

# 海洋球石藻(*Emiliana huxleyi*)磷脂酶 C 的结构特点及系统进化分析\*

郭强强<sup>1,2</sup> 蔡伟聪<sup>1,2</sup> 李桂玲<sup>1</sup> 曾珺<sup>1</sup> 李健<sup>1</sup> 刘静雯<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院 厦门 361021; 2. 福建省高校食品微生物与酶工程重点实验室 厦门 361021)

**摘要** 磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)作为一种重要的细胞信号分子,是 G 蛋白信号转导过程中的重要调节因子之一,在动、植物环境胁迫应答及病原菌致病过程中发挥重要作用。海洋浮游植物生长代谢与环境因子之间的相互作用涉及细胞内复杂的信号通路,并最终通过调节细胞分裂过程控制浮游植物的增殖、种群生长动力及初级生产力。但对浮游植物 PLC 及其参与的信号通路的了解却非常少。通过 NCBI 基因数据库的关键词搜索、比对,发现海洋球石藻 (*Emiliana huxleyi*)中含有 30 种 PLC 蛋白,利用 SMART 程序预测其结构保守域,以此将 30 种 PLC 分为四大类;对其氨基酸序列的信号肽、跨膜结构域、一级结构、二级结构、三级结构及其细胞定位等进行了生物信息学分析和预测。结果表明,海洋球石藻 PLC 具有丰富的多样性,它们在信号肽、跨膜区等方面均有一定的差别,其一级结构中存在多个可能的磷酸化修饰位点。二级结构中都含有  $\alpha$  螺旋,  $\beta$  折叠,无规则卷曲,且都定位于线粒体,而三级结构相似度不高。从亲缘关系上看,海洋球石藻 PLC 与低等动物更接近。该研究补充和完善了对植物 PLC 信号转导网络系统的认识,并为进一步开展海洋球石藻 PLC 细胞定位及其参与的信号通路与环境胁迫之间关系的研究提供了重要的理论指导。

**关键词** 海洋球石藻; 磷脂酶 C 结构; 系统进化; 信号转导; 生物信息学

**中图分类号** Q948.8 **doi:** 10.11693/hyhz20170200030

磷脂酶 C (PLC: EC3.1.4.3)广泛存在于原核生物和真核生物中,可以水解磷脂生成二酰甘油(diacyl glycerol, DAG)和肌醇三磷酸(inositol trisphosphates, IP<sub>3</sub>),这两个小分子作为第二信使在动、植物信号转导中具有重要作用(Zheng *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; 王法微等, 2014)。PLC 根据反应底物的不同可以分为磷脂酰肌醇特异性 PLC (phosphoinositide-specific PLC, PI-PLC)和非特异性 PLC (Non-specific PLC, NPC)。有关 PLC 研究较多的集中于动物中,可分为 6 大类,分别为 PLC $\beta$ 、PLC $\gamma$ 、PLC $\delta$ 、PLC $\epsilon$ 、PLC $\zeta$  和 PLC $\eta$  (Suh *et al.*, 2008)。在动物细胞中, PLC 水解

磷脂形成 DAG 和 IP<sub>3</sub>, 其中 DAG 能够激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC), 进一步传递给有丝分裂原活化蛋白激酶, 从而在细胞增殖、分化和凋亡信号转导中起重要作用; IP<sub>3</sub> 则结合在内质网膜的受体上, 激活 Ca<sup>2+</sup>通道, 将内质网中储存的 Ca<sup>2+</sup>释放到细胞质中, 而释放到胞浆中的大部分 Ca<sup>2+</sup>由钙泵重新摄取回内质网, 以此维持内质网 Ca<sup>2+</sup>浓度的平衡, 少量钙离子则被线粒体摄入, 这些过量的 Ca<sup>2+</sup>会导致线粒体损伤并释放细胞色素 C, 活化凋亡特征蛋白酶 caspases, 从而诱导细胞凋亡(Kadenbach *et al.*, 2004; Bardo *et al.*, 2006)。植物中的 PLC 分类没有动物中那么复杂, 只

\* 国家自然科学基金项目, 41576166 号; 福建省科技计划重点项目, 2015Y0039 号; 中国南方海洋研究中心基金项目, 14GZP71NF35 号。郭强强, E-mail: 970681589@qq.com

通讯作者: 刘静雯, 博士, 教授, E-mail: ljwsbch@163.com

收稿日期: 2017-02-16, 收修改稿日期: 2017-03-21

存在一种亚型结构, 缺少 PH 结构域, 与动物中 PLC $\zeta$  结构类似。目前已发现拟南芥基因组中存在 6 种 NPC、9 种 PI-PLC 和 4 种普通的 PLC (Nakamura *et al.*, 2005; Tasma *et al.*, 2008)。水稻基因组中含有 9 个 PLC, 其中 4 个属于 PI-PLC, 另外 5 个均为 NPC (Singh *et al.*, 2013)。植物中尚未发现 PKC 的同源蛋白, 也没有鉴定出明确的 IP<sub>3</sub> 受体。植物中的 PLC 水解产生的 DAG 在激酶的作用下转化成磷脂酸(phos-phatatic acid, PA), IP<sub>3</sub> 则会被磷酸化成 IP<sub>4</sub>、IP<sub>5</sub> 和 IP<sub>6</sub>, 这些磷酸化产物在植物激素信号转导中可能起主要作用(黄冬等, 2017)。浮游植物中的 PLC 则报道较少, 在莱茵衣藻、红藻、绿藻中只发现单拷贝的 PLC 基因, 这些单拷贝基因在进化演变中促成了 PLC 功能的多样性(Mikami, 2014)。

海洋球石藻(*Emiliana huxleyi*)是一种全球广泛分布且具有重要生态功能的真核浮游植物。其具有独特的生物矿化作用和高产二甲基硫化物(DMSP)能力, 这一特点使其成为影响全球碳、硫生物地化循环及气候变化的一个关键物种(Joassin *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012; Blanco-Ameijeiras *et al.*, 2016)。自然海域中球石藻经常会形成大面积赤潮, 研究证实特异性病毒(*E. huxleyi* virus)感染和裂解是终止该藻赤潮的一个重要因素。有趣的是, 球石藻被病毒感染后能够大量合成鞘脂类代谢产物—神经酰胺类物质并导致宿主细胞凋亡, 从而调控宿主种群密度(Bidle *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2009; Michaelson *et al.*, 2010; Rosenwasser *et al.*, 2014)。可见, 球石藻细胞中鞘脂类物质的代谢在调节病毒与宿主间的相互作用中起着非常重要的作用。神经酰胺是细胞信号转导中的一个重要的信号分子, 可作为传递细胞外应激信号的第二信使将凋亡信号传至核内, 激活凋亡特征蛋白酶 caspases, 从而诱发细胞凋亡; 也可以直接作用于线粒体, 改变其正常结构和功能从而导致细胞凋亡(罗磊, 2014)。在动物细胞中, 神经酰胺主要以结合态的鞘脂类形式存在于细胞膜上, 通过 PLC 的水解作用转化为游离的神经酰胺, 从而作为第二信使参与细胞信号转导(金道忠等, 2007)。细胞凋亡这一古老而又十分保守的死亡过程存在于所有的多细胞生物中。近年来对于单细胞生物, 特别是具有光合能力的浮游植物细胞凋亡的研究越来越受到关注。过去, 动物摄食和沉降被认为是浮游植物死亡的原因, 现在人们发现病毒感染以及逆境条件下的主动死亡(细胞凋亡或程序化死亡)也是引起浮游植物死亡的重要原因,

