

黄曲霉毒素生物合成途径调节基因 *aflR*

陈 茹 刘钟滨*

(同济大学医学院病原生物学教研室, 上海 200092)

摘要 黄曲霉毒素生物合成途径调节基因在黄曲霉毒素产生过程中发挥十分重要的作用, 它为绝大多数黄曲霉毒素合成相关基因的表达所必需。黄曲霉毒素生物合成途径调节基因的启动子中, 含有若干真菌转录因子同源物的假定结合位点。AflR 蛋白是黄曲霉毒素生物合成途径中的主要正性转录因子, 它调节大多数黄曲霉毒素合成相关基因, 也包括其自身基因的表达。

关键词 黄曲霉毒素; 黄曲霉毒素生物合成途径调节基因; 生物合成

由某些曲霉菌产生的黄曲霉毒素(aflatoxins, AF)是一类引起肝细胞癌的强致癌剂, 主要包括: AFB1、AFB2、AFG1、AFG2, 其中 AFB1 是毒性最强的致肝癌毒素。AF 不仅对人类健康危害极大, 而且通过污染农作物给国民经济造成巨大损失。AF 的生物合成过程非常复杂, 共涉及到 21 步酶促反应^[1]。迄今, 大部分与 AF 及其前体柄曲霉素(sterigmatocystin, ST)生物合成相关的酶促反应已为人们所认识, 这些酶的编码基因也相继被克隆^[2]。参与 AF 合成的绝大多数基因聚集于某特定基因簇中, 其中包括黄曲霉毒素生物合成途径调节基因(aflatoxin biosynthetic pathway regulatory gene, *aflR*), 该基因为其他参与 AF 合成的基因表达所必需^[3]。本文围绕近年有关 *aflR* 基因的研究进展, 作一综述。

1 *aflR* 基因

在黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*, *A.flavus*)和寄生曲霉菌(*Aspergillus parasiticus*, *A.parasiticus*)中, 参与 AF 生物合成的约 20 个左右基因聚集于一个约 70 kb 的基因簇中, 其中包括 *aflR* 基因, 它位于参与 AF 合成的早期基因如 *fas1*、*fas2*、*pksA* 和晚期基因如 *estA*、*ver1*、*omtA*、*ordA* 之间^[2]。Ehrlich 等^[4]对来自曲霉菌 Flavi 群的黄曲霉菌、寄生曲霉菌、*A.nomius*、*A.bombycis* 和 *A.pseudotamarii* 等 5 个产 AF 菌种的 28 个菌株的 *aflR* 编码区进行比较, 发现此区域的长度从黄曲霉菌 S_{BG} 的 1305 bp 到 *A.pseudotamarii* 的 1350 bp 不等。

研究者从多个角度证明了 *aflR* 在 AF 产生中的重要性: *aflR* 为其他 AF 合成相关基因的表达所必需^[3], *aflR* 的中断可抑制其他 AF 合成相关基因的表

达^[5]。用一个野生型 *aflR* 转化 *aflR* 突变的黄曲霉菌, 可恢复 AF 合成相关基因的转录^[6]。用包含完整 *aflR* 的质粒转化寄生曲霉菌, 转化株产生的 AF 相关代谢物比未转化株多 5 倍^[3]; *aflR* 的表达产物 AflR 蛋白是 AF 生物合成途径中的主要正性转录因子^[3], 大多数 AF 合成相关基因受 AflR 蛋白的调节^[4]; 一些环境和营养因素如 pH、温度、氧气、碳源、氮源可能通过影响 *aflR* 的表达而影响 AF 的生物合成^[7]。

黄曲霉菌、寄生曲霉菌、米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*, *A.oryzae*)和酱油曲霉菌(*Aspergillus sojae*, *A. sojae*)同属于曲霉菌 Flavi 群, 它们不但在形态上相似, 而且许多基因序列的同源性也很高^[8]。研究者普遍认为酱油曲霉菌是由寄生曲霉菌派生的一个变种^[9], 而米曲霉菌被认为是由黄曲霉菌进化而来^[10]。米曲霉菌和酱油曲霉菌也有 *aflR* 和其他 AF 合成相关基因的同源物^[8,11]。但黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生 AF, 而米曲霉菌和酱油曲霉菌不产 AF 并且广泛用于工业酶制剂和发酵食品的生产。

