

教育部補助大專校院延攬國際頂尖人才 期中 111 年度績效報告

學校名稱及聘任系所：國立中興大學生物科技學研究所	學門領域：生命科學與農學
學者姓名：呂冠儒	<input type="checkbox"/> 玉山學者 <input checked="" type="checkbox"/> 玉山青年學者

一、質化績效說明（執行成果得累計呈現，如：第 2 年之年度績效報告，可包含第 1 年及第 2 年之成果）

審查重點	預期達成目標	執行績效及目標達成情形說明	檢附資料
一、玉山（青年）學者之研究工作主要內容及全程經過概述。	玉山青年學者計畫的目標是希望能夠幫助年輕研究人員厚植研究基礎，站穩台灣，迎向國際。本計畫預期能夠幫助申請人推進學術研究，發表高品質的研究，並且讓申請人可以有更多的機會參與國際研究活動，加強台灣與世界研究的接軌。	計劃執行至今已達三年，由於計畫經費的挹注，使得申請人得以有較佳的研究人力來執行研究。在成果上，由於許多實驗皆需時間攝製，個人研究室的產出仍在孵化階段，目前預計接下來的一年會開始有產出。在國際合作上，已經有研究成果成形，目前已被高影響因子（ IF=10.5, Ranking 5% ）的期刊接受，另有一篇論文正在撰寫中，相信接下來會有更多高影響力的論文發表。此外，由於疫情的影響漸退，今年已經參加了國際阿拉伯芥研究，並發表海報。接下來還有台日植物學聯和研討會，除了參與外，也會讓學生、助理參與，拓展視野。最後，不論在教學以及服務方面，申	如附件 2

審查重點	預期達成目標	執行績效及目標達成情形說明	檢附資料
		請人皆有積極的投入參與。詳細執行內容請參閱附件 2。	
<p>二、玉山（青年）學者未來研究主題與校務發展（包括高等教育深耕計畫）之連結及預期效益：</p> <p>（1）學者研究規劃及目標。</p> <p>（2）學者研究主題內容及其與學校校務發展關聯性。</p> <p>（3）具體工作績效或成果，內容請包括專題研究計畫期中進度報告。</p> <p>（4）預期成效（預計可達到量化或質化之具體成果）</p> <p>※如有量化績效者，請另再填寫</p> <p>附件 1</p>	<p>（1）學者研究規劃及目標：系統性地了解原生質絲的特性、其運輸蛋白的機制、演化上的過程、病毒如何利用這個系統傳遞，以及最終能夠發展出調節這些機制的技術</p> <p>（2）學者研究主題內容及其與學校校務發展關聯性：目前，在中興生技所缺少了針對細胞間溝通，在植物生長與病毒移動的深入研究。申請人在植物細胞間溝通的專長，是完整研究植物病毒與植物生長發育中，所需的一塊重要拼圖。</p> <p>（3）具體工作績效或成果：第一年，實驗室將專注於利用現有的工具，經由生物轉殖技術來製造研究所需知轉殖地錢。第二年開始構築地錢的原生質絲蛋白質體。利用目前已知的技術，測試在地錢中純化原生質絲的可能性。第三年目標是分析地錢原生質絲組成的保留性與差異性。</p> <p>（4）預期成效：申請人預期在玉山青年學者補助期間，能夠有三至四篇突</p>	<p>（1）目前分別依照計畫中了解地錢原生質絲的特性以及運輸蛋白機制部分，有相當程度的進展。此外，在病毒如何利用原生質絲系統傳遞的部分，目前已得到相當不錯的資訊，正在著手驗證篩選出來的基因，是否會影響病毒在細胞間的移動。</p> <p>（2）目前與所上兩位病毒專門的老師有相當程度工作上的互相幫助，此外，也與生科系、植病系、生化所的老師有許多研究上的交流。相信在未來會有更多實質合作的機會與可能。</p> <p>（3）目前，第一年的目標基本上都已達成，第二、三年的目標也正順利進行。詳情請參考附件 2</p> <p>（4）目前，申請人在與國外合作的研究上已被高影響國際期刊接受，並且有接續的研究正在進行中。在參與了研討會後也新增兩國（西班牙、德國）的研究合作。而實驗室目前的研究進度也在掌控中，相信接下</p>	<p>具體工作績效或成果請參考附件 1 以及附件 2</p>

審查重點	預期達成目標	執行績效及目標達成情形說明	檢附資料
	<p>破性研究論文發表於高影響力國際期刊。另外，申請人預計參加三至四場國際研討會，並發表研究成果。建立中興大學與荷蘭瓦赫寧恩大學、比利時 VIB 化學基因體中心之緊密國際合作關係。</p>	<p>來的一年會有機會有更多產出。</p>	
<p>三、<u>學校申請計畫原定目標暨支持成效</u>。（請敘明學校協助學者進行教學研究所提供之各項配合措施或經費，如研究設備及經費、研究助理人事費、住宿搬遷、子女教育協助事項等）</p>	<p>研究設備及經費： 生物科技學研究所提供辦公室以及個人研究室，以及多項研究設備（包含本所除提供呂冠儒博士教師個人實驗室外，並可提供雙掃描式光譜式雷射共軛焦顯微鏡、倒立式雷射共軛焦顯微鏡、高效能液相層析儀、串聯質譜儀、細胞培養室、及植物生長溫網室等設備）。中興大學研發處另補助新進人員研究經費新台幣六十萬元整、農資學院補助設備費新台幣十萬元整以及生物科技學所補助設備費新台幣十萬元整。</p>	<p>在研究設備與經費上，校方及所方提供相當不錯的支持，使得申請人在第一年即可快速設立好研究室以及取得適當的研究設備。校方以及所方的職員也給予相當大的支援，使得申請人在行政事務上，可以快速地進入狀況。此外，玉山青年學者挹注的經費也實質上的幫助了申請人在人事上聘用助理，讓申請人可以投注足夠的時間進行研究室的設立以及執行研究計畫。在生活方面，校方提供相當優貨的宿舍租用，對於赴任初期給予了相當大的方便。</p>	
<p>四、<u>玉山學者團隊合作情形</u>（請敘明團隊成員及合作方式）（玉山青年學者免填）</p>	<p>須與申請計畫書內容相符</p>		

審查重點	預期達成目標	執行績效及目標達成情形說明	檢附資料
<p>五、玉山（青年）學者國際化合作，鏈結接軌國外學術資源合作交流，與學校發展相結合；學者亦應善用其國際學術網絡資源，協助任職學校國際化，推動國際交流合作（包括國際師生交換、跨國合作研究、雙聯學制）</p>		<ol style="list-style-type: none"> 1. 於 2022 年 5 月訪問荷蘭 Wageningen University and Research (WUR) 並發表演講 2. 於 2022 年 5 月訪問奧地利 Institute of Science and Technology Austria (ISTA) 並發表演講 3. 荷蘭 Wageningen University and Research (WUR) 生化所所長 prof dr Dolf Weijers 於 2023 年 3 月 20-27 日應邀來台參訪，並發表演說 4. 比利時根特大學暨 VIB 研究中心 植物系統生物學中心 研究人員 prof dr Bert De Rybel 於 2023 年 6 月 12 日應邀來台發表演講。 5. 與 2023 年 6 月 5 日至 6 月 9 日參與第 33 屆國際阿拉伯芥研究研討會，並發表海報 6. 將於 2023 年 10 月 13-15 日於台北參與台日國際植物學研討會，發表海報 7. 將於 2023 年 10 月 26 日於台大參與地錢研究研討會發表演講。 	<p>詳見附件 2</p>

量化績效說明

項目		成果及具體工作績效	說明
1. 人才培育		碩博班課程__6__堂 學士班課程__2__堂 博士生__0__人 碩士生__8__人(含畢業生 2 人、外籍生 1 人) 學士生__0__人 其他 助理 3 人 博士後 1 人	碩班課程：分子發育生物學、專題研究、文獻選讀、分子生物技術及原理、植物訊息傳遞 學士班課程：分子生物學、農業概論(英語授課)、國外農業訓練(英語授課)
2. 論文著作	國內	期刊論文__篇 專書及專書論文__本 研討會論文__篇 技術報告__篇 其他____	
	國外	期刊論文__1__篇 專書及專書論文__本 研討會論文__篇 技術報告__篇 其他____	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590346223001979 Plant communication: 5 year IF: 10.5, Ranking plant biology 12/262 (top 4.6%) by JCI
3. 專題演講		__4__場次	2022 年於荷蘭、奧地利給予專題研講、2021 年於台灣植物學年會、國立中興大學植病系、國立中央大學生命科學系給予專題演講
4. 專利 (含申請中)	國內	__件	
	國外	__件	
	<input type="checkbox"/> 不適用		
5. 產學合作		產學合作企業__家	
		產學合作計畫__案	
6. 技術移轉		技轉授權__項	
		技術移轉授權金合計(金額) __元	

