

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01317

酿酒酵母中亚硫酸盐转运基因 *SSU1* 的分子进化分析

彭立新, 孙菲菲, 黄艳燕, 黎贞崇

广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 南宁 530007

摘要: *SSU1* 基因是涉及亚硫酸外排及SO₂耐受性的重要因素之一。为了研究酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisiae*)中*SSU1*对SO₂耐受性及其分化机制, 文章探讨了*SSU1*基因在酿酒酵母中的遗传特征及进化规律。基于*SSU1*基因序列的聚类分析表明, 酿酒酵母群体可通过该基因分为3个亚群, 且与其分离的地理位置无关; 基于群体数据的McDonald-Kreitman检验表明, *SSU1*基因在酿酒酵母中受到适应性选择的作用; *Ka/Ks*检验表明, 在酿酒酵母中, 不同的亚群间有*Ka/Ks*显著大于1的值, 且PAML的支系模型检测到正选择作用在群体中特定的支系上; PAML的支系-位点模型检验获得9个潜在正选择作用位点, 其中有4个发生在受正选择作用的特定支系中; 基于ssu1p蛋白结构的分析表明, 在特定支系存在的正选择作用位点中, 除345(R/K)位点上两氨基酸替换均为碱性氨基酸外, 其他3个位点均是极性氨基酸/疏水性氨基酸之间替换, 考虑不同区域的氨基酸pKa值对其维持正常的功能有着重要的作用, 在该类位点的替换可能影响到ssu1p蛋白对SO₂的转运作用。

关键词: 酿酒酵母; 亚硫酸盐转运蛋白; 适应性进化

Molecular evolution of the sulphite efflux gene *SSU1* in *Saccharomyces cerevisiae*

PENG Li-Xin, SUN Fei-Fei, HUANG Yan-Yan, LI Zhen-Chong

State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China

Abstract: The *SSU1* gene encoding a membrane sulfite pump is a main facilitator involved in sulfite efflux. In *Saccharomyce cerevisiae*, various range of resistance to sulfite was observed among strains. To explore the evolution traits of *SSU1* gene, the population data of *S. cerevisiae* were collected and analyzed. The phylogenetic analysis indicated that *S. cerevisiae* population can be classified into three sub-populations, and the positive selection was detected in population by McDonald-Kreitman test. The analysis of *Ka/Ks* ratios further showed that *S. cerevisiae* sub-population was undergoing positive selection. This finding was also supported by PAML branch model. Nine potential positive selection sites were predicted by branch-site model, and four sites exclusively belong to the sub-population under positive selection. The data from ssu1p protein structure demonstrated that three sites are substitutions between polar and hydrophobic amino acids, and

收稿日期: 2013-02-26; 修回日期: 2013-08-22

基金项目: 广西科学院基本科研业务(编号: 10YJ25SW13)和广西青年基金项目(编号: 2013GXNSFBA019106)资助

作者简介: 彭立新, 副研究员, 研究方向: 微生物。Tel: 0771-2503970; E-mail: pengpeperry@hotmail.com

通讯作者: 黎贞崇, 研究员, 研究方向: 微生物。E-mail: 2503915@163.com

网络出版时间: 2013-9-17 14:40:06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130917.1440.001.html>

only one site of substitution from basic amino acid to basic amino acid (345R/K). Because amino acid pKa values are crucial for sulfite pump to maintain their routine function, positive selection of these amino acid substitutions might affect sulfite efflux efficient.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; *SSUI*; adaptive evolution

亚硫酸(SO_2)作为食品添加剂已存在上百年的时间。在酿酒工艺中,亚硫酸有抑菌、抗氧化、改善品味及增酸等作用,被广泛应用于酿酒的消毒与发酵液中。除此之外,酵母细胞在同化硫酸盐生成含硫氨基酸(如甲硫氨酸, S-腺苷甲硫氨酸和半胱氨酸)的代谢过程中也会产生亚硫酸^[1]。主要以两种形式存在发酵液中:一种是游离 SO_2 ,包括分子态 SO_2 及 HSO_3^- 、 SO_3^{2-} 离子;另一种是与发酵液中的有机分子形成结合态 SO_2 (如在酒精发酵中,可与乙醛结合生成稳定的乙醛亚硫酸^[1])。

SO_2 在细胞中累积时,会在多个水平上影响微生物的活性,如:(1)与膜受体结合引起的膜损伤^[1];(2)引起细胞内容物的外流^[2];(3)影响ATP酶,从而抑制ATP合成^[3,4]。此外,亚硫酸还通过与酶(如甘油醛-3-磷酸脱氢酶^[2]或代谢产物(如葡萄糖、磷酸二羟丙酮、丙酮酸)^[5]结合影响代谢途径,并由此导致细胞生长滞后、诱导孢子生成或细胞死亡等一系列异常表现。因此,在酿酒工艺中,特别是在啤酒、红酒及果酒生产过程中, SO_2 耐受性一直是选择生产菌株的重要指标之一。

酵母中,特别是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的不同菌株对 SO_2 耐受性有着较大差异^[6-7]。目前,*SSUI*基因(亚硫酸盐转运蛋白)被认为是导致亚硫酸外排及耐受性差异的主要原因之一^[7]。在DNA水平上,*SSUI*基因位于*S. cerevisiae*的16号染色体上,受*FZF1*转录因子调控^[8,9]。在自然状态下,*S. cerevisiae*群体存在两种调控类型,并与亚硫酸耐受性呈现高度正相关^[10,11]。在蛋白水平上,ssulp蛋白属于TDT (Tellurite-resistance/dicarboxylate transporter family)家族,主要通过编码亚硫酸盐转运蛋白,以亚硫酸外流泵的形式锚定于细胞膜^[12,13],以调节胞内亚硫酸盐的外排^[14]。此外,*S. cerevisiae*菌株间的耐受性分化并非仅存在于其表达调控水平上^[15]。编码区域的研究表明,*SSUI*基因也有着较高的多态

性,存在正选择作用^[16],可能是在多样化的酿酒工艺中,*SSUI*基因在不同环境的选择压下,获得不同程度的 SO_2 外排能力^[16]。其高效率的 SO_2 外排能力,一方面能使酵母在发酵前期保持较高的生长优势,以抑制杂菌生长;另一方面使菌株在高浓度 SO_2 条件下仍维持高的发酵能力。但至今为止,人们对*S. cerevisiae*中*SSUI*基因的正选择作用位点、作用方向及其如何影响ssulp蛋白的亚硫酸外排机制仍知之甚少。为探讨以上问题,本研究以*SSUI*基因群体数据为出发点,通过研究*SSUI*基因的遗传特征及其结构,探讨正选择的作用目标及其外排机制。

