



莱茵衣藻中脂质代谢过程研究进展

张岩 罗锋 李楠楠*

西南大学资源环境学院 重庆 400715

摘要: 微藻中脂质代谢产生的化合物, 可用于生物燃料、营养品和生物药品的生产, 因此具有重要的经济价值。脂质代谢贯穿微藻的全部生命过程, 对微藻的生长发育和应对外界胁迫都具有重要意义。微藻与研究较清楚的真菌和陆地植物在脂质代谢过程方面具有相似性。当然, 随着微藻脂质代谢相关功能基因逐渐被鉴定, 人们发现微藻的脂质代谢也具有区别真菌和陆地植物的独特性, 因此针对微藻脂质代谢过程的分析具有重要意义。莱茵衣藻是研究脂质代谢过程的模式生物, 已经通过基因组、转录组、蛋白质组和代谢组等方法, 对其质体、内质网和过氧化物酶体中进行的脂质合成和分解过程进行了研究。本文总结了近年来莱茵衣藻质体、内质网和过氧化物酶体中脂质代谢过程的研究成果, 并进行综合阐述。

关键词: 莱茵衣藻, 脂质合成, 脂质降解

Advances on lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*

ZHANG Yan LUO Feng LI Nan-Nan*

College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The compounds derive from lipid metabolism in microalgae have important economic value, which can be used for the production of biofuels, nutraceuticals and green chemicals. Lipid metabolism processes are important in growth and development of microalgae and the response to stress. There are many similarities among microalgae, fungi and land plants in terms of lipid metabolism. With the recent advances in identification of functional genes related to lipid metabolism in microalgae, it has been found that lipid metabolism in microalgae have uncovered unique features, pointing out the necessity to analyze lipid metabolism in microalgae themselves. *Chlamydomonas reinhardtii* is a model organism to study lipid metabolism. Methods such as genom, transcriptom, proteom and metabolom are used to analyze lipid synthesis and lipid degradation processes in plastid, endoplasmic reticulum, and peroxisome. In this review, the authors summarized the recent research progress of lipid metabolism occurs in plastid, endoplasmic reticulum and peroxisome in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, Lipid synthesis, Lipid degradation

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31400063)

***Corresponding author:** Tel: 86-23-68250097; E-mail: linannan2013@swu.edu.cn

Received: 10-04-2018; **Accepted:** 08-06-2018; **Published online:** 22-06-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31400063)

*通信作者: Tel: 023-68250097; E-mail: linannan2013@swu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-10; 接受日期: 2018-06-08; 网络首发日期: 2018-06-22

脂类在生物体中具有重要功能,例如甘油磷脂(Phosphoglycerolipids)、鞘脂(Sphingolipids)和半乳糖脂(Galactoglycerolipids)等类脂是细胞膜的重要组成部分;三酰甘油(Triglycerides, TAG)等中性脂是生物中能量贮存的最主要形式,也是生物燃料的原料^[1-5];磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PtdIns)和脂氧化物(Oxylipins)是生物体重要的信号分子^[6]。脂质合成和降解是生物体基本代谢过程,产生的化合物如生物燃料、饲料、食品和化学品等都具有重要的经济价值^[7]。脂质代谢是生物体基本代谢之一,对脂质代谢途径的研究不仅具有理论意义,还具有广泛的应用价值,如利用基因工程技术生产有用脂肪酸、改善生物燃料和脂肪的品质、增加生物体抗逆性和设计除草剂等。

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是单细胞真核藻类,因具有细胞结构简单、基因工程操作简便、已完成全基因组测序等优势,广泛用于分子遗传学和基因工程研究^[8-12],是研究脂质代谢的模式生物^[13-14]。

莱茵衣藻中的脂质代谢过程,主要包括脂质合成和脂质降解^[7]。在质体中主要进行类囊体膜脂的合成;在内质网中主要进行储能物质 TAG 的形成;在过氧化物酶体则主要进行脂质的降解过程,为生命活动提供能量,具体过程如图 1 所示。各细胞器内的脂质代谢过程相互联系、互为补充,并且在胁迫进行应激响应时,各个细胞器间的脂质流动会更为频繁^[15]。近年来,有很多针对莱茵衣藻中的脂质代谢通路的研究^[16]。下面就近年来莱茵衣藻中脂质代谢过程的研究进展进行详细综述。

1 叶绿体内油脂活动

1.1 酰基-ACP 合成过程

在质体内通过乙酰辅酶 A 羧化酶(Acetyl-CoA carboxylase, ACCase)、脂肪酸合成酶(Fatty acid synthase, FAS)多酶复合体催化生成酰基-ACP。其中 ACCase 能催化乙酰-CoA 生成丙二酸单酰-CoA

(Malonyl-CoA), FAS 继续催化丙二酸单酰-CoA 和乙酰-CoA,以每次增加两个碳的连续聚合反应,进行酰基链延伸^[17]。延伸后的酰基链为防止被降解,又与酰基载体蛋白(Acyl carrier protein, ACP)结合,生成酰基-ACP (Acyl-ACP)^[18-19]。生成的酰基-ACP 主要包括两个去向:一是合成游离脂肪酸,并且从质体运至内质网中进行延伸和加工。二是在质体内参与合成质体脂质。微藻根据生长状态和对胁迫的应激响应,调整两个去向的分配比例。例如,在微藻生长旺盛的对数期,会合成大量的类囊体膜脂,而在生长不活跃的平台期,会合成大量的 TAG 以储存能量。在氮饥饿等胁迫条件下,生物体也会应激合成更多的 TAG^[20]。

1.2 游离脂肪酸的合成及转运

1.2.1 合成游离脂肪酸过程

酰基-ACP 在酰基-ACP 硫酯酶(Acyl-ACP thioesterase, FAT)作用下脱去 ACP,形成游离脂肪酸(Free fatty acid, FFA)。由于酰基-ACP 合成速率不同和 FAT 底物特异性,形成的游离脂肪酸主要为软脂酸(Palmitic acid, 16:0)和油酸(Oleic acid, 18:1 Δ^9)及少量的硬脂酸(Stearic acid, 18:0)^[21]。合成的游离脂肪酸主要分布在质体边缘,为防止积累过多的游离脂肪酸产生毒害作用,很快就会运出质体进入内质网,参与磷脂酸(Phosphatidic acid, PA)和三酰甘油的合成^[22-23]。Blatti 等^[24]研究表明,莱茵衣藻中的脂肪酸酰基载体蛋白(CrACP)和酰基-ACP 硫酯酶(CrTE)间具有蛋白质间相互作用,共同参与质体中脂肪酸水解过程,形成游离脂肪酸,并且 CrTE 基因超表达莱茵衣藻中的短链脂肪酸含量增加,而其它藻种的酰基-ACP 硫酯酶在莱茵衣藻中过量表达,却不能提高短链脂肪酸含量。

1.2.2 游离脂肪酸运出质体过程

在质体内部合成的游离脂肪酸需要穿过质体的双层膜结构向外运输。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,游离脂肪酸先经过位于质体内膜的 FAX1 (Fatty acid export 1)蛋白的转运后,又经过位

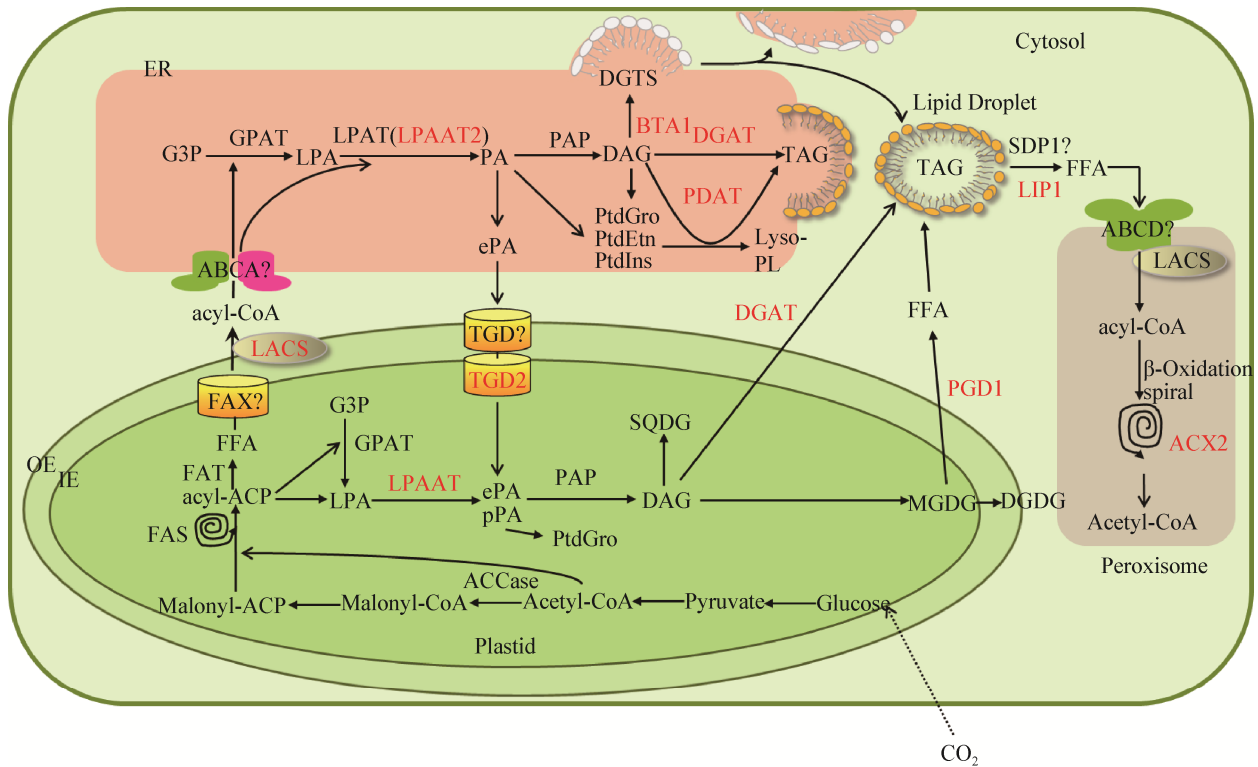


图 1 莱茵衣藻脂质代谢网络图

Figure 1 Pathways and processes involved in lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*

