

不同细菌来源的 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ生物学特性分析*

余永红^{1,2)} 马建荣¹⁾ 苗馨予²⁾ 王海洪^{2)**}

(¹⁾ 广东食品药品职业学院, 广州 510520; (²⁾ 华南农业大学 生命科学院 / 广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广州 510642)

摘要 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ(FabH)是催化细菌脂肪酸合成的起始反应。研究表明, 革兰氏阳性细菌 FabH 对支链脂酰-CoA 前体的选择性是其合成支链脂肪酸的关键。但部分革兰氏阴性细菌也产生一定量的支链脂肪酸, 其合成机制还不清楚。为此, 本研究选取了革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌 *BsfabH1* 和 *BsfabH2*、金黄色葡萄球菌 *SafabH*、天蓝色链霉菌 *ScofabH*、革兰氏阴性细菌茄科雷尔氏菌 *RsfabH*、大肠杆菌 *EcfabH*, 以及产支链脂肪酸的水稻黄单胞菌 *XoofabH*, 共 7 种 *fabH* 同源基因进行生物学特性分析。异体遗传互补茄科雷尔氏菌 *fabH* 突变株 *RsmH*, 表明这 7 个基因编码蛋白都具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ活性。脂肪酸组成分析显示, 4 个革兰氏阳性菌 *fabH* 和 *XoofabH* 互补株类似, 均能产生支链脂肪酸, 而 *EcfabH* 和 *RsfabH* 互补株不产生支链脂肪酸, 说明 *XooFabH* 不同于 *EcFabH*, 参与支链脂肪酸合成。体外酶学分析表明, *XooFabH* 与 4 种革兰氏阳性菌 FabH 类似, 对支链脂酰-CoA 有较高的选择, 但 *EcFabH* 和 *RsFabH* 对支链前体活性低。与革兰氏阳性细菌 FabH 不同, *XooFabH* 对中短链长(C4~C10)脂酰-CoA 也具有较高活性。综合以上结果, 不同细菌来源 FabH 的生物学特性差异明显, FabH 能利用支链前体是细菌合成支链脂肪酸的关键因素。

关键词 脂肪酸合成, 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ, 支链脂肪酸

学科分类号 Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0184

脂肪酸是细胞膜的重要组成部分, 细菌通过调节脂肪酸的种类和组成, 改变细胞膜的流动性, 以适应不同逆境生长^[1]。细菌采用Ⅱ型脂肪酸合成系统从头合成脂肪酸, 每步反应都由独立的酶催化^[2]。脂肪酸合成分起始反应和循环反应两部分, 其中起始反应由 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ催化乙酰辅酶 A (CoA)与丙二酸单酰 ACP 缩合, 生成 3-酮基丁酰 ACP, 并进入循环反应。3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ是细菌脂肪酸生物合成的关键酶, 已成为药物靶标用于新型抗菌药物开发^[3]。

不同细菌编码不同的 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ催化脂肪酸合成起始反应。大肠杆菌(*Escherichia coli*)利用 FabH (EcFabH)催化起始反应, EcFabH 在溶液中以同型二聚体形式存在, 每一单体的分子质量为 33.5 ku, 其活性口袋由 2 个 α 螺旋共聚形成, 3 个关键氨基酸残基 Cys-His-Asn 组成催化活性中心, 对乙酰-CoA 有较高的活性^[4]。许多细菌编码 FabH 同源蛋白, 也都具有相同的催化中心。但铜

绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)不编码 FabH 同源蛋白, 而是利用新型 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ (FabY)催化脂肪酸合成起始反应。FabY 分子质量为 68.7 ku, 结构特征与 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅰ和Ⅱ类似^[5]。铜绿假单胞菌编码的 PA3286 也属于 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ家族, 具有 FabH 结构域, 但分子质量(38.2 ku)较 FabH 大。PA3286 催化中链脂酰-CoA (C8~C10)与丙二酸单酰 ACP 缩合, 完成脂肪酸合成起始^[6]。茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)也编码 PA3286 同源蛋白 FabW, 其对脂酰-CoA (C2~C10)和脂酰 ACP (C4~C8)都具有催化活性^[7]。

* 国家自然科学基金(31601601, 31471743), 广东省自然科学基金(2014A030313455)和广东食品药品职业学院院级课题(2015YZ006)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 020-85281389, E-mail: wanghh36@scau.edu.cn

收稿日期: 2016-06-06, 接受日期: 2016-09-26

支链脂肪酸(BCFA)含有末端甲基, 影响磷脂堆积和细胞膜相变温度, 因此调节支链脂肪酸含量是一些细菌应对低温等逆境的常用方式. 同时, 支链脂肪酸与细菌致病性、群体信号分子 DSF 合成紧密相关^[8-9]. 对合成支链脂肪酸的革兰氏阳性细菌的研究表明, 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ (FabH)的底物专一性是支链脂肪酸合成的关键因素, 其 FabH 对支链脂酰 -CoA 前体(异丁酰 -CoA、异戊酰 -CoA 和 2-甲基丁酰 -CoA)的活性高^[10]. 部分革兰氏阴性细菌也合成一定量的支链脂肪酸^[11], 如水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*), 那么其 FabH 是否也对支链前体具有底物选择性呢? 有待验证. 另外, 虽然革兰氏阳性细菌 FabH 对支链脂酰 -CoA 前体有较高活性, 但不同来源的 FabH 对底物的选择性是否一致也有待深入研究.

