

· 综述 ·

氮唑类抗真菌药物靶酶 CYP51 的研究进展

李冉, 张大志 (第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 氮唑类药物是临床上应用最广、种类最多的广谱高效抗真菌药物,其作用靶点为真菌甾醇合成过程中的一个关键酶——羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶(CYP51)。CYP51由 *CYP51* 基因(同名 *ERG11*)表达。一方面,真菌 CYP51 是跨膜蛋白,难以纯化获得其准确的结构信息,成为药物研发的瓶颈之一;另一方面,CYP51 变异是公认的真菌耐药的主要原因之一,研究其结构变化对于抗真菌耐药具有重要意义。因此,笔者对近年来 CYP51 的研究进展进行综述。

[关键词] CYP51 靶酶;三维结构;动力学;突变;耐药

[中图分类号] R978.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)02-0106-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.02.003

Development in research of CYP51 as the target of triazoles

LI Ran, ZHANG Dazhi (Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Triazoles are the most widely used antifungal drugs in clinic with broad spectrum and high efficacy, which targets sterol 14 α -demethylase (CYP51), an enzyme expressed by the gene *ERG11*, which is a key enzyme in the fungi ergosterol biosynthesis. On the one hand, the CYP51 belongs to a transmembrane protein. It is difficult to get the exact functional structure conformation which becomes a big challenge for the development of new drugs. On the other hand, it becomes consensus that *ERG11* exon mutation cause CYP51 structural change is one of the major reasons for antifungal drugs resistance. Therefore, study of the structural changes toward the antifungal drug resistance is quite important. The review authors have summarized the research progress on CYP51 over the recent years.

[Key words] target CYP51; gene sequence; three-dimensional structure; kinetics; variation and resistance

羊毛甾醇 14- α 去甲基酶(sterol 14 α -demethylase, P450_{14DM}, CYP51)是麦角甾醇生物合成路径中必不可少的酶^[1],其主要功能是催化羊毛甾醇 14- α 位的甲基离去。唑类化合物能选择性地抑制真菌的 CYP51,为常用的抗真菌药物^[2]。但由于 CYP51 是疏水性很强的膜蛋白,药物与靶酶的构效关系研究难以形成清晰明确的结论^[3],阻碍了新型抗真菌化合物的设计和发展。另外,CYP51 也参与了部分耐药机制,它的变异是真菌耐药问题的主要原因之一。近些年来已有研究者对致病性真菌不同种属类的 CYP51 的三维结构、活性位点以及与唑类的结合进行了较为深入的研究,分析了靶酶的相关动力学性质,与耐药有关的基因突变的报道也在不断增加。

1 CYP51 基因序列与氨基酸序列

目前,不同相关菌属的 *CYP51* 基因已经得到克隆和鉴定。对基因序列的识别和对比有利于了解不同种类的 *CYP51* 在基因水平的联系。一般而言,序列一致性低于 40% 的基因视为不同的家族,一致性高于 55% 的基因归为一个亚家族,因此,不同的亚家族基因的一致性应在 40% ~ 55% 之间。整个生物界 *CYP51* 的序列相似性降低至 23% ~ 34%,同一物种 *CYP51* 多个拷贝间的序列相似性程度为中等,真菌间的相似性相对低很多,一般把一致性在 30% 左右的就可以归为同一家族,可见真菌的 CYP51 酶的基因序列差异较大^[4]。这种基因序列的低一致性与生物功能的高度单一性反差较大,使得对 *CYP51* 催化反应的单一性和反应机制的研究愈加困难,颇具挑战性。

不同 CYP51 氨基酸序列的一致性同源模建的基础。虽然真菌中围绕卟啉-Fe 的氨基酸序列的一致性相对较高,但总体而言,种间的一致性、相似

[作者简介] 李冉,硕士研究生,E-mail:liran19922010@163.com

[通讯作者] 张大志,博士,教授,研究方向:抗真菌药物及靶点研究.E-mail:zhangdzl@hotmail.com

性不高^[5]。新近报道的首个真菌类 CYP51 晶体(酿酒酵母的 RsCYP51)结构中^[6],其氨基酸序列与白念珠菌、新生隐球菌、烟曲霉等致病真菌的 CYP51 相比较,绝对保守的为 24%,相近的仅为 25%。

2 CYP51 三维结构与动力学

2.1 三维模型的构建与分子对接

早期张万年等^[7]首次根据原核生物 P450s (P450BM3、P450cam、P450terp 和 P450eryF)已知的共晶结构来构建白念珠菌的 CYP51 与底物 24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇复合物三维结构,同时鉴定了与底物任意一原子相距 0.8 nm 以内的活性位点氨基酸残基,这些氨基酸残基有助于更好地理解酶的结构与功能关系。底物与 CYP51 的分子对接研究^[8]表明,底物固定在活性位点主要是通过疏水作用力和氢键相互作用。另外 14 个唑类化合物的活性构象也分别对接到白念珠菌 CYP51 的唑类结合位点,研究发现这 14 个唑类化合物在结合位点都有相似的对接模式。抑制剂的卤代苯环和氨基酸残基 Y132 之间可能有 π - π 叠加相互作用。伊曲康唑和酮康唑较长侧链会穿过结合位点和底物入口通道的残基相互作用。

