

The tropomyosin structure and phylogenetic analysis of five fish species

Yu-Cheng You and Ming-Chih Huang*

Department of Biological Sciences and Technology, National University of Tainan.

Abstract

Fish are vertebrates and the largest number of biological species, they also have high degree of biodiversity. In order to survival in different environments, fish develop many patterns or mechanisms to adapt surrounding changes. For this reason, there are many fishes look similar but not the same species. To identify a correct species is an difficult but important issue for fish science.

Today species identification and classification of commonly used molecular markers including mitochondrial cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase subunit I. But not all of them are applicable for above systems. This study wanted to use tropomyosin as a new molecular markers for fish identification, classification and development. Movement proteins are long-standing presence protein, one of movement proteins, tropomyosin can coordination of regulation and the promotion of muscle contraction with actin and myosin. This study use highly conserved features of tropomyosins as a molecular markers by DNA or protein sequences.

The use of the logged database of fish muscle tropomyosin amino acid and DNA sequences to calculate and simulation five fish relationship including white croaker (*Pennahia argentata*), northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*), tiger pufferfish (*Takifugu rubripes*), zebrafish (*Danio rerio*), Atlantic salmon (*Salmo salar*). We will investigate whether tropomyosin can become a good molecular markers or not.

By results, we found the primary and second structure of tropomyosin were different among the five fishes. The various of structure could help the fish with some different biological functions to adapt environment. The results of used tropomyosin as molecular marker to establish phylogenetic tree were more close to traditional theory than used other markers. This means that tropomyosin can be used as molecular markers for fish evolution and phylogenetic analysis.

The study wish to take views to explain the relationship between biological evolution by tropomyosin and a new molecular marker to species identification.

Key words: fish, muscle, tropomyosin, cytochrome *b*, cytochrome *c* oxidase subunit I

* Corresponding author: mingchih39@mail.nutn.edu.tw

DOI : 10.6159/IJSE.2016.(6-1).02

原肌球蛋白在魚類肌肉之結構差異及親緣關係建立

尤御丞¹、黃銘志^{1,2*}

¹國立台南大學生物科技學研究所碩士班

²國立台南大學生物科技學系

摘要

魚類是脊椎動物中種類及數量最多的生物，具有高度的物種歧異度與生物多樣性，外型相近但不同種類的魚種甚多，在基因及蛋白質上表現多元化，因此魚類之物種鑑定、分類及親緣關係的研究是一個重要的課題。

現今物種鑑定及分類研究中常用的分子標記包含粒線體細胞色素 *b* (Cyt *b*) 及細胞色素 *c* 氧化酶 I (COI)，並非所有的分類及演化皆適用 Cyt *B* 及 COI 系統。本研究想利用原肌球蛋白(TM)發展為分子標記之可能。運動蛋白是一種在演化存在已久之蛋白，其中的原肌球蛋白存在許多生物中，可藉由與肌動蛋白(actin)、肌凝蛋白(myosin)之協調促進肌肉之調節與收縮。本次研究利用原肌球蛋白(tropomyosin)高度保守的特性，以原肌球蛋白之蛋白質及 DNA 作為分子標記。利用資料庫中已登錄肌肉原肌球蛋白胺基酸及 DNA 序列之魚類，以計算(calculation)與模擬(simulation)之系統生物學方法，分析白口魚 (*Pennahia argentata*)、北方黑魷 (*Thunnus thynnus*)、虎河魷(*Takifugu rubripes*)、斑馬魚 (*Danio rerio*)、大西洋鮭 (*Salmo salar*)等五種魚類親緣關係的遠近，探討生物原肌球蛋白差異性在演化上之意義。

由分析結果發現；原肌球蛋白在五種魚類之 DNA、蛋白質一次及二次結構上皆有相異之處，推測與生物功能及適應環境有相當程度的關聯。在建構魚類演化之親緣關係時發現以原肌球蛋白為標記分子推算出來的結果比利用 Cyt *b* 或 COI 更接近傳統演化之理論，代表在魚類演化及親緣關係中，原肌球蛋白是可以被作為分子標記的。

本研究希望能利用原肌球蛋白觀點解釋生物演化先後的關係，並作為判斷物種親緣性的新指標。

關鍵字：魚類、肌肉、原肌球蛋白、細胞色素 *b*、細胞色素 *c* 氧化酶 I



壹、前言

魚類屬於動物界(Animalia)脊索動物門(Chordata)，目前化石證據顯示出現於泥盆紀 (Devonian)，由原始的無頷魚類 (Agnatha) 演化出盾皮魚類 (Placodermi) 後再發展出軟骨魚，再變成今日常見的高等硬骨魚類。

目前已知脊椎動物中以魚類所佔數量最多，估計佔脊椎動物種類的一半以上，除了是該分類群中最大宗之物種外，也是水生生態系最重要的成員，亦是脊椎動物演化之第一步。根據前全球已命名的魚種約在 32900 種(FishBase, ver Nov, 2014 Update)以上。其中以硬骨魚(Osteichthyes)的種類最多，軟骨魚(Chondrichthyes)類次之。魚類的物種歧異度相當高，無論在基因、形態、生態、生理或行為等等各方面都深具多樣性；例如南極齒魚(*Dissostichus mawsoni*)能生長於南極海的低溫水域(Fenaughty *et al.*, 2003)，而吳郭魚(*Oreochromis mossambica*)則喜生長於熱帶並耐鹽度變化(Fiess, *et al.*, 2007)；北方黑鮪(*Thunnus thynnus*)可生長在熱帶到溫帶的海水中(Carey and Teal, 1969)，斑馬魚(*Danio rerio*)則適應鹽度低的淡水(Rahman, 1989)。由於魚類的高度歧異度，常有看起來很類似的兩隻魚卻是不同種類的情形，如瓜子鱻 (*Girella punctata*) 和 小鱗瓜子鱻 (*Girella leonina*) 兩種魚類看起來非常像似，卻是兩種不同之魚類，故魚類的物種鑑定及分類是困難且值得研究的課題(Itoi *et al.*, 2007)。

在演化的分子研究當中，由於粒線體DNA較易累積訊息，因此常被當作親緣關係研究的分子標記(molecular marker)。粒線體DNA中有兩種物質常被用來作為分子標記，其一為細胞色素b (Cytochrome b, Cyt b)，許多演化分類學研究報告指出使用該基因作為標記能夠更清楚的鑑別生物之間的關係 (Arnason *et al.*, 1995; Lara *et al.*, 1996; Faulkes *et al.*, 1997; LeDuc *et al.*, 1999; Mattheand Robinson, 1999)，而Cyt b也被使用在哺乳類動物的分類上 (Castresana, 2001)；另一為Hebert等人 (2003) 提出的細胞色素c氧化酶I (cytochrome c oxidase I, COI) DNA。

運動對於生物而言是重要的本能之一，從單細胞生物到脊椎生物均有運動的構造藉以覓食、求偶、繁殖後代、逃避敵害等。魚類的肌肉收縮主要仰賴於三種肌肉纖維蛋白；包括肌動蛋白(actin)、肌凝蛋白(myosin)以及原肌球蛋白(tropomyosin)。三種運動纖維中以原肌球蛋白之構造較單純、分子量較小，並且普遍存在生物體中(Hitchcock-Degregori and Varnell, 1990)。本研究利用這種小分子嘗試做為一種標記之演化分子，並利用魚類來作為驗證。

