

阿拉伯芥 *atToc159* 轉運蛋白基因的細胞專一性表現與領先內插子對基因表現的影響

劉玉山 孫智雯*

國立臺灣師範大學生命科學系

(收稿日期: 2013.4.12, 接受日期: 2013.5.9)

摘要

根據蛋白質胺基酸序列的相似度與運輸蛋白質種類的不同, 可將阿拉伯芥四種 *Toc159* 的同源蛋白質, 分成 *atToc159/atToc90* 和 *atToc132/atToc120* 兩大群。其中 *atToc159/atToc90* 被認為與辨識和運輸光合作用蛋白質有關, *atToc132/atToc120* 則可能負責辨識和運輸非光合作用蛋白質。在阿拉伯芥生長發育的過程中, 這些轉運蛋白的基因必須被適當的調控, 否則色質體的發育與生理將因缺乏必需的蛋白質的輸入而被抑制。為了解 *atToc159* 基因家族的表現機制, 轉殖分別攜帶不同長度的基因上游調控序列的重組質體進入野生型阿拉伯芥, 以獲得穩定轉殖的植株。分析這些轉殖植株中營養器官的 GUS 酵素活性及 mRNA 表現量, 發現 *atToc159*、*atToc132/90* 和 *atToc120* 基因在七天齡的幼苗中分別有最高, 次之及最低的表現量。此外, 位於 *atToc120* 和 *atToc90* 的 5' UTR 內的領先內插子序列會明顯增加其基因表現量。進一步探討光對內插子在基因表現上的影響, 比較生長在光照和黑暗條件下的 120PUI 和 120P 轉殖株的 GUS 表現量, 我們發現黑暗會提高內插子效應。除了進行不同組織的基因表現之比較分析外, 我們也進行了這些轉殖株中基因的細胞專一性表現的研究。令人驚訝的, 在與 *atToc159* 和 *atToc132* 的比較下, *atToc90* 和 *atToc120* 在子葉保衛細胞中基因的表現量明顯地要比葉肉細胞多, 這顯示 *atToc90* 和 *atToc120* 在保衛細胞運輸蛋白質進入葉綠體上可能扮演一定的角色。這些研究結果支持葉綠體轉運蛋白 *atToc159* 基因家族之基因的表現量在不同的組織和發育階段的差異, 可能是受到不同的發育和環境的因子刺激所調節。

關鍵詞: 阿拉伯芥、*atToc159* 基因表現、領先內插子、GUS 報導基因、保衛細胞

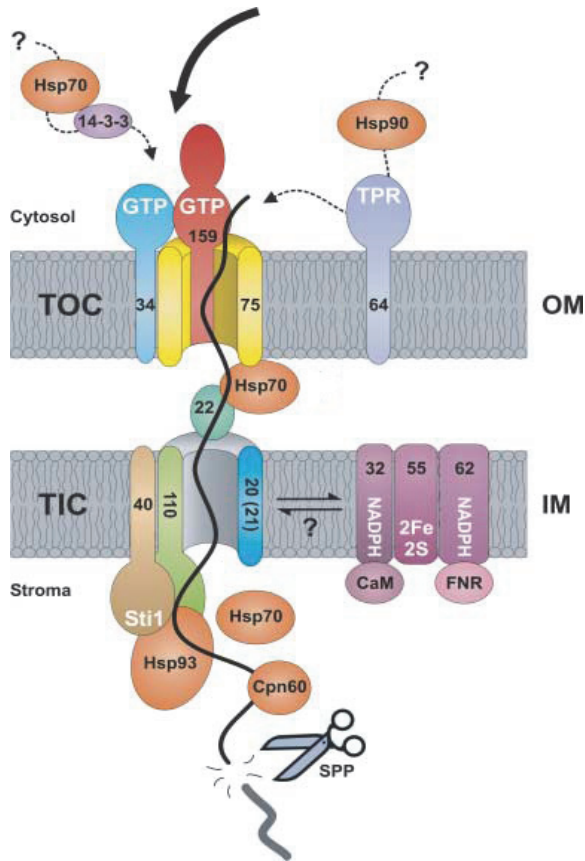
緒言

色質體(plastids)是植物細胞內最重要的胞器之一, 主要包括白色體(leucoplasts)、雜色體(chromoplasts)和葉綠體(chloroplasts)等三種。這些色質體均是由原色質體(proplastids)衍生而來, 只要給予適當的訊號, 他們可以進行彼此之間的轉換。根據演化的內共生理論(endosymbiont hypothesis), 色質體存在於植物細胞中起源於遠古時期, 將藍綠菌(cyanobacteria)經由胞吞作用(endocytosis)移至植物細胞質中。然而高等植物的演化過程中, 超過百分之九十的藍綠菌基因, 卻被轉送到植物寄主的細胞核內(Martin *et al.*, 2002)。現今植物在進行色質體的生物發生(biogenesis)時, 必須將這百分之九十的基因產物準確地送回色質體中, 否則色質體內的脂質生合成

(lipid synthesis)、色素合成(pigment synthesis)、色質體基因表現(殘存在色質體的基因)、膜系組裝(membrane assembly)及光訊號接收(light perception)皆會受到嚴重的抑制(Rochaix *et al.*, 2004)。

色質體內大多數的細胞核解碼蛋白(nucleus-encoded proteins)要運輸回到色質體中, 需要在細胞核內的基因轉錄及在細胞質內轉譯並修飾後, 再傳送回色質體內。大多數的色質體內的蛋白質, 多含有一段特別的肽構造位於其胺基端延伸(N-terminal extension)部分, 稱之為運輸肽(transit peptide)。這些含有運輸肽的色質體前驅蛋白(precursor proteins), 會被位於色質體膜上的轉運蛋白機組(translocons)所辨識, 進而將其運輸至色質體內。前人在豌豆的葉綠體中發現數種轉運蛋白機組成員(圖一; Jarvis, 2008)。位於葉綠體

*通信作者: 孫智雯 (Chih-Wen Sun); FAX: 886-2-29312904; E-mail: cwsun@ntnu.edu.tw



圖一、色質體 TOC/TIC 轉運蛋白機組成員。
Figure 1. The translocon components of TOC/TIC complex (modified from Jarvis, 2008).

