

雨生红球藻虾青素酰基转移酶的鉴定与功能研究

曹黎 马海燕 魏自旺 赵亮 伍小颖 严海龙 胡强 韩丹翔

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL STUDY OF ASTAXANTHIN ACYLTRANSFERASE IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

CAO Li, MA Hai-Yan, WEI Zi-Wang, ZHAO Liang, WU Xiao-Ying, YAN Hai-Long, HU Qiang, HAN Dan-Xiang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.132>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

褪黑素对非生物胁迫下雨生红球藻中虾青素积累的影响

THE EFFECTS OF MELATONIN ON THE ACCUMULATION OF ASTAXANTHIN IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* LUGU UNDER ABIOTIC STRESS CONDITIONS

水生生物学报. 2018, 42(5): 1043–1049 <https://doi.org/10.7541/2018.128>

饲料中添加雨生红球藻粉对三疣梭子蟹雌体卵巢发育、色泽、抗氧化能力和生化组成的影响

EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* POWDER ON OVARIAN DEVELOPMENT, COLORATION, ANTIOXIDANT CAPACITY AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF ADULT FEMALE SWIMMING CRAB, *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

水生生物学报. 2018, 42(4): 698–708 <https://doi.org/10.7541/2018.086>

饲料中添加合成虾青素对中华绒螯蟹成体雌蟹性腺发育、色泽和抗氧化能力的影响

EFFECTS OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF SYNTHETIC ASTAXANTHIN ON OVARIAN DEVELOPMENT, COLORATION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF ADULT FEMALE CHINESE MITTEN CRAB, *ERIOCHEIR SINENSIS*

水生生物学报. 2017, 41(4): 755–765 <https://doi.org/10.7541/2017.94>

亚硝酸钠诱导的草鱼肝细胞凋亡中内质网应激IRE1通路的作用研究

ROLE OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IRE1 PATHWAY IN HEPATOCYTE APOPTOSIS OF GRASS CARP *CTENOPHARYNGODON IDELLA* INDUCED BY SODIUM NITRITE

水生生物学报. 2020, 44(1): 10–19 <https://doi.org/10.7541/2020.002>

AHLs对小球藻PS II光化学活性与光合作用关键酶的影响

EFFECTS OF AHLs ON PS II PHOTOCHEMISTRY ACTIVITY AND PHOTOSYNTHESIS CRUCIAL ENZYMES OF *CHLORELLA VULGARIS*

水生生物学报. 2017, 41(3): 629–636 <https://doi.org/10.7541/2017.80>

团头鲂GPR43基因克隆、组织分布及黄连素对其mRNA表达量的影响

GENE CLONING OF *GPR43* AND ITS DISTRIBUTION IN THE TISSUE OF BLUNT SNOUT BREAM AND THE EFFECT OF BERBERINE ON ITS MRNA EXPRESSION

水生生物学报. 2018, 42(4): 663–672 <https://doi.org/10.7541/2018.082>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.132

雨生红球藻虾青素酰基转移酶的鉴定与功能研究

曹黎^{1,2} 马海燕¹ 魏自旺¹ 赵亮¹ 伍小颖¹
严海龙^{1,2} 胡强¹ 韩丹翔¹

(1. 中国科学院水生生物研究所藻类生物技术和生物能源中心, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为研究雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)的甘油二酯酰基转移酶(Diacylglycerol acyltransferase, DGAT)是否具有催化虾青素酰基化的功能, 首先通过雨生红球藻的cDNA库克隆得到了一个II型DGAT编码区全长序列(DGTT2)。在甘油三酯(Triacylglycerol, TAG)合成缺陷型酵母*Saccharomyces cerevisiae* H1246中过表达DGTT2基因发现HpDGTT2不能回补H1246的表型, 即不具有典型的DGAT功能。利用分离得到的雨生红球藻的内质网成功地建立了一个体外的虾青素酰基转移酶酶活测定体系, 添加含有重组HpDGTT2的酵母细胞的微粒体后虾青素酯的含量显著高于对照, 初步表明HpDGTT2具有催化雨生红球藻中虾青素酰基化功能。以上结果为进一步探索雨生红球藻中DGTT2的功能及深入理解虾青素合成在代谢水平的调控奠定了基础。

关键词: 雨生红球藻; 虾青素; 甘油二酯酰基转移酶; 内质网

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)05-1143-09

在自然界中, 虾青素由一部分的微藻、植物、真菌及细菌合成, 而在微藻中的分布尤为广泛。目前已知的能够合成虾青素的微藻包括新绿藻(*Neochloris wimmeri*)、栅藻(*Scenedesmus vacuolatus*)、小球藻(*Chlorella zofingiensis*)、原管藻(*Protophycopsis botryoides*)和雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)等^[1]。虾青素在微藻细胞中的积累, 是单细胞光合生物抵抗环境胁迫的一种重要保护机制。以雨生红球藻为例, 其在氮和磷等营养缺乏以及高光、高盐、高温和干燥胁迫条件下可以诱导虾青素的积累, 最高可达干重的4%^[2,3]。

近年来, 雨生红球藻中许多与类胡萝卜素和虾青素生物合成相关的编码基因已经被鉴定, 这也使其成为研究虾青素生物合成与调控的模式生物^[4]。目前对雨生红球藻虾青素生物合成调控的研究大多数集中在基因表达调控上。研究发现, 雨生红球藻中大多数涉及类胡萝卜素生物合成的基因, 受到非生物胁迫条件(如高光、高盐等)在转录水平上的正向调控^[5,6]。转录水平调控被认为受自由基的形成的控制^[7]。另外, 通过一系列的光合电子传递的

抑制剂研究表明, 质体醌的氧化还原状态也能调控类胡萝卜素合成基因的表达^[8]。

最新研究表明虾青素和脂肪酸生物合成这两个途径是通过形成虾青素酯相互作用的, 表明虾青素的生物合成可能存在代谢水平的调控。一旦虾青素酯的合成受到抑制, 细胞内游离的虾青素过多积累, 从而对虾青素生物合成起到负反馈调节^[9]。研究发现在虾青素合成的体外酶活测定体系中添加甘油二酯酰基转移酶(Diacylglycerol Acyltransferase, DGAT)特异性抑制剂黄腐酚(Xanthohumol)和A922500, 对虾青素酯和虾青素的净合成起到抑制作用^[10-12]。该结果表明虾青素酯的形成即虾青素的酰基化可能是由DGAT所催化。

