



新生隐球菌半胱氨酸转运蛋白 Mup1 鉴定及其表达调控研究

范静¹, 宋浩雷², 王鑫¹, 王玉琼¹, 彭艳¹, 况野¹, 廖国建^{1*}

1 西南大学药学院, 重庆 400715

2 河北亚诺生物科技股份有限公司, 河北 石家庄 050000

范静, 宋浩雷, 王鑫, 王玉琼, 彭艳, 况野, 廖国建. 新生隐球菌半胱氨酸转运蛋白 Mup1 鉴定及其表达调控研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3534-3545.

FAN Jing, SONG Haolei, WANG Xin, WANG Yuqiong, PENG Yan, KUANG Ye, LIAO Guojian. Identification and transcriptional regulation of L-cysteine transporter Mup1 in *Cryptococcus neoformans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3534-3545.

摘要:【目的】鉴定新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)的半胱氨酸转运蛋白及其对致病性的影响。【方法】构建候选基因敲除株, 检测突变株以半胱氨酸为唯一硫源的生长情况; 检测半胱氨酸转运蛋白 Mup1 对新生隐球菌毒力因子表达和不同胁迫条件下生长的影响; 通过新生隐球菌大蜡螟(*Galleria mellonella*)和小鼠感染模型分析 Mup1 对致病性的影响; 通过转录组分析和酵母单杂交研究硫代谢核心转录因子 Cys3 与 Mup1 的调控关系。【结果】Mup1 具有转运半胱氨酸、胱氨酸、胱硫醚和同型半胱氨酸的能力。基因 *MUP1* 缺失不影响毒力因子表达和细胞对应激的反应。大蜡螟和小鼠隐球菌感染模型表明 Mup1 对新生隐球菌的致病性无显著影响。转录组分析和酵母单杂交实验显示 Cys3 可能间接调控 *MUP1* 的转录。【结论】新生隐球菌 Mup1 具有转运半胱氨酸、胱氨酸、胱硫醚和同型半胱氨酸的功能, 但不影响致病性, 基因转录可能受 Cys3 的间接调控。

关键词: 新生隐球菌; 转运蛋白; 半胱氨酸; 致病性; 调控关系

资助项目: 国家自然科学基金(32270075)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270075).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-68251225, E-mail: gjliao@swu.edu.cn

Received: 2022-12-22; Accepted: 2023-02-21; Published online: 2023-03-06

Identification and transcriptional regulation of L-cysteine transporter Mup1 in *Cryptococcus neoformans*

FAN Jing¹, SONG Haolei², WANG Xin¹, WANG Yuqiong¹, PENG Yan¹, KUANG Ye¹, LIAO Guojian^{1*}

1 College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Hebei Yanuo Bioscience Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, Hebei, China

Abstract: [Objective] To identify the L-cysteine transporter of *Cryptococcus neoformans* and study the effect of the transporter on the fungal pathogenicity. [Methods] We constructed the candidate gene-deleted strains, and examined the growth of the mutants with L-cysteine as the sole sulfur source. We then tested the effect of the L-cysteine transporter Mup1 on the expression of virulence factors and the growth of *C. neoformans* under different stress conditions. Further, we used the *Galleria mellonella* infection model and the mouse infection model to explore the effect of MUP1 on the pathogenicity of *C. neoformans*. RNA-Seq and yeast one-hybrid assay were employed to investigate the regulatory relationship between the master transcription factor Cys3 and Mup1. [Results] Mup1 could transport L-cysteine, L-cystine, DL-cystathionine, and L-homocysteine. The deletion of gene *MUP1* did not affect the expression of virulence factors or the cellular response to stress. Mup1 had no significant effect on the pathogenicity of *C. neoformans* in *G. mellonella* and mice. Cys3 might indirectly regulate the transcription of *MUP1*. [Conclusion] Mup1 is the transporter of L-cysteine, L-cystine, DL-cystathionine, and L-homocysteine in *C. neoformans*. It does not affect the pathogenicity of *C. neoformans* and may be indirectly regulated by Cys3.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; transporter; L-cysteine; pathogenicity; regulatory relationship

新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)是一种条件致病的侵袭性真菌, 主要感染免疫功能低下的人群, 每年在全球造成约 23 万死亡^[1], 给人类健康带来了严重威胁^[2]。新生隐球菌能在多种环境中生存, 从桉树、鸽粪到人类。该菌进化出多种能力以适应宿主环境, 包括获取宿主营养、在吞噬细胞中复制和增殖、形态和倍性的变化、感染中枢神经系统的倾向等^[3-5]。

硫是微生物必不可少的营养元素之一, 是构成氨基酸、蛋白质、辅酶等的组成成分^[6]。半胱氨酸是含硫醇的氨基酸, 不仅是合成谷胱

甘肽所必需的前体物质, 而且常出现在蛋白质的功能部位^[7]。半胱氨酸获取分内部从头合成和外部直接摄取。在真菌中, 普遍存在 2 条从头合成半胱氨酸的途径, 即 OAS 途径 (O-acetylserine pathway) 和转硫途径^[8]。在新生隐球菌中, 仅通过由丝氨酸-O-乙酰转移酶 (Cys2) 和半胱氨酸合成酶 (Cys1) 组成的 OAS 途径产生半胱氨酸, 反向转硫途径可能不存在或无法发挥作用^[9]。CYS1 缺失突变株在小鼠感染模型中丧失毒力, 表明半胱氨酸对新生隐球菌的致病性是必需的^[9]。

真菌除了能从头合成半胱氨酸，还可以从外界环境中直接摄取半胱氨酸，包括利用特异性半胱氨酸转运蛋白和非特异性的氨基酸通透酶。在酿酒酵母中，酵母氨基酸转运蛋白(yeast amino acid transporter, YAT)亚家族的非特异性转运蛋白 Agp1、Gap1、Bap2、Bap3、Gnp1、Tat1 和 Tat2 都可以转运半胱氨酸。L 型氨基酸转运蛋白(L-type amino acid transporter, LAT)亚家族的 Mup1 是高亲和力甲硫氨酸和半胱氨酸转运蛋白，而旁系同源的 Mup3 是低亲和力甲硫氨酸转运蛋白。Mup1 和 Mup3 都属于氨基酸多聚胺有机阳离子(amino acid polyamine organic cation, APC)超家族的转运蛋白^[10-12]。Yct1 是酿酒酵母高亲和力半胱氨酸转运蛋白，属于主要易化子超家族(main transfigurative subfamily, MFS)^[13]。在新生隐球菌中，在唯一氮源的筛选条件下，鉴定了 8 个 APC 超家族的氨基酸通透酶，分别是 Aap1、Aap2、Aap4、Aap5、Aap6、Aap8、Mup1 和 Mup3^[14-15]。由于半胱氨酸不是新生隐球菌优先利用的氮源，难以通过唯一氮源条件确定其转运蛋白。因此，新生隐球菌半胱氨酸转运蛋白尚不明确。

