

几种旋孢腔菌毒素产生的分子生物学进展

董金泉 王江柱 阎淑娟 刘国振*

(河北农业大学植保系, 保定 071001)

旋孢腔菌(*Cochliobolus*)是植物上的一类重要病原真菌, 业已表明许多种可以产生寄主选择性毒素。自从1946~1948年北美燕麦维多利亚疫病菌(*Cochliobolus victoriae*)产生的寄主选择性毒素(victorin)引起毁灭性的疫病以来, 人们已经认识到这类重要病原菌的次生代谢产物在植物病害中起着极其重要的作用^[1,2]。目前, 人们正在对植物与病原物互作体系中数以百计的病害特异性基因(病原物上称致病基因, 植物上称抗病基因)进行定位和分析^[3]。而寄主选择性毒素作为在植物-病原物互作体系中的特异性因子已受到植物病理学家和植物生理学家尤其是分子生物学家前所未有的高度重视。

1 旋孢腔菌毒素产生的遗传基础

在寄主选择性毒素的研究中, 人们比较感兴趣的是控制它们产生的遗传学。据报道, HMT-毒素(由异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)产生)是由遗传基因控制的^[4], 单基因控制着毒素的产生, 多基因控制着毒素产生的数量^[5]。研究表明, 玉米圆斑病炭色长蠕孢菌(*C. carbonum*)1号小种(产生毒素)和2号小种(不产生毒素)的杂交后代, 产生HC-毒素和不产生HC-毒素的比率为1:1。同样, 玉米小斑病异旋孢腔菌(*C. heterostrophus*)T小种和O小种随机杂交后形成的子囊孢子, 产毒素和不产生毒素也是1:1的分离比率。这些均表明, 上述二种毒素的产生是受一个单等位基因控制。Bronson(1991)报道在旋孢腔菌的三个种内, 即Tox1、Tox2和Tox3三个不同的单基因分别控制着异旋孢腔菌(*C. heterostrophus*)、炭色旋孢腔菌(*C. carbonum*)和维多利亚旋孢腔菌(*C. victoriae*)中HMT-毒素(引起玉米小斑病)、HC-毒素(引起玉米圆斑病)和HV-毒素(引起燕麦维多利亚疫病)的产生^[6]。长期以来, 虽然人们还无

法解释单基因是如何控制这些复杂次生代谢产物产生的, 但各种假设似乎支持毒素的单基因控制学说。例如, 旋孢腔菌的某种毒素可能是一种在Tox基因的非功能位点存在下积累的偶而有植物毒性的中间代谢产物。因而推测毒素的产生可能是隐性遗传, 而如果强行使异旋孢腔菌的Tox1和tox1株系成为异核体, 发现HMT-毒素的产生相对于不产毒菌来讲却是显性遗传^[7]。况且其他许多寄主选择性毒素的结构已表明它们不是代谢的中间产物, 更有可能的是Tox基因编码了多功能酶或基因群。在炭色旋孢腔菌中控制着HC-毒素生物合成的基因位点Tox2是一个至少54kb部分编码大分子多功能酶基因群的二个拷贝。对于Tox2来讲, 既然炭色旋孢腔菌的非产毒菌株缺少同源DNA, 那么整个DNA片段可分成单个孟德尔基因位点^[8]。在异旋孢腔菌T小种和维多利亚旋孢腔菌中, 有毒(*Tox*⁺)和无毒(*Tox*⁻)菌株杂交产生的后代均呈1:1的分离现象, 说明HMT-毒素和HV-毒素的产生由单基因控制。此外, 用维多利亚旋孢腔菌和炭色旋孢腔菌1号小种杂交产生的后代出现四种后代, 即: ①产HV-毒素或产HC-毒素的类型; ②都能产生HV-毒素和HC-毒素的类型; ③只产生HV-毒素的类型; ④只产生HC-毒素的类型。四个类型(其比例是1:1:1:1)进一步说明, HV-毒素和HC-毒素的产生是受单一基因控制的^[9,10]。

2 旋孢腔菌毒素产生的酶学研究

人们曾对许多细菌非特异性毒素产生的分子生物学进行大量研究^[11], 然而在真菌中人们却只研究了炭色旋孢腔菌HC-毒素生物合成的酶学。研究的目的是想了解HC-毒素是如何利用这