DGAT是甘油三酯(Triacylglycerol, TAG)合成过程中的限速酶, 能够催化甘油二酯的酰基化反应。目前有一些DGAT已经被鉴定, 包括I型的DGAT1和II型的DGAT2^[13]。它们催化了相同的生物学反应, 但是在序列上并没有明显的相似性^[14]。DGAT1作为膜结合Acyl-CoA-酰基转移酶(Membrane bound O-acyltransferase, MBOAT)家族的一

收稿日期: 2019-05-05; 修订日期: 2019-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(31570304)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570304)]

作者简介: 曹黎(1991—), 女, 硕士研究生; 研究方向为虾青素生物合成及代谢调控。E-mail: 847306704@qq.com

通信作者: 韩丹翔, E-mail: danxianghan@ihb.ac.cn

员,具有广泛的底物选择性,是一种多功能酶^[15]。DGAT2首次是在一种油性真菌拉曼被孢霉(*Mortierella ramanniana*)中被发现^[16]。通过对目前已知基因组藻的比较分析表明在真核藻类中DGAT2比DGAT1更为普遍存在,比如莱茵衣藻*Chlamydomonas reinhardtii*具有5个DGAT2,其中的2个拷贝在缺氮条件下表达上调^[17,18]。

本研究在前期研究的基础上,首次克隆了雨生红球藻II型DGAT编码基因(*DGTT2*)cDNA全长序列,并通过体内外的酶活分析体系初步确认了其功能,为深入研究虾青素酯化过程奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雨生红球藻*H. phyalis* 316由本实验室保藏。TAG合成缺陷型酵母*Saccharomyces cerevisiae* H1246(*MATaare1-Δ::HIS3 are2-Δ::LEU2 dgal-Δ::KanMX4 Iro1-Δ::TRP1 ADE2 ura3 TAG⁻ SE⁻*)^[19]和酵母表达载体pYES2/CT均购自美国Invitrogen公司。pYES2/CT-CrDGTT2-H1246过表达酵母转化子由北京大学刘进老师惠赠。

1.2 *DGTT2*基因引物设计与PCR扩增

将莱茵衣藻DGAT2家族中的CrDGTT1(Cre12.g557750), CrDGTT2(Cre02.g121200), CrDGTT3(Cre06.g299050)和CrDGTT4(Cre03.g205050)的氨基酸序列依次在雨生红球藻高光胁迫下的转录本中进行比对,得到一个与CrDGTT2氨基酸序列高度匹配的转录本。该转录本含有第一个起始密码子ATG、终止密码子,部分5'-UTR和3'-UTR。接着设计上下游引物(5'-cggaattcATGGGTGTCGCAACG AATGC-3'/5'-gctctagaCTGGATCTCCAGGGGCT TGTC-3',由上海生工生物技术有限公司合成),并以雨生红球藻cDNA库为模版进行PCR扩增。PCR体系(25 μL)如下: Premix(Vazyme Biotech)12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL, 上游引物1 μL, 下游引物1 μL, cDNA模板1 μL。反应条件为98℃预变性2min, 98℃变性30s, 59℃退火30s, 72℃延伸1min, 共35个循环; 72℃延伸10min, 4℃保存。PCR产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶纯化回收目的片段, 然后将产物与pMD18-T载体连接, 并转化至DH5α中, 氨苄抗性平板筛选阳性克隆并进行菌液PCR鉴定, 最后送往上海生工生物技术有限公司测序。

1.3 *DGTT2*基因序列分析

利用NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)的BLASTP工具进行同源基因氨基酸序列的查找。

利用ExPASy(<http://web.expasy.org/protparam/>)软件预测蛋白分子量及等电点。利用SMART(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)软件预测蛋白跨膜结构域。利用DNAMAN 6.0进行氨基酸序列比对以及MEGA 6.0软件中的邻接法(Neighbor-joining method)构建系统发育进化树。

1.4 酵母菌株的转化、培养和诱导

将测序正确的pMD18-T-HpDGTT2经双酶切后克隆到酵母表达载体pYES2/CT并转化至酵母*S. cerevisiae* H1246, 实验操作根据试剂盒说明书(Invitrogen, USA)进行。将酵母株pYES2/CT-H1246、pYES2/CT-HpDGTT2-H1246以及pYES2/CT-CrDGTT2-H1246接种于酵母Sc-Ura生长培养基中(北京泛基诺科技有限公司), 培养条件为30℃, 250 r/min培养12h至16h, 然后转接至酵母诱导培养基(北京泛基诺科技有限公司)中并使其接种初始浓度 A_{600} 为0.4。pYES2/CT-HpDGTT2-H1246、阳性对照pYES2/CT-CrDGTT2-H1246及空载pYES2/CT-H1246酵母转化子的诱导时间分别为12h、12h和24h。

1.5 外源脂肪酸喂养HpDGTT2和CrDGTT2酵母转化子

pYES2/CT-HpDGTT2-H1246和pYES2/CT-CrDGTT2-H1246被转接至诱导培养基后, 将终浓度为90 μmol/L的外源脂肪酸C16:1(n7), C18:2和C18:3(n3)[脂肪酸均溶解于0.1 g/L牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)]添加入酵母培养物中, 分别取培养0和24h的培养物经10 μmol/L的BODIPY 409/503(Invitrogen, USA)进行染色后拍照以观察脂滴的合成。

