

文章编号: 1000-0615(2017)03-0347-11

DOI: 10.11964/jfc.20160510396

香港牡蛎新型LRR受体克隆与功能分析

刘映^{1,2,3}, 李军^{1,2}, 张跃环^{1,2}, 张扬^{1,2}, 喻子牛^{1,2*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 热带海洋生物资源与生态重点实验室,
广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东广州 510301;
2. 南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东广州 510301;
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 亮氨酸富集重复(LRRs)是一种常见于膜上受体的多功能配体识别结构域, 涉及机体发育、免疫应答及激素调控等重要生理过程。本实验通过基因克隆、序列比对分析、原位杂交、重组蛋白细胞体外处理等方法, 对一种在胚胎发育时期显著高表达的香港牡蛎新型LRR受体进行了初步功能探究。SMART结构域预测结果显示, 该新型LRR受体膜外区除了LRRs结构域外还含有一个免疫球蛋白样(immunoglobulin-like)结构域, 是典型的I型跨膜蛋白, 将其命名为香港牡蛎含LRRs和IG-like结构域受体(*ChLIGR*)。序列比对分析结果显示, *ChLIGR*是含IG-like结构域LRR蛋白超家族中的新成员, 其同源蛋白多见于软体动物, 但功能均未被揭示。胚胎发育各时期表达谱与胚胎整体原位杂交结果一致表明*ChLIGR*在囊胚期显著高表达, 而且表达信号富集于胚胎局部。联合*ChLIGR*表达调控区含ETS/AP-1组合调控位点的预测结果, 提出*ChLIGR*参与胚胎原肠胚化相关上皮间质细胞转换过程的猜想。*ChLIGR*膜外区重组蛋白体外处理显著促进细胞迁移相关基因的表达上调, 为猜想提供了部分理论依据。综上所述, 本研究初步揭示了香港牡蛎新型LRR受体在囊胚期促进细胞迁移, 介导胚胎原肠胚化过程的重要作用。

关键词: 香港牡蛎; 亮氨酸富集重复; 胚胎发育; 细胞迁移

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

亮氨酸富集重复(leucine-rich repeats, LRRs)是一种以串联模体为特征的蛋白结构域, 能形成各种识别并结合特异配体的多功能结构框架^[1-2]。这些配体包括各种蛋白、多糖、核酸乃至脂质等生物大分子。规则排布于LRRs结构域的基序(motif)单元含20~30个氨基酸残基, 其motif核心是含11个氨基酸残基的标志性基序LxxLxLxxNxL^[2]。其中L指代亮氨酸残基, 偶尔会被异亮氨酸残基或缬氨酸残基替代, x指代任意氨基酸残基, N指代天门冬酰胺残基。标志性基序中的可变氨基酸残基往往是决定配体特异性的根本要素, 而保守的疏水性氨基酸残基和天门冬酰胺残基

则是LRRs的结构基础。根据Kobe等^[1]对模体基序的分类结果, 目前LRRs超家族可分为RI样基序、SDS-22样基序、含半胱氨酸残基的基序、细菌专属基序、典型LRR基序、植物特有基序和*Treponema pallidum* (*TP*)专属基序7个类别。动物中存在于分泌性胞外蛋白和膜上受体类蛋白的LRRs绝大部分属于典型LRR类群。Bella等^[3]就人类(*Homo sapiens*), 小鼠(*Mus musculus*), 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)4种模式生物蛋白组数据库中的胞外LRR蛋白进行系统搜寻和分类, 将胞外LRR蛋白分为LRR_Ig/FN3、LRR_Tollkin、

收稿日期: 2016-05-10 修回日期: 2016-08-16

资助项目: 国家自然科学基金(31502193); 广东省自然科学基金博士启动项目(2014A030310402); 广东省科技计划项目(2014B030301064)

通信作者: 喻子牛, Email: carlzyu@scsio.ac.cn

LRR_Other、LRR_Only 4大类^[5]。

LRR蛋白广泛存在于各种生命形式,参与各式各样的生理生化过程。在机体免疫领域,LRRs结构域在多种行使监控防御功能的受体蛋白家族中扮演着重要角色。作为Toll样受体(Toll like receptor, TLR)家族成员的标志性结构域之一,LRRs以其多变的靶标识别特点被专门用于病原相关分子模式(pathogen associated molecules patterns, PAMPs)的特异识别结合胞外区^[4-5]。另外,许多胞外区含LRRs的受体蛋白参与机体的发育和特定组织的分化调控。例如,含LRRs的G蛋白偶联受体(leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors, LGRs)能响应多种生长激素,参与机体的发育分化调控^[6]。促卵泡素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)是LGRs家族A类群成员,FSHR响应促卵泡素信号,分别促进雌性卵泡生成与雄性精子生成^[7]。新近发现的神经LRR受体蛋白与神经细胞分化伸张和突触形成密切相关^[8]。目前在牡蛎中已经克隆鉴定出多种含LRR结构域的功能基因。然而,胞外域同时含有LRR结构域与免疫球蛋白样结构域(IG-like)的功能受体在牡蛎乃至软体动物中仍鲜有报道。新近研究发现,携带IG-like结构域的LRR受体在机体发育分化中扮演重要角色。本课题组在转录组数据库中发现一个在发育时期高表达的LRR受体基因,结构域组成分析,其表面还含有IG-like结构域,因此将该基因命名为香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)LRRs与IG-like组合型受体(leucine-rich repeats and IG-like containing receptor in *C. hongkongensis*-ChLIGR),并就其在牡蛎胚胎发育期间行使的功能开展一系列的研究。

