

- 73 刘洪. 湖北植保, 2004 (3): 7.
- 74 王艾青, 肖荷生, 彭成员, 易泽喜. 白蚁防治, 2005, (4): 4.
- 75 黄求应, 薛东, 丁思悦, 欧秋玲, 雷朝亮. 昆虫知识, 2006, 40 (2): 200~203.
- 76 林章. 林业科技通讯, 1995, (7): 28~29.
- 77 申玉梅. 城市害虫防治, 2006, (1): 31~33.
- 78 童新旺. 湖南白蚁研究与防治. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004. 344~346.
- 79 陈红梅. 华东昆虫学报, 1999 8(1): 107~109.
- 80 梁修山, 徐光余, 张业芳. 林业科技通讯, 2001, (3): 14~16.
- 81 张英俊. 西北大学学报, 1983, (4): 48~55.
- 82 李栋. 营养与健康, 2002, (2): 15.
- 83 薛德钧. 中草药, 2004 35(4): 386~387.
- 84 段金殿, 黄兴哲, 王静蓉, 周荣汉, 张培毅. 中药材, 1999, 22 (10): 489~491.
- 85 张贞华, 董兆良. 科技通报, 1991, 7(6): 340~342.
- 86 张培毅. 世界林业研究, 1999, 12(3): 24~28.
- 87 谢保国, 谢华鸣, 谢鸣荣. 白蚁防治, 2005, (3): 45~46.
- 88 张培毅. 中药材, 1999 22(9): 437~438.
- 89 王秀丽, 薛德钧. 山东中医药大学学报, 2004, 28(6): 459~460.
- 90 彭红, 薛德钧, 邓永蓉, 吴德龙. 江西中医学院学报, 2003, 15(2): 45.
- 91 薛德钧, 李云秋, 徐彭, 朱家谷. 江西中医学院学报, 2003, 15(1): 43~44.
- 92 汪桐, 潘群皖, 刘潮. 皖南医学院学报, 1994, 13(2): 95~97.
- 93 张贞华. 杭州大学学报, 1987, 14(1): 80~90.
- 94 段金殿, 黄文哲, 杨东, 周荣汉, 张培毅. 动物药研究, 1999, 22(9): 437~438.
- 95 段金殿, 黄兴哲, 周荣汉, 张培毅, 谢保国. 中药材, 1999, 22(11): 554~556.
- 96 薛德钧, 周慧, 张敏, 谢康, 张勇. 中药材, 2005, 28(10): 873~875.
- 97 薛德钧, 李云秋. 中国现代应用药学, 2002 19(6): 472~473.
- 98 张贞华, 董兆良. 科技通报, 1993, 9(1): 41~43.
- 99 王秀丽, 王焕秀, 徐彭, 薛德钧. 中草药, 2005, 36(2): 247~248.
- 100 王焕秀, 王秀丽, 朱家谷, 薛德钧. 江西中医学院学报, 2003, 15(3): 45.

昆虫几丁质合成酶及其抑制剂

杨化恩¹ 刘守柱² 李友忠¹ 杜翠敏³

(1 山东省临沂市河东区农业局 临沂 276034; 2 山东农业大学植物保护学院 泰安 271018;

3 山东省临沂市兰山区植物保护工作站 临沂 276003)

Chitin synthase from insects and its inhibitors. YANG Hua-En¹, LIU Shou-Zhu², LI You-Zhong¹, DU Cui-Min³
(1. *Hedong Agriculture Bureau of Linyi, Shangdong Province*, Linyi 276034, China; 2. *Plant Protection College, Shandong Agricultural University*, Tai'an 271018, China; 3. *Lanshan Plant Protection Station of Linyi*, Linyi 276003, China)

Abstract Chitin synthase is the key enzyme in the synthesis of chitin, which has three domains: domain A, domain B and domain C; domain B is the catalytic center. Based on relative sequence differences, chitin synthases have been grouped into two classes: class CS-A and class CS-B enzymes, which catalyze the formation of chitin in epidermis and peritrophic matrix respectively. Two model of catalyze mechanism was suggested. There are many chemicals that can inhibit the synthesis of chitin, of which nucleoside peptidyl antibiotics and nucleoside phosphates are acting on the catalytic site of CS as competitive inhibitors; however, other chemicals' inhibition mode is still unknown.

