

國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所

碩士論文

Institute of Molecular and Cellular Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



硝酸鹽轉運蛋白 CHL1 與氫離子幫浦 AHA2 的
交互作用

The interaction between nitrate transporter CHL1
and proton pump AHA2

許為綺

Wei-Chi Syu

指導教授：蔡宜芳 博士

Advisor: Yi-Fang Tsay, Ph.D.

中華民國 104 年 1 月

January, 2015

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

硝酸鹽轉運蛋白 CHL1 與氫離子幫浦 AHA2 的
交互作用

The interaction between nitrate transporter CHL1
and proton pump AHA2

本論文係許為綺君 (R01B43015) 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 104 年 01
月 23 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：

蔣百芳

(指導教授)

楊政

董桂書

系主任、所長

周子賓

致謝




經歷了兩年半的時間，終於順利的把論文完成，很高興有這個機會，能站在知識的邊境上，探索未知的領域。

因為有許多人的支持、鼓勵與帶領，才能順利的完成這份論文。非常感謝指導教授蔡宜芳老師，感謝老師帶領我探索未知的科學領域，即便我常常沒辦法把事情做好，老師還是非常有耐心地指導，同時也給予最大的鼓勵。也十分感謝李秀敏老師與董桂書老師，因為兩位老師的建議，讓我的論文能夠更加完整，也提供許多後續研究的方向。N317 的各位學長姊，在這一段探索旅途中，更是不可或缺的存在。感謝珊華學姊時時刻刻的叮嚀，讓每一件事都可以順利進行。每次在實驗上遇到的疑難雜症，都能夠在與富鈞學長、博凱學長、又瑄學姊的討論中獲得建議並順利排除，真的很謝謝你們。謝謝慧宇學姊在我口試前的緊要關頭，花了好多時間幫我調整簡報，還抽空擔任我口試時的記錄。感謝于婷學姊給我研究所生活的經驗與方向，讓我無論在選課、上課或準備論文上都能有頭緒的進行。感謝國恩學長，在許多實驗上面給的小建議，讓我每次的實驗都能有所進步。還要謝謝已經離開實驗室的雅筠學姊、珮茹學姊和鳳君，謝謝妳們當時給的建議和鼓勵。也非常感謝以前大學時期的老師和同學，以及博雅書院的夥伴們，在我研究所時期依然關心我的狀況，並時時給予鼓勵與祝福，讓我有能量繼續向前進。還要謝謝遠在丹麥的 Dr. Palmgren 與 Dr. Fuglsang 提供我 RS-72 酵母菌系統，讓我的研究可以順利進行。最後，要感謝我的家人，謝謝你們無時無刻的支持和關心，在我低潮時刻給予我鼓勵與勇氣，讓我能夠順利的完成這一趟探索之旅。

這是一趟有趣的探險，讓我對科學又有了更進一步的認識，非常感謝！

為綺

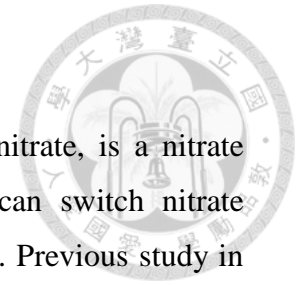
摘要



CHL1 是一個協同運輸的硝酸鹽轉運蛋白，它透過氫離子驅動力的協助來運輸硝酸鹽。此外，CHL1 還是一個雙親和性蛋白，會依據環境中硝酸鹽濃度而改變其對硝酸鹽的親和性。本實驗室先前酵母菌雙雜合篩選中，發現 CHL1 會與氫離子幫浦 AHA2 互相結合。已知 AHA2 是一個能創造氫離子驅動力的自我抑制型幫浦蛋白，需要其它激酶或去磷酸酶對 AHA2 蛋白質 C 端 R domain 進行磷酸化或去磷酸化修飾，才可以調控其氫離子幫浦活性。本研究針對 CHL1 在運輸硝酸鹽上對氫離子的需求，以及 CHL1 與 AHA2 的結合進行分析。爪蟾卵硝酸鹽吸收實驗結果顯示，在植物生理 pH 值範圍內，CHL1 在高親和性模式下，硝酸鹽吸收能力隨 pH 值下降而上升；在低親和性模式下，吸收能力幾乎不受 pH 值影響。以酵母菌雙雜合實驗分析 CHL1 與 AHA2 的結合，發現不同親和性模式下的 CHL1 與 AHA2 的結合強度沒有差異。而 CHL1 除了能與 AHA2 結合之外，還可以與同一家族的 AHA1、4、11 互相結合。分析 CHL1 與 AHA2 的不同片段區域之結合強度，發現 CHL1 與 AHA2 的 R domain 結合能力非常微弱，而對 AHA2 之第七到第十個穿膜蛋白的結合能力最強，但若第七到第十個穿膜蛋白，加上最末端 R domain，則結合能力會下降，推測 R domain 會阻礙 CHL1 與 AHA2 的結合。我們亦使用電腦模擬 CHL1 與 AHA2 可能的結合方式，並與酵母菌雙雜合試驗結果進行比較，推論出最有可能之結果。此外，也發現能調控 CHL1 親和性轉換的 CIPK23 與 ANI 皆會與 AHA2 結合，且這樣的結合需要 R domain 的存在，推測它們能夠調控 AHA2 的活性。但是，我們以 RS-72 互補實驗發現，CHL1、CIPK23 皆無法獨自活化 AHA2 的氫離子幫浦活性。我們推測，CHL1 可能需要與 CIPK23 或其他蛋白共同合作，才有辦法對 AHA2 進行調控。

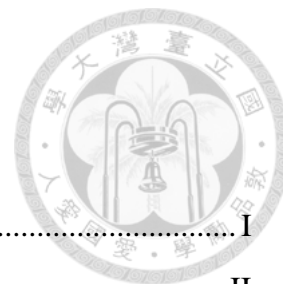
關鍵字：CHL1、AHA2、協同運輸、吸收硝酸鹽、氫離子驅動力

Abstract



CHL1, using proton gradient as driving force to transport nitrate, is a nitrate co-transporter. Moreover, it is a dual-affinity transporter that can switch nitrate affinity according to the nitrate concentrations in the environment. Previous study in our lab found that CHL1 can interact with AHA2, a H⁺-ATPase, in a yeast two-hybrid screen. AHA2 generates the proton motive force but is an auto-inhibited proton pump. It needs kinase and phosphatase to modified the C-terminal R domain to regulate the pump activity. In this study, I focus on the requirement of proton motive force on CHL1 nitrate uptake and the interaction between CHL1 and AHA2. In the oocyte nitrate uptake study, we found that within the plant physiological pH range, high-affinity transport activity of CHL1 showed more dramatic difference between low pH and high pH condition; while the low-affinity transport activity of CHL1 show little or not difference between low- and high-pH condition. Yeast two-hybrid study showed that AHA2 can interact both CHL1 T101A and CHL1 T101D suggesting that CHL1 at both high- and low-affinity modes can interact with AHA2. CHL1 can also interact with other AHA family member including AHA1, AHA4 and AHA11. Analyzing the interaction between CHL1 and different truncated forms of AHA2, we found the interaction between CHL1 and AHA2 R domain is very weak, and the AHA2 transmembrane domain 7 to 10 has the strongest interaction with CHL1. But the R domain hampered the interaction between CHL1 and AHA2 as AHA2 transmembrane domain 7 to 10 with R domain interact with CHL1 weaker than the one without R domain. We also use computer to simulate the interaction model between CHL1 and AHA2 to predict the potential model that can accommodate yeast two-hybrid results. We also found that CIPK23 and ANI, known to regulate the CHL1, can interact with AHA2 and their interaction with AHA2 requires the presence of R domain, suggestion that they might regulate the activity of AHA2. But using RS-72 complementation assay, we found that CHL1 and CIPK23 cannot activate the pump activity of AHA2. More study is required to find out if CHL1 need to cooperate with CIPK23 or other proteins to regulate AHA2.

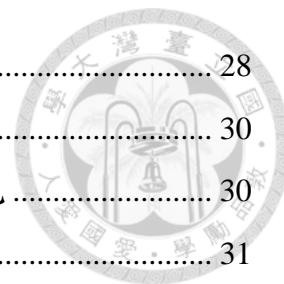
Keywords: CHL1 、AHA2 、Cotransport 、Nitrate uptake 、proton motive force



目錄

致謝	I
摘要	II
Abstract.....	III
圖目錄	VI
第一章 前言	1
1.1 植物對氮的吸收機制，是解決糧食與氮污染議題的一大關鍵	1
1.2 硝酸鹽轉運系統	1
1.3 CHL1 的運輸方式-協同運輸 (Co-transport)	2
1.4 Plasma Membrane H ⁺ -ATPase Family	4
1.5 PM H ⁺ -ATPase 的調控機制	5
1.6 PM H ⁺ -ATPase 與硝酸鹽之間的關係	6
1.7 實驗目的	6
第二章 實驗材料與方法	8
A. 非洲爪蟾卵 (<i>Xenopus laevis</i> oocytes) 之硝酸鹽吸收活性測定	8
B. 質體構築	10
C. 酵母菌雙雜合試驗	15
D. 西方點墨法	16
E. RS-72 互補實驗	17
F. ZDock 蛋白質接合模擬	18
G. 蛋白質序列相似度比較	19
H. 引子列表	19
第三章 結果	21
3.1 氫離子驅動力對 CHL1 硝酸鹽轉運能力的影響	21
3.2 CHL1 與 AHA2 之間的結合關係	23
3.3 CHL1 與 AHA family 其他成員的結合關係	26
3.4 CHL1 相關激酶及去磷酸酶與 AHA2 之間的結合關係	27

3.5 CHL1 調控 AHA2 的可能性	28
第四章 討論	30
4.1 氫離子驅動力在 CHL1 硝酸鹽運輸中所扮演的角色	30
4.2 CHL1 與 AHA2 結合模擬圖之分析	31
4.3 CHL1 與 AHA2 可能存在之互動關係	33
4.4 細胞膜上的工作群組	34
圖表	37
參考文獻	62



圖目錄

圖一、CHL1 在高、低親和性轉運模式下，硝酸鹽轉運能力受氫離子驅動力影響的程度不同	38
圖二、在酵母菌之中，CHL1、CHL1-T101A、CHL1-T101D 與 AHA2 的結合強度沒有差異	39
圖三、在酵母菌之中，CHL1 與 AHA2 之 R domain 的結合強度顯著低於與 AHA2 結合的強度	40
圖四、在酵母菌之中，CHL1 與 AHA2-TM7~10 的結合強度最高，而 R domain 會降低其結合強度	42
圖五、AHA2 各片段之示意圖	43
圖六、pDL2Nx-AHA2 Δ 248 與 pDL2Nx-AHA2 Δ R 兩個蛋白質的表現量極低	44
圖七、ZDock 模擬 CHL1 與 AHA2 之結合結果- Model 1	46
圖八、ZDock 模擬 CHL1 與 AHA2 之結合結果- Model 2	48
圖九、ZDock 模擬 CHL1 與 AHA2 之結合結果- Model 3	50
圖十、CHL1 與 AHA Family 之間可能存在高度保留的結合位置	51
圖十一、AHA2-R domain 存在時，ANI、CIPK23 和 CIPK8 才能夠與 AHA2 結合	53
圖十二、RS-72 系統中，CHL1 無法單獨活化 AHA2 的氫離子幫浦活性	55
圖十三、在 RS-72 系統中，CIPK23 無法單獨活化 AHA2 的氫離子幫浦活性	57
附圖一、在酵母菌之中，CHL1 與 AHA2 之 R domain 的結合強度顯著低於與 AHA2 結合的強度	58
附圖二、在酵母菌之中，CHL1 與 AHA2-TM7~10 的結合強度最高，而 R domain 會降低其結合強度	59
附圖三、AHA family 於阿拉伯芥根部的基因表現程度	60
附圖四、AHA Family 之系統分類樹及植物不同發育時期之表現量	61

第一章

前言



1.1 植物對氮的吸收機制，是解決糧食與氮污染議題的一大關鍵

所有生物皆需從外界攝取養分，以維持生理機能運行。在大自然中，作為生產者 (producers) 的植物，扮演將環境中無機物 (inorganic compound) 帶到生態系統 (ecosystem) 中的重要角色；植物吸收自然環境中消費者 (consumers) 無法直接利用的無機化合物，轉換成有機物 (organic compound) 供消費者使用，此環節若出了問題，將會影響奠基於其上的整個生態系統。隨著世界人口爆炸性的成長，系統中的生產者是否足夠支持其上的消費者，遂成為迫切的議題。因此，植物如何有效吸收與利用環境中的無機物，以供給其上整個系統，是生態系統中非常重要的一環。

氮 (nitrogen, N)，是透過植物進入生態系統的重要元素之一，生物的基本遺傳物質去氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 以及產生生命現象所需的蛋白質 (protein)，皆含有氮元素。對植物來說，氮也是其生長的限制因子 (limiting factor)，土壤中植物可利用之氮含量多寡，影響了植物生長好壞。在農業應用上，施加氮肥是提升糧食產量的對策之一；然而，過量的施肥卻也造成環境汙染的問題。農地中的含氮肥料常隨著雨水流至水庫與海洋，不僅污染飲用水亦造成水質優養化的環境問題 (Wen and Chang, 2008; Moran, 2011)。若能充分了解植物對氮的吸收機制，以提升其吸收效率，對糧食危機與環境汙染議題可說是一大助益。

1.2 硝酸鹽轉運系統

植物可利用的氮源主要有：無機物型態的硝酸鹽 (NO_3^- , nitrate)、銨鹽 (NH_4^+ , ammonium) 以及有機物型態的胜肽 (peptide)、尿素 (urea)。其中，硝酸鹽是大部分植物在有氧土壤中的主要無機氮源 (Krouk et al., 2010a)，同時也扮演植物體


內訊息 (signal) 傳遞分子 (Crawford, 1995)。然而，硝酸鹽的流動性 (mobility) 很強，非常容易受雨水沖刷 (Crawford and Glass, 1998)，土壤中硝酸鹽含量往往有千倍的急遽的變化，範圍可從 100 millimolar (100 mM) 至 10 micromolar (10 μ M) (Crawford, 1995)。為因應硝酸鹽的濃度變化，植物演化出兩種吸收硝酸鹽的系統：(1) 高親和性轉運系統 (high-affinity transport system) 主要負責吸收 micromolar 濃度範圍的硝酸鹽 (2) 低親和性轉運系統 (low-affinity transport system) 主要負責吸收 millimolar 濃度範圍的硝酸鹽。

在阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中，有兩類型的硝酸鹽轉運蛋白，分別是 AtNRT1 family 及 AtNRT2 family。AtNRT1 family 共有 53 個同源蛋白 (homologue)，其中大部分為低親和性硝酸鹽轉運蛋白，而 AtNRT2 family 則為高親和性硝酸鹽轉運蛋白 (Tsay et al., 2007)。在 AtNRT1 family 中有一個特別的成員 AtNRT1.1 (CHL1)，同時具有高、低親和性硝酸鹽轉運的能力，能夠隨外界硝酸鹽濃度變化，轉換對硝酸鹽的親和性，就如同開車換檔一樣，可根據外部狀況對本身進行切換，是一雙親和性硝酸鹽轉運蛋白 (Liu and Tsay, 2003)。

我們實驗室過去研究發現，CHL1 的雙親和性轉換機制，主要是第 101 個胺基酸蘇胺酸 (Threonine, T) 的磷酸化 (phosphorylation) 與否 (Liu and Tsay, 2003)。當 101 蘇胺酸受到磷酸化，CHL1 會呈現高親和性的硝酸鹽轉運特性；反之，則呈現低親和性硝酸鹽轉運特性。隨著自然環境中硝酸鹽濃度高低的波動，CHL1 透過 T101 的磷酸化與否，自由切換硝酸鹽轉運的模式，以適應外界環境的劇烈變化。除了轉運硝酸鹽的功能之外，CHL1 還是一個硝酸鹽的感應蛋白 (sensor)，可以幫助植物感知環境中硝酸鹽的濃度，以啟動相對應代謝措施 (Ho et al., 2009)。

1.3 CHL1 的運輸方式-協同運輸 (Co-transport)

生物細胞將物質從外界運至細胞內，除了一些不需膜蛋白 (membrane protein)，透過擴散作用直接穿過細胞膜的物質之外，主要透過細胞膜上的膜蛋白進行運輸。負責運輸物質的膜蛋白，又可分成幫浦蛋白 (ATP-powered pump)、離子通道蛋白 (ion channel) 與轉運蛋白 (transporter)。並依照消耗 ATP 之有無，簡單分成主動



運輸 (active transport) 與被動運輸 (passive transport) 。一般來說，物質會由高濃度往低濃度移動，因此透過物質本身濃度梯度產生之化學驅力 (chemical driving force) ；除了化學驅力外，細胞膜兩側的電位 (electric potential) 差，也是影響物質的運輸驅動力。綜合以上兩股力量，我們將影響物質運輸的驅動力統稱為電化學位階 (electrochemical potential) 。將物質由位階高處送往位階低處的運輸，我們稱為被動運輸。反之，當細胞需要從位階低處將物質送往位階高處，則需要消耗能量，以對抗電化學位階，這種需耗費能量的運輸稱為主動運輸。幫浦蛋白執行主動運輸，透過消耗 ATP 產生能量，造成蛋白結構變化，對抗電化學位階運輸物質；有點類似我們從地下抽水至高處需要消耗能量。執行被動運輸的主要是離子通道蛋白與輸送單一物質的轉運蛋白 (uniporter) 。這兩種蛋白輸送物質時，是透過物質本身的位階差，使該物質被動地移動。其中離子通道蛋白就如其名，打開通道，讓物質從高位階流向低位階；而轉運蛋白，則是透過物質由高位階流向低位階的這股電化學驅力，產生結構改變，進而將其運輸。整體而言，就像是水從高處往低處流的感覺。除了幫浦、離子通道及單一物質轉運蛋白之外，生物還演化出結合主動及被動運輸方式的運輸型態，稱為次級運輸，又名協同運輸 (co-transport) ；行使這類運輸的轉運蛋白 (co-transporter) ，本身不直接消耗 ATP ，就能夠將物質從位階低處送往位階高處。這類膜蛋白是將其它主動運輸膜蛋白所創造的電化學驅力當作能量來源，協助將輸送的另一物質由位階低處送往位階高處；就如同水力發電，將水抽至高處，讓其往低處流產生能量，並用這股能量來執行其他需要耗能的事情。協同運輸的膜蛋白，可同時運送 A、B 兩種物質，其中 A 物質是主要被運送的物質，需要從位階低處送往位階高處；B 物質則是會協助 A 物質的運輸，主動運輸膜蛋白會創造 B 物質的電化學驅力，用途在推動協同運輸蛋白運作。因此，藉由 B 物質的驅力推動，A 物質能順利由低濃度處送往高濃度處。依照 A、B 兩物質運送方向的異同，可分為反向運輸 (antiport) 與同向運輸 (symport) 。


植物時常利用協同運輸吸收土壤中的養分，CHL1 就是利用協同運輸的方法運送硝酸鹽 (Tsay et al., 1993) ；藉由根部氫離子幫浦 (H^+ -ATPase) 所產生的氫離子驅動力 (proton motive force) (即氫離子的電化學驅力)，CHL1 將土壤中硝酸鹽透過同向運輸的方式，與氫離子一同轉運至植物體內。



1.4 Plasma Membrane H⁺-ATPase Family

AHA 為 Arabidopsis Plasma membrane H⁺-ATPase，屬於幫浦蛋白中的 P-type ATPase。當它進行轉運時，蛋白上一個高度保留 (highly conserved) 的天門冬胺酸 (Asparate) 會被磷酸化。主要含三個功能區域 (functional domain)：Nucleotide-binding domain (N domain) 負責與 ATP 結合、Phosphorylation domain (P domain) 是會被磷酸化的區域、Actuator domain (A domain) 負責對 P domain 進行去磷酸化 (dephosphorylation) 以帶動整個蛋白運轉 (Pedersen et al., 2007)。AHA 是阿拉伯芥細胞膜上的氫離子幫浦，共發現有 12 個同源基因 (homologue)，其中 *AHA12* 被認為是偽基因 (Pseudogene) (Axelsen and Palmgren, 2001; Gaxiola et al., 2007)。11 個同源基因中 (*AHA1-II*)，*AHA1* 與 *AHA2* 可以說是最主要的成員，幾乎大量表現於所有的組織中，是維持離子恆定的管家基因 (housekeeping gene)；若兩者互相比較，*AHA1* 於莖部有較多的表現量，而 *AHA2* 則是主要表現於根部組織 (Harper et al., 1990; Gaxiola et al., 2007)。有文獻指出，*aha1aha2* double mutation 會導致胚胎致死 (embryonic lethality) (Haruta et al., 2010)，表示 *AHA1* 與 *AHA2* 在阿拉伯芥的生長上扮演不可或缺的角色。有些 AHA 基因則有較強的組織專一性 (tissue specificity)，例如 *AHA6*、*AHA7*、*AHA8*、*AHA9* 主要在花藥與花粉上 (Houlne and Boutry, 1994; Bock et al., 2006; Gaxiola et al., 2007)；*AHA10* 與種皮發育有關，主要表現於發育初期的果莢與種子上 (Baxter et al., 2005)。 *AHA3*、*AHA4*、*AHA5*、*AHA11* 的在植物中的表現狀況，介於全株大量表現與高組織專一性之間。公開的微陣列資料 (BAR Arabidopsis e-FP Browser) 顯示，在各組織中或多或少都可以偵測到它們的表現；有文獻針對它們進行個別研究，發現 *AHA3* 主要在根、莖、葉維管束 (vascular tissue) 及韌皮部伴細胞 (phloem companion cells) (DeWitt et al., 1991)，*AHA4* 主要表現於根部內皮細胞與種子 (Vitart et al., 2001)，保衛細胞內能發現大量的 *AHA5* (Ueno et al., 2005)，葉片中則可發現大量的 *AHA11* (Alsterfjord et al., 2004; Ueno et al., 2005)。

1.5 PM H⁺-ATPase 的調控機制



PM H⁺-ATPase (Plasma Membrane H⁺-ATPase) 是一個自我抑制蛋白 (auto-inhibition protein)，在一般狀況下氫離子幫浦活性極低，阿拉伯芥透過轉譯後修飾 (post-translational modification)，來調節 PM H⁺-ATPase 的氫離子幫浦活性 (Palmgren, 2001; Gaxiola et al., 2007)。PM H⁺-ATPase C 端 (C-terminal) 的最後 100 個胺基酸，被稱作 R domain (regulatory domain)，會抑制本身的氫離子幫浦活性；目前認為 R domain 抑制的機制為，R domain 包覆 PM H⁺-ATPase 上的 A domain 與 P domain，進而影響氫離子幫浦活性 (Eraso and Portillo, 1994; Morsomme et al., 1996; Morsomme et al., 1998; Palmgren, 2001; Gaxiola et al., 2007; Pedersen et al., 2007)。R domain 上的磷酸化與去磷酸化修飾，是調控 PM H⁺-ATPase 的主要機制 (Axelsen et al., 1999; Palmgren, 2001; Gaxiola et al., 2007; Rudashevskaya et al., 2012)。文獻指出，R domain 末端有一個高度保留的 HYTV motif，其中 T (Threonine, T) 更是存在於所有的 AHA family 中，T 磷酸化與否影響了 PM H⁺-ATPase 的氫離子幫浦活性；此 T 對應到 AHA2 上即是 T947，當 T 947 被磷酸化之後，14-3-3 蛋白將會與 R domain 結合，移除 R domain 的抑制效果，進而促進 AHA2 的氫離子幫浦活性 (Jahn et al., 1997; Baunsgaard et al., 1998; Fuglsang et al., 1999; Palmgren, 2001; Gaxiola et al., 2007)。研究發現，剔除 R domain 的 AHA2 即失去自我抑制的特性 (Palmgren et al., 1990; Regenberg et al., 1995)，因此目前推測，14-3-3 蛋白是將 R domain 稍稍推離 AHA2 本體，以加強 AHA2 的氫離子幫浦活性。除了 AHA2 T947 外，AHA2 T881 若受到磷酸化，亦會促進 AHA2 的氫離子幫浦活性 (Rudashevskaya et al., 2012; Fuglsang et al., 2014)；相反地，S931 受到磷酸化則反抑制氫離子幫浦活性 (Fuglsang et al., 2007)。影響 14-3-3 與 R domain 結合與否的關鍵角色是 T947，T881 磷酸化與否並不影響 14-3-3 與 R domain 的結合，S931 磷酸化則會抑制 14-3-3 與 R domain 的結合 (Fuglsang et al., 2007; Rudashevskaya et al., 2012; Fuglsang et al., 2014)。

