



真菌中锌簇蛋白的结构和功能

吴绍文, 孔谦, 黄文洁, 晏石娟*

广东省农业科学院农业生物基因研究中心, 广东省农作物种质资源保存与利用重点实验室, 广东 广州 510640

吴绍文, 孔谦, 黄文洁, 晏石娟. 真菌中锌簇蛋白的结构和功能. 微生物学报, 2022, 62(8): 2916–2926.

Wu Shaowen, Kong Qian, Huang Wenjie, Yan Shijuan. Structures and functions of zinc cluster proteins in fungi. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 2916–2926.

摘要: 锌簇家族蛋白即 Zn_2Cys_6 类锌指蛋白, 是真菌中特有的一类蛋白, 它们属于转录因子类, 广泛参与真菌中初级和次级代谢、胁迫应答和细胞分裂等生命活动的调控。锌簇蛋白主要包括 N 端的 DNA 结合结构域、中间的调节结构域和 C 端的酸性区域, 其中 DNA 结合结构域包含锌指基序并负责结合靶基因的启动子。目前已经解析了多个锌簇家族转录因子 DNA 结合结构域的三维结构, 并发现该家族中一些蛋白能够参与调控多个基因的表达, 但缺乏对其结构、动力学和功能关系的全面分析。本文综合分析了不同锌簇蛋白与 DNA 结合的结构特征, 总结其结构域与功能的关系, 指出锌簇蛋白研究的重要方向, 旨在为锌簇家族蛋白的深入研究提供思路。

关键词: 真菌; 锌簇蛋白; 结构; 构象动力学; 功能

Structures and functions of zinc cluster proteins in fungi

WU Shaowen, KONG Qian, HUANG Wenjie, YAN Shijuan*

Guangdong Key Laboratory for Crop Germplasm Resources Preservation and Utilization, Agro-Biological Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: Zinc cluster proteins, or Zn_2Cys_6 binuclear cluster proteins, are a family of transcription

基金项目: 国家自然科学基金(31500045); 高水平农科院建设-科技创新战略专项(R2021YJ-YB1004, R2020PY-JX019); 农业农村部华南现代生物种业重点实验室(2105-000000-20-03-457451)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31500045), by the Special Fund for Scientific Innovation Strategy-Construction of High Level Academy of Agriculture Science (R2021YJ-YB1004, R2020PY-JX019) and by the Key Laboratory of Modern Biological Seed Industry in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2105-000000-20-03-457451)

*Corresponding author. Tel: +86-20-85161425; Fax: +86-20-85161416; E-mail: shijuan@agrogene.ac.cn

Received: 7 December 2021; Revised: 4 March 2022; Published online: 12 April 2022

factors unique to the fungal kingdom. They are involved in diverse cellular processes of fungi, such as primary and secondary metabolism, stress response, and cell division. Zinc cluster proteins contain the DNA binding domain at the N-terminus, the regulatory domain in the middle, and the acidic activating domain at the C-terminus. The DNA binding domain, comprising a zinc finger motif, is responsible for binding to promoters of the target genes. At the moment, the three-dimensional structures of the DNA binding domains of some zinc cluster transcription factors have been resolved, and some proteins in this family have been verified to regulate the expression of multiple genes. However, no comprehensive report on the structures, dynamics and functions of them is available. Therefore, we analyzed the structural characteristics of different zinc cluster proteins, summarized the relationship between the domains and functions, and pointed out the future research focuses, hoping to provide a reference for in-depth research on zinc cluster proteins in the future.

Keywords: fungi; zinc cluster protein; structure; conformational dynamics; function

锌是大量蛋白质发挥正常生理功能所必需的微量元素, 其中锌指蛋白是一类包含锌指(zinc finger)基序的锌结合蛋白, 它们在包括DNA识别、RNA代谢、转录激活、蛋白质折叠和信号转导等多种生命过程中发挥重要功能^[1-5]。早在30年之前, 锌指基序首次在非洲爪蟾转录因子TFIIIA中被发现, 三维结构解析显示其形状类似手指。锌指蛋白都含有至少1个锌指基序, 能够结合1个或多个锌离子从而协调DNA结合结构域的折叠^[6]。锌指蛋白大多数是转录调控因子, 并且组成了真核生物中最大的转录调节因子家族之一。根据围绕锌离子折叠形成的结构及功能不同, 锌指转录因子被分成C2H2、CCHC、Cys₄和Zn₂Cys₆等主要类型(图1A)^[5-7]。其中Zn₂Cys₆是一类真菌中专有的锌指蛋白, 包含1个高度保守的Cys-X₂-Cys-X₆-Cys-X₅₋₁₂-Cys-X₂-Cys-X₆₋₈-Cys锌指基序(其中X代表任意氨基酸), 基序中的半胱氨酸残基与2个锌离子结合, 因此这类蛋白被称为锌簇或锌双核簇蛋白^[6,8]。

目前已经在曲霉、念珠菌和酵母菌等真菌中鉴定到大量的锌簇转录因子, 它们参与调控真菌的初级和次级代谢、胁迫应答和细胞分裂

等多个过程^[6,9-19]。比如, 酵母中的Gal4、Put3、Thi2和Leu3蛋白分别参与调控其半乳糖、脯氨酸代谢及维生素B₁和亮氨酸的生物合成^[12-15,20]。AflR蛋白为黄曲霉、寄生曲霉和构巢曲霉等多种产毒真菌中黄曲霉毒素合成途径的主要调控转录因子, 参与调控毒素合成基因簇中十几个基因的表达^[21-22]。Pdr1和Pdr3蛋白参与调控芽殖酵母的耐药性^[16,19]。PoxCxrA蛋白通过调节子囊菌中纤维素酶的表达来帮助其应对外源胁迫^[17]。Mca1蛋白能够激活减数分裂特异性蛋白Mfc1的表达, 从而保障裂殖酵母减数分裂的正常进行^[18,23]。由于锌簇蛋白在调节真菌生命活动中的重要作用, 在原子水平解析其功能机制对于深入理解真菌相关的生物学问题具有重要的科学意义。

