

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201604015



Cry1A 型杀虫晶体蛋白活性区的空间结构比较分析

刘肖萍, 林毅

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 对 9 种代表性 Cry1A 型杀虫晶体蛋白成员进行活性区空间结构的同源建模与比较分析. 分析结果表明: Domain I 和 Domain III 相对保守, 其中, Domain I 整体走向及结构基本重叠, 只有 Cry1Aa 和 Cry1Af 多了一个螺旋; Domain II 的主要差异体现在 loop 上; 将 Domain III 结构一致的成员 Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ae 和 Cry1Af 归为一个亚型, 其他 5 种成员归为另一个亚型. 研究确定了影响 Cry1A 型杀虫晶体蛋白结构差异的关键氨基酸及关键结构片段.

关键词: 苏云金杆菌; Cry1A 型杀虫晶体蛋白; 空间结构差异; 构效关系

中图分类号: S 433 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2016)04-0465-06

Structural Comparison of Toxic Core of Cry1A-Type Insecticidal Crystal Proteins

LIU Xiaoping, LIN Yi

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The 3-D structure of the toxic core for all available 9 typical Cry1A proteins were constructed by the method of homology modeling. The structural differences among different Cry1A proteins indicated that Domain I and Domain III were more conservative than Domain II. Structures of Cry1A Domain I were almost identical except Cry1Aa and Cry1Af which had one more helix. The differences among the Cry1A Domain II were mainly located in loops. Structures of Domain III of Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ae and Cry1Af were consistent, thus these four Cry1A proteins and the other five were divided into two different subgroups. The results confirm that the key residues and motifs are important for the insecticidal activities of Cry1A proteins.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Cry1A-type insecticidal crystal proteins; structural differences; structure-function relationships

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt)是一种产孢型昆虫病原菌. 从 Bt 中已分离和鉴定出的昆虫毒性蛋白有 10 多种^[1], 其中, 最重要的是 Cry 系列毒素蛋白^[2]. Cry1A 类蛋白原毒素被酶水解后, 形成活性毒素蛋白片段, 活性区由 3 个结构域构成, Domain I 位于 N 端, 由反向平行的 α 螺旋构成; Domain II 由 3 个 β -折叠片层构成 β -棱柱结构^[3]; Domain III 则由 2 个弯曲的反向平行 β -折叠构成. Cry1A 类蛋白中, 已经测得的晶体结构有 Cry1Aa(PDB ID: 1CIY)^[4] 与 Cry1Ac(PDB ID: 4ARY)^[5].

收稿日期: 2015-10-09

通信作者: 林毅(1976-), 男, 教授, 博士, 主要从事伴孢晶体蛋白的基因克隆与信息学的研究. E-mail: lyhxm@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40601046); 教育部科学技术研究重点项目(211205); 华侨大学中青年教师科研提升资助计划(ZQN-YX205)

Cry1A类蛋白的杀虫机制是与中肠上皮细胞的毒素受体结合、构象变化引起寡聚化以及插入细胞膜形成孔洞,最后导致昆虫死亡^[6-7]. Cry1A类蛋白经胰蛋白酶活化后,与不同的受体结合,受体主要有氨肽酶N(APN)、碱性磷酸酶(ALP)和钙黏蛋白类^[6,8-11]. Cry毒素已经被广泛应用于对鳞翅目、鞘翅目、双翅目害虫及植物病原线虫的防治^[8]. 转Cry基因农作物已被大面积种植,有效地控制了鳞翅目与鞘翅目害虫的危害^[12]. 然而,目前已经超过60%的害虫对转基因作物产生了抗性,而Cry1A类的蛋白占抗性总数的41%^[13]. Cry1A蛋白有10种成员,共有107个蛋白. 其中,Cry1Aa,Cry1Ab,Cry1Ac分别有24,34和38个蛋白,同源性高于95%的蛋白比例较高,结构较为相似. 本文构建了Cry1A蛋白中9种成员的活性区空间结构,比较分析其结构差异,并结合现有的活性信息探讨其构效关系.

1 材料与方法

1.1 数据库和服务端

基因与蛋白质序列检索比对数据库NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>),获取9个代表蛋白质氨基酸序列;蛋白质结构数据库Protein Data Bank(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>);序列比对服务器(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>);Swiss-Model服务器(<http://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测三级结构模型;蛋白质三级结构分析软件PyMOL.

