农药学学报, 2005, 7(4): 311-315
Chinese Journal of Pesticide Science

·研究论文·

除草剂靶酶—AHAS酶及基因突变体与除草剂设计(Ⅱ). AHAS及W464突变酶与除草活性分子的相互作用

席 真[1*], 牛聪伟[1], 班树荣[1], 李庆霞[1], 欧阳砥[1], 黄明智[2]

(1. 南开大学 元素有机化学研究所,元素有机化学国家重点实验室,化学生物学系,天津 300071;
2. 湖南化工研究院,湖南 长沙 410007)

摘 要:乙酰羟基酸合成酶(AHAS)是磺酰脲类、咪唑啉酮类、三唑嘧啶磺酰胺类及水杨酸类除草剂的作用靶标,大田使用中杂草对这几类除草剂产生抗性的主要因素是AHAS酶的突变。利用大肠杆菌AHAS Ⅱ中464位的色氨酸突变体(W464A、W464F、W464L、W464Y),研究了野生型和突变酶对商品化除草剂(氯嘧磺隆、氯磺隆、咪唑乙烟酸、咪唑喹啉酸)以及烷硫基磺酰脲的敏感性。野生型E. coli AHAS Ⅱ对这些化合物的抑制作用较为敏感,而突变酶对其呈现出不同程度的抗性,使商品化除草剂的抑制常数增加了10～1.0×10^4倍不等,烷硫基磺酰脲的抑制常数增加幅度较小。烷硫基磺酰脲**1a**对W464L突变酶的高抑制活性,暗示着发展针对靶酶抗性的除草剂的可能性。

关键词:乙酰羟基酸合成酶;除草剂;抗性;抑制
中图分类号: Q946.5 **文献标识码**: A **文章编号**: 1008-7303(2005)04-0311-05

Studies on Herbicide Design through Mutation on Herbicidal Target Acetohydroxyacid Synthase (Ⅱ). Effects of mutagenesis at tryptophan 464 of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase Ⅱ on herbicidal molecules

XI Zhen[1*], NIU Cong-wei[1], BAN Shu-rong[1], LI Qing-xia[1], OUYANG Di[1], HUANG Ming-zhi[2]

(1. Elemento Organic Chemistry Institute, State-Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, Department of Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China;
2. Hunan Research Institute of Chemical Industry, Changsha 410007, China)

Abstract: Acetohydroxyacid synthase (AHAS) is a target for sulfonylurea and imidazolinone herbicides. Resistance to sulfonylurea and imidazolinone herbicides can occur by mutation in AHAS. Four E. coli AHAS Ⅱ mutants (W464A, W464F, W464L, W464Y) and wild type were characterized for the sensitivities to commercial inhibitors (chlorimuron ethyl, chlorsulfuron, imazethapyr, imazaquin) and some newly synthesized alkylthio-containing sulfonylureas. Wild type enzyme showed it was sensitive to these herbicidal compounds. The mutants showed they were resistant to the commercial sulfonylureas

收稿日期: 2005-04-30; **修回日期**: 2005-06-01.
作者简介: *席真(1963-),男,通讯作者,博士,教授,主要从事农药化学生物学研究. **联系电话**: 022-23504782; **E-mail:** zhenxi@nankai.edu.cn
基金项目:国家重点基础研究发展规划(973计划)(2003CB114400);国家自然科学基金项目(20432010, 20372021).

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

with the increases of K_i^{app} values from dozens to several thousand fold. Substantial differences were observed in the sensitivity of wild type and mutant enzymes to these various inhibitors. Alkylthio-containing sulfonylureas seem they met relatively weak resistance by W464 mutant enzymes.

