

# GH78 家族真菌 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶分子系统 进化关系分析

巩建业, 吴喆瑜, 李利君, 倪辉

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

**摘要:** 为了分析糖苷水解酶第 78 家族(glucoside hydrolase family 78, GH78)中真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶保守区及进化关系, 本研究应用 ClustalW2 软件对 87 条 GH78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进行多重序列比对, 利用 Block Maker 进一步分析, 得到了该家族真菌的共有完全氨基酸保守位点及保守区; 利用 SignalP 4.1 Server 对序列进行信号肽预测; 应用 MEGA 6.0 软件对 ClustalW2 结果进行遗传距离分析并构建分子系统进化树。GH78 家族真菌 87 条序列虽然长度不等, 但均包含 AHGWSTGPTY、VTLDTGQNVAG 和 NELSIPTDGAKRD 3 个保守区及多个完全保守氨基酸位点; 87 条序列中 29 条含有信号肽; 属间遗传距离为 0.7~48.5, 种间遗传距离为 0.4~48.5; 分子系统进化树并不是依靠菌株来源进行聚类, 而是依据是否为胞外酶进行聚类。该研究分析了 GH78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的保守区及进化关系, 为  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的工程改造奠定了基础。

**关键词:**  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶; 保守区; 分子系统进化; 进化树

文章编号: 1673-9078(2017)10-13-20

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.003

## Analysis of Evolutionary Relationship of GH78 Fungal

### $\alpha$ -L-Rhamnosidase

GONG Jian-ye, WU Zhe-yu, LI Li-jun, NI Hui

(Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to analyze the conserved regions and the evolutionary relationship of fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase in glucoside hydrolase family 78 (GH78), 87 sequences of GH78 fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidases were collected and compared by ClustalW2 software. In addition, the conserved amino acid sites and the common conserved regions of GH78 fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidases were obtained by Block Maker. Meanwhile, the signal peptide was predicted by SignalP 4.1 Server. Besides, the genetic distance and the phylogenetic tree of 87 sequences were constructed by MEGA6.0 software. Although the amino acid sequences of fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidases had various lengths, all contained three conserved regions, including AHGWSTGPTY, VTLDTGQNVAG and NELSIPTDGAKRD, as well as a number of conserved amino acid sites. Moreover, 29 sequences contained signal peptides. The genetic distance between the genera was from 0.7 to 48.5, and the genetic distance of interspecies was from 0.4 to 48.5. Interestingly, it was found that the phylogenetic tree of the phylogenetic system was not clustered by the source of the strain, but on whether the extracellular enzyme was clustered. In this study, the conserved region and evolutionary relationships of GH78  $\alpha$ -L-rhamnosidases were analyzed, which laid the foundation for engineering modification of  $\alpha$ -L-rhamnosidase.

**Key words:**  $\alpha$ -L-rhamnosidase; conserved domains; evolutionary relationship; phylogenetic tree

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶[ $\alpha$ -L-rhamnosidase(EC 3.2.1.40)]属于转化糖苷水解酶类, 能够专一、高效地水解许多糖苷类物质如柚皮苷(naringin)、芦丁(rutin)和橘皮苷

收稿日期: 2017-03-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31371751); 福建省农业高校产学研合作重大项目(2014N5010)

作者简介: 巩建业(1993-), 男, 硕士在读, 研究方向: 食品化学与食品生物技术研究

通讯作者: 李利君(1973-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品酶学

(hesperidin)等末端的  $\alpha$ -L-鼠李糖基, 其在饮料加工行业和药物制备行业具有良好的应用价值<sup>[1,2]</sup>。

CAZy (<http://www.cazy.org/>) 数据库根据序列相似性和疏水簇分析将  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶主要归为糖苷水解酶第 13、78 和 106 家族。GH13 家族序列来源广泛, 条目总数最多, 包含许多其他类型的糖苷水解酶, 该家族酶的三维结构中都有  $(\alpha\beta)_8$  的结构, 催化机理也已经得到证实, 起到催化亲和攻击的原子为 Asp, 催化质子给予的原子为 Glu<sup>[3]</sup>; GH78, GH106 家族只包含