但对其程序性死亡的分子机制及其生态学意义仍不十分清楚(Gordeeva *et al.*, 2004; Franklin *et al.*, 2006; Schatz *et al.*, 2014)。

本文采用生物信息学方法, 对海洋球石藻磷脂酶 C 进行理化性质和结构分析, 预测其可能的代谢调节功能, 探索其在浮游植物环境胁迫应答及微生物侵染过程中发挥的重要作用, 并为进一步开展浮游植物 PLC 信号通路特别是病毒介导的海洋球石藻细胞凋亡信号通路的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究材料

利用 NCBI 在线蛋白数据库搜索、过滤, 获得 30 条海洋球石藻(*Emiliana huxleyi* CCMP 1516) PLC (*EhPLC*)氨基酸序列信息, 对这些序列进行系统的生物信息分析。

### 1.2 方法

**1.2.1 *EhPLC* 一级结构及理化性质的分析** 蛋白质一级结构是指蛋白质多肽链氨基酸的组成及排列顺序, 利用不同的在线软件对 *EhPLC* 理化性质、疏水性、信号肽及磷酸化位点等进行预测分析。利用 ExPaSy 中的 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对 *EhPLC* 氨基酸序列进行理化性质分析; 利用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对 *EhPLC* 氨基酸序列中的信号肽进行预测; 利用 TMHMM 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白跨膜区; 利用 ProtScale (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)对 *EhPLC* 进行疏水性分析, 窗口尺寸调整为 19; 利用 NetPhos3.0 Server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)对 *EhPLC* 氨基酸序列中的磷酸化位点进行分析, 预测其氨基酸序列中的苏氨酸(Thr)、酪氨酸(Tyr)和丝氨酸(Ser)等三种氨基酸被磷酸化修饰的可能性。

**1.2.2 *EhPLC* 二级结构及亚细胞定位** 利用 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线分析 30 种 *EhPLC* 的保守结构域的特征; 筛选其中具有代表性的 8 种 *EhPLC* 序列, 利用 Prabi 程序 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_hnn.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_hnn.pl))对其蛋白质二级结构进行预测; 利用 Target P1.1 数据库对 *EhPLC* 进行蛋白质转运肽预测; 利用 ProtComp v9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?group=programs&subgroup=proloc&topic=protcompan>)预测 *EhPLC*

的亚细胞定位。

**1.2.3 EhPLC 三级结构预测** 利用在线工具 ExPaSy 中的 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org>)程序进行同源性比较, 选取同源性最高的模板在线生成模型, 然后通过 PyMOL Viwer 软件进行编辑, 最终绘制成蛋白质的三级结构模型图。

**1.2.4 EhPLC 序列比对及系统发育树的构建** 利用 NCBI 将 *EhPLC19* 的氨基酸序列进行 Blast 同源性分析, 选取同源性较高的不同物种, 再利用 MEGA5.0 对这些氨基酸序列进行序列比对, 用相邻链接法(NJ 法)构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 搜索结果

根据 NCBI 的基因数据库, 输入关键词 *Emilianai huxleyi* phospholipase C, 获得 33 个 *EhPLC* 的登录信息, 将搜索到的 33 个 *EhPLC* 氨基酸序列比对后发现其中有三对的氨基酸序列完全一致, 因此确定有 30 种 *EhPLC*。将 30 种氨基酸序列由小到大排序, 并依次将其命名为 *EhPLC1*、*EhPLC2*、*EhPLC3*、*EhPLC4*..... 等等, 序列信息如表 1。根据氨基酸个数相近和所含结构域的不同从中选取 8 种 *EhPLC* 作进一步分析。

表 1 海洋球石藻磷脂酶 C 的基本信息  
Tab.1 Information of PLC in *E. huxleyi*

名称	Gene ID	Protein ID	功能	基因序列长度(nt)	氨基酸长度(aa)
<i>EhPLC1</i>	XM_005782057.1	XP_005782114.1	phospholipase c	501	166
<i>EhPLC2</i>	XM_005780273.1	XP_005780330.1	phospholipase c	501	166
<i>EhPLC3</i>	XM_005759050.1	XP_005759107.1	phospholipase c	527	176
<i>EhPLC4</i>	XM_005782058.1	XP_005782115.1	phospholipase c	711	236
<i>EhPLC5</i>	XM_005757135.1	XP_005757192.1	phospholipase c	747	248
<i>EhPLC6</i>	XM_005790884.1	XP_005790941.1	phospholipase c	816	271
<i>EhPLC7</i>	XM_005776531.1	XP_005776588.1	phospholipase c	822	273
<i>EhPLC8</i>	XM_005774657.1	XP_005774714.1	phospholipase c	933	310
<i>EhPLC9</i>	XM_005779192.1	XP_005779249.1	phospholipase c	1267	380
<i>EhPLC10</i>	XM_005770382.1	XP_005770439.1	phospholipase c	1164	387
<i>EhPLC11</i>	XM_005772628.1	XP_005772685.1	phospholipase c	1197	398
<i>EhPLC12</i>	XM_005758266.1	XP_005758323.1	phospholipase c	1197	398
<i>EhPLC13</i>	XM_005774657.1	XP_005774714.1	phospholipase c	1311	436
<i>EhPLC14</i>	XM_005787721.1	XP_005787778.1	phospholipase c	1359	452
<i>EhPLC15</i>	XM_005776126.1	XP_005776183.1	phospholipase c	2049	682
<i>EhPLC16</i>	XM_005763258.1	XP_005763315.1	phospholipase c	2619	872
<i>EhPLC17</i>	XM_005771178.1	XP_005771235.1	phospholipase c	2679	892
<i>EhPLC18</i>	XM_005792977.1	XP_005793034.1	phospholipase c	2886	961
<i>EhPLC19</i>	XM_005782439.1	XP_005782496.1	phospholipase c	3075	1024
<i>EhPLC20</i>	XM_005770577.1	XP_005770634.1	phospholipase c	4914	1147
<i>EhPLC21</i>	XM_005768682.1	XP_005768739.1	phospholipase c	3795	1264
<i>EhPLC22</i>	XM_005761145.1	XP_005761202.1	phospholipase c	4662	1500
<i>EhPLC23</i>	XM_005781409.1	XP_005781466.1	phospholipase c	4587	1528
<i>EhPLC24</i>	XM_005774402.1	XP_005774459.1	phospholipase c	4641	1546
<i>EhPLC25</i>	XM_005777446.1	XP_005777503.1	phospholipase c	4950	1649
<i>EhPLC26</i>	XM_005793571.1	XP_005793628.1	phospholipase c	5943	1692
<i>EhPLC27</i>	XM_005756497.1	XP_005756554.1	phospholipase c	5127	1708
<i>EhPLC28</i>	XM_005785467.1	XP_005785524.1	phospholipase c	8102	1931
<i>EhPLC29</i>	XM_005785678.1	XP_005785735.1	phospholipase c	6093	2030
<i>EhPLC30</i>	XM_005762079.1	XP_005762136.1	phospholipase c	7341	2446

