

# 2012 年美國微生物學會 “念珠菌與念珠菌病” 研討會記事

張德斌

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

## 前 言

念珠菌是引發侵入性黴菌感染主要的病原菌，影響所及包含了愛滋病患者、早產兒、住院病患等等，而又因抗黴菌藥物的使用量逐漸增加，使得具抗藥性的念珠菌菌株隨之加增，也引起基礎研究與臨床醫學上高度重視。除了抗藥性之外，以念珠菌為主題的研究群也日益增多，有鑑於此，美國微生物學會於每兩年召開一次的會議，提供一個黴菌研究學者直接交換目前最新的進展與溝通思路想法的平台，包含的層面從臨床面臨的問題、寄主反應、甚至到分子機制的調控，有助於瞭解念珠菌感染的現況與促進相關基礎研究的交流。

筆者於 2012 年 3 月 29 日至 4 月 2 日，參加於美國加州舊金山 (San Francisco, California) 所召開的第 11 屆大會美國微生物學會舉辦“念珠菌與

念珠菌病”研討會 (11<sup>th</sup> ASM Conference on *Candida* and Candidiasis)。此次為期五天的研討會，共有超過 400 位的研究學者參與，有將近 100 場的演講與 220 篇的海報展示。分為 11 個領域，分別為環境訊息傳遞與調節 (environmental signaling and regulatory networks)、系統與系統生物學 (systematic and systems biology)、抗黴菌藥物與抗藥性 (antifungal agents and resistance)、黴菌細胞表面研究 (The yeast cell surface)、免疫辨認與反應 (immune recognition and response)、致病因子與活體生長 (virulence factors and growth *in vivo*)、疫苗與寄主反應 (vaccines and host response)、寄主的訊息傳遞與適應 (signaling and adaptation to the host)、細胞週期、型態與發育 (cell cycle, morphology and development)、生物膜與微生物群落 (biofilms and microbial communities)、

演化基因體學 (the evolving genome) 等各領域，呈現了在念珠菌領域研究學者的各種多樣性。

此次大會由主辦人 Dr. Scott Filler (Harbor UCLA Medical Center) 揭開序幕，說明此次會議的宗旨並對於各國學者與會表達感謝之意。以下，分享此次會議所獲得些日前於念珠菌研究上最新的進展：

### 白色念珠菌細胞黏附之調節

生物膜，由微生物細胞自身所產生的多醣包圍所形成，其對於不同介質的細胞黏附性亦有很大的差異性。因為矽樹脂 (silicone) 於醫療器材上的大量使用，Dr. Wu 與 Dr. Mitchell 於賓州匹茲堡卡內基美隆大學的團隊 (Carnegie Mellon University) 在兩場演講與一張海報展示的研究中皆提及新的技術對於研究上著實具有事半功倍的幫助。他們的團隊將研究目標放在白色念珠菌 (*Candida albicans*) 與矽樹脂之附著關係上，來探討細胞黏附表現基因的相互關係與基因網絡。他們利用突變篩選與定量細胞流動分析，確認了 30 個和細胞黏附性有關的轉錄因子，並藉由新技術—nanoString 基因表現的分析，比較這些轉錄基因的差異。其研究有兩個重要的發現：(1) 新功能：除了已知的與生物膜或細胞黏附有關的轉錄因子外，也發現一些特徵尚未分類的，例如與細胞表面黏合成相關因子，都和細胞黏附性有

高度的相關性。並發現除了已知調節細胞物質黏附進而影響生物膜附著的 Bcr1 之外，並發現另一調控基因 Ace2，除了具有調控生物膜附著的能力，亦是另一染色體重組因子 Snf5 的重要下游基因。除此之外，Bcr1 和 Ace2 同時也調控許多相同的基因，此研究由此發現此兩基因的高度相關性。(2) 基因網絡：由此研究發現另一和鋅離子反應相關的調控因子 Zap1，其調控生物膜基因網絡中另 11 個附著基因，並發現 Zap1 大約也調控了白色念珠菌細胞表面大約 1/4 的基因。除基因網絡的建立與連結，此研究的另一貢獻，讓我們有更明確的證據得知雖然上游基因的少許突變發生，對於下游的基因網絡卻具有廣泛的影響。

