

· 专题论坛 ·

## 植物 $\omega$ -7脂肪酸的系统代谢工程

吴永美, 毛雪, 王书建, 薛金爱, 贾小云, 王计平, 杨致荣, 李润植\*

山西农业大学农业生物工程研究中心, 太谷 030801

**摘要**  $\omega$ -7脂肪酸(C16:1 $\Delta$ 9, C18:1 $\Delta$ 11, C20:1 $\Delta$ 13), 特别是棕榈油酸(C16:1 $\Delta$ 9)具有重要的工业、营养和医药价值。这些珍稀脂肪酸大多在一些野生植物的种子中合成, 不能商业化生产。对普通油料作物的油脂代谢途径进行遗传修饰, 使其种子大量合成并积累 $\omega$ -7脂肪酸, 已成为生物技术和可再生资源研究的一个热点领域。基因操作的主要靶标包括: 不同来源的 $\Delta$ 9脱氢酶的应用、提高底物(C16:0)的浓度、共表达质体型和内质网型 $\Delta$ 9脱氢酶以及代谢物流的优化等。该文在解析 $\omega$ -7脂肪酸生物合成途径及其调控网络的基础上, 重点论述了 $\omega$ -7脂肪酸代谢工程的技术策略、研究进展和存在的问题, 并进一步讨论了油脂组学和转基因组学等组学技术在鉴定参与 $\omega$ -7脂肪酸生物合成途径及其调控的特异基因和优化油脂代谢工程设计上的应用前景。

**关键词**  $\omega$ -7脂肪酸,  $\Delta$ 9脱氢酶, 代谢工程, 代谢物流

吴永美, 毛雪, 王书建, 薛金爱, 贾小云, 王计平, 杨致荣, 李润植 (2011). 植物 $\omega$ -7脂肪酸的系统代谢工程. 植物学报 46, 575–585.

油脂是人类饮食的必需品, 年人均约食用25 kg 油脂, 其中80%为大豆(*Glycine max*)、油菜(*Brassica campestris*)、向日葵(*Helianthus annuus*)、油棕(*Elaeis guineensis*)和棉花(*Gossypium* sp.)等油料作物的种子油(<http://www.ers.usda.gov/Briefing/SoybeansOilCrops/>)。植物种子油不仅为人类提供了基本的脂肪酸营养, 而且还具有保健功效和医药价值, 同时也是重要的工业原料和可再生资源。大田栽培的普通油料作物种子油的主要成分包括棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1 $\Delta$ 9)、亚油酸(C18:2 $\Delta$ 9,12)和亚麻酸(C18:3 $\Delta$ 9,12,15)。此外, 其它油料植物及一些野生植物的种子能够高水平合成并积累一些具有重要价值的稀有脂肪酸。例如, 蓖麻(*Ricinus communis*)种子含有90%的蓖麻油酸(C18:1 $\Delta$ 9, 12-OH), 油桐(*Vernicia fordii*)种子含有80%的桐油酸(C18:3 $\Delta$ 9 $trans$ ,10 $trans$ ,12 $cis$ )。加利福尼亚月桂树(*Umbellularia californica*)种子油中含有大约60%的月桂酸(C12:0)。据报道源于植物的脂肪酸多达200多种(van de Loo et al., 1993)。

脂肪酸的碳链长度、双键数目及位置决定着脂肪

酸的理化性质、烹饪特性及对人类健康的影响(刘立侠等, 2005; 石娟等, 2007)。因此, 不同用途的脂肪酸要求不同的碳链长度和双键数目(刘立侠等, 2005; 石娟等, 2007)。油料作物的种子油通常需经过一系列昂贵的加工过程, 才能符合食用要求, 但在种子油的加工过程中会产生一些对人体有害的反式脂肪酸和氢化脂肪酸。近年来, 为提高种子油的食用、医用和工业用价值以及便于加工和制作各种不同用途的植物油脂产品, 培育富含单一脂肪酸植物种子油的新种质(品种)已成为油料作物遗传改良和植物油脂代谢工程的一个新的热点研究领域(吴永美等, 2004; 刘立侠等, 2005; 岳爱琴等, 2007; 戴晓峰等, 2007; Damude and Kinney, 2008; Dyer and Mullen, 2008)。

棕榈油酸(C16:1 $\Delta$ 9)是一种由16个碳原子组成且含1个双键的 $\omega$ -7脂肪酸。棕榈油酸在营养、医药和工业上具有重要的应用价值。例如, 棕榈油酸可增加细胞膜的流动性、修饰细胞膜转运系统、减少血液中胆固醇含量、防止心律失常和抑制肿瘤发生(Akazawa et al., 2010; Misra et al., 2010)。它在治疗老年人中

收稿日期: 2011-04-06; 接受日期: 2011-07-17

基金项目: 国家自然科学基金(No.30971806)、国家教育部科技重点项目(No.2002-03)、山西省自然科学基金(No.2010011038-1)、山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划(No.201003)和山西农业大学育种基金(No.2005041)

\* 通讯作者。E-mail: rli2001@hotmail.com

风等疾病方面具有特殊价值。相反,棕榈酸则被证实可引起血液中胆固醇的含量升高,增加心脏疾病、乳腺癌、结肠癌和前列腺癌等疾病的发生率(Simonsen et al., 1998)。在工业上,新近发现棕榈油酸和顺式-11-十八碳烯酸(C18:1 $\Delta$ 11)等 $\omega$ -7脂肪酸可直接用于高效生产辛烯(Rybak and Meier, 2008; Meier, 2009)。辛烯是一种工业需求量较大的化工品,每年全球需求量高达50多万吨,主要用于线性低密度聚乙烯的工业生产。目前,辛烯主要源于石油的乙烯或煤基合成气(coal-derived syngas)(Michael et al., 2010)。

鉴于棕榈油酸等 $\omega$ -7脂肪酸在人类健康、医药上的独特价值以及可作为再生资源的重要性,有关植物棕榈油酸生物合成途径及遗传修饰的研究日渐增多,且取得了可喜进展(吴永美等, 2004; Nguyen et al., 2010)。近年来,本课题组相继开展了植物油脂代谢工程和大豆油脂遗传改良的研究(吴永美等, 2004; 王计平等, 2006; 岳爱琴等, 2007; Li et al., 2010a, 2010b),取得了一些成果。现结合我们对植物棕榈油酸合成机制以及转基因培育高含棕榈油酸大豆的研究,重点论述参与植物棕榈油酸等 $\omega$ -7脂肪酸的生物合成途径及其调控的一些关键酶基因,探讨应用系统代谢工程在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和油料作物种子中组装相关基因原件以及培育高效合成积累 $\omega$ -7脂肪酸新型油料作物的技术策略、存在问题和研究进展,并对其发展前景进行展望。

## 1 $\omega$ -7脂肪酸及其高含植物

植物 $\omega$ -7脂肪酸主要有棕榈油酸和顺式-11-十八碳烯酸(*cis*-vaccenic acid)。棕榈油酸化学名称为hexadec-9-enoic acid,别名为*cis*-palmitoleic acid和9-*cis*-hexadecenoic acid。研究表明,棕榈油酸是在 $\Delta$ 9脱氢酶的催化下,由棕榈酸转化而成。之后,在脂肪酸延伸酶1(fatty acid elongase 1, FAE1)的催化下,棕榈油酸增加2个C原子生成顺式-11-十八碳烯酸(图1)。在质体内,棕榈油酸则由脂肪酸合成酶II,即酮脂酰-ACP合成酶II(3-ketoacyl-ACP synthase II, KASII)催化生成顺式-11-十八碳烯酸。

