

## 真菌铜离子内稳态 (homeostasis) 调节的多样性

祝嫦巍, 潘皎, 严冰, 朱旭东\*

南开大学生命科学学院微生物学系, 天津 300071)

**摘要:**铜是生物体中必需的微量元素之一, 作为多种氧化酶的辅助因子参与不同的生物反应, 对于维持生命活动起到重要的作用。但在过量的情况下, 无论是一价铜离子还是二价铜离子对于生物体都具有很强的细胞毒性, 因此铜的代谢是受细胞严格调控的。以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为模式生物对铜代谢的研究已取得了很大进展, 对其它高等生物体内铜代谢及其重要生理功能提供了重要信息。本文对酿酒酵母中铜离子的吸收、转运以及在细胞内的代谢调控的新进展进行了归纳, 并结合自己的研究综述了真菌铜代谢调节的共性与差异。

**关键词:** 铜; Cu/Zn 超氧化物歧化酶; 铜伴侣蛋白; 酿酒酵母; 漆酶

**中图分类号:** Q935    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0841-07

铜元素的代谢调控十分重要。首先铜是必需的微量元素之一, 在正常细胞活动中担负许多必不可少的功能, 作为多种氧化酶的辅助因子参与重要的生物反应, 这些酶包括细胞色素 C 氧化酶、Cu/Zn 超氧化物歧化酶、漆酶、赖氨酰氧化酶和多巴胺  $\beta$  羟化酶等。而这些酶是生物体很多反应的关键酶类, 如细胞色素 C 氧化酶是呼吸作用的关键酶, 多巴胺  $\beta$  羟化酶对于儿茶酚胺的形成也是必要的, 超氧化物歧化酶参与细胞内自由基的消除反应, 以维护细胞内蛋白和 DNA 等大分子的稳定; 真菌中普遍存在漆酶, 是参与纤维木质素降解的关键酶之一<sup>[1]</sup>。但是在过量的情况下, 无论是一价铜离子还是二价铜离子对于生物体都是具有高度毒性的。因为它们能作为电子转移的中介催化形成活泼的氢氧根离子, 而氢氧根离子被认为通过对细胞膜脂质的过氧化反应, 蛋白质的氧化和对 DNA 和 RNA 分子的解链反应, 对细胞产生破坏。因此, 在长期的进化过程中, 生物体获得一套完整的铜代谢调控机制, 包括从营

养物质中摄取所需铜的能力, 通过生物膜上的铜转运蛋白运输所需铜离子, 并精确的调节细胞内铜的积累防止毒性产生。最近的研究表明, 铜的各种分子组分在细胞内的运输途径在酵母和人类间是相当保守的, 在酿酒酵母中对铜转运和代谢的研究为动、植物及人类铜代谢的研究提供了有效参考。本文主要对铜在真菌尤其是酿酒酵母这一模式菌株中的铜吸收、转运及代谢途径进行概述, 并比较真菌之间铜代谢调节的不同点。

### 1 二价铜离子的还原吸收

自然环境下铜离子多以二价存在。研究表明, 二价铜离子在被酵母吸收之前, 首先由细胞质膜上 *FRE1* 和 *FRE2* 基因编码的还原酶复合体还原为一价铜离子, 再由铜转运蛋白将一价铜离子转运到胞内<sup>[2]</sup>。

*Fre1p* 和 *Fre2p* 最初被鉴定为细胞表面的三价铁离子还原酶<sup>[3-4]</sup>, 具有细胞表面 90% ~ 98% 的还

基金项目: 国家自然科学基金 (30570027)

\* 通信作者。Tel: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

作者简介: 祝嫦巍 (1976-), 女 (满族), 吉林省伊通县人, 博士, 研究方向为细胞信号转导。E-mail: zhuchwei@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-09; 修回日期: 2009-02-17

