

的 $\alpha$ 亚类有同源性。已知NF- $\kappa$ B/1 $\kappa$ B(NF, nuclear factor of human B cell)信号途径参与动物的许多抗病反应,提示植物SAR信号途径可能是高等生物有机体中古老的、普遍存在的防御机制<sup>[38]</sup>。对动、植物防御反应机制的进一步比较研究必将有助于加深对植物防御反应的理解。

## 摘 要

水杨酸和茉莉酸是介导植物防御反应的两种重要信号分子。它们的生物合成途径迥然不同、对PRs以及防御反应的诱导方面具有相对独立性;虽然两者之间存在若干相互拮抗现象,但它们在介导植物防御反应中却又表现出一定的协同效应。本文综述了两者关系研究中的一些新进展,并提出该领域亟待解决的有关问题,以期为了解、调控和利用植物防御反应提供理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Raskin, I. et al., 1992, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43**:439.
- [2] Ellis, B. E. et al., 1971, *Phytochem.*, **10**:3069.
- [3] Farmer, E. E. et al., 1992, *Plant Cell*, **4**:129-134.
- [4] White, R. F., 1979, *Virology*, **99**:410-412.
- [5] Malamy, J. et al., 1990, *Science*, **250**:1002-1004.
- [6] Metraux, J. P. et al., 1990, *Science*, **250**:1004-1006.
- [7] Uknes, S. et al., 1996, *MPMI*, **6**:692-698.
- [8] Creelman, R. A. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4938-4941.
- [9] Albrcht, T. et al., 1993, *Planta*, **191**:86-94.
- [10] O, Donnell, P. J. et al., 1996, *Science*, **274**:1914-1917.
- [11] Seo, S. et al., 1995, *Science*, **270**:1988-1991.
- [12] McConn, M. et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:5473-5477.
- [13] Farmer, E. E., 1994, *Plant Mol. Biol.*, **26**:1423-1437.
- [14] Wieringa-Brants, D. H. et al., 1998, *J. Phytopathol.*, **123**:333-343.
- [15] Gaffney T et al., 1993, *Science*, **261**:754-756.
- [16] Farmer, E. E. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:7713-7716.
- [17] Mason, H. S. et al., 1990, *Plant Cell*, **2**:569-579.
- [18] Farmer, E. E. et al., 1992, *Plant Cell*, **4**:129-134.
- [19] Heitz, T. et al., 1997, *Plant Physiol.*, **114**:1085-1093.
- [20] Xu, Y. et al., 1994, *Plant Cell*, **6**:1077-1085.
- [21] Howe, G. A. et al., 1996, *Plant Cell*, **8**:2067-2077.
- [22] Wildon, D. C. et al., 1992, *Nature*, **360**:62-65.
- [23] Pearce, G. et al., 1991, *Science*, **253**:895-898.
- [24] Van Loon, L. C. et al., 1985, *Plant Mol. Biol.*, **4**:111-116.
- [25] Van Loon, L. C. et al., 1994, *Plant Mol. Biol. Rep.*, **12**:245-264.
- [26] Ohashi, Y. et al., 1992, *Plant Cell Physiol.*, **33**:819-826.
- [27] 大桥佑子等, 1998, 植物的化学调节, **33**(2):266-267.
- [28] Ohshima, M. et al., 1990, *Plant Cell*, **2**:95-106.
- [29] Hennig, J. et al., 1993, *Plant J.*, **4**:481-493.
- [30] Doherty, H. M. et al., 1988, *Physiol Mol. Plant Pathol.*, **33**:377-384.
- [31] Doares, S. H. et al., 1995, *Plant Physiol.*, **108**:1741-1746.
- [32] Niki, T. et al., 1998, *Plant Cell Physiol.*, **39**:500-507.
- [33] Ward, E. R. et al., 1991, *Plant Cell*, **3**:1085-1094.
- [34] Seo, S. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:10556-10560.
- [35] Seo, S. et al., 1996, *Plant Cell Physiol.*, **37**:762-769.
- [36] 李兆亮等, 1998, 植物学报, **40**(5):430-436.
- [37] 吴献忠等, 1998, 植物病理学报, **28**:173-174.
- [38] Ryals, J. et al., 1997, *Plant Cell*, **9**:425-439.
- [39] 曾晓春, 周燮, 1999, 植物学报, **41**(5):560-562.
- [40] Zeng X. C. et al., 1999, *J Plant Growth Regulation*, **18**:153-158.
- [41] 高夕全等, 2000, 中国农学通报, **16**: (3)7-9.
- [42] 甘立军等, 2000, 植物生理学通讯, **6**.
- [43] 刘世家等, 2000, 作物学报, **12**:印刷中.
- [44] Gundlach H et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**:2389-2393.
- [45] Laudert D et al., 1998, *Plant J*, **15**:675-684.
- [46] Shah J, et al., 1999, *Plant Cell*, **11**:191-206.
- [47] Felton GW et al., 1999, *Current Biology*, **9**:317-320.
- [48] Maleck K et al., 1999, *Trends in plant science*, **4**:215-219.
- [49] Gonoud T et al., 1999, *Trends in plant science*, **4**:503-507.
- [50] Pieterse CMJ et al., 1998, *Plant Cell*, **10**:1571-1580.
- [51] 宋平, 博士学位论文, 2000, p51-53.

