

DOI: 10.12264/JFSC2021-0477

豹纹鳃棘鲈酪氨酸酶 *Tyr* 基因家族的结构特征及组织表达分析

肖婕¹, 王梦娅¹, 吴绍轩¹, 汪波², 胡景杰^{1,2}, 包振民^{1,2}

1. 中国海洋大学三亚海洋研究院, 海南省热带水产种质重点实验室, 海南 三亚 572000;
2. 中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: 酪氨酸酶蛋白家族(tyrosinase gene family)是一类调控黑色素合成的关键酶, 在黑色素细胞形成的过程中起着不可替代的作用, 然而 *Tyr* 基因家族在东星斑体色形成中的潜在机制尚不清楚。豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*)俗称东星斑, 是我国重要的热带经济养殖鱼类, 但是人工养殖的东星斑因环境等变化而逐渐出现体色变淡或者变黑的现象, 严重影响其品质和经济价值。本研究从东星斑全基因组中共筛选鉴定获得 5 个 *Tyr* 基因家族成员, 氨基酸序列比对结果显示不同物种间的同源基因保守性较高, 尤其是 *Tyr* 家族典型的酪氨酸酶功能域在不同物种各成员之间均具有高度保守性。系统发育和共线分析均显示东星斑 *Tyr* 基因家族进化过程中存在基因复制和丢失现象。此外, 荧光定量 PCR 结果表明 *Tyr* 基因家族所有成员在东星斑黑色个体的皮肤组织中表达量均显著高于红色个体($P < 0.05$)。本研究初步鉴定和分析了东星斑 *Tyr* 基因家族在其体色形成中的作用, 旨在深入解析东星斑酪氨酸酶蛋白基因家族的进化及功能机制提供依据。

关键词: 豹纹鳃棘鲈; 酪氨酸酶基因家族; 进化分析; 表达差异

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)05-0653-12

鱼类作为种类最多的脊椎动物类群之一, 有着丰富的颜色和花纹, 这不仅是一种重要的表型性状, 也是一种独特的经济特征, 为研究色素富集和体色形成等提供了良好的生物模型^[1]。不同种类的色素细胞在体表的聚集是导致鱼类体色多样的重要因素。到目前为止, 起源于神经嵴细胞的黑色素细胞是被研究得最广泛的色素细胞, 在神经和激素的双重调节下, 它可以使黑色素颗粒向细胞核聚拢或分散到树突状结构中, 表现出着色的深浅^[2]。动物黑色素细胞的发生发育受黑色素合成相关基因的调控, 其中, 酪氨酸酶蛋白家族(tyrosinase gene family)在动物皮肤和毛发的黑色素形成中发挥着重要作用^[3]。该家族的成员属于 3-型金属蛋白(type-3copper)超家族, 均具有一

对保守的金属离子结合结构域, 是催化 EGF_like motif 所必需的, 这可能与黑素小体内 3 种蛋白质形成的多酶复合物有关, 且每个结构域都是由 3 个保守的组氨酸(His)共同协调^[4]。此外, 该家族成员在近端启动子区都有一段高度保守的 M-box 调控元件, 这是家族成员表达蛋白所必需的区域, 并且在 M-box 区域中存在一段保守序列 E-box, 它是色素细胞特异性基因表达的关键调控区域^[5]。

酪氨酸酶基因家族成员广泛存在于真核和原核生物中, 是一类编码黑色素合成关键酶的基因, 该家族主要包含 3 个成员, 即酪氨酸酶(*Tyr*)、酪氨酸相关蛋白酶 1(*Tyrp1*)和酪氨酸相关蛋白酶 2(*Tyrp2*)^[6]。其中, *Tyr* 基因是头索动物-脊椎动物分化前祖先酪氨酸酶基因在复制过程中产生的一

收稿日期: 2021-10-29; 修订日期: 2021-12-16.

基金项目: 海南省重点研发计划项目(ZDYF2021 XDNY133); 三亚崖州湾科技城管理局项目(SKJC-KJ-2019 KY01, SKJC-2020-02-009).

作者简介: 肖婕(1997-), 女, 硕士研究生, 鱼类遗传育种. E-mail: xiaojie199792@163.com

通信作者: 汪波, 讲师, 主要从事海水鱼类的人工繁育. E-mail: wb@ouc.edu.cn;

胡景杰, 教授, 主要从事热带海洋生物遗传学、种质资源评价与开发、良种培育. E-mail: hujingjie@ouc.edu.cn

个单一基因,随后 *Tyr* 基因发生复制产生了 *Tyrp1* 和 *Tyrp2* 基因^[7]。研究人员已在多个物种中成功鉴定和分离出酪氨酸酶蛋白家族成员^[8]。例如, *Tyrp1* 是酪氨酸蛋白酶家族中第一个从小鼠(*Mus musculus*)中克隆获得的黑色素生成酶^[9],随后 *Tyrp2* 在小鼠^[10]和人类(*Homo sapiens*)^[11]中也被鉴定和克隆,且两者的氨基酸序列高度同源。作为酪氨酸蛋白酶家族成员,它们在体内参与催化 L-酪氨酸羟基化的一系列生化反应过程,是黑色素合成过程中重要的蛋白酶^[3]。其中, *Tyr* 是黑色素合成起始过程中的一种关键的限速酶,其转录的提前终止会导致黑色素无法合成而造成白化现象。*Tyrp2* 是在产生黑色素的最后几步中起催化作用,它虽然不是使色素生成量增加的蛋白酶,但是它可以保护黑色素细胞。*Tyrp1* 虽然与 *Tyr*、*Tyrp2* 基因结构相似,但是它在黑色素生成中的作用还没有定论,目前普遍认可 *Tyrp1* 有着稳定 *Tyr* 功能的作用^[6]。广泛存在的酪氨酸酶基因家族在临床医学研究、畜牧生产等方面都有研究报道^[12]。在羊驼(*Vicugna pacos*)的研究表明, *Tyr*、*Tyrp1* 和 *Tyrp2* 基因在棕色羊驼中 mRNA 表达水平平均比白色羊驼高,表明酪氨酸酶蛋白家族的基因成员表达量与其毛色表型显著相关^[13]。另外, Iwata 等^[14]研究发现黑皮肤中的酪氨酸酶活性远高于白皮肤,酪氨酸酶活性的差异可能不仅是黑色素细胞中参与黑色素合成酶数量的差异,还有可能是与酪氨酸酶的催化活性相关。

与四足类动物相比,由于硬骨鱼经历了特异性全基因组复制(teleost-specific whole-genome duplication),使得黑色素合成途径中的大部分基因在硬骨鱼中发生了扩张现象^[15]。多数硬骨鱼中存在 *Tyr* 和 *Tyr-like* 两种 *Tyr* 的同源基因,另外, *Tyrp1* 在硬骨鱼中也存在 *Tyrp1a* 和 *Tyrp1b* 两个亚型^[16],导致大多数硬骨鱼中有关黑色素合成的基因比四足类动物多。但是复制基因的保留方式存在种间差异,在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中鉴定到 3 个参与黑色素生成、酪氨酸代谢途径调控的基因差异表达基因,其中包括 *Tyr*、*Tyrp1* 和 *Tyr-like*^[17]。而在斑马鱼(*Danio rerio*)中只检测到 1 个 *Tyr* 基因, *Tyr-like* 基因缺失^[15]。在红鳍东

