

知識天地

蚊科昆蟲共生菌的致病基因演化

羅文穗（TIGP-MBAS 博士候選人）、郭志鴻副研究員（植物暨微生物學研究所）

如影隨形的共生菌

細菌在自然環境中幾乎是無所不在，上自空氣稀薄的高空，下至深不見底的海溝，到處都可以找到細菌的蹤跡。在各式各樣的細菌中，有一部分物種演化出了可以利用動植物作為宿主的能力。在這些共生關係中，大部份的共生菌似乎對宿主不會有顯著的影響（稱之為片利共生，英文專有名詞為commensalism），但少數則可能為宿主提供好處（互利共生，即mutualism；例如在動物腸道中幫忙分解食物或合成維生素的細菌）或是造成傷害（寄生，即parasitism；例如各種病菌）。無論如何，與真核生物共生為這些細菌提供了有利的生態棲位，因此所有的動植物在自然狀況下都甩不開他們如影隨形的共生菌。

螺旋菌質體是什麼？可以吃嗎？

螺旋菌質體（*Spiroplasma*），一如他們的名稱，在光學顯微鏡下看起來像是被稍微拉長了的電話線。偶而，例如在又黑又冷的顯微鏡室裡待久了，一群糾結纏繞的螺旋菌質體細胞看起來就像一團泡麵的麵條，讓人越看越餓。但是螺旋菌質體非常小，一個細胞大約只有幾個微米（ μm ; 10^{-6} 公尺）長，所以即使有大量的螺旋菌質體細胞，也不夠塞牙縫。

在生態上，大部份的螺旋菌質體物種是節肢動物的共生菌。雖然目前對他們在自然環境中與宿主的互動所知有限，但已被研究的物種中包含了針對蜜蜂還有養殖蝦蟹的病原菌，另外還有一些演化成了藉由昆蟲傳播的植物病菌，在農業上造成中很大的損失。在分類上，螺旋菌質體被歸類在柔膜菌綱（Mollicutes）。這一個分類群的共同祖先在演化上失去了合成細胞壁所需的基因，而「柔膜」即是用來形容缺乏細胞壁這個特徵。在演化上，螺旋菌質體的近親包含了會感染溫血動物的黴漿菌（*Mycoplasma*）和會感染植物的植物菌質體（phytoplasma）。除了都是缺乏細胞壁的共生菌之外，這些細菌擁有的基因數量都不多。以大家最常聽到的大腸桿菌（*Escherichia coli*）為例，其基因體大約有四千多個基因。相較之下，螺旋菌質體只有大約一千個基因。除了無法形成細胞壁之外，螺旋菌質體也缺乏合成氨基酸、脂質等養份所需的基因。在自然環境下，螺旋菌質體需要依賴宿主提供各式養分才能生存。也因此有別於細菌頑強難殺死的刻板印象，在實驗室中純化與培養螺旋菌質體並不容易。雖然目前已經開發出種種成份複雜的人工培養基，也成功的培養了一些物種進行實驗，還有更多螺旋菌質體只能藉由顯微鏡觀察或是DNA檢測的方法發現他們在昆蟲樣品中的存在，但仍無法對這些未命名的物種進行人工培養或其他後續研究。

以臺灣為名的螺旋菌質體

蚊科昆蟲是登革熱（dengue fever）、日本腦炎（Japanese encephalitis）、瘧疾（malaria）等重要傳染病的媒介，也因此流行病學家經常藉由採集蚊子樣品以監控疫情。樣品在採集後，除了鑑定蚊子的種類之外，檢測蚊子體內所帶有的各式病原也是標準流程的一部分。在過去的採集記錄中，除了對人類有威脅的微生物之外，螺旋菌質體也經常被發現於各種蚊子體內。目前共有四個已經被命名的螺旋菌質體物種被界定為蚊子的共生菌，其中有兩個物種是在1980年代由法國科學家自臺灣所採集的家蚊中首次發現。第一個物種根據發現的地點而命名為*Spiroplasma taiwanense*，而第二個物種則因為細胞較小而命名為*Spiroplasma diminutum*。另外兩個物種則是分離自美國東岸斑蚊樣品的*Spiroplasma culicicola*以及分離自法國阿爾卑斯山區斑蚊的*Spiroplasma sabaudiense*。

為了瞭解這些蚊子的共生菌與宿主之間的互動，自1990年代以來生物學家們曾經進行了許多的人工感染實驗。其中*S. diminutum*和*S. sabaudiense*雖然可以在蚊子體內大量繁殖，但是被感染的蚊子並不會有顯著的症狀。而*S. culicicola*雖然可以在感染後提高蚊子的死亡率，但在生物安全性的評估實驗中卻發現這個物種可以在小鼠的腦部生存，因此對溫血動物可能也有威脅。最後，*S. taiwanense*則是可以降低蚊子的飛行能力、提高蚊子的死亡率、對蜜蜂沒有傷害、也無法在老鼠體內生存，因此似乎很有潛力可被應用於病媒蚊的生物性防治。