1 材料与方法

1.1 动物样品收集

健康成体香港牡蛎取自中国广西北海水产养殖基地。从性成熟牡蛎中分离并收集精细胞和卵细胞。受精卵及胚胎发育中多个关键时期包括2细胞期,4细胞期,8细胞期,囊胚期,原肠胚期和担轮幼虫期。所有样品均用PBS漂洗后浸泡于4%多聚甲醛并保存于4℃。另取成体香港牡蛎各组织,包括鳃、唇瓣、外套膜、性腺、消化腺、闭壳肌、心脏和淋巴液,与胚胎发育各时期样品一同浸泡于Trizol试剂中,充分

匀浆后储存于-80℃。剪取少量闭壳肌,PBS漂洗1遍后浸泡于75%乙醇溶液,用于DNA提取。样品RNA提取采用Trizol法进行,样品DNA提取采用软体动物DNA纯化试剂盒(Magen,中国)。核酸纯化产物采用浓度1%琼脂糖电泳检测其完整度,采用电子分光光度计检测其260和280 nm处吸光度比值得出其浓度及纯度。

1.2 ChLIGR克隆及生物信息学分析

ChLIGR转录产物片段来源于本课题组的香港牡蛎转录组数据库。根据片段已知序列进行SMART-RACE,获取ChLIGR的5'/3'-端非翻译区序列,并与已知全段序列进行拼接从而获得表达序列全长。用于SMART-RACE的cDNA模板采用SMART-RACE cDNA扩增试剂盒(clontech, TaKaRa)制备,引物见表1。电泳后将符合预期大小的条带采用胶纯化试剂盒(MAGEN,中国)进行胶纯化回收,并克隆至pMD-19T克隆载体,对阳性克隆进行测序获取序列信息。ChLIGR蛋白序列分别提交至ExPASy(<http://web.expasy.org>)和SMART软件(<http://smart.embl-heidelberg.de>)进行蛋白生化性质(分子量与等电点)和结构域预测。另外,参考长牡蛎(*C. gigas*)基因组序列设计同源区搜寻引物,从香港牡蛎基因组中特异扩增包含ChLIGR的区段,获取ChLIGR的基因结构和启动子附近序列。参考Dolan等^[9]对4种模式生物胞外LRR蛋白的分类结果,获取LRR_IG类所有蛋白序列以及NCBI去冗余蛋白组数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)BLAST比对结果中与ChLIGR相似的蛋白序列,与ChLIGR一起进行多序列比对,并构建系统进化树。多序列比对采用Clustal X(版本1.81)。邻接法构建系统进化树(MEGA 4.0)。在TRANSAC(<http://www.gene-regulation.com>)进行ChLIGR表达调控区转录因子结合位点预测。

1.3 探针制备及胚胎整体原位杂交

ChLIGR特异探针采用罗氏地高辛标记体外转录试剂盒(Roche, USA)。简略过程如下,先将ChLIGR探针区段亚克隆至pGEM-T载体,随后以pGEM-T-ChLIGR-ISH为模板特异扩增体外转录所需模板(表1)。正义探针和反义探针分别来源于特异识别T7和SP6的转录酶。转录产物采用罗氏RNA纯化柱(mini quick spin RNA columns)纯化,纯化产物采用浓度1%琼脂糖电泳检测其完整度,采用电子分光光度计检测其260和280 nm处吸光

表 1 本研究使用引物

Tab. 1 The sequences of primers used in this study

引物 primer	序列 sequence (5'-3')	用途 usage
ChLIGR-OF	GGTCAAACCACGAAATCAATG	ORF 扩增
ChLIGR-OR	GATAAACCTGGCACAACTACT	
ChLIGR-GS-F1	ATCAACCAGGGGCGAAAC	启动子扩增
ChLIGR-GS-R1	ACTACCGAGAAATGCTTGAACA	
ChLIGR-GS-F2	GACATTGTGAAAATCTCTCCTGG	启动子扩增
ChLIGR-GS-R2	ATGCTGGTTTGCTATTCTCCT	
qChLIGR-F	CCATCGGATACTGGGTGAC	<i>ChLIGR</i> qPCR
qChLIGR-R	TGAAATGGAGGCTTCTGAGA	
ChLIGR-3RACE1	GGTGAGCATGGTCATTGGGGGAATCT	3'RACE特异引物
ChLIGR-3RACE2	CATCACCAAGGAAATGTGCTACACCC	
ChLIGR-5RACE1	GCTGAGGCTCGGCAATGAAGAGTGAC	5'RACE特异引物
ChLIGR-5RACE2	CTTGCAGGAGAATGGCAAACCAGCAT	
qChGAPDH-F	GGATTGGCGTGGTGGTAGAG	<i>ChGAPDH</i> qPCR
qChGAPDH-R	GTATGATGCCCTTTGTTGAGTC	
qChEfl α -F	CGGGATCCATGTATAGTCGGGAGA	<i>ChEflα</i> qPCR
qChEfl α -R	CCCAAGCTTTCACAGAGAAATCAA	
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTATCAACGCAGAGT	RACE通用引物
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
ChLIGR-T7-F	ATCGTGTAATACGACTCACTATAGGG	原位杂交探针制备
ChLIGR-T7-R	CACTAGTGATTTCCAATTCCC	
ChLIGR-SP6-F	AGTCTGATTTAGGTGACACTATAGAAT	
ChLIGR-SP6-R	GGGAATTCGATTCACAGCTGT	
ChLIGR-ECD-GH-F	CCGCGTGGATCCCCGGAATTCAGAAAAATAACTCTGAACCAGACTGTC	pGST-HIS-ECD
ChLIGR-ECD-GH-R	ATGATGATGCGGCCGCTCGAGAACCCTGAACAATCGGGTCA	载体构建
qN-Cadherin1-F	ATCACCAAACCTGTCCCCT	<i>Cadherin1</i> qPCR
qN-Cadherin1-R	TGTCTCTGTCCACCTCAAAATAC	
qN-Cadherin2-F	ATTAAATGGCGTGGTGCGA	<i>Cadherin2</i> qPCR
qN-Cadherin2-R	TGACAGAAGCAATAGAATAGCG	
qSe-Cadherin-F	ACACGACCCACAAGTTTTTCC	<i>Se-Cadherin</i> qPCR
qSe-Cadherin-R	ATTCTCCGATGCCCTCTCC	
qMRG-F	AAAGAAATTCGGGTTAGAGGA	MRG qPCR
qMRG-R	CATGTGTAGCACCAGCACAG	