锌簇蛋白主要包括DNA结合结构域(DNA-binding domain)、调控结构域(regulatory domain)和酸性区域(acidic region, 图1B), 其酸性区域在少数蛋白中被证明具有转录激活的功能, 因此也被称为激活结构域(activation domain)。其中DNA结合结构域通常又可以分为3个区域: 锌指基序(zinc finger motif)、连接序列(linker region)和卷曲螺旋(coiled-coil)。我们对一些常见的锌簇蛋白进行序列对比和结构

域分析显示,除了锌指基序的保守性相对较高以外,其他结构域的保守性均比较低(图 1B)。到目前为止, Gal4、Ppr1、AlcR 等多个锌簇蛋白和 DNA 结合的三维结构已经得到解析^[24-32],其中结合 DNA 的形式包括同源二聚体和单体。另外,也有研究表明 2 种不同的锌簇蛋白能够

形成异源二聚体发挥功能^[33-34]。本文围绕已经解析的锌簇蛋白的三维结构进行总结,分析其 DNA 结合结构域的构象动力学及 DNA 结合的变构调节,并讨论其他结构域的作用,以期为研究真菌中锌簇蛋白的结构、动力学和功能关系提供线索和思路。

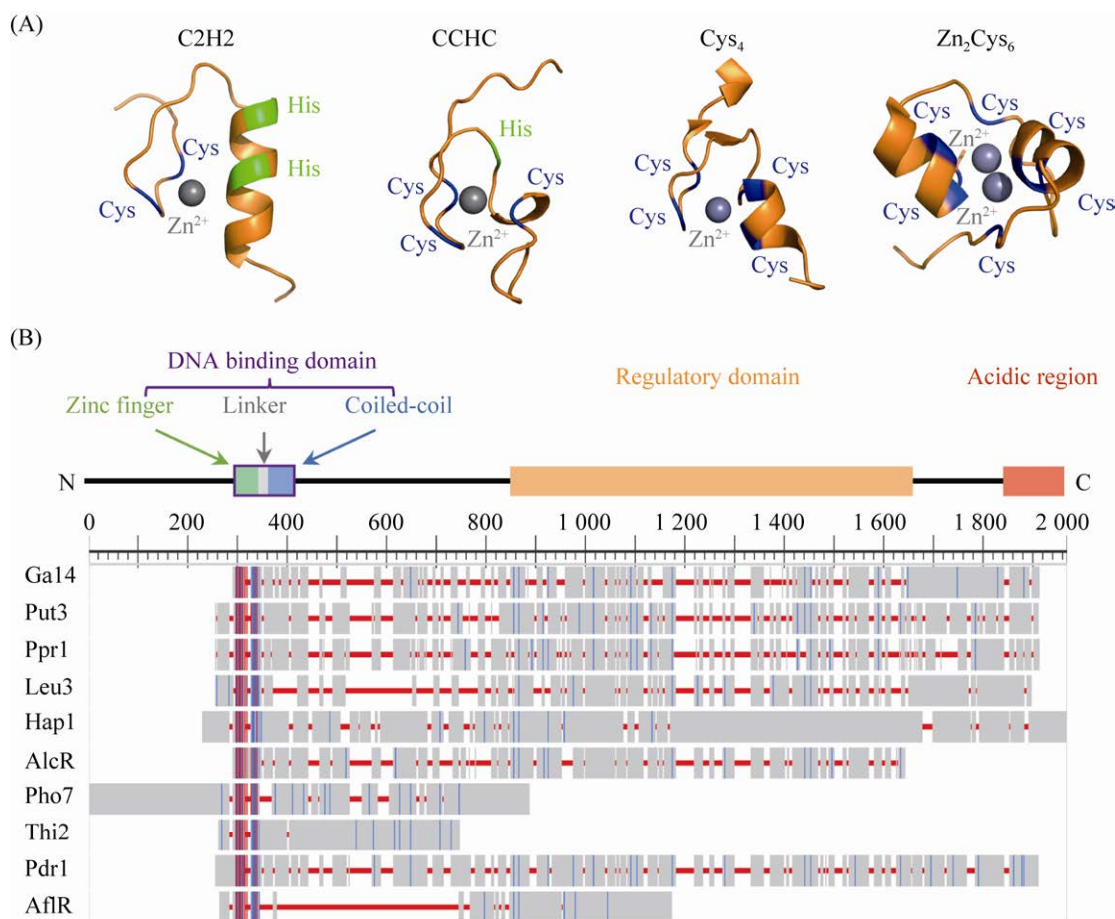


图 1 不同类型锌指基序结构对比和锌簇蛋白的序列同源性分析

Figure 1 The structural comparison of zinc finger motifs and zinc cluster protein sequence alignment. A: the representative structures of zinc finger motifs. The structural diagrams of C2H2, CCHC, Cys₄ and Zn₂Cys₆ motifs are transcription factor Sp1, HIV-2 nucleocapsid protein, recombinational repair protein RecR and transcription factor Gal4, respectively; B: the domain organization and sequence alignment of zinc cluster proteins. The sequence alignment of several common zinc cluster proteins (Gal4, Put3, etc.) was performed using COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>). The red and blue vertical lines represent highly conserved residues and low conserved residues, the gray boxes represent non-conserved regions and the red horizontal lines represent gaps. The approximate location of different domains was predicted by CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) and InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