## 2.2 EhPLC 一级结构及理化性质特点

**2.2.1 理化性质** 8 种 *EhPLC* 均含碱性氨基酸和酸性氨基酸(表 2)。当蛋白质的不稳定系数大于 40 即

为不稳定蛋白。表 2 结果显示只有 *EhPLC20* 的不稳定系数小于 40, 因此, 除 *EhPLC20* 外, 其余 7 种 *EhPLC* 均为不稳定蛋白。

表 2 海洋球石藻磷脂酶 C 蛋白理化性质分析  
Tab.2 Physical and chemical properties of PLC proteins in *E. huxleyi*

蛋白名称	主要氨基酸(%)	碱性/酸性氨基酸	理论等电点 pI	不稳定指数
<i>EhPLC14</i>	Ala 11.5 Thr 9.5 Leu 9.1 Gly 8.4	35/48	5.30	41.26
<i>EhPLC15</i>	Leu 10.9 Ala 10.4 Arg 9.4 Gly 8.4	80/83	6.77	51.56
<i>EhPLC16</i>	Leu 12.0 Ala 11.5 Ser 9.6 Gly 7.2	85/94	5.92	46.52
<i>EhPLC17</i>	Leu 12.0 Ala 11.0 Arg 9.3 Ser 9.0	99/1115	5.93	51.46
<i>EhPLC18</i>	Leu 11.7 Ala 10.6 Ser 10.0 Arg 8.5	98/100	6.99	60.99
<i>EhPLC19</i>	Ala 11.8 leu 10.8 Pro 10.2 Arg 9.1	110/108	7.75	62.00
<i>EhPLC20</i>	Ser 16.2 Ala 15.9 Arg 11.5 Gly 9.8	167/72	11.08	38.45
<i>EhPLC21</i>	Ala 11.2 Leu 10.6 Ser 9.8 Arg 7.5	145/136	8.62	46.27

**2.2.2 信号肽及跨膜区预测** 通过 SignalP 4.1 Sever 在线分析上述 8 种 *EhPLC* 氨基酸序列中的信号肽, 结果显示, *EhPLC16* 和 *EhPLC21* 在 N 端都存在一个典型的信号肽, 其他 6 种不存在信号肽(以 *EhPLC16* 为例, 如图 1 所示)。通过 TMHMM Server 分析, *EhPLC18* 在 N 端存在一个跨膜区(如图 2), *EhPLC19* 在第 74—97 氨基酸位置上存在一个跨膜结构域, 其他蛋白序列不存在跨膜区。

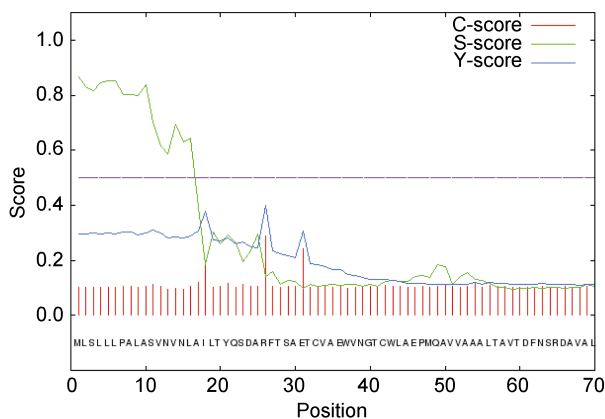


图 1 *EhPLC16* 信号肽预测图

Fig.1 The prediction of signal peptide of *EhPLC16*

注: C-score (Cleavage site score): 剪切位置分值; S-score (Signal peptide score): 信号肽分值; Y-score (combined cleavage site score): 综合考虑 C-score 和 S-score。在信号肽的位置, Y-score 有峰值, C-score 有个高峰值

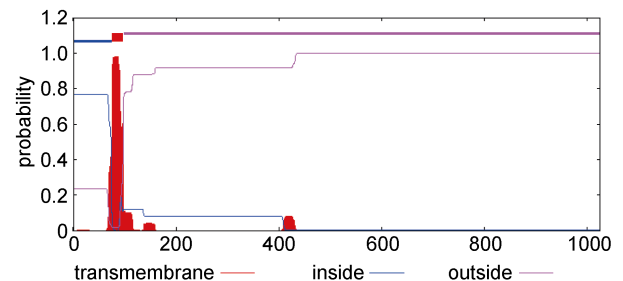


图 2 *EhPLC19* 跨膜区预测图

Fig.2 The prediction of transmembrane structure domain of *EhPLC19*

注: 蓝线代表膜内区, 红线代表膜外区; 位置发生交换, 说明此处具有跨膜结构, 且预测概率接近 1, 说明此处很可能存在一个跨膜区

**2.2.3 疏水性预测** 通过 ProtScale 程序中的得分法进行疏水性分析。结果显示, 该 8 种 *EhPLC* 的氨基酸疏水性平均值均为负值, 表明整体上都属于亲水性蛋白, 但在亲水程度上存在一定差异, 其中亲水性最强的是 *EhPLC20* (图 3)。

**2.2.4 磷酸化位点预测** 利用 NetPhos 对 8 种 *EhPLC* 酸化位点进行预测, 预测其磷酸化位点的可能性均大于 0.5。8 种 *EhPLC* 中丝氨酸磷酸化位点最多, 苏氨酸磷酸化位点次之, 酪氨酸磷酸化位点较少(表 3)。PLC 在信号分子刺激下可结合 GTP, 通过获得若干个磷酸基团而被激活, 在信号刺激减弱时

