

综 述

核糖体失活蛋白及其在植物抗真菌病基因工程中的应用

单丽波 贾 旭

(中科院遗传所植物细胞与染色体工程国家重点实验室 北京 100101)

摘要 真菌病是农作物减产的主要原因之一。而植物界大量存在着具有离体抑制真菌生长增殖能力的蛋白质,核糖体失活蛋白(RIP, ribosome inactivating protein)就是其一。它能特异地水解核糖体RNA 3'端茎环结构的腺嘌呤残基而导致核糖体失活,进而抑制蛋白合成。但它却不使自身的核糖体失活,只对其它物种核糖体显示高度特异性,这显然具有防止外来病原体侵染的功能。利用基因工程技术,使其在一些经济作物中高效表达,筛选具有抗性的转基因植株,这正日益成为植物真菌病防治的新途径。它克服了常规育种周期长,抗性种质缺乏的弊端,更避免了施用农药带来的环境污染等问题,其应用前景甚为广阔。围绕其在抗真菌病基因工程中的应用,本文对核糖体失活蛋白在植物体中的分布、分类、生化、结构、功能特性、作用机制以及应用前景等作简要、全面的阐述。

关键词 RIP

1 RIP 的分类、分布及基本生化特性

RIP 分为两类^[1],一类(\tilde{N} 型)为一种单链蛋白,分子量约26-32kD,呈碱性,等电点(pI)均大于10,多数为糖蛋白,且非常稳定^[2]。如皂毒苷(saporin),在有些变性剂及蛋白水解酶时,仍可稳定存在^[3]。另一类(\hat{O} 型)除具有一条与 \tilde{N} 型RIP单链功能相似的A链外(毒素链),还具有一条可结合D型半乳糖的B链(结合链),其间仅靠一个二硫键及氢键相连。A链分子量与 \tilde{N} 型单链相似,约30kD,但偏酸性,pI的范围为4.18-8,并且非常不稳定^[2]。Collins等人发现,虽然 \tilde{N} 型RIP单链与 \hat{O} 型RIP的A链在一级结构上同源性并不很高,但其三级结构却极其相似,这可能与它们具有相似的功能特性有关^[4]。B链分子量约30kD,具有两个糖基化位点,可结合细胞表面的D型半乳糖,该位点与A链的毒性并无关系。

\tilde{N} 型RIP分布很广,很多植物的多数器官都有,且不同植物不同器官含量差别很大(表1)^[2]。现已知葫芦(*Asparagus officinalis*)种子^[5],玉米(*Zea mays*)种子^[6],大麦(*Hordeum vulgare*)种子^[6],丝瓜(*Luffa cylindrica*)种子^[7,8],苦瓜(*Momordica charantia*)种子^[9],小麦(*Triticum aestivum*)胚芽^[10],美洲商陆(*Phytolacca americana*)种子^[11]、根^[5]、叶^[12],麝香石竹(*Dianthus caryophyllus*)

叶子^[13],肥皂草(*Saponaria officinalis*)种子^[3]蛋白中均含有 \tilde{N} 型RIP。其中肥皂草种子蛋白中皂毒苷含量高达10%^[3]。随着更深入的研究,发现同一植物来源的RIP也会略有差别,它们为同一蛋白的异构型(isoform),其间仅相差几个氨基酸^[14]。

\hat{O} 型RIP分布范围相对较窄(表2),目前仅知蓖麻(*Ricinus communis*)种子^[15-17],相思子(*Abrus precatorius*)种子^[18],槲寄生(*Viscum album*)叶子^[19,20,24], (*Adenia digitata*)根^[22,24], (*Adenia velkensis*)根^[25,26]中含有。