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶, 他们是  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶主要家族。GH78 家族为古菌、细菌和真核生物 3 种来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶, 都具有特征的 $(\alpha/\alpha)_6$ 的桶状结构; GH106 家族的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶主要来自于细菌, 该家族三维结构与催化机理还没有得到确定。

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的来源非常广泛<sup>[4-6]</sup>, 但其主要来源为微生物。目前已有许多细菌和真菌来源  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的报道, 真菌中  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的研究主要集中在曲霉属<sup>[1]</sup>, 且不同来源的序列差异较大, 如 Manzanares<sup>[7]</sup>等人从棘孢曲霉中克隆的两种编码  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的基因 rhaA 和 rhaB 的核苷酸序列几乎没有相似性。然而, 迄今有关真菌这一进化水平的真核生物的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基因的分子特点和系统进化动力学方面的研究报道却不多见。所幸的是, 随着分子生物学对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基因研究的不断深入, 已有众多真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基因序列被解读出来, 从而使开展真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基因的进化分析成为可能。

另外,  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶在食品、医药等行业具有广泛的应用价值<sup>[8-11]</sup>, 但自然存在的多数  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的性质不能满足工业生产高温和耐碱等极端环境的需求, 工业化应用往往需对其进行分子改造<sup>[12]</sup>。而在分子改造时为保持其原有催化功能, 应尽量避免改造进化过程中保守氨基酸或区域, 本研究对 87 种 GH78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进行序列、结构和功能分析, 确定糖苷水解酶 GH78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的保守区及进化关系, 为该酶的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源

$\alpha$ -L-鼠李糖苷酶蛋白质序列均来源于碳水化合物活性酶数据库 CAZy (<http://www.cazy.org/>), 分析该数据库糖苷水解酶第 78 家族真菌来源的所有  $\alpha$ -L-鼠

李糖苷酶氨基酸序列, 去除重复和不完整序列, 作为实验的研究集合。

### 1.2 多序列比对及保守区确定

运用 CLUSTALW2 (<http://www.clustal.org/>) 软件对  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶序列进行多序列比对分析, 获得完全保守的氨基酸位点; 并应用序列着色软件 Esript 3.0 (<http://esript.ibcp.fr/>) 对完全保守氨基酸位点进行着色; 应用 Block Maker ([http://blocks.fhcrc.org/blocks/make\\_blocks.html](http://blocks.fhcrc.org/blocks/make_blocks.html)) 确定第 78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶共有的保守区; 应用 Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 软件生成保守区序列谱利用信号肽预测软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 获得每条序列的信号肽位置; 利用 MEGA6.0 (<http://www.megasoftware.net/>) 软件计算属、种间遗传距离并构建 NeighborJoining 系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 GH78 家族 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的序列登录号与序列

CAZy 数据库收录 GH78 家族真核生物  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶蛋白质序列共计 89 条。对这些序列进行分析, 发现 1 条序列因测序方法升级被移除, 1 条来自于动物, 其余 87 条均来自于真菌。通过对真菌来源的序列统计分析, 我们发现 80 条序列来自于子囊菌亚门 14 个属中包括 21 个不同种, 7 条序列来自于担子菌亚门 1 个属中的 2 个种 (表 1)。

表 1 所列出的 87 条序列中, 从物种来源看, 有 39 条序列来源于曲霉和青霉属, 其中 32 条来源于曲霉属中的 6 个种, 7 条来源于青霉属 2 个种。这说明了真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶相关研究很多都集中在曲霉和青霉两个属。

表 1 GH78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶蛋白序列信息表

Table 1 The protein sequences information of GH78 fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase

genus	species	number	GenBank accession NO.
Aspergillus	<i>Aspergillus niger</i>	9	CAK49119.1, CAK96693.1, CAK43781.1, AGN92963.1, CAK43282.1, CAK97320.1, CAK46278.1, CAK39248.1, CAK38995.1
	<i>Aspergillus nidulans</i>	9	CCB96437.1, ABF50852.1, EAA67087.1, EAA65188.1, EAA62978.1, EAA62466.1, EAA61403.1, EAA59988.1, EAA57680.1
	<i>Aspergillus oryzae</i>	10	BAE66403.1, BAE65861.1, BAE63199.1, BAE63198.1, BAE60295.1, BAE58354.1, BAE58123.1, BAE56658.1, BAE56341.1, BAE54925.1
	<i>Aspergillus aculeatus</i>	2	AAK16249.1, AAG13964.1