为此, 本研究选取了具有代表性的革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) *BsfabH1* 和 *BsfabH2*、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) *SafabH* 和天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) *ScofabH*, 以及具有代表性的革兰氏阴性细菌大肠杆菌 *EcfabH*、茄科雷尔氏菌 *RsfabH* 和水稻黄单胞

菌 *XoofabH* 等 7 个基因为研究对象, 采用异体遗传互补、脂肪酸组成分析、体外酶活性检测等技术分析了其在细菌脂肪酸合成代谢中的功能, 研究不同来源 FabH 的生物学特性差异.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基.

本研究所用到的大肠杆菌菌株有 DH-5 α 、S17-1、BL21(DE3), 茄科雷尔氏菌 *fabH* 突变株 RsmH. 使用的质粒有 pSRK-Km^[12]和 pET28b, 其他载体均为上述质粒的衍生质粒(具体构建过程见下文), 具体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, BG(1%细菌酪蛋白, 0.1%酵母提取物, 0.1%水解酪蛋白酸, 0.5%葡萄糖)用作茄科雷尔氏菌及突变株的丰富培养基. 抗生素的使用浓度如下: 30 mg/L 氯霉素(Cm)、100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)、30 mg/L 卡那霉素(Km). 诱导剂异丙基 - β -D- 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)使用浓度为 1 mmol/L.

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strain/Plasmid		Relevant genotype or characteristics	Sources or reference
<i>E. coli</i> strains	DH-5 α	ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 endA1recA1hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺)	Laboratory collection
	S17-1	Tp ^r Sm ^r <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> :M ⁺ RP4::2-Tc::Mu:Km::Tn7, <i>λpir</i>	Laboratory collection
	BL21(DE3)	<i>ompT</i> <i>hsdS</i> B (rB ⁻ mB ⁻) (DE3)	Laboratory collection
<i>R. solanacearum</i>	GMI1000	Wild-type strain	ATCC
	RsmH	GMI1000 Δ <i>fabH</i> , Cm ^r	[7]
Plasmids	pMD19-T	TA clone vector, Amp ^r	TaKaRa
	pSRK-Km	Broad-host-range expression vector containing <i>lac</i> promoter and <i>lacI</i> ^s , <i>lacZ</i> α ⁺ , Km ^r	[12]
	pET-28b	Expression vector, Km ^r	Laboratory collection
	pSRK- <i>EcfabH</i>	<i>EcfabH</i> in pSRK-Km, Km ^r	Laboratory collection
	pMYH-1	<i>RsfabH</i> in pSRK-Km, Km ^r	[7]
	pMXY-1	<i>XoofabH</i> in pSRK-Km, Km ^r	This study
	pMXY-2	<i>ScofabH</i> in pSRK-Km, Km ^r	This study
	pMXY-3	<i>SafabH</i> in pSRK-Km, Km ^r	This study
	pMXY-4	<i>BsfabH1</i> in pSRK-Km, Km ^r	This study
	pMXY-5	<i>BsfabH2</i> in pSRK-Km, Km ^r	This study
	pET- <i>EcfabH</i>	<i>EcfabH</i> in pET-28b, Km ^r	Laboratory collection
	pMYH-2	<i>RsfabH</i> in pET-28b, Km ^r	[7]
	pMXY-6	<i>XoofabH</i> in pET-28b, Km ^r	This study
	pMXY-7	<i>ScofabH</i> in pET-28b, Km ^r	This study
	pMXY-8	<i>SafabH</i> in pET-28b, Km ^r	This study
	pMXY-9	<i>BsfabH1</i> in pET-28b, Km ^r	This study
	pMXY-10	<i>BsfabH2</i> in pET-28b, Km ^r	This study

1.1.2 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 和 Pfu DNA 聚合酶、Marker DL2000、标准蛋白质等试剂, T- 载体克隆、质粒提取和 DNA 凝胶回收等试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司; 利福平、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG、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上海 Sangon 公司完成。

1.2 互补质粒与表达质粒构建

本研究所使用的 PCR 引物见表 2, 分别以水稻黄单胞菌、天蓝色链霉菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌基因组 DNA 为模板, 使用 pfu DNA 聚

合酶, PCR 扩增 *XoofabH*、*ScofabH*、*SafabH*、*BsfabH1* 和 *BsfabH2* 基因。回收 PCR 扩增产物, 经 *Nde* I (*SafabH* 和 *BsfabH1* 用 *Sac* I) 和 *Hind* III 酶切后, 分别连接入 pSRK-Km, 并转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆, DNA 序列测定验证基因序列, 得到质粒 pMXY-1 (*XoofabH*), pMXY-2 (*ScofabH*), pMXY-3 (*SafabH*), pMXY-4 (*BsfabH1*), pMXY-5 (*BsfabH2*)。用类似的策略, 通过 *Nde* I (*SafabH* 和 *BsfabH1* 用 *Nhe* I) 和 *Hind* III 消化, 将基因分别连入表达载体 pET-28b, 测序验证后获得 pMXY-6 (*XoofabH*)、pMXY-7 (*ScofabH*)、pMXY-8 (*SafabH*)、pMXY-9(*BsfabH1*)、pMXY-10(*BsfabH2*)。

