

真菌中温度敏感型相关基因研究进展*

王洪凯 林福呈 李德葆

(浙江大学生物技术研究所 杭州 310029)

Research Advances of Temperature-sensitive Related Genes in Fungi*

Wang Hongkai Lin Fucheng Li Debao

(Biotechnology Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

关键词:真菌,温度敏感型;基因

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)05-0634-06

生物在长期进化过程中,逐渐演化,适应了周围的环境。温度是一种基本的环境因素,任何生物体都有其生长温度范围和最适生长温度。当生物体的某些基因发生突变后,可以改变生物体对温度的适应性。温度敏感型突变体是指生物体基因突变后,在最适生长温度条件下可以生长,而在低于(或高于)最高(低)生长温度的某一亚致死温度下不能生长的突变体,突变的基因为温度敏感型相关基因。温度敏感型突变体对温度适应性的变化涉及到一系列生理生化特性的改变,体现了基因功能结构域突变后基因功能的异常。因此,温度敏感型突变体提供了研究功能基因的好材料,是研究蛋白质与蛋白质互作的良好体系^[1],成为研究基因结构与功能的有效手段。本文综述了温度敏感型突变体在真菌基因结构功能研究中的进展。由于温度敏感型突变体形成的机理在动物中研究的比较深入,在形成机理方面引用了一些动物研究中的材料。

1 温度敏感型突变体形成的机理

生物体的某些基因突变后,其编码的蛋白质的氨基酸会随之改变。当蛋白质的 1 至几个重要氨基酸突变后,会使蛋白质的空间结构发生变化,导致酶分子不能形成稳定的催化结构,酶分子的催化能力下降,当温度升高时,生物体不能生长,即形成温度敏感型突变体。关于温度敏感型突变体形成的机理,我们以哺乳动物的 Hck 蛋白和谷胱氨酰转移酶的研究结果,具体说明。

Hck 蛋白是一种激酶,在细胞内信号传导过程中起重要作用。它主要在 B-淋巴细胞和骨髓瘤细胞的生血细胞中,起调节单核细胞-巨噬细胞的连接和输出的作用,还可与白血病抑制因子作用抑制胚胎干细胞分化。另外研究发现至少有 2 种异型,定位于不同的细胞器的质膜上。Scholz 等用寡核苷酸介导的直接定点突变方法^[2],将 Hck 蛋白的 isoleucine(异亮氨酸)-433 突变为 methionine(甲硫氨酸),proline(酪氨酸)-475 突变为 serine(丝氨酸)后,形成温度敏感型突变体。在 33℃ 该蛋白具有正常功能,37℃ 功能降低 20 倍,39℃ 完全丧失功能。而野生型 Hck 蛋白的功能正常。

蛋白激酶要实现其信号传导功能,首先要折叠形成具有催化功能的结构并稳定的保持。Hck 蛋白结晶体研究表明, isoleucine-433 位于 F- α -螺旋和 G- α -螺旋之间,而 Proline-475 位于 H- α -螺旋和 I- α -螺旋之

* 国家自然科学基金资助(30080021)

作者简介:王洪凯(1970-) 山东淄博人,浙江大学生物技术研究所博士后,主要从事丝状真菌分子生物学研究。

收稿日期:2002-01-30,修回日期:2002-04-27

间,这两个氨基酸面对面地位于激酶结构底部的突出部位,相距约 23Å,且这两个氨基酸残基距离该酶的催化活性位点都较远,但对保持 Hck 蛋白正常的空间结构具有重要作用。Isoleucine-433 与其两侧的 F- α -螺旋和 G- α -螺旋形成一个紧密的疏水区域。当 isoleucine-433 突变成 methionine 后,由于 isoleucine 的 β -甲基缺失,轻- α -螺旋很容易移动,使此部位的疏水性进一步降低。Proline-475 在 Hck 中的作用是两方面的。首先,它使 H 和 I 两个螺旋稳定的形成环状结构,其次,在 H 螺旋的丙氨酸-脯氨酸-谷氨酸簇中保守的(Glu-404)谷氨酸残基和在 I 螺旋的脯氨酸-谷氨酸-精氨酸簇中保守的精氨酸(Arg-478)之间,形成了盐桥。Proline-475 有效地包裹着精氨酸,维持着盐桥的稳定。丝氨酸取代酪氨酸后,增加了这一区域的溶解性(包围谷氨酸-精氨酸盐桥的),这一局部介电常数的增加,能降低这两个结构域互作的强度,使 Proline-475 在 Hck 中的两方面的作用都下降。

