

烟曲霉细胞壁及其 GPI 锚定结构研究进展*

Cell Wall and GPI Structure in *Aspergillus fumigatus*

欧阳浩森, 金城

OUYANG Hao-miao, JIN Cheng

(中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101)

(State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China)

摘要:对烟曲霉而言,细胞壁不仅作为其坚硬的外骨骼保证了结构的完整性,对细胞进行保护,而且介导了真菌内部生理状态与外界环境之间的交流。由于缺乏精确快速的诊断方法且抗曲霉感染药物疗效不佳,以及烟曲霉菌株对新药耐受的不断增强,导致真菌感染的死亡率非常高。近年来,以细胞壁为药物靶点的研究越来越多。本文综述了烟曲霉细胞壁的研究进展以及与细胞壁密切相关的 GPI 锚定结构的研究现状,揭示了抗真菌新药的研制任重道远,迫切需要研究宿主菌的毒力分子机制,寻找更好的药物靶点。

关键词:烟曲霉 细胞壁 糖基磷脂酰肌醇(GPI)

中图分类号:Q936 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2014)02-0099-04

Abstract: In *A. fumigatus*, the cell wall is essential for fungal growth as well as for resisting environmental stresses. Because of absence of the effective diagnostic method and increase of the drug resistance, the lethality of fungal infection is very high. Now more and more researches were focused on the cell wall to find the possible drug targets. This article introduced the research progress of the cell wall and glycosylphosphatidylinositol(GPI) structure in *Aspergillus fumigatus*, and revealed that new drug research and development still have a long way to go.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, cell wall, glycosylphosphatidylinositol (GPI)

烟曲霉被认为是最为常见的空气传播条件致病真菌^[1~4], 将近 90% 的曲霉感染都是源自烟曲霉。国内近十年来条件致病真菌感染呈现出明显的上升趋势, 即使在治疗的情况下死亡率仍高达 80%~90%^[5~7]。因此, 迫切需要了解烟曲霉的感染机制, 为预防和治疗真菌感染奠定理论基础。由于细胞壁在保护细胞抵御恶劣环境时所起到的关键作用, 同时也由于细胞壁是真菌区别于哺乳动物的主要结构之一, 多年以来细胞壁一直作为研制抗真菌感染药物的重要靶点。

1 烟曲霉细胞壁结构研究进展

1.1 烟曲霉细胞壁结构

烟曲霉细胞壁占细胞干重的 30% 左右, 细胞壁中 90% 的成分为由各种各样的多聚糖共价结合形成的坚固的骨架结构, 其中嵌合着糖蛋白。研究表明, 烟曲霉细胞壁结构如图 1 所示, 细胞壁多糖主要由几丁质和半乳糖甘露聚糖分别通过 β -1,4 和 α -1,6 键与 β -1,3-葡聚糖的非还原端连接, β -1,6 分支的 β -1,3-葡聚糖通过与几丁质的结合而形成核心结构, 成为细胞骨架的内纤维层^[8]。这也是胞外周质的主要成分, 使得菌丝能聚集成生物被膜从而抵抗抗真菌药物。对啤酒酵母的研究发现, β -1,6 分支的 β -1,3-葡聚糖与几丁质主要是对细胞壁的刚性起作用, 而单独的 β -1,3-葡聚糖则有助于细胞壁的流动性^[9]。烟曲霉的细胞壁结构与其他真菌和酵母相比较, 既有相同点又有不同点: 分支的 β -1,3-葡聚糖是除了酿酒酵母外的其他真菌所共有的结构, 但啤酒酵母中没有几丁质成

收稿日期: 2013-09-30

作者简介: 欧阳浩森(1980-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事丝状真菌糖基化相关工作研究。

*中国科学院地台合作项目“基因组学比较分析构建乙醇发酵高产酿酒酵母菌株”资助。

分,啤酒酵母也不含有由 α -1,3-葡聚糖组成的无定形成分;烟曲霉中的甘露聚糖是作为 5 个半乳呔喃糖单元中的短侧链存在,取代了啤酒酵母中的甘露聚糖侧链。与细胞壁刚度相关的多糖三维网状结构的形成是一个非常复杂而且需要一系列酶参与的过程。这些酶参与 α -和 β -1,3-葡聚糖、几丁质、半乳甘露聚糖以及 N-,O-甘露聚糖的形成。

