

2024年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070003
參展科別 微生物學
作品名稱 泛基因組分析破囊壺菌產油基因

就讀學校 高雄市立高雄女子高級中學
指導教師 陳怡靜
作者姓名 施岑瑩、黃胤蓉

關鍵詞 破囊壺菌、二十二碳六烯酸 (DHA)、生物資訊分析

作者簡介



我們是施岑瑩和黃胤蓉，目前就讀高雄女中二年級。DHA是生活中常見的保健食品，此次有幸能遇到老師帶領我們使用生物資訊來探究破囊壺菌生產DHA的途徑，讓我們對生活周遭的事物有更深入的了解，在過程中我們更學會了運用現代科技來完成繁瑣的流程，多虧了老師用心的指導和耐心的回答我們每次提出的問題，才能讓我們的研究能夠順利進行。

摘要

破囊壺菌為海洋原生生物，因可產生 DHA 而被廣泛使用於藻油生產。破囊壺菌可透過 18s rRNA 鑑種，不同菌株之產油量相差甚大。其產油途徑主要有 FAS 及 PUFAs 二條路徑，含有 PUFAs 之菌種通常具有較高之產油率。前人依產油途徑將破囊壺菌分為三型（I-III 型），然而各型基因組間之差異仍待研究。本研究透過生物資訊分析 8 個破囊壺菌基因組，發現同型之破囊壺菌其產油相關基因（PUFAs, Desaturase, Elongase 及 Citrate lyase）之存在具有高度相關性，基因共線性分析也顯示其產油基因間具有高度同源性，然而同屬之破囊壺菌不一定為同一型，顯示以 18s rRNA 鑑種可能不適用於破囊壺菌。此外，Citrate lyase 僅存在於第 II 及 III 型，顯示第 I 型破囊壺菌其 DHA 合成之碳源來自不同途徑。

Abstract

Thraustochytrids are single-celled marine heterotrophic protists utilized for DHA (docosahexaenoic acid) production. DHA is synthesized within thraustochytrids through either the FAS (Fatty Acid Synthesis) or PUFAs (Polyunsaturated Fatty Acids) pathways, with the PUFAs pathway being more efficient. DHA production rates and the composition of fatty acids vary among different strains, depending on the presence or absence of the FAS and PUFAs pathways. Thraustochytrids can be categorized into three types (Type I-III) based on their DHA production pathways. Type I strains exclusively employ the PUFAs pathway, Type II strains possess both the FAS and PUFAs pathways, while Type III strains rely solely on the FAS pathway. While research has examined differences in fatty acid composition among these types, the genomic distinctions between them have yet to be thoroughly explored. We conducted an analysis of eight sequenced strains and observed a high correlation between the presence or absence of PUFAs, Desaturase, Elongase, and Citrate lyase genes within strains of the same type. Syntenic gene analysis also revealed that these genes are conserved across species. However, species within the same genus may belong to different types, which implies that relying solely on 18s rRNA for strain identification may not always be entirely reliable. Furthermore, the presence of citrate lyase in Type I and II strains but its absence in Type III strains suggests the existence of an alternative pathway for providing acetyl-CoA for DHA production in Type III strains.

壹、前言

一、研究動機：

二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 為多元不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA) , 由於人體無法合成, 因此其為一種必需脂肪酸。研究發現 DHA 對大腦發育、神經功能、視覺和免疫系統功能至關重要, 因此 DHA 的攝取不僅和成人健康相關, 對於嬰幼兒的智力發展更為重要。DHA 的工業生產來源一直以來都是以魚油為主, 這在未來可能會面臨供應不足或素食者無法食用的問題, 因此工業生產 DHA 的另一來源為透過微藻或破囊壺菌等微生物, 因為其具有可大量培養之優勢。破囊壺菌具有相當高的多樣性, 至少可以分為 10 個不同的屬, 且不同種之間的 DHA 產量存在顯著差異。本研究的主要動機在於以生物資訊法透過基因研究, 比較不同破囊壺菌產油基因, 以期望了解基因對其 DHA 生產之影響為何。並希望該結果能應用至提高破囊壺菌之 DHA 產量。

二、研究目的：

本研究的主要目的在於透過生物資訊分析, 深入了解破囊壺菌中 DHA 合成基因之差異及其對產油率可能之影響。具體而言, 我們期望解決以下問題：

問題 1: 基因對菌種之產油量及脂肪酸組成比例的影響為何?

問題 2: 不同菌株之產油量不同, 其演化關係為何?

三、文獻回顧：

(一) 破囊壺菌簡介

破囊壺菌 (Thraustochytrids) 為腐食性海洋原生生物, 廣泛分佈於海洋、河口、內陸性鹽水湖泊及紅樹林等地域, 主要以藻類及植物殘屑為食 (Lyu et al., 2020) 。破囊壺菌因其構造及生活史特殊, 其分類地位仍有爭議, 早期將其歸類在不等鞭毛菌分群的單細胞雜色藻類, 然而因其為異營性生物, 又不具有色素體 (plastid) , 因此目前其演化地位仍不甚明確 (蔡喬筑, 2000) 。破囊壺菌因外觀像破囊菌, 而釋放孢子的方式像壺菌而被

命名，目前已知其主要行無性生殖，過程中伴隨在細胞分裂後會及形成孢子囊，孢子囊具有網狀物結構可使其固定在物體表面，待成熟後，孢子囊破裂並將具有鞭毛之細胞釋出，被釋放出的游離細胞可透過鞭毛運動尋找下個生長點（陳逸民，2012）。

（二）破囊壺菌的生活史

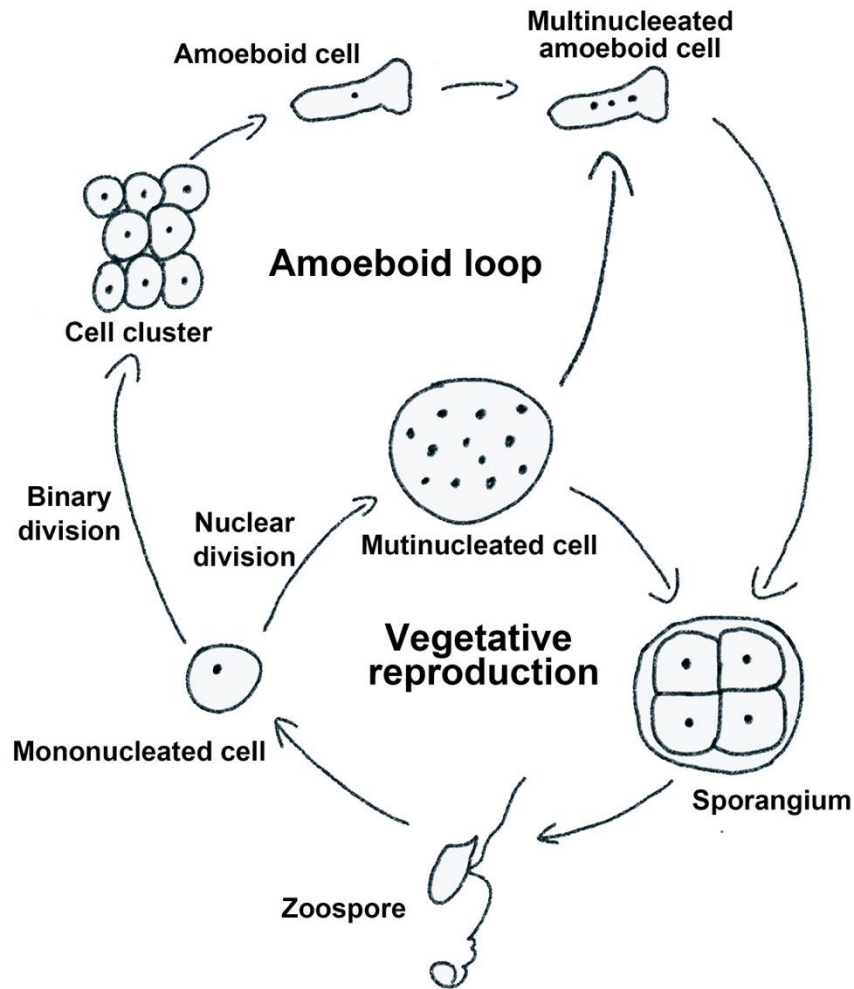
目前已知破囊壺菌至少可被分為 10 個屬，不同屬之間的生活史有部份不同，其生活史包含游離單細胞期，單細胞期，多細胞期，孢子囊期，孢子釋放期及變形蟲期等（Abdel-Wahab et al., 2021）。不同屬之破囊壺菌生活史最大的差異點在於其是否會形成孢子囊，是否具有變形蟲期以及細胞之分裂方式（圖一）（Morabito et al., 2019）。

