

粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) β 酮脂酰 ACP 合成酶 II 同源蛋白功能分析*

王玉琪** 孙益嵘** 陈艺彩 王海洪***

(华南农业大学 生命科学学院, 广州 510642)

摘要 FabB 和 FabF 是大肠杆菌(*Escherichia coli*)脂肪酸合成的关键酶. 生物信息学分析显示, 粪肠球菌基因组中有 2 个与大肠杆菌 *fabF* 同源的基因: *fabF1* 和 *fabF2*, 缺少与 *fabB* 同源的基因. 用粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)V583 总 DNA 为模板, PCR 扩增 *fabF1* 和 *fabF2* 基因, 以 pBAD24 为载体, 构建了重组质粒 pHW13(*fabF1*)和 pHW14(*fabF2*). 体内体外研究显示: *fabF1* 基因能互补大肠杆菌 *fabB* 突变, FabF1 具有 β 酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB)活性; *fabF2* 能互补大肠杆菌 *fabF* 突变, FabF2 具有 β 酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF)活性. 同时发现粪肠球菌 FabF2 不同于大肠杆菌 FabF, 它还拥有微弱 β 酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB)活性, 可使大肠杆菌 *fabB* 突变株产生少量的不饱和脂肪酸. 上述结果表明, FabF 类酶 (FabF like enzyme) 同样可以具有 β 酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 活性.

关键词 粪肠球菌, FabF 同源蛋白, β 酮脂酰 ACP 合成酶

学科分类号 Q78

大肠杆菌(*Escherichia coli*)脂肪酸合成途径研究得较为透彻, 是细菌脂肪酸合成途径研究的范例^[1-5]. 大肠杆菌有 3 个 β 酮脂酰 ACP 合成酶 (KAS): β 酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB), β 酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF)和 β 酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH). FabH 催化乙酰 CoA 与丙二酸单酰 ACP 的缩合, 起始脂肪酸的合成^[3,6]. FabB (Swiss-Prot AC: POA954)和 FabF (Swiss-Prot AC: POAA16)缩合丙二酸单酰 ACP 与脂酰 ACP, 完成脂酰链的延伸^[3,5]. 在大肠杆菌中 FabB 和 FabF 都具有延长长链饱和脂酰 ACP 的能力, 但是 FabB 是大肠杆菌合成不饱和脂酰酸的关键酶之一, 直接参与不饱和脂酰 ACP 的从头合成, 产生顺 -9- 十六烯脂酰 ACP^[3,7,8]. 而 FabF 只能将顺 -9- 十六烯脂酰 ACP 延伸为顺 -11- 十八烯脂酰 ACP, 不参与不饱和脂酰 ACP 的从头合成^[9]. 因此, *fabB* 和 *fabF* 2 个基因中任何一个发生突变, 大肠杆菌均能完成饱和脂肪酸的合成^[8,10], 但 *fabB* 基因的变异造成大肠杆菌不饱和脂肪酸营养缺陷型突变, 突变株仅能生长在添加油酸的培养基上, 而 *fabF* 突变没有表型特征, *fabB* 和 *fabF* 的双突变是致死的^[11].

随着大量细菌全基因组序列测定的完成, 发现

细菌脂肪酸合成代谢存在着多样性^[4,5,12]. 一般地说, FabB 同源蛋白仅存在于变形菌门(Proteobacteria)的 α 和 γ 类群中, 而 FabF 的同源蛋白却在细菌中普遍存在^[4,7,13]. 粪肠球菌的全基因组序列已经测定完成^[14]. 同源比较分析显示, 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)具有 2 个 FabF 的同源蛋白: FabF1 (Swiss-Prot AC: Q820V4)和 FabF2 (Swiss-Prot AC: Q820T4), 但没有 FabB 同源蛋白^[14]. 这表明粪肠球菌脂肪酸合成机制可能与大肠杆菌的有差异, 有待深入研究.

本研究通过互补大肠杆菌 *fabB* 和 *fabF* 突变株, 发现粪肠球菌 FabF1 具有大肠杆菌 FabB 的活性, 合成顺 -9- 十六烯脂酰 ACP, 是不饱和脂肪酸合成的关键酶之一; 而 FabF2 与大肠杆菌的 FabF 类似, 能将顺 -9- 十六烯脂酰 ACP 转化成顺 -11- 十八碳不饱和脂酰 ACP, 且具有低水平 FabB 的活性.