1.2 分析方法

1.2.1 Cry1A类蛋白质结构预测结果 分别取Cry1Aa1,Cry1Ab1,Cry1Ac1,Cry1Ad1,Cry1Ae1,Cry1Af1,Cry1Ag1,Cry1Ah1和Cry1Ai1为Cry1A类蛋白质代表,通过Swiss-Model服务器进行同源建模,得到其活性区的空间结构. 其中,Cry1Aa和Cry1Ac已测得晶体结构,其PDB ID分别为IC1Y和4ARY. 因为Cry1Ac晶体结构带有配体,所以它不适合作为建模的模板,对它进行同源建模,Cry1A类蛋白的结构皆以Cry1Aa为模板进行预测.

1.2.2 构效关系分析 在蛋白质三级结构分析软件PyMOL中,打开9个Cry1A类杀虫晶体蛋白成员三级结构,读取二级结构,并进行三级结构之间的比对.

2 结果与分析

2.1 二级结构的特征分析

Cry1A类蛋白共有9种成员,对各个代表蛋白质进行二级结构元件描述. 结果显示,Domain I非常保守,与其他种蛋白相比,Cry1Aa在螺旋 $\alpha 7$ 上被loop分为2个螺旋,Cry1Af在 $\alpha 5$ 上被loop分为2个螺旋;Domain II则差异较大,主要差异体现在结构元件 $\alpha 9, \beta 4, \beta 6b, \beta 8, \beta 11b$ 和 $\alpha 11$ 上,Cry1Ab,Cry1Ae和Cry1Af在二级结构元件上完全一致,Cry1Ah和Cry1Ai在二级结构元件上也完全一致,其他成员在二级结构元件上都有差异;Domain III相对较保守,其中,Cry1Ab,Cry1Ad,Cry1Ae,Cry1Af和Cry1Ag在结构元件上完全一致,Cry1Ah和Cry1Ai在结构元件上也完全一致.

2.2 Cry1A不同成员间活性区空间结构差异分析

2.2.1 Domain I结构差异 Cry1A不同成员间的Domain I氨基酸序列比较结果,如图1所示. 由图1可知:Cry1Aa和Cry1Af有9个螺旋,而其他成员只有8个螺旋,原因是Cry1Aa和Cry1Af第184~200位的氨基酸与其他成员相比差异很大,导致Cry1Aa和Cry1Af在175~179位比其他成员多了1个螺旋.Cry1Ab和Cry1Ad的Domain I完全重叠,而其他成员的Domain I结构走向与相似度非常高.

Cry1Ab与Cry1Af的Domain I结构比对,如图2所示. 其他成员因与这两个成员非常类似,因此,未在图2中表示.

2.2.2 Domain II结构差异 Cry1A不同成员间的Domain II结构差异主要体现在loop上,其比对结果如图3所示. 由图3可知:Cry1Ab与Cry1Af完全重合;差异较小的分别是Cry1Aa,Cry1Ab,Cry1Ae与Cry1Af,Cry1Ac与Cry1Ah,其他两两成员之间的结构差异较大,几乎无法重合.

Cry1A不同成员间Domain II的氨基酸序列比对,如图4所示. 由图4可知:Cry1Aa,Cry1Ac,Cry1Ag,Cry1Ah和Cry1Ai与其他成员相比,有1个很显著的差异. 前者的348~351氨基酸表现为 β

