

文章编号: 1004-0374(2012)01-0058-05

多不饱和脂肪酸对微生物低温适应性的影响

张琦, 王志, 何仕武, 季秀玲, 林连兵, 魏云林*

(昆明理工大学生命科学与技术学院生物工程技术研究中心, 昆明 650224)

摘要: 地球生物圈 75% 以上的环境温度常年低于 5 °C, 在这种低温环境中栖息着多种适应低温的微生物。在长期进化过程中低温微生物从细胞到分子水平形成一套独特的低温环境适应机制, 而通过增加细胞膜脂质中多不饱和脂肪酸含量来维持低温条件下最佳的细胞膜流动性是其中的一种。从多不饱和脂肪酸对微生物低温生长、细胞膜流动性细胞膜蛋白的组成和表达水平的影响来探讨多不饱和脂肪酸与微生物低温适应性的关系, 总结多不饱和脂肪酸低温合成调节机制的研究进展, 为相关的基础和应用开发研究提供参考。

关键词: 多不饱和脂肪酸; 低温适应性; 膜流动性; 膜蛋白; 调节机制

中图分类号: Q936 **文献标志码:** A

Effects of polyunsaturated fatty acids on the cold adaptation of microorganisms

ZHANG Qi, WANG Zhi, HE Shi-Wu, JI Xiu-Ling, LIN Lian-Bing, WEI Yun-Lin*

(Biotechnology Research Center, School of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: Over 75% of the Earth's biosphere experiences temperatures of less than 5 °C throughout the year, where various low-temperature adapted microorganisms inhabit. Due to long-term natural selection, these microorganisms have evolved some adaptive mechanisms at cellular and molecular levels to adapt to their living environments. One of the mechanisms is to increase polyunsaturated fatty acid content of membrane lipids to maintain optimum membrane fluidity at low temperatures. Based on the effects of polyunsaturated fatty acid biosynthesis on microbial growth, the membrane fluidity and composition and expression levels of membrane proteins, this paper discusses the contribution of polyunsaturated fatty acids to the cold adaptation of microorganisms and summarize the research progress in the regulatory mechanisms of polyunsaturated fatty acid biosynthesis at low temperatures, providing a reference for relevant fundamental and application research in this field.

Key words: polyunsaturated fatty acids; cold adaptation; membrane proteins; microorganisms; regulatory mechanisms

地球生物圈 75% 以上的环境温度常年低于 5 °C, 包括极地、深海和高山等环境, 在这些环境中栖息着大量的微生物。据估计, 地球上约 60%~90% 的微生物生活在低温海洋环境中, 其微生物物种多样性和遗传多样性高, 而且营养类型也多样^[1]。低温必然对这些生境中微生物的生命过程产生最根本的影响, 可通过多种途径影响细胞功能, 比如营养吸收、基因表达、代谢活性、能量产生和细胞生长等^[2]。然而, 作为这些生境的主要生物类群, 包括嗜冷微生物和适冷微生物的低温微生物会产生一些相应的

低温适应机制, 将环境所造成的影响减小到最低程度。近期的研究结果揭示, 低温环境中的微生物形成了一些机制来适应低温, 如提高细胞内液态水的黏度, 降低酶的活性, 合成一些低温酶来维持细胞

收稿日期: 2011-08-08; 修回日期: 2011-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960079, 311600-16); 云南省应用基础研究基金项目(KKSA201126005)