目前對負責 PM H⁺-ATPase 磷酸化的激酶 (kinase) 與去磷酸化的去磷酸酶 (phosphatase) 有些許的了解。文獻指出，部分相關的酶位於細胞膜上 (Hayashi et al., 2010; Kinoshita and Hayashi, 2011)。在磷酸化部分，近期研究發現，位於細胞膜的

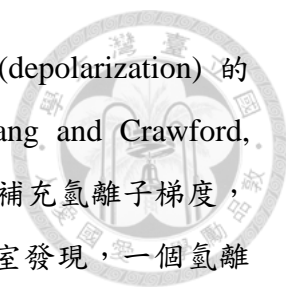
植物胜肽鏈受體 (PSY1 receptor, 一種 LRR-RK) , 其 kinase domain 會磷酸化 AHA1/AHA2 T881 (Fuglsang et al., 2014) , 進而增強其活性; 而蛋白質激酶 PKS5 (又被稱為 CIPK11) , 則會磷酸化 AHA2 S931, 影響 14-3-3 與 AHA2 的結合, 進而降低 AHA2 活性 (Fuglsang et al., 2007) 。但是, 負責去磷酸化 T881 與 S931 位置的去磷酸酶都尚未被找到。在去磷酸化部分, 已知 Protein phosphatase 2A 會與 14-3-3 蛋白競爭與 R domain 結合的位置 (Fuglsang et al., 2006) , 但其實際去磷酸化的位置並不清楚; 另外, Protein phosphatase 2C-D clade 則參與 AHA2 T947 的去磷酸化 (Spartz et al., 2014) , 不過負責磷酸化 T947 位置的激酶尚未被發現。

1.6 PM H⁺-ATPase 與硝酸鹽之間的關係

PM H⁺-ATPase 的活性受到許多外在因素影響, 例如藍光 (Kinoshita and Shimazaki, 1999) 、生長素 (auxin) (Takahashi et al., 2012) 。有文獻指出, 在黃瓜 (*Cucumis sativus* L. cv. Chinese long) 中, 施予硝酸鹽會使根部及葉部 PM H⁺-ATPase 的蛋白質總量與 ATP 水解效率增加 (Nikolic et al., 2012) ; 而施予 PM H⁺-ATPase 抑制劑 (Vanadate) , 則會影響硝酸鹽的吸收速率。在葡萄中, 硝酸鹽會使 PM H⁺-ATPase 蛋白質總量增加, 進而提升整體 ATP 水解效率 (Pii et al., 2014) 。然而, 亦有研究顯示, 有約四成的 AHA1/AHA2 T881 會因硝酸鹽影響而在十分鐘內被去磷酸化, 三十分鐘後又會再度被磷酸化, 但若是施予銨鹽 (NH₄) , 則近九成的 AHA1/AHA2 T881 會在五分鐘內被去磷酸化, 三十分鐘後, 幾乎所有的 AHA1/AHA2 T881 會被去磷酸化 (Engelsberger and Schulze, 2012) 。由此可知, PM H⁺-ATPase 在植物對硝酸鹽的吸收上, 扮演了重要的角色。

1.7 實驗目的

根據本實驗室先前的酵母菌雙雜合大量篩選 (Yeast two-hybrid screen) , 發現以協同運輸作為轉運方式的 CHL1 與 AHA2 會互相結合。亦有文獻指出, 給予根



部細胞硝酸鹽後，細胞膜會因為吸收硝酸鹽而立刻出現去極化 (depolarization) 的現象，但接著會慢慢回復至極化 (Meharg and Blatt, 1995; Wang and Crawford, 1996)；推測回復至極化的現象，是因為 H^+ -ATPase 被磷酸化而補充氫離子梯度，讓硝酸鹽可以持續被轉運，但仍缺乏直接的證據。而我們實驗室發現，一個氫離子驅動力的消耗者，與一個氫離子驅動力的提供者會互相結合，這使我們懷疑 CHL1 可能會調控 AHA2 的活性，用以供給自己轉運硝酸鹽所需的氫離子驅動力。此外，CHL1 本身也是硝酸鹽感應蛋白，我們亦懷疑它能根據環境中硝酸鹽濃度變化，來調控 AHA2 的活性。本篇論文想要探討，CHL1 與 AHA2 之間的關係。CHL1 是否扮演調控 AHA2 的角色？所以，我們首先利用非洲爪蟾卵硝酸鹽吸收實驗，探討氫離子驅動力對 CHL1 轉運能力的影響。也企圖使用酵母菌雙雜合系統尋找 CHL1 與 AHA2 之間可能的結合狀況；最後，使用 RS-72 酵母菌系統，探討 CHL1 是否能夠調控 AHA2 的活性。

第二章 實驗材料與方法



A. 非洲爪蟾卵 (*Xenopus laevis* oocytes) 之硝酸鹽吸收活性測定

1. 質體 (plasmid) 製備:

將帶有 pGEMHE-CHL1 質體的大腸桿菌株 (*E. coli* strain) 以含有 Ampicillin 的 LB 溶液，於 37°C 培養 12-16 小時，取 1.5mL 菌液以離心機離心 6000rpm 1 分鐘後，移除上清液，以 Viogene Mini-MTM plasmid DNA extraction kit 抽取質體，溶於 50μL 無菌水中。

2. 體外轉錄 (*in vitro* transcription) 模板製備：

取 50μL 質體，加入 13μL 無菌水、7μL NEB 2 號 buffer、2μL NheI 限制酶，在 37°C 下反應 1 小時。以 phenol / chloroform (25:24) 純化 DNA，測定 DNA 濃度後，將其稀釋至 1μg/μL。

3. 體外轉錄 (*in vitro* transcription)：

以 mMESSAGE mMACHINTM 體外轉錄組 (Ambion, Austin, Texas)，取 2μL 10X buffer、10μL 2X NTP/CAP mix、2μL 10X enzyme mix，加入 1μg 模板，並補水至 20μL，放入 37°C 下反應 1.5 小時。之後加入 1μL DNase 混合均勻後，放入 37°C 下反應 15 分鐘，加入 115μL DEPC-H₂O、15μL 4M NH₄OAc、150μL phenol/chloroform (25:24) 混合均勻，以 14000rpm 離心 8 分鐘，取上清液加入兩倍體積之 isopropanol 混勻，放入 -80°C 冰箱 30 分鐘後，以 14000rpm 4°C 離心 15 分鐘，以 70%、100% 酒精清洗沉澱物。移除酒精，待乾之後，溶解於適量的 DEPC-H₂O，並使 cRNA 濃度大於 1μg/μL。

4. 非洲爪蟾卵製備：

i. 蛙卵取得：

將雌蛙放入碎冰中 30 分鐘使之昏迷，取出後將蛙肚朝上放置於冰上，

以無塵紙拉起肛門上方 1-2 公分處左側或右側之表皮，用消毒過的手術剪刀橫向剪開一 1 公分開口，再將其內部肌肉組織剪開 1 公分缺口，用鈍端鑷子將卵巢取出，放置於 ND-96 不含 CaCl_2 之緩衝溶液中 (96mM NaCl、2mM KCl、2mM MgCl_2 、5mM HEPES、以 NaOH 調至 pH7.6)，以林格氏液 (Ringer's solution, 150mM NaCl、1.8mM CaCl_2 、2.5mM KCl、10mM HEPES、1mM MgCl_2 、以 NaOH 調至 pH7.4) 清洗傷口，維持傷口濕潤，再用手術縫線將肌肉層與表皮層進行縫合。肌肉層與表皮層進行縫合各縫合 3 針，每一針先打兩個單結在打一個雙結，第一個單結不可拉太緊，以免拉扯肌肉，雙結必須拉緊，以確保傷口密合。最後將爪蟾放置於塑膠盆內，先放入些許的逆滲透水，不可蓋過其口鼻，待其清醒後，再加入 10mM NaCl 溶液至塑膠盆的二分之一用以消毒，約每 24 小時換水一次。

ii. 蛙卵處理：

將蛙卵至於培養皿中，以約 10 顆蛙卵一小群為單位，用鑷子將蛙卵撕開。接著倒除原有緩衝液，加入含 0.8-1 mg/mL collagenase 之 ND-96 不含 CaCl_2 之緩衝液，以 50 rpm 混合速度混合，每 15 分鐘以口徑較大之塑膠滴管反覆抽吸蛙卵，將之混合均勻，共約處理 60 分鐘。最後將蛙卵以含 0.3mM CaCl_2 之 ND-96 緩衝液清洗數次，最後保存於含有 gentamycine (10g/L) 的含 0.3mM CaCl_2 ND-96 緩衝液中。

5. 蛙卵之 cRNA 微量注射：

i. 玻璃針製備：

將毛細管置於微管形成器 (Model p-87 Flaming/brown micropipette puller, Sutter instrument Co., Novato, CA) 中，以 heat 760、pull 130、time 100、pressure 500 拉針程式拉針。並在顯微鏡下，用剪刀將其剪成直徑 0.1-0.15 mm 之缺口。

ii. 注射 cRNA：

先從玻璃針後方，以注射針注入長約 2-2.5 公分的礦物油，再將微量注射器 (model, Company) 從玻璃針末端插入，將其固定於固定架

上，吸取約 1 μ L 的 DEPC-H₂O，再將濃度 1 μ g/ μ L 之 cRNA 吸入。把具動物極與植物極分布均勻，且有明顯赤道極的（第 V-VI 期）蛙卵放置於鋪有尼龍網的培養皿中，讓蛙卵卡在尼龍網的縫隙中，並將針插入卵中，注射 50 nL 的 cRNA。注射完後將卵放回含有 ND-96 緩衝液培養皿中，與 16°C 培養箱中培養兩天，使其表現蛋白後再進行實驗。

6. 蛙卵硝酸鹽吸收實驗：

挑選已表現蛋白之健康蛙卵，以 10 顆一組，分別放入六孔盤中，吸乾 ND-96 緩衝液後，分別加入 5mL 的 10mM 或 100 μ M 硝酸鹽溶液 (10mM 或 100 μ M K¹⁵NO₃、215mM Mannitol、0.3mM CaCl₂，利用 10mM Tris/MES 調整至所需之 pH 值)，放在震盪器上以 40 rpm 速度在室溫中搖晃 1.5 小時或 0.5 小時。之後用塑膠滴管吸出蛙卵，以 ND-96 緩衝液清洗 3 次，放入個孔皆裝有鋁箔小袋之 96 孔盤中，用滴管吸乾液體，置於 80°C 烘箱中兩天將其烘乾。最後用穩定同位素分析儀 ANCA-GSL20/20 (PDZ,UK) 分析同位素 ¹⁵N 含量。

7. 統計分析：

數據使用 Excel 巨集進行統計分析。

Real Statistics Resource Pack software (Release 3.4). Copyright (2014) Charles Zaiontz. www.real-statistics.com

B. 質體構築

1. pTMBV4-AHA2

利用 AHA2 XbaI F/ AHA2 PstI R 為引子，pGEMHE-AHA2 (由許富鈞學長構築) 作為模板，將 AHA2 片段以 5 μ L High Fidelity Taq Buffer、4 μ L 2.5mM dNTP、1 μ L High Fidelity Taq mix (Fermentas) 的條件進行連鎖聚合酶反應分離出來。把分離出之片段，利用 5 μ L 2X ligation buffer、1 μ L T4 ligase (Promega)、0.5 μ L pGEM®-T Easy (Promega)，並補水至體積 10 μ L，置

於 16°C 培養箱中 30 分鐘，將片段連接到 pGEM®-T Easy (Promega) 載體上。將上述帶有我們所需基因片段之 pGEM®-T Easy 轉型 (transformation) 進 *E.coli* 中，將之培養於塗有 80μL X-Gal (2 mg X-Gal/mL DMF (dimethylformamide)) 的 LB + Ampicillin (50μg/mL) 培養基中，置於 37°C 培養箱中 16 小時。挑選白色菌落，以菌落 PCR 確認載體帶有所需之基因，將帶有成功連接基因片段載體之菌落，接種於含有 Ampicillin 的 LB 溶液，於 37°C 培養 12-16 小時，取 1.5mL 菌液以離心機離心 6000rpm 1 分鐘後，移除上清液，以 Viogene Mini-M™ plasmid DNA extraction kit 抽取質體，溶於 50μL 無菌水中。取濃度約 500-700 ng/μL 的質體，用 T7 或 SP6 引子送核酸定序，確認基因序列無誤。再用 XbaI 與 PstI 限制酶切下 pGEM®-T Easy 上之基因片段，接到同樣用 XbaI 與 PstI 限制酶處理的 pTMBV4 載體上，最後用 P995F / P996R 引子定序確認。(引子序列請見 G. 引子列表)

2. pTMBV4-AHA2 Δ R

以上述相同方式進行構築，但一開始所使用之引子換成 AHA2 XbaI F / AHA2-a.a.834-PstI R

3. pDL2Nx-AHA1

利用 AHA1 BamHI F / AHA1 ClaI R 引子，阿拉伯芥根部 cDNA 作為模板，將 AHA1 片段以 5μL High Fidelity Taq Buffer、4μL 2.5mM dNTP、1μL High Fidelity Taq mix (Fermentas) 的條件進行連鎖聚合酶反應分離出來，連接到 pGEM®-T Easy (Promega) 載體上。以前述相同方式培養與挑選菌落，並確認連接於 pGEM®-T Easy (Promega) 載體上之基因序列無誤，並用 BamHI 與 ClaI 限制酶切下基因片段，接到同樣用 BamHI 與 ClaI 限制酶處理的 pDL2Nx 載體上，以 P2092/P2093 引子定序確認。

4. pDL2Nx-AHA2

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AtHA2B-F / AtHA2-TGA-ClaI R 為



引子，pGEMHE-AHA2 作為模板。

5. pDL2Nx-AHA3

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AHA3 SfiI F / AHA3 SfiI R 為引子，以 SfiI 作為接點。

6. pDL2Nx-AHA4

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AHA4 SfiI F / AHA4 SfiI R 為引子，以 SfiI 作為接點。

7. pDL2Nx-AHA11

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AHA11 SfiI F / AHA11 SfiI R 為引子，以 SfiI 作為接點。

8. pDL2Nx-AHA2-R domain

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AtHA2-BamHI-835 F / AtHA2-TGA-ClaI R 為引子，pGEMHE-AHA2 作為模板。

9. pDL2Nx-AHA2-TM7~10

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AtHA2-BamHI-a.a.701 F / AtHA2-a.a.834-TGA-ClaI R 為引子，pGEMHE-AHA2 作為模板。

10. pDL2Nx-AHA2-TM7~10+R

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AtHA2-BamHI-a.a.701 F / AtHA2-TGA-ClaI R 為引子，pGEMHE-AHA2 作為模板。

11. pDL2Nx-AHA2-ΔR

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AtHA2B-F / AtHA2-a.a.834-TGA-ClaI R 為引子，pGEMHE-AHA2 作為模板。



12. pDL2Nx-AHA2- Δ 248

過程與 pDL2Nx-AHA1 相同，唯利用 AtHA2B-F / AtHA2-a.a.700-TGA-ClaI R 為引子，pGEMHE-AHA2 作為模板。

13. pTMBV4-CHL1-ADE1

目的是要將 pTMBV4-CHL1 (由何承訓學長構築) 內，CHL1 基因末端加上 stop codon，並將酵母菌篩選標記 (selection marker) LEU2 換成 ADE1。

i. CHL1 基因末端加上 stop codon：

以 CHL1-XbaI F/CHL1-StuI R 為引子，pTMBV4-CHL1 為模板，將 CHL1 片段以 5 μ L High Fidelity Taq Buffer、4 μ L 2.5mM dNTP、1 μ L High Fidelity Taq mix (Fermentas) 的條件進行連鎖聚合酶反應分離出來，連接到 pGEM[®]-T Easy (Promega) 載體上。以前述相同方式培養與挑選菌落，並確認連接於 pGEM[®]-T Easy (Promega) 載體上之基因序列無誤。再用 XbaI 與 StuI 限制酶切下 pGEM[®]-T Easy 上之基因片段，接到同樣用 XbaI 與 StuI 限制酶處理的 pTMBV4 載體上，最後用 P995F / P996R 引子定序確認。

ii. 將酵母菌篩選標記 LEU2 換成 ADE1：

以 ADE1 F/ ADE1 R 為引子，pMP1612 (Fuglsang et al., 2007) 為模板，將 ADE1 基因以 5 μ L High Fidelity Taq Buffer、4 μ L 2.5mM dNTP、1 μ L High Fidelity Taq mix (Fermentas) 的條件進行連鎖聚合酶反應分離出來，連接到 pGEM[®]-T Easy (Promega) 載體上。以前述相同方式培養與挑選菌落，並確認連接於 pGEM[®]-T Easy (Promega) 載體上之基因序列無誤。以 BglII 與 BstXI 限制酶切下 pGEM[®]-T Easy 上之 ADE1 基因，接到以 BglII 與 BstXI 限制酶處理的前述 CHL1 末端加上 stop codon 之 pTMBV4-CHL1 載體上。

14. pTMBV4-CHL1-Nonsense-ADE1

因為沒有連接 CHL1 基因之 pTMBV4 載體上有三個 BglII 切位，所以無法製做不含 CHL1 之 pTMBV4-ADE1 質體。我們挑選製做

pTMBV4-CHL1-ADE1 質體時，因 CHL1 基因序列錯誤造成 Nonsense mutation (Ser26 TCA→TAA) 之 pTMBV4-CHL1-ADE1 質體作為實驗控制組使用。



15. pEG202-ADE1

以 ADE1 F (pEG202)/ADE1 R (pEG202) 為引子，pTMBV4-CHL1-ADE1 為模板，將 ADE1 基因以 5 μ L High Fidelity Taq Buffer、4 μ L 2.5mM dNTP、1 μ L High Fidelity Taq mix (Fermentas) 的條件進行連鎖聚合酶反應分離出來，連接到 pGEM[®]-T Easy (Promega) 載體上。以前述相同方式培養與挑選菌落，並確認連接於 pGEM[®]-T Easy (Promega) 載體上之基因序列無誤。以 BstXI 限制酶切下 pGEM[®]-T Easy 上之 ADE1 基因，接到以 BstXI 限制酶處理的 pEG202 載體上。

16. pEG202-CIPK23-ADE1

以 ADE1 F (pEG202)/ADE1 R (pEG202) 為引子，pTMBV4-CHL1-ADE1 為模板，將 ADE1 基因以 5 μ L High Fidelity Taq Buffer、4 μ L 2.5mM dNTP、1 μ L High Fidelity Taq mix (Fermentas) 的條件進行連鎖聚合酶反應分離出來，連接到 pGEM[®]-T Easy (Promega) 載體上。以前述相同方式培養與挑選菌落，並確認連接於 pGEM[®]-T Easy (Promega) 載體上之基因序列無誤。以 BstXI 限制酶切下 pGEM[®]-T Easy 上之 ADE1 基因，接到以 BstXI 限制酶處理的 pEG202-CIPK23 (由鄭又瑄學姊構築) 質體上。

17. pEG202-CIPK8-ADE1

過程與 pEG202-CIPK23-ADE1 相同，唯最後將 ADE1 基因連接到 pEG202-CIPK8 (由鄭又瑄學姊構築) 質體上。

18. pEG202-CIPK8-kinase domain-ADE1

過程與 pEG202-CIPK23-ADE1 相同，唯最後將 ADE1 基因連接到 pEG202-CIPK8-kinase domain (由鄭又瑄學姊構築) 質體上。

C. 酵母菌雙雜合試驗

1. 酵母菌菌株：

DSY-1 *MATa his3delta200 trp1-901 leu2-3,112 ade2*
LYS:(lexAop)4-HIS3 ura3:(lexAop)8-lacZ GAL4

自 DUAL membrane kit (DUAL system)



2. 酵母菌質體轉殖：

挑選單一菌落酵母菌菌株，以 YPD (1% BACTO yeast extract、1% BACTO peptone、2% glucose) 於 30°C 培養 12 小時，取 1mL 菌液以離心機離心 6000rpm 1 分鐘後，倒除上清液。加入 0.5-1 µg 質體 DNA、2µL 10mg/mL salmon sperm DNA、20µL 1M DTT、0.5mL PLATE mixture (45% PEG4000、1M LiOAc、1M Tris-Cl (pH7.5)、0.5M EDTA)，混合 (vortex) 後置於室溫 8-16 小時。以 42°C 熱水浴處理 10 分鐘，取 50-100 µL 菌液塗於含不同胺基酸之篩選培養基上，以 30°C 培養兩天。

*使用之質體列表：

pTMBV4：

pTMBV4-CHL1/ pTMBV4-CHL1-T101A/pTMBV4-CHL1-T101D (以上由何承訓學長構築)

pTMBV4-AHA2/ pTMBV4-AHA2 Δ R

pDL2Nx：

pDL2Nx-NubI/ pDL2Nx-NubG/ pDL2Nx-AHA1/ pDL2Nx-AHA2/
pDL2Nx-AHA4/ pDL2Nx-AHA11/ pDL2Nx-AHA2 Δ R/ pDL2Nx-AHA2-TM7~10/ pDL2Nx-AHA2-TM7~10+R/ pDL2Nx-ANI (由鄭又瑄學姊構築)/ pDL2Nx-CIPK23 (由王珮茹學姊構築)

3. X-gal 呈色實驗：

以牙籤挑選大小相同之酵母菌菌落，點於另一個培養基上，並在 30°C 培養一天，用 3mm 濾紙貼於培養基上，迅速拿起確認菌落完全沾黏於濾紙後，放入液態氮中。5 分鐘後以鑷子夾出，置於室溫 5 分鐘，並放入培養

皿中，倒入含 X-gal 之 agarose (1x PBS pH7.4、0.5% (w/v) agarose、0.1mg/mL-X-gal)，記錄菌落呈色之時間。



