

祝友朋,陈 摇,韩长志. 胶孢炭疽菌黑色素合成途径中漆酶蛋白生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(6):48-51.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.06.011

胶孢炭疽菌黑色素合成途径中漆酶蛋白生物信息学分析

祝友朋,陈 摇,韩长志

(西南林业大学生物多样性保护与利用学院云南省森林灾害预警与控制重点实验室,云南昆明 650224)

摘要:胶孢炭疽菌可以侵染桃、核桃等诸多重要农林植物,它可引起生产上诸多经济树种的炭疽病,严重威胁着各国农林业的健康生产。植物病原丝状真菌中黑色素合成途径中关键环节漆酶已经在稻瘟病菌、玉米大斑病菌等进行了较为深入的研究,然而尚未见有关胶孢炭疽菌黑色素合成途径中关键环节漆酶的生物信息学分析报道。本研究以胶孢炭疽菌中漆酶 Cg14LAC 氨基酸序列为基础,通过 TargetP、SignalP、ProtComp、Phyre、big - PI Fungal Predictor、SMART、TMHMM 等生物信息学分析工具对上述序列开展蛋白质亚细胞定位、细胞信号肽、二级结构、锚定位点、保守结构域、跨膜结构域等进行分析,同时对上述序列开展与炭疽菌属不同真菌遗传进化关系分析。研究结果为进一步深入开展该蛋白在致病过程中所具有的功能研究打下坚实的理论基础。

关键词:农林植物;胶孢炭疽菌;黑色素;漆酶;生物信息学;遗传进化

中图分类号:S432.4⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)06-0048-04

胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)在分类上属于炭疽菌属真菌,作为引起多种农林业经济作物炭疽病的病原菌之一,可以危害芒果、柿树、草莓、桃树以及核桃等植物^[1]。前人研究较多关注于该菌的形态特征、生活史以及遗传关系、致病基因等方面^[2]。近些年,随着同属于炭疽菌属中的禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)、希金斯炭疽菌(*Colletotrichum higginsianum*)全基因组序列的公布^[3],笔者对上述病菌 G 蛋白信号通路相关蛋白进行生物信息分析,同时,也对该菌中重要的 G 蛋白信号通路调控因子 RGS 蛋白开展生物信息学分析^[4]。

植物病原丝状真菌能否成功侵入寄主植物组织并在其中生长繁殖,是其能否成功导致植物发病的基本条件之一。DHN 黑色素作为植物病原菌重要的毒力因子之一,其合成途径包括 1 个聚酮体合成酶基因、2 个还原酶基因、2 个脱水酶基因以及 1 个漆酶基因^[5]。漆酶作为一种广泛存在于真菌、细菌、昆虫和植物中含铜的多酚氧化酶,能够催化酚类化合物及其衍生物,使之生成相应的苯醌和水^[6]。目前,学术界关于漆酶在植物病原丝状真菌中的报道较多,如稻瘟病菌^[7]、灰霉菌^[8]、玉米大斑病菌^[9]、番茄枯萎病菌^[10]等。漆酶基因

与真菌的生长发育、分生孢子形成、黑色素合成、致病性等相关,但在不同植物病原真菌中的作用差异很大。就炭疽菌属中真菌漆酶基因的研究而言,在西瓜炭疽病病菌(*Colletotrichum orbiculare*)中,漆酶基因 *lac2* 调控附着胞黑色素和分生孢子色素沉着,突变后致病力丧失^[11]。然而,漆酶基因 *lac1* 在黄瓜炭疽菌(*Colletotrichum lagenarium*)中并非是黑色素合成和对寄主致病力的必要因素^[12]。芒果胶孢炭疽菌漆酶基因 *lac1* 不仅可以调控降解芒果组织中的酚类物质、促进病原菌的扩展,也可以通过干扰与致病力相关的黑色素合成和细胞壁降解酶的产生来影响其致病力^[13];推测 *lac2* 可能调控分生孢子萌发,也可能参与调控其漆酶活性和抗氧化反应等^[14]。

目前,对于 *C. gloeosporioides* 黑色素合成途径中关键环节漆酶的生物信息学分析尚未见报道,近些年,随着云南省各地区大面积种植核桃^[15],各地区核桃炭疽病发生较为严重(韩长志等,未发表数据),因此,深入开展该菌黑色素合成相关基因的研究,可以更好地明确病原菌的致病机制^[16],对于进一步深入开展该蛋白在致病过程中所具有的功能具有非常重要的理论指导和生产实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

