

赤霉菌分子生物学研究进展

李红民¹ 贾敬芬¹ 梅兴国^{2*}

(¹西北大学生命科学学院 西安 710069)

(²军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)

摘 要 过去 10 年中,由于基因克隆、遗传转化等分子生物学方法与技术的应用,对赤霉菌中赤霉素生物合成基因的克隆、鉴定、异源表达及其表达调控等分子生物学研究取得了很大进展。现从赤霉菌的转化系统、赤霉素生物合成基因克隆、合成机理及其基因表达调控等方面的研究进展进行综述。

关键词 赤霉素 植物激素 转化系统 基因克隆 生物合成 基因表达调控

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)04-0552-04

水稻恶苗病原菌赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)因产赤霉素(Gibberellins, GAs)而闻名。目前,在植物、真菌和细菌中已经鉴定的赤霉素烷类化合物已达 126 种。其中 GA₃、GA₄、GA₇ 和 GA₉ 等可作为天然植物激素有效控制植物种子萌发过程中水解酶活性的诱导、茎的伸长、花的诱导和种子发育等植物生长发育过程^[1]。正是由于这些特性和其商业利用价值,曾经投入了大量的人力和物力进行赤霉素的开发应用研究。尤其过去 10 年中,伴随着分子生物学方法技术的渗透与应用,在赤霉菌分子生物学研究方面取得了许多进展^[2]。

1 转化系统

1.1 GA 合成缺陷突变株

GA 合成缺陷突变株的研究最早始于 20 世纪 50 年代,最有名的突变体是 Bearder 等^[3]采用 UV 诱变法以野生型菌株 GF-1a 为出发菌株得到的突变体 B1-41a,该菌株不能氧化内根-贝壳杉烯醛(ent-kaur-16-en-19-al)产生内根-贝壳杉烯酸(ent-kaur-16-en-19-oic-acid),使内根-贝壳杉烯的氧化发生遗传阻断。Candau 等^[4]采用亚硝基胍(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine)诱变野生型赤霉菌菌株 IM158289 得到了 GA 合成途径不同反应点发生阻断的缺陷突变株 SG121、SG136、SG138 和 SG139,为了解赤霉菌中赤霉素的代谢途径提供了有利的实验材料。Krasnopolskaya 等^[5]也曾通过从野生型菌株的菌丝体制备原生质体并使之再生筛选出了倾向于合成 GA₄ 或 GA₇ 的菌株。

这些突变体在赤霉素生物合成途径研究、基因的克隆、鉴定、表达及功能等研究中起着非常重要的作用,也是获得改良菌株、提高赤霉素产量的有力工具。

1.2 载体及转化系统

对 GA 生物合成基因的特性进行研究,一个重要前提就是建立一个高效的遗传转化系统。与其他的丝状真菌转化

一样,赤霉菌的转化一般采用细菌质粒构建转化载体。1991 年, Sanchez-Fernandez 等^[6]在黑曲霉(*Aspergillus niger*)硝酸还原酶基因(*niaD*)的基础上,以不能在以硝酸盐为唯一氮源的培养基上生长的赤霉菌突变株 SG140(*niaD11*⁻)的原生质体作为转化受体,通过营养缺陷互补筛选表型为原养型的转化子,构建了第一个用于赤霉菌的异源转化系统,其转化频率仅为 1~2 转化子/每微克 DNA。随后,几种异源转化系统相继建立,载体携带通过营养缺陷互补筛选转化子的构巢曲霉鸟氨酸氨甲酰基转移酶基因 *argB* 或是显性选择标记如 benomyl 抗性基因或氨基糖苷类抗生素潮霉素 B 抗性基因^[7,8],虽然使筛选效率大大提高,但转化频率都没有显著提高。1996 年, Tudzynski 等^[9]克隆分离了赤霉菌硝酸还原酶基因(*niaD*)并以此为标记构建了一个粘粒载体 pGFniaD 和普通质粒载体 pJN1。用 pGFniaD/pJN1 转化 *niaD* 基因缺陷的赤霉菌突变株 *niaD5*(UV 诱变野生型菌株 m567 的衍生菌株),转化频率均可达 80~200 个转化子/每微克 DNA。

