

专题介绍 Special Topics

植物抗真菌蛋白的抗菌机制

郑灿伟^{1,2}, 宾金华^{1,*}¹华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; ²广东广雅中学, 广州 510160

Action Mechanism of Antifungal Proteins Derived from Plants

ZHENG Can-Wei^{1,2}, BIN Jin-Hua^{1,*}¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; ²Guangya High School of Guangdong, Guangzhou 510160, China

提要: 文章就植物抗菌蛋白抑制真菌生理代谢、降解细胞壁聚合体、改变细胞膜通透性和形成穿膜小孔、破坏细胞的核糖体和降解细胞中的核酸机制的研究进展作介绍。

关键词: 植物; 抗菌蛋白; 抗菌机制

植物在其生长过程中常常受到各种真菌的侵害。据报告, 已知真菌大约有 100 000 种, 其中侵害植物的种类不超过 10% (Knogge 1996), 却引起 80% 以上的植物病害(张福丽等 2006), 造成世界粮食作物减产约 20% (Knight 等 1997)。另一方面, 真菌在侵染植物的过程中, 释放出来的代谢产物——真菌毒素(mycotoxins), 对农作物以及人类的健康也造成极大的危害(Bennett 和 Klich 2003)。黄曲霉毒素(aflatoxin)就是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)产生的一种特剧毒性的真菌毒素, 其毒性比砒霜大 68 倍, 比氰化钾大 10 倍; 它同时还是目前发现的最强的致癌物质, 它主要诱使动物发生肝癌(Henry 等 1999)。

面对众多真菌的威胁, 植物并不是束手无策, 植物含有较多的蛋白质, 特别是在种子中, 一些蛋白质已证明具有抗真菌的作用, 称为抗菌蛋白(antifungal protein, AFP), 如蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PI)、几丁质酶、葡聚糖酶、核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating protein, RIP)等, 有些抗菌蛋白是植物本身所固有的, 有些则是在植物发生系统获得抗性过程中产生的, 这类蛋白称之为病程相关蛋白(pathogenesis-related protein, PR), 到目前为止所发现的病程相关蛋白有 17 种。

除了抗菌蛋白以外, 植物中还有一些具有抗菌活性的小分子量蛋白类物质, 称为抗菌肽(antifungal peptides), 如防御素、硫堇等。人们通常把氨基酸含量在 50 个以下、分子量小于 5 kDa 的多肽称

为抗菌肽; 而把氨基酸含量在 50 个以上、分子量大于 5 kDa 的称为抗菌蛋白。植物在与病原真菌长期斗争过程中所形成的抗菌蛋白或抗菌肽种类非常多, 迄今发现的就有好几百种, 而且种类还不断地增加。本文中着重介绍植物的抗菌蛋白是如何起抑菌作用的。

1 抑制真菌的生理代谢

植物病原菌在侵染植物过程中, 分泌多种酶分解植物细胞, 以获得生长和繁殖所需的碳源和氨基酸。植物则通过其体内多种酶抑制剂抑制这些酶的活性, 以阻止病原菌降解植物细胞, 病原菌也因营养不足而生长、增殖、侵染和扩展受阻, 因此抗病力增强。

蛋白酶抑制剂分为两类: 丝氨酸蛋白酶(如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶)抑制剂和半胱氨酸蛋白酶抑制剂。从玉米中纯化出来的一个分子量为 14 kDa 的胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor, TI)能破裂黄曲霉孢子和抑制黄曲霉菌丝的生长, 以致菌丝变得粗短(Chen 等 1998)。通过基因重组, 过表达这种 TI 后, 其重组蛋白能抑制多种植物病原真菌的生长, 表明 TI 是植物抵抗多种病原真菌侵染的物质(Chen 等 1999a)。这种 TI 能通过抑制胞外 α -淀粉酶的活性

收稿 2008-04-07 修定 2008-09-04
资助 国家自然科学基金(30671338)和广东省自然科学基金(31531)。

* 通讯作者(E-mail: binjh@scnu.edu.cn; Tel: 020-85211375-8033)。

而削弱黄曲霉对糖类的利用(Chen等1999b)。花生在栽培过程中和收获后都容易受到黄曲霉侵染, PI可以抑制黄曲霉的生长(宾金华等2000), 表明PI是花生抵抗黄曲霉侵染的物质。

除了蛋白酶抑制剂外, 有些凝集素活性的抗菌蛋白也具有酶抑制剂活性。AILP (α -amylase inhibitor from *Lablab purpureus*)是分离自扁豆(*Lablab purpureus*)的一种分子量为36 kDa的 α -淀粉酶竞争性抑制剂, 这种蛋白抑制几种真菌 α -淀粉酶活性, 但对动物和植物的 α -淀粉酶则几乎不起作用。抑菌实验表明, AILP抑制黄曲霉孢子萌发和菌丝生长。这种AILP不具有胰蛋白酶抑制剂活性, 却表现出凝集素活性, 氨基酸序列分析表明, AILP与豆科中的凝集素-表壳蛋白 α -淀粉酶抑制剂(lectin-arcelin- α -amylase inhibitor)家族的凝集素相似, 是植物抵抗病虫害的一种物质(Fakhoury和Woloshuk 2001)。

