

恶臭假单胞菌中3-酮脂酰ACP还原酶FabG5是
脂肪酸合成关键酶*郭剑英^{1)**} 陈博^{2)**} 李先其²⁾ 况承伟²⁾ 王海洪²⁾ 马建荣³⁾ 余永红^{3)***}⁽¹⁾ 华南农业大学兽医学院, 广州 510642;⁽²⁾ 华南农业大学生命科学学院/广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广州 510642;⁽³⁾ 广东食品药品职业学院, 广州 510520)

摘要 3-酮脂酰ACP还原酶(FabG)催化脂肪酸合成中的第一步还原反应,是细菌生长的关键酶之一.恶臭假单胞菌在环境污染治理和工业聚羟基脂肪酸(PHA)的生产中,都具有重要的应用价值.生物信息学分析显示,恶臭假单胞菌基因组编码6个FabG同源蛋白质,与大肠杆菌FabG相比较,PpFabG5序列相似性最高(76.5%),其他几个PpFabG也都具有较高的序列相似性(约50%).除PpFabG4之外,其他的同源蛋白质都具有催化活性位点和N端辅因子结合位点.为研究恶臭假单胞菌中这6个FabG同源蛋白质的生物学功能,本文进行了异体遗传互补、体外酶学活性分析、体内基因敲除与突变株性状分析等研究.结果显示,只有PpfabG1、PpfabG3、PpfabG5能恢复大肠杆菌fabG温度敏感突变株CL104在42℃时生长,其中PpfabG1互补株生长较弱.而在体外活性检测中,PpFabG1、PpFabG3和PpFabG5在脂肪酸合成起始反应和延伸反应中都具有催化活性,但PpFabG1活性较弱,PpFabG6仅在起始反应中具有催化活性.PpfabG5是恶臭假单胞菌生长的必需基因,不能被敲除,而其他几个PpfabG基因敲除后不影响菌体的生长,突变株的脂肪酸组成与野生菌也无差异.但PpfabG1、PpfabG2敲除后菌体的运动性下降,PpfabG3、PpfabG6突变影响了生物被膜的合成量,而PpfabG4、PpfabG6敲除突变株对H₂O₂的耐受性增强,表明这些基因具有不同的生理功能,可能在菌体的不同逆境中发挥作用.

关键词 恶臭假单胞菌, 3-酮脂酰ACP还原酶, 脂肪酸合成
中图分类号 Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0132

脂肪酸合成是细菌最重要的初级代谢之一,合成的脂肪酸可用于合成磷脂,最终合成细胞膜,并通过改变脂肪酸的种类和组分,适应不同逆境生长^[1].脂肪酸合成的中间产物还参与其他生物活性分子(硫辛酸、生物素等)的合成,同时也为外膜类脂A、群体感应信号分子合成提供原料^[2-5].细菌采用II型脂肪酸合成系统从头合成脂肪酸,其每一步反应都由独立的酶催化,包括聚体、还原、脱水 and 再还原4个步骤,酰基载体蛋白(ACP)携带脂酰基团,在不同酶之间传递中间产物^[6-7].

脂肪酸合成中的关键还原反应由3-酮脂酰ACP还原酶(FabG)催化,生成3-羟基脂酰ACP再进行脱水反应^[8].多数细菌中FabG高度保守,是抗菌药物设计开发的重要靶标^[9].但随着研究深入,FabG多样性也被陆续报道.茄科雷尔氏菌

(*Ralstonia solanacearum*)中FabG1和FabG2都具有活性,但只有FabG1对细菌生长是必需的,而FabG2在抗逆性、致病性中发挥作用^[10].在中华苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)中,与结瘤相关的NodG也具有FabG活性,细胞内过表达nodG也能替换fabG功能^[11].野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)中FabG2为新型的3-酮脂酰ACP还原酶,仅对长链底物具有选择性,过表达并添加正辛酸时FabG2也能催化脂肪酸合

* 国家自然科学基金(31601601,31671987),广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室开放课题(PFRAO201804)和广东食品药品职业学院院级课题(2017ZR006)资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel:020-29164616, E-mail:yuyh@gdyzy.edu.cn

收稿日期: 2019-06-18, 接受日期: 2019-08-19

成^[12]. 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 编码 12 个 FabG 同源蛋白, 但只有 PA2967、PA4389 和 PA4786 具有催化活性, 而 PA2967 是菌体生长所必需的^[13].

恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 为专性好氧的革兰氏阴性杆菌, 是常见的鱼类致病菌, 少数种为人和动物的条件致病菌^[14]. 由于恶臭假单胞菌具有广泛的代谢酶, 对难降解的有机物和重金属都具有代谢分解能力, 在环境治理中发挥重要作用^[15-16]. 同时, 恶臭假单胞菌还具有强大的生物合成能力, 能产生许多次级代谢产物, 在工业上也具有重要的应用价值, 其生产的聚羟基脂肪酸 (PHA) 能被生物降解, 可作为塑料的潜在替代品, 还可用于医疗生物材料的生产^[17-18]. 虽然报道 PHA 合成的前体来源于脂肪酸合成代谢中间产物, 但恶臭假单胞菌的脂肪酸合成研究还未见报道^[19]. 为此, 本研究对恶臭假单胞菌基因组中多个 3-酮脂酰 ACP 还原酶同源蛋白质进行研究, 采用异体遗传互补、体外活性分析、基因敲除突变株生理性状分析等方法, 分析了这几个同源蛋白质的生物学功能.

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有 DH-5 α 、S17-1、BL21 (DE3) 和 CL104 菌株, 以及恶臭假单胞菌野生菌株 PpF1. 使用的质粒有 pBAD24M、pSRK-Gm^[20] 和 pET-28(b), 其他载体均为上述质粒的衍生质粒 (具体构建过程见下文), 具体菌株和质粒见表 1. LB 用作培养大肠杆菌和恶臭假单胞菌的丰富培养基, M9 用作恶臭假单胞菌及突变株的基础培养基. 抗生素的使用浓度如下: 30 mg/L 庆大霉素 (Cm)、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) 浓度为 0.02%, 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 浓度为 1 mmol/L.