## 核糖体灭活蛋白及其在植物抗真菌病基因工程中的应用

李巧丽 袁月星 黄祥辉

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

真菌病是造成作物减产的主要原因之一,是长期以来作物育种学家一直在努力攻克的难题。虽然在病害防治中采取了综合防治措施,并取得了一定

的成效,但各种方法都有其局限性,如化学防治造成病原菌的耐药性和环境污染,传统抗病育种周期长,而新品种又易被新的病原真菌毒性生理小种所淘汰

等缺点。近年来随着分子生物学的迅速发展,抗病基因工程应运而生,它为人们提供了一种既不污染环境又稳定有效的防病方法。

植物界大量存在具有离体抑制真菌生长增殖能力的蛋白质,相应基因在转基因植株中表达,可使这些植株产生抗真菌能力。核糖体灭活蛋白(Ribosome-inactivating proteins, RIPs)就是其中之一。核糖体灭活蛋白的最初得名是由于这些蛋白对动物核糖体的灭活作用<sup>[1]</sup>。虽然早在19世纪末期就已从蓖麻籽中分离出了第一个RIPs-蓖麻毒蛋白(ricin),但直到1960年发现RIPs对肿瘤细胞的毒性大于正常细胞后,才发现了RIPs对蛋白质合成的抑制作用,并进一步阐明了其作用机理。不同的RIPs分别对病毒、昆虫具有不同的抗性,有些RIPs可灭活真菌的核糖体<sup>[2,3]</sup>,因此分离RIPs基因并构建基因表达载体,用于转基因植物,以提高植株的抗真菌病也是人们研究的热点。本文围绕RIPs在植物抗真菌病基因工程中的应用,对RIPs的功能、分类、分布、生化及诱导表达特性、协同表达特性等进行了阐述。