2-1 無性生殖

破囊壺菌的生殖方式為透過無性生殖，由單一細胞分裂至多細胞，不同屬之細胞分裂方式有所不同，目前已知的二種不同的細胞分裂方式，第一種方式為由單一細胞進行二分裂為二個細胞，並重覆該過程，至多細胞期。另一種方式為單一細胞先進行核分裂以產生多核細胞，待核分裂完成後再透過質膜內陷或與內部囊泡膜融合產生細胞膜形成多細胞。部份破囊壺菌在細胞分裂時會形成孢子囊以保護細胞不受外界環境影響（Bennett et al., 2017）。

2-2 變形蟲循環

部份破囊壺菌屬之生活史具有變形蟲循環，如 *Ulkenia*、*Aurantiochytrium* 和 *Thraustochytrium*，變形蟲細胞為單核或多核細胞，具有緩慢移動的能力。單核變形蟲細胞為由單核細胞轉變而來，而多核變形蟲則是由多核細胞轉變而來，目前仍不清楚如何控制變形蟲細胞的形成。



圖一、破囊壺菌的生活史

生活史階段示意圖：破囊壺菌的生活史包含多個階段，不同屬之間存在差異。主要階段包括游離單細胞期、單細胞期、多細胞期、孢子囊期、孢子釋放期和變形蟲期。最大的差異在於是否形成孢子囊、是否有變形蟲期，以及細胞分裂方式。無性生殖或稱營養繁殖 (Vegetative reproduction)：破囊壺菌的無性生殖是重要的生殖方式。它們可以透過單一細胞的分裂，或者進行核分裂以產生多核細胞，然後產生多細胞體。部分破囊壺菌在細胞分裂時會形成孢子囊，以保護細胞。變形蟲循環 (Amoeboid loop)：變形蟲細胞可以是單核或多核，具有緩慢的運動能力。單核變形蟲由單核細胞轉變而來，而多核變形蟲是由單核變形蟲或多核細胞轉變而來。

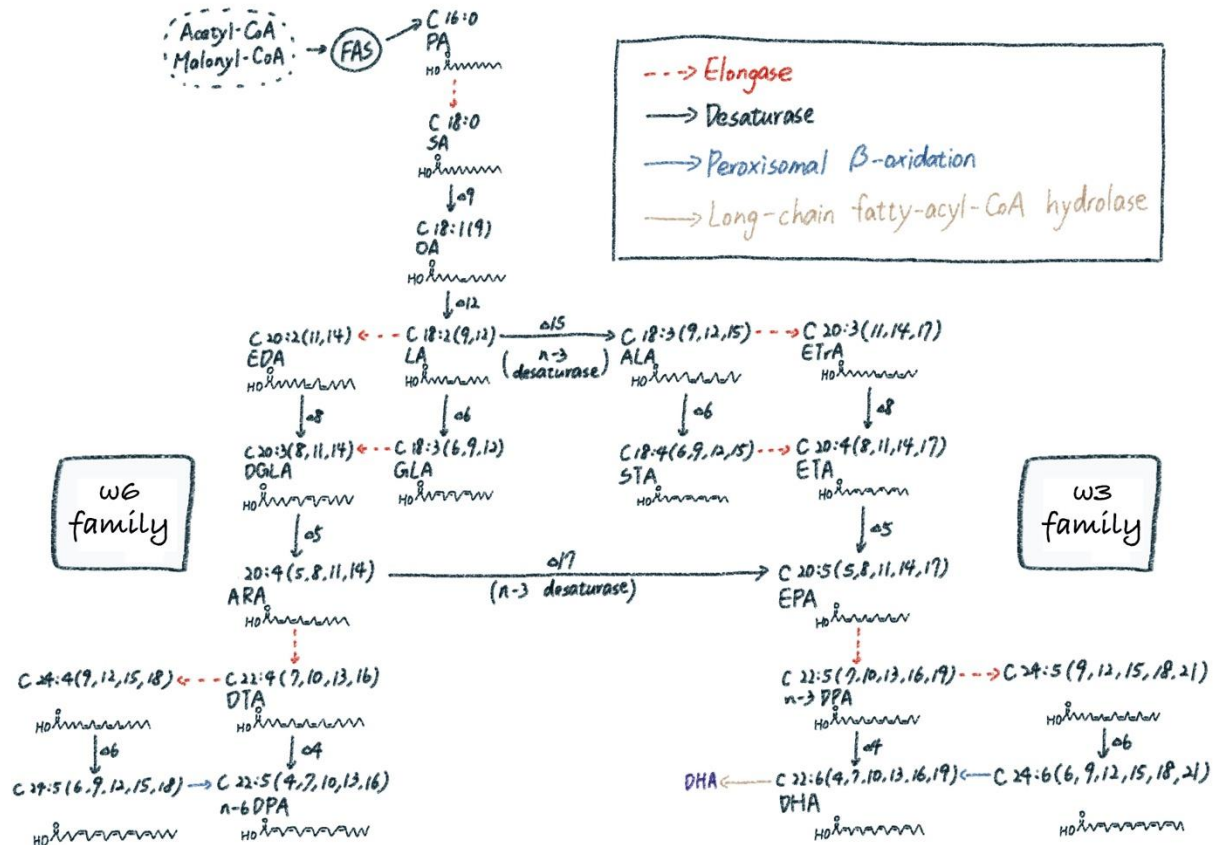
註：引用自 (Bennett et al., 2017) 的結果圖三，並進行重製。

(三) 破囊壺菌的 PUFA 合成路徑

破囊壺菌具有合成 PUFA (polyunsaturated fatty acid) 之路徑, PUFA 為多元不飽合脂肪酸, 其中又以 C18–C22 等長度之 PUFA 最常見, 人類因無法合成 $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 等 PUFA, 因此得靠食物攝取 (吳淑姿, 2002)。破囊壺菌因可合成之大量之 DHA (C22:6, $\omega 3$) 及 EPA (C22:5, $\omega 3$) 等 PUFA, 因此成為工業藻油之重要來源。目前已知破囊壺菌具有兩種 PUFA 合成途徑, 分別為傳統的脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase) 路徑 (FAS pathway) 及多元不飽合脂肪酸合成酶 (PUFA synthase) 路徑 (PUFAs pathway) (Qiu X., 2003)。PUFAs pathway 的合成效率較高, 但其產物只有 DHA 及 EPA (C22:6, $\omega 3$), 而 FAS pathway 雖效率較低, 但可合成之 PUFA 種類也較多, 涵蓋的範圍為 C18–C22 之各式 PUFA (Ishibashi et al., 2021; Song et al., 2018)。

3-1 脂肪酸合成酶途徑 (FAS pathway)

Fatty acid synthase (FAS) 合成途徑為一般生物合成之脂肪酸的主要路徑, 其最終產物為 C16 長鏈飽和脂肪酸。C16 長鏈飽和脂肪酸可再經由脂肪酸延長酶 (elongase) 及去飽合酶 (desaturase) 催化過程進行脂肪酸延長及去飽合以合成 PUFA, 不飽合脂肪酸的長度為 C18–C22, 其間需有 C16, C18 及 C20 延長酶的參與。而去飽合酶則主要有 $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 8$, $\Delta 9$, $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 去飽合酶等數種, 其中人類因不含 $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 飽合酶, 因此無法合成 $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 脂肪酸。過程為 C16 長鏈飽和脂肪酸 (C16:0) 先經由 C16 elongase 將脂肪酸延長為 C16:0 FA, 再經由 $\Delta 9$ desaturase 將其轉換為 C18:1 ^{$\Delta 9$} , 接著再以 $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 飽合酶, 將其轉換為 linoleic acid (LA, C18:3, $\omega 3$)。該產物則再經由 C18 及 C20 elongase 及 $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 8$ desaturase 等作用將其轉換為 Arachidonic acid (ARA, C20:4, $\omega 6$), Eicosatetraenoic acid (ETA, C20:4, $\omega 3$), DHA, EPA 等 PUFA (圖二)。



