

螢光魚的首創與 一種新型*microRNA*的發現

文・圖／蔡懷楨

本人從事「魚類基因的複殖、分子結構、功能解析及調控機制」、「魚類胚胎發育」、「基因轉殖魚的研究及應用」和「海洋生物技術」的研究，至今26年餘。研究主題從水生生物的基礎研究、技術開發、到實質應用。總共發表116篇學術論文。以下和讀者們分享本人實驗室最具特色的兩項成果：

一、水產生物之轉殖技術的開發及應用方面

本人研發水生生物（魚、蝦、貝及藻類）之基因轉殖技術多年，目的是改良品種（成長快、抗病力強及增加觀賞價值等）以應用在水產養殖業及水族業；同時，開拓轉殖模式魚種（斑馬魚及青鰐魚）成為研究人類疾病的模式動物、藥物篩選、轉譯醫學、環境偵測及生物反應器的新材料。這些成果中最被注意的是全身會發螢光及心臟會發螢光的轉殖魚。

White light



Blue light

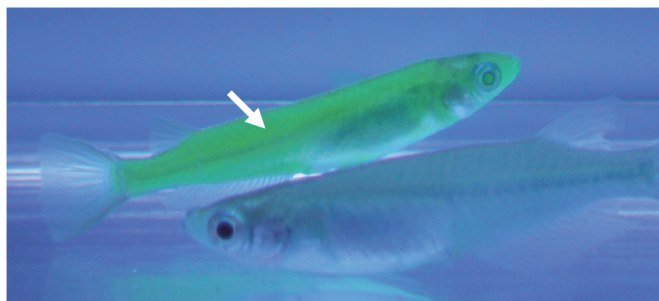


圖1：全身會發綠螢光的基因轉殖青鰐魚。在一般光源下(上圖)和黑燈管下(下圖)螢光魚(箭頭所指)與原生種的比較(Chou et al., 2001)。

■首創螢光魚

我的碩士班學生周記源於1997年開始構築表現載體並進行青鰐魚的基因轉殖；接著由洪龍賢篩選品系、配對及DNA檢測而使本實驗室第一個發表全身會發綠螢光且能穩定繼代遺傳的基因轉殖青鰐魚（Chou et al., 2001）。於是一種嶄新的觀賞魚品系——螢光魚（圖1）誕生了。此一首創除了國內媒體報導，國外報章雜誌如2003年5月8日在Far Eastern

Economic Review及紐約的The Wall Street Journal最先報導；接著5月30日在Science也相繼刊登，並於11月24日當選Time雜誌2003年最酷發明之一。同年9月更吸引Discovery頻道和動物星球（Animal Planet）工作小組Ingrid Bates及Sarah Garbutt專程從London來拍攝（2004年6月在美國播出）；2004年1月法國第三電視台也派Franck Mazoyer一組專員從Paris來拍攝「螢光魚專輯」（2005年6月在歐洲播出）；National Géographic France接著刊登。同時，螢光魚被納入大學教科書的題材，例如Thomson Brooks/Cole出版的Biotechnology: An Introduction (2nd edition, 2005)，由Miami大學Prof. Susan Barnum主筆的Marine Biotechnology篇章中”Biotech Revolution: Fluorescent Fish Pets”就詳細介紹了螢光魚。其他還有中小學生科教材也放入這個題材。我們率先利用分生科技成功地使觀賞魚產生新奇漂亮的螢光，而開啟了螢光魚研究之先河，讓臺灣產官學研各界往後開始用相同的策略在不同的觀賞魚種進行研發，至今10多年仍熱潮不減，因而大大提升了臺灣水產生技的實力。此外，更值得一提的是：為了避免轉殖魚破壞環境生態，本實驗室也多年致力於轉殖魚之不孕研究工作，現在已讓臺灣成為第一個能生產不孕之轉殖青鰐魚的國家，著實地提升了臺灣的國際聲譽和競爭力。

