

苏云金芽孢杆菌辅助蛋白的研究进展

邵宗泽^{1,2} 喻子牛¹(华中农业大学微生物科学技术系 武汉 430070)¹(山东农业大学生命科学院生物农药研究室 泰安 271018)²

摘要:杀虫晶体蛋白是苏云金芽孢杆菌所产生的主要杀虫成分,在其超量表达与晶体形成过程中有时需要辅助蛋白的参与。在这些辅助蛋白中有的能够防止正在翻译过程中的杀虫晶体蛋白被菌体内的蛋白酶降解,起着分子伴侣的作用;有的在晶体形成过程中起着脚手架的作用。本文对辅助蛋白 P20、P19 以及 ORF1、ORF2 等在杀虫晶体蛋白表达及晶体形成过程中的作用作了综述。

关键词:苏云金芽孢杆菌,辅助蛋白,杀虫晶体蛋白,分子伴侣

中图分类号:Q963 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-077-05

杀虫晶体蛋白(ICPs)是苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)的主要杀虫成分,它们在菌体的对数生长后期开始表达,并以伴胞晶体的形式在菌体内积累。伴胞晶体的形成不仅可以防止菌体蛋白酶对晶体蛋白的降解而使其获得大量表达,而且还可以有利于 Bt 制剂的制备。

在 Bt 菌株中还表达一些小分子量的蛋白质,虽然它们本身不具有杀虫活性,但对某些杀虫晶体蛋白的正常表达和晶体形成却有帮助作用、有时甚至是必需的。由于它们不是构成伴胞晶体的主要成分,因此被称为辅助蛋白(Accessory proteins)。现已发现的辅助蛋白主要有 P19、P20、ORF1 和 ORF2 等。其中, P19、P20 基因位于以色列亚种(*israelensis* subsp.)的 *cry11Aa* 操纵子中(图 1)。P19 是由该操纵子的第一个基因编码的 19kD 的蛋白质, P20 是由该操作子中的最后一个基因编码的 20kD 蛋白质(又称帮助蛋白, Helper Protein)^[1](图 1)。ORF 蛋白是另一类辅助蛋白,编码这些 ORF 蛋白的基因通常位于 *cry2* 类基因操纵子中,例如 *cry2A* 和 *cry2C* 上游分别含有 *orf1* 和 *orf2* 两个开放阅读框,它们分别编码辅助蛋白 ORF1 和 ORF2^[2](图 1)。

在这些辅助蛋白中,关于 P20 的研究较多。目前已发现它对 Cyt1A、Cry4Aa、Cry11Aa、Cry1Ab、Cry14Ac 以及 Cry2Aa 等多种杀虫晶体蛋白的表达都有促进作用^[3~12]。此外发现 ORF2 在 Cry2A 晶体的形成中是必不可少的。弄清这些辅助蛋白与伴胞晶体形成的关系,不仅有助于理解杀虫晶体

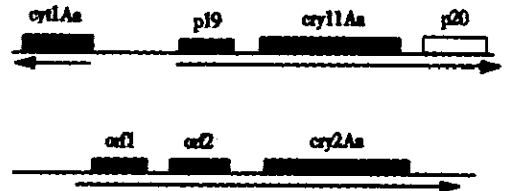


图 1 *cry11Aa* 和 *cry2Aa* 操纵子的结构

p19 和 *p20* 分别位于 *cry11Aa* 的上游和下游,是该操纵子的第一、三开放阅读框(Adams 等,1989;Dervyn 等,1995), *Cry2A* 操纵子编码 ORF1、ORF2 和 *Cry2Aa* 3 种蛋白质,箭头指示转录方向

蛋白超量表达的机制,而且对高效 Bt 工程菌的构建也有一定的指导意义。本文就这方面的研究进展作一综述。

1 P20 及其功能

Mclean 和 Whiteley(1987)在研究 27kD 的 *cyl1Aa* 基因的克隆与表达时,发现位于 *cyl1Aa* 上游区的 4kb 片段对于 *cyl1Aa* 基因在大肠杆菌中的充分表达是必需的^[13]。该上游片段无论顺式(cis)还是反式(trans),作用相同。Tn5 插入突变结果表明该区内对 Cyt1Aa 表达所必需的 DNA 片段大约为 0.8kb。通过亚克隆等进一步分析表明该区编码一种 20kD 的蛋白质。当该区段存在时,27kD 的 *cyl1Aa* 基因的表达量大大提高。关于 P20 的作用水平,发现它对 *cyl1Aa* mRNA 的量没有明显的改变,说明其作用不是在转录水平。由此推测 P20 的作用可能是发生在转录后水平上。

