

EPSP 合酶的研究进展

徐杰 蒋世云 傅凤鸣 耿鹏飞 黄凯

(广西科技大学生物与化学工程学院, 柳州 545006)

摘要: 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSP 合酶)是莽草酸途径中的第六位酶,参与合成芳香族氨基酸以及部分次生代谢的产物,同时 EPSP 合酶不仅是除草剂草甘膦、抗菌素、抗寄生虫药物的作用靶酶,而且也是促进生物体内莽草酸积累的重要调控位点。近年来,随着分子生物学技术的快速发展和对 EPSP 合酶的深入研究,EPSP 合酶基因在耐草甘膦转基因作物、医药卫生等方面被广泛应用。对 EPSP 合酶的研究进展进行综述及展望。

关键词: 莽草酸途径 EPSP 合酶 莽草酸积累 耐草甘膦

The Research Progress of EPSP Synthase

Xu Jie Jiang Shiyun Fu Fengming Geng Pengfei Huang Kai

(College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006)

Abstract: 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase for short), is the sixth enzyme of shikimic acid pathway and participates in the synthesis of aromatic amino acids and some of secondary metabolites. Meanwhile, EPSP synthase are not only targets of the herbicide (glyphosate), antibiotics, anti-parasitic drugs, but also is important regulatory site of promoting the accumulation of shikimic acid in the organism. In recent years, with the rapid development of molecular biology technology and the in-depth study of EPSP synthase, EPSP synthase genes have been widely used in resistance to glyphosate genetically modified crops, medicine and health, etc. The research progress of EPSP synthase were reviewed and prospects in this paper.

Key words: Shikimate pathway EPSP synthase Shikimic acid accumulation Resistance to glyphosate

1969 年研究人员在研究真菌体中芳香族氨基酸的生物合成过程中发现 EPSP 合酶的存在,并将该酶命名为 3-phosphoshikimate-1-carboxyvinyl transferase^[1],1974 年将其名改为 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase,即 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶,简称 EPSP 合酶。EPSP 合酶主要存在于真菌、细菌、藻类、高等植物及寄生于脊椎动物的 Apicomplexan(顶复虫)体内,该酶催化莽草酸途径中的倒数第二步反应,是合成芳香族氨基酸以及部分次生代谢物过程的关键酶。迄今为止,EPSP 合酶已经从原核和真核生物中纯化出来,且在很多生物中分离克隆出能编码 EPSP 合酶的基因(aroA)^[2]。

由于 EPSP 合酶是农药草甘膦作用的靶标而受到广泛研究。草甘膦是目前使用最广泛的一种广谱

性除草剂,但是作为一种非选择性除草剂,能够专一的抑制 EPSP 合酶的活性,从而阻断植物内辅酶 Q、叶酸、芳香族氨基酸等化合物的生物合成,使植物细胞分裂、叶绿素合成、蒸腾、呼吸及蛋白质等代谢受到影响而死亡^[3,4]。随着分子生物学技术的快速发展和对 EPSP 合酶的深入研究,1996 年,美国 Monsanto 公司利用 CP4 农杆菌的耐草甘膦 EPSP 合酶的编码基因研发出第一种耐草甘膦作物-耐草甘膦大豆(Roundup ready)。虽然研究人员已经发现上千种抗草甘膦的 EPSP 合酶,但是大多数不符合转基因的要求^[5]。目前,研究人员已经研发出许多耐草甘膦的转基因作物,如棉花、玉米、油菜、水稻、番茄和杨树等,但现在只有大豆、棉花、玉米、油菜和转基因作物用于商业化大规模种植^[6]。

收稿日期:2013-10-24

基金项目:广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019168)

作者简介:徐杰,男,硕士研究生,研究方向:生物制药;E-mail:xj6176512@126.com

通讯作者:蒋世云,男,博士,教授,研究方向:生物制药;E-mail:jiangshiyun@126.com

EPSP 合酶不仅是除草剂草甘膦作用的靶标,也可以作为抗菌素和抗寄生虫药物的靶标。另一方面,EPSP 合酶是莽草酸代谢下游的一个重要酶,研究表明,减弱或切断该酶基因的表达或抑制其酶活性也有利于莽草酸的合成积累,因此 EPSP 合酶也是促进生物体内莽草酸积累的重要调控位点^[7-12]。

1 莽草酸途径简介

莽草酸途径是存在于植物、细菌和真菌中的一条重要代谢途径，而动物体内的代谢中是不存在此途径的，此途径使糖代谢和次生代谢紧密地联系在一起。该途径有 7 个酶参与催化反应，并且这 7 个酶都可以通过真核和原核细胞来源的基因表达获得^[13]。第一步反应是磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和赤藓糖-4 磷酸 (E4P) 的反应。PEP 和 E4P 分别是由糖酵解途径和戊糖磷酸途径产生的物质。最后一步反应是分支酸的生成。分支酸不仅是莽草酸途径的终产物，也是 3 种芳香族氨基酸和一些次生代谢产物的主要前体^[14]。分支酸的去向如图 1 所示。植物的次生代谢产物合成途径包括苯丙烷代谢途径、异戊二烯代谢途径和生物碱合成途径等。研究表明，许多次生代谢产物的芳香族氨基酸前体都是来自莽草酸途径产生的芳香族氨基酸及其中间产物，因此莽草酸途径在合成有商业价值的天然产物过程中起着非常重要的作用。莽草酸途径在植物中的重要性也得到证实，由莽草酸途径产生的物质大约占植物干重的 35% 以上^[15]。

由于莽草酸途径在哺乳动物、鸟类、鱼类、爬行动物和昆虫中是不存在的，近年来它逐渐成为抗菌素、除草剂和活体疫苗的靶标^[16]。例如，由恶性疟原虫引起的疟疾，每年大约 200 多万人死于这种疾病，科学家利用莽草酸途径寻找新型的抗疟疾病药，目前草甘膦作为疟疾的疗效药已经在小鼠身上成功试验^[17]。

2 EPSP 合酶的分类、细胞中定位及不同组织中的分布

目前 EPSP 合酶被分为两种类型, 类型 I 包括来源于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 的 EPSP 合酶; 类型 II 包括来源于覆盆子土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)

