

專訪中央研究院細胞與 個體生物學研究所 吳金洌 特聘研究員

撰文/陳政忻



看著一條條小魚悠遊穿梭在水草、礁石間，令人心曠神怡，觀賞魚已成為現代人忙碌之餘的紓壓良方，其中斑馬魚 (Zebrafish) 具有「美麗亞洲寶石」之稱，廣受許多水族愛好者青睞。斑馬魚屬小型鯉科魚類，成魚身長僅 3 公分，活動力高，對環境適應力強，死亡率亦低，具備造型優美、飼養方便的優點；但對科學家來說，斑馬魚的基因訊息不但可運用在觀賞養殖，更是人類疾病研究的主要動物模式之一。而全球首隻能專一在肝臟表現螢光蛋白的轉殖基因斑馬魚之重要推手，即是

現任中央研究院細胞與個體生物學研究所的吳金洌特聘研究員。

吳金洌老師的研究專長為海洋分子生物學、分子魚類病毒學、海洋生物技術與基因工程學，為國內第一位引進斑馬魚的研究者。尤其對斑馬魚胚胎發育、器官分化、基因調控、人類疾病模式等研究之創新性及重要性，發表多篇論文，深獲得國際肯定。同時更將現代分子生物技術導入國內水產養殖研究，如在魚類類胰島素生長因子之起動子調控及其對成長之促進有深入的研究，不但取得多項專利，也突破世界養殖魚類成長之瓶頸。在魚類對低溫適應之研究方面，發現魚類不同類型激酸激酶素在不同溫度下有不同的活性，因而有效調節各種溫度下的能量需求。在水生病毒致病機轉上，首先提出病毒會造成細胞凋亡，並且也發現病毒引發及抑制細胞凋亡的基因。這些理論的突破，在水產養殖產業上也具有重要價值。

吳金洌特聘研究員從 1976 年回國服務迄今已 32 年，在學術研究及行政服務工作上皆極為傑出。除受邀擔任國際病毒分類委員會 (ICTV) 委員、國際養殖生殖生物委員會 (RBA / IUBS) 委員、國際生物科學與技術資料委員會執行委員與國際生物種資料庫委員會委員等國際事務外，更擔任農業生物技術國家型科技計畫共同主持人、教育部尖端生

物技術科技人才培育計畫總主持人、農業生物技術產業發展方案總主持人，已為國內培育眾多英才，並促進產業發展，實為國內學者之典範。本刊此次藉由專訪，分享他在水產養殖領域之研究與產業化建議：

老師您利用斑馬魚為模式動物，研究肝臟與腸道形成缺陷之病理研究有極大貢獻，當初是為何投入此一領域研究？

斑馬魚就和白老鼠一般，可作為「模式動物」，其優點是體積小、好飼養，幼魚在短短二至三個月便可達到性成熟階段。研究者可利用調整控制光的週期，讓成熟的魚兒產下大量透明卵。在二至三天內，胚胎內器官就可發育形成，這些特徵對研究人員來說，相當有利於顯微注射及胚胎發育學的研究。學界在轉殖基因斑馬魚的研究上，藉助許多促使基因表現的啟動因子 (Promoter)，成功地在斑馬魚的特定組織或是器官上，表現出紅色或是綠色螢光蛋白，許多相當成功的斑馬魚基因研究平台也就此產生。

過去本人綜覽國際間有關斑馬魚基因研究的研究論文，鮮少發現專門研究表現在消化性臟器的啟動因子，以及基因轉殖魚模式的建立。從胚胎發育學來看，人類細胞的發育過程和斑馬魚完全相同，頓時靈光乍現想到：「若利用斑馬魚胚胎發育來探索消化道形成之相關基因的分子機制，相信對肝臟與腸道形成缺陷的病理研究上有極大助益！」。由於哺乳類動物的消化性臟器和斑馬魚一樣，是由內胚層細胞 (endodermal cells) 分化而來。當時，對控制脊椎動物外胚層與中胚層的分子機制比較，已經有不少研究，不過，內胚層的發育卻受到較少的重視。

