



MRJP1



Chain-B MRJP1

Sequence and structure analysis of royal jelly main protein family 蜂王浆主蛋白家族序列及结构分析

组长：潘飞 (G3A)

Institute of Apicultural Research

Yunitcon@yeah.net

组员：

张志浩 (G3B)

范冰冰 (G3C)

黎明 (G3D)

Chain-C Apisimin

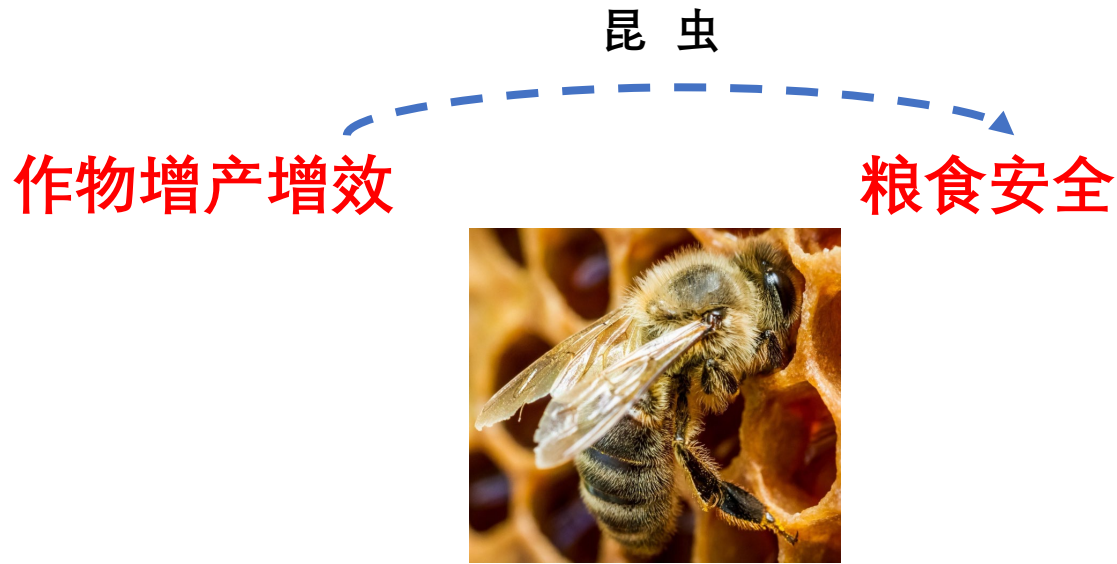
Chain-D Apisimin

2022-12-4



一、研究背景

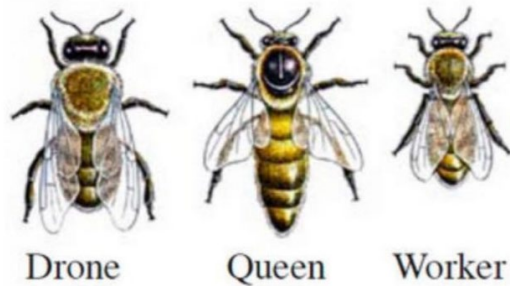
众所周知，植物要结出果实必须经过授粉。全世界可供人类食用的水果和作物，有接近75%的种类在一定程度上依靠授粉媒介来维持正常生产。授粉媒介影响着全球35%的农业用地，并为全球87种主要粮食作物的生产提供支持。自然界中约有4万种植物的繁育会遇到困难，甚至会濒临灭绝。全球115种主要农作物中有**75%**依赖蜂类授粉，蜂类授粉贡献了**全球35%的农作物**产值。



一、高度社会化群体生物——蜜蜂

蜜蜂（Bee/Honey bee）在昆虫分类学上属于膜翅目、细腰亚目、针尾部、蜜蜂总科、蜜蜂科昆虫的统称，是膜翅目重要的类群。根据化石资料，蜜蜂在第三纪晚始新世地层中已大量发现，蜜蜂科的许多种类具有巨大的经济价值，与人类生活密切相关。在中国古代就有对蜜蜂及其用途的记载。不少种类的产物或行为与医学(如蜂蜜、王浆、蜂毒)、农业(如作物传粉)、工业(如蜂蜡、蜂胶)有密切关系，它们被称为资源昆虫。最为人们所熟悉的是人工驯养用来酿蜜的**意大利蜜蜂（意蜂）**和**东方蜜蜂（中蜂）**。

三型蜂 高度社会化群体生物



卵
幼虫
蛹
成蜂
4个发育阶段



雄蜂



蜂王



工蜂

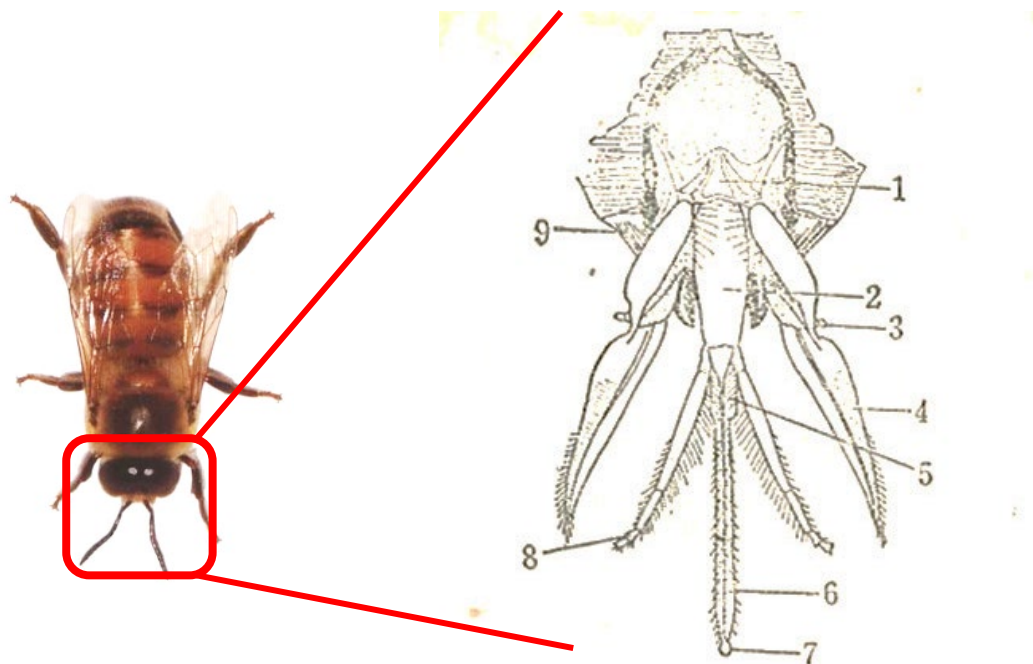
一、三型蜂形态学



区别	蜂王 (唯一生殖器官发育完整雌性蜂)	雄蜂	工蜂
体型:	大	中	小
发育起源:	受精卵发育	未受精发育	受精卵发育
发育周期:	卵期3天 幼虫期5天 蛹期8天 从卵到成蜂16天 生存时间最长达 4-5年	卵期3天 幼虫期7天 蛹期13天 从卵到成蜂23天 生存时间最长达 4月	卵期3天 幼虫期6天 蛹期11天 从卵到成蜂20天 生存时间最长达 45天
职能:	维持蜂群的秩序 产卵繁殖后代	专司与处女蜂王 交尾 “游手好闲”	承担着蜂群的所有劳作 采花酿蜜、清理蜂巢、哺育幼虫、 守卫警戒、泌蜡筑巢
饮食:	幼虫起终身吃高质量 蜂王浆	幼虫前三天吃 蜂王浆 ，之 后吃蜂蜜	幼虫前三天吃 蜂王浆 ，之 后吃低质量工蜂浆和蜂蜜

一、蜂王浆基本介绍

蜂王浆 (Royal jelly, RJ) 是哺育工蜂咽下腺和上颚腺分泌的，主要用以饲喂蜂王和蜜蜂幼虫的乳白色、淡黄色浆状物，是蜂产品中最具有特色的物质之一，是国际公认的对动物和人体具有增强免疫力和延缓衰老等多种功能的健康食品。



蜜蜂的口器 (腹面)

1. 颊基 2. 颊 3. 下颚须 4. 下颚 5. 侧唇
舌 6. 舌 7. 唇瓣 8. 下唇须 9. 上颚

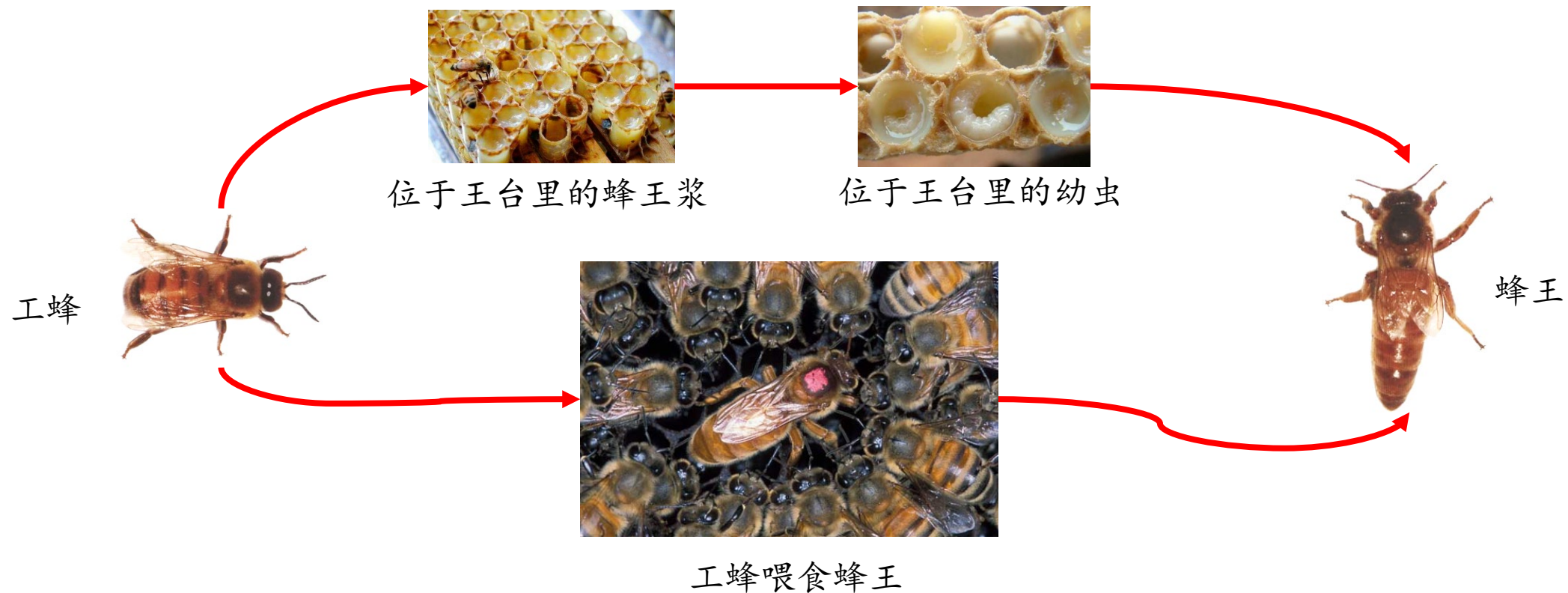


位于王台里的蜂王浆



新鲜蜂王浆

一、蜂王浆功能



?