1 锌簇蛋白 DNA 结合结构域的结构特征

1.1 以同源二聚体形式结合 DNA 的锌簇蛋白

目前已经解析的三维结构中锌簇蛋白主要以同源二聚体的形式结合 DNA，这些蛋白包括 Gal4、Put3、Ppr1、Hap1 和 Leu3 (图 2)，都来源于酵母。其中 Gal4 是第 1 个被研究的锌簇转录因子，它参与调控酵母的半乳糖和蜜二糖代谢^[6,24-27,30,35]。我们使用文献报道的 PDIVIZ 软件^[36]分析了锌簇蛋白与 DNA 大、小凹槽的结合情况(图 2)。结果显示，锌簇蛋白二聚体与 DNA 结合的复合物中 Zn₂Cys₆ 锌指基序能够识别 2 个 CGG 位点

形成的大凹槽(major groove, 5'-CGGN_xCCG-3', 其中 N 代表任意碱基, x 代表可变的碱基数目)。能够结合 DNA 大凹槽的锌指基序主要由 2 个短的 α-螺旋组成, 每个螺旋分别含有 3 个半胱氨酸, 中间由柔性的环(loop)连接并结合 2 个锌离子。大量的突变实验表明 6 个半胱氨酸及与锌离子结合相关的残基在 DNA 结合以及蛋白功能方面具有重要作用, 比如, 连接 2 个螺旋的突环中的脯氨酸提供了局部结构柔性^[6]。锌指基序 N 端的柔性区域、C 端连接区域及卷曲螺旋中的氨基酸残基可参与结合 DNA 形成的小凹槽(minor groove), 并通过大、小凹槽共同形成的多位点结合界面来稳定锌簇蛋白 DNA 复合物。

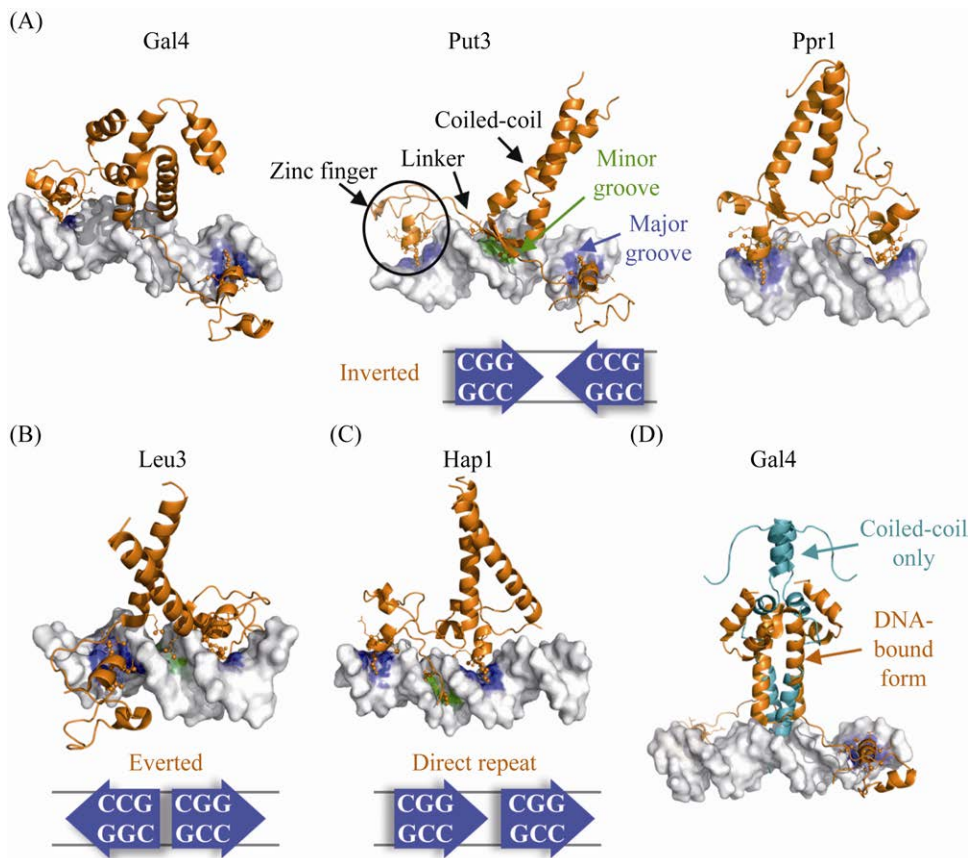


图 2 以同源二聚体形式结合 DNA 的锌簇蛋白的三维结构

Figure 2 The structures of homodimeric zinc cluster proteins. A: Gal4, Put3, and Ppr1 recognize inverted CGG sites; B: Leu3 recognizes everted CGG sites; C: Hap1 recognizes direct repeat CGG sites; D: structural comparison of Gal4. The structure of Gal4 coiled-coil region obtained in the absence of DNA was aligned to the DNA-bound form.

