

# 知識天地

## 漫談生物體內的長鏈有機分子：多元不飽和脂肪酸

陳耀甥博士、俞聖法副研究員（化學研究所）、張繼堯副研究員（細胞與個體生物學研究所）

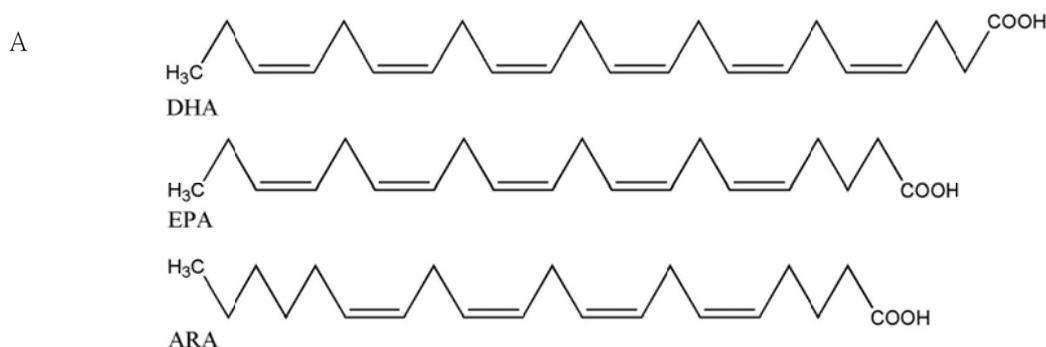
### 摘要

斑馬魚 $\Delta$ -5/ $\Delta$ -6脂肪酸去飽和酶(Z-FADS)在長鏈不飽和脂肪酸(LC-PUFAs)催化與生合成過程中扮演重要角色。以螢光共振能量轉移(FRET)證明斑馬魚Z-FADS蛋白會與第二及第三型細胞色素**b5**還原酶(CYB5R2, 3)及四種延長酶(ELOVL2, 4, 5, 7)產生交互作用。將斑馬魚*fads*、*elovl2*、*elovl4*及*elovl5*基因同時轉染至HeLa細胞，以 $\alpha$ -次亞麻油酸(ALA)為反應起始物，利用氣相層析圖譜分析法，證明斑馬魚 $\omega$ 3系列長鏈不飽和脂肪酸生合成過程中，特別是DHA及EPA的生合成需要Z-FADS、ELOVL2、ELOVL4及ELOVL5的協同作用。

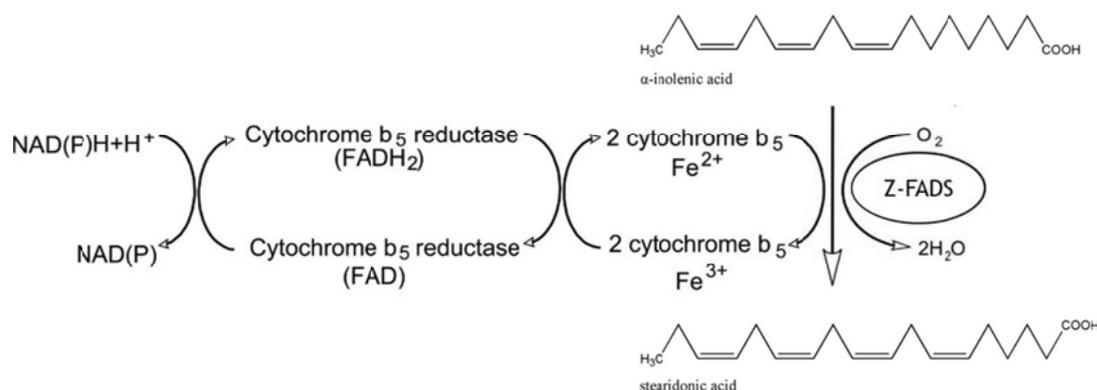
### 前言

脂肪酸是含有一條長烴鏈和一個末端羧基的有機物，廣泛的分布在動物、植物和微生物體內，對於生物體內細胞膜的組成、訊號傳遞及能量儲存皆扮演重要的角色。自然界之生物，特別是脊椎動物，其生長發育過程中需要大量不同來源之營養物質，而長鏈不飽和脂肪酸則為發育過程中不可或缺之營養物，尤其是腦部與眼部的發育。長鏈不飽和脂肪酸除了提供發育過程中所需，對於生物體的結構形成與能量貯存也扮演重要角色。生物體內脂質分為兩大類，分別為磷脂類與甘油酯類。磷脂類為長鏈不飽和脂肪酸接上鞘氨醇(sphingosine)及磷酸形成鞘磷脂類(sphingolipids)，主要為形成細胞膜的脂質雙層結構，而大量長鏈不飽和脂肪酸則可增加細胞膜的流動性，能抵抗環境中溫度變化所造成的低溫傷害。甘油酯類為長鏈不飽和脂肪酸接上甘油而形成三酸甘油酯(triacyl-glycerol, TG)，作為生物體脂肪貯存之方式，可做為生物體內除了肝醣之外的另一種貯存能量來源。