原肌球蛋白之結構以 α -helix為主，以兩個單體形成coiled-coil的形式存在，能藉由與鈣離子及肌鈣蛋白(troponin)交互作用，調節肌動蛋白、肌凝蛋白而促進肌肉之收縮(Perry, 2001)。有別於肌動蛋白與肌凝蛋白的高分子量，原肌球蛋白的分子較小及低分子量的特色，所以較容易被研究及分析。目前已知魚類骨骼肌中的原肌球蛋白以284個胺基酸殘基為主，分子量約33 kDa並且具有高度保守的N端及C端。

魚類原肌球蛋白最早的研究起源於鯉魚(*Cyprinus carpio*, Hamoir, 1951)，當時以蛋白質的純化及特性的研究為目的。其後相關學者研究發現大部分的魚類肌肉原肌球蛋白只有一種 (Ochiai *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004)，因此原肌球蛋白適合作為物種鑑定及分類的標記。Wang等(2011)利用原肌球蛋白轉譯區(TM code sequence) 作為分子標記，分析43種軟體動物之關係，顯示原肌球蛋白可作為一種分子標記。

為了探討原肌球蛋白在不同魚類中序列變異程度及結構之異同，本研究嘗試以肌肉纖維中的原肌球蛋白及其DNA及胺基酸作為研究對象，分析五種不同魚類包含白口魚 (*Pennahia argentata*)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*)、虎河魷 (*Takifugu rubripes*)、斑馬魚 (*Danio rerio*)、大西洋鮭 (*Salmo salar*)物種間的差異，並繪製以原肌球蛋白及Cyt *b*、COI為基礎之親緣關係樹狀圖，並與傳統之魚類形態分類系統做比較，探討原肌球蛋白作為分子標記之可行性。

貳、研究方法

一、DNA 及胺基酸序列取得

本次研究選用之魚種參考形態分類學系統，臺灣脊椎動物誌 (陳兼善, 1986) 真骨魚類演化系統樹(圖一)，其中一條演化路線上選擇五個種類進行比較。

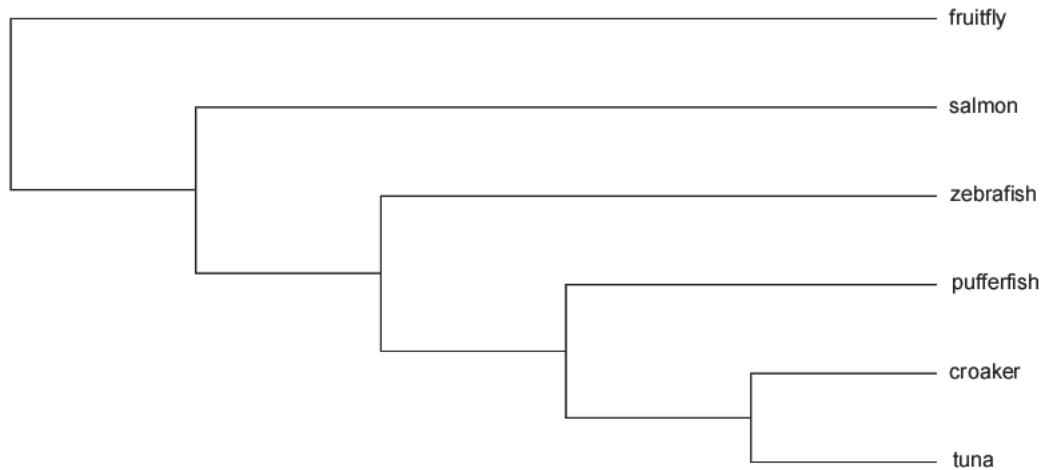


Fig.1

圖一、五種魚類包含白口魚 (簡寫為 croaker, *Pennahia argentata*)、北方黑鮪 (tuna, *Thunnus thynnus*)、虎河魷(pufferfish, *Takifugu rubripes*)、斑馬魚 (zebrafish, *Danio rerio*)、大西洋鮭 (salmon, *Salmo salar*) 及果蠅 (fruitfly, *Drosophila melanogaster*) 之關係 Newich tree format 演化圖。圖形製作參考自臺灣脊椎動物誌 (陳兼善, 1986) 真骨魚類演化系統樹。

選定魚種包含白口魚 (*Pennahia argentata*)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*)、虎河魷(*Takifugu rubripes*)、斑馬魚 (*Danio rerio*)、大西洋鮭 (*Salmo salar*) 及果蠅 (*Drosophila melanogaster*)經網路資料庫 National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)取得魚類的原肌球蛋白、COI 及 Cyt *b* 之 DNA 和胺基酸序列。分析之種類及序列登錄序號如下表：

表一、實驗選用魚種之中英文俗名與學名

中文名稱	英文簡名	學名	分類 (目)
虎河魷	pufferfish	<i>Takifugu rubripes</i>	魷形目 (Tetraodontiformes)
白口魚	croaker	<i>Pennahia argentata</i>	鱸形目 (Perciformes)
北方黑鮪	tuna	<i>Thunnus thynnus</i>	鱸形目 (Perciformes)
斑馬魚	zebrafish	<i>Danio rerio</i>	鯉形目 (Cypriniformes)
大西洋鮭	salmon	<i>Salmo salar</i>	鮭形目 (Salmoniformes)
果蠅	fruit fly	<i>Drosophila melanogaster</i>	雙翅目 (Diptera)

表二、實驗選用魚種之 TM, COI, Cyt *b* DNA 及胺基酸序列登錄號

中文名	(TM DNA/胺基酸)	(COI 胺基酸)	(Cyt <i>b</i> 胺基酸)
虎河魷	AB080271 /BAC10576	NP_694917	NP_694927
白口魚	AB045645/BAB20881	YP_004285959	YP_004285969
北方黑鮪	AB109447/BAD01050	YP_003587397	BAC78542
斑馬魚	M24635/AAA50021	COX1_15414	CYTB_15414
大西洋鮭	L25609 /AAB36559	COX1_14000	ACB30582
果蠅	NM_169634/NP_732002	AAF77227	AAF77227

二、DNA 與蛋白質一次結構及序列比對分析

利用軟體 European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) - ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)將取得之魚類肌肉原肌球蛋白、COI、Cyt *b* 的 DNA 及胺基酸序列進行比對分析，並加入差異性較高的果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 序列作為外部比對(outgroup) 以增加分析的準確度。

三、遺傳因子高度變異區分析

利用 Protein Variability Server (PVS)(<http://imed.med.ucm.es/PVS/>)(Shannon, 1948)計算一次結構之變異度之差異及位置。將上述五種魚類肌肉原肌球蛋白一次序列比對結果進行分析，以得知比對序列中變異性較高的位置，並在二級及三級分析中探討其變異度之影響。

四、蛋白質二次結構分析

利用軟體 GOR IV secondary structure prediction methods (Garnier *et al.*, 1996) (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)將取得的物種肌肉 TM 蛋白質進行二次結構分析，計算其各種二次結構之種類及所佔比例。

五、蛋白質三次結構預測

蛋白質三次結構是具有功能性之結構，在功能分析上極其重要。蛋白質三次結構之預測可利用網路軟體 SWISS - MODEL Automatic Modelling Mode (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1)。將取得的魚類物種肌肉 TM 蛋白質進行三次結構預測。並利用模擬軟體 Swiss - Pdb Viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>) (Biasini, *et al.*, 2014)呈現經由計算而得知模擬預測圖。