这两个面对面的位置的突变结合起来,有效的降低了激酶 C-端臂环的稳定性,随温度的升高,降低了突变体的催化活性,形成了温度敏感型突变体。

Rossjohn 等对哺乳动物的谷胱氨酰转移酶的研究表明,温度敏感型突变体形成机理与 Hck 蛋白相似^[3]。谷胱氨酰转移酶 α -螺旋结构域的重要氨基酸(Ser, Asp 等)突变,可形成温度敏感型突变体。对温度敏感型突变体的谷胱氨酰转移酶和正常谷胱氨酰转移酶蛋白晶体的 x-衍射研究表明,突变使酶的单体间的距离(大于 1Å)比正常的(0.41Å)增大,严重影响到酶的稳定性和活性,随温度的升高,谷胱氨酰转移酶失去活性。

2 产生温度敏感型突变体的方法

温度敏感型突变体产生的机率很低,筛选突变体比较困难。温度敏感型产生方法主要有两种,一是用物理化学方法随机诱变。得到温度敏感型突变体后,先用遗传学方法确定温度敏感型突变位点和相关性状是否偶联,再进行相关基因的克隆。这种方法的产生频率在 1000-2000 分之一^[4,5]。二是对于已经克隆的基因,如果推测基因产物可能与其它生物大分子连接互作有关,为了进一步研究其作用机理,或酶分子的结构特性及与其功能的关系,用 PCR 方法,对该基因进行随机位点突变,产生温度敏感型突变体。这种方法的产生频率为 600 分之一。用 DNA 插入整合取代(integration replacement disruption method)也可产生温度敏感型突变体^[6]。我们实验室采用紫外线诱变,筛选稻瘟病菌的温度敏感型突变体,突变率在 1500 分之一。我们已经筛选到一些与稻瘟病菌致病性相关的温度敏感型突变体,为研究稻瘟病菌的致病机制获得了良好的试验材料。

得到温度敏感型突变体以后,采用质粒互补的方法,获得温度敏感型相关基因,通过序列比较,研究基因的突变位置和其编码产物的重要结构域,通过研究突变体和野生株在相同温度下基因表达的差异(采用 Northern, Western, GFP, knock-out 等),进一步确定基因的生理功能。

3 温度敏感型相关基因在真菌中的研究进展

3.1 利用温度敏感型突变体研究复制相关基因及其功能

在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,DNA 聚合酶 I 突变后,可形成温度敏感型突变体。Lucchini 等利用这种突变体^[7]对 DNA 聚合酶 I 的特性进行了研究。结果表明该酶的 N-端的 Gly 残基被 Asp 或 Glu 残基取代,形成了温度敏感型突变体,说明该酶的 N-端结构域是该酶与其他蛋白质互作的区域。

S. cerevisiae 的 *dna2* 突变体是 DNA2 基因突变形成的温度敏感型突变体,DNA2 基因编码 DNA 激发的 ATP 酶,并与 DNA 的解旋有关,对 DNA 的复制很重要。Budd 等利用 *dna2* 突变体研究了 DNA2 基因的特性^[8]。结果表明 DNA2 基因的功能与 DNA 复制和 DNA 损伤后的修复有关。

3.2 利用温度敏感型突变体研究转录相关基因及其功能

在细胞质和细胞核中,都有一些与 mRNA 相联系的 RNA-结合蛋白(RNA-binding protein)其中,Npl3p 在酵母 *S. cerevisiae* 中对生长非常重要,它与细胞核内核蛋白差异较大,而与核糖体蛋白相似性较高。该

