

浮游植物 metacaspase 的分布、结构及其功能特性*

苏金净^{1,2} 蔡伟聪^{1,2} 李桂玲¹ 李健¹ 曾珺¹ 刘静雯^{1,2}

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

摘要 精氨酸/赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Metacaspase)在浮游植物程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)过程中起着关键作用。本文利用生物信息学方法分析 metacaspase 基因在浮游植物中的分布,并以海洋球石藻(*Emiliania huxleyi*) metacaspases (EhMCs)为代表分析其结构和功能,依据 Uniprot 和 String 数据库挖掘与 metacaspase 功能相关并参与浮游植物 PCD 过程的互作蛋白。结果发现:共计 29 条、四种类型的 metacaspases 分布于 11 种浮游植物中,它们的 metacaspase 蛋白一级结构存在明显差异,但位于 p20 的组氨酸和半胱氨酸活性位点均具有高度的保守性; EhMCs 三级结构与酵母的 metacaspase 十分相似,暗示它们具有类似的功能;浮游植物 metacaspases 与多种蛋白存在直接或间接的互作关系,在细胞 PCD 过程、响应环境胁迫和能量代谢等方面发挥重要作用。另外,metacaspase 的磷酸化修饰可能在浮游植物 PCD 信号转导过程中起调节作用。

关键词 浮游植物;程序性细胞死亡(PCD);metacaspase;结构与功能;互作蛋白

中图分类号 S432.1 doi: 10.11693/hyhz20190300056

精氨酸/赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Metacaspases)广泛存在于高等植物、浮游植物、霉菌、真菌以及细菌中(Bidle *et al.*, 2004),它们均含有类似动物 caspase 酶类保守的结构域及包含组氨酸和半胱氨酸的催化位点(Read *et al.*, 2013),在非生物(如营养、光照、渗透压等)和生物(病毒感染、化感作用等)胁迫诱导的浮游植物程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)过程中起着关键作用(Bidle, 2016)。目前,浮游植物中已确定的 metacaspases 有三种类型,即 I 型、II 型及新近发现的 III 型 metacaspases,与 I 型或 II 型 metacaspases 蛋白酶的结构域不同,III 型 metacaspases 中 p10 和 p20 的结构域进行了重新排序,使 p10 位于 p20 结构域的前端(Coll *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013)。除此之外,浮游植物中还存在着一种类 metacaspase 蛋白酶(metacaspase-like proteases, MCP),其与细菌的 MCP 类似,暗示真核生物 metacaspases 蛋白酶可能起源于细菌(Choi *et al.*, 2013)。Metacaspases 参与众多胁迫诱导的浮游植物

PCD 过程,如营养胁迫(Bidle *et al.*, 2008; 郭莉莎等, 2012; Lu *et al.*, 2017)、病毒感染(Bidle *et al.*, 2007; Bidle, 2016; Liu *et al.*, 2018)等。多数物种具有多个编码 metacaspase 的基因,每个基因的功能也不尽相同,它们除了调控细胞死亡,在细胞信号转导、各种酶活性及蛋白质修饰过程中也发挥着作用(Bidle, 2015)。另外,metacaspase 和经典 caspase 的生化特征以及它们之间在功能上的相互关系也是一个备受关注和讨论的焦点。与经典 caspase 相比,metacaspase 虽然参与 PCD 过程,也保留了类似 caspase 的组氨酸-半胱氨酸的催化活性位点,但是它们具有不同的底物特异性、metacaspase 的酶活不被 caspases 抑制剂所抑制、metacaspase 和 caspase 对底物的切割位点不同等特点(Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010),说明 metacaspase 和 caspase 的功能存在一定的差异。

浮游植物 metacaspase 的结构和功能的研究起步较晚,浮游植物中普遍存在的 metacaspase 与 PCD 过程中活性 caspase 之间的相关性尚缺乏充分的证

* 国家自然科学基金项目,41576166 号;福建省自然科学基金项目,2019J01696 号;福建省科技计划重点项目,2015Y0039 号;福建省食品微生物与酶工程重点实验室开放基金项目,B18097-1 号。苏金净,硕士研究生,E-mail: 201611710031@jmu.edu.cn

通信作者: 刘静雯,博士,教授,E-mail: ljwsbch@163.com

收稿日期: 2019-03-16, 收修改稿日期: 2019-05-20

据。本文基于近年来浮游植物 metacaspase 与 PCD 过程相关性研究报道以及在线相关数据库信息,采用生物信息学方法分析浮游植物 metacaspases 核酸及氨基酸序列特征、蛋白结构、系统进化关系及潜在的磷酸化位点等,并对该蛋白进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能注释及蛋白互作分析,了解 metacaspase 与 caspase 之间在功能上的相关性特点。为进一步深入研究浮游植物 metacaspase 的功能提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究材料

