微藻脂肪酸去饱和酶及其基因表达的生态调控研究新进展*

NEW ADVANCES ON FATTY ACID DESATURASE AND REGULATION OF THESE GENES EXPRESSION BY ECOLOGICAL FACTORS IN MICROALGAE CELLS

魏 东 张学成

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

多不饱和脂肪酸(PUFAs)是指十六碳以上、含有两个以上双键的脂肪酸,有 n-6 和 n-3 两个系列,其中 n-6 系列的 γ-亚麻酸(GLA)、花生四烯酸(AA)和 n-3 系列的二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)都是人体必需的脂肪酸,在营养强化、预防和治疗人类多种疾病方面具有重要作用,如预防动脉粥样硬化和心血管疾病、降低血浆中胆固醇和甘油三酯水平、减轻关节炎等炎症,还可能成为抗肿瘤的药物[1]。目前,海洋鱼油仍是 PUFAs 的主要商业来源,但海鱼是通过食物链从海洋微藻中获得的,微藻才是自然界中 PUFAs 的初级生产者。采用高效生物反应器工业化生产富含 PUFAs 的微藻,作为代替鱼油生产 PUFAs 的新途径已得到国际上的公认[1]。

与高等植物相似,微藻细胞也是从乙酰-CoA 合成十六碳饱和脂肪酸,然后在碳链延长酶(Elongase, E)和一系列脂肪酸去饱和酶(Fatty acid desaturase, DES)的脱氢作用下逐步形成十六碳以上的 PUFAs。在微藻的光合膜中,脂肪酸的不饱和水平决定着膜脂的相转变温度,即不饱和程度越高,膜的相转变温度越低[2]。通过调节去饱和酶的酶量和活性,就能够改变膜脂的不饱和度,直接决定着微藻的耐低温性[3]、低温下光损伤的修复[4]等许多重要生理功能。环境因素(如温度、光照等)正是通过某些分子机理来实现去饱和酶的表达及其活性调控的,使细胞得以迅速改变脂肪酸的组成来适应环境的变化[2]。近年来,国外对微藻脂肪酸去饱和酶及其基因的克隆、基因表达的生态调控的研究已经相当深入,已从多种蓝藻、真核微藻中克隆了去饱和酶基因,部分基因已实现了基因转移,并以蓝藻为模式生物,提出了去饱和酶基因表达生态调控的分子机理。本文就国际上近年来在上述领域取得的研究新进展进行简要综述。

1 微藻的脂肪酸去饱和酶及其性质

1.1 脂肪酸去饱和酶的共性

脂肪酸去饱和酶有 3 类。在植物叶绿体、真核微藻和蓝藻中,绝大多数脂肪酸的去饱和反应是由酰基脂去饱和酶(Acyl-lipid desaturase)催化的,它只在糖脂结合态的脂肪酸中引入不饱和键。酰基-酰基载体蛋白去饱和酶(Acyl-ACP desaturase)主要存在于植物的细胞质中,只在酰基载体蛋白(ACP)结合态的脂肪酸上引入第一个双键。酰基-辅酶 A 去饱和酶(Acyl-CoA desaturase)主要存在于动物、真菌、酵母中,只在辅酶 A 结合态的脂肪酸中引入不饱和键[5]。

所有已知的脂肪酸去饱和酶普遍存在着 3 个极保守的组氨酸簇,它们与二价铁离子结合形成酶的活性中心。大多数酰基脂去饱和酶由 300~350 个氨基酸残基组成,其蛋白疏水区可穿膜 4 次。可能每个酰基-酰基载体蛋白去饱和酶都与 2 个铁离子结合,并与氧形成一个反应复合体(Fe-O-Fe)催化双键的形成[5]。脂肪酸去饱和酶对底物的识别特性,一般具有链长特异性和位置特异性[6],在某些高等植物中还具有组织特异性[7]。

