

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



白色念珠球菌 **a**-費洛蒙運輸蛋白質 Hst6 對於費洛蒙誘
導細胞附著、交配能力及 White-Opaque 型態轉換之
探討

An **a**-pheromone transporter Hst6 is involved in
pheromone-induced cell adhesion, mating and
White-Opaque transition of *Candida albicans*

簡琇羽

Xiu-Yu Jian

指導教授：林晉玄 博士

Advisor: Ching-Hsuan Lin, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July 2016



誌謝

於這兩年的研究生涯中，首先感謝我的指導教授林晉玄老師於研究上不厭其煩地指導，對於沒有分生背景的我給予許多包容，甚至親自教導實驗的操作，讓我受益良多，同時找到做實驗的熱誠及成就感。而在各場口頭報告之前，也非常謝謝老師總是堅持於百忙之中抽空聽取預報並加以修正，使我的思維能更具有邏輯性。口試期間承蒙藍忠昱教授、呂俊毅教授、羅秀容教授、陳穎練教授、薛雁冰教授提出諸多的寶貴意見與指正，使得本論文更臻完善。

感謝 314 實驗室的所有成員：謝謝已經畢業的張雯涵學姊仍然耐心協助海報撰寫以及實驗技術的操作，讓我能順利完成研究並參加研討會。而在我實驗卡關時，鄧福勝學長總是能給予關鍵的建議與看法，使我得以解決所面臨的困境；同時學長經常於佳節時分舉行實驗室聚會或出遊，替大家的研究生活增添許多歡樂的回憶。也很感謝侯健睿同學容忍我在實驗及寫論文時的抱怨，而晚上偶爾的吉他演奏會則紓解了大家緊繃的壓力。還有碩一的陳昱嘉及何新榮學弟時常分享生活中的趣事或電影，使實驗室氣氛能充滿歡笑。大學部的茂暘、正緯、珈敏、芸君和宥成謝謝你們於實驗材料上的準備，帮助大家實驗能順利進行。十分感謝 314 的所有夥伴，於生活及實驗上的鼓勵與支援，和你們相處的點滴是我研究生涯中最珍貴的回憶。

最後要感謝家人的全力支持與體諒，並提供我衣食無缺的環境，讓我能無後顧之憂地完成碩班的學業。謝謝男朋友彥麟在我實驗撞牆期不斷地給予鼓勵，同時在口試前陪我熬夜預講，讓我得以有自信地面對口委的提問。此外也很感謝劉毛毛學姐慷慨分享求職經驗，協助我履歷及自傳的撰寫，安撫了我對於未來的徬徨及焦躁。謝謝大學好友們不時的約聚餐，讓大家在互相吐苦水的機會，支撐彼此能夠順利走完研究的路。

2016/07/22 簡琇羽

中文摘要



白色念珠球菌 (*Candida albicans*) 為人類主要的伺機型致病真菌之一，對於免疫缺失的患者易造成致命的系統性感染。為了適應宿主體內多樣的微環境，白色念珠球菌發展出一種獨特的型態轉換，稱之為 white-opaque switching。而 white 細胞及 opaque 細胞之間最大的行為差異，在於其能否行有性生殖。opaque 細胞具有交配能力，藉由分泌與細胞性狀一致的費洛蒙 (**a** or α pheromone)，來活化相反性狀之細胞進行交配反應。雖然 white 細胞不具有交配能力，但是當接收到 opaque 細胞所分泌的費洛蒙時，能誘導 white 細胞產生細胞附著及生成生物膜。過去實驗室研究發現，以 α pheromone 刺激 *MTLa/a* white 細胞後，由 cDNA 微陣列分析結果顯示 *MFA1* (產生 **a** pheromone 前導蛋白質) 及 *HST6* (產生 **a** pheromone 運輸蛋白質) 皆出現高表現的情形。因此，本研究假設 *MFA1* 及 *HST6* 可能會參與在 α pheromone 誘導的 white 細胞之細胞附著中，並進一步探討其所扮演的角色。於編號 P37005 之 *MTLa/a* 菌株剔除 *HST6* 後，會使得費洛蒙誘導之細胞附著量 (約 5.2×10^7 個細胞) 與野生株 (約 13.4×10^7 個細胞) 相比出現顯著下降；然而 *MFA1* 基因的剔除，卻不會影響費洛蒙誘導之細胞附著。先前研究指出，Cph1 是調控費洛蒙誘導之細胞附著形成的重要轉錄因子。在此，透過定量即時聚合酶鏈鎖反應分析顯示，*HST6* 基因的表現會受到 Cph1、Cek1 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 及 Ste2 (α pheromone 受體蛋白質) 所調控。除此之外，*hst6* Δ 的交配效率僅有 0.0004%，相較於野生株的交配率 65.07% 有顯著減少，這意味著剔除 *HST6* 基因可能導致白色念珠球菌的 **a** pheromone 分泌產生缺損，從而影響交配反應的進行。為探究 Hst6 運輸蛋白質除了影響費洛蒙誘導之細胞附著外，是否也會同時參與在傳統生物膜 (conventional biofilm) 的生成，因此針對 2 個與傳統生物膜相關的轉錄因子 (Tec1、Ndt80) 進行測試。實驗結果不論是生物膜乾重或是 *TEC1* 及 *NDT80* 基因的表現程度，在野生株與 *hst6* Δ 之間並沒有明顯的差異，顯示 Hst6 運輸蛋白質只會專一地參與於費洛蒙誘導之細胞附著，並不涉及傳統生物膜的發展。



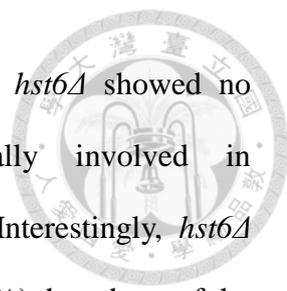
有趣的是，*hst6* Δ 的 white-to-opaque 型態轉換率 ($1.95 \pm 2.51\%$) 也遠低於野生株的轉換效率 ($34.34 \pm 20.16\%$)。然而於另一株 *MTLa/a* RBY717 菌株將 *HST6* 基因剔除後，並不影響其費洛蒙誘導之細胞附著與 white-to-opaque 表現型轉換，暗示著 Hst6 運輸蛋白質的調節作用可能具有菌株專一性。根據上述實驗結果，本次研究發現 *MTLa/a* 細胞中的 *a* pheromone 運輸蛋白質，Hst6，會參與在白色念珠球菌 P37005 菌株的費洛蒙誘導之細胞附著、交配反應以及 white-to-opaque 型態轉換之中，但對於傳統生物膜之生成不具影響力。

關鍵字：白色念珠球菌、費洛蒙誘導之細胞附著、費洛蒙訊息傳遞路徑、交配、傳統生物膜、white-opaque 型態轉換

英文摘要



Candida albicans is a prevalent opportunistic human fungal pathogen that can cause vital systemic infections in immunocompromised patients. In order to adapt multiple niches, *C. albicans* develops a unique phenotypic transition between white and opaque phases. The most behavioral difference of these two cell forms is their sexual fertility. Opaque cells are the mating competent form that secrete cell type-specific (**a** or α) pheromones to activate mating responses in the opposite cell type. However, although white cells are incapable of mating, pheromones released from minority opaque cells could induce biofilm formation and cell adhesion of white cells. The array profiling has shown that *MFA1* (encoded with an **a**-pheromone precursor) and *HST6* (encoded with an **a**-pheromone transporter) in *MTLa/a* white cells were highly expressed when challenged with α -pheromone. We therefore hypothesized that *MFA1* and *HST6* are involved in the cell adhesion during the response to α -pheromone. Deletion of the *HST6* gene, an **a**-type specific **a**-pheromone transporter, in *MTLa/a* P37005 strain resulted in the significant reduction of numbers in pheromone-induced cell adhesion (5.2×10^7) comparing with those of the wild-type strain (13.4×10^7), while deletion of the *MFA1* gene exhibited no role in its cell adhesion. Preliminary studies have identified the transcriptional regulator of pheromone-induced cell adhesion as Cph1. Quantitative RT-PCR also showed that the expression of the *HST6* is directly regulated by Cph1, Cek1 (MAPK) and Ste2 (receptor of α -pheromone). Additionally, *hst6 Δ* showed an extremely low mating efficiency (0.004%) comparing to that of the wild-type strain (65.07%), suggesting that deletion of *HST6* could cause **a**-pheromone peptide secretion defects in *C. albicans*. To understand if Hst6 involved in pheromone-induced cell adhesion also plays a role in conventional biofilm formation, two genes of biofilm-associated regulators were tested. Expression of *TEC1* or *NDT80*



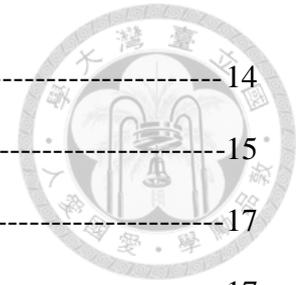
and the dry mass of biofilms between the wild-type strain and *hst6Δ* showed no significant differences, suggesting that Hst6 is specifically involved in pheromone-induced cell adhesion but not biofilm development. Interestingly, *hst6Δ* displayed a lower white-to-opaque switching frequency ($1.95 \pm 2.51\%$) than those of the wild-type ($34.34 \pm 20.16\%$). However, deletion of the *HST6* gene in *MTLa/a* RBY717 strain exhibited no effects on pheromone-induced cell adhesion and white-to-opaque transition, which implied that the functions of Hst6 might be strain-specific. Taken together, our study has demonstrated that Hst6, an **a**-pheromone transporter in *MTLa/a* cells, is involved in pheromone-induced cell adhesion, mating and white-to-opaque transition in P37005 strain of *C. albicans*, but is dispensable for the formation of conventional biofilms.

Keywords : *Candida albicans*, pheromone-induced cell adhesion, pheromone MAPK pathway, mating, conventional biofilm, white-opaque switching

目錄



誌謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	v
目錄	vii
圖目錄	x
表目錄	xi
前言	1
白色念珠球菌 (<i>Candida albicans</i>)	1
White-Opaque 型態轉換及細胞特性	2
White-Opaque 型態轉換之調控	3
Opaque 細胞之交配反應	5
費洛蒙誘導 white 細胞之生物膜形成 (Pheromone-induced biofilm)	5
費洛蒙訊息傳遞路徑 (pheromone MAP kinase pathway)	6
Mfa1, α -費洛蒙前導蛋白質 (α -pheromone precursor)	8
Hst6, α -費洛蒙運輸蛋白質 (α -pheromone transporter)	8
實驗目的	11
材料與方法	12
實驗藥品及培養基	12
聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)	12
洋菜膠電泳分析 (Agarose gel electrophoresis)	12
DNA 片段回收	13
DNA 接合 (Ligation) 反應	13
<i>E. coli</i> 轉型作用 (Transformation)	13
<i>E. coli</i> 質體 DNA 萃取	14



質體的構築 -----	14
構築 <i>C. albicans</i> 突變菌株 -----	15
構築 <i>hst6/hst6::HST6</i> 互補株 -----	17
費洛蒙誘導之細胞附著 (Pheromone-induced cell adhesion) -----	17
<i>C. albicans</i> 菌株之交配能力測試 -----	18
流式細胞儀測定菌株染色體套數 (ploidy) -----	18
傳統生物膜 (Conventional biofilm) 之生成 -----	19
定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction) -----	20
White-to-Opaque 型態轉換 -----	21
結果 -----	22
壹、探討 Hst6 運輸蛋白質與 white 細胞費洛蒙誘導細胞附著之關係 -----	22
1. PCR 鑑定 <i>hst6</i> 、 <i>mfa1</i> 突變株及 <i>hst6</i> 互補株之構築 -----	22
2. 剔除 <i>HST6</i> 基因使得費洛蒙誘導之細胞附著數量顯著下降，剔除 <i>MFA1</i> 基 因不會造成影響-----	22
3. <i>hst6</i> 突變株的 <i>PBR1</i> 基因表現與野生株相比明顯下降 -----	23
4. <i>HST6</i> 基因的缺失會影響費洛蒙訊息傳遞路徑之相關基因表現 -----	24
5. <i>HST6</i> 的基因表現由轉錄因子 Cph1 調控 -----	25
貳、探討 Hst6 運輸蛋白質與 opaque 細胞交配功能之關係 -----	26
1. <i>C. albicans</i> 突變株交配效率 -----	26
2. <i>C. albicans</i> 交配菌株之子代鑑定 -----	27
參、探討 Hst6 運輸蛋白質與傳統生物膜生成之關係 -----	28
1. <i>hst6</i> 突變株所生成的傳統生物膜 (conventional biofilms) 與野生株相似 -----	28
2. <i>hst6</i> 突變株之傳統生物膜的 <i>TEC1</i> 及 <i>NDT80</i> 基因表現並未產生改變 -----	29

肆、探討 Hst6 運輸蛋白質與 white-opaque 型態轉換之關係	30
<i>hst6</i> 突變株在 NAG 誘導下，white-opaque 表現型轉換受到抑制	30
伍、探討 Hst6 運輸蛋白質的調節作用與菌株專一性之關係	31
1. 構築 RBY717 <i>MTLa/a</i> 的 <i>hst6</i> 突變株	31
2. 剔除 RBY717 <i>MTLa/a</i> 菌株的 <i>HST6</i> 基因並不影響費洛蒙誘導之細胞附著	32
3. RBY717 菌株的 <i>HST6</i> 基因缺失，並不影響於 NAG 誘導下 white-opaque 表現型之轉換	33
討論	34
未來研究方向	39
圖表	40
參考文獻	60
附錄	66

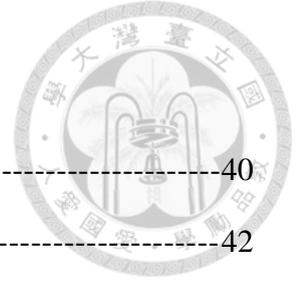




圖目錄

圖一、 <i>hst6</i> 、 <i>mfa1</i> 突變株及 <i>hst6</i> 互補株之構築與鑑定	46
圖二、 剔除 <i>HST6</i> 基因導致費洛蒙誘導 <i>MTLa/a</i> (P37005) 細胞附著能力下降	47
圖三、 定量即時聚合酶鏈鎖反應分析在費洛蒙誘導下，野生株、 <i>hst6</i> 突變株及 <i>mfa1</i> 突變株的 <i>PBR1</i> 基因表現	48
圖四、 <i>hst6</i> 突變株於費洛蒙誘導下， <i>STE2</i> 及 <i>CEK1</i> 的基因表現與野生株相比皆顯著下降	49
圖五、 定量即時聚合酶鏈鎖反應分析於費洛蒙刺激後，野生株、 <i>tec1</i> 突變株及 <i>cph1</i> 突變株的 <i>HST6</i> 基因表現	50
圖六、 交配效率測試	51
圖七、 交配子代之基因型鑑定	52
圖八、 傳統生物膜之乾重測試	53
圖九、 傳統生物膜之 <i>TEC1</i> 及 <i>NDT80</i> 基因表現程度	54
圖十、 <i>hst6</i> 突變株受 NAG 誘導之 white-to-opaque 型態轉換率較低	55
圖十一、 <i>MTLa/a</i> 野生型菌株 (RBY717) 所構築的 <i>Rhst6</i> 突變株之 PCR 鑑定	56
圖十二、 剔除 <i>MTLa/a</i> 野生型菌株 RBY717 中的 <i>HST6</i> 基因不影響費洛蒙誘導之細胞附著形成	57
圖十三、 剔除野生型菌株 RBY717 的 <i>HST6</i> 基因不影響 NAG 誘導之 white-to-opaque 型態轉換率	58
圖十四、 <i>Hst6</i> 運輸蛋白質於 white 細胞費洛蒙反應之調控機制模型	59

表目錄



表一、本研究所使用之藥品 -----	40
表二、本研究所用之引子序列 -----	42
表三、本研究所使用及構築之 <i>C. albicans</i> 菌株 -----	43
表四、GoTaq® DNA polymerase PCR 反應之溶液組成 -----	44
表五、Phusion® High-Fidelity DNA polymerase PCR 反應之溶液組成 -----	44
表六、PCR 反應程序 -----	44
表七、iScript reverse transcriptase 反轉錄 PCR 反應之溶液組成 -----	45
表八、反轉錄 PCR 反應程序 -----	45
表九、iQ™ SYBR® Green supermix qRT-PCR 反應之溶液組成 -----	45
表十、qRT-PCR 反應程序 -----	45

前言



白色念珠球菌 (*Candida albicans*)

白色念珠球菌是人體內主要的伺機型致病真菌之一，平時會以共生的方式存在於口腔、腸道、皮膚及泌尿生殖道中，不會對健康的人體造成傷害[1,2]。當人體的免疫力因年齡、器官移植、化學治療或 HIV 病毒感染造成缺失時，*C. albicans* 就會轉變為致病型態，可對宿主造成感染[3]。*C. albicans* 主要會造成兩種形式的感染：包含淺層感染 (superficial infections)，如口腔、陰道等表皮黏膜的念珠菌症 (candidiasis)，及致命的系統性感染 (systemic infections)，其所造成的致死率可高達 46% - 75% [2,3]。臨床統計發現，由真菌所引起並且致死的院內感染中，90% 以上皆來自於四種菌屬：分別為隱球菌屬 (*Cryptococcus*)、念珠菌屬 (*Candida*)、麴黴屬 (*Aspergillus*) 及肺囊蟲屬 (*Pneumocystis*) [4]。此外，念珠菌屬在美國為第四大造成院內菌血症感染的致病真菌[3]。依據台灣疾病管制署所建立的院內感染監視資訊系統 (Taiwan Nosocomial Infections Surveillance System, TNIS) 所公布的 2015 年第 2 季監視報告中，念珠菌屬在醫學中心加護病房常見醫療照護相關感染菌種所佔的比例，有逐年上升的趨勢，且自 2007 年開始其排名皆為第一名，其中 *C. albicans* 是造成感染的最主要菌種。

為了適應宿主體內多變的環境因子，*C. albicans* 具有多種的型態變化，包含酵母菌型 (yeast-form)、菌絲型 (hyphae)、假菌絲型 (pseudohyphae) 及 opaque 型態等[5]。*C. albicans* 可於以上型態之間進行轉換，而型態的可塑性 (phenotypic plasticity) 除了有助於 *C. albicans* 在不同器官組織中生存外，也可促進其生長及致病能力[6]。



White-Opaque 型態轉換及細胞特性

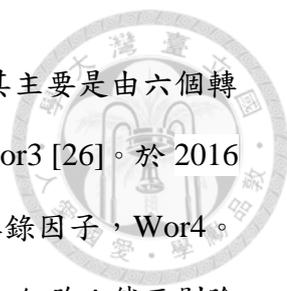
David R. Soll 的研究團隊於 1987 年發現白色念珠菌新的型態轉換，稱為 White-Opaque Switch [7]。此型態轉換具有遺傳性且屬可逆的轉換。white 細胞形狀多為圓形且表面平滑，於固態培養基上會形成半球型光滑的白色菌落。opaque 細胞形狀則接近橢圓形，其體積約為 white 細胞的兩倍大，表面還具有獨特的粗糙顆粒構造，於固態培養基上為平坦粗糙的灰色菌落，同時可以被 phloxine B 染劑選擇性染色，產生粉紅色的菌落[2,3,7]。這兩種細胞擁有截然不同的細胞特性，不論是在形態外觀，交配能力、致病力、基因表現以及與宿主免疫系統的交互作用等皆有著極大的差異[4]。opaque 細胞具有交配能力，當接收到相反性狀之 opaque 細胞所分泌的費洛蒙 (pheromone) 後，會產生交配突出物 (mating projections)，並進行交配反應，完成有性生殖[8]；white 細胞雖然不具有交配能力，但接收到 pheromone 的刺激時，會形成生物膜，幫助維持 pheromone 的濃度梯度，以促進 opaque 細胞交配反應[9-10]。此外，white 細胞主要會造成宿主系統性的感染，opaque 細胞則多是使宿主產生表皮感染[11-12]。由於 opaque 細胞中 *SAP1* 基因的大量表現，會轉譯出蛋白酶，進而幫助 *C. albicans* 黏附並損害宿主的表皮皮層[11]。White-Opaque 型態轉換也被認為可以協助 *C. albicans* 逃離宿主的防禦機制[13]。2004 年 Geiger 等人發現 white 細胞所分泌的化學誘導物 (chemoattractant) 會吸引宿主的多形核白血球 (polymorphonuclear leukocytes, PMNs) 靠近並產生吞噬作用；然而 opaque 細胞卻具有躲避宿主免疫細胞攻擊的能力[14]。後續在 Sasse 的研究亦觀察到，將 white 細胞及 opaque 細胞與人類的 PMNs 混合後，PMNs 只會針對 white 細胞進行吞噬[15]。同時，white 細胞也較容易被先天免疫細胞所吞噬，如老鼠的 macrophage-derived 細胞株、果蠅的 S2 細胞等[16]。這些結果顯示 White-Opaque 型態的轉換提供 *C. albicans* 對不同宿主環境絕佳的適應方式。