	<input type="checkbox"/> 不適用	
7.其他		

績效說明

研究目標：

細胞間的溝通，對於細胞辨認自身環境而產生相對應的反應、以及在多細胞生物體中，細胞如何合作來建構出完整組織與器官而言，是不可或缺的機制。然而由於細胞壁的分隔，使得植物細胞在直接運輸物質上，相對於動物細胞，有較高的困難度。為了克服這個屏障，植物在由藻類演化成陸生植物時，演化出了包含細胞膜的微小通道來連接細胞，稱為原生質絲。原生質絲可通透許多植物所需的微小分子。其中，蛋白質會經由原生質絲的運輸，參與細胞身份的決定以及調節整體組織結構的形成，來調控植物生長與發育。例如，在植物的頂芽，生長點的細胞需要維持其潛能性，然而這些位置的細胞，會因為細胞分裂，而離開原先的位置，進而開始分化成不同的細胞身份。植物就利用了原生質絲的系統，將一個重要的轉錄因子 WUSCHEL (WUS) 由內向外運輸，因此，當細胞因為細胞分裂而距離增加，WUS 的運輸無法達到時，細胞便會開始分化。而在植物的根部，內皮層的形成，也是藉由將 SHORTROOT(SHR) 蛋白質從維管束向外移動，然後再與另一轉錄因子 SCARECROW(SCR) 結合，調控內皮層的分化。在植物的生長發育中，還有許多像維管束的分化、根毛以及葉表面絨毛的形成、以及植物開花時間的決定等，都需要經由細胞間分子的運輸來達成。此外，許多植物病毒也演化出特殊的移動蛋白，利用這個便利的原生質絲通道來傳遞，達到系統性感染。即便植物細胞間蛋白質運輸的機制如此重要，我們對於植物如何調控蛋白質經由原生質絲運輸的機制，知道得非常有限。因此，為了能夠系統性地了解原生質絲的特性、其運輸蛋白的機制、演化上的過程、病毒如何利用這個系統傳遞，以及最終能夠發展出調節這些機制的技術，申請人將計畫分成短期研究重點以及長期研究目標，以期達到最終瞭解植物生長發育以及促進台灣農業發展的目標。

研究規劃：

為了瞭解原生質絲蛋白質運輸的機制，我們計劃首先利用新興的模式植物地錢 (*Marchantia polymorpha*) 來探討，早期演化分枝出的無維管束植物如何調控細胞間蛋白質的運輸。由於地錢在植物演化初期，就與維管束植物分枝開來，因此，地錢在細胞間蛋白質運送的機制可能與維管束植物已知的狀態有些許差異。然而，單純以阿拉伯芥中原生質絲蛋白質體的基因來做比較，約有 75% 的基因也存在於地錢中。顯示了研究地錢的系統，會同時有機會可以獲得兩物種間，早期共同祖先就已經擁有的基礎原生質絲系統，也可以獲取維管束植物植物中才演化出的蛋白質運輸調控機制。此部分的研究計畫主要分為三大主要部分：A、地錢原生質絲運輸特性分析、B、建立地錢原生質絲蛋白質體資料庫、C、利用地錢篩選原生質絲運輸缺陷的突變植物。

另外，為了針對病毒移動的機制做更深入的了解，我們也提出利用模式植物圓葉菸草（*Nicotiana benthamiana*）來探討植物病毒系統性感染。此部分的研究計畫主要分為兩大部分：A. 建立生物素（biotin）標記蛋白質系統以及 B. 探索植物病毒運輸的機制。

(一)預期達成目標(含質化或量化績效目標)

以下將以甘特圖方式，呈現短期目標中計畫的分項目標與時間軸：

	Time line				
	1st year	2nd year	3rd year	4th year	5th year
地錢原生質絲運輸特性分析					
蛋白質運輸監測系統的設置					
探索原生質絲通透可能的調控機制（創癒葡聚糖）					
參與國際研討會					
里程碑一、投稿國際期刊					
建立地錢原生質絲蛋白質體資料庫					
原生質絲純化與蛋白質體研究					
針對目標蛋白質做功能性研究					
參與國際研討會					
里程碑二、投稿國際期刊					
利用地錢篩選原生質絲運輸缺陷的突變植物					
利用運輸檢測系統做突變篩選					
鑑定突變植株所帶之突變基因及其功能					
參與國際研討會					
里程碑三、投稿國際期刊					
國際合作：化學遺傳學（與比利時根特大學合作）					
參與國際研討會					
里程碑四、投稿國際期刊					
建立生物素（biotin）標記蛋白質系統					
目標蛋白質互動蛋白體分析					
里程碑五、投稿國際期刊					
探討植物生長點抗病毒入侵機制					
系統性分析病毒互動蛋白在生長點表現情形					
突變植株篩選與生長性狀分析					
病毒感染與入侵生長點測試					
里程碑六、投稿國際期刊					

第一年預期目標：

實驗室建置：添購研究所需研究器材以及測試研究系統與聘任研究助理

研究目標：

- 在地錢中設立蛋白質運輸監測系統：光誘導螢光蛋白系統與組織專一促進子表現螢光移動蛋白系統。

- 研究地錢中創癒葡聚醣合成酶對細胞間蛋白質移動的調控影響
- 設置利用生物素標記方式探討植物病毒移動機制的系統

教學目標：課程開設

- 參與系上以及與他系合開課程
- 指導碩、博班學生
- 指導高中生命科學研究人才培育計畫學生

服務目標：加入並參與台灣植物學年會活動、參與國際研討會

第二年預期目標：

研究目標：

- 期刊投稿：針對地錢蛋白質移動系統的設置以及初步探討地錢蛋白質移動的現象撰寫論文，以及針對利用生物素標定系統來獲取病毒移動蛋白的互動蛋白質體撰寫論文。
- 下半年度預計開始運輸系統篩選
- 地錢的原生質絲純化與蛋白質體研究
- 生物素標記系統的優化與針對目標蛋白的互動蛋白質體純化與分析

教學目標：課程開設

- 參與系上以及與他系合開課程
- 指導碩、博班學生
- 指導高中生命科學研究人才培育計畫學生

服務目標：根據所上以及領域所需，積極參與相關服務項目

第三年預期目標：

研究目標：

- 優化及分析地錢原生質絲蛋白質體資料
- 針對比較蛋白質體篩選出的標基因，設計製作突變植物來探討其生理功能
- 分析互動蛋白質體，統個別基因在植物生長點細胞表現情形，篩選目標基因。再進一步設計生成突變植物。

教學目標：課程開設

- 參與系上以及與他系合開課程
- 指導碩、博班學生

服務目標：根據所上以及領域所需，積極參與相關服務項目、參與國際研討會

第四年預期目標：

研究目標：

- 期刊投稿：針對地錢原生質絲蛋白質體的分析，以及篩選出基因的生理功能探討來撰寫論文。
- 針對比較地錢與阿拉伯芥的原生質絲蛋白質體篩後選出的標基因，設計製作突變植物來探討其生理功能。
- 針對在病毒移動蛋白的互動蛋白質體中，在植物生長點有專一表現的目標基因，生成突變植物並測試其生理功能與病毒移動效率分析。
- 與比利時根特大學合作，利用化學遺傳學的方式，來挑選出可影響地錢中蛋白質移動之化合物。

教學目標：課程開設

- 參與系上以及與他系合開課程
- 指導碩、博班學生

服務目標：根據所上以及領域所需，積極參與相關服務項目

第五年預期目標：

研究目標：

- 期刊投稿：針對地錢運輸系統做突變篩選的研究撰寫論文、下半年開始撰寫與根特大學合作的化學遺傳學研究結果，另會針對植物病毒移動機制以及可能影響入侵生長點的機制撰寫論文。
- 與比利時根特大學合作，利用化學遺傳學的方式，來挑選出可影響地錢中蛋白質移動之化合物。
- 針對在病毒移動蛋白的互動蛋白質體中，在植物生長點有專一表現的目標基因，生成突變植物並測試其生理功能與病毒移動效率分析。

