

# 真菌几丁质合酶的研究进展

冯贻安 崔志峰\*

(浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310032)

**摘要:** 真菌细胞壁几丁质的合成是一个复杂的过程, 其关键酶为几丁质合酶(CS)。近年来, 丝状真菌中的 CS 研究有了大的突破, 与酿酒酵母中只有 3 种 CS 不同, 丝状真菌中存在 7 种类别的 CS。大部分临床和农业中重要的病原真菌都是丝状真菌, 文中对真菌中 7 种类别 CS 的结构和功能作了概述, 重点讨论了丝状真菌中重要的 CS 类别, 并介绍了 CS 作为抗真菌药物有效靶标的研究现状, 旨在为研究真菌 CS 及其抑制剂提供参考。

**关键词:** 真菌细胞壁, 几丁质合酶, 基因敲除, 感染性

## Progress in the Studies of Fungal Chitin Synthases

FENG Yi-An CUI Zhi-Feng\*

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)

**Abstract:** Chitin is one of the most important component in fungal cell wall. Biosynthesis of chitin is a complex processes and needs several chitin synthase isoenzymes. The knowledge of structure, function and regulation of chitin synthases is mainly derived from the study of *Saccharomyces cerevisiae*. In contrast with the 3 chitin synthases in *S. cerevisiae*, 7 were found in most filamentous fungi. In this review the classification and function of chitin synthases are summerized, and progress in the studies on chitin synthases of filamentous fungi which are of theoretical or medical or agricultural importance, including *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* and *Ustilago maydis* are emphasized. Recent advance of research on chitin synthase as antifungal target is also discussed.

**Keywords:** Fungal cell wall, Chitin synthase, Gene disruption, Virulence

真菌细胞壁是真菌细胞外的重要结构, 主要由葡聚糖, 甘露聚糖和几丁质等组成, 为真菌抵御渗透压和机械力等提供保护<sup>[1]</sup>。几丁质作为细胞壁的重要成分之一在含量上随菌种的不同而有较大差别, 在酿酒酵母中占细胞壁干重的 1–2%, 在构巢曲霉中可达 20%。同一菌种的细胞壁几丁质含量也会随着其基因变化和生理状态的不同而改变, 例如在 FKS1 缺失的酿酒酵母突变株中其细胞壁的几丁质

含量明显增加<sup>[2]</sup>。

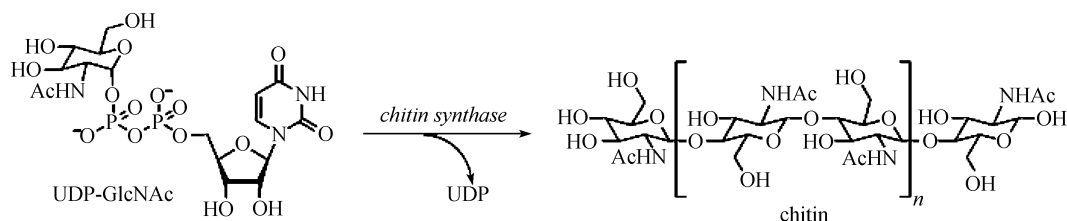
几丁质合成是一个复杂的过程, 其关键酶为几丁质合酶(chitin synthase, CS)。几丁质合酶(CS)(EC 2.4.1.16)的作用是催化二磷酸基 N-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)形成 $\beta$ -1,4-键连接的线状纤维素样聚合物, 称为几丁质。

在不同的真菌中存在一种至多种类别的 CS 同功酶<sup>[3,4]</sup>。这些同功酶在维持细胞壁完整性, 菌丝

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No.2003CB114400)

