

出國報告（出國類別：講學）

日本神戶大學生物系植物生態生理課程 與專題演講

服務機關：國立中興大學 生命科學系

姓名職稱：顏宏真 教授

派赴國家：日本 神戶

出國期間：102.06.03~102.06.25

報告日期：102.07.19

摘要

本講學活動是應邀到日本神戶大學生物系與學生和老師進行交流，在「植物生理生態學」課程中，針對大三大四學生進行「高等植物耐鹽機制」的介紹。內容包括逆境的定義與種類、何謂滲透逆境、滲透調節、相容質、離子區隔的機制以及耐鹽植物冰花的介紹，讓學生了解耐鹽植物的生理特性。專題演講是針對系上的研究生與老師，講題為「Post-translational modifications of SKD1/VPS4 participate in the salt-tolerant mechanisms of halophyte ice plant」，主要是針對本實驗室近年研究蛋白質後轉譯修飾作用與鹽逆境的相關性進行探討，除此之外，並介紹中興大學的歷史與特色，達到宣傳學校的目的。

目次

目的-----	4
過程-----	4
心得與建議-----	8

目的

本人之專長為植物逆境的分子機制，著重探討高等植物耐鹽機制，因為今年四月時去神戶大學生物系進行研究工作，與系上老師進行學術交流。之後受邀在六月以英文參與課程 Plant Ecophysiology 的授課，介紹植物在高鹽下的反應與適應機制，目的是讓大學部學生了解植物細胞如何適應高鹽的環境。除此之外，還參與系上研究生的書報討論、lab meeting 以及專題演講，除了學術討論之外，並介紹中興大學，希望兩校可以有更多的交流。

過程

計畫執行經過：因為今年四月時去神戶大學生物系進行學術交流活動，由於專長相符，受邀在六月以英文參與課程 Plant Ecophysiology 的授課，有感於是宣傳台灣及中興大學的好機會，並且神戶大學提供本人住宿與實驗室做實驗所需藥品與儀器，而本人利用自己計畫結餘款支付機票費用。

研究機關(機構、單位)介紹：日本神戶大學建立於 1929 年，是日本的國立大學之一，由於神戶港是日本最早開放的港口之一，西化程度頗深。最早成立的是商學院與理工學院，尤其是經濟系在日本頗富盛名，1992 年成立藝術學院和教育學院，開始朝人文社會領域發展，各個科系幾乎都包括大學部和研究所，研究風氣頗盛。神戶大學生物系屬於理學院，理學院包括化學系、物理系、和數學系。位於六甲校區地址如下: The Second Rokkodai (六甲台第 2, Rokkdai Daini) Campus Letters, Science, Agriculture, Engineering (1-1, Rokkodai, Nada-ku, Kobe)，此校區依山而建，每天從阪急電鐵六甲站到校區需要爬山約 10-15 分鐘，非常適合鍛鍊身體。

出國期間行程(課程)

周一到周五每天行程：坐巴士換電車到阪急六甲站，然後走 15 分鐘的上坡路到理學大樓 C 棟生物系，此段上坡路有點陡，但是為了省錢所以沒有搭巴士。

大學部課程：Plant Ecophysiology 每周二早上兩個鐘頭，六月四號、十一號、十八號共三周

主題:高等植物耐鹽機制－以冰花為模式

目的:讓大學部學生了解植物細胞如何適應高鹽的環境

課程安排:

1. Stress 的定義與種類
- 2.何謂滲透逆境
- 3.滲透調節、相容質、離子區隔的機制
- 4.冰花簡介

課程內容:

一開始被交代要詳細自我介紹，可見日本學術界很重視出身，並且被交代要跟學生說明，為何從事研究工作?在日本學術界，女性的研究者還是算少數，藉機鼓勵有興趣的學生繼續攻讀研究所。之後介紹中興大學，特地從學校網站中研讀校史，才知道本校在 1919 年即成立，稱為台灣總督府農林專門學校，後來在 1928 年併入台北帝國大學(即台大的前身)，成為其附屬的農林專門單位；在 1943 年從台北帝國大學分出，並遷到台中現在的校址，開始在台中落地生根，生長並茁壯。

