，所以他們觀察到的相當有可能不是進入膜間隙的 mature Tic22。故我重新探討，prTic22 進入葉綠體所需的 ATP 濃度。為消除 TNT Reticulocyte Lysate System 中的 ATP 干擾，需經由凝膠管柱過濾合成的前驅蛋白。而葉綠體自豆子分離出後，需於黑暗中冰上靜置 2 小時，以消耗葉綠體內部合成的 ATP，且因受到光照後，葉綠體仍會自行生合成 ATP，故實驗需於黑暗中進行。實驗中以 prRBCS 作為對照組。

依據實驗結果可以發現，在 ATP 濃度極低時 (0.05 mM)，prRBCS 幾乎不能夠進入葉綠體 (圖七)，當 ATP 濃度為 0.25 mM 時 prRBCS 開始進入葉綠體，進入葉綠體的的量隨著 ATP 濃度上升增加，當 ATP 濃度到達 3 mM 時，似為進入葉綠體最好的濃度，當 ATP 大於 3 mM 時，沒有更多的 prRBCS 再進入到葉綠體內。再看到 prTic22 的部分，在 ATP 濃度極低時 (0.05 mM)，已有少部分的 Tic22 已進入到葉綠體之中，且在 0.05 至 1 mM 時，mature Tic22 的量，差異並不大，但當 ATP 濃度提高至 3 mM 時，mature Tic22 又有大幅量增加的情形。由實驗結果可以知道少部分的 prTic22 進到葉綠體，只需要極少 ATP，與前人結果相似(Kouranov et al., 1999; Vojta et al., 2007)，而大部分 prTic22，則需要較高濃度的 ATP 才能進入到葉綠體中。

## prTic22 是否與 prRBCS 使用相似途徑進入葉綠體

目前已知的葉綠體蛋白質如 prRBCS，是使用 TOC 與 TIC complexes 進入到葉綠體內。欲瞭解 prTic22 進入葉綠體，是否也需要 translocon complexes，我透過 *E.coli* 大量表現並純化出重組蛋白 prRBCS 及 RBCS，作為 translocon complexes 的競爭者。實驗對照組中，將具有放射線標定的 [<sup>35</sup>S-Met]prRBCS 與重組蛋白一起輸送至葉綠體中。隨著重組蛋白 prRBCS 濃度升高，出現競爭的現象，所以放射線的強度有所下降(圖八)；若與 RBCS 一起送至葉綠體種，因 RBCS 無法進入葉綠體，所以對於 [<sup>35</sup>S-Met]prRBCS 進入葉綠體不會造成影響。放射線標定的 [<sup>35</sup>S-Met]prTic22 與 重組蛋白 prRBCS 或是 RBCS 一起進入葉綠體的實驗結果與 [<sup>35</sup>S-Met]prRBCS 對照組一樣，隨著 prRBCS 濃度升高，進入葉綠體的效率有下降的情況，而 RBCS 對於 prTic22 進葉綠體則沒有影響。以上結果可以說明，prTic22 到達膜間隙的路徑與 prRBCS 具有競爭關係，兩者的進到葉綠體的路徑有所重疊，所以 prTic22 在進入葉綠體時，應是使用 translocon complex 的。

## 在 translocon complex 突變株中，prTic22 進入葉綠體之效率

為了釐清 prTic22 進入到膜間隙，與 prRBCS 進入到葉綠體路徑上的重疊之處，包含哪些 TOC 與 TIC 蛋白質。我使用了幾個 TOC 或是 TIC 的阿拉伯芥突變株，分別是：*tic236 (m4)*, *tic20 (y3)*, *toc75 (mar1)* 以及 *toc33 (127-4)*，以了解那些蛋白質的缺失，會影響 prTic22 進入到葉綠體中。在此實驗，仍使用 prRBCS 作為對照。可以看到 prRBCS 進入到葉綠體需要上列所有的 translocon 成員，故在所有突變株中，與 wild-type (*Col*) 相比，RBCS 進入到葉綠體的效率都有所下降(圖九 A、C)。相較之下，prTic22 在 TIC 突變株 *m4* 及 *y3* 中，進到葉綠體的效率沒有下降，甚至在

*m4* 突變株中有上升的情形，但在 TOC 的突變株 *mar1* 和 127-4 中則有下降(圖九 B、D)。根據以上結果，所以可以結論出，prTic22 進入到到膜間隙是需要透過 Toc75 及 Toc33，但不需要 Tic20 與 Tic236。



## 結論



在第一部分，TMD 肽氨基酸體積對於兩種內膜蛋白的路徑選擇之研究中，首先透過統計，歸納整理後發現，stop-transfer 路徑之 TMD 肽氨基酸組成上，體積大的肽氨基酸，如 W、F 及 Y 出現的機率較大；而在另一個路徑 post-import 中，體積較小的肽氨基酸，如 G 跟 A 較常被觀察到。不論是只針對阿拉伯芥，或是加入其他三種植物的同源基因做比較，統計結果皆為如此。可以知道 TMD 組成中，肽氨基酸的體積大小，在植物的演化中具有一定的保守性。針對此特性初步設立一個可以測試的假說：「stop-transfer 路徑的蛋白質，其 TMD 中體積較大的肽氨基酸，對於此 TMD 做為 stop-transfer signal 是重要的。」

針對此一假說，我選用了 TGD2—一個利用 stop-transfer 插入內膜上的蛋白質。在 TGD2 的 TMD 中可以發現到，N 端(第 95 個肽氨基酸)與 C 端(第 116 個肽氨基酸)各自有一個 W，我透過定點突變的方式將這兩個 W 置換成 A，得到了 W95A、W116A 及 W95A/W116A，等三個點突變 TGD2 mutants。將 TGD2 及點突變的蛋白質進入到葉綠體中，並透過強鹼萃取法確認其是否仍然具 stop-transfer 之特性(即所有 mature 的訊號，皆在膜系上(P))，或是失去部分 stop-transfer 的功能，造成可溶部分(S)有 mature 訊號產生。初步實驗結果發現 TGD2-(W95A)的突變中，在 P 與 S，都有 mature 的訊號，故 W95A 此突變確實令 TGD2 失去部分停留在內膜上的功能。進一步將此位置上的 A 突變成一樣是體積小的肽氨基酸 G，實驗結果與 A 相同，或換回與 W 體積一樣是大的 F，實驗結果則與原本的 W 相似。以上實驗及分析結果皆顯示，TGD2 這選用 stop-transfer 路徑的蛋白質，其 TMD 上前端的肽氨基酸體積大小，對於此 TMD 做為 stop-transfer signal 是重要的。

