

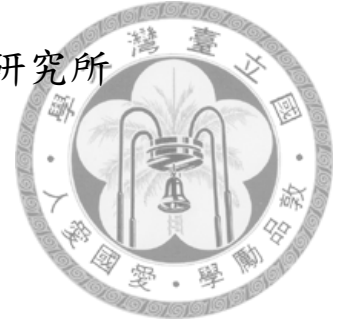
國立臺灣大學生命科學院漁業科學研究所

碩士論文

Institute of Fisheries Science

National Taiwan University

Master Thesis



日本鰻聯接蛋白 *Je-Cx34.4* 與 *Je-Cx43* 分子結構之分析與在卵  
巢表現之研究

Structure and expression of ovarian connexin *Je-Cx34.4* and *Je-  
cx43* in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)

廖唯甯

Wei-Ning Liao

指導教授：羅秀婉 博士

王永松 博士

Advisors: Show-Wan Lou, Ph.D.

Yung-Song Wang, Ph.D.

中華民國 104 年 7 月

July 2015

國立台灣大學(碩)博士學位論文

口試委員審定書

日本鰻聯接蛋白 JeCx34.4、JeCx43 分子結構之  
分析與表現之研究

Structure and expression of ovarian connexin *Je-Cx34.4* and  
*Je-Cx43* in Japanese eel (*Anguilla japonica*)

本論文係 廖唯甯(R02B45001)在國立台灣大學漁業科學研究所之  
碩士學位論文，於民國 104 年 7 月 14 日承下列考試委員審查通過  
口試及格，特此證明

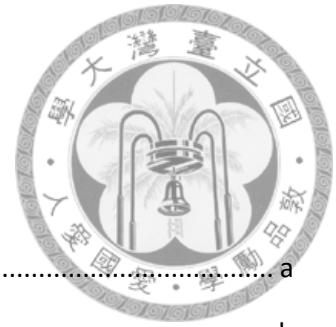
口試委員：

羅秀娟 王永松  
(指導教授) (指導教授)

黃唯甯 蔡永松

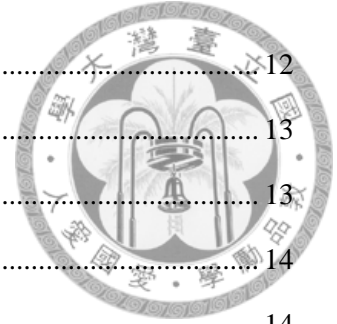
系主任、所長

李英園



## 目錄

謝辭.....	a
摘要.....	b
Abstract.....	d
第一章 前言.....	1
日本鰻生活史.....	1
日本鰻種魚人工誘導催熟.....	1
間隙連接 (Gap Junctions, GJs) 與聯接蛋白 (Connexin, Cx).....	2
硬骨魚類卵濾泡早期發育.....	3
硬骨魚卵濾泡之細胞間通道蛋白.....	4
硬骨魚 GJs 與 Cx 受到性荷爾蒙調控其表現.....	5
濾泡細胞間之 Cx43 與 Cx34.3.....	6
研究動機與目的.....	7
第二章 材料與方法.....	8
1. 實驗用魚與採樣.....	8
2. Connexin 基因選殖.....	8
2-1. 總量 RNA 萃取.....	8
2-2. cDNA 製備 (Reverse Transcription).....	9
2-3. 引子設計.....	9
2-4. 反轉錄聚合酶反應 (RT-PCR)及膠體電泳分析.....	10
2-5. DNA 片段純化.....	10
2-6. 接合及轉形作用.....	11
2-7. 小量質體製備及限制酶切割.....	11
2-8. DNA 定序.....	12
2-9. 親緣關係圖譜建立.....	12
3. 日本鰻卵巢 Cx34.4, cx43 基因表現.....	12



3-1. 鮭魚腦下垂體誘導催熟.....	12
3-2. 基因表現定量分析.....	13
3-3 即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應.....	13
3-4 組織分佈實驗.....	14
4. 卵濾泡組織形質觀察.....	14
4-1. 固定包埋.....	14
4-2. 組織切片.....	14
4-3. 組織染色及封片.....	15
4-4. 切片觀察及照相.....	15
5. 免疫組織染色 (Immunohistochemistry).....	15
5-1. 抗體選用.....	15
5-2. 免疫染色 (whole mount).....	15
第三章 實驗結果.....	17
1. 日本鰻 Connexin 基因分析.....	17
1-1. <i>Je-Cx34.4</i> .....	17
1-2. <i>Je-Cx43</i> .....	18
2. Connexin 成員親緣關係.....	19
3. 日本鰻 Cx34.4 與 Cx43 於不同組織分佈之表現.....	20
4. 鮭魚腦下垂體對日本鰻性腺之影響 (Gonadosomatic index ; GSI %).....	20
5. 日本鰻卵巢內 Connexin 基因表現.....	21
5-1. Cx 基因在不同週數 SPE 誘導處理之表現.....	21
5-2. Cx 基因在不同的 GSI 分組下之表現.....	21
6. 卵濾泡組織形質觀察.....	21
第四章 討論.....	23
1. NGS 資料庫之 Connexin 比對分析.....	23
2. Connexin 保守區域.....	23
3. 硬骨魚獨有的 Connexin.....	24
4. 哺乳類及硬骨魚 Cx43.....	25



5. SPE 對於性腺成熟效果.....	26
6. Connexin 基因在誘導過程中的變化.....	27
7. GSI 與 Cx 基因表現量差異.....	28
8. Cx43 位置.....	29
第五章 結論.....	31
參考文獻.....	32
附錄 圖表與表格.....	40



## 謝辭

大學就讀生醫系的我，不顧當時導師的勸說，選擇了一個不一樣的路，現在回頭看，覺得改變是值得。這兩年，我遇見以前不會有機會接觸的人，他們共事讓我學習到很多新知識或事物，可以說是相當充實的兩年。

首先必須感謝我的指導教授羅秀婉老師，每天都與我腦力激盪，很支持我在研究上做的改變。從老師身上學到很多不只海洋生物方面知識，同時包括做人的態度。我應該是少數愛跟老師鬥嘴的學生，交流想法與人溝通是我這兩年做最大改變。同樣地，我十分感恩，王永松老師在學業第二年共同指導我，在實驗和邏輯推論方面幫助我很多，提供我許多不一樣的想法與靈感。

感謝黃娟娟教授，黃永森副教授，王永松老師及羅秀婉老師撥冗審查論文，並提出許多寶貴意見，再次感謝黃娟娟老師慷慨提供實驗材料，讓我的論文更趨完整。感謝張益修老闆每次都能穩定提供鰻魚，才得以讓實驗進行順利。

我的實驗室學長與學弟，彥羲、智堯、浩瑋、彥融、天讚、世榮、盈妤、立博、晉成、煥成與尚樞是我最要感謝的實驗夥伴們，不管在生活上實驗上均提供我很多協助，還有一群在新的朋友，博文、岱筠，淳森，竑霖，累的時候可以讓我放鬆心情，沒有他們我無法完成此研究。感謝天讚與浩瑋帶我進入觀賞魚的世界，讓我一直以來的興趣變深奧起來了。


最後感謝我父母，全力支持我的決定與大力資助，也很感謝我姊姊在這兩年也給我許多人生建議。有你們陪伴打氣，我才能完成學業。

沒有大家的一路相挺，沒有今天的成就，能完成這趟再次感謝身旁的各位。

## 摘要



本論文首次在日本鰻卵巢組織發現兩種聯接蛋白基因，針對基因序列與其在卵巢發育過程表現量進行初探。細胞內離子及小分子經由聯接蛋白 (Connexin; Cx) 組成的間隙連接 (Gap junctions; GJs) 進行傳遞，參與許多生理機制。從硬骨魚到哺乳類的卵巢發育過程皆需要聯接蛋白之參與。然而，硬骨魚的卵巢 Cx 於前卵黃生成期的表現或參與機制鮮少討論，日本鰻亦復如此。本研究透過日本鰻卵巢轉錄基因體資料庫篩選出一段 Cx 核酸片段，將基因進行預測胺基酸分析及分子結構分析，與銀鮭 Cx34.3 屬同源基因，此支系屬家族分類  $\alpha$  子群，其分子量為 34.4 kDa，綜合分析結果將其命名為 *Je-Cx34.4*；另外設計 Cx43 退化性引子進行 PCR，篩選片段拼接後預測其胺基酸與其他已知 Cx43 有高達 95% 相似度，又以硬骨魚更為類似 (98%)，屬家族分類  $\alpha$  子群且包含一段 Cx43 特殊 domain，我們將其命名為 *Je-Cx43*。兩基因均預測出穿膜區域，其中包含 Cx 第三穿膜保守區與羧基端保守片段，且均有預測出磷酸化位點，可推定本研究選殖出日本鰻卵巢中兩種 Cx 基因片段。組織分佈實驗可觀察到 *Je-Cx34.4* 僅表現於卵巢，反觀 *Je-Cx43* 至少表現於六種組織中。在親緣關係分析中，*Je-Cx34.4* 隸屬一群可能在硬骨魚獨立分支之 Cx 家族，而 *Je-Cx43* 則與其他物種 Cx43 為一群，兩分群均屬同一大系群，為  $\alpha$  子群。欲了解這兩種日本成鰻 Cx 在卵巢早期發育階段之表現變化，透過外源性鮭魚腦下垂體誘導催熟日本成鰻卵巢至第六週，分別於各週進行採樣，並藉由計算其生殖腺指數 (Gonadosomatic index; GSI%) 作為卵巢發育之指標。卵巢樣本進行 cDNA 製備並用於即時定量聚合酶鏈鎖反應 (quantitative PCR; qPCR) 測定其相對表現量。結果顯示 *Je-Cx34.4* 與 *Je-Cx43* 其相對表現量分別在各週採樣之間沒有顯著差異。雖然在誘導組別中 *Je-Cx34.4* 表現量有上升但無顯著差異，而 *Je-Cx43* 則在未誘導與誘導組間均無差異。如果以 GSI 數值高於 1.5 % 做為性腺發育判斷依據進行分析 (<1.5 % 或 >1.5 %)，結果顯示，*Je-Cx34.4* 在 > 1.5 % 組別裡有較高表現量

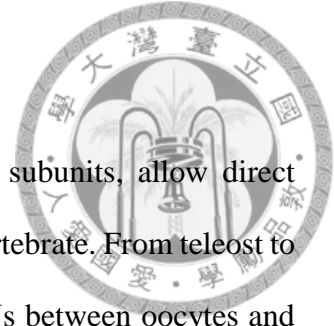


( $p < 0.05$ )；而 *Je-Cx43* 雖然在  $> 1.5\%$  組別中有趨緩趨勢，但統計上沒有差異。總結以上結果，我們發現在日本鰻卵巢早期發育階段，至少有兩種 Cx 表現，且 1) *Je-Cx34.4* 表現與性腺成熟有密切關係，在進入卵黃生成階段有較高的表現，2) 雖然 *Je-Cx43* 的基因表現隨著性腺發育持續表現但變化不大，其生理機制以及與哺乳類之差異有待進一步實驗與討論。

關鍵字：日本鰻、卵濾泡、卵巢發育、鮭魚腦下垂體、連接蛋白、生殖腺指數

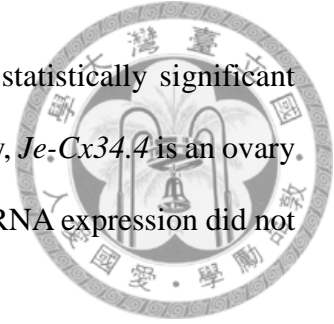


## Abstract



Gap junctions (GJs), composed of connexin (Cx) protein subunits, allow direct communication through conduits between neighboring cells in vertebrate. From teleost to mammals, throughout oogenesis, cell-cell communication via GJs between oocytes and surrounding follicle cells, and/or amongst follicle cells is required for successful follicular development. However, the functions and regulation of ovarian GJs or Cx during earlier stages of oogenesis, such as previtellogenic and vitellogenic stages, mostly remain to be explored. To gain a fundamental understanding of ovarian GJs in teleost, we identified 7 Cx genes in our Japanese eel (*Anguilla japonica*) ovarian cDNA library. One of the gene transcripts designated *Je-Cx34.4* were confirmed by polymerase chain reaction (PCR); In addition, *Cx43*, a highly conserve Cx gene in vertebrates could retrieve partial sequence through PCR with degenerated primers from ovary cDNA, we designated *Je-Cx43*. Tissue distribution showed that *Je-Cx34.4* was only expressed in ovary, by contrast *Je-Cx43* were at least expressed in six tissues. Phylogenetic analysis shows that *Je-Cx34.4* may be the Cx subfamily only in teleost; *Je-Cx43* was similar to other species *Cx43*, especially. To study early oogenesis of Japanese eel, fish received weekly intraperitoneal injections of salmon pituitary extracts (SPE). Ovarian tissue were sample weekly and gonadosomatic index (GSI%) was used as an ovary development status. Changes in gene expression across the early oogenesis were determined by using quantitative real-time PCR (qPCR). Transcription of *Je-Cx34.4* was not different during every week of induction, same results seem in *Je-Cx43*. Although transcript of *Je-Cx34.4* increase in induction group, but was not significantly different to control group. By contrast *Je-Cx43* did not have significantly difference between induction group and control group. However fish had various response to SPE induction, in accordance with a dividing point, GSI 1.5%, *Je-Cx34.4* was significantly higher in GSI > 1.5% group ( $p < 0.05$ ); *Je-Cx43*

had a tendency to increase in GSI > 1.5% group, but without statistically significant difference. Our findings suggest that in the early stage of eel ovary, *Je-Cx34.4* is an ovary-specific *Cx* and may correlated with folliculogenesis; *Je-Cx43* mRNA expression did not change but still had its appearance in early stage of oogenesis.



Keywords : Japanese eel; connexin; ovarian follicle; SPE Induction; oogenesis; GSI.



## 第一章 前言

### 日本鰻生活史

日本鰻 (Japanese eel, *Anguilla japonica*)，為降海洄游型魚類，屬於終生生殖一次的物種 (Semelparous species)，於北太平洋馬里亞納海溝西側產卵 (Tsukamoto 1992, Tsukamoto, Otake et al. 2003, Tsukamoto, Aoyama et al. 2009, Kurogi, Okazaki et al. 2011)，孵化後的仔魚轉變型態為柳葉鰻 (Leptocephalus)，藉由北赤道洋流與黑潮飄送至台灣、日本、中國、韓國等東亞陸地邊緣，隨後變態為玻璃鰻 (Glass eel)，部分進入河川成長，部分仍留在河海交會處成長 (Tzeng, Iizuka et al. 2003)，由於腹部略呈黃色，故稱黃鰻。野生黃鰻經過 4-5 年成長期後，開始進入銀化過程，鱗片增生，腹部鱗片交疊使腹部有銀白色光澤，眼徑增大，胸鰭變黑等特徵。陳彥義 (2013) 指出銀化與卵巢發育沒有直接相關，應該是為了適應降海之環境而做的改變。在歐洲鰻的研究顯示鰻魚在完成銀化，進入白鰻階段，性腺發育成熟必須進行出海洄游過程才會完成 (Van Ginneken, Durif et al. 2007)。最後雄雌鰻回到海洋中，交配產生子代，完成生命週期。

### 日本鰻種魚人工誘導催熟

日本鰻在現今淡水養殖環境中，生殖腺無法自然進入卵黃生成期 (Vitellogenetic stage, VIT) 階段，需要外源性荷爾蒙誘導，讓卵巢發育得以進行 (Yamamoto, Morioka et al. 1974, Yamamoto and Yamauchi 1974, Ohta, Kagawa et al. 1997)。1970 年代，日本研究學者開始運用鮭魚腦下垂體萃取物 (Salmon Pituitary Extracts, SPE) 對於在出海口所捕捉之野生鰻進行誘導 (Yamamoto, Morioka et al. 1974, Yamamoto and Yamauchi 1974)，並能得到受精卵。1990 年代，利用 SPE 誘導日本鰻性腺成熟的標準程序沿用至今 (Ohta, Kagawa et al. 1997)，可以誘導卵巢發育至可受精且孵



化。本研究室發現當以 SPE 併用甲基睾固酮 ( $17\alpha$ -Methyl-Testosterone, MT) 能使卵巢中卵濾泡發育較同步，卵數可保留較多 (王永松 1999)，而隨後黃蘊璞 (2001) 與吳煥成 (2003) 的研究指出，每週利用誘導日本雌鰻卵巢發育，在六週後可以有更高比例的卵細胞完成卵黃蓄積。然而卵細胞要進入到最後成熟 (Final maturation) 階段需靠施打外源性  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) (Ijiri, Kayaba et al. 1998) 或 17-Hydroxyprogesterone (17-OHP) (黃蘊璞 2001) 才可以進一步讓卵細胞成熟達到可排卵至產卵階段。另外，吳煥成 (2003) 與詹智堯 (2015) 的研究更發現在 SPE 與 MT 配合誘導六週後，依據雌鰻身體質量指數 (Body Mass Index, BMI) 之進展，持續以 SPE 誘導至 BMI 大於 110% 後，再施打 17-OHP 即可以觀察到人工配對下雌雄鰻自然受精的行為，並且成功獲得受精卵。在前人為改善日本鰻無法在人工環境飼養下自然性成熟的研究可知，日本鰻已經可透過外源性 SPE 的誘導，促使卵巢發育得已進展到獲得受精卵並孵化出幼苗。

### 間隙連接 (Gap Junctions, GJs) 與聯接蛋白 (Connexin, Cx)

GJs 為多細胞生物體細胞之間互相溝通的重要通道，心肌細胞 (Barr, Dewey et al. 1965)，神經細胞 (Fisher and Linberg 1975) 均有發現此結構體的存在。GJs 位於兩兩細胞膜之間，除了能傳遞小於 1000 Da 的分子，例如第二信使 cyclic AMP (cyclic AMP)，鈣、鉀離子等 (Christ, Brink et al. 1993, Christ, Spray et al. 1996, Melman and Rehman 1999) 與訊息傳遞相關物質外，GJs 也使細胞與細胞形成同時執行相同功能的細胞體 (Functional Syncytium)，在哺乳類已有許多研究指出 GJs 與內、外分泌均有關 (Serre-Beinier, Mas et al. 2002)。GJs 是由 Connexin (聯接蛋白, Cx) 所形成之 Connexon (聯接蛋白六聚體) 定位於細胞膜上，形成兩個半通道 (hemichannel)。Cx 為一種穿膜蛋白，其結構 (Makowski, Caspar et al. 1977) 擁有一胞內氨基端 (N-terminus)，一胞質環 (Cytoplasmic loop)，四個穿膜區域 (Transmembrane domain)，兩個胞外環 (Extracellular loop) 及一段尾端胞內羧基端 (Carboxyl-



terminus)，其中胞外環扮演與另一細胞的間隙連接接合的重要區域 (Bai and Wang 2014)。通道的活性與細胞內 pH 值及鈣離子濃度有關 (Rose, Simpson et al. 1977, Turin and Warner 1977, Spray, Harris et al. 1981)，且通道的開闔或允許物質通透性也與 Cx 單體本身結構有關 (Unwin and Ennis 1983, Unwin and Ennis 1984)。由於 Cx 的胞質環與羧基端在胺基酸序列上的變異，使 Cx 衍生出許多種家族成員 (Isoform)。目前人類的 Cx isoform 有 21 種，老鼠有 20 種 (Sohl and Willecke 2003, Sohl and Willecke 2004)。在斑馬魚至少預測有 37 種 Cx isoform (Iovine, Higgins et al. 2005, Eastman, Chen et al. 2006)，其成員的多樣可能與基因重製 (Gene duplication) 有關 (Sato and Nishida 2010, Iovine 2013)。基於其龐大家族成員，傳統上目前已知 Cx 成員依照胺基酸序列相似度與胞質環長度分為三子群 (Subgroup)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Kumar and Gilula 1996, Jurgen, Joachim et al. 2011)。命名上除了以 Cx 本身蛋白質分子量區分也可用隸屬之子群區別，以人類做例子，Cx43 又稱 GJA1、Cx37 又稱 GJC1 (C 表示屬  $\gamma$ )。

### 硬骨魚類卵濾泡早期發育

從卵生的硬骨魚至胎生哺乳類，卵巢中之卵濾泡 (Ovarian follicle) 的形成是由一群原始生殖細胞 (Primordial germ cell) 在性別決定後轉變成卵原細胞 (Oogonia)，此階段卵原細胞可進行細胞分裂 (Mitosis)，之後轉變成卵細胞 (Oocyte)，最明顯的差異在於卵核內開始進行減數分裂 (Onset of Meiosis)。然而減數分裂很快就停滯在前期 (Prophase I)，同時間卵細胞外層的一群特殊的體細胞 (Somatic cells) 成為前濾泡細胞 (Pretfollicle cells) 並聯合基底膜 (Basement membrane) 鬆散的分佈於正停留在第一次減數分裂 (meiosis I) 前期的粗線絲期晚期 (Pachytene) 至雙線期早期 (Diplotene) 的卵細胞。大部分硬骨魚前濾泡細胞之後成為顆粒細胞 (Granulosa cells) 單層的包圍整個卵細胞，隨後鞘細胞 (Theca cells) 也在基底膜外形成，此階段稱為濾泡生成期 (Folliculogenesis) (Tokarz 1978, Wallace and Selman



1990, Patiño and Sullivan 2002, Menn, Cerdà et al. 2007)。濾泡細胞對於整個卵濾泡的發育極為重要，依賴著生殖內分泌的調控，濾泡細胞接收從腦下垂體以及卵巢內分泌之因子傳來的訊號，例如兩種促性腺激素 (Gonadotropin hormone, GTH)，包括促濾泡生成激素 (Follicle-stimulating hormone, FSH) 參與濾泡生成與卵黃生成過程、而黃體生成素 (Luteinizing hormone, LH)，影響類固醇生合成 (Steroidogenesis) 與使卵細胞獲得成熟能力 (Oocyte Maturation Competence, OMC) 等功能。透過濾泡細胞與卵細胞緊密聯繫以及濾泡細胞之聯繫，互相溝通，這種訊號傳遞軸，又稱下視丘－腦下垂體－生殖線軸 (Hypothalamus-Pituitary-Gonad axis) 協助卵細胞持續正常的發展。在哺乳動物 (Anderson and Albertini 1976) 與爪蟾 (Dumont and Brummett 1978) 的研究指出，細胞間物質、離子與訊息分子的溝通需要靠卵濾泡組織內細胞間的間隙連接 (Gap junction, GJs) 執行功能才得以讓整個卵濾泡發育正常 (Heller, Cahill et al. 1981, Brower and Schultz 1982, Browne and Werner 1984, Caveney 1985, Greeley, Begovac et al. 1987, Cerda, Petrino et al. 1993, Carabatsos, Sellitto et al. 2000, Ackert, Gittens et al. 2001, Yoshizaki, Patino et al. 2001)

### 硬骨魚卵濾泡之細胞間通道蛋白


早在硬骨魚 GJs 研究域開始前，非洲爪蟾 (Dumont and Brummett 1978) 及家鼠 (Anderson and Albertini 1976) 便有類似結構於卵巢中發現，且認為此結構是 GJs。硬骨魚隨後在 1980-1988 年間，利用穿透式電子顯微鏡，分別在香魚 (*Ayu, Plecoglossus altivelis*) (Toshimori and Yasuzumi 1979)、大馬哈魚 (Chum salmon, *Oncorhynchus keta*) (Kobayashi 1985)、青鱈 (Medaka, *Oryzias latipes*) (Iwamatsu, Ohta et al. 1988) 的卵濾泡觀察到濾泡細胞之間與卵細胞與濾泡細胞之間間隙有連接的結構，以香魚與斑馬魚濾泡細胞與卵細胞之間發現的異型間隙連接 (Heterologous GJs) 能清楚可見於冷凍蝕刻切片 (Toshimori and Yasuzumi 1979, Kessel, Tung et al.