1.6 酵母微粒体的提取与蛋白免疫印迹(Western-blotting)验证

将诱导收获的酵母经4000×g, 2min离心后去除上清。用PBS磷酸缓冲液轻轻重悬酵母, 经4000×g, 2min离心后去除上清; 然后将菌体重悬于酵母裂解缓冲液[5%(w/v)甘油, 20 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)、0.3 mol/L (NH₄)₂SO₄、10 mmol/L MgCl₂+蛋白酶抑制剂, 购自Roche公司], 经低温超高压细胞破碎仪破碎(1000 bar预破碎一次, 1800 bar破碎3至4次), 收集细胞匀浆, 经3000×g, 10min, 4℃离心, 将上清转移至干净的超离管; 经10000×g, 30min, 4℃离心去除线粒体, 将上清转移至干净的超离管; 100000×g, 60min, 4℃离心去除上清, 收集沉淀得到酵母微粒体。用制备的酵母的微粒体做蛋白免疫印迹, 其中将转化空载的酵母的微粒体作

为对照,以确认HpDGTT2在酵母中的表达。蛋白免疫印记的操作过程为取20 μL 的酵母微粒体,加入60 μL 的缓冲液A和40 μL 的缓冲液B于震荡仪上震荡30min使其充分混合,其中缓冲液A组分为0.1 mol/L Na_2CO_3 和0.1 mol/L二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT);缓冲液B组分为30%(m/v)蔗糖和5%(w/v)十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS);然后加入20 μL 6 $\times$ 蛋白质上样缓冲液(Trans-Gen Biotech),于65 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴10min,接着20000 $\times g$,4 $^{\circ}\text{C}$,10min离心后取上清上样至聚丙烯酰胺凝胶中电泳。

1.7 雨生红球藻的培养和诱导

将雨生红球藻*H. pluvialis* 316以初始接种浓度约 5×10^4 cells/mL接种于12 L的平板光生物反应器中,培养基为BG-11(Blue-Green Medium)完全培养基^[20],培养温度为20 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 通气量为2%(v/v),光强控制在20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。经4—5d的生长细胞浓度约 1.1×10^5 cells/mL,经3000 $\times g$,3min离心去除上清收集藻细胞,用PBS磷酸缓冲液洗1至2次后将细胞轻柔重悬于BG-11缺氮培养基中,光强控制在200 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,高光缺氮诱导13h后离心(3000 $\times g$,3 min)收集雨生红球藻细胞,再经磷酸缓冲液PBS清洗1至2次。3000 $\times g$,3min离心后去掉上清收获藻细胞。

1.8 雨生红球藻内质网的制备

将经生长和诱导收获的雨生红球藻细胞重悬于藻裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4、5 mmol/L Na_2EDTA 、0.1%(w/v)BSA+蛋白酶抑制剂,购自Roche公司),经低温超高压细胞破碎仪破碎(1000 bar预破碎1次,1400 bar破碎3至4次)。收集细胞匀浆,经3000 $\times g$,10min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心。将离心后的上清转移至干净的超离管中,经10000 $\times g$,14min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心去除线粒体;然后将上清依次用18%和25%(w/v)的蔗糖溶液悬托,经100000 $\times g$,60min,4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心后,收集原蔗糖浓度18%以及18%和25%界面层位置所在处的溶液,将其转移至干净的超离管中,再次经100000 $\times g$,60min,4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心后去掉上清,收集沉淀得到雨生红球藻的内质网。借助于内质网细胞器特异性蛋白Marker,蛋白免疫印迹检测分离得到的内质网的质量。

1.9 雨生红球藻虾青素酰基化的体外酶学分析体系的建立

体外酶学分析体系的建立 将分离出的雨生红球藻的内质网作为虾青素酰基转移酶反应测定的粗酶,将虾青素单体(HPLC级,纯度 $\geq 97\%$,

Sigma-Aldrich)和酰基辅酶A(Acyl-CoA)(Sigma-Aldrich)作为虾青素酯合成的前体。体外酶学分析体系的建立如下:将制备好的雨生红球藻内质网与虾青素分子(溶解在氯仿中)在正己烷和机械力的作用下融合。在一个总体积为600 μL 的反应体系中,其中内质网蛋白总量约500 μg ,蛋白浓度用CB-X protein assay kit(GBiosciences, <http://www.gbiosciences.com>)来测量,根据试剂盒说明书进行操作。虾青素单体和酰基辅酶A(18:1-CoA, n9)在反应体系中终浓度为250 $\mu\text{mol/L}$,其中将以水代替酰基辅酶A的反应体系作为对照组。

利用体外酶学分析体系鉴定虾青素酰基转移酶 将含有重组HpDGTT2的酵母微粒体(蛋白总量约为600 μg)分别添加至上述体系中进行虾青素酰基转移酶酶活检测。其中将空载表达载体pYES2/CT-H1246的酵母微粒体作为虾青素酰基转移酶活反应的对照组。以上实验反应条件为30 $^{\circ}\text{C}$,250 r/min,反应时间90min。雨生红球藻虾青素酰基化的体外酶活反应完成后,用1.8 mL甲醇终止反应,再加入4.8 mL氯仿,在震荡仪上水平震荡10min来提取反应体系中的色素。经1000 $\times g$,3min离心后吸取有机层转移至干净的玻璃管中,溶解于有机试剂中的色素经氮气吹干后,复溶于300 μL 甲醇:二氯甲烷=3:1(v/v)(HPLC级, Sigma-Aldrich, USA),然后用高效液相色谱仪来对反应体系中的色素组分进行定性和定量的分析。

高效液相色谱检测条件 根据不同类胡萝卜素保留时间和480 nm吸收光下光谱图的差异,可以鉴定出游离虾青素及虾青素酯所对应的色谱峰^[21]。在本研究当类胡萝卜素的分离洗脱程序为:0—8min流动相为100%A;8—14min流动相由100%A切换为100%B;14—38min流动相为100%B;38—40min流动相由100%B切换为100%A;40—45min流动相为100%A。A相为二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=5:85:5.5:4.5(v/v);B相为二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=25:28:42.5:4.5(v/v),分离洗脱流速为1 mL/min。

1.10 酶活性的表征

利用雨生红球藻内质网膜建立体外反应体系 雨生红球藻虾青素酰基化的体外酶活反应完成后,用甲醇终止反应,用氯仿来提取反应体系中的色素,然后用高效液相色谱仪来对反应体系中的色素组分进行定性和定量的分析。根据不同色素保留时间和480 nm吸收光下光谱图的差异,可以鉴定出虾青素酯所对应的色谱峰。每个色谱峰对应的峰面积数值大小可以表征色素的含量^[22]。在