大田栽培的油料作物种子仅含微量(<2%)的 $\omega$ -7脂肪酸,难以满足人类食用和工业的需求。然而,

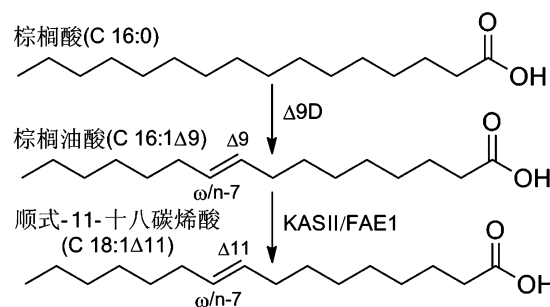


图1 两种主要的 $\omega$ -7脂肪酸及其酶促反应

$\Delta$ 9D:  $\Delta$ 9脱氢酶; KASII: 酮脂酰-ACP合成酶II; FAE1: 脂肪酸延伸酶1

Figure 1 Two major  $\omega$ -7 fatty acids and the enzymatic reactions

$\Delta$ 9D:  $\Delta$ 9 desaturases; KASII: 3-ketoacyl-ACP synthase II; FAE1: Fatty acid elongase 1

一些野生植物和藻类则能够高水平合成并积累棕榈油酸等 $\omega$ -7脂肪酸(表1)。例如,原产于亚马逊雨林、南美洲和中美洲等热带地区的木质藤本植物——猫爪草(花)(*Doxantha unguis-cati*)种子含有64%的棕榈油酸(Vickery, 1971)。另一种热带植物——澳洲坚果(*Macadamia integrifolia*)的棕榈油酸含量为30%,顺式-11-十八碳烯酸的含量为49.6%(Gummeson et al., 2000)。棕榈油酸含量最高的是山龙眼科植物——*Kermadecia sinuata*,其种子中含有70%的棕榈油酸(Vickery, 1971)。顺式-11-十八碳烯酸含量最高的是澳洲银橡树(*Grevillea robusta*),其含量高达62.7%。蓝藻中的席藻(*Phormidium* sp.)(NKBG041105)和颤藻(*Oscillatoria* sp.)细胞可积累高达54.5%的棕榈油酸(Matsunaga et al., 1995)。与其它在种子中高积累棕榈油酸的植物不同,沙棘(*Hippophae rhamnoides*)的种子仅含4.4%,但它的果肉中则可积累24.9%的棕榈油酸(Yang and Kallio, 2001)。沙棘果肉的油脂可分馏成液相(20%)和固相。液相可富集53%的棕榈油酸,固相中则多为棕榈酸(Gutiérrez and Belkacemi, 2008)。另外,通常情况下制取沙棘汁后的果渣常作为废物弃去。Klaas和Meurer(2004)研究发现,果渣(不含种子)中仍含有15%的棕榈油酸,经进一步萃取可制备棕榈油酸含量高达82%的油脂品。

在这些高积累 $\omega$ -7脂肪酸的野生植物中,目前,

表1 高积累 $\omega$ -7脂肪酸的植物  
Table 1 Natural high accumulator of  $\omega$ -7 fatty acids

种名	棕榈油酸 (C16:1 $\Delta$ 9) (%)	顺式-11-十八碳烯酸 (C18:1 $\Delta$ 11) (%)	器官	参考文献
<i>Doxantha unguis-cati</i>	64	15	种子	Vickery, 1971
<i>Hippophae rhamnoides</i>	53	10	果肉	Gutiérrez and Belkacemi, 2008
<i>Macadamia integrifolia</i>	30	49.6	种子	Gummeson et al., 2000
<i>Asclepias syriaca</i>	9	15	种子	Chisholm and Hoplins, 1960
<i>Grevillea robusta</i>	14.9	62.7	种子	Vickery, 1971
<i>Orites diversifolia</i>	40.4	37.5	种子	Vickery, 1971
<i>Gevuina avellana</i>	24.3	37.2	种子	Vickery, 1971
<i>Hicksbeachia pinnatifolia</i>	40.5	24.3	种子	Vickery, 1971
<i>Kermadecia sinuata</i>	70	5	种子	Vickery, 1971
<i>Phormidium</i> sp.	54.5	2.8	细胞	Matsunaga et al., 1995
<i>Oscillatoria</i> sp.	54.5	6.1	细胞	Matsunaga et al., 1995

只有澳洲坚果种子广泛用于 $\omega$ -7脂肪酸油脂食品工业。绝大多数因种子小、产量低和地理分布窄等原因, 还不能像普通油料作物那样, 大规模种植和商业化生产种子油。这些植物可用于深入研究棕榈油酸等 $\omega$ -7脂肪酸的生物合成积累机制, 并可为油料作物脂肪酸改良提供一些靶基因原件。

2  $\omega$ -7脂肪酸的生物合成途径

图2显示了 $\omega$ -7脂肪酸的生物合成途径及相关蛋白酶和亚细胞器。质体是发育种子中脂肪酸生物合成的主要场所。蔗糖是脂肪酸碳骨架的最初来源。叶片中合成的蔗糖运输到发育种子的细胞中, 经过一系列生化反应形成丙酮酸(Pyr)。丙酮酸进入质体, 在丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)催化下生成乙酰-CoA, 为脂肪酸合成提供了起始的2C分子。乙酰-CoA在乙酰-CoA羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的催化下加上1个羧基生成3C分子的丙二酰-CoA。接着, 在转酰基酶(transacylase, TA)的作用下, 丙二酸单酰基从CoA分子转移到酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)上, 形成丙二酸单酰-ACP。然后, 在脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FAS)复合体的作用下, 以丙二酸单酰-ACP为底物, 经过多次循环(每次循环使碳链增加2个碳原子), 直到饱和脂肪酸链长度达到16(C16:0)或18(C18:0)个碳原子为止(Ohlrogge and Jaworski, 1997)。

质体中脂肪酸合成酶复合体是酮脂酰-ACP合成

酶(3-ketoacyl-ACP synthase, KAS), 它包含3种主要酶分子。酮脂酰-ACP合成酶III(3-ketoacyl-ACP synthase III, KASIII)催化丙二酰-CoA和乙酰-CoA最初合成3-酮丁酰-ACP(4C链)。酮脂酰-ACP合成酶I(3-ketoacyl-ACP synthase I, KAS I)催化正在加长的酰基链与丙二酰-ACP聚合, 生成6C–16C脂肪酸。酮脂酰-ACP合成酶II催化丙二酰-ACP与棕榈酰-ACP(C16:0-ACP)的缩合, 生成18C脂肪酸(卢善发, 2000)。另一种重要的酶是硫酯酶(thioesterase, TE), 它能把正在延长的脂酰基侧链从ACP分子上解离下来, 从而终止脂肪酸碳链的延长。

在质体中合成的C16:0-ACP代谢有不同分支。其一是硫酯酶FatB将16C脂肪酸侧链从ACP上切割下来, 形成游离的16C脂肪酸(即棕榈酸), 从质体中转出。其二是C16:0-ACP在KASII作用下延长为硬脂酰-ACP(C18:0-ACP)。硬脂酰基在另一种硫酯酶FatA的作用下从ACP上分离, 生成18C:0而转出质体。C18:0-ACP也可在可溶性硬脂酰-ACP去饱和酶(C18:0-ACP- $\Delta$ 9D)的作用下, 在第9与第10个碳原子之间形成1个双键, 即形成油酰-ACP(C18:1 $\Delta$ 9-ACP)。再在FatA的作用下, 油酰基团从ACP分子上分离成为油酸后转出质体。其三是C16:0-ACP在C18:0/C16:0-ACP- $\Delta$ 9D催化下生成棕榈油酸-ACP(C16:1 $\Delta$ 9-ACP)( $\omega$ -7脂肪酸), 之后从ACP上分离, 转出质体。或者C16:1 $\Delta$ 9-ACP再经KASII催化加上2个C而生成另一种油酰-ACP(C18:1 $\Delta$ 11-ACP)(另一种 $\omega$ -7脂肪酸)。由此可见, C18:0/C16:0-ACP- $\Delta$ 9D、