方鲀(*Takifugu rubripes*)中分离并鉴定出 *Tyr*、*Tyr-like*、*Tyrp1a* 和 *Tyrp2* 四个酪氨酸酶蛋白家族成员,没有鉴定到 *Tyrp1b* 基因。另外, *Tyrp2* 在已鉴定的硬骨鱼中以单拷贝的形式存在^[18]。已有研究表明,斑马鱼 *Tyrp2* 基因可作为其黑色素细胞早期的标记基因^[19]。在青鳉(*Oryzias latipes*)中, *Tyr* 基因转移到白化突变体的受精卵中,获得了体色着色的转基因个体^[20]。利用 CRISPR/Cas9 技术将 *Tyr* 基因的 Cas9 mRNA 和 gRNA 注射到橙红色青鳉鱼个体的胚胎中,突变体中的色素细胞大量减少,成功获得白化个体^[21]。在斑马鱼和瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)白皮黑斑品系(WB)中,利用 CRISPR/Cas9 系统对其 *Tyrp1* 基因进行破坏,突变体 *Tyrp1* 基因功能丧失表明其皮肤中存在严重的黑色素缺乏。同时,研究发现单个 *Tyrp1* 基因的失活并没有阻碍黑色素的合成,证明了 *Tyrp1* 基因在斑马鱼和瓯江彩鲤中都存在功能冗余^[22]。酪氨酸蛋白酶的活性与鱼类体色密切相关,体色鲜艳鱼类更能满足消费者的需求,因此解决鱼类体色变异问题对水产养殖物种具有重要价值。

豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*)俗称东星斑,属于鲈科(Serranidae)鳃棘鲈属,在自然海域中外观呈现鲜红色或亮橘色,全身布满蓝色、蓝白色的圆点或椭圆形点,体色鲜亮,市面上很受欢迎且需求量较大。但是其养殖个体体色暗淡,呈现黑棕色或者黑色,严重影响其经济价值,所以对东星斑体色的研究具有重要的经济价值和理论意义^[23]。*Tyr* 基因家族作为影响体色、毛发等黑色素沉积的关键基因,在四足类动物中已经有很多研究,但是有关东星斑 *Tyr* 基因家族的研究相对缺乏。本研究使用生物信息学的方法在全基因组中对东星斑 *Tyr* 家族基因鉴定和分析,并结合实时荧光定量检测了这一家族基因在不同体色个体中的表达差异,为其在体色调控的功能研究中提供参考。

1 材料与方 法

1.1 *Tyr* 基因家族成员的鉴定及理化性质分析

为鉴定东星斑 *Tyr* 基因家族成员的相关信息,

通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)网站和 UniProt (<https://www.uniprot.org/>)网站联合检索到部分四足类和硬骨鱼 *Tyr* 基因家族的氨基酸序列, 并通过本地服务器进行 BLAST 比对, 筛选出东星斑基因组中 *Tyr* 基因家族成员的基因序列。

从 pep 文件中查找有关于东星斑 *Tyr* 基因家族的氨基酸序列, 利用 ExPASy 在线分析软件 (<https://web.expasy.org/>)中的 ProtParam 选项, 预测东星斑 *Tyr* 蛋白家族的氨基酸数目、ORF 长度、相对分子质量、等电点等蛋白质基本理化性质。根据东星斑的 GFF 基因注释文件, 获得 *Tyr* 基因家族成员的染色体位置信息。此外, 利用 Wolf 在线软件 (<https://wolfsort.hgc.jp/>)对东星斑 *Tyr* 基因家族进行亚细胞定位。

1.2 基因结构分析

为分析东星斑 *Tyr* 基因家族各个成员的基因结构, 根据东星斑的 GFF 基因注释文件, 得到基因序列的相关信息, 使用在线工具 GSDS (Gene Structure Display Server 2.0) (<http://gsds.gao-lab.org/>)对外显子和内含子结果进行数据分析, 得出东星斑 *Tyr* 基因家族成员的基因结构特征可视化图, 并比较 *Tyr* 基因家族成员之间基因结构。

1.3 *Tyr* 基因家族蛋白结构域分析

利用 SMART 在线网站 (<http://smart.embl.de/>), 选择 PFAM domain 选项, 基于序列同源性确定保守区域对东星斑蛋白序列进行结构域预测, 并使用 IBS 软件画出东星斑 *Tyr* 基因家族蛋白结构域的可视化结果, 进行基因家族成员间的结构域对比。此外, 将东星斑与其他硬骨鱼以及四足类动物的 *Tyr* 基因家族在 MEGEX 中生成的 alignment 文件导入 GeneDoc 软件中, 生成氨基酸多序列可视化对比结果。

1.4 *Tyr* 家族基因进化分析

将东星斑 *Tyr* 基因家族成员与四足类动物: 人、小鼠、鸡 (*Gallus gallus*)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)和硬骨鱼: 龙胆石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、秀美花鳉 (*Poecilia formosa*)、红鳍东方鲀、斑点雀

鳉 (*Lepisosteus oculatus*)、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)、月光鱼 (*Xiphophorus maculatus*)的 *Tyr* 基因家族的蛋白序列全长构建系统发育树。使用 Ensemble (<https://asia.ensembl.org>)和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)获取以上物种的氨基酸序列, 保存为 fasta 格式, 并将结果导入 MEGAX (Molecular evolutionary genetics analysis)软件中, 使用软件中的 ClustalW 进行多序列比对, 再采用 NJ 邻接树法 (neighbor-joining) 构建, 设置自展值 (Bootstrap) 为 10000 次重复以检测其可信度, 其余参数为默认模式, 分析得出系统进化结果。

1.5 基因共线性分析

为了确定 *Tyr* 基因家族的基因复制事件, 本研究对所选择物种的 *Tyr* 家族成员进行共线性分析。首先利用 Genomicus 在线网站 (<https://www.genomicus.bio.ens.psl.eu>)查找不同物种目的基因的上下游基因的排列顺序, 并结合 NCBI 网站中的 gene 选项确认 *Tyr* 基因家族成员所在染色体的上下游基因的名称、方向和定位。同时根据它们在染色体上的相对位置, 绘制出目的基因所在染色体上下游基因相对分布位置, 对多个物种之间基因的共线性进行分析。

1.6 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

随机选取 100 日龄的红、黑体色的东星斑各 3 尾, 取与黑色素调控或合成相关的 4 个组织, 皮肤、脑、肠和肝脏, 使用 Trizol 试剂 (Invitrogen, CA, 美国)提取总 RNA, 使用 RNase-free DNaseI (TaKaRa, Dalian, 中国)处理以除去基因组 DNA。采用微量分光光度计 (Implen, Munich, 德国)和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和完整性。在反应体系中加入 1 μg RNA 和 1 μL Random Primer, 补水至 6 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 冰上急冷 2 min, 离心数秒。随后使用 M-MLV 反转录酶 (TaKaRa, Dalian, 中国)合成 cDNA 第一链。反应在 PCR 仪中进行, 程序如下: 30 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 72 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; 冰上冷却。合成的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.7 荧光定量 PCR 检测东星斑目的基因的组织特异性表达