将酱油曲霉菌的 *aflR*(*aflRas*)与寄生曲霉菌的 *aflR*(*aflRap*)进行比较发现: *aflRas* 包含 2 个明显的突变即位于 AflR 蛋白氨基末端的 HAHA 序列和 *aflR* 基因序列中一个提前出现的终止密码子。HAHA 序列指的是在 111~114 位点出现的 His 和 Ala 残基的重复序列^[11]。提前出现的终止密码子指的是与 *aflRap* 中编码 Arg385 的密码子 CGA 不同, 在 *aflRas* 中该密码子发生由 C 到 T 的突变而成为一个提前出现的

收稿日期: 2005-02-24 接受日期: 2005-04-18

* 通讯作者。Tel: 021-65985615, Fax: 021-65983793, E-mail:

lzbj@126.com

终止密码子 TGA, 这导致在羧基末端酱油曲霉菌的 AflR 蛋白(AflRas)比寄生曲霉菌的 AflR 蛋白(AflRap)短缺了 62 个氨基酸, 这种短缺可造成 AflRas 羧基末端转录激活区域的丢失, 该区域对于 AF 合成相关基因的表达是很关键的^[8,11]。构建一个包含突变体 HAHA 序列和一个正常羧基末端区域的杂交 *aflR*, 这种杂交 *aflR* 的转化株产生的 AF 前体的数量与野生型 *aflRap* 转化株相近。由于除了突变体 HAHA 序列外, 杂交 AflR 与 AflRap 是完全相同的, 可见氨基末端的 HAHA 序列对 AflR 蛋白的功能并不重要^[11,12], 它很可能与 AflRas 转录激活功能的缺失无关。因此可推测 *aflRas* 中提前出现的终止缺陷是导致酱油曲霉菌不产 AF 的原因之一^[8,11]。

Takahashi 等^[8]选用去除了 *aflR* 基因的寄生曲霉菌 CS10-N2 Δ *aflR* 为宿主菌, 将酱油曲霉菌 *aflR* 基因插入载体 PGSR80, 用其转化寄生曲霉菌 CS10-N2 Δ *aflR*, 用 real-time PCR 定量检测 *aflR* 基因的表达量, 结果表明在 CS10-N2 Δ *aflR* 转化株中, *aflR* 的表达量是野生型寄生曲霉菌 CS10-N2 的 1/2 稍强。这个结果表明 *aflRas* 在寄生曲霉菌基因背景中的表达是相对较高的, 而 *aflRas* 在酱油曲霉菌的基因背景中却不表达, 这提示酱油曲霉菌菌株中, 除了 *aflRas* 的转录提前出现终止外, 还有另外的缺陷存在, 使得这些菌株的潜在产 AF 能力进一步削弱。

2 *aflR* 的启动子

aflJ 是位于 AF 生物合成基因簇内的紧邻 *aflR* 上游并且与 *aflR* 有密切关系的基因, 现一般认为 *aflR/aflJ* 基因间区域即 *aflR* 的启动子部位。Ehrlich 等^[4]对上述 28 个曲霉菌株的 *aflR* 启动子进行比较, 发现其长度从 *A.pseudotamarii* 的 689 bp 到黄曲霉菌 *S_{BG}* 的 745 bp 不等, 并且还发现 *aflR* 的启动子含有真菌转录因子 AflR、AreA、AbaA、BrlA 和 PacC 同源物的假定结合位点。

不同氮源对 AF 生物合成的抑制或促进作用可能因菌种的不同而不同, 这取决于它们 *aflR* 启动子中 AreA 结合位点的存在与否, 而 *aflR* 启动子中的 AreA 结合位点可能是 GATA 位点。对 28 个曲霉菌株的研究发现^[4], 它们的 *aflR* 启动子区域至少包含 2 个 GATA 位点, 并且在寄生曲霉菌、黄曲霉菌 *S_B*、黄曲霉菌 L、*A.nomius* N16 和 *A.pseudotamarii* 菌株中, 两个 GATA 位点之间的间隔为 15 bp, 以前证明这种毗连的位点足以激活由 AreA 所介导的转录。