近期研究成果

為了對這些蚊子共生菌的致病機制有進一步的瞭解，我們實驗室在近幾年完成了這四個螺旋菌質體物種的全

基因體解序以及比較分析。在第一階段的研究計畫中 (Lo et al. 2013)，我們針對分離自臺灣的兩個物種進行分析。結果發現具致病性的*S. taiwanense*與不具致病性的*S. diminutum*在基因體結構上非常相似，但這兩個物種在與醣類代謝相關的基因上則有許多的差異。其中*S. diminutum*擁有可以代謝蔗糖 (sucrose)、海藻糖 (trehalose)、纖維雙糖 (cellobiose)、和 N-乙酰胞壁酸 (N-acetylmuramic acid; MurNAc) 等碳水化合物的基因 (圖一)。由於這些醣類可以自蚊子所攝取的花蜜或是昆蟲血淋巴中取得，因此我們推論*S. diminutum*可充分利用這些養分與其宿主進行片利共生。

相較之下，這些基因在*S. taiwanense*的基因體中已經因為突變的累積而變成失去功能的假基因 (pseudogene) 或是完全消失。不過*S. taiwanense*卻具有*S. diminutum*所缺乏的甘油 (glycerol) 代謝基因*glpK*和*glpO* (圖一)。其中*glpO*基因產物所催化的化學反應會產生活性含氧物 (reactive oxygen species; ROS)，而這些活性含氧物則可能對宿主細胞造成傷害。雖然目前仍無法對螺旋菌質體直接進行遺傳實驗以確定*glpO*在*S. taiwanense*中的功能，但前人研究已證實*glpO*是演化上相近的黴漿菌針對動物宿主的主要致病基因，因此*glpO*極可能在*S. taiwanense*與宿主的互動關係中也有相同的功能。

在第二階段的研究計畫中 (Chang et al. 2014)，我們進一步探討了*glpO*等致病基因的演化歷史。我們主要想回答的問題是：究竟是*S. taiwanense*在演化的過程中得到了這些致病基因，或是*S. diminutum*在演化的過程中失去了這些致病基因？換句話說，這些螺旋菌質體物種的共同祖先是否具有這些致病基因？為了回答這個問題，我們加入了其他兩個分離自蚊子的螺旋菌質體物種、對蜜蜂有致病性的*Spiroplasma apis*、以及其他親緣關係更遠的物種進行演化基因體學分析。結果顯示這些細菌的共同祖先應該具有*glpO*，而不具致病性的*S. diminutum*和*S. sabaudiense*則可能在演化的過程中各自獨立失去了這個致病基因 (圖二)。

結語

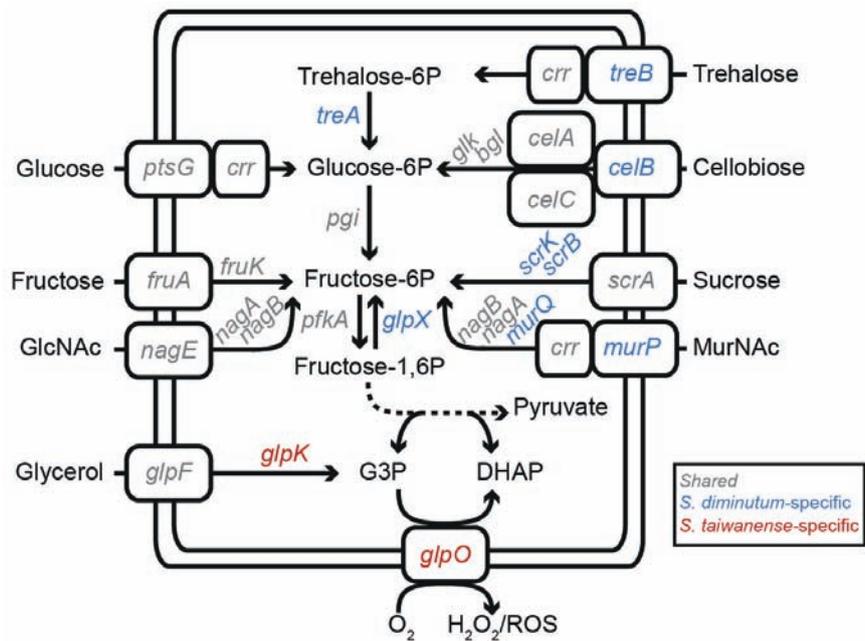
藉由這些研究，我們對螺旋菌質體的致病基因演化有了進一步的瞭解。然而，一個細菌的基因體中含有致病基因並不代表這些基因會一直被表現而造成宿主生病。對於依賴宿主維生的共生菌來說，引發疾病甚或殺死宿主似乎是自尋死路，除非這些共生菌可以在這個過程中得到一些好處 (例如提高其散播到新宿主的機率)。因此，我們目前的研究計畫主要試著探討會影響致病基因表現的環境因子。