從前人的研究發現，脂肪酸結合蛋白 (Fatty Acid Binding Protein) 具有高度結合長鏈脂肪酸的功能，而在斑馬魚身上，發現有三種脂肪酸結合蛋白，其中腸道型脂肪酸結合蛋白 (I-FABP) 表現在腸道，肝臟型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) 則表現在魚

的肝臟。因此若要瞭解 L-FABP 基因在肝臟的表現情況，唯一的解決方式，就是創造出在肝臟表現綠色螢光蛋白 (GFP) 的轉殖基因斑馬魚，有效地將斑馬魚肝臟標記出來，同樣地，也建立一種專門表現在腸道轉殖基因斑馬魚，可以隨時在體內調查腸道發育的相關調控基因。

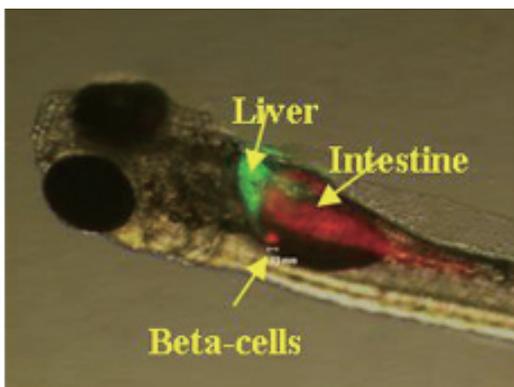
建立基因轉殖斑馬魚研究系統的主要目的，便是希望能更進一步瞭解特異性基因個別的功能與調節作用，並建立一套有效的脊椎動物系統模式，以研究肝臟和腸道作用機制及其相關人類的疾病，對於消化系統之致病機制探討、病毒感染之影響，以及藥物之快速活體篩選等生物科技發展，具有相當重要的創新性。

請老師分享開發基因轉殖斑馬魚研究系統之歷程。

有了研究標的後，接下來便是繁複的實驗過程。第一步先從將斑馬魚的肝臟型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) 基因，分離出一段長為 2.8Kb，僅表現在斑馬魚肝臟的啟動因子基因；此外為瞭解腸道發育情形，也從斑馬魚的腸道型脂肪酸結合蛋白 (I-FABP)，分離出一段長為 4.5Kb，僅表現在腸道的啟動因子基因。將 2 段基因分離出來之後，分別在啟動子基因後接上螢光蛋白，構成兩種 DNA 構築體 (construct)，而螢光蛋白則扮演著報導者的角色，以作為研究者觀察斑馬魚肝臟和腸道的觀察依據。再利用顯微注射，將兩種 DNA 構築體分別送入野生斑馬魚交配而尚未分裂的受精卵。5 天後，用螢光顯微鏡篩選具有螢光反應的魚種，在 28~30 度的恆溫與光週期環境下培養 3 個月，等待性成熟後與野生種斑馬魚交配繁殖，分批收集受精卵並繼續培育，轉殖斑馬魚第一子代於焉誕生。同時從中觀察第一子代是否在不同啟動因子驅動下，產生具有肝臟表現綠色螢光品系，以及腸道表現紅色或是綠色兩種轉基因品系，並經觀察結果挑選出具遺傳能力的轉殖基因魚。

爲了確定肝臟轉殖基因參與發育過程及在特定組織表現情況，還需分別比較不同發育階段之 L-FABP 基因和綠色螢光蛋白基因表現情形。結果發現螢光蛋白無論在 36 小時後基因開始表現，或是只表現在肝臟部位都非常類似。進一步分析結果指出，斑馬魚肝臟可能在受精後 2 天開始就有脂質的代謝功能，在第 6 天有明顯的細胞增生現象，第 7 天有新月形狀出現。由這些結果推測，轉殖基因的表現情況和內生基因的表現情況相符合。