注: ER: 内质网; IE: 质体内膜; OE: 质体外膜; ACCase: 乙酰辅酶 A 羧化酶; FAS: 脂肪酸合成酶; ACP: 酰基载体蛋白; FAT: 酰基-ACP 硫酯酶; FFA: 游离脂肪酸; LACS: 长链脂酰辅酶 A 合成酶; ABCA: ABC 转运蛋白 A 亚族; G3P: 甘油-3-磷酸; GPAT: 甘油-3-磷酸酰基转移酶; LPA: 溶血磷脂酸; LPAT: 溶血磷脂酸酰基转移酶; PA: 磷脂酸; PAP: 磷脂酸磷酸酯酶; DAG: 二酰甘油; SQDG: 硫代异鼠李糖甘油二酯; MGDG: 二酯甘油单半乳糖脂; DGDG: 二酯甘油双半乳糖脂; TAG: 三酰甘油; PtdGro: 磷脂酰甘油; PtdEtn: 磷脂酰乙醇胺; PtdIns: 磷脂酰肌醇; DGAT: 二酰甘油酰基转移酶; PDAT: 磷脂二酰甘油酰基转移酶; BTA1: 甜菜碱合成酶; DGTS: 1,2-二酰基甘油-O-4'-(N,N,N-三甲基)高丝氨酸; Lyso-PL: 溶血磷脂; PGD1: 质体半乳糖脂降解酶; SDP1: TAG 脂肪酶; LIPI: 脂肪酶 1; ABCD: ABC 转运蛋白 D 亚族; ACX2: 酰基辅酶 A 氧化酶。

Note: ER: Endoplasmic reticulum; IE: Inner plastid envelope; OE: Outer plastid envelope; ACCase: Acetyl-CoA carboxylase; FAS: Fatty acid synthase; ACP: Acyl carrier protein; FAT: Acyl-ACP thioesterase; FFA: Free fatty acid; LACS: Long chain acyl-CoA synthetase; ABCA: Half-size ABC transporter subfamily A; G3P: Glycerol-3-phosphate; GPAT: Glycerol-3-phosphate acyltransferase; LPA: Lysophosphatidic acid; LPAT: Lysophosphatidic acid acyl-transferase; PA: Phosphatidic acid; PAP: Phosphatidic acid phosphatase; DAG: Diacylglycerol; SQDG: Sulfoquinovosyldiacylglycerol; MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol; DGDG: Digalactosyldiacylglycerol; PtdGro: Phosphatidylglycerol; PtdEtn: Phosphatidylethanolamine; PtdIns: Phosphatidylinositol; TAG: Triacylglycerol; PDAT: Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase; DGAT: Diacylglycerol acyltransferase; BTA1: Betaine lipid synthase 1; DGTS: Diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine; Lyso-PL: Lysophospholipids; PGD1: Plastid galactoglycerolipid degradation 1; SDP1: Sugar dependent 1; LIPI: Lipase 1; ABCD: ABC transporter subfamily D; ACX2: Acyl-CoA oxidase.

于叶绿体外膜的长链脂酰辅酶 A 合成酶(Long-chain acyl-CoA synthetase, LACS)酰基化, 形成酰基辅酶 A 进入下游代谢途径^[25]。

在拟南芥中, FAX1 是介导质体中脂肪酸向外输出的内膜转运蛋白。AtFAX1 通过 α -螺旋形成跨膜结构, 并且可能通过一个朝向叶绿体基质方向的两性 α -螺旋结合游离脂肪酸, 实现对游离脂肪酸的

跨质体内膜转运。FAX1 主要影响生物量、雄性生殖发育和脂肪酸衍生物的合成。通过对 FAX1 基因缺失突变体的脂质含量进行分析, 发现内质网中的脂质如 TAG 含量减少, 而质体中的脂质含量增多, 这与拟南芥 FAX1 基因超表达植株结果相反^[26]。并且将拟南芥 FAX1 转入酵母功能缺失型突变体, 酵母恢复脂肪酸转运功能。拟南芥中 FAX 家族共有

表 1 莱茵衣藻中参与脂质代谢过程的基因和蛋白质汇总

Table 1 A summary of genes and proteins involved in lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*

代谢过程 Pathway	基因名称 Gene ID	基因名称缩写 Gene name abbreviations	功能描述 Description	亚细胞定位 Subcellular localization	参考文献 References	
酰基-ACP 合成 Acyl-ACP synthesis	Cre12.g519100.t1.2	ACX1(α -CT)	α -羧基转移酶(ACCCase 复合体) α -Carboxyltransferase (ACCCase complex)	C	N	
	Cre12.g484000.t1.2	BCX1(β -CT)	β -羧基转移酶(ACCCase 复合体) β -Carboxyltransferase (ACCCase complex)	C	N	
	Cre17.g715250.t1.2	BCC1	生物素羧基载体蛋白(ACCCase 复合体) Biotin carboxyl carrier protein (ACCCase complex)	C	N	
	Cre01.g037850.t1.1	BCC2	生物素羧基载体蛋白(ACCCase 复合体) Biotin carboxyl carrier protein (ACCCase complex)	C	N	
	Cre08.g359350.t1.2	BCR1	生物素羧化酶(ACCCase 复合体) Biotin carboxylase (ACCCase complex)	C	N	
	Cre16.g673109.t1.1	ACP1	酰基载体蛋白 Acyl carrier protein	M	N	
	Cre13.g577100.t1.2	ACP2	酰基载体蛋白 Acyl carrier protein	C	N	
	Cre11.g467723.t1.1	KAS1	β -酮脂酰-CoA 合酶(FAS 复合体) β -Ketoacyl-CoA-synthase (FAS complex)	C	N	
	Cre07.g335300.t1.2	KAS2	β -酮脂酰-ACP 合酶(FAS 复合体) β -Ketoacyl-CoA-synthase (FAS complex)	C	N	
	Cre04.g216950.t1.2	KAS3	β -酮脂酰合成酶(FAS 复合体) β -Ketoacyl-CoA-synthase (FAS complex)	C	N	
	Cre03.g208050.t1.2	HAD1	β -羟酰-ACP 脱水酶(FAS 复合体) β -Hydroxyacyl-ACP dehydratase (FAS complex)	C	N	
	Cre03.g172000.t1.2	KAR1	β -酮脂酰-ACP 还原酶(FAS 复合体) β -Oxoacyl-ACP reductase (FAS complex)	C	N	
	Cre06.g294950.t1.1	ENR1	烯酰基-ACP 还原酶(FAS 复合体) Enoyl-ACP reductase (FAS complex)	C	N	
	脂肪酸输出 Fatty acid export pathway	Cre06.g256750.t1.2	TE	酰基-ACP 硫酯酶 Acyl-ACP thioesterase	C	[24]
		Cre10.g421750.t1.1	FAX1	跨膜蛋白 Transmembrane protein	C	N
Cre08.g366000.t1.2		FAX2	跨膜蛋白 Transmembrane protein	O	N	
Cre03.g182050.t1.2		ACS1(LCS1)	长链脂酰辅酶 A 合成酶 Long-chain acyl-CoA synthetase	O	[36,38]	
Cre13.g566650.t2.1		ACS2(LCS2)	长链脂酰辅酶 A 合成酶 Long-chain acyl-CoA synthetase	O	[4,36-37]	
PA 合成 PA synthesis	Cre06.g273250.t1.2	GPAT	甘油-3-磷酸酰基转移酶 Glycerol-3-phosphate acyltransferase	C	N	
	Cre09.g398289.t1.1	LPAAT1	溶血磷酸酰基转移酶 Lysophosphatidic acid acyltransferase	C ^E	[44]	
	Cre17.g707300.t1.2	LPAAT2	溶血磷酸酰基转移酶 Lysophosphatidic acid acyltransferase	SP ^E	[45]	

(待续)

(续表 1)					
TAG 合成	Cre14.g613950.t1.2	ABCA	ABC 转运蛋白 A 亚族	SP	N
TAG synthesis			ABC transporter subfamily A		
	Cre05.g230900.t1.1	PAP1	磷脂酸磷酸酯酶	SP	N
	Cre05.g240000.t1.2	PAP2	Phosphatidate phosphatase 磷脂酸磷酸酯酶	SP	[59]
	Cre03.g150050.t1.1	PAH1	Phosphatidate phosphatase 磷脂酸磷酸酯酶	C	N
	Cre01.g045903.t1.1	DGAT1	Phosphatidate phosphatase 二酰甘油酰基转移酶, DGAT I 型	C	[13,20,64,66-69]
			Diacylglycerol acyltransferase, DGAT Type I		
	Cre12.g557750.t1.1	DGTT1	二酰甘油酰基转移酶, DGAT II 型	SP	
			Diacylglycerol acyltransferase, DGAT Type II		
	Cre09.g386912.t1.1	DGTT2	二酰甘油酰基转移酶, DGAT II 型	SP	
			Diacylglycerol acyltransferase, DGAT Type II		
	Cre06.g299050.t1.2	DGTT3	二酰甘油酰基转移酶, DGAT II 型	O	
			Diacylglycerol acyltransferase, DGAT Type II		
	Cre03.g205050.t1.2	DGTT4	二酰甘油酰基转移酶, DGAT II 型	SP	
			Diacylglycerol acyltransferase, DGAT Type II		
	Cre02.g079050.t1.1	DGTT5	二酰甘油酰基转移酶, DGAT II 型	M	
			Diacylglycerol acyltransferase, DGAT Type II		
	Cre02.g106400.t1.1	PDAT1	磷脂二酰甘油酰基转移酶	C	[66,72]
			Phospholipid diacylglycerol acyltransferase		
DGTS 合成	Cre07.g324200.t1.2	BTA1	甜菜碱合成酶	O	[74,76]
DGTS synthesis			Diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine synthase		
脂质转移	Cre06.g268200.t1.2	TGD1	ABC 转运蛋白	M	N
Lipid trafficking			ABC transporter		
	Cre16.g694400.t1.2	TGD2	ABC 转运蛋白	C ^E	[41]
			ABC transporter		
	Cre16.g658526.t1.1	TGD3	ABC 转运蛋白	C	N
			ABC transporter		
脂质分解	Cre03.g193500.t1.2	PGD1	质体半乳糖脂降解酶	O	[15,80]
Lipid degradation			Plastid galactoglycerolipid degradation		
	Cre16.g699100.t1.1	SDP1	TAG 降解酶	M	N
			TAG lipase		
	Cre09.g390615.t1.1	LIP1	DAG 降解酶	O	[115]
			DAG lipase		
脂肪酸去饱和作用	Cre17.g701700.t2.1	SAD/FAB2	Δ^9 硬脂酰-ACP 去饱和酶	C	[88-89]
Fatty acid desaturation			Δ^9 Stearoyl-ACP desaturase		
	Cre17.g711150.t1.2	FAD2	ω -6 脂肪酸去饱和酶	O	[93]
			ω -6 Fatty acid desaturase		
	Cre13.g590500.t1.1	FAD6	ω -6 脂肪酸去饱和酶	C	[91]
			ω -6 Fatty acid desaturase		