Key words: acetohydroxyacid synthase; herbicidal inhibition; herbicide resistance

乙酰羟基酸合成酶 (AHAS, EC 2.2.1.6)在细菌、酵母、植物中催化支链氨基酸的生物合成,它是几类商品化除草剂如磺酰脲类、咪唑啉酮类、三唑嘧啶磺酰胺类以及水杨酸类等的作用靶标[1,2]。

由于在大田中重复使用除草剂,导致杂草的抗性表型出现。一般表现为靶酶与除草剂的结合部位发生了变化,与除草剂的结合性能降低。大部分特征化的除草剂抗性所依赖的分子基础是源于野生型酶序列中单个氨基酸的变化,这些变化主要集中于 AHAS酶的 5个结构域中,它们所在的位点在对除草剂敏感的酶中是高度保守的。在实验室或大田中通过诱发、自然突变或随机突变得到了来自于植物和细菌的除草剂 ——抗性点突变,这些突变演绎出来的 AHAS酶对一种或多种除草剂表现出抗性[4]。

作者已经构建了大肠杆菌 AHAS Ⅱ的 W464位点的 4个突变体,考察了这些突变酶以及野生型的 AHAS酶的动力学性质[3]。在本研究中,作者详细考察了这 4个突变酶以及野生型的 AHAS酶与除草活性分子 (包括氯嘧磺隆、氯磺隆、咪唑乙烟酸、咪唑喹啉酸以及新合成的烷硫基磺酰脲)之间的相互作用。

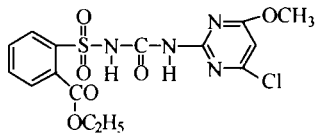
1 材料与方法

1.1 定点突变

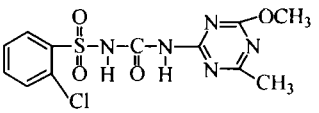
参照文献[3]及文献[5]进行。

1.2 供试化合物

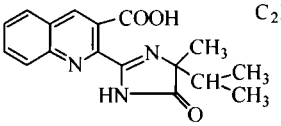
氯嘧磺隆 (chlorimuron ethyl, CE), 氯磺隆 (chlorsulfuron, CS),咪唑喹啉酸 (imazaquin, IQ),咪唑乙烟酸 (imazethapyr, IM),纯度均在 95%以上,由南开大学元素有机化学研究所提供。新合成的烷硫基磺酰脲结构 (表 1)通过 ^{1}H NMR、^{13}C NMR、LC-MS等方法进行了验证。



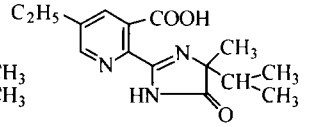
chlorimuron ethyl(CE)



chlorsulfuron(CS)

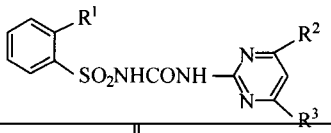


imazaquin(IQ)



imazethapyr(IM)

Table 1 Alkylthio-containing sulfonylureas used herein



Compd.	R^1	R^2	R^3	Compd.	R^1	R^2	R^3
1a	Cl	SC_2H_5	OCH_3	**1d**	Cl	SC_2H_5	CH_3
1b	Cl	$SCH(CH_3)_2$	OCH_3	**1e**	Cl	$SCH(CH_3)_2$	CH_3
1c	Cl	SCH_3	CH_3	**1f**	Cl	$SCH_2CH_2CH_3$	CH_3

1.3 E. coli AHAS酶的表达及酶活性测定

E. coli AHAS Ⅱ野生型及突变体的表达按照文献[6]的方法进行。AHAS Ⅱ酶活性以及化合物的筛选在 Westerfeld[7]和 Singh等[8]方法的基础上稍有改进。化合物用 DMSO溶解,控制 DMSO在反应体系中的体积分数不超过 4%。反应液中含有 50 mmol/L磷酸钾缓冲液 (pH 7.5), 10 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L 硫胺素焦磷酸 (ThDP), 10 μmol/L 黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD), 100 mmol/L 丙酮酸,以及各种浓度的化合物。每个化合物的抑制常数至少重复测定 2～4次。