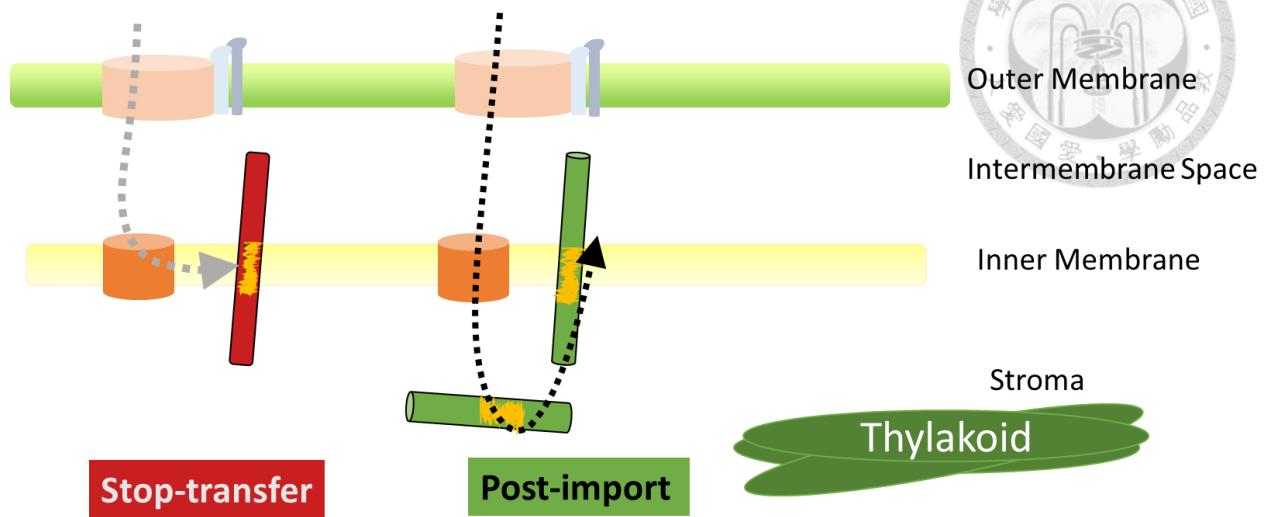
第二部分，針對了膜間隙蛋白質 Tic22，進入葉綠體之路徑做研究。因

前人研究中，對於 Tic22 進入葉綠體究竟是否需要 TOC translocon 有所爭執(Kouranov et al., 1999; Vojta et al., 2007)。但前人發表中，prTic22 進入葉綠體的效率不佳。故實驗室將 prTic22 換上 SP6 promoter，增進了其進入葉綠體的效率後，由我進行 prTic22 進入到葉綠體的實驗。首先測試 prTic22 進入葉綠體，所需要的時間及 ATP 的量。設計並進行 prTic22 進葉綠體之時間進程實驗結果發現，隨時間增加，prTic22 進入葉綠體的量，的確隨時間增加而上升，為確保所見之 Tic22 所進入葉綠體之訊號為真，取部分葉綠體處理 thermolysin，未進入葉綠體的蛋白質，會受到此蛋白酶降解。處理過後，未進入葉綠體的 prTic22 被分解；令我們驚訝的是，在處理過後，mature Tic22 訊號也減少許多，但仍有部分隨時間增加慢慢累積。其他蛋白質如 prRBCS 完全進入葉綠體，在相同條件下僅需花費 15 分鐘左右(Theg et al., 1989)，相較之下 prTic22 進入葉綠體所需的時間也較多，約莫為 30 分鐘。與前人實驗結果中 prTic22 約以 10 分鐘即完全進入葉綠體之結果不相符(Kouranov et al., 1999; Vojta et al., 2007)，但前人之實驗數據中 prTic22 進入葉綠體效率不佳，故可信度不足。在測試 ATP 需求量的實驗中，我使用了多種濃度的 ATP (0-5 mM)，並加入 prRBCS 作為實驗對照組。實驗結果發現，prTic22 與 prRBCS 皆會隨 ATP 濃度上升後，進入葉綠體效率提高。唯 prTic22 在 ATP 濃度極低的情況下，已有部分進入葉綠體內，直至 ATP 濃度高於 3 mM 時，又有一大部分的 Tic22 進入葉綠體中。為何 prTic22 進入葉綠體有兩種 ATP 需求量，仍需進一步研究。

在研究 prTic22 是否需要透過 translocon 蛋白進入葉綠體時，首先透過 prTic22 與 prRBCS 競爭。實驗結果指出隨著 prRBCS 的濃度升高，prTic22 進入葉綠體的效率會下降；但若 RBCS 濃度升高，則不影響 prTic22 進入葉綠體的情況。此現象也與對照組中 prRBCS 之實驗結果相同，顯示 prTic22 與 prRBCS 是會競爭葉綠體上的 translocon，故可推測，兩者進入

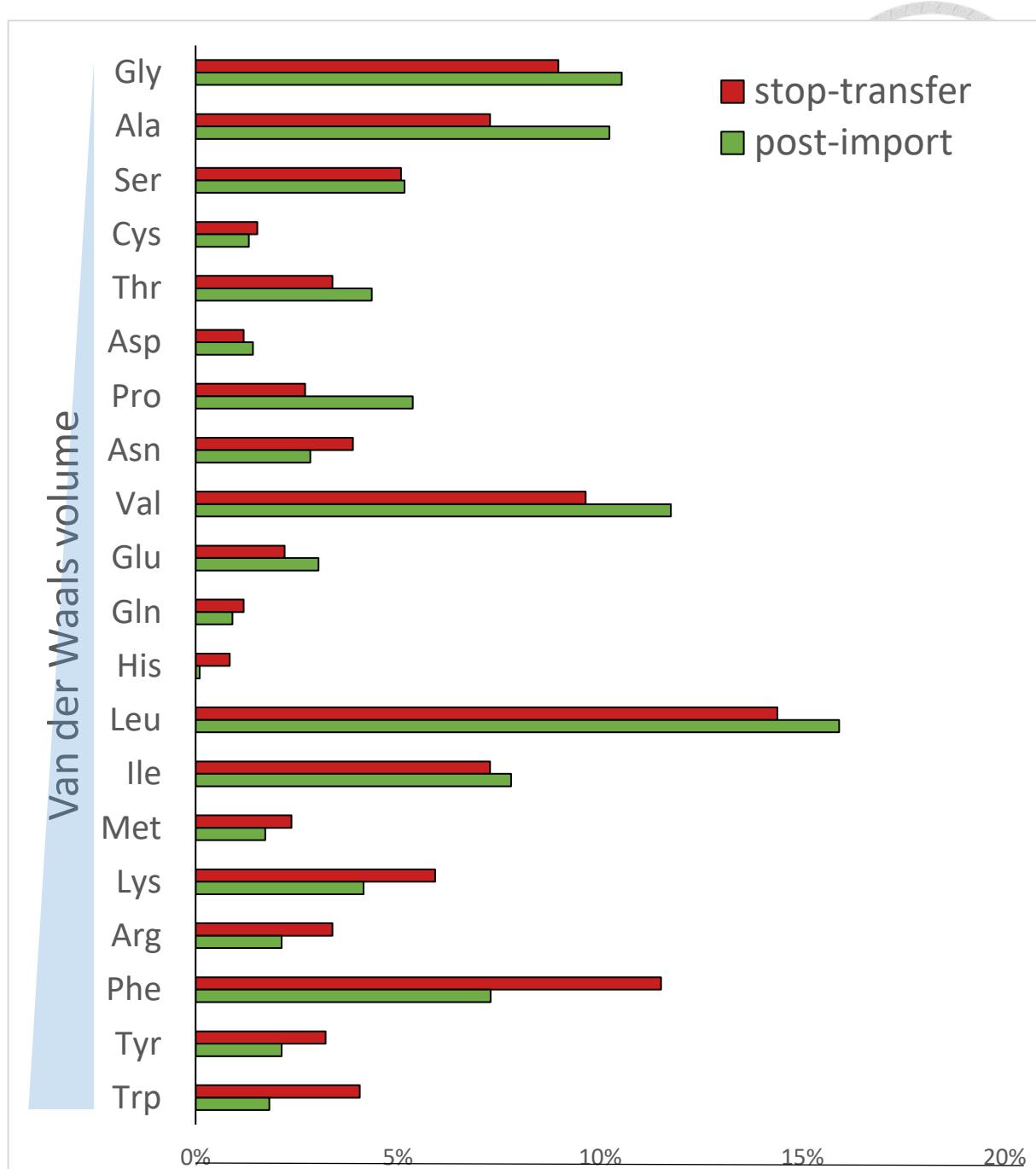
葉綠體內的路徑，有部分重疊。更進一步地將 prTic22 與對照組 prRBCS 送至 translocon 蛋白突變株所分離出的葉綠體。並與 wild type(*Col*)所分離出來的葉綠體一起進行實驗。對照組的 prRBCS 進入葉綠體基質是需要所有的 translocon，故在所有突變株中，進入葉綠體的能力與 *Col* 相比皆有下降。prTic22 在進入到 Toc75 與 Toc33 兩個 TOC 蛋白的突變株中，效率有減少。而在 Tic236 與 Tic20 兩個 TIC translocon 突變株中，prTic22 進入的情況沒有下降。可以驗證，prTic22 進入葉綠體，是需要 TOC complex，但不需要 TIC complex 的。至於為何 mature Tic22 在 m4 的突變株中，會有上升的情況，仍須進一步的研究。