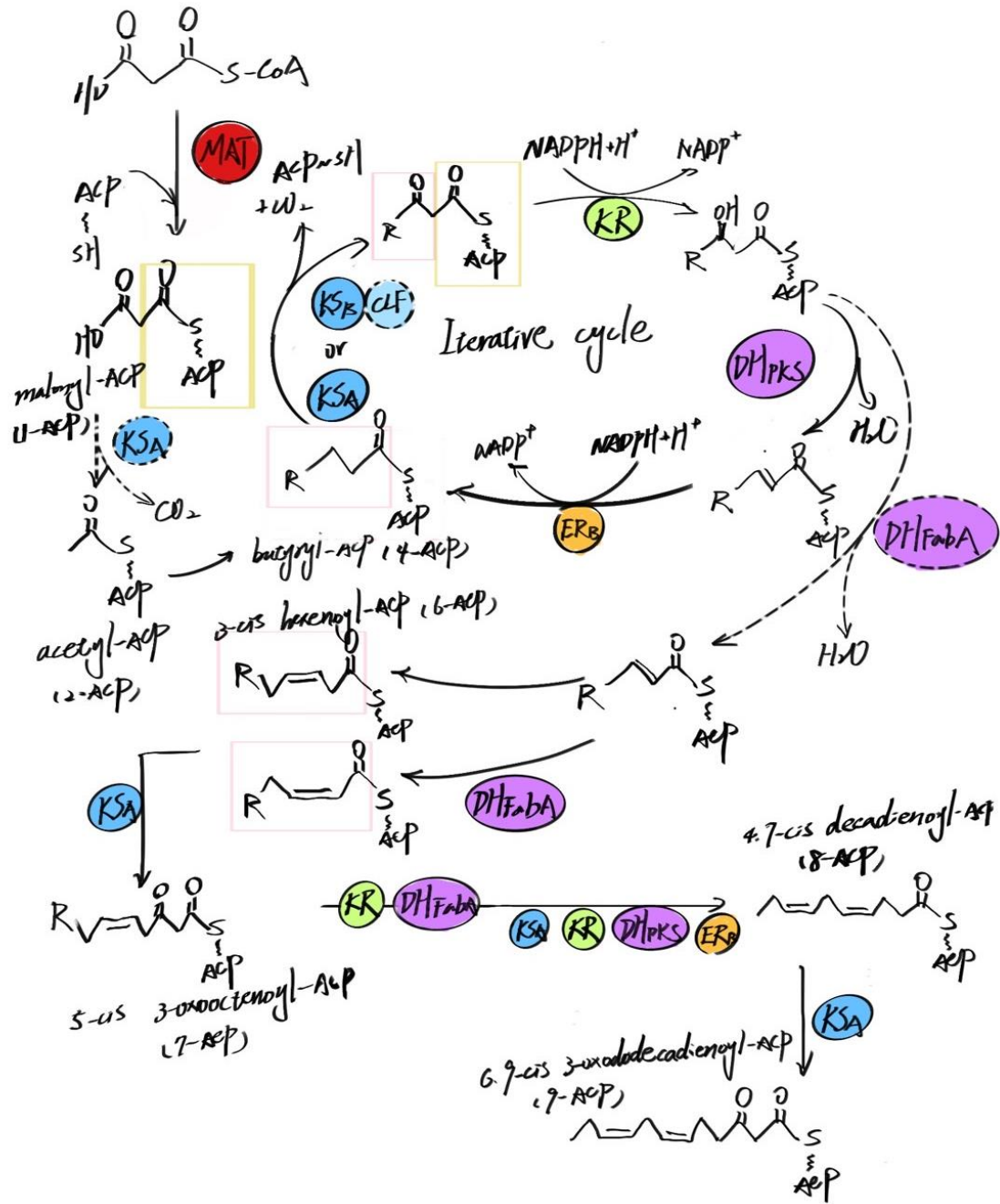
圖二、Fatty acid synthase (FAS) 合成途徑

圖中包含了脂肪酸合成酶途徑各個過程之結構、脂肪酸名稱以及其涉及的酵素。不同類型的酵素以不同顏色做為區別，紅色虛線所涉及之酵素為延長酶，黑色實線為去飽和酶，藍色實線為過氧化氫體中的脂肪酸 β 氧化作用 (β oxidation)，淡咖啡色實線為長鏈醯輔酶 A 脫氫酵素。最終產物 DHA，即二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic Acid) 以藍色標示。

註：引用自 (Song et al., 2018) 的結果圖六，並進行重製。

3-2 多元不飽合脂肪酸合成酶途徑 (PUFAs pathway)

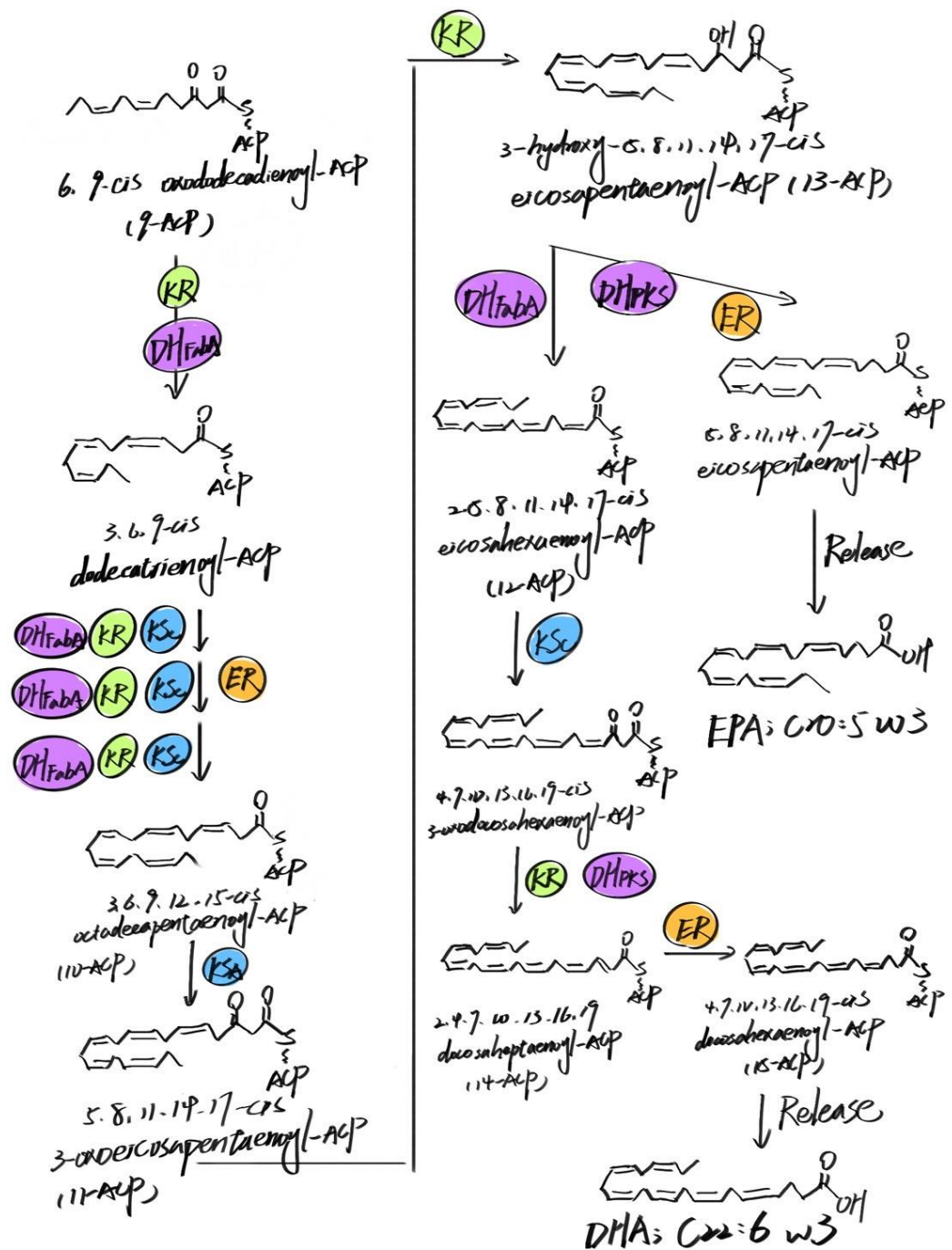
PUFAs 途徑為部份原核生物，真菌及原生生物合成 PUFA 的特殊途徑，其具有較高的 PUFA 合成效率。該路徑為聚酮合酶 (Polyketide Synthases, 簡稱為 PKS) 相似路徑，主要酵素 PUFAsA, B 及 C, 合成時受質和 FAS 途徑一樣為 malonyl-CoA, 和 FAS 途徑不同的是 PUFAs 途徑無需氧氣參與雙鍵形成，另外該途徑最終產物在破囊壺菌中為 DHA 及 EPA, 不含其它的 PUFA (圖三、四) (Guo et al., 2022; Hayashi et al., 2019)。



圖三、多元不飽和脂肪酸合成酶途徑 (PUFAs pathway)

該圖解釋了多元不飽和脂肪酸合成酶由 malonyl-CoA 至多元不飽和脂肪酸之合成過程。本圖顯示由 PUFAs-A 所負責的前半段路徑，由 malonyl-CoA 至 9-ACP 碳鏈延長及雙鍵形成之過程。後續過程請見圖四。

註：引用自 (Hayashi, 2019) 的結果圖二，並進行重製。



圖四、多元不飽和脂肪酸合成酶途徑 (PUFAs pathway)

該圖解釋了多元不飽和脂肪酸合成酶由 9-ACP 至最終產物 DHA 之合成過程。本圖為接續圖三之後續過程，該路徑的後半段由 PUFAs-B 及 C 所負責，將 9-ACP 進行碳鏈延長及雙鍵形成至 DHA。

註：引用自 (Hayashi, 2019) 的結果圖二，並進行重製。

貳、研究方法與流程

一、研究方法

資料來源及基因組基本資訊的蒐集

本研究針對八個不同破囊壺菌物種進行了基因組基本資訊調查。這些物種包括：*Hondaea fermentalgiana* CCAP_4062/3、*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304、*Thraustochytrium* sp. TN22、*Thraustochytrium striatum* ATCC 24473、*Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381、*Schizochytrium aggregatum* ATCC 28209、*Schizochytrium* sp. TIO01 及 *Parietichytrium* sp. I65-24A。為獲取這些破囊壺菌物種的基因組基本資訊，我們自 NCBI 資料庫 (National Center for Biotechnology Information) 進行關鍵字搜尋以取得各個物種的基因組資訊，並將每個物種的基因組資訊從 NCBI 資料庫下載，包括基因組序列、注釋資訊、大小等。在獲得每個破囊壺菌物種的基因組大小資訊後，我們也進行了基因組大小的比較分析。

