



真菌中 G 蛋白信号调控因子蛋白类型与其理化性质的关系

祝友朋^{1,2}, 韩长志^{1,3*}

¹西南林业大学生物多样性保护学院, 云南 昆明 650224

²西南林业大学研究生院, 云南 昆明 650224

³云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224

摘要: 【目的】G蛋白信号调控因子(RGS)作为G蛋白信号转导途径的负调控因子, 在植物病原菌的致病性和有性生殖调控方面发挥着重要作用。研究真菌中RGS蛋白类型与其理化性质及特征的关系, 为今后深入开展不同真菌中具有不同类别RGS的功能解析打下坚实的理论基础。【方法】前期对模式生物、病原菌、非致病菌等49个真菌中229个RGS蛋白序列进行找寻, 并根据其保守结构域和同源性确定RGS类型有DEP-RGS、RGS-TM、PXA-RGS-PX、RGS、RGS-PAS-PAC、TM-RGS等6类。利用蛋白质数据库、ProtComp v9.0、PHD以及MEME等网站对上述RGS蛋白进行理化性质、亚细胞定位以及二级结构、基序等特征分析。【结果】上述不同类别的RGS蛋白具有明显的类别特征性, 同时, 也具有以下共同特征: 理论等电点集中在6.01–7.00; 不稳定性系数集中在40.01–60.00; 95%以上的RGS蛋白属于亲水性蛋白; 亲水性最强氨基酸残基存在较多的是R、D、E、Q、N; 疏水性最强氨基酸残基存在较多的L、A、V、F、I; 二级结构组成特征为 β 折叠较少; 转运肽情况尚未明确; 亚细胞定位多集中在细胞核。【结论】真菌中6类RGS蛋白的理化性质具有一定的共同特征, 但不同类别的RGS蛋白也具有明显的类别特征, 主要表现在保守结构域、二级结构、等电点、转运肽和亚细胞定位情况。

关键词: 真菌, G 蛋白信号调控因子, 理化性质, 关系解析, 生物信息学

G 蛋白信号途径作为真菌中诸多细胞信号转导途径之一, 参与调控真菌生长发育、生殖以及侵染致病等相关过程^[1]。G 蛋白信号调控因子

(regulators of G-protein signaling, RGS)作为该途径的负调控因子^[2], 主要功能是通过促进 G α 偶联的 GTP 水解, 使 G α 和 G $\beta\gamma$ 亚基发生重新聚合^[3–5],

基金项目: 云南省应用基础研究计划(2018FG001-028); 国家自然科学基金(31960314); 西南林业大学大学生创新创业项目(2018Y012)

*通信作者。Tel/Fax: +86-871-63862918; E-mail: hanchangzhi2010@163.com

收稿日期: 2020-03-16; 修回日期: 2020-06-17; 网络出版日期: 2020-08-17

导致 G 蛋白失活而实现快速关闭 G 蛋白信号途径^[6]。国内外学者就众多模式生物真菌中含有的 RGS 数量和功能开展了诸多研究工作,明确酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288c 有 4 个 RGS 蛋白(Sst2、Res2、Rax1 和 Mdm1),影响着有性生殖、细胞极性和细胞遗传^[7-8]; 构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 有 5 个 RGS 蛋白(FlbA、RgsA、RgsB、RgsC 和 GprK),影响着营养生长、压迫反应、无性产孢、气生菌丝和色素的产生^[9-11]; 同时,对于植物病原真菌中 RGS 蛋白开展了诸多研究工作,明确稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 有 8 个 RGS 蛋白^[12](MoRGS1–MoRGS8),影响着营养生长、有性/无性产孢、附着胞分化和侵染菌丝的生长^[13-14]; 轮枝镰孢菌 *Fusarium verticillioides* 有 6 个 RGS 蛋白(RgsA、ResB、ResC1、RgsC2、FlbA1 和 FlbA2),影响着分生孢子的形成和伏马菌素 B1 的合成^[15]; 玉米赤霉菌 *Gibberella zeae* 有 7 个 RGS 蛋白(FgFlbA、FgFlbB、FgRgsA、FgRgsB、FgRgsB2、FgRgsC 和 FgGprK),影响着营养生长、毒素产生、有性/无性产孢和致病性^[16]; 新型隐球菌 *Cryptococcus neoformans* 有 3 个(Crg1、Crg2 和 Crg3)^[17]; 禾谷炭疽菌 *Colletotrichum graminicola* 有 6 个(CgRGS1–CgRGS6)^[18]; 希金斯炭疽菌 *C. higginsianum* 有 5 个(ChRGS1–ChRGS5)^[19]; 以及引起橡胶炭疽病的胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) RGS 数量有 10 个(CgRGS1–CgRGS10),影响着营养生长、分生孢子产生、细胞壁完整性及致病力^[20-22]。上述研究已明确 RGS 在真菌的菌丝发育、产孢、次生代谢产物及色素合成,以及致病性和有性生殖调控等方面发挥着重要作用^[23]。另外,南京农业大学张正光教授研究团队在稻瘟病菌 *M. oryzae* 中,通过对 RGS 结

构域互换载体、并将其回补到相应的基因敲除突变体中,明确该菌中 RGS7 保守结构域能够恢复 RGS1 突变体的缺陷表型,说明 RGS1 和 RGS7 蛋白中的 RGS 结构域所具有的功能是一致的,尽管如此,将其他 6 个 RGS 结构域替换 RGS1 的保守结构域后发生了定位的变化,并不能恢复缺陷突变体的表型^[14]。然而,上述研究更多关注的是某种真菌中 RGS 的数量和功能等方面的研究,尚未见不同 RGS 类型与其理化性质及特征关系的研究。