What are the key components?

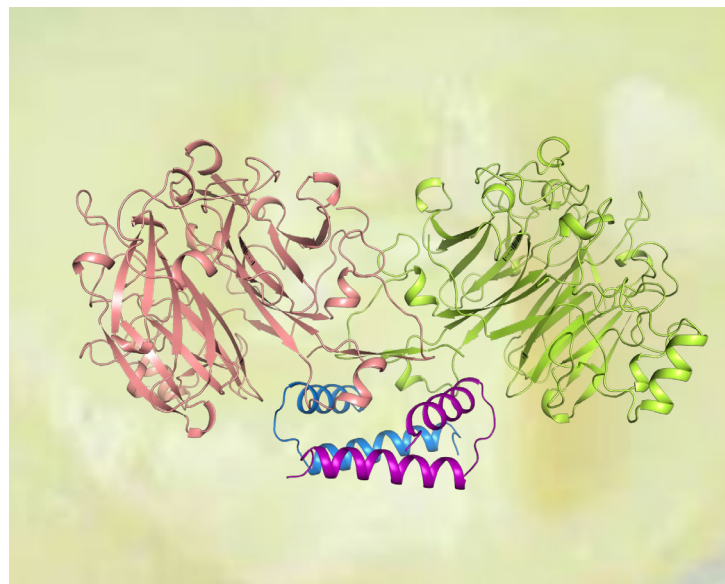
一、蜂王浆主蛋白背景

蜂王浆中主要的干物质是蛋白质，约占50%以上，其中**蜂王浆主蛋白**(Major royal jelly proteins, MRJPs)约占总蛋白含量**80%**以上。



2011年，日本富山县立大学学者镰仓昌树（KAMAKURA）在NATURE发表的研究结论，发现了蜂王浆中的一种蛋白质是蜜蜂幼虫变身蜂王的秘密所在。MRJPs喂养果蝇结果表明：MRJPs能增加果蝇个体大小、细胞大小和卵巢繁殖能力，延长寿命并缩短发育时间，这与蜂王浆喂养果蝇的结果一致。(Kamakura, M., *Nature*, 2011, 473, 478-483.)

2018年，中国农大和农科院蜜蜂研究所在鉴定并报告了一个16分子结构的原生MRJP1寡聚物，其中包含4个MRJP1, 4个apisimin和8个未预料到的24-甲基胆固醇分子，分辨率为2.65 Å。
(Tian, W., *Nature Commun*, 2018, 9, 3373.)

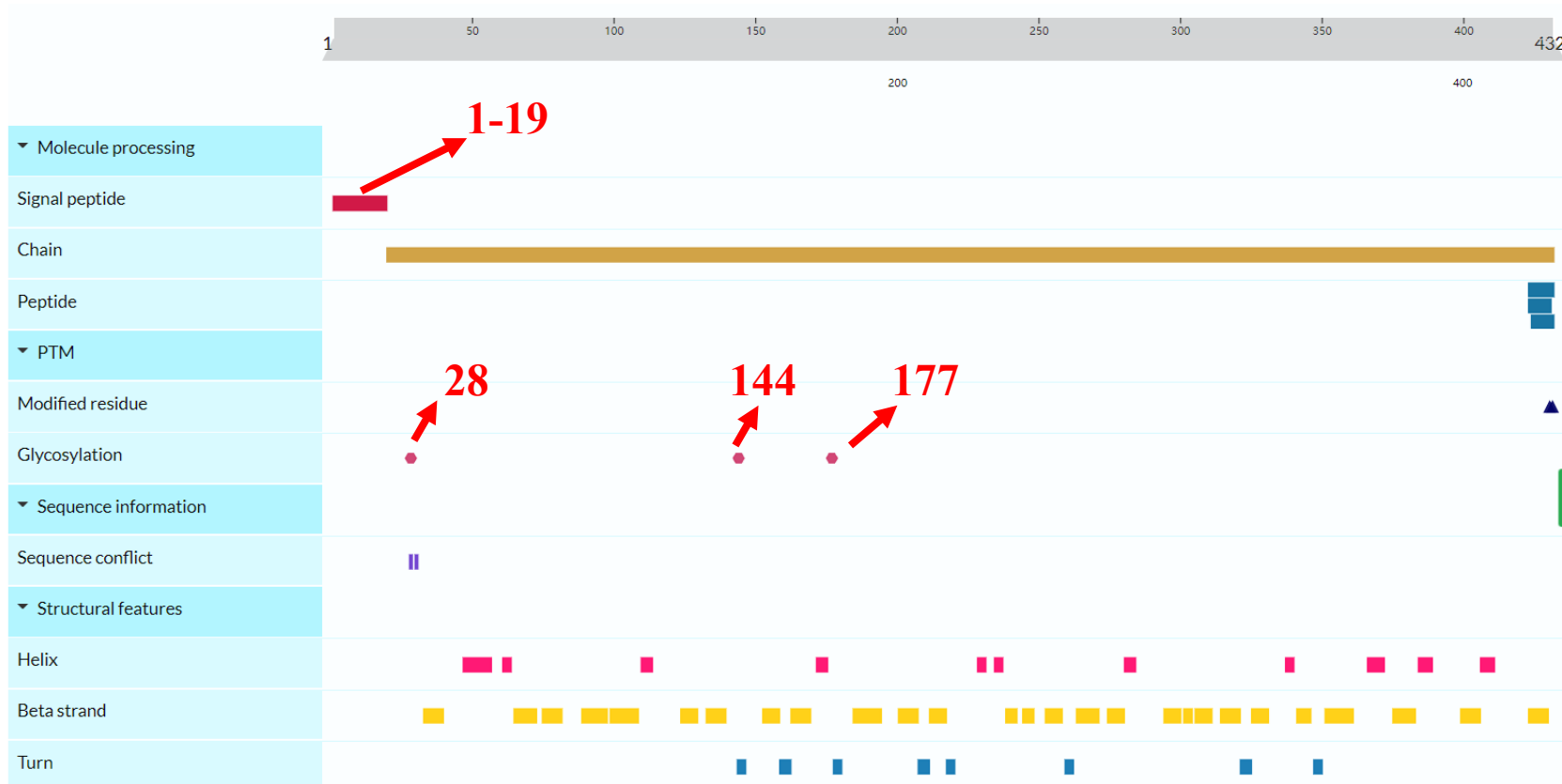


二、MRJP1序列分析

使用UniProt检索MRJP1序列信息



蜂王浆主蛋白1,英文名称为Major royal jelly protein 1, 其在Uniprot数据库中的登陆号位O18330, 属于Apis mellifera (Honeybee), Taxonomic为7460。



二、MRJP1结构分析

使用NCBI PSI-BLAST

Database: PDB

Max target sequences: 500

Expect threshold: 0.05

Word size: 3

Matrix: BLOSUM62

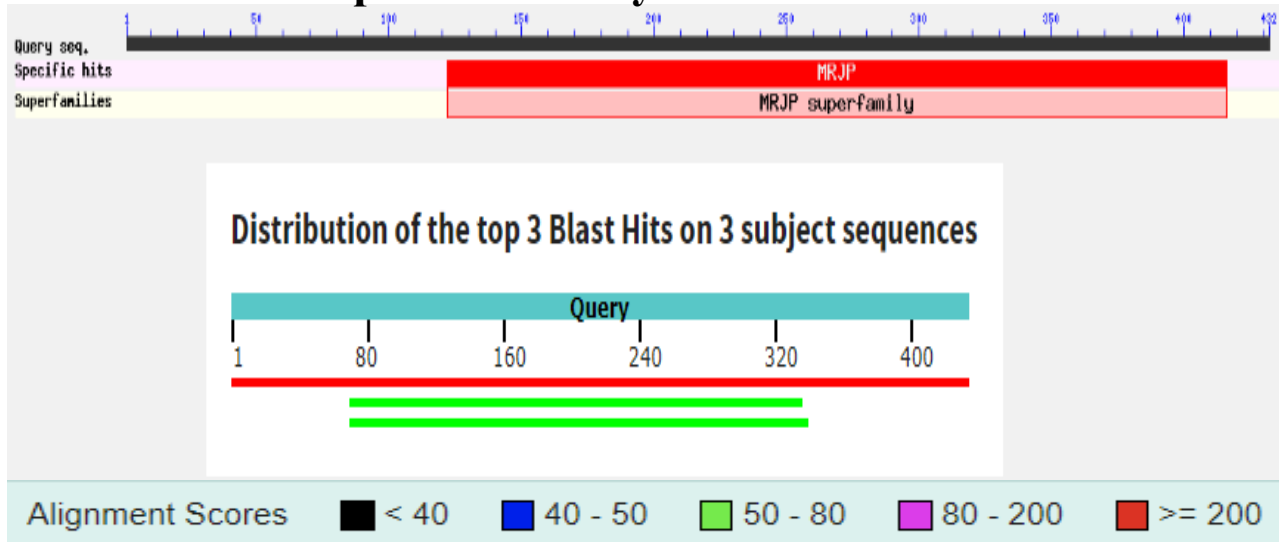
Gap Costs: 11 1

PSI-BLAST Descriptions result

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	Select for PSI blast	Used to build PSSM	Newly added
<input checked="" type="checkbox"/> Structure of Major Royal Jelly Protein 1 Oligomer [Apis mellifera]	Apis mellifera	901	901	100%	0.0	100.00%	432	5YYL_A	<input checked="" type="checkbox"/>		
<input checked="" type="checkbox"/> Salivary protein from Lutzomyia longipalpis [Lutzomyia longipalpis]	Lutzomyia long...	62.8	62.8	61%	3e-10	25.35%	381	3Q6K_A	<input checked="" type="checkbox"/>		
<input checked="" type="checkbox"/> Salivary protein from Lutzomyia longipalpis. Selenomethionine derivative [Lutzomyia longipalpis]	Lutzomyia long...	62.4	62.4	62%	5e-10	25.35%	381	3Q6P_A	<input checked="" type="checkbox"/>		