根据西瓜炭疽菌中已经报道的漆酶蛋白 LAC1、LAC2 序列(蛋白编号为 BAB32575、BAN13563.1)^[11],在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)数据库中进行 BLASTp 比对,获得胶孢炭疽菌 Cg-14 以及 Nara gc5 菌株的 LAC1、LAC2 蛋白序列,分别命名为 Cg14LAC1、Cg14LAC2、CgNLAC1、CgNLAC2。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质转运肽及信号肽预测 利用 TargetP 1.1

收稿日期:2017-12-13

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560211);国家级大学生创新创业训练计划(编号:201610677001);云南省高等学校大学生创新创业训练计划;云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金(编号:ZK150004);云南省高校优势特色重点学科(生物学)建设项目(编号:50097505)。

作者简介:祝友朋(1996—),男,云南曲靖人,E-mail:3420204485@qq.com;共同第一作者:陈 摇(1995—),女,云南昆明人,E-mail:2058278171@qq.com。

通信作者:韩长志,博士,副教授,研究方向为经济林木病害生物防治与真菌分子生物学。E-mail:hanchangzhi2010@163.com。

Server^[17]和 SignalP 4.0 Server^[18]分别实现对蛋白质转运肽的预测、信号肽的预测。

1.2.2 亚细胞定位及锚定位点分析 利用 ProtComp v9.0 和 big-PI Fungal Predictor 分别实现蛋白的定位^[19]、锚定位点情况^[20]。

1.2.3 蛋白质疏水性预测及理化性质分析 利用 ExPASy^[21]实现。

1.2.4 蛋白质保守结构域及跨膜结构域预测 利用 SMART^[22-23]实现对蛋白的保守结构域预测;利用 TMHMM Server v. 2.0^[18]和 HMMTOP version 2.0^[24]、TMpred 等跨膜网站对蛋白质的跨膜区结构进行预测。

1.2.5 二级结构预测 采用 Phyre2 在线分析实现^[25]。

1.2.6 系统进化树构建 在 NCBI 中找寻 Cg14LAC1、Cg14LAC2 的同源序列,利用 ClustalX^[26]进行多重比对分析,随后利用 MEGA 7.0 软件^[27]构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 序列分析

通过对胶孢炭疽菌中 Cg14LAC1、Cg14LAC2、CgNLAC1、CgNLAC2 序列进一步分析,结果表明,Cg14LAC1 比 CgNLAC1 序列多 43 个氨基酸,位置为第 334~376 氨基酸,推测可能原

因在于测序结果不准确或者自然原因丢失,尚不能确定,而 Cg14LAC2 与 CgNLAC2 序列相同。为了更好地开展胶孢炭疽菌中漆酶蛋白的生物信息学分析,因此,本研究选择 Cg14LAC1、Cg14LAC2 进行后续分析。

2.2 转运肽、信号肽以及亚细胞定位、锚定位点预测

通过对 Cg14LAC1 与 Cg14LAC2 的信号肽分析,上述蛋白均具有明显的信号肽序列,位置分别为第 22、23 位和第 23、24 位,最大切割率均为 0.450,上述蛋白均属于分泌蛋白;进一步对其转运肽、亚细胞定位以及锚定位点进行分析,转运肽分析结果表明,上述蛋白均定位在线粒体上,但其预测可靠性概率不同(表 1),同时,亚细胞定位分析结果表明,上述蛋白定位于胞外,可结合在膜上(表 2);尽管如此,通过对上述蛋白进行锚定位点的预测分析,并未发现上述蛋白含有锚定位点。

2.3 疏水性及理化性质分析预测

通过对 Cg14LAC1 与 Cg14LAC2 进行疏水性预测,明确 Cg14LAC1 中位于第 132 位的苏氨酸(T),其亲水性最强(-3.267),而位于第 16 位的亮氨酸(L),疏水性最强(2.044);与 Cg14LAC1 不同,Cg14LAC2 中位于第 375 位的谷氨酰胺(Q),亲水性最强(-2.889);而位于第 15 位的亮氨酸(L),疏水性最强(2.489)(表 3)。