除此之外, 一些蛋白酶抑制剂同时还具有抑制肿瘤和人类免疫系统缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的能力。从花生中纯化出来的一种与凝集素类似的抗菌蛋白, 不仅能抑制HIV-1逆转录酶的活性, 还能抑制与HIV侵染过程相关的一些酶的活性(Ye等2001)。从蚕豆(*Vicia faba*)中分离出的一种分子量为13 kDa的胰凝乳蛋白酶抑制剂, 不仅对花生球腔菌(*Mycosphaerella arachidicola*)和梨轮纹病菌(*Phylospora piricola*)有抑制作用, 而且可以激发小鼠脾脏细胞的促有丝分裂反应, 抑制HIV-1逆转录酶的活性(Ye和Ng 2002b)。

植物中蛋白酶抑制剂的作用机制尚需要进一步探讨, 有些蛋白酶抑制剂的抑菌作用与其浓度有关, 如低浓度的TI能抑制黄曲霉 α -淀粉酶的分泌, 高浓度(200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的TI反而能促进其分泌(Chen等1999b)。除此之外, 单纯通过抑制一种酶活性似乎并不能完全起到抑菌作用, 如低浓度的TI在抑制 α -淀粉酶的同时也促进了黄曲霉的另一种代谢酶——淀粉葡萄糖苷酶的活性(Chen等1999b), 单一的蛋白酶抑制剂并不能完全抑制真菌全部的生理代谢活动, 因此推测蛋白酶抑制剂通过与其它抗菌蛋白的相协调而发挥抑菌作用。

2 降解真菌细胞壁聚合物

真菌细胞壁位于真菌最外围一层, 大约占真菌干重的20%~30%, 不仅维持真菌细胞的形态, 免受

外界的物理伤害, 同时还在生殖、黏着和疏水性起作用。与植物细胞壁不同, 真菌细胞壁主要由三种不同的多聚糖组成, 即几丁质、 β -(1,3)葡聚糖和 β -(1,6)葡聚糖。许多抗菌蛋白就是以真菌细胞壁中的不同成分作为其作用靶点, 通过破坏真菌细胞壁以此抵抗病原真菌的侵染。

2.1 几丁质结合蛋白 几丁质结合蛋白(chitin-binding protein, CBP)是一种可以通过与新生几丁质结合而影响真菌生长的蛋白质, 植物中的PR-4蛋白属于几丁质结合蛋白, 分子量在13~14.5 kDa之间。几丁质结合蛋白分为两个亚类, 其中I类是蛋白的N端几丁质结合域(chitin-binding domain, CBD)与hevein(一种几丁质结合多肽)的氨基酸序列非常相似, 是几丁质结合凝集素的超家族。II类是蛋白缺乏与hevein相似的结构域。虽然在植物中并未发现几丁质, 但却存在几丁质结合蛋白, 由于大部分真菌的细胞壁和许多无脊椎动物包括线虫和昆虫外壳中均含有几丁质, 因此普遍认为几丁质结合蛋白是植物防御体系中的一部分。

几丁质结合蛋白之所以能抑制真菌的生长则在于它们与真菌细胞壁几丁质的结合能力。真菌生长的同时常伴随着菌丝细胞壁的组装, 其几丁质暴露在外面, 容易为几丁质结合蛋白结合。真菌细胞的极性是生长所必需的, 抗菌蛋白可以结合到萌发中的孢子表面和生长着的菌丝的顶端——表明其抗菌活性是抗菌蛋白与真菌细胞壁几丁质结合的结果, 因此细胞极性受到破坏, 造成孢子和菌丝的涨大以及出现不规则的菌丝分支, 从而抑制真菌细胞的生长(Bormann等1999)。

有些凝集素抗菌蛋白也具有与几丁质结合的能力。天麻抗真菌蛋白(*gastrodia* antifungal protein, GAFP)是从天麻(*Gastrodia elata*)中纯化出来的一种分子量为10 kDa抗菌蛋白, 能抑制多种真菌菌丝的生长, N端氨基酸序列分析表明, GAFP属于凝集素的一类, 但不能引起经胰岛素处理过的兔红细胞凝集(Xu等1998)。经荧光试剂FITC标记的GAFP蛋白处理绿色木霉菌(*Trichoderma virid*), 其菌丝周围有荧光出现, 以菌丝横隔和菌丝顶端较强, 表明GAFP对木霉的作用位点在菌丝的细胞壁上; 而经GAFP处理后的孢子并未观察到明显的荧光, 这可能是未萌发时的孢子还处于休眠封闭状态, 其胞壁结构和成分很少变化所致(徐荣华和刘小焯

