

## 鲨烯合酶的研究进展

赵明文<sup>1,2</sup> 钟家禹<sup>1,2</sup> 王 南<sup>2\*</sup> 梁婉琪<sup>3</sup> 潘迎捷<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学生命科学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

(<sup>2</sup>上海市农业科学院食用菌研究所 农业部食用菌遗传育种重点开放实验室 上海 201106)

(<sup>3</sup>上海市农业科学院生物技术中心 上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201106)

### Research Progress on the Squalene Synthase

Zhao Mingwen<sup>1,2</sup> Zhong Jiayu<sup>1,2</sup> Wang Nan<sup>2\*</sup> Liang Wanqi<sup>3</sup> Pan Yingjie<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment of Ministry of Agriculture ,  
Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China )

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Edible Fungus Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture , Edible Fungi Institute ,  
Agricultural Academy of Shanghai , Shanghai 201106 , China )

(<sup>3</sup> Key Laboratory of Agriculture Genetics and Breeding of Shanghai , Agro-Biotech Research Center ,  
Agricultural Academy of Shanghai , Shanghai 201106 , China )

关键词 鲨烯合酶 灵芝酸 三萜 萜烯类化合物

中图分类号 :Q55 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2003)05-0676-05

鲨烯合酶(Squalene Synthase, EC 2.5.1.21, 简称 SQS)是催化两分子的法呢酯焦磷酸(Farnesyl diphosphate, 简称 FPP)缩合产生鲨烯(SQ)的关键酶,而鲨烯是生物合成三萜、甾醇、胆固醇等萜烯类重要物质的共同前体<sup>[1,2]</sup>。因此,对鲨烯合酶的研究倍受重视,迄今人们已对 14 个不同物种中的鲨烯合酶进行了研究。本文简要综述国内外关于鲨烯合酶研究的进展。

### 1 SQS 在萜烯类化合物生物合成中的作用

萜烯类化合物生物合成的途径见图 1<sup>[1]</sup>,SQS 处于代谢途径中 FPP 到其它产物的分支点上,FPP 除可以被鲨烯合酶催化产生鲨烯(SQ)外,还可以在其它酶的催化下产生赤霉素、类胡萝卜素等<sup>[1,3]</sup>。因此,SQS 成为生物合成三萜、甾醇、胆固醇等萜烯类重要物质过程中的一个关键酶,其含量和活性决定了后续产物的产量<sup>[4]</sup>。

### 2 SQS 的分离、纯化及其晶体结构

20 世纪 70 年代末,Agnew 和 Popjak 用脱氧胆酸从酵母中提取出可溶性的 SQS<sup>[5]</sup>,但是这种形式的酶不稳定,阻碍了进一步提纯。10 年后,Sasiak 和 Rilling 才从野生酿酒酵母中第一次分离、纯化出纯度达 95% 以上的 SQS<sup>[6]</sup>。此后,Shechter 等<sup>[7]</sup>从鼠肝中也分离出可溶性的鼠 SQS, Hanley 和 Chappell 也从烟草

基金项目:上海市科委重点专项资助项目

\* 通讯作者。Tel:86-21-5263137; Fax:86-21-62207544; E-mail:syja14@saas.sh.cn

作者简介:赵明文(1974-)男,安徽天长人,讲师,在读博士研究生,主要从事药用真菌分子遗传学研究。E-mail:mwzhao@njau.edu.cn

收稿日期:2002-12-09,修回日期:2003-06-23

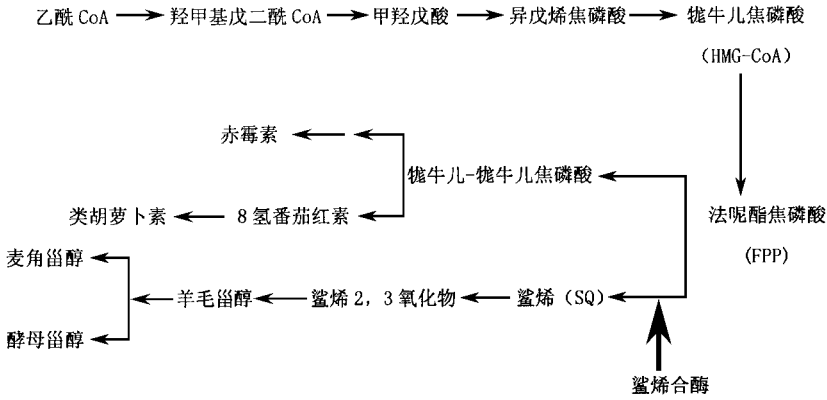


图 1 萜烯类化合物的生物合成途径

的细胞悬浮培养液中分离出部分纯化的植物 SQ<sup>[8]</sup>。由于在人体中鲨烯是合成胆固醇、胆汁酸和类固醇激素等重要物质的共同前体,同时也是研制治疗与胆固醇相关疾病干扰剂作用的选择位点,因此人体 SQS 的研究倍受重视,并于 21 世纪初阐明了其晶体结构<sup>[9]</sup>。