表 1 Cg14LAC1 和 Cg14LAC2 含有潜在转运肽

名称	叶绿体转运肽	线粒体目标肽	分泌途径信号肽	定位情况	预测可靠性
Cg14LAC1	0.251	0.451	0.059	S	0.2~0.4
Cg14LAC2	0.040	0.890	0.091	S	0.6~0.8

表 2 Cg14LAC1 和 Cg14LAC2 亚细胞定位情况

名称	核	质膜	胞外	细胞质	线粒体	内质网	过氧化物酶体	溶酶体	高尔基体	液泡
Cg14LAC1	0.00	0.01	9.97	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Cg14LAC2	0.00	0.00	9.98	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00

表 3 Cg14LAC1 和 Cg14LAC2 疏水性情况

名称	亲水性最强氨基酸残基			疏水性最强氨基酸残基			亲水性氨基酸残基数值总和	疏水性氨基酸残基数值总和
	名称	位置	数值	名称	位置	数值		
Cg14LAC1	T	132	-3.267	L	16	2.044	-351.005	122.570
Cg14LAC2	Q	375	-2.889	L	15	2.489	-287.043	120.767

同时,进一步对 Cg14LAC1 与 Cg14LAC2 蛋白开展理化性质分析,明确其在基本理化性质方面差别不大,其理论等电

点分别为 5.40、5.37,属于酸性范围;上述蛋白的总平均亲水性均为负值,表明上述蛋白均属于亲水性蛋白(表 4)。

表 4 Cg14LAC1 和 Cg14LAC2 基本理化性质

名称	相对分子质量(Du)	理论等电点	负电荷氨基酸残基数(个)	正电荷氨基酸残基数(个)	分子式	原子数量(个)	半衰期(h)	不稳定性系数	脂肪族氨基酸指数	总平均亲水性
Cg14LAC1	65 535.24	5.40	65	41	C _{2 939} H _{4 426} N ₇₈₈ O ₈₈₇ S ₁₇	9 057	30	29.29	74.69	-0.396
Cg14LAC2	65 811.14	5.37	65	44	C _{2 954} H _{4 483} N ₇₉₃ O ₈₇₇ S ₂₁	9 128	30	39.84	77.08	-0.279

一般而言,组成蛋白质的氨基酸种类可以分为酸性氨基酸、碱性氨基酸、非极性 R 基氨基酸以及不带电荷的极性 R 基氨基酸等 4 类。对 Cg14LAC1 与 Cg14LAC2 氨基酸组成进行分析,明确上述蛋白在氨基酸组成方面,无论是数量,还是在所占比例方面均没有太大的差别(表 5)。

2.4 保守结构域及跨膜结构域分析

通过对 Cg14LAC1 与 Cg14LAC2 进行疏水性预测,明确

上述蛋白均不含有保守的结构域;同时,利用 HMMTOP 以及 TMHMM 进行分析,上述蛋白均不具有跨膜区;进一步通过 TMpred 分析,发现 Cg14LAC1 具有 2 个跨膜区,Cg14LAC2 具有 1 个跨膜区(表 6),推测上述跨膜结构应为前期预测的信号肽更为准确。因此,胶孢炭疽菌中 Cg14LAC1 是否具有跨膜区域有待进一步通过生物学试验进行验证,而 Cg14LAC2 不具有跨膜区结构。

表 5 Cg14LAC1 和 Cg14LAC2 氨基酸组成情况

氨基酸类别	氨基酸	Cg14LAC1		Cg14LAC2	
		数量(个)	所占比例(%)	数量(个)	所占比例(%)
酸性氨基酸	Glu(E)	25	4.20	33	5.50
	Asp(D)	40	6.80	32	5.40
碱性氨基酸	Arg(R)	18	3.10	22	3.70
	Lys(K)	23	3.90	22	3.70
	His(H)	25	4.20	20	3.40
非极性 R 氨基酸	Ala(A)	36	6.10	57	9.60
	Val(V)	36	6.10	43	7.20
	Leu(L)	46	7.80	41	6.90
	Ile(I)	31	5.30	30	5.00
	Trp(W)	15	2.50	16	2.70
	Met(M)	10	1.70	15	2.50
	Phe(F)	23	3.90	23	3.90
	Pro(P)	39	6.60	42	7.10
	Gly(G)	50	8.50	42	7.10
	Asn(N)	37	6.30	28	4.70
不带电荷的极性 R 氨基酸	Cys(C)	7	1.20	6	1.00
	Gln(Q)	19	3.20	26	4.40
	Ser(S)	33	5.60	40	6.70
	Thr(T)	53	9.00	36	6.10
	Tyr(Y)	24	4.10	21	3.50

