

The NTU Style :

蚜蟲成為新興發育模式物種的故事

文・圖／張俊哲

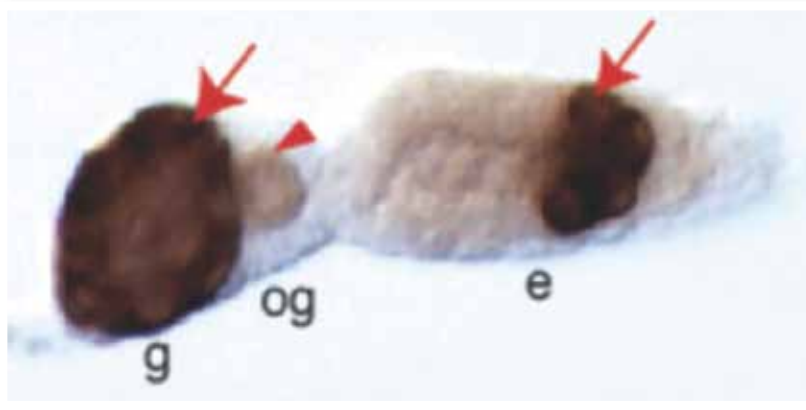


圖1：豌豆蚜的初始生殖細胞（箭號）經由免疫染色實驗被 VASA 抗體所標定。
g, germarium (生殖原區)；og, oogonium (卵母細胞，箭頭)；e, embryo (胚胎)。

約在1990年初期，當我還是碩士生時，我最佩服生化所學長們能以高超的實驗技巧選殖基因，並且親自製備定序電泳膠片，解開基因密碼。當時超羨慕學長能常常用油性簽字筆在 X 光片上頭寫下密密麻麻的“A, T, C, G”，彷彿會做基因定序的實驗，才能成為分子生物學家。不過，對於如何解釋基因序列，以及如何解析基因功能，我幾乎不敢奢求，總覺得那都是頂尖期刊上頭那些“聰明的外國人”才辦到的事。碩士畢業後，我就繼續帶著「基因的迷惘與自卑」入伍。

是頂尖期刊上頭那些“聰明的外國人”才辦到的事。碩士畢業後，我就繼續帶著「基因的迷惘與自卑」入伍。

很感恩的是，退伍後考上公費留考，獲得和“聰明的外國人”共事的機會。在申請學校的過程，和劍橋大學麥克艾肯（Michael Akam）教授接觸，表達對於同盒基因（homeotic genes; 簡稱 Hox genes）如何影響果蠅體節的發育有著濃厚的興趣（事實上當時不過是讀起那類的文章較感興趣而已），並且願意在攻讀博士期間從事相關研究。不料，在我加入艾肯實驗室的初期，他建議我先試著選殖非洲沙漠飛蝗（*Schistocerca gregaria*）的生殖基因 *vasa*，藉以熟悉研究室常用的設備與技術，不用急著做果蠅體節發育的研究。坦白說，大老遠從臺灣飛到劍橋，就是想加入果蠅這個明星物種的研究行列，卻無預警地被“鼓勵”從事蝗蟲基因的選殖，和原先預期實有不小的落差。但為了和指導老師維持和諧的關係，也不要讓老師看扁臺灣的公費生，我鼓起所剩不多的熱情開始進行實驗。感謝臺大生化科學所的訓練，使我得以在比小鼠基因體更為龐大的沙漠飛蝗基因體中，順利選殖到生殖基因 *vasa*，突破研究室長達7年沒有人能選殖到該基因的困境。從那一刻起，我竟然踏上探究昆蟲生殖細胞發育的路途，完全不在原本的生涯規劃當中。值得欣慰的是，我迄今仍為生殖細胞的特化（specification）和移動（migration）著迷不已！

因要標定蝗蟲生殖細胞的移動路徑，我須製備 VASA 抗體。整個抗體製備的過程雖尚稱順利，但在免疫染色的階段卻備嚐艱辛，此乃因蝗蟲胚胎解剖與染色的方法處於草創階段，最佳反應條件不易掌握。我花了整整兩年的時間，標定到蝗蟲初始生殖細胞（primordial germ cells），但染色雜訊總揮之不去。面對這樣的困境，艾肯教授和我都不得不下一個沈痛的