* 河北农业大学实验中心分子生物学实验室
1995-10-23 收稿

些酶来克隆 *Tox2* 基因的,而且对 *Tox2* 的研究有可能为研究其它旋孢腔菌,甚至其他真菌的 *Tox* 基因提供模式。早在 1961 年, Nelson 和 Ullstrup 在研究炭色旋孢腔菌 1 号和 2 号小种时因发现它们在没有 Hm 抗病基因的玉米上的致病性不同,提出 1 号和 2 号小种可能有一基因是不同的^[2],其实这一报道比发现 HC-毒素还要早,而且当时只了解这种真菌的小种专化致病性可能与这种未知基因有关,尚不知它的作用。后来当 Scheffer 和 Ullstrup^[13]发现只有炭色旋孢腔菌 1 号小种在培养中才能产生 HC-毒素这一选择性代谢产物后,人们才发现炭色旋孢腔菌产生 HC-毒素能力与早期鉴定的致病基因是不同的,这一基因后来称为 *Tox2*。目前已经明确,HC-毒素的化学结构是一环状四肽^[14],而且表明这种化合物的合成与其他小分子肽如短杆菌肽、短杆菌肽肽相似,即在一系列连续的酶促反应中,由某些大分子多功能酶催化合成了肽抗生素。首先,氨基酸被 ATP 活化,然后随着 AMP 的释放,它们以硫脂共价键的形式结合到酶上,于是在氨基酸之间形成了肽键,肽被释放出来,从氨基酸-腺苷酸这一步是可逆的平衡,而且它是非核糖肽合成酶交换 ATP/ppi 的基础。

HC-毒素的生物合成需要两种酶,即 HC-毒素合成酶 1(HTS-1)和 HC-毒素合成酶 2(HTS-2)。目前已经对这些酶进行了纯化。HTS-1,分子量 220ku,催化与 L-脯氨酸有关的 ATP/ppi 交换和使 L-脯氨酸差向异构为 D-脯氨酸的活动;HTS-2,分子量 160ku,催化与 D-丙氨酸和 L-丙氨酸有关的 ATP/ppi 交换和使 L-丙氨酸差向异构为 D-丙氨酸的活动,以上二种酶均以硫酯键与氨基酸底物共价结合。HTS-2 能够辨别 D-丙氨酸,并将它掺加在 HC-毒素中,这一发现为放射性标记 HC-毒素提供了方法。D-丙氨酸是一种相对专一的前体,实际上加到培养液中这种具放射性标记 D-丙氨酸只有 3%掺加到 HC-毒素中。

3 炭色旋孢腔菌毒素合成酶的克隆

目前,Scott-Craig 等^[15]用抗 HC-毒素合成酶 1 的鼠多克隆抗体筛选出了一种 lambda gtl1 表达

库,并从该库中分离到一种 cDNA 的克隆,开始编码 HTS-1 和 HTS-2 的研究,现已发现一种免疫确定性 cDNA 编码一种通过 HC-毒素合成酶直接排列获得的肽。几乎同时,Panaccione 等^[6],用这种 cDNA 作探针来鉴定包括编码 HTS-1 的基因,即克隆了 HTS-1 的基因。先不考虑 HTS-1 的分子细节及产物的功能如何?仅编码这个基因的染色体位点就有以下特征:①HTS-1 是 DNA 上的一段连续片段,长 22kb,同先前检查到的不产生 HC-毒素的炭色旋孢腔菌菌株或其他旋孢腔菌的 DNA 相比较没有同源性。HTS-1 特异性引物能通过 PCR 从 1 号小种的所有菌株的 DNA 扩增适当长度的片段,但是在其它小种或种的菌株上却从未获得成功(Jones 和 Dunkle, 1993);②这种 1 号小种特有的 22kb 的 DNA 二侧都被中度拷贝的 DNA 所包围。5' 和 3' 末端的部分区域相互间有同源性。同时和该菌中其他小种甚至与维多利亚旋孢腔菌的菌株的重复序列有同源性;③1 号小种特有的整个 22kb 片段,连同重复 DNA 5' 末端的至少 6kb 和 3' 端 2kb 片段均被复制。这种复制在已检查过的所有炭色旋孢腔菌 1 号小种菌株中均可发现,而且在遗传上是连锁的。这些发现无疑有助于启发人们对炭色旋孢腔菌小种特异致病性的研究。在炭色旋孢腔菌中,发现不产毒小种的 DNA 与产毒小种和具致病力小种 DNA 没有同源性,表明炭色旋孢腔菌生理小种的演变涉及到大片段 DNA 的缺失或插入。或许是在某一段时间,该病菌的所有种群都具有产生 HC-毒素的能力,但后来因某些菌株丧失了产毒能力,于是演变成了 2 号小种;也有可能某些种群最近又获得产毒能力,于是又演变成了 1 号小种。这个问题意义很大,假如 HC-毒素的产生是因一些小种丧失了某种祖传特性,那么旋孢腔菌产生新的产毒小种是不可能的。然而如果它们能够获得新的毒素合成基因,例如通过基因的水平漂移(horizontal gene transfer),这样具有新的产毒能力的菌株会周期性地出现。