1.4 数据处理

化合物的抑制常数 K_i^{app} 值通过方程 (1)拟合得到。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$v_i = v_\infty + (v_0 - v_\infty) / (1 + [I] / K_i^{app}) \quad (1)$$

v_i和 v_0分别表示在抑制剂存在和不存在情况下酶的速率(这里可以用相对活性表示);[I]表示抑制剂的浓度;K_i^{app}为 apparent K_i,即表观抑制常数,也就是抑制剂抑制了 AHAS酶 50%的活性时所对应的浓度。如果测定结果表明,在饱和的抑制剂浓度下,酶几乎没有活性,可以设定 $v_\infty = 0$,再通过方程(1)拟合得出 K_i^{app}值。

2　结果与讨论

经过 DNA 测序,验证了在大肠杆菌 E. coli AHAS Ⅱ的 W464位点成功地引入点突变。在 E. coli XL1-Blue中表达了野生型和突变型 AHAS Ⅱ酶,并考察了它们与除草活性分子之间的相互作用。所使用的小分子化合物包括:两个磺酰脲类除草剂 CE、CS;两个咪唑啉酮类除草剂(M、IQ);新烷硫基磺酰脲是以氯磺隆的结构为模板,通过对其杂环部分进行改造得到的。

这些化合物对野生型和突变型 E. coli AHAS Ⅱ酶的离体活性及 K_i^{app}值见表 2。磺酰脲类除草剂 CS和新化合物 **1c**对野生型和突变型 E. coli AHAS Ⅱ典型的抑制曲线见图 1。这些曲线按照方程(1)拟合得到。

Table 2　K_i^{app} of the tested compounds by the wild-type AHAS Ⅱ and its W464 mutants

Compd.	K_i^{app} /mol·L^{-1}				
	Wild-type	W464A	W464F	W464L	W464Y
Imazethapyr	(8.71 ±2.0) ×10^{-4}	(1.13 ±0.18) ×10^{-2}	1.13 ×10^{-2}	>6.6 ×10^{-3}	(4.29 ±0.89) ×10^{-2}
Imazaquin	(1.86 ±0.23) ×10^{-4}	(7.13 ±1.26) ×10^{-3}	3.16 ×10^{-2}	(3.87 ±0.86) ×10^{-3}	>1.0 ×10^{-2}
Chlorimuron ethyl	(2.21 ±0.64) ×10^{-8}	(3.54 ±0.43) ×10^{-5}	(1.91 ±0.39) ×10^{-6}	(4.78 ±1.53) ×10^{-5}	>2.62 ×10^{-4}
Chlorsulfuron	(3.25 ±0.51) ×10^{-7}	>5.6 ×10^{-4}	>1.19 ×10^{-3}	(2.84 ±0.61) ×10^{-3}	(1.39 ±0.16) ×10^{-3}
1a	(4.07 ±1.96) ×10^{-6}	(1.82 ±0.73) ×10^{-6}	(1.31 ±0.25) ×10^{-6}	(1.15 ±0.15) ×10^{-6}	(2.75 ±0.29) ×10^{-7}
1b	(7.42 ±1.20) ×10^{-5}	(1.32 ±0.20) ×10^{-4}	(6.38 ±0.13) ×10^{-4}	(7.74 ±0.56) ×10^{-5}	(2.09 ±0.62) ×10^{-4}
1c	(7.01 ±1.78) ×10^{-6}	(4.29 ±0.37) ×10^{-4}	(1.86 ±0.11) ×10^{-5}	(1.23 ±0.10) ×10^{-5}	(1.57 ±0.22) ×10^{-4}
1d	(3.80 ±1.26) ×10^{-5}	(2.55 ±0.28) ×10^{-4}	(2.61 ±0.34) ×10^{-4}	(7.67 ±0.81) ×10^{-5}	(7.98 ±1.04) ×10^{-5}
1e	>2 ×10^{-3}	(2.67 ±0.17) ×10^{-4}	(2.77 ±0.30) ×10^{-4}	(2.23 ±0.18) ×10^{-4}	(1.14 ±0.18) ×10^{-4}
1f	(3.04 ±0.80) ×10^{-4}	(2.47 ±0.13) ×10^{-4}	(1.45 ±0.83) ×10^{-5}	(1.73 ±0.18) ×10^{-4}	(4.72 ±0.17) ×10^{-5}

