

## 稻瘟菌 CYP51 蛋白 F 螺旋区保守氨基酸残基与 烯唑醇作用机制研究

廖卫芳<sup>1,2</sup> 刘婷婷<sup>1</sup> 杨劭<sup>1</sup> 张国森<sup>1</sup> 舒潼<sup>1</sup> 王乐乐<sup>1</sup> 杨娇艳<sup>1\*</sup>

(1. 华中师范大学 生命科学学院 湖北 武汉 430079)

(2. 华中科技大学 生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074)

**摘要:**【目的】研究稻瘟菌 CYP51 蛋白 F 螺旋区保守氨基酸残基与烯唑醇的相互作用机制, 为稻瘟病菌新型高效特异杀菌剂的开发提供理论依据。【方法】设计稻瘟菌 CYP51 蛋白 F 螺旋区保守氨基酸残基突变体 P222C、P222H、I223A、I223W、N224A、N224S, 截去 N 端跨膜区 36 个氨基酸后, 在大肠杆菌 BL21(DE3) Rosetta 菌株中过量表达, 采用结合光谱法分析诱导蛋白对烯唑醇的结合能力。【结果】表达的目标蛋白均保持了对药物的结合能力, 呈现出 II 型的结合光谱曲线。相对于野生型蛋白, 突变体 I223W 和 I223A 对烯唑醇的结合常数  $K_d$  值基本不变, N224S、N224A、P222C 的  $K_d$  值都略有增大, 无显著性差异( $P>0.05$ ), 但是, P222H 的  $K_d$  值有了显著的增大( $P<0.05$ ), 表明突变体 P222H 对烯唑醇的亲合能力显著降低。【结论】稻瘟菌 CYP51 P222 位点的疏水性与药物结合密切相关。

**关键词:** 稻瘟菌, 烯唑醇, CYP51, 突变, 结合光谱

## Interaction between the conserved amino acid in *Magnaporthe oryzae* CYP51 F helix and Diniconazole

LIAO Wei-Fang<sup>1,2</sup> LIU Ting-Ting<sup>1</sup> YANG Shao<sup>1</sup> ZHANG Guo-Sen<sup>1</sup> SHU Tong<sup>1</sup>  
WANG Le-Le<sup>1</sup> YANG Jiao-Yan<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

(2. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

**Abstract:** [Objective] The interaction between the conserved amino acid in *Magnaporthe oryzae* CYP51 F helix and Diniconazole was studied, aiming to help for designation of new specific and effective demethylase inhibitors for *M. oryzae*. [Methods] Six mutants (P222C, P222H, I223A, I223W, N224A, N224S) of *M. oryzae* sterol 14 $\alpha$ -demethylase (MGCYP51) F helix were constructed with truncation of N-terminal 36 residues and heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30900054, 21172089); 国家水体污染控制与治理科技重大专项项目(No. 2013ZX07104-004-03); 华中师范大学中央高校基本科研业务费项目(No. CCNU14A02011)

\*通讯作者: ✉: yang\_jiaoyan@126.com

收稿日期: 2015-03-13; 接受日期: 2015-05-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-02

Rosetta. The binding ability of the recombination proteins to the diniconazole was detected by using the binding spectrum method. **[Results]** All of the recombination proteins had the activity to binding to the diniconazole and presented type II spectrum. Compared with the wild type protein, the  $K_d$  values of the mutations I223W and I223A binding to diniconazole were essentially unchanged, and the  $K_d$  values of N224S, N224A, P222C increased slightly with no significant difference ( $P>0.05$ ), while the  $K_d$  of P222H increased significantly ( $P<0.05$ ), indicating that the ability of the mutation P222H binding to the diniconazole significantly reduced. **[Conclusion]** The hydrophobic of the site P222 could play a major role in the binding of MGCYP51 to the diniconazole.

