

白念珠菌 RIM101 途径与环境 pH 的应答反应

李明春 梁 勇 魏东盛 邢来君*

(南开大学微生物学系 天津市微生物功能基因组学重点实验室 天津 300071)

摘 要 :白念珠菌(*Candida albicans*)是一种重要条件致病菌,近年来引起人们的关注,大量的研究由此展开。对环境的改变积极做出应答是白念珠菌致病的重要条件。外界环境尤其是 pH 的变化影响着白念珠菌的形态和毒力。*RIM101* 途径是真菌中一种保守的信号转导途径,白念珠菌也存在 *RIM101* 途径,并且该途径至少部分地控制着细胞对 pH 的应答。这里主要综述了近年来有关白念珠菌 *RIM101* 途径、pH 应答及两者相互关系的研究。

关键词 :白念珠菌; *RIM101* 途径; pH 应答; Rim101p

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)02-0366-04

人类条件致病菌白念珠菌的生长和寄居位点处的 pH 值能够显著的变化,例如人的口腔、血液等组织部位的 pH 变化非常明显,研究表明白念珠菌能够在 pH 2 ~ 10 的范围内生长^[1]。外界 pH 是一种重要的环境信号,它能影响微生物的生长、生理、形态和分化。白念珠菌必须能够感觉并对环境中 pH 变化做出应答才能在宿主体内存活下来并表现一定的毒力。这种对碱性 pH 的应答是由保守的信号传导途径 *RIM101* 途径控制, *RIM101* 途径通过具有锌指结构的转录因子 Rim101p 来控制细胞对 pH 的应答。这里主要从白念珠菌 *RIM101* 途径、pH 应答及两者相互关系等方面进行探讨。

1 白念珠菌 RIM101 途径的特征

由外界 pH 变化所导致的转录应答在许多真菌中都有所研究。例如在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)中由碱性 pH 诱导的 IPNA 和青霉素合成基因的表达,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中 *ena1* 和 *vma4* 基因的诱导表达等^[2,3]。这些基因的表达都是由一个保守的信号转导途径所控制,该途径最早在 *A. nidulans* 中研究,在碱性条件下基因的诱导表达由转录因子 PacC 激活^[4]。随后在酿酒酵母中发现了 PacC 的同源物,称为 Rim101 蛋白^[5]。

为了识别白念珠菌中潜在的 pH 应答调节因子, Davis 等^[6]通过研究 *C. albicans* 的部分基因组数据库,找到了与酿酒酵母 *rim101* 的同源序列,并通过插入缺失突变和 PCR 介导基因敲除技术证明了 *C. albicans* Rim101p 在 pH 应答中的作用。*C. albicans* *rim101* 编码 661 个氨基酸的多肽^[7],是 *RIM101/pacC* 途径的核心成员,含有 3 个锌指结构。通过突变体的研究发现, *rim101*, *rim8/palF*, *rim9/palI*, *rim21/palH*,

rim13/palB, *rim20/palA* 的突变体的表型是一致的,而且 Rim101-405p(截短 Rim101p,是 Rim101p 的活化形式)能够使上述基因突变体的表型得到恢复,因此, Rim8p, Rim9p, Rim21p, Rim13p 是 *RIM101* 途径的上游成员,该途径被称为 *RIM101/pacC* 途径。

2 Rim101p 的加工活化过程

C. albicans Rim101p 在酸碱条件下都能够表达,但是结构和活性有所不同。在细胞中该蛋白的活性受蛋白酶解加工的控制,然而其酶解过程与酿酒酵母和构巢曲霉 Rim101p/PacC 的加工过程不同^[8]。酿酒酵母的 Rim101p 的加工活化只有一步,在蛋白水解酶 Rim13p 的作用下从 C 端水解 100 个氨基酸^[10],直接产生截短的活化形式的 Rim101p。不同于酿酒酵母,构巢曲霉的 PacC 的加工活化分为两步(1)全长形式的 PacC(74kDa)在蛋白水解酶 PalB 的作用下,变成 53kDa 的 PacC 中间体(2)该中间体再经过酶解产生只含有 3 个锌指结构的活化的 PacC 蛋白(27kDa),其中第一步酶解过程依赖碱性 pH,第二步加工为 pH 非依赖型^[9]。本文作者在研究 *C. albicans* 过程中,通过一系列的生化试验证明 *C. albicans* Rim101p 也存在不同形式的加工过程^[11]。*C. albicans* Rim101p 全长为 85kDa,在酸碱条件下都存在。在碱性 pH 时全长形式的 Rim101p 在 Rim13p 的作用下,水解去除 C 端 D/E 富集区,产生 74kDa 的截短的活化形式,同时还有少量的 Rim101p⁶⁵(表示分子量为 65kDa 的 Rim101p)。这一酶解过程依赖 pH 和 Rim13p。而在酸性条件下只产生 Rim101p⁶⁵。这种形式可能来源于 Rim101p⁷⁴ 中间体,有可能是以 Rim101p⁷⁴ 作为底物,以一种不依赖于 Rim13p 的加工过程而产生 Rim101p⁶⁵(图 1),这一说法尚需要更多的实验来证明。