在此基础上 Adams 等(1989)对该上游区作了序列分析,发现它含有一个完整的开放阅读框,编码一种分子量为 19.584kD 的蛋白质,定点突变结果进一步证实了它对 *cyl1Aa* 表达的影响来自该蛋白本身,而不是它的 mRNA 或 DNA^[14]。他们还发现,P20 的 mRNA 的出现时间(t_0)比 27kD 的 *cyl1Aa* 早 2h(t_2),而两种蛋白质是同时在 t_2 开始合成的。然而,在对数生长期内有少量的 P20 出现,而此时 27kD 的 Cyt1Aa 尚未合成。反转录酶分析发现 P20 基因有两个启动子,第一个位于起始密码子上游 23 个核苷酸处,仅在 t_0 期启动,是一强启动子;第二个位于 235 个核苷酸处,从 t_2 一直接续到 $t_{5.5}$ 期,是一弱启动子。这一结果与后来 Dervyn 等(1995)^[11]的报道结果不符合(图 1)。关于 P20 的作用机制,Adams 等(1989)推测该蛋白可能起脚手架蛋白(Scaffolding protein)的作用,有利于晶体的形成,或者能够防止晶体蛋白被蛋白酶降解^[14]。

在发现并克隆了 P20 基因之后人们对其功能作了进一步研究。Visick 和 Whiteley(1991)^[15]研究发现 P20 能够防止 Cyt1Aa 在菌体内被蛋白酶降解。他们将 Cyt1Aa 基因转入一些携带有突变 *rpoH*, *groEL* 或 *dnaK* 等分子伴侣基因的大肠杆菌突变株(它们对体内不正常的蛋白质具有较低的水解能力),免疫沉淀检测表明无论 P20 存在与否,*cyl1Aa* 都能够在这些大肠杆菌突变株菌体内正常表达,而在野生型菌体内只有在 P20 存在的情况下才能检测得到 Cyt1Aa 蛋白的表达。此外该蛋白同样可以提高 *cryIVD*(*cryIIAa*)在野生型大肠杆菌中的表达,但对 *cryIA*、*cryIB* 无效。研究还发现,同一个菌体内产生的 Cyt1Aa 蛋白和 P20 可以发生免疫共沉淀反应,而体外混合则无此反应,说明 P20 是通过与正在合成的 Cyt1Aa 的新生肽结合而发生作用的。P20 可能在细胞内起一种分子伴侣的作用,能够帮助蛋白分子的正确折叠。

2 P20 对以色列亚种不同杀虫晶体蛋白表达及晶体形成的影响

以色列亚种能产生多种性质不同的杀虫晶体蛋白。如 Cyt4Aa、Cyt4Ba 为大分子量原毒素,含有参与晶体形成的 C-半端(C-terminal half,约含 600 个残基,在原毒素活化后被除去)。CryIIAa 为中分子量蛋白,不含与晶体形成有关的 C-半端;Cyt1Aa 则为溶细胞性小分子量蛋白,其结构与 Cry 蛋白无同源性。P20 和 P19 蛋白基因与 CryIIA 基因位于一个操纵子中,并与 Cyt1A 基因位于一个质粒上^[1]。然而,以色列亚种中伴孢晶体形态并不规则。那么,这些辅助蛋白在以以色列亚种的杀虫晶体蛋白表达中作用如何呢?

2.1 对 Cyt1Aa 的作用

前已述及,在大肠杆菌中 Cyt1Aa 的大量表达离不开 P20 的帮助。那么,在苏云金芽胞杆菌内 P20 是否有同样的作用呢?在尚未弄清 P20 基因的启动子之前,Wu 和 Federici(1993)利用苏云金芽胞杆菌 *cryIAc* 的强启动子来确保 P20 的充分表达来研究它对 *cyl1Aa* 表达的影响^[5]。结果表明,在该蛋白存在的情况下,*cyl1Aa* 基因能在苏云金芽胞杆菌无晶体突变株中超量

表达,形成较大的双金字塔形伴胞晶体,芽胞形成也很正常。但是若无 P20 存在,CytlAa 的表达导致了受体细胞一进入芽胞分比期后即被杀死。Chang 等(1993)也发现,CytlAa 在无晶体突变体中的表达致使芽胞异常而且菌体裂解受到抑制^[7]。这些结果说明,若无 P20 存在,CytlAa 在菌体内表达后即与细胞膜结合而导致菌体生长受阻、甚至死亡。在大肠杆菌中,P20 同样能够防止 CytlAa 对菌体的致死作用而使细胞生长正常。

Cyt2Aa 来自九州亚种(*kyushuensis* subsp.),虽然它与 CytlAa 有 39% 的同源性和 70% 相似性(Similarity),但对 P20 的反应却不同。在没有 P20 存在的情况下,Cyt2Aa 蛋白照样能在大肠杆菌内大量产生并可以看到包涵体的形成,说明它的表达及晶体形成不需要 P20 的帮助,其晶体的形成不可能与它 C-端的作用有关。