之後開始進入主題，首先是定義逆境這個名詞，而未和植物逆境反應如此重要?因為植物的特性為著地性、多變之生長環境、可塑性的生長，且不像動物可以用遷徙的方式，來躲避逆境，故須發展出一套完整的機制來適應逆境。逆境的定義為：外在的因素對生物生長發育造成不良之影響，而逆境的種類，廣義的可分為生物性之傷害及非生物性（環境）逆境，所謂適應逆境的定義即為：植物不需馴化作用即可生長於特定逆境的環境中並具有繁衍後代的能力。並花了一些時間解釋一些專有名詞：適應 vs 馴化 vs 逃避，及其不同處。適應逆境的機制，主要是因特殊之結構、生理、化學及行為上的改變使植物具有存活的能力，而且植物適應逆境的機制中有許多具有共通性，例如：適應乾旱逆境的機制，亦可幫助其適應高鹽、低溫等相關逆境，這樣就可在外在環境惡劣的情況下，達到經濟又有效的作用。

接下來介紹各種逆境，如生物性逆境，其定義為：植物遭受其他生物之侵襲，如病毒、細菌、真菌等病原菌之感染，昆蟲、草食性動物（尤其是哺乳動物）之嚼食。防禦生物性逆境主要是利用物理性的屏障，如：增厚的木質化細胞壁、角質層、木栓層、蠟質等以防止病菌入侵。刺鼻、多刺、或強韌堅硬的莖葉避免動物嚼食。黏性、多毛或滑

溜的葉避免昆蟲啃食。或是用化學物質的保護，如：植物合成特定的植物烯類、植物酚類、有機物、或特定蛋白質，來驅逐、毒害、或使嚼食者消化不良。在病原菌入侵時，植物會分泌水解酵素，瓦解病菌的細胞壁，達到侷限病菌生長的目的。特定的化學物質亦參與植物之間的競爭作用。

至於非生物性逆境，其定義為：植物處於不良的環境，如：強光、缺水、高鹽、低溫、高溫、缺氧等，使植物生長發育受阻。在非生物性逆境中最主要的是水分缺乏的相關逆境，因為植物必須從土壤中吸收大量的水分，來進行蒸散作用。而植物幾乎每天均會面臨到不同程度的缺水逆境，植物會依缺水的程度，有不同階段的反應機制：

1st 落葉以減少葉面積

2nd 促進根部生長以吸收水分

3rd 氣孔關閉以減少蒸散作用

4th 調節細胞滲透壓以維持細胞水分平衡

5th 調整葉面角度、捲曲葉片、增加表皮蠟質、形成針狀葉等方式以減少陽光照射所帶來的能量

6th 缺水誘導細胞生理代謝的變化，如誘導景天酸(CAM)代謝

7th 缺水高溫誘導具有 CO₂濃縮機制之 C4 植物的演化

與缺水逆境相關的鹽分逆境，亦是植物常接受到的一種非生物性逆境；一些植物如濱海植物可生長在高鹽份的環境，它們同時要對抗缺水及離子毒害的逆境。耐鹽植物均具有抵抗缺水逆境的機制，同時並可以有效的排除體內吸入過多的氯化鈉。多餘的氯化鈉常被儲存於液泡或表皮特化細胞中，或經由鹽腺排出體外。高等植物耐鹽機制是由多個互相連結的途徑組成，每個途徑均有特定之功能，亦有相互重疊之處，交織成一複雜之網絡。研究較深入的機制包括增加滲透調節物質的累積、增加水分吸收及利用效率、維持鉀離子吸收及區隔鈉離子等，其中有效的區隔鈉離子及維持細胞內外離子平衡則耐鹽植物特有之適應機制，在不耐鹽植物中則僅有侷限之排鹽能力。 Na^+/K^+ 比值是判定植株耐鹽性的一個重要的指標，當外界鈉離子濃度高時，因濃度梯度差造成 Na^+ 順向流入胞內，使細胞內的 Na^+ 累積至毒害細胞的濃度，擾亂正常之生理代謝。離子進出細胞必須經過原生質膜上特殊之 transporters，而 Na^+ 進入細胞的管道之一是經

