

昆虫中肠 Bt 晶体蛋白受体的研究进展

农 广 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 杀虫作用的主要成份是胞内产生的伴孢晶体, 晶体蛋白经昆虫吞食, 在肠道降解为激活的毒性肽。普遍认为毒性肽的作用机制主要有两个步骤: 1) 与中肠表面的受体专一结合; 2) 在细胞膜上形成跨膜通道。杀虫晶体蛋白的专一性与中肠细胞膜表面的受体蛋白紧密相连, 晶体蛋白的杀虫作用是通过昆虫中肠细胞的专一性受体而起作用。本文通过说明受体蛋白的生物学特性、分子本质及与昆虫抗性的关系, 概述了近年来中肠受体蛋白的研究进展。

1 昆虫中肠受体蛋白的生物学特性

1.1 受体蛋白的分离鉴定

最早从昆虫的 CF1 细胞系中鉴定出一种约 146 kD 结合毒蛋白的膜表面糖蛋白^[1], 跟着发现晶体蛋白的专一性是由于中肠的刷状缘膜小泡 (brush border membrane vesicles, BBMV) 存在有高度亲和结合位点^[2,3], 用¹²⁵I 标记 Bt 毒蛋白的结合试验表明, 从烟草从蛾 *Manduca sexta* 中肠上皮细胞的 BBMV 中鉴定到结合毒蛋白的受体蛋白^[4], 并进一步发现, 晶体蛋白的毒性与受体蛋白和晶体蛋白结合的能力呈正相关^[5], 膜受体蛋白是毒蛋白专一性的决定因子。

上述之外, 已有多种幼虫的中肠受体蛋白被鉴定。通过亲和柱层析, 分离和鉴定到 Cry1Aa (原为 CryIA (a)) 结合斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的受体蛋白为 160 kD, 家蚕 *Bombyx mori* 受体蛋白为 220 kD 和 150 kD^[6]。在海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的 BBMV 中, Cry1Ca (原为 CryIC) 与 40 kD 和 65 kD 的蛋白结合^[7]。在柞蚕卷蛾 *Choristoneura fumiferana* 的 BBMV 中, 鉴定到 Cry1Aa、Cry1Ab (原为 CryIA (b)) 和 Cry1Ac (原为 CryIA (c)) 的结合蛋白, 并且每种毒素的结合蛋白都至少有两个^[8]。Cry1A (原为 CryIVD) 毒蛋白在疟蚊 *Anopheles stephensi* 的受体蛋白为 148 kD, 沼泽大蚊 *Tipula olerace* 的受体蛋白为 78 kD^[9]。在舞毒蛾 *Lymantria dispar* 的 BBMV 中, 结合 Cry1Ac 的蛋白与氨肽酶表现抗原一致性^[10]。经 6 种毒蛋白的结合试验显示, Cry1Ac 能与氨肽酶强烈结合, 而 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ca、Cry2Aa (原为 CryIIA) 和 Cry3Aa (原为 CryIII A) 只有弱的结合作用, 说明氨肽酶是 Cry1Ac 的主要受体^[11]。

* 国家自然科学基金 (39680029) 和广东省科学基金 (950039 和 963056) 资助项目
1997-01-10 收稿, 1998-04-16 收修改稿

1.2 受体蛋白的结合动力学

选用对 Cry1Ac 具有不同敏感性的烟草天蛾、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 和抗 Cry1Ac 的草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的幼虫, 体外受体结合试验显示, 它们的 BBMV 存在有与 Cry1Ac 发生饱和结合的结合位点, 并具有高度亲和性, ^{125}I 标记的 Cry1Ac 与 BBMV 杂交结合表明, 不同种的幼虫 BBMV 中, 存在有一或多个结合蛋白, 大小从 63 kD 到 155 kD 不等, 其中烟草天蛾为 128 kD, 烟芽夜蛾有 6 条, 分别为 155 kD、120 kD、103 kD、90 kD、81 kD 和 63 kD, 而美洲棉铃虫只比烟芽夜蛾少了 81 kD 的那一条, 抗 Cry1Ac 的草地夜蛾也有一条 148 kD 的结合蛋白^[12]。配体结合试验发现, 在从烟芽夜蛾中肠制备的膜蛋白中, Cry1Aa 和 Cry1Ab 结合到 170 kD 的同一蛋白, 而 Cry1Ac 结合到 140 kD 和 120 kD 蛋白上^[3], 再选用三个属的五个种幼虫, 进一步研究显示, 在每个种的 BBMV 中, Cry1Aa 和 Cry1Ab 总是结合到同一个受体蛋白, 而 Cry1Ac 和 Cry1Ca 则结合到与 Cry1Aa 和 Cry1Ab 不同的受体蛋白^[14], 抗体结合试验表明, 来自烟芽夜蛾和 *H. zea* 的 170 kD 蛋白有免疫相关, Oddou 等认为 Cry1Ab 毒蛋白分子上具有不同的结合决定子, 并与受体蛋白的专一性结合位点发生作用。