那么,为什么 \tilde{N} 型, \hat{O} 型RIP在一些生化特性及分布上差别较大呢?我们进一步从其结构、功能特性上来分析上述问题。

2 RIP 的结构、功能特性

\tilde{N} 型RIP在植物体中首先以无活性的前体蛋白2原蛋白(proprotein)形式存在,然后经一相对简单的加工过程而成为成熟蛋白^[14,27,28]。原蛋白中含有一信号肽,该信号肽序列不仅具有指导蛋白定位功能,还具有保护作用,即前体蛋白由于具有信号肽,便不能抑制核糖体活性,从而使植物自身蛋白合成过程受到保护。Ready等曾报道美洲商陆抗病毒蛋白(PAP, pokeweed antiviral protein)首先以无毒性前体形式被合成,然后在信号肽指导下,被运至叶肉细胞壁基质中才最终成为有活性的毒蛋白^[29]。

Benatti 等发现皂毒昔的羧末端扩展区(具有一个糖基化位点), 不仅可以指导相应无活性前体运至液泡贮存, 还具有保护自身蛋白合成体系不被破坏的作用^[28, 30]。该扩展区如同RIP的抑制剂, 只有被水解掉以后, RIP 才具有活性。这一点与小麦外源凝集素很相似, 其羧末端对于其能否正确定位于液泡是至关重要的。Bednarek 等利用报告基因在烟草中也证明了此点^[31]。

Ø 型 RIP 也有个加工成熟过程, 它首先以无活性单链蛋白2前蛋白形式 (preproprotein) 被合成, 信号肽被切除后仍为无活性单链前体蛋白2原蛋白 (proprotein)。只有当内切酶水解掉中间十几个氨基酸(如蓖麻毒蛋白中为 12 个) 之后, 才形成由 A, B 两条链(其间靠疏水二硫键相连) 组成的真正毒蛋白 (protein)^[32]。此时, A 链具毒性, 即可抑制核糖体活性, 终止蛋白的合成, 称之为毒素链。B 链有两个糖基化位点, 可结合 D₂半乳糖, 称之为结合链。尽管前原蛋白及原蛋白均可结合半乳糖, 但其毒素链却无酶活性。因此, 植物可以安全地进行其自身蛋白的合成, 只有当前原蛋白被运至目的地, 其 C 末端信号肽被切除后, 且中间连结氨基酸序列被切除, 单链变成双链后, 才具有真正的毒性。Lamb 等已在蓖麻子蛋白体中分离纯化到了单链前原蓖麻毒蛋

白(preproricin) 及水解掉中间 12 个氨基酸序列的内切蛋白酶^[32]。晶体结构分析可知, 蓖麻毒蛋白的活性区可形成一个核苷酸结合区缝隙, 这一点与反转录酶及核酸内切酶很相似, 这为阐明 RIP 的作用机制奠定了基础^[33]。由上可知, Ñ 型、Ø 型 RIP 最大差别是 Ø 型具有一结合链。结合链可以结合细胞表面的 D₂半乳糖, 且可协助 A 链进入细胞, 整个过程通过受体调节的内吞作用来完成。当其进入高尔基体时, 两链间的二硫键被蛋白二硫还氧酶打开^[34]。独立的 A 链此时具有极强的毒性, 可抑制蛋白合成, 全过程皆为酶所催化, 因此效率极高。Ñ 型无结合区, 不能与细胞结合, 不易进入细胞内部, 因此对蛋白合成的抑制效果就较差。可以说 Ñ 型具细胞外毒性, 而 Ø 型则具细胞内毒性, 其毒性是较强的, 极少量就有致死性, 仅一个分子蓖麻毒蛋白分子即足以杀死一个细胞。从表 1, 2 中我们即可看出 Ñ 型 RIP 对游离单细胞的抑制剂量很低, 普遍小于 1, 即对游离单细胞蛋白合成的抑制作用极强。而对完整细胞组织的抑制剂量却高达几千至几万单位, 甚至根本对其无抑制作用, 如禾本科的黑麦、小麦、玉米等。但 Ø 型与其恰恰相反。基于此点, 物竞天择, 在长期的进化过程中, Ñ 型必更普遍地存在于自然界。