度比值得出其浓度及纯度。

胚胎整体原位杂交实验根据罗氏地高辛标记应用手册并做简略修改。首先脱水样品进行梯

度重水化(无RNA酶PBST; 甲醇); 水化样品杂交前预处理, 蛋白酶K溶液(10 μ g/mL)浸泡20 min, 甘氨酸溶液终止消化, 用含0.25%醋酸酐的TEA

溶液浸泡样品5 min, 再用含0.5%醋酸酐的TEA溶液浸泡样品5 min, 随后用PBST冲洗2遍, 每次5 min。4%多聚甲醛重固定后用无RNA酶PBST洗3遍; 样品预杂交, PBST/杂交液(50/50)浸泡10 min, 100%杂交液65 °C浸泡过夜; 样品原位杂交, 加入特异性RNA探针(1 µg/mL), 65 °C浸泡过夜; 样品清洗, 杂交液65 °C下2×SSC(50/50)浸泡40 min, 每20 min换新溶液; 65 °C下, 杂交液/2×SSC(25/75)浸泡40 min, 每20 min换新溶液; 65 °C下, 2×SSC浸泡30 min, 用含0.1%Tween 20的0.2×SSC浸泡60 min, 每30 min换新溶液; RT, 浸泡于MaNaT 20 min, 每10 min换新溶液; 样品封闭, 室温浸泡于Blocking solution 4 h; 抗体孵育, 抗体/Blocking solution(1/3000)孵育过夜; 抗体漂洗, 浸泡于MaNaT 3 h以上, 每30 min换新溶液; 样品显色, 浸泡于Detection buffer 30 min以上, 每隔10 min换新溶液, 随后加入NBT/BCIT底物染液(2%)避光放置过夜; 样品记录, 弃染液, 浸泡于PBST 20 min, 每隔10 min换新溶液, 最后存放于70%甘油—PBS溶液, 玻片观察并拍照。

1.4 组织分布与胚胎发育各时期表达谱

采用实时定量PCR方法对*ChLIGR*表达水平进行定量检测, 香港牡蛎甘油醛磷酸脱氢酶基因(*ChGAPDH*)和香港牡蛎翻译延伸因子基因(*ChE1fa*)分别作为组织分布和胚胎发育各时期表达谱的内参基因, 用于标定*ChLIGR*的表达量。表达量数据处理方法为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[9]。逆转录采用PrimerScript逆转录试剂盒(TaKaRa, Japan), 使用1 µg RNA模板, 将cDNA产物稀释10倍制备实时定量PCR工作模板。实时定量PCR反应采用荧光标记PCR反应混合液(Genstar, 中国), 反应程序为95 °C预变性10 min, 紧接45个变性退火延伸循环, 其中变性10 s, 退火10 s, 延伸20 s, 最后进行熔解曲线分析, 确认产物的特异性。实时定量PCR均进行3次重复, 并采用SPSS 13.0进行差异显著性分析。

1.5 ChLIGR膜外区原核重组蛋白制备和鳃细胞处理

根据结构域预测结果将ChLIGR去除信号肽的膜外区段序列亚克隆至本实验室构建的pGST-His表达载体(表1), 采用菌落PCR筛选阳性克隆并测序确认构建质粒正确无误。纯化的pGST-

His-ECD和空载体pGST-His分别转化DE3大肠杆菌感受态细胞(全式金, 中国), PCR验证阳性菌落。蛋白表达诱导程序如下, 过夜培养预备菌液, 次日按1:100于200 mL LB抗性培养液中扩大培养, 200 r/min 37 °C摇床培养3 h后添加IPTG(终浓度为1 mmol/L), 于200 r/min 28 °C条件下摇床培养12 h。经SDS-PAGE电泳检测确认表达后离心收集菌体。非变性条件(PBS重悬)下冰浴超声裂解菌液, 4 °C下15 000×g离心10 min收集上清液与沉淀。上清液过GST结合纯化柱纯化, 沉淀则采用十二烷基肌氨酸钠CAPS裂解液重悬溶解, 经透析复性后过镍柱纯化(GE Healthcare, USA)。

香港牡蛎鳃细胞取自健康成体牡蛎鳃组织温和匀浆液, 于自制的牡蛎培养液中20 °C培养过夜, 包括20%的牡蛎血清制剂, 74%的minimum essential medium(MEM)培养剂, 5%的海盐溶液母液(盐度65%)和1%青链霉素。次日按1 mg/mL制备含处理组和对照组蛋白的牡蛎培养液, 离心收集细胞, 去除培养液后添加新制培养液。于处理后3、6、12和24 h离心收集细胞, Trizol法提取RNA并按上述方法制备cDNA模板, 进行实时定量PCR检测三个神经钙黏蛋白(N-Cadherin)相关基因与一个基质金属蛋白酶(MRG)相关基因的表达水平变化。N-Cadherin是上皮胞质细胞转移起始的上调标志性基因, MRG作为胞外基质重构的主要功能酶, 能促进细胞迁移过程。Se-Cadherin源于*Sexostrea echinata*的Cadherin相关基因。实时定量PCR均进行3次重复, 并采用SPSS 13.0进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 ChLIGR全长与生物信息学分析