Table 2 Sequences of the PCR primers used in this work

Primers	Sequence
M13 For primer	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC
M13 Rev primer	GAGCGGATAACAATTCACACAGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGGG
<i>XoofabH</i> <i>Nde</i> I	AATACGGCATATGAGCAAGCGGATCTATTCC
<i>XoofabH</i> <i>Hind</i> III	AATTAAGCTTTGCAGGAGACAACGACCTC
<i>ScofabH</i> <i>Nde</i> I	AATTGCGCATATGTCGAAGATCAAGCCCAG
<i>ScofabH</i> <i>Hind</i> III	AATTAAGCTTACGGAGTGCCTAGGGGAG
<i>SafabH</i> <i>Nhe</i> I	AATTGCTAGCAACGTGGGTATTAAAGGTTTTGGT
<i>SafabH</i> <i>Sac</i> I	AATTGAGCTCGATGAACGTGGGTATTAAAGGTTTTG
<i>SafabH</i> <i>Hind</i> III	AATTAAGCTTCGTATCCTCTATTTTCCCCA
<i>BsfabH1</i> <i>Nhe</i> I	AATTGCTAGCAAAGCTGGAATACTTGGTGT
<i>BsfabH1</i> <i>Sac</i> I	TATAGAGCTCGATGAAAGCTGGAATACTTGGTGT
<i>BsfabH1</i> <i>Hind</i> III	AATTAAGCTTAGTCATCTTGTGTGCACCTC
<i>BsfabH2</i> <i>Nde</i> I	ATATGCGCATATGTCAAAAGCAAAAATTACAGCTAT
<i>BsfabH2</i> <i>Hind</i> III	AATTAAGCTTACATCCCCCATTTAATAAGCAATC

The underlined sequences are the introduced restriction sites.

1.3 异体遗传互补分析

将构建好的 pSRK 系列互补载体: pMXY-1、pMXY-2、pMXY-3、pMXY-4、pMXY-5 以及 pSRK-*EcfabH*、pMYH-1(*RsfabH*)分别转化大肠杆菌 S17-1 后, 与茄科雷尔氏菌 *fabH* 突变株 RsmH 接合。由于 RsmH 为正辛酸(C8)的营养缺陷型, 在添加辛酸的 BG (C8, Km)平板筛选获得接合子, 并接种到不含有正辛酸的培养基上, 观察细菌生长情况, 进行表型互补鉴定。

1.4 脂肪酸组成分析

在 BG 中分别培养含有不同来源 *fabH* 的

RsmH 互补菌株, 离心收集菌体, 按照文献[7, 13]的方法, 提取细菌的脂肪酸, 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, 进行脂肪酸组成 GC-MS 分析。

1.5 FabHs 蛋白质表达与分离纯化

将表达质粒 pMXY-6、pMXY-7、pMXY-8、pMXY-9、pMXY-10 以及 pET-*EcfabH*、pMYH-2 (*RsfabH*)分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 挑选单菌落, 在 LB (Km)中 37℃震荡培养过夜。1%转接至新鲜的 LB (Km)中, 37℃震荡培养 4 h 后, 添加 IPTG (200 g/L), 继续诱导 4 h, 收集菌体。之后蛋白

质纯化步骤均在 4℃ 进行. 使用裂解液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)悬浮菌体, 超声破碎细胞, 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清. 上清液与 1 ml Ni-NTA 混合结合 1 h (4℃), 过柱收集流出液, 并用预冷的洗涤缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗涤层析柱, 再用预冷的洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱并收集洗脱液. SDS-PAGE 检测后, 将收集的蛋白质装入透析袋, 置于 1 000 ml 透析液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH 8.0)中, 4℃ 透析过夜. 使用 Bradford 方法定量后, 置于 -80℃ 备用. 同时参照文献[13]的方法, 分别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)^[14]和大肠杆菌 holo-ACP 蛋白, 并且体外合成丙二酸单酰 ACP(Mal-ACP)、己脂酰 ACP、辛脂酰 ACP.

1.6 FabHs 体外功能检测

体外检测 FabHs 是否具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ活性参照文献[15]. 具体做法如下: 反应体系 40 μl , 含有 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 50 $\mu\text{mol/L}$ NADH, 50 $\mu\text{mol/L}$ NADPH, 1 mmol/L β -巯基乙醇, 100 $\mu\text{mol/L}$ 丙二酸单酰 -CoA; 50 $\mu\text{mol/L}$

holo-ACP; 100 $\mu\text{mol/L}$ 脂酰 -CoA, 大肠杆菌 FabD、FabG、FabA、FabI 各 0.1 μg , 反应在添加不同来源的 0.1 μg FabH 后, 37℃ 保温 1 h, 用分离胶浓度为 17.5%, 且含有 1~3 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳进行分析.

1.7 分光光度计法测定 FabHs 活性

体外测定 FabHs 活性参照文献[16-17]. 100 μl 反应体系中含有 0.1 mol/L 磷酸钠 (pH 6.4), 大肠杆菌 FabD、FabG 各 0.2 μg , 100 $\mu\text{mol/L}$ ACP, 0.5 mmol/L 脂酰 -CoA, 0.5 mmol/L 丙二酸单酰 -CoA, 0.2 mmol/L NADPH. 反应在添加 1 μg FabH 后, 利用分光光度计在 340 nm 处测定 NADPH 的氧化速率, 并计算 FabHs 的催化活性(相关系数为 6 220 M^{-1}).