同时,学术界对于生物中 RGS 蛋白的分类依据主要为 RGS 蛋白氨基酸之间同源性和保守结构域的差异性^[24]。前人根据 RGS 氨基酸同源性,把 30 多种 RGS 蛋白分为了 6 个亚家族^[24],不同的亚家族含有不同的结构域。前期,本研究团队以 49 个全基因组序列已经释放的真菌(构巢曲霉 *A. nidulans*、土曲霉 *A. terreus*、棒曲霉 *A. clavatus*、烟曲霉 *A. fumigatus*、费氏曲霉 *A. fischeri*、米曲霉 *A. oryzae*、黄曲霉 *A. flavus*、黑曲霉 *A. niger*、假禾谷镰刀菌 *Fusarium pseudograminearum*、轮枝镰刀菌 *F. verticillioides*、藤黑镰孢菌 *F. fujikuroi*、腐皮镰刀菌 *F. solain*、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*、禾谷镰刀菌 *F. graminearum*、里氏木霉 *Trichoderma reesei*、绿木霉 *T. virens*、禾谷炭疽菌 *C. graminicola*、希金斯炭疽菌 *C. higginsianum*、西瓜炭疽菌 *C. orbiculare*、胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*、大丽轮枝菌 *Verticillium dahlia*、毕赤酵母 *Komagataella pastoris*、解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica*、棉阿舒囊霉 *Ashbya gossypii*、酿酒酵母 *S. cerevisiae*、日本裂殖酵母 *Schizosaccharomyces japonicus*、粟酒裂殖酵母 *S. pombe*、低温裂殖酵母 *S. cryophilus*、八孢裂殖酵母 *S. octosporus*、松

杨栅锈菌 *Melampsora laricipopulina*、小麦秆锈病菌 *Puccinia graminis*、叶锈菌 *Puccinia triticina*、圆核腔菌 *Pyrenophora teres*、小麦颖枯病菌 *Parastagonospora nodorum*、小球腔菌 *Leptosphaeria maculans*、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis*、稻瘟菌 *M. oryzae*、草坪斑枯病菌 *Magnaporthe poae*、玉米丝黑穗病菌 *Sporisorium reilianum*、玉米黑粉菌 *Ustilago maydis*、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、灰霉菌 *Botrytis cinerea*、松穴褥盘孢菌 *Dothistroma septosporum*、小麦叶枯病菌 *Zymoseptoria tritici*、粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa*、银耳 *Cryptococcus neoformans*、松露 *Tuber melanosporum*、禾本科布氏白粉菌 *Blumeria graminis*、花药黑粉菌 *Microbotryum violaceum*)为研究对象, 利用 OrthoVenn2 进行 RGS 同源基因比对、根据酿酒酵母 *S. cerevisiae* S288C 的 4 个 RGS 氨基酸序列在线 BLASTp 比对以及 NCBI 数据库关键词检索等方法, 并通过 SMART 进行保守结构域分析, 得到 229 个 RGS 蛋白序列, 并根据 RGS 中保守结构域和同源性进行分类, 可以划分为 6 类(I–VI型), 保守结构域类型分别为 RGS-TM、DEP-RGS、PXA-RGS-PX、RGS、RGS-PAS-PAC、TM-RGS, 其数量分别为 56、58、46、44、17、8 个。其中, DEP 结构域是一个由约 80 个氨基酸残基组成的球形结构域, 主要功能是将含有 DEP 结构域的蛋白质靶向特定的亚细胞膜位点, 在靶向 G 蛋白偶联的信号传导途径中发挥选择性作用; PX 结构域是一个长约 120 个氨基酸残基组成的能够与磷脂结合的序列, 作为分拣信号将 RGS 蛋白定位到不同的地方, 发挥多种功能, 如细胞信号传导、水泡运输、蛋白质分选和脂质修饰等, 而 PXA 结构域能够

与 PX 结合, 在液泡形态分化和将蛋白定位在液泡中发挥着作用; PAS 结构域则参与许多信号蛋白的传递, 被用作信号传感器, PAC 域出现在所有已知 PAS 域的 C 末端, 有助于 PAS 结构域折叠^[25]。本研究基于此, 对 49 个真菌中 6 类共 229 个 RGS 蛋白的理化性质、不稳定系数、疏水性、二级结构、转运肽及亚细胞定位、基序等特性开展生物信息学预测分析, 明确不同 RGS 类型与其理化性质及特征关系, 以期为今后深入开展植物病原丝状真菌中的 RGS 功能解析打下坚实的理论基础。

1 材料和方法

1.1 RGS 蛋白序列来源

前期所明确的 49 个真菌中 229 个 RGS 蛋白序列。

1.2 RGS 蛋白理化性质分析

运用蛋白质数据库分析 RGS 蛋白的理化性质^[26], 包括理论等电点、不稳定性系数、总亲水性等; 采用 PHD 分析 RGS 蛋白的二级结构^[27]; 采用 ProtScale 分析 RGS 蛋白的疏水性; 采用 TargetP 1.1 Server 分析 RGS 蛋白的转运肽^[28]; 采用 ProtComp v9.0 分析 RGS 蛋白的亚细胞定位情况; 采用 MEME 分析 RGS 蛋白的 motif, 然后对分析数据进行整理归纳^[29]。

