

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.01.02

鸟胞内分枝杆菌 *mmpL11* 同源基因序列分析及功能预测

王文靖¹, 孙妍², 王心倩², 余晓丽^{2*}

(1. 南阳市第二中学, 河南 南阳 473000;

2. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 武汉 430023)

摘要:以非结核分枝杆菌中的胞分枝杆菌、鸟分枝杆菌两个标准株为研究对象,以耻垢分枝杆菌 mc2 155 和结核分枝杆菌 H37Rv 为对照,对其 *mmpL11* 同源基因进行序列分析,并对其蛋白质进行结构及功能预测,为后期的抗酸染色阳性菌诊断,药物靶标的筛选提供理论基础。根据同源比对找到两个标准株的 *mmpL11* 同源基因;应用 expasy 工具预测 MmpL11 同源蛋白理化性质;蛋白质信号肽预测采用 SignalP 在线软件进行预测;使用 TMHMM 在线工具进行拓扑结构预测;利用 Interproscan 工具对蛋白保守序列和功能进行预测;使用 SSpro 对蛋白二级结构进行预测。OCU48920 蛋白的理化性质分析显示:其氨基酸个数为 1 018,分子量为 108.4 kD,理论等电点为 7.61,疏水指数为 0.227;MAP3637c 蛋白的理化性质分析显示:其氨基酸个数为 1 007,分子量为 107.2 kD,理论等电点为 8.59,疏水指数为 0.231。信号肽预测发现两个标准株的 MmpL11 均不存在信号肽切割位点,未发现信号肽存在。跨膜预测发现其跨膜次数分别为 12 和 12 肽链,N 端均在膜内,二级结构以 α -螺旋和 β -片层为主。保守序列预测发现两个标准株的 MmpL11 蛋白均有两个 MMPL 跨膜结构域,一个固醇敏感多肽区。OCU48920、MAP3637c 为 H37Rv 的 MmpL11 同源蛋白,推测其功能同 MmpL11 相似,是分枝菌酸的转运蛋白,参与胞内小分子的运输和信号转导。

关键词:非结核分枝杆菌;MmpL11;序列分析;功能预测

中图分类号:Q 93 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2016)01-007-06

Sequence analysis and function prediction of *Mycobacterium avium* intracellulare *mmpL11* gene

WANG Wenjing¹, SUN Yan², WANG Xinqian², YU Xiaoli^{2*}

(1. The Second Middle School Nanyang, Nanyang 473000, China;

2. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: To provide evidence for future research on the structures and function of *mmpL11* (Rv0202c) in *Mycobacterium*, we analyzed homologous sequences, predicted topological structures and conservative domain structures of two *Nontuberculous Mycobacterium* named *M. Intracellulare* and *M. avium*, both of which were compared with *M. Smegmatis*str MC2155 and H37Rv. According to the homologous comparison, we found two standard strains of *mmpL11* homologous genes. The physicochemical properties and con-served domain of MmpL11 in *M. tuberculosis* were predicted by ExPASy online tools. Online tool TMHMM Server 2.0 was used to predicted the topological structure. Interproscan was used to predict conservative domain structure. SSpro was used to predict the secondary structure. According to the physical and chemical properties of protein, the amino acid number of OCU48920 was 1 018, molecular weight was 108.4 kD, theoretical isoelectric point was 7.61, hydrophobic index was 0.227, the amino acid number of MAP3637c was 1 007, the molecular weight was 107.2 kD, theoretical isoelectric point was 8.59, hydrophobic index was 0.231, the amino acid number of MSMEG0241 was 954, the molecular weight was 102.6 kD, theoretical isoelectric point was 5.98 and hydrophobic index was 0.305. By *SignalP*'s predicting, we found MmpL11 didn't have signal peptide cutting locus in its three standard strains and signal peptide. The forecast

收稿日期:2015-11-12;修回日期:2015-12-15.

基金项目:武汉轻工大学研究生创新基金项目(2014cx019)。

作者简介:王文靖,女,研究方向:微生物;E-mail:2504692896@qq.com.