半胱氨酸是一种含硫氨基酸，虽然并非新生隐球菌优先利用的氮源，但是一种重要的硫源。本研究通过生物信息学确定候选基因，然后构建敲除株，观察其在以半胱氨酸为唯一硫源下的生长表型，确定新生隐球菌中的半胱氨酸转运蛋白。测试 *MUP1* 敲除株对毒力因子表达、应激表型和致病性的影响，通过转录组测序和酵母单杂交实验研究 Mup1 与转录因子 Cys3 的调控关系。半胱氨酸摄取机制的研究有助于对新生隐球菌感染过程和致病机制的理解。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究采用的菌株和质粒见表 1、引物见表 2。

1.1.2 培养基

新生隐球菌基础培养基为 YPD 培养基；黑色素形成培养基为 niger seed 培养基，荚膜诱导培养基为 DEME 培养基。低硫源培养基 BM 培养基是将 20 g D-glucose、0.802 4 g NH₄Cl、0.898 2 g KH₂PO₄、0.114 1 g K₂HPO₄、0.099 3 g

表 1 本研究中所用到的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmids	Genotype/Properties	Source/Reference
<i>C. neoformans</i>		
H99	MAT α , wild-type	[16]
<i>mup1</i> Δ	MAT α , <i>MUP1::NEO</i>	In this study
<i>yct1</i> Δ	MAT α , <i>YCT1::NEO</i>	In this study
<i>mup1</i> Δ <i>mup3</i> Δ	MAT α , <i>MUP1::NEO</i> , <i>MUP3::NAT</i>	In this study
<i>mup1</i> Δ + <i>P</i> _{H3} - <i>MUP1</i> - <i>mCherry</i>	MAT α , <i>MUP1::NEO</i> , <i>P</i> _{H3} - <i>MUP1</i> - <i>mCherry</i> - <i>HYG</i>	In this study
H99 <i>P</i> _{<i>MUP1</i>} - <i>CnFLuc</i>	MAT α , <i>P</i> _{<i>MUP1</i>} - <i>CnFLuc</i> - <i>NEO</i>	In this study
<i>S. cerevisiae</i>		
EGY48	MAT α , <i>ura3</i> , <i>his3</i> , <i>trp1</i> , LexAop (\times 6)- <i>LEU2</i>	FAN Yanhua
Plasmids		
SH1- <i>P</i> _{<i>CTR4</i>} - <i>CnFLuc</i>	Overexpression with <i>CnFLuc</i> in the “SH1” locus	Our laboratory
<i>P</i> _{H3} - <i>mCherry</i> -G418	Overexpression with <i>mCherry</i> in the “SH2” locus	Our laboratory

表 2 本研究中所用到的引物

Table 2 The primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Targeted genes
<i>MUP1</i> -SgRNA-F	AGTGACGATCCAAGACGTGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	<i>MUP1</i> SgRNA F
<i>MUP1</i> -U6-R	ACACGTCTTGGATCGTCACTAACAGTATACCCTGCCGGTG	<i>MUP1</i> SgRNA R
<i>MUP1</i> -Left-F	GGATGTCCAGCTAGTACGG	<i>MUP1</i> KO F1
<i>MUP1</i> -Left-R	GCACTGGCCGTCGTTTTACGAAGTGGTGAGTGCGAATG	<i>MUP1</i> KO R1
<i>MUP1</i> -Right-F	GTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGGGACTCCTAACACCGTACTC	<i>MUP1</i> KO F2
<i>MUP1</i> -Right-R	AGCCATCTCGTCACTCAAG	<i>MUP1</i> KO R2
<i>MUP1</i> -qPCR-F	CGGCTATCTGGTTCGTCTCC	<i>MUP1</i> qPCR F
<i>MUP1</i> -qPCR-R	CGGGACGAGGAAGATTCAAG	<i>MUP1</i> qPCR R
<i>MUP1</i> - <i>mCherry</i> -F	TGATCTGGCCGCAACAACAATGTCAGGCAGTT	<i>MUP1</i> Comp F
<i>MUP1</i> - <i>mCherry</i> -R	GGAAAAAAGCGATCGCCTTCTCGCTGCTCTTTCAAATC	<i>MUP1</i> Comp R
<i>MUP1</i> -JD-F	GAATTGAAAAGCTTGAATTCCACAATGTGGCATGATGAC	<i>MUP1</i> yeast one-hybrid F
<i>MUP1</i> -JD-R	TACAGAGCACATGCCTCGAGTGTGTTACCTGTGCGATTAGG	<i>MUP1</i> yeast one-hybrid R
<i>MUP3</i> -U6-R	GTACATTAGGCGACAGACTCAACAGTATACCCTGCCGGTG	<i>MUP3</i> SgRNA R
<i>MUP3</i> -SgRNA-F	GAGTCTGTCGCCTAATGTACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	<i>MUP3</i> SgRNA F
<i>MUP3</i> -Left-F	TCTCAAGGCTAACAATTTGATGC	<i>MUP3</i> KO F1
<i>MUP3</i> -Left-R	GCACTGGCCGTCGTTTTACAAGCCCTGGATACATATGCT	<i>MUP3</i> KO R1
<i>MUP3</i> -Right-F	GTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGGGGGCTCTATTGCATTATGG	<i>MUP3</i> KO F2
<i>MUP3</i> -Right-R	TTCGGAGCTGTAGAACGC	<i>MUP3</i> KO R2
<i>YCT1</i> -SgRNA-F	GTAAGGAAGTAGGCGGTATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	<i>YCT1</i> SgRNA R
<i>YCT1</i> -U6-R	ATGACCGCCTACTTCTTACAACAGTATACCCTGCCGGTG	<i>YCT1</i> SgRNA F
<i>YCT1</i> -Left-F	CAATGGCCATCGAAATCGG	<i>YCT1</i> KO F1
<i>YCT1</i> -Left-R	GCACTGGCCGTCGTTTTACCGCTAGGCACAGATCTCAT	<i>YCT1</i> KO R1
<i>YCT1</i> -Right-F	GTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGGCTATCACTAAGGCCCTCAG	<i>YCT1</i> KO F2
<i>YCT1</i> -Right-R	ATGCGGATCTTGGAATAGGC	<i>YCT1</i> KO R2