采用关键词“metacaspase”,在 NCBI 数据库中搜索基因,获得该数据库中所有 metacaspases 基因条目,通过种属分类,将所有属于浮游植物的 metacaspases 基因筛选出来并记录相关信息(基因登录号见附表 1)。

1.2 方法

1.2.1 Metacaspase 序列保守性及系发育树的构建 针对 NCBI 数据库中所有浮游植物的 metacaspases 基因,利用 MEGA7 软件进行多重序列比对,选择邻接法(N-J)构建系统发育树。

1.2.2 Metacaspase 的亚细胞定位 选取海洋球石藻 *Emiliana huxleyi* CCMP1516 的 9 条 metacaspases (EhMCs)蛋白序列,利用 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)分析其含有的各类信号肽序列。利用 NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>)和 NetNES (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>)对 9 条 EhMCs 蛋白进行核定位信号和核输出信号预测。

1.2.3 Metacaspase 空间结构分析 以 EhMC1 为例,在蛋白质数据库(protein data bank databases, PDB)中筛选与其序列匹配度最高的物种模板,分别利用 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)和 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)构建蛋白质三级结构模型。

1.2.4 Metacaspase 功能及蛋白质互作分析 利用 NCBI 数据库收集所有浮游植物 metacaspases 蛋白的注释信息,包括细胞成分(cellular component)、分子功能(molecular function)和生物过程(biological process)等,为后续分析工作提供参考。基于 String 数据库(<https://string-db.org/>),利用基因邻接(gene neighborhood)、基

因融合(gene fusions)、共生关系(co-occurrence)、基因共表达(gene co-expression)、蛋白质互作实验(experimentally determined)、数据库记录(databases)以及文本挖掘(textmining)等方法分析与浮游植物 metacaspases 相互作用的蛋白。

1.2.5 Metacaspase 蛋白质磷酸化位点预测

蛋白磷酸化是最常见、最重要的一种翻译后修饰,参与并调节机体的多种生命活动,如信号转导、基因表达、细胞周期及细胞死亡等,并对物种的遗传多样性具有重要贡献。利用 Scansite 在线工具(<http://scansite3.mit.edu/#proteinScan>)预测浮游植物 metacaspases 潜在的磷酸化修饰位点,将有助于了解单细胞浮游植物 PCD 信号通路的调控方式及浮游植物多样性的进化轨迹。

2 结果与讨论

2.1 Metacaspase 基因在浮游植物中的分布

通过在 NCBI 数据库中对浮游植物的 metacaspase 基因进行统计,确定浮游植物一共 11 个物种的 29 条 metacaspases 基因,统计结果见表 1。与已完成基因组测序的其他物种相比,浮游植物中 metacaspase 基因的数量分布并不均匀,如海洋球石藻(*E. huxleyi* CCMP1516)中含有 9 条 metacaspases 基因,而绿藻中的莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)只含有 2 条,同属于绿藻的金牛微球藻(*Ostreococcus tauri*)、原壳小球藻(*Auxenochlorella protothecoides*)及微胞藻(*Micromonas commoda*)则各只有 1 条。浮游植物 metacaspases 基因数在各物种间相差较大,主要区别在于 MCP 数量的不同(表 1)。真核生物 metacaspases 起源于细菌两种类型的 metacaspases,即 type I (存在于 β -、 δ -变形杆菌门、放线菌和硝化螺旋菌中)和 MCP (存在于 α -变形杆菌门)(Choi *et al*, 2013)。进化过程中通过基因水平转移,大多数浮游植物获得了 MCP,有些浮游植物 MCP 的 p10 结构域具有完整的底物识别序列,但有些浮游植物 MCP 缺失了特异性识别底物的序列,这种“冗余”蛋白逐渐丢失导致 metacaspase 数量减少(Choi *et al*, 2013)。

2.2 Metacaspase 基因在浮游植物中的进化分析

利用 MEGA7 软件对浮游植物中 29 条及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 1 条 metacaspases 的氨基酸序列进行多重比对,metacaspases 的活性位点用红色箭头标记(图 1)。

表 1 Metacaspase 基因在浮游植物中的分布统计
Tab.1 Distribution statistics of metacaspase genes in phytoplankton

