國內外新知

以電腦分子模擬的方式探討白色念珠菌 (*Candida albicans*) 羊毛甾醇14α-脫甲基酶 (Erg11p) 變異與 fluconazole 抗藥性之間的關係

【國衛院感染症與疫苗研究所台灣黴菌實驗中心 周怡君/曾國鋆/陳盈之/謝禮雲/羅秀容 摘譯】

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 為臨床上常見具有抗藥性的菌株，這類具抗藥性菌株會導致很嚴重的血液感染和高死亡率。Azole 類抗黴菌藥物，被廣泛使用於白色念珠菌臨床治療上。在 Azole 藥物中，尤其是 fluconazole 常被用作治療念珠菌感染的第一線藥物。Erg11p 是參與 lanosterol 形成 ergosterol 一連串的酵素反應中重要成員之一，而 fluconazole 會結合在 Erg11p 上進行抑制作用，進而導致細胞膜 ergosterol 無法形成，嚴重影響了白色念珠菌細胞膜的完整性，導致白色念珠菌細胞體內物質溢出造成死亡。

在過去的二十年中，念珠菌對 fluconazole 的抗藥性逐漸提高。在 1980 年，首次報導白色念珠菌對 fluconazole 具有抗藥性。根據美國疾病控制與預防中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 2019 年的報告，臨床上發現具有抗 fluconazole 的念珠菌物種佔 44,800 例，死亡 2,200 人。在過去的研究中發現，增加藥物輸出幫浦 (drug efflux pumps)、藥物標的物的過度表達 (overexpression of drug targets)、藥物標的物的突變 (target alterations) 和代謝路徑轉換 (metabolic bypasses) 等皆與抗藥性有關。其中，發現白色念珠菌 *ERG11* 突變對於 fluconazole 抗藥性具有至關重要關聯性，作者以電腦分子模擬技術提出 *ERG11* 突變和 fluconazole 抗藥性機制新的見解。

近代，電腦分子模擬技術在全球生物學研究中扮演著非常重要的角

色。蛋白質晶體結構改變可藉由電腦模擬方式來預測觀察蛋白質的結構變化和穩定性。目前，電腦模擬技術已廣泛用於探討各種生物學研究相關機制，例如藥物的敏感性和耐受性，蛋白質與蛋白質之間和 DNA 與蛋白質之間的相互作用。Erg11p 的氨基酸突變是導致白色念珠菌對 fluconazole 抗藥重要機制之一。所以針對 Erg11p 中胺基酸突變的研究將幫助我們確認可能與白色念珠菌抗藥相關的關鍵氨基酸。在開始進行嚴謹、費時費力的實驗之前，藉由電腦分子模擬運算技術可以預測其分子間交互作用關係，挑出最有可能的實驗設計假設去進行後續實驗的確認，進而降低人力、時間和經費，對於探討蛋白胺基酸突變和其藥物之間關係將具有重要意義。在本文分享的文獻中，主要是使用電腦分子模擬方法研究探討白色念珠菌 Erg11p 中點突變與 fluconazole 感受性之間的關聯性。

首先，作者從蛋白質數據庫 (PDB) 中檢索了白色念珠菌 Erg11p 的晶體結構，再經由電腦分子動力學模擬 (MDS) 分析發現 5V5Z 結構體較穩定且與野生型 Erg11p 更相似，故挑選了 5V5Z 當作晶體結構的基礎模板，並作為此電腦模擬研究後續 Erg11p 點突變蛋白的晶體結構依據；對模擬好的脫輔基蛋白進行 25ns MDS 分析，觀察其突變對於蛋白結構的穩定性。與野生型相比，所有的突變蛋白 RMSF 值均無顯著變化，這表明突變蛋白質的三級結構只有很小的變化。推論，突變引起的抗藥性可能是因為 fluconazole 與 Erg11p 的結合效率低下或結合腔結構發生變化而引起的。