**Keywords:** *Magnaporthe oryzae*, Diniconazole, CYP51, Mutation, Binding spectrum

由 *Magnaporthe oryzae* (无性世代 *Pyricularia oryzae* Cav.或 *Pyricularia grisea* Sacc.)引起的稻瘟病是水稻三大病害之一,具有“水稻癌症”之称。20 世纪 90 年代以来,我国稻瘟病的年发生面积均在 380 万  $\text{hm}^2$  以上,年损失稻谷达数亿千克,经济损失可达数十亿美元<sup>[1-3]</sup>。稻瘟病的防治有着重要的经济价值、社会价值和生物学意义,是植保行业的重要研究内容。

目前,用唑类药物进行化学防治是控制稻瘟病危害的重要手段<sup>[4-5]</sup>。14 $\alpha$ -去甲基化酶(Sterol 14 $\alpha$ -demethylase, CYP51)是唑类药物与稻瘟菌作用的靶酶,该酶是真菌细胞膜重要成分麦角甾醇合成过程中的关键酶<sup>[6]</sup>。唑类药物的三唑环或咪唑环上存在的孤对电子可以与靶酶血红素辅基的 Fe 原子形成配位键,阻碍血红蛋白与氧的结合而无法完成底物羟化反应,使得真菌麦角甾醇大量缺乏,起到抑菌的效果<sup>[7-8]</sup>。

由于唑类药物作用靶点单一,长期使用导致抗药性的频繁发生<sup>[9]</sup>,因此药物与靶酶 CYP51 的相互作用机制一直是学者们研究的热点。研究者发现,在 CYP51 的三维结构中, F 螺旋区富含芳香族氨基酸,并推测这些芳香族氨基酸是抑制剂选择作用的基础<sup>[10-11]</sup>。本实验室前期研究表明,稻瘟菌 CYP51 F 螺旋区中氨基酸残基 F220 突变后,导致突变蛋白与烯唑醇不再结合。此外,在稻瘟菌 CYP51 F 螺旋区中还发现了 3 个保守性较高的氨基酸 P222、I223 和 N224,推测他们在靶酶与药物的相互作用中也具有重要作用。本研究选择了这 3 个氨基酸残基作为研究对象,进行残基定点突变,并进行异源表达,

测定其与药物结合能力,进一步从分子水平上研究靶酶的功能,为新型稻瘟菌唑类抑制剂的研发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3) Rosetta,由本实验室保存。稻瘟菌 CYP51 基因表达载体 pET-30a-MGCYP51(-36 aa)由本实验室构建并保存。

### 1.2 质粒、引物和 DNA 序列测定

pET-30a 表达载体购自 Novagen 公司,实验中构建的载体见表 1,突变体引物(表 2)合成及 DNA 测序均由上海生工公司完成。

### 1.3 药物及试剂

氯霉素、卡那霉素均购自武汉博悦生物公司;烯唑醇由华中师范大学化学学院万坚教授提供;PCR 定点突变试剂盒购于北京赛百盛公司;SDS-PAGE 低分子量蛋白 Marker、限制性内切酶购于 TaKaRa 公司;其他试剂均为国药出品分析纯。

### 1.4 质粒提取、酶切鉴定及定点突变

碱裂解法提取质粒 pET-30a-MGCYP51(-36 aa),并进行酶切,测序鉴定截去 N 端跨膜区 36 个氨基酸后的稻瘟菌 *cyp51* 基因序列。PCR 介导的体外定点突变按试剂盒说明进行。

### 1.5 异源表达野生型 MG-CYP51 及突变体重组蛋白的制备、SDS-PAGE 分析及浓度测定

37 °C、200 r/min 振荡培养表达重组 CYP51 的工程菌,  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时,加入终浓度为

表 1 研究中使用的载体  
Table 1 Plasmids used in this study

重组质粒 Reconstructed plasmid	插入片段 Inserting DNA
pET-30a-MGCYP51(−36 aa)	<i>cyp51</i> ORF of <i>Magnaporthe oryzae</i> (−36 aa)
pET-30a-MGCYP51(−36 aa)/P222C	<i>cyp51</i> ORF with P222C mutation (−36 aa)
pET-30a-MGCYP51(−36 aa)/P222H	<i>cyp51</i> ORF with P222H mutation (−36 aa)
pET-30a-MGCYP51(−36 aa)/I223A	<i>cyp51</i> ORF with I223A mutation (−36 aa)
pET-30a-MGCYP51(−36 aa)/I223W	<i>cyp51</i> ORF with I223W mutation (−36 aa)
pET-30a-MGCYP51(−36 aa)/N224A	<i>cyp51</i> ORF with N224A mutation (−36 aa)
pET-30a-MGCYP51(−36 aa)/N224S	<i>cyp51</i> ORF with N224S mutation (−36 aa)