以赤霉菌硝酸还原酶基因(*niaD*)为基础的转化系统是第一个用于赤霉菌的高效同源转化系统。该系统的建立,使得通过基因破坏实验或转化 GA 合成缺陷突变株以产生功能互补的转化子,从而进行 GA 生物合成基因的克隆、鉴定、功能研究和表达调控分析并最终在分子水平上澄清赤霉素生物合成机理成为可能。同时,该系统也为赤霉菌的分子遗传学研究、定向遗传操作与选择以及菌种改良等工作提供了有力的工具。但是,该系统要求专门的 *niaD* 基因及相应的 *niaD* 基因缺陷的赤霉菌菌株,使对该系统的进一步广泛应用受到很大的限制。另外,上述转化系统基本上以原生质体作为转化受体,操作过程相对繁琐。

1.3 外源 DNA 在赤霉菌中的稳定性

已有的研究结果表明,外源 DNA 整合到赤霉菌染色体上的方式基本可以分为 3 种: (1) 单拷贝单位点; (2) 多拷贝单

基金项目:国家自然科学基金(30371704)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-66932644 E-mail: xg-mei@yahoo.com

作者简介:李红民(1972-),女,陕西人,讲师,在职博士研究生,主要从事植物细胞工程与生物技术制药。E-mail: hlhm2002@yahoo.com.cn

收稿日期:2003-11-03,修回日期:2004-04-12

位点 (3) 单拷贝或多拷贝方式插入多位点。插入位点可以是同源的,也可以是异源的,与外源基因在其它真菌中的整合方式基本相同。当利用限制性内切酶介导整合(Restriction enzyme-mediated integration, REMI)可以显著提高转化和单拷贝整合的频率^[6~10]。根据 Fernandez-Martin 等^[11]报道,只有当重组质粒携带来自受体赤霉菌基因组的同源片段时才能以较高的频率转化受体赤霉菌,并通过同源重组整合到宿主染色体中。但是,以任何方式转入受体菌中的外源基因在丝状真菌中经历减数分裂后通常表现出明显的不稳定性,其有丝分裂稳定性也要依赖选择压力来维持。这种不稳定性同样也出现在赤霉菌中,但是根据 Leslie 等^[10]的研究结果,在实验室条件下,外源基因在赤霉菌中经历减数分裂/有丝分裂后的不稳定性似乎相对较低,而且以单拷贝整合到赤霉菌染色体中的转化子似乎更加稳定。

2 基因克隆

2.1 基因克隆概况

首先从赤霉菌中克隆的基因是法呢基焦磷酸合成酶基因(*fpps*)。随后,参与赤霉菌生物合成的多个基因以及部分代谢调控基因被相继克隆^[12~17]。HMG-CoA 合成酶基因、FDP 合成酶基因以及香叶儿香叶儿焦磷酸(Geranylgeranyl diphosphate, GGDP)合成酶基因均以单拷贝形式存在于赤霉菌基因组中并组成型表达,高浓度的铵或葡萄糖不影响它们的转录^[21]。参与赤霉素生物合成的 7 个基因 *orf3*、*P450-4*、*P450-1*、*P450-2*、*ggs2*、*cps/ks* 以及 *P450-3* 基因紧密连锁^[16](图 1)组成一个基因簇,存在于赤霉菌第四条染色体上^[18],但各成员转录方向并不相同。位于基因簇左边界的 *orf3/des* 的编码产物是 GA_4 1,2-脱氢酶,其表达受高浓度氮源的抑制。在 *orf3/des* 的右边是 *P450-4* 基因,编码一个多功能内根-贝壳杉烯氧化酶,催化赤霉素合成过程中内根-贝壳杉烯到内根-异贝壳杉烯酸的所有 3 步氧化反应^[15]。

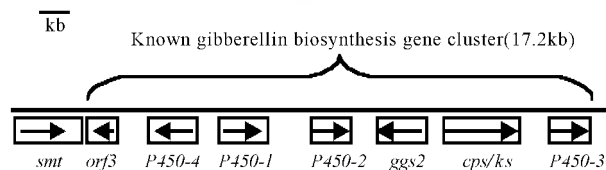


图 1 赤霉菌中赤霉素生物合成基因簇^[17]

Fig.1 Gibberellin biosynthesis gene cluster in *Gibberella fujikuroi*^[17]