蛋白的温度敏感型突变体不能将 mRNA 运出细胞核。Shen 等利用这种温度敏感型突变体,研究了 *Npl3* 基因和编码 mRNA 帽子结合复合体亚单位的基因(*CBP80* 和 *CBP20*)的互作关系^[9]。在这种温度敏感型突变体中,去掉 *CBP80* 和 *CBP20* 中的任何一个基因,突变体不能生长,表现致死的表型。用共免疫沉淀进一步研究 *Npl3* 基因和 mRNA 帽子结合复合体的互作关系,结果表明, *Chp80p* 和 *Chp20p* 能逐一地与 *Npl3p* 共免疫沉淀,但 *Npl3p* 和 *Chp80p* 的互作必须有 *Chp20p* 和 RNA 的存在。另外,Shen 等^[9]利用这种温度敏感型突变体研究表明,在 RNA 正在合成时, *Chp80p* 能在细胞核与细胞质之间穿梭。这些结果表明在 mRNA 转录加工过程中,其帽子复合体和 *Npl3p* 将其包裹,并运出细胞核。

人类的 EBP2 蛋白质是通过双杂交分析获得的,与爱泼斯坦-巴尔体病毒核抗体 1 互作。该蛋白在 *Saccharomyces cerevisiae* 中有同源蛋白,它们的 C-末端都有一个 200~300 氨基酸的保守区段。为了明确 EBP2 的细胞学功能,Huber 等(2000)对 *S. cerevisiae* 的 *Ebp2* 蛋白进行了研究^[4]。*Ebp2* 蛋白的 N-末端含有 KKE 结构(KKE motifs),与核仁的结合有关。而 C-末端的保守区域与蛋白的活性有关。*EBP2* 基因的编码产物定位于细胞核中。用 PCR 方法,对 *EBP2* 基因进行随机位点突变,产生温度敏感型突变体 *ebp2-1*,在 28℃ 可以生长,34℃ 下不能生长。研究表明由于 F217S 和 E243G 替换形成了 *ebp2-1*,*ebp2-1* 在 27SA 前体形成 27SB 前体时存在缺陷,说明 *Ebp2* 蛋白的功能与 rRNA 的前体剪切形成成熟的 rRNA 有关。

在真核细胞中, RNA 聚合酶 II 是保守性很强的复合体,在转录过程中起重要作用。在酵母中, RNA 聚合酶 II 由 12 个亚基(RPB1-RPB12)组成, RPB4 突变可形成温度敏感型突变体,在温和温度条件下(12℃~32℃)可以生长。温度敏感型突变体 Δ RPB4 形成的原因是 RPB4 的突变影响到 RNA 聚合酶 II 的稳定性, RNA 聚合酶 II 由紧凑型变为开放型,当温度低于 12℃ 或高于 32℃ 时,基因不能转录。为了明确 RNA 聚合酶 II 各亚基及与其它蛋白的互作, Tan 等通过基因互补试验,得到了 3 个可以抑制温度敏感型突变体 Δ RPB4 表型的基因^[10]:一个是编码 RNA 聚合酶 II 亚基的 RPB7,说明 Rpb4p 与 Rpb7 互作,保持 RNA 聚合酶 II 的稳定性;另一个编码核蛋白,第 3 个是 SRO9,编码一种 RNA 结合蛋白 Sro9p。研究结果还表明 Sro9p 与 RNA 聚合酶 II 结合后,能增强 RNA 的转录,并能增加 mRNA 的稳定性,说明 Sro9p 参与 RNA 的转录和转录后 mRNA 的加工。

RuvB 蛋白是一种原核细胞的 DNA 解旋酶,其功能是在细胞分裂后期的同源重组过程中,使同源染色体分离。从小鼠的肝细胞中分离到 2 个蛋白, *p47* 和 *p50*,含有与 RuvB 蛋白同源性很高的保守结构域。在 *S. cerevisiae* 中分离到与编码 *p47* 的基因同源的 *TIH2* 基因,为了研究其特性, Lim 等用 PCR 方法^[5],对 *TIH2* 基因进行随机位点突变,产生温度敏感型突变体 *tih2-160*,在高于 37℃ 时不能生长,细胞生长停止在 G1 期。Northern 分析表明 *Tih2p* 蛋白是 G1 环化酶基因和多个核糖体基因转录所必须的。说明 *TIH2* 基因的功能是调节被 RNA 聚合酶 II 指导的基因转录。