物种名	数量	类型 I	类型 II	类型 III	MCP	备注(名称)	基因总量
<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>	2	1	1	-	-	Metacaspase(2)	14473
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	1	1	-	-	Metacaspase(2)	14634
<i>Monoraphidium neglectum</i>	2	-	-	-	-	Metacaspase(2)	16808
<i>Micromonas commoda</i>	1	-	-	-	-	hypothetical metacaspase protein(1)	10299
<i>Ostreococcus tauri</i>	1	-	-	-	-	Metacaspase involved in regulation of apoptosis(1)	8119
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	1	-	-	-	-	Metacaspase(1)	7198
<i>Emiliania huxleyi</i> CCMP1516	9	2	-	-	7	putative metacaspase protein (8) putative metacaspase protein with Ca-binding EF hand domain (1)	38549
<i>Phaeodactylum tricoratum</i> CCAP 1055/1	5	-	-	3	2	metacaspase (5)	10022
<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP1335	3	1	-	2	-	metacaspase-like protein (1) hypothetical metacaspase protein (2)	10517
<i>Chondrus crispus</i>	2	-	1	-	-	metacaspase (1) metacaspase-like, probable inactive (1)	9603
<i>Aureococcus anophagefferens</i>	1	1	-	-	-	putative metacaspase(1)	11522

注:“-”表示无相关信息;()内的数字表示分类命名的 metacaspase 个数;MCP: metacaspase-like proteases, 类 metacaspase 蛋白酶

陆生植物 metacaspase 的活性位点一般是位于 p20 的 164 位组氨酸(His)和 220 位的半胱氨酸(Cys), 浮游植物与陆生植物拟南芥 metacaspase 1 位于第 164 位和第 220 位活性位点的氨基酸组成几乎完全相同, 表明浮游植物和陆生植物 metacaspase 基因存在一定的亲缘关系。单针藻(*Monoraphidium neglectum*) metacaspase 2 和金牛微球藻 metacaspase 缺失活性位点的组氨酸和半胱氨酸, 在 164 位分别被丙氨酸(Ala)和精氨酸(Arg)所取代, 在 220 位则分别被异亮氨酸(Ile)和酪氨酸(Tyr)取代, 单针藻 metacaspase 1 在 220 位缺失半胱氨酸。组氨酸属于极性带正电荷的 R 基氨基酸, 丙氨酸属于脂肪族类非极性带 R 基氨基酸, 精氨酸属于极性带正电荷且有胍基的碱性氨基酸, 半胱氨酸是不带电荷的极性 R 基氨基酸, 异亮氨酸属于脂肪族类带 R 基氨基酸, 酪氨酸属于不带电荷的极性 R 基氨基酸, 可以看出取代的氨基酸在理化性质上与原来的氨基酸相比存在显著差异, 因此推测单针藻 metacaspase 2 和金牛微球藻 metacaspase 可能不参与 PCD 过程, 而可能具有其它功能。

系统发育树显示, 来自同一物种的不同 metacaspase 基因之间具有极强的亲缘关系, 如三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)及海洋球石藻, 但莱茵衣藻(*C. reinhardtii*)虽然含有多条 metacaspases 基因, 这些 metacaspases 基因相互之间似乎并没有太多的亲缘关系(图 2)。已被鉴定的 II 型莱茵衣藻 metacaspase 1、团藻(*Volvox carteri*)metacaspase 1 分别被分到同一个分枝, 说明相同类型的 metacaspase 尽管来自不同物种, 却有着极强的同源性。另外, 9 条 EhMCs 被分成两类, 其中 EhMC6 独立为一类, 其他 8 条 EhMCs 聚为一类。

2.3 Metacaspase 的亚细胞定位

通过对 9 条 EhMCs 分泌信号肽和线粒体转运肽的预测分析, 发现它们氨基酸序列的 SP 值均低于 0.5, 说明这些 EhMCs 的 N 端不具有分泌信号肽, 不会通过内膜系统分泌到细胞外, 可能为胞内蛋白。而 EhMC5 和 EhMC6 的 mTP 值均大于 0.5, 极有可能进入线粒体中发挥作用。另外, EhMC8 为具有核定位信号序列和核输出序列的核质蛋白。如在挪威云杉胚柄细胞退化诱导的 PCD 过程中, 一种 II 型 metacaspase 从细胞质转运至细胞核, 促进染色体的降解, 与动物细胞中 caspase-3, 6 的作用类似(Suarez *et al.*, 2004)。

