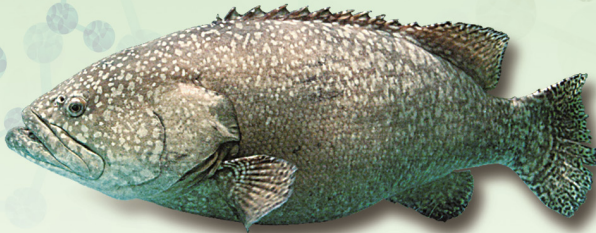


龍膽石斑肌肉增生相關基因之初步探討



林峰右、吳育甄、葉信利
水產試驗所海水繁殖研究中心

前言

龍膽石斑在臺灣魚類資料庫列名為鞍帶石斑魚，為暖水性魚類，常棲息於珊瑚礁或沿岸礁區，為高經濟價值的食用魚。體長橢圓，標準體長為體高之 2.4—3.4 倍，與其他鮨科魚類相比，為體型最大的石斑魚，因而有「斑王」之稱。

龍膽石斑體型大且成長快，為其生態演化之優勢。就此觀點，魚隻體型的大小，與其肌肉增生有極大的關連性，由生理學角度觀察，生物體體型增大需要攝入足夠的食物，以提供肌肉成長及其他所有的生理需求，因此龍膽石斑其成長基因的表現在生活史當中，應該相當活躍，是為研究成長相關基因的優良材料。

目前與肌肉增生直接相關的基因為 MRF 肌肉特異性轉錄因子 (myogenic regulatory factor) 以及肌細胞增強因子 MEF2 (myocyte enhancer factor-2)。MRF 是調控肌肉細胞末期分化的主要因子，有四種對肌肉基因進行不同能力的調控因子，包含有肌原分化決定因子 (myogenic determination, MyoD)、肌原

因子 (myogenic factor 5, Myf-5)、肌細胞生成素 (myogenin) 以及肌調節因子 (muscle regulatory factor 4, MRF4)；MEF2 是細胞在轉變成肌細胞時，扮演重要的角色，MEF2 主要充當控制肌肉 MRF 基因家族成員的共同調節因子，在骨骼肌和心肌基因的調控區皆存在有相結合的位置，能夠調節骨骼肌和心肌細胞的發育過程，MRF 和 MEF2 這兩個家族的轉錄因子經由相互輔助成為控制肌肉的生成及發育的重要關鍵。另一與肌肉分化相關的轉錄因子 FoxO1 (forkhead box protein 1) 又稱為 FKHR (forkhead in rhabdomyosarcoma)，在肌肉末期分化上也扮演重要角色，它會調控肌纖維母細胞 (myoblasts) 間的融合，此為肌肉細胞分化的過程中扮演相當重要的關聯性角色，此部分在所有水產動物而言，尚需積極加以研究。

本篇報告主要介紹魚的肌肉與肌肉增生相關基因在龍膽石斑育種上的應用，針對龍膽石斑具有成長快，體型大，明顯體型優勢之魚種，強化研究其肌肉增生相關基因在魚體扮演的角色及表現情形，並試圖利用分子生物相關技術來達成育種之目的。

魚類肌肉功能及分類

所有生物的肌肉主要功能為形體的轉位或移動，但魚類與其他陸上類動物肌肉組織在特性上差異很大，主要有三個因素：(1)水體浮力會支撐魚類，所以魚類較陸生生物不需要存在強韌的結締組織來維繫與支撐肌肉；(2)多數重要經濟魚類為變溫動物，其肌肉蛋白組成性質與溫血動物差異大；(3)魚體肌肉構造排列方式與陸上動物有顯著不同，與其獨特的活動方式有很大關係。魚類在水中運動之動力源自於肌肉的收縮，同時也帶動其他器官運動，在生理功能方面，分為與能量代謝、收縮及結構有關之蛋白質，如依其化學特性又可分為水溶性、脂溶性及不溶性。

魚類肌肉是由肌原纖維細胞組合而成，依其形態功能可分為平滑肌肉、骨骼肌肉與心臟肌肉。骨骼肌肉成束的肌原纖維因具有橫紋，因而又稱為橫紋肌肉，可隨意控制，故名思義又為隨意肌。平滑肌肉由長紡錘型單核細胞所構成，由自主神經支配調節亦稱不隨意肌，是構成消化管、血管、淋巴管等內臟器官。心臟肌肉是構成心臟壁的肌肉，肌肉細胞形態與骨骼肌相同，但在生理上受自主神經支配調節其運動，屬於不隨意肌。