*通信作者: E-mail: homework18@126.com; Tel: 0871-5920148

基本的代谢活动, 抑制 DNA 和 RNA 异常结构的形成, 以及调节细胞膜脂的组成来维持膜的流动性等^[2-3]。

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 是指含有两个或两个以上双键、碳原子数为 18~22 的直链脂肪酸, 可以分为 n-6 和 n-3 两大系列。PUFAs 广泛存在于各种生物中, 但在不同物种中的组成和含量有所区别。一系列的研究表明, PUFAs 具有调节膜相关的生理过程、抗肿瘤抗炎、促进细胞生长、防止心脑血管疾病、有利于大脑视网膜形成、免疫调节和基因表达等很多重要的生理调节功能^[4-6], 因此成为有价值的产品, 促进了人们对 PUFAs 的需求。许多研究表明, 作为细胞膜膜脂的重要组成部分, PUFAs 对细胞膜结构、流动性、相转变、信号转导、物质运输、离子交换、能量传递以及酶活性大小等方面起着重要的调节作用^[7-8]。

1 微生物多不饱和脂肪酸的生物合成

为了适应不同的生境, 不同生物衍生出不同的 PUFAs 生物合成机制, 在包括微生物在内的低等真核生物中, PUFAs 的合成是从 18 碳的饱和脂肪酸 - 硬脂酸 (stearic acid, STA, C18:0) 开始的。硬脂酸在

不同脂肪酸脱氢酶 (fatty acid desaturase) 和延长酶 (elongase) 交替催化下, 通过脂肪链的脱氢和延长反应合成花生四烯酸 (arachidonic acid, AA, C20:4n-3)、二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA, C20:5n-3) 和二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA, C22:6n-3) 等长链多不饱和脂肪酸, 而亚油酸 LA (linoleic acid, C18:2n-6) 是 n-6 和 n-3 系列 PUFAs 的共同前体, 因此, Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶催化油酸 (oleic acid, OA, C18:1n-3) 合成 LA 是低等真核生物中 PUFAs 合成的关键步骤 (图 1)^[9]。一些深海细菌中同样具有 PUFAs (主要是 EPA 和 DHA, 而不是动物、植物、真菌和蓝细菌中常见的 C18 的 PUFAs), 但其合成过程中不涉及重要的脂肪酸脱氢和延长机制, 而是由一种类似于聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 的酶系催化合成, 这种合成不涉及有氧脱氢机制^[10]。有意思的是, 一些低等真核生物中利用 PKS 系统合成 DHA (图 1)^[9], 而某些蓝细菌中却存在和真核生物相同的 PUFAs 合成途径, 但这些蓝细菌中只产生 18 碳的 PUFAs, 不涉及碳链的延伸, 这可能和蓝细菌的结构和膜脂组成与植物相似有关^[11]。本实验室在内的很多研究已经表明, 低温条件下 PUFAs 的合成增加, 提高了微生物的低温适应性。

