

魚類性別決定與分化的分子遺傳學研究概況

黃家富、劉富光

水產試驗所淡水繁養殖研究中心

前言

邁入 21 世紀，人類面臨人口增長、糧食短缺、資源衰退及環境惡化等世界性的問題，特別是 SARS 與禽流感等傳染性疾病可經由禽畜食品感染給人類，故水產品作為較安全的蛋白質來源更受到各國政府與學者專家們的認同與關注，因而，可持續性發展的養殖漁業已成為眾所關注的時代主題，時下則成為開發國家積極發展的重要產業。為進一步獲得養殖魚類的生殖生物學知識，有效進行人工育種繁殖、揭開魚類兩性生長與對環境適應力差異的遺傳原因，魚類性別決定機制的究明是重要關鍵之一。

有性生殖生物之雌雄性別的分化包括性別決定與性別分化 2 階段，而目前對魚類性別決定與性別分化中具有關鍵作用的基因或染色體區域所知甚少，研究過程也從魚類基因組中尋找與哺乳動物相同的性別決定之同源基因，逐漸轉向尋找魚類自身的性別決定基因。魚類染色體上有關性別決定的基因數量仍然未知，通常性染色體是上位性的，但有時位於體染色體上基因的作用，可能超過性別決定基因，而且在不同種類，體染色體在性別決定中的相對作用強度是不同的。

下面就常見的、研究比較多的幾類性別決定基因做一簡單介紹。

性別決定基因

一、性別連鎖基因 (Sex-Linked gene)

Matsuda 等 (1998) 分離到了青鱈魚的性別連鎖基因 SL 1 和 SL 2，並用 Southern 印跡證明 SL 2 是一重複序列基因。Sakamoto 等 (2000) 繪製了虹鱒微衛星連鎖圖譜 (Linkage map)，發現雌魚與雄魚在染色體端區的重組率有所差異。Almeida 等 (2000) 用 C 帶染色技術分析了一種電鰻 (俗稱 Eigenmannia)，在雄魚 Y 染色體中心粒區與雌性相應端區，發現 Y 染色體上存在少量 G + C 豐富區，且認為此現象可能在魚類性別基因分化中較廣泛出現。

二、重複序列 (Banded Krait Minor, BKM)

重複序列是基因進化的源泉之一。微衛星序列 (如 GATA) 在鳥類和爬行類的性別決定中有一定作用，也是性染色體標記 (marker) 之一。Wachteld 等 (1991) 以 BKM 為探針與魚類基因進行雜合研究，發現具此類重複序列的同源基因片段，但並未顯現具有性別決定的特異性。Nanada 等 (1993) 以合成的特異簡單重複序列作為探針，對鱸科 (Poecillidae) 中某些魚種進行 DNA 雜合分析，結果出現了性別特異的雜交圖譜，再結合染色體的 C 帶染色技術，證明孔雀魚

(*Poecillia reticulata*) 之雄魚為異型染色體，而在黑摩利 (*P. sphenops*) 卻是雌魚為異型染色體；因此認為重複序列在性染色體異型化的進化中，可能有一定的作用，但是否構成性別決定基因，則有待進一步研究。

三、芳香化酶基因 (Aromatases gene)

芳香化酶是屬於細胞色素 *p* 450 家族的一員，更是類固醇激素代謝中重要的酶類，為雄性激素轉化為雌性激素的主要關鍵酶，在魚類性別分化中是必要的。

Baroiller 等 (2001) 研究虹鱔和尼羅吳郭魚的性分化期，發現芳香化酶在所有 XX 性腺中呈高濃度的表現，而在 XY 性腺中濃度卻很低。Kitano 等 (1999, 2000) 研究日本比目魚 (*P. olivaceus*) *p* 450 芳香化酶基因的調控機制，用芳香化酶抑制劑 Fadrozole 與 17- α 甲基甾固酮來抑制魚體之芳香化酶的表現，結果在全雌後代中獲得雄性個體；若同時給予 Fadrozole 與 17- β 雌二醇時，因二者作用相互抵消，則無雄性出現。Kwon 等 (2002) 分別在低溫 (28°C) 與高溫 (36°C) 環境下，用芳香化酶抑制劑 AI 處理吳郭魚，結果在兩種溫度下都使遺傳型雌性尼羅吳郭魚轉化成雄性表現型，這可確定芳香化酶基因在遺傳性別決定與溫度性別決定中扮演關鍵角色。

由於芳香化酶在脊椎動物雄性個體生殖中的調節機制較為複雜，目前只知道與性激素含量的變化有關，至於與其他因素的關係，還需進一步探討。

四、*SRY* (Sex related Region of Y) 基因

Sinclair 等 (1990) 無性複製 (Clone) 到人類 Y 染色體區域內的一個新的候選基因—

SRY，同時也在小鼠 Y 染色體發現類似的基因，經證實 *SRY* 基因是哺乳動物性別決定過程中，睪丸決定因子 (Testis determining factor, TDF) 的主宰基因。*SRY* 基因具有高度進化保守性，在其他的動物如鳥類、兩棲類、果蠅及魚類中也都發現 *SRY* 的同源基因。*SRY* 盒基因 (*SRY* box gene) 的發現及其保守性，為性別決定機制等的研究提出新的研究課題。

