

白念珠菌胞内铁离子存储转运系统的研究进展

钱柯帆 董义杰 徐宁 喻其林 邢来君 李明春*

(南开大学 微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

摘要: 白念珠菌是一种常见的条件致病性真菌。为了在宿主体内复杂的铁离子微环境中定居、生长和繁殖, 该菌在长期的进化过程中演化出一系列复杂的铁离子稳态调控网络, 包括位于细胞膜表面的铁离子吸收系统和位于细胞内的铁离子储存、转运及利用系统。本文结合课题组研究工作, 简要综述近几年关于铁离子吸收、储存及转运机制的研究进展, 主要关注细胞内铁离子的储存、转运, 尤其是线粒体在胞内铁离子代谢及稳态维持方面的作用。

关键词: 白念珠菌, 胞内铁离子稳态, 线粒体

Research advances of cellular iron transport and storage in *Candida albicans*

QIAN Ke-Fan DONG Yi-Jie XU Ning YU Qi-Lin XING Lai-Jun LI Ming-Chun*

(Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: *Candida albicans* is one of the most important opportunistic pathogens. In order to adapt to the various ecological niches of the host, *Candida albicans* has evolved a variety of sophisticated metabolic strategies to maintain iron homeostasis, including multiple iron acquisition systems that target the cell membranes, and the mechanisms that coordinate intracellular iron trafficking. Here, combined with our study, we review the research advances of iron acquisition, storage and transportation strategies in recent years, focusing on intracellular iron storage and transport, especially the roles of mitochondria in cellular iron metabolism and homeostasis.

Keywords: *Candida albicans*, Intracellular iron homeostasis, Mitochondria

白念珠菌作为一种常见的条件性致病真菌, 因其极高的感染率和致死率及其复杂的耐药性存活机制逐渐成为国内外研究的热点。铁离子作为生命体必需的营养元素之一, 对细胞的正常发育和生长具有至关重要的作用。由于真核生物缺少细胞膜铁离子泵出系统, 而且正常情况下外环境铁离子多以

非生物可利用性状态存在, 因此白念珠菌逐渐演化出一系列严谨的铁离子获得、储存及转运系统来维持胞内铁离子的动态平衡^[1]。近年来, 白念珠菌铁离子获得及调控系统的研究取得了较大的进展, 一系列铁离子稳态相关基因和转录因子被鉴定出来, 重要基因的功能已逐渐得到阐释。但是胞内铁离子

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070126, 81171541); 天津自然科学基金项目(No. 13JCYBJC20700)

*通讯作者: Tel: 86-22-23508506; Fax: 86-22-23508800; 信箱: nklimingchun@163.com

收稿日期: 2013-10-24; 接受日期: 2013-12-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-11

储存转运系统的研究仍处于初级阶段。有趣的是,近期的研究证实线粒体在细胞内铁离子代谢及稳态维持方面具有重要的作用^[2]。线粒体作为细胞内能量转换的场所,对生命体的生长和存活至关重要,因此关于线粒体中铁离子代谢过程及其在细胞内铁离子稳态方面的研究将进一步丰富我们对于白念珠菌铁应答调控通路的认识。本文结合我们实验室的工作,对白念珠菌铁离子吸收系统及胞内铁离子储存、转运机制进行综述,着重概述了线粒体内铁离子代谢过程及其在细胞内铁稳态维持方面的研究进展。

1 白念珠菌胞外铁离子吸收系统

真核生物中铁离子吸收系统的研究多以酿酒酵母为模式生物展开。由于人体中铁离子多以铁蛋白、转铁蛋白及乳铁蛋白的形式存在,这种天然的低铁环境使白念珠菌进化出一套比酿酒酵母更加复杂的铁离子吸收、储存和利用机制。近年来,白念珠菌在宿主微环境中的铁离子获得途径得到了较为系统的研究,但许多重要组分的生物学功能仍需进一步阐释。白念珠菌主要存在3种铁离子获得系统:还原型铁吸收系统(The reductive uptake system),铁载体吸收系统(The siderophore uptake system)和血红素铁吸收系统(The heme-iron uptake system)。这三种系统对于白念珠菌在低铁环境下的存活、定殖和致病过程具有非常关键的作用,统称为高亲和铁离子吸收系统(High-affinity iron acquisition systems, HAIU)^[3-5]。