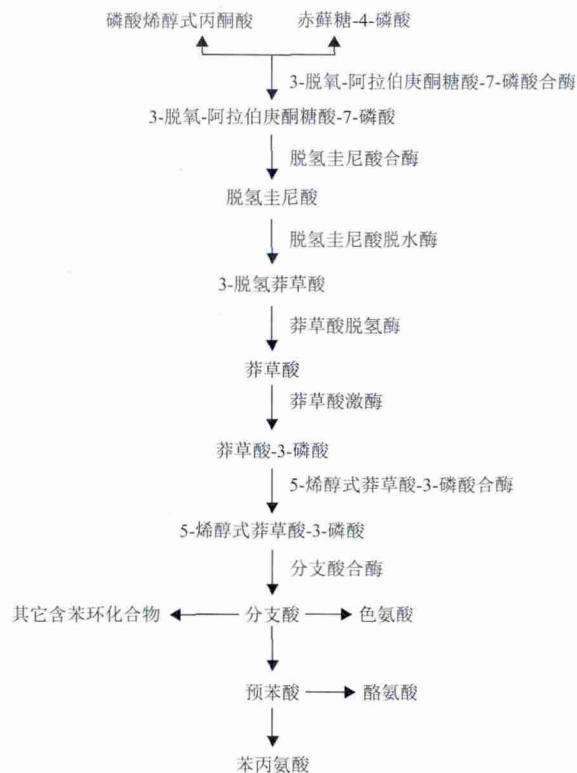


图 1 莽草酸途经

sp.CP4)、无色杆菌 (*Achromobacter* sp.LBAA)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.PG2982) 等^[18]。类型 II 的 EPSP 合成酶多克隆抗体与类型 I 的 EPSP 合酶不会发生抗原抗体交叉反应, 而且两种类型序列一致性 30% 左右^[19]。I 型 EPSP 合酶对除草剂草甘膦敏感。II 型 EPSP 合酶在草甘膦存在时, 相对于 I 型 EPSP 合酶表现出更高的催化效率。研究人员将 II 型 EPSP 合酶转入作物中可以对除草剂产生抗性, 显著有效的控制了田间杂草^[20]。目前已知的 II 型 EPSP 合酶都是在微生物中存在的^[13, 21]。在今天市场上销售的大多数耐草甘膦产品都含有农杆菌 CP4-EPSPS^[22]。

Della-Cioppa 等^[23]发现在植物细胞中, 前体 EPSP 合酶存在于细胞核中, 但是当该酶变为成熟的 EPSP 合酶 (Mature enzyme) 时, 是存在于叶绿体内。EPSP 合酶是通过前体 EPSP 合酶合成的。绝大多数植物的 EPSP 合酶的活性中心存在于叶绿体中。前体 EPSP 合成酶也具有催化活性, 并且它的催化活性也受到草甘膦的抑制^[24]。前体 EPSP 合酶的 N 端为信号肽所在的位置。信号肽的主要作用是引导 EPSP 合酶进入叶绿体基质, 之后信号肽被水解, 前

体蛋白就变成成熟的 EPSP 合酶。例如,童旭宏等^[25]发现陆地棉 EPSP 合酶基因编码 521 个氨基酸残基,前 74 个氨基酸残基为运输肽,当前体 EPSP 合酶进入叶绿体后经加工剪切信号肽,变成成熟 EPSP 合酶^[26]。成熟 EPSP 合酶包含 447 个氨基酸,比前体 EPSP 合酶氨基酸少了 74 个氨基酸,分子量约为 48 kD^[25]。信号肽对于 EPSP 合酶定位于叶绿体起着决定性的作用。微生物的 EPSP 合酶存在于细胞质中,并且没有一段氨基酸序列在 N 端,所以微生物 EPSP 合酶无信号肽。我们通过转基因技术把微生物的 EPSP 合酶基因导入植物中虽然能够成功表达 EPSP 合酶,但是不能进入叶绿体,如果加上信号肽序列,就能把表达的 EPSP 合酶定位到叶绿体上。

植物中的 EPSP 合酶主要存在叶片、根、顶端分生组织、嫩叶和胚芽鞘中,叶片中合成大量的芳香族氨基酸,而在根、顶端分生组织、嫩叶和胚芽鞘中既能够自身合成,也能吸收叶片中的芳香族氨基酸^[27]。

3 EPSP 合酶的三维结构与活性区

Krekel 等^[28]成功纯化出大肠杆菌的 EPSP 合酶。通过对此酶核磁共振及晶体衍射研究分析发现,其合酶由两个结构域组成,每个结构域包含 3 个相同的 $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ 折叠单位,每个折叠单位由两个平行的 α 螺旋和 4 个 β 折叠组成(图 2)^[29]。研究人员发现大肠杆菌 EPSP 合酶共有 427 个氨基酸残基,PEP 结合位点与 Lys-22、Arg-124、Asp-313、Arg-344、Arg-386 和 Lys-411 这 6 个氨基酸残基有关,Arg-27 与莽草酸-3-磷酸(S_3P)结合位点有关^[15]。EPSP 合酶蛋白的 N 端和 C 端都在同一个结构域中,PEP 主要与 EPSP 合酶的 C 端结构域结合,而 S_3P 与 EPSP 合酶主要结合在 N 端结构域^[29-31]。两个平行的 α 螺旋在两个结构域间形成了可以吸引负电荷基团的正电荷区。EPSP 合酶存在状态分为两种:一种是开放(Open)状态(图 3-a),当没有底物与合酶结合,且两个结构域相距较远时存在的状态^[32];当酶与底物 S_3P 结合时,两个结构域相互靠近,并且在两个结构域之间裂缝中出现酶的活性位点^[33],这时合成酶存在的状态为关闭(Closed)状态(图 3-b)。

在关闭状态下,采用限制性胰消化酶也很难使

其消化,在开放口的 90-102 位氨基酸及附近的 1 区(123-134 位氨基酸)、2 区(140-152 位氨基酸)、3 区(355-366 位氨基酸)与底物结合,从而避免了这些区域被消化,通过这个试验确定了 EPSP 合酶的活性区域。如果将 EPSP 合酶与底物结合区域的某些氨基酸残基替代,如将 Gly96 改为 Ala、Pro101 改为 Ser,则草甘膦就很难与合酶结合,这时该酶表现出耐草甘膦的特性^[34]。

易弋等^[2]对盐藻的 EPSP 合酶三级结构进行预测并对氨基酸序列进行多重比对发现,盐藻 EPSP 合酶的氨基酸序列与高等植物、细菌一样,都有开放和关闭两种状态,并且都含有 3 处氨基酸序列非常保守的区域,这些非常保守的区域就是 EPSP 合酶与酶底物 PEP、 S_3P 或草甘膦结合的活性位点,如果改变保守区域中的一个位点,那么酶的活性将会改变,草甘膦的抑制作用也会减弱。