4. β -半乳糖苷酶活性定量實驗：

將帶有質體之酵母菌株培養於 2mL 培養液中，以 30°C 培養 12-16 小時。取 1mL 菌液，加至 4mL YPD 培養液中，於 30°C 培養約 2-3 小時。測量 OD₆₀₀ 讀值，數值應屆於 0.5-0.8 之間，並確實記錄每一菌株之 OD₆₀₀ 讀值。取 1.5mL 菌液，14000rpm 離心 30 秒後去除上清液，用 1.5mL Z-buffer (16.1g/L Na₂HPO₄ · 7H₂O、5.5g/L NaH₂PO₄ · H₂O、0.75g KCl、0.246g/L MgSO₄ · 7H₂O, pH 調至 7.0) 清洗兩次，吸乾上清液後，溶於 0.3mL Z-buffer。取 0.1mL 放入 2mL 微量離心管中，將整個離心管放入液態氮與 37°C 水浴槽各 1 分鐘，反覆來回三次以上，以打破酵母菌細胞。之後加入 0.7mL Z-buffer (含 2.7% 14.4M β -ME) 與 160 μ L ONPG (4mg/mL Z-buffer)，立刻開始計時，並將反應置於 30°C 烘箱中。待溶液呈現黃色後，加入 0.4mL 1M Na₂CO₃，並立刻記錄時間。以 14000rpm 離心 10 分鐘後，取上清液測定其 OD₄₂₀ 讀值。

β -半乳糖苷酶活性計算公式為：

$$1000 * OD_{420} / (\text{時間}(\text{min}) * 0.1(\text{mL}) * 5(\text{濃縮倍率}) * OD_{420})$$

5. 統計分析：

數據使用 Excel 巨集進行統計分析。

Real Statistics Resource Pack software (Release 3.4). Copyright (2014) Charles Zaiontz. www.real-statistics.com

D. 西方點墨法

1. 膠體電泳分析：

將 NuPAGE 10%Bis-Tris gel (invitrogen) 架設於直立式電泳槽上，以 NuPAGE MOPS SDS 緩衝溶液 (0.05M 3-(N-morpholino) ethane sulfonic

acid、0.05M Tris、2%SDS、1.025mM EDTA) 為 running buffer。把蛋白質樣本加入電泳槽中，以 70 伏特電壓進行電泳 15 分鐘，在切換為 110 伏特電壓，電泳 110 分鐘或 180 分鐘。取 PVDF membrane、濾紙、海綿、轉印緩衝液 (4.08g/L Bicine、5.232g/L Bis-Tris、0.3g EDTA、10% methanol)，用轉印緩衝液將濾紙與海綿充分浸濕，把 PVDF membrane 浸泡於 100% methanol 活化 2 分鐘，之後依序 (由電流負極向正極) 將：兩塊海綿、一塊濾紙、切除 stacking gel 部分之膠體、PVDF membrane、一塊濾紙、三塊海綿，放入轉印槽中，擠出夾在上述物品間之氣泡後，開始進行轉印。為避免機器過熱，應將冰塊放置於轉印槽外。以 40 伏特電壓通電 70 分鐘完成轉印。

2. 專一性抗體雜合：

從轉印槽中取出前述之 PVDF membrane，置於以 1X PBST (8g NaCl、0.2g KCl、1.805g Na₂HPO₄、0.24g KH₂PO₄、0.5% Tween 20) 所配置之 0.1% gelatin 溶液中，於室溫下搖晃 30 分鐘進行 blocking，降低抗體非專一性結合。去除上述 blocking 溶液後，加入一級抗體，於室溫中反應 1 小時，之後以 1X PBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。接著加入二級抗體，室溫下反應 30 分鐘，在以 1X PBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘。將 ECLT^M detection kit 中 A、B 溶液以 1:1 混和後，均勻滴至 PVDF membrane 上，最後以底片 (GE) 壓片成像。

E. RS-72 互補實驗

1. 酵母菌菌株：

RS-72 *MATa ade1-100 his4-519 leu2-3,312 pPMA1::pGAL1*
(Fuglsang et al., 2007)

2. 酵母菌質體轉殖：

方法同酵母菌雙雜合實驗之轉殖方式，唯 YPD 中之 glucose 改成 galactose。

*使用之質體列表：



YEp351/ pMP136/ pMP132

pMP136 為帶有 AHA2 全長之 YEp351 (Palmgren and Christensen, 1993)

pMP132 為帶有 AHA2 Δ 92 之 YEp351 (Palmgren and Christensen, 1993)

pRS415/ pMP1745

pMP1745 為帶有 AHA2 全長之 pRS415^{*註} (Fuglsang et al., 2007)

^{*註}reference 之描述有誤，與原作者通訊後，確認 pMP1745 位於 pRS415

pTMBV4-CHL1-ADE1/ pTMBV4-CHL1-Nonsense-ADE1

pEG202-ADE1/pEG202-CIPK23-ADE1/pEG202-CIPK8-ADE1/

pEG202-CIPK8-kinase domain-ADE1

3. 互補實驗：

將帶有質體之轉殖菌株，以 2mL 將碳源從 glucose 改成 galactose 之培養液培養。於 30°C 培養 2 天後，取 0.5mL 測定 OD₆₀₀ 數值，將所每一管菌液，以培養液稀釋至相同 OD₆₀₀ 數值後，再以 30°C 培養 3-5 小時。取 0.5mL 測定 OD₆₀₀ 數值，確認濃度一致後，序列稀釋，並分別滴至含 galactose 與含 glucose 之培養基上。將培養基置於 30°C 培養，每日觀察酵母菌生長狀況。

F. ZDock 蛋白質接合模擬

1. 蛋白質結構來源：

CHL1：RCSB Protein Data Bank ID:4OH3 (Sun et al., 2014)

AHA2：RCSB Protein Data Bank ID:3B8C (Pedersen et al., 2007)

2. 蛋白質結構處理：

i. CHL1：

以 Discovery Studio (Accelrys) 開啟 CHL1 蛋白質結構，刪除 A chain、Hetatm 與 ligand groups，使用工具列 Macromolecules/Prepare Protein/Automatic Preparation 中的 Prepare Protein 功能進行蛋白結構處理；若要以 dimer CHL1 進行模擬，則不須刪除 A chain。

ii. AHA2：

以 Discovery Studio (Accelrys) 開啟 AHA2 蛋白質結構，刪除 B chain、Hetatm 與 ligand groups，使用工具列 Macromolecules/Prepare Protein/Automatic Preparation 中的 Prepare Protein 功能進行蛋白結構處理。



3. ZDock 接合運算：

使用工具列 Macromolecules/Dock and Analyze Protein Complexes/Dock Proteins 中的 Dock Proteins (ZDOCK) 功能，分別設定 input receptor protein 與 input ligand protein（若將 CHL1 設為 receptor，則 AHA2 為 ligand），Angular step size 設為 15；Clustering 選項中，RMSD Cutoff 設為 6.0，Interface Cutoff 設為 9.0，ZRank 為 True。

G. 蛋白質序列相似度比較

1. 序列來源：

TAIR database

AT2G18960、AT4G30190、AT5G57350、AT3G47950、AT2G24520、AT2G07560、AT3G60330、AT3G42640、AT1G80660、AT1G17260、AT5G62670

2. 相似度比較：

開啟 Clustalx 1.83，載入蛋白質序列，使用工具列 Alignment/Do Complete Alignment 功能，將結果存成 msf 檔案。以 GeneDoc 開啟前述 msf 檔，選擇工具列上之 Reports/Statistic Report。

H. 引子列表

引子名稱	引子序列 5'→3' (底線為限制內切酶序列)
AHA2 XbaI F	CTTT <u>TCTAGAC</u> AAAAATGTCGAGTCTCGAAGATATCAAG
AHA2 PstI R	CTTT <u>CTGCA</u> GGCCACAGTGTAGTGACTGGGAGTTTC
P995F	ACGGTCTTCAATTTCTCAAG
P996R	GTAAGGTGGACTCCTTCT

AHA2-a.a.834-PstI R	CTTTCTGCAGGCCAATGGGAAGTATGTGACAATACTG
AHA1 BamHI F	C <u>GGATCC</u> ATGTCAGGTCTCGAAGATATCAAGAAC
AHA1 ClaI R	GT <u>ATCGATA</u> CTACACAGTGTAGTGATGTCCTGCTGTA
P2092	GATTTTCGTCAAGACTTTGACCGG
P2093	CACAGTGTAGTGAAGTGGGAGTTTC
AHA4 SfiI F	GAGTGGCCATTACGGCCATGACGACGACTGTGGAGGAC
AHA4 SfiI R	GAGAGGCCGAGGCGGCCTCAGACAGTGTAAGCTTGTTG
AHA3 SfiI F	GAGTGGCCATTACGGCCATGGCGAGTGGCCTCGAG
AHA3 SfiI R	GAGAGGCCGAGGCGGCCTTAAACGGTGTAGTGACCAGC
AHA11 SfiI F	GAGTGGCCATTACGGCCATGGGGGACAAGGAAGAAGTC
AHA11 SfiI R	GAGAGGCCGAGGCGGCCTCAGACGGTGTAAAGCTTGTTG
AtHA2B-F	AGGGATCCATGTTCGAGTCTCGAAGATATCAAGA
AtHA2-TGA-ClaI R	GT <u>ATCGATT</u> CACACAGTGTAGTGAAGTGGGAGTTTC
AtHA2-BamHI-835 F	G <u>GGATCC</u> GACGTTTTCAAGTTTGCCATTCGATACAT
AtHA2-BamHI-a.a.701 F	CCC <u>GATCCC</u> CTGATAGCTGGAACTTAAAG
AtHA2-a.a.834-TGA-ClaI R	C <u>ATCGATT</u> CACAATGGGAAGTATGTGACAATACTG
AtHA2-a.a.700-TGA-ClaI R	CCT <u>ATCGATT</u> CATGTGGGAGATGGCTTAACTCTG
CHL1-XbaI F	<u>TCTAGAC</u> AAAAATGTCTCTTCCTGAACTAAATCTGATGAT
CHL1-StuI R	<u>AGGCCTT</u> CAATGACCCATTGGAATAC
ADE1 F	<u>GCCTGAATGGCCT</u> GAAACTTTTCCTGAAGGTTG
ADE1 R	<u>CCATTTAGGTGGT</u> GTCTCTGAGAACATTTATACATTAATAC
ADE1 F (pEG202)	ATCTA <u>CCACCGCTCTGG</u> CTGAAACTTTTCCTGAAGGTTG
ADE1 R (pEG202)	ACTTT <u>CCAGAGCGGTGGT</u> GTCTCTGAGAACATTTATACATTAATAC

濃度皆稀釋至 10μM/μL

第三章 結果



3.1 氫離子驅動力對 CHL1 硝酸鹽轉運能力的影響

在開始探討 CHL1 與 AHA2 之間的關係前，我們想先了解，氫離子驅動力在 CHL1 轉運硝酸鹽時，是否真的扮演重要的角色？目前已知表現 CHL1 的非洲爪蟾卵，在 pH7.4 的環境中，因吸收硝酸鹽所產生的去極化現象之程度，較處在 pH5.5 環境中來得小 (Tsay et al., 1993)；這意味著，氫離子驅動力在 CHL1 轉運硝酸鹽時，扮演一定程度的角色。但是，我們想要更進一步從 CHL1 實際轉運的硝酸鹽多寡，來檢視氫離子驅動力對 CHL1 硝酸鹽轉運能力的影響。我們同樣利用非洲爪蟾卵細胞作為膜蛋白表現系統，來進行硝酸鹽吸收實驗。

將 *CHL1* cRNA 以顯微注射的方式注入爪蟾卵細胞內，使其表現出 CHL1 蛋白，並浸泡於不同 pH 值的硝酸鹽溶液中，最後分析不同處理的爪蟾卵中硝酸鹽之含量。CHL1 在面對高、低濃度硝酸鹽時，有兩種親和性轉運模式，因此我們使用 100 μ M 與 10 mM 兩種濃度的硝酸鹽進行實驗。本實驗所使用的硝酸鹽以同位素 ^{15}N 標定；因為，自然界中將近 99% 的氮是以 ^{14}N 的方式存在 (Böhlke et al., 2005)，所以透過同位素 ^{15}N 標定，我們能夠分辨來自爪蟾卵所吸收之硝酸鹽的氮 (^{15}N)，與其本身所含的氮 (^{14}N)，並計算爪蟾卵透過 CHL1 所吸收之硝酸鹽的量。因為高、低濃度硝酸鹽處理所得之數據，經過同質性檢定 (Levene's Tests) 後發現為不同質，因此我們將兩組數據分開，使用 one-way ANOVA 進行統計分析。

此外，在討論 CHL1 高、低親和性轉運模式吸收能力時，因為對於它們實際運作的方式尚未明瞭，不確定這樣的親和性轉換，是 CHL1 整體運輸能力的改變，還是多被賦予另一種運輸能力。舉例來說：假設一個半小時內，CHL1 在高親和性模式下，可以吸收 0.4 nmole 的硝酸鹽，在低親和性模式下可以吸收 1.4 nmole 的硝酸鹽，我們不確定在低親和性模式下所吸收之 1.4 nmole 硝酸鹽，是高親和性 CHL1 額外被賦予低親和性運輸能力，因此多吸收了 1 nmole 硝酸鹽，還是 CHL1 從本質上改變，完全失去高親和性模式的運輸，用低親和性運輸能力吸收了 1.4 nmole 的硝酸鹽。所以在進行分析時，根據以上兩種假設，我們將低親和性模式的

數據以兩種方式計算：方式 1. 不扣除高親和性模式運輸所得之數值，也就是假設 CHL1 親和性轉換是本質上的變化；方式 2. 扣除高親和性模式運輸所得之數值，也就是假設 CHL1 親和性轉換是原本的運輸能力被額外賦予另一種親和性運輸能力。

比較置於相同濃度硝酸鹽溶液，但不同 pH 值處理的爪蟾卵之 ^{15}N 含量，發現在低濃度硝酸鹽 ($100\ \mu\text{M}$) 環境中，pH 值介於 7.4~5.5 之間的處理，其 ^{15}N 含量隨 pH 值下降而上升，pH5.0 大約是 pH7.4 的三到四倍(圖一 A,D)。這表示在低濃度硝酸鹽環境下，愈大的氫離子驅動力能使 CHL1 有愈高的硝酸鹽轉運活性；也意味著 CHL1 在高親和性轉運模式下，其硝酸鹽轉運能力受氫離子驅動力影響甚多。然而，同樣的 pH 值範圍，在高濃度硝酸鹽 ($10\ \text{mM}$) 環境中，以兩種不同方式計算的爪蟾卵 ^{15}N 含量，除了以方式 1. 所計算之結果，在 pH5.5 時有顯著差異之外(圖一 B)，其它都未隨 pH 值下降而出現非常明顯的改變(圖一 B,C)。難道在高濃度硝酸鹽環境中，也就是低親和性轉運模式下的 CHL1，不需要氫離子驅動力即可轉運硝酸鹽？

為了回答此一問題，我們擴大 pH 值的範圍，意即增加或減少氫離子驅動力，企圖回答這個問題。因為過於極端的 pH 值，可能會對爪蟾卵造成危害，所以，將浸泡的時間由 1.5 小時縮短為 0.5 小時。實驗結果顯示，在低濃度硝酸鹽 ($100\ \mu\text{M}$) 環境中，CHL1 的硝酸鹽轉運能力也是明顯的隨 pH 下降而上升(圖一 D)。在高濃度硝酸鹽 ($10\ \text{mM}$) 環境中，pH5.0 時 CHL1 的硝酸鹽轉運能力沒有顯著增加；但是在 pH8.5 時，卻有顯著低於 pH7.4 的狀況(圖一 E,F)。雖然，這個 pH 值範圍已經超過正常自然環境中，植物可能會遇到的狀況，但由此可知，在高濃度硝酸鹽環境中，氫離子驅動力還是對 CHL1 的硝酸鹽轉運能力有所影響。因此，我們可以排除 CHL1 在高濃度硝酸鹽環境中，就不需要氫離子驅動力協助運輸的假設。高濃度硝酸鹽環境中的 CHL1，並不獨立於氫離子驅動力的影響之外，只是受其影響較小。

在高濃度硝酸鹽環境下，pH5.5 在兩次實驗中，一次與 pH7.4 有顯著差異(圖一 B)，另一次沒有顯著差異(圖一 E)，較難下一個明確的結論，我們還需要更多次實驗，來確認 CHL1 低親和性模式於 pH5.5 下的轉運狀況。但是，相較於低濃度硝酸鹽環境中三到四倍的差異(圖一 A,D)，高濃度硝酸鹽的 pH5.5 與 pH7.4

差異都低於一點三倍，因此還是可以說明，高濃度硝酸鹽環境下，CHL1 對氫離子驅動力的需求很低。另外，在高濃度硝酸鹽環境下，除了 pH5.5 之外，兩種計算方式下，統計顯著性並無差異（圖一 B,C,D,F）。所以，在確認 CHL1 低親和性轉運模式於 pH5.5 下的轉運狀況前，我們無法針對這兩種計算方式下結論。

綜合以上結果，我們可以整理出一個現象，在植物生理 pH 值範圍內，CHL1 在低濃度硝酸鹽環境下，硝酸鹽轉運能力，會因為氫離子驅動力的變化而有影響；但在高濃度硝酸鹽環境下，硝酸鹽轉運能力，則不因氫離子驅動力變化，而出現差異。表示 CHL1 在高、低親和性轉運模式下，硝酸鹽轉運能力受氫離子驅動力的影響不同，也可證實，氫離子驅動力確實會對 CHL1 的轉運能力造成影響。

3.2 CHL1 與 AHA2 之間的結合關係

因為，從本實驗室先前的酵母菌雙雜合大量篩選中，發現 CHL1 與 AHA2 會互相結合，繼而開啟了我們對 CHL1 與 AHA2 之間關係的研究。我們推測這樣的結合，是因為 CHL1 需要 AHA2 所產生之氫離子驅動力，來協助其進行硝酸鹽的轉運；進而想了解，CHL1 是否能夠藉由與 AHA2 的結合，來調控其活性。

前一節提到，CHL1 在高親和性轉運模式下，受氫離子驅動力影響較在低親和性轉運模式下來得大。CHL1 與 AHA2 之間的結合強度，是否也會因 CHL1 的親和性轉運模式不同，而有所差異？

我們使用 DUALmembrane system 酵母菌雙雜合實驗來回答這個問題。把 CHL1 與 AHA2 共同轉殖 (co-transformation) 進酵母菌株，當 CHL1 與 AHA2 互相結合，將可以啟動酵母菌的下游報導基因 (reporter gene) *lacZ*，產生 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)，此酵素可以催化 X-gal 產生藍色物質；當兩者結合程度愈高，所產生之 β -半乳糖苷酶就愈多。因此，透過判別顏色深淺，便可得知 CHL1 與 AHA2 的結合強度。此外，利用點突變的方式，構築 CHL1-T101D 來模擬 CHL1-T101 磷酸化，將其限制於高親和性轉運狀態；利用 CHL1T-101A 模擬 CHL1-T101 去磷酸化，將其限制於低親和性轉運狀態 (Liu and Tsay, 2003)；如此一來，就可以檢驗 CHL1 在不同親和性轉運模式下，與 AHA2 之間的結合強度。

X-gal 呈色實驗顯示，CHL1、CHL1-T101A、CHL1-T101D 與 AHA2 結合之後，酵母菌皆能呈現出藍色物質，且肉眼無法分辨出顯著的深淺差異（圖二 A）。因此，我們進行 β -半乳糖苷酶活性定量實驗，發現三個組合之間， β -半乳糖苷酶的活性在並無顯著差異（圖二 B）。表示 CHL1 的任兩種轉運模式下，都可與 AHA2 結合。同時，我們也利用西方點墨法，偵測蛋白質表現量（圖二 C），確認兩蛋白質之結合強度，是在相同蛋白質表現量之下所呈現的結果。

我們在前言部分有談到，目前認為 AHA2 自我抑制之成因，起因於 R domain 包覆 PM H^+ -ATPase 上的功能區域，進而影響整體活性 (Eraso and Portillo, 1994; Morsomme et al., 1996; Morsomme et al., 1998; Palmgren, 2001; Pedersen et al., 2007)。我們推測，若 CHL1 能夠調控 AHA2，或許可藉由移開 R domain 對 AHA2 的包覆，來調控 AHA2 的功能。我們可以藉由檢視，CHL1 與 AHA2 結合的主要位置，是不是 AHA2 的 R domain，來檢驗這個假設，我們進行了 CHL1 與 AHA2 的 R domain 的雙雜合實驗。但是，X-gal 呈色實驗顯示，CHL1 與 AHA2 結合所產生的藍色，比與 R domain 結合所產生的藍色還要明顯（圖三 A）。進一步的 β -半乳糖苷酶活性定量實驗，發現 CHL1 與 AHA2 結合所產生的 β -半乳糖苷酶活性，顯著高於與 R domain 結合所產生的活性（圖三 B）。這表示 CHL1 與 AHA2 結合的主要位置並不是 AHA2 的 R domain。此外，CHL1 與 R domain 結合所產生的酵素活性非常低（圖三 B），兩者之間似乎並沒有互相結合；但在沒有其他證據前，也不能完全排除兩者有互相結合的可能性。第二次的重複實驗與第一次結果相同，與 R domain 的結合都遠低於 AHA2（附圖一 B），且本次有利用西方點墨法確認蛋白質表現量（附圖一 C）。

有文獻將 AHA2 上的穿膜區域 (transmembrane domain) 7 至 10 (TM7~10) 加上 R domain 當成一個單位，因為主要執行功能的區域，是位於 TM7 之前的 A、P、N domain；且 AHA2 所屬的 P-type ATPase 中，大部分成員都有 TM7~10 這段區域，但序列低度保留 (poorly conserved) (Morth et al., 2011)。我們將 AHA2 各片段之示意圖整理出來（圖五）。並透過酵母菌雙雜合實驗，測試 CHL1 與 AHA2 的 TM7~10 及 TM7~10+R domain 的結合能力。這次我們一樣沒辦法從 X-gal 呈色實驗看出差異（圖四 A），所以也進行了 β -半乳糖苷酶活性定量（圖四 B）。結果顯示，CHL1 與 TM7~10 及 TM7~10+R domain 的結合強度，都大大高於與 AHA2 的結合，其中

TM7~10 強度最強，TM7~10+R domain 次之（圖四 B）。從結果看來，TM7~10 這個區域很有可能是與 CHL1 結合的主要位置，而 R domain 與 TM7~10 以外的區域都會影響 CHL1 與 AHA2 的結合。蛋白質表現量上，除了 CHL1 + TM7~10+R 的 CHL1 表現量不佳之外，其他組合都有偵測到蛋白質表現（圖四 C）。為確認結合強度之結果並非受蛋白質表現量影響，我們做了重複的實驗（附圖二）。從第二次實驗的西方點墨法結果可以發現（附圖二 C），除了 $\Delta 248$ 和 ΔR 之外，其他組合的 CHL1 與 AHA2 片段都有表現，且表現量差異不大，表示結合強度之結果不是蛋白質表現差異所造成的影響。

要證實 AHA2 上 TM7~10 是與 CHL1 結合的主要區域，就必須看到去除此段區域的 AHA2 無法與 CHL1 結合的證據。我們構築了含有 AHA2 剔除 TM7 及其之後所有胺基酸（AHA2 $\Delta 248$ ，又稱 $\Delta 248$ ）與 AHA2 剔除 R domain（AHA2 ΔR ，又稱 ΔR ）的兩個質體（圖五），並與 CHL1 共同轉殖進酵母菌做雙雜合實驗。但是，卻一直沒辦法用西方點墨法清楚的從酵母菌中偵測到 AHA2 $\Delta 248$ 與 AHA2 ΔR 兩個蛋白質（圖四 C, 圖六, 附圖二 C）。所以，目前只知道 CHL1 對 AHA2 TM7~10 這段區域的結合強度最高，而當 R domain 存在時，會降低兩者結合強度，但 AHA2 TM7~10 是否為 CHL1 與 AHA2 互相結合的主要區域，尚無法下明確的結論，還有待繼續探討。