六、親緣關係圖繪製

利用親緣系譜(phylogeny)可以推論物種演化之方向與時間。根據不同之理論基礎，可分為二大類，一為距離行列法(distance matrix method)，另一為形質狀態法(character state method)。距離行列法包含平均距離法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA)及近鄰接合法(Neighbor-joining method, N-J method)。形質狀態法有最大相似度法(maximum likelihood method, ML method)等。分析軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (MEGA6) (<http://www.megasoftware.net/mega.php>)可以算出不同種間距離(distance)，及 bootstrap value 之值，根據原肌球蛋白、COI 及 Cyt *b* 的蛋白質一次結構序列比對分析結果繪製親源關係樹狀圖，bootstrap value 之 N 值為 1000 (Felsenstein, 1985)，分析模式以 Jones-Taylor-Thornton 模式運算(1992)，並與臺灣脊椎動物誌 (陳兼善, 1986) 真骨魚類演化系統樹比較。

繪製親源關係樹狀圖使用三種較為常用之分析法實行，兩種距離行列法(N-J 法)、平均距離法(UPGMA 法)及最大相似度法(ML 法)計算。

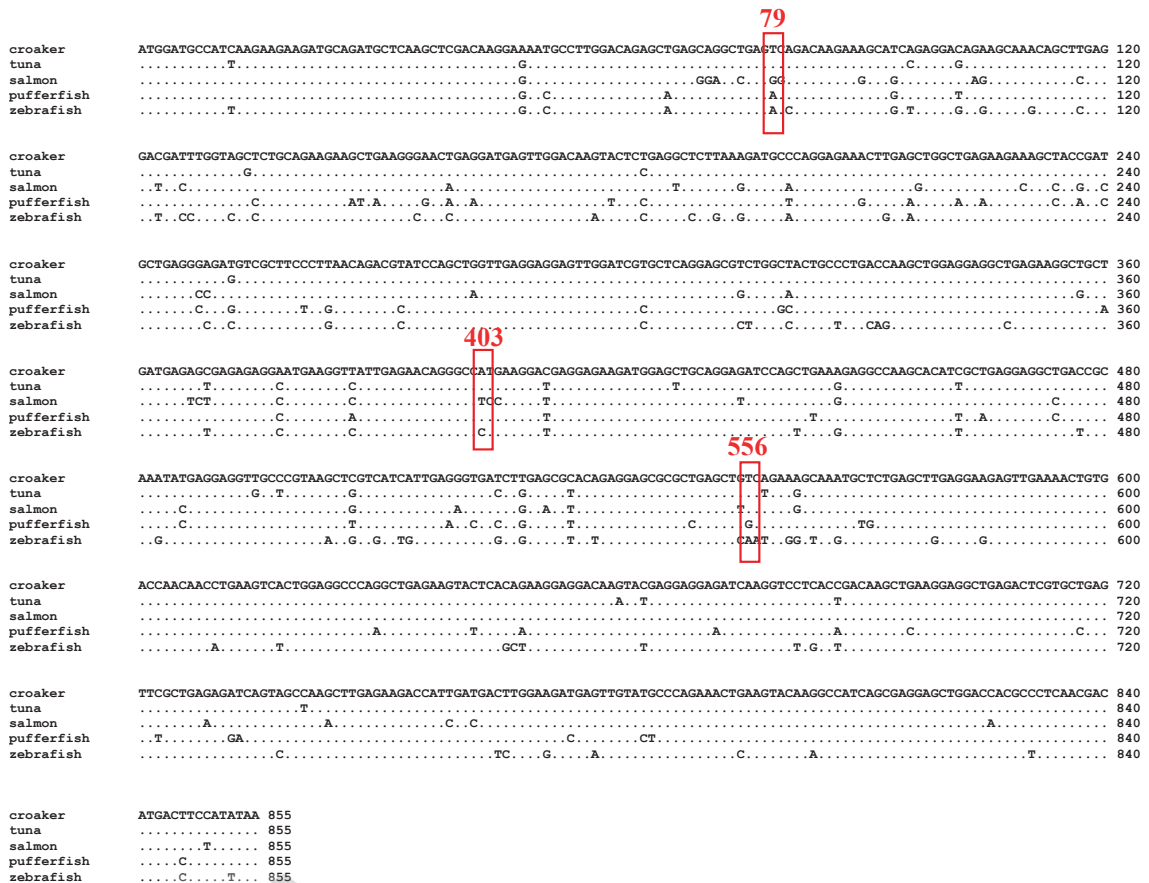
評估方式以兩個標準來做討論，一是 bootstrap value 數值之大小，另一是根據現今魚類相關演化樹之相似度來做為評估之標準。bootstrap value 是一種評

估系統分析樹穩定與否之方法，是系統樹分枝的方式之準確率之指標

參、結果

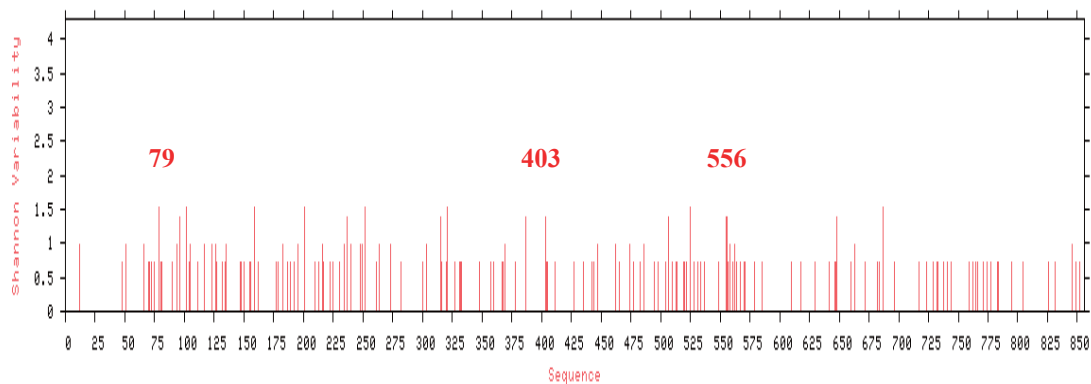
一、DNA 序列比對分析

白口魚 (*Pennahia argentata*, AB045645)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*, AB109447)、斑馬魚 (*Danio rerio*, M24635)、大西洋鮭 (*Salmo salar*, L25609)、虎河魴(*Takifugu rubripes*, AB080271) 的原肌球蛋白之 DNA 序列比對分析結果如圖二所示，序列中變異度數值根據 Shannon entropy analysis (Shannon, 1948)計算。數值越高表示變異度越高，這種根據 Shannon 理論計算之變異度稱為 Shannon 變異度(ShanonVariability)。



圖二、TM DNA 序列比對分析結果。比對結果以型態分類學系統樹中演化末端的白口魚(croaker, *Pennahia argentata*,)為基準；“.”代表該位置 DNA 與最上排序列相同；“-”代表無序列。紅框表示高變異發生在密碼子的第一個位置。數字代表高度變異位置。五種魚類 DNA 序列資料如下:白口魚 (*Pennahia argentata*,

AB045645)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*, AB109447)、大西洋鮭 (*Salmo salar*, L25609)、虎河魴(*Takifugu rubripes*, AB080271)、斑馬魚 (*Danio rerio*, M24635)。