ChLIGR cDNA全长为2511 bp, 包括117 bp 5'端非翻译区、1938 bp开放阅读框和466 bp 3'端非翻译区, NCBI序列登记号为KX236459。其ORF编码645个氨基酸残基, 预测含有一段信号肽, 一个含6单元的亮氨酸富集重复结构域, 一个免疫球蛋白样结构域和单次跨膜区, 胞内域除了一个螺旋卷曲结构域和两个简单序列区外无其他可识别功能结构域或翻译后修饰热点。其蛋白产物的理论等电点为6.01, 预测大小为72.3 ku。根据多序列比对结果构建的系统进化树

显示, ChLIGR和存在于软体动物体内的相似蛋白共同归为有别于其他LRR与IG组合受体家族的一簇(图1)。ChLIGR启动子附近序列被识别存在多个与发育分化相关转录因子的结合位点, 包括Fork head box D3, HLF, Evi, HNF-4和CDP CR1等。除了AP-1和ETS转录因子家族结合位点, 在中下游还识别出一个ETS/AP-1组合调控位点(图2), 表明ChLIGR表达很可能受到AP-1和ETS家族相关转录因子的协同调控。

2.2 ChLIGR组织分布与胚胎发育各时期表达谱

ChLIGR组织分布表达谱显示, ChLIGR广泛

表达于成体牡蛎各组织, 在鳃、唇瓣等与外环境接触频繁的组织中表达水平较高, 在心脏中表达水平最低。而在外套膜、性腺、消化腺、淋巴和闭壳肌中表达量相对持平(图3)。胚胎发育各时期表达谱显示ChLIGR在受精卵及其后的卵裂期表达水平变化不大, 但到囊胚期表达水平显著升高, 而且远高于早期卵裂阶段。ChLIGR囊胚期相对表达水平分别是受精卵期的3.9倍, 2细胞期的3倍, 4细胞期的10倍, 8细胞期的3倍, 之后逐步下降, 到担轮幼虫期相对表达水平只剩囊胚期的17.8%。上述结果表明, ChLIGR在囊胚期及原肠胚期行使重要功能。

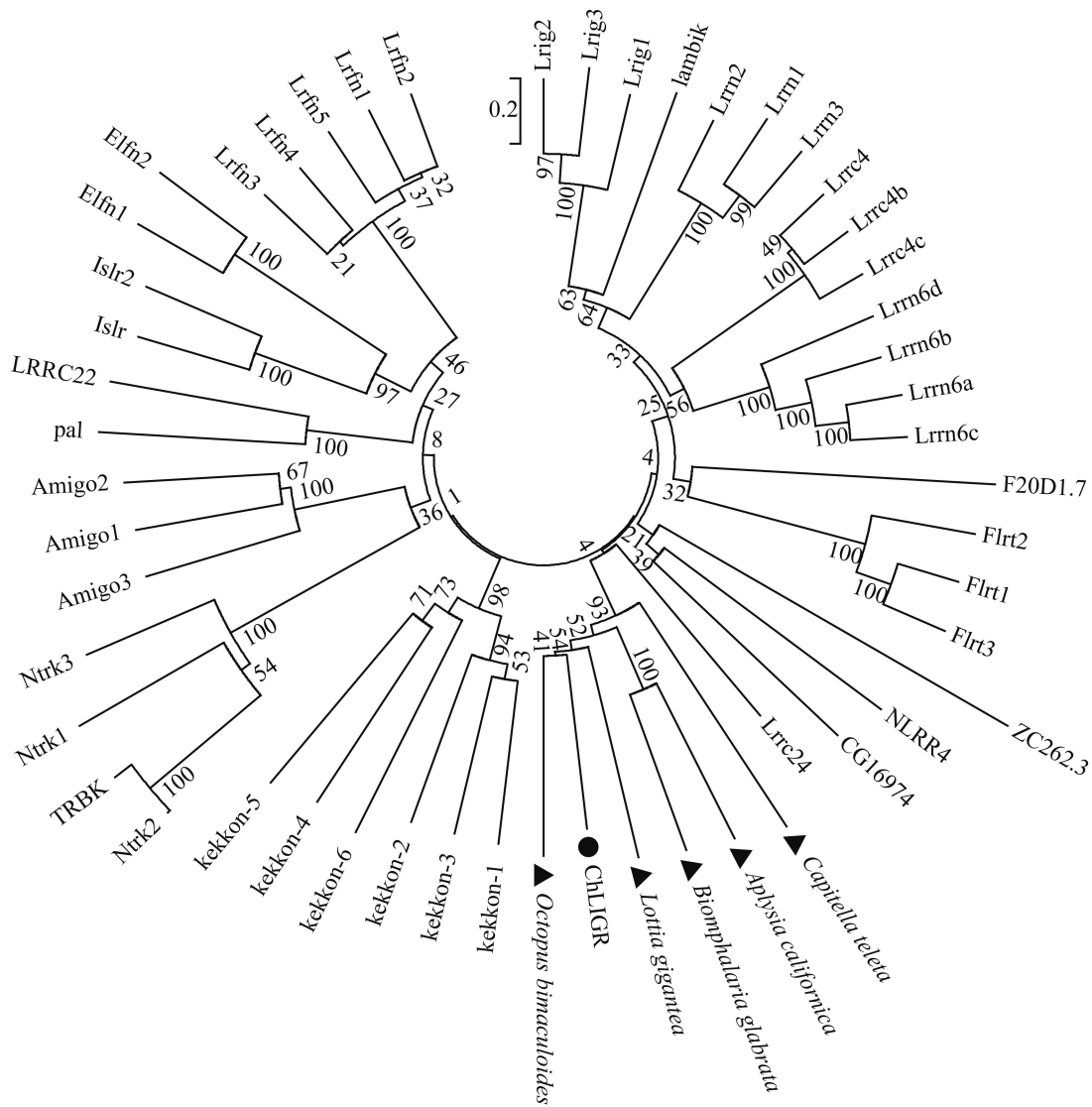


图 1 ChLIGR分类簇集图

实心圆标示ChLIGR; 实心三角形标示其他物种中的同源蛋白

Fig. 1 The cluster of ChLIGR and other similar proteins

ChLIGR is denoted by solid circle; the homologous proteins from other species are denoted by solid triangle