外膜的轉運蛋白稱之為 Toc (translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts)，位於葉綠體內膜的則稱為 Tic (translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts)。豌豆 Toc 複合體主要由 Toc75 和 Toc159 和 Toc34 三種蛋白質所構成，其中 Toc75 是一個擁有 β-筒狀(β-barrel)構造的蛋白質，是前驅蛋白質運輸時主要穿越外膜的通道蛋白 (protein-translocating channel)。Toc34 和 Toc159 屬於 GTP 水解酶(GTPase)，主要功能是辨識前驅蛋白，當作運輸胜肽最初的受器。Toc159 包含三個不同的蛋白質區域，一個是羧基端嵌於外膜內的 M 區域(membrane anchor domain)、位於中央部分具有 GTP 水解酶功能的 G 區域以及胺基端的 A 區域(acidic domain) (Ivanova *et al.*, 2004)。另外，Toc34 結構中包含二個區域，為具有 GTP 水解酶功能的 G 區域與羧基端嵌於外膜上的 M 區域。Toc34 的功能雖未完全明瞭，但是許多證據顯示其可與前驅蛋白有直接的交互作用，被認為可能是運輸胜肽的受器，且與協助 Toc159 與 Toc 複合體結合上扮演重要的角色(Jarvis and Robinson, 2004)。

阿拉伯芥 atToc159 具有兩種不同的型式，一種是細胞游離型(soluble cytoplasmic form)的 atToc159，一種則是嵌於葉綠體外膜上的膜結合型(membrane-bound form)的 atToc159。可能游離型的 atToc159 以其 G 區域與前驅蛋白的運輸胜肽結合後，再藉由 atToc33 的協助，將攜帶前驅蛋白的游離型 atToc159 順利地嵌入葉綠體外套膜上 atToc75 通道蛋白旁，形成膜結合型的 atToc159，如此便可不斷將前驅蛋白導入 atToc75 通道蛋白中(Wallas *et al.*, 2003)。整個嵌入過程最關鍵的部分，涉及 GTP 的水解活化 atToc159 與 atToc33 的 G 區域，也說明了 Toc 複合體運輸前驅蛋白進入葉綠體需要 GTP 參與 (Smith *et al.*, 2002)。

阿拉伯芥含有四個豌豆 *psToc159* 的同源基因，包括 atToc159、atToc132、atToc120 和 atToc90。AtToc159 基因家族的蛋白質產物構造上的主要差異在於胺基端的 A 區域的長度。各種 atToc159 基因家族的人造蛋白質(chimeric protein)之試管(*in vitro*)和活體(*in vivo*)研究結果，證實 A 區域可能與選擇運輸何種蛋白質進入葉綠體有關(Inoue *et al.*, 2010)。另外，阿拉伯芥中也含有二個 *psToc34* 的同源基因，atToc33 及 atToc34。越來越多的研究顯示，阿拉伯芥的 atToc159 和 atToc34 基因家族成員的蛋白質產物可能與不同種類前驅蛋白的辨識和運輸有關，一般認為 atToc159 可與 atToc33 合作辨識並運輸光合性蛋白質(photosynthetic protein)，而 atToc120 或 atToc132 則負責與 atToc34 合作辨識並運輸非光合性蛋白質 (Invanova *et al.*, 2004；Smith *et al.*, 2004)。AtToc90 的功能性研究顯示它似乎與運輸光合作用蛋白有關，其辨識和運輸的機制可能與 atToc159 相似，但重要性遠不及 atToc159 (Hiltbrunner *et al.*, 2004)。

阿拉伯芥突變株 *ppi2* (*plastid protein import 2*, atToc159 突變株)的幼苗出現嚴重白化的現象，無法在土壤中存活。且葉綠體的發育受到抑制，體內的光合作用蛋白含量明顯的下降，而非光合作用蛋白的含量則與野生型沒有明顯差異。顯示 atToc159 可能與光合作用相關蛋白最初的辨識和運輸有關(Bauer *et al.*, 2000)。此外，*ppi2* 突變株的葉子在發育後期卻發生嚴重的構造上的缺失，葉肉細胞明顯的變少，細胞間隙變多，海綿組織與柵狀組織無法區分，葉綠體內 DNA 複製則在發育早期即受到嚴重的抑制(Asano *et al.*, 2004)。另一個關於阿拉伯芥突變株 *ppi2* 的研究，卻發現突

變株 *ppi2* 植株子葉的保衛細胞的葉綠體內仍可以看見葉綠素的累積和正常的囊狀膜的堆疊，並有光合作用產物澱粉的生成，顯示突變株 *ppi2* 的保衛細胞內的葉綠體仍具有運輸光合作用蛋白的能力，亦即在保衛細胞的葉綠體的生成過程中，*atToc159* 並非是必要的(Yu and Li, 2001)。另一個以 *ppi2* 突變株為基因背景下過度表現 *atToc90* 的實驗中，則發現大量表現的 *atToc90* 可以部分恢復 *ppi2* 突變株累積光合作用蛋白的能力(Sibylle *et al.*, 2011)。與野生型植株比較，*attoc132* 與 *attoc120* 等單突變株沒有外表型的瑕疵，但是 *attoc132/attoc120* 的雙突變株(double mutant)卻出現白化的現象，顯見 *atToc132* 和 *atToc120* 具有功能上的重疊性(Ivanova *et al.*, 2004; Kubis *et al.*, 2004)。

植物生活史中不同的發育階段中，不同的組織含有不同形式的色質體，色質體的發育必須健全，植物細胞才能擁有的正常的生理功能。所以這些轉運蛋白的基因必須被適當的調控，否則色質體的發育與生理將因缺乏必須的蛋白質的輸入而被抑制，進而影響植物的生長和發育。因此，探討有關 *atToc34* 和 *atToc159* 基因家族的基因在不同的組織或發育階段是如何被啟動或調節，不同的轉錄因子與基因調節序列在基因表現上的影響以及 mRNA 的穩定度對基因表現的影響等，將可以進一步說明葉綠體蛋白質運輸的可能調節機制，並提供色質體正常發育的重要訊息。

基於以上的理由，我們曾將 *atToc34* 基因家族(*atToc33* 和 *atToc34*)不同上游調控序列連接 *GUS* 報導基因後，進行穩定轉殖植株分析。結果顯示 *atToc33* 及 *atToc34* 主要分別表現在葉及根中。這兩個基因位於 5' 端非轉譯區(5' untranslated region, 5' UTR)的領先內插子(leader intron)序列，可以提高成熟植株的 *atToc33* 和 *atToc34* 基因的表現量。因為兩基因的表現明顯受到不同的機制調節，*atToc33* 和 *atToc34* 在葉綠體的功能及發育中可能扮演不同角色(Chen and Sun, 2010)。

本研究將接續以上的實驗，嘗試進行 *atToc159* 基因家族，包括 *atToc159*、*atToc132*、*atToc120* 和 *atToc90* 等基因的不同上游調控序列，連接 *GUS* 報導基因的穩定轉殖植株研究。除了找到細胞核中 *atToc159* 基因家族可能的調節機制，也希望幫助我們更進一步瞭解不同組織與發育階段色質體蛋白質運輸的可能調節方式，以及 *atToc159* 基因家族的蛋白質產物在色質體功能和發育上所扮演的角色。

材料與方法

阿拉伯芥的栽培

將消毒好的野生型阿拉伯芥(ecotype Columbia; WT)或轉殖植株 T₃ 同型合子的種子，置於 4 °C 冰箱中春化 2 天。再將種子均勻塗佈於 MS 培養基(Murashige and Skoog, 1962)或種植於土壤中。置於生長箱中，日夜恆溫 22 °C，以 16 小時光照 8 小時黑暗的光照週期(正常光照週期)或連續黑暗環境下培養。

