



## 厚壳贻贝组蛋白 H2 的免疫响应及其衍生肽抑菌活性

王昊东, 刘璐, 阳宗欣, 王月, 杨金月, 何建瑜,  
张晓林, 何梦岚, 严小军\*, 廖智\*

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 海洋生物资源与分子工程研究室, 浙江舟山 316022)

**摘要:** 为深入了解组蛋白及其衍生肽在贻贝免疫过程中的作用, 实验采用荧光定量 PCR (qPCR) 技术对厚壳贻贝组蛋白 H2A 和 H2B 进行微生物胁迫后的表达量变化进行分析。在此基础上, 对厚壳贻贝组蛋白 H2A 和 H2B 基于其 N 端序列设计的衍生肽段 (分别为 Coruscusin-I 和 Coruscusin-II) 进行固相化学合成、圆二色性光谱分析以及抑菌活性验证。结果显示, 厚壳贻贝组蛋白 H2A 和 H2B 在不同组织中, 对不同微生物胁迫均产生明显的表达量上调, 且在血细胞中表现出对真菌和革兰氏阴性菌的敏感性, 在鳃组织中表现为对革兰氏阳性菌的敏感性; 而在消化腺组织中, H2A 对革兰氏阳性菌较为敏感, 但 H2B 对真菌和革兰氏阴性菌较为敏感。厚壳贻贝组蛋白衍生肽段 Coruscusin-I 和 Coruscusin-II 在非极性溶液中, 其螺旋含量明显上升, 且二者对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有明显的抑菌活性, 但 Coruscusin-II 对真菌的抑制活性较 Coruscusin-I 强。进一步的螺旋结构预测结果表明, 2 种衍生肽序列中碱性氨基酸的种类及分布特征可能是其抑菌活性差异的内在原因。本研究为了解组蛋白及其衍生肽在贻贝免疫过程中的作用及其机制奠定了基础, 也为开发贻贝组蛋白衍生肽为来源的新型生物抗生素提供了科学依据。

**关键词:** 厚壳贻贝; 组蛋白; 组蛋白衍生抗菌肽; 固相化学多肽合成

中图分类号: R 978.1<sup>+</sup>6; S 944.4<sup>+</sup>2

文献标志码: A

组蛋白是一类参与真核生物染色质组装和转录调控, 同时又具有重要免疫功能的蛋白质<sup>[1]</sup>。目前, 已报道的真核生物组蛋白包括 H1~H5 共 5 大类, 其中 H2 又分为 H2A 和 H2B, 与 H3 和 H4 一起构成核小体组装的核心结构<sup>[2]</sup>。H1/H5 则负责核小体之间的连接<sup>[3-4]</sup>。组蛋白通常富含碱性氨基酸, 其中, H1 和 H2 往往富含赖氨酸, 而 H3 和 H4 富含精氨酸, 其所带正电荷会对原核细胞富含负电荷的细胞膜造成损害, 因此, 组蛋白是一类潜在的具有抗菌活性的蛋白质, 其在真核生物免

疫中的重要作用已有报道<sup>[5-6]</sup>。组蛋白衍生抗菌肽 (HDAPs) 正是在这一背景下被首次从中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 中发现, 该蟾蜍中的 HDAP 是一种由 39 个氨基酸组成的多肽, 裂解自其体内 H2A 组蛋白, 被命名为 Buforin I<sup>[7]</sup>。随后, 又从同物种中发现 Buforin II, 一种由 21 个氨基酸残基组成的多肽, 同样是裂解自 H2A, 具有广谱抗菌活性<sup>[8]</sup>, 且其作用机制在于可透过细菌细胞膜, 并结合原核生物 DNA 而发挥抗菌效果<sup>[9]</sup>。对于 HDAP 在生物体内的发生机制, 目前普遍认为,

收稿日期: 2022-01-20 修回日期: 2022-03-04

资助项目: 国家自然科学基金 (42020104009); 舟山市科技局计划专项 (2019F12004); 浙江省大学生创新创业孵化项目 (2021R411055); 浙江省教育厅一般项目 (Y202044838)

第一作者: 王昊东 (照片), 从事贝类免疫效应分子研究, E-mail: S21070700048@zjou.edu.cn

通信作者: 严小军, 从事海洋生物及生态学研究, E-mail: yanxj@zjou.edu.cn;

廖智, 从事贻贝生理生化属性研究, E-mail: liaozhi@zjou.edu.cn



完整的组蛋白在生物体遭受细菌入侵时, 通过胞内的酶解机制被裂解, 并释放至胞外发挥抑菌活性。例如, Buforin I 被认为是蟾蜍胃壁细胞中, 由胃蛋白酶同工酶在组蛋白 H2A 序列的 Try 39~Ala 40 位置, 经过裂解并释放出相应肽段, 即 Buforin I<sup>[10]</sup>。而在鲑 (*Parasilurus asotus*) 中, 其 HDAP(被命名为 Parasin I) 是由组织蛋白酶在其组蛋白 H2A 序列的 Ser 19~Arg 20 位置产生裂解, 继而释放至其皮肤黏液中发挥抗菌活性<sup>[11]</sup>。

目前, 多数已报道的 HDAPs 均发现于脊椎动物, 特别是鱼类中, HDAPs 被认为是鱼类抗菌肽家族的重要一员<sup>[12]</sup>。而在无脊椎动物中, 关于 HDAPs 的报道较少, 仅在少数甲壳类以及软体动物中被鉴定, 包括凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)<sup>[13]</sup>、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[14-15]</sup>、锯缘青蟹 (*Scylla paramamosain*)<sup>[16]</sup> 以及软体动物中的栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)<sup>[17]</sup> 和皱纹盘鲍 (*Haliotis discus discus*)<sup>[18]</sup> 等。此外, 在美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 中已报道了具有抑菌活性的完整组蛋白 H2B<sup>[19-20]</sup>。以上研究表明, 组蛋白在无脊椎动物的免疫体系中可能也发挥了重要作用。

贻贝是一类具有重要经济价值的双壳贝类。与其他贝类相比, 贻贝在养殖过程中表现出对疾病的较强耐受性<sup>[20-23]</sup>。值得关注的是, 在当前抗菌肽研究中, 贻贝抗菌肽表现出较强的分子多样性和广谱的抗菌活性, 已报道的贻贝抗菌肽家族目前已超过 10 种<sup>[24]</sup>, 这使得贻贝成为海洋生物中发现抗菌肽数量最为丰富的物种之一, 其丰富的抗菌肽种类也为开发贻贝抗菌肽为来源的新型生物抗生素提供了一个资源宝库。尽管 HDAPs 在少数其他贝类中已有相关报道, 但是贻贝中至今尚未发现其体内 HDAPs 的存在, 也不清楚组蛋白在其免疫防御过程中的作用。考虑到贻贝对疾病较强的耐受性以及贻贝抗菌肽的多样性, 贻贝体内可能也存在类似的 HDAPs, 并参与了贻贝的免疫防御过程。因此, 针对贻贝 HDAPs 的研究, 将有助于拓展对 HDAPs 在无脊椎生物中的认知, 了解 HDAPs 在贻贝免疫体系中的作用及其机制。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 是我国东部海域最重要的养殖贝类之一, 也是西太平洋沿岸的代表性贻贝物种。此前已从厚壳贻贝中鉴定到各类抗菌肽分子, 包括 mytilin<sup>[25]</sup>、myticin<sup>[26]</sup>、myticusin<sup>[27]</sup> 以及 mytichitin<sup>[28]</sup>。但与其他贻贝属物种, 如地中海贻贝 (*M. galloprovincialis*) 和紫贻贝 (*M. edulis*) 相比, 厚壳贻贝中抗菌肽研究仍存在很大空间。为探究