2 结果和分析

2.1 不同类别 RGS 蛋白具有不同的 motif

根据 RGS 中保守结构域和同源性进行分类, 可以划分为 6 类(I–VI型), 保守结构域类型分别

为 RGS-TM、DEP-RGS、PXA-RGS-PX、RGS、RGS-PAS-PAC、TM-RGS，然后对不同类别的 RGS 蛋白序列开展 MEME 分析，结果表明 6 类 RGS 蛋白具有不同的 motif (图 1)。就不同类别的 RGS 而言，在基序组成方面不尽相同，主要表现为：I 型为 QQRSVDYLDLDFWLDVAQHMSLCRHYVRELRRS 和 EDDGRDDPEVFDVAKDYVFQAMERDAFPGFLRMKALGNLVP；II 型为 DGIKEILAQAYGIYNAFLAPGSPCELNIDHQLRNSLATRMTKAVGQDVAM；III 型为 DVLRDASGLSYFMEFMDRQRLMPLVQFWLVVDGFRNPLEDD；IV 型为 RPSLDEILABTAPPPWTLsAFMAYLSQNHCL ETLEFTLDAKRYRKYTYEEL 和 YIIPCAREVNL PSEVRDRLRLPCSPTPPHPSELDEAVRIVYELMEESV；V 型为 PDDFGPEIFQVVLHNPTTSHQLLKFASRGCGENVEFLKKI 和 ESVEQRIARDIYPAFVRHQLALSASRALA；VI 型为 ELTRERFN RALRIYTEFISPRHAEFPJNJASQDLKKLEDIFE RAARILYG 和 DRVQYWGDIPESFGPNVFDDAZESIKYLVLTNTWPKFVKER。

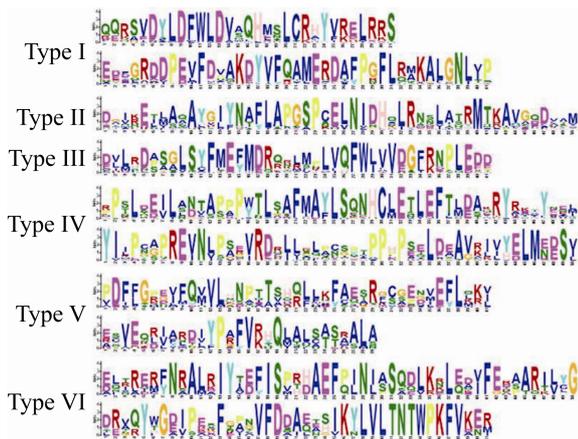


图 1. 不同类别 RGS 蛋白的 motif 对比分析

Figure 1. Comparative analysis of motif of different classes of RGS proteins.

2.2 理论等电点集中在 6.01–7.00

一般而言，蛋白分子在等电点以两性离子的形式存在，其溶解度最小，有助于蛋白质的分离、提纯及变性。通过对 229 个 RGS 蛋白所具有的理论等电点数值进行分析，明确 IV 型 RGS 蛋白茄腐镰刀菌 *Fusarium solan I* (NechaG95673) 具有最低理论等电点值，为 5.00；I 型 RGS 蛋白大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* (VDAG_02225) 具有最高理论等电点值，为 10.02。进一步将全部 RGS 蛋白以理论等电点 1.00 为 1 个间隔单位，对其进行归类分析，结果表明，RGS 蛋白理论等电点主要集中于 6.01–7.00，数量为 73 个，所占比例为 31.88%；其次是理论点为 8.01–9.00 的 RGS 蛋白，数量为 55 个，所占比例为 24.02%。同时，对属于酸性蛋白(理论等电点小于 6.01)的 RGS 蛋白进行统计，其数量为 44 个，所占比例为 19.21%；对属于中性蛋白(理论等电点位于 6.01–8.00)的 RGS 蛋白进行统计，其数量为 89 个，所占比例为 38.86%；对属于碱性蛋白(理论等电点大于 8.00)的 RGS 蛋白进行统计，其数量为 96 个，所占比例为 41.92%，上述结果表明真菌中 RGS 蛋白多为碱性蛋白。同时，按 RGS 蛋白类型进行分类统计发现，I 型 RGS 蛋白酸性蛋白、中性蛋白、碱性蛋白分布较为均匀，所占比值为 1:1.12:1.18；II 型 RGS 蛋白多为碱性蛋白，所占比例为 72.41%；III 型 RGS 蛋白多为中性蛋白，所占比例为 69.57%；IV 型 RGS 蛋白多为酸性和中性蛋白，所占比例都为 40.91%；V 型 RGS 蛋白多为碱性蛋白，所占比例为 76.47%；VI 型 RGS 蛋白多为碱性蛋白，所占比例为 87.50% (图 2)，上述结果表明，真菌中不同类型 RGS 蛋白具有不同类型的酸碱蛋白集中度。

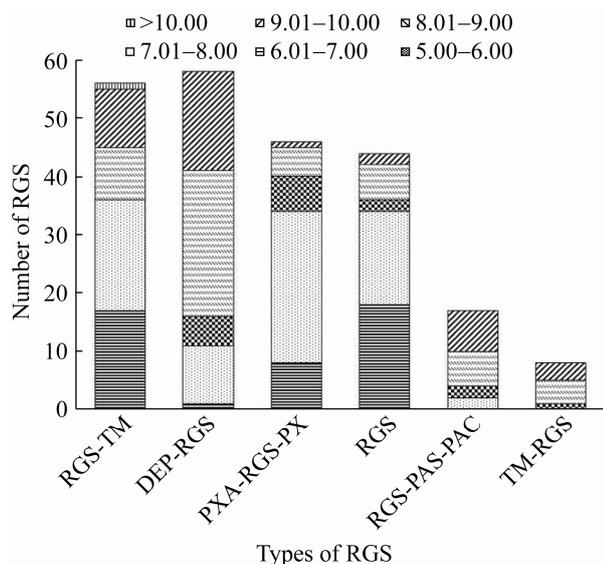


图 2. 不同类型 RGS 蛋白理论等电点对比分析
Figure 2. Comparative analysis of theoretical isoelectric points of different types of RGS proteins.

