决定花生籽粒油酸与亚油酸含量的关键酶—Δ12-油酸脱氢酶

张小茜[1,2]，单 雷[1]，毕玉平[1,2,*]，李长生[1]
(1.山东省农业科学院高新技术研究中心，山东省作物与畜禽品种改良生物技术重点实验室，山东 济南 250100；
2.济南铁道职业技术学院，山东 济南 250013)

摘 要：本文介绍了高油酸花生研究的重要性与Δ12-油酸脱氢酶(FAD)的基本特性、结构特性、基因分类，以及其促成高油酸花生的分子基础及其生物学特性。

关键词：高油酸；Δ12-FAD；单不饱和脂肪酸；多不饱和脂肪酸

Key Enzyme Determining Oleic and Linoleic Acid Content in Peanut Oilseeds—Δ12-Oleic Acid Desaturase

ZHANG Xiao-qian[1,2], SHAN Lei[1], BI Yu-ping[1,2,*], LI Chang-sheng[1]
(1.High-tech Research Center, Shangdong Academy of Agricultural Science, Key Laboratory for Genetic Improvement of Crop, Animal and Poultry of Shandong Province, Jinan 250100, China; 2.Jinan Railroad Technical College, Jinan 250013, China)

Abstract: This article introduces the importance of high-oleate peanut research, as well as the basic characteristic, structural characteristics, classification of Δ12-oleic acid desaturase, the molecular basis of the enzyme which result in high-oleate peanut traits, and its biological characteristics.

Key words: high-oleate; Δ12- oleic acid desaturase; monounsaturated fatty acid; polyunsaturated fatty acid
中图分类号：S562 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)05-0489-04

花生油酸/亚油酸(O/L)比值是国际贸易中最重要的品质性状指标之一(另一个是黄曲霉毒素污染指标)。目前限制我国花生及其油制品与世界接轨的关键因素之一是其脂肪酸中O/L比值太低。虽然花生亚油酸对软化心脑血管有积极意义，但因其双键不饱和，极易氧化酸败而衍生出醛类、酮类及其他产生恶臭味的烃类等，因而其营养价值次于油酸。因此，研究培育高油酸花生对开展花生优质育种，增强在国际贸易中的竞争力具有重要的现实意义。

1 高油酸花生研究的重要性

长期摄入富含大量饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFAD)的动物脂肪会导致高血压、冠心病、动脉粥样硬化等疾病，而多数植物油中含有大量的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFAD)，其酰基易受氧化，不但缩短了保存期，还增加了烹饪过程中的不稳定性；形成的氧化产物，往往产生难闻气味和不适口感并伴随着酸败变质，同时可能会引起动脉硬化[1]。因此油类中多不饱和脂肪酸的含量、组成及其状态是油类品质最重要的决定因素[2]。食用含有高单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFAD)的油类能够有效的降低胆固醇水平，而没有油脂氧化的副作用[1]。降低了多不饱和性意味着油类在组成上与橄榄油更相似，与普通花生品种相比，保鲜更久，在酸败前有了更长的货架期，因此具有重要的商业价值[3]。最近一项研究表明，高油酸花生的低脂肪高单不饱和脂肪酸饮食比严格的低脂肪饮食更能有效的改善血清油脂和载脂蛋白蛋白谱(profile)。此外，高油酸花生产品还能够改善味道，增加氧化稳定性[1]。

2 Δ12-FAD的基本特性

Δ12-FAD是膜结合蛋白，常规的生物化学方法很

收稿日期：2007-04-05
基金项目：山东省农业良种工程项目(2003-3001-02)；山东省优秀中青年奖励基金项目(2006BS06024)
作者简介：张小茜(1981-)，女，助教，硕士，研究方向为植物分子生物学。E-mail：zhangxiaoqian198@163.com
*通讯作者：毕玉平(1961-)，男，研究员，博士，研究方向为植物遗传育种。E-mail：yuping_bi@hotmail.com