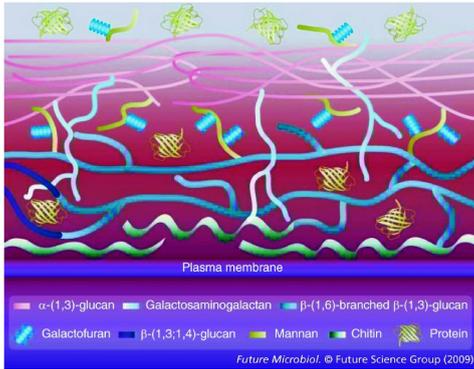


图 1 烟曲霉细胞壁结构^[8]

Fig. 1 The structure of cell wall in *Aspergillus fumigatus*

1.2 细胞壁药物靶点

近年来,以细胞壁为药物靶点的研究越来越多^[10,11]。研究发现,真菌细胞壁的修饰会影响其毒力,例如 β -1,3-葡聚糖合成酶缺失株 Δ ags3 会引起烟曲霉毒力提高,推测是黑色素合成加快导致;而与之相反的是缺失半乳呔喃糖的 Δ glfA 突变株,半乳呔喃糖的缺失使得突变株细胞壁变薄,从而使抗真菌药物的通过性比野生型提高^[10],降低侵袭性曲霉病(IA)模型中烟曲霉的毒力;此外,几丁质合成酶突变株由于菌丝生长急剧减少,其毒力相对野生型也显著下降。

针对真菌细胞壁的药物开发主要包括棘白菌素类和尼克霉素类。其中,棘白菌素类卡泊芬净(Caspofungin)是以真菌细胞壁中的 β -1,3-葡聚糖为靶点研发的一种新型的抗真菌药物,由于动物细胞没有细胞壁,卡泊芬净比针对于细胞膜中的甾醇等为靶点的两性霉素 B 和伊曲康唑有更高的专一性,也不会有细胞毒性;而且卡泊芬净破坏细胞壁之后,更利于两性霉素 B 和伊曲康唑作用于细胞膜,因此通常协同用药。研究发现,卡泊芬净处理菌丝过程中, β -1,3-葡聚糖含量减少,几丁质水平上升,同时菌丝形态也发生改变,包括萌发管分枝异常以及在细胞壁合成活跃点细胞被裂解等,此外还观察到菌丝生长的顶端和分支处膜的去极化。卡泊芬净等棘白菌素类药物几乎不影响肾功能,但可引起肝功能异常,血胆红素增高,对重度功能障碍需要停药;尼克霉素 Z

是 UDP-N-乙酰葡萄糖胺的底物类似物,能强烈抑制体内几丁质的合成,被尼克霉素 Z 处理过的曲霉菌丝,会沿着正常菌丝形成膨胀的、球状结构^[12],但是其类似物对烟曲霉并不十分有效,因此目前几丁质合成酶抑制剂尚未被引入临床应用中。

2 烟曲霉 GPI 结构研究进展

2.1 GPI 蛋白及功能

真核细胞产生细胞壁蛋白,大部分需要经过翻译后的糖基磷脂酰肌醇(GPI)修饰并被锚定在细胞表面从而发挥其生物学功能,这些蛋白称之为 GPI 锚定蛋白。根据其定位不同,又分为 GPI 锚定细胞膜蛋白(GPI-CMP)和 GPI 锚定细胞壁蛋白(GPI-CWP)。近些年,GPI 脂锚已经成为研制抗真菌药物、发展抗宿主菌策略非常有意义的一项新的热点靶点。GPI 锚定蛋白分布广泛,从原虫的包被蛋白到哺乳动物神经细胞的黏附因子^[13],很多酶(例如碱性磷酸酶、乙酰胆碱脂酶、5' 核酸酶、肾二肽酶、碳酸酐酶等)、受体、黏附蛋白、抗体均为 GPI 锚定蛋白。