■心臟專一性之螢光魚

魚類是所有動物中最早擁有心臟器官的脊椎動物，成為用來研究心臟發育最好的實驗材料。碩士生黃秋茹複殖出心臟專一性的*cmlc2*序列並構築好表現載體，之後由蕭崇德進行斑馬魚的基因轉殖，最後成功地建立了世界第一個只有心臟會螢光的轉殖品系（Huang et al., 2003；此篇論文已被引用156次）（圖2）。有了這種穩定遺傳的轉殖魚，對心臟發育的分子機制、心臟病的模式動物及藥物的篩選方面都有很大的貢獻，因為可以利用這種轉殖魚進行活體收集心臟先驅細胞，再分析所含心臟特殊性基因的表現，也可動態解析不同發育階段有哪些基因或蛋白質具有關鍵性的表現。因此，這個品系的成功建立，讓數十間世界著名的實驗室前來與臺大合作，並發表了很多好文章。

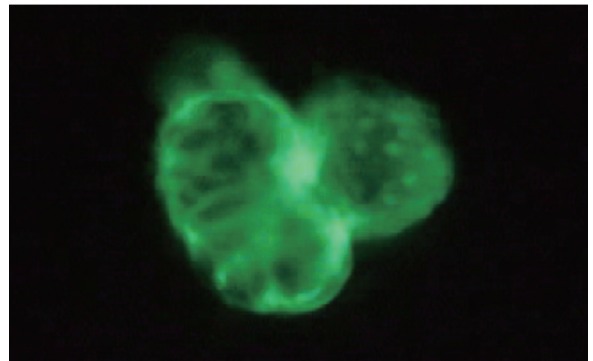


圖2：心臟專一性發螢光的轉殖斑馬系品系。魚類之一心室(左)及一心房(右)的心臟在螢光顯微鏡下清晰可見(Huang et al., 2003)。

二、魚類肌肉發育的基礎研究

■研發一種有效找出microRNA目標基因的新技術

博士生許仁駿研發一種有效、簡單且經濟的方法可以找到microRNA之目標基因的新技術，稱為Labeled microRNA pull-down assay (LAMP) (Hsu et al., 2009)。它直接利用細胞核

萃取物，加入標記處理過的已知pre-microRNA，再用可結合標記物之抗體進行pull-down，這樣就有機會找到可能會受microRNA結合之mRNA的3'UTR序列，藉此就可以複製出目標基因全長的mRNA。如此，可以避開用microarray或bioinformatics分析時可能造成的盲點，而能找到不同發育時期同一種或極相近的microRNA所默化不同的目標基因。此技術已編入在Dr. John Goodchild主編的教科書“Methods in Molecular Biology”內。

■ 發現一種新穎的microRNA並解析它如何調控肌肉myf5基因表現的分子機制

本實驗室多年來對於魚類負責肌肉分化的調控蛋白Myf5基因有一系列完整的研究。最重要的是當時還是碩士生的林正勇發現myf5的intron內含有一個會抑制myf5本身表現的cis-element存在。接著，證實此intronic motif的RNA分子即可抑制myf5的表現，而首度發現一種novel的intronic microRNA—稱為miR-In300或miR-3906。後來，博士生的林正勇及許仁駿用LAMP的方法，共同找到miR-3906的目標基因是dickkopf-3-related (dkk3r/dkk3a)，而接著傅傳楊發現了軀幹肌肉細胞在特化時分泌在somite細胞外的Dkk3a ligand會結合Integrin $\alpha 6b$ 的膜蛋白接受器而促進