原酶活性。这 2 个蛋白的结构和功能类似,并且表达都受到低浓度铁离子的诱导<sup>[5]</sup>。进一步的研究显示, *Fre1p* 和 *Fre2p* 也具有二价铜离子还原酶活性<sup>[2]</sup>。二价铜离子可以抑制 *FRE1* 基因的转录,并且是 *Fre1p* 还原酶的作用底物。但是只有 *FRE1* 的表达受低浓度铜的诱导, *FRE2* 表达只受低浓度铁的诱导,不受低浓度铜诱导。过量表达 *FRE1* 导致细胞对铜敏感<sup>[5]</sup>。铜转录因子 *Mac1p* 参与 *FRE1* 和 *FRE2* 的转录调控<sup>[5,6]</sup>,不同的是在低铜的条件下, *FRE1* 基因的表达被激活, *FRE2* 基因的表达则被抑制。

通过氨基酸序列的同源性比对,在酿酒酵母中还发现另外 7 个与 *FRE1* 和 *FRE2* 同源的基因。这些基因都是编码铁离子或铜离子还原酶。需要指出的是, *Fre7p* 的表达可以刺激细胞表面还原酶的活性的增加<sup>[7]</sup>,并且 *FRE7* 和 *FRE1* 类似,在铜缺乏的情况下被诱导表达。而 *Fre6p* 定位在液泡膜表面,作用于 *Ctr2p* (见随后部分详细阐述)的上游,共同介导液泡内储存铜输出至细胞质<sup>[7]</sup>。但缺失 *FRE6* 或 *FRE7* 对细胞表型没有影响。

在其它真菌的基因组序列中发现类似还原酶复合物普遍存在,表明真菌从环境中吸收铜离子的机制具有共同点。例如我们较关注的人类致病真菌新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*) 中也发现了编码铁离子还原酶的基因<sup>[8]</sup>。该基因编码的蛋白也具有铜离子还原酶活性,但是在其它真菌中对该酶系的生物功能还需要进一步鉴定。

## 2 一价铜离子的跨膜转运

金属离子通过疏水的细胞膜进入细胞需要有跨膜转运蛋白 (ion transporter),也称为离子泵 (ion pump)。转运蛋白对铜离子的亲和性不同,已发现酿酒酵母中存在两种铜跨膜转运系统,即高亲和 (high-affinity) 和低亲和 (low-affinity) 转运系统。酿酒酵母中高亲和铜转运蛋白有两种,分别由 *CTR1* 和 *CTR3* 编码<sup>[9-10]</sup>,负责在低铜的条件下吸收铜离子。实验发现 *ctr1* 突变株对二价铁离子和一价铜离子的转运能力均降低, *ctr1* 突变株对铁离子转运的缺陷可以通过在培养基中加入高浓度的铜得到补偿<sup>[10]</sup>,但缺失 *CTR1* 并不会使细胞缺铜,进一步的试验发现,酿酒酵母细胞膜中存在另外一种铜转运蛋白 *Ctr3p*<sup>[10]</sup>。 *Ctr1p* 和 *Ctr3p* 均定为在细胞膜上,并且功能相似。但二者序列的同源性却很低, *Ctr1p* 和 *Ctr3p* 均含有 3 个跨膜区域, *Ctr1p* 的 N 端有典型的

铜结合域 MXXMXM 重复序列,这与其它生物的 *Ctr* 蛋白类似,具有保守性。但 *Ctr1p* 的跨膜域与其它 *Ctr* 蛋白同源性很低。 *Ctr3p* 则没有 MXXMXM 序列。双缺失 *CTR1* 和 *CTR3* 会导致细胞出现严重的铜缺乏现象。在低铜的条件下, *CTR1*、*CTR3* 被高度表达;而在高铜的情况下,表达被抑制<sup>[11-12]</sup>。 *CTR1*、*CTR3* 的表达由 *MAC1* 编码的转录激活因子调控的。 *Mac1p* 在高铜和低铜的情况下均定位在细胞核。 *Mac1p* 的调节作用需要 *CTR1* 和 *CTR3* 启动子中的铜响应元件 (CuREs) 5'-TTTGCTC-3' 的存在<sup>[11-12]</sup>, *Mac1p* 与铜响应元件结合需要铜离子的参与,但过多的铜会破坏结合<sup>[13]</sup>。在高铜条件下,细胞膜中的 *Ctr1p* 被降解<sup>[14]</sup>。 *Ctr1p* 的降解途径有两条,一少部分 *Ctr1p* 被细胞内吞,转运到液泡中,被液泡蛋白酶降解;一大部分 *Ctr1p* 通过内吞和液泡蛋白酶以外的机制降解。 *Ctr1p* 的降解需要 *Mac1p* 的参与<sup>[15]</sup>,并且 *Mac1p* 通过控制 *Ctr1p* 的降解调节细胞内铜的内稳态。但是高铜对 *Ctr3p* 没有影响<sup>[16]</sup>。