教學目標：課程開設

- 參與系上以及與他系合開課程

— 指導碩、博班學生

服務目標：根據所上以及領域所需，積極參與相關服務項目、參與國際研討會

(二)執行績效及目標達成情形說明(請說明達到量化或質化之具體成果與績效、對學校發展之具體助益等)

第一年績效及目標達成情形

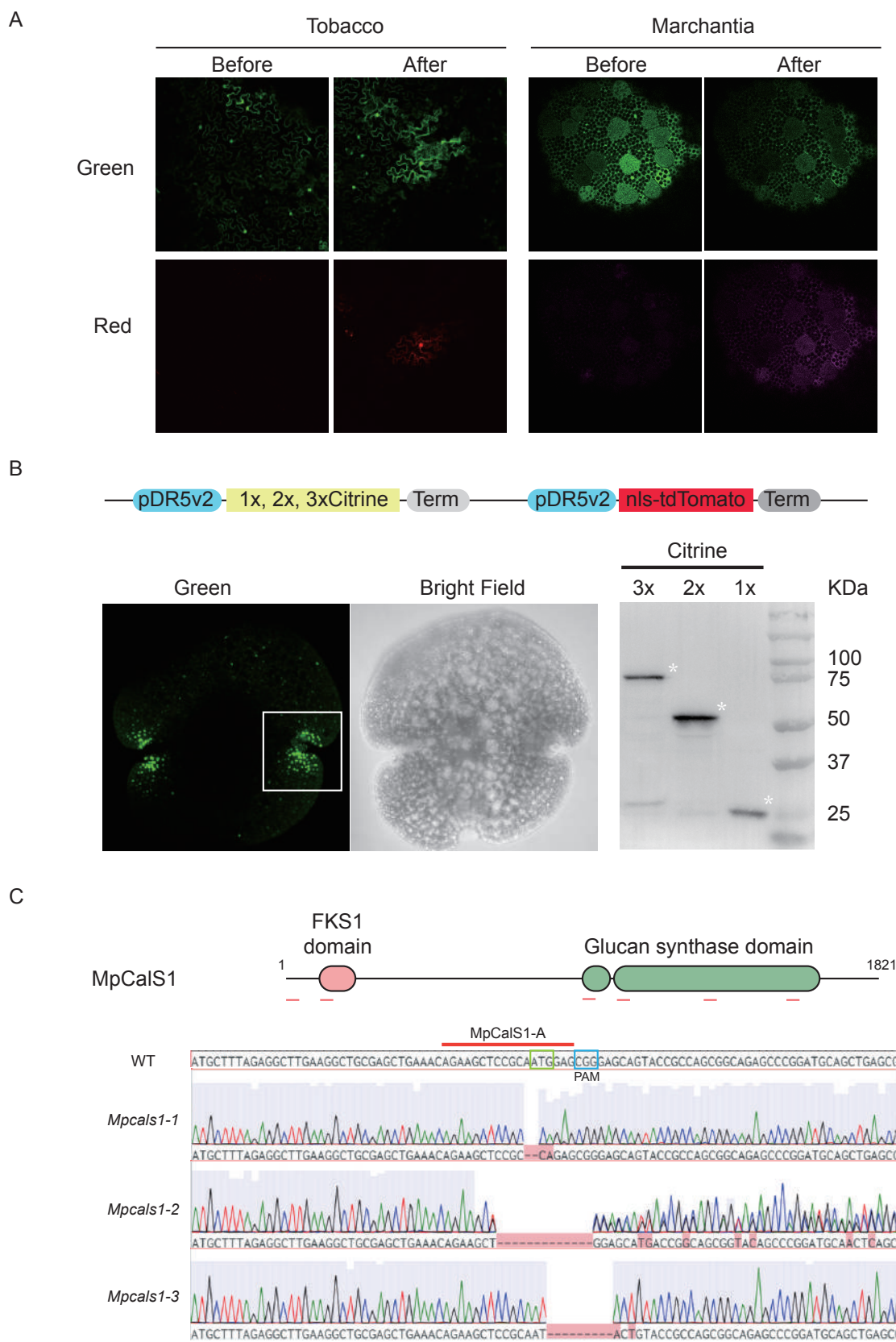
實驗室建置：

— 在科技部、教育部以及中興大學校方、生技所所方提供的幫助下，實驗室的設立非常順利（請參照報告第三部分）。多數的研究設備在短期內皆已就位，也順利徵得兩位研究助理進行研究。

— 實驗系統的設立：

目前，在地錢中利用光誘導變色螢光蛋白來探索蛋白質移動效率的系統，已經建置完成，並且在共軛焦螢光顯微鏡下可明顯的探測到螢光蛋白在經過光誘導後的顏色改變（圖一A）

此外，利用組織轉一促進子 *DR5*（圖一B）來表現不同大小螢光蛋白的載體，業已完成。目前在利用短暫表達的方式在圓葉菸草中可觀察到螢光蛋白的表現，並且利用西方墨點法可以確認載體可順利表達不同大小的螢光蛋白（圖一B）。現在正在將載體轉殖至地錢中以進一步篩選有表達螢光蛋白之轉殖植物。



圖一 實驗室研究系統建置概況。

(A) 在共軛焦螢光顯微鏡下，利用 UV 誘導螢光蛋白由綠螢光轉為紅螢光。在菸草（左）以及地錢（右）中，皆偵測到紅螢光的表

現。在地錢中，我們將整個畫面一起處理光誘導，因此誘導的強度不如菸草，但在 Red channel 螢光出現的情形仍清晰可見。

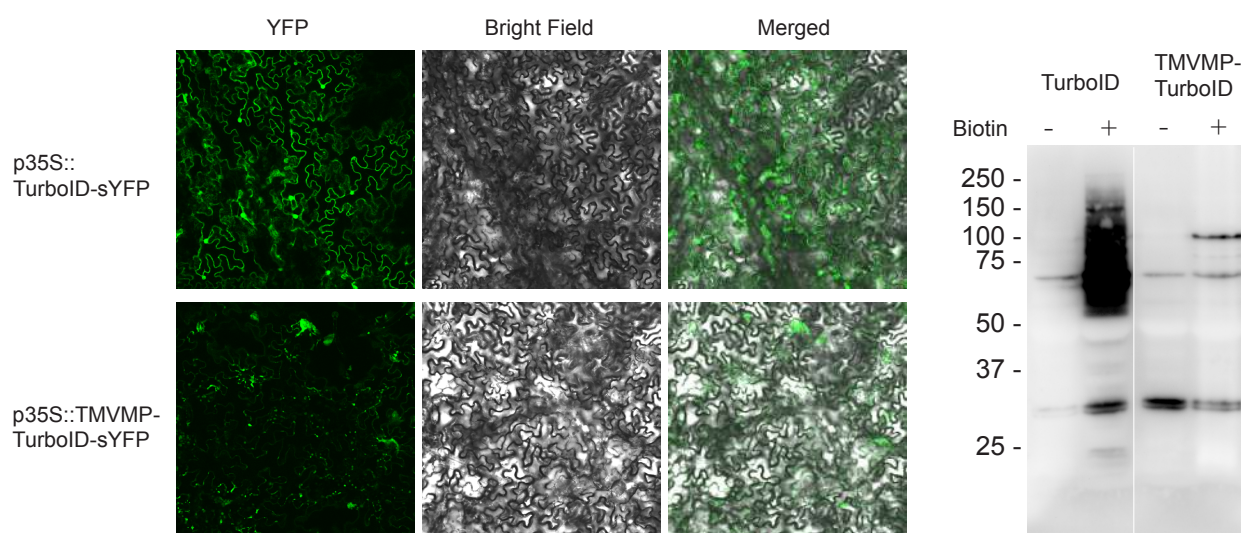
(B) 在共軛焦顯微鏡下，組織專一促進子 DR5 可在地錢生長點周圍（白色方框區域）專一表達綠螢光蛋白。使用西方墨點法，可偵測到建構好的載體可在圓葉菸草中表達不同大小的螢光蛋白。