圖二、DNA 變異度分析。由 DNA 變異度分析可以看出，白口魚 (*Pennahia argentata*, AB045645)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*, AB109447)、斑馬魚 (*Danio rerio*, M24635)、大西洋鮭 (*Salmo salar*, L25609)、虎河魴(*Takifugu rubripes*, AB080271)五種魚類之高度變異區出現在八個位置(ShanonVariability 數值為 1.522)，分別為 79, 102, 159, 201, 252, 321, 525, 687。次高區(ShanonVariability 為 1.371)出現在九個位置，分別為 96, 237, 315, 387, 403, 507, 555, 556, 648 等。計算理論使用 Shannon entropy analysis (Shannon, 1948)。

根據 DNA 序列比對分析結果顯示，五種魚類之高度變異區出現在八個位置(ShanonVariability 數值為 1.522)，分別為 79, 102, 159, 201, 252, 321, 525, 687。次高區(ShanonVariability 為 1.371)出現在九個位置，分別為 96, 237, 315, 387, 403, 507, 555, 556, 648 等。其中十七個高變異區中有 79、403、556 等 3 個高變異的位置發生在密碼子的第一位置，因此該位置有較高的機率造成胺基酸的變異。其他高度變異區出現在第三位置，合乎搖擺理論(Wobble base pair)，較不易產生胺基酸變異。此次分析並無發生第二位置之變異。

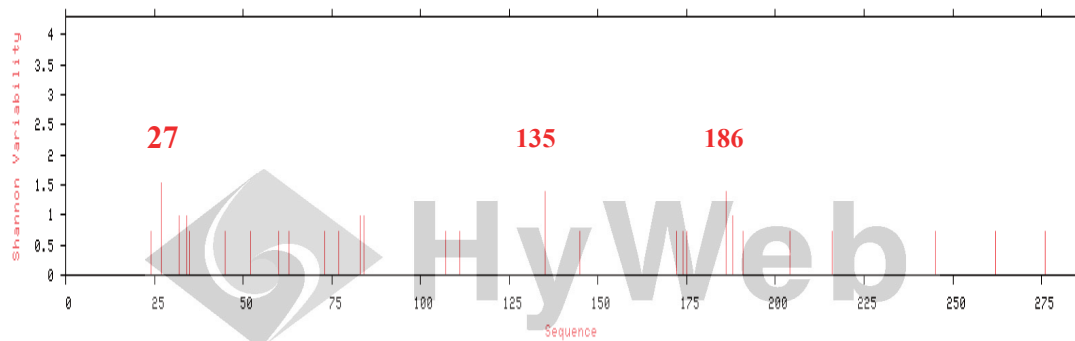
二、魚肌肉原肌球蛋白胺基酸一次結構分析及序列變異性分析

白口魚 (*Pennahia argentata*, AB045645)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*, AB109447)、大西洋鮭 (*Salmo salar*, L25609)、虎河魴(*Takifugu rubripes*, AB080271)、斑馬魚 (*Danio rerio*, M24635)的原肌球蛋白胺基酸一級結構分析結果如圖三 A 所示。根據序列變異性分析結果(圖三 B)標出了 27 (DNA 79 位置)、135 (DNA 403 位置)、186 (DNA 556 位置)等三個高度變異的位置，與根據 DNA 序列變異性分析推測之結果完全吻合。

(A)

		27		
croaker	MDAIKKKMQMLKLDKENALDRAEQAR	S	DKKASEDRSKQLEDDLVALQKCLKGTEDEL	DKY 60
tunaE.....G.....	60
salmonG.....	GA..K.....	60
pufferfish	TA.....	F 60
zebrafish	TA.E.....A.....	60
croaker	SEALKDAQEKLELAEKKATDAEGDVASLNRRIQLVVEELDRAQERLATATKLEEA		KAA	120
tunaE.....	120
salmon	..S.....V..T...A.....			120
pufferfish	AEG.....	120
zebrafishQ.....	120
		135		
croaker	DESERGMKVIENTRAM	M	DEEKMELQEIQLKEAKHIAEEADRKYEEVARKLVIIEGDLERTE	180
tuna	180
salmon	SD.....S.....	180
pufferfish	180
zebrafish	LV..E.....	180
		186		
croaker	ERAEIS	S	SKCSELEEELKTVTNNLKSLEAQAEKYSQKEDKYEEEIKVLTDKLKEAETRAE	240
tuna	G	240
salmon	G	240
pufferfish	AA.....	240
zebrafish	N	G.....M.....A.....	240
croaker	FAERSVAKLEKTIDDLEDELYAQKLYKAISEELDHALNDMTSI			284
tuna	284
salmonN.....	284
pufferfishT.....S.....	284
zebrafish	284

圖三、(A) 白口魚 (*Pennahia argentata*, AB045645)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*, AB109447)、大西洋鮭 (*Salmo salar*, L25609)、虎河魮(*Takifugu rubripes*, AB080271)、斑馬魚 (*Danio rerio*, M24635)的原肌球蛋白胺基酸一次結構分析。比對結果以型態分類學系統樹中演化末端的白口魚(*Pennahia argentata*)為基準；“.”代表該位置胺基酸與最上排序列相同；方框為高度變異位置，方框及數字顏色代表該位置在 DNA 序列上之變異度。數字代表高度變異位置。



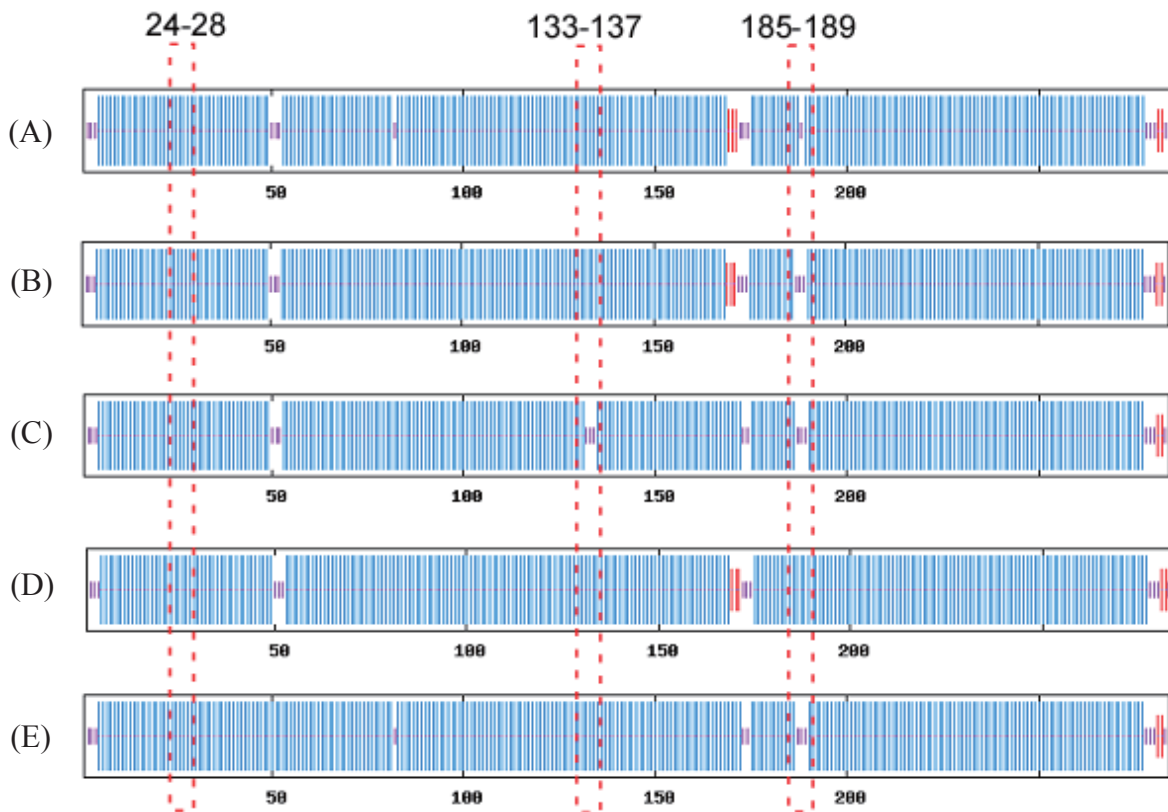
圖四、胺基酸序列變異性(PVS)分析結果，高變異度區域(Shanon Variability 數值為 1.522)共有 27、135、186 等三處。橫軸為胺基酸序列編號，縱軸為序列變異