*华南农业大学校长基金资助项目.

**并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 020-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

收稿日期: 2006-12-31, 接受日期: 2007-01-28

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基. 本研究所用细菌菌株和质粒见表 1. LB 用作培养大肠杆菌的丰富培养基, RB 作为检测脂肪酸合成突变菌株的培养基^[1]. 用无水乙醇配 20%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%. 抗生素的使用浓度如下: 100 mg/L 氨苄青霉素, 30 mg/L 卡那霉素, L- 阿拉伯糖 10%, 岩藻糖 0.01%, 1 mmol/L IPTG.

1.1.2 试剂. 限制性内切酶、T4 连接酶、氨苄青霉

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> Strains		
DH5 α	<i>lacZ</i> Δ M15/ Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA lendA1 hsdR17</i>	Laboratory collection
JW275	<i>fabB15</i> (Ts) <i>fabF::kan</i>	[10]
MG1655		Laboratory collection
CY244	<i>fabB15</i> (Ts) <i>fabF</i>	[10]
CY242	<i>fabB15</i> (Ts)	[10]
K1060	<i>fabB5</i>	[10]
MR52	<i>fabF::kan</i>	[10]
HW1	K1060 (pHW2), Km ^r , Cm ^r , <i>fabB5 fabF::kan</i>	[10]
HW4	Transductant of K1060 (pHW13) with phage P1 grown on MR52, Km ^r , Amp ^r	This work
HW6	HW1(pHW14), Km ^r , Amp ^r , Cm ^r	This work
Plasmids		
pBAD24	Amp ^r , expression vector	Laboratory collection
pCR2.1TOPO	Km ^r , Amp ^r , cloning vector	Invitrogen
pHW11	Amp ^r , Km ^r , <i>fabF1</i> of <i>E. faecalis</i> in pCR2.1TOPO	This work
pHW2	Cm ^r , <i>H. influenzae fabB</i> in pHSG576	[10]
pHW12	Amp ^r , Km ^r , <i>fabF2</i> of <i>E. faecalis</i> in pCR2.1TOPO	This work
pHW13	Amp ^r , <i>fabF1</i> from pHW11 cut with <i>Bsp</i> H I and <i>Pst</i> I and ligated between the <i>Nco</i> I and <i>Pst</i> I sites of pBAD24	This work
pHW14	Amp ^r , <i>fabF2</i> from pHW12 constructed as pHW13	This work

素、卡那霉素、IPTG、Marker DL2000 等试剂、胶回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; [2-¹⁴C]丙二酸单酰 CoA(203.5 $\times$ 10¹⁰ Bq/mol)和[1-¹⁴C]乙酸钠(192 $\times$ 10¹⁰ Bq/mol)购自 American Radiolabeled Chemicals 公司; 油酸和浅蓝菌素(Cerulenin)等购自 Sigma 公司; 其他生化试剂均购自上海 Sangon 公司.

1.2 质粒构建和重组 DNA 技术

以粪肠球菌 V583 总 DNA 为模板, PCR 扩增 *fabF1* 和 *fabF2* 基因. *fabF1* 扩增引物: 5' AAAC-TCGGAGGTACATCATGAAAAGAGTGGTC 和 5' CATAATTTCTGCTGCAGTCATT, *fabF2* 扩增引物 5' CGAAAGGAGTCAAAATCATGAATCGAGT-AGTA 和 5'TCTAACTGCAGGTTAATCCTC. 上述 2 对引物中划底线的碱基代表引入的限制性酶切位点, 它们分别是 *Bsp*H I 和 *Pst* I. 采用常规 PCR 扩

增, 所得 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的片段回收纯化后克隆到载体质粒 pCR2.1TOPO 上, 得到质粒 pHW11(*fabF1*)和 pHW12(*fabF2*). 测定 2 质粒上克隆的 DNA 片段序列, 确定克隆 DNA 片段的准确性. 用 *Bsp*H I 和 *Pst* I 酶切质粒 pHW11 和 pHW12, 回收并纯化克隆的 *fabF1* 和 *fabF2* 基因. 用 *Nco* I 和 *Pst* I 酶切载体 pBAD24, 将 *fabF1* 和 *fabF2* 基因克隆到载体 pBAD24, 得到质粒 pHW13(*fabF1*)和 pHW14(*fabF2*).