此外，CHL1 與 AHA2 的蛋白質結構皆已被解出來，所以我們以電腦進行模擬，預測兩蛋白互相結合的可能方式。利用 Discovery Studio 模擬軟體，對兩蛋白質結構進行 ZDock 接合運算，並挑選眾多結果中，兩蛋白之排列，與其位於細胞膜上時之方向相同的組合。CHL1 結構是以二聚體 (dimer) 的方式被解構出來 (Parker and Newstead, 2014; Sun et al., 2014)，但是其中一方質疑在植物體內，CHL1 二聚體的生物意義 (Parker and Newstead, 2014)。因此，我們把 CHL1 分成單體與二聚體分別與 AHA2 進行接合模擬運算。

我們挑出三個分數較高，且兩蛋白之排列，與其位於細胞膜上時之方向相同的 Model (圖七、八、九)。在 Model 1 中 CHL1 用 TM9,12 與 AHA2-TM2,6,9 互相結合 (圖七 A)，AHA2 的 N 端與 C 端位於結合交界面兩側 (圖七 B)，CHL1 最主要的結合位置是第十二個穿膜蛋白，且高低親和性轉換的關鍵磷酸化位置 T101 遠離交界面 (圖七 C)。Model 2 中，CHL1-TM2,4,11 會與 AHA2-TM7,10 互相結

合 (圖八 A)，AHA2 蛋白質 C 端被夾在雙方交界面中 (圖八 B)，CHL1-T101 位置在鄰近兩蛋白的交界面 (圖八 C)。另外，以二聚體 CHL1 進行接合運算後，得出 Model 3，主要是由其中一個 CHL1 的 TM5,8 與 AHA2 TM3,5,7 結合 (圖九 A)，CHL1-T101 位置與兩蛋白的交界面同側 (圖九 B)，但雙方並非完全並排貼合，AHA2 於細胞外側的開口較朝向 CHL1 (圖九 C,D)。

3.3 CHL1 與 AHA family 其他成員的結合關係

我們好奇 CHL1 與 AHA2 的結合是否具有專一性？CHL1 除了 AHA2 之外，是否還可以與其他 AHA family 成員互相結合？

首先我們從 TAIR database 上整理了 AHA family 於根部的基因表現程度表，基因表現量最高為 AHA2，低於 AHA2 的前兩名為 AHA1 與 AHA11 (附圖三)。我們亦比較 AHA family 的蛋白質序列，發現當以 AHA2 為比較對象時，所有成員的相同性皆不低於 70%，相似性皆不低於 80%。相同性與相似性最低的前三者依序為 AHA10 (70%，83%)、AHA7 (72%，84%)、AHA4 (79%，88%) (圖十 A)。因為 CHL1 主要表現位置是根部，所以我們初步先挑選 AHA1 與 AHA11，這兩個較可能與 CHL1 和 AHA2 一起出現之基因進行試驗。此外，與 AHA2 相似度最低的三者，因 AHA4 於根部表現量高於其它兩者，所以也挑選 AHA4 進行試驗。從系統分類樹來看，AHA1 與 AHA2 是最相近的，而 AHA4、AHA11 是相對來說，關係較遠的蛋白 (附圖四 A)。

酵母菌雙雜合呈色結果顯示，AHA1、AHA2、AHA4、AHA11 皆會與 CHL1 互相結合 (圖十 B)，但強弱是否有差異，還需要進一步以酵素活性定量的方式進行探討。而 AHA3 則是構築時，序列產生錯誤，導致第 945 胺基酸突變，因此尚無法確認未突變之 AHA3 是否能夠與 CHL1 結合。以目前初步的結果來判斷，與 AHA2 相同性只有 79% 的 AHA4 也可與 CHL1 互相結合，表示 CHL1 與 AHA family 之間可能存在高度保留的結合位置。未來，除了檢驗 CHL1 與 AHA family 各成員的結合強度之外，也會檢驗 AHA7、10 是否會與 CHL1 互相結合；若結合有強弱的差異，或許可以從 AHA family 蛋白質序列上的些微差異，找到它們與 CHL1 主

要的結合位置。



3.4 CHL1 相關激酶及去磷酸酶與 AHA2 之間的結合關係

調控 AHA2 活性的主要機制，就是對其 R domain 進行磷酸化與去磷酸化。但是 CHL1 並不含有能使其它蛋白磷酸或去磷酸化的 kinase domain 或是 phosphatase domain，如此一來，要如何對 AHA2 進行調控呢？

因此，我們使用目前已知會與 CHL1 互相結合，並控制其高、低親和性模式轉換的激酶 CIPK23 和去磷酸酶 ANI，以及同樣會參與 CHL1 調控之 CIPK8 和 CIPK8 的 kinase domain (CIPK8 Kinase)，與 AHA2 進行酵母菌雙雜合實驗，想知道它們是否也能與 AHA2 互相結合。推測它們可能會在對 CHL1 進行親和性轉換的調控時，同時也調控了與 CHL1 互相結合之 AHA2 的氫離子幫浦活性。此外，調控 AHA2 的激酶與去磷酸酶，都是與 R domain 結合並對其進行磷酸化與去磷酸化修飾。所以，我們也加入了 AHA2 Δ R 的組合，要知道 R domain 的有無是否會影響結合強度。這裡的 AHA2 Δ R，與前面跟 CHL1 進行實驗的 AHA2 Δ R 位於不同的載體 (vector) 上面，所以沒有蛋白表現量不足的問題 (圖十一 C)。

從 X-gal 呈色實驗上可以明顯看出，ANI、CIPK23、CIPK8、CIPK8 Kinase 與 AHA2 的組合之酵母菌呈現明顯的藍色；而與剔除 R domain 的 AHA2 Δ R 之組合，卻完全沒有產生藍色的物質 (圖十一 A)。雖然，AHA2 的負對照 (negative control) NubG 這一組有出現淡藍色，表示有背景值存在；但是，透過活性定量實驗，發現背景值並不影響結果 (圖十一 B)。同時，也更進一步以量化方式證實，ANI、CIPK23 和 CIPK8 會與 AHA2 互相結合，而 AHA2 的 R domain 在此一結合中扮演重要角色 (圖十一 B)。這表示 ANI、CIPK23 和 CIPK8 可能會直接與 R domain 結合，並在其上進行修飾，以調控 AHA2 氫離子幫浦活性；但還需要進一步用 ANI、CIPK23 單獨與 R domain 進行雙雜合與磷酸化實驗才能證實。而 CIPK8 Kinase 與 AHA2 的組合雖然在呈色上有明顯的藍色 (圖十一 A)，但因統計檢定未通過，尚無法確認 CIPK8 Kinase 與 AHA2 的結合是否有顯著大於 AHA2 Δ R。



3.5 CHL1 調控 AHA2 的可能性

由酵母菌雙雜合實驗，我們稍微了解 CHL1 及其相關激酶和去磷酸酶與 AHA2 之間結合的關係。接下來，要進入功能調控的部分，看 CHL1 是否能夠調控 AHA2 的氫離子幫浦活性。我們利用酵母菌株 RS-72 進行互補實驗 (yeast complementation assay)。在 RS-72 菌種中內生性 (endogenous) 氫離子幫浦 PMA1 之啟動子 (promoter) 被換成一半乳糖誘導型啟動子 (galactose-inducible promoter) GAL1 promoter (Cid et al., 1987)。這株酵母菌生長在含有半乳糖的環境時，才能夠表現內生性氫離子幫浦，若在有葡萄糖 (glucose) 的環境下，PMA1 的表現會被抑制，使其難生長於含葡萄糖的環境中。我們將具有自我抑制特性的氫離子幫浦 AHA2，與候選蛋白 (CHL1、ANI、CIPK23、CIPK8、CIPK8 Kinase domain) 共同轉殖入 RS-72 中，若此候選蛋白能夠活化 AHA2 的氫離子幫浦活性，則 RS-72 將可順利生長於葡萄糖的環境中。透過觀察這些轉殖 RS-72 的生長狀況，我們就可以檢驗那些蛋白能夠活化或抑制 AHA2 氫離子幫浦活性。

首先，我們將 CHL1 與 AHA2 共同轉殖進 RS-72 進行互補實驗。因為質體上限制內切酶切位 (restriction enzyme cleavage sites) 種類的限制，我們無法製作不含 CHL1 的控制組，因此使用了發生 Nonsense mutation 的 CHL1 做為控制組，此 CHL1 Nonsense 只能轉譯出 CHL1 的前 25 個胺基酸。結果顯示，在葡萄糖環境下，帶有 CHL1 與 AHA2 的 RS-72 之生長狀況，並沒有比只含 AHA2 的 RS-72 來得好 (圖十二)。此外，因為想知道當 CHL1 在運輸硝酸鹽時，是否會因結構改變而影響 AHA2 的活性，所以也在培養基中加入不同濃度硝酸鹽，但是，這也不會使 RS-72 長得較好 (圖十二)。表示於 RS-72 系統中，CHL1 在不同濃度硝酸鹽環境下，皆無法單獨活化 AHA2 的氫離子幫浦活性。

在 3.3 節有提到，透過酵母菌雙雜合實驗，我們發現調控 CHL1 高、低親和性轉換的 CIPK23 與 ANI 也會與 AHA2 互相結合。所以，想知道它們是否能夠單獨調控 AHA2 的活性。RS-72 互補實驗結果顯示，在葡萄糖環境中，與 AHA2 共同表現 CIPK23 或 ANI 時，酵母菌生長狀況與未表現 CIPK23 或 ANI 的組合沒有差異 (圖十三 A)。也無法與帶有剔除 C 端 92 個胺基酸，以移除自我抑制功能之 AHA2

$\Delta 92$ 的生長狀況相同 (圖十三 B) , 表示 CIPK23 與 ANI 並無法單獨影響 AHA2 的氫離子幫浦活性單獨影響 AHA2 的氫離子幫浦活性。



第四章

討論



4.1 氫離子驅動力在 CHL1 硝酸鹽運輸中所扮演的角色

在植物生理 pH 值範圍內，CHL1 在高親和性轉運模式境下，硝酸鹽轉運能力受氫離子驅動力影響，轉運能力隨 pH 值下降而上升，pH5.5 幾乎是 pH7.4 的四倍 (圖一 A)；而在低親和性轉運模式下，幾乎不受氫離子驅動力的影響 (圖一 B,E) 。反觀另一個低親和性運輸蛋白 NRT1.5，在 pH5.5 與 pH7.4 之間有兩倍的差異 (Lin et al., 2008) 相比較之下，CHL1 顯得較為特別。表示 CHL1 低親和性轉運所能運用的氫離子驅動力範圍較大，這使植物更易於硝酸鹽的吸收。但這並不代表 CHL1 的低親和性轉運不需要氫離子驅動力，因為在更為極端的高 pH 值環境中，CHL1 的低親和性表現還是會下降 (圖一 E) ，表示 CHL1 還是需要氫離子驅動力的協助進行硝酸鹽轉運。從 CHL1 mRNA 在低 pH 時會大量表現 (Tsay et al., 1993) 的特性，可以發現 CHL1 本身還是較偏好於低 pH 值的環境。在低親和性模式下，能降低氫離子驅動力的需求，可能是長期演化下所獲得的優勢，讓植物在較為鹼性的環境中，還是可以順利地從土壤中吸收硝酸鹽。另外，有研究發現，CHL1 還能夠轉運生長素 (auxin) ，而轉運生長素的能力受硝酸鹽濃度影響，但生長素濃度並不影響硝酸鹽的轉運 (Krouk et al., 2010b) 。也有人發現，CHL1 除了能吸收硝酸鹽，還可以反向的從細胞中運出硝酸鹽，且這不受細胞內外氫離子濃度梯度的影響 (Leran et al., 2013) 。表示我們可能無法單純以普遍對同向協同運輸蛋白的認知來看 CHL1 。

在細菌的協同運輸胜肽鏈轉運蛋白 PepT_{St} 中發現，同一個蛋白在轉運 di-peptides 與 tri-peptides 時，所使用的氫離子胜肽比 (proton : peptide) 不同；運送 1 個 di-peptide 時需要 4-5 個氫離子，但運送 1 個 tri-peptides 只需要 3 個氫離子 (Parker et al., 2014) 。或許 CHL1 在不同的親和性模式時，轉運硝酸鹽所需的氫離子數目也不同，因此我們會看到高低親和性模式下氫離子驅動力影響的差異。另一個可能原因是，硝酸鹽高低親和性模式不同時，CHL1 對氫離子的親和性也會產生差異。CHL1 在吸收硝酸鹽時，需要與氫離子和硝酸鹽結合，才可將兩者送進細

胞。於低硝酸鹽親和性轉運模式下，環境中氫離子濃度增加並無法提升其硝酸鹽吸收能力（圖一 B），表示此時 CHL1 與氫離子的結合能力可能已達飽和，所以在這個時候增加氫離子濃度，並無法提高 CHL1 吸收硝酸鹽的能力。但在高硝酸鹽親和性模式下，同樣的氫離子濃度範圍，硝酸鹽吸收能力卻有顯著變化（圖一 A），表示此時 CHL1 與氫離子的結合尚未達到飽和，所以當氫離子濃度增加，CHL1 運送硝酸鹽的能力也會上升。由此可推測，高硝酸鹽親和性模式下的 CHL1，需要更多的氫離子，才能使其對氫離子的結合能力達到飽和，表示此一模式下的 CHL1 對氫離子的親和性較低。而在低硝酸鹽親和性轉運模式時，其對氫離子的親和性則較高。簡單來說，就是當對硝酸鹽親和性高時，對氫離子親和性就下降；對硝酸鹽親和性低時，氫離子親和性上升。因此，我們會看到在生理 pH 值範圍內，CHL1 高親和性模式受到氫離子驅動力顯著影響，因為對氫離子親和性較低，所以 pH 值的些微變化，就會造成影響；但低親和性模式下，因為對氫離子親和性較高，所以需要超出植物生理濃度的極端 pH 值，才會對 CHL1 硝酸鹽轉運產生影響。

4.2 CHL1 與 AHA2 結合模擬圖之分析

ZDock 是利用剛體對接運算 (rigid-body docking algorithms) 進行模擬，簡單來說，就像是把兩個固體模型以各種不同角度結合，並尋找一個較吻合的結合狀態，例如凸起與凹陷互相結合。再加入額外參數後，可進一步納入表面正負電荷的因素進行結合模擬。因此，搭配酵母菌雜合之實驗結果，能篩選出可能性較大的模擬結合狀況。

目前酵母菌雙雜合結果可得知，CHL1 與 AHA2 TM7~10 片段之結合能力，大於與整個 AHA2 結合（圖四 B）。此外，R domain 與 AHA2 TM7~10 以外的片段，會阻礙 AHA2 TM7~10 與 CHL1 的結合（圖四 B），但是 AHA2 蛋白結構並沒有解出 R domain 的部分，無法直接從結構上看出 R domain 的影響；因此，我們從 AHA2 蛋白質 C 端的位置，以及 R domain 可能會向 N 端延伸包覆 A、P domain 的推測 (Eraso and Portillo, 1994; Morsomme et al., 1996; Morsomme et al., 1998; Palmgren, 2001; Gaxiola et al., 2007; Pedersen et al., 2007)，來討論可能的情形。而 $\Delta 248$ 與 Δ

R 的部分，因無法確認其蛋白質是否有表現，所以暫時不加入討論。未來會試著利用不同的一級抗體（不同品牌之 α -HA 或 α -AHA2）進行西方點墨法，以確認其是否真的沒有表現蛋白質。

Model 1 的 CHL1 用 TM9,12 與 AHA2-TM2,6,9 互相結合，實驗結果較強的 AHA2 TM7~10 範圍，只有 AHA2-TM9 出現在這個 Model 的交互作用區（圖七 A）。另外，AHA2-C' 外露於 CHL1 與 AHA2 的交界面（圖七 B），且距離結合的交界面較遠，對結合強度產生影響的可能性較小；但我們也無法排除，R domain 延伸出來並往 AHA2-N' 方向擺動時，會直接經過 CHL1 與 AHA2 的交界面，因而影響雙方的結合。

Model 2 中，CHL1-TM2,4,11 會與 AHA2-TM7,10 互相結合（圖八 A），且在這個模擬狀況中，CHL1 幾乎完全位於 AHA2 TM7~10 一側（圖八 A,B），很符合 AHA2 TM7~10 是主要的結合位置之假設。AHA2-C' 則是被夾在 AHA2 與 CHL1 之間，且朝向 CHL1 的方向延伸（圖八 B），若 R domain 從此位置延伸出來，很有機會影響與 CHL1 的結合。此外，若 R domain 朝 AHA2-N' 方向的 A、P domain 擺動，也有可能因此擠壓 CHL1，因此確實有可能對兩者的結合造成影響。再者，AHA2-C' 正下能看到兩個 CHL1 的穿膜區域（圖八 B），或許這兩個穿膜區域在 CHL1 產生構型改變的動態變化時，有可能推擠 R domain 進而使 AHA2 被活化。

Model 3 則是以 CHL1 二聚體 (dimer) 進行模擬，因為研究指出 CHL1 很可能是以二聚體的形式存在於植物中 (Sun et al., 2014)。但是，AHA2 還是偏向與其中一個 CHL1 結合，而非結合於二聚體的交界處。在 CHL1 二聚體的研究中指出，CHL1 的高、低親和性模式，分別是變位二聚體 (decouple) 與二聚體 (Sun et al., 2014)。二聚體 CHL1 主要是由其中一個 CHL1 的 TM5,8 與 AHA2 TM3,5,7 結合（圖九 A），只有一個 TM7 包含於 AHA2 TM7~10 片段。接著比較其 AHA2-C' 的方向性，雖然 AHA2-C' 並沒有被包夾於交界之中，但是卻直接朝向 CHL1（圖九 D），R domain 從此處延伸出去後，也有機會阻礙與 CHL1 之間的結合，這與酵母菌雙雜合結果相同。

Model 1、Model 2、Model 3 中，在 R domain 抑制 AHA2 與 CHL1 結合之效果方面，Model 2、Model 3 皆符合，而 Model 1 則有兩種解釋，所以也無法排除真實性。此外，三者都滿足會與 AHA2 TM7~10 結合，但其中 Model 2 所包含的區域最

多，CHL1 幾乎是完全與 AHA2 TM7~10 結合，是較符合實驗結果的模擬。總體來說，我們認為 Model 2 是最符合目前實驗結果的模擬，但因為 CHL1 可能是以二聚體方式存在，且 Model 3 也不與目前實驗結果相抵觸，所以並不排除 CHL1 與 AHA2 可能會在 Model2 及 Model3 之間做轉換。Model 1 則是目前可能性最低的模擬結果。

4.3 CHL1 與 AHA2 可能存在之互動關係

調控 CHL1 高低親和性模式轉換的激酶 CIPK23 與去磷酸酶 ANI，能夠與 AHA2 互相結合，且與 R domain 有密切相關 (圖十一 A,B)，我們預期它們在調控 CHL1 的同時，會一起調控與 CHL1 互相結合之 AHA2 的活性。因為 CHL1 在高親和性轉運模式下，對氫離子驅動力的需求較高 (圖一 A,D)，所以我們猜測，當作為感應蛋白的 CHL1 感應到外界硝酸鹽濃度降低時，CIPK23 將 CHL1 轉換至高親和性模式；此時，CIPK23 可能也會磷酸化 AHA2 的 R domain，使其離開 AHA2-N'，進而活化 AHA2 的氫離子幫浦活性，以提供 CHL1 所需之氫離子驅動力。此外，在生理 pH 值範圍內，低親和性模式下的 CHL1 較不需要氫離子驅動力 (圖一 B,C)，所以當 CHL1-T101 被去磷酸化後，去磷酸酶也很有可能接著對 R domain 進行去磷酸化，以關閉 AHA2 的氫離子幫浦活性。但因缺乏直接證據，我們也無法排除，CHL1 相關激酶與去磷酸酶，兩者皆會活化，或兩者皆會抑制 AHA2 氫離子幫浦活性的可能。

若控制 CHL1 親和性模式轉換相關的酶真的可以調控 AHA2，則我們可以看看 CHL1-T101 的位置是否接近 R domain。如此一來，這些酶才有機會在調控 CHL1 時，一起調控 AHA2。有團隊認為，AHA2 處於抑制狀態時，R domain 除了包覆 A、P domain 外，其末端可能是位於 AHA2-TM1,2 之間 (Pedersen et al., 2007)；而當 AHA2 處於活化狀態時，R domain 應該會離開 AHA2 N 端。

前一節討論出最有可能的結合方式 Model 2，其 CHL1-T101 (位於 CHL1-TM3 上) 位置與 AHA2-TM1,2 位於不同側 (圖八 A,C)，可能較難活化抑制狀態的 AHA2。但是，從結構上看，AHA2-C' 夾在兩蛋白交界面，與 CHL1-T101 在同一側 (圖

八 B) ，若 AHA2 處於活化狀態，R domain 離開 N 端，很有可能晃至 CHL1-T101 附近。這樣看來，Model 2 的情況較難活化 AHA2，反而比較有機會抑制 AHA2。

Model 3 的 AHA2-TM1,2 很靠近 CHL1-TM3，也就是 CHL1-T101 的所在位置 (圖九 A,B)，很符合前述 CHL1 的酶能活化 AHA2 的假設。不過，若 AHA2 處在活化狀態，R domain 離開 N 端，可能就會遠離 CHL1-T101，如此一來就難以再進行其他調控。但是，亦不排除，R domain 可能反而由 AHA2-TM1,2 朝 CHL1-TM3 的方向擺動 (圖九 A)。如果是這樣，那 Model 3 的 CHL1-T101 可能會像開關，讓 R domain 於 AHA2-TM1,2 與 CHL1-TM3 之間來回擺動，藉此調控 AHA2 氫離子幫浦活性。

Model 1 的 AHA2-TM1,2 雖然距離 CHL1-TM3 有點距離，但是與兩蛋白的界面很接近 (圖七 A,C)，不排除可能 CHL1 透過轉運硝酸鹽時所產生的構型改變，影響位於 AHA2-TM1,2 的 R domain。當 AHA2 活化時，R domain 離開 N 端，也有兩種擺動方式，一種是朝向 CHL1，一種是遠離 CHL1 (圖七 A)，與 Model 3 的狀況類似。

若是從 CHL1 與 AHA2 的可能互動方式來看，Model 1 與 Model 3 比較像 CHL1 活化 AHA2，但也有機會形成類似開關的調控方式，Model 2 則比較偏向於 CHL1 抑制 AHA2。若如同前一節的一種假設，AHA2 與 CHL1 能在 Model2 及 Model3 之間做轉換，那一樣可以形成類似開關的調控方式。但這些可能的互動方式，皆缺乏具體的實驗證據，都還需要更進一步的驗證。

4.4 細胞膜上的工作群組

試想，從微觀的視角觀看細胞膜時，它並非如蛋殼靜止不動，而是像海洋一樣，無時無刻都在流動。在這一大片「脂質海」上，漂盪著許許多多的膜蛋白，它們負責溝通細胞內外的大小事項，從物質的進出、訊息的傳遞，乃至於細胞身分的辨識，都有賴於這些蛋白質。膜蛋白種類繁多，但絕大部分都需要相互合作，以維持生理運作。但是，若兩個互相合作的膜蛋白，因細胞膜的流動而漸行漸遠，導致在需要共同合作時效率低落，或甚至無法完成任務，這對細胞乃至於整個生

