

大豆长链脂酰辅酶 A 合成酶基因 *GmLACS* 在酵母中的表达

于莉莉^{1,2}, 谭小力², 侯文胜¹

(1. 中国农业科学院 作物科学研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081; 2. 江苏大学 生命科学研究院, 江苏 镇江 212013)

摘要:在 LACS 缺陷型酵母 YB525 中对已经克隆的大豆长链脂酰辅酶 A 合成酶基因(*GmLACS*)进行表达,并对其功能进行了预测。进化树比对分析显示大豆长链脂酰辅酶 A 合成酶(*GmLACS*)与其它植物的 LACSs 具有高度的同源性;酵母互补测试显示 *GmLACS* 蛋白能够互补 LACS 缺陷型酵母 YB525,具有长链脂酰辅酶 A 合成酶活性;底物偏好性分析显示 *GmLACS* 偏好活化大豆中的重要长链脂肪酸。以上研究结果表明:大豆长链脂酰辅酶 A 合成酶基因 *GmLACS* 编码的蛋白属于 LACS 家族,能够活化外源脂肪酸并参与了脂肪酸相关的脂类代谢。

关键词:大豆;长链脂酰辅酶 A 合成酶;进化树分析;酵母互补

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)05-0719-04

Enzyme Activity Analysis of *GmLACS* in *Saccharomyces Cerevisiae*

YU Li-li^{1,2}, TAN Xiao-li², HOU Wen-sheng¹

(1. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Beijing 100081; 2. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China)

Abstract: In this paper, *GmLACS* was transformed into LACS-deficient *Saccharomyces cerevisiae* YB525 to analyze its enzymatic activity. Phylogenetic analysis indicated *GmLACS* showed a high degree of homology with other LACSs of plants. *GmLACS* could complement the YB525 mutant which was deficient in LACS showing that *GmLACS* belonged to the LACS family. The transformants preferred to use long chain fatty acids indicated *GmLACS* could activate the free fatty acids and involve the metabolism of fatty acids and lipids.

Key words: Soybean; LACS; Phylogenetic analysis; Yeast complementation

大豆是重要的油料作物,其种子含油量约为20%。近年来,我国大豆年产量一直在1 500万t左右徘徊,难以满足国内的消费需求,2009年我国大豆进口量高达4 255万t^[1]。由于我国大豆种植面积难以大幅度增加,要进一步提高大豆油产量,大豆品种含油量的提高就显得尤为重要。大豆的含油量是一个复杂的数量遗传性状,与其相关的代谢途径涉及很多种酶,其中,长链脂酰辅酶 A 合成酶(LACS)家族是极为重要的一类酶,在模式植物拟南芥中鉴定出的该家族成员,已被证实参与脂肪酸相关的油脂代谢中起着重要作用^[2]。

长链脂酰辅酶 A 合成酶属于 ACS 家族(AMP-绑定超家族),具有这个家族的 AMP-绑定域标签(Prosite PS00455)的保守氨基酸序列。其主要功能是在辅酶 A、ATP 及 Mg^{2+} 存在的条件下,催化游离长链脂肪酸活化成为长链脂酰辅酶 A,进而参与到细胞的生命活动中^[3]。LACS 主要通过两步机制来催化形成脂酰辅酶 A。首先通过 ATP 的焦磷酸

解作用,将游离脂肪酸活化成脂酰-AMP 中间体(即腺苷酸),然后通过腺苷酸的活化羧基碳与辅酶 A 的巯基基团偶联,释放出 AMP 和脂酰辅酶 A^[4]。

高等植物 LACS 家族包括多个成员,可被定位到包括叶绿体的外膜、发芽种子的过氧化酶体、内质网、叶绿体等不同的亚细胞结构,参与如脂肪酸的碳链延伸、油脂的生物合成、蜡质角质的生物合成、油脂的分解代谢等多种生化过程^[5-8]。在已发现的9个拟南芥 LACS 编码基因中,7个可以互补缺陷型酵母。其中 *AtLACS1* 和 *AtLACS2* 共同参与蜡质层和角质层合成;*AtLACS6* 和 *AtLACS7* 参与了过氧化物酶体中的 β -氧化代谢途径;*AtLACS9* 是主要的叶绿体 LACS 蛋白编码基因与油脂的合成相关^[9-11]。在已发现的10个甘蓝型油菜 LACS 基因中,*pXT166*、*BnLACS4* 和 *ACS6* 在发育中的胚乳、花和花芽中大量表达,可能主要参与了油脂合成代谢^[12-14]。棉花中的长链脂酰辅酶 A 合成酶基因 *GhACS1* 在花药中强烈表达,推测其对早期花粉的