已经发现其他生物的铜转运蛋白可以回补酿酒酵母 *CTR1* 和 *CTR3* 缺失。人类的 *hCTR1* 和 *hCTR2*; 裂殖酵母 (*S. pombe*) 的铜转运蛋白 *Ctr4p* 和 *Ctr5p*; 鹅柄抱壳菌 (*Podospora anserina*) 中的 *PaCtr2p* 可以部分互补 *ctr1* 突变; *PaCtr1p* 和 *PaCtr3p* 可以完全互补 *ctr1* 突变。这说明了高亲和铜转运蛋白在不同生物间是高度保守的。我们在新型隐球酵母中克隆并鉴定出一个编码高亲和和铜转运蛋白的基因 *CTR4*。 *Ctr4p* 的 N 端有 3 个的铜结合域 MXXMXM 的重复序列,其氨基酸序列与酿酒酵母中的 *Ctr3p* 同源性更高。铜缺乏条件诱导 *Ctr4p* 的表达,随着环境中铜离子浓度的增加, *Ctr4p* 的表达量逐渐降低。 *Ctr4p* 的表达受转录因子 *Cuf1p* 的调控<sup>[17]</sup>,这与酿酒酵母和裂殖酵母中的情况类似。并且 *CTR4* 和 *CUF1* 突变株均表现出致病性降低的表型,这说明铜的稳态调节对隐球酵母致病性有重要的作用。

在酿酒酵母中还鉴定出几种低亲和铜转运蛋白,包括 *Ctr2p* 和 *Fet4p*。 *Fet4p* 最初被认为是低亲和铁转运蛋白,与高亲和铜转运蛋白 *Ctr* 家族没有任何同源性。 *Fet4p* 对包括铜、锌在内的其他金属离子也具有吸收功能<sup>[18]</sup>, *Fet4p* 整合在细胞膜上,铜、钴和镉对 *Fet4p* 的表达有抑制作用。 *FET4* 的转录在低浓度铁的条件下受 *Aft1p* 的诱导,在低浓度锌的条件下受 *Zap1p* 诱导,但对低浓度铜没反应<sup>[19]</sup>,在厌氧条件下 *FET4* 也被诱导,在有氧条件下被 *Rox1p*

抑制。Rox1p 通过 Aft1p 或 Zap1p 削弱 *FET4* 的活性。Ctr2p 与高亲合铜转运 Ctr 家族具有同源性。Ctr2p 定位在液泡膜上, 对利用胞内的储备铜起到一定的作用<sup>[7]</sup>。Ctr2p 在液泡膜表面形成多聚物, 可以将液泡中储存的铜离子转运至细胞质。酵母菌株缺失 *CTR2* 后, 液泡中积聚过多的铜离子, 细胞表现出对高浓度的铜离子产生的毒性的抗性增强的表型; 过量表达 *CTR2* 则使细胞对铜毒性的敏感性增强和对铜匮乏的抗性增强。*CTR2* 不是铜转运所必需的, 甚至在 *ctr1ctr3* 双缺失的菌株中也不是必需的。

### 3 铜离子在胞内的运输

由于铜离子的高细胞毒性, 铜离子在细胞内与特异的铜伴侣蛋白 (copper chaperone protein) 结合, 转运到特定的靶蛋白。酵母和人的 Atx1p 和 Cox17p 研究得比较透彻。铜伴侣蛋白如何与靶蛋白相互作用将铜离子转移, 是非常有趣的课题, 这方面结构生物学取得了较大进展。铜伴侣蛋白在其他生物体内的研究较少。