度。計算理論使用 Shannon entropy analysis (Shannon, 1948)。

其中 27、135、186 等三個位置由於發生了胺基酸高度變異(Shanon Variability 數值為 1.522)，因此可能進而影響原肌球蛋白在該位置的二級結構。

三、蛋白質二次結構分析

根據魚類肌肉原肌球蛋白二級結構分析結果 (如圖四所示)



圖四、利用軟體 (GOR IV) 解析魚肌肉原肌球蛋白蛋白質二級結構分析結果。(A) 白口魚 (*Pennahia argentata*, AB045645)、(B) 北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*, AB109447)、(C) 大西洋鮭 (*Salmo salar*, L25609)、(D) 虎河魮 (*Takifugu rubripes*, AB080271)、(E) 斑馬魚 (*Danio rerio*, M24635) 之肌肉原肌球蛋白蛋白質二次結構分析。藍色代表 α -helix，紫色代表 random coil，紅色代表 extended strand。紅框處代表胺基酸序列位置 27, 135 及 186 位置。

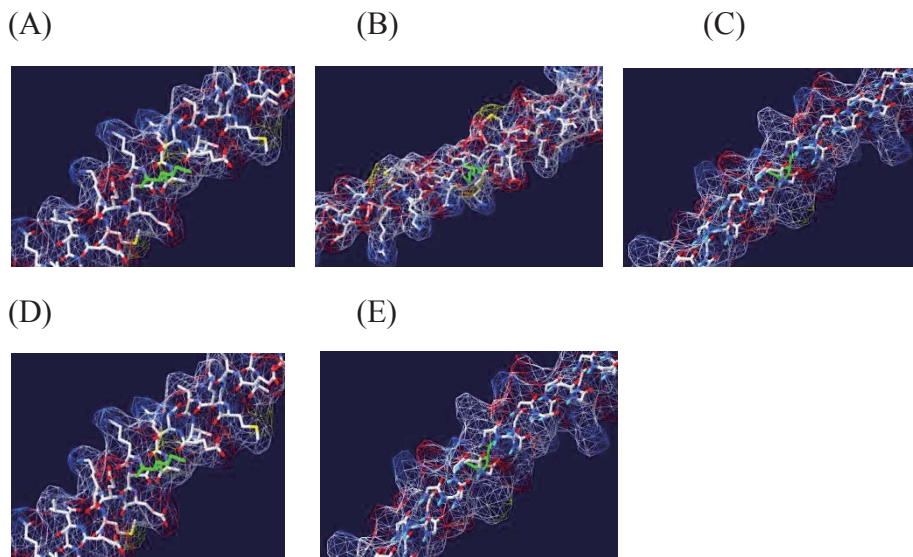
比對原肌球蛋白胺基酸一次結構分析及原肌球蛋白二級結構分析結果發現，第 135 及 186 號胺基酸的改變，造成不同物種原肌球蛋白二級結構上的差異。27 胺基酸位置雖然在蛋白質一次結構序列上有高度變異，但並無對二級結構造成明

顯差異，而 135 號胺基酸雖有高度變異，但只對大西洋鮭(*Salmo salar*)之原肌球蛋白造成二級結構的變化。

其中 80~90 及 170~180 號胺基酸序列區間在不同物種原肌球蛋白的二級結構上也皆有變異，但此二區間在原肌球蛋白一級結構上並無高度變異，取而代之的是二至三個連續的低度變異。此結果顯示胺基酸序列上單一點的高度變異不一定會造成二級結構的變異，而連續的低度變異也可能造成二級結構的變異。

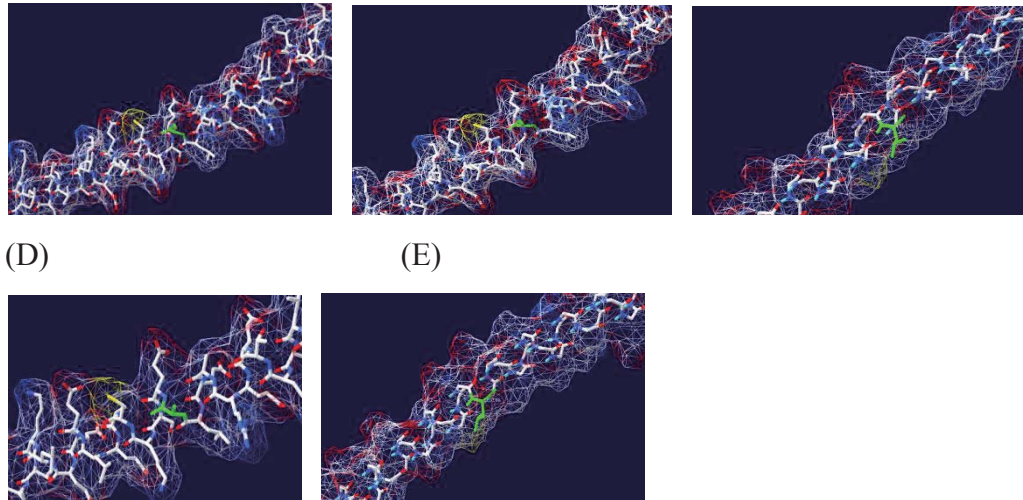
四、蛋白質三次結構預測

由於一級結構胺基酸種類影響了部分魚類在原肌球蛋白二級結構蛋白質之結構，三級結構是否也受到影響?經由 SWISS-MODEL 及 Swiss-Pdb Viewer 之三次結構預測的結果顯示，本次研究中所選用的五個不同魚種之肌肉原肌球蛋白單體在三次結構上大致相同，雖然一次結構上有數個胺基酸相異，並且造成二次結構上有些許不同，但結果顯示在三次結構整體上並無明顯差異。135、186 兩者高度變異區所呈現之局部變化可以顯示但基本上並不影響其三度空間之結構，蛋白質三次結構預測結果如下圖 (圖五) 所示：



圖五、利用軟體 (SWISS-MODEL) 預測魚肌肉原肌球蛋白三次結構結果。圖中綠色部位為胺基酸序列 135 位置。(A)虎河鮪(*Takifugu rubripes*, AB080271)、(B)白口魚 (*Pennahia argentata*, AB045645)、(C)北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*, AB109447)、(D)斑馬魚 (*Danio rerio*, M24635)、(E)大西洋鮭 (*Salmo salar*, L25609) 之肌肉原肌球蛋白三次結構預測。