锌簇蛋白 DNA 结合结构域中连接区域与卷曲螺旋之间的排列方式各有不同, 并导致这类蛋白与 DNA 结合的构象各异。根据 CGG 位点结构和朝向不同, 可以分为反向[inverted, 5'-CGG(N_x)CCG-3']、翻转[everted, 5'-CCG(N_x)CGG-3']和同向[direct repeat, 5'-CGG(N_x)CGG-3']这 3 种方式, 其中 Gal4、Put3 和 Ppr1 结合反向 CGG 位点(图 2A), Leu3 结合翻转的 CGG 位点(图 2B), 而 Hap1 结合同向的 CGG 位点(图 2C)。Gal4 与 Ppr1 的锌指基序同源性较高, 在与 DNA 结合时, 它们都主要结合于 DNA 形成的大凹槽, 而 Put3 靠近卷曲螺旋的连接区域能够形成小的 β-折叠并结合在 DNA 小凹槽内, Leu3 和 Hap1 分别以螺旋卷曲前端和柔性区域与 DNA 的小凹槽相互作用(图 2)。因此这些锌簇蛋白虽然都是通过形成同源二聚体的形式结合 DNA, 但是其结合方式有明显的不同。根据结构分析和 DNA 结合实验, CGG 位点的朝向以及 2 个位点之间的空间距离被认为是决定锌簇蛋白 DNA 结合特异性的重要因素。除此之外, 蛋白质的结构以及 DNA 中 CGG 位点附近的核苷酸也能决定 DNA 结合的亲和力^[37]。使用大规模、全基因组层面的研究策略, 能够进一步挖掘决定锌簇转录因子与 DNA 结合特异性的其他因素^[5,10-11]。

1.2 以单体形式结合 DNA 的锌簇蛋白

少数锌簇蛋白, 例如来源于酵母的 Rgt1、Upc2、Pho7 和来源于曲霉菌的 AlcR, 被认为能够以单体的形式结合 DNA, 其中利用核磁共振结合约束分子动力学模拟以及 X-射线晶体衍射分别解析了 AlcR 和 Pho7 结合 DNA 的结构, 证实它们以单体形式结合 DNA^[28-29,31-32]。AlcR 的氨基酸序列中不包含帮助形成二聚体的卷曲螺旋并且锌指基序的第 3 至第 4 个半胱氨酸残基之间含有延长至 16 个氨基酸的序列。AlcR

以单体形式结合 CGG 位点, 分析显示这一位点延长为 T/AGCGG。与 Gal4 等以同源二聚体形式结合 DNA 的蛋白相比, AlcR-DNA 结合结构域的锌指基序由于氨基酸序列的延长而形成 3 个短的 α-螺旋, 并且与 DNA 之间具有更多的接触位点从而稳定单体与 DNA 之间的结合(图 3A)^[29]。最近, Shuman 课题组报道了 Pho7 蛋白以单体形式与不同 DNA 序列结合的晶体结构, 结构显示 Pho7 分别与 *tgpl*、*pho1* 启动子区域长达 14 个碱基的序列接触(图 3B)^[31-32]。Pho7 与 DNA 的接触界面包含 TCGG 碱基对形成的大凹槽和其他碱基对形成的 2 个小凹槽。与 AlcR 不同的是, Pho7 锌指基序的第 3 至第 4 个半胱氨酸之间只包含 5 个氨基酸序列, 并且它的整个锌指基序与 Gal4 等蛋白类似形成 2 个短的 α-螺旋。

比较单体和同源二聚体结合 DNA 的锌簇蛋白的结构可以发现, 其最明显的区别在于是否需要锌指基序 N 端的柔性区域参与 DNA 的结合。在以同源二聚体结合 DNA 的锌簇蛋白中, 由于螺旋卷曲结构域能够帮助稳定蛋白-DNA 复合物, 这类蛋白与 DNA 的结合主要是其锌指基序结合在 DNA 上 CGG 结合位点形成的大凹槽, 或者其卷曲螺旋及锌指基序 C 端的柔性区域参与结合 DNA 上的小凹槽(图 2); 而以单体形式结合 DNA 的锌簇蛋白则不同, AlcR 和 Pho7 的结构显示除了上述结合以外, 它们都需要锌指基序 N 端的柔性区域参与结合 DNA 的小凹槽(图 3)。

1.3 锌簇蛋白与 DNA 结合的构象变化

随着蛋白质结构和功能研究的发展, 特别是固有无序蛋白和区域(intrinsically disordered proteins and regions, IDPs and IDRs)研究的深入, 人们逐渐认识到除了蛋白质的三维结构以外, 蛋白质的构象动力学对于其行使正常的生

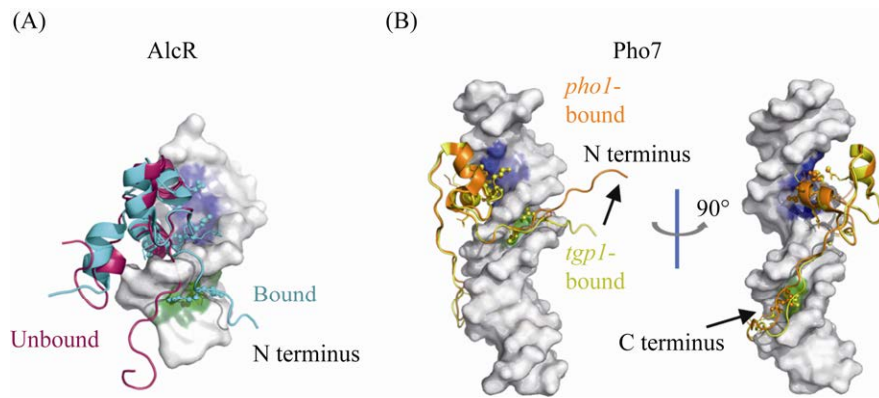


图3 以单体形式结合 DNA 的锌簇蛋白的三维结构

Figure 3 The structure of monomeric zinc cluster proteins. A: structural comparison of the free and DNA-bound forms of AlcR; B: structural comparison of two DNA-bound forms of Pho7. The Pho7 protein binds to the promoter DNA of *pho1* gene and *tgp1* gene, respectively.