表 2 突变引物序列  
Table 2 Sequence of the mutation primers

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	长度 Sizes (bp)
P222-C forward	ACCTGGGTTTCCGCTGCATCAACTTCCTAG	30
P222-C reverse	CTAGGAAGTTGATGCAGCGGAAACCCAGGT	30
P222-H forward	ACCTGGGTTTCCGCCACATCAACTTCCTAG	30
P222-H reverse	CTAGGAAGTTGATGTGGCGGAAACCCAGGT	30
I223-A forward	TGGGTTTCCGCCCCGCCAACTTCCTAGCCC	30
I223-A reverse	GGGCTAGGAAGTTGGCGGGGCGGAAACCCA	30
I223-W forward	TGGGTTTCCGCCCCCTGGAACCTTCCTAGCCCC	31
I223-W reverse	GGGGCTAGGAAGTTCCAGGGGCGGAAACCCA	31
N224-A forward	GTTTCCGCCCCATCGCCTTCCTAGCCCCGT	30
N224-A reverse	ACGGGGCTAGGAAGGCGATGGGGCGGAAAC	30
N224-S forward	GTTTCCGCCCCATCTCCTTCCTAGCCCCGT	30
N224-S reverse	ACGGGGCTAGGAAGGAGATGGGGCGGAAAC	30

0.4 mmol/L 的 IPTG, 18 °C、200 r/min 诱导 5 h, 10 000×g、4 °C 离心 10 min 收集菌体, 重悬于磷酸缓冲液(磷酸钾 100 mmol/L, 甘油 20%, EDTA 1 mmol/L, pH 7.2, 用前加 DTT 至终浓度 1 mmol/L), 加入终浓度为 1 g/L 的溶菌酶, 冰上反应 30 min。超声波破碎 5 min (破碎 10 s, 停 10 s), 加入 DNase 和 RNase, 冰上放置 15 min, 6 000×g、4 °C 离心 15 min, 收集沉淀, 重悬于磷酸缓冲液中, −80 °C 保存备用。使用 10% SDS-PAGE 凝胶分离目的蛋

白, 采用 Bradford 法<sup>[12]</sup>测定蛋白含量。

1.6 重组 MG-CYP51 与烯唑醇结合的光谱学分析

将稀释到 0.5 g/L 的酶液加入到石英比色皿中, 350–500 nm 扫描基线; 然后逐次加入 20 μL 的低浓度(0.005 μmol/L)烯唑醇, 进行扫描, 至接近饱和时, 加入 20 μL 高浓度(0.05 μmol/L)烯唑醇, 直到吸光度不再变化。根据公式  $K_d = \Delta A_{\max} [I] / (\Delta A - [I])$ , 其中  $\Delta A$  表示不同烯唑醇浓度时结合光谱最大吸光度与最

小吸光度间的差值,  $\Delta A_{\max}$  是达到饱和时最大吸光度与最小吸光度间的差值,  $[I]$  是烯唑醇浓度,  $K_d$  是结合常数, 利用 Hanes-Woolf 作图法(即以  $[I]$  对  $[I]/\Delta A$  作图, 计算出  $K_d$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 稻瘟菌 *cyp51* 基因的 DNA 酶切鉴定、测序验证

碱裂解法提取已构建的质粒 pET-30a-MGCYP51(-36 aa), 使用 *Pst* I 单酶切时, 产生 7 kb 左右的一条带; 使用 *Eco* R V 和 *Xho* I 进行双酶切时, 产生了 5.6 kb 和 1.4 kb 左右的条带(图 1), 与预期结果一致。酶切验证正确的阳性克隆载体经测序, 得到的插入长度是 1 440 bp。稻瘟菌 *cyp51* 基因全长为 1 548 bp, 截去 N 端跨膜区的 36 个氨基酸后正好是 1 440 bp, 将该序列与 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行基因序列 BLAST 分析显示, 该序列与数据库中的稻瘟菌 *M. oryzae* 70-15 *cyp51* 基因序列一致。