## 圖表



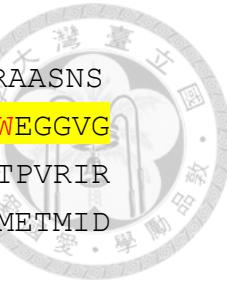
圖一、葉綠體內膜蛋白插入之路徑示意圖

要前往葉綠體內膜的蛋白質，有兩種不同的路徑—stop-transfer 及 post-import。使用 stop-transfer 路徑的蛋白質，在穿越內膜的通道後，就停留在內膜上，橫向地移動，離開通道至內膜其他部位。以 post-import 路徑進入內膜之蛋白質，在穿越 translocon 後，會整個進入到葉綠體基質之中，再回插到內膜上。



圖二、TMD 肽氨基酸組成

為了增加樣品數量，統計圖中除了阿拉伯芥，另外加入了葡萄、白楊樹以及番茄同源基因之氨基酸序列。且因程式所計算之 TMD 會有些微變動，統計之時，取預測 TMD 片段往前後各延伸五個氨基酸，作為統計區間。TMD 的預測來自 Aramemnon website. 使用 AramTmCon 來預測 TMD，只挑選預測分數大於 0.6 之區間。圖中氨基酸之排序系依凡德瓦爾力體積(Van der Waals volume)由小至大排序。



(A)

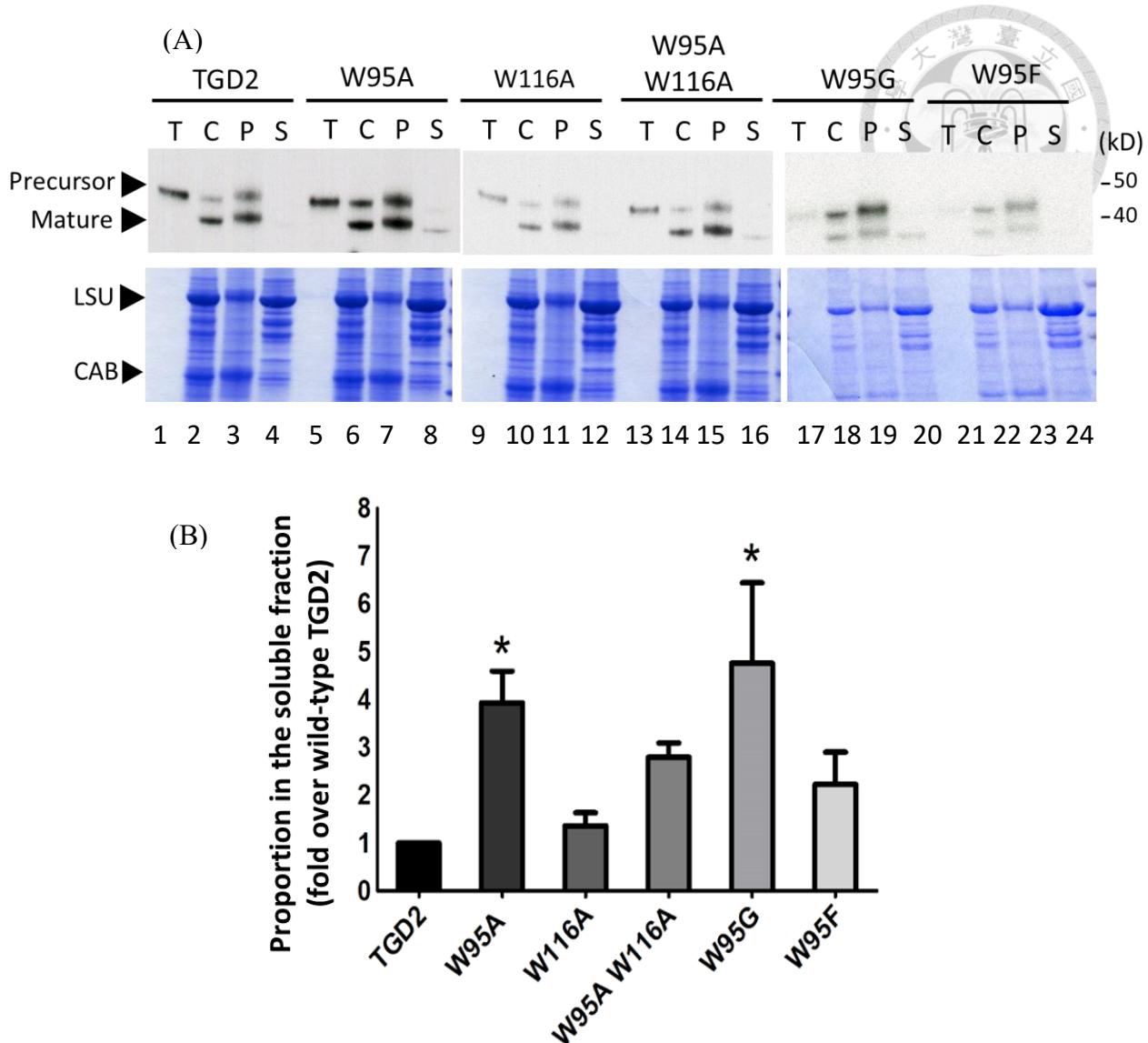
1 MIGNPVIQVPSSLMPSSSMIACPRVSPNGVPYLPPKPRTRHLVVRAASNS  
51 DAAHGQPSSDGGKNPLTVVLDVPRNIWRQTLKPLSDFGFGKRSI**WEGGVG**  
101 **LFIVSGATLLALSWA**WLRGFQMRSKFRKYQTVFELSHASGICTGTPVRIR  
151 GVTVGTIIRVNPSLKNIEAVAEIEDDKIIIIPRNSLVEVNQSGLLMETMID  
201 IMPRN.....381

(B)

prTGD2	WEGGVG LFIVSGATLL ALSWA
prTGD2 (W95A)	<b>A</b> EGGVG LFIVSGATLL ALSWA
prTGD2 (W116A)	WEGGVG LFIVSGATLL ALS <b>A</b>
prTGD2 (W95A/W116A)	<b>A</b> EGGVG LFIVSGATLL ALS <b>A</b>
prTGD2 (W95G)	<b>G</b> EGGVG LFIVSGATLL ALSWA
prTGD2 (W95F)	<b>F</b> EGGVG LFIVSGATLL ALSWA