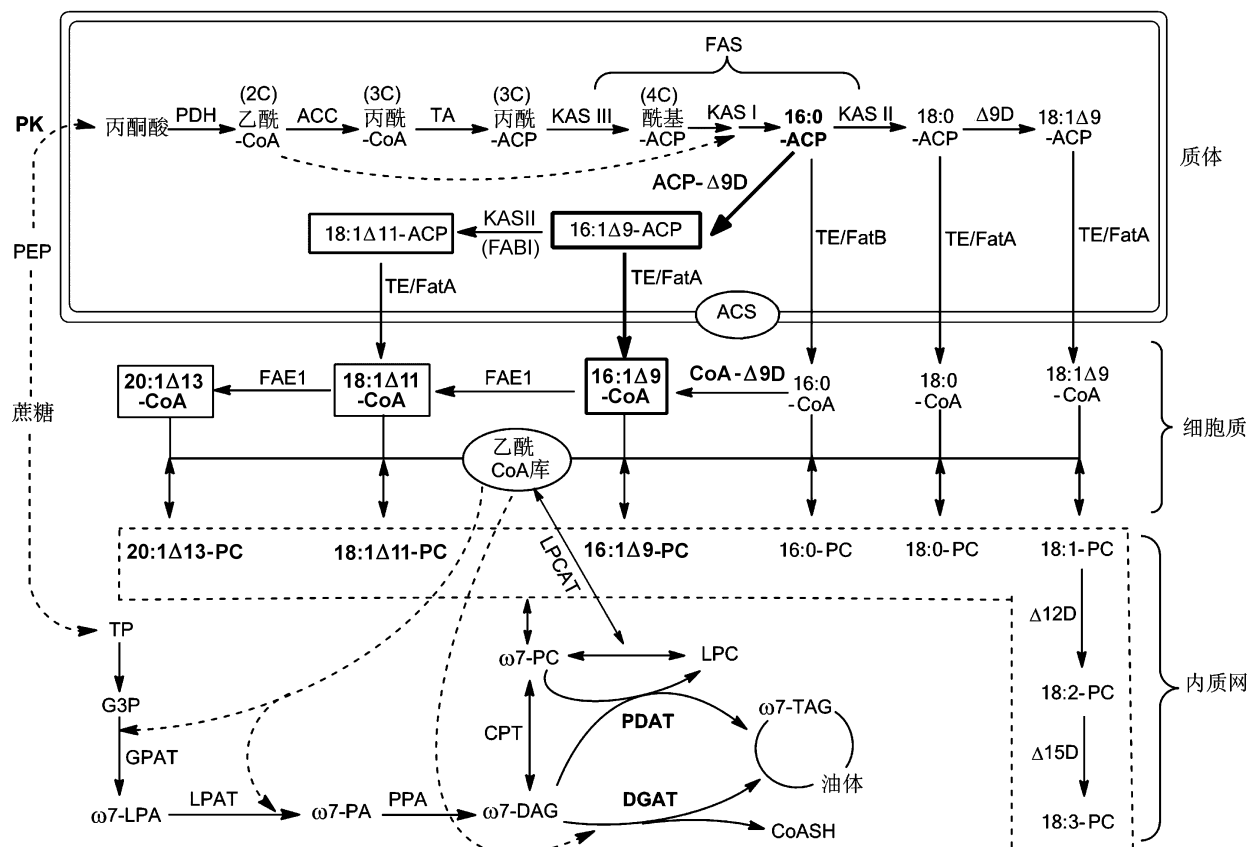


图2 植物种子中 $\omega$ -7脂肪酸的生物合成途径

ACC: 乙酰辅酶A羧化酶; ACP: 酰基载体蛋白; ACS: 酰基辅酶A合成酶; CoASH: 辅酶A; CPT: 转磷酸胆碱酶; DAG: 二酰甘油; DGAT: 二酰甘油酯转移酶; FAS: 脂肪酸合成酶; FAB1: 硬脂酰载体蛋白脱氢酶1; FAE1: 脂肪酸延伸酶1; FatA: 酰基载体蛋白硫酯酶A; FatB: 酰基载体蛋白硫酯酶B; GPAT: 甘油三磷酸酰基转移酶; G3P: 甘油三磷酸; KAS I: 酮酰-ACP合成酶I; KAS II: 酮酰-ACP合成酶II; KAS III: 酮酰-ACP合成酶III; LPA: 溶血磷脂酸; LPAT: 溶血磷脂酸酰基转移酶; LPC: 溶血磷脂酰胆碱; LPCAT: 溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶; PA: 磷脂酸; PC: 磷脂酰胆碱; PDAT: 磷脂酰胆碱二酰甘油转移酶; PDH: 丙酮酸脱氢酶; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; PK: 丙酮酸激酶; PPA: 磷脂磷酸酶; TA: 转酰基酶; TAG: 三酰甘油; TE: 硫酯酶; TP: 丙糖磷酸;  $\Delta$ 9D:  $\Delta$ 9脱氢酶;  $\Delta$ 12D: 油酸脱氢酶;  $\Delta$ 15D: 亚油酸脱氢酶; C16:0: 棕榈酸; C16:1 $\Delta$ 9: 棕榈油酸; C18:0: 硬脂酸; C18:1 $\Delta$ 9: 油酸; C18:1 $\Delta$ 11: 顺式-11-十八碳烯酸; C18:2: 亚油酸; C18:3: 亚麻酸; C20:1 $\Delta$ 13: 二十碳烯酸。方框所示的脂肪酸分别为连接于ACP和CoA分子的 $\omega$ -7脂肪酸; 方框线的粗度示意代谢物流量大小; 字体加粗的酶蛋白为目前 $\omega$ -7脂肪酸代谢工程的主要靶标分子。

Figure 2 Biosynthesis pathway of  $\omega$ -7 fatty acids in plant seeds

ACC: Acyl-CoA carboxylase; ACP: Acyl carrier protein; ACS: Acyl-CoA synthase; CoASH: Coenzyme A; CPT: Cholinephosphotransferase; DAG: Diacylglycerol; DGAT: Diacylglycerol acyltransferase; FAS: Fatty acid synthase; FAB1: Stearoyl-ACP desaturase; FAE1: Fatty acid elongase 1; FatA: Acyl-ACP thioesterase A; FatB: Acyl-ACP thioesterase B; GPAT: Glycerol-3 phosphate acyltransferase; G3P: Glycerol-3 phosphate; KAS I: 3-ketoacyl-ACP synthase I; KAS II: 3-ketoacyl-ACP synthase II; KAS III: 3-ketoacyl-ACP synthase III; LPA: Lysophosphatidic acid; LPAT: Lysophosphatidic acid acyltransferase; LPC: Lysophosphatidylcholine; LPCAT: Lysophosphatidylcholine acyltransferase; PA: Phosphatidic acid; PC: Phosphatidylcholine; PDAT: Phosphatidylcholine diacylglycerol acyltransferase; PDH: Pyruvate dehydrogenase; PEP: Phosphoenolpyruvate; PK: Pyruvate kinase; PPA: Phosphatidate phosphatase; TA: Transacylase; TAG: Triacylglycerol; TE: Thioesterase; TP: Triose phosphate;  $\Delta$ 9D:  $\Delta$ 9 desaturase;  $\Delta$ 12D:  $\Delta$ 12 desaturase;  $\Delta$ 15D:  $\Delta$ 15 desaturase; C16:0: Palmitic acid (hexadecanoate); C16:1 $\Delta$ 9: Palmitoleic acid (*cis*-9-hexadecenoate); C18:0: Stearic acid (octadecanoate); C18:1 $\Delta$ 9: Oleic acid (*cis*-9-octadecenoate); C18:1 $\Delta$ 11: *cis*-vacenic acid; C18:2: Linoleic acid (*cis*-9,12-octadecadienoate); C18:3: Linolenic acid (*cis*-9,12,15-octadecatrienoate); C20:1 $\Delta$ 13: *cis*-13-eicosenoic acid.  $\omega$ -7 fatty acids linked to ACP or CoA are boxed. The flux level of  $\omega$ -7 fatty acids are indicated with the thickness of box edge lines. Main target enzymes of  $\omega$ -7 fatty acid metabolic engineering are bolded.