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

为研究不同来源 3-酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ (FabH) 的生化特性, 我们选取了革兰氏阴性细菌大肠杆菌 FabH (EcFabH)、茄科雷尔氏菌 FabH (RsFabH)、水稻黄单胞菌 FabH (XooFabH), 和革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌 FabH1 (BsFabH1)、FabH2 (BsFabH2)、金黄色葡萄球菌 FabH (SaFabH)、天蓝色链霉菌 FabH (ScoFabH), 进行同源比对. 结果发现, 不同来源 FabH 都具有催化中心 Cys-His-Asn (图 1a). 进一步利用 MEGA 7.0 软

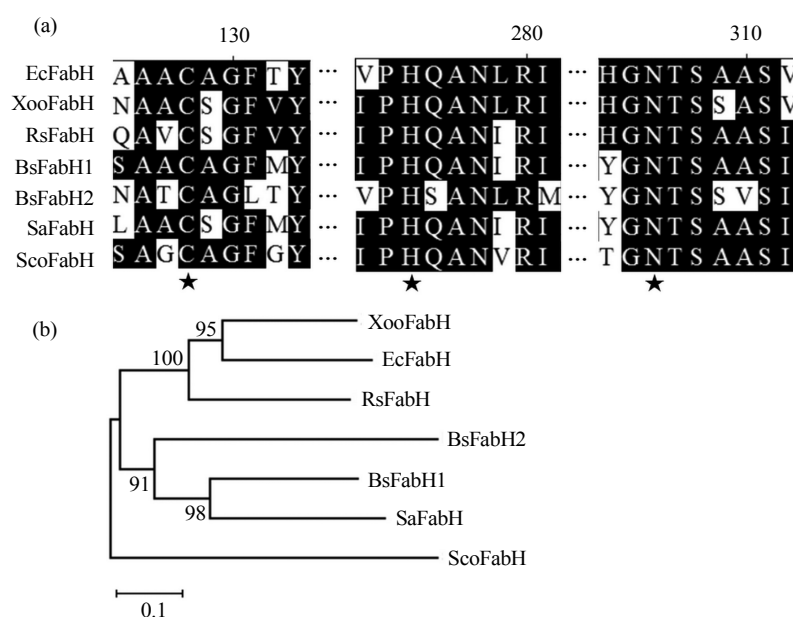


Fig. 1 Bioinformatics analysis of FabHs from different bacteria

(a) Amino acid sequence alignment, the active-site cysteine (C), histidine (H) and asparagine (N) residues are asterisked. The residue numbering on the top refers to ScoFabH. (b) Phylogenetic analysis of FabHs.

件进行系统进化分析(NJ 法), 结果显示, 这 7 个 FabH 可聚为三类: a. 革兰氏阴性菌来源的 EcFabH、XooFabH 和 RsFabH, 三者间同源性较高(>55%); b. 革兰氏阳性菌来源的 BsFabH1、BsFabH2 和 SaFabH; c. 革兰氏阳性菌来源的 ScoFabH, 与其他 6 种 FabH 的同源性都较低(图 1b).

2.2 fabHs 遗传互补茄科雷尔氏菌 fabH 突变株 RsmH

在大肠杆菌中, *fabH* 基因编码 3- 酮脂酰 ACP 还原酶 III, 是其生长的必需基因, 不能获得 *fabH* 的敲除突变株^[18]. 但茄科雷尔氏菌中 RsFabH 和 RsFabW 都具有 3- 酮脂酰 ACP 还原酶 III 活性, 其

中 FabW 能以中长链脂酰 -CoA 为前体, 完成脂肪酸的合成, 因此茄科雷尔氏菌 *fabH* 突变株 RsmH 在添加正辛酸的培养基上能正常生长^[7]. 为验证不同来源 *fabH* 基因的功能, 本研究将上述 7 个 *fabH* 基因分别克隆到互补载体 pSRK-Km 上, 并通过接合方法导入茄科雷尔氏菌 *fabH* 突变株 RsmH, 检测各互补菌株在不含正辛酸的 BG 平板的生长情况. 结果如图 2 所示, 7 个 *fabH* 基因都能恢复突变株 RsmH 在不含正辛酸平板的生长, 表明其编码产物都具有 3- 酮脂酰 ACP 还原酶 III 活性, 能起始脂肪酸的从头合成反应.

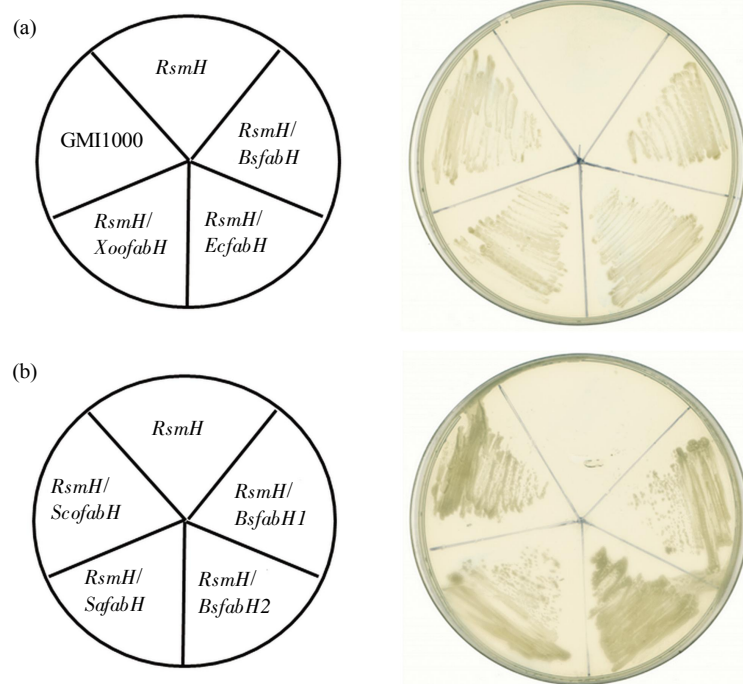


Fig. 2 Complementation of *R. solanacearum* *fabH* deletion mutant RsmH with *fabH*

(a) Complementation of RsmH with *XooFabH*, *EcFabH*, *RsFabH*. (b) Complementation of RsmH with *ScoFabH*, *SaFabH*, *BsFabH2*, *BsFabH1*.