* 通信作者:余晓丽,女,教授,研究方向:细胞生物学;E-mail:yxll268@126.com.

of transmembrane showed that it crossed membrane 12 times and 12 peptides. N-terminal was within the membrane. Secondary structure was given priority to with alpha helix and beta patches. The prediction of conservative sequence and MmpL11 protein's function showed two MMPL transmembrane domain (MMPL domain) structure, a sterol sensitive polypeptide area (SSD domain). OCU48920, MAP3637c were homologous proteins of H37Rv MmpL11. We speculate that their functions were similar with MmpL11, and they were translocators of mycolic-acid. These two proteins participated in transporting intracellular small molecules and signal transduction.

Keywords: *Nontuberculous Mycobacterion*; MmpL11 ; Sequential analysis; Function prediction

鸟胞内分支杆菌复合体 (*Mycobacterium avium-intracellulare complex*, MAC) 是细胞内寄生的病原体, 在吞噬细胞内增殖, 并能引起 AIDS 病人的机会性感染。一般说来, 目前市场上有效的药物单用, 甚至多药联合都难以根治 MAC 感染^[1]。是非结核分枝杆菌 (*Nontuberculosis Mycobacteria*, NTM) 为抗酸染色阳性菌, 临床症状多与结核分枝杆菌感染相似, 容易误诊为由结核分枝杆菌感染引起的结核病, 且对多种抗结核药物具有耐药性^[2-3]。

MmpL 蛋白家族是分枝杆菌耐受-结节-分裂家族 (Resistance-nodulation-cell division family, RND 家族) 超家族蛋白中的一种膜蛋白, 是影响分枝杆菌的生存和毒力的关键因子之一, 在结核分枝杆菌中包括 MmpL1-13^[4]。

RND 家族中固醇敏感多肽区 (SSD domain) 在胆固醇自我平衡调节、物质运输以及细胞信号转导中发挥重要的作用^[5]。此外, 研究发现, 在基因组中, 有大约 20%~30% 的基因产物被预测为膜蛋白, 在药物研发过程中, 膜蛋白偶联受体是绝大多数药物的作用靶点, 跨膜蛋白在生物体中担负着各种各样的重要功能: 细胞的运输, 细胞膜内外信号的传递及能量转换等^[6]。由于膜蛋白数量巨大而且功能多样, 因此通过跨膜蛋白的拓扑结构能对其功能进行初步预测。

以非结核分枝杆菌胞分枝杆菌、鸟分枝杆菌标准株为研究对象, 耻垢分枝杆菌标准株和 H37Rv 为对照, 对其 MmpL11 进行同源性分析、理化性质分析、信号肽预测、跨膜结构预测、保守序列和二级结构预测以及蛋白质功能预测, 为进一步阐明抗酸染色阳性非结核分枝杆菌的毒力、致病机制和疾病研究提供理论依据。

1 方法和步骤

1.1 方法

运用生物信息学方法, 通过序列对比, 理化性质分析, 信号肽预测, 跨膜结构预测, 保守序列, 二级结构分析等生物信息学手段^[7], 对胞分枝杆菌 (*M.*

intracellulare ATCC13950), 鸟分枝杆菌 (*M. avium subsp. paratuberculosis* K-10), 耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatistr* mc2 155) 的 MmpL11 进行同源序列分析及功能预测。

1.2 步骤

1.2.1 MmpL 11 同源序列比对

在 NCBI 数据库中查找结核分枝杆菌 (MTB) H37Rv 的 MmpL11 的氨基酸序列, 在 BLAST 搜索两个标准株的同源序列。

1.2.2 MmpL11 理化性质分析

用 ExPASy 在线序列分析工具, 对 MmpL11 蛋白理化性质进行预测。

1.2.3 MmpL 11 信号肽预测

用 SSpro (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线软件对 MmpL11 进信号肽预测。