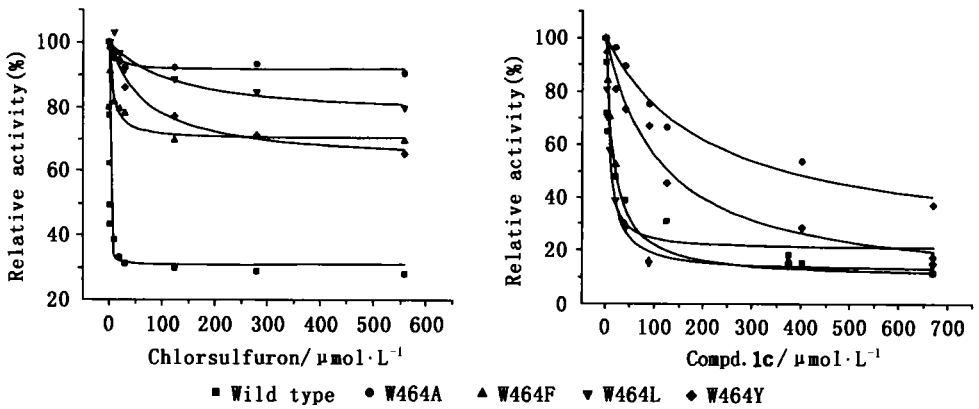


Fig. 1　The typical inhibition curves of the wild-type E. coli AHAS Ⅱ and its W464 mutants by chlorsulfuron and alkylthio-containing sulfonylurea **1c**

表 2中的抑制常数大于某个数值是表示在该化合物测试过程中,在最高浓度下,AHAS酶活性仅下降了 10%～20%,从而无法估计出抑制常数,所以用该浓度来表示。如在图 2中,在 560 μmol/L 的氯磺隆存在下,W464L 突变体的酶活性只下降了 10%,所以估计 CS 对 W464A 的 K_i^{app}大于 560 μmol/L。采用 K_i^{app}(突变体)与 K_i^{app}(野生型)的比值表示抗性,即抗性因子(resistance factors, RF) = [K_i^{app}(突变体)/K_i^{app}(野生型)](见表 3),RF值越大,说明酶的点突变对酶抑制剂的抑制活

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

性影响越大,与野生型酶比较,该突变酶对酶抑制剂越不敏感,或者说,抑制剂对酶渐渐失去抑制活性。

从表 2中化合物的抑制常数可以看出,野生型的 E. coli AHAS Ⅱ对所测试化合物的抑制是敏感的。两个咪唑啉酮类除草剂的抑制常数在 10 μmol/L 级别,而两个磺酰脲类除草剂的抑制常数在几十个 nmol/L 级别。所合成化合物的抑制常数比商品化除草剂的稍弱一些。杂环上的 R^2 基团影响化合物的活性。化合物 **1c**除 R^2 基团不同外与氯磺隆的结构相似,在 **1c**中 R^2 是 SCH_3,而在氯磺隆中是 OCH_3, **1c**的抑制常数比氯磺隆高一个数量级,这可能是由于 SCH_3 在给电子能力及空间取向上异于 OCH_3 的缘故。另外化合物 **1a**和 **1b**以及 **1c**、**1d**、**1e**、**1f**这两组化合物,除 R^2 基团不同外,其余结构相似。当 **1a**的 SC_2H_5 变成 **1c**的 $SCH(CH_3)_2$ 时,化合物的活性略有下降。R^2 基团在第二组化合物中分别为 SCH_3、SC_2H_5、$SCH(CH_3)_2$和 $SCH_2CH_2CH_3$,化合物的活性由高到低的顺序为 **1c** > **1d** > **1f** > **1e**。可见,随着 R^2 取代基体积的增大,化合物的活性降低。

Table 3 The resistance values of E. coli AHAS Ⅱ W 464 mutants to the tested herbicidal compounds