SQS 的核心结构与已知晶体结构的禽类法呢酯焦磷酸合酶( Farnesyl pyrophosphate synthase ,FPS )、链霉菌( *Streptomyces* )的 PLX( Pentalene synthase )和烟草的 EAS( 5-epiaristolochene synthase )3 种酶的核心结构非常相似,尽管这些酶的氨基酸序列缺少同源性,但它们的确是保守的,都是由一个  $\alpha$  螺旋核心围绕着一个中央激活位点空穴,它的一端为疏水性的,另一端为亲水性的,其中含一个特征性的“富-天冬氨酸序列”( Aspartate-rich sequence )。天冬氨酸的侧链可与 Mg 离子结合,而  $Mg^{2+}$  又可与底物的二磷酸结合,因此推测此核心部位可能是酶的活性中心。

3 SQS 的反应机理

SQS 催化两分子 FPP 形成一分子 SQ 要经两步反应<sup>[10,11]</sup>。第一步反应是两分子的 FPP 通过异戊烯基转移反应缩合成前鲨烯焦磷酸( PSQPP 或 PSPP ),并释放出一分子无机二磷酸。在这个过程中,其中一个 FPP 的  $(\alpha 1)-(\alpha 2)$  的双键作为另一个 FPP 的异戊烯基受体,第二步反应是 PSQPP 在 NADPH 作为氢供体的情况下,通过正碳离子重排转化为鲨烯<sup>[12]</sup>。许多研究人员曾对 SQS 催化的两步反应分别进行单独研究,试图了解这两步反应中的化学和动力学的特性,有证据表明在 PSQPP 转化为 SQ 的过程中有一个正离子的环丙烷进行了重排。对于 PSQPP 合成早期的动力学,曾用乒乓反应机理( Ping-Pong mechanism )来解释,而对从 PSQPP 和 NADPH 合成为鲨烯用依次反应机理( Ordered mechanism )来解释<sup>[13]</sup>。最近的研究支持在 PSQPP 形成过程中, FPP 是依次叠放到两个不等价的 FPP 结合位点上,并且对于在从 FPP 合成 PSQPP 和随后还原为 SQ 的过程中, PSQPP 是否依然结合在酶上提出了许多猜测<sup>[14]</sup>。Agnew 和 Popjak 发现在 FPP 浓度为  $100\mu\text{M}$  以上时, FPP 会抑制 SQ 的合成,但并不抑制 PSQPP 的合成<sup>[5]</sup>。Radisky 等<sup>[12]</sup>也指出高浓度的 FPP 会抑制 SQ 的合成,但不抑制 PSQPP 合成,并指出由于 FPP 与 NADPH 的竞争,而产生底物选择性抑制作用,当 FPP 浓度高时,第 3 个分子的 FPP 结合于  $E\cdot\text{FPP}\cdot\text{FPP}$  三元复合物上,因而阻碍了  $E\cdot\text{FPP}\cdot\text{FPP}\cdot\text{NADPH}$  复合物的形成,但并没有干扰 PSQPP 形成反应,并且由前稳态分布图表明: SQS 催化反应的限速步骤是在 SQ 和 PSQPP 形成之前。

4 SQS 基因的克隆

克隆 SQS 基因的工作是从酿酒酵母( *Saccharomyces cerevisiae* )开始的。自 1991 年 Jennings 等<sup>[2]</sup>构建酵母的基因组 DNA 文库,通过功能互补法,利用缺失 SQS 基因( *era9* )的空变株克隆 SQS 基因以来, SQS 基