White-Opaque 型態轉換之調控

White-Opaque 型態轉換主要是由四個轉錄因子所調控，分別為 *Wor1*、*Wor2*、*Czf1* 以及 *Efg1* [17]。其中，*Wor1* 是型態轉換過程中最重要的調節因子。若將 *WOR1* 基因剔除，會使得細胞停留於 white 型態而無法轉換成 opaque 型態[18]。當 white 細胞中 *Wor1* 蛋白質的表現量超過閾值水平 (threshold level) 時，會促使細胞轉變為 opaque 型態。此外，*Wor1* 蛋白質會結合至自身 *WOR1* 基因的啟動子 (promoter)，轉錄並轉譯出更多的 *Wor1* 蛋白質，形成一個正回饋迴路 (positive feedback loop)，促使細胞進行 White-Opaque 型態轉換並且穩定維持於 opaque 的型態[18-20]。此外，*Czf1* 及 *Wor2* 蛋白質也扮演著正向調控的角色，*Czf1* 蛋白質的大量表現可以促進 white 細胞轉變為 opaque 細胞，但卻不參與後續 opaque 型態的維持；而 *Wor2* 蛋白質則是能幫助 opaque 細胞穩定的存在[17, 21]。在 White-Opaque 型態轉換過程中，*Efg1* 蛋白質為負向的調控因子，其大量表現可以使 opaque 細胞轉變成 white 細胞，並且幫助 white 型態的維持[22-23]。*Wor1* 蛋白質除了與自身基因的啟動子結合外，也會結合上 *WOR2*、*CZF1* 及 *EFG1* 基因的啟動子。於 opaque 型態時，*Wor1* 蛋白質藉由刺激 *WOR1*、*CZF1* 和 *WOR2* 基因大量表現，與抑制 *EFG1* 基因表現，確保細胞得以穩定停留於 opaque 細胞。同時，*Wor2* 蛋白質會正向調控 *WOR1* 基因的活性，而 *Czf1* 蛋白質則利用抑制 *EFG1* 基因表現的方式，幫助 *WOR1* 基因得以持續表現。於 white 型態時，*Efg1* 蛋白質會藉由抑制 *WOR2* 基因，進而間接抑制 *WOR1* 基因的表現[17]。

近年來的研究發現，*Ahr1* (*Zcf 37*) 與 *Wor3* 也會影響 White-Opaque 型態轉換[24-25]。*Ahr1* 蛋白質可以藉由調控 *Efg1* 轉錄因子，促使 opaque 細胞轉變成 white 細胞[24]。而細胞之中 *WOR3* 基因的大量表現，則會刺激其轉變為 opaque 型態；有趣的是，剔除 *WOR3* 基因，並不影響 White-Opaque 型態轉換的效率，且能使 opaque 細胞穩定存在於 37 °C 培養條件下[25]，這些結果顯示 *Wor3* 蛋白質與過去所發現的調控因子有著不同的角色，接著於 2013 年 Johnson 的研究團



隊針對 White-Opaque 型態轉換，提出了新的調控迴路模式，其主要是由六個轉錄因子所組成，分別為 Wor1、Wor2、Czf1、Efg1、Ahr1 及 Wor3 [26]。於 2016 年 Johnson 的研究團隊發現 White-Opaque 型態轉換的第七個轉錄因子，Wor4。當 Wor4 蛋白質大量表現時，可以促進 white 細胞轉變為 opaque 細胞；然而剔除 *WOR4* 基因則會使細胞無法進行 White-Opaque 型態轉換。顯示 Wor4 蛋白質對於 opaque 型態的建立及維持皆具有關鍵影響力，其調控模式與先前發現的調控因子截然不同。同時，藉由 ChIP-sequencing 分析發現 Wor4 蛋白質與現有的 White-Opaque 型態轉換調控迴路有著高度相關性[69]。

White-Opaque 型態轉換同樣也會受到 *C. albicans* 的性狀 (mating type) 所調控 [6,12]。*C. albicans* 具有雙套染色體，在其第五對染色體上含有 *MTL* (mating-type-like) locus 基因座，能夠產生三種性狀組合，包含 *MTLa/a*、*MTL α / α* 以及 *MTLa/ α* [8]。而在自然界中所分離得到的 *C. albicans* 菌株大多為 *MTLa/ α* ，由於同時帶有 **a** 和 α 基因，因此可以產生的 **a1** 蛋白質與 $\alpha 2$ 蛋白質，並組成 **a1/ $\alpha 2$** 異二聚體蛋白質 (heterodimer)。**a1/ $\alpha 2$** 異二聚體蛋白質會抑制 *WOR1* 基因表現，使 white 細胞無法轉換為 opaque 型態。因此僅有同型合子的 *MTLa/a* 及 *MTL α / α* 菌株才有機會能進行 White-Opaque 型態轉換[12]。

除此之外，外在環境因子也是影響 White-Opaque 型態轉換的關鍵因素。環境中的氧化壓力、嗜中性白血球 (neutrophils) 以及低劑量的紫外線照射都可以促進 white 細胞轉換成 opaque 細胞[27]。而當溫度低於 4 °C 或是人體生理溫度 (37 °C) 時，則會使 opaque 細胞不穩定，且極易轉變回 white 型態[28]。在厭氧環境之中，則會透過增加轉錄因子 Czf1 蛋白質的活性，進而刺激 White-Opaque 型態轉換，即使於人體生理溫度 (37 °C) 仍有大量 white 細胞轉變為 opaque 細胞 [29]。同時研究也指出，高濃度的二氧化碳 (CO₂) 及 N-Acetylglucosamine (簡稱為 NAG) 皆能透過 cAMP/PKA 訊息傳遞路徑，正向調控 Wor1 蛋白質，不僅促使 opaque 細胞的形成，且能穩定存在於人體生理溫度 (37 °C) 之下[30-31]。當

細胞暴露於基因毒性 (genotoxic) 壓力時，如含有甲磺酸甲酯 (Methyl methane sulfonate, MMS) 等化學物質的環境，亦會增加細胞 White-Opaque 轉換的效率 [32]。



Opaque 細胞之交配反應

於自然界中所分離得到的 *C. albicans* 大多為 *MTLa/a* 菌株[33]。當要進行交配時，*MTLa/a* 菌株須先進行同型合子化 (homozygosis)，產生 *MTLa/a* 或 *MTLa/a* 菌株，再轉換為具有交配能力之 opaque 細胞[6]。*MTLa/a* 及 *MTLa/a* opaque 細胞同時存在時，會個別分泌出 **a** 或 α -pheromone，誘導相反性狀之細胞產生交配突出物 (mating projections)。接著親代細胞之細胞核移動至突出物末端，隨後相反性狀之之交配突出物相互接觸並行核融合反應，形成具有四套染色體的 *MTLa/a/a/a* 子代[8]。*C. albicans* 與真菌的標準模式菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 相似，皆可行有性生殖，但兩者的交配機制卻有所不同[34-36]。首先，*C. albicans* 必須先經由型態轉換後才可行交配反應[6]。此外，*S. cerevisiae* 為單套染色體細胞，交配後會得到雙套染色體之子代，隨後由減速分裂 (meiosis) 再次回復至單套染色體狀態[35]。而 *C. albicans* 則為雙套染色體，交配後的子代會具有四套染色體，後續經由隨機失去染色體的方式變回雙套染色體的狀態[37]，然而目前對於 *C. albicans* 隨機失去染色體的相關機制仍然不明。

費洛蒙誘導 white 細胞之生物膜形成 (Pheromone-induced biofilm)

當同型合子之 *C. albicans* white 細胞經型態轉換為 opaque 細胞後，即具有交配能力，能進行有性生殖。而 white 細胞則被視為不具交配能力，故在 pheromone 誘導下並不會有交配反應發生[3,6,8,9]。2003 年 Lockhart 等人發現當 white 細胞受到 pheromone 刺激時，與 pheromone 訊息傳遞路徑相關的多個基因之表現量仍然有增加的趨勢[38]，同時於 white 細胞表面亦觀測到 pheromone 接收器

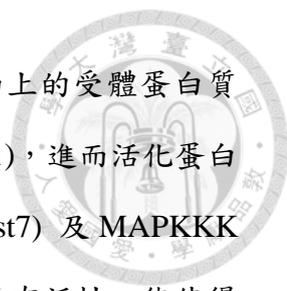


(receptor) 的存在[10]。而於 2006 年 Soll 的研究團隊發現 α -pheromone 刺激下，*MTLa/a* white 細胞會在固體表面產生細胞附著；同時若將 *MTLa/a* opaque 細胞加至 *MTLa/a* white 細胞群時，則能促使 white 細胞形成生物膜[10]。當 *MTLa/a* 及 *MTLa/a* white 細胞接受到相反性狀之 opaque 細胞所分泌之 pheromone 時，會誘導 white 細胞於固體表面產生附著，在多層細胞附著堆疊後，細胞開始產生菌絲 (hyphae) 並分泌胞外聚合物 (extracellular matrix)，逐漸發展為成熟的費洛蒙誘導之生物膜 (pheromone-induced biofilm) [39-41]。而過去研究曾指出費洛蒙誘導之生物膜的產生，得以使 opaque 細胞分泌的 pheromone 形成穩定的濃度梯度，促進 opaque 細胞間的向化性 (chemotropism) 並提高交配效率[10]。

C. albicans 在面臨不同環境條件時，會形成不同種類的生物膜，包含費洛蒙誘導生物膜 (pheromone-induced biofilm) 及傳統生物膜 (conventional biofilm)。兩者雖然於結構上十分相似，但卻擁有截然不同的功能[41]。傳統生物膜具有極低的滲透性，介於約 300 Da -140 kDa 大小的分子物質難以通透，同時能抵抗宿主白血球的吞噬作用，且對於抗真菌藥物 (如 fluconazole) 有較高的抗性，因此被認為與 *C. albicans* 的致病能力有著相關性。而費洛蒙誘導生物膜則是有著高滲透性，對於白血球的吞噬作用及抗真菌藥物的抗性皆較低[41-43]。但是其高滲透的特性則能幫助 pheromone 濃度梯度的建立及維持，進而促進 opaque 細胞的交配反應[10]。2013 年 Park 等人發現將 opaque 細胞接種於費洛蒙誘導生物膜之中的交配效率，比存在於傳統生物膜的 opaque 細胞高出約 10 倍至 100 倍[40]。顯示費洛蒙誘導生物膜的生成與 *C. albicans* 的有性生殖有著正相關。

費洛蒙訊息傳遞路徑 (pheromone MAP kinase pathway)

C. albicans 之 opaque 細胞接收到 pheromone 刺激後，會促使交配反應的進行，而 pheromone 訊號主要會透過 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 訊息路徑來傳遞[8]。由 opaque α 細胞所分泌的 α -pheromone 及 opaque **a** 細胞所分泌



的 a-pheromone，會分別結合至相反性狀之 opaque 細胞表面上的受體蛋白質 (Ste2 或 Ste3)，接著啟動 G-蛋白質複合體 (Ste4、Ste18 及 Cag1)，進而活化蛋白質激酶，包含 MAPKs (Cek1、Cek2)、MAPKK (MAPK kinase, Hst7) 及 MAPKKK (MAPKK kinase, Ste11)。被磷酸化之 MAPKKK (Ste11) 會具有活性，能使得 MAPKK (Hst7) 磷酸化而活化，且再進一步藉由磷酸化去活化 MAPKs (Cek1、Cek2)。而活化態的 MAPKs 會促使轉錄因子 Cph1 調控下游基因表現，使 opaque 細胞能順利進行交配反應[8,44-45]。

在交配反應中，*C. albicans* 不論於細胞型態或是進行調控的 pheromone 訊息傳遞路徑皆與 *S. cerevisiae* 有著高度的相似性。其中，參與在 *C. albicans* 費洛蒙訊息傳遞路徑中的 pheromone、受體蛋白質、MAPK 訊息傳遞路徑之調控因子、鷹架蛋白質 (Scaffold protein)，甚至是轉錄因子皆與 *S. cerevisiae* 具有同源性 [44,46-49]。

C. albicans 同型合子的 white 細胞雖不具有交配能力，但在受到 pheromone 誘導下，會形成生物膜。於 2008 年 Yi 等人發現當 white 細胞接收到 pheromone 刺激時，會透過與 opaque 細胞交配反應之中相同的受體蛋白質 (Ste2 或 Ste3)、相同的 G-蛋白質複合體 (Ste4、Ste18、Cag1)、相同的 MAPK 訊息傳遞路徑，來促使 white 細胞產生細胞附著並生成生物膜[50]。2010 年 Soll 的研究團隊發現參與 white 細胞的費洛蒙訊息傳遞路徑的轉錄因子為 Tec1 [51-52]。然而，本實驗室於 2013 年則發現 Cph1 才是調控 white 細胞中費洛蒙反應之最主要的調控子。顯示 Cph1 對於 opaque 細胞及 white 細胞的費洛蒙訊息傳遞皆扮演重要的調控角色[53]。



Mfa1, a-費洛蒙前導蛋白質 (a-pheromone precursor)

由費洛蒙訊息所調節的交配反應 (pheromone-mediated mating process) 於真菌生物十分常見[54]。當 *C. albicans* 進行有性生殖時，opaque 型態之 *MTLa/a* 及 *MTLa/a* 菌株，亦會藉由各自分泌出的 **a** 或 α -pheromone，誘導相反性狀之細胞行交配反應，最後產生具有四套染色體的 *MTLa/a/a/a* 子代[8]。於 2007 年 Whiteway 的研究團隊發現 *MTLa/a* opaque 細胞接受到 α -pheromone 刺激時，會促使 *MFA1* 基因大量表現並產生 **a-費洛蒙前導蛋白質 (a-pheromone precursor)**，其由 42 個胺基酸所組成[55]。經由轉譯後修飾 (posttranslational modification) 作用下，會轉變為僅含有 14 個胺基酸之成熟的 **a-pheromone**，而後藉由 **a-費洛蒙運輸蛋白質 (a-pheromone transporter, Hst6)** 將具有活性的 **a-pheromone** 運送至細胞外[49,56-57]。研究中也指出，分別將 *MTLa/a* 及 *MTLa/a* opaque 細胞中的 *MFA1* 基因剔除，僅 *MTLa/a* 菌株無法進行交配，而 *MTLa/a* 菌株的交配現象仍然存在，顯示 *MFA1* 基因只會影響 *MTLa/a* opaque 細胞的交配反應[55]。隨後於 2014 年 Huang 的研究團隊則發現，*MTLa/a* 的 white 細胞受到 α -pheromone 刺激或與 *MTLa/a* 之 opaque 細胞產生碰觸時，也會促使 *MTLa/a* 之 white 細胞分泌出 **a-pheromone**，並進一步誘導 *MTLa/a* 之 opaque 細胞生成交配突出物，從而提高 opaque 細胞的交配效率[58]。

Hst6, a-費洛蒙運輸蛋白質 (a-pheromone transporter)

真菌標準模式菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 同樣可行有性生殖，單套染色體的 *MATa* 及 *MAT α* 細胞會各自分泌與性狀相同之 pheromone，誘導相反性狀的細胞產生突出物 (shmoos)，待兩者突出物結合後即產生具有雙套染色體之 *MATa/a* 子代[59-60]。其中，*MATa* 細胞是由 *MFA1* 及 *MFA2* 基因生成 **a-費洛蒙前導蛋白質 (a-pheromone precursor)**，經修飾作用成為成熟的 prenylated **a-pheromone**[57]。最後透過 **a-費洛蒙運輸蛋白質, Ste6 (a-pheromone transporter)**



將其運送至細胞外，參與交配反應[61]。

而 Ste6 運輸蛋白質為 ABC (ATP-binding cassette) 運輸蛋白質分子，其需要藉由水解 ATP 獲取能量後，才可將物質進行運送。過去研究發現將 *S. cerevisiae* MATa 細胞的 STE6 基因剔除時，會使得 MATa 細胞所產生的成熟或未成熟之 a-pheromone 累積在細胞之中，無法被分泌至細胞外，並進而導致交配反應的缺失[56,61,70]。此外，研究也指出 STE6 基因的表現於 MATa 細胞中會受到 $\alpha 2$ 蛋白質所抑制，而在 MATa/ α 細胞則是受 a1/ $\alpha 2$ 異二聚體蛋白質 (heterodimer) 抑制，顯示其具有 MATa-specific 的特性[71]。

於 1998 年 Thomas 的研究團隊將 *C. albicans* 的 HST6 (CaHST6) 基因送入 *S. cerevisiae* MATa 細胞所構築的 Ste6 Δ 中，發現 HST6 能成功將其運送 a-pheromone 的功能互補回來，並使得突變株再次擁有交配能力[56]。同時於蛋白質序列分析上，CaHst6p 與 ScSte6p 具有高度同源性，有著 35% 一致性 (identity) 及 48% 相似性 (similarity)。因此認為 Hst6p 可能是 *C. albicans* 的 a-費洛蒙運輸蛋白質[56]。隨後 2002 年 Magee 的研究團隊發現若剔除 *C. albicans* MTLa/a 及 MTL α / α opaque 細胞中的 HST6 基因時，僅 MTLa/a 菌株失去交配功能，MTL α / α 菌株則不受影響，表示 HST6 基因對於 MTLa/a 細胞的交配扮演著重要角色[49]。

Hst6 運輸蛋白質由 1323 個胺基酸所組成，其結構預測包含兩個相似的半部 (halves)，每個半部都含有穿膜區域 (transmembrane domain, TMD) 以及 ATP 結合區 (cytosolic nucleotide-binding domain, NBD)。而 TMD 具有六個穿膜片段 (segments) 負責物質的運送，NBD 則為 ATP 結合與水解的部位，因此 Hst6 運輸蛋白質隸屬於 ABC (ATP-binding cassette) 運輸蛋白質分子[56,66]。ABC 運輸蛋白質廣泛的存在於原核及真核生物之中，負責多樣物質的運送，包含蛋白質、小分子多肽、環狀醣類 (cyclic sugars)、離子等。過去研究發現 ABC 運輸蛋白質也可將藥物運輸至細胞外，藉此提高多種類型細胞的抗藥性[67]。如 *S.*



cerevisiae 的 Pdr5、Snq2、Ycf1 及 Yor1 蛋白質，當大量表現時會增加細胞的多效性藥物抗性(pleiotropic drug resistance)；而 *C. albicans* 的 Cdr1 及 Cdr2 蛋白質大量表現則能提高其對於抗真菌藥物 (azole為主) 的抗性[56,66]。除此之外，過去研究還指出 Hst6 運輸蛋白質與哺乳類細胞中的多重藥物運輸蛋白質 (multidrug transporter)，P-glycoprotein 於結構及功能上皆有高度同源性，因此認為 Hst6 運輸蛋白質對於 *C. albicans*的抗藥性也具有影響的潛力，但仍未被證實 [56]。

實驗目的

於 2006 年 Soll 的研究團隊發現當 white 細胞接收到 pheromone 刺激時，會在固體表面產生細胞附著，並逐漸發展成生物膜，稱為費洛蒙誘導之生物膜 (pheromone-induced biofilm) [10]。而費洛蒙誘導之生物膜的生成則被認為可以幫助 opaque 細胞所分泌的 pheromone 維持穩定的濃度梯度，以促進 opaque 細胞交配反應的進行[10]。至 2008 年 Yi 等人發現 white 細胞在 pheromone 誘導下，會透過與 opaque 細胞相同的費洛蒙訊息傳遞路徑，來促使細胞貼附及形成生物膜 [50]。然而目前對於費洛蒙誘導之生物膜生成的相關機制以及與宿主之間的作用關係仍有許多待釐清的地方。於本實驗室先前的研究發現，給予 α -pheromone 刺激 *MTLa/a* 之 white 細胞後，藉由 cDNA 微陣列分析觀測到約有 200 個基因的表現呈現增加的趨勢，其中與 **a**-pheromone 生合成及運送相關的 *MFA1* (產生 **a**-pheromone 前導蛋白質) 及 *HST6* (產生 **a**-pheromone 運輸蛋白質) 也產生高度表現[53]。因此推測由 α -pheromone 所誘發的 white 細胞之細胞附著與 **a**-pheromone 之間可能存在著關聯性。本次研究欲藉由剔除 *MFA1*、*HST6* 得到 *mfa1*、*hst6* 突變株，在外加 α -pheromone (+MF α) 誘導下，觀測費洛蒙誘導之細胞附著是否會受 *MFA1* 及 *HST6* 基因所影響，並進一步探討其調控機制。

材料與方法



實驗藥品及培養基

本研究所使用之藥品列於表一。培養基及製作流程如附錄所示。

聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

本研究使用 DNA 聚合酶 Gotag (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 或 Phusion (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) 進行 PCR 反應，將所需之基因片段進行放大。而 PCR 反應溶液及流程如表四至表六，利用重複的 Denaturation、Annealing 及 Extension 反應程序 30 至 35 次放大基因片段。

洋菜膠電泳分析 (Agarose gel electrophoresis)

取 1 g Agarose 加入 100 mL 1× TAE 緩衝溶液 (40 mM Tris base, 20mM acetic acid, 1mM EDTA, pH8.0) 中，加熱溶解後製成 1.0 % 的洋菜膠體。當膠體降溫至約 60 °C 時，加入 5-10 μL 的 Ethidium bromide 溶液 (原始濃度為 10 mg/mL)，均勻混合後，倒入鑄膠槽並插上齒梳，避光靜置至膠體凝固。小心移除齒梳，將膠體放入水平電泳槽 (Mini Horizontal Gel Electrophoresis System, Major Science, Saragota, CA, USA) 中，再加入 1× TAE 緩衝溶液至膠體被完全淹沒。將 DNA 樣品與 6× Loading dye (GMbiolab Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 混合，並注入膠體樣本槽內，同時注入 DNA marker (GenKB DNA Ladder, GMbiolab Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 至其餘樣本槽，作為 DNA 片段大小的判斷依據。以 120 伏特 (V) 電壓進行 20-25 分鐘的電泳，待 DNA 分離至一定程度即停止電泳，並利用紫外光顯示出 DNA 樣品和 marker 的條帶。拍照記錄完成後，藉由 DNA marker 的對照，即可推測出 DNA 樣品的片段大小。



DNA 片段回收

本實驗使用 GeneKlean Gel Recovery Kit & PCR CleanUp Kit (MDBio, Inc., Shandong, China) 進行 DNA 片段回收。在回收 PCR DNA 樣本時，需加入三倍體積的 Binding solution 至 PCR 樣本中，混勻使其呈現淡黃色。而進行膠體 DNA 片段回收時，先將欲回收之 DNA 片段洋菜膠體切下，加入 500 μ L 的 Binding solution B，並於 60 $^{\circ}$ C 乾浴槽中加熱溶解，確認溶液是否為淡黃色。將淡黃色之樣本溶液移入管柱，高速離心 1 分鐘。去除廢液後加入 500 μ L 的 Washing solution，高速離心 1 分鐘並移除廢液，此步驟需重複 2 次。再次高速離心 1 分鐘，用以去除殘留的酒精。將管柱移至新的微量離心管，靜置晾乾後，加入 20-50 μ L 的無菌水至管柱濾膜中心處，以回溶 DNA 片段。靜置 2 分鐘後高速離心，收集 DNA 溶液，儲存於 -20 $^{\circ}$ C 下備用。