由運輸 K^+ 之 transporter 進入細胞。 K^+ 是植物細胞生長所需之大量元素，在含高鈉鹽的土壤中， K^+ 吸收會受限制，造成植物同時遭受 Na^+ 毒害及 K^+ 缺乏之逆境而本實驗室的主題之一就是利用耐鹽植物冰花，來研究 Na^+/K^+ 平衡在耐鹽植物中的重要性。最後還介紹了近幾年冰花被拿來當成健康食品，在日本有公司用水耕培養冰花，在市場販售，本人在超市中亦見過，拿來當生菜甚至包在壽司中食用。

研究所專題演講課程，每週三下午兩個鐘頭，六月五號、十二號、十九號，共計三周，其中兩周是其他的講者的演講，一周由本人主講。專題演講題目 Post-translational modifications of SKD1/VPS4 participate in the salt-tolerant mechanisms of halophyte ice plant
主題:耐鹽植物冰花的後轉譯修飾作用與其耐鹽相關性

目的:蛋白後轉譯修飾在逆境下扮演重要的角色

內容安排:

1.冰花生理特性介紹

2.轉錄與轉譯階段的調控

3.protein trafficking 機制參與膜蛋白運送與在細胞位置的分布

首先介紹耐鹽植物冰花，冰花是雙子葉一年生植物，幼苗時並不十分耐鹽，如遭遇乾旱、高鹽環境或發育至成熟階段時，會發生許多基因層次的變化，造成許多生理生化途徑之變化，以防止體內水分散失及離子毒害，適應環境的變化。冰花可生長於高鹽分(500 mM NaCl)的土壤中，且其耐鹽性可經由環境變化而誘導，並具有細胞層次的耐鹽性，是研究高等植物耐鹽機制的最佳模式植物之一。目前研究高等植物的耐鹽機制有幾個方向：水分吸收，相容性溶質的累積，鈉離子區隔，以及鉀離子的平衡。本實驗室針對鹽逆境下鈉鉀離子的平衡做深入探討，但由於冰花不適合進行遺傳，故同步利用酵母菌及阿拉伯芥完備之遺傳系統同步進行相關基因功能之研究。尤其著重於鹽逆境初始反應的分子生理機制，在 2002 年時利用 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) 偵測到加鹽數小時之間，冰花體內發生劇烈的蛋白構型變化，而阿拉伯芥則無此反應。在 2006 年與 2012 年的文章中發現一 AAA-type ATPase 會與一 protein kinase SnRK1 具交互作用並將其磷酸化，在加鹽數小時之間會由細胞質往原生質膜移動，並與膜上

一個 E3 ligase CPN1 形成蛋白複合體，將 SKD1 進行泛素化的修飾，推測此現象可能參與逆境的感應或訊息傳遞。為了要觀察活體細胞內蛋白分布的變化，利用阿拉伯芥的原生質體進行 bimolecular fluorescence complementation 的觀察，發現此三個蛋白質會形成蛋白複合體。但是由於原生質體沒有辦法進行高鹽或乾旱處理，故無法得知此三個蛋白在逆境下是否可重新分布?再者阿拉伯芥並非耐鹽植物，是否有此現象還需要確認。

由於有此考量，希望可以在冰花的模式下進行實驗，首先要確認鹽逆境下冰花體內鈉離子的累積量，故今年四月時前往神戶大學 Mimura 教授實驗室，經過一個月的測試，已發展出偵測冰花體內鈉離子分布的有效方法。此實驗室在 2009 年時(Hamaji et al. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis. Plant Cell Physiology 50: 2023-2033)，發展了以 Sodium Green 染劑觀察活體阿拉伯芥根部以及培養細胞內鈉離子累積的情形，同時也以 Neutral Red 染劑觀察液胞的分布，再配合觀察特定 Q-SNARE-GFP 融合蛋白螢光分布，發現在鹽處理下有許多膜狀粒子(membrane-bound vesicles)在細胞質內快速重新分布，所以在這次的演講中也加入了此次實驗所得知結果，包括測量植體內鈉鉀離子的比值，以及利用螢光染劑觀察鈉離子在冰花體內的分布，引起熱烈之討論，達到學術交流之目的。