2.2 对 Cyt4Aa 和 Cyt11Aa 的作用 在大肠杆菌中,P20 同样能够提高 Cry4Aa^[4]和 Cry11Aa 的表达量^[6,15]。但在苏云金芽孢杆菌无晶体突变株中,关于 Cry4Aa 甚至 CytlAa 的大量表达需不需要 P20 的存在结论却不一致。Wu 和 Federici(1995)报道,当将 20kD 蛋白基因置于 *cryIac* 强启动子的控制下,它在 Bt 无晶体突变株中同样能够促进 *cry11Aa* 的表达和晶体形成。Cry11Aa 形成的双梯型的(bitrapezoidal)伴胞晶体平均大小为 1.3×0.29×0.31 μm ,其体积为 *cry11Aa* 操纵子对照菌所产生的晶体的 1.7 倍^[6],由此可见,P20 可以促进 Cry11Aa 蛋白的表达和晶体形成。

相反,Chang 等(1993)则认为 20kD 蛋白对 Cry11Aa 的表达并不必需。他们从编码 CytlAa、Cry11Aa 和 P20(也包括 P19,当时尚未发现)的 9.4kb *HindIII* 片段上截取其中的一段,衍生出这几种蛋白的不同组合,然后插入穿梭质粒 pHT3101 并转化无晶体突变株,发现 CytlAa 及 Cry11Aa 的表达并不需要 P20 的存在。因此,作者认为无论 CytlAa 还是 Cry11Aa,只要有另外一种蛋白存在(不管是不是 P20)它们的表达量就会提高,P20 对它们的表达并不是必需的^[7]。值得注意的是,在该实验中 P19 与 P20、Cry11Aa 基因同在一个操纵子中,共用 P19 基因上游的启动子。但当时尚未发现 P19,因此其作用可能被忽视。总之,CytlA 和 Cry11A 基因的正常表达的确需要辅助蛋白的参与。

3 P20 对其它亚种的杀虫晶体蛋白生物合成及晶体形成的影响

一般认为,大分子毒素(130~140kD)晶体的形成是靠其 C-半端的参与,通过分子内或分子间二硫键形成,而缺少类似 C-半端的 Cry3A 则主要靠盐键作为晶体分子间的主要连结。因此,这些 ICPs 的晶体形成都不需要其它辅助蛋白的参与。然而 Cyt2A 缺少这类分子间的连结,Cyt2Aa 晶体的形成则离不开 ORF2 的参与。

3.1 对部分缺失的 Cry1C 的影响 Rang 等(1996)报道,P20 能够使缺失部分毒性肽区域的 Cry1C 的表达量略有提高^[8]。缺失的 Cry1C 虽然含有完整的 C-半端,但是也不能正常形成晶体,甚至 SDS-PAGE 检测不到明显的表达。在 P20 存在的情况下,通过 SDS-PAGE 则能够检测到这些不完整的 Cry1C 的表达,但是仍不能形成伴胞晶体。这说明 P20 对那些结构不正常的蛋白质也有一定的保护作用,而晶体形成与否,与晶体蛋白的结构完整性有直接关系。

3.2 对 Cry1Ab 的影响 P20 同样能够提高 *cry1Ab* 的表达,但是仍不能促进其晶体的形成。Cry1Ab 在苏云金芽孢杆菌无晶体突变株 BMB171 表达量很低。SDS-PAGE 分析几乎检测不到 Cry1Ab 130kD 的产物,电镜下仅能观察到很少的、极小的菱形晶体。而当 P20 存在时,Cry1Ab 的表达量有明显提高,但是仍难以形成晶体^[10]。这与 Cry1Ab 分子的 C-半端内二硫键的缺失有关。

3.3 对 Cry1Ac 的影响 在苏云金芽孢杆菌无晶体突变株中,P20 对 *cry1Ac* 的表达和伴胞晶体形成有明显的促进作用,毒力也有显著提高^[12]。在 P20 的参与下 Cry1Ac 的表达量为不含 P20 对照菌

的3.5倍,形成的双金字塔形伴胞晶体长达 $1.85\mu\text{m}$ 、宽 $0.85\mu\text{m}$,体积为对照菌的3倍,同时对初孵棉铃虫幼虫的毒力提高了1.5倍。进一步分析表明,P20是通过防止Cry1Ac新生肽免受胞内蛋白酶的降解而使得Cry1Ac表达量提高的。

