

白念珠菌转录因子 Cap1p 的研究进展

王彦,曹永兵,高平挥,姜远英*

(第二军医大学药学院药理学教研室,上海 200433)

[摘要] Cap1p 是由白念珠菌 CAP1 基因编码的碱性亮氨酸拉链转录因子,既和耐药性有关,又在白念珠菌的氧化应激反应中发挥着举足轻重的作用。Cap1p 在 AP-1 家族转录因子中属于和 Yap1p、Yap2p 及 Pap1p 同样的亚家族,其调控靶基因转录的机制是核定位机制。近年来, Cap1p 调控的可能靶基因逐一被发现,其与 Yap1p 之间的异同也逐步被揭示,但是 Cap1p 和白念珠菌耐药性之间的关系至今尚未阐明。当前抗病原真菌研究领域的两大热点问题正是白念珠菌的氧化应激机制和耐药性产生,因此 Cap1p 的重要性显得尤为突出。本课题组长期从事白念珠菌转录因子 Cap1p 的研究工作,本文对 Cap1p 的研究进展作一介绍。

[关键词] 白念珠菌; Cap1p; 转录因子; 氧化应激; 抗药性, 真菌

[中图分类号] R 739.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0197-04

Candida albicans transcription factor Cap1p: an update

WANG Yan, CAO Yong-bing, GAO Ping-hui, JIANG Yuan-ying* (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Cap1p, encoded by CAP1, is a basic region-leucine zipper (bZip) transcription factor in *Candida albicans*. It has been proven to play important roles in both drug resistance and oxidative stress. Within the AP-1 family, Cap1p belongs to the same subgroup which also includes Yap1p, Yap2p, and Pap1p. The function of Cap1p is regulated by a nuclear localization mechanism. In recent years, some target genes of Cap1p have been discovered and the differences as well as similarities between Cap1p and Yap1p have been revealed. However, the role of Cap1p in the drug resistance of *Candida albicans* still needs to be further investigated. Currently drug resistance and oxidative stress are the 2 focuses in the research of fungal pathogens, making Cap1p very important in the future study. The authors have been involved in Cap1p research for a long time and this review introduces the current progress in the area.

[KEY WORDS] *Candida albicans*; Cap1p; transcription factors; oxidative stress; drug resistance; fungal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 28(2):197-200]

Cap1p 是由白念珠菌 CAP1 基因编码的碱性亮氨酸拉链(basic region-leucine zipper, bZip)转录因子。虽然目前的研究认为 Cap1p 与酿酒酵母的转录因子 Yap1p 同源,其主要功能在于转录调节白念珠菌的氧化应激反应^[1-4],但 Cap1p 以及 CAP1 基因的发现还要从有关白念珠菌耐药性的研究说起。

1 CAP1 基因的发现

1997 年, Alarco 等^[5]发现了一个新的耐药相关基因,即 CAP1。伴随着真菌感染发生率的增加和以氟康唑为代表的传统抗真菌药物长期广泛应用于临床,真菌耐药性问题日益成为科研工作者关注的焦点。在这样的研究背景下, Alarco 等^[5]试图从白念珠菌的全基因组 DNA 文库入手,进一步探讨白念珠菌的耐药性问题。他们将白念珠菌 DNA 文库中的基因装载入高拷贝的酿酒酵母质粒中,并将质粒转入酿酒酵母,筛选能在含有高浓度氟康唑(500 mg/ml)的培养基平板上生长的克隆。他们随机挑选了 12 个耐药克隆,这 12 个克隆经鉴定竟然是同一质粒的转化子。这些阳性克隆的转化质粒中插入的就是 CAP1 的基因片段。进一步的研究发现

CAP1 完整的开发阅读框编码的蛋白 Cap1p 包含 499 个氨基酸,具有亲水性,等电点是 5.15,预计相对分子质量为 55 000。

2 Cap1p 的结构

应用生物信息学方法对 CAP1 基因的序列进行分析发现, CAP1 有 2 段高度保守的序列,分别是 N-端的碱性区域和 C-端的酸性区域,其中碱性区域的后面就是亮氨酸拉链的基序。这样的结构在 AP-1 家族转录因子中属于和 Yap1p、Yap2p 及 Pap1p 同样的亚家族。划分亚家族的标准有 3 个^[6]:第一个标准是:碱性区域在 N-端,而诸如 Gen4、Fos 和 Jun 等转录因子的碱性区域在 C-端。在 Cap1p、Yap1p、Yap2p 及 Pap1p 的碱性区域还有一个共同的片段,在这一片

[基金项目] 国家自然科学基金(30500628);上海市青年科技启明星项目(05QMX1470). Supported by National Natural Science Foundation of China (30500628) and Shanghai Rising Star Program (05QMX1470).