2003)。由于GFP并不具有几丁质酶和 β -(1,3)葡聚糖苷酶活性,但却有结合甘露糖、*N*-乙酰葡萄糖胺和几丁质能力(Xu等1998),于是推测它是通过结合细胞壁上的多种结构物质(如几丁质等),引起细胞壁极性的改变而起抗菌作用的。

2.2 几丁质酶 尽管植物并不含有几丁质,但几丁质酶是在高等植物中普遍存在的,它分为I~V型,大部分属于植物的PR-3蛋白,分子量在26~43 kDa之间。几丁质酶先将几丁质水解为寡聚糖,然后再进一步水解为*N*-乙酰氨基葡萄糖,破坏真菌细胞壁的结构完整,从而抑制一些真菌孢子的萌发和菌丝生长,因此一直被看作是植物抗真菌病害的潜在物质。几丁质酶会促使真菌细胞壁变得脆弱,随后引起细胞溶解(Sela-Burlage等1993),而有些植物则通过胞外分泌的几丁质酶将残留在植物细胞间的真菌杀死(Sela-Burlage等1993; Zareie等2002),表明胞外分泌的抗菌蛋白也是植物抵抗真菌的一条途径。

催化几丁质水解能力并不是几丁质酶发挥抗菌作用所必需的。烟草中I型几丁质酶的N端有一个富含Cys的几丁质结合域,其催化能力比缺少此种结合域的突变蛋白高出许多;虽然此种结合域在抗菌作用中并不是必需的,但在有几丁质结合域时,抑菌活性可提高3倍(Iseli等1993),由于几丁质是不溶的,所以具有几丁质结合域的几丁质酶都能吸附在几丁质上,因而其在局部的底物浓度增高,几丁质与酶催化中心之间的距离拉近,进而其分解真菌细胞壁的能力提高。栗子富含一种I型几丁质内切酶,有研究表明, Glu122和Glu144是其催化作用的2个氨基酸,并且Glu173、Thr175和Asn144的突变也对酶活性有影响;但缺少几丁质分解活性的突变几丁质酶却和野生的几丁质酶一样也有抑菌活性(Garcia-Casado等1998),这表明它并不是通过水解活性,而是N端的几丁质结合域直接干扰真菌菌丝顶端几丁质的合成和分解起作用的。由此可以看出,几丁质酶可以通过与几丁质结合而起到抑制菌活性的作用。

从菜豆(*Phaseolus vulgaris*)中分离出一种几丁质酶Phaseins A (28 kDa)和一种新的抗菌蛋白Phaseins B (32 kDa),这两种蛋白可以抑制HIV逆转录酶活性,还能引起鼠类巨嗜细胞亚硝酸盐的分泌增强(Ye等2002a),由于一些有活性的氮的中间产物(如亚硝酸盐)能抑制肿瘤细胞呼吸的作用,因

此认为,这两种抗菌蛋白具有潜在的抗癌作用。

2.3 葡聚糖酶 葡聚糖是真菌细胞壁的第2种组成成分。除了 β -(1,3)葡聚糖这种基本葡聚糖以外,还发现有 α -(1,3)、 β -(1,4)和 β -(1,6)等连接方式,因此认为可以水解不同葡聚糖的葡聚糖酶有潜在的抗菌能力。植物体内的PR-2蛋白具有 β -(1,3)葡聚糖酶活性,其分子量约为33或36 kDa,其作用机制有直接和间接作用两个方面。

(1)直接抑菌作用: β -(1,3)葡聚糖酶可以由病原或植物信号因子(如乙烯或水杨酸等)诱导产生,经过一系列的反应后,植物 β -(1,3)葡聚糖酶(包括胞内积累的碱性类型和胞间积累的酸性类型)大量合成 β -(1,3)葡聚糖酶。同几丁质酶一样, β -(1,3)葡聚糖酶通过水解真菌细胞壁中的 β -(1,3)葡聚糖结构,特别是作用于葡聚糖中暴露比较薄弱的菌丝体顶端,从而导致脆弱细胞的裂解和死亡(Selitrennikoff 2001)。另外,几丁质酶可以协同其效应,共同水解葡聚糖和几丁质。葡聚糖酶与几丁质酶可协同抑菌的原因可能是这两种酶都可水解真菌菌丝, β -(1,3)葡聚糖苷酶可水解真菌菌丝外围的葡聚糖成分,而将菌丝内部的几丁质暴露出来,因而几丁质酶更容易作用于菌丝,抑制真菌的作用于是增强所致。