贻贝体内组蛋白及其衍生肽是否在其免疫中发挥重要作用, 以厚壳贻贝为对象, 首先对其已公布的组织全长转录组数据库 (SRA 登录号: PRJNA 635756) 进行数据挖掘, 筛选出其组蛋白 H2A 和 H2B 基因序列; 在序列分析基础上, 进一步采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 手段, 对不同微生物诱导后, 贻贝代表性免疫组织, 包括血细胞、鳃和消化腺的 H2A 和 H2B 基因表达量变化开展分析; 此外, 利用固相化学合成技术, 对厚壳贻贝 H2A 和 H2B 可能的抗菌肽段进行了化学合成, 并进一步开展了结构与功能分析。研究表明, 厚壳贻贝组蛋白 H2A 和 H2B 在不同微生物诱导后, 其基因相对表达量均明显上调, 且对不同微生物所表现出的免疫模式具有差异; 所合成的厚壳贻贝组蛋白 H2A 和 H2B 功能肽段均具有明显抑菌活性, 且其抑菌活性可能与其构象以及碱性氨基酸分布具有关联。本研究首次在贻贝中证实了组蛋白及其衍生肽在贻贝免疫防御过程中的作用, 也为基于贻贝 HDAP 的分子资源开发奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 厚壳贻贝组蛋白 H2A 和 H2B 的序列及 qPCR 分析

厚壳贻贝 H2A 和 H2B 序列从基于厚壳贻贝基因组数据的组织全长转录组数据库 (SRA 数据库编号: PRJNA635756) 中进行筛选。筛选后的序列通过与厚壳贻贝基因组相应序列进行比较, 确认其开放阅读框的完整性和序列正确性。开放阅读框采用 Lasergene 软件 (版本 7.1.0) Editseq 模块进行预测。采用 DNAMAN 8 软件对厚壳贻贝 H2A 和 H2B 基因的 cDNA 序列及其开放阅读框推导的氨基酸序列进行比对。蛋白质序列搜索比对采用 NCBI 数据库的 BlastP 模块进行; 开放阅读框推导的氨基酸序列于网站 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线开展结构域预测; 采用 SWISS MODEL 服务器进行蛋白质三级结构预测。蛋白质螺旋特征预测采用 HeliQuest 网站 (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) 在线进行。

根据厚壳贻贝 H2A 和 H2B 基因序列中开放阅读框设计特异性引物 (表 1), 利用 qPCR 技术开展基因表达分析。厚壳贻贝的细菌诱导实验参照文献方法进行<sup>[29]</sup>: 对厚壳贻贝进行不同微生物诱导, 包括金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 和白色念珠

菌 (*Candida albicans*)。诱导后分别于 0.5、1、2、4、8、12、24、48 和 72 h 采集厚壳贻贝鳃、消化腺以及血淋巴组织; 其中, 血淋巴经离心 (1 500×g, 10 min, 4 °C) 后获得血细胞。对以上组织进行总 RNA 提取和逆转录, 所得组织 cDNA 作为模板开展后续 qPCR 分析。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

qPCR 在实时定量 PCR 系统 (MX3000P, Strata-

gene 公司, 美国) 中进行。荧光染料为 SYBR Green。PCR 程序设置为 95 °C 预变性 180 s, 95 °C 变性 20 s, 59 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 25 s, 循环数为 35。特异性引物及内参基因引物见表 1。相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法<sup>[30]</sup> 进行分析。采用 3 次重复实验, 数据以平均值±标准差表示; 所得数据以 SPSS 软件 (v25.0) 的 One-Way ANOVA 方法进行显著性分析,  $P < 0.05$  代表具有显著差异。

表 1 荧光定量 PCR 研究的特异性引物

Tab. 1 Primers for qPCR analysis

目标基因 target genes	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	扩增子长度/bp length of amplicon	用途 usage
<i>H2A</i>	F: GAAAAGACTCAGGAAAGGCTAAAAG R: CAGCGGTCAGGTATTCCAAG	174	qPCR
<i>H2B</i>	F: AGACCGCTGTCCGTCTTCTC R: AGACTGTTTACTTGCTGCTGGTG	102	qPCR
<i>α-Tubulin</i>	F: TTGCAACCATCAAGACCAAG R: TGCAGACGGCTCTCTGT	135	内参基因 reference gene

## 1.2 厚壳贻贝组蛋白 H2A 和 H2B 衍生肽段的设计与化学合成

因迄今尚未从贝类中分离纯化到天然的 HDAP, 因此厚壳贻贝 H2A 衍生肽段序列参照文献<sup>[31]</sup> 进行设计, 结合现有已知的 H2A 衍生肽的序列长度和位置 (多为 H2A 的 N 端位置, 含 20~27 个氨基酸残基且含丰富的精氨酸残基), 最终选取厚壳贻贝 H2A 的 N 端 21 个氨基酸残基 (位于蛋白 N 端第 19~39 号残基) 的肽段, 序列为 NH<sub>2</sub>-SRSQRAGL-QFPVGRHRLKH-COOH, 并命名为 Coruscusin- I。H2B 衍生肽段序列 (命名为 Coruscusin- II) 参照文献<sup>[32]</sup> 进行设计, 并参考已报道的 H2B 衍生肽的序列位置 (通常为 H2B 的 N 端)、序列长度 (多为 20 个氨基酸残基) 及序列特征 (富含赖氨酸), 最终选取厚壳贻贝 H2B 组蛋白的 N 端 19 个氨基酸残基序列: NH<sub>2</sub>-PPKVGTKGAKKAVTKAK-COOH 作为目标肽, 该肽段序列位于厚壳贻贝组蛋白 H2B 的 N 端第 2~18 号残基。进一步对 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 序列开展在线螺旋结构预测 (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>), 以判断 2 种衍生肽段的螺旋结构特征。

Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 的多肽固相化学合成参照文献<sup>[33]</sup>, 在十二通道半自动多肽合成仪 (上海强耀生物科技有限公司) 上合成, 合成方向为从羧基端向氨基端。合成后的线性多肽粗品

以高效液相色谱仪 (Agilent 1260, 美国) 进行分离纯化, 色谱柱为 C<sub>18</sub> 反相柱 (Kromasil 100-5, 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 洗脱液分别为含 0.1% TFA 的纯水 (A 液) 和含 0.1% TFA 的乙腈 (B 液); 其中, Coruscusin- I 合成产物的洗脱梯度为 25 min 内 B 液比例由 0% 上升到 100%; Coruscusin- II 合成产物的洗脱梯度为 25 min 内 B 液比例由 15% 上升到 40%; 流速均为 1.0 mL/min; 采用紫外检测器进行检测, 检测波长为 280 nm。收集洗脱目标峰开展质谱分析, 采用质谱仪 (Agilent-6125B, 美国安捷伦公司) 对合成后的多肽纯品进行精确分子量鉴定, 质谱检测条件: 气动辅助电喷雾离子化 (ESI), 毛细管电压为 4.5 kV, 检测器电压为 1.5 kV, 离子源温度为 250 °C, 离子检测方式为选择性离子检测, 离子极性为正离子。

采用复性液 (0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 含 1.5 mmol/L 还原型谷胱甘肽、0.15 mmol/L 氧化型谷胱甘肽及 0.05 mol/L NaCl, pH 值 8.6) 对 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 在多肽浓度为 0.5 mg/mL 时复性 24 h。复性后的 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 经脱盐及纯化后, 开展抑菌活性实验。

## 1.3 抑菌活性测试

参照文献方法<sup>[34]</sup>, 采用生长曲线抑制法, 对合成的 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 进行抑菌活性测试。Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 以生理盐

水配置成 100  $\mu\text{mol/L}$ 。测试菌种购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 包括 4 种革兰氏阴性菌, 分别为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (ATCC25922)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC9027)、副溶血性弧菌 (ATCC19659) 和河流弧菌 (*V. fluvialis*) (ATCC33809); 以及 5 种革兰氏阳性菌, 分别为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) (ATCC 19161)、金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) (ATCC19659)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (CGMCC18964)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*) (CCTCCAB2011085) 以及 1 种真菌 [白色念珠菌 (ATCC10231)]。

#### 1.4 圆二色性光谱分析

参照文献<sup>[35]</sup>的方法, 将 Coruscusin-I 和 Coruscusin-II 分别溶解于纯水、PBS (10 mmol/L) 和 30% (体积百分比) 三氟乙醇 (2,2,2-Trifluoroethanol, TFE) 溶液中, 配置成 100  $\mu\text{g/mL}$  浓度; 上样圆二色性光谱仪 (JASCO J715 型, 日本) 采集 CD 谱; 采集温度设置为 298 K, 扫描波长范围设置为 190~260 nm; 波宽为 1.0 nm, 步长为 0.1 nm; 扫描速率为 20 nm/min; 二级结构含量参照文献<sup>[36]</sup>方法计算。