Compd.	RF			
	W 464A	W 464F	W 464L	W 464Y
Imazethapyr	13	13	> 7. 6	49. 3
Imazaquin	38. 3	170	20. 8	> 54
Chlorimuron ethyl	1 602	86. 4	2 163	> 11 855
Chlorsulfuron	> 1 723	> 3 661	8 738	4 277
1a	0. 45	0. 32	0. 28	0. 067
1b	1. 78	8. 60	1. 04	2. 82
1c	61. 2	2. 65	1. 75	22. 4
1d	6. 71	6. 87	2. 02	2. 1
1e	0. 13	0. 14	0. 11	0. 06
1f	0. 81	0. 048	0. 57	0. 16

Note: RF = [K_i^{app} (mutant) / K_i^{app} (wild type)]

从表 3中可以看出, 4个突变体对测试的商品化除草剂表现出很强的抗性,抗性因子 RF 从 10倍到 1 ×10^4 倍不等。一般来说, W 464突变酶对咪唑啉酮类除草剂的抗性弱于对磺酰脲类除草剂, RF一般小于 100,可能 W 464位点与咪唑啉酮类除草剂的结合位点有一定的距离,这类抗性的产生可能主要来源于点突变造成的酶结合口袋的整体调整[9]。突变酶对磺酰脲类除草剂 (CE、CS)的 RF变化极大,其值一般大于 1 000,说明 W 464位点是磺酰脲类除草剂的结合位点,该点的结构变化直接影响酶抑制剂的有效结合。W 464点突变酶对 CE的抗性变化从 RF为 86 (W 464F)、1 600 (W 464A)、2 200 (W 464L)到 12 000 (W 464Y)。AHAS酶 464位色氨酸 (W)突变为酪氨酸 (Y)造成最大变化,酪氨酸突变基本改变了酶对 CE的结合。色氨酸 (W)突变为苯丙氨酸 (F)造成变化最小,可能与色氨酸和苯丙氨酸中的芳香基团的疏水堆积作用有关。尽管酪氨酸仅比苯丙氨酸多一个酚羟基,显然酪氨酸因其电负性造成酶结构变化较大 (W 464Y酶的比活性远低于野生型)。

W 464点突变酶对合成的烷硫基磺酰脲表现出来的抗性不大。W 464A 和 W 464Y对化合物 **1c**有 20到 60倍的抗性。其他突变体对化合物的作用,有的表现得与野生型酶一样,如化合物 **1b**和 **1d**对突变体的抑制与野生型相当;而 **1a**、**1e**和 **1f**对突变体的抑制能力比对野生型还好,而且对突变体 W 464F、W 464Y的抑制常数小于对 W 464A、W 464L 突变体的抑制常数。在同类化合物中, **1a**和 **1e**的取代基 R^2 是体积最小的 SCH_3。总的来说, W 464突变酶对烷硫基磺酰脲保持相当敏感,可能与烷硫基取向偏离于 W 464位点有关,其具体原因有待于进一步研究。结合最近报道的磺酰脲类除草剂与酵母 AHAS酶催化亚基的复合物晶体结构可以看出,磺酰脲与酵母中 AHAS酶的 W 586 (W 464, E. coli AHAS Ⅱ)有很多相互作用[10]。磺酰脲的构象取向能影响磺酰脲与具体酶残基的相互作用。W 464突变酶对烷硫基磺酰脲的敏感性,说明有可能设计出没有交互抗性的新型除草剂。

应该提到的是,对除草剂抗性的定义是相当模糊的,尚没有一个精确的分界线来描述除草剂敏感性和靶酶抗性[11]。根据文献 [11],作者以 RF = 5作为分界线。虽然除草剂对突变酶的抑制能力下降,但这些突变酶对烷硫基磺酰脲没有表现出很高的抗性。W 574L 突变 (A. thaliana序列)是报道过的对除草剂产生抗性的位点[11]。当 W 574突变成亮氨酸时,对除草剂产生抗性的杂草有苍耳 (Xantbium strumarium L.)、waterhemp (Amarantbus rudis Sauer)、kochia (Kocbia scoparia)等[12],这些杂草对磺酰脲类和咪唑啉酮类有大于 10倍的抗性。本实验进一步验证了 W 464位点

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(E. coli AHAS Ⅱ序列)是与除草剂结合的位点。实验结果发现,突变酶对除草剂的离体抗性远远大于活体抗性。本研究中,烷硫基磺酰脲 1a 对 W464L 突变酶(此酶对商品化磺酰脲除草剂有高抗性)依然保持高抑制活性,说明 1a 可以用于避免交互抗性除草剂的设计。对抗性酶分子作用机制的研究,可为新农药的分子设计提供更细致的理论指导。

参考文献:

[1] Schloss J V. Chemistry and Plant Production: Herbicides Inhibiting Branched Chain Amino Acid Biosynthesis——Recent Developments (Setter J, Ed.) [A in M]. Springer-Verlag, Berlin, 1994. 3-14.

