

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0094 - 05

脂肪酶分子生物学的研究进展

邬显章¹, 邬敏辰²

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 医学系, 江苏 无锡 214063)

摘 要: 迄今为止已克隆了包括微生物和动植物在内的众多脂肪酶基因, 测定了它们的核苷酸序列, 从而确定了这些酶的一级结构. 作者重点就有关微生物脂肪酶的基因克隆、核苷酸及氨基酸序列分析和基因表达等分子生物学内容作一综述.

关键词: 脂肪酶; 克隆; 基因和氨基酸序列; 表达

中图分类号: TQ925.6

文献标识码: A

Review of Studies on Molecular Biology of Lipases

WU Xian-zhang, WU Min-chen

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Medical Department, Southern Yangtze University, Wuxi 214063, China)

Abstract: Up to now, many genes encoding lipases including those from microorganisms, animals and plants were cloned, and the lipase cDNA and DNA sequences were determined. In this paper, we reviewed mainly on molecular biology of microbial lipases, such as gene cloning, nucleotide and amino acid sequencing and analyzing, gene expression, and so on.

Key words: lipases; cloning; sequencing and analyzing; expression

脂肪酶(EC 3.1.1.3.)是分解三脂酰甘油的水解酶类,被水解底物三脂酰甘油的醇部分是丙三醇,酸部分为水不溶的 12 碳以上的长链饱和或不饱和脂肪酸,水解反应发生的部位是三脂酰甘油的酯键.其催化反应如下:

三脂酰甘油 + 水 $\xrightarrow{\text{脂肪酶}}$ 二脂酰甘油 + 脂肪酸

其中的二脂酰甘油可被进一步水解为一脂酰甘油、甘油和游离脂肪酸.有关脂肪酶(Lipase)较确切的定义是 20 世纪 70 年代由 Brockerhoff 等首先提出的,他将能水解长链脂肪酸酯或水解油酸酯类的酶类定义为脂肪酶.由于发现该定义易引起脂肪酶和酯酶的混淆, Huang 等随即将定义修改为一类能

催化特殊类型的酯键即三脂酰甘油的酯键水解的酶,或者从催化作用的可逆性考虑将脂肪酶定义为与高级脂肪酸和丙三醇所形成的三脂酰甘油的合成、转酯和分解有关的酶类;或简言之脂肪酶是催化油脂水解的一类酶的总称.按照国际生化联合会的命名分类原则,脂肪酶编号: EC 3.1.1.3. ,系统名称: 三脂酰甘油酰基水解酶;习惯名称: 脂肪酶.

脂肪酶的一个最显著的特点是它不同于其它多数水解酶的催化特性,即该酶催化的水解反应是一种非均相体系,水溶性的酶在底物(水不溶性)和水的界面上催化底物反应,对水溶性底物不起催化作用.

收稿日期: 2001 - 05 - 18; 修订日期: 2001 - 11 - 24.

基金项目: 国家“九五”科技攻关项目(96-C03-02-01)资助课题.

作者简介: 邬显章(1932 -)男,江苏无锡人,教授.

微生物脂肪酶作用于底物三脂酰甘油的方式因酶的类型而异. Alford 曾比较了 23 种不同的微生物脂肪酶, 发现有 3 种作用方式类型(见表 1), 其中, 大多数脂肪酶作用于三脂酰甘油的初级位(1, 3-位)酯键, 但葡萄球菌、黑曲霉和圆弧青霉等脂肪酶无位置专一性, 即能水解初级和次级位(2-位)的酯键; 白地霉脂肪酶则表现出另一种特殊的专一性, 即专一作用于油酸所形成的三脂酰甘油的酯键. 近年来, 不断有其它底物专一性的脂肪酶被发现, 例如, *Staphylococcus hyicus* 脂肪酶偏爱磷脂为底物, 也可以水解脂肪酸链长短不一的各种油脂; 相反, *Staphylococcus aureus* 脂肪酶专一作用于短链脂肪酸所形成的三脂酰甘油, 而中、长链脂肪酸形成的三脂酰甘油以及磷脂很难被水解.