## 2 结果

### 2.1 厚壳贻贝 H2A 和 H2B 的序列特征

厚壳贻贝 H2A 和 H2B 序列已上传 GenBank 数据库, 序列号分别为 MZ665469 和 MZ665470。其中, H2A 基因开放阅读框长度为 387 bp, 编码一条由 128 个氨基酸残基组成的前体多肽, 理论分子量为 13.469 ku, 理论等电点为 10.60, 属于碱性多肽, 其序列中含量最丰富的氨基酸依次为丙氨酸 (占比 14.1%)、甘氨酸 (12.5%) 和赖氨酸 (10.9%) (图 1-a)。H2B 基因开放阅读框长度为 375 bp, 编码的前体肽长度为 124 个氨基酸残基, 其理论分子量为 13.789 ku, 理论等电点为 10.69, 属碱性多肽; 其序列中最丰富的氨基酸依次为赖氨酸 (12.9%)、丙氨酸 (11.3%) 和丝氨酸 (11.2%), 此外, 精氨酸含量也较高 (9.7%) (图 1-b)。BLAST 搜索结果表明, 厚壳贻贝 H2A 与其他物种, 包括地中海贻贝 (*M. galloprovincialis*), 鱼类如非洲齿鲤 (*Nothobranchius furzeri*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、贝氏银汉鱼 (*Melanotaenia boesemani*) 等, 爬行动物如金龟 (*Mauremys*

*reevesii*), 以及哺乳动物如赤鹿 (*Muntiacus muntjak*) 等物种的 H2A 具有极高的序列相似性, 其序列一致性超过 95%, 表明厚壳贻贝 H2A 与其他物种的 H2A 具有很强的保守性。厚壳贻贝 H2B 则主要与来自贻贝属物种, 包括地中海贻贝、加利福尼亚贻贝 (*M. californianus*)、紫贻贝, 以及其他无脊椎动物如燕麦真滑刃线虫 (*Aphelenchus avenae*) 和玫瑰旋轮虫 (*Philodina roseola*) 等物种的 H2B 具有 40%~60% 的序列相似性, 而与其他脊椎动物的 H2B 序列相似性较低, 显示出厚壳贻贝 H2B 在进化上已与脊椎动物的 H2B 产生了分歧, 且 H2B 蛋白在进化过程中有其独特性。

结构域预测结果表明, H2A 蛋白序列中无信号肽, 其结构域主体为 H2A 结构域 (5~125 位氨基酸残基所在肽段, 编号为 SM000414) (图 2-a), 此外无其他可预测的结构域。H2B 蛋白序列中同样无信号肽, 其序列中主体结构域为 H2B (26~122 位氨基酸残基所在肽段, 结构域编号为 SM000427) (图 2-b)。此外, 其序列中还含有一段 low complexity region (LCR, 4~20 肽段) (图 2-b), 其特征表现为富含赖氨酸。对厚壳贻贝 H2A 和 H2B 分别采用原鸡 (*Gallus gallus*) H2A 空间结构 (RCSB 数据库编号为 1eqz.1.C) 和黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) H2B 空间结构 (RCSB 数据库编号为 7pj1.1.B) 为模板进行三级结构预测, 结果显示, H2A 蛋白三级构象包括 5 段  $\alpha$ -螺旋以及无规卷曲结构, 无  $\beta$ -折叠结构 (图 2-c); H2B 的三级构象同样以  $\alpha$ -螺旋为主, 包括 4 段  $\alpha$ -螺旋, 其余为无规卷曲结构 (图 2-d)。

### 2.2 厚壳贻贝 H2A 和 H2B 在不同微生物刺激下的免疫反应模式

血细胞、鳃和消化腺是贻贝体内代表性的免疫相关组织; 同时, 已知贻贝免疫体系对不同的微生物具有不同的免疫响应<sup>[37]</sup>。为此, 分别采用金黄色葡萄球菌 (革兰氏阳性菌)、副溶血性弧菌 (革兰氏阴性菌) 以及白色念珠菌 (真菌) 为诱导菌株, 分析了厚壳贻贝 H2A 和 H2B 基因在 3 种微生物刺激下, 其在厚壳贻贝血细胞、鳃以及消化腺组织中的相对表达量变化。厚壳贻贝 H2A 在消化腺中表现出对金黄色葡萄球菌的快速且敏感的反应特征, 其峰值出现时间 (4 h) 早于副溶血性弧菌诱导 (24 h), 且其表达量上升倍数 (相对对照组为 8 倍) 也高于副溶血性弧菌诱导组 (4.5 倍) (图 3-a)。

```

1   ATGGCTGGCGGTAAAGCAGGAAAAGACTCAGGAAAGGCTAAAGCCAAAGCTGTCTCCAGA   60
1   M A G G K A G K D S G K A K A K A V S R   20
61  TCTCAAAGAGCAGGATTACAGTTCCTGTTGGTCGTATCCACAGACATCTTAAACACAGA   120
21  S Q R A G L Q F P V G R I H R H L K H R   40
121 ACAACCAGTCATGGTCGTGTTGGTGCCACCGCTGCCGTATACAGTGCCGCCATCTTGGAA   180
41  T T S H G R V G A T A A V Y S A A I L E   60
181 TACCTGACCCTGAAGTTTGGAGTTGGCAGGTAACGCCAGTAAAGATTTGAAAGTAAAG   240
61  Y L T A E V L E L A G N A S K D L K V K   80
241 AGAATAACACCCCGTCATTTACAGCTGGCCATCAGAGGAGATGAAGAATTGGACTCCCTT   300
81  R I T P R H L Q L A I R G D E E L D S L   100
301 ATCAAAGCTACCATTGCTGGAGGTGGTGTCCACATATCCATAAATCTCTTATAGGG   360
101 I K A T I A G G G V I P H I H K S L I G   120
361 AAGAAAGGTCCGCAAGGAAAGGCATAA   387
121 K K G P Q G K A *   128

```

(a)

```

1   ATGCCACAAAAGTTGGAACCAAAGGAGCCAAAAGGCCGTAACAAAGGCAAAGACTGCC   60
1   M P P K V G T K G A K K A V T K A K T A   20
61  CGACCCGGCGGTGACAAGAAAAGGAGGAGGAAGAGGAGAGAATCCTATGCCATCTACATC   120
21  R P G G D K K R R R K R R E S Y A I Y I   40
121 TACAAAGTCTTGAGACAAGTTCACCCGACACCGGAGTGTCTCAAAGGCAATGTCCATC   180
41  Y K V L R Q V H P D T G V S S K A M S I   60
181 ATGAACAGCTTCGTCAACGATATCTTCGAGAGAATCGCAGCAGAGGCTTCCCGATTGGCA   240
61  M N S F V N D I F E R I A A E A S R L A   80
241 CACTACAACAAAAGATCTACCATCACATCCCGGAGATCCAGACCGCTGCCGTCTTCTC   300
81  H Y N K R S T I T S R E I Q T A V R L L   100
301 TTACCCGAGAAATTGGCCAAGCACGCTGTCAAGGTACCAAAGCCGTCACCAAATAC   360
101 L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y   120
361 ACCAGCAGCAAGTAA   375
121 T S S K *   124

```

(b)

图 1 厚壳贻贝 H2A (a) 和 H2B (b) 基因开放阅读框核苷酸-氨基酸序列图

衍生肽段 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 序列以方框标注所在区域, \* 代表终止密码子。

Fig. 1 cDNA sequence and derived amino acid sequence of H2A (a) and H2B (b)

The designed peptides (Coruscusin- I and Coruscusin- II) were denoted by frame, \*represents termination codon.