魚類體側肌肉是骨骼肌規則性排列，在軀幹與尾部兩側肌肉束的集合體，藉由伸縮運動使體軸搖動或扭曲，讓魚體獲得游泳原動力，在體側肌表面沿水平存著縱向帶狀紅色肌肉束，此紅色肌肉束又分為表層血合肌與深層血合肌。在某些鯉、鮪科魚類體中心附近，沿脊椎骨兩側有一對紅色肌肉束，即

屬深層血合肌，其含有豐富維生素 B 群等成分，一般在洄游性魚類等發達，而運動性較遲緩魚類較不發達。由於深層血合肌的微細血管分佈豐富，肌肉細胞內線粒體都較多，所以它主要是依靠有氧呼吸，這類肌肉的收縮速度較緩慢，但能較持久，代謝產生的能量來供給肌肉的收縮，不易產生乳酸堆積產生疲勞，是日常生活活動的主要肌群，常用於長時間游泳。魚類白色肌肉大部分屬於短暫性能量的肌肉，細胞內粒線體較少，而微細血管則相對較缺乏，它主要是通過無氧呼吸代謝產生的能量來進行收縮活動，故能在很短的時間內快速地運動，產生巨大的爆發力，但持久力差，較易疲勞。

另外，魚類其他部位肌肉，還包含與調控鰭條相關鰭肌，內有背鰭與臀鰭所屬各鰭條基底側面的肌肉束，分別稱為鰭屈肌、臀鰭屈肌，主要功能係促使背鰭與臀鰭左右擺動；位於背鰭與臀鰭神經間棘和血管間棘間前後的有舉肌和伏肌，主要功能為控制鰭條倒、豎作用；擺動胸鰭肌肉群有三角形的胸鰭舉肌和紡錘形的胸鰭屈肌，主要為加快泳速以及控制方向；腹肌有三個主要肌肉群包含腹鰭內舉肌、腹鰭外舉肌、腹鰭屈肌；控制尾鰭運動相關肌肉有尾鰭屈肌、閉尾肌、尾鰭條間肌；與口部攝食閉合關係最大為閉顎肌，此閉顎肌又分不同區域的肌肉束，分別調整嘴部細微開合動作；鰓蓋運動肌肉分為鰓蓋舉肌、鰓蓋伏肌。當然上述分部在不同位置，各司不同功能的肌肉，會因魚種在肌肉大小及調控強度表現上而有差異，而從食用及經濟角度而言，魚類肌肉組織的性質對人類食物價值及評價視為最大影響。

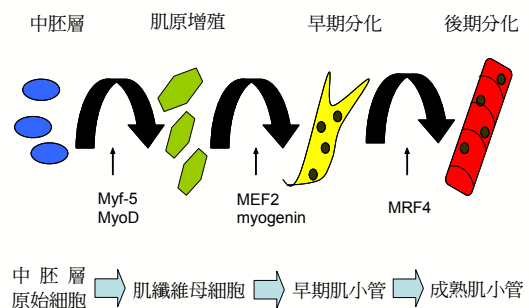
肌肉增生直接相關基因調控

肌肉細胞分化、生長是由一些正向和負向調控因子進行雙向調節，在肌肉組織發育過程中，由纖維母細胞特化為肌纖維母細胞，經細胞融合形成長圓管狀肌管，其中肌管含有肌動蛋白與肌球蛋白組成肌原纖維。此肌原纖維發生初期，藉由細胞膜表面醣蛋白交互作用而互相融合在一起。因此，在一條肌纖維之中，有數百個細胞核存在，並充滿密集的細圓柱狀纖維，此為收縮有關的肌原纖維。肌原纖維再以肌原纖維節 (sarcomere) 為單位所連成，肌原纖維節的間隔膜稱為 Z 膜，而肌原纖維節的中央部分則顏色較深它的構造僅由兩種肌絲 (filament) 組成：細的肌絲稱肌動蛋白絲 (actin filament)、肌原纖維節的中央部分則由粗肌絲稱肌蛋白絲 (myosin filament) 組成。