2.3 不稳定性系数集中在 40.01–60.00

蛋白的不稳定性系数是衡量蛋白在体外的稳定性的重要指标。对 229 个 RGS 蛋白的不稳定性系数进行统计分析, 结果表明, RGS 蛋白的不稳定性系数集中在 40.01–60.00, 其数量为 163 个, 所占比例为 71.18%。同时, 对上述蛋白中不稳定性系数小于 40.01 (稳定蛋白) 进行分析, 其数量为 16 个, 所占比例为 6.99%, 且主要集中在 II 型 RGS 蛋白中; 其次对不稳定性系数大于 40.01 (不稳定蛋白) 的 RGS 蛋白进行分析, 其数量为 213 个, 所占比例为 93.01% (图 3)。上述结果表明, RGS 蛋白大多属于不稳定蛋白。

2.4 RGS 蛋白多属于亲水性蛋白

蛋白的氨基酸的亲水性和疏水性的相互作用在维持蛋白质结构稳定时发挥着重要的作用, 因此对 RGS 蛋白的亲水性进行统计分析。结果表明, RGS 蛋白多数属于亲水性蛋白(亲水性值小

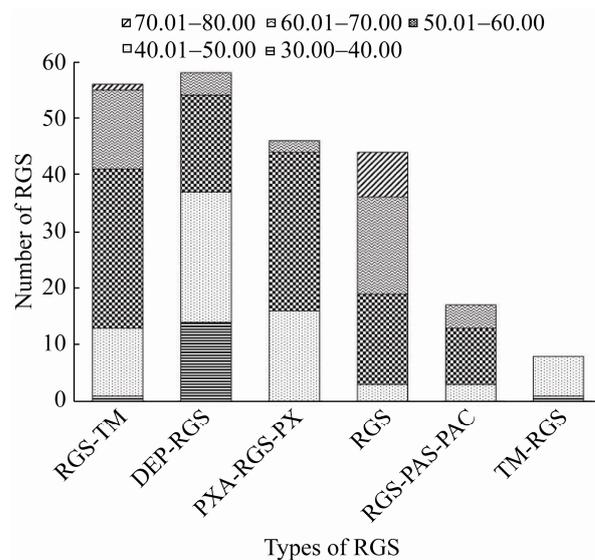


图 3. 不同类型 RGS 蛋白不稳定性系数对比分析
Figure 3. Comparative analysis of instability coefficients of different types of RGS proteins.

于 0), 其数量为 222 个, 所占比例为 96.94%; 同时, 对疏水性蛋白(亲水性值大于 0)的 RGS 蛋白进行统计, 其数量为 7 个, 所占比例为 3.06%。上述结果表明, RGS 蛋白多数属于亲水性蛋白。另外, 按 RGS 蛋白类型进行分类统计发现, 6 类 RGS 蛋白多数都属于亲水性蛋白, 其中 II 型、III 型、IV 型和 V 型 RGS 蛋白都为亲水性蛋白。

此外, 对 RGS 蛋白的疏水性进行统计分析, 结果与亲水性分析一致。对 RGS 蛋白亲水性最强氨基酸残基、疏水性最强氨基酸残基种类进行统计分析, 明确前者有 16 种氨基酸残基, 缺少 C (半胱氨酸)、I (异亮氨酸)、V (缬氨酸)、W (色氨酸) 等 4 种氨基酸残基, 存在较多的是 R (精氨酸)、D (天冬氨酸)、E (谷氨酸)、Q (谷氨酰胺)、N (天冬酰胺) 等 5 种氨基酸残基, 所占比例分别为 22.74%、12.64%、10.11%、9.75%、9.03% (图 4); 后者有 16 种氨基酸残基, 缺少 K (赖氨酸)、N、Q、W 等 4 种氨基酸残基, 存在较多的是 L (亮氨

酸)、A (丙氨酸)、V (缬氨酸)、F (苯丙氨酸)、I (异亮氨酸)等 5 种氨基酸残基, 所占比例分别为 30.36%、13.77%、11.74%、11.34%、10.12% (图 4)。

按 RGS 蛋白类型进行分类统计发现, 6 类 RGS 蛋白中亲水性最强氨基酸残基、疏水性最强氨基酸残基存在较多的都一致, 但亲水性最强氨基酸残基中仅 III 型 RGS 蛋白存在 F、L、M (甲硫氨酸), 疏水性最强氨基酸残基中仅 I 型 RGS 蛋白存在 R, II 型 RGS 蛋白存在 D、H (组氨酸), IV 型 RGS 蛋白存在 E、P (脯氨酸)。

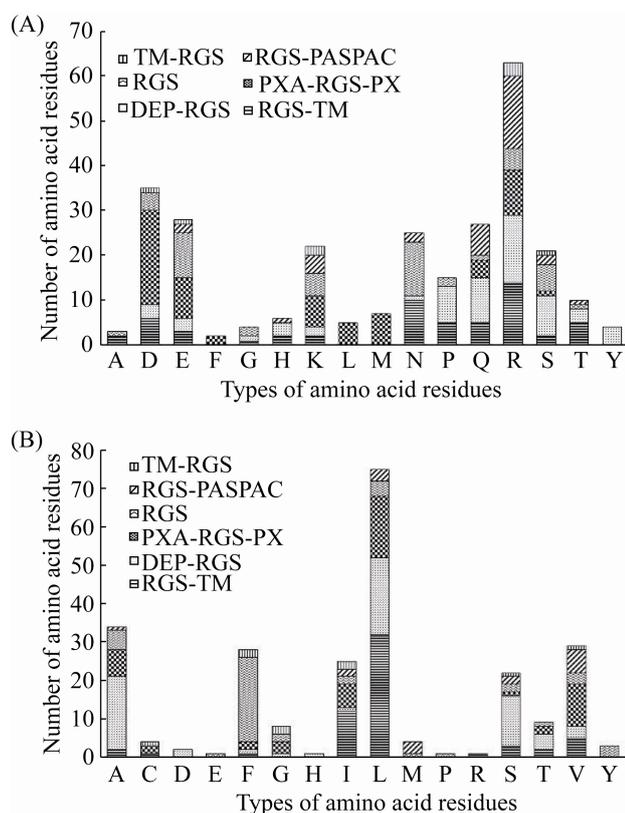


图 4. 不同类型 RGS 蛋白亲水性最强和疏水性最强氨基酸残基的分布

Figure 4. Distribution of the most hydrophilic and the most hydrophobic amino acid residues in different types of RGS proteins. A: amino acid residue with the strongest hydrophilicity; B: amino acid residue with the strongest hydrophobic.