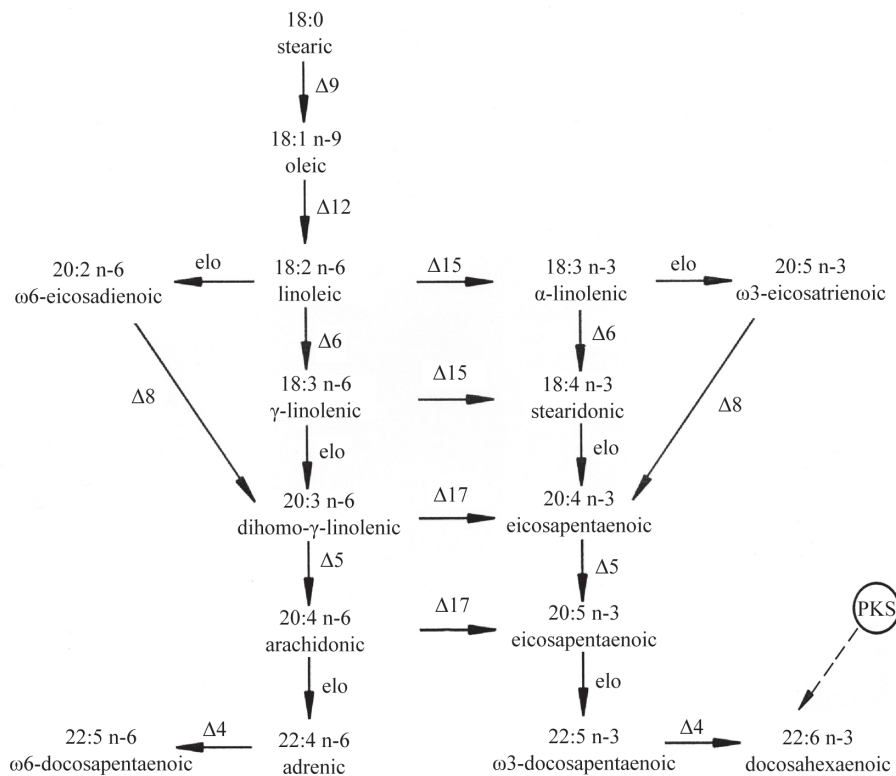


图1 低等真核生物多不饱和脂肪酸的生物合成

2 多不饱和脂肪酸对微生物低温生长的影响

Wada 等^[12]通过点突变的方法,使蓝细菌 (*Synechocystis* PCC 6803) Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶失活,导致细胞膜上 PUFAs 的合成受到抑制,改变了细胞膜磷脂组成,使细胞在 22 °C 培养时生长明显减慢。他们进一步把蓝细菌的 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因 *desA* 导入寒敏感的蓝细菌 *Anacystis nidulans* 中进行表达,结果 *A. nidulans* 中 LA 含量明显增加,对 5 °C 低温的抗性明显增强^[13]。Weinstein 等^[14]研究表明,低温培养提高一些真菌菌株细胞膜中 PUFAs 的含量,而且在长孢被孢霉 (*Mortierella elongata*) 中还产生了新的十八碳四烯酸 (steridonic acid, SDA, C18:4n-3),这种脂肪酸主要存在于寒冷地带的植物以及南极和其他寒冷海洋环境的微生物中。陆合等^[15]的研究表明,15 °C 培养根霉 (*Rhizopus* sp.) R31.6,细胞膜膜脂中 PUFAs,特别是 γ -亚麻酸 (γ -linolenic acid, GLA, C18-3n-6) 的含量明显提高。本实验室前期的工作也表明,产油丝状真菌深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) 的细胞膜中 PUFAs 的含量,随着培养温度降低而增加;通过 RNAi 方法抑制菌株 PUFAs 的合成,导致菌株在低温条件下 (15 °C) 生长明显减慢。这些研究表明,增加细胞膜中 PUFAs 的合成有助于提高菌株的低温生长适应能力,推测 PUFAs 在低温条件下能调节细胞膜的流动性或膜相活动,对维持细胞膜的正常功能以及细胞的低温生长起到重要的作用。

3 多不饱和脂肪酸对细胞膜低温流动性的影响

细胞膜流动性指的是构成细胞膜的脂类和蛋白质分子的运动性,是细胞膜的基本特性之一。细胞膜是生物体细胞与外部环境之间的界膜,其流动性是细胞膜功能和细胞生存所必需的,特别是对于细菌、真菌、原生生物、植物和鱼类等一些变温生物来说,调节细胞膜的流动性显得特别重要^[16-17]。细胞膜主要由脂类和蛋白质组成,膜结构具有液态镶嵌模型,膜脂成分变化会影响细胞膜的流动性,而且这种影响与膜脂中脂肪酸种类和组成有关,比如脂肪酸链的长度、脂肪酸的结构、顺式和反式脂肪酸比例和脂肪酸饱和度等^[16]。膜流动性的一个基本的生物物理学关键因素就是膜脂中饱和与不饱和脂肪酸的平衡,低温条件下多数微生物细胞通过改变细胞膜脂中脂肪酸组成来维持细胞膜的流动性。最常见的是通过提高细胞膜中脂肪酸脱氢酶对膜