Toc159 基因家族成員上游的調控序列的取得

阿拉伯芥 Toc159 基因家族(*atToc159*、*atToc132*、*atToc120*、*atToc90*)的上游的調控序列，可在阿拉伯芥基因線上資料庫 TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, Lamesch *et al.*, 2012)中，依據基因編號(gene accession number)下載。包含該基因啟動子(promoter)的和 5' UTR 區域。本論文所提及的基因編號包括 AT4G02510 (*atToc159*)、AT2G16640 (*atToc132*)、AT3G16620 (*atToc120*) 和 AT5G20300 (*atToc90*)。

引子的設計

利用上述方法所取得的基因序列，設計能複製各基因上游調控序列之專一性引子。其中前置引子(forward primer)的 5' 加上含有限制酶 Hind III 切點的序列，而反置引子(reverse primer)的 5' 則加上含有限制酶 Bam HI 切點的序列。各基因引子之序列如下：

Toc159 re-F1
5' - gccaagcttggatttggttatgttctcgc -3'
Toc159 re-R1
5' - cggggatccccgcttggctactgagactc -3'
Toc132 re-F1
5' - gccaagctttagctgcaccagcttattgag -3'
Toc132 re-R1
5' - cggggatcctctagatcaccaccgctacg -3'
Toc132 re-R2
5' - cggggatcccagaagttagatagagagag -3'
Toc120 re-F1
5' - gccaagcttagtgtggtgtttaaagtgtg -3'
Toc120 re-R1
5' - cggggatcccttaggatcaccacaaatcacg -3'
Toc120 re-R2
5' - cggggatccctggttagagaaggcaaaagtc -3'
Toc90 re-F1
5' - gccaagcttagacgaagatgtcgtcattgg -3'
Toc90 re-R1
5' - cggggatccaactatctgcccaacagcaag -3'

Toc90 re-R2

5' - cggggatcctgtgttgccgagagaagag -3'

構築轉殖植株載體與植物轉殖

將上述七個 *atToc159* 基因家族的基因片段經聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 放大後，與含有 β -glucuronidase (*GUS*) 基因的 binary vector pCAMBIA1391Z 黏合後，將所得的重組質體，藉由農桿菌 GV3101 為媒介，並利用花序沾黏法的方式轉殖進入野生型的阿拉伯芥植株中 (Clough and Bent, 1998)。T₁ 種子培養於洋菜培養基 (含 hygromycin 30 μ g/mL) 篩選出成功轉殖的植株，並以上述特定專一性引子進行 PCR 確定。這些轉殖株分別命名為 1391Z、159PUI、132PUI、132P、120PUI、120P、90PUI 和 90P。除 1391Z 為空的 pCAMBIA1391Z 質體的穩定轉殖株，當作本研究的控制組外，其餘轉殖株則分別攜帶不同長度的 *atToc159* 基因家族 (*atToc159*、*atToc132*、*atToc120*、*atToc90*) 的基因上游的調控序列的重組質體。這些轉殖株經過至少兩代的篩選，最後獲得第三代是同型合子 (T₃ homozygote) 的個體，作為本研究使用的材料。

GUS 活性分析

本實驗分別進行 GUS 酵素的螢光定量和活體組織的 GUS 活性定位染色 (Jefferson et al., 1987)，藉以分析不同轉殖株的 *GUS* 基因表現程度與位置。在 GUS 酵素螢光的定量分析中，細胞抽出物以螢光光譜儀 (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Device) 偵測並定量；而活體組織的 GUS 活性定位染色，則是分別將植株幼苗浸泡於 GUS 活性染色液中，37 °C 環境下反應 3 小時、8 小時、18 或 24 小時後，並置於固定液中 (內含 0.1 M sodium phosphate, pH 7.2, 0.1% formaldehyde, 0.1% triton X-100, 0.1% β -mercaptoethanol) 保存。

即時定量反轉錄 PCR (real-time quantitative reverse-transcription PCR, qRT-PCR)

以 TRIzol 試劑 (Invitrogen, Chomczynski et al., 1987)，抽取不同處理之阿拉伯芥轉殖株的 total RNA。取 5 μ g total RNA，利用寡核苷酸引子 (oligo-dT primer) 以及反轉錄酶 (M-MLV reverse transcriptase, Promega) 反轉錄成 cDNA (complementary DNA)。以這些 cDNA 作為 qRT-PCR 的模板，加上各 *atToc159* 家族基因之專一性引子 (*UBQ10* 作為內部控制組)

以及 2X SYBR FAST qPCR kit 的試劑 (KAPA Biosystems) 進行實驗，其條件設定為 95 °C 3 分鐘，而後 95 °C 3 秒、60 °C 30 秒為一個循環，進行 40 個循環 (StepOne Plus thermal cycler, Applied Biosystems)，並分析結果。

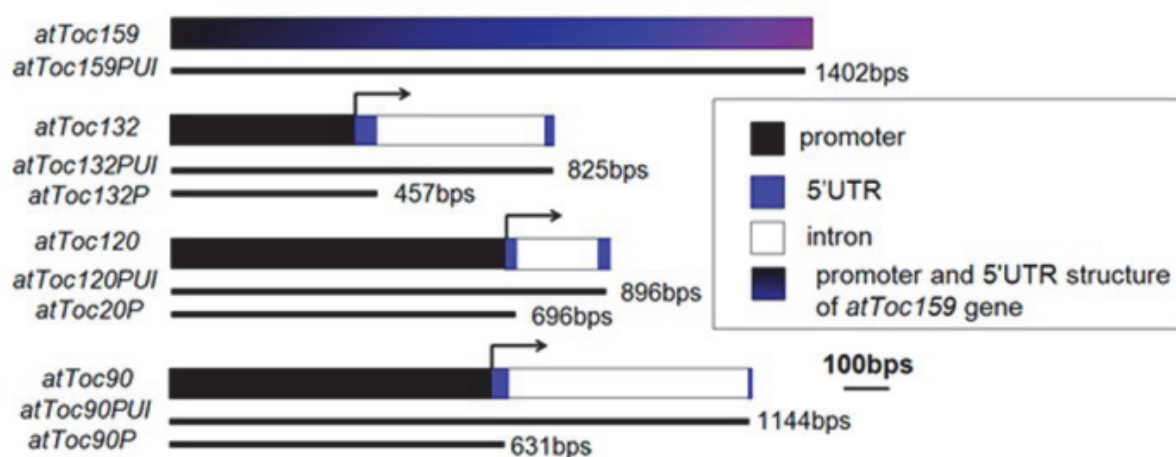
GUS 活性定位染色的觀察

圖三是使用 Leica M3Z 解剖顯微鏡觀察，Nikon Coolpix P5100 相機照像記錄。圖五 A 是以可見光為光源，使用 Leitz Laborlux S 光學顯微鏡觀察。照像記錄系統則是使用 PointGrey 公司生產的 CCD 影像裝置 (型號 Grasshopper GRAS-20S4C)，影像處理軟體為 Fly Capture 2.0。圖五 B、C、D 則是以可見光為光源，使用 Leica TCS SP2 共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP2 - Laser Scanning Spectral Confocal Microscope) 觀察，CCD 影像裝置則是使用 Canon EOS 600D 系統與專屬影像處理軟體。