(C) 針對地錢中創癒葡聚糖合成酶，利用基因剪輯的方式，經由定序分析，確認我們已經分離出數個潛在的突變植物。其中我們以 MpCalS1 作為範例，卡通圖表示整個蛋白質的長度，紅色與綠色長條區域為分析後得到的蛋白質 domains。在蛋白質下方的紅色線條為突變發生的目標區域。其中第一個區域的部分，經由定序後可以發現我們取得的突變植物皆有發生突變 (*Mpcals1-1* ~ *1-3*)。

在地錢中，經由生物資訊分析方式可鑑定出三個創癒葡聚糖的合成酶 (MpCalS1, 2, and 3)，利用 CRISPR/Cas 基因編輯的方式，我們正在逐步地解析單一個合成酶對於地錢生長的影響 (圖一 C)。目前發現，我們所篩選到帶有突變的植物，不論是有嵌入或是移除核酸，突變的方式都僅限於不會造成蛋白質轉譯框架移動的突變。我們推測這些創癒葡聚糖對於地錢的生長發育也許佔有非常重要的地位，以至於發生嚴重突變的植株 (轉譯框架改變而導致轉譯錯誤，使得蛋白完全失去功能)，皆無法存活。目前我們正在取樣更多植株來判定這一可能性。若推測為正確，我們可能需要利用誘導式突變的方式，讓植物在生長時不會發生突變，直到我們希望測試功能時，再誘導突變。

我們也正積極地將蛋白質利用基因工程的方式來將 MpCalS1-3 與螢光蛋白結合，以達到分析蛋白質在細胞內座落的位置以及功能性分析。

在生物素標定系統上，目前已可穩定將目標蛋白與生物素標定酶在圓葉菸草中表達，再經由生物素處理後，已可偵測到與未處理植物間蛋白質標定的差異。將在下個年度進行純化與分析，以期了解蛋白質互動的機制與調控蛋白移動的原理 (圖二)。



圖二 生物素標定技術發展

在共軛焦螢光顯微鏡下，受到膿桿菌浸潤感染的煙草葉表皮細胞中，可明顯偵測到生物素標定酶的表現。此外，在處理生物素後，利用西方墨點法，我們可以明顯地偵測到圓葉菸草內有大量蛋白質接收到生物素標定。

課程開設的部分，目前在所有有與其他老師合授分子植物發育，並且獨立開設植物訊息傳導的課程，也即將在研究生加入後，開設專題研究與文獻選讀的課程。在其他課程上，目前也與園藝系老師合授大學部分分子生物學的課程。

學生指導上，由於是第一年加入，目前尚未有研究生。在 110 年上學期開始後，將會有 2 位碩士班學生加入。此外，希望能夠徵求博士後研究人員加入，以增加研究室的研究量能。在下個執行年度中，將會指導高中生人才培育計畫內的幾位學生，以培植優秀的青年學子，帶動新一代研究新血。

最後在服務方面，在去年已加入台灣植物學年會，並在植物分子夏令營活動中，參與最佳論文評比與最佳壁報評比的評審工作。在國際上，也負責擔任相關領域的論文評鑑人員 (*Frontier in plant science*)。另外，在今年的 intercellular communication and plasmodesmata in plant development and disease meeting (11-16 July 2021) 線上研討會中，已與多位學者有交流討論，未來會再持續參與國際間的交流活動。

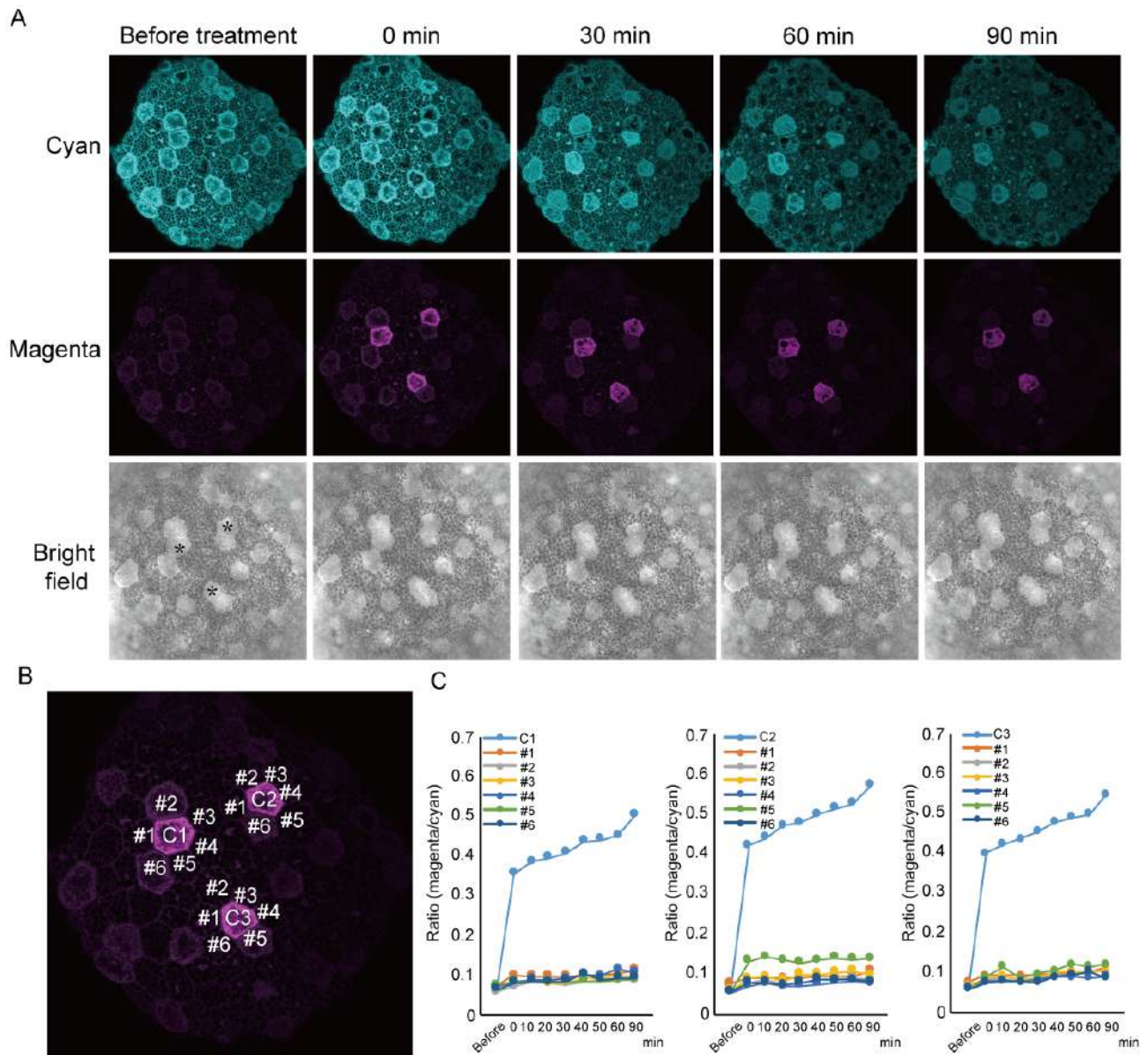
第二年績效及目標達成情形

研究目標：

地錢原生質絲特性分析：

在維管束植物中，利用組織專一性 promoter 表現不同倍數的綠色螢光蛋白(1x, 2x, 3xGFP)的方式得知，在接近分生組織以及年輕(sink tissues)組織的部分，原生質絲允許約 60kDa 大小的物質擴散通過。由於結構上，地錢的原生質絲與維管束植物並無明顯的特異性，因此，我們假設地錢與維管束植物原生質絲的通透性不會有明顯的特異性。為調查此一特性，我們利用第一年執行計畫時所設立的光誘導變色螢光蛋白來測試其移動特性。

我們利用了專一誘導的方式，將地錢初生芽的表皮細胞中，假根前驅細胞內的螢光蛋白做光轉換，來觀察螢光移入周圍細胞的情形。出乎意料的是，此大小約 25kDa 的 mEOS3.2 蛋白，在



圖三、mEOS3.2在觀測的90分鐘內，無明顯移動現象

A，單一細胞光轉換實驗的時間序列影像。明視野圖中的星號代表著處理光轉換的假根前驅細胞。B 和 C，mEOS3.2蛋白質移動數據化是將洋紅頻道中，光轉換細胞以及周圍細胞偵測到的數值，除以相同細胞在青色頻道中偵測到的數值。B 圖中標示了在C圖中數據化的細胞。C，受到光誘導的細胞（C1、C2、C3）的光轉換可以明顯在T0時被偵測到，然而幾乎所有周圍細胞，在偵測的時間內（90分鐘），紅/青數值的比例皆非常穩定，表示光轉換後的mEOS3.2蛋白質，在這段時間內沒有從被誘導的細胞移動到周圍細胞。

