

知識天地

蛋白質進入葉綠體之連續步驟

朱瓊枝博士後、李秀敏研究員（分子生物研究所）

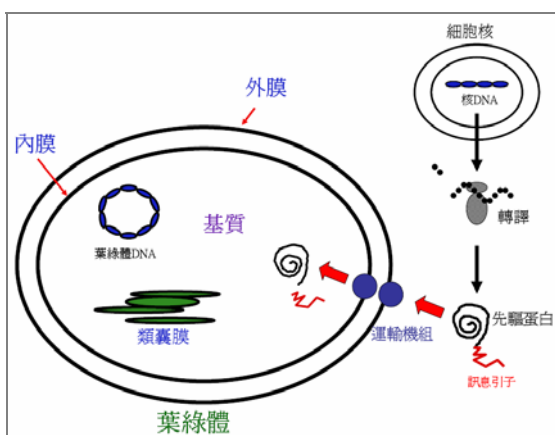
綠色植物是地球上主要的生產者，他們能利用陽光的能量，將二氧化碳及水轉換成碳水化合物及氧氣，這個過程就是大家所熟知的光合作用，而葉綠體便是唯一能夠進行光合作用的胞器。葉綠體同時也是製造不飽和脂肪酸、葫蘿蔔素及必需胺基酸的地方。

葉綠體內大約含有 3500~4000 種蛋白質，而葉綠體本身的基因體卻只能作出約 100 種，因此葉綠體內大部分的蛋白質都是由細胞核內的基因體所轉錄，並在細胞質中經過轉譯後才被運送到葉綠體內（圖一）。因此研究蛋白質如何被送入葉綠體乃是了解光合作用的重要基本課題。

葉綠體是由三個膜系構造所組成，由外而內可區分為外膜（outer envelope membrane）、內膜（inner envelope membrane）及綠色的類囊膜（thylakoid membrane）；內膜與類囊膜中間的部分則稱為基質（stroma）。

大部分要被送入葉綠體的蛋白質，會先在細胞質被做成先驅蛋白（pre-protein），在先驅蛋白的 N 端含有一段地址標籤，我們稱它為訊息引子（transit peptide）。先驅蛋白是經由葉綠體內、外膜上的運輸機組（translocon）被送入葉綠體內（圖一）。當先驅蛋白被送到葉綠體表面時，訊息引子會被運輸機組辨認。當葉綠體基質內有充分的 ATP 時，先驅蛋白就會通過葉綠體的外膜及內膜而進到葉綠體基質內。此時先驅蛋白上的訊息引子就會被葉綠體基質內的一個特殊的蛋白質水解酶切除，成為成熟蛋白（mature protein）。雖然許多運輸機組成員已被發現，但在蛋白質運送過程中，各個成員到底扮演什麼角色以及運送過程的連續步驟，至今仍不清楚。

由之前的研究已知，葉綠體內膜上運輸機組成員 Tic110、Hsp93 和 Tic40 可能參予先驅蛋白穿過內膜的運送過程。Tic110 是第一個和訊息引子結合的內膜蛋白，其 N 端負責將 Tic110 固定在內膜上，C 端則座落於基質中。Hsp93 是目前唯一會與運輸機組穩定結合的 ATPase，因此推測它是基質中能利用 ATP 水解的能量，將蛋白質拉入葉綠體的馬達。Tic40 與 Tic110 相同，也是利用 N 端固定在內膜上，C 端座落於基質中。C 端的前半有一 TPR (tetra-tricopeptide) 區段，後半則有一個與共同伴護子 (co-chaperone) Hop (Hsp70/Hsp90-organizing protein) 和 Hip (Hsp70-interacting protein) 同源的區段（在此稱為 Tic40Hip/Hop 區段）。當阿拉伯芥 (Arabidopsis) 的 Tic40 壞掉時，會導至植株小且生長十分緩慢，呈現淡綠色（圖二），但並不會死亡。因此推測 Tic40 在蛋白質運送過程是扮演非必須的調節者角色，所以我們推測 Tic40 可能是一個共同伴護子，負責調控 Tic110 及 Hsp93。