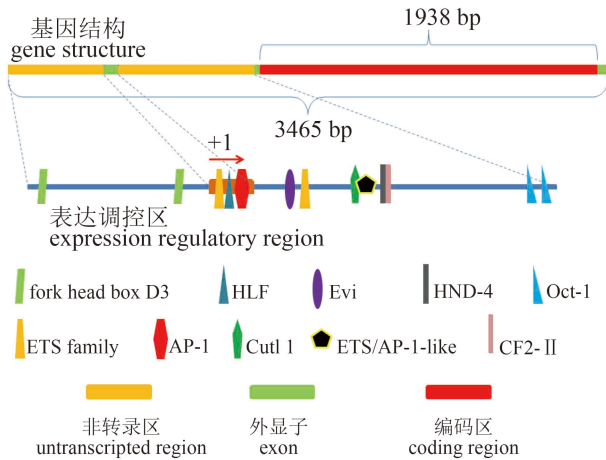


图2 *ChLIGR*基因结构与转录因子结合位点
 Fig. 2 The gene structure and transcription factor binding sites in regulatory region of *ChLIGR*

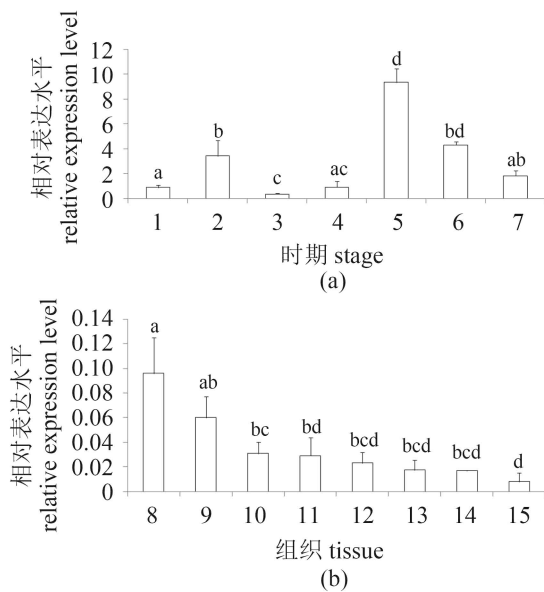


图3 *ChLIGR*胚胎发育各时期表达谱与成体组织分布表达谱

(a) *ChLIGR*胚胎发育各时期表达谱; (b) *ChLIGR*成体组织分布表达谱; 1. 受精卵; 2. 2细胞期; 3. 4细胞期; 4. 8细胞期; 5. 囊胚期; 6. 原肠胚期; 7. 担轮幼虫期; 8. 鳃; 9. 唇瓣; 10. 外套膜; 11. 性腺; 12. 消化腺; 13. 血细胞; 14. 闭壳肌; 15. 心脏。差异显著性用小写字母表示($P < 0.05$)

Fig. 3 The time-dependent expression pattern during embryogenesis and tissue specific expression pattern of *ChLIGR*

(a) the time-dependent expression pattern during embryogenesis; (b) tissue specific expression pattern; 1. fertilized oocyte; 2. 2-cell; 3. 4-cell; 4. 8-cell; 5. blastula; 6. gastrula; 7. trochophore; 8. gill; 9. labial palp; 10. mantle; 11. gonad; 12. digest gland; 13. hemocytes; 14. adductor; 15. heart. The significance is denoted by lowercase letters($P < 0.05$)

2.3 *ChLIGR*胚胎整体原位杂交

原位杂交结果显示, 受精卵和卵裂期*ChLIGR*信号较弱。到桑椹胚期和囊胚期, *ChLIGR*信号呈局部分布特点, 局部聚集于胚胎一侧囊胚孔(Blastopore)区域。担轮幼虫期*ChLIGR*信号减弱, 但仍能被检测于特定部位(图版)。原位杂交结果与上述胚胎发育各时期表达谱相符, *ChLIGR*信号在囊胚期和原肠胚期的特征性局部聚集与*ChLIGR*在胚胎原肠胚化过程中发挥的重要作用密切相关。

2.4 香港牡蛎鳃细胞*ChLIGR*膜外区重组蛋白处理

SDS-PAGE结果显示*ChLIGR*膜外区重组蛋白预测大小为72.5 ku, 空载体蛋白预测大小为28.8 ku, 条带大小与预期一致(图4)。ChLIGR膜外区重组蛋白处理鳃细胞后, 以N-Cadherin为代表的3个钙黏蛋白相关基因在处理组和对照组比较中都呈不同程度的表达上调。*N-Cadherin1*表达量在处理6 h便显著上升, 在处理12 h达顶峰, 24 h后恢复至对照组水平(图5)。*N-Cadherin2*和*Se-Cadherin*只有在处理后12 h表达水平显著高于对照组, 显示出不同钙黏蛋白受到的调控并不一致。与对照组相比, *MRG*表达水平在处理

