

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

臺灣地區臨床分離之酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 致病性之研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2320-B-002-033-
執行期間：96年02月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

計畫主持人：張雅雯

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：吳玉珊、李承光

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96年10月31日

報告內容

前言 / 研究目的 / 文獻探討

酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 長久以來被廣泛地應用於烘焙、發酵、釀酒等食品相關工業上，另外，因其為簡單的單細胞真核生物，且具遺傳學及分子生物學上操作的便利性，*S. cerevisiae* 也常被科學家當成研究真核細胞的一種工具。

一般來說，在正常的個體身上 *Saccharomyces cerevisiae* 是不會導致疾病的，但是在免疫力較差的病人身上，如：進行移植手術的病人、愛滋病人、化療病人、骨髓移植病人等卻是一個重要的伺機致病原，發現有表皮性或是全身性的感染。過去有研究指出，從這些病人身上分離出來的臨床菌種經分析後，發現溫度的抗性及其假菌絲的分化是臨床分離菌株的兩個重要毒性特質[1, 2]，在42°C下生長及37°C下形成假菌絲和毒性是最有相關性的，因為這些菌株能在CD-1小鼠的腦中持續增殖大於或等於28天[1]。至於這樣的表現型和毒性之間的詳細機轉，目前仍不清楚。

根據[3]報告指出 high temperature growth 的基因調控屬於 quantitative trait locus (QTL)，Steinmets 等人利用 genome wide mapping 和 microarray 的方法找出位於 chromosome XIV 上的 *MKT1*、*RHO2*、*END3* 為 quantitative trait genes，調控高溫生長的表現型。另外在[4]發現 *RHO2* 的 3'UTR polymorphism 似乎也跟此表現型有關。

Saccharomyces cerevisiae 在缺乏氮源的情況下，會由酵母菌型轉變成假菌絲型，假菌絲的鑑別可藉由以下方式判別：細胞拉長、細胞的黏附力增加、單極方向的出芽生殖[5]。目前已經知道有三個訊息傳導路徑會調節假菌絲的生成，第一個是 MAPK pathway (mitogen-activated protein kinase)，第二個是 cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway [2]，第三個是 TOR (target of rapamycin) pathway [6]。MAPK 訊息傳遞路徑是一連串磷酸激酶的活化，其中包括 Ste11、Ste7 及 Kss1。活化型 Kss1 再去活化轉錄因子 Ste12 及 Tec1，使 Ste12 及 Tec1 共同結合到 filamentation gene 即 *FLO11* 的 promoter 區，幫助 filamentation gene 轉錄。在 cAMP/PKA 訊息傳遞路徑主要先由 G-protein coupled receptor 活化，進一步活化了 cAMP，cAMP 再去活化 protein kinase A，protein kinase A 的 catalytic subunits 有 Tpk1、Tpk2 及 Tpk3，Tpk2 再去活化轉錄因子 Flo8，而活化型的 Flo8 可結合到 *FLO11* 的 promoter 區，幫助 *FLO11* 轉錄。在 TOR pathway 中，Tap42-Sit4 此複合物可以藉由調控與假菌絲形成的相關基因達到調節假菌絲生成的能力。對於這三個路徑和假菌絲形成之間的關係若更加清楚的話，未來是有機會可以當成抗黴菌藥物的標的物。

因此，為了了解在臺灣臨床分離的 *Saccharomyces cerevisiae* 是否也具有高溫生長及假菌絲分化的能力，我們和台大醫院合作收集了好幾個臨床的分離株，分別命名為 YYC1、YYC2 及 YYC3，並分別測試這些分離株是否具有在 42°C 下生長及 37°C 下形成假菌絲的能力，並針對影響此表現型相關之基因進行定序，觀察在這些基因中是否具有單一核苷酸的多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP)，來分析其 SNP 和高溫生長或假菌絲生成之間的關係為何，以進一步了解這些臨床分離株的致病性。

研究方法

菌株、培養基、及培養方法：

我們和台大醫院合作收集了三株臨床的分離株，分別命名為 YYC1、YYC2 及 YYC3。本實驗所使用之菌株，已列於表一。培養基 YPAD 成分如下：1% [wt/vol] yeast extract, 2% [wt/vol]

Bacto Peptone, 2% [wt/vol] glucose, 2% [wt/vol] agar, 1% Adenine。菌株若無特別註明，皆在 30°C 下培養 48 小時。誘導假菌絲生成之培養基 PSH plate 成分如下：0.17% yeast nitrogen base without amino acids and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 μM HCl, 2% [wt/vol] glucose, 0.5% casein, 2% [wt/vol] agar。另一誘導假菌絲生成之培養基 SLAD plate 成分如下：0.17% yeast nitrogen base, 50 μM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% Bacto-agar, 2% glucose。