Martinez-Ramirez 等研究发现, 不同的毒蛋白 Cry1Aa, Cry1Ab 和 Cry1Ac 都可识别烟草天蛾的 210 kD 的 BBMV 蛋白, 与 Oddou 的研究结果相似, 并且发现 Cry1Aa 和 Cry1Ac 会与 Cry1Ab 竞争性结合 210 kD 蛋白^[15]。Masson 等将烟草天蛾的 120 kD 的 BBMV 蛋白, 用磷脂酶 C (Phospholipase C) 切除其糖基化磷脂酰肌醇锚着区部分 (glycosylphosphatidylinositol anchor), 成为 115 kD 的水溶性蛋白, 这个 115 kD 蛋白只能识别 Cry1Aa, Cry1Ab 和 Cry1Ac, 但不能识别 Cry1Ca (Cry1Ca 对幼虫表现毒性), 并且发现这水溶性蛋白上, 对 Cry1Aa 和 Cry1Ab 只有单一结合位点, 而对 Cry1Ac 则有两个结合位点^[16]。

以上研究结果表明, 同一毒蛋白对不同的昆虫, 会在受体及专一性上显示差异, 而同一昆虫对不同的毒蛋白, 也会表现出受体结合位点的差异, 并且一种毒蛋白可以存在多个 BBMV 结合蛋白, 这些结果表明, 毒蛋白-受体蛋白的结合并不是简单的一一识别关系, 还表现出多样性和复杂性。

2 受体蛋白的分子本质

目前, 从 cDNA 文库中已获得三个受体蛋白的编码基因克隆, 它们是烟草天蛾结合 Cry1Ac 的 120 kD 受体蛋白基因^[17], 烟芽夜蛾结合 Cry1Ac 的 120 kD 受体蛋白基因^[18], 以及烟草天蛾结合 Cry1Ab 的 210 kD 受体蛋白基因^[19]。烟草天蛾结合 Cry1Ab 的 210 kD 蛋白的等电点 pI 值约 5.5, 对蛋白酶表现敏感, 分子中富含酸性氨基酸^[20]。对于这些中肠受体蛋白的分子本质, 研究表明烟草天蛾和烟芽夜蛾结合 Cry1Ac 的 120 kD 蛋白都是氨肽酶 (Aminopeptidase N, APN)^[18,21], 而烟草天蛾与 Cry1Ab 结合的 210 kD 蛋白则属于 cadherin-like 蛋白^[19]。通过直接纯化氨肽酶, 结合试验显示, 氨肽酶就是舞毒蛾、小菜蛾 *plutella xylostella* 和粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 与 Cry1Ac 结合的受体^[10,11,22]。

Knight 等对编码基因的氨基酸序列分析发现^[17], 基因编码一个 999 个氨基酸残基的较大前体原蛋白 (prepro-protein), 编码蛋白的两个前体序列区 (pre-region 分别是 C-端的 GPI

信号序列 (glycosylphosphatidylinositol signal sequence, 968-980 氨基酸残基), 和 N-端的信号肽部分 (1-15 氨基酸残基), 在信号肽的蛋白酶切除位点至成熟蛋白的 N-端起始位点还存在一个原体序列区 (pro-region, 16~35 氨基酸残基)。蛋白酶将前体、原体序列切除后, 剩下 934 个氨基酸残基的蛋白序列, 这具催化功能的分子质量为 105 kD。紧邻着 GPI 信号序列的一个 33 个氨基酸残基序列 (935~967 氨基酸残基), 富含丝氨酸和苏氨酸, 是潜在的 O-糖基化位点, 这个序列区段形成一个 O-糖基化柄, 有利于将酶激活位点抬出细胞表面。成熟蛋白中还存在有四个保守的 N-糖基化位点, 至少其中的一个能与外源凝聚素 (Lectin) 结合, 这种糖基化作用正是 cDNA 克隆序列多肽链推导的分子质量 (105 kD) 与实际纯化得到的分子质量 (120 kD) 有差异的原因。

氨肽酶作为一个肽链端解酶, 本身并没有参与 130 kD 的 Cry1Ac 原毒素降解为 66 kD 激活毒蛋白的过程^[23], 也没有参与分子内环状结构的切割作用^[24], 氨肽酶作为受体也许只是因为在上皮细胞的端膜处存在丰富的数量, 而不是因为其蛋白酶功能, 但不排除毒蛋白与受体结合后, 跟着与和氨肽酶在功能上相联系的其它膜蛋白成分发生作用。对粉纹夜蛾的研究显示, 氨肽酶抑制剂的存在并不影响 Cry1Ac 造成膜通道、引起毒性, 也就是说, Cry1Ac 的毒性只需要氨肽酶的存在而不需要酶活性, 并且, 去除 GPI 信号序列也不影响氨肽酶作为受体的作用^[22]。