Tiersch 等 (1992) 證實在美洲河鯰 (channel catfish) 之雌雄個體及經激素誘導性轉變之個體，均可發現與 *SRY* 探針結合的同源基因片段；近年來，中國的研究者陸續從泥鰱、大鱗副泥鰱、刺鰱、鯽魚和黃鰱中得到有關 *SRY* 基因同源性的類似實驗結果，但卻未發現與性別有關的特異雜合帶。所以 *SRY* 基因不是魚類性別決定的因子，但是否如同哺乳動物，對性別決定的下游基因 (如 *Sox 9* 基因等) 具有調控作用，目前仍尚待證實。

五、鋅指結構基因 (Zinc-Finger-Y gene, *ZFY*)

Ao 等 (1994) 首次報導的性別決定基因，位於人類 Y 染色體短臂的 Ucd0 43 區，是繼 *SRY* 之後又一個與性分化有關的單拷貝基因。但是後來發現有袋動物和單孔目動物之 *ZFY* 被定位於體染色體上，而且小鼠實驗也不支持 *ZFY* 是 TDF。然此基因所編碼的蛋白質在結構上是由氨基酸構成的許多指狀環組成，中間由鋅橋連接，因此稱之為“鋅-指”蛋白。這種蛋白質具有明顯的可與 DNA 結合的結構特徵，因而可能參與基因表達調控。

但以 *ZFY* 片段為探針，在斑點叉尾鮰、

金擬花鱸 (*Anthias squamipinnis*)、虹鱒等魚種中不能產生性別特異性雜合帶。故該基因被認為不是性別決定的主要信號，而可能是在性別分化的級聯作用 (Cascade effect) 中，擔任某一角色或是作為轉錄因子功能。

六、*DAX-1* 基因 (*DSS-AHC critical region on the X chromosome gene 1*)

在人類找到 X 染色體劑量敏感性反轉決定區 (Dosage sensitive sex reversal, *DSS*) 上的候選基因—*DAX-1* 基因，該基因編碼具 470 個氨基酸的核酸蛋白，該蛋白質與 DNA 結合並調控轉錄，顯示 *DAX-1* 可能在雄性發育時具有劑量敏感的抑制作用，而促進雌性發育。應用此高等脊椎動物中的性別特異之探針 *DAX-1* 和 *SRY*，在虹鱒、鯉魚中進行基因組 Southern 雜合分析，結果均未發現性別特異性基因片段。Wang 和 Kobayashi (2002) 運用 RT-PCR 和 5'RACE、3'RACE 技術無性複製到尼羅吳郭魚的 *DAX-1* 基因，其在成年雌魚與雄魚的組織中都檢測到，尤其在精巢中表現濃度最高；在性腺發育過程中 *DAX-1* 的表現無性別差異，但在性別分化的關鍵時期卻發現 *DAX-1* 表現量有顯著增加，這表明 *DAX-1* 可能與吳郭魚的性腺分化有關。

七、*SOX* 基因家族 (*Sox gene family*)

SOX (*SRY* related HMG box) 基因是一類基因的統稱，目前已發現 *SOX* 基因家族有 40 餘個成員，其特點是均含有一 *SRY* 型 HMG (high mobility group box)。儘管 *SOX* 家族基因以 *SRY* 為代表，但其成員與 *SRY* 間仍有所區別；*SRY* 在不同物種間存在較大的差異，而 *SOX* 基因是由 79 個氨基酸殘基組成一具高度保守的 DNA 結合區，在雌雄性別的基因

中均存在，具轉錄調控因子功能，如 *SOX* 1/2/3、*SOX* 11、*SOX* 30 均在中樞神經中表現，*SOX* 4 在 T 淋巴細胞表現、*SOX* 10 在周圍神經表現，而 *SOX* 9 已被證實是參與性別決定的基因。故 *SOX* 基因家族在哺乳類胚胎發育早期表達、調控分化及發育過程，包括軟骨形成、造血、神經形成、晶狀體形成及性別決定都具重要的作用 (Schepers et al., 2002)。