利用 IDT 在线网站 (<https://sg.idtdna.com/>), 根

据所获得的东星斑目的基因 cDNA 序列设计荧光定量 PCR 所需的正反向引物, 并以 *Rpl13* 为内参基因(表 1)^[24], cDNA 为模板进行荧光定量 PCR, 各组织均选取 3 个平行的实验个体, 每个实验个体重复 3 次。程序如下: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 58 °C 退火 1 min, 35 个循环, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算东星斑实验样本中的 *Tyr* 基因家族各个成员的相对表达量, 采用 SPSS18.0 软件对数据进行单因素方差分析与显著性检验。

2 结果与分析

2.1 东星斑 *Tyr* 基因家族成员的鉴定及理化性质

共鉴定到 5 个东星斑 *Tyr* 基因家族成员, 分别为 *Tyr*、*Tyr-like*、*Tyrp1a*、*Tyrp1b*、*Tyrp2*, 5 个基因分别分布在不同的染色体上, *Tyr* 基因家族的开放阅读框范围为 1551~1623 aa, 等电点分布在

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR

基因 gene	引物序列(5'—3') primer sequence (5'—3')
<i>Tyr</i>	F: GACCGTAGCAGAGAGAGATT R: CACGAGCACACAGAGAATAC
<i>Tyr-like</i>	F: CGTGATGACAGAGAGAGGT R: ATCACAGTTCGGTCCAGT
<i>Tyrp1a</i>	F: CAGGCTTACAAGATGGAAGG R: TCAAGAATCTACACATGCTCTC
<i>Tyrp1b</i>	F: GTCCGAGATCATCACCATTG R: TAGACAACGGACTGTGATTTG
<i>Tyrp2</i>	F: GACCGTAGCAGAGAGAGATT R: CACGAGCACACAGAGAATAC

注: F—正义链引物; R—反义链引物。

Note: F—Sense primer; R—Antisense primer.

5.44-5.94, 相对分子质量范围为 57.7~61.4 kD, 氨基酸数目在 516~540 (表 2)。

表 2 东星斑 *Tyr* 基因家族信息

Tab. 2 Information of *Tyr* gene family in *Plectropomus leopardus*

基因 gene	染色体位置 chromosome location	ORF 长度/bp ORF length	氨基酸数目 amino acid number (aa)	分子量/D relative molecular weight	等电点 pI	亚细胞定位 subcellular localization
<i>Tyr</i>	Chr 6: 24897028-24901162	1623	540	61273.06	5.94	细胞膜 cell membrane
<i>Tyr-like</i>	Chr 16: 21176168-21184962	1620	539	61356.97	5.78	细胞膜 cell membrane
<i>Tyrp1a</i>	Chr 23: 13006267-13010531	1578	525	58913.03	5.44	细胞膜 cell membrane
<i>Tyrp1b</i>	Chr 4: 7637550-7645815	1569	522	58228.45	5.50	细胞膜 cell membrane
<i>Tyrp2</i>	Chr 8: 17261397-17261397	1551	516	57764.29	5.59	细胞膜 cell membrane

2.2 东星斑 *Tyr* 基因家族结构

东星斑 *Tyr* 家族成员的基因结构显示(图 1), *Tyr* 包含 5 个外显子, 4 个内含子; *Tyr-like* 包含 5 个外显子, 5 个内含子; *Tyrp1a* 包含 7 个外显子, 6 个内含子; 而 *Tyrp1b* 和 *Tyrp2* 都包含 8 个外显子, 7 个内含子。

2.3 东星斑 *Tyr* 基因家族蛋白结构域

东星斑 *Tyr* 基因家族成员结构域的多序列分

析比对结果显示, 它们都属于典型的酪氨酸酶蛋白家族, 且蛋白结构中存在多个保守区域(图 2)。每个家族成员都含有一个酪氨酸酶结构域和一个完整的跨膜螺旋结构域, 预测结构显示只有东星斑 *Tyr* 蛋白在 65~113 氨基酸有 EGF_like 结构域, 其余家族成员均没有此结构域。此外, *Tyr* 基因家族的五个成员在整个氨基酸序列的其他位置上也存在多个保守区域, 包括 N-末端信号肽、两个组

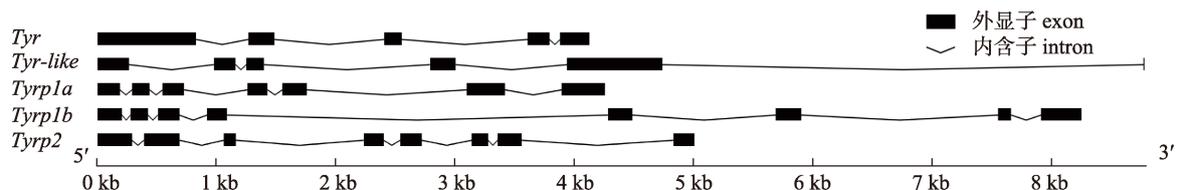
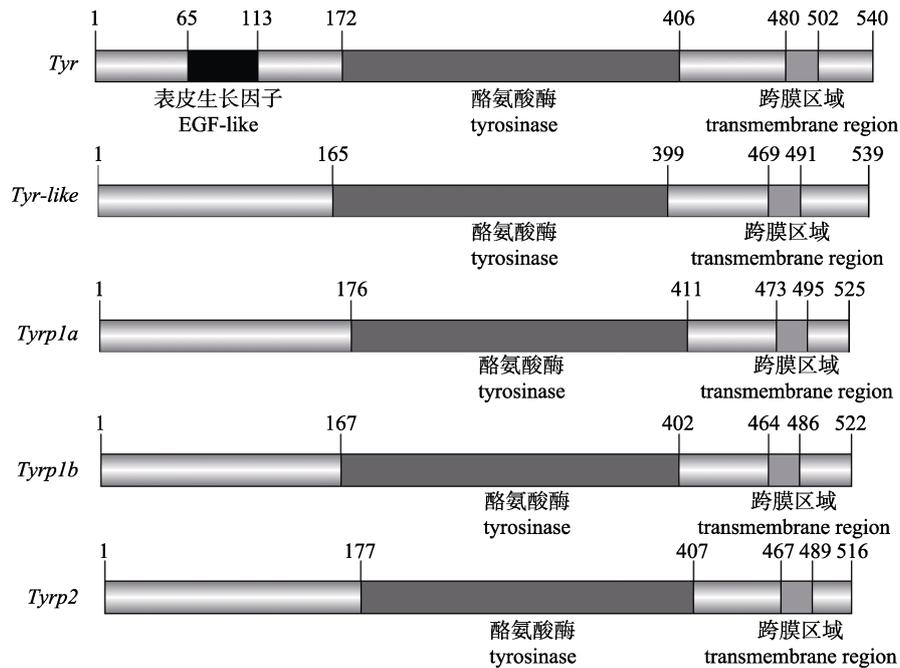