目前为止, 对受体蛋白的性质、种类还处在不断认识的过程, 受体蛋白在不同昆虫、对不同毒蛋白是否会表现出多样性? 受体蛋白在毒蛋白的作用过程中, 还担当些什么作用? 都有待进一步探讨。

3 中肠受体蛋白与抗性

对杀虫晶体蛋白的作用机制研究表明, 中肠受体蛋白的存在、数目和亲和性与杀虫作用的特异性、毒力和抗性呈相关关系。从印度谷螟 *Plodia interpunctella* 抗性系的中肠分离到的 BBMV 受体蛋白, 与 Cry1Ab 结合的亲和性比敏感系下降了 50 倍, 同时还发现, 这抗性系对 Cry1Ca 的亲和性却比敏感系提高了, 并证实原因是 Cry1Ca 的结合位点增加了^[25]。在小菜蛾大田抗性研究中也发现类似的结果, 对 Cry1Ab 有抗性的小菜蛾对 Cry1Ab 的敏感性比敏感系下降了 200 倍以上, 对这个敏感系的研究表明, 这是由于毒蛋白没能与受体结合, 其原因可能是由于受体的缺失或是亲和性极度下降; 同时, 抗性系对 Cry1Ba 和 Cry1Ca 敏感性没有变化, 这表明这三种毒蛋白各有自己的受体, Cry1Ab 的抗性变化, 并没有影响到别的受体发生变化^[26]。

在小菜蛾的一个敏感系和六个抗性系中, 用免疫组织化学法测定表明, 幼虫的刷状缘膜都能与 Cry1Aa、Cry1Ab 和 Cry1Ac 结合, 而其中一个抗性系以前研究表明, ¹²⁵I 标记的毒蛋白与受体结合能力极度下降, 虽然组织化学测定显示能发生结合, 生物测定中并没有能引起毒性, 表明低水平的结合虽可发生但没有毒力, 这提示着除了毒蛋白与受体结合因素之外, 可能还有其它因素参与了抗性作用机制^[27]。Masson 等通过表面胞质共振 (surface plasmon resonance) 发现小菜蛾抗性系和敏感系的受体结合动力学并无区别, 虽然发现抗性系中受体数目下降了约 3 倍, 但对于解释高度抗性的产生, 受体结合因素还不足够, 这与 Escriche 等研究是相一致的^[28]。Luke 用同样的方法研究也发现相似的结果, 敏感系或抗性系的小菜蛾

中肠刷状缘膜囊泡对 Cry1Ac 毒蛋白的结合并无明显差异。

对烟芽夜蛾的抗性系研究表明, 尽管抗性系比敏感系表现出高 20~70 倍的抗性, 然而 BBMV 对 Cry1Ab 和 Cry1Ac 的结合亲和性仅下降 2~4 倍, 而结合位点数目还上升 4~6 倍, 这表明造成 20~70 倍抗性的原因决不仅仅是受体蛋白^[29]。Lee 等利用烟芽夜蛾一个对 Cry1Ac 抗性比敏感系高 10 000 倍的抗性系和敏感系进行比较, 敏感系对不同毒蛋白的敏感性为 Cry1Ac>Cry1Ab>Cry1Aa, 并且结合到同一个受体蛋白的不同位点, 结果在抗性系中发现, Cry1Aa 完全不能与受体蛋白结合, 而 Cry1Ac 和 Cry1Ab 的结合亲和性顺序与原来相同, 结合位点浓度也没有多少改变, 唯一的区别就是丧失了 Cry1Aa 的结合能力, 这表明抗性系的受体蛋白发生了改变^[30]。

对昆虫抗性与中肠受体蛋白作用的研究说明, 昆虫的抗性与受体蛋白直接相关, 受体数目、结合位点和亲和性的改变, 与抗性形成有关, 但是研究亦发现, 结合位点数目和亲和性并不能完全解释所形成的抗性, 也许还存在其它的因子参与昆虫抗性作用。

参 考 文 献 (References)