脂肪酸去饱和反应是个氧化反应,需要 2 个电子和一分子氧。蓝藻和叶绿体中,每个去饱和酶都是以铁氧还蛋白为电子供体,但在植物细胞质中,则以 1 个由细胞色素 b_5 和 NADH-细胞色素 b_5 氧化还原酶

* 国家"九五"攻关项目 96-C02-04-05、96-C02-01-10-8 号和"海洋 863"项目 819-02-01 号

收稿日期:2000-02-21;修回日期:2000-05-08

组成的系统作为电子供体[5]。

1.2 微藻脂肪酸去饱和酶及其细胞定位

到目前为止，蓝藻脂肪酸去饱和酶的研究最为深入。根据脂肪酸去饱和作用方式的不同，可将蓝藻分为4类：第1类藻株只能在糖脂上脂肪酸的Δ9位去饱和，如聚球藻(*Synechococcus* PCC 7942)；第2类能在C_{18}脂肪酸的Δ9、Δ12和ω3位及C_{16}脂肪酸的Δ9、Δ12位引入双键，如聚球藻7002和异形鱼腥藻(*Anaboena variabilis*)；第3类能在Δ6、Δ9、Δ12位引入双键，如集胞藻(*Synechocystis* PCC 6714)和钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)；第4类能在Δ6、Δ9、Δ12和ω3位引入双键，如聚球藻6803。后两类均不能使C_{16}脂肪酸去饱和。免疫细胞化学的研究发现，聚球藻6803中Δ6、Δ9、Δ12和ω3位4种去饱和酶都定位于细胞质膜和质体膜上，说明蓝藻中膜脂的去饱和作用会同时发生在质体膜和细胞质膜上[8]。真核紫球藻(*Porphyridium cruentum*)中Δ6和Δ5去饱和作用都发生在细胞质中，ω3去饱和酶存在于叶绿体膜上[9,10]。

Δ9去饱和酶(简称Δ9DES或Δ9D)催化脂肪酸中第一个双键的形成，是不饱和脂肪酸生物合成的关键调节酶，都以铁为辅因子，在蓝藻中又称为DesC。其功能是催化16∶0-ACP和18∶0-ACP转化为16∶1(Δ9)-ACP和18∶1(Δ9)-ACP[11]。

Δ12去饱和酶(简称Δ12DES或Δ12D)在高等植物和真核微藻中称为Fatty acyl-CoA desaturase、Oleic-CoA desaturase、ω6 desaturase，而在蓝藻中又称DesA。其功能是在膜上糖脂的脂肪酸上引入第2个双键，即催化18∶1(Δ9)转化为18∶2(Δ9,Δ12)。这个反应需还原态的铁氧还蛋白为电子供体，分子氧为最终电子受体[12]。

ω3去饱和酶主要是指Δ15去饱和酶(Δ15-linolate desaturase，简称Δ15 DES或Δ15 D)，在蓝藻中又称DesB，决定着ω3途径的活性。真核微藻中的Δ17去饱和酶(简称Δ17 DES或Δ17 D)也属于此类酶。除草剂Sandoz 9785 [4-chloro-5(dimethylamino)-2-phenyl-3(2H) pyridazinone]是叶绿体膜上Δ15去饱和酶的特异抑制剂，可有效地减少高等植物和藻类膜上糖脂中18∶3ω3的水平，使18∶2ω6在细胞中积累。从钝顶螺旋藻和真核紫球藻中筛选的Sandoz 9785抗性藻株，在细胞中分别过量产生了GLA和EPA，并可在无Sandoz 9785存在下稳定遗传50代以上。

