



研究报告

天蓝色链霉菌中长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的功能

马建荣 余永红*

广东食品药品职业学院 广东 广州 510520

摘要:【背景】链霉菌属于放线菌科,在土壤环境中广泛分布。链霉菌具有复杂的形态分化和多样性的次生代谢网络,能产生大量具有生物活性的次级代谢产物,被广泛深入研究。【目的】天蓝色链霉菌是链霉菌的模式菌株,其脂肪酸合成代谢与次级代谢联系紧密,但目前脂肪酸合成代谢途径还不清楚,其长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶还未见报道。【方法】利用大肠杆菌 FabF 序列进行同源比对,发现天蓝色链霉菌 A3(2)的基因组中,SCO2390 (ScoFabF1)、SCO1266 (ScoFabF2)、SCO0548 (ScoFabF3)和 SCO5886 (ScoRedR)具有较高的相似性,并具有保守的 Cys-His-His 催化活性中心,可能具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性。采用 PCR 扩增方法分别获得以上基因,连入表达载体 pBAD24M 后分别互补大肠杆菌 *fabB(ts)* 突变株和 *fabB(ts)fabF* 双突变株,并检测转化子的生长情况。以上基因与 pET-28b 连接后,在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达,并利用 Ni-NTA 纯化获得蛋白,体外测定其催化活性。将以上基因分别互补大肠杆菌 *fabF* 突变株后,GC-MS 测定互补株的脂肪酸组成。

【结果】4 个同源基因中,只有 *ScofabF1* 能恢复 *fabB(ts)fabF* 双突变株 42 °C 时在添加油酸条件下的生长,其他 3 个基因均不能恢复生长。而这 4 个基因都不能恢复 *fabB(ts)* 突变株 42 °C 时生长。体外活性测定 ScoFabF1 具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性,其他 3 个蛋白都不具有该活性。仅 *ScofabF1* 能显著提高大肠杆菌 *fabF* 突变株的顺-11-十八碳烯酸(C_{18:1})比例,其他 3 个基因都不具有该功能。【结论】天蓝色链霉菌中 *ScofabF1* 编码长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II,在脂肪酸利用过程中发挥重要作用。天蓝色链霉菌中没有发现编码长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 的基因,其可能通过其他途径合成少量的不饱和脂肪酸。以上研究结果为进一步研究天蓝色链霉菌中脂肪酸合成机制奠定了基础。

关键词: 天蓝色链霉菌, 脂肪酸代谢, 3-酮脂酰 ACP 合成酶

Function of the long chain 3-ketoacyl-ACP synthase in *Streptomyces coelicolor*

MA Jian-Rong YU Yong-Hong*

Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520, China

Abstract: [Background] *Streptomyces* strains are widely distributed in soil environment. With a complex

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31601601); Medical Science and Technology of Guangdong Province (A2018409); Science Foundation of Guangdong Food & Drug Vocational College (2017ZR006)

*Corresponding authors: Tel: 86-20-29164616; E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

Received: 24-08-2018; Accepted: 16-10-2018; Published online: 27-12-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31601601); 广东省医学科学技术研究基金(A2018409); 广东食品药品职业学院院级课题(2017ZR006)

*通信作者: Tel: 020-29164616; E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

收稿日期: 2018-08-24; 接受日期: 2018-10-16; 网络首发日期: 2018-12-27

morphological differentiation and a large diversity of secondary metabolic networks, *Streptomyces* can produce many bioactive secondary metabolites. **[Objective]** Fatty acid biosynthesis and secondary metabolism are closely related in the model strain *Streptomyces coelicolor*, but the fatty acid synthetic mechanism is still unclear, and its long-chain 3-ketoacyl ACP synthase has not been reported. **[Methods]** Through sequence alignment with *Escherichia coli* FabF (EcFabF), SCO2390 (ScoFabF1), SCO1266 (ScoFabF2), SCO0548 (ScoFabF3) and SCO5886 (ScoRedR) were found in the genome of *Streptomyces coelicolor* A3(2), which showed high similarity with EcFabF, and contained the conserved Cys-His-His sites, indicating that they may have the 3-ketoacyl-ACP synthase activity. The four genes were amplified by PCR, and ligated into the expression vector pBAD24M, and transferred into *E. coli fabB(ts)* and *E. coli fabB(ts)fabF* mutants. The growth of transformants was analyzed. The four genes were also ligated into pET-28b, and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The four EcFabF homologues with hexahistidine-tag were purified by Ni-NTA, and the activities were analyzed *in vitro*. The fatty acid profiles of *E. coli fabF* mutants completed with the four genes were also analyzed by GC-MS. **[Results]** Only *ScofabF1* conferred the *E. coli fabB(ts)fabF* mutant to grow with oleic acid supplemented at 42 °C, and all failed to complete *E. coli fabB(ts)* at 42 °C. *In vitro* enzymatic analysis also demonstrated that only ScoFabF1 has 3-ketoacyl-ACP synthase activity, while the other three proteins showed no similar activity. *E. coli fabF* mutant harboring *ScofabF1* increased the amount of unsaturated fatty acid C_{18:1} significantly. **[Conclusion]** All of above suggested that *Streptomyces coelicolor ScofabF1* encodes 3-ketoacyl-ACP synthase II, and plays an important role in fatty acid synthesis. However, no gene encoding 3-ketoacyl-ACP synthase I was found in the genome, indicating that *Streptomyces coelicolor* may have other mechanism to synthesize small amount of unsaturated fatty acids. Achievement in this study will contribute to further research about the mechanism of fatty acid synthesis in *Streptomyces coelicolor*.