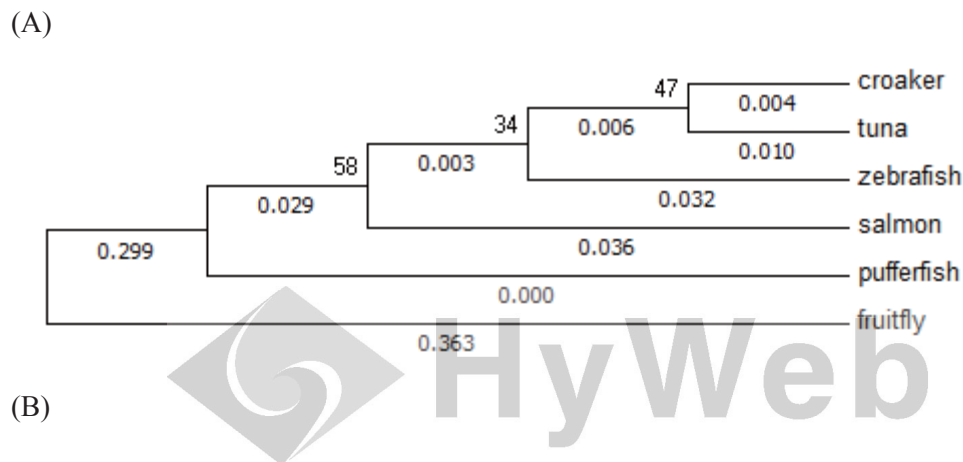


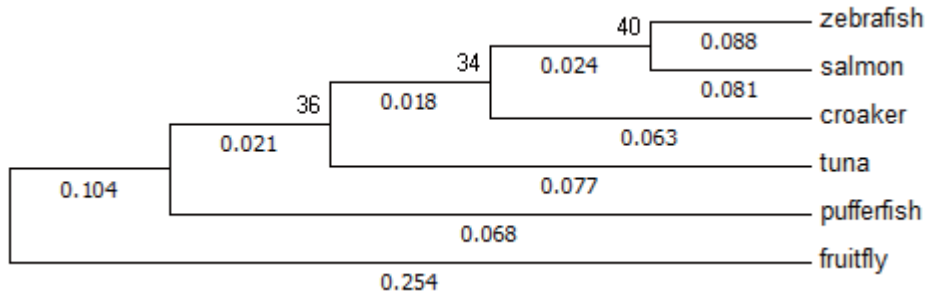


圖五、利用軟體 (SWISS-MODEL) 預測魚肌肉原肌球蛋白三次結構結果。圖中綠色部位為胺基酸序列 186 位置。(A)虎河魮(*Takifugu rubripes*, AB080271)、(B)白口魚 (*Pennahia argentata*, AB045645)、(C)北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*, AB109447)、(D)斑馬魚 (*Danio rerio*, M24635)、(E)大西洋鮭 (*Salmo salar*, L25609) 之肌肉原肌球蛋白三次結構預測。

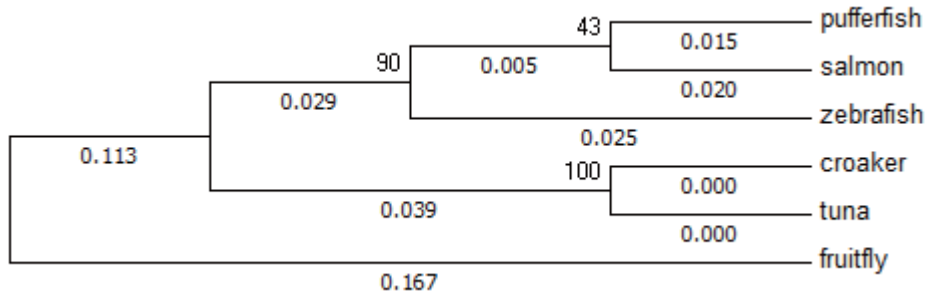
五、親緣關係圖繪製

利用 MEGA6 根據原肌球蛋白、Cyt *b*、COI 胺基酸比對結果以 maximum likelihood 法、neighbor-joining method 法及 UPGMA 法繪製的親緣關係樹狀圖如下圖所示 (圖三、圖四)。相較於 Cyt *b* 和 COI，原肌球蛋白的親緣關係樹狀圖經 bootstrap 後的結果。胺基酸變異計算則以 Jones-Taylor-Thornton model (1992) 為基礎。



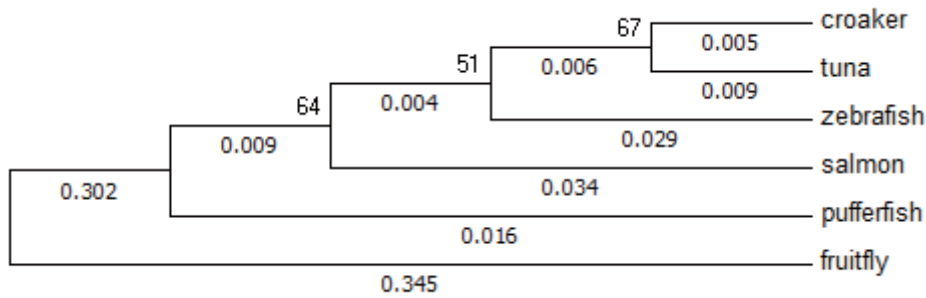


(C)

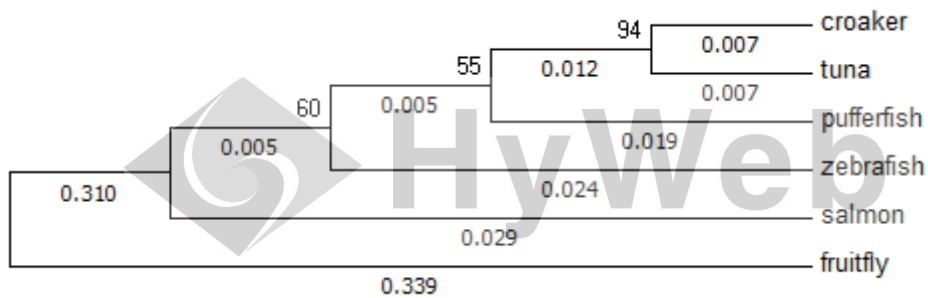


圖六、虎河魨(*Takifugu rubripes*)、白口魚 (*Pennahia argentata*)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*)、斑馬魚 (*Danio rerio*)、大西洋鮭 (*Salmo salar*)及果蠅 (*Drosophila melanogaster*)的胺基酸 maximum likelihood 法樹形圖。(A) 原肌球蛋白, (B) *Cyt b*, (C) COI。左上角之數字為 bootstrap value 值。

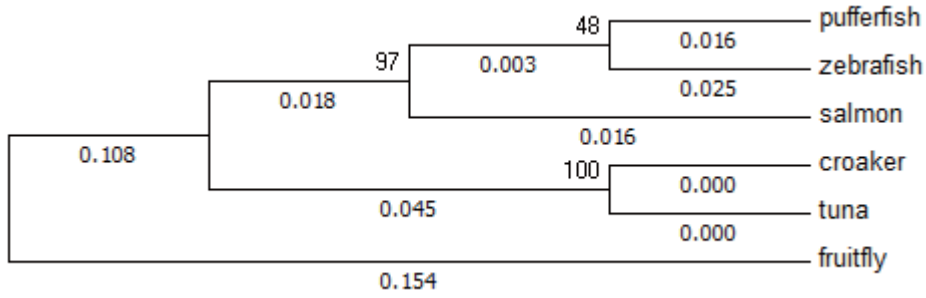
(A)



(B)