转下页

接上页

	<i>Aspergillus kawachii</i>	1	BAF98236.1
	<i>Aspergillus terreus</i>	1	AFH54529.1
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium rubens</i>	5	CAP83098.1, CAP83097.1, CAP91891.1, CAP91236.1, CAP79677.1
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	2	BAU45349.1, BAU37009.1
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium fujikuroi</i>	9	CCT76033.1, CCT75869.1, CCT75250.1, CCT75039.1, CCT75036.1, CCT73942.1, CCT71937.1, CCT68213.1, CCT62249.1
	<i>Fusarium graminearum</i>	7	CEF76152.1, CEF76149.1, CEF76201.1, CEF88112.1, CEF86884.1, CEF88666.1, CEF85655.1
<i>Botrytis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	8	CCD42947.2, CCD56434.1, CCD55451.1, CCD52401.1, CCD52340.1, CCD50488.1, CCD44503.1, CCD34287.1
<i>Orbilia</i>	<i>Arthrobotrys oligospora</i>	5	EGX54175.1, EGX51590.1, EGX50846.1, EGX44245.1, EGX44008.1
<i>Komagataella</i>	<i>Komagataella phaffii</i>	2	CCA41154.1, CAY71241.1
<i>Yarrow</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2	CAG81231.1, XP_503039.1
<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	CAG87565.2
<i>Magnaporthe</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>	2	XP_003717360.1, XP_003712802.1
<i>Leptosphaeria</i>	<i>Leptosphaeria maculans</i>	1	CBY00141.1
<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria sp.</i>	1	AFA41507.1
<i>Xylaria</i>	<i>Xylaria polymorpha</i>	1	AFA53086.1
<i>Pseudogymnoascus</i>	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	1	AFD32790.1
<i>Myceliophthora</i>	<i>Myceliophthora thermophila</i>	1	AEO55772.1
<i>Filobasidiella</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6	AAW44459.2, AAW42008.1, AFR96797.2, FR94105.2, FR93595.1, DV19373.1
	<i>Cryptococcus gattii</i>	1	ADV19373.1

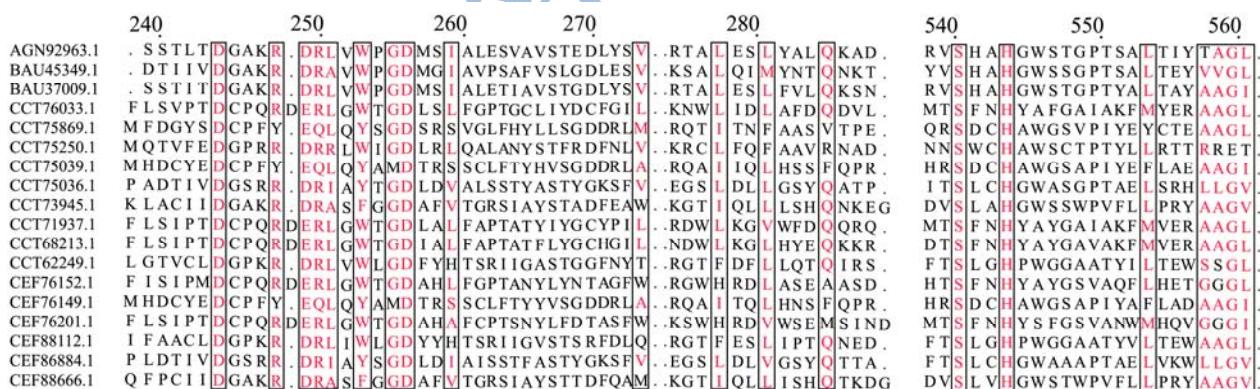


图1 GH78 家族真菌 α-L-鼠李糖苷酶保守位点

Fig.1 The conserved amino acid sites of GH78 fungal α-L-rhamnosidase

## 2.2 真菌 α-L-鼠李糖苷酶序列保守位点分析

根据目前对 α-L-鼠李糖苷酶结构的研究表明, α-L-鼠李糖苷酶均含有(α/α)<sub>6</sub>的桶装催化结构域,该结构域也是极其保守的<sup>[13,14]</sup>。应用序列比对软件 ClustalW2.0 对 GH78 家族 87 条真菌 α-L-鼠李糖苷酶序列进行了多重序列比对,利用 Espript3.0 软件对其结果着色,图 1 显示了这些序列共有的保守氨基酸位点。这 87 条序列含有 28 个完全保守位点,分别为