基金项目: 国家自然科学基金(30570096) 教育部留学回国人员科研启动基金[教外司留(2005)546 号]

* 通讯作者。Tel: 86-22-23508506; Fax: 86-22-23508800; E-mail: xinglaij@eyou.com

作者简介: 李明春(1968-),女,天津人,教授,博士。主要从事真菌的分子生物学研究。E-mail: lmchun68@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-07-31 接受日期: 2006-08-13 修回日期: 2006-12-21

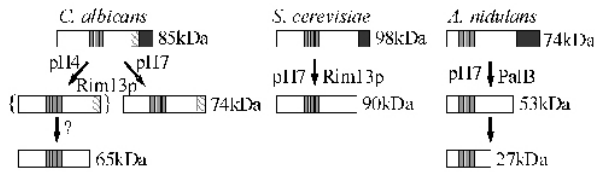


图 1 白念珠菌、酿酒酵母和构巢曲霉 Rim101p/PacC 的加工活化过程

Fig.1 Scale model of Rim101p/PacC processing in *C. albicans*, *S. cerevisiae*, and *A. nidulans*. In *C. albicans*, the processing of 74kDa depends on pH and Rim13p, 74kDa form is a substrate for a Rim13p-independent processing to produce the 65kDa form. In *S. cerevisiae* Rim101p processing depends on alkaline pH and Rim13p. In *A. nidulans*, PacC processing includes two steps: first step(pH and PalB-dependent) to produce 53kDa intermediate, then the intermediate is processed to the active 27kDa form, which is PalB-independent.

pH 依赖的 Rim101p 蛋白水解是通过一些 Rim 蛋白实现的 ,其中包括 Rim13p/PalB、Rim8p/PalF、Rim9p/Pa II、Rim21p/PalH 和 Rim20p/PalA ,这些 Rim 蛋白缺失突变都会阻止 Rim101p 的加工活化^[6]。将 rim101-405 引入突变体中并表达能够使突变体的表型得到回复。由此说明 rim 基因产物是 RIM101 途径的上游成员。Rim13p 为 calpain 蛋白酶的同源类似物 ,是 Rim101p 加工过程中的蛋白水解酶。目前仅知道 Rim8p 也参与 Rim101p 的活化 ,具体作用未知。Rim9p 和 Rim21p 为细胞膜上的跨膜蛋白 ,感受外界 pH 的变化。Rim20p 既能够与 Rim101p 的 C 末端结合 ,也能与 Snf7 蛋白结合 ,形成脚手架的结构^[10] ,从而使 Rim13p 能够准确地识别 Rim101p 上的酶解位点 ,裂解全长的 Rim101p。我们通过研究也发现在这个过程中 Snf7 蛋白起着重要作用 ,snf7Δ/Δ 突变体中 ,在 pH4 和 pH8 条件下全长形式的 Rim101p 都不能被加工活化^[12] ,因此 Snf 蛋白是 Rim101p 加工所必需的 ,证明 Snf7 蛋白也是 RIM101 途径的上游成员。最近又发现多泡体 ESCRT 复合物的一些成员也是 Rim101p 加工活化的必需蛋白^[13]。Snf7p 就是 ESCRT 复合物的成员 ,当然还有一些编码 ESCRT 复合物亚基的基因(例如 dfg16、vps20)的缺失也能导致白念珠菌不能表现碱性条件下菌丝诱导型生长 ,而且 Rim101-405p 能够使得菌丝缺陷表型得到恢复。目前 RIM101 途径成员蛋白之间的关系发现的很少 ,RIM101 途径中很可能还存在其他未知的蛋白成员。以下 3 点可以证明某种蛋白是否为 RIM101 途径的成员 :编码该蛋白的基因缺失后 , (1)在碱性 pH 条件下表现出生长缺陷 (2)碱性条件下菌丝缺陷 (3)rim 101-405 等位基因的表达能弥补由该基因缺失所造成的表型缺陷。