理功能也发挥不可或缺的作用^[38-40]。比如, 我们的前期研究发现细胞膜骨架蛋白 4.1G 的 C 端结构域能够与核有丝分裂蛋白 NuMA 的一段无序多肽结合并形成动态模糊复合物^[41]; 而谷氨酰胺结合蛋白 GlnBP 在结合和不结合底物谷氨酰胺时都存在多种状态, 底物的结合主要是调节其构象分布往关闭方向移动^[42-43]。通过比较 AlcR 结合 DNA 前后的结构变化可以看出, 结合了 DNA 的 AlcR 发生了明显的构象改变, 特别是其 N 端的柔性区域发生了移动(图 3)。根据 PDIVIZ 对锌簇蛋白结合 DNA 大、小凹槽的分析显示 Gal4 等二聚体结合 DNA 的锌簇蛋白中柔性连接区域大多数没有嵌入 DNA 形成的小凹槽, 只有 Put3 中连接区域靠近 C 端螺旋卷曲的部分形成 β -折叠并插入 DNA 小凹槽中(图 2A)。然而 Pho7 锌指基序的 N 端和 C 端以及 AlcR 锌指基序 N 端的柔性区域都直接嵌入 DNA 小凹槽, 从而与 DNA 大凹槽结合的锌指基序共同稳定蛋白-DNA 复合物。并且 Pho7 与不同靶基因的启动子 DNA 结合的构象变化主要来自于柔性区域的摆动。另外已经解析的 Gal4 未结合与结合 DNA 时的结构与构象比较

也显示其卷曲螺旋的结构发生了变化, 不结合 DNA 时 Gal4 的卷曲螺旋呈现伸长的结构, 这一卷曲螺旋由 3 个 α -螺旋及柔性连接组成, 在结合 DNA 后其 C 端发生了明显的移动(图 2D)^[44]。

上述结果说明锌簇蛋白的构象动力学在 DNA 结合过程中也扮演了重要的角色, 甚至可能参与调节 DNA 结合的特异性。但是迄今还没有锌簇蛋白的动态变化及其与 DNA 结合关系的详细报道, 这也是未来值得研究的一个重要方向。

2 锌簇蛋白不同结构域和功能的关系

前面主要对锌簇蛋白 DNA 结合结构域的 DNA 结合机制进行了详细分析, 在这里对锌簇蛋白不同结构域与功能的关联进行进一步的探讨, 以期理解其结构和功能关系提供思考。锌簇蛋白的调控结构域, 在这一家族的大多数蛋白中同源性较低, 并且不是所有的锌簇蛋白都包含这一结构域, 但是它被认为在调控转录活性方面具有重要作用^[45]。一些研究表明, 这一结构域的缺失通常会导致锌簇转录因子的组成性表达。在酿酒酵母血红素激活蛋白 Hap1

中去除调控结构域的一段氨基酸会导致其在没有血红素存在的情况下也表现出转录激活,表明这一区域可能具有氧传感的作用,而在 Leu3 中删除一段相似的区域会导致该蛋白被永久激活^[46-48]。Rse2 和 Rse3 蛋白参与调节柄孢霉中线粒体损伤的代谢反应,遗传筛选实验发现其调节结构域的一些突变能够导致下游氧化酶 aox 的组成性表达^[49]。另外, Pdr1 和 Pdr3 蛋白在调控结构域的突变也能够导致其活性增加,表明这一结构域对于转录激活具有一定的抑制作用^[50-51]。这些研究显示锌簇蛋白的调控结构域具有多重功能。

锌簇蛋白 C 端的酸性区域通常又被称为转录激活结构域,这一结构域与调节结构域类似,保守性较低。Rse2、Rse3、Pdr1 和 Pdr3 蛋白在这一区域的突变也能够增加转录活性,但是 Uga3 转录因子中删除最 C 端的 10 个氨基酸却导致其完全失去转录因子的活性^[6,49-51]。这些研究表明酸性区域在不同的锌簇蛋白中可能扮演不同的角色。另外,酵母中参与激活支链氨基酸途径中多个基因表达的锌簇蛋白 Leu3 的 C 端酸性区域能够与蛋白中间区域结合形成一个自抑制的构象,而 α -异丙基苹果酸的结合能够导致其构象发生变解除自抑制,从而释放并激活酸性区域^[48]。这些研究表明在 Leu3、Rse2、Rse3、Pdr1 和 Pdr3 等锌簇蛋白中调控结构域很有可能和酸性区域共同发挥作用,它们通过分子内的相互作用形成自抑制的构象从而处于一个转录抑制的状态,随着调控分子或其他互作蛋白的竞争结合,打开其自抑制构象,从而进入转录激活的状态。另外,磷酸化能够多方面调节锌簇蛋白质的结构、动力学和相互作用,一些研究表明主要发生在酸性区域的磷酸化修饰也能够调节锌簇蛋白的功能^[52]。例如 Gal4 蛋白 Ser699 位点的磷酸化与半乳糖的感应相关^[53-54];