KASII、FatB和FatA等是质体中 $\omega$ -7脂肪酸合成及转出的关键酶。

在质体中合成的 $\omega$ -7脂肪酸(C16:1 $\Delta$ 9-和C18:1 $\Delta$ 11-ACP)以及C16:0-、C18:0-和C18:1 $\Delta$ 9-ACP, 经不同硫酯酶催化从ACP分子上解离, 生成C16:1 $\Delta$ 9-、C18:1 $\Delta$ 11-、C16:0-、C18:0-和C18:1 $\Delta$ 9-, 接着在位于质体外膜的酰基-CoA合成酶(acyl-CoA synthase, ACS)作用下, 形成C16:1 $\Delta$ 9-、C18:1 $\Delta$ 11-、C16:0-、C18:0-和C18:1 $\Delta$ 9-CoA。这些脂肪酰基CoA从质体转运到细胞质的内质网(endoplasmic reticulum, ER)上, 与磷脂(phospholipids, PL)如磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)结合形成C16:1 $\Delta$ 9-、C18:1 $\Delta$ 11-、C16:0-、C18:0-和C18:1 $\Delta$ 9-PC。C16:0-PC在位于内质网的CoA-型 $\Delta$ 9D催化下转化为C16:1 $\Delta$ 9-PC, 之后经脂肪酸延伸酶作用生成C18:1 $\Delta$ 11-PC以及二十碳烯酸-PC(C20:1 $\Delta$ 13-PC)(均为 $\omega$ -7脂肪酸)。在普通油料作物的种子中, C16:0-PC通常先延长为C18:0-PC, 再去饱和生成C18:1 $\Delta$ 9-PC, 依次在 $\Delta$ 12脱氢酶( $\Delta$ 12D)和 $\Delta$ 15脱氢酶( $\Delta$ 15D)催化下生成C18:2 $\Delta$ 9, 12-PC和C18:3  $\Delta$ 9, 12, 15-PC。

这些结合于磷脂酰胆碱的 $\omega$ -7脂肪酸(C16:1 $\Delta$ 9, C18:1 $\Delta$ 11, C20:1 $\Delta$ 13)以及其它脂肪酸在一系列酰基转移酶的作用下, 最后转入3-磷酸甘油(3-phosphoglycerate, 3PG)分子形成三酰基甘油酯(triacylglycerol, TAG)。首先, 在3-磷酸甘油酰基转移酶(glycerol-3 phosphate acyltransferase, GPAT)和溶血性磷脂酸酰基酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAT)分别作用下, 脂肪酸碳链从各种脂肪酰基-CoA分子上转移到3PG的sn-1和sn-2位置上, 从而生成磷脂酸(phosphatidic acid, PA)。然后, PA分子上sn-3位的磷酸基被磷脂酸磷酸酶(phosphatidic acid phosphatase, PAP)切除, 形成二酰甘油酯(diacylglycerol, DAG)。再在二酰甘油酯转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT)的作用下, DAG的sn-3位置上再结合1个脂肪酸碳链形成TAG。与DGAT的作用机制不同, 磷脂二酰甘油酯转移酶(phosphatidylcholine diacylglycerol acyltransferase, PDAT)可直接将脂酰基从磷脂酰胆碱分子上转移至DAG, 从而合成TAG, 没有经过中间产物CoA(Stahl et al., 2004)。最后, 疏水性的TAG聚集在内质网脂质

双层膜结构的脂酰基区域。这些高含TAG的脂酰基区域形成“脂质凸起”, 进而从内质网膜中分离出来成为油体。

上述 $\omega$ -7脂肪酸的生物合成途径涉及各蛋白酶协同表达和共同运作, 是一个高度精密调控的生化过程。研究表明, 转录因子WRINKLED 1(WRI1)能够调控许多参与脂肪酸合成积累的酶活性(Masaki et al., 2005; Baud et al., 2007; Shen et al., 2010)。PC被认为是脂肪酸在质体中合成后, 最终形成TAG过程中的一个关键中间产物。在多聚不饱和脂肪酸的合成过程中, 与PC结合的脂肪酸是 $\Delta$ 6、 $\Delta$ 9、 $\Delta$ 12和 $\Delta$ 15脱氢酶的底物(Jackson et al., 1998; Lu et al., 2009)。此外, 脂肪酸在CoA和PC等中间产物库间的分布及转运机制亦对油脂合成积累有重要作用(Wallis and Browse, 2010)。参与TAG合成中最后一步酰基化反应的DGAT和PDAT是种子油合成积累的一个限速环节(Lung and Weselake, 2006)。特别是DGAT对一些稀有脂肪酸(如环氧化和羟化脂肪酸等)有特异性(Shockey et al., 2006; Burgal et al., 2008; Li et al., 2010a, 2010b)。这些因子在 $\omega$ -7脂肪酸合成途径中的详细作用机制目前尚不清楚。

### 3 $\omega$ -7脂肪酸生物合成的代谢工程

如上所述,  $\omega$ -7脂肪酸(C16:1 $\Delta$ 9、C18:1 $\Delta$ 11和C20:1 $\Delta$ 13)具有重要的工业、医药和营养价值。然而, 在普通油料作物种子中 $\omega$ -7脂肪酸的含量甚微, 高积累这些 $\omega$ -7脂肪酸的野生植物又不能用于商业化生产。因此, 近年来相继开展了应用代谢工程培育高水平合成积累 $\omega$ -7脂肪酸普通油料作物的研究。目前, 主要应用技术策略有: (1) 提高 $\omega$ -7脂肪酸合成前体化合物(如C16:0)的含量; (2) 在植物种子或组织中超表达催化 $\omega$ -7脂肪酸形成的酶(如 $\Delta$ 9D,  $\Delta$ 12D)基因; (3) 应用RNA干涉(RNAi)等技术沉默靶标基因以阻断 $\omega$ -7脂肪酸转化成其它脂肪酸。

#### 3.1 超表达源于动物和酵母的 $\Delta$ 9D

$\Delta$ 9D是以C16:0为底物催化生成C16:1 $\Delta$ 9的关键酶。植物细胞内有2种 $\Delta$ 9D, 其一是存在于质体的ACP- $\Delta$ 9D, 其二是存在于内质网的CoA- $\Delta$ 9D。迄今为止,

已分离并克隆了多种编码 $\Delta 9$ D的基因(Shanklin and Somerville, 1991; Cahoon and Ohlrogge, 1994; Cahoon et al., 1994a, 1994b, 1997; Kaup et al., 2002)。

早期用于转基因合成C16:1 $\Delta 9$ 的 $\Delta 9$ D基因源于动物和酵母。Grayburn等(1992)在烟草(*Nicotiana tabacum*)组织中组成型超表达了哺乳动物大鼠的CoA型 $\Delta 9$ D(即硬脂酰-CoA脱氢酶), 转基因烟草愈伤组织和叶片中C16:0含量减少, C16:1 $\Delta 9$ 的含量增加(Grayburn et al., 1992)。Liu等(1996)在大豆体细胞中用种子特异表达启动子驱动大鼠的硬脂酰-CoA脱氢酶表达, 转基因大豆体细胞中C16:0含量从25%减少到5%。相反, C16:1 $\Delta 9$ 的含量从0增加到10%。这些研究表明, 哺乳动物CoA型 $\Delta 9$ D可在植物组织中以C16:0为底物生成C16:1 $\Delta 9$ (但含量不高)。对转大鼠硬脂酰-CoA脱氢酶的烟草组织中脂肪酸在不同脂类分子及亚细胞分布的研究表明, 硬脂酰-CoA脱氢酶定位于内质网(Moon et al., 2000)。C16:1 $\Delta 9$ 多整合于膜脂分子的 $sn$ -1和 $sn$ -2位置。C18:1 $\Delta 11$ 则多整合在所检测脂类分子的 $sn$ -1位置。此外, C18:2在磷脂分子中的数量增加, 而C18:3则在除磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)外其它所检测的脂类分子中分布减少。与非转基因植物组织相比, 总16C脂肪酸分布于半乳糖脂分子的数量明显提高, 而在磷脂分子中的数量没有变化。此外, 研究还发现(Grayburn and Hildebrand, 1995), 一些表达大鼠硬脂酰-CoA脱氢酶的烟草植株能够大量合成十六碳烯酸(C16:1 $\Delta 7$ )而不是C16:1 $\Delta 9$ , 这表明 $\Delta 9$ D可能受到其它未知因子的影响, 具体为何种因子, 有待进一步研究。