\* 通讯作者: Tel: 0571-88320741; 信箱: zfcui@zjut.edu.cn

收稿日期: 2007-05-18; 接受日期: 2007-09-07



正常生长和无性孢子产生等方面起重要作用<sup>[5,6]</sup>。在致病真菌中还发现一些 CS 基因的缺失会使菌株的生长速率和感染能力同时减弱<sup>[7]</sup>。由于在动物和植物中不存在几丁质, CS 被认为是抗真菌药物的理想靶标。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)CS 的分子生物学研究发现, 存在 3 种 CS 结构基因(*Scchs1*、*Scchs2* 和 *Scchs3*)编码 CS1, CS2 和 CS3, 分别在酵母细胞分裂后的修复、初级隔膜的形成和几丁质环及侧壁几丁质合成中起作用<sup>[8]</sup>。近年来丝状真菌中的 CS 研究有了大的突破, 研究发现大部分丝状真菌具有 7 种类别的 CS。本文对这 7 类 CS 的结构特点和作用模式作了综述, 重点讨论了丝状致病真菌中重要的 CS 类别, 并介绍了 CS 作为抗真菌药物有效靶标的研究现状, 旨在为研究真菌 CS 及其抑制剂提供参考。

## 1 真菌几丁质合酶基因

在模式真菌酿酒酵母中存在 3 个 CS 结构基因, *Scchs1*、*Scchs2* 和 *Scchs3*, 分别编码 CS1, CS2, CS3<sup>[8]</sup>。假丝酵母(*Candida albicans*)是临床上重要的人体条件致病菌, 一直以来人们都认为该菌中仅含有 3 种 CS 结构基因, *Cachs1*, *Cachs2* 和 *Cachs3*。直至 *Cachs8* 的发现才证明该菌株中共有 4 个结构基因存在<sup>[9]</sup>。

丝状真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)是模式真菌, 在该菌中至少存在 6 个 CS 结构基因, 分别命名为 *AnchsA*, *AnchsB*, *AnchsC*, *AnchsD*, *AnchsM* 和 *AnchsB*<sup>[10]</sup>。烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)也是临床上重要的人体条件致病真菌, 至今已经从烟曲霉中扩增了 7 个 CS 结构基因, 分别命名为 *AfchsA*, *AfchsB*, *AfchsC*, *AfchsD*, *AfchsE*, *AfchsF* 和 *AfchsG*<sup>[11]</sup>。灰霉(*Botrytis cinerea*)是一种重要的植物致病真菌, 变异性极强。目前已经发现在该菌中至少有 8 个 CS 结构基因存在, 分别命名为 *Bcchs*, *Bcchs*, *Bcchs*, *Bcchs*, *Bcchs*, *Bcchs*, *Bcchs*, *Bcchs*<sup>[12]</sup>。

其它如玉米黑粉菌<sup>[13]</sup> (*Ustilago maydis*)、禾柄锈

菌<sup>[14]</sup> (*Puccinia graminis*)、*Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*<sup>[15]</sup>、镰刀菌<sup>[16]</sup> (*Fusarium oxysporum*)米曲霉<sup>[17]</sup> (*Aspergillus oryzae*)等多种重要真菌中都已经开展了 CS 的分子生物学研究。目前研究的重点正在从模式真菌转向致病真菌, 对其中与致病性相关的几丁质合酶基因正在加紧进行基因克隆以及功能分析的研究。

## 2 几丁质合酶的分类与结构

### 2.1 几丁质合酶的分类

目前已经测序的 CS 基因有上百种, 根据其推定的氨基酸序列特征及相似性可以将之归为 7 类。本文通过 clustal X 软件对几种在理论、临床和农业上重要真菌的 CS 基因作了比对分析(图 1)。