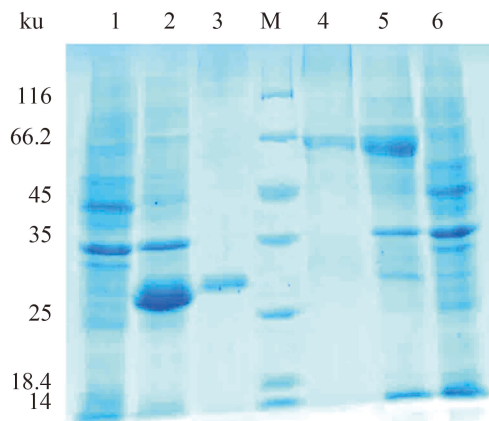


图4 膜外区重组蛋白与空载体蛋白制备

1. 空载体阴性对照; 2. 空载体诱导菌总蛋白; 3. 空载体蛋白纯化; 4. 重组蛋白纯化; 5. 重组载体诱导菌总蛋白; 6. 重组载体阴性对照; M. 蛋白大小标记

Fig. 4 Preparation of recombinant ectodomain and control protein

1. the control of empty vector; 2. the total protein in induced *E. coli* with empty vector; 3. the purification of control protein; 4. the purification of recombinant ectodomain; 5. the total protein in induced *E. coli* with pGST-His-ECD; 6. the control of pGST-His-ECD; M. protein marker

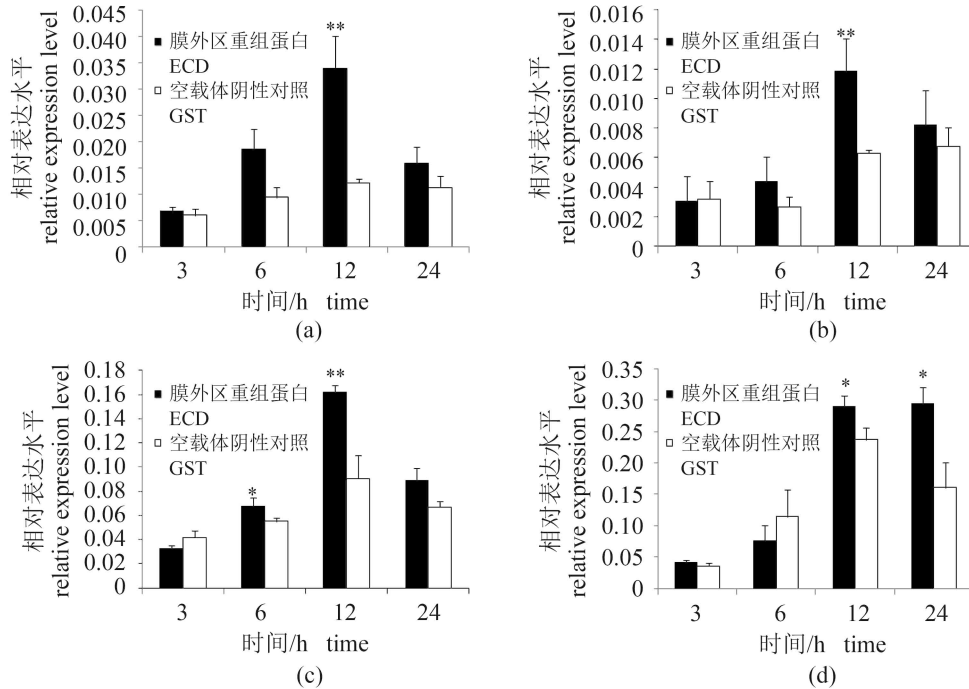


图 5 细胞迁移相关基因表达水平差异

Fig. 5 The differences of cell migration related genes expression level in ECD treated and control

(a) *N-Cadherin1*; (b) *N-Cadherin2*; (c) *Se-Cadherin*; (d) *MRG*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

后3~6 h并未发生显著差异,但在随后12~24 h表达量显著上升。尽管对照组中MRG的表达水平也随时间逐渐升高,其表达上调持续时间明显短于处理组。

3 讨论

本研究主要从基因相关序列信息、mRNA水平的基因表达和受体膜外区重组蛋白细胞处理效应3个方面探讨了ChLIGR的未知功能,初步揭示了其在牡蛎胚胎发育中的促原肠胚化作用。蛋白氨基酸序列分析结果显示,ChLIGR膜外区含有典型LRRs结构域和免疫球蛋白样结构域,膜内区含有参与众多蛋白相互作用以及大蛋白复合物组成的Coiled-coil结构域。膜外同时含有LRRs和IG-like结构域的组合型受体目前已被广泛发现存在于生物界,这些蛋白通常以膜蛋白和分泌蛋白形式在生物体内行使独特的功能。从Dolan等^[3]对LRR膜蛋白的系统分类结果来看,含IG-like的LRR膜蛋白超家族在不同物种中展现出各异的进化特征。例如,该蛋白超家族在果蝇中出现典型的基因扩张现象,以Kekkon为代表的蛋白家族衍生出6种异型(图1)。功能上Kekkon-1被证实是表皮生长因子受体(EGFR)的顺式抑制因

子,通过与EGFR直接相互作用介导EGFR的泛素化降解,从而负调控EGFR下游相关信号通路^[10]。然而在高等动物如人类和小鼠中,含IG-like的LRR受体则表现为明显的基因家族多样化,出现多种以LRRs和IG-like结构域组合为特征的蛋白家族。目前研究发现,这些蛋白家族参与多种生物过程,尤其是神经系统的发育分化以及神经信号传导。例如,AMIGO是Kv2.1钾离子通道复合物的辅基之一,参与调控发育期间树突状细胞伸张及成体神经细胞存活等重要生理过程^[11-12]。LINGO则是NgR的共受体,响应配体信号激活下游RhoA蛋白,抑制树突状细胞髓鞘形成和寡聚树突状细胞的分化^[13]。尽管学术界对上述这些与ChLIGR相似的蛋白功能已有了充分的认识,但考虑到这类蛋白迥异的系统进化特征和功能多样性,以及ChLIGR在分类结果中显示的旁系同源相关性,认为该类蛋白在牡蛎乃至软体动物中很可能行使某些种属特异的重要功能。