肌肉的生長需要肌纖維母細胞的增殖和肌原分化決定因子 (myogenic determination, MyoD)，或肌肉特異性轉錄因子 (myogenic regulatory factor, MRFs) 家族基因調控。其中 MRFs、MEF2s 等因子形成了一個包含時間、位置和數量信息複雜的調控系統，以各種細胞的信號通道通過使肌肉表達不同的肌肉蛋白，使肌纖維母細胞最後發育成為不同類型的肌纖維 (myofibers)。MRFs 家族基因包含有 MyoD、Myf-5、myogenin 以及 MRF4。上述所列基因都與活化基因蛋白質表現及組成肌纖維調控有關，另外細胞轉變成為成熟的肌細胞時則需要 MEF2 的幫忙。

重要的 MEF2 乃肌肉細胞分化之必要因子，它會作用在富含 A/T 的序列上，存在腦

部及肌肉或廣泛存在各組織中。而在肌原母細胞發育為肌纖維過程中 (如圖)，發現 MEF2 表現於在細胞分化或增生肌纖維母細胞，主要功能是使蛋白質之間形成二聚體 (dimer) 與目標 DNA 的調控區相結合，使 MEF2 能轉錄活化肌細胞生成素基因，根據之前的研究顯示，當 MEF2 蛋白和 MyoD (或 myogenin) 形成異型二聚體 (heterodimer) 相互作用時，對肌肉特異性基因的活化有加乘的效果，且 MEF2 在骨骼肌和心肌基因的調控區存在 MEF2 的結合點，這說明 MEF2 在調節骨骼肌和心肌細胞的發育過程中具有重要的作用，且達到快速活化標的基因轉錄來促進肌肉發育，因此要分化成肌肉細胞，MEF2 為必要因子，另外尚有許多與代謝、生長、肌肉增生及發育相關調控基因，魚類肌肉增生及調控相關基因彙整如表。



肌原母細胞發育為肌纖維過程中，參予調控 bHLH 結構 MRF 系列相關基因 (modified from Erica Gerace, 2013)

MEF2 在龍膽石斑育種之應用

根據 OECD (2009) 指出，分子標誌輔助技術將在 2015 年廣泛應用於畜、禽及水產動

物等，藉以提升產量或品質。目前畜、禽及水產動物也已廣泛使用此技術提升動物繁殖之速度與準確性，而近年來各國更已經將分子標記輔助選育 (MAS) 導入長期性育種計劃，利用分子標記可將物種族群中原有的個體差異 (基因型) 進行分辨。分析族群帶有優良性狀個體的基因組，把古典選拔育種輔

以現代化品種改良，可以補足形態標誌的不足。選擇具開發潛力的龍膽石斑，應用於育種重要因素分三個層面分析，(1)經濟層面：具有較高經濟價值，若龍膽石斑育種相關研究成功，可如同畜產業協助幫助種豬篩選販售；(2)試驗策略層面：利用相同的分子生物技術策略可以快速找出相關 Marker，對其他

调控魚類肌肉及細胞生長相關基因彙整 (美國國家生物技術信息中心 National Center for Biotechnology Information)

基 因 名 稱	功 能 導 向 及 核 苷 酸 訊 息	物 種
肌細胞增強因子 (myocyte enhancer factor 2D, MEF2D)	表現使其進入細胞融合 (Cell fusion) 以及最後的未分化階段，作用可以形成肌纖維，此即是構成肌肉的單元，與肌肉的發育有直接相關性 (1981bp、Complete)。	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)
肌原分化決定因子 (myogenic determination, MyoD)	與肌肉細胞發育及調控有主要的關係，是決定肌肉品系形成的重要轉錄因子表現在骨骼肌肉細胞以及肌肉前驅細胞中 (1441bp、Complete)。	<i>Epinephelus coioides</i> (orange-spotted grouper)
肌細胞生成素 (myogenin)	Myogenin 及 MyoD 屬於 muscle specific helix-loop-helix (HLH) 同一族系的蛋白，它們可活化非肌細胞之肌肉特異基因，誘發肌細胞之生長週期 (1381bp、Complete)。	<i>Cyprinus carpio</i> (common carp)
AKT 蛋白質 (AKT interacting protein)	磷酸化、甲基化、乙醯化及泛素化的調控，與目標基因結合的準確性及結合能力。調控 FoxO1 最主要的路徑 (2101bp、Complete)。	<i>Danio rerio</i> (zebrafish)
轉化生長因子-β 接受子 (TGF-beta receptor type-2, tgfr2)	促進轉型生長因子對於細胞生長及分化傳導路徑 (2761bp、Complete)。	<i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon)
類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor Ib)	促進細胞增長，幫助神經成熟及建立與其他神經元的功能性連結 (1141bp、Complete)。	<i>Epinephelus lanceolatus</i>
Sparc 基因 (secreted protein acidic and rich in cysteine/osteonectin)	胚胎發育過程，細胞的分化、組織的鈣化生成、骨骼發育、型態及器官發育，推測很有可能與早期魚類發育過程中骨骼的生長有關係，影響到魚隻的賣相 (1321bp、Complete)。	<i>Epinephelus coioides</i>
PPARA1 (peroxisome proliferator-activated receptor alpha 1)	與脂質代謝合成、調節三酸甘油酯及脂蛋白基因調節，間接影響肌肉生成 (681bp、partial)。	<i>Epinephelus coioides</i>