表 1 各种微生物脂肪酶的主要作用类型

Tab.1 The Main Processing Types of Microbial Lipases on Substrates

底物专一性	脂肪酶来源
作用于 1 或 3 位酯键	霉实假单孢菌、荧光假单孢菌、解脂假丝酵母、巢子须霉、腐乳毛霉、娄地青霉、少孢根霉、费雷生刺枝霉、美丽异囊霉;
作用于 1、2 和 3 位酯键	金黄色葡萄球菌、黄曲霉;
作用于油酸形成的酯键	白地霉

另外存在一类较特殊的脂肪酶, 它仅作用于单脂酰或二脂酰甘油, 而对三脂酰甘油完全不起催化作用, 但它与三脂酰甘油脂肪酶(triacylglycerol lipase)一起使用时, 能协助或加速三脂酰甘油的彻底水解, 被称为单-双脂酰甘油脂肪酶(mono-diacylglycerol lipase). 例如, 来源于微生物真菌 *Penicillium camembertii* U-150 和 *Aspergillus oryzae* 的脂肪酶.

脂肪酶分子生物学的研究进展较快, 到目前为止已克隆了包括微生物和动植物在内的众多脂肪酶基因, 测定了它们的核苷酸序列, 从而确定了这些酶的氨基酸一级结构. 人胰脂肪酶(HPL)^[1]、*Rhizomucor miehei* 脂肪酶(RML)^[2]和 *Geo candidum* 脂肪酶^[3]等的蛋白晶体结构已经研究清楚. 对脂肪酶活性中心的研究发现, Ser-Asp-His 组成了一个有催化作用的三联体, HPL、RML 的立体结构也证明了这种三联体的存在. *Geo candidum* 脂肪酶的三联体是 Ser-Glu-His, 即 Glu 取代了 Asp. 上述 3 种脂肪酶中, 活性中心丝氨酸残基的侧链构象在空间结构方面与丝氨酸蛋白酶的非常相似, 所不同的是脂肪酶的活性中心隐藏在蛋白质内部. HPL、RML 的活性中心被一个亲水性的短 α -螺旋覆盖, *Geo candidum* 脂肪酶的

活性中心被两个平行的 α -螺旋覆盖. Brzowski 等证实 RML 与底物作用时, 覆盖活性中心的 α -螺旋发生了移动, 从而暴露了活性中心, 可以推测脂肪酶构象变化导致了酶的活化.

1 哺乳动物脂肪酶

从 cDNA 推导的人胰脂肪酶由 465 个氨基酸残基组成, 其中包括由 16 个氨基酸残基组成的信号肽^[4]. 该成熟蛋白一级结构分别与猪和狗胰脂肪酶有 85% 和 70% 的同源性, 其中猪和人胰脂肪酶中所有 14 个半胱氨酸都是保守的; 人胰脂肪酶是一种糖蛋白, 这与其一级结构在 Asn¹⁶⁷ 有一个糖基化位点是一致的. 猪和狗胰脂肪酶的两个糖基化位点分别在 Asn¹⁴⁰和 Asn¹⁶⁷.

人肝脏脂肪酶基因定位在第 15 号染色体长臂, 从 cDNA 推导的酶蛋白由 476 个氨基酸残基组成, 计算相对分子质量 53 249, 成熟蛋白 N 末端前面 23 个氨基酸组成信号肽. 该脂肪酶与哺乳动物肝脏脂肪酶、脂蛋白脂肪酶和胰脂肪酶等有两段相同的疏水结构域: Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly 和 Ser-(X)₆-Ser, 其中 Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly 被证明是结合脂肪的区域, 表 2 列举了某些哺乳动物脂肪酶的底物结合区域.