2.2 GPI 锚定结构影响细胞壁合成

与大多数的其他真核生物类似,烟曲霉的细胞壁合成也与 GPI 蛋白密切相关。*Afpi*g-a 基因与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中催化 GPI 锚合成第一步反应的催化亚基 *Gpi* 3 同源,敲除该基因会导致 GPI 连接蛋白的缺失,突变株孢子萌发提前,细胞自溶,细胞壁变厚,甘露糖蛋白及 β -葡聚糖含量增加,以及在肺部感染曲霉病的小鼠模型中毒力下降^[14]。对 *Afpi*g-a 基因的启动子替换突变株的研究发现^[15],抑制条件下突变株的细胞壁发生缺陷,表现为对细胞壁干扰剂的敏感性增加,细胞壁糖蛋白及 β -葡聚糖减少;突变株中细胞壁合成相关蛋白质合成增多和 GPI 锚的减少导致了内质网胁迫。转录组分析表明,GPI 合成受阻后磷脂酰肌醇积累导致磷脂酰肌醇的合成途径被抑制,同时磷脂酰肌醇信号通路被激活;另外,磷脂酰肌醇信号通路还可激活 *PkcA/Pkc1* 及其下游的 *MpkA* 分子;磷脂酰肌醇信号途径的激活和内质网胁迫导致突变株内质网 Ca^{2+} 释放到细胞质,并激活自噬相关基因的表达,从而导致细胞发生自噬,且突变株坏死性凋亡增加。最新研究表明^[16],烟曲霉中有 115 个可能的 GPI 锚定蛋白,可通过 GPI 锚将蛋白定位于细胞质膜或与细胞壁多糖共价结合后被整合到细胞壁上,但是其 GPI 蛋白与细胞壁的锚定方式并不清楚。Bruneau 等人用磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC) 处理提取了烟曲霉的细胞膜组分,

并对其进行了蛋白质组学分析,确认烟曲霉细胞壁至少有 9 种 GPI 锚定蛋白连接在多糖骨架上,其中包括与 *S. cerevisiae* 的 Gas、Crh 以及 Ecm33 家族蛋白同源的 5 个 GPI 蛋白^[17]。GPI 锚定的 β -1,3-葡聚糖转移酶家族在真菌细胞壁葡聚糖延伸过程中发挥了重要作用,其中 *gel 2* 是维持烟曲霉毒力所必需的基因,*gel 4* 则是烟曲霉的必需基因。与 *gel 2* 不同,敲除 *ecm 33* 则会导致烟曲霉的毒力上升、孢子的萌发率上升、细胞壁中几丁质的大量富集,推测烟曲霉细胞壁组分的改变是毒力增加的主要原因。此外,对几丁质合成酶和糖基转移酶突变株的研究显示,这些突变株生长形态变化与 GPI 锚定蛋白改变相关。这些结果提示烟曲霉的 GPI 锚定蛋白与细胞壁组成相关。对烟曲霉中 4 个 GPI 锚定蛋白上的 GPI 结构进行分析发现,其 GPI 脂锚的磷脂酰肌醇基团是包含神经鞘氨醇和单水合 C24:0 脂肪酸的肌醇磷酸神经酰胺,GPI 糖链主要是一个线性的五甘露糖结构连接到葡萄糖胺残基上,其核心结构为:Man α 1-3 Man α 1-2 Man α 1-2 Man α 1-6 Man α 1-4 GlcN^[18]。根据烟曲霉中与酵母同源的 GPI 生物合成相关酶的检索结果,结合其糖链核心结构分析,预测其可能的模式结构如图 2 所示。以上研究表明,GPI 锚定细胞壁蛋白在维持细胞壁功能,以及参与其致病机制方面发挥着重要作用。

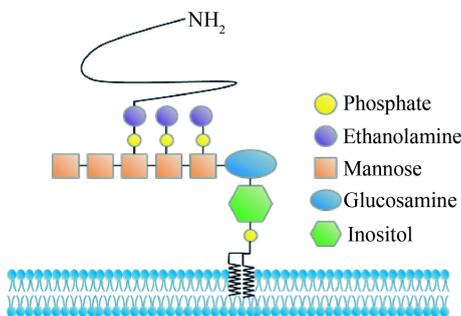


图 2 推测烟曲霉 GPI 锚的模式结构

Fig. 2 Putative structure of glycosylphosphatidylinositol in *Aspergillus fumigatus*

2.3 GPI 信号定位特点

研究发现,真菌 GPI 锚定细胞壁蛋白通过 GPI 分子的残余部分与细胞壁结合。对酵母细胞膜定位 GPI 蛋白和细胞壁定位 GPI 蛋白的氨基酸序列分别进行生物信息学分析发现,存在于“ ω -”区域一侧的长的富含丝氨酸和苏氨酸的氨基酸序列以及 2 个碱性氨基酸序列在决定 GPI 蛋白的最终定位上具有重要影响,其中前者对 GPI 蛋白定位的作用优先于后者^[19]。如果“ ω -”一侧存在 2 个碱性氨基酸,那么 GPI 蛋白将可能锚定在细胞膜上;反之则定位在细胞