G139、Y142、D244、R248、D249、R250、W253、G255、D256、Q285、G289、D358、W359、N372、L499、L500、W534、W519、E250、G526、S540、H543、V557、A558、G559、L560、P612 和 P622。而这些保守位点多位于(α/α)<sub>6</sub>桶装结构上。

目前解析出的 α-L-鼠李糖苷酶的晶体结构为 4 个,均为细菌来源,分别是:3W5M、2OKX、4XHC 和 3CIH<sup>[15]</sup>, Fujimoto 等<sup>[16]</sup>解析的 3W5M 晶体结构中, Glu636 被预测为给糖苷中的氧提供质子, Glu895 在催



化中起到亲核攻击的作用, 绑定鼠李糖的氨基酸是两个芳香族残基 Trp747 和 Trp640; 2OKX<sup>[17]</sup>晶体结构中, 通过定点突变实验, 发现 Asp567、Asp572、Asp579 及 Glu841 对于酶活性有负影响。这些细菌来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶晶体结构中的关键氨基酸位点, 在保守位点分析中均有体现, 这为揭示真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶结构与功能之间的关系起到了一定的作用。

保守位点分析发现, 组成  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>桶状结构的氨基酸序列保守性明显高于其他区域氨基酸序列, 这与( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>桶状结构为  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶催化结构域的结论相互印证, 也充分说明保守氨基酸位点对于  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶三维空间结构的研究至关重要。

### 2.3 真菌 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶共有保守区确定

利用 Block 软件和 Esript 3.0 软件进一步分析多重序列比对结果, 确定了 GH78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶共有 3 个保守区。

图2为 Weblogo 软件生成的 3 个保守区的序列谱。从序列谱中可读出真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶共有的 3 个 block 去序列分别为: AHGWSTGPTY、VTLDTGQNVAG 和 NELSIPTDGAKRD。

龚燕燕<sup>[18]</sup>等人对糖苷水解酶第 10 家族真菌木聚糖酶分析得出 5 个 block 区, 并由此鉴定了来源于 *AusamiiE001* 中的木聚糖酶 *Auxyn10A*。据此, 确定 87 条序列的共有保守区可用于第 78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的鉴定。目前尚未有研究表明  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的催化中心, 而保守 block 区通常包含功能基因。王波等<sup>[19]</sup>人在对植物 III 型聚酮合酶基因家族分子进化分析时发现, 植物 PKSIII 保守结构域不仅包含活性位点, 也包含了产物结合位点, 故对第 78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶保守区的分析, 有利于阐明  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的催化关键氨基酸位点。

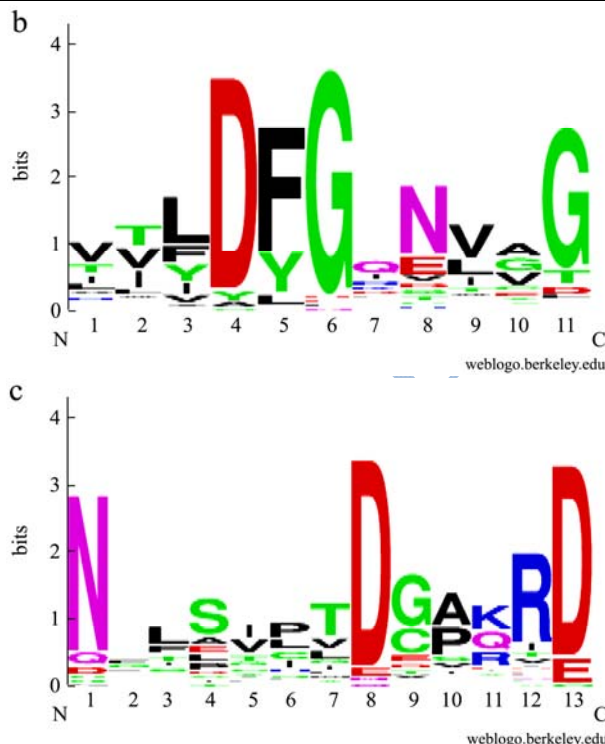
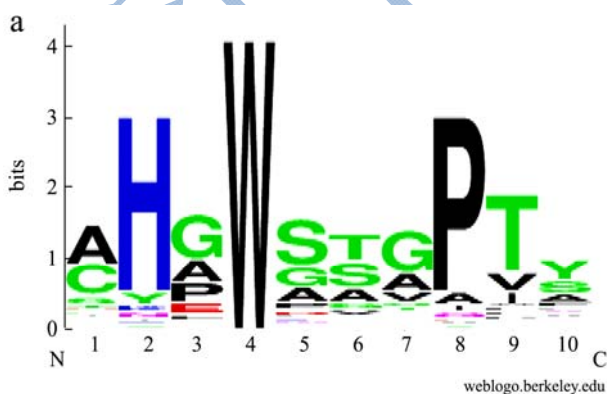