表 2 哺乳动物脂类水解酶的底物结合区域

Tab.2 Binding Substrates Region in Mammalian Lipase

动物脂肪酶	底物结合区域
人胰脂肪酶(HPL)	¹⁴⁶ N V H V I G H S L G A H A ¹⁵⁸
猪胰脂肪酶(PPL)	¹⁴⁵ N V H V I G H S L G S H A ¹⁵⁷
狗胰脂肪酶(DPL)	¹⁴⁷ Q V Q L I G H S L G A H V ¹⁵⁹
人肝脏脂肪酶(HHL)	¹³⁸ H V H L I G Y S L G A H V ¹⁵⁰
鼠肝脏脂肪酶(RHL)	¹⁴⁰ K V H L I G Y S L G A H V ¹⁵²
人脂蛋白脂肪酶(HLPL)	¹²⁵ N V H L L G Y S L G A H A ¹³⁷
鼠脂蛋白脂肪酶(MLPL)	¹²⁵ N V H L L G Y S L G A H A ¹³⁷
牛脂蛋白脂肪酶(BLPL)	¹²⁵ N V H L L G Y S L G A H A ¹³⁷
人胃脂肪酶(HGL)	¹⁴⁷ Q L H Y V G H S Q G T T I ¹⁵⁹
鼠舌脂肪酶(RLL)	¹⁶³ K I H Y V G H S Q G T T I ¹⁷⁵

2 细菌脂肪酶

有关细菌脂肪酶的分子生物学, 尤其是假单胞

菌属的研究最为深入,已测定了假单孢菌、葡萄球菌、链霉菌和枯草杆菌等众多的细菌脂肪酶基因序列和对应的氨基酸序列,其中某些基因已在相应的宿主中得到了表达。例如:*Staphylococcus hyicus subsp hyicus* 的脂肪酶基因已在 *Staphylococcus carnosus* 和 *Escherichia coli* 中进行了表达研究,重组脂肪酶为具有催化活性的胞外酶,克隆的 DNA 片段长度为 2.5 kb, DNA 序列分析确定了脂肪酶基因的位置、核糖体的结合位点、信号肽序列以及编码前蛋白 1923 个核苷酸的开放阅读框,在结构基因的 3' 末端存在 3 个连续的终止密码子和转录终止信号^[5];克隆了来源于 *Staphylococcus aureus* 的脂肪酶基因,并在 *Escherichia coli*、*Bacillus subtilis* 和 *S. carnosus* 中获得了表达^[6];分别克隆了来源于 *Alcaligenes denitrificans*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas fragi* 的脂肪酶基因,并在相应的宿主菌中获得了表达。

Pseudomonas alcaligenes M-1 产碱性脂肪酶,该酶具有极好地去除脂肪污垢和适合洗涤条件的特性,Gijs 等^[7]将该酶的结构基因在各种宿主菌中进行了表达,例如,*Bacillus licheniformis*、*Escherichia coli*、*Streptomyces lividans*、*Aspergillus niger*、*Kluyveromyces lactis*,但表达量都很低。进一步的研究发现与脂肪酶基因(lipA)相邻被称之为辅助基因(lipB)的 DNA 片段有关,lipB 对 lipA 的表达起重要的作用,将 lipA 和 lipB 一起克隆到多拷贝质粒 pJRD215 中,在原宿主菌中进行表达,脂肪酶产量比 *Pseudomonas alcaligenes* M-1 提高了近 40 倍。许多研究人员也发现了这一影响脂肪酶基因表达的辅助基因,分别被称为 lipH、limL 和 lif 等。Gijs 将 *P. alcaligenes*、*P. aeruginosa*、*P. glumae* 和 *P. cepacia* 脂肪酶辅助基因产物的氨基酸序列进行了比较,发现有较高的同源性。

来自于假单菌属 17 个种或株的脂肪酶基因已被克隆和测序,Gilbert 根据氨基酸序列的同源性将它们分为两组,这两组脂肪酶之间除了含有非常保守的脂肪酶活性中心保守序列(-Gly-X₁-Ser-X₂-Gly-)之外,无任何相似之处。