### 一、RIPs的功能

植物核糖体灭活蛋白(Ribosome-inactivating proteins, RIPs)能够破坏真核或原核细胞的核糖体大亚基RNA,使核糖体灭活而不能与蛋白质合成过程中的延伸因子相结合,从而导致蛋白质合成受到抑制<sup>[4]</sup>。根据RIPs的作用机制不同又分为两类:大多数植物和细菌的RIPs是通过其RNA N-糖苷酶(RNA N-glycosidase)活性来实现其抑制蛋白质合成的功能,而真菌中的RIPs则以其核糖核酸酶(RNase)活性来起作用。RIPs的N-糖苷酶活性具体表现为它可以特异水解28srRNA的第4323位核苷酸的腺嘌呤与核糖之间的N-C糖苷键,干扰核糖体与延伸因子EF-Tu和EF-G的结合,从而抑制蛋白质合成。1987年,日本科学家Endo等在研究蓖麻毒蛋白A链(ricin A)时首次阐明了酶的这种作用机制<sup>[1,5]</sup>,这在体外翻译系统中也得到了证实。RNase型RIPs专一水解真核细胞核糖体28srRNA第4325和4326位核苷酸之间的磷酸二酯键,如帚曲霉素(asarscin)<sup>[6]</sup>。离体研究表明,RIPs能抑制病原真菌的生长<sup>[7,8]</sup>。谷物如大麦、小麦、玉米胚乳胞质中的RIPs,不作用于自身核糖体,但是很容易修饰外源核糖体,包括真菌的核糖体<sup>[9]</sup>,这些都为RIPs的抗真菌病基因工程提供了强有力的理论根据。

## 二、植物RIPs的分类

根据分子结构和性质RIPs分为两类。I型RIPs只有一条多肽链,分子量大约30kDa,如商陆抗病毒蛋白(pokeweed-antiviral protein, PAP),它是第一个被发现的I型RIPs;此外还有麦芽凝集素(tritin)、苦瓜抑制剂(momordin)、多花树毒蛋白(gelonin)、丝瓜素(luffin)等,均为一条链的蛋白,对无细胞系统的蛋白质合成有强烈的抑制作用,而对完整细胞或动物毒性很小或无毒,称为单链核糖体灭活蛋白,简称单链蛋白或单链毒素、半毒素;II型RIPs是由A、B两条链组成的高毒性毒蛋白,分子量大约60kDa,如蓖麻毒蛋白(ricin)、相思子毒蛋白(abrin)等。A链与I型RIPs同源,是毒性分子,B链是凝集素,能结合到细胞膜表面并协助A链进入细胞。从结构和基因的分析表明,II型RIPs可能是由I型RIPs进化来的<sup>[10]</sup>。

## 三、RIPs在植物中的分布和一般性质

RIPs广泛分布于自然界,含量丰富。迄今为止,人们已在许多植物(包括双子叶植物和单子叶植物)中分离出60多种不同的RIPs。在植物不同组织(如根、叶、种子、乳汁)中都发现有RIPs的存在,通常以种子含量较高,叶含量较少。在种子中的含量相差也很大,有些含量很高,如肥皂草素(saporin),在肥皂草种子中的含量达到蛋白质总量的7%。有时同一植物不同组织,甚至同一组织中同时存在有几种不同的RIPs,如肥皂草的叶子中含有肥皂草素(saporin)-L1、L2,根中含有肥皂草素(saporin)-R1、R2、R3,种子中含有肥皂草素(saporin)-S5、S6、S8、S9<sup>[11]</sup>;美洲商陆的春叶中含有商陆抗病毒蛋白(PAP),夏叶中含有商陆抗病毒蛋白-II(PAP-II),种子中含有商陆抗病毒蛋白-S(PAP-S);小麦种子中含有tritin-s,叶子中含有tritin-l<sup>[12]</sup>;同一植物不同品种间也有差异,即使在同种植物同种组织中,RIPs也经常以不同的亚型存在<sup>[13]</sup>。所发现的II型RIPs比I型少得多,而且除了*Cinnamomum camphora*和*Sambucus elucus L.*外<sup>[4,14]</sup>,很少有I、II两种类型的RIPs在同一种植物中都存在。

单链蛋白的分子量大约30kDa,为碱性蛋白,等电点在pH8以上。多数是糖蛋白,且糖蛋白类型相差很大。有少数不含糖,如PAP、肥皂草素等。单链蛋白性质较稳定,如石竹素(dianthin)和多花树毒