#### 3.1 铜运送至线粒体

线粒体中细胞色素氧化酶作为呼吸链中主要的线粒体酶在其两个亚基中需要插入 3 个铜原子: 突出在线粒体内膜的结合两个铜原子的位置和埋藏在膜内的结合一个铜原子的位置。现在还不清楚这些铜原子是如何插入到酶蛋白中的, 但目前认为所有的与细胞色素氧化酶活性相关的因子中, 铜伴侣蛋白 Cox17p 对铜的利用起到重要作用。

Cox17p 是一种小分子可溶蛋白, 富含半胱氨酸残基, 在酵母和人类的类似物蛋白中是保守的。酵母的 Cox17p 定位在细胞质或线粒体的内膜上, 这与其作为转运蛋白, 将铜离子转运至线粒体的功能相一致。一价铜离子与 Cox17p 的半胱氨酸残基结合, 在转运铜离子的时候 Cox17p 七个半胱氨酸残基中有三个是其功能所必需的<sup>[8]</sup>。Cox17p 的靶蛋白有两个, 分别是 Sco1p 和 Cox11p<sup>[9]</sup>。这两个蛋白的功能是将铜离子分别运送至细胞色素 C 氧化酶的铜结合位点  $Cu_A$  和  $Cu_B$ 。Sco1p 是一种定位于线粒体内膜的蛋白, 在激活细胞色素氧化酶的活性和呼吸中起到作用。SCO1 与细胞色素 C 氧化酶的第二个亚基有同源部分, 包括两个保守的结合铜的半胱氨酸配基。Cox11p 也是一种定位于线粒体内膜的蛋白质, 是细胞色素 C 氧化酶的多个催化亚基组装所必需的<sup>[10]</sup>。Cox11p 的 C 末端包含有铜结合域, 暴露于线粒体内膜空间并形成同型二聚体, 可以结合两

个铜原子; 同时铜结合域对 Cox11p 的定位也起到重要作用。

#### 3.2 通过 *ATX1* 途径将铜转送至高尔基体

伴侣蛋白 *ATX1* 在酿酒酵母中最初被鉴定为可以为细胞提供保护, 抵抗氧化损害的基因。过量表达 *ATX1* 可以提高细胞对氧气和百草枯的抗性。实验发现 Atx1p 可以特异的将铜离子从细胞膜上的 Ctr1p 转运至分泌途径中位于后高尔基体囊泡的 Ccc2p, 最终运送至细胞表面的高亲和铁吸收蛋白 Fet3p<sup>[11]</sup>。Atx1p 转运铜的目标蛋白 Ccc2p 是 P 类 ATP 酶, 这类蛋白在真核生物中也是高度保守的, 例如, 隐球酵母的 *CCC2* 基因具有相似的结构和功能, 它是漆酶获得铜离子所必需的<sup>[12]</sup>。这些转运蛋白是 ATP 酶转运蛋白家族的成员, ATP 酶利用 ATP 水解释放的能量驱动膜蛋白转运金属离子。人类的两种类似物 (homologs) 转运蛋白, ATP7A 和 ATP7B<sup>[13]</sup>, 如果突变则导致两类遗传疾病 Menke's 和 Wilson's, 这两种疾病都是体内铜代谢紊乱。ATP7A 和 ATP7B 都可以互补酵母中的 *CCC2* 缺失引起的功能缺陷。