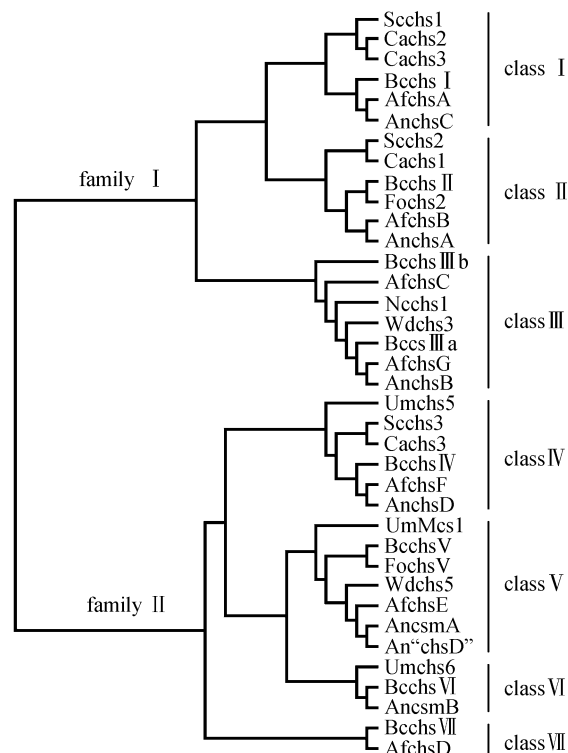


图 1 几种重要真菌几丁质合酶分类树

Fig. 1 The phylogenetic tree of fungal chitin synthases  
An: *Aspergillus nidulans*; Af: *Aspergillus fumigatus*; Bc: *Botrytis cinerea*; Ca: *Candida albicans*; Nc: *Neurospora crassa*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Um: *Ustilago maydis*; Wd: *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*

从图 1 可以发现酿酒酵母 CS 基因 *Scchs1*、

*Scchs2* 和 *Scchs3* 分属于 , , 类。假丝酵母 CS 基因 *Cachs1*, *Cachs2*, *Cachs3* 和 *Cachs8* 分属于 , , 类。而丝状真菌(如构巢曲霉和灰霉等)的 CS 基因不仅包括与酵母 CS 相似的 , , 类, 还包含在酵母中不存在的类别 , , , 类。

## 2.2 几丁质合酶的结构

CS 是膜结合蛋白, 由于膜结合蛋白提取纯化难度大, 难以得到蛋白质晶体, 因此 CS 至今尚未有 X-射线的三维结构的直接证据。目前对 CS 结构的理解主要依赖于对其氨基酸序列的分析。

通过 NCBI 的 Blast 和 TMHMM 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)对丝状真菌

的 到 类 CS 基因的氨基酸序列进行结构域分析和跨膜域预测, 得到 CS 结构的示意图(图 2)。可以发现家族 I (family I) 包括 , , 类 CS 都含有催化结构域 (Chitin\_synth\_1) 和多次跨膜域 (multi-transmembrane domain, MTM)。而家族 II (family II) 包括 , , 类含有催化结构域 2 (Chitin\_synth\_2) 和细胞色素 b5 结构域 (cyt-b5), 其中 , 类还含有肌动蛋白头结构域 (Myosin motor head)<sup>[12]</sup>。