本实验所采用的 DNA 操作, 包括 DNA 的酶切、片段回收、连接、转化等方法参照文献[15].

1.3 制备无细胞提取物

根据 Heath 和 Rock^[16]的方法制备脂肪酸合成无细胞提取物. 用 Bradford 方法, 以牛血清白蛋白为标准, 确定蛋白质浓度. 分装并贮存在-80℃冰箱

中备用.

1.4 体外脂肪酸合成分析

体外脂肪酸合成分析参照文献[17,18]. 反应体系总体积 40 μl , 其中含 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 0.1 mmol/L β -巯基乙醇, 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰 CoA, 0.175 mmol/L NADH, 0.149 mmol/L NADPH, 54 $\mu\text{mol/L}$ ACP 和 30 μg 无细胞提取物. 如果需要添加浅蓝菌素 (Cerulein), 终浓度为 1 mmol/L, 并将反应混合物在室温下放置 5 min, 抑制 FabB 和 FabF 活性. 再加入 45 $\mu\text{mol/L}$ [2- ^{14}C] 丙二酸单酰 CoA (210.9 $\times 10^{10}$ Bq/mol) 开始反应. 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 将反应物置于冰浴中, 终止反应. 反应物与上样缓冲液混合, 加到 15% 的非变性的聚丙烯酰胺凝胶板上 (含 2.5 mol/L 尿素), 4 $^{\circ}\text{C}$ 电泳 3 h. 之后, 将胶板固定干燥, 并曝光.

1.5 脂肪酸组成分析

将不同菌株的大肠杆菌接种在 10 ml RB 培养液中, 在特定温度下培养过夜. 离心收集菌体. 在室温用 RB 培养液洗涤 3 次. 之后加入 6 ml 氯仿甲醇 (体积比为 2:1) 溶液悬浮菌体, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 1 h, 用于抽提磷脂. 离心去除沉淀, 在上清液中加入 2 ml 的无菌水和 2 ml 氯仿, 混合均匀, 离心, 弃上清. 加入等体积的 2 mol/L KCl, 混合均匀, 离心, 弃上清, 加入等体积的无菌水, 混合均匀, 离心, 弃上清. 下层有机相在通风橱中, 接入氮气将其吹干. 将样品溶解在氯仿 / 甲醇 (体积比为 1:2) 的溶液中, 做碰撞诱导解离质谱 (CID ES-MS) 分析^[10,11], 3 次重复. 分析放射性脂肪酸采用薄层层析^[10,11,18,19].

2 结果与分析

2.1 粪肠球菌 *fabF1* 和 *fabF2* 同源基因互补大肠杆菌突变株

为了检测粪肠球菌 *fabF1* 和 *fabF2* 的功能, 用质粒 pHW13 和 pHW14 转化大肠杆菌 *fabB* 错义突变株 K1060 和温度敏感突变株 CY242. 在含有阿拉伯糖的 RB 培养基上检测转化子的生长. 结果显示, pHW13 能使 K1060 在不加油酸的 RB 培养基上恢复生长, 也能使大肠杆菌 CY242 在非许可生长温度 (42 $^{\circ}\text{C}$) 下, 生长在不加油酸的 RB 培养基上, 说明 *fabF1* 互补了 *fabB* 突变, 而 pHW14 不能恢复 CY242 (42 $^{\circ}\text{C}$) 在不加油酸的培养基上生长, 能使 K1060 生长在不加油酸的 RB 培养基上, 但长势较弱, 而在 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, *fabF2* 不能使 K1060 在不加油酸的 RB 培养基上生长, 表明 FabF2 具有微弱 FabB

的功能.