因的克隆主要经历了从基因组 DNA 文库到全长 cDNA 文库筛选两种技术路线。到目前为止,已有酵母(酿酒酵母、裂殖酵母、假丝酵母)、鼠、人、拟南芥和烟草等 14 种物种的 SQS 基因被克隆和测序,所采用的策略包括(1)功能互补:酿酒酵母 SQS 的基因就是用这种方法克隆的。将无 SQS 活性的酵母突变株,与野生型酵母基因组文库进行功能互补实验,分离出酵母的 SQS 基因<sup>[21]</sup>。(2)RT-PCR 与 RACE 相结合:烟草(*Nicotiana benthamiana*<sup>[15]</sup>, *N. tabacum*<sup>[16]</sup>)的 SQS 基因就是用这种方法克隆的。根据酵母和人 SQS 的氨基酸保守区,设计简并引物,经 RT-PCR 获得特异基因片段,根据片段设计基因特异的引物,用 3'、5' RACE 法扩增,获得基因的 3'、5'末端,再在基因的 3'、5'末端内,设计特异引物,通过 RT-PCR 获得全长基因。(3)RT-PCR 与筛库相结合:拟南芥<sup>[17]</sup>、*Botryococcus braunii*<sup>[18]</sup>和鼠<sup>[19]</sup>的 SQS 基因是采用这一策略克隆的。根据酵母和人 SQS 的氨基酸保守区设计简并引物,RT-PCR 法获得特异片段,用<sup>32</sup>P 标记此片段作为探针,筛选 cDNA 表达文库获得全长基因。

通过对 SQS 蛋白的纯化和序列测定,以及对 SQS 基因的克隆和序列测定,发现 SQS 的氨基酸序列中,有 6 个区域是比较保守的<sup>[20]</sup>。其中有 3 个区域是高度保守的,在动物、植物和真菌中几乎是一样的,这 3 个区域(Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ)被认为是与活性位点相关的,它们在氨基酸序列上的位置分别为:168~186、202~217 和 285~298。区域Ⅱ虽然保守性较低,但在此区域中含着高度保守的 1~2 个天冬氨酸残基,被认为是 Mg<sup>2+</sup> 结合的位点。区域Ⅵ保守性也较低,但含有一个高度疏水序列(又称疏水区域),被认为与酶和内质网膜的结合有关。一般认为区域Ⅰ保守性很差。每个保守区域的氨基酸残基数一般为 14~23 个。

比较来自酵母、人和拟南芥 SQS 的氨基酸序列,发现它们之间的相似性比较低,但在植物之间(烟草与拟南芥)、动物之间(人与鼠)相似性是较高的。目前已知的 SQS 氨基酸残基数在 410~461 之间<sup>[8,18~20]</sup>,分子量在 46.9~52.5kD 之间,如拟南芥 SQS 的氨基酸残基数为 410,鼠类的为 416,而酵母的为 444。

## 5 SQS 基因表达和调节

关于 SQS 基因表达与调节的研究还不多,目前以 Guan 等<sup>[21]</sup>研究人 SQS 基因的表达调节较深入,他们把人的鲨烯合酶(Human squalene synthase,简称 HSS)基因的启动子的 5'旁邻序列,与荧光素酶报告基因融合,并转染到人的肝癌细胞系 HepG-2 中进行分析,结果表明,由甾醇介导的调节是一个多调控元件参与的复杂过程。他们认为该启动子有 4 个 CCAAT 框、3 个与甾醇调节因子(Sterol regulatory element,简称 SRE)相关的顺式元件和两个 GC 框参与了调节作用。Guan 等<sup>[21]</sup>还对 HSS 的启动子进行了一系列的突变,并与报告基因融合,研究这些元件对转录调节的影响,结果表明,HSS 基因甾醇介导调节的复杂性是由 HSS 启动子中存在多拷贝的各种顺式元件引起的。

此外,Kennedy 等<sup>[22]</sup>对酿酒酵母的 SQS 基因(*erg9*)的表达调节进行了研究,构建了 *erg9* 启动子与 *lacZ* 融合表达质粒。*erg9* 的表达受到转录因子 Hap1(Heme activator protein)、Hap2/3/4 和 Yap1(Yeast activator protein)的复杂调控,Hap1 和 Hap2/3/4 的突变,会使 *erg9* 的表达下降,而 Yap-1 和 Ino2/4 的突变,则会导致 *erg9* 表达上升。在酵母培养过程中加入 Lovastatin(它是 HMG-CoA 还原酶的竞争性抑制剂),导致其 SQS 的 mRNA 转录水平提高了两倍。此外,在厌氧条件下 SQS 基因的表达会下降。

## 6 SQS 基因进化的系统树

Hata 等<sup>[23]</sup>对来自 14 种生物的 SQS 的多态性进行了比较,并作出了一个系统进化树(图 2)。植物、动物和酿酒酵母的 SQSs,分属于 3 个明显的类群;而裂殖酵母和原生动物不属于 3 个类群中的任何一个。早期,曾认为 SQS 是以单一形式存在的,因为人和酵母的 SQS 基因都以单拷贝的形式存在。但是从拟南芥和欧亚甘草(licorice)等却分离出两种形式的 SQS 基因。目前还难以判断有多少物种含有两种或更多种形式的鲨烯合酶基因。