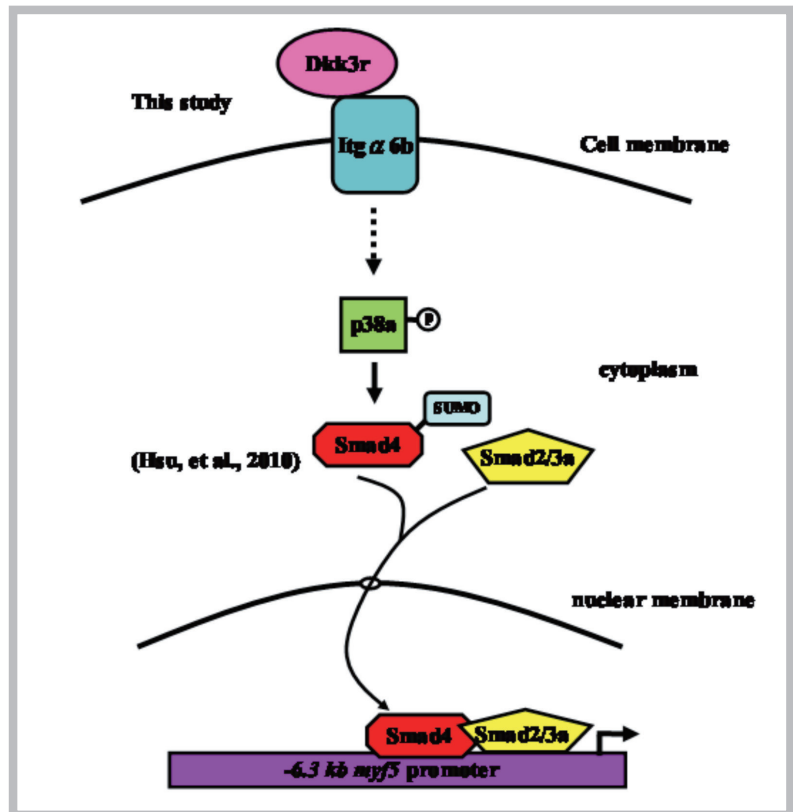


圖3：肌肉細胞特化時somite外的Dkk3a會結合Integrin $\alpha 6b$ 膜蛋白接受器而促進p38a的磷酸化，穩定Smad4的活性而助於Smad4/2/3a complex的形成再進核去幫助開啟myf5啟動子(Hsu et al.,2010;2011; Fu et al.,2012)。

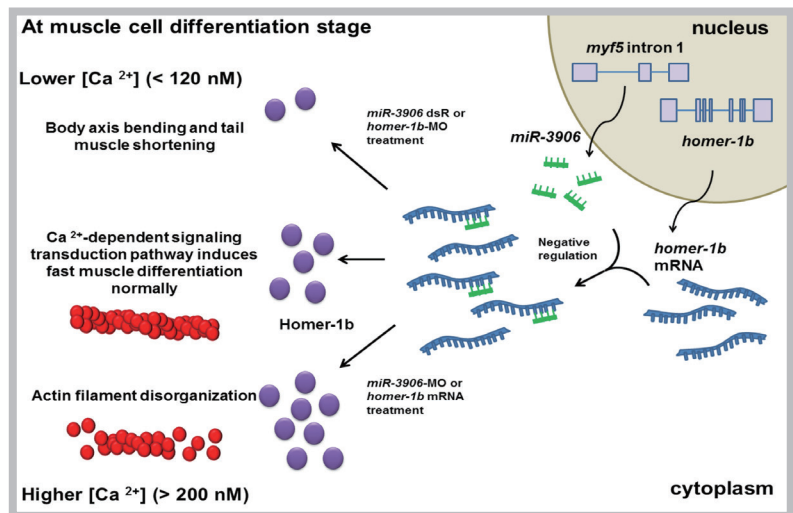


圖4：當肌肉細胞在進入分化成熟時期，miR-3906會默化另外一個目標基因homer-1b的表現，微調肌肉細胞內鈣離子的正常濃度，以維持胚胎時期肌細胞的分化進行以及肌纖維的正常排列(Lin et al.,2013a)。

p38a的磷酸化，穩定Smad4的活性而助於Smad4/2/3a complex的形成再進核去幫助開啟*myf5*啟動子（Hsu et al., 2010; 2011; Fu et al., 2012; 圖3）。但是一旦肌肉細胞進入特化期，累積過的*miR-3906*就會開始去默化*dkk3a*而造成*myf5*在軀幹肌肉細胞的表現被抑制。這時肌肉細胞開始進入分化成熟期，而*miR-3906*卻會開啟自己的啟動子進行轉錄，但會與另外一個目標基因*homer-1b*結合。藉由*miR-3906*默化*homer-1b*的表現，微調肌肉細胞內鈣離子的正常濃度，以維持胚胎時期肌細胞的分化進行以及肌纖維的正常排列（Lin et al., 2013a; 圖4）。因此，我們發現在不同的肌肉發育階段時，細胞內的*miR-3906*會默化不同的目標基因（*dkk3a*或*homer-1b*），以執行不同的任務來完成肌肉細胞正常的發育。