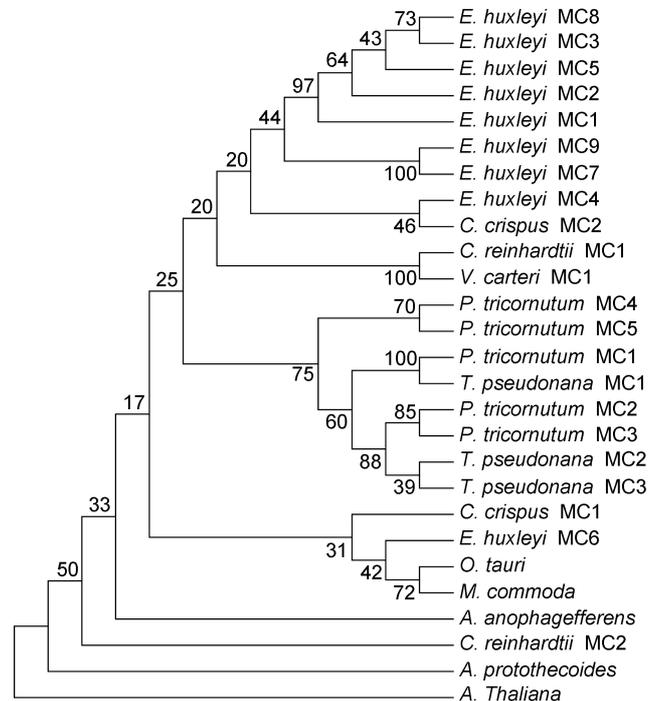


图 2 浮游植物 Metacaspase 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of metacaspases in phytoplankton

2.4 Metacaspase 蛋白质空间结构分析

在 PDB 数据库中搜索到与 EhMC2 模板匹配度最高为 33.05%, 是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 metacaspase (Yca1), 其 PDB 数据库编号为: 4f6o.1。利用 SWISS-MODEL 对 EhMC2 进行同源建模并用 Modeller 软件对该模型进行评估。Modeller 的平均评分小于 -0.02 时可信度较可靠。虽然 EhMC2 与模板的匹配度最高, 但模拟结果的评分值均大于 -0.02, 可信度较低。因此, 我们进一步采用 Phyre2 分别对 EhMC1 和 EhMC2 进行精确的折叠识别建模, 并采用 Modeller 对模型结果进行评估, 结果显示该模型对 EhMC1 模拟结果如图 3a, 且平均评分值小于 -0.02(图 3b), 可见在与模板蛋白同源性较低的情况下, 利用折叠识别建模的结果更加准确可靠。预测的 EhMC1 的三级结构显示, 具有 6 个 α 螺旋、8 个 β 折叠, p20 结构域中 Cys192 残基处于酶活性中心, 与 His147 构成水解二联体, 形成具有催化功能的水解酶折叠中心(图 3a)。实验结果显示, 酵母的活性 Yca1 具有同源二聚体特点, Yca1 的 p20 结构域在 Arg72 和 Lys86 两处被切割成两个较小的 36kDa 片段并二聚化, 而钙离子能够特异性地增强 Yca1 的自剪切加工(Wong *et al.*, 2012)。因此推测, 自剪切加工和二聚化可能也是 EhMC1 产生活性形式的关键步骤。

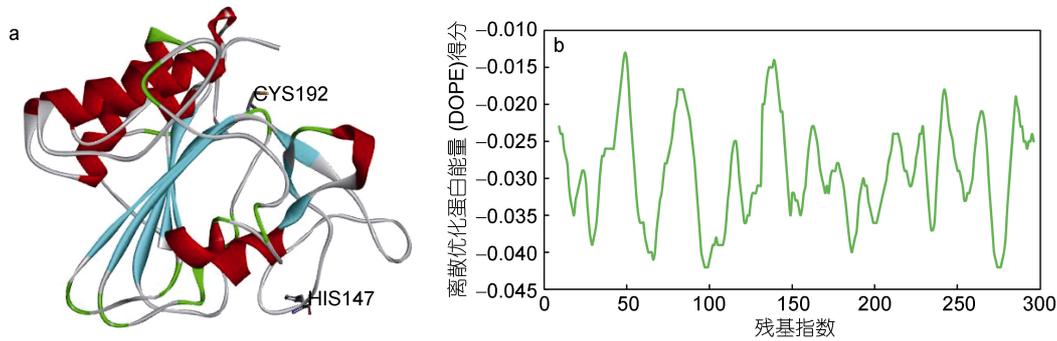


图3 EhMC1 蛋白三维结构预测及评价

Fig.3 Three-dimensional structure and the evaluation of EhMC1

注: a. 折叠识别建模三级结构; b. 折叠识别建模评价

另外, 植物 metacaspases 中的某些氨基酸可以被 S-亚硝基化, 从而导致 metacaspase 降解失活, 如拟南芥 AtMC9 的活性位点处的 Cys-147 在植物体内可被 S-亚硝基化, 抑制其自我加工及降解底物活性 (Belenghi *et al.*, 2007)。S-亚硝基化是一氧化氮(NO)以共价键方式与蛋白质特定位置上的半胱氨酸(Cys)残基相连, 从而影响被修饰蛋白质的活性, 是一种翻译后基因表达调控方式。研究表明, 病毒感染诱导海洋球石藻细胞产生和释放 NO 并启动宿主细胞 PCD 过程 (Rosenwasser *et al.*, 2016)。病毒诱导球石藻 PCD 的精确机制尚不清楚, 不过由此我们可以推测 S-亚硝基化这种翻译后修饰方式可能在病毒诱导的球石藻 PCD 过程中调控 metacaspase 的活性。