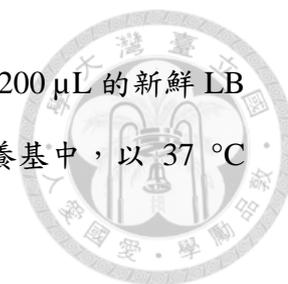
DNA 接合 (Ligation) 反應

將欲接入之 DNA 片段 (insert) 與 vector 以 5:1 體積混合，加入 2 μ L 的 T4 DNA ligase buffer，以無菌水補充體積至 19 μ L。最後加入 1 μ L 的 T4 DNA ligase (350 U/mL, Takara Bio Inc., Shiga, Japan)，混合後靜置於 16 $^{\circ}$ C 作用過夜，使 insert 與 vector 接合。

E. coli 轉型作用 (Transformation)

本實驗以 Heat shock 的方式，將質體送入 *E. coli* 的 DH5 α 菌株。首先將 DH5 α 之勝任細胞 (competent cell) (Fast-TransTM Competent *E. coli* DH5 α Cells, Protech Technology Enterprise Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 自 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出，置於冰浴上回溫溶解。加入質體溶液後，置於冰浴上 10 分鐘，接著以 42 $^{\circ}$ C 乾浴槽進行 Heat shock 2 分鐘，隨後再置於冰上 10 分鐘冷卻。加入 1 mL 新鮮的 LB 培

養液，於 37 °C 震盪培養 1 小時。離心去除上清液後，利用 200 μ L 的新鮮 LB 培養液回溶菌體，並均勻塗盤於 LB/Chloramphenicol 固態培養基中，以 37 °C 培養過夜，待菌落生成後，利用 PCR 反應進行檢測。



***E. coli* 質體 DNA 萃取**

以 Mini PlusTM Plasmid DNA Extraction System (Viogene BioTek Corp., New Taipei, Taiwan) 進行質體 DNA 萃取。由培養基挑取單一菌落的 *E. coli*，接種到 3 mL 的 LB/Chloramphenicol 培養液中，以 37 °C 震盪培養 12-16 小時。以 2600 rpm 轉速於室溫下將菌液離心 10 分鐘，移除上清液，加入 200 μ L 的 MX1 solution 回溶菌體，並移至新的微量離心管中。加入 250 μ L 的 MX2 solution，溫和晃動微量離心管使溶液均勻混合，並靜置 2-5 分鐘作用。加入 350 μ L 的 MX3 solution，溫和晃動微量離心管使溶液均勻混合，並靜置 2-5 分鐘作用。高速離心 10 分鐘後，小心取出上清液至管柱中，以高速離心 1 分鐘後去除廢液，接著加入 500 μ L 的 WN solution，高速離心 1 分鐘以去除廢液，再加入 700 μ L 的 WS solution，高速離心 1 分鐘去除廢液。最後再次高速離心 1 分鐘，將殘餘的酒精完全去除。管柱移至新的微量離心管，靜置晾乾後，取 50 μ L 的無菌水加到管柱濾膜中心處，回溶質體 DNA。靜置一段時間後，以高速離心收集質體 DNA，並儲存於 -20 °C 下備用。

質體的構築

本研究使用 pSFS2A 質體建立突變株質體，用以後續建構所需的 *C. albicans* 突變株及互補株[62]。而 *C. albicans* SC5314 標準序列來自線上資料庫 (Candida Genome Database, CGD. <http://www.candidagenome.org/>)。實驗中所使用之引子列於表二，由生物工程 (Sangon Biotech Co., Ltd., Shanghai, China) 合成。建構過程使用的限制酶酵素來自 New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA 及 Thermo

Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA。



建構 pSFS-HST6 KO 質體

分別使用引子對 NO. 291/292 及 NO. 293/294 以 PCR 擴增 *HST6* 基因的 5' flanking (435 bp) 和 3' flanking (550 bp) 基因片段。再利用限制酶 *Apa I/Xho I* 及 *Sac II/Sac I* 分別對 5' flanking 及 3' flanking 基因片段進行酵素截切反應，並與被相同限制酶截切的 pSFS2A 質體接合，建構出 pSFS-HST6 KO 質體。

建構 pSFS-MFA1 KO 質體

利用引子對 NO. 531/532 以及 NO. 658/659 分別放大出 5' flanking (480 bp) 和 3' flanking (511 bp) 兩種基因片段。以限制酶 *Apa I/Xho I* 及 *Not I/Sac II* 分別針對 5' flanking 及 3' flanking 基因片段進行酵素截切，再與相同限制酶截切過的 pSFS2A 質體接合，建構出 pSFS-MFA1 KO 質體。

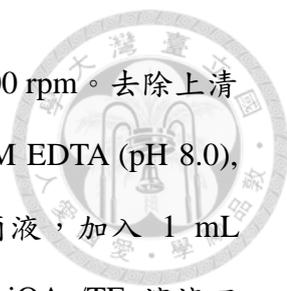
建構 pSFS-HST6 AB 質體

使用引子對 NO. 575/576 擴增出包含 *HST6* 啟動子的 DNA 片段 (4723 bp)。再以限制酶 *Apa I/Xho I* 進行酵素截切，與相同限制酶截切過的 pSFS2A 質體接合後建構出 pSFS-HST6 AB 質體。

構築 *C. albicans* 突變菌株

本研究中所使用及構築之 *C. albicans* 菌株列於附錄表三，各基因型皆構築兩株獨立菌株進行後續的實驗操作。

所有的 *C. albicans* 轉形作用都利用相同的實驗方式進行，在此以構築 *MTLa/a* 之 *hst6/hst6* 突變株為例說明。將 P37005 菌株接種至 YPD 培養液，於 30 °C 培養過夜。取出 200 μ L 過夜培養之菌液接種至 10 mL YPD 培養液，於



30 °C 培養 5 小時。室溫下離心 10 分鐘收集菌液，轉速為 2400 rpm。去除上清液後，加入 5 mL LiOAc/TE 溶液 [0.1 M Lithium acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)] 打散沉澱菌塊。再次離心收集菌液，加入 1 mL LiOAc/TE 溶液打散沉澱菌塊。再次離心收集菌液，以 200 μ L LiOAc/TE 溶液回溶沉澱菌塊。利用限制酶 *Apa* I 及 *Sac* I 截切 pSFS-HST6 KO 質體。於微量離心管中加入 LiOAc/TE 回溶之菌液 100 μ L、95 °C 預熱之 10 mg/mL ssDNA 10 μ L、限制酶截切後的 pSFS-HST6 KO 質體以及 1 mL LiOAc/PEG 溶液 [40 % PED, 0.1 M Lithium acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)] 並混勻，靜置於室溫下過夜。將混合液置於 42 °C 乾浴槽中加熱 1 小時，離心並去除上清液後，以 1 mL 新鮮的 YPD 培養液回溶菌體，於 30 °C 培養 4 小時。將 1 mL 菌液離心並收集菌體，以 200 μ L 新鮮的 YPD 培養液回溶，均勻塗盤於 YPD/NAT 培養基上。挑取菌落，利用引子對 6/295 及 7/296 進行 PCR 反應，分別確認 5' 及 3' check 基因片段 (898、1025 bp)，即可得轉形成功之 *hst6::SAT1/HST6* 菌株。將 *hst6::SAT1/HST6* 菌株塗盤至 Maltose 培養基上，麥芽糖 (maltose) 會活化 *MAL2p* 啟動子，使下游 *CaFLP* 基因表現，而 Flp 蛋白質可作用在 *FRT* 切位的兩端，以去除 *CaSAT1* 基因，得到不具有 NAT 抗性的 *hst6/HST6* 菌株。重複上述之步驟進行第二次轉形作用，將經酵素截切後的 pSFS-HST6 KO 質體送入 *hst6/HST6* 菌株，利用引子對 6/295、7/296 及 297/298 進行 PCR 反應，分別確認 5'、3' check 及 ORF 片段 (898、1025、802 bp)，即可得到轉形成功之 *hst6/hst6::SAT1* 菌株 (YL915、YL916)。於 RBY717 *MTLa/a* 菌株所構築的 *Rhst6* 突變株所使用之質體與轉型方法，和上述過程相同。經過 2 次 *C. albicans* 轉形作用後，利用引子對 6/295、7/296 及 297/298 進行 PCR 反應，獲得 3 段基因片段 (5' check、3' check 及 ORF)，確認 *C. albicans* 雙套染色體上的目標基因是否成功被剔除。最後即可得轉形成功之 *hst6/hst6::SAT1* 菌株 (YL769、YL770)。

構築 *mfa1/mfa1* 突變株時，以限制酶 *Apa* I 及 *Sac* II 截切 pSFS-MFA1 KO



質體，進行轉形作用，送入 P37005 菌株中。第一次轉形後，利用引子對 6/537、7/538 分別確認轉形基因之 5' 及 3' check 片段 (1090、1044 bp)，得到 *mfa1::SAT1/MFA1* 菌株。將 *mfa1::SAT1/MFA1* 菌株塗盤至 Maltose 培養基上，去除 *CaSAT1* 基因，得到不具有 NAT 抗性的 *mfa1/MFA1* 菌株。重複第二次的轉形作用，利用引子對 6/537、7/538 及 533/534，分別確認 5'、3' check 及 ORF 片段 (1090、1044、143 bp)，最後即可獲得 *mfa1/ mfa1::SAT1* 菌株 (YL1247、YL1248)。

構築 *hst6/hst6::HST6* 互補株

從 *E. coli* 的 GM48 菌株中抽取 pSFS-HST6 AB 質體，以去除質體之甲基化，接者利用限制酶 *Pfo* I 進行截切，轉形送入已不具有 NAT 抗性的 *hst6/hst6* 突變株 (YL915、YL916)。將生長出的菌落以引子對 297/298 進行 PCR 反應，確認 ORF 片段 (802 bp)，即獲得 *hst6/hst6::HST6* 互補株 (YL1089、YL1090)。

費洛蒙誘導之細胞附著 (Pheromone-induced cell adhesion)

將 white 細胞接種至 Spider 培養液中，於 30 °C 培養過夜。取 5×10^7 個細胞與新鮮的 1 mL Lee's 培養液均勻混合，並移入 12 孔盤內。分別加入 DMSO 或 α -pheromone (胜肽序列為 GFRLTNFGYFEPG，由 GMbiolab Co, Ltd. 合成) 於其中，使最終濃度各別為 0.01 % 及 10 μ g/mL，與菌液混勻後靜置於室溫下 24 小時。將上清液去除，以 phosphate-buffered saline (PBS) 小心清洗 2-3 次並拍照記錄。接著刮取蒐集吸附於 12 孔盤底的菌體，將其回溶於 1 mL 去離子水中，利用分光光度計測定 OD₆₀₀ 吸光值以測量菌數。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果。



C. albicans 菌株之交配能力測試

將缺乏 *ARG4* 基因並帶有 *CaSAT1* 基因的 *MTLa/a* (DSY211) [63] 以及具有 *ARG4* 基因並缺乏 *CaSAT1* 基因的 *MTLa/a opaque* 細胞接種至 Spider 培養液，置於 25 °C 培養過夜。利用分光光度計測定 OD₆₀₀ 吸光值定量菌數，再分別從兩菌液中取出 2 x 10⁷ 個細胞均勻混合。將孔徑 0.8 μm 之濾膜 (Nitrocellulose membrane gridded, Merk Millipore Ltd., Billerica, MA, USA) 置於 Spider 固態培養基上，使之充分吸收培養基的養分及水分。取 20 μL 的交配菌株混合液點在濾膜上，待菌液完全被吸收後，於 25 °C 下培養 48 小時。將濾膜上所有的交配菌株刮取下來，並回溶於 1 mL 去離子水中，以超音波震盪器 (Ultrasonic Processors VCX 130 PB, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) 打散菌塊。交配菌株液經序列稀釋後，均勻塗盤於 Arg⁻、NAT、Arg⁻NAT 固態培養基，置於 30 °C 培養 2-3 日。統計生長在培養基上的菌落數，於 Arg⁻ 或 NAT 固態培養基可長出親代之菌落，而 Arg⁻NAT 固態培養基則只會長出子代之菌落。計算菌株交配效率為 Arg⁻NAT/ Arg⁻ 或是 Arg⁻NAT/ NAT。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果。

流式細胞儀測定菌株染色體套數 (ploidy)

將 *C. albicans* 菌株接種至 YPD 培養液，於 30 °C 培養過夜。以 OD₆₀₀ 吸光值測定菌液。取出 500 μL 菌液 (OD₆₀₀ ≥ 0.5) 至新的微量離心管，並加入 1.1 mL 的酒精 (95%)。溫和地翻轉微量離心管混合菌液和酒精，再放置於 4 °C 環境作用至少 1 小時。以最大轉速離心 5 分鐘，去除上清液後，利用 750 μL 含 5 mM EDTA 之 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液清洗細胞，移除殘餘的酒精。離心去除上清液後，以相同溶液再次回溶菌體，並藉由超音破震盪器打散菌塊。離心去除上清液後，加入 500 μL RNAase A 溶液 (2 mg/mL RNAase A, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 回溶菌體，靜置於 37 °C 作用至少 2 小時。離心並小心移除



RNAase A 溶液後，以 250 μ L 新鮮配製之 Pepsin 溶液 (5 mg/mL Pepsin, 55 mM HCl) 於 37 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘。離心去除 Pepsin 溶液，加入 750 μ L 含 5 mM EDTA 之 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液回溶細胞。再次離心後，以 250 μ L 相同之溶液回溶細胞。取 50 μ L 溶液至新的微量離心管，加入 500 μ L 的 Sytox 溶液 (1 μ M Sytox green, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH7.5)，靜置於 4 $^{\circ}$ C 避光反應至少 1 小時。利用流式細胞分析儀 (BD FACSCanto II, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) 偵測樣品的染色體套數，並藉由 FlowJo 軟體 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) 分析測定結果。

傳統生物膜 (Conventional biofilm) 之生成

此實驗是以矽膠片作為生物膜生成的平台。先將矽膠片裁成固定大小之方形 (Cardiovascular Instruments Corp., PR72034-06N, 1.5 cm \times 1.5 cm) 後加以高溫滅菌，秤取各矽膠片的重量，並放入 12 孔盤中，添加 2 mL 的小牛血清 (Sigma B-9433)，以 37 $^{\circ}$ C 及轉速 125 rpm 進行預培養過夜。同時將 *C. albicans* 菌株接種至 YPD 培養液，於 30 $^{\circ}$ C 培養過夜。去除孔盤內的小牛血清後，以 2 mL PBS 溶液潤洗矽膠片，再加入 2 mL 的 Spider 培養液。利用分光光度計測定 OD₆₀₀ 吸光值定量 *C. albicans* 菌株，並從各菌液中取出約 2×10^7 個細胞，接種至處理過的 12 孔盤中，以 37 $^{\circ}$ C、125 rpm 震盪培養 4 小時。再將矽膠片以 3 mL PBS 溶液小心潤洗後，移至含有新鮮 2 mL Spider 培養液的 12 孔盤，於 37 $^{\circ}$ C、125 rpm 下震盪培養 48 小時。去除孔盤內的 Spider 培養液，並置於室溫下數天，晾乾矽膠片後秤取其重量，即可得生成之生物膜乾重。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果。

定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction)

本研究以 RiboPure™ RNA Purification Yeast Kit (Applied Biosystems, Bedford, MA, USA) 進行 Total RNA 的萃取。再藉由 iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) 將 RNA 反轉錄為互補 DNA。並以 CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Singapore) 進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，所使用的 qRT-PCR 反應溶液來自 iQ™ SYBR® Green supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)。最後利用 CFX Manager™ Software 軟體 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) 分析測定結果。

本研究中所有的 qRT-PCR 分析皆利用相同的實驗方式進行，在此以費洛蒙誘導細胞附著的實驗條件為例說明。菌株接種於 Spider 培養液，30 °C 下培養過夜。取 5×10^7 個細胞與 1 mL Lee's 培養液混合，並移入 12 孔盤。分別加入 DMSO (-MF α) 或 α -pheromone (+MF α)，與菌液均勻混合後靜置於室溫 4 小時。收集菌體 (約 3×10^8 個細胞) 於室溫下離心 10 分鐘，去除上清液。依序加入 480 μ L 的 Lysis buffer、48 μ L 的 10 % SDS 溶液以及 480 μ L 的 Phenol : Chloroform : IAA，以試管震盪器 (Vortex) 震盪 10-15 秒。將樣本混合液移入含有 750 μ L Zirconia Beads 的 Screw Cap Tubes，隨後以試管震盪轉接器 (Vortex adapter) 於最大震盪速度下震盪 20 分鐘，使細胞破裂。於室溫下離心 10 分鐘，轉速為 16100 xg。抽取含有 RNA 產物之上層水溶液，並移至 15 mL 離心管。加入 1.4 mL 的 Binding buffer 及 940 μ L 的 100% Ethanol，均勻混合後，取 700 μ L 之樣本混合液至 Filter Cartridge 中，高速離心 1 分鐘以去除廢液。此步驟需重複 4 次將約 2.8 mL 之樣本混合液過濾完全。加入 700 μ L 的 Wash Solution 1，高速離心 1 分鐘並移除廢液。再加入 500 μ L 的 Wash Solution 2/3，高速離心 1 分鐘並移除廢液，此步驟需重複 2 次。再次高速離心 1 分鐘，以去除殘留的 wash solution。將管柱移至 2 mL Collection Tube，取 25 μ L 的 Elution Solution (事先預熱至 95 °C) 加到管



柱濾膜中心，回溶樣品之 RNA。靜置 3 分鐘後，以高速離心收集 RNA，此步驟需重複 2 次。接著於 RNA 抽取液中加入 5 μ L 的 DNase 1 Buffer 與 4 μ L 的 DNase I，置於 37 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，以消除殘留的 DNA 片段。加入 6 μ L 的 DNase Inactivation Reagent，混勻後於室溫下作用 5 分鐘。高速離心 2-3 分鐘，並抽取含 RNA 之上清液至新的離心管，儲存於 -20 $^{\circ}$ C 下備用。

利用 MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer (Life Tec Gen co, Tehran, Iran) 測定 RNA 的濃度及純度 (每個 RNA 樣品的 A260/A280 比值須為 1.9-2.1；A260/A230 比值須為 2-2.4)。並取 1 μ g 的 RNA 樣本液行反轉錄聚合酶鏈鎖反應，反轉錄為互補 DNA，而反轉錄反應的溶液及流程列於表七至表八。隨後取約 100 ng 之互補 DNA 進行定量即時聚合酶鏈鎖反應，其反應溶液與程序如表九至表十。為了分析各樣品之間的基因相對表現量，本研究以 *ACT1* 基因的表現作為內部校正點 (Internal control)，校正非實驗所產生的差異，其計算公式為 Ct of Target gene - Ct of reference gene (Internal control) = Δ Ct。隨後利用 Δ Ct of Sample - Δ Ct of Calibrator (實驗基準點) = $\Delta\Delta$ Ct，得到與實驗基準點相對應的 $\Delta\Delta$ Ct 值，最後將其帶入公式 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ，即可得到實驗點與實驗基準點之間基因的相對倍率。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果。

White-to-Opaque 型態轉換

將 *C. albicans* 菌株接種至 YPD 培養液，於 30 $^{\circ}$ C 培養過夜。將 white 細胞稀釋至一定濃度 (約 2×10^7 個細胞/mL) 後，取適量菌液均勻塗抹在 Lee's NAG 培養基上，每盤細胞數約 200 至 300 個左右，於 25 $^{\circ}$ C 培養 4-5 天。培養基內含有 Phloxine B 染劑，會選擇性的將 opaque 細胞的細胞壁染成粉紅色。white-opaque 型態間的轉換效率以 opaque 菌落數/(所有菌落數) 做計算。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果。



結果

壹、探討 Hst6 運輸蛋白質與 white 細胞費洛蒙誘導細胞附著之關係

1. PCR 鑑定 *hst6*、*mfa1* 突變株及 *hst6* 互補株之構築

本研究首先於編號 P37005 之 *MTLa/a* 野生型菌株中剔除 *HST6*、*MFA1* 基因。藉由 2 次 *C. albicans* 轉形作用之後，實驗針對每個目標基因，都設計了 3 組引子對 (如材料方法所敘述)，利用 PCR 反應獲得的 3 段基因片段 (5' check、3' check 及 ORF)，確認 *C. albicans* 雙套染色體上的目標基因是否成功被剔除。而當中的 5' 及 3' check 是用來判斷基因是否產生重組，若質體 DNA 順利與 *C. albicans* 目標基因置換時，則可以被引子對擴增出 5'、3' check 的 PCR 產物。野生株由於未有基因重組，在此可作為實驗的負控制組。ORF 的基因片段則能確認菌株是否還具有目標基因，若目標基因已經被剔除，引子對將無法擴增 ORF 的 PCR 產物。而野生株還保有目標基因，因此做為實驗的正控制組。實驗結果如圖一所示，*hst6*、*mfa1* 突變株皆無出現 ORF 的基因片段，但同時都具有 5'、3' check 之 PCR 產物，表示本實驗已在 *MTLa/a* 野生型菌株 P37005 中成功剔除 *HST6*、*MFA1* 基因。針對 *hst6* 互補株的部分，經過 1 次 *C. albicans* 轉形作用後，透過 PCR 反應所得之 ORF 基因片段 (引子對同上述)，檢測 *HST6* 基因是否有成功互補回 *MTLa/a* 的 *hst6* 突變株。野生株在此做為實驗的正控制組，而 *hst6* 突變株則是負控制組。實驗結果如圖一，*hst6* 互補株具有 ORF 之 PCR 產物，顯示本實驗成功構築出 *hst6* 互補株 (*hst6/hst6::HST6*)。