依據脊椎動物的 *SOX* 基因序列設計引子 (primer)，在虹鱒、黃鱔、青鱈魚及泥鰱中無性複製與研究魚類 *SOX* 之同源基因。黃鱔的 *SOX* 9 被定位於 6 號染色體，*SOX* 17 定位於 5 號染色體 (周等, 1996)。姚波等 (2002) 利用石斑魚揭示了 *SOX* 3 是否持續的表達，將決定配子發生向兩種截然不同的方向進行，這一發現證實了 *SOX* 3 在卵子發生和精子細胞分化中的潛在調控作用，並確信 *SOX* 3 在卵子發生中的作用比在精子發生中的作用大得多。Chang 等 (2000) 在泥鰱與大鱗副泥鰱之 *SOX* 8 與 *SOX* 9 基因分析中，未發現性別特異性的雜合帶，但 *SOX* 9 在大鱗副泥鰱精巢中有大量的表現，表明該基因與精巢形成和分化有關。

另有研究者在魚類基因組中發現 *SOX* 基因家族中的一些基因具有兩個不同序列的拷貝，如黃鱔有 *SOX* 9a 和 *SOX* 9b 基因，虹鱒也具有兩個不同的 *SOX* 9 基因。目前的研究顯示，*SOX* 基因家族廣泛存在於魚類中，其結構和功能與發育過程具有密切相關，但無法證實該家族的基因是性別決定基因。

八、*DMY* (*DM domain gene On Y chromosome*) 基因

利用哺乳動物的 *SRY* 尋求魚類性別決定因子方法，似乎行不通，終究是必須從魚類本身的基因組中去定位和尋找相關的基因或 DNA 標記，來作為研究性別決定基因及其功能的後選基因，或作為遺傳性別鑑定的工具。

在此方面，青鱗魚的相關研究已得到令人鼓舞的結果。Konda 等 (2003) 從青鱗魚 Y 染色體上找到的 *DMY* (Doublesex/*mab-3* domain of Y chromosome) 基因，其在青鱗魚 Y 性腺體細胞內表達，是雄性正常發育所必需的，且其表達量需達到一定的數值，否則產生 XY 雌性個體；且在其開放閱讀框 (Open reading frame, ORF) 區域產生突變，則直接導致魚向雌性化方向發展。故 *DMY* 基因是迄今在魚類 Y 染色體上，找到與精巢發生和分化直接相關證據最充分的 1 個性別決定功能基因，其與 *SRY* 在哺乳類的作用類似。但後來以與青鱗魚親緣關係相近的物種及其它硬骨魚類作研究，卻都未能找到 *DMY* 的同源基因。這說明，*DMY* 並不是一廣泛存在於魚類中的性別決定基因，魚類的性別決定是有別於哺乳類的，在不同的種，甚至是不同的品系之中，可能存在不同的性別決定基因。

九、*DMRT1* (DM-related transcription factor 1) 基因

DMRT 基因家族與性別決定的關係源自於果蠅 *doublesex* (*dsx*) 基因和線蟲 *mab-3* 基因的發現。通過分析 *dsx* 與 *mab-3* 的結構特徵，發現二者編碼蛋白質都有一個非常相似的 DNA 結合域 (DM domain)，其結構具有典型的鋅指結構，可作為轉錄因子。這說明性別調控機制至少在某些方面是有著共同的進化起源。Raymond 等 (1998) 在人類基因中無

性複製到 *DMRT 1* 基因，該基因位於體染色體上，雌雄性基因組中均存在，但在雌雄中的表現不同，其功能與精巢的細胞發育有關；另根據表達圖譜和染色體定位，認為該基因是 1 個性別分化基因，與雄性性別發育有關。

而在魚類方面，目前已從尼羅吳郭魚、虹鱔、青鱗魚、石斑等魚類中無性複製到 *DMRT1* 基因；Guan 等 (2000) 從尼羅吳郭魚性腺中分離兩個包含 DM 區域的序列，這分別在精巢與卵巢中顯著表現的基因 *DMRT 1* 與 *DMO* (DM-domain gene in ovary)，分析顯示 *DMRT 1* 與 *SRY* 具有一致序列，*DMO* 則無。在虹鱔之 *DMRT 1* 檢測中發現，在性腺分化發育期，*DMRT1* 基因只在精巢中表現，卵巢中則無。2003 年在青鱗魚的 Y 染色體上發現 *DMRT 1* 的 Y 染色體拷貝 *DMRT 1 b* (Y)，亦為前述的 *DMY* 基因。近年來，亦有學者由具有性轉變的石斑魚無性複製到 *DMRT 1* 基因，分析結構與表達模式，發現其具有兩個不同於其他物種的 *DMRT 1* 特徵，一為該基因的開放閱讀框序列不含內含子 (Intron)，二為只在精子發生過程中的精子細胞 (Germ cell) 中表現。同時與分類上不同之 5 種魚種—黑鯛、尼羅郭魚、黃鰱、牙漢魚及細棘海豬魚的 *DMRT 1* 的基因關係較為相近。

由上述結果可知，其在魚類與其他脊椎動物中的功能一樣，*DMRT 1* 是一個性別分化基因，與精巢的形成和功能維持有關。不過 *DMRT* 基因家族的具體調控機制、相互關係以及進化特性等，仍有待更進一步深入的研究探討。