目前对于铜离子从 Atx1p 转运到 Ccc2p 的机制已经有了初步的研究。首先, 酿酒酵母中的铜伴侣蛋白 Atx1p 通过保守序列 MXCXXC (M 代表甲硫氨酸, X 代表任意氨基酸, C 代表半胱氨酸) 中的 2 个半胱氨酸残基结合一个金属离子。这个金属结合位点具有很强的灵活性, 能根据结合金属的数量改变蛋白的结构<sup>[14]</sup>。而 *ATX1* 的靶蛋白 Ccc2p 在其 N 端包含有多个类似 Atx1p 的区域。这个同源区域大约 8 kDa, 最值得注意的是在这一同源区域中也包含铜离子结合位点 MTCXXC。因此认为, 铜离子从 *ATX1* 的 MXCXXC 位点直接转移至 *CCC2* 的类似的位点。对 Atx1p 晶体结构的研究发现, Atx1p 具有  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  折叠结构, 并将铜离子结合位点暴露在外<sup>[15]</sup>。这种结构可以提供与一价铜离子更加紧密的结合位点, 既能保护离子不被氧化, 同时可以保护不被外界过多的竞争剂如谷胱甘肽夺取。在 Atx1p 的表面还存在多个赖氨酸残基, 这些赖氨酸残基被认为在靶蛋白的识别过程中起重要作用。Cu-Atx1p 复合物如何特异识别、靠近并将铜离子转移至 P 类金属转运蛋白 Ccc2p 的? 双杂交实验显示在 *ATX1p* 和 *CCC2p* 之间存在一种依赖于铜离子的相互作用<sup>[16]</sup>。铜离子与其结合位点 MXCXXC 中的半胱氨酸残基结合是 *ATX1* 与 *CCC2* 相互作用所必需的。另外, Atx1p 的碱性表面可以提高这种作用的效率。而转运蛋白 Ccc2p 的 *ATX1* 类似区域的表面是酸性的。因此认

为 Atx1p 与 Ccc2p 间的相互作用也是电荷间相互作用的结果<sup>[5,27]</sup>。

Atx1p 与 Ccc2p 进行金属交换反应的热力学梯度是相当小的<sup>[27]</sup>，一价铜离子的交换平衡指数是 1.4。从这种意义上说，金属伴侣蛋白的功能类似催化酶，可以降低一价铜离子转移的能量障碍，促使反应的特异发生。Atx1p 可以迅速的将铜离子转运至 Ccc2p，这种平衡在外加过量 50 倍的谷胱甘肽的条件下仍不被破坏，说明 Atx1p 还有保护一价铜离子不进行其它非特异反应的功能。

### 3.3 运送铜至细胞质中的超氧化物歧化酶 Sod1p

Cu/Zn-超氧化物歧化酶 Sod1p 的功能是通过氧化还原反应清理超氧化物离子，保护细胞不受氧化损伤。在酿酒酵母细胞内，将铜离子运送到 Sod1p 需要铜伴侣蛋白 CCS (copper chaperone for Sod1p) 的参与。酿酒酵母的 CCS 最初发现其参与赖氨酸的合成，以此被命名为 *LYS7*。*lys7* 的缺失突变株可以表达不含铜的 Sod1p，但每个 Sod1p 的二聚体仍然包含一个锌原子。酿酒酵母 CCS 伴侣蛋白的鉴定后，很快就克隆到了人类基因中的类似物，被命名为 SOD4，一种 SOD 的异构体。小鼠中的 CCS 突变后表现出严重的 Sod1p 活性的降低，说明在真核生物中 CCS 对 Sod1p 活性的必需是高度保守的<sup>[28]</sup>。

CCS 是目前为止鉴定出的最大的铜伴侣蛋白。Atx1p 和 Cox17p 是只有一个结构域蛋白，而 CCS 蛋白有 3 个功能域<sup>[29]</sup>。CCS 的 N 端区域 I 与 *ATX1* 的结构非常相似，包含 MXCXXC 铜结合位点，但是它们在功能上并不能互换。在细胞不缺铜的情况下，功能域 I 不是 CCS 功能所必需的，缺失该功能域的 CCS 分子可以正常的将铜离子传递给 Sod1p。因此推测这段 *ATX1* 类似的功能域的作用只是在极度缺铜的情况下使 CCS 的功能最大化。CCS 蛋白的中心功能域 (区域 II) 与它的靶蛋白 SOD1 同源<sup>[29-30]</sup>。二者的同源性非常高，在区域 II 中的一个点突变都可以使 CCS 变成类似 SOD 的分子，具有清除超氧化物的活性。人类的 CCS 蛋白也是如此。区域 II 不含有铜结合位点，但是与 Sod1p 相互作用所必需的。Sod1p 通常以同型二聚体的形式存在，铜在 CCS 和 SOD1 两个蛋白间转换前，SOD1 与 CCS 的功能域 II 结合形成瞬时的异型二聚体或异型四聚体<sup>[31]</sup>。并且认为在插入铜离子的过程中该功能域对酶蛋白起到保护作用。CCS 蛋白 C 端的功能域 III 是一个非常小的部分，大约有 30 个氨基酸，这一功能域对在胞内激活 SOD1p 起到至关重要的作用<sup>[29]</sup>。CCS 这