### 熱帶念珠菌表型轉換與有性生殖

白色念珠菌 (*C. albicans*) 長期以來都被視為行無性生殖的物種，但近期發現它是可行有性生殖的黴菌，控制其交配的基因座稱為 *MTL*，調控機制與酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 類似，*MTLa/MTLa* 細胞可與 *MTL $\alpha$ /MTL $\alpha$*  細胞交配，但 *MTLa/MTL $\alpha$*  則否。而其交配行為是由費洛蒙所調控的：*MTLa/MTLa* 細胞和 *MTL $\alpha$ /MTL $\alpha$*  細胞會分別分泌  $\alpha$  與  $\alpha$  費洛蒙，以利交配的發生。然而，念珠菌較酵母菌更為複雜，其細胞必須由不能行交配的 white cell 轉換成可行交配

的 opaque cell 型式後，才可進行。兩個二倍體的白色念珠菌交配後會產生四倍體，其後再經由染色體缺失 (chromosome loss) 的方式產生二倍體的子代。一般而言，此一途徑可由 Spo11 (在其他物種中與減數分裂有關的同源基因) 來調控，但在白色念珠菌中，目前沒有證據其可行正常的減數分裂。

就生物體而言，有性生殖是維持真核生物遺傳多樣性的重要機制，和白色念珠菌一樣，許多黴菌，是否含有無性與有性生殖的現象，依舊是未知。來自羅德島州布朗大學 (Brown University, Rhode Island) 的 Dr. Porman、Dr. Bennett 與其研究團隊，對於影響人類健康的重要病原黴菌之一——熱帶念珠菌 (*Candida tropicalis*) 的長期研究，在此次大會的報告中提出其具有“隱蔽”的有性生殖機制，他們發現其表型就像是一個開關，可以調控此隱蔽的機制，導致熱帶念珠菌可行有性生殖。在此一模式中，必須先過二倍體 aa 和  $\alpha\alpha$  細胞的發育過渡期，形成穩定 aa/ $\alpha\alpha$  四倍體的發生。團隊發現不管在表型上的轉變或進行有性生殖，Wor1 扮演了重要的角色。而在其他的黴菌物種中，Wor1 則是靠溫度來調節控制其表現。相對的，在熱帶念珠菌中，進行交配最合適的溫度為 25°C 和 37°C，這表示了其寄主——哺乳動物一旦遭受感染後，其所提供的溫度環境的確非常適合熱帶念珠菌進行交配。藉由熱帶念珠菌與白色念珠菌

a 與  $\alpha$  轉錄圖譜中大約 400 個相關基因差異表現之資料可得知，Wor1 在此兩物種中皆占有重要地位，若將 Wor1 剔除，白色念珠菌中的 a 和  $\alpha$  細胞就不會發生交互作用。

此一發現讓吾人得知在念珠菌的物種中，表型控制有性生殖的機制是相當穩定且保守的，當在環境適宜發展時，無性生殖是最好的選擇，可以維持一個好的基因組的穩定性。但在逆境出現時，可以轉換成有性生殖的可能性，大幅增加了其基因多樣性與適應性，而 Wor1 的調控，讓熱帶念珠菌可以穩定的控制其表型上的改變進而影響其是否可進行有性生殖的關鍵，為此一研究的重大發現。

## 念珠菌疫苗的進展與挑戰

來自義大利的 Dr. Cassone (Istituto Superiore di Sanità) 在會議中，說明目前研發念珠菌疫苗的情況與進展。利用減毒黴菌或重組蛋白與糖複合物 (glycoconjugates) 當作念珠菌疫苗的想法，已經根據 GMP 的規範制訂並進行完成準備的程序。其中，Als3 和 Sap2 重組蛋白皆已有完整的研究，目前正通過第一階段的臨床試驗。根據實驗結果，Sap2 其他 10 個位於白色念珠菌中的同源基因，皆在陰道念珠菌病的發病機制中發揮了關鍵的作用。仿病毒顆粒佐劑 (Virosomal) 疫苗本身證明了高度免疫性和保護不受念珠菌的感染，此研究並提供證明經由