結 果

阿拉伯芥穩定轉殖植株的獲得

為了探討光照及內插子序列對於 *Toc159* 基因家族基因表現量的影響，我們選擇了七條不同長度的 *Toc159* 基因家族的基因上游調節序列片段 (圖二)，並黏合至 *GUS* 報導基因的重組載體。再將此重組載體以花絮沾黏法方式轉殖進入野生型的阿拉伯芥中，以獲得穩定轉殖植株。這七種轉殖株分成兩類，第一類含有各基因的啟動子 (P)、5' UTR (U) 及內插子 (I) 序列，故命名為 PUI 植株，包含 159PUI、132PUI、120PUI 及 90PUI。第二類只含各基因的啟動子及部分 5' UTR 序列，故命名為 P 植株，包含 132P、120P 及 90P。AtToc159 基因轉錄起始點仍未知，因此沒有 159P 植株。最後我們得到了 21 個含有 *atToc159* 基因片段的穩定轉殖株品系 (159PUI-1~21)；9 個含有 *atToc132PUI* 基因片段的穩定轉殖株品系 (132PUI-1~9)；23 個含有 *atToc132P* 基因片段的穩定轉殖株品系 (132P-1~23)；9 個含有 *atToc120PUI* 基因片段的穩定轉殖株品系 (120PUI-1~9)；50 個含有 *atToc120P* 基因片段的穩定轉殖株品系 (120P-1~50)；14 個含有 *atToc90PUI* 基因片段的穩定轉殖株品系 (90PUI-1~14)；以及 11 個含有 *atToc90P* 基因片段的穩定轉殖株品系 (90P-1~11)。每一個轉殖株各選三個同型合子的 T₃ 子代 (分為 159PUI-1、159PUI-3、159PUI-8; 132PUI-6、



圖二、*atToc159* 家族成員基因的上游調控序列結構圖。箭頭所指的位置為轉錄起始點，然而 *atToc159* 基因的轉錄起始點的位置仍未知。

Figure 2. Promoter and 5' UTR structure of four *atToc159* gene members. The arrows indicate the transcription start sites. However, the location of transcription start site of *atToc159* is unclear.

132PUI-7、132PUI-8; 132P-1、132P-13、132P-19; 120PUI-1、120PUI-3、120PUI-9; 120P-3、120P-12、120P-28; 90PUI-1、90PUI-3、90PUI-9; 90P-1、90P-3、90P-6 等)，以作為本研究的實驗材料。

幼苗發育初期光照因子對於 *atToc159* 基因家族的基因表現量的影響

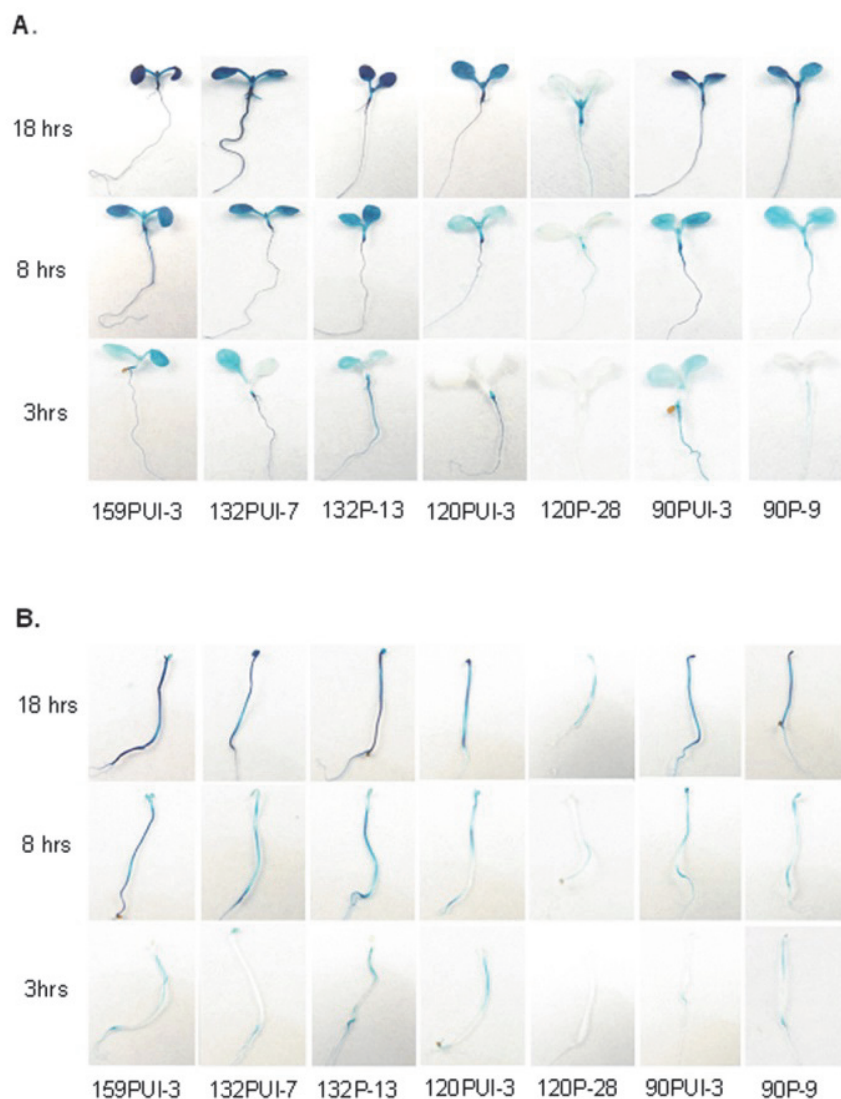
首先，我們以正常的光照週期(16 小時光照和 8 小時黑暗)和連續黑暗下培養的七天齡轉殖植株幼苗為材料，進行活體組織 GUS 活性定位染色。生長在正常光照週期之轉殖植株幼苗浸泡於 GUS 活性染色液中，分別在 37 °C 的下反應 3 小時、8 小時和 18 小時後，比較染色的結果。染色 3 小時後，159PUI、132PUI 與 90PUI 轉殖植株幼苗全株即可清楚看到藍色染色結果(圖三 A)；在 18 小時染色後，120PUI 及 90P 轉殖植株則顯現全株藍色的結果，但 120P 轉殖植株除根及上胚軸呈現淺藍色外，其餘組織仍為白色。此結果顯示七天齡轉殖植株中，*atToc120* 及 *atToc90* 的上游調節序列啟動報導基因的能力較 *atToc159* 及 *atToc132* 差，這個結果也從 GUS 酵素的活性定量分析及 GUS mRNA 表現量獲得佐證(圖四 A 及 C)。類似的結果也在七天齡的白化苗中呈現(圖三 B，圖四 B 及 D)。這些研究顯示 *atToc159*、*atToc132/90* 和 *atToc120* 基因在七天齡的幼苗中分別有最高，次之及最低的表現量。