Keywords: *Streptomyces coelicolor*, Fatty acid metabolism, 3-Ketoacyl-ACP synthase

细菌脂肪酸具有重要的生理功能, 脂肪酸作为细胞膜的组成部分影响其流动性, 并影响菌体的逆境耐受性^[1-2]。脂肪酸还参与细菌类脂 A^[3]、群体感应信号分子的合成^[4-5], 脂肪酸还为其他活性物质(如硫辛酸、脂多糖)的合成提供原料^[6], 还可通过 β -氧化途径产能^[7]。细菌采用 II 型脂肪酸合成系统(Fatty acid synthesis II, FAS II)从头合成脂肪酸, 包括聚合、还原、脱水和再还原 4 个步骤, 其中 3-酮脂酰 ACP 合成酶催化脂肪酸合成的聚合反应^[8]。模式细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)基因组编码 3 种 3-酮脂酰 ACP 合成酶, 但生理功能各有不同。3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH)在脂肪酸合成起始反应中发挥作用^[9], 而 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 和 II (FabB 和 FabF)是脂肪酸合成循环反应中的关键酶, 被称为长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶^[10]。其中, 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB)是大肠杆菌不饱和脂肪酸合成的关键酶, 催化不饱和脂肪酸的从头合成, 而 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF)

则能将棕榈油酸(C_{16:1})进一步延伸为顺-11-十八碳烯酸(C_{18:1}), 参与温度影响下的脂肪酸组成调控^[11-12]。

不同细菌来源的长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶与大肠杆菌不尽相同, 具有多样性。嗜血流感细菌(*Haemophilus influenzae*)仅编码 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB), 而不编码 FabF^[13]。茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)仅有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF), 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 和 II 的双重活性^[14]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)也仅含有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II, 但不具有 FabB 和 FabF 双功能^[15]。粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)不编码大肠杆菌 FabB 的同源蛋白, 但编码两个 FabF 同源蛋白 FabO 和 FabF, 其中 FabO 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性, FabF 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 和 II 的双重活性^[16]。另外, 乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)和丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)基因组中 *fabF* 基因编码蛋白也都具有 3-酮脂酰

ACP 合成酶 I 和 II 双重酶活性^[17-18]。

链霉菌是高(G+C)mol%含量的革兰氏阳性丝状细菌,能产生大量具有生物活性的次级代谢产物,被广泛用于医学、农业等领域。天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)作为链霉菌属的模式菌株,已完成全基因组测序,为相关的生物化学与分子生物学研究提供了基础^[19]。天蓝色链霉菌产生多种次级代谢产物,包括放线菌紫素(Act)、十一烷基菌红素(Red)、次甲霉素(Mmy)和钙依赖抗生素(CDA)等,其合成与调控机制被广泛研究,证明次级代谢的聚酮体合成(Polyketide synthesis, PKS)与初级代谢的脂肪酸合成紧密相关^[20],但天蓝色链霉菌的脂肪酸合成机制仍不完全清楚。目前天蓝色链霉菌基因组中催化脂肪酸合成的还原酶(FabG 和 FabI)^[21]、脱水酶(FabA)^[22]以及 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH)^[23]已有研究报道,但其长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶还未见报道。因此,本文主要通过异体遗传互补和体外活性分析等手段,完成了对天蓝色链霉菌中链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的功能鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

所用到的大肠杆菌菌株有 MG1655 (野生型)、DH5 α 、BL21(DE3)、CY242[*fabB(ts)*]、CY244[*fabB(ts)fabF*]、CL28 和天蓝色链霉菌 A3(2)。使用的质粒有 pMD19-T、pBAD24M 和 pET-28b,其他载体均为上述质粒的衍生质粒,细菌菌株和质粒详见表 1。LB 用作培养大肠杆菌的丰富培养基, RB^[15]作为检测脂肪酸合成突变菌株的培养基。合成 V 号培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, 牛肉膏 1.0, KNO₃ 1.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, 调节 pH 至 7.0-7.2, 用于链霉菌培养。油酸(Ole)用无水乙醇配成 20%的油酸储液,并用氢氧化钾调 pH 至中性。在 RB 培养基中油酸的最终添加浓度是 0.1%。抗生

素的使用浓度为: 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)、30 mg/L 卡那霉素(Km)。诱导剂 L-阿拉伯糖(Ara)使用浓度为 0.02%, 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)使用浓度为 1 mmol/L。

1.1.2 主要试剂与仪器

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 和 *Pfu* DNA 聚合酶、DNA Marker DL2000、标准蛋白质、T-载体克隆、质粒提取和 DNA 凝胶回收