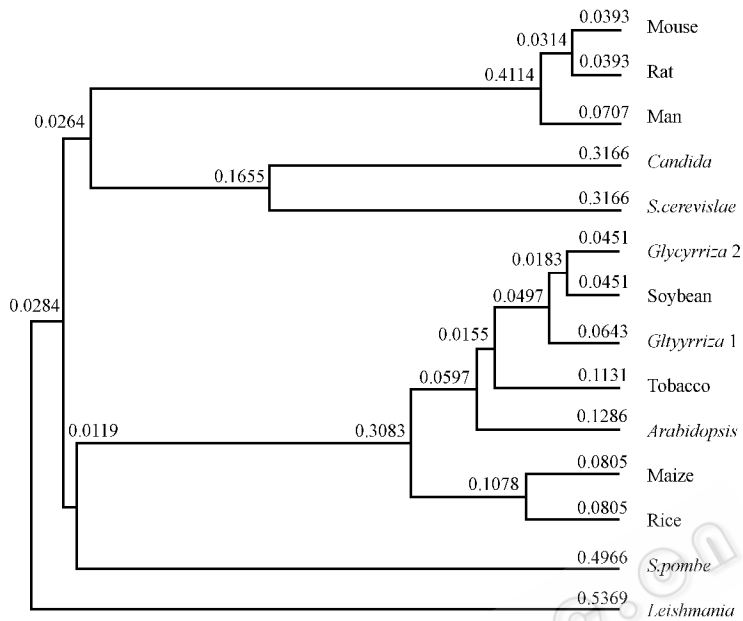


图 2 鲨烯合酶的系统进化树

7 我国对 SQS 研究的最新进展

迄今为止,我国对 SQS 的研究主要限于以高等真菌的灵芝 SQS 为对象。灵芝中的重要药效成分,灵芝三萜(又称灵芝酸),也是一种萜类化合物。鲨烯合酶也是灵芝三萜合成途径中的一个关键酶,灵芝三萜产量的多少与该酶的多少及活性密切相关。目前从赤芝中分离出的三萜类化合物已有 100 多种,它们都属于高度氧化的羊毛甾烷的衍生物<sup>[24]</sup>。我们在全中国范围内收集了 19 株灵芝菌种,进行了菌丝的生长状况、灵芝多糖和灵芝酸含量的测定,从中筛选出一株生长速度快、灵芝酸含量高的韩国灵芝,作为进行分子生物学研究的出发菌株<sup>[25]</sup>。采用融合蛋白表达技术,将编码鲨烯合酶氨基酸序列中的第Ⅳ保守区的核苷酸序列,克隆入表达质粒 pET-32a 中进行表达,并制备了针对鲨烯合酶氨基酸序列中第Ⅳ保守区的抗体,利用该抗体检测了鲨烯合酶在灵芝发育过程中的表达情况,证实了在灵芝的原基和幼菇时期中,鲨烯合酶的产量较高,而在菌丝体阶段则较低,这一结果与灵芝中灵芝酸含量的变化相符。同时还根据鲨烯合酶氨基酸的保守区设计了简并引物,从灵芝的基因组 DNA 中扩增出了灵芝鲨烯合酶的特异片段,并根据此片段设计了专一引物,从灵芝 cDNA 文库中获得了灵芝鲨烯合酶的全长基因。经序列分析表明灵芝鲨烯合酶的 cDNA 全长为 1404bp,编码 467 个氨基酸,目前正在对该基因进行功能和表达特性的分析。此外,我们还利用专一性引物扩增出了灵芝属中不同种的鲨烯合酶的特异片段,通过 Clustal W 分析显示,该片段在灵芝属中的保守性很高,说明鲨烯合酶可能普遍存在与灵芝属中。

参 考 文 献

[ 1 ] 李季伦,张伟心,杨启瑞,等.微生物生理学.北京:北京农业大学出版社,1993. 227~231.

[ 2 ] Jennings S M,Tsay Y H,Fisch T M,et al. Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 6038~6042.

[ 3 ] Shechter I. The road to squalene synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **202**: 1261~1266.

[ 4 ] Goldstein J L,Brown M S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 1990, **343**: 425~430.

[ 5 ] Agnew W S,Popjak G.Squalene synthetase. Solubilization from yeast microsomes of a phospholipid-requiring enzyme. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 1111~1115.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

*Chem* ,1978 ,**253** :4574 ~ 4583.