1 材料和方法

1.1 *SSUI* 基因群体数据收集

*SSUI*基因的群体数据收集主要来源于两部分,一部分来自于*S. cerevisiae*基因组数据,如SGRP (Saccharomyces Genome Resequencing Project, Wellcome Trust Sanger Institute), the Fay Lab (<http://genome.wustl.edu/pub/organism/Fungi/>), NITE (<http://www.bio.nite.go.jp/ngac/e/sc1-e.html>), SGD (<http://www.yeastgenome.org/>);另一部分来自于Erlend等^[16]对*SSUI*基因的群体分析数据(表1)。本研究共收集了83株不同菌株的*SSUI*基因序列,由于Vin13、FosterO、W303、VL3、AWRI796菌株的*SSUI*基因序列不完整,在此后分析中将其剔除,共获得78个菌株的完整基因序列(表1)。其中Foster'sB、LalvinQA23、MMW1-15、MMW1-2、M5-7、Sgu52E为杂合子,因此有84条*SSUI*基因序列参与计算。构建*SSUI*基因的NJ树时,*S. cerevisiae*及其近源菌株的*SSUI*基因序列来源于SGD数据库。比较*S. cerevisiae*与*S. paradoxus*的群体数据时,*S. paradoxus*的*SSUI*基因(36株)数据来自于SGRP数据库。

1.2 *SSUI* 基因数据分析

ClustalW 用于群体数据的多序列比对,比对结

果去除终止密码子后进行下一步分析。在多个核苷酸替换模型中, Jmodeltest2.1.1^[23]用于筛选最适核苷酸替换模型。在Jmodeltest中, 以AIC(Akaike Information Criterion)为标准, 选择出TPM1uf+G(即K81uf+G)为最适模型。在最适核苷酸替换模型下, PhyML^[24]用于构建NJ树, 并进行Bootstrap检验

表 1 本文所使用的 *S. cerevisiae* 菌株信息

| 菌株名 | 地点 | 来源 | 收集者 | 菌株名 | 地点 | 来源 | 收集者 |
|------------|-------|---------|---------------------------|---------------|--------|-------|----------------------------|
| RM11-1a | 美国 | 葡萄酒 | Broad ^[17] | NCYC110 | 西非 | 姜汁啤酒 | Sanger ^[18] |
| Fy935a | 美国 | 葡萄汁/无花果 | Cavalieri ^[16] | NCYC361 | 爱尔兰 | 啤酒污染物 | Sanger ^[18] |
| M1-2 | 意大利 | 葡萄园 | Cavalieri ^[16] | REF | 美国 | 实验室 | Sanger ^[18] |
| M2-8 | 意大利 | 葡萄园 | Cavalieri ^[16] | SK1 | 美国 | 土壤 | Sanger ^[18] |
| M5-7 | 意大利 | 葡萄园 | Cavalieri ^[16] | UWOPS03-461.4 | 马来西亚 | 玻淡棕榈 | Sanger ^[18] |
| M7-8 | 意大利 | 葡萄园 | Cavalieri ^[16] | UWOPS05-217.3 | 马来西亚 | 玻淡棕榈 | Sanger ^[18] |
| Sgu52E | 意大利 | 葡萄园 | Cavalieri ^[16] | UWOPS05-227.2 | 马来西亚 | 玻淡棕榈 | Sanger ^[18] |
| Bb32(5) | 美国 | 葡萄园 | Fay ^[19] | UWOPS83-787.3 | 巴哈马 | 缩刺仙人掌 | Sanger ^[18] |
| CBS7960 | 巴西 | 乙醇发酵 | Fay ^[19] | UWOPS87-2421 | 夏威夷,美国 | 仙人掌 | Sanger ^[18] |
| CLIB215 | 新西兰 | 烘焙物 | Fay ^[19] | Y12 | 非洲 | 棕榈酒 | Sanger ^[18] |
| EC1118 | 未知 | 葡萄酒 | Fay ^[19] | Y55 | 法国 | 葡萄酒 | Sanger ^[18] |
| FL100 | 美国 | 临床 | Fay ^[19] | Y9 | 日本 | 青酒 | Sanger ^[18] |
| PW5 | 尼日利亚 | 棕榈酒 | Fay ^[19] | YI1c17_E5 | 法国 | 葡萄酒 | Sanger ^[18] |
| K7 | 日本 | 青酒 | NRIB ^[20] | YJM789 | 美国 | 临床 | Sanger ^[18] |
| T7 | 美国 | 橡树 | Fay ^[19] | YJM975 | 意大利 | 临床 | Sanger ^[18] |
| T73 | 西班牙 | 葡萄酒 | Fay ^[19] | YJM978 | 意大利 | 临床 | Sanger ^[18] |
| UC5 | 日本 | 青酒 | Fay ^[19] | YJM981 | 意大利 | 临床 | Sanger ^[18] |
| Y10 | 菲律宾 | 椰子 | Fay ^[19] | YPS128 | 美国 | 橡树 | Sanger ^[18] |
| YPS163 | 美国 | 橡木分泌物 | Fay ^[19] | YS2 | 澳大利亚 | 烘焙物 | Sanger ^[18] |
| FostersB | 未知 | 酿酒液 | Fosters ^[21] | YS4 | 荷兰 | 烘焙物 | Sanger ^[18] |
| LalvinQA23 | 未知 | 葡萄酒 | Lallemant ^[21] | YS9 | 新加坡 | 烘焙物 | Sanger ^[18] |
| JAY291 | 未知 | 酒精发酵 | McCusker ^[22] | YPS396 | 美国 | 橡树土壤 | Sniegowski ^[16] |
| Ba194 | 意大利 | 葡萄汁 | Mortimer ^[16] | YPS400 | 美国 | 橡树土壤 | Sniegowski ^[16] |
| YJM269 | 未知 | 苹果汁 | Pereira ^[19] | YPS598 | 美国 | 橡树土壤 | Sniegowski ^[16] |
| 273614N | 英国 | 临床 | Sanger ^[18] | YPS600 | 美国 | 橡树分泌物 | Sniegowski ^[16] |
| 322134S | 英国 | 临床 | Sanger ^[18] | YPS602 | 美国 | 橡树土壤 | Sniegowski ^[16] |
| 378604X | 英国 | 临床 | Sanger ^[18] | YPS604 | 美国 | 橡树土壤 | Sniegowski ^[16] |
| BC187 | 美国 | 橡木桶 | Sanger ^[18] | YPS606 | 美国 | 橡树皮 | Sniegowski ^[16] |
| DBVPG1106 | 澳大利亚 | 葡萄 | Sanger ^[18] | YPS610 | 美国 | 橡树皮 | Sniegowski ^[16] |
| DBVPG1373 | 荷兰 | 土壤 | Sanger ^[18] | MMR2-1 | 意大利 | 葡萄园 | Townsend ^[16] |
| DBVPG1788 | 芬兰 | 土壤 | Sanger ^[18] | MMR2-3 | 意大利 | 葡萄园 | Townsend ^[16] |
| DBVPG1853 | 埃塞俄比亚 | 画眉草 | Sanger ^[18] | MMR2-5 | 意大利 | 葡萄园 | Townsend ^[16] |
| DBVPG6040 | 荷兰 | 水果 | Sanger ^[18] | MMW1-12 | 意大利 | 葡萄园 | Townsend ^[16] |
| DBVPG6044 | 西非 | 葡萄酒 | Sanger ^[18] | MMW1-15 | 意大利 | 葡萄园 | Townsend ^[16] |
| DBVPG6765 | 未知 | 未知 | Sanger ^[18] | MMW1-2 | 意大利 | 葡萄园 | Townsend ^[16] |
| K11 | 日本 | 青酒 | Sanger ^[18] | ORM1-1 | 意大利 | 白葡萄 | Townsend ^[16] |
| L-1374 | 智利 | 葡萄酒 | Sanger ^[18] | S288c | 美国 | 无花果 | Unkown |
| L-1528 | 智利 | 葡萄酒 | Sanger ^[18] | Sigma1278b | 未知 | 实验室 | Unkown |
| LEO | 未知 | 未知 | Sanger ^[18] | YPH499 | 美国 | 无花果 | Unkown |