收稿日期:2011-05-27

基金项目:国家科技重大专项资助项目(2008ZX08010-004)。

第一作者简介:于莉莉(1985-),女,在读硕士,研究方向为大豆克隆与功能鉴定。E-mail: merrys222@126.com。

通讯作者:侯文胜(1969-),男,博士,研究员,主要从事大豆基因克隆、转基因技术和分子育种研究。E-mail: houwsh@caas.net.cn。

小孢子形成具有关键作用^[15]。在蓖麻中发现的 *RcLACS2* 基因,其表达的蛋白能够优先活化蓖麻醇酸形成辅酶 A 硫酯,推测其可能在蓖麻油酸酯的合成过程中起着重要作用^[16]。

在前期研究中,实验室克隆了 1 个大豆 *LACS* 基因家族成员,命名为 *GmLACS* (GenBank 序列号为 AK245419),并对其进行了初步的生物信息学和基因表达分析^[17]。该研究通过酵母互补分析系统,进一步明确了 *GmLACS* 基因编码酶的活性及其对不同底物的偏好性,有助于深入研究其在脂肪酸代谢中的作用,为大豆脂类代谢的基因调控提供理论依据和新品种育种选育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

基因来源于大豆 (*Glycine max* L. Merr.) 品种 Williams 79,酵母菌种为 YB525。

进化树分析所使用的蛋白包括:拟南芥 *AtLACS1* ~ *AtLACS9* (AAM28868 ~ AAM28876)、蓖麻 *RcLACS1* 和 *RcLACS2* (XP_002520618、XP_002520615)、油菜 *BnACS1* ~ *BnACS6* (X94624、Z72152、Z72151、Z72153、X94625、AJ401089)。

1.2 试验方法

1.2.1 进化树分析 BLAST 蛋白相似性在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行,利用 MEGA4.1 进行进化树分析。

1.2.2 RNA 提取 使用植物 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取大豆萌发 10 d 的幼苗叶片 RNA,所有步骤均依照生产商提供的说明操作。

1.2.3 酵母表达载体构建和酵母转化 设计引物 *GmLACSF*: 5'-ggatccATGGCACAGAAGAGATTCA-TCAT-3' *BamH* I 和 *GmLACSR*: 5'-tctagaTCAG-GCACTGGGTTTACTTCC-3' *Xba*I,以 300 ng cDNA 为模板,使用 LA-Taq 酶 (TaKaRa) 进行 PCR,条件为: 94℃ 5 min, 35 个循环 (94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 2 min), 72℃ 10 min。回收 PCR 产物,连接到 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 上,转化 *E. coli* DH5 α ,测序验证。利用 *Bam*HI/*Xba*I 酶切 pMD18-T-*GmLACS*,回收目的基因片段连接到酵母表达载体 pYES2 的相应位点,得到重组质粒 pYES2-*GmLACS*。将重组质粒 pYES2-*GmLACS* 和 pYES2 (空载体对照) 分别转入 LACS 缺陷型酵母 YB525 感受态细胞中,利用缺省尿嘧啶固体 drop-out 培养基^[14]筛选转化子。

1.2.4 酵母互补和脂肪酸底物偏好 选择阳性克隆,在缺省尿嘧啶的液体 drop-out 培养基中培养,酵母互补和脂肪酸底物偏好性分析参照朱福各等的

方法^[14]。酵母互补测试是在 drop-out 培养基中添加半乳糖以诱导外源基因大量表达,然后将菌液转入以 16:0 脂肪酸 (油酸) 为唯一碳源的 drop-out 培养基中培养。脂肪酸底物偏好性分析是将转入 pYES2-*GmLACS* 载体和转入 pYES2 空载体的 YB525 酵母,分别在添加 98 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的不同碳链长度脂肪酸 (分别是 C12:0、C14:0、C16:0、C18:0、C18:1 和 C22:1,即月桂酸、豆蔻酸、软脂酸、硬脂酸、油酸、芥酸) 作为唯一碳源的 drop-out 培养基中培养,培养 84 h,然后测定酵母在含有不同脂肪酸培养基中的生长速率。