(待续)

(续表 1)

	Cre06.g288650.t1.2	FAD6a	ω -6 脂肪酸去饱和酶 ω -6 Fatty acid desaturase	C	N
	Cre01.g038600.t1.2	FAD7	ω -3 脂肪酸去饱和酶 ω -3 Fatty acid desaturase	C ^E	[96-97,99]
	Cre01.g037700.t1.2	Δ 4FAD	Δ^4 脂肪酸去饱和酶 Δ^4 Fatty acid desaturase	C ^E	[104]
	Cre10.g453600.t1.2	DES	Δ^5 脂肪酸去饱和酶 Δ^5 Fatty acid desaturase	O	[108]
β -氧化过程 β -Oxidation pathway	Cre15.g637761.t3.1	ABCD	ABC 转运蛋白 D 亚族 ABC transporter subfamily D	M	N
	Cre12.g507400.t1.2	ACS3(LCS3)	长链酰基辅酶 A 合成酶 Long-chain acyl-CoA synthetase	M	N
	Cre16.g689050.t1.1	ACX1	酰基辅酶 A 氧化酶 Acyl-CoA oxidase	C	N
	Cre05.g232002.t2.1	ACX2	酰基辅酶 A 氧化酶 Acyl-CoA oxidase	P ^E	[125]
	Cre16.g687350.t1.2	ACX3	酰基辅酶 A 氧化酶 Acyl-CoA oxidase	M	N
	Cre16.g695400.t1.1	ACX4	酰基辅酶 A 氧化酶 Acyl-CoA oxidase	M	N

注: (1): M: 线粒体; C: 叶绿体; P: 过氧化物酶; SP: 分泌途径; O: 其他部位; E: 此基因的亚细胞定位已被试验证明; N: 基因功能未得到验证; (2): 利用预测工具 PredAlgo (<https://giavap-genomes.ibpc.fr/cgi-bin/predalgotdb.perl?page=main>), 对莱茵衣藻中脂质代谢相关基因进行亚细胞定位预测. 在设计 PredAlgo 程序时, 由于过氧化物酶蛋白序列还未得到鉴定, 所以 PredAlgo 预测只是简单的归为线粒体、叶绿体、分泌途径和其他^[125,128]. 综合 PredAlgo 的预测结果和已有试验的研究结果绘制此表格.

Note: (1): M: Mitochondrion; C: Chloroplast; P: Peroxisome; SP: Secretory pathway; O: Other; E: The subcellular localization of this gene has been experimentally demonstrated; N: The function of this gene was not verified. (2): Using the PredAlgo program to predict the subcellular localization (<https://giavap-genomes.ibpc.fr/cgi-bin/predalgotdb.perl?page=main>). In the design of PredAlgo program, the prediction is simply attributed to mitochondria, chloroplast, secretory pathway and other category, because the peroxidase protein sequence has not been identified^[125,128]. Comprehensive PredAlgo prediction results and experimental results have been used to draw this table.

7 个成员, 其中 FAX2、FAX3 和 FAX4 可能与 FAX1 有相似功能^[25]. 莱茵衣藻基因组中编码了 2 个 AtFAX1 的同源蛋白, 但莱茵衣藻中 FAX1 功能还需进行后续研究.

长链脂酰辅酶 A 合成酶(Long-chain acyl-CoA synthetase, LACS)含有 AMP 绑定域标签, 在脂质的合成和分解过程都发挥重要作用. 一方面参与长链脂质的合成过程, 为内质网中的脂质合成过程提供底物^[27]. 另一方面参与脂质分解过程, 为过氧化物酶体的 β -氧化过程提供底物^[28]. 在拟南芥中, 定位在质体外膜上的 LACS9, 能酯化游离脂肪酸产生脂酰-CoA, 并且脂酰-CoA 能进入内质网中参与长链脂质的合成过程^[29]. 对 LACS9 基因缺失突变体研究发现, LACS9 催化了质体中 90% 的脂酰-CoA 合成过程^[30]. 但 *lacs9* 突变体表型与野生型无显著

差异, 说明 LACS9 可能与其他基因存在相似功能. 有研究表明 LACS9 还能将脂肪酸运回质体, 参与脂肪酸的双向运输^[31]. 拟南芥中 LACS 家族至少有 9 个成员, 且具有不同的功能. 有研究表明, 在拟南芥种子中油脂的合成过程中, LACS9 与内质网上的 LACS1 和 LACS4 具有相似功能^[31-32]. 在拟南芥角质层形成过程中, 定位在内质网上的 LACS1 和 LACS2 具有相似功能^[33-34], 而 LACS6 和 LACS7 则被证明参与脂肪酸 β -氧化过程^[35].

莱茵衣藻中共有 3 个 LACS 蛋白, 分别命名为 CrACS1-3, 其中 ACS1 和 ACS2 已被证明参与胞内脂类成分的合成和胞外脂类成分的分泌^[36-37]. 宋燕子等^[38]证明 CrACS1 能恢复 YB525(ACS 基因部分缺失)功能缺失型酵母表型, 且 CrACS1 具有底物偏好性, 活化并优先利用 C16:1 和 C14:0. Li 等^[37]

在进行莱茵衣藻脂质转运突变体的反向遗传学筛查时,证实了 CrACS2 能酯化游离脂肪酸,从而参与三酰甘油合成过程。Rengel 等^[4]研究表明, CrACS2 基因超表达的莱茵衣藻,在含氮的培养条件下,乙酰辅酶 A 累积量能提高 60%;在氮饥饿胁迫条件下, TAG 的积累量为野生型的 2.4 倍,并且通过对膜脂成分分析发现, TAG 含量的增高是通过增加质体中用于合成脂酰-CoA 的碳通量,而不是以抑制膜脂的合成作为代价。Jia 等^[36]研究发现, CrACS1 和 CrACS2 也参与将脂肪酸分泌到胞外,为在高产油微藻细胞中实现脂肪酸外分泌和降低产油成本提供了依据。

1.3 合成类囊体膜脂过程

由于 sn-2 酰基转移酶具有酰基特异性,所以将在质体中进行的质体脂质合成过程称为原核生物途径(Prokaryotic pathway),表现为甘油脂的甘油主链 sn-2 位上连接着链长为 16 个碳原子的脂肪酸,而脂质在内质网中进行脂肪酸延伸和加工后,又运回质体中参与质体脂质合成过程称为真核生物途径(Eukaryotic pathway),表现为甘油脂的甘油主链 sn-2 位上连接着链长为 18 个碳原子的脂肪酸^[21],可以通过质体甘油脂的甘油主链 sn-2 位上的酰基成分加以区分^[39],并且两种生物合成路径相互联系,互为补充。在拟南芥中,类囊体膜脂是通过两条途径合成的,一条是原核途径:在质体中通过甘油-3-磷酸酰基转移酶(Glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)、溶血磷脂酸酰基转移酶(Lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT)催化甘油-3-磷酸(Glycerol-3-phosphate, G3P)合成 sn-2-C₁₆-PA,进而形成类囊体膜脂。另一条是真核途径:在内质网中利用 GPAT 和 LPAT 合成 sn-2-C₁₈-PA,然后通过三半乳糖基二甘油酯(Trigalactosyldiacylglycerol, TGD)蛋白将内质网中合成的 PA 运回质体,用于合成类囊体膜脂^[25,40],经过以上两条途径合成的类囊体膜脂的甘油主链 sn-2 位上为 C₁₆ 和 C₁₈ 的混合物。但是与拟南芥等高等植物不同,莱茵衣藻的类囊体膜脂的甘油主链

sn-2 位上只有 C₁₆ 而没有 C₁₈^[7,41],则莱茵衣藻与高等植物的类囊体膜脂合成过程既存在相似性也存在差异性。在生长环境发生波动时,质体脂质会发生分解,以保证生物体的正常生理功能。

1.3.1 原核途径合成类囊体膜脂

与陆生植物和蓝藻相似,莱茵衣藻类囊体膜脂主要成分是二酯甘油单半乳糖脂(Monogalactosyldiacylglycerol, MGDG)、二酯甘油双乳糖脂(Digalactosyldiacylglycerol, DGDG)、硫代异鼠李糖甘油二酯(Sulfoquinovosyldiacylglycerol, SQDG)和磷脂酰甘油(Phosphatidylglycerol, PtdGro)。因为在莱茵衣藻基因组中编码了 AtGPAT 和 AtLPAT 同源蛋白,所以莱茵衣藻与高等植物中 PA 的合成路径具有潜在的相似性^[7,42]。已有研究表明,将缺刻叶球藻(*Lobosphaera incisa*)的 LiGPAT 基因在莱茵衣藻中过量表达, LiGPAT 基因超表达莱茵衣藻的 TAG 含量提高 50%^[43]。在莱茵衣藻中,定位在质体上的 LPAAT1,能以 16:0-ACP 为酰基供体形成 sn-2-C₁₆-PA,合成的 PA 作为中间体继续参与形成质体脂质^[44]。综上所述,莱茵衣藻与拟南芥中,利用原核途径合成类囊体膜脂的过程具有相似性。

1.3.2 真核途径合成类囊体膜脂

莱茵衣藻与拟南芥中,利用真核途径合成质体脂质的过程在具有相似性的同时还具有差异性。研究表明,与拟南芥 sn-2 酰基转移酶 AtLPAT 不同,莱茵衣藻中 CrLPAAT1 和 CrLPAAT2 的都以 16 个碳的脂肪酸作为酰基供体。其中 CrLPAAT2 定位在内质网上,更偏好 16:0-CoA 而不是 18:0-CoA 作为酰基供体,从而在内质网中合成 sn-2-C₁₆-PA^[45]。内质网中 PA 是合成磷脂和 TAG 的共同中间物,一部分通过 TGD 蛋白将其从内质网运回质体,在质体中参与合成类囊体膜脂。这也与莱茵衣藻中磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PtdIns)、MGDG 和 DGDG 的甘油主链 sn-2 位全为 C₁₆ 脂肪酸的结果相符^[7,46]。因为无论是通过原核途径还是真核途径,类囊体膜脂甘油主链的 sn-2 位全为 16 个碳脂肪酸^[45]。另一部分继续在内质网中参与合成 TAG。这也与在缺氮