actamicro@im.ac.cn

2.5 二级结构组成特征为 β 折叠较少

蛋白的不同结构决定了蛋白可以发挥不同的生物学功能, 因此对 RGS 蛋白进行二级结构预测并统计分析, 结果表明, RGS 蛋白含有无规则卷曲、 α 螺旋、 β 折叠、TM (跨膜螺旋)结构, 所占比例分别是 45.57%、48.10%、3.68%、6.79%, 所占比值为 1 : 1.055 : 0.081 : 0.149。同时, 对 RGS 蛋白中的酸性蛋白、中性蛋白及碱性蛋白二级结构组成进行统计分析, 就无规则卷曲、 α 螺旋、 β 折叠、TM 等结构组成比例而言, 明确在酸性蛋白中所占比例分别为 48.05%、49.50%、1.05%、8.61%; 在中性蛋白中所占比例分别为 45.85%、50.99%、3.06%、6.69%; 在碱性蛋白中所占比例分别为 45.15%、45.81%、5.51%、6.19% (图 5)。因此, RGS 蛋白中酸性蛋白、中性蛋白及碱性蛋白二级结构组成都以无规则卷曲、 α 螺旋为主, β 折叠较少。同时, 按 RGS 蛋白类型进行分类统计发现, 就无规则卷曲、 α 螺旋、 β 折叠、TM 结构组成比例而言, I 型 RGS 蛋白中所占比例分

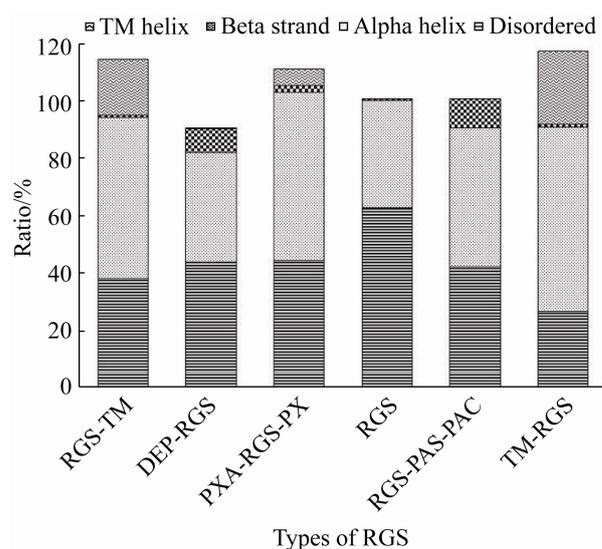


图 5. 不同类别 RGS 蛋白二级结构组成对比分析
Figure 5. Comparative analysis of the secondary structure of different types of RGS proteins.

别为 38.25%、56.02%、0.80%、19.34%；II 型 RGS 蛋白中所占比例分别为 43.90%、38.21%、8.19%、0.10%；III 型 RGS 蛋白中所占比例分别为 44.43%、58.61%、2.37%、5.70%；IV 型 RGS 蛋白中所占比例分别为 62.86%、37.20%、0.68%、0.00%；V 型 RGS 蛋白中所占比例分别为 42.53%、48.00%、10.29%、0.00%；VI 型 RGS 蛋白中所占比例分别为 26.88%、64.00%、1.13%、25.38%。因此，6 种 RGS 蛋白的二级结构组成特征都是无规则卷曲和 α 螺旋较多，但 II 型、IV 型和 V 型 3 种 RGS 蛋白的二级结构组成中不含有 TM。

2.6 转运肽情况尚不明确

对 RGS 蛋白的转运肽预测分析，明确 RGS 蛋白的线粒体靶向肽预测值、信号肽预测值、定位情况和预测可靠性。其中在定位情况中，有 144 个定位在其他位置，45 个定位在分泌通路、40 个定位在线粒体，所占比例分别为 62.88%、19.65%、17.47% (图 6)。同时，按 RGS 蛋白类型进行分类统计发现，I 型、II 型、IV 型和 V 型 RGS 蛋白定位集中在其他位置，III 型和 VI 型 RGS 蛋白定位集中在分泌通路，除 III 型和 VI 型 RGS 蛋白外，其余 4 种 RGS 都没有定位在分泌通路(图 6)。

2.7 亚细胞定位多集中在细胞核

对 RGS 蛋白的亚细胞定位分析，明确 RGS 蛋白亚细胞定位情况，主要集中在细胞核、细胞质膜和线粒体，其数量分别为 86、55、38，所占比例分别为 37.55%、24.02%、16.59%。同时，按 RGS 蛋白类型进行分类统计发现，I 型和 VI 型 RGS 蛋白亚细胞定位情况集中在细胞质膜，数量分别为 30、6 个；II 型 RGS 蛋白亚细胞定位情况集中在线粒体和细胞质，数量分别为 22、17 个；III 型、IV 型和 V 型 RGS 蛋白亚细胞定位情况集中

在细胞核，数量分别为 32、31、10。另外 I 型 RGS 蛋白亚细胞定位分别有 1 个定位在液泡和过氧化物酶，VI 型 RGS 蛋白亚细胞定位有 2 个定位在细胞外(图 7)。