■ 發現肌肉特有的*miR-1* 和*miR-206*因默化不同的目標基因而造成兩者對血管新生完全相反的調控

*miR-1*與*miR-206*這兩種microRNAs從線蟲到人類都有，演化上十分保守，皆屬肌肉專一型的microRNA。由於*miR-1*（UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU）與*miR-206*（UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG）具有相同的seed sequence（如劃線所標）。若用生物資訊來推測他們的目標基因是很難區分的。因此，有學者將把*miR-1*與*miR-206*兩者因功能相同而把牠們視為一體，但這“一體”論所得的結論與分開各個別處理結果者又有些無法一致，至今仍然莫衷一是。為了挑戰這個疑問，我們用斑馬魚胚胎為材料，設計出了能專一抑制*miR-1*或能專一抑制*miR-206*的反義核酸序列。結果發現：(a) *miR-1*及*miR-206*雖是肌肉專一型之microRNA，卻都會調控血管內皮生長因子（VegfAa）的分泌，而導致會影響血管生成的cross-tissue signaling regulators。

(b) *miR-1*及*miR-206*分別默化不同的目標基因：一個是*sars*；一個是*vegfaa*。使用上述LAMP技術，我們找到*miR-1*只會抑制絲氨酸-tRNA合成酵素（seryl-tRNA synthetase）基因*sars*；而*miR-206*只會抑制*vegfaa*。(c) *miR-1*及*miR-206*是透過不同的調控途徑來影響血管的生成：一個是正向影響的*miR-1*/SARS/VegfAa pathway；一個是負向影響的*miR-206*/VegfAa pathway（圖5）。

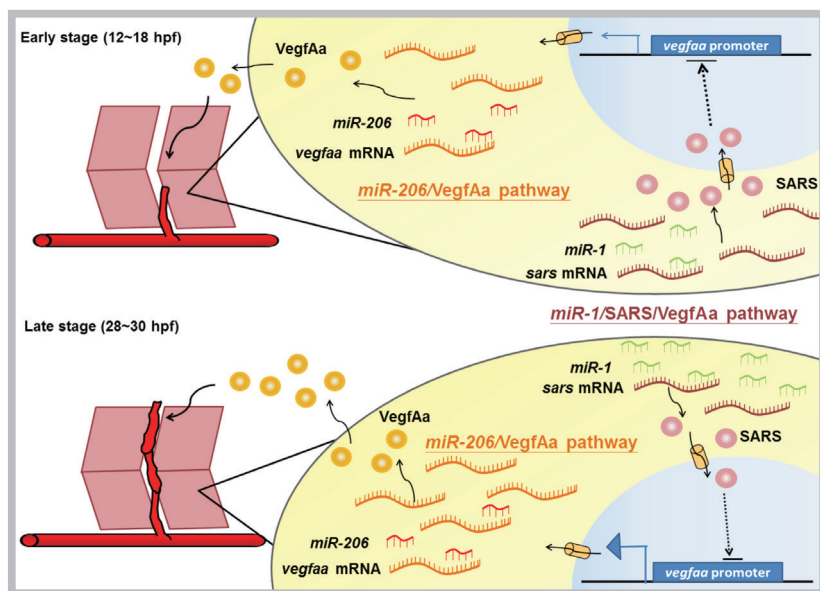


圖5：示意圖解釋斑馬魚胚胎發育過程中*miR-1*/SARS/VegfAa與*miR-206*/VegfAa對於血管發育的影響(Lin et al., 2013b, Nature Communications)。

