科技前沿

昆虫几丁质合成及其调控研究前沿*

张文庆** 陈晓菲*** 唐 斌*** 田宏刚*** 陈 洁 姚 琼

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广州 510275)

摘 要 几丁质合成与降解是昆虫最重要的生理过程之一。本文根据国外和作者自己的研究,综述了昆虫几丁质合成及其调控研究进展。昆虫几丁质的生物合成通路始于海藻糖,终止于几丁质,其中共有8个酶参与。目前研究最多的为海藻糖酶和几丁质合成酶。昆虫存在2个海藻糖酶基因和2个几丁质合成酶基因。可溶性海藻糖酶基因对昆虫表皮的几丁质合成影响更大,而膜结合海藻糖酶基因则主要影响中肠的几丁质合成。几丁质合成酶A主要负责表皮和气管几丁质的合成,而几丁质合成酶B则负责中肠围食膜的几丁质合成。目前,昆虫几丁质合成的调控途径主要有两种:利用RNAi技术和几丁质合成抑制剂。

关键词 几丁质合成通路,RNAi,调控

Insect chitin biosynthesis and its regulation

ZHANG Wen-Qing** CHEN Xiao-Fei*** TANG Bin***

TIAN Hong-Gang*** CHEN Jie YAO Qiong

(State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Chitin biosynthesis and degradation is one of the most important physiological processes in insects. Insect chitin biosynthesis pathway starts from trehalose and ends with chitin, in which 8 enzymes are involved. Trehalases and chitin synthases (CHS) have currently been studied at most. There are two trehalases in insects, soluble and membrane-bound trehalases, with major roles in chitin synthesis in the cuticle and the midgut, respectively. The class A CHS is involved primarily in chitin synthesis in the cuticle and trachea, while class B CHS is thought to be for synthesis of chitin in the peritrophic matrix. At present, chitin biosynthesis can be regulated in two aspects such as use of RNAi techniques and chitin synthesis inhibitors.

Key words chitin biosynthesis pathway, RNAi, regulation

几丁质是自然界中储存量仅次于纤维素的第二大天然多糖,广泛存在于真菌、昆虫和甲壳类动物之中,但不存在于植物和脊椎动物中(Andersen *et al.*,1995)。几丁质是昆虫表皮(外骨骼)的主要成分,也是中肠围食膜的重要成分。几丁质约占昆虫虫蜕干物质的40% (Kramer *et al.*, 1995)。几丁质的合成和降解对昆虫的生长发育至关重要(Merzendorfer and Zimoch, 2005),一直是害虫控制的理想靶标。本文根据国外和作者自己的研究,综述了昆虫几丁质合成及其调控研究与发展前沿。

1 昆虫几丁质合成通路基因的特性和功能

1.1 昆虫几丁质合成通路

昆虫几丁质的合成是一个高度复杂的、多方面联系的一系列生化和生理过程。Candy 和 Kilby

* 资助项目:国家自然科学基金项目(30871634)。

**通讯作者,E-mail: lsszwq@mail.sysu.edu.cn

***现工作单位:陈晓菲(美国 University of Michigan)、唐斌(杭州师范大学生命与环境科学学院)、田宏刚(西北农林科技大学植物保护学院)

收稿日期:2011-05-03,接受日期:2011-05-05

(1962)首次提出了昆虫体内几丁质的生物合成通路,始于海藻糖,终止于几丁质,其中共有 8 个酶参与,依次为海藻糖酶(trehalase)、己糖激酶(hexokinase)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose-6-phosphate isomerase)、谷氨酸盐:果糖-6-磷酸转氨酶(glutamine: fructose-6-phosphate aminotransferase)、葡糖胺-6-磷酸-N-乙酰转移酶(glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase)、磷乙酰氨基葡萄糖变位酶(phosphoacetylglucosamine mutase)、UDP-N-乙酰葡糖胺焦磷酸化酶(UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase)和几丁质合成酶(chitin synthase)。

关于几丁质合成通路,目前研究最多的为海藻糖酶和几丁质合成酶,也就是几丁质合成的第一个和最后一个酶。相比较,通路中其它的基因研究很少,主要为 Kato 和同事对埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的谷氨酸盐:果糖-6-磷酸转氨酶(Kato *et al.*,2002),葡糖胺-6-磷酸-N-乙酰转移酶(Kato *et al.*,2005a),磷乙酰氨基葡萄糖变位酶和 UDP-N-乙酰葡糖胺焦磷酸化酶(Kato *et al.*,2005b)等基因进行了克隆和特征分析。