NaCl、0.102 9 g CaCl₂·2H₂O、0.406 6 g MgCl₂·6H₂O、0.5 mg H₃BO₃、0.04 mg CuCl₂·2H₂O、0.1 mg KI、0.19 mg ZnCl₂、0.05 mg FeCl₃·6H₂O、2 mg D-泛酸钙(calcium pantothenate)、2 mg 维生素 B₁、2 mg 维生素 B₆、0.02 mg 维生素 H、20 mg 肌醇(inositol)溶于 1 L 水中, 121 °C 高压灭菌 20 min^[17]。酵母转化的筛选培养基和酵母单杂交的显色培养基的配制方法见 One Hybrid System (Clontech 公司)的说明书。

1.1.3 主要仪器

采用 Bio-Rad 电转化仪转化外源 DNA, 采用 MP-Bio 样品均质器破碎细胞, 采用蔡司显微镜观察荚膜, 采用 Bio-Rad 实时荧光定量 PCR

仪进行 PCR 扩增和数据收集, 采用 Molecular Devices 多功能酶标仪测定 OD₆₀₀ 和收集数据。

1.2 基因敲除和基因回补

参照文献[17]的方法, 采用 TRACE 系统进行基因敲除和基因回补。

1.3 生长曲线的测定

为了测试突变株在不同有机硫化物作为唯一硫源下的生长情况, 将野生型、*mup1*Δ、*mup1*Δ+*MUP1*、*mup1*Δ *mup3*Δ、*yct1*Δ 菌株于 YPD 液体培养基中 30 °C、220 r/min 振荡培养 12 h 后, 4 000 r/min 离心 3 min, 去除培养基上清, 得到的菌体用无菌水洗涤 2 次后, 转移至 BM 培养基中 30 °C、220 r/min 饥饿 12 h。硫饥

饿的目的是使菌充分适应新培养基和消耗内部储存的硫。硫饥饿后用无菌水洗涤 2 次, 去除上清和重悬于 BM 培养基至初始 OD_{600} 为 0.01–0.02 后, 添加 10、100、1 000、10 000 $\mu\text{mol/L}$ 硫源(L-半胱氨酸、L-胱氨酸、L-甲硫氨酸、DL-胱硫醚和同型半胱氨酸), 然后在 96 孔板中 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、500 r/min、培养 72 h, 每组 2 个生物学重复。

1.4 RNA 提取及 qRT-PCR 分析

为了进一步验证 Mup1 转运半胱氨酸的功能, 将野生型菌株分别在加硫酸盐、半胱氨酸和硫酸盐的 BM 培养基中诱导 1 h, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 *MUP1* 的表达水平。按照 Ultrapure RNA Kit (康为世纪)说明书提取样品总 RNA, 用 HiScript II 1st Strand cDNA (Vazyme) 去除 gDNA 后, 用 1 μg RNA 合成 cDNA, 用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Vazyme)在实时荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR。基因表达差异倍数用 $\text{fold change}=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目的基因的相对表达倍数, 以管家基因 *TEF1* 作为内参基因, 每组 3 个生物学重复。

1.5 荧光素酶报告菌株的发光测定

为了验证 *MUP1* 的表达是否与半胱氨酸浓度有关, 构建了 *MUP1* 启动子融合表达荧光素酶的菌株, 测试其不同浓度半胱氨酸诱导下的表达情况。将 *MUP1* 的启动子通过同源重组与 *CnFLuc* 相连构建 SH1-*P_{CTR4}*-*CnFLuc* 载体。载体通过 PCR 线性化后, 与 SH3-SgRNA、Cas9 共转化至野生型菌株中, 通过 G418 抗生素筛选和诊断性 PCR 获得荧光素酶报告菌株。报告菌株于 YPD 中过夜培养, 无菌水洗涤, 离心去除上清和重悬于 BM 培养基至 1×10^7 CFU/mL, 添加 10 mmol/L 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 半胱氨酸后 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 6 h。无菌水洗涤, 离心去除上

清, 重悬后加入发光底物 D-luciferin 至终浓度 0.15 mg/mL, 测发光强度和 OD_{600} , 以添加同等浓度的无关硫源还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的 BM 培养条件下的生物发光和 OD_{600} 作为参照均一化处理, 得到其相对发光强度。

1.6 转录组分析

为了初步探究 Mup1 与转录因子 Cys3 的调控关系, 分别测定野生型菌株和 *cys3* Δ 在硫充足和硫饥饿条件下的转录组。菌株 YPD 过夜培养后转接至添加 5 mmol/L L-cysteine 的 BM 液体培养基中, 初始菌浓度为 1×10^7 CFU/mL, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至对数生长期, 用水洗涤 2 次后, 分别将 5×10^8 CFU 的菌置于不加硫源和添加 5 mmol/L L-cysteine 的 BM 液体培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 孵育 2 h, 每组 3 个生物学重复。提取样品的总 RNA 后, 利用 Illumina NovaSeq 6000 平台上双端测序, 单端读数为 150 bp。使用 STAR2.6.0c 将 RNA 序列与新生隐球菌 H99 注释基因组进行对比, 使用 HTSeq 进行基因表达量的计数。使用每百万碱基转录本 (transcripts per million, TPM) 对基因表达量计数和基因长度进行标准化, 确定基因的表达水平。使用 DESeq2, 根据 $\text{Padj}<0.05$, $\log_2(\text{fold change})$ 绝对值 >2 获取差异表达基因。

1.7 酵母单杂交分析

以新生隐球菌野生型 cDNA 为模板扩增转录因子 Cys3 的 CDS 片段, 并通过无缝克隆连接到 pB42AD 载体上, 构建受体载体。扩增 *MUP1* 启动子片段, 通过无缝克隆连接到 pLacZi 载体上, 使目的基因启动子位于 *lacZ* 的上游, 构建诱饵载体。将诱饵载体和受体载体共转化到酿酒酵母 EGY48 中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。将转化子转接至 SD/Gal/Raf 显色培养基上, 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光培养 5 d, 观察是否变蓝, 每组 2 个生物学重复。