### 2.2 *cyp51* 基因突变体的 DNA 鉴定及测序验证

根据氨基酸的极性、酸碱性, 将选取的 3 个氨基酸 P222、I223 和 N224 分别进行了不同的点突变, 经 DNA 测序和 BLAST 比对表明, 所有设计的

定点突变均成功, 测序得到的突变序列结果见图 2。

### 2.3 野生型及突变体 CYP51 重组蛋白表达分析

经 0.4 mmol/L IPTG 18 °C 诱导 5 h 后, 破菌后收集蛋白进行 SDS-PAGE 检测, 发现野生型及所有突变体均在 60 kD 处有明显蛋白条带, 与先前研究结果一致, 表明这些突变体均在大肠杆菌 BL21(DE3) Rosetta 中获得了异源表达(图 3)。

### 2.4 重组蛋白与烯唑醇的结合光谱分析

异源表达的野生型及所有突变体蛋白与烯唑醇均有结合, 呈现出 II 型 P450 结合光谱(图 4), 相对于典型的 II 型结合光谱(最大吸收 430 nm, 最小吸收 400 nm)波峰波谷向左稍有偏移, 可能是酶液中含有的其它杂蛋白和膜成分干扰所致。

以 Hanes-Woolf 作图法得到每个重组蛋白与烯唑醇的结合常数  $K_d$  值(表 3), 结果表明, 突变体 I223W 和 I223A 对烯唑醇的  $K_d$  值与野生型大致相同, 亲和能力在突变前后没有发生明显的变化。突变体 N224S、N224A、P222C 的  $K_d$  值略有增大但差异不明显( $P>0.05$ )。但是, P222H 的  $K_d$  值有了显著的增大( $P<0.05$ ), 对烯唑醇的亲合力有了显著的下降, 表明该突变对蛋白与烯唑醇的结合有很大影响。

## 3 结论

本实验室前期研究表明, 稻瘟菌的 CYP51 是跨膜蛋白, 截去 N 端跨膜区 36 个氨基酸残基后, 可以在宿主菌中获得高效表达并保持活性<sup>[2]</sup>。目前用杀菌剂进行化学防治是控制稻瘟病危害流行的重要手段, 商品化的唑类药物通过与靶酶 CYP51 作用抑制病原菌生长。采用结合光谱的方法分析稻瘟菌突变体与三唑类药物烯唑醇的结合能力, 获得这些突变位点的功能信息, 对稻瘟菌特异杀菌剂的研发具有指导意义。

以往的研究表明, 利士曼原虫 CYP51 晶体结构中的 F 螺旋区参与形成底物进入活性中心的通道<sup>[13]</sup>。在对白色念珠菌 CYP51 进行同源建模时, 发现三唑类药物和 F 螺旋中含有苯环结构的 F233

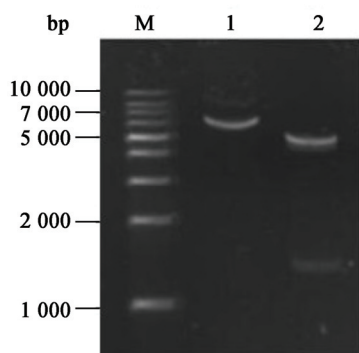


图 1 pET-30a-MGCYP51(-36 aa)质粒酶切鉴定

Figure 1 Identification of pET-MGCYP51(-36 aa) plasmid by restriction enzyme digestion

注: M: 1 kb Marker; 1: *Pst* I 单酶切; 2: *Eco* R V/*Xho* I 双酶切。

Note: M: 1 kb Marker; 1: *Pst* I single endonuclease digestion; 2: *Eco* R V/*Xho* I double enzyme digestion.

