

真菌果胶酶的分子生物学研究进展

高必达

(湖南农业大学植物保护系 长沙市 410128)

摘要 近 10 年来国外在果胶酶分子生物学研究上取得了重大进展,从 11 个属的真菌克隆了 50 个以上的基因并测序。对果胶酶基因的结构、功能、调控、录译后加工等方面进行了深入探讨。已克隆的果胶酶基因以多聚半乳糖醛酸酶(PG)基因和果胶裂解酶(PL)基因为主,也有果胶酯酶(PE)基因和鼠李半乳糖醛酸酶(RHG)基因,大多有内含子。前体蛋白一般有 N-信号肽和糖基化位点。果胶酶一般受果胶、低浓度的(0.1%)D-半乳糖醛酸等诱导,而受较高浓度(1%)的半乳糖醛酸、抗体、某些抗菌素抑制。

关键词 果胶酶 真菌 分子生物学 综述

近十年来,果胶酶的分子生物学研究进展很快,已从 11 个属的真菌克隆和测序至少 50 个果胶酶编码基因(表 1 和表 2),并从结构、功能、调控、录译后加工等方面进行了深入探讨。

1 真菌果胶分解酶的类型

真菌分解果胶类物质的酶主要是多聚半乳糖醛酸酶(PG)和果胶裂解酶(PL),以内切型(endo-)为主,也有外切型(exo-)。一些真菌也产生果胶酯酶(PE)和鼠李半乳糖醛酸酶(RHG)等,PG的前体蛋白一般为 360~390AA,基中 N-信号肽 17~40AA。PL 的前体蛋白一般为 370~380AA,但有的低于 250AA,已报告序列的 PE 前体蛋白 331AA。

1.1 多聚半乳糖醛酸酶(PG)

1.1.1 曲霉菌 PG

最初(1990)从商品的黑曲霉(*A. niger*)果胶酶分离到 5 种 endo-PG 和一种 exo-PG。主要的 endo-PG 为 endo-PG₁ 和 endo-PG₂,分子量分别为 55kDa 和 38kDa,两者的等电点、比活、对寡聚底物的作用方式及氨基酸组成全然不同。另外 3 种 endo-PG 即 endo-PG_A, endo-PG_B 和 endo-PG_C 的生理活性与 endo-PG₁ 极相似。其后从黑曲霉基因组文库分离出几个基因,编码的 endo-PGE 分子量 35.6kDa, pI = 3.6, 最适 pH = 3.8。endo-PGE 与 endo-PGC 的 AA 序列同源性最高,有 77.6% 相同,与 endo-PG₁ 和 endo-PG₂ 的同源性较差,分别为 57.6% 和 54.3% 相同^[1]。

米曲霉(*A. oryzae*)有 2 种 PG,分子量分别为 41kDa 和 39kDa,最适 pH 为 5.0,最适温度分别为

45 和 55^[2]。黄曲霉(*A. flavus*)两个 PG 基因即 pecA 和 pecB,前体蛋白预期分子量分别为 37.6kDa 和 38kDa^[3]。其它曲霉菌,如 *A. ustus* 的 endo-PG 分子量为 36kDa, pI = 8.3。*A. parasiticus* 的 endo-PG 基因 pecA 用黑曲霉 pga 做探针分离到,与其它真菌的 PG 基因极相似。*A. tubigensis* 的 endo-PG 基因 pga 与 *A. niger* 的 pga 基因的核苷酸序列有 83% 相同,前体蛋白 AA 序列 94% 相同。

1.1.2 灰霉菌(*Botrytis cinerea*) PG

最初从在苹果果胶上培养的灰霉菌分离得到 5 种 PG 同工酶(—),4 个酸性,1 个碱性, pI 分别为 9.3、4.9、4.6、3.7、2.7,其中以 PG₁ 比活最高,PG₁ 为内切酶,另 4 种为外切酶。后来从灰霉菌引起的苹果腐败组织中分离到 1 种 exo-PG,表观分子量为 45kDa, pI = 4.6,与此菌在液培时产生的同工酶的 pI、最适 pH 和作用方式相似。另用 *A. niger* 的 pga 基因做探针从灰霉菌分离到 6 个 endo-PG 的编码基因,这 6 个基因编码的 endo-PG 前体的氨基酸序列有 34~73% 相同,可分到 3 个单源(monophyletic)组中^[4]。