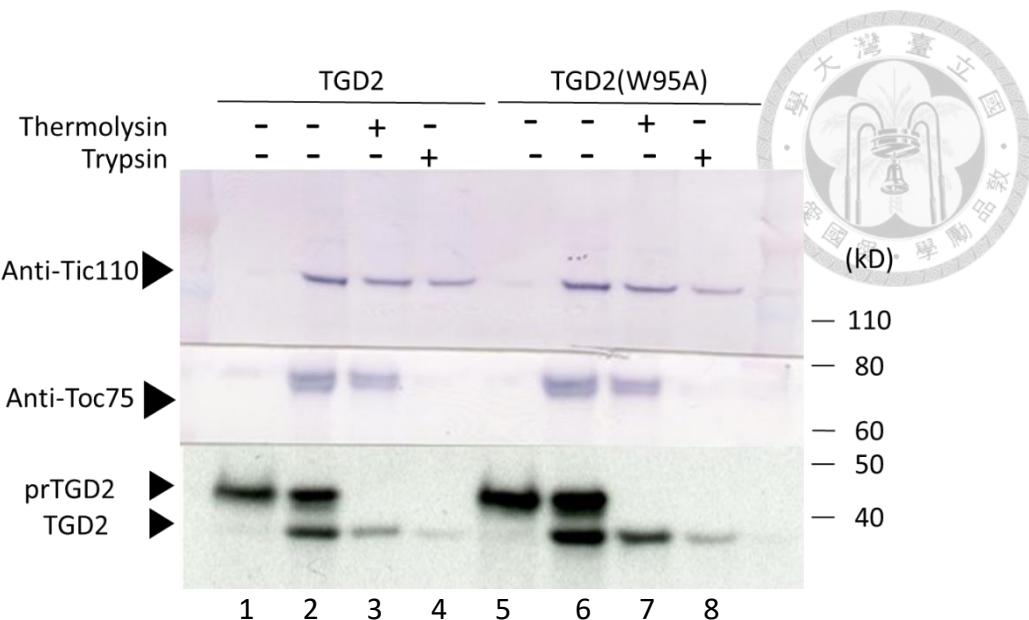
### 圖三、TGD2 之胺基酸序列及 TMD 點突變

(A) TGD2 之 N 端胺基酸序列，黃色標記處為 TMD 所在，紅色標記的兩個 Tryptophan (W) 將進行點突變。(B) TGD2 及其點突變之 TMD 序列。將第 95 號胺基酸由 W 換成 A、G 或是 F，第 116 胺基酸 W 突變成 A。



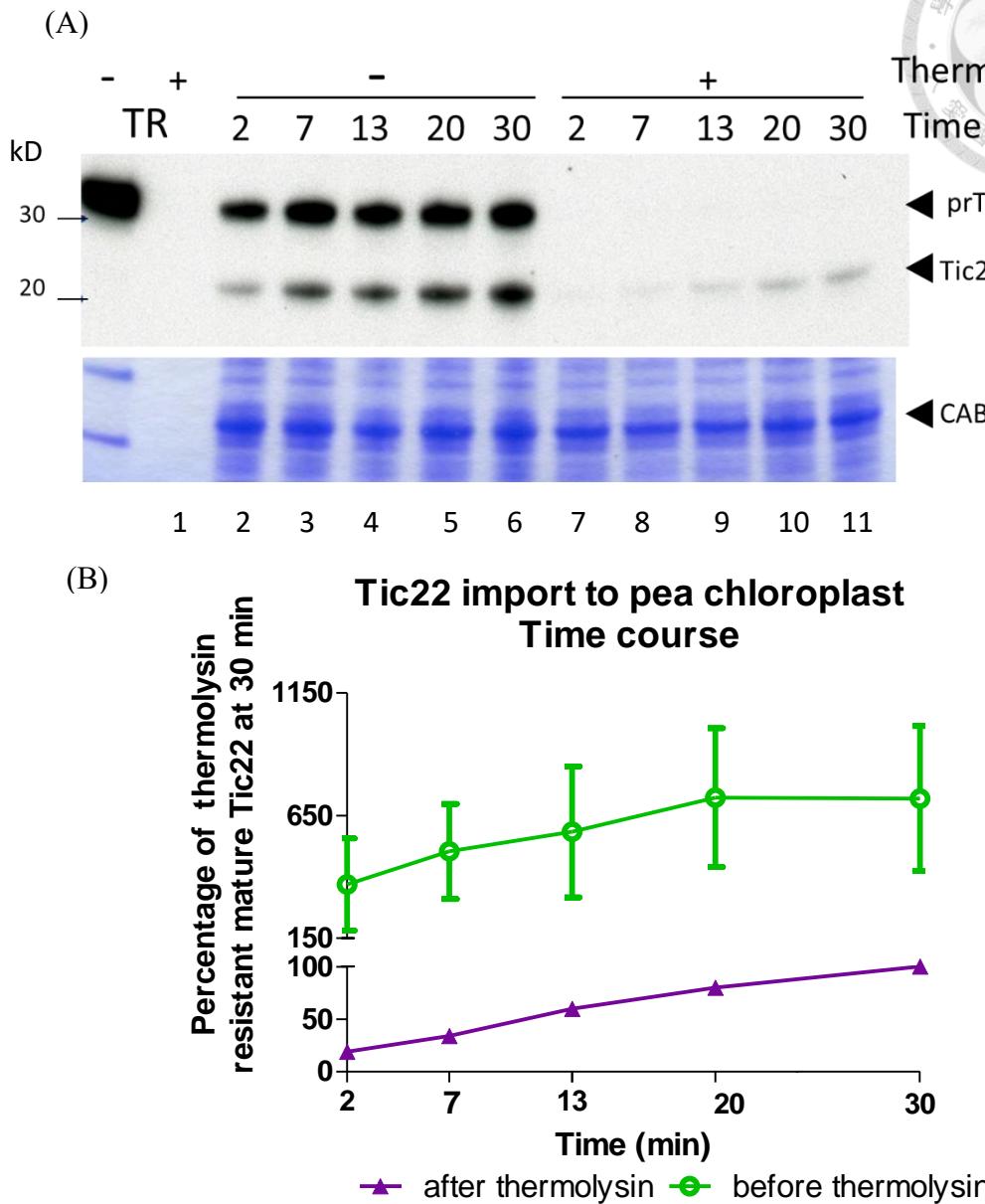
圖四、將 prTGD2 及其 TMD 突變之蛋白質輸送至分離葉綠體中

(A) 將 prTGD2 與突變之蛋白質之標定  $^{35}\text{S}$ -Met 轉譯產物(T)運送至豆子所分離葉綠體中 15 分鐘後。分離出完整葉綠體(C)。部分葉綠體使用  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pH11.5)處理置於冰上 30 分鐘。以超高速離心分出不可溶部份(P)及可溶的部份(S)。使用 SDS/PAGE 電泳膠體分析。所有的(P)皆有相同蛋白質含量，(S)則來自與其對應的(P)相同體積的葉綠體。圖中上部為 X 光片成像，下部為同片膠之 Coomassie-blue 染色。(B) 在可溶區中 mature 蛋白的比例。實驗方法如(A)上述。每個樣品在可溶區(S)之 mature TGD2 訊號除以(P)與(S)加總之 mature TGD2 訊號。在與各次實驗中的 wild-type 相除後所得定量圖。值=平均值±標準差( $n \geq 3$ )。