圖2：以孤雌胎生繁衍後代的豌豆蚜蟲。圖中正在分娩的小蚜蟲已懷有身孕，形成三代同堂。（攝影：吳士緯）

結論：我們所製備、純化的抗體品質有待加強！就在絕望之際，我的同事大衛史騰（David Stern）和三浦徹（Toru Miura）提供我豌豆蚜（pea aphid），作為免疫染色實驗的控制組。按常理言，一株專為蝗蟲“量身訂作”的抗體都無法專一地偵測到蝗蟲的生殖細胞，又怎能奢望它可染到蚜蟲的生殖細胞？因此，蚜蟲成為名符其實的“負控制組”（negative control）應是個完美的期待。令人驚訝的是：就在我加入呈色試劑不到兩秒鐘（真的是兩秒鐘那麼短），蚜蟲生殖細胞即被清楚而專一標定（圖1）！雖然當時更換博士研究主題為時已晚，然而我在顯微鏡前下了一個決定：如果有一天能擁有自己的研究室，我一定要從事蚜蟲生殖細胞的研究！

非常感謝臺大昆蟲系的接納，讓我得於 2003 年的夏天一償夙願，開啟探索蚜蟲生殖細胞發育的科學之路。有異於果蠅和常見的有性卵生昆蟲，蚜蟲以孤雌胎生（parthenogenetic and viviparous）的方式大量繁衍後代；也就是說，母蚜蟲根本無需受精，在卵巢中即可自行孕育胚胎；而且，在成熟的蚜蟲胚胎腹中又有“小胚胎”，形成“三代同堂”的奇景，好像“俄羅斯娃娃”（圖2）！在 2006 年，我們首度解開孤雌生殖蚜蟲生殖細胞特化的機制，發現在胚胎細胞尚未形成時，生殖細胞的決定因子已聚集在卵腔後端，負責驅動生殖細胞的特化。由於這是首度以分子層次的證據，揭櫫孤雌胎生昆蟲的生殖細胞特化機制，我們的研究成果被刊登於《國際發育生物學期刊》（*International Journal of Developmental Biology*）的封面（圖3）^[1]。更讓人興奮的是，這是第一篇我們在臺大所發表的國際期刊論文，暫時解除自 2003 年以來沒有研究成果發表、研究能力遭受質疑、研究計畫岌岌可危的危機。

在生殖細胞特化研究達成階段目標後，我們繼續探究生殖細胞如何在胚胎發育的過程移動。當我將這個研究構想向研究生們提出不久後，有一位同學拿出在總圖影印的古文獻



圖3：國立臺灣大學蚜蟲研究團隊之研究成果分別於 2006 年（左）和 2010 年（右）榮登期刊封面。



圖4：蚜蟲生殖細胞的移動。箭號所標示的為 Will 所發現的背側生殖細胞；在中間方形括弧所涵蓋的胚胎中，生殖細胞正移向蛋腔前端，由臺大研究團隊的新發現。（圖文：林季瑋、張俊哲）

表示，早在19世紀末（1888），德國學者魯得威爾（Ludwig Will）已利用顯微觀察，描繪出蚜蟲生殖細胞的移動路徑。雖然我看不懂文獻上的德文，但生殖細胞在胚胎背側清楚地被標示出來，卻是不爭的事實！也因此，我不得不終止這個研究。在心情平復後的數週，我再度端詳古文獻，蚜蟲生殖細胞在發育過程幾乎“文風不動”，令人起疑。因為，相較於果蠅生殖細胞須“穿腸破肚”方能抵達性腺，或斑馬魚生殖細胞須先經過原腎細胞才與性腺結合，蚜蟲生殖細胞一直停留在背側，實在靜得不像所認識的動物生殖細胞！難道是威爾錯過了某個發育階段的觀察？