脂中脂肪酸底物的催化作用,在膜脂的脂肪酸链中引入新的双键,提高脂肪酸的不饱和度,从而降低脂质双分子层中饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例,使膜脂的熔点降低,导致细胞膜的流动性提高,但在温度高的条件下则相反。这种通过改变膜脂中饱和与不饱和脂肪酸比例来维持正常细胞膜流动性的适应现象称为“恒黏适应性”(homeoviscous adaptation)^[18-19]。很多研究表明,在一定碳链长度和双键数量范围内,增加膜脂中脂肪链上双键的数目和 PUFAs 含量,对维持细胞膜在低温条件下细胞膜的流动性更加有利^[16,20]。

4 多不饱和脂肪酸对细胞膜膜蛋白的影响

作为细胞膜的另一主要组成成分,细胞膜膜蛋白在物质运输、信号转导、细胞识别和免疫等方面具有重要功能,而且膜蛋白与膜脂的相互作用对细胞膜的结构和功能具有重要的调节作用。细胞膜膜脂组成变化速率与膜蛋白对环境温度的感应程度有关^[21],而且细胞膜中不同区域膜蛋白的组成、表达水平、结构和功能与膜脂中 PUFAs 的组成和分布有关,影响细胞对低温环境的适应性^[3,16]。膜蛋白与膜脂的相互作用有助于脂质双分子层的稳定,而且这种相互作用受细胞膜的流动性和脂肪酸组成等因素影响^[3]。Kawamoto 等^[22]通过同源重组的方法构建海洋细菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 的 EPA 缺失突变株,进一步对缺失突变株的研究结果表明,EPA 缺乏导致菌株低温生长明显延迟,同时引起一些与信号转导、跨膜运输以及维持低温条件下膜结构和功能等相关的一些膜蛋白表达水平的提高和降低,而且抑制菌株部分膜蛋白的表达明显影响菌株低温生长。此外,*S. livingstonensis* Ac10 膜脂中缺乏 EPA 可能还影响一些膜蛋白的折叠、低温稳定性、横向分布和寡聚化。

5 多不饱和脂肪酸合成的低温调节机制

细胞感受外界温度下降的信号并将此信号向胞内传递然后激活相关基因的表达来增加膜脂中 PUFAs 的含量以适应低温环境,有关这方面的机制研究已引起研究者的极大兴趣。由于细菌的遗传机制相对简单,因此,在这方面的研究首先取得一些进展。Suzuki 等^[23-24]的研究表明,蓝细菌 (*Synechocystis* PCC 6803) 中存在一个由膜整合的感受蛋白激酶和胞质中反应调节蛋白组成的双组分信号转导系统 (two-component signal transduction system)-Hik33/

Rer1 系统来调节 Δ^{15} - 脂肪酸脱氢酶 (desB) 基因的表达 (图 2), 提高膜脂中的 α - 亚麻酸 (α -linolenic acid, ALA, C18-3n-3) 含量, 提高菌株低温环境的适应性。感受蛋白激酶 Hik33 由几个跨膜结构域、一个 N 端信号识别结构域和一个 C 端激酶功能域组成。在 ATP 存在时, 细菌中细胞膜流动性的降低可作为感觉低温的初级信号激活感受蛋白激酶 Hik33, 并将其自动磷酸化而激活, 激活后的 Hik33 进一步将磷酸基团通过 Hik19 传递给反应调节蛋白 Rer1, 进一步使 Rer1 磷酸化, 后者作为转录调节因子直接参与 Δ^{15} - 脂肪酸脱氢酶基因的表达, 提高了 ALA 的含量。因此, Hik33 和 Hik19 也称为温度感应器。然而, 进一步的研究发现, Hik33/Rer1 系统还与一些基因的低温诱导表达有关, 但对其他脂肪酸脱氢酶基因调节并不明显, 这可能与其它脂肪酸脱氢酶基因调节存在不同的温度感应器和调节系统有关^[24-25]。类似的调节系统还有枯草芽孢杆菌 DesK-DesR 系统^[26] 和大肠杆菌 CpxA-CpxR 系统^[27], 只不过这些系统激活的脂肪酸脱氢酶只利用饱和脂肪酸作为底物引入一个双键。