1.1.2 试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、PCR mix、Marker DL2000、蛋白质 Marker 等试剂, 质粒提取和 DNA 凝胶回收等试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司; 庆大霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、L-阿拉伯糖、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 表达质粒构建

本文所使用的 PCR 引物见附件表 S1, 以恶臭假单胞菌 PpF1 总 DNA 为模板, 使用 PCR mix 分别扩增 *PpfabG1* ~ *PpfabG6* 基因片段. 回收 PCR 扩增产物, 经 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切后, 分别连接到 pBAD24M, 并转化大肠杆菌 DH-5 α , 筛选的阳性克隆经测序验证后, 依次得到互补质粒 pB1 (*PpfabG1*) ~ pB6 (*PpfabG6*). 用类似的策略, 通过 *Nde* I 和 *Hind* III 位点, 分别将 6 个基因连入表达载体 pET-28 (b), 测序验证后获得 pE1 (*PpfabG1*) ~ pE6 (*PpfabG6*). 还将 *PpfabG5* 连入 pSRK-Gm 获得 pS5 (*PpfabG5*).

1.3 异体遗传互补分析

将获得的 pBAD24M 系列互补质粒 pB1 (*PpfabG1*) ~ pB6 (*PpfabG6*) 以及 pBAD-*EcfabG*、pBAD24M 分别转化大肠杆菌 CL104 获得转化子. 由于大肠杆菌 CL104 为温度敏感突变株, 分别检测不同转化子在 42 $^{\circ}$ C 的生长情况, 进行表型互补鉴定.

1.4 突变菌株的构建

以恶臭假单胞菌 PpF1 总 DNA 为模板, 利用附件表 S1 中的引物, PCR 分别扩增 *PpfabG1* ~ *PpfabG6* 基因上下游各约 500 bp 片段, 并利用融合 PCR 技术获得 6 个基因的敲除盒. 酶切后分别连接到 pK18mobsacB 上, 获得质粒敲除质粒 pK1 (Δ *PpfabG1*) ~ pK6 (Δ *PpfabG6*), 并测序验证正确.

敲除质粒分别转化大肠杆菌 S17-1 后, 与恶臭假单胞菌 PpF1 在 LB 平板上 30 $^{\circ}$ C 共培养 24 h, 然后用 1 ml 无菌水培养物悬浮, 稀释到 10⁻³ 后涂布于含有氨苄青霉素 (Amp) 和卡那霉素 (Km) 的 LB 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h 获得单菌落. 分别选取单菌落培养后提取总 DNA, 用 P1 和 P4 进行 PCR 检测, 获得一次重组菌株. 进一步将一次菌株在含有 Amp 的 LB 中培养 18 h 后, 涂布于含有 Amp 和 10% 蔗糖的 LBS 平板, 筛选对 Km 敏感的菌株, PCR 验证并测序后获得突变株 Δ PpG1、 Δ PpG2、 Δ PpG3、 Δ PpG4、 Δ PpG6.

以 pS5 (*PpfabG5*) 质粒为模板, 以 *PpfabG5X* F 和 *PpfabG5XR* 为引物 (附表 S1), 扩增获得含有 *lacI* 基因、*P_{lac}* 启动子和 *PpfabG5* 基因 5' 端约 500 bp 的片段, 经 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切后将其连接到 pK18mobsacB 上, 获得质粒 pK5X. 将 pK5X 转化大

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	$\phi 80\Delta lacZ\Delta M15\ endA1\ recA1\ hsdR17$ (r_K^- , m_K^+)	Lab collection
S17-1	Tp^+ Sm^r <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR-M</i> ^r RP4::2-Tc::Mu:Km::Tn7, λ_{pir}	Lab collection
BL21 (DE3)	<i>ompT hsdS B</i> (r_B^- m_B^-) (DE3)	Lab collection
CL104	<i>E. coli fabG</i> (Ts)	Lab collection
<i>P. putida</i>		
PpF1	Amp ^r , Wild-type strain	Lab collection
Δ PpG1	Amp ^r , <i>PpfabG1</i> deletion mutant	This study
Δ PpG2	Amp ^r , <i>PpfabG2</i> deletion mutant	This study
Δ PpG3	Amp ^r , <i>PpfabG3</i> deletion mutant	This study
Δ PpG4	Amp ^r , <i>PpfabG4</i> deletion mutant	This study
Δ PpG6	Amp ^r , <i>PpfabG6</i> deletion mutant	This study
Δ PpG1G3	Amp ^r , <i>PpfabG1</i> and <i>PpfabG3</i> double deletion mutant	This study
Δ PpG5X	Amp ^r , Km ^r , <i>PpFabG1</i> carry with pK5X	This study
Plasmids		
pBAD24M	Amp ^r , expression vector	Lab collection
pBAD- <i>EcfabG</i>	Amp ^r , <i>E. coli fabG</i> in pBAD24M	Lab collection
pB1	Amp ^r , <i>PpfabG1</i> in pBAD24M	This study
pB2	Amp ^r , <i>PpfabG2</i> in pBAD24M	This study
pB3	Amp ^r , <i>PpfabG3</i> in pBAD24M	This study
pB4	Amp ^r , <i>PpfabG4</i> in pBAD24M	This study
pB5	Amp ^r , <i>PpfabG5</i> in pBAD24M	This study
pB6	Amp ^r , <i>PpfabG6</i> in pBAD24M	This study
pET-28 (b)	Km ^r , expression vector	Lab collection
pET- <i>EcfabG</i>	Km ^r , <i>E. coli fabG</i> in pET-28b	Lab collection
pE1	Km ^r , <i>PpfabG1</i> in pET-28b	This study
pE2	Km ^r , <i>PpfabG2</i> in pET-28b	This study
pE3	Km ^r , <i>PpfabG3</i> in pET-28b	This study
pE4	Km ^r , <i>PpfabG4</i> in pET-28b	This study
pE5	Km ^r , <i>PpfabG5</i> in pET-28b	This study
pE6	Km ^r , <i>PpfabG6</i> in pET-28b	This study
pK18mobsacB	Km ^r , conjugation vector	Lab collection
pK1	Km ^r , <i>PpfabG1</i> in pK18mobsacB	This study
pK2	Km ^r , <i>PpfabG2</i> in pK18mobsacB	This study
pK3	Km ^r , <i>PpfabG3</i> in pK18mobsacB	This study
pK4	Km ^r , <i>PpfabG4</i> in pK18mobsacB	This study
pK5	Km ^r , <i>PpfabG5</i> in pK18mobsacB	This study
pK6	Km ^r , <i>PpfabG6</i> in pK18mobsacB	This study
pK5X	Km ^r , <i>PpfabG5X</i> in pK18mobsacB	This study
pSRK-Gm	Gm ^r , expression vector	Lab collection
pS5	Gm ^r , <i>PpfabG5</i> in pSRK-Gm	This study