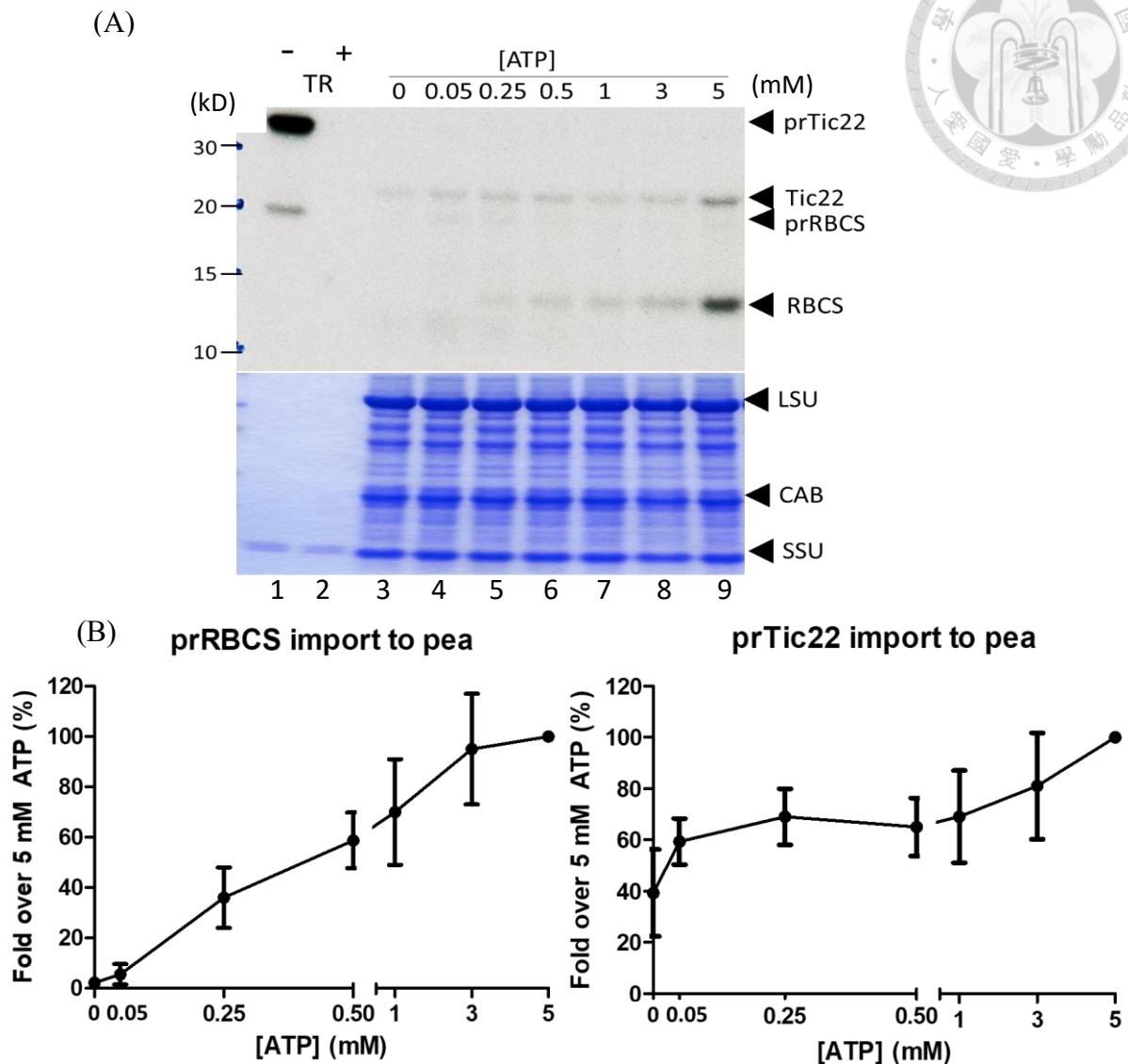
圖五、TGD2 及突變蛋白累積於葉綠體可溶區之確認

將活體外轉路轉譯並標定  $^{35}\text{S}$ -Met 的 prTGD2 及 prTGD2(W95A) 運送至豆子分離出的葉綠體 15 分鐘。取一部分處理 thermolysin，另一部分處理 trypsin。透過 Toc75 (葉綠體外膜) 及 Tic110 (葉綠體內膜) 作為蛋白酶作用的 control。下方為同片膠的 X 光片成像。



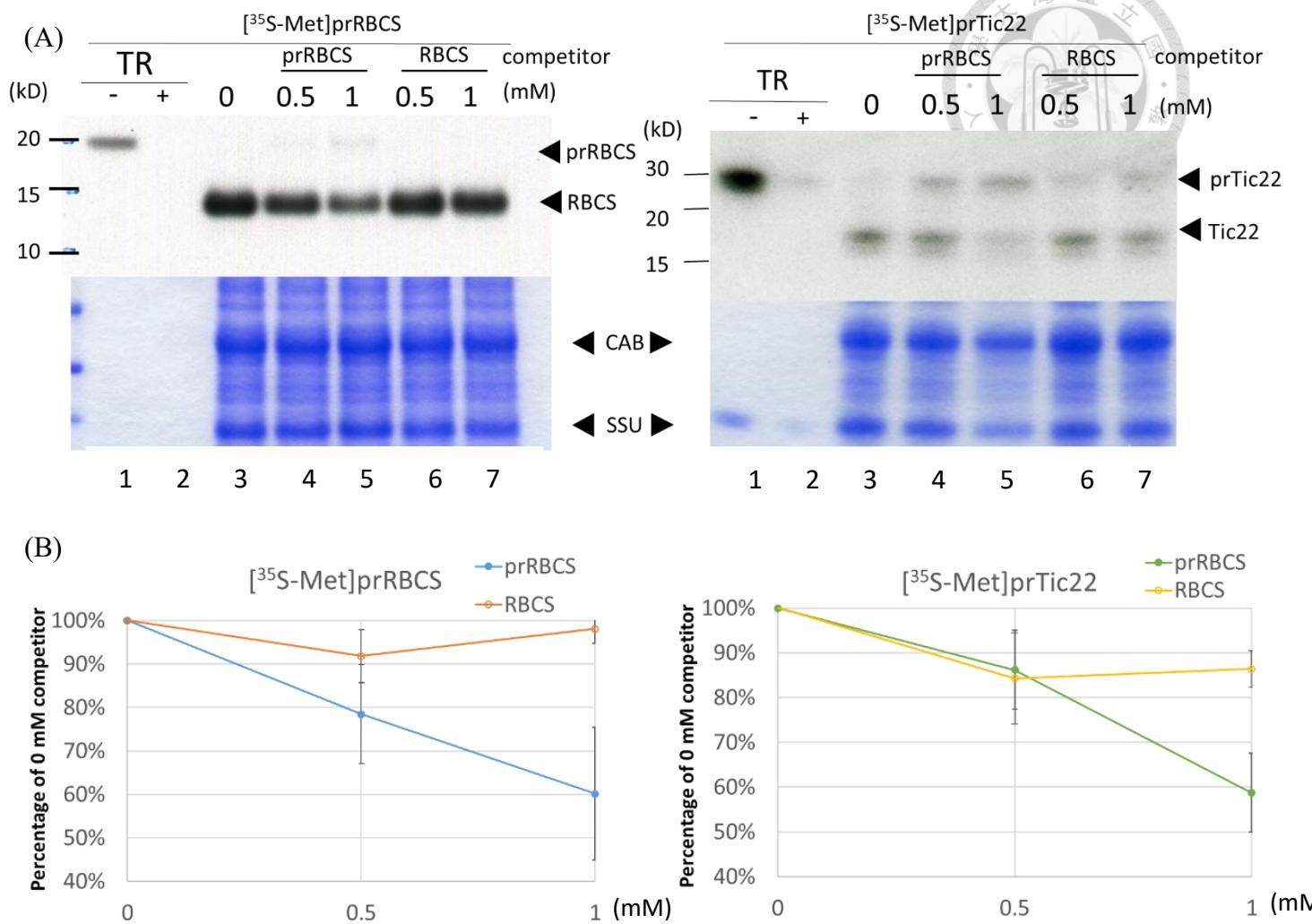
圖六、prTic22 進入葉綠體之時間進程 (Time course)