1.8 大蜡螟感染模型

为了研究转运蛋白 Mup1 对新生隐球菌致病性的影响,将 10 μ L 1×10^3 CFU 对数生长期的野生型和 *mup1* Δ 菌株通过微量注射器注射至大蜡螟幼虫[体重(330 \pm 25) mg]的最后一个左前肢, 每组 8 只幼虫。以注射水的幼虫作为对照组。所有幼虫在 37 $^{\circ}$ C 黑暗中养 10 d, 每 24 h 监测存活率, 触摸不动计为死亡。

1.9 小鼠感染模型

本研究已获西南大学实验动物伦理审查委员会批准(伦理审查号: IACUC-20230209-01)。为了研究转运蛋白 Mup1 对新生隐球菌致病性的影响, 将 7–8 周龄体重为 18–22 g 的雌性 C57BL/6 小鼠麻醉后, 用 50 μ L 1×10^5 CFU/mL 对数生长期的野生型和 *mup1* Δ 菌株的菌液进行鼻吸感染, 每组 10 只小鼠。每 24 h 监测存活率, 直至所有小鼠全部死亡。

1.10 应激表型实验

为了观察 *mup1* Δ 在不同外界压力条件下的生长情况, 将 5×10^7 CFU/mL 的野生型和 *mup1* Δ 连续 10 倍稀释后, 取 2 μ L 的菌液滴于不同的固体培养基上, 在 30 $^{\circ}$ C 下培养 48 h 后, 拍照记录结果。固体培养基包括 YPD、YPD+1% 刚果红(细胞壁压力)、YPD+1.5 mol/L 山梨醇(渗透压)、YPD+1 mmol/L 亚硝酸钠(硝化压力)、YPD+1.5 mol/L 氯化钾(渗透压)、YPD+50 μ mol/L 硫酸镉(重金属压力)。

1.11 毒力因子

测试了新生隐球菌 3 种经典毒力因子黑色素、荚膜和 37 $^{\circ}$ C 生长情况, 具体方法如前所述^[18]。

1.12 数据分析方法

采用 GraphPad Prism 7 软件的 *t* 检验分析对 qRT-PCR 结果进行差异性分析; 采用 Log-rank (Mantel-Cox) 检验法对动物生存曲线进行差异性分析, $P < 0.05$ 表示显著差异。

2 结果与分析

2.1 转运蛋白 Mup1 的功能鉴定

参照酿酒酵母甲硫氨酸转运蛋白 Mup1 (编码基因 *YGR055W*) 和 Mup3 (编码基因 *YHL036W*), 用 BLASTP 算法从新生隐球菌 H99 基因组数据库中鉴定出候选基因 *MUP1* (*CNAG_07693*) 和 *MUP3* (*CNAG_03955*), 分别编码 605 和 580 个氨基酸的蛋白。序列比对显示新生隐球菌 Mup1 与酿酒酵母 Mup1 具有 55% 氨基酸序列相似性, Mup3 与酿酒酵母 Mup3 具有 45% 的相似性。参照酿酒酵母高亲和力半胱氨酸转运蛋白 Yct1 (*YLL055Wp*), 同样在新生隐球菌中确定了候选基因 *YCT1* (*CNAG_06890*), 编码一个 522 个氨基酸的蛋白, 与酿酒酵母 Yct1 具有 49% 氨基酸序列相似性。

为了探究上述候选基因在新生隐球菌中的功能, 以 *NEO* (遗传霉素) 抗性基因置换 *MUP1* 和 *YCT1*, 以 *NAT* (诺尔丝菌素) 抗性基因置换 *MUP3* 构建缺失菌株, 诊断性 PCR 扩增和酶切验证后得到了 *mup1* Δ 、*yct1* Δ 和 *mup3* Δ 。以类似的方法构建了 *mup1* Δ *mup3* Δ 双敲除菌株。将突变株接种到含有不同有机硫化物作为唯一硫源培养基 BM 中, 结果发现在添加半胱氨酸 (≤ 100 μ mol/L) 时, 相比野生型菌株, *mup1* Δ 具有明显的生长缺陷(图 1A)。在添加半胱氨酸时, *mup1* Δ *mup3* Δ 双敲菌株与 *mup1* Δ 生长无显著差异(图 2A)。在添加甲硫氨酸时, *mup1* Δ 和 *mup1* Δ *mup3* Δ , 均没有观察到明显的生长缺陷(图 2B)。由于在双敲菌株中未能够观察到进一步敲除 *MUP3* 对表型的影响, 因此后续未继续测试 *mup3* Δ 的表型。在添加半胱氨酸(10 μ mol/L–10 mmol/L) 时, *yct1* Δ 与野生型相比没有明显的生长缺陷(图 2A); 为了进一步确认 Mup1 的功能, 将 *MUP1* 异位插入到 *mup1* Δ 的“避风港” (safe haven) 区域