肠杆菌 S17-1 后, 与恶臭假单胞菌 PpF1 接合 (步骤同上), 获得具有 Km 抗性的接合子 Δ PpG5X.

1.5 蛋白质表达与分离纯化

将构建好的表达质粒 pE1 (*PpfabG1*) ~ pE6

(*PpfabG6*) 以及 pET-*EcfabG* 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 蛋白质的表达和分离纯化参考文献 [21-22] 进行. 同时参考文献 [21-22] 的方法, 分别纯化大肠杆菌丙二酸单酰 CoA: ACP 转

移酶 (FabD)、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)^[23] 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 (C₈-ACP)、癸脂酰 ACP (C₁₀-ACP)。

1.6 体外功能检测

恶臭假单胞菌 PpFabG1~ PpFabG6 体外活性检测参照文献 [24]。具体做法如下: 反应体系 50 μl, 含有 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、50 μmol/L NADH、50 μmol/L NADPH、1 mmol/L β-巯基乙醇、100 μmol/L 丙二酸单酰-CoA, 50 μmol/L holo-ACP, 100 μmol/L 乙酰 CoA 或辛酰 ACP, 大肠杆菌 FabD、FabA、FabI 各 0.1 μg。反应在添加不同的 0.1 μg FabG 后, 37℃ 保温 1 h, 分离胶浓度为 17.5%, 用含有 1~3 mol/L 尿素的非变性蛋白质凝胶电泳进行分析。其中起始反应体系中添加乙酰 CoA, 延伸反应中添加辛酰 ACP。而辛酰 ACP 合成反应体系为 30 μl, 含有 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1 mmol/L 辛酸、5 mmol/L DTT (二硫苏糖醇)、10 mmol/L MgSO₄、10 mmol/L ATP、50 μmol/L holo-ACP、添加 0.1 μg AasS 后 37℃ 保温 1 h。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

为研究恶臭假单胞菌 PpF1 来源的 3-酮脂酰

ACP 还原酶, 本文利用大肠杆菌 FabG (EcFabG) 蛋白序列与其基因组进行 Blast 分析, 结果发现 Pput_0620、Pput_2199、Pput_2972、Pput_3177、Pput_3800 和 Pput_3860 共 6 个基因编码 FabG 同源蛋白, 也都标注为 3-酮脂酰 ACP 还原酶, 因此本文将这 6 个基因依次命名为 PpfabG1~ PpfabG6。其中 PpfabG5 位于推测的脂肪酸合成基因簇中, 其他 5 个基因均位于功能未知基因簇中。PpFabG1 与大肠杆菌 FabG 的序列相似性 (76.5%) 和一致性 (65.2%) 都最高, 其他 5 个的序列相似性和一致性由高到低依次为 PpFabG3、PpFabG1、PpFabG6、PpFabG2、PpFabG4 (表 2)。除 PpFabG4 外, 5 个 FabG 同源蛋白都具有 Ser-Tyr-Lys 催化活性中心, 以及 N 端辅因子结合域 (Gly-X₃-Gly-X₁-Gly)^[25]。PpfabG2~ PpfabG6 分子质量大小与 EcFabG 相当, 但 PpFabG1 分子质量约为 EcFabG 的 2 倍, 共 451 个氨基酸 (表 2)。而 PpFabG1 与铜绿假单胞菌中具有活性的 PA4786 也具有 65.5% 的序列相似性。生物信息学分析结果显示, PpFabG5 极有可能具有 3-酮脂酰 ACP 还原酶活性, 而 PpFabG4 可能没有该活性, 其他几个蛋白质是否具有这一活性, 需要进一步实验分析。为此, 本文对以上几个 FabG 同源蛋白进行了以下研究。

Table 2 Alignment of *P. putida* 3-keoacyl ACP reductase homologs with *E. coli* FabG

FabG homologs	Length	Similarity/%	Identity/%	Catalytic motif (Ser-Tyr-Lys)	N-terminal cofactor binding motif (Gly-X ₃ -Gly-X ₁ -Gly)
PpFabG1	451	38.6	54.9	Yes	Yes
PpFabG2	247	32.0	50.4	Yes	Yes
PpFabG3	246	39.3	57.7	Yes	Yes
PpFabG4	259	28.1	46.6	No	No
PpFabG5	250	65.2	76.5	Yes	Yes
PpFabG6	247	37.8	54.6	Yes	Yes