1.1.3 镰孢菌(*Fusarium spp.*)的 PG

番茄尖镰孢(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)一种主要胞外 endo-PG 前体蛋白分子量 41.1kDa,成熟蛋白推算分子量为 35.5kDa, pI = 6.2,与 *F. moniliforme* 的 PG, *C. carbonum* 的 PGN1, *A. niger* 的 PG, *A. oryzae* 的 PG, 和 *S. sclerotiorum* 的 PGI 分别有 82.9%、29%、27.6%、14.2% 和 26.9% 同源性^[5]。

番茄根腐尖镰孢 (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) 在降解果胶时先产生 *endo*-PG, 以后以 *exo*-PG 为主。*exo*-PG 与其它真菌的 *endo*-PG 相似程度高^[6]。

串珠镰孢 (*F. moniliforme*) 也有一种 *endo*-PG。

1.1.4 其它真菌的 PG

菜豆炭疽病菌 (*Colletotrichum lindermuthianum*) 已有 2 个 *endo*-PG 基因被克隆, 其中 *pg1* 编码主要的 *endo*-PG, 这个基因在病菌腐生时和在侵染植物时都表达。在菜豆坏死组织中检测到, 与细胞壁大量降解有关, RT-PCR 表明在侵染的死体营养阶段开始时 *pg1* 表达。*pg2* 与 *pg1* AA 序列有 61 % 相同, 与其它真菌的 *endo*-PG 有 37 % - 59 % 相同^[7]。

核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的 *endo*-PG 有多种等电点不同的同工酶, 其中 *pg1* 是一种中性蛋白, *endo*-PG2 和 *endo*-PG3 的等电点分别为 4.8 和 4.9, 分子量相似, 氨基酸组成上仅在天冬氨酸-天冬酰胺组成上不同, 与 *PG1* 氨基酸序列分别有 90 % 和 89 % 相同。用 *PG3* 制备的抗体与 *PG2* 有交互反应, 但不与黑曲霉 *PG* 反应。*endo*-PG 由多基因家族编码, 7 个基因构成这个家族的 2 个亚家族。比较这个基因家族的 3 个成员的编码区的核苷酸序列, 发现差异很小^[8]。

北方核盘菌 (*S. borealis*) 有 1 种特殊的喜冷 *endo*-PG, 分子量为 40kDa, 等电点为 7.5, 最适 pH 为 4.5, 适温为 40-50 °C, 在 5 °C 仍有 30 % 的活性, 60 °C 时活性弱^[9]。

玉米圆斑病菌 (*Cochliobolus carbonum*) 的 1 个 *endo*-PG 基因 *pgn1* 和 1 个 *exo*-PG 基因 *pgx1* 已分离到, *pgx1* 产物 *PGX1* 前体推算分子量为 48kDa, 与 *A. tubingensis* 的 *exo*-PG 有 61 % 氨基酸相同。*pgx1* 突变菌系在果胶上生长慢, 对玉米仍致病, *pgn1/pgx1* 双突变菌系尽管 *PG* 活性只及野生型 1 %, 但仍对玉米致病^[10]。

青霉菌 *P. oxalicum* 有 2 种 *PG*, *PG* 不太稳定, 为外切酶, *PG* 为内切酶, 活性强, 4 小时内可浸解和杀死木薯组织, 在病程中似起主要作用。*P. janthinillum* 和 *P. griseoroseum* 各有 1 种 *PG*^[11]。

啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) CECT1389 菌系一种 *endo*-PG 表观分子量 39kDa, 最适 pH 为 5.5, 最适温度为 45 °C。啤酒酵母 *PG* 与其它真菌的 *PG* 有 54 % 同源。与植物和细菌的 *PG* 只有 24 % 同源。每个单倍体只有 1 个单基因拷贝^[12]。

脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的 *endo*-PG 洗脱成单一活性峰, 提纯的 *PG* 为单体糖蛋白 (38 % CH₂O), 表观分子量 36.6 ~ 37.0kDa, 最适 pH 6.0, 最适温度 45 °C^[13]。

粟疫菌 (*Cryphonectria parasitica*) 的成熟蛋白 *ENPG-1* 推定分子量为 34.5kDa, pI = 7.2, 与玉米圆斑病菌的 *endo*-PG 有 66 % 相同^[14]。

榆枯萎病菌 (*Ophiostroma novae-ulmi*) 也有一种 *PG*。

1.2 果胶裂解酶 (PL)

主要是曲霉菌和镰孢菌产生 *PL*, 此外还有 *P. oxalicum* 和啤酒酵母和灰霉菌。

从黑曲霉已克隆到 6 个 *PL* 编码基因, 即 *pelA*、*pelB*、*pelC*、*pelD*、*pelE* 和 *pelF*, 其中 *pelA* 和 *pelD* 分别编码商品果胶酶 Ultra2m 的两种主要 *PL* 即 *PL* 和 *PL*。

从茄镰孢豌豆专化型 (*F. solani* f. sp. *pisi*) 分离到 4 个 *endo*-*PL* 基因, 即 *pelA*、*pelB*、*pelC*、*pelD*^[15]。*pelA* 编码的 *endo*-*PLA* 前体蛋白 29kDa, 成熟蛋白 26kDa, pI = 8.3, 最适 pH = 9.4。*pelB* 编码的 *PLB* 分子量为 25.6kDa, 最适 pH 值 10.0。与 *PLA* 的 AA 序列有 65 % 相同, *PLA* 和 *PLB* 与其它果胶酶无明显的同源性。*pelC* 编码的 *PLC* 分子量 23.3kDa, 与 *PLA* 有血清关系, AA 序列与有 51 % 相同, 最适 pH 9.5, 活温 55 °C。*pelD* 编码的 *PLD* 分子量 24.5kDa, 成熟蛋白分子量 22.7kDa, AA 序列与 *PLA*、*PLB*、*PLC* 分别有 49 %、44 %、65 % 相同。

番茄尖镰孢编码 *PL1* 的基因与茄镰孢豌豆专化型 (*F. solani* f. sp. *pisi*) 的 *pelA*、*pelB*、*pelC* 和 *pelD* 基因分别有 89 %、67 %、55 % 和 56 % 同^[16]。

1.3 果胶酯酶 (PE)

黑曲霉、啤酒酵母和玉米圆斑病菌等菌具有 *PE*。*PE* 去酯化是随机的。

2 真菌果胶分解酶的结构与功能

真菌果胶分解酶基因的开放读码框 (ORF) 绝大多数被内含子分隔。内含子最多的达 7 个, 两种已克隆的 *PE* 基因都有 6 个内含子 (表 1 和表 2)。