[作者简介] 王彦,博士,讲师。

* Corresponding author. E-mail: jiangyuaning@126.com

段中2个碱性氨基酸残基的集簇被1个丙氨酸的间隔基序分隔开来,呈现出一种特殊的 cluster-spacer-cluster 的组织形式,所有的碱性亮氨酸拉链的转录因子都具有这样的组织形式,这样的组织形式是DNA结合活性的结构基础。第二个标准是:在亮氨酸拉链的第3个亮氨酸的位置氨基酸残基不是亮氨酸,Cap1p是丙氨酸,Yap1p和Yap2p是天冬酰胺,Pap1p是苏氨酸。而诸如Gcn4、Fos和Jun等转录因子在这个位置的氨基酸残基都是亮氨酸。先前的研究^[6]表明这个氨基酸残基对DNA的结合和转录激活的活性是很重要的。第3个标准是:C-端酸性区域较之碱性区域保守性较差,但有意思的是Cap1p、Yap1p、Yap2p及Pap1p在C-端酸性区域的同样位置含有3个半胱氨酸残基。C-端的半胱氨酸富集区域在功能上可能与转录因子的调控机制有关。

3 Cap1p 调控的核定位机制

由于CAP1和YAP1,以及Cap1p和Yap1p在结构上有很大的相似性,Yap1p在C-端的半胱氨酸残基在Cap1p的结构中都有体现,众所周知Yap1p的C-端区域以及那些保守的半胱氨酸残基都是Yap1p转录调控核定位机制的关键结构,研究工作者于是将关注的焦点转移到Cap1p的转录调控机制上来,研究Cap1p的调控机制是否和Yap1p同样的核定位机制。

核定位机制不同于一般转录因子的水平调控机制,对Yap1p的研究^[7-11]表明,Yap1p能通过自身细胞定位的转移激活靶基因,也就是说在通常非激活状态下,Yap1p是弥散在细胞质和细胞核中的,而且大部分分布在细胞质区域,当接收到激活的信号时,比如过氧化氢的刺激信号,Yap1p会重新分布,绝大部分重新定位至细胞核区域,在细胞核中调控基因的表达。这样的调控机制被称为核定位机制(nuclear localization mechanism)。

研究核定位机制的最有效手段就是利用CAP1-GFP融合基因,通过检测和观察绿荧光蛋白的定位来跟踪Cap1p的定位。实验研究^[2]的结果完全证实了人们先前的猜想,正如Yap1p一样,在通常非激活状态下,Cap1p是弥散在细胞质和细胞核中的,而且大部分分布在细胞质区域,当接受到过氧化氢的刺激后,Cap1p重新分布,绝大部分重新定位至细胞核区域。

谈到核定位机制,不能忽略的是Cap1p结构中的C-端区域和这个区域中的半胱氨酸残基。在功能上,C-端区域似乎并不是导致耐药性所必需的,因为C-端区域缺失的CAP1在酿酒酵母中高表达完全可以导致对氟康唑耐药性的产生,而且导致耐药的程度丝毫不比完整的CAP1差^[5]。但是如果将C-端区域477位的半胱氨酸突变为丙氨酸,Cap1p的核定位机制就完全被破坏了,突变后的Cap1p不再出现定位的转移,而是无论有没有氧化刺激的激活信号都始终定位于核区^[2]。