随着同源建模技术的发展,白念珠菌、烟曲霉菌和新生隐球菌 CYP51 酶的三维模型依次被构建出来^[5,8],用于研究与底物的结合模式和与唑类抑制剂的相互作用,以及邻近突变对酶与抑制剂结合的影响。研究发现,疏水作用和氢键在底物识别和定向方面起重要作用。白念珠菌和烟曲霉菌的 CYP51 酶的模型虽然有相似的核心结构,但它们的活性位点明显不同。对白念珠菌和烟曲霉菌 CYP51 的结合位点与唑类化合物分子对接研究表明^[8],泊沙康唑较长的侧链能占据 CYP51 的一个特定通道。通道内相应的氨基酸残基能为唑类化合物对特定点突变耐药菌株的活性数据^[8]提供解释和支持。结果表明,这种额外的相互作用有利于稳定其与 CYP51 突变体的结合,而氟康唑(FCZ)和伏立康唑并没有这种性质。同时表明,这些能特异影响泊沙康唑活性点的突变,是通过干预泊沙康唑侧链与受体的结合而起作用的。

2.2 重组体的表达及动力学研究

2.2.1 白念珠菌属羊毛甾醇 14- α 去甲基酶(CaCYP51)与唑类结合的性质

2010 年,Warriow 等^[9]首次在大肠杆菌中表达出了野生型的 CaCYP51,并初步阐述了突变体 I 471T CaCYP51 的性质。研究发现,在氧化条件下,纯化的 CaCYP51 与唑类的亲

和力是相似的,解离常数 K_d 值在 10~26 nM (除了 FCZ 的 K_d 值为 47 nM)。伏立康唑与 CaCYP51 的亲合力高于 FCZ,归因于伏立康唑脂肪碳上多出来的甲基增强了与芳香氨基酸的疏水相互作用,但是,克霉唑和伊曲康唑与 CaCYP51 相似的亲合力表明化合物侧链并不是决定与靶酶亲和力的决定性因素。在 CO 置换实验中,CaCYP51 与伊曲康唑的亲合力是 FCZ 的 7 倍,与在氧化条件的 2 倍相比,这一差距表明唑类的侧链对结合力有着决定性作用。突变体 I471T CaCYP51 也在该实验中得到了初步的表征,并表明 FCZ 的耐药是源自对底物亲和力的增强和对唑类化合物结合力减弱的双重影响。其后,人类同源的 14- α 去甲基酶 HsCYP51 和 $\Delta 60$ HsCYP51 得到表达和纯化^[10],以探索唑类药物和农业中的抗真菌药对它们的选择性。

2.2.2 烟曲霉菌羊毛甾醇 14- α 去甲基酶(CYP51B)的结构与功能研究

不同于人类和其他脊椎动物,烟曲霉菌有 2 个 CYP51 基因^[11,12],所表达的酶分别是 CYP51A 和 CYP51B,两者氨基酸序列的相似度为 59%。尽管 2 个基因在烟曲霉菌中都有活性,但是研究指出 CYP51B 基因编码的酶主要负责羊毛甾醇的去甲基化。2 个基因的出现或许成为解释烟曲霉菌高度耐药的原因。2015 年,Hargrove 等^[13]首次表达纯化并鉴定了烟曲霉菌的 CYP51B,研究发现它催化天然底物齿孔醇和植物的 CYP51 底物钝叶醇去甲基化的催化常数 K_{cat} 值分别为 (45 ± 3) 和 (52 ± 3) /min,对羊毛甾醇并没有活性。咪康唑在测定过程中对酶的抑制活性最强。与伏立康唑复合物的 X-射线结构表明,烟曲霉菌的 CYP51B 与其他同源的 CYP51 有较高的整体相似性,但具有在其他门系所没有的特点,进而为小分子伏立康唑对曲霉菌有效提供了解释。

3 CYP51 变异与真菌耐药

随着唑类药物的长期大量使用,真菌的耐药情况日益严重。已知的临床致病真菌对唑类化合物耐药的机制主要分为 4 类:①CYP51 的点突变致使其与唑类药物的亲合力降低;②靶酶基因的上调导致 CYP51 的过度表达;③转运蛋白的过度表达致使唑类药物的流出增加;④在耐药的白念珠菌属中发现的 ERG3 的突变。其中,影响唑类结合的 CYP51 的突变体通常在耐药菌株中发现^[14,15],并得到了广泛的研究。研究 CYP51 的突变及对唑类结合的影响,有利于设计抗耐药真菌的药物。