表 1 Ñ 型 RIP 的分布及其基本特性

来源	名称	含量	分子量	对蛋白合成的抑制作用 ID50(nM)	
		g/ 100g	Mt(kD)	游离单细胞	完整细胞组织
麦毒草种子 ^[3]	agrostin 2	814	301 6	016	
	agrostin 5	3412	291 5	0147	9200
	agrostin 6	1814	291 6	0157	7800
麝香石竹叶子 ^[13]	dianthin 30	2	291 5	013	18000
	dianthin 32	2	311 7	0112	14000
肥皂草种子 ^[3]	saporin 5	63	291 5	01041	
	saporin 6	414	291 5	01037	2300
	saporin 9	115	291 5	01037	5400
丝瓜种子 ^[7,8]	luffin	51	26	01002	
苦瓜种子 ^[9]	momordin	150- 180	31	0106	32000
大麦种子 ^[6]		139	30	3113	
		3- 4	31	0183	
黑麦种子		200	30	410	
小麦种子 ^[10]		32	30	1187	
	trit in	3	30	213	
玉米种子 ^[6]		35	23	2113	
美洲商陆叶子 ^[12]	PAP	912	29	0124	
	PAP Ø	316	30	0125	
种子 ^[11]	PAP2S	100- 180	31	01037	33000

表 2 ò 型 RIP 的分布及其基本特点

来源	名称	含量 mg/ 100g	分子量 Mt(KD)	对蛋白合成的抑制作用 ID50(nM)	
				游离单细胞	完整细胞组织
蓖麻种子 ^[15, 16, 17]	ricin	120	62	84	010011
	A chain		31	01 1	
	B chain		31		
相思子种子 ^[18]	abrin	75	65	88	010037
	A chain		30	01 5	
	B chain		36		
槲寄生叶子 ^[19, 20, 21]	viscumin	61 8	60	4313	01008
	A chain		29	31 5	
	B chain		32		
根 ^[22, 23, 24]	modeccin	20- 180	63	45	010003
	A chain		28	21 3	
	B chain		31		
根 ^[25, 26]	volkensin	371 5	62	84	010123
	A chain		29	01 37	
	B chain		36		