以雨生红球藻内质网膜建立反应体系时,将以水代替酰基辅酶A的反应体系作为对照组。分别统计实验组和对照组的虾青素酯的含量并进行比较分析。

利用体外分析体系鉴定虾青素酰基转移酶 将实验组(HpDGTT2微粒体+内质网为酶源)所生成的虾青素酯的含量相对于对照组(空载微粒体+内质网为酶源)虾青素酯的含量的比值作为评价HpDGTT2酵母微粒体活性的依据。若其比值大于1,则表明HpDGTT2有效地参与了反应,从而初步确定HpDGTT2为虾青素酰基转移酶。以上每组各设置4组技术重复并进行 t -test,如果 $P < 0.05$ 则认为差异显著。

2 结果

2.1 雨生红球藻DGTT2基因全长扩增和序列分析

以雨生红球藻cDNA为模板,设计引物DGTT2-Y-F/R进行PCR扩增,获得雨生红球藻DGTT2基因编码区全长为1017 bp,共编码338个氨基酸,其相对分子质量为37.82326 kD,理论等电点(Isoelectric point)为9.75。通过TMHMM软件预测DGTT2编码了1个3次跨膜蛋白。通过DNAMAN6.0进行氨基酸多序列比对发现DGTT2包含一段高度保守的“YFP”结构域和一段与DGAT2/MGAT活性功能相关的“FPHG”结构域(图1)^[23]。

雨生红球藻DGTT2氨基酸序列经NCBI中Protein Blast比对,发现其与莱茵衣藻的DGTT2(CrDGTT2)具有最高的同源性,相似性高达97%。利用软件ClustalW与其他23种生物的DGAT2氨基酸序列进行多重比对,并用MEGA6.0软件以邻位相接法(Neighbor-joining method)构建了DGAT2基因氨基酸的系统发育进化树。如图2所示, HpDGTT2与莱茵衣藻中的同源基因CrDGTT2形成聚类,该类群与由单细胞绿藻*Monoraphidium neglectum* DGAT2和月芽藻*Raphidocelis subcapitata* DGAT2所组成的

类群构成姐妹群。

2.2 HpDGTT2在TAG合成缺陷型酵母*Saccharomyces cerevisiae* H1246中的表达

用提取的pYES2/CT-HpDGTT2-H1246酵母的微粒体用做蛋白免疫印迹检测,以确认HpDGTT2的表达。结果表明HpDGTT2在酵母中成功表达而且可在微粒体中检测到, HpDGTT2编码的融合蛋白分子大小分别约为38 kD(图3A),与预测的结果基本一致。为了检测HpDGTT2是否具有DGAT功能参与TAG的合成,本研究对酵母细胞进行了荧光染色和显微观察。由于雨生红球藻的甘油三酯富含C16:1(n7)、C18:2和C18:3(n3),而这些脂肪酸在酵母细胞中含量低^[24, 25],因此在酵母培养体系中添加以上三种外源的脂肪酸,以避免由于脂肪酸缺乏导致无法检测到TAG合成的情况发生。本研究还将CrDGTT2过表达酵母(以及脂肪酸喂养组)作为TAG合成的正对照^[26]。结果显示无论是否添加外源脂肪酸,过表达HpDGTT2均未能回补*S. cerevisiae* H1246的TAG合成缺陷的表型(图3B),而过表达阳性对照CrDGTT2酵母转化子出现了产油的表型(图3C),说明HpDGTT2不具备合成TAG的功能。

2.3 HpDGTT2具有虾青素酰基转移酶的功能

当用HPLC对雨生红球藻内质网的色素组成进行分析时,发现在本研究中所使用的HPLC色素检测系统中,虾青素在保留时间3min左右时出峰,而虾青素酯的出峰时间在12—28min左右(图4A)。将雨生红球藻分离的内质网作为粗酶建立虾青素酯的体外酶活测定方法时,首先利用内质网细胞器特异性蛋白标记物BIP对分离的内质网进行免疫印迹,结果显示内质网制备质量良好(图4B)。体外酶活实验结果显示,相比于对照组,实验组的虾青素酯的绝对含量在反应的90min内呈现了明显的增加(图4C)。

将空载pYES2/CT和pYES2/CT-HpDGTT2酵母

```

MGVATNATHLKETASHPLETHELNARIWSDGQTRDSKMTWLELMVAVVTLTAYTGWIHIL
MLLGISAVFWQVPRLLILVLSSTLLLPARPVLWTSFNRSWVFSTWRKYFKFSYLLEAPSRPG
SRLVMAEFPHGVFPMGPLLAGTLCQILFPDFNIFSLAASSVFSVPGWRHFVAWMGSMPTAR
SNYRLLLSKGSVAVIVGGIAEMFLQHPHKQIVKLLTRKGFVEVAVEEGADGVVPVYHFGN
TDVLDIFPQCMGRLSRRMRAAGGFMYGVAGLPVPRRKPIYMTGSPITPKTSRNEAGFQ
AEVDRVHGLVVQELQALYDRHKASFGWQDKPLEIQ*
  
```

图1 推译的雨生红球藻DGTT2蛋白质氨基酸序列及结构域示意图

Fig. 1 The putative amino acid sequence and e putative conserved domains of *Haematococcus pluvialis* DGTT2 protein

其中灰色阴影部分为预测的3个跨膜结构域,方框内为DGAT2/MGAT功能位点

The sequences in the shaded boxes and in the red boxes are 3 transmembrane domains and putative conserved domains predicted in *Haematococcus pluvialis* DGTT2, respectively