Key words insect, chitin synthase, chitin synthesis, inhibitor

摘 要 几丁质合成酶(CS)是几丁质合成的关键酶,它具有3个结构域:结构域A、结构域B和结构域C,其中结构域B是催化域。根据氨基酸序列的差异,几丁质合成酶分为两类:CS-A及CS-B,分别在表皮及围食膜基质中催化合成几丁质。关于几丁质合成有2种假想模型。有多种抑制剂可以抑制几丁质的

* E-mail: yanghuaen@163.com

重登收稿日期: 2007-03-27, 接受日期: 2007-05-27

合成, 其中核苷肽抗生素类及核苷磷酸类作用于 CS 的催化部位, 是竞争性抑制剂, 其它抑制剂的作用机理仍不明确。

关键词 昆虫, 几丁质合成酶, 几丁质合成, 抑制剂

几丁质是自然界中含量仅次于纤维素的生物合成物质^[1], 它存在于节肢动物的外骨骼、真菌的细胞壁及线虫的卵壳中, 是由 N-乙酰- β -D-葡萄糖胺经多聚化作用而形成的一种多聚物。在昆虫中, 它主要存在于表皮层中的上表皮以及消化道的围食膜基质中。上表皮中的几丁质作为外骨骼的支架材料, 与硬化蛋白一起构成外骨骼, 使外骨骼成为一种刚性结构, 从而使昆虫能维持特定的形态, 并防止外来物的侵染或物理损伤, 是内部器官与外界环境之间的保护性屏障。此外, 外骨骼及内陷形成的内骨可供肌肉着生, 以组成虫体的运动机构。围食膜基质(peritrophic matrix)中的几丁质则在食物颗粒与肠道细胞之间构成一道保护屏障, 避免细胞受到较硬的食物颗粒的损伤。

虽然几丁质对昆虫有重要的保护作用, 但与此同时, 它也给昆虫的生长发育带来了不利的影响。昆虫的体壁由于非常坚硬, 刚性很强, 因而不能随昆虫的生长而生长。当昆虫长到一定大小时, 其表皮层就限制它进一步生长, 这就是昆虫蜕皮的原因。只有把旧的表皮脱去, 然后再合成一个更大的表皮, 昆虫才能继续生长。在蜕皮过程中, 旧表皮中的几丁质被几丁质酶(chitinase)分解, 同时, 几丁质合成酶(chitin synthase)合成新的几丁质并分泌到新表皮中。正是由于几丁质在昆虫的生长发育过程中有重要作用, 因而可以被用作靶标, 来研究开发新型的杀虫剂、杀菌剂。由于几丁质不存在于脊椎动物中, 因而该类药剂对人畜较为安全, 是环境友好农药。

1 几丁质合成酶

几丁质的生物合成主要是由几丁质合成酶(chitin synthase, CS)来催化的, 是一个极其复杂的过程。几丁质合成酶(UDP-N-乙酰-D-葡萄糖胺: 几丁质 4- β -N-乙酰葡萄糖胺转移酶;

EC 2.4.1.16)存在于所有能合成几丁质的生物体中。由于几丁质合成酶是一种跨膜蛋白, 其纯化分离较困难。真菌中的 CS 目前研究最为清楚, 其分离纯化研究较多^[2,3], 并纯化得到了单一酶^[4]。近来, 真菌的 CS 研究有了大的突破, 原先被认为在几丁质合成中起主要作用的几丁质合成酶(CS1)被发现对几丁质的生物合成不是必需的^[5]。几丁质的生物合成牵涉多种 CS 的综合作用, 存在精细的时间、空间、质和量的调节。在啤酒酵母中已检测出 3 种 CS, 其中 CS3 合成细胞中 90% 以上的几丁质, 是最主要的几丁质合成酶, 而 CS1 和 CS2 只合成细胞中 10% 的几丁质。CS1 只是作为一种修复酶, 在胞质分裂的过程中起补充几丁质作用^[8]。