產油相關泛基因組序列蒐集

我們從 DDBJ (DNA Data Bank of Japan) 下載了 Ishibashi 等人發表的 *Aurantiochytrium limacinum* 的蛋白質序列，作為我們的參考序列 (query)。接著，使用 TBLASTN 程式，將蒐集來的 *A. limacinum* 產油基因序列 (如 PUFA synthase、去飽合酶、延長酶和檸檬酸裂解酶等) 為 query，在其他破囊壺菌的基因組中進行搜尋，以尋找與這些目標基因相似的序列。搜尋結果中，我們使用自行編寫的 Python 程式篩選出了與目標基因相似的 DNA 序列，然後搭配 FGENESH+ 軟體從這些 DNA 序列中預測蛋白質序列，最後使用 Snapgene 程式將基因結構繪製出。

蛋白質功能域識別

利用軟體 motif search 進行蛋白質功能域識別。我們採用 PFAM 資料庫，以確認蛋白質的功能域。首先，使用軟體 motif search，勾選 PFAM 資料庫，對目標蛋白質序列進行功能域搜尋。在 PFAM 資料庫中搜索蛋白質序列的功能域，以確定特定功能域的存在。提取和記錄已確認的功能域及其位置信息，以供後續的分類和功能分析使用。

親緣關係樹分析與分群

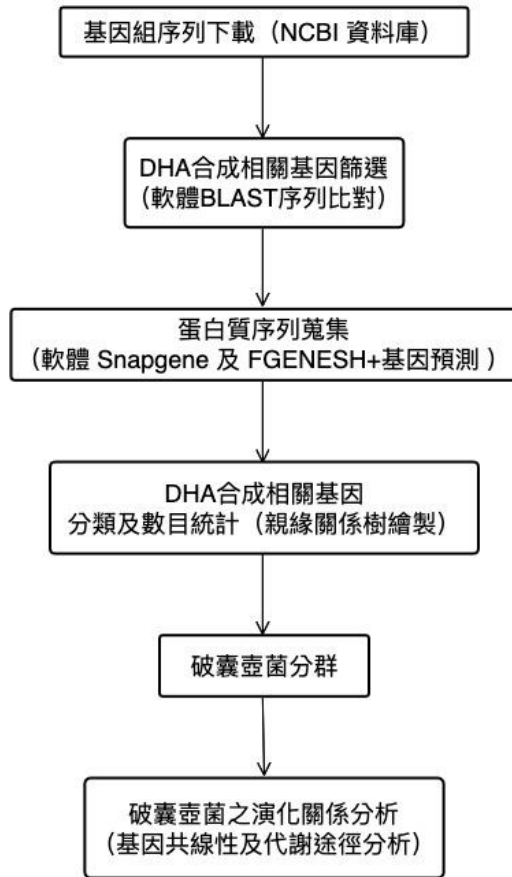
使用 PHYLIP 軟體製作親緣關係樹並進行物種分群。首先，使用 MAFFT 軟體對蛋白質序列進行多重序列比對 (multiple sequence alignment)。接著，利用 PHYLIP bootstrap 進行 1000 次重複抽樣，以生成一系列具有不同資料集的重複樹 (duplication trees)。使用 PHYLIP 中的 PRODIST 程式，計算每個重複樹的距離矩陣。使用 NJ method (鄰接法) 將每個距離矩陣轉換為 1000 棵親緣關係樹。得到 1000 棵親緣關係樹後，將這些樹與最初的模板樹使用 BOOSTER 軟體生成一致性樹 (Consensus Tree)。最後，使用網頁 iTOL 將一致性樹之各分支 bootstrap value 繪製於上。

二、研究流程

前人研究中，發現 DHA 的產量和 FAS 及 PUFAs 途徑的存在與否具有相關性，具有 PUFAs 途徑的菌種會有較高之產油率，因此根據合成 DHA 的途徑和機制將破囊壺菌分為三種：Type I，僅透過 PUFAs 途徑 (多元不飽和脂肪酸合成酶樣蛋白) 合成 DHA，如 *A. limacinum*；Type II，同時擁有 PUFAs 和 FAS 途徑，如 *T. aureum*；Type III，只透過 FAS 途徑合成 DHA，如 *Parietichytrium sp.*。

該研究中只以 3 種破囊壺菌進行研究，並且沒有深入探討這三型破囊壺菌之產油基因之間的差異，因此在本研究中我們將以生物資訊分析 8 種破囊壺菌之產油基因，以求更進一步了解破囊壺菌之產油機制及其相互之親緣關聯性 (圖五)。主要方法步驟如下：

1. 基因組序列下載：使用 NCBI 及 JGI 數據庫，獲取破囊壺菌的基因組序列、蛋白質資料和轉錄體數據。
2. 產油相關基因之序列獲取：使用生物資訊工具如 BLAST，對破囊壺菌的基因組和轉錄體進行分析，識別 DHA 合成途徑相關基因在基因組之可能序列。
3. 基因預測和注釋：以軟體 Snapgene 及 FGENESH+ 進行基因組序列進行基因預測，以獲得產油基因之 mRNA 及蛋白質序列。
4. 親源關係分析：以親源演化樹及基因共線性分析產油基因之分類及可能之演化關係。



圖五、研究方法流程圖

此圖顯示了研究的流程，一開始先從 NCBI 資料庫下載破囊壺菌的基因組序列資料，為進一步的分析提供原始資訊。接著，使用 BLAST 序列比對軟體，篩選出跟 DHA 合成相關的基因序列，以進一步深入研究。利用 Snappgene 和 FGENESH+ 軟體，蒐集並預測篩選得到的基因序列的蛋白質序列。序列分析 DHA 合成相關基因，同時建立親緣關係樹，以進一步的分類和數目統計。進一步分析破囊壺菌的演化關係，包括基因共線性和代謝途徑分析，以深入了解它們之間的演化和功能關係。

參、研究結果與討論

一、研究結果

(一) 破囊壺菌基因組基本資訊調查

在本研究中，我們進行了八個不同破囊壺菌物種的基因組基本資訊調查，包含有 *H. fermentalgiana* CCAP_4062/3、*T. aureum* ATCC 34304、*T. sp.* TN22、*T. striatum* ATCC 24473、*A. limacinum* ATCC MYA-1381、*S. aggregatum* ATCC 28209、*S. sp.* TIO01 及 *P. sp.* I65-24A，這八個物種分別隸屬於 5 個不同的屬別。當對八個破囊壺菌物種的基因組基本資訊進行調查後，我們發現它們在基因組大小上存在相似性。大多數物種的基因組大小約在 40 Mb 左右，顯示它們在某種程度上有一定的基因組相似性。然而，也有一些例外，如 *A. limacinum* ATCC MYA-1381 與 *S. sp.* TIO01，其基因組明顯較大，為 62.1 Mb 和 64.9 Mb（表一）。約為其它基因組的 1.5 倍，然而因該兩物種為不同屬，顯示其基因組較大在演化上並無關聯性。