4 Cap1p 在白念珠菌氧化应激中的重要作用

从上述核定位机制我们已经知道过氧化氢这样的氧化性物质是Cap1p的激活信号,先前的研究也已经证明Yap1p是酿酒酵母中参与氧化应激反应的重要转录因子。那么Cap1p是否和白念珠菌的氧化应激有关呢?人们把白念珠菌中的CAP1基因从基因组中敲除,发现CAP1基因缺失的白念珠菌菌株对过氧化氢非常敏感,将完整的CAP1基因重新转入,菌株对过氧化氢的耐受性恢复,但是C-端有缺欠的CAP1基因则不能使菌株恢复对过氧化氢的耐受性^[1,2]。这一现象证实了Cap1p在白念珠菌氧化应激中的重要作用,而且证明完整的CAP1是耐受过氧化氢氧化刺激所必需的。

本课题组应用基因芯片及其他多种分子生物学技术阐明了Cap1p参与氧化应激的分子机制^[12]。研究结果显示Cap1p能通过影响多种通路的基因转录参与白念珠菌的氧化应激反应,其影响的通路包括:直接的抗氧化通路(如硫氧还蛋白还原酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽S-转移酶、NADPH脱氢酶和锰-超氧化物歧化酶)、碳水化合物代谢和能量代谢通路(如磷酸戊糖通路的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和醛糖转移酶;糖酵解相关基因乙二醛酶I和NADPH-依赖的甲基乙二醛还原酶;与线粒体呼吸功能有关的NADH-依赖的黄素氧化还原酶、醌氧化还原酶、线粒体呼吸链功能蛋白等)、蛋白降解通路(如和泛素代谢有关的泛素特异性异肽酶、泛素特异性蛋白酶和泛素-蛋白连接酶)、ATP依赖的RNA解旋酶(ATP依赖的RNA解旋酶基因DBP8和MAK5)、药物外排相关的耐药通路(如多药耐药基因CaMDR1、CaYCF1和CaCIP1)等。其中最值得注意的是:Cap1p正常表达的菌株CAI4经过过氧化氢处理后多药耐药基因CaMDR1的转录水平升高,而在CAP1基因缺失的菌株CJD21中CaMDR1的转录不能被过氧化氢激活,从而在国内外首次发现了过氧化氢能以Cap1p依赖的方式激活多药耐药基因CaMDR1的表达。

5 Cap1p 与白念珠菌的多药耐药性

虽然Cap1p在白念珠菌氧化应激中的重要作用得以证实,但是其与耐药性之间的相关性并非人们所料想的那样。起先CAP1基因在酿酒酵母中表达时的表型特征使人们预想Cap1p是导致白念珠菌耐药性激活因子,然而此后在白念珠菌中进行的研究发现CAP1基因缺失的白念珠菌菌株较之缺失前的亲本菌株,对氟康唑、浅蓝菌素、布雷菲尔德菌素A和胍的敏感性没有明显变化,只是对镉、4-硝基喹啉N-氧化物、1,10-二氮菲以及过氧化氢的敏感性增加^[1]。将C-端区域缺失的CAP1基因转入到CAP1基因缺失的白念菌株中,菌株就出现了对上述化合物(过氧化氢除外)的强耐受性^[1]。更有趣而且难以解释的是,将一个多药耐药基因CaMDR1高表达的白念菌株FR2中的CAP1基因敲除,菌株并没有出现耐药性的减弱,相反却出现了更高水平的对氟

康唑的耐药性,与此同时人们还观察到多药耐药基因 *CaMDR1* 更高水平的表达^[1]。Cap1p 是白念珠菌耐药的激活因子还是抑制因子至今尚无定论。总之, Cap1p 和耐药性之间的关系纷繁复杂,存在很多问题有待进一步的研究探讨。