1.2.4 MmpL11 跨膜结构、保守序列和二级结构分析

用 TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线软件对 MmpL11 进行拓扑结构预测。用 Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) 对 MmpL11 同源序列进行保守序列和结构域分析。用 SSpro 对 MmpL11 同源序列进行二级结构预测。

2 结果

2.1 MmpL11 同源序列比对

同源分析结果显示: 与 H37Rv 的 MmpL 11 比较, 胞分枝杆菌同源序列为 OCU48920 (Ident, 72%), 鸟分枝杆菌为 MAP3637c (Ident, 76%), 耻垢分枝杆菌为 MSMEG0241 (Ident, 69%)。

2.2 MmpL11 理化性质分析

用 ExPASy 在线序列分析工具, 对 MmpL11 蛋白理化性质进行预测, 见表 1。

2.3 MmpL 11 信号肽预测

用 SSpro (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线软件对 MmpL11 进信号肽预测, 信号肽分析显示两个标准株的 MmpL11 蛋白均不存在信

号肽切割位点,未发现信号肽存在。

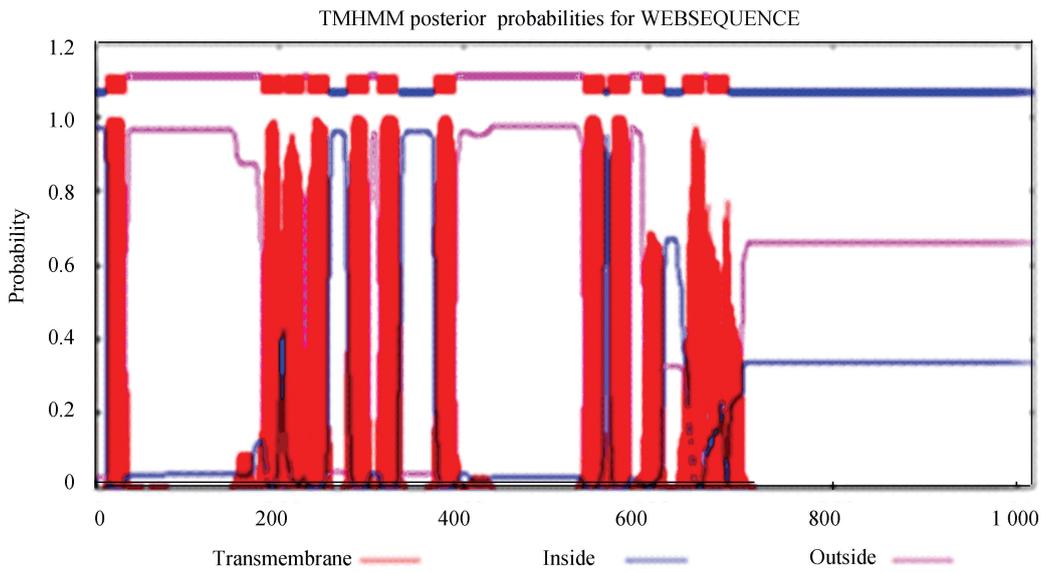
2.4 MmpL11 跨膜结构、保守序列和二级结构分析