表一、八個破囊壺菌物種之基因組基本資訊調查

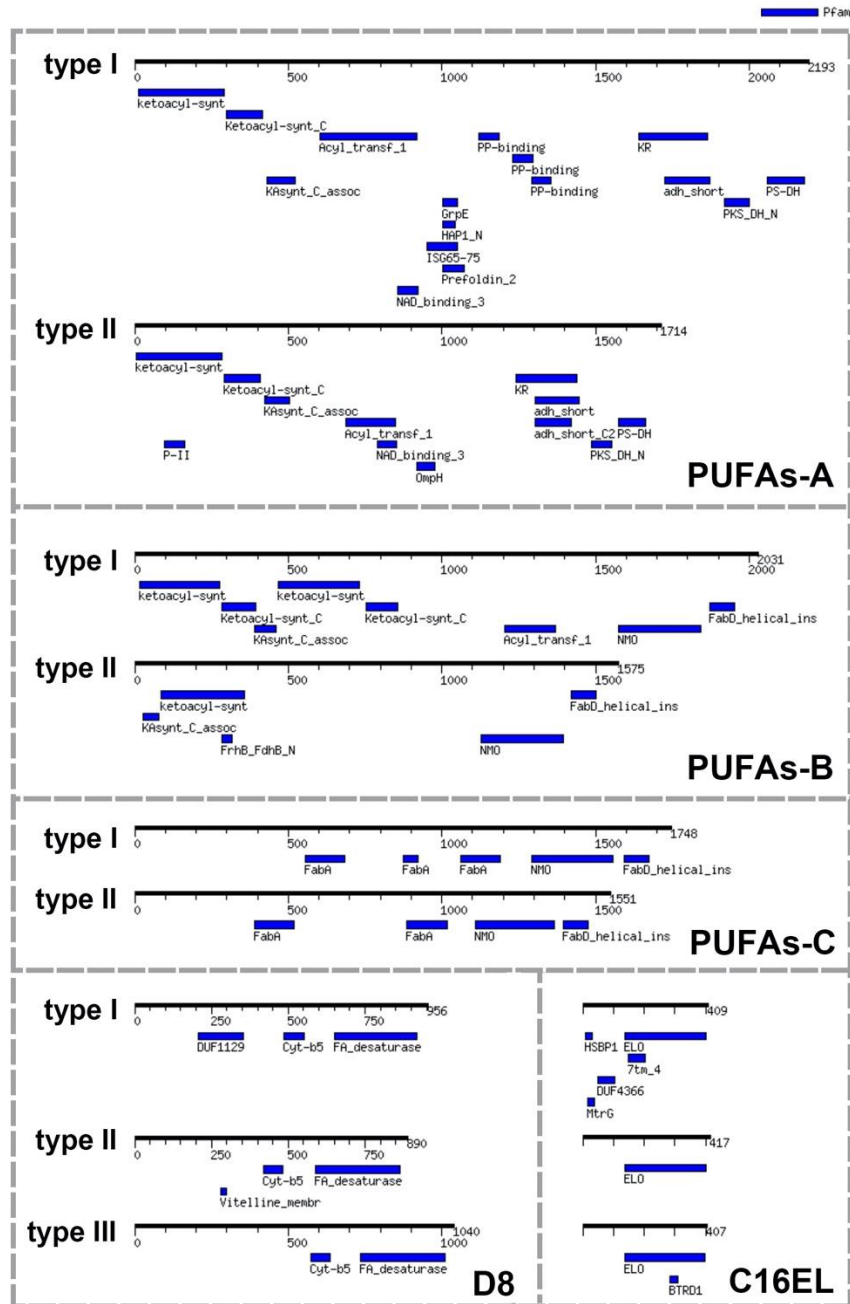
此基本資訊表包含有八個破囊壺菌物種之學名及其演化階層所隸屬的屬別，並檢附基因組檔案下載來源及基因組大小。

屬別	物種學名	來源	大小 (Mb)
<i>Hondaea</i>	<i>Hondaea fermentalgiana</i> CCAP_4062/3	JGI	39.7
<i>Thraustochytrium</i>	<i>Thraustochytrium aureum</i> ATCC 34304	NCBI	35.6
	<i>Thraustochytrium sp.</i> TN22	NCBI	40
	<i>Thraustochytrium striatum</i> ATCC 24473	NCBI	40
<i>Aurantiochytrium</i>	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> ATCC MYA-1381	JGI	62.1
<i>Schizochytrium</i>	<i>Schizochytrium aggregatum</i> ATCC 28209	JGI	41.7
	<i>Schizochytrium sp.</i> TIO01	NCBI	64.9
<i>Parietichytrium</i>	<i>Parietichytrium sp.</i> I65-24A	NCBI	43.9

(二) 泛基因搜尋破囊壺菌產油途徑之基因

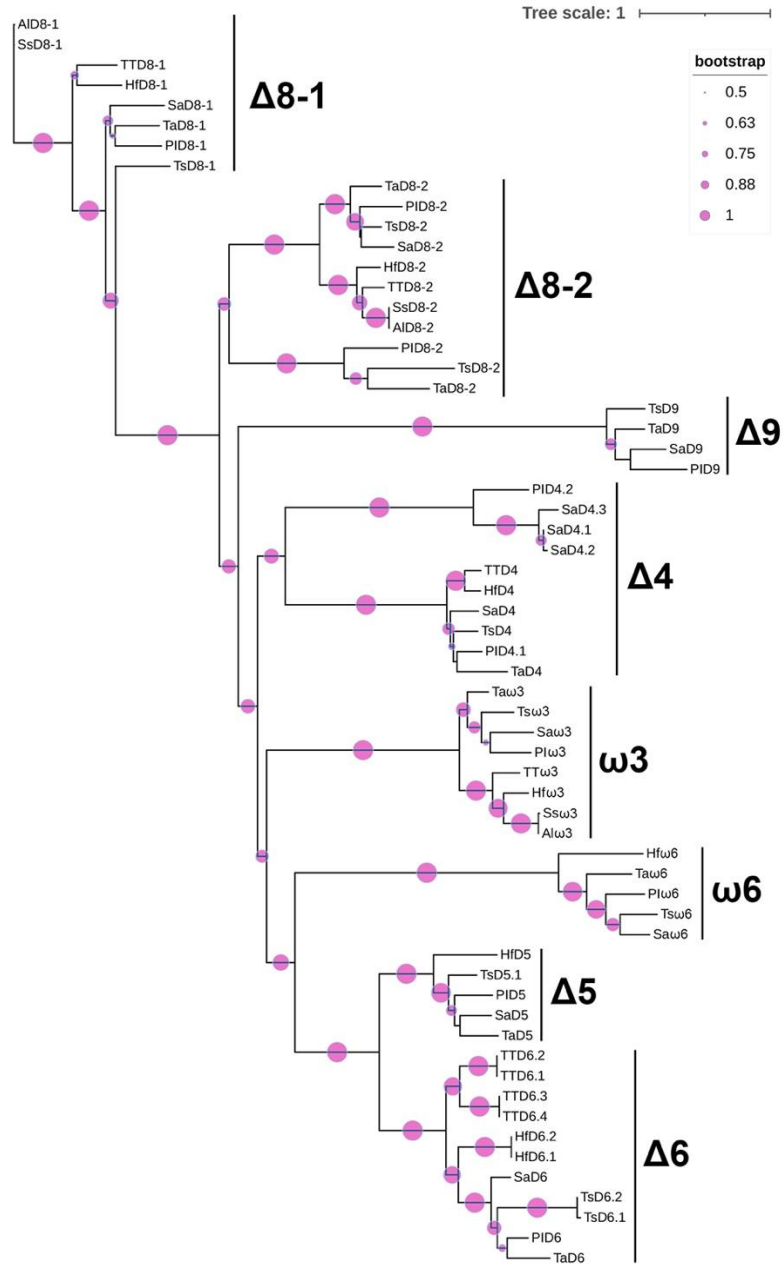
在前人的研究中，根據破囊壺菌之產油途徑將其分為三型，第一型為僅具有 PUFAs 途徑，第二型為同時具有 PUFAs 及 FAS 途徑，第三型則僅具有 FAS 途徑。為了解破囊壺菌產油基因之差異，我們針對八種破囊壺菌之產油基因進行分析，其中包含了 PUFA synthase、去飽合酶、延長酶還有檸檬酸裂解酶進行分析，其中 PUFA synthase 為 PUFA 途徑相關基因，而去飽合酶及延長酶則為 FAS 途徑相關基因。PUFA synthase 基因包含 PUFAs A-C，去飽合酶則包含 $\Delta 4$ ， $\Delta 5$ ， $\Delta 6$ ， $\Delta 8$ ， $\Delta 9$ ， $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 等去飽合酶，而延長酶則包含 C16，C22 及 C22 等延長酶。

首先我們先以於 DDBJ 下載 Ishibashi 等人公佈之 *A. limacinum* 之產油基因序列，再以這些序列為 query，並以 TBLASTN 程式於基因組中搜尋這些基因之相似序列，最終以軟體預測出的蛋白質序列，將會以軟體 PFAM 進行最終蛋白質功能域確認，如 PUFAs-A 具有 ketoacyl-synt、Acyl_transf_1、NAD_binding_3、KR、adh_short、PKS_OH_N 及 PSDH；而 PUFAs-B 具有 ketoacyl-synt 及 FabD_heliical_ins；PUFAs-C 則具有 FabA、NMO 及 FabD_heliical_ins 等功能域。去飽合酶以各群皆具有的 D8-1 為例，會有 Cyt-b5 及 FA_desaturase 等功能域。延長酶以 C16 為例，會有一保守的 ELO 功能域（圖六）。確認蛋白質序列皆具有保守的功能域後再以演化樹進行分群，詳細方法請見材料與方法。結果顯示，破囊壺菌去飽合酶確實可被分為 $\Delta 4$ ， $\Delta 5$ ， $\Delta 6$ ， $\Delta 8$ ， $\Delta 9$ ， $\omega 6$ 及 $\omega 3$ 等七型去飽合酶（圖七），而延長酶則可被分為六型，包含 C16，C18 及 C20 及三型未知之延長酶（圖八）。在基因序列確認之後，我們依其所含基因將八個破囊壺菌進行分群（表二）以及基因數目統計。