培养条件下, 约有 70% 的 TAG 甘油主链 sn-2 位为 C₁₆ 脂肪酸的结果相符^[45,47-48]。内质网中也存在 sn-2 为 C_{18:3} 的脂质, 这说明内质网中还存在未被鉴定的 LPAAT 酶^[49]。

质体和内质网衍生的脂质都是合成质体类囊体膜脂的前体, 说明真核途径合成的脂质需要穿过质体的两层膜结构, 才能进入质体^[21]。在植物中, ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)的 I 亚族又名 TGD 蛋白, 能将内质网产生脂质运回质体^[18,25]。在拟南芥中大约 30%–50% 的已输出质体的脂肪酸, 会通过 TGD 蛋白共同作用再次运回质体^[50]。拟南芥中 TGD 蛋白家族共有 5 个成员, 分别命名为 AtTGD1–5。研究表明, 拟南芥 TGD1-3 作为一个复合体共同参与叶绿体膜间隙到质体基质的运输^[51-53], 其中位于质体内膜的 TGD1 能促进 DGDG 的积累, 且 TGD1 功能缺失突变体会造成脂质从内质网向质体的转移途径受到破坏^[54-55], 位于叶绿体膜间隙的 TGD2 负责结合底物 PA, 位于质体基质中 TGD3 能为复合蛋白的转运提供能量^[50]。位于叶绿体外膜上 TGD4 参与质体外膜上 PA 转运^[25,56]。而新发现的 TGD5 蛋白可能连接 TGD1-3 蛋白与 TGD4 蛋白, 通过蛋白间的相互作用促进脂质从外膜向内膜转移^[57]。

对莱茵衣藻的脂滴进行蛋白质组学分析, 发现莱茵衣藻中有 3 个拟南芥 TGD1-3 蛋白的同源蛋白, 分别命名为 CrTGD1–3, 却没有发现拟南芥 TGD4 和 TGD5 蛋白的同源蛋白^[42]。目前只有 CrTGD2 的功能被鉴定^[41]。莱茵衣藻 TGD2 定位在叶绿体内膜上, 体外试验证明, 莱茵衣藻 TGD2 结合的主要脂质成分是 PA。通过对野生型和 CrTGD2 基因缺失突变体进行动力学分析, Warakanont 等^[41]证明 CrTGD2 参与脂质跨质体内膜运输, *crtad2* 突变体的存活率降低, 质体外膜 PA 大量积累刺激 MGDG 合成酶活性, MGDG 含量增高, 并且有更多的 MGDG 向 TAG 转化, 脂滴中的 TAG 积累量增加。莱茵衣藻中没有发现 TGD4 和 TGD5 蛋白, 所以何种蛋白参与将脂质从内质网转移至质体内膜还需

后续研究^[41]。

2 内质网内油脂活动

2.1 脂酰-CoA 进入内质网过程

在拟南芥中, 通过定位在内质网上 ABCA9 转运蛋白, 将脂酰-CoA 转运至内质网。在种子成熟中期和后期 ABCA9 会特异性表达, TAG 合成速率达到最大并且油脂快速积累, 说明 ABCA9 可促进脂酰-CoA 进入内质网, 进行 TAG 的组装。有研究表明, 与野生型相比, ABCA9 基因缺失突变体种子中, TAG 积累量减少 35%, 但脂肪酸种类不变。ABCA9 基因超表达植株, 能在不影响蛋白质和碳水化合物的含量的情况下, 显著提高 TAG 积累量^[58]。综上所述, 在种子形成过程中, ABCA9 能为内质网中 TAG 的生物合成提供脂肪酸基质^[50]。莱茵衣藻的细胞器膜结构和脂质合成路径都与拟南芥相似, 并且莱茵衣藻基因组中编码了 AtABCA9 同源蛋白, 推测在莱茵衣藻的内质网上也存在转运蛋白, 能将细胞质中的脂酰-CoA 运输至内质网中进行脂质合成, 但还需进一步试验验证。

2.2 TAG 合成

莱茵衣藻和拟南芥有相似的 TAG 合成路径, 都是先通过 GPAT、LPAAT 先合成 PA, 再通过磷脂酸磷酸酯酶(Phosphatidic acid phosphatase, PAP)、二酰甘油酰基转移酶(Diacylglycerol acyltransferase, DGAT)和磷脂二酰甘油酰基转移酶(Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase, PDAT)催化 PA 合成 TAG。

PAP 能将甘油-3-磷酸 sn-3 位置上的磷酸去磷酸化, 形成 TAG 的前体物质 DAG^[59-61]。酵母、哺乳动物和拟南芥中 PAP 酶的功能已经得到广泛验证^[62-63]。莱茵衣藻中基因组中编码了 3 个植物 PAP 同源蛋白, 分别命名为 CrPAP1、CrPAP2 和 CrPAH1^[7,9]。现有研究表明, 在缺氮条件下, CrPAP1 和 CrPAP2 表达量提高, 能促进 TAG 合成^[20]。其中, Deng 等^[59]证明, CrPAP2 基因沉默突变体中 TAG 含量减少, 而 CrPAP2 超表达莱茵衣藻中 TAG

含量提高。

DGAT 能将脂酰-CoA 分子上脂肪酸连至 DAG 的 sn-3 位形成 TAG, 催化 TAG 生物合成的最后一步, 是 TAG 合成的限速酶。根据酰基特异性和表达模式的不同, 将 DGAT 分别定为 I 型(属于酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶家族, Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase, ACAT)和 II 型(属于单酰甘油酰基转移酶家族, Monoacylglycerol acyl transferase, MGAT)^[64]。将三角褐指藻中 PtDGAT1、PtDGAT2 和 PtDGAT3 在微拟球藻大洋种(*Nannochloropsis oceanica*)中过量表达, 能显著提高转化藻的油脂含量^[65]。在莱茵衣藻中有 1 个 I 型 DGAT 酶, 命名为 CrDGAT1, 有 5 个 II 型 DGAT 酶, 分别命名为 CrDGTT1-5^[13,66]。Liu 等^[67]利用同位素标记法, 证明莱茵衣藻 DGATs 酶具有不同的底物特异性。DGTT1 存在质体和内质网中, 能催化原核和真核途径产生的 sn-2-C₁₆-DAG 生成 TAG^[45]。DGTT2 和 DGTT3 参与催化真核途径产生的 DAG, 参与内质网中 TAG 的生物合成。DGTT1、DGTT2、DGTT3、DGTT5 单基因下调突变体中, TAG 含量降低^[67-68]。但 DGTT4 基因沉默突变体反而引起 TAG 含量增高。分别将 DGTT1、DGTT2 和 DGTT3 转入酵母突变体, 酵母都能恢复 TAG 合成功能, 但是 DGTT4 却不能恢复酵母突变体表型^[69]。胁迫条件下, CrDGAT 酶的表达量增加。例如, 氮饥饿胁迫会引起 PDAT1、DGAT1 和 DGTT1 表达量增加^[20,66]。硫、磷、锌和铁饥饿, 能导致 DGTT1 和 DGAT1 表达量增加^[70]。而且在不同的营养元素胁迫下, DGTT 同工酶的表达量也存在差异。

PDAT 能将甘油磷脂如 PtdIns、PtdGro 和磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PtdEtn)等 sn-2 位上的酰基链转移至 DAG 甘油主链的 sn-3 位形成 TAG 和溶血磷脂(Lysophospholipids)^[71]。莱茵衣藻基因组中仅编码了 1 个 PDAT 酶, 命名为 CrPDAT1^[42]。与酵母和高等植物中 PDAT 功能相似, CrPDAT1 参与甘油磷脂酰基转移和 TAG 合成过程,

将磷脂转化为 TAG 能增强脂质的流动性^[66,72]。此外, PDAT 酶还具有水解酶活性。体外试验证明, CrPDAT 还能水解 TAGs、磷脂、半乳糖脂和胆固醇脂等^[72]。与野生型相比, CrPDAT 基因缺失突变体, TAG 积累量减少 25%, 但不会完全消除 TAG, 说明在脂质合成过程中 PDAT 与 DGAT 有相似功能^[66,72]。

虽然莱茵衣藻和拟南芥的脂质代谢通路具有相似性, 但是也存在部分的差异。莱茵衣藻与大部分真核生物不同, 缺乏主要的膜脂组分磷脂酰胆碱(Phosphatidyl cholines, PtdCho), 却替代性的大量合成甜菜碱(Diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine, DGTS), 因为 DGTS 和 PtdCho 的结构相似, DGTS 是膜脂的主要成分之一, 可能能够替代 PtdCho 的功能^[73]。用生物信息学方法分析发现, 莱茵衣藻 BTA1 (Betaine lipid synthase 1)酶能将 S-腺苷基甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM)的高丝氨酸基团和甲基基团转移至 DAG, 参与形成 DGTS^[74]。CrBTA1 在大肠杆菌中异源表达, 大肠杆菌重组菌株能合成 DGTS。另有研究表明, 当粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)处于磷饥饿胁迫下, 也会通过 BTA1 酶合成没有磷元素的 DGTS, 而不再合成 PtdCho^[75]。此外, BTA1 还能影响膜脂和中性脂之间的脂质转化。Lee 等^[76]研究表明, 莱茵衣藻 BTA1 基因下调突变体, 可能通过 DGTS 负调控和内质网应激, 引起 DGTS 和 MGDG 积累量减少(其它半乳糖脂和磷脂含量不变), TAG 积累量增加, 这说明利用基因工程方法对膜脂合成路径进行修饰, 不仅能提高 TAG 积累量, 还能调整膜脂和中性脂之间的脂质转化。

脂滴(Lipid droplet)是近圆形的细胞器, 也是中性脂的主要储存场所, 当细胞需要能量或者脂类分子时, 脂滴中的脂类被释放出来, 以维持生物体的正常生命活动。原有的研究表明, 莱茵衣藻在缺氮或高光胁迫条件下, 能在叶绿体内检测到脂滴^[48,77-78], 但随着研究的深入, Moriyama 等^[79]通过

对原研究结果进行重复,并通过显微镜对脂滴进行观察,发现脂滴存在于叶绿体膜与细胞膜形成的间隙中,但是却没有证据表明叶绿体基质中存在脂滴。Moriyama 等的研究结果表明,叶绿体中脂质与脂滴中 TAG 之间存在脂质代谢活动。