天然或人工合成的  $\beta$ -1-3 glucans 與去毒的白喉毒素載體結合的疫苗 (Lam-CRM 疫苗) 和已批准的佐劑 (MF59) 可對於一般的黴菌感染具有成效。儘管如此, anti-Sap 和 anti- $\beta$ -1-3 glucans 抗體的中和能力、影響的發炎反應與和寄主的反應與安全性, 都還在研究當中。總體而言, 技術與經濟層面著實影響了疫苗的進展與增加其挑戰性, 但許多研究學者依舊在這個領域努力, 希望抗黴菌疫苗能早日的對人類群體有所助益。

### 白色念珠菌中重要轉錄因子 Ndt80 蛋白質所扮演的角色

依據 TNIS (Taiwan Nosocomial Infection Surveillance) 的調查, 黴菌是加護病房中院內感染最主要的致病因, 不僅造成住院時間增加並且耗費更多醫療資源的投入, 除此之外, 抗黴菌藥物的過度使用, 亦會篩選出更多的抗藥性菌種。一旦發生黴菌感染, 在有限的藥物選擇中, 降低副作用的發生以及減少抗藥性的發生, 都是需考量的方向。因此, 如何開發新的藥物或其他替代療法有其存在的必要性。Ndt80 蛋白質是白色念珠菌 (*C. albicans*) 中基因調控網絡中位於上游的重要轉錄因子之一, 在國家衛生研究院感染症與疫苗研究所羅秀容博士所率領的團隊對於此一蛋白之長期研究, 發現它會經由一個僅有 8 個鹼基長度的 MSE 片段 (mid-sporulation

element) 來調控其目標基因。此團隊更進一步的發現, 位於此蛋白 DNA 結合定義域 (DNA-binding domain) 中其第 432 個胺基酸的改變 (*ndt80*<sup>R432A</sup>), 會降低此一蛋白與 MSE 的結合力。由不同層次的實驗, 包含細胞型態、發芽管 (germ tube) 的形成、菌絲生長、藥物的抗性以及致病能力皆證明此第 432 個胺基酸的改變在 *Ndt80* 蛋白質扮演的重要角色。而在加州大學舊金山分校 (University of California, San Francisco) 的 Dr. Johnson 團隊在大會的報告中提出對於白色念珠菌在生物膜的轉錄調控網路上最新的研究, 發現大約有 1,000 個基因被六個主要的基因調節, 而 *Ndt80* 是其中影響與涵蓋範圍最為廣泛的基因 (其他的為 *Bcr1*, *Brg1*, *Efg1*, *Tecl* 與 *Rob1*)。綜合此些發現, 得知 *Ndt80* 的重要與關鍵性, 可使得後續在抗黴菌藥物的研發上, 加入新的思考方向。

### 熱帶念珠菌 異結合性的喪失與抗藥性

黴菌抗藥性的問題長期以來是一個無論在基礎研究或臨床研究中, 持續存在且令人困擾的問題。在國家衛生研究院感染症與疫苗研究所羅秀容博士所率領的團隊的另一個研究中, 針對全台灣各個醫院所收集到的 97 株熱帶念珠菌 (*C. tropicalis*) 臨床菌株當中, 發現有 1 個品系對於 flucytosine (5FC) 藥物具有抗藥性。而在 30 個具

藥物敏感性品系當中，發現有 22 個品系其 *Fcy2* 基因的第 145 個鹼基是 G/T 異結合型式。經由鹼基互換取代的實驗發現，當此第 145 個鹼基是 T/T 同結合型的型式時，會對此藥物產生抗藥性。除了 *Fcy2* 基因外，羅博士團隊更進一步的研究其周遭基因的同結合型型式與否和抗藥性的關係。在 *fcy2* 基因周圍約 2.3 Mb 的鹼基範圍內，經由大量序列資料之比較，觀察對於 5FC 藥物抗性與感性的品系其單一核苷酸多態型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 之改變。此一研究發現抗藥性的菌株皆具有大片段喪失異結合型 (loss of heterozygosity, LOH) 的情形發生，藉由此重要的發現，推論這可能和等位基因間重組或斷裂產生複製的機制有關，進而影響其與抗藥性的關係。儘管 LOH 會降低基因組中的多態型，依據演化的角度，在合適的選汰壓作用之下，卻可有機會提高隱性基因座的適存度，增加物種存活的机会。在前人的研究也發現 *Erg11*, *Tac1* 與 *Mrr1* 同結合型基因座的表現明顯的加增白色念珠菌對於 fluconazole 的抗性。而對環境有選汰優勢的基因的組合 (例如 LOH) 則有可能對於有較強選汰環境下，有較高的適存度。

