

模式生物基因體學特論期末報告

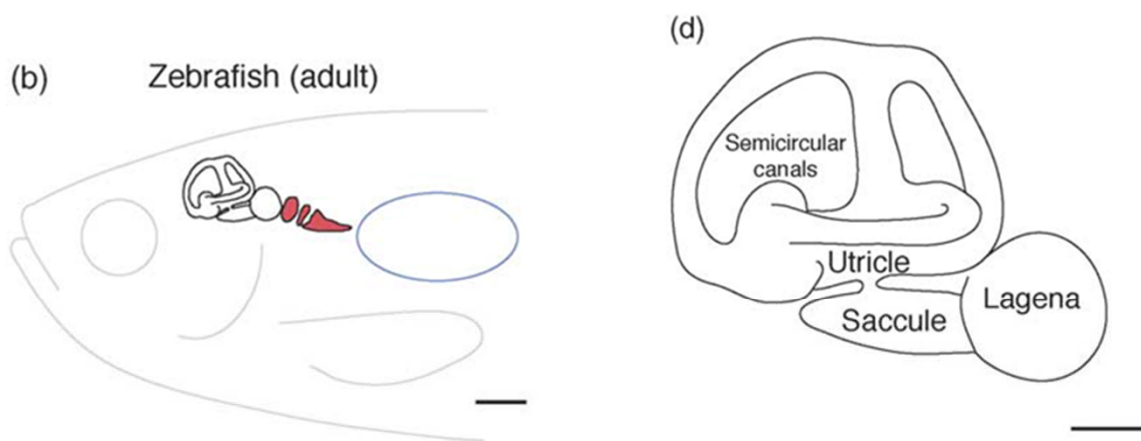
以斑馬魚作為聽力缺損之 模式生物

基蛋所 博一 林盈宏/劉逸軒副教授



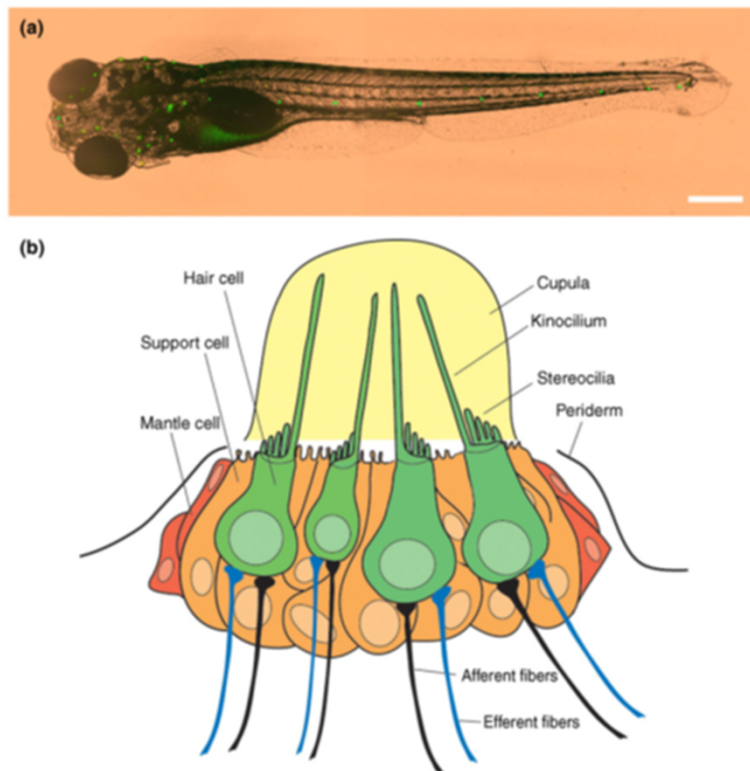
模式生物可應用於找尋新的基因或是作為研究基因功能的驗證平台。舉例來說，聽力缺損是常見的遺傳性疾病，基因於聽損之發生扮演極重要的角色。目前已知有超過 100 個基因與聽損有關，但無法直接於人體內耳進行研究，追蹤人類內耳的發育，因此有賴於動物模式的建立，以克服這些困難。