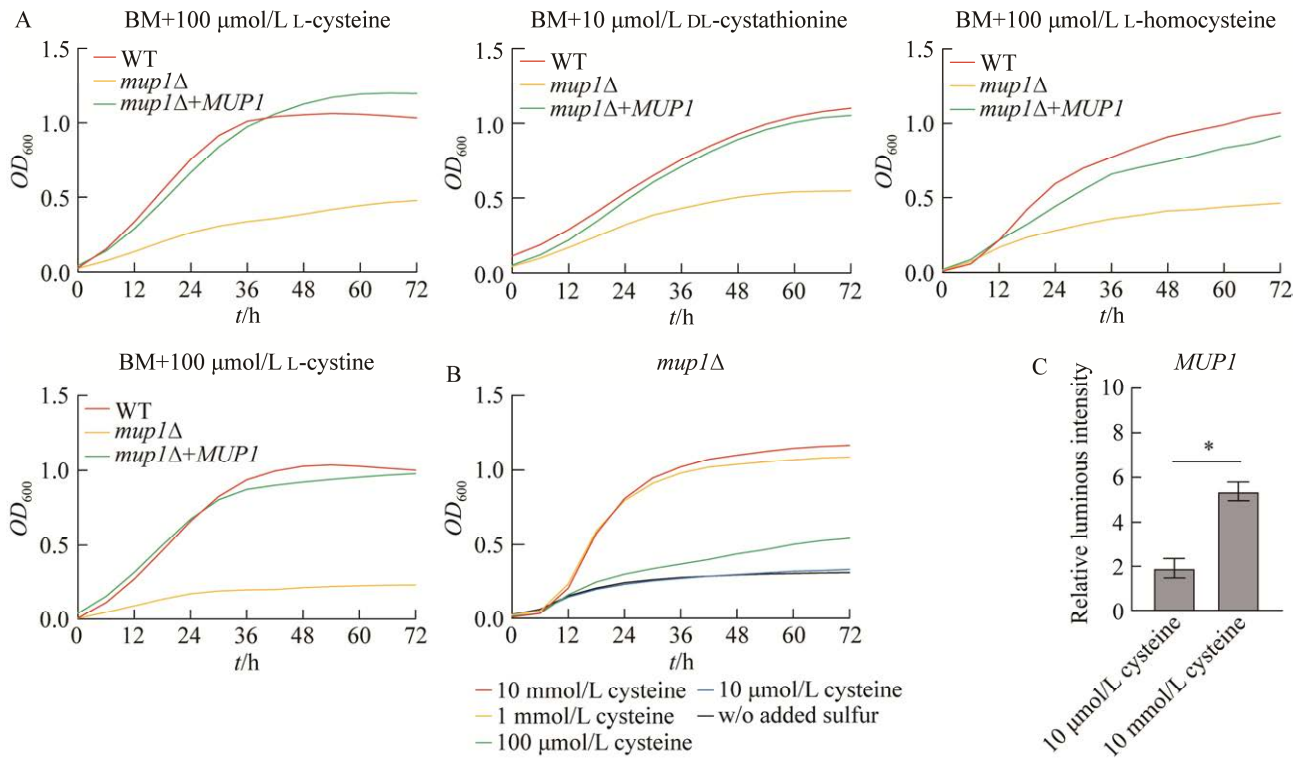


图 1 Mup1 的功能表征

Figure 1 Functional characterization of Mup1. A: Growth curves of wild-type, *mup1Δ*, and complemented strains under L-cysteine, L-methionine, L-cystine, L-homocysteine, or DL-cystathionine as sole sulfur source. B: Growth curves of *mup1Δ* under various concentration of L-cysteine as sole sulfur source. C: Relative bioluminescence intensity of P_{MUP1} -*CnFLuc* after 6 h induction in BM medium supplemented with different concentrations of L-cysteine.

中, 构建了回补菌株 *mup1Δ+MUP1*。和预期一致, 回补菌株与野生型菌株表现出相同的表型, 表明这些表型的改变与 *MUP1* 的缺失有关(图 1A)。这些结果初步表明在新生隐球菌中仅 Mup1 具有半胱氨酸转运功能。有趣的是, *mup1Δ* 在添加高浓度半胱氨酸(1 mmol/L)时仍能够正常生长(图 1B), 表明隐球菌基因组含有编码半胱氨酸转运蛋白基因。此外, Mup1 还具有转运半胱氨酸类似物同型半胱氨酸、胱氨酸、胱硫醚的能力(图 1A)。为了进一步探究 Mup1 与半胱氨酸转运的联系, 将 *MUP1* 启动子与荧光素酶 *CnFLuc* 融合表达后导入野生型菌株。报告基因的结果显示 *MUP1* 的转录呈现半胱氨酸浓度依赖性, 随着半胱氨酸浓度增加, *MUP1* 的表达增强。这些

结果表明 Mup1 对于新生隐球菌在低浓度半胱氨酸作为唯一硫源条件下的生长是极其重要的。推测 Mup1 可能是高亲和力的半胱氨酸转运蛋白, 并且可能转运半胱氨酸的前体或类似物。

2.2 Mup1 对毒力因子表达、应激表型的影响

荚膜、黑色素和 37 °C 生长是新生隐球菌 3 种经典的毒力因子。为了探究 Mup1 对新生隐球菌毒力因子表达的影响, 将野生型和 *mup1Δ* 在产生荚膜的 DMEM 固体培养基、产生黑色素的 niger seed 固体培养基, 以及在 YPD 固体培养基上 37 °C 培养。结果显示 *mup1Δ* 的 3 种毒力因子表型与野生型相比无明显差异(图 3A), 表明转运蛋白 Mup1 对荚膜形成、黑色素合成

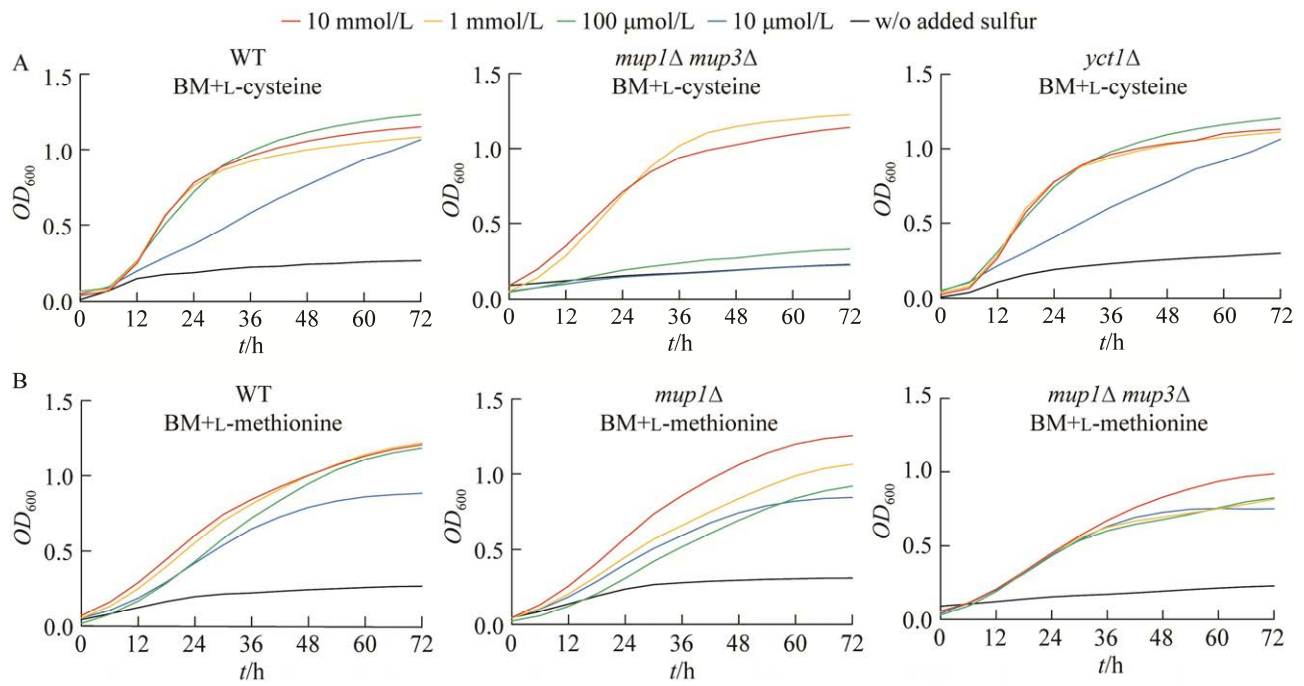


图 2 Mup1 是新生隐球菌的半胱氨酸转运蛋白

Figure 2 Mup1 is a L-cysteine transporter in *Cryptococcus neoformans*. A: Growth curves of wild-type, *mup1Δ mup3Δ*, and *yct1Δ* under L-cysteine as sole sulfur source. B: Growth curves of wild-type, *mup1Δ*, *mup1Δ mup3Δ*, and *yct1Δ* under L-methionine as sole sulfur source.