當時較令人感到驚艷的是，轉殖基因斑馬魚在經過十三個月的發育過程後，仍然可在其肝臟上偵測到明顯的綠色螢光，而看不見肝臟有發育上的缺陷產生。因此，遂誕生全球第一隻能夠專一在肝臟表現螢光蛋白轉殖基因斑馬魚，同時也誕生全球首隻能夠專一在腸道表現螢光蛋白轉殖基因的斑馬魚。



基因轉殖斑馬魚動物模式／吳金洌老師 提供

基因轉殖斑馬魚研究系統除了用在科學研究外，尚有何種用途？

在寓教於樂的科學教育方面，如果將這種技術加以推廣到肌肉透明的觀賞魚（如玻璃貓），只要藉由肉眼就可以觀察到消化道器官的發育、形成，能灌輸學生們在發育生物學的知識，有助於使更多人才投身科學研究。目前已有國內生技公司嗅到商機，正開發類似產品。

一般大眾擔心基因轉殖魚若逃至田野，將會造成生態危機，關於這點您的看法為何？

魚類基因轉殖研究至今，尚無法上市，其主要原因在於基因轉殖田間隔離試驗場所，極爲短欠，且尚無良好的基礎研究與技術來發展評估生物安全性。基因轉殖魚的研究中如何造成轉殖魚的後代不孕是一個重要的生物安全性考量因子，在實驗室中可利用 RNAi 干擾技術與基因轉殖的技術對 GnRH 或 GtH 等生殖相關基因之功能做抑制，進而產生不孕之基因轉殖魚種。

另外，應用魚類育種也可產生不孕子代，如將四倍體和兩倍體染色體的魚交配在一起，自然生下三倍體染色體的螢光魚，這種魚仍有公、母之分，也可以交配，但無法正常受精、無法孵化，永遠無法產生下一代，因此也不會破壞生態。

請您談談目前貴實驗室在魚用疫苗的研發概況？

以海洋養殖魚類來說，病毒性疾病的報導越來越多，目前全世界尚無法完全瞭解魚類疾病的致病機制，故無法研發有效的魚用疫苗。但在魚類感染性胰臟壞死病毒 (IPNV)，本實驗室發現其致病機制乃細胞的反凋亡與凋亡之調控作用。感染性胰臟壞死病毒 (IPNV) 是魚類最重要的致病病毒，屬水生雙股 RNA 病毒屬，本實驗室以台灣分離之 EIS 病毒株進行基因體分析、功能探究及致病機制。首先發現 IPNV 之 VP5 之反凋亡功能，加上後續 VP3 之凋亡功能，最後造成細胞壞死而完成病毒之致病過程，因而提出非典型凋亡 (non-typical apoptosis) 之病毒與宿主互相作用之機制模式，並且取得魚病控制新發明之美國專利認可。

後來提出病毒會造成宿主的重要存活因子 (MCL-1) 下降之報告及宿主細胞的 Bad 基因在病毒感染後被誘導表現，並透過酪胺酸激酶 (tyrosine kinase) 之訊息傳導途徑，促進宿主細胞死亡。病毒

感染，亦能造成負責吞噬細胞凋亡小體的磷脂酰絲胺酸受體 (PSR) 期表現量增加。此外，本實驗室以 PSR 之 Morpholino 寡核苷酸對會集結在凋亡細胞殘骸的 PSR，進行競爭抑制，發現正常體節、腦、心臟及脊椎的發育逐步被干擾，此不健全的胚胎，在注射入 PSR 之 mRNA 後恢復正常發育。此結果支持斑馬魚胚胎擁有會吞噬凋亡細胞殘骸 PSR 依賴系統之假說，且其在斑馬魚器官形成扮演重要角色。