蛋白(gelonin)经反复 10 次的冰冻和融化或冰冻干燥,活性不变, gelonin 与等量胰蛋白酶或胃蛋白酶等水解酶处理过夜,活性不变<sup>[15,16]</sup>。II 型 RIPs 分子量大约 60kDa, A 链呈酸性或碱性。同一植物不同组织或者同一组织中的 RIPs 有一定的同源性,分子量、等电点和氨基酸组成都很接近,但活性、含量、表达特性及所需辅助因子有所不同<sup>[10,17]</sup>。以前认为 RIPs 的产生并不是植物细胞生存所必需的<sup>[18]</sup>,后来发现 RIPs 可由多种因素诱导表达,如病原体入侵、环境压力(温度、渗透压)、植物衰老等, RIPs 会被诱导表达或其活性会增加<sup>[19]</sup>。RIPs 在植物中分布如此广泛及其诱导表达特性,很自然让人想到它们可能具有重要的生理功能。

#### 四、RIPs 与其他 防卫蛋白的协同表达

由于真菌成熟细胞菌丝体结构成分的复杂性,单一几丁质酶或  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶抑菌活性很弱,离体生物检测得知, RIPs 与几丁质酶或  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶具有很强的协同作用<sup>[7]</sup>。几丁质酶和  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶可水解真菌的细胞壁,从而解除了 RIPs 进入真菌细胞的屏障, RIPs 特异地使外源核糖体灭活,从而抑制靶细胞蛋白质合成,真菌核糖体即可作为 RIPs 的靶目标<sup>[8]</sup>。1995 年, Jach 等将大麦中三种抗真菌蛋白基因-几丁质酶基因同  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶基因 CHI/GLU 和几丁质酶基因同核糖体灭活蛋白基因 CHI/RIP 协同在转基因烟草中表达,大大提高了对土壤病原真菌立枯丝核菌(*Rhizoctinia solani*)的抗性<sup>[20]</sup>。

#### 五、RIPs 在抗真菌病植物基因工程中的应用及存在的问题

利用分子生物学手段将带有强启动子的 RIPs 基因转入某些植物,在转基因植株中组成型表达 RIPs,可有效增强其抗病性。几丁质酶和  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶的表达定位特点决定其不能有效地使植物免受病害,而 RIPs 具有对不同真菌的广谱抗性,正日益发展成为植物真菌病害防治的新途径。

离体研究表明,从大麦种子中纯化的 RIP 在 500 $\mu$ g/ml 的浓度下,即可抑制立枯丝核菌的生长,天花粉蛋白对 9 种不同的真菌都有抑制作用<sup>[21]</sup>。1992 年, Logemann 等将大麦胚乳 RIP 基因在马铃薯创伤诱导基因 wun1 的启动子控制下转入烟草,明

显提高了烟草对立枯丝核菌的抗性<sup>[22]</sup>。大麦种子 RIP 的转基因烟草在感染立枯丝核菌时,病情指数与对照相比下降了 51%<sup>[20]</sup>。玉米胚乳胞质中 b-32 的转基因烟草<sup>[23]</sup>以及表达商陆抗病毒蛋白(PAP-II)基因的烟草<sup>[24]</sup>同样在立枯丝核菌侵染时,抗病性增强,转基因烟草生长发育正常。我们实验室已成功地将玉米胚乳 RIP 基因转入烟草和矮牵牛。体外粗蛋白抑菌圈实验和接种病原菌实验表明,与对照相比,转基因烟草对油菜菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、镰刀菌(*Fusarium solani*)、灰色葡萄孢(*Botrytis cinerea*)和烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)等病原真菌都有明显的抑制作用(待发表)。转基因矮牵牛的抗病能力正在进一步检测中。RIPs 具有对多种病原真菌的抗性,在生产和园艺上具有潜在的应用价值。