图 1 东星斑 *Tyr* 基因家族外显子-内含子结构示意图

Fig. 1 Exon-intron structure of *Tyr* genes in *Plectropomus leopardus*

图 2 东星斑 *Tyr* 基因家族的结构域结构Fig. 2 Domain structure of *Tyr* genes of *Plectropomus leopardus*

氨酸结构域, 结合金属离子 Me(A)和 Me(B)等(图 3)。所有重要的结构和功能结构域在鱼类酪氨酸酶蛋白家族中都是保守的^[8]。

2.4 东星斑 *Tyr* 基因系统进化分析

东星斑与四足类和其他硬骨鱼 *Tyr* 基因家族的系统进化结果显示(图 4), 脊椎动物的 *Tyr* 基因家族被划分为 2 个大分枝, *Tyr* 亚家族和 *Tyrp* 亚家族。*Tyr* 亚家族分成了两个分枝, *Tyr* 基因分枝和硬骨鱼聚集成的 *Tyr-like* 基因分枝。在 *Tyrp* 基因分枝中, 硬骨鱼 *Tyrp1a* 和 *Tyrp1b* 先聚为一枝, 随后与四足类 *Tyrp1* 聚成一枝, 最后与 *Tyrp2* 基因分枝聚成 *Tyrp* 亚家族。在各 *Tyr* 基因分枝中, 硬骨鱼与四足类分别聚为一枝, 东星斑与硬骨鱼聚成一枝, 与物种的进化地位相一致。此外, 硬骨鱼 *Tyrp1* 基因分别聚类为 *Tyrp1a* 和 *Tyrp1b* 两枝的现象表明这两个基因的起源与硬骨鱼类的第 3 次全基因组复制事件相关。

2.5 东星斑 *Tyr* 基因家族共线性分析

东星斑与四足类动物以及硬骨鱼的 *Tyr* 基因家族成员的染色体共线性结果得出, 除斑点雀鳉、红鳍东方鲀、龙胆石斑以外, 其他硬骨鱼包含所有 *Tyr* 基因家族成员, 即 *Tyr*、*Tyr-like*、

Tyrp1a、*Tyrp1b*、*Tyrp2*; 人、小鼠、鸡和唯一没有发生基因复制的硬骨鱼斑点雀鳉有 *Tyr*、*Tyrp1*、*Tyrp2* 三个成员。除此之外, 所分析的不同物种的 *Tyr* 基因家族成员均分布在不同的染色体上(图 5)。在硬骨鱼中, *Tyr* 家族(除 *Tyrp2* 外)基因的共线性与四足类的保守性较差。

在 *Tyr* 基因家族成员的进化过程中, 大多数硬骨鱼 *Tyr* 和 *Tyrp* 祖先基因发生了复制事件, 并且复制基因所在的染色体分别保留和丢失了部分原始染色体上的基因。以 *Tyr* 和 *Tyr-like* 基因为例(图 5A), 在斑点雀鳉 LG3 染色体上, *Tyr* 的上游基因分别是 *Grm5b*、*Ctsc*、*Rab38b*、*Tmen135*、*Fzd4*、*Dync2h1*、*Pdgfd*, 下游基因分别是 *Nox4*、*Naalad2*、*Chordc1b*、*Fat3a*、*Mtnr1bb*。在复制事件发生后的东星斑 *Tyr* 基因的上下游保留了 *Grm5b*、*Ctsc*、*Rab38b*、*Fzd4*、*Dync2h1*、*Pdgfd*、*Nox4*、*Naalad2* 基因位于在 6 号染色体, *Chordc1b*、*Fat3a*、*Mtnr1bb* 等被保留在 *Tyr-like* 基因的上下游, 在 16 号染色体上, 而 *Tmen135* 在复制过程中发生丢失。硬骨鱼的 *Tyrp2* 基因所在的染色体均缺失 *Gpr180* 和 *Tgds* 两个基因, 其他基因与四足类动物 *Tyrp2* 基因的上下游基因在染色体上存在较好的共线性。