1985)。在前人研究中也觀察到 Heterologous GJs 主要形成於卵細胞微絨毛與濾泡之間，而非濾泡細胞微絨毛與卵細胞連接處 (Toshimori and Yasuzumi 1979, Kobayashi 1985, Cerdà, Reidenbach et al. 1999, Menn, Cerdà et al. 2007)。在早期硬骨魚 GJs 研究中發現，在香魚的卵細胞與周圍濾泡細胞之間 GJs 對於卵細胞正常發育是有其必要性 (Iwamatsu and Ohta 1981)，在鱒魚 (Mummichog, *Fundulus heteroclitus*) 也觀察到 heterologous GJs (不同種細胞之間形成之 GJs，顆粒細胞與卵細胞間) 可傳遞鉀離子輔助其卵細胞吸水階段 (Cerdà, Petrino et al. 1993)。不過在濾泡細胞之間組成之 homologous GJs (同種細胞之間形成之 GJs，此指顆粒細胞之間) 卻鮮少人討論其功能。

#### 硬骨魚 GJs 與 Cx 受到性荷爾蒙調控其表現

從哺乳類及爪蟾卵巢研究已知 GJs 在卵細胞成熟過程中，其通透性受到促性腺激素 (Gonadotropin) 所調控 (Browne, Wiley et al. 1979, Sommersberg, Bulling et al. 2000)。1990 年後不斷有硬骨魚 Cx 被發現，其中主要以波紋絨鬚石首魚 (Atlantic croaker, *Micropogonia undulates*)、真鯛 (Red seabream, *Pagrus major*)、香魚及銀鮭 (Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*) 之卵巢為主要研究對象。波紋絨鬚石首魚與真鯛的卵巢 GJs 在受到 LH 誘導下，獲得成熟能力的卵細胞大量增加 (York, Patino et al. 1993, Patino and Kagawa 1999, Bolamba, Patino et al. 2003)；同時在香魚的研究發現以 GJ 抑制劑 carbenoxolone (CBX) 作用，發現 GJs 所形成之通道是卵細胞進入 OMC 階段之不可或缺因子，且 OMC 的發生調控於 Protein kinase A (PKA) (Yamamoto, Yoshizaki et al. 2007, Yamamoto and Yoshizaki 2008)。另一方面，以人類重組第一類胰島生長因子 (Recombinant human-IGF1) 誘導 (*In vitro*) 真鯛性腺，透過穿透式電顯觀察到卵巢內 GJs 有增加趨勢 (Patino and Kagawa 1999)。從先前研究可知，卵巢內 GJs 增加或減少受到內分泌激素所調控，影響 GJs 的核苷酸 (Cx) 轉譯作用。在 OMC 階段，真鯛以 FSH, LH 處理會使 Cx32.3 及 Cx31.5 增加表現



量 (Choi and Takashima 2000, Choi and Takemura 2001)；波紋絨鬚石首魚以人類絨毛膜促性腺激素 (hCG) 會促進 Cx32.2 的表現量 (Chang, Patino et al. 2000)；以 h-IGF1、FSH、LH 處理銀鮭則分別在前卵黃生成期 (Previtellogenic stage, PV) 至 VIT 時期調控著不同的 Cx 基因 (Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)。由這些研究顯示在卵細胞成熟過程中，內分泌激素透過 Cx 所組成之 GJs 影響卵巢發育。

### 濾泡細胞間之 Cx43 與 Cx34.3

在哺乳類已知 Cx43 廣泛存在於各組織，而在卵濾泡中主要表現於周圍濾泡細胞間 (包括 Cumulus cell 與 Mural cell)，且已知小鼠胚胎剔除 Cx43 基因 (*GJA1*/*GJA1*)，除有心臟疾病明顯徵兆以外，其濾泡無法形成多層，且卵細胞發育遲緩 (Ackert, Gittens et al. 2001)。Cx43 (*GJA1*) 也發現高度演化保守至一些硬骨魚中 (van der Heyden, van Eijk et al. 2004)，且在銀鮭發現同源家族成員 Cx43.2 (Cx 命名以分子量大小命名之)，其基因表現模式類似於哺乳類，在進入 OMC 時期有最高表現，且整個卵濾泡均有其 mRNA 表達 (Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)。另外在銀鮭中發現 Cx34.3，目前發現僅表現於周圍濾泡細胞的顆粒細胞，證據顯示可能形成 homologous GJs，且受到 FSH、LH、IGF-1 刺激促進其表現，且需要 FSH 來維持表現量 (Luckenbach, Yamamoto et al. 2013)。同時 Cx34.3 與已知硬骨魚卵巢中發現之 Cx 成員親緣關係相近 (石首魚 Cx32.7)，Cx34.3 可能對於硬骨魚早期卵濾泡發育相關，例如參與卵黃生成。





## 研究動機與目的

日本鰻卵巢發育研究至今，尚未有卵巢 GJs 或 Cx 相關研究發表。不管從卵生到胎生動物均指出卵巢中的 GJs 或 Cx 對於性腺發育完整性極為重要。但硬骨魚相關研究中 (Matsuyama, Nagahama et al. 1991, Cerda, Petrino et al. 1993, York, Patino et al. 1993, Chang, Patino et al. 1999, Patino and Kagawa 1999, Choi and Takashima 2000, Yamamoto, Yoshizaki et al. 2007)，大部分探討在卵細胞 OMC 階段的機制，鮮少針對卵細胞發育初期 (PV) 研究 Cx 或 GJs 的表現與作用機制之探討。

本研究分別透過實驗室的次世代定序 (Next generation sequencing ; NGS) 資料庫以及根據目前已知硬骨魚與哺乳類之 Cx 設計退化性引子進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 方式篩選基因, 2 種 Cx isoform (*Cx43* 與 *Cx34.4*)，並分析其分子結構與比較其他物種 Cx isoform 之親緣關係。過去文獻認為這兩種 Cx 在魚類可能參與早期卵細胞周圍之濾泡細胞生成與類固醇合成 (Yamamoto, Luckenbach et al. 2011, Luckenbach, Yamamoto et al. 2013)。本研究欲了解在外源性激素刺激下，觀察 *Cx43* 與 *Cx34.4* 在日本鰻卵濾泡 PV 進入 VIT 階段的基因表現之變化。

## 第二章 材料與方法



### 1. 實驗用魚與採樣

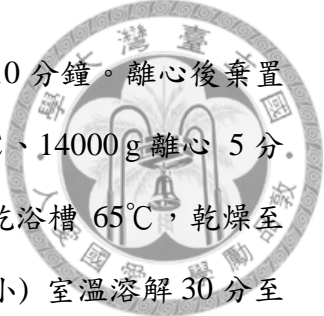
日本鰻 (*Anguilla japonica*) 購自鹿港養殖戶張益修先生，鰻魚為淡水養殖，年齡約入池後 2-3 年，平均體重  $763.11 \pm 105.08$  g，平均體長  $76.84 \pm 7.71$  cm，魚隻皆以活體運輸方式運送，置於預先準備好的淡水檢疫筒檢查無傷口後，以 20 ppm 歐索林酸 (Oxolinic acid) 進行消毒，浸泡隔夜後批次換水。為辨識魚隻，以 AVID MUSICC Chip (AVID Identification systems, Inc) 圓柱型晶片注入背鰭頂端右下方，消毒靜置。待傷口癒合後，進行一週海水馴化，鹽度批次調至 8‰、15‰、22‰、30‰。過去文獻指出日本鰻在洄游過程中消化道指數 (digestosomatic index, DSI) 變小 (Han, Tzeng et al. 2001)，進食行為降低，故馴化過程停止餵食，飼育水溫維持 21°C，鹽度維持在 30-34‰，並以遮光黑塑膠板避光以及防止魚隻跳出。

犧牲採樣，以 2-phenoxyethanol (20 ppm) 麻醉致死，犧牲後秤重，並取出兩側卵巢，採用生殖線指數  $GSI = [\text{生殖腺重量}/\text{體重}] \times 100$  作為卵巢發育參考依據之一。卵巢樣本運用後續 cDNA 製備與組織包埋切片。

### 2. Connexin 基因選殖

#### 2-1. 總量 RNA 萃取

於取樣卵巢組織中段，剪取一塊  $8 \text{ mm}^3$  組織塊放入 1.5 ml 微量離心管底，浸泡於 500  $\mu\text{l}$  Trizol reagent (Azol)，以研磨棒磨碎組織塊呈乳白色糜狀，再加入 500  $\mu\text{l}$  Trizol 及 300  $\mu\text{l}$  三氯甲烷 (Chloroform) 後劇烈震盪均勻 (3s/次\*4)，室溫靜置 15 分鐘，2°C、14000 g 離心 15 分鐘。離心後輕取上清液 300  $\mu\text{l}$  至新的 1.5 微量離心管，加入 300  $\mu\text{l}$  異丙醇 (Isopropanol, 同上清液體積) 並以微量吸管輕輕地混均勻，



室溫靜置 10 分鐘 (或 4°C 靜置 1 小時), 2°C、14000 g 離心 10 分鐘。離心後棄置上清液, 可見透明沉澱, 加入 1ml EtOH, 清洗白色沉澱, 2°C、14000 g 離心 5 分鐘後, 棄上清液重複酒精清洗步驟。結束後棄上清液, 放置乾浴槽 65°C, 乾燥至沉澱接近透明便可加入 40-60  $\mu$ l 預熱 DEPC 水 (看沉澱物大小) 室溫溶解 30 分至 1 小時。回溶溶液可利用 Nanodrop 測量吸光值, 確認符合 RNA OD 260/280 吸光值後, 用於反轉錄合成 cDNA 或立即置於 -80°C 保存。

## 2-2. cDNA 製備 (Reverse Transcription)

利用 Improm- II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase kit (Promega, step two) 進行反轉錄合成 cDNA。步驟一, 將總量 RNA (2  $\mu$ g) 與 0.5  $\mu$ l Oligo dT, 補 DEPC 水至 5 $\mu$ l, 70°C 反應 5 分鐘後 4°C 冷卻 (或至於冰上)。待步驟一反應期間預備步驟二反應混和液: 2.4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (2.5mM)、1  $\mu$ l dNTP mix (2.5mM)、4  $\mu$ l Improm- II<sup>TM</sup> 5X buffer、1  $\mu$ l Improm- II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase, 最後補 DEPC 水至 15  $\mu$ l 混勻後, 將步驟一反應物與反應混和液 (20  $\mu$ l) 混和後靜置 5 分鐘, 進行步驟二, 42°C 反應 60 分鐘; 70°C 反應 15 分鐘, -20°C 保存。

## 2-3. 引子設計

本實驗室運用兩種方式篩選卵巢中 Cx 基因。利用日本鰻卵巢轉錄基因體資料庫設計引子與設計退化性引子進行 PCR。

### 2-3.1 Je-Cx34.4

本實驗室 NGS 資料庫 (日本鰻卵巢轉錄基因體; 尚未發表), 發現 Cx34.3 僅在海水誘導組中表現 (Table 1)。其中 cDNA 資料庫, 讀取序列與 non-redundant (nr) 資料庫比對分析。讀取編號 c23806\_c0\_seq1 比對近似銀鮭 Cx34.3 (GenBank: HQ315554.1)。為了再次確定 NGS 資料庫中序列 c23806\_c0\_seq1 的正確性, 我們以其為模板設計引子 (Table 2)。設計過程中

比對其他 Cx isoform 編碼區內相異區為主要設計區域，核酸序列預測後的胞質環與胞內羧基端，避免引子與其他 Cx 成員基因反應。



### 2-3.2 *Je-Cx43* 退化性引子設計

在 NGS 資料庫並未比對出 *Cx43* 基因的片段。然而 *Cx43* 應為演化上保守的基因，基於此原因，根據 NCBI 上已發表 *Cx43 (GJA1)* 核苷酸序列，比對人類 (AF151980.2)、家鼠 (NM\_010288.3)、斑馬魚 (AF035481.1)、鯉魚 (AY008286.1)、虹鱒 (DQ204869.1)、銀鮭 (HQ315555.1) 等進行多序列並排比對分析，選擇此基因物種間演化最相近且避免與其他 Cx isoform，選擇 *Cx43* 獨特序列區域設計退化性引子(正向與反向)。設計上一段引子，退化性核苷酸不多於 4 個。

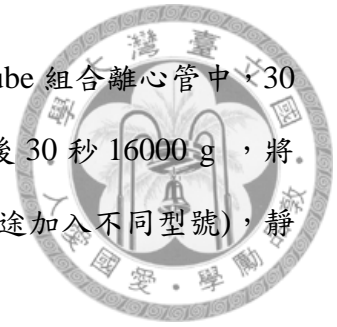
### 2-4. 反轉錄聚合酶反應 (RT-PCR)及膠體電泳分析

取 1  $\mu$ l 卵巢 cDNA (2  $\mu$ g)，正、反向引子各 1  $\mu$ l (10  $\mu$ M)，2X PCR MasterMix 10 $\mu$ l，最後補純水至 20 $\mu$ l。反應條件為 95 $^{\circ}$ C 變性 3 分鐘，進入循環 30-35 重複，包括 95 $^{\circ}$ C 變性 3 分鐘、黏合溫度視引子而定反應 30 秒、72 $^{\circ}$ C 聚合依照預期產物長調整反應 30-40 秒。最後 72 $^{\circ}$ C 延長反應 5 分鐘後 4 $^{\circ}$ C 保存待電泳確認。取 5  $\mu$ l PCR 產物以 1.5% 瓊膠 (Amreseo, Solon, Ohio, USA) 中，以 80-90 伏特下進行 25-30 分鐘電泳，以溴乙烷 (Ethidium bromide) 外染 10 分鐘並以清水退染 2 分鐘，以紫外光燈下觀察產物，並拍照做紀錄。

### 2-5. DNA 片段純化

將瓊膠中預期 DNA 產物，以刀片於膠體切下置入 1.5 ml 微量離心管，利用 Gel band purification kit (GE Healthcare) 進行膠體萃取。首先加入 500  $\mu$ l capture buffer type 3，60 $^{\circ}$ C 乾浴槽內加熱 15-30 分鐘，每 5 分鐘輕翻轉離心管混勻，直至膠

體溶解。將溶液取至 GFX microSpin™ column 與 Collection tube 組合離心管中，30 秒 16000 g，去除濾液，再加入 500 µl Wash buffer type 1 後 30 秒 16000 g，將 column 移至 1.5 ml 微量離心管，加入 Elution buffer (依照用途加入不同型號)，靜置 1-3 分鐘後離心 60 秒 16000 g。

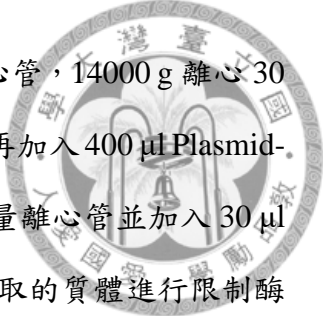


## 2-6. 接合及轉形作用

純化 DNA 片段利用大腸桿菌 (E. coli) 大量複製 DNA 片段，利於若產物濃度過低，不適於定序之狀況。將純化 DNA 片段 (莫耳數比大約為，載體：核酸產物 = 1 : 1.5)、pGM-T Vector (Genemark) 1 µl、10X T4 DNA ligation buffer 1 µl 及 T4 DNA ligase 1 µl，Nuclease free water 至 10 µl 混均勻後，黏合混合液室溫反應 1 小時。pGM-T 上帶有 Amp<sup>r</sup> 與 LacZ $\alpha$  基因，固選用 IPTG/X-gal staining 藍白篩選成功轉型細菌。E. coli 勝任細胞以 DH5 $\alpha$  (Genemark) 為宿主。以 5 µl 黏合混合液與 50 µl 已冰上回溫勝任細胞輕彈混勻，冰上反應 30 分鐘。反應後進行 42°C 熱休克反應 (Heat-shock) 45 秒後立即置於冰上 3 分鐘 (勿晃動)。反應管個別加入 250 µl SOC medium 於 37°C 水浴槽 (200 rpm) 搖晃培養 1 小時。將轉型混合液混勻後取 100 µl 至含 ampicillin (50 µg/ml) 與事先加入 IPTG (80 µl, 50 mM) 與 X-gal (80 µl, 20mg/ml) 的洋菜膠培養皿中塗勻至微乾，置於 37°C 培養箱培養 12-16 小時，最後挑選白色菌落進行快速偵測或直接用牙籤沾取菌落至 LB broth 培養液 (含 amp) 培養 12 小時用於質體製備。

## 2-7. 小量質體製備及限制酶切割

利用 ZR Plasmid Miniprep™-classic kit (Zymo Research) 取 4 ml 培養菌液至離心管 12000g 離心 20 秒，去除上清液後，加入 200 µl P1 buffer，劇烈震盪或重複稀吐液體直至菌液回溶完整，接著加入 200 µl P2 buffer 輕翻轉 2 至 4 次立即加入 400 µl P3 buffer，翻轉至融液成黃色，靜置 2 分鐘後離心 14000 g 離心 2 分鐘。將



上清液加入 Zymo-Spin™ II in column 與 collection tube 組合離心管，14000 g 離心 30 秒，棄濾液加入 200  $\mu$ l Endo-Wash buffer，14000 g 離心 30 秒後再加入 400  $\mu$ l Plasmid-Wash buffer，14000 g 離心 1 分鐘。將 column 移至 1.5 ml 微量離心管並加入 30  $\mu$ l DNA Elution Buffer，室溫靜置 2 分鐘，16000 g 離心 30 秒，取的質體進行限制酶切割，取 5  $\mu$ l 質體 DNA 與 1  $\mu$ l EcoR I，2  $\mu$ l 緩衝液最後補水至 20  $\mu$ l，37°C 切割反應 1 小時後 65°C 停滯反應 20 分鐘。取 10  $\mu$ l 進行電泳確認切割結果。

## 2-8. DNA 定序

將確認含有目標產物的質體或切膠純化 PCR 產物，送請廠商定序 (源資生物科技)，定序結果先確認訊號圖譜峰值，增加定序可信度。核苷酸序列利用 NCBI blast 功能比對，或 ExPASy translate tool 預測其轉譯蛋白質用於建立蛋白質親緣關係圖譜。本實驗序列以拼接方式，模板以銀鮭 *Cx34.3* (HQ315554.1) 與銀鮭 *cx43.2* (HQ315555.1) 便於比對。

## 2-9. 親緣關係圖譜建立

為了解日本鰻 *cx* 與其他物種 *cx* isoform 基因的親緣關係，利用生物資訊分析軟體 CLC Sequence Viewer 7.5 的不加權平均重法 (UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) 建構親緣關係圖譜，NCBI 上目前已發表之 *cx* isoform 基因與 *je-cx34.4*、*je-cx43* 一同分析，Bootstrap 100 次做親緣關係分析。

## 3. 日本鰻卵巢 *Cx34.4*，*cx43* 基因表現

### 3-1. 鮭魚腦下垂體誘導催熟

為使性腺能夠進展，採用鮭魚腦下垂體誘導性腺發育。誘導催熟流程主要依詹智堯 (2015) 與吳煥成 (2003) 流程。魚隻進行誘導前，先犧牲海水馴化鰻作為控制組。本研究魚隻每周進行一次鮭魚腦下垂體誘導，施打劑量為 20mg/0.5ml/kg (Ijiri,

Kazeto et al. 1995) 分別在第二，四，六周的第三天取樣，採樣時間點參考闕 (2011) 採樣時間點試驗，將日本鰻用 2-phenoxyethanol 麻醉致死，犧牲後秤重並取出兩側卵巢，採用生殖線指數  $GSI = [\text{生殖腺重量}/\text{體重}] \times 100$  作為卵巢發育參考依據之一。卵巢樣本運用後續 cDNA 製備 (材料方法 2-2) 與組織包埋切片 (材料方法 3-3)。