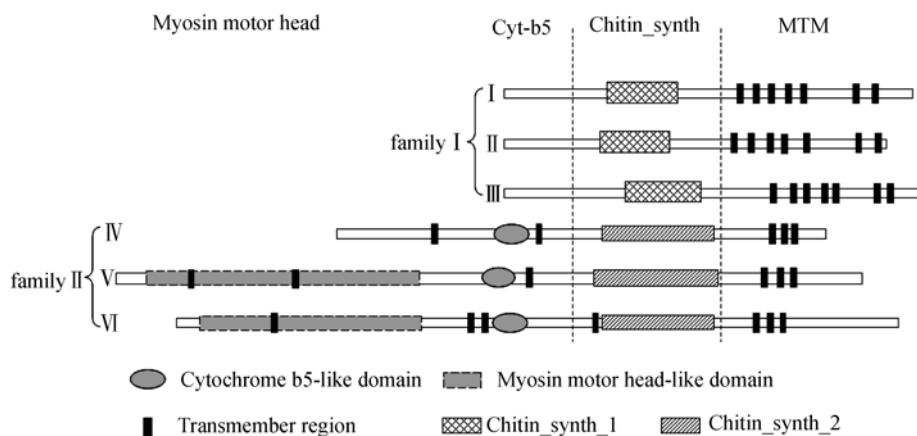


图 2 真菌几丁质合酶的结构示意图

Fig. 2 Characterization of the structure of fungal CS

## 3 几丁质合酶的生物学功能

酿酒酵母 CS 的功能是目前研究得最清楚的, CS3 ( 类)在细胞周期开始时, 在细胞出芽位点处合成几丁质环; CS2 ( 类)在有丝分裂末期, 在母细胞和子细胞之间合成初级隔膜; 而 CS1 ( 类)则是在细胞分裂后起修复损伤作用<sup>[8]</sup>。假丝酵母 CS 的功能与酿酒酵母相似, 类(*Cachs3p*)是主要的 CS 参与大部分几丁质的合成, 类(*Cachs1p*)参与细胞隔膜的合成, 类可能与修复损伤有关<sup>[9]</sup>。

与酵母相比, 丝状真菌中存在更多类别的 CS 同功酶。丝状真菌中 、 、 、 类 CS 基因的单基因敲除通常不会导致明显表型缺陷, 但是 、 或 类 CS 单个基因的敲除却往往能导致菌株表型的明显缺陷, 说明在丝状真菌中 、 、 类 CS 扮演重要的角色<sup>[7,10,11]</sup>。

构巢曲霉的 类 CS 基因(*AnchsB*)在整个发育过程中都表达, *AnchsB* 敲除后导致菌株生长速率减

慢、不产孢子、菌丝尖端膨大和侧壁异常等表型缺陷, 并且不能通过添加渗透稳定剂来挽回<sup>[18]</sup>。但是在 *W. dermatitidis* 中的 类 CS 基因的敲除仅使 CS 活性有所下降, 但生长速率、形态、毒力、几丁质含量等都不受影响<sup>[19]</sup>。烟曲霉中存在两个 类 CS 基因 *AfchsC* 和 *AfchsG*, *AfchsG* 的敲除会使菌株产生明显的表型缺陷, 而 *AfchsC* 敲除的表型与野生型无异<sup>[20]</sup>, 表明在某些丝状真菌中存在两个相似的 类 CS 基因, 而仅有一种 类 CS 基因在生命活动中起重要作用。

通过对构巢曲霉 类 CS 基因(*AncsmA*)的研究发现, 该基因在低渗条件下表达量高, 而在高渗条件下则几乎不表达<sup>[6]</sup>。*AncsmA* 基因敲除后菌株在低渗萌发时容易裂解, 菌丝沿长度方向膨胀、形成空泡, 对几丁质结合染料及抑制剂敏感, 产生内生菌丝等缺陷, 而这些表型缺陷能通过添加渗透稳定剂来部分挽回<sup>[6,21]</sup>。由此可以推测, 类 CS 的功能是维持细胞壁的完整性, 并在低渗条件下起尤为关键

的作用。

类与 类 CS 基因具有类似的结构,但是目前对 类 CS 基因的研究相对较少。在构巢曲霉中发现 类与 类 CS 的功能类似,同时敲除 类与 类 CS 基因的构巢曲霉是致死的<sup>[10]</sup>。在玉米黑粉菌中,单独敲除 或 类 CS 基因都不会使菌株产生明显的表型缺陷,而同时敲除 或 类 CS 基因会导致突变株膨胀,表明 类 CS 在功能上与 类部分重复,并在维持细胞壁完整性中起作用<sup>[13,22]</sup>。