3 类囊体膜脂降解

在胁迫条件下,拟南芥和莱茵衣藻都能通过分解半乳糖脂促进 TAG 的积累,但是两者分解半乳糖脂路径不同,且产生的用于合成 TAG 的底物不同^[25]。在莱茵衣藻中,质体半乳糖脂肪酶 (Plastid galactoglycerolipid degradation 1, PGD1)是目前唯一已知的参与类囊体膜脂分解的酶^[80]。在胁迫条件下,PGD1 表达量提高,参与水解 MGDG,为 TAG 的生物合成提供游离脂肪酸。将 CrPGD1 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中异源表达,大肠杆菌重组菌株能水解 MGDG 产生游离脂肪酸和 Lyso-MGDG^[80]。CrPGD1 会影响微藻细胞生长状况和耐受能力。研究表明,在氮饥饿胁迫条件下,CrPGD1 基因缺失突变体中 TAG 积累量只有野生型的一半(减少的成分主要是油酸),还会产生更多的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)并且抑制细胞生长^[15]。综上所述,在氮饥饿胁迫条件下大量累积的 TAG,一部分是由质体内从头合成的游离脂肪酸,参与形成的 TAG;另一部分是由类囊体膜脂降解产生的游离脂肪酸,参与形成的 TAG。并且在莱茵衣藻脂滴研究时,在脂滴中发现了质体特有的半乳糖脂,进一步证明 TAG 的部分组分来自质体^[81]。已有研究表明,在低温胁迫下的拟南芥叶片,能通过半乳糖脂半乳糖基转移酶(Galactolipid galactosyltransferase, 又名 Sensitive to freezing 2, SFR2)作用下,将 MGDG 转化为 DAG (Diacylglycerol),从而为 TAG 合成提供底物^[82]。

4 脂肪酸去饱和作用

不饱和脂肪酸(Unsaturated fatty acids)参与构成生物膜,对生物膜的形成和物理性质、膜脂中脂肪酸的组成与不饱和度等方面起主要调节作用。莱茵

衣藻是 16 个碳脂肪酸和 18 个碳脂肪酸的混合物,并且脂肪酸中最多含有四个不饱和键^[83]。

脂肪酸去饱和酶(Fatty acid desaturases, FAD)是合成不饱和脂肪酸的关键酶,催化脂肪酸链上特定位置形成双键^[84-85],并且将羧基端(Carboxyl terminus)位置用 Delta (Δ)表示,甲基端(Methyl terminus)位置用 Omega (ω)表示。脂肪酸的去饱和和反应在质体和内质网上进行,并且需要两个电子和一个氧分子^[85],质体中的去饱和反应是由铁氧还蛋白(Ferredoxin)作为电子给体,其中铁氧还蛋白-5 (Ferredoxin-5, FDX5)已被证明能为质体中去饱和酶 Cr Δ 4FAD 和 CrFAD6 提供电子^[86];内质网中的去饱和和反应是由细胞色素 b_5 (Cytochrome b_5 , Cyt b_5)提供电子^[84]。脂肪酸去饱和酶可分为酰基-辅酶 A 去饱和酶(Acyl-CoA desaturases)、酰基-酰基载体蛋白去饱和酶(Acyl-ACP desaturases)和酰基-酯去饱和酶(Acyl-lipid desaturases)^[84]。

4.1 Δ^9 硬脂酰-ACP 去饱和酶

Δ^9 硬脂酰-酰基载体蛋白去饱和酶(Δ^9 Stearoyl-ACP desaturase/Plastid acyl-ACP desaturase, SAD/FAB2)催化形成脂肪酸中的第一个双键,能将质体基质中 18:0-ACP 的 Δ^9 位脱氢形成 18:1 Δ^9 -ACP,即将硬脂酸(18:0)反应生成油酸(18:1 Δ^9)。郭雪洁等^[87]研究表明,低温和高盐胁迫能够提高 CrFAB2 基因表达量,说明莱茵衣藻能迅速改变脂肪酸的组成以适应外界环境的变化。Hwangbo 等^[88]研究表明,与野生型对照相比,CrFAB2 基因超表达莱茵衣藻中的油酸含量增加了约 2.4 倍,亚油酸(Linoleic acid, 18:2 $\Delta^{9,12}$)和总脂肪酸含量都有所增加。de Laeger 等^[89]研究表明,CrFAB2 基因下调突变体会导致 TAG 分子中的硬脂酸含量增加一倍。

4.2 ω -6 脂肪酸去饱和酶

ω -6 脂肪酸是构成细胞膜结构的重要成分,可以影响细胞膜的流动性,并且对维持细胞的基本功能具有重要作用。 ω -6 脂肪酸去饱和酶能催化 16:1 Δ^7 和 18:1 Δ^9 生成 16:2 $\Delta^{7,10}$ 和 18:2 $\Delta^{9,12}$,为下游的去饱和酶提供底物。莱茵衣藻 *hf-9* (High

fluorescence 9)是质体 ω -6脂肪酸合成路径受到损坏的突变体,并且其叶绿体超微结构发生改变,光合活性受到影响^[90]。将定位在质体中的CrFAD6在突变体 hf -9中表达, hf -9突变体能恢复 ω -6脂肪酸合成路径,说明CrFAD6基因编码质体 ω -6脂肪酸去饱和酶,但是突变体 hf -9的光合能力未恢复,说明 hf -9中的光合损伤不是由去饱和酶缺失引起的^[91]。CrFAD6在莱茵衣藻中还有2个同源基因,分别为CrFAD2和CrFAD6a,并且CrFAD2和CrFAD6a都具有跨膜结构域和3个非常保守的组氨酸簇,也是与膜结合的酰基-酯去饱和酶^[7]。但CrFAD2和CrFAD6的亚细胞定位不同,CrFAD2预测定位在内质网中,而CrFAD6则被证明定位在质体中,也可称为“内质网型”的CrFAD2和“质体型”的CrFAD6^[92]。将“内质网型”的CrFAD2在酿酒酵母中异源表达,酿酒酵母重组菌株能利用酵母中的细胞色素 b_5 作为电子供体,从而生成 $18:2\Delta^{9,12}$;而“质体型”的CrFAD6在酿酒酵母中异源表达,因酵母中缺乏铁氧还蛋白,不能生成 $18:2\Delta^{9,12}$ ^[93]。近期研究发现,一种北极衣藻ArF0006(*Chlamydomonas* sp. ArF0006)中,含有定位在质体中的 ω -6脂肪酸去饱和酶AChFAD6,将AChFAD6在大肠杆菌中异源表达,能显著提高大肠杆菌重组菌株中的 $18:2\Delta^{9,12}$ 含量^[94]。

4.3 ω -3脂肪酸去饱和酶

莱茵衣藻中的 ω -3脂肪酸主要成分为 $16:3\Delta^{7,10,13}$ 、 $16:4\Delta^{4,7,10,13}$ 、 $18:3\Delta^{9,12,15}$ (α -Linolenic acid, α -亚麻酸)和 $18:4\Delta^{5,9,12,15}$ 四种,占脂肪酸总量的50%以上^[7,48,83]。 ω -3脂肪酸去饱和酶能在甲基端的第三个碳原子处形成双键。在高等植物中,质体和内质网中的 ω -3脂肪酸是由不同的 ω -3脂肪酸去饱和酶催化而成的^[95],但是莱茵衣藻中只有1个定位在质体上的 ω -3脂肪酸去饱和酶,因其与质体中AtFAD7的序列相似度高达63.1%,所以将其命名为CrFAD7^[96-97]。牛丽红等^[98]将CrFAD7在酵母中异源表达,酵母重组菌株中 $18:2\Delta^{9,12}$ 的含量明显降低, $18:3\Delta^{9,12,15}$ 含量有所升高。Nguyen等^[96]通过对莱茵

衣藻进行正向遗传学筛选,获得 ω -3脂肪酸合成路径受到损坏的突变体 $crfad7$,该突变体中CrFAD7基因表达量下降,所有的 ω -3脂肪酸含量都减少,伴随着 ω -6脂肪酸含量增加;并且将CrFAD7在 $crfad7$ 中表达,其 ω -3脂肪酸含量和CrFAD7基因表达量能基本恢复到野生型水平。有趣的是,突变体 $crfad7$ 与野生型相比,能够短时间增加耐热性^[96],说明去饱和酶能够在微藻应对外界胁迫时发挥重要作用。Lim等^[99]研究发现,CrFAD7酶的第286位苏氨酸残基(Threonine residue)在 ω -3脂肪酸合成过程中发挥重要作用。CrFAD7很可能是定位在质体的外膜上,并且在质体和内质网的接触位点上发挥作用,可以使合成的甘油酯通过细胞器内部的接触位点来进行转移,从而形成内质网膜和质体膜^[96-97],这也与质体外膜是主要的质体脂质组装场所,同时也是一个广泛的脂质成分交换场所的概念相符^[100-103]。

4.4 MGDG特异性的 Δ^4 脂肪酸去饱和酶

对MGDG进行脂肪酸组分分析发现, $18:3\Delta^{9,12,15}/16:4\Delta^{4,7,10,13}$ (sn-1/sn-2)的含量最高,约占MGDG总脂肪酸含量的67%^[96]。Zäuner等^[104]发现莱茵衣藻中含有MGDG特异性的 Δ^4 脂肪酸去饱和酶Cr Δ 4FAD,能参与合成 $16:4\Delta^{4,7,10,13}$,并且Cr Δ 4FAD基因表达量不同,会导致MGDG的总量发生变化,这说明脂质总量和脂肪酸不饱和度密切相关。Cr Δ 4FAD含有3个组氨酸簇和质体转运肽,是定位在质体中的膜结合去饱和酶,但区别于其他已知的质体去饱和酶,Cr Δ 4FAD蛋白质N末端也有一个细胞色素 b_5 结构域^[104]。没有研究表明莱茵衣藻的质体中存在NADH-细胞色素 b_5 还原酶(Cytochrome b_5 reductase),细胞色素 b_5 有可能从铁氧还蛋白中获得电子,也有可能是Cr Δ 4FAD定位在质体外膜,能从细胞质中获得电子。通过对质体中的CrFAD7和Cr Δ 4FAD进行研究,都指出单细胞藻类的质体外膜,在生物合成脂质和维持细胞内脂质平衡方面都具有重要作用。这也与莱茵衣藻中只有一个约占细胞总体积的70%的大型质体^[105],