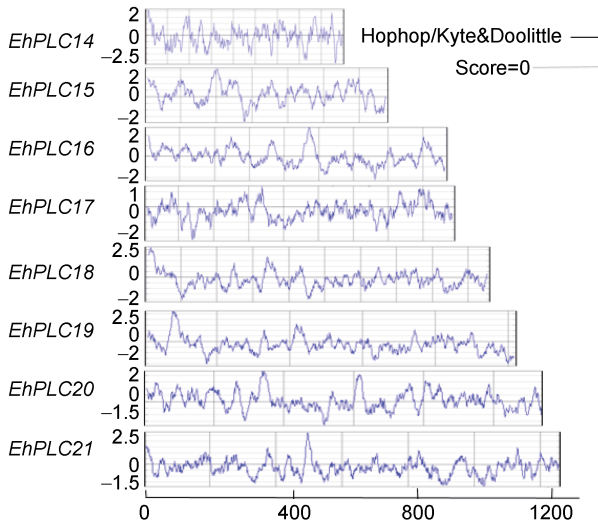


图3 海洋球石藻磷脂酶C疏水性分析  
Fig.3 The hydrophobicity of *EhPLC*

表3 海洋球石藻8种PLC蛋白氨基酸序列磷酸化位点预测

Tab.3 Prediction of phosphorylation sites of 8 PLCs in *E. huxleyi*

蛋白名称	Thr	Ser	Tyr
<i>EhPLC14</i>	9	14	8
<i>EhPLC15</i>	9	24	4
<i>EhPLC16</i>	12	37	2
<i>EhPLC17</i>	21	37	3
<i>EhPLC18</i>	19	49	1
<i>EhPLC19</i>	13	51	2
<i>EhPLC20</i>	24	87	3
<i>EhPLC21</i>	13	56	4

这些磷酸基团将被去除。*EhPLC*如此多样性的磷酸化修饰表明在海洋球石藻中,磷酸化与去磷酸化分子开关在调控*EhPLC*参与的信号传导中起着关键作用。

### 2.3 *EhPLC* 二级结构及亚细胞定位

**2.3.1 保守结构域分析** 根据植物PI-PLC的基本结构:EF指型结构、X结构域、Y结构域及C2结构域,利用SMART在线分析预测30条氨基酸序列,结果如图4所示,其中10条序列不含PI-PLC的典型结构域;有11条序列只有一个PI-PLC典型结构域,其中*EhPLC4*、*EhPLC9*、*EhPLC10*只含有C2结构域,*EhPLC11*只含Y区,*EhPLC15*、*EhPLC16*、*EhPLC28*只含X区,*EhPLC24*、*EhPLC26*含有X区和跨膜结构域,*EhPLC29*含有X区、ww结构域、跨膜区,*EhPLC30*含有X区、跨膜区、PbH1结构域;有6个

序列含有两个PLC典型结构域,*EhPLC12*含有Y区、C2区;*EhPLC17*、*EhPLC22*含有X区、Y区;*EhPLC18*含有X区、C2区、跨膜区,*EhPLC23*含有X区、C2区、FHA结构域;有3个序列含有3个PLC典型结构域,其中,*EhPLC21*含有X区、Y区、C2区,*EhPLC19*含有X区、Y区、C2区、跨膜区,*EhPLC27*含有X区、Y区、C2区、FHA结构域。

X-Y催化区中间的连接序列XY-linker与IP<sub>3</sub>结合;EF手型结构用于结合Ca<sup>2+</sup>;C2结构域的功能是结合磷脂,其过程依赖Ca<sup>2+</sup>,对维持催化区活性有辅助作用(Nomikos *et al.*, 2007; Suh *et al.*, 2008)。PLC结构的多样性使得不同的磷脂酶C所依赖的金属离子不同,如大多微生物来源的PLC酶活需要Zn<sup>2+</sup>的参与(Hough *et al.*, 1989)。*EhPLC9*特有的ww结构域存在于第1405—438氨基酸位置处。ww结构域是由38—40个氨基酸残基严密组织形成一个连贯、紧凑的结构域,其中两个色氨酸残基为其结构的主要特征,能特异性识别并结合富含脯氨酸的蛋白质基序和磷酸化的丝氨酸/色氨酸-脯氨酸肽段,是介导蛋白质相互作用的一类小的蛋白质模块(Halder *et al.*, 2011; Hergovich, 2012)。*EhPLC26*在氨基酸231—583位置处含有5个PbH1结构域,可以结合多糖。FHA为叉头相关结构域(forkhead-associated domain),是许多调控蛋白的磷酸肽识别结构域,具有磷酸苏氨酸和磷酸酪氨酸专一性识别位点,且对前者的亲和力会相对高一些(Hofmann *et al.*, 1995)。

**2.3.2 二级结构特征** 对8种*EhPLC*二级结构预测结果显示,它们均含有α螺旋、β折叠及无规则卷曲,无规则卷曲所含比例最大,β折叠所含比例最小(图5)。具体而言,含α螺旋比例最高的是*EhPLC16*,为43.46%,最低的是*EhPLC20*,为27.9%;含β折叠比例最高的是*EhPLC14*,为14.82%,最低的是*EhPLC18*,为9.78%;含无规则卷曲比例最高的是*EhPLC14*,为55.88%,最低的是*EhPLC16*,为44.84%。

**2.3.3 细胞定位分析** 利用ProtComp v9.0程序进行分析,结果显示,所有*EhPLC*都主要定位于线粒体,另外也有个别分布于过氧化物酶体和高尔基体中(表4)。推测*EhPLC*主要在线粒体中行使其功能。*EhPLC*的细胞定位对确定其功能具有重要意义。禾谷炭疽菌中不同的PLC定位在线粒体、高尔基体、和细胞核等不同位置(韩长志, 2016),莱茵衣藻PLC则定位于质膜(Awasthi *et al.*, 2012)。