图2 GH78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 3 个保守区序列谱  
Fig.2 The three conserved sequence spectra of GH78 fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase

注: a、b、c 分别为 block1、block2、block3; 纵坐标表示氨基酸位点的相对保程度; 单个氨基酸位点所有氨基酸字母的高度代表该位点的相对保守程度, 单个氨基酸位点中单个字母高度代表该氨基酸在该位点中出现的相对频率, 字母的颜色表示不同性质的氨基酸。

### 2.4 GH78 家族真菌 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶属间及种间遗传距离

表 2 和表 3 列出了基于  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶序列的属间及种间遗传距离。属间遗传距离最小值出现在毕赤酵母属 (*Komagataella*) 和德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*) 之间, 最大值出现在假裸囊菌属 (*Pseudogymnoascus*) 和小球腔菌属 (*Leptosphaeria*) 之间; 种间遗传距离最小值出现在棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 和白曲霉 (*Aspergillus kawachii*) 之间, 最大值出现在蚀丝霉属嗜热甲烷八叠球菌 (*Myceliophthora thermophila*) 和锈腐柱隔孢 (*Pseudogymnoascus destructans*) 之间, 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*)、白曲霉 (*Aspergillus kawachii*) 三者进化关系比较近。

表 2 GH78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶序列的属间遗传距离

Table 2 The genetic distance of intergeneric of GH78 fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1															
2	6.9														
3	6.6	7.0													
4	6.7	7.8	8.2												
5	5.4	6.1	4.4	6.6											
6	5.4	6.0	4.5	7.1	1.2										
7	5.3	5.9	4.2	7.1	0.7	1.1									
8	5.9	5.8	4.3	7.6	3.4	3.7	3.4								
9	5.6	5.5	4.0	7.0	4.5	4.7	4.1	2.8							
10	4.9	5.6	3.5	6.6	1.6	1.6	1.5	2.9	3.2						
11	5.0	5.9	7.2	3.8	6.4	7.0	7.1	7.8	7.8	6.8					
12	17.3	17.1	24.1	6.2	10.2	6.9	11.6	30.8	48.5	17.3	1.0				
13	5.0	5.0	3.5	6.8	3.9	4.5	3.7	3.0	2.3	2.9	6.2	5.6			
14	6.9	6.6	8.5	9.3	6.5	5.9	6.2	6.4	6.1	5.4	5.5	28.0	5.9		
15	6.0	6.8	6.2	7.2	4.3	4.1	4.2	5.4	5.1	4.0	5.5	27.7	4.9	6.4	

注: 1. *Aspergillus*; 2. *Fusarium*; 3. *Botrytis*; 4. *Orbilia*; 5. *Komagataella*; 6. *Yarrow*; 7. *Debaryomyces*; 8. *Magnaporthe*; 9. *Leptosphaeria*; 10. *Alternaria*; 11. *Xylaria*; 12. *Pseudogymnoascus*; 13. *Myceliophthora*; 14. *Filobasidiella*; 15. *Penicillium*.