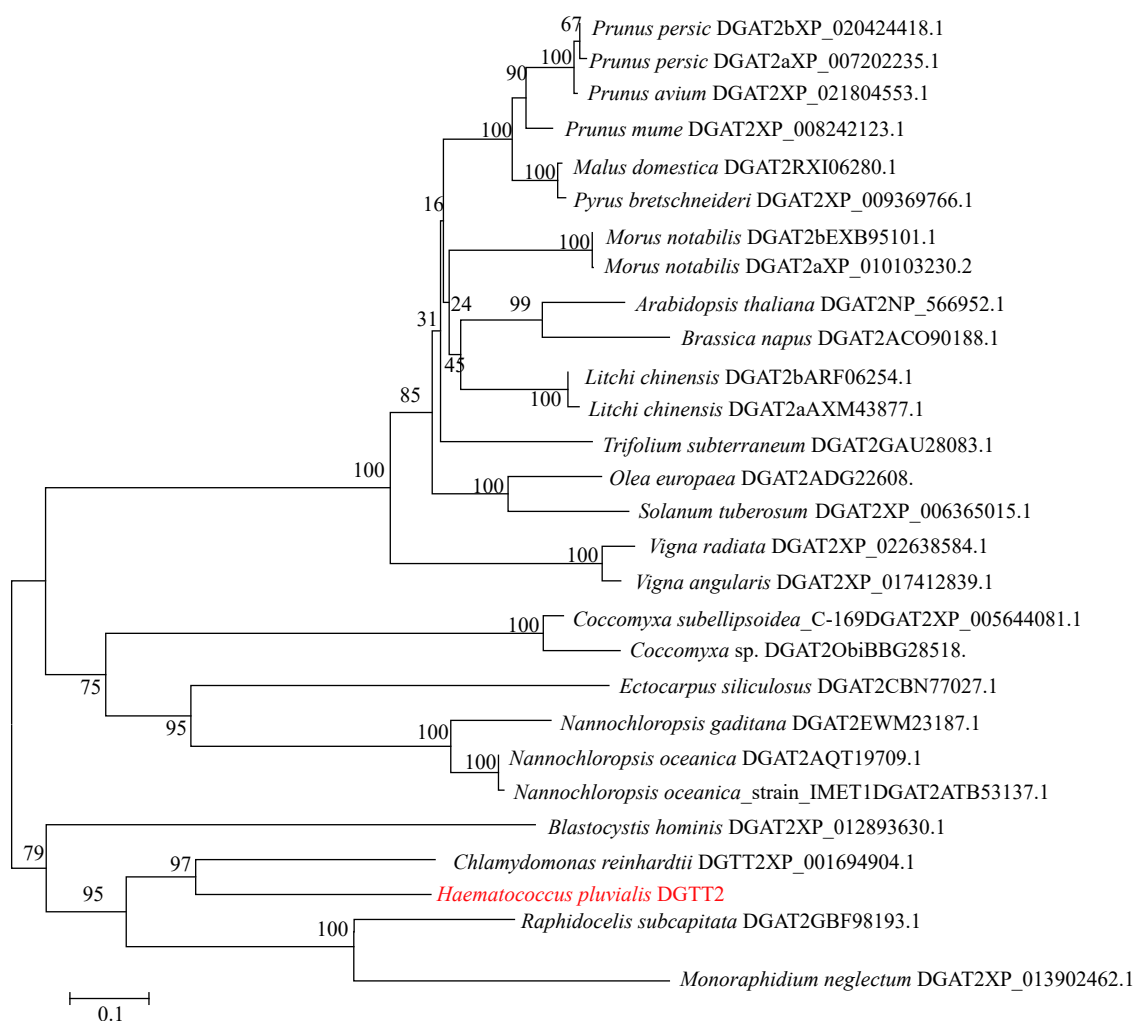


图2 邻接法构建HpDGTT2氨基酸系统发育进化树(Bootstrap=1000)

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed from the HpDGTT2 amino acid with the neighbor-joining method (Bootstrap=1000)

微粒体添加到雨生红球藻分离的内质网为粗酶建立虾青素酯的体外酶活测定方法时,发现添加Hp-DGTT2酵母微粒体使反应体系中保留时间为20.8min, 21.1min, 24.3min对应的虾青素酯的含量分别提高了13.79%、9.56%和25.86% ($P < 0.05$, 图5)。这一结果说明HpDGTT2具有虾青素酰基转移酶的功能。

3 讨论

基于HpDGAT可能催化虾青素的酯化过程的科学假设,本研究克隆了雨生红球藻II型DGAT编码基因HpDGTT2。生物信息学分析表明HpDGTT2属于溶血磷脂酰基转移酶(Lysophospholipid Acyltransferases, LPLAT)超家族,系统发育进化分析显示HpDGTT2与CrDGTT2亲缘关系较近。氨基酸序列以及活性位点的高度相似性说明二者可能具有相似的功能。然而通过酵母的回补实验却发现HpDGTT2不具有典型的DGAT功能,即以甘油二酯和酰基辅酶A为底物合成甘油三酯,这与CrDGTT2

形成了明显的对比。这一发现说明在进化的过程中, HpDGTT2基因可能发生了分化并获得了新的功能。

进一步通过体外酶活实验初步证实HpDGTT2可能具有虾青素酰基转移酶的功能,即以虾青素和酰基辅酶A为底物催化虾青素酯的形成。尽管过去的研究成功建立了以 β -carotene为前体合成虾青素的体外酶活测定体系^[27, 28],但是虾青素酰基化的酶活测定尚未见报道,这也是鉴定虾青素酰基转移酶编码基因所面临的困难。已有的研究表明,虾青素的酰基化发生在内质网上^[29-30],因此本研究首先采用了分离的内质网作为正对照建立虾青素酰基化的酶活测定方法。在虾青素酰基化的体外酶学实验最初的探索阶段,本研究参照过去虾青素生物合成的酶活的测定方法,将外源虾青素和卵磷脂制成脂质体,以增加底物的水溶性,使其充分地参与到虾青素酰基化的反应体系当中。结果表明,实验组中虾青素酯的含量在反应时间内呈现持续