內插子序列在 *atToc159* 基因家族基因表現的影響

為了瞭解領先內插子序列在 *atToc159* 基因家族基因表現上所扮演的角色，我們同樣以轉殖植株幼苗的活體組織 GUS 定位染色、GUS 酵素螢光定量和 qPT-PCR 實驗，分別比較各基因內插子序列對基因表現的影響。檢驗 GUS 基因或 GUS 活性時，很明顯地觀察到 *atToc120* 基因在缺少內插子序列時，不論正常光照週期或連續黑暗生長下的七天齡植株，其表現量皆明顯地下降(圖三及圖四)。光照下，120PUI 植株的 GUS 基因或 GUS 活性比較 120P 植株高出兩倍左右。而黑暗條件下，120PUI 植株的 GUS 基因或 GUS 活性比較 120P 植株則提高到三倍左右。這表示 *atToc120* 的內插子序列能增加基因表現量，且黑暗生長條件有較明顯的促進基因表現的效果。而 *atToc132* 和 *atToc90* 的內插子序列，似乎也有類似促進基因表現功能，但沒有 *atToc120* 明顯(圖三~圖四)。

十天齡轉殖植株之子葉的 *atToc159* 基因家族基因表現量差異

在顯微鏡下觀察十天齡轉殖植株之子葉的活體組織 GUS 活性定位染色實驗中，我們比較不同層面之細胞的染色結果發現，若僅觀察子葉的下表皮表面，所有轉殖植株子葉的保衛細胞均可偵測到 GUS 基因的表現量，尤其以 159PUI、132PUI 和 90PUI 的活性染色程度較高。然而，利用偏光顯微鏡比較子葉的不同層面之細胞後，可以發現 159PUI、132PUI、132P 等轉殖植株的保衛細胞的染色程度均與葉肉細胞相似，但 90PUI 與 120PUI 等轉殖植株的



圖三、光照與黑暗培養條件下 *atToc159* 基因家族成員的基因表現量差異。A. 正常光照週期(16小時光照與8小時黑暗)生長之七天齡的轉殖植株幼苗的活體組織 GUS 活性定位染色。GUS 染色時間分別為3、8及18小時。B. 連續黑暗生長下之七天齡的轉殖植株幼苗的活體組織 GUS 活性定位染色。染色時間為3、8及18小時。

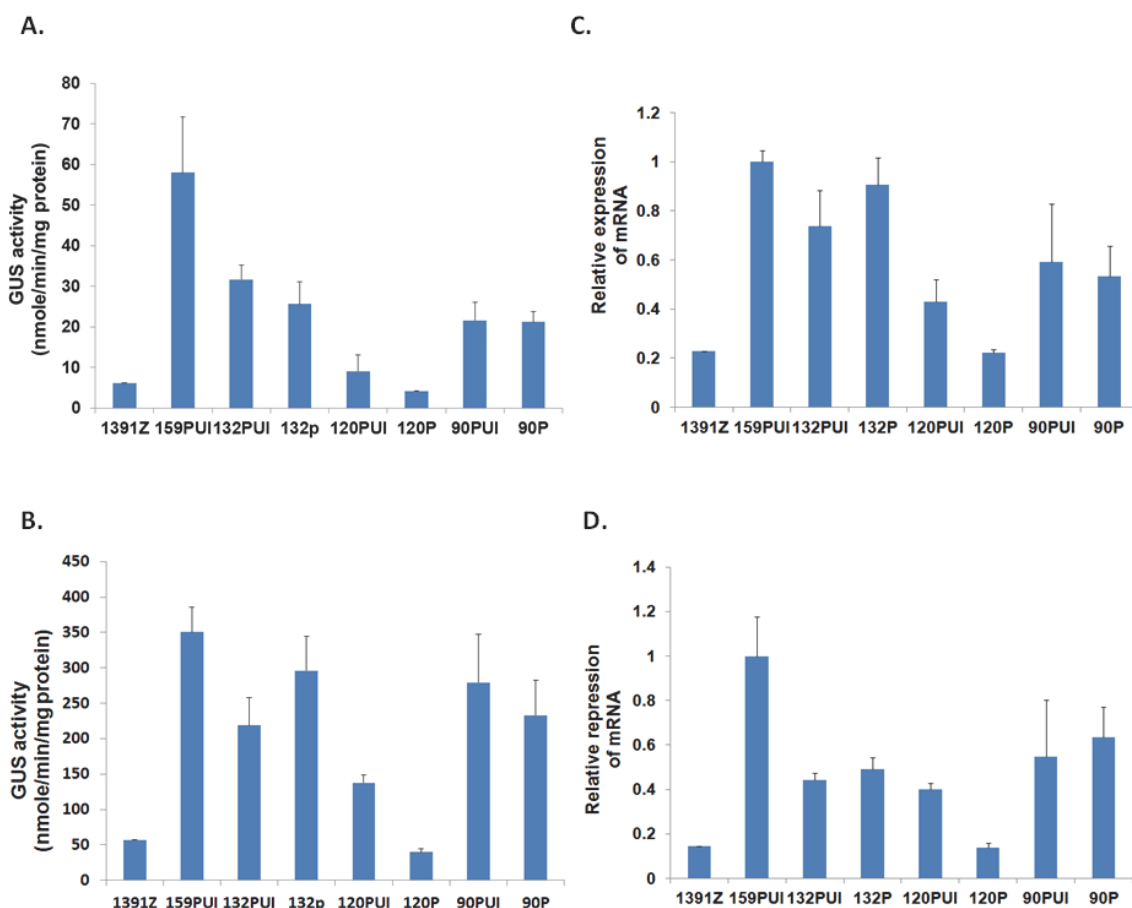
Figure 3. Expression of *atToc159* gene members under light and dark conditions. A. *In situ* staining of 1-w-old transgenic seedlings grown under a 16h light/8h dark cycle. Samples were incubated in GUS solution for 3, 8 and 18 hours, respectively. B. *In situ* staining of 1-w-old seedlings grown in continuous dark.

保衛細胞的染色程度均較葉肉細胞明顯。相同的情形也出現在90P與120P轉植株中(圖五)。顯示在子葉的不同組織中，*atToc120* 和 *atToc90* 傾向在保衛細胞中增加表現量，而 *atToc159* 和 *atToc132* 是葉肉細胞中主要的表現基因。

討 論

經由穩定轉殖植株的 GUS 定性及定量分析，我們發現在七天齡的幼苗中，*atToc159* 家族成員呈現基因表現差異：*atToc159* 有最高

量表現，*atToc132* 和 *atToc90* 次之，而 *atToc120* 最低。此外，位於5' UTR的領先內插子，似乎可以提高 *atToc120* 及 *atToc90* 的基因表現量。此種內插子媒介的基因表現加強作用 (intron-mediated enhancement, IME)，在不同的環境因子和發育階段對基因表現的影響程度可能不同。我們的研究顯示，黑暗生長條件似乎可以提高內插子序列對 *atToc120* 基因表現上的影響。最後，*atToc159* 家族成員在子葉的不同組織中，顯現細胞專一表現性。因此我們認為 *atToc159* 家族成員的基因會受到光照因子和組織位置的影響，藉由特定的機制調節