(2)间接抑菌作用: β -(1,3)葡聚糖酶在降解病原物细胞壁的同时,其释放出来的寡糖还能作为植物多种抗病反应(如过敏反应)的激发子,诱导植物的全面抗病反应(Klarzynski等2000)。

除了 β -(1,3)葡聚糖酶之外,有些植物中还有 β -(1,6)葡聚糖酶、 α -(1,3)葡聚糖酶和 β -(1,3)葡聚糖结合蛋白,它们都是通过与真菌细胞壁葡聚糖相互作用而起抗菌作用的(Theis和Stahl 2004)。

3 影响细胞膜通透性和穿膜小孔的形成

细胞质膜是真菌的一道重要屏障,在细胞生理代谢、物质运输、信号传递、DNA复制中发挥作用。绝大多数抗菌蛋白均以细胞膜为作用靶点,破坏真菌细胞膜的结构,包括改变真菌细胞膜的通透性,或形成穿膜小孔,引起了胞内水溶性物质大量渗出,从而最终导致真菌细胞死亡。

植物中的作用于细胞膜的PR-5蛋白是一种类甜味蛋白(thaumatin-like protein, TLP),其分子量大约22 kDa。玉米中22 kDa的PR-5抗菌蛋白Zeamatin可以导致真菌细胞液的外流,于是细胞很

快裂解, 这种裂解通常发生在细胞的尖端区域, 推测其机制与一些植物的抗菌肽(如防御素等)相似, 它直接插入细胞膜中, 引起细胞膜穿孔从而导致细胞破裂(Roberts 和 Selitrennikoff 1990)。但晶体结构的研究表明, Zeamatin 并不是形成穿膜小孔, 而是引起菌丝近端的静电作用的改变导致细胞内水分和离子的外流(Batalia 等 1996)。来源于烟草的一种 PR-5 蛋白——渗透蛋白(osmotin)不仅能引起一些病原真菌孢子的溶解和抑制孢子萌发, 还能降低菌丝的活力, 其抑菌效果与渗透蛋白引起真菌细胞膜 pH 梯度的消失有关(Abada 等 1996)。亚麻种子中一种分子量为 25 kDa 的 PR-5 蛋白 Linusitin 能改变细胞膜通透性, 其作用机理是通过膜上形成四聚体蛋白而引起细胞内容物的外流; 通过增加其负电荷的磷脂和醇类的含量或者降低内容物的 pH 而增强 Linusitin 的作用效果(Anzlovar 等 1998)。后来又有研究表明, PR-5 蛋白的作用与真菌 G 蛋白介导的信号通路有关, G 蛋白可以影响细胞壁的多孔性和几丁质的沉淀进而影响 PR-5 蛋白的活性(Coca 等 2000)。同时, 质壁分离后的真菌对渗透蛋白也变得不敏感, 这表明与真菌细胞壁的相互作用仍是渗透蛋白发挥抑菌作用的一个重要环节(Abada 等 1996); 其后的研究表明, 一些类甜味蛋白可以与细胞壁上的 β -(1,3)葡聚糖和甘露糖所结合(Trudel 等 1998; Ibeas 等 2000)。一些无机离子可以调节渗透蛋白活性, Ca^{2+} 通过促进渗透蛋白与细胞表面的结合而调节其抗菌活性, 这一过程对细胞表面的甘露糖磷酸是依赖的; 而 K^{+} 通过竞争性结合到细胞表面的甘露糖磷酸而阻断这种作用; 渗透蛋白同时还是一个 Ca^{2+} 结合蛋白, 这种结合对 pH 和蛋白本身的酸性区域是依赖的(Salzman 等 2004)。因此, 认为植物中 PR-5 蛋白的抑菌机制首先是与真菌细胞壁上的 β -(1,3)葡聚糖和甘露糖结合, 而后插入到细胞膜中, 通过与细胞膜的相互作用改变细胞膜的通透性, 从而抑制真菌的生长。此外, 从皇帝蕉中分离出来的一个分子量为 20 kDa 的类甜味蛋白不仅能抑制尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和花生球腔菌的生长, 而且对 HIV-1 逆转录酶也有抑制作用(Ho 等 2007)。

2S 清蛋白是种子中一种小分子量的富含谷氨酰胺的储藏蛋白, 油菜和萝卜种子的 2S 蛋白均有抑制真菌生长的作用, 电镜和 K^{+} 外流测定表明, 其作

用机制与硫素(一种抗菌肽)相似, 它依靠增加细胞膜的透性而抑制真菌的生长(Terras 等 1993)。从大果西番莲(*Passiflora quadrangularis*)中分离得到的 2S 清蛋白同源的蛋白 Pf1 和 Pf2 可以抑制啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的生长, 从而影响细胞膜的通透性, 并引起真菌表型、细胞壁、芽孢、内部细胞器的改变(Agizzio 等 2007)。