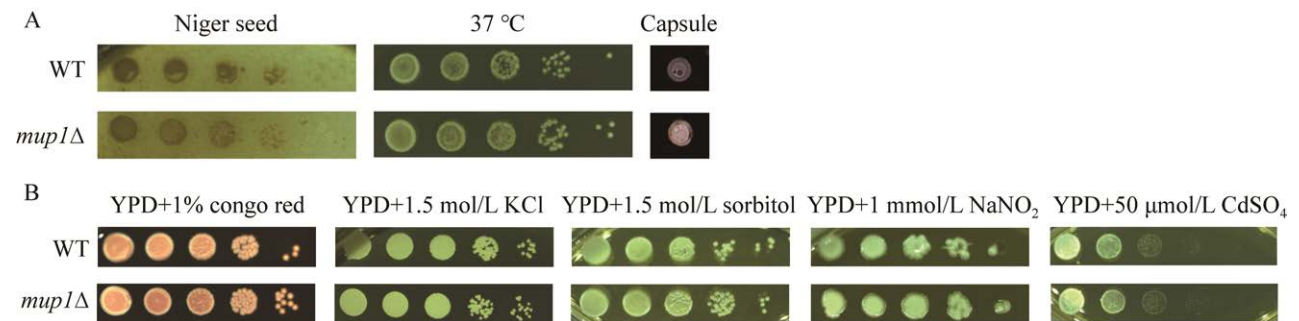


图 3 Mup1 对新生隐球菌毒力因子表达和应激表型的影响

Figure 3 Effect of Mup1 on virulence factors and stress phenotypes of *Cryptococcus neoformans*. A: The virulence factors of wild-type and *mup1Δ*. B: The stress phenotypes of wild-type and *mup1Δ*.

和 37 °C 生长不是必需的。为了探究 Mup1 是否影响新生隐球菌应对环境胁迫的能力，将野生型和 *mup1Δ* 于添加 KCl、山梨醇、刚果红、CdSO₄ 和 NaNO₂ 的 YPD 固体培养基中。结果表明 *mup1Δ* 的胁迫表型与野生型相比无明显差异 (图 3B)，表明转运蛋白 Mup1 不影响新生隐球

菌的应激能力。

2.3 Mup1 对致病性的影响

为了探究转运蛋白 Mup1 是否影响新生隐球菌的毒力，用大蜡螟和小鼠隐球菌感染模型比较了野生型和 *mup1Δ* 的致病性。与野生型菌株相比，*mup1Δ* 在 2 种模型中存活率均无显著

差异(图 4)。这些结果表明, Mup1 对新生隐球菌的毒力不是必需的, 在感染的过程中病原菌可能通过从头合成途径获得足够的半胱氨酸来满足生长和繁殖的需要。

2.4 转录因子 Cys3 与 *MUP1* 转录

新生隐球菌中 bZIP 家族转录因子 Cys3 (编码基因 *CNAG_04798*) 是硫代谢核心调控因子。为了探究 *MUP1* 的转录是否受到 Cys3 的调控, 分别将野生型和 *cys3Δ* 硫饥饿和硫充足条件下处理 2 h 的样品进行转录组测序, 结果显示 *MUP1* 在野生型中受硫饥饿的诱导表达(\log_2 FC=7.9), 但在 *cys3Δ* 中基因表达无明显差异, 与硫同化途径中的编码硫酸腺苷酰转移酶的基因 *MET3* 的表达

类似(图 5A), 这表明 *MUP1* 的转录受 Cys3 的调控。为了进一步分析这种调控关系是直接还是间接的, 将含 *MUP1* 启动子的诱饵质粒和含 Cys3 开放阅读框的受体质粒共转化到酵母单杂宿主菌株 EGY48 中, 以西南大学范艳华教授提供的 PB42AD-SMR1/PLACZI-*P_{BRIA}* 作为阳性对照。阳性对照获得了预期的结果, 菌落呈现为蓝色。

3 讨论与结论

半胱氨酸是真菌重要的营养物质。根据浓度不同, 细胞利用高亲和力或低亲和力的转运蛋白将其运输进入细胞质, 进而发挥重要功能。本研究初步鉴定了新生隐球菌的首个半胱氨酸

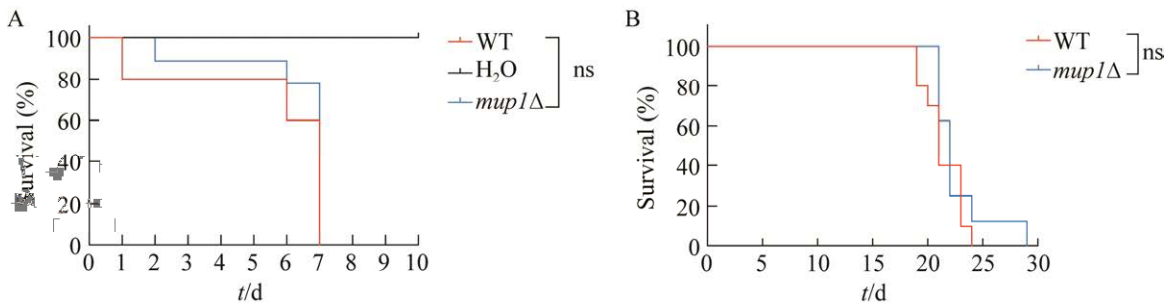


图 4 Mup1 对新生隐球菌致病性的影响

Figure 4 Effect of Mup1 on the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. A: Survival curves of a *Galleria mellonella* model of *Cryptococcus neoformans* infection. B: Survival curves of a mice model of *Cryptococcus neoformans* infection. ns: Not significant.