(Bootstrap值为 1 000)。DnaSP v5^[25]用于 *SSU1* 基因群体数据的杂合子单倍型分析、多态性参数统计、Tajima's D、Fu and Li's D、Fu and Li's F、McDonald-Kreitman(MK)检测^[26]。为检验群体分化程度,利用 DnaSP v5^[25]分别计算了两群体的平均核苷酸分化度 D_x 、 D_y (Nucleotide diversity), 两群体间 D_{xy} (Nucleotide divergence between two populations)和群体间净分化度(Net nucleotide divergence between two populations) $D_a = D_{xy} - (D_x + D_y)/2$ 。Paml4.4^[27]用来分析不同模型下 *SSU1* 基因的选择作用检测。

1.3 ssu1p 蛋白结构分析

I-TASSER server^[28, 29]用于 *ssu1p* 蛋白的结构模拟, TehA 蛋白结构(3M71)来自于 RCSB(<http://www.rcsb.org/pdb>)。PSCT1.2(Protein structure comparison Tool, <http://www.rcsb.org/pdb>)用于不同蛋白结构之间的比对。

2 结果与分析

2.1 序列分析

通过 SGD 数据库注释, *SSU1* 基因在 *S. cerevisiae* 中全长 1 370 bp, 无内含子。图 1 为 *S. cerevisiae* 的 *SSU1* 基因与其近源种之间的 NJ 树(Bootstrap 值为 1 000), 其中 *S. cerevisiae* 与 *S. paradoxus* 相似度最高。因此, 在以下的群体分析中, 选择 *S. paradoxus* 做为外群。

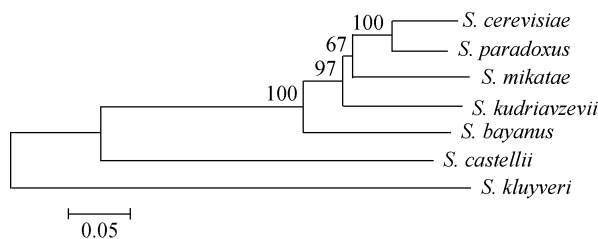


图 1 *Saccharomyce* 属近源菌种的 *SSU1* 基因 NJ 树

2.2 群体分析

S. cerevisiae 和 *S. paradoxus* 群体的变异位点见表 2。群体分化程度检验结果显示, *S. paradoxus* 群体 ($D_y=0.0127$) 较 *S. cerevisiae* ($D_x=0.00326$) 有着高的核苷酸分化度, 两群体间净分化度 $D_a=0.089$ 显著大于群体内分化度, 表明在 *SSU1* 基因上 *S. cerevisiae*、*S. paradoxus* 两群体间存在着显著的群体分化。

表 2 *S. cerevisiae*、*S. paradoxus* 两种群 *SSU1* 基因的变异位点

| 种群 | 简约位点 | 单突变位点 | 同义突变位点 | 非同义突变位点 |
|----------------------|------|-------|--------|---------|
| <i>S. cerevisiae</i> | 19 | 11 | 11 | 19 |
| <i>S. paradoxus</i> | 54 | 7 | 49 | 14 |

为了观察 *SSU1* 基因在群体水平上是否受到正选择的作用, 本研究分别对两群体进行了 Tajima's D 检验、Fu and Li 检验及 McDonald-Kreitman(MK) 检验。尽管 Tajima's D、Fu and Li's D、Fu and Li's F 检验在两群体中均不显著, 但基于两群体数据的 MK 检验, 其结果显示 32/59(非同义多态位点数/同义多态位点数)与 21/78(非同义固定位点数/同义固定位点数)存在显著差异, 表明 *SSU1* 基因在 *S. cerevisiae* 群体存在选择作用。

2.3 Ka/Ks 分析

为进一步观察 *SSU1* 的进化历程, 本文分别计算了 *S. cerevisiae*、*S. paradoxus* 两群体内的 K_a 、 K_s 及 K_a/K_s 值, 并进行了 Z 检验。结果表明, 在群体水平上, *S. cerevisiae* 的平均每位点非同义替换 $K_s=0.00448$ ($SE=0.00186$) 大于平均每位点同义替换 $K_a=0.00290$ ($SE=0.00098$), 其平均 K_a/K_s 显著小于 1, 表明 *SSU1* 基因在群体进化过程中, 由于其基因功能的保守性, 总体上受到纯化选择的作用。

基于群体平均的 K_a 、 K_s 值易掩盖群体中部分个体可能存在的选择作用, 为验证该可能性, 本研究首先以 *S. paradoxus* 为外群, 构建了 *SSU1* 基因的 NJ 树。结果显示 *S. cerevisiae* 群体可分为明显的 3 个亚群(图 2, 以下用 G1、G2、G3 标识)。在 3 个亚群中, 其遗传距离与其地理分布并无关联(图 2), 同一组群中菌株可以来自于不同地域的样本, 如在 G1 中, 其个体可以来自于美洲、欧洲、澳洲。与全基因组数据构建的 NJ 树相比^[18, 30], 在几支明显的支系上, *SSU1* 基因所构建的 NJ 树与前者有一定的相似性。如在 Liti 等^[18]与 Schacherer 等^[30]研究结果中, 以发酵日本清酒(Sake)为用途的菌株(Y9、Y12、K11 与 K7)、分离于马来西亚的菌株(UWOPSO5_217.3、UWOPSO5_461.4 与 UWOPSO5_227.2)与分离于欧洲的菌株(DBVPG1373、DBVPG1106、DBVPG6765 与 DBVPG1788)呈相明显的 3 支系, 这与本研究中通