2.2 PpfabGs遗传互补大肠杆菌fabG温度敏感突变株CL104

大肠杆菌 CL104 是 fabG 的温度敏感突变株, 30℃ 正常生长, 但在非允许温度 (42℃) 时不能合成 3-酮脂酰 ACP 还原酶, 菌体不能生长^[9]。为检测恶臭假单胞菌中 6 个 FabG 同源蛋白是否具有 3-酮脂酰 ACP 还原酶活性, 本研究首先将 PpfabG1~ PpfabG6 基因分别转化 CL104 菌株, 并检测转化子

在 42℃ 的生长情况 (图 1)。
异体遗传互补结果显示, 在添加诱导剂阿拉伯糖 (Ara) 的平板上, 与阳性对照类似, 含有 pB1 (PpfabG1)、pB3 (PpfabG3) 和 pB5 (PpfabG5) 的转化子能生长, 但含有 pB2 (PpfabG2)、pB4 (PpfabG4)、pB6 (PpfabG6) 以及空载体 pBAD24M 的转化子都不能生长。而 pB5 (PpfabG5) 转化子也能在不添加 Ara 的平板上生

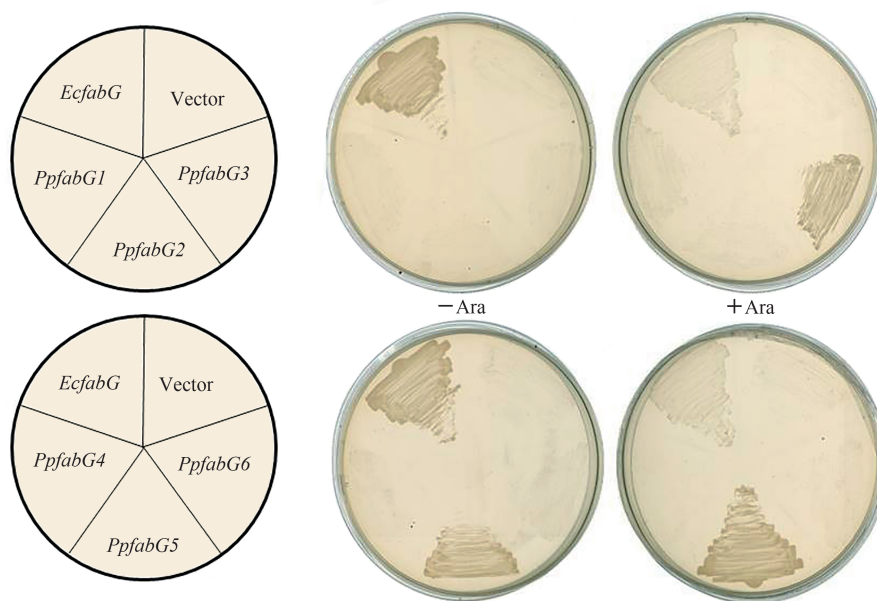


Fig. 1 Complementation of *E. coli fabG* (ts) mutant CL104 with *PpfabGs*

长. 42℃测定不同转化子的生长曲线也得到类似的结果, 互补了 *PpfabG1*、*PpfabG3* 和 *PpfabG5* 菌株在添加诱导剂时都能恢复生长 (结果未列). 以上结果说明 *PpfabG1*、*PpfabG3* 和 *PpfabG5* 的编码产物具有 3-酮脂酰 ACP 还原酶活性, 而 *PpFabG2*、*PpFabG4* 和 *PpFabG6* 可能不具有该活性.

2.3 FabG同源蛋白的表达纯化与体外活性测定

为进一步研究这 6 个 FabG 同源蛋白在体外的生物学功能, 分别将 *PpfabG1*~*PpfabG6* 基因克隆到 pET-28 (b) 上, 获得表达质粒 pE1 (*PpfabG1*) ~ pE6 (*PpfabG6*), 转化大肠杆菌 BL (DE3) 后, 在 37℃ 诱导表达, 并采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化获得 N 端融合有 His-tag 的 *PpFabG1*~*PpFabG6*. 经 SDS-PAGE 检测为单一条带, 分子质量与推测相符, 表明纯化成功 (图 2a).

为了验证 *PpFabG1*~*PpFabG6* 是否具有 3-酮脂酰 ACP 还原酶活性, 首先体外重建了脂肪酸合成起始反应 (图 2b). 大肠杆菌 FabH 催化乙酰-CoA 前体与丙二酸单酰 ACP 聚合, 生成 3-酮基丁酰 ACP, 而后在还原酶 FabG 催化下生成 3-羟基丁酰 ACP, 再依次在脱水酶 FabA、还原酶 FabI 催化下生成丁酰 ACP (C4: 0-ACP). 结果显示, 与阳性对照大肠杆菌 FabG (泳道 8) 类似, *PpFabG1* (泳道 2)、*PpFabG3* (泳道 4)、*PpFabG5* (泳道 6) 和 *PpFabG6* (泳道 7) 都催化生成了丁酰 ACP, 说明

PpFabG1、*PpFabG3*、*PpFabG5* 和 *PpFabG6* 都具有 3-酮脂酰 ACP 还原酶催化能力, 而 *PpFabG2* 和 *PpFabG4* 没有该活性. 但催化生成的产物浓度有所不同, *PpFabG3* 和 *PpFabG5* 催化活性较高, *PpFabG6* 活性弱一些, 而 *PpFabG1* 催化活性比较微弱.