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
<i>E. coli</i> strains		
BL21(DE3)	<i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) (DE3)	Our lab collection
DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺)	Our lab collection
CY242	<i>fabB(ts)</i>	[24]
CY244	<i>fabB(ts)fabF</i>	[11]
CL28	<i>fabF::kan</i> of MG1655	[25]
MG1655	Wild type	Our lab collection
<i>Streptomyces coelicolor</i> strain		
A3(2)	Wild type	Our lab collection
Plasmids		
pMD19	Amp ^r , T-vector	TaKaRa
pBAD24M	Amp ^r , expression vector	Our lab collection
pET-28b	Km ^r , expression vector	Our lab collection
pBAD- <i>EcfabB</i>	Amp ^r , <i>E. coli fabB</i> gene in pBAD24M	Our lab collection
pYH01	Amp ^r , <i>ScofabF1</i> gene in T-vector	This study
pYH02	Amp ^r , <i>ScofabF2</i> gene in T-vector	This study
pYH03	Amp ^r , <i>ScofabF3</i> gene in T-vector	This study
pYH04	Amp ^r , <i>ScoredR</i> gene in T-vector	This study
pYH05	Amp ^r , <i>ScofabF1</i> in pBAD24M	This study
pYH06	Amp ^r , <i>ScofabF2</i> in pBAD24M	This study
pYH07	Amp ^r , <i>ScofabF3</i> in pBAD24M	This study
pYH08	Amp ^r , <i>ScoredR</i> in pBAD24M	This study
pYH09	Km ^r , <i>ScofabF1</i> in pET-28b	This study
pYH10	Km ^r , <i>ScofabF2</i> in pET-28b	This study
pYH11	Km ^r , <i>ScofabF3</i> in pET-28b	This study
pYH12	Km ^r , <i>ScoredR</i> in pET-28b	This study

等试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG、阿拉伯糖、各种脂肪酸等试剂购自 Sigma 公司; PCR 扩增引物的合成以及核酸序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。PCR 电泳仪购自北京东胜创新生物科技有限公司; 分光光度计气相色谱质谱联用仪购自岛津公司。

1.2 DNA 重组技术

以天蓝色链霉菌 A3(2)的基因组为模板, 利用表 2 中所列引物分别 PCR 扩增获得天蓝色链霉菌的 *ScofabF1*、*ScofabF2*、*ScofabF3* 以及 *ScoredR* 基因。扩增产物纯化后分别连入 pMD19-T 载体, 并转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, 通过测序验证获得质粒 pYH01 (*ScofabF1*)、pYH02 (*ScofabF2*)、pYH03 (*ScofabF1*)和 pYH04 (*ScoredR*)。而后用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切后消化质粒, 回收基因片段, 分别克隆到表达载体 pBAD24M 上, 获得互补质粒 pYH05、pYH06、pYH05、pYH08。用类似策略, 将回收的基因片段分别克隆到 pET-28b 上, 获得表达载体 pYH09、pYH10、pYH11、pYH12。

表 2 所用引物序列

Table 2 Sequences of the PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequences (5'→3')
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGGG
<i>ScofabF1</i> (<i>Nde</i> I)	AATACGT <u>CATATG</u> AGCTCGACCAATCGCA C
<i>ScofabF1</i> (<i>Hind</i> III)	AATTAAGCTTCTCAGACCGACCGGAACG CG
<i>ScofabF2</i> (<i>Nde</i> I)	AATACGT <u>CATATG</u> ACCGGCGCCCGTCCC
<i>ScofabF2</i> (<i>Hind</i> III)	AATTAAGCTTCTTCTCCCTTTCGTTGCAG AAC
<i>ScofabF3</i> (<i>Nde</i> I)	AATACGGC <u>CATATG</u> AGTCCACGACACGCGG
<i>ScofabF3</i> (<i>Hind</i> III)	AATTAAGCTTTCATGAGGCGTCGGCGA
<i>ScoredR</i> (<i>Nde</i> I)	AATACGT <u>CATATG</u> ACCGACCCCTCCCTCG
<i>ScoredR</i> (<i>Hind</i> III)	AATTAAGCTTCGTCAGCGGGCCCGGGC

注: 引物中下划线序列为引入的酶切位点。

Note: The underlined sequences are the introduced restriction sites.

1.3 蛋白质的表达与分离纯化

将表达质粒 pYH09、pYH10、pYH11、pYH12 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 蛋白表达与分离纯化参照文献[4,26]进行。同时参照文献[27-28]中的方法, 分别分离纯化大肠杆菌丙二酸单酰 CoA:ACP 转移酶(FabD)、3-酮脂酰 ACP 还原酶(FabG)、3-羟基脂酰 ACP 脱水酶/异构酶(FabA)、烯脂酰 ACP 还原酶(FabI)、哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶(AasS)和大肠杆菌 holo-ACP 蛋白, 并且体外合成丙二酸单酰 ACP (Mal-ACP)、辛脂酰 ACP、癸脂酰 ACP 以及月桂酰 ACP。其中丙二酸单酰 ACP 合成体系(50 μ L): 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 μ mol/L Holo-ACP, 5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 0.2 mmol/L 丙二酸单酰 CoA (Mal-CoA), 0.1 μ g FabD。长链脂酰 ACP 合成体系(50 μ L): 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 μ mol/L Holo-ACP, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L ATP, 10 mmol/L MgSO₄, 0.4 mmol/L 脂肪酸, 0.1 μ g AasS。以上催化反应在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h。

1.4 体外活性分析

体外分析 FabFs 以及 ScoRedR 是否具有长链 3-酮基脂酰 ACP 合成酶的活性, 参照文献[14]进行。反应体系(50 μ L): 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 μ mol/L NADH, 50 μ mol/L NADPH, 50 μ mol/L 丙二酸单酰 ACP, 50 μ mol/L 辛脂酰 ACP (或癸脂酰 ACP)。大肠杆菌脂肪酸合成相关酶 FabG、FabA、FabI 各 0.1 μ g, 反应在添加纯化的 0.1 μ g FabFs (或 ScoRedR)后, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h。使用癸脂酰 ACP、辛脂酰 ACP (或月桂酰 ACP)为对照, 用分离胶浓度为 17.5%且含有 2.5 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳进行分析。

