

水產種苗研究團隊－台灣重要養殖魚貝類之抗病基因研究

張錦宜、吳嘉哲、陳力豪、林金榮
水產養殖組

水產生物生活的環境極其複雜，其抗病能力仰賴極高效率的非特異先天性免疫 (innate immune)，其中，抗菌胜肽即扮演重要角色。近年來，許多重要的水產生物抗菌胜肽陸續被發現，其中 defensin 與 cathelicidin 為魚類抗菌胜肽中最廣受矚目的兩大家族。Defensin 是一群具 6 個半胱氨酸且帶正電荷的抗菌胜肽家族，其分子量小，多數由不超過 100 個胺基酸組成，而且同時具有親水端與疏水端，兼具殺菌及抗病毒的功能，除了人類與哺乳類之外，在許多植物與昆蟲中亦有發現。在水產生物方面，目前發現具 defensin 的種類包括貽貝、扇貝、牡蠣、鮑魚、斑馬魚、河豚、鱒魚、日本稻田魚及比目魚。

本研究自尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 選殖出一個抗菌胜肽基因，並命名為 OnBD。OnBD 基因全長 782bp，具有 3 個可轉錄序列 (exon)，共長 201bp，可轉譯出 66 個胺基酸。經電腦分析 OnBD 胜肽的胺基酸序列組成，其中 N-端為 24 個胺基酸的訊號序列 (signal peptide)，C-端則為 42 個胺基酸組成抗菌序列 (antimicrobial peptide)。成熟的抗菌序列具有 4 個帶正電胺基酸及 1 個帶負電胺基酸，淨電荷為+3，OnBD 並同時具有親水結構

與疏水結構，為兩性分子 (圖 1A)。此外，OnBD 的組成胺基酸具有完全符合魚類 defensin 的 6 個保守印記 (conserved signature) 半胱氨酸，經電腦四級結構模擬分析 (圖 1B) 顯示，這 6 個半胱氨酸可形成 1-5, 2-4, 3-6 鍵結的 3 對雙硫共價鍵，其分子構型屬於典型的 β -defensin 抗菌胜肽家族 (defensin family) 成員之一。

以即時定量 PCR 分析 OnBD 的組織表達分布，結果發現健康的吳郭魚的血液、鰓、頭腎、腸道、肝臟、肌肉、皮膚、脾臟等均有 OnBD 表達，而以皮膚的表達量最高；以病原性愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 人工感染刺激後，除皮膚外，頭腎、脾臟及肝臟中的表現量亦會顯著增加 (圖 2)。

將化學合成之 OnBD 成熟抗菌片段 (由 N 端 42 個胺基酸組成) 分別針對 8 種水產常見病原菌進行最小抑菌濃度 (MIC) 試驗，結果顯示，OnBD 對不同的水產病原菌均有抑制能力，但抗菌活性不盡相同，以對 *E. tarda* 及鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 的抑菌效果最佳，MIC 為 4 μ M；對親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 抑菌效果較差，MIC 為 32 μ M。

本研究為 defensin family 的成員首次在吳郭魚中發現。

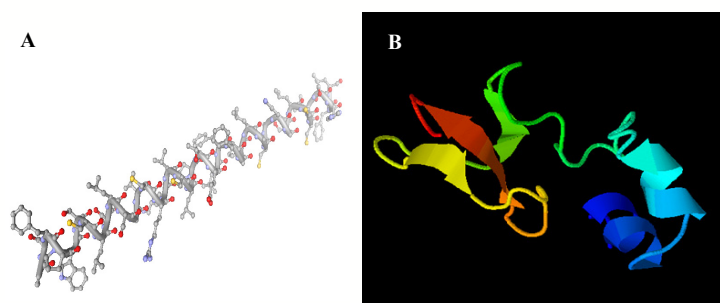


圖 1 電腦模擬吳郭魚抗菌胜肽 OnBD 的分子結構。A：三度空間模擬可見 OnBD 同時兼具疏水性的芳香環狀結構與具親水性的 α -螺旋結構，為兩性分子；B：四級結構模擬分析則顯示 OnBD 呈現典型 β -defensin 的分子構型

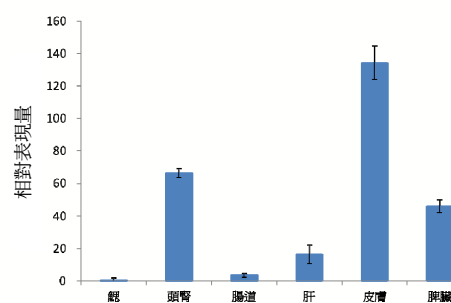


圖 2 以即時定量 RT-PCR 分析吳郭魚 OnBD 抗菌胜肽 mRNA 經 *E. tarda* 人工注射感染後，在各組織的表現情形，三重複試驗