基因启动子上游的转录因子结合位点集合是表达调控的本质所在,考虑到转录因子识别结合的顺式作用元件的保守性以及多个重要转录因子家族已在牡蛎中被发现并鉴定^[14-15],采用生物信息学方法对ChLIGR启动子附近序列进行

转录因子结合位点预测具有一定的指导意义。*ChLIGR*转录调控区存在多个与发育分化相关的转录因子家族,说明*ChLIGR*在发育阶段受到重要的调控,暗示了其参与机体发育及组织器官分化^[16-20]。相关文献记载,ETS/AP-1组合调控位点是大部分响应ERK/RAS信号的下游效应基因共有的特征性调控热点^[21],而且这些基因不同于其他单独受控于AP-1或ETS蛋白家族的基因,有着自身独特的表达调控模式以及功能范畴,主要涉及细胞侵染与胞外基质组织^[22]。同理,若*ChLIGR*具备该ETS/AP-1复合位点,很可能意味着*ChLIGR*亦行使相关的功能。

成体组织特异性表达谱显示*ChLIGR*广泛表达于各组织,可见*ChLIGR*功能并不局限于胚胎发育时期,尤其是在腮和外套膜等组织中的相对高表达暗示了*ChLIGR*在这些组织中的特殊作用。胚胎发育各时期表达谱结果显示*ChLIGR*在囊胚期和原肠胚期显著高表达。事实上,从囊胚期到原肠胚期机体发生了众多关键的生理生化过程,其中最为人所熟知的便是上皮间质细胞转换(EMT)。囊胚原肠胚化过程中,外胚层的上皮样细胞特异表达与细胞迁移和分化相关的基因,执行EMT程序,最后分别形成外胚层、中胚层和内胚层的三层生殖层^[23]。结合前述*ChLIGR*调控区含有ETS/AP-1组合调控位点的预测结果,很可能意味着*ChLIGR*参与了囊胚期过渡至原肠胚期的EMT过程,调控局部上皮样细胞的粘连与迁移。

高等动物体内N-Cadherin和上皮钙黏蛋白(E-Cadherin)的表达水平变化往往作为EMT起始的标志事件^[24]。E-Cadherin主要参与细胞的粘附附着,因此在EMT开始后,表达量显著下调,N-Cadherin促进细胞的脱离和游走,因而在EMT时期表达量显著上升^[25]。本研究采用原核表达截短型*ChLIGR*胞外域重组蛋白处理牡蛎成体鳃细胞,通过实时定量PCR检测多个与细胞粘连及迁移相关的效应基因表达情况,验证了*ChLIGR*对细胞粘连与迁移的影响。结果显示,*ChLIGR*胞外区重组蛋白的处理显著促进了N-Cadherin、MRG等细胞迁移相关基因的上调表达,说明*ChLIGR*的重组胞外区能促进细胞的迁移及胞外基质重构。

本研究就上述实验结果对*ChLIGR*功能提出两个观点。其一,*ChLIGR*在囊胚期高表达于胚

胎上皮样细胞,这些高表达*ChLIGR*的上皮样细胞可能位于原肠胚化相关的重要部位,如囊胚孔等。其二,*ChLIGR*的表达上调能促进上皮样细胞的迁移,介导上皮样细胞向游走能力强的间质细胞转变,从而在胚胎原肠胚化过程中扮演重要的角色。

参考文献:

- [1] Kobe B, Kajava A V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(6): 725-732.
- [2] Bella J, Hindle K L, McEwan P A, *et al.* The leucine-rich repeat structure[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(15): 2307-2333.
- [3] Dolan J, Walshe K, Alsbury S, *et al.* The extracellular leucine-rich repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 320.
- [4] Bell J K, Mullen G E D, Leifer C A, *et al.* Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. *Trends in Immunology*, 2003, 24(10): 528-533.
- [5] Iozzo R V. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 32(2): 141-174.
- [6] Luo CW, Hsueh A J. Genomic analyses of the evolution of LGR genes[J]. *Chang Gung Medical Journal*, 2006, 29(1): 2-8.
- [7] Robker R L, Richards J S. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation [J]. *Biology of Reproduction*, 1998, 59(3): 476-482.
- [8] Chen Y N, Aulia S, Li L Z, *et al.* AMIGO and friends: an emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs[J]. *Brain Research Reviews*, 2006, 51(2): 265-274.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] Ghigllone C, Carraway K L, Amundadottir L T, *et al.* The transmembrane molecule kerkon 1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis[J]. *Cell*,