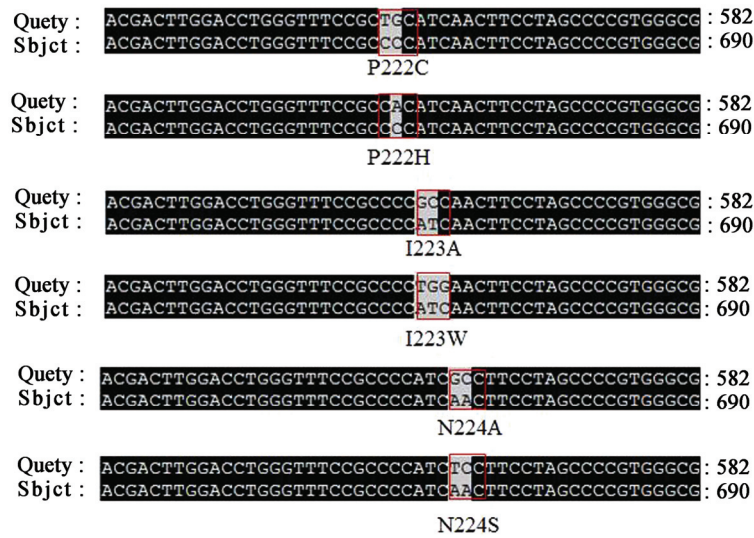


图 2 *cyp51* ORF 基因定点突变的测序验证  
Figure 2 The sequencing and alignment results of site-directed mutation in *cyp51* ORF

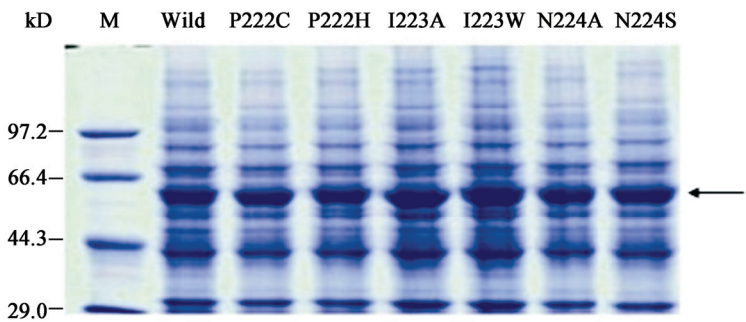


图 3 野生型及突变体 CYP51 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Figure 3 SDS-PAGE analysis of mutant and wild strains CYP51 expressed in BL21(DE3) Rosetta

表 3 重组蛋白与烯唑醇的结合常数( $K_d$ 值) Table 3 The $K_d$ value of recombinant protein biding to Diniconazole		
重组蛋白 Recombinant protein	回归方程 Regressive equation	结合常数 $K_d \pm s$ (nmol/L)
Wild type	$y=2.443\ 9x-0.049\ 3$	$0.017 \pm 0.004$
P222C	$y=0.860\ 9x+0.066\ 9$	$0.053 \pm 0.035$
P222H	$y=0.728\ 0x+0.079\ 6$	$0.109 \pm 0.000$
I223A	$y=0.765\ 6x+0.016\ 0$	$0.029 \pm 0.011$
I223W	$y=0.692\ 9x+0.020\ 6$	$0.028 \pm 0.003$
N224A	$y=0.812\ 5x+0.015\ 7$	$0.043 \pm 0.033$
N224S	$y=0.620\ 4x+0.040\ 4$	$0.078 \pm 0.020$

和 F235 位点之间有结合作用[14]。结合分枝杆菌 F 螺旋区保守氨基酸 L172A/G/V、G175A/T 突变导致去甲基活性的丧失或降低, L172 可能参与甾醇底物的结合并与甾醇的侧链间有疏水相互作用, G175 可能参与分割 CYP51 的二级结构域和影响其三维结构的柔性<sup>[15-17]</sup>。小鼠 CYP51 的 F 螺旋区氨基酸 D231 突变也导致其活性改变<sup>[18]</sup>。由此可见, F 螺旋区与 CYP51 的活性和药物的结合能力有着重要关系。稻瘟菌 F 螺旋区的 P222 和 N224 位点在真菌中高度保守, I223 的保守性也较高。本研究对这 3 个氨基酸残基进行了定点突变、表达相应蛋白并采用结合光谱法分析诱导蛋白对烯唑