研究人员发现细菌和植物的 EPSP 合酶是一个单体酶,分子量大约为 44-48 kD^[35]。而真菌的 EPSP 合酶属于 AROM 蛋白结构域中的其中一个,AROM 蛋白通常是以二聚体形式存在的,单体形式下没有催化活性,分子量比较大,最多含有 1 618 个氨基酸,最少含有 1 563 个氨基酸,而且 AROM 蛋白是一个同时具有脱氢奎尼酸合酶、脱氢奎尼酸脱水酶、莽草酸脱氢酶、莽草酸激酶和 EPSP 合酶活性的 5 功能多肽,催化真菌中芳香族氨基酸合成途径的第 3 步到第 6 步的反应^[36, 37]。

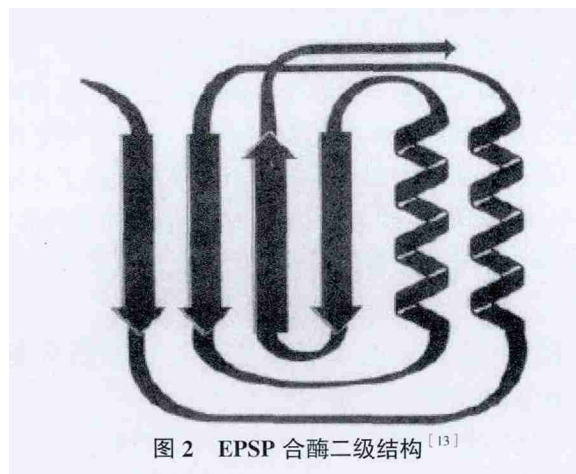
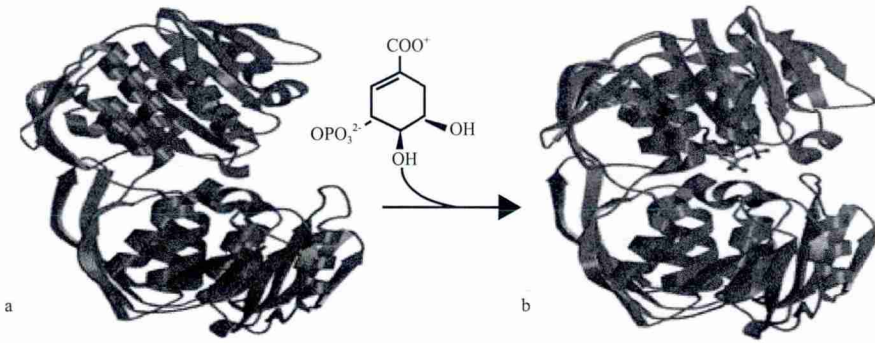


图 2 EPSP 合酶二级结构^[13]

4 EPSP 合酶的催化机制

EPSP 合酶作为莽草酸途径的第 6 位酶,参与合

图3 EPSP 合酶开放和关闭结构示意图^[13]

成芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸)和许多次生代谢产物,如泛醌(Ubinquinone),维生素K(Vitamink),维生素K2类(Menaquinone)等。EPSP合酶催化烯醇式丙酮酸基团从PEP转化到 S_3P 上形成产物EPSP,并释放出一分子无机磷,这个化学反应是PEP的C-O键裂解而不是经过P-O键的裂解,并且在PEP上发生乙烯基质子的交换^[38]。之前有研究者认为合酶与底物的结合是随机的,但是通过用动力学优化的底物诱导试验证实了酶与底物结合是有先后顺序的^[39]。1988年,Wibbenmeyer等^[40]将大肠杆菌EPSP合酶纯化,当纯度达到97%以上时,通过核磁共振(NMR)和快速淬灭动力学(Raid quench kinetics)方法得到了EPSP合酶催化 S_3P 和PEP的反应是一个缩合反应,EPSP合酶和 S_3P 及PEP形成了一个四面体过渡态I,并伴随着生成一个EPSP缩酮副产物II,过渡态I随后生成EPSP并释放一分子无机磷(图4-a)。1997年,Studelska等^[41]利用固体核磁共振(Solid-state NMR)方法对EPSP合酶的催化机理重新进行了研究,发现PEP首先和EPSP合酶形成过渡态A、B,之后与 S_3P 结合形成合酶缩酮过渡态C,而后生成EPSP(图4-b),这种催化机理也得到了研究者的证实^[42, 43]。

5 EPSP 合酶基因及表达

目前已经从细菌,真菌和植物中分离克隆出许多EPSP合酶基因^[44-46]。在原核生物中,许多EPSP合酶基因被克隆与分析。1984年,Duncan等^[44, 47]首次克隆出长度为1284 bp,编码427个氨基酸残基的E.coli EPSP合酶基因,并且该基因内没有内含子。Comai等^[48]对鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella*

typhimurium) EPSP合酶基因进行克隆发现,基因编码427个氨基酸,合酶蛋白的分子量约为46 kD。有研究者对大肠杆菌与鼠伤寒沙门氏菌的EPSP合酶基因进行了对比发现,二者的核苷酸序列差异为21%,同义密码子有78%在第1位或第二位碱基上发生变化,65%在第3位碱基上变化,氨基酸序列的同源性为93%,并且两种多肽的15个N端氨基酸残基也是相同的,在86-131位氨基酸之间的区域为高度保守区域,而在302-371和381-422位氨基酸之间的区域为C端高度保守区域。脯氨酸分别位于这两种合酶序列中的不同位置,位于鼠伤寒沙门氏菌EPSP合酶序列的85位上,而在大肠杆菌中位于合酶序列的81位上,并且在81-85位的氨基酸残基在鼠伤寒沙门氏菌EPSP合酶序列中是不存在的,两者其它部位的脯氨酸是完全保守的^[49]。

在真菌中,许多EPSP合酶基因也被克隆与分析。Charles等^[45]报道了真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的EPSP合酶基因,其合酶属于AROM蛋白结构域中的其中一个,基因中含有一个单一的阅读框架,长度为5311 bp。于海涛等^[36]克隆分离得到了假丝酵母TY-JM和黄曲霉TZ1985的EPSP合酶蛋白编码序列。假丝酵母TY-JM的EPSP合酶编码序列长度为1311 bp,编码436个氨基酸,理论分子量为46 kD,黄曲霉TZ1985的EPSP合酶编码序列长度为1353 bp,编码450个氨基酸,理论分子量为48 kD。通过与其它物种EPSP合酶氨基酸序列对比分析,TY-JM EPSP合酶基因与杜氏假丝酵母、热带假丝酵母和白假丝酵母等物种的同源性为80%,而与棒曲霉、核盘菌的同源性为66%,TZ1985 EPSP合酶基因与土曲霉、烟曲霉、白曲霉和黑曲霉的同