1.2 海藻糖酶基因

昆虫存在 2 个海藻糖酶基因:可溶性海藻糖酶基因(*Tre-1*)和膜结合海藻糖酶基因(*Tre-2*)。第一个海藻糖酶基因首先在黄粉虫 *Tenebrio molitor* 中被克隆(Takiguchi *et al.*,1992),经分析是一个可溶性海藻糖酶基因。膜结合海藻糖酶基因到 2005 年才在家蚕 *Bombyx mori* 中获得(Mitsumasu *et al.*, 2005)。

海藻糖酶基因具有 2 个"标签序列"(signature motifs):PGGRFREFYYWDSY 和 QWDYPNAWPP。膜结合海藻糖酶基因包含一个长为 20 个氨基酸的跨膜区域(Tang *et al.*, 2008)。可溶性海藻糖酶基因在中肠、马氏管和卵巢中表达,而膜结合海藻糖酶基因则在脂肪体、中肠和马氏管中表达。

Chen 等(2010)利用 RNAi 技术阐明了 2 个海藻糖酶基因在昆虫几丁质合成中的不同功能。注射 dsRNA 干涉 2 个海藻糖酶基因后,昆虫的存活率明显降低,对几丁质合成通路下游基因的转录水平都有不同程度的下调作用,其中干涉 *Tre-1* 对几丁质合成酶 A 基因(*CHSA*)的影响较大,对 *CHSB* 的影响很小,而干涉 *Tre-2* 则对几丁质合成酶 B 基因(*CHSB*)有较大的影响。进一步的研究表明,*Tre-1* 对昆虫表皮中的几丁质合成影响更大,而 *Tre-2* 则主要影响中肠中的几丁质合成。

1.3 几丁质合成酶基因

昆虫也存在 2 个几丁质合成酶基因:A 基因(*CHSA*)和 B 基因(*CHSB*)。第一个几丁质合成酶基因首先从铜绿丽蝇 *Lucilia cuprina* 中克隆获得,经分析是一个 A 基因(Tellam *et al.*, 2000)。然后,2 个几丁质合成酶基因相继在埃及伊蚊(Ibrahim *et al.*, 2000)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*(Gagou *et al.*, 2002)、烟草天蛾 *Manduca sexta*(Zhu *et al.*, 2002; Hogenkamp *et al.*, 2005)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*(Arakane *et al.*, 2004)、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*(Hogenkamp *et al.*, 2005)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*(Chen *et al.*,2007;Kumar *et al.*, 2008)等昆虫中被克隆和研究。由于在黑腹果蝇和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中,这 2 个基因都位于同一条染色体上,因此它们很可能由一个共同的祖先通过基因复制进化而来(Gagou *et al.*, 2002; Arakane *et al.*, 2005)。

昆虫几丁质合成酶是分子量大约在 160 ~ 180 ku 之间的大型跨膜蛋白,其氨基酸序列具有 3 个结构域:结构域 A、B 和 C,其中结构域 B 高度保守并含有 2 个特有序列(unique motifs),EDR 和 QRRRW(Tellam *et al.*, 2000)。区分 2 个几丁质合成酶基因的特征是:几丁质合成酶 A 基因存在交替外显子(alternative exon)的结构。几丁质合成酶 A 基因在表皮和气管中表达,而 B 基因则只在中肠表达。与此相对应,前者主要负责表皮和气管几丁质的合成,而后者则负责中肠围食膜的几丁质合成(Merzendorfer and Zimoch, 2005)。

RNAi 技术已被用于研究 2 个几丁质合成酶基因的功能。赤拟谷盗 *CHSA* 基因被 RNAi 后,出现畸形幼虫、畸形蛹和畸形成虫以及蜕皮障碍,畸形预蛹中的几丁质含量降低了 66.9%;*CHSB* 基因被 RNAi 后,幼虫取食减少,身体变小,中肠中的几丁质含量降低(Arakane *et al.*, 2005)。甜菜夜蛾 *CHSA* 基因被 RNAi 后,昆虫的生长发育受到抑制,出现蜕皮障碍、表皮几丁质层不能正常形成、气管发育畸形等现象(Chen *et al.*, 2008)。Tian 等(2009)还发现饲喂法 RNAi 可沉默昆虫非中肠基