进一步提取不同 *fabH* 互补菌株的全细胞脂肪酸, 并且利用 GC-MS 技术分析其脂肪酸组成成分. 结果显示, 突变株 RsmH 互补不同的 *fabH* 后, 其脂肪酸组成差异明显(表 3). *RsFabH* 和 *EcFabH* 互补株几乎都不产生支链脂肪酸(约 1%), 而其他 5 个产支链脂肪酸细菌来源的 *fabH* 互补株都产生了支链脂肪酸, 但支链脂肪酸含量有差别. 其中 *XooFabH* 互补株的支链脂肪酸含量较低(25.6%),

BsFabH2 和 *ScoFabH* 互补株产生的支链脂肪酸含量相当(约 40%), 而 *BsFabH2* 和 *ScoFabH* 互补株的支链脂肪酸含量较高(约 50%). 以上结果说明: a. 虽然 *XooFabH* 与 *EcFabH*、*RsFabH* 都具有较高的同源性, 但 *XooFabH* 在体内能催化支链脂肪酸的合成, 与革兰氏阳性菌 FabH 类似; b. 产支链细菌 FabH 都能参与支链脂肪酸的合成, 但是各种 FabH 的生化特性不相同.

Table 3 Fatty acids composition analysis of RsmH complemented with different fabHs

Fatty acids	<i>EcfabH</i>	<i>RsfabH</i>	<i>XoofabH</i>	<i>BsfabH1</i>	<i>BsfabH2</i>	<i>ScofabH</i>	<i>SafabH</i>
<i>n</i> -C14:0	3.07 ± 0.14	5.79 ± 0.28	1.11 ± 0.05	0.36 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.68 ± 0.06	0.59 ± 0.05
iso-C15	0.24 ± 0.04	0.25 ± 0.07	4.12 ± 0.61	6.37 ± 0.87	2.82 ± 0.43	3.94 ± 0.42	4.73 ± 0.51
Anteiso-C15	0.09 ± 0.01	0.63 ± 0.06	0.13 ± 0.03	0.55 ± 0.13	0.33 ± 0.07	1.13 ± 0.42	0.46 ± 0.04
<i>n</i> -C15:0	0.42 ± 0.11	0.44 ± 0.03	0.92 ± 0.24	0.42 ± 0.12	0.46 ± 0.13	0.17 ± 0.05	0.24 ± 0.04
3-OH-C14	18.19 ± 2.05	21.47 ± 1.21	10.91 ± 1.23	6.52 ± 0.45	8.85 ± 1.02	8.77 ± 0.85	6.44 ± 0.49
iso-C16	0.45 ± 0.12	0	2.18 ± 0.21	5.91 ± 0.21	9.08 ± 0.21	2.81 ± 0.21	5.9 ± 0.21
<i>n</i> -C16:1	14.28 ± 0.55	28.77 ± 2.41	19.44 ± 0.55	12.52 ± 0.55	12.15 ± 0.55	13.72 ± 0.55	14.7 ± 0.55
<i>n</i> -C16:0	34.31 ± 1.59	19.24 ± 0.81	15.08 ± 1.03	9.17 ± 0.56	15.05 ± 1.12	12.63 ± 0.89	11.7 ± 0.75
iso-C17	0.36 ± 0.10	0	13.12 ± 1.78	24.1 ± 2.15	10.71 ± 1.67	21.15 ± 2.12	18.46 ± 1.62
Anteiso-C17	0	0	5.03 ± 0.42	16.14 ± 2.18	16.91 ± 1.89	10.97 ± 0.88	18.44 ± 1.12
<i>n</i> -C18:1	25.9 ± 2.03	16.59 ± 2.03	24.97 ± 2.23	15.02 ± 1.43	18.1 ± 1.65	18.49 ± 1.89	15.23 ± 1.65
<i>n</i> -C18:0	2.69 ± 0.62	6.81 ± 0.62	3.01 ± 0.48	2.92 ± 0.67	4.72 ± 1.12	5.54 ± 1.10	3.12 ± 0.67
BCFA	1.14 ± 0.56	0.87 ± 0.13	24.57 ± 2.56	53.07 ± 4.87	39.85 ± 4.75	40.00 ± 3.68	47.99 ± 3.67
UFA	40.18 ± 4.16	45.36 ± 2.57	44.41 ± 4.35	27.54 ± 2.42	30.25 ± 2.67	32.2 ± 2.89	29.93 ± 3.12
Iso/Anteiso	–	–	3.8	2.2	1.3	2.3	1.5

2.3 FabH 同源蛋白的表达纯化与体外活性测定
为进一步研究这 7 个 FabH 在体外的生物功能, 将 *fabH* 基因分别克隆到 pET-28(b)上, 获得表达质粒, 转化大肠杆菌 BL(DE3)后, 在 37℃ 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 的 FabHs. 经 SDS-PAGE 检测