P450-1 为多功能细胞色素 P450 单氧化酶,催化赤霉素生物合成途径中连续的 4 步反应: 7β -羟基化、通过 C-6 位氧化使 B 环收缩、 3β -羟基化以及 C-7 位上的氧化^[13]。序列分析表明,细胞色素 P450 单氧化酶基因 *P450-1* 和 *P450-2* 在与重要功能性结构域尤其是血红蛋白结合结构域相对应的序列结构上高度同源^[12]。在大肠杆菌中的异源表达表明 *cps/ks* 的表达产物内根-柯坪内酯焦磷酸合成酶为双功能酶,催化 GGDP 到内根-贝壳杉烯的两步环化反应。*cps/ks* 基因从左至右转录,与其左边的 *ggs2* 基因的转录方向相反,但两者共用了 839bp 启动子区^[21]。*ggs2* 直接与 *cps/ks* 连锁,这种结构排布方式可能更有利于 GGS2 蛋白特异性地为 CPS/KS 提供 GGDP,为 GA 代谢途径中较早期步骤中可能的区室化作

用做准备^[19]。在 *cps/ks* 基因的右边,是第三个细胞色素 P450 单氧化酶基因 *P450-3*^[12],编码 13-羟基化酶,在代谢途径的最后一步催化 GA_7 向 GA_3 的转化以及 GA_4 向 GA_1 转化的 13-羟基化作用,是基因簇中唯一不受氮源抑制的基因^[16]。

2.2 基因克隆方法

早期分离赤霉菌基因的是在真菌、植物或脊椎动物的相应基因共有序列的基础上设计引物进行 PCR 扩增,以 PCR 产物为探针筛选基因文库。之后, Tudzynski and Hoelter 采用 mRNA 差异显示法成功克隆了赤霉素生物合成中的细胞色素 P450 单氧化酶基因 *P450-1* 和 *P450-2*,采用双方向染色体步移的方法克隆了位于 *P450-2* 下游的 *ggs2* 基因^[12]。并且通过基因破坏^[8,13,17]、基因置换^[17]、异源表达^[21]、基因剔除与遗传互补^[15,16]、分子杂交等分子生物学方法对基因功能及表达调控等进行研究。

3 赤霉素生物合成的分子机理

在过去 50 多年的研究中,对赤霉菌中赤霉素合成的基本途径已经相当清楚,但对赤霉素合成途径的生物化学反应过程并不明了。随着赤霉菌分子生物学研究的深入,参与赤霉素生物合成的特异性基因已经全部被克隆定位,并对所有基因的功能进行了详细研究^[15,16]。赤霉菌中赤霉素合成的生物化学反应机制从而得以阐明:由羟甲基戊二酰辅酶 A 在 3-羟基-3-甲基-戊二酰 CoA 还原酶作用下生成甲羟戊酸,经异戊烯基二磷酸(IDP)香叶儿二磷酸(GDP),由法尼基二磷酸(FDP)合成酶催化 GDP 生成 FDP;FDP 在香叶儿香叶儿二磷酸(GGDP)合成酶作用下转化成 GGDP;GGDP 在赤霉素合成特异性基因 *cps/ks* 编码的 CPS/KS 双功能合成酶催化下,经过两步环化反应经由柯坪内酯焦磷酸(Copalyl diphosphate)转化成内根-贝壳杉烯,该反应是赤霉素合成途径中特异性的关键步骤并被认为是真菌中赤霉素生物合成的限速步骤^[21]。然后高度疏水的内根-贝壳杉烯被 *P450-4* 编码的多功能内根-贝壳杉烯氧化酶连续催化,经内根-贝壳杉烯醇、内根-贝壳杉烯醛而氧化成内根-异贝壳杉烯酸^[15,18]。内根-异贝壳杉烯酸在多功能细胞色素 *P450-1* 单氧化酶连续催化作用下,经内根- 7α -羟基-异贝壳杉烯酸、 GA_{12} -醛(赤霉素代谢途径中第一个内根-赤霉素烷类化合物)、 GA_{14} -醛到 GA_{14} ^[13,18,20]。之后, GA_{14} 在 *P450-2* 催化下转化成 GA_4 , GA_4 在 *orf3/des* 编码的 GA_4 1,2-脱氢酶作用下氧化成 GA_7 或在 *P450-3* 催化下转化成 GA_1 。 GA_7 在 *P450-3* 催化下转化成 GA_3 ^[2,12,18]。

4 赤霉素生物合成基因的表达调控

培养基中高浓度的氮源(包括氨态氮和硝态氮)和葡萄糖都会显著降低赤霉菌合成赤霉素的产量^[21],而且一些植物生长延缓剂如季胺类化合物、2-酮戊二酸结构类似物、含氮杂环化合物以及 16,17-二氢-GAs 等均能抑制赤霉素在赤霉菌中的合成^[22~24]。但是对这些抑制因子作用于靶基因分子机理却研究得相对较少。