幾種非必須(non-essential)但是卻非常重要的長鏈多元不飽和脂肪酸(long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs)，包括花生四烯酸(arachidonic acid, ARA)，二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)及二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)，可以在生物體內利用 $\omega$ 6及 $\omega$ 3系列的亞麻油酸(linoleic acid, LA)及 $\alpha$ -次亞麻油酸( $\alpha$ -inolenic acid, ALA)，藉由脂肪酸去飽和酶(fatty acids desaturase, FADS)及延長酶(elongation of long chain fatty acids, ELOVL)合成出來(圖一)。但是人體內缺乏 $\Delta$ -12及 $\Delta$ -15去飽和酶，因此沒有辦法直接合成出LA及ALA，這些必須脂肪酸LA及ALA需要靠攝取食物作為來源。LC-PUFAs生合成過程是一連串複雜的蛋白交互作用，需要依靠細胞色素**b5**還原酶(cytochrome *b5* reductase, CYB5R)進行氧化還原反應，將輔酶NADH的電子傳遞至具有heme-binding domain的細胞色素**b5**蛋白(cytochrome *b5* protein)，細胞色素**b5**蛋白為細胞色素**b5**還原酶與去飽和酶之中間蛋白，在接受電子後再傳遞給去飽和酶，協助去飽和酶及延長酶直接對LC-PUFAs進行催化反應。



B



圖一、 $\omega$ 3及 $\omega$ 6系列長鏈不飽和脂肪酸結構圖與去飽和酶催化反應圖。(A)為 $\omega$ 3系列之DHA及EPA及 $\omega$ 6系列之花生四烯酸ARA結構圖，(B)為斑馬魚脂肪酸去飽和酶催化過程中電子傳遞與協同作用的相關蛋白。

### 脂肪酸生合成相關蛋白

脂肪酸在生物體內生合成過程中，需要數種不同酵素參與其中協同作用。脂肪酸去飽和酶在去飽和化的反應過程中需要外源電子參與催化反應，而電子傳遞過程則需要CYB5R的協同作用。CYB5R廣泛分布於細胞中，是一種NADH依賴型黃素還原酶(NADH-dependent flavin reductase)，CYB5R所需要的電子必須仰賴輔酶NADH提供。在LC-PUFAs生合成途徑中，除了CYB5R參與電子傳遞外，同時也有ELOVL共同作用以延長長鏈不飽和脂肪酸之長度。脂肪酸延長酶基因(*elovl*)廣泛分布於各物種中，截至目前為止，生物體至少發現7種ELOVL蛋白，而這7種ELOVL蛋白皆具有多重穿膜結構，在生物體內也具有組織專一性表現之特性。ELOVL在脂肪酸生合成代謝途徑中扮演將脂肪酸延長的功能，每次添加兩個碳至羧酸根上。脂肪酸生合成過程中，會先在粒線體內透過脂肪酸合成酶(*fatty acid synthase*)生合成至16個碳的長鏈脂肪酸，如果是在植物體內，則會生合成至18個碳的長鏈脂肪酸。接著透過去飽和酶的催化作用，將脂肪酸不飽和化，再透過脂肪酸延長酶將不飽和脂肪酸延伸至所需的長度。在近期的研究中指出， $\omega$ 6及 $\omega$ 3系列長鏈不飽和脂肪酸的延伸，分別是透過ELOVL2、ELOVL4、ELOVL5及ELOVL7來完成，而長鏈飽和脂肪酸及 $\omega$ 9系列長鏈不飽和脂肪酸，則分別是透過ELOVL1、ELOVL3及ELOVL6來完成，其中ELOVL7可以接受飽和類、 $\omega$ 9及 $\omega$ 6系列不飽和脂肪酸。