### 3-2. 基因表現定量分析

#### 3-2.1 樣品製備

##### 3-2.1 A 總量 RNA 萃取

同材料方法 2-1

##### 3-2.1 B cDNA 製備

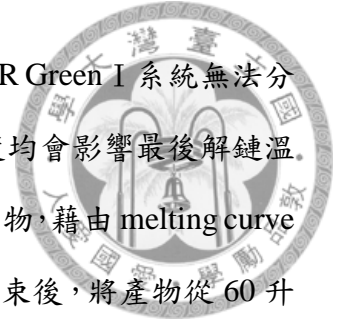
同材料方法 2-2

### 3-3 即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應

一般 RT-PCR 是利用反轉錄好的 cDNA 作為模板進行 PCR 反應。即時定量是透過 SYBR Green I 螢光染劑與 DNA 雙股螺旋中的結構 (minor groove) 結合，當結合時會放出強螢光，藉此透過每次反應後偵測其螢光轉換成 Ct 值，Ct 值指每個反應管內螢光訊號到達設定之閾值所需要的反應循環數 (cycle)，我們以此值計算基因表現量。以相對量來比較基因表現，需要藉著參考基因 (利用 house keeping gene) 校正目標基因，得到樣本間目標基因的相差倍數，此實驗所選用參考基因為日本鰻 *efla* (Higuchi, Celino et al. 2012)。本研究以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式計算倍數 (Livak and Schmittgen 2001)，將未以 SPE 誘導催熟的樣本視為控制組，其餘為處理組代入公式計算。

本實驗使用 Fast SYBR® Green Master Mix (ABI)，預先配置好反應混和液：2X Fast SYBR MM，5  $\mu$ l、正反向引子 (2  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ l、Nuclease free water，1  $\mu$ l、cDNA (10 ng/ $\mu$ l)，5  $\mu$ l，總體積 10  $\mu$ l。反應條件為：95°C，20 秒、進入 40 個循環反應，

變性 95°C，3 秒、黏合與延伸 60°C，30 秒，結束反應。SYBR Green I 系統無法分辨非特異性產物，由於每個 DNA 產物 G，C 比例與產物長度均會影響最後解鏈溫度 (Melting temperature)，所以可以藉此溫度分辨不同 DNA 產物，藉由 melting curve 來分析判定反應過程產物是否有專一性。上述 40 循環反應結束後，將產物從 60 升溫至 95°C，每 0.25°C 偵測一次螢光，直到螢光驟降，將數據做一次微分後，理論上產物若專一性夠高，只會有一個波峰。



### 3-4 組織分佈實驗

#### 3-4.1 Total RNA 萃取

同材料方法 2-1，樣本取自淡水養殖鰻，取樣組織分別為心臟、肝臟、腸道、肌肉，鰓絲，卵巢，GSI%： $<1\%$ ，萃取方式同材料方法 2-1

#### 3-4.2 cDNA 製備

同材料方法 2-2

#### 3-4.3 RT-PCR

同材料方法 2-4

## 4. 卵濾泡組織形質觀察

### 4-1. 固定包埋

為觀察以 SPE 誘導催熟的鰻魚卵巢，犧牲後採樣卵巢以 4% Paraformaldehyde 固定組織塊，12-16 小時，以酒精濃度梯度脫水（濃度 25-50-75% 各 5 分鐘，100% 脫水 1 分鐘後再以 100% 最後脫水 30 分鐘）。以 JB4 樹脂包埋套組 (EMS) 包埋組織塊。將完成脫水組織以浸潤液 (Solution A：Catalyst Benzoyl Peroxide) 浸潤至組織沉底，換新浸潤液隔夜浸潤。將浸潤組織以包埋液（浸潤液：Solution B) 包埋至 1.5 ml 微量離心管，立即置於抽真空機 2 小時使包埋塊變硬。

### 4-2. 組織切片





利用超薄切片機 (Reichert ultracuts) 選擇半厚切 2  $\mu\text{m}$ ，將包埋塊修成梯形，使玻璃刀受力均勻。切片以氨水 ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 0.1 %) 展片，60°C 烘片機將氨水完全蒸發後，方可進行組織染色。

#### 4-3. 組織染色及封片

切片以 Hematoxylin & Eosin 染色法進行染色。染色為兩種染劑分開進行，Hematoxylin 10 分鐘後水洗至不退色，烘片後以氨水顯色，烘片後進行 Eosin 複染 3 分鐘，流水褪色 5 分鐘。烘片後封片待觀察。

#### 4-4. 切片觀察及照相

以連續切片前後 3-5 片切片中觀察同一組織塊中有卵核視為一顆細胞計算。測量卵徑，以卵徑 200  $\mu\text{m}$  為基準粗分大小卵細胞 (平均 200  $\mu\text{m}$  左右開始進入卵黃生成)，並計算大小卵比例。

### 5. 免疫組織染色 (Immunohistochemistry)

#### 5-1. 抗體選用


為了解 Cx43 蛋白質在卵巢內的分佈位置，我們採用免疫組織染色法。由於鰻魚目前沒有市售抗體，我們選用針對老鼠 CX43 胺基酸序列 362-382 設計的市售抗體 C6219 (Anti-Connexin-43 antibody produced in rabbit, Sigma) (由陽明大學生理學研究所，黃娟娟教授提供)，事先與鰻魚序列相近的虹鱒 CX43 做比對，序列只有四個位點不相同，且胺基酸 I, V 性質類似。

>mouse 362 RPSSRASSRASSRPRPDDLEI\* 382

>trout 363 RPCSRASSRMSSRPRPDDL DV\* 383

#### 5-2. 免疫染色 (whole mount)

將事先固定 (4% paraformaldehyde) 的卵巢組織，以含有 0.1% glycine 的 PBS 去除 paraformaldehyde 40 分鐘，再以 0.3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  / PBS 抑制過氧化氫酶 4 小時。為了阻擋非專一性抗原位結合，加入 5 % Bovine Serum albumin 與 0.1 % Tween 20



/PBS 處理 1 小時，抗體比例 1:100 以含 5 % BSA/PBS 一抗隔夜培養。隔日，以 5 % BSA/PBS 4°C 清洗一小時兩次，並在室溫清洗一小時三次。二抗培養，抗體為 Anti rabbit 1:100。隔日清洗法如上述後，利用 0.1 % Tween 20 /PBS 清洗 20 分鐘後加入反映放大物質 (avidin) 1 小時，以 0.1 % Tween 20 /PBS 清洗 3 次，各五分鐘，加入呈色劑 0.05 % DAB 與 0.015 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /PBS，呈色 15 分鐘，0.1 % Tween 20 /PBS 清洗 3 次，各五分鐘後進入酒精梯度脫水，如材料方法四。

## 6.統計分析

本研究欲了解不同誘導週數下，Cx mRNA 變化差異數據以平均值±標準誤 (S.E.M) 呈現，首先以軟體 SPSS v12.0 進行單因子變異數分析 (One way ANOVA) 檢定所有組別平均數是否相異，又以 Tukey's HSD 進行組間的比較，檢定各組間平均數是否有差異。GSI % 分組分析以 T test 進行組間的比較。ANOVA 與 T test 的均以 95% 信賴水準判斷組間差異性。

### 第三章 實驗結果



#### 1. 日本鰻 Connexin 基因分析

##### 1-1. *Je-Cx34.4*

從本實驗室的 NGS 資料庫與其他硬骨魚類 Cx 序列相比對結果，編號 c45341\_g1\_i1 (相似於 Zebrafish Cx52.9) 與 c30606\_g1\_i1 (相似於 Red Seabream Cx31.5) 僅專一表現於未以 SPE 誘導之組別，而 c23806\_c0\_seq1 (相似於 Coho Salmon Cx34.3) 與 c10677\_c0\_seq1 (相似於 Medaka GJB-5) 專一表現於 SPE 誘導組 (Figure 1)。Cx31.5 與 Cx34.3 在過去文獻均指出與卵巢發育相關，然而本實驗欲探討海水馴化之日本鰻 Cx 在性腺發育過程中的表現變化，所以我們將近似於 Coho Salmon Cx34.3 (編號 c23806\_c0\_seq1) 作為我們研究對象之一。

將編號 c23806\_c0\_seq1 之基因序列以 ExPASy translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) 可預測出完整編碼區 (Coding region)，ExPASy compute pI/Mw tool ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 可知此蛋白質序列分子量為 34438 Da。為了再次確認此序列的正確性，利用此段基因序列設計引子 (Table 2) 進行 PCR (Figure 2)。我們將 PCR 產物進行基因定序，定序結果與 NGS 資料庫的基因序列比對皆為 99% 相似度。將 c23806\_c0\_seq1 預測之胺基酸序列 (Figure 3)，利用 NCBI BLAST 網站與 nr 資料庫比對 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。如 Figure 4 所示，此序列預測結果包含兩個 Cx 基因 domain，Cx superfamily domain (N-terminal to Secondary transmembrane; 氨基端至第二穿膜；其基因序列如 Figure 2 綠底標記處) 與 Cx \_C-C-C superfamily domain (Cysteine rich；如 Figure 3 黃底標記處)。c23806\_c0\_seq1 cDNA 全長為 1471 bp (Figure 3)，包含 84 bp 的 5' 端未轉譯區 (5'-untranslation region, 5'-UTR)，897 bp 的開放讀碼區 (open reading frame, ORF) 以及 490 bp 的 3' 端未轉譯區 (3'-untranslation region, 3'-UTR)。此序列進行胺基酸

轉譯預測結果為 298 amino acids。利用胺基酸序列進一步與 NCBI CDD conserve domain 資料庫 (Marchler-Bauer, Derbyshire et al. 2015) 再次進行比對，其結果同樣證明 c23806\_c0\_seq1 屬於 Cx superfamily (編號為 pfam00029) 之一員。




因為 Cx 為一種穿膜蛋白，我們將整段編碼區預測穿膜區以 TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))，結果如 Figure 5 親疏水性分析含有四個疏水性區域 (Figure 3 黑框標記處)，這四個疏水性區域即為穿膜區域位置，與其他物種穿膜區域相似。將 c23806\_c0\_seq1 編碼區胺基酸依照 Figure 4 的預測結果分成不同區域 (包括四段穿膜區域，兩段胞外環區域，以及一段胞內環區域)，顯示此序列與銀鮭 Cx34.3 和斑馬魚 Cx34.5 相近 (Table 3)。三者不管是相似度 (Similarity) 或相同度 (Identity) 達 50% 以上。故可再次確定 c23806\_c0\_seq1 為 Cx 家族成員之一。綜合以上分析結果，本研究將 NGS 資料庫編號 c23806\_c0\_seq1 之 cDNA 全長序列命名為日本鰻 Cx34.4 (*Je-Cx34.4*)。

除了包含 Cx 蛋白家族特徵外，運用 Kinase phos 2.0 (Wong, Lee et al. 2007) 預測磷酸化位置 (Figure 3 黑底線標記處)。我們在胞內環區發現有五個絲胺酸 (Serine, S) 與一個蘇胺酸 (Threonine, T) 位點為磷酸化作用位置 (Figure 3)。

### 1-2. *Je-Cx43*

在我們的日本鰻卵巢 NGS 資料庫與 NCBI nr 資料庫比對結果並未發現 Cx43 相似基因序列。同樣的結果在銀鮭的研究，透過銀鮭的卵巢 NGS 資料庫也未發現 Cx43 基因序列 (Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)。但透過以虹鱒 Cx43 序列作為模板設計引子，進行一系列分子選殖得到銀鮭 Cx43.2 全長序列，以及偵測其在卵巢內的表現。

所以我們依循相同模式，運用其他物種 Cx43 的核苷酸序列，設計不同位置的退化性引子 (Table 4) 進行 PCR (Figure 6)。PCR 產物定序結果拼接如 Figure 7 之核苷酸序列所示。核苷酸序列以 ExPASy translate tool 預測其胺基酸序列 (Figure 7)



利用 NCBI BLAST 網站與 nr 資料庫比對結果，證明我們所得到胺基酸序列確實含有一個 Cx43 專一性 domain (Figure 8；詳細序列如 Figure 7 綠底標記處)。同時，Cx43 有一段演化上高度保守片段 (E/R)(R/G)TNSCRNY(I/N)KXA(N/S)EQNW(G/A)N，與 NCBI CDD conserve domain：pfam03508 資料庫內的其他物種 Cx43 比對結果，我們的胺基酸片段與東方紅鰭鮪的專一性 connexin 43 domain 相似度達 65%、與鯉魚的專一性 connexin 43 domain 有 85 % 高度之相似度 (Figure 9)。綜合上述分析結果，我們將此 cDNA 部分序列暫定為日本鰻 Cx43 (*Je-Cx43*)。

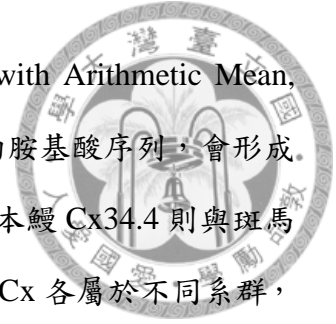
我們一樣將此預測胺基酸進行親疏水性分析 (TMpred)，結果如 Figure 10 分析結果含有兩個疏水性區域 (胺基酸序列如 Figure 7 黑框標記處)，這兩個疏水性區域即為穿膜區域位置，與其他物種穿膜區域相似。運用 Kinase phos 2.0 預測磷酸化作用位置，羧基端被預測到的磷酸化位點有 8 處 (如 Figure 7 之 Serine (S) 與 Threonine (T) 之標記處)。

由於本研究並未得到 Cx43 cDNA 全長，我們將部分 cDNA 序列轉譯預測而成的胺基酸片段與他物種 Cx43 比對，增加 cDNA 序列為 Cx43 家族的可信度。如 Figure 11 所示，與銀鮭 Cs-Cx43.2、虹鱒 Rt-Cx43、鯉魚 Cc-Cx43、斑馬魚 Zf-Cx43 胺基酸序列做比對。比對結果發現其他物種 Cx43 與日本鰻已確認的片段極為相似 (相同胺基酸以\*號標記)。從上述比對可推斷我們在卵巢中以退化性引子得到之 cDNA 為 Cx43 基因，且在不同硬骨魚間的相似度極為相似。

## 2. Connexin 成員親緣關係

我們欲了解在卵巢中發現的兩種 Cx 基因與其他已發表的硬骨魚 Cx 基因的親緣關係，我們利用 CLC Sequence Viewer 7.5 分析軟體 (CLC bio, a QIAGEN Company.) 將目前硬骨魚有文獻發表的 Cx 與日本鰻 Cx 預測胺基酸序列做比對後，

進行不加權平均法計算並 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) 建構親緣關係圖譜 (Figure 12)。圖譜中關係愈近的胺基酸序列，會形成一群落。日本鰻 Cx43 與其他物種 Cx43 成員形成一群，而日本鰻 Cx34.4 則與斑馬魚 Cx34.5、銀鮭 Cx34.3、香魚 Cx34.9 關係最近。雖然這兩個 Cx 各屬於不同系群，但由過去文獻得知，這兩系群係來自於  $\alpha$  族群 (Figure 12 膚色方塊底)。



### 3. 日本鰻 Cx34.4 與 Cx43 於不同組織分佈之表現

我們以日本鰻卵巢、心臟、肝臟、腸道、肌肉與鰓絲等組織進行採樣，萃取 total RNA 並反轉錄為 cDNA 後，利用引子 (如 Table 2 與 Table 4 所示) 進行 PCR。我們以 18S rRNA 作為參考基因。不同組織的 PCR 產物再次經過定序分別確認為 *Je-Cx34.4* 與 *Je-Cx43*。Figure 13 所示，PCR 產物經由電泳分析結果顯示 *Je-Cx34.4* 主要表現於卵巢組織中，其餘均無表現；另一方面，*Je-Cx43* 於各採樣組織均有表現，其中以鰓絲組織表現最強。

### 4. 鮭魚腦下垂體對日本鰻性腺之影響 (Gonadosomatic index ; GSI %)

我們欲觀察日本鰻 Cx 在卵巢發育過程中的表現，實驗中利用 SPE 誘導日本鰻性腺發育。首先，日本鰻在 SPE 每週誘導處理下，於第零、二、四、六週後的第三天將魚隻犧牲，取下兩側卵巢進行秤重，計算 GSI %。Figure 14 顯示不同週數 SPE 處理組的鰻魚個體 GSI % (0w、1w、2w、3w、4w 與 6w 代表不同誘導週數，總數 27 隻)，在 0w 處理組 GSI 值均小於 1 %；而隨著誘導週數增加，魚隻的 GSI 值有上升的趨勢。不同週數的平均 GSI % 分別為：0.78±0.13 % (0 週)；0.97±0.11 % (1 週)；1.15±0.29 % (2 週)；1.23±0.15 % (3 週)；1.52±0.21 % (4 週)；2.12±0.77 % (6 週)。



## 5. 日本鰻卵巢內 Connexin 基因表現

### 5-1. Cx 基因在不同週數 SPE 誘導處理之表現

為了解在 SPE 不同週數誘導下，日本鰻卵巢內 *Je-cx34.4* 與 *Je-cx43* 的變化，我們利用 qPCR 偵測兩種 Cx 的基因表現。實驗過程以 *ef1a* 作為參考基因。同時，為了確認我們所使用的引子對於所有目標基因具有專一性，qPCR 實驗結束後，我們檢視所有反應的 melting curve。Figure 15 的結果顯示，無論何種基因均只有表現單一峰值，代表我們所使用的引子對於目標基因具專一性，沒有其他產物影響結果。Cx 基因表現的相對變化數值以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  做為定量方式計算。第零週與各誘導週數組進行比較，結果顯示 *Je-Cx34.4* 在第四週處理組中有較高的相對表現量 (Figure 16)，比起第零週的 *Je-Cx34.4* 增高 6.7 倍，雖然第六週處理組的 *Je-Cx34.4* 相對表現量稍有下降，但比零週處理組的 *Je-Cx34.4* 仍有 2.8 倍的增加，但所有組別之間經統計分析沒有顯著差異；另一方面，雖然 *Je-Cx43* 基因表現在 SPE 處理第二週至第六週有增加的趨勢，不過組別間同樣沒有顯著差異 (Figure 17)。以上結果顯示，由於可能日本鰻的個體誘導前之差異，影響其性腺發育產生差異。所以接下來我們嘗試以 GSI 數值代表每隻鰻魚性腺發育狀況，進行分組，重新進行 qPCR 實驗。

### 5-2. Cx 基因在不同的 GSI 分組下之表現

我們以誘導組與未誘導組進行分組比較 (Figure 18, 19)，*Je-Cx34.4* 在誘導組有較高的表現，比起未誘導組有 4.8 倍的上升；反觀 *Je-Cx43* 兩組之間沒有顯處差異變化。我們另外嘗試以 GSI 數值高於或低於 1.5 % 做為分組依據 (若不論 SPE 誘導幾週，所有誘導處理組中日本鰻的 GSI 平均值為 1.33 %)。*Je-Cx34.4* 在 > 1.5 % 的組別中其相對表現量顯著高於 < 1.5 % 的組別 2.5 倍 ( $p=0.024$ ； Figure 20)。然而，*Je-cx43* 在兩組間統計上不顯著 (Figure 21)。

## 6. 卵濾泡組織形質觀察

從外源性 SPE 誘導下可以看到日本鰻的 GSI % 有增加的趨勢。當 GSI 增加 (Figure 22, A、B 與 C 分別代表三隻日本鰻之 GSI 數值, 其分別為: 1.69%、2.03% 與 3.23%), 卵巢內卵細胞大於 200  $\mu\text{m}$  的卵徑出現頻度也隨之增加 (A: 14.2%、B: 33.3%、C: 42.8%)。且進入卵黃生成的卵數比例也增加, GSI 數值為 3.23% 的日本鰻有明顯的卵黃質顆粒蓄積於細胞膜周圍 (黑色箭頭; Figure 22 D, F)。卵徑大於 200  $\mu\text{m}$  的卵細胞周圍可清楚看見兩層濾泡細胞 (白色箭頭; Fig. 22 D, F)。





## 第四章 討論




### 1. NGS 資料庫之 Connexin 比對分析

本實驗室將 SPE 誘導處理三週之日本鰻卵巢組織利用 NGS 進行轉錄體資料庫的建立，並且與 NCBI nr 資料庫的 Cx 基因進行比對。在日本鰻卵巢早期發育階段發現至少 7 個 Cx 亞型 (isoform)，其序列分別相似於目前已知的硬骨魚類 Cx 成員，包括真鯛、斑馬魚、大西洋鮭、銀鮭等 (Table 1)。Cx 為脊索動物特有基因家族，從胺基酸序列相似度與胞質環長度可分為  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  與最新的分出的  $\delta$  四群，其中  $\delta$  為魚類特有分群 (Cruciani and Mikalsen 2006, Eastman, Chen et al. 2006)。而我們利用 NGS 所找到之 7 種 Cx isoform，其中兩個屬於  $\alpha$  子群、一個屬於  $\gamma$  子群，其餘四個屬於  $\beta$  子群。在這些 isoform 之中，相似於銀鮭 Cx34.3 ( $\alpha$  子群) 及真鯛 Cx31.5 ( $\beta$  子群) 的兩個基因已證明與卵巢發育研究相關 (Choi and Takashima 2000, Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)，其餘 Cx isoform 在卵巢組織扮演角色仍不清楚。雖然 NGS 資料庫有 7 個 Cx isoform，只有近似於銀鮭之 Cx34.3 之基因片段 Cx34.4 在 NGS 資料庫中出現 (Figure 1)，所以我們將實驗重點放在 Cx34.3 在我們人工催熟日本鰻卵巢發育過程的變化。從我們的研究結果顯示，隨著在卵濾胞發育，Cx34.4 基因表現有上升趨勢 (Figure 18、20)。所以 Cx34.4 可能與進入卵黃生成與蓄積有關。

### 20. Connexin 保守區域

我們發現的兩個 Cx，透過預測方式可知其胺基酸序列。其中 *Je-Cx34.4* 包含完整的編碼區。透過親疏水性分析可將序列分成不同區域。其中第一胞外環也可見保守 C(N/D)TXQPGCX<sub>2</sub>(M/V)C；第二胞外環 C(S/E/T/A)(R/Y)(F/S)CPH(Q/K)(V/I/L/M)(D/E/N)C(F/Y)(L/I/V/M)(S/A)(R/K)P 也是 (Yoshizaki, Patino et al. 1994)；第三個穿膜區域保守片段 (S/T/V)YX<sub>3</sub>(V/I/L)(V/I/L)X(K/R)X<sub>2</sub>(F/L)E 亦是 (Hoh,