[2] Chaleff R S, Mauvaris C J. Acetolactate synthase is the site of action of sulfonylurea herbicides in higher plants [J]. Science, 1984, 224: 1443-1445.

[3] XI Zhen(席真), NIU Cong-wei(牛聪伟), LI Qing-xia(李庆霞), et al. 除草剂靶酶 —AHAS酶及基因突变体与除草剂设计(I). 野生型和突变型 E. coli AHAS Ⅱ酶动力学性质的系统研究 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学学报), 2005, 7(3): 215-220.

[4] Devine M D, Shukla A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance [J]. Crop Prot, 2000, 19: 881-889.

[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[6] Engel S, Vyazmensky M, Vinogradov M, et al. Role of a conserved arginine in the mechanism of acetohydroxyacid synthase [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 24803-24812.

[7] Westerfeld W W. A colorimetric determination of blood acetoin [J]. J Biol Chem, 1945, 161: 495-502.

[8] Singh B K, Stidham M A, Shaner D L. Assay of acetohydroxyacid synthase [J]. Anal Biochem, 1988, 171: 173-179.

[9] Pang S S, Duggleby R G, Guddat L W. Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors [J]. J Mol Biol, 2002, 317: 249-262.

[10] McCourt J A, Pang S S, Guddat L W, et al. Elucidating the specificity of binding of sulfonylurea herbicides to acetohydroxyacid synthase [J]. Biochemistry, 2005, 44: 2330-2338.

[11] Duggleby R G, Pang S S. Acetohydroxyacid synthase [J]. J Biochem Mol Biol, 2000, 33: 1-36.

[12] Tranel P J, Wright T R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? [J]. Weed Sci, 2002, 50: 700-712.

(Ed. JIN S H)

欢迎订阅　第 8 卷《农药学学报》(2006)

邮发代号** 2-949　A4 **开本**　96 **页**　**彩色四封

《农药学学报》是中国农业大学主办的、国内外公开发行的农药学综合性学术期刊,"中国科技核心期刊"。主要面向农药研究工作者、植保工作者及大专院校师生。旨在及时、全面报道农药学各分支学科有创造性的最新研究成果与综合评述,是了解我国农药研究动态的理想园地。

本刊现设 3个栏目:专论与综述、研究论文及研究简报。所发表的论文涵盖了农药学所有分支领域,主要包括合成与构效关系、分析与残留、环境与毒理、作用机制研究、制剂加工及应用等。

本刊现已被美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《动物学记录》以及汤姆森科技信息集团(Thomson Scientific)等 10家国外重要检索机构收录,同时是《中国科学引文数据库扩展库》等多家国内重要数据库的来源期刊。2004年,本刊荣获了教育部科技司"全国高校优秀期刊评比·优秀编辑出版质量奖",并获得了"2002～2004年度第四届全国优秀农业期刊评选·学术类期刊二等奖"。

《农药学学报》现为 A4开本,全国统一邮政发行(邮发代号 2-949),国内定价 15元,全年 4期共 60元。订户可通过当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部索取订单或直接从邮局汇款购买(1999～2005年已出版期刊,本编辑部还有少量库存,欢迎订阅,价格优惠 20%)。

汇款请寄:北京海淀区圆明园西路 2号中国农业大学理学院应用化学系《农药学学报》编辑部

邮编: 100094　　**联系人**:唐　静　　**电　话**: 010-62733003

E-mail: nyxuebao@263.net

欢迎单位及个人踊跃订阅!

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net