1.1 昆虫中的几丁质合成酶(CS)结构

昆虫的几丁质合成酶是一些较大的跨膜蛋白^[6,7], 其理论分子量约为 160 ~ 180 kDa, 等电点为 6.1 ~ 6.7, 其活性需要 2 价阳离子的存在, 并且在经过温和的蛋白质水解后, 活性可以提高, 表明 CS 可能以酶原的形式存在。它含有 3 个结构域: 结构域 A、结构域 B 和结构域 C。

结构域 A 在几丁质合成酶的 N 端区, 主要由跨膜螺旋组成。不同昆虫的 CS 含有不同数量的跨膜螺旋, 表现出最低的序列相似性。这种跨膜螺旋的数目决定了 N 端在膜上的位置, 或者是面向细胞质, 或者是面向细胞外环境。

结构域 B 在几丁质合成酶的中心区, 由大约 400 个氨基酸组成, 包含蛋白质的催化中心。B 域高度保守, 含有 2 个独一无二的基本序列, EDR 和 QRRRW, 这 2 个序列存在于各种 CS 中, 可以被看作是识别序列(signature sequences), 其中的一些保守氨基酸是酶的催化机制所必需的, 它们可能与底物的质子注入有关, 如果被其它氨基酸取代就可能会造成酶活力的急剧下降。酵母几丁质合成酶(CS2)441 位的天门冬氨酸残基也被认为是存在于所有 CS 中的保

守残基, 当它被谷胺酸取代后可引起 CS 活性的严重丧失^[19]。昆虫 CS 相应位置的天门冬氨酸也不能被谷氨酸取代, 表明在这个位置至少需要一个天门冬氨酸。此外, 还有学者指出在昆虫 CS 中还有 3 个高度保守区, CATMWHXT, QXFEEY 和 WGTRE (分别位于果蝇 CS1 上的 583 ~ 590, 794 ~ 798 和 1 076 ~ 1 080 处), 它们中的大多数氨基酸在真菌和线虫中也是保守的^[20]。

结构域 C 由 C 端部分组成, 包含 2 个可能与酶的催化有关的氨基酸, W803 和 T805。定向诱导突变表明, 酵母 CS2 中的这 2 个氨基酸被丙氨酸取代后, 酶的活性即消失。在昆虫中这 2 个残基的位置类似于中酵母中位置, 也是高度保守, 并紧接在 C 域的 5 个跨膜螺旋之后。C 域不像催化域那样保守, 它以含有 7 个跨膜螺旋做为共同特征^[21]。

1.2 昆虫几丁质合成酶分类

真菌几丁质合成酶具有多个结构基因^[9], 但昆虫中只发现有 2 个结构基因, 相应的几丁质合成酶也有 2 种, 分别为 CS1 及 CS2。

根据氨基酸序列的相对差异, 几丁质合成酶被分为两类: CSA 及 CSB。大多数昆虫都各含有 1 个基因拷贝, 这 2 个基因位于同 1 条染色体上, 可能是由同一祖先进化而来。A 类几丁质合成酶多在表皮层细胞及气管细胞中表达, 而 B 类几丁质合成酶被限制在中肠的表皮细胞中表达。A 类几丁质合成酶的共同特征是在 C 域的 5 个跨膜螺旋之后有 1 个卷曲螺旋区 (Coiled-coils), 它面向细胞外空间, 可能与蛋白质之间的相互作用、囊泡的融合作用及几丁质的低聚作用有关^[21]。

虽然对 CS 的研究有了很大进展, 但无论是对 CS 还是对其同源蛋白的了解都未曾超出过最基本的水平^[8]。因而, 确定最有可能代表有催化活性的蛋白质区域的研究就依赖预测分析。第 1 步是对所有已知的 CS 序列进行多重比较, 去除掉大约有 450 个氨基酸残基的一段共有序列。接下来, 对 CS 各相关序列的预测研究应用了疏水性簇分析和同源模拟 (homology

modeling)。研究显示其 3 级结构是一种交替的 $\alpha\beta$ 折叠。CS 活性结构域或者是一种 8 链的 α/β 折叠, 或者是类似罗斯曼折叠。应用 QSLAVE 技术, 即一种蛋白质结构预测的专家系统, 可发现 CS 活性结构域的 3 级结构类似于罗斯曼折叠, 中央有 1 条深的催化沟, 构成与底物 UDP-一糖的结合结构域。