在 $\omega$ -7脂肪酸代谢工程上应用较多的基因是酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) $\Delta 9$ D基因。Polashock等(1992)将依赖于内质网-细胞色素b5的酵母 $\Delta 9$ 脂肪酸脱氢酶基因转入烟草并高量表达, 与野生型(<2%)相比, 转基因植株叶组织中C16:1 $\Delta 9$ 的含量提高了10倍。亚细胞定位及生化分析发现, C16:1 $\Delta 9$ 在内质网上合成, 主要结合在磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、单半乳糖甘油二酯(monogalactosyl diglyceride, MGD)和二半乳糖甘油二酯(digalactosyl diglyceride, DGD)的 $sn$ -2位置上(Polashock et al., 1992)。说明宿主细胞中 $sn$ -2酰基转移酶对不饱和脂肪酸有特异的选择性, 而对脂肪酸

C链的长度无选择性。在矮牵牛(*Petunia hybrida*)叶组织中表达酵母 $\Delta 9$ D, 亦可导致叶组织中单不饱和脂肪酸C16:1 $\Delta 9$ 和C18:1 $\Delta 9$ 的含量提高(Choudhary et al., 1994)。以上这些转基因植物脂肪酸组成及含量发生了可检测的变化, 但植株生长发育等表型并未呈现出可见的改变。

与上述转基因植物不同, 高表达酵母 $\Delta 9$ D的转基因番茄(*Lycopersicon esculentum*), 除了C16:1、十六碳二烯酸(C16:2)和C18:1不饱和脂肪酸的含量增加外, 植株抵抗白粉病(*Erysiphe polygoni*)的能力也增强了。进一步分析认为这种抗病性的提高与C16:1和C16:2的含量升高有关(Wang et al., 1996)。与此类似, 高表达酵母 $\Delta 9$ D的转基因茄子(*Solanum melongena*), 也表现为C16:1、十六碳三烯酸(C16:3)和C18:1脂肪酸的含量上升及对黄萎病(*Verticillium dahliae*)抗性的增强(Xing and Chin, 2000)。当用黄萎病菌感染植株后, 与非转基因植株相比, 转基因植株组织中磷脂酶(phospholipase, PLA)和脂肪氧化酶(lipoxygenase, LOX)活性、游离脂肪酸含量及脂质过氧化物水平均表现为瞬时增加量更多。研究表明, C16:1 $\Delta 9$ 能够明显抑制黄萎病菌的生长。因此, 增加植物组织中C16:1 $\Delta 9$ 的含量也是提高植物抵抗真菌病害的一种途径。

### 3.2 超表达源于高积累 $\omega$ -7脂肪酸植物的 $\Delta 9$ D

如表1所示, 种子中高积累 $\omega$ -7脂肪酸的植物有热带植物猫爪草(55% C16:1 $\Delta 9$ , 17% C18:1 $\Delta 11$ )、马利筋属植物*Asclepias syriaca*(10% C16:1 $\Delta 9$ , 15% C18:1 $\Delta 11$ )和澳洲坚果(30% C16:1 $\Delta 9$ )等。理论上讲, 这些植物的 $\Delta 9$ D应该具有催化 $\omega$ -7脂肪酸合成的特异性。Cahoon等(1997)从*Asclepias syriaca*发育的种子中分离到编码ACP- $\Delta 9$ D(C18:0 $\Delta 9$ -ACP desaturase)的cDNA克隆(Cahoon et al., 1997)。离体及活体功能鉴定显示, 与其它已知C18:0 $\Delta 9$ -ACP脱氢酶相比, 该cDNA克隆的编码产物对C16:0-ACP底物有较高的特异性, 但对C18:0-ACP底物的特异性更强(高于C16:0-ACP的12倍)。然而, 从猫爪草发育种子中分离到的C16:0-ACP特异的ACP- $\Delta 9$ D基因克隆的编码产物对C18:0-ACP底物的特异性比C16:0-ACP低4倍(Cahoon et al., 1998)。这表明不同植物来源的ACP- $\Delta 9$ D对C16:0-和C18:0-ACP的选择性差异

较大。

与这2个ACP- $\Delta$ 9D功能鉴定结果相似,在表达 *Asclepias syriaca* ACP- $\Delta$ 9D的拟南芥中未检测到 $\omega$ -7脂肪酸的合成。而在表达猫爪草ACP- $\Delta$ 9D的拟南芥种子中新合成并积累了约10%的 $\omega$ -7脂肪酸(Nguyen et al., 2010)。Bondaruk等(2007)报道,将猫爪草编码C16:0-ACP特异的ACP- $\Delta$ 9D(C16:0-ACP- $\Delta$ 9D)的cDNA克隆导入模式植物拟南芥和油菜(*Brassica napus*),特异表达该基因的拟南芥和油菜种子中新合成并积累了 $\omega$ -7脂肪酸(Bondaruk et al., 2007)。总体上,C16:1 $\Delta$ 9以及它的延伸产物C18:1 $\Delta$ 11和C20:1 $\Delta$ 13的含量均提高了,但饱和脂肪酸(C16:0和C18:0)的含量并未减少,甚至有所上升。显然,靶标脂肪酸合成途径的下游步骤存在一些机制反馈作用于C16:0-ACP- $\Delta$ 9D。进一步对C16:1 $\Delta$ 9合成的下游步骤进行遗传修饰,有助于减少饱和脂肪酸的含量,提高C16:1 $\Delta$ 9的积累。另外,转基因拟南芥和油菜的脂肪酸组成变化也存在差异。在拟南芥种子中,C18:1 $\Delta$ 11和C20:1 $\Delta$ 13含量明显升高,而在油菜种子中未检测到这2种 $\omega$ -7脂肪酸。可见,模式植物拟南芥的特定脂肪酸代谢不完全适合油菜,不同植物在脂类合成及代谢的精细路径上是有差异的。

本实验室从一种食用蘑菇——平菇(*Pleurotus ostreatus*)中分离到特异作用于C16:0的 $\Delta$ 9DcDNA克隆,用种子特异启动子驱动 $\Delta$ 9D基因在大豆体细胞胚中表达,已获得棕榈油酸含量高达11%的转化体(王计平等, 2006)。目前正在筛选棕榈油酸含量高、无抗生素标记和遗传稳定的转基因纯合株系。

### 3.3 C16:0-ACP特异 $\Delta$ 9D的筛选和应用

上述转基因表达不同来源的 $\Delta$ 9D的研究显示,尽管转基因植物合成积累了 $\omega$ -7脂肪酸,但含量远远低于高积累 $\omega$ -7脂肪酸的植物种子。其原因一方面可能是所用的 $\Delta$ 9D对C16:0-ACP或C16:0-CoA的特异性不强,另一方面可能是宿主细胞中脂类代谢途径的差异或其它因子的影响。因此,一些研究开始对已有的 $\Delta$ 9D进行突变,以期能筛选到对C16:0-ACP或C16:0-CoA的特异性更加优化的 $\Delta$ 9D突变体。Cahoon等(1998)根据Acyl-ACP- $\Delta$ 9D家族底物结合区的序列及三维结构特征,通过点突变技术获得了蓖麻C18:0-ACP- $\Delta$ 9D的氨基酸残基1118w突变体。该点突变体对