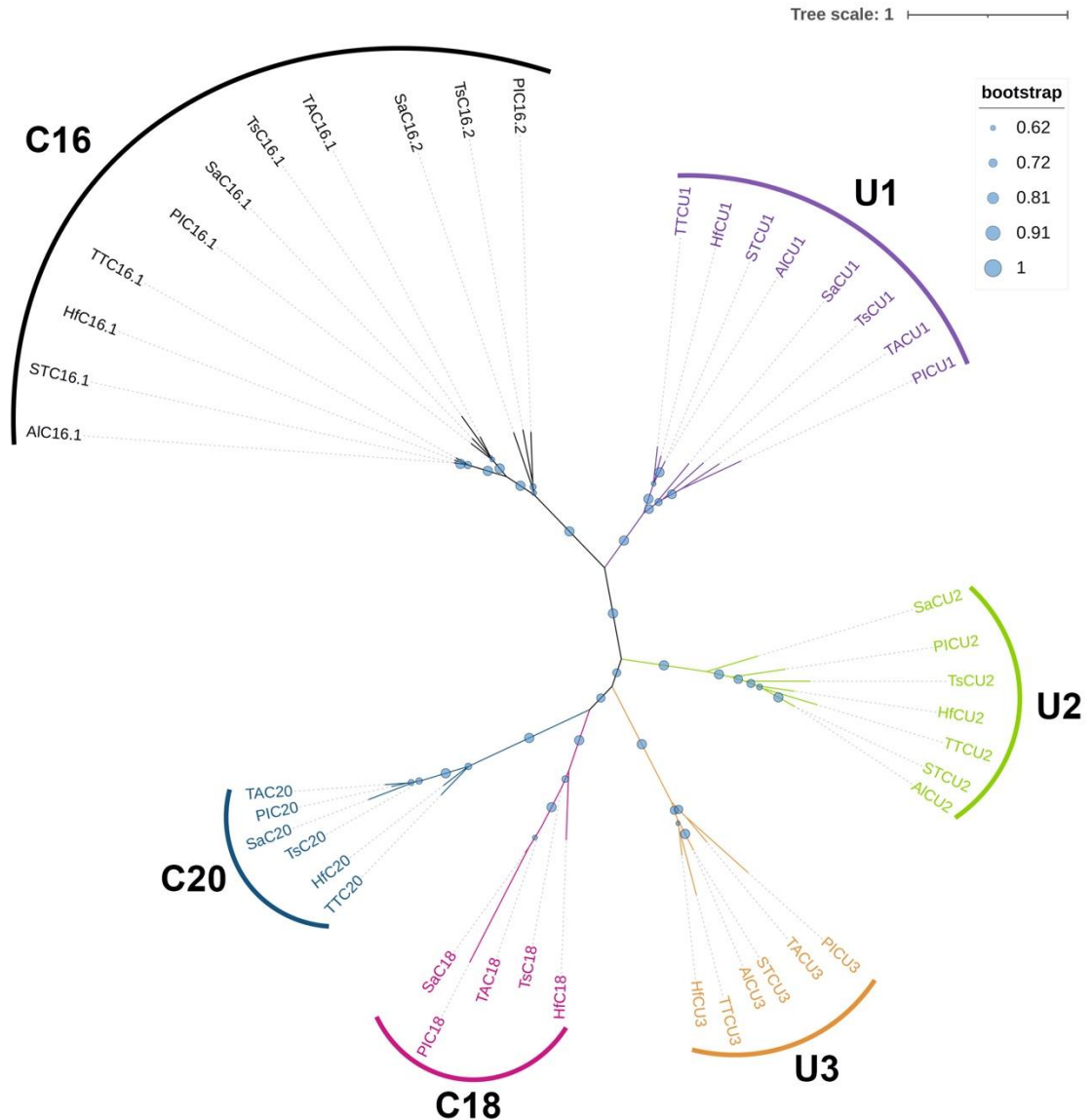
圖六、DHA 合成相關蛋白質序列之功能域分析

以三型之破囊壺菌各挑一物種，分別為 *A. limacinum*、*T. Aureum* 及 *T. striatum*。使用軟體 motif search 進行 DHA 合成相關蛋白質序列之各區保守性功能域分析。圖中為 PUFAs A–C、去飽和酶 (D8-1) 及延長酶 (C16EL) 共 12 條序列之所得結果。左邊標示有各序列之基因名。以 Pfam 資料庫進行預測之各序列所含功能域以藍色方塊顯示於序列下方，序列長度依比例繪製並標示於下方，總長度則標示於序列後方。



圖七、去飽和酶親緣關係樹分析

分析序列來自於 8 個破囊壺菌物種之所有去飽和酶。演化樹為先以軟體 MAFFT 進行多重序列排序，再以鄰接法建構此無根樹。各群去飽和酶以黑色垂直實線及文字標示於右方中，比例尺表示演化距離，不同大小的粉紅圓點為重複 1000 次所得的 bootstrap value，0.5 以下不顯示。



圖八、延長酶親緣關係樹分析

延長酶的無根親緣關係樹分析，使用了來自 8 個破囊壺菌物種的所有延長酶序列。分析的流程包括多重序列排序，其中我們使用了 MAFFT 軟體，然後利用鄰接法建構了這棵無根親緣關係樹。在演化樹中，不同的延長酶群以不同顏色的分支標示，並以實線和文字標示在外側。比例尺顯示了演化距離，不同大小的藍色圓點代表了 1000 次的 bootstrap value。我們僅在 bootstrap value 高於 0.62 的節點上標示。

(三) 破囊壺菌之分類及產油基因數目分析

第一類 (Type I) 的破囊壺菌, 包括 *H. fermentalgiana*、*T. sp. TN22*、*S. sp. TIO01* 和 *A. limacinum*。這些破囊壺菌擁有完整的 PUFAs 合成途徑相關基因, 包括 PUFAs-A、PUFAs-B 及 PUFAs-C。然而, 值得注意的是, 它們缺少某些脂肪酸合成酶 (FAS) 基因, 如 desaturase ($\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 9$ 、 $\omega 6$) 和 elongase (C18EL、C20EL)。此外, 它們也缺少檸檬酸裂解酶 (Citrate lyase, CL)。

第二類 (Type II) 的破囊壺菌只有 *T. aureum*, 其具有完整的 PUFAs 合成途徑, 同時也擁有 FAS 基因, 包括 desaturase ($\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 8$ 、 $\Delta 9$ 、 $\omega 6$ 及 $\omega 3$) 和 elongase (C16EL、C18EL、C20EL)。此外, 它們擁有檸檬酸裂解酶。

第三類 (Type III) 的破囊壺菌包括 *P. sp. I65-24A*、*S. aggregatum* 和 *T. striatum*。這個類別的破囊壺菌缺少 PUFAs 合成途徑相關基因, 但具有完整的 FAS 基因, 包括 desaturase ($\Delta 4$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 8$ 、 $\Delta 9$ 、 $\omega 6$ 及 $\omega 3$) 和 elongase (C16EL、C18EL 及 C20EL)。同時, 它們也擁有檸檬酸裂解酶 (表二)。

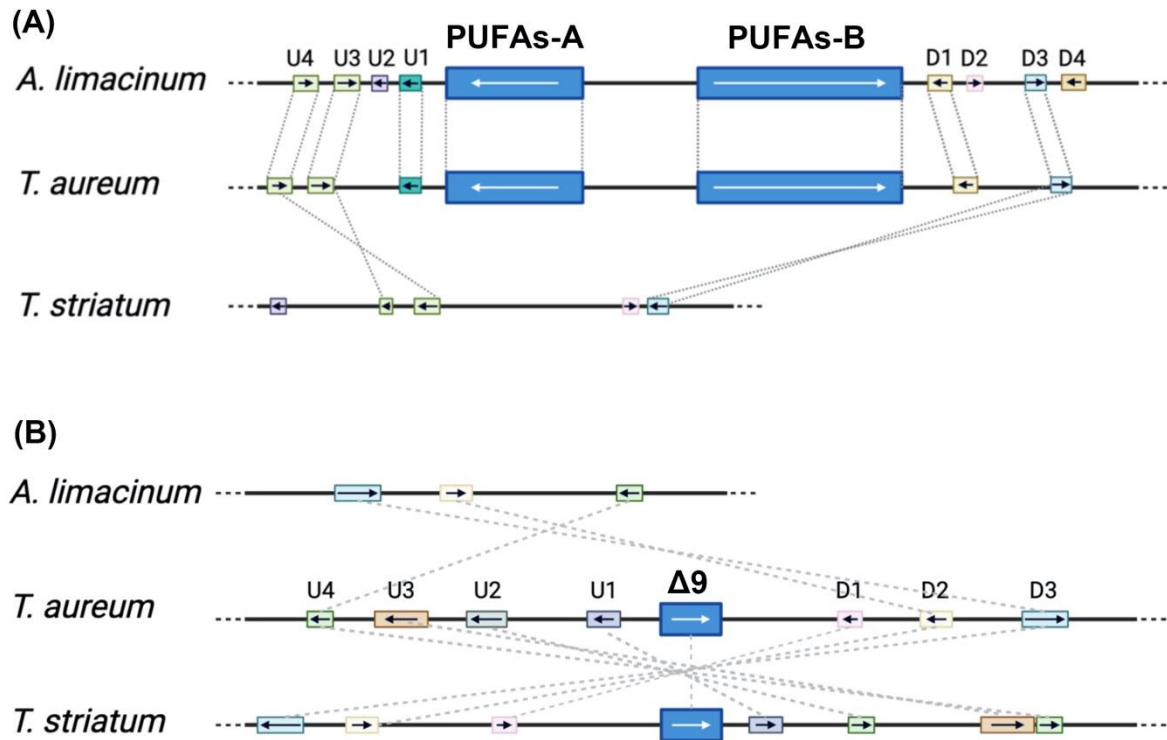
表二、FAS 與 PUFAs 合成脂肪酸途徑之基因數目統計

PUFAs 合成途徑基因包括 PUFAs-A, PUFAs-B, PUFAs-C 與 PUFAs-E。FAS 合成途徑包含了去飽和酶 (Desaturase)、延伸酶 (Elongase)。基因數目是自 NCBI 下載的基因組資料庫中比對搜尋後確定的。CL 為檸檬酸裂解酶 (citrate lyase)。