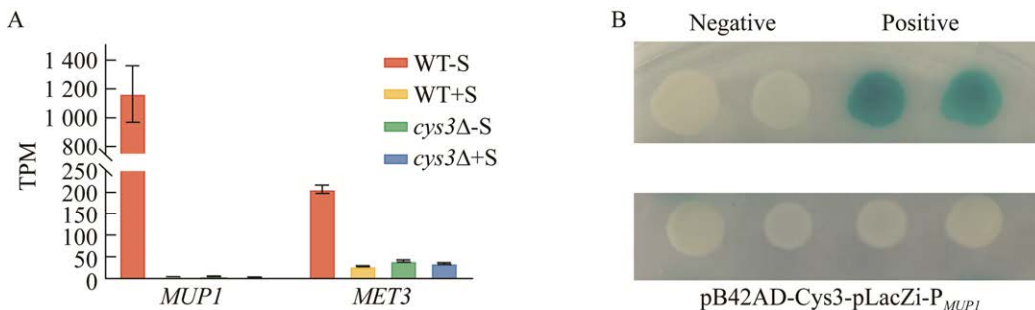


图 5 Cys3 间接调控 *MUP1* 表达

Figure 5 Regulatory relationship between *MUP1* and Cys3. A: Transcripts per million of *MUP1* and reference gene *MET3* under sulfur repletion and sulfur starvation conditions in wild-type or *cys3Δ*. B: β -galactosidase chromogenic reaction of pB42AD-Cys3/pLacZi-*P_{MUP1}*. Negative control is PB42AD/PLACZI, and positive control is PB42AD-SMR1/PLACZI-*P_{BRIA}*.

转运蛋白 Mup1, 其基因转录受到硫饥饿显著诱导。新生隐球菌 Mup1 丧失了甲硫氨酸的转运能力, 这与酿酒酵母 Mup1 功能不同, 该蛋白具备转运这 2 种重要含硫氨基酸的能力。酿酒酵母和新生隐球菌的 Mup1 虽然都属于 LAT 亚

家族的氨基酸通透酶家族转运蛋白, 然而分别具有 10 和 12 个跨膜结构域(图 6A), 且二者亲缘关系较远(图 6B), 这表明新生隐球菌 Mup1 可能在进化中丧失了甲硫氨酸的转运功能, 进化出对半胱氨酸专一的转运功能。此外, 新生

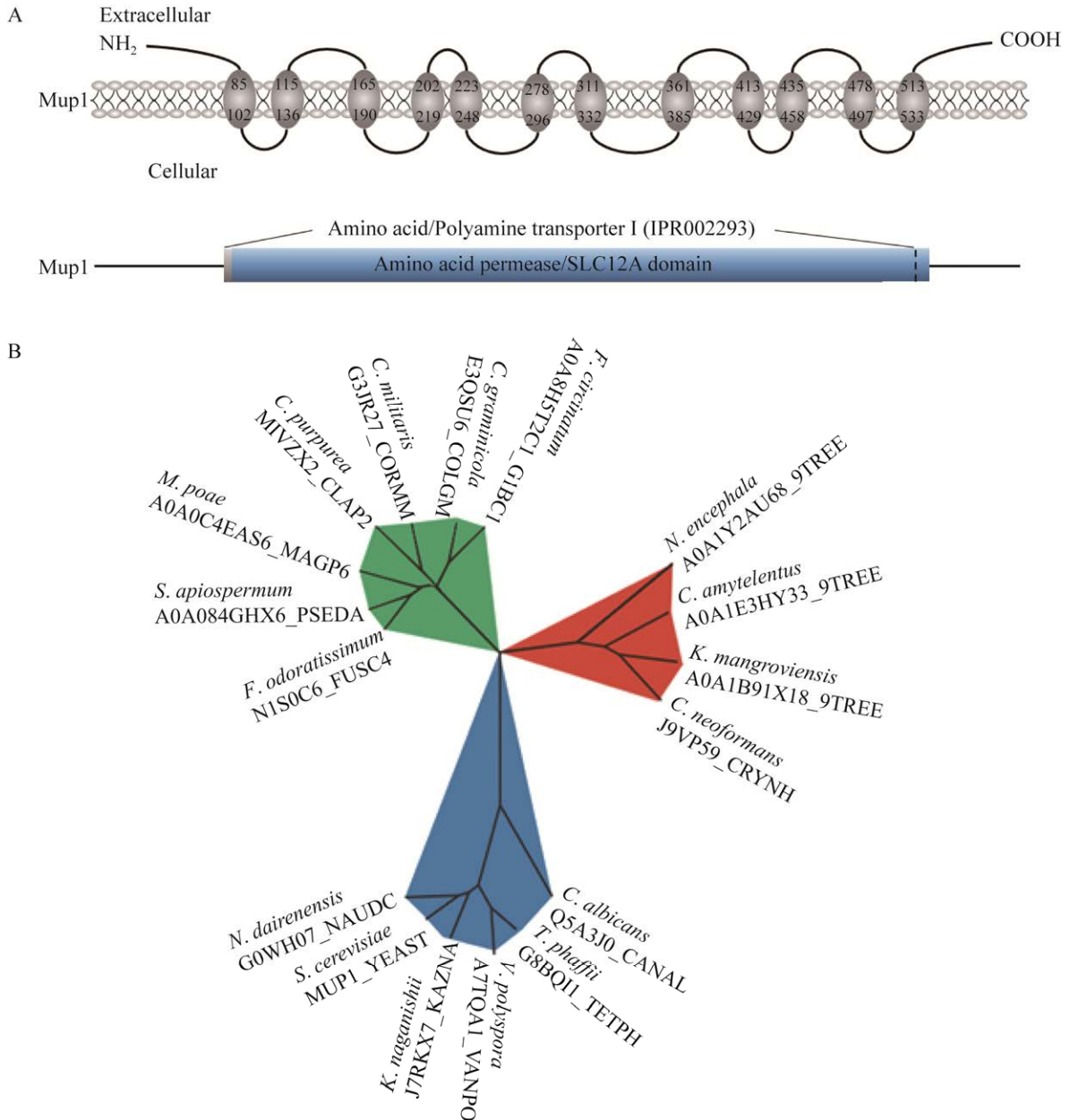


图 6 Mup1 的蛋白序列分析

Figure 6 Protein sequence analysis of Mup1. A: Transmembrane and conserved domain of Mup1. B: Phylogenetic tree of Mup1.