用 TMHMM 2.0 软件对 MmpL11 及其同源序列

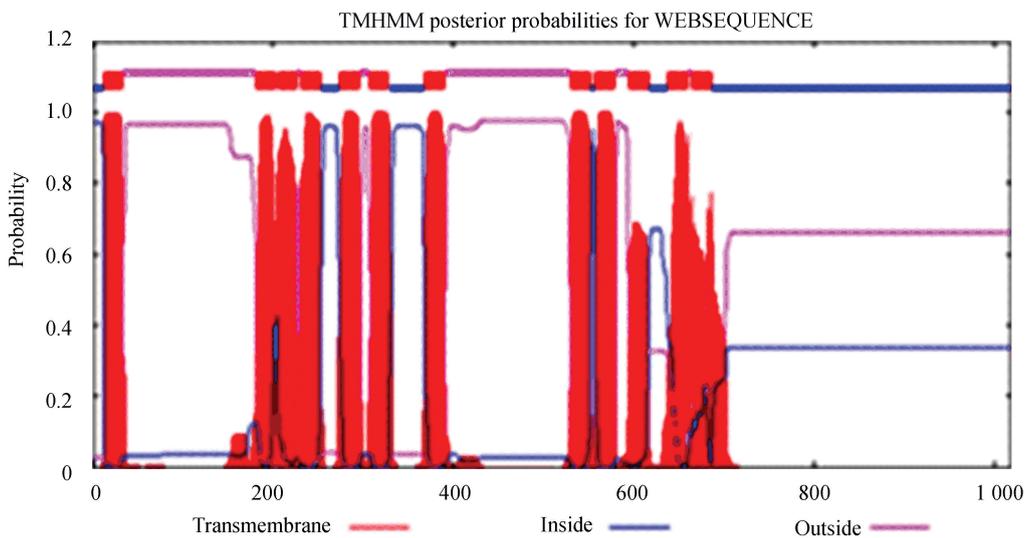
跨膜结构预测,胞分枝杆菌,鸟分枝杆菌,耻垢分枝杆菌的 MmpL11 同源蛋白跨膜次数分别为 12、12、11,且同源蛋白的肽链 N 短都分布在膜内见图 1(a-d)。

表 1 MmpL11 蛋白理化性质
Table 1 Physicochemical properties of MmpL11

菌株名称	MmpL11 同源序列	氨基酸个数	分子量	理论等电点	疏水指数	理论分子式
H37Rv	Rv0202c	966	103.5 kD	9.36	0.337	C ₄₆₃₉ H ₇₄₂₆ N ₁₂₉₆ O ₁₂₉₈ S ₄₃
<i>M. intracellulare</i>	OCU48920	1 018	108.4 kD	7.61	0.227	C ₄₈₁₉ H ₇₇₃₇ N ₁₃₄₇ O ₁₄₀₄ S ₄₃
<i>M. avium</i>	MAP3637c	1 007	107.2 kD	8.59	0.231	C ₄₇₈₀ H ₇₆₇₂ N ₁₃₃₈ O ₁₃₇₉ S ₄₂
<i>M. smegmatistr</i>	MSMEG0241	954	102.6 kD	5.98	0.305	C ₄₆₀₅ H ₇₃₇₅ N ₁₂₄₇ O ₁₃₂₇ S ₃₉



(a) 结核分枝杆菌H37Rv (ML11)



(b) 胞分枝杆菌 (OCU48920)