### 念珠菌基因體資料庫

念珠菌基因體資料庫 (the *Candida* Genome Database, CGD)，提供了念珠

菌各基因片段基本資訊、基因序列、蛋白質功能等是相關基因體研究學者很重要的資料庫，並加速了黴菌研究學者對於念珠菌的分子生物資訊的進展。此資料庫建構於 2004 年，但隨著定序資料的日益加增，此資料庫的涵蓋範圍亦從只包含白色念珠菌 (*C. albicans*)，目前更納入了許多其他念珠菌的物種，在此次的演講中，來自加州史丹福大學 (Stanford University) 建構此資料庫的 Dr. Sherlock 與其團隊整合此些資訊，並說明目前增加了 *C. glabrata* 與其他物種的資料。並可比較不同物種間同源基因的關係，可幫助基因功能註解、蛋白質結構、物理化學的特性、並且標示了個基因在生物學上的功能與重要影響。

截至目前為止，此資料庫整合的資訊，已有 6,108 筆白色念珠菌，與 5,212 筆 *C. glabrata* 的開放編碼區 (open reading frames, ORFs) 的序列資料 (不包含未分類的 4,705 與 5,034 筆開放編碼區資料)；依據蛋白質定義域 (protein domain) 所判斷的基因功能註解，於此兩物種中分別有 6,048 與 5,087 筆資料；同緣關係特徵的描述，也分別有 1,352 與 3,982 筆資料。除了此些屬於各基因與物種間的基本資料外，並增加了實驗室品系關係圖，讓吾人可以方便得知此些在實驗室中常用的品系間的親緣關係並提供搜尋與比較，包含了白色念珠菌 SC5314 (4 個品系)、WO-1 (5 個品系)；*C. dubliniensis* (6 個品系)；*C.*

*guilliermondii* (5 個品系)；*C. lusitaniae* (5 個品系)；*C. parapsilosis* (5 個品系)；*C. tropicalis* (5 個品系)；*Debaryomyces hansenii* (7 個品系) 以及 *Lodderomyces elongisporus* (5 個品系)。所有的資訊皆可以在此線上資料庫中免費取得 (CGD, <http://www.candidagenome.org>)。

## 總 結

綜觀生物學的研究上，在台灣，投入念珠菌的研究學者雖然沒有其他熱門領域來的多，但筆者很榮幸有這個機會參與此次的研討會，與其他國家研究同類群物種的研究學者一同討論與分享。而新的分析工具與研究方法的加入，使得許多的研究有更長足且快速的進步。即便在基礎研究上與臨床實驗過程中有許多不易之處，但欣慰的是在此次研討會上看到許多年輕的大學生與研究人員的加入，熱烈的討論，激盪許多嶄新的火花與思維。人類與黴菌的戰爭持續地進行，這是一條漫長的路，如何在其中找尋一更好的平衡點，我相信是所有與會研究學者希冀且共同努力的方向。

## 參考文獻

1. Cassone A, Casadevall A: Recent progress in vaccines against fungal diseases. *Curr Opin Microbiol* 2012;15:1-7.
2. Chen YN, Lo HJ, Wu CC, et al: Loss of heterozygosity of *FCY2* leading to the development of flucytosine resistance in *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2506-14.
3. Coste A, Selmecki A, Forche A, et al: Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 2007;6:1889-1904.
4. Finkel JS, Xu W, Huang D, et al: Portrait of *Candida albicans* adherence regulators. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002525.
5. Hadany L, Beker T: On the evolutionary advantage of fitness-associated recombination. *Genetics* 2003;165:2167-79.
6. Inglis DO, Arnaud MB, Binkley J, et al: The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Research* 2012;40:D667-74.
7. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, et al: The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2007;3:e164.
8. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, et al: A recent evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell* 2012;148:126-38.
9. Porman AM, Alby K, Hirakawa MP, et al: Discovery of a phenotypic switch regulation sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:21158-63.
10. Yang YL, Wang CW, Leaw SN, et al: R432 is a key residue for the multiple functions of Ndt80p in *Candida albicans*. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:1011-23.
11. White TC, Holleman S, Dy F, et al: Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1704-13.