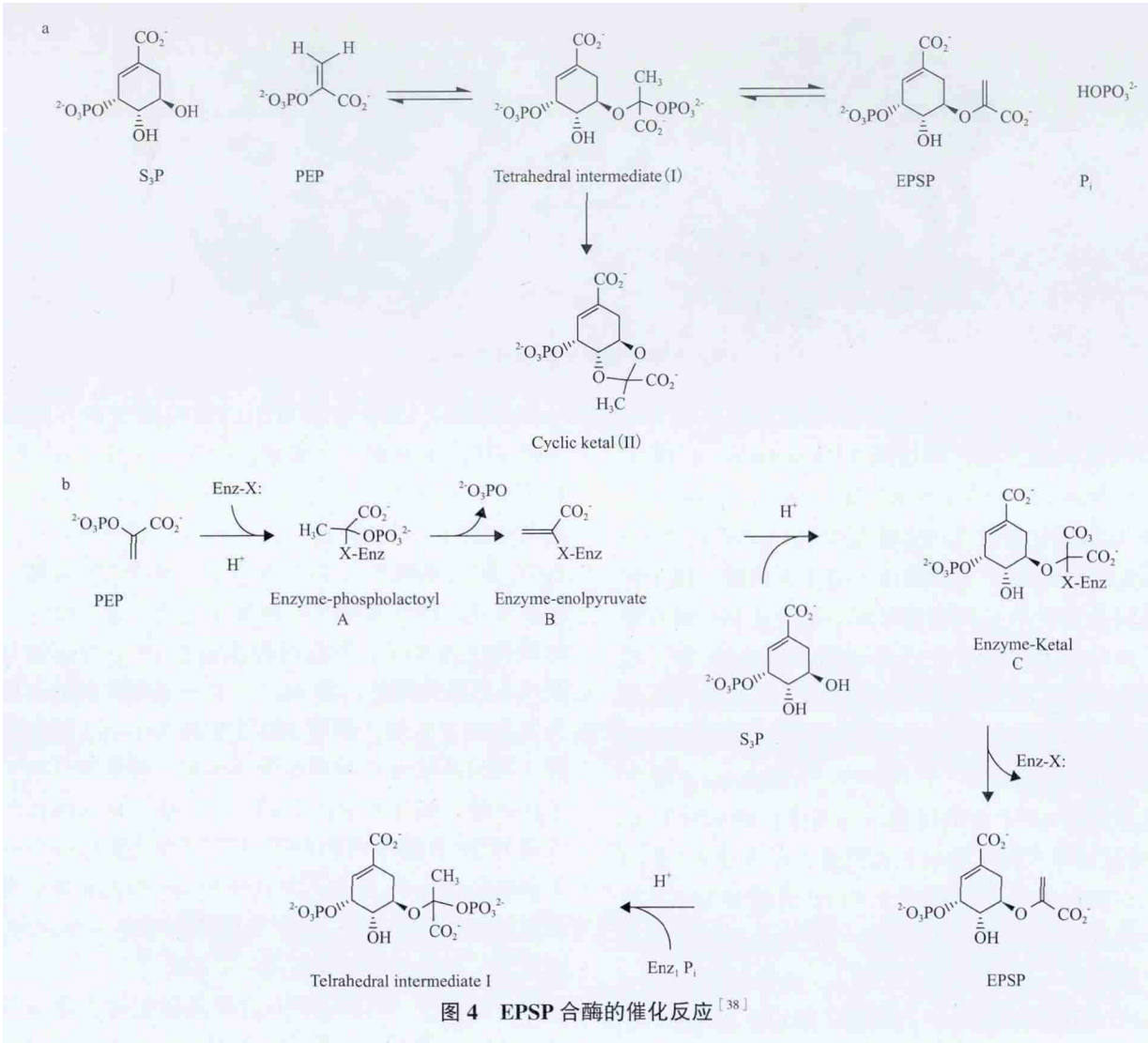


图 4 EPSP 合酶的催化反应 [38]

源性为 90%，而与白假丝酵母、杜氏假丝酵母和热带假丝酵母的同源性为 68%。在进化关系上，TY-JM EPSP 合酶和 TZ1985 EPSP 合酶与真菌的 EPSP 合酶有很近的亲缘关系，而与植物和细菌的 EPSP 合酶亲缘关系比较远。

在植物中，一些 EPSP 合酶基因也被克隆与分析。Wang 等 [31] 发现烟草中有两种 EPSP 合酶基因的 cDNA，两种 cDNA 的长度分别为 2 000 bp 和 1 300 bp，二者编码的氨基酸序列和核苷酸序列的同源性分别为 95.9% 和 89%，但是两种 EPSP 合酶的酶活力相同。刘晓军等 [24] 从诸葛菜中也克隆出两段 EPSP 合酶基因片段，其中一段长为 797 bp，另一段长为 1 157 bp，两个片段的外显子序列是完全

相同的，内含子相差很大，但是这两段基因编码出相同的 EPSP 合酶，这两个片段所编码氨基酸序列与欧洲油菜、玉米、拟南芥、黑麦草、水稻及矮牵牛的一致性分别为 85%、80%、83%、80%、79% 和 79%。

Gasser 等 [50] 通过对比细菌、植物和真菌的 EPSP 合酶编码区，获得了一个比较一致的模式（图 5），三者 EPSP 合酶中约有 38% 的氨基酸残基相同，细菌和植物之间 EPSP 合酶的同源性为 54%，真菌和植物之间 EPSP 合酶的同源性为 38%，这些数据表明真菌和植物中的 EPSP 合酶的分枝比细菌和植物中此酶的分枝出现的早。

研究者发现 EPSP 合酶基因在生物不同的组织

中表达也是有差异的,在矮牵牛中其基因表达量最高的组织是花瓣^[50],在银杏中表达量最高的是在果实和叶子中;其次为茎,最低的是在根中^[51]。木本植物喜树 EPSP 合酶基因表达量最高的组织是在叶子,根中表达量最低^[52]。薤白 EPSP 合酶基因在幼叶中表达量最高,而在壮叶和茎中表达量最低^[53]。出现这种表达差异的原因可能是由于 EPSP 合酶基因在不同的组织中发生转录的起始位点不相同,也有研究者认为黄酮含量也与不同组织中 EPSP 合酶基因的表达量有关^[54]。