在鳃组织中, H2A 在金黄色葡萄球菌诱导后, 其表达量峰值出现在 24 h, 上升倍数约 10 倍, 在副溶血性弧菌和白色念球菌诱导后, 其表达量峰值均出现在 8 h, 上升倍数均约为 5 倍。在血细胞组织中, H2A 表现出对白色念球菌诱导的敏感性, 其表达量峰值出现在诱导后 8 h, 且上升倍数相对对照组约为 9 倍。H2A 在副溶血性弧菌诱导后, 其表达量峰值出现在 24 h, 上升倍数约为 6 倍, 但在血细胞中, H2A 对金黄色葡萄球菌诱导表现不敏感(图 3-a)。

H2B 则表现出与 H2A 不一样的响应特征。在消化腺中, H2B 对白色念球菌和副溶血性弧菌诱导较为敏感, 其表达量峰值分别出现在 8 和 24 h,

相对对照组, 其表达量上调倍数分别为 3.2 和 3.5 倍; 但对金黄色葡萄球菌诱导表现不敏感(图 3-b)。在鳃组织中, H2B 则表现为对金黄色葡萄球菌诱导的敏感性、持续性, 其表达量在 2~24 h 均相比对照组极显著上调 ( $P < 0.01$ ), 其峰值表达量出现在 24 h, 表达量上调倍数约为 6.5 倍。H2B 对白色念球菌和副溶血性弧菌也表现出一定的敏感性, 其表达量峰值均出现在 8 h, 表达量上调倍数约为 3.4 倍。在血细胞中, H2B 则对金黄色葡萄球菌诱导表现不敏感, 但是对副溶血性弧菌诱导表现较为敏感, 其表达量峰值出现在 24 h, 表达量上调倍数约为 3 倍。此外, H2B 在血细胞中对白色念球菌诱导表现出一定的持续性, 其表达量在 8~48 h

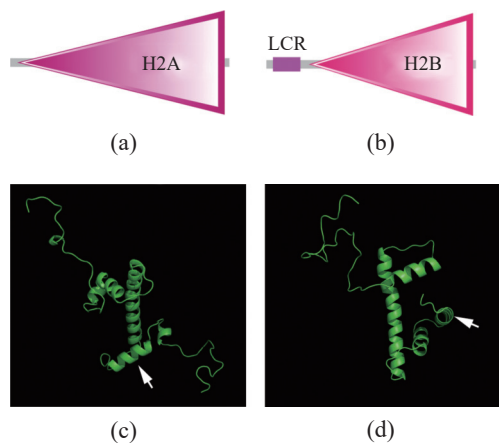


图2 厚壳贻贝 H2A 和 H2B 的高级结构特征

(a) 厚壳贻贝 H2A 的结构域预测结果, (b) 厚壳贻贝 H2B 的结构域预测结果, (c) 厚壳贻贝 H2A 三级结构预测结果, (d) 厚壳贻贝 H2B 三级结构预测结果。结构域预测采用 SMART 软件在线进行, 三级结构预测采用 SWISS MODEL 服务器进行。白色箭头表示衍生肽所在部位。

Fig. 2 Structural prediction of H2A and H2B

(a) domain prediction of H2A of *M. coruscus*, (b) domain prediction of H2B of *M. coruscus*, (c) special structure prediction of H2A of *M. coruscus*, (d) special structure prediction of H2B of *M. coruscus*. The domains were predicted by SMART and the spatial structures were predicted by SWISS MODEL server, respectively. White arrows indicate where the derived peptide is located.

均保持了较高的上调倍数 (2.2~2.5 倍) (图 3-b)。

### 2.3 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 的固相化学合成

采用固相多肽合成技术完成对 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 的化学合成。Coruscusin- I 合成后的粗品经高效液相色谱纯化, 其目标峰出峰时间为 13.39 min (图 4-a)。根据曲线下面积计算其纯度达到 96% 以上; 质谱鉴定结果表明, 合成的 Coruscusin- I 分子量为 2 480.08 u, 与理论分子量 (2 480.87 u) 一致 (图 4-a)。合成的 Coruscusin- II 经高效液相色谱纯化, 其纯度达到 96% 以上, 其质谱鉴定分子量为 1 709.02 u, 与理论分子量 (1 709.11 u) 一致 (图 4-b)。上述结果表明, 分别来源于厚壳贻贝 H2A 和 H2B 的肽段 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 合成成功, 可用于后续研究。

### 2.4 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 的抑菌活性

Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 在 100  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, 对所测试的微生物均表现出抑菌活性 (图 5)。其中, Coruscusin- I 对革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌, 以及

革兰氏阴性菌中的河流弧菌、铜绿假单胞菌抑制率较强, 其抑制率均在 60% 以上; 而对革兰氏阳性菌中的蜡状芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌, 以及革兰氏阴性菌中的副溶血性弧菌和大肠杆菌的抑制率较弱, 均在 50% 以下 (图 5-a)。Coruscusin- II 对革兰氏阳性菌中的巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌, 革兰氏阴性菌中的河流弧菌和铜绿假单胞菌, 以及真菌白色念珠菌具有较强抑制率 (抑制率在 60% 以上), 而对其他测试菌株抑制率较低 (多为 40% 以下) (图 5-b)。

### 2.5 对 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 的圆二色性光谱分析

采用圆二色性光谱完成对 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 在三种不同溶液 (纯水、PBS 缓冲液以及 30% TFE) 中的结构分析。Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 在不同溶液条件下的圆二色性光谱曲线存在明显差异, 表明两种多肽的溶液构象存在差别 (图 6)。进一步根据文献报道的计算公式<sup>[38]</sup> 计算这两种多肽在 3 种溶液条件下的 4 种二级结构含量, 结果见表 2。Coruscusin- I 在水及 PBS 中的构象主要以无规卷曲为主, 其  $\alpha$ -螺旋含量为 0; 但在 30% 的 TFE 溶液中, 其  $\alpha$ -螺旋含量增加到 41.2%, 表明 Coruscusin- I 在非极性条件下, 具有形成  $\alpha$ -螺旋的倾向。Coruscusin- II 则在水及 PBS 溶液中以无规卷曲为主, 含量占比达到 78% 以上; 而在 30% 的 TFE 溶液中, 其  $\alpha$ -螺旋含量增加到 15.2%,  $\beta$ -转角增加至 17%, 且  $\beta$ -折叠消失, 表明在非极性溶液中, Coruscusin- II 表现出极性条件中与 Coruscusin- I 不一样的构象特征, 且存在较大差异。

为进一步探明对 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 的螺旋结构特征, 通过在线网站开展螺旋结构预测, Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 均能预测到典型的螺旋结构, 且 Coruscusin- I 的碱性氨基酸在螺旋外侧呈均匀分布, 其疏水性氨基酸 (缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸) 则在螺旋上呈现集中分布特征。Coruscusin- II 的碱性氨基酸 (7 个精氨酸) 则在螺旋上集中分布于螺旋半侧, 而两个脯氨酸以及小的侧链氨基酸残基 (丙氨酸和甘氨酸) 则分布于螺旋另外半侧 (图 7)。