另外，魚類神經壞死病毒 (NNV) 會引發病毒性腦炎及視網膜病變，在感染魚體的組織切片上，可以觀察到神經組織及視網膜有空泡及壞死的現象，且其能感染眾多海洋魚類，常常造成養殖戶重大經濟損失。魚類神經壞死病毒包含兩條正股 RNA，RNA 1 為 3.1 Kb，其負責 RNA 聚合酶的表現；RNA 2 為 1.4 Kb，合成外殼蛋白。我們利用雙股 RNA 誘發出 Dicer 生化途徑後，攻擊病毒的 RNA 造成 NNV 在細胞內無法複製而降低病毒複製及傳播之速度，期能有效阻止 NNV 以水平及垂直之方式的感染，並於活體中達到功效。

現在則著重於疫苗田間試驗工作與評估，並落實商品化應用之目標。希望將不同設計的 RNA 疫苗利用口服方式進入石斑魚內，偵測其對抗病毒的能力，並以病毒偵測方法來偵測不同組別的疾病量的差異性，來達到 RNA 疫苗的最佳化。同時亦使用含抗 NNV 之 IgY 的蛋粉飼料來抵抗石斑神經壞死病毒的攻擊，此種防治方式為被動免疫方式，主要利用飼料內抗 NNV 之專一性的 IgY 來中和魚表面及腸道的病毒，期能有效阻止 NNV 的感染，並提供魚苗成長的營養，也能有效降低施打疫苗之人事成本，這樣的技術可以提供未來魚類抵抗魚類神經壞死病毒的一個策略。

請您簡述貴實驗室在提升魚類生長效率及抗寒性之應用研究？

以斑馬魚及吳郭魚之模式為基石，本實驗室可

應用至生長研究與抗寒性兩方面。在生長研究方面，本實驗室從吳郭魚的基因體中，找到兩種類胰島素生長因子 (IGF)，分別為 IGF-I 及 IGF-II。將兩者注射於吳郭魚體內，在十周內便可使魚的體重增加至未注射者的 1.5 倍。進一步分析生長激素 (GH) 及類胰島素生長因子 (IGF) 之內分泌功能軸關係，發現 IGF 表現係由不同選擇性剪接 (Alternative splicing) 而成，由轉殖技術証實 IGF 及 IGFBP 具有活體內促進生長之功能，若能順利將其商品化，極具市場潛力。

此外肌肉生長抑制素 (Myostatin) 一直是分子生物學家的研究目標。由於 Myostatin 會限制哺乳動物肌肉的生長，包括人類；當負責這個蛋白質的基因受到改變或是抑制時，會促進肌肉的生長並減少脂肪的貯存。若將 Myostatin 應用於魚類，亦能提升魚類生長效率。在低溫適應方面，由於台灣位處亞熱帶，所生產魚種多為亞熱帶魚種，適應溫度介於攝氏 15 度至 30 度間。每當寒流來襲，養殖業者往往因寒害而遭受重大損失，而某些魚類具有耐寒性，正是因為牠在面對低溫時，能發展出完備的代謝補償機制，故本實驗室希望能藉此改良養殖魚種對環境的適應性。首先發現鯉魚肌肉型肌酸肌酶 (M-CK) 在低溫下可發揮活性，負責在低溫下提供魚類能量，遂利用基因轉殖方式，將此抗寒基因轉殖至斑馬魚，提昇斑馬魚的抗寒力。上述兩類基礎研究成果均已建立研究模式，現正與國內數間生技公司合作。

請您談談國內農業生技的專利布局。

個人認為農業生技與醫藥生技兩者的市場導向不同，故專利布局應有所差異。舉例來說，由於台灣地處亞熱帶，農業生技之研究開發標的多為亞熱帶動植物品種，若將亞熱帶物種之專利到歐美等溫帶國家申請，實質效益有限，故國內農業生技的專利布局應著重在未來可發展市場，如東南亞等；而醫藥市場長期以來掌握在歐、美等大國，故醫藥生