在酿酒酵母中, *YPA1* 基因编码的蛋白与哺乳动物的磷酸酪氨酸转移酶(phosphotyrosyl phosphatase) PP2A 同源。为了研究 *YPA1* 基因的功能, Hoof 等用 PCR 方法,对该基因进行随机位点突变^[11],产生温度敏感型突变体,该突变体在非生长温度下停止在细胞分裂的间期。在正常温度下,该突变体的表型与野生株不完全相同,如细胞分裂的间期缩短,芽体形态异常等。研究结果表明 *YPA1* 是 PP2A 的正调节子。

3.3 利用温度敏感型突变体研究细胞分裂过程中的相关基因

在酵母中,肌动蛋白参与细胞分裂的许多方面,包括线粒体分裂进入正在生长的芽细胞中。酵母细胞中缺少 *mdm20* 基因功能,则线粒体遗传和肌动蛋白组成都缺失(defect),特别是缺少明显的肌动蛋白素(actin cable),对高温的敏感性增强,形成温度敏感型突变体。Singer 等^[12]从 *mdm20* 突变体中进一步筛选抑制其表型的第 2 点突变体, 9 个突变体可以恢复温度敏感型缺陷和线粒体遗传缺陷,部分恢复肌动蛋白素结构。这 9 个突变体明确了 2 个基因 *ACT1* 和 *TPM1*,分别编码肌动蛋白和原肌球蛋白的主要形式。*ACT1* 突变体分析结果表明,该基因含有 1 个肌动蛋白和原肌球蛋白连接的结构域,说明 *ACT1* 基因具有通过增强肌动蛋白-原肌球蛋白的相互作用稳定肌动蛋白素的功能,并推测 *mdm20* 基因具有调节肌动蛋白-原肌球蛋白的相互作用的功能。

Osherove 等^[13]研究了构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 的 2 个极性缺陷突变株 *podG3* 和 *podH40*。它们在 32℃ 下生长正常,而在 42℃ 下细胞核可以分裂,但菌丝不能生长,而野生菌株在 42℃ 下能生长。通过互补的方法克隆了这 2 个基因,发现 *podG* 的基因产物与酵母的线粒体苯丙氨酸-tRNA 合成酶的 α 亚基同源,*podH* 的基因产物与酵母的 CTD-磷酸化酶转录因子 IIF 的结合物同源。因此 Osherove 等^[13]推论分生孢子萌发首先要经历一个非极性生长期,在此期间经过基因转录、蛋白质合成,然后才能建立细胞的极性,细胞进行正常生长。

cdc50-1 突变株是 *Saccharomyces cerevisiae* 的一个对低温敏感的温度敏感型突变体,当温度低于 14℃ 时,不能生长。Radji 等^[14]采用质粒互补的方法,克隆了 *CDC50* 基因。该基因定位于第 3 染色体上,包括 1173 个核苷酸,编码 391 个氨基酸的蛋白质。该基因的第 1 个起始密码子缺失突变形成了 *cdc50-1* 突变株。在 14℃ 条件下培养,*cdc50-1* 突变株生长停止在细胞分裂的 G_1 期。*CDC39* 基因的过量表达(over-expression)可抑制 *cdc50-1* 突变株的表型,在 14℃ 条件可以生长。*CDC39* 基因的产物是转录因子,调节信息素反应途径相关基因的表达。这些结果表明 *CDC50* 的功能与调节 *CDC39* 基因的转录有关。

在 *Saccharomyces cerevisiae* 中,温度敏感型突变体 *cdc42* 对高温敏感,在 36℃ 下,生长停止在细胞分裂的 G_1 期。采用基因互补的方法,克隆了 *CDC42* 基因,*CDC42* 基因编码高保守的 GTP 酶,具有调节细胞极性和肌动蛋白组成的功能。另外,在酵母及哺乳动物细胞的研究中,发现 Cdc42p 通过与 p21-活化激酶(PAKs)的互作,在信息素传递途径中调节靶基因的转录。*cdc42* 突变体对 α -因子信号途径(信息素途径)无反应,在含有 α -因子的培养基上不能生长。但也有些研究结果认为 Cdc42p 蛋白的功能与信息素信号传递无关。为了进一步确定 Cdc42p 的功能,Moskow 等用 PCR 随机诱变体系,使 Cdc42p 蛋白的 Val136 或 Tyr40 发生突变,获得了可以对 α -因子信号途径发生反应的 *cdc42md* 突变体^[15],该突变体在含有 α -因子的培养基上能够生长,具有相关的极性功能。突变使 Ste20p 不能有效的分布于芽体顶端(bud tip),体外试验证明突变影响到了 Cdc42p 上与 Ste20p 互作的结合结构域。四分体分析表明具体影响到了信号传导的 Ste20p 步骤,Ste20p 的过量表达(overproduction)能恢复这种缺陷。这些结果表明信息素反应中需要 Cdc42p,Cdc42p 功能通过与 p21-活化激酶信号途径中的 Ste20p 蛋白的互作实现。Moskow 等认为 Cdc42p 提供了细胞表面的支架(scaffold),帮助增加信号传导激酶在局部的浓度,通过 Ste20p 启动被有丝分裂原活化的蛋白激酶串(MAPK cascade)的活性,实现了信号的传导。