RIPs 与其他植物病程相关蛋白如几丁质酶、葡聚糖酶有很强的协同作用。在抗病基因工程中,可把几丁质酶、葡聚糖酶的基因分别与 RIPs 的基因转入植物,得到的转两种基因的植物比单独转 RIPs 基因的植物可能具有更强的抗真菌活性。将作用机制不同的抗真菌蛋白结合起来协同表达将拓宽转基因植物的抗菌谱并提高抗性的遗传稳定性。

但是,也有实验表明,转基因植株的形态和生长特性也有不同。Eckart Gorschen 将从大麦中提取出的一种核糖体灭活蛋白-JIP60 的 cDNA 转入烟草,转基因烟草出现了生长畸形<sup>[25]</sup>。表达商陆中一种 RIP 基因的烟草抗病性增强,但生长缓慢,有叶斑病,而且败育<sup>[26]</sup>。其原因可能是由于不同 RIPs 对不同植物的核糖体的敏感性不同所致。敏感性的差异可能的原因有两个:(1)不同 RIPs 起作用所需要的辅助成分不同。天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)需要  $Ca^{2+}$ <sup>[27]</sup>;多花树毒蛋白(gelonin)的作用受  $Mg^{2+}$ 、ATP 的影响<sup>[28]</sup>;与小麦 tritin-l 不同, tritin-s 需要 ATP<sup>[12]</sup>。(2)核糖体蛋白以及它们所维持的核糖体的构象的差异。最近 Katalin A. 等发现酵母核糖体中大亚基的 L3 蛋白是 PAP 作用所必需的<sup>[29]</sup>。

至于 RIPs 的防御机制目前尚不完全了解,据 Wang. P<sup>[24]</sup>等最新研究报道表明,转入 RIPs 基因的植株抗真菌能力的增加除了 RIPs 本身的作用外,还可能是由于激活了植物的某些防御相关的信号传导途径,启动了植物的防御系统。

但是 RIPs 也有灭活植物自身核糖体,杀死自身

细胞的可能性,因此在正常情况下,植物必然会采取措施防止这种自杀行为的发生<sup>[14,30]</sup>:(1)核糖体对自身的RIP具有抗性;(2)以不具活性的核糖体前体形式存在,必要时再加工成活性状态,如带有C末端扩展序列的肥皂草素S6、TCS是无活性的。但玉米胚乳胞质中pro-RIP酶原似乎并不是防止其自身核糖体免受活性RIP( $\alpha\beta$ RIP)破坏的一种机制<sup>[31]</sup>,至于pro-RIP在其中所起的作用并不清楚,可能与植物的发芽等生理过程有关;(3)大多数双子叶植物的RIPs是分泌性蛋白,这可能是保护自身核糖体的一种机制;(4)RIPs与自身核糖体是分离的,如PAP定位于细胞壁与细胞膜之间的基质中,saporin积累在细胞间或液泡内,这种区室化分布就防止了RIPs对自身核糖体的作用;(5)单子叶植物禾谷类如玉米胚乳b-32,大麦RIPs,小麦tritin-s存在于胞质中,与核糖体直接接触,但并不灭活自身核糖体,推测可能是由于胞质中一些可溶性因子,如核糖体蛋白参与维持了核糖体的某种构象所致<sup>[3]</sup>。

## 摘 要

真菌病往往使作物产量造成严重损失,也使农产品品质下降。植物核糖体灭活蛋白(Ribosome-inactivating proteins,RIPs)是一种作用于真核或原核细胞的核糖体,抑制蛋白质生物合成的毒素。随着对其作用机理、生化特性、表达调控的深入研究,核糖体灭活蛋白基因转化植株显示出很高的抗真菌能力,正日益发展成为植物真菌病害防治的新途径。围绕RIPs在抗真菌病基因工程中的应用,本文对RIPs的功能、分类、分布及性质等进行了阐述。