C16:0-ACP的特异性显著高于C18:0-ACP,而蓖麻野生型的C18:0-ACP- $\Delta$ 9D仅对C16:0-ACP有微弱的底物特异性。说明通过对特定氨基酸进行点突变可以获得对C16:0-ACP有特异性的C18:0-ACP- $\Delta$ 9D(Cahoon et al., 1998)。

Whittle和Shanklin(2001)进一步应用饱和突变体和酶进化实验,构建了蓖麻C18:0-ACP- $\Delta$ 9D的突变群体,从中筛选出对C16:0-ACP有较高特异性的突变体(Whittle and Shanklin, 2001)。其中,com25突变体对底物C16:0-ACP特异性的各项酶学参数最优。将com25突变体在野生型拟南芥种子中特异表达,并使其进入质体内行使功能,可使种子中 $\omega$ -7脂肪酸的含量增加到约14%(2% C16:1 $\Delta$ 9, 12% C18:1 $\Delta$ 11)(Nguyen et al., 2010)。可见,分离特异作用于C16:0-ACP的 $\Delta$ 9D基因或构建C16:0-ACP特异的 $\Delta$ 9D突变体,是 $\omega$ -7脂肪酸代谢工程的重要环节。

### 3.4 提高 $\Delta$ 9D底物C16:0-ACP的含量

由图2可知,在质体中KASII能够催化C16:0-ACP生成C18:0-ACP。显然,在脂肪酸代谢过程中,KASII和导入的外源 $\Delta$ 9D对底物C16:0-ACP形成竞争。沉默KASII基因的功能,可使底物C16:0-ACP的含量增加,进而有利于 $\Delta$ 9D将更多的C16:0-ACP转化为C16:1 $\Delta$ 9-ACP。拟南芥KASII突变体fab1(James and Dooner, 1990)种子中C16:0的含量为野生型的2.1倍。以该突变体为转基因受体,超量表达上述 $\Delta$ 9D突变体com25,合成积累的 $\omega$ -7脂肪酸高达39%(23% C16:1 $\Delta$ 9, 16% C18:1 $\Delta$ 11)(Nguyen et al., 2010)。用RNAi技术沉默拟南芥KASII基因亦可获得高积累C16:0的突变体(Nguyen and Shanklin, 2009)。本实验室目前正对C16:0-ACP合成的上游基因进行操作,以期提高C16:0的初始合成量。

### 3.5 共表达质体ACP-和内质网CoA- $\Delta$ 9D

ACP-和CoA- $\Delta$ 9D分别在质体和内质网上行使功能。在质体中合成的C16:0-ACP并非全部被ACP- $\Delta$ 9D转化成C16:1 $\Delta$ 9-ACP,有相当一部分会转出质体,以C16:0-CoA形式存在于内质网上。提高内质网上CoA- $\Delta$ 9D的活性,可使内质网上更多的C16:0-CoA转化为C16:1 $\Delta$ 9。以高积累C16:0的拟南芥突变体为受体,在细胞质中超表达2种源于真菌的CoA- $\Delta$ 9D(AnD9D和

SnD9D), 转基因种子中合成积累的 $\omega$ -7脂肪酸可高达 36%(18%C16:1 $\Delta$ 9, 18%C18:1 $\Delta$ 11)(Nguyen et al., 2010)。在上述表达2个CoA- $\Delta$ 9D的拟南芥突变体(高含C16:0)转基因植株中, 再导入可在质体中行使功能的蓖麻ACP- $\Delta$ 9D突变体*com25*, 转基因种子中合成积累的 $\omega$ -7脂肪酸平均可达66%(43.1%C16:1 $\Delta$ 9, 23.2%C18:1 $\Delta$ 11)(Nguyen et al., 2010)。但是, 饱和脂肪酸C16:0的含量还有11%。这一整合多个基因修饰的策略能否应用于普通油料作物, 以大幅度提高 $\omega$ -7脂肪酸的合成积累尚需进一步研究。

### 3.6 优化 $\omega$ -7脂肪酸转运至TAG的代谢物流

从图2可以看出,  $\omega$ -7脂肪酸从合成位点转运并最终整合入TAG分子, 需要经过在不同中间产物(如CoA、PC、PE、MGD和DAG)库间的有效转运。这涉及包括酰基转移酶在内的多种酶依次有序催化。高含 $\omega$ -7脂肪酸的野生植物, 经过长期进化, 形成了某种未知机制, 以确保合成的 $\omega$ -7脂肪酸被特异选择和有效转运直到形成TAG。对其它稀有脂肪酸的代谢工程研究表明, 参与TAG形成最后一步酰基化反应的DGAT在特异选择积累稀有脂肪酸机制中起重要作用(Li et al., 2010a)。

本实验室最近从猫爪草(花)发育种子中分离到编码对C16:1 $\Delta$ 9有选择性的DGAT的cDNA克隆, 构建了种子特异表达该cDNA以及在质体中作用的 $\Delta$ 9D的载体。用基因枪法将这2个表达盒导入大豆的胚性细胞, 获得了成熟的转基因大豆体细胞胚。脂肪酸成分测定显示(图3), 转基因体细胞胚新合成积累了C16:1 $\Delta$ 9。 $\Delta$ 9D转基因体细胞胚C16:1 $\Delta$ 9的含量平均为12%, 而 $\Delta$ 9D与DGAT双转基因体细胞胚C16:1 $\Delta$ 9的含量平均上升到19%。这些数据显示, 导入C16:1 $\Delta$ 9特异的DGAT, 能加速 $\Delta$ 9D催化合成的C16:1 $\Delta$ 9有效转运并整合到TAG分子上, 进而提高 $\omega$ -7脂肪酸的积累。

## 4 研究展望

综上所述,  $\omega$ -7脂肪酸既是人类营养所需的健康有益型脂肪酸, 又是工业用重要化合物(辛烯)的来源。应用模式植物拟南芥和普通油料作物(如油菜和大豆)进行 $\omega$ -7脂肪酸代谢工程研究已取得了有益的进展。

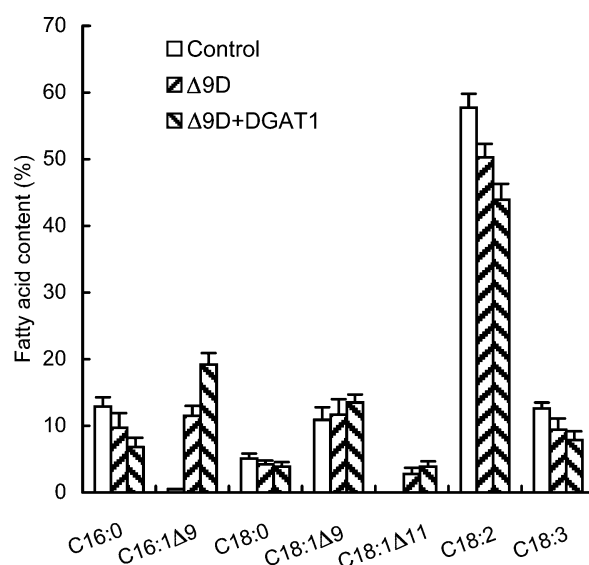


图3 转基因大豆体细胞胚中的脂肪酸含量分析(平均值 $\pm$ 标准差)

对照(Control): 非转基因大豆的体细胞胚;  $\Delta$ 9D: 表达 $\Delta$ 9脱氢酶基因的大豆体细胞胚;  $\Delta$ 9D+DGAT1: 共表达 $\Delta$ 9D和DGAT1基因的大豆体细胞胚。采用气相色谱法分析样品中的脂肪酸并计算其含量。C16:0、C16:1 $\Delta$ 9、C18:0、C18:1 $\Delta$ 9、C18:1 $\Delta$ 11、C18:2和C18:3同图2。

Figure 3 Fatty acid profiles in the transgenic soybean somatic embryos (means $\pm$ SD)

Control: Non-transgenic soybean somatic embryo (SSE);  $\Delta$ 9D: SSE expressing the  $\Delta$ 9 desaturase;  $\Delta$ 9D+DGAT1: SSE co-expressing the  $\Delta$ 9D and the DGAT1. The fatty acid methyl esters are analyzed by gas chromatography (GC). C16:0, C16:1 $\Delta$ 9, C18:0, C18:1 $\Delta$ 9, C18:1 $\Delta$ 11, C18:2 and C18:3 are the same as noted for Figure 2.