1.3 几丁质合成酶活性测定

早期几丁质合成酶测活方法为体外组织培养法^[9], 利用昆虫器官芽的离体培养来检测新合成的几丁质。在分离提取几丁质合成酶以后 (粗提物), 可以利用同位素法进行活性测定, 这种方法被大量采用, 至今仍是主要的活性测定方法^[10]。由于同位素试剂较为昂贵, 并且对人体不安全, Lucero 等人又提出了一种非放射性测活方法^[11], 使得测定结果更为准确灵敏, 并且可以进行高通量筛选几丁质合成酶的抑制剂。

2 几丁质合成过程

几丁质合成酶以 UDP-N-乙酰葡萄糖胺 (UDP-GlcNAc) 为底物, 通过转移作用, 脱去 UDP, 合成几丁质链。其催化反应可以表示如下: $2n\text{UDP-GlcNAc} \rightarrow [\text{GlcNAc-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc}]_n + 2n\text{UDP}$ 。

UDP-GlcNAc 是几丁质的直接前体, 它是由海藻糖和葡萄糖经过一系列的酶促反应过程所合成的^[9], 大量存在于细胞质中。CS 主要以簇的形式存在于细胞内的高尔基体膜、囊泡膜及质膜上, 它是一类大分子跨膜蛋白, 其催化域面向细胞质。

几丁质合成的详细机制现在依然不清楚, 但有证据表明几丁质的合成是一种不对称机制: 从细胞质中的 UDP-GlcNAc 池中获得 GlcNAc, 而把新生的几丁质释放到细胞外环境中。上述分析表明 CS 结合 UDP-GlcNAc 的催化位点应当是面向原质质的。

基于现有的数据, 人们提出了 2 种几丁质合成模型。在模型 I 中, 细胞内的囊泡仅仅是作为一种面向细胞外的运输工具, 它的主要作用就是把 CS 转运到原生质膜上。当携带有 CS

的囊泡到达原生质膜后,就与质膜融合,CS 结合到质膜上,活化后向细胞外分泌几丁质。这种模型需要一些调控步骤来控制酶的活性。在囊泡与质膜融合之前,酶的活性处于关闭状态,融合后经中肠或体壁蜕皮液中的蛋白酶部分水解作用而激活。在模型 II 中,几丁质被分泌到囊泡内腔中,这些囊泡位于细胞端部质膜的下方,当需要几丁质的时候,囊泡与质膜融合并把几丁质释放到细胞外。这种模型的优点是可以贮藏几丁质,并能快速释放。根据对吸血蚊虫的研究,这一点对围食膜基质的分泌非常重要。它的缺点是合成的几丁质链的长度受到囊泡内腔大小的限制。在这 2 种模型中,新生的几丁质都需要一个跨膜运输的过程。

除了 CS 外,几丁质的合成还受其它效应物的影响。有报道称,GlcNAc 可以刺激真菌及某些昆虫体内的几丁质合成,与此相反,也有报道 1 mmol/L 的 GlcNAc 几乎可以完全抑制几丁质的合成。在更深的层次上,几丁质合成受许多激素如蜕皮激素的调控,其机制亦不是很清楚。

昆虫几丁质的合成受一系列具有时间限制效应的内分泌调控所支配^[12]。一些关键激素,如促前胸腺激素(PTTH)、蜕皮激素—20 羟基蜕皮酮(20E)和保幼激素(JH)在调节过程中起主导作用。当幼虫达到临界体重时,本体感受器向脑神经分泌细胞传递信号,后者分泌 PTTH。PTTH 转而激活前胸腺,向血淋巴中分泌蜕皮酮。蜕皮酮能够降低蜕皮间期几丁质的合成作用,从而初始化蜕皮过程。