真核细胞中 mRNA 降解的主要途径是先依靠脱腺苷作用(deadenylation-dependent),脱去 mRNA 的帽子结构,再在 5'-3'核糖外切酶的作用下降解。同时,mRNA 的帽子结构又是转录起始因子 eIF4E 的结合区。对 eIF4E 突变形成的温度敏感型突变体(*cdc33-42*)的研究表明,在非生长温度下,由于 mRNA 的迅速降解而停止生长。由此推测转录产物的降解速率取决于转录起始复合体和脱帽酶类在该区域结合的竞争。为了验证这个推测,Schwartz 等^[16]经过体外实验证明 eIF4E 在 mRNA 帽子结构区结合抑制了脱帽酶 Dcp1 的活性。Schwartz 等又将编码脱帽酶 Dcp1 的基因突变,使其失去部分功能,再转入 *cdc33-42* 中,构建了新的突变体 *dcp1-1* 结果表明在 *dcp1-1* 中 mRNA 可以迅速降解。这些结果表明脱帽反应前首先需要 eIF4E 与 mRNA 帽子结构区分离。

3.4 利用温度敏感型突变体研究核糖体相关基因及其功能

在 *S. cerevisiae* 中,*Tom1p* 被认为是普遍存在的连接酶(ubiquitin-ligase)。Sasaki 等用酵母双杂交体系^[17]筛选到一个与 *TOM1* 互作的基因 *KRR1*。为了研究 *KRR1* 的功能,Sasaki 等^[17]用 PCR 方法,对 *KRR1* 基因进行随机位点突变,产生温度敏感型突变体在 25℃ 可以生长,37℃ 下不能生长。应用基因互补的方法,获得 2 个抑制子(可以恢复突变体的部分功能),一个是 *RPS14A*,编码 40S 核糖体蛋白。另一个是新基因,定名为 *KPI1*(意为 *KRR1* 互作的基因)。*KRR1* 基因对生长是必须的,其编码的蛋白定位于细胞核中,功能分析表明 *Krr1p* 和 *kri1p* 互作形成复合体是 40S 核糖体蛋白在细胞核中的生物合成必需的。

在 *S. Scerevisiae* 中,*ccal-1* 菌株是温度敏感型突变体。采用基因互补,*ccal-1* 菌株的方法,Deno 等^[18]

从 *Kluyveromyces lactis* 文库中分离出一个基因 *KICCA1*, 该基因编码 489 个氨基酸的 $\text{ATP}(\text{CTP})$:tRNA 特异 tRNA 核苷酸基转移酶, 该酶与 *S. cerevisiae* 中的同源蛋白有 57% 的相同序列。Southern 杂交表明仅有 1 个拷贝存在于 *K. lactis* 的基因组中。*KICCA1* 可以恢复 *cca1-1* 突变体细胞质(突变体可以利用非发酵的碳源)和线粒体(突变体只能利用发酵的碳源)的缺陷, 表明 *KICCA1* 可编码一系列同工酶, 定位在细胞核、细胞质和线粒体等不同的亚细胞区。当用 PCR 方法将 *KICCA1* 基因序列不完整的扩增, 再转化 *cca1-1* 突变体, 使 *KICCA1* 编码的蛋白缺失开始的 35 个氨基酸, 则可恢复 *cca1-1* 突变体细胞核、细胞质中的缺陷, 但不能恢复线粒体中的缺陷, 表明这 35 个氨基酸与线粒体靶位点的结合有关, 而与酶的活性无关。