壁。但即使“ ω -”一侧存在 2 个碱性氨基酸,如果丝氨酸富集区同时存在,那么该蛋白质将很可能定位在细胞壁,而不是细胞膜。酵母 GPI 蛋白的细胞定位分拣机制已经得到大部分研究人员的认可和实验支持,而丝状真菌中的分拣机制仍在深入研究中。目前的结果表明,丝状真菌决定细胞定位的信号同样存在于 C 端的 GPI 结合结构域。然而,最新研究表明烟曲霉的 GPI 蛋白定位信号与酵母存在着较大差异,位于 ω -1 和 ω -2 位的单碱性氨基酸就能使得 GPI 锚定蛋白定位于细胞质膜^[20]。尽管细胞壁定位信号并未鉴定,但对 GPI 锚定细胞壁蛋白 AfMP1 的研究表明,蛋白质 C 端的丝氨酸和苏氨酸富集区对其细胞壁定位并不是必需的^[19]。利用 GPI 蛋白这一锚定特点,Ouyang 等^[21]已经构建丝状真菌细胞表面展示系统,并成功将外源蛋白分别表达在烟曲霉和里氏木霉细胞表面(见图 3)。

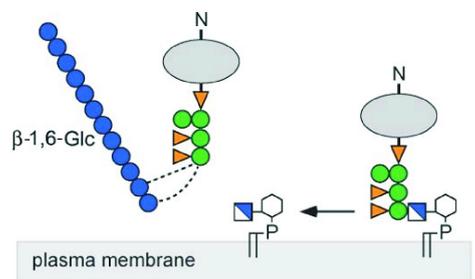


图 3 酵母 GPI 锚与细胞壁的结合^[21]

Fig. 3 Linkage structure between GPI anchored proteins and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*

文献报道,大多数的 GPI 蛋白都是通过 β -葡聚糖共价结合在细胞壁上^[22],但是在曲霉中并非如此^[23,24]。丝状真菌 GPI-CWPs 与细胞壁中多聚糖的具体连接方式尚未确定,但它们同样可以被氢氟酸或者氢氟酸-吡啶作用释放出来,因而推测它们的连接方式应当与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的相同,即通过残留的 GPI 部分以磷酸二酯键连接在 β -1,6-葡聚糖上。然而,Latge 等人研究推测烟曲霉 GPI 蛋白仅参与细胞壁生物合成,而并非像酵母那样,与细胞壁糖链共价结合并参与细胞壁三维网状结构的构建。Bernard 等^[23]对烟曲霉 GPI 细胞壁蛋白 PhoAp 的研究发现,其 C 末端并不存在 β -1,6-葡聚糖,也未发现其他共价结合的多糖,对其蛋白序列分析,发现存在大量潜在的 N 糖基化位点,推测高甘露糖基化有利于蛋白与细胞壁上 β -1,3-葡聚糖的结合。尽管烟曲霉中并未发现与 GPI 蛋白 AfPhoAp 共价结合,但是 5 个与细胞壁糖蛋白交联相关的 CRH 家族同源蛋白已经被鉴定,对其单基因敲除发现并无明显生长表型变化^[23]。Ouyang 等^[20]对 GPI

信号肽研究中发现 GPI 细胞壁蛋白 AfMp1 能与细胞壁共价结合,而且该蛋白没有 N 糖基化修饰,仅存在 GPI 和 O 糖基化修饰,其与细胞壁连接的具体方式仍不清楚,推测存在着与 AfPhoAp 不同的另外一套细胞壁蛋白结合方式。

3 展望

目前,抗真菌药物的消耗已经成为医院里第二乃至最高的花销。然而,一方面由于缺乏精确快速的诊断方法导致治疗被延误,抗曲霉感染药物疗效不佳,另一方面烟曲霉对新药耐受的不断增强而新药研制的速度却跟不上,导致真菌感染的死亡率非常高。这些事实均说明抗真菌新药的研制任重道远。通过对与毒力密切相关的烟曲霉细胞壁以及 GPI 锚的研究,将更好的阐明宿主菌的毒力分子机制,也加深了对丝状真菌 GPI 糖基化这一过程的认识,为寻找合适的药物靶点提供理论依据,并有助于研制新型抗真菌感染药物。

参考文献:

[1] Bodey G P, Vartivarian S. *Aspergillois* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1989, 8(5): 413-437.