1.5 脂肪酸组成分析

将构建好的 pBAD24M 系统互补质粒 pYH05、pYH06、pYH05、pYH08 以及空载体 pBAD24M 分别转化大肠杆菌 *fabF* 突变菌株 CL28。添加阿拉伯糖(Ara)诱导转化子中质粒表达后, 4 000 r/min 低

温(4 °C)离心 10 min 收集菌体, 按照文献[27-28]的方法提取脂肪酸并转化为脂肪酸甲酯(每种样品做 3 个重复)。样品送华南农业大学测试中心, GC-MS 分析脂肪酸组成。分析条件: 分离柱为 DB-1, 30 m×0.32 mm, 柱温为 100 °C 保持 5 min, 10 °C/min 升温至 200 °C, 保持 5 min, 再 10 °C/min 升温至 220 °C, 保持 5 min, 进样口温度为 220 °C, 载气 He 流速为 1.0 mL/min, 质谱扫描范围为 35–335 amu。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶催化脂酰 ACP 与丙二酸单酰 ACP 发生聚合, 生产 3-酮脂酰 ACP (图 1A), 是脂肪酸合成的关键步骤。天蓝色链霉菌 A3(2)全基因组测序已完成^[19]。首先利用大肠杆菌 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (EcFabB)序列同源比对天蓝色链霉菌 A3(2)基因组, 未发现 EcFabB 的同源序列。利用相同方法, 以大肠杆菌 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (EcFabF)序列同源比对天蓝色链霉菌 A3(2)

基因组, 结果显示基因组编码 4 个同源蛋白, 分别为 SCO2390 (命名为 ScoFabF1)、SCO1266 (命名为 ScoFabF2)、SCO0548 (命名为 ScoFabF3) 和 SCO5886 (ScoRedR), 与 EcFabF 的序列一致性分别为 41%、39%、38%和 42%。进一步序列分析发现这 4 个同源蛋白都具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶保守的 Cys-His-His 活性中心^[29](图 1B)。*ScofabF1* 基因位于推测的脂肪酸合成基因簇中, *ScoredR* 基因位于灵菌红素合成基因簇中, *ScofabF2*、*ScofabF3* 都位于功能未知的基因簇中。根据生物信息学分析结果, 推测 *ScofabF1* 编码 3-酮脂酰 ACP 合成酶, 在脂肪酸合成过程中具有重要作用。为验证这一观点, 对其进行了以下研究。

2.2 遗传互补大肠杆菌突变株

为验证天蓝色链霉菌基因组中 *EcfabF* 同源基因的功能, 将其分别克隆到受阿拉伯糖诱导的表达载体 pBAD24M 上, 获得互补质粒 pYH05 (*ScofabF1*)、pYH06 (*ScofabF2*)、pYH05 (*ScofabF3*) 和 pYH08 (*ScoredR*), 并将这 4 个互补质粒转化大

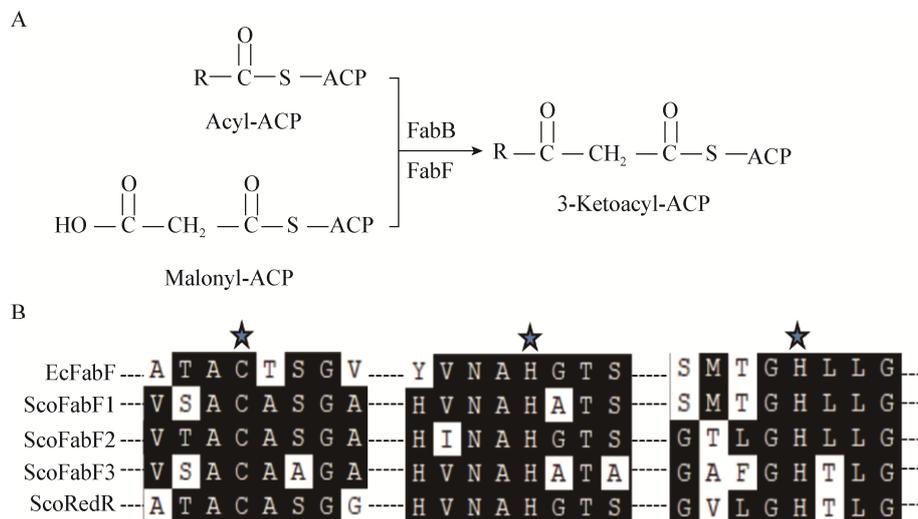


图 1 长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶的催化反应以及 ScoFabFs、ScoRedR 与 *E. coli* FabF 序列比对
Figure 1 3-Ketoacyl-ACP synthase catalyzed reaction and alignment of ScoFabFs, ScoRedR with *E. coli* FabF

注: A: 长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶催化的反应; B: FabF 催化活性中心比对。星号标注的为活性催化中心 Cys-His-His。

Note: A: 3-Ketoacyl-ACP catalyzed reaction; B: Amino acid sequence alignment, the active-site cysteine (C), histidine (H) and histidine (H) residues are asterisked.