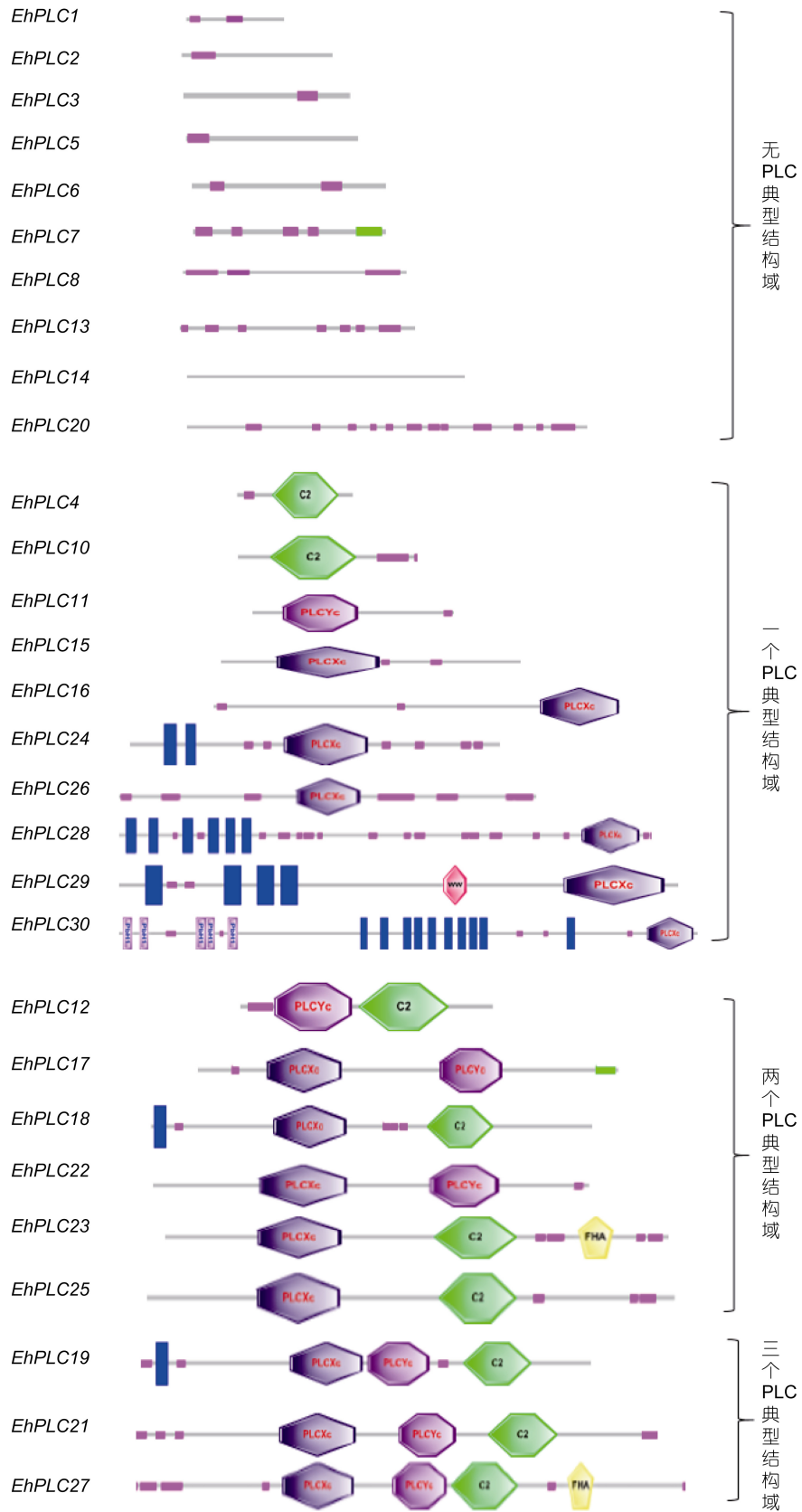


图4 海洋球石藻磷脂酶 C 结构分析  
Fig.4 The conserved domain of *EhPLC*



表 4 海洋球石藻 PLC 亚细胞定位预测  
Tab.4 The subcellular localization of PLC in *E. huxleyi*

名称	核	线粒体	过氧化物酶体	高尔基体	内质网	溶酶体	液泡	细胞质	质膜	胞外
<i>EhPLC14</i>	0	2.85	2.15	0.73	0.67	1.35	0	1.21	0.92	2.38
<i>EhPLC15</i>	0	3.17	2.03	0	0.80	1.60	0	1.36	0.91	2.33
<i>EhPLC16</i>	0	2.93	1.93	0.11	0.93	1.66	0	1.48	0.87	2.21
<i>EhPLC17</i>	0	3.13	2.50	2.74	1.03	0.11	0	0.99	1.00	2.74
<i>EhPLC18</i>	0	2.96	2.23	0.45	0.50	1.30	0	1.48	0.94	2.49
<i>EhPLC19</i>	0	2.78	2.20	0.39	0.43	1.45	0	1.45	0.94	2.50
<i>EhPLC20</i>	0	2.62	1.83	0.29	0.49	1.86	0	1.61	0.86	2.21
<i>EhPLC21</i>	0	2.34	2.02	0.15	0.58	1.88	0	1.61	0.88	2.30

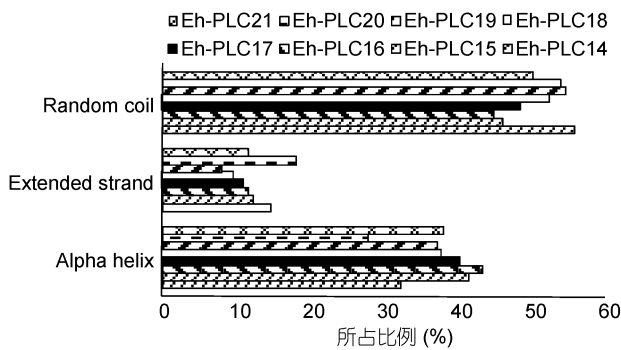


图 5 海洋球石藻磷脂酶 C 二级结构域预测

Fig.5 Prediction of the secondary structure domain of *EhPLC*  
注: Random coil: 无规则卷曲; Extended strand:  $\beta$  折叠; Alpha helix:  $\alpha$  螺旋

#### 2.4 三级结构的预测

同源建模结果显示, 8 种 *EhPLC* 主要有 6 种模板: 2pz0.1.A, 3qr0.1.A, 5fbh.1.A, 2fju.1.B, 3qr1.1.A 及 4qj3.1.B, 可预测的蛋白区域主要集中在多肽中间, 这与 PLC 保守结构域的位置相吻合。与模板相似度最高的为 *EhPLC19*, 达 54.05%。而其他与模板源性均较低, 分析结果并不可靠, 所以选取 *EhPLC19* 进行同源建模, 结果如图 6 所示, 图中红色  $\alpha$ -螺旋结构是 *EhPLC19* 的 C2 结构域, 即与底物及  $\text{Ca}^{2+}$  结合的部位。

#### 2.5 系统发育树

以 *EhPLC19* 作为目标序列, 在 GenBank 中进行 blast 搜索氨基酸序列进行同源性比较分析。结果显示, 该序列与其他物种的 PLC 同源性较低, 与白斑狗鱼 *Esox lucius* 的同源性最高, 为 39%, 与气单胞菌属 *Angomonas deanei* 的同源性为 38%, 与利什曼虫 *Leishmania infantum* JPCM5 的同源性为 37%, 与袋獾 *Sarcophilus harrisii* 的相似度为 35%, 与旋毛虫 *Trichinella* 的同源性为 31%, 以上结果表明不同物种