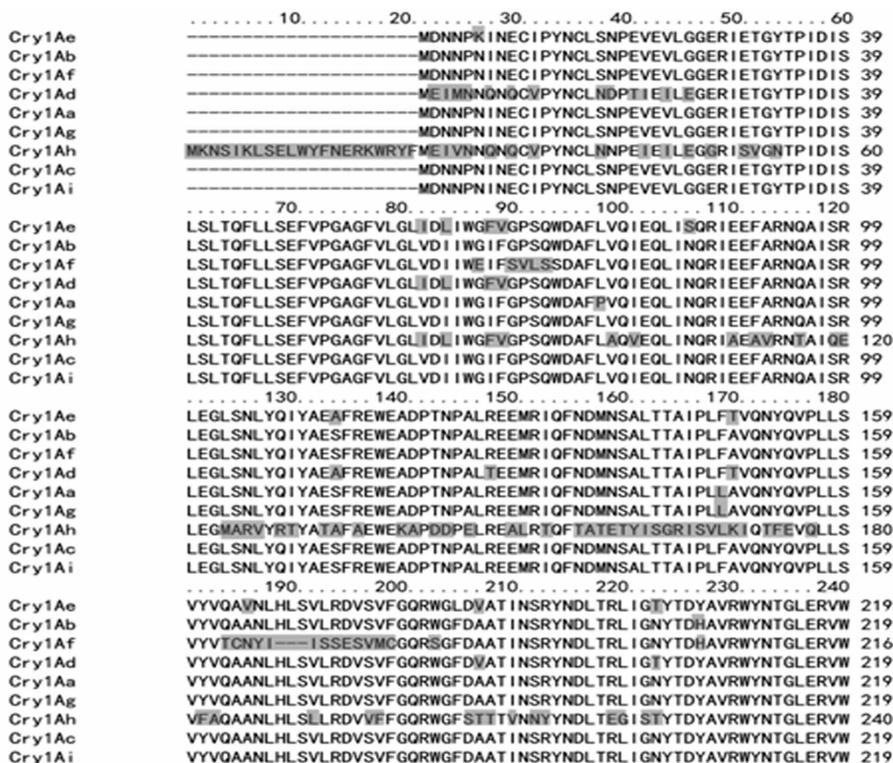


图 1 Cry1A 型不同成员 Domain I 氨基酸序列比对结果

Fig. 1 Sequence alignment of Domain I of Cry1A proteins

片层,后者则为无规则卷曲,原因是 343 位氨基酸存在差异.虽然 β 片层的核心区相似度非常高,但是连接相邻 β 片层的 loop 却表现出巨大的差异.氨基酸在 368~380 位、391~397 位、435 位、440 位、442 位和 447 位的不同是造成这些差异的主要原因.

Cry1Aa, Cry1Ab 与 Cry1Ae 的差异主要体现在 loops $\beta 5-\beta 6$, $\beta 6-\beta 7$ 和 $\beta 10-\beta 11$, 表现为卷曲方式和长度差异; Cry1Ab 与 Cry1Ae 在 loops $\beta 5-\beta 6$, $\beta 6-\beta 7$ 存在差异.

2.2.3 Domain III 结构非常保守 Cry1A 不同成员间 Domain III 空间结构比对结果,如图 5 所示.由图 5 可知: Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ae 和 Cry1Af 完全重合,其对应的

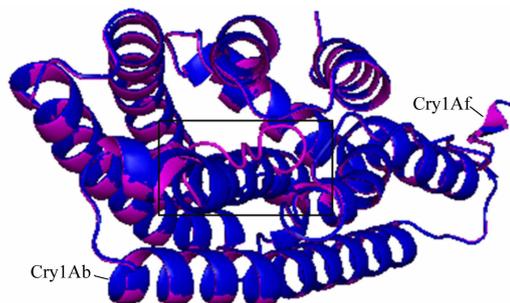
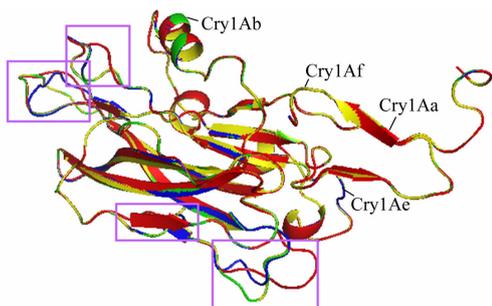
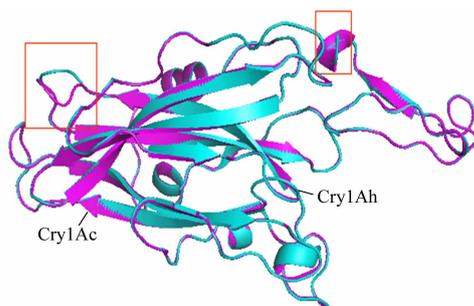