對於利用共生菌控制蚊媒疾病的策略而言，除了直接降低病媒蚊的存活率及密度之外，另外一個可能的研究方向是抑制人類病源在蚊子體內的複製及傳播。有一個澳洲的研究團隊發現如果將原先存在果蠅體內的共生菌*Wolbachia*人工接種到蚊子體內，登革熱病毒的複製會大幅降低，因此有可能降低對人感染的風險。自2011年起在昆士蘭州北部的凱恩斯 (Cairns) 進行野放實驗以來，這些*Wolbachia*已經散播至當地的埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 族群之中，而且野外捕回的受*Wolbachia*感染的蚊子也的確維持了這個抑制登革熱病毒複製的特性 (Frentiu et al. 2014)。然而，這個策略是否可以有效控制登革熱疫情仍然需要流行病學及公共衛生等學門的進一步研究才能有定論。

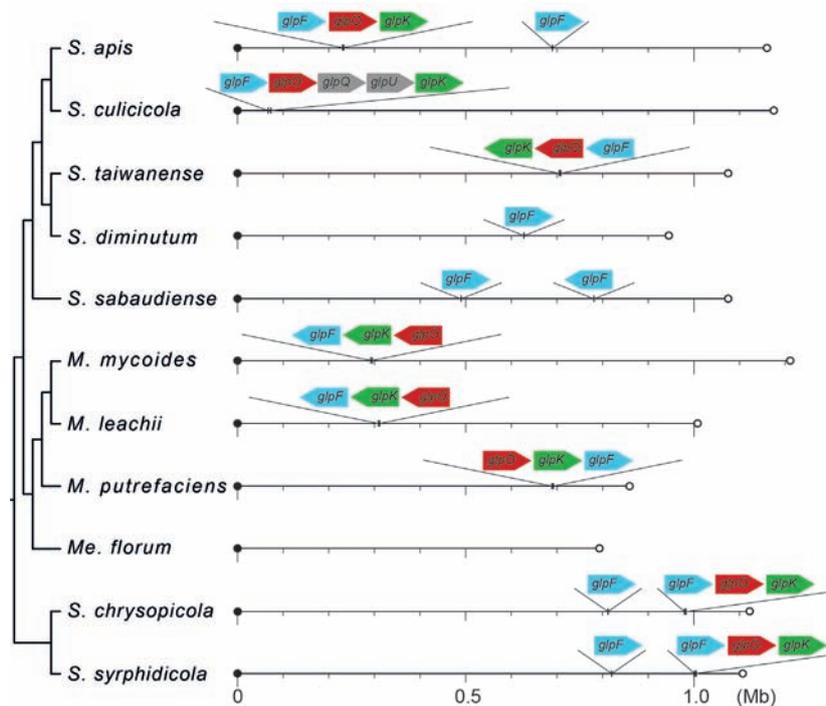
綜合而論，雖然這些關於共生菌的基礎研究可以增進我們對生物學的了解，也有可能未來對發展生物防治法有所貢獻，但離實際應用仍然有一段相當的距離。面對臺灣近年來嚴重的登革熱疫情，加強環境清理以及個人防蚊措施還是最有效的作法。

參考文獻

- Chang TH[#], Lo WS[#], Ku C, Chen LL, Kuo CH^{*} (2014) Molecular evolution of the substrate utilization strategies and putative virulence factors in mosquito-associated *Spiroplasma* species. *Genome Biology and Evolution* 6: 500-509. DOI: 10.1093/gbe/evu033 [#]Equal contribution.
- Frentiu FD, Zakir T, Walker T, Popovici J, Pyke AT, van den Hurk A, McGraw EA, O' Neill SL^{*} (2014). Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8: e2688. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002688
- Lo WS, Ku C, Chen LL, Chang TH, Kuo CH^{*} (2013) Comparison of metabolic capacities and inference of gene content evolution in mosquito-associated *Spiroplasma diminutum* and *S. taiwanense*. *Genome Biology and Evolution* 5: 1512-1523. DOI: 10.1093/gbe/evt108



圖一、兩個分離自台灣家蚊樣品的螺旋菌質體物種之代謝途徑比較。不具致病性的*S. diminutum*之特有基因以藍色標示，具致病性的*S. taiwanense*之特有基因以紅色標示，而兩個物種皆有之基因則以灰色標示。圖中下方的*glpO*基因產物為甘油-3-磷酸氧化酵素（glycerol-3-phosphate oxidase）。由此酵素所催化的化學反應產物包含過氧化氫（ H_2O_2 ）及活性含氧物（reactive oxygen species; ROS），可對宿主細胞造成傷害，因此*glpO*為可能之主要致病基因。圖取自Lo et al. (2013)。



圖二、甘油代謝相關基因*glpF*（藍色）、*glpK*（綠色）、及*glpO*（紅色）在螺旋菌質體以及親緣相近的黴漿菌物種之染色體上的位置。物種間的演化關係以圖中左方之親緣樹表示，最左方之親緣樹根（root）位置代表圖中所有物種之共同祖先。依照現存物種所帶有之基因以及物種之間的親緣關係推論，這些物種的共同祖先應該具有此三個基因。*S. diminutum*及*S. sabaudiense*可能因為獨立發生的基因缺失事件而失去*glpK*及*glpO*，因此對蚊子宿主不再具有致病性。圖取自Chang et al. (2014)。

更多「知識天地」內容，請於本院網頁：<http://sec.sinica.edu.tw/knowledge.htm>瀏覽。