在进化过程中 PLC 基因出现了较大的差异。同源比对结果中未出现植物物种的 PLC, 说明海洋球石藻 *EhPLC* 的同源性植物的相似性很低, 而与低等动物的相似性相对较高, 推测在进化过程中 *EhPLC* 的结构和功能也更接近动物。8 种 *EhPLC* 则大致聚为三类, *EhPLC16*、*EhPLC20* 为一类, *EhPLC17*、*EhPLC15*、*EhPLC18*、*EhPLC19* 为一类, *EhPLC4*、*EhPLC21* 为一类(图 7)。

### 3 讨论

PLC 的功能在动物中已经研究得十分清楚, 动物细胞膜上的 G 蛋白偶联受体(R)接受配体信号, 通过 G 蛋白激活 PI-PLC, 水解  $\text{PIP}_2$ , 生成 DAG 和  $\text{IP}_3$  (李莉等, 2015)。它们分别结合并激活 PKC 和  $\text{IP}_3$  的受体, 使内质网钙离子通道打开, 后者释放  $\text{Ca}^{2+}$  到胞质。线粒体摄取  $\text{Ca}^{2+}$ , 导致细胞色素 C 的释放, 最终使细胞凋亡。然而在植物中尚未鉴定出激活 PLC 的 G 蛋白, 也没有发现 PLC 下游信号中的两个重要调节因子, 即  $\text{IP}_3$  的受体和 PKC (Munnik *et al.*, 2009)。植物体内生成的  $\text{IP}_3$  会通过磷酸化形成  $\text{IP}_4$ 、 $\text{IP}_5$  及  $\text{IP}_6$

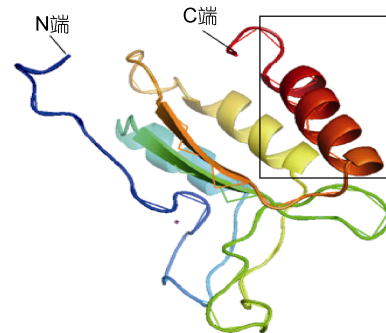


图 6 海洋球石藻 *EhPLC19* 三级结构预测图

Fig.6 Prediction of the tertiary structure domain of *EhPLC19*  
注: 黑框中红色  $\alpha$ -螺旋结构是 *EhPLC19* 的 C2 结构域, 即与底物及  $\text{Ca}^{2+}$  结合的部位

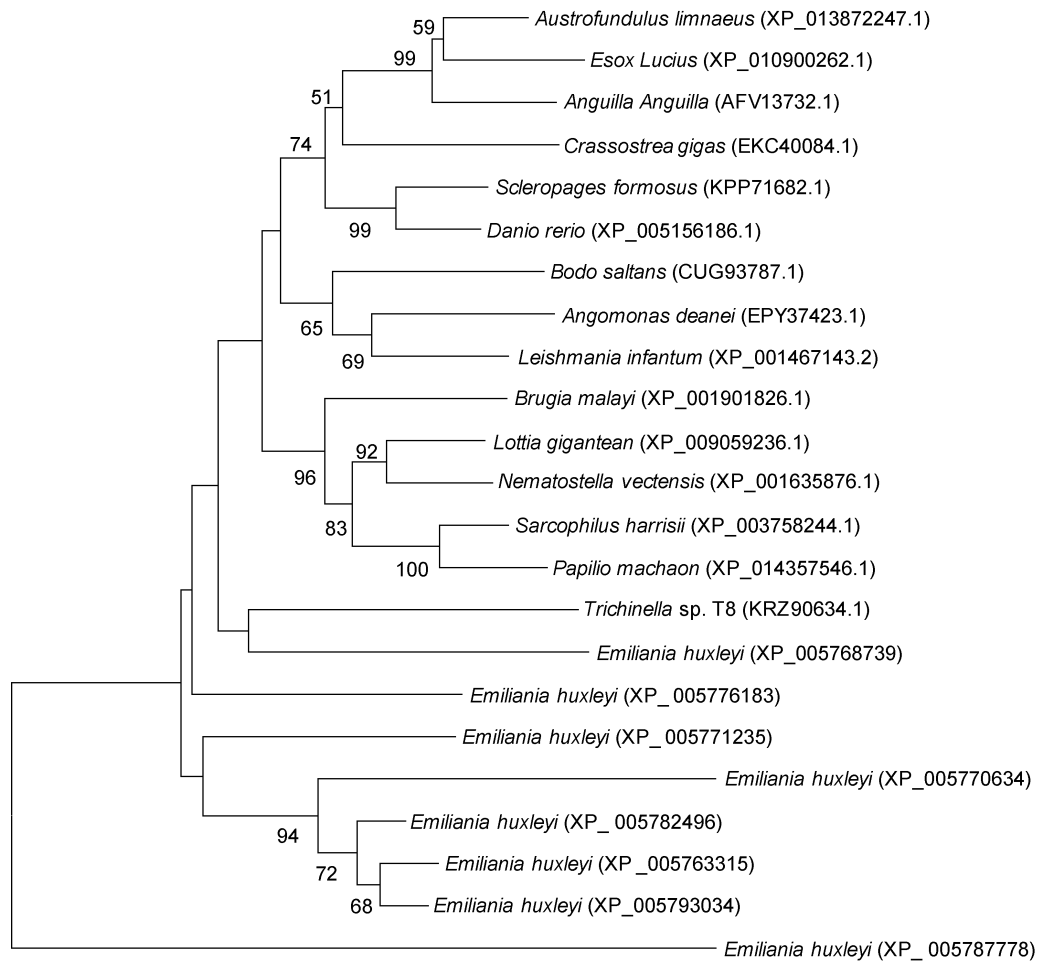


图 7 根据不同物种的 PLC 氨基酸序列绘制的系统发育树

Fig.7 The distance tree based on the amino acid sequences of the PLCs from different organisms

注: *Emiliana huxleyi* (XP\_005768739): EhPLC21; *Emiliana huxleyi* (XP\_005776183): EhPLC15; *Emiliana huxleyi* (XP\_005771235): EhPLC17; *Emiliana huxleyi* (XP\_005770634): EhPLC20; *Emiliana huxleyi* (XP\_005782496): EhPLC19; *Emiliana huxleyi* (XP\_005763315): EhPLC16; *Emiliana huxleyi* (XP\_005793034): EhPLC18; *Emiliana huxleyi* (XP\_005787778): EhPLC14