其次, 进一步构建了不同 FabG 同源蛋白参与的脂肪酸合成延伸反应 (图 2c). 利用哈氏弧菌脂酰 ACP 合成酶 (AasS), 以正辛酸和 holo-ACP 为底物, 合成辛脂酰 ACP. 而后利用茄科雷尔氏菌中 FabW (RSp0194) [26] 催化辛脂酰 ACP 与丙二酸单酰 ACP 聚合, 生成 3-酮基癸脂酰 ACP, 可进一步被脱水酶 FabA、还原酶 FabI 催化生成癸脂酰 ACP. 结果显示, *PpFabG1* (泳道 3)、*PpFabG3* (泳道 5) 和 *PpFabG5* (泳道 7) 都生成了癸脂酰 ACP, 三者都具有 3-酮脂酰 ACP 还原酶活性. 但 *PpFabG1* 催化生成的产物浓度较低, 再次证明其活性较弱, 该结果与异体遗传互补实验中, *PpfabG1* 互补菌株生长相对较弱的表型相吻合.

2.4 恶臭假单胞菌 *PpfabGs* 突变株的构建

异体遗传互补和体外活性检测结果显示, 恶臭假单胞菌中不同的 *PpfabG* 基因可能具有不同的生理功能. 为进一步研究这 6 个 *PpfabG* 的生理功能, 本研究采用同源重组的方式构建了基因敲除突变株. 首先采用融合 PCR 的方法, 分别构建了 6 个 *PpfabG* 敲除质粒, 导入大肠杆菌 S17-1 菌株后, 与

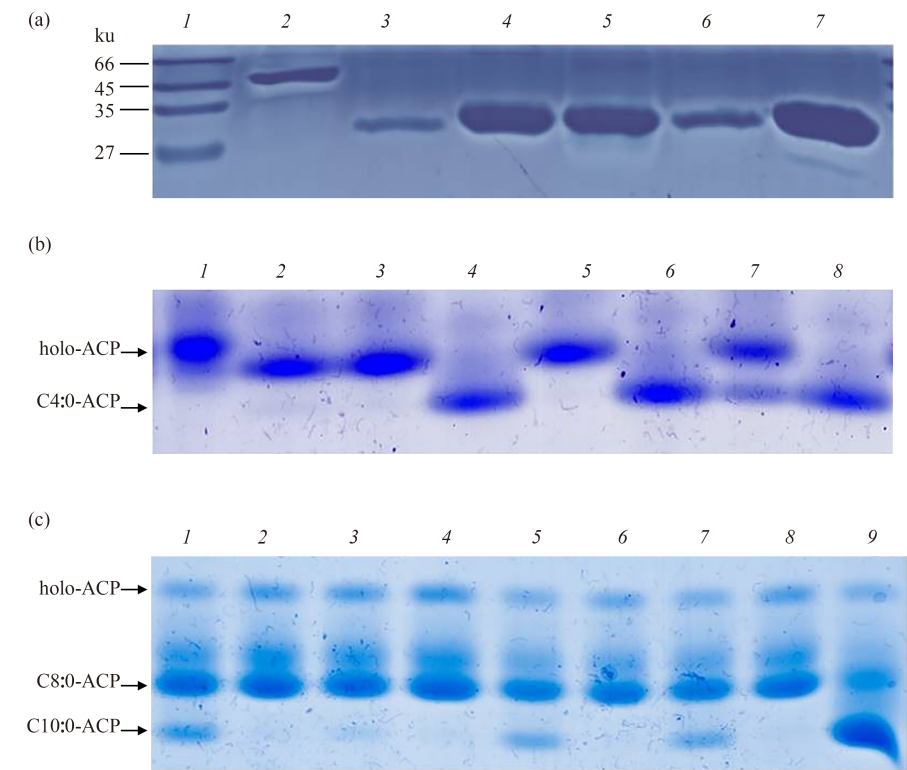


Fig. 2 Purification and enzymatic characterization of PpFabGs in fatty acid biosynthesis

(a) *Pseudomonas putida* FabG homologues purification. 1: protein marker; 2~7: purified PpFabG1~ PpFabG6, respectively. (b) The initial reaction. The migration positions of holo-ACP and butyryl-ACP on gel are shown. 1: holo-ACP; 2~7: PpFabG1~ PpFabG6, respectively; 8: EcFabG. (c) The elongation reaction. The migration positions of octanoyl-ACP and capryl-ACP on gel are shown. 1: EcFabG; 2: No FabG; 3~8: hexanoyl-ACP PpFabG1~ PpFabG6, respectively; 9: capryl-ACP. In the initial reaction, fatty acid biosynthesis was reconstructed by adding each purified FabG to a reaction mixture containing Tris-HCl, NADH, NADPH, Mal-ACP, *E. coli* FabH/FabA/FabI and acetyl-CoA primer. In the elongation reaction, each purified FabG was added to the mixture containing Tris-HCl, NADH, NADPH, Mal-ACP, octanoyl-ACP, RsFabW, *E. coli* FabA/FabI. The reaction products were resolved by conformational sensitive gel electrophoresis on 17.5% polyacrylamide gels containing concentrations of urea optimized to effect the separation.

恶臭假单胞菌 PpF1 接合, 筛选获得一次重组菌株, 其中 *PpfabG1*~ *PpfabG4* 和 *PpfabG6* 进一步筛选后顺利获得敲除突变株 Δ PpG1~ Δ PpG4 和 Δ PpG6. 但多次筛选后都不能获得 *PpfabG5* 的敲除突变株, 推测 *PpfabG5* 为恶臭假单胞菌生长的必需基因, 敲除后将导致细菌死亡 [27].

为验证以上推测, 首先将 *PpfabG5* 基因连入 pSRK-Gm, 并以此为模板扩增获得含有 *lacI* 基因、启动子 *P_{lac}* 和 *PpfabG5* 基因 5'端约 500 bp 序列的片段, 连入 pK18mobsacB 获得质粒 pK5X, 进一步通过接合方式将其导入恶臭假单胞菌 PpF1, 获得重组菌 Δ PpG5X. 平板检测 Δ PpG5X 生长情况, 结果显示在添加诱导剂 IPTG 时, 由于解除了 LacI 蛋白对 *P_{lac}* 启动子的抑制, Δ PpG5X 生长良好, 而在无

IPTG 的培养基中, Δ PpG5X 不生长 (图 3). 这一结果充分说明 *PpfabG5* 是恶臭假单胞菌生长的必需基因.