肠杆菌 *fabB* 温度敏感突变株 CY242 [*fabB(ts)*]。该菌株在 30 °C 能正常生长, 但在 42 °C 时由于不饱和脂肪酸合成的关键蛋白 FabB 失活, 只有在外源添加油酸时, 菌体才能生长(图 2B), 表现为油酸的营养缺陷型。因此, 如果外源基因在不添加油酸时能恢复 CY242 在 42 °C 的生长, 则表明该基因编码蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的活性。遗传互补结果表明(图 2A), 上述 4 个互补质粒都不能恢复 CY242 在 42 °C 时生长, 说明 *ScofabF1*、*ScofabF2*、*ScofabF3* 和 *ScoredR* 基因的编码蛋白都不具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性。

进一步将这 4 个互补质粒转化大肠杆菌 *fabB* 和 *fabF* 双突变菌株 CY244 [*fabB(ts)fabF*]。虽然该菌株 *fabF* 基因发生突变, 30 °C 时 *fabB* 编码蛋白具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性, 菌体能正常生长, 但该菌株在 42 °C 时, *fabB* 编码蛋白也没有活性, 即使添加油酸也不能生长。因此, 在 42 °C 培养条件下, 如果外源基因在不添加油酸条件下能恢复 CY244 的生长, 表明该基因编码蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的活性, 如果外源基

因在添加油酸条件下恢复 CY244 的生长, 则表明该基因编码蛋白具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 的活性。互补结果表明, 不添加油酸时 4 个互补质粒都不能恢复 CY244 在 42 °C 时生长, 再次证明这 4 个基因产物都不具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性(图 2C); 而在添加油酸时, 只有 pYH05 (*ScofabF1*) 质粒能恢复 CY244 在 42 °C 时生长, 其他 3 个互补质粒则不能恢复生长(图 2C)。以上结果说明只有 *ScoFabF1* 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 活性, 4 个同源蛋白都不具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I 活性。

2.3 体外活性检测

为了进一步研究天蓝色链霉菌中几个 FabF 同源蛋白在体外的生物功能, 分别将 *ScofabF1*、*ScofabF2*、*ScofabF3* 和 *ScoredR* 基因克隆到 pET-28b 上, 获得表达质粒 pYH09 (*ScofabF1*)、pYH10 (*ScofabF2*)、pYH11 (*ScofabF3*) 和 pYH12 (*ScoredR*)。而后将这 4 个表达质粒分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 在 37 °C 诱导蛋白质表达, 并采用 Ni-NTA 亲和层析, 纯化获得 N 端融合有 His-tag 标签蛋白(图 3A)。

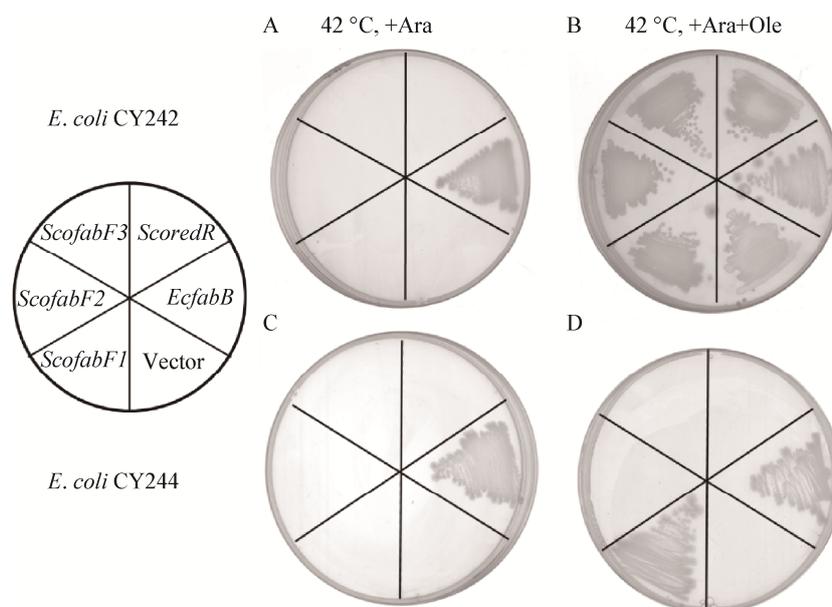


图 2 *fabF* 同源基因互补大肠杆菌突变株 CY242 和 CY244

Figure 2 Complementation of *E. coli* mutant CY242 and CY244 with *fabF* homologues

在细菌脂肪酸合成的循环反应中,长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶能催化脂酰 ACP 与丙二酸单酰 ACP 缩合,生成 3-酮脂酰 ACP (图 1A),而后依次被 3-酮脂酰 ACP 还原酶(FabG)、3-羟脂酰 ACP 脱水酶(FabA)、烯脂酰 ACP 还原酶(FabI)催化,最终生成延伸两个碳的脂酰 ACP。新生成的脂酰 ACP 又可以进入下一个循环反应,合成新的长链脂酰 ACP。

为了确定天蓝色链霉菌 FabF 同源蛋白是否具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶功能,体外重建大肠杆菌脂肪酸合成体系,通过分析合成产物来明确上述蛋白在脂肪酸延伸反应中的功能。首先反应系统中以辛脂酰 ACP 和丙二酸单酰 ACP 为底物,添加大肠杆菌来源的 FabG、FabA、FabI 和辅因子 NADPH、NADH,并分别添加不同的 FabF 同源蛋