过 *SSU1* 基因所呈现的菌株亚群分布相似。

在此基础上, Paml4.4 中的成对模型(Pair model)用于分别计算 *S. cerevisiae* 群体个体间的 Ka/Ks 值(图 3), 结果显示, 有部分个体间 Ka/Ks 值显著大于 1, 且主要分布于 G2/G1 及 G2/G3 间。

在 G2 中, 有 4 株分离于日本(如 Y9、K11、K7、UC5), 且用途均以发酵日本清酒为主, 该结果提示 *SSU1* 基因在 *S. cerevisiae* 不同的个体间、特定的支系或位点上可能存在正选择作用。为此, 本研究采用基于最大似然法估计的支系模型(Branch model)及位点模型(Site model)检验在不同的支系或位点上的选择作用。表 3 中结果显示, 支系模型匀显著优于零假设 H_0 , 该结果表明在特定支系上经历不同的进化历程。这与之之前个体间 Ka/Ks 值显示的结果一致, 说明 ω 值在各支系上的分布存在差异, 其正选择的作用主要发生在特定的支系(G2)中。此外, 为检验正选择可能的作用位点, M1a/ M2a、M8/M7 的两位点模型分别用于群体数据的检验。结果显示, 位

点模型均显著优于零假设模型, 且均检出两个相同的潜在正选择位点(19V 和 90S, $P>95\%$, 见表 4)。而在更为灵敏的支-位点模型(Branch-site model)检出 9 个潜在的正选择位点(16F/S、19M/V、52 A / T、90N/S、157P/S、191T/A、312D/A、345R/K、396V/I), 其中有 4 个多态位点, 即 52A、157P、191T、345R 仅发生在 G2 中(表 5)。结果提示在 G2 中, 正选择可能作用以上位点而引起其功能的部分改变。

2.4 结构分析

在蛋白结构上, *ssu1p* 蛋白属于 *TDT* 基因家族。在该家族中, 来自于 *Escherichia coli*(*E.coli*)的 TehA 蛋白、*Schizosaccharomyces pombe*(*S. pombe*)的 Mae1 蛋白已有较好的结构信息的注释。为进一步探讨正选择位点对其蛋白结构与功能的影响, 本研究使用 I-TASSER server 构建了 *ssu1p* 的蛋白结构。与 TehA 蛋白相比, 尽管两者的蛋白序列相似度低于 13%, 但其在结构骨架(Backbone)上具有较高的保守性