因為當時蚜蟲發育中後期之胚胎免疫染色條件未臻成熟，我們直接由蚜蟲選殖 *vasa* 基因，製備 *vasa* 核酸探針，企圖藉由原位雜合技術（*in situ* hybridization）來探測生殖細胞的移動路徑。雖然在2006年基因選殖和定序的科技已較1990年初期進步許多，我們也在短時間內選殖到兩個 *vasa* 基因，並且備妥探針，但原位雜合的結果卻一再地顯示 *vasa* 基因不能專一地表現在生殖細胞，讓我們大失所望。在此一“內憂”形成之際，又遭逢“外患”威脅：由國際交流

管道得知，國外頂尖大學的研究室也在進行相同的實驗，而且已將蚜蟲（豌豆蚜）的整個基因庫完全定序，只需輕鬆上網，即可取得任何蚜蟲生殖基因的序列！

此一消息傳來，我只能故作鎮定，告訴研究生繼續往前邁進，或尚存一絲生機。就在實驗膠著之際，我突然想到當年因著調整核酸黏合條件，使我選殖到蝗蟲 *vasa* 基因。難道，國外研究單位和我們都還沒有試遍可能的黏合條件，因此錯過了第三個、甚至第四個蚜蟲的 *vasa* 基因？很幸運地，在改變了反應條件後，竟然找到了 “*vasa3*”，而且用它所製備的探針幫我們順利地偵測到蚜蟲的生殖細胞！更令人訝異的是，我們觀察到威爾所忽略的路徑：生殖細胞先位居於背側，但在胚胎翻轉過程（有點像後空翻），生殖細胞會離開背側，移置蛋腔前端；待翻轉後，它們再移回背側（圖4）。迄今仍難忘那個傍晚：當我伸出手向學生道賀這是蚜蟲胚胎研究的重要突破，學生不敢置信，在位於蟾蜍山下的臺大昆蟲館，也能取得先機，做出重要的科學研究。很快地，我們將研究成果投稿至演化發育的老牌期刊 “*Development, Genes, and Evolution*”，論文順利地在 2007 年刊出^[2]。湊巧的是，該期刊發行於德國，正是 120 年前威爾發表蚜蟲生殖細胞文獻的國家。

由於蚜蟲以刺吸式口器吸吮農作物汁液，造成植物枯萎，同時在植株間傳播植物病毒，致使農損慘重，可謂名符其實之重大農業害蟲。因此，2009 年「國際蚜蟲基因體聯盟」（International Aphid Genomics Consortium, IAGC）正式成立，希望藉由國際合作的力量，為剛剛定序完成的豌豆蚜基因體序列進行分析，找出當中的生物學意涵，作為基礎研究與防治策略之參考。當我們接獲 IAGC 的訊息時，一則喜、一則憂。高興的是我們將有機會參與跨國合作，擔憂的是我們的研究計畫將進一步地提早曝露於競爭團隊之前。更令人擔心的是，我們從未有過分析全定序基因體之經驗，冒然報名參加，恐會自曝其短。幾經考慮，我們抱定 “Do or Die, or Don't Try”（RNA Tie Club）的精神勇往直前。在行前我們作足了功課，從零開始學習基因體的分析；在會議過程中我們不卑不亢，好似充滿鬥志的臺商爭取國際商機。會議的結果頗令人欣慰：我們不但得以參與生殖發育基因的分析，而且和許多位蚜蟲分子生物學家建立良好的合作關係。

IAGC 跨國合作的甜美果實終於在 2010 年收成，蚜蟲的全基因體定序分析主要成果刊登於生物學領域排名第一的頂尖期刊 “*PLoS Biology*”^[3]。參與分析工作的博士生和我有幸躋身作者列，個人並榮任生殖基因組的組長。坦白而言，沒有什麼人會在讀這篇論文時還去在乎那近百名的作者是誰；然而，若有人要瞭解參與的單位，應不難發現臺灣大學名列其中。因為該期雜誌的封面就是由臺灣大學昆蟲學系所提供（圖3），封面上的豌豆蚜是百分百的 “Made in Taiwan”！對我們而言，這是美好的開始，也是更為競爭世代的來臨。因著參與此項工作，我們的國際能見度加增，也陸續發表有關“蚜蟲原位雜合技術開發”^[4]、“蚜蟲體軸前端之決定”^[5]、“蚜蟲發育基因解析”^[6]、“蚜蟲 RNAi 分子網路之解析”^[7]等研究論文，使得蚜蟲逐步邁向模式物種的行列當中。即將召開的蚜蟲國際研討會，亦有幸擔任「蚜蟲成為研究模式物種（Aphids as Research Models）」之召集人，顯示國際研究社群對臺灣大