果胶酶的前体蛋白 N-信号肽一般为 16 ~ 27AA, 个别如曲霉菌的 *PGC* 有一个较长的 N-信号肽 (40AA), 有的 *PL* 无 N-信号肽。

许多果胶酶都有糖基化位点, 如串珠镰孢 *endo*-*PG* 前体有 4 个糖基化位点。

关于酶的活性中心, 对 24 种曲霉 *PG* 的分析表

表 1 已克隆的真菌多聚半乳糖醛酸酶基因

真 菌 fungi	DNA type	基因 genes	全长 length	编码区 (bp) coding region	内含子 (bp) intron	前体蛋白 AA	信号肽 N-signal
<i>Aspergillus niger</i>	G	pga	1221	228 + 420 + 459	52/ 62	368	31
	G	pga	1141	630 + 459	52	362	21
	G	pgaC	1336	264 + 426 + 130 + 332	75/ 56/ 53	383	40
	G	pgaE	1293	261 + 423 + 130 + 323	50/ 50/ 59	378	39
	G	pga	1141	630 + 459	52	362	27
<i>A. aculeatus</i>	c	pga	1137	1137		378	17
<i>A. flavus</i>	G	pecA	1231	216 + 417 + 459	58/ 81	363	20
	G	pecB	1221	225 + 417 + 459	65/ 55	366	
<i>A. oryzae</i>	G	pgaA	1230	216 + 417 + 459	57/ 81	363	28
	G	pgaB	1226	225 + 420 + 459	65/ 57	367	
<i>A. parasiticus</i>	G	pg	1220	317 + 416 + 459	52/ 76	363	28
<i>A. tubingensis</i>	G	pga	1141	630 + 459	52	362	21
	G	pga	1681	307 + 367 + 59 + 161 + 189 + 102 + 75 + 48	57/ 52/ 58/ 51/ 50/ 52/ 53	435	22
<i>Botrytis cinerea</i>	G	Bcpg1	1149	1149	0	382	
	G	Bcpg2	1282	69 + 179 + 418 + 459	58/ 49/ 50	374	
	G	Bcpg3	1392	43 + 1262	87	434	
	G	Bcpg4	1311	670 + 53 + 471	58/ 59	397	
	G	Bcpg5	1370	252 + 426 + 130 + 242 + 92	56/ 51/ 52/ 68	380	
	G	Bcpg6	1215	352 + 401 + 363	46/ 53	371	
<i>Claviceps purpurea</i>	G	pg1	1199	225 + 882	92	368	
	G	pg2	1211	225 + 885	101	369	
<i>Cochliobolus carbonum</i>	G	pgn1	1152	384 + 711	57	364	27
	G	pgx1	1525	325 + 364 + 406 + 246	51/ 63/ 70	446	
<i>Colletotrichum lindermuthianum</i>	G	pg1	1162	222 + 870	70	363	26
	G	pg2	1152	475 + 623	54	365	25
<i>Cryphonectria parasitica</i>	G	enpg - 1	1233	231 + 129 + 750	61/ 62	369	
<i>Fusarium moniliforme</i>	G	pgA	1331	60 + 165 + 149 + 457 + 291	54/ 53/ 50/ 52	373	24
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	G	pg1	1318	60 + 156 + 149 + 457 + 291	50/ 51/ 50/ 54	370	21
	G	pg1 ?	1318	60 + 159 + 149 + 457 + 291	47/ 51/ 50/ 54	371	22
	G	pg2	1135	207 + 879	49	361	
<i>Ophiostroma novosulmi</i>	G	pg	1140	1140	0	379	
<i>Penicillium janthinellum</i>	G	pg	1266	237 + 420 + 459	88/ 62	371	19
<i>P. griseoroseum</i>	G	pgg1	1254	249 + 423 + 459	56/ 67	376	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	G	pg1	1143	1143	0	380	17
	G	pg5	1371	273 + 426 + 130 + 242 + 93	31/ 50/ 52/ 74	387	

注(Note) : G= genomic DNA ;c = cDNA

明,一个外露的 Tyr 残基在 pH9.3 ~ 9.5 时离子化,可能与催化有关,内藏的 Tyr 残基与催化关系密切,在 pH10.5 时离子化^[17]。串珠镰孢 endo-PG 的

His₂₃₄对酶活性和浸解活性起关键作用,与结合 PGIP 无关,当 His₂₃₄ Lys 时无酶活,Ser₂₃₇和 Ser₂₄₀ Gly 时,酶活性分别降低 48 %和 6 %。