## 3 讨论

组蛋白及其衍生肽历来是生物抗菌肽研究的

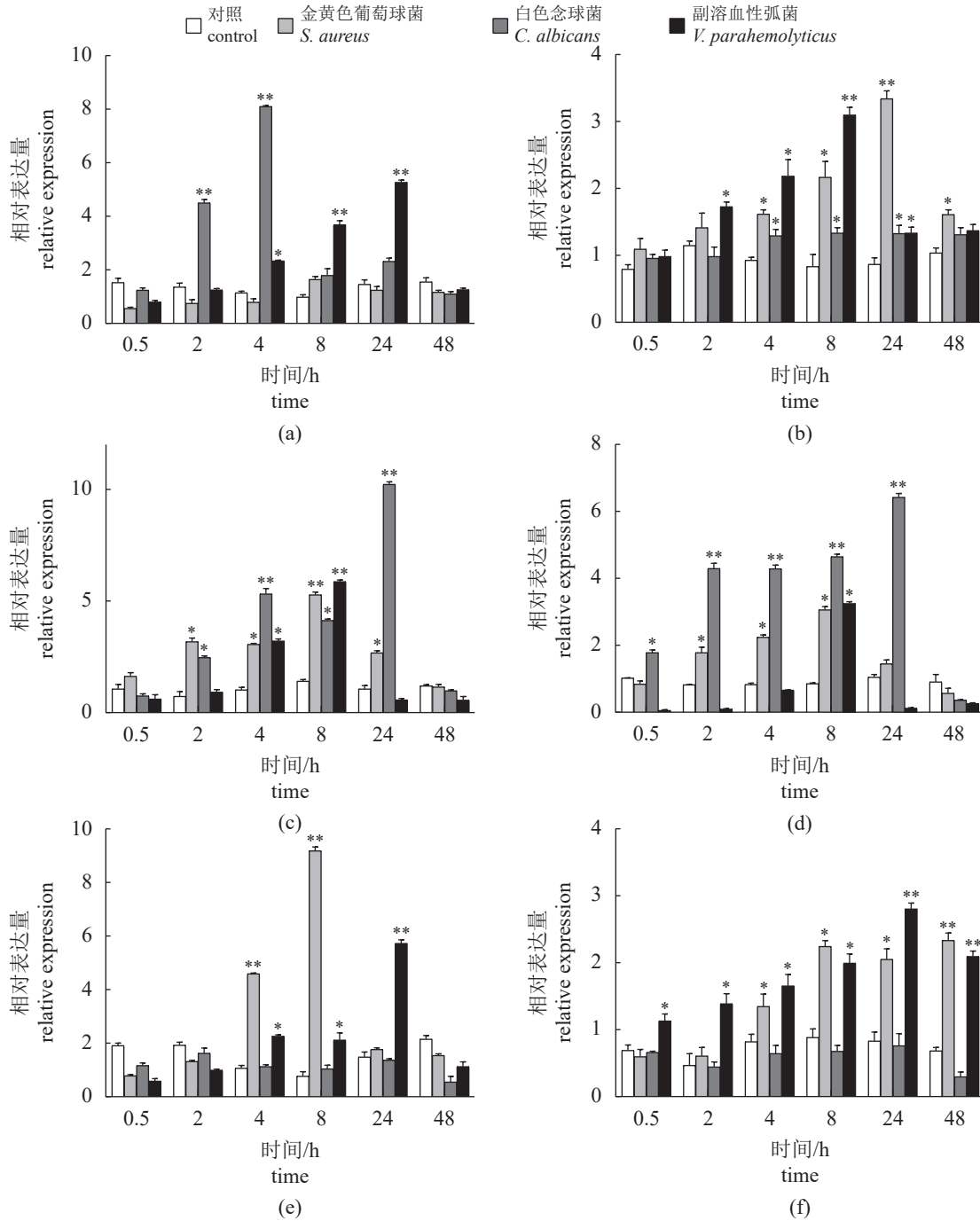


图3 三种不同微生物刺激下厚壳贻贝 H2A 和 H2B 在各组织中的表达量变化

(a) H2A 在消化腺中的表达量变化, (b) H2B 在消化腺中的表达量变化, (c) H2A 在鳃中的表达量变化, (d) H2B 在鳃中的表达量变化, (e) H2A 在血细胞中的表达量变化, (f) H2B 在血细胞中的表达量变化。数据以平均值±标准差 (n=3) 展示, 相对表达量基于  $C_t$  值以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行计算, 显著性差异分析基于 One-Way ANOVA 算法, 采用 Tukey 氏检验进行, 分析软件为 SPSS (v25.0), \*和\*\*分别代表  $P<0.05$  和  $P<0.01$  (实验组与对照组之间的变化,  $n=3$ )。

Fig. 3 Relative expression of H2A and H2B in tissues of *M. coruscus* after infection with three microbes

(a) the relative expression of H2A in digestive gland after three microbes induction; (b) the relative expression of H2B in digestive gland after three microbes induction; (c) the relative expression of H2A in gill after three microbes induction; (d) the relative expression of H2B in gill after three microbes induction; (e) the relative expression of H2A in hemocytes after three microbes induction; (f) the relative expression of H2B in hemocytes after three microbes induction. Statistical analysis of differences was performed by SPSS (v25.0) with One-Way ANOVA followed by Tukey's multiple range test. \* and \*\* represent  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively (Changes between experimental group and control group,  $n=3$ ).

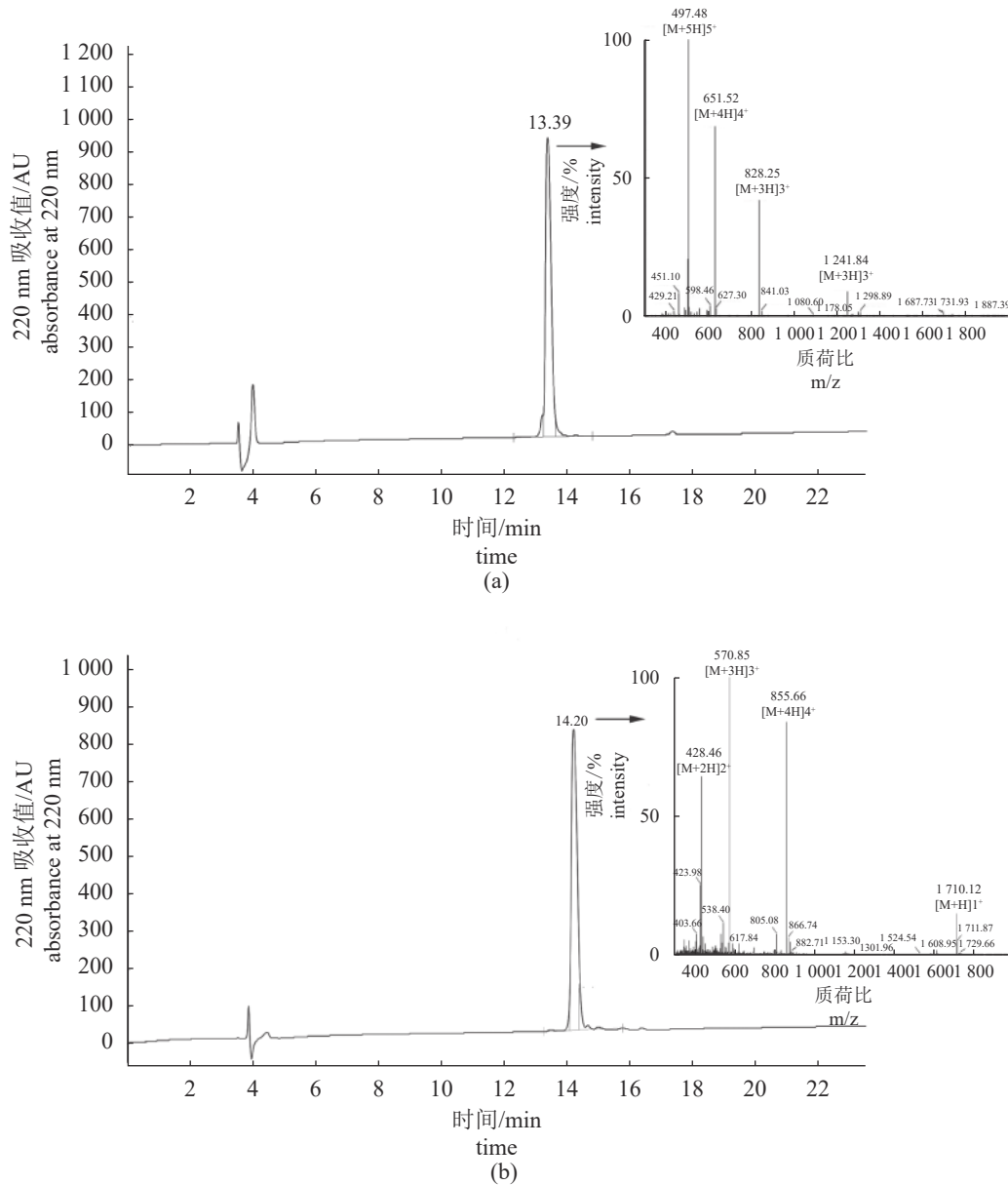


图 4 固相化学合成 Coruscusin-I (a) 和 Coruscusin-II (b) 粗品的 RP-HPLC 纯化与分子量质谱鉴定

箭头所示为目标峰的质谱检测结果。

Fig. 4 Purification of solid, chemically synthesized Coruscusin-I (a) and Coruscusin-II (b) by HPLC and the mass spectrum of the fraction collected from HPLC elution

The arrow denotes the spectrum of LC-MS/MS.