種類而言，也需要花同樣時間，因此選擇較具成長優勢代表性的龍膽石斑；(3)生理層面：龍膽石斑與其他石斑相比，生長速率明顯較快，因此由生理角度而言，選擇龍膽石斑來找出成長相關育種 Marker，對於成長方面會比較容易有差異性的表現，較具有完整性及特殊性的代表。

海水繁養殖研究中心經多批次畜養及研究，目前已建立龍膽石斑育種培育平臺，分別建立不同階段所畜養之養殖區域，包含防疫觀察區、防風防寒中間育成區、深水式種魚養成區三個區域，由 5—7 吋苗開始畜養，期間建立養殖培育技術，包含建立不同階段標準養殖操作模式、養殖管理，影像紀錄建檔、晶片埋植個體追蹤之外，尚利用形態特徵篩選魚隻進行畜養，同時進行成長趨勢分析相關圖表，以提供後續分子輔助育種技術導入。其中魚隻成長趨勢分析，我們是利用多年定期採樣記錄追蹤所完成，首先在採樣前確認魚隻批次，並提前完成記錄本編號，晶片植入器消毒，魚隻捕撈網具、樣本採集管準備，接續開始進行魚隻麻醉捕撈、晶片植入及讀取，魚隻體重、標準體長、全長之測定、樣本採集分裝、影像紀錄編號，同時在進行試驗中將體型過大或過小魚隻進行篩選，分別畜養追蹤，以此採樣流程所紀錄數據，完成魚隻年齡與成長值分析、影像紀錄分析、魚隻年齡與體重百分位分析圖、魚隻年齡與全長百分位分析圖。

藉由與國立臺灣海洋大學水產養殖學系龔紘毅助理教授進行合作計畫所提供龍膽石斑轉錄體資料庫，及 GenBank database 尋找石斑魚功能性基因之微衛星 (microsatellite)

DNA 標誌，經設計龍膽石斑功能性基因之簡單重複序列 (Simple Sequence Repeats DNA, SSR DNA) 引子對，進行 SSR 尋找及比對基因多型性與性狀之關係，目前發現有 8 個 SSR DNA 與生長相關微衛星 DNA 可作為分子標誌。其中一個 SSR DNA 即是由 MEF2D 基因所設計，另外在統計上，其等位基因 (alleles) 之基因型 (genotypes) 與大小體重表現型 (phenotypes) 具有顯著相關性 ($p < 0.05$)，作為進行篩選生長性狀較佳之龍膽石斑魚所應用。

結語

目前臺灣龍膽石斑種魚養殖都未對石斑種魚篩選培育作長期計畫，多數業者仍僅以形態特徵篩選種魚，在生殖期大多利用加強營養及體型篩選作為魚隻生產配對手段，但若同時透過分子生物科技，特別是基因體及功能性基因之研究，由良好選種及育種策略來選拔魚隻，選優汰劣，勢必可以建立水產生物各項生理特性相關的功能性基因、分子遺傳標記等基礎資訊，進而提升養殖效率與品質。

未來希望在吋苗時期便能有效篩選群體之間體型差異性，再藉由配合傳統育種所建立的年齡別體重或體長圖，加以佐證，期盼未來能解決近親交配所產生的問題，並進一步配合分子標誌輔助選種，加速培育具有生長優勢的優質龍膽石斑品系，為臺灣石斑魚養殖產業長遠發展之必要方向。