圖四、光照與黑暗條件下內插子效應對基因表現量的影響。A 及 B. 生長於正常照光週期(A)與連續黑暗條件下(B)之七天齡的轉殖植株幼苗的 GUS 酵素螢光定量分析。GUS 活性的數值是三個不同代表性轉殖株之平均值。B 及 D. 以 qRT-PCR 分析生長於正常照光週期(C)與連續黑暗條件下(D)之七天齡的轉殖植株幼苗的 GUS mRNA 相對表現量。Y 軸為 *atToc159* 基因家族成員基因對 *UBQ10* 基因的相對表現量。GUS mRNA 量是三個不同代表性轉殖株之平均值。

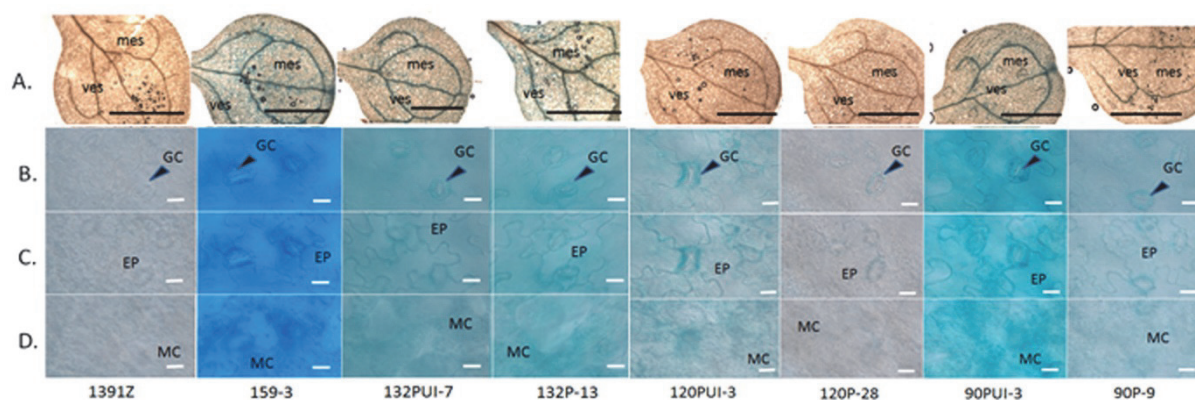
Figure 4. Expression of *atToc159* gene members under light and dark conditions. A and B. GUS enzyme activity from 1-w-old transgenic seedlings grown under a 16h light/8h dark cycle (A) or continuous dark (B). C and D. GUS mRNA level from 1-w-old transgenic seedlings grown under a 16h light/8h dark cycle (C) and continuous dark (D). The relative expression level of *atToc159* gene members to *UBQ10* gene is indicated in Y axis. Data are means \pm SD of three repeat experiments from three individual transgenic lines.

各個基因的表現量，進而使不同種類的前驅蛋白在正確的時間運輸進入色質體，以幫助色質體的發育並協助其發揮正常的功能。

本研究中不管光照或黑暗中生長的植株，*atToc159* 基因均有一定的 GUS 表現量(圖三~五)。雖然一般認為 *atToc159* 主要負責辨識和運輸與光合作用有關的蛋白質，*atToc159* 基因主要表現幼嫩的發育早期的綠色組織，但也有一些研究發現 *atToc159/atToc132* 雙突變株會有嚴重的胚胎死亡(embryo-lethal)的現象(kubis *et al.*, 2004)。因此 *atToc159* 在所有前驅蛋白的辨識和運輸中扮演的角色，應不僅僅只是幫助光合作用有關的前驅蛋白運輸進入色質體(kubis *et al.*, 2004)。而 *atToc90* 也被歸類為與

運輸光合作用前驅蛋白有關，但其功能遠不及 *atToc159* (Hiltbrunner *et al.*, 2004)。因為 *atToc90* 可與 *atToc33* 和 *atToc75* 直接的進行交互作用，協助辨識和運輸光合作用的前驅蛋白(Hiltbrunner *et al.*, 2004)。

比較本研究與 GENEVESTIGATOR 資料庫的微陣列晶片分析(microarray) 的實驗數據(圖六, Zimmermann *et al.*, 2004)，個別 *atToc159* 成員的表現形式大致與我們的結果吻合。*atToc159* 與 *atToc132* 的表現量在七天齡植株中，*atToc159* 的表現量約為 *atToc132* 基因的表現量的一倍。但是 Kubis 等人(2004)的 RNA 膠體墨漬法(RNA gel blot)實驗結果卻顯示，十天齡的野生型阿拉伯芥之 *atToc159*



圖五、十天齡轉殖植株之子葉的 GUS 活性定位染色。子葉下表皮的細胞形態分別以光學顯微鏡觀察外部構造(A)及以偏光顯微鏡觀察相同下表皮區域中不同層細胞的 GUS 活性(B、C 及 D)。B 代表下表皮保衛細胞，C 代表下表皮細胞層，D 代表葉肉細胞層。染色時間為 1.5 小時。mes, 葉肉組織; vas, 維管束組織; GC, 保衛細胞; MC, 葉肉細胞; EC, 表皮細胞。Bars = 5 mm (A) 或 20 µm (B、C 及 D)。

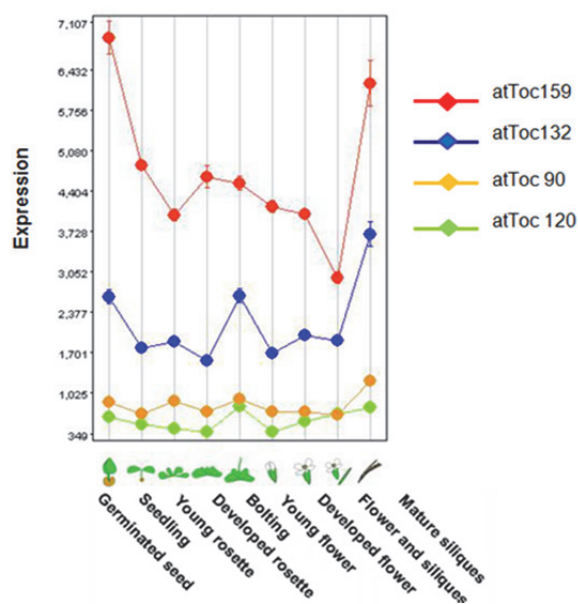
Figure 5. Histochemical localization of GUS activity in 10-day-old transgenic seedlings. The external and internal structures of abaxial epidermal layer in cotyledon were observed by optical microscope (A) and polarized optical microscope with visible light source (B, C and D). B~D represents guard cells on abaxial epidermal surface, abaxial epidermal cells and mesophyll cells, respectively. Tissues were incubated in GUS solution for 1.5 hours. mes, mesophyll; vas, vascular tissue; GC, guard cell; MC, mesophyll cell; EC, epidermis cell. Bars = 5 mm (A) or 20 µm (B, C and D).