大肠杆菌 JWC275 [*fabB* (ts) *fabF*::*kan*] 菌株在 30 $^{\circ}\text{C}$ 生长时, 有 FabB 活性, 能进行正常的脂肪酸合成, 故在 RB 培养基上能正常生长. 在 42 $^{\circ}\text{C}$ 时, FabB 和 FabF 均无活性, 不能进行正常的脂肪酸合成, 即使添加油酸, 也不能在 RB 培养基上生长^[4]. 因此, 在 42 $^{\circ}\text{C}$ 时能使 JWC275 在不添加油酸的培养基上生长, 表明 *fabB* 得到互补, 能使 JWC275 在添加油酸的培养基上生长, 表明 *fabF* 得到互补^[10,11]. 用上述 2 个质粒 (pHW13 和 pHW14) 转化大肠杆菌 JWC275, 在含有阿拉伯糖的 RB 培养基上, 检测转化子的生长. 发现 pHW13 在非许可温度下 (42 $^{\circ}\text{C}$) 可使 JWC275 既能生长在添加油酸的 RB 培养基上, 也能生长在不加油酸的 RB 培养基上, 而 pHW14 仅能使 JWC275 生长在添加油酸的 RB 培养基上.

综合上述, 实验表明, *fabF1* 能互补大肠杆菌 *fabB* 基因, *fabF2* 能互补大肠杆菌 *fabF* 基因, 同时, FabF2 具有微弱 FabB 功能.

2.2 转化子细胞脂肪酸组成分析

如果上述结论是正确的, 那么转化子的脂肪酸组成中应有不饱和脂肪酸成分. 用 CID ES-MS 质谱分析了 K1060 不同质粒转化子的脂肪酸组成, 结果表明, K1060 的 pHW13 转化子的确能合成不饱和脂肪酸, 而且不饱和脂肪酸的量与 K1060 的 pCY9 (携带大肠杆菌 *fabB* 基因) 转化子的相近 (图 1).

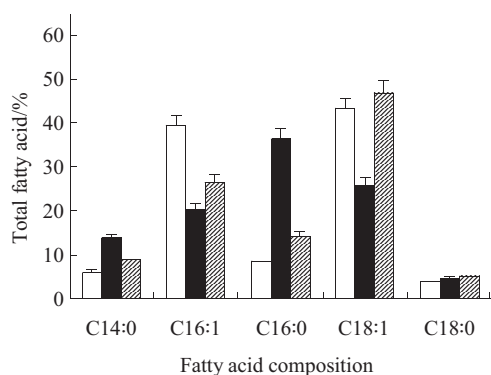


Fig. 1 Fatty acid compositions of *E. coli* K1060 strains transformed with plasmids: pHW13, pHW14 or pCY9

□: K1060/pHW13; ■: K1060/pHW14; ▨: K1060/pCY9.

为了深入证明 *fabF1* 的功能, 还构建携带 pHW13 质粒的大肠杆菌 *fabB* 和 *fabF* 的双突变菌株. MR52 是大肠杆菌 *fabF*::*kan* 突变株, 通过 P1 转导的方式, 将 *fabF*::*kan* 导入携带 pHW13 的 K1060 中, 得到 HW4 菌株. 该菌株是携带 pHW13

质粒的大肠杆菌 *fabB* 和 *fabF* 的双突变菌株, 它能在未加油酸的 RB 培养基上生长良好(结果未列). 分析在不同温度下该菌株的脂肪酸组成(图 2), 未发现顺 -11- 十八烯酸大幅度增加, 其主要的饱和脂肪酸是顺 -9- 十六烯酸. 表明粪肠球菌 *fabF1* 的确能互补大肠杆菌的 *fabB* 基因突变, FabF1 具有 FabB 的功能.

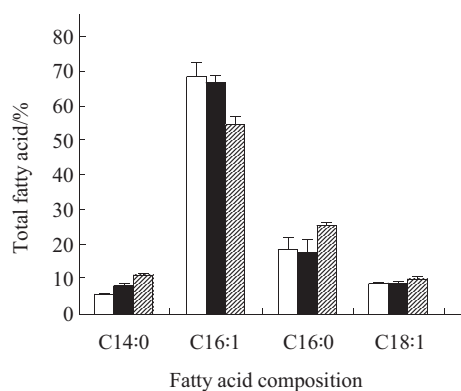


Fig. 2 Fatty acid compositions of strain HW4 growing at different temperature

□: 30°C; ■: 37°C; ▨: 42°C.