白,反应产物用非变性凝胶电泳检测显示,只有 ScoFabF1 催化生成了更长链的脂酰 ACP (图 3B,条带 1),证明其具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性,而其他蛋白不具有该活性(图 3B,条带 2-4)。进一步以癸脂酰 ACP 和丙二酸单酰 ACP 为底物,用类似体系和方法,再次证明 ScoFabF1 具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性,其他蛋白不具有该活性(图 3C)。体外检测结果与异体遗传互补实验的结果相吻合。

2.4 脂肪酸组成分析

3-酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF)催化特点是能将棕榈油酸(C_{16:1})延伸为顺-11-十八碳烯酸(C_{18:1}),调节细菌脂肪酸组成。为进一步确定天蓝色链霉菌中 FabF 同源蛋白的催化活性,将质粒 pYH05 (ScofabF1)、pYH06 (ScofabF2)、pYH05 (ScofabF3)

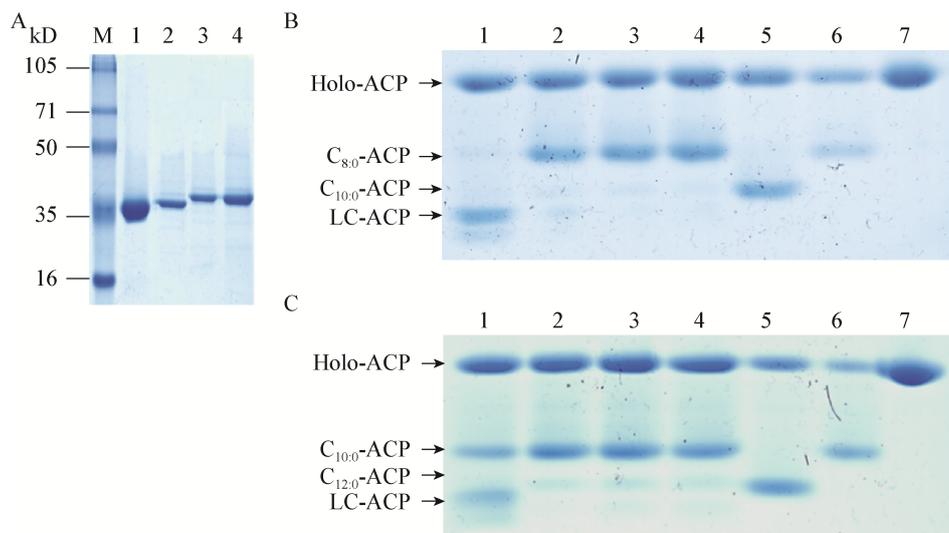


图 3 天蓝色链霉菌中 FabF 同源蛋白体外活性分析

Figure 3 Enzymatic activity assay of *Streptomyces coelicolor* FabF homologues *in vitro*

注: A: FabF 同源蛋白纯化。M: 蛋白质 Marker, 1、2、3、4 分别为 ScoRedR、ScoFabF3、ScoFabF2、ScoFabF1; B: 以辛脂酰 ACP 为底物的催化产物电泳分析。1、2、3、4 分别为 ScoFabF1、ScoFabF2、ScoFabF3 和 ScoRedR 催化生成的产物; 5、6、7 分别为癸脂酰 ACP (C_{10:0}-ACP)、辛脂酰 ACP (C_{8:0}-ACP)和 Holo-ACP 对照。C: 以癸脂酰 ACP 为底物的催化产物电泳分析。1、2、3、4 分别为 ScoFabF1、ScoFabF2、ScoFabF3 和 ScoRedR 催化生成的产物; 5、6、7 分别为月桂酰 ACP (C_{12:0}-ACP)、癸脂酰 ACP (C_{8:0}-ACP)和 Holo-ACP 对照。

Note: A: FabF homologues purification. M: Protein marker, 1: ScoRedR; 2: ScoFabF3; 3: ScoFabF2; 4: ScoFabF1. B: Electrophoretic analysis of products using octanoyl-ACP as the substrate. The migration positions of capryl-ACP (C_{10:0}-ACP), octanoyl-ACP (C_{8:0}-ACP) and holo-ACP are shown in lane 5, 6, 7 respectively. The products of ScoFabF1, ScoFabF2, ScoFabF3 and ScoRedR were shown in lane 1-4 respectively; C: Electrophoretic analysis of products using capryl-ACP as substrate. The migration positions of decenoyl-ACP (C_{12:0}-ACP), capryl-ACP (C_{10:0}-ACP) and holo-ACP are shown in lane 5, 6, 7 respectively. The products of ScoFabF1, ScoFabF2, ScoFabF3 and ScoRedR were shown in lane 1-4 respectively.