为单一条带, 分子质量与推测的分子质量相符, 表明纯化成功(结果未列).
为了验证不同来源的 FabH 是否具有 3- 酮脂酰 ACP 合成酶Ⅲ的活性, 体外重建不同 FabH 参与的大肠杆菌脂肪酸合成起始反应. 首先检测了以乙酰 - CoA 为前体的起始反应(图 3a). 结果显示, 除

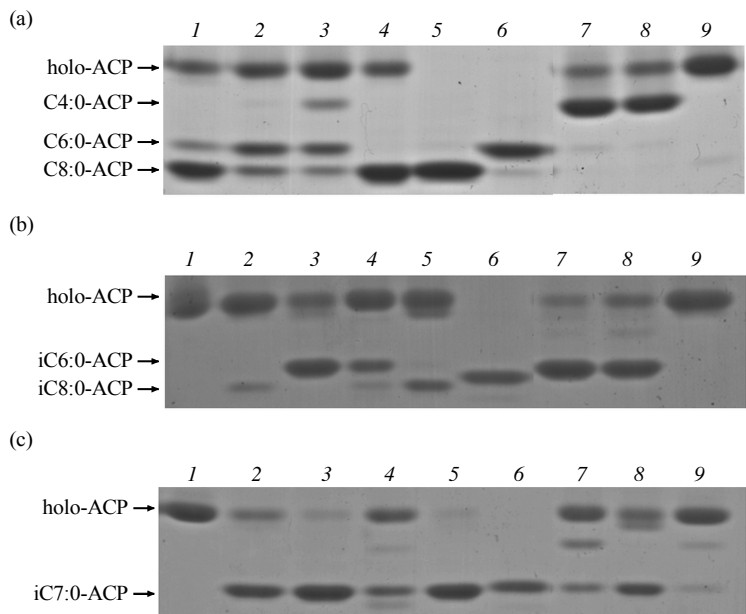


Fig. 3 Enzymatic characterization of FabHs in the initial reaction of fatty acid biosynthesis

(a) Acetyl-CoA as primer. The migration positions of butyryl-ACP, hexanoyl-ACP and octanoyl-ACP on gel are shown. 1–4: BsFabH1, BsFabH2, XoofabH, SaFabH, respectively; 5: Octanoyl-ACP; 6: Hexanoyl-ACP; 7–9: EcFabH, RsFabH, ScoFabH, respectively. (b) Isobutyryl-CoA as primer. The migration positions of isohexanoyl-ACP and iso-octanoyl-ACP on gel are shown. 1: Holo-ACP; 2–5: BsFabH1, BsFabH2, ScoFabH, SaFabH, respectively; 6: Hexanoyl-ACP; 7–9: EcFabH, XoofabH, RsFabH, respectively. (c) Isovaleryl-CoA as primer. The migration positions of isohepanoyl-ACP on gel are shown. 1: Holo-ACP; 2–5: BsFabH1, BsFabH2, ScoFabH, SaFabH, respectively; 6: Hexanoyl-ACP; 7–9: EcFabH, XoofabH, RsFabH, respectively. Note: Fatty acid biosynthesis was reconstructed by adding each purified FabH to a reaction mixture containing Tris-HCl, NADH, NADPH, Mal-ACP, *E. coli* FabG/FabA/FabI and different acyl-CoA primers. The reaction products were resolved by conformational sensitive gel electrophoresis on 17.5% polyacrylamide gels containing concentrations of urea optimized to effect the separation.

ScoFabH 催化只检测到痕迹量产物外, 其余 6 种 FabH 都具有明显活性, 但反应产物有差别. RsFabH 与 EcFabH 催化后都生成了丁酰 ACP (C4:0-ACP) (泳道 7、8), 其余 4 种 FabH 催化反应产物类似, 都合成己酰 ACP (C6:0-ACP) 和辛酰 ACP (C8:0-ACP).

本研究继续分析了以支链脂酰 -CoA 为前体的起始反应. 结果显示, 以异丁酰 -CoA 为前体时, 除 RsFabH 的催化活性较低外, 其余 6 种 FabH 对支链前体都具有活性. XooFabH、EcFabH、ScoFabH 和 BsFabH2 催化生成了异己酰 ACP (iC6:0-ACP), 而 BsFabH1、SaFabH 催化生成 6-甲基庚酰 ACP (iC8:0-ACP) (泳道 2 和 5) (图 3b). 以异戊酰 -CoA 为前体时, 7 种 FabHs 都催化生成了异庚酰 ACP (iC7:0-ACP), 但 EcFabH 和 RsFabH 的催化活性比较差, 只生成了少量的产物(泳道 7 和 9)

(图 3c). 以上结果说明, 不同来源的 FabHs 都具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III 活性, 但不同 FabH 对不同前体的活性差异明显, XooFabH 与革兰氏阳性菌 FabH 类似, 对支链前体具有较高活性.

本研究进一步利用分光光度计法测定各种 FabH 对不同脂酰 -CoA 前体的催化活性, 结果如表 4 所示. XooFabH 和 3 种革兰氏阳性菌 FabH 都对支链前体具有较高的活性, 而 EcFabH、RsFabH 对乙酰 -CoA 具有较高活性. 同时各种产支链脂肪酸细菌的 FabH 对底物的选择性不同, BsFabH1 检测到对支链前体具有活性, SaFabH 对丁酰 -CoA 和己酰 -CoA 也具有活性, 而 BsFabH2 对短链脂酰 -CoA (C4~C8) 都有较高活性. XooFabH 比 BsFabH2 有更广的底物选择性(C2~C10), 并且对短链前体催化活性较高. 但利用本方法没有检测到 ScoFabH 的催化活性.