图 2 Cry1Ab 与 Cry1Af 的 Domain I 结构对比

Fig. 2 Structural comparison of Domain I between Cry1Ab and Cry1Af



(a) Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ae 与 Cry1Af



(b) Cry1Ac 与 Cry1Ah

图 3 Cry1A 不同成员间 Domain II 结构比对

Fig. 3 Structural comparison of Domain II among Cry1A proteins

氨基酸序列差异非常小,其中, Cry1Aa 和 Cry1Ab 完全一致. Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ae 和 Cry1Af 与其他 5 个 Cry1A 成员存在较大差异.因此, Cry1A 型杀虫晶体蛋白可据此划分成 2 个亚型: Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ae 和 Cry1Af 为一个亚型,以 Cry1Ab 为代表;其他 4 个成员归为另一个亚型. 2 个亚型比

较结果表明, Domain III 的结构相对 Domain I 和 Domain II 较为保守. 特别地, 虽然 Cry1Ah 和 Cry1Ai 的 Domain III 氨基酸序列同源性非常高, 但其三级结构差异却很大.

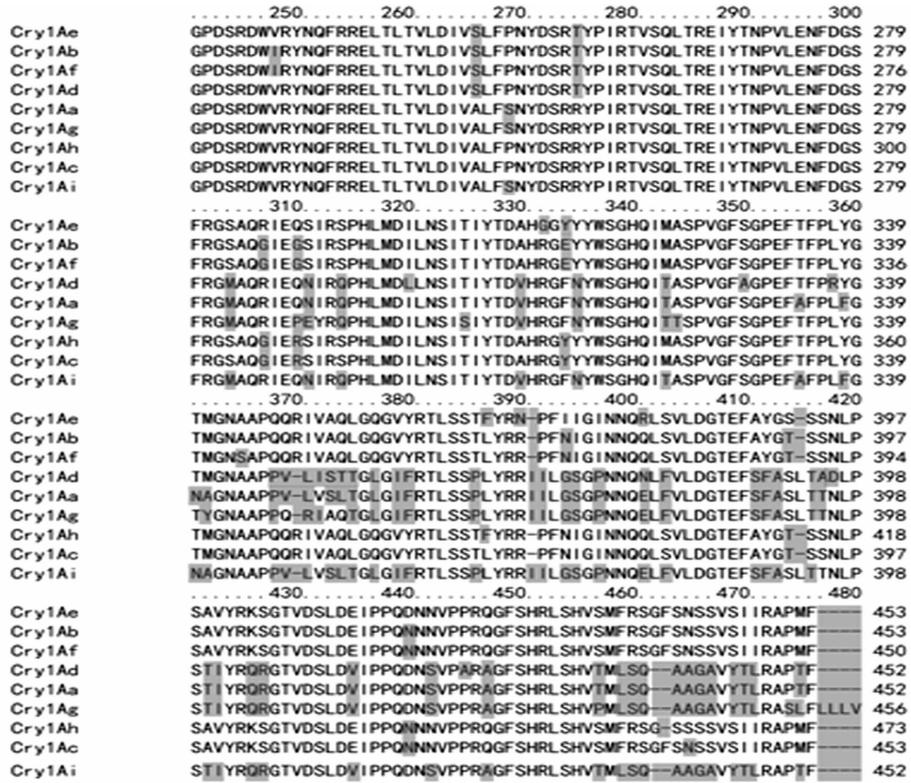


图4 Cry1A 不同成员间 Domain II 的氨基酸序列比对结果
Fig. 4 Sequence alignment of Domain II of Cry1A proteins