参与细胞信号转导, 植物中  $IP_6$  是促进钙离子释放的主要因素(Lemtiri-Chlieh *et al*, 2003; Michell, 2008)。现在众多植物包括番茄、杨树、大豆、拟南芥和水稻等的基因组已经完全测序, 还有大量 EST 文库, 在这些数据库中并未发现  $IP_3$  的受体基因。但是在衣藻和草履虫基因组中发现了  $IP_3$  受体基因(Wheeler *et al*, 2008)。在硅藻(角毛藻, 三角褐指藻, 圆柱拟脆杆藻及多列拟菱形藻)基因组中搜索到 G 蛋白偶联受体的基因, 与人体蛋白序列比对含 G 蛋白偶联受体核心组件, 硅藻 G 蛋白  $\alpha$ -和  $\beta$ -亚基与人同源物的序列相似性水平比已知的植物界 G 蛋白亚基和人 G 蛋白略高(Port *et al*, 2013)。海洋球石藻 *E. huxleyi* CCMP1516 全基因组注释显示, 基因组中含有蛋白激酶基因、 $IP_3$  基因、G 蛋白及 G 蛋白偶联受体基因。海洋球石藻中存在丰富多样的磷脂 C 种类及完善的 G 蛋白偶联受

体介导的信号通路中的主要成员, 因此, 我们可以提出这样一个有趣的假设, 即病毒感染海洋球石藻后或许也可以同时启动神经酰胺以外的另一信号途径, 即 G 蛋白偶联的 DAG/ $IP_3$  双信号系统诱导宿主细胞凋亡。这也为我们进一步深入研究球石藻病毒诱导宿主细胞死亡的分子机制提供了一个新的思路。

神经酰胺可作为第二信使传递细胞凋亡和分化增殖的信号, 通过调控细胞周期的运行过程从而控制细胞的分裂和死亡。病毒感染海洋球石藻后通过掌控宿主鞘脂类合成途径大量合成病毒特有的新型鞘脂神经酰胺, 这些神经酰胺在细胞膜表面形成神经酰胺富集的膜结构, 最终形成膜筏(Michaelson *et al*, 2010; Rose *et al*, 2014)。病毒利用这种新颖的脂筏通过与宿主细胞质膜融合或内吞作用进入宿主细胞, 导致宿主细胞膜结构和功能的紊乱, 促进子代病毒



的增殖和释放,而这一过程可能涉及到宿主细胞周期调控的异常,并最终诱导宿主细胞凋亡(Liu *et al.*, 2011, 2015; Vermont *et al.*, 2016)。最新研究发现,病毒感染球石藻可以诱导宿主细胞另一种主动死亡程序即——细胞自噬过程(Schatz *et al.*, 2014),可见细胞凋亡和细胞自噬之间可能存在交叉作用。本实验室初步的研究结果显示,病毒感染能够促使海洋球石藻宿主细胞中 PLC 在转录和蛋白水平表达量的增加并与细胞中神经酰胺的积累存在一定的相关性(数据未发表)。在哺乳动物钙离子与凋亡的研究中发现,PLC 含量的增加,使细胞内的 IP<sub>3</sub> 含量也增加,通过内质网表面的受体,打开 Ca<sup>2+</sup>通道,使 Ca<sup>2+</sup>进入细胞质的同时,线粒体内的 Ca<sup>2+</sup>出现了升高,线粒体内的 Ca<sup>2+</sup>超载,而后线粒体结构出现肿胀和裂解,进而引起细胞的凋亡(赵凤命等, 2012)。因此我们可以提出一个假设:病毒感染藻细胞后,主导宿主鞘脂类代谢促进磷脂酶 C 的积累并合成病毒特有的新型鞘脂类物质,这两者是否都通过线粒体途径,导致细胞色素 C 的释放,活化 metacaspase,引起线粒体结构和功能改变,进而促进凋亡的发生?综上所述,本研究系统地分析了 *EhPLC* 结构特点及可能的功能,为进一步开展 *EhPLC* 细胞定位及其参与的信号通路与环境胁迫之间关系的研究提供了重要的理论指导。

#### 4 结论

自然海域中,病毒感染和裂解球石藻过程中伴随着大量球石粒 CaCO<sub>3</sub> 和 DMSP 的释放,特别是其赤潮的瓦解有赖于病毒裂解而使其在全球碳、硫生物地化循环、气候变化过程中起着十分重要的作用。磷脂酶 C 作为一种重要的细胞信号分子,在浮游植物环境胁迫应答及病原菌侵染过程中发挥重要作用。随着球石藻及其特异性病毒全基因组序列的注释和深入分析,病毒与宿主间复杂的信号转导网络研究引起了学者们的极大兴趣。本研究基于前人研究成果,对海洋球石藻 PLC 进行了系统的生物信息学分析,明确该藻中存在 30 个典型的 PLC 并分属于四大类型;它们在信号肽、亚细胞定位及二级结构组成等方面上存在一定差异,推测上述蛋白在不同位置发挥不同作用;多数 *EhPLC* 具有典型的 PLCX、PLCY 及 C2 等保守的结构域;系统发育分析结果显示 *EhPLC* 与植物的相似度很低,而与低等动物的相似度相对较高。该研究补充了对浮游植物 PLC 信号转导网络系统的认识,并对进一步开展海洋球石藻 PLC 细胞定

位及其参与的信号通路与环境胁迫之间关系的研究具有重要的理论意义。

#### 参 考 文 献

- 王法微, 王 骐, 邓 宇等, 2014. 磷脂酶 C 基因家族研究进展. 生物技术通报, (12): 33—39
- 李 莉, 井 文, 章文华, 2015. 植物细胞中磷酸肌醇和磷脂酶 C 介导的信号转导. 植物生理学报, 51(10): 1590—1596
- 罗 磊, 2014. 神经酰胺在外源化学物诱导线粒体依赖性细胞凋亡中的作用. 卫生研究, 43(6): 1031—1037
- 金道忠, 朱兴族, 2006. 神经酰胺代谢及凋亡信号调节. 生命科学, 18(5): 481—486
- 赵凤命, 张谈顺, 王仲兵等, 2012. 钙离子与细胞凋亡. 中国动物检疫, 29(2): 67—71
- 黄 冬, 吴 燕, 2017. 植物磷脂酶 C 的功能研究进展. 生命科学, 29(6): 575—581
- 韩长志, 2016. 禾谷炭疽菌磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 生物信息学分析. 科学技术与工程, 16(2): 18—23
- Awasthi M, Batra J, Kateriya S, 2012. Disulphide bridges of phospholipase C of *Chlamydomonas reinhardtii* modulates lipid interaction and dimer stability. PLoS One, 7(6): e39258
- Bardo S, Cavazzini M G, Emptage N, 2006. The role of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store in the plasticity of central neurons. Trends Pharmacol Sci, 27(2): 78—84
- Bidle K D, Haramaty L, Barcelos J B E *et al.*, 2007. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. Proc Natl Acad Sci, 104(14): 6049—6054
- Blanco-Ameijeiras S, Lebrato M, Stoll H M *et al.*, 2016. Phenotypic variability in the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. PLoS One, 11(6): e0157697
- Evans C, Pond D W, Wilson W H, 2009. Changes in *Emiliania huxleyi* fatty acid profiles during infection with *E. huxleyi* virus 86: physiological and ecological implications. Aquat Microb Ecol, 55(3): 219—228
- Franklin D J, Brussaard C P D, Berges J A, 2006. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? Eur J Phycol, 41(1): 1—14
- Gordeeva A V, Labas Y A, Zvyagilskaya R A, 2004. Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution. Biochemistry, 69(10): 1055—1066
- Halder G, Johnson R L, 2011. Hippo signaling: growth control and beyond. Development, 138(1): 9—22
- Hergovich A, 2012. Mammalian Hippo signalling: a kinase network regulated by protein-protein interactions. Biochem Soc Trans, 40(1): 124—128
- Hofmann K, Bucher P, 1995. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. Trends Biochem Sci, 20(9): 347—349
- Hough E, Hansen L K, Birknes B *et al.*, 1989. High-resolution (1.5Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. Nature, 338(6213): 357—360
- Joassin P, Delille B, Soetaert K *et al.*, 2011. Carbon and nitrogen flows during a bloom of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*: modelling a mesocosm experiment. J Mar Syst,