重要领域，其在脊椎动物，特别是在鱼类免疫中的研究已相当深入<sup>[12]</sup>。然而，无脊椎动物中的组蛋白及其衍生肽在免疫中的相关作用研究目前尚不多见。贻贝具有丰富的抗菌肽分子多样性，因此赋予了该物种较强的疾病耐受性，也使得贻贝抗菌肽成为新型生物抗生素研发的重要来源<sup>[39-40]</sup>。考虑到组蛋白及其 HDAPs 在其他物种中的重要免疫相关功能，推测贻贝体内的组蛋白可能也发挥了类似的作用。从以往报道来看，HDAPs 主要来自

组蛋白 H2A 和 H2B<sup>[41]</sup>，因此，实验首先测试了厚壳贻贝 H2A 和 H2B 基因在微生物诱导后的表达量变化。通过 3 种不同代表性微生物 (革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及真菌) 对厚壳贻贝进行胁迫，结合 qPCR 分析，发现厚壳贻贝 H2 组蛋白基因在微生物胁迫后均出现明显上调，表明贻贝组蛋白确实参与了贻贝的免疫响应。但是在不同组织以及不同微生物胁迫下，H2A 和 H2B 表达变化表现出不同的免疫响应特征。其中，H2A 在消化腺及



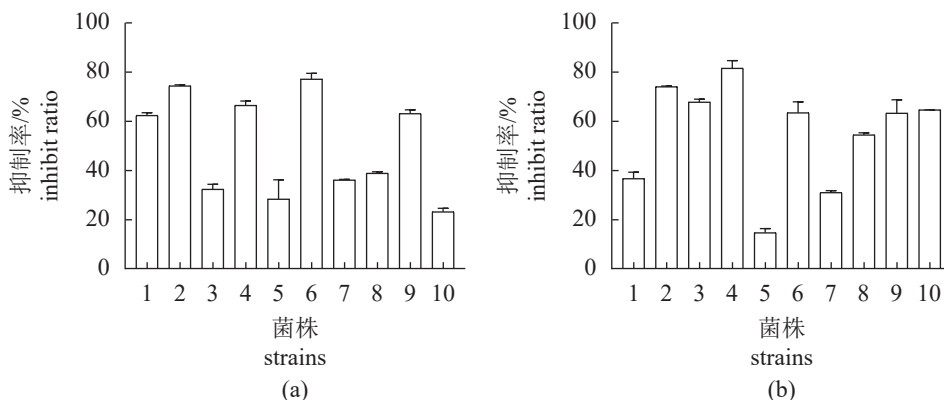


图5 Coruscusin- I (a) 和 Coruscusin- II (b) 抑菌活性测试

1. 金黄色葡萄球菌, 2. 巨大芽孢杆菌, 3. 蜡状芽孢杆菌, 4. 枯草芽孢杆菌, 5. 地衣芽孢杆菌, 6. 河流弧菌, 7. 副溶血性弧菌, 8. 大肠杆菌, 9. 铜绿假单胞菌, 10. 白色念珠菌。

Fig. 5 Antimicrobial activities of Coruscusin- I (a) and Coruscusin- II (b)

1. *S. aureus*, 2. *B. megaterium*, 3. *B. cereus*, 4. *B. subtilis*, 5. *B. licheniformis*, 6. *V. fluvialis*, 7. *V. parahemolyticus*, 8. *E. coli*, 9. *P. aeruginosa*, 10. *C. albicans*.

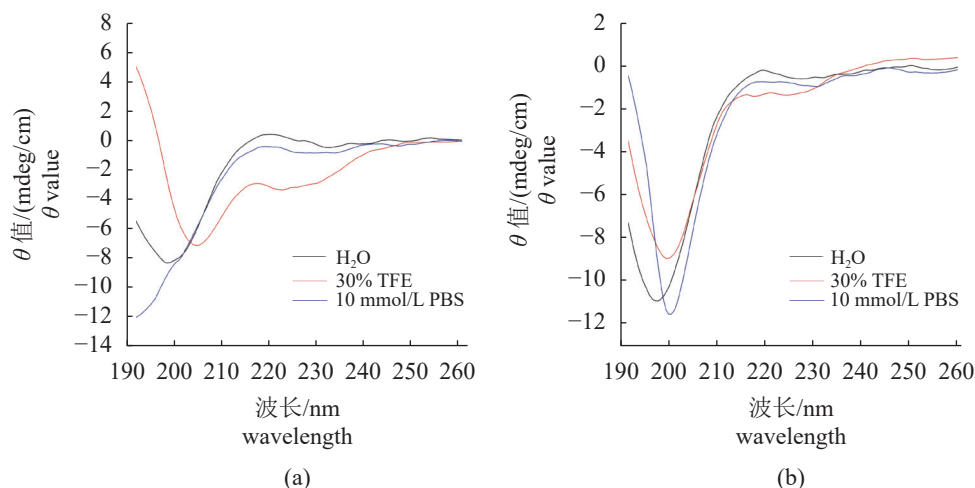


图6 Coruscusin- I (a) 和 Coruscusin- II (b) 在不同溶液中的圆二色性光谱

Fig. 6 CD spectra of Coruscusin- I (a) and Coruscusin- II (b) in various buffers

鳃组织中表现为对革兰氏阳性菌的敏感性, 而在血细胞组织中表现为对真菌的敏感性; H2B 则在消化腺和血细胞组织中表现为对革兰氏阴性菌和真菌的敏感性, 但在鳃组织中表现为对革兰氏阳性菌的敏感性。推测该结果与贻贝不同组织对不同微生物有着不同的识别以及免疫信号转导机制有关。考虑到贻贝不同组织在水中的暴露程度不同, 面临的微生物威胁也不尽相同, 因此, 贻贝不同组织的组蛋白 H2 表现出对不同微生物的免疫调控机制不同。

组蛋白参与宿主免疫防御的分子机制目前被认为有多种不同的方式, 包括组蛋白本身直接参与抗菌功能<sup>[19-20, 42]</sup>, 以及通过酶裂解手段, 从其序列中产生相应的肽段即 HDAPs, 来发挥抗菌活性<sup>[41]</sup>。

其中 HDAPs 是组蛋白参与免疫的主要方式。根据以往报道, HDAPs 主要裂解自组蛋白的 N 端片段, 且不同物种裂解自同一组蛋白的 HDAPs 在序列上往往具有较强的保守性<sup>[43]</sup>。尽管不同类型的组蛋白均有可能产生 HDAPs, 但组蛋白 H2A 和 H2B 目前来看是产生 HDAPs 的主要组蛋白来源<sup>[41]</sup>。通过对厚壳贻贝组蛋白 H2A 和 H2B 的 N 端肽段的化学合成以及抑菌活性研究, 发现厚壳贻贝 H2A 的衍生肽 Coruscusin- I 和 H2B 的衍生肽 Coruscusin- II 均表现出明显的体外抑菌活性。从结果来看, Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 对所测试的菌株均表现出强弱不一的抑菌活性, 且与其他物种 H2A 和 H2B 衍生肽的抑菌活性类似, 如 hipposin<sup>[44]</sup>、parasin I<sup>[45]</sup>、buforin I<sup>[8]</sup> 和 buforin II<sup>[46]</sup>。

表 2 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 在不同溶液中的二级结构含量

Tab. 2 Content of secondary structure of Coruscusin- I and Coruscusin- II in various buffers %

多肽 peptide	二级构象 secondary conformation	H <sub>2</sub> O	10 mmol/L PBS缓冲液 10 mmol/L PBS buffer	30%三氟乙醇 30% TFE
Coruscusin- I	α-螺旋 α-helix	0	0	41.2
	β-折叠 β-sheet	23.2	27.4	0
	β-转角 β-turn	0	25.8	3.4
	无规卷曲 random coil	76.8	46.9	55.4
	合计 total	100.0	100.0	100.0
Coruscusin- II	α-螺旋 α-helix	2.3	12.9	15.2
	β-折叠 β-sheet	13.9	8.7	0
	β-转角 β-turn	5.5	0	17.0
	无规卷曲 random coil	78.3	78.4	67.8
	合计 total	100.0	100.0	100.0

在抑菌活性分析中, Coruscusin- II 相对于 Coruscusin- I 表现出对真菌较强但对革兰氏阴性菌较弱的抑制活性(图 5), 推测与其序列中碱性氨基酸的种类和分布差异有关。精氨酸和赖氨酸被认为在 HDAP 的抑菌活性中发挥了关键作用<sup>[5, 47]</sup>,

其中精氨酸有利于抗菌肽穿越细菌细胞膜<sup>[5]</sup>, 而赖氨酸则有利于抗菌肽裂解细菌细胞膜<sup>[48]</sup>。从 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 的序列及螺旋特征来看, 二者的主要区别在于 Coruscusin- I 的碱性氨基酸以精氨酸为主, 且在螺旋外侧呈均匀分布特征, 而 Coruscusin- II 的碱性氨基酸全部为赖氨酸, 在其螺旋外侧呈集中分布特征(图 7)。因此, 推测上述差异可能是 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 抑菌活性存在差异的内在原因。