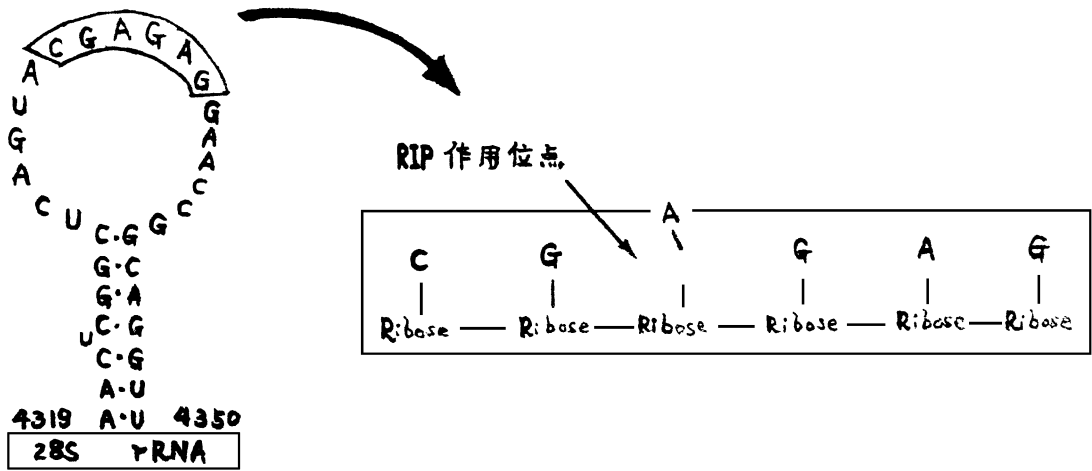


图 RIP 的作用机制: 特异的 N2糖苷酶活性从 rRNA 大亚基 3c2端茎环结构上水解掉一个腺嘌呤, 而导致核糖体失活, 进而终止蛋白的合成

3 RIP 的作用机制

RIP 的作用机制大体上说, 都是因其具特异的 RNA, N2糖苷酶活性, 可特异地水解核糖体 RNA, 3c2端茎环结构的腺嘌呤残基, 而使核糖体大亚基不能结合延长因子 2, 进而抑制蛋白的合成(见图)^[2]。从细菌到高等哺乳类, 能被 RIP 识别的 rRNA 序列是相当保守的^[36] 38], 但对不同来源的 rRNA, RIP 都有其特异的作用方式, 而不同来源的核糖体对不同的 RIP 其敏感性也不同^[39, 40], 其中对哺乳动物的核糖体最为敏感, 纳摩尔浓度(nanomolar)即可起作用^[36] 38]。这又给 RIP 在植物抗真菌病基因工程中的应用带来了极大的限制。

总体上 RIP 毒性的强弱取决于其是否容易接触到蛋白合成过程。例如 Ñ 型毒性普遍较弱, 但它

对巨噬细胞^[43, 44], 滋养层细胞^[41, 42] 却有很强的毒性, 这很可能源于这些细胞本身具很强的胞饮作用。因此可容易地进入细胞内部抑制蛋白合成。目前中医仍将 Trichosanthin 作为治疗宫外孕及副作用很小的避孕药^[41, 42]。另外 Ñ 型 RIP 对植物细胞的毒性很差, 但它却有一定的抗病毒活性^[43]。因为被病毒侵染的动植物细胞对 RIP 渗透力增强, RIP 很易进入细胞, 进而抑制病毒的复制。这进一步说明了, 只要 Ñ 型 RIP 可进入病原体细胞内部, 接触到蛋白合成过程, 其毒性与 ò 型 RIP 是异曲同工的。这为其在植物抗真菌病基因工程中的应用又奠定了有力的理论依据。

4 RIP 在植物抗真菌病基因工程中的应用

早在本世纪 20 年代, 人们便曾用美洲商陆叶粗

提液涂抹植株来抑制植物病毒的侵染。目前, 各种来源不同的 RIP 在植物抗病基因工程中得到了更广泛的应用。基于 \tilde{N} 型 RIP 对蛋白合成的抑制机理, 其在植物抗病基因工程中可以做为一个好的目的基因。Lodge, J. K. 等报道转 rip 基因植株显示出对病毒侵染具广谱抗性^[44]。Jach, G. 等 1995 年报道了大麦 \tilde{N} 型 rip 单基因转化烟草, 其转基因植株对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 等真菌病原体具有一定的抗性^[45]。随后他们又发现该抑制作用在有真菌细胞壁水解酶的协助作用下, 抑菌效果更为显著。他们获得的转基因烟草与对照株相比较, 对立枯丝核菌显示更强的抗性^[45]。这种水解酶能水解真菌细胞壁, 有助于 RIP 进入真菌细胞内部而发挥作用。因此, RIP 能否进入真菌细胞内部是抑菌效果的关键。几丁质酶 (chitinase)^[46], 1, 3-葡聚糖酶 (glucanase)^[47] 可催化真菌细胞壁的重要成分) 几丁质 (chitin), 1, 3-葡聚糖 (glucan) 水解, 但对植物体却无任何伤害。将此类酶基因与某些对完整细胞无任何毒性的 \tilde{N} 型 rip 基因 (如某些禾本科植物种子的 rip) 构建到同一个表达二元质粒载体上, 并使其超量表达, 则通过几丁质酶, 葡聚糖酶对真菌细胞壁的瓦解, \tilde{N} 型 RIP 随之进入真菌细胞内部, 必致死性抑制真菌蛋白合成, 强烈抑制真菌的侵染。并且, 由于几丁质酶, 葡聚糖酶等对植物体、动物体并不起作用, 则对完整细胞组织无任何毒性的 \tilde{N} 型 RIP 便无法进入植物体、动物体细胞。这不仅解决了 \tilde{N} 型 RIP 毒性较弱的缺点, 也避免了 \tilde{O} 型 RIP 极强的非专一性细胞内毒性。这种组合使 \tilde{N} 型 RIP 在对付真菌病原体入侵时的作用强度上可与 \tilde{O} 型相媲美。并且由于我们选择的是那些对完整细胞组织无任何毒害作用的 \tilde{N} 型 RIP, 例如来自大麦, 小麦, 黑麦, 玉米种子的 \tilde{N} 型 RIP (表 1), 因此转基因植株对人畜是安全的, 但对真菌等病原体却有极大抗性, 这无疑是一个效果极佳的抗病基因组合。本实验室已构建了 rip 单基因及 rip2chi 双基因二元表达质粒载体, 并进一步对转基因植株抗病性及双基因协同表达效应等方面进行研究。