3.1 白念珠菌

目前,已有 140 多种不同的

CYP51 氨基酸替换见诸文献报道,但是大约只有一半仅存在于对唑类药物敏感力弱的菌株中(表1)^[16]。虽然临床上菌株含有的氨基酸替换通常不止一个,但替换的位点大部分都位于3个区域^[17]:氨基酸残基105-165、266-287和405-488。一些点突变体已在大肠杆菌中被表达出来,用于研究氨基酸替换对CYP51的活性和对药物敏感性的影响、突变体与唑类的结合位点及动力学性质。其中包括Y132H^[18]、F145L^[19]、I471T^[20]和S279F^[21]。另外,一些突变体如G464S^[22]、R467K^[23]和T315A在啤酒酵母菌中被表达,可用于对唑类耐药的研究^[24]。

表1 临床致病真菌中与耐药有关的CYP51的氨基酸替换^[19]

| 菌种 | 氨基酸替换 |
|-------|---|
| 白念珠菌 | Y33C、Y39C、P49R/T、W54Stop、A61V、Y79C、K99T、F105L、A107T、K108E、A114S、K119L、F126L、V130I、Y132F/H、N136Y、K143E/R、A149V、T199I、T229A、P230L、I253V、Y257H、R267H、D278E/N、S279F、H283D/R、K287R、G307S、F380S、V509V404I/L、S405G、D446N、Y447G/H、G448E/R/V、F449L/S/V/Y、G450E/V、V452A、V456I、G464S、G465S、R467I/K、I471T、Q474K、T486P、L491V、T494A、P503L |
| 烟曲霉菌 | N22D、S52T、G54E/K/V/R/W、Q88H、L98H、V101F、N125I、G138C/R、Q141H、H147Y、P216L、M220K/I/T/V、M236K/T/V、S297T、P394L、Y431C、G434C、T440A、G448S、Y491H、F495I |
| 新生隐球菌 | Y145F、G484S |

3.2 烟曲霉菌 与白念珠菌不同,烟曲霉的耐药机制仅与CYP51变异有关^[25],其CYP51酶有2种同源蛋白CYP51A和CYP51B。但研究表明,大部分耐药的烟曲霉菌株通常只含有CYP51A的单个突变体^[26]。烟曲霉菌在临床上与耐药有关的CYP51的氨基酸取代(表1)虽然少于白念珠菌属,但也有30多种^[27,28],其中最常见氨基酸替换有G54、L98、G138和M220^[27]。从临床上耐药的菌株中发现,氨基酸G54和M220有不同的取代。部分烟曲霉菌CYP51的突变体也在啤酒酵母菌中表达。通过活性研究发现,G54的突变能严重影响菌株对伊曲康唑和泊沙康唑的敏感性,但对伏立康唑的活性影响不大^[28]。对于M220的突变,M220K和M220T能降低菌株对所有药物的敏感性,M220I能特异地影响伊曲康唑,M220V能影响伊曲康唑和泊沙康唑。有分析表明,在同一位置的不同取代能特异地影响药物与靶标的相互作用。

3.3 新生隐球菌 目前只在临床菌株中发现了2

个介导耐药的新生隐球菌CYP51的氨基酸取代,G484S^[29]和Y145F^[30](表1)。G484S能引起新生隐球菌对FCZ的耐药^[29],Y145F能使真菌对FCZ和伏立康唑耐药,但能增强真菌对伊曲康唑和泊沙康唑的敏感性^[30]。

4 总结与展望

利用同源模建构建致病性真菌CYP51酶的三维结构,并通过分子对接研究有利于更好地了解靶酶的结构与功能关系,同时也有利于为新型抗真菌药物的研发建立高通量的筛选体系。但不同种的CYP51基因序列的一致性普遍较低,表明同源模建的CYP51用于药物设计的准确度并不高。利用基因克隆与表达技术,纯化得到相应的靶酶重组体,为酶的动力学性质提供了更准确和更可靠的信息。另外,CYP51突变与耐药的关系能为设计抗真菌耐药的药物提供基础。目前还需要利用现有的先进技术对靶酶的性质做进一步阐述,为设计研发新型的具有高度特异性的抗真菌药物提供平台。