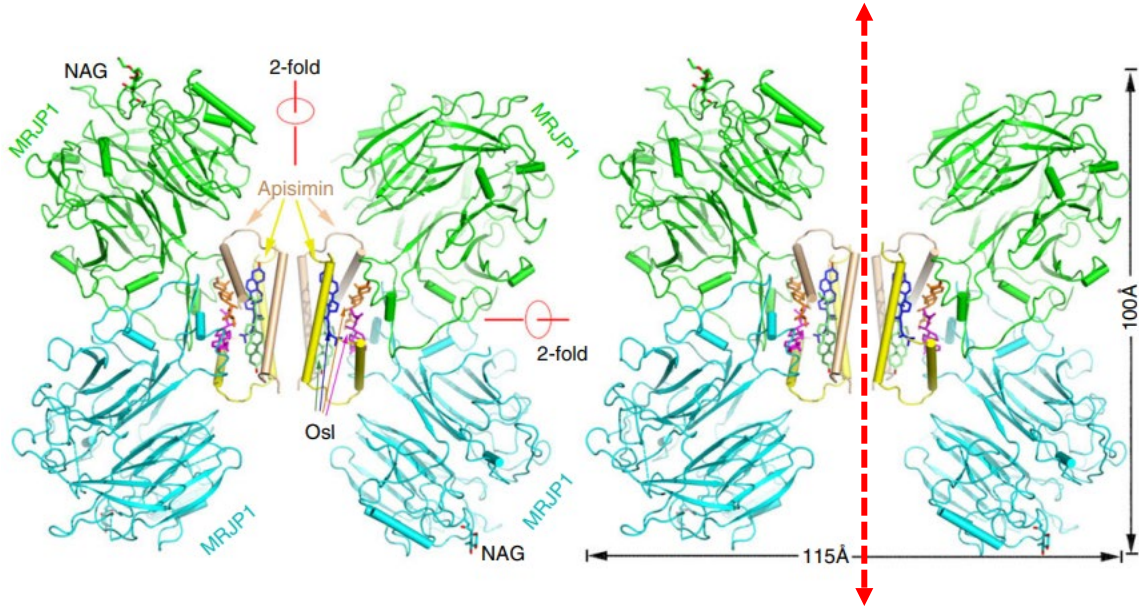
长吻沙蝇唾液中提取的一种“黄色”蛋白质

PSI-BLAST Graphic Summary result

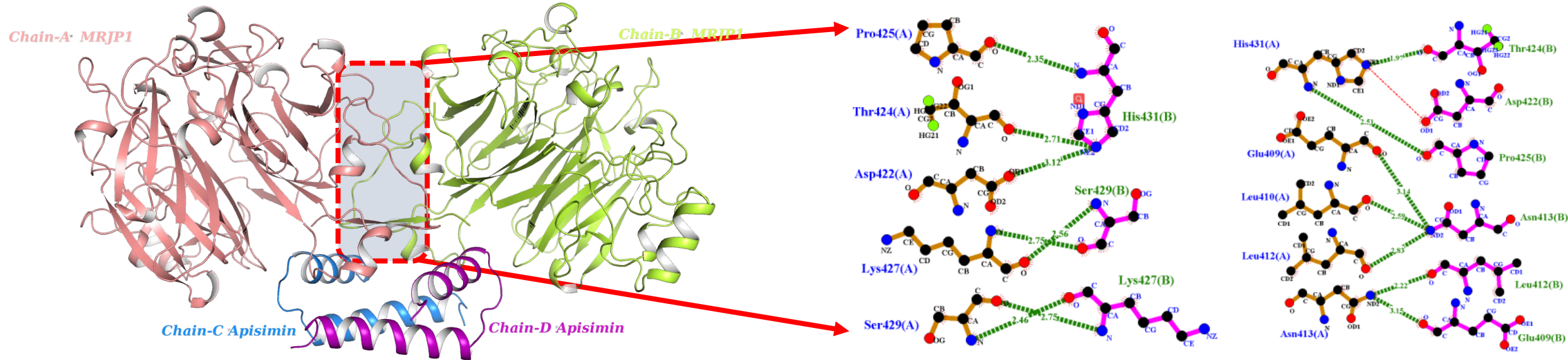


Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
62.4 bits(150)	5e-10	Compositional matrix adjust.	73/288(25%)	115/288(39%)	30/288(10%)
Query 70	DQWHDKIFVTMLR-YNGVPSLNVISKK-----VGDGGPLLQPYPDWSFAKYDDDCSGIVS				123
Sbjct 34	D AEGEKLF LAVPRKLRVPYTLAEVDTKNSLGVGKSHSPLLN-----KFSGHKTGKELTS				88
Query 124	ASKLAIDKCDRLWVLD SGLVN-----NTQPMCSFKLLTFDLTTSQLLKQVE--IPHDVA				175
Sbjct 89	IYQPVIDDCRRLWVWDIGSVEYRSRGAKDYP SHRPAIVAYDLKQFPNYPEVVRYVFPTRLV				148
Query 176	VNATTGKGR LSSLA VQSLDCNTNSD TMVYIAD EKG EGLIVY-HNSDDSFHRLT SNTFDYD				234
Sbjct 149	EKPTYFGGFAVDVANPKGDC---SETFVYITNFLRGALFIYDHKKQDSWN-VTHPTFKAE				204
Query 235	PKFTKMTIDGESYTAQDGISGMAL----SPMTNNLYSPVASTSLYYVNT EQFRTSDYQQ				290
Sbjct 205	-RPTKFDYGGKEYEFKAGIFGITLGD R DSEGNRPAYLAGSAIKVYSVNTKELKQKGGKL				263
Query 291	NDIHYEGVQNILD TQSSAKV VSKSGVLF FGLVGD SALGCWNEHRTLER				338
Sbjct 264	NP-ELGNRGKYND AIALAYDPKTKVIFFAEANTKQVSCWNTQKXPLR				310

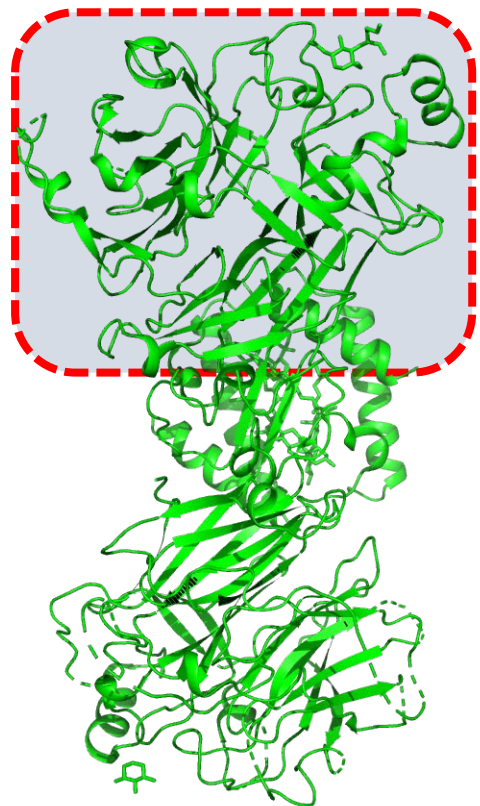
二、MRJP1结构分析



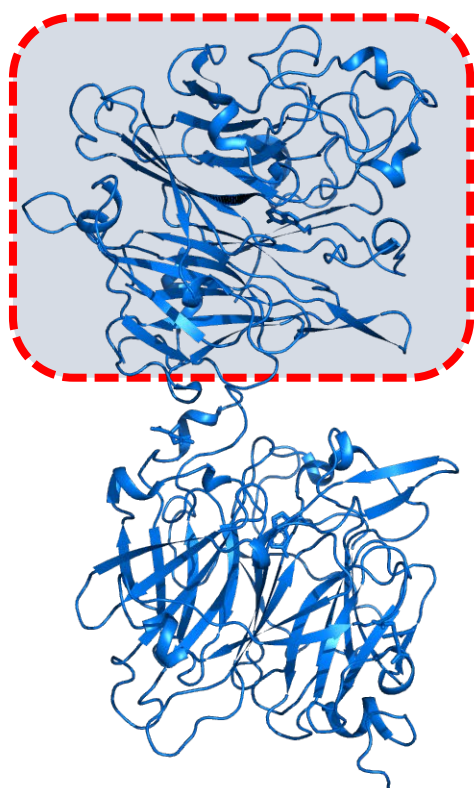
X射线衍射所获得PDB登录号为5YYL，X射线衍射分辨达到2.65Å。结果显示MRJP1四聚体由4个MRJP1单体、4个多肽apisimin和8个24-亚甲基胆甾醇小分子组成。MRJP1的结构是采用经典的六叶β-折叠组成螺旋桨式结构，主要以疏水相互作用和氢键结合，其中apisimin起关键的连接作用，另外还含有3个二硫键。