表現量較 *atToc132* 的表現量多 10 倍左右。Yu 等人(2001)以 RT-PCR 技術比較一個月齡的野生型植株之基因表現，卻發現 *atToc159*、*atToc132* 及 *atToc120* 的 mRNA 表現量幾乎相同。雖然不同研究的結論差異很大，但可以確定的是 *atToc159* 基因的表現量會受到發育早晚期的影響。另一方面，不同的研究室針對 *atToc90* 表現量的結論就有很大的差異。我們認為 *atToc132* 與 *atToc90* 在七天齡植株中的表現量的大致相似，而 GENEVESTIGSTIGA 資料庫卻出現 *atToc132* 表現量較 *atToc90* 表現量高兩倍左右，Kubis 等人(2004)認為 *atToc90* 表現量較 *atToc132* 表現量甚至高到三倍左右。因為我們是以含有 *atToc159* 家族成員的上游調節序列及報導基因重組質體之穩定轉植株，去比較各成員的基因表現量，這與植物內生性基因表現的真正情況可能有差異。但不同的研究方法和資料庫有關 *atToc159* 家族基因表現量的高度差異，仍有待進一步的實驗來加以釐清。

已有報告指出一些特殊位置的內插子序列可能在基因調節上扮演重要的功能，例如領先內插子序列會調節特定基因的表現形式和表現量(Jeong *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2008)，雖然其詳細的作用機制仍不是很清楚。這種內插子序列可以提高基因的表現量的現象，特稱為內插子強化基因表現(IME)的作用(Mascarenhas *et al.*, 1990)。許多研究顯示內插

子提升基因表現量的程度，可能與內插子所在的位置、鄰近內插子的序列及轉殖質體所含的報導基因種類有關(Luehrsen and Walbot, 1991; Rethmeier *et al.*, 1998)，也可能與所在的組織或細胞種類有關(Gallie and Tounq, 1994)。在本研究中除了 *atToc159* 基因的起始轉錄點尚未確認外，其他 *atToc159* 家族基因的 5' UTR 內均具有一個領先內插子序列。我們發現在不同的植株發育階段與不同組織，*atToc120* 及 *atToc90* 各自的領先內插子序列，都可以提高植株內其相對應基因的表現量。所以我們認為在這些基因的領先內插子序列中，可能包含與發育調節和組織細胞表現專一性有關的基因強化子(enhancer)，當然我們需要設計更多的實驗，才能證實這樣的說法。

一般而言，植物體內葉肉細胞和保衛細胞中均存在正常功能的葉綠體。其中，葉肉細胞是植物主要進行光合作用製造醣類的場所。而植物必須藉由保衛細胞控制氣孔的開閉，植物才能具有蒸散作用和吸收 CO₂ 的能力，這些生理功能也都與保衛細胞葉綠體的光合作用有關，所以維持保衛細胞內葉綠體的正常功能必定對於植物的生長發育具有關鍵的影響力。令人感興趣的是，我們有關十天齡的轉植株 GUS 活性定位染色結果顯示，120PUI 與 90PUI 植株的保衛細胞 GUS 酵素活性比葉肉細胞高(圖五)。Yu 等人(2001)研究發現 *ppi2* (*atToc159* knockout mutant) 突變株的子葉的碘液染色中



圖六、*atToc159* 基因家族成員在阿拉伯芥不同發育階段的基因表現量。資料來自 GENEVESTIGATOR database 網站(Zimmermann *et al.*, 2004)。

Figure 6. Expression profile of *atToc159* gene members during *Arabidopsis* development. This expression profile was downloaded from GENEVESTIGATOR database (Zimmermann *et al.*, 2004).

以保衛細胞最為明顯，並在保衛細胞中仍可發現正常的葉綠囊膜的堆疊和澱粉的累積。相反的，葉肉細胞的色質體發育卻出現嚴重的缺失。顯然地，正常功能的 *atToc159* 是葉肉細胞色質體發育所必需，但 *atToc159* 在保衛細胞色質體的功能上扮演並非絕對的需要的角色。我們認為喪失 *atToc159* 正常功能的 *ppi2* 變株的子葉中，葉肉細胞的葉綠體也失去正常的功能，因為 *atToc159* 在葉肉細胞中仍扮演重要的葉綠體的辨識和運輸機組蛋白角色。這樣的推論可以由一些有關 *ppi2* 植株的葉肉組織發育的相關研究得到佐證(Asano *et al.*, 2004)。而 *ppi2* 植株的子葉保衛細胞卻仍存在正常功能的葉綠體，則可能是因為 *atToc159* 功能由 *atToc90* 或 *atToc120* 等其他同源蛋白所取代。也就是說，子葉保衛細胞中可能存在與 *atToc159* 無關的運輸光合作用蛋白質的途徑。這樣的研究結果似乎支持 Bischof 等人(2011)的蛋白質體學與轉錄體學的研究，色質體前驅蛋白質可能分為兩大類，亦即非 *Toc159* 依賴型 (*Toc159*-independent) 和 *Toc159* 依賴型 (*Toc159*-dependent) 兩種，且 *atToc159* 對於一些光合性前驅蛋白的運輸並不具有專一性。

雖然最近以 *ppi2* 突變株為基因背景下過度表現 *atToc90* 基因的研究中，已發現大量表

現 *atToc90* 可以部分恢復 *ppi2* 突變株累積光合作用蛋白的能力(Infanger *et al.*, 2011)，但是至今仍缺乏相關於 *atToc159* 基因家族成員基因在保衛細胞專一性表現的相關研究，只有一些關於保衛細胞原生質體的微陣列晶片分析的實驗數據(Zimmermann *et al.*, 2004)。所以 *atToc90* 或 *atToc120* 在保衛細胞中葉綠體發育上所扮演的角色，有待進一步的實驗加以證實。此外，有關 *ppi2* 突變株的組織發育上研究也發現，*ppi2* 突變株的子葉的大小、根形態、莖頂分生組織(shoot apical meristem)的構造與發育早期的葉原基組織(leaf primordia)與野生型並沒有不同。然而，*ppi2* 突變株的葉子在發育後期卻發生嚴重的構造上的缺失(Asano *et al.*, 2004)。似乎指出 *atToc159* 在發育早期所扮演的角色較不重要，或者色質體對幼苗早期發育較不重要，或是 *atToc159* 的其他三種同源蛋白部分取代了 *atToc159* 的功能。綜合以上的結果可以發現，*Toc159* 主要在葉肉細胞中發揮重要的功能，而其他不同的 *atToc159* 的同源蛋白質的其他成員似乎作用在不同的組織或細胞中發揮功能，不同的 *atToc159* 蛋白質機組成員所組成 *TOC* 複合體可能具有細胞的專一性。

綜合以上的結果，我們可以知道不同的 *atToc159* 家族基因成員的相關啟動子的序列會影響基因的組織和細胞的專一性表現，而 5' UTR 內領先內插子序列則可增加基因的表現量。這些研究結果支持葉綠體轉運蛋白 *atToc159* 基因家族之基因的表現在不同的組織和發育階段的差異，可能是受到不同的發育和環境的因子刺激所調節。希望這些研究，不僅只是找到細胞核中 *atToc159* 基因家族能的調節機制，也幫助我們更進一步瞭解色質體可能發育的過程。