另一方面,有研究者报道,改变高度保守区域的氨基酸残基,可使 EPSP 合酶与草甘膦的结合能力发生改变,从而使生物表现出抗草甘膦特性^[55]。

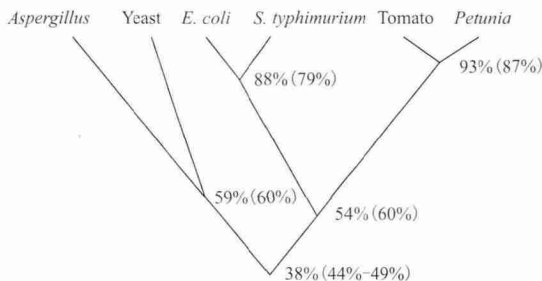


图5 EPSP 合成酶的系统进化树^[50]

6 EPSP 合酶基因的应用

EPSP 合酶不仅是除草剂草甘膦作用的靶标,也可以作为抗菌素和抗寄生虫药物的靶标;另一方面,EPSP 合酶活性大小对生物体内莽草酸的积累有重要影响^[7-12]。

6.1 草甘膦及抗草甘膦EPSP合酶基因

6.1.1 草甘膦及其与 EPSP 合酶作用机制 草甘膦作为一种非选择性除草剂,在杀死杂草的同时,也会杀死农作物,从而限制了草甘膦的使用范围和时间,自 1974 年在美国注册登记以来,已成为当今世界上销售量最大且使用最广的农药品种,问世 30 多年来经久不衰^[18]。草甘膦与 EPSP 合酶的作用机制是:草甘膦与 PEP 在结构上非常相似,在莽草酸途径中草甘膦占据了 EPSP 合酶和 PEP 的连接位点,形成 EPSP 合酶· S_3P ·glyphosate 的复合物,使 EPSP 合酶催化烯醇式丙酮酸基团从 PEP 转化到 S_3P 上形成 EPSP 的过程停止,竞争性抑制 EPSP 合酶的

活性导致芳香族氨基酸和一些芳香化合物合成受阻,最终导致一些关键性代谢物和激素如酚类化合物、木质素、代谢失调,使生物体不能进行正常的氮代谢而死亡,而且 EPSP 合酶进入叶绿体的过程也受草甘膦的抑制^[56-58]。

6.1.2 抗草甘膦 EPSP 合酶基因来源 1983 年,Comai 等^[59]从鼠伤寒沙门菌中分离克隆出了抗草甘膦的突变基因——aroA 基因,此后许多研究者对抗草甘膦基因进行了深入广泛的研究。抗草甘膦的 EPSP 合酶基因主要来源于微生物和植物,而且研究者发现植物中的 EPSP 合酶比细菌中 EPSP 合酶对草甘膦的抗性大约低了两个数量级。表 1 为目前已获得的主要抗草甘膦 EPSP 合酶基因及其来源。目前获得抗草甘膦 EPSP 合酶编码基因的途径主要有两种:第 1 种是从天然抗草甘膦的物种或突变体中克隆分离出抗草甘膦基因或突变基因。在天然抗草甘膦基因中,土壤农杆菌 CP4-EPSP 合酶基因是应用最广泛的抗草甘膦 EPSP 合酶基因,并形成商业化生产。除此之外,研究者从一些物种的突变体中克隆分离出抗草甘膦突变基因,如研究者克隆大豆、油菜、马铃薯及拟南芥抗草甘膦的 EPSP 合酶突变基因发现,大豆 EPSP 合酶基因编码的 104Gly 突变为 Ala,油菜 EPSP 合酶基因编码的 Gly96 突变为 Ala,马铃薯和拟南芥 EPSP 合酶第 101 位上 Gly 变为 Ala^[60]。Shah 等^[61]从筛选出的抗草甘膦矮牵牛 MP4—G 细胞系中克隆出 EPSP 合酶的 cDNA,将其 cDNA 导入矮牵牛叶片后,对草甘膦的抗性明显提高。Scott 等^[62]发现牛筋草的 EPSP 合酶基因发生突变,第 101 位脯氨酸突变为色氨酸后,对草甘膦具有很低的敏感度,表现出抗草甘膦。第 2 种是利用遗传学方法改造 EPSP 合酶编码基因,提高对草甘膦的抗性:定点突变可以减小酶与草甘膦的亲合力或提高酶与底物的亲合力,从而提高对草甘膦的抗性。Tian 等^[63]利用定点突变使苹果的 EPSP 合酶基因编码的 Thr101 变为 Ala,Ala187 变为 Thr,通过动力学分析证实两个氨基酸突变后提高了对草甘膦的抗性;Ming 等^[64]使用易错倾向 PCR 随机突变技术使来源于大肠杆菌和沙门氏菌的 aroA 基因发生突变和重组,得到 aroM1、aroM2、aroM3 和 aroM4 4 种突变体,通过 EPSP 合酶活性的动力学分析表明,

4 种突变体的 4 个突变基因编码的 EPSP 合酶的活性比突变前提高了 2-10 倍，与烯醇式丙酮酸的亲和性提高了 2.5-19 倍，与草甘膦的 K_i 值提高了 0.4-8 倍；Lebrun 等^[65] 使用定点突变，从玉米中克隆获得了抗草甘膦的 CP4 基因，而且先正达公司通过转基因技术开发出了耐草甘膦玉米品种 GA21。研究者发现，通过遗传学方法改造 EPSP 合酶编码基因，虽然提高了生物对草甘膦的抗性，但是也降低了 EPSP 合酶的催化活性^[21]，因此，目前改造成功并用于商业化生产的抗草甘膦转基因作物的基因几乎全部是 CP4-EPSP 合酶基因。

表 1 主要抗草甘膦的 EPSP 合酶基因及其来源 ^[66, 67]		
基因	名称	基因来源
aroA	Epsps 突变基因	鼠伤寒沙门氏菌
		大肠杆菌
		拟南芥
		矮牵牛
aroA1	Epsps 突变基因	链霉菌
aroA2	Epsps 突变基因	耐盐芽孢杆菌
aroA1- M	Epsps 突变基因	鼠伤寒沙门氏菌
		大肠杆菌
CP4-epsps	cp4-epsps 基因	天然农杆菌
aroA	aroA 突变体	肺炎克氏杆菌
igrA	igrA	假单胞菌 PG2982 菌株

6.2 在抗菌素和抗寄生虫药物上的应用

EPSP 合酶可以作为抗菌素的靶标，如研究者通过试验删除肺炎链球菌和支气管炎博德特菌的 EPSP 合酶的基因后，发现二者的毒性减弱^[68, 69]。在抗寄生虫药物方面，研究者已经证实草甘膦能够抑制 *Toxoplasma gondii*、*Cryptosporidium* 以及 *Plasmodium falciparum* (malaria) 等顶复门寄生虫的生长^[17, 70]。