Cat8 蛋白在下游基因表达时处于磷酸化状态,而 War1 和 Put3 的磷酸化分别与酵母对弱酸胁迫的响应和不同氮源的反应相关^[55-58]。磷酸化是否能够调节锌簇蛋白的自抑制构象从而影响其活性,也是后续研究应该关注的方向。

锌簇蛋白的 DNA 结合结构域也受到多种因素的调节。锌离子是锌簇蛋白折叠和发挥正常生理功能的关键因素之一,也有一些实验表明锌离子可以被其他金属离子替代,比如镉和钙离子。前面我们提到,锌簇蛋白 DNA 结合结构域中锌指基序的结构大多比较类似(图 2),而连接区域变化较大。有研究表明,替换不同锌簇蛋白的锌指基序不影响其结合目标 DNA 的特异性,但是其结合强度受到一定的影响,而同时替换连接区域却能够影响其结合目标 DNA 的特异性,并且一些连接区域的突变能够导致蛋白不能正常发挥功能^[6,59]。根据前面对 DNA 结合结构域的结构特征分析显示,连接区域能够结合 DNA 上的小凹槽(图 2-3),特别是以单体形式结合 DNA 的锌簇蛋白中,更需要连接区域插入 DNA 小凹槽中以稳定蛋白-DNA 复合物(图 3)。因此,在连接区域的关键结合位点进行突变可能导致锌簇蛋白与 DNA 结合不稳定,从而影响其功能。另外, DNA 结合结构域中的螺旋卷曲一方面负责二聚体结构的形成,另一方面也参与其他蛋白的相互作用。比如, Gal4 蛋白通过卷曲螺旋与一种 RNA 聚合酶全酶的组分 Gal11 相互作用,从而共同调节下游基因的表达^[30]。更为重要的是,一些锌簇转录因子能够通过其 DNA 结合结构域结合多种不同基因的启动子,从而在多种不同的生理过程中发挥作用。例如, Hap1 除了能结合晶体结构中解析的细胞色素 C1 (CYC1)上游启动子以外,还能够结合胞质过氧化氢酶 T (CTT1)的启动子,从而保护细胞免受过氧化氢的毒性作用^[27];

Pho7 蛋白能够分别结合甘油磷酸转运体 Tgp1、细胞表面酸性磷酸酶 Pho1 和无机磷酸盐转运体 Pho84 的启动子并上调相应基因的表达^[31-32]。解析锌簇蛋白准确识别不同基因启动子的分子机制是理解其多功能性的重要基础, 能够为真菌转录调控的精准设计、次生代谢产物的合成生物学研究提供理论指导, 非常值得进一步探究。

3 总结与展望

锌簇蛋白广泛参与真菌的初级和次级代谢、胁迫应答和细胞分裂等多种生命活动, 特别是一些锌簇家族转录因子被发现能够同时调节多个生理过程, 因此在分子原子层面研究其功能机制对于理解真菌相关的生物学过程的生化机理、传染性疾病和农业问题的发生机理具有重要意义。对目前已经解析的锌簇蛋白 DNA 结合结构域的三维结构进行详细分析显示, 其锌指基序的结构在不同蛋白中差别较小, 而柔性区域的变化较大。相比于以同源二聚体结合 DNA, 以单体形式结合 DNA 的锌簇蛋白可能由于结合界面稳定性的原因, 需要参与结合的 DNA 的 CGG 位点序列更长, 并且需要其锌指基序 N 端的柔性区域共同参与与 DNA 的结合。

已有结构和生物化学实验的结果显示 DNA 上 CGG 位点的朝向、位点之间的空间距离以及锌簇蛋白 DNA 结合结构域中柔性区域共同参与决定结合的特异性。然而, 目前的研究结果也表明锌簇蛋白的构象动力学与 DNA 的结合密切相关, 特别是以单体形式结合 DNA 的锌簇蛋白在结合 DNA 以后发现了明显的构象变化, 并且在与不同的启动子 DNA 结合时构象的变化也是不同的。这些结果预示着同一个锌簇蛋白在结合不同基因的启动子时很有可能是通过其不同的构象调节来完成的。对锌簇蛋白构象动力学与 DNA 结合及其特异性开展进

一步研究, 对于理解锌簇蛋白结构、动力学和功能关系具有重要意义。

参考文献

- [1] Padjasek M, Kocyla A, Kluska K, Kerber O, Tran JB, Kręzel A. Structural zinc binding sites shaped for greater works: structure-function relations in classical zinc finger, hook and clasp domains. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2020, 204: 110955.
- [2] Rakhra G, Rakhra G. Zinc finger proteins: insights into the transcriptional and post transcriptional regulation of immune response. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(7): 5735-5743.
- [3] Wang YS, Yu Y, Pang YD, Yu HJ, Zhang WQ, Zhao X, Yu JX. The distinct roles of zinc finger CCHC-type (ZCCHC) superfamily proteins in the regulation of RNA metabolism. *RNA Biology*, 2021, 18(12): 2107-2126.
- [4] 梁甜甜, 王亦婧, 程晓婕, 曾斌, 贺斌. Zn(II)₂Cys₆ 锌指转录因子的结构和功能研究进展. *江西科技师范大学学报*, 2019(6): 96-98.
Liang TT, Wang YJ, Cheng XJ, Zeng B, He B. Research progress on the structure and function of Zn(II)₂Cys₆ zinc finger transcription factor. *Journal of Jiangxi Science & Technology Normal University*, 2019(6): 96-98. (in Chinese)
- [5] Li YH, Liu TB. Zinc finger proteins in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4): 1361.
- [6] MacPherson S, Larochelle M, Turcotte B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2006, 70(3): 583-604.
- [7] Leon O, Roth M. Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions. *Biological Research*, 2000, 33(1): 21-30.
- [8] Campbell RN, Leverenz MK, Ryan LA, Reece RJ. Metabolic control of transcription: paradigms and lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal*, 2008, 414(2): 177-187.
- [9] Todd RB, Andrianopoulos A. Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genetics and Biology*, 1997, 21(3): 388-405.