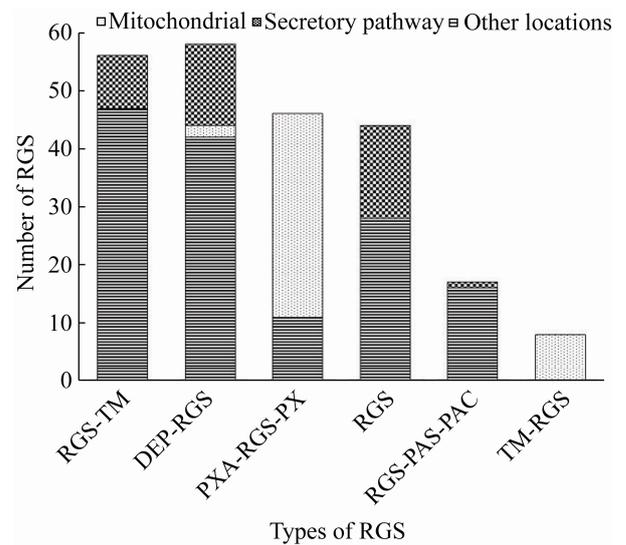


图 6. 不同类别 RGS 蛋白转运肽的分布情况
Figure 6. Distribution of different types of RGS protein transport peptides.

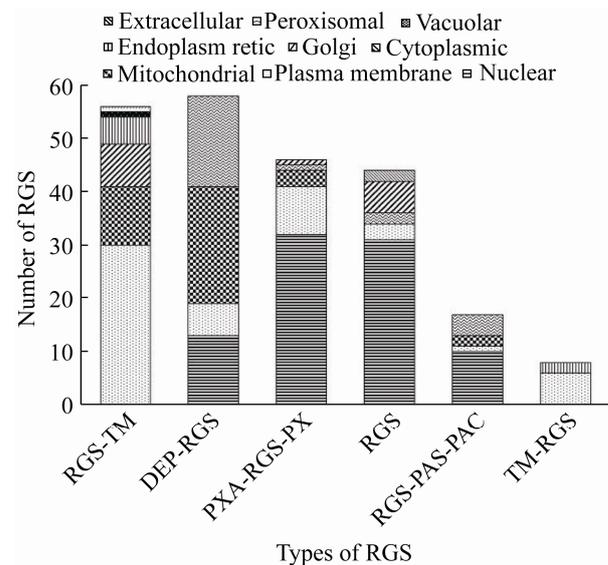


图 7. 不同类别 RGS 蛋白亚细胞定位的分布情况
Figure 7. Distribution of subcellular localization of different classes of RGS proteins.

3 讨论和结论

3.1 讨论

前人研究发现,RGS蛋白无论是在真菌生长发育的过程中,还是在定殖植物的过程中,均发挥着重要作用;就植物病原丝状真菌而言,其在实现对植物侵染的过程中,会分泌大量的效应分子与植物中的防卫反应相关蛋白发生相互作用^[4,30-31],从而在植物中实现定殖、扩展等过程^[32]。前期研究明确植物病原菌中的RGS数量明显高于其他真菌,同时,明确半活体营养型病原菌中的RGS数量既高于死体营养型病原菌,也高于活体营养型病原菌,进一步对比分析RGS蛋白类型,发现V型和VI型的RGS主要集中在半活体营养型病原菌和死体营养型病原菌。此外,还明确部分植物病原菌(主要包括花药黑粉菌 *M. violaceum*、西瓜炭疽菌 *C. orbiculare*、禾谷炭疽菌 *C. graminicola*、希金斯炭疽菌 *C. higginsianum*、松穴褥盘孢菌 *D. septosporum*、大丽轮枝菌 *V. dahlia*)具有多个I型RGS蛋白,以及包括禾谷镰刀菌 *F. graminearum*、藤黑镰刀菌 *F. fujikuroi*、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*、假禾谷镰刀菌 *F. pseudograminearum*、串珠镰刀菌 *F. verticillioides*、腐皮镰刀菌 *F. solain*等植物病原菌具有多个II型RGS蛋白。本研究对于真菌中RGS的理化性质分析,发现同一真菌同类型RGS蛋白的亚细胞定位位置和转运肽相同,但pH值、亲水性最强氨基酸残基和疏水性最强氨基酸残基存在较大的差异,推测该蛋白在植物病原菌的营养生长、致病性等方面发挥着互补性。

对全部RGS展开遗传关系分析,发现I型和IV型RGS的亲缘关系较近,而II型、III型和VI型亲缘关系较近,V型单独一支。本研究中则通过

对上述6类RGS蛋白的理化性质进行对比分析,发现同类别RGS蛋白的理化性质具有一定的共同性,但6类RGS蛋白之间相互进行比较时,不同类别的RGS蛋白则具有明显的类别特征,具体而言:在理论等电点中I型RGS蛋白酸性蛋白、中性蛋白、碱性蛋白分布较为均匀,II型、V型和VI型RGS蛋白多为碱性蛋白,III型RGS蛋白多为中性蛋白,IV型RGS蛋白多为酸性和中性蛋白。在亲水性最强氨基酸残基中,仅III型RGS蛋白存在F、L、M,疏水性最强氨基酸残基中仅I型RGS蛋白存在R,II型RGS蛋白存在D、H,IV型RGS蛋白存在E、P。同时,在蛋白质二级结构解析中,II型、IV型和V型等3种RGS蛋白均不含TM结构,而II型和V型RGS蛋白的主要功能是将RGS蛋白定位到不同的亚细胞膜位点,是否能推测出IV型RGS蛋白的功能与其类似有待于进一步验证。在转运肽定位中III型和VI型RGS蛋白则集中在分泌通路,其余4类RGS均未定位在分泌通路上,推测与功能有关,III型RGS蛋白具有PX结构域和PXA结构域,将RGS蛋白定位到不同的地方,发挥多种功能,如细胞信号传导、膜泡运输、蛋白质分选和脂质修饰等。前人研究发现,在玉米赤霉菌 *G. zeae*、轮枝镰孢菌 *F. verticillioides*和稻瘟病菌 *M. oryzae*等植物病原菌中,该蛋白缺失则影响着上述病原菌分生孢子的产生和毒力等功能,同时,在酿酒酵母 *S. cerevisiae*中,此RGS蛋白作用则是在高温情况下维持细胞核和线粒体的遗传等。VI型RGS蛋白在N端具有TM结构域,但功能未见报道。在亚细胞定位中I型和VI型RGS蛋白集中在细胞质膜,II型RGS蛋白则集中在线粒体和细胞质,而且II型RGS蛋白中部分蛋白具有很好的稳定性。III型、IV型和V型RGS蛋白集中在细胞核。