特别是已培育成功 $\omega$ -7脂肪酸含量高的拟南芥工程株系, 其种子中 $\omega$ -7脂肪酸的含量接近高积累 $\omega$ -7脂肪酸的野生植物种子。但是, 拟南芥不能像大田油料作物一样种植和用于工业化生产 $\omega$ -7脂肪酸。普通油料作物的 $\omega$ -7脂肪酸代谢工程尚未取得突破, 且所获得的转基因种子合成的 $\omega$ -7脂肪酸含量尚未达到商业化生产要求。

未来普通油料作物 $\omega$ -7脂肪酸代谢工程的优化依赖于对植物 $\omega$ -7脂肪酸生物合成途径及其调控网络的全面认识。已有的 $\omega$ -7脂肪酸转基因普通油料作物株系和高积累 $\omega$ -7脂肪酸的野生植物为深入解析 $\omega$ -7脂



肪酸生物合成的分子机制提供了良好的植物材料。比较分析拟南芥、大豆和蓖麻基因组及功能基因组的已有信息, 结合应用油脂物组学、转录组学和转基因组学的研究技术, 分离和鉴定参与 $\omega$ -7脂肪酸生物合成的酶基因和调控基因, 阐明普通油料作物和高积累 $\omega$ -7脂肪酸植物油脂合成的代谢途径和机制的特异性, 将使人们能够更加合理地组装相关基因和代谢途径, 培育可用于商业化生产 $\omega$ -7脂肪酸的普通油料作物。

## 参考文献

- 戴晓峰, 肖玲, 武玉花, 吴刚, 卢长明 (2007). 植物脂肪酸去饱和酶及其编码基因研究进展. *植物学通报* **24**, 105–113.
- 刘立侠, 柳青, 许守民 (2005). 基因工程在改善植物油营养价值中的应用. *植物学通报* **22**, 623–631.
- 卢善发 (2000). 植物脂肪酸的生物合成与基因工程. *植物学通报* **17**, 481–491.
- 石娟, 朱葆华, 潘克厚 (2007). 转基因植物生产超长链多不饱和脂肪酸研究进展. *植物学通报* **24**, 659–666.
- 王计平, 史华平, 李润植 (2006). 植物种子油合成的调控与遗传修饰. *植物遗传资源学报* **7**, 488–493.
- 吴永美, 毛雪, 王书建, 李润植 (2004). 转基因改良植物的营养价值. *生物工程学报* **20**, 471–476.
- 岳爱琴, 李润植 (2009). 新型可再生工业用油脂的代谢工程. *中国生物化学与分子生物学学报* **25**, 501–509.
- 岳爱琴, 孙希平, 李润植 (2007). 食用植物油脂的代谢工程. *植物生理与分子生物学学报* **3**, 489–498.
- Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, Charlton MR, Gores GJ (2010). Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol* **52**, 586–593.
- Baud S, Mendoza MS, To A, Harscoët E, Lepiniec L, Dubreucq B (2007). WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in Arabidopsis. *Plant J* **50**, 825–838.
- Bondaruk M, Johnson S, Degafu A, Boora P, Bilodeau P, Morris J, Wiehler W, Foroud N, Weselake R, Shah S (2007). Expression of a cDNA encoding palmitoyl-acyl carrier protein desaturase from cat's claw (*Doxantha unguis-cati* L.) in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* leads to accumulation of unusual unsaturated fatty acids and increased stearic acid content in the seed oil. *Plant Breed* **126**, 186–194.
- Burgal J, Shockey J, Lu CF, Dyer J, Larson T, Graham I, Browse J (2008). Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnol J* **6**, 819–831.
- Cahoon EB, Coughlan SJ, Shanklin J (1997). Characterization of a structurally and functionally diverged acyl-acyl carrier protein desaturase from milkweed seed. *Plant Mol Biol* **33**, 1105–1110.
- Cahoon EB, Cranmer AM, Shanklin J, Ohlrogge JB (1994a).  $\Delta 6$  hexadecenoic acid is synthesized by the activity of a soluble  $\Delta 6$  palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm. *J Biol Chem* **269**, 27519–27526.
- Cahoon EB, Dörmann P, Ohlrogge JB (1994b). Petroselinic acid biosynthesis and production in transgenic plants. *Prog Lipid Res* **33**, 155–163.
- Cahoon EB, Ohlrogge JB (1994). Apparent role of phosphatidylcholine in the metabolism of petroselinic acid in developing Umbelliferae endosperm. *Plant Physiol* **104**, 845–855.
- Cahoon EB, Shah S, Shanklin J, Browse J (1998). A determinant of substrate specificity predicted from the acyl-acyl carrier protein desaturase of developing cat's claw seed. *Plant Physiol* **117**, 593–598.
- Chisholm MJ, Hoplins CY (1960). 11-octadecenoic acid and other fatty acid of *Asclepias syriaca* seed oil. *Can J Chem* **38**, 805–812.
- Choudhary ML, Chin CK, Polashock JJ, Martin CE (1994). *Agrobacterium* mediated transformation of *Petunia hybrida* with yeast  $\Delta 9$  fatty acid desaturase. *Plant Growth Regul* **15**, 113–116.
- Damude HG, Kinney AJ (2008). Engineering oilseeds to produce nutritional fatty acids. *Physiol Plant* **132**, 1–10.
- Dyer JM, Mullen RT (2008). Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: the need for underpinning cell biology research. *Physiol Plant* **132**, 11–22.
- Grayburn WS, Collins GB, Hildebrand DF (1992). Fatty acid alteration by a  $\Delta 9$  desaturase in transgenic tobacco tissue. *Biotechnology* **10**, 675–678.
- Grayburn WS, Hildebrand DF (1995). Progeny analysis of tobacco that express a mammalian  $\Delta 9$  desaturase. *J Am Oil Chem Soc* **72**, 317–321.
- Gummeson PO, Lenman M, Lee M, Singh S, Stymne S (2000). Characterisation of acyl-ACP desaturases from *Macadamia integrifolia* Maiden & Betche and *Nerium*