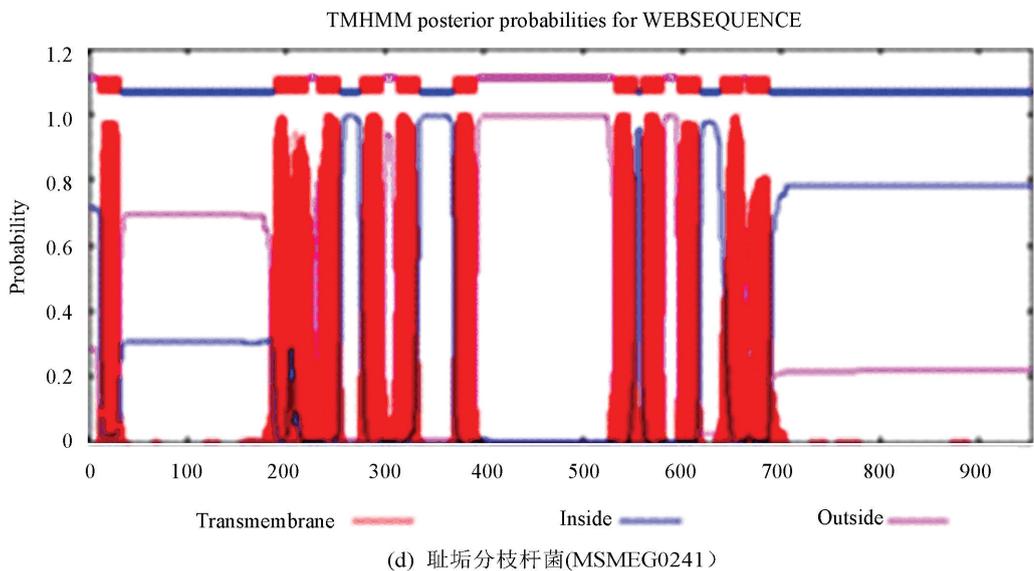
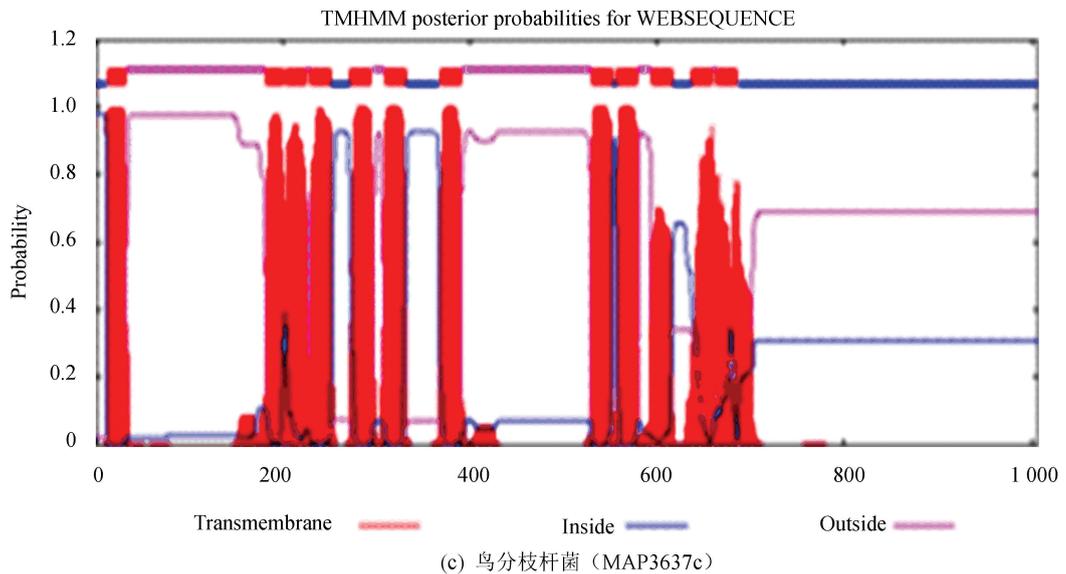


图1 MmpL11 跨膜结构预测

Fig.1 Transmembrane structure prediction of MmpL11

H37Rv 的 MmpL11 结构域预测显示具有两个膜转运蛋白 (MMPL domain) 结构域和一个固醇敏感多肽区 (Sterol-sensing domain, SSD), 两个标准株的 MmpL11 同源蛋白均有两个膜转运蛋白结构域和一个 SSD 结构域, 说明该同源序列既有膜转运功能又有 SSD 结构域介导的胆固醇自我平衡调节、物质运输以及细胞信号转导功能见图 2(a-d)。