Frenken 等在前人研究的基础上,具体确定了 *Ps. glumae* 脂肪酶催化中心三组合 Ser-Asp-His 在一级结构中的位置。他们首先测定了 *Ps. glumae* PG1 脂肪酶的编码基因序列,然后构建了一系列的突变菌株,分别用其它氨基酸取代原催化中心三组合中的某一氨基酸,测定这一系列突变菌株所产脂肪酶的动力学常数,通过分析最后确定了 Ser⁸⁷、Asp²⁴¹ 和 His²⁸⁵ 三组合构成 *Ps. glumae* PG1 脂肪酶的活性催化中心。万方数据

Rollof 等研究了 *Staphylococcus aureus* 脂肪酶在体内的加工过程。许多 *Staphylococcus* 属的脂肪酶已被纯化,*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus hyicus* 的脂肪酶基因序列也已经被测定。*Staphylococcus aureus* 基因编码一个相对分子质量为 76 000 的蛋白质(包括信号肽),但从细胞外纯化的有活性的脂肪酶表观相对分子质量为 82 000,这可能是由于这个酶的亲水部分与疏水部分结合导致了酶在 SDS-PAGE 时的泳动速度降低,另外从细胞培养物上清液中可以纯化到比较稳定的相对分子质量在 45 000 ~ 46 000 的有活性的酶蛋白。当 *S. aureus* 在肉汤培养基中于 37 °C 培养时,6 h 就可以从上清液中检测到相对分子质量为 82 000 的有活性的酶蛋白,8 h 它的含量达到最大,此时相对分子质量为 45 000 ~ 46 000 的脂肪酶开始出现。继续温育含有细胞的培养液和不含细胞的上清液,相对分子质量为 82 000 的酶蛋白同步降解,最后形成 45 000 ~ 46 000 的脂肪酶及痕量 82 000 的酶蛋白。在整个转化过程中,用抗体可检测到相对分子质量介于 82 000 和 45 000 ~ 46 000 很宽的弥散条带并具有酶活性,说明在 82 000 脂肪酶加工过程中,随机产生了不同相对分子质量的过度态蛋白质,是一种多级的蛋白质加工过程。

由 *Bacillus subtilis* 脂肪酶基因编码的酶蛋白一级结构中不存在保守的五肽 Gly-X₁-Ser-X₂-Gly。通过与其它微生物和哺乳动物脂肪酶序列的同源性比较,*Bacillus subtilis* 脂肪酶中存在这样的保守五肽 Ala-X₁-Ser-X₂-Gly。普遍认为保守五肽中的 Ser 是一种亲核残基;参与水解机理的一个过程,是催化中心三组合 Ser/Asp/His 的成员之一;而 Ser 侧翼的 Gly 在酶的催化过程中所起的作用不大,推测其作用为增加保守五肽的柔韧性和减少空间障碍,以便底物能与催化中心更好地结合和催化水解。从保守五肽中的第一个 Gly 被突变为 Ala 而不改变酶的活性这一现象,就能解释上述的推测。

3 真菌脂肪酶

Rhizomucor miehei 脂肪酶由 269 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 29 472,这个酶的前体由 363 个氨基酸残基构成,其中 24 个氨基酸组成信号肽,70 个氨基酸作为前肽部分。天然酶在体内经修饰后有两种活性组分,它们的碳水化合物质量分数分别为 11% 和 4%。

Geotrichum 和 *Galactomyces* 各菌株分别具有编码同源性很高的 Lipase I 和 Lipase II 的不同脂肪酶基因,而 *Candida cylindracea* 具有 5 个不同的脂肪酶基

因 编码同源性在 80% 以上的 5 个脂肪酶^[8],该现象被称为脂肪酶基因的多态性.随后,Brocce 等报道了 *Candida rugosa* 同一菌株具有 7~10 个脂肪酶基因,编码众多的同功酶,它们之间的同源性在 70% 以上.对 *Candida rugosa* 所产各种脂肪酶同功酶的分纯化化和性质研究表明,不同的同功酶具有不同的生化性质和底物专一性.各种不同基因的表达和/或翻译后修饰直接导致了多种同功酶的存在.