- [10] Zhang CH, Huang H, Deng WQ, Li TH. Genome-wide analysis of the Zn(II)₂Cys₆ zinc cluster-encoding gene family in *Tolypocladium guangdongense* and its light-induced expression. *Genes*, 2019, 10(3): 179.
- [11] Hou ZH, Chen Q, Zhao MR, Huang CY, Wu XL. Genome-wide characterization of the Zn(II)₂Cys₆ zinc cluster-encoding gene family in *Pleurotus ostreatus* and expression analyses of this family during developmental stages and under heat stress. *PeerJ*, 2020, 8: e9336.
- [12] Kartal B, Akçay A, Palabiyik B. Oxidative stress upregulates the transcription of genes involved in thiamine metabolism. *Turkish Journal of Biology*, 2018, 42(5): 447–452.
- [13] Börlin CS, Nielsen J, Siewers V. The transcription factor Leu3 shows differential binding behavior in response to changing leucine availability. *FEMS Microbiology Letters*, 2020, 367(13): fnaa107.
- [14] Nishimura A, Yoshikawa Y, Ichikawa K, Takemoto T, Tanahashi R, Takagi H. Longevity regulation by proline oxidation in yeast. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1650.
- [15] Venkatesh A, Murray AL, Coughlan AY, Wolfe KH. Giant GAL gene clusters for the melibiose-galactose pathway in *Torulaspora*. *Yeast*, 2021, 38(1): 117–126.
- [16] Buechel ER, Pinkett HW. Transcription factors and ABC transporters: from pleiotropic drug resistance to cellular signaling in yeast. *FEBS Letters*, 2020, 594(23): 3943–3964.
- [17] Liao LS, Li CX, Zhang FF, Yan YS, Luo XM, Zhao S, Feng JX. How an essential Zn₂Cys₆ transcription factor Po_xCxrA regulates cellulase gene expression in ascomycete fungi? *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 105.
- [18] Beaudoin J, Ioannoni R, Mailloux S, Plante S, Labbé S. Transcriptional regulation of the copper transporter mfc1 in meiotic cells. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12(4): 575–590.
- [19] Schüller C, Mamnun YM, Wolfger H, Rockwell N, Thorner J, Kuchler K. Membrane-active compounds activate the transcription factors Pdr1 and Pdr3 connecting pleiotropic drug resistance and membrane lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 2007, 18(12): 4932–4944.
- [20] Traven A, Jelacic B, Sopta M. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Reports*, 2006, 7(5): 496–499.
- [21] Caceres I, Khoury AA, Khoury RE, Lorber S, Oswald IP, Khoury AE, Atoui A, Puel O, Bailly JD. Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: a review. *Toxins*, 2020, 12(3): 150.
- [22] Khan R, Ghazali FM, Mahyudin NA, Samsudin NIP. Aflatoxin biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: a review. *Journal of Fungi: Basel, Switzerland*, 2021, 7(8): 606.
- [23] Beaudoin J, Ioannoni R, Normant V, Labbé S. A role for the transcription factor Mca1 in activating the meiosis-specific copper transporter Mfc1. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201861.
- [24] Marmorstein R, Carey M, Ptashne M, Harrison SC. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature*, 1992, 356(6368): 408–414.
- [25] Marmorstein R, Harrison SC. Crystal structure of a PPR1-DNA complex: DNA recognition by proteins containing a Zn₂Cys₆ binuclear cluster. *Genes & Development*, 1994, 8(20): 2504–2512.
- [26] Swaminathan K, Flynn P, Reece RJ, Marmorstein R. Crystal structure of a PUT3-DNA complex reveals a novel mechanism for DMA recognition by a protein containing a Zn₂Cys₆ binuclear cluster. *Nature Structural Biology*, 1997, 4(9): 751–759.
- [27] King DA, Zhang L, Guarente L, Marmorstein R. Structure of a HAP1-DNA complex reveals dramatically asymmetric DNA binding by a homodimeric protein. *Nature Structural Biology*, 1999, 6(1): 64–71.
- [28] Cerdan R, Cahuzac B, Félenbok B, Guittet E. NMR solution structure of AlcR (1-60) provides insight in the unusual DNA binding properties of this zinc binuclear cluster protein. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 295(4): 729–736.
- [29] Cahuzac B, Cerdan R, Félenbok B, Guittet E. The solution structure of an AlcR-DNA complex sheds light onto the unique tight and monomeric DNA binding of a Zn(2)C_ss(6) protein. *Structure: London, England: 1993*, 2001, 9(9): 827–836.
- [30] Hong MQ, Fitzgerald MX, Harper S, Luo C, Speicher DW, Marmorstein R. Structural basis for dimerization in DNA recognition by Gal4. *Structure*, 2008, 16(7): 1019–1026.
- [31] Garg A, Goldgur Y, Schwer B, Shuman S. Distinctive structural basis for DNA recognition by the fission yeast Zn₂Cys₆ transcription factor Pho7 and its role in