心得及建議

神戶大學是日本的國立大學之一，在關西地區頗負盛名，學生的素質頗高。停留時間發現學生念的均是日文翻譯的教科書，而非英文版的原文書，內容雖然一樣，但是日本學生對於英文撰寫的文章及專有名詞，較不熟悉。所比較的對象是成績在平均以上的本系學生，也就是說台灣學生的英文閱讀能力，與用英文表達討論科學的能力，是在神戶大學學生之上。但是他們的大學生上課態度很好，感覺大部分學生有認真聽講，比中興大學的學生平均學習態度要好，不過可能是語言和文化的關係，上課中都沒有發問，下課後才有人非常有禮貌的跟我約時間討論。在實驗室所接觸的大學生，英文口說能力也沒有本系學生平均來的好。

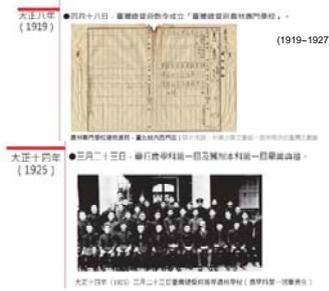
與出國主題相關之具體建議事項：此行最大收穫是跟不同文化背景的學生交流，建議學習他們的優點：良好的學習態度，也認清自己的長處：專業術語的英語能力較強，

且學習方式較活潑，在課堂上會直接發問，此次活動是用本人計畫的結餘款以及自費支付費用，無論在大學部或研究所課程均強力介紹中興大學，希望學校可以多支持補助此類交流活動。

附錄:

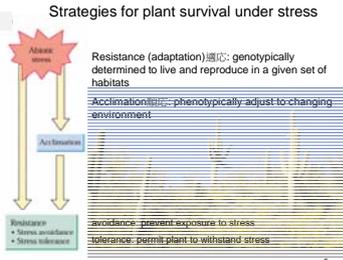
The adaptation mechanisms of salt tolerance in higher plants
----using ice plant as a model

Dr. Hungchen Emilie Yen
Dept of Life Sciences,
National Chung Hsing University
Taichung, Taiwan



Definition
Stress: external conditions that adversely affect growth, development, or productivity

Abiotic stress (environmental stress): excess or deficit in the physical or chemical environment



Salinity (high conc. of total salt in the soil)
Seashore, dry land salinity
Irrigated land salinity

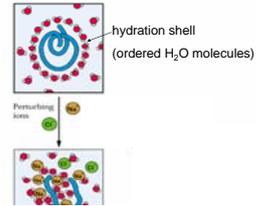
The effects of salinity:
Injure plants; growth inhibition
Degrade soil structure (decrease porosity and water permeability)

Effects of salinity on plant growth:

- Osmotic effect: similar to that of water-deficit stress; cross resistance
- Ionic effect: Na⁺-specific effect
necrosis of old leaves
reduction of growth and yield

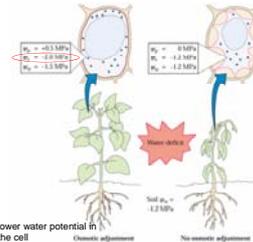
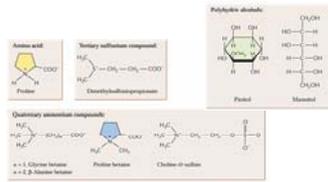
Why is Na⁺ toxic?

- Compete with K⁺
- Disrupt protein structure

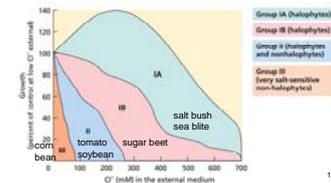


Compatible solutes

small organic compounds, highly soluble, accumulate at high conc, not interfere with cellular metabolism