国内外已报道了数十种真菌脂肪酶的基因序列,其中有些基因之间具有很高的同源性,另一些却没有或只有很低的同源性.已知基因序列的真菌包括 *Rhizomucor miehei*、*Geotrichum candidum*、*Humicola lanuginosa*、*Candida cylindracea*、*Penicillium camembertii*、*Penicillium cyclopium*、*Penicillium expansum*、*Rhizopus*、*Galactomyces geotrichum*、*Fusarium heterosporum*、*Aspergillus oryzae* 和 *Yarrowia lipolytica* 等霉菌和酵母属种.有些属内不同菌种的脂肪酶基因序列也已报道,例如,根霉属内的 *Rhizopus oryzae*、*Rhizopus arrhizus* (GenBank: AF229435)、*Rhizopus niveus* (GenBank: AB013496)、*Rhizopus delemar*、*Rhizopus javanicus* 等,这些基因所对应的成熟肽氨基酸序列之间最多只有 4 个氨基酸的差别.有些相同菌种但不同菌株的脂肪酶基因序列也有差异,例如 *Geotrichum candidum*,其不同菌株 ATCC 34614、NRCC 205002、NRRL Y-552 和 NRRL Y-552 等脂肪酶的一级结构之间有差别,而且就目前所知每个菌株分别具有两个不同的脂肪酶基因,但都具有很高的同源性^[9].另外,有些不同的菌株具有完全相同的脂肪酶基因或蛋白质一级结构,反之,同一菌株能产性质和一级结构完全不同的脂肪酶,例如 *Penicillium cyclopium* PG37 和 *Penicillium expansum* WMC 20718 这两个不同菌株,它们具有完全相同的碱性脂肪酶基因 (GenBank 登录号分别为 AF274320 和 AF288685).

作者采用 PCR 和 RT-PCR 技术分段扩增目的基因片段,然后将所克隆并测序的基因片段进行拼接,获得了多个完整的脂肪酶 cDNA 和 DNA 序列.其中:从同一个菌株 *Penicillium cyclopium* PG37 中克隆并测定了两个完全不同的脂肪酶基因 (GenBank 登录号分别为 AF274320 和 AF288219),分别编码 Triacylglycerol lipase Lip I 和 mono-diacylglycerol lipase,前者的一级结构与其它脂肪酶的同源性很低,与最

接近的 *H. lanuginosa* 脂肪酶仅有 25.6% 的同源性,说明是一种新的脂肪酶蛋白或基因,而后的基因或氨基酸序列与 *Penicillium camembertii* U-150 的完全相同;另外,利用扩增 PG37 DNA 的一对引物,从 *Penicillium expansum* WMC20718 的总 DNA 中扩增并克隆了一个碱性脂肪酶基因 (GenBank 登录号 AF288685),该 DNA 基因与 PG37 Lip I 基因的序列完全相同,说明不同菌种之间可能存在相同的脂肪酶基因.

Antoniar^[10]研究了当时已知序列的脂肪酶,指出除了 *P. fragi* 和 *R. miehei* 脂肪酶外,其它所有的脂肪酶都含有糖基化位点, N-X-T 或 N-X-S (其中 X 为除了 Pro 以外的任何氨基酸).寡糖通过 N-乙酰-D-氨基葡萄糖与 Asn 的氨基连接,或通过 N-乙酰-D-氨基半乳糖与 Ser 或 Thr 的羟基连接.但随着脂肪酶序列不断地被发现,不含糖基化位点的脂肪酶越来越多,例如, *Fusarium heterosporum*、*Penicillium cyclopium* 等.真核生物 mRNA 的成熟有一个剪接过程,一般将对应于成熟的 RNA 中尚存的 DNA 序列称为外显子,对应于切除的部分称为内含子.真菌脂肪酶基因中内含子的数目各不相同,对于有内含子的脂肪酶基因,其内含子的结构和剪接位置 (表 3) 与已确定的丝状真菌非常类似^[11].