从图 1 中可以看到, 虽然 K1060 的 pHW14 转化子也能合成不饱和脂肪酸, 但是不饱和脂肪酸的量要比 K1060(pCY9) 和 K1060(pHW13) 的少, 说明 FabF2 合成不饱和脂肪酸的能力弱, 仅具有低水平 FabB 功能. 如果是这样, 那么 CY242(pHW14) 也应该能合成不饱和脂肪酸, 只是由于量少而不能维持正常生长. 为了证明这一假设, 在 42°C 用含有顺 -9,10- 亚甲基软脂酸(该化合物可替代油酸维持大肠杆菌 *fabB* 菌株生长)的 RB 中培养 CY242(pHW14) 菌株, 同时用 [1-¹⁴C] 乙酸钠标记细胞. 通过薄层层析分析细胞的脂肪酸组成(图 3). 层析结果显示, CY242(pHW14) 可以合成不饱和脂肪酸, 但是其含量明显比野生菌株少. 由此可见 FabF2 确实具有微弱 FabB 的活性.

互补实验表明, *fabF2* 能互补大肠杆菌 *fabF* 突变, 为了证明这一结论是正确的, 用 pHW14 转化大肠杆菌 *fabF* 菌株 MR52, 并分析了转化子脂肪酸组成(图 4). 与对照相比, MR52(pHW14) 能大幅度地提高顺 -11- 十八烯酸含量, 同时顺 -9- 十六烯酸的量大幅度下降. 这说明 FabF2 具有将顺 -9- 十六烯酸转化成顺 -11- 十八烯酸的能力.

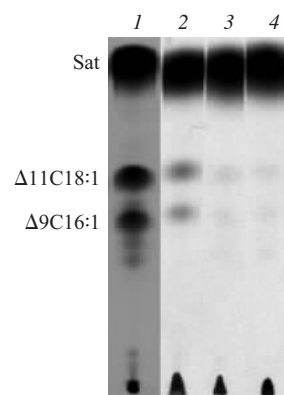


Fig. 3 Thin-layer chromatographic analysis of fatty acid composition of strain CY242 carrying plasmid pHW14

1: MG1655; 2: CY242/pHW14+arabinose; 3: CY242/pHW14; 4: CY242/pBAD24

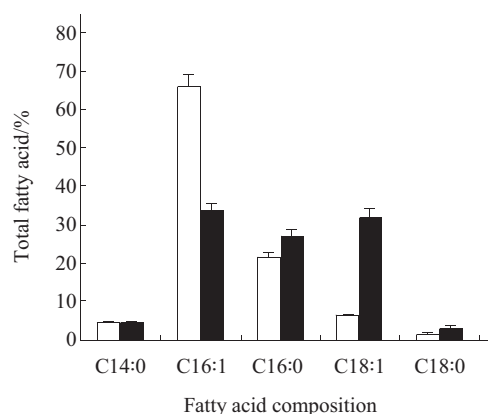


Fig. 4 Fatty acid compositions of *E. coli* MR52 strains transformed with pHW14

□: MR52/pBAD24; ■: MR52/pHW14

HW1 是大肠杆菌 *fabB* 和 *fabF* 的双突变菌株, 它携带克隆有嗜血流感菌 (*Haemophilus influenzae* Rd) *fabB* 基因的 pHW2 质粒. 已经证明嗜血流感菌的 FabB 不具有延伸顺 -9- 十六烯酸为顺 -11- 十八烯酸能力^[10]. 用 pHW14 转化该菌株得到 HW6, 比较 HW1 与 HW6 的脂肪酸组成(图 5), 结果显示, 在 HW1 中不饱和脂肪酸以顺 -9- 十六烯酸为主, 只有痕迹量的顺 -11- 十八烯酸, 在 HW6 中不饱和脂肪酸的总量与 HW1 相近, 但顺 -9- 十六烯酸的量下降, 而顺 -11- 十八烯酸明显增加. 这再次证明了 FabF2 具有将顺 -9- 十六烯酸转化成顺 -11- 十八烯酸的能力, 具有典型的 β -酮脂酰 ACP 合成酶 II (Fab F) 的活性.