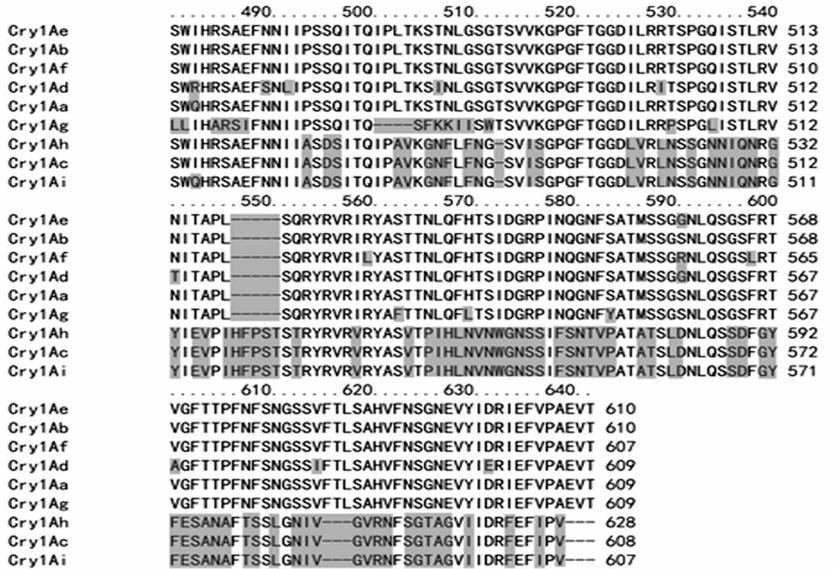


图5 Cry1A 不同成员 Domain III 氨基酸序列比对结果
Fig. 5 Sequence alignment of Domain III of Cry1A proteins

3 讨论

Cry 蛋白的 Domain I 参与了杀虫晶体蛋白在昆虫中肠细胞的膜表面形成孔道; 亲水氨基酸残基暴露在蛋白表面, 疏水残基尤其是芳香族氨基酸则被包裹在蛋白内侧, 指向位于中心的 α -5 螺旋^[14]. 与天然 Cry1A 类蛋白相比, 去除掉 α -1 和部分 α -2 的改造 Cry1A 类蛋白具有更高毒力且扩大了杀虫谱. 这是由于改造后的蛋白不用与钙黏蛋白进行结合, 而是直接简易地形成聚合物^[15-16]. 对 Domain I 螺旋上

的一些氨基酸位点进行突变,发现成孔能力有所改变,导致杀虫活性有一定的变化^[17-20]。文中研究结果表明:Cry1A 不同成员之间的 Domain I 相当保守,Cry1A 类蛋白的成孔能力及与钙黏蛋白结合的能力相差不大,Cry1Af 的 Domain I 在螺旋 α -5 处与其他成员存在明显差异,可能会导致 Cry1Af 有特殊的活性,但目前没有相关的活性信息。

许多研究表明,Domain II 结构的 loop 上,氨基酸的突变会改变杀虫晶体蛋白的活性。Cry1Aa 的 loop β 10~loop β 11 中,Y445C 的突变降低了其与 BtR175 受体的结合,从而导致了 Cry1Aa 对家蚕的毒性显著降低^[21]。Cry1Ab 的 loop 2 上 N372A 的突变,使 Cry1Ab 对舞毒蛾的毒性大大增加^[22]。将 Cry4Aa 的 loop 3 取代 Cry1Aa 的 loop 3 后发现,Cry1Aa 对蚊虫有毒性,这说明 loop 对活性产生较大的影响^[23]。将 Cry1Ah 和 Cry1Ai 的 loop 2 进行交换,发现 Cry1Ai 获得了对棉铃虫的杀虫活性,而 Cry1Ah 则失去了对棉铃虫的杀虫活性,但 loop 2 的互换并没有改变两种蛋白对家蚕的原有活性,这说明 Domain II 的 loop 2 与棉铃虫杀虫特异性密切相关。而两个蛋白的 loop 3 互换时,不但没有使 Cry1Ai 获得对棉铃虫的杀虫活性,反而导致 Cry1Ah 失去了对棉铃虫的杀虫活性,这说明 loop 3 对 Cry1Ah 和 Cry1Ai 保持原有的棉铃虫的杀虫活性比较重要^[24]。Cry1A 不同成员之间的 loop 差异较为明显,且现有活性信息也显示 loop 对 Cry1A 活性有影响,Cry1Aa 与 Cry1Ae 因 loop 上的差异表现出截然不同的活性,而 Cry1Aa 与 Cry1Ab 的 loop 差异未在现有活性信息中体现。