难分离纯化膜结合的FAD，因此研究其在自然环境中的生化特性比较困难[3]。Δ12-FAD基因开放读码框(ORF)为1140bp，编码379个氨基酸，它包含一个内含子，位于编码区3’末端[4]。Δ12-FAD酶促的生化反应在脂肪酸碳链上引入第二个双键，催化油酸(18:1 n-9)转化为亚油酸(18:2 n-6)，是生成亚油酸的关键酶，也是PUFAs代谢n-3和n-6途径的限速酶[5]。Δ12-FAD只存在于植物和微生物中，在人和哺乳动物中不存在，所以人体不能自身合成亚油酸。人们先后从蓝细菌(*Synechocystis* PCC6803)、拟南芥[6]、花生[1]及棉花[7]中分离了质体或微粒体Δ12-FAD基因。编码的蛋白Δ12-FAD中存在3个组氨酸保守区、2个膜嵌合区、4个保守结构域和15个保守的氨基酸。1998年，Panpoom等将蓝细菌PCC6803的Δ12-FAD基因在大肠杆菌中进行了表达，表达的Δ12-FAD占细胞总蛋白的10%，膜总蛋白的25%，且具有生物活性，为研究膜结合蛋白提供了一个过渡表达系统[8]。

3 Δ12-FAD的结构特性及基因分类

3.1 Δ12-FAD的结构特性

各种膜结合的FAD蛋白序列结构有许多共同特点：氨基端和羧基端同源性很低，但中部序列相对保守，都有2段长的疏水区和2段短的疏水区，形成4个跨膜区和2个膜嵌合区，并且具有3个极其保守的富含组氨酸结构域[9]。在花生FAD2克隆预测的产物中确定了在所有膜结合脱氢酶中都高度保守的3个富含组氨酸基序[$HX_{(3\pm4)}HX_{(7\pm41)}HX_{(2\pm3)}$ $HHX_{(61\pm189)}$(H/Q)$X_{(2\pm3)}$-HH][1]。第一个组氨酸簇前有一个大约40～55个氨基酸残基组成的跨膜区和另一个大约50个氨基酸残基组成的跨膜区，这2个跨膜区可在蛋白质疏水区穿膜4次[10]。第一和第二个组氨酸簇之间的距离具有高度的保守性，其长度为31个氨基酸，包含一个膜镶嵌蛋白区[9]。与来自*Synechococcus*的亚油酸脱氢酶、环氧化酶及来自Crepis的乙酰基酶相同，它们都是油脂修饰酶，在第二个组氨酸区SHRXHHS后第九个氨基酸处呈现保守的天冬氨酸，它们在这个酶家族中总是保守的[2]。第二个组氨酸区之后是第二个膜镶嵌蛋白区，它对底物的识别具有链长特异性和位置特异性，在某些高等植物中还具有组织特异性。3个组氨酸保守区都位于细胞质一侧。其作用是作为金属螯合配基，与二价铁离子结合，在反应中心结合氧，构成FAD催化的活性中心(图1)[11]。研究表明，FAD2(内质网定位的Δ12-FAD)C-末端有一个含芳香族氨基酸的序列(-YNNKL)，该保守基序是使其定位到内质网膜上必需和充分的，并且是维持酶活性的必需基序。FAD2 C-末端序列特异的保守基序一般含有Φ-X-X-K/R/D/ E-Φ-COOH，其中，Φ代表大分子疏水氨基酸残基[12]。

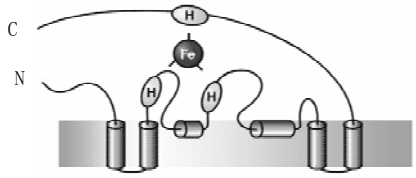


图1 膜结合FAD的拓扑结构模式图[13]

Fig.1 Model of proposed topology of membrane-bound FAD[13]