3 几丁质合成酶抑制剂

如上所述,几丁质的代谢在昆虫的生长发育过程中是至关重要的,若不能正常合成几丁质,则使昆虫发育畸形,对外界环境适应力降低,甚至失去行动能力而死亡,干扰几丁质生物合成的物质可以抑制真菌细胞的生长,有成为抗真菌药的可能^[13, 14],在医学领域,来源于微生物的抑制几丁质合成的抗真菌药物已经出现^[15, 16]。因此,几丁质合成酶可以作为害虫控制的靶标,许多学者也都在这一领域进行研究,

以期开发出作用新颖、对环境友好、对非靶标生物安全的新型杀虫剂、杀菌剂。经过大量研究,作用于几丁质合成酶(CS)的抑制剂主要是以下二类^[1],均作用于催化部位。

3.1 核苷肽抗生素类

此类化合物是从放线菌中提取的一些大分子的嘧啶核苷肽,结构类似于 CS 的底物 UDP-GlcNAc,是一类强力的竞争性抑制剂,主要是多氧霉素(polyoxins)系列和尼克霉素(nikkomycins)系列。

多氧霉素(A-M)是由日本的科学家在几十年前从链霉菌的培养产物中提取的,由 1 个腺苷核糖连在 1 个二肽上组成。多氧霉素的动力学研究表明,其核苷部分作为结合位点,与几丁质合成酶的特定部位结合,对发挥酶的活性至关重要;肽部分则与酶的催化部位结合,抑制酶的活性。尼克霉素结构类似于多氧霉素,区别是在最后一个氨基酸上加了 1 个嘧啶环。

这些抗生素是有效的杀菌剂,但作为昆虫控制剂却很差,其中一个很重要的原因是它们都是极性分子,很难穿透昆虫的疏水表皮进入昆虫体内。当它们被昆虫取食后,会被消化道降解或者由于其相对较大的分子量而不能吸收至细胞内,因而其触杀及胃毒作用都较小。尽管这些核苷肽抗生素对昆虫的毒力较小,但多氧霉素 D 对 *Lucilia cuprina* 及尼克霉素对 *Epilachna varivestis* 均表现出了较好的效果。当白粉蝶的幼虫被注射多氧霉素 D 后,其外表皮发育畸形。利用同位素标记技术标记葡萄糖、葡萄糖胺、N-乙酰葡萄糖胺,在多种昆虫的体壁培养物中,测得多氧霉素 D 是一种强力的抑制剂,其 I_{50} 值在 $1.9 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-7}$ mol/L 之间。尼克霉素(X 及 Z 混合物)是最有效的 CS 抑制剂,它对 *T. castaneum* 和 *Trichophysia ni* 几丁质合成酶的 I_{50} 分别是 0.02 和 0.06 μ mol/L。

3.2 核苷磷酸类

在几丁质合成过程中释放的腺苷二磷酸(UDP)是一种有效的 CS 抑制剂,当它在昆虫体内积累的浓度达到一定水平后就会极大的降低几丁质的合成速度。多氧霉素 D 与 UDP 的抑

制曲线非常相似,表明它们作用于酶的同一个部位。

3.3 其它类

除了上述 2 类化合物外,尚有多种物质可以抑制几丁质的生物合成,但其作用机理并不明确,可能并不直接作用于几丁质合成酶,而是作用于调节因子或几丁质链的转运、聚合过程^[5]。该类化合物主要有以下几种:

(1) 苯甲酰基脲类(BPUs): 该类化合物是昆虫中最主要的几丁质合成抑制剂,已实现了商品化。如除虫脲^[17],可引起昆虫中毒后表皮畸形,但在几丁质合成酶的体外合成中,并不抑制几丁质的合成,表明它可能不是作用于几丁质合成酶。苯甲酰基脲类的作用机理有多种假说,有可能通过影响内源激素来调节几丁质合成,或者作用于 DNA 的合成。

(2) 硫醇类阻断剂: 克菌丹为硫醇类阻断剂,是一种广谱、高效的杀菌剂,它可与真菌中的硫醇基团反应,对真菌中的 CS1 不敏感而对昆虫中的 CS1 敏感。对克菌丹及其相关化合物的研究推测昆虫 CS1 包含敏感的硫醇基团,可与硫醇类阻断剂作用,从而导致对几丁质聚合的强烈抑制。