2. 剔除 *HST6* 基因使得費洛蒙誘導之細胞附著數量顯著下降，剔除 *MFA1* 基因不會造成影響

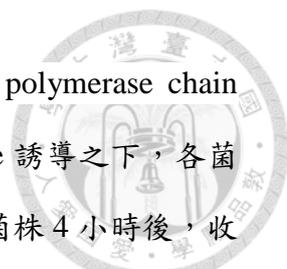
於本實驗室先前研究發現 *MTLa/a* white 細胞在 α -pheromone 誘導之下，經由 cDNA 微陣列 (cDNA-microarray) 分析，觀測到 *MFA1* 及 *HST6* 基因皆產生大量

表現[53]。而 *MFA1* 在 *MTLa/a* 細胞中是負責 α -費洛蒙前導蛋白質 (α -pheromone precursor) 的生成[55]；*HST6* 則是將成熟的 α -pheromone 分泌至細胞外的 α -費洛蒙運輸蛋白質 (α -pheromone transporter) [56]，兩者的功能皆與 α -pheromone 有著相關性。因此，推測 *MFA1* 及 *HST6* 可能也會參與在 α -pheromone 所誘導的細胞附著之中，並深入探討其扮演的角色。

實驗將 white 細胞的 *MTLa/a* 野生株 (P37005)、*hst6* 突變株、*hst6* 互補株及 *mfal* 突變株外加 α -pheromone (+MFA) 刺激 24 小時，以 PBS 溶液小心清洗 2-3 次後拍照記錄。同時刮取附著於孔盤上的菌體，利用分光光度計測定 OD₆₀₀ 吸光值以測量菌數。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果，觀測各突變株與野生株之間是否存在顯著差異，結果如圖二。在未受到 α -pheromone (-MFA) 刺激下，菌株不會附著於底部。當受到 α -pheromone (+MFA) 誘導時，野生株及 *mfal* 突變株皆出現明顯的細胞貼附，由圖二的統計圖可觀察到兩者的細胞附著量相近，約有 1.4×10^8 個細胞附著。然而，*hst6* 突變株受 α -pheromone 誘導後的附著量只有約 5.6×10^7 個細胞。*hst6* 互補株在 α -pheromone 刺激後，細胞附著回復至野生株水準，約有 1.4×10^8 個細胞貼附。此外，藉由統計分析結果可以看到，*hst6* 突變株的細胞附著量與野生株相比有明顯的下降，存在著顯著差異 ($p < 0.001$)。同時由圖二的拍照結果圖顯示，野生株、*mfal* 突變株及 *hst6* 互補株皆有一層厚實的細胞附著於孔盤底部；而 *hst6* 突變株的貼附狀態則較薄且脆弱，於 PBS 沖洗過程易產生破裂。

3. *hst6* 突變株的 *PBR1* 基因表現與野生株相比明顯下降

由前一個實驗結果發現，*hst6* 突變株受費洛蒙誘導所產生之細胞附著與野生株相比有明顯減少，但在 *mfal* 突變株卻沒有出現相似的差異。過去研究指出，當 white 細胞受到 pheromone 刺激時，*PBR1* (Pheromone-induced Biofilm Regulator 1) 基因會大量表現，並影響 white 細胞的附著及生物膜生成[64]。因此，



本實驗欲利用定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction) 偵測野生株、*hst6* 突變株及 *mfa1* 突變株於 pheromone 誘導之下，各菌株的 *PBR1* 基因表現情形。實驗以 α -pheromone (+MF α) 刺激菌株 4 小時後，收集細胞並萃取其 RNA，利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcription-PCR) 轉錄為互補 DNA (cDNA)，再藉由 qRT-PCR 分析菌株的 *PBR1* 基因表現程度。本實驗選用 *ACT1* 基因作為內部校正點 (internal control)，以消除各樣品之間非實驗所產生的差異。而未受 α -pheromone (-MF α) 刺激的野生株 *PBR1* 基因表現值則設為實驗基準點，去比較分析受到 α -pheromone 誘導後，菌株 *PBR1* 基因的表現情況，結果如圖三。菌株沒有 α -pheromone 的誘導時，其 *PBR1* 基因表現值皆維持基準水平，約為 1 左右。而野生株及 *mfa1* 突變株於 α -pheromone 刺激下，*PBR1* 的基因表現皆出現大幅增加，約提高 40 倍以上的表現量，且 *mfa1* 突變株與野生株之間並不存在統計差異。然而，*hst6* 突變株與 α -pheromone 作用後，*PBR1* 的基因表現和野生株相比有顯著下降，約只有 2 倍的表現量，其表現情形近乎於未受 α -pheromone 刺激的組別 (圖三)。由 qRT-PCR 的結果可以再次證實，Hst6 運輸蛋白質會影響費洛蒙所誘導之細胞附著，但是 Mfa1 蛋白質卻不會參與其中。

4. *HST6* 基因的缺失會影響費洛蒙訊息傳遞路徑之相關基因表現

C. albicans 的 white 細胞接收到 opaque 細胞所分泌的費洛蒙 (pheromone) 時，會形成費洛蒙誘導之生物膜，進而幫助 opaque 細胞交配反應的進行[39-41]。由 opaque α 細胞所分泌的 α -pheromone，會結合到 white **a** 細胞的 Ste2 受體蛋白質；而 opaque **a** 細胞所分泌的 **a**-pheromone，則結合至 white α 細胞的 Ste3 受體蛋白質上，進一步啟動 G-蛋白質複合體去活化 MAPK 訊息傳遞路徑，並促使轉錄因子調控下游基因表現，最後刺激 white 細胞產生細胞附著及費洛蒙誘導之生物膜[50]。先前實驗結果已觀察到，*hst6* 突變株生成費洛蒙誘導之細胞附著的



能力有顯著降低，因此推測費洛蒙訊息傳遞路徑是影響的關鍵因素。為探究其調控路徑，本研究利用 qRT-PCR 觀測野生株及 *hst6* 突變株在 α -pheromone 刺激後，菌株中 *STE 2* 與 *CEK1* 的基因表現是否出現差異。其中，Ste2 是 a 細胞上負責接收 α -pheromone 的受體蛋白質，Cek1 則為 MAPK 訊息傳遞路徑中的 MAPK[44,45,48]。實驗結果如圖四(A)，在未受 α -pheromone 的誘導下，所有菌株的 *STE2* 基因表現值皆約為 1 左右。而野生株於 α -pheromone 刺激時，*STE2* 的基因表現則上升至約 50 倍的表現量；然而，*hst6* 突變株的 *STE2* 基因表現量則約為 20 倍。*CEK1* 的基因表現情形與 *STE2* 有著相類似的趨勢，結果如圖四(B)，所有菌株在沒有 α -pheromone 的條件下，*CEK1* 的表現值皆維持基準水平。然而，在受到 α -pheromone 誘導後，野生株 *CEK1* 基因的表現量約提高 8 倍，但 *hst6* 突變株 *CEK1* 的表現量僅有 2 倍。綜合以上實驗結果顯示，在 α -pheromone 誘導下，*hst6* 突變株的 *STE2* 與 *CEK1* 基因表現程度與野生株相比皆產生下降，可能因此影響後續費洛蒙誘導之細胞附著的形成。

5. *HST6* 的基因表現由轉錄因子 Cph1 調控

於先前實驗結果觀察到 *hst6* 突變株於 α -pheromone 誘導下，*STE2* 及 *CEK1* 的基因表現皆有明顯減少，顯示 *HST6* 的表現與費洛蒙訊息傳遞路徑之間存在著關聯性。先前本實驗室研究發現，white 細胞接收到 pheromone 訊號刺激，需要透過轉錄因子 Cph1 調控下游基因表現，才能促使 white 細胞產生附著[53]。然而，其他研究團隊也指出 pheromone 訊號活化的轉錄因子為 Tec1 [51-52]。對此，本研究欲深入探討 Hst6 運輸蛋白質對於費洛蒙誘導之細胞附著的影響，是受到轉錄因子 Cph1 或是 Tec1 所調控。實驗則針對野生株、*cph1* 突變株[53]及 *tec1* 突變株[53]分別給予 α -pheromone 刺激，以 qRT-PCR 分析各菌株的 *HST6* 基因表現程度。實驗結果如圖五所示，未受到 α -pheromone 刺激時，各菌株的 *HST6* 表現量皆維持基準水平約為 1 左右。於 α -pheromone 誘導後，野生株及 *tec1* 突變



株的 *HST6* 基因表現量都出現上升的趨勢，其中 *tec1* 突變株中 *HST6* 基因表現程度略高於野生株，這與過去文獻報告相符[53]。然而，在 *cph1* 突變株的 *HST6* 基因則幾乎不會產生表現，其表現量甚至低於未受 α -pheromone 誘導的野生株（圖五）。這些結果顯示，剔除 *CPH1* 基因會使得菌株於 pheromone 誘導下 *HST6* 的表現情形消失；但是 *TEC1* 基因的缺失卻不影響 *HST6* 的表現，表示 *HST6* 基因受到轉錄因子 Cph1 所調控。

貳、探討 Hst6 運輸蛋白質與 opaque 細胞交配功能之關係

1. *C. albicans* 突變株交配效率

同型合子的白色念珠球菌 opaque 細胞具有交配能力，在接收相反性狀之 opaque 細胞所分泌的費洛蒙 (pheromone) 後，會誘導交配突出物 (mating projections) 的生成並進行交配反應。而 white 細胞雖然不具有交配能力，但仍可接受費洛蒙的刺激形成費洛蒙誘導之生物膜[1]。雖然 pheromone 的誘導會促使 opaque 細胞與 white 細胞產生不同的生理反應，然而這兩者卻都是透過相同的費洛蒙受體蛋白質、相同的費洛蒙訊息傳遞路來調控下游基因的表現[50,53]。於先前實驗結果顯示，Hst6 運輸蛋白質會影響 white 細胞的費洛蒙反應，因此預測 *hst6* 突變株的 opaque 細胞之交配能力，與野生株相比也會有下降的趨勢。本研究使用帶有不同 selectable marker 的菌株，進行 *C. albicans* 的交配實驗。分別為缺乏 *ARG4* 基因並具有 *CaSAT1* 基因的 *MTLa/a* 之 opaque 細胞 (DSY211) [63]，以及具有 *ARG4* 基因但缺乏 *CaSAT1* 基因的 *MTLa/a* 之 opaque 細胞 (野生株、*hst6* 突變株)，其中 *hst6* 突變株利用 Maltose 培養基，將其 *CaSAT1* 基因去除。接著將欲進行交配之兩菌株混合，進行交配實驗測試。實驗至少獨立操作三重複，以 student's t-test 統計結果，分析突變株與野生株之間是否存在顯著差異。結果顯示，野生株 (P37005 x DSY211) 的交配效率約為 $65.07 \pm 24.81\%$ ，而 *hst6* 突變株的交配效率則僅 0.00004% (圖六)。由統計分析結果，*hst6* 突變株的交配效率與野生

株相比出現明顯下降，且存在顯著差異 ($p < 0.001$)。



2. *C. albicans* 交配菌株之子代鑑定

本研究利用 PCR 及 FACS 鑑定生長於 Arg⁻NAT 培養基上的菌落之基因型，確認其是否為菌株交配後所產生的子代。若為成功交配後的子代會具有 *MTLa/a/α/α* 性狀，同時含有 **a** 基因及 α 基因，因此能被引子放大出 **a** 基因與 α 基因的 ORF 片段。野生株 SC5314、RBY717 及 RBY722 為 *MTLa/a*、*MTLa/a* 及 *MTLa/a* 細胞的實驗控制組。每組交配菌株皆挑選四顆子代菌落進行 PCR 鑑定，結果顯示都可同時放大出 **a** 基因與 α 基因的 ORF 片段 [圖七(A)]。FACS (Fluorescence-activated cell sorting) 則是以螢光染劑 Sytox green 染菌株的染色體 DNA，藉由流式細胞分析儀測定菌株的染色體套數。若菌株成功交配，則子代會具有四套 (tetraploid) 染色體 DNA，其產生的螢光強度為雙套 (diploid) 染色體 DNA 之菌株的兩倍。實驗以雙套染色體的野生株及四套染色體的野生交配子代株當作實驗控制組。結果如圖七(B)，每組交配菌株的子代染色體螢光強度與帶有四套染色體的實驗控制組菌株相近，且為雙套染色體菌株的兩倍。依據 PCR 及 FACS 的鑑定，證實了生長於 Arg⁻NAT 培養基上的菌落，為菌株進行交配後所產生的子代。



參、探討 Hst6 運輸蛋白質與傳統生物膜生成之關係

1. *hst6* 突變株所生成的傳統生物膜 (conventional biofilms) 與野生株相似

為了適應不同的環境因子，*C. albicans* 發展出兩種形式的生物膜：費洛蒙誘導之生物膜 (pheromone-induced biofilms) 及傳統生物膜 (conventional biofilms)。兩者在型態結構上十分相似，但卻扮演全然不同的角色。費洛蒙誘導之生物膜對於分子物質具較高滲透性，且藥物敏感性高，但可以使 pheromone 的濃度梯度維持穩定，促進 opaque 細胞交配反應的進行。然而，傳統生物膜則與其他致病性細菌所形成的生物膜相同，有著低滲透性，高藥物抗性，且能抵擋宿主白血球的吞噬作用，提高 *C. albicans* 於宿主的生存率及致病能力[41-43]。除此之外，兩種生物膜的生成會透過不同的訊息傳遞路徑進行調控。費洛蒙誘導之生物膜主要是經由費洛蒙訊息傳遞路徑，而傳統生物膜則是以 Ras1/cAMP 路徑刺激下游基因表現[1]。本實驗室先前研究發現，Hgc1 蛋白質 (Hypha-specific G1 cyclin-related protein) 會同時參與於費洛蒙誘導之生物膜以及傳統生物膜的生成[53]。由先前實驗結果得知，Hst6 運輸蛋白質會影響費洛蒙誘導之細胞附著。因此，本研究欲進一步去探討 Hst6 運輸蛋白質對於傳統生物膜之生成是否同樣具有影響力。實驗以矽膠片作為傳統生物膜附著的平台，事先將固定大小之矽膠片秤重，放入 12 孔盤並添加 Spider 培養液。分別從野生株及 *hst6* 突變株菌液中取出約 2×10^7 個細胞，接種至 12 孔盤，以 37°C、125 rpm 震盪培養 48 小時後，移除孔盤內的 Spider 培養液並拍照紀錄。隨後將矽膠片置於室溫下數天晾乾，秤取其重量，即可得生成的生物膜乾重。實驗至少獨立操作三重複，並以 student's t-test 分析統計結果。由圖八的統計圖顯示野生株形成的傳統生物膜乾重約為 7.35 ± 1.07 毫克，*hst6* 突變株的傳統生物膜乾重則略高於野生株，約為 8.00 ± 0.59 毫克，但與野生型菌株之間並不存在統計差異。同樣在圖八的拍照結果圖可觀察到，野生株及 *hst6* 突變株皆能於矽膠片上產生一層厚實且完整的傳統生物膜。

2. *hst6* 突變株之傳統生物膜的 *TEC1* 及 *NDT80* 基因表現並未產生改變

先前實驗結果發現，*hst6* 突變株形成的傳統生物膜之乾重與野生株相比沒有顯著差異，且皆能於矽膠片上產生完整的生物膜，顯示 Hst6 運輸蛋白質可能並不參與在傳統生物膜的生成。由研究指出，傳統生物膜主要受到六個轉錄因子 (Bcr1、Brg1、Efg1、Rob1、Ndt80 及 Tec1) 構成的轉錄網絡所調控，只要缺乏其中任一個轉錄因子，皆無法形成完整的生物膜[65]。本研究欲藉由 qRT-PCR 觀測野生株及 *hst6* 突變株於傳統生物膜培養條件下，*NDT80* 及 *TEC1* 基因表現是否出現差異。實驗直接以 12 孔盤作為生物膜的附著平台，將定量菌液加入 Spider 培養液，於 37°C、125 rpm 震盪培養 24 小時後，收集細胞並萃取 RNA，反轉錄為互補 DNA (cDNA)，再以 qRT-PCR 分析菌株的 *TEC1* 及 *NDT80* 基因表現程度。本實驗先以 *ACT1* 基因作為內部校正點 (internal control)，去除各樣品之間非實驗所產生的差異。而後將野生株的基因表現值設為實驗基準點，與 *hst6* 突變株進行比較後，即可知 *TEC1* 及 *NDT80* 基因表現是否發生改變。實驗結果如圖九，*hst6* 突變株不論是 *TEC1* 或是 *NDT80* 的表現程度，皆與野生株相似，顯示兩菌株的基因表現並無太大差異。因此，由 qRT-PCR 的分析結果可再次驗證，Hst6 運輸蛋白質並不會影響傳統生物膜之形成。

肆、探討 Hst6 運輸蛋白質與 white-opaque 型態轉換之關係



hst6 突變株在 NAG 誘導下，white-opaque 表現型轉換受到抑制

環境之中有許多外在因子會影響 *C. albicans* 的 white-opaque 型態轉換，過去研究指出 NAG (N-Acetylglucosamine) 會促使野生型菌株的 white 細胞轉變為 opaque 細胞[30-31]。以 NAG 培養基進行型態轉換測試時，意外發現 *hst6* 突變株的 white-opaque 轉換率大幅下降。實驗分別將 *MTLa/a* 的 *hst6* 突變株、*hst6* 互補株及野生株之 white 細胞均勻塗盤於含有 Phloxine B 染劑的 Lee's NAG 培養基，於 25 °C 培養 4-5 天後，利用統計分析得到菌株的 white-opaque 型態轉換比率，其中僅有 opaque 細胞所形成的菌落會被 Phloxine B 染成粉紅色。實驗至少獨立操作三重複，而每片培養基上皆約有 200 顆細胞，統計所得的轉換率平均值及標準差如圖十。野生株於 NAG 誘導下，菌株的 white-opaque 型態轉換率為 $34.34 \pm 20.16\%$ 。而 *hst6* 互補株的轉換率與野生株相近，約為 $41.88 \pm 14.69\%$ 。但 *hst6* 突變株僅有 1% 至 5% 的轉換率，與野生株相比明顯下降（圖十）。由結果得知，*hst6* 突變株於 NAG 誘導時 white-opaque 型態轉換率比野生株低，表示其型態轉換受到抑制。



伍、探討 Hst6 運輸蛋白質的調節作用與菌株專一性之關係

1. 構築 RBY717 *MTLa/a* 的 *hst6* 突變株

前述所有實驗結果皆是在 *C. albicans* 編號 P37005 的 *MTLa/a* 野生型菌株所獲得。本實驗室先前研究針對 *MTLa/a* white 細胞在 α -pheromone 誘導下，進行的 cDNA 微陣列分析[53]；以及另一個研究團隊提出的轉錄因子 Tec1 會調控費洛蒙誘導之生物膜生成 [51-52]，所使用的野生型菌株同樣為 *MTLa/a* 之 P37005 菌株。為了了解 Hst6 蛋白質於其它菌株是否扮演相同功能，本實驗使用另一株 *C. albicans MTLa/a* 菌株 (RBY717)，並剔除其 *HST6* 基因後，分析 Hst6 運輸蛋白質的調控作用。於後續敘述中，會將 RBY717 菌株剔除 *HST6* 基因後所得的突變株稱為 *Rhst6* 突變株。

而剔除 RBY717 菌株的 *HST6* 基因，所使用之質體與方法和前述相同。利用 2 次 *C. albicans* 轉形作用後，實驗針對目標基因設計了 3 組引子對 (如材料方法敘述)，以 PCR 反應獲得的 3 段基因片段 (5' check、3' check 及 ORF)，確認 *C. albicans* 雙套染色體上的目標基因是否成功被剔除。ORF 的基因片段可確認菌株是否還具有目標基因，若目標基因已被剔除，引子對將無法擴增 ORF 的 PCR 產物。而野生株還保有目標基因，因此做為實驗的正控制組。5' 及 3' check 則用來判斷基因是否產生重組，若質體 DNA 順利與 *C. albicans* 目標基因置換，則可以被引子對擴增出 5'、3' check 的 PCR 產物。野生株由於未有基因重組，在此作為實驗的負控制組。實驗結果如圖十一所示，*Rhst6* 突變株缺乏 ORF 的基因片段，但同時具有 5'、3' check 之 PCR 產物，顯示本實驗已在 *MTLa/a* RBY717 菌株中成功剔除 *HST6* 基因。

2. 剔除 RBY717 *MTLa/a* 菌株的 *HST6* 基因並不影響費洛蒙誘導之細胞附著

為探究 Hst6 運輸蛋白質對於 *C. albicans MTLa/a* 細胞的調控能否普遍存在於各菌株，實驗將 RBY717 菌株的 *HST6* 基因剔除後，觀測於 α -pheromone 誘導下，細胞的附著量是否也會產生下降。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果，實驗結果如圖十二(A)。未受到 α -pheromone (-MF α) 刺激下，菌株均無附著能力。當受到 α -pheromone 誘導時，*Rhst6* 突變株與 RBY717 菌株都出現大量的細胞附著，由統計圖可觀察到兩者的細胞附著量相近，皆約有 1×10^8 個細胞附著，且於統計分析上不具有顯著差異。從圖十二(A) 拍照結果圖也顯示，*Rhst6* 突變株與 RBY717 菌株於 α -pheromone 刺激時，皆能在孔盤底部產生厚實的細胞附著。

同時，本研究利用 qRT-PCR 分析於 α -pheromone 存在下，RBY717 菌株和 *Rhst6* 突變株之 *PBR1* 基因表現程度。本實驗選擇 *ACT1* 基因作為內部校正點 (internal control)，並將未受 α -pheromone (-MF α) 刺激 RBY717 菌株的 *PBR1* 基因表現值作為實驗基準點，比較分析受到 α -pheromone 誘導後，菌株 *PBR1* 基因的表現程度。結果顯示，在沒有 α -pheromone 的誘導下，所有菌株的 *PBR1* 基因表現值皆維持於基準水平。而給予 α -pheromone 後，*Rhst6* 突變株與 RBY717 菌株的 *PBR1* 基因表現都呈現上升趨勢，兩者的表現量近乎一致，於統計分析上並不存在差異 [圖十二(B)]。綜合以上兩個實驗結果顯示，剔除 *C. albicans MTLa/a* 之 RBY717 菌株的 *HST6* 基因，並不會抑制或影響費洛蒙誘導之細胞附著形成。