对若干株寄生曲霉菌的 *aflR* 启动子的研究表明^[13], 有的菌株有 GATA 位点 1 和 2, 有的菌株只有单独的 GATA 位点 5。*aflR* 启动子中 GATA 位点的多样性以及不同真菌 AF 产量的差异性, 使人们能更好地了解不同氮源对 AF 合成相关基因转录的调节作用。

Ehrlich 等^[4]对上述 28 个曲霉菌株进行研究, 发现除黄曲霉菌 *S_B* 和黄曲霉菌 L 之外, 在其他菌株的 *aflR* 启动子中都存在假定的 BrlA 结合位点, 一些 *A.nomius* 菌株有 2 个假定的 BrlA 结合位点, 而其他菌株只有 1 个 BrlA 结合位点, 已证实 BrlA 是一种参与构巢曲霉菌(*Aspergillus nidulans*, *A.nidulans*)发育调节的转录因子。他们还发现 AbaA 的结合位点位于 BrlA 结合位点的上游。据 Sewall^[14]报道, 转录因子 BrlA 和 AbaA 可能介导某些与真菌发育相关的基因的表达, 但不直接参与调节 AF 的生物合成。

已知 pH 是影响 AF 生物合成的重要因素, 不同曲霉菌对 pH 的敏感性各不相同, 它们 AF 的产量也因此存在差异。Ehrlich 等^[4]发现不同曲霉菌对 pH 敏感性的差异在一定程度上与 *aflR* 启动子中 PacC 结合位点的存在与否有关。PacC 是参与 pH 依赖基因表达调控的转录因子, Orejas 等^[15]发现在碱性环境中 PacC 的羧基末端发生部分缺损, 正是这种截短的 PacC 可能抑制某些酸依赖基因如 *aflR* 的表达。Ehrlich 等^[4]对上述 28 个曲霉菌株的研究发现, 除了寄生曲霉菌、*A.pseudotamarii* 和源于 Benin 的 *A.nomius*(N20-22)以外, 在其他菌株的 *aflJ* ORF 附近存在 PacC 结合位点 1。在寄生曲霉菌、黄曲霉菌 L、*A.bombycis* 和 *A.pseudotamarii* 菌株的 *aflR* ORF 附近存在 PacC 结合位点 2, 但在 *A.nomius*、黄曲霉菌 *S_B* 和黄曲霉菌 *S_{BG}* 菌株中不存在 PacC 结合位点 2。PacC 结合位点 1 靠近 *aflJ* ORF 以及 PacC 结合位点 2 靠近 *aflR* ORF, 这说明 PacC 可能参与 *aflJ* 和 *aflR* 这两个基因表达的 pH 调控。曲霉菌株中 PacC 结合位点的多样性使人们有可能更客观地认识 PacC 在 *aflR* 转录调控中的作用。

黄曲霉菌和寄生曲霉菌在进化过程中逐渐产生某种调控机制, 该机制通过增加 *aflR* 启动子中对环境因素敏感的特定转录调节位点(例如 GATA 位点和 PacC 结合位点)的数量, 而在转录水平控制蛋白质的产生^[4]。

为了分析 *aflR* 启动子的功能, 用经适当改动后的启动子去驱动一个大肠杆菌 β -葡萄糖醛酸酶编码基因 *uidA* 的表达。结果表明移走启动子中从 -758

到-280的区域对启动子活性无影响。但进一步移走-280到-118的序列会使该基因表达增强约5倍。再进一步移走从-118到-100的区域,几乎完全消除了该基因的表达。因此,从-280到-118的区域似乎存在一个 *aflR* 启动子活性的负调节位点,而从-118到-100这18bp的区域可能对 *aflR* 启动子的活性有重要意义^[7]。

Cary等^[5]已确定了位于 *aflR* 启动子中的3个顺式作用位点,这3个位点可能参与AF合成相关基因表达的正性调节。其中一个就是从-118到-100的区域,该区域是AflR蛋白结合位点。另外2个分别是:富含G+A的位点(紧接着AflR蛋白结合位点下游,并且靠近 *aflR* 基因的转录起始点)、PacC蛋白结合位点(-164到-159)。分别去除这3个位点都将导致AF前体产物OMST产量的减少。