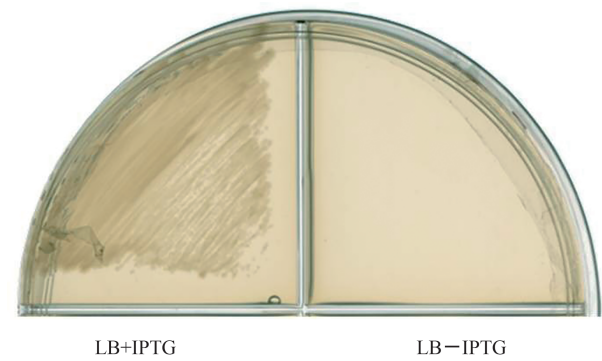


Fig. 3 The growth of Δ PpG5X on LB NYG plate with or without IPTG

2.5 恶臭假单胞菌*PpfabGs*突变株生理性状分析

为研究 *PpfabG1*~*PpfabG4* 和 *PpfabG6* 突变对恶臭假单胞菌的影响, 本研究进一步分析了突变株的生理功能. a. 测定了突变株在丰富培养基和基础培养基上生长曲线, 结果显示突变株的生长与野生菌无差异, 说明这 5 个基因突变都不影响菌体生长. 由于 3-酮脂酰 ACP 还原酶在脂肪酸合成中发挥作用, 进一步测定了不同突变株的脂肪酸组成, 结果显示各个突变株的脂肪酸组成与野生菌无统计学差异, 说明这 5 个基因不参与菌体的脂肪酸合成. b. 分析了突变株的运动性 (swimming), 结果显示, 与野生菌相比, $\Delta PpG3$ 、 $\Delta PpG4$ 和 $\Delta PpG6$ 的运动性没有变化, 但 $\Delta PpG1$ 和 $\Delta PpG2$ 的运动性明显下降, 有统计学差异 ($P < 0.01$) (图 4a). c. 检测了恶臭假单胞菌 PpF1 和突变株生物被膜的生成量.

结果显示, 与野生菌相比较, *PpfabG3* 和 *PpfabG6* 基因敲除突变株的生物被膜生成量显著下降, 但 *PpfabG1*、*PpfabG2* 和 *PpfabG4* 突变后没有明显影响生物被膜的生成 (图 4b). d. 检测了 *PpfabG* 基因突变对菌体抗逆性方面的影响. 结果显示, 与野生菌相比, $\Delta PpG1$ ~ $\Delta PpG4$ 和 $\Delta PpG6$ 突变株在耐盐实验 (1.5%~3.0%)、耐酸实验 (pH=4.7~5.0) 和耐 SDS 实验 (0.02%~0.06%) 中都没有差异 (结果未列). 但在抗氧化实验中, 当 H_2O_2 浓度为 2.2 mmol/L 时, 突变株与野生菌的耐受性无明显差异, 而当 H_2O_2 浓度升高为 4.4 mmol/L 和 8.8 mmol/L 时, $\Delta PpG4$ 和 $\Delta PpG6$ 表现出更强的耐受性, 其他 3 个突变株与野生菌无差异 (图 4c). 以上结果表明, 不同 *PpfabG* 具有不同的生理功能.

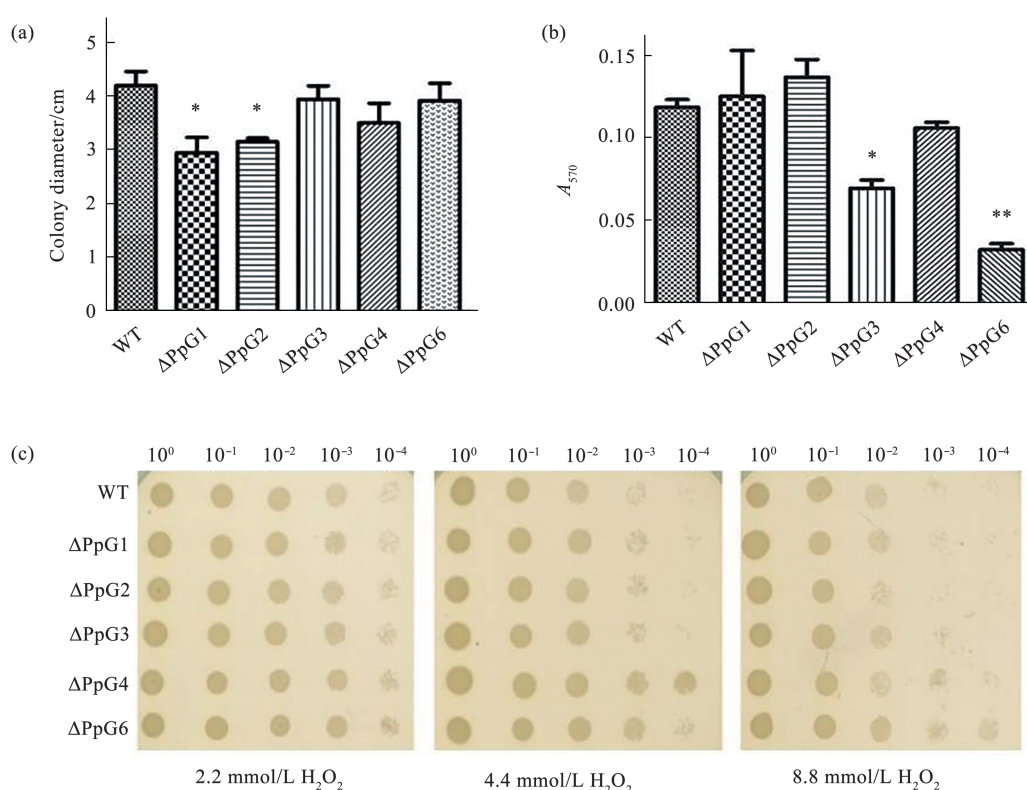


Fig. 4 Physiological characters analysis of different *PpfabG* mutants

(a) Motility assay on LB plates with 0.3% agarose. (b) Biofilm assay. (c) Growth of *PpfabG* mutants treated with different concentration of H_2O_2 . The statistical analysis was performed with P values by two-tailed student t tests. Significant differences were indicated by asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