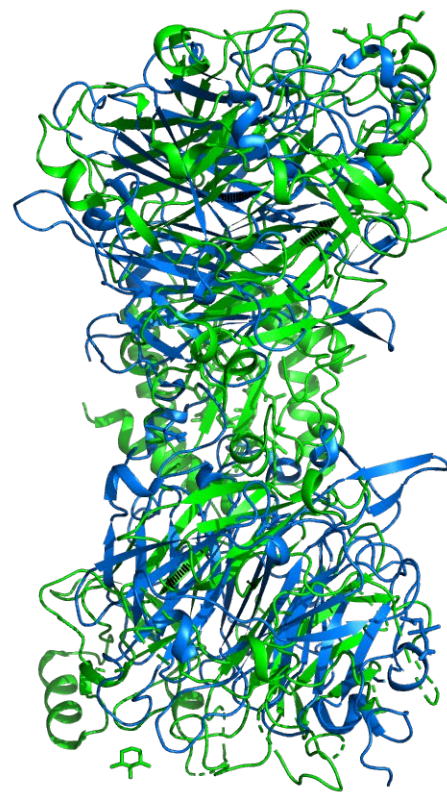
二、MRJP1与Salivary protein结构分析



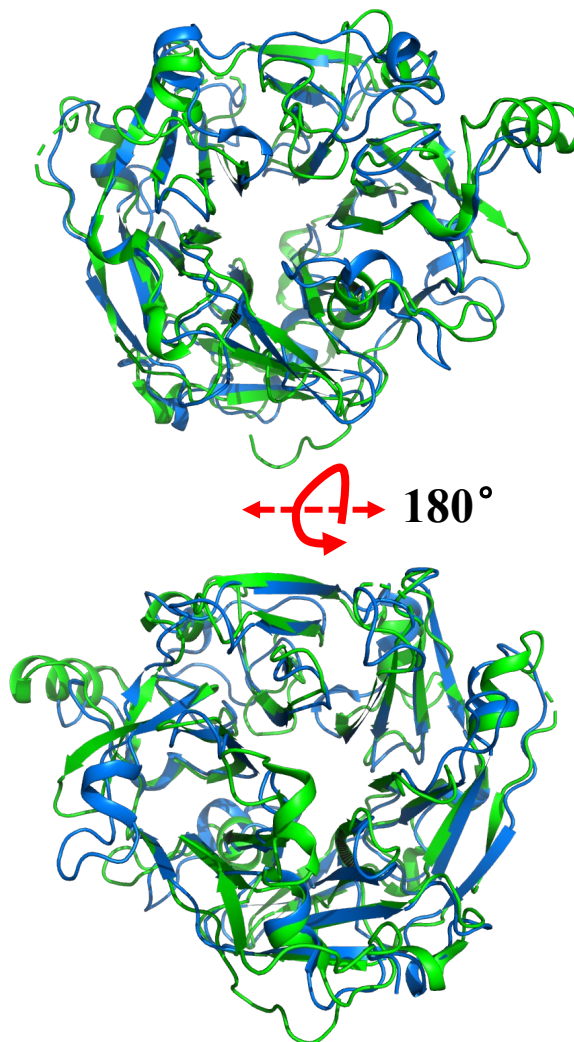
MRJP1
PDB ID : 5YYL
Resolution : 2.65Å
Method : X-RAY DIFF



Salivary protein
PDB ID : 3Q6K
Resolution : 2.52Å
Method : X-RAY DIFF



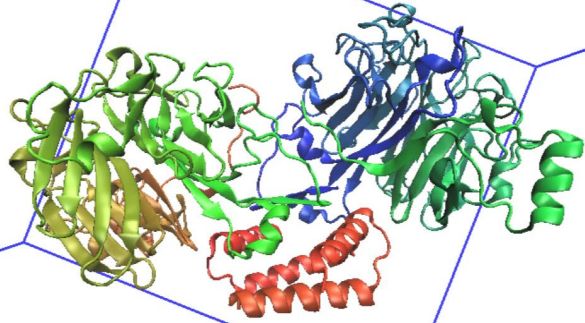
RMSD = 21.523



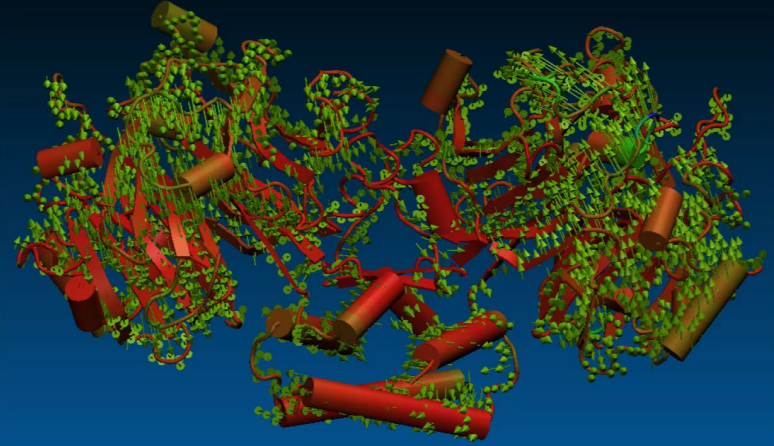
RMSD = 1.912

二、MRJP1动态分析

使用GROMACS对MRJP1二聚体进行600 ns分子动力学模拟 (模拟条件：中性、常压、常温、水环境)



MRJP1二聚体在常温常压下动力学模拟



MRJP1二聚体PCA分析

三、研究问题

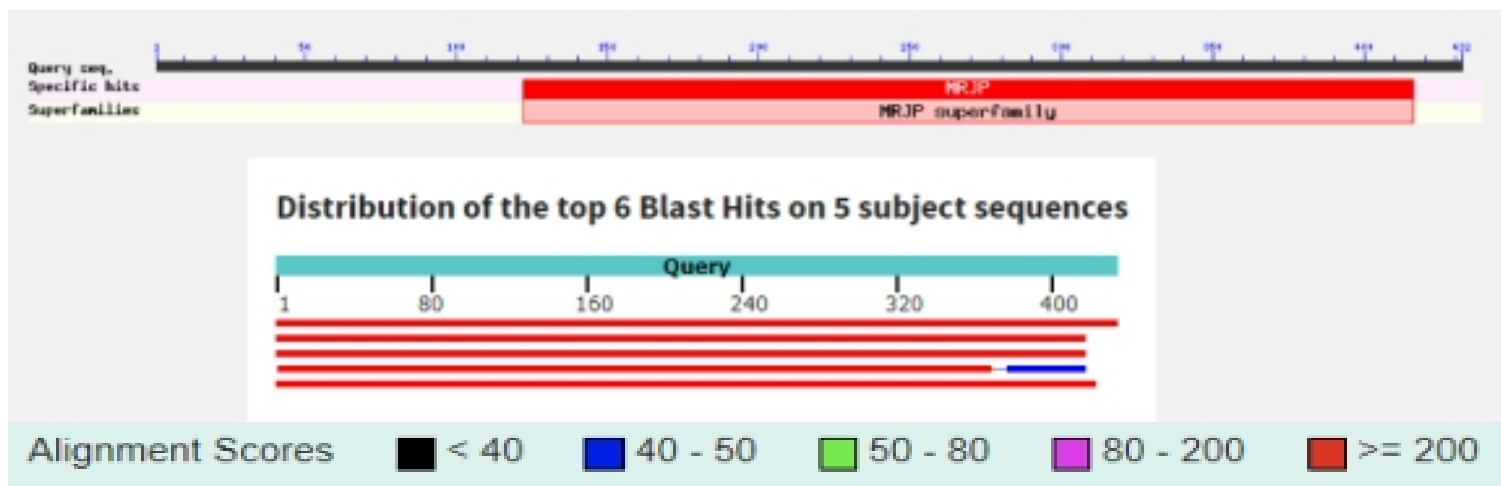
MRJP1的分子机制结构已经清晰，由于MRJP1-3是MRJPs家族的主要蛋白质，它们的相对含量分别为31%、16%、26%，那么MRJP2-3是否也具有与MRJP1相似的分子结构，从而发挥类似于调控蜂王级型分化的结果。此外，其他的几种MRJPs蛋白的结构相似度是多少呢？

基于已知的MRJP1知识，进一步探索MRJP2-3的潜在信息！

三、MRJPs家族序列分析

在NCBI Blast的搜索框内输入MRJP1的UniProt登录号O18330，Organism选择Apis mellifera (taxid:7460)，数据库选择swiss-prot，点击BLAST搜索。

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
sp O18330.1	Major royal jelly protein 1	872	872	1	0	1	432	O18330.1
sp O77061.1	Major royal jelly protein 2	561	561	0.96	0	0.6739	452	O77061.1
sp Q17060.1	Major royal jelly protein 3	545	545	0.96	0	0.6445	544	Q17060.1
sp O97432.1	Major royal jelly protein 5	504	544	0.94	2E-178	0.6423	598	O97432.1
sp Q17061.1	Major royal jelly protein 4	479	479	0.97	2E-170	0.5711	464	Q17061.1