- phosphate homeostasis. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(21): 11262–11273.
- [32] Garg A, Goldgur Y, Sanchez AM, Schwer B, Shuman S. Structure of fission yeast transcription factor Pho7 bound to pho1 promoter DNA and effect of Pho7 mutations on DNA binding and phosphate homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 2019, 39(13): e00132–e00119.
- [33] Baumgartner U, Hamilton B, Piskacek M, Ruis H, Rottensteiner H. Functional analysis of the Zn₂Cys₆ transcription factors Oaf1p and Pip2p: different roles in fatty acid induction of β -oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(32): 22208–22216.
- [34] Mamnun YM, Pandjaitan R, Mahé Y, Delahodde A, Kuchler K. The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers *in vivo*. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(5): 1429–1440.
- [35] Fitzgerald MX, Rojas JR, Kim JM, Kohlhaw GB, Marmorstein R. Structure of a Leu3-DNA complex: recognition of everted CGG half-sites by a Zn₂Cys₆ binuclear cluster protein. *Structure*, 2006, 14(4): 725–735.
- [36] Ribeiro J, Melo F, Schüller A. PDIviz: analysis and visualization of protein-DNA binding interfaces. *Bioinformatics*, 2015, 31(16): 2751–2753.
- [37] Noël J, Turcotte B. Zinc cluster proteins Leu3p and Uga3p recognize highly related but distinct DNA targets. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(28): 17463–17468.
- [38] Campitelli P, Modi T, Kumar S, Ozkan SB. The role of conformational dynamics and allostery in modulating protein evolution. *Annual Review of Biophysics*, 2020, 49: 267–288.
- [39] Kharche SA, Sengupta D. Dynamic protein interfaces and conformational landscapes of membrane protein complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 2020, 61: 191–197.
- [40] Salladini E, Jørgensen MLM, Theisen FF, Skriver K. Intrinsic disorder in plant transcription factor systems: functional implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9755.
- [41] Wu SW, Wang DD, Liu J, Feng YT, Weng JW, Li Y, Gao X, Liu JW, Wang WN. The dynamic multisite interactions between two intrinsically disordered proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(26): 7515–7519.
- [42] Feng YT, Zhang L, Wu SW, Liu ZJ, Gao X, Zhang X, Liu ML, Liu JW, Huang XH, Wang WN. Conformational dynamics of apo-GlnBP revealed by experimental and computational analysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(45): 13990–13994.
- [43] Zhang L, Wu S, Feng Y, Wang D, Jia X, Liu Z, Liu J, Wang W. Ligand-bound glutamine binding protein assumes multiple metastable binding sites with different binding affinities. *Communications Biology*, 2020, 3: 419.
- [44] Hidalgo P, Ansari AZ, Schmidt P, Hare B, Simkovich N, Farrell S, Shin EJ, Ptashne M, Wagner G. Recruitment of the transcriptional machinery through GAL11P: structure and interactions of the GAL4 dimerization domain. *Genes & Development*, 2001, 15(8): 1007–1020.
- [45] Schjerling P, Holmberg S. Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(23): 4599–4607.
- [46] Martínez JL, Liu LF, Petranovic D, Nielsen J. Engineering the oxygen sensing regulation results in an enhanced recombinant human hemoglobin production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(1): 181–188.
- [47] Friden P, Reynolds C, Schimmel P. A large internal deletion converts yeast LEU3 to a constitutive transcriptional activator. *Molecular and Cellular Biology*, 1989, 9(9): 4056–4060.
- [48] Zhou KM, Kohlhaw GB. Transcriptional activator LEU3 of yeast. Mapping of the transcriptional activation function and significance of activation domain tryptophans. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(29): 17409–17412.
- [49] Bovier E, Sellem CH, Humbert A, Sainsard-Chanet A. Genetic and functional investigation of Zn(2)Cys(6) transcription factors RSE2 and RSE3 in *Podospira anserina*. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(1): 53–65.
- [50] Delaveau T, Delahodde A, Carvajal E, Subik J, Jacq C. PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to *PDR1* and controls the multidrug resistance phenomenon. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1994, 244(5): 501–511.
- [51] Kolaczowska A, Goffeau A. Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resistance Updates*,

- 1999, 2(6): 403–414.
- [52] Nishi H, Shaytan A, Panchenko AR. Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Frontiers in Genetics*, 2014, 5: 270.
- [53] Sadowski I, Costa C, Dhanawansa R. Phosphorylation of Gal4p at a single C-terminal residue is necessary for galactose-inducible transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(9): 4879–4887.
- [54] Rohde JR, Trinh J, Sadowski I. Multiple signals regulate GAL transcription in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(11): 3880–3886.
- [55] Huang HL, Brandriss MC. The regulator of the yeast proline utilization pathway is differentially phosphorylated in response to the quality of the nitrogen source. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(3): 892–899.
- [56] Kren A, Mammun YM, Bauer BE, Schüller C, Wolfger H, Hatzixanthis K, Mollapour M, Gregori C, Piper P, Kuchler K. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(5): 1775–1785.
- [57] Randez-Gil F, Bojunga N, Proft M, Entian KD. Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(5): 2502–2510.
- [58] Charbon G, Breunig KD, Wattiez R, Vandenhoute J, Noël-Georis I. Key role of Ser562/661 in Snf1-dependent regulation of Cat8p in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(10): 4083–4091.
- [59] Reece RJ, Ptashne M. Determinants of binding-site specificity among yeast C6 zinc cluster proteins. *Science*, 1993, 261(5123): 909–911.

(本文责编 李磊)