物體的生理來說，都是很危險的一件事。

單從功能的角度上看，CHL1 與 PM H⁺-ATPase 之間似乎也恰好存在這種，不太能距離過遠，相輔相成的功能：一個使用氫離子驅動力，一個提供氫離子驅動力；一個感應膜外硝酸鹽濃度，一個提供氫離子以維持內外離子與電位恆定。雖然目前尚無直接證據，證實兩者間確實存在這樣的互助關係，但從本次研究的酵母菌雙雜合實驗結果看來，CHL1 與 AHA1、AHA2、AHA4、AHA11 都能夠互相結合（圖十 B）。雖然，我們預期 AHA2 TM7~10 這一段在 P-type ATPase 中低度保留的序列，會是 CHL1 與 AHA2 結合的主要位置，但是從 AHA family 蛋白相似度比較中可得知，與 AHA2 相同性只有 79% 的 AHA4 也可與 CHL1 結合，表示互相結合的位置可能高度保留於 AHA family。表示當 CHL1 在細胞膜上時，有很大的機會與 PM H⁺-ATPase 聚集在一起。

有文獻指出，在細胞膜上有一些流動性較低的區域，稱為耐洗潔劑微區 (detergent resistant microdomains, DRMs)，又被稱為脂筏 (lipid raft)。這是細胞膜上的小區塊，其膽固醇 (cholesterol) 與鞘脂 (sphingolipids) 濃度較細胞膜其他區域高，因此流動性極低，相較於細胞膜其它區域，脂筏就如同漂盪在細胞膜上的木筏。脂筏上通常嵌有許多訊息傳導相關的受體激酶 (receptor kinases)、異源三體 G 蛋白 (heterotrimeric G proteins)、訊號激酶 (signaling kinases)，目的是將所有訊息傳遞相關蛋白集合在一起，以促進訊號傳導之效率 (Shahollari et al., 2004; Gaxiola et al., 2007)。

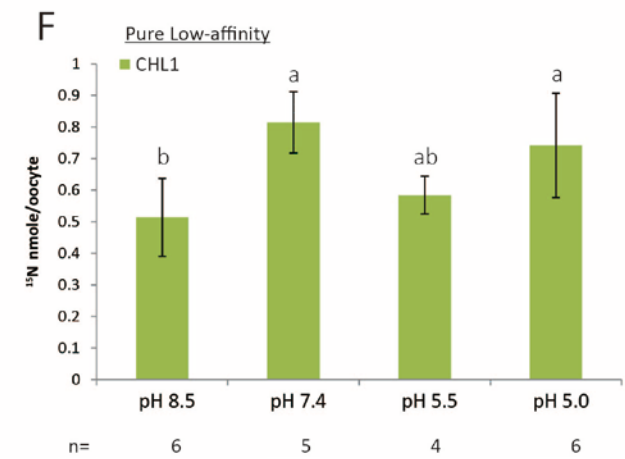
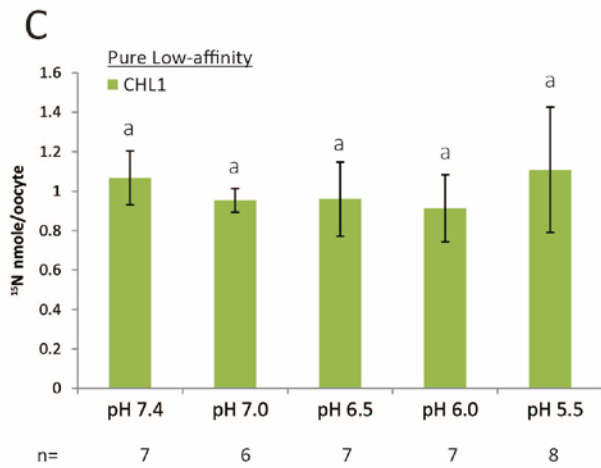
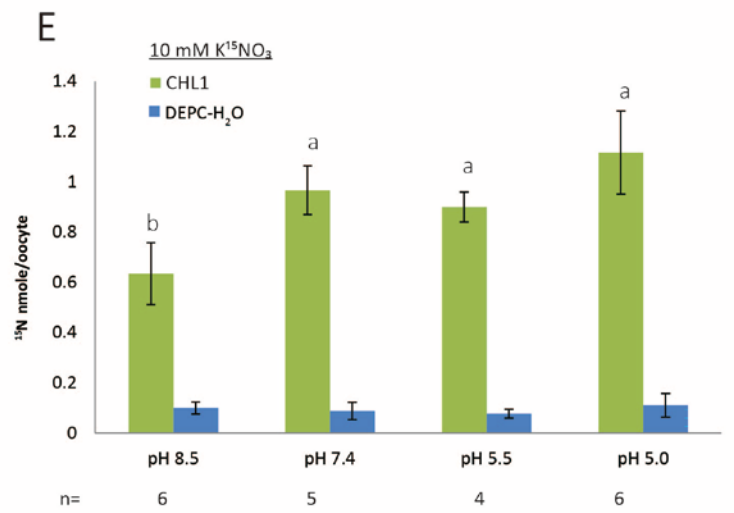
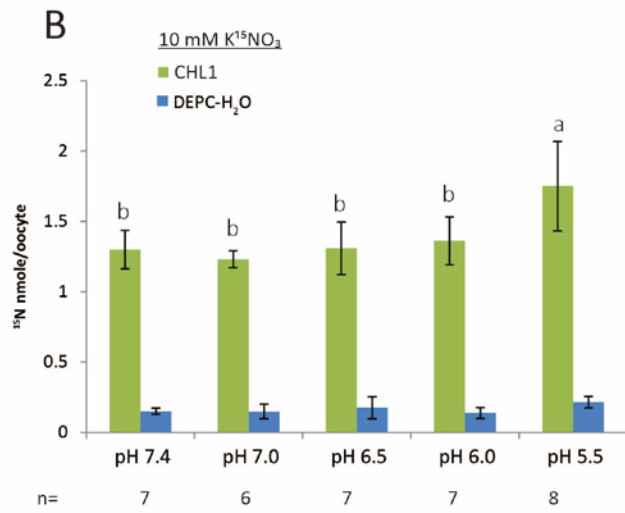
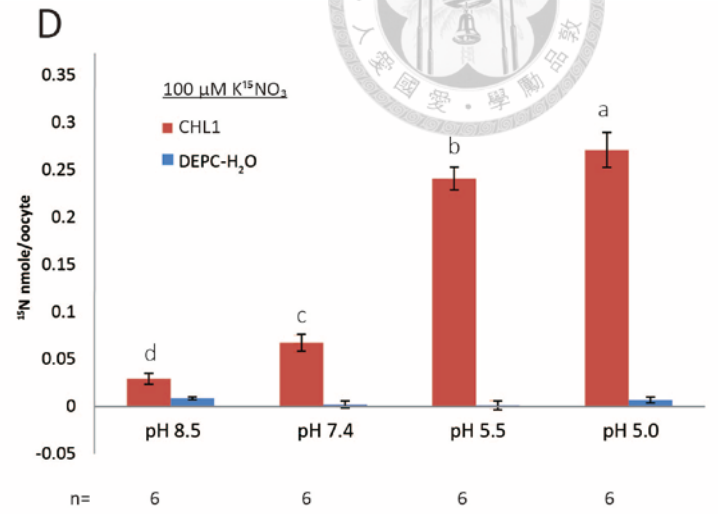
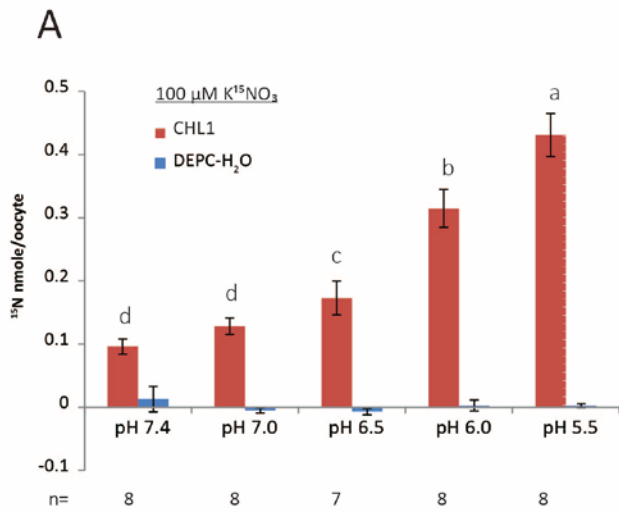
相較於哺乳類動物，從阿拉伯芥中所分離出的脂筏上，除了 AHA3、AHA7、AHA8 之外，發現許多 PM H⁺-ATPase 成員，此外還有 14-3-3 蛋白、多重覆白胺酸受體激酶 (leucine-rich receptor kinase, LRR-RK)、異源三體 G 蛋。這意味著 PM H⁺-ATPase 在植物體內的角色相當重要，需要與這些受體及訊號相關蛋白放在一起，以便迅速地對 PM H⁺-ATPase 進行調控 (Shahollari et al., 2004; Gaxiola et al., 2007)。其中 14-3-3 已知是活化 PM H⁺-ATPase 的重要角色，近期也有研究發現一種屬於 LRR-RK 的植物胜肽鏈受體 (PSY1 receptor)，在接受到 PSY1 之後，會透過其激酶區域活化 PM H⁺-ATPase (Fuglsang et al., 2014)。

本次研究中，發現調控 CHL1 的激酶 CIPK23 與去磷酸酶 ANI，能夠與 AHA2 互相結合，且與 R domain 有密切相關（圖十一 A,B）。很有可能在這些激酶調控

CHL1 的同時，能夠一起調控 AHA2 活性。但 RS-72 系統的實驗結果顯示，CIPK23 無法單獨活化 AHA2 (圖十三)。或許 CHL1 扮演了引導激酶活化 AHA2 的角色，也就是說，需要 CHL1 感受到硝酸鹽濃度改變，吸引 CIPK23 去對自己進行磷酸化的同時，才能讓 CIPK23 產生構型上的改變，以利 CIPK23 正確的活化 AHA2。

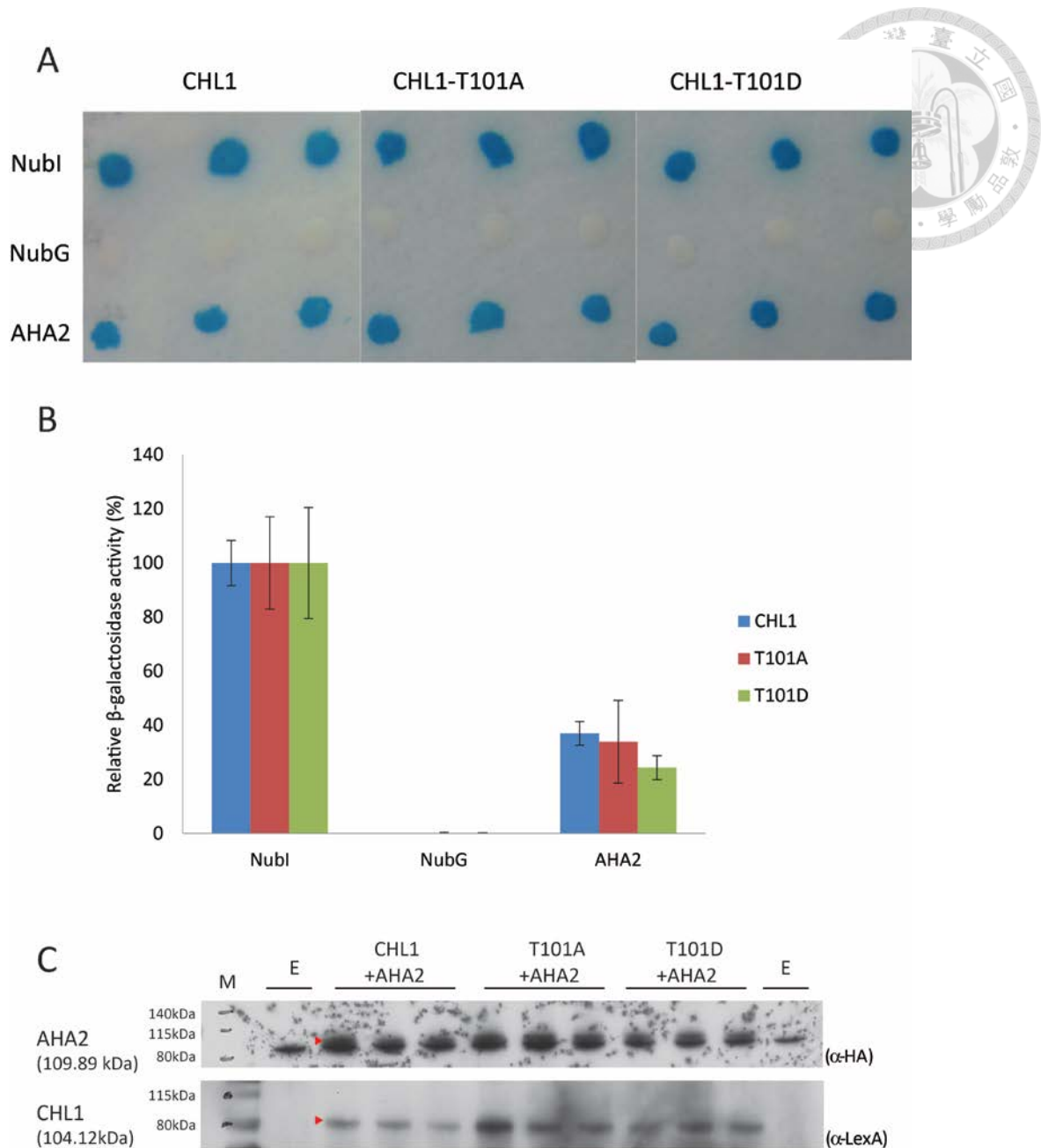
總歸來說，雖然 CHL1 本身不帶有激酶區域，也沒有脂筏相關報導，但透過與 AHA2 的結合，以及調節功能之激酶的結合，還是有機會形成一個多蛋白組合體，而交互影響 AHA2。但是，這都還需要進一步的實驗驗證，未來，我們將把 AHA2、CHL1、Kinase 三者共同轉殖進 RS-72，並培養於不同濃度硝酸鹽環境中，以驗證此假設。

圖表



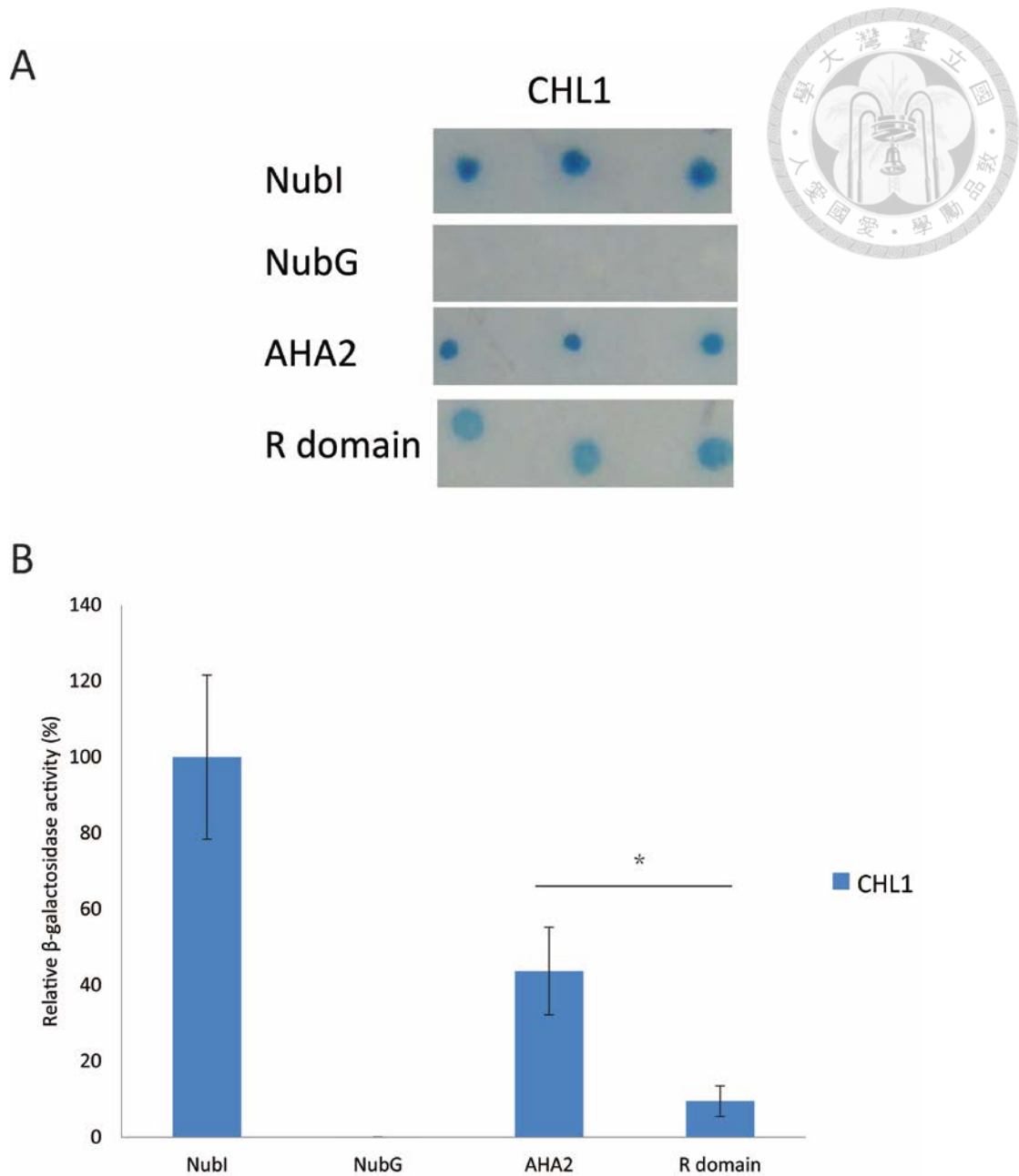
圖一、CHL1 在高、低親和性轉運模式下，硝酸鹽轉運能力受氫離子驅動力影響的程度不同

將 CHL1 基因表現於爪蟾卵中，分別浸泡於不同 pH 值之 100 μ M (圖 A、D) 與 10mM (圖 B、C、D、E) K¹⁵NO₃ 溶液中，1.5 小時 (圖 A、B、C) 或 0.5 小時 (圖 D、E、F)，並分析卵內 ¹⁵N 含量。圖中數值為平均值 \pm SD，是用 box plot 剔除各組離群值 (outlier)，所得之結果。其中，低親和性轉運模式利用兩種方式計算，方式 1. 不扣除高親和性轉運模式之數值 (圖 B、E) 與方式 2. 扣除高親和性轉運模式與控制組 DEPC-H₂O 之數值，得到 Pure Low-affinity 數值 (圖 C、F)。各平均值上示以相同字母者，為經由 ANOVA Tukey's Test 後未達顯著差異者 ($p < 0.05$)。n 為剔除離群值後，每一組之爪蟾卵數。



圖二、在酵母菌之中，CHL1、CHL1-T101A、CHL1-T101D 與 AHA2 的結合強度沒有差異

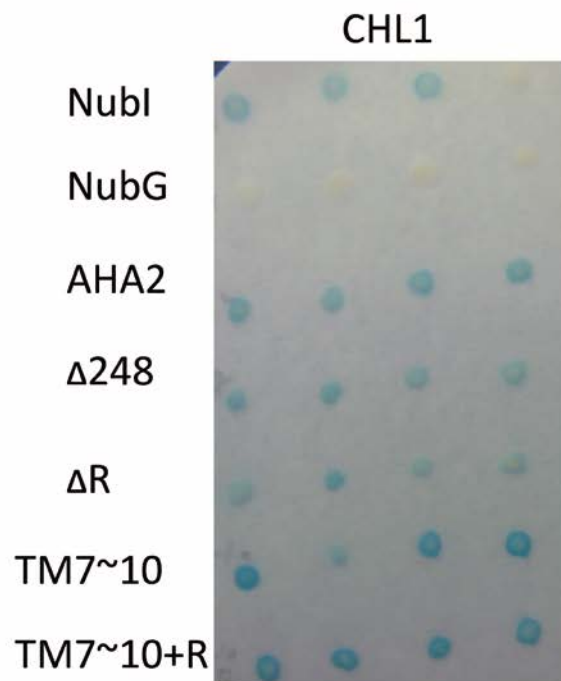
將 pTMBV4-CHL1、CHL1-T101A、CHL1-T101D 與 pDL2Nx-AHA2 共同轉殖入酵母菌株，以 X-gal 呈色實驗（圖 A）及 β-半乳糖苷酶活性定量（圖 B）分析兩蛋白之間的結合強度。NubI 為正對照組(positive control)，NubG 為負對照組(negative control)。AHA2 之組合以 one-way ANOVA 檢驗後無顯著差異。α-HA 與 α-LexA 為西方點墨法所使用的一級抗體，M 為 marker，E 為 Empty vector 表示控制組（圖 C）。



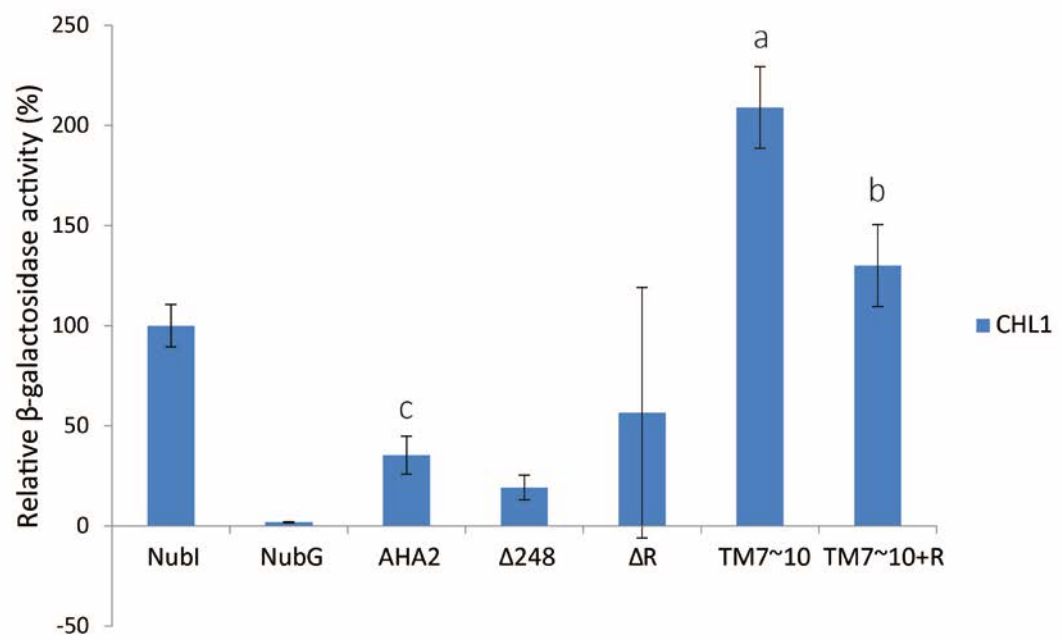
圖三、在酵母菌之中，CHL1 與 AHA2 之 R domain 的結合強度顯著低於與 AHA2 結合的強度