2.5 Metacaspase 蛋白质功能分析

Metacaspases 与 caspase 家族半胱氨酸蛋白酶具有远缘关系, 且与植物和低等真核细胞中的 PCD 过程相关。Metacaspase 是精氨酸/赖氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶类, 其通过自剪切加工或二聚化激活 (McLuskey *et al.*, 2012)。在 UniProt 蛋白数据库中 11 个浮游植物物种的 29 个 metacaspases 都具有半胱氨酸蛋白酶活性, 并且在 NCBI 数据库的电子注释中发现 EhMC4 具有钙离子结合位点。许多生化证据表明, 高等植物 I 型和 II 型 metacaspase 的催化活性依赖于钙离子的存在 (Du *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2011; Piszczek *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2013)。Choi 等人 (2013) 通过结构预测分析显示, 隐藻 (Cryptophyta, *Guillardia theta*) 具有 III 型 metacaspase (GtMC2) (Choi *et al.*, 2013), 随后的实验结果证实其具有蛋白内切酶活性, 并优先切割精氨酸残基, 且 GtMC2 的活性依赖于钙离子浓度 (Klemenčič *et al.*, 2018)。蓝藻 (*Microcystis aeruginosa*) 细胞具有缺乏 p10 结构域的

MCP (MaOC1), 其依赖于钙离子并以二聚化形式激活, 即 MaOC1 通过切割 Arg219 残基后活化, 形成分子量为 55kDa 和 25kDa 的蛋白亚基 (Klemenčič *et al.*, 2015)。目前, 浮游植物的 metacaspase 相关实验数据较少, 基因组及蛋白注释也不完整, 它们在 PCD 过程中所处的位置尚不十分清晰。

利用 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 分析推测与浮游植物 metacaspase 互作的蛋白质, 在中等条件下 (score 等于 0.4) 选取评分大于 0.4 的蛋白作为分析对象。结果发现, 莱茵衣藻、三角褐指藻及假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 具有蛋白互作相关数据, 且绝大多数互作蛋白都定位于胞质内或细胞膜上 (表 2)。这些互作蛋白可能通过调控诸如依赖于钙离子的半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸内肽酶及酰基转移酶的活性参与胁迫应答、蛋白水解、细胞 PCD 及自噬等生物学过程。

2.6 浮游植物 metacaspases 磷酸化特点

选择模序程序 (Motif Scan) 并设置 “high” 严谨度 (百分位分数设置为 0.1%), 对除 EhMCs 外 20 条 metacaspases 进行磷酸化修饰分析, 结果显示 9 个 metacaspases 可能被特定蛋白激酶磷酸化, 总共含有 20 个潜在的磷酸化位点 (表 3), 且一个蛋白含有一个或多个磷酸化位点。如莱茵衣藻 metacaspase (XP_001696956) 有 3 个磷酸化结构域, 其中两个是 Abl Kinase, 位点为 Y73 和 Y131; 另一个是 PLK1 Kinase, 位点为 T271; 其余的物种也检测到磷酸化位点。

许多 caspase 的活性可以通过蛋白磷酸化直接调节 (Dix *et al.*, 2012)。Martins 等人 (1997) 首次报道在依托泊苷 (etoposide) 诱导的细胞 PCD 过程中, HL-60 细胞的胞浆中存在磷酸化形式的活性 caspase, 并证实至少三种 caspase 由激酶磷酸化激活, 且 caspase-3 中含有多个潜在的磷酸化位点。有关浮游植物 metacaspase

表 2 浮游植物 metacaspase 互做蛋白的功能信息注释
Tab.2 The protein-protein interactions of metacaspase family in phytoplankton

物种名称	互做蛋白登录号	相关系数	细胞成分	分子功能	生物过程
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	EDO96786	0.609	叶绿体/细胞质基质	丝氨酸内肽酶活性	光抑制作用/蛋白糖基化
	EDP07810	0.565	胞内/运动纤毛	钙离子依赖的半胱氨酸内肽酶活性	蛋白水解
	EDP07609	0.565	膜整合成分/胞内	钙离子依赖的半胱氨酸内肽酶活性	蛋白水解
	EDP07381	0.565	胞内	钙离子依赖的半胱氨酸内肽酶活性	—
	EDP00530	0.565	胞内/运动纤毛	钙离子依赖的半胱氨酸内肽酶活性	蛋白水解
	EDP07861	0.695	胞质核糖体小亚基	结合核苷酸/核糖体结构组成	tricotronic rRNA 转录成熟体 / 翻译
	Phatr45234	0.474	胞内	钙离子依赖的半胱氨酸内肽酶活性	—
	Phatr50303	0.471	—	—	自噬
	Phatr14561	0.467	膜整合成分	—	—
	Phatr49544	0.465	膜整合成分	α -1,4-葡萄糖苷活性/ α -葡萄糖苷酶活性/转移酶活性, 酰基转移酶活性	—
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Phatr49462	0.465	膜整合成分	α -1,4-葡萄糖苷活性/ α -葡萄糖苷酶活性/转移酶活性, 酰基转移酶活性	—
	thaps21893	0.485	胞内	钙离子依赖的半胱氨酸内肽酶活性	蛋白水解
	thaps32176	0.485	—	—	自噬/细胞对氮饥饿的响应
	thaps17961	0.475	膜整合成分	—	—
	thaps928	0.470	膜整合成分	转移酶活性, 酰基转移	—
	thaps7704	0.470	细胞	黄素腺嘌呤二核苷酸结合/氧化还原酶活性	细胞氧化还原稳态