物種	PUFAs			FAS									CL	
				Desaturase						Elongase				
	A	B	C	$\Delta 4$	$\Delta 5$	$\Delta 6$	$\Delta 8$	$\Delta 9$	$\omega 6$	$\omega 3$	C16	C18		C20
Type I														
<i>Hondaea fermentalgiana</i>	1	1	1	1	0	2	2	0	1	1	4	1	1	0
<i>Thraustochytrium sp. TN22</i>	1	1	1	1	0	2	2	0	1	1	4	1	1	0
<i>Schizochytrium sp. TIO01</i>	1	1	1	0	0	0	2	0	0	1	4	0	0	0
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	1	1	1	0	0	0	2	0	0	1	4	0	0	0
Type II														
<i>Thraustochytrium aureum</i>	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	3	1	1	1
Type III														
<i>Parietichytrium sp. I65-24A</i>	0	0	0	2	1	1	3	1	1	1	3	1	1	1
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	0	0	0	3	1	1	2	1	1	1	4	1	1	1
<i>Thraustochytrium striatum</i>	0	0	0	1	1	1	3	1	1	1	4	1	1	1

(四) 破囊壺菌產油相關基因共線性分析

通過共線性分析可發現 PUFAs-A 與 B 基因組片段在 Type I 和 Type II 破囊壺菌物種中顯示保守的共線性。而 Type III 菌株雖然缺乏 PUFAs-A 與 B，但其基因組序列仍然與 Type III 的基因組具有一定的基因共線性。此外，我們也觀察到 PUFAs-A 和 PUFAs-B 基因緊密相鄰（圖九、A）。而 $\Delta 9$ 去飽和酶基因組片段則在 Type II 和 Type III 菌株中顯示明顯的共線性。Type I 菌株雖然缺乏 $\Delta 9$ 去飽和酶和 citrate lyase，但其基因組序列仍然與其他兩類型的基因組具有一定的基因共線性（圖九、B）。



圖九、三型破囊壺菌 PUFAs-A 與 B 以及去飽和酶 $\Delta 9$ 之基因共線性分析

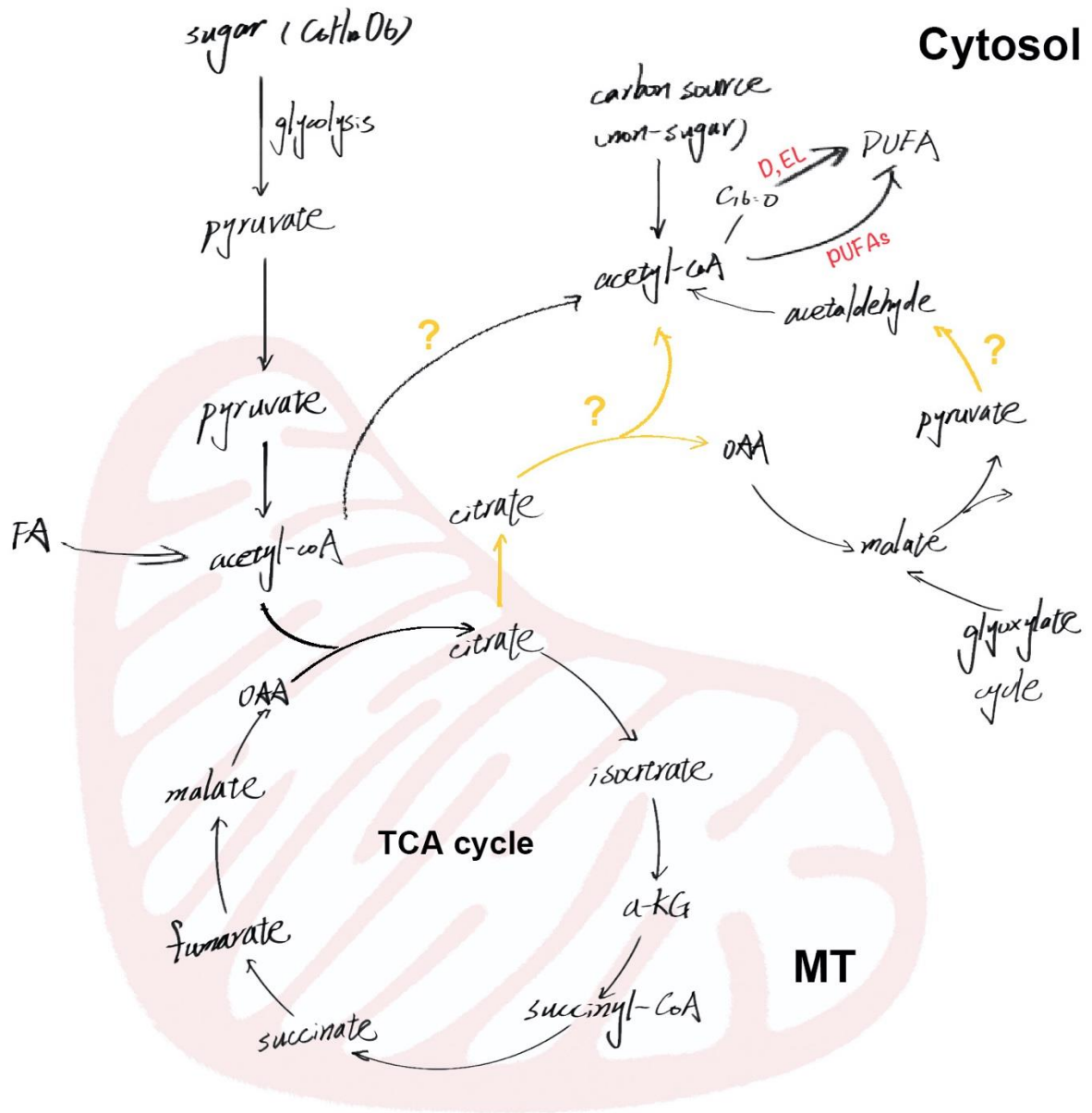
(A) 不同顏色之長方形代表不同的基因，內部箭頭為基因方向性，跨物種同源之基因以灰色虛線相連。上游鄰近基因以“U”表示，下游鄰近基因則以“D”表示，越靠近 PUFAs-A 與 B 的鄰近基因其編號越小，以 *A. limacinum* 之 PUFAs-A 與 B 的上、下游各取 4 個鄰近基因 (U1-U4, D1-D4)，共 8 條進行比對。

(B) 相同顏色之長方形代表相同的基因，內部箭頭為基因方向性，跨物種同源之基因以灰色虛線相連。上游鄰近基因以“U”表示，下游鄰近基因則以“D”表示，越靠近

PUFAs-A 與 B 的鄰近基因其編號越小，以 *T. striatum* 之 $\Delta 9$ 的上游取 4 個鄰近基因 (U1-U4) ，而下游取 3 條鄰近基因 (D1-D3) ，共 7 條進行比對。