(A) 將 prTic22 [ $^{35}$ S-Met] 與豆子分離出的葉綠體放在一起，並加入 3 mM ATP，進行進入葉綠體實驗。在各個時間點終止反應。取一半的樣品，以 thermolysin 處理，分離出完整的葉綠體後，以 SDS-PAGE 電泳凝膠分析。所有的樣品以相同蛋白質含量膠體電泳分析。圖中上部為 X 光片成像，下部為同片膠之 Coomassie blue 染色。(B) 定量分析 mature 的 Tic22 之含量。(n=3)。



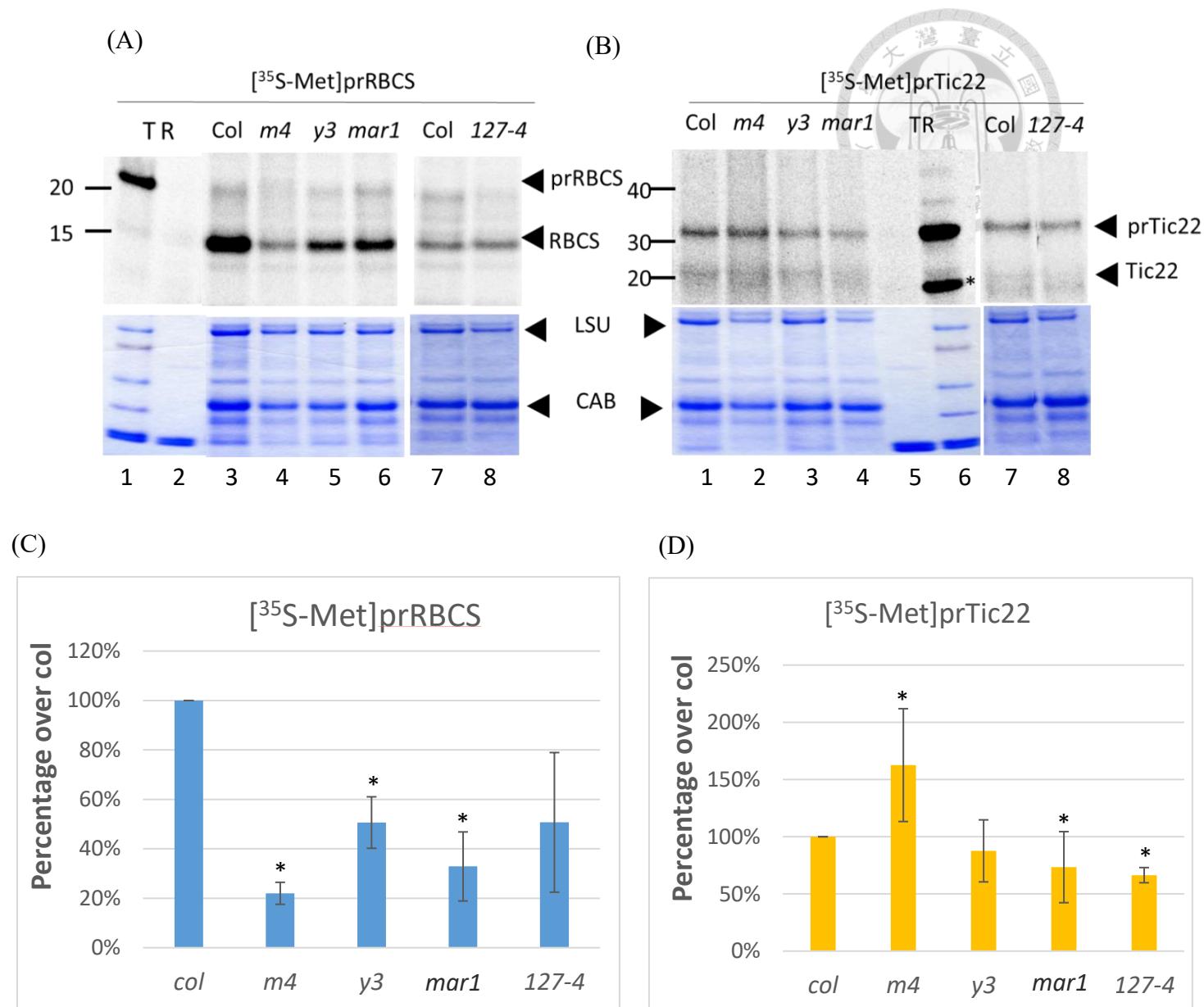
圖七、prTic22 進入葉綠體對於 ATP 之需求

放射線標定( $^{35}\text{S}$ -Met)之 prTic22 與 prRBCS，與豆子所分離出的葉綠體，在各種 ATP 濃度下，進行輸入到葉綠體實驗 30 分鐘的實驗。結束實驗後，將葉綠體以 thermolysin 處理。再分離出完整葉綠體，進行 SDS-PAGE 電泳膠體分析，每個樣品以相同蛋白質含量進行膠體電泳分析。圖中上部為 X 光片成像，下部為同片膠之 Coomassie blue 染色。(B)定量 Tic22 與 RBCS 的 mature 訊號並做圖 (n=4)。將 5 mM ATP 之 mature 訊號視為 100%。