將 pTMBV4-CHL1 與 pDL2Nx-AHA2、AHA2 R domain 共同轉殖入酵母菌株，以 X-gal 呈色實驗（圖 A）及 β -半乳糖苷酶活性定量（圖 B）分析兩蛋白之間的結合強度。NubI 為正對照組，NubG 為負對照組。AHA2 與 R domain 之組合以單尾 T-test 檢驗後達顯著差異 ($p < 0.05$)。AHA2 各片段之相對位置請參考圖五。

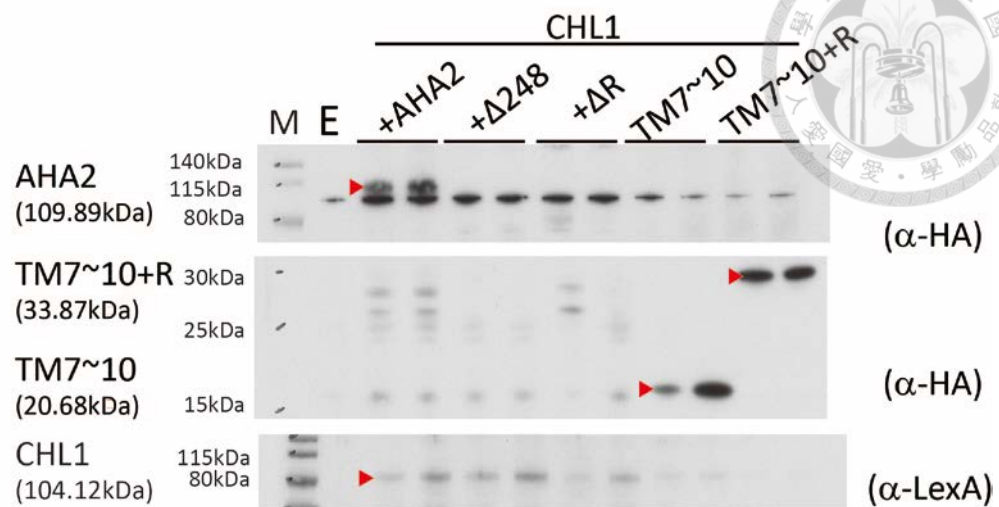
A



B

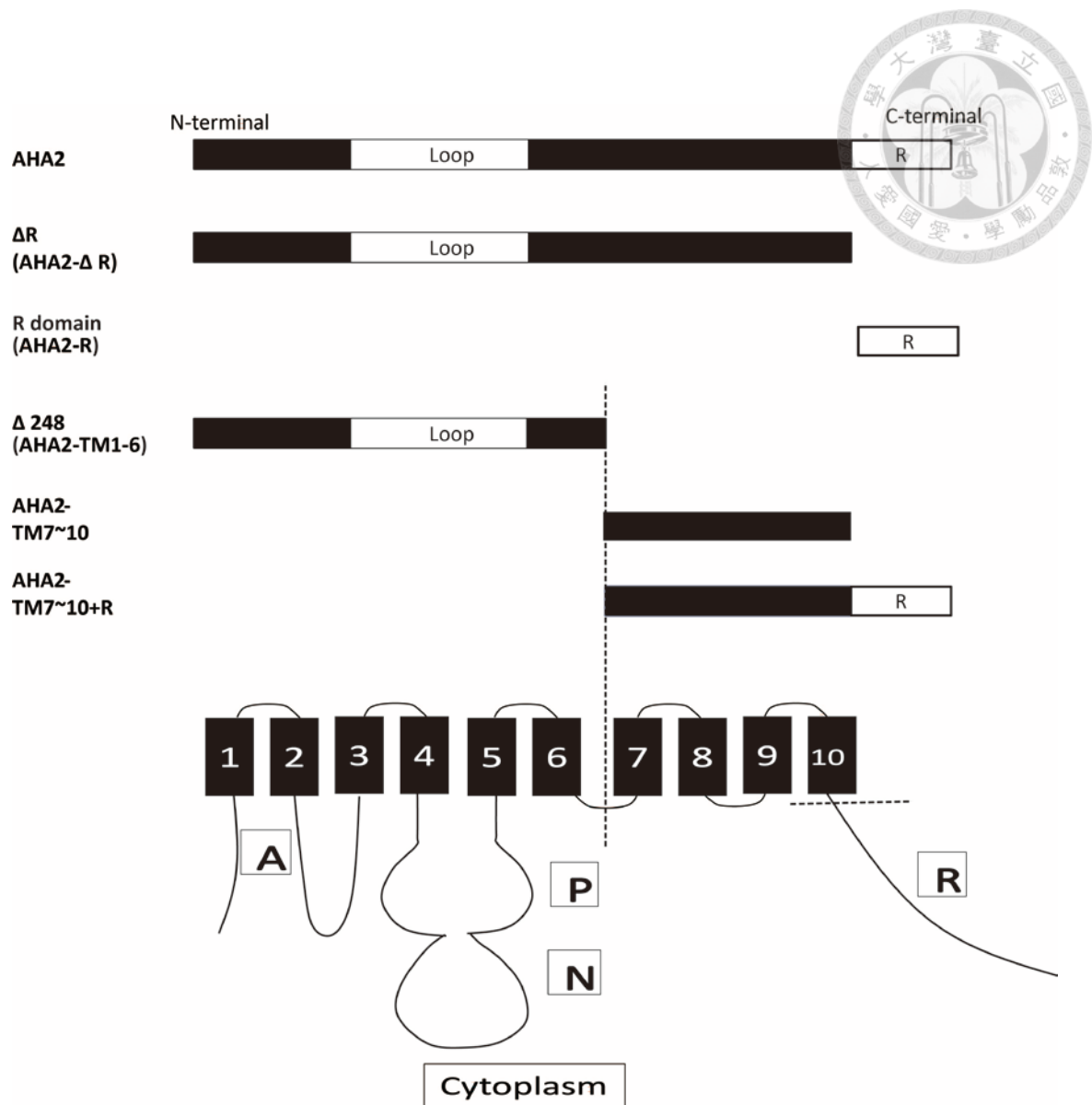


C



圖四、在酵母菌之中，CHL1 與 AHA2-TM7~10 的結合強度最高，而 R domain 會降低其結合強度

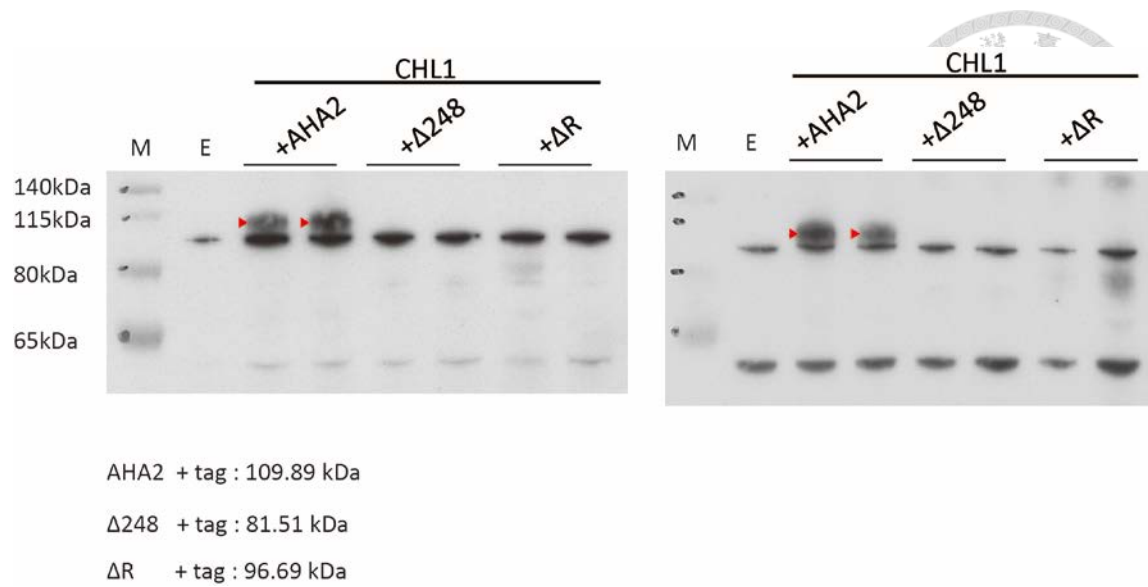
將 pTMBV4-CHL1 與 pDL2Nx-AHA2 各片段共同轉殖入酵母菌株，以 X-gal 呈色實驗 (圖 A) 及 β -半乳糖苷酶活性定量 (圖 B) 分析兩蛋白之間的結合強度。NubI 為正對照組，NubG 為負對照組。各平均值上示以相同字母者，為經由 ANOVA Tukey's Test 後未達顯著差異者 ($p < 0.05$)。因 $\Delta 248$ 與 ΔR 並無法於西方點墨法中偵測到蛋白質表現 (圖 C)，因此不進行統計分析。AHA2 各片段之相對位置請參考圖五。 α -HA 與 α -LexA 為西方點墨法所使用的一級抗體，M 為 marker，E 為 Empty vector 表示控制組 (圖 C)。



* 未依蛋白質大小比例作圖

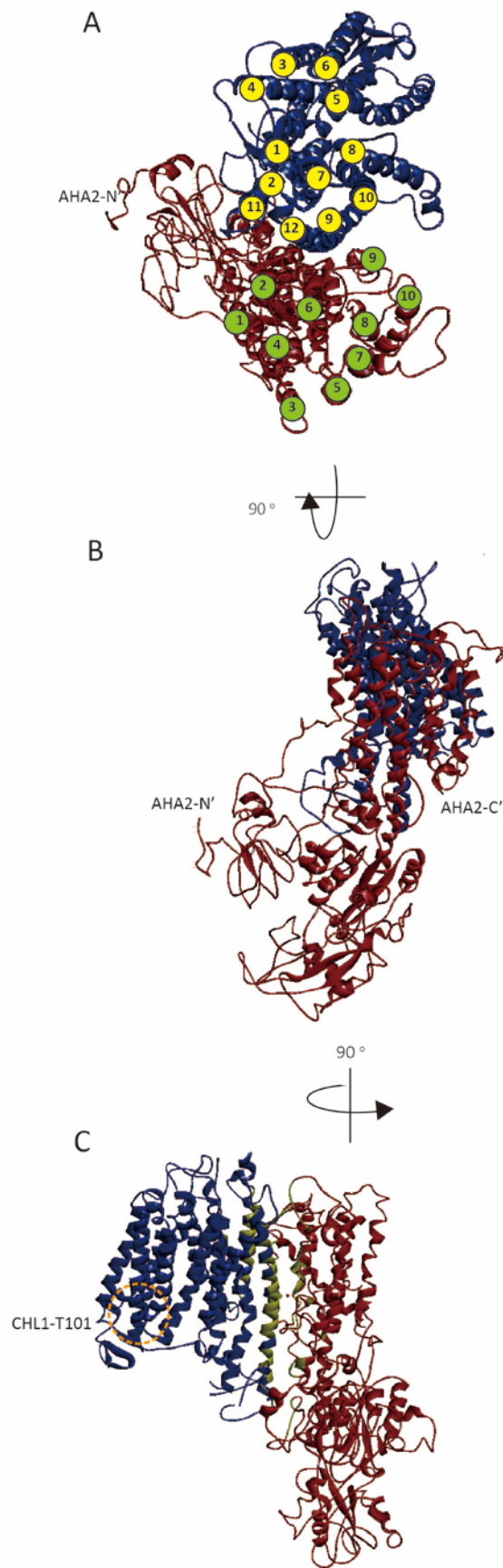
圖五、AHA2 各片段之示意圖

方框中之 A、P、N 為 AHA2 的功能性區域，R 為 R domain。虛線為分割片段之位置。



圖六、pDL2Nx-AHA2 Δ 248 與 pDL2Nx-AHA2 Δ R 兩個蛋白質的表現量極低

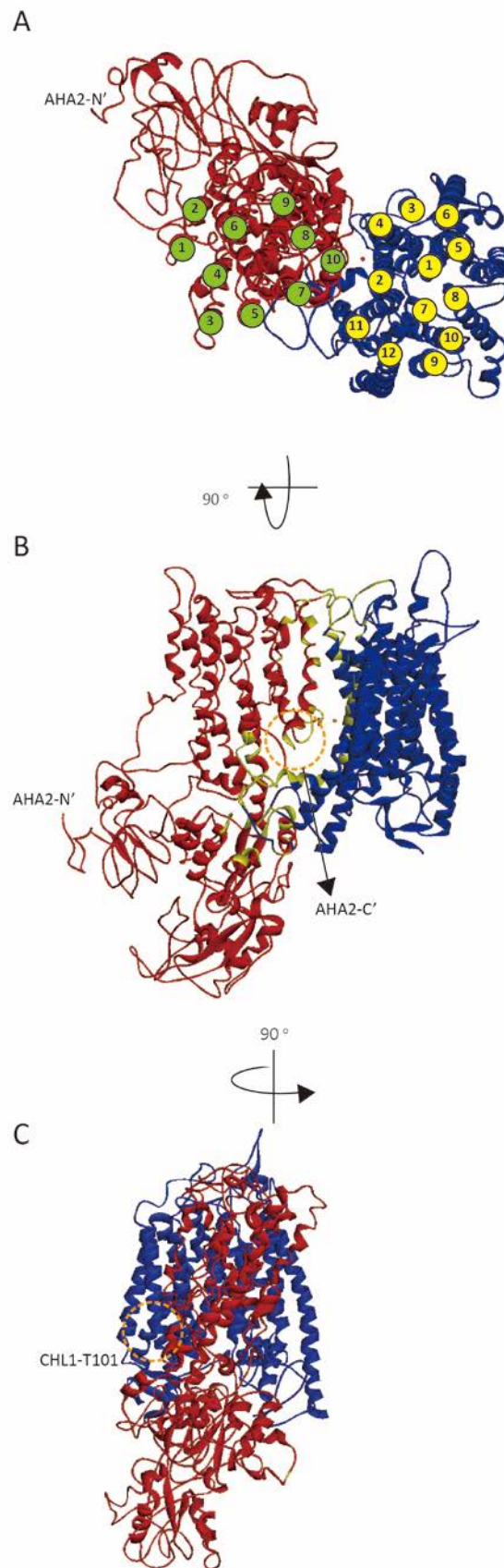
M 為 marker，E 為 Empty vector，此西方點墨法之一級抗體為 α -HA。



圖七、ZDock 模擬 CHL1 與 AHA2 之結合結果- Model 1

以 Discovery Studio ZDock 進行 docking 模擬，挑選結果中，兩蛋白之排列，與其位於細胞膜上時之方向相同的組合。以 CHL1 為 receptor 進行 ZDock，藍色結構為 CHL1，紅色結構為 AHA2。圓形圖式內的數字代表穿模區域的順序 (圖 A)。黃色區域為模擬結合的位置 (圖 C)。AHA2-N' 為 AHA2 蛋白結構 N 端；AHA2-C' 為 AHA2 蛋白結構 C 端 (圖 B)；CHL1-T101 為 CHL1 第 101 號胺基酸 Threonine (圖 C)。





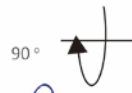
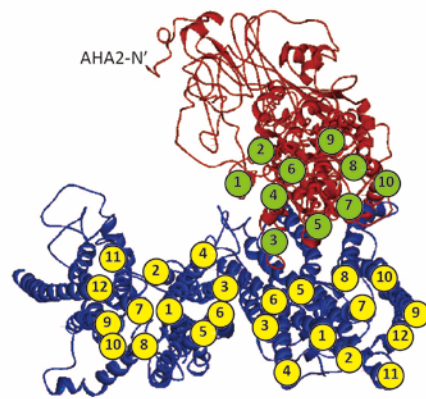
圖八、ZDock 模擬 CHL1 與 AHA2 之結合結果- Model 2

以 Discovery Studio ZDock 進行 docking 模擬，挑選結果中，兩蛋白之排列，與其位於細胞膜上時之方向相同的組合。以 AHA2 為 receptor 進行 ZDock，藍色結構為 CHL1，紅色結構為 AHA2。圓形圖式內的數字代表穿模區域的順序 (圖 A)。黃色區域為模擬結合的位置 (圖 B)。AHA2-N' 為 AHA2 蛋白結構 N 端；AHA2-C' 為 AHA2 蛋白結構 C 端；CHL1-T101 為 CHL1 第 101 號胺基酸 Threonine (圖 C)。

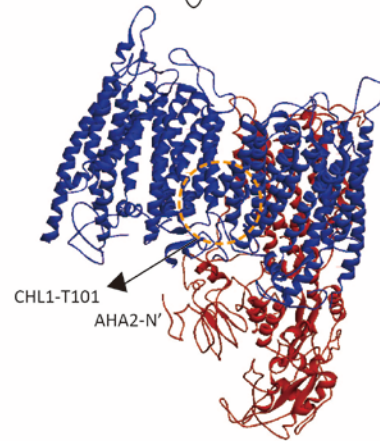




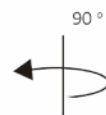
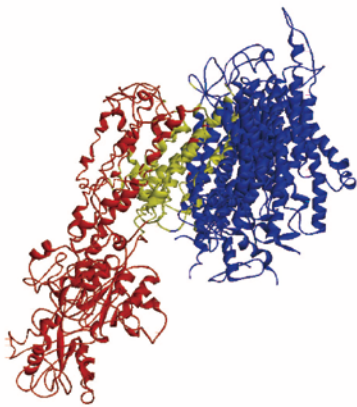
A



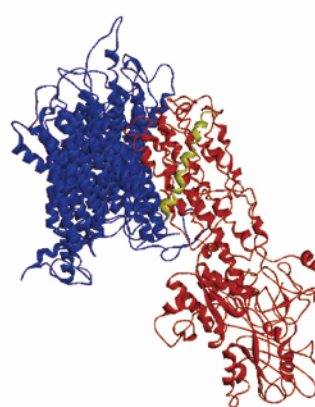
B



C



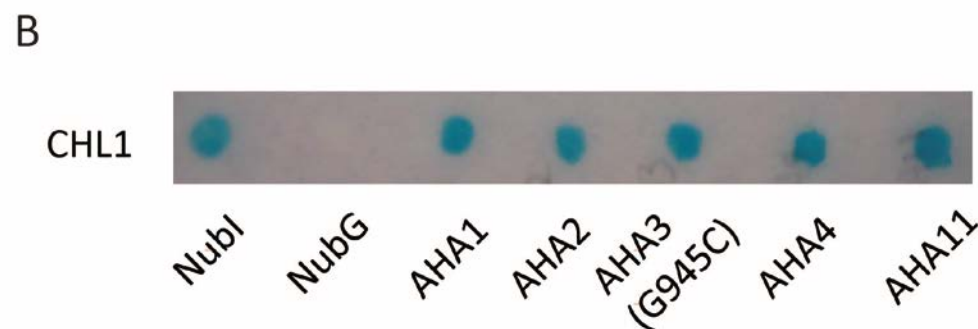
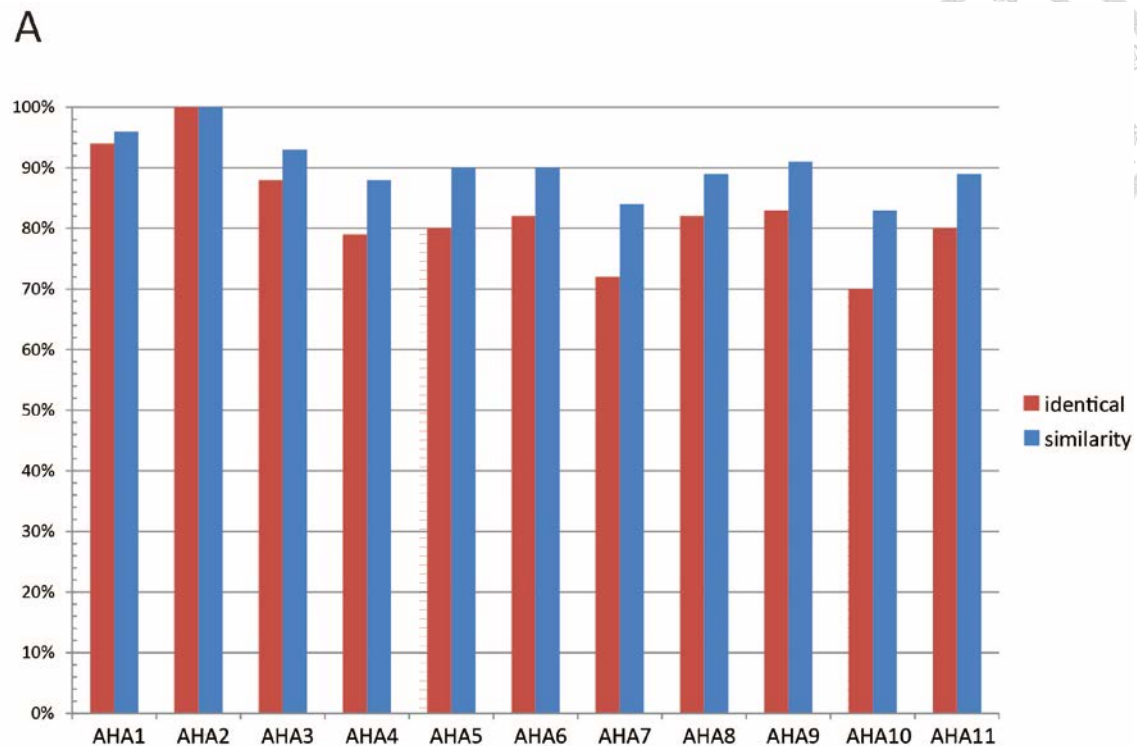
D



圖九、ZDock 模擬 CHL1 與 AHA2 之結合結果- Model 3

以 Discovery Studio ZDock 進行 docking 模擬，挑選結果中，兩蛋白之排列，與其位於細胞膜上時之方向相同的組合。以 AHA2 為 receptor 與 CHL1 dimer 進行 ZDock 進行模擬。藍色結構為 CHL1，紅色結構為 AHA2。圓形圖式內的數字代表穿模區域的順序（圖 A）。黃色區域為模擬結合的位置（圖 C）。（圖 D）黃色區域為 AHA2-TM10 之位置。