还原型铁吸收系统作为白念珠菌在低铁条件下获得铁离子的重要途径,受到研究人员的广泛关注,目前已鉴定出许多该系统相关基因,包括高铁还原酶(Ferric reductases, Fre)、多铜氧化酶(Multicopper oxidase, MCO)及铁通透酶(Permease)等基因,并不断对相关基因的分子及细胞学功能进行了详细注释^[5-6]。白念珠菌中现已鉴定的高铁还原酶至少有17种,而且不同的高铁还原酶之间存在着功能互补现象,能够对外界环境做出相

应的应答^[7]。Hammacott J. E.等在2000年鉴定出首个高铁还原酶基因*FRE1*,发现它能够弥补酿酒酵母*fre1Δ/Δ*缺失突变株的生长缺陷^[8],但是该基因详细的生理学功能尚不明确。此外,Knight S. A.等鉴定出*FRE10*是酸性条件下细胞高铁还原酶的最主要贡献者^[9],我们实验室的早期研究结果显示*FRE2*和*FRP1*是碱性应答基因,并且*FRE2*可能是碱性条件下细胞高铁还原酶的主要贡献者^[10-11],这进一步丰富和完善了不同pH条件下高铁还原酶的表达调控网络。多铜氧化酶(MCO)作为还原性铁吸收系统的重要成员能够与铁通透酶形成功能性复合体将铁离子转运至胞内,在白念珠菌的基因组中已鉴定出5种MCO基因*FET3*、*FET31*、*FET33*、*FET34*及*FET99*,我们的研究结果表明多种多铜氧化酶基因之间同样存在着互补效应,且*FET3*和*FET34*是低铁条件下主要的多铜氧化酶基因^[12]。虽然这一系列基因的发现及功能分析为整个系统的研究提供了大量的理论基础,但由于多个关键基因均存在大量的同源序列,白念珠菌在不同的宿主环境下如何调控相关基因的表达及各基因之间相互作用的研究仍有待进一步开展。

2 白念珠菌胞内铁离子存储、转运系统

适宜的铁离子浓度有利于保证细胞功能的正常发挥。随着酿酒酵母铁离子吸收系统研究的不断完善,胞内铁离子存储转运机制也逐渐清晰。研究结果显示,线粒体和液泡是细胞内铁离子主要的储存场所,并且在调控胞内铁离子分配的过程中发挥重要作用^[13]。在酿酒酵母中,细胞首先利用质膜铁离子吸收系统将胞外环境中非生物可利用性铁离子转换为可利用性状态,进而运输至细胞质中,在细胞质中形成一个不稳定的铁离子储存库(Labile Fe pool),随后这一不稳定库内的铁离子会随着细胞状态的变化被输送至胞内不同位置以维持铁离子内稳态的平衡(图1)。根据目前的研究结果可将胞内铁离子分配途径概括为以下3条,如图1所示,途径一:不稳定库内的铁离子与谷氧还蛋

白复合体(Grx3-Grx4)结合,形成谷胱甘肽结合型[2Fe-2S]簇(Glutathione-coordinated [2Fe-2S] cluster),随后铁离子在谷氧还蛋白的协助下组装至细胞质内的含铁硫簇蛋白、含铁蛋白及其他细胞质组分^[14];途径二:铁离子通过线粒体膜上的Mrs3/Mrs4转运蛋白运输至线粒体内,用于Fe/S簇(Iron sulfur cluster, ISC)的组装及低铁蛋白和血红素的合成^[15]。此外,线粒体铁硫簇组装过程中产生的一类未知分子X能够通过线粒体膜上的ABC型转运蛋白Atm1被分泌至细胞质内,一方面用于细胞质和细胞核中铁硫簇的组装,另一方面作为信号因子被Aft1识别从而传递线粒体内铁离子状态信息^[16];途径三:过量的铁离子通过液泡膜上的Ccc1通道进入液泡,后者作为胞内铁离子存储和脱毒的场所能够在特定的条件下通过Smf3蛋白将铁离子输出至细胞质中,以满足生命体的需求^[16-18]。