奇怪的是位于 1 号小种特有的 22kbDNA 二端的重复 DNA 序列的存在与丝状真菌重复序列相比较是少见的。有限序列分析未能发现重复片

段与任何已知的基因或转位因子间的明显相似性。虽然 tox^+ 和 tox^- 菌株中普遍含有重复 DNA, 但还是不清楚它是存在于 tox^- 同源染色体的同一区域还是分散于整个基因组中。如果位于同一位点, 重复 DNA 内 $Tox2$ 位点可能会出现交叉互换, 最终导致 tox^+ 表现型出现不正常的分离比率。Ahn 和 Walton 最近指出利用 $Tox2$ 脉冲场凝胶电泳的物理图谱可以确定与 $Tox2$ 联系的重复 DNA 的本质和位置。

4 炭色旋孢腔菌毒素合成酶的歧化

用依赖于 L-脯氨酸的 ATP/ppi 互换来测定, 发现 HTS1 基因一条链近 5' 端的歧化会导致 HTS-1 50% 活性的降低, 但一条链歧化后产生 HTS1 突变型仍可产生毒素并引起正常 1 号小种同样的症状。尚若这些株系的第二条链在同一位点又发生歧化, 那么突变型完全失去了 HTS-1 的活性^[6]。这些二条链发生歧化的突变型菌株不产生 HC-毒素, 在感病玉米上引起的症状与 2 号小种相同, 即褪绿斑。这是迄今为止证明 HC-毒素在叶斑病害中具有必不可少作用的最有力的证据。然而, 试验还发现 HTS1 突变型随 HTS-1 活性的降低, HTS-2 的活性成比例下降^[8]。早期 Walton 和 Holden^[16] 曾证明 HTS-1 和 HTS-2 是二种作用不同的独立的酶。在后来的歧化试验中 HTS1 的两条链均在 3' 附近歧化, 产生的突变型不产生 HC-毒素, 并缺乏 1 号小种的致病性, 不过这些菌株却保持了 HTS-1 和 HTS-2 60% 的活性。所有通过 HTS-1 歧化产生的突变型在培养下积累一种新的含环氧化物, 这种代谢物同 HC-毒素中发现的氨基酸 Aeo (代表 2-氨基-9, 10-环氧-8-氧化癸酸) 明显有关, 野生型 1 号小种可微量产生这种分子, HTS1 的突变型大量产生, 而 2 号小种却根本不产生这种分子。因此, 含环氧化物同 HC-毒素有关, 可能作为前体或 Aeo 的支路代谢。果真如此的话, 表明这种分子不是通过 HTS1 基因的产物而合成, 而且 2 号小种缺乏产生它的酶。

5 炭色旋孢腔菌毒素合成酶的序列分析

HTS1 基因的歧化会导致 HTS-2 活性的降低, 它可以通过 HTS1 的序列分析来解决。HTS1

是一个大的 15.7kb 的开放阅读框架 (ORF), 能编码二种含 5215 个氨基酸的蛋白质和一个 Mr570ku 的多肽, 这是所有生物中的最大 ORF, 在通过 DNA 测序确定大小的多肽中, 它编码已知的第二大肽^[15]。ORF 的推断产物包括通过 HTS-1 直接排序可得到的肽段和一个由 HTS-2 排序得到的含 20 个氨基酸的肽。因此, HTS-1 和 HTS-2 是一个单一多肽的潜在部分。在一些 HTS 制剂中, 抗 HTS-2 的抗血清识别了一个大于 Mr480ku 的多肽, 这支持了 HTS-1 和 HTS-2 在细胞中作为大的单一多肽存在的假说。而且也推断 HTS1 产物具有非常类似于其它大分子抗生素合成酶的基本结构。Smith 等^[17] 报道 HTS1 和 ORF 推断的产物包括四个亚基, 每个亚基约含 600 个氨基酸。它们彼此之间以及与原核、真核生物肽合成酶类似亚基极为相似, 这些酶包括多种原核生物的丝状真菌的氨基-半胱氨酸-缬氨酸 (ACV) 合成酶以及短杆菌的短杆菌肽合成酶^[18]。至今研究过的多功能肽合成酶中, 某特定酶中亚基的数目与这种酶活性的氨基酸的数目是相应的。这种相关性对于 HC-毒素合成酶似乎正好适用, 因为玉米炭色旋孢腔菌的 HTS1 编码四个亚基, 而 HC-毒素正好是四环肽。