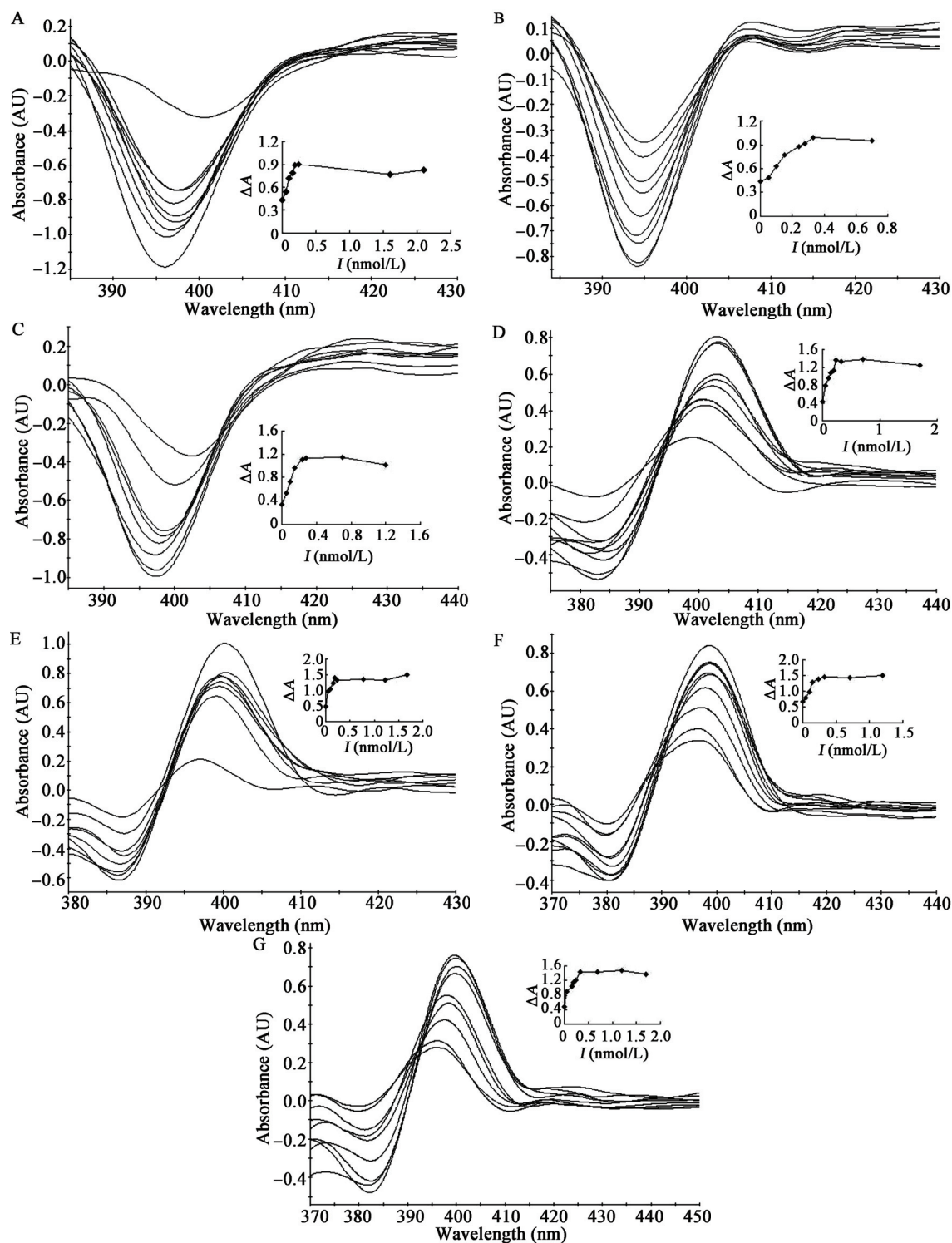


图4 野生型及突变体 CYP51 与烯唑醇的结合光谱

Figure 4 Binding spectra of diniconazole to wild type and mutants in F helix CYP51

注: A: 野生型 CYP51 蛋白; B: 突变体 P222C; C: 突变体 P222H; D: 突变体 I223A; E: 突变体 I223W; F: 突变体 N224A; G: 突变体 N224S. 蛋白含量 1 g/L.

Note: A: The wild CYP51 protein; B: The mutant P222C; C: The mutant P222H; D: The mutant I223A; E: The mutant I223W; F: The mutant N224A; G: The mutant N224S. Protein content 1 g/L.