目前,国内外已报道了几十个真菌脂肪酶的基因及氨基酸序列,其中有些基因或氨基酸序列之间具有很高的同源性,另外一些序列之间却没有或只有很低的同源性,但都没有一个整体的分析和研究.为了对真菌脂肪酶基因、蛋白质、结构与功能等方面有更全面和完整的认识,以及对今后新发现的基因或酶蛋白的归类,作者分析研究了几乎所有已报道的真菌脂肪酶基因和氨基酸序列,包括作者等最近发表的 *Pen. cyclopium* PG37 和 *Pen. expansum* WMC20718 脂肪酶蛋白质一级结构,然后根据它们蛋白质一级结构的同源性程度,对真菌脂肪酶氨基酸序列进行了比较和分类,构建了真菌脂肪酶的系统进化树,并对真菌脂肪酶的氨基酸和基因结构进行了分析.该分类研究工作目前在国内外均未见有报道^[12].

表 3 *Pen camembertii* U-150 *mdlA* 基因的内含子结构和剪接位置

Tab.3 Splice Signals within the Introns of the *mdlA* Gene from *Penicillium camembertii* U-150

内含子	5 '剪接位点	信号信点	间隔距离/bp	3 '剪接位点	长度/bp
I	G/GTACAT	TACTGAC	4	GGTTAG/A	56
II	A/GTAAAGT	TACTTAC	4	GCATAG/C	53
真菌的一致性	GTRNGT	YGCTAAC	0 ~ 22	YAG	< 100

注：R ,嘌呤碱核苷酸 ;Y ,嘧啶碱核苷酸 ;N ,任意核苷酸 ;斜线表示剪接点。

参考文献：

[1] WINKLER F K , ARCY A D , HUNZIKER W. Structure of human pancreatic lipase[J]. **Nature** , 1990 , 343 : 771 – 774.

[2] BRADY L , BRZOZOWSKI A M , DEREWENDA Z S. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase[J]. **Nature** , 1990 , 343 : 767 – 770.

[3] SCHRAG J D. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candium*[J]. **Nature** , 1991 , 351 : 761 – 764.

[4] LOWE M K , ROSENBLUM J R , STRAUSS A W. Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA[J]. **J Biol Chem** , 1989 , 264 : 20042 – 20048.

[5] GOTZ F , POPP F , KORN E , *et al.* Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*[J]. **Nucleic Acids Res** , 1985 , 13 : 5895 – 5906.

[6] LEE C Y. Mechanism of bacteriophage conversion of lipase activity in *Staphylococcus aureus*[J]. **J Bacteriol** , 1985 , 164 : 288 – 293.

[7] GIJS G , RONALD W J , WIM J Q. Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain [J]. **Appl Environ Microbiol** , 1998 , 64 : 2644 – 2651.

[8] LOTTI M , GRANDORI R , FUSETTI F , *et al.* Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences[J]. **Gene** , 1993 , 124 : 45 – 55.

[9] BERTOLINI N C , LARAMEE L , THOMAS Y T , *et al.* Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains[J]. **Eur J Biochem** , 1994 , 219 : 119 – 125.

[10] ANTONIAN E. Recent advances in the purification , characterization and structure determination of lipases[J]. **Lipids** , 1988 , 23 : 1101 – 1106.

[11] GURR S J , UNKLES S E , KINGHORN J R. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi[M]. Oxford : IRL Press , 1987.

[12] 邬敏辰. 脂肪酶基因结构和氨基酸序列的比较[J]. 江南学院学报 , 2001 , 1(2) : 1 – 5.

(责任编辑 杨 萌)