現今的聽損研究大多以和人類同為哺乳類動物的小鼠為模式生物，雖然在解剖學上來說，小鼠耳朵構造與人類較為相近，但相較於小鼠，斑馬魚成魚約為三公分，因此在相對小的空間內可以養殖大量的個體，且一次產卵可以得到約200個胚胎，因此建置的成本較為便宜，需要的空間也較小。斑馬魚沒有外耳與中耳的構造，亦沒有其他脊隨動物保有的特化聽覺器官—耳蝸，但擁有同脊隨動物的內耳(圖一)，成年的斑馬魚耳朵可聽到 100-4000 Hz 範圍的聲音。儘管斑馬魚耳朵在解剖學上明顯的差異，但毛細胞的構造與功能與哺乳類動物呈現高度保留。這些條件使得斑馬魚可以是研究聽損的模式生物。



圖一、斑馬魚內耳的位置與主要構造。
(Whitfield TT *et al.* Drug Discov. Today 2005).

至於內耳與毛細胞的觀察，斑馬魚無疑是最適合的模式生物。由於斑馬魚為體外受精，胚胎非常容易取得與觀察。儘管內耳是內部的器官，但斑馬魚的胚胎和幼魚都是透明的，因此發育早期即可在活體觀察內耳的發育和毛細胞的形成，這是在子宮內發育的小鼠所無法做到的。胚胎透明的特性也使得在活體內可以利用染色技術做觀察。此外，斑馬魚的側線系統是另外一個研究毛細胞的優勢，側線包含了一連串的感覺器官，稱作神經丘 (**neuromasts**) (圖二)，神經丘內的毛細胞與內耳的毛細胞相似，但位於皮膚表面，可以做直接的觀察，因此許多斑馬魚毛細胞功能的研究使用的是側線的毛細胞而非內耳毛細胞。

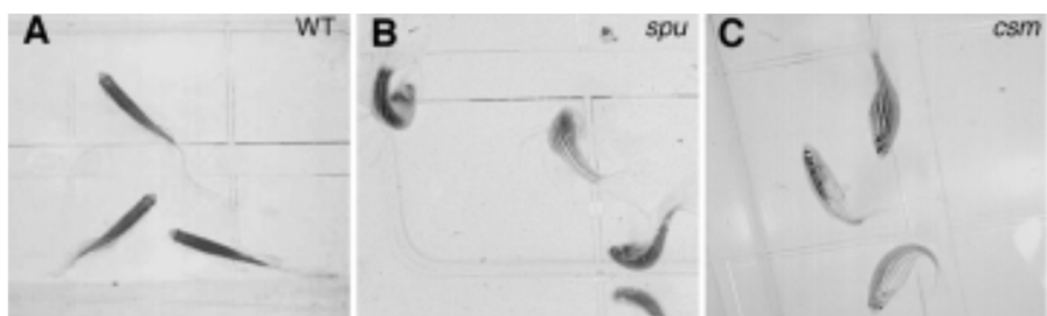


圖二、斑馬魚五天幼魚的神經丘經過 YO-PRO1 染色與神經丘圖解
([Ou HC et al. Drug Discov Today. 2010](#))

斑馬魚的另外一個優勢是發育非常快速，世代時間約為三個月。受精後 24 小時毛細胞即開始分化，80 小時後就可測量毛細胞活性。內耳的主要結構在三天的幼魚就會出現，受精後三到五天就會對聲音或震動呈現驚嚇反射 (startle reflex)。而小鼠毛細胞是在胚胎的第 15 天才開始分化，到出生後聽力才成熟。

綜合以上，應用斑馬魚研究與毛細胞相關的聽力缺損擁有幾項特質：(1) 高繁殖力，每次交配可產生上百隻後代；(2) 可做活體螢光標定，側線的毛細胞可以使用活體染劑；(3) 透明的外觀，容易直接在活體觀察。此外，斑馬魚也易於基因操作，進行正向遺傳學 (forward genetics) 與反向遺傳學 (reverse genetics) 的研究。

在正向遺傳學的研究中，可以利用 N-Ethyl-N-nitrosourea (ENU) 產生大量的點突變品系， γ 射線則可以產生較大範圍的受損，如染色體的缺失或重組。經過突變劑的處理之後，最直接的篩選方式就是觀察是否有型態的缺陷，耳朵整體的形狀是最明顯的特徵，另外耳朵的大小以及異常的半規管形成，也利用了這個技術篩選出突變的品系。除了型態之外，行為的測試也可以運用在突變品系的篩選，如異常的游泳模式可以篩選出前庭的缺陷 (圖三)。此外，也可以藉由聲音對成魚直接的刺激，觀察驚嚇的反應，來篩選與晚發性聽損有關的突變。然而，正向遺傳學的篩選受到了後續分離出突變點位的效率較差以及需要可以觀察到的表現型等限制。