Table 4 Substrate specificities of different FabHs

Substrates	Enzyme activity/($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) (mean $\pm$ SD)					
	BsFabH1	BsFabH2	SaFabH	XooFabH	EcFabH	RsFabH
Acetyl-CoA	—	1.94 $\pm$ 0.35	—	15.15 $\pm$ 2.13	22.02 $\pm$ 1.67	24.2 $\pm$ 2.52
Isobutyryl-CoA	14.2 $\pm$ 3.43	40.8 $\pm$ 4.15	6.16 $\pm$ 0.74	21.00 $\pm$ 3.56	7.02 $\pm$ 0.55	—
Isovaleryl-CoA	4.21 $\pm$ 0.78	27.2 $\pm$ 2.22	4.89 $\pm$ 0.68	17.85 $\pm$ 3.56	—	—
Butyryl-CoA	—	34.8 $\pm$ 3.14	3.22 $\pm$ 0.54	57.15 $\pm$ 3.56	—	—
Hexanoyl-CoA	—	13.08 $\pm$ 2.97	4.94 $\pm$ 0.51	49.45 $\pm$ 5.27	—	—
Octanoyl-CoA	—	4.57 $\pm$ 0.80	—	25.40 $\pm$ 7.07	—	—
Decanoyl-CoA	—	—	—	7.14 $\pm$ 1.43	—	—

"—" means no activity was tested.

3 结论与讨论

在细菌 II 型脂肪酸合成系统中, 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III (FabH) 催化起始反应, 是脂肪酸合成关键酶, 也是抗菌药物筛选的重要靶点. 为研究不同细菌来源 FabHs 的生物学特性, 本论文选取了 3 种革兰氏阴性菌 *fabH* 基因, 以及 4 种革兰氏阳性菌 *fabH* 基因进行研究. 这 7 个 FabH 都具有相同的催化活性中心, *fabH* 基因都能恢复茄科雷尔氏菌 *fabH* 突变株 RsmH 的生长, 体外活性检测结果显示 7 个 FabH 都具有 3-酮脂酰 ACP 合成酶 III 活性, 但生物学特性有差异.

同源性分析结果显示, 3 种革兰氏阴性菌 FabH 同源性高, 推测具有相似的生物学特性. 但体内互补实验、体外生化分析得出不同的结果:

XoofabH 互补株能合成支链脂肪酸, 与革兰氏阳性菌 *fabH* 互补株类似, 说明 XooFabH 具有催化支链脂肪酸的合成能力. 体外活性测定结果也证明了这一点. 以上结果说明, 产支链脂肪酸细菌 FabH 都能参与支链脂肪酸合成. 虽然不同革兰氏阳性菌 FabH 都能利用支链前体合成支链脂肪酸, 但不同互补株支链脂肪酸含量不同, 体外活性检测结果也显示, 不同 FabH 的生物学特性差别明显.

本研究中, *EcfabH* 互补突变株 RsmH, 不合成支链脂肪酸(约 1%), 表明 EcFabH 对支链脂酰 -CoA 前体没有活性, 与文献报道类似^[10]. 但以支链脂酰 -CoA 作为唯一底物进行活性检测时, EcFabH 也催化支链脂肪酸的合成起始(图 3b). 天蓝色链霉菌 *fabH* 被 *EcfabH* 替换后, 突变株仍能合成一定量的支链脂肪酸(12.5%)^[10]. 因此, 我们推测前体浓

度影响支链脂肪酸的合成, EcFabH 对高浓度的支链前体具有低活性。另外, 本研究利用分光光度计法没有测定到 ScoFabH 的催化活性, 但体外重建脂肪酸起始反应, 电泳法检测到 ScoFabH 对支链前体有催化活性, 推测其原因是 ScoFabH 的催化活性较低, 需要延长反应时间才能检测到催化活性。

XooFabH 与革兰氏阳性菌 FabH 也不相同, 对短链脂酰-CoA(C2~C10)也具有较高活性, 表现出较广的底物多样性(表 4), 推测 XooFabH 还具有其他生物学功能。黄单胞菌利用 RpfF 合成多种 DSF (diffusible signal factor) 信号分子, 但 RpfF 具有硫解和脱水双功能^[8, 20]。由于 RpfF 的硫解活性具有底物广泛性, 细胞内产生大量短链脂肪酸^[21], 因此我们推测 XooFabH 在中短链脂肪酸再利用中发挥作用。目前, 本课题组已对该机制进行深入研究, 相关结果将另行发表。