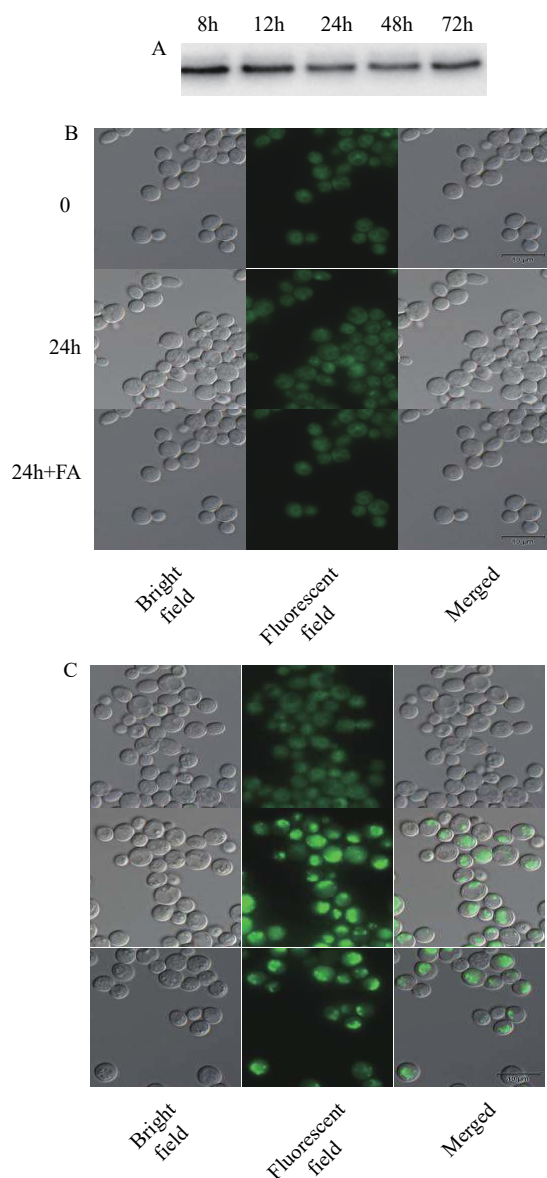


图3 HpDGTT2和CrDGTT2在*S. cerevisiae* H1246中的表达及功能回补分析

Fig. 3 Expression of HpDGTT2 and CrDGTT2 in *S. cerevisiae* H1246 and functional complementation analysis

A. HpDGTT2酵母微粒体蛋白免疫印迹确认; B. HpDGTT2过表达酵母转化子无甘油三酯合成; C. CrDGTT2过表达酵母转化子中检测到甘油三酯

A. Western-blotting analysis of *S. cerevisiae* H1246 harboring pYES2/CT-DGTT2 induction for 8h, 12h, 24h, 48h and 72h, respectively; B. No lipid body observed in HpDGTT2 *S. cerevisiae* H1246 transformants; C. Lipid body formed in CrDGTT2 *S. cerevisiae* H1246 transformants

的上升趋势,说明内质网中的虾青素酰基转移酶催化了虾青素酯的合成(结果未显示)。然而,这样的实验结果重复性差,成功率低,说明与 β -carotene不同的是被脂质体包被的虾青素分子可能与内质网膜上的酰基转移酶接触并发生反应的几率并不

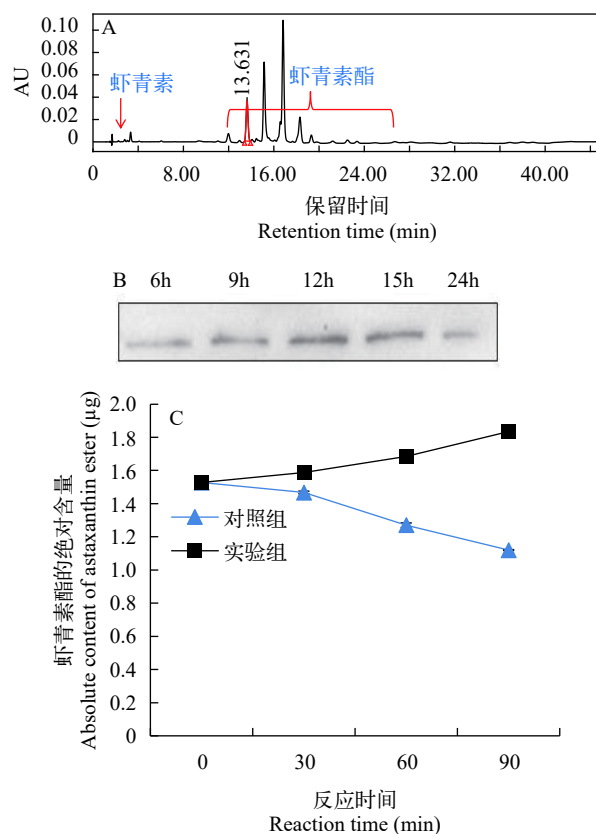


图4 虾青素酰基化体外酶活分析体系建立

Fig. 4 Establishment of astaxanthin acylation in an *in vitro* enzymatic assay system

A. 为雨生红球藻分离的ER的色素组成色谱图。其中箭头和括号在横坐标的垂直投影分别对应游离虾青素和虾青素酯的保留时间; B. 为雨生红球藻高光缺氧6h、9h、12h、15h和24h时分离的内质网的蛋白免疫印迹结果,其中BIP为细胞器特异性蛋白标记物; C. 为将雨生红球藻内质网作为虾青素酰基化的粗酶时,反应体系中实验组和对照组的虾青素酯含量的变化

A. Chromatogram of separated ER extracted from *Haematococcus pluvialis*; B. Western-blotting analysis of separated ER in *H. pluvialis* under high light stress for 6h, 9h, 12h, 15h and 24h, respectively. BIP was used as ER-specific marker; C. Astaxanthin ester (s) content variation between control group and experimental group when separated ER was used as crude transacylation enzyme *in vitro* assay

高。因此,本研究进一步尝试改进了促使虾青素分子进入反应体系中的方式,即在正己烷的作用下用机械研磨的方式将虾青素分子与内质网膜融合,以增加虾青素分子与内质网上的酰基转移酶接触并发生反应的几率。酶学分析发现以机械研磨的方式可以使雨生红球藻内质网酰基转移酶有效地参与到虾青素酰基化的反应体系中,即采用内质网作为正对照的实验能稳定、可重复地检测出虾青素酰基转移酶活性。随后在此反应体系中加入表达有HpDGTT2的酵母的微粒体,发现其使某些特定的保留时间下虾青素酯发生显著净增。通过成功