磷脂转运蛋白(lipid-transfer protein, LTP)是一种小分子量(约 8.7 kDa)的蛋白, 约含 90 个氨基酸, 其有一个由 4 个二硫键固定的中央隧道状疏水蛋白区域, 在细胞膜间有转运磷脂的功能。Ha-AP10 是一种磷脂转运蛋白, 它通过改变细胞膜的通透性来杀死真菌, 致死效应与其剂量呈相关性, 这是最早证明磷脂转运蛋白具有细胞毒性作用的工作, 也是合理解释 LTP 能可直接抑制真菌生长的实验依据; 磷脂转运蛋白的细胞毒性并不伤害植物细胞本身, 说明磷脂转运蛋白靶分子仅存在于真菌细胞膜上(Regente 等 2005)。

抗菌蛋白与真菌细胞膜相互作用与其自身结构有关, PaAMP 是一种从美洲商陆(*Phytolacca americana*)中分离得到的抗菌蛋白, 定点突变体和 GFP-PaAMP 融合蛋白的研究表明, PaAMP 通过疏水表面与真菌细胞膜的相互作用而发挥抗菌活性功能(Peng 等 2005)。除此以外, 一些以细胞内靶目标为作用位点的抗菌蛋白必然要穿过细胞壁和细胞膜进入细胞内, 这就涉及到抗菌蛋白与细胞壁和细胞膜之间的相互作用, 因此, 很难分清一些与细胞壁或细胞膜相互作用的抗菌蛋白究竟是以细胞壁或细胞膜为作用位点, 还是以细胞内的靶目标为作用位点。过去有些报道认为是与细胞膜相互作用的抗菌蛋白, 后来又发现其作用靶点在细胞内(Theis 和 Stahl 2004)。另外, 不以细胞膜为作用靶点的抗菌蛋白, 它在引起真菌细胞死亡的同时还会引起细胞膜的通透性改变(Chadha 和 Das 2006)。

4 破坏细胞的核糖体

核糖体失活蛋白(RIP)是一种以细胞内的物质为作用靶点的抗菌蛋白, 它通过破坏核糖体的功能而抑制蛋白质的生物合成, 其在植物中广泛存在。RIP 分为 3 类: 单链的 1 型 RIP、双链的 2 型 RIP 和小分子的 3 型 RIP; 其作用方式有 2 种: RNA 水解酶型和 RNA N-糖苷酶型, 作用位点都是 28S rRNA。

RNA 水解酶型: RIP 专一水解 28S rRNA 第 G4325~A4326 位间的磷酸二酯键, 在 28S rRNA 的 3' C 端切下一个长约 500 个核苷酸片段, 因而核糖体失活, 蛋白质合成受抑制(Endo和Wool 1982), 这类 RNA 水解酶型 RIP 一般只见于真菌曲霉属。

RNA *N*-糖苷酶型: 植物中的 RIP 主要属于 *N*-糖苷酶型, 其专一水解真核细胞核糖体 28S rRNA 第 A4324 位腺苷酸的 *N*-C 键, 释放出一个腺嘌呤碱基(Endo 等 1988), 因此它使其不能结合延长因子, 从而阻止蛋白的合成, 造成靶细胞由于缺少必要的蛋白而死亡。随着 RIP 研究的深入, 人们发现 RIP 不仅能从核糖体 RNA 的第 A4324 位上释放腺嘌呤, 而且能从核糖体 RNA 的多个位点和从不同来源的 RNA 或 DNA 核酸分子上释放腺嘌呤, 称为 RIP 的多核苷酸: 腺苷糖苷酶(polynucleotide: adenosine glycosidase, PAG)活性(Barbieri 等 1997)。有研究表明, 缺少酶活性的突变体蛋白对病原菌没有任何作用效果, 因而推测 *N*-糖苷酶活性在 RIP 抑菌作用中起作用(Kirsten 等 2001)。另外, RIP 的抑菌作用还涉及到其是如何进入细胞内的过程, 有些具有 *N*-糖苷酶活性的 RIP 并不能单独起抑菌作用, 只有在有儿丁质酶和葡聚糖酶同时存在的情况下才能发挥抑制真菌生长的作用(Park 等 2002)。这表明抗菌蛋白并不是独立起作用, 它们之间往往有密切的协同作用。

TRIP 是一种来自烟草的 RIP, 它表现出强烈的 *N*-糖苷酶活性, 能抑制蛋白的翻译过程, 对里氏木霉(*Trichoderma reesei*)和青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacearum*)表现出强烈的抑菌活性, 但 TRIP 对于核糖体的破坏能力比其它的 RIP 低得多; 氨基酸序列测定表明, 其与烟草中的 Fe-SOD 内部序列有 15 个氨基酸是完全相同, 而且来自大肠杆菌的 Fe-SOD 也有 RIP 活性, 因此推测 TRIP 可能具有 RIP 活性和 Fe-SOD 双重酶活性(Sharma 等 2004)。