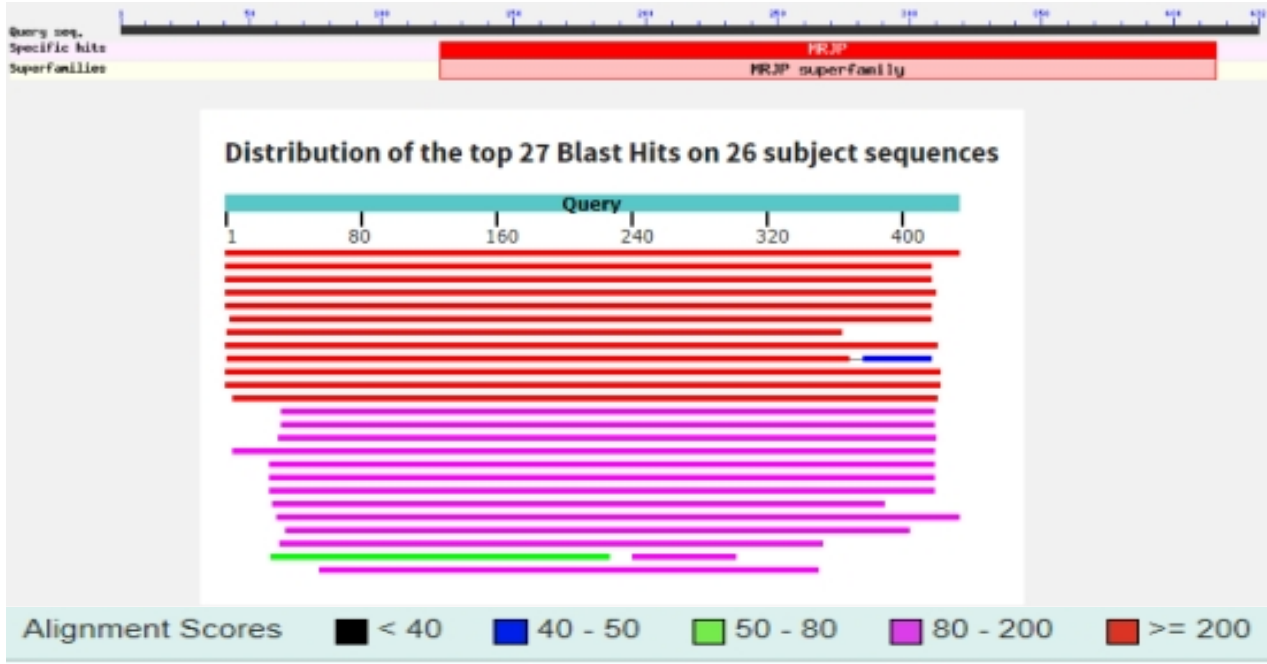


MRJP2、MRJP3和MRJP5分别与MRJP1的序列相似性均超过64%，而MRJP4与MRJP1的序列相似性约为57%。此外，MRJP2-4相似序列覆盖面积与MRJP1序列等同。

三、MRJPs家族序列分析

在NCBI Blast的搜索框内输入MRJP1的UniProt登录号O18330，Organism选择Apis mellifera (taxid:7460)，数据库选择Reference proteins (refseq_protein)，之后点击BLAST搜索。

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
major royal jelly protein 1 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	872	872	100%	0.0	100.00%	432	NP_010115759.1
major royal jelly protein 2 isoform X1 [Apis mellifera]	Apis mellifera	561	561	96%	0.0	67.39%	452	XP_026299315.1
major royal jelly protein 2 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	561	561	96%	0.0	67.39%	452	NP_010115580.1
major royal jelly protein 7 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	558	558	96%	0.0	66.27%	443	NP_010114429.1
major royal jelly protein 3 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	545	545	96%	0.0	64.45%	544	NP_010116581.1
major royal jelly protein 6 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	533	533	96%	0.0	63.94%	437	NP_010116221.1
major royal jelly protein 5 isoform X1 [Apis mellifera]	Apis mellifera	506	506	83%	5e-100	66.03%	364	XP_026299316.1
major royal jelly protein 8 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	500	500	96%	7e-177	58.47%	416	NP_010115564.1
major royal jelly protein 5 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	504	544	94%	1e-175	64.23%	598	NP_010115393.1
major royal jelly protein 4 isoform X1 [Apis mellifera]	Apis mellifera	481	481	97%	2e-168	57.58%	464	XP_026299317.1
major royal jelly protein 4 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	479	479	97%	1e-167	57.11%	464	NP_010116101.1
major royal jelly protein 9 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	454	454	96%	9e-159	55.90%	423	NP_010119869.1
yellow-a3 precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	192	192	88%	1e-56	31.76%	424	NP_010109369.1
yellow-a3 isoform X1 [Apis mellifera]	Apis mellifera	192	192	88%	1e-56	31.76%	426	XP_066558951.2
yellow-y precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	183	183	89%	4e-53	32.75%	430	NP_010109359.1
major royal jelly protein 1 [Apis mellifera]	Apis mellifera	162	162	96%	5e-53	30.73%	409	XP_001122624.1
yellow-h precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	160	160	90%	6e-51	27.83%	562	NP_010109367.1
yellow-h isoform X2 [Apis mellifera]	Apis mellifera	179	179	90%	1e-50	27.83%	552	XP_066558953.1
yellow-h isoform X1 [Apis mellifera]	Apis mellifera	179	179	90%	4e-50	27.83%	620	XP_066558952.2
yellow-f precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	161	161	83%	5e-45	27.01%	411	NP_010116351.1
protein yellow like [Apis mellifera]	Apis mellifera	147	147	93%	2e-39	26.86%	457	XP_026299340.1
protein yellow [Apis mellifera]	Apis mellifera	139	139	85%	8e-37	26.77%	413	XP_063249426.1
protein yellow [Apis mellifera]	Apis mellifera	129	129	74%	5e-33	27.76%	431	XP_066559088.1
major royal jelly protein 2 like [Apis mellifera]	Apis mellifera	84.0	84.0	14%	4e-28	59.68%	67	XP_066559089.2
major royal jelly protein 1 [Apis mellifera]	Apis mellifera	89.0	89.0	68%	3e-19	24.50%	375	XP_396828.1
protein yellow [Apis mellifera]	Apis mellifera	79.3	79.3	46%	5e-16	26.11%	375	XP_066559086.1



共检索26条序列

可以看到，除了swiss-prot检索到的4个蛋白外，还发现了格外与MRJP1高度相似 (>50%) 的序列，如MRJP8 precursor, MRJP6 precursor, MRJP7 precursor, MRJP9 precursor。

三、MRJP1-10序列比较

Name	UniProt ID
MRJP1	O18330
MRJP2	O77061
MRJP3	Q17060
MRJP4	Q17061
MRJP5	O97432
MRJP6	A0A8B6WZ10
MRJP7	A0A8B6WZ41
MRJP8	B3GM11
MRJP9	B3GM12
MRJP10	A0A1Q1N6A4



<input type="checkbox"/> tr B3GM12 B3GM12_APIME	100.00%	62.07%	50.24%	48.91%	54.59%	46.49%	53.10%	54.18%	53.10%	54.63%
<input type="checkbox"/> tr B3GM11 B3GM11_APIME	62.07%	100.00%	58.64%	47.31%	58.97%	53.96%	58.98%	59.02%	56.69%	63.72%
<input type="checkbox"/> sp Q17060 MRJP3_APIME	50.24%	58.64%	100.00%	72.34%	64.08%	58.57%	65.89%	68.51%	65.51%	69.55%
<input type="checkbox"/> tr Q3ZLX2 Q3ZLX2_APICE	48.91%	47.31%	72.34%	100.00%	57.61%	56.99%	65.96%	66.67%	61.70%	Not a Number
<input type="checkbox"/> sp O18330 MRJP1_APIME	54.59%	58.97%	64.08%	57.61%	100.00%	58.47%	64.39%	66.03%	61.97%	69.44%
<input type="checkbox"/> sp Q17061 MRJP4_APIME	46.49%	53.96%	58.57%	56.99%	58.47%	100.00%	63.92%	58.11%	62.82%	72.69%
<input type="checkbox"/> tr A0A1Q1N6A4 A0A1Q1N6A4_APIFL	53.10%	58.98%	65.89%	65.96%	64.39%	63.92%	100.00%	72.30%	71.63%	75.00%
<input type="checkbox"/> sp O77061 MRJP2_APIME	54.18%	59.02%	68.51%	66.67%	66.03%	58.11%	72.30%	100.00%	69.46%	76.82%
<input type="checkbox"/> sp O97432 MRJP5_APIME	53.10%	56.69%	65.51%	61.70%	61.97%	62.82%	71.63%	69.46%	100.00%	78.18%
<input type="checkbox"/> tr Q5I223 Q5I223_APICE	54.63%	63.72%	69.55%	Not a Number	69.44%	72.69%	75.00%	76.82%	78.18%	100.00%

三、MRJP1-10系统发生树分析

Name	UniProt ID
MRJP1	O18330
MRJP2	O77061
MRJP3	Q17060
MRJP4	Q17061
MRJP5	O97432
MRJP6	A0A8B6WZ10
MRJP7	A0A8B6WZ41
MRJP8	B3GM11
MRJP9	B3GM12
MRJP10	A0A1Q1N6A4