John et al. 1991) 於第 148-160 胺基酸序列；以及在最後羧基端保守片段 QNX<sub>9-14</sub>S. (Hoh, John et al. 1991) 在第 262-278 胺基酸序列。另一方面 *Je-Cx43* 雖然目前只有部分胺基酸序列，不過仍保有第三個穿膜區域保守片段與羧基端保守片段。代表從硬骨魚開始，Cx 在細胞之間的存在很重要，所以許多胺基酸區域仍有高度的保守性。另一方面，我們透過磷酸位點預測 (Wong, Lee et al. 2007)，在羧基端有一些絲胺酸 (S)，蘇胺酸 (T) 磷酸位點，過去研究顯示，當 Cx 磷酸化之後，會造成其蛋白質構型發生變化，調控 GJs 通道的開闔 (Musil, Cunningham et al. 1990, Lampe and Lau 2000, Solan and Lampe 2005)，更有證據顯示，*Cx43* 羧基端的兩個蘇胺酸位點會受到 pp60<sup>src</sup> kinase 磷酸化影響其 GJs 在細胞間之通透性改變 (Filson, Azarnia et al. 1990, Swenson, Piwnica-Worms et al. 1990)。

### 3. 硬骨魚獨有的 Connexin

不管是核苷酸或胺基酸序列的比對，日本鰻 *Cx34.4* 比對到最相近的基因為斑馬魚 *Cx34.5* (Iovine, Higgins et al. 2005) 與銀鮭 *Cx34.3* 以及石首魚 *Cx32.7* (Yoshizaki, Patino et al. 1994, Bruzzone, White et al. 1995)。Eastman 團隊第一次將魚類 Cx 與哺乳類 Cx 相比並分類演化同源基因 (Eastman, Chen et al. 2006)，也指出斑馬魚 *Cx34.5* 是一個魚類特有的 Cx 基因。另外在石首魚 *Cx32.7* 研究中，也發現此基因是專屬於卵巢組織的 Cx 成員，且可推測僅存於周圍濾泡細胞 (Chang, Patino et al. 2000)，且 Cruciani 與 Mikalsen 亦指出若假設硬骨魚存在一群獨立 Cx，*Cx32.7* 等成員與目前已知之哺乳類 Cx 成員比較無同源基因 (Cruciani and Mikalsen 2006)。此外銀鮭 *Cx34.3* 亦在卵巢中發現，加上在本實驗中此同源基因 *Cx34.4* 在組織分佈實驗中，也只主要表現於卵巢組織內 (Fig. 13)，若將鰻魚 *Cx34.4* 胺基酸序列與哺乳類資料庫比對，最相近基因均為哺乳類眾多預測的 GJA-3，雖然有將近 60-68 % 相似度，相似處均為 Cx Superfamily (氨基端至第二穿膜域)，但在胞質環與羧基端處極為不同，這兩區域即便是不同物種但若為同源基因會有高度相似度，另一方面，GJA-3 目前並未有



此基因在性腺相關研究的探討，其功能無從得知。綜合上述文獻比對結果，日本鰻 Cx34.4 應屬硬骨魚的一個特有 Cx 基因群。但仍需進一步實驗證實 Cx34.4 為卵巢內濾泡細胞內特有的 Cx。

#### 4. 哺乳類及硬骨魚 Cx43


在本研究日本鰻轉錄基因體資料庫中，並未發現 Cx43 相關片段被拼接與比對出。然而從過去文獻發現 Cx43 在哺乳類中從生殖細胞至胚胎發育到器官多數發育與細胞凋亡，Cx43 參與許多生理功能。當家鼠 Cx43 基因剔除後 (Juneja, Barr et al. 1999)，其胚胎發育不正常，屬於致死基因的一員。若將缺少 Cx43 的卵巢移植到腎臟繼續培育，卵巢得以生存，但濾泡細胞無法形成空腔 (Antrum) 且卵細胞發育遲緩 (Juneja, Barr et al. 1999, Gittens, Mhawi et al. 2003)，在此實驗中得知家鼠 Cx43 在早期濾泡生成扮演著重要的角色。在硬骨魚中，從鯉科斑馬魚、鯉魚、至鮭科的虹鱒與銀鮭均有發現此基因家族存在。然而斑馬魚目前最多探討與胚胎發育及魚鰭發展相關 (Iovine, Higgins et al. 2005) 並沒有其與卵巢發育相關研究。只有銀鮭的 Cx43.2，有比較多與卵巢發育相關之初探，且特別的是，在 Yamamoto 團隊的發表中亦提及，Cx43.2 並未在他們擁有的銀鮭卵巢 cDNA 資料庫發現，而是從虹鱒 Cx43 預測引子得到的基因 (Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)，這發現的過程與本實驗過程類似。在各物種間同源的 Cx43 基因均保留一段 Connexin 43 domain: (E/R)(R/G)TNSCRNY(I/N)KXA (N/S)EQNWAN，然而日本鰻在最後一段胺基酸 WAN 為 WGN，至於是否為鰻魚的特殊變異，可能要透過更多的定序確認，此變異改變功能的可能性未知，鮮少有此段保留區的功能性探討，只知道其中的 Serine 與 PKC 磷酸位點有關，由於本研究尚未完成全長 Cx43 cDNA，仍無法預測得知鰻魚此 Cx 蛋白質的分子量，未來我們將繼續完成日本鰻 Cx43 完整序列的選殖。另外組織分佈的實驗中可看到，心臟、肝臟、腸道、肌肉、鰓絲均有很微弱的表現 (Figure 13)，類似過去研究指出 Cx43 是屬於存在於多細胞生物體各種組織器官的



常見 Cx 基因 (Dermietzel, Hwang et al. 1990, Bennett, Barrio et al. 1991, Iovine, Higgins et al. 2005)。然而在過去與硬骨魚 Cx 相關研究中，石首魚，真鯛均未有 Cx43 同源基因的發現，然而三個團隊使用的引子比較 Cx43 核甘酸序列有蠻高的相似度，沒有發現的原因很多，可能以目前篩選基因方法仍不完善，另一可能是在演化上鱸形目 (石首魚，真鯛) 為較新的一群硬骨魚分支，可能其擁有的 Cx 家族比較獨立，石首魚的 Cx32.2、Cx32.7；真鯛 Cx32.3、Cx31.5 幾乎沒有同源哺乳類基因存在。以香魚來說，此魚種為胡瓜魚目，此目是一獨立系群 (Nelson 2006)，但特別的是，香魚的 Cx32.1 胺基酸序列 (Yamamoto, Yoshizaki et al. 2007)，其胺基酸與 Cx43 差異很大，其羧基端較短，卻包含一段 Connexin 43 domain，且 mRNA 表現位置與一般認為 Cx43 的表現位置類同，且也是在完成 OMC 之前達到表現最高峰 (Wiesen and Midgley 1993, Mayerhofer and Garfield 1995, Gittens, Mhawi et al. 2003, Kalma, Granot et al. 2004) 這可能意味，在演化上擁有 Cx43 domain 之家族成員，在硬骨魚差異性較大，而哺乳類物種間之 Cx43 變異區域較少。本實驗尚未做到卵巢發育後期 (進入 OMC 階段)，Cx43 在晚期之表現可能會增加，並與銀鮭同源 Cx43.2 一樣，分佈於濾泡細胞之間形成 homologous GJs 及濾泡細胞與卵細胞之間 heterologous GJs，其功能上可能與哺乳類稍有差異，推測與晚期卵細胞進行吸水有關 (Cerdeira, Petrino et al. 1993)。

## 5. SPE 對於性腺成熟效果

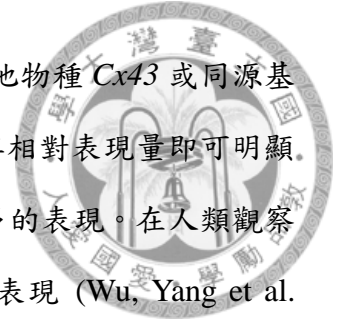
SPE 之中有許多不同激素存在包括 FSH、LH，雖然無法得知在誘導過程中有那些激素刺激那些基因影響發育，但對於我們要觀察發育中的卵巢內相關 Cx 基因表現之變化，利用 SPE 給予 GnRH 與 GtHs 不足的養殖鰻完整的荷爾蒙刺激，是目前最穩定的方式。當開始外源性激素誘導，雌鰻性腺被誘導走向下一步，隨著誘導週數愈長，GSI % 平均也逐漸增加 (Figure 14)，雖然在本實驗中到第六週 GSI 值最大只到 3.23 %，但已進入卵黃生成期 (Figure 22 D, F)，跟實驗室過去以往誘



導效果來說，GSI 相對較小 (吳煥成 2003, 詹智堯 2015)，較小的可能性為，樣本數不夠大；實驗期間已過適合誘導季節，過去經驗宜進行誘導的季節可能為下半年 (八月份至隔年四月)，雖然實際適合誘導季節仍需更多資料的統計分析。在本實驗可見有以 SPE 誘導催熟的鰻隻，平均都可以達到  $GSI > 1.3\%$ 。若以組織切片看卵質型態，可看到油滴累積，且當 GSI 數值接近 2% 的卵巢，許多卵濾泡已開始進入卵黃生成期，在未誘導催熟的卵巢內是看不到的卵黃生成期間的卵濾泡。香魚的 *Cx32.1* 與 *Cx34.9* 在卵黃生成期有大量表現，銀鮭的 *Cx34.3* 與 *Cx43.2* 也在此時期有很高的表現，兩者可能與魚類特有的卵黃生成蓄積有關或參與相關機制。

## 6. Connexin 基因在誘導過程中的變化

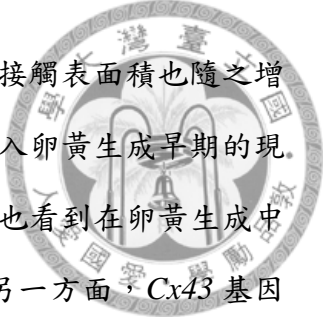
在哺乳類與爪蟾已有很多證據顯示，Cx 與 GJs 的表現受到荷爾蒙調控 (Browne, Wiley et al. 1979, Burghardt and Matheson 1982, Granot and Dekel 1994, Sommersberg, Bulling et al. 2000)。在魚類研究中，更可看到 FSH、LH、IGF-1 等卵巢內重要激素影響 Cx 的表現及 GJs 數量增減 (Chang, Patino et al. 2000, Choi and Takashima 2000, Yamamoto, Yoshizaki et al. 2007, Yamamoto and Yoshizaki 2008)。以外源性 SPE 誘導鰻魚性腺發展的方法已行之多年，且日本也透過 SPE 為主軸的誘導催熟可達到 F2 子代 (Yamamoto, Morioka et al. 1974, Ohta, Kagawa et al. 1997)，這種人工誘導催熟的方式對於本實驗讓鰻魚在人為養殖下得以性腺成熟。*Je-Cx34.4* 從未誘導至誘導第四週表現量有上升趨勢且有較高表現，雖然統計上無顯著差異，不過 *Je-Cx34.4* 表現被促進的傾向近似其同源基因：銀鮭 *Cx34.3*，結果顯示以卵形質分期，隨著進入表層胞期 *Cx34.3* 逐漸升高到卵黃生成期達高峰，之後到了卵細胞成熟期後降低 (Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)。然而日本鰻在第六週有下降趨勢，造成此表現模式的可能性，是由於鰻魚在誘導前每隻狀況略不同，導致誘導至第六週卵巢有些才開進入卵黃生成期，而數據是處理方式分組平均後的結果去比較而得，這可能需要累積更多樣本消弭個體差異很大所造成的影響。*Je-*



*Cx43* 則是在誘導與未誘導組間均無顯著差異，這同樣符合其他物種 *Cx43* 或同源基因，在早期此基因只有微弱低量表現。若與 *Je-Cx34.4* 比較其相對表現量即可明顯看到，在早期卵巢發育階段，比起 *Je-cx43*，*Je-Cx34.4* 有較多的表現。在人類觀察到早期卵巢發育過程中雄性素 (Androgen) 會抑制 *Cx43* 的表現 (Wu, Yang et al. 2010)，而在本實驗室也有觀察到日本鰻發育早期雄性素受器高量表現 (尚未發表)，可能代表卵細胞正與雄性素作用，而雄性素的出現同時抑制著日本鰻的 *Cx43*，若以此推測，總和以上發現使我們觀察到初期雖然可以偵測到 *Cx43*，但基因表現維持低量的可能原因之一。然而雖然在銀鮭 *Cx34.3* 已知 mRNA 只在濾泡細胞中出現，其序列與 *Je-Cx34.4* 相似度極高，合理推測日本鰻的 *Cx34.4* 可能也有極類似的表現方式，需要透過更多實驗來證實，另一方面本研究也觀察到比起 *Je-Cx43* 的基因表現，*Je-Cx34.4* 的確表現較豐，可能是為了在初期正值濾泡細胞增值階段，為了將卵細胞緊密包覆，濾泡細胞表面積增加 (扁形變成立方) 這可能是在初期 *je-Cx34.4* 或同源銀鮭 *Cx34.3* 需要這麼大量的原因，是否參與濾泡增生過程或與卵黃生成有關或是純粹是物理性使濾泡細胞間很緊密圍繞卵細胞，還需要更多實驗進一步證明，但是以上發現與哺乳類不大相同，以現有哺乳類研究均指出主要形成於濾泡細胞之間 GJs 的為 *Cx43* (Kidder and Mhawi 2002)，猜測可能原因與哺乳類濾泡細胞有多層的原因之一。

## 7. GSI 與 Cx 基因表現量差異


我們 SPE 誘導不同週數實驗中，可觀察到在同週數犧牲的魚隻，即便在體重與體長上已十分接近，仍然會看到犧牲後 GSI 數值差異性大。然而透過組織切片觀察其卵巢，GSI 對於卵徑頻度與卵質分期有一定的影響，即便卵期發展不同步，仍有集中於特定階段之現象，所以當我們將日本鰻誘導週數打散，以 GSI 數值 1.5% 為分界，可以看到 *Je-Cx34.4* 在大於 1.5 % 組別中有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。這可能意味著隨著 GSI 到達 1.5% 以上，卵徑大的卵細胞比例也隨之增多，周圍濾泡細胞也



變大 (物鏡 40X, 可以辨認出濾泡細胞), 代表濾泡細胞之間接觸表面積也隨之增加。同時我們觀察到當 GSI 接近或進入 2%, 卵細胞已經有進入卵黃生成早期的現象, 而此時 Cx34.4 的增加有顯著差異, 其同源的銀鮭 Cx34.3 也看到在卵黃生成中期表現量有較高的表現 (Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)。另一方面, Cx43 基因表現量在 GSI 大於 1.5% 的組別雖然平均上有稍微降低趨勢, 但無顯著變化, 不過符合文獻指出, Cx43 在達到表現最高峰時已是卵濾泡組織發育後期 (OMC 還未 GVBD), 在 OMC 前維持低量表現 (Mayerhofer and Garfield 1995, Nuttinck, Peynot et al. 2000, Ackert, Gittens et al. 2001, Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)。GSI 的增加意味著整個卵巢中卵濾泡發育走向成熟的趨勢 (大卵徑卵細胞比例增加), 然而, 從切片也可以看到, 大小卵參雜, 加上觀察到有相似 GSI 的樣本 (誘導第四週, 二樣本鰻之 GSI 均為 1.69%) 但其基因表現量有差異, 可能大小卵 (依卵徑) 出現頻度有關。未來可能需要將卵巢內卵濾泡做不同分群去測試這兩個 Cx 基因的表現, 可能比較能看出不同發育階段, Cx 的變化。

## 8. Cx43 位置

過去文獻未曾有相關研究探討魚類 Cx43 蛋白質在卵巢內表現的位置, 但目前沒有針對日本鰻或其他硬骨魚 Cx43 抗原所製備之抗體。然而, Cx43 在許多文獻指出從硬骨魚到哺乳類其胺基酸序列具有很高的保守性, 所以我們嘗試直接利用針對老鼠 Cx43 抗原所製備之抗體 C6219 (Anti-Connexin-43 antibody produced in rabbit, 材料方法 5-1) 作為偵測日本鰻卵巢組織 Cx43 之工具。C6219 係由陽明大學生理學研究所黃娟娟 教授提供。以全標本免疫抗體染色法 (Whole mount immunohistochemistry) 進行觀察。以 SPE 誘導至第二週 (Figure 23 A-D) 與第四週 (Figure 23 E-H) 卵巢樣本進行免疫組織染色。相較於對照組 (一抗染色步驟省略; Figure 23 H), 不管是第二週或第四週誘導的組別, 卵徑小於 200  $\mu\text{m}$  的卵濾泡內, 其油滴周圍有棕色呈色 (Figure 23 黑色箭頭標記處), 且接近 100  $\mu\text{m}$  更為明顯; 相反的, 卵徑大於 200  $\mu\text{m}$  沒有看到任何免疫反應。由以上結果, 我們首次發現日本



鰻 Cx43 表現於卵巢組織內，尤其是表現於較小卵徑的卵濾泡，分佈於油滴周圍，但其生理意義仍有待釐清。過去文獻指出 Cx43 在哺乳類卵巢中主要存在於濾泡細胞也有少量表現於卵細胞內 (Kidder and Mhawi 2002)，我們的實驗也證實 Cx43 在卵細胞質內有表現，但卻是集中於油滴周圍，周圍的濾泡細胞均未有看到表現，這表現模式與以往文獻說法明顯有差異，在銀鮭同源的 Cx43.2 之 mRNA 則顯示在卵巢內濾泡細胞間與卵細胞均有表現 (Yamamoto, Luckenbach et al. 2011)。此實驗訊號的正確性仍需要利用 normal IgG 來確認。





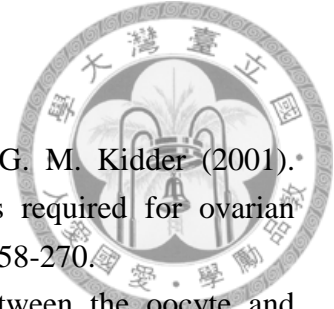
## 第五章 結論

日本鰻為高經濟價值養殖魚種，本實驗室利用次世代定序擁有日本鰻卵巢基因轉錄體，希望可從中找到與生殖相關的機制，其中包括讓細胞間得以溝通的間隙連接通道。硬骨魚對於連接蛋白在卵巢內的作用，不管是功能還是其演化上意義仍有很多疑問。

本實驗在日本鰻卵巢基因轉錄體資料庫中發現至少 7 種預測的 Cx 成員，其中一種為 *Cx34.4*，我們也可利用引子，選殖出相同序列；另一種利用他物種的 *Cx43*。預測退化性引子，找到屬於日本鰻的 *Cx43*。*Cx34.4* 只在卵巢內表現而 *Cx43* 則是在所有心臟、肝臟、腸道、肌肉、鰓絲中均有微弱表達。在卵巢早期發育過程中，當 GSI 大於 1.5% 的組別中 *Cx34.4* 有較顯著的表現，而不管是誘導週數或是以 GSI 分組，*Cx43* 有微弱表現但無顯著差異。

總結以上結果，我們發現在日本鰻卵巢早期發育階段，至少有八種 Cx 表現，其中 *Je-Cx34.4* 與 *Je-Cx43 (1)* 表現與性腺成熟有密切關係，(2) 雖然 *Je-Cx43* 的基因表現不會隨著性腺發育而有所變化，其生理機制與哺乳類之差異有待進一步實驗與討論。

## 參考文獻



- Ackert, C. L., J. E. Gittens, M. J. O'Brien, J. J. Eppig and G. M. Kidder (2001). "Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse." Developmental Biology **233**(2): 258-270.
- Anderson, E. and D. F. Albertini (1976). "Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary." The Journal of Cell Biology **71**(2): 680-686.
- Bai, D. and A. H. Wang (2014). "Extracellular domains play different roles in gap junction formation and docking compatibility." Biochemical Journal **458**(1): 1-10.
- Barr, L., M. M. Dewey and W. Berger (1965). "Propagation of action potential and structure of the nexus in cardiac muscle." The Journal of General Physiology **48**: 797-823.
- Bennett, M. V., L. C. Barrio, T. A. Bargiello, D. C. Spray, E. Hertzberg and J. C. Saez (1991). "Gap junctions: new tools, new answers, new questions." Neuron **6**(3): 305-320.
- Bolamba, D., R. Patino, G. Yoshizaki and P. Thomas (2003). "Changes in homologous and heterologous gap junction contacts during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption in ovarian follicles of Atlantic croaker." General and Comparative Endocrinology **131**(3): 291-295.
- Brower, P. T. and R. M. Schultz (1982). "Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: Existence and possible nutritional role during oocyte growth." Developmental Biology **90**(1): 144-153.
- Browne, C. L. and W. Werner (1984). "Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis*." Journal of Experimental Zoology **230**(1): 105-113.
- Browne, C. L., H. S. Wiley and J. N. Dumont (1979). "Oocyte-follicle cell gap junctions in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability." Science **203**(4376): 182-183.
- Bruzzo, R., T. W. White, G. Yoshizaki, R. Patino and D. L. Paul (1995). "Intercellular channels in teleosts: functional characterization of two connexins from Atlantic croaker." FEBS Letters **358**(3): 301-304.
- Burghardt, R. C. and R. L. Matheson (1982). "Gap junction amplification in rat ovarian granulosa cells: I. A direct response to follicle-stimulating hormone." Developmental Biology **94**(1): 206-215.
- Carabatsos, M. J., C. Sellitto, D. A. Goodenough and D. F. Albertini (2000). "Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence." Developmental Biology **226**(2): 167-179.
- Caveney, S. (1985). "The role of gap junctions in development." The Annual Review of Physiology **47**: 319-335.
- Cerdà, J., S. Reidenbach, S. Prätzel and W. W. Franke (1999). "Cadherin-Catenin

Complexes During Zebrafish Oogenesis: Heterotypic Junctions Between Oocytes and Follicle Cells." Biology of Reproduction **61**(3): 692-704.

Cerda, J. L., T. R. Petrino and R. A. Wallace (1993). "Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation." Developmental Biology **160**(1): 228-235.