双组分信号转导系统广泛存在于原核和真核生物中, 对双组分信号系统的研究已经初步阐明低温条件下蓝细菌中 PUFAs 的合成受其调节, 但仍不清楚其他产 PUFAs 的细菌和真核生物, 特别是低等真核生物是否也通过类似的信号转导系统来响应外界温度变化并调节膜脂中脂肪酸组成。

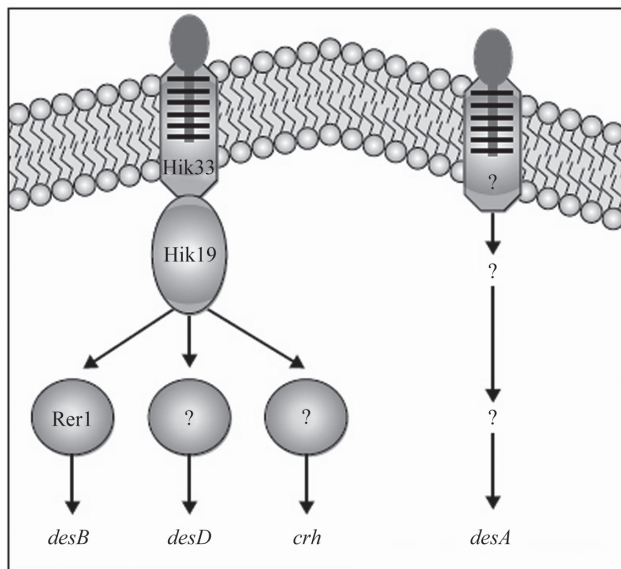


图2 蓝细菌中低温信号转导途径示意图

6 总结和展望

包括微生物在内的生物体对低温刺激的应答和适应过程极为复杂, 涉及细胞结构和组成的变化以及在分子水平形成多种适应机制等。从上述的分析中可以看出, 作为细胞膜膜脂的重要组成部分, PUFAs 通过影响微生物生长、细胞膜流动性及细胞膜蛋白的组成和表达水平等对微生物适应低温环境具有重要的功能。PUFAs 与微生物低温适应机制的关系研究也逐步成为热点, 但总体上进展缓慢, 目前只在少数几种细菌中证实双组分信号系统在细菌感应低温刺激并通过多级反应向内传递信号, 最终引起细胞膜膜脂中 PUFAs 的变化, 提高了菌株对低温环境的适应性。然而, 这些细菌中相应低温刺激并引起 PUFAs 合成变化的双组分信号系统中的分子组成不同, 也不清楚是否存在多个双组分信号系统之间的相互调节作用, 因此, 难以确定信号转导过程中的关键步骤, 而且目前也没有报道揭示细胞膜上感应蛋白如何感知膜流动性变化以及反应调节蛋白诱导基因表达的具体调节过程。此外, 对具有低温适应性的真核微生物来说, 是否存在类似的调节系统及其调节机制如何, 目前这方面的研究也未见报道。随着分子生物学研究的发展, 利用反向遗传学技术并结合基因组学、转录组学和蛋白质组学的研究方法将有助于解决这些问题, 最终揭示低温环境条件下 PUFAs 合成的调节机制及其与微生物低温适应性的关系。微生物是自然界中 PUFAs 的主要生产者, 因此, 了解 PUFAs 合成的调节机制有助于利用相关的调节过程, 为进一步的研究和工业化应用奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Lauro FM, McDougald D, Williams TJ, et al. A tale of two lifestyles: the genomic basis of trophic strategy in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(37): 15527-33
- [2] Ting L, Williams TJ, Cowley MJ, et al. Cold adaptation in the marine bacterium, *Sphingopyxis alaskensis*, assessed using quantitative proteomics. *Environ Microbiol*, 2010, 12(10): 2658-76
- [3] Kawamoto J, Kurihara T, Kitagawa M, et al. Proteomic studies of an Antarctic cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10, for global identification of cold-inducible proteins. *Extremophiles*, 2007, 11(6): 819-26
- [4] Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part I: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol*, 1997, 15(10): 401-9
- [5] 夏亚穆, 王伟, 王琦, 等. 海洋多不饱和脂肪酸生物活性的研究进展. *化学与生物工程*, 2008, 25(12): 13-6