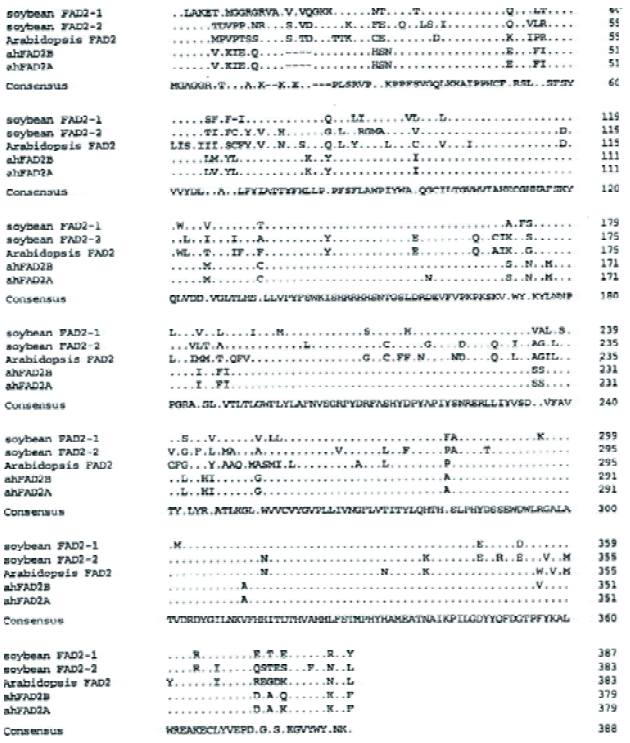
3.2 花生Δ12-FAD的基因组成

花生中含有两个微粒体Δ12-FAD基因(*AhFAD2A*和*AhFAD2B*)，它们是起源于两个不同二倍体种的同源非等位基因，*ahFAD2A*氨基酸序列与大豆*ahFAD2-1*具有82%的同一性，与大豆*ahFAD2-2*具有74%同一性，与拟南芥*ahFAD2*有70%相似性(图2)[1]。*ahFAD2A*和*ahFAD2B*序列相似，序列分析揭示了二者读码框序列之间存在限制性酶切位点的多态性(*RsaI*位点)[14]，它们在ORF区表现出99%的同一性，只有11个碱基不同，编码的四个氨基酸发生变化。两个cDNA克隆中侧接甲硫氨酸起始密码子的序列是高度保守的，与公认的植物转录起始统一序列(AACAATGGC)相比只有一个碱基不同(AACAATGGG)[1]。此外，*ahFAD2A*包含两种不同的等位基因，这两种*ahFAD2A*等位基因中的一个(*ahFAD2A-2*)产生功能性的酶，另一个(*ahFAD2A-1*)产生活性低得多的酶。*ahFAD2A-1*在接近保守组氨酸区域(HX_2HH)有一个残基的突变(D150N)，该区域对酶的功能是至关重要的[14]。

4 促成高油酸花生表型的分子基础

FAD2很可能是造成高油酸突变的候选基因，因为已知在非光合作用组织，如根和油料作物发育中的种子内，它的翻译产物负责将油酸转化为亚油酸。早先已有人分析了发育中花生种子微粒体内FAD2的体外活性。结果表明在高油酸种子中FAD2的活性低的多，而油酸脱氢为亚油酸所需辅助的成分，如溶血磷脂酰胆碱(lyso-PC)：酰基-CoA酰基转移酶，细胞色素b_5还原酶和细胞色素b_5，它们的浓度和活性却几乎没有变化。其他含油种子作物，如向日葵、大豆和油菜籽中高油酸突变体发育中的种子内微粒体FAD2活性都已丧失。这些结果说明微粒体FAD2是控制含油种子内油酸含量的主要酶[1]。

花生中存在两个FAD2同源基因，因此能够假设：其中一个基因可能通过长期传代被选择出来，成为唯一表达的基因，控制花生油酸水平；也可能，在花生中



相同的氨基酸用圆点表示

图2　来自 *A. hypogaea*（*ahFAD2A*和 *ahFAD2B*）和其他高等植物的 *FAD2*氨基酸序列比较[1]

Fig.2　Comparison of deduced amino acid sequences of FAD2 from *A. hypogaea* (*ahFAD2A* and *ahFAD2B*), and other higher plants[1]

这两个基因都表达并影响最终的亚油酸水平。研究结果表明正常油酸品种中这两个同源基因都表达，而在高油酸品种中，*ahFAD2B*的表达极大降低，表明*ahFAD2B*转录物水平的降低与高油酸表型相关。*ahFAD2A*在高油酸(M2-225和8-2122)和正常油酸(AT108和F78-1339)株系都表达，这些株系中*ahFAD2A* ORF的核酸序列已被确定。经过分析，证明*ahFAD2A*没有参与高油酸表型。推测这项研究中分析的正常和高油酸株系中的*ahFAD2A*具有突变，导致产物成为非功能性或低活性酶[5]，这一结论被进一步的研究所证实[15]。2000年*Jung*等在酵母*S. cerevisiae*中表达Virugard，59～4144和91～1718三个花生品种的克隆序列，检测由*ahFAD2A*和*ahFAD2B*编码的蛋白的酶活性，发现只有*ahFAD2B*基因产物表现出有效的FAD2活性。此外，观察到*ahFAD2A*基因有一个点突变，使天冬氨酸150转变为天冬酰胺(D150N)。天冬氨酸150残基在所有脂肪酸脱氢酶中是绝对保守的，这表明在研究者选择的几个供试正常的和高油酸品种中*ahFAD2A-1*可能是不能编码活性蛋白的*ahFAD2A*突变等位基因。后又发现在正常油酸花生株系91-1718中另一个*ahFAD2A*等位基因*(ahFAD2A-2)* D150N没有发生改变。这个花生株系对高油酸特性呈现双基因分离方式[15]。在高油酸生化诱导突变体Mycogen-Flavo和M2-225的*ahFAD2B*基因中发现一个相同的微型反向重复转位元件(miniature inverted- repeat transposable element，MITE)插入，造成移码，导致翻译的蛋白质序列提前终止，不能形成有功能的蛋白。因此，除了*ahFAD2A*中的点突变，*ahFAD2B*内MITE的插入是造成上述两种突变体高油酸表型的原因[16]。总之，*ahFAD2A*的突变和*ahFAD2B*转录物水平的大量下降共同造成了花生品种的高油酸表型，*ahFAD2A*或*ahFAD2B*任一酶的活性对于正常的油酸表型都是足够的[15]。