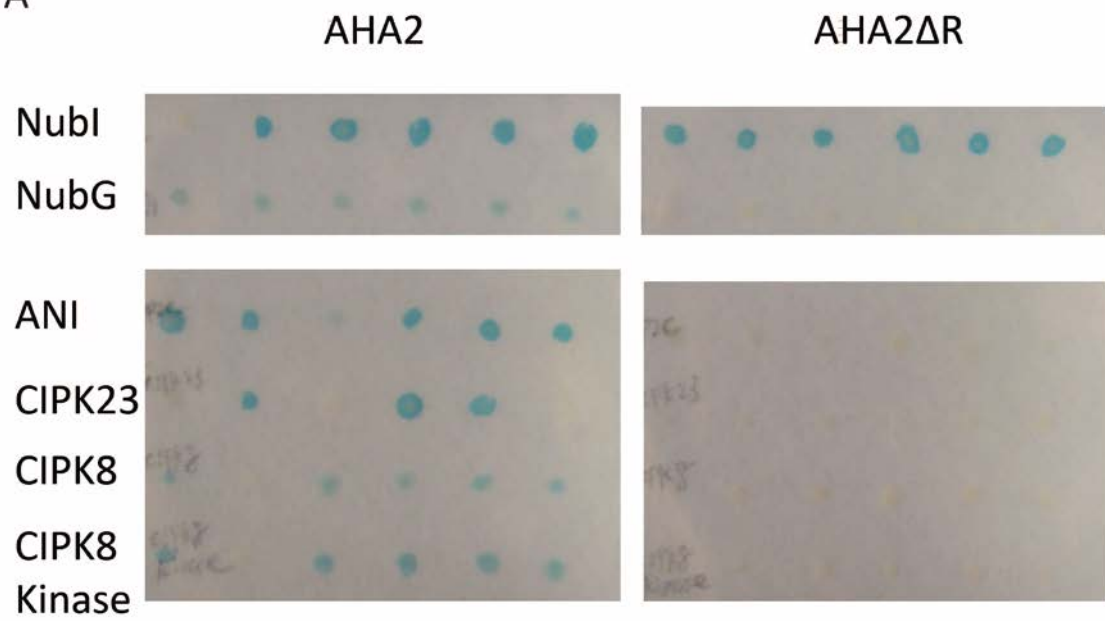




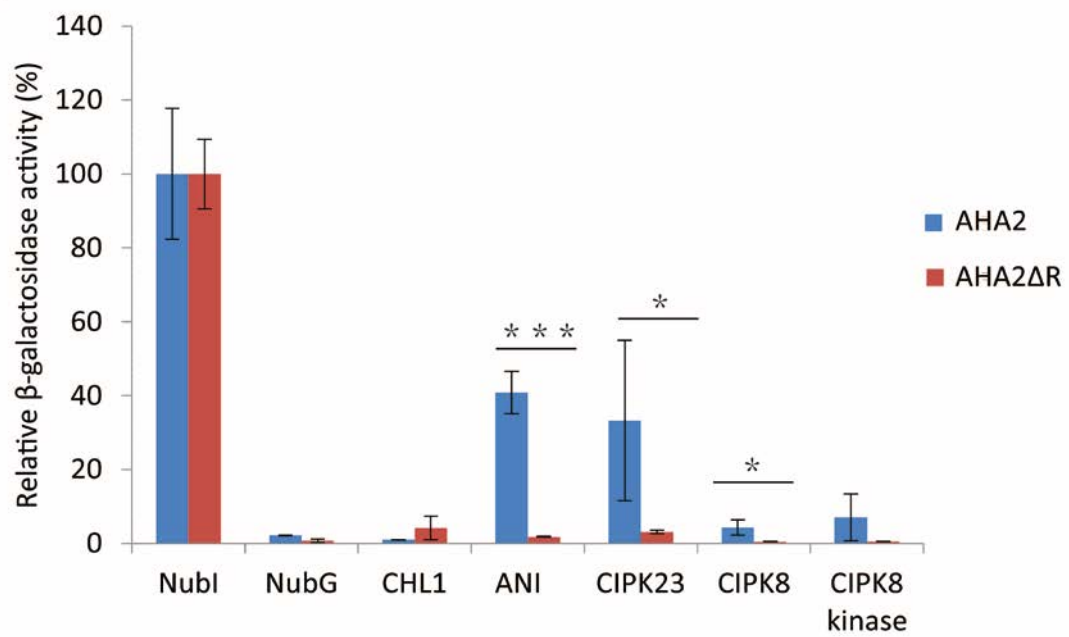
圖十、CHL1 與 AHA Family 之間可能存在高度保留的結合位置

利用 Clustalx 進行 Alignment 後，以 GeneDoc 讀取並計算其相同性 (identical) 與相似性 (similarity) (圖 A)。pTMBV4-CHL1 分別與 pDL2Nx-AHA1、2、3、4、11 共同轉殖入酵母菌株，以 X-gal 呈色實驗 (圖 B) 分析兩蛋白之間的結合強度。其中 AHA3 序列發生突變，導致第 945 號胺基酸產生突變。NubI 為正對照組，NubG 為負對照組。

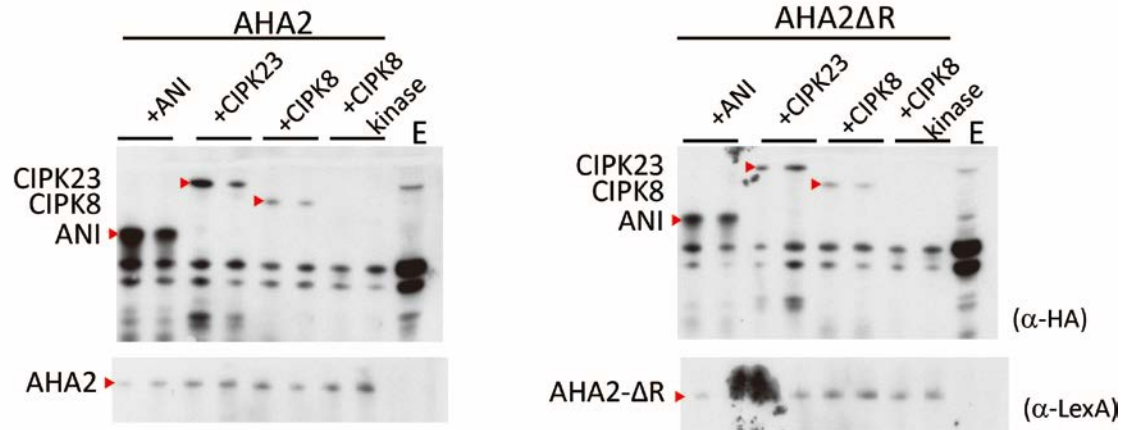
A



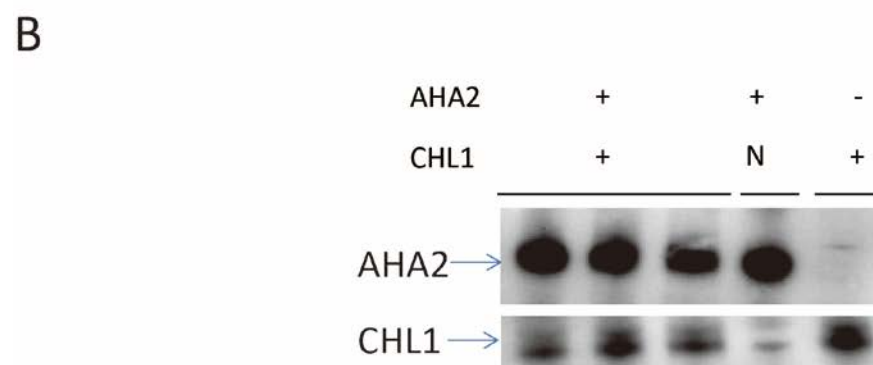
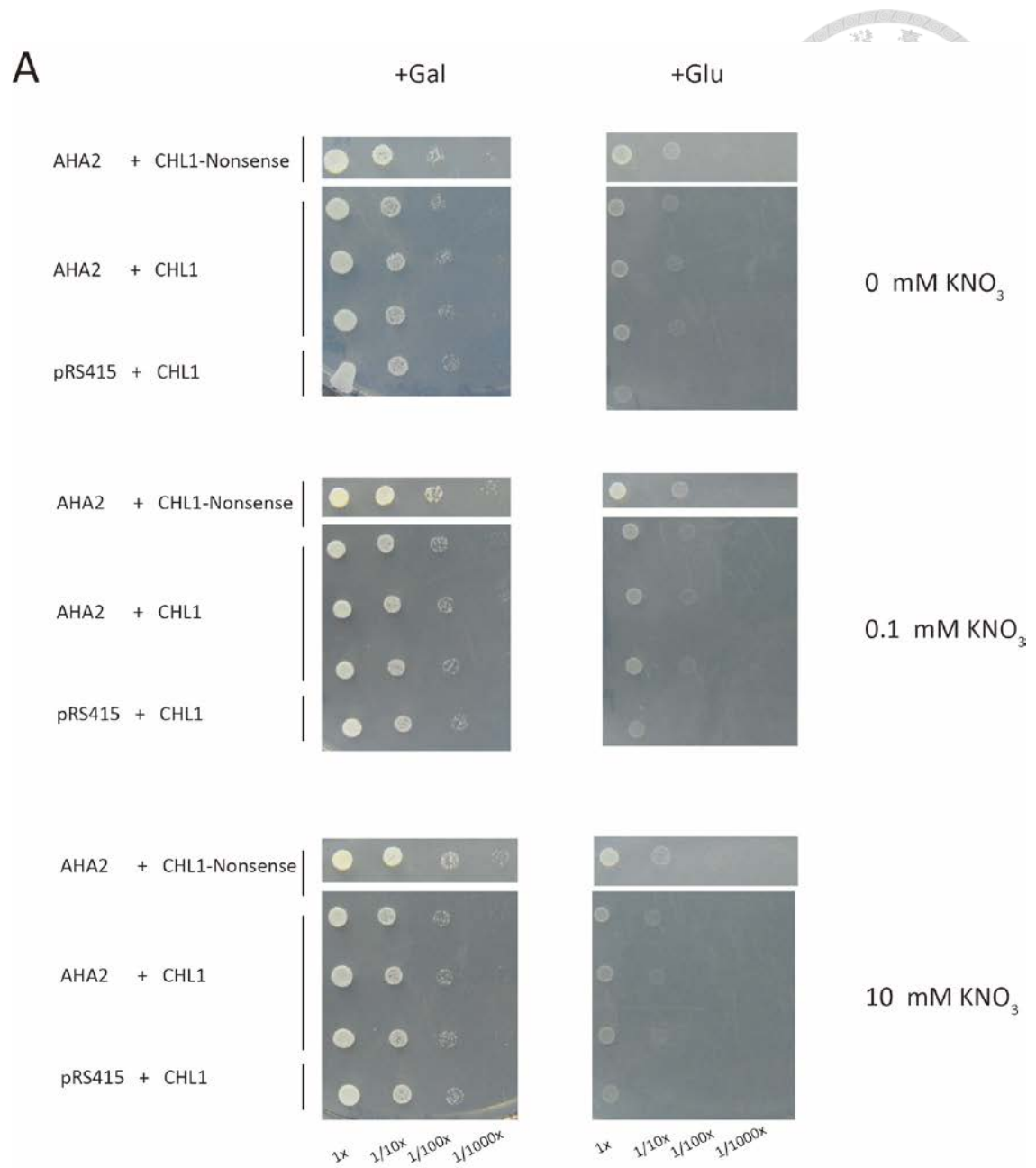
B



C



圖十一、AHA2-R domain 存在時，ANI、CIPK23 和 CIPK8 才能夠與 AHA2 結合。將 pTMBV4-AHA2、AHA2 Δ R 與 pDL2Nx-ANI、CIPK23、CIPK8、CIPK8 Kinase domain 共同轉殖入酵母菌株，以 X-gal 呈色實驗（圖 A）及 β -半乳糖苷酶活性定量（圖 B）分析兩蛋白之間的結合強度。NubI 為正對照組，NubG 為負對照組。經單尾 T-test 檢驗後達顯著差異(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)。 α -HA 與 α -LexA 為西方點墨法所使用的一級抗體，E 為 Empty vector 表示控制組（圖 C）。

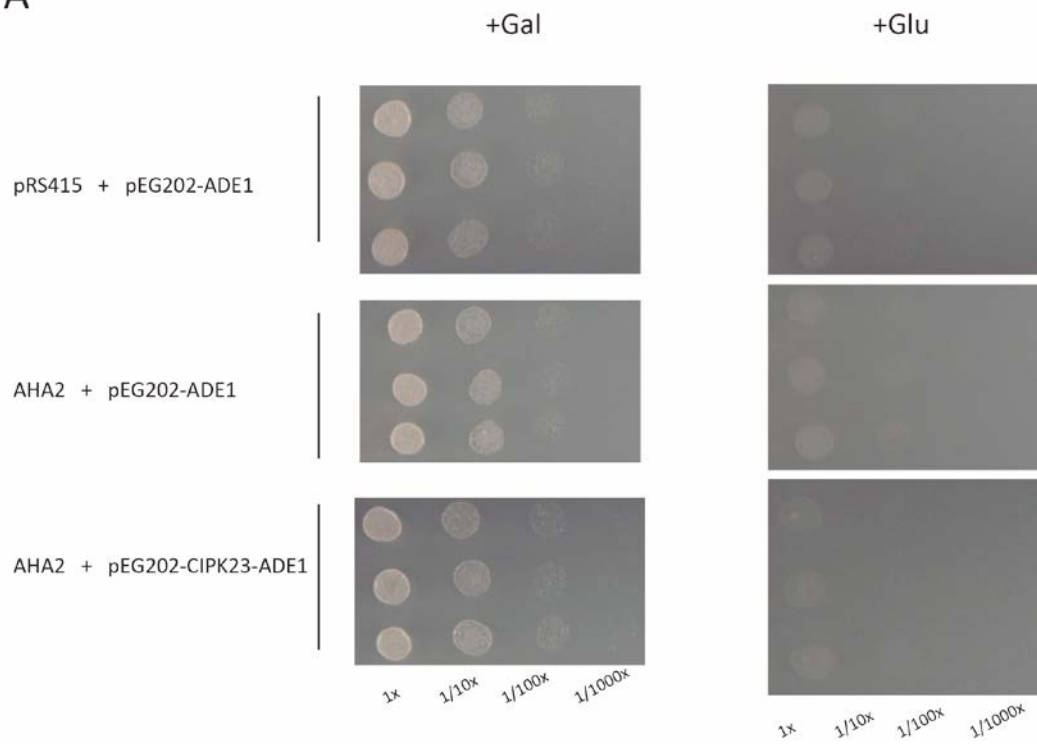




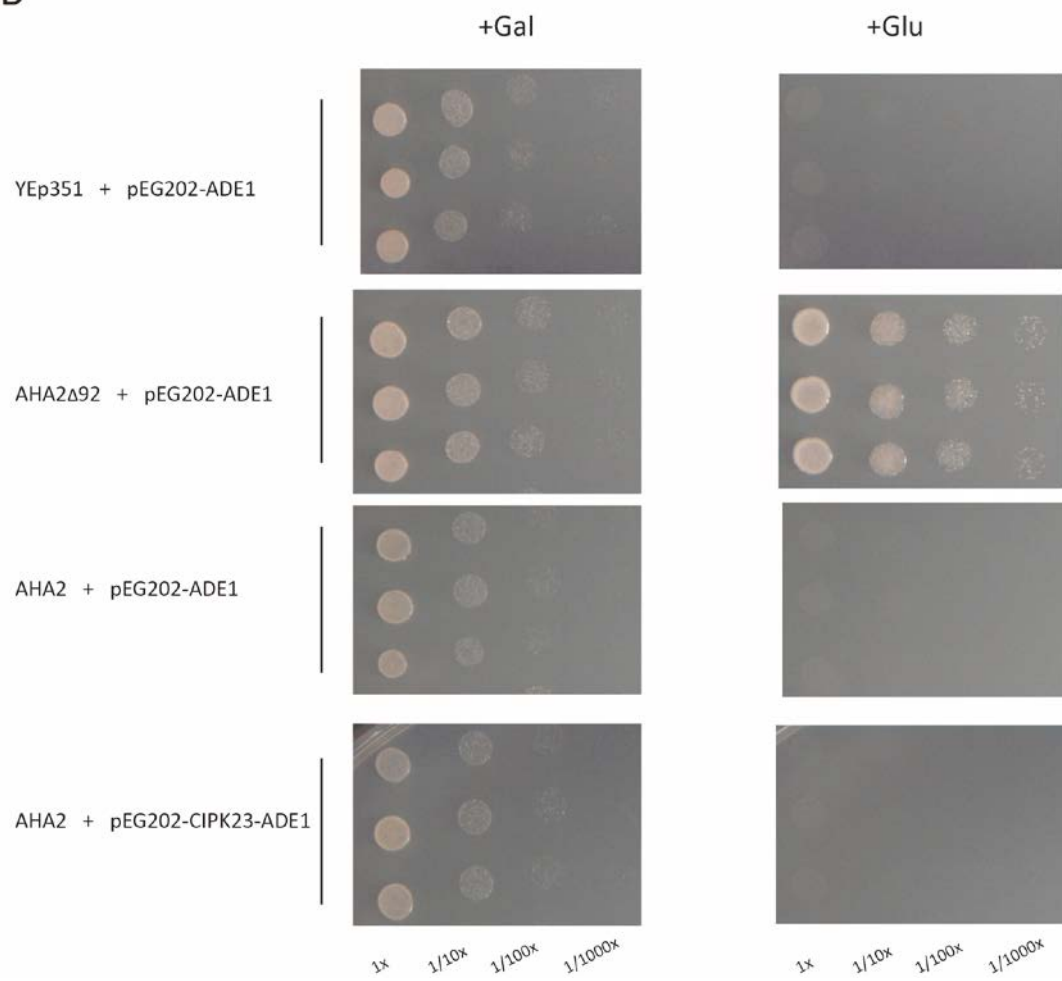
圖十二、RS-72 系統中，CHL1 無法單獨活化 AHA2 的氫離子幫浦活性

將 CHL1、CHL1-Nonsense (為 CHL1 Nonsense mutation) 分別與 AHA2 (pMP1745, 位於 pRS415 vector) 共同轉殖進酵母菌 RS-72 中；經序列稀釋後，分別滴至不同 KNO_3 濃度的 +Gal (galactose) 與 +Glu (glucose) 培養基。只有在含 +Gal 的培養基中，RS-72 才會表現具活性之內生性氫離子幫浦；因此，在 +Glu 培養基中，若 AHA2 不具活性，則 RS-72 生長狀況較差 (圖 A)。使用 α -AHA2 與 α -CHL1 做為西方點墨法之一級抗體；N 代表 CHL1-Nonsense (圖 B)。

A

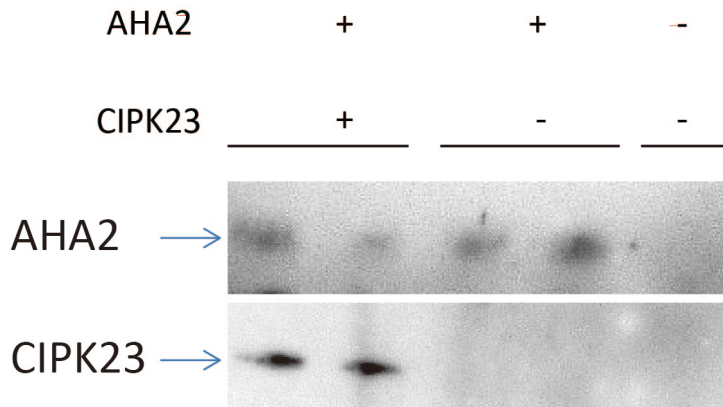


B

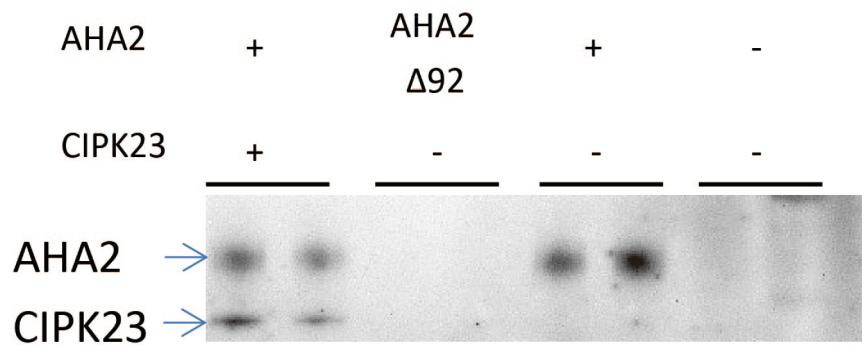




C



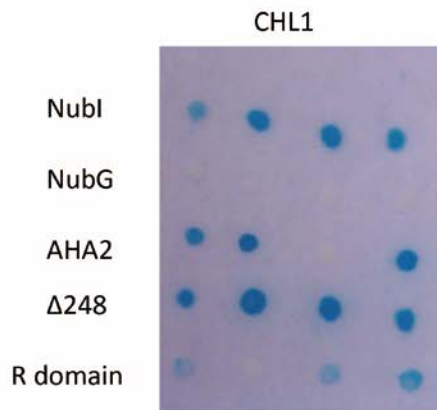
D



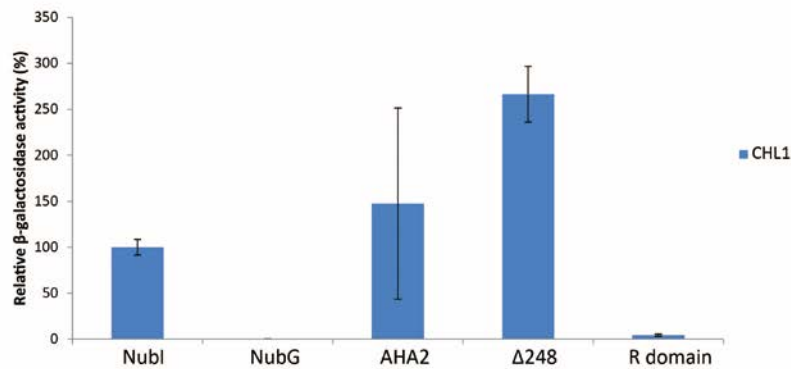
圖十三、在 RS-72 系統中，CIPK23 無法單獨活化 AHA2 的氫離子幫浦活性
 將 CIPK23 (位於 pEG202-ADE1) 與位於 pRS415 vector (圖 A) 及 YEp351 vector (圖 B) 的 AHA2 共同轉殖進酵母菌 RS-72 中；經序列稀釋後，分別滴至 +Gal (galactose) 與 +Glu (glucose) 培養基。只有在含 +Gal 的培養基中，RS-72 才會表現具活性之內生性氫離子幫浦；因此，在 +Glu 培養基中，若 AHA2 不具活性，則 RS-72 生長狀況較差。AHA2 Δ 92 為剔除 C 端 92 個胺基酸，移除自我抑制功能的 AHA2 正對照組。使用 α -AHA2 與 α -LexA (CIPK23 之 tag) 做為西方點墨法之一級抗體；西方點墨法之結果，分別為圖 A 的蛋白質表現量 (圖 C) 與圖 B 的蛋白質表現量 (圖 D)。