表 6 Cg14LAC1 和 Cg14LAC2 的跨膜情况

名称	起始氨基酸位置 1	终止氨基酸位置 1	起始氨基酸位置 2	终止氨基酸位置 2
Cg14LAC1	5	23	262	285
Cg14LAC2	3	21	—	—

2.5 二级结构预测及组成情况分析

目前,预测蛋白质二级结构的常用方法除 Phyre^[28] 和 PSIPRED^[29] 外,还有 PHD 等方法。上述方法所得结果基本相似,本研究以 Phyre 所分析结果为例,明确胶孢炭疽菌中 Cg14LAC1 和 Cg14LAC2 蛋白含有 α 螺旋、无规则卷曲和 β 转角、TM 螺旋等结构(图 1),各结构所占比例大体相当。

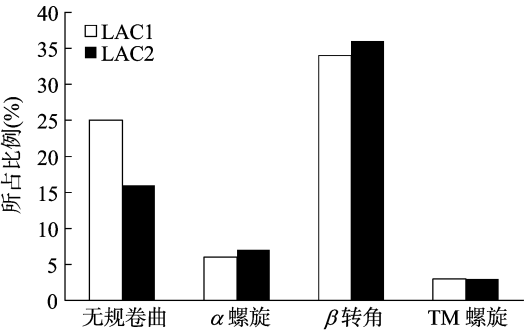


图 1 Cg14LAC1 和 Cg14LAC2 二级结构

2.6 遗传关系分析

以 Cg14LAC1、Cg14LAC2 为基础序列,通过 BLASTp 同源性搜索,获得与胶孢炭疽菌漆酶具有同源性的炭疽菌属不同真菌的氨基酸序列,根据其同源关系数值,结合 Cg14LAC1、Cg14LAC2 序列,利用 MEGA 7.0 进行系统进化分析,明确胶孢炭疽菌 Cg14PLC1 与 Cg14PLC2 分别形成具有不同群体的 2 类(数据未显示),Cg14PLC1 与胶孢炭疽菌中另外一个菌株

Nara gc5 中的 CgNPLC1(XP_007283028.1)序列相同,与同属于炭疽菌属的其他真菌 *C. orbiculare* 中的 ENH79795.1 亲缘关系较近;Cg14PLC2 则与胶孢炭疽菌中的 AFK76451.1 亲缘关系较近,并与菌株 Nara gc5 中的 CgNPLC2(XP_007273654.1)聚为一类。

3 讨论

前期,利用 NCBI 蛋白数据库,对胶孢炭疽菌中漆酶蛋白进行“Colletotrichum gloeosporioides AND laccases”关键词搜索,结果表明有 57 个蛋白,对上述蛋白逐一查看,去除西瓜炭疽菌中的漆酶蛋白,剩余 46 个蛋白,对这些蛋白开展遗传关系分析,可以分为 13 个小类,该结果表明胶孢炭疽菌在不同炭疽菌属种中的漆酶蛋白并不具有较强的保守性,该结果为进一步解释胶孢炭疽菌可以侵染诸多农林植物提供新的研究思路。

同时,由于胶孢炭疽菌全基因组序列并未完全释放,本研究根据同属于炭疽菌属的西瓜炭疽菌中已经报道的 LAC1、LAC2 进行 BLASTp 比对,从而获得胶孢炭疽菌 Cg-14、Nara gc5 菌株中的 LAC1、LAC2,并对其开展包括二级结构、疏水性、理化性质等全面的生物信息学分析预测工作,为进一步开展引起核桃炭疽病的炭疽病菌中漆酶的功能研究提供重要的理论参考。

胶孢炭疽菌是造成多种农林业上植物产生重要损失的病原菌之一^[30-31],它主要通过产生附着胞利用机械压力穿透植物侵入寄主。黑色素是否合成直接关系到病原菌附着胞能够形成巨大膨压从而侵入寄主组织,因此,开展该病菌黑色素合成相关基因的研究对于进一步解析病原菌致病机制具有重要的理论意义,同时,也为进一步开发适合于今后生产上适用的靶标杀菌剂具有重要的应用价值。