用 SSpro 对 MmpL11 同源序列进行二级结构预测, 分析显示两个标准株的二级结构均以 α -螺旋和 β -片层为主。

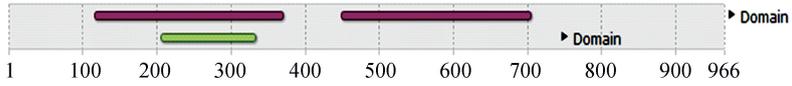
3 讨论

MmpL 家族蛋白是一组与结核分枝杆菌药物外

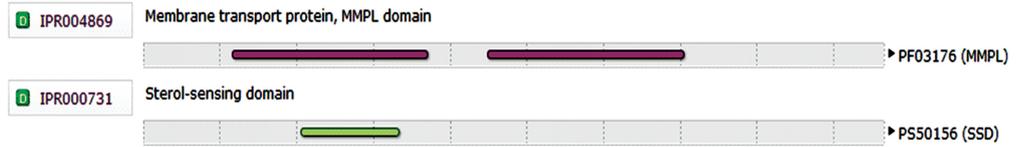
排有关的一个跨膜蛋白家族, 可作为抗结核药物或菌种鉴定药物提供靶位点。研究发现在耻垢分枝杆菌中 MmpL11 具有摄取血红素, 转运多分支酰基二酰基甘油 (MMDAG) 和霉菌酸蜡脂 (WE) 的功能^[8-13]。我们推测在耻垢分枝杆菌中 MmpL11 可能参与胞壁含分枝菌酸的脂类运输和脂类代谢。胞壁分枝菌酸在结核分枝杆菌的抗酸染色、生长特性、致病性和抵抗力等密切相关^[14]。

两个标准株的 MmpL11 同源序列 OCU48920、MAP3637c、MSMEG0241 与 H37Rv 的同源性分别为 72%、76%、69%。通过理化性质、跨膜分析、信号肽预测和结构域分析显示: 两个标准株的 MmpL11 同源序列具有疏水性, 其跨膜蛋白不存在信号肽, 具有一个 SSD 结构域等。

Domains and repeats

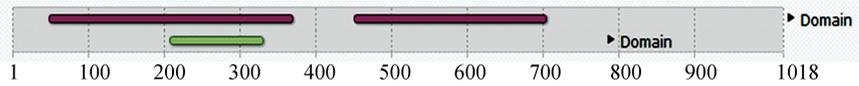


Detailed signature matches



(a) 结核分枝杆菌H37Rv (MmpL11)

Domains and repeats

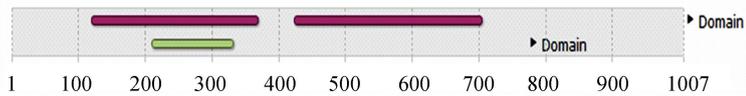


Detailed signature matches

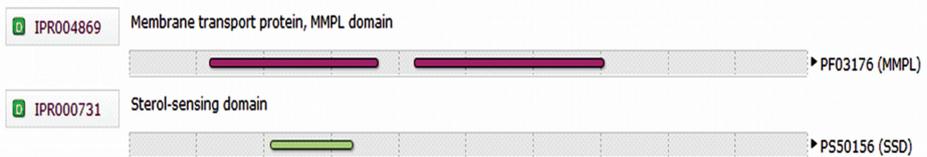


(b) 胞分枝杆菌 (OCU48920)

Domains and repeats

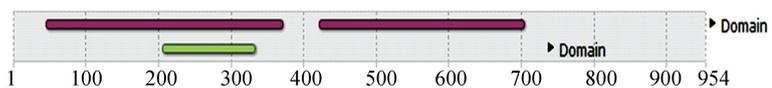


Detailed signature matches

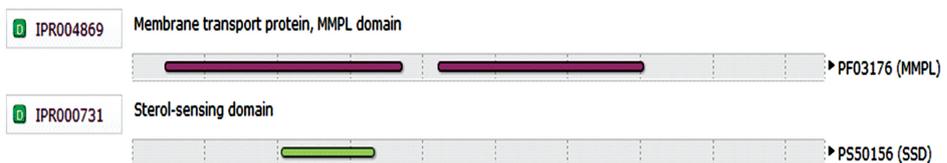


(c) 鸟分枝杆菌 (MAP3637c)

Domains and repeats



Detailed signature matches



(d) 耻垢分枝杆菌 (MSMEG0241)

图 2 MmpL11 跨膜结构

Fig.2 Transmembrane domain of MmpL11

结构域分析发现两个标准株的 MmpL11 蛋白均有两个 MMPL 膜转运功能区 (MMPL domain) 和一个固醇敏感多肽区 (SSD domain), 推测其可能不仅具有膜转运功能也可能具有 SSD 结构域在胆固醇自我平衡调节、物质运输以及细胞信号转导中的作用。