Δ6去饱和酶(Linoleoyl-CoA desaturase，EC.1.14.99.25，简称Δ6DES或Δ6D)，在蓝藻中又称DesD[11]，以铁为辅因子，催化Linoleoyl-CoA(18∶2Δ9,Δ12)转化为γ-linolenoyl-CoA(18∶3Δ6,Δ9,Δ12)。它是整个PUFA生物合成途径中的限速步骤。现已发现了两种Δ6去饱和酶的特异性抑制剂：除草剂Norflurazon[4-chloro-5(methylamino)-2-(α-trifluoro-m-tolyl)-3(2H) pyridazinone]特异性地抑制Δ6去饱和酶，用它处理钝顶螺旋藻和真核蒜头藻(*Monodus subterraneus*)，可有效地减少18∶3ω6的积累并增加亚油酸的水平，并使蒜头藻中EPA得以积累。最近又发现，Sclicylhydroxamic acid (SHAM)在40 μmol/L下就可立即抑制紫球藻中该酶的活性，而不抑制该酶的合成。加入其产物18∶3ω6就可解除这种抑制[13]。

2 微藻的脂肪酸生物合成途径

微藻是低等植物，其不饱和脂肪酸的生物合成，至少在18∶2ω6的合成途径上与高等植物类似[10]，更长链的脂肪酸的生物合成在不同种类的微藻中有很大区别而且更加复杂。蓝藻结构简单，无细胞器的分化，脂质只存在于生物膜系统中，整个细胞功能与植物叶绿体相似[4]。真核微藻中长链脂肪酸的生物合成非常复杂，涉及到细胞质膜、叶绿体、内质网、微粒体及细胞质之间复杂的相互作用。

在真核微藻中，紫球藻的不饱和脂肪酸生物合成途径研究得比较清楚，也是从18∶2ω6开始以ω6和ω3两条途径起始合成的[9](见图1)，其中ω6途径是PUFAs生物合成的主要途径[10]。在ω6途径中，18∶2-PC(卵磷脂，PC)在细胞质中先在Δ6位去饱和为18∶3ω6，再经链延长、Δ5位去饱和转化为20∶4ω6/20°4ω6-PC，继续被Δ17(ω3)去饱和酶催化产生EPA。在ω3途径中，18∶2-PC先由Δ15(ω3)去饱和酶催化形成18∶3ω3-PC，再通过ω6途径中相同的酶作用下转化为20∶5ω3-PC。两条途径的产物均以二酯酰甘油的形式转运到叶绿体，被糖基化为相应的单糖基二酯酰甘油。与之不同，拟微球藻(*Nannochloropsis*)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)中，AA被去饱和为EPA的反应，是在细胞质中的Δ17(ω3)去饱和酶催化下完成的，且以磷脂结合态的AA为底物。以ω3途径为主的其他微藻还有紫球藻(*Porphyridium yezoensis*)、*Mortierella alpina*、小球藻(*Chlorella* sp. *C. stigmatophora*)、拟微球藻(*Nannochloropsis salina*)等，以ω6途径为主的微藻还有纤细裸藻(*Euglena gracilis*)，

它也可将 18：2ω6 延长至 20：2ω6,再去饱和为 20：3ω6[9]。钝顶螺旋藻中只有 ω6 途径。

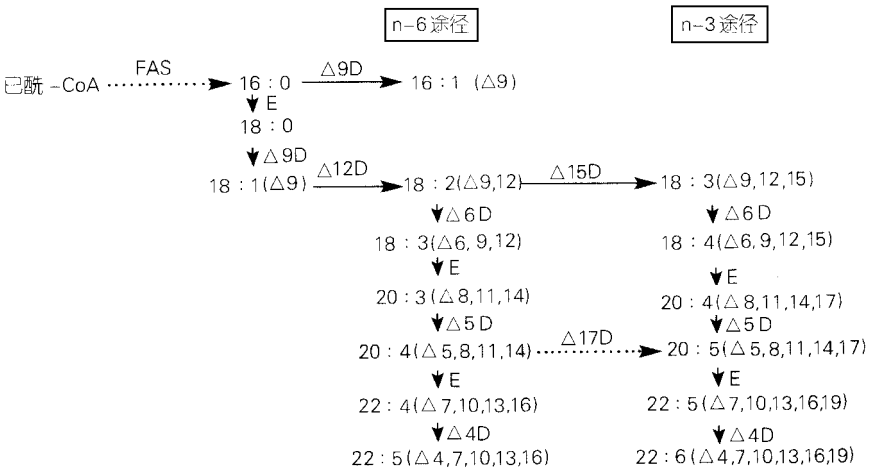

图 1　微藻长链脂肪酸生物合成途径

(脂肪酸合成酶(FAS),链延长酶(E),去饱和酶(D)