因(几丁质合成酶 A 基因),大大拓宽了昆虫基因的利用途径。

2　几丁质合成的调控

目前,昆虫几丁质合成的调控途径主要有两种:利用 RNAi 技术抑制相关基因的 mRNA 水平来调控以及利用几丁质合成抑制剂来调控。

利用 RNAi 技术干涉几丁质合成通路基因,可显著降低昆虫表皮或中肠的几丁质含量(表 1)。而作为通路的最后一个基因,几丁质合成酶 A 基因被 RNAi 后,表皮的几丁质含量降低了 66.9%,但对中肠的几丁质含量没有影响(Arakane *et al.*, 2005)。作为通路的第一个基因,海藻糖酶基因被 RNAi 后,昆虫表皮或中肠的几丁质含量降低较少(Chen *et al.*, 2010)。由于蜕皮激素受体(*EcR*)基因可以调控几丁质合成通路基因,因此 *EcR* 基因被 RNAi 后,也能降低表皮的几丁质含量,但中肠的几丁质含量反而增加(由于中肠的几丁质降解受阻)(Yao *et al.*, 2010)。

表 1　RNAi 后昆虫表皮和中肠几丁质含量的降低程度

Table 1　The percentage decreased in chitin content in the epidermas and midgut after RNAi

靶标基因 Target gene	物种 Species	表皮几丁质降低程度(%) % decreased in chitin content in the epidermas	中肠几丁质降低程度(%) % decreased in chitin content in the midgut	参考文献 References
几丁质合成酶 A 基因 *CHSA*	赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*	66.9	没有影响 No effection	Arakane *et al.*, 2005
可溶性海藻糖酶基因 *Tre-1*	甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*	31.6	2.6	Chen *et al.*, 2010
膜结合海藻糖酶基因 *Tre-2*	甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*	12.3	26.2	Chen *et al.*, 2010
蜕皮激素受体基因 *EcR*	甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*	12.1	-174.6	Yao *et al.*, 2010

苯甲酰基脲类化合物作为昆虫中最主要的几丁质合成抑制剂,在害虫防治中具有重要意义。先后开发了 Du-19111 和除虫脲,后者还实现了商品化。这类化合物可使昆虫的表皮几丁质沉积受抑,合成过程受阻,虽具体机制不是很明确,但已证实对几丁质合成酶没有直接的抑制活性(李秀峰等, 2001)。

3　展望

未来昆虫几丁质合成及其调控的发展方向将主要集中在以下 3 个方面。

3.1　几丁质合成的调控 microRNA

microRNA (miRNA) 是生物体内长度约为 21~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA,通过与靶 mRNA 互补配对而在转录水平上对基因的表达进行负调控,导致 mRNA 的翻译抑制或降解。它们是动物很多生理过程中重要的调控因子(Bartel, 2009),因此推测它们也参与昆虫几丁质合成过程。陈洁等通过细胞水平实验验证,筛选出调控褐飞虱几丁质合成通路基因的 5 个 miRNA(未发表),正在研究其功能。

3.2　作为 RNAi 的靶标基因

基于 RNAi 的转基因植物可用于控制害虫的为害。在玉米中表达 *V-ATPase* 基因的 dsRNA,可显著减轻玉米根莹叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 的为害(Baum *et al.*, 2007)。这说明昆虫基因的 dsRNA 将来会与 *Bt* 基因一样在害虫控制中发挥重要作用(Gordon and Waterhouse, 2007)。虽然昆虫海藻糖酶基因、几丁质合成酶基因和蜕皮激素受体基因被 RNAi 后,均能导致害虫死亡,并影响到表皮和中肠的几丁质含量(表 1),但是考虑到特异性和安全性,几丁质合成酶基因和蜕皮激素受体基因是否可作为 RNAi 的候选靶标基因,还需要进一步在转基因植物中对其控害效果和安全

性等进行评价。

3.3 新的几丁质合成抑制剂

尽管昆虫几丁质合成抑制剂是一类安全性好的新一代杀虫剂，但是商品化的产品太少。近年来，随着几丁质代谢相关酶（几丁质酶和几丁质合成酶等）的结构被解析（Liu *et al.*，2011），基于结构的新先导化合物筛选将受到越来越多的重视。通过计算机辅助设计和模拟预测，可指导新的几丁质合成抑制剂的设计和发现，大大加快研发效率。

参考文献（References）

Andersen SO，Hojrup P，Roepstorff P，1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，25：153—176.

Arakane Y，Zhu YC，Kramer KJ，Charles A，Michael R，2004. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle，*Tribolium castaneum*，and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，34：291—304.

Arakane Y，Muthukrishnan S，Kramer KJ，Specht CA，TomoyasuY，Lorenzen MD，Kanost M，Beeman RW，2005. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.*，14：453—463.