本实验结果显示, Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 在水溶液以及非极性溶液中, 其构象也存在差异。特别是在非极性溶液中, 二者的构象均表现为在相对极性溶液(水溶液和 PBS)条件下, 其螺旋含量明显上升(图 6, 表 2), 这可能有助于 Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 在靠近细菌细胞膜后, 通过构象变化来破坏或穿越细胞膜从而发挥抑菌活性。此外, Coruscusin- I 在非极性条件下的螺旋含量(41.2%)明显高于 Coruscusin- II (15.2%)(表 2), 推测与 Coruscusin- II 序列中含有较多的脯氨酸有关。脯氨酸对 α-螺旋具有破坏作用, 但有利于 β-转角的形成, 因此, Coruscusin- II 在非极性条件下表现出较 Coruscusin- I 更多的 β-转角(17.0% vs. 3.4%, 表 2)。上述结果也表明, Coruscusin- I 和 Coruscusin- II 在不同溶液体系中的构象变化以及二者之间构象的差别可能也是这两种多肽抑菌活性差异产生的原因之一。

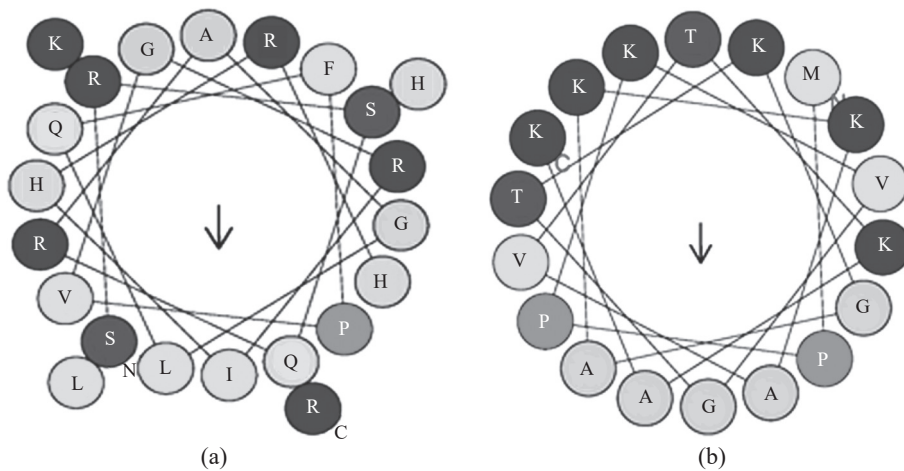


图 7 Coruscusin- I (a) 和 Coruscusin- II (b) 的螺旋结构预测

A. 丙氨酸, R. 精氨酸, F. 苯丙氨酸, S. 丝氨酸, H. 组氨酸, G. 甘氨酸, P. 脯氨酸, Q. 谷氨酰胺, I. 异亮氨酸, L. 亮氨酸, V. 缬氨酸, K. 赖氨酸, T. 苏氨酸, M. 甲硫氨酸。

Fig. 7 Spiral structure prediction of Coruscusin- I and Coruscusin- II

A. alanine, R. arginine, F. phenylalanine, S. serine, H. histidine, G. glycine, P. proline, Q. glutamine, I. isoleucine, L. leucine, V. valine, K. lysine, T. threonine, M. methionine.

以上研究首先在厚壳贻贝组蛋白 H2 的基因表达层面确认了其在微生物胁迫后的免疫响应, 同时也分析了 H2A 和 H2B 的 N 端肽段的抑菌活性及其可能的机制, 初步证实厚壳贻贝组蛋白可能参与了其免疫防御过程。上述研究进一步拓展了组蛋白在贻贝免疫防御中的可能分子角色的科学认知, 同时, 也为后续深入研究贻贝组蛋白来源抗菌肽的分子机制, 以及在此基础上开发贻贝组蛋白衍生肽为来源的新型生物抗生素奠定了基础。但是厚壳贻贝完整的组蛋白 H2 是否具有抑菌活性, H2 组蛋白衍生肽段 (Coruscusin- I 和 Coruscusin- II) 是否在贻贝体内真实存在, 以及厚壳贻贝 H2 及其衍生肽在贻贝免疫防御过程中的具体分子过程和机制有待研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Parseghian M H, Luhrs K A. Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2006, 84(4): 589-604.
- [ 2 ] Wyrick J J, Parra M A. The role of histone H2A and H2B post-translational modifications in transcription: a genomic perspective[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2009, 1789(1): 37-44.
- [ 3 ] Fyodorov D V, Zhou B R, Skoultchi A I, *et al.* Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(3): 192-206.
- [ 4 ] Kostova N N, Srebrev L, Markov D V, *et al.* Histone H5-chromatin interactions in situ are strongly modulated by H5 C-terminal phosphorylation[J]. *Cytometry-Part A*, 2013, 83A(3): 273-279.
- [ 5 ] Cutrona K J, Kaufman B A, Figueroa D M, *et al.* Role of arginine and lysine in the antimicrobial mechanism of histone-derived antimicrobial peptides[J]. *FEBS Letters*, 2015, 589(24PtarB): 3915-3920.
- [ 6 ] Tagai C, Morita S, Shiraishi T, *et al.* Antimicrobial properties of arginine- and lysine-rich histones and involvement of bacterial outer membrane protease T in their differential mode of actions[J]. *Peptides*, 2011, 32(10): 2003-2009.
- [ 7 ] Kim H S, Park C B, Kim M S, *et al.* cDNA cloning and characterization of buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 229(2): 381-387.
- [ 8 ] Park C B, Kim M S, Kim S C. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 218(1): 408-413.
- [ 9 ] Park C B, Kim H S, Kim S C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 244(1): 253-257.
- [10] Kim H S, Yoon H, Minn I, *et al.* Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I[J]. *The Journal of Immunology*, 2000, 165(6): 3268-3274.
- [11] Cho J H, Park I Y, Kim H S, *et al.* Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish[J]. *The FASEB Journal*, 2002, 16(3): 429-431.
- [12] Masso-Silva J A, Diamond G. Antimicrobial peptides from fish[J]. *Pharmaceuticals*, 2014, 7(3): 265-310.
- [13] Patat S A, Carnegie R B, Kingsbury C, *et al.* Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(23-24): 4825-4833.
- [14] Arockiaraj J, Gnanam A J, Kumaresan V, *et al.* An unconventional antimicrobial protein histone from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: analysis of immune properties[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1511-1522.
- [15] Chaurasia M K, Palanisamy R, Bhatt P, *et al.* A prawn core histone 4: Derivation of N- and C-terminal peptides and their antimicrobial properties, molecular characterization and mRNA transcription[J]. *Microbiological Research*, 2015, 170: 78-86.
- [16] Chen B, Fan D Q, Zhu K X, *et al.* Mechanism study on a new antimicrobial peptide Sphistin derived from the N-terminus of crab histone H2A identified in haemolymphs of *Scylla paramamosain*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 833-846.