另外 I 型 RGS 蛋白分别有 1 个定位在液泡和过氧化物酶, VI 型 RGS 蛋白有 2 个定位在细胞外, 蛋白的亚细胞定位和稳定性之间是否具有一定联系有待于进一步验证。

为了进一步解析真菌中 RGS 蛋白类型与其理化性质之间的关系, 笔者试图将 49 个真菌按模式生物、病原菌、非致病菌进行分类统计, 然而, 令人遗憾的是, 并未发现不同类型 RGS 蛋白在理化性质方面表现出明显的规律性, 该尝试也充分说明了 RGS 蛋白理化性质在不同群体真菌中的稳定性特点, 从而在不同生物中有效地保证了其在 G 蛋白信号途径中发挥负调控的作用, 也从侧面说明了真菌中 RGS 的变化主要体现在数量的多寡、种类之间的差异性。

3.2 结论

本研究明确 49 个真菌中 229 个 RGS 蛋白具有以下特征: 理论等电点集中在 6.01–7.00, 不稳定性系数集中在 40.01–60.00, 95% 以上的 RGS 蛋白属于亲水性蛋白, 亲水性最强氨基酸残基存在较多的是 R、D、E、Q、N, 疏水性最强氨基酸残基存在较多的 L、A、V、F、I, 二级结构组成特征为 β 折叠较少, 转运肽情况尚未明确, 亚细胞定位多集中在细胞核。该研究为今后深入开展植物病原丝状真菌中的 RGS 功能解析打下坚实的理论基础。

参考文献

- [1] Han CZ, Yang B. Mapping and bioinformatics analysis on G protein signaling pathway related protein of *Colletotrichum graminicola*. Beijing: Science Press, 2016. (in Chinese)
韩长志, 杨斌. G 蛋白信号途径相关蛋白生物信息学: 以禾谷炭疽菌为例. 北京: 科学出版社, 2016.
- [2] Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 795–827.
- [3] Asli A, Sadiya I, Avital-Shacham M, Kosloff M. “Disruptor” residues in the regulator of G protein signaling (RGS) R12 subfamily attenuate the inactivation of $G\alpha$ subunits. *Science Signaling*, 2018, 11(534): eaan3677.
- [4] Alqinyah M, Hooks SB. Regulating the regulators: epigenetic, transcriptional, and post-translational regulation of RGS proteins. *Cellular Signalling*, 2018, 42: 77–87.
- [5] McPherson KB, Leff ER, Li MH, Meurice C, Tai S, Traynor JR, Ingram SL. Regulators of g-protein signaling (RGS) proteins promote receptor coupling to g-protein-coupled inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *The Journal of Neuroscience*, 2018, 38(41): 8737–8744.
- [6] Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C, Chidiac P. RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cellular Signalling*, 2006, 18(5): 579–591.
- [7] Dohlman HG, Song J, Ma D, Courchesne WE, Thorner J. Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein α subunit). *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(9): 5194–5209.
- [8] Wang YC, Geng ZY, Jiang DW, Long FF, Zhao Y, Su H, Zhang KQ, Yang JK. Characterizations and functions of regulator of G protein signaling (RGS) in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 7977–7987.
- [9] Yu JH. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology*, 2006, 44(2): 145–154.
- [10] Yu JH, Wieser J, Adams TH. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *The EMBO Journal*, 1996, 15(19): 5184–5190.
- [11] Han KH, Seo JA, Yu JH. Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB ($G\alpha$) signalling. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 529–540.
- [12] Zhang HF, Tang W, Liu KY, Huang Q, Zhang X, Yan X, Chen Y, Wang JS, Qi ZQ, Wang ZY, Zheng XB, Wang P, Zhang ZG. Correction: eight RGS and RGS-like proteins orchestrate growth, differentiation, and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(11): e1008187.