广阔的质体外膜为细胞内的脂质代谢提供了场所^[101,106]。

4.5 Δ^5 脂肪酸去饱和酶

第一个不饱和双键位于第 5 位碳(Δ^5)上, 被称为 Δ^5 型不饱和脂肪酸。 Δ^5 脂肪酸去饱和酶能催化 $18:2\Delta^{9,12}$ 和 $18:3\Delta^{9,12,15}$ 生成 $18:3\Delta^{5,9,12}$ (Pinolenic acid, 松油酸)和 $18:4\Delta^{5,9,12,15}$ (Coniferonic acid, 柏油酸), 其中 $18:3\Delta^{5,9,12}$ 已被证明能在体外抑制人类乳腺癌细胞转移^[107]。莱茵衣藻内质网中 DGTS 和 PtdEtn 的甘油主链 sn-2 位上含有 $18:3\Delta^{5,9,12}$ 和 $18:4\Delta^{5,9,12,15}$ ^[83]。Kajikawa 等^[108]在莱茵衣藻中分离和鉴定到 N 端含有 Cytb₅ 结构域的 Δ^5 脂肪酸去饱和酶, 并将其命名为 CrDES。将 CrDES 分别在酵母中和烟草(Tobacco)中异源表达, 研究发现重组子中 $18:3\Delta^{5,9,12}$ 和 $18:4\Delta^{5,9,12,15}$ 含量显著提高, 伴随着 $18:2\Delta^{9,12}$ 和 $18:3\Delta^{9,12,15}$ 含量的降低。

5 过氧化物酶体中油脂活动

过氧化物酶体(也称微体)是一种微小的由单层膜包被的细胞器, 主要进行脂肪酸的 β -氧化过程。进行 β -氧化的游离脂肪酸主要来自膜脂降解和 TAG 水解, 但为避免积累过多的游离脂肪酸产生毒害作用, 会将膜脂降解产生的游离脂肪酸先以 TAG 的形式储存在脂滴中, 再通过水解 TAG 产生游离脂肪酸, 游离脂肪酸再进入过氧化物酶体中进行 β -氧化, 并且 β -氧化产生的乙酰-CoA 可以为新的生物合成提供前体^[50,109-110]。

5.1 TAG 水解过程

TAG 的脂解不仅是特殊培养条件下的应激反应, 也是维持细胞内油脂合成和降解平衡体系的关键过程^[7]。TAG 在 TAG 脂肪酶的催化下, 水解为游离脂肪酸和 DAG。DAG 可继续通过 DAG 脂肪酶进行水解。在拟南芥中, 以脂滴形式储存的 TAG, 会在以 SDP1 (Sugar-dependent 1)为首的 TAG 脂肪酶水解后, 逐步的将 TAG 水解成游离脂肪酸和甘油, 在酿酒酵母中也发现了 3 个 TAG 脂肪酶 TGL3p-5p, 并且 SDP1 和 TGL3p-5p 都定位在脂滴

上^[110-112]。此外, 在三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)中 TGL1 是 SDP1 的同源蛋白, PtTGL1 基因下调突变体中, TAG 的含量是野生型两倍^[113]。经研究, 缺刻叶球藻中 LiSDP1 与 AtSDP1 都具有 GX SXG 保守序列, 将 LiSDP1 在拟南芥 SDP1 基因缺失型突变体中表达, 能部分恢复拟南芥 *sdp1* 突变体的表型^[114]。目前还没有针对莱茵衣藻 TAG 脂肪酶的研究。莱茵衣藻基因组中编码了 1 个 AtSDP1 的同源蛋白 CrSDP1, 但莱茵衣藻中 SDP1 功能还需进行后续研究^[7]。

LIP1 (Lipase 1)是莱茵衣藻中唯一被鉴定的脂肪酶。通过详细的生化特征分析、序列同源性分析和体外试验证明, 莱茵衣藻中 LIP1 是二酰基甘油脂肪酶, 能水解 DAG 释放游离脂肪酸, 在脂滴分解过程中位于三酰基甘油脂肪酶的下流。将 CrLIP1 在脂肪酶功能缺失型酵母中表达, 能恢复酵母表型。CrLIP1 的基因表达量与 TAG 含量负相关。对莱茵衣藻 CrLIP1 基因沉默突变体, 先进行氮胁迫后进行氮恢复, 突变体中 TAG 的脂解过程受到抑制^[115]。在酵母、假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)和高等植物中都发现, 脂肪酶表达量下调能增加 TAG 积累量, 说明脂肪酶能负调控 TAG 含量^[116-118]。研究表明利用基因工程方法对脂类脂解路径进行修饰, 能在不影响微藻生长状态和生物量的情况下, 提高微藻油脂产量^[119]。

5.2 转运脂肪酸进入过氧化物酶体

在拟南芥中, 全分子转运蛋白 ABCD1 又名 PXA1 (Peroxisomal ABC transporter 1)、CTS (Comatose)和 PED3 (Peroxisomal defective 3), 属于 ABC 转运蛋白 D 亚族, 能将拟南芥细胞质中 TAG 水解分离出的游离脂肪酸, 跨膜运至过氧化物酶体, 是脂肪酸进入过氧化物酶体进行 β -氧化的入口^[120-121]。ABCD1 也参与转运亲脂性的激素前体继而调控醋酸的新陈代谢^[122]。

在 ABCD1 基因缺失突变体中, 过氧化物酶体的 β -氧化过程受到抑制, 种子的休眠和萌发功能受到影响。将拟南芥 ABCD1 在功能缺失型酵母中

表达, 酵母恢复了脂肪酸的 β -氧化过程^[123]。游离脂肪酸经 AtABCD1 蛋白转运进入过氧化物酶体后, 又经 AtLACS6 和 AtLACS7 活化为脂酰-CoA。其中 *lacs6/lacs7* 单突变体的种子萌发、生长和生殖发育没有受到影响, 但 *lacs6/lacs7* 双突变体, 种子中油脂形成和幼苗萌发都受到影响^[124]。酵母互补实验证明, ABCD1 与 LACS6/LACS7 蛋白在过氧化物酶体上具有相互作用^[109]。莱茵衣藻基因组编码 1 个 ABCD1 同源蛋白和 3 个 LACS 同源蛋白^[7], 分别命名为 CrABCD1 和 CrACS1-3, 其中 CrACS1 和 CrACS2 已被证明参与了脂质的合成过程^[4,36-37,42], 而莱茵衣藻中 ABCD1 和 LACS 的同源蛋白在过氧化物酶体中的作用还需进一步验证。

5.3 β -氧化过程

脂酰-CoA 进入过氧化物酶体基质后, 在多种酶的催化下, 依次进行氧化、水化、脱氢和硫解四步连续反应, 生成 H_2O_2 、NADH (还原型辅酶 I)、乙酰-CoA 和比原来少两个碳原子的脂酰-CoA。主要有 4 种酶参与 β -氧化反应: 酰基辅酶 A 氧化酶、2 种功能蛋白(烯酰辅酶 A 水化酶、3-羟酰基-辅酶 A 脱氢酶)和酮脂酰辅酶 A 硫解酶。拟南芥中参与 β -氧化的复合酶, 在莱茵衣藻基因组都有编码其同源蛋白, 但只有酰基辅酶 A 氧化酶 CrACX2 (Acyl-CoA oxidase) 的功能被验证^[9,125]。CrACX2 有 2 个乙酰辅酶 A 脱氢酶结构域和 1 个乙酰辅酶 A 氧化酶结构域, 且具有乙酰辅酶 A 氧化酶的特征^[125]。CrACX2 定位在过氧化物酶体上, 催化脂酰-辅酶 A 生成反式-2-烯脂酰-辅酶 A, 并以黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 作为辅助因子, 生成 H_2O_2 , 是 β -氧化循环的第一步^[125]。将 CrACX2 在大肠杆菌中异源表达, 大肠杆菌重组菌株能催化脂酰-CoA 生成反式-2-烯脂酰-辅酶 A 并生成 H_2O_2 。通过对莱茵衣藻进行正向遗传学筛选, 鉴定到 CrACX2 功能缺失型突变体的油脂再利用过程受阻严重(60%–80%), 但不会完全消除, 可能是其他莱茵衣藻 ACXs 同工酶发挥了作用^[7,126]。在拟南芥中只有 ACX1 和 ACX2 都缺失的突变体才会阻碍油脂再利用, 单突变体不会影响

植物表型, 说明拟南芥中 ACX 同工酶的底物特异性也具有相似部分^[127]。研究表明, 与 AtACX2 相比, CrACX2 对不同长度的脂酰-CoA 都具有更强的活性, 这也解释了 *cracx2* 突变体有明显的表型, 而拟南芥 *atacx2* 突变体没有明显表型^[125]。通过基因工程等方法降低脂质的降解, 也能显著提高油脂产率。

6 展望

莱茵衣藻与酵母和拟南芥的的脂肪酸代谢通路具有相似性, 我们通过基因组、转录组、蛋白质组和脂质分析方法, 对莱茵衣藻中脂质代谢通路进行分析, 并结合已报道的莱茵衣藻脂质代谢路径, 最终绘制出莱茵衣藻中脂质代谢网络图, 参与脂质代谢过程的基因和蛋白质见表 1。本篇文章对各细胞器中进行的脂质合成和分解过程进行描述, 并对参与各细胞器间的脂质运输过程进行分析。与真菌和高等植物相比, 莱茵衣藻的脂质代谢过程具有相似性的同时也具有其独特性, 应对莱茵衣藻中特异性脂质代谢路径进行重点分析研究。虽然近几年对莱茵衣藻的脂质代谢过程进行了大量研究, 但仍有很多问题没有解决, 需要后续的不断研究。例如至今为止没有鉴定到 TAG 脂肪酶, 并且在过氧化物酶体中进行的 β -氧化过程除了产生乙酰-CoA, 还会产生 H_2O_2 和 NADH, 但对 H_2O_2 和 NADH 的代谢过程并没有研究清楚。此外, 对脂滴在细胞质中积累的分子机制还了解不够充分。对莱茵衣藻脂质代谢过程进行研究能为后续利用基因工程方法, 增加生物燃料生产量和提高具有经济效益的脂质衍生物的质量提供理论依据。

REFERENCES

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 294-306
- [2] Durrett TP, Benning C, Ohlrogge J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels[J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(4): 593-607
- [3] Ruiz J, Olivieri G, de Vree J, et al. Towards industrial products from microalgae[J]. *Energy and Environmental Science*, 2016, 9(10): 3036-3043
- [4] Rengel R, Smith RT, Haslam RP, et al. Overexpression of