同一 RIP 对不同病原菌的作用方式并不相同。玉米种子中含有丰富的 RIP, 其 RIP1 (分子量 32 kDa) 能引起构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)菌丝顶端的溶解, 从而抑制构巢曲霉菌丝的增殖; 同时这种 RIP1 还能抑制黄曲霉菌丝的生长, 导致黄曲霉菌丝的不正常分支(Kirsten 等 2001)。有研究还表明, 西洋参(*Panax quinquefolium*)中提取出的一

种 RIP 具有抑制 HIV-1 逆转录酶的活性(Wang 和 Ng 2000)。

5 降解细胞中的核酸

5.1 降解 RNA 通过细胞膜进入细胞以降解 RNA 的抗菌蛋白主要是 PR-10 蛋白。PR-10 蛋白是小分子的酸性蛋白, 这类蛋白不含信号肽序列, 说明这些蛋白应该是位于细胞质中的胞内蛋白中, 这与多数 PR 蛋白不一样, 其它 PR 蛋白大多都是位于胞外。许多实验都证明 PR-10 蛋白具有核酸酶活性。

分离自安第斯块茎和酢浆薯(*Oxalis tuberosa*)的 Ocatin 是一种分子量为 18 kDa 的储存蛋白, 属于 PR-10 蛋白家族, 体外实验发现, Ocatin 具有抑制多种植物病原菌的作用, 如尖孢镰刀菌和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) (Flores 等 2002)。CaPR-10 是存在于辣椒中的一种分子量为 17.3 kDa 的胞内在蛋白, 它能抑制南瓜疫病菌(*Phytophthora capsici*)菌丝的延伸, 推测核酸酶在其中起作用(Park 等 2004)。玉米种子中的一种分子量为 16.9 kDa 的 PR-10 蛋白——ZmPR-10 具有核酸酶活性, 它通过抑制菌丝的生长而抗黄曲霉菌(Chen 等 2006)。从刺茄中纯化出来的 SsPR-10 表现出对刺茄叶中总 RNA 有核酸酶活性, 同时也能抑制稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)的菌丝生长; 这种由胁迫和病原菌诱导的 SsPR-10 蛋白不仅在防御和抗胁迫反应中表现出核酸酶和抗菌活性, 在植株的生长、发育和衰老过程中都表现出这一活性(Liu 等 2006)。

从种子萌发 6 d 长出的花生根中纯化出一种分子量为 20 kDa 的 AhPR10 蛋白, 重组蛋白的抑菌实验表明, AhPR10 蛋白对花生病原菌尖孢镰刀菌和立枯丝核菌有抑制作用。多肽链的第 54 位点上 Lys 突变成 Asn 的突变体蛋白 AhPR10-K54N 缺少核酸酶活性和抑菌活性; 荧光标记的 AhPR10 和 AhPR10-K54N 均通过细胞膜而进入尖孢镰刀菌和立枯丝核菌, 但 AhPR10-K54N 并不具有抑菌活性, 这表明核酸酶活性是抗菌活性所必需的。同时, AhPR10 蛋白通过细胞膜进入敏感真菌菌丝的这种内化作用(internalization)依赖于温度和能量, 而且细胞膜也未出现破裂现象, 这表明内化作用是通过细胞的主动运输进行的(Chadha 和 Das 2006)。PR-10 蛋白在细胞膜上的受体或靶位点、运输途径以及细胞内定位尚不十分清楚, 仍需要做进一步的研

究。

除了PR-10蛋白和RNA水解酶型核糖体失活蛋白具有核酸酶活性以外,从小麦中分离出来的一种PR-4蛋白有核酸酶活性,其与PR-10蛋白的作用方式不同,推测这种PR-4蛋白可能是通过抑制蛋白质翻译而抑制真菌生长的(Caporale等2004)。

5.2 降解DNA 有些抗菌蛋白具有DNA酶活性,它通过分解病原真菌的DNA而抑制真菌细胞生长。从石刁柏(*Asparagus officinalis*)种子中分离出一种分子量为30 kDa的蛋白,虽然具有抑制非细胞系的翻译活性,但不同于RIP蛋白,它具有典型的脱氧核苷酸酶N端序列(GIEVKIREL)。它不具有核酸酶、蛋白酶和HIV-1反转录酶活性,只对DNA起作用。体外抑菌实验表明,它能抑制灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)生长(Wang等2001)。