3. RBY717 菌株的 *HST6* 基因缺失，並不影響於 NAG 誘導下 white-opaque 表現型之轉換

於前述實驗結果發現，P37005 之 *MTLa/a* 野生型菌株若剔除 *HST6* 基因時，其 white-to-opaque 型態轉換比率於 NAG 誘導培養後，顯著減少（圖十）。為了探討此現象是否亦存在於 *Rhst6* 突變株，本實驗同樣藉由 NAG 的誘導，觀測 *Rhst6* 突變株的 white-to-opaque 型態轉換效率。實驗將菌株均勻塗盤於含有 Phloxine B 染劑的 Lee's NAG 培養基上，於 25 °C 培養 4-5 天後，利用統計分析菌株之 white-to-opaque 型態轉換率平均值及標準差，其中僅有 opaque 細胞所形成的菌落會被 Phloxine B 染成粉紅色。實驗至少獨立操作三重複，結果如圖十三。兩株 *Rhst6* 突變株的型態轉換率分別是 $79.70 \pm 12.29\%$ 及 $79.74 \pm 15.18\%$ ，與 RBY717 菌株的 $78.14 \pm 11.11\%$ 轉換率相比幾乎一致。故由結果可得知，剔除 *HST6* 基因並不影響 *C. albicans MTLa/a* 之 RBY717 菌株在 NAG 培養刺激下，white-to-opaque 的型態轉換效率。

討論



為了適應多變的微環境，*C. albicans* 發展出多種的型態及獨特的型態轉換，而本研究則主要著重於 white-opaque 型態。white 與 opaque 細胞之間最大的行為差異在於有性生殖能力，只有 opaque 型態才具有交配能力。雖然 white 型態無法行交配反應，但是當接收到 opaque 細胞分泌的費洛蒙刺激時，white 細胞會產生細胞附著及生物膜[39-40]。然而目前研究對於 white 細胞費洛蒙誘導之生物膜形成的相關機制仍有許多不明之處[1,27]，這也是本次研究欲探討及解決的重點。於本實驗室先前研究發現，利用 α -pheromone 誘導 *MTLa/a* 之 white 細胞後，cDNA 微陣列分析觀察到 *MFA1* (產生 α -pheromone 前導蛋白質) 及 *HST6* (產生 α -pheromone 運輸蛋白質) 都呈現高度表現，而這兩者的功能皆與 α -pheromone 相關[53]。因此，本研究推測於 α -pheromone 所誘發的 white 細胞之細胞附著，*MFA1* 與 *HST6* 也會參與其中。

本次研究首先在編號 P37005 之 *MTLa/a* 野生株中，構築 *hst6* 及 *mfal* 突變株。於外加 α -pheromone (+MF α) 誘導下，觀測到不論是費洛蒙誘導後的細胞附著量或是 *PBR1* 基因的表現程度，都僅在 *hst6* 突變株出現大幅下降，而 *mfal* 突變株的表現則與野生株近乎一致，結果如圖二至圖三。這顯示 Hst6 運輸蛋白質會參與在費洛蒙所誘導之細胞附著，然而 Mfal 蛋白質的有無卻不會造成影響。因此後續實驗將針對 Hst6 運輸蛋白質的調控機制進行探討。當位於 white 細胞表面的費洛蒙受體蛋白質接收到 pheromone 訊號，會進一步活化細胞內的費洛蒙訊息傳遞路徑，促使轉錄因子調控下游特定基因 (white-specific factors) 表現[53,64]。由實驗結果發現，在受到 α -pheromone 刺激時，*hst6* 突變株中與費洛蒙訊息傳遞路徑相關之基因 (*STE2* 及 *CEK1*) 表現量皆顯著下降 (圖四)，推測 Hst6 運輸蛋白質與費洛蒙訊息傳遞路徑之間可能存在著關聯性，並進而影響 white 細胞的費洛蒙誘導之細胞貼附。



過去研究認為 white 細胞費洛蒙訊息傳遞路徑的轉錄因子為 Tec1[51-52]。然而本實驗室先前研究發現轉錄因子 Cph1 是促使 white 細胞產生附著及生物膜的最主要調控子[53]。本研究針對轉錄因子 (Tec1 或是 Cph1) 對於 Hst6 蛋白質的調控進行探討，由結果觀測到 *CPH1* 基因的剔除會造成 pheromone 誘導下 *HST6* 的表現消失，而 *TEC1* 基因的的缺失仍可偵測到 *HST6* 基因的表現量 (如圖五)，這意味著 *HST6* 的表現主要受轉錄因子 Cph1 所調控。另外，在結果圖五可以發現 *tec1* 突變株的 *HST6* 基因表現程度略高於野生株，與過去文獻結果相符[53]。然而，對於這樣的現象仍不清楚，有可能是 Tec1 蛋白質與 *HST6* 基因之間存在著其他的調節關係。綜合以上 qRT-PCR 分析所得的結果，本研究建構出一個訊息調節路徑(圖十四)：當 *MTLa/a* 之 white 細胞接收到 α -pheromone 時，位於訊息傳遞路徑下游的 *HST6* 會受到費洛蒙訊息傳遞路徑以及轉錄因子 Cph1 所調控，並進一步活化 white 細胞產生細胞附著。

過去研究指出，Hst6 蛋白質為 *C. albicans MTLa/a* 細胞中負責運送 α -pheromone 至細胞外的 α -費洛蒙運輸蛋白質[56]。而 Hst6 運輸蛋白質是如何參與在由 α -pheromone 所誘導的 white 細胞之細胞附著中，以下提出幾個假設：(1) 由於目前在 *C. albicans* 中 Hst6 蛋白質所扮演的角色僅止於 α -pheromone 輸送[56,66]，其他可能涉及的調節作用皆為未知，因此對於費洛蒙誘導之細胞附著的調控可能為 Hst6 運輸蛋白質的潛在功能，只是至本研究才被發掘；(2) 剔除 *HST6* 基因，可能導致成熟或未成熟的 α -pheromone 累積在細胞中，造成細胞內胨肽濃度的改變進而影響費洛蒙所誘發的生理反應；(3) 過去研究曾提出 Hst6 蛋白質也具有運送其他物質至細胞外的潛力 (如脂質、抗真菌藥物等) [56,66-67]。因此 Hst6 蛋白質運送功能的缺失，亦有可能造成欲運送至細胞外的其他物質受阻，而導致 white 細胞的費洛蒙反應缺損。

White 細胞與 opaque 細胞雖然在受到 pheromone 刺激時會引發不同生理反應 (white 細胞：細胞附著及生物膜形成，opaque 細胞：進行交配)，但兩者卻均



是透過相同的費洛蒙訊息傳遞路徑，且藉由相同的轉錄因子 Cph1 進行調控[53]。本研究利用具有 selectable marker 的 opaque 菌株，進行 *C. albicans* 交配實驗，發現 *hst6* 突變株的交配效率近乎於 0%（圖六）。由此結果顯示剔除 *HST6* 後，*a*-pheromone 無法順利分泌至細胞外，可能使 opaque 細胞之交配突出物生成受影響，導致交配反應無法正常進行。同時也可得知 Hst6 運輸蛋白質對於 white 細胞以及 opaque 細胞的費洛蒙反應皆具有重要的影響力。

C. albicans 在面臨不同環境條件時，會生成兩種不同形式的生物膜：費洛蒙誘導之生物膜及傳統生物膜，兩者的型態雖然相似，但所具備的功能及調控的訊息傳遞路徑卻截然不同[41]。由本實驗結果更進一步證實，兩者生物膜生成的調控機制完全不同。剔除 *HST6* 基因後，將導致費洛蒙誘導產生的細胞附著能力下降，但不影響傳統生物膜的生成。傳統生物膜形成主要受到 Bcr1、Brg1、Rob1、Tec1、Ndt80 與 Efg1 所調控[65]。雖然過去文獻指出剔除這些轉錄因子基因，會造成費洛誘導生物膜生成下降。然而這些因素主要是由於它們傳統生物膜缺失間接造成費洛蒙誘導生物膜的減少[53]。故本實驗結果顯示 Hst6 運輸蛋白質只會專一地參與在費洛蒙誘導之細胞附著。也再度驗證調控兩者生物膜生成的機制截然不同。

而環境之中許多環境因子會影響 *C. albicans* 的 white-to-opaque 型態轉換，包含氧化壓力、嗜中性白血球 (neutrophils)、低劑量的紫外線照射以及高濃度的二氧化碳 (CO₂) 等都可以促進 white 細胞轉換成 opaque 細胞[27]。本研究將各菌株培養在含有 NAG (N-Acetylglucosamine) 的培養基，促使 white-to-opaque 型態進行轉換時，意外地發現 *hst6* 突變株的型態轉換效率受到抑制（圖十）。這暗示著 Hst6 運輸蛋白質可能也會透過其他調控機制參與在 white-to-opaque 的型態轉換。然而 Hst6 蛋白質為什麼與 white-opaque 型態轉換有關？其相關的調控機制為何？本研究對此目前尚未有定論。僅可得知 Hst6 運輸蛋白質的功能，不單只是運送 *a*-pheromone，對於 *C. albicans* 的多項生理反應、型態轉變等同樣具有



調控的潛力。

前述結果均由 *C. albicans* P37005 的 *MTLa/a* 野生型菌株所獲得。然而，本研究於另一株 *MTLa/a* 菌株 RBY717 中將 *HST6* 基因剔除後，其費洛蒙誘導後細胞的附著量以及 *PBR1* 基因表現的程度，與 RBY717 菌株相比均無顯著差異（圖十二）。除此之外，*Rhst6* 突變株於 NAG 誘導培養後 white-to-opaque 型態轉換效率也與 RBY717 菌株相同，未受到抑制（圖十三）。因此，由以上結果，得知 Hst6 蛋白質並不會影響 RBY717 *MTLa/a* 野生株的費洛蒙誘導之細胞附著及 white-to-opaque 型態轉換，顯示其影響力可能只侷限於特定的 *MTLa/a* 菌株 (P37005)，具有菌株專一性。這些結果暗示著在 *C. albicans* 中即便擁有相同性狀（如皆為 *MTLa/a*），但品系 (strain) 不同的菌株之間，可能也會透過不同的調控機制來調節生理反應，如此一來可以提高 *C. albicans* 面臨環境壓力時的生存機率。而菌株之間的多樣性或許也是造成現今於臨床醫療上 *C. albicans* 難以消滅的因素。

總結目前的研究結果，本研究於 P37005 *MTLa/a* 野生型菌株發現到 Hst6 運輸蛋白質會影響費洛蒙所誘導之細胞附著，但 Mfa1 蛋白質不會參與其中。當 *MTLa/a* 之 white 細胞 (P37005) 受 α -pheromone 刺激時，位在訊息路徑下游的 *HST6* 會被費洛蒙訊息傳遞路徑以及轉錄因子 Cph1 所調控，並進一步促使 white 細胞生成細胞附著。此外，*HST6* 基因的缺失也會影響 opaque 細胞的交配能力。由此顯示 Hst6 運輸蛋白質會同時參與在 white 細胞以及 opaque 細胞的費洛蒙反應之中，包含 white 細胞之細胞附著，與 opaque 細胞的交配反應。其中 white 細胞生成的費洛蒙誘導之細胞附著和生物膜，可以促進自然界中少部分存在的 opaque 細胞行有性交配，提高其交配成功的機率，而這也代表 Hst6 運輸蛋白質對於 *C. albicans* 的有性生殖扮演相當重要的角色。研究當中，意外的發現剔除 *HST6* 基因會造成 white-to-opaque 型態轉換效率大幅下降，顯示其型態轉變的過程受到抑制。推測 Hst6 運輸蛋白質可能透過一個目前未知的機制正向調控

white-to-opaque 型態轉換。本次研究首度發現 **a**-pheromone 運輸蛋白質，Hst6 亦會影響 white 細胞的費洛蒙誘導之細胞附著及 white-to-opaque 型態轉換，並提出一個新的訊息調控模型，希望能有助於未來在 white 細胞費洛蒙反應之相關機制的建立。





未來研究方向

1. 於實驗結果得知 *HST6* 基因的缺失會導致於 pheromone 刺激下, white 細胞的細胞附著能力受損。而目前已知 Hst6 蛋白質的功能為 *C. albicans MTLa/a* 細胞中負責分泌 **a**-pheromone 至胞外的 **a**-費洛蒙運輸蛋白質。因此對於 Hst6 運輸蛋白質如何參與在由 α -pheromone 所誘導的 white 細胞之細胞附著, 提出了幾個假設 (如討論所述)。其中針對剔除 *HST6* 基因可能導致成熟或未成熟的 **a**-pheromone 累積在細胞內, 進而造成 white 細胞的費洛蒙反應缺損之假說, 在未來希望能藉由建構同時缺乏 *HST6* 及 *MFA1* 基因的雙突變株 (*hst6* Δ /*mfa1* Δ), 以去除 *hst6* 突變株中造成 **a**-pheromone 累積的因素, 並觀測其費洛蒙誘導之細胞附著情形是否會回復至與野生株一致。

圖表

表一、本研究所使用之藥品

藥品名稱	製造商
Acetic acid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Adenine hydrochloride hydrate	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Agarose	MDBio, Inc., Shandong, China
L-Alanine	Acros Organics, Geel, Belgium
American bacteriological agar	Laboratorios CONDA, Madrid, Spain
L-Arginine monohydrochloride	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Boottel becto peptone	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Bovine serum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Chloramphenical	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
dATP	MDBio, Inc., Shandong, China
dCTP	MDBio, Inc., Shandong, China
dGTP	MDBio, Inc., Shandong, China
DMSO	MDBio, Inc., Shandong, China
dTTP	MDBio, Inc., Shandong, China
Ethidium bromide solution (EtBr)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	MDBio, Inc., Shandong, China
D-glucose (dextrose) anhydrous	Amresco LLC, Solon, OH, USA
Glycerol	MDBio, Inc., Shandong, China
Glycine	MDBio, Inc., Shandong, China
L-Histidine monohydrochloride monohydrate	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
L-Isoleucine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
LB broth	MDBio, Inc., Shandong, China
LB powderd	MDBio, Inc., Shandong, China
L-Leucine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Lithium acetate dehydrate (LiOAc)	Acros Organics, Geel, Belgium
L-Lysine monohydrochloride	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Magnesium chloride hexahydrate (MgCl ₂ • 6H ₂ O)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
D(+) - Maltose monohydrate	Acros Organics, Geel, Belgium
D-Mannitol	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
L-Methionine	Amresco LLC, Solon, OH, USA
N-acetyl-D-glucoseamine (NAG)	Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA
Nourseothricin (NAT or LEXSY NTC)	Jena Bioscience, Jena, Germany
Nutrient broth	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Pepsin 1:3000	Bio Basic Inc. Ontario, Cannada



Pheloxine B	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
L-Phenylalanine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Phosphate-buffered saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Poly (ethylene glycol) (PEG)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Potassium chloride (KCl)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Potassium phosphate dibasic (K₂HPO₄)	Showa Chemical Industry Co., St. Louis, MO, USA
L-Proline	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
RNase A	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
L-Serine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Sodium chloride (NaCl)	MDBio, Inc., Shandong, China
Sodium hydroxide (NaOH)	MDBio, Inc., Shandong, China
Tetracyclin hydrochloric acid, 37 %	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
L-Theronine	Amresco LLC, Solon, OH, USAhydrate
Tris base	MDBio, Inc., Shandong, China
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
L-Tyrosine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Uracil	MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA
L-Valine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Yeast extract	Laboratorios CONDA, Madrid, Spain
Yeast nitrogen base without amino acid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Zinc sulfate heptahydrate	Showa Chemical Industry Co., St. Louis, MO, USA

表二、本研究所用之引子序列

Number	Sequence (5' to 3')
2	CCTTC AATTG CATCG TAAGT ACC
3	GAAGA TGACT CAGGT CATGC
4	GTGGT CAATG GAGCT GATAC
5	ACATG TGGTC GCCCA ACTCC
6	CTCAA CCATA GCAAT CATGG
7	GCGAA AAAGT GGGCA CTAAG
112	GGGTG GTCGT TTCAC CGG
113	CCCGT TCAAG AATTG CCGT
291	GGAGC GGGGC CCGTC CTGTC CCAAT TAGGA AATAG
292	GGAGC GCTCG AGGGG AAAGA CAGTT TTTCA GATTT
293	GGAGC GCCGC GGGGG AATAT TCGCC AAGAG ATAGC
294	GGAGC GGAGC TCCAA GGTTG TTGAT GGTAAGACG
295	GTTGT AGTGG TGGTG GTGGC
296	CGCTG GTAAG ATCAT TCCAG C
297	GTGAC GACTG ACAAT GATAC GC
298	CTATC AAATT ATCGG CAATA CGC
531	GGAGC GGGGC CCCTT GGTTG ATCCA TACTT GATGC A
532	GGAGC GCTCG AGCTC TATTT TTCGC AATTA CCCCC
533	AAAAT GGCTG CTCAA CAACA ATC
534	GGCGG TGGCT ATTAC ATAAC AGA
537	TTAAA ACAAA GAACC CACAT GCG
538	TGACA GTGAC AGTGG CTTGA TTG
541	TGGAC TTGTG TTGTT ATCTG GACT
542	CTTGC TGTGT TTGTG TTTGT GTTG
575	GGAGC GGGGC CCAAC CGATA CAAAC AAACA GAGGA
576	GGAGC GCTCG AGTTG CTGTG ATGAT GAAGA AGGTG
658	GGAGC GGCGG CCGCT CCCAC ATATT GTTCA ACATT TGG
659	GGAGC GCCGC GGGGT CAACT CTGGG TGAAA CCATT
660	TCAAC AAGGA TTCCG TGGTA ATG
661	TGTAG AAAGT AGCAC CTGGA GTAA
699	GCTGT GGTGT AAGTT CAGTT AGAA
700	GCGTA TCATT GTCAG TCGTC AC
701	TACCA GCAGA TGTCG CACTA C
702	AATGG TCCTC GTGGT GTAAT TGA
703	TCACA ACTGC TCAAT ACTTC ATTA
704	AAGGG TGTTG GCTAT TATGC



735	CCGAT TTAAG AAATT TGAAA TGTGG
736	AGTGT ACTCC GGTGA CGATT TTTC
737	CGACA AAAAC CAAGA AGCAG AATA
738	CCCAA AAAAA AATAA TGAGA AACGA
739	GAACT CCCAT TAGAA AGACT TTGGG
740	CAAAG GATTG CCCGA GTGTT T

表三、本研究所使用及構築之 *C. albicans* 菌株

Strain	<i>MTL</i>	Genotype	White/Opaque	Ref.
P37005	a/a	Wild type	White	[33]
SC5314	a/α	Wild type	White	[68]
RBV717	a/a	Sorbose-induced from SC5314 isolate	White	[68]
RBV722	a/α	Sorbose-induced from SC5314 isolate	White	[68]
DSY211	a/α	<i>leu2::hisG/leu2::hisG</i> <i>his1::hisG/his1::hisG::SAT1</i>	Opaque	[63]
YL224, YL225	a/a	<i>cph1/cph1</i>	White	[53]
YL242	a/a	<i>tec1/tec1::SAT</i>	White	[53]
YL769, YL770	a/a	<i>hst6/hst6::SAT</i> (in RBV717)	White	This study
YL915, YL916	a/a	<i>hst6/hst6::SAT</i> (in P37005)	White	This study
YL1089, YL1090	a/a	<i>hst6/hst6::HST6</i> (in P37005)	White	This study
YL1247, YL1248	a/a	<i>mfa1/mfa1::SAT</i> (in P37005)	White	This study
YL1304, YL1305	a/a	Opaque P37005	Opaque	This study
YL1308, YL1309	a/a	Opaque <i>hst6/hst6</i>	Opaque	This study
YL1408, YL1409, YL1432, YL1433	a/a/a/α	Zygote of P37005 x DSY211	White	This study
YL1434-YL1441	a/a/a/α	Zygote of <i>hst6Δ</i> x DSY211	White	This study

表四、GoTaq® DNA polymerase PCR 反應之溶液組成

Component	Volume	Final concentration
5x GoTaq® Flexi Buffer	5 µL	1x
MgCl ₂ solution (25 mM)	2 µL	2 mM
Forward primer (5 µM)	1 µL	0.2 µM
Reverse primer (5 µM)	1 µL	0.2 µM
dNTP mixture (10 mM each)	0.5 µL	0.2 mM each dNTP
GoTaq® DNA polymerase	0.3 µL	0.06 U
<i>C. albicans</i> cells		a few
ddH ₂ O		to final 25 µL

表五、Phusion® High-Fidelity DNA polymerase PCR 反應之溶液組成

Component	Volume	Final concentration
5x Phusion® HF Buffer	10 µL	1x
Forward primer (5 µM)	1 µL	0.1 µM
Reverse primer (5 µM)	1 µL	0.1 µM
dNTP mixture (10 mM each)	1 µL	0.2 mM each dNTP
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase	0.5 µL	0.001 U
<i>C. albicans</i> cells		a few
ddH ₂ O		to final 50 µL

表六、PCR 反應程序

Step	Temp	Time
Initial denaturation	95 °C	3 min
Denaturation	95 °C	30 sec
Annealing	55 °C	30 sec
Extension	72 °C	30 sec/kb for GoTaq® DNA polymerase 15-30 sec/kb for Phusion® High-Fidelity DNA polymerase
Final extension	72 °C	10 min
Soak	10 °C	overnight

表七、iScript reverse transcriptase 反轉錄 PCR 反應之溶液組成

Component	Volume
5x iScript reaction mix	4 μ L
iScript reverse transcriptase	1 μ L
RNA template (1 μ g total RNA)	X μ L
Nuclease-free water	to final 20 μ L