3 AflR蛋白

aflR 基因的表达产物AflR蛋白属于双核锌指DNA(binuclear zinc-finger DNA)结合蛋白家族,该家族是一类在丝状真菌和酵母菌中发现的代谢途径特异性调节蛋白^[6]。AflR蛋白是作为AF生物合成途径中的主要正性转录因子来发挥其调节作用的,除 *estA* 基因外,AF生物合成途径中相关酶基因的表达都受到AflR蛋白的正性调节^[16]。AflR是一种GAL4型序列特异性DNA结合蛋白^[3]。AflR含有类似于酵母菌和真菌中的其他GAL4型蛋白的相应结构域^[3,17]。AflR蛋白序列中有几个部分是高度保守的,这些区域包括:核定位信号区(RRARK, aa20~24)、DNA结合区(aa29~66)和C末端转录激活区^[3,4]。

核定位信号区为核信息传递所必需,它对转录因子行使其功能有重要意义。用在假定的核定位信号区发生突变的质粒(去掉了RRARK)转化寄生曲霉菌RHN1,结果转化株所产生的AF相关代谢物只有未转化株的1/5^[3]。

AflR的DNA结合区包含锌簇区[Cys₆Zn₂序列(aa29~56)]和连接区(aa57~66)^[4],这两个区域为序列特异性DNA结合所必需。例如寄生曲霉菌RHN1是寄生曲霉菌SRRC2043的硝酸盐还原酶突变株,它可累积性地表达AF前体产物OMST,用含有突变的锌簇区基因的质粒(aa49的半胱氨酸突变成色氨酸)转化寄生曲霉菌RHN1,结果转化株所产生的OMST只有未转化株的1/5^[3]。这说明含有不完整锌簇区的AflR不能激活其他AF合成相关基因的表达。另外,

GAL4型转录因子中DNA结合区C末端的氨基酸决定DNA结合的特异性。

连接区下游是富含组氨酸的区域,该区域的大小因菌种而异^[4]。这样的组氨酸重复区域存在于很多真核转录因子中,并且它可能与pH调控的蛋白质-蛋白质相互作用有关。AflR序列中这些组氨酸重复区域的大小可能是不同pH环境下AflR活性的决定性因素^[4]。

C末端转录激活区是位于AflR羧基末端60个氨基酸之内的与转录激活相关的区域,该区域可激活AF合成相关基因的表达。缺少转录激活区的AflR不能激活它自身基因的表达,也不能激活其他AF合成相关基因的表达^[3]。该结果进一步表明 *aflR* 的表达是自我调节的。

此外,在 *A.nomius* 和 *A.bombycis* 的AflR序列中的富含丝氨酸的区域是一个明显的PEST区域(富含脯氨酸、谷酰胺、丝氨酸、苏氨酸的区域),该区域可能是磷酸化作用和泛素介导的蛋白质水解作用的靶位点。而在其他产AF菌种的AflR序列中不存在类似区域。PEST区域可能反映了 *A.nomius* 和 *A.bombycis* 不同于其他产AF菌种的调节机制或者是进化中出现的无功能残留区^[4]。

研究表明AflR不但结合于其他AF合成相关基因启动子的某些特异位点,而且也结合于它自身基因 *aflR* 启动子的某特异位点^[3,6]。像其他GAL4型DNA结合蛋白一样,AflR很可能以一个二聚体形式结合于DNA。AF合成相关基因的启动子中通常都存在公认的AflR结合位点:TCG_NCGA。在 *aflR* 的启动子中未发现该位点,但在黄曲霉菌和寄生曲霉菌的 *aflR* 启动子中发现了TCG_{tccgg}(N₆)CGA序列,该序列是黄曲霉菌和寄生曲霉菌中与上述公认AflR结合位点的同源性最高的序列^[18]。现认为AflR既参与其他AF合成相关基因的转录调节,也参与自身基因的转录调节^[6]。AflR通过一个GAL4型双核锌指DNA结合区(aa29~56)和一个酸性区(aa349~380^[12])而上调它自身的表达^[19]。

另外,AflR与AflJ彼此间可发生相互作用^[18]。研究表明在酱油曲霉菌中AflR与AflJ相互作用能力的丧失可抑制AF合成相关基因的转录^[20]。AflJ是 *aflJ* 基因的表达产物,它在黄曲霉毒素生物合成途径中发挥重要作用。AflJ直接参与AF生物合成途径中某些酶蛋白结构基因(*pksA,norI,verl,omtA*)的转录调节, *aflJ* 基因的中断将在很大程度上降低上述基