再來，作者將已經模擬出的 Erg11p 突變體結構和野生型 Erg11p 與抗黴菌藥物 fluconazole 進行分子對接 (Molecular docking) 自由能分析模擬試驗，結果顯示與原始 Erg11p_WT (Glide: -65.436 kcal/mol, MM-GBSA: -54.33 kcal/mol) 相比，Erg11p_THR285ALA (Glide: -62.650 kcal/mol, MM-GBSA: -60.78 kcal/mol) 與野生型 Erg11p 相似，顯示出最小的結合自由能值。已知的抗藥性突變菌株 Erg11p_TYR447HIS (Glide: -58.756 kcal/mol, MM-GBSA: -35.04 kcal/mol) 和本文獻中的實驗組 Erg11_LEU321PHE (Glide: -60.177 kcal/mol, MM-GBSA: -43.11 kcal/mol) 和 Erg11p_SER457PRO (Glide: -562.214 kcal/mol, MM-GBSA: -36.12 kcal/mol)，自由能皆高於原始 Erg11p_WT，作者推測突變的 Erg11p 減少了非鍵相互作用 (non-bonded interactions)，並提高了結合自由能，可能與 fluconazole 抗藥有關。

在過去啤酒酵母菌 (*S. cerevisiae*) 研究中發現，Erg11p 中的胺基酸中的 water bridges 與 fluconazole 相互作用對於抗藥性有其重要性。為了分析白色念珠菌 Erg11p 和 -fluconazole 相互作用是否也會因 water bridges

而影響其穩定性，進行了 MDS 分析，Erg11p_LEU321PHE、Erg11p_SER457PRO 與 wild type 相比降低了 water bridges 交互作用能力，推測 water bridges 交互作用能力與白色念珠菌對 fluconazole 耐受性有其關聯性；另一方面，heme interaction 的強度會影響 fluconazole 與 Erg11p 的結合效率，故在 heme interaction 觀察上，與 wild type 相比 Erg11p_LEU321PHE 的 heme interaction 明顯下降，然而 Erg11p_SER457PRO 突變體則完全丟失了 heme interaction 能力。綜合上述，實驗組 Erg11p_LEU321PHE 突變導致減少了非鍵交互作用 (non-bonded interactions)，water bridges 和 heme interaction 而降低了與 luconazole 的結合效率。另一株實驗組 Erg11p_SER457PRO 則因缺乏關鍵的 water bridges 和且完全丟失了 heme interaction，導致與 fluconazole 的結合效率下降，完美呼應了前面的自由能分析模擬試驗中最低的 fluconazole 結合效率模擬數據。

此篇模擬研究的結果，顯示 Erg11p_SER457PRO 突變可能在 fluconazole 抗藥性中發揮積極作用。突變 Erg11p_LEU321PHE 可能具有中等作用，而 Erg11p_THR285ALA 可能對 fluconazole 抗藥性沒有任何重要作用。經由電腦分子模擬演算後縮小目標，後續再進行實驗來驗證，進一步證實這些突變與 fluconazole 抗性有其相關性。這項研究將有助於探索 Erg11p 其他可能的抗藥突變，也可以為未來在開發新的抗黴菌藥物和了解白色念珠菌中不斷增加的抗藥性指出光明道路。

【譯者評】過去對於這類因基因突變造成的抗藥或多重抗藥菌株機制實驗研究，總是像大海撈針，耗時耗力也花費昂貴的實驗成本，電腦分子模擬方式，可以解決這些問題。隨著時代演進，電腦硬體和軟體的進階升級，電腦運算分子模擬技術已廣泛應用在生物醫學研究、藥物設計和抗藥性研究中，本篇文章分享，可看出經由分子模擬技術，可直接微觀藥物和目標物間的穩定度和分子作用關係，進而推斷出可能導致抗藥性的突變位置和原因，對於研發新型抗黴菌劑有很大的幫助。但電腦模擬需要強大的資料庫，相信經由大家對於電腦模擬技術的熟悉使用後，各領域增加高量的資料庫數據，可以更加快新型藥物研發和致病機制的了解。然而，電腦模擬的推測，還是必需經由實驗來做驗證，才能下結論。

參考文獻

1. Prakash SMU, Nazeer Y, Jayanthi S, et al: Computational insights into fluconazole resistance by the suspected mutations in lanosterol 14α-demethylase (Erg11p) of Candida albicans. Mol Biol Res Commun 2020;9:155-67.
2. Kullberg BJ, Arendrup MC: Invasive Candidiasis. N Engl J Med 2015;373:1445-56.
3. Sanglard D: Emerging threats in antifungal

resistant fungal pathogens. Front Med 2016;3:11.

4. Sagatova AA, Keniya MV, Wilson RK, et al: Triazole resistance mediated by mutations of a conserved active site tyrosine in fungal lanosterol 14 α-demethylase. Sci Rep 2016;6:1-11.