- [13] 韩秀秀. 受 *COS1* 转录调控的稻瘟病菌基因 *RGS1* 和 *CMR1* 的功能鉴定. 海南大学硕士学位论文, 2013.
- [14] 乐鑫怡. 稻瘟病菌 RGS 家族蛋白 RGS 结构域的功能解析及 Dynamin 家族蛋白 MoDnm2、MoDnm3 的生物学功能研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
- [15] Mukherjee M, Kim JE, Park YS, Kolomiets MV, Shim WB. Regulators of G-protein signalling in *Fusarium verticillioides* mediate differential host-pathogen responses on nonviable versus viable maize kernels. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(5): 479–491.
- [16] Park AR, Cho AR, Seo JA, Min K, Son H, Lee J, Choi GJ, Kim JC, Lee YW. Functional analyses of regulators of G protein signaling in *Gibberella zeae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49(7): 511–520.
- [17] Wang P, Cutler J, King J, Palmer D. Mutation of the regulator of G protein signaling *Crg1* increases virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(4): 1028–1035.
- [18] Han CZ. Bioinformatics analysis on regulators of G-protein signaling in *Colletotrichum graminicola*. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1582–1594. (in Chinese)
韩长志. 禾谷炭疽菌 RGS 蛋白生物信息学分析. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1582–1594.
- [19] Han CZ. Bioinformatics analysis on regulators of G-protein signaling in *Colletotrichum higginsianum*. *Biotechnology*, 2014, 24(1): 36–41. (in Chinese)
韩长志. 希金斯炭疽菌 RGS 蛋白生物信息学分析. 生物技术, 2014, 24(1): 36–41.
- [20] 吴曼莉. 橡胶树胶孢炭疽菌 G 蛋白信号调控因子 *CgRGS1*、*CgRGS2* 和 *CgRGS7* 的克隆及生物学功能. 海南大学硕士学位论文, 2017.
- [21] Wu ML, Li XY, Zhang N, Xu S, Liu ZQ. Gene cloning and biological function of *CgRGS2* in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(1): 66–76. (in Chinese)
吴曼莉, 李晓宇, 张楠, 徐爽, 柳志强. 胶孢炭疽菌 *CgRGS2* 基因的克隆及生物学功能. 微生物学报, 2017, 57(1): 66–76.
- [22] Xu S, Ke ZJ, Zhang K, Liu ZQ, Li XY. Biological function of a regulator of G-protein signaling *CgRGS3* in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2018, 45(4): 827–835. (in Chinese)
徐爽, 柯智健, 张凯, 柳志强, 李晓宇. 胶孢炭疽菌 G 蛋白信号调控因子 *CgRGS3* 的生物学功能. 植物保护学报, 2018, 45(4): 827–835.
- [23] Choi YH, Lee MW, Igbalajobi OA, Yu JH, Shin KS. Transcriptomic and functional studies of the RGS protein *rax1* in *Aspergillus fumigatus*. *Pathogens*, 2020, 9(1): 36.
- [24] Zheng B, De Vries L, Farquhar MG. Divergence of RGS proteins: evidence for the existence of six mammalian RGS subfamilies. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(11): 411–414.
- [25] Zhao Y, Wang YC, Jiang DW, Su H, Yang JK. Advances in functional research of RGS proteins in fungi. *Microbiology China*, 2014, 41(4): 712–718. (in Chinese)
赵勇, 王云川, 蒋德伟, 苏浩, 杨金奎. 真菌 G 蛋白信号调控蛋白的功能研究进展. 微生物学通报, 2014, 41(4): 712–718.
- [26] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server//Link AJ. 2-D Proteome Analysis Protocols. Totowa: Humana Press, 1999: 531–552.
- [27] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845–858.
- [28] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 953–971.
- [29] Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren JY, Li WW, Noble WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S2): W202–W208.
- [30] Salem-Mansour D, Asli A, Avital-Shacham M, Kosloff M. Structural motifs in the RGS RZ subfamily combine to attenuate interactions with *Gα* subunits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503(4): 2736–2741.
- [31] Lou F, Abramyan TM, Jia HY, Tropsha A, Jones AM. An atypical heterotrimeric *Gα* protein has substantially reduced nucleotide binding but retains nucleotide-independent interactions with its cognate RGS protein and *Gβγ* dimer. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019, doi: 10.1080/07391102.2019.1704879.
- [32] Han CZ, Xu X. Advance in functional research of secreted protein and CAZymes in plant pathogenic filamentous fungus. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2017, 41(5): 152–160. (in Chinese)
韩长志, 许僖. 植物病原丝状真菌分泌蛋白及 CAZymes 的研究进展. 南京林业大学学报(自然科学版), 2017, 41(5): 152–160.

Relationship between RGS protein types and physicochemical properties in fungi

Youpeng Zhu^{1,2}, Changzhi Han^{1,3*}

¹ College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan Province, China

² Graduate School of Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan Province, China

³ The Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Kunming 650224, Yunnan Province, China

Abstract: [Objective] As a negative regulator of G protein signal transduction pathway, G protein signal regulator factor plays an important role in the pathogenicity asexual reproduction regulation of plant pathogens. To identify the relationship between RGS protein types and their physicochemical properties in fungi. [Methods] We analyzed 229 of previously identified RGS protein sequences in 49 fungi including model organism, pathogenic bacteria and non-pathogenic bacteria, and identified 6 proteins according to their conserved domains, such as DEP-RGS, RGS-TM, PXA-RGS-PX, RGS, RGS-PAS-PAC and TM-RGS. We used the protein database, ProtComp v9.0, PHD and MEME to analyze the physicochemical properties, subcellular localization, secondary structure and motif of the above RGS proteins. [Results] The above-mentioned different types of RGS proteins had obvious characteristic features, and following common characteristics: theoretical isoelectric point was between 6.01 and 7.00, instability coefficients were between 40.01 and 60.00, more than 95% of RGS proteins were hydrophilic protein, the strongest hydrophilic amino acid residues were arginine, aspartic acid, glutamic acid, glutamine, asparagine, the strongest hydrophobic amino acid residues were leucine, alanine, valine, phenylalanine, isoleucine, the secondary structure was characterized by less Beta strand, situation for the transit peptide situation is unclear, and subcellular location is more concentrated in the nucleus. [Conclusion] The physicochemical properties of the six RGS proteins have some common characteristics, but different types of RGS proteins also have obvious category characteristics, mainly in the conserved domain, secondary structure, isoelectric point, transport peptide and subcellular localization.

Keywords: fungus, G protein signal regulator factor, physical and chemical properties, relationship analysis, bioinformatics

(本文责编: 李磊)

Supported by the Yunnan Province Applied Basic Research Program Project, China (2018FG001-028), by the National Natural Science Foundation of China (31960314) and by the Southwest Forestry University Students' Innovation and Entrepreneurship Project, China (2018Y012)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-871-63862918; E-mail: hanchangzhi2010@163.com

Received: 16 March 2020; Revised: 17 June 2020; Published online: 17 August 2020