和 pYH08 (*ScoredR*) 分别转化大肠杆菌 *fabF* 突变株 CL28 (*fabF::kan*), 并提取携带不同质粒转化子的全细胞脂肪酸, 利用 GC-MS 测定各菌株的脂肪酸组成, 结果如图 4 所示。与对照 CL28 (pBAD24M) 相比, 携带 pYH05 (*ScofabF1*) 质粒的菌株中棕榈油酸(C_{16:1})占总脂肪酸含量的比例下降为 46.0% (对照菌株为 48.2%), 而顺-11-十八碳烯酸(C_{18:1})的比例则由对照菌株的 3.4% 显著上升为 6.7%, 说明天蓝色链霉菌中 ScoFabF1 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的活性。而携带其他几个质粒(pYH06、pYH07、pYH08) 的菌株脂肪酸组成与对照菌株没有明显差异, 说明 *ScofabF2*、*ScofabF3* 和 *ScoredR* 编码产物不具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 活性。

3 讨论与结论

链霉菌因其能产生大量不同结构的次级代谢产物, 并具有多方面的应用价值, 已被广泛深入研究。微生物次级代谢是指生长到一定阶段后, 以初级代谢产物为前体合成的对微生物生命活动等没有明确功能的物质的过程, 因此初级代谢直接影响次级代谢。脂肪酸合成代谢是细菌最重要的初级代谢之一, 合成的脂肪酸不仅用于细胞膜磷脂的合成, 还作为前体物质用于类脂 A、群体感

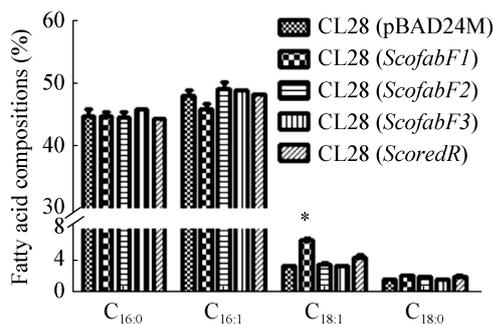


图 4 携带不同质粒的大肠杆菌 CL28 脂肪酸组成
Figure 4 Fatty acid composition of *E. coli* CL28 carrying different plasmids

注: C_{16:0}: 十六碳正酸; C_{16:1}: 十六碳烯酸; C_{18:0}: 十八碳正酸; C_{18:1}: 十八碳烯酸。

Note: C_{16:0}: Palmitic acid; C_{16:1}: Palmitoleic acid; C_{18:0}: Octadecanoic acid; C_{18:1}: Octadecenoic acid.

应信号分子、鼠李糖脂等生物活性分子的合成, 而且脂肪酸合成与链霉菌的聚酮体合成直接相关^[30]。天蓝色链霉菌作为链霉菌的模式菌株, 其脂肪酸合成相关的多个基因已有报道, 包括 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH)、3-酮脂酰 ACP 还原酶 (FabG)、羟脂酰 ACP 脱水酶 (FabA) 以及烯脂酰 ACP 还原酶 (FabI), 但其长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶还未见报道。

因此本文采用生物信息学方法, 利用大肠杆菌来源的 3-酮脂酰 ACP 合成酶 I、II (FabB 和 FabF) 序列, 同源比对天蓝色链霉菌基因组, 发现没有与 FabB 同源的蛋白, 但有几个 FabF 的同源蛋白 (ScoFabF1、ScoFabF2、ScoFabF3 和 ScoRedR), 序列一致性均约为 40%, 并具有长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶保守的 Cys-His-His 活性中心。异体遗传互补实验结果显示, 仅 *ScofabF1* 能恢复突变株 CY244 在添加油酸时 42 °C 生长, 说明只有 ScoFabF1 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 II 的功能。体外活性检测也证明只有 ScoFabF1 具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶活性, 其他几个同源蛋白都不具有该活性。进一步互补大肠杆菌突变株 CL28 后, 测定脂肪酸组成, 结果也显示 *ScofabF1* 编码长链 3-酮脂酰 ACP 合成酶, 在脂肪酸合成中发挥重要作用。

在基因组中, *ScofabF1* 位于推测的脂肪酸合成基因簇中, 其上游的 *SCO2388* (编码 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III)^[23]、*SCO2389* (编码脂酰载体蛋白)^[31] 已证实参与脂肪酸合成代谢, 本文结果证明 ScoFabF1 也参与脂肪酸合成代谢。虽然 4 个蛋白与大肠杆菌 FabF 的序列一致性都接近 40%, 但其他 3 个蛋白的功能还不清楚。天蓝色链霉菌的灵菌红素 (Red) 基因簇中, RedP 与大肠杆菌 FabH 也具有同源性, 但 RedP 专一性催化灵菌红素的合成反应, 而不能催化脂肪酸合成反应^[31], 推测 SCO5886 (ScoRedR) 也具有类似特点, 专一性作用于灵菌红素的生物合成, 但具体催化步骤与机制

还有待深入研究。

虽然不饱和脂肪酸往往是革兰氏阴性细菌生长所必需的,但革兰氏阳性细菌合成大量的支链脂肪酸能有效调节细胞膜的流动性,如天蓝色链霉菌中支链脂肪酸含量约为75%,而不饱和脂肪酸仅约占5%^[32]。没有发现具有类似于大肠杆菌 FabB 的同源蛋白,说明天蓝色链霉菌中不饱和脂肪酸合成机制与大肠杆菌不同。同源性分析发现,天蓝色链霉菌基因组中 SCO3128 编码脂肪酸脱饱和酶(DesA),推测可能通过脱饱和方式合成不饱和脂肪酸。另外,SCO2553 编码蛋白与幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)不饱和脂肪酸合成酶 FabX^[33]也具有一定的相似性,说明天蓝色链霉菌也可能采用类似的方式合成不饱和脂肪酸。因此,天蓝色链霉菌中不饱和脂肪酸的合成机制还有待深入研究。