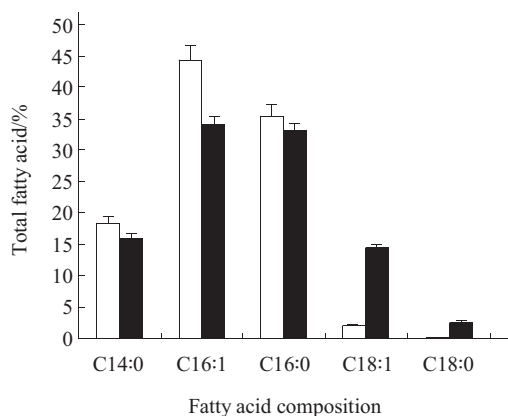


Fig. 5 Fatty acid compositions of HW6 strain transformed with pHW14

□: HW1/pBAD24; ■: HW6

2.3 体外无细胞脂肪酸合成分析

互补实验和转化子脂肪酸组成分析表明, 粪肠球菌的 FabF1 具有 β -酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的活性, FabF2 既有 β -酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 的活性, 也有微弱 β -酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的活性. 如果真是这样, 在体外也应该能检测到这 2 种酶的活性.

制备菌株 JWC275 携带不同质粒 (pBAD24、pHW13 和 pHW14) 和野生菌株 MG1655 的脂肪酸合成所需的无细胞提取物, 并在体外进行脂肪酸合成反应. 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示 (图 6), 在不添加浅蓝菌素时, MG1655, JWC275 (pHW13) 和 JWC275 (pHW14) 的无细胞脂肪酸反应均能产生长链脂酰 ACP (lane 1、3、5). 由于 JWC275 (pBAD24) 没有长链 β -酮脂酰 ACP 合成酶 (FabB 和 FabF) 活性, 仅有 β -酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH) 活性, 因此该反应仅有丁酰 ACP 生成 (lane 7), 长链脂酰 ACP 为痕量. 如果反应体系中添加浅蓝菌素时, 它抑制长链 β -酮脂酰 ACP 合成酶 (FabB 和 FabF) 活性, 所有反应体系都无长链脂酰 ACP 生成 (lane 2、4、6、8), 仅有丁酰 ACP 生成. 这一实验结果表明, 粪肠球菌的 FabF1 和 FabF2 都具有长链 β -酮脂酰 ACP 合成酶活性, 且活性受浅蓝菌素抑制.

将体外反应生成的脂酰 ACP, 转化为脂酰甲酯, 用薄层层析分析组成. 结果显示, JWC275 (pHW13) 的反应与 MG1655 的反应一样, 有不饱和脂肪酸的合成, JWC275 (pHW14) 的反应主要形成饱和脂肪酸, 但也能合成微量的不饱和脂肪酸 (结果未列).

总之, 通过上述实验充分证明了粪肠球菌的

FabF1 具有 β -酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的活性, FabF2 虽具有 β -酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 的活性, 但也有部分 β -酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的活性.

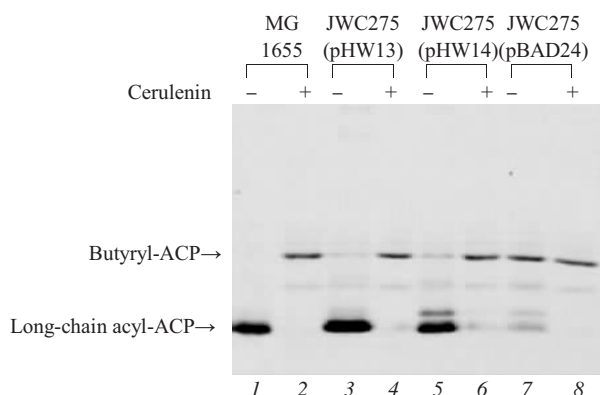


Fig. 6 Synthesis of acyl-ACP by strain JWC275 with plasmids pHW13 or pHW14 in vitro