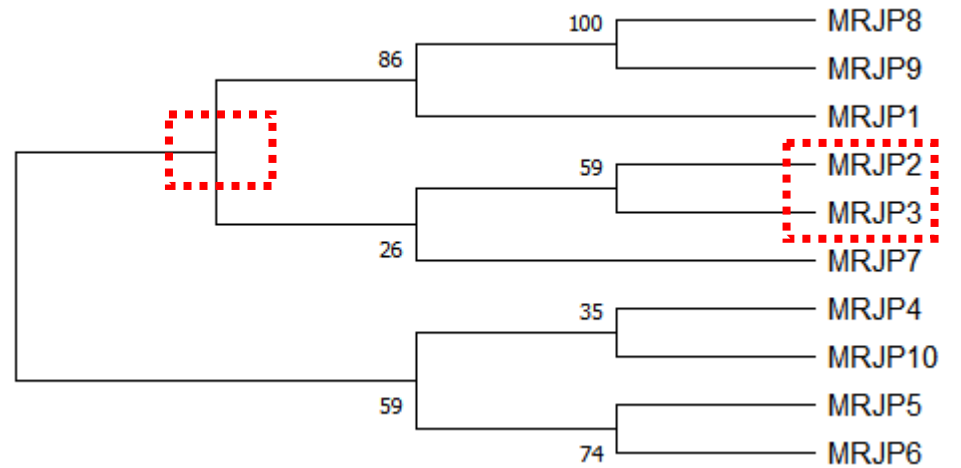
MSA analysis



MEGA-X
ClustaW进行MSA分析



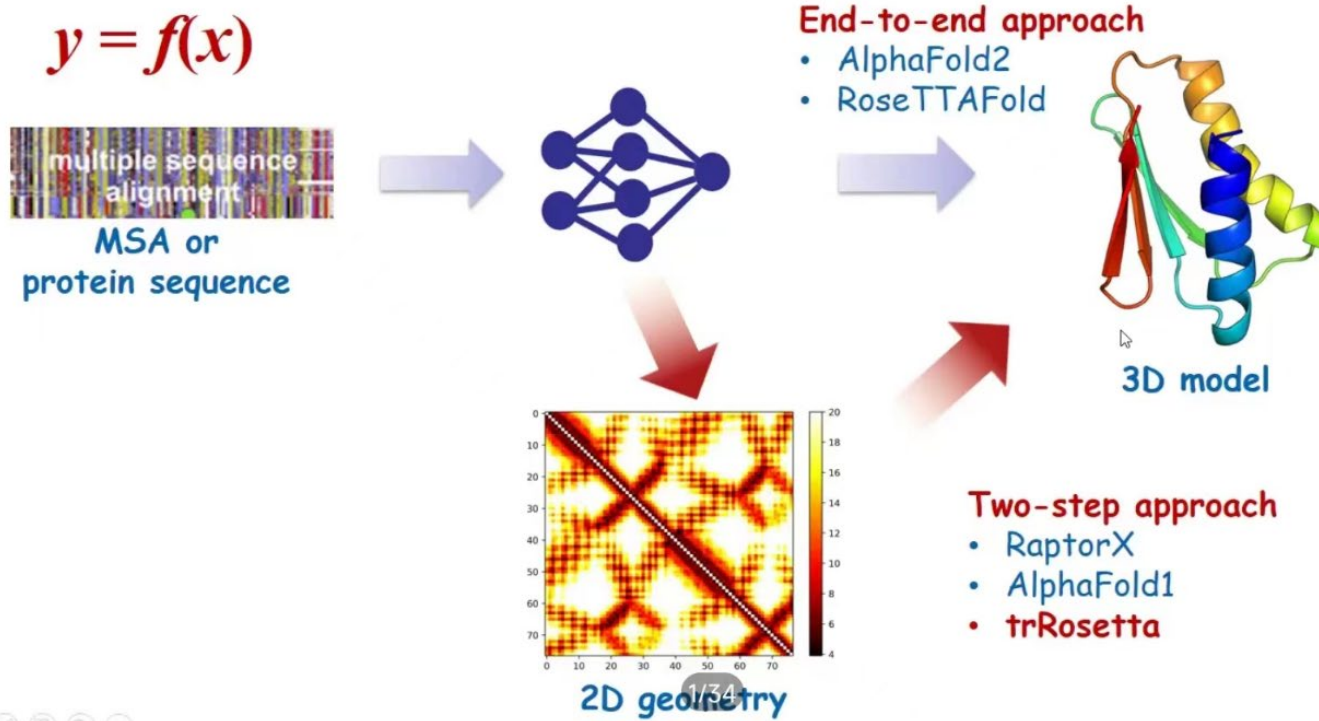
Phylogenetic analysis
Neighbor-joining tree
Bootstrap method



MRJP1-3和MRJP7-9同属于一个大分支，其中MRJP2和MRJP3更接近，MRJP8和MRJP9更接近。

三、MRJP2-3结构建模与分析

MRJP1的结构已经通过X-ray和冷冻电镜解析，而其格外的MRJP蛋白质还未揭露。由于它们的序列相似比较高，因此，可以通过计算机来预测它们的结构，从而来推测这些蛋白质的结构是否相似，进而判断它们是否会具有相同功能。**这里仅展示MRJP2-3的结构建模与分析。**



AF2针对一个500AA序列进行建模，需要4-6小时

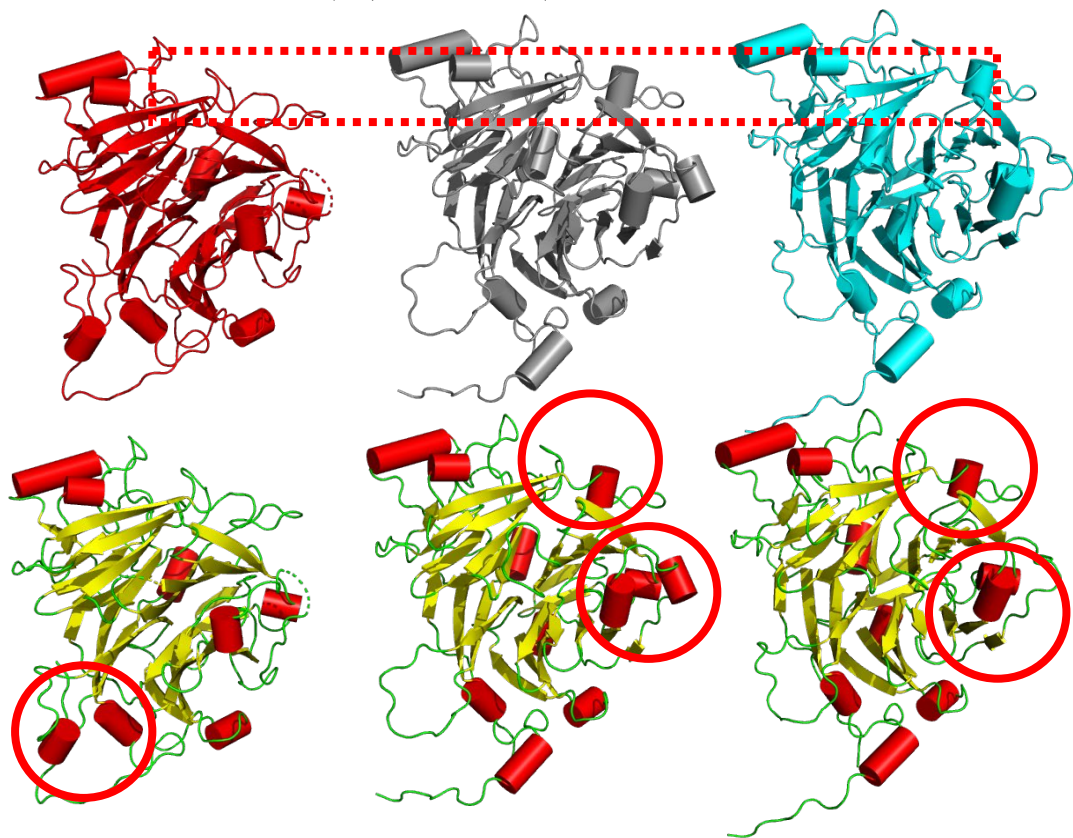


准确度 ↑
速度 ↑

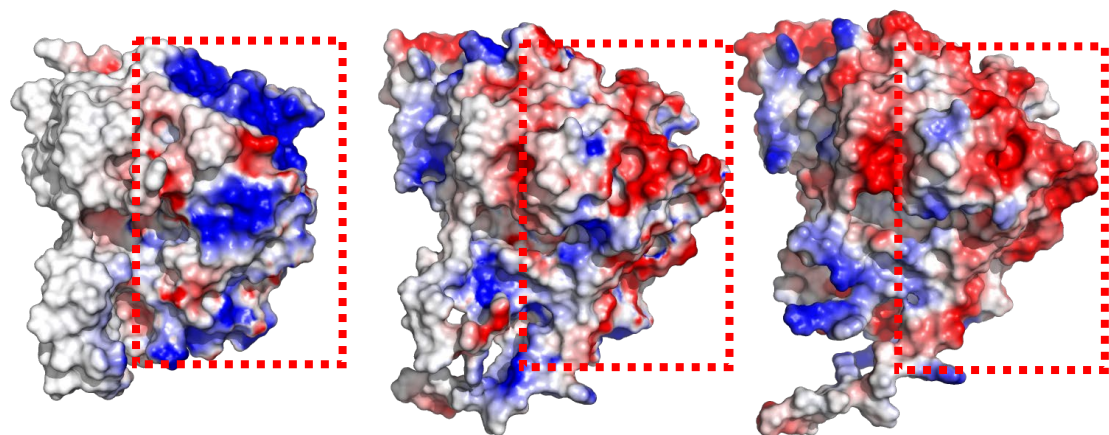
<https://cloud.zelixir.com/fastaf2/#/fast-af2>