2 结果与分析

2.1 分子进化树分析

为了进一步明确克隆的大豆 *GmLACS* 基因与其它植物来源的 LACS 家族编码基因的关系,将大豆 *GmLACS* 蛋白与其它高等植物的 LACS 蛋白序列进行了进化树比对分析,结果显示,参与比对的所有 LACS 均起源于一个共同的祖先,LACS 家族主要有 2 个大的进化分支,*GmLACS* 与 *BnACS3*、*BnACS1*、*AtLACS1* 和 *AtLACS2* 的亲缘关系比较近 (图 1)。其中 *AtLACS1* 和 *AtLACS2* 已经被证明参与了拟南芥蜡质和角质合成^[9],推测 *GmLACS* 可能具有类似功能。同时,进化树分析还显示,LACS 之间存在个体特异性。

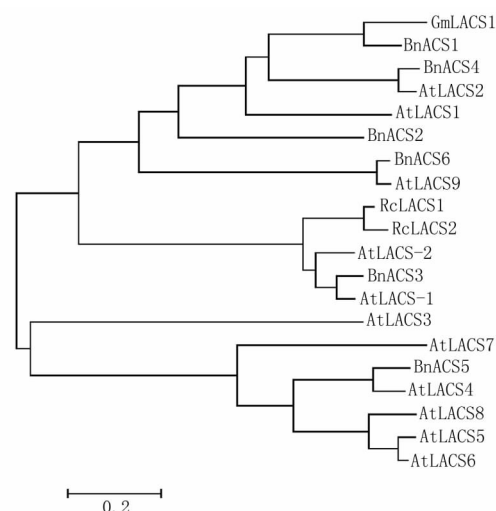


图 1 植物 LACS 蛋白进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of plants LACS

2.2 缺陷型酵母测试

为明确克隆的大豆 *GmLACS* 基因的编码产物是否具有 LACS 酶活性,构建了 pYES2-*GmLACS* (图 2) 酵母载体,利用酵母互补表达体系对其进行了分析。酵母菌株 YB525 是一种缺少 LACS 活性的菌株,这种缺陷型酵母在只以脂肪酸为唯一碳源的培

培养基中不能生长,除非表达了具有 LACS 酶活性的基因。酵母互补测试是对转入不同载体的酵母细胞在以 16:0 脂肪酸为唯一碳源的 drop-out 培养基中诱导培养 84 h 的生长状况进行测定(图 3)。测试结果显示转入 pYES2-*GmLACS* 载体的 YB525 酵母细胞 OD 值为 0.78,表明其可以在只以脂肪酸 C16:0 为唯一碳源的 drop-out 培养基中正常生长,而转入 pYES2 空载体的酵母细胞 OD 值为 0.032,与初始值相同,表明其在脂肪酸 C16:0 为唯一碳源的 drop-out 不能生长。说明 *GmLACS* 基因的异源表达能够互补缺陷型酵母,具有 LACS 蛋白酶活性。

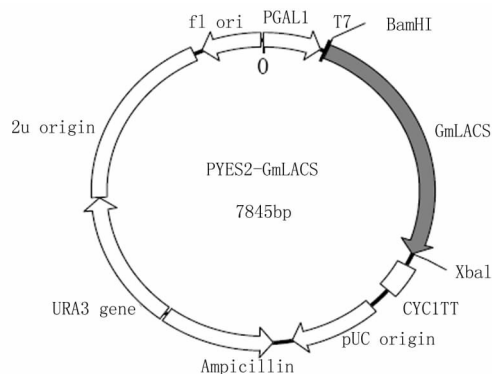
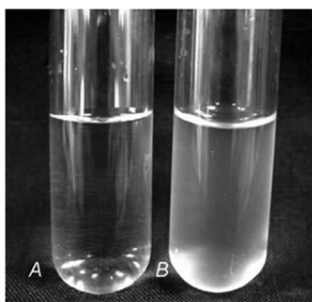