3 讨论

生物信息学分析表明, 在粪肠球菌基因组中, 编码脂肪酸合成酶系的基因集中在 2 个区域 (图 7), 第一个区域包含所有参与脂肪酸合成酶的基因, *fabF2* 和 *fabZ2* 处在这一区域. 第二个区域包含 3 个基因: *fabI*、*fabF1* 和 *fabZ1*, 其中 *fabI* 的转录方向与 *fabF1* 和 *fabZ1* 相反^[14]. 在粪肠球菌基因组中未发现有 *fabB* 和 *fabA* 同源基因^[14]. 同源比较分析显示, 粪肠球菌的 FabF1 与大肠杆菌的 FabF 之间的氨基酸序列一致性为 49.9%, FabF2 与大肠杆菌的 FabF 有 46.3% 的一致性 (图 7). 另外, 大肠杆菌 FabF 所拥有的活性位点 (Cys163/His303/His340)^[20-24] 在粪肠球菌的 FabF1 和 FabF2 中也存在 (Cys162/His301/His339), 并且发现 FabF1 和 FabF2 在活性位点附近的氨基酸序列与大肠杆菌 FabF 高度同源. 因此有理由相信, FabF1 和 FabF2 应该具有 β -酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 的活性. 然而, 体内互补实验和生化分析得出了与上述不同的结果: *fabF1* 基因能互补大肠杆菌 *fabB* 突变, 使大肠杆菌 *fabB fabF* 双突变正常生长. 体内体外脂肪酸组分分析表明, FabF1 参与不饱和脂肪酸的合成, 能够合成顺-9-十六烯酸, 但 FabF1 延伸顺-9-十六烯酸为顺-11-十八烯酸的能力较差, 这些都是 β -酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 的特征, *fabF2* 能互补大肠杆菌 *fabF* 突变, 具有较强的转化顺-9-十六烯酸为顺

-11-十八烯酸的能力, 但也与典型的 β - 酮脂酰 ACP 合成酶 II (FabF) 的特征不同, 它具有微弱的

β - 酮脂酰 ACP 合成酶 I (FabB) 活性.

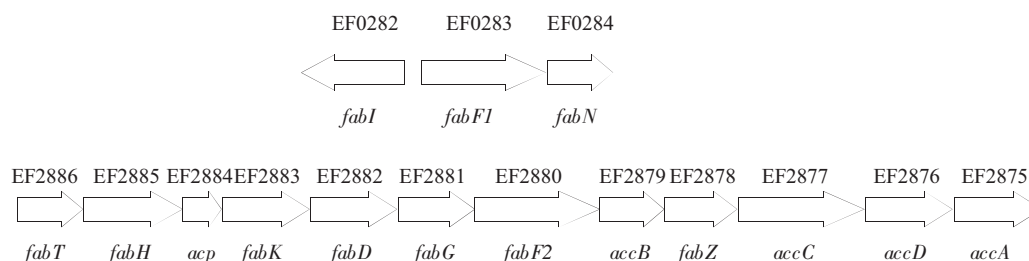


Fig. 7 The *E. faecalis* fatty acid biosynthetic gene clusters

Rock等^[24]很早就猜测 FabF 可能具有合成顺-9-十六烯酸的能力, 但由于在大肠杆菌中过量表达 *fabF* 基因引起细胞致死^[25], 所以一直未得到直接的证据. 粪肠球菌的 FabF1 和 FabF2 都具有合成顺-9-十六烯酸的能力, 为 Rock 的猜想提供了直接的证据, 并且否定了只有 FabB 才能延伸不饱和脂肪酸合成关键中间产物 3- 顺式 - 癸烯酰 ACP 的观点^[3].

致谢 感谢美国 Illinois 大学 Cronan 教授提供大肠杆菌突变菌株和粪肠球菌的总 DNA.