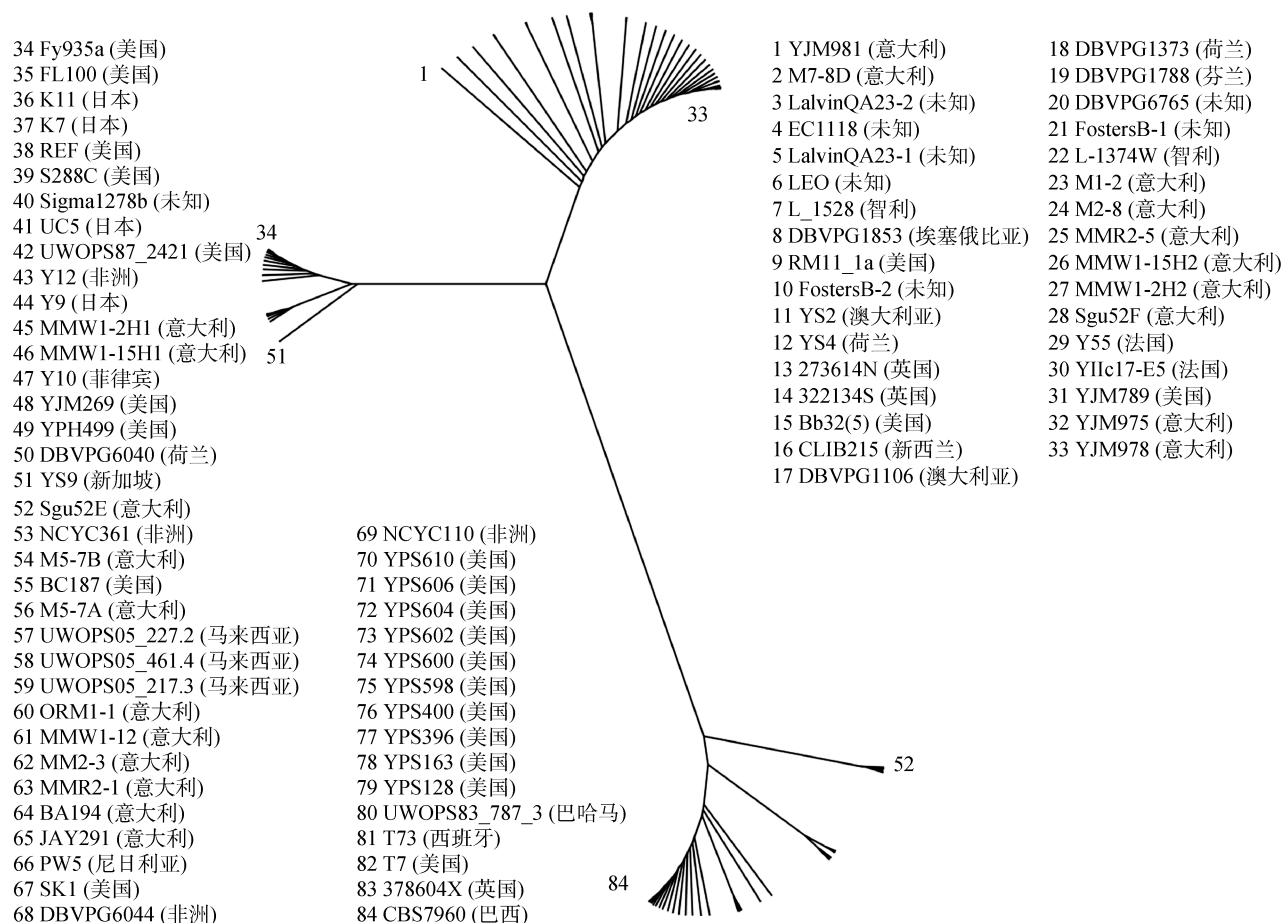


图 2 基于 *S. cerevisiae* 群体数据所构建的 *SSU1* 基因树

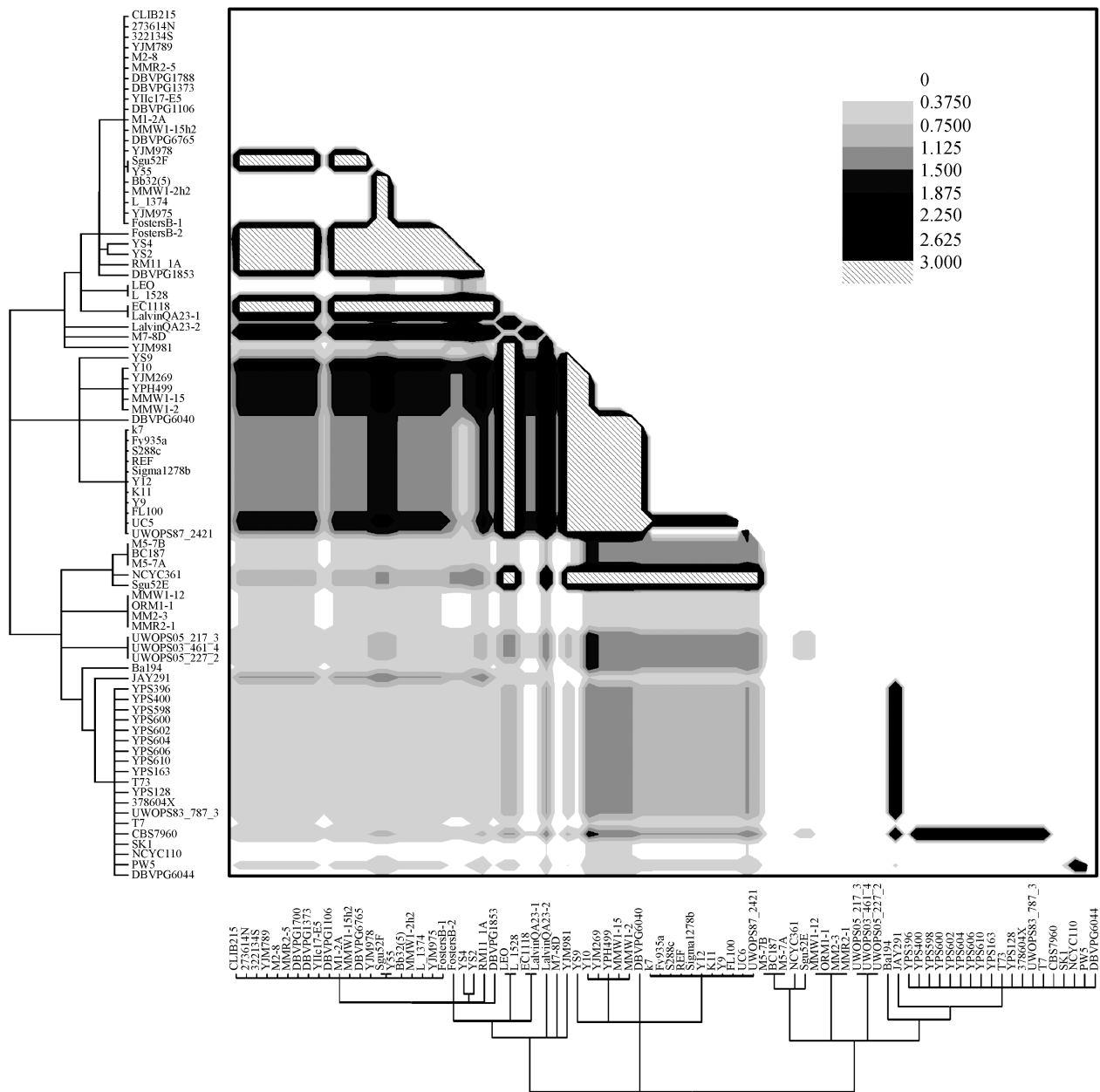


图 3 *Ka/Ks* 值在 *S. cerevisiae* 不同亚群的分布
使用 PAML 成对模型计算不同个体间 *Ka/Ks* 值, 其值大于 1.5 的部分用黑色线条勾勒出来。 *Ka*>0 而 *Ks*=0 的值用 3 和斜线表示。

表 3 PAML 支系模型用于检验 *SSU1* 基因在特定支系上的选择作用

| 分析模型 | ω_1 | ω_2 | ω_3 | lnL | LRT |
|--|------------|-------------|-------------|-----------|----------------|
| H0: $\omega_1=\omega_2=\omega_3$ | 0.932 | $=\omega_1$ | $=\omega_1$ | -2161.978 | NA |
| H1: $\omega_1=\omega_2\neq\omega_3$ | 0.874 | $=\omega_1$ | 1.024 | -2161.429 | $P>0.2^a$ |
| H2: $\omega_1\neq\omega_2=\omega_3$ | 1.630 | $=\omega_3$ | 0.333 | -2159.932 | $P>0.1^b$ |
| H3: $\omega_1=\omega_3\neq\omega_2$ | 0.609 | 999 | $=\omega_1$ | -2157.689 | $P<0.01^{**c}$ |
| H4: $\omega_1\neq\omega_2\neq\omega_3$ | 0.466 | 999 | 0.838 | -2157.379 | $P>0.4^d$ |

注: ^aH1:H0, df=1; ^bH2:H0, df=1; ^cH3:H0, df=1; ^dH4:H3, df=1。

表 4 PAML 位点模型用于检验 *SSU1* 基因中位点的选择作用

| 模型 | <i>dN/dS</i> | 估计参数 | lnL | LRT |
|-------------------|--------------|---|-----------|-----------------|
| M0 | 0.932 | 0.932 | -2161.978 | |
| M1 | 0.428 | $p_0=0.572, (p_1=0.428) (\omega_0=0), (\omega_1=1)$ | -2158.685 | $P<0.05^{*a}$ |
| M2 | 0.9645 | $p_0=0.959, p_1=0.0012, (p_2=0.038) (\omega_0=0.243), (\omega_1=1), \omega_2=18.78$ | -2145.712 | $P<0.001^{**a}$ |
| M7:beta | 0.500 | $p=0.005 q=0.0055$ | -2158.488 | |
| M8:beta& ω | 0.958 | $p_0=0.960, (p_1=0.0391) p=0.0058, q=0.0254, \omega=18.35$ | -2146.314 | $P<0.001^{**b}$ |