注: “—”表示无相关信息

表 3 浮游植物 Metacaspase 蛋白磷酸化位点分析
Tab.3 Analysis of phosphorylation sites of metacaspase in phytoplankton

蛋白名称(登录号)	得分	百分位值 (%)	基序	基序集群	位点
CrMC2 (XP_001696956)	0.298	0.014	Abl 激酶 (Abl_Kin)	酪氨酸激酶集群 (Y_kin)	Y73
	0.325	0.029	Abl 激酶 (Abl_Kin)	酪氨酸激酶集群 (Y_kin)	Y131
MnMC2 (XP_013906657)	0.166	0.007	PLK1 激酶 (PLK1)	嗜酸性丝氨酸/苏氨酸激酶集群 (Acid_ST_kin)	T271
	0.369	0.096	Abl 激酶 (Abl_Kin)	酪氨酸激酶集群 (Y_kin)	Y124
OtMC (XP_003083452)	0.322	0.074	酪蛋白激酶 2 (Casn_Kin2)	嗜酸性丝氨酸/苏氨酸激酶集群 (Acid_ST_kin)	S112
PtMC1 (XP_002178108)	0.425	0.071	Erk D-结构域 (ErkDD)	激酶结合位点集群 (Kin_bind)	L493
	0.287	0.017	Src SH3 结构域 (Src_SH3)	SH3 功能域 (SH3)	P320
PtMC2 (XP_002180075)	0.287	0.017	Src SH3 结构域 (Src_SH3)	SH3 功能域 (SH3)	P320
	0.230	0.080	CDK1 基序 1 - [ST]P×[KR]x (CDK1_1)	脯氨酸依赖性丝氨酸/苏氨酸激酶集群 (Pro_ST_kin)	T75
	0.212	0.052	CDK1 基序 1 - [ST]P×[KR]x (CDK1_1)	脯氨酸依赖性丝氨酸/苏氨酸激酶集群 (Pro_ST_kin)	S267
PtMC3 (XP_002182518)	0.224	0.035	CDK1 基序 2 - [ST]P××K (CDK1_2)	脯氨酸依赖性丝氨酸/苏氨酸激酶集群 (Pro_ST_kin)	S267
	0.312	0.022	Cdc2 激酶 (Cdc2_Kin)	脯氨酸依赖性丝氨酸/苏氨酸激酶集群 (Pro_ST_kin)	S267
	0.306	0.058	Cdk5 激酶 (Cdk5_Kin)	脯氨酸依赖性丝氨酸/苏氨酸激酶集群 (Pro_ST_kin)	S267
TpMC1 (XP_002290139)	0.397	0.009	AMP_集美 (AMPK)	嗜碱性丝氨酸/苏氨酸激酶 (Baso_ST_kin)	S64
	0.406	0.067	Akt 激酶 (Akt_Kin)	嗜碱性丝氨酸/苏氨酸激酶 (Baso_ST_kin)	S223
	0.341	0.076	PKC $\alpha/\beta/\gamma$ (PKC_common)	嗜碱性丝氨酸/苏氨酸激酶 (Baso_ST_kin)	S191
TpMC3 (XP_002297230)	0.286	0.092	蛋白激酶 A (PKA_Kin)	嗜碱性丝氨酸/苏氨酸激酶 (Baso_ST_kin)	S191
	0.286	0.092	蛋白激酶 A (PKA_Kin)	嗜碱性丝氨酸/苏氨酸激酶 (Baso_ST_kin)	S191
	0.279	0.009	Abl 激酶 (Abl_Kin)	酪氨酸激酶集群 (Y_kin)	Y186
VeMC2 (XP_002948071)	0.349	0.058	Abl 激酶 (Abl_Kin)	酪氨酸激酶集群 (Y_kin)	Y201