6.3 EPSP合酶新型抑制剂

草甘膦作为 EPSP 合酶的抑制剂是众所周知的，但随着 EPSP 合酶晶体与催化底物机理的深入研究，也推动了 EPSP 合酶新型抑制剂的研发。如研究者根据 $S_3P \cdot$ glyphosate、EPSP 合酶的分子模型，设计并合成了与除草剂草甘膦具有类似抑制作用的化合物 4^[71, 72]，用等温低定量热法测定 EPSP 合酶与化合物 4 的连接常数 K_d 为 $0.53 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ ，而 EPSP 合酶 $\cdot S_3P +$ glyphosate 的 K_d 值为 0.15 ± 0.03

$\mu\text{mol/L}$ ，前者 K_d 值仅仅是后者的 3.5 倍，而且通过动力学、光谱学和微量热法证实了化合物 4 与 EPSP 合酶的结合位点和 S_3P 与酶的结合位点是相同的，从而抑制 EPSP 合酶的催化活性。研究者报道了莽草酸衍生物、羟基丙二酸衍生物等都可以与 EPSP 合酶形成四面体过渡态，从而使 EPSP 合酶活性受到抑制^[73]。目前，草甘膦依然是作用于该靶标的有效抑制剂，还没有新的 EPSP 合酶抑制剂商业化应用，但随着除草剂草甘膦的使用越来越广，抗草甘膦杂草也越来越多，所以 EPSP 合酶新的抑制剂研究必将会成为热点^[74]。

6.4 EPSP合酶对莽草酸代谢的影响

莽草酸是生物体内许多物质合成代谢的中间体，也是人工化学合成许多生物碱、芳香氨基酸与吲哚衍生物、手性药物（如抗病毒药）的原料。近年来，禽流感爆发此起彼伏，危害人类健康安全。莽草酸是合成目前在临床上唯一一种有效抗禽流感药物——磷酸奥司米韦（商品名为达菲，为瑞士 Roche 制药公司生产）的关键原料^[75-77]，因此生物合成莽草酸的研究是目前的一个研究热点。EPSP 合酶是莽草酸代谢下游的一个重要酶，研究表明，减弱或切断该酶基因的表达或抑制其酶活性也有利于莽草酸的合成积累^[7-12]。Kramer 等^[7] 报道，敲除 EPSP 合酶基因，使莽草酸和莽草酸 -3-磷酸大量累积，后者去磷酸化后就获得目标产物。2011 年公布的美国专利^[9]“草甘膦在微生物发酵法生产莽草酸中的使用”就是利用草甘膦对 EPSP 合酶的抑制作用来提高微生物发酵生产莽草酸产量。Bresnahan 等^[10] 研究报道，在给小麦施加非选择性除草剂草甘膦后，不仅有助于农作物的丰收，而且草甘膦还可以被吸收并转移到植物的活性生长区内，通过抑制 EPSP 合酶的合成，能够干扰莽草酸的正常代谢途径。在试验中观察到，在小麦乳熟期使用草甘膦会使其内部的莽草酸最多增加 24 倍，若在蜡熟期使用，其内部的莽草酸能增加 3 倍。

7 结语

自 EPSP 合酶发现至今已有 40 多年，其理论与应用研究都取得了显著的成果。目前已发现并克隆出许多种 EPSP 合酶基因，特别在农业上的应用，

随着许多耐草甘膦的 EPSP 合酶基因被克隆出来,有力的推动了耐草甘膦作物的发展。虽然通过遗传学方法改造 EPSP 合酶编码基因,提高了生物对草甘膦的抗性,但是也降低了 EPSP 合酶的催化活性,所以目前改造成功并用于商业化生产的抗草甘膦转基因作物的基因几乎全部是 CP4-EPSP 合酶基因,因此该领域有待进一步深入研究。另一方面,EPSP 合酶也可以作为抗菌素和抗寄生虫药物的靶标。因此对 EPSP 合酶与草甘膦以及其它抑制剂的结合模式的研究,能够为设计出新的除草剂、抗寄生虫药物以及抗菌素提供有力的理论依据。此外,EPSP 合酶也是促进生物体内莽草酸积累的重要调控位点,因此随着人们对 EPSP 合酶的全面深入研究,相信 EPSP 合酶基因会在医药卫生、农业生产等方面发挥更重要的作用。

虽然现在一些 EPSP 合酶的三维晶体结构已通过物理化学方法和 X-射线衍射得到,但是许多研究只报道了未与配体结合的 EPSP 合酶三级结构,所以不能完全确定酶的活性位点,但随着计算机技术的发展,可利用计算机模拟出 EPSP 合酶与底物的结合位点;另一方面通过计算机模拟,可为筛选出较高活性的 EPSP 合酶及抗草甘膦较强的 EPSP 合酶基因节省大量人力物力。本课题组首先利用分子对接软件进行反对接计算配体小分子化合物与不同生物的 EPSP 合酶结合自由能,同时根据计算结合自由能最低的结合模式分析底物、抑制剂(草甘膦)与 EPSP 合酶作用机理及其构效关系,提出 EPSP 合酶基因的改造方案,应用基因工程手段对目标生物 EPSP 合酶基因进行遗传改造,改造选育出有利于莽草酸积累的生物突变体或耐草甘膦作物;另一方面根据底物、抑制剂(草甘膦)与 EPSP 合酶作用机理及其构效关系,也可提出抑制剂改造方案,合成新的抑制剂备选化合物,通过试验验证最终筛选获得更有效的除草剂、抗菌素或抗寄生虫药物。