圖一 葉綠體的基本構造與蛋白質被運送進入葉綠體之簡圖



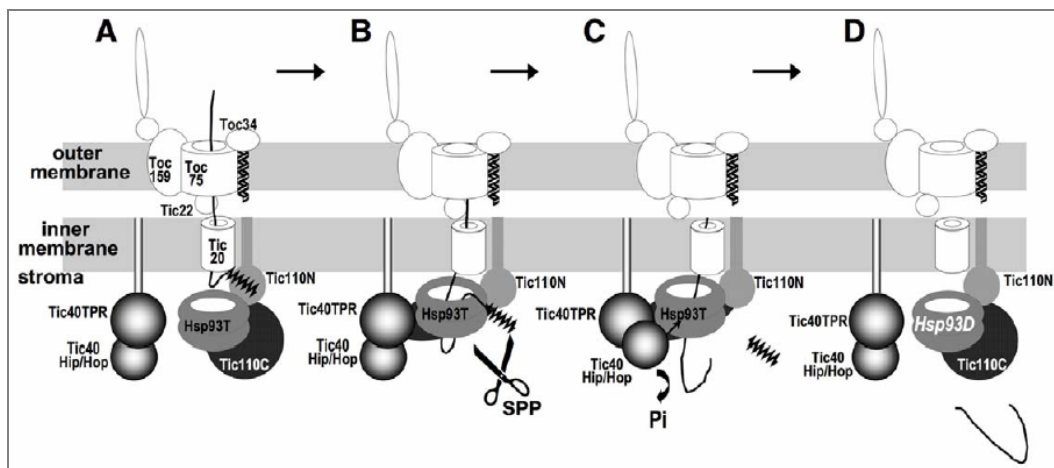
圖二 野生型阿拉伯芥與 *tic40* 突變株

為了驗證我們的假說，我們首先測試 Tic40 是否具有與 Tic110 結合的能力。利用 yeast two-hybrid 與 in vitro pull-down 等方法進行分析，結果都顯示 Tic40 的 TPR 區段會與 Tic110 的 C 端結合。接著我們探討 Tic40 與 Tic110 的結合是否會影響先驅蛋白與 Tic110 的結合，結果發現，當先驅蛋白與 Tic110 結合後，Tic40 便會與 Tic110 的結合；

但當 Tic40 與 Tic110 結合後，Tic40 會促進訊息引子從 Tic110 釋出。這樣的交互作用，可能是要確使在先驅蛋白進入基質後，訊息引子能很快被切除。我們使用 Tic40 缺失的突變株來檢測，證明突變株的葉綠體中，訊息引子被切除的速度的確變慢。

另一方面，我們測試在與 Hsp93 接觸的成員中，哪些會影響 Hsp93 水解 ATP 的能力。結果發現，單獨的 Tic40Hip/Hop 區段可以增進 Hsp93 水解 ATP 的能力達六倍之多。在 *tic40* 突變株中，我們也觀察到，先驅蛋白在運送的過程中，常常無法完成，而掉落回葉綠體外，這可能是葉綠體在沒有 Tic40 時，Hsp93 水解 ATP 速度太慢，無法及時把先驅蛋白拉入葉綠體內。最後我們又發現在 ADP 存在下，Tic40 與 Hsp93 的結合能力減低，這顯示當 ATP 被水解成 ADP 後，Hsp93 會與 Tic40 分開。

綜合上述結果，我們提出蛋白質送進葉綠體連續步驟的模式 (圖三): 當訊息引子由內膜通道進入基質時，Tic110 會與其結合 (圖三 A)，這樣的結合會使得 Tic110 的構形發生改變，使 Tic40 的 TPR 區段與 Tic110 C 端結合 (圖三 B)，當 Tic40 的 TPR 區段與 Tic110 結合後，訊息引子就會被 Tic110 釋放，然後被基質中的蛋白質水解酶切除。此外，Tic40 TPR 跟 Tic110 結合後還可使得 Tic40 的 Hip/Hop 區段裸露出來，然後刺激 Hsp93 的 ATP 水解活性 (圖三 C)。ATP 被 Hsp93 水解所產生的能量，使用在將蛋白拉進葉綠體中 (圖三 D)。Hsp93 將 ATP 水解成 ADP 後，便與 Tic40 分開。在正常光照的情形下，葉綠體因行光合作用的關係，基質內有很高濃度的 ATP，因此 Hsp93 可再與一個 ATP 結合，開始下一個循環的先驅蛋白的運送。



圖三 蛋白質運送至葉綠體基質之步驟模式圖