因的转录水平^[18]。Meyers 等^[21]也曾报道黄曲霉菌转化株中 *aflJ* 基因的插入中断可明显降低 AF 的产量。*AflJ* 的大多数区域对 *AflR* 与 *AflJ* 的相互作用很重要,对寄生曲霉菌的 *AflJ* 的删除实验表明:若去除 *AflJ* 的起始 2 个氨基酸残基,对其与 *AflR* 的相互作用能力没有明显影响;若去除 *AflJ* 的起始 9 个氨基酸残基,可使上述相互作用能力丧失 85%~90%;去掉 *AflJ* 的其他区域也会削弱上述相互作用能力。*AflR* 的中间和羧基末端区域对上述相互作用也很重要,特别是 *AflR* 羧基末端含有 Arg427、Arg429、Arg431 的某个区域的完整性对 *AflR* 与 *AflJ* 的相互作用十分关键^[18]。但研究表明,像大多数 AF 合成相关基因一样, *aflJ* 通常是受 *AflR* 调节的,在经研究的菌株中,绝大部分菌株的 *aflJ* ORF 上游 68~78 bp 处存在与已知 *AflR* 结合位点同源的序列^[4]。

4 小结

aflR 是 AF 生物合成途径的关键性调节基因, *aflR* 的表达产物 *AflR* 蛋白是 AF 生物合成途径中的主要正性转录因子,它参与包括它自身基因在内的大多数 AF 合成相关基因的转录调节。影响 AF 生物合成的因素很多,而某些因素可能正是通过调节 *aflR* 的表达进而影响 AF 合成相关基因的转录来发挥作用

的。正由于 *aflR* 基因的重要性,有理由推测 *aflR* 基因及其启动子变异与黄曲霉毒素产生存在一定的关联,但有关研究还有待深入。有关 *aflR* 基因的深入研究将有助于进一步阐明 AF 的产生机制,从而为采取有效措施控制 AF 的产生打下理论基础。

参考文献 (References)

- [1] Bhatnagar D *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**: 83
- [2] Yabe K *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**: 745
- [3] Ehrlich KC *et al.* *Fungal Genet Biol*, 1998, **23**: 279
- [4] Ehrlich KC *et al.* *Fungal Genet Biol*, 2003, **38**: 63
- [5] Cary JW *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **53**: 680
- [6] Chang PK *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 2508
- [7] Ehrlich KC *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1444**: 412
- [8] Takahashi T *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3737
- [9] Klich MA *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **47**: 246
- [10] Geiser DM *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 388
- [11] Matsushima K *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**: 585
- [12] Chang PK *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 2372
- [13] Chang PK *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1491**: 263
- [14] Sewall TC. *Can J Microbiol*, 1994, **40**: 1035
- [15] Orejas M *et al.* *Genes Dev*, 1995, **9**: 1622
- [16] Yu J *et al.* *Mycopathologia*, 2002, **156**: 227
- [17] Lamb HK *et al.* *Microbiology*, 1996, **142**: 1477
- [18] Chang PK. *Mol Genet Genomics*, 2003, **268**: 711
- [19] Watson AJ *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 307
- [20] Chang PK. *J Biotechnol*, 2004, **107**: 245
- [21] Meyers DM *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3713

The Aflatoxin Biosynthetic Pathway Regulatory Gene

Ru Chen, Zhong-Bin Liu*

(Department of Pathogen Biology, Medical College, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract The aflatoxin biosynthetic pathway regulatory gene plays a key role in the production of aflatoxin, and it is required for the expression of most aflatoxin pathway genes. In the promoter of the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory gene, there exist some putative binding sites for homologs of fungal transcription factors. The *AflR* protein acts as a main positive transcription factor in the aflatoxin biosynthetic pathway, and the *AflR* protein can modulate the expression of most aflatoxin pathway genes including its own gene.

Key words Aflatoxin; *aflR*; biosynthesis

Received: February 24, 2005 Accepted: April 18, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-21-65985615, Fax: 86-21-65983793, E-mail: lzbjh@126.com