Bartel DP，2009. MicroRNAs：Target recognition and regulatory functions. *Cell*，136：215—233.

Baum JA，Bogaert T，Clinton W，Heck G. R，Feldmann P，Ilagan O，Johnson S，Plaetinck G，Munyikwa T，Pleau M，Vaughn T，Roberts J，2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotech.*，25：1322—1326.

Candy DJ，Kilby BA，1962. Studies on chitin synthesis in the desert locust. *J. Exp. Biol.*，39：129—140.

Chen J，Tang B，Chen HX，Yao Q，Huang XF，Chen J，Zhang DW，Zhang WQ，2010. Differential functions of the soluble and membrane-bound trehalase genes of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* for chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE*，5(4)：e10133.

Chen XF，Yang X，Kumar NS，Tang B，Sun XJ，Qiu XM，Hu J，Zhang WQ，2007. The class A chitin synthase gene in *Spodoptera exigua*：Molecular cloning and expressional patterns. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，37：409—417.

Chen XF，Tian HG，Zou LZ，Tang B，Hu J，Zhang WQ，2008. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bull. Entomol. Res.*，98：613—619.

Gagou ME，Kapsetaki M，Turberg A，Kafetzopoulos D，2002. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila metamorphosis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，32：141—146.

Gordon KHJ，Waterhouse PM，2007. RNAi for insect-proof plants. *Nat. Biotech.*，25：1231—1232.

Hogenkamp DG，Arakane Y，Zimoch L，Merzendorfer H，Kramer KJ，Beeman RW，Kanost MR，Specht CA，Muthukrishnan S，2005. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*，characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，35：529—540.

Ibrahim GH，Smartt CT，Kiley LM，Christensen BM，2000. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，30：1213—1222.

Kato N，Dasgupta R，Smartt CT，Christensen BM，2002. Glucosamine：fructose-6-phosphate amidotransferase：gene characterization，chitin biosynthesis and peritrophic formation in *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*，11：207—216.

Kato N，Mueller CR，Wessely V，Lan Q，Christensen BM，2005a. Mosquito Glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase：cDNA，gene structure and enzyme kinetics. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，35：637—646.

Kato N，Mueller CR，Wessely V，Lan Q，Christensen BM，2005b. *Aedes aegypti* phosphohexomutases and uridine diphosphate-hexose pyrophosphorylases：comparison of primary sequences，substrate specificities and temporal transcription. *Insect Mol. Biol.*，14：615—624.

Kramer KJ，Hopkins TL，Schaefer J，1995. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，25：1067—1080.

Kumar NS，Tang B，Chen XF，Tian HG，Zhang WQ，2008. Molecular cloning，expression and comparative analysis of chitin synthase gene B in *Spodoptera exigua*. *Comp. Biochem. Physiol.*，*Part B*，149：447—453.

李秀峰，庄佩君，唐振华，2001. 昆虫几丁质合成抑制剂及其作用机理. 世界农药，23(1)：21—23.

Liu T，Zhang HT，Liu FY，Wu QY，Xu Shen X，Yang Q，2011. Structural determinants of an insect β-N-acetyl-D-hexosaminidase specialized as a chitinolytic enzyme. *J. Biol. Chem.*，in press.

Merzendorfer H, Zimoch L, 2005. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.*, 206: 4393—4412.

Mitsumasu K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2005. Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect Mol. Biol.*, 14: 501—508.

Takiguchi M, Niimi T, Su ZH, Yaginuma T, 1992. Trehalase from male accessory gland of an insect, *Tenebrio molitor*, cDNA sequencing and developmental profile of the gene expression. *Biochem. J.*, 288: 19—22.

Tang B, Chen XF, Liu Y, Tian HG, Liu J, Hu J, Xu WH, Zhang WQ, 2008. Characterization of a membrane-bound trehalase of *Spodoptera exigua* and its expression patterns. *BMC Mol. Biol.*, 9:51.

Tellam R, Vuocolo T, Johnson SE, Jarmey J, Pearson RD, 2000. Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6025—6043.

Tian HG, Peng H, Yao Q, Chen HX, Xie Q, Tang B, Zhang WQ, 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS ONE*, 4(7):e6225.

Yao Q, Zhang DW, Tang B, Chen J, Chen J, Lu L, Zhang WQ, 2010. Identification of 20-hydroxyecdysone late-response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PLoS ONE*, 5(11): e14058.

Zhu YC, Specht CA, Dittmer NT, Muthukrishnan S, Kanost MR, Kramer KJ, 2002. Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 1497—1506.