(3) 苯并咪唑类: 该类化合物中的某些种类对家蝇的毒性相当强,但其作用机理目前尚不清楚,其抑制曲线的斜率要比多氧霉素小的多,显示出这是 2 种不同的作用机制。

4 结论

几丁质在真菌和无脊椎动物的生命活动中担负着重要功能,其复杂的合成途径为防治害虫和有害真菌提供了契机。经过大量研究,目前已经明确:真菌中含有 3 种 CS,起主要作用的是 CS3;昆虫中已经发现了 2 种 CS,根据结构基因的不同分为 CS1 及 CS2,根据相对的序列差异分为 CSA 及 CSB,分别在不同的器官中合成几丁质;CS 在细胞中定位在各种膜上;CS 具有 3 个结构域。虽然昆虫 CS 的研究取得了一定的进展,但是它的详细催化机制仍不清楚;CS 也未纯化得到单一酶;某些几丁质合成抑制

剂的抑制机理还不清楚。

可以认为,几丁质合成抑制剂是一类与环境高度相容的杀虫剂,对天敌和其他非靶标生物影响小,抗性增长缓慢,混用可增效,选择毒性和残留毒性均极小的高效化学农药,这就为几丁质合成抑制剂在田间的大规模运用奠定了基础。可以预期,随着研究的进一步深入,几丁质合成抑制剂类农药将在有害生物的化学防治中发挥越来越大的作用。

参 考 文 献

- 1 Cohen E. *Ann. Rev. Entomol.*, 1987, **32**: 71~93.
- 2 Keller F. A., Ealib E. *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**(1): 160~166.
- 3 Kang M. S., Elango N., Mattia E., Aceu-Young J., Robbins P. W., Cabib. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**: 14 966~14 972.
- 4 Machida S., Saito M. *J. Biol. Chem.*, 1992, **268** (3): 1 702~1 707.
- 5 李秀锋, 庄佩君, 唐振华. 世界农药(原农药译丛), 2000, **22**(5): 33~38.
- 6 Merzendorfer H., Zimoch L. *J. Exper. Biol.*, 2003, **206**: 4 393~4 412.
- 7 Tellam R. L., Vuocolo T., Johnson S. E., Jamey J., Pearson R. D. *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**: 6 025~6 042.
- 8 唐振华, 毕强. 杀虫剂作用的分子行为. 上海: 上海远东出版社, 2003. 504~523.
- 9 Glaser L., Brown D. H. *Synthesis Chitin*, 1957, **228**(2): 729~742.
- 10 Zimoch L., Hogenkamp D. G., Kramer K. J., Muthukrishnan S., Merzendorfer H. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2005, **35**: 515~527.
- 11 Lucero H. A., Kuranda M. J., Bulik D. A. *Anal. Biochem.*, 2002, **305**: 97~104.
- 12 Banerjee S., Madgum S., Kalena G. P., Banerjia. *J. Appl. Entomol.*, 2001, **125**: 25~30.
- 13 虞瑞尧. 国外医学皮肤性病学分册, 1996, **22** (6): 362.
- 14 Wills E. A. *Emerging Therapeutic Targets*, 2000, **4** (3): 1~32.
- 15 叶丽娟, 朱辉, 田敏. 国外医药抗生素分册, 2005, **26** (1): 34~34.
- 16 方建茹, 谢小梅, 章洪华. 现代诊断与治疗, 2004, **15** (6): 364.
- 17 Beeman R. W. *Ann. Rev. Entomol.*, 1982, **27**: 253~281.
- 18 Cabib E., Sburdati A., Bowers B., Silverman S. J. *J. Cell Biol.*, 1989, **108**: 1 665~1 672.
- 19 Nagahashi S., Sudoh M., Ono N., Sawada R., Yamaguchi E., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**: 13 961~13 967.
- 20 Zhu Y. C., Specht C. A., Dittmer N. T., Muthukrishnan S., Kanost M. R., *et al.* *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **32**: 1 497~1 506.
- 21 Tellam R. L., Vuocolo T., Johnson S. E., Jamey J., Pearson R. D. *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**(19): 6 025~6 043.