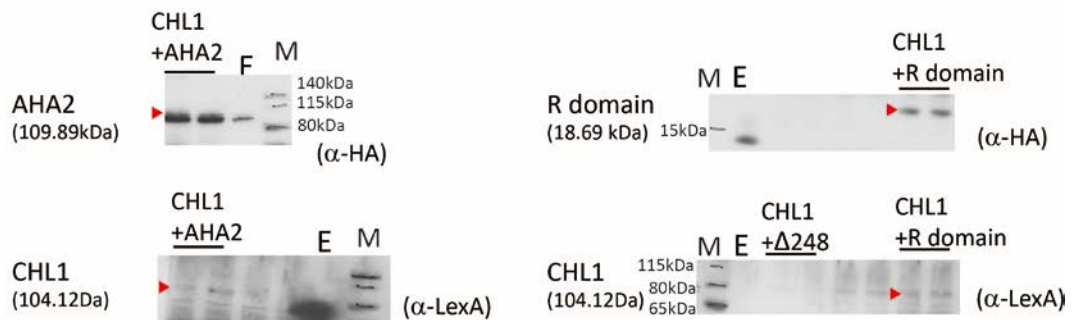
A



B

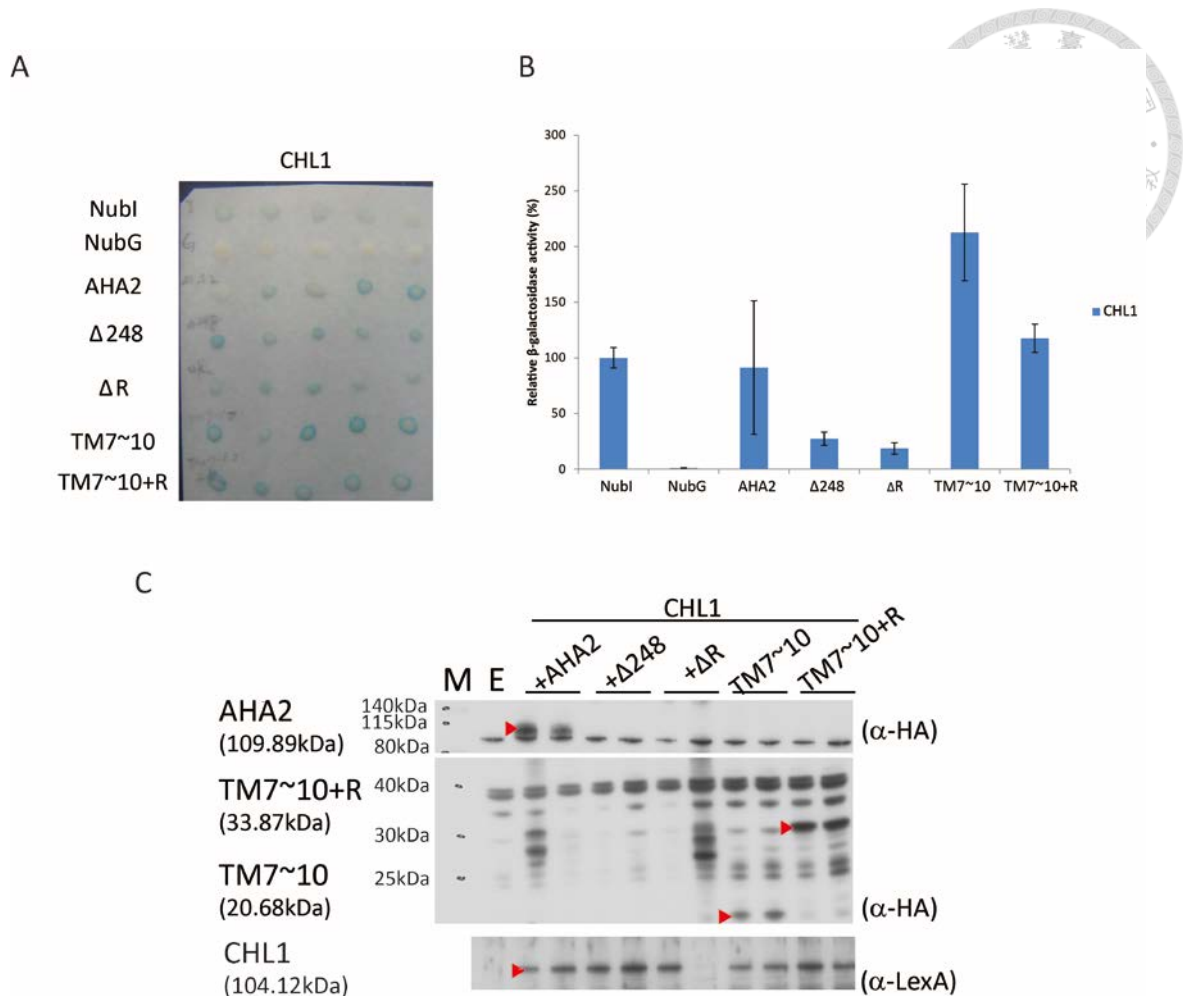


C



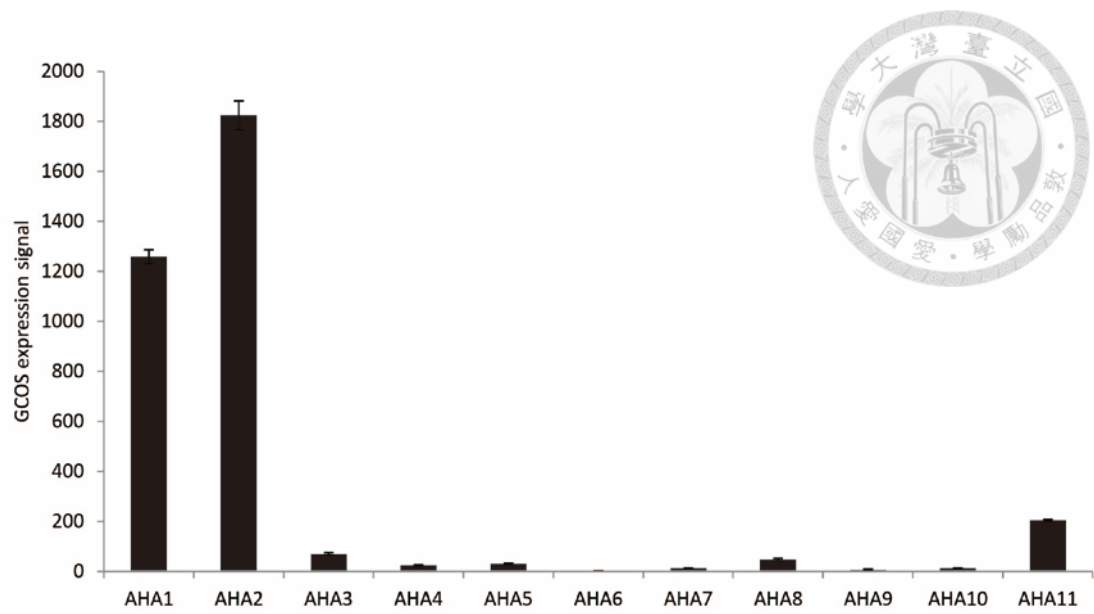
附圖一、在酵母菌之中，CHL1 與 AHA2 之 R domain 的結合強度顯著低於與 AHA2 結合的強度

將 pTMBV4-CHL1 與 pDL2Nx-AHA2 各片段共同轉殖入酵母菌株，以 X-gal 呈色實驗 (圖 A) 及 β-半乳糖苷酶活性定量 (圖 B) 分析兩蛋白之間的結合強度。NubI 為正對照組，NubG 為負對照組。α-HA 與 α-LexA 為西方點墨法所使用的一級抗體，M 為 marker，E 為 Empty vector 表示控制組 (圖 C)。



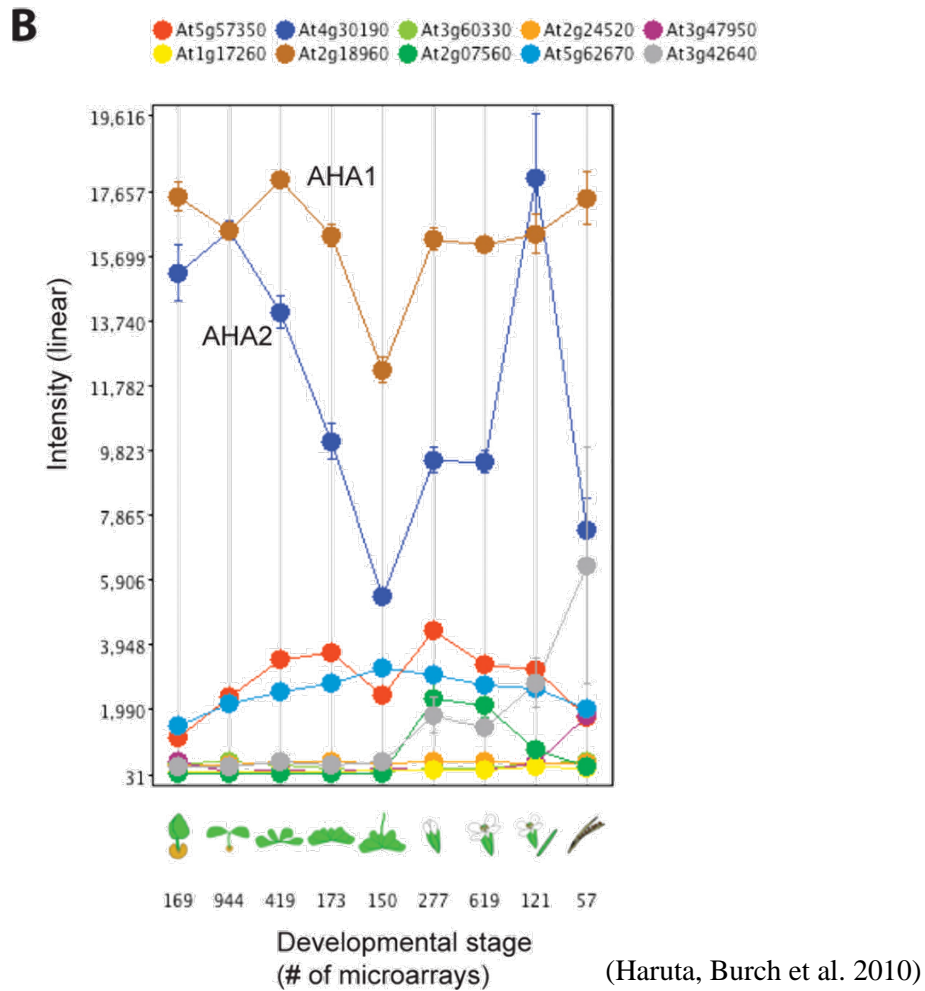
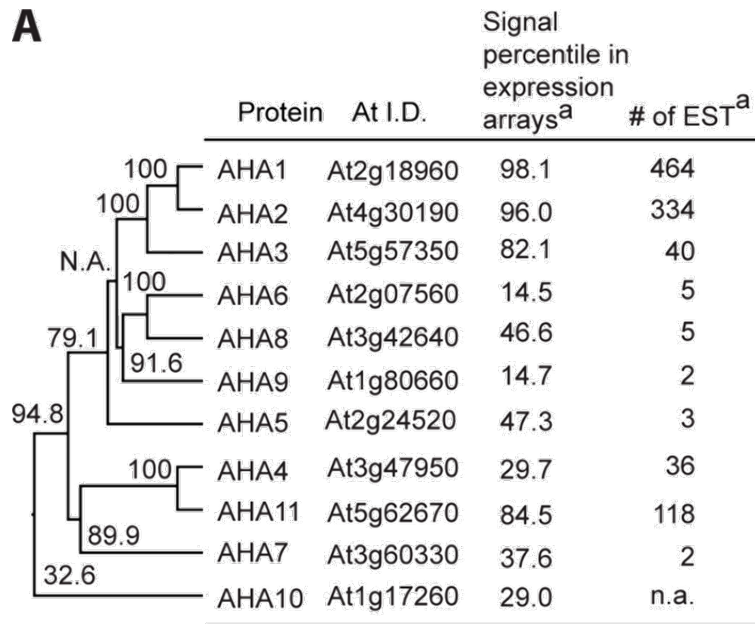
附圖二、在酵母菌之中，CHL1 與 AHA2-TM7~10 的結合強度最高，而 R domain 會降低其結合強度

將 pTMBV4-CHL1 與 pDL2Nx-AHA2 各片段共同轉殖入酵母菌株，以 X-gal 呈色實驗（圖 A）及 β -半乳糖苷酶活性定量（圖 B）分析兩蛋白之間的結合強度。Nubl 為正對照組，NubG 為負對照組。 α -HA 與 α -LexA 為西方點墨法所使用的一級抗體，M 為 marker，E 為 Empty vector 表示控制組； α -HA 曝光時間為 3 分鐘， α -LexA 曝光時間為 40 分鐘（圖 C）。



附圖三、AHA family 於阿拉伯芥根部的基因表現程度

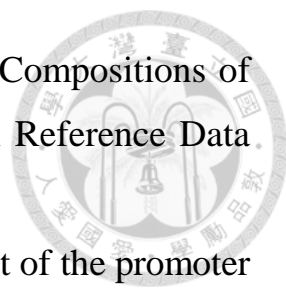
資料來源：TAIR database 上之公開微陣列資料 (BAR Arabidopsis e-FP Browser)



附圖四、AHA Family 之系統分類樹及植物不同發育時期之表現量

參考文獻

- Alsterfjord, M., Sehnke, P.C., Arkell, A., Larsson, H., Svennelid, F., Rosenquist, M., Ferl, R.J., Sommarin, M., and Larsson, C. (2004).** Plasma membrane H(+)-ATPase and 14-3-3 isoforms of Arabidopsis leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H(+)-ATPase interaction. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1202-1210.
- Axelsen, K.B., and Palmgren, M.G. (2001).** Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **126**, 696-706.
- Axelsen, K.B., Venema, K., Jahn, T., Baunsgaard, L., and Palmgren, M.G. (1999).** Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H⁺-ATPase AHA2: mapping of residues that when altered give rise to an activated enzyme. *Biochemistry* **38**, 7227-7234.
- Baunsgaard, L., Fuglsang, A.T., Jahn, T., Korthout, H.A., de Boer, A.H., and Palmgren, M.G. (1998).** The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H(+)-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *Plant J.* **13**, 661-671.
- Baxter, I.R., Young, J.C., Armstrong, G., Foster, N., Bogenschutz, N., Cordova, T., Peer, W.A., Hazen, S.P., Murphy, A.S., and Harper, J.F. (2005).** A plasma membrane H⁺-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2649-2654.
- Bock, K.W., Honys, D., Ward, J.M., Padmanaban, S., Nawrocki, E.P., Hirschi, K.D., Twell, D., and Sze, H. (2006).** Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics. *Plant Physiol.* **140**, 1151-1168.
- Böhlke, J.K., de Laeter, J.R., De Bièvre, P., Hidaka, H., Peiser, H.S.,**

- 
- Rosman, K.J.R., and Taylor, P.D.P.** (2005). Isotopic Compositions of the Elements, 2001. Journal of Physical and Chemical Reference Data. **34**, 57-67.
- Cid, A., Perona, R., and Serrano, R.** (1987). Replacement of the promoter of the yeast plasma membrane ATPase gene by a galactose-dependent promoter and its physiological consequences. Curr. Genet. **12**, 105-110.
- Crawford, N.M.** (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell **7**, 859-868.
- Crawford, N.M., and Glass, A.D.M.** (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends Plant Sci. **3**, 389-395.
- DeWitt, N.D., Harper, J.F., and Sussman, M.R.** (1991). Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. Plant J. **1**, 121-128.
- Engelsberger, W.R., and Schulze, W.X.** (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved Arabidopsis seedlings. Plant J. **69**, 978-995.
- Eraso, P., and Portillo, F.** (1994). Molecular mechanism of regulation of yeast plasma membrane H(+)-ATPase by glucose. Interaction between domains and identification of new regulatory sites. J. Biol. Chem. **269**, 10393-10399.
- Fuglsang, A.T., Tulinius, G., Cui, N., and Palmgren, M.G.** (2006). Protein phosphatase 2A scaffolding subunit A interacts with plasma membrane H⁺-ATPase C-terminus in the same region as 14-3-3 protein. Physiol. Plant. **128**, 334-340.
- Fuglsang, A.T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O.N., Aducci, P., and Palmgren, M.G.** (1999). Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H(+)-ATPase AHA2 involves

- the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947). *J. Biol. Chem.* **274**, 36774-36780.
- Fuglsang, A.T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G., and Zhu, J.K.** (2007). Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* **19**, 1617-1634.
- Fuglsang, A.T., Kristensen, A., Cuin, T.A., Schulze, W.X., Persson, J., Thuesen, K.H., Ytting, C.K., Oehlenschlaeger, C.B., Mahmood, K., Sondergaard, T.E., Shabala, S., and Palmgren, M.G.** (2014). Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. *Plant J.* **80**, 951-964.
- Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., and Schumacher, K.** (2007). Plant proton pumps. *FEBS Lett.* **581**, 2204-2214.
- Harper, J.F., Manney, L., DeWitt, N.D., Yoo, M.H., and Sussman, M.R.** (1990). The *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase multigene family. Genomic sequence and expression of a third isoform. *J. Biol. Chem.* **265**, 13601-13608.
- Haruta, M., Burch, H.L., Nelson, R.B., Barrett-Wilt, G., Kline, K.G., Mohsin, S.B., Young, J.C., Otegui, M.S., and Sussman, M.R.** (2010). Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 17918-17929.
- Hayashi, Y., Nakamura, S., Takemiya, A., Takahashi, Y., Shimazaki, K., and Kinoshita, T.** (2010). Biochemical characterization of in vitro phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol.* **51**, 1186-1196.
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., and Tsay, Y.F.** (2009). CHL1 functions as

a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184-1194.

Houlne, G., and Boutry, M. (1994). Identification of an Arabidopsis-Thaliana Gene Encoding a Plasma-Membrane H⁺-ATPase Whose Expression Is Restricted to Anther Tissues. *Plant J.* **5**, 311-317.

Jahn, T., Fuglsang, A.T., Olsson, A., Bruntrup, I.M., Collinge, D.B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M.G., and Larsson, C. (1997). The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase. *Plant Cell* **9**, 1805-1814.

Kinoshita, T., and Shimazaki, K. (1999). Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* **18**, 5548-5558.

Kinoshita, T., and Hayashi, Y. (2011). New insights into the regulation of stomatal opening by blue light and plasma membrane H(+)-ATPase. *International review of cell and molecular biology* **289**, 89-115.

Krouk, G., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M., and Tsay, Y.F. (2010a). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 266-273.

Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P., and Gojon, A. (2010b). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* **18**, 927-937.

Leran, S., Munos, S., Brachet, C., Tillard, P., Gojon, A., and Lacombe, B. (2013). Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation. *Molecular plant* **6**, 1984-1987.

Lin, S.H., Kuo, H.F., Canivenc, G., Lin, C.S., Lepetit, M., Hsu, P.K., Tillard, P., Lin, H.L., Wang, Y.Y., Tsai, C.B., Gojon, A., and Tsay, Y.F. (2008). Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter

causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell* **20**, 2514-2528.

Liu, K.H., and Tsay, Y.F. (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* **22**, 1005-1013.

Meharg, A.A., and Blatt, M.R. (1995). NO₃⁻ transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage. *J. Membr. Biol.* **145**, 49-66.

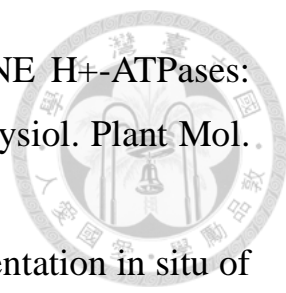
Moran, S. (2011). Nitrogen pollution disrupts Pacific Ocean. *Nature*.

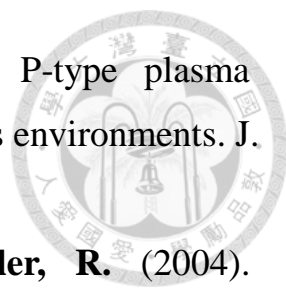
Morsomme, P., Dambly, S., Maudoux, O., and Boutry, M. (1998). Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H⁺-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* **273**, 34837-34842.

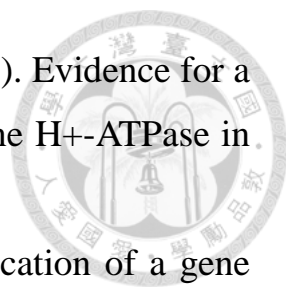
Morsomme, P., de Kerchove d'Exaerde, A., DeMeester, S., Thinès, D., Goffeau, A., and Boutry, M. (1996). Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H⁽⁺⁾-pumping and permit yeast growth at low pH. *EMBO J.* **15**, 5513-5526.

Morth, J.P., Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Andersen, J.P., Vilsen, B., Palmgren, M.G., and Nissen, P. (2011). A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 60-70.

Nikolic, M., Cesco, S., Monte, R., Tomasi, N., Gottardi, S., Zamboni, A., Pinton, R., and Varanini, Z. (2012). Nitrate transport in cucumber leaves is an inducible process involving an increase in plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase activity and abundance. *BMC Plant Biol.* **12**, 66.

- 
- Palmgren, M.G.** (2001). PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 817-845.
- Palmgren, M.G., and Christensen, G.** (1993). Complementation in situ of the yeast plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase gene *pma1* by an H⁽⁺⁾-ATPase gene from a heterologous species. *FEBS Lett.* **317**, 216-222.
- Palmgren, M.G., Larsson, C., and Sommarin, M.** (1990). Proteolytic activation of the plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase by removal of a terminal segment. *J. Biol. Chem.* **265**, 13423-13426.
- Parker, J.L., and Newstead, S.** (2014). Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**, 68-72.
- Parker, J.L., Mindell, J.A., and Newstead, S.** (2014). Thermodynamic evidence for a dual transport mechanism in a POT peptide transporter. *eLife* **3**, e04273.
- Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Morth, J.P., Palmgren, M.G., and Nissen, P.** (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* **450**, 1111-1114.
- Pii, Y., Alessandrini, M., Guardini, K., Zamboni, A., and Varanini, Z.** (2014). Induction of high-affinity NO₃⁻ uptake in grapevine roots is an active process correlated to the expression of specific members of the NRT2 and plasma membrane H⁺-ATPase gene families. *Funct. Plant Biol.* **41**, 353-365.
- Regenberg, B., Villalba, J.M., Lanfermeijer, F.C., and Palmgren, M.G.** (1995). C-terminal deletion analysis of plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase: yeast as a model system for solute transport across the plant plasma membrane. *Plant Cell* **7**, 1655-1666.
- Rudashevskaya, E.L., Ye, J., Jensen, O.N., Fuglsang, A.T., and**

- 
- Palmgren, M.G.** (2012). Phosphosite mapping of P-type plasma membrane H⁺-ATPase in homologous and heterologous environments. *J. Biol. Chem.* **287**, 4904-4913.
- Shahollari, B., Peskan-Berghofer, T., and Oelmuller, R.** (2004). Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiol. Plant.* **122**, 397-403.
- Spartz, A.K., Ren, H., Park, M.Y., Grandt, K.N., Lee, S.H., Murphy, A.S., Sussman, M.R., Overvoorde, P.J., and Gray, W.M.** (2014). SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H⁺-ATPases to Promote Cell Expansion in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 2129-2142.
- Sun, J., Bankston, J.R., Payandeh, J., Hinds, T.R., Zagotta, W.N., and Zheng, N.** (2014). Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* **507**, 73-77.
- Takahashi, K., Hayashi, K., and Kinoshita, T.** (2012). Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **159**, 632-641.
- Tsay, Y.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., and Crawford, N.M.** (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705-713.
- Tsay, Y.F., Chiu, C.C., Tsai, C.B., Ho, C.H., and Hsu, P.K.** (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett.* **581**, 2290-2300.
- Ueno, K., Kinoshita, T., Inoue, S., Emi, T., and Shimazaki, K.** (2005). Biochemical characterization of plasma membrane H⁺-ATPase activation in guard cell protoplasts of Arabidopsis thaliana in response to blue light. *Plant Cell Physiol.* **46**, 955-963.

- 
- Vitart, V., Baxter, I., Doerner, P., and Harper, J.F.** (2001). Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. *Plant J.* **27**, 191-201.
- Wang, R., and Crawford, N.M.** (1996). Genetic identification of a gene involved in constitutive, high-affinity nitrate transport in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 9297-9301.
- Wen, C.G., and Chang, C.H.** (2008). Non-point Pollution of Nitrogen and Phosphorus from Agriculture in Taiwan. In (Special Publication of TARI No. 134) *Proceedings of Conference on Non-point Pollution from Agriculture*, pp. 23-40.