我們觀察的時段（90 分鐘）內，並沒有移動到周圍細胞的現象（圖三），與我們所假設的現象不同。因此，我們提出兩個可能的假設：一、地錢的原生質絲通透性與維管束植物不同，只能通透小分子物質。二、由於我們所觀察的樣品是初生芽，在尚未接觸水分前，初生芽是身處冬眠狀態。在維管束植物中，分生組織與種子的冬眠都與原生質絲的閉合有密切關係，並且會受到植物荷爾蒙 ABA 的調控，我們因此推測是因為初生芽在冬眠狀態下，原生質絲處於關閉狀態，而無法通透 mEOS3.2。

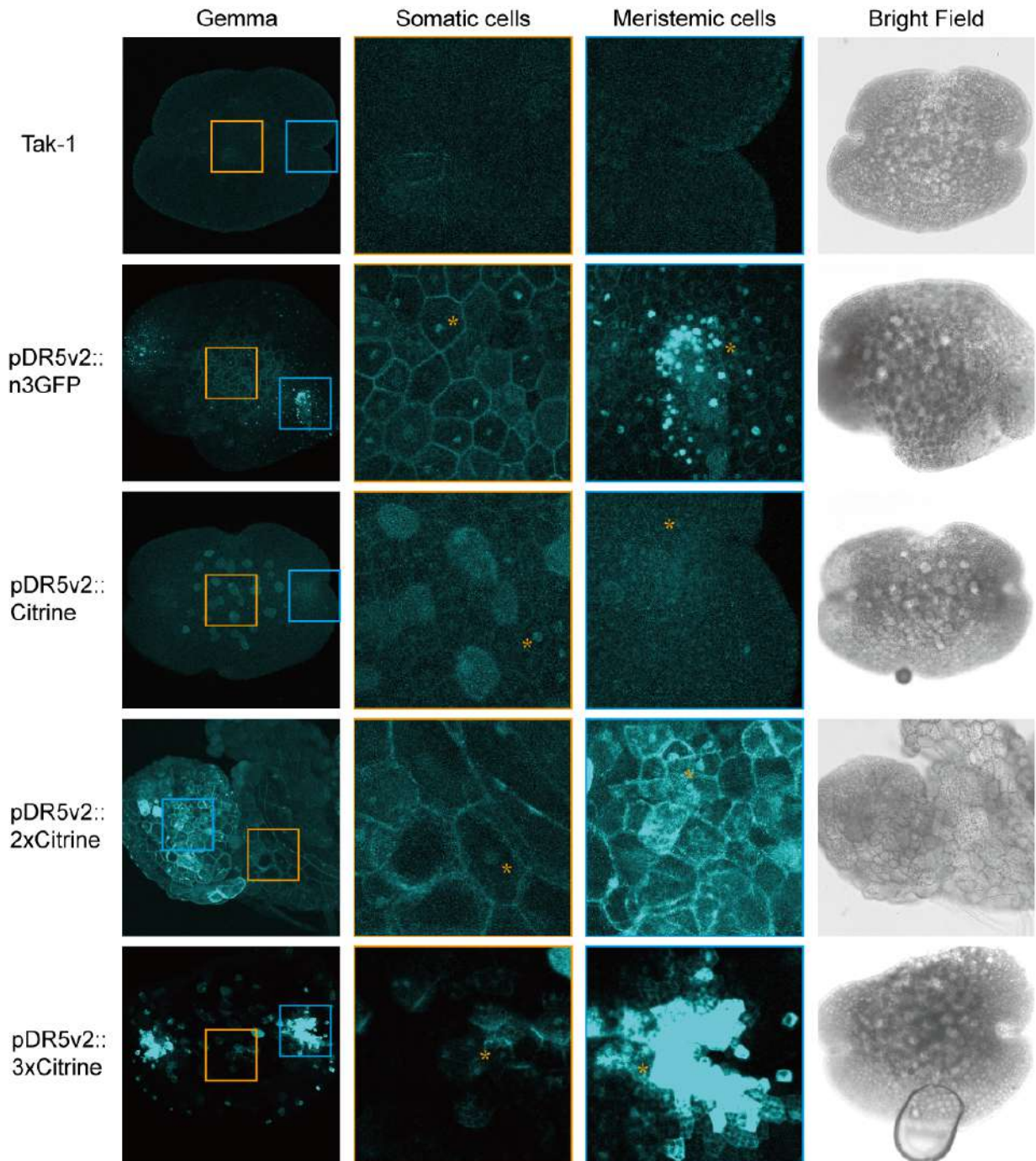
為了進一步了解以上推測何者為真，我們將進行一系列的測試：

一、利用小分子螢光物質 CFDA (5-Carboxyfluorescein diacetate) 來測試地錢初生芽以及脫離冬眠後的芽體原生質絲的擴散狀況。二、利用光轉換螢光系統來測試脫離冬眠後芽體細胞間，是否逐漸可以運輸 mEOS3.2。三、利用基因槍將 mEOS3.2 在成熟地錢表皮細胞短暫表達，觀察 mEOS3.2 是在成熟地錢中，可以如預期的移動。

目前部分實驗正在進行中，相信很快可以得到足夠訊息來了解地前緣升值絲的特性，我也將會著手進行論文撰寫，希望可以將目前的研究成果發表。

運輸系統篩選：

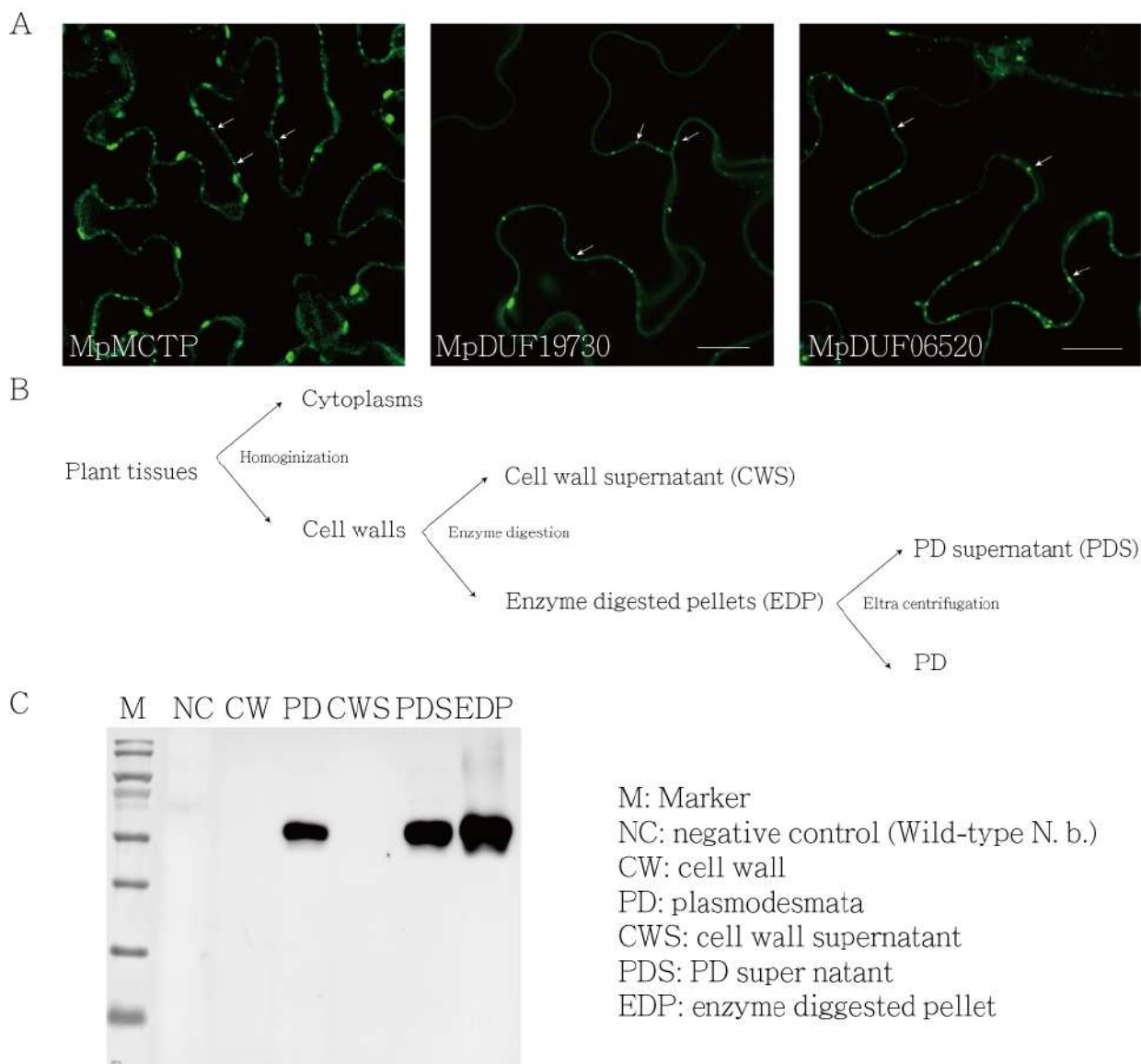
在取得了 DR5v2::1x, 2x, 3xCitrine 的轉殖植物後，我們利用最新一代共軛焦螢光顯微鏡的時間解析螢光光譜系統 (Fluorescent lifetime imaging microscopy, FLIM) 來進一步詳細分析轉殖植物螢光表現的位置，以定義蛋白質移動的現象。然而，當我們觀察轉殖植物後發現，除了過去可見的生長組織部位，有相當強的螢光表現外，過去認為沒有螢光表現的位置，我們也發現了較