尽管白念珠菌中铁离子吸收系统的研究逐渐

完善,但细胞内铁离子储存、分配的机制尚不清楚。近年来,随着生物信息学技术的发展和白念珠菌全基因组测序的完成,在白念珠菌基因组中鉴定出一系列胞内铁离子分配相关的同源序列,包括线粒体膜转运蛋白Mrs4/Atm1,液泡铁离子转运系统Ccc1/Smf3等,并根据序列同源性对这些基因的功能进行了注释,但其详细的生物学功能仍有待进一步研究。2012年我们实验室首次鉴定了白念珠菌的线粒体转运蛋白Mrs4,实验结果表明Mrs4位于线粒体内膜上,该基因的缺失能够导致菌体的生长缺陷、胞内铁含量上升及线粒体形态异常^[19]。随后,我们陆续鉴定了液泡铁离子转运蛋白Ccc1和Mrs4,并对其生物学功能进行了一系列研究,相关研究结果正在进一步确认中。虽然白念珠菌胞内铁离子稳态维持及分配相关基因也逐渐被鉴定注释,然而,各细胞器与细胞质之间通过怎样的信号传递途径来完成胞内铁离子的分配,以及各转录因子之间的协调机制仍有待进一步研究。

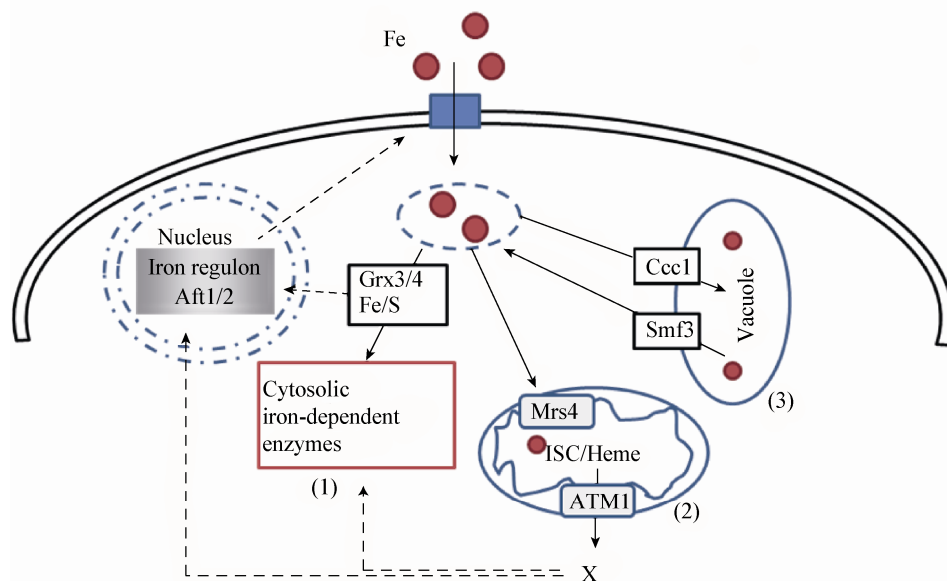


图1 酿酒酵母胞内铁离子储存、转运模型

Figure 1 Model of intracellular iron storage and transport in *Saccharomyces cerevisiae*