Cry 蛋白的 Domain III 可能有 2 个功能:保持结构的完整性;引导毒素蛋白的 Domain II 的特异性受体结合^[25]。将 Cry1Ab 的 Domain III 替换为 Cry1Ca 的 Domain III 后,对甜菜夜蛾的活性有所提升^[26]。Cry1Aa 与 Cry1Ac 或 Cry1Aa 与 Cry1Ab Domain III 互换实验,表明 Domain III 影响毒性和受体结合能力^[27-28]。文中研究结果显示,Cry1Aa,Cry1Ab,Cry1Ad,Cry1Ae 和 Cry1Af 的 Domain III 完全重合,而与其他 4 个 Cry1A 杀虫晶体蛋白成员差异较大。Cry1Aa,Cry1Ab 和 Cry1Ad 都对甜菜夜蛾有活性,结合 Domain II 的构效分析,推测 Cry1Af 对甜菜夜蛾也可能有活性。

参考文献:

- [1] DE MAAGD R A, BRAVO A, BERRY C, et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria[J]. Annual Review of Genetics, 2003, 37(1): 409-433.
- [2] SCHNEPF E, CRICKMORE N, VAN RIE J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3): 775-806.
- [3] SHIMIZU T, MORIKAWA K. The beta-prism: A new folding motif[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1996, 21(1): 3-6.
- [4] GRPCHULSKI P, MASSON L, BORISOVA S, et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation[J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 254(3): 447-464.
- [5] DERBYSHIRE D J, ELLAR D J, LI J. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine[J]. Acta crystallographica, 2001, 57(12): 1938-1944.
- [6] PARDO-LÓPEZ L, SOBERÓN M, BRAVO A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection[J]. Fems Microbiology Reviews, 2013, 37(1): 3-22.
- [7] VACHON V, LAPRADE R, SCHWARTZ J L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 111(1): 1-12.
- [8] ARENAS I, BRAVO A, SOBERÓN M, et al. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(17): 12497-12503.
- [9] KNIGHT P J, CRICKMORE N, ELLAR D J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N[J]. Molecular Microbiology, 1994, 11(3): 429-436.
- [10] PIGOTT C R, ELLAR D J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, 71(2): 255-281.
- [11] VADLAMUDI R K, WEBER E, JI I, et al. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(10): 5490-5494.
- [12] RIE J V. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies[J]. International Journal of

- Medical Microbiology, 2000, 290(4/5): 463-469.
- [13] LUCENA W A, PELEGRINI P B, MARTINS-DE-SA D, et al. Molecular approaches to improve the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins[J]. Toxins (Basel), 2014, 6(8): 2393-2423.
- [14] LI J D, CARROLL J, ELLAR D J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution[J]. Nature, 1991, 353(6347): 815-821.
- [15] MUÑOZ-GARAY C, PORTUGAL L, PARDO-LÓPEZ L, et al. Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1788(10): 2229-2237.
- [16] SOBERÓN M, PARDO-LÓPEZ L, LÓPEZ I, et al. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance[J]. Science, 2007, 318(5856): 1640-1642.
- [17] GIRARD F, VACHON V, LEBEL G, et al. Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1788(2): 575-580.
- [18] VACHON V, PRÉFONTAINE G, RANG C, et al. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 6123-6130.
- [19] JIMÉNEZ-JUÁREZ N, MUÑOZ-GARAY C, GÓMEZ I, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(29): 21222-21229.
- [20] RODRÍGUEZ-ALMAZÁN C, ZAVALA L E, MUÑOZ-GARAY C, et al. Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: Demonstration of the role of oligomerization in toxicity[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5545.
- [21] ATSUMI S, INOUE Y, ISHIZAKA T, et al. Location of the *Bombyx mori* 175kDa cadherin-like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin[J]. The FEBS Journal, 2008, 275(19): 4913-4926.
- [22] RAJAMOCHAN F, ALZATE O, COTRILL J A, et al. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(25): 14338-14343.
- [23] ABDULLAH M A, ALZATE O, MOHAMMAD M, et al. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5343-5453.
- [24] 周子珊. Cry1Ah 蛋白杀虫特异性分子机制的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 37-38.
- [25] SAMSOMEMEA E, VÁZQUEZ C, ORTIZ A. Genetic manipulation in *Bacillus thuringiensis* for strain improvement[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(11): 1549-1557.
- [26] DE MAAGD R A, WEEMEN-HENDRIKS M, STIEKEMA W, et al. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(4): 1559-1563.
- [27] DE MAAGD R A, KWA M S, VANDER K H, et al. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(5): 1537-1543.
- [28] LEE M K, YOUNG B A, DEAN D H. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 216(1): 306-312.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)