圖四 DR5v2 promoter 在地錢芽體的表現情況。

利用Leica Stellaris共軛焦螢光時間解析系統拍攝的轉殖植物螢光影像。所有轉殖植物拍攝的設定皆與Wild type Tak-1相同。與過去一般共軛焦顯微鏡下拍攝的狀況相似，pDR5v2::n3GFP在生長點部分（藍色匡線部分）有相當高的表現。然而，在其他細胞（橘色匡線部分），也可以很明顯看到較弱的螢光訊號。在所有轉殖植物中，我們皆有發現生長點與其他細胞皆有相似的表现情况。第二與第三列影像分別是第一列影像的放大，橘色星號代表偵測到細胞核的訊號。

微弱卻穩定表現的螢光（圖四）。由於此系統是為了接著以化學基因體方式來篩選調節移動的化合物，因此，螢光對比的強度需要有足夠的差異，才能夠讓篩選容易進行。目前我們手上的轉殖植物並不適合此一目標，因此，我們預計另外選用其他已知的組織專一的 promoters (*MpFRHpro*, *MpRSL3pro*) 來重新構築此系統。預計會有半年左右的時間差。



圖五、原生質絲分離技術

A、利用生物資訊技術分析所取得，潛在能座落在地錢原生質絲蛋白質，在菸草表皮細胞表現之情形。利用農桿菌短暫表達方式，將地錢的三個蛋白質與綠色螢光蛋白結合後，可明顯觀察到座落在菸草表皮細胞的原生質絲位置（白色箭頭表示）。

B、原生質絲分離流程圖

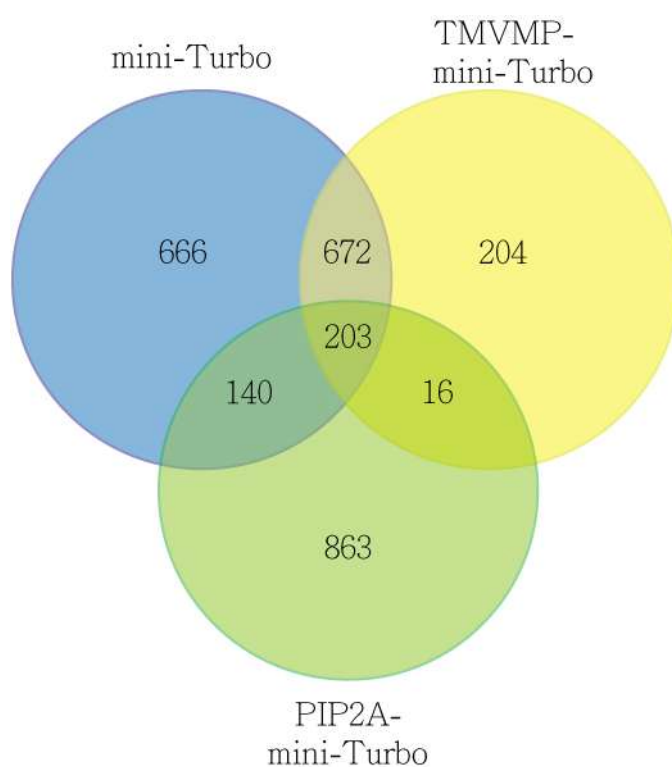
C、將表達有p35S::MpMCTP-GFP的菸草，經過原生質絲分離後，在western blot分析之下可發現，在未經酵素消化前，基本上都無法偵測到訊號。只有在酵素處理後，可偵測到MpMCTP-GFP，雖然仍有部分蛋白無法完全沈澱，但是在PD fraction可清晰偵測到訊號。

地錢的原生質絲純化與蛋白質體研究：

為了進一步了解原生質絲結構上的演進，我們計劃分離地錢的原生質絲並進行蛋白質體的分析。在正式進行分離前，我們計劃先篩選可能座落在地錢原生質絲的蛋白質作為標定蛋白。為了達成此目標，我們利用生物資訊方式，分析了數個已知會座落在阿拉伯芥原生質絲的蛋白在地錢中的相似基因。目前，我們已經分析了 6 個已知的基因，其中四個蛋白質的地錢相似基因，再接上螢光蛋白後利用短暫表達，也會抵達圓葉菸草的原生質絲（圖五）。我們利用其中一個蛋白質當作標定，進行了圓葉菸草的原生質絲分離。我們在分離的過程中，分別紀錄了細胞壁碎裂的情況、纖維素酶作用的效率以及最終分離出的原生質絲中，標定蛋白存在與否。我們發現，目前我們的 protocol，可以有效地粉碎細胞壁，並且在纖維素酶作用後，將大多數的纖維素分解，最終分離出來的原生質絲，也包含有大量的標定蛋白（但仍有等量的標定蛋白在懸浮溶液中）（圖五）。因此，我們確認我們的原生質絲分離方法，可以有效地分離原生質絲。目前，我們正在將篩選出來的標定基因轉殖到地錢中，將在取得轉殖植物後，進行原生質絲的分離以及蛋白質體的分析。預計一年之內應可得到目標資訊。

生物素標記系統的優化與針對目標蛋白的互動蛋白質體純化與分析：

為了更詳細的了解，植物細胞間，如何透過原生質絲運輸蛋白質，我們建立了生物素標記系統，並且確認了已知會在植物細胞間移動的菸草鑲嵌病毒的移動蛋白（TMVMP），在接上了生物素標記系統，仍可以準確地抵達原生質絲後（圖二），我們便開始著手進行生物素標記、親和力沈澱以及蛋白質體的分析。最初，我們利用沒有連接 TMVMP 的生物素標記系統作為控制組，分別進行了三次得標定，並且進行蛋白質體的分析。其中，在扣除了與控制組重疊的蛋白質清單後，我們得到了約 350 個潛在 TMVMP 的互動蛋白清單（圖六）。目前，我們正針對這個清單，再進一步的分析其參與的生理路徑。在初步的分析中，我們發現，有許多細胞內蛋白質運輸的相關蛋白，有被生物素標記，因此，我們計劃針對這些基因，進一步利用病毒誘導的基因靜默技術，來將圓葉菸草的目標基因靜默，並且觀察 TMVMP 的位置以及運輸，是否會受到這些基因的調控。



圖六、利用生物素標定方式篩選與TMVMP移動相關之蛋白質

以散佈在細胞質及細胞核中的mini-Turbo以及分布在細胞膜上的PIP2A蛋白質作為背景，篩選出約200個只在TMVMP-mini-Turbo表現時，被生物素標記的蛋白質。