表 1 野生型菌株和 rim101-/- 突变株在酸碱性 pH 条件下基因表达差异比较

Table 1 Different expression in acidic and alkaline environments in Candida albicans wild-type compared with rim101-/- strains					
pH	Genotype	The number of genes of different expression			
		Alkaline-up	Alkaline-down	pH-independent	Total
4 and 8	WT	267	247	-	514
8	WT and rim101-/-	67	49	78	186
4	WT and rim101-/-	-	1	7	8

3 RIM101 途径与 pH 应答

环境中 pH 的变化能导致白念珠菌细胞形态的改变^[14] ,当 pH 从 4 升到 8 时 ,细胞由酵母型转变为菌丝型生长 ,细胞壁的成分随之发生很大的变化^[15]。这种变化是由基因表达的变化引起的。最早发现的受 pH 调节的基因是 phr1^[16]。phr1 编码一种细胞表面糖蛋白 ,在 pH 大于 5.5 时表达 ,pH 小于 5.5 时未检测到该基因的表达。phr1 的缺失导致在碱性条件下不能形成正常的菌丝型细胞 ,但在酸性条件细胞生长无影响。随后又发现 phr1 的同源基因 phr2 ,该基因在 pH 小于 5.5 时才能表达 ,phr2 的缺失能导致细胞在酸性条件下的形态缺陷。phr1 和 phr2 表达依赖于 pH 的变化 ,受到转录因子 Rim101p 的调控^[6]。在碱性条件下 ,Rim101p 抑制 phr2 的表达 ,诱导 phr1 的表达 ,酸性条件下正好相反。

那么 RIM101 途径是否控制着 pH 应答呢 ? 首先 ,通过对 rim101Δ、rim20Δ、rim8Δ、rim21Δ、rim13Δ 一系列突变株的研究发现 ,突变体在碱性条件下都表现为菌丝生长缺陷 ,这说明 RIM101 途径是适应碱性条件生长所必需的。其次在酿酒酵母中通过 Northren 杂交的方法分析^[17] ,碱性上调基因可以分为 3 种类型 (i)Rim101p 严格依赖型 (ii)Rim101p 部分依赖型 (iii)非 Rim101p 依赖型。而在白念珠菌中 ,Bensen^[18] 等通过微阵列技术研究野生型细胞在酸碱性 pH 条件下的转录变化时发现 ,在 1084 个 pH 应答基因中有 514 个基因在酸碱不同 pH 下 ,表达差异在 2 倍以上 ,其中 247 个是碱性下调基因 ,267 个为碱性上调基因。但是在研究 rim101-/- 和野生型细胞在酸碱性 pH 条件下的表达发现 ,在 pH4 时有 8 个基因表达差异在 2 倍以上 ,但其中只有 1 个基因是在 pH4 时特异性差异 ,其它 7 个基因在 pH8 时的表达差异也在 2 倍以上 ;在 pH8 时 ,有 186 个基因的表达有明显差异 ,其中碱性下调基因 49 个 ,碱性上调基因 67 个 ,78 个基因不受 pH 调节(表 1)。上述结果说明 *C. albicans* RIM101 途径通过调节基因表达的方式对 pH 变化做出应答 :RIM101 途径对酸性环境应答的作用不是很明显 ,对碱性应答存在两种途径控制 ,一种是 RIM101 途径依赖型 ,另一种是 RIM101 途径非依赖型。

那么 Rim101p 是如何调节 pH 应答基因的表达呢 ? 酿酒酵母和白念珠菌的调节方式不同。在碱性条件下 ,酿酒酵母的 Rim101p 调节菌丝的生长是通过抑制 nrg1 基因来实现的^[19]。Nrg1p 是一种转录抑制因子 ,抑制许多基因的表达。因此 Rim101p 在酿酒酵母中主要起抑制子的作用。而在白念珠菌中 ,碱性条件下野生型细胞和 nrg-/- 的生长相似 ,这说明 Nrg1p 对于碱性条件的生长不是必需的 ,而 rim101-/- 在碱

性条件下出现严重的生长缺陷^[18]。Ramón 和 William 研究发现^[20], *C. albicans* Rim101p 是一种 DNA 结合蛋白, 直接结合于碱性应答基因 *phr1* 的上游序列, 从而促进该基因的表达, 并且对其它 pH 应答基因的调节也是如此。因此 *C. albicans* Rim101p 调节 pH 应答基因的方式类似于构巢曲霉的 PacC, 直接结合在基因的上游序列, 促进基因的表达, 但结合位点的特异性不同于 PacC。