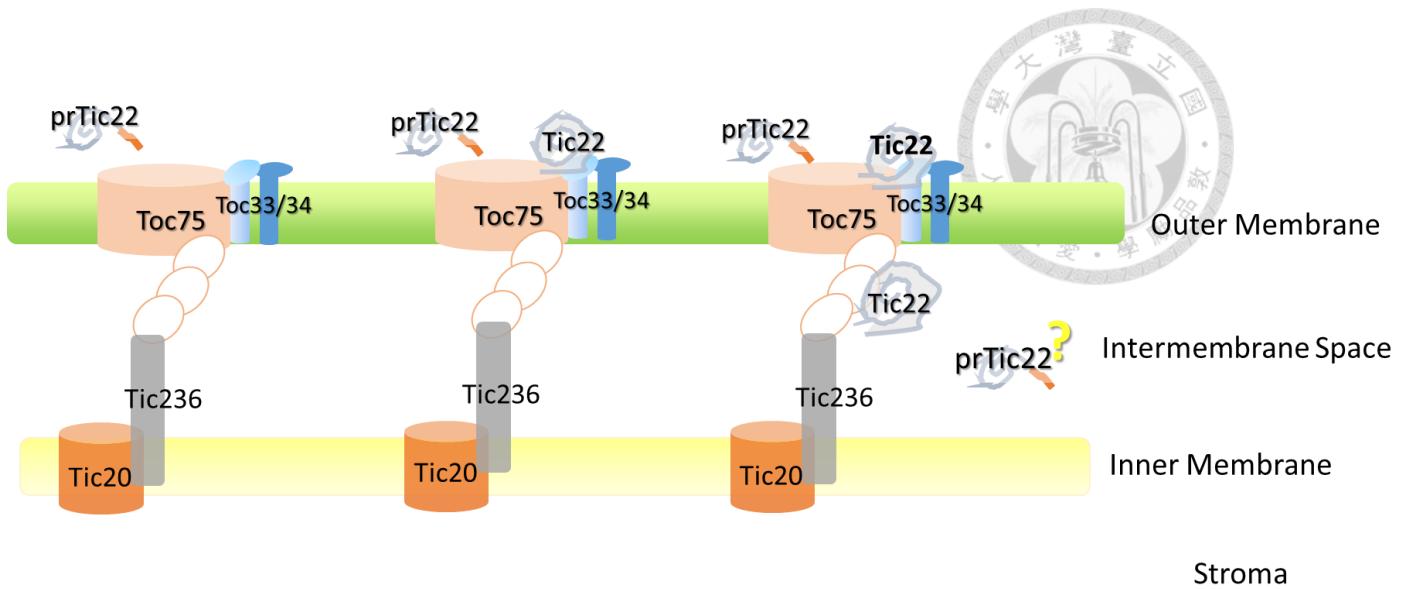
圖八、prRBCS 與 prTic22 進入葉綠體的競爭

(A) 將豆子分離出的葉綠體與活體外轉譯的 $[^{35}\text{S}\text{-Met}]$ prTic22 或是 $[^{35}\text{S}\text{-Met}]$ prRBCS，與 5 mM ATP 且加入 *E.coli* 大量表達純化後的 prRBCS 或 RBCS，以三個不同的濃度，作為競爭者，一起進入到葉綠體 30 分鐘的實驗。結束實驗後，將葉綠體處理 thermolysin，再分離出完整葉綠體，進行 SDS-PAGE 膠體電泳分析。所有樣品皆以相同的蛋白質含量，進行膠體電泳分析。圖中上部為 X 光片成像，下部為同片膠之 Coomassie-blue 染色。(B) 將 mature 的 RBCS 與 Tic22 進行定量，重複實驗並作圖的結果(n=3)。每次實驗皆以競爭者濃度為 0 mM 時 mature 的 RBCS 或是 Tic22 import 的量為 100%。



圖九、Tic22 進入到葉綠體膜間隙需要 TOC 蛋白

prRBCS 與 prTic22 進入到阿拉伯芥 translocon 突變株 *m4* (*tic236*)、*y3* (*tic20*)、*mar1* (*toc75*)、127-4 (*toc33*) 及 wild type (*Col*) 所分離出的葉綠體。以 5 mM ATP 與分離出的葉綠體一起反應 20 分鐘後，將葉綠體處理 thermolysin，再分離出完整葉綠體。以 SDS-PAGE 膠體電泳分析。所有樣品皆以相同的蛋白質含量，進行膠體電泳分析。圖中上部為 X 光片成像，下部為同片膠之 Coomassie-blue 染色。（\*此為 prRBCS 之 TR 訊號）(B) 將 mature 的 RBCS 與 Tic22 進行定量，重複實驗並作圖的結果 (n=3)。以 prRBCS 與 prTic22 進入到 *Col* 之 mature 作為 100%。\*由成對樣本 t 檢定 (Paired Sample t test)  $p < 0.05$



圖十、prTic22 進入至膜間隙之示意圖

表一、TMD 氨基酸序列

我們選擇了 14 個內膜蛋白的 TMD 序列，5 個是使用 stop-transfer 路徑，9 個是屬於 post-import 路徑。Glycine 跟 alanine，這兩個體積比較小的氨基酸，以綠色標記。Tryptophan、phenylalanine 跟 tyrosine，這些體積比較大的氨基酸，以紅色標記。



### stop-transfer

Accession no.	Name	TMD
At3g20320	TGD2	<b>WEGGVGLFIV SGATLLALSW A</b>
At2g25660	M4	<b>FFLRC CSVFFA VISGVCLLVW Y</b>
At5g42480	ARC6	<b>EASVKIL AAG VAIGL ISLF SQ</b>
At3g63410	APG1	<b>FLGRFILLGTL AAAWFVLIPI Y</b>
At5g46110	TPT	<b>KYPWLVTGFF FFMWYFLNVI F</b>

### post-import

Accession no.	Name	TMD
At2g26500	PetM/VII	<b>FKIAAIMNAL TLVGVAVGFV L</b>
At5g52440	TatB	<b>ASLFGVGAPE ALVIGVVALL V</b>
At5g28750	Tha4 (TatA)	<b>NALFGLGVPE LAVIAGVAAL L</b>
At5g16620	Tic40	<b>GSPLFWIGVG VGLSALFSYV T</b>
At4g03280	petC	<b>TLNLLLLGAL SLPTGYMLVP Y</b>
At1g77490	APX	<b>NYFLNIIIAI GVLVLLSTLF G</b>
At5g21430	CCRL	<b>PTRILGYFIG AWLVLGVALS V</b>
At4g09350	J25 (CRRJ)	<b>TALTFDILIV LFAVCC IAF VI</b>
At4g14870	SecE1	<b>TTGVVLGVIA GSSVVLLTVN F</b>

表二、使用 post-import pathway 插入內膜及穿越內膜的蛋白質 TMD 與其前後之氨基酸序列

下表為阿拉伯芥與白楊樹、葡萄及番茄之同源基因。黃色標記部分為

Aramemnon website (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/request.ep>)所預測之

TMD 序列，統計以下序列各種氨基酸數量，即可獲得圖二。



### TatB At5g52440

Arabidopsis	SMMIRASLFGVGAAPEALVIGVVALLVFGPKG
Western Poplar	GKVIHASLFGVGAAPEALVIGVVALLVFGPKG
Grape	GKVVYASLFGVGAAPEALVIGVVALLVFGPKG
Tomato	KGKGVYASLFGVGAAPEALVIGVVALLVFGPKG

### atTic40 At5g16620

Arabidopsis	SSSTIGSPLFWIGVGVLGSAFLSYVTSNLKK
Western Poplar	PPSQIGSPLFWVGVGVALSAIFSWVATRLKN
Grape	PSSNIIGSPLFWIGVGVLGSAFLSWVASNLLKK
Tomato	PPSQMGSPLFWIGVGVGFSALFAWVASYLKK

### TatA At5g28750

Arabidopsis	KPLTCNALFGLGVPELAVIAGVAALLFGPKK
Western Poplar	KKGLTCNALFGLGVPELVVIAGVATLLFGPK
Grape	KRLTCCTCLFGLGVPELVVIAGVAALVFGPKK
Tomato	RGLSCYCLFGLGVPELAVIAGVAALVFGPKQ

### PetM AT2G26500

Arabidopsis	AVGEIFKIAAIMNALTIVGVAVGFVILLRIET
Western Poplar	DVGEIFRIAAIMNGLVLGVAVGFVILLRVEA
Grape	AASEIFRIAAIMNALVLIGVAVGFVILLRIEA
Tomato	AALEIFRIASIIPGLVLGVAVGFVILLRIET