图 2 酵母表达载体 pYES2-*GmLACS*

Fig.2 The construction strategy of yeast expression vector pYES2-*GmLACS*



A: 转化pYES2空载体的酵母细胞; B: 转化pYES2-*GmLACS*的酵母细胞
A: The culture of yeast strain YB525 cells containing pYES2 empty vector;
B: The culture of yeast strain YB525 cells containing pYES2-*GmLACS* vector

图 3 缺陷型酵母互补测试

Fig.3 The complementation test of deficient yeast

2.3 *GmLACS* 底物偏好性分析

为了进一步明确 *GmLACS* 可利用的底物,通过在不同脂肪酸培养基中测定酵母的生长速率来间接分析其底物偏好性。试验结果显示:转入 pYES2 空载体的对照酵母细胞在不同培养基中的生长情况经过检测后,其 OD 值都小于 0.1,与初始值相比无明显变化,认为该转化酵母不能正常生长;转入 pYES2-*GmLACS* 载体的酵母细胞可以在以 C14:0、C16:0、C18:0、C18:1 和 C22:1 脂肪酸分别为唯一碳源的 drop-out 培养基中正常生长,其 OD 值都大于

0.5,在添加了 C16:0 脂肪酸的培养基中生长速度最快;在以 C12:0 脂肪酸为唯一碳源的 drop-out 培养基中不能生长,其 OD 值也小于 0.1,与初始值相同,认为该转化酵母不能在含有 C12:0 脂肪酸的培养基中正常生长(图 4)。C12:0 脂肪酸属于中链脂肪酸,而 C14:0、C16:0、C18:0、C18:1 和 C22:1 脂肪酸均属于长链脂肪酸,该结果表明 *GmLACS* 能够优先利用长链饱和脂肪酸作为底物,尤其是 C16:0、C18:0 和 C18:1 脂肪酸,而这些都是大豆脂肪酸组分中重要的组成部分^[1]。

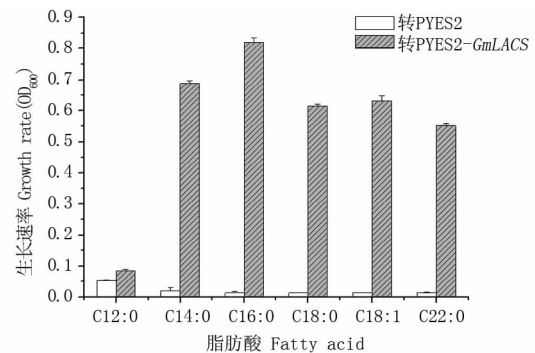


图 4 酵母细胞生长速率

Fig.4 Growth rates of yeast cells

3 讨论

在高等植物脂肪酸及其衍生物的合成代谢和分解代谢反应中,长链脂酰辅酶 A 合成酶起着关键作用,其主要功能是将游离脂肪酸活化成长链脂酰辅酶 A,进而参与到脂肪酸链的延伸,磷脂、甘油三酯、角质、蜡质的生物合成等途径中^[18-19]。目前,一些高等植物的 LACS 家族基因已被克隆和分析,其中,已在模式植物拟南芥中分离了 9 个 LACS 基因^[8]。克隆和分析大豆 LACS 基因,有助于进一步理解大豆脂肪酸和油脂代谢调控机制,指导大豆新品种的选育。通过对该实验室克隆的大豆 *GmLACS* 基因编码的蛋白进行进化树比对分析发现,其编码蛋白与拟南芥 AtLACS1 和 AtLACS2 具有很高相似性;Shockey 等^[8]也通过互补测试证实 AtLACS1 和 AtLACS2 能够互补缺陷型酵母 YB525,与实验室获得的大豆 *GmLACS* 研究结果相似,而后续研究结果表明 AtLACS1 和 AtLACS2 主要参与植物表皮中角质和蜡质的合成,与植物的耐逆代谢相关^[11],据此推测 *GmLACS* 可能具有类似的功能,可能在大豆耐逆性育种中具有潜在应用价值。

已知的拟南芥 LACS 家族成员,对不同的长链脂肪酸具有一定的偏好性,分别在脂肪酸代谢途径中的不同环节发挥作用^[14,16]。该研究结果显示, *GmLACS* 也偏好利用长链脂肪酸作为底物,而不是