三、MRJP1结构建模与验证

二级结构



静电势表面



MRJP1

红色为实验解析的结构

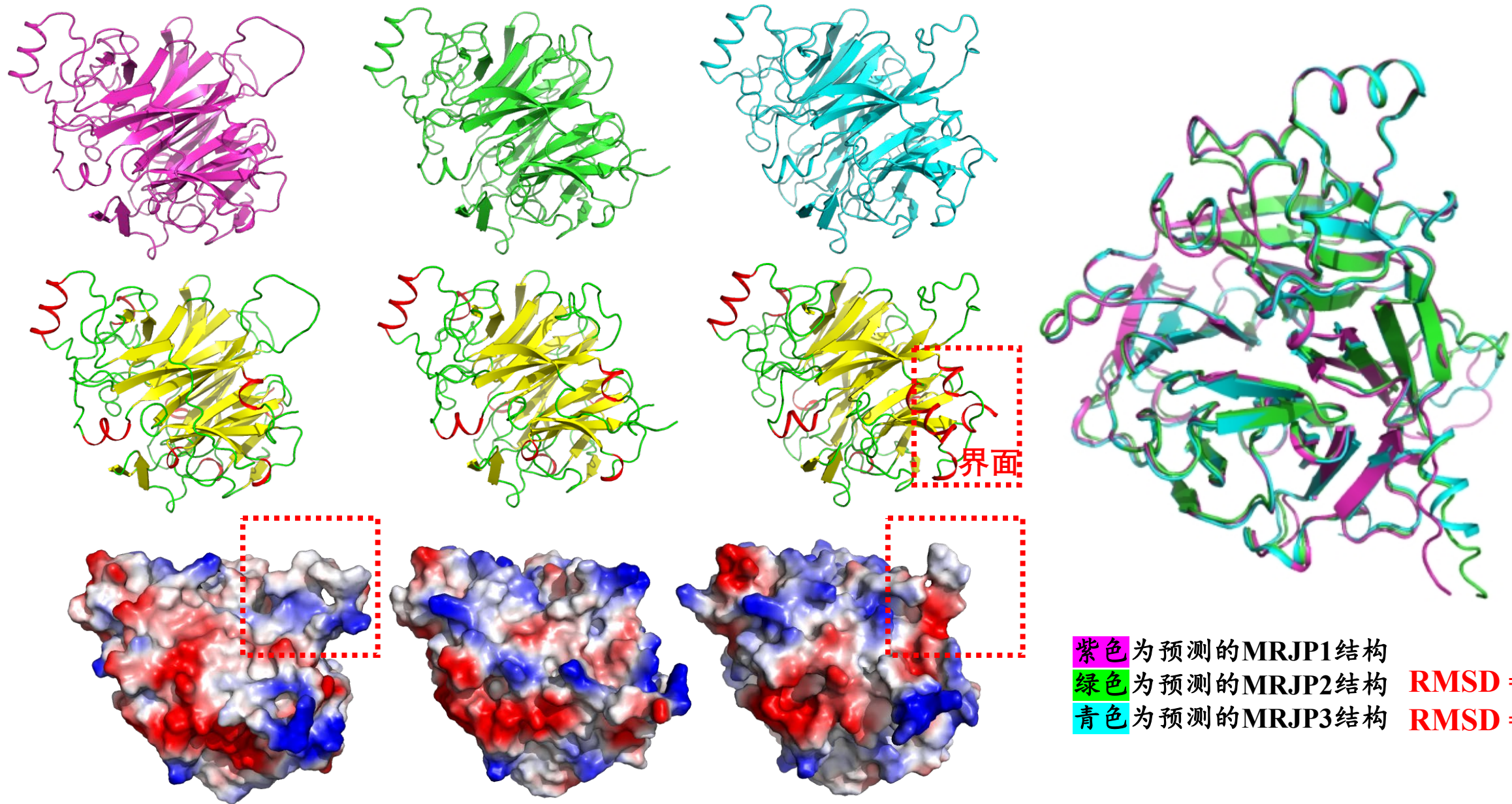
青色为fastAF2预测的结构

灰色为AlphaFold2预测的结构

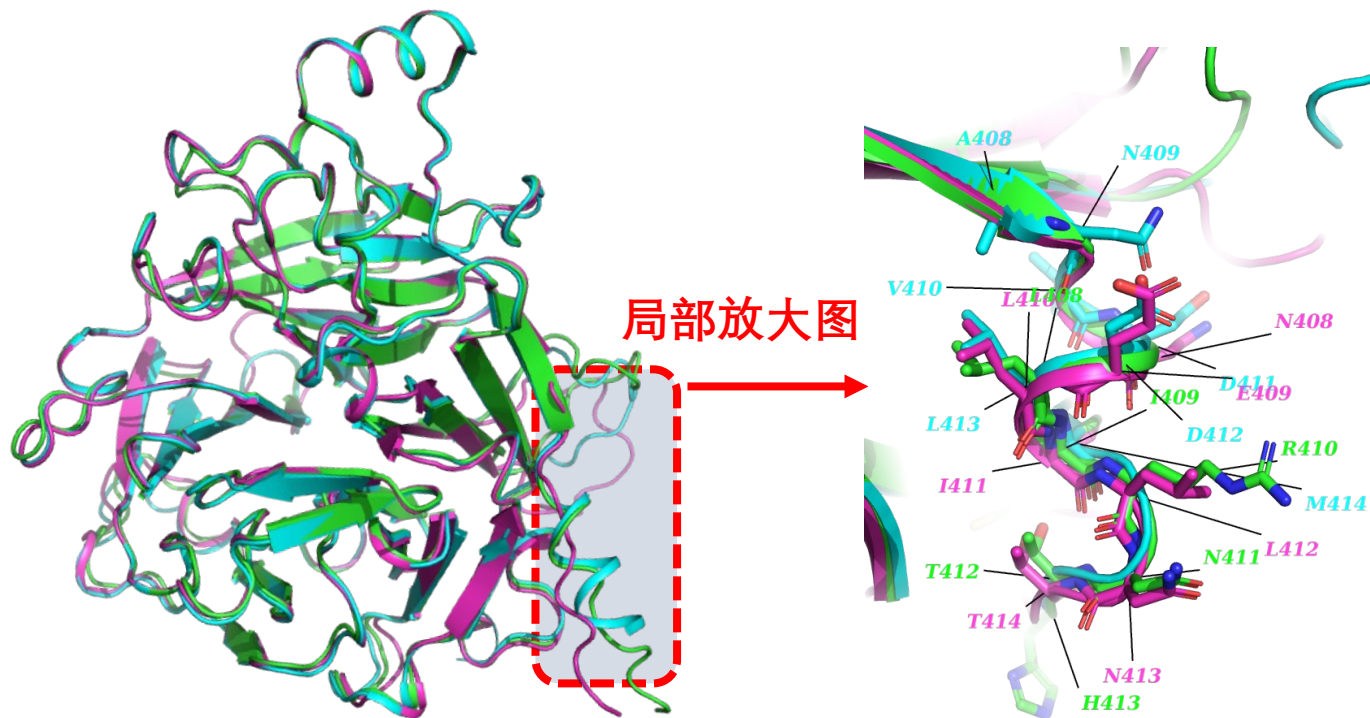
RMSD = 0.489

RMSD = 0.509

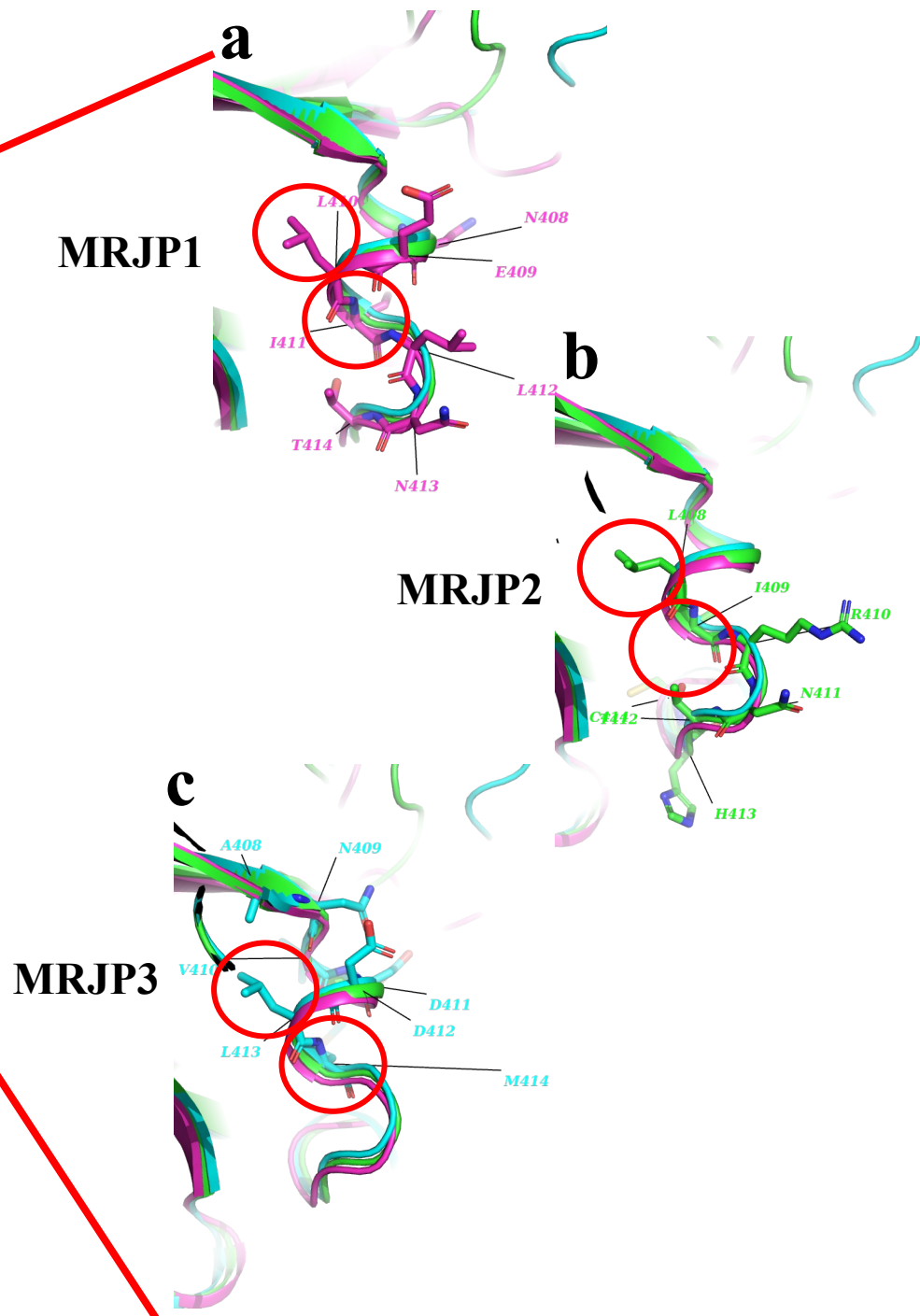
三、MRJP2-3结构建模与分析



三、MRJP2-3结构建模与分析

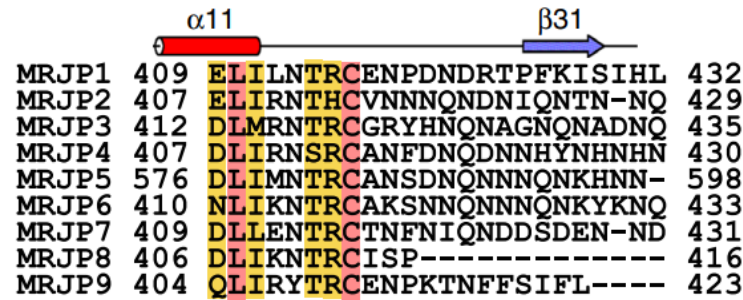


		$\alpha 11$	$\beta 31$	
MRJP1	409	ELI LNTRCENPDNDRTPFKIS IHL		432
MRJP2	407	ELIRNTHCVNNNQNDNIQNTN-NQ		429
MRJP3	412	DLMRNTRCGRYHNQAGNQADNQ		435
MRJP4	407	DLIRNSRCANFDNQDNNHYNHNN		430
MRJP5	576	DLIMNTRCANSQNNNQNNKHNN-		598
MRJP6	410	NLIKNTCAKSNNNQNNQNKYKNQ		433
MRJP7	409	DLENTRCTNFNIQNDSDEN-ND		431
MRJP8	406	DLIKNTRCISP-----		416
MRJP9	404	QLIRYTRCENPKTNFFSIFL----		423