誌謝

本報告之完成要感謝行政院國家科學委員會提供經費(NSC98-2311-B-003-002 and NSC99-2311-B-002-MY3)。感謝師大生命科學系張永達教授慷慨提供光學顯微鏡設備與師大影像核心實驗室提供共軛焦顯微鏡設備，作為子葉 GUS 活性定位染色觀察使用。

參考文獻

Asano T, Yoshioka Y and Machida Y. 2004. A defect in *atToc159* of *Arabidopsis thaliana*

- causes severe defects in leaf development. *Genes Genet. Syst.* 79: 207-12.
- Bauer J, Chen K, Hiltbrunner A, Wehrli E, Eugster M, Schnell D and Kessler F. 2000. The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403: 203-207.
- Bischof S, Baerenfaller K, Wildhaber T, Troesch R, Vidi PA, Roschitzki B, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Kessler F, Gruissem W and Baginsky S. 2011. Plastid proteome assembly without Toc159: photosynthetic protein import and accumulation of N-acetylated plastid precursor proteins. *Plant. Cell* 23: 3911-28.
- Chen YJ and Sun CW. 2010. Transgenic study of chloroplast translocon gene regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Bot. Stud.* 51: 147-153.
- Chomczynski P and Sacchi N. 1987. Single Step Method of RNA Isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Clough S and Bent A. 1998. Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Gallie DR and Young TE. 1994. The Regulation of Gene Expression in Transformed Maize Aleurone and Endosperm Protoplasts' Analysis of Promoter Activity, Intron Enhancement, and mRNA Untranslated Regions on Expression. *Plant Physiol.* 106: 929-939.
- Hiltbrunner A, Grunig K, Alvarez-Huerta M, Infanger S, Bauer J and Kessler F. 2004. AtToc90, a new GTP-binding component of the Arabidopsis chloroplast protein import machinery. *Plant Mol. Biol.* 54: 427-440.
- Infanger S, Bischof S, Hiltbrunner A, Agne B, Baginsky S and Kessler F. 2011. The chloroplast import receptor Toc90 partially restores the accumulation of Toc159 client proteins in the Arabidopsis thaliana *ppi2* mutant. *Mol. Plant* 4: 252-263.
- Inoue H, Rounds C and Schnell D. 2010. The molecular basis for distinct pathways for protein import into Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* 22: 1947-1960.
- Ivanova Y, Smith MD, Chen K and Schnell D. 2004. Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Mol. Biol. Cell* 15: 3379-3392.
- Jarvis P and Robinson C. 2004. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol.* 14: 1064-1077.
- Jarvis P. 2008. Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* 179: 257-285.
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Jeong YM, Mun JH, Lee I, Woo JC, Hong CB and Kim SG. 2006. Distinct roles of the first introns on the expression of Arabidopsis profile in gene family members. *Plant Physiol.* 140: 196-209.
- Kubis S, Patel R, Combe J, Bédard J, Kovacheva S, Lilley K, Biehl A, Leister D, Ríos G, Koncz C and Jarvis P. 2004. Functional Specialization amongst the Arabidopsis Toc159 Family of Chloroplast Protein Import Receptors. *Plant Cell* 16: 2059-2077.
- Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, Karthikeyan AS, Lee CH, Nelson WD, Ploetz L, Singh S, Wensel A and Huala E. 2012. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res.* 40: 1202-1210.
- Luehrsen KR and Walbot V. 1991. Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells. *Mol. Gen. Genet.* 225: 83-93.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M and Penny D. 2002. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 12246-12251.
- Mascarenhas D, Mettler IJ, Pierce DA and Lowe HW. 1990. Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. *Plant Mol. Biol.* 15: 913-20.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

- Rethmeier N, Kramer E, Va M, Montagu N and Cornelissen M. 1998. Identification of cat sequences required for intron-dependent gene expression in maize cells. *Plant J.* 13: 831-835.
- Rochaix JD. 2004. Genetics of the biogenesis and dynamics of the photosynthetic machinery in eukaryotes. *Plant Cell* 16: 1650-1660.
- Rose AB, Elfersi T, Parra G and Korf I. 2008. Promoter proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression. *Plant Cell* 19: 1898-1911.
- Smith M, Hiltbrunner A, Kessler F and Schnell D. 2002. The targeting of the *atToc159* preprotein receptor to the chloroplast outer membrane is mediated by its GTPase domain and is regulated by GTP. *J. Cell Biol.* 159: 833-843.
- Smith M, Rounds C, Wang F, Chen K, Afitlhile M and Schnell D. 2004. The *atToc159* is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *J. Cell Biol.* 165: 323-334.
- Wallas T, Smith M, Sanchez-Nieto S and Schnell D. 2003. The roles of Toc34 and Toc75 in targeting the Toc159 preprotein receptor to chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 278: 44289-44297.
- Yu TS and Li Hm. 2001. Chloroplast protein translocon components *atToc159* and *atToc33* are not essential for chloroplast biogenesis in guard cells and root cells. *Plant Physiol.* 127: 90-96.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L and Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* 136: 2621-2632.

Cell-type Specific and Leader Intron-regulated Expression of *Arabidopsis atToc159* Translocon gene family

Yu-Shan Liu and Chih-Wen Sun*

Department of Life Science, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

(Received: 12 April 2013, accepted: 9 May 2013)

ABSTRACT

In *Arabidopsis*, four Toc159 homologues are reported and could be classified to two subgroups, atToc159/atToc90 and atToc132/atToc120, based on their sequence homology and substrate specificity. Therefore, expression of these translocon genes have to be regulated properly, otherwise the development and maintenance of plastids would be prohibited due to lack of essential protein import. In order to reveal the regulatory mechanism of *atToc159* gene family members, transgenes containing various lengths of the upstream sequences of these translocon genes and *GUS* coding sequence were transferred to wild-type *Arabidopsis*. The steady accumulation of GUS expression from the vegetative tissues of these transformants was examined first. In general, *atToc159*, *atToc132/atToc90*, and *atToc120* have relatively high, moderate, and low expression levels in various tissues of 7-day-old seedlings. Furthermore, the expression of *atToc120* and *atToc90* could be up-regulated by their corresponding leader intron sequence within 5' untranslated region (5' UTR) region. To further understand the intron effect of *atToc120* expression was regulated by light, the GUS activity of 120PUI and 120P plants grown under light/dark cycle and continuous dark conditions were compared. Our data suggests that the intron sequence of *atToc120* is more responsive to dark signal. In addition to tissue-specific expression, the cell-specific expression of these transgenic plants was also determined. Surprisingly, *atToc90* and *atToc120* had higher GUS activity in the guard cells than mesophyll cells of cotyledon when compared to *atToc159* and *atToc132*. This indicates that *atToc90* and *atToc120* might play a more important role in regulating chloroplast protein import of guard cells. These data support that the spatial and temporal expression of *atToc159* gene family members is regulated by different developmental and environmental stimuli.

Key words: *Arabidopsis*, *atToc159* gene expression, leader intron, *GUS* reporter gene, guard cells

*Corresponding author: Chih-Wen Sun; FAX: 886-2-29312904; E-mail: cwsun@ntnu.edu.tw