表 3 真菌 23 种  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶序列的种间遗传距离

Table 3 The genetic distance of interspecies of GH78 fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	5.5											
3	5.9	7.2										
4	4.7	6.0	10.5									
5	3.2	6.0	5.9	5.3								
6	0.8	5.6	6.3	4.5	2.9							
7	6.5	4.9	4.2	8.9	6.2	6.8						
8	10.6	24.7	17.3	48.1	5.6	17.3	1.0					
9	6.6	5.3	4.1	9.8	6.5	6.9	0.6	0.9				
10	4.2	7.3	7.1	7.4	4.4	4.6	6.3	22.2	6.5			
11	4.8	6.2	6.7	7.8	5.0	5.1	4.6	15.5	4.8	6.8		
12	0.4	5.8	6.2	4.6	3.2	0.7	7.0	18.9	7.3	4.2	5.0	
13	0.9	6.1	6.3	5.1	3.5	1.1	6.7	35.1	7.1	4.5	4.9	0.9
14	1.7	6.1	6.2	4.9	4.5	1.6	7.0	6.9	6.6	5.0	5.9	1.6
15	1.6	6.4	6.2	4.8	3.7	1.5	7.1	11.6	6.8	5.0	5.8	1.6
16	5.0	6.5	6.5	7.1	5.5	5.2	5.0	24.7	5.3	6.4	6.8	5.2
17	1.6	6.8	6.4	5.1	3.9	1.6	6.4	10.2	6.9	5.1	5.8	1.6
18	3.3	6.2	6.6	5.4	2.3	3.2	7.8	48.5	8.4	4.7	6.0	3.0
19	3.5	8.2	7.9	10.1	3.5	3.5	7.2	24.1	7.7	6.0	6.9	3.5
20	5.3	6.8	7.6	7.3	5.2	5.7	6.4	17.7	6.6	7.8	7.2	5.5
21	5.2	6.2	6.7	7.0	4.7	5.4	5.3	16.4	5.6	6.7	6.3	5.4

转下页

接上页												
22	6.4	8.4	7.1	14.7	6.8	6.6	3.8	6.2	3.7	7.1	6.4	6.8
23	3.1	6.4	7.0	5.8	3.0	2.9	7.8	30.8	7.8	5.5	6.0	2.9
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14	1.6											
15	1.6	1.1										
16	5.3	5.1	5.2									
17	1.5	1.2	0.7	5.4								
18	3.3	4.7	4.1	5.9	4.5							
19	3.7	4.5	4.2	7.3	4.4	4.0						
20	5.6	6.0	6.0	7.6	6.2	5.7	7.2					
21	5.5	6.1	5.8	7.1	6.0	5.3	6.7	6.3				
22	6.7	7.1	7.1	7.4	6.6	7.0	8.2	8.3	7.2			
23	3.0	3.7	3.4	6.4	3.4	2.8	4.3	5.9	5.7	7.6		

注: 1. *Aspergillus aculeatus*; 2. *Cryptococcus neoformans*; 3. *Aspergillus nidulans*; 4. *Cryptococcus gattii*; 5. *Myceliophthora thermophila*; 6. *Alternaria sp.*; 7. *Xylaria polymorpha*; 8. *Pseudogymnoascus destructans*; 9. *Aspergillus terreus*; 10. *Aspergillus niger*; 11. *Aspergillus oryzae*; 12. *Aspergillus kawachii*; 13. *Penicillium chrysogenum*; 14. *Yarrowia lipolytica*; 15. *Debaryomyces hansenii*; 16. *Penicillium rubens*; 17. *Komagataella phaffii*; 18. *Leptosphaeria maculans*; 19. *Botrytis cinerea*; 20. *Fusarium fujikuroi*; 21. *Fusarium graminearum*; 22. *Arthrotrrys oligospora*.