的磷酸化研究鲜有报道。Liu 等(2018)发现海洋球石藻 9 条 EhMCs 的一级结构中均存在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸等多个潜在的磷酸化修饰位点, 并通过实验首次证实了病毒诱导球石藻 PCD 过程中伴随着磷酸化 metacaspase 的高表达(Liu *et al*, 2018)。另外, 海洋球石藻 *E. huxleyi* 磷脂酶 C (PLC) (EhPLC) 的一级结构中也存在多样性的磷酸化修饰, 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, 在对环境胁迫应答及病原菌致病过程中发挥重要作用(郭强强等, 2018)。可见, 蛋白质的磷酸化与去磷酸化分子开关可能在调控浮游植物应答环境胁迫过程中起着关键作用。

3 结论

本文利用生物信息学方法系统地分析了浮游植物 PCD 特征蛋白酶 metacaspases 的分布、结构特点及功能特性, 发现浮游植物该蛋白类型多样, 虽然它们的一级结构存在明显差异, 但活性位点的氨基酸基序具有高度保守性, 且蛋白三级结构与酵母的 metacaspase 高度相似, 暗示它们可能具有类似的功能。与浮游植物 metacaspase 相互作用的蛋白大部分具有依赖于钙离子的半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸内肽酶及酰基转移酶的功能。浮游植物 metacaspases 存在多个潜在的磷酸化修饰位点, 暗示磷酸化修饰对该酶的活性功能具有一定的调控作用。

参 考 文 献

郭莉莎, 章 军, 吴 娟等, 2012. 黑暗暗气条件下铜绿微囊藻细胞死亡的形态结构和生理生化变化. 微生物学报, 52(2): 228—235

郭强强, 蔡伟聪, 李桂玲等, 2018. 海洋球石藻(*Emiliania huxleyi*)磷脂酶 C 的结构特点及系统进化分析. 海洋与湖沼, 49(1): 106—116

Belenghi B, Romero-Puertas M C, Vercammen D *et al*, 2007. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2): 1352—1358

Bidle K D, 2015. The molecular ecophysiology of programmed cell death in marine phytoplankton. *Annual Review of Marine Science*, 7: 341—375

Bidle K D, 2016. Programmed cell death in unicellular phytoplankton. *Current Biology*, 26(13): R594—R607

Bidle K D, Bender S J, 2008. Iron starvation and culture age activate metacaspases and programmed cell death in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Eukaryotic Cell*, 7(2): 223—236

Bidle K D, Falkowski P G, 2004. Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*,

2(8): 643—655

Bidle K D, Haramaty L, Barcelos E Ramos J *et al*, 2007. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14): 6049—6054

Carmona-Gutierrez D, Fröhlich K U, Kroemer G *et al*, 2010. Metacaspases are caspases. Doubt no more. *Cell Death and Differentiation*, 17(3): 377—378

Choi C J, Berges J A, 2013. New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. *Cell Death and Disease*, 4(2): e490

Coll N S, Vercammen D, Smidler A *et al*, 2010. *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science*, 330(6009): 1393—1397

Dix M M, Simon G M, Wang C *et al*, 2012. Functional interplay between caspase cleavage and phosphorylation sculpts the apoptotic proteome. *Cell*, 150(2): 426—440

Du F, Zhang Y, Ren H Y, 2011. The universal bundling activity of AtVNL4 in diffusely growing cells. *Plant Signaling & Behavior*, 6(9): 1290—1293

Klemenčič M, Funk C, 2018. Type III metacaspases: calcium-dependent activity proposes new function for the p10 domain. *New Phytologist*, 218(3): 1179—1191

Klemenčič M, Novinec M, Dolinar M, 2015. Orthocaspases are proteolytically active prokaryotic caspase homologues: the case of *Microcystis aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 98(1): 142—150

Liu J W, Cai W C, Fang X *et al*, 2018. Virus-induced apoptosis and phosphorylation form of metacaspase in the marine coccolithophorid *Emiliania huxleyi*. *Archives of Microbiology*, 200(3): 413—422

Lu Z Y, Sha J, Tian Y *et al*, 2017. Polyphenolic allelochemical pyrogallol acid induces caspase-3(like)-dependent programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Algal Research*, 21: 148—155

Machado M F M, Marcondes M F, Juliano M A *et al*, 2013. Substrate specificity and the effect of calcium on *Trypanosoma brucei* metacaspase 2. *The FEBS Journal*, 280(11): 2608—2621

Martins L M, Kottke T, Mesner P W *et al*, 1997. Activation of multiple interleukin-1 converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(11): 7421—7430

McLuskey K, Rudolf J, Proto W R *et al*, 2012. Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19): 7469—7474

Piszczek E, Dudkiewicz M, Mielecki M, 2012. Biochemical and bioinformatic characterization of Type II metacaspase protein (TaeMCAII) from wheat. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(6): 1338—1347

Read B A, Kegel J, Klute M J *et al*, 2013. Pan genome of the phytoplankton *Emiliania* underpins its global distribution. *Nature*, 499(7457): 209—213