- 1 Knowles B H, Ellar D J. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific delta-endotoxin. *J. Cell Sci.*, 1986, 83: 89~101
- 2 Hofmann C, Luthy P, Hutter R *et al.* Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.*, 1988, 173: 85~91
- 3 Hofmann C, Vanderbruggen H, Hofte H *et al.* Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85: 7 844~7 848
- 4 Van Rie J, Jansens S, Hofte H *et al.* Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 186: 239~247
- 5 Van Rie J, Jansens S, Hofte H *et al.* Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin. *Appl. Env. Microbiol.*, 1990, 56: 1 378~1 385
- 6 Indrasith L S, Hori H. Isolation and partial characterization of binding protein for immobilized delta-endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombyx mori*, and the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Comp. Biochem. physiol.*, 1992, 102 B: 605~610
- 7 Sanchis V, Ellar D J. Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. *FEBS. Lett.*, 1993, 316: 264~268
- 8 Pang A S. Detection of *Choristoneura fumiferana* brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by crossed affinity immuno-electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 199: 1 194~1 199
- 9 Feldmann F, Dullemans A, Waalwijk C. Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. *Appl. Env. Microbiol.*, 1995, 61: 2 601~2 605
- 10 Valaitis A P, Lee M K, Rajamohan F *et al.* Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIAC delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1995, 25: 1 143~1 151
- 11 Lee M K, You T H, Young B A *et al.* Aminopeptidase-N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin. *Appl. Env. Microbiol.*, 1996, 62: 2 845~2 849
- 12 Garczynski S F, Crim J W, Adang M J. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Env. Microbiol.*, 1991, 57: 2 816~2 820

- 13 Oddou P, Hartmann H, Geiser M. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Eur. J. Biochem., 1991, 202: 673~680
- 14 Oddou P, Hartmann H, Radecke F *et al.* Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* sp. midgut membrane proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin. Eur. J. Biochem., 1993, 212: 145~150
- 15 Martinez-Ramirez A C, Gonzalez-Nebauer S, Escriche B *et al.* Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 201: 782~787
- 16 Masson L, Lu Y J, Mazza A *et al.* The CryIAC receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. J. Biol. Chem., 1995, 270: 20 309~20 315
- 17 Knight P J K, Knowles B H, Ellar D J. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin. J. Biol. Chem., 1995, 270: 17 765~17 770
- 18 Gill S S, Cowles E A, Francis V. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem., 1995, 270: 27 277~27 282
- 19 Vadlamudi R K, Weber E, Ji I *et al.* Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem., 1995, 270: 5 490~5 494
- 20 Vadlamudi R K, Ji T H, Bulla L A Jr. A specific Binding Protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. J. Biol. Chem., 1993, 268: 12 334~12 340
- 21 Knight P J K, Crickmore N, Ellar D J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAC delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. Microbiol., 1994, 11: 429~436
- 22 Lorence A, Darszon A, Bravo A. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin on *Trichoplusia ni* membrane. FEBS Lett., 1997, 414: 303~307
- 23 Bietlot H P, Carey P R, Pozsgay M *et al.* Isolation of carboxyl-terminal peptides from proteins by diagonal electrophoresis: application to the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis*. Anal. Biochem., 1989, 181: 212~221
- 24 Angsuthanasombat C, Crickmore N, Ellar D J. Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB delta-endotoxin. FEMS. Microbiol. Lett., 1993, 111: 255~261
- 25 Van Rie J, McGaughey W H, Johnson D E *et al.* Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 1990, 247: 72~74
- 26 Ferre J, Real M D, Van Rie J *et al.* Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 5 119~5 123
- 27 Escriche B, Tabashnik B, Finson V *et al.* Immunohistochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella* from Hawaii. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, 212: 388~395
- 28 Masson L, Mazza A, Bronsseau R *et al.* Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. J. Biol. Chem., 1995, 270: 11 887~11 896
- 29 MacIntosh S C, Stone T B, Jokerst R S *et al.* Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 8 930~8 903
- 30 Lee M K, Rajamohan F, Gould F *et al.* Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. Appl. Env. Microbiol., 1995, 61: 3 836~3 842

**PROGRESS IN STUDIES ON INSECT MIDGUT MEMBRANE
RECEPTOR FOR *BACILLUS THURINGIENSIS*
 δ - ENDOTOXIN**

Nong Guang Pang Yi

(State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract Toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin is interrelated to larval midgut membrane receptor and its binding affinity and numbers. Binding to a specific receptor is an important determinant with respect to differences in insecticidal spectrum of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Membrane receptor has different binding sites which can interact specially with different binding determinants on the toxin molecules. Meanwhile, endotoxin might interact with more than one receptor in BBMV. The interaction of toxin and membrane receptor shows both the complexity and diversity, but not only recognizing one by one simply. Insect resistance to Bt is also related to the midgut membrane receptor in binding sites, affinity and numbers. It was shown that midgut membrane receptors are brush border membrane vesicles on the membrane of midgut epithelial cells, they belong to aminopeptidase family or cadherin family. Aminopeptidase acts as receptor just on its presence, but not its enzymatic activity.

Key words midgut receptor, *Bacillus thuringiensis*, aminopeptidase, cadherin