最近又有报道指出，大豆FAD2-1中185位点Ser残基能够被磷酸化，该残基很可能是这个酶的活性位点，在该位点引入一个带电残基会对FAD2-1造成影响。这个位点被Asp或Glu残基取代确实会导致该酶活性的下降[3]。

5　Δ^{12}-FAD的生物学作用

植物脂肪酸在质体和内质网中合成、延长和修饰后主要有两个去向，一是以三酰基甘油(TAG)的形式贮藏于种子中，即作为贮藏脂存在，为后代植物生长发育提供能量；另一个是用来构成生物膜的甘油脂和磷脂。

如上所述，Δ^{12}-FAD催化油酸转化为亚油酸，是决定含有种子中油酸、亚油酸含量的关键酶。

动植物和微生物的生物膜脂包含有饱和程度不同的脂肪酸。随生长温度的变化不饱和程度也会发生一定变化。在低温下膜脂不饱和程度升高。有报道指出拟南芥Δ^{12}-FAD基因在酵母中表达水平受温度影响，随温度升高Δ^{12}-FAD催化产生的亚油酸逐渐减少，这可能是由于较高的温度对PUFAD有不利影响或酶的稳定性下降[17]。同年在酵母中表达拟南芥Δ^{12}-FAD基因，发现在8℃下生长时FAD2转化体比在30℃下生长的转化体含有相对多的PUFAD并且转化体具有较高的抗酒精能力[18]。酵母中表达绿藻(*Chlrella vulgaris*)Δ^{12}-FAD基因*CvFAD2*，低温条件下转录物浓度上调，提高了酵母的抗冷能力，它可能参与低温适应并与其结冰耐受程度有关[19]。*Saccharomyces kluyveri*中的Δ^{12}-FAD基因SkFAD2转录不受外源不饱和脂肪酸抑制，但受低温胁迫诱导，先被低温激活，随后又被抑制[20]。此外，有研究发现FAD2基因的突变改变了叶片表面蜡的沉积结构并增大了叶片表层的溶液渗透性，其原因可能与木质素的合成受抑制相关[21]。

大豆中FAD2-1A的N末端区可能是温度依赖的去稳定结构域，当这些结构域被取代，会使FAD2-1B在30℃下更加不稳定性[3]。FAD活性随温度的降低而增加，但Northern杂交表明FAD活性的增加不是由于mRNA水平

相应的增加造成的。在一定条件下，mRNA 水平不受温度影响。能够改变它的最重要的因素可能是启动子活性。但是，增加的Δ12-FAD 活性是由寒冷对mRNA 或蛋白水平的影响造成的，还是Δ12-FAD 更长的半衰期直接影响了蛋白的活性？对此，学术界有着不同的观点[22]。因此，FAD2A 、FAD2B 这两个同功酶基因是控制油酸含量的关键酶基因，但可能其他酶基因或多种调控机制也起着重要作用。

6 结 论

综上所述，Δ12-FAD 的研究取得了相当进展。但不可否认的是，还有许多工作亟待解决，目前我们对Δ12-FAD 的调节机制还不十分明确，尤其是在高等植物领域。另一方面，在我国，植物基因工程在花生品种改良上的应用研究起步较晚，这些因素都限制了Δ12-FAD 遗传操作及其在种质改良方面的进一步应用。

虽然有许多问题尚待研究和解决，随着花生大量功能基因的分离克隆、表达调控方式和分子机制的阐明，以及分子水平遗传改良手段的不断完善，突破花生育种瓶颈也不再是遥不可及。从功能基因的分离入手，结合研究其表达调控、基因间互作，揭示性状形成的遗传基础和分子机制，最终为高油酸花生分子改良育种提供新理论和新方法，可极大促进我国花生生物技术的长足发展。

参考文献：

[1] JUNG S, SWIFT D, SENGOKU E, et al. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) I: isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases[J]. Mol Gen Genet, 2000a: 263; 796-805.