表八、反轉錄 PCR 反應程序

Step	Temp	Time
Priming	25 $^{\circ}$ C	5 min
Reverse transcription	42 $^{\circ}$ C	30 min
RT inactivation	85 $^{\circ}$ C	5 min
Soak	4 $^{\circ}$ C	overnight

表九、iQTM SYBR[®] Green supermix qRT-PCR 反應之溶液組成

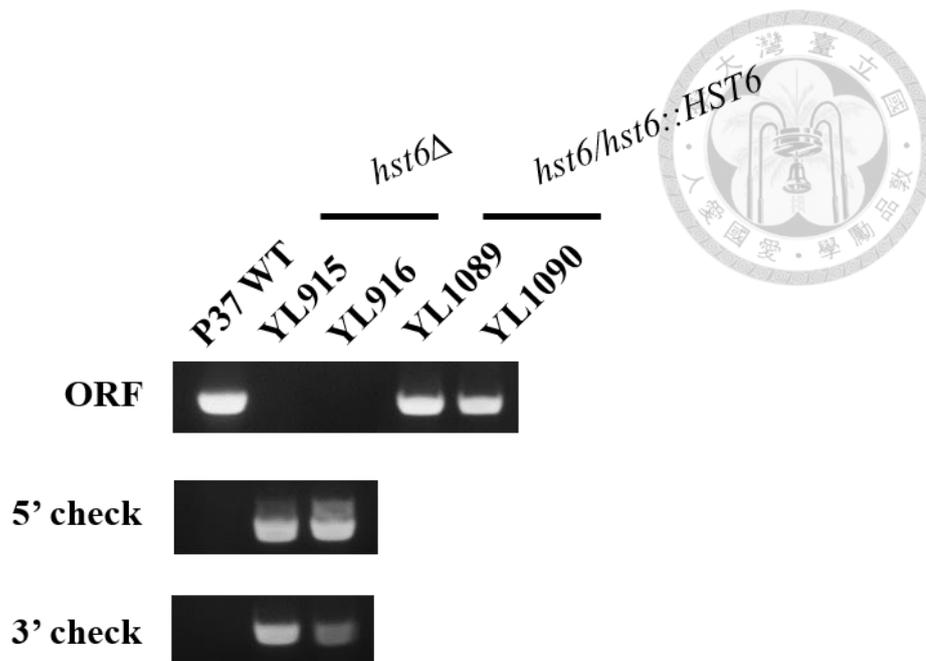
Component	Volume	Final concentration
2x iQ TM SYBR [®] Green supermix	10 μ L	1x
Forward and reverse primers	1.8 μ L	300 nM
cDNA template	2 μ L	10 ng
ddH ₂ O	to final 20 μ L	

表十、qRT-PCR 反應程序

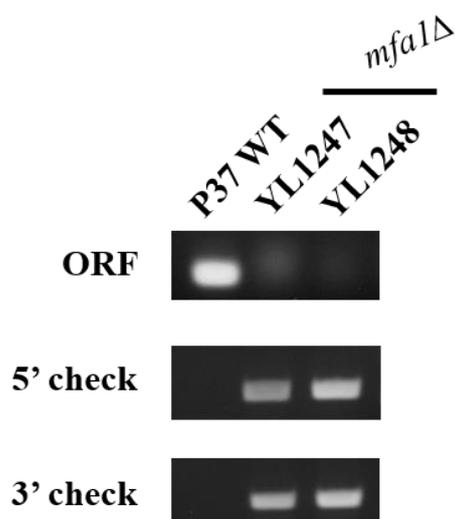
Step	Temp	Time
Polymerase Activation and DNA denaturation	95 $^{\circ}$ C	3 min
Denaturation	95 $^{\circ}$ C	10 sec
Annealing/ Extension	60 $^{\circ}$ C	30 sec
Melt curve	65-95 $^{\circ}$ C	0.5 $^{\circ}$ C increment 2-5 sec/step

Amplification: 35-40 cycles

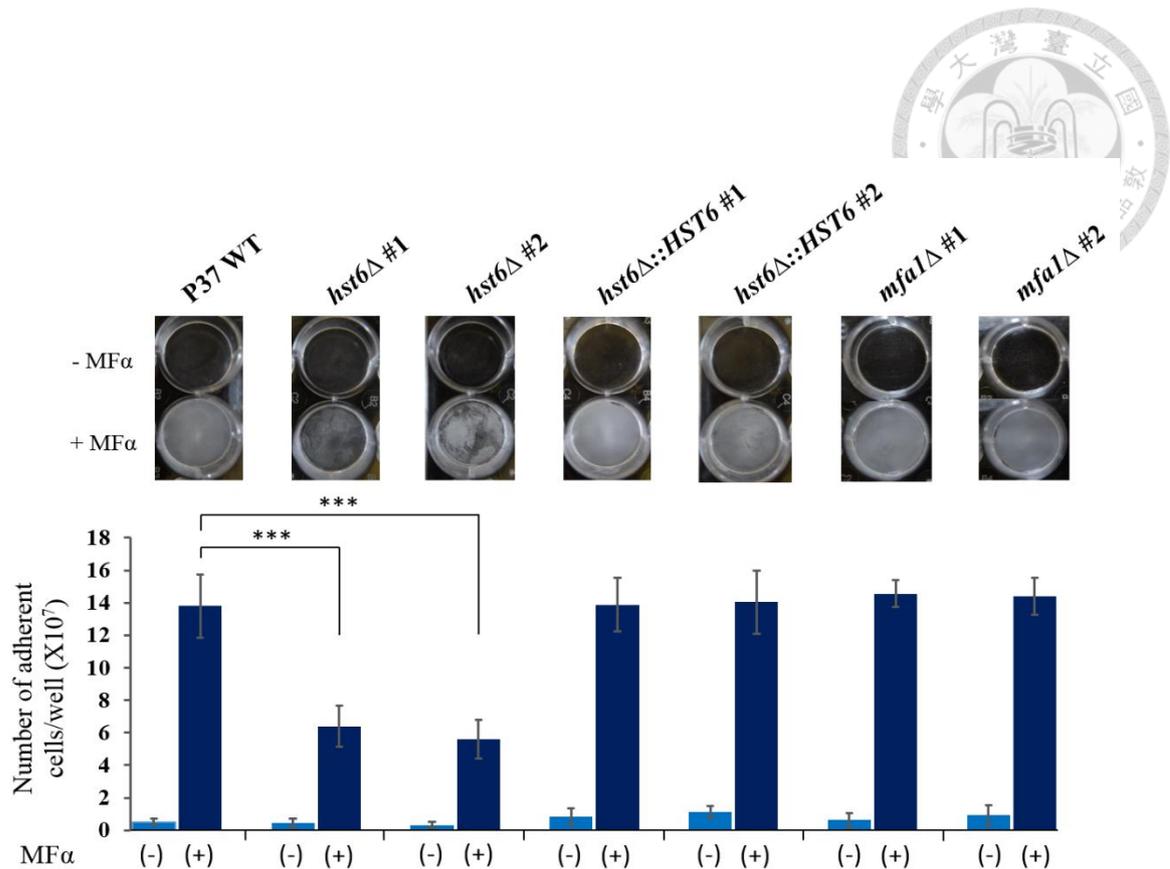
(A)



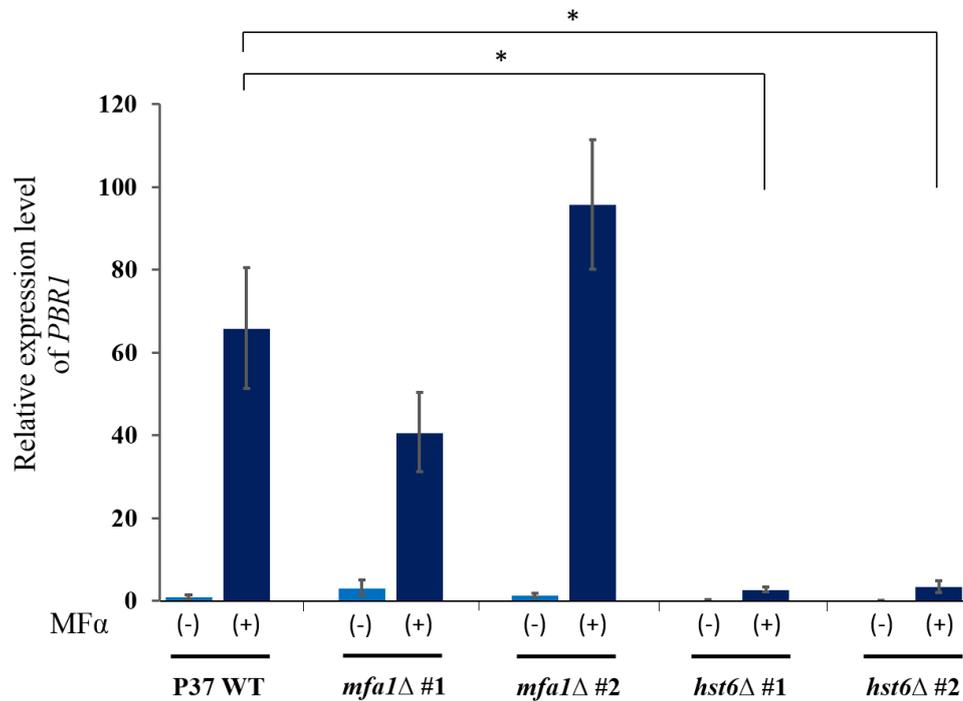
(B)



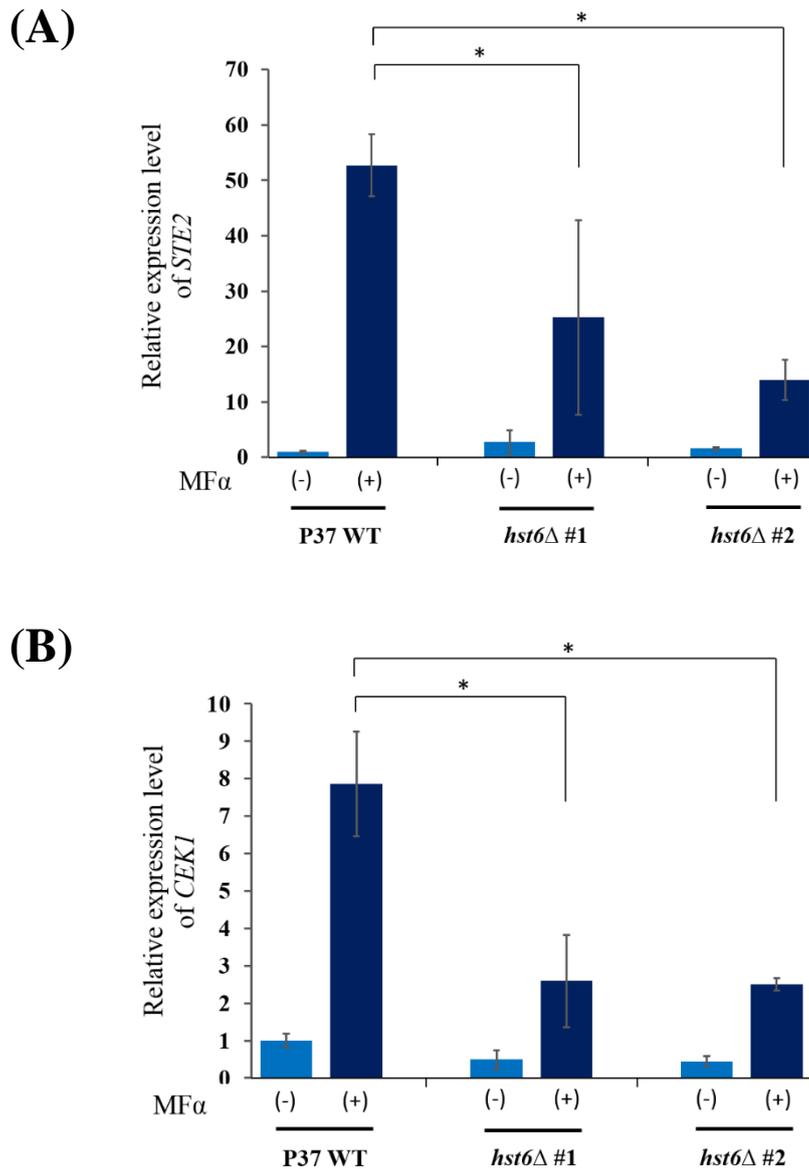
圖一、*hst6*、*mfa1* 突變株及 *hst6* 互補株之構築與鑑定。於編號為 P37005 之 *MTLa/a* 野生型菌株中，建構 (A) *hst6* 突變株、*hst6* 互補株及 (B) *mfa1* 突變株。以 PCR 進行鑑定時，*hst6*、*mfa1* 突變株不具有 ORF 的基因片段，但會出現 5' 與 3' check 之 PCR 產物。野生株在此作為實驗控制組，具有 ORF 之 PCR 產物，但不會產生 5' 與 3' check 之 PCR 產物。而將 *HST6* 基因互補回 P37005 *MTLa/a* 之 *hst6* 突變株中，則可得到 *hst6* 互補株。PCR 鑑定時，只有互補成功的 *hst6* 互補株具有 ORF 的基因片段。



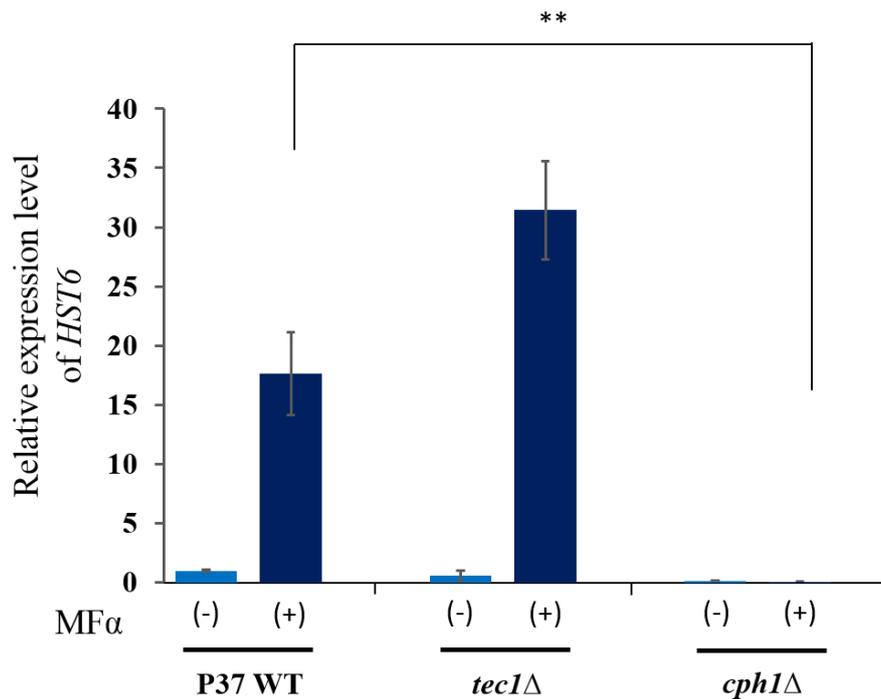
圖二、剔除 *HST6* 基因導致費洛蒙誘導 *MTLa/a* (P37005) 細胞附著能力下降。將 white 細胞接種至 Spider 培養液中，於 30 °C 培養過夜。取 5×10^7 個細胞與新鮮的 1 mL Lee's 培養液均勻混合，並移入 12 孔盤內。分別加入 DMSO (-MF α) 或 α -pheromone (+MF α) 於其中，與菌液混勻後靜置於室溫下 24 小時。將上清液去除，以 phosphate-buffered saline (PBS) 小心清洗並拍照記錄。接著蒐集吸附於 12 孔盤底的菌體，將其回溶於 1 mL 去離子水中，利用分光光度計測定 OD₆₀₀ 吸光值以測量菌數。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果。於 α -pheromone 誘導下，僅 *hst6* 突變株之細胞附著量與野生株相比有明顯的下降。*** $p < 0.001$ 。



圖三、 定量即時聚合酶鏈鎖反應分析在費洛蒙誘導下，野生株、*hst6* 突變株及 *mfa1* 突變株的 *PBR1* 基因表現。以 Spider 培養液培養菌株之 white 細胞過夜，取 5×10^7 個細胞與 1 mL Lee's 培養液均勻混合，移入 12 孔盤內。分別加入 DMSO (-MFA) 或 α -pheromone (+MFA)，並靜置於室溫誘導 4 小時。收集菌株 (每組約 3×10^8 個細胞) 進行 RNA 萃取，利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應轉錄為互補 DNA，再藉由 qRT-PCR 分析菌株之 *PBR1* 基因表現程度。在此以 *ACT1* 基因作為內部校正點 (internal control)，未受 α -pheromone (-MFA) 刺激的野生株 *PBR1* 基因表現值則為實驗基準點。實驗至少進行三重複獨立操作。同樣地 *hst6* 突變株與 α -pheromone 作用後，*PBR1* 的基因表現和野生株相比有明顯下降。* $p < 0.05$

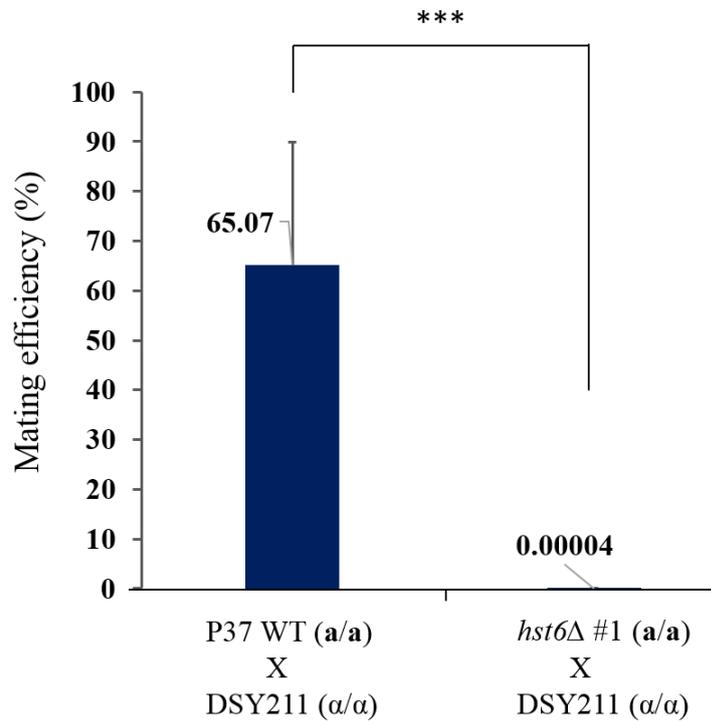


圖四、*hst6* 突變株於費洛蒙誘導下，*STE2* 及 *CEK1* 的基因表現與野生株相比皆顯著下降。將 white 細胞之菌株株接種至 Spider 培養液培養過夜，取 5×10^7 個細胞與 1 mL Lee's 培養液混勻，移入 12 孔盤內。分別加入 DMSO (-MF α) 或 α -pheromone (+MF α)，並靜置於室溫誘導 4 小時。收集菌株 (每組約 3×10^8 個細胞) 進行 RNA 萃取，反轉錄為互補 DNA 後，再藉由 qRT-PCR 分析菌株之 (A) *STE2* 及 (B) *CEK1* 的基因表現程度。在此以 *ACT1* 基因作為內部校正點 (internal control)，而未受 α -pheromone (-MF α) 刺激野生株的基因表現值作為實驗基準點，設為 1。實驗至少進行三重複獨立操作。受 α -pheromone 作用下，*hst6* 突變株中的 *STE2* 及 *CEK1* 的基因表現皆低於野生株。* $p < 0.05$



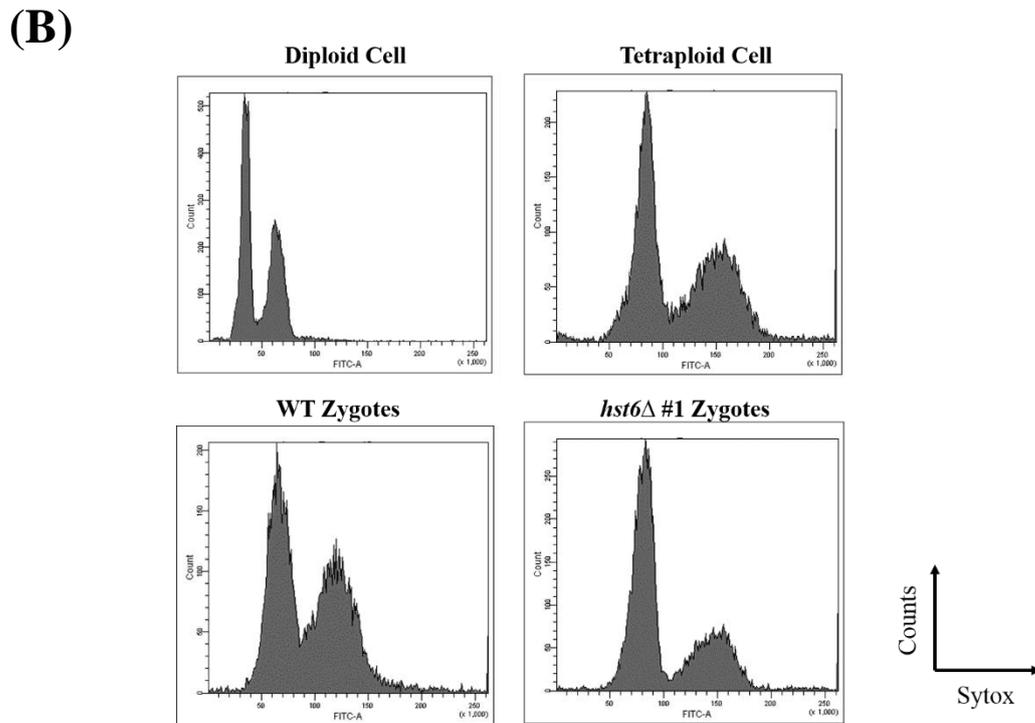
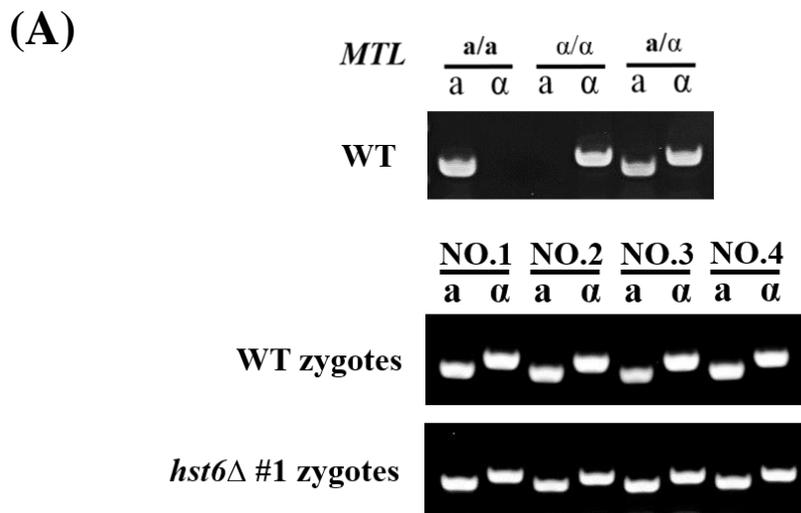
圖五、 定量即時聚合酶鏈鎖反應分析於費洛蒙刺激後，野生株、*tec1* 突變株及 *cph1* 突變株的 *HST6* 基因表現。以 Spider 培養液培養菌株過夜，取 5×10^7 個細胞與 1 mL Lee's 培養液均勻混合，並移入 12 孔盤。分別加入 DMSO (-MFα) 或 α -pheromone (+MFα)，靜置於室溫誘導 4 小時。收集菌株 (每組約 3×10^8 個細胞) 進行 RNA 萃取，反轉錄為互補 DNA 後，利用 qRT-PCR 分析菌株之 *HST6* 基因表現程度。實驗以 *ACT1* 基因作為內部校正點 (internal control)，而未受 α -pheromone (-MFα) 刺激之野生株的基因表現值則設為實驗基準點。實驗至少進行三重複獨立操作。於 *cph1* 突變株中幾乎觀測不到 *HST6* 基因的表現，暗示著 Hst6 運輸蛋白質主要是受到轉錄因子 Cph1 的調控。