### 2.5 真菌 87 条 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶信号肽分析及分子进化树构建

利用 SMART 数据库中 SignalP4.1 软件对 87 条  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶进行信号肽预测分析, 87 条序列中 29 条序列含有信号肽 (图 3 中蓝色底色序列)。

进化树不仅反映可以产生新的基因复制或享有共同祖先的生物体的歧异点的一种, 也可以作为序列分类的依据, Stam 等<sup>[20]</sup>人将糖苷水解酶第 13 家族中的 1691 条序列分为 35 个亚科。我们以大肠杆菌来源的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 (GenBank 登录号为: ADX49293.1) 为外群, 应用 MEGA 6.0 软件构建 GH78 家族真核  $\alpha$ -L-

鼠李糖苷酶的 NJ (邻接) 进化树 (图 3)。根据进化树所示亲缘关系, 子囊菌亚门 14 属 80 条序列和担子菌亚门 1 属 2 种的 7 条序列分为两大支系, 外群恰好用于区分两大支系。

分析进化树结果, 不同来源的蛋白序列发生了聚类, 说明了氨基酸序列与功能的一致性<sup>[21]</sup>。结合信号肽预测结果, 含有信号肽的序列全部分布在外群的右侧, 而不含预测出信号肽的序列大部分分布在外群左侧, 这表明进化树分支关系由是否为胞外酶确定。据此, 我们推测胞内与胞外的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶有着各自独立进化过程。

分析曲霉及青霉属 8 个物种 39 条序列在分子系统进化树中的分布发现, 曲霉属与青霉属物种亲缘关系

较近,且曲霉属序列大都处于系统进化树各支系的顶端,进化时间较其他物种晚。

另外,从进化树上还可以看出,很多真菌可以产生不同的GH78家族的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶,当来源不同的 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶共存时,他们可能在水解底物的过程中发挥不同的作用,而这些潜在的资源有待进一步的发掘和利用。

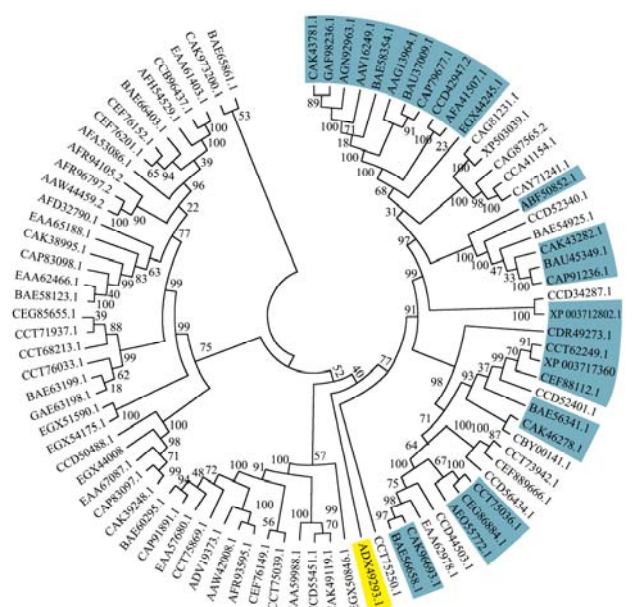


图3 真菌 87 条  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶之间的同源性 & 进化关系  
**Fig.3 The homology and evolutionary relationships between 87 of GH78 fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidase**

注:黄色序列 ADX49293.1 为大肠杆菌来源的外群,蓝色底色的序列含有信号肽的序列。

### 3 结论

本研究以 CAZy 中收录的糖苷水解酶 78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶 78 序列为基础,进行了多重序列比对、保守区、进化关系等方面的分析。序列分析发现  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的功能结构域( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> 组成模式高度保守,遗传距离分析显示了各个属、种间  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的亲缘关系,依据分子系统进化树将糖苷水解酶 78 家族真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶分为两大支系,分支关系依靠是否为胞外酶进行分类。这为今后深入研究真菌  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶的功能差异提供了理论支撑和数据来源。

### 参考文献

[1] Yadav V, Yadav P K, Yadav S, et al.  $\alpha$ -L-rhamnosidase: a review [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(8): 1226-1235  
 [2] Qian S, Wang H, Zhang C, et al. Isolation and characterization of dioscin- $\alpha$ -L-rhamnosidase from bovine