4 引发 RIM101 途径的信号

Rim101p 在酸碱条件下都能够表达, 当环境中的 pH 由酸性变为碱性时, 全长无活性的 Rim101p 在 Rim 蛋白的辅助下激活并调节相关基因的表达, 外界 pH 的变化可以通过跨膜蛋白 Rim9p 或 Rim21p 高级结构的变化将信号传递到细胞内。因而 pH 是 RIM101 途径的一种潜在信号因子。外界 pH 的变化可以引起细胞膜的成分发生重大变化, 那么是否存在其他信号用于引发 RIM101 途径呢? 在碱性条件下, 生物生长的许多营养物质(如 Fe, Cu 等)以不溶物的形式存在, 并且发现铁离子、铜离子是酿酒酵母在碱性条件下的生长限制因子^[21], 这些阳离子的饥饿也可能作为刺激白念珠菌 RIM101 途径的信号, 因为通过微阵列研究发现 Rim101p 依赖的碱性上调基因中有许多基因与铁离子的代谢有关。微生物通过进化已经获得了许多低亲和系统和高亲和系统, 用于吸收不溶形式的金属离子。白念珠菌至少存在 4 种铁获得系统^[22-23]。通过微阵列技术研究白念珠菌基因的表达变化时发现, 受 Rim101p 调节的基因中包含许多与铁代谢相关的基因, 而且 *rim101-/-* 突变体对铁离子饥饿的环境特别敏感^[18]。这些都暗示了 RIM101 途径依赖的碱性应答的一个重要作用是为了适应细胞对铁离子的饥饿。因此, 金属离子饥饿(Fe)可能是引发 RIM101 途径的信号, 目前这部分工作正在进行当中, 需要更多的实验证据来说明 Rim101p 与铁代谢相关基因之间的关系。

5 RIM101 途径, 细胞形态转变与致病性

外界 pH 控制着白念珠菌的细胞形态。在酸性条件下以酵母型生长, 碱性条件下主要以菌丝型生长, 细胞形态转变的同时, 细胞壁成分及黏附特性都发生了改变^[15]。这些应答都是由碱性条件下基因表达变化引起的。最早研究的两个与形态转变相关的基因是 *phr1* 和 *phr2*^[16-24]。在小鼠感染模型实验中^[25], 利用小鼠体内不同生境的 pH 来研究 *phr1* 和 *phr2* 及其突变株的毒力, 证明了 pH 是决定白念珠菌致病性的重要环境因子。Mitchell^[26] 研究发现白念珠菌的形态对其毒力也是非常重要的, 细胞形态学的转变严重影响着毒力。以上结果说明外界环境的 pH 与细胞形态对白念珠菌的致病性起同等重要的作用。

为了研究 rim101 途径是否影响白念珠菌的毒力, Davis 等^[27] 研究发现, 在野生型和 RIM101/*rim101*-突变型细胞的毒力相似, 而 *rim101p-/-rim101*-突变株的毒力大大下降, 这表明在小鼠感染模型中 Rim101p 是白念珠菌表达毒力所必需的, 而且 *rim101-405* 的表达能够使得突变株的毒力得到恢复。

这说明 RIM101 途径能够控制着白念珠菌的致病性。虽然突变株或在酸性条件下造成 Rim101p 不能活化, 进而不能促进 *phr1* 的表达, 但 *phr2* 仍能够表达, 并仍能够使小鼠致病, 这证明除了 RIM101 途径以外, 还存在其他方式或途径促进白念珠菌毒力因子的表达, 使得在酸性条件下白念珠菌仍可以表现致病性。

6 问题和展望

白念珠菌作为人类的一种重要致病菌, 在较大的 pH 范围内都具有致病性。RIM101 途径部分地控制了细胞的 pH 应答, 有效的促进碱性应答基因和抑制酸性应答基因的表达, 从而影响着白念珠菌的致病性。白念珠菌 pH 应答的研究对临床上治疗白念珠菌的感染和药物开发具有重要的理论和实际意义。目前, RIM101 途径成员之间的关系及其作用还不完全清楚, RIM101 途径对 pH 应答以及该途径对白念珠菌毒力的影响还需要进一步的研究, RIM101 途径的激活与铁离子代谢之间的关系等一系列的问题都给我们留下了广阔的研究空间。