参考文献

- [1] Ahmed SI, Giles NH. Organization of enzymes in the common aromatic synthetic pathway :evidence for aggregation in fungi [J] . Bacteriology, 1969, 99 (1) :231-237.
- [2] 易弋. 盐生杜氏藻 EPSP 合成酶基因的克隆、功能鉴定及其结构的光谱学性质分析 [D] . 成都 :四川大学, 2007.
- [3] 游大慧, 骞宇, 王健美, 等. 芸苔 EPSPS 基因 cDNA 的克隆和表达载体的构建 [J] . 四川大学学报, 2004, 41 (3) :661-664.
- [4] Priestman MA, Healy ML, Funke T, et al. Molecular basis for the glyphosate-insensitivity of the reaction of 5-enoipyruvylshikimate 3-phosphate synthase with shikimate [J] . FEBS Letters, 2005, 579 (25) :5773-5780.
- [5] 刘树鹏, 李刚强, 王楠, 等. CP4-EPSPS 蛋白在大肠杆菌中的表达与制备 [J] . 中国农业科技导报, 2012, 14 (1) :91-97.
- [6] 童汉华, 曹一平, 章善庆. 耐草甘膦作物的选育研究概况 [J] . 中国稻米, 2006 (6) :12-14.
- [7] Kramer M, Bongaerts J, Bovenberg R, et al. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid [J] . Metabolic Engineering, 2003, 5 (4) :277-283.
- [8] Iomantas YAV, Abalakina EG, Polanuer BM, et al. Method for producing shikimic acid :US, B1, 6436664 [P] . 2002-8-20.
- [9] Bogosian G, Frantz JP. Use of glyphosate to produce shikimic acid in microorganisms :US, A1, 20110020885 [P] . 2011-1-27.
- [10] Bresnahan GA, Manthey FA, Howatt KA, et al. Glyphosate applied preharvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*) [J] . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51 (14) :4004-4007.
- [11] Marchiosi R, Ferrarese MLL, Bonini EA, et al. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots [J] . Pesticide Biochemistry and Physiology, 2009, 93 (1) :28-33.
- [12] Tong XH, Daud MK, Sun YQ, et al. Physiological and molecular mechanisms of glyphosate tolerance in an in vitro selected cotton mutant [J] . Pesticide Biochemistry and Physiology, 2009, 94 (2-3) :100-106.
- [13] 李亮. II 型 EPSP 合酶的功能域鉴定及大肠杆菌在草甘膦冲击下的基因表达谱分析 [D] . 北京 :中国农业科学院, 2010.
- [14] Knaggs AR. The biosynthesis of shikimate metabolites [J] . Natural Product Report, 2003, 20 (1) :119-136.
- [15] 聂燕芳. T42M 突变型 EPSP 合成酶基因的克隆和研究 [D] . 广州 :中山大学, 2004.
- [16] Pereira JH, Canduri F, Basso LA, et al. Structural bioinformatics study of EPSP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* [J] . Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 312 (3) :608-614.

- [17] Roberts F, Roberts CW, Johnson JJ, et al. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites [J]. *Nature*, 1998, 393 (6699) :801-805.
- [18] 王宏伟, 梁业红, 史振声, 等. 作物抗草甘膦转基因研究概况 [J]. *作物杂志*, 2007 (4) :9-12.
- [19] Tian YS, Xu J, Han J, et al. Complementary screening, identification and application of a novel class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Bacillus cereus* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29 (3) :549-557.
- [20] Barry GF, Kishore GM, Padgett SR, et al. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases :US, B1, 6248876 [P]. 2001-6-19.
- [21] Funke T, Han HJ, Healy-Fried ML, et al. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (35) :13010-13015.
- [22] 柏亚罗. 耐草甘膦作物的发展历程和展望 [J]. *现代农药*, 2005, 4 (5) :26-30.
- [23] Della-Cioppa G, Bauer SC, Klein BK, et al. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83 (18) :6873-6877.
- [24] 刘晓军. 诸葛菜 (*Olychophragmus violaceus*) EPSP 合成酶基因的克隆与分析 [D]. 成都 :四川大学, 2002.
- [25] 童旭宏, 吴玉香, 祝水金. 陆地棉 EPSPS 基因的克隆及其组织特异性表达分析 [J]. *棉花学报*, 2009, 21 (4) :259-264.
- [26] Zhao J, Hemmann KM. Cloning and sequencing of a second cDNA encoding 3-deoxy-D-arabino-Heptulosonate-7-phosphate synthase from *Solanum tuberosum* L. [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100 (2) :1075-1076.
- [27] Lynda GB, Celine BS. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops :a case study with glyphosate (Roundup) [J]. *Ecotoxicology*, 2003, 12 (1-4) :271-285.
- [28] Krekel F, Oecking C, Amrhein N, et al. Substrate and inhibitor-induced conformational changes in the structurally related enzymes UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) [J]. *Biochemistry*, 1999, 38 (28) :8864-8878.
- [29] William WC, Abdel-Meguid SS, Lim LW, et al. Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase :A distinctive protein fold [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1991, 88 (11) :5046-5050.
- [30] 刘光全, 刘柱, 陆伟, 等. 草甘膦抗性新基因的克隆、序列分析及其蛋白高级结构预测 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22 (3) :197-203.
- [31] Wang YX, Jones JD, Weller SC, et al. Expression and stability of amplified genes encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-tolerant tobacco cells [J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 17 (6) :1127-1138.
- [32] Schonbrunn E, Eschenburg S, Shuttlesworth WA. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in atomic detail [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2001, 98 (6) :2944-2946.
- [33] Li L, Lu W, Han YL, et al. A novel RPMXR motif among class II 5-enolpyruvylshikimate-5-enolpyruvyl synthases is required for enzymatic activity and glyphosate resistance [J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 144 (4) :330-336.
- [34] 刘锡娟. 转 EPSPS 基因抗草甘膦烟草棉花的研究 [D]. 北京 :中国农业科学院, 2007.
- [35] 徐军望, 冯德江, 李旭刚, 等. 水稻 EPSP 合酶基因的克隆、结构分析和定位 [J]. *中国科学*, 2002, 32 (2) :97-104.
- [36] 于海涛. 抗草甘膦真菌的分离及 EPSPS 基因克隆与表达研究 [D]. 哈尔滨 :东北农业大学, 2012.
- [37] 于寒颖, 杨谦. 核盘菌 *arom* 基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达 [J]. *微生物学报*, 2006, 46 (1) :43-47.
- [38] Lewis J, Johnson KA, Anderson KS, et al. The catalytic mechanism of EPSP synthase revisited [J]. *Biochemistry*, 1999, 38 (22) :7372-7379.
- [39] Ream JE, Yuen HK, Frazier RB, et al. EPSP synthase :binding studies using isothermal titration microcalorimetry and equilibrium dialysis and their implications for ligand recognition and kinetic mechanism [J]. *Biochemistry*, 1992, 31 (24) :5528-5534.
- [40] Wibbenmeyer J, Brundage L, Stephen R, et al. Mechanism of the EPSP synthase catalyzed reaction :Evidence for the lack of a covalent carboxyvinyl intermediate in catalysis [J]. *Biochemical and Biophysical Communications*, 1988, 153 (2) :760-766.
- [41] Studelska DR, McDowell LM, Espe MP, et al. Slowed enzymatic