参 考 文 献

- [1] Zhang Y M, Rock C O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6**(3): 222-233
- [2] Marrakchi H, Zhang Y M, Rock C O. Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**(Pt 6): 1050-1055
- [3] Heath R J, White S W, Rock C O. Inhibitors of fatty acid synthesis as antimicrobial chemotherapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**(6): 695-703
- [4] Heath R J, Rock C O. Inhibition of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1996, **271**(18): 10996-11000
- [5] Yuan Y, Sachdeva M, Leeds J A, *et al.* Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is initiated by the FabY class of β -ketoacyl acyl carrier protein synthases. *J Bacteriol*, 2012, **194**(19): 5171-5184
- [6] Yuan Y, Leeds J A, Meredith T C. *Pseudomonas aeruginosa* directly shunts β -oxidation degradation intermediates into *de novo* fatty acid biosynthesis. *J Bacteriol*, 2012, **194**(19): 5185-5196
- [7] Mao Y H, Ma J C, Li F, *et al.* *Ralstonia solanacearum* RSp0194 encodes a novel 3-Keto-Acyl carrier protein synthase III. *Plosone*, 2015, **10**(8): e0136261
- [8] Zhou L, Yu Y, Chen X, *et al.* The multiple DSF-family QS signals are synthesized from carbohydrate and branched-chain amino acids via the FAS elongation cycle. *Sci Rep*, 2015, **5**: 13294
- [9] Sun Y, Wilkinson B J, Standiford T J, *et al.* Fatty acids regulate stress resistance and virulence factor production for *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, 2012, **194**(19): 5274-5284
- [10] Choi K H, Heath R J, Rock C O. β -Ketoacyl-Acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *J Bacteriol*, 2000, **182**(2): 365-370
- [11] Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Mol Biological Review*, 1991, **55**(2): 288-302
- [12] Khan S R, Gaines J, Roop R M II, *et al.* Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(16): 5053-5062
- [13] Zhu L, Bi H, Ma J, *et al.* The two functional Enoyl-Acyl carrier protein reductases of *Enterococcus faecalis* do not mediate triclosan resistance. *mBio*, 2013, **4**(5): e00613
- [14] Jiang Y, Chan C H, Cronan J E. The soluble acyl-acyl carrier protein synthetase of *Vibrio harveyi* B392 is a member of the medium chain acyl-CoA synthetase family. *Biochemistry*, 2006, **45**(33): 10008-10019
- [15] 冯赛祥, 朱 磊, 罗 彪, 等. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)体外脂肪酸合成反应的重建. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(8): 954-963
- [16] Zhang Y M, Wu B, Zheng J, *et al.* Key residues responsible for acyl carrier protein and β -ketoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG) interaction. *J Biol Chem*, 2003, **278**(52): 52935-52943
- [17] Qiu X, Choudhry A E, Janson C A, *et al.* Crystal structure and substrate specificity of the β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Staphylococcus aureus*. *Protein Sci*, 2005, **14**(8): 2087-2094
- [18] Lai C Y, Cronan J E. β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem*, 2003, **278**(51): 51494-51503
- [19] Li Y L, Florova G, Reynolds K A. Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-Ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH). *J Bacteriol*, 2005, **187**(11): 3795-3799
- [20] Bi H K, Christensen Q H, Feng Y J, *et al.* The *Burkholderia cenocepacia* BDSF quorum sensing fatty acid is synthesized by a bifunctional crotonase homologue having both dehydratase and thioesterase activities. *Mol Microbiol*, 2012, **83**(4): 840-855
- [21] Bi H K, Yu Y H, Dong H J, *et al.* *Xanthomonas campestris* RpfB is a fatty acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase. *Mol Microbiol*, 2014, **93**(2): 262-275

Biological Function Research of 3-ketoacyl ACP Synthase III From Different Bacteria*

YU Yong-Hong^{1,2)}, MA Jian-Rong¹⁾, MIAO Xin-Yu²⁾, WANG Hai-Hong^{2)**}

¹⁾ Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;

²⁾ College of Life Sciences, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key
Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms, Guangzhou 510642, China)

Abstract 3-ketoacyl ACP synthase III (FabH) catalyzes the initial reaction in bacterial fatty acid synthesis. Gram-positive bacterial FabHs are able to utilize branched chain acyl-CoA as a primer, and are essential for the synthesis of branched chain fatty acids (BCFAs). However, some Gram-negative bacteria also synthesize BCFAs through a mechanism that is poorly understood. To compare the features of different bacterial FabHs, we selected four homologous Gram-positive bacterial *fabH* genes (*Bacillus subtilis* *BsfabH1* and *BsfabH2*, *Staphylococcus aureus* *SafabH* and *Streptomyces coelicolor* *ScofabH*), and three homologous Gram-negative bacterial *fabH* genes (*Escherichia coli* *EcfabH*, *Ralstonia solanacearum* *RsfabH*, and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *XoofabH*) for further study. Expression of each of the seven *fabH* genes restored the growth of the *R. solanacearum fabH* mutant RsmH in the absence of octanoic acid, indicating that all encoded FabHs have 3-ketoacyl ACP synthase III activity. Furthermore, fatty acid profiling showed that complementation with the four Gram-positive bacterial *fabH* genes or the Gram-negative *XoofabH* rendered the *R. solanacearum fabH* mutant able to produce a large quantity of BCFAs, while the RsmH mutant harbouring *EcfabH* or *RsfabH* could only synthesize straight chain fatty acids, suggesting XooFabH performs a role different from EcFabH or RsFabH in BCFA synthesis. *In vitro* analysis showed that, similar to the four Gram-positive FabHs, XooFabH has a preference for using branched chain acyl-CoAs as primers. XooFabH also displayed a strong activity towards short or medium chain acyl-CoAs (~C4-C10), unlike other Gram-positive FabHs. These results confirmed that FabH from different bacteria have different biological characteristics, and display a preference for branched chain acyl-CoAs, which are essential for BCFAs synthesis.

Key words fatty acid synthesis, 3-ketoacyl-ACP synthase III, branched chain fatty acid

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0184

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31601601, 31471743), The Natural Science Foundation of Guangdong Province (2014A030313455) and Science Foundation of Guangdong Food & Drug Vocational College (2015YZ006).

**Corresponding author.

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

Received: June 6, 2016 Accepted: September 26, 2016