3 线粒体内铁离子代谢过程及其在白念珠菌铁离子稳态维持方面的作用

长期以来,线粒体因其能够通过氧化磷酸化将储存在碳水化合物中的能量转换为 ATP 形式,从而保证细胞内需能活动的正常进行而受到人们的广泛关注。不仅如此,近年来随着研究的不断深入,发现线粒体能够产生细胞氧化还原反应的调控因子,包括超氧自由基(Superoxide anion)、过氧化氢(H_2O_2)、一氧化氮(NO)、亚硝酸盐(Peroxynitrite)等,从而影响细胞的代谢和分化^[20]。同时,线粒体也是细胞内常见过渡态金属离子——铁离子代谢的重要场所。由于铁离子极易进行氧化与还原状态的相互转换,线粒体能够通过富含铁离子的血红素及铁硫簇蛋白,维持电子传递链的功能,从而完成胞内能量的转换。研究结果表明,线粒体是血红素合成的唯一场所,也是胞内铁硫簇组装的主要场所,不仅能够合成线粒体自身需要的铁硫簇,对细胞质及细胞核内铁硫簇相关蛋白的合成过程也具有重要作用^[2]。铁硫簇作为蛋白辅助因子参与细胞内许多重要的代谢过程,如细胞呼吸、核糖体组装及再循环、DNA 损伤修复及 DNA 合成等^[21]。由此,我们不难发现线粒体与胞内铁离子稳态的维持具有密切的关系,同时铁离子对于线粒体功能的正常发挥及细胞的生长发育具有非常重要的作用。

20 世纪后期,酿酒酵母线粒体内铁硫簇组装机制的研究取得了较大的进展。研究发现线粒体内铁硫簇组装机制与细菌中 *isc* 操纵子机制相同,且这一组装机制在真核生物中具有很强的保守性,因此将线粒体内铁硫簇的组装系统称为 ISC 组装系统^[16,22-23]。目前铁硫簇组装机制被划分为 3 个主要的步骤。第一步,骨架蛋白 Isu1 上[2Fe-2S]簇的从头合成。这一过程需要硫离子供体 Nfs1-Isd11 及 NAD(P)H-铁氧还蛋白还原酶-铁氧还蛋白复合物组成的电子传递链的参与,同时 Frataxin 蛋白在这个过程中充当铁离子供体或调控因子。第二步,[2Fe-2S]簇从 Isu1 骨架蛋白上解离下来。这一过程通过 ATP-依赖型伴侣系统 Hsp70 与 Isu1 蛋白的结

合实现。解离下来的[2Fe-2S]簇一部分能够迅速与谷氧还蛋白和谷胱甘肽结合形成复合体,并被呈递至目标脱辅基蛋白(Apoproteins)。第三步,解离后剩余的部分[2Fe-2S]簇在一些功能特异性的蛋白辅助下完成[4Fe-4S]簇的组装,并进一步保证一些功能特异性蛋白的成熟,如顺乌头酸酶等。其中,前两个步骤参与线粒体内全部 Fe/S 簇蛋白质的成熟,且同时对细胞质和细胞核中铁硫簇蛋白的成熟及细胞质中铁离子稳态的调控具有至关重要的作用,因此被称为“核心 ISC 组装机制”。当核心 ISC 组装机制中出现功能基因的缺失时会导致线粒体铁硫簇合成受阻,细胞相应的出现胞内铁离子聚集甚至线粒体铁离子过载现象。这些研究结果表明,线粒体内铁硫蛋白的合成可能在细胞内充当信号分子用于调控细胞铁离子的摄取及胞内铁离子的分配^[16]。

酿酒酵母中铁离子相关基因的表达主要受 Aft1/Aft2 型转录因子的正向调控,谷氧还蛋白结合的铁硫簇及线粒体 Atm1 蛋白输出的未知成分 X 分别作为细胞质及线粒体内铁离子状态的信号分子,从而通过 Aft1/2 调控铁离子获得及利用基因的表达(图 1)。当信号分子 X 和 Grx (+Fe)存在时,Aft1 从启动子上释放下来并被释放到细胞质中,当细胞内缺乏信号分子 X 和 Grx (+Fe)时,Aft1 转录因子会持续激活细胞铁获得系统相关基因的表达,从而调控细胞内铁离子含量^[16,24]。白念珠菌中胞内铁离子储存、转运调控系统较酿酒酵母中更为复杂。2010 年我们实验室首次鉴定出白色念珠菌中 Aft 型转录因子 CaAft2,并发现其能够双向调控铁离子相关基因的表达^[25]。此外,还有文献报道了该菌中存在 GATA 型转录抑制因子 Sfu1 及多种重要的锌指转录调控因子如 Sef1、Hap43 等,这可能与白念珠菌宿主微环境的多样性和复杂程度有关^[4]。我们的研究也发现,白念珠菌线粒体转运蛋白 Mrs4 的缺失会导致细胞膜表面铁离子获得系统相关基因 *FET3*、*FTR1*、*SIT1*、*CFL2*、*FRE10* 表达量上调,而铁离子利用相关基因 *ISU1*、*YFH1*、