表 2 已克隆的真菌果胶裂解酶基因和果胶酯酶基因

真 菌 fungi	DNA type	基因 genes	全长 length	编码区 (bp) coding region	内含子 (bp) intron	前体蛋白 AA	信号肽 N-signal
Pectin lyase							
<i>Aspergillus niger</i>	G	pelA	1358	347 + 126 + 97 + 234	52/ 48/ 64/ 54	379	20
	G	pelB	1372	204 + 141 + 126 +	62/ 59/ 57/ 57	378	20
				330 + 336			
	G	pelD	1368	200 + 144 + 126 +	65/ 61/ 63/ 57	373	19
97 + 555							
<i>A. nidulans</i>	G	pelA	1098	307 + 245 + 429	68/ 49	326	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	G	pnlA	1704	305 + 52 + 123 + 262 +	58/ 48/ 57/ 67/	380	26
				52 + 41 + 308	86/ 245		
	G	pnlB	996	996	0	331	
<i>Fusarium oxysporum lycopersici</i>	G	pel1	?	?	?	240	15
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>pisi</i>	G	pelA	868	157 + 145 + 143 + 284	47/ 46/ 46	242	17
	G	pelB	857	160 + 130 + 445	72/ 50	244	16
	G	pelC	767	154 + 152 + 342	56/ 63	215	0
	G	pelD	757	199 + 503	55	233	19
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	G	pelA	943	129 + 771	43	299	
<i>Pectin. methyl eterase</i>							
<i>A. aculeatus</i>	c	pmel	996	996		331	17
<i>A. niger</i>	G	pmeA	1321	117 + 137 + 80 +	63/ 50/ 50/	331	17
				147 + 61 + 194 + 260	50/ 54/ 58		
<i>A. oryzae</i>	G	pmeA	1370	117 + 137 + 80 +	65/ 62/ 59/	331	17
				147 + 61 + 194 + 260	60/ 65/ 63		

注 (Note) : G = genomic DNA ; c = cDNA

3 表达与调控

如前所述,多种真菌的果胶酶已在酵母菌中正确表达。如茄镰孢豌豆专化型 pelB、pelC 和 pelD 的 cDNA 转入一种毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) 可表达。

果胶酶一般受果胶、植物维管组织、低浓度的 (0.1%) D-半乳糖醛酸、半乳糖诱导,受葡萄糖、较高浓度 (1%) 的半乳糖醛酸、抗体、某些抗菌素 (如阿莫西林)、植物的 PG 抑制蛋白 (PGIP) 抑制。Ca²⁺ 抑制一些 PG,而一些 PL 的活性需 Ca²⁺ 参与。个别果胶酶基因组成型表达。

4 真菌果胶分解酶的加工和输出

真菌果胶酶一般有糖基化位点,功能酶以糖蛋白形式存在。如玉米圆斑病菌 pgx1N-端有 12AA 的糖基化位点,糖蛋白分子量 60kDa,去糖基后表观分子量 45kDa^[10]。核盘菌在多聚半乳糖醛酸的培养基上培养的早期分泌的 2 种 endo-PG 都是糖蛋

白。番茄根腐尖镰孢 exo-PG 的糖基化程度高,糖蛋白形式存在时分子量为 66kDa,去糖后 50kDa^[6]。不过似以黑曲霉的 endo-PC 糖基化程度最高。

果胶酶一般输出到胞外,如啤酒酵母的 endo-PG。

5 结语

真菌果胶酶的多样性使我们在利用果胶酶时有更大的选择余地。对于一些产果胶酶也产致癌毒素如黄曲霉素的真菌,可将其果胶酶基因转入不产毒素的真菌如酵母菌和米曲霉中。为得到单一的果胶酶,可将其基因克隆到不产果胶酶的相近真菌中。用强启动子如 TEF1 启动子取代果胶酶基因原有的启动子或在果胶酶的发酵生产中加入果胶酶诱导物可用以提高产量,而在果实贮藏期间可用果胶酶抑制物处理或转 PGIP 基因入植物可防软化。富含果胶的物质如苹果渣既是果胶酶诱导物和底物,也是果胶酶的良好载体。北方核盘菌喜冷 endo-PG 的