同 ACV 合成酶或短杆菌肽合成酶相比, HTS1 产物的四个亚基间的氨基酸几乎没有相似性^[9], 如果假设多功能肽合成酶基因起源于这样一个亚基的重复复制, 那么基于各自蛋白质亚基的相似性, HC-毒素合成酶要先于 ACV 合成酶或短杆菌肽合成酶而存在。Scott-Craig 等 (1992) 发现, HTS1 的最显著特征是它明显缺乏内含子, 而所有四个已知的其他炭色旋孢腔菌基因, 尽管只相当于 HTS1 大小的一个片段, 却都包含 1 或 2 个内含子。人们一直怀疑 $Tox2$ 是不是其他 Tox 基因的前体, 因为首先, 通过常规诱变未能获得异旋孢腔菌的 $Tox1$ 突变型, 失败的原因可能同 $Tox2$ 一样, 一些或全部的 $Tox1$ 都是复制的^[20]。另一方面, 维多利亚旋孢腔菌的 $Tox1$ 和 $Tox3$ 也能分别编码 HMT-毒素和 HV-毒素合成酶。HV-毒素是一环肽, 所以毫无疑问它的合成在结构和功能上与 HC-毒素合成酶及其他

环肽合成酶是相似的。HMT-毒素是多肽,而且已知的所有多肽都是由基因群编码的大分子、多功能合成酶合成的^[2]。多肽和环肽在功能上是相似的。Panaccione 和 Walton 最近利用 PCR 技术已克隆了维多利亚旋孢腔菌肽合成酶基因的片段,且正通过目的基因的歧化来检验它们在 HV-毒素合成中的作用以及它们与 *Tax3* 的关系。与 *Tax2* 相反,在所有检验过的旋孢腔菌种内都发现编码推断的 HV-毒素合成酶的 DNA。目前,尽管人们正在集中力量研究毒素产生的分子生物学,但由于种种原因,进展不甚顺利,不过我们相信,随着分子生物学科的发展,这些研究一定能够不断深入,这无疑为推动研究寄主与病原物互作的分子机制奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 董金泉,黄梧芳. 河北农业大学学报. 1988, 11(2): 123~128.
- [2] 章元寿. 真菌学报. 1991, 10(3): 169~181.
- [3] Walton J D, D G Panaccione. Annu Rev Phytopathol. 1993, 31: 275~303.
- [4] Smedgard-Peterson V, R R Nelson. Phytopathology, 1969, 59(4): 402.

- [5] Lim S M, A L Hooker. Genetics 1971, 69: 115~117.
- [6] Bronson C R. Experientia. 1991, 47: 771~776.
- [7] Leach J. Physiol. plant Pathol. 1982, 21: 327~333.
- [8] Panaccione D G. Proc. Nat Acad. Sci. USA 1992, 89: 6590~6594.
- [9] Yoder O C. Annu. Rev. Phytopathol. 1980, 18: 103~129.
- [10] Tsuge T. In "Host-Specific Toxins" Tottori Univ. Press: 1989, 153~170.
- [11] Willis D K. Experientia, 1991, 47: 765~771.
- [12] Nelson R R, A J Ullstrup. Phytopathology. 1961, 51: 1~2.
- [13] Scheffer R P, A J Ullstrup. Phytopathology. 1965, 55: 1037~1038.
- [14] Walton J D. Biochem Biophys. Res. Commun. 1982, 107: 785~894.
- [15] Scott-Craig J S. J. Biol. Chem. 1992, 267: 26044~26049.
- [16] Walton J D, F R Holden. Mol. Plant-Microbe Interact. 1988, 1: 128~134.
- [17] Smith D J. EMBO J. 1990, 9: 2743~2750.
- [18] Turgay K. Mol. Microbiol. 1992, 6: 529~546.
- [19] Scott-Craig J S. Plant Cell. 1990, 2: 1191~1200.
- [20] Bronson C R, D C Yoder. In "Host-specific Toxins" Tottori Univ Press: 1989, 171~185.
- [21] Hopwood D A, D H Sherman. Annu. Rev Genet. 1990, 24: 37~66.