3.4 对Cry2Aa的影响 Ge等(1998)比较了P20和*cry2Aa*操纵子中*orf2*编码的29kD蛋白对Cry2A蛋白质合成及晶体形成的影响^[9]。结果发现,在P20存在的情况下,Cry2Aa的表达量大约提高15%,在ORF2存在的情况下,Cry2Aa的表达量大约提高20%,在20kD和29kD两种辅助蛋白都存在的情况下,Cry2Aa的表达量大约提高45%。但是,在P20存在的时候,Cry2Aa只能形成不定型的内涵体;只有在ORF2存在的情况下Cry2Aa才能形成晶体。

总之,P20无论是天然存在于同一菌株的Cyt1Aa、Cry11Aa,还是来自其它亚种的杀虫晶体蛋白Cry1C、Cry2A、Cry1Ab、Cry1Ac等都能提高它们的表达量。并且对Cyt1Aa、Cry11Aa和Cry1Ac的晶体形成有明显的促进作用。

4 其它辅助蛋白对杀虫晶体蛋白表达及其晶体形成的影响

4.1 ORF2 *cry2Aa*是三基因操纵子中最远端的一个基因,与其上游的*orf1*、*orf2*共用一个芽胞分化依赖型的启动子。根据核苷酸序列推测*orf2*编码一种由252个氨基酸组成的多肽,该多肽含有15个氨基酸的motif 11次串联重复,第一个motif起始于第67个残基。当移码突变ORF2后,菌体生长到芽胞分化时不能形成Cry2Aa内含体。虽然可以检测得到Cry2Aa毒素的表达,但其表达量比含完整*orf2*基因的对照菌明显低。由此可见,Cry2Aa晶体的形成必须有ORF2的参与^[3]。Ge等(1998)也进一步证实ORF2的参与不仅可以提高Cry2Aa的表达量,而且能够帮助其形成晶体^[9]。ORF2的重复单元可能为Cry2Aa晶体的形成提供一个附着体(matrix)或脚手架(scaffold),有利于晶体的形成。

*cry2C*基因位于与*cry2Aa*相类似的操纵子中,其前面也有两个阅读框*orf1*和*orf2*,但是Cry2C晶体的形成并不需要ORF1和ORF2的参与。

4.2 19kD蛋白和ORF1 p19基因位于*cry11Aa*基因的上游,对于Cry11Aa的表达略有帮助;当p19基因与*cyt1Aa*基因串联后一起转入大肠杆菌后,Cyt1Aa对细胞的致死作用比不含p19的对照强,这可能是P19促进了Cyt1Aa在大肠杆菌内的表达^[11]。另外,P19同样能够促进Cry1Ab在苏云金芽孢杆菌无晶体突变株中的表达,其作用效果与P20相似。

*orf1*是*cry2Aa*操纵子中的第一个基因,与*cry11Aa*操纵子中的p19基因有33%的同源性,初步发现它对Cry2A的正常表达无明显作用。目前还未发现ORF1对其它Cry蛋白的表达的影响。

综上所述,大部分辅助蛋白对苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白的表达有促进作用,甚至对晶体的形成是必需的。P20在杀虫晶体蛋白表达中起着分子伴侣的作用,而ORF2对伴胞晶体形成过程中起着脚手架蛋白的作用,类似的蛋白(如其它分子伴侣)可能对杀虫晶体蛋白的表达也具有相似的作用,它们可用于高效表达工程菌的构建。

参 考 文 献

- [1] Dervyn E, Poncet S, Klier A, et al. J Bacteriol, 1995, 177: 2283~2291.
- [2] Winder W R, Whiteley H R. J Bacteriol, 1989, 171: 965~974.
- [3] Crickmore N, Ellar D J. Mol Microbiol, 1992, 6(11): 1537~1537.
- [4] Yoshisue H, Yoshida K, Sen K, et al. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56: 1429~1433.

- [5] Wu D, Federici B A. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 5276~5280.
- [6] Wu D, Federici B A. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **42**: 697~702.
- [7] Chang C, Yu Y M, Dai S M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 815~821.
- [8] Rang C, Bes M, Lullien~Pellerin V, *et al.* *FEMS Microbiol Letts*, 1996, **141**: 261~264.
- [9] Ge B X, Bideshi D, Moar W J, *et al.* *FEMS Microbiol Letts*, 1998, **165**: 35~41.
- [10] Liu Z Z, Shao Z Z, Zheng R, *et al.* In: *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*, Beijing: Science Press, 1999, **3**: 107~112.
- [11] 刘子铎, 孙明, 喻子牛, 等. *微生物学报*, 1999, **39**(2): 114~119.
- [12] Shao Z Z, Liu Z Z, Yu Z N. In: *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*. Beijing: Science Press, 1999, **3**: 122~125.
- [13] Mclean K, Whiteley H R. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 1017~1023.
- [14] Adams L F, Visick J E, Whiteley H R. *J Bacteriol*, 1989, **17**(1): 521~330.
- [15] Visick J E, Whiteley H R. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 1748~1756.