段多肽序列在不同的生物中是高度保守的，包括一段可以结合铜的保守序列 CXXC。区域 III 的晶体结构混乱，但是这段区域被认为位于 N 端功能域 I 附近，可能与 N 端的铜结合位点相呼应，直接将铜离子插入 SOD1 的活性位点。但到目前为止铜离子在这 2 个蛋白间转运的机制还不清楚。

有活性的 Sod1p 是由 2 个单体分子通过保守的半胱氨酸残基以二硫键的形式结合成二聚体，同时结合一个铜原子和一个锌原子。实验发现 CCS 有助于半胱氨酸的氧化和二硫键的异构化<sup>[32]</sup>。Sod1p 的激活还需要与铜结合的 CCS 和氧压力 ( $O_2$  或  $O_2^-$ ) 的存在。从无氧的条件转变到有氧的条件导致细胞内 Sod1p 活性的迅速升高，CCS 在这一过程中起到直接的翻译调节作用<sup>[33]</sup>。另外，线粒体内的 Sod2p 的聚积和成熟依赖于线粒体中 CCS 的表达水平<sup>[34]</sup>。

## 4 铜稳态失调与细胞的缺陷表型

在酿酒酵母中对铜离子代谢的研究也使人们不断发现和鉴定出人类基因组中与其功能类似的同源基因。如许多的 *CTR* 基因都是通过在酿酒酵母中的互补实验被发现和鉴定的。哺乳动物细胞中的 ATP7A 和 ATP7B 两个蛋白是与酿酒酵母中的 CCC2 同源的蛋白，分别在肠内细胞和肝脏细胞调节铜离子的代谢<sup>[35]</sup>。ATP7B 主要在肝脏细胞中表达，在肾脏、脑、和胎盘细胞中也有部分表达。在这些器官中 ATP7B 作为一种转运器将细胞中的铜离子转运至血浆铜蓝蛋白。ATP7B 的缺失或突变将导致一种可遗传的常染色体退行性肝脏疾病 Wilson's 疾病。这种疾病是由于胆汁排泄铜离子的功能受损导致肝脏细胞中铜离子过度集聚。ATP7A 主要在肠内上皮细胞和除了肝脏之外的其他器官中表达。ATP7A 受损将导致 Menkes 病，一种由于肠内铜离子吸收缺陷引起的铜代谢紊乱。由于肠内细胞的铜离子不能正常流出导致血液中的铜浓度降低进而导致整个机体的铜离子缺乏。

铜代谢在新型隐球酵母致病机制的作用再次引起注意，研究发现铜元素是多个致病因子生成的所必需，也是致病必要条件<sup>[7,37]</sup>。新型隐球酵母是一种感染免疫缺陷人群的条件致病真菌，至少有两个含铜蛋白 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 SOD 和漆酶 (laccase) 都是其重要的毒性因子。漆酶是一种多酚氧化酶，与底物反应形成黑色素，黑色素具有保护酵母细胞免受宿主体内免疫系统吞噬的作用。在新型隐球酵母中也发现了 P 类铜转运 ATP 水解酶的同