注：^aM2:M1, df=2; ^bM8: M7, df=2。

表 5 PAML 支-位点模型预测的选择位点在 *ssu1p* 的分布及在 *TehA* 与 *SLAC1* 蛋白中的对应关系

| | TM1 | TM1 | TM2 | TM3 | | TM5 | TM8 | TM8 | TM10 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>ssu1p</i> | 16F/S | 19M/V | 52A/T | 90N/S | 157P/S | 191T/A | 312D/A | 345R/K | 396V/I |
| <i>TehA</i> | 12G | 16G | 48A | 80F | — | 153S | 227A | 246P | 290F |
| <i>SLAC1</i> | 191G | 194G | 232S | 264V | — | 342A | 416R | 436F | 481I |

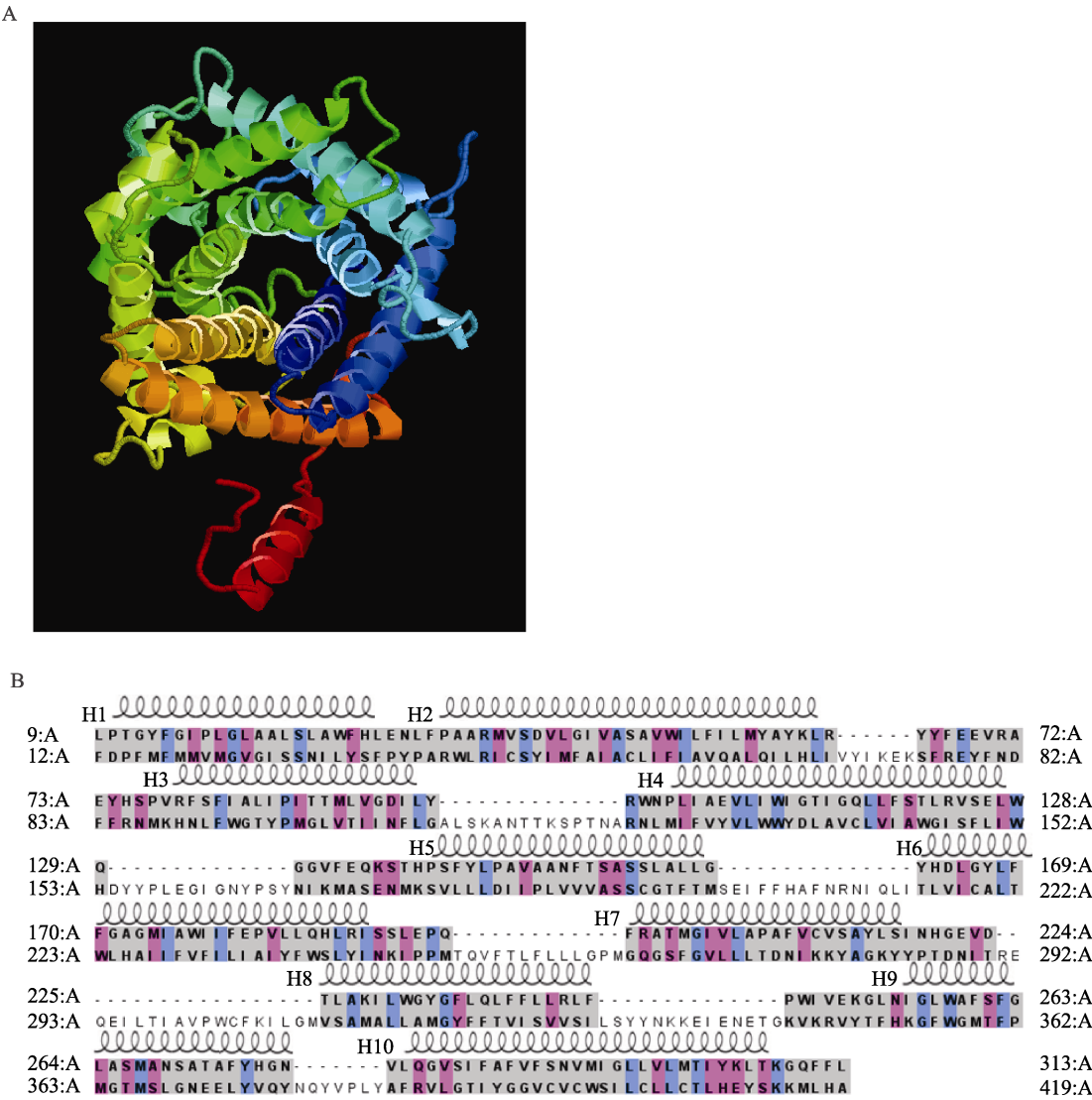


图 4 *ssu1p* 蛋白结构示意图及同源蛋白结构比对
A：*ssu1p* 蛋白三维结构示意图；B：*ssu1p* 蛋白与 *TehA* 蛋白的结构比对。

(RMSD=0.96, Z-score=6.92)。如图 4A 所示, ssulp 蛋白结构与 TehA 蛋白相似, 均由 10 个跨膜的螺旋(Helix)构成双层通道结构。

但在细胞内外两个表面的螺旋环(Helix loop)处, 构成 ssulp 蛋白螺旋与螺旋连接的氨基酸要明显长于 TehA(图 4B)。在位于在通道门(Channel gate)位点上, ssulp(361)与 TehA(262)、SLAC1(462)蛋白均为保守的苯丙氨酸(Phe)。表 5 比较了 ssulp、TehA 及 SLAC1 三种蛋白在 9 位点的氨基酸情况。除 ssulp(157Phe)位于螺旋连接处外, 其他位点均分布于构成通道的骨架上。如 ssulp 中的 16(F/S)、19(M/V)、90(N/S)与 191(T/A)分别分布构成通道内层的螺旋 TM1、TM1、TM3 与 TM5, 而 52(T/A)、191(T/A)、312(D/A)、345(R/K)与 396(V/I)分布于外层的螺旋 TM2、TM8、TM8、TM10。特别是 TehA(15G)与 SLAC1(194G)蛋白中两个位点均为保守的甘氨酸(Gly)位点, 而在对应 ssulp 中分别为 16(F/S)与 19(M/V)所替代。在 ssulp、TehA 与 SLAC1 蛋白中, 这两个位点均分布于通道内层的 TM1 螺旋上, 且被认为处于通道的中心位置。在 TehA 蛋白该位点的突变(G15D)会因为通道阻断, 而显著影响到蛋白对负离子的运输能力。考虑到 ssulp 蛋白中在该两位点上的突变, 联系其功能及潜在正选择位点检测结果, 推测此两位点在一定程度上会影响到 ssulp 蛋白对负离子的运输能力。与此相对应的是 G2 中特有的 4 个位点, 即 52A、157P、191T、345R 均分布于通道的外层空间上。除 345(R/K)位点上两氨基酸替换均为碱性氨基酸(Alkaline)外, 其他 3 个位点均是极性氨基酸(Polar)/疏水性氨基酸(Hydrophobic)之间替换。如在 G2 中, 为 52(A 疏水性)、157(P 疏水性)、191(T 极性), 而在 G1 与 G3 中均为 52(T 极性)、157(S 极性)、191(A 疏水性)。