1999 年, Tudzynski 等^[17]克隆了赤霉菌的氮源代谢调节基因 *areA*,通过遗传互补和基因置换实验表明,该基因产物

AREA-GF 控制赤霉菌对氮源的利用。进一步的研究证明^[25], AREA-GF 可以直接结合在 6 个接受氮源调节的基因 *orf3*、*P450-4*、*P450-1*、*P450-2*、*ggs2* 以及 *cps/ks* 的启动子区, 对氮源利用及 GA 合成起正调节作用。在 *areA* 缺失突变体中, 赤霉素生物合成基因簇中 6 个基因(除 *P450-3* 以外)的表达水平显著降低。

在碳源代谢抑制的分子机理研究上, 虽然已经克隆了一个参与赤霉菌碳源代谢调节的基因 *creA-GF*, 但是该基因产物的作用靶基因、靶位点及作用方式尚不清楚^[24]。

5 结束语

综上所述, 有效的遗传转化系统的建立为许多基于转化系统的分子生物学技术如基因扩增、基因破坏、人为关闭竞争性代谢旁路(如类胡萝卜素合成途径)以及基因启动子区的修饰等提供了重要前提。赤霉素生物合成途径中绝大多数基因被相继克隆, 在分子水平上系统认识赤霉素合成途径每一步反应的酶动力学、编码基因及其调控方式、碳氮源代谢调节的分子机理以及利用分子遗传学方法改良菌种以提高该类微生物中各种次级代谢产物的含量已经成为可能。国际上已经有多个研究机构和企业已经越来越重视对赤霉菌进一步的开发利用研究^[26]。

另外, 赤霉素是一种二萜类化合物, 随着赤霉菌中赤霉素合成及调控的分子机理逐渐明了, 有可能通过人工操纵实现自然界中仅以很低的资源量存在的重要萜类化合物在赤霉菌中的表达乃至最终的规模化生产。本课题研究小组正在积极开展这方面的研究工作, 拟通过基因剔除的方法构建特定基因发生突变的赤霉菌受体系统, 实现相应的植物源萜类化合物生物合成相关基因在该系统中的表达。具体情况见另文报道。

总之, 随着分子生物学方法技术和物理化学方法在赤霉菌研究中的不断应用, 赤霉菌将很可能成为继曲霉(*Aspergillus nidulans*)和粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)之后另一个有广阔开发利用前景的丝状真菌。

参 考 文 献

- [1] MacMillan J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *J Plant Growth Regul*, 2002, **20**: 387–442.
- [2] Tudzynski B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 298–310.
- [3] Bearder J R, MacMillan J, Wels M, et al. Position of the metabolic block for gibberellin biosynthesis in mutant B1–41a of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 1974, **13**: 911–917.
- [4] Candau R, Avalos J, Cerda-Â-Olmedo E. Gibberellins and carotenoids in the wild type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 3378–3382.
- [5] Krasnopolskaya L M, Makeeva A P, Sokolova L M, et al. Production of gibberellins A4 and A7 by *Fusarium moniliforme* strains. *Mikrobiologiya*, 1997, **66**: 501–505.
- [6] Sanchez-Fernandez R, Unkles S E, Campbell E I, et al. Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *Aspergillus niger* *niaD* gene encoding nitrate reductase. *Mol Gen Genet*, 1991, **225**: 231–233.