【参考文献】

- [1] Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase (cyp51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis[J]. *Curr Top Med Chem*, 2011, 11(16): 2060-2071.
- [2] Yoshida Y. Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents[J]. *Curr Top Med Mycol*, 1988, 2: 388-418.
- [3] Warrilow AG, Melo N, Martel, CM, et al. Expression, purification, and characterization of *Aspergillus fumigatus* sterol 14 α -demethylase (CYP51) isoenzymes A and B[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(10): 4225-4234.
- [4] Lepesheva GI, Waterman MR. Structural basis for conservation in the CYP51 family[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1814(1): 88-93.
- [5] Sheng CQ, Miao ZY, Ji HT, et al. Three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase from *Cryptococcus neoformans*: active-site characterization and insights into azole binding[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(8): 3487-3495.
- [6] Monk BC, Tomasiak TM, Keniya MV, et al. Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer[J]. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 2014, 111(10): 3865-3870.
- [7] Ji, HT, Zhang WN, Zhou YJ, et al. A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungal[J]. *J Med Chem*, 2000, 43(13): 2493-2505.

- [8] Sheng CQ, Zhang WN, Zhang MY, *et al.* Homology modeling of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* and insights into the enzyme-substrate interactions[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2004, 22(1): 91-99.
- [9] Li X, Vincent M, Andrew SC, *et al.* Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14-sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into Posaconazole binding[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 568-574.
- [10] Warrilow AG, Parker JE, Kelly DE, *et al.* Azole affinity of sterol 14-demethylase (CYP51) enzymes from *Candida albicans* and *Homo sapiens*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(3): 1352-1360.
- [11] Fan J, Urban M, Parker JE, *et al.* Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function[J]. *New Phytol*, 2013, 198(3): 821-835.
- [12] Hawkins NJ, Cools HJ, Sierotzki H, *et al.* Paralog re-emergence: a novel, historically contingent mechanism in the evolution of antimicrobial resistance[J]. *Mol Biol Evol*, 2014, 31(7): 1793-1802.
- [13] Hargrove TY, Wawrzak Z, Lamb DC, *et al.* Structure-functional characterization of cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and molecular basis for the development of antifungal drugs[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(39): 23916-23934.
- [14] Cools HJ, Mullins JG, Fraaije BA, *et al.* Impact of recently emerged sterol 14 alpha-demethylase (CYP51) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(11): 3830-3837.
- [15] Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA, *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida species* isolated from Tunisian hospitals[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(7): 3182-3193.
- [16] Morio F, Loge C, Besse B, *et al.* Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 66(4): 373-384.
- [17] Marichal P, Koymans L, Willemsens S, *et al.* Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans* [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 2701-2713.
- [18] Kudo M, Ohi M, Aoyama Y, *et al.* Effects of Y132H and F145L substitutions on the activity, azole resistance and spectral properties of *Candida albicans* sterol 14-demethylase P450 (CYP51): a live example showing the selection of altered P450 through interaction with environmental compounds[J]. *J Biochem*, 2005, 137(5): 625-632.
- [19] Bellamine A, Lepesheva GI, Waterman MR. Fluconazole binding and sterol demethylation in three CYP51 isoforms indicate differences in active site topology[J]. *J Lipid Res*, 2004, 45(11): 2000-2007.
- [20] Warrilow AG, Martel CM, Parker JE, *et al.* Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14-alpha demethylase (CaCYP51)[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(10): 4235-4245.
- [21] Warrilow AG, Mullins JG, Hull CM, *et al.* S279 point mutations in *Candida albicans* sterol 14-alpha demethylase (CYP51) reduce *in vitro* inhibition by fluconazole[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(4): 2099-2107.
- [22] Kelly SL, Lamb DC, Loeffler J, *et al.* The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262(1): 174-179.
- [23] Lamb DC, Kelly DE, White TC, *et al.* The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes drug resistance through reduced affinity[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(1): 63-67.
- [24] Lamb DC, Kelly DE, Schunck WH, *et al.* The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(9): 5682-5688.
- [25] Mellado E, Alcazar FL, Garcia EG, *et al.* New resistance mechanisms to azole drugs in *Aspergillus fumigatus* and emergence of antifungal drugs-resistant *A. fumigatus* atypical strains[J]. *Med Mycol*, 2006, 44: 367-371.
- [26] Garcia EG, Mellado E, Gomez-Lopez A, *et al.* Differences in interactions between azole drugs related to modifications in the 14-alpha sterol demethylase gene (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(5): 2119-2121.
- [27] Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, *et al.* Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(7): 2468-2472.
- [28] Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Cuenca-Estrella M, *et al.* Probing the role of point mutations in the cyp51A gene from *Aspergillus fumigatus* in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Med Mycol*, 2011, 49(3): 276-284.
- [29] Rodero L, Mellado E, Rodriguez AC, *et al.* G484S amino acid substitution in lanosterol 14-alpha demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(11): 3653-3656.
- [30] Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, *et al.* Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14alpha-demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(3): 1162-1169.

[收稿日期] 2015-12-21 [修回日期] 2016-01-26

[本文编辑] 李睿旻