另外, RIP 在抗病基因工程中应用时的一个趋势是: 更加贴近植物自身进化的特点即尽量不采用组成型强启动子, 而使用一些组织部位特异表达或发育阶段特异表达的启动子。如对真菌侵染敏感的菜豆几丁质酶启动子^[48], 损伤诱导型启动子 PD \tilde{O} ^[49] 以及来自果蝇的 hsp70 基因的热诱导启动子^[50] 等等。

当前, 对于 RIP 研究的焦点是特异性免疫毒素的制备^[51] 及其在癌症、艾滋病^[52] 等病毒病防治方面的应用。植物方面深入的机理研究和应用研究并不十分多。但是有一点可以肯定, 即 RIP 不抑制自身核糖体活性, 但不同程度地抑制远缘物种, 包括真菌核糖体的活性。RIP 在植物中含量极低, 但极为普遍, 其作用可能是作为防御病毒, 真菌等病原体入侵的屏障, 也可能是作为防御其种子被其它动物捕食的武器。将 \tilde{N} 型 rip 基因与真菌细胞壁降解酶基因结合起来, 进行转基因方面的研究工作, 在植物抗真菌病基因工程方面的应用前景甚为广阔。

参考文献

- [1] Barbieri, L. Stirpe, F., et al. (1982) *Canver Surv.* 1, 489- 520.
- [2] Fiorenzo stirpe, et al. (1992) *Bio/technology.* Vol 10, 405- 411.
- [3] Stirpe, F., ect. (1983) *Biochem. J.* 216: 617- 625.
- [4] Collins, E. J. Robertus, J. D., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 257: 9054- 9060.
- [5] Bolognesi, A., Barbieri, L., et al. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1087: 293- 302.
- [6] Coleman, W. H and Roberts, W. K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 29: 239- 244.
- [7] Kishia, K., Masuho, Y. and Hara, T. (1983) *FEBS Lett.* 153: 209- 212.
- [8] Kamenosono, M., Nishida, H. and Funatsu, G. (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52: 1223- 1227.
- [9] Barbieri, L., Zamboni, M., et al. (1980) *Biochem. J.* 186: 443- 452.
- [10] Roberts W. K. and Stewart, T. S. (1979) *Biochem.* 18: 2615- 2621.
- [11] Barbieri, L., Aron, G. M., et al. (1982) *Biochem. J.* 203: 55- 62.
- [12] Irvin, J. D. (1975) *Arch Biochem. Biophys.* 169: 522- 528.
- [13] Stirpe, F., Williams, D. G., et al. (1981) *Biochem. J.* 195: 399- 405.
- [14] Chow, T. P., et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 8670- 8674.
- [15] Olsenes, S. and Pihl, A. (1973) *Biochem.* 12: 3121- 3126.
- [16] Funatsu, G., Yoshitake, S. and funatsu, M. (1978) *Agric. Bio. Chem.* 42: 501- 502.
- [17] Funatsu, G., Kimura, M. and Funatsu, M. (1979) *Agric. Biol. Chem.* 43: 2221- 2224.
- [18] Olsnes, S. and Pihl, A. (1973) *Eur. J. Biochem.* 35: 179- 185.
- [19] Luther, P., Theise, H., et al. (1980) *Int. J. Biochem.* 11: 429- 435.
- [20] Stirpe, F., Legg R. F., et al. (1980) *Biochem. J.* 190: 843- 845.
- [21] Olsnes, S., Stirpe, F., et al. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 13263- 13270.
- [22] Olsnes, S., Haylett, T., et al. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 5069-