- [7] Brückner B, Unkles S E, Weltring K, et al. Transformation of *Gibberella fujikuroi*: effect of the *Aspergillus nidulans* AMA1 sequence on frequency and integration. *Curr Genet*, 1992, **22**: 313–316.
- [8] Linnemannstons P, Voß T, Hedden P, et al. Deletions in the Gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 2558–2564.
- [9] Tudzynski B, Mende K, Weltring K-M, et al. The *Gibberella fujikuroi* *niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. *Microbiology*, 1996, **142**: 533–539.
- [10] Leslie J F, Dickman M B. Fate of DNA encoding hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 1423–1429.
- [11] Fernandez-Martin R, Cerda-Â-Olmedo E, Avalos J. Homologous recombination and allele replacement in transformants of *Fusarium fujikuroi*. *Molecular and General Genetics*, 2000, **263**: 838–845.
- [12] Tudzynski B, Hölter K. The gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet Biol*, 1998, **25**: 157–170.
- [13] Rojas M C, Hedden P, Gaskin P, et al. The *P450 1* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. *PNAS*, 2001, **98**: 5838–5843.
- [14] Tudzynski B, Liu S J, Kelly J M. Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea* genes. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **184**: 9–15.
- [15] Tudzynski B, Hedden P, Carrera E, et al. The *P450–4* Gene of *Gibberella fujikuroi* encodes *ent*-Kaurene oxidase in the gibberellin biosynthesis pathway. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(8): 3514–3522.
- [16] Tudzynski B, Mihlan M, Rojas M C, et al. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: *des* and *P450–3* encode GA4 desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 28635–28643.
- [17] Tudzynski B, Homann B, Feng B, et al. Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol Gen Genet*, 1999, **261**: 106–114.
- [18] Hedden P, Phillips A L, Rojas M C, et al. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *J Plant Growth Regul*, 2002, **20**: 319–331.
- [19] Domenech C E, Giordano W, Avalos J, et al. Separate compartments for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Eur J Biochem*, 1996, **239**: 720–725.
- [20] Urrutia O, Hedden P, Rojas M C. Monooxygenases involved in GA12 and GA14 synthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 2001, **56**: 505–511.
- [21] Borrow A, Brown S, Jefferys E G, et al. Metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can J Microbiol*, 1964, **10**: 407–444.
- [22] Rademacher W. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, **51**: 501–531.

[24] Hedden P. Gibberellin metabolism and its regulation. *J Plant Growth Regul* , 2002 , **20** : 317 – 318.

[25] Mihlan M , Homann V , Ta-Wei D L , *et al* . AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* , but its activity is not affected by NMR. *Mol Microbiol* , 2003 , **47** : 975 – 991 .

[26] Leslie J F. *Gibberella fujikuroi* : available polulations and variable traits. *Can J Bot* , 1995 , **73** : S282 – S291 .

Recent Advances in The Molecular Biology of *Gibberella fujikuroi*

LI Hong-Min¹ JIA Jing-Fen¹ MEI Xing-Guo^{2*}

(¹ School of Life Science , Northwest University , Xi 'an , 710069 , China)

(² Institue of Pharmacology and Toxicology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing , 100850 , China)

Abstract : The ascomycetous filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* , a pathogenic to plant , is important in commercial production and academy research of gibberellins which were identified as natural plant hormone controlling the plant development such as stem elongation and seed germination. However , the molecular biology of this fungus has been under-developed. Based on the transformation system , genes cloning , molecular biosynthetic pathway of gibberellins and the regulation of the corresponding genes , some biomolecular aspects about *Gibberella fujikuroi* were summarized in this paper.

Key words :Gibberellin , Plant hormone , Transformation system , Gene cloning , Biosynthesis , Gene expression regulation

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (30371704)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-66932644 ; E-mail : xg_mei@yahoo.com

Received date : 11-03-2003

微 生 物 学 报
WEISHENGWU XUEBAO
(双月刊 ,1953 年创刊)

第 44 卷 第 4 期 2004 年 8 月

ACTA MICROBIOLOGICA SINICA
(Bimonthly Started in 1953)

Vol.44 No.4 August 2004

编 辑 《微生物学报》编辑委员会
地址 北京海淀中关村中国科学院微生物研究所内
邮政编码 :100080 电话 :86-10-62630422
Http :/www.im.ac.cn/journals
E-mail : actamicro@sun.im.ac.cn

主 编 李季伦

主 办 中国科学院微生物研究所
中国微生物学会

出 版 科学出版社
地址 北京东黄城根北街 16 号
邮政编码 :100717

印刷装订 北京科信印刷厂

总 发 行 科学出版社
地址 北京东黄城根北街 16 号
邮政编码 :100717
电话 :010-64034563
E-mail :journal@cspg.net

国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址 北京 399 信箱 邮政编码 :100044

广告经营许可证 京东工商广字第 0034 号

Edited by Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica
Add : Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Zhongguancun , Beijing 100080 , China
Tel 86-10-62630422
Http :/www.im.ac.cn/journals
E-mail : actamicro@sun.im.ac.cn

Editor-in-Chief LI Ji-Lun

Sponsored by Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences
Chinese Society for Microbiology

Published by Science Press
Add : 16 Donghuangchenggen North Street , Beijing 100717 , China

Printed by Kexin Printing House

Distributed by Science Press
Add : 16 Donghuangchenggen North Street , Beijing 100717 , China
Tel : 010-64034563 ; E-mail : journal@cspg.net

Foreign distribution China International Book Trading Corporation
Add : P. O. Box 399 , Beijing 100044 ,China