然而，由於 TMVMP 在生成後，可觀察到的位置皆在細胞的膜狀系統中，因此，我們希望利用也是膜狀系統中的蛋白質來當作另一個對照組。我們選用了已知會座落在細胞膜上的 PIP2A 蛋白質，在接上了生物素標記系統後，我們也確認了 PIP2A 可以抵達細胞膜，並且在生物素標記、蛋白質體分析後，我們發現有部分潛在 TMVMP 互動蛋白，也會與 PIP2A 互動，因此，我們將清單縮小到 204 個基因（圖六）。在接下來的研究中，將會進一步挑選目標基因，來進一步探討這些基因與 TMVMP 之間的互動關係以及是否參與在 TMVMP 在細胞間移動的機制中。

課程開設部分：

除了之前已經參與的部分（合授分子植物發育、合授大學部分分子生物學）外，新開植物訊息傳導學碩課程（合授），並且參與英語授課之農業生物科技導論（合授）。在新的學期也會加入生物技術原理課程的合授教師行列。

指導學生：

目前有兩位碩士班學生（一升二），並且也已經確定將指導兩位新入學碩士學生以及一位外籍碩士學生。此外，今年（2022）初，實驗室招聘到了一位博士後研究人員，開始新的研究方向，期望新的一年，研究動能可以更上一層樓，開始有產出。

服務方面：

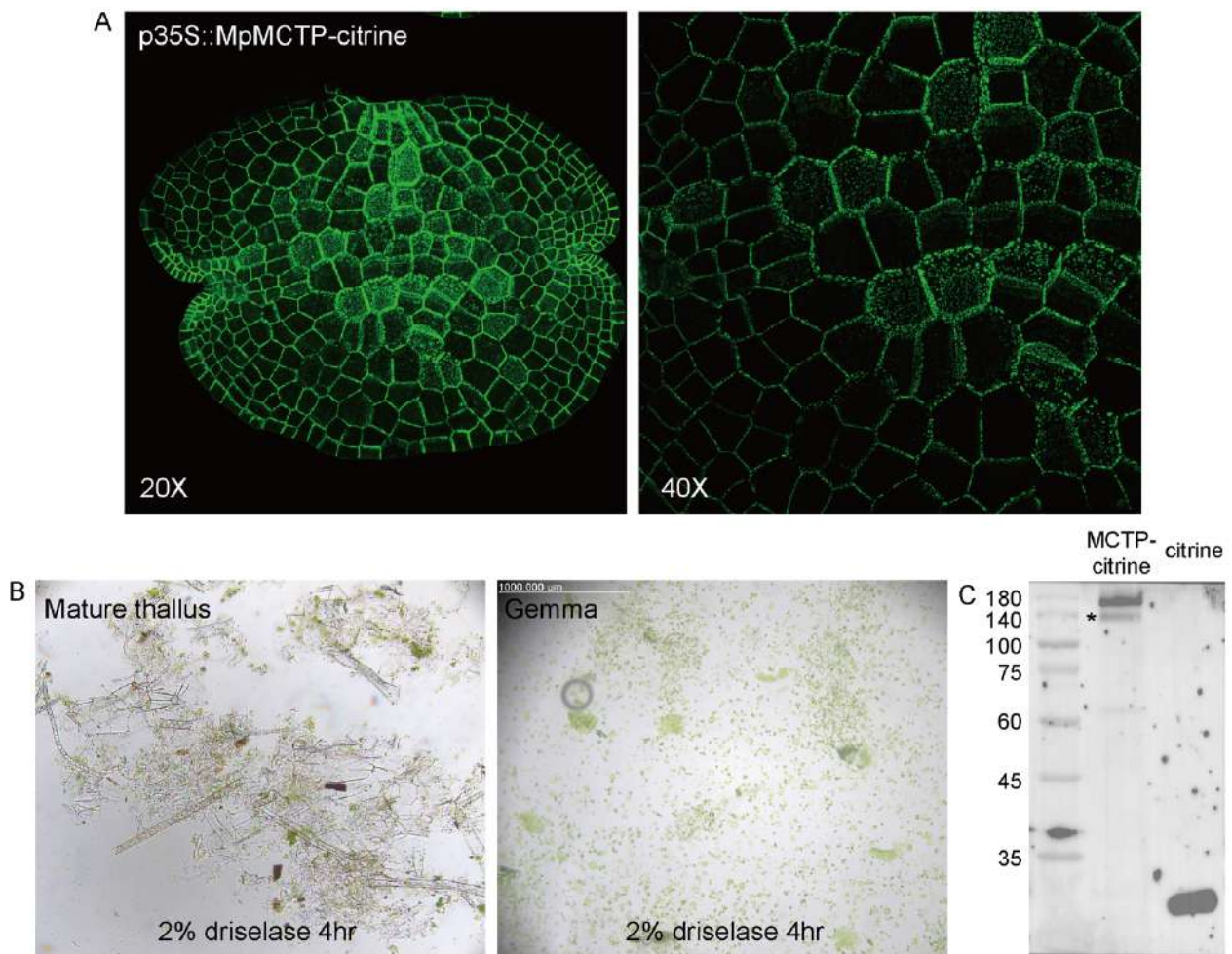
在過去一年指導了明道高中的三位高中生執行科展研究計畫，很榮幸地得到中區生物組的第二名（第一名從缺），獲得學校高度肯定也頒發感謝狀一張（請參考照片部分）。另外，也參與了台中市北屯區松竹國小的科展團隊，此團隊也勇奪中區第三名，學校也頒發感謝狀一張（請參考照片部分）。在去年執行招生海報製作、碩士甄試入學委員、科技部生科司大專生研究計畫評審。今年也擔任碩士班入學考試命題教師，也參與製作招生廣告，並且擔任所上 EMI 課程規劃教師，積極參與學校相關事務。今年也受邀擔任國際知名期刊 *Science advance* 的 reviewer，替國際學術研究領域提供專業領域的建議。最後，參與今年台灣植物學會舉辦的“後疫情時代之前沾植物科學與永續農業研討會”之協辦單位，幫忙處理場地預訂與協調部分廠商贊助。

第三年績效及目標達成情形

研究目標：

優化及分析地錢原生質絲蛋白質體資料：

在第二年的報告中，我們針對了 p35S::MpMCTP-Citrine 轉殖菸草測試了原生質絲的分離，發現在經過纖維素分解後的 fraction 可以偵測到大小約 60KDa 的條帶（圖 5C）。然而這一分子量大小與預測的大小(130KDa)有相當大的落差，後來經過進一步分析發現此為纖維素分解酶的殘留，因此才會只在添加纖維素分解酶後，才會被偵測到。因此，我們不是非常確定我們的原生質絲分離是否如我們預期。為了進一步了解分離效率，我們製作了 p35S::MpMCTP-Citrine 的轉殖地錢（圖七 A），並且改用了來自真菌的漬漬酶（driselase）來分解細胞壁。



圖七、地錢原生質絲分離

（A）地錢p35S::MpMCTP-citrine在轉殖植物中的表現位置confocal圖。由左圖中可見，MCTP-citrine座落在細胞的周圍。然而當我們用較高倍率的物鏡觀察時，可明確觀察到MCTP-citrine在細胞周圍形成點狀分佈，與已知原生質絲的分佈相似。甚至當對焦在兩細胞間，可以很清晰地看見亮點分布在此平面上，顯示MCTP在細胞間的分布非均勻，而是有聚集的狀態。（B）幼年時期的gemma可被driselase所分解，而mature thallus則無法被分解。在2% driselase處理四小時的情況下，可以發現成熟的thallus仍然處於多數細胞非常完整的狀態。相對的，在同樣處理條件下，gemma的細胞幾乎被完全釋放出來。（C）轉殖的p35S::MpMCTP-citrine地錢在直接萃取蛋白質做western blot的情況下，可以得到在約140KDa（黑色星號處）大小的條帶，表示轉殖植物確實有表現MCTP-citrine。

我們利用了年輕的孢芽（gemma）與成熟的葉狀體（thallus）測試細胞壁分解效果，意外的發現，年輕時的 gemma 才可以被 driselase 分解（圖七 B）。為了確保轉殖的地錢 MpMCTP-citrine 蛋白質可以被抗體辨認，因此我們接萃取了轉殖 p35S::MpMCTP-citrine 的地

錢，以 western blot 確認可以偵測到 phusion protein (圖七 C)。最終，我們利用了約七天大的 gemma 來測試原生質絲的分離。目前，已經順利分離出好的原生質絲 fraction，即將在近期做蛋白質體分析，相信會有相當好的結果出現。