6 Cap1p 可能的靶基因

目前认为 Cap1p 可能的靶基因有多药耐药基因 *CaMDR1*、与镉耐受有关的 ABC 外转运蛋白基因 *CaYCF1*、谷胱甘肽还原酶基因 *CaGLR1* 和硫氧还蛋白基因 *CaTRR1*。其中,和物质的耐受或者说耐药有关的基因是 *CaMDR1* 和 *CaYCF1*,和细胞内的氧化还原反应有关的基因是 *CaGLR1* 和 *CaTRR1*。这些基因被认为 Cap1p 可能的靶基因是因为将 C-端区域缺失的 *CAP1* 基因转入到 *CAP1* 基因缺失的白念菌株中,菌株的 *CaMDR1*、*CaYCF1*、*CaGLR1* 和 *CaTRR1* 的转录水平明显升高^[1]。在这 4 个可能的靶基因中,对 *CaGLR1* 的研究最为深入。应用虫荧光素酶报告基因和谷胱甘肽还原酶活性检测,人们发现过氧化氢和胍能够诱导 *CaGLR1* 的转录和活性,而此诱导的过程依赖于 Cap1p 这一转录因子的存在^[2]。我们研究了白念珠菌氧化应激过程中的 Cap1p 相关基因^[12],其中有数十条基因在启动子区域有 Cap1p 的识别元件,如 *ZWF1*、*TAL1*、*GLO1*、*IPF7817*、*IPF11105* 等,这些基因也很有可能是 Cap1p 直接调控的靶基因。

7 Cap1p 与 Yap1p 的异同

Cap1p 与 Yap1p 有很多的相似之处,除结构上的相似,核定位机制的相似外,它们都与镉和过氧化氢的耐受有关。有研究者将 *CAP1* 基因转入 *YAP1* 基因缺失的酿酒酵母中,发现 *CAP1* 基因虽然不能完全替代 *YAP1* 基因,但是能够部分弥补 *YAP1* 基因的功能,*CAP1* 基因的转入使原本对镉和过氧化氢非常敏感的酿酒酵母菌株耐受性有所回复^[2]。

在调控的可能的靶基因上,二者也有很大的相似之处。目前发现的 Yap1p 的可能靶基因有 *FLR1*^[5]、*YCF1*^[13]、*GLR1*^[14]、*TRR1*^[15]、*ATR1*^[16]、*TRX2*^[17]、*GSH1*^[18] 等,其中 *FLR1* 和白念珠菌的 *CaMDR1* 同源,都属于 MFS 超家族的多药耐药基因。

此外, Cap1p 和 Yap1p 参与氧化应激的通路也有相似之处。Yap1p 参与氧化应激的通路包括直接的抗氧化通路、碳水化合物代谢通路和蛋白降解通路^[19]。我们的研究发现 Cap1p 参与氧化应激的通路也包括上述这些。

然而, Cap1p 和 Yap1p 毕竟是不同物种中的转录因子,分别存在于致病菌白念珠菌和非致病菌酿酒酵母中,白念珠菌和酿酒酵母在进化上有很大差异, Cap1p 和 Yap1p 存在差异是必然的。 *CAP1* 基因在酿酒酵母中不能完全替代 *YAP1* 基因的功能已经是很好的例证。此外,我们的研究^[12]发现 Cap1p 在氧化应激中直接或间接调控了众多的基因,其中很大一部分是 Yap1p 研究中未见报道的,比如 *ZWF1*、*TAL1*、

EBP4、*GLO1*、*IPF7817*、*IPF11105*、*DBP8* 等。

8 Cap1p 相关研究的意义

白念珠菌是临床危害最严重的致病真菌之一,不仅会引起浅表的感染,更会导致免疫功能低下患者严重的深部感染。目前临床应用的抗真菌药物种类有限且耐药性问题日趋严重,研究抗白念珠菌感染的新策略已成为科研工作者极具挑战性的课题。另一方面的研究发现白念珠菌侵犯人体时,机体最重要的防御途径是通过吞噬细胞释放活性氧类(如过氧化氢)物质杀伤病原菌细胞^[20];此外,通过导致氧化应激反应杀伤真菌也是目前某些抗真菌药物的作用机制之一^[21-23]。由此看来,利用活性氧和氧化应激反应可能是抗真菌的有效途径。Cap1p 是不可多得的既和耐药性有关又参与白念珠菌氧化应激的转录因子,对其进行深入研究有望发现抗白念珠菌感染的新策略、新靶点。

[参考文献]