源基因 *CCC2*<sup>[6]</sup>。该基因的突变导致细胞黑色素形成缺陷,而在外加铜离子的情况下可以恢复漆酶活性。另外,突变菌株不能在加有铜离子或铁离子螯合剂的培养基中生长,说明菌株的铜稳态失调,导致某些含铜蛋白如高亲和铁转运蛋白 Fet3p 不能正常获得其活性所必需的铜离子,进而引起细胞铁离子吸收出现缺陷。实验中还发现,液泡(H<sup>+</sup>)-ATPase 的亚基 *VPH1* 的缺失导致细胞完全丧失漆酶活性,而外加铜离子,尤其在酸性条件下,可以恢复 $\Delta vph1$  细胞的漆酶活性,其原因是在 $\Delta vph1$  细胞中无法完成铜与漆酶的结合<sup>[7]</sup>。我们在研究发现新型隐球酵母氯离子通道基因 *clc-a* 突变株同样不具有漆酶活性,同时在缺铜的条件下 $\Delta clc-a$  细胞的 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 SOD 活性明显降低。而这些现象均与 CLC 在铜离子稳态调节中的作用相关(祝嫦巍等,未出版数据)。另外,高亲和铜转运蛋白 *CTR4*、铜应答因子 *CUF1* 等均与新型隐球酵母毒性因子的表达和致病性相关。 $\Delta ctr4$  突变株生长缓慢,荚膜变小,致病性显著降低。 $\Delta cuf1$  菌株虽然表现出荚膜增大的表形,但其致病性却显著降低<sup>[7]</sup>。说明铜稳态调节对细胞的生长和致病性均有重要的作用,而这二者之间也存在紧密联系,理论上说,铜元素的代谢调控蛋白也可以是抗真菌药的良好靶位点。

## 5 展望

铜是必需微量元素,但又有很强的细胞毒性,所以真菌的铜代谢受细胞的严格调控,因此,对铜代谢的研究对于疾病的治疗和相关药物的研发都有着重要的意义。近年来,随着铜稳态调节相关基因的鉴定以及蛋白功能的研究,人们对细胞代谢网络和蛋白的调控机制有了进一步的了解和认知,特别是真菌铜调节的研究可以帮助揭示微生物应对环境中铜浓度变化的应答机制和进化规律。

## 参考文献

- [1] Gambling L, Andersen HS, McArdle HJ. Iron and copper, and their interactions during development. *Biochemical Society Transactions*, 2008, 36 (6): 1258 – 1261.
- [2] Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS, et al. The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (21): 13786 – 13792.
- [3] Dancis A, Klausner RD, Hinnebusch AG, et al. Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10 (5): 2294 – 2301.
- [4] Georgatsou E, Alexandraki D. Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14 (5): 3065 – 3073.
- [5] Shi X, Stoj C, Romeo A, et al. Fre1p Cu<sup>2+</sup> reduction and Fet3p Cu<sup>1+</sup> oxidation modulate copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (50): 50309 – 50315.
- [6] De Freitas JM, Kim JH, Poynton H, et al. Exploratory and confirmatory gene expression profiling of mac1Delta. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (6): 4450 – 4458.
- [7] Rees EM, Thiele DJ. Identification of a vacuole-associated metalloreductase and its role in Ctr2-mediated intracellular copper mobilization. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (30): 21629 – 21638.
- [8] Nyhus KJ, Jacobson ES. Genetic and physiologic characterization of ferric/cupric reductase constitutive mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 1999, 67 (5): 2357 – 2365.
- [9] Dancis A, Yuan DS, Haile D, et al. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell*, 1994, 76 (2): 393 – 402.
- [10] Pena MM, Puig S, Thiele DJ. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (43): 33244 – 33251.
- [11] Labbe S, Zhu Z, Thiele DJ. Copperspecific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (25): 15951 – 15958.
- [12] Yamaguchi-Iwai Y, Serpe YM, Haile D, et al. Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of *FRE1* and *CTR1*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997 (28), 272: 17711 – 17718.
- [13] Heredia J, Crooks M, Zhu Z. Phosphorylation and Cu<sup>+</sup> coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (42): 8793 – 8797.
- [14] Ooi CE, Rabinovich E, Dancis A. Copperdependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO Journal*, 1996, 15 (4): 3515 – 3523.