#### 4 几丁质合酶与致病性的关系

在致病真菌中 CS 不仅对维持细胞生长起重要作用,还与致病能力有密切关系。玉米黑粉菌的 8 个 CS 基因中, *Ummcs1*、*Umchs5*、*Umchs6* 和 *Umchs7* 的缺失都会导致菌株感染能力下降,尤其是 *Ummcs1*( 类)或 *Umchs6*( 类)的缺失几乎使菌株失去对玉米的感染力<sup>[13,22]</sup>。而 *Umchs7*( 类)、*Umchs5*( 类)敲除导致毒力下降说明在二态菌玉米黑粉菌中, 类 CS 基因可能在酵母态中起重要作用<sup>[13]</sup>。Soulie 等分别将灰霉的 *Bcchs* ( 类)和 *Bcchs a*( 类)敲除后,发现这两个基因缺失都会导致菌株致病能力的下降,其中 *Bcchs a* 敲除后的致病能力下降更为明显<sup>[7,24]</sup>。假丝酵母的 *Cachs1* 的条件突变株在该基因受抑制条件下失去毒性<sup>[25]</sup>。烟草曲霉 *AfchsC* 缺陷后致病能力与野生型相同,而同时敲除 *AfchsC*、*AfchsG* 会使致病能力下降 70%,表明 *AfchsC* 在生物学功能和致病能力中都不起作用,而 *AfchsG* 则在两个方面都起重要作用<sup>[20]</sup>。在 *W. dermatitidis* 中只有 *Wdchs5*( 类)的缺失才导致菌株在 37 致病能力的下降<sup>[15]</sup>。镰刀菌的 *Fochs2*( 类)和 *Fochs* ( 类)缺失都会使菌株致病能力下降,其中 *Fochs* 的缺失几乎导致菌株致病能力丧失<sup>[16,26]</sup>。

多种类别的 CS 基因敲除都会导致致病真菌的毒力下降,表明真菌毒力与 CS 存在着较为复杂的关系。但对玉米黑粉菌、灰霉和镰刀菌等致病菌中的 CS 与致病能力相关性研究发现不同类别 CS 基因缺失导致毒力下降的程度各异,其中 、 和 类 CS 缺失导致的毒力下降更为明显,表明在致病能力中这三类 CS 也同样起关键作用<sup>[7,13,16,22]</sup>。

#### 5 展望

真菌细胞壁被认为是抗真菌药物的理想靶标,

抗真菌药物的开发是目前的研究热点之一。研究发现在酿酒酵母中不同的 CS 同功酶对药物的敏感性不同,如尼克霉素(nikkomycin Z)对 CS3 有较好的抑制效果,而 CS2 则对其有抗性<sup>[27]</sup>。最近发现在植物提取物中,厚朴(*Magnolia obovata*)中的 obovatols、东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)中的儿茶酸、山楂(*Crataegus pinnatifida*)中的熊果酸都对 CS2 有比较明显的抑制效果,其中熊果酸对 CS2 的 IC<sub>50</sub> 低至 1.8 μM<sup>[28]</sup>。因此,同时使用上述两类抑制剂可能会极大的提高防治真菌感染效果。

真菌细胞壁几丁质合成是一个复杂的过程,并且大部分临床和农业中重要的病原真菌都是丝状真菌,而丝状真菌的 CS 种类更多,作用机制更为复杂。目前国内对丝状真菌 CS 的研究仍较少,对这些重要病原真菌中 CS 基因及其调控机理的研究必将极大的促进新型抗真菌药物的研制和发展。

#### 参 考 文 献

- [1] Frans MK, Pieterella M, Klaas H, *et al.* Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, **26**(3): 239–256.
- [2] Garcia-Rodriguez LJ, Trilla JA, Castro C, *et al.* Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 2000, **478**(1–2): 84–88.
- [3] 李秀峰, 庄佩君, 唐振华. 真菌中的几丁质合成酶. 世界农药, 2000, **22**(5): 33–38.
- [4] Roncero C. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet*, 2002, **41**(6): 367–378.
- [5] Fujiwara M, Ichinomiya M, Motoyama T, *et al.* Evidence That the *Aspergillus nidulans* Class I and Class II Chitin Synthase Genes, *chsC* and *chsA*, Share Critical Roles in Hyphal Wall Integrity and Conidiophore Development. *J Biochem*, 2000, **127**(3): 359–366.
- [6] Yamada E, Ichinomiya M, Ohta A, *et al.* The class V chitin synthase gene *csmA* is crucial for the growth of the *chsA chsC* double mutant in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69**(1): 87–97.
- [7] Soulie MC, Perino C, Piffeteau A, *et al.* *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (*Bcchs3a*). *Cellular Microbiology*, 2006, **8**(8): 1310–1321.
- [8] Schmidt M. Survival and cytokinesis of *Saccharomyces*