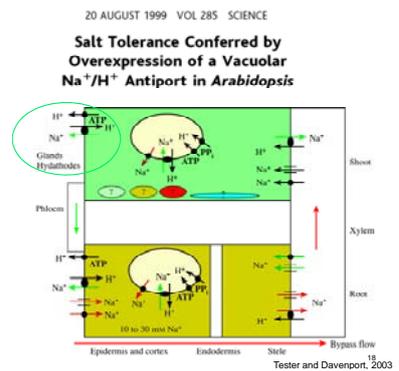
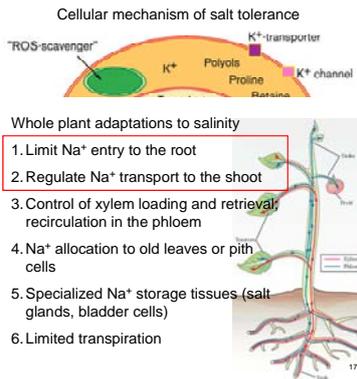
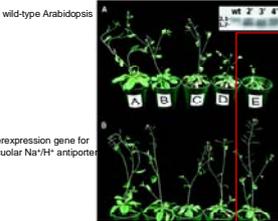


Classification according to the response to salinity
Halophyte
Non-halophyte (Glycophyte)

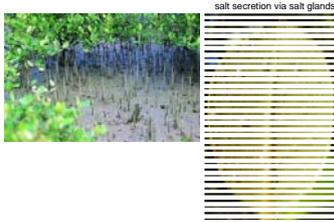


Mechanisms of salinity tolerance in higher plants

Cellular salinity tolerance
Whole-plant salinity tolerance



Avicennia marina



Atriplex halimus

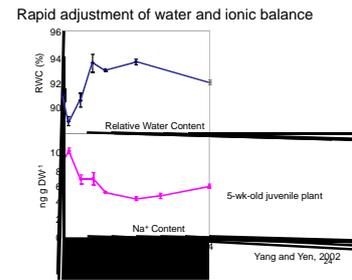
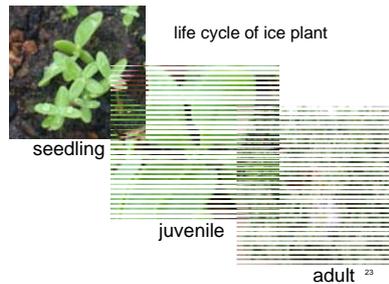


Mesembryanthemum crystallinum (ice plant)
Epidermal Bladder Cells (EBCs)

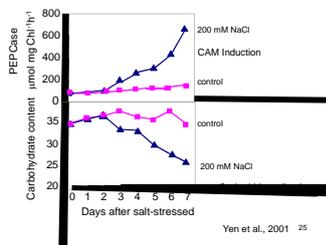


Mesembryanthemum crystallinum L.
(common ice plant)

- Aizoaceae Family, an annual dicot found in the regions with 地中海性氣候
- Halophyte, can grow in sea water
- Inducible CAM plant, an adaptation to drought



CAM induction within a week



Salt tolerant mechanisms of ice plant

- An immediate response once encounter high salinity to maintain ion homeostasis
- CAM is induced for long-term water conservation
- Overall morphological changes for water storage and Na⁺ compartmentation

Salt-tolerant nature of cultured ice plant cells



演講公告上的摘要(由於含有未發表之數據，故無法將 ppt 內容公布)

The halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. (ice plant) is marked by giant epidermal bladder cells (EBCs) for ion and water storage. The differentiation of pavement cells into EBCs occurs at an early developmental stage and the presence of both NR-stained (acidic) and NR-unstained (neutral) EBCs are found at the juvenile stage of leaves. We previously identified a salt-induced SKD1 (suppressor of K⁺ transport growth defect 1)/VPS4 (vacuolar protein sorting 4) that accumulates in EBCs and cells actively engaged in the secretory processes. Knock-down *SKD1* Arabidopsis mutants have a reduced abundance of lateral roots and an imbalanced Na⁺/K⁺ ratio under salt stress. The localization of SKD1 protein changes from the cytoplasm towards the plasma membrane six hours after salt stress in ice plant seedlings. The rapid redistribution of SKD1 is believed to be mediated by the post-translational modifications events. We discuss the potential effects of ubiquitination and phosphorylation on SKD1, such as changes in the ATPase activity and cellular localization, and how they relate to the functions of SKD1 in the maintenance of Na⁺/K⁺ homeostasis under salt stress.