- 85(3—4): 71—85
- Kadenbach B, Arnold S, Lee I *et al*, 2004. The possible role of cytochrome *c* oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochem Biophys Acta*, 1655: 400—408
- Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie E A C, Webb A A R *et al*, 2003. Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proc Natl Acad Sci*, 100(17): 10091—10095
- Liu J W, Bratbak G, Zheng T L *et al*, 2011. Effects of virus infection on expression of cell cycle regulatory proteins in the unicellular marine algae *Emiliana huxleyi*. *Acta Oceanol Sin*, 30(4): 89—95
- Liu J W, Xu M M, Zheng T L, 2015. A minireview of marine algal virus-Coccolithoviruses. *J Ocean Univ China*[0], 14(2): 293—300
- Martínez J M, Schroeder D C, Wilson W H, 2012. Dynamics and genotypic composition of *Emiliana huxleyi* and their co-occurring viruses during a coccolithophore bloom in the North Sea. *FEMS Microbiol Ecol*, 81(2): 315—323
- Michaelson L V, Dunn T M, Napier A, 2010. Viral *trans*-dominant manipulation of algal sphingolipids. *Trends Plant Sci*, 15(12): 651—655
- Michell R H, 2008. Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2): 151—161
- Mikami K, 2014. Structural divergence and loss of phosphoinositide-specific phospholipase C signaling components during the evolution of the green plant lineage: implications from structural characteristics of algal components. *Front Plant Sci*, 5: 380
- Munnik T, Testerink C, 2009. Plant phospholipid signaling: “in a nutshell”. *J Lipid Res*, 50(S): S260—S265
- Nakamura Y, Awai K, Masuda T *et al*, 2005. A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 280(9): 7469—7476
- Nomikos M, Mulgrew-Nesbitt A, Pallavi P *et al*, 2007. Binding of phosphoinositide-specific phospholipase C- $\zeta$  (PLC- $\zeta$ ) to phospholipid membranes: potential role of an unstructured cluster of basic residues. *J Biol Chem*, 282(22): 16644—16653
- Port J A, Parker M S, Kodner R B *et al*, 2013. Identification of G protein-coupled receptor signaling pathway proteins in marine diatoms using comparative genomics. *BMC Genomics*. 14: 503—518
- Rose S L, Fulton J M, Brown C M *et al*, 2014. Isolation and characterization of lipid rafts in *Emiliana huxleyi*: a role for membrane microdomains in host-virus interactions. *Environ Microbiol*, 16(4): 1150—1166
- Rosenwasser S, Mausz M A, Schatz D *et al*, 2014. Rewiring host lipid metabolism by large viruses determines the fate of *Emiliana huxleyi*, a bloom-forming alga in the ocean. *Plant Cell*, 26(6): 2689—2707
- Schatz D, Shemi A, Rosenwasser S, 2014. Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms. *New Phytol*, 204(4): 854—863
- Singh A, Kanwar P, Pandey A *et al*, 2013. Comprehensive genomic analysis and expression profiling of phospholipase C gene family during abiotic stresses and development in Rice. *PLoS One*, 8(4): e62494
- Suh P G, Park J I, Manzoli L *et al*, 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep*, 41(6): 415—434
- Tasma I M, Brendel V, Whitham S A *et al*, 2008. Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 46(7): 627—637
- Vermont A I, Martínez J M, Waller J D *et al*, 2016. Virus infection of *Emiliana huxleyi* deters grazing by the copepod *Acartia tonsa*. *J Plankton Res*, 38(5): 1194—1205
- Wheeler G L, Brownlee C, 2008. Ca<sup>2+</sup> signalling in plants and green algae-changing channels. *Trends Plant Sci*, 13(9): 506—514
- Zheng S Z, Liu Y L, Li B *et al*, 2012. Phosphoinositide-specific phospholipase C<sub>9</sub> is involved in the thermotolerance of *Arabidopsis*. *Plant J*, 69(4): 689—700

## STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND EVOLUTION OF PHOSPHOLIPASE C IN MARINE MICROALGA *EMILIANA HUXLEYI*

GUO Qiang-Qiang<sup>1,2</sup>, CAI Wei-Cong<sup>1,2</sup>, LI Gui-Ling<sup>1</sup>, ZENG Jun<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, LIU Jing-Wen<sup>1,2</sup>  
(1. College of Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China)

**Abstract** Phospholipase C (PLC), an important cell-signaling molecule, plays a critical role in GTP-binding protein mediated signal transduction pathways in plants and animals under environmental stress or pathogen invasion. As a unicellular phytoplankton, *Emiliana huxleyi* grows directly upon the completion of a cell cycle, during which cell signaling leads to the regulation of cellular metabolism and primary production, and responds to the environmental changes. However, phytoplankton phospholipase C and its involvement in signaling pathways remain unknown. By searching and compare the NCBI gene database keyword, we screened out 30 PLC proteins of *E. huxleyi* (*EhPLC*). By analyzing in conserved domain with the SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) online, the 30 PLCs could be divided into four categories. In addition, we analyzed the systematic bioinformatics, including signal peptide, transmembrane domain, primary structure, secondary structure, tertiary structure, and cell localization. Certain differences are found in the signal peptide and transmembrane region of these amino acids; and all these PLCs have  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, and random coil in the secondary structure domain, and are located in the mitochondria. However, similarity in the tertiary structure is not obvious. In system evolutionary relationship, *EhPLC* is more intimate to protozoon other than plants. Therefore, the new findings would enrich the network system of plant in PLC signal transduction and provide tools for understanding relationship between PLC cell localization and signal pathways at an environmental stress.

**Key words** *Emiliana huxleyi*; phospholipase C structure; phylogenic evolution; signal transduction; bioinformatics