[2] Dixon D D, Walsh T J. Human pathogenesis[M]//Bennet J W, Klitch M A(ed.). *Aspergillus*. Biology and Industrial Application. Butterworth-Heinemann, Boston, Mass, 1992; 249-267.

[3] Kurup V P, Kumar A. Immunodiagnosis of aspergillois [J]. Clin Microbiol Rev, 1991, 4(4): 439-456.

[4] Latgé J P, Paris S, Sarfati J, et al. Infectivity of *Aspergillus fumigatus* [M]. Vanden Bossche, H. et al, (ed.), In Host-Fungus Interplay, National Foundation for Infectious Diseases, 1997; 99-110.

[5] Denning D A, Lipshy K A. Missed pathology following laparoscopic cholecystectomy; a cause for concern? [J]. Am Surg, 1995, 61(2): 117-120.

[6] Denning D W. Therapeutic outcome in invasive aspergillois [J]. Clin Infect Dis, 1996, 23(3): 608-615.

[7] Groll A H, Shah P M, Mentzel C, et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital [J]. J Infect, 1996, 33(1): 23-32.

[8] Gastebois A, Clavaud C, Aïmanianda V, et al. *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization [J]. Future Microbiol, 2009, 4(5): 583-595.

[9] Rees D A, Morris E R, Thom D, et al. Shapes and interactions of carbohydrate chains [M]. New York: Academic Press, 1982; 196-290.

[10] Schmalhorst P S, Krappmann S, Verweeke W, et al. Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* [J]. Eukaryot Cell, 2008, 7(8): 1268-1277.

[11] Paris S, Debeauvais J P, Cramer R, et al. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1581-1588.

[12] Steinbach W J, Cramer R A, Perfect B Z, et al. Calcineurin inhibition or mutation enhances cell wall inhibitors against *Aspergillus fumigatus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(8): 2979-2981.

[13] Ferguson M A. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research [J]. J Cell Sci, 1999, 112(17): 2799-2809.

[14] Li H, Zhou H, Luo Y, et al. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence [J]. Mol Microbiol, 2007, 64(4): 1014-1027.

[15] Yan J H, Du T, Zhao W, et al. Transcriptome and biochemical analysis reveals that suppression of GPI-anchor synthesis leads to autophagy and possible necroptosis in *Aspergillus fumigatus* [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59013.

[16] De Groot P W, Brandt B W. ProFASTA; a pipeline web server for fungal protein scanning with integration of cell surface prediction software [J]. Fungal Genet Biol, 2012, 49(2): 173-179.

[17] Bruneau J M, Magnin T, Tagat E, et al. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis [J]. Electrophoresis, 2001, 22(13): 2812-2823.

[18] Fontaine T, Magnin T, Melhert A, et al. Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins [J]. Glycobiology, 2003, 13(3): 169-177.

[19] Frieman M B, Cormack B P. The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall [J]. Mol Microbiol, 2003, 50: 883-896.

[20] Ouyang H, Chen X M, Lü Y, et al. One single basic amino acid at ω -1 or ω -2 site is a signal that retains glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored protein in plasma membrane of *Aspergillus fumigatus* [J]. Eukaryotic Cell, 2013, 12(6): 889-899.

[21] 苏建臣, 欧阳浩森, 赵婉, 等. 里氏木霉细胞表面表达系统的构建 [J]. 微生物学报, 2013, 53(1): 38-46.

Su J C, Ouyang H M, Zhao W, et al. Construction of a cell-surface expression system in *Trichoderma reesei* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(1): 38-46.

[22] de Groot P W, de Boer A D, Cunningham J, et al. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesions [J]. Eukaryotic Cell, 2004, 3: 955-965.

[23] Latgé J P, Mouyna I, Tekaiia F, et al. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* [J]. Med Mycol, 2005, 43 Suppl 1, S: 15-22.

[24] Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, et al. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus* [J]. Microbiology, 2002, 148(9): 2819-2829.

(责任编辑:陆雁)