Rosenwasser S, Ziv C, Van Creveld S G *et al*, 2016. Virocell

- metabolism: metabolic innovations during host-virus interactions in the ocean. *Trends in Microbiology*, 24(10): 821—832
- Suarez M F, Filonova L H, Smertenko A *et al*, 2004. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology*, 14(9): R339—R340
- Wang X D, Wang X J, Feng H *et al*, 2012. *TaMCA4*, a novel wheat metacaspase gene functions in programmed cell death induced by the fungal pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(6): 755—764
- Watanabe N, Lam E, 2011. Calcium-dependent activation and autolysis of *Arabidopsis* metacaspase 2d. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12): 10027—10040
- Wong A H H, Yan C Y, Shi Y G, 2012. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35): 29251—29259

DISTRIBUTION, STRUCTURE, AND FUNCTION OF PHYTOPLANKTON METACASPASES

SU Jin-Jing^{1,2}, CAI Wei-Cong^{1,2}, LI Gui-Ling¹, LI Jian¹, ZENG Jun¹, LIU Jing-Wen^{1,2}

(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 Metacaspases are evolutionarily distant homologs of caspases and play key roles in phytoplankton programmed cell death (PCD). We analyzed the characteristics of distribution, structure, and function of phytoplankton metacaspases using bioinformatics methods. The results show that a total of 29 phytoplankton metacaspases are found in 11 phytoplankton species, and can be grouped into three main types, namely type I, type II, and type III based on their multiple alignment of amino acid sequence. Despite the low amino acid sequence identity, they displayed high structural conservation in histidine- and cysteine- containing catalytic domain. The three-dimensional structures of *Emiliana huxleyi* (EhMC) are very close to that of yeast metacaspase, suggesting that they might have similar function. The results of the protein-protein interaction analysis revealed that metacaspases directly or indirectly interacted with multiple cellular proteins, playing a critical role in cell apoptosis, response to environmental stress, and energy metabolism. Furthermore, the phosphorylation modification of metacaspase may play a regulatory role in the PCD signal transduction of phytoplankton.

Key words phytoplankton; programmed cell death (PCD); metacaspase; structure and function; protein-protein interaction

附表 1 浮游植物 metacaspases 基因登录号
Tab.S1 Metacaspases in phytoplankton

物种	缩写 ^a	基因 ID	mRNA ID	蛋白 ID
<i>Aureococcus anophagefferens</i>	AaMC1	20221022	XM_009042055.1	XP_009040303.1
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	ApMC1	23614527	XM_011399004.1	XP_011397306.1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CrMC1	5717424	XM_001691774.1	XP_001691826.1
	CrMC2	5722640	XM_001696904.1	XP_001696956.1
<i>Chondrus crispus</i>	CcMC1	17321622	XM_005713836.1	XP_005713893.1
	CcMC2	17324901	XM_005717127.1	XP_005717184.1
	EhMC1	17284475	XM_005791576.1	XP_005791633.1
<i>Emiliana huxleyi</i> CCMP1516	EhMC2	17283241	XM_005790343.1	XP_005790400.1
	EhMC3	17277722	XM_005784825.1	XP_005784882.1
	EhMC4	17277488	XM_005784588.1	XP_005784645.1
	EhMC5	17269785	XM_005776613.1	XP_005776670.1
	EhMC6	17267081	XM_005773908.1	XP_005773965.1

续附表

物种	缩写 ^a	基因 ID	mRNA ID	蛋白 ID
	EhMC7	17256866	XM_005763016.1	XP_005763073.1
	EhMC8	17253171	XM_005759676.1	XP_005759733.1
	EhMC9	17251088	XM_005757309.1	XP_005757366.1
<i>Micromonas commoda</i>	McMC1	8242492	XM_002501537.1	XP_002501583.1
	MnMC1	25726426	XM_014051203.1	XP_013906657.1
<i>Monoraphidium neglectum</i>	MnMC2	25726427	XM_014051204.1	XP_013906658.1
	OtMC1	9831219	XM_003083404.1	XP_003083452.1
	PtMC1	7197248	XM_002178072.1	XP_002178108.1
	PtMC2	7200976	XM_002180039.1	XP_002180075.1
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> CCAP 1055/1	PtMC3	7203298	XM_002182482.1	XP_002182518.1
	PtMC4	7203526	XM_002182516.1	XP_002182552.1
	PtMC5	7203528	XM_002182670.1	XP_002182706.1
	TpMC1	7449711	XM_002290103.1	XP_002290139.1
<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP1335	TpMC2	7450918	XM_002295318.1	XP_002295354.1
	TpMC3	7451860	XM_002297194.1	XP_002297230.1
	VcMC1	9618094	XM_002946692.1	XP_002946738.1
<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i>	VcMC2	9621258	XM_002948025.1	XP_002948071.1

a: MC, Metacaspase