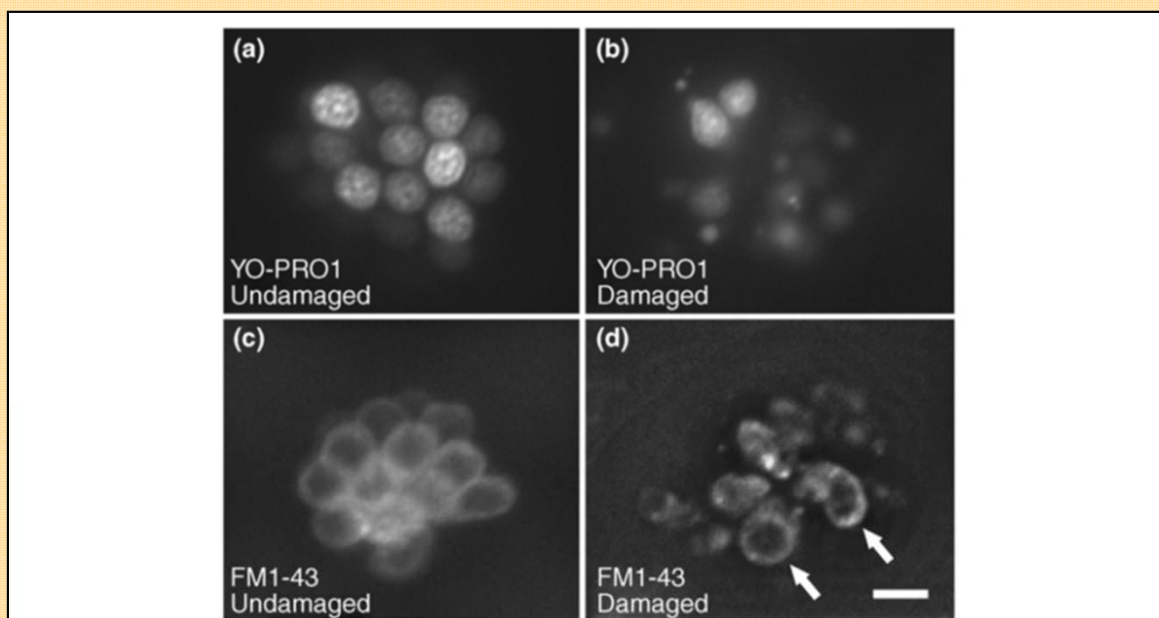


圖三、野生型斑馬魚與突變型斑馬魚游泳模式。

(Whitfield TT, *J Neurobiol.* 2002).

反向遺傳學的研究可以利用 **morpholino** 與核酸序列互補的特性，與 **mRNA** 結合，抑制目標基因轉譯為蛋白質，亦可設計 **morpholino** 使其結合在剪接位點 (**splice site**) 的位置，阻礙形成 **mRNA** 的過程。**Morpholino** 通常是在斑馬魚一到兩個細胞時期直接注射到胚胎內，是非常簡便的技術，但有明顯的限制。細胞內的 **morpholino** 濃度會隨著細胞數目的增加逐漸稀釋，若在單細胞時期就注射 **morpholino**，其效能只能維持在發育的前五天。且此技術只能抑制基因表現量，並非完全剔除目標基因，因此稱作為 **knockdown**。目前以斑馬魚為模式生物的聽損研究，多是以 **morpholino** 的 **knockdown** 方式來進行。直到近年來基因編輯技術的發展，包括 **ZFNs**，**TALENs**，與 **CRISPR-Cas** 系統的出現，才使得斑馬魚可以進行 **knockout** 的研究，但截至目前為止，尚未有利用基因編輯技術培育出的基因剔除斑馬魚作為聽力缺損動物模式的研究。