3 讨论

在酿酒工艺中, 特别是在啤酒、红酒及果酒生产过程中, 高SO₂耐受菌株在抑菌杀菌、抗氧化、改善风味、增酸、解决酒的老化问题上有着独特的优势。SSUI 作为编码亚硫酸外流泵的基因, 是影响酵母SO₂耐受性的主要因素之一, 研究表明其外排亚硫酸的能力与SSUI 基因的表达水平呈显著正相关性^[10, 11]。此外, SSUI 基因在皮肤真菌中不仅介导

SO₂外排机制, 还与降解角蛋白及感染途径有关^[31, 32]。在SSUI 基因突变株中, 其SO₂的耐受性及感染能力均显著下降^[31, 32]。2002 年, Perez-Ortin等^[15]报道了在自然条件下, *S. cerevisiae*群体存在两种基因型(SSUI 和 SSUI-R), 其 SSUI-R 型是在启动子区域, 由 SSUI(16 号染色体)与 ECM34 基因(8 号染色体)通过染色体间重排(Chromosome Rearrangment)形成。进一步的实验表明, SSUI-R 型通过捕获 ECM34 基因 5' 端的启动子, 并经过几次重复后, 获得更多的 FZF1 结合位点, 使其表达水平获得明显的上调^[7, 33]。在构建耐高SO₂的工程菌中, 通过提高SSUI 基因的表达量也是减缓SO₂对细胞毒性的有效途径之一, 如陈叶福等^[10]、沈世超等^[34]通过高表达SSUI 基因可获得抗亚硫酸与抗氧化能力均提高的工程菌株。在自然界中, 不仅只存在对其表达模式的选择, Aa等^[16]的研究表明, SSUI 基因在*S. cerevisiae*酵母菌中有较高的多态性, 且受到正选择的作用。该结论与本研究对群体的MK检验一致, 提示在不同的环境中, 适应性进化不仅作用调控位点上, 同样存在于SSUI 的编码区域。通过Ka/Ks正选择检验, 在群体平均水平上, SSUI 基因总体上是受到纯化选择的作用(Ks=0.00448, Ka=0.00290), 但在不同的个体之间, 存在显著的Ka/Ks大于1的值, 且主要发生在G2中。在G2群体中, 有4株以发酵淀粉类为主的工业菌株(Y9、K11、K7、UC5)为主要用途。而与葡萄发酵相关的菌株广泛分布于3个亚群中, 呈现较高的多态性。如G1(RM11-1a、M1-2、M2-8、M7-8、MMR2-5、Sgu52F、MMW1-15、MMW1-2、Bb32(5)), G2(MMW1-15H1、MMW1-2H1、Fy935a)与G3(MMW1-12、MMR2-3、MMR2-1、Sgu52E、M5-7、ORM1-1)均分离于葡萄园, 在SSUI 基因为杂合子的6株菌株(FostersB、LalvinQA23、MMW1-15、MMW1-2、M5-7、Sgu52E), 4株与葡萄酿造相关(MMW1-15、MMW1-2、M5-7、Sgu52E)。该结果提示, 不同的环境胁迫下, 酵母SSUI 基因可能受到不同程度的选择作用, 如以天然混合酵母菌发酵的葡萄酒中, 保持了酵母群体丰富的多态性; 而在富含淀粉为主的工业菌株中, 自然或人工选择趋向选择并保留具有高SO₂耐受性的酵母菌株, 从而使菌株在发酵前期能保持较高的生长优势, 维持高SO₂浓度下的发酵力。

基于位点正选择及蛋白结构的预测分析, 也暗示在 *ssu1p* 蛋白的结构上, 可能会存在一些关键位点, 在该类位点上的变异将会引起 SO_2 外排能力的差异。在 9 个受到潜在正选择的位点中, 多数分布于通道的骨架上(表 3)。如在 TehA(15G)与 SLAC1 (194G)蛋白中该位点均为保守的甘氨酸(Gly), 而在 *ssu1p* 对应 19 位点上为缬氨酸(Val)与甲硫氨酸(Met)所替代。Chen 等^[35]研究了 TehA 蛋白的 15 位点的甘氨酸替代天冬氨酸(酸性氨基酸)的功能与结构, 其结果表明, 在关键位点上的突变会导致整个通道的阻断, 而丧失运输能力。在 *ssu1p* 蛋白中, 以缬氨酸与甲硫氨酸代替 TehA, SLAC1 中保守的甘氨酸, 从氨基酸性质而言, 3 种氨基酸均属于疏水性氨基酸且等电点 pI 值均相近(Gly: 5.97, Val: 5.97, Met: 5.75)。因此, 我们推断在 *ssu1p* 蛋白的 19 位点缬氨酸与甲硫氨酸的替代, 可能并未引起其功能损伤, 而只是功能的调整。而在 G2 中特有的 4 个多态位点, 均分布于通道外层空间上, 其中 3 个位点为不同性质的氨基酸替换。由于在该蛋白家族中, 不同区域的氨基酸 pKa 值对其维持正常的功能有着重要的作用, 如 Du 等^[36]曾对 SLAC1 蛋白结构不同区域的 pKa 值研究提出, 在该膜蛋白中维持不同层的 pKa 差, 对其 CO_2 的浓缩与传递有着重要的作用。在 *ssu1p* 蛋白中, 也有可能采用相似的转运机制, 而 3 个不同性质的氨基酸替换可能通过该机制引起该蛋白功能的变化。但该假设还有待于我们进一步的实验证据, 对该问题的回答也将有助于对 TDT 家族(如 SLAC1)分子机制的进一步认识。

参考文献(References):