Chang, X., R. Patino, P. Thomas and G. Yoshizaki (1999). "Developmental and protein kinase-dependent regulation of ovarian connexin mRNA and oocyte maturational competence in Atlantic croaker." General and Comparative Endocrinology **114**(3): 330-339.

Chang, X., R. Patino, G. Yoshizaki, P. Thomas and V. H. Lee (2000). "Hormonal regulation and cellular distribution of connexin 32.2 and connexin 32.7 RNAs in the ovary of Atlantic croaker." General and Comparative Endocrinology **120**(2): 146-156.

Choi, C. Y. and F. Takashima (2000). "Molecular cloning and hormonal control in the ovary of connexin 31.5 mRNA and correlation with the appearance of oocyte maturational competence in Red seabream." The Journal of Experimental Biology **203**(Pt 21): 3299-3306.

Choi, C. Y. and A. Takemura (2001). "Molecular cloning and expression of connexin 32.3 cDNA in the ovary from the red seabream (*Pagrus major*)." Comparative Biochemistry and Physiology **129**: 767-775.

Christ, G. J., P. R. Brink, A. Melman and D. C. Spray (1993). "The role of gap junctions and ion channels in the modulation of electrical and chemical signals in human corpus cavernosum smooth

muscle." International Journal of Impotence Research **5**: 77-96.

Christ, G. J., D. C. Spray, M. El-Sabban, L. K. Moore and P. R. Brink (1996). "Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone." Circulation Research **79**: 631-646.

Cruciani, V. and S. O. Mikalsen (2006). "The vertebrate connexin family." Cellular and Molecular Life Sciences **63**(10): 1125-1140.

Dermietzel, R., T. K. Hwang and D. S. Spray (1990). "The gap junction family: structure, function and chemistry." Anatomy and Embryology **182**(6): 517-528.

Dumont, J. N. and A. R. Brummett (1978). "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues." Journal of Morphology **155**(1): 73-97.

Eastman, S. D., T. H. Chen, M. M. Falk, T. C. Mendelson and M. K. Iovine (2006). "Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes." Genomics **87**(2): 265-274.

Filson, A. J., R. Azarnia, E. C. Beyer, W. R. Loewenstein and J. S. Brugge (1990). "Tyrosine phosphorylation of a gap junction protein correlates with inhibition of cell-to-

cell communication." Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research **1**(12): 661-668.

Fisher, S. K. and K. A. Linberg (1975). "Intercellular junctions in the early human embryonic retina." Journal of Ultrastructure Research **51**: 69-78.

Gittens, J. E., A. A. Mhawi, D. Lidington, Y. Ouellette and G. M. Kidder (2003). "Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis." The American Journal of Physiology. Cell Physiology **284**(4): C880-887.

Granot, I. and N. Dekel (1994). "Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian gap junction protein are regulated by luteinizing hormone." The Journal of Biological Chemistry **269**(48): 30502-30509.

Greeley, M. S., P. C. Begovac and R. A. Wallace (1987). "Removal of enveloping follicle cells can trigger resumption of meiotic maturation in *Fundulus heteroclitus* oocytes." Journal of Experimental Zoology **244**(1): 177-180.

Han, Y. S., W. N. Tzeng, Y. S. Huang and I. C. Liao (2001). "Silvering in the eel: changes in morphology, body fat content, and gonadal development." Journal of Taiwan Fisheries Research **9**: 119-127.

Heller, D. T., D. M. Cahill and R. M. Schultz (1981). "Biochemical studies of mammalian oogenesis: Metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes." Developmental Biology **84**(2): 455-464.

Higuchi, M., F. T. Celino, A. Tamai, C. Miura and T. Miura (2012). "The synthesis and role of taurine in the Japanese eel testis." Amino Acids **43**(2): 773-781.

Hoh, J. H., S. A. John and J. P. Revel (1991). "Molecular cloning and characterization of a new member of the gap junction gene family, connexin-31." The Journal of Biological Chemistry **266**(10): 6524-6531.

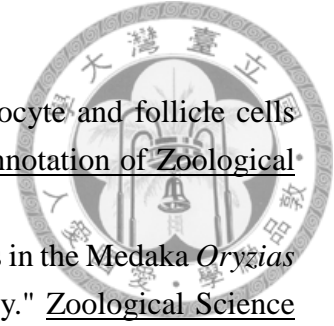
Ijiri, S., T. Kayaba, N. Takeda, H. Tachiki, S. Adachi and K. Yamauchi (1998). "Pretreatment Reproductive Stage and Oocyte Development Induced by Salmon Pituitary Homogenate in the Japanese Eel *Anguilla japonica*." Fisheries science **64**(4): 531-537.

Ijiri, S., Y. Kazeto, N. Takeda, H. Chiba, S. Adachi and K. Yamauchi (1995). "Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*." Aquaculture **135**(1-3): 3-16.

Iovine, M. K. (2013). "Possible regulation of connexin function through gene duplication events." Membrane Transport and Signaling **2**(5): 221-225.

Iovine, M. K., E. P. Higgins, A. Hindes, B. Coblitz and S. L. Johnson (2005). "Mutations in connexin43 (GJA1) perturb bone growth in zebrafish fins." Developmental Biology **278**(1): 208-219.

Iovine, M. K., E. P. Higgins, A. Hindes, B. Coblitz and S. L. Johnson (2005). "Mutations in connexin43 (GJA1) perturb bone growth in zebrafish fins." Developmental Biology



278(1): 208-219.

Iwamatsu, T. and T. Ohta (1981). "On a relationship between oocyte and follicle cells around the time of ovulation in the medaka, *Oryzias latipes*." Annotation of Zoological Japanese **54**: 17-29.

Iwamatsu, T., T. Ohta, E. Oshima and N. Sakai (1988). "Oogenesis in the Medaka *Oryzias latipes* : Stages of oocyte Development : Developmental Biology." Zoological Science **5**(2): 353-373.

Juneja, S. C., K. J. Barr, G. C. Enders and G. M. Kidder (1999). "Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43." Biology of Reproduction **60**(5): 1263-1270.

Jurgen, E., D. Joachim and R. Alessandro (2011). "Connexin Genes in the Mouse and Human Genome." Cell Communication and Adhesion **8**: 163-165.

Kalma, Y., I. Granot, D. Galiani, A. Barash and N. Dekel (2004). "Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: inhibition of translation." Endocrinology **145**(4): 1617-1624.

Kessel, R. G., H. N. Tung, R. Roberts and H. W. Beams (1985). "The presence and distribution of gap junctions in the oocyte-follicle cell complex of the zebrafish, *Brachydanio rerio*." Journal of submicroscopic cytology **17**(2): 239-253.

Kidder, G. M. and A. A. Mhawi (2002). "Gap junctions and ovarian folliculogenesis." Reproduction **123**(5): 613-620.

Kobayashi, W. (1985). "Communications of oocyte-granulosa cells in the chum salmon ovary detected by transmission electron microscopy." Development Growth and Differentiation **27**(5): 553-561.

Kumar, N. M. and N. B. Gilula (1996). "The gap junction communication channel." Cell **84**(3): 381-388.

Kurogi, H., M. Okazaki, N. Mochioka, T. Jinbo, H. Hashimoto, M. Takahashi, A. Tawa, J. Aoyama, A. Shinoda, K. Tsukamoto, H. Tanaka, K. Gen, Y. Kazeto and S. Chow (2011). "First capture of post-spawning female of the Japanese eel *Anguilla japonica* at the southern West Mariana Ridge." Fisheries Science **77**(2): 199-205.

Lampe, P. D. and A. F. Lau (2000). "Regulation of Gap Junctions by Phosphorylation of Connexins." Archives of Biochemistry and Biophysics **384**(2): 205-215.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Luckenbach, J. A., Y. Yamamoto, J. M. Guzman and P. Swanson (2013). "Identification of ovarian genes regulated by follicle-stimulating hormone (Fsh) in vitro during early secondary oocyte growth in coho salmon." Molecular and Cellular Endocrinology **366**(1): 38-52.

Makowski, L., D. L. Caspar, W. C. Phillips and D. A. Goodenough (1977). "Gap junction

structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data." Journal of Cell Biology **74**: 629-645.

Marchler-Bauer, A., M. K. Derbyshire, N. R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L. Y. Geer, R. C. Geer, J. He, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R. A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng and S. H. Bryant (2015). "CDD: NCBI's conserved domain database." Nucleic Acids Research **43**(Database issue): D222-226.

Matsuyama, M., Y. Nagahama and S. Matsuura (1991). "Observations on ovarian follicle ultrastructure in the marine teleost, *Pagrus major*, during vitellogenesis and oocyte maturation." Aquaculture **92**(0): 67-82.

Mayerhofer, A. and R. E. Garfield (1995). "Immunocytochemical analysis of the expression of gap junction protein connexin 43 in the rat ovary." Molecular Reproduction and Development **41**(3): 331-338.

Melman, A. and J. Rehman (1999). "Pathophysiology of erectile dysfunction." Molecular Urology **3**: 87-102.

Menn, F., J. Cerdà and P. J. Babin (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. The Fish Oocyte. P. J. Babin, J. Cerdà and E. Lubzens, Springer Netherlands: 1-37.

Musil, L. S., B. A. Cunningham, G. M. Edelman and D. A. Goodenough (1990). "Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines." The Journal of Cell Biology **111**(5): 2077-2088.

Nelson, J. S. (2006). Fishes of the World, John Wiley & Sons.

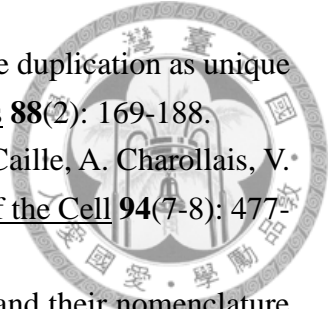
Nuttinck, F., N. Peynot, P. Humblot, A. Massip, F. Dessy and J. E. Flechon (2000). "Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary." Molecular Reproduction and Development **57**(1): 60-66.

Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa, N. Iinuma and K. Hirose (1997). "Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*." Fish Physiology and Biochemistry **17**(1-6): 163-169.

Patiño, R. and C. Sullivan (2002). "Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish." Fish Physiology and Biochemistry **26**(1): 57-70.

Patino, R. and H. Kagawa (1999). "Regulation of gap junctions and oocyte maturational competence by gonadotropin and insulin-like growth factor-I in ovarian follicles of red seabream." General and Comparative Endocrinology **115**(3): 454-462.

Rose, B., I. Simpson and W. R. Loewenstein (1977). "Calcium ion produces graded changes in permeability of membrane channels in cell junction." Nature **267**: 625-627.



- Sato, Y. and M. Nishida (2010). "Teleost fish with specific genome duplication as unique models of vertebrate evolution." Environmental Biology of Fishes **88**(2): 169-188.
- Serre-Beinier, V., C. Mas, A. Calabrese, D. Caton, J. Bauquis, D. Caille, A. Charollais, V. Cirulli and P. Meda (2002). "Connexins and secretion." Biology of the Cell **94**(7-8): 477-492.
- Sohl, G. and K. Willecke (2003). "An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man." Cell Communication and Adhesion **10**(4-6): 173-180.
- Sohl, G. and K. Willecke (2004). "Gap junctions and the connexin protein family." Cardiovascular Research **62**(2): 228-232.
- Solan, J. L. and P. D. Lampe (2005). "Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1711**(2): 154-163.
- Sommersberg, B., A. Bulling, U. Salzer, U. Fröhlich, R. E. Garfield, A. Amsterdam and A. Mayerhofer (2000). "Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: Regulation by follicle-stimulating hormone." Biology of Reproduction **63**(6): 1661-1668.
- Spray, D. C., A. L. Harris and M. V. L. Bennett (1981). "Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. ." Science **211**: 712-715.
- Swenson, K. I., H. Piwnica-Worms, H. McNamee and D. L. Paul (1990). "Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication." Cell Regulation **1**(13): 989-1002.
- Tokarz, R. R. (1978). Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in nonmammalian vertebrates. The Vertebrate ovary: comparative biology and evolution. R. E. Jones. New York, Plenum Press: 145-179.
- Toshimori, K. and F. Yasuzumi (1979). "Gap junctions between microvilli of an oocyte and follicle cells in the teleost (*Plecoglossus altivelis*)." Z Mikrosk Anat Forsch **93**(3): 458-464.
- Tsukamoto, K. (1992). "Discovery of the spawning area for Japanese eel." Nature **356**(6372): 789-791.
- Tsukamoto, K., J. Aoyama and M. J. Miller (2009). Eels at the edge., American Fisheries Society Symposium.
- Tsukamoto, K., T. Otake, N. Mochioka, T. W. Lee, H. Fricke, T. Inagaki, J. Aoyama, S. Ishikawa, S. Kimura, M. J. Miller, H. Hasumoto, M. Oya and Y. Suzuki (2003). "Seamounts, New Moon and eel Spawning: The Search for the Spawning Site of the Japanese eel." Environmental Biology of Fishes **66**(3): 221-229.
- Turin, L. and A. E. Warner (1977). "Carbon dioxide reversibly abolishes ionic communication between cells of early amphibian embryo." Nature **270**: 56-57.
- Tzeng, W.-N., Y. Iizuka, J.-C. Shiao, Y. Yamada and H. P. Oka (2003). "Identification and

growth rates comparison of divergent migratory contingents of Japanese eel (*Anguilla japonica*)." Aquaculture **216**(1-4): 77-86.

Unwin, P. N. and P. D. Ennis (1983). "Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern." The Journal of Cell Biology **97**: 1459-1466.

Unwin, P. N. and P. D. Ennis (1984). "Two configurations of a channel-forming membrane protein." Nature **307**: 609-613.

van der Heyden, M. A., M. van Eijk, R. Wilders, J. M. de Bakker and T. Opthof (2004). "Connexin43 orthologues in vertebrates: phylogeny from fish to man." Development Genes and Evolution **214**(5): 261-266.

Van Ginneken, V., C. Durif, S. Dufour, M. Sbahi, R. Boot, K. Noorlander, J. Doornbos, A. Murk and G. van den Thillart (2007). "Endocrine profiles during silvering of the European eel (*Anguilla anguilla*) living in saltwater." Animal Biology **57**(4): 453-465.

Wallace, R. A. and K. Selman (1990). "Ultrastructure aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians." Journal of Electron Microscopy Technique **16**(3): 175-201.

Wiesen, J. F. and A. R. J. Midgley (1993). "Changes in expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth." Endocrinology **133**(2): 741-746.

Wong, Y. H., T. Y. Lee, H. K. Liang, C. M. Huang, T. Y. Wang, Y. H. Yang, C. H. Chu, H. D. Huang, M. T. Ko and J. K. Hwang (2007). "KinasePhos 2.0: a web server for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns." Nucleic Acids Research **35**(Web Server issue): W588-594.

Wu, C. H., J. G. Yang, J. J. Yang, Y. M. Lin, H. D. Tsai, C. Y. Lin and P. L. Kuo (2010). "Androgen excess down-regulates connexin43 in a human granulosa cell line." Fertility and Sterility **94**(7): 2938-2941.

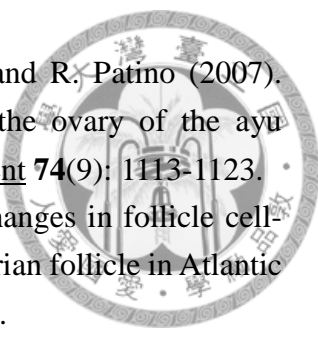
Yamamoto, K., T. Morioka, O. Hiroi and M. Omori (1974). "Artificial maturation of female Japanese eels by the injection of salmonid pituitary." Nippon Suisan Gakkai **40**(1): 1-7.

Yamamoto, K. and K. Yamauchi (1974). "Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium." Nature **251**(5472): 220-222.

Yamamoto, Y., J. A. Luckenbach, M. A. Middleton and P. Swanson (2011). "The spatiotemporal expression of multiple coho salmon ovarian connexin genes and their hormonal regulation in vitro during oogenesis." Reproductive Biology and Endocrinology **9**: 52.

Yamamoto, Y. and G. Yoshizaki (2008). "Heterologous gap junctions between granulosa cells and oocytes in ayu (*Plecoglossus altivelis*): formation and role during luteinizing hormone-dependent acquisition of oocyte maturational competence." Journal of Reproduction and Development **54**(1): 1-5.



- 
- Yamamoto, Y., G. Yoshizaki, T. Takeuchi, K. Soyano, F. Itoh and R. Patino (2007). "Differential expression and localization of four connexins in the ovary of the ayu (*Plecoglossus Altivelis*)." Molecular Reproduction and Development **74**(9): 1113-1123.
- York, W. S., R. Patino and P. Thomas (1993). "Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the ovarian follicle in Atlantic croaker." General and Comparative Endocrinology **92**(3): 402-418.
- Yoshizaki, G., R. Patino and P. Thomas (1994). "Connexin messenger ribonucleic acids in the ovary of Atlantic croaker: molecular cloning and characterization, hormonal control, and correlation with appearance of oocyte maturational competence." Biology of Reproduction **51**(3): 493-503.
- Yoshizaki, G., R. Patino, P. Thomas, D. Bolamba and X. Chang (2001). "Effects of maturation-inducing hormone on heterologous gap junctional coupling in ovarian follicles of Atlantic croaker." General and Comparative Endocrinology **124**(3): 359-366.
- 王永松 (1999). 腦下垂體研磨液及性類固醇注射日本鰻卵巢發育之影響 碩士論文, 國立台灣大學.
- 吳煥成 (2003). 人工誘導日本鰻自然產卵排精之研究 碩士論文, 國立台灣大學.
- 陳彥義 (2013). 日本鰻銀化階段鱗片發育及皮膚結構之改變 碩士論文, 國立台灣大學.
- 黃蘊璞 (2001). 日本鰻人工催熟之研究 碩士論文, 國立台灣大學.
- 詹智堯 (2015). 日本鰻進入最後催熟時機之改進 碩士論文, 國立台灣大學.
- 闕伯霖 (2011). 日本鰻生長分化因子-9 (GDF-9) 基因選殖與其在人工誘導性成熟時卵巢發育的變現 碩士論文, 國立台灣大學.

附錄

圖表與表格



**Table 1. Comparison of Cxs sequence from Japanese eel ovaries Transcriptome and NCBI nr database**

Table 1		
Control <sup>a</sup>	Induction <sup>b</sup>	nr <sup>c</sup>
c30606_g1_i1		<i>Cx31.5 [Pagrus major] (AB037933.1)</i>
c45341_g1_i1		<i>Cx52.9 [Danio rerio] (NM_207093)</i>
c9704_g1_i1		<i>GJB-1 [Salmo salar] (NM_001139950.1)</i>
	c23806_c0_seq1	<i>Cx34.3 [Oncorhynchus kisutch] (HQ315554)</i>
	c10677_c0_seq1	<i>GJB-5 [Oryzias latipes] (XM_011493013)</i>
c6399_g1_i1	c14044_c0_seq1	<i>GJB-3 [Maylandia zebra] (XM_004574740)</i>
c4598_g2_i1	c19641_c0_seq1	<i>GJB-4 [Osmerus mordax] (BT074803)</i>
c19785_g1_i1	c25539_c0_seq1	<i>GJC-1 [Maylandia zebra] (XM_004567475)</i>

a) Control: Without induction, sample size n=1 (GSI : 0.92 %).

b) Induction: 3 weeks SPE induction, sample size n=1 (GSI : 2.56 %).

c) NCBI nr database.

NGS reads sequences clustering to a contiguous sequences and named for serial numbers.

Compare to nr database and select the sequence that similar to Cx gene family (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> column).



**Table 2. *Je-Cx34.4* primers used**

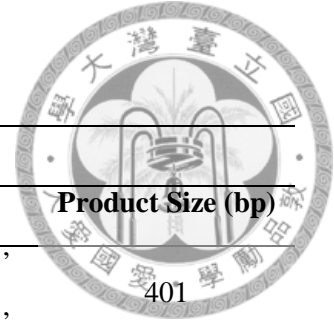
<i>je-Cx34.4</i>			
Step	Strand	Sequence	Product Size (bp)
<b>PCR</b>	Sense	1: 5'CGGGTACAAGGTCCCCAAATAC3'	1+4: 415 1+5: 504 1+6: 429
		2: 5'ACTACTATTACGGCTTCACCTTG3'	
		3: 5'CAAGGACCTGGCCATCCAGAAC3'	
	Antisense	4: 5'AGTTCTGGATGGCCAGGTC3'	2+6: 301 3+5: 111 6: 5'CTCCAGGTTGACCCAGTTCTGGA3'
		5: 5'CATGTTGGTGCTTACGTCCTC3'	
		6: 5'CTCCAGGTTGACCCAGTTCTGGA3'	
<b>qPCR</b>	Sense	5'CAAATACTCAGACAGCGAGGG3'	135
<b>qPCR</b>	Antisense	5'CAAGGTGAAGCCGTAATAGTAGT3'	

The serial number: 23806\_c0\_seq1 as a template for designing primer that use for PCR or qPCR.