二、討論

破囊壺菌為藻油的重要來源，為提高其產油量，科學家會藉由篩選高產油株、改變培養條件或是基因轉殖工程以提高其產油率，因此了解破囊壺菌之產油機制對提高其產油率極為重要。本研究透過比較破囊壺菌之產油基因，發現同型之破囊壺菌雖來自不同屬，但其產油基因組成極為相似。Type I 為僅有 PUFA 途徑之菌株，其最大之共通點為不具有 $\Delta 9$ 去飽和酶，該酵素為 FAS 途徑中第一個去飽和酶，顯示缺乏該酵素之菌株將無法透過 FAS 途徑產油，然而 Type I 菌株仍具有部份之去飽和酶，如 *A. limacinum* 及 *S. sp. T1001* 含有 $\Delta 8$ 和 $\omega 3$ 去飽和酶，而 *H. fermentalgiana* 和 *T. sp. TN22* 則含有 $\Delta 6$, $\Delta 8$, $\omega 6$ 和 $\omega 3$ 去飽和酶，該結果顯示 Type I 菌株雖無法使用 FAS 途徑產生 PUFA，但其仍保有部份之酵素，這些酵素可能是用來產生其它較少雙鍵之不飽和脂肪酸，或是將由食物中攝取之脂肪酸轉變為不飽和脂肪酸。Type I 菌株的另一特點為不含有檸檬酸裂解酶 (citrate lyase)，該酵素之功能為將細胞質中之檸檬酸 (citrate) 轉換為草醯乙酸 (Oxaloacetate, OAA) 及 acetyl-CoA，因此若缺乏此酵素，細胞將無法提供 acetyl-CoA 做為合成 PUFA 之碳源。破囊壺菌培養之培養基，主要以葡萄糖為碳源，葡萄糖會經由糖解作用變成丙酮酸並進入粒線體，丙酮酸在粒線體中會經由脫羧作用變為 acetyl-CoA，而 acetyl-CoA 無法自由進出粒線體，僅能透過和 OAA 結合變為 Citrate 才能離開粒線體進入細胞質，因此 Type I 菌株應具有其它將 Citrate 轉換為 acetyl-CoA 之途徑。我們有確認過 Citrate 運送蛋白在所有菌株中都存在，顯示 Citrate 在 Type I 菌株中仍可以由粒線體中被運送至細胞質，然而目前並無報導顯示有其它酵素可將 citrate 裂解為 OAA 及 acetyl-CoA，所以該想法仍有待証實。此外，在部份報導中，提及肉鹼 (carnitine) 可將 acetyl-CoA 運送至細胞質，因此不排除 Type I 菌株可能直接使用肉鹼將 acetyl-CoA 運送至細胞質 (圖九)。



圖九、破囊壺菌脂肪酸代謝途徑。

圖中包含了糖解作用、克氏循環及脂肪酸合成酶路徑 (FAS pathway) 和多元不飽合脂肪酸合成酶路徑 (PUFAs pathway)。FA 為脂肪酸 (fatty acid)，OAA 為草醯乙酸 (oxaloacetate)，D 為去飽和酶 (desaturase)，EL 為延長酶 (elongase)。MT 為粒線體。黃色箭頭及問號代表了目前尚未確認之 Type I破囊壺菌可能之碳源途徑。

共線性分析顯示 $\Delta 9$ 去飽和酶及 citrate lyase 基因組片段在 Type II 及 Type III 菌株中具有共線性，而 Type I 菌株雖不具有 $\Delta 9$ 去飽和酶及 citrate lyase，但該區段基因組序列仍和其它兩類型基因組具有基因共線性。此外 *PUFAs-A* 及 *PUFAs-B* 為相鄰基因，其所在基因組位置在三型菌株中也具有共線性，該結果顯示這些菌株具有共同祖先，而該共同祖先可能為不具有 PUFAs 途徑之菌株，也就是 Type III 菌株，因為有報導顯示 PUFAs 基因應是透過水平轉移而來。因此當共同祖先獲得 PUFAs 基因後，因該途徑之效率較高，因此在 Type I 菌株中，逐漸將 FAS 途徑相關基因丟失，而 citrate lyase 的缺失也有可能是因為該型菌株想要透過更有效率之方式以獲得 acetyl-Coa。然而分析中也顯示同屬菌株可能同時含有各型之菌株，如 *Thraustochytrium* 含有三型菌株，而同型菌株中卻又同時存在不同屬之菌株，如 Type I 含有四個屬之菌株，若以演化觀點而言，該結果並不合理，因為演化應該具有連續性，同型之菌株應具有較高的演化關聯性，而不該以跳躍式的方式出現在各屬之中。檢視文獻顯示，破囊壺菌之鑑種多以 18s RNA 分析進行分子鑑種，而破囊壺菌多樣性頗豐，因此使用單一基因進行破囊壺菌鑑種是否可行仍有待商榷。

肆、結論與應用

一、結論：

破囊壺菌為藻油重要來源，如何提升其產油率為研究重要課題。基因組分析不僅可以幫助我們更加了解其產油機制，以期將其應用在未來基因工程，也可以讓我們更加了解破囊壺菌之演化過程以及各屬菌株之關聯性。

二、應用：

(一)、破囊壺菌產油株的篩選：破囊壺菌的產油率與脂肪酸比例和產油相關基因之間有相互關聯，尤其是去飽和酶、延長酶和多元不飽合脂肪酸合成酶基因，這些基因的存在與否除了可用來推測菌株之產油率及其脂肪酸比例，未來也可應用在以序列鑑定快速評估不同破囊壺菌株的油脂產生能力。

(二)、破囊壺菌之物種鑑定：破囊壺菌具有物種多樣性，分子鑑種可快速辨別不同來源之破囊壺菌株，考慮到單獨使用 18s rRNA 在鑑定破囊壺菌物種方面的不足，產油基因在各型破囊壺菌中相對保守，可作為輔助分子鑑種的工具。

(三)、以基因工程增加產油率或控制特定脂肪酸比例：傳統上，提高破囊壺菌產油率通常透過人工誘變產生的突變株來實現。這種方法雖可提高產油率但無法控制特定脂肪酸比例。如剔除 $\omega 3$ 可特定生產 $\omega 6$ 脂肪酸或 Type I 菌株可透過轉殖 Citrate lyase 增加其碳源以提高產油量。因此透過遺傳工程進行菌種改良，不僅可提高產油率，也可達到精準控制特定脂肪酸比例之目的。

伍、參考文獻

- 吳淑姿 (2002) 。海洋單細胞真菌 - Schizochytrium sp. S31 生產多元不飽和脂肪酸 - DHA, 博士論文, 臺灣大學。
- 蔡喬筑 (2000) 。台灣北部沿海地區破囊壺菌科形態、分類學之研究, 碩士論文, 臺灣師範大學。
- 陳逸民 (2012) 。破囊壺菌。 *科學發展月刊*, 480 期, 53-57。
- Abdel-Wahab, M. A., El-Samawaty, A. E. M. A., Elgorban, A. M., and Bahkali, A. H. (2021). Fatty acid production of thraustochytrids from Saudi Arabian mangroves. *Saudi journal of biological sciences*, 28(1), 855–864.
- Bennett, R. M., Honda, D., Beakes, G. W., and Thines, M. (2017). “Labyrinthulomycota,” in Handbook of the Protists, eds J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, C. H. Slamovits, L. Margulis, M. Melkonian, D. J. Chapman, et al. (*Cham: Springer International Publishing*), 1–36.
- Guo, P., Dong, L., Wang, F., Chen, L., and Zhang, W. (2022). Deciphering and engineering the polyunsaturated fatty acid synthase pathway from eukaryotic microorganisms. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 1052785.
- Hayashi, S., Naka, M., Ikeuchi, K., Ohtsuka, M., Kobayashi, K., Satoh, Y., Ogasawara, Y., Maruyama, C., Hamano, Y., Ujihara, T., and Dairi, T. (2019). Control Mechanism for Carbon-Chain Length in Polyunsaturated Fatty-Acid Synthases. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 58(20), 6605–6610.
- Ishibashi, Y., Goda, H., Hamaguchi, R., Sakaguchi, K., Sekiguchi, T., Ishiwata, Y., Okita, Y., Mochinaga, S., Ikeuchi, S., Mizobuchi, T., Takao, Y., Mori, K., Tashiro, K., Okino, N., Honda, D., Hayashi, M., and Ito, M. (2021). PUFA synthase-independent DHA synthesis pathway in *Parietichytrium* sp. and its modification to produce EPA and n-3DPA. *Communications biology*, 4(1), 1378.
- Lyu, L., Wang, Q., and Wang, G. (2020). Cultivation and diversity analysis of novel marine thraustochytrids. *Marine life science and technology*, 3(2), 263–275.
- Morabito, C., Bournaud, C., Maës, C., Schuler, M., Aiese Cigliano, R., Dellerio, Y., Maréchal, E., Amato, A., and Rébeillé, F. (2019). The lipid metabolism in thraustochytrids. *Progress in lipid research*, 76, 101007.

Qiu X. (2003). Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 68(2), 181–186.

Song, Z., Stajich, J. E., Xie, Y., Liu, X., He, Y., Chen, J., Hicks, G. R., and Wang, G. (2018). Comparative analysis reveals unexpected genome features of newly isolated Thraustochytrids strains: on ecological function and PUFAs biosynthesis. *BMC genomics*, 19(1), 541.

【評語】 070003

本研究使用生物資訊的軟體工具，分析 8 種破囊壺菌的產油相關基因，期能增加對破囊壺菌產油機制的了解，也可為可作為分子鑑種的輔助工具，是以具有學術性。然而，本研究雖已有初步的比對分析結果，也能依產油基因差異將破囊壺菌分成三型，但未能回答核心問題，包括：(1) 菌種之產油量到底受那些基因或哪些基因變異的影響？(2) 同一型的破囊壺菌之間，其產油量會相同嗎？若不相同，可能原因為何？(3) 產油量與菌株的演化有何相關性？

建議作者應收集 8 種破囊壺菌的產油量與產油種類實際資料，再與基因分析結果作一比對，或許能從中一窺核心問題的答案。