- acetyl-CoA synthetase (ACS) enhances the biosynthesis of neutral lipids and starch in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Algal Research*, 2018, 31: 183-193
- [5] Feng GD, Cheng LH, Xu XH, et al. Strategies in genetic engineering of microalgae for high-lipid production[J]. *Progress in Chemistry*, 2012, 24(7): 1413-1426 (in Chinese)
冯国栋, 程丽华, 徐新华, 等. 微藻高油脂化基因工程研究策略[J]. *化学进展*, 2012, 24(7): 1413-1426
- [6] Okazaki Y, Saito K. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants[J]. *The Plant Journal*, 2014, 79(4): 584-596
- [7] Li-Beisson Y, Beisson F, Riekhof W. Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(3): 504-522
- [8] Rochaix JD. The three genomes of *Chlamydomonas*[J]. *Photosynthesis Research*, 2002, 73(1/3): 258-293
- [9] Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions[J]. *Science*, 2007, 318(5848): 245-250
- [10] Day A, Goldschmidt-Clermont M. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(5): 540-553
- [11] Michelet L, Lefebvre-Legendre L, Burr SE, et al. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(5): 565-574
- [12] Li Y, Wang CG, Hu ZL. Research advances of genetic engineering of microalgae for improving lipid production[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(3): 70-81 (in Chinese)
李逸, 王潮岗, 胡章立. 利用基因工程技术提高微藻油脂含量的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(3): 70-81
- [13] Merchant SS, Kropat J, Liu BS, et al. TAG, you're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 352-363
- [14] Liu BS, Benning C. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(2): 300-309
- [15] Du ZY, Lucker BF, Zienkiewicz K, et al. Galactoglycerolipid lipase PGD1 is involved in thylakoid membrane remodeling in response to adverse environmental conditions in *Chlamydomonas*[J]. *Plant Cell*, 2018, 30(2): 447-465
- [16] Rastogi RP, Pandey A, Larroche C, et al. Algal green energy-R&D and technological perspectives for biodiesel production[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 82: 2946-2969
- [17] Zhu SN, Wang ZM, Shang CH, et al. Lipid biosynthesis and metabolic regulation in microalgae[J]. *Progress in Chemistry*, 2011, 23(10): 2169-2176 (in Chinese)
朱顺妮, 王忠铭, 尚常花, 等. 微藻脂肪合成与代谢调控[J]. *化学进展*, 2011, 23(10): 2169-2176
- [18] Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, et al. Acyl-lipid metabolism[J]. *Arabidopsis Book*, 2010, 8: e0133
- [19] Troncoso-Ponce MA, Nikovics K, Marchive C, et al. New insights on the organization and regulation of the fatty acid biosynthetic network in the model higher plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochimie*, 2016, 120: 3-8
- [20] Miller R, Wu G, Deshpande RR, et al. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(4): 1737-1752
- [21] Browse J, Warwick N, Somerville CR, et al. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochemical Journal*, 1986, 235(1): 25-31
- [22] Koo AJK, Ohlrogge JB, Pollard M. On the export of fatty acids from the chloroplast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(16): 16101-16110
- [23] Kunz HH, Scharnewski M, Feussner K, et al. The ABC transporter PXA1 and peroxisomal β -oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(9): 2733-2749
- [24] Blatti JL, Beld J, Behnke CA, et al. Manipulating fatty acid biosynthesis in microalgae for biofuel through protein-protein interactions[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e42949
- [25] Li NN, Xu CC, Li-Beisson Y, et al. Fatty acid and lipid transport in plant cells[J]. *Trends in Plant Science*, 2016, 21(2): 145-158
- [26] Li NN, Gügel IL, Giavalisco P, et al. FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export[J]. *PLoS Biology*, 2015, 13(2): e1002053
- [27] Ichihara KI, Kobayashi N, Saito K. Lipid synthesis and acyl-CoA synthetase in developing rice seeds[J]. *Lipids*, 2003, 38(8): 881-884
- [28] Pei ZT, Oey NA, Zuidervaart MM, et al. The acyl-CoA synthetase "bubblegum" (lipidosin): further characterization and role in neuronal fatty acid β -oxidation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(47): 47070-47078
- [29] Schnurr JA, Shockey JM, de Boer GJ, et al. Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1700-1709
- [30] Breuers FKH, Bräutigam A, Geimer S, et al. Dynamic remodeling of the plastid envelope membranes-A tool for chloroplast envelope *in vivo* localizations[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 7
- [31] Jessen D, Roth C, Wiermer M, et al. Two activities of long-chain acyl-coenzyme A synthetase are involved in lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2015, 167(2): 351-366
- [32] Zhao LF, Katavic V, Li FL, et al. Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in *Arabidopsis* seed oil biosynthesis[J]. *The Plant Journal*, 2010, 64(6): 1048-1058
- [33] Lü SY, Song T, Kosma DK, et al. *Arabidopsis CER8* encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis[J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(4): 553-564
- [34] Weng H, Molina I, Shockey J, et al. Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2010, 231(5): 1089-1100
- [35] Fulda M, Shockey J, Werber M, et al. Two long-chain acyl-CoA

- synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid β -oxidation[J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(1): 93-103
- [36] Jia B, Song YZ, Wu M, et al. Characterization of long-chain acyl-CoA synthetases which stimulate secretion of fatty acids in green algae *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 184
- [37] Li XB, Zhang R, Patena W, et al. An indexed, mapped mutant library enables reverse genetics studies of biological processes in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *The Plant Cell*, 2016, 28(2): 367-387
- [38] Song YZ, Jia B, Lin BC, et al. cDNA cloning and yeast expression of acyl-CoA synthetase of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(9): 119-124 (in Chinese)
宋燕子, 贾彬, 林柏成, 等. 莱茵衣藻酰基辅酶 A 合成酶 cDNA 克隆及其酵母表达[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(9): 119-124
- [39] Browse J, Somerville C. Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, 42(1): 467-506
- [40] Maisonneuve S, Bessoule JJ, Lessire R, et al. Expression of rapeseed microsomal lysophosphatidic acid acyltransferase isozymes enhances seed oil content in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(2): 670-684
- [41] Warakanont J, Tsai CH, Michel EJS, et al. Chloroplast lipid transfer processes in *Chlamydomonas reinhardtii* involving a TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL 2 (TGD2) orthologue[J]. *The Plant Journal*, 2015, 84(5): 1005-1020
- [42] Nguyen HM, Baudet M, Cuiné S, et al. Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism[J]. *Proteomics*, 2011, 11(21): 4266-4273
- [43] Iskandarov U, Sitnik S, Shtaida N, et al. Cloning and characterization of a GPAT-like gene from the microalga *Lobosphaera incisa* (*Trebouxiophyceae*): overexpression in *Chlamydomonas reinhardtii* enhances TAG production[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(2): 907-919
- [44] Yamaoka Y, Achard D, Jang S, et al. Identification of a *Chlamydomonas* plastidial 2-lysophosphatidic acid acyltransferase and its use to engineer microalgae with increased oil content[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(11): 2158-2167
- [45] Kim Y, Terng EL, Riekhof WR, et al. Endoplasmic reticulum acyltransferase with prokaryotic substrate preference contributes to triacylglycerol assembly in *Chlamydomonas*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(7): 1652-1657
- [46] Giroud C, Gerber A, Eichenberger W. Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of molecular species and intracellular site(s) of biosynthesis[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1988, 29(4): 587-595
- [47] Allen JW, DiRusso CC, Black PN. Triglyceride quantification by catalytic saturation and LC-MS/MS reveals an evolutionary divergence in regioisometry among green microalgae[J]. *Algal Research*, 2014, 5: 23-31
- [48] Fan JL, Andre C, Xu CC. A chloroplast pathway for the *de novo* biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(12): 1985-1991
- [49] Lager I, Yilmaz JL, Zhou XR, et al. Plant acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) have different specificities in their forward and reverse reactions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(52): 36902-36914
- [50] Li-Beisson Y, Neunzig J, Lee Y, et al. Plant membrane-protein mediated intracellular traffic of fatty acids and acyl lipids[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 40: 138-146
- [51] Awai K, Xu CC, Tamot B, et al. A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(28): 10817-10822
- [52] Lu BB, Xu CC, Awai K, et al. A small ATPase protein of *Arabidopsis*, TGD3, involved in chloroplast lipid import[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(49): 35945-35953
- [53] Roston RL, Gao JP, Murcha MW, et al. TGD1, -2, and -3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(25): 21406-21415
- [54] Xu CC, Fan JL, Riekhof W, et al. A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*[J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(10): 2370-2379
- [55] Xu CC, Fan JL, Froehlich JE, et al. Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(11): 3094-3110
- [56] Wang Z, Anderson NS, Benning C. The phosphatidic acid binding site of the *Arabidopsis* Trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) protein required for lipid import into chloroplasts[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(7): 4763-4771
- [57] Fan JL, Zhai ZY, Yan CS, et al. *Arabidopsis* TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL5 interacts with TGD1, TGD2, and TGD4 to facilitate lipid transfer from the endoplasmic reticulum to plastids[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(10): 2941-2955
- [58] Kim S, Yamaoka Y, Ono H, et al. AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(2): 773-778
- [59] Deng XD, Cai JJ, Fei XW. Involvement of phosphatidate phosphatase in the biosynthesis of triacylglycerols in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2013, 14(12): 1121-1131
- [60] Csaki LS, Dwyer JR, Fong LG, et al. Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling[J]. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(3): 305-316
- [61] Jin HH, Jiang JG. Phosphatidic acid phosphatase and diacylglycerol acyltransferase: potential targets for metabolic engineering of microorganism oil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(12): 3067-3077
- [62] Phan J, Reue K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene[J]. *Cell Metabolism*, 2005, 1(1): 73-83
- [63] Han GS, Wu WI, Carman GM. The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg^{2+} -dependent phosphatidate phosphatase enzyme[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(14): 9210-9218