## PetC At4g03280

Arabidopsis	MEKRKTLNLLLLGALSLPTGYMLVPYATFFV
Western Poplar	MGKRELMNLLLLGALSLPTAGMLVPYTYFFV
Grape	GKRKLMNLLLLGAISLPSAGMLIPYATFFAP
Tomato	EKRNLNMNLLLGALALPTGGMLVPYATFFAP

## APX At1g77490

Arabidopsis	KPLPTNYFLNIIIAIGVLVLLSTLFGGNNNS
Western Poplar	-
Grape	-
Tomato	PDKPLPTNYFLNIIIVIGVLAILTYLLGN

## CRR1 At5g21430

Arabidopsis	PEDVG PTRILGYFIGAWLVLGVALSVAFNR
Western Poplar	PEDEG PTRILGYFALAWLVLAVTLSVTLN R
Grape	PEDVRPTILVGYFLFAWLILSFTLSIALNR
Tomato	PEDVG PTRILGYFIGAWLVLGVALSVAFNR

## CRRJ At4g09350

Arabidopsis	SDQAM TALTDFDILIVLFAVCCIAFVI VFKDP
Western Poplar	SDQAMSALTDFDIFIILFSIGCLIFVLFFKEP
Grape	SDQAVTALTDFDILIIIFAICCIYVLFKEP
Tomato	QAKTALTDFDILIIIFSFCCIYAVVFKEQY

## SecE At4g14870

Arabidopsis	QKVLGTTGVVLGVIAGSSVLLTVNFLLAEL
Western Poplar	AFGKVLGTTGVVIGVIVGSSVLLTVNAVLA E
Grape	-
Tomato	-

表三、使用 stop-transfer pathway 插入內膜之 TMD 與其前後之胺基酸序列

下表為阿拉伯芥與白楊樹、葡萄及番茄之同源基因。黃色標記部分為

Aramemnon website (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/request.ep>)所預測之

TMD 序列，統計以下序列各種胺基酸數量，即可獲得圖二。



## TGD2 At3g20320

Arabidopsis	KRSIWEGGVGLFIVSGATLLALSWAWLRGFQ
Western Poplar	GRRSIWEGGVGLFLVSGAVLVALSLAWLRGFQ
Grape	RRSIWEGGVGLFLVSGTVLLVLSLAWLRGFQ
Tomato	KRSIWEGGVGLFIVSGTVLLALSLAWLRGFQ

## M4 At2g25660

Arabidopsis	WEEGLFFLRCGVFFAVISGVCLLVWYQQNKA
Western Poplar	VWKEGLLIVRCGVFGAVISGVCLLVWYGQNR
Grape	PLWKEGLFVRCGVFLAVISGVCLLVWYGRAK
Tomato	GTLVEAKPNLHFAVLNFPVSLVPTLVQVIES

## ARC6 AT5G42480.1

Arabidopsis	ADMLKEASVKILAAGVAIGLISLFSQKYFLK
Western Poplar	TEKIKDASIKIMCAGVAIGLLTLAGLKYFPP
Grape	KIKDASVKIMCGGVVGLMTLIGLKYLPACK
Tomato	IKDASLKIMCAGVAVGFTLVGLKLSSFRHG

## APG1 AT3G63410

Arabidopsis	VNNPFSFLGRFLLGTLAAAWFVLIPYMWIKD
Western Poplar	PANPFVFFLRFILGAMAATYYVLVPIYMWIKD
Grape	-
Tomato	VNPFPFLMRFLLGIMAASYYVLVPIYMWIKD

## TPT At5g46110

Arabidopsis	VGFLAKYPWLVTGFFFFMWFYFLNVIFNILNK
Western Poplar	GFFEKNPALVTGFFFFMWFYFLNVIFNILNK
Grape	IGFLDKYPALVTGFFFFMWFYFLNVIFNILNK
Tomato	KIGFFNKATLTTGFFFFMWFYFLNVIFNILNK

## 參考資料

- Awai, K., Xu, C., Tamot, B., and Benning, C.** (2006). A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 10817-10822.
- Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., and Zhu, T.** (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**, 559-574.
- Chen, Y.L., Chen, L.J., Chu, C.C., Huang, P.K., Wen, J.R., and Li, H.M.** (2018). TIC236 links the outer and inner membrane translocons of the chloroplast. *Nature* **564**, 125-129.
- Froehlich, J.** (2011). Studying *Arabidopsis* envelope protein localization and topology using thermolysin and trypsin proteases. *Methods Mol Biol* **774**, 351-367.
- Froehlich, J.E., and Keegstra, K.** (2011). The role of the transmembrane domain in determining the targeting of membrane proteins to either the inner envelope or thylakoid membrane. *The Plant Journal* **68**, 844-856.
- Gutensohn, M., Schulz, B., Nicolay, P., and Flugge, U.I.** (2000). Functional analysis of the two *Arabidopsis* homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *Plant J* **23**, 771-783.
- Keegstra, K., Lubben, T.H., and Theg, S.M.** (1988). Transport of proteins into chloroplasts. *Photosynth Res* **17**, 173-194.
- Keegstra, K., Olsen, L.J., and Theg, S.M.** (1989). Chloroplastic Precursors and their Transport Across the Envelope Membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 471-501.
- Kouranov, A., Wang, H., and Schnell, D.J.** (1999). Tic22 is targeted to the intermembrane space of chloroplasts by a novel pathway. *J Biol Chem* **274**, 25181-25186.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., and Schnell, D.J.** (1998). Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *The Journal of cell biology* **143**, 991-1002.
- Li, H.-m.M., and Chiu, C.-C.C.** (2010). Protein transport into chloroplasts. *Annual review of plant biology* **61**, 157-180.

- Paila, Y.D., Richardson, L.G.L., and Schnell, D.J.** (2015). New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. *J Mol Biol* **427**, 1038-1060.
- Richards, F.M.** (1974). The interpretation of protein structures: Total volume, group volume distributions and packing density. *Journal of Molecular Biology* **82**, 1-14.
- Schnell, D.J., Blobel, G., Keegstra, K., Kessler, F., Ko, K., and Soll, J.** (1997). A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends in Cell Biology* **7**, 303-304.
- Shi, L.X., and Theg, S.M.** (2013). The chloroplast protein import system: from algae to trees. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 314-331.
- Stanga, J.P., Boonsirichai, K., Sedbrook, J.C., Otegui, M.S., and Masson, P.H.** (2009). A role for the TOC complex in Arabidopsis root gravitropism. *Plant Physiol* **149**, 1896-1905.
- Theg, S.M., Bauerle, C., Olsen, L.J., Selman, B.R., and Keegstra, K.** (1989). Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J Biol Chem* **264**, 6730-6736.
- Viana, A.A.B., Li, M., and Schnell, D.J.** (2010). Determinants for Stop-transfer and Post-import Pathways for Protein Targeting to the Chloroplast Inner Envelope Membrane. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 12948-12960.
- Vojta, L., Soll, J., and Bolter, B.** (2007). Protein transport in chloroplasts - targeting to the intermembrane space. *Febs j* **274**, 5043-5054.
- Windsor, B., Roux, S.J., and Lloyd, A.** (2003). Multiherbicide tolerance conferred by AtPgp1 and apyrase overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* **21**, 428-433.