6 结束语

植物中含有丰富的抗菌蛋白,如何通过人工诱导或基因工程的方法,提高抗菌蛋白在植物中的表达量,以提高植物抵抗真菌入侵的能力,是值得深入探讨的。

以往人们常着重于从植物中提取出具有抗菌活性的多肽或蛋白的研究,近年来,其抗菌机制的研究十分活跃。从真菌外层的细胞壁和细胞膜,到细胞内的各个组分,都是植物抗菌蛋白的作用靶点,通过亚显微结构观察能直观了解抗菌蛋白的具体作用效果,采用荧光素标记蛋白可以对抗菌蛋白进行细胞内定位,而结合体内生物学功能的研究开展体外酶动力学和蛋白晶体结构研究对更深入阐明抗菌蛋白的抗菌机制也是重要的。

植物并不是通过单一抗菌蛋白起抗菌作用的,各种抗菌蛋白之间往往有协同作用,迄今这种协同作用大多还只停留于理论解释,而深入探讨其分子机制尚少,对于抗菌蛋白与真菌表面受体的相互识别以及靶位点的相互作用也知之甚少,抗菌蛋白在真菌细胞内的具体运输途径以及其中信号转导也不甚清楚,未来可就这些方面深入探讨。研究植物抗菌蛋白抑制或杀灭真菌的内在分子机制,可以增强人们对植物与病原微生物之间相互作用的分子生物学基础的认识,从而为抗菌蛋白的研究奠定基础。

当今医学界面临的两大医学难题是癌症和艾滋病,最近的研究发现,植物抗菌蛋白不仅抑制特异侵染植物的微生物,其中有些抗菌蛋白还可以杀

死肿瘤细胞,甚至起抑制HIV病毒的作用(Wang和Ng 2000; Ye和Ng 2001, 2002a, 2002b; Ho等2007),这表明植物抗菌蛋白在医药领域可能有潜在的应用前景。相信随着植物抗真菌蛋白研究的深入,其在植物真菌病害的防治以及医药领域将会发挥更大的作用。

参考文献

- 宾金华, 温巧琴, 廖忠富(2000). 花生种子中存在抗菌蛋白. 中国植物生理学会第八次全国会议学术论文汇编: 275
- 徐荣华, 刘小烛(2003). 天麻抗真菌蛋白对木霉菌丝的作用位点. 云南植物研究, 25 (5): 573-578
- 张福丽, 王占斌, 王志英(2006). 几丁质酶在植物抗真菌病害中的作用. 林业科技, 31 (3): 24-27
- Abada LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, Niu XM, Singhb NK, Hasegawaa PM, Bressan RA (1996). Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci*, 118: 11-23
- Agizzio AP, Cunha MD, Carvalho AO, Oliveira MA, Ribeiro SFF, Gomes VM (2007). The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Sci*, 171: 515-522
- Anzlover S, Dalla SM, Dermastia M, Menestrina G (1998). Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. *Mol Plant Microbe Interact*, 11 (7): 610-617
- Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F (1997). Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res*, 25: 518-522
- Batalia MA, Monzingo AF, Ernst S, Roberts W, Robertus JD (1996). The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. *Nat Struct Biol*, 3 (1): 19-23
- Bennett JW, Klich M (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16 (3): 497-516
- Bormann C, Baier D, Horr I, Raps C, Berger J, Jung G, Schwartz H (1999). Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein *Streptomyces tendae* Tü901 that interferes with growth polarity. *J Bacteriol*, 181: 7421-7429
- Caporale C, Di Berardino I, Leonardi L, Bertini L, Cascone A, Buonocore V, Caruso C (2004). Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. *FEBS Lett*, 575: 71-76
- Chadha P, Das RH (2006). A pathogenesis related protein AhPR10 from peanut, an insight of its mode of antifungal activity. *Planta*, 225: 213-222
- Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Cleveland TE, Russin JS (1999a). Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 65: 1320-1324