liver [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 97(8): 31-35  
 [3] Lombard V, Ramulu H G, Drula E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(D1): D490-D495  
 [4] Qian S, Yu H, Zhang C, et al. Purification and characterization of dioscin- $\alpha$ -L-rhamnosidase from pig liver [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 53(8): 911-914  
 [5] Kurosawa Y, Ikeda K, Egami F.  $\alpha$ -L-rhamnosidases of the liver of *Turbo cornutus* and *Aspergillus niger* [J]. Journal of Biochemistry, 1973, 73(1): 31-37  
 [6] Bourbouze R, Pratviel-Sosa F, Percheron F. Rhamnodiastase et  $\alpha$ -L-rhamnosidase de *Fagopyrum esculentum* [J]. Phytochemistry, 1975, 14(5-6): 1279-1282  
 [7] Manzanares P, van den Broeck H C, de Graaff L H, et al. Purification and characterization of two different  $\alpha$ -L-rhamnosidases, RhaA and RhaB, from *Aspergillus aculeatus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2230-2234  
 [8] Yadav S, Yadav K. Secretion of  $\alpha$ -L-rhamnosidase by *aspergillus terreus* and its role in debittering of orange juice [J]. Journal of Scientific & Industrial Research, 2000, 59: 1032-1037  
 [9] Sheu F, Chien P J, Hsieh K Y, et al. Purification, cloning, and functional characterization of a novel immunomodulatory protein from *Antrodia camphorata* (bitter mushroom) that exhibits TLR2-dependent NF- $\kappa$ B activation and M1 polarization within murine macrophages [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(10): 4130-4141  
 [10] Yadav S, Yadav R S S, Yadav K D S. An  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus awamori* MTCC-2879 and its role in debittering of orange juice [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 48(5): 927-933  
 [11] Gallego M V, Pinaga F, Ramón D, et al. Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking [J]. Journal of Food Science, 2001, 66(2): 204-209  
 [12] 张霞.黑曲霉 JMU-TS528 菌株的  $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶基因的克隆和表达分析[D].厦门:集美大学,2014  
 ZHANG Xia. Cloning and expression analysis of  $\alpha$ -L-rhamnosidase gene from *Aspergillus niger* JMU-TS528 [D]. Xiamen: Jimei University, 2014  
 [13] Pitson S M, Mutter M, van den Broek L A M, et al. Stereochemical course of hydrolysis catalysed by  $\alpha$ -L-



- rhamnosyl and  $\alpha$ -D-galacturonosyl hydrolases from *Aspergillus aculeatus* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 242(3): 552-559
- [14] Zverlov V V, Hertel C, Bronnenmeier K, et al. The thermostable  $\alpha$ -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercoarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial  $\alpha$ -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase [J]. Molecular Microbiology, 2000, 35(1): 173-179
- [15] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- [16] Fujimoto Z, Jackson A, Michikawa M, et al. The structure of a *Streptomyces avermitilis*  $\alpha$ -L-rhamnosidase reveals a novel carbohydrate-binding module CBM67 within the six-domain arrangement [J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(17): 12376-12385
- [17] Cui Z, Maruyama Y, Mikami B, et al. Crystal structure of glycoside hydrolase family 78  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL1 [J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 374(2): 384-398
- [18] 龚燕燕,朱天地,殷欣,等.糖苷水解酶第 10 家族真菌木聚糖酶保守区及进化关系的分析[J].中国生物制品学杂志,2014,27(1):46-51
- GONG Yan-yan, ZHU Tian-di, YIN Xin, et al. Conserved region of glucoside hydrolase family 10 fungal xylanases and its evolutionary relationship [J]. Chin. J Biologicals, 2014, 27(1): 46-51
- [19] 王波,孙君社,翟玉盼,等.植物III型聚酮合酶基因家族的分子进化分析[J].生物技术通报,2011,1:83-89
- WANG Bo, SUN Jun-she, ZHAI Yu-pan, et al. Molecular evolution of plant-specific type III PKS family [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 1: 83-89
- [20] Stam M R, Danchin E G J, Rancurel C, et al. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of  $\alpha$ -amylase-related proteins [J]. Protein Engineering Design and Selection, 2006, 19(12): 555-562
- [21] Bittner B, Kellner H, Jehmlich N, et al. The wood rot ascomycete *Xylaria polymorpha* produces a novel GH78 glycoside hydrolase that exhibits  $\alpha$ -L-rhamnosidase and feruloyl esterase activities and releases hydroxycinnamic acids from lignocelluloses [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(14): 4893-4901