** $p < 0.01$

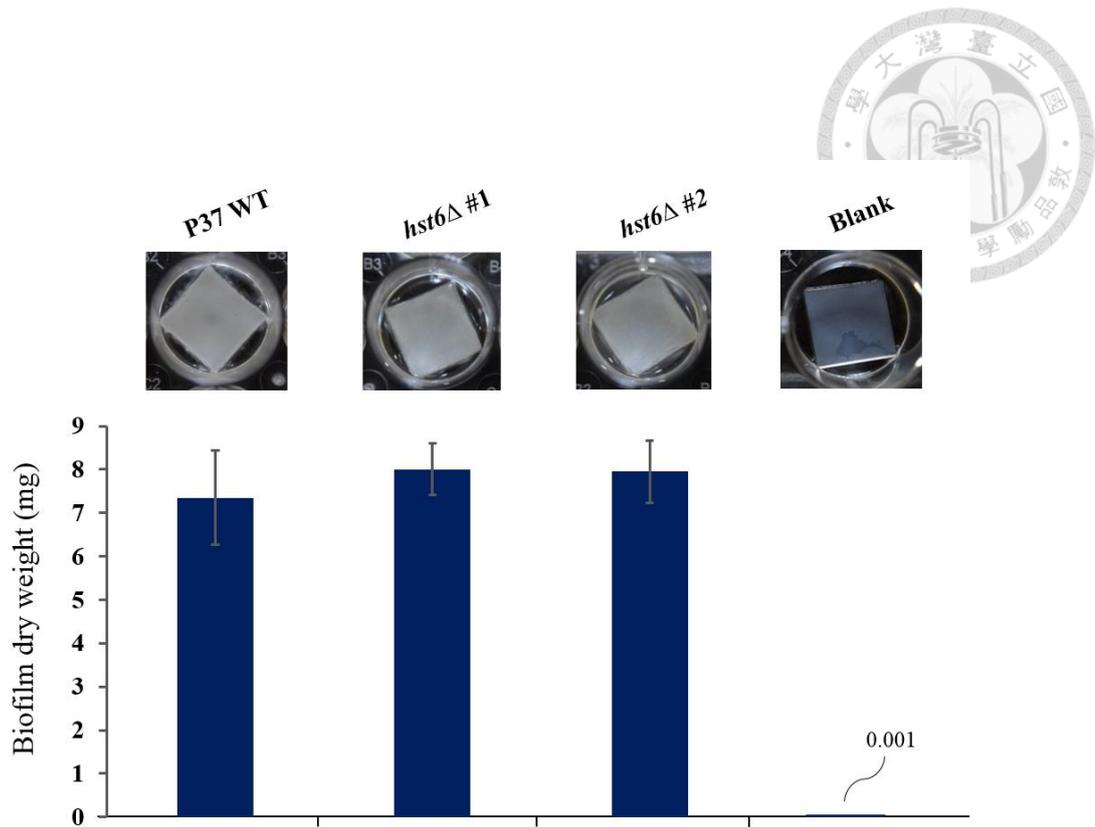


Mating cross

圖六、交配效率測試。將 *MTLa/a* 及 *MTLa/a* 的 opaque 細胞接種至 Spider 培養液，置於 25 °C 培養過夜。分別從兩菌液中取出 2×10^7 個細胞均勻混合，點在 Spider 固態培養基上，於 25 °C 下培養 48 小時。收取交配菌株並均勻塗盤至 Arg⁻、NAT、Arg⁻NAT 固態培養基，以 30 °C 培養 2-3 日。計算菌株交配效率為 Arg⁻NAT/ Arg⁻ 或是 Arg⁻NAT/ NAT。實驗至少進行三重複獨立操作，以 student's t-test 分析統計結果。*hst6* 突變株之交配效率與野生株相比明顯產生下降。*** $p < 0.001$



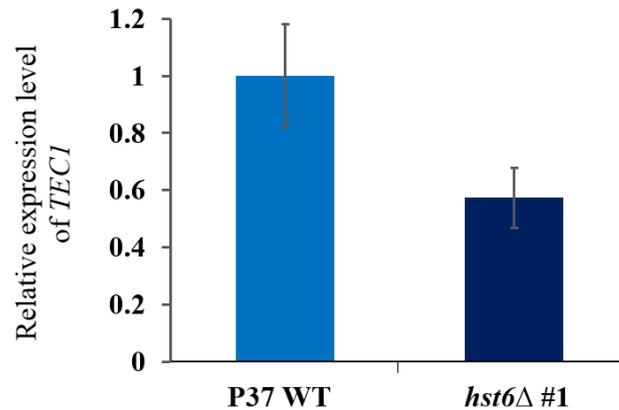
圖七、交配子代之基因型鑑定。(A) PCR 鑑定 *MTL* 基因座，子代皆同時具有 *a* 基因及 α 基因；(B) 染色體套數鑑定，以螢光染劑 Sytox green 染菌株的染色體 DNA，藉由流式細胞分析儀測定螢光強度，結果證實交配子代均含有四套染色體。



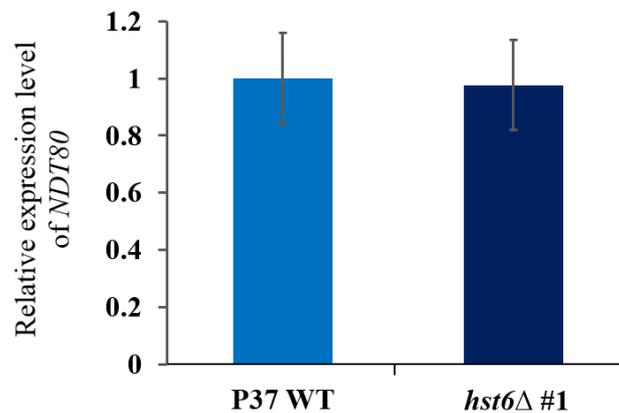
圖八、傳統生物膜之乾重測試。將固定大小且秤重之矽膠片放入 12 孔盤中，添加 2 mL 的小牛血清進行預培養過夜。同時將菌株接種至 YPD 培養液，於 30 °C 培養過夜。去除孔盤內的小牛血清後，加入 2 mL 的 Spider 培養液。從各菌液中取出約 2×10^7 個細胞，接種至處理過的 12 孔盤中，以 37°C、125 rpm 震盪培養 48 小時。去除孔盤內的 Spider 培養液，並置於室溫下數天，晾乾矽膠片後秤取其重量，將其扣除矽膠片淨重後，即可得生成之生物膜乾重。實驗至少進行三重複獨立操作。*hst6* 突變株的傳統生物膜乾重與野生株並無明顯差異，且皆能於矽膠片上形成厚實之傳統生物膜。



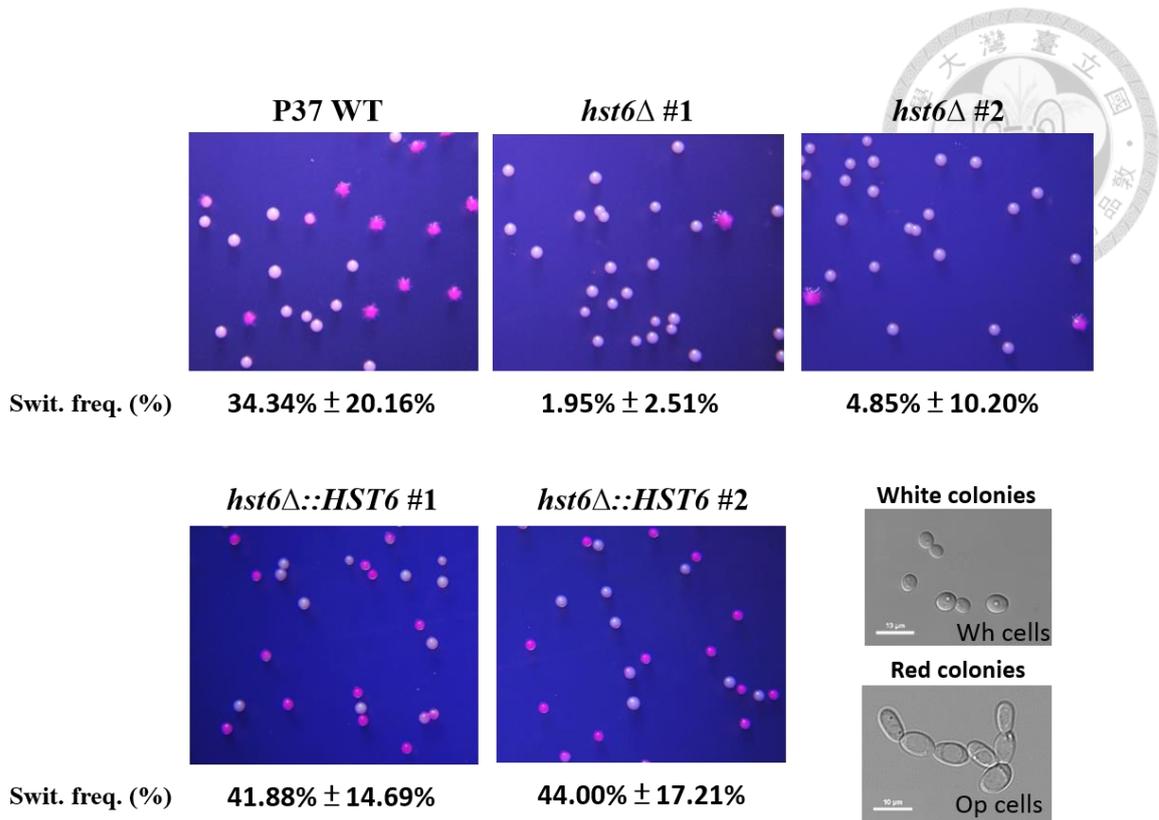
(A)



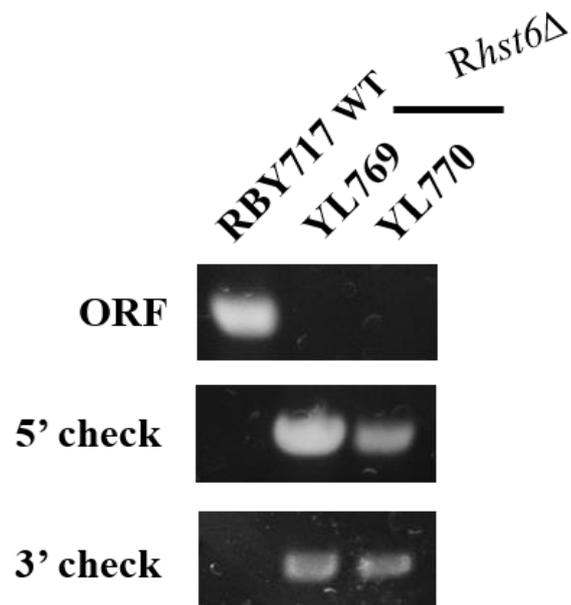
(B)



圖九、傳統生物膜之 *TEC1* 及 *NDT80* 基因表現程度。直接以 12 孔盤作為生物膜的附著平台，在小牛血清預培養過夜後，加入 2 mL 的 Spider 培養液。從各菌液中取出約 2×10^7 個細胞進行接種，以 37°C 、125 rpm 震盪培養 24 小時後，收集細胞並萃取 RNA，反轉錄為互補 DNA。利用 qRT-PCR 分析菌株中 (A) *TEC1* 及 (B) *NDT80* 的基因表現程度。實驗以 *ACT1* 基因作為內部校正點 (internal control)，而野生株的基因表現值則為實驗基準點，其設為 1。實驗進行三重覆。*hst6* 突變株中 *TEC1* 及 *NDT80* 的表現情形幾乎與野生株一致，再次證實 Hst6 運輸蛋白質並不影響傳統生物膜之生成。

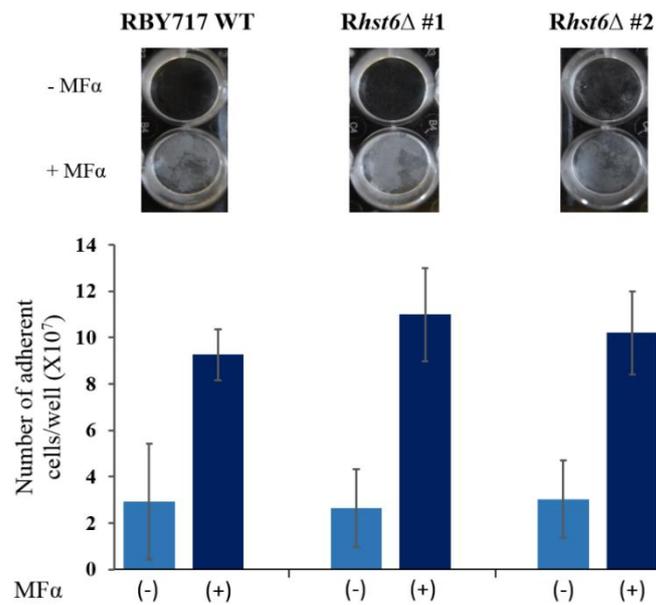


圖十、*hst6* 突變株受 NAG 誘導之 white-to-opaque 型態轉換率較低。利用 YPD 培養液培養菌株之 white 細胞過夜，稀釋菌液並均勻塗盤於含有 Phloxine B 之 Lee's NAG 培養基上，每盤約有 200 至 300 顆菌落，以 25 °C 培養 4-5 天後，進行細胞計數及拍照觀察。而 Phloxine B 染劑可選擇性將 opaque 菌落然染成粉紅色，white 菌落則依然維持白色。實驗至少進行三重複，統計所得之型態轉換效率列於各圖下方。Swit. Freq. 為 white-opaque 型態轉換效率：opaque 菌落數/所有菌落數。*hst6* 突變株在 NAG 誘導下，white-opaque 型態轉換率明顯產生下降。

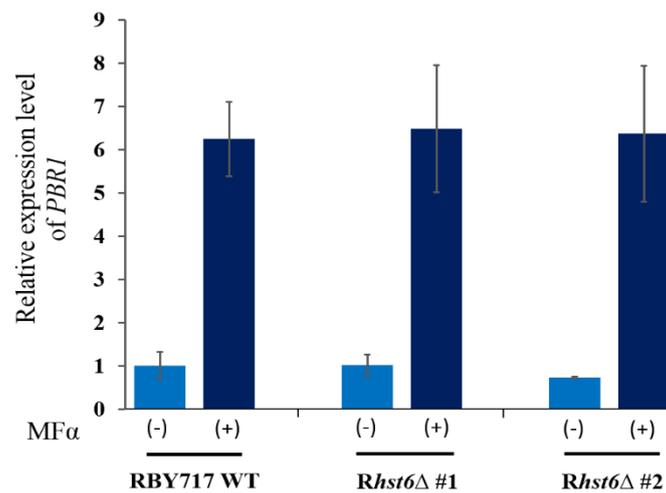


圖十一、*MTLa/a* 野生型菌株 (RBY717) 所構築的 *Rhst6* 突變株之 PCR 鑑定。於編號為 RBY717 之 *MTLa/a* 菌株中剔除 *HST6* 基因，得到 *Rhst6* 突變株。以 PCR 進行鑑定時，*Rhst6* 突變株不具有 ORF 的基因片段，但會出現 5' 與 3' check 之 PCR 產物。野生株 (RBY717) 在此作為實驗控制組，具有 ORF 之 PCR 產物，但不會產生 5' 與 3' check 之 PCR 產物。

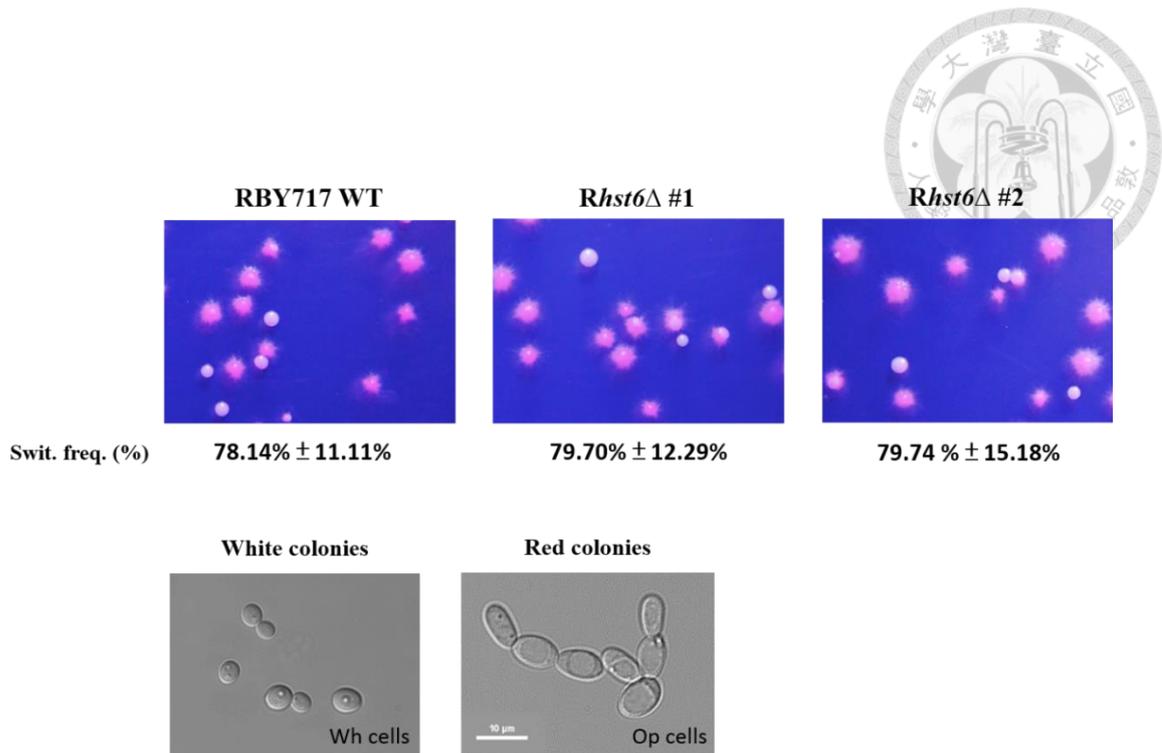
(A)



