

# 海洋中心電子報

## 專題報導

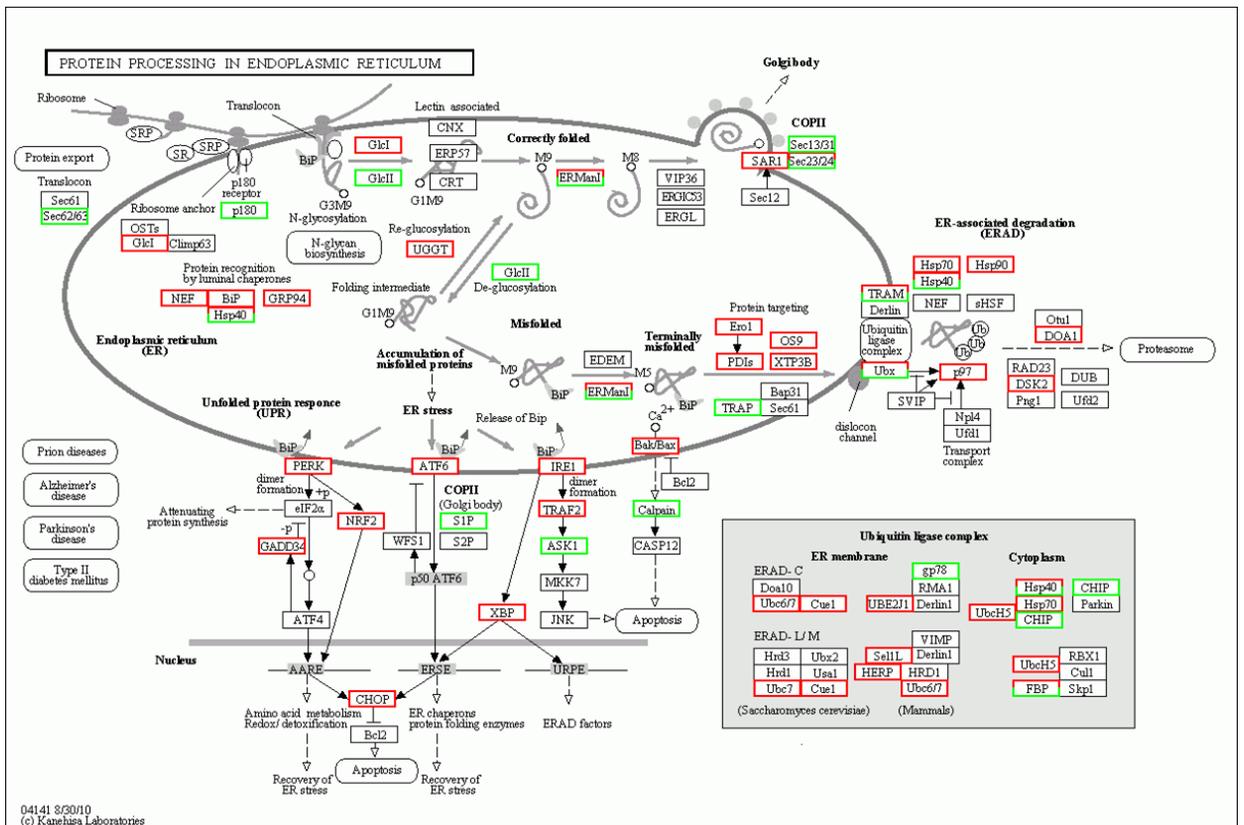
### 高通量核酸定序技術：石斑魚神經壞死病毒解密



水產養殖學系  
呂明偉老師

海洋大學養殖學系呂明偉教授在海洋中興支援下，利用次世代定序技術建立石斑魚腎細胞轉錄基因庫，發現25條unigenes是內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress: ER stress)相關基因，包括ER chaperone immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP)， PKR-like ER kinase (PERK)， activating transcription factor 6 (ATF6)， inositol-requiring 1 (IRE1)和 X-box-binding protein (XBP-1) (圖1)。本研究證實NNV病毒感染細胞後BiP的表現量上升，而在BiP的控制下，三個調節因子 (PERK， ATF6和IRE1) 表現量也有增加的趨勢，此將造成細胞凋零。另一項重要發現是，在共軛焦顯微鏡和免疫共沉澱分析下可證實，BiP蛋白可以和NNV外鞘蛋白相互作用(圖2)，可以一起被發現位於受感染細胞的細胞核內。同時也證實證明NNV外鞘蛋白能夠在病毒複製期間進入受感染細胞的細胞核中，由此可知 NNV外鞘蛋白可能也在調控感染細胞的基因表現中發揮作用。石斑魚是世界重要的經濟魚類，也是台灣高經濟價值的水產養殖魚種，但由於台灣養殖面積狹隘、放養密度過高，造成許多疾病產生，石斑魚苗在孵化後四十天內極易受到神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus: NNV)感染，得到病毒性神經壞死病(viral Nervous Necrosis; VNN)，也被稱為病毒性腦病和視網膜病(Viral encephalopathy and retinopathy: VER)，感染NNV會引起魚體不正常游動，有突發性的迴旋打轉，魚苗體色變深及部份魚苗會發生脊椎側彎，死亡率高達90%以上。