REFERENCES

- [1] Zhang YM, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 222-233
- [2] Lindström F, Thurnhofer S, Vetter W, et al. Impact on lipid membrane organization by free branched-chain fatty acids[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2006, 8(41): 4792-4797
- [3] Wang XY, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification[J]. *Progress in Lipid Research*, 2010, 49(2): 97-107
- [4] Yu YH, Hu Z, Dong HJ, et al. *Xanthomonas campestris* FabH is required for branched-chain fatty acid and DSF-family quorum sensing signal biosynthesis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32811
- [5] Hoang TT, Sullivan SA, Cusick JK, et al. Beta-ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2002, 148(Pt 12): 3849-3856
- [6] Cronan JE. Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(2): 429-450
- [7] Joseph J. Fattening by deprivation: methyl balance and perinatal cardiomyopathy[J]. *The Journal of Pathology*, 2011, 225(3): 315-317
- [8] Parsons JB, Rock CO. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis[J]. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(3): 249-276
- [9] Heath RJ, Rock CO. Inhibition of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biology and Chemistry*, 1996, 271(18): 10996-11000
- [10] Campbell JW, Cronan JE. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 305-332
- [11] de Mendoza D, Klages Ulrich A, Cronan Jr JE. Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I[J]. *Journal of Biology and Chemistry*, 1983, 258(4): 2098-2101
- [12] Garwin JL, Cronan JE. Thermal modulation of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* does not involve *de novo* enzyme synthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1980, 141(3): 1457-1459
- [13] Wang HH, Cronan JE. *Haemophilus influenzae* Rd lacks a stringently conserved fatty acid biosynthetic enzyme and thermal control of membrane lipid composition[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(16): 4930-4937
- [14] Cheng JL, Ma JC, Lin JS, et al. Only one of the five *Ralstonia solanacearum* long-chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase homologues functions in fatty acid synthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(5): 1563-1573
- [15] Ma JC, Deng LT, Tong WH, et al. Identification and function research of five 3-ketoacyl-ACP synthase homologues[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2014, 41(9): 887-895 (in Chinese)
马金成, 邓丽婷, 童文华, 等. 五个 3-酮脂酰 ACP 合成酶同源蛋白的功能鉴定[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(9): 887-895
- [16] Wang HH, Cronan JE. Functional replacement of the FabA and FabB proteins of *Escherichia coli* fatty acid synthesis by *Enterococcus faecalis* FabZ and FabF homologues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(33): 34489-34495
- [17] Zhu L, Cheng JL, Luo B, et al. Functions of the *Clostridium acetobutylicum* FabF and FabZ proteins in unsaturated fatty acid biosynthesis[J]. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 119
- [18] Morgan-Kiss RM, Cronan JE. The *Lactococcus lactis* FabF fatty acid synthetic enzyme can functionally replace both the FabB and FabF proteins of *Escherichia coli* and the FabH protein of *Lactococcus lactis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2008, 190(4): 427-437
- [19] Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147
- [20] Liu G, Chater KF, Chandra G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 112-143
- [21] Singh R, Reynolds KA. Characterization of FabG and FabI of the *Streptomyces coelicolor* dissociated fatty acid synthase[J]. *Chembiochem*, 2015, 16(4): 631-640
- [22] Singh R, Reynolds KA. Identification and characterization of FabA from the type II fatty acid synthase of *Streptomyces coelicolor*[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(1): 240-243
- [23] Revill WP, Bibb MJ, Scheu AK, et al. β -ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid

- biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(11): 3526-3530
- [24] Ulrich AK, de Mendoza D, Garwin JL, et al. Genetic and biochemical analyses of *Escherichia coli* mutants altered in the temperature-dependent regulation of membrane lipid composition[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 154(1): 221-230
- [25] Lai CY, Cronan JE. Isolation and characterization of β -ketoacyl-acyl carrier protein reductase (*fabG*) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(6): 1869-1878
- [26] Mao YH, Li F, Ma JC, et al. *Sinorhizobium meliloti* functionally replaces 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG) by overexpressing *NodG* during fatty acid synthesis[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2016, 29(6): 458-467
- [27] Mao YH, Ma JC, Li F, et al. *Ralstonia solanacearum* RSp0194 encodes a novel 3-keto-acyl carrier protein synthase III[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136261
- [28] Zhu L, Bi HK, Ma JC, et al. The two functional enoyl-acyl carrier protein reductases of *Enterococcus faecalis* do not mediate triclosan resistance[J]. mBio, 2013, 4(5): e00613
- [29] Rock CO, Jackowski S. Forty years of bacterial fatty acid synthesis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 292(5): 1155-1166
- [30] Cronan JE, Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways[J]. Methods in Enzymology, 2009, 459: 395-433
- [31] Singh R, Mo S, Florova G, et al. *Streptomyces coelicolor* RedP and FabH enzymes, initiating undecylprodigine and fatty acid biosynthesis, exhibit distinct acyl-CoA and malonyl-acyl carrier protein substrate specificities[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 328(1): 32-38
- [32] Li YL, Florova G, Reynolds KA. Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH)[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(11): 3795-3799
- [33] Bi HK, Zhu L, Jia J, et al. Unsaturated fatty acid synthesis in the gastric pathogen *Helicobacter pylori* proceeds via a backtracking mechanism[J]. Cell Chemical Biology, 2016, 23(12): 1480-1489

(上接 p.2271)

征 稿 简 则

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式即各种文字、各种介质版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 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(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>