- turnover allows characterization of intermediates by solid-state NMR [J] . Biochemistry, 1997, 36 (50) :15555-15560.
- [42] Jakeman DL, Mitchell DJ, Shuttleworth WA, et al. On the mechanism of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [J] . Biochemistry, 1998, 37 (35) :12012-12019.
- [43] 向文胜, 张文吉, 王相晶, 等. EPSP 合成酶的特性及新抑制剂的研究进展 [J] . 农药学学报, 2000, 2 (2) :1-8.
- [44] Duncan K, Lewendon A, Coggins JR. The complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [J] . FEBS Lett, 1984, 170 (1) :59-63.
- [45] Charles G, Keyte JW, Brammar WJ, et al. Structure and nucleotide sequence of the complex AROM locus of *Aspergillus nidulans* [J] . Nucleic Acids Res, 1986, 14 (5) :2201-2213.
- [46] Klee HJ, Muskopf YM, Gasser CS. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase : sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants [J] . Mol Genet, 1987, 210 (3) :437-442.
- [47] Duncan K, Coggins JR. The *serC-aroA* operon of *Escherichia coli*. A mixed function operon encoding enzymes from two different amino acid biosynthetic pathways [J] . Biochem J, 1986, 234 (1) :49-57.
- [48] Comai L, Facciotti D, Hiatt WR, et al. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate [J] . Nature, 1985, 317 :741-744.
- [49] Maskell DJ, Morrissey P, Dougan G. Cloning and nucleotide sequence of the *aroA* gene of *Bordetella pertussis* [J] . J Bacteriol, 1988, 170 (6) :2467-2471.
- [50] Gasser CS, Winter JA, Hironaka CM, et al. Structure, expression, and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of *petunia* and *tomato* [J] . The Journal of Biological Chemistry, 1988, 263 :4280-4287.
- [51] 程华, 李琳玲, 王燕, 等. 银杏 EPSPS 基因克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2010, 30 (12) :2365-2372.
- [52] Gong Y, Liao Z, Chen M, et al. Characterization of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase gene from *Camptotheca acuminata* [J] . Biologia Plantarum, 2006, 50 (4) :542-550.
- [53] Jiang X, Dai XZ, Li YQ, et al. Semiquantitative analysis of EPSPS gene expression in tissues of *Allium macrostemon* Bunge [J] . Journal of Hunan Agricultural University, 2007, 33 (5) :542-545.
- [54] Benfey PN, Takatsuji H, Ren L, et al. Sequence requirements of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 5 [prime] --upstream region for tissue-specific expression in flowers and seedlings [J] . Plant Cell, 1990, 2 (9) :849-856.
- [55] 向文胜. 抗除草剂草甘膦转基因作物 [J] . 东北农业大学学报, 1998, 29 (1) :92-98.
- [56] Vanghn KC, Duke SO. Biochemical basis of herbicide resistance [J] . Chem Plant Protect, 1991, 7 :141-169.
- [57] Dill GM. Glyphosate-resistant crops :history, status and future [J] . Pest Manage Sci, 2005, 61 (3) :219-224.
- [58] Tan S, Evans R, Singh B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops [J] . Amino Acids, 2006, 30 (2) :195-204.
- [59] Comai L, Sen LC, Stalker DM. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate [J] . Science, 1983, 221 (4608) :370-371.
- [60] 周晓卉, 黄丽华, 蒋向, 等. 薹白 EPSP 合成酶基因 cDNA 的克隆与原核表达分析 [J] . 中国农业科学, 2009, 42 (7) :2297-2304.
- [61] Shah DM, Horsch RB, Klee HJ, et al. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants [J] . Science, 1986, 233 (4762) :478-481.
- [62] Scott R, Damian J, Rodriguez MT, et al. Glyphosate-resistant goosegrass identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate -3-phosphate synthase [J] . Plant Physiology, 2002, 129 (3) :1265-1275.
- [63] Tian YS, Xu J, Peng RH, et al. Mutation by DNA shuffling of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Malus domestica* for improved glyphosate resistance [J] . Plant Biotechnology, 2013, 11 (7) :829-838.
- [64] Ming H, Zhong YY, Yan FN, et al. A new type of class I bacterial 5-enopyruvyl -shikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate [J] . Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects, 2001, 1568 (1) :1-6.
- [65] Lebrun M, Sailland A, Freyssinet G, et al. Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene :US, B1, 6566587 [P] . 2003-5-20.
- [66] 阮燕晔, 薛寥莎. 植物抗除草剂基因研究进展 [J] . 南方农业学报, 2012, 43 (4) :462-466.
- [67] 周心童. 抗除草剂基因 EPSPS 在棉花杂种优势中的利用极其

- 快速转育 [D] . 保定 :河北农业大学 , 2012.
- [68] McDevitt D, Payne DJ, Holmes DJ, et al. Novel targets for the future development of antibacterial agents [J] . *Applied Microbiology*, 2002, 92 (S1) :28-34.
- [69] McArthur JD, West NP, Cole JN, et al. An aromatic amino acid auxotrophic mutant of *Bordetella bronchiseptica* is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection [J] . *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 221 (1) :7-16.
- [70] McKinney JD, Jacobs Jr WR, Bloom BR. 3 Persisting problems in tuberculosis [R] . New York :Emerging Infections, Academic Press, 1998 :51-146.
- [71] Marzabadi MR, Gruys KJ, Walker MC, et al. An EPSP synthase inhibitor joining shikimate 3-phosphate with glyphosate :synthesis and ligand binding studies [J] . *Biochemistry*, 1996, 35 (13) :4199-4210.
- [72] Wang JH, Lv ZJ. Design and synthesis of a novel inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [R] . Germany : Magjarevic R, 2009 :100-101.
- [73] Miller MJ, Cleary DG, Ream JE, et al. New EPSP synthase inhibitors :Synthesis and evaluation of an aromatic tetrahedral intermediate mimic containing a 3-malonate ether as a 3-phosphate surrogate [J] . *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1995, 3 (12) :1685-1692.
- [74] 刘柱 . 可变盐单胞菌中草甘膦抗性 EPSP 合酶新基因克隆、大肠杆菌表达及其抗性机制的研究 [D] . 成都 :四川大学 , 2004.
- [75] Ghosh S, Chisti Y, Banerjee UC. Production of shikimic acid [J] . *Biotechnology Advances*, 2012, 30 (6) :1425-1431.
- [76] Nie LD, Shi XX. A novel asymmetric synthesis of oseltamivir phosphate (Tamiflu) from (-)-shikimic acid [J] . *Tetrahedron :Asymmetry*, 2009, 20 (1) :124-129.
- [77] Satoh N, Akiba T, Yokoshima S, et al. A practical synthesis of (-)-oseltamivir [J] . *Tetrahedron*, 2009, 65 (16) :3239-3245.

(责任编辑 狄艳红)