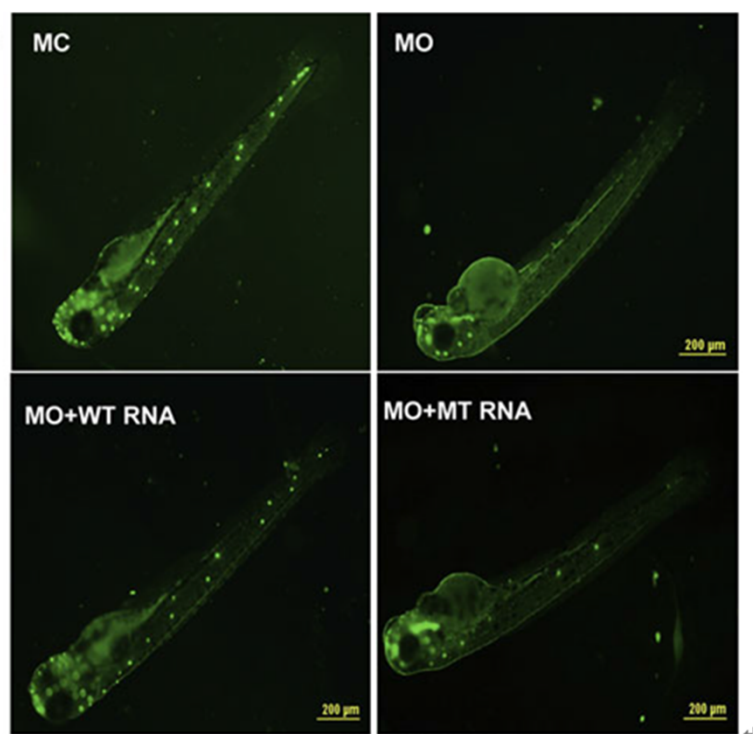
除了基因突變的研究，斑馬魚的側線是一個理想的藥物篩選平台，可用於測試會導致或保護毛細胞死亡的藥物。**YO-PRO1** 是一種能選擇性標定毛細胞細胞核的螢光染劑，將五天大的斑馬魚以 **YO-PRO1** 標定其側線毛細胞 30 分鐘，放入 96 孔盤之後，暴露於不同的藥物，再經過具有耳毒性藥物的處理，藉由螢光顯微鏡觀察側線毛細胞的型態，就可以篩選出具有保護效果的藥物 (圖四)。



圖四、正常與受損的神經丘表現，可作為快速的藥物篩選。

([Ou HC et al. Drug Discov Today. 2010](#)).

斑馬魚也可作為聽損基因致病機制的驗證平台，隨著定序技術的進步，越來越多新的致病基因被發現，但需要一個好的驗證平台來證明基因突變與聽損的關係，以及其致病的機制。除了小鼠之外，斑馬魚提供了另一個快速且較低成本的方式。針對找到的致病基因，除了可以設計 **morpholino** 去抑制正常蛋白質的產生，觀察與控制組的表現差異，也可以同時注射 **morpholino** 與目標基因的 **mRNA**，觀察是否注射進去的 **mRNA** 可以恢復被 **morpholino** 所抑制的蛋白質的功能。注射帶有不同突變位點的 **mRNA**，更可以評估不同的突變位點對於基因功能的影響 (圖五)。



圖五、神經丘的毛細胞在控制組與實驗組的表現差異。

注射 morpholino 的斑馬魚無法染出毛細胞，同時注射 morpholino 與 mRNA 可以恢復毛細胞的構造。

(Li J *et al.* Hum Mutat. 2015)

過去研究的證實以及新技術的開發，使得斑馬魚可以作為聽損的模式生物。相較於小鼠的研究，斑馬魚可用較少的經費與時間得到實驗的結果，除了可單獨作為基因功能研究的工具之外，亦可在研究初期提供有利的證據支持後續小鼠研究的方向或發展。除了聽損之外，適合的人類疾病都可以經由斑馬魚模式生物的篩選，加上小鼠等哺乳類動物模式的驗證，作為疾病的動物模式研究平台。

參考文獻

1. Whitfield TT (2002) Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J Neurobiol* 53: 157-171.
2. Whitfield TT, Mburu P, Hardisty-Hughes RE, Brown SDM (2005) Models of congenital deafness: Mouse and zebrafish. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2: 85-92.
3. Ou HC, Santos F, Raible DW, Simon JA, Rubel EW (2010) Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug Discov Today* 15: 265-271.
4. Huang P, Zhu Z, Lin S, Zhang B (2012) Reverse genetic approaches in zebrafish. *J Genet Genomics* 39: 421-433.
5. Li J, Zhao X, Xin Q, Shan S, Jiang B, et al. (2015) Whole-Exome Sequencing Identifies a Variant in TMEM132E Causing Autosomal-Recessive Nonsyndromic Hearing Loss DFNB99. *Hum Mutat* 36: 98-105.