醇的结合能力, 结果表明, 突变体 P222H 的  $K_d$  值有了显著的增大( $P < 0.05$ ), 其对抑制剂的亲和能力有了显著的下降, 表明 P222 位点对稻瘟菌 CYP51 与烯唑醇的结合密切相关。

有研究者表明, CYP51 中保守活性位点的疏水性作用是保证唑类药物与 CYP51 结合的关键<sup>[10]</sup>。根据氨基酸极性改变的突变原则, 本研究将疏水非极性的 P222 突变为极性碱性氨基酸 H 后, 稻瘟菌 CYP51 与烯唑醇的结合能力显著下降, 可能 P222 位点的疏水性有利于与三唑类药物结合。而且 P222 位点在真菌中高度保守, 因此可以将其作为新型特异抑制剂设计的靶位点。

## 参 考 文 献

- [1] Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, et al. Signaling in plant-microbe interactions[J]. Science, 1997, 276(5313): 726-733
- [2] Yang JY, Zhang QY, Liao MJ, et al. Expression and homology modelling of sterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Magnaporthe grisea* and its interaction with azoles[J]. Pest Management Science, 2009, 65(3): 260-265
- [3] Choi J, Park SY, Kim BR, et al. Comparative Analysis of pathogenicity and phylogenetic relationship in *Magnaporthe grisea* species complex[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57196
- [4] Fu JC, Han YJ. Effects of different fungicides on rice blast[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2014(1): 54-56 (in Chinese) 付久才, 韩玉军. 不同杀菌剂对水稻稻瘟病的防治效果[J]. 黑龙江农业科学, 2014(1): 54-56
- [5] Kunova A, Pizzatti C, Bonaldi M, et al. Sensitivity of nonexposed and exposed populations of *Magnaporthe oryzae* from rice to tricyclazole and azoxystrobin[J]. Plant Disease, 2014, 98(4): 512-518
- [6] Yoshida Y, Aoyama Y, Noshiro M, et al. Sterol 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 273(3): 799-804
- [7] Hartman PG, Sanglard D. Inhibitors of ergosterol biosynthesis as antifungal agents[J]. Current Pharmaceutical Design, 1997, 3(2): 177-208
- [8] He XP, Zhang BR. The research progress of microbial ergosterol[J]. Microbiology China, 1998, 25(3): 166-169 (in Chinese) 何秀萍, 张博润. 微生物麦角固醇的研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(3): 166-169
- [9] Mares D, Romagnoli C, Andreotti E, et al. Emerging antifungal azoles and effects on *Magnaporthe grisea*[J]. Mycological Research, 2006, 110(6): 686-696
- [10] Strushkevich N, Usanov SA, Park HW. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles[J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 397(4): 1067-1078
- [11] Lamb DC, Cannieux M, Warrilow AGS, et al. Plant sterol 14 $\alpha$ -demethylase affinity for azole fungicides[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 284(3): 845-849
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [13] Hargrove TY, Wawrzak Z, Liu JL, et al. Substrate preferences and catalytic parameters determined by structural characteristics of sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) from *Leishmania infantum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(30): 26838-26848
- [14] Lamb DC, Kelly DE, Baldwin BC, et al. Differential inhibition of *Candida albicans* CYP51 with azole antifungal stereoisomers[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 149(1): 25-30
- [15] Lepesheva GI, Virus C, Waterman MR. Conservation in the CYP51 family. Role of the B' helix/BC loop and helices F and G in enzymatic function[J]. Biochemistry, 2003, 42(30): 9091-9101
- [16] Bellamine A, Mangla AT, Dennis AL, et al. Structural requirements for substrate recognition of *Mycobacterium tuberculosis* 14 $\alpha$ -demethylase: implications for sterol biosynthesis[J]. Journal of Lipid Research, 2001, 42(1): 128-136
- [17] Lepesheva GI, Podust LM, Bellamine A, et al. Folding requirements are different between sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* and human or fungal orthologs[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(30): 28413-28420
- [18] Nitahara Y, Kishimoto K, Yabusaki Y, et al. The amino acid residues affecting the activity and azole susceptibility of rat CYP51 (Sterol 14-demethylase p450)[J]. Journal of Biochemistry, 2001, 129(5): 761-768