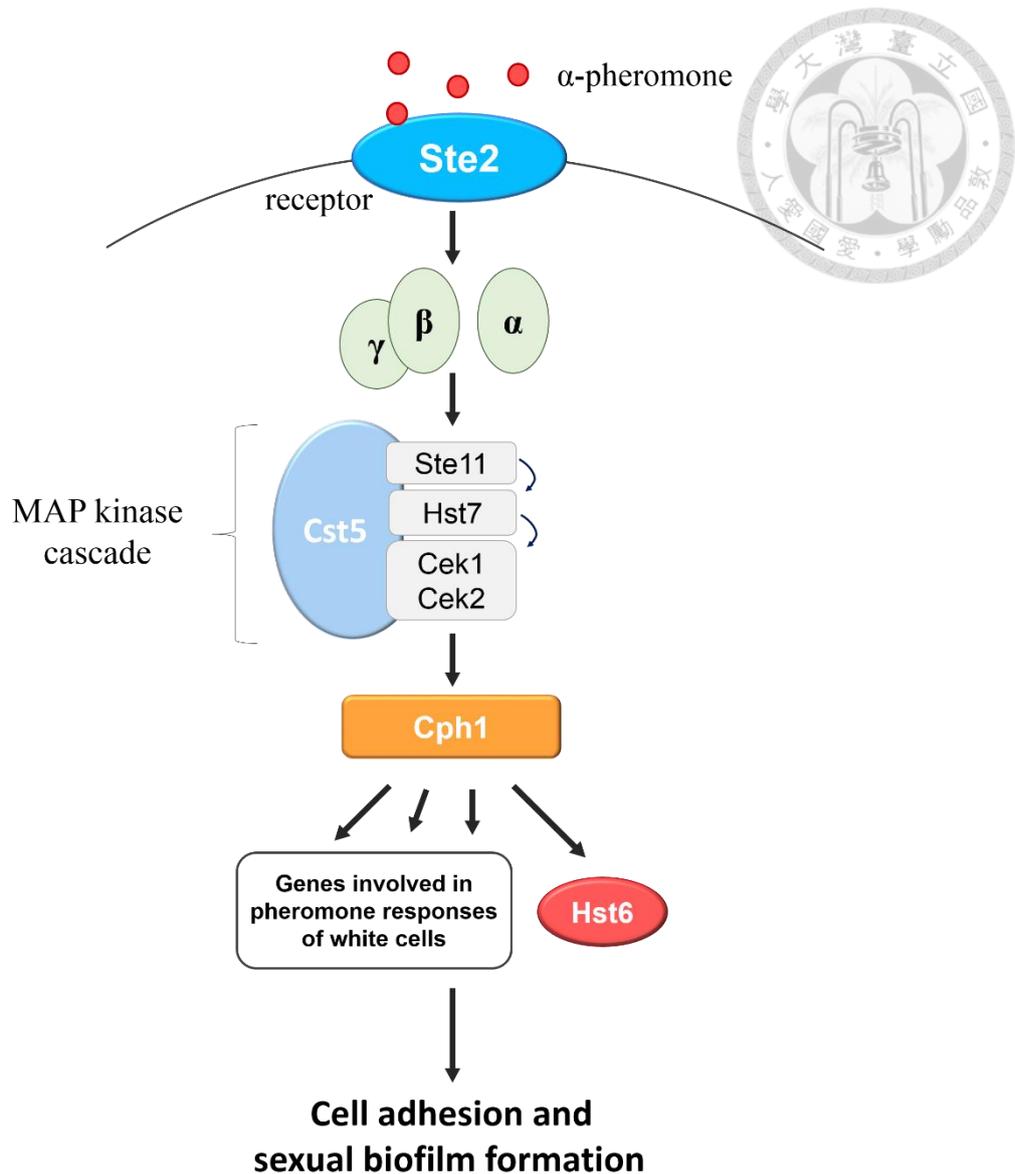
(B)



圖十二、剔除 *MTLa/a* 野生型菌株 RBY717 中的 *HST6* 基因不影響費洛蒙誘導之細胞附著形成。white 細胞於 Spider 培養液，30 °C 下培養過夜。取 5×10^7 個細胞與 1 mL Lee's 培養液混合，並移入 12 孔盤。分別加入 DMSO (-MF α) 或 α -pheromone (+MF α)，與菌液混勻後靜置於室溫。(A) 24 小時後以 PBS 溶液清洗並拍照記錄。蒐集於 12 孔盤底部的菌體，利用分光光度計 OD₆₀₀ 吸光值測量菌數。(B) 同時以 qRT-PCR 分析菌株之 *PBR1* 基因表現，實驗將 *ACT1* 基因作為內部校正點 (internal control)，而未受 α -pheromone (-MF α) 刺激之 RBY717 菌株的 *PBR1* 基因表現值設為實驗基準點。實驗至少進行三重複獨立操作。於 α -pheromone 誘導下，*Rhst6* 突變株與 RBY717 菌株的細胞附著量及 *PBR1* 基因表現程度並無差異。



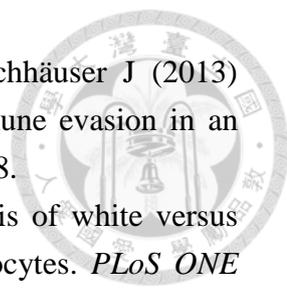
圖十三、剔除野生型菌株 RBY717 的 *HST6* 基因不影響 NAG 誘導之 white-to-opaque 型態轉換率。以 YPD 培養液培養菌株過夜後，稀釋菌液並均勻塗盤於含有 Phloxine B 之 Lee's NAG 培養基上，每盤約有 200 至 300 顆菌落，以 25 °C 培養 4-5 天後，進行細胞計數及拍照觀察。Phloxine B 染劑可選擇性將 opaque 菌落然染成粉紅色，white 菌落則依然維持白色。實驗至少進行三重複，統計所得之型態轉換效率列於各圖下方。Swit. Freq. 為 white-opaque 型態轉換效率：opaque 菌落數/所有菌落數。*Rhst6* 突變株與 RBY717 菌株受 NAG 誘導時，white-opaque 型態轉換效率相似。

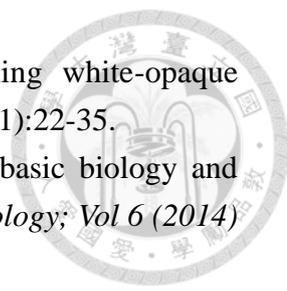


圖十四、Hst6 運輸蛋白質於 white 細胞費洛蒙反應之調控機制模型。當 *C. albicans* 的 white *MTLa/a* 細胞接收到 α -pheromone 時，位在訊息路徑下游的 *HST6* 基因會受到上游的費洛蒙訊息傳遞路徑以及轉錄因子 Cph1 所調節，且對於 white 細胞的費洛蒙誘導之細胞貼附與生物膜形成扮演著相當重要的角色。

參考文獻

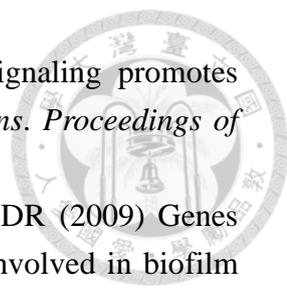
1. Scaduto CM & Bennett RJ (2015) *Candida albicans* the chameleon: transitions and interactions between multiple phenotypic states confer phenotypic plasticity. *Current Opinion in Microbiology* 26:102-108.
2. Mayer FL, Wilson D, & Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4(2):119-128.
3. Lohse MB & Johnson AD (2009) White–opaque switching in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* 12(6):650-654.
4. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, & White TC (2012) Hidden Killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine* 4(165):165rv113-165rv113.
5. Gow NAR (2013) A developmental program for *Candida* commensalism. *Nat Genet* 45(9):967-968.
6. Miller MG & Johnson AD (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 110(3):293-302.
7. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, & Soll DR (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 169(1):189-197.
8. Bennett RJ & Johnson AD (2005) Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annual Review of Microbiology* 59(1):233-255.
9. Morschhäuser J (2010) Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Medical Microbiology and Immunology* 199(3):165-172.
10. Daniels KJ, Srikantha T, Lockhart SR, Pujol C, & Soll DR (2006) Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *The EMBO Journal* 25(10):2240-2252.
11. Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J, & Soll DR (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAPI*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infection and Immunity* 67(12):6652-6662.
12. Soll DR (2009) Why does *Candida albicans* switch? *FEMS Yeast Research* 9(7):973-989.
13. Odds EC (1997) Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. *Mycoses* 40:9-10.
14. Geiger J, Wessels D, Lockhart SR, & Soll DR (2004) Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 72(2):667-677.

- 
15. Sasse C, Hasenberg M, Weyler M, Gunzer M, & Morschhäuser J (2013) White-Opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. *Eukaryotic Cell* 12(1):50-58.
 16. Lohse MB & Johnson AD (2008) Differential phagocytosis of white versus opaque *Candida albicans* by drosophila and mouse phagocytes. *PLoS ONE* 3(1):e1473.
 17. Zordan RE, Miller MG, Galgoczy DJ, Tuch BB, & Johnson AD (2007) Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biology* 5(10):e256.
 18. Zordan RE, Galgoczy DJ, & Johnson AD (2006) Epigenetic properties of white–opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(34):12807-12812.
 19. Huang G, Wang H, Chou S, Nie X, Chen J, & Liu H (2006) Bistable expression of *WOR1*, a master regulator of white–opaque switching in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(34):12813-12818.
 20. Srikantha T, Borneman AR, Daniels KJ, Pujol C, Wu W, Seringhaus MR, Gerstein M, Yi S, Snyder M, & Soll DR (2006) TOS9 Regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 5(10):1674-1687.
 21. Vices MD & Kumamoto CA (2007) The morphogenetic regulator Czf1p is a DNA-binding protein that regulates white–opaque switching in *Candida albicans*. *Microbiology* 153(9):2877-2884.
 22. Sonneborn A, Tebarth B, & Ernst JF (1999) Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infection and Immunity* 67(9):4655-4660.
 23. Srikantha T, Tsai LK, Daniels K, & Soll DR (2000) *EFG1* null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. *Journal of Bacteriology* 182(6):1580-1591.
 24. Wang H, Song W, Huang G, Zhou Z, Ding Y, & Chen J (2011) *Candida albicans* Zcf37, a zinc finger protein, is required for stabilization of the white state. *FEBS Letters* 585(5):797-802.
 25. Lohse MB, Hernday AD, Fordyce PM, Noiman L, Sorrells TR, Hanson-Smith V, Nobile CJ, DeRisi JL, & Johnson AD (2013) Identification and characterization of a previously undescribed family of sequence-specific DNA-binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(19):7660-7665.
 26. Hernday AD, Lohse MB, Fordyce PM, Nobile CJ, DeRisi JL, & Johnson AD

- 
- (2013) Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 90(1):22-35.
27. Soll DR (2014) The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *Journal of Oral Microbiology; Vol 6 (2014) incl Supplements*.
 28. Rikkerink EH, Magee BB, & Magee PT (1988) Opaque-white phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 170(2):895-899.
 29. Ramírez-Zavala B, Reuß O, Park Y-N, Ohlsen K, & Morschhäuser J (2008) Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 4(6):e1000089.
 30. Huang G, Srikantha T, Sahni N, Yi S, & Soll DR (2009) CO₂ Regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Current biology : CB* 19(4):330-334.
 31. Huang G, Yi S, Sahni N, Daniels KJ, Srikantha T, & Soll DR (2010) N-Acetylglucosamine Induces white to opaque switching, a mating prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 6(3):e1000806.
 32. Stevenson JS & Liu H (2011) Regulation of white and opaque cell-type formation in *Candida albicans* by Rtt109 and Hst3. *Molecular Microbiology* 81(4):1078-1091.
 33. Lockhart SR, Pujol C, Daniels KJ, Miller MG, Johnson AD, Pfaller MA, & Soll DR (2002) In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* 162(2):737-745.
 34. Zhao R, Daniels KJ, Lockhart SR, Yeater KM, Hoyer LL, & Soll DR (2005) Unique aspects of gene expression during *Candida albicans* mating and possible G1 dependency. *Eukaryotic Cell* 4(7):1175-1190.
 35. Hartwell LH (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological Reviews* 38(2):164-198.
 36. Bennett RJ & Johnson AD (2003) Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *The EMBO Journal* 22(10):2505-2515.
 37. Forche A, Alby K, Schaefer D, Johnson AD, Berman J, & Bennett RJ (2008) The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biology* 6(5):e110.
 38. Lockhart SR, Zhao R, Daniels KJ, & Soll DR (2003) α -Pheromone-induced “shmooing” and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. *Eukaryotic Cell* 2(5):847-855.
 39. Pujol C, Daniels KJ, & Soll DR (2015) Comparison of switching and biofilm

- formation between *MTL*-homozygous strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Eukaryotic Cell* 14(12):1186-1202.
40. Park Y-N, Daniels KJ, Pujol C, Srikantha T, & Soll DR (2013) *Candida albicans* forms a specialized “sexual” as well as “pathogenic” biofilm. *Eukaryotic Cell* 12(8):1120-1131.
 41. Yi S, Sahni N, Daniels KJ, Lu KL, Srikantha T, Huang G, Garnaas AM, & Soll DR (2011) Alternative mating type configurations (**a**/ α versus **a/a** or α/α) of *Candida albicans* result in alternative biofilms regulated by different pathways. *PLoS Biology* 9(8):e1001117.
 42. Srikantha T, Daniels KJ, Pujol C, Kim E, & Soll DR (2013) Identification of genes upregulated by the transcription factor Bcr1 that are involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans* **a/a** biofilms. *Eukaryotic Cell* 12(6):875-888.
 43. Soll DR (2014) The evolution of alternative biofilms in an opportunistic fungal pathogen: An explanation for how new signal transduction pathways may evolve. *Infection, Genetics and Evolution* 22:235-243.
 44. Soll DR (2011) Evolution of a new signal transduction pathway in *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 19(1):8-13.
 45. Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen W-C, Wang P, Pan X, Waugh M, & Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(4):746-785.
 46. Liu H, Kohler J, & Fink GR (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* 266(5191):1723-1726.
 47. Yi S, Sahni N, Daniels KJ, Lu KL, Huang G, Garnaas AM, Pujol C, Srikantha T, & Soll DR (2011) Utilization of the mating scaffold protein in the evolution of a new signal transduction pathway for biofilm development. *mBio* 2(1):e00237-00210.
 48. Chen J, Chen J, Lane S, & Liu H (2002) A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 46(5):1335-1344.
 49. Magee BB, Legrand M, Alarco A-M, Raymond M, & Magee PT (2002) Many of the genes required for mating in *Saccharomyces cerevisiae* are also required for mating in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 46(5):1345-1351.
 50. Yi S, Sahni N, Daniels KJ, Pujol C, Srikantha T, & Soll DR (2008) The same receptor, G protein, and mitogen-activated protein kinase pathway activate different downstream regulators in the alternative white and opaque

- pheromone responses of *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* 19(3):957-970.
51. Sahni N, Yi S, Daniels KJ, Huang G, Srikantha T, & Soll DR (2010) Tec1 mediates the pheromone response of the white phenotype of *Candida albicans*: insights into the evolution of new signal transduction pathways. *PLoS Biology* 8(5):e1000363.
52. Daniels KJ, Srikantha T, Pujol C, Park Y-N, & Soll DR (2015) Role of Tec1 in the development, architecture, and integrity of sexual biofilms of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 14(3):228-240.
53. Lin C-H, Kabrawala S, Fox EP, Nobile CJ, Johnson AD, & Bennett RJ (2013) Genetic control of conventional and pheromone-stimulated biofilm formation in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 9(4):e1003305.
54. Coppin E, de Renty C, & Debuchy R (2005) The function of the coding sequences for the putative pheromone precursors in *Podospira anserina* Is restricted to fertilization. *Eukaryotic Cell* 4(2):407-420.
55. Dignard D, El-Naggar AL, Logue ME, Butler G, & Whiteway M (2007) Identification and characterization of *MFA1*, the gene encoding *Candida albicans* **a**-factor pheromone. *Eukaryotic Cell* 6(3):487-494.
56. Raymond M, Dignard D, Alarco A-M, Mainville N, Magee BB, & Thomas DY (1998) A Ste6p/P-glycoprotein homologue from the asexual yeast *Candida albicans* transports the **a**-factor mating pheromone in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 27(3):587-598.
57. Michaelis S & Barrowman J (2012) Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone **a**-factor, from yeast mating to human disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(3):626-651.
58. Tao L, Cao C, Liang W, Guan G, Zhang Q, Nobile CJ, & Huang G (2014) White cells facilitate opposite- and same-sex mating of opaque cells in *Candida albicans*. *PLoS Genetics* 10(10):e1004737.
59. Chenevert J, Valtz N, & Herskowitz I (1994) Identification of genes required for normal pheromone-induced cell polarization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 136(4):1287-1297.
60. Cross F, Hartwell LH, Jackson C, & Konopka JB (1988) Conjugation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Cell Biology* 4(1):429-455.
61. Kuchler K, Sterne RE, & Thorner J (1989) *Saccharomyces cerevisiae* *STE6* gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *The EMBO Journal* 8(13):3973-3984.
62. Reuß O, Vik Å, Kolter R, & Morschhäuser J (2004) The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341:119-127.

- 
63. Alby K & Bennett RJ (2011) Interspecies pheromone signaling promotes biofilm formation and same-sex mating in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(6):2510-2515.
64. Sahni N, Yi S, Daniels KJ, Srikantha T, Pujol C, & Soll DR (2009) Genes selectively up-regulated by pheromone in white cells are involved in biofilm formation in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 5(10):e1000601.
65. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR, & Johnson AD (2012) A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell* 148(1-2):126-138
66. Cannon RD & Holmes AR (2015) Learning the ABC of oral fungal drug resistance. *Molecular Oral Microbiology* 30(6):425-437
67. Snider J, Hanif A, Lee ME, Jin K, Yu AR, Graham C, Chuk M, Damjanovic D, Wierzbicka M, Tang P, Balderes D, Wong V, Jessulat M, Darowski KD, San Luis B-J, Shevelev I, Sturley SL, Boone C, Greenblatt JF, Zhang Z, Paumi CM, Babu M, Park H-O, Michaelis S, & Stagljar I (2013) Mapping the functional yeast ABC transporter interactome. *Nat Chem Biol* 9(9):565-572.
68. Bennett RJ & Johnson AD (2006) The role of nutrient regulation and the Gpa2 protein in the mating pheromone response of *C. albicans*. *Molecular Microbiology* 62(1):100-119.
69. Lohse MB & Johnson AD (2016) Identification and characterization of Wor4, a new transcriptional regulator of white-opaque switching. *G3: Genes/Genomes/Genetics* 6(3):721-729.
70. Berkower C & Michaelis S (1991) Mutational analysis of the yeast a-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *The EMBO Journal* 10(12):3777-3785.
71. Wilson KL & Herskowitz I (1984) Negative regulation of *STE6* gene expression by the alpha 2 product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 4(11):2420-2427.

附錄



培養基

本研究所使用之固態及液態培養基配製方法如下。其中 40% 葡萄糖溶液需先以 0.22 μm 孔徑之濾膜 (Millex-GS Syringe Filter Unit, Merk Millipore Ltd, Billerica, MA, USA) 過濾。如欲配製含有 phloxine B 染劑的固態培養基，則在高溫滅菌之後，額外添加 phloxine B 至最終濃度為 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

YPD 培養液：

欲配製 100 mL 的 YPD 培養液，取 2 克的 Bacto Peptone 及 1 克 Yeast Extract 溶於 95 mL 去離子水中，經高溫滅菌處理後，再加入 5 mL 40% 葡萄糖溶液。

YPD 固態培養基：

欲配製 400 mL 的 YPD 固態培養基，取 8 克 Bacto Peptone、4 克 Yeast Extract 及 8 克 Bacto Agar (最終濃度為 2%) 溶於 380 mL 去離子水中，經高溫滅菌處理後，再加入 20 mL 40% 葡萄糖溶液。

YPD/NAT 固態培養基：

於 YPD 固態培養基配方中額外添加 Nourseothricin 至最終濃度為 0.2 mg/mL。

Spider 培養液：

欲配製 100 mL 的 Spider 培養液，先秤取 1 克 Mannitol、1 克 Nutrient Broth 及 0.4 克 K_2HPO_4 溶於 100 mL 去離子水中，並調整 pH 值至 7.2，進行高溫滅菌。

Spider 固態培養基：

欲配製 400 mL 的 Spider 固態培養基，先秤取 4 克 Mannitol、4 克 Nutrient Broth



及 1.6 克 K_2HPO_4 溶於 400 mL 去離子水中，並調整 pH 值至 7.2，再加入 8 克 Bacto Agar (最終濃度為 2%)，進行高溫滅菌。

Lee's glucose 培養液：

欲配製 200 mL 的 Lee's glucose 培養液，需先秤取 3.46 克 Lee's powder 溶於 190 mL 去離子水後，加入 0.04 mL 1mM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 及 0.2 mL 1mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ，將 pH 值調整至 4.0 後再調整為 6.8，進行高溫滅菌處理，待培養液降溫後加入 6.25 mL 40% 葡萄糖溶液。

Lee's NAG 固態培養基：

欲配製 400 mL 的 Lee's NAG 培養基，需先秤取 6.92 克 Lee's powder 溶於 380 mL 去離子水後，加入 0.08 mL 1mM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 及 0.4 mL 1mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ，將 pH 值調整至 4.0 後再調整為 6.8，再加入 8 克 Bacto Agar (最終濃度為 2%)，進行高溫滅菌，待降溫後加入 20 mL 之 25% NAG 溶液及 phloxine B 染劑均勻混合。

Arg 固態培養基：

欲配製 400 mL 的 Arg 固態培養基，先秤取 8 克 Bacto Agar (最終濃度為 2%)、0.68 克不完全胺基酸粉末及 2.8 克 YNB without amino acid 溶於 380 mL 去離子水，經高溫滅菌後，再加入 20 mL 40% 葡萄糖溶液、1.8 mL 1 % Uracil、1.8 mL 1 % Histidine 及 4.32 mL 1 % Leucine。其中 Uracil、Histidine、Leucine 溶液需事先以 0.22 μm 孔徑之濾膜 (Millex-GS Syringe Filter Unit, Merk Millipore Ltd, Billerica, MA, USA) 過濾。



NAT 固態培養基：

欲配製 400 mL 的 NAT 固態培養基，先秤取 8 克 Bacto Agar (最終濃度為 2%)、0.68 克不完全胺基酸粉末及 2.8 克 YNB without amino acid 溶於 380 mL 去離子水，經高溫滅菌後，再加入 20 mL 40% 葡萄糖溶液、1.8 mL 1 % Uracil、1.8 mL 1 % Histidine、4.32 mL 1 % Leucine、1.8 mL 1 % Arginine 及 Nourseothricin (最終濃度為 0.2 mg/mL)。Arginine 溶液需事先以 0.22 μm 孔徑之濾膜 (Millex-GS Syringe Filter Unit, Merk Millipore Ltd, Billerica, MA, USA) 過濾。

Arg/NAT 固態培養基：

欲配製 400 mL 的 Arg/NAT 固態培養基，先秤取 8 克 Bacto Agar (最終濃度為 2%)、0.68 克不完全胺基酸粉末及 2.8 克 YNB without amino acid 溶於 380 mL 去離子水，經高溫滅菌後，再加入 20 mL 40% 葡萄糖溶液、1.8 mL 1 % Uracil、1.8 mL 1 % Histidine、4.32 mL 1 % Leucine 及 Nourseothricin (最終濃度為 0.2 mg/mL)。