- [64] La Russa M, Bogen C, Uhmeyer A, et al. Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 162(1): 13-20
- [65] Zhang L. Study on molecular regulation of PUFA and TAG biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2014 (in Chinese)
张琳. 微拟球藻 PUFA 和 TAG 合成的分子调控研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2014
- [66] Boyle NR, Page MD, Liu BS, et al. Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(19): 15811-15825
- [67] Liu J, Han DX, Yoon K, et al. Characterization of type 2 diacylglycerol acyltransferases in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals their distinct substrate specificities and functions in triacylglycerol biosynthesis[J]. The Plant Journal, 2016, 86(1): 3-19
- [68] Deng XD, Gu B, Li YJ, et al. The roles of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 genes in the biosynthesis of triacylglycerols by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Molecular Plant, 2012, 5(4): 945-947
- [69] Hung CH, Ho MY, Kanehara K, et al. Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. FEBS Letters, 2013, 587(15): 2364-2370
- [70] Hernández-Torres A, Zapata-Morales AL, Ochoa Alfaro AE, et al. Identification of gene transcripts involved in lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen, iron and sulfur deprivation[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(4): 55
- [71] Dahlqvist A, Ståhl U, Lenman M, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6487-6492
- [72] Yoon K, Han DX, Li YT, et al. Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Cell, 2012, 24(9): 3708-3724
- [73] Moore TS, Du ZR, Chen Z. Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *In vitro* biosynthesis of diacylglyceryltrimethylhomoserine[J]. Plant Physiology, 2001, 125(1): 423-429
- [74] Riekhof WR, Sears BB, Benning C. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1_C[J]. Eukaryotic Cell, 2005, 4(2): 242-252
- [75] Riekhof WR, Naik S, Bertrand H, et al. Phosphate starvation in fungi induces the replacement of phosphatidylcholine with the phosphorus-free betaine lipid diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserine[J]. Eukaryotic Cell, 2014, 13(6): 749-757
- [76] Lee JW, Shin SY, Kim HS, et al. Lipid turnover between membrane lipids and neutral lipids via inhibition of diacylglyceryl *N,N,N*-trimethylhomoserine synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Algal Research, 2017, 27: 162-169
- [77] Goodson C, Roth R, Wang ZT, et al. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost[J]. Eukaryotic Cell, 2011, 10(12): 1592-1606
- [78] Goold HD, Cui S, Légeret B, et al. Saturating light induces sustained accumulation of oil in plastidal lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Physiology, 2016, 171(4): 2406-2417
- [79] Moriyama T, Toyoshima M, Saito M, et al. Revisiting the algal "chloroplast lipid droplet": the absence of an entity that is unlikely to exist[J]. Plant Physiology, 2018, 176(2): 1519-1530
- [80] Li XB, Moellering ER, Liu BS, et al. A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Cell, 2012, 24(11): 4670-4686
- [81] Tsai CH, Zienkiewicz K, Amstutz CL, et al. Dynamics of protein and polar lipid recruitment during lipid droplet assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Journal, 2015, 83(4): 650-660
- [82] Moellering ER, Muthan B, Benning C. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane[J]. Science, 2010, 330(6001): 226-228
- [83] Giroud C, Eichenberger W. Fatty-acids of *Chlamydomonas reinhardtii*-structure, positional distribution and biosynthesis[J]. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1988, 369(1): 18-19
- [84] Los DA, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1394(1): 3-15
- [85] Shanklin J, Cahoon EB. Desaturation and related modifications of fatty acids[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998, 49(1): 611-641
- [86] Yang WQ, Wittkopp TM, Li XB, et al. Critical role of *Chlamydomonas reinhardtii* ferredoxin-5 in maintaining membrane structure and dark metabolism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(48): 14978-14983
- [87] Guo XJ, Lu YD, Zhang L, et al. Heterologous expression of acyl-ACP desaturase (FAB2) from *Chlamydomonas reinhardtii* in *Escherichia coli* and its expression features in response to different temperature and salinity stresses[J]. Marine Sciences, 2012, 36(5): 34-41 (in Chinese)
郭雪洁, 路延笃, 张蕾, 等. 莱茵衣藻 FAB2 的原核表达以及不同胁迫条件下的表达模式[J]. 海洋科学, 2012, 36(5): 34-41
- [88] Hwangbo K, Ahn JW, Lim JM, et al. Overexpression of stearyl-ACP desaturase enhances accumulations of oleic acid in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Biotechnology Reports, 2014, 8(2): 135-142
- [89] de Laeger J, Springer J, Wolbert EJH, et al. Gene silencing of stearyl-ACP desaturase enhances the stearic acid content in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Bioresource Technology, 2017,

- 245: 1616-1626
- [90] Sato N, Tsuzuki M, Matsuda Y, et al. Isolation and characterization of mutants affected in lipid metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 230(3): 987-993
- [91] Sato N, Fujiwara S, Kawaguchi A, et al. Cloning of a gene for chloroplast ω 6 desaturase of a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Journal of Biochemistry*, 1997, 122(6): 1224-1232
- [92] Sakurai K, Moriyama T, Sato N. Detailed identification of fatty acid isomers sheds light on the probable precursors of triacylglycerol accumulation in photoautotrophically grown *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(2): 256-266
- [93] Chi XY, Zhang XW, Guan XY, et al. Fatty acid biosynthesis in eukaryotic photosynthetic microalgae: identification of a microsomal delta 12 desaturase in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *The Journal of Microbiology*, 2008, 46(2): 189-201
- [94] Jung W, Kim EJ, Han SJ, et al. Enzymatic modification by point mutation and functional analysis of an omega-6 fatty acid desaturase from Arctic *Chlamydomonas* sp.[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 47(2): 143-150
- [95] Wallis JG, Watts JL, Browse J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, 27(9): 467-473
- [96] Nguyen HM, Cuin  S, Beyly-Adriano A, et al. The green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* has a single ω -3 fatty acid desaturase that localizes to the chloroplast and impacts both plastidic and extraplastidic membrane lipids[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 914-928
- [97] Pflaster EL, Schwabe MJ, Becker J, et al. A high-throughput fatty acid profiling screen reveals novel variations in fatty acid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and related algae[J]. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(11): 1431-1438
- [98] Niu LH, Geng LL, Zhang R, et al. Hetero expression of ω -3 desaturase gene from *Chlamydomonas reinhardtii* and assay of its activity in *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 27(12): 96-101 (in Chinese)
牛丽红, 耿丽丽, 张蕊, 等. 莱茵衣藻 ω -3 脂肪酸脱氢酶基因在毕赤酵母中的表达与活性分析[J]. *生物技术通报*, 2011, 27(12): 96-101
- [99] Lim JM, Vikramathithan J, Hwangbo K, et al. Threonine 286 of fatty acid desaturase 7 is essential for ω -3 fatty acid desaturation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 66
- [100] Douce R, Joyard J. Biochemistry and function of the plastid envelope[J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1990, 6: 173-216
- [101] Joyard J, Teyssier E, Mi ge C, et al. The biochemical machinery of plastid envelope membranes[J]. *Plant Physiology*, 1998, 118(3): 715-723
- [102] Benning C. Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2009, 25: 71-91
- [103] Rolland N, Curien G, Finazzi G, et al. The biosynthetic capacities of the plastids and integration between cytoplasmic and chloroplast processes[J]. *Annual Review of Genetics*, 2012, 46(1): 233-264
- [104] Z uner S, Jochum W, Bigorowski T, et al. A cytochrome b₅-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2012, 11(7): 856-863
- [105] Harris EH. *Chlamydomonas* as a model organism[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001, 52(1): 363-406
- [106] Mehrshahi P, Johnny C, DellaPenna D. Redefining the metabolic continuity of chloroplasts and ER[J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(8): 501-507
- [107] Chen SJ, Hsu CP, Li CW, et al. Pinolenic acid inhibits human breast cancer MDA-MB-231 cell metastasis *in vitro*[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(4): 1708-1715
- [108] Kajikawa M, Yamato KT, Kohzu Y, et al. A Front-end desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii* produces pinolenic and coniferonic acids by ω 13 desaturation in methylotrophic yeast and tobacco[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47(1): 64-73
- [109] De Marcos Lousa C, van Roermund CWT, Postis VLG, et al. Intrinsic acyl-CoA thioesterase activity of a peroxisomal ATP binding cassette transporter is required for transport and metabolism of fatty acids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(4): 1279-1284
- [110] Eastmond PJ. SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(3): 665-675
- [111] Athenstaedt K, Daum G. YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(26): 23317-23323
- [112] Athenstaedt K, Daum G. Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(45): 37301-37309
- [113] Barka F, Angstenberger M, Ahrendt T, et al. Identification of a triacylglycerol lipase in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1861(3): 239-248
- [114] Siegler H, Valerius O, Ischebeck T, et al. Analysis of the lipid body proteome of the oleaginous alga *Lobosphaera incisa*[J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 98-105
- [115] Li XB, Benning C, Kuo MH. Rapid triacylglycerol turnover in *Chlamydomonas reinhardtii* requires a lipase with broad substrate specificity[J]. *Eukaryotic Cell*, 2012, 11(12): 1451-1462
- [116] Fan JL, Yan CS, Roston R, et al. *Arabidopsis* lipins, PDAT1 acyltransferase, and SDP1 triacylglycerol lipase synergistically direct fatty acids toward β -oxidation, thereby maintaining membrane lipid homeostasis[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(10): 4119-4134
- [117] Daum G, Wagner A, Czabany T, et al. Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast[J]. *Biochimie*, 2007, 89(2):

243-248

- [118] Slocombe SP, Cornah J, Pinfield-Wells H, et al. Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(7): 694-703
- [119] Trentacoste EM, Shrestha RP, Smith SR, et al. Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(49): 19748-19753
- [120] Theodoulou FL, Holdsworth M, Baker A. Peroxisomal ABC transporters[J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(4): 1139-1155
- [121] Baker A, Carrier DJ, Schaedler T, et al. Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2015, 43(5): 959-965
- [122] Hooks MA, Turner JE, Murphy EC, et al. The *Arabidopsis* ALDP protein homologue COMATOSE is instrumental in peroxisomal acetate metabolism[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 406(3): 399-406
- [123] Nyathi Y, De Marcos Lousa C, van Roermund CW, et al. The *Arabidopsis* peroxisomal ABC transporter, comatose, complements the *Saccharomyces cerevisiae* *pxa1 pxa2A* mutant for metabolism of long-chain fatty acids and exhibits fatty acyl-CoA-stimulated ATPase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(39): 29892-29902
- [124] Fulda M, Schnurr J, Abbadi A, et al. Peroxisomal acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(2): 394-405
- [125] Kong FT, Liang YX, Légeret B, et al. *Chlamydomonas* carries out fatty acid β -oxidation in ancestral peroxisomes using a bona fide acyl-CoA oxidase[J]. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 2017, 90(2): 358-371
- [126] Kong FT, Romero IT, Warakanont J, et al. Lipid catabolism in microalgae[J]. *New Phytologist*, 2018, 218(4): 1340-1348
- [127] Eastmond PJ, Hooks M, Graham IA. The *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase gene family[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28(6): 755-757
- [128] Tardif M, Atteia A, Specht M, et al. PredAlgo: a new subcellular localization prediction tool dedicated to green algae[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29(12): 3625-3639

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，月刊，是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办，国内外公开发行人，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊，中国科技核心期刊，CSCD 核心期刊，曾获国家优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计，本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”，并入选“中国精品科技期刊”，成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2019年每册定价80元，全年960元，我们免费寄刊。

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413