價值的水產養殖魚種，但由於台灣養殖面積狹隘、放養密度過高，造成許多疾病產生，石斑魚苗在孵化後四十天內極易受到神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus: NNV)感染，得到病毒性神經壞死病(viral Nervous Necrosis; VNN)，也被稱為病毒性腦病和視網膜病(Viral encephalopathy and retinopathy: VER)，感染NNV會引起魚體不正常游動，有突發性的迴旋打轉，魚苗體色變深及部份魚苗會發生脊椎側彎，死亡率高達90%以上。



圖一、內質網內相關的基因表現變化圖譜。分析NNV在感染GK cell 6小時和33小時後基因的表現量變化，確定總共有117條基因與ER pathway有關。紅色框為基因表現量在NNV感染GK細胞後是增加的。綠色框為基因表現量在NNV感染GK細胞後是下降的。

# 海洋中心電子報

CENTER OF EXCELLENCE FOR THE OCEANS

研究NNV病毒在石斑魚細胞的致病性分子機制，存在一個很難克服之障礙，就是缺乏足夠的宿主基因組信息。近代的次世代定序 (next generation sequencing: NGS) 技術可以解決此一問題。NGS技術應用在轉錄組測序(RNA解碼)，在不明瞭的基因上提供有價值的功能信息，也就是能將生物功能基因表現量呈現出來。本研究使用石斑魚腎細胞 (grouper kidney cell: GK cell) 通過NGS技術建立一個轉錄基因庫，內含五千一百萬條原始數據，組裝後獲得66584條基因(unigenes) (表1)，再通過各種數據庫配對後，依據這些基因的特徵分成不同的功能類別。分析結果證實有25條是內質網壓力(endoplasmic reticulum stress: ER stress)相關基因，其中包括ER chaperone immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP)， PKR-like ER kinase (PERK)， activating transcription factor 6 (ATF6)， inositol-requiring 1 (IRE1)和 X-box-binding protein (XBP-1) (圖1)。