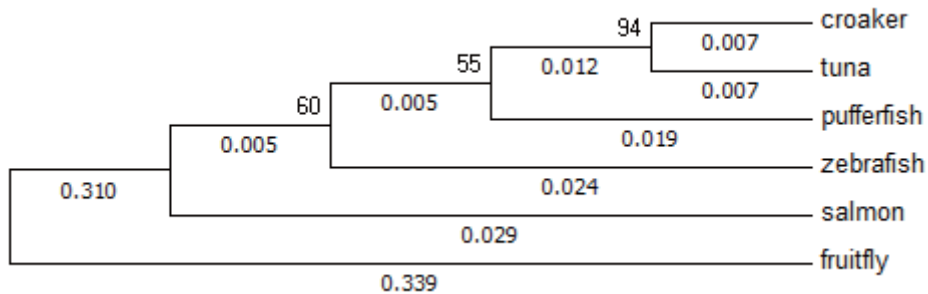
(C)



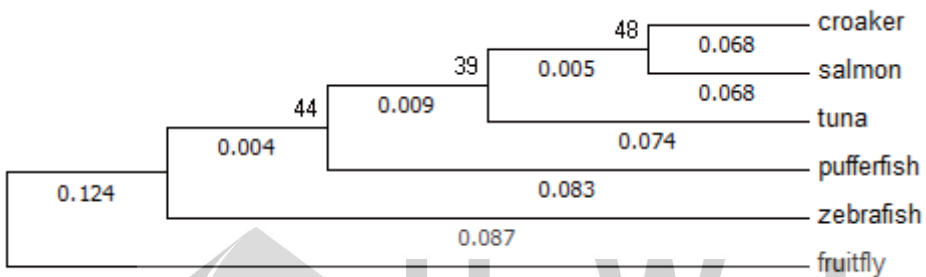
圖七、虎河魨(*Takifugu rubripes*)、白口魚 (*Pennahia argentata*)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*)、斑馬魚 (*Danio rerio*)、大西洋鮭 (*Salmo salar*)及果蠅 (*Drosophila melanogaster*)的胺基酸之 neighbor-joining 法樹形圖。(A) 原肌球蛋白, (B) Cyt *b*, (C) COI。

利用 MEGA6 根據原肌球蛋白、Cyt *b*、COI 胺基酸及 DNA 比對結果以 UPGMA 法繪製的親緣關係樹狀圖如下二圖所示 (圖五、圖六)。由以 UPGMA 法繪製的親緣關係樹狀圖相互比較顯示,根據原肌球蛋白比對結果所繪製的親緣關係圖之 bootstrap value 值較 Cyt *b* 及 COI 高,尤其是根據 DNA 比對所呈現的結果,原肌球蛋白更是幾乎能百分之百將同屬鱸目的白口魚 (*Pennahia argentata*)、北方黑鮪 (*Thunnus thynnus*)分類在同一類群。

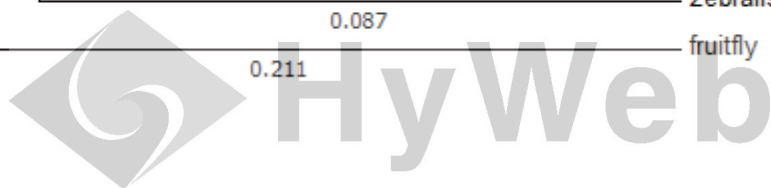
(A)

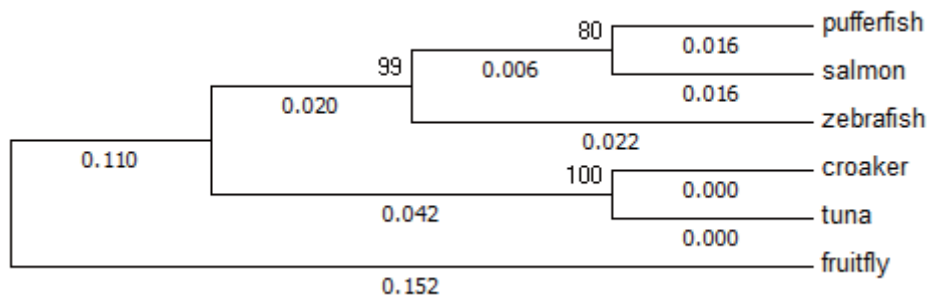


(B)



(C)





圖八、虎河魨(*Takifugu rubripes*)、白口魚 (*Pennahia argentata*)、北方黑魷 (*Thunnus thynnus*)、斑馬魚 (*Danio rerio*)、大西洋鮭 (*Salmo salar*)及果蠅 (*Drosophila melanogaster*)的胺基酸 UPGMA 法樹形圖。(A) 原肌球蛋白, (B) Cyt b, (C) COI。

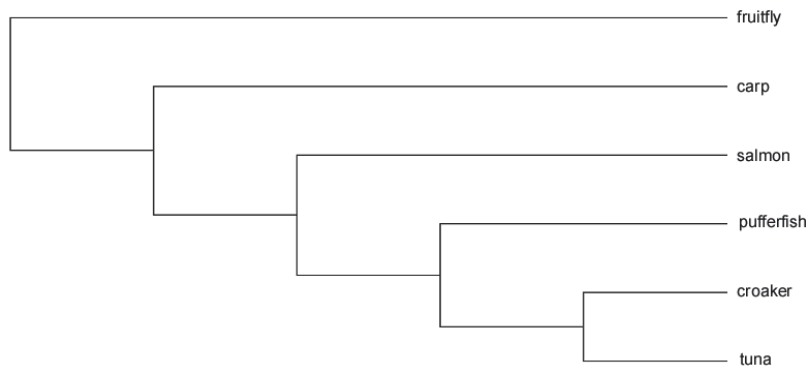
將繪製出的親緣關係樹狀圖與臺灣脊椎動物誌 (陳兼善, 1986) 真骨魚類演化系統樹比較可發現, 以原肌球蛋白為標記所繪製的親緣關係樹狀圖與形態分類系統分類的結果較為相近。

肆、討論

理論上應找演化樹上具有種代表性之魚類來作分析, 如鱒形目 (Acipenseriformes)、鰻目 (Anguilliformes)、鮫鱈目 (Lophiiformes)、鮫目 (Siluriformes) 等演化較末端之魚類較具有代表性, 但限於許多魚種在資料庫上並未登錄, 所以只能就現有之資料種類做分析。

在一級及二級結構中發現原肌球蛋白在胺基酸 135、186 有高度變異, 三級結構中仍然保持有 α -helix 結構。這種胺基酸種類改變但卻沒有改變基本 α -helix 結構, 但卻可能影響原肌球蛋白之安定性及特性, 讓魚類更能適應環境, 是生物多樣性之特性之一, 也是魚類演化、判斷親緣關係的重要依據之一。

為了探討以分子生物學之特殊標記(biomarker)建立演化基礎, 以傳統分類學 (taxonomy) 為基礎建立之系統發生樹(phylogenetic tree)或稱演化樹(evolutionary tree)是重要的參考依據。在此參考了兩位學者之論述, 陳兼善(1986)和 Bonde (1994)在分類上最大不同在於鯉科(Cyprinidae)的位置(圖十), Bonde (1994)認為鯉科是一群數量龐大的族群, 原始鯉科出現可能比鮭科(Salmonidae)早, 目前認為原始鯉科可能出現在第三紀(Tertiary Period)晚期所以將鯉科放在鮭科 (Salmonidae)之前。由於本研究之鯉科魚類為斑馬魚(*Danio rerio*), 屬於鯉科魚類中較後期出現, 故仍將以陳兼善(1986)之理論為主要依據。



圖十、Bonde (1994)之魚類 Newich tree format 演化圖之部分。(N. Bonde (1994), Geological Inst., Copenhagen)