學蚜蟲研究團隊的肯定。然而，我們近期在蚜蟲早期胚胎發育的研究也棋逢對手，和其他國際研究團隊短兵相接，讓我們神經緊繃，深怕進度落後。毫無疑問，這些競爭都起因於蚜蟲基因序列之取得更為便利，而且誰先掌握控制它胚胎發育和繁衍的新發現，誰就取得抑止這個令人頭疼的農業害蟲散布的先機！

10年前，僅為實現當年在顯微鏡前許下的美麗願望，投身蚜蟲生殖發育基因的研究。10年來，很訝異，那樣近乎天真浪漫的情懷竟然讓我和蚜蟲研究結下不解之緣。我很清楚地知道，若非國科會、農委會、臺大校方和臺大昆蟲學系的支持，特別是那一群可能比我更浪漫的年輕人，願意加入研究團隊一起打拼，這個具有“NTU Style”的蚜蟲研究不可能延續至今，而且正朝著更具挑戰的未來邁進。📖（本專題策畫／農藝系盧虎生教授&動物學所陳俊宏教授&分子與細胞生物學研究所周子賓所長）

參考文獻：

- [1] Chang, C.-c., Lee, W.C., Cook, C.E., Lin, G.W. and Chang, T. (2006) Germ-plasm specification and germline development in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: Vasa and Nanos as markers. *Int J Dev Biol* 50: 413-421.
- [2] Chang, C.-c., Lin, G.W., Cook, C.E., Horng, S.B., Lee, H.J. and Huang, T.Y. (2007) Apvasa marks germ-cell migration in the parthenogenetic pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Dev Genes Evol* 217: 275-287.
- [3] The International Aphid Genomics Consortium (2010) Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol* 8: e1000313.
- [4] Chang, C.-c., Huang, T.Y., Shih, C.L., Lin, G.W., Chang, T.P., Chiu, H. et al. (2008) Whole-mount identification of gene transcripts in aphids: protocols and evaluation of probe accessibility. *Arch Insect Biochem Physiol* 68: 186-196.
- [5] Huang, T.Y., Cook, C.E., Davis, G.K., Shigenobu, S., Chen, R.P. and Chang, C.-c. (2010) Anterior development in the parthenogenetic and viviparous form of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: hunchback and orthodenticle expression. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2: 75-85.
- [6] Shigenobu, S., Bickel, R.D., Brisson, J.A., Butts, T., Chang, C.-c., Christiaens, O. et al. (2010) Comprehensive survey of developmental genes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: frequent lineage-specific duplications and losses of developmental genes. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2: 47-62.
- [7] Lu H-I, Tanguy S, Rispe C, Gauthier J-P, Walsh T, et al. (2011) Expansion of genes encoding piRNA-associated argonaute proteins in the pea aphid: diversification of expression profiles in different plastic morphs. *PLoS ONE* 6(12) : e28051. doi:10.1371/journal.pone.0028051.



張俊哲小檔案

在國立臺灣大學農化系、生化科學研究所畢業後，公費留考赴英國劍橋大學遺傳系取得博士學位。目前任教於臺大昆蟲學系，同時也是臺大生物科技研究所合聘副教授，以及基因體與系統生物學學位學程兼任副教授。專長為發育生物學與分子遺傳學，「分子生物學」是他在臺大的主授課，曾數度獲得校級教學優良之榮譽（2007, 2010, 2011, 2012）。研究方面，曾獲臺大生農學院年輕學者學術研究獎（2006），並於近年獲得學術獎勵和擔任國科會初、複審委員。除了專業課程，另開授「新生專題」與相關科普課程，以及擔任教學發展中心電子報主編，是位很樂於分享與幫助同學的科學家。詳細資訊請參考其個人網頁（<http://lgdntu.blogspot.com/>）。