隐球菌的 Yct1 和 Mup3 都不具备半胱氨酸的转运能力。与表型一致, 新生隐球菌 *YCT1* 和 *MUP3* 不响应硫饥饿(\log_2 FC=0.9, \log_2 FC=0.8) (结果未显示)。虽然 *mup1Δ* 在低浓度半胱氨酸(100 μmol/L)有显著的生长缺陷, 但是在高浓度半胱氨酸(1 mmol/L)无显著生长缺陷, 这表明新生隐球菌很可能还存在低亲和力的半胱氨酸转运蛋白, 尚有待鉴定。新生隐球菌 *CYS1* 缺失导致致病力显著降低, 表明半胱氨酸对隐球菌的致病非常重要。然而 *MUP1* 敲除菌株的致病力并没有变化, 这说明在感染过程中, 病原菌的半胱氨酸可能主要来自从头合成, 或者宿主环境中存在大量的半胱氨酸, 可以通过尚未鉴定的低亲和力半胱氨酸转运蛋白运输进入细胞, 满足病原菌的需要。

在真菌中, 存在一种硫代谢物抑制系统(sulfur metabolite repression system, SMR)调节硫代谢过程, 即当硫饥饿或只存在无机硫时, 参与硫酸盐同化和含硫氨基酸合成的基因被诱导表达; 而在含硫氨基酸存在时, 这些基因的表达被抑制。真菌中已鉴定的调控该过程的核心转录因子均属于 bZIP 家族, 在 N 端富含脯氨酸的转录激活结构域和在 C 端具有亮氨酸拉链 DNA 结合结构域。调控硫代谢 bZIP 家族转录因子分为 2 类, 包括 670–710 个氨基酸的蛋白, 如酿酒酵母 Met4, 以及 319–371 个氨基酸的蛋白, 如粗糙脉孢菌 Cys-3 和新生隐球菌的 Cys3。转录组分析发现 *MUP1* 的表达受到了 Cys3 的调控, 酵母单杂交实验初步表明 Cys3 间接调控 *MUP1* 的表达。考虑转录因子的活性受到细胞内环境的影响, 在异源宿主酿酒酵母中的结果不一定反映真实的调控关系, 后续将通过染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq)等技术在新生隐球菌中进一步确定二者的调控关系。

总之, 本研究鉴定了新生隐球菌高亲和力

半胱氨酸转运蛋白 Mup1。该蛋白还具有转运胱氨酸、胱硫醚、同型半胱氨酸等半胱氨酸类似物的能力。Mup1 对毒力因子表达, 应激反应和致病性均无影响。*MUP1* 的表达可能受硫代谢核心转录因子 Cys3 的间接调控。对关键营养物质半胱氨酸转运蛋白的研究有助于加深新生隐球菌代谢的理解。

参考文献

- [1] BADDLEY JW, CHEN SCA, HUISINGH C, BENEDICT K, de BESS EE, GALANIS E, JACKSON BR, MACDOUGALL L, MARSDEN-HAUG N, OLTEAN H, PERFECT JR, PHILLIPS P, SORRELL TC, PAPPAS PG. MSG07: an international cohort study comparing epidemiology and outcomes of patients with *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii* infections[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, 73(7): 1133-1141.
- [2] STEENBERGEN JN, SHUMAN HA, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(26): 15245-15250.
- [3] LIN XR, HEITMAN J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60: 69-105.
- [4] BARTNICKI-GARCIA S. The evolution of fungal morphogenesis, a personal account[J]. *Mycologia*, 2016, 108(3): 475-484.
- [5] ZHAO YB, LIN JF, FAN YM, LIN XR. Life cycle of *Cryptococcus neoformans*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 17-42.
- [6] HÉBERT A, CASAREGOLA S, BECKERICH JM. Biodiversity in sulfur metabolism in hemiascomycetous yeasts[J]. *FEMS Yeast Research*, 2011, 11(4): 366-378.
- [7] MARINO SM, GLADYSHEV VN. Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 404(5): 902-916.
- [8] TEIXEIRA de MELO A, MARTHO KF, ROBERTO TN, NISHIDUKA ES, MACHADO J, BRUSTOLINI

- OJB, TASHIMA AK, TEREZA VASCONCELOS A, VALLIM MA, PASCON RC. The regulation of the sulfur amino acid biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans*: the relationship of Cys3, calcineurin, and Gpp2 phosphatases[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 11923.
- [9] TOH-E A, OHKUSU M, SHIMIZU K, ISHIWADA N, WATANABE A, KAMEI K. Novel biosynthetic pathway for sulfur amino acids in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Current Genetics*, 2018, 64(3): 681-696.
- [10] WIPF D, LUDEWIG U, TEGEDER M, RENTSCH D, KOCH W, FROMMER WB. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(3): 139-147.
- [11] PEREZ-LEAL O, MONCADA C, CLARKSON AB, MERALI S. *Pneumocystis* S-adenosylmethionine transport: a potential drug target[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2011, 45(6): 1142-1146.
- [12] BIANCHI F, VAN'T KLOOSTER JS, RUIZ SJ, POOLMAN B. Regulation of amino acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2019, 83(4): e00024-e00019.
- [13] KAUR J, BACHHAWAT AK. Yct1p, a novel, high-affinity, cysteine-specific transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2007, 176(2): 877-890.
- [14] FERNANDES JD, MARTHO K, TOFIK V, VALLIM MA, PASCON RC. The role of amino acid permeases and tryptophan biosynthesis in *Cryptococcus neoformans* survival[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132369.
- [15] CALVETE CL, MARTHO KF, FELIZARDO G, PAES A, NUNES JM, FERREIRA CO, VALLIM MA, PASCON RC. Amino acid permeases in *Cryptococcus neoformans* are required for high temperature growth and virulence; and are regulated by Ras signaling[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0211393.
- [16] PERFECT JR, KETABCHI N, COX GM, INGRAM CW, BEISER CL. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(12): 3305-3309.
- [17] CHEREST H, SURDIN-KERJAN Y. Genetic analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway[J]. *Genetics*, 1992, 130(1): 51-58.
- [18] MARTHO KF, BRUSTOLINI OJB, VASCONCELOS AT, VALLIM MA, PASCON RC. The glycerol phosphatase Gpp2: a link to osmotic stress, sulfur assimilation and virulence in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2728.