- [ 6 ] Sasiak K ,Rilling H C. Purification to homogeneity and some properties of squalene synthetase. *Arch Biochem Biophys* ,1988 ,**260** :622 ~ 627.
- [ 7 ] Shechter I ,Klinger E ,Rucker M L ,*et al.* Solubilization , purification and characterization of a truncated form of rat hepatic squalene synthetase. *J Biol Chem* ,1992 ,**267** :8628 ~ 8635.
- [ 8 ] Hanley K ,Chappell J. Solubilization , partial purification and immunodetection of squalene synthetase from tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol* ,1992 ,**98** :215 ~ 220.
- [ 9 ] Pandit J ,Danley D E ,Schulte G K ,*et al.* Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* ,2000 ,**275** :30610 ~ 30617.
- [ 10 ] Poulter C D. Biosynthesis of non-head-to-tail terpenes. Formation of 1'-1 and 1'-3 linkages. *Acc Chem Res* ,1990 ,**23** :70 ~ 77.
- [ 11 ] Beytia E ,Qureshi A A ,Porter J W. Squalene synthetase. 3. Mechanism of the reaction. *J Biol Chem* ,1973 ,**248** :1856 ~ 1867.
- [ 12 ] Radisky E S ,Poulter C D. Squalene synthase : steady-state , pre-steady-state , and isotope-trapping studies. *Biochemistry* ,2000 ,**39** :1748 ~ 1760.
- [ 13 ] Dugan R E ,Porter J W. Hog liver squalene synthetase : The partial purification of the particulate enzyme and kinetic analysis of the reaction. *Arch Biochem Biophys* ,1972 ,**152** :28 ~ 35.
- [ 14 ] Mookhtiar K A ,Kalinowski S S ,Zhang D ,*et al.* Yeast squalene synthase. A mechanism for addition of substrates and activation by NADPH. *J Biol Chem* ,1994 ,**269** :11201 ~ 11207.
- [ 15 ] Hanley K M ,Nicolas O ,Donaldson T B ,*et al.* Molecular cloning , in vitro expression and characterization of a plant squalene synthetase cDNA. *Plant Mol Biol* ,1996 ,**30** :1139 ~ 1151.
- [ 16 ] Devarenne T P ,Shin D H ,Back K W ,*et al.* Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor. *Arch Biochem Biophys* ,1998 ,**349** :205 ~ 215.
- [ 17 ] Kribil R ,Arro M ,Delarco A ,*et al.* Cloning and characterization of the arabidopsis thaliana SQS1 gene encoding squalene synthase— involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway. *Eur J Biochem* ,1997 ,**249** :61 ~ 69.
- [ 18 ] Okada S ,Devarenne T P ,Chappell J. Molecular characterization of squalene synthase from the green microalga *Botryococcus braunii* , race B. *Arch Biochem Biophys* ,2000 ,**373** :307 ~ 317.
- [ 19 ] Takayuki I ,Takashi O ,Shingo H. Molecular cloning and functional expression of a cDNA for mouse squalene synthase. *Biochem et Biophysica Acta* ,1995 ,**1260** :49 ~ 54.
- [ 20 ] Robinson G W ,Tsay Y H ,Kienzie B K ,*et al.* Conservation between human and fungal squalene synthetases : Similarities in structure , function , and regulation. *Mol Cell Biol* ,1993 ,**13** :2706 ~ 2717.
- [ 21 ] Guan G M ,Dai P H ,Osborne T F ,*et al.* Multiple sequence elements are involved in the transcriptional regulation of the human squalene synthase gene. *J Biol Chem* ,1997 ,**272** :10295 ~ 10302.
- [ 22 ] Kennedy M A ,Barburch R ,Bard M. Transcriptional regulation of the squalene synthase gene ( *ERG9* ) in the yeast , *Saccharomyces cerevisiae* . *Biochem et Biophysica Acta* ,1999 ,**1445** :110 ~ 122.
- [ 23 ] Hata S ,Sanmiya K ,Kouchi H ,*et al.* cDNA cloning of squalene synthase genes from mono- and dicotyledonous plants , and expression of the gene in rice. *Plant Cell Physiol* ,1997 ,**38** ( 12 ) :1409 ~ 1413.
- [ 24 ] 程若芸 ,于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展. *药学报* ,1990 ,**25** ( 12 ) :940 ~ 953.
- [ 25 ] 赵明文 ,鲍 鹏 ,王 南 ,等. 不同灵芝菌丝体中三萜与多糖含量的比较. *中国食用菌* ,2003 ,**22** ( 2 ) :43 ~ 46.