利用三種胺基酸包含原肌球蛋白 Cyt *b*, 和 COI 作比較，並經由三種模式以胺基酸序列計算演化樹(phylogeny)包含 N-J 法、UPGM 法及 ML 法計算，結果發現以原肌球蛋白為分子標記所繪出之系統演化樹有最接近傳統演化樹之現象，其中利用 UPGMA 法所得之結果和傳統演化樹(phylogeny)得到相同之結果。這說明原肌球蛋白是一種良好之分子標記。

伍、結論

本次原肌球蛋白之胺基酸及 DNA 分析結果顯示，不同魚種的原肌球蛋白在蛋白質結構上有許多不同之處，而某些魚種的原肌球蛋白在胺基酸一次、二次結構上有獨特的相似之處，由此可推斷某些原肌球蛋白結構相似的魚種可能親緣關係較接近。不同物種的原肌球蛋白在一次結構及二次結構上雖皆有不同之處，但在三次結構上並無明顯的差異。

以上以三種分子作為標記探討演化時，以原肌球蛋白為分子標記，UPGMA 法所繪製的親緣關係樹狀圖與台灣脊椎動物誌的魚類演化系統樹比較，可發現得到完全相同之結果，而且較 Cyt *b* 及 COI 作為分子標記模式更穩定(bootstrap value 值較高)，顯示在本研究中原肌球蛋白為分子標記有相當良好之結果。

未來若有更多魚種之原肌球蛋白之 DNA 或胺基酸序列被解析，將能夠更進一步的分析、比對及統計其他魚種原肌球蛋白結構的異同之處，可更明確的界定出各種不同魚種的分類標記，並能夠對魚類物種及親緣鑑定之研究有所幫助。

陸、致謝

感謝國立台南大學生物科技學系碩士班陳俊文同學在系統分析上之協助，部分經費來自行政院國家科學委員會計畫：(NSC100-2313-B024-002)之提供，在此一併致謝。

柒、參考文獻

- 陳兼善(1986)。硬骨魚綱。臺灣脊椎動物誌(上)(頁 174-217)。臺北市：臺灣商務出版社。
- Adams, MD., Celniker, SE., Holt, RA., Evans, CA., Gocayne, JD., Amanatides, PG., Scherer, SE., *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287: 2185-2195.
- Arnason, U., Bodin, K., Gullberg, A., Ledje, C., Mouchaty, S. (1995) A molecular view of pinniped relationships with particular emphasis on the true seals. *J. Mol. Evol.*, 40: 78-85.
- Azou, Y., Bregliano, JC. (2001) I-R system of hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster* : analysis of the mitochondrial DNA in reactive strains exhibiting different potentials for I factor transposition. *Heredity*, 86: 110-116.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, TG., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42: W252-W258.
- Broughton, RE., Milam, JE., Roe, BA. (2001) The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.*, 11: 1958-1967.
- Castresana, J. (2001) Cytochrome *b* phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Mol. Biol. Evol.* 18: 465-471.
- Carey FG, Teal, JM. (1969) Regulation of body temperature by the bluefin tuna. *Comp Bio Physiol.* 28(1): 205-213.
- Dal-Pra, S., Thisse, C., Thisse, B. (2011) Fox A transcription factors are essential for the development of dorsal axial structures. *Dev. Biol.*, 350: 484-495.
- Elmerot, C., Arnason, U., Gojobori, T., Janke, A. (2002) The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. *Gene*, 295: 163-172.
- Faulkes CG, Bennett NC, Bruford MW, O'Brien, HP., Aguilar, GH., Jsrvis, JU. (1997) Ecological constraints drive social evolution in the African molerats. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 264: 1619-1627.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies; an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fiess, JC., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, LG., Yancey, PH., Hirano, T., Grau, EG. (2007) Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 146(2): 252-264

- Garnier, J., Gibrat, JF., Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* 266: 540-553.
- Hamoir, G. (1951) Fish tropomyosin and fish nucleotropomyosin. *Biochem J.* 48: 146-151.
- Heeley, DH., Bieger, T., Waddleton, DM., Hong, C., Jackman, DM., McGowan, C., Davidson, WS., Beavis, RC. (1995) Characterisation of fast, slow and cardiac muscle tropomyosins from salmonid fish. *Eur. J. Biochem.* 232: 226-234.
- Hebert, PDN., Ratnasingham, S., deWaard, JR. (2003) Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: S96-S99.
- Hitchcock-Degregori, SE., Varnell, TA. (1990) Tropomyosin has discrete actin-binding sites with sevenfold and fourteenfold periodicities. *J. Mol. Biol.* 214: 885-896.
- Huang, MC., Ochiai, Y., Watabe, S. (2004) Structural and thermodynamic characterization of tropomyosin from fast skeletal muscle of bluefin tuna. *Fish. Sci.* 70: 667-674.
- Itoi, S., Saito, T., Shimojo, M., Washio, S., Sugita, H. (2007) Identification of *Girella punctata* and *G. leonina* by PCR-RFLP analysis. *ICES J. Marine Sci.* 64: 328-331.
- Jones, DT., Taylor, WR., Thornton, JM. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Applic Biosci.* 8: 275-282.
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., Tamura, K. (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Lara, MC., Patton, JL., da Silva, MN. (1996) The simultaneous diversification of South American echimyid rodents (Hystricognathi) based on complete cytochrome *b* sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5: 403-413.
- Leduc, RG., Perrin, WF., Dizon, AE. (1999) Phylogenetic relationships among the delphinid cetaceans based on full cytochrome *b* sequences. *Mar. Mamm. Sci.* 15: 619-648.
- Matthee, CA., Robinson, TJ. (1999) Cytochrome *b* phylogeny of the family bovidae: resolution within the alcelaphini, antilopini, neotragini, and tragelaphini. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12: 31-46.
- Ochiai, Y., Ahmed, K., Ahsan, MN., Funabara, D., Nakaya, M., Watabe, S. (2001) cDNA cloning and deduced amino acid sequence of tropomyosin from fast skeletal muscle of white croaker *Pennahia argentata*. *Fisheries Sci.* 67: 556-558.
- Rahman, AKA. (1989) Freshwater fishes of Bangladesh. Zoological Society of Bangladesh. Department of Zoology, University of Dhaka. 364 p.

- Shannon, CE. (1948) The mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27: 379-423 & 623-656.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24: 1596-1599.
- Perry, SV. (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil.* 22: 5-49.
- Wang, X., Li, L., Xu, F., Zhang, G. (2011) Tropomyosin is a nice marker gene for phylogenetic analysis of molluscs. *Mol Biol Rep.* 38: 4589-4593.



作者簡介：

尤御丞：

2007年9月進入國立台南大學生物科技學系就讀，2011年6月畢業。同年9月進入國立台南大學生物科技學碩士班就讀。研究內容包含九孔、鎖管等海洋無脊椎動物外，也探討魚類之演化問題。興趣喜愛繪畫及動漫等。

黃銘志：

2004年畢業於日本東京大學農學生命科學研究科水圈生物科學專攻博士課程，主要探討魚類基因及肌肉結構蛋白。畢業後在神奈川縣獨立行政法人理化學研究所基因總合研究中心擔任研究員，研究主題為癌症基因體、抗老化基因、先天性癲癇基因等。2008年起擔任國立台南大學生物科技學系教師，目前興趣為海洋生物基因及蛋白質結構、養殖漁業技術開發、櫻花蝦研究、鮪魚魚類學及異常肉研究等。