- [1] Divol B, du Toit M, Duckitt E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(3): 601–613. [\[DOI\]](#)
- [2] Hinze H, Holzer H. Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Arch Microbiol*, 1986, 145(1): 27–31. [\[DOI\]](#)
- [3] Hinze H, Holzer H. Effect of sulfite or nitrite on the ATP content and the carbohydrate metabolism in yeast. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1985, 181(2): 87–91. [\[DOI\]](#)
- [4] Schimz KL, Holzer H. Rapid decrease of ATP content in intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* after incubation with low concentrations of sulfite. *Arch Microbiol*, 1979, 121(3): 225–229. [\[DOI\]](#)
- [5] Rankine BC, Pocock KF. Influence of yeast strain on binding of sulphur dioxide in wines, and on its formation during fermentation. *J Sci Food Agric*, 1969, 20(2): 104–109. [\[DOI\]](#)
- [6] Divol B, Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for ‘refermentation’ in *Botrytis*-affected wines. *J Appl Microbiol*, 2006, 100(3): 516–526. [\[DOI\]](#)
- [7] Nardi T, Corich V, Giacomini A, Blondin B. A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene *SSU1* in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 6): 1686–1696. [\[DOI\]](#)
- [8] Engle EK, Fay JC. Divergence of the yeast transcription factor *FZF1* affects sulfite resistance. *PLoS Genet*, 8(6): e1002763. [\[DOI\]](#)
- [9] Sarver A, DeRisi J. Fzf1p regulates an inducible response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(10): 4781–4791. [\[DOI\]](#)
- [10] 陈叶福, 沈世超, 王艳, 肖冬光. *SSU1* 多拷贝表达对酿酒酵母二氧化硫生成量的影响. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1609–1615. [\[DOI\]](#)
- [11] Iijima K, Ogata T. Construction and evaluation of self-cloning bottom-fermenting yeast with high *SSU1* expression. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(6): 1906–1913. [\[DOI\]](#)
- [12] Avram D, Bakalinsky AT. *SSU1* encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1997, 179(18): 5971–5974. [\[DOI\]](#)
- [13] White MA, Clark KM, Grayhack EJ, Dumont ME. Characteristics affecting expression and solubilization of yeast membrane proteins. *J Mol Biol*, 2007, 365(3): 621–636. [\[DOI\]](#)
- [14] Park H, Bakalinsky AT. *SSU1* mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2000, 16(10): 881–888. [\[DOI\]](#)
- [15] Pérez-Ortín JE, Querol A, Puig S, Barrio E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res*, 2002, 12(10): 1533–1539. [\[DOI\]](#)
- [16] Aa E, Townsend JP, Adams RI, Nielsen KM, Taylor JW. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2006, 6(5): 702–715. [\[DOI\]](#)
- [17] Török T, Mortimer RK, Romano P, Suzzi G, Polsinelli M. Quest for wine yeasts—An old story revisited. *J Ind Microbiol*, 1996, 17(3–4): 303–313. [\[DOI\]](#)
- [18] Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, Davey RP, Roberts IN, Burt A, Koufopanou V,

- Tsai IJ, Bergman CM, Bensasson D, O'Kelly MJ, van Oudenaarden A, Barton DB, Bailes E, Nguyen AN, Jones M, Quail MA, Goodhead I, Sims S, Smith F, Blomberg A, Durbin R, Louis EJ. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, 2009, 458(7236): 337–341. [\[DOI\]](#)
- [19] Fay JC, Benavides JA. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*, 2005, 1(1): e5. [\[DOI\]](#)
- [20] Akao T, Yashiro I, Hosoyama A, Kitagaki H, Horikawa H, Watanabe D, Akada R, Ando Y, Harashima S, Inoue T, Inoue Y, Kajiura S, Kitamoto K, Kitamoto N, Kobayashi O, Kuhara S, Masubuchi T, Mizoguchi H, Nakao Y, Nakazato A, Namise M, Oba T, Ogata T, Ohta A, Sato M, Shibasaki S, Takatsume Y, Tanimoto S, Tsuboi H, Nishimura A, Yoda K, Ishikawa T, Iwashita K, Fujita N, Shimoi H. Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7. *DNA Res*, 18(6): 423–434. [\[DOI\]](#)
- [21] Borneman AR, Desany BA, Riches D, Affourtit JP, Forgan AH, Pretorius IS, Egholm M, Chambers PJ. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*, 7(2): e1001287. [\[DOI\]](#)
- [22] Argueso JL, Carazzolle MF, Mieczkowski PA, Duarte FM, Netto OVC, Missawa SK, Galzerani F, Costa GGL, Vidal RO, Noronha MF, Dominska M, Andrietta MG, Andrietta SR, Cunha AF, Gomes LH, Tavares FC, Alcarde AR, Dietrich FS, McCusker JH, Petes TD, Pereira GAG. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Res*, 2009, 19(12): 2258–2270. [\[DOI\]](#)
- [23] Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, 2012, 9(8): 772. [\[DOI\]](#)
- [24] Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, 2003, 52(5): 696–704. [\[DOI\]](#)
- [25] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451–1452. [\[DOI\]](#)
- [26] 林栲, 李海鹏. DNA水平上检测正选择方法的研究进展. *遗传*, 2009, 31(9): 896–902. [\[DOI\]](#)
- [27] Yang ZH. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1586–1591. [\[DOI\]](#)
- [28] Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 2010, 5(4): 725–738. [\[DOI\]](#)
- [29] Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 40. [\[DOI\]](#)
- [30] Schacherer J, Shapiro JA, Ruderfer DM, Kruglyak L. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2009, 458(7236): 342–345. [\[DOI\]](#)
- [31] Hennicke F, Grumbt M, Lermann U, Ueberschaar N, Palige K, Böttcher B, Jacobsen ID, Staib C, Morschhäuser J, Monod M, Hube B, Hertweck C, Staib P. Factors supporting cysteine tolerance and sulfite production in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 2013, 12(4): 604–613. [\[DOI\]](#)
- [32] Grumbt M, Monod M, Yamada T, Hertweck C, Kunert J, Staib P. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(6): 1550–1555. [\[DOI\]](#)
- [33] Yuasa N, Nakagawa Y, Hayakawa M, Iimura Y. Distribution of the sulfite resistance gene *SSU1-R* and the variation in its promoter region in wine yeasts. *J Biosci Bioeng*, 2004, 98(5): 394–397. [\[DOI\]](#)
- [34] 沈世超, 陈叶福, 王艳, 肖冬光. 亚硫酸盐分泌量提高的啤酒酵母基因工程菌株发酵性能研究. *酿酒科技*, 2008, (7): 29–35. [\[DOI\]](#)
- [35] Chen YH, Hu L, Punta M, Bruni R, Hillerich B, Kloss B, Rost B, Love J, Siegelbaum SA, Hendrickson WA. Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature*, 2010, 467(7319): 1074–1080. [\[DOI\]](#)
- [36] Du QS, Fan XW, Wang CH, Huang RB. A possible CO₂ conducting and concentrating mechanism in plant stomata SLAC1 channel. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e24264. [\[DOI\]](#)