4 结论

通过对 *mmpL11* 基因的信息学预测, 为后续深入研究 MmpL11 蛋白的生物学功能、验证 MmpL11 作为药靶的候选蛋白的可行性提供基础资料, 并得出如下结论。

(1) 通过生物信息学对鸟胞内分枝杆菌 MmpL11 的研究发现, 两个标准株中存在 MmpL11 的同源序列, 这些同源序列可能在以后的研究中做为药物靶设计药物达到诊断或治疗结核病的目的。

(2) 在确定两个标准株的 MmpL11 的同源序列的过程中跨膜次数与肽链 N 端在膜内外的分布情况作为辅助条件进行分析的方法未见报道。

(3) 通过生物信息学筛选出一些 MmpL11 的同源序列, 并通过生物信息学分析对其理化性质、二级结构、结构域等进行分析, 为下一步对该蛋白功能的研究提供理论支持。

(4) 通过生物信息学对 MmpL11 蛋白进行分析是一种合理的方法, 为结核分枝杆菌保守序列和靶位点的研究提供了新的研究思路。

参考文献

- [1] ONYEJI C, NIGHTINGALE C, NICOLAU D, et al. Efficacies of avium-M. liposome-encapsulate clarithromycin and ofloxacin against *mycobacterium* intracellulare complex in human macrophages [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(3): 523.
- [2] 綦迎成, 李君莲, 陈美娟. 实用结核病实验室诊断 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2012.
- QI Yingcheng, LI Junlian, CHEN Meijuan. The practical diagnose of TB in laboratory [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2012.
- [3] 王琰. 耐药结核分枝杆菌基因突变热点筛查与检测技术平台的建立 [D]. 西安: 第四军医大学, 2004.
- WANG Yan. The new technique platforms for screening and detecting the mutational hot spots of genes associated with *M.tuberculosis* Drug Resistance [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2004.
- [4] 张贺秋, 赵雁林. 现代结核病诊断技术 [M]. 北京: 人民卫

生出版社, 2013.

ZHANG Heqiu, ZHAO Yanlin. Modern TB diagnosis techniques [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013.

- [5] 胡广安. 固醇敏感多肽区 (Sterol-sensing domain) 的分子进化 [J]. 河南师范大学学报 (自然科学版), 2003, 31(1): 88-92, 109.
- HU Guangan. The molecular evolution of Sterol-sensing domain [J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2003, 31(1): 88-92, 109.
- [6] 裔东亮. 蛋白质跨膜结构与二硫键连接模式研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- YI Dongliang. The research upon prediction methods of Transmembrane [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2009.
- [7] 吴祖建, 高芳銮, 沈建国. 生物信息学分析实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- WU Zujian, GAO Fangluan, SHEN Jianguo. Bioinformatics analysis practice [M]. Beijing: Beijing Science Press, 2010.
- [8] GIOVANNA P, BATES R H, SALVATORE A, et al. Improved BM212 MmpL3 inhibitor analogue shows efficacy in acute murine model of *Tuberculosis* infection [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): 396.
- [9] PACHECO S, BRAND J, ZAVERTON M, et al. Sensitivity analysis and optimization method for the fabrication of one-dimensional beam-splitting phase gratings [J]. *Optics Express*, 2015, 23(9): 11771-11782.
- [10] OWENS. MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the *Mycobacterial* cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(33): 213-222.
- [11] CHIM N, TORRES R, LIU Yuqi, et al. The structure and interactions of periplasmic domains of crucial mmpL membrane proteins from *mycobacterium tuberculosis* [J]. *Chemistry Biology*, 2015, 22(8): 1098-1107.
- [12] PACHECO S, HSU F F, POWERSET K M, et al. MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(33): 24213-24222.
- [13] PILAR D, REED M B, BARRY C E. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(6): 92-101.
- [14] 全国卫生专业技术资格考试专家委员会. 临床医学检验技术师 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- The national health professional and technical qualifications examination committee of experts. Clinical medical inspection technology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010.