[2] ANN C B, SOOK J, ALBERT G A, et al. The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of aspartate 150 to asparagines[J]. Crop Sci, 2001:41:522-526.

[3] GUO Q T, WILLIAM P N, CAROL H G, et al. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation[J]. The Plant Journal, 2005, 44: 433-446.

[4] LOPEZ Y, NADAF H L, SMITH O D, et al. Isolation and characterization of the (12-fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and search for polymorphisms for the high oleate trait in Spanish market-type lines[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 1131-1138.

[5] SEIKI T, EIJI S, AKIKO T, et al. Improvement of the fatty acid composition of an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, through RNA interference with Δ12-desaturase gene expression[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5124-5128.

[6] IBA K, GIBSON S, NISHIUCHIT, et al. A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the FAD7 mutant of *Arabidopsis thaliana*[J]. J Biol Chem, 1993, 268(32): 24099-24105.

[7] LIU Q, BRUBAKER C L, GREEN A G, et al. Evolution of the FAD2-1 fatty acid desaturase 5' UTR intron and the molecular systematics of Gossypium (*Malvaceae*)[J]. Am J Bot, 2001, 88(1): 92-102.

[8] PANPOOM S, LOS D A, MURATA N. Biochemical characterization of a delta12 acyl-lipid desaturase after overexpression of the enzyme in *Escherichia coli*[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1390(3): 323-332.

[9] SHANKLIN J, CAHOON E B. Desaturation and related modifications of fatty acids[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 611-641.

[10] 元冬娟, 江黎明. 海洋微藻脂肪酸去饱和酶[J]. 生命的化学, 2006, 26(5): 422-425.

[11] GUILLERMO A P, SILVIA G A, ANTONIO D U. Trypanosoma brucei oleate desaturase may use a cytochrome b5-like domain in another desaturase as an electron donor[J]. Eur J Biochem, 2004: 271; 1079-1086.

[12] ANDREW W M, JONH M D, PREETINDER K D, et al. Membrance-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini[J]. The Plant Journal, 2004, 37: 156-173.

[13] JOHN M D, DORSELYN C C, JUI-CHANG W K, et al. Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of blant fatty acid diversity[J]. Plant Physiology, 2002: 130; 2027-2038.

[14] JUNG S, TATE P L, HORN R, et al. The phylogenetic relationship of possible progenitors of the cultivated peanut[J]. Journal of Heredity, 2003, 94(4): 334-340.

[15] JUNG S, POWELL G, MOORE K, et al. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) II: molecular basis and genetics of the trait[J]. Mol Gen Genet, 2000b: 263: 806-811.

[16] PATEL M, JUNG S, MOORE K, et al. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the FAD2 gene[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108 (8): 1492-1502.

[17] PATRICK S C, DARWIN W R. Functional expression of the extraplastidial arabidopsis thaliana oleate desaturase gene (FAD2) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Plant Physiol, 1996, 111: 223-226.

[18] SUSUMU K, ATSUYA S, TOSHIO F, et al. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of ethanol tolerance and the FAD2 gene from *Arabidopsis thaliana*[J]. Applied and Environmental Micorobiology, 1996, 62: 4309-4313.

[19] KOUSHIROU S, KEN-ICHI H, NAOKI F, et al. Two low-temperature-inducible chlorella genes for Δ12 and ω-3 fatty acid desaturase (FAD): isolation of Δ12 and ω-3 fad cDNA clones, expression of Δ12 fad in *Saccharomyces cerevisiae*, and expression of ω-3 fad in *Nicotiana tabacum*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(6): 1314-1327.

[20] KYOKO W, TAKAHIRO O, HIROMICHI S, et al. Yeast Δ12 fatty acid desaturase: gene cloning, expression, and founction[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(3): 721-727.

[21] 王敬乔, 陈薇, 曾黎琼, 等. Δ12-脂肪酸去饱和酶基因(FAD2)突变对油菜叶片表面结构和透性的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(3) : 192-198.

[22] LI M C, LI H, WEI D S, et al. Cloning and molecular characterization of Δ12-fatty acid desaturase gene from *Mortierella isabellina*[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(21): 3373-3379.