3.5 利用温度敏感型突变体在孢子萌发和抗逆性等方面的研究

休眠的 *Aspergillus nidulans* 的分生孢子具有萌发的能力。为了明确分生孢子在萌发过程的分子机制, Oshero 等用氧化硝基喹啉, 对 *A. nidulans* 的分生孢子进行诱变, 获得了与萌发相关的温度敏感型突变体^[19]。这些突变体在萌发时对碳源的需求发生变化。通过基因互补, Oshero 等获得了 8 个与萌发相关的基因。对其中 5 个基因的研究结果表明, 分生孢子的萌发需要有与转录起始相关的蛋白的合成, 乙酰-CoA 的合成, 以及信号激联反应的激活。

在裂殖酵母 (*S. pombe*) 中 *WIS1* 基因是活化有丝分裂原蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase), 调节有丝分裂和介导抗逆反应。*wis1Δ* 突变株是温度敏感型突变体, 在最适温度下能存活, 但对温度敏感, 在较高温度下细胞有丝分裂停止, 但可继续细胞伸长生长。Prochnik 等^[20]从 *wis1Δ* 分离出可抑制对热敏感的突变体。通过遗传分析表明, 这些新突变体有 2 个位点, *sow1* 和 *sow2* (suppressor of *wis1Δ*) 发生突变。*sow1* 和 *sow2* 除了抑制对热敏感, 还可抑制 *wis1Δ* 对渗透压敏感和细胞循环缺陷。因此 Prochnik 等认为 *sow* 基因的功能与抗逆性和细胞循环控制有关。

3.6 利用温度敏感型突变体研究细胞内物质运输的分子机理

在 *S. cerevisiae* 中, *YPT6* 基因编码 GTP 酶, 细胞缺乏 *Ypt6p* 会形成温度敏感型突变体, 并造成细胞内物质运输缺陷。这种突变体的蔗糖酶的活性与正常的相比降低很多。Li 等利用这种突变体对 *YPT6* 基因进行了研究^[21], 认为 *YPT6* 基因与高尔基体联结互作和核糖体的生物合成有关。Simiosoglou 等采用互补这种突变体的方法, 又筛选到 *RIC1* 基因^[22], *Ric1p* 可与一个未知蛋白 *Rgp1* 形成复合体, 可激活 *Ypt6p*, 使 GTP-GDP 发生转换。*Ric1p-Rgp1* 复合体通过 GDP 与 *Ypt6p* 连接, 催化 *Ypt6p* 与高尔基体的膜连接, 而这是内质网衍生的小体与高尔基体的连接所必须的。

Wedlich-Söldner 采用温度敏感型突变体方法^[23], 从 *Ustilago maydis* 克隆了一个与表型缺陷相关的基因 (*YUPI*), 其编码产物是可溶性 N-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感型融合蛋白的连接受体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor)。其功能是使孢囊向生长点聚集, 细胞壁成分在菌丝顶端积累。温度敏感型突变体是由于其编码蛋白的 Phe45(苯丙氨酸)替换为 Ala(丙氨酸)而形成, 在非正常生长温度下 (34℃), 孢囊向生长点聚集受阻, 菌丝不能生长。

4 总结与展望

生物从遗传信息的表达到正常生理功能的发挥, 涉及到许多蛋白质与其它生物大分子物质的连接与互作, 而温度敏感型突变体为我们研究这些过程提供了一个有效手段。温度敏感型相关基因的突变在改变生物对温度适应性的同时, 也会引起一些其它性状的变化。如在正常的生长温度下, 细胞的形态发生改变^[24], 生长滞后^[25], 对氨基酸的营养需求发生改变^[26], 酶的活性降低^[21], 萌发时对碳源的需求发生变化等。因此我们就可以利用温度敏感型突变体对控制生物体一些重要性状的基因及其调节方式进行研究, 为进一步对这些性状进行人工调控提供理论依据。真菌生长周期短, 易于培养, 哺乳动物及其它生物类群的一些基因也可以利用真菌的温度敏感型突变体进行功能分析。虽然温度敏感型突变体产生的频率较低, 在真菌中的研究不多, 在丝状真菌中的研究更少, 但温度敏感型突变体的产生是由 1 至几个重要氨基酸的突变引起的, 因此又是研究蛋白质功能结构域特性的有效方法。稻瘟病菌与水稻的