ACO1、*ATM1* 等则出现表达量下调。这一结果表明,当线粒体铁离子吸收系统受阻时,线粒体内铁离子代谢过程受到相应的影响^[19]。由此我们推测,*MRS4* 缺失菌株表现出的铁离子相关基因的表达调控现象可能与线粒体内铁硫簇合成受阻相关,同时导致 *Atm1* 输出的信号分子 X 含量降低,从而向细胞内调控系统传递线粒体缺少铁离子的信号,进一步激活铁离子吸收系统相关基因的表达以满足细胞需要。关于这一推测过程的验证及白念珠菌线粒体内铁硫簇代谢相关基因缺失后的表达调控现象将是未来研究工作的重点。此外,由于白念珠菌铁离子稳态调控网络的复杂性,白念珠菌线粒体转运蛋白 *Atm1* 输出的信号分子及信号调控机制也有待进一步的实验论证。

4 小结与展望

铁离子作为生命体必需的一种营养元素,参与细胞内许多重要的代谢过程,对真核生物线粒体功能的正常发挥也具有至关重要的作用。目前关于真核生物中铁离子代谢系统的研究多以酿酒酵母为模式生物展开,在此基础上白念珠菌铁离子吸收及胞内铁离子调控机制也取得了很大的进展。与酿酒酵母类似,白念珠菌细胞膜铁离子吸收系统主要包括还原性铁吸收系统、铁载体吸收系统和血红素吸收系统。当铁离子通过质膜到达胞内后会根据细胞自身的需要进行胞内铁离子的严谨分配。过去十年间,研究人员逐渐揭示了酿酒酵母线粒体内铁硫簇合成有关的“ISC 组装机制”,且该机制从低等真核生物到人类具有高度的保守性^[26]。最近的研究结果显示含铁硫簇蛋白的成熟对细胞核内 DNA 损伤的修复及基因组稳定性的维持具有非常重要的作用^[27],这一发现使对线粒体内 ISC 组装机制的研究更加引人注目。此外,研究人员发现线粒体 ISC 组装机制与胞内铁离子稳态之间有密切的联系,尽管真核生物胞内铁离子稳态调控机制之间存在差异,但是线粒体内铁硫簇合成的效率是几乎所有的真核生物调控细胞铁离子摄取及胞内铁离子分配的一种策略^[16]。

白念珠菌中,随着生物信息学技术和基因微阵列技术等研究方法的快速发展,许多细胞铁离子吸收相关基因及转录调控因子已被鉴定并进行功能阐释。同时,研究人员也不断发现了白念珠菌胞内铁离子储存、转运相关的基因及胞内铁离子稳态维持相关多种转录因子。这些研究成果为白念珠菌铁离子稳态系统的研究提供了大量的理论依据。但是由于白念珠菌铁离子调控网络的复杂性,其中仍有许多机理需要阐明,例如:液泡和线粒体作为胞内铁离子主要的储存场所,与细胞内铁离子代谢及稳态维持之间有怎样的联系?细胞如何感应线粒体内铁离子的状态从而调控相关基因的表达?胞内参与铁离子贮存和分配的相关基因的功能鉴定?尽管我们的研究工作中发现 *Mrs4* 参与胞内铁稳态的维持,但是白念珠菌线粒体内铁离子的代谢以及从线粒体铁硫簇蛋白输出的途径仍有待进一步的研究。同时,白念珠菌中线粒体与细胞质中铁离子稳态维持之间关系的进一步阐释也是我们接下来工作的重点。