4 结论

本研究以胶孢炭疽菌中漆酶 Cg14LAC 氨基酸序列为基础,通过 TargetP、SignalP、ProtComp、Phyre、big - PI Fungal Predictor、SMART、TMHMM 等生物信息学分析工具对上述序列开展蛋白质亚细胞定位、细胞信号肽、二级结构、锚定位点、保守结构域、跨膜结构域等分析,同时,对上述序列开展了与炭疽菌属不同真菌遗传进化关系分析。

参考文献:

- [1] 韩长志. 胶孢炭疽病菌的研究进展[J]. 华北农学报, 2012, 27 (增刊 1): 386 - 389.
- [2] 韩长志. 胶孢炭疽菌侵染过程相关基因研究进展[J]. 广东农业科学, 2014, 41(9): 165 - 169.
- [3] O'Connell R J, Thon M R, Hacquard S, et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses[J]. Nature Genetics, 2012, 44(9): 1060 - 1065.
- [4] 韩长志. 胶孢炭疽菌 RGS 蛋白生物信息学分析[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2015(1): 116 - 122.
- [5] 贾慧, 孟庆江, 李志勇, 等. 玉米大斑病菌黑色素合成酶基因的全基因组定位及表达模式分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(14): 2767 - 2776.
- [6] Widsten P, Kandelbauer A. Laccase applications in the forest products industry: a review[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(4): 293 - 307.
- [7] 陈新. 稻瘟病菌两个漆酶基因功能分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
- [8] Shaghi M, Jeandet P, Bessis R, et al. Degradation of stilbene - type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines[J]. Plant Pathology, 2010, 45(1): 139 - 144.
- [9] 孟川. 玉米大斑病菌 *StLAC2* 基因与黑色素合成及致病性关系研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
- [10] Cañero D C, Roncero M I. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*[J]. Phytopathology, 2008, 98(5): 509 - 518.
- [11] Lin S Y, Okuda S, Ikeda K, et al. LAC2 encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare* [J]. Molecular Plant - Microbe Interactions, 2012, 25(12): 1552 - 1561.
- [12] Tsuji G, Fujikawa J, Ishida H, et al. Laccase gene *LAC1* of *colletotrichum lagenarium* is not essential for melanin biosynthesis and pathogenicity[J]. Journal of General Plant Pathology, 2001, 67(3): 182 - 190.
- [13] 韦运谢, 张贺, 刘晓妹, 等. 芒果胶孢炭疽菌漆酶 *lac1* 与致病力的相关性分析[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(11): 5 - 10.
- [14] 韦运谢, 蒲金基, 张贺, 等. 胶孢炭疽菌漆酶基因 *Lac2* 的序列特征与表达分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 35 - 38.
- [15] 李娅, 韩长志. 云南省核桃产业发展现状及对策分析[J]. 经济林研究, 2012, 30(4): 162 - 167.
- [16] 曹志艳. 玉米大斑病菌黑色素合成途径相关基因的克隆及功能分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [17] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 953 - 971.
- [18] Dyrlov - Bendtsen J, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(4): 783 - 795.
- [19] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N - terminal amino acid sequence [J]. Journal of Molecular Biology, 2000, 300(4): 1005 - 1016.
- [20] Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, et al. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome - wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 337(2): 243 - 253.
- [21] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server [J]. The proteomics protocols handbook: Springer, 2005: 571 - 607.
- [22] Schultz J, Milpetz F, Bork P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(11): 5857 - 5864.
- [23] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: D302 - D305.
- [24] Tusnady G E, Simon I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server [J]. Bioinformatics, 2001, 17(9): 849 - 850.
- [25] Kelley L A, Mezulis S, Yates C M, et al. The phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis [J]. Nature Protocols, 2015, 10(6): 845 - 858.
- [26] Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2002, Chapter 2 (Unit 2): Unit 2.3.
- [27] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731 - 2739.
- [28] Kelley L A, Sternberg M J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server [J]. Nature Protocols, 2009, 4(3): 363 - 371.
- [29] Buchan D W A, Minnici F, Nugent T C O, et al. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(W1): W349 - W357.
- [30] 刘鄯洲, 陈夕军, 尹小乐, 等. 23 株芽胞杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 533 - 542.
- [31] 柳志强, 李乔曼, 徐爽, 等. 催吐罗美木内生菌 *Bacillus subtilis* LYM3 的抑菌活性产物 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 67 - 72.