- [6] Bureau DP, Hua K, Harris AM, et al. The effect of dietary lipid and long-chain n-3 PUFA levels on growth, energy utilization, carcass quality, and immune function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J World Aquacult Soc*, 2008, 39(1): 1-21
- [7] Muphy DJ, Piffaneth P. Fatty acid desaturase: structure mechanism and regulation[M]//Harwood JL. *Plant lipid biosynthesis: recent advances of agricultural importance*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998: 95-130
- [8] Vigh L, Maresca B, Harwood JL, et al. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(10): 369-74
- [9] Pereira SL, Leonard AE, Mukerji P, et al. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *PLEFA*, 2003, 68(2): 97-106
- [10] Metz JG, Roessler P, Facciotti D, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*, 2001, 293(5528): 290-3
- [11] Harwood JL. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1301(1-2): 7-56
- [12] Wada H, Murata N. *Synechocystis* PCC6803 mutants defective in desaturation of fatty acids. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30(7): 971-8
- [13] Wada H, Gombos Z, Murata N, et al. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature*, 1990, 347(6289): 200-3
- [14] Weinstein RN, Montiel PO, Johnstone K, et al. Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic. *Mycologia*, 2000, 92(2): 222-9
- [15] 陆合, 张学昆, 李加纳, 等. 逆境对真菌膜脂肪酸成分的影响. *微生物学杂志*, 2005, 25(2): 1-3
- [16] Chintalapati S, Kiran MD, Shivaji S, et al. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell Mol Biol*, 2004, 50(5): 631-42
- [17] Beney L, Gervais P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 57(1-2): 34-42
- [18] Sinensky M. Homeoviscous adaptation, a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(2): 522-5
- [19] Hamamoto T, Takata N, Kudo T, et al. Effect of temperature and growth phase on fatty acid composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain no. 5710. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 119(1-2): 77-82
- [20] Lee AG. How lipids and proteins interact in a membrane: a molecular approach. *Mol Biosyst*, 2005, 1(3): 203-12
- [21] van Dooremalen C, Ellers J. A moderate change in temperature induces changes in fatty acid composition of storage and membrane lipids in a soil arthropod. *J Insect Physiol*. 2010, 56(2): 178-84
- [22] Kawamoto J, Kurihara T, Yamamoto K, et al. Eicosapentaenoic acid plays a beneficial role in membrane organization and cell division of a cold-adapted bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10. *J Bacteriol*. 2009, 191(2): 632-40
- [23] Suzuki I, Los DA, Kanasaki Y, et al. The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J*, 2000, 19(6): 1327-34
- [24] Suzuki I, Kanasaki Y, Mikami K, et al. Cold-regulated genes under the control of cold sensor *hik33* in *Synechocystis*. *Mol Microbiol*, 2001, 40(1): 235-45
- [25] Browse J, Xin Z. Temperature sensing and cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol*, 2001(4): 241-6
- [26] Aguilar PS, Hernandez-Arriaga AM, Cybulski LE, et al. Molecular basis of thermosensing: a two-competent signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*, 2001, 20(7): 1681-91
- [27] Los DA, Suzuki I, Zinchenko VV, et al. Stress responses in *Synechocystis*: regulated genes and regulatory systems [M]//Herrero A, Flores E. *The cyanobacteria: molecular biology, genetics and evolution*. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2008: 117-58