参 考 文 献

- [1] Kaplan CD, Kaplan J. Iron acquisition and transcriptional regulation[J]. Chemical Reviews, 2009, 109(10): 4536-4552.
- [2] Richardson DR, Lane DJ, Becker EM, et al. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2010, 107(24): 10775-10782.
- [3] Philpott CC. Iron uptake in fungi: a system for every source[J]. Biochimica et Biophysica Acta(bba)-Molecular Cell Research, 2006, 1763(7): 636-645.
- [4] Chen C, Pande K, French SD, et al. An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis[J]. Cell Host and Microbe, 2011, 10(2): 118-135.
- [5] 徐宁,程欣欣,喻其林,等.白念珠菌铁稳态调控网络研究进展[J].微生物学通报,2012,39(3):386-393.
- [6] Ziegler L, Terzulli A, Gaur R, et al. Functional characterization of the ferroxidase, permease high-affinity iron transport complex from *Candida albicans*[J]. Molecular Microbiology, 2011, 81(2): 473-485.
- [7] Jeeves RE, Mason RP, Woodacre A, et al. Ferric reductase genes involved in high-affinity iron uptake are differentially regulated in yeast and hyphae of *Candida albicans*[J]. Yeast, 2011, 28(9): 629-644.

- [8] Hammacott JE, Williams PH, Cashmore AM. *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* *frel* mutant[J]. Microbiology, 2000, 146(4): 869-876.
- [9] Knight SA, Vilaire G, Lesuisse E, et al. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(9): 5482-5492.
- [10] 梁勇, 郑雯, 魏东盛, 等. 白念珠菌高铁还原酶 *FRP1* 基因的功能[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 337-342.
- [11] Liang Y, Wei D, Wang H, et al. Role of *Candida albicans* Aft2p transcription factor in ferric reductase activity, morphogenesis and virulence[J]. Microbiology, 2010, 156(10): 2912-2919.
- [12] Cheng X, Xu N, Yu Q, et al. Novel insight into the expression and function of the multicopper oxidases in *Candida albicans*[J]. Microbiology, 2013, 159(6): 1044-1055.
- [13] Schueck ND, Woontner M, Koeller DM. The role of the mitochondrion in cellular iron homeostasis[J]. Mitochondrion, 2001, 1(1): 51-60.
- [14] Rouhier N, Couturier J, Johnson MK, et al. Glutaredoxins: roles in iron homeostasis[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2010, 35(1): 43-52.
- [15] Muhlenhoff U, Stadler JA, Richhardt N, et al. A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(42): 40612-40620.
- [16] Lill R, Hoffmann B, Molik S, et al. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1823(9): 1491-1508.
- [17] Li L, Chen OS, McVey Ward D, et al. *CCCI* is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(31): 29515-29519.
- [18] Portnoy ME, Liu XF, Culotta VC. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(21): 7893-7902.
- [19] Xu N, Cheng X, Yu Q, et al. Identification and functional characterization of mitochondrial carrier Mrs4 in *Candida albicans*[J]. FEMS Yeast Research, 2012, 12(7): 844-858.
- [20] Lill R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins[J]. Nature, 2009, 460(7257): 831-838.
- [21] Sonia L, Ermanna R. The role of iron in mitochondrial function[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1790: 629-636.
- [22] Zheng L, Cash VL, Flint DH, et al. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(21): 13264-13272.
- [23] Bandyopadhyay S, Chandramouli K, Johnson MK. Iron-sulfur cluster biosynthesis[J]. Biochemical Society Transactions, 2008, 36(6): 1112-1119.
- [24] Courel M, Lallet S, Camadro JM, et al. Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1[J]. Molecular and Cellular Biology, 2005, 25(15): 6760-6771.
- [25] Xu N, Cheng X, Yu Q, et al. Aft2, a novel transcription regulator, is required for iron metabolism, oxidative stress, surface adhesion and hyphal development in *Candida albicans*[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62367.
- [26] Lill R, Dutkiewicz R, Elsasser HP, et al. Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1763(7): 652-667.
- [27] Stehling O, Vashisht AA, Mascarenhas J, et al. *MMS19* assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity[J]. Science, 2012, 337(6091): 195-199.