表一. 本實驗所使用之 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株

Strain	Origin	Strain type ^a
YYC1	NTU SC-1 ^b	C
YYC2	NTU SC-2 ^b	C
YYC3	NTU SC-3 ^b	C
YYC5	BY4741	L
YYC29	BY4741 x BY4742	L
YYC32	YJM145/YL23 ^c , YJM145 is segregant of YJM128	C

^a C, 臨床分離株；L, 實驗室常用之菌株

^b 台大醫院之臨床分離株

^c 由 Dr. McCusker 所提供之美國臨床分離株

DNA 萃取：

DNA 萃取方法如 [7] 所示，純化後由臺大醫學院第二共同研究室進行定序。

結果與討論 (含結論與建議)

一、臺灣地區臨床分離的菌株，具高溫生長之能力

台大醫院的三株臨床分離株，與 YYC5 和 YYC32 在 30, 37, 39, 42°C 的環境下，培養在 YPAD 培養基中 48 小時，發現在 42°C 的環境下，YYC1 及 YYC3 長的較好，colony size 與 YYC32 相似，而 YYC2 與 YYC5 則無 single colony 長出(見表二)，此結果顯示臨床分離株 YYC1 及 YYC3 與美國之臨床分離株 YYC32 同具有 thermotolerance 的能力。

表二 臺灣地區臨床分離的菌株，在不同溫度下的生長情形

30°C		37°C		39°C		42°C	
YYC1	+++++	YYC1	+++++	YYC1	++++	YYC1	+++
YYC2	++++	YYC2	+++++	YYC2	+++	YYC2	+
YYC3	+++++	YYC3	+++++	YYC3	++++	YYC3	+++
YYC5	+++	YYC5	+++	YYC5	++	YYC5	+
YYC32	++++	YYC32	+++	YYC32	+++	YYC32	+++