- oleander* L. *Plant Sci* **154**, 53–60.
- Gutiérrez LF, Belkacemi K** (2008). Palmitoleic acid enrichment of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pulp oil by crystallization process. *Sep Sci Technol* **43**, 2003–2022.
- Jackson FM, Michaelson L, Fraser TCM, Stobart AK, Griffiths G** (1998). Biosynthesis of triacylglycerol in the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Microbiology-Sgm* **144**, 2639–2645.
- James DW, Dooner HK** (1990). Isolation of EMS-induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty-acid composition. *Theor Appl Genet* **80**, 241–245.
- Kaup MT, Froese CD, Thompson JE** (2002). A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol* **129**, 1616–1626.
- Klaas MRG, Meurer PU** (2004). A palmitoleic acid ester concentrate from seabuckthorn pomace. *Eur J Lipid Sci Tech* **106**, 412–416.
- Li RZ, Yu KS, Hatanaka T, Hildebrand DF** (2010a). Vernonia DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotech J* **8**, 184–195.
- Li RZ, Yu KS, Hildebrand DF** (2010b). *DGAT1*, *DGAT2* and *PDAT* expression in seeds and other tissues of epoxy and hydroxy fatty acid accumulating plants. *Lipids* **45**, 145–157.
- Liu W, Torisky RS, McAllister KP, Avdiushko S, Hildebrand D, Collins GB** (1996). A mammalian desaturase gene lowers saturated fatty acid levels in transgenic soybean embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **47**, 33–42.
- Lu CF, Xin ZG, Ren ZH, Miquel M, Browse J** (2009). An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *ROD1* gene of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 18837–18842.
- Lung SC, Weselake RJ** (2006). Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* **41**, 1073–1088.
- Masaki T, Mitsui N, Tsukagoshi H, Nishii T, Morikami A, Nakamura K** (2005). ACTIVATOR of *Spo<sup>min</sup>::LUC1/WRINKLED1* of a *Arabidopsis thaliana* transactivates sugar-inducible promoters. *Plant Cell Physiol* **46**, 547–556.
- Matsunaga T, Takeyama H, Miura Y, Yamazaki T, Furuya H, Sode K** (1995). Screening of marine cyanobacteria for high palmitoleic acid production. *FEMS Microbiol Lett* **133**, 137–141.
- Meier MAR** (2009). Metathesis with oleochemicals: new approaches for the utilization of plant oils as renewable resources in polymer science. *Macromol Chem Phys* **210**, 1073–1079.
- Michael BC, Nare DN, Schmidt LD** (2010). Catalytic partial oxidation of ethane to ethylene and syngas over Rh and Pt coated monoliths: spatial profiles of temperature and composition. *Chem Eng Sci* **65**, 3893–3902.
- Misra A, Singhal N, Khurana L** (2010). Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils. *J Am Coll Nutr* **29**, S289–S301.
- Moon H, Hazebroek J, Hildebrand DF** (2000). Changes in fatty acid composition in plant tissues expressing a mammalian  $\Delta 9$  desaturase. *Lipids* **35**, 471–479.
- Nguyen HT, Mishra G, Whittle E, Pidkowich MS, Bevan SA, Merlo AO, Walsh TA, Shanklin J** (2010). Metabolic engineering of seeds can achieve levels of  $\omega$ -7 fatty acids comparable with the highest levels found in natural plant sources. *Plant Physiol* **154**, 1897–1904.
- Nguyen T, Shanklin J** (2009). Altering *Arabidopsis* oilseed composition by a combined antisense-hairpin RNAi gene suppression approach. *J Am Oil Chem Soc* **86**, 41–49.
- Ohlrogge JB, Jaworski JG** (1997). Regulation of fatty acid synthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 109–136.
- Polashock JJ, Chin CK, Martin CE** (1992). Expression of the yeast  $\Delta$ -9 fatty acid desaturase in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* **100**, 894–901.
- Rybak A, Meier MAR** (2008). Acyclic diene metathesis with a monomer from renewable resources: control of molecular weight and one-step preparation of block copolymers. *ChemSusChem* **1**, 542–547.
- Shanklin J, Somerville C** (1991). Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 2510–2514.
- Shen B, Allen WB, Zheng PZ, Li CJ, Glassman K, Ranch J, Nubel D, Tarczynski MC** (2010). Expression of *ZmLEC1* and *ZmWRI1* increases seed oil production in maize. *Plant Physiol* **153**, 980–987.
- Shockey JM, Gidda SK, Chapital DC, Kuan JC, Dhanoa PK, Bland JM, Rothstein SJ, Mullen RT, Dyer JM** (2006). Tung tree *DGAT1* and *DGAT2* have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **18**, 2294–2313.
- Simonsen NR, Fernandez-Crehuet Navajas J, Martin-Moreno JM, Strain JJ, Huttunen JK, Martin BC, Thamm M, Kardinaal AF, van't Veer P, Kok FJ,**

- Kohlmeier L** (1998). Tissue stores of individual mono-unsaturated fatty acids and breast cancer: the EURAMIC study. *Am J Clin Nutr* **68**, 134–141.
- Ståhl U, Carlsson AS, Lenman M, Dahlqvist A, Huang BQ, Banaś W, Banaś A, Stymne S** (2004). Cloning and functional characterization of a phospholipid: diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 1324–1335.
- van de Loo FJ, Fox BG, Somerville C** (1993). Unusual fatty acids. In: Moore JTS, ed. *Lipid Metabolism in Plants*. Boca Raton: CRC Press. pp. 91–126.
- Vickery JR** (1971). The fatty acid composition of the seed oils of proteaceae: a chemotaxonomic study. *Phytochemistry* **10**, 123–130.
- Wallis JG, Browse J** (2010). Lipid biochemists salute the genome. *Plant J* **61**, 1092–1106.
- Wang CL, Chin CK, Ho CT, Hwang CF, Polashoc JJ, Martin CE** (1996). Changes of fatty acids and fatty acid-derived flavor compounds by expressing the yeast  $\Delta$ -9 desaturase gene in tomato. *J Agri Food Chem* **44**, 3399–3402.
- Whittle E, Shanklin J** (2001). Engineering  $\Delta$ 9-16:0-acyl carrier protein (ACP) desaturase specificity based on combinatorial saturation mutagenesis and logical redesign of the castor  $\Delta$ 9-18:0-ACP desaturase. *J Biol Chem* **276**, 21500–21505.
- Xing JS, Chin CK** (2000). Modification of fatty acids in eggplant affects its resistance to *Verticillium dahliae*. *Physiol Mol Plant Pathol* **56**, 217–225.
- Yang B, Kallio HP** (2001). Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different origins. *J Agric Food Chem* **49**, 1939–1947.

## Systematic Metabolic Engineering of $\omega$ -7 Fatty Acids in Plants

Yongmei Wu, Xue Mao, Shujian Wang, Jinai Xue, Xiaoyun Jia, Jiping Wang, Zhirong Yang, Runzhi Li\*

Center for Agricultural Biotechnology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

**Abstract** Omega-7( $\omega$ -7) fatty acids (FAs) such as C16:1 $\Delta$ 9, C18:1 $\Delta$ 11 and C20:1 $\Delta$ 13, particularly palmitoleate (C16:1 $\Delta$ 9), are an important contributor to human health and are highly valued in pharmaceutical and industrial applications. A number of natural wild plants can synthesize high levels of these unusual FAs in seeds, but low yields and poor agronomic properties of those plants preclude their commercial use for  $\omega$ -7 FA production. The lipid metabolic pathway has been genetically modified to develop engineered common oil crops that can highly produce and accumulate  $\omega$ -7 FAs in seeds and represents a key hot-spot in biotechnology and renewable bio-based resources. The major targets for modification in the oil biosynthesis pathway include expression of various  $\Delta$ 9 desaturases, increasing substrate (C16:0) levels, co-expression of plastidial and endoplasmic reticulum  $\Delta$ 9 desaturases and optimizing the metabolic flux into triacylglycerols (TAGs). Here, we summarize our current understanding of  $\omega$ -7 FA biosynthesis and its regulation and describe the advances in  $\omega$ -7 FA metabolic engineering. We also discuss the current “bottleneck” in this field and potential breakthroughs by combining lipidomics, transgenics and other “-omics”. These new tools will provide a valued platform for mining genes involved in  $\omega$ -7 FA biosynthesis and regulation. With this knowledge, we will develop more rational designs for metabolically engineering the commercial production of  $\omega$ -7 FA in established oilseeds for human health and sustainable development of the related industry.

**Key words**  $\omega$ -7 fatty acids,  $\Delta$ 9 desaturases, metabolic engineering, metabolic flux

**Wu YM, Mao X, Wang SJ, Xue JA, Jia XY, Wang JP, Yang ZR, Li RZ** (2011). Systematic metabolic engineering of  $\omega$ -7 fatty acids in plants. *Chin Bull Bot* **46**, 575–585.

\* Author for correspondence. E-mail: rli2001@hotmail.com