致谢 本文所引用的作者的部分工作是在美国明尼苏达大学微生物学系 Dr. Dana Davis 实验室完成的, 特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Davis DA. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet*, 2003, **44**: 1-7.
- [2] Espeso EA, Penalva MA. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 28825-28830.
- [3] Suarez T, Penalva MA. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB-pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol Microbiol*, 1996, **20**: 529-540.
- [4] Arst HN, Bignell E, Tilburn J. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 1994, **245**: 787-790.
- [5] Li W, Mitchell AP. Proteolytic Activation of Rim1p, a Positive Regulator of Yeast Sporulation and Invasive Growth. *Genetics*, 1997, **145**: 63-73.
- [6] Davis DA, Wilson RB, Mitchell AP. RIM101-dependent and -independent pathways Govern pH response in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 2000, **3**: 971-978.
- [7] Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, et al. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J*, 1995, **14**: 779-790.
- [8] Penalva MA, Arst HN. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**: 426-446.
- [9] Diez E, Alvaro J, Espeso EA, et al. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc-finger transcription factor requires two proteolytic steps.

- [10] Xu W , Mitchell AP. Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* , 2001 , **183** : 6917 – 6923.
- [11] Li MC , Martin SJ , Bruno VM , *et al.* *Candida albicans* Rim13p , a pretease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryotic cell* , 2004 , **3** : 741 – 751.
- [12] Kullas AL , Li MC , Davis DA. Snf7p , a component of the ESCRT-III protein complex , is an upstream member of the rim101p Pathway in *Candida albicans* . *Eukaryotic Cell* , 2004 , **3** : 1609 – 1618.
- [13] Barwell KJ , Boysen JH , Xu W , *et al.* Relationship of DFG 16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* . *Eukaryot Cell* , 2005 , **4** : 890 – 899.
- [14] Buffo J , Herman MA , Soll DR. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans* . *Mycopathologia* , 1984 , **85** : 21 – 30.
- [15] Chiaffin WL , Lopez-ribot JL , Casanova M , *et al.* Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans* : identification , function , and expression. *Microbiol Mol boil Rev* , 1998 , **62** : 130 – 180.
- [16] Saporito-irwin SM , Birse CE , Sypherl PS , *et al.* PHR1 , a pH-regulated gene of *Candida albicans* , is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* , 1995 , **15** : 601 – 613.
- [17] Lamb TM , Xu W , Diamond A , *et al.* Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the Rim101 pathway. *J Biol Chem* , 2001 , **276** : 1850 – 1856.
- [18] Bensen ES , Samuel JM , Li MC , *et al.* Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Molecular microbiology* , 2004 , **54** : 1335 – 1351.
- [19] Lamb TM , Mitchell AP. The transcriptional factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae* . *Mol Cell Bio* , 2003 , **23** : 677 – 686.
- [20] Ramón AM , Fonzi WA. Diverged binding specificity of Rim101p the *Candida albicans* ortholog of PacC. *Eukaryotic Cell* , 2003 , **2** : 718 – 728.
- [21] Serrano R , Bernal D , Simón E , *et al.* Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J Biol Chem* , 2004 , **279** : 19698 – 19704.
- [22] Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake : the role of siderophores in iron uptake and storage. *Applied Microbiol Biotechnol* , 2003 , **62** : 316 – 30.
- [23] Santos R , Buisson N , Knight S , *et al.* Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans* : role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. *Microbiology* , 2003 , **149** : 579 – 588.
- [24] Muhlschlegel FA , Fonzi WA. PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol* , 1997 , **17** : 5960 – 5967.
- [25] Bernardis FD , Muhlschlegel FA , Cassone A , *et al.* The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans* . *Infect Immun* , 1998 , **66** : 3317 – 3325.
- [26] Mitchell AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans* . *Curr Opin Microbiol* , 1998 , **1** : 587 – 692.
- [27] DiRita VJ , Davis DA , Edwards JE , *et al.* *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* , 2000 , **68** : 5953 – 5959.

The response to environmental pH of RIM101 pathway in *Candida albicans*

LI Ming-chun , LIANG Yong , WEI Dong-sheng , XING Lai-jun *

(Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics , Department of Microbiology ,
Nankai University , Tianjin 300071 , China)

Abstract : *Candida albicans* is the most common kind of human opportunistic pathogen and gets many attentions in recent years. A lot of research has been done. The sites this organism colonizes differ in pH. *C. albicans* must be able to response to the environmental changes for its survival and pathogenicity. Extracellular environment , especially pH changes is critical for *C. albicans* morphological differentiation and virulence. RIM101 pathway is a conserved fungal signal transduction pathway and at least partly controls the cellular pH response through the activity of the zinc finger transcription factor Rim101p. This review concisely summarized recent research on RIM101 pathway , pH response and their relationship in *C. albicans* .

Keywords : *Candida albicans* ; RIM101 pathway ; pH response ; Rim101p