发现为果胶物质的低温降解提供了可能。真菌果胶酶分子生物学的进一步研究将有助于更合理地利用果胶酶。

参考文献

- [1] Parenicova L , Benen J. A , Kester HC , Visser J. Eur J Biochem 1998 ;251 (1 - 2) :72 - 80
- [2] Kitamoto N , Matsui J , et al. Appl Microbiol Biotechnol 1998 ;50 (1) :85 - 92
- [3] Whitehead MP , Shieh MT , et al. Appl Environ Microbiol 1995 ;61 (9) :3316 - 22
- [4] Wubben JP , Mulder W , et al. Appl Environ Microbiol 1999 ;65 (4) :1596 - 602
- [5] Di Pietro A , Roncero MI. Mol Plant Microbe Interact 1998 ;11 (2) :91 - 98
- [6] Patino B , Posada ML , et al. Can J Microbiol 1997 ;43 (11) :1084 - 1090
- [7] Centis S , Guillas I , et al. Mol Plant Microbe Interact 1997 ;10 (6) :769 - 775
- [8] Fraissinet-Tachet L , et al. Curr Genet 1995 ;29 (1) :96 - 99
- [9] Takasawa T , Sagisaka K , et al. Can J Microbiol 1997 ;43 (5) :417 - 424
- [10] Scott-Craig JS , Cheng YQ , et al. Appl Environ Microbiol 1998 ;64 (4) :1497 - 1503
- [11] Ishida Y. , Kakibuchi K , et al. J. Ferment. Bioeng. 1997 ;84 ,257 - 260
- [12] Blanco P , Sieiro C , et al. FEMS Microbiol Lett 1998 Jul 15 ;164 (2) :249 - 55
- [13] Crotti LB , Terenzi HF , et al. J Basic Microbiol 1998 ;38 (3) :181 - 188
- [14] Gao S , Choi GH , et al. Appl Environ Microbiol 1996 ;62 (6) :1984 - 1990
- [15] Guo W , Gonzalez-Candelas L , Kolattukudy PE. Arch Biochem Biophys 1996 ;15 ;332 (2) :305 - 312
- [16] Huertas Gonzalez MD , et al. Curr Genet 1999 ;35 (1) :36 - 40
- [17] Stratilova E , Dzurova M , et al. FEBS Lett 1996 ;11 ;382 (1 - 2) :164 - 6

Molecular Biology of Fungal Pectinases

Gao Bi-da

(Department of Plant Protection , Hunan Agricultural University , Changsha 410128)

Abstract Progress in molecular biology research on fungal pectinases in the past decade was reviewed. At least 50 pectinase-encoding genes from 11 genera of fungi were cloned and sequenced. Those genes were investigated in structure , function , regulation , post-transcription and post-translation processing. Cloned genes mostly encode polygalacturonases (PG) and pectinlyases (PL) . only a few code for pectin esterases (PE) and rhamnogalacturonase (RHG) . Open reading frame (ORF) were generally interrupted by intron (s) . Most gene products have N-signal peptide and glycosylation sites. pectinases are inducible by pectin , 0.1 % D-galacturonate and other factors and inhibited by 1 % galacturonate , antibody and antibiotics.

Key words Pectinase , Fungus , Molecular biology , Review

新书征订

中国生物工程发展及国际走势

由广州生物工程学会、广东万国经济发展研究中心、南方生物技术产业发展研究所组织编辑的《中国生物工程发展及国际走势》一书，近日由中国数字化出版社出版。

该书收录了国内知名生物技术专家就生物工程研究发展与产业化的各方面问题的综述，内容涉及医药生物技术、农业生物技术、轻化工与食品生物技术等专业领域，对研究我国的生物技术产业如何发展、我国应重点发展的生物技术专业领域、重点产品和发展模式以及有关政府部门、相关生物技术企业与金融投资有较大的参考价值。

订阅该书者请与广州生物工程学会联系。通信地址：广州市沙河 16003 信箱，邮编：510500，联系人：杨久炎研究员，电话：020 - 87739957，传真：020 - 87647232，Email：wgyjse@gdwg.gznet.com