3 讨论

在细菌脂肪酸合成循环中, 3-酮脂酰 ACP 还原

酶 (FabG) 以 NADPH 为辅因子, 催化第一步还原反应, 是脂肪酸合成的关键酶^[9]. 由于不同细菌的 3-酮脂酰 ACP 还原酶相对保守, 其多样性报道相对

较少, 因此FabG也被认为是抗菌药物筛选的理想靶点^[28]. FabG蛋白属于短链脱氢酶家族(SDR), 该家族含有大量成员催化多种代谢途径的氧化还原反应^[29]. 由于细菌基因组编码大量的SDR蛋白, 也通常有许多被预测具有3-酮脂酰ACP还原酶活性^[13]. 恶臭假单胞菌中有6个基因预测编码3-酮脂酰ACP还原酶, 但是否具有相关的酶活性以及具体的生物学功能, 国内外都未见相关报道.

同源性分析结果显示, 与模式生物大肠杆菌FabG相比较, PpFabG5的序列相似性最高(76.5%), 其他5个同源蛋白质的序列相似性也较高(46.6%~57.7%). 除PpFabG4之外, 其他5个同源蛋白质都具有保守的活性位点和N端辅因子结合位点, 推测PpFabG4可能没有3-酮脂酰ACP还原酶活性. 本文首先将这6个fabG同源基因异体遗传互补大肠杆菌fabG温度敏感突变株. 结果显示, 在42℃时, PpfabG5、PpfabG3互补株生长良好, 而PpfabG1互补株微弱生长, 但其他3个同源基因不能恢复突变株的生长. 该结果初步说明PpFabG1、PpFabG3、PpFabG5均具有3-酮脂酰ACP还原酶活性, 但活性强弱有差别.

进一步体外酶活性分析也得到相似的结果. 只有PpFabG1、PpFabG3、PpFabG5在体外重建的脂肪酸合成反应和循环反应中, 都显示具有3-酮脂酰ACP还原酶活性, 但PpFabG1催化活性较弱. 体外重建的脂肪酸合成起始反应中, PpFabG6也检测到了反应产物, 而在脂肪酸合成循环反应中, 又没有检测到相应的活性, 说明PpFabG6可能只对短链底物具有催化活性, 而对长链底物没有催化活性, 而这也可能是PpfabG6不能恢复大肠杆菌fabG温度敏感突变株CL104在42℃生长的原因, 推测PpFabG6为新型的3-酮脂酰ACP还原酶.

本文还采用同源重组方法, 对恶臭假单胞菌中6个fabG同源基因进行了敲除, 顺利获得PpfabG1~PpfabG4以及PpfabG6的基因敲除突变株, 但不能获得PpfabG5基因敲除突变株. 将PpfabG5启动子原位替换为 P_{lac} 后, 突变株只在添加IPTG时才能生长, 证明PpfabG5是菌体生长的必需基因. PpfabG1~PpfabG4和PpfabG6敲除突变株的生长、脂肪酸组成都与野生菌无差异, 说明这几个基因不是生长的必需基因, 也不参与脂肪酸合成. 但与野生菌相比, PpfabG1和PpfabG2敲除后菌体的运动性下降, PpfabG3和PpfabG6突变影响了生物被膜的合成量, 而PpfabG4和PpfabG6敲除

突变株对H₂O₂的耐受性增强, 表明这些基因具有不同的生理功能, 可能在菌体的不同逆境中发挥作用, 但每个基因编码蛋白具体的作用机制, 还有待进一步深入研究.

附件 表S1见本文网络版(<http://www.cnki.net> 或 <http://www.pibb.ac.cn>).

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] Cronan J E. Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, **80**(2): 429-450
- [3] Wang X, Quinn P J. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*, 2010, **49**(2): 97-107
- [4] Nhu Lam M, Dudekula D, Durham B, *et al.* Insights into β -ketoacyl-chain recognition for β -ketoacyl-ACP utilizing AHL synthases. *Chemical Communications*, 2018, **54**(64): 8838-8841
- [5] Zhou L, Zhang L H, Camara M, *et al.* The DSF family of quorum sensing signals: diversity, biosynthesis, and turnover. *Trends in Microbiology*, 2017, **25**(4): 293-303
- [6] Parsons J B, Rock C O. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog Lipid Res*, 2013, **52**(3): 249-276
- [7] Cronan J E, Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol*, 2009, **459**: 395-433
- [8] Fisher M, Sedelnikova S E, Martindale W, *et al.* Crystallization of the NADP-dependent β -keto acyl-carrier protein reductase from *Brassica napus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2000, **56**(Pt 1): 86-88
- [9] Lai C Y, Cronan J E. Isolation and characterization of β -ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 2004, **186**(6): 1869-1878
- [10] Feng S X, Ma J C, Yang J, *et al.* *Ralstonia solanacearum* fatty acid composition is determined by interaction of two 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductases encoded on separate replicons. *BMC Microbiol*, 2015, **15**: 223
- [11] Mao Y H, Li F, Ma J C, *et al.* *Sinorhizobium meliloti* functionally replaces 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG) by overexpressing NodG during fatty acid synthesis. *Mol Plant Microbe Interact*, 2016, **29**(6): 458-467
- [12] Hu Z, Dong H, Ma J C, *et al.* Novel *Xanthomonas campestris* long-chain-specific 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase involved in diffusible signal factor synthesis. *MBio*, 2018, **9**(3). pii: e00596-18
- [13] Guo Q Q, Zhang W B, Zhang C, *et al.* Characterization of 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase homolog genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Front Microbiol*, 2019, **10**: 1028