- cerevisiae* in the absence of chitin. *Microbiology*, 2004, **150**(10): 3253–3260.
- [9] Munro CA, Whitton RK, Hughes HB, *et al.* *CHS8* — a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, **40**(2): 146–158.
- [10] Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, *et al.* *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases *CsmA* and *CsmB*, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Molecular Microbiology*, 2006, **59**(5): 1380–1394.
- [11] Mellado E, Dubreucq G, Mol P, *et al.* Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (*chsG*-/*chsE*-) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, **38**(1): 98–109.
- [12] Choquer M, Boccara M, Goncalves IR, *et al.* Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur J Biochem*, 2004, **271**(11): 2153–2164.
- [13] Weber I, Assmann D, Thines E, *et al.* Polar Localizing Class V Myosin Chitin Synthases Are Essential during Early Plant Infection in the Plant Pathogenic Fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 2006, **18**(1): 225–242.
- [14] Broecker K, Fehser S, Moerschbacher BM. Survey and expression analysis of five new chitin synthase genes in the biotrophic rust fungus *Puccinia graminis*. *Curr Genet*, 2006, **50**(5): 295–305.
- [15] Liu HB, Kauffman S, Becker JM, *et al.* *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* WdChs5p, a Class V Chitin Synthase, Is Essential for Sustained Cell Growth at Temperature of Infection. *Eukaryotic Cell*, 2004, **3**(1): 40–51.
- [16] Madrid MP, Di Pietro A, Roncero MI. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol Microbiol*, 2003, **47**(1): 257–266.
- [17] Muller C, Hjort CM, Hansen K, *et al.* Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*, 2002, **148**(12): 4025–4033.
- [18] Lee JI, Choi JH, Park BC, *et al.* Differential expression of the chitin synthase genes of *Aspergillus nidulans*, *chsA*, *chsB*, and *chsC*, in response to developmental status and environmental factors. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, **41**(6): 635–646.
- [19] Wang Z, Szaniszlo PJ. *WdCHS3*, a gene that encodes a class III chitin synthase in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, is expressed differentially under stress conditions. *J Bacteriol*, 2000, **182**(4): 874–881.
- [20] Mellado E, Aufauvre-Brown A, Gow NAR, *et al.* The *Aspergillus fumigatus chsC* and *chsG* genes encode Class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol*, 1996, **20**(3): 667–679.
- [21] Takeshita N, Ohta A, Horiuchi H. *csmA*, a gene encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain of *Aspergillus nidulans*, is translated as a single polypeptide and regulated in response to osmotic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **298**(1): 103–109.
- [22] Garcera-Teruel A, Xoconostle-Cazares B, Rosas-Quijano R, *et al.* Loss of virulence in *Ustilago maydis* by *Umchs6* gene disruption. *Res Microbiol*, 2004, **155**(2): 87–97.
- [23] Horiuchi H, Fujiwara M, Yamashita S, *et al.* Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol*, 1999, **181**(12): 3721–3729.
- [24] Soulie MC, Piffeteau A, Choquer M, *et al.* Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene *Bcchs1* results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genet Biol*, 2003, **40**(1): 38–46.
- [25] Munro CA, Winter K, Buchan A, *et al.* *Chs1* of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol*, 2001, **39**(5): 1414–1426.
- [26] Martin-Udiroz M, Madrid MP, Roncero MI. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology*, 2004, **150**(10): 3175–3187.
- [27] Gaughran JP, Lai MH, Kirsch DR, *et al.* Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 in vitro and in vivo. *J Bacteriol*, 1994, **176**(18): 5857–5860.
- [28] Behr JB. Chitin Synthase As an Antifungal Target Recent Advances. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents*, 2003, **2**(2): 173–189.