技專利在此兩地區方有發展空間。

此外我國應建立水產種苗法，如此一來在外銷時，方可保障國內種苗業者。台灣在植物品種方面已建立「植物品種及種苗法」，其中已有限制種苗、種苗之收穫物與其直接加工物輸出入的規定；「畜牧法」尚針對種畜禽進行種源管理，其規定發現、育成或自國外引進新品種或新品系之種畜禽或種原者，應向中央主管機關申請登記，經審定核准登記後，始得推廣、銷售。然而，目前國內並無明確法規能保障水產種苗，國際上亦無類似規範，倘若能建立水產種苗法，相信能鼓勵更多業者投入。

吳老師您長年來與產業互動密切，對於國內水產種苗產業化方向的想法為何？

國內水產養殖業已發展許久，雖然已累積相當豐富的成果，但各生產階段分工明確，若能於各階段引進關鍵技術串連整合，應能發揮綜效，為我國水產種苗業者打開國際市場。

由於水產種苗的種類繁多，包括魚、蝦、貝等等，生產過程會依屬性不同而有所差異。若從魚苗生產流程來思考，在種魚篩選及培育時，依業者本身的需求，選擇生產食用魚苗或觀賞魚苗。篩選出種魚後，需檢測其是否帶有特定病原，故此時應要有特定病原分子檢測技術來輔佐。爾後再將優質、無毒的種魚收集並保存，以利後續的育種。

在育種技術開發上，可應用傳統育種方式培育優質品系，同時更需仿照畜牧動物的品系族譜，建立種魚的品系族譜，方能提供品質穩定之魚苗，更能藉此打開業者的品牌知名度。另外，可引進不同魚種做種間雜交或應用突變育種技術，發揮遺傳優勢，找出具競爭力的種魚。近來生物技術快速發展，可應用分子標幟輔助育種 (Marker Assisted Selection, MAS) 加速優質魚種之培育；染色體操作技術 (Chromosomal Manipulation Technology) 亦可培育出生長速度快的魚種。無論觀賞魚苗或食用魚苗皆需導入不孕技術，如雜交技術、基因轉殖技

術、及染色體操作技術等可使魚種不孕，藉此保障種苗業者。

除了魚苗育種外，生殖調控在水產種苗的生產上，更是不可或缺。生殖調控包含自然產卵、生殖腺人工催熟、環境調控（如光週期、溫度、鹽度、壓力）及營養調控，之後便是自然或人工授精之受精卵孵化及發育。此外魚苗培育的過程，應開發飼料及餌料生物培養技術，同時尚要注意水質調控，再輔以 SPF 種苗培育技術與疾病預防技術，如疫苗開發、益生菌 (Probiotics) 及魚用保健品，使魚苗無病毒感染且健康成長。

外在環境控制方面，則應注意養殖池的水質管理、魚池清潔管理，才不會讓之前辛苦培育的無毒魚苗白費。同時應建立魚苗檢疫及認證制度，證明魚苗的品質，最後搭配魚苗活體技術的開發，降低魚苗的耗損率，便能提高業者的獲利。國內水產種苗產業化應考量整體的生產流程，各階段環環相扣，只要稍有不慎，之前努力的成果便會瞬間化為烏有。

結語

自七〇年代即投身動物研究的吳金洌特聘研究員，雖然以基因轉殖斑馬魚研究系統獲得國際重要的學術成就，但本刊在訪談的過程中，吳老師不時表達出希望學術研究能與產業密切結合之想法，讓研究成果得以應用於產業。基於此一想法，吳老師的研究室也因此延伸出魚類繁殖力的改進、環境適應性的改良，以及疫苗研發等研究課題，期望藉由生物技術的導入，增加水產養殖的產量與價值，將台灣深具潛力的水產養殖業不斷向上提升。在此信念下，相信吳金洌特聘研究員及其研究室團隊必能為我國水產養殖業開創美好的明天。

AgBIO