3　去饱和酶基因表达及其活性的生态调控机理

到目前为止,温度、光照是研究最多的生态调控因子,也提出了相应的调控机理模型。此外,生活环境中的活性氧浓度、氧化还原电位、N/P 比、盐度等因素对微藻脂肪酸的组成也有显著影响,但机理尚不十分清楚。

3.1　温度

在蓝藻中已经证实,脂肪酸的去饱和作用是低温下细胞维持正常生长的重要措施之一。目前,温度对膜脂脂肪酸不饱和度的调控机制存在 3 种模型。

一种模型认为,低温诱导了酰基脂去饱和酶的合成,即低温激活了去饱和酶的转录与翻译,增加了细胞内的酶量,使膜脂的去饱和作用得以加强,以维持细胞完成正常生理功能所需的生物膜的流动性。已有许多证据支持这种机制。例如,在 22 ℃下生长的稳定期聚球藻 7002 细胞,其 *des*A mRNA 的丰度比 38 ℃下生长的细胞高出 3 倍,半衰期延长了 3.5 倍。*des*B 基因的转录受温度的紧密调节,在 38 ℃时未检测到转录产物,而在 22 ℃时转录产物大量积累,半衰期延长了 15 倍。*des*C mRNA 的水平和半衰期则在两个生长温度相似。*des*A 和 *des*B 基因的转录水平在细胞转到 22 ℃后 15 min 内升高到最高值,而再转回 38 ℃后 15 min 内又恢复。上述作用可被氯霉素阻断,但 *des*C 的表达水平在 22 ℃时不受氯霉素的影响。Murata,1995 年报道,在集胞藻 6803 也发现了类似的现象,自养的细胞从 36 ℃转移到 22 ℃时,Δ12 和 ω3 DES 基因的 mRNA 水平大为提高。可见,去饱和酶基因的表达是受 mRNA 的合成和 mRNA 的稳定性共同控制的。

由此推测,可能存在一个特异的温度感受器和信号传导系统来调节低温下去饱和酶基因的表达,很可能是一个转录的调节蛋白(激活剂或抑制剂)[14]。这个模型中,生物膜在感受和传导温度信号给去饱和酶基因的表达调控区过程中起着重要作用。随温度的下降,膜的流动性会降低。这个信号通过一个尚未证实的低温感受器传递给一个调控分子,直接或间接地作用于去饱和酶基因的表达调控区域,激活它们的表达,结果使去饱和酶的水平增加和脂肪酸的去饱和。最后,多不饱和脂肪酸的积累导致膜流动性的恢复和与膜相关的酶活性的提高。生物膜感受温降的功能已在集胞藻 6803 质膜膜脂脂肪酸的氢化反应中得到证实。上述模型至少适用于蓝藻[5]。在 *Escherichia coli* 中证实存在着冷休克蛋白,涉及许多细胞功能,如转录、

翻译、mRNA降解、重组和DNA解旋,核糖体很可能是冷休克蛋白的感受器。蓝藻在低温下去饱和酶表达的调节,很可能与冷休克反应类似[14]。

第2种模型认为,去饱和酶的活性具有负的温度系数,低温激活了膜上的去饱和酶,使低温下具有更高的酶活。第3种模型认为,低温下减少了饱和脂肪酸的合成,结果微调了去饱和酶的活性以保持饱和与不饱和脂肪酸的平衡。但研究发现,Δ12D的酶活具有正的温度系数,低温只可诱导该酶的合成[12]。目前尚缺乏足够的证据支持这两种调控机理。