- [17] Li C H, Song L S, Zhao J M, *et al.* Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(6): 663-672.
- [18] De Zoysa M, Nikapitiya C, Whang I, *et al.* Abhisin: a potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(5): 639-646.
- [19] Seo J K, Stephenson J, Crawford J M, *et al.* American oyster, *Crassostrea virginica*, expresses a potent antibacterial histone H2B protein[J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(5): 543-551.
- [20] Seo J K, Stephenson J, Noga E J. Multiple antibacterial histone H2B proteins are expressed in tissues of American oyster[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 158(3): 223-229.
- [21] Domeneghetti S, Varotto L, Civettini M, *et al.* Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(1): 37-44.
- [22] Romero A, del Mar Costa M, Forn-Cuni G, *et al.* Occurrence, seasonality and infectivity of *Vibrio* strains in natural populations of mussels *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 108(2): 149-163.
- [23] Figueras A, Moreira R, Sendra M, *et al.* Genomics and immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in a changing environment[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 440-445.
- [24] Gerdol M, Venier P. An updated molecular basis for mussel immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 17-38.
- [25] 王日昕, 刘梅, 廖智, 等. 厚壳贻贝抗菌肽Mytilin的初步鉴定[J]. *水产学报*, 2010, 34(1): 153-159.
- Wang R X, Liu M, Liao Z, *et al.* Purification and identification of mytilins from *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(1): 153-159 (in Chinese).
- [26] 廖智, 刘梅, 王日昕, 等. 厚壳贻贝抗菌肽mytilin和myticin的cDNA基因的克隆与序列分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(7): 1025-1033.
- Liao Z, Liu M, Wang R X, *et al.* cDNA clone and sequence analysis of mytilin and myticin from *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(7): 1025-1033 (in Chinese).
- [27] Liao Z, Wang X C, Liu H H, *et al.* Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 610-616.
- [28] 孙敬敬, 刘慧慧, 周世权, 等. 一种新型贻贝抗菌肽的分离纯化及鉴定[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 563-570.
- Sun J J, Liu H H, Zhou S Q, *et al.* A novel antimicrobial peptide identified from *Mytilus coruscus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 563-570 (in Chinese).
- [29] Sonthi M, Cantet F, Toubiana M, *et al.* Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(1): 45-50.
- [30] 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.
- [31] Sruthy K S, Nair A, Antony S P, *et al.* A histone H2A derived antimicrobial peptide, *Fi-Histin* from the Indian White shrimp, *Fenneropenaeus indicus*: molecular and functional characterization[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 667-679.
- [32] Robinette D, Wada S, Arroll T, *et al.* Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1998, 54(5): 467-475.
- [33] 宫延斌, 秦传利, 石戈, 等. 厚壳贻贝抗菌肽mytichitin-CB的固相化学合成、复性及功能[J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(1): 8-13,75.
- Gong Y B, Qin C L, Shi G, *et al.* Solid-phase synthesis, oxidation and function of Mytichitin-CB from *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2018, 37(1): 8-13,75 (in Chinese).
- [34] Chung E M C, Dean S N, Propst C N, *et al.* Komodo dragon-inspired synthetic peptide DRGN-1 promotes wound-healing of a mixed-biofilm infected wound[J]. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2017, 3: 9.
- [35] Borocci S, Della Pelle G, Ceccacci F, *et al.* Structural analysis and design of chionodracine-derived peptides using circular dichroism and molecular dynamics simulations[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4): 1401.

- [36] Fernández-Vidal M, White S H, Ladokhin A S. Membrane partitioning: "Classical" and "nonclassical" hydrophobic effects[J]. *The Journal of Membrane Biology*, 2011, 239(1-2): 5-14.
- [37] He Z J, He J Y, Wang J X, *et al.* Comparative transcriptomic analysis of gill and gonad from *Mytilus* under antibiotics treatment followed by different bacteria challenge[J]. *Aquaculture*, 2022, 547: 737457.
- [38] Luo P Z, Baldwin R L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(27): 8413-8421.
- [39] Gosset C C, Do Nascimento J, Augé M T, *et al.* Evidence for adaptation from standing genetic variation on an antimicrobial peptide gene in the mussel *Mytilus edulis*[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(12): 3000-3012.
- [40] Grienke U, Silke J, Tasdemir D. Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health[J]. *Food Chemistry*, 2014, 142: 48-60.
- [41] Sim S, Wang P, Beyer B N, *et al.* Investigating the nucleic acid interactions of histone-derived antimicrobial peptides[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(5): 706-717.
- [42] Ye X, Feng C L, Gao T, *et al.* Linker histone in diseases[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2017, 13(8): 1008-1018.
- [43] Eirín-López J M, González-Tizón A M, Martínez A, *et al.* Molecular and evolutionary analysis of mussel histone genes (*Mytilus* spp.): possible evidence of an "orphan origin" for H1 histone genes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 55(3): 272-283.
- [44] Athira P P, Anju M V, Anooja V V, *et al.* A histone H2A-derived antimicrobial peptide, Hipposin from mangrove whip ray, *Himantura walga*: molecular and functional characterisation[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(11): 467.
- [45] Park I Y, Park C B, Kim M S, *et al.* Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*[J]. *FEBS Letters*, 1998, 437(3): 258-262.
- [46] Cho J H, Sung B H, Kim S C. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2009, 1788(8): 1564-1569.
- [47] Moon C P, Fleming K G. Side-chain hydrophobicity scale derived from transmembrane protein folding into lipid bilayers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(25): 10174-10177.
- [48] Koo Y S, Kim J M, Park I Y, *et al.* Structure-activity relations of parasin I, a histone H2A-derived antimicrobial peptide[J]. *Peptides*, 2008, 29(7): 1102-1108.

## Immune response of histone H2 and antimicrobial activity of its derived peptide in *Mytilus coruscus*

WANG Haodong, LIU Lu, YANG Zongxin, WANG Yue, YANG Jinyue, HE Jianyu, ZHANG Xiaolin, HE Menglan, YAN Xiaojun\*, LIAO Zhi\*

(Laboratory of Marine Biology Resource and Molecular Engineering, Marine Science and Technical College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** The research of histones and histone-derived peptides is one of the most important study field of antimicrobial peptides. The genus *Mytilus* is not only of significant economic importance in aquaculture around the world but also shows strong tolerance to a wide range of environmental factors, including various microbes. Although *Mytilus* antimicrobial peptides had been studied for more than thirty years, there is no reports for now regarding the immunological effects of histones and their derived peptides in this genus. For understanding the roles of histones and their possible derived peptides in *Mytilus* immunity, the expression levels of H2A and H2B genes were analyzed by fluorescence quantitative PCR after various microbial stress, including Gram-positive, Gram-negative bacterium, and fungi, respectively. In addition, two peptides, Coruscusin I and Coruscusin II, derived from the N-terminal of H2A and H2B, respectively, were synthesized by solid phase chemical synthesis. The special configurations of Coruscusin I and Coruscusin II were analyzed by circular dichroism spectrometer, and their antimicrobial activities were studied by growth curve suppression method. The results showed that both H2A and H2B of *M. coruscus* contain classical histone characteristic domain in their sequences, and the  $\alpha$ -helix apparently is the predominant conformation for both H2A and H2B. In addition, both H2A and H2B of *M. coruscus* presented a high sequence similarity with histones of other bivalves species, indicating the conservation of histones in various species. The results of fluorescence quantitative PCR showed that the genes of histone H2A and H2B of *M. coruscus* were significantly up-regulated in different tissues under different microbial stresses. H2A gene was significantly up-regulated under *Staphylococcus aureus* induction in digestive gland and gill tissues, and the highest relative expression level were presented at 4 and 24 h for digestive gland and gill, respectively; in blood cell, the gene of H2A was significantly up-regulated at 8 and 24 h under the induction of *Vibrio parahaemolyticus* and *Candida albicans*, respectively. In addition, H2B showed sensitivity to *V. parahaemolyticus* and *C. albicans* in both digestive gland and hemocytes, and the expression level of H2B gene was significantly up-regulated at 8 and 24 h after induction. In gill, the H2B gene showed sensitivity to *S. aureus* induction, and the highest expression level was presented at 24 h. These results indicate a very complex immunological responses of histones in *Mytilus*, and this observation strongly suggests the existence of different recognition mechanisms or signal transduction pathways in mussels. Moreover, Coruscusin-I and Coruscusin-II were synthesized successfully with the expected molecular masses. Both Coruscusin-I and Coruscusin-II showed an increasing helix content in 30% of trifluoroethanol compared to that in pure water and PBS buffer, indicating a conformational change in nonpolar solution for both peptides. In addition, both Coruscusin-I and Coruscusin-II showed significant antimicrobial activity against tested gram-positive and gram-negative bacteria, as well as fungi. However, Coruscusin-II showed stronger antifungal activity than that of Coruscusin-I. Further helical structure prediction results indicate that the types and distribution characteristics of basic amino acids in the sequences of the two peptides might be the internal cause of the difference in antimicrobial activity. This study provides a foundation for elucidating the role of histones and their derived peptides in mussel immunity and its mechanism, and also provides a scientific basis for the development of new biological antibiotics derived from mussel histones.

**Key words:** *Mytilus coruscus*; histone; histone-derived antimicrobial peptide; solid phase chemical synthesis

**Corresponding authors:** YAN Xiaojun. E-mail: yanxj@zjou.edu.cn;

LIAO Zhi. E-mail: liaozhi@zjou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (42020104009); Project of Zhoushan Science and Technology Bureau (2019F12004); Zhejiang Innovation and Entrepreneurship Incubation Program for Undergraduates (2021R411055); General Project of Education Department of Zhejiang Province (Y202044838)