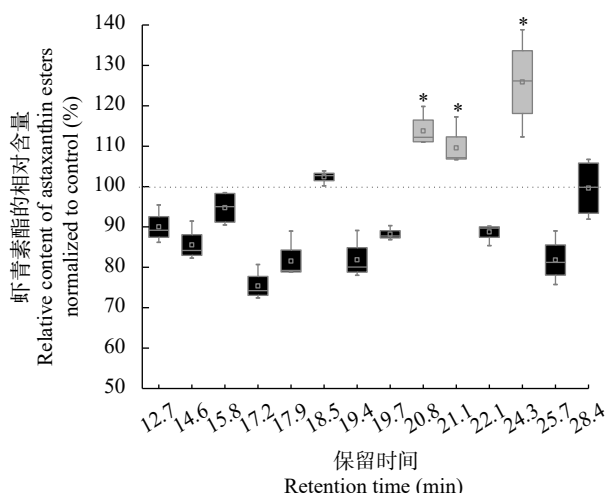


图5 添加含有HpDGTT2的酵母微粒体导致反应体系保留时间分别为20.8min、21.1min和24.3min的虾青素酯含量的净增加(*, $P < 0.05$)

Fig. 5 Addition of the yeast microsomes harboring HpDGTT2 led to a net increase in the content of astaxanthin esters with retention times of 20.8min, 21.1min and 24.3min (*, $P < 0.05$)

建立虾青素酰基化的体外酶活分析体系, HpDGTT2被初步鉴定为虾青素酰基转移酶。

在大多数生物体内, DGAT2主要负责甘油三酯TAG的生物合成^[31]。大多数已知的真核藻类含有多个DGAT2拷贝, 例如在伪矮海链藻(*T. pseudonana*), 三角褐指藻(*Phaeodactylum triconutum*), 微拟球藻(*Nanochloropsis oceanica*)中分别有4和6和11个DGAT2编码基因^[32, 33], 而这些数目众多的DGAT基因在行使甘油三酯合成的功能之外是否还具有其他的功能是有待回答的科学问题。在过去一系列针对包括海洋微拟球藻、莱茵衣藻的研究中就发现部分DGAT基因在体外酶活的测试中并未显示出典型的催化甘油三酯合成的活性, 在体内诱导产油条件下, 部分DGAT基因在转录水平上也没有任何响应^[34], 这表明这些DGAT基因可能在进化过程中获得了新的未知功能, 而具体的机制还有待进一步的研究。

目前对于类胡萝卜素(包括虾青素分子)酯的形成相关研究非常有限。但是对比长链的碳氢化合物的酰基化过程的研究不难发现DGAT可能在这一类化合物酰基化的过程中扮演非常重要的作用。例如, 在哺乳动物中, 视黄醇(类胡萝卜素的降解产物)可以被酰基化为视黄醇酯^[35], 而且这一过程是被DGAT1催化的, 其具有视黄醇酰基转移酶(Acyl-CoA: Retinol acyltransferase, ARAT)的活性^[36]。鼠科的DGAT1也具有多种酰基转移酶活性, 包括甘油单酯酰基转移酶(Acyl-CoA: Monoacylglycerol

acyltransferase, MGAT)活性合成甘油二酯DAG; 蜡酰基转移酶活性合成蜡酯。类似地, 在哺乳动物, 植物和微生物中的DGAT2能够利用广泛的酰基受体^[37], 例如破囊壶菌(*Thraustochytrium aureum*)的DGAT2能够利用脂肪醇和酰基辅酶A生成蜡酯类物质^[38]。而对拟南芥的两个叶绿醇酰基转移酶(Phytol ester synthase, PES)的酶学分析发现它们都具有典型的I型和II型的DGAT功能, 即利用酰基辅酶A为酰基供体, 甘油二酯DAG或者其他含有羟基的分子如甘油单酯(Monoacylglycerol, MAG)和醇类为酰基受体, 形成含有酯键的脂类分子^[39]。这些信息也进一步反映了雨生红球藻中虾青素的酰基化反应极有可能是由DGAT催化的。

本研究克隆了雨生红球藻DGTT2编码区全长, 其氨基酸序列和活性位点虽然与莱茵衣藻DGTT2高度相似, 但是在以酵母为表达宿主的异源体内实验并未检测到其TAG合成活性, 其不具有DGAT功能。而在以雨生红球藻分离的内质网作为粗酶成功建立虾青素酰基化的体外分析体系时, HpDGTT2却展示出了虾青素酰基转移酶的活性。这些结果表明HpDGTT2可能参与到虾青素酯的生物合成中, 但是其生物合成代谢调控有待进一步研究。值得一提的是HpDGTT2酵母微粒体作用的虾青素酯的保留时间相对靠后, 主要是一些虾青素双酯。这说明HpDGTT2可能主要以虾青素单酯为前体合成双酯。因此在未来的研究当中, 制备虾青素单酯用作体外反应研究HpDGTT2功能值得尝试。

参考文献:

- [1] Orosa M, Torres E, Fidalgo P, *et al.* Production and analysis of secondary carotenoids in green algae [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2000, **12**(3): 553-556.
- [2] Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response [J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, **108**(2): 111-117.
- [3] Lemoine Y, Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress [J]. *Photosynthesis Research*, 2010, **106**(1-2): 155-177.
- [4] Han D, Li Y, Hu Q. Astaxanthin in microalgae: Pathways, functions and biotechnological implications [J]. *Algae*, 2013, **28**(2): 131-147.
- [5] Li Y, Sommerfeld M, Chen F, *et al.* Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, **165**(17): 1783-1797.
- [6] Li Y, Sommerfeld M, Chen F, *et al.* Effect of photon flux

- densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, **22**(3): 253-263.
- [7] Steinbrenner J, Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Physiology*, 2001, **125**(2): 810-817.
- [8] Steinbrenner J, Linden H. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, **52**(2): 343-356.
- [9] Chen G, Wang B, Han D, *et al.* Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *The Plant Journal*, 2015, **81**(1): 95-107.
- [10] Zhao G, Souers A J, Voorbach M, *et al.* Validation of diacylglycerol acyltransferase I as a novel target for the treatment of obesity and dyslipidemia using a potent and selective small molecule inhibitor [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008(51): 380-383.
- [11] Inokoshi J, Kawamoto K, Takagi Y, *et al.* Expression of two human acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase isozymes in yeast and selectivity of microbial inhibitors toward the isozymes [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2009(62): 51-54.
- [12] King A J, Segreti J A, Larson K J, *et al.* Diacylglycerol acyltransferase I inhibition lowers serum triglycerides in the Zucker Fatty Rat and the Hyperlipidemic Hamster [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2009(330): 526-531.
- [13] Lung S C, Weselake R J. Diacylglycerol acyltransferase: A key mediator of plant triacylglycerol synthesis [J]. *Lipids*, 2006(41): 1073-1088.
- [14] Chen J E, Smith A G. A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae [J]. *Journal of Biotechnology*, 2012(162): 28-39.
- [15] Nguyen R L, Tam L W, Lefebvre P A. The *LF1* gene of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a novel protein required for flagellar length Control [J]. *Genetics*, 2005(169): 1415-1424.
- [16] Lardizabal K D, Mai J T, Wagner N W, *et al.* DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001(276): 38862-38869.
- [17] Durrett T P, McClosky D D, Tumaney A W, *et al.* A distinct DGAT with sn-3 acetyltransferase activity that synthesizes unusual, reduced-viscosity oils in *Euonymus* and transgenic seeds [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010(107): 9464.
- [18] Moellering E R, Benning C. RNA Interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2010(9): 97-106.
- [19] Sandager L, Gustavsson M H, Ståhl U, *et al.* Storage lipid synthesis is non-essential in yeast [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002(277): 6478-6482.
- [20] Stanier R Y, Kunisawa R, Mandel M, *et al.* Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) [J]. *Bacteriological Reviews*, 1971(35): 171-205.
- [21] Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991(71): 335-339.
- [22] Li Y, Sommerfeld M, Chen F, *et al.* Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010(22): 253-263.
- [23] Wagner M, Hoppe K, Czabany T, *et al.* Identification and characterization of an acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010(48): 407-416.
- [24] Yuan J-P and Chen F. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Food Chemistry*, 2000(68): 443-448.
- [25] Holtin K, Kuehnle M, Rehbein J, *et al.* Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009(395): 1613.
- [26] Liu J, Han D, Yoon K, *et al.* Characterization of type 2 diacylglycerol acyltransferases in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals their distinct substrate specificities and functions in triacylglycerol biosynthesis [J]. *The Plant Journal*, 2016(86): 3-19.
- [27] Fraser P D, Shimada H, Misawa N. Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate *in vitro* assay [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998(252): 229-236.
- [28] Chen G, Wang B, Han D, *et al.* Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [J]. *The Plant Journal*, 2015(81): 95-107.
- [29] Lang N J. Electron microscopic studies of extraplastidic astaxanthin in *Haematococcus* [J]. *Journal of Phycology*, 1968(4): 12-19.
- [30] Fátima M, Santos J, Mesquita F. Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis [J]. *Cytolo-*

- gia, 1984(49): 229-241.
- [31] Durrett T P, McClosky D D, Tumaney A W, *et al.* A distinct DGAT with sn-3 acetyltransferase activity that synthesizes unusual, reduced-viscosity oils in *Euonymus* and transgenic seeds [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010(107): 9464.
- [32] Boyle N R, Page M D, Liu B, *et al.* Three Acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012(287): 15811-15825.
- [33] Merchant S S, Kropat J, Liu B, *et al.* TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012(23): 352-363.
- [34] Yen C-L E, Monetti M, Burri B J, *et al.* The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters [J]. *Journal of Lipid Research*, 2005, 46(7): 1502-1511.
- [35] Shih M Y S, Kane M A, Zhou P, *et al.* Retinol esterification by DGAT1 is essential for retinoid homeostasis in murine skin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(7): 4292-4299.
- [36] Yen C-L E, Monetti M, Burri B J, *et al.* The triacylglycerol synthesis enzyme DGAT1 also catalyzes the synthesis of diacylglycerols, waxes, and retinyl esters [J]. *Journal of Lipid Research*, 2005(46): 1502-1511.
- [37] Liu Q, Siloto R M P, Lehner R, *et al.* Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase: Molecular biology, biochemistry and biotechnology [J]. *Progress in Lipid Research*, 2012(51): 350-377.
- [38] Zhang C, Iskandarov U, Klotz E T, *et al.* A thraustochytrid diacylglycerol acyltransferase 2 with broad substrate specificity strongly increases oleic acid content in engineered *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013(64): 3189-3200.
- [39] Lippold F, vom Dorp K, Abraham M, *et al.* Fatty acid phytyl ester synthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2012(24): 2001.

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL STUDY OF ASTAXANTHIN ACYLTRANSFERASE IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

CAO Li^{1,2}, MA Hai-Yan¹, WEI Zi-Wang¹, ZHAO Liang¹, WU Xiao-Ying¹,
YAN Hai-Long^{1,2}, HU Qiang¹ and HAN Dan-Xiang¹

(1. Center for Microalgal Biotechnology and Biofuels, Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: This study aimed to unravel whether DGATs are involved in the biological processes of astaxanthin acylation in *H. pluvialis*. A type II DGAT-encoding gene, *DGTT2*, was identified in *H. pluvialis* NIES-144 through RNA-seq and cloned from the cDNA library. Overexpression of HpDGTT2 in the TAG-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain H1246 failed to rescue the TAG-deficient phenotype, indicating that HpDGTT2 cannot utilize diacylglycerol for TAG biosynthesis. Meanwhile, an *in vitro* enzymatic assay system for measuring astaxanthin:acyl-CoA acyltransferase activity was established successfully by using *H. pluvialis* endoplasmic reticulum membranes as crude enzymes. When the *S. cerevisiae* microsomes containing recombinant HpDGTT2 were incorporated into the system, the concentrations of a number of astaxanthin esters increased significantly compared with the control, which indicated that HpDGTT2 possesses astaxanthin acyltransferase activity. This study will provide a basis for further studies on the function and metabolic regulation of HpDGTT2 in astaxanthin biosynthesis.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; Astaxanthin; Diacylglycerol acyltransferase; Endoplasmic reticulum