**Table 3. Position in the amino acid sequence of predicted topological domains and percentage amino acid sequence identity and similarity of Japanese eel cx34.4 with the respective topological domains of Coho salmon Cx34.3 and Zebrafish Cx34.5.**

Domain	Position	Coho salmon Cx34.3		Zebrafish Cx34.5	
		Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	Similarity (%)
<b>N</b>	1-20	90.0	95.0	95.0	100.0
<b>M1</b>	21-40	85.0	95.0	85.0	95.0
<b>E1</b>	41-76	91.7	97.2	91.7	97.2
<b>M2</b>	77-97	85.7	90.5	76.2	85.7
<b>CL</b>	98-149	55.8	73.1	55.8	65.4
<b>M3</b>	150-172	69.6	87.0	78.3	87.0
<b>E2</b>	173-201	86.2	86.6	86.2	86.2
<b>M4</b>	202-224	73.9	96.3	82.6	100.0
<b>C</b>	225-298	51.4	66.2	63.5	78.4

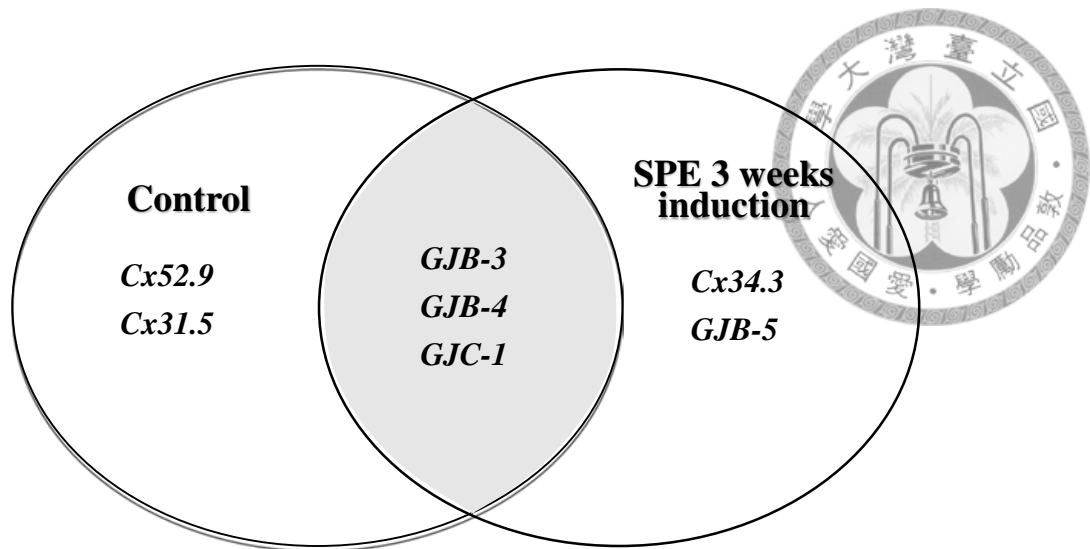
PS. : N, N-terminal; M1, First Transmembrane; E1, First Extracellular loop; M2, Secondary Transmembrane; CL, Cytoplasmic loop; M3, Third Transmembrane; E2, Secondary Extracellular loop; M4, 4<sup>th</sup> Transmembrane; C, C-terminal.



**Table 4. *Je-cx43* primer design**

<i>je-cx43</i>			
Step	Strand	Sequence	Product Size (bp)
<b>Degenerate</b>	Sense	5'GATGCGAAAGGARGAGAARCT3'	401
	Antisense	5'AGAMSACGTAGAAGAGCTCRA3'	
<b>Nested</b>	Sense-1	5'TGATGCGAAAGGAGGAGAAAC3'	1+2: 330
	Antisense-1	5'CACCAGCATGAAGATGATG3'	2+1: 242
	Sense-2	5'GTCAAGCACGGGATGGAG3'	2+2: 222
	Antisense-2	5'AGACCGTTTTTCTCCGTGGGG3'	
<b>3' Elongation</b>	Sense	5'GCCGCCGTCTACACCTGCGAG3'	476
	Antisense	5'GTRTCRTCAGGGWAGTCRAAG3'	

The nucleotide sequence that use for alignment is based on NCBI nr database, *cx43* (*GJA1*) complete cds sequence. Including human (AF151980.2) 、 mouse (NM\_010288.3) 、 zebrafish (AF035481.1) 、 common carp (AY008286.1) 、 rainbow trout (DQ204869.1) 、 coho salmon (HQ315555.1). Degenerate primer design at the most unique region (CL and C' term) of Cx43 from fish to mammals.



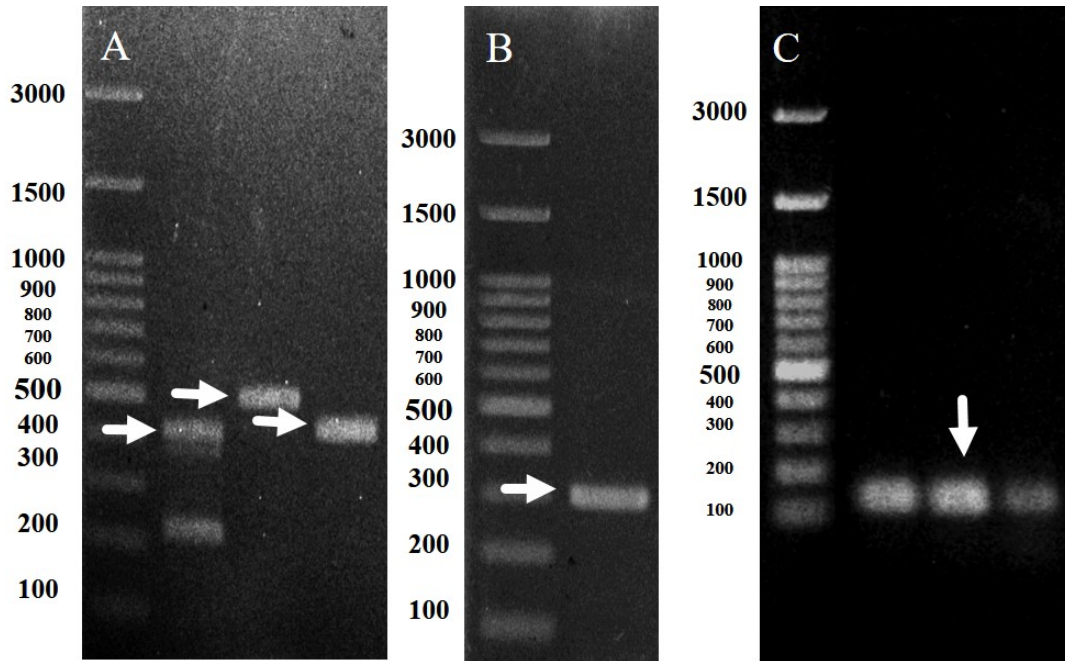
**Figure 1. Predicted 7 Cx genes express in two groups**

Red seabream *Cx31.5*, zebrafish *Cx52.9* in without induction group (control).

Coho salmon *Cx34.3*, medaka *GJB-5* in induction SPE 3 weeks group.

Zebra mbuna *GJB-3* and *GJC-1*, rainbow smelt *GJB-4* in both group

**Figure 2. PCR analysis of cDNA from without induction ovarian tissue, using *Je-Cx34.4* primer pairing.**



A: Column 1: primer 1+4; Column 2: primer 1+5; Column 3: primer 1+6.

B: Column 1: primer 2+6.

A,B T<sub>m</sub> value 56°C.

C: Column 1-3: primer 3+5. Annealing T<sub>m</sub> value 58°C, 59°C and 60°C respectively.

cDNA from fresh water rearing Japanese eel, weight 450.0g, ovary weight 9.30g and GSI% 0.92.

gatctgtttgagagctgatgagcctctgggggagcatcatctggttttacagtcgcttctttgctcgac  
agactggaagagagaatgggagagtgggactttctgggacggcttctggacaaagtccagaccactcc  
M G E W D F L G R L L D K V Q T H S  
acggtcatcgggaaggtctggctgaccgtcctgttctgcttccagatcctggctcctgggggctgcggcg  
T V I G K V W L T V L F V F R I L V L G A A A  
Gagagggtgtggggggacgagcagtcctgacttctgtctgcaacacggagcagcccgggtgcgagaacatg  
E R V W G D E Q S D F V C N T E Q P G C E N M  
tgctacgaccacgccttccccatctcccacgtccgcatctgggtgctgcagatcgttcttcttccacg  
C Y D H A F P I S H V R I V V L Q I V F V S T  
ccgaccctggcttacctggggcagctcctgcacgtggtccacatggagaagaagtacagggagagaacg  
P T L V Y L G H V L H V V H M E K K Y R E R T  
CK2  
cgtaagcaggccgaggaggagctcagcagcctgatcctgaggaacgggtacaaggtccccaataactca  
R K Q A E E E L S S L I L R N G Y K V P K Y S  
CK1CK1 PKA/CK1/CK2  
gacagcgagggaaggtcagcctgcacggtcactccttcagagctacctgggtgaacctgcttccaag  
D S E G K V S L H G R L L Q S Y L V N L L F K  
PKA/CK1 PKA  
atcttgctggaagtggggttcatcctggggcagttactactattacggcttcacctgagggcccgctac  
I L L E V G F I L G Q Y Y Y Y G F T L Q A R Y  
gtctgcagccggttcccctgcccgcaccaggtggactgttctctccaggccacggagaagaccatc  
V C S R F P C P H Q V D C F L S R P T E K T I  
ttcatttggttcatgctgggtggctgcctgtgtctccctggctcctgaacctggctgagatcctctatctg  
F I W F M L V V A C V S L V L N L V E I L Y L  
tgcaccagggccgtcaccaagtgcgtggacaagaagcagggttacatggctcactcgtgtaactccagtc  
C T R A V T K C V D K K Q G Y M V T R V T P V  
ctgcagagaaacgagttcaaaaacaaggacctggccatccagaactgggtcaacctggagctggagcta  
L Q R N E F K N K D L A I Q N W V N L E L E L  
caggaaggaagctaggcagtggggtcactaaaagcctggaatcggaggacgtaagcacaacatggag  
Q G R K L G S G V T K S L E S E D V S T N M E  
CK2PKC  
gagggtccacatctgaactgctgctttgaggcacagacttaactgtaaagcactttgccctgaaaactgt  
E V H I -  
gttggcagggtgtgttaggtttaatttcttacaggatgaataagatttccgctcactgtcaagctcattctg  
taggctgttaaaaaagtttttataaaaatttaactcgcctgttattttcatgcatctaagtagttatg  
aaattacatgtgtctttaaatacatatgacacctgtgccagtttctgtgagttatgtttccatttctgt  
aagtcttatgtacttttactttaccataccatctttaccataataaacaacataatagtcacattatg  
ccaaatatctatctcagaaaaatataatgcactgtaacattcacttgtttttttaccggttatttcagttgct  
tttcagtcactgataattttataataatcaagttgctaattttttgtatactttttgtcttttcagtcac  
tgataattttataataatcaagttgctaattttttgtatacttttcttcaataaaatacacaacata  
cactcg

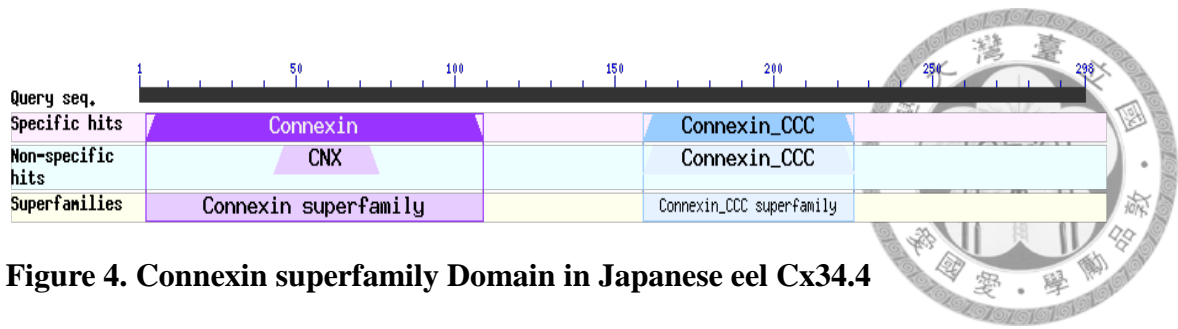
**Figure 3. Je-Cx34.4 cDNA and Deduced Amino acid sequence.**

Green highlight: Cx superfamily

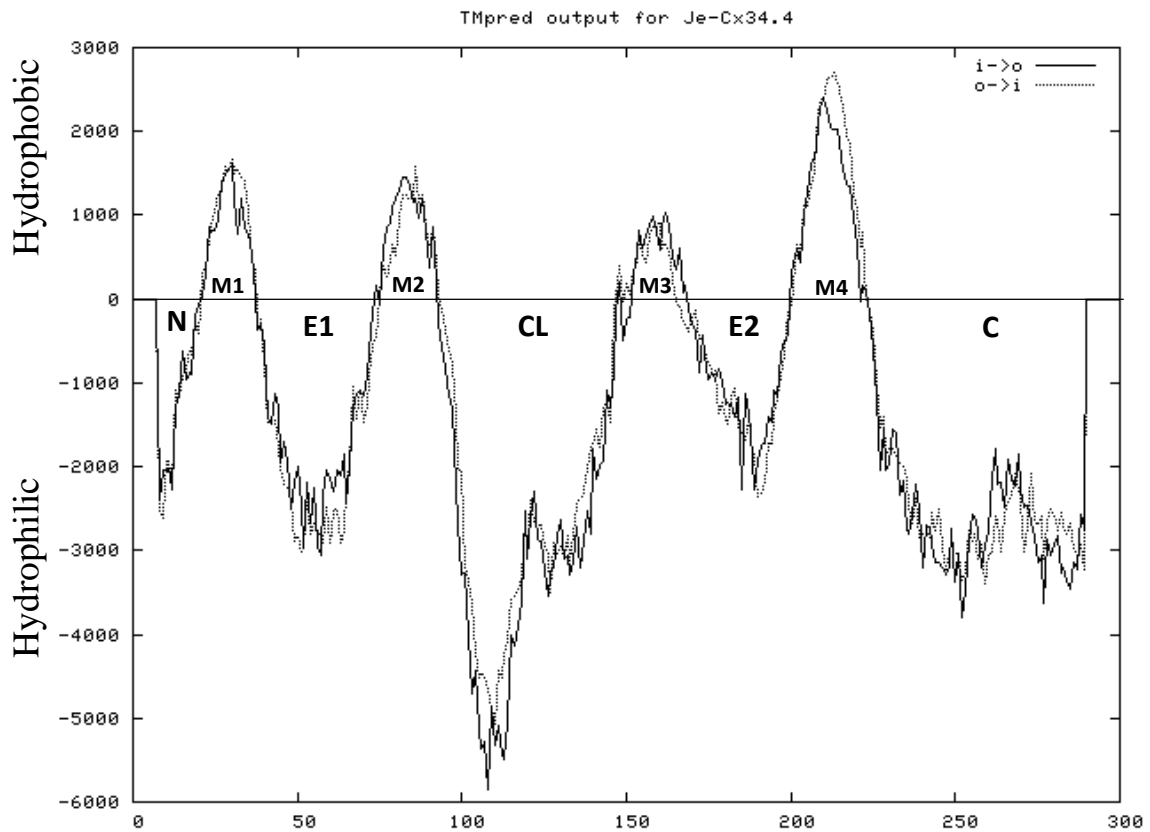
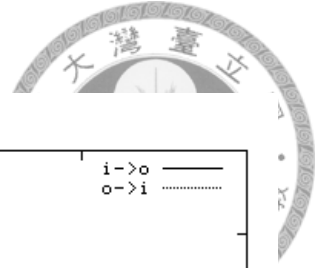


Yellow highlight: Cysteine rich region;  
Black frame, red words: Transmembrane domain;  
Underline: Phosphorylation site.





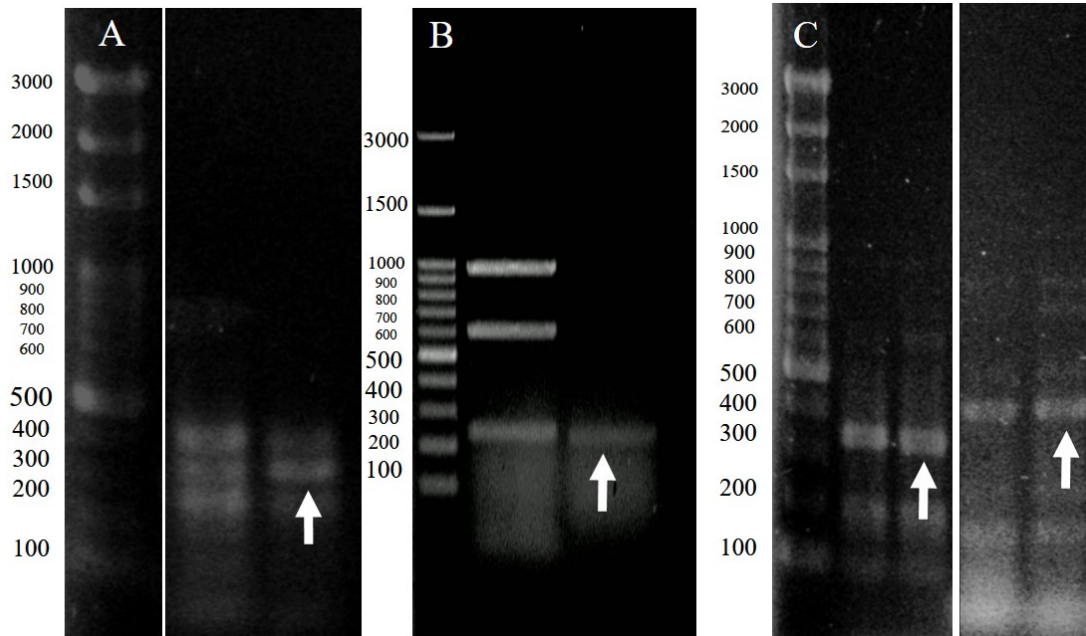
**Figure 4. Connexin superfamily Domain in Japanese eel Cx34.4**



**Figure 5. Je-Cx34.4 Hydropathicity analysis.**

以 TMpred 預測 Cx34.4 穿膜區域，包含有四個疏水性區，五個親水性區，疏水性區為膜內區域。N：N Terminal region (胞內氨基端)、M：Transmembrane domain (穿膜蛋白域)、CL：Cytoplasmic loop (胞質環)、E：Extracellular domain (胞外環)、C：C Terminal region (胞內羧基端)。

**Figure 6. PCR analysis of cDNA from without induction ovarian tissue, using *Je-Cx43* primer pairing.**



A: Degenerate primer, Annealing Tm value 53°C, 55°C respectively.

B: Nested primer, Column 1: 2+1; Column 2: 2+2. Annealing Tm value 59°C

C: Column 1-2: Nested primer 1+2. Annealing Tm value 55°C, 59°C;

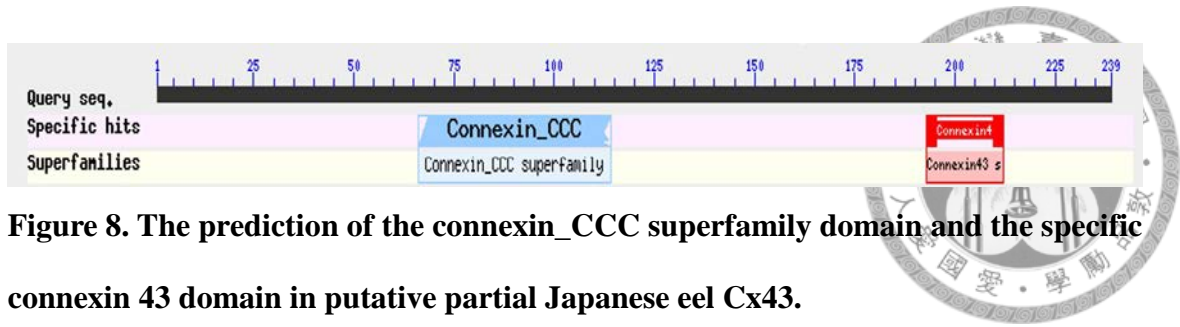
Column 3-4: 3' Elongation degenerate primer. Annealing Tm value 59.3°C, 60.1°C respectively.

cDNA from SPE Induction 3 week Japanese eel. Total weight 638.8g, ovary weight 16.38g and GSI% 2.56.

tgatgCGAAAGGAGGAGAACTGAACAAGAAGGAGGAGGACCTGAAGGYGGTSCAGAACGACGGCGGY  
 M R K E E K L N K K E E D L K X X Q N D G X  
 gagctggamataccgctgaggaagatcgagttgaagarggtcaagcacgggmtggaggagcatgggaag  
 D V X I P L R K I E L K X V K H G X E E H G K  
 gtcaagatgaaggbgccctcttgCGCACCTACATCGTCAGCATYTGTTCAAGTCCATCTTCGAGGTG  
 V K M K X A L L R T **Y I V S X X F K S I F E V**  
 ggcttctgatgatccagtggtaactttacggcttctccgctggccgccgctctacacctgCGAGAGGGAC  
**G F L M I Q W** Y F T A S P L A A V Y T C E R D  
 ccctgccccacagggtagactgcttctgtccccgccccacggagaaaacgggtcttcatcatcttcatg  
**P C P H R V D C F L S R P T E K T** **V F I I F M**  
 ctgggtgggtgtccctgggtgtccctcmtgtcaacgtcatcgagctcttctacgtgtttatTTAAACGGATC  
**L V V S L V S L X L N V I E L F Y V L F** K R I  
 aagatcgCGTGAAGGGAAAGATTACCACTACCCACCAGCGGTACCCTGAGCCCCACCCCAAAGAC  
 K D R V K G K D Y H Y P T S G T L S P T P K D  
 PKC/CK1 PKC/CK2  
 ctgtcccaactaagtagcctactacaatggctgtctctccccaccgccccctgtcccaatgtca  
 L S P T K Y A Y Y N G C S S P T A P L S P M S  
 CK1CK1 CK1  
 cctccgggtacaatctggccactggggagaggaccaactcctgtcgcaattacatcaaacagccaac  
 P P G Y N L A T G **E R T N S C R N Y I K P A N**  
 CK2 PKC  
 gagcagaactggggcaactactgcaccgagcagaaccggctggtttAAACGGATGCCCCATCTCCAAC  
**E Q N W G N** Y C T E Q N R L V -  
 CK2  
 tcgcacgcgcaggccttcgattaccccgacgacgg

**Figure 7. Je-cx43 partial DNA and deduced amino acid sequence.**

- Yellow highlight: Cysteine rich region;
- Green highlight: Connexin 43 domain;
- Black frame, red words: Transmembrane domain;
- Underline: Phosphorylation site.