- [5] Yonkovich J, Mckenndry R, Shi X, et al. Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (27): 23981 – 23984.
- [6] Pena MM, Puig S, Thiele DJ. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (43): 33244 – 33251.
- [7] Waterman SR, Hacham M, Hu G, et al. Role of a CUF1/CTR4 copper regulatory axis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117 (8): 794 – 802.
- [8] Hassett R, Dix DR, Eide DJ, et al. The Fe (II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 2000, 15; 351 (2): 477 – 484.
- [9] Waters BM, Eide DJ. Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (37): 33749 – 33757.
- [20] Heaton D, Nittis T, Srinivasan C, et al. Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (48): 37582 – 37587.
- [21] Horng YC, Cobine PA, Maxfield AB, et al. Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (34): 35334 – 35340.
- [22] Banting GS, Glerum DM. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase assembly protein Cox11p. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5 (5): 568 – 578.
- [23] Lin SJ, Pufahl RA, Dancis A, et al. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* *ATX1* gene in copper trafficking and iron transport. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (44): 9215 – 9220.
- [24] Fu D, Beeler TJ, Dunn TM. Sequence, mapping and disruption of *CCC2*, a gene that cross-complements the Ca<sup>2+</sup>-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu<sup>2+</sup>-ATPase subfamily. *Yeast*, 1995, 11 (3): 283 – 292.
- [25] Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, et al. Metal ion chaperone function of the soluble Cu<sup>I</sup> receptor Atx1. *Science*, 1997, 278 (5339): 853 – 856.
- [26] Banci L, Bertini I, Cantini F, et al. The Atx1-Ccc2 complex is a metal-mediated protein-protein interaction. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2 (7): 367 – 368.
- [27] Arnesano F, Banci L, Bertini I, et al. A docking approach to the study of copper trafficking proteins: interaction between metallochaperones and soluble domains of copper ATPases. *Structure*, 2004, 12 (4): 669 – 676.
- [28] Wong PC, Waqqoner D, Subramaniam JR, et al. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97 (6): 2886 – 2891.
- [29] Schmidt PJ, Rae TD, Pufahl RA, et al. Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (34): 23719 – 23725.
- [30] Schmidt PJ, Ramos-Gomez M, Culotta VC. A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (52): 36952 – 36956.
- [31] Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, et al. Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2001, 8 (9): 751 – 755.
- [32] Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO Journal*, 2004, 23 (4): 2872 – 2881.
- [33] Brown NM, Torres AS, Doan PE, et al. Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2004, 101 (15): 5518 – 5523.
- [34] Field LS, Furukawa Y, O'Halloran TV, et al. Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (30): 28052 – 28059.
- [35] Lutsenko S, Barnes NL, Barte MY, et al. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiological Reviews*, 2007, 87 (3): 1011 – 1046.
- [36] Walton FJ, Idnurm A, Heitman J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 2005 57 (5): 1381 – 1396.
- [37] Zhu X, Gibbons J, Zhang S, et al. Copper-mediated reversal of defective laccase in a Deltavph1 avirulent mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 2003, 47 (4): 1007 – 1014.

## Regulations diversity of fungal copper homeostasis-A review

Changwei Zhu, Jiao Pan, Bing Yan, Xudong Zhu\*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** Copper is an essential trace element in all organisms and serves as a catalytic cofactor for many biological processes in cells. Yet excess cuprous and cupric forms can be high toxic to the cells. Thus cells must have developed diverse mechanisms to control the uptake and distribution of copper. Much are known about the copper metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and a few other fungi. In this review, we focus on the recent research in copper uptake, transport and distribution in model organism baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as well as the new frontier in other fungi, e.g. the novel roles of copper in the pathogenesis of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*.

**Keywords:** copper; Cu/Zn SOD; copper chaperone proteins; *Saccharomyces cerevisiae*; laccase

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the Natural Science Foundation of China (50570027)

\* Corresponding author. Tel: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

Received: 9 December 2008/Revised: 17 February 2009

### 1953年创刊以来所有文章全文上网

2008年1月中旬,《微生物学报》自1953年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文!

建立全文数据库的工作是从2007年初开始的,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史悠久,其间经历了期刊的变化,变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

《微生物学报》刊、期统计表

2009年7月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 ~ 1956	半年刊	1 ~ 4	1 ~ 2
1957 ~ 1958	季刊	5 ~ 6	1 ~ 4
1959	季刊	7	1 ~ 2
1959 ~ 1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3 ~ 4
1963 ~ 1965	季刊	9 ~ 11	1 ~ 4
1966	季刊	12	1 ~ 2
1966 ~ 1972	停刊6年半		
1973 ~ 1988	季刊	13 ~ 28	1 ~ 4
1989 ~ 2007	双月刊	29 ~ 47	1 ~ 6
2008	月刊	48	1 ~ 12
2009	月刊	49	1 ~ 7