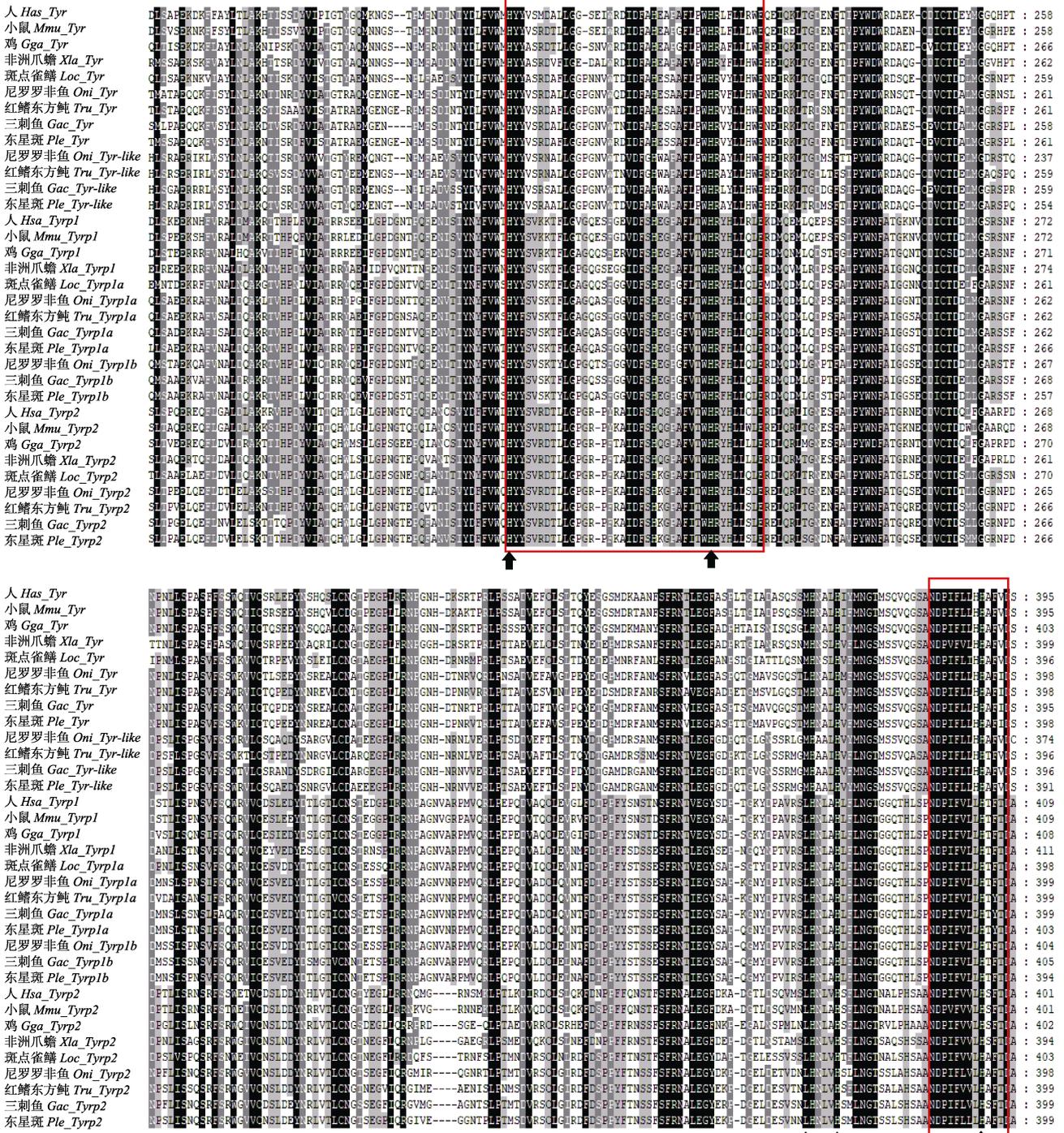


图 3 东星斑 Tyr 基因家族与其他脊椎动物的氨基酸序列比对

用黑色底纹和灰色底纹表示 100%和 75%的氨基酸残基相似度；图中显示的序列为东星斑酪氨酸酶蛋白家族中典型的酪氨酸酶结构域，其中，红色方框内的氨基酸分别表示金属离子结合区域 Me(A)和 Me(B)；箭头表示 6 个保守的组氨酸位点。

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of Tyr genes in *Plectropomus leopardus* with other vertebrates. Black shading and gray shading were used to represent 100% and 75% similarity of amino acid residues. The sequence shown in the figure is a typical tyrosinase domain in the Tyr genes of *Plectropomus leopardus*. Among them, the amino acids in the red box are represented as copper ion binding regions Me(A) and Me(B) respectively; the arrows represent six conserved histidine sites.

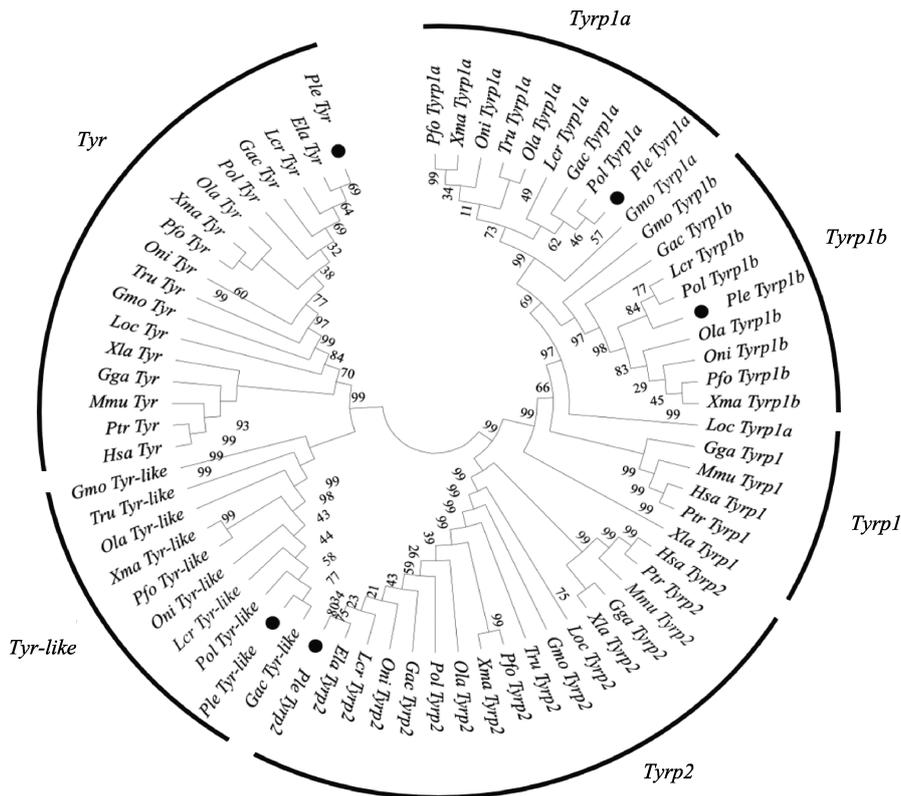


图 4 东星斑与其他脊椎动物 *Tyr* 基因家族系统进化树分析
东星斑 *Tyr* 基因家族用黑点表示。

Has: 人; *Mmu*: 小鼠; *Gga*: 鸡; *Ptr*: 黑猩猩; *Xla*: 非洲爪蟾; *Ela*: 龙胆石斑鱼; *Lcr*: 大黄鱼; *Gac*: 三刺鱼; *Pol*: 牙鲆;
Oni: 尼罗罗非鱼; *Ola*: 青鳉; *Pfo*: 秀美花鲈; *Tru*: 红鳍东方鲀; *Loc*: 斑点雀鳉; *Gmo*: 大西洋鳕; *Xma*: 月光鱼。

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of *Tyr* genes in *Plectropomus leopardus* with other vertebrates
Tyr genes in *Plectropomus leopardus* are marked with black spots. *Has*: *Homo sapiens*; *Mmu*: *Mus musculus*; *Gga*: *Gallus gallus*;
Ptr: *Pan troglodytes*; *Xla*: *Xenopus laevis*; *Ela*: *Epinephelus lanceolatus*; *Lcr*: *Larimichthys crocea*; *Gac*: *Gasterosteus aculeatus*;
Pol: *Paralichthys olivaceus*; *Oni*: *Oreochromis niloticus*; *Ola*: *Oryzias latipes*; *Pfo*: *Poecilia formosa*; *Tru*: *Takifugu rubripes*;
Loc: *Lepisosteus oculatus*; *Gmo*: *Gadus morhua*; *Xma*: *Xiphophorus maculatus*.

2.6 东星斑 *Tyr* 基因家族红黑个体差异表达分析

qRT-PCR 检测结果显示, *Tyr* 基因家族所有成员在红、黑东星斑个体的脑、皮肤、肠、肝组织中均有表达(图 6)。家族成员在脑组织中均具有较高的表达水平, *Tyr* 和 *Tyrp2* 基因在黑色个体的肝组织中高表达, 而 *Tyr-like* 和 *Tyrp1b* 基因在除脑外的其它组织中表达量都相对较低。此外, 我们发现 *Tyr* 基因家族所有成员在黑色个体的皮肤中的表达量都显著高于红色个体, 且在肠组织中表达相对较低。除 *Tyrp1a* 基因外, 其余家族成员在黑色个体的肝脏组织中的 mRNA 表达水平都显著高于红色个体。*Tyr*、*Tyr-like* 和 *Tyrp2* 基因在红色个体的脑组织中的 mRNA 表达水平都显著高于黑色个体。