3.2 光照

研究表明,光照对集胞藻6803中4种酰基脂去饱和酶基因的表达存在着不同的影响,总体上来说,光诱导了特异去饱和酶的表达和脂肪酸组成的改变,但这种诱导作用不依赖于光照强度 *des*C mRNA (Δ9DES)的水平不受光照的影响,*des*B的转录水平在黑暗生长的细胞中极低,而暴露于光下则增加10倍,15 min内达到最高表达水平。*des*A和 *des*D mRNA的水平在黑暗生长的细胞中要比 *des*B mRNA高得多,在光照诱导下它们的转录则提高了10倍。利福平、氯霉素和DCMU能完全阻断 *des*A、*des*B、*des*D的表达,说明光诱导去饱和酶的表达涉及到转录、翻译和光合作用[2]。

光合膜的去饱和作用主要通过光合电子传递系统与光合作用相关联[2]。在研究植物叶绿体膜中的去饱和酶活性时,发现叶绿体中酰基脂族脂肪酸的去饱和作用需要还原态的铁氧还蛋白。铁氧还蛋白的还原,可发生在光照下由来自光系统I的光合电子传递链完成,也可发生在黑暗中由NADPH完成,受铁氧还蛋白-NADP氧化还原酶的催化。但铁氧还蛋白如何将电子传递给去饱和酶,中间是否有别的电子载体尚不清楚,已发现叶绿体基质中可溶性的18:0-ACP去饱和酶就可直接从还原态的铁氧还蛋白接受电子。蓝藻中由于不存在18:0-ACP去饱和酶,可能也采用差别不大的反应机制进行催化。

3.3 温度与光照的协同调控作用

在蓝藻中也存在着与高等植物类似的现象,即光照与温度对脂肪酸去饱和酶基因表达的调控具有协同作用,因而对高光强和低温表现出了更高的敏感性[3]。Δ12和ω3 DES基因的表达与微藻的抗冷性有关,其产物是维持低温和过高光强条件下细胞生长和光合作用所必需的[4],还能促进光系统II从光伤害中恢复,在低温下能增加细胞对光抑制的耐受性[4]。一种可能的机理解释了光照和低温的协同调控作用,即当微藻细胞处于低温环境中,由温度介导的代谢过程需要大量能量,而光合作用器就是提供这种能量的机器[2]。

4 微藻脂肪酸去饱和酶基因的克隆与基因转移

微藻中去饱和酶基因的克隆主要是在蓝藻集胞藻等模式生物中进行的,部分去饱和酶的基因已实现了基因转移,为转基因微藻的应用奠定了基础。

4.1 蓝藻

现已从模式株集胞藻6803中克隆了 *des*A(Δ12DES)、*des*B(ω3 DES)、*des*C(Δ9 DES)和 *des*D(Δ6 DES)基因[11],并以这些基因为探针,又从集胞藻6714、聚球藻7002和异形鱼腥藻中克隆了 *des*A、*des*B和 *des*C[14]。另外,还从钝顶螺旋藻中克隆了 *des*A和 *des*C、*des*D[15]。蓝藻中去饱和酶基因的转移,不仅证实了该基因的功能,也使受体细胞的脂肪酸组成得到了显著改善。例如,将集胞藻6803的 *des*A(Δ12DES)基因转入 *Escherichia coli* 中实现了该酶的过量表达,表达产物表现出很强的酶活[12]。将来源于上述藻株的 *des*A和 *des*B基因都导入聚球藻7942,由于亲本藻株只能在Δ9位使膜脂上的脂肪酸去饱和,导入后的转化子就能够在Δ9、Δ12和ω3位上进行膜脂的去饱和作用,这就意味着可采用遗传操作的方法改变细胞膜脂的饱和度和脂肪酸组成。将集胞藻6803的 *des*D基因接合转移到缺少该酶的鱼腥藻7120中并稳定表达,受体细胞中产生了GLA和$C_{8:4}$的积累。还发现了集胞藻6803的 *des*A和 *des*D基因是连锁的,将它们转入双酶缺陷型的聚球藻7942中表达,使受体细胞产生了亚油酸和γ-亚麻酸。此外,将集胞藻的 *des*D基因转入烟草中表达,使转基因烟草中明显积累了GLA[16]。