互作研究已成为真菌-植物互作的研究模式,其互作过程中涉及到许多的基因表达、物质运输及信号传导过程。温度敏感型突变体将为我们研究致病过程的分子机理提供很好的体系。我们已经筛选到一些与稻瘟病菌致病性相关的温度敏感型突变体,为研究稻瘟病菌致病的分子机制获得了良好的试验材料。真菌温度敏感型相关基因的研究,为我们明确真菌一些重要性状相关基因及其产物的生物学功能提供了新的手段。

参 考 文 献

- [1] Schwienhorst I ,Johnson E S ,Dohmen R J ,et al . *Molecular-and-General-Genetics* 2000 **263** :771 ~ 786 .
- [2] Scholz G ,Hartson S D ,Cartledge K ,et al . *Molecular and Cellular Biology* 2000 **20** :6984 ~ 6995 .
- [3] Rossjohn J ,McKinstry W J ,Oakley A J ,et al . *Journal of Molecular Biology* 2000 **302** :295 ~ 302 .
- [4] Huber M D ,Dworet J H ,Frappier K ,et al . *The Journal of Biological Chemistry* 2000 **275** :28764 ~ 28773 .
- [5] Lim C R ,Kimata Y ,Ohdate H ,et al . *The Journal of Biological Chemistry* 2000 **275** :22409 ~ 22417 .
- [6] Toh-e A ,Oguchi T . *Genes and Geneti* 2000 **75** :33 ~ 39 .
- [7] Lucchini G ,Falconi M M ,Pizzagalli A ,et al . *Genetics* ,1990 **90** :99 ~ 104 .
- [8] Budd M E ,Campbell J L . *Mutation Research* 2000 **459**(3) :173 ~ 186 .
- [9] Shen E C ,Stage-Zimmermann T ,Chui P ,et al . *The Journal of Biological Chemistry* 2000 **275** :23718 ~ 23724 .
- [10] Tan Q ,Li X ,Sadhale P P ,et al . *Molecular And Cellular Biology* 2000 **20** :8124 ~ 8133 .
- [11] Hoof V C ,Janssens V ,Baere D I . *Journal of Molecular Biology* 2000 **302**(1) :103 ~ 119 .
- [12] Singer J M ,Hermann G J ,Shaw J M . *Genetics* 2000 **156** :523 ~ 534 .
- [13] Osherov N ,Mathew J ,May G S . *Fungal Genetics and Biology* 2000 **31** :181 ~ 188 .
- [14] Radji M ,Jong-Myong K ,Togan T ,et al . *Yeast* 2001 **18** :195 ~ 205 .
- [15] Moskow J J ,Gladfelter A S ,Lamson R E ,et al . *Molecular And Cellular Biology* 2000 **20** :7559 ~ 7571 .
- [16] Schwartz D C ,Parker P . *Molecular And Cellular Biology* 2000 **20** :7933 ~ 7942 .
- [17] Sasaki T ,Toh-E A ,Kihuchi Y . *Molecular And Cellular Biology* 2000 **20** :7971 ~ 7979 .
- [18] Deng X Y ,Hanic-Joyce P J ,Joyce P B M . *Yeast* , 2000 **16** :945 ~ 952 .
- [19] Osherov N ,May G . *Genetics* 2000 **155** :647 ~ 656 .
- [20] Prochnik S ,Fantes P . *Yeast* 2001 **18** :229 ~ 238 .
- [21] Li B ,Warner J R . *J Biol Chem* ,1996 **271** :16813 ~ 16819 .
- [22] Siniosoglou S ,Peak C S Y ,Pelham H . *The EMBO Journal* 2000 **19**(18) :4885 ~ 4894 .
- [23] Wedlich-Söldner R ,Bölker M ,Kahmann R . et al . *The EMBO Journal* 2000 **19**(9) :1974 ~ 1986 .
- [24] Holthuis J C M ,Nichols B J ,Dhruvakumar S D ,et al . *The EMBO Journal* ,1998 **17** :113 ~ 126 .
- [25] Hartwell A . F ,Smith D . *Genetics* ,1985 **110** :381 ~ 395 .
- [26] Aguilera A ,Klein H L . *Genetics* ,1998 **119** :779 ~ 790 .