3 讨论

黑色素是动物界中最重要的色素之一, 它具有光吸收、光保护以及皮肤色素沉着等功能^[25], 其生物合成过程主要是由酪氨酸酶和其相关蛋白酶调控, 所以酪氨酸蛋白酶家族的表达水平直接影响了东星斑的体色。*Tyr* 基因家族几乎存在于所有真核和原核生物中, 但不同物种中其成员数有所差异。本研究在东星斑中共鉴定到了 5 个 *Tyr* 基因家族成员, 即 *Tyr*、*Tyr-like*、*Tyrp1a*、*Tyrp1b*、*Tyrp2*, 其中 *Tyr-like* 和 *Tyrp1b* 仅在部分硬骨鱼中存在, 在四足类动物中却未发现。这种差异可能是由于硬骨鱼的特异性基因组复制引起的, 许多基因在四足类动物以及斑点雀鳉中仅有 1 个拷贝,

而在大多数硬骨鱼中存在两个或多个基因拷贝，并且基因的复制和保留方式不同^[15, 26]。

在本研究中，9 种硬骨鱼中都存在 *Tyr-like* 基

因，7 种硬骨鱼具有 *Tyr1b* 基因，而四足类动物中均不存在这两个基因。在人类及大猩猩(*Gorilla*)中虽然存在 *Tyr-like* 基因位点，但它们是缺乏外显

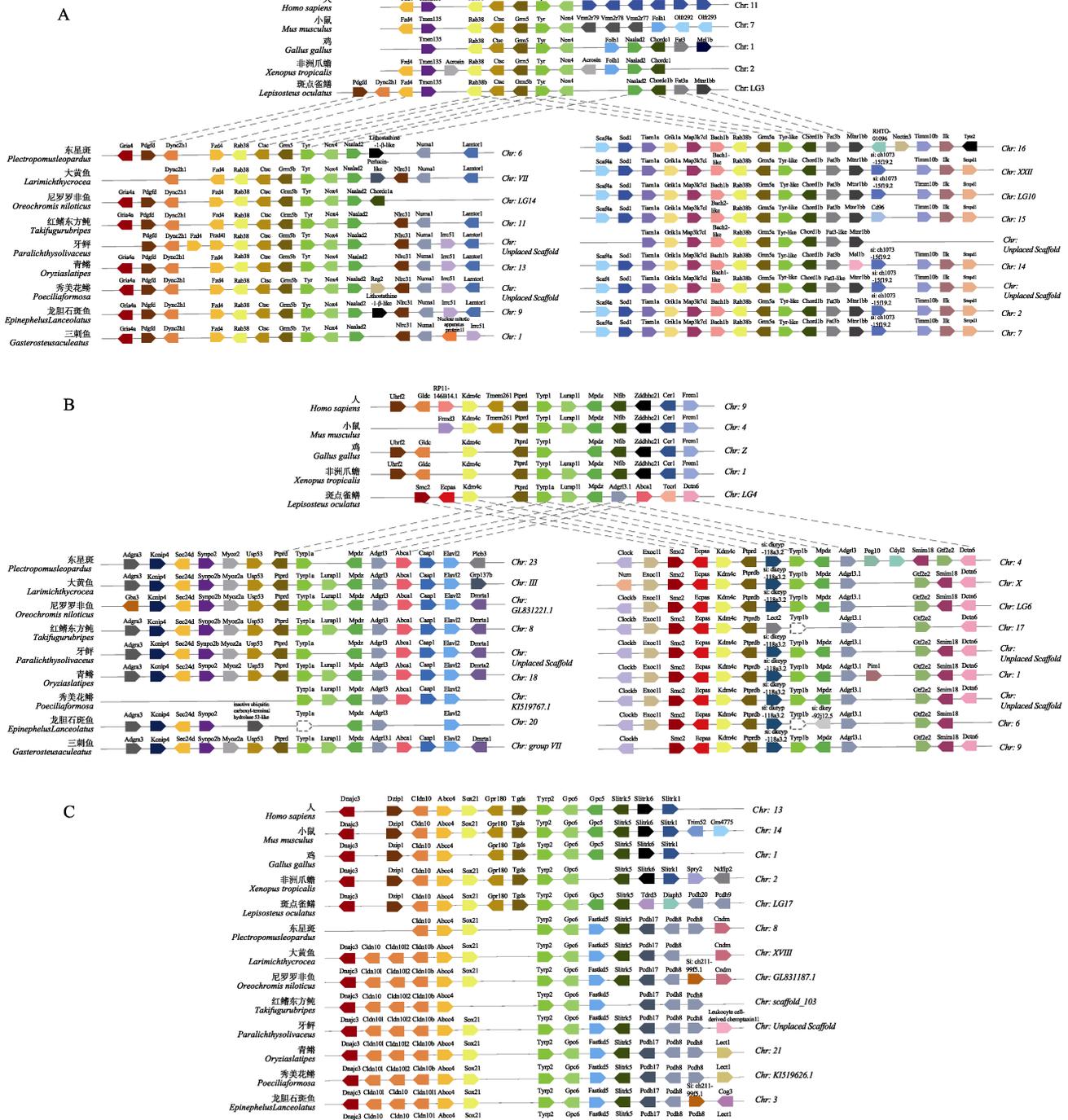


图 5 东星斑与其他动物之间 *Tyr* 基因家族的共线性分析

基因由彩色五边形表示，基因名称显示在顶部；相同颜色的五边形表示不同物种间同一基因或同源基因；五边形的方向表示与参考基因相比的基因方向；虚线框表示丢失的基因。

Fig. 5 Synteny analysis of *Tyr* genes between *Plectropomus leopardus* and other animals

Genes were represented by colored pentagons, and the gene names were indicated on top. The same colored pentagons indicated the same gene in different species or homologous gene. Dashed boxes represented genes that were lost.