4.2 真核微藻

真核微藻种类繁多,目前只对极少数种类进行了研究,如从红藻 *Cyanidioschyzon merolae* 中克隆了Δ9 D的基因[17];从莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中克隆了叶绿体ω6 DES(Δ6 DES)基因[18];从纤细裸藻

(*Euglena gracilis*) 中克隆了 Δ8 DES 的 cDNA 全序列，并证实其蛋白产物与 *Caenhorabitis elegans* 中 Δ6 和 Δ5 DES 的产物有很高的同源性[19]。

5 结论与展望

脂肪酸去饱和酶及其基因克隆、转基因技术的发展，在提高高等植物的耐低温性、改善植物种子油的品质，以及获得抗病害、抗真菌感染等特性的转基因植物方面，已显示出重大的理论和实践意义，在国外已获多项专利。特别值得注意的是，某些特殊种类的微藻，如钝顶螺旋藻、小球藻、等边金藻 (*Isochrysis galbana*)、三角褐指藻、紫球藻、拟微球藻等经济微藻，能在细胞内大量积累 PUFAs(如 GLA、AA、EPA、DHA)[1]，又具有生物安全性，有的已实现了工业化生产。这些微藻既可使用去饱和酶的特异性抑制剂来筛选高产 PUFAs 的抗性突变型，也可应用转基因技术获得高产 PUFAs 的基因工程藻株，再结合工业化生产中的生态调控，完全有可能实现微藻 PUFAs 的高效生产和产品的高值化，对于人类的医疗保健和水产养殖业都具有重大意义。

参考文献

1 Zittelli G C., Lavista F.. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70, 299 ~ 312

2 Kis M., Zsiros O.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**(8): 4 209 ~ 4 214

3 Sakamoto T., Shen G Z.. *Arch. Microbiol.*, 1998, 169: 20 ~ 28

4 Sakamoto T., Higashi S.. *Fems. Microbiol. Letters*, 1997, 152: 313 ~ 320

5 Los DA. and Murata N.. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1394, 3 ~ 15

6 Cahoon EB., Lindqvist Y.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**(10): 4 872 ~ 4 877

7 Berberich T., Harada M.. *Plant. Mol. Biol.*, 1998, 36: 297 ~ 306

8 Mustardy L., Los AD.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93, 10 524 ~ 10 527

9 Khozin I., Adlerstein D.. *Plant. Physiol.*, 1997, 114, 223 ~ 230

10 Shiran D., Khozin I.. *et al.*. *Lipids*, 1996, **31**(12): 1 277 ~ 1 282

11 Los, DA., Ray MK. *et al.*. *Mol. Microbio.*, 1997, **25**(6): 1 167 ~ 1 175

12 Panpoom S., Los DA. *et al.*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1 390, 323 ~ 332

13 Khozin-Goldberg I., Bigogno C., Cohen Z.. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1 439**(3): 384 ~ 394

14 Sakamoto T. and Bryant DA.. *Mol. Microbiol.*, 1997, **23**(6): 1 281 ~ 1 292

15 Murata N., Deshnium P. and Tasaka Y.. In: Gamma-Linolenic Acid, Metabolism and its Roles in Nutrition and Medicine, Huang Y. and Milles DE (Eds.), Champaign, Illinois, AOC Press, 1996, 22 ~ 32

16 Reddy AS. and Thomas TL.. *Nat. Biotechnol.*, 1996, **14**(5): 639 ~ 642

17 Itoh R., Toda K. *et al.*. *Curr. Genet.*, 1998, **33**(3): 165 ~ 170

18 Sato N., Fujiwara S.. *J. Biochem.*, 1997, **122**(6): 1 224 ~ 1 232

19 Wallis JG. and Browse J.. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, **365**(2): 307 ~ 1 622

(本文编辑：张培新)