- [1] Alarco A M, Raymond M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*[J]. *J Bacteriol*, 1999, 181:700-708.
- [2] Zhang X, de Micheli M, Coleman S T, et al. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36:618-629.
- [3] Nicholls S, Straffon M, Enjalbert B, et al. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*[J]. *Eukaryot Cell*, 2004, 3:1111-1123.
- [4] Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, et al. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamyospore formation in *Candida albicans*[J]. *Eukaryot Cell*, 2003, 2:351-361.
- [5] Alarco A M, Balan I, Talibi D, et al. AP-1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires *FLR1* encoding a transporter of the major facilitator superfamily[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:19304-19313.
- [6] Wemmie J A, Wu A L, Harshman K D, et al. Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269:14690-14697.
- [7] Kuge S, Arita M, Murayama A, et al. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21:6139-6150.
- [8] Wood M J, Storz G, Tjandra N. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization[J]. *Nature*, 2004, 430:917-921.
- [9] Cyert M S. Regulation of nuclear localization during signaling[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:20805-20808.
- [10] Isoyama T, Murayama A, Nomoto A, et al. Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pselp, and this import step is not affected

- by oxidative stress[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:21863-21869.
- [11] Okazaki S, Naganuma A, Kuge S. Peroxiredoxin-mediated redox regulation of the nuclear localization of Yap1, a transcription factor in budding yeast[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(3-4):327-334.
- [12] Wang Y, Cao Y Y, Jia X M, et al. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans* [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40:1201-1209.
- [13] Wehrschutz-Sigl E, Jungwirth H, Bergler H, et al. The transporters Pdr5p and Snq2p mediate diazaborine resistance and are under the control of the gain-of-function allele PDR1-12[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271:1145-1152.
- [14] Grant C M, Collinson L P, Roe J H, et al. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation[J]. *Mol Microbiol*, 1996, 21:171-179.
- [15] Morgan B A, Banks G R, Toone W M, et al. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *EMBO J*, 1997, 16:1035-1044.
- [16] Coleman S T, Tseng E, Moye-Rowley WS. *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the ATR1 structural gene[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:23224-23230.
- [17] Gulshan K, Rovinsky S A, Coleman S T, et al. Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280:40524-40533.
- [18] Brombacher K, Fischer B B, Rufenacht K, et al. The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen[J]. *Yeast*, 2006, 23:741-750.
- [19] Dumond H, Danielou N, Pinto M, et al. A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36:830-845.
- [20] Wintergerst E S, Maggini S, Hornig D H. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions[J]. *Ann Nutr Metab*, 2006, 50:85-94.
- [21] Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46:3113-3117.
- [22] Lupetti A, Paulusma-Annema A, Senesi S, et al. Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46:1634-1639.
- [23] Brakebusch M, Wintergerst U, Petropoulou T, et al. Bromelain is an accelerator of phagocytosis, respiratory burst and killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes[J]. *Eur J Med Res*, 2001, 6:193-200.
- [收稿日期] 2006-10-30 [修回日期] 2007-01-10
[本文编辑] 尹 茶

· 书 讯 ·

《临床睡眠障碍诊疗手册》《实用骨折治疗学》《中华肝病专家论坛》已出版

《临床睡眠障碍诊疗手册》由赵忠新主编, ISBN 7-81060-600-X, 定价:49.00元。全书包括90余种睡眠疾病, 对于临床常见的睡眠问题的发生机制、诊断、鉴别诊断与治疗, 以及睡眠生理、睡眠障碍治疗药物、睡眠障碍客观评估方法和评估量表等进行了论述。适用于临床各科医师, 特别是神经内科、老年病科、呼吸内科、心血管内科、耳鼻喉科、小儿科和神经科临床医师阅读参考。

《实用骨折治疗学》由徐卫东主编, ISBN 7-81060-549-6, 定价:80.00元。主要为医学生、低年资创伤骨科医生、急诊外科医生而编写, 突出临床实用性。本书的特点之一是, 将各种骨折的介绍以线性顺序排列, 并将其分成多个小单元; 特点之二是, 在骨折治疗方面尽可能提供临床实际治疗和操作的过程及一些细节。

《中华肝病专家论坛》由吴孟超主编, ISBN 7-81060-581-X, 定价:160.00元。全书由百位国内知名专家结合多年临床经验, 对肝病诸多方面进行详尽阐述。具有严谨的科学性、系统性和可读性。适合感染病科、消化内科、肝胆外科等住院医师以上人员参考阅读。

以上图书均由第二军医大学出版社出版、发行。

订购电话:021-65493093, 地址:上海市翔殷路800号 第二军医大学出版社发行科, 邮编200433