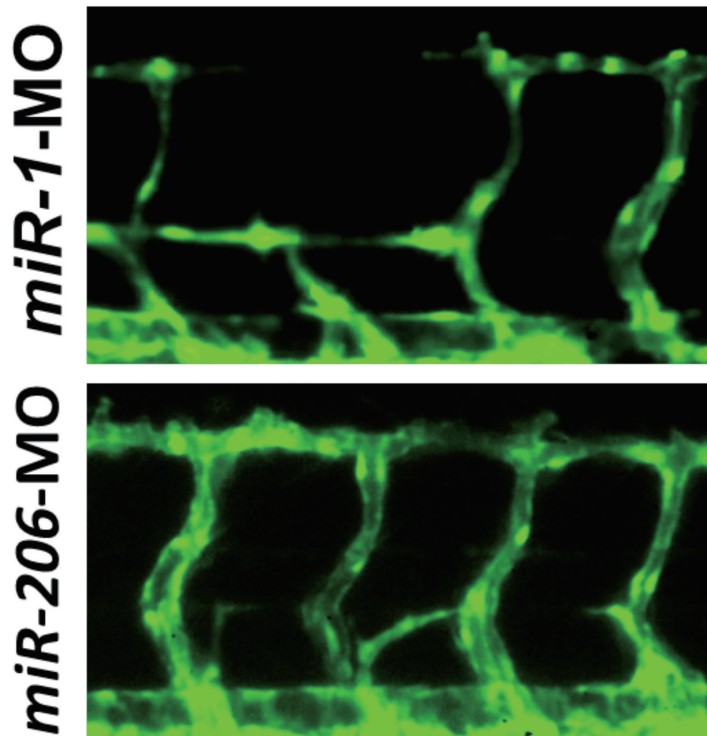


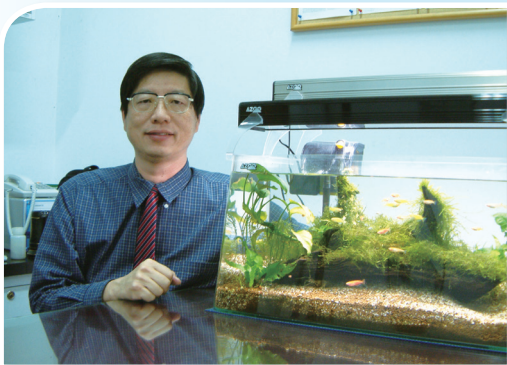
圖6：斑馬魚胚胎發育時，若抑制*miR-1* (*miR-1-MO*; 上圖)，血管生成變少; 若抑制*miR-206* (*miR-206-MO*; 下圖)，血管生成變多。故*miR-1*與*miR-206*的表現對於血管發育的影響相反((Lin et al., 2013b, Nature Communications))。

同時，在斑馬魚活體胚胎中，我們進一步證實SARS蛋白質的產生是受*miR-1*專一的影響，且SARS會抑制下游的VegfAa。在抑制*miR-1*或過量表現*sars*時，細胞內SARS蛋白質上升而VegfAa表現量下降，而造成血管生長停滯。反觀，*miR-206*則是抑制*vegfaa*基因的表現而直接控制VegfAa的生成量。所以當抑制*miR-206*時，SARS蛋白質量不變，但VegfAa表現量會增加，而造成血管新生異常生成（圖6）。顯然*miR-1*與*miR-206*對血管生成上是透過不同的分子機制來扮演相反的作用。最後我們發現胚胎晚期的血管生成受到*miR-1*/SARS/VegfAa pathway的影響比*miR-206*/VegfAa pathway的影響大。（d）提出*miR-1*與*miR-206*調控血管生成的「陰陽」新模式而推翻耶魯大學Prof. Antonio Giraldez 研究團隊於2012年在Development發表*miR-1*及*miR-206*為「一體」的論點。（e）在RNA Biology領域建立新觀念：即seed sequence並非決定miRNA選擇目標基因合的唯一因素。microRNA的研究至今，一直認為microRNA與目標基因的結合主要是透過seed sequence。然而本論文卻有了新發現，那就是*miR-1*及*miR-206*這兩種seed sequence極近似的微型RNA在選擇牠們的目标基因默化時，除seed sequence本身外，其鄰近的序列其實也是參與決定選擇特定目標基因的重要關鍵元素。這對microRNA的調控，提出了新的觀念而提升RNA Biology領域更深入的瞭解。本論文詳細瞭解*miR-1*及*miR-206*對血管生成的分子機轉，將有助於在治療疾病及癌症上之潛在應用。這個成果發表於Nature Communications (Lin et al., 2013b)。