- [23] Gasper2Campani, A. , et al. (1978) *Biochem. J.* 174:491- 496.
- [24] Barbieri, L. , et al. (1980) *Biochem. J.* 185: 203- 210.
- [25] Barbieri, L. , et al. (1984) *FEBS Lett* 171: 277- 279.
- [26] Ho, W. K. K. , et al. , (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1088: 311 - 314.
- [27] Benatti, L. , et al. , (1989) *Eur. J. Biochem.* 183: 465- 470.
- [28] Ready, M. P. , et al. , (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5053- 5056.
- [29] Funatsu, G. , et al. (1978) *Agric. Biol. Chem.* 42: 501- 503.
- [30] Bednarek, S. Y. , et al. (1990) *Plant Cell* 2: 1145- 1155.
- [31] Lamb, F. I. , et al. (1985) *Eur. J. Biochem.* 148: 265- 270.
- [32] O'Hare, M. , et al. (1987) *FEBS Lett.* 216: 73- 78.
- [33] Robertus, J. D. , et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 19- 20.
- [34] Patak, M. , et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 4837- 4843.
- [35] Endo, Y. , et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 8128- 8130.
- [36] Endo, Y. , et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 5908- 5912.
- [37] Endo, Y. , et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 8735- 8739.
- [38] Cenini, P. , et al. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 148: 521- 527.
- [39] Cenini, P. , et al. (1988) *J. Protozool.* 35: 384- 387.
- [40] Chang, M. C. , Saksena, SK. , et al. (1979) *Contraception* 19: 175- 184.
- [41] Wang, Y. , et al. (1986) *Pure & Appl. Chem.* 58: 789- 798.
- [42] Spreafico, F. , et al. (1983) *Int. I. Immunopharmac.* 5: 335- 343.
- [43] Leung, S. O. , et al. (1987) *Immunopharm.* 13: 159- 171.
- [44] Lodge, J. K. , et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7089- 7093.
- [45] Guido Jach, et al. (1995) *Plant. J.* 8(1) 97- 100.
- [46] Yao Xu, et al. (1996) *PMB* 30: 387- 401.
- [47] Urs Vogeli, et al. (1988) *Planta* 174: 364- 372.
- [48] Roby, D. , et al. (1990) *The Plant Cell* 2: 999- 1007.
- [49] Keil, M. , et al. (1986) *Nucl. Acids. Res.* , 14: 5641- 5650.
- [50] Spena, A. , et al. (1985) *EMBO J.* 4: 2739- 2743.
- [51] Uhr, J. WE. , et al. (1991) *Semin. Cell. Biol.* 2: 1- 6.
- [52] Barbieri, L. , et al. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1154: 237- 282.

Ribosome Inactivating Protein and its Application in Plant Anti2fungal Disease Genetic Engineering

Shan Li2bo Jian Xu

(Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Fungal disease is one of main reasons on crop losses. At the same time, there are a lot of proteins inhibiting the fungal growth in vitro from plants, to which ribosome inactivating protein(RIP) belongs. It can specifically cleave the glycosidic bond of adenine from the ribosomal RNA of the large subunit and cause complete inaction of the ribosome, hence inhibiting protein synthesis. But it can not inactivate / self0 ribosomes, and only shows varying degrees of activity towards ribosomes of distantly related species, including fungal ribosomes, which indicates that it is a defensive agent whose principal function is probably antipathogens. By genetic engineering it can be effectively expressed in some economical crops and such engineered plants may be desirably antidisease, which is becoming a new way to protecting the plant against fungal disease because it avoids not only potentially harming to the environment causing by the application of agrochemicals but also the time2consuming processes of conventional breeding. In the present study, we briefly and comprehensively elaborated its distribution, classification, biochemical, structural, functional properties, effects on protein synthesis and its perspectives closely focusing on its roles in resistance to fungal disease.