- [14] Yonezuka K, Shimodaira J, Tabata M, *et al.* Phylogenetic analysis reveals the taxonomically diverse distribution of the *Pseudomonas putida* group. J Gen Appl Microbiol, 2017, **63**(1): 1-10
- [15] Wang Q, Li Y, Li J, *et al.* Experimental and kinetic study on the cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. Environ Sci Pollut R, 2015, **22**(1): 565-573
- [16] Canovas D, Cases I, De Lorenzo V. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. Environ Microbiol, 2003, **5**(12): 1242-1256
- [17] Kennedy R K, Naik P R, Veena V, *et al.* 5-Methyl phenazine-1-carboxylic acid: a novel bioactive metabolite by a rhizosphere soil bacterium that exhibits potent antimicrobial and anticancer activities. Chem Biol Interact, 2015, **231**: 71-82
- [18] Zinn M, Witholt B, Egli T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv Drug Deliver Rev, 2001, **53**(1): 5-21
- [19] Vo M T, Lee K W, Jung Y M, *et al.* Comparative effect of overexpressed *phaJ* and *fabG* genes supplementing (R) -3-hydroxyalkanoate monomer units on biosynthesis of mcl-polyhydroxyalkanoate in *Pseudomonas putida* KCTC1639. J Biosci Bioeng, 2008, **106**(1): 95-98
- [20] 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
- [21] Yu Y H, Hu Z, Dong H J, *et al.* *Xanthomonas campestris* FabH is required for branched-chain fatty acid and DSF-family quorum sensing signal biosynthesis. Sci Rep, 2016, **6**: 32811
- [22] 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): e00613-13
- [23] 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
- [24] 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
Feng S X, Zhu L, Luo B, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(8): 954-963
- [25] Price A C, Zhang Y M, Rock C O, *et al.* Cofactor-induced conformational rearrangements establish a catalytically competent active site and a proton relay conduit in FabG. Structure, 2004, **12**(3): 417-428
- [26] Mao Y H, Ma J C, Li F, *et al.* *Ralstonia solanacearum* RSp0194 encodes a novel 3-keto-acyl carrier protein synthase III. Plos One, 2015, **10**(8): e0136261
- [27] 余永红, 马建荣, 王海洪. 野油菜黄单胞菌中烯脂酰 ACP 还原酶的功能鉴定. 生物化学与生物物理进展, 2016, **43**(05): 514-522
Yu Y H, Ma J R, Wang H H. Prog Biochem Biophys, 2016, **43**(05): 514-522
- [28] Heath R J, Rock C O. Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. Curr Opin Investig Drugs, 2004, **5**(2): 146-153
- [29] Kallberg Y, Oppermann U, Jornvall H, *et al.* Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: a large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. Protein Sci, 2002, **11**(3): 636-641

3-Ketoacyl ACP Reductase FabG5 is Essential for Fatty Acid Synthesis in *Pseudomonas putida**

GUO Jian-Ying^{1)**}, CHEN Bo^{2)**}, LI Xian-Qi²⁾, KUANG Cheng-Wei²⁾,
WANG Hai-Hong²⁾, MA Jian-Rong³⁾, YU Yong-Hong^{3)***}

⁽¹⁾ College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, 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;

³⁾ Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

Abstract 3-Ketoacyl ACP reductase (FabG), the key enzyme for bacteria growth, catalyzes the first reduction step in fatty acid synthesis. *Pseudomonas putida* has important application values in environmental pollution bioremediation and industrial polyhydroxy fatty acid (PHA) production. Bioinformatics analysis showed *Pseudomonas putida* genome encodes six FabG homologues with *E. coli* FabG, of which PpFabG5 shows the highest sequence similarity (76.5%) and other five PpFabGs also have high similarity (about 50%). Except PpFabG4, the other homologs have the conserved catalytic activity sites and N-terminal cofactor binding sites. So the paper used different methods, including the genetic complementary, catalytic activity analysis *in vitro*, gene deletion *in vivo*, and mutant characteristic analysis, to study the biological functions of the six homologs. The results showed that only *PpfabG1*, *PpfabG3* and *PpfabG5* could restore the growth of *E. coli fabG* temperature-sensitive mutant CL104 at 42°C, and the complementary strain of PpfabG1 grew weakly. While *in vitro* analysis, PpFabG1, PpFabG3 and PpFabG5 also showed the catalytic activities in the initial and extension reactions of fatty acid synthesis, although the activity of PpFabG1 was really weak. PpFabG6 only had catalytic activity in the initial reaction. *PpfabG5* is an essential gene for growth, which can't be deleted in the genome. While the deletion of the other *PpfabG* individually does not affect bacteria growth or the compositions of fatty acids comparing with wild type strain. However, the motility of *PpfabG1* or *PpfabG3* deletion mutant decreased, *PpfabG3* or *PpfabG6* deletion affected the biofilm formation, and *PpfabG3* or *PpfabG6* deletion mutant showed higher tolerance to H₂O₂. These results proved different FabG homologs contained different biological functions, especially when countered with stressful conditions.

Key words *Pseudomonas putida*, 3-ketoacyl-ACP reductase, fatty acid synthesis

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0132

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31601601, 31671987), Open Research of Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in Agricultural Organisms (PFRAO201804), and Science Foundation of Guangdong Food & Drug Vocational College (2017ZR006).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-20-29164616, E-mail: yuyh@gdyzy.edu.cn

Received: June 18, 2019 Accepted: August 19, 2019