月桂酸等中短链脂肪酸,而且这些长链脂肪酸都是大豆中重要的脂肪酸,说明 GmLACS 可能活化大豆中的长链脂肪酸并参与其代谢过程。Shockey 等^[8,10]报道 AtLACS2 主要偏好 C16 和 C18 脂肪酸,这两类脂肪酸是角质合成的主要原始底物,后续研究又进一步表明 AtLACS2 基因主要参与了植物表皮角质的合成,这与该试验对于大豆 GmLACS 底物偏好 C16 和 C18 脂肪酸的研究结果相近,据此推测 GmLACS 基因参与了大豆的长链脂肪酸的代谢调控,可能与大豆表皮角质的合成代谢关系更为密切,因此值得对其在大豆耐逆品种选育中的应用价值开展深入研究。

参考文献

- [1] 石彦国. 调整产业结构确保大豆产业健康持续发展[J]. 中国食品学报, 2010, 10(4): 1-6. (Shi Y G. Adjusting the industrial structure to ensure sustained and healthy development of soybean industry[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(4): 1-6.)
- [2] Shockey J M, Fulda M S, Browse J A. *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism[J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1710-1722.
- [3] Kornberg A, Pricer W E. Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids[J]. Journal of Biological Chemistry, 1953, 204(1): 329-343.
- [4] Stuible H P, Kombrink E. Identification of the substrate specificity-conferring amino acid residues of 4-coumarate:coenzyme A ligase allows the rational design of mutant enzymes with new catalytic properties[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(29): 26893-26897.
- [5] Andrews J, Keegstra K. Acyl-CoA synthetase is located in the outer membrane and Acyl-CoA thioesterase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes[J]. Plant Physiology, 1983, 72(3): 735-740.
- [6] Fulda M, Shockey J, Werber M, et al. Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation[J]. Plant Journal, 2002, 32(1): 93-103.
- [7] Fulda M, Shockey J, Werber M, 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.
- [8] Shockey J M, Fulda M S, Browse J A. *Arabidopsis* contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism[J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1710-1722.
- [9] Fulda M, Shockey J, Werber M, et al. Two long-chain acyl-CoA synthetases from *Arabidopsis thaliana* involved in peroxisomal fatty acid beta-oxidation[J]. Plant Journal, 2002, 32(1): 93-103.
- [10] Schnurr J, Shockey J, Browse J. The acyl-CoA synthetase encoded by LACS2 is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2004, 16(3): 629-642.
- [11] Lu S, Song T, Kosma D K, et al. *Arabidopsis* CER8 encodes long-chain acyl-coA synthetase1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis[J]. Plant Journal, 2009, 59(4): 553-564.
- [12] Fulda M, Heinz E, Wolter F P. *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 33(5): 911-922.
- [13] Pongdontri P, Hills M. Characterization of a novel plant acyl-coA synthetase that is expressed in lipogenic tissues of *Brassica napus* L. [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 47(6): 717-726.
- [14] 朱福各, 谭小力, 崇保强, 等. 油菜脂酰 CoA 合成酶基因 pXT166 的鉴定和功能分析[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(3): 274-278. (Zhu F G, Tan X L, Chong B Q, et al. Characterization and functional analysis of pXT166 gene in *Brassica napus* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2009, 31(3): 274-278.)
- [15] Wang X L, Li X B. The *GhACS1* gene encodes an acyl-CoA synthetase which is essential for normal microsporogenesis in early anther development of cotton [J]. Plant Journal, 2009, 57(3): 473-486.
- [16] He X, Chen G Q, Kang S T, et al. *Ricinus communis* contains an acyl-CoA synthetase that preferentially activates ricinoleate to its CoA thioester[J]. Lipids, 2007, 42(10): 931-938.
- [17] Yu L L, Tan X L, Yuan W W, et al. In silicon cloning and analysis of a LACS gene from *Glycine max* (L.) [J]. International Journal of Biology, 2010, 2(1): 111-116.
- [18] Groot P H, Scholte H R, Hülsmann W C. Fatty acid activation; specificity, localization, and function [J]. Advances in Lipid Research, 1976, 14: 75-126.
- [19] Ohlrogge J B, Kuhn D N, Stumpf P K. Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(3): 1194-1198.