参 考 文 献

- Heath R J, White S W, Rock C O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog Lipid Res*, 2001, **40** (6): 467~497
- Rock C O, Jackowski S. Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292** (5): 1155~1166
- Rock C O, Cronan J E. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1302** (1): 1~16
- Marrakchi H, Zhang Y M, Rock C O. Mechanistic diversity and regulation of type II fatty acid synthesis. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30** (6): 1050~1055
- Campbell J W, Cronan J E. Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 305~332
- Heath R J, Rock C O. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1996, **271** (18): 10996~11000
- Lu Y J, Zhang Y M, Rock C O. Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. *Biochem Cell Biol*, 2004, **82** (1): 145~155
- de Mendoza D, Ulrich A K, Cronan J E. Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. *J Biol Chem*, 1983, **258** (4): 2098~2101
- Garwin J L, Klages A L, Cronan J E. Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis. *J Biol Chem*, 1980, **255** (8): 3263~3265
- Wang H, Cronan J E. *Haemophilus influenzae* Rd lacks a stringently conserved fatty acid biosynthetic enzyme and thermal control of membrane lipid composition. *J Bacteriol*, 2003, **185** (16): 4930~4937
- Ulrich A K, de Mendoza D, Garwin J L, et al. Genetic and biochemical analyses of *Escherichia coli* mutants altered in the temperature-dependent regulation of membrane lipid composition. *J Bacteriol*, 1983, **154** (1): 221~230
- Marrakchi H, Choi K H, Rock C O. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, 2002, **277** (47): 44809~44816
- Hoang T T, Schweizer H P. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the fabAB operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). *J Bacteriol*, 1997, **179** (17): 5326~5332
- Paulsen I T, Banerjee L, Myers G S, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 2003, **299** (5615): 2071~2074
- Sambrook J, David W R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Heath R J, Rock C O. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1996, **271** (4): 1833~1836
- Lai C Y, Cronan J E. Isolation and characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol*, 2004, **186** (6): 1869~1878
- Wang H, Cronan J E. Only one of the two annotated *Lactococcus lactis* fabG genes encodes a functional beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase. *Biochemistry*, 2004, **43** (37): 11782~11789
- Gelmann E P, Cronan J E. Mutant of *Escherichia coli* deficient in the

- synthesis of cis-vaccenic acid. J Bacteriol, 1972, **112** (1): 381~387
- 20 Davies C, Heath R J, White S W, *et al.* The 1.8 Å crystal structure and active-site architecture of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Escherichia coli*. Structure Fold Des, 2000, **8** (2): 185~195
- 21 Olsen J G, Kadziola A, von Wettstein-Knowles P, *et al.* The X-ray crystal structure of beta-ketoacyl [acyl carrier protein] synthase I. FEBS Lett, 1999, **460** (1): 46~52.
- 22 Moche M, Schneider G, Edwards P, *et al.* Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target, beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase. J Biol Chem, 1999, **274** (10): 6031~6034
- 23 Huang W, Jia J, Edwards P, *et al.* Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E.coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. Embo J, 1998, **17** (5): 1183~1191.
- 24 Moche M, Dehesh K, Edwards P, *et al.* The crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Synechocystis sp.* at 1.54 Å resolution and its relationship to other condensing enzymes. J Mol Biol, 2001, **305** (3): 491~503.
- 25 Subrahmanyam S, Cronan J E. Overproduction of a functional fatty acid biosynthetic enzyme blocks fatty acid synthesis in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 1998, **180** (17): 4596~4602

Characterization of β -Ketoacyl-acyl Carrier Protein Synthase II Homologues in *Enterococcus faecalis**

WANG Yu-Qi**, SUN Yi-Rong**, CHEN Yi-Cai, WANG Hai-Hong***

(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract FabB (β - ketoacyl-acyl carrier protein synthase I) and FabF (β - ketoacyl-acyl carrier protein synthase II) are two key enzymes of fatty acid biosynthesis in *E.coli*. The Gram-positive pathogenic bacterium *Enterococcus faecalis* has a fatty acid composition very similar to that of *E.coli*. Bioinformatic analysis reveals that though *E. faecalis* has two *fabF* homologues, there is no recognizable *fabB* homologue in the genome of *E. faecalis*. Two *fabF* homologues (*fabF1* and *fabF2*) were amplified by using *E. faecalis* V583 genomitic DNA as template, and two plasmids, pHW13 (*fabF1*) and pHW14 (*fabF2*), were constructed. The results of experiments *in vivo* and *in vitro* have shown that *fabF1* gene could complement *E. coli fabB* mutation and FabF1 possessed β - ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB) activity, while *fabF2* gene could complement *E. coli fabF* mutation and FabF2 had β - ketoacyl-acyl carrier protein synthase II (FabF) activity. Meanwhile the data also shown that FabF2 possessed partial function of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB), and it could make *E. coli fabB* mutation synthesized low amount of unsaturated fatty acid. From these data it is clear that FabF species enzymes could have activity of β - ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB).

Key words *Enterococcus faecalis*, FabF homologues, β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase

*This work was supported by a grant from The President Foundation of South China Agricultural University.

**These two authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-20-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

Received: December 31, 2006 Accepted: January 28, 2007