此外，在去年製作的 TMVMP 互動蛋白質體中，我們利用生物資訊分析法，將蛋白質依照功能分類，發現有約 20 個蛋白質是參與在蛋白質從細胞內向細胞外運輸的機制中，與 TMVMP 細胞間移動關聯性相當高。因此，我們挑選了其中的五個基因來測試與 TMVMP 移動的影響。我們利用了菸草中早已成熟的 virus induced gene silencing (VIGS) 技術，針對這五個基因做 silencing，並且利用基因槍的方式，將 TMVMP-GFP 表現在 silencing 的葉下表皮，可以觀察 TMVMP-GFP 在細胞內座落的位置以及移動的效率。

為了確認我們可以觀察到移動的情形，我們採用了已知的 TMVMP-GFP 來測試。在未做處理的菸草下表皮中，可以明確地看見，當利用基因槍將 35S::TMVMP-GFP 的質體送入單一細胞中，TMVMP-GFP 會聚集在細胞周圍的原生質絲上，以點狀呈現 (圖八 A)。除了表現的細胞的位置外，我們也可明確的觀察到 TMVMP-GFP 移動到細胞外的情形，周圍細胞也同時可以觀察到螢光聚集在細胞周圍以點狀呈現的現象 (圖八 A)。為了明確的瞭解 VIGS 處理後，gene silencing 的成效，我們在 VIGS 處理後，利用 qPCR 的方式測試目標基因 mRNA 量的差異 (圖八 B)，我們可以很明顯地看見，針對不同基因，VIGS 的影響有所不同，不過皆有 30-60% 左右的表現亮差異。

在確認 VIGS 有成功的造成差異後，我們便針對不同的 silencing 植物，利用 agroinfiltration 的方式將 TMVMP-GFP 表達，並觀察其座落位置的變化。目前，我們已針對了五個基因測試了 TMVMP-GFP 在細胞內位置變化的測試。在直接的觀察下，我們並沒有發現 TMVMP-GFP 在細胞內位置有明顯的變化 (圖八 C)，由於在菸草中利用 gene silencing 無法將目標 mRNA 完全 knock out，而 agroinfiltration 需要約 24-48 小時後，才能觀察到 TMVMP-GFP 的累積。因此，可能我們的 gene silencing 造成了 TMVMP-GFP 抵達的時間有差異，卻因為觀察時間太落後，無法觀察到與控制組有差異。

為了進一步確認，我們的推論是否正卻，我們改用基因槍的方式，將 TMVMP-GFP 表現在單一細胞中。若是我們的推論正確，雖然基因槍的實驗也需要約 48 小時後才觀察，但是因為移動的效率會有差距，我們應該可以看到擴散距離的差異。目前，我們已經測試了兩個目標基因，可以明顯看到，在 VIGS 處理的植物中，TMVMP-GFP 移動的距離，在相對的時間中，有明顯的下降 (圖八 D)，顯示我們所篩選的的基因，真的與 TMVMP-GFP 的移動有關係。

此外，在目前的測試中，我們發現，我們所篩選出來的蛋白質，多數與蛋白質在細胞間移動的機制有相關，與原生質絲相關的基因幾乎都沒有互動。其中一個可能性是原生質絲蛋白佔細胞內總體蛋白的比例很低，在我們的萃取方法下，很難被分離、鑑定。因此，我們利用了目前已設立的原生質絲分離技術，搭配 TMVMP-miniTurbo-sYFP 的標定，希望能進一步辨認出原生質絲蛋白質體中，有哪些蛋白質會與 TMVMP 靠近？藉此我們想鑑定出潛在于原生質絲上的 TMVMP receptor。目前，原生質絲的分離已在順利進行中，希望在下一期的報告中，可以有進一步的研究成果。

原生質絲突變植物篩選：

過去的兩年，在原生質絲突變篩選的進程中，遇到許多挑戰。第一是專一表現的 promoter 並非想像中專一（圖四，P5），再重新選擇了報導中會專一表達的 promoter 後，我們仍舊可以觀察到多數細胞會表達的狀態。因此，我們決定重新利用較為成熟的阿拉伯芥系統。在阿拉伯芥中，在維管束篩管細胞旁的伴細胞，利用原生質絲與篩管細胞相連，提供主要的物質來源支持已不具細胞核及多數胞器的篩管細胞的需求。利用在伴細胞表達的 SUC2 promoter 表達 GFP，可以觀察到 GFP 會擴散到阿拉伯芥的整個根部。當利用創癒葡聚糖合成酶 (Callose Synthase, CalS) 來增加原生質絲周圍的創癒葡聚糖 (callose) 時，GFP 將會被滯留在維管束中。因此，我希望利用 pSUC2::GFP 的轉殖植物，來執行化學基因體學的測試。然而，在合作夥伴的系統中，這個系統的表達強度，無法直接使用，這是我們目前遇到的第二個難點。為了克服這個困難，我們希望採用我博士後時期的研究材料來進一步測試。

過去，我們研究了一個可以在細胞間移動，調控阿拉伯芥胚胎發育的蛋白質 TARGET OF MONOPTEROS 7 (TMO7)。TMO7 的 promoter 在胚胎中的基部表達，而蛋白質卻會移動至與母體連接的 suspensor，影響根的決定。在成熟的根中，TMO7 也有相似的移動狀態：TMO7 promoter 表現在跟冠細胞的周圍，然而蛋白質卻可以移動到根尖。目前，我們正在確認是否這個系統，可以有足夠的對比，當 TMO7-GFP 不移動時，根尖應該會呈現透明，而 TMO7-GFP 移動的狀況下，根尖應該會完全地散發螢光。如果這個系統可行，我們將在接下來的一年中，執行化學基因體的測試實驗。

雖然目前突變植物的篩選，依舊是困難重重，但是這個研究的潛力還是相當吸引人。因此，為了能夠最大化執行的可能性，在這次參與國際阿拉伯芥研究研討會的過程中，遇到了在地錢中研究生長點發育的 Dr. Hirakawa，並且獲得了可在地錢生長點表達的兩個專一 promoter。目前，我們也已經製作好 promoter::citrine 以及 promoter::nls-tdTomato 的質體，期待在短期內可以獲得轉殖植物，也許在兩相比較下，可以明顯看出蛋白質移動與否，是否可以給予很明顯的對比。若此系統可以順利，從阿拉伯芥篩選中所得到的化學物質，將會用來測試在地錢中是否也可以影響原生質絲的通透。

教學目標：課程開設

除了之前已經參與的部分（合授分子植物發育、生物技術原理、合授大學部分分子生物學）外，也已開設植物訊息傳導學碩課程（合授），與英語授課之農業生物科技導論（合授）。在今年暑假也參與院所開設的暑期國外農業訓練課程（英語課程）。

指導學生：

今年順利的指導兩位碩士班學生取得碩士學位，而實驗室目前有六位碩士班學生：碩一升碩二，三位（包含一位外籍學生），確定將指導三位新入學碩士學生，開始新的研究方向，期望新的一年，研究動能可以更上一層樓。

照片

一、實驗室建置：

在科技部哥倫布計畫以及教育部玉山青年學者補助的幫助下，實驗室的建置非常順利的完成。以下為實驗室現況



二、參與服務部分：

一、在 109 學年度分別擔任私立明道中學科展指導教授，以及台中市北屯區松竹國小科展顧問，榮獲學校頒發感謝狀各一張。



二、於 112 年七月分，加入院際課程 - 國外農業培訓，帶領學生至日本大學交流訪問，期間並發表專題演講。

<p>始業式（丸山院長 致詞）</p>	<p>磯部老師 講述日本農業概況</p>
<p>窪田老師 講授 根圈溫度調節系統</p>	<p>參觀窪田老師溫室</p>



上吉原老師 講解番茄與草莓氣味分析的發展與應用



參觀上吉原老師果園 藍莓採摘活動



大田果菜市場 參訪



贈與 解說人員 紀念品

三、國際合作部分：



一、於 2022 年五月，出訪荷蘭、奧地利合作單位進行交流，並發表演講

二、於 2023 年三月，邀請荷蘭 Wageningen University and Research, prof. dr. Dolf Weijers 來訪及演講，圖為 prof. dr. Dolf Weijers 與中興大學玉山學者 dr. Wilhelm Gruissem、中興大學生化所所長楊俊逸博士以及中研院植微所吳亭穎助理研究員餐敘。



三、於 2023 年三月，至日本千葉縣參與國際阿拉伯芥研究會議，並發表海報