本論文是由本校分組所訓練出來的博士生（現為博士後研究員林正勇、李鴻杰、傅傳楊）及兩屆的碩士生（丁郁芸、陳潔心、李明軒、黃薇臻）在困頓的實驗環境、拮据的研究經費且要面對耶魯大學強大的學術競爭的壓力下，群策群力、不眠不休所完成的。這個成果能被Nature Communications肯定而刊登，實在更加難能可貴。這也證明了本校訓練出來的研究生在科學研究工作上很紮實，且具有國際競爭力，真該為這群優秀的研究生們感到驕傲和喝采，因為他們才是臺大最重要、最寶貴的學術資產。（本期專欄策畫／生命科學系黃偉邦教授&檢驗暨生技系方偉宏教授）

參考文獻：

- [1] Chou CY, Horng LS and Tsai HJ. 2001. Transgenic Res., 10: 303-315.
- [2] Fu CY, Su YF, Chang GD and Tsai HJ. 2012. J. Biol. Chem., 287: 40031-40042.
- [3] Huang CJ, Tu CT, Hsiao CD, Hsieh FJ and Tsai HJ. 2003. Dev. Dynamics, 228 :30-40.
- [4] Hsu RJ, Lin CC, Su YF and Tsai HJ. 2011. J. Biol. Chem., 286: 6855-6864.
- [5] Hsu RJ, Yung HJ and Tsai HJ. 2009. Nucleic Acids Res., 37:e77.
- [6] Hsu RJ, Lin CY, Hoi HS, Zheng SK, Lin CC and Tsai HJ. 2010. Nucleic Acids Res., 38: 4384-4393.
- [7] Lin CY, J. S. Chen JS, M. R. Loo MR, C. C. Hsiao CC, W. Y. Chang WY and Tsai HJ. 2013a. PLoS ONE, 8: e70187.
- [8] Lin CY, Lee HJ, Fu CY, Ding YY, Chen JC, Lee MH, Huang, WJ and Tsai HJ. 2013b. Nat. Commun., 4: 2829.
- [9] 林秀玉、羅時成. 2004. 螢光魚的「做者」——蔡懷楨教授. 科學月刊, 412: 282-288.



蔡懷楨小檔案

- 現任：臺灣大學生命科學院分子及細胞生物研究所特聘教授
臺灣大學生命科學院生命科學系合聘教授
- 學歷：輔仁大學生物系學士
臺灣大學海洋研究所（漁業及生物組）碩士
美國奧立岡州立大學哲學博士（微生物系）
Johns Hopkins University（Dept. of Biology）博士後研究員
- 經歷：臺大分子及細胞生物研究所所長（兩任）
臺大漁業科學研究所副教授、教授、所長（兩任）
輔仁大學生物系兼任副教授、教授
國科會生物處漁業生物學門召集人
美國加州大學舊金山分校客座教授
臺大研發會委員
國家實驗研究院海洋科技中心海洋生物組合聘教授
- 得獎紀錄：1988-1998, 2001-2002年 國科會研究甲種獎勵
1999及2003年 國科會傑出研究獎
2006年獲第二屆有庠科技發明獎（生技醫藥類）
2008-2011年國科會傑出學者研究計畫
- 研究專長：分子生物學
胚胎發育學
水生物基因轉殖學
海洋生物技術學