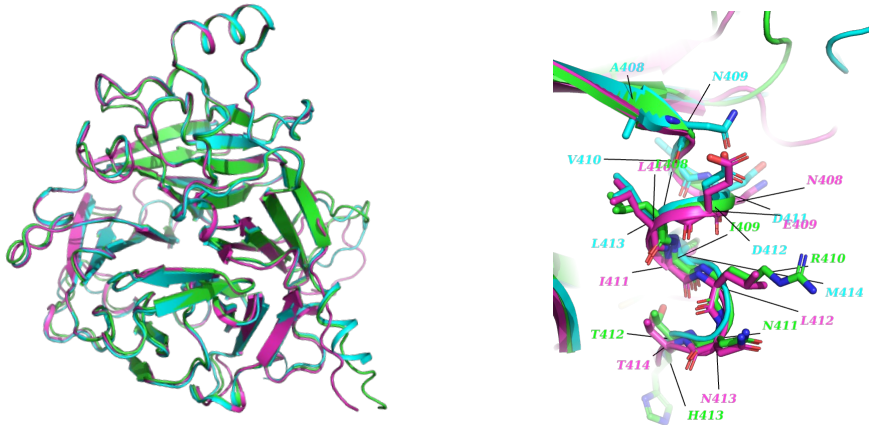


四、结论

- 在MRJPs家族中，MRJP1-10序列具有较高的相似性，且界面区域具有高度保守



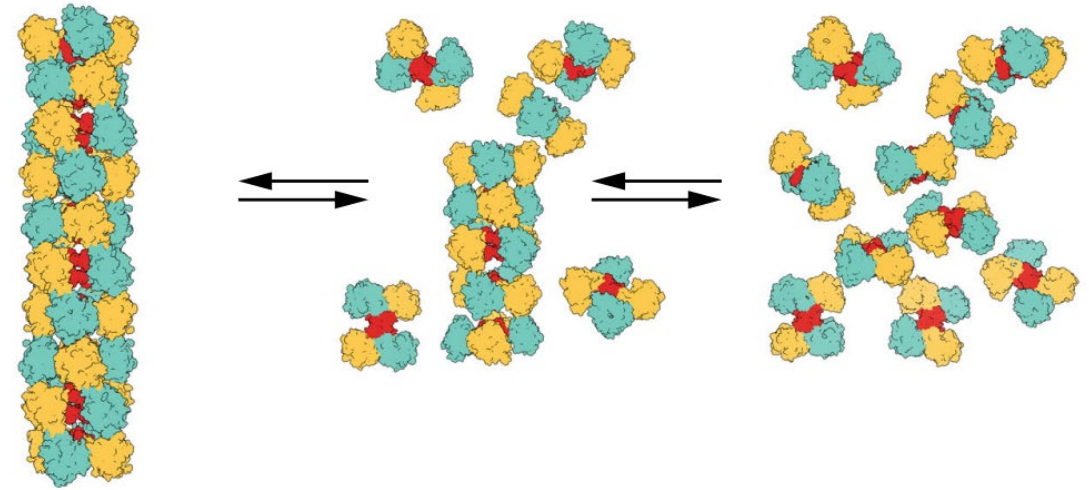
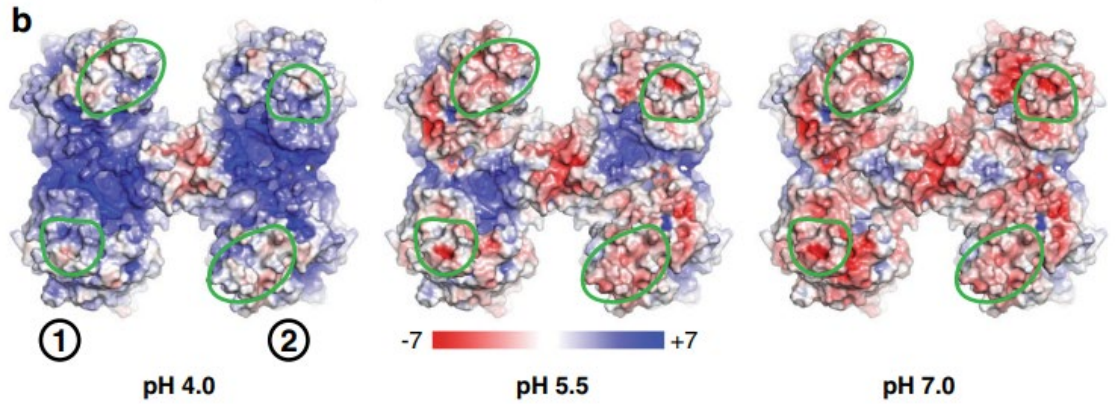
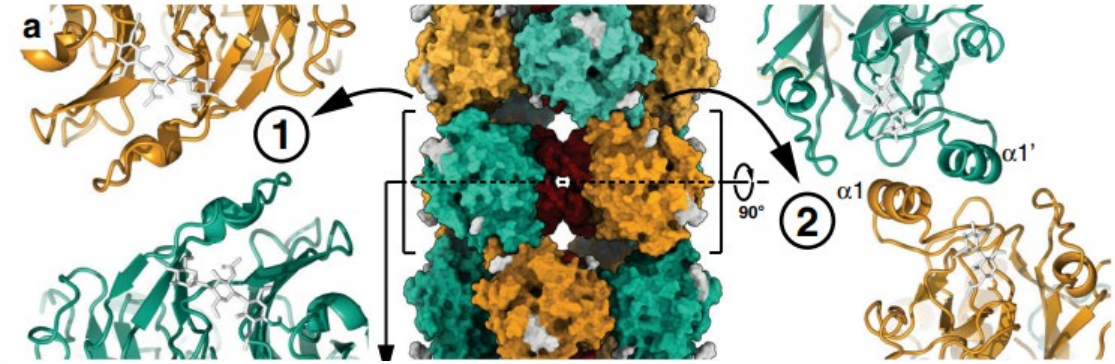
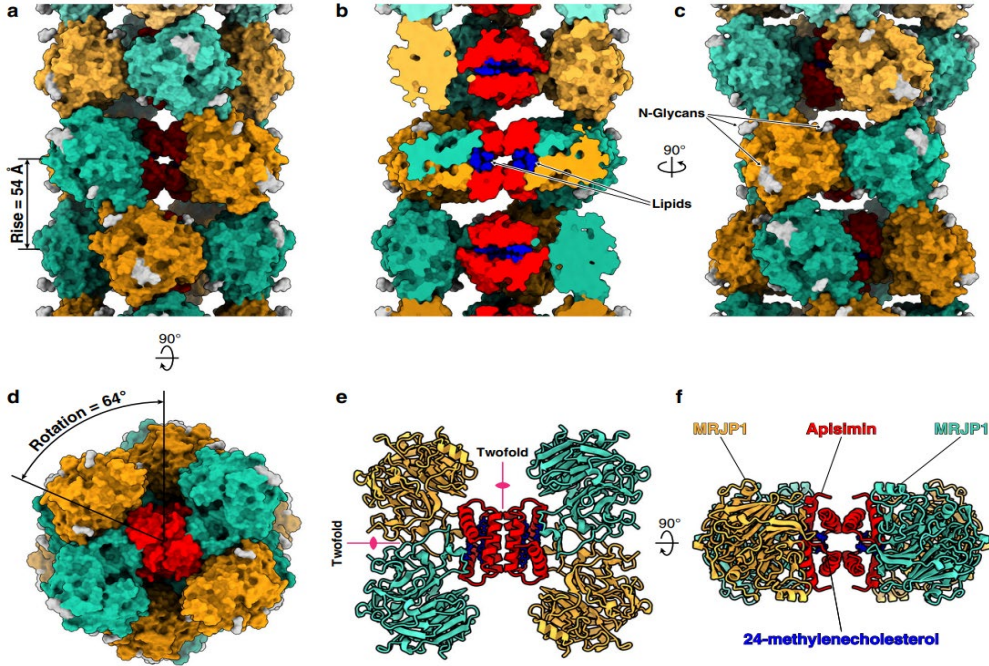
- MRJP2-3与MRJP1结构高度相似，且界面区域也相似。



- MRJP2-3可能具有与MRJP1相似的功能活性。

tr B3GM12 B3GM12_APIME	100.00%	62.07%	50.24%	48.91%	54.59%	46.49%	53.10%	54.18%	53.10%	54.63%
tr B3GM11 B3GM11_APIME	62.07%	100.00%	58.64%	47.31%	58.97%	53.96%	58.98%	59.02%	56.69%	63.72%
sp Q17060 MRJP3_APIME	50.24%	58.64%	100.00%	72.34%	64.08%	58.57%	65.89%	68.51%	65.51%	69.55%
tr Q3ZLX2 Q3ZLX2_APICE	48.91%	47.31%	72.34%	100.00%	57.61%	56.99%	65.96%	66.67%	61.70%	Not a Number
sp O18330 MRJP1_APIME	54.59%	58.97%	64.08%	57.61%	100.00%	58.47%	64.39%	66.03%	61.97%	69.44%
sp Q17061 MRJP4_APIME	46.49%	53.96%	58.57%	56.99%	58.47%	100.00%	63.92%	58.11%	62.82%	72.69%
tr A0A1Q1N6A4 A0A1Q1N6A4_APIFL	53.10%	58.98%	65.89%	65.96%	64.39%	63.92%	100.00%	72.30%	71.63%	75.00%
sp O77061 MRJP2_APIME	54.18%	59.02%	68.51%	66.67%	66.03%	58.11%	72.30%	100.00%	69.46%	76.82%
sp O97432 MRJP5_APIME	53.10%	56.69%	65.51%	61.70%	61.97%	62.82%	71.63%	69.46%	100.00%	78.18%
tr Q5I223 Q5I223_APICE	54.63%	63.72%	69.55%	Not a Number	69.44%	72.69%	75.00%	76.82%	78.18%	100.00%

五、展望



Thank you for listening

CAAS G3