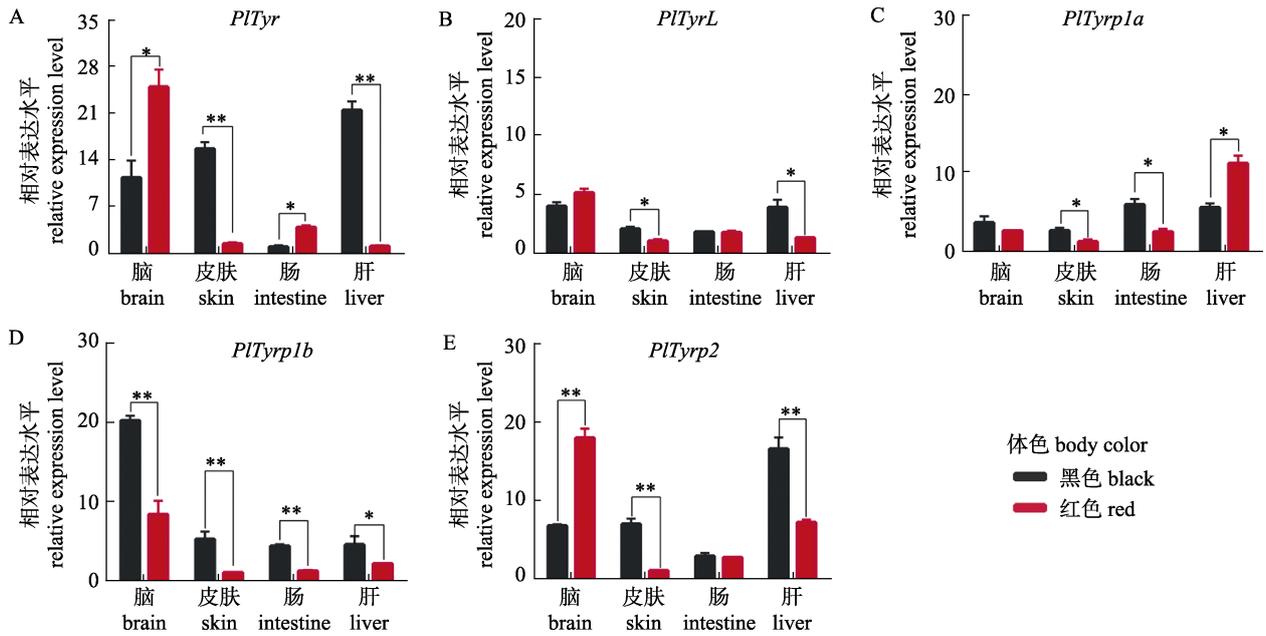


图 6 *Tyr* 基因家族在东星斑红黑个体的差异表达

A: *Tyr*, B: *Tyr-like*, C: *Tyrp1a*, D: *Tyrp1b*, E: *Tyrp2*.

“*”表示显著性 $P < 0.05$, “**”表示显著性 $P < 0.01$.

Fig. 6 Differential expression of *Tyr* genes in red and black individuals of *Plectropomus leopardus*

A: *Tyr*, B: *Tyr-like*, C: *Tyrp1a*, D: *Tyrp1b*, E: *Tyrp2*;

“*” indicates significance $P < 0.05$ and “**” indicates significance $P < 0.01$.

子 I、II、III 序列的假基因^[27]。系统进化树显示, 不同物种相同基因成员亲缘关系有一定的差异。东星斑 *Tyr* 基因家族成员的氨基酸序列同龙胆石斑鱼、大黄鱼、牙鲆等硬骨鱼类的相似性最高, 亲缘关系最近, 与人、小鼠等四足类动物相似性较低, 亲缘关系较远。基因共线性结果也进一步验证了 *Tyr* 基因家族在四足类和硬骨鱼中的起源和进化关系。这一结果与斑马鱼 7 号和 1 号染色体上的 *Tyr* 家族基因 *Tyrp1a* 和 *Tyrp1b* 与人类位于 9 号染色体上的 *Tyrp1* 基因在染色体位置上具有保守性的结果相一致^[15, 28], 均是经历了硬骨鱼特有的全基因组复制过程, 由祖先染色体复制产生, 因此 *Tyrp1a* 和 *Tyrp1b* 均与哺乳类动物的基因同源。从图 5B 中可以看出硬骨鱼在其进化过程中保守性相对较高, 可以在不同硬骨鱼之间直观地找到前后对应的基因, 不同硬骨鱼间存在较高的基因共线性, 但是同时也存在基因缺失现象。例如, 在红鳍东方鲀和龙胆石斑鱼中均发生了 *Tyrp1b* 基因缺失现象。基因扩张导致表型性状变化, 从而驱动适应性进化过程^[29]。由于硬骨鱼特

异性全基因组加倍产生的复制基因在进化过程中可能经历不同的命运, 比如亚功能化, 祖先基因的功能在同源基因复制之后, 两个基因分别发生功能分化具有各自的特征功能; 或者新功能化, 其中一个基因维持原有功能, 另一个基因获得进化产生新的功能^[30]。因此, 东星斑 *Tyr-like* 和 *Tyrp1b* 基因是硬骨鱼特异性全基因组复制而产生的同源基因, 从进化距离、共线性分析以及东星斑蛋白质结构综合方面来看, 它们的功能分别更接近 *Tyr* 基因和 *Tyrp1* 基因。

色素细胞分布在真皮、表皮和神经血管中, 不同色素细胞的比例会导致鱼类呈现不同的体色^[31]。本实验分析了东星斑黑色素调控关键基因家族 *Tyr* 家族成员的 RNA 表达谱, 发现东星斑同锦鲤(*Cyprinus carpio*)以及其他鱼类类似^[26], *Tyr* 基因家族成员在红黑个体的多个组织中均有表达, 且多个 *Tyr* 基因在黑色个体中的表达量要显著高于红色个体。这表明 *Tyr* 基因家族的表达量与体色相关, 并且在色素沉积的过程中起到重要调控作用, 促进了黑色素的合成与沉积。另外, 已有研

究表明 *Tyr* 家族基因在物种间的不同组织中有着不同的表达模式。例如, 橘色双冠丽鱼(*Amphiphys citrinellus*)的 *Tyr* 基因在眼、鳃、尾鳍、鳃和肉中都显示出较高的表达量, 但是在心、肾、脑和皮肤等组织有表达量极少^[32]。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)也有类似的研究结果, *Tyrp1a* 和 *Tyrp2* 基因在背部皮肤中的表达程度显著高于其他组织^[1]。同样, 本研究定量结果显示 *Tyr* 基因家族成员在东星斑多个组织中均有表达, 且组织间存在显著差异。*Tyr* 基因家族成员在脑和肝脏组织中的表达显著高于在皮肤和肠组织中表达, 在黑色个体中尤为明显, 这可能与脑部参与神经调控黑色素合成相关。以上结果均表明, *Tyr* 基因家族在黑色素的合成过程中起到重要作用, 其表达水平与其体色密切相关, 是鱼类体色形成的重要调控因子^[1]。

本研究鉴定了东星斑 *Tyr* 基因家族成员, 进行了相关生物信息学分析, 并对其在不同组织中的表达进行了检测。研究结果不仅为进一步深入研究东星斑 *Tyr* 基因家族的功能提供证据, 同时也为东星斑的体色研究提供基础资料。

参考文献:

- [1] Wu S J, Huang J Q, Li Y J, et al. Cloning, sequence analysis, and expression of *tyrp1a* and *tyrp2* genes related to body colour in different developmental stages and tissues of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29(3): 941-961.
- [2] Rawls J F, Mellgren E M, Johnson S L. How the zebrafish gets its stripes[J]. *Developmental Biology*, 2001, 240(2): 301-314.
- [3] Wang J Q, Hou L, Zhang R F, et al. The tyrosinase gene family and albinism in fish[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2007, 25(2): 191-198.
- [4] Aguilera F, McDougall C, Degnan B M. Evolution of the tyrosinase gene family in bivalve molluscs: Independent expansion of the mantle gene repertoire[J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(9): 3855-3865.
- [5] Goding C R. Mitf from neural crest to melanoma: Signal transduction and transcription in the melanocyte lineage[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(14): 1712-1728.
- [6] Solano F. On the metal cofactor in the tyrosinase family[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 633.
- [7] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.
- [8] Camacho-Hübner A, Richard C, Beermann F. Genomic structure and evolutionary conservation of the tyrosinase gene family from Fugu[J]. *Gene*, 2002, 285(1-2): 59-68.
- [9] Shibahara S, Torrita Y, Sakakura T, et al. Cloning and expression of cDNA encoding mouse tyrosinase[J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(6): 2413-2427.
- [10] Jackson I J, Chambers D M, Tsukamoto K, et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus[J]. *The EMBO Journal*, 1992, 11(2): 527-535.
- [11] Yokoyama K, Yasumoto K, Suzuki H, et al. Cloning of the human DOPAchrome tautomerase/tyrosinase-related protein 2 gene and identification of two regulatory regions required for its pigment cell-specific expression[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(43): 27080-27087.
- [12] Xu W, Feng J Q, Huang L, et al. Research progress on TYR gene[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2017, 53(4): 23-27. [徐伟, 封竣淇, 黄兰, 等. TYR 基因研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(4): 23-27.]
- [13] Gao L, Dong C S, He X Y, et al. Gene expression levels of alpaca tyrosinase gene family in individuals of different colors[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2008, 39(7): 895-899. [高莉, 董常生, 赫晓燕, 等. 羊驼酪氨酸酶基因家族在不同毛色个体中的基因表达水平[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(7): 895-899.]
- [14] Iwata M, Corn T, Iwata S, et al. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1990, 95(1): 9-15.
- [15] Braasch I, Scharlt M, Volf J N. Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7: 74.
- [16] Braasch I, Liedtke D, Volf J N, et al. Pigmentary function and evolution of *tyrp1* gene duplicates in fish[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009, 22(6): 839-850.
- [17] Zhang S Y, Li X, Pan J L, et al. Use of comparative transcriptome analysis to identify candidate genes related to albinism in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 500: 75-81.
- [18] Camacho-Hübner A, Rossier A, Beermann F. The Fugu rubripes tyrosinase gene promoter targets transgene expression to pigment cells in the mouse[J]. *Genesis (New York, N Y: 2000)*, 2000, 28(3-4): 99-105.
- [19] Kelsh R N, Schmid B, Eisen J S. Genetic analysis of melanophore development in zebrafish embryos[J]. *Develop-*

- pmental Biology, 2000, 225(2): 277-293.
- [20] Inagaki H, Koga A, Bessho Y, et al. The tyrosinase gene from medakafish: Transgenic expression rescues albino mutation[J]. *Pigment Cell Research*, 1998, 11(5): 283-290.
- [21] Fang J, Chen T S, Pan Q H, et al. Generation of albino medaka (*Oryzias latipes*) by CRISPR/Cas9[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 2018, 330(4): 242-246.
- [22] Chen H, Wang J, Du J, et al. Analysis of recently duplicated TYRP1 genes and their effect on the formation of black patches in Oujiang-color common carp (*Cyprinus carpio* var. *color*)[J]. *Animal Genetics*, 2021, 52(4): 451-460.
- [23] Chen C, Wu L M, Li Y L, et al. Morphology of the early age and the pigment occurrence and the effects of different feed additives on the body color of *Plectropomus leopardus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(5): 83-90. [陈超, 吴雷明, 李炎璐, 等. 豹纹鳃棘鲈(*Plectropomus leopardus*) 早期形态与色素变化及添加剂对其体色的影响[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 83-90.]
- [24] Chen X J, Sun Y, Zhang P P, et al. Screening of stable internal reference genes by quantitative real-time PCR in humpback grouper *Cromileptes altivelis*[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39(5): 1985-1999.
- [25] Jablonski N G, Chaplin G. The evolution of human skin coloration[J]. *Journal of Human Evolution*, 2000, 39(1): 57-106.
- [26] Holland P W H, Marlétaz F, Maeso I, et al. New genes from old: Asymmetric divergence of gene duplicates and the evolution of development[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2017, 372(1713): 20150480.
- [27] Oetting W S, Stine O C, Townsend D, et al. Evolution of the tyrosinase related gene (TYRL) in Primates[J]. *Pigment Cell Research*, 1993, 6(3): 171-177.
- [28] Woods I G, Wilson C, Friedlander B, et al. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes[J]. *Genome Research*, 2005, 15(9): 1307-1314.
- [29] Lei Y, Yang L D, Jiang H F, et al. Recent genome duplications facilitate the phenotypic diversity of Hb repertoire in the Cyprinidae[J]. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(7): 1149-1164.
- [30] Venkatachalam A B, Parmar M B, Wright J M. Evolution of the duplicated intracellular lipid-binding protein genes of teleost fishes[J]. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 2017, 292(4): 699-727.
- [31] Luo M K, Lu G Q, Yin H R, et al. Fish pigmentation and coloration: Molecular mechanisms and aquaculture perspectives[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13(4): 2395-2412.
- [32] Jiang Y L, Song H M, Liu Y, et al. Cloning and expression analysis of the developing sequence and tissue expression of *TYR* gene in *Amphilophus citrinellus*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(5): 697-707. [蒋燕玲, 宋红梅, 刘奕, 等. 橘色双冠丽鱼 *TYR* 基因的克隆及其发育时序和组织表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(5): 697-707.]

Bioinformatics and expression analysis of Tyrosinase protein family genes in leopard coral grouper

XIAO Jie¹, WANG Mengya¹, WU Shaoxuan¹, WANG Bo², HU Jingjie^{1,2}, BAO Zhenmin^{1,2}

1. Key Laboratory of Tropical Aquatic Germplasm of Hainan Province, Sanya Oceanographic Institution, Ocean University of China, Sanya 572000, China;
2. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China

Abstract: The tyrosinase protein family contains key enzymes for regulating the synthesis of melanin, which plays an irreplaceable role in the formation of melanocytes. However, the underlying mechanism of the *Tyr* gene family in body-color formation is unclear in *Plectropomus leopardus*. *P. leopardus* is an economically important tropical fish in China. The body color of farmed *P. leopardus* has different degrees of degradation, which seriously affects its quality and market price. In this study, a total of five *Tyr* genes were identified from the whole genome of *P. leopardus*, and amino acid sequence alignment showed that *Tyr* family proteins in *P. leopardus* were highly conserved in relation to homologous proteins of other species, especially the typical tyrosinase functional domain of this family. The phylogenetic and comparative synteny indicated the gain and loss of *Tyr* genes after teleost-specific whole-genome duplication (3R-WGD). In addition, the results of qRT-PCR showed that the expression levels of all members of *Tyr* genes in the skin tissues of black individuals were significantly higher than those of red individuals ($P < 0.05$). This paper preliminarily identified and analyzed the role of the *Tyr* gene family in the formation of body color, providing a basis for further analyzing the evolution and functional mechanism of the tyrosine protease gene family in *Plectropomus leopardus*.

Key words: *Plectropomus leopardus*; *Tyr* gene family; evolutionary analysis; expression difference

Corresponding author: WANG Bo, E-mail: wb@ouc.edu.cn; HU Jingjie, E-mail: hujingjie@ouc.edu.cn