**Figure 8. The prediction of the connexin\_CCC superfamily domain and the specific connexin 43 domain in putative partial Japanese eel Cx43.**

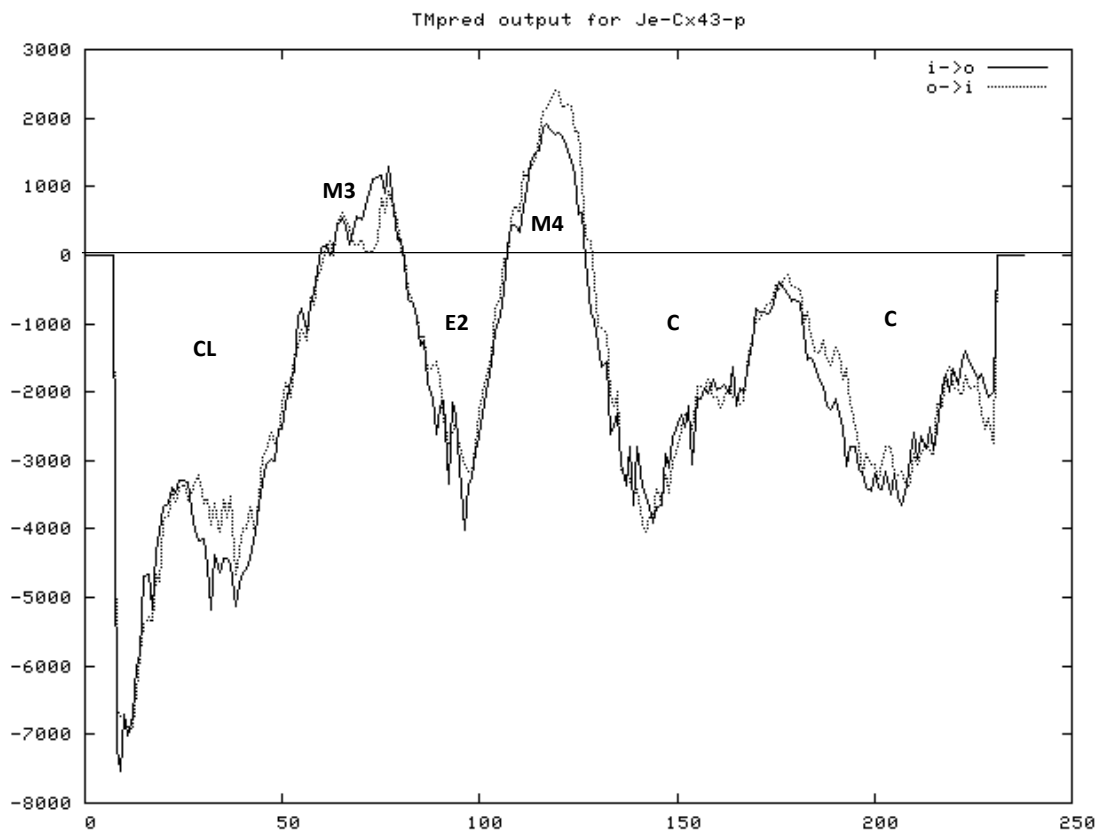
Eel ERTNSCRNYIKPANEQNWGN  
 Carp ERTNSCRNYNKQANEQNWAN  
 Pufferfish RGTGSCRNYNKHASEQNWAN  
 +\* \*\*\*\*\* \* \*+\*\*\*\*\*+\*



**Figure 9. The specific connexin 43 domain alignment.**

Eel: Japanese eel, *Anguilla japonica*; Carp: Common carp, *Cyprinus carpio*; Pufferfish: Tiger puffer, *Takifugu rubripes*.

三者為相同胺基酸以「\*」號標記，若三者胺基酸性質相似以「+」標記。

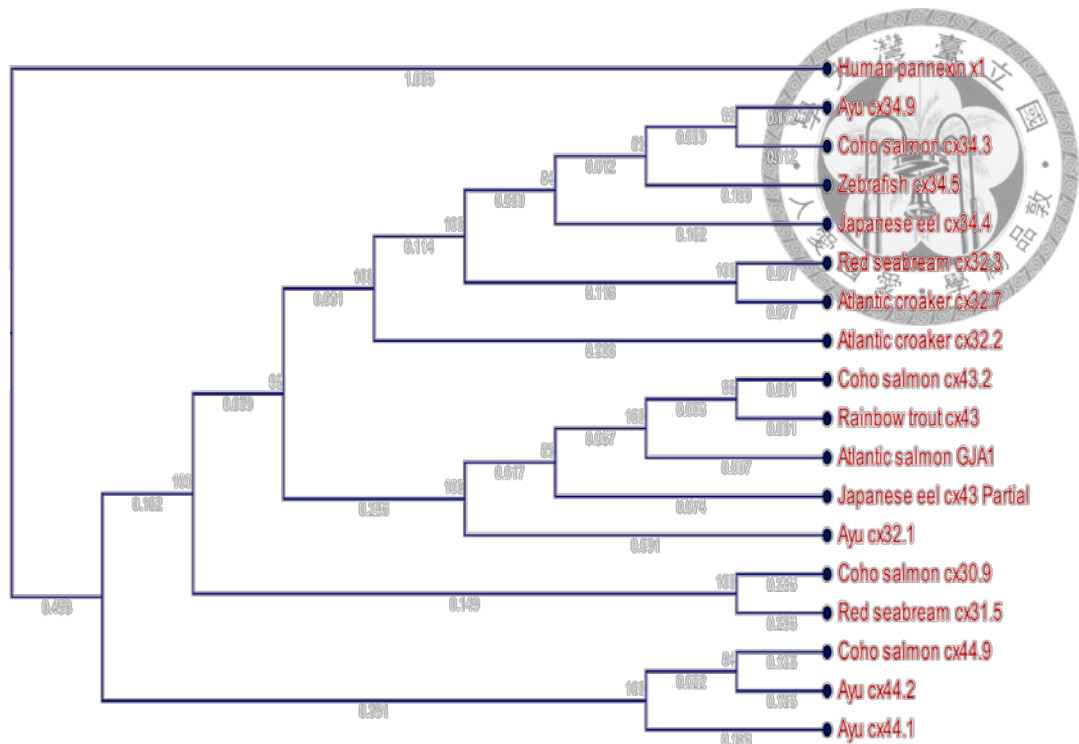


**Figure 10. Je-Cx43-p Hydropathicity analysis.**

以 TMpred 預測日本鰻部分 Cx43 穿膜區域，包含有兩個疏水性區，三個親水性區，疏水性區為膜內區域。CL：Cytoplasmic loop (胞內環)、M：Transmembrane domain (穿膜蛋白域)、E：Extracellular domain (胞外環)、C：C Terminal region (胞內羧基端)。

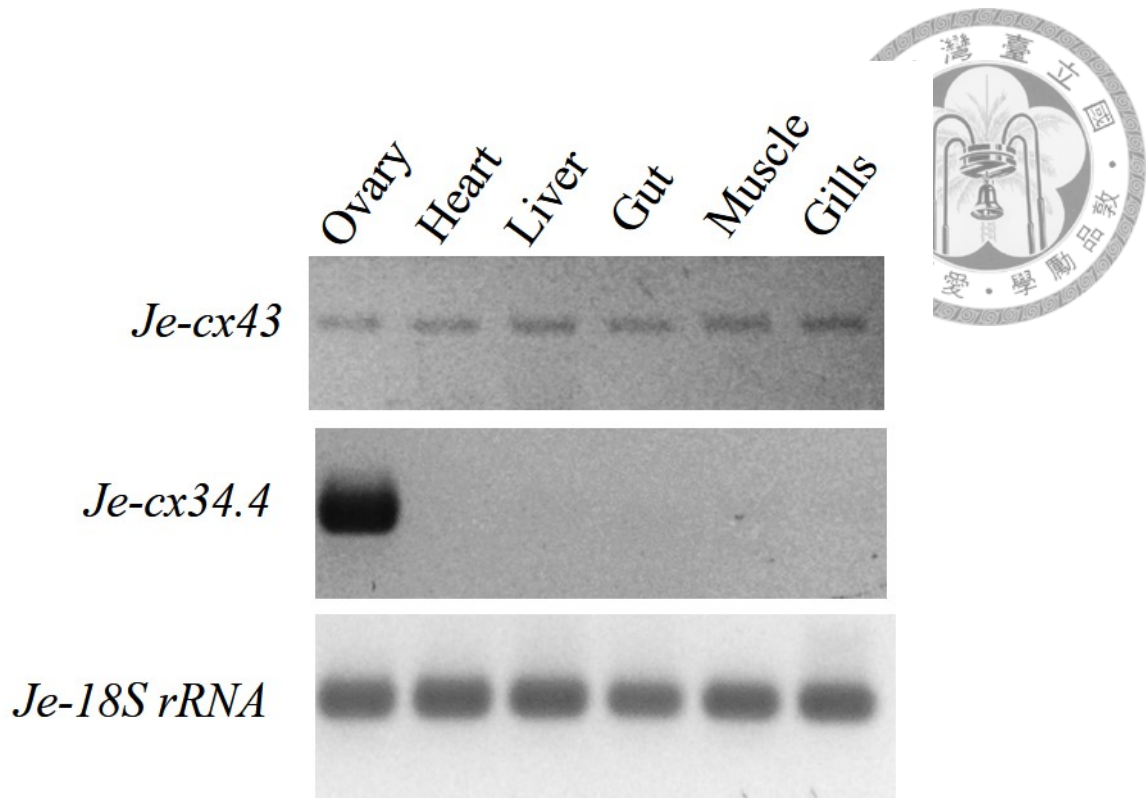






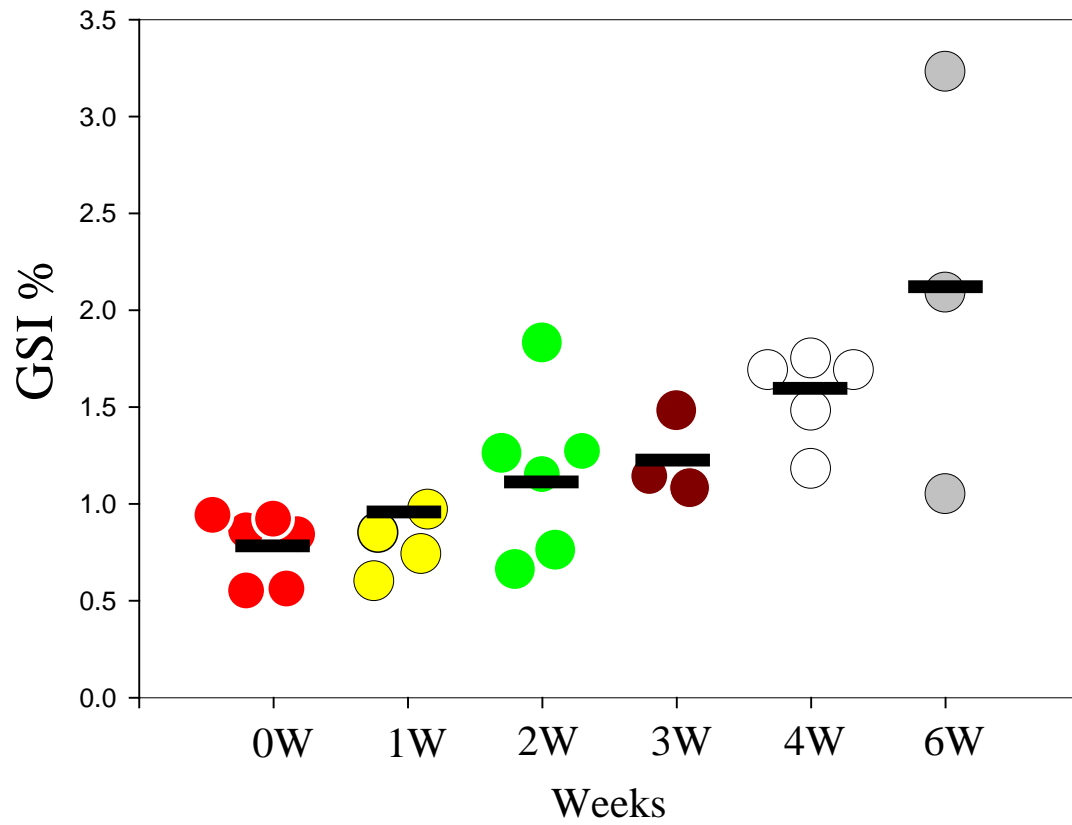
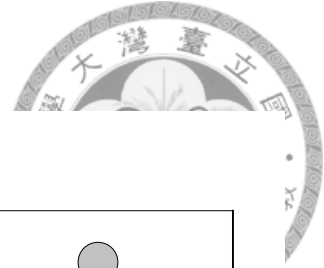
**Figure 12. Phylogenetic relationship between Japanese eel and other teleost known Cx proteins**

To run the phylogenetic tree, chose teleost cx genes in GenBank database, accession number of aligned deduced amino sequence are as followed: Atlantic croaker Cx32.2 (L31542.1) and Cx32.7 (L31541.1), red seabream Cx31.5 (AB037933.1) and Cx32.3 (AB048251.1); ayu Cx32.1 (DQ487733.1), Cx34.9 (DQ487730.1), Cx44.1 (DQ487731.1) and Cx44.2 (DQ487732.1), rainbow trout Cx43 (also known as gap junction protein alpha 1; Gja1, DQ204869.1), coho salmon Cx30.9 (ADZ96427.1), Cx34.3 (ADZ96428.1), Cx43.2 (ADZ96429.1) and Cx44.9 (ADZ96430.1), atlantic salmon gap junction protein alpha 1; Gja1, BT059188.1), and zebrafish Cx34.5 (also known as gap junction protein alpha a; Gjaa, NP\_001025371.1). Human, Homo sapiens, Pannexin-1, (NP\_056183.2) was use as outgroup ◦



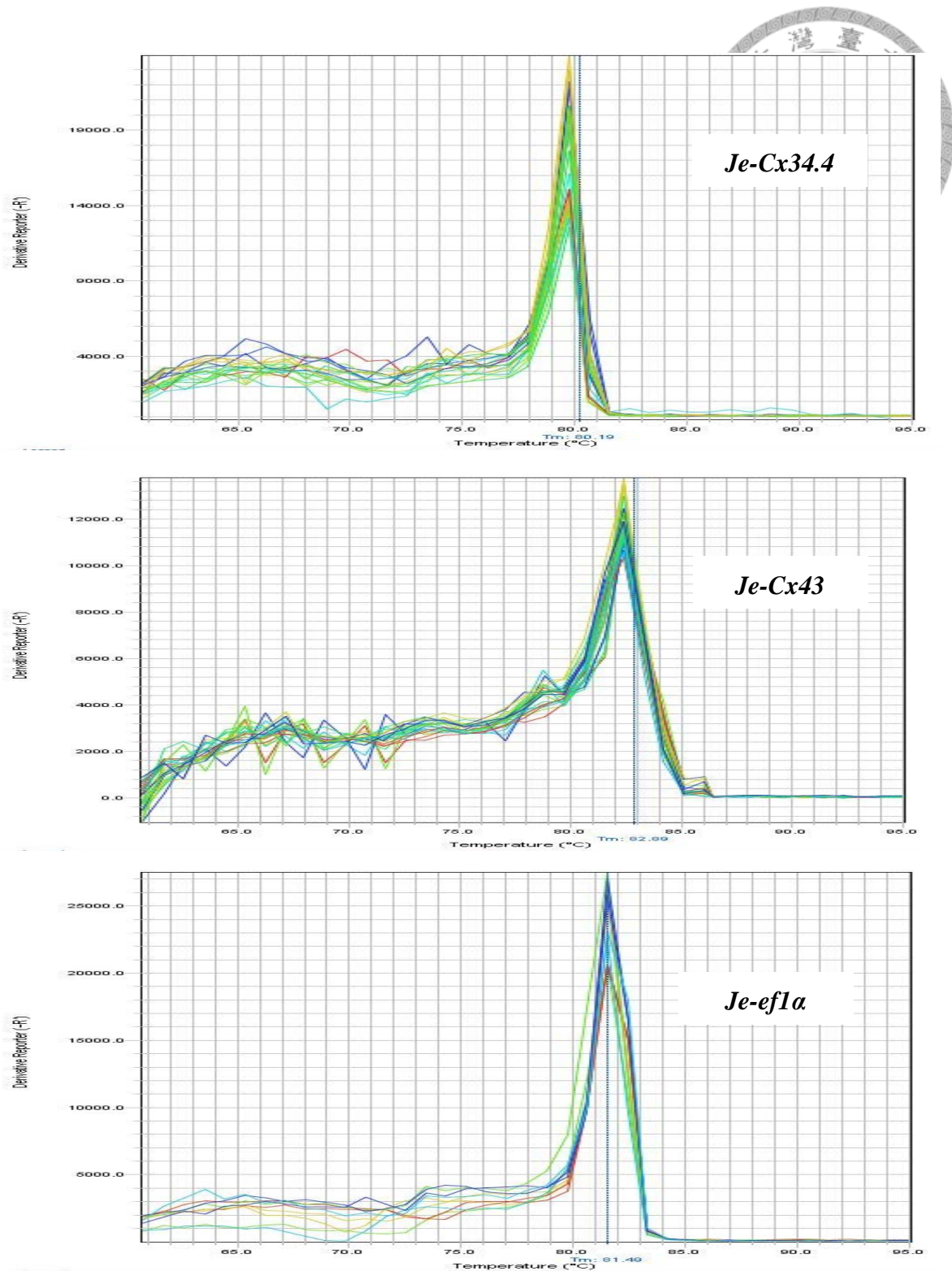
**Figure 13. *Je-Cx34.4* and *Je-cx43* transcripts in tissues of Japanese eel.**

PCR product was amplified by cDNA (2  $\mu$ g each) that from several tissue, including ovary, heart, liver, gut, muscle and gills. Japanese eel 18S ribosomal RNA were use as reference gene.



**Figure 14. The GSI change of Japanese eel after SPE weekly induction**

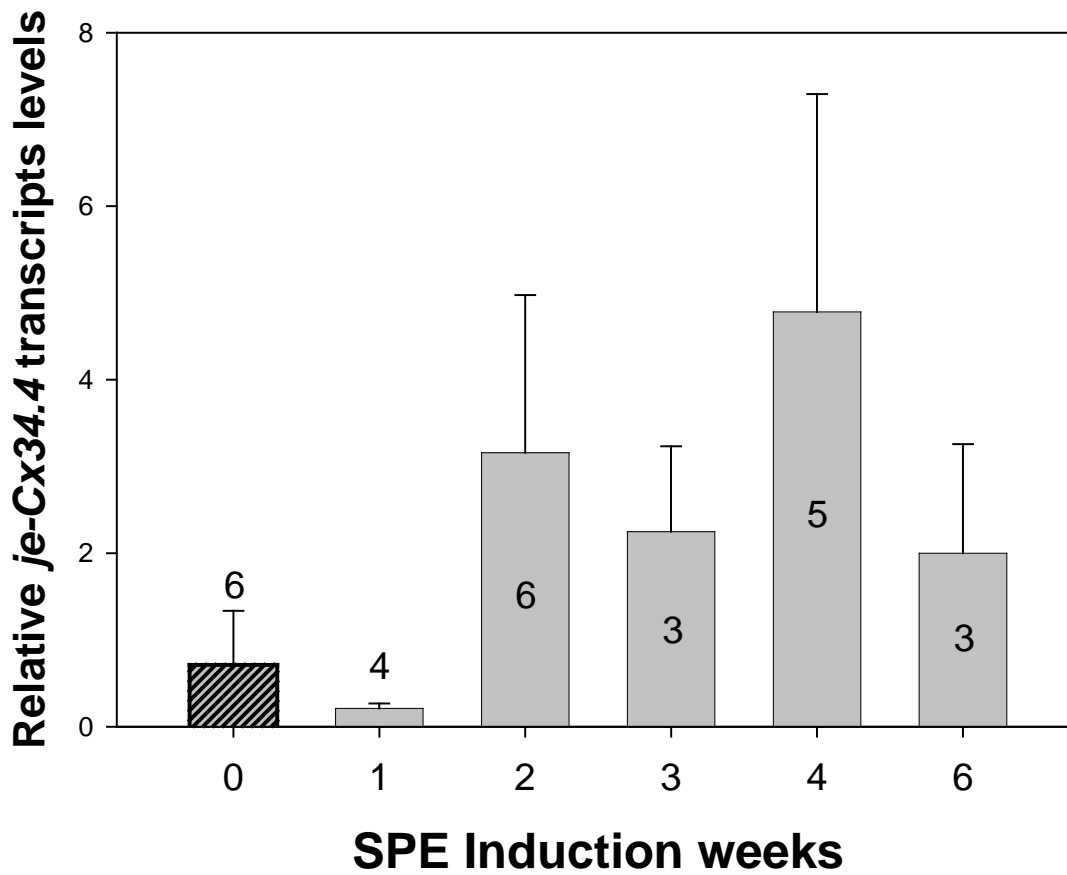
Black bar: average of GSI value during the week. 0W: 0.78%; 1W: 0.97%; 2W: 1.16%; 3W: 1.23%; 4W: 1.56%; 6W: 2.12%.