表一、GK cell轉錄組測序

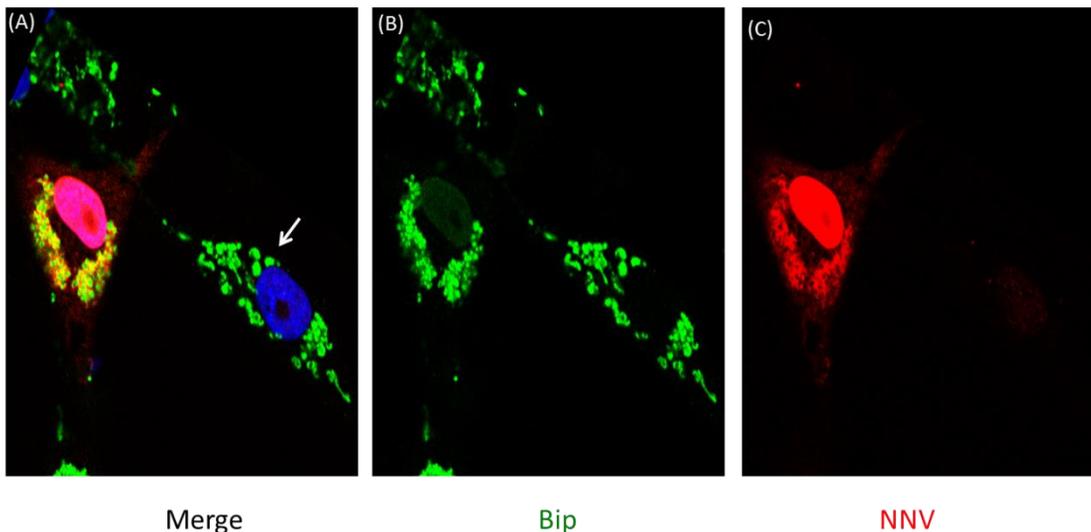
Total Reads	51,198,090
Total Nucleotides (nt)	4,607,828,100
Total Contig Number	204,517
Mean Length of Contig (bp)	248
Total Contig Length (nt)	50,696,343
Total Scaffold Number	79,687
Mean Length of Scaffold (bp)	527
Total Scaffold Length (nt)	41,984,530
Total Unigene Number	66,582
Mean Length of Unigene (bp)	603
Total Length of all Unigene (nt)	40,146,797

許多研究顯示病毒誘導的ER stress可決定受感染細胞的命運，及受感染的細胞將走向存活或死亡，細胞無法克服ER stress會導致最終走向凋亡。在ER stress的細胞內BiP，也被稱為glucose-regulated protein 78 (GRP78)，可以藉由控制代謝路徑(unfolding protein response (UPR) pathway)來紓緩ER stress。。這些調節因子藉由協助蛋白質折疊減輕ER stress，降低新合成的蛋白質移動到ER，並促進ER內的蛋白質降解。

# 海洋中心電子報

CENTER OF EXCELLENCE FOR THE OCEANS

本研究證實NNV病毒感染細胞後BiP的表現量上升，而在BiP的控制下，三個調節因子（PERK，ATF6和IRE1）表現量也有增加的趨勢，。另一項驚奇的研究發現是，在共軛焦顯微鏡和免疫共沉澱分析下可證實，BiP蛋白可以和NNV外鞘蛋白相互作用(圖2)，可以一起被發現位於受感染細胞的細胞核內，此外，過量表現外鞘蛋白會觸發體內的ER stress和轉染細胞的凋亡。有研究證實BiP蛋白與RdRp的相互作用可增強線粒體調節的細胞死亡，當細胞受NNV感染後，BiP和病毒蛋白之間的作用對細胞之後的命運有重要的影響。最後，我們證明NNV外鞘蛋白能夠在病毒複製期間進入受感染細胞的細胞核中，這一結果推測NNV外鞘蛋白可能也在調控感染細胞的基因表現中發揮作用。



圖二、定位受NNV感染的石斑魚鰭細胞(Grouper fin cell line:GF-1)內NNV外鞘蛋白和BiP蛋白的位置。GF-1感染NNV(MOI=10) 24小時後，固定細胞後以rabbit anti-NNV capsid和mouse anti-BiP共染，之後再以Texas Red conjugated anti-rabbit IgG and Fluorescein conjugated mouse IgG螢光染色，以4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)染色細胞核。螢光染色標示出NNV外鞘蛋白(C)以及BiP蛋白(B)所在的區域，通過合併圖像(A)可觀察到，在受NNV感染的細胞核內可發現有NNV外鞘蛋白和BiP蛋白的分布，而白色箭頭所指為未受感染的GF-1 cell。

## 中心業務報告

本校「海洋中心」與「海洋能源與政策研究中心」於9月14日共同舉辦「workshop on OWC」論壇，此次很榮幸邀請到梅強中院士(MIT)擔任keynote speaker，敬邀本校師生同仁踴躍參加。

時間：2015/9/14 9:30am~5:00pm

地點：人文社會科學院畢東江國際會議廳

議程等相關訊息請見海洋中心網站(<http://www.ceo.ntou.edu.tw/>)。