- Chen ZY, Brown RL, Rajasekaran K, Daman KE, Cleveland TE (2006). Identification of a maize kernel pathogenesis-related protein and evidence for its involvement in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Phytopathology*, 96: 87~95
- Chen ZY, Brown RL, Russin JS (1998). Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernel is associated with a 14-Kda protein. *Phytopathology*, 88: 276~271
- Chen ZY, Brown RL, Russin JS (1999b). A corn trypsin inhibitor with antifungal activity inhibits *Aspergillus flavus* α -amylase. *Phytopathology*, 89: 902~907
- Coca MA, Damsz B, Yun DJ, Hasegawa PM, Bressan RA, Narasimhan ML (2000). Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *Plant J*, 22 (1): 61~69
- Endo Y, Tsurugi K, Franz H (1988). The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett*, 231 (2): 378~380
- Endo Y, Wool IG (1982). The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes: the sequence at the α -sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem*, 257 (15): 9054~9060
- Fakhoury AM, Woloshuk CP (2001). Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal α -amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. *Mol Plant Microbe Interact*, 14 (8): 955~961
- Flores T, Alape-Giron A, Flores-Diaz M, Flores HE (2002). Ocatin. A novel tuber storage protein from the andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities. *Plant Physiol*, 128 (4): 1291~1302
- Garcia-Casado G, Collada C, Allona I, Casado R, Pacios LF, Aragoncillo C, Gomez L (1998). Site-directed mutagenesis of active site residues in a class I endochitinase from chestnut seeds. *Glycobiology*, 8: 1021~1028
- Henry SH, Bosch FX, Troxell TC, Bolger PM (1999). Reducing liver cancer-global control of aflatoxin. *Science*, 5449 (286): 2483~2484
- Ho VS, Wong JH, Ng TB (2007). A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. *Peptides*, 28: 760~766
- Ibeas JI, Lee H, Damsz B, Prasad DT, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA, Narasimhan ML (2000). Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *Plant J*, 23: 375~383
- Iseli B, Boller T, Neuhaus JM (1993). The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiol*, 103: 221~226
- Kirsten N, Gary AP, Rebecca SB (2001). Maize ribosome-inactivating protein inhibits normal development of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*. *Mol Plant Microbe Interact*, 14 (2): 164~172
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B (2000). Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol*, 124 (3): 1027~1038
- Knight SC, Anthony VM, Brady AM, Greenland AJ, Heaney SP, Murray DD, Powel KA, Schultz MA, Spinks CA, Worthington PA et al (1997). Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu Rev Phytopathol*, 35: 349~372
- Knogge W (1996). Fungal infection of plants. *Plant Cell*, 8: 1711~1722
- Liu XJ, Huang BN, Lin J, Fei J, Chen ZH, Pang YZ, Sun XF, Tang KX (2006). A novel pathogenesis-related protein (SsPR-10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress- and pathogen-inducible. *J Plant Physiol*, 163: 546~556
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J*, 37: 186~198
- Park SW, Lawrence CB, Linden JC, Vivanco JM (2002). Isolation and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from root cultures of pokeweed and its mechanism of secretion from roots. *Plant Physiol*, 130 (1): 164~178
- Peng C, Dong CX, Hou QM, Xu CY, Zhao JD (2005). The hydrophobic surface of PaAMP from pokeweed seeds is essential to its interaction with fungal membrane lipids and the antifungal activity. *FEBS Lett*, 579: 2445~2450
- Regente MC, Giudici AM, Villalain J, de la Canal L (2005). The cytotoxic properties of a plant Lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett Appl Microbiol*, 10: 183~189
- Roberts WK, Selitrennikoff CP (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen Microbiol*, 136: 1771~1778
- Salzman RA, Koiwa H, Ibeas JI, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA (2004). Inorganic cations mediate plant PR5 protein antifungal activity through fungal *Mnn1*- and *Mnn4*-regulated cell surface glycans. *Mol Plant-Microbe Interact*, 17 (7): 780~788
- Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Vloemans SA, Melchers LS, Van den Elzen PJM, Cornelissen BJC (1993). Only specific tobacco (*Nicotinia tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol*, 101: 857~863
- Selitrennikoff C (2001). Antifungal protein. *Appl Environ Microbiol*, 67: 2883~2894
- Sharma N, Park SW, Vepachedu R, Barbieri L, Ciani M, Stirpe F, Savary BJ, Vivanco JM (2004). Isolation and characterization of an RIP (ribosome-inactivating protein)-like protein from tobacco with dual enzymatic activity. *Plant Physiol*, 134: 171~181
- Terras FR, Schoofs HME, Thevissen K, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue BPA (1993). Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol*, 103: 1311~1319
- Theis T, Stahl U (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol Life Sci*, 61: 437~455

- Trudel J, Grenier J, Potvin C, Asselin A (1998). Several thaumatin-like proteins bind to β -1,3-glucans. *Plant Physiol*, 118: 1431~1438
- Wang HX, Ng TB (2000). Quinqueginsin, a novel protein with anti-human immunodeficiency virus, antifungal, ribonuclease and cell-free translation-inhibitory activities from American ginseng roots. *Biochem Biophys Res Commun*, 269: 203~208
- Wang HX, Ng TB (2001). Isolation of a novel deoxyribonuclease with antifungal activity from *Asparagus officinalis* seeds. *Biochem Biophys Res Commun*, 289: 120~124
- Xu Q, Liu Y, Wang X, Gu H, Chen Z (1998). Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. *Plant Physiol Biochem*, 36: 899~905
- Ye XY, Ng TB (2001). Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen. *J Pept Res*, 57: 330~336
- Ye XY, Ng TB (2002a). A new antifungal protein and a chitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. *pinto*. *Biochem Biophys Res Commun*, 290 (2): 813~819
- Ye XY, Ng TB (2002b). A new peptidic protease inhibitor from *Vicia faba* seeds exhibits antifungal, HIV-1 reverse transcriptase inhibiting and mitogenic activities. *J Pept Sci*, 8 (12): 656~662
- Zareie R, Melanson DL, Murpy PJ (2002). Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 15: 1031~1039