(-) = no growth of the dense streak of cells

+/- = poorly of the dense streak of cells

(+) = growth of the dense streak of cells but no colony formation

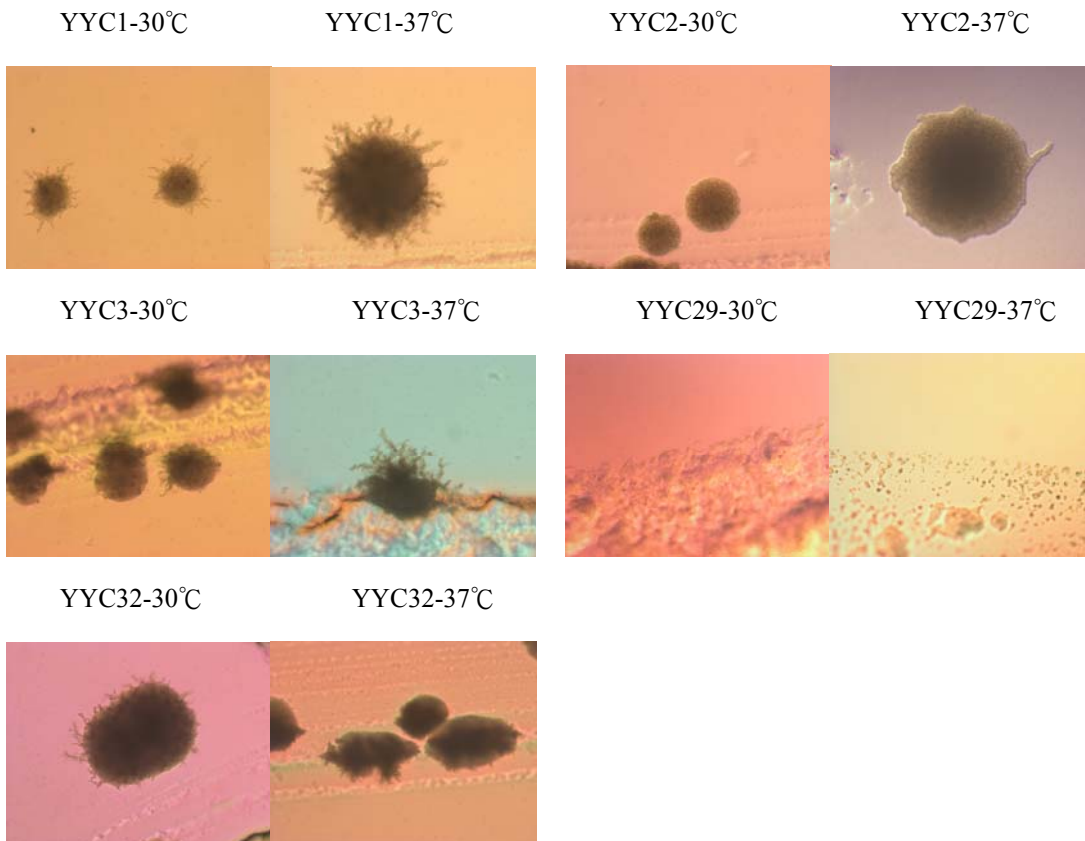
(++) = formation of microcolonies

>= (+++) = formation of increasingly larger colonies

二、臺灣地區臨床分離的菌株，在 37°C 培養下能形成假菌絲

台大醫院的三株臨床分離株，與 YYC29 和 YYC32 在 30 及 37°C 的環境下，培養在 PSH plate 中 14 天，或 SLAD 培養基中 6 天，以測試假菌絲的生成。發現在 37°C 的環境下，YYC1 及 YYC3 與 YYC32 相似，皆會誘發假菌絲的生成，而 YYC2 與 YYC29 則無假菌絲長出(圖一)。此結果顯示臨床分離株 YYC1 及 YYC3 與美國之臨床分離株 YYC32 經適當的培養，同樣可誘發假菌絲的生成。

圖一 臺灣地區臨床分離的菌株，可在 SLAD 培養基中誘發假菌絲的生成



三、由 DNA 的定序分析，得知在臨床分離菌株中，基因 *RHO2*，*END3*，及 *FLO8* 上均有發現 SNP 存在，可能與上述兩項表現型相關，進而影響菌株之致病性。

由上述的結果發現，臨床分離株 YYC1 及 YYC3 同樣具有 42°C 下生長及 37°C 下形成假菌絲兩個重要毒性特質，於是針對影響此二表現型之基因進行定序，希望可找出特定之突變或 SNP site，並進一步探討其功能，以了解這些基因如何影響菌株之致病性。針對基因 *RHO2* 的定序結果發現，在 YYC2 中 3' untranslated region (UTR) 有一 SNP 位點出現 (C→T)，而在 YYC1 及 YYC3 中並沒有發現。過去曾有研究指出，*RHO2* 3' UTR 可能與菌株的高溫生長能力密切相關[4]，值得對此臨床分離株進行更深入的探討。

針對基因 *END3* 的定序結果發現，在 YYC2 中第 631 核苷酸有一 SNP 位點出現 (C→T)，使胺基酸序列發生改變，而在 YYC1 及 YYC3 中並沒有發現。由於此 SNP 位在 End3 蛋白的 EH-domain 上，是否因此而影響其功能，仍有待進一步的研究。

針對基因 *FLO8* 的定序結果發現，在 *YYC1* 及 *YYC3* 中第 2263 核苷酸有一 SNP 位點出現(A→T)，而在 *YYC2* 中並沒有發現。曾有研究指出，在 *Candida albicans* 其 Flo8 蛋白的 C 端是有幫助於轉錄活性的進行[8]，因此我們高度認為或許這個位置和 37°C 假菌絲的生成具有密切關係，值得進一步探討。

參考文獻

1. McCusker, J. H., Clemons, K. V., Stevens, D. A. & Davis, R. W. *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42°C and form pseudohyphae. *Infect. Immun.* 62, 5447-5455 (1994).
2. McCusker, J. H., Clemons, K. V., Stevens, D. A. & Davis, R. W. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics* .136, 1261-1269 (1994).
3. Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JI, Oefner PJ (2002) Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* 416: 326 – 330.
4. Himanshu Sinha,Bradly P. Nicholson,Lars M. Steinmetz,John H. McCusker Complex genetic interactions in a quantitative trait locus. *PLoS Genet.* 2006 Feb;2(2):e13. Epub 2006 Feb 3
5. Xuewen Pan, Toshiaki Harashima and Joseph Heitman. Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Microbiology*, 3:567–572 (2000)
6. N. Shane Cutler, Xuewen Pan, Joseph Heitman, and Maria E. Cardenas. The TOR Signal Transduction Cascade Controls Cellular Differentiation in Response to Nutrients. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 4103–4113 (2001)
7. *Methods in Yeast Genetics* (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press
8. Fang Cao, Shelley Lane, Prashna Pala Raniga, Yang Lu, Zhou Zhou, Karalyn Ramon, Jiangye Chen, and Haoping Liu. The Flo8 Transcription Factor Is Essential for Hyphal Development and Virulence in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*.17, 295–307 (2006)

計畫成果自評

一般來說，*Saccharomyces cerevisiae* 在正常的個體身上是不會導致疾病的，但是在免疫力較差的病人身上，如：進行移植手術的病人、愛滋病人、化療病人、骨髓移植病人等卻是一個重要的伺機致病原，發現有表皮性或是全身性的感染。本計畫利用與台大醫院合作收集的好幾個臨床分離株，分別測試這些分離株具有在 42°C 下生長及 37°C 下形成假菌絲的能力，並針對影響此表現型相關之基因進行定序，已發現數個 SNP 位點，可能與菌株的致病性相關，未來若進一步對致病機轉的研究，將有助於臨床上對此菌株致病性的瞭解，且機轉中的主要調控基因，也可能成為未來抗黴菌藥物的標的物，有助於抗黴菌藥物的開發。有關此計畫成果，已進行論文撰寫，準備發表。