## 参 考 文 献

- [1] Endo Y, Mitsui K, Motizuki M. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, **262**:5908-5912.
- [2] Walsh TA, Morgan AE, Hey TD, 1991, *J. Biol. Chem.*, **266**(34):23422-23427.
- [3] Hank W. Bass, 1992, *The Plant Cell*, **4**:225-234.
- [4] Barbieri L, Battelli MG, Stripe F., 1993, *Biochem. Biophys. Acta*, **1154**:237-282.
- [5] Endo Y, Tsurugi K, 1987, *J. Biol. Chem.*, **262**:8128.
- [6] Endo Y, Wool IG, 1982, *J. Biol. Chem.*, **257**:9054.
- [7] Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J, 1991, *J. Biol. Chem.*, **266**:1564-1573.
- [8] Roberts WK, Selitrennibott CP, 1986, *Biosci. Rep.*, **6**:19-29.
- [9] Taylor S. et al., 1994, *The Plant J*, **5**:827-835.
- [10] 王莉江,安成才,陈章良, 2000, *生物技术通报*, **2**:1-4.
- [11] Ferreras JM, Barbieri L, Girbas T. et al., 1993, *Biol. Chem. Biophys. Acta*, **1216**:31-42.
- [12] Andrea J, Massiah, 1995, *Planta*, **197**:633-640.
- [13] 范琦,高晓蓉,李文礼,金礼吉,安利佳, 2000, *生物工程学报*, **16**(4):457-460.
- [14] Fernando M de Benito, Citores L, Iglesias R. et al., 1998, *FEBS Letters*, **360**:299-302.
- [15] Stripe F. et al., 1981, *Biolchem J.*, **195**:399.
- [16] Stripe F. et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, **255**(14):6947.
- [17] 郑硕, 1989, *生物化学与生物物理进展*, **16**(1):16-18.
- [18] Luigi Barbieri, 1989, *Biolchem J.*, **257**(3):801-807.
- [19] Rippmann JF. et al., 1997, *Plant Mol. Biol.*, **35**(6):701-709.
- [20] Guido Jach, 1995, *The Plant J*, **8**(1):97-109.
- [21] 胡苹,安成才,李毅,陈章良, 1999, *微生物学报*, **39**:234-241.
- [22] Logemann J. et al., 1992, *Bio/Technology*, **10**:305-308.
- [23] Maddaloni M, Forlani F. et al., 1997, *Transgenic research*, **6**:393-402.
- [24] Wang P, Zoubenka O. et al., 1998, *Plant Mol. Biol.*, **38**:957-964.
- [25] Eckart Gorschen. et al., 1997, *Planta*, **202**(4):470-478.
- [26] Lodge JK, Kaniewski WK, Turner NE, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:7089-7093.
- [27] Li MX, Teung HW. et al., 1991, *Nucl. Acids. Res.*, **19**:6309-6312.
- [28] Sperti S, Brigotti M. et al., 1991, *Biolchem J*, **277**:281-284.
- [29] Hudak KA, Dinman JD, Turner NE, 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**:3859-3864.
- [30] Carzanign R. et al., 1994, *Planta*, **194**:461-470.
- [31] Timothy D. Hey, 1995, *Plant Physiol*, **107**:1323-1332.

## 中国细胞生物学学会专业委员会

### “2002年学术活动信息”

- 细胞工程和转基因生物专业委员会定于5月在厦门举行“转基因植物”讨论会,联系人:西北大学贾敬芬、厦门大学田惠桥。
- 细胞生长、分化专业委员会、免疫细胞生物学专业委员会、医学细胞生物学专业委员会定于10月在上海联合举行“干细胞生物学”、“肿瘤疫苗和抗体工程”讨论会。联系人:中国医大宋今丹、中科院动物所丰美福、北师大何大澄。
- 细胞信号转导专业委员会定于10月在武汉举行“植物细胞信号转导”讨论会,联系人:河北师大孙大业、中科院植生所薛红卫。

(中国细胞生物学学会)