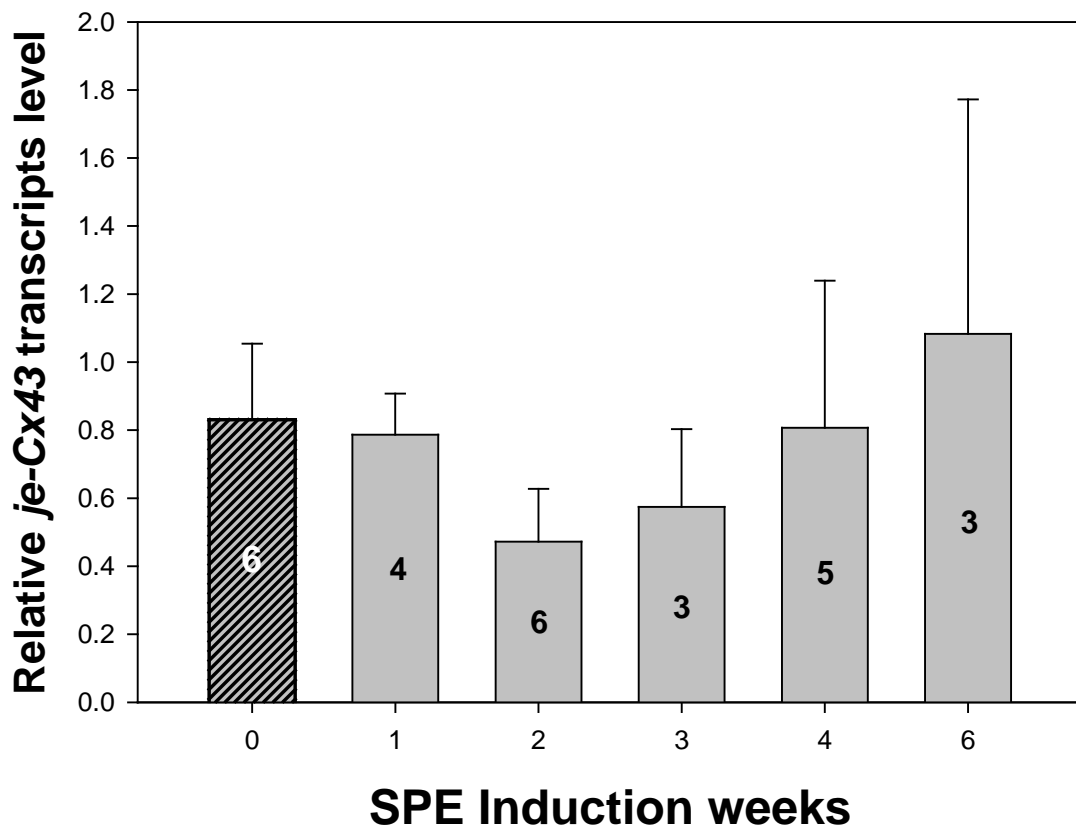
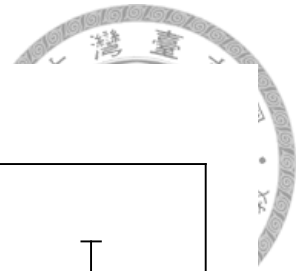
**Figure 15. Melting Curve of *Je-Cx34.4*, *Je-Cx43* and *Je-ef1a*.**

Vertical axis: SYBR Green detecting reporter value ; horizontal axis: temperature °

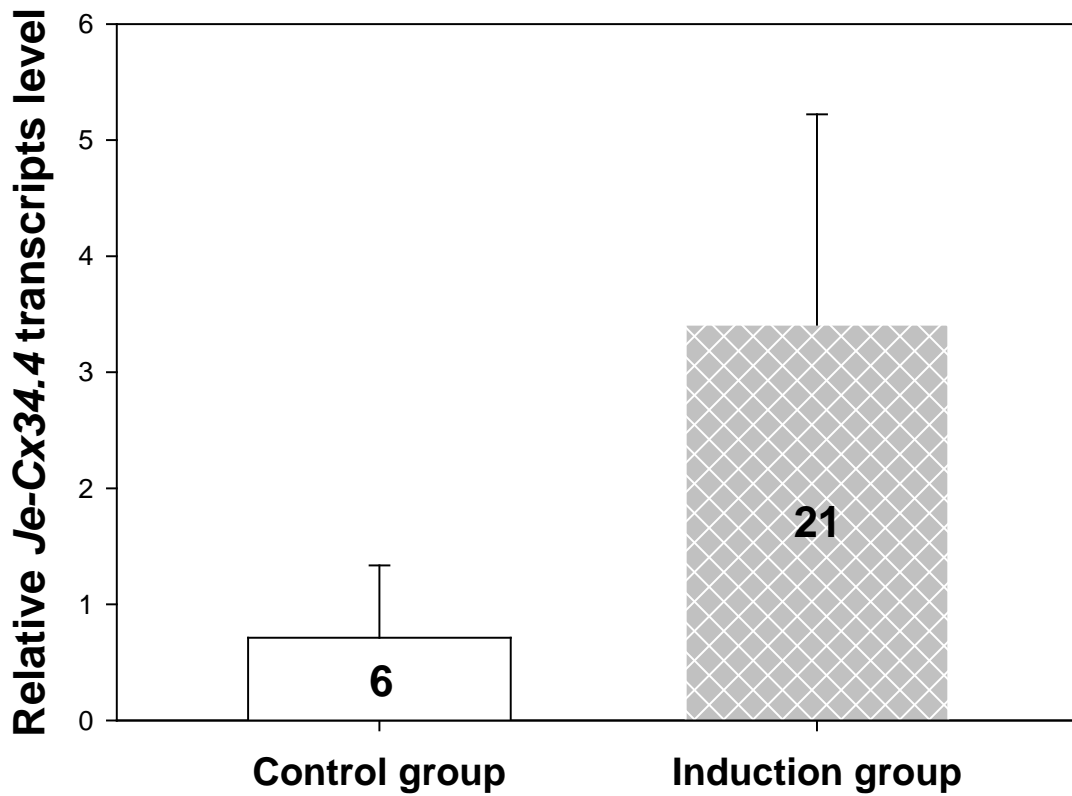
*Je-Cx34.4*, *Je-Cx43* and *Je-ef1a* had a peak at 80.19 °C , 82.09 °C and 81.40 °C respectively.



**Figure 16. The transcript levels of *Je-Cx34.4* after SPE weekly induction.**  
 Number shows the sample size of each group.



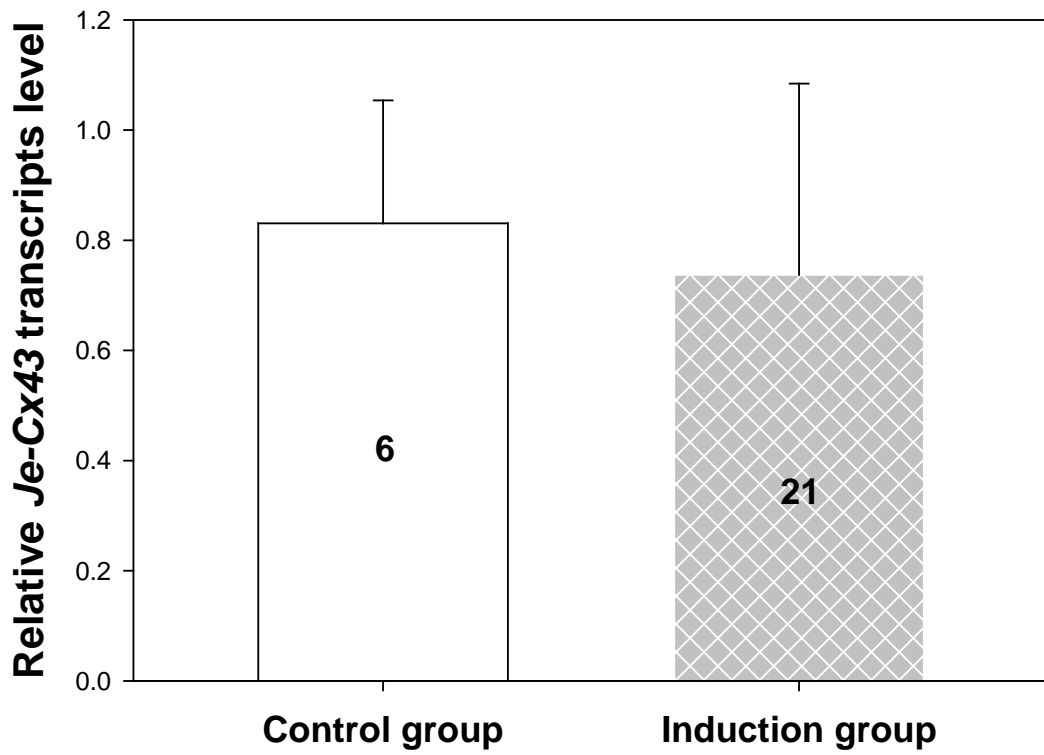
**Figure 17. The transcript levels of *Je-Cx43* after SPE weekly induction.**  
Number shows the sample size of each group



**Figure 18. The transcript levels of *Je-Cx34.4* between induction group and without induction (Control) group.**

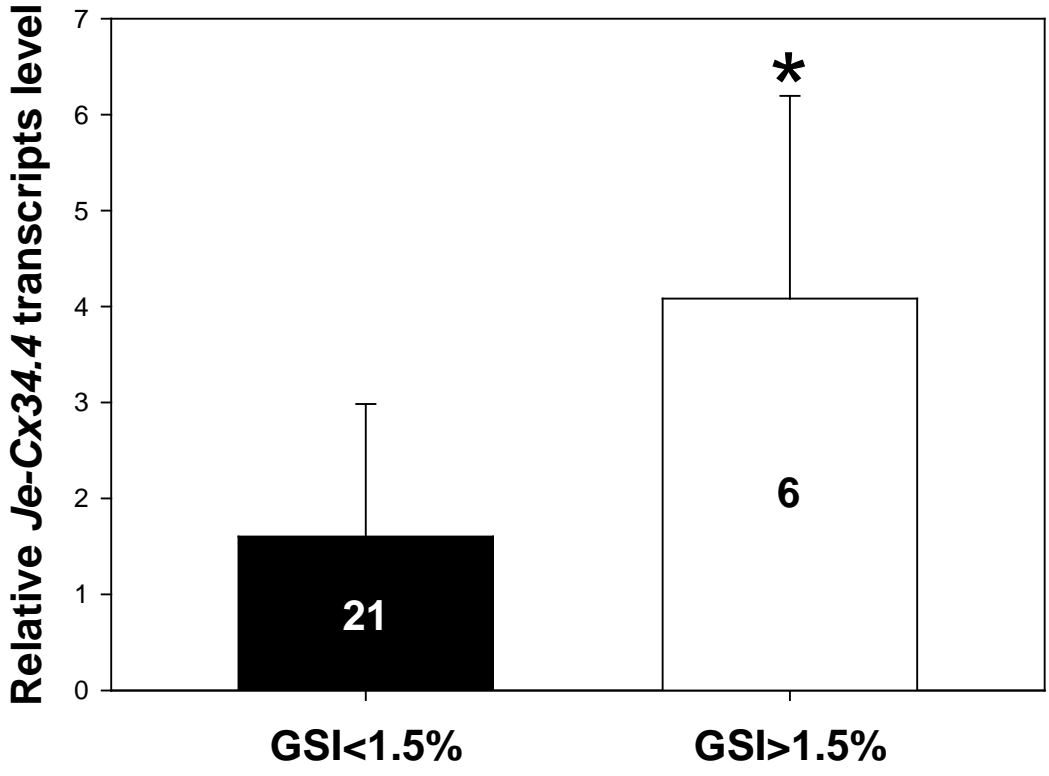
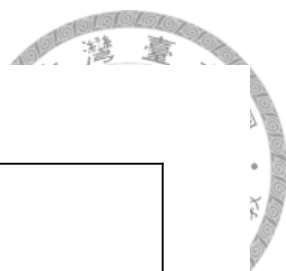
Number shows the sample size of each group





**Figure 19.** The transcript levels of *Je-Cx34.4* between induction group and without induction (Control) group.

Number shows the sample size of each group



**Figure 20.** The transcript change of *Je-Cx34.4* from GSI grouping ovarian tissue  
Number shows the sample size of each group  
P=0.024

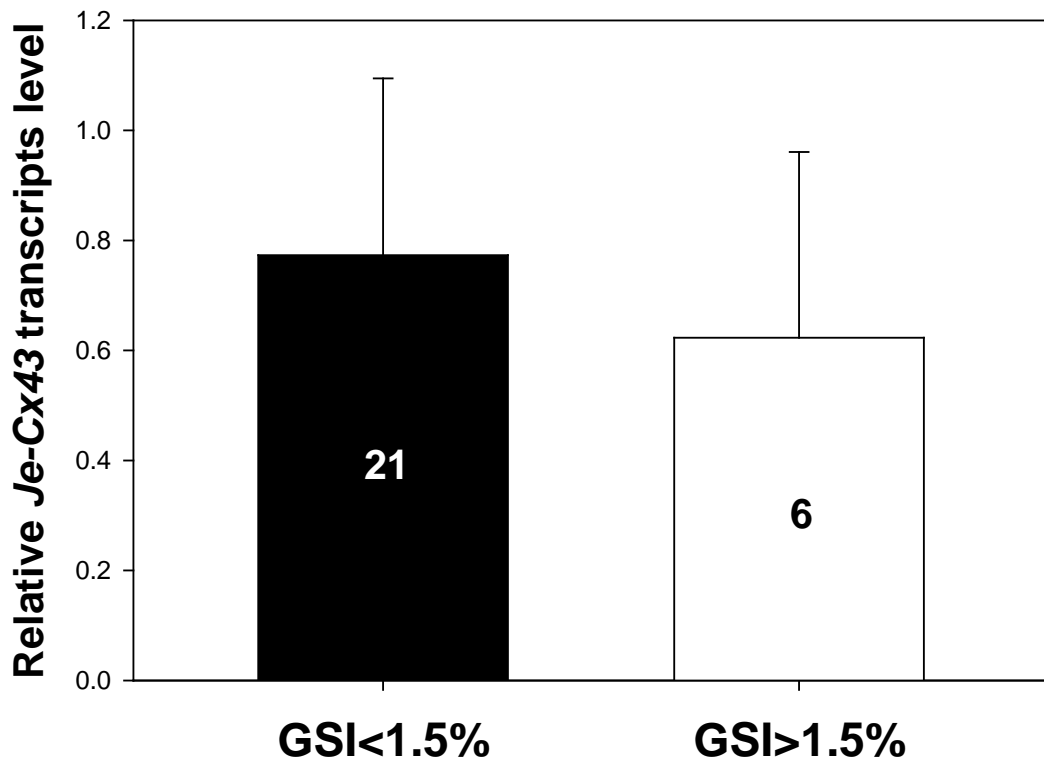
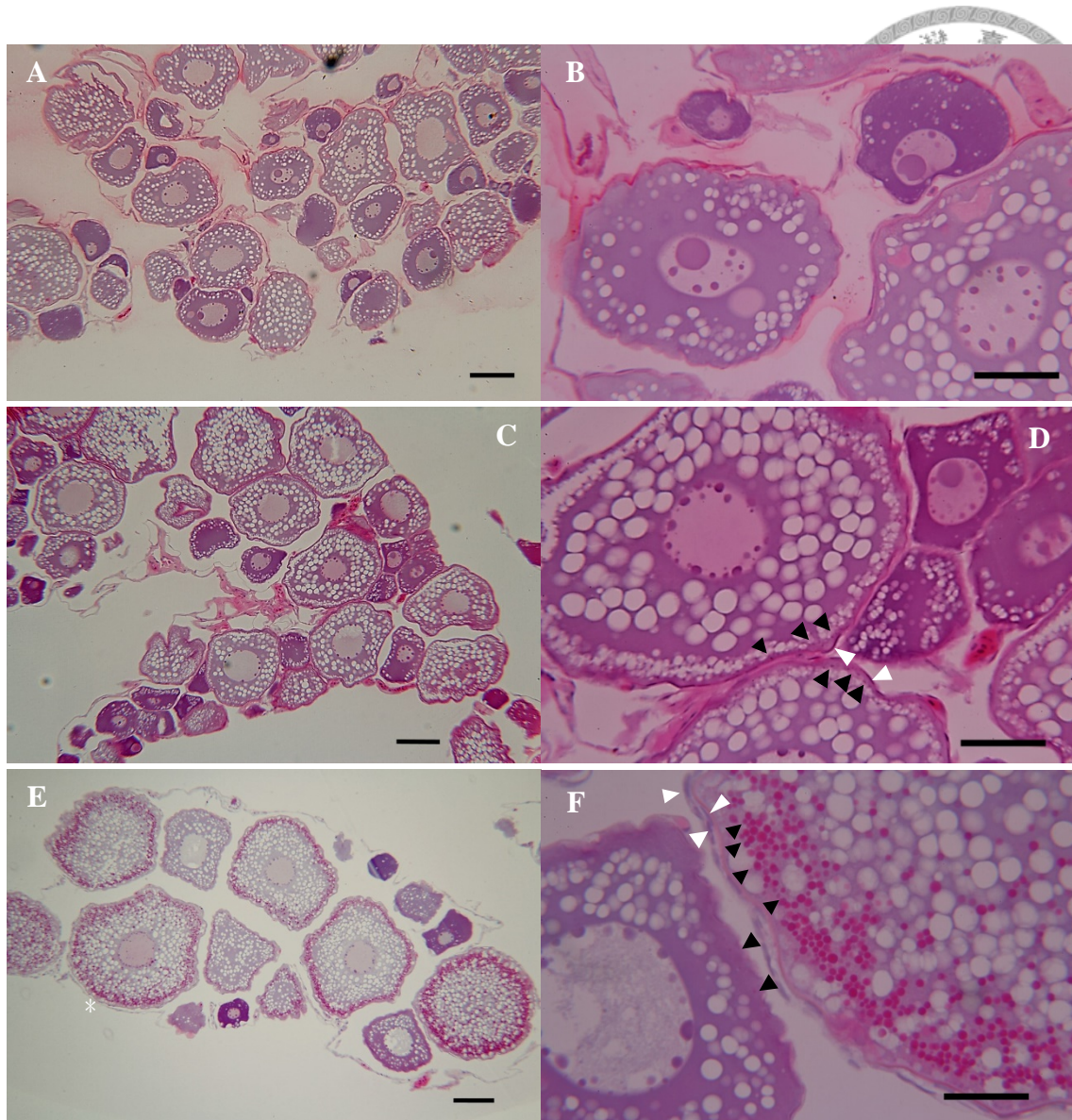


Figure 21. The transcript change of *Je-Cx43* from GSI grouping ovarian tissue

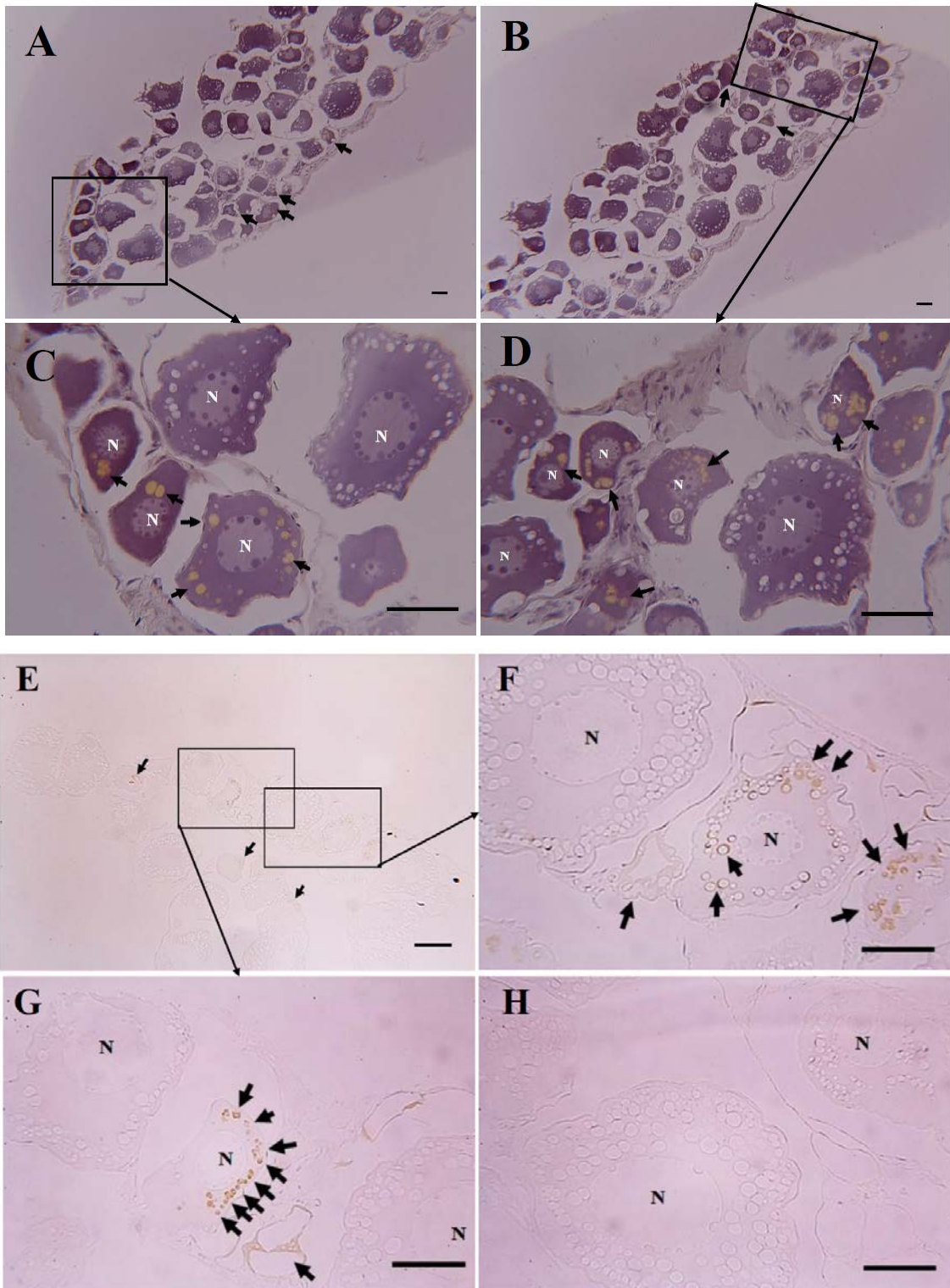


**Figure 22. Histology of Japanese eel SPE induction ovary.**

Hematoxylin & Eosin.

A, C, E objective lens 物鏡放大倍率 10 倍，尺規為 100  $\mu\text{m}$ ；B, D, F 物鏡放大倍率 40 倍，尺規為 50  $\mu\text{m}$ 。A, B: SPE 4 weeks induction, GSI 1.69 %；C, D: SPE 6 weeks induction, GSI 2.09 %；E, F SPE 6 weeks induction, GSI 3.23 %。

White arrow : follicle cells ; black arrow : yolk 。



**Figure 23. Immunohistochemistry of Cx43 in Japanese eel ovary tissue**

A~H : DAB coloration ; A~D : Hematoxylin counter staining ◦

H : Negative control (without Ab<sup>1</sup>) ◦

Black arrow : CX43 Ab ; N : nucleus ◦

Scale bar in A,B,E : 100 μm ; C,D,F,G,H : 50 μm ◦

A~D: SPE 2 weeks induction, GSI 1.18% ; E~H: 4 weeks induction, GSI 1.69%