- 1999, 96(6): 847-56.
- [11] Peltola M A, Kdaja-Panula J, LAuri S E, *et al.* AMIGO is an auxiliary subunit of the Kv2.1 potassium channel[J]. *EMBO Report*, 2011, 12(12): 1293-1299.
- [12] Zhao X, Kdaja-Panula J, Sundvik M, *et al.* Amigo adhesion protein regulates development of neural circuits in zebrafish brain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(29): 19958-19975.
- [13] Mi S, Miller R H, Lee X, *et al.* LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes[J]. *Nature Neuroscience*, 2005, 8(6): 745-751.
- [14] Xiang Z M, Qu F F, Li J, *et al.* Activator protein-1(AP-1) and response to pathogen infection in the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 83-89.
- [15] Qu F F, Xiang Z M, Wang F X, *et al.* A novel molluscan Fos gene with immune defense function identified in the Hong Kong oyster, *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 51(1): 194-201.
- [16] Dottori M, Gross M K, Labosky P, *et al.* The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate[J]. *Development*, 2001, 128(21): 4127-4138.
- [17] Friedman J R, Kaestner K H. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(19-20): 2317-2328.
- [18] Celá P, Balková S M, Bryjová A, *et al.* Expression, function and regulation of *Evi-1* during embryonic avian development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2013, 13(8): 343-353.
- [19] Nepveu A. Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development[J]. *Gene*, 2001, 270(1-2): 1-15.
- [20] Komorowska K, Doyle A, Soneji S, *et al.* Hepatic leukemia factor is essential for maintaining hematopoietic stem cell function[J]. *Experimental Hematology*, 2015, 43(9): 73.
- [21] Hollenhorst P C. RAS/ERK pathway transcriptional regulation through ETS/AP-1 binding sites[J]. *Small GTPases*, 2012, 3(3): 154-158.
- [22] Selvaraj N, Budka J A, Ferris M W, *et al.* Extracellular signal-regulated kinase signaling regulates the opposing roles of JUN family transcription factors at ETS/AP-1 sites and in cell migration[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2015, 35(1): 88-100.
- [23] Kalluri R, Weinberg R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [24] Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development[J]. *Mechanisms of Development*, 2003, 120(11): 1351-1383.
- [25] Moustakas A, Heldin C H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression[J]. *Cancer Science*, 2007, 98(10): 1512-1520.

Cloning and function analysis of novel LRRs receptor in *Crassostrea hongkongensis*

LIU Ying^{1,2,3}, LI Jun^{1,2}, ZHANG Yuehuan^{1,2}, ZHANG Yang^{1,2}, YU Ziniu^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510301, China;

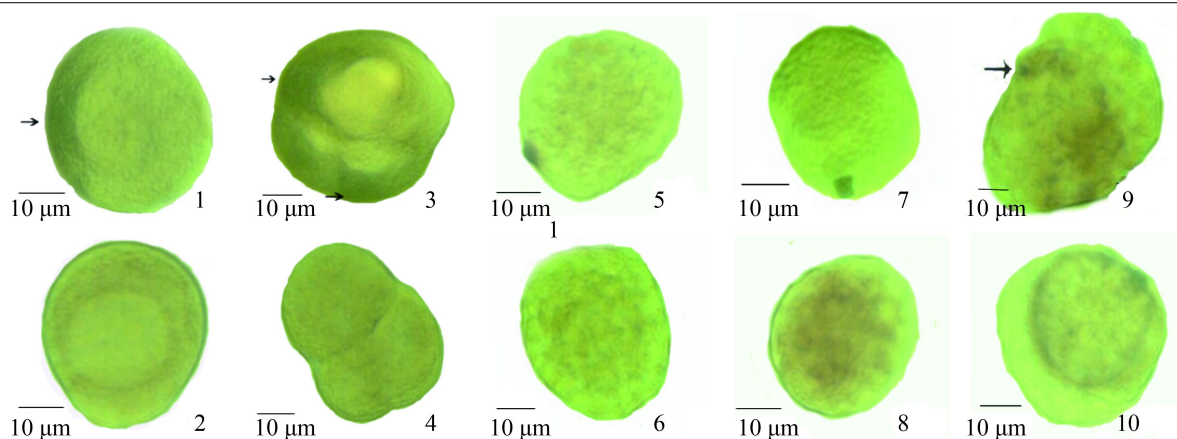
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Leucine-rich repeats protein is a versatile ligand recognition domain present in receptors, which is involved in many important physiological processes such as development, immune responses and hormone regulation etc. A novel LRRs protein with significant high expression level during embryogenesis was identified in this study. Its function was investigated by various methods including cloning, sequences alignment, in situ hybridization and in vitro treatment with recombinant proteins. SMART analysis indicated that an IG-like domain was located in the extracellular region besides the LRRs domain. Thus we designated it as *Crassostrea hongkongensis* LRRs and IG-like containing receptor (*ChLIGR*). Sequences alignment revealed that *ChLIGR* is a new member in the IG-like containing LRR proteins superfamily, and most of its homologous proteins belong to mollusk without any function related description. Consistent with its expression pattern during embryogenesis, the in situ hybridization results showed that *ChLIGR* was expressed most highly in blastula stage and was distributed to a distinct place in the embryo. Combining with the predicted ETS/AP-1 regulatory site upstream the promoter, we hypothesized that *ChLIGR* would be involved in gastrulation related epithelial-mesenchymal transition process. Notably, in vitro treatment with recombinant extracellular domains of *ChLIGR* augments the expression of migration related genes, which partly supports our hypothesis. In conclusion, the function of this novel IG-like domain containing LRR receptor is preliminarily unveiled as an activator for gastrulation by promoting the cell migration.

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; leucine-rich repeats; embryogenesis; cell migration

Corresponding author: YU Ziniu. E-mail: carlzyu@scsio.ac.cn

Funding projects: National Science Foundation of China (31502193); Guangdong Natural Science Foundation (2014A030310402); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (2014B030301064)



图版 胚胎整体原位杂交

图中箭头所示为检测阳性信号。1. 受精卵反义; 2. 受精卵正义; 3. 卵裂期反义; 4. 卵裂期正义; 5. 囊胚期反义; 6. 囊胚期正义; 7. 原肠胚期反义; 8. 原肠胚期正义; 9. 担轮幼虫期反义; 10. 担轮幼虫期正义

Plate The whole mount in situ hybridization

Arrow indicates the positive signal. 1. fertilized oocyte by antisense probe; 2. fertilized oocyte by sense probe; 3. cell division by antisense probe; 4. cell division by sense probe; 5. blastula by antisense probe; 6. blastula by sense probe; 7. gastrula by antisense probe; 8. gastrula by sense probe; 9. trochophore by antisense probe; 10. trochophore by sense probe