斑馬魚(*Danio rerio*)的脂肪酸去飽和酶(zebrafish fatty acids desaturase, Z-FADS)為典型的膜結合型脂肪酸去飽和酶，其座落位置位於細胞之內質網與粒線體膜上。多數生物的基因體都具有2-3個脂肪酸去飽和酶基因(*fads*)，分別轉譯出FADS1、FADS2及FADS3蛋白。而定序完成之斑馬魚基因體DNA中，卻只發現一個脂肪酸去飽和酶基因，此外在吳郭魚(*Oreochromis niloticus*)也同樣只發現一個脂肪酸去飽和酶基因，顯示這兩種魚類的脂肪酸去飽和酶可能具有多功能性。為了探討Z-FADS在脂肪酸生合成過程中所扮演的角色，以及EPA及DHA生合成途徑有哪些酵素共同參與協同作用，我們選殖參與脂肪酸生合成途徑的斑馬魚基因並共轉染於真核細胞內表現。

### 斑馬魚脂肪酸合成作用機制

為了探討斑馬魚脂肪酸生合成途徑中，各蛋白之間彼此的交互作用，我們採用物理學上所發現的一個現象—螢光共振能量轉移(FRET)來測定帶有螢光基團的蛋白，彼此是否有發生能量轉移的現象來推測其彼此是否有產生交互作用。根據文獻資料，長鏈不飽和脂肪酸在進行生合成反應時，需要CYB5R將外源電子自輔酶NADH傳遞至細胞色素b<sub>5</sub>蛋白，再傳遞給去飽和酶進行脂肪酸去飽和作用，而在延長過程中則需要不同種類的延長酶

於脂肪酸羧酸根進行加兩個碳的延長作用。

共軛焦顯微鏡(Confocal Microscope)進行受體漂白作用(Acceptor Bleaching)分析的結果顯示，在電子傳遞部分，斑馬魚CYB5R2與CYB5R3皆會與Z-FADS產生交互作用，將電子從輔酶NADH轉移至Z-FADS，而CYB5R1則因為會參與細胞色素P450蛋白之電子傳遞，因此並無法偵測到螢光共振能量轉移之頻率(FRET efficiency)。在研究斑馬魚Z-FADS與ELOVL之交互作用的實驗組設計中，由於Z-FADS及ELOVL皆為膜蛋白，在進行FRET實驗過程需要考量到穿膜構造與次數，因此在實驗設計上需要分別針對蛋白之N端與C端進行FRET分析。透過螢光共振能量轉移分析證明，Z-FADS的N端與C端皆可與ELOVL2、ELOVL4及ELOVL5的N端與C端產生交互作用，此結果顯示斑馬魚在長鏈不飽和脂肪酸生合成過程中，這三種ELOVL都會參與延伸作用。

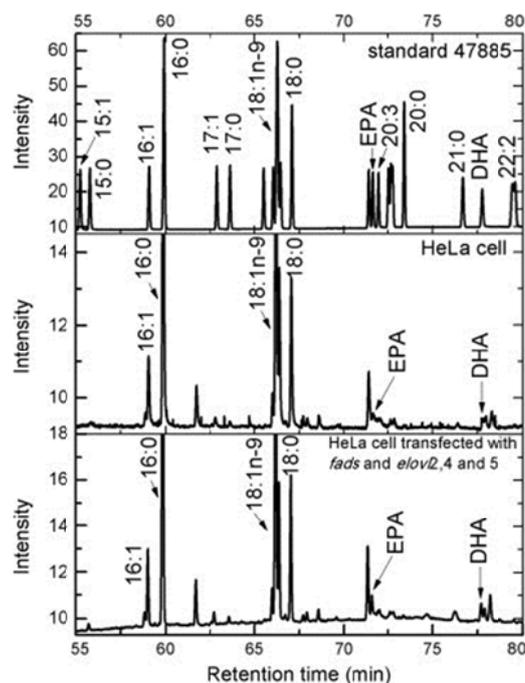
ELOVL在活性相關研究中發現，ELOVL並沒有反應物專一性，可以接受不同碳數或不同飽和程度之長鏈不飽和脂肪酸，只要可被反應口袋抓取穩定住之脂肪酸皆可被反應。因此在脂肪酸生合成途徑中，ELOVL與Z-FADS的交互作用，其反應物可能由Z-FADS選擇，Z-FADS將反應物不飽和化後，再將產物轉移給ELOVL進行延伸作用。而在CYB5R與Z-FADS交互作用的實驗組中，有兩型CYB5R會與Z-FADS產生交互作用，一型為膜結合型(CYB5R2) 一型為溶解型(CYB5R3)。CYB5R在去飽和作用的功能為傳遞電子，而Z-FADS因已具有細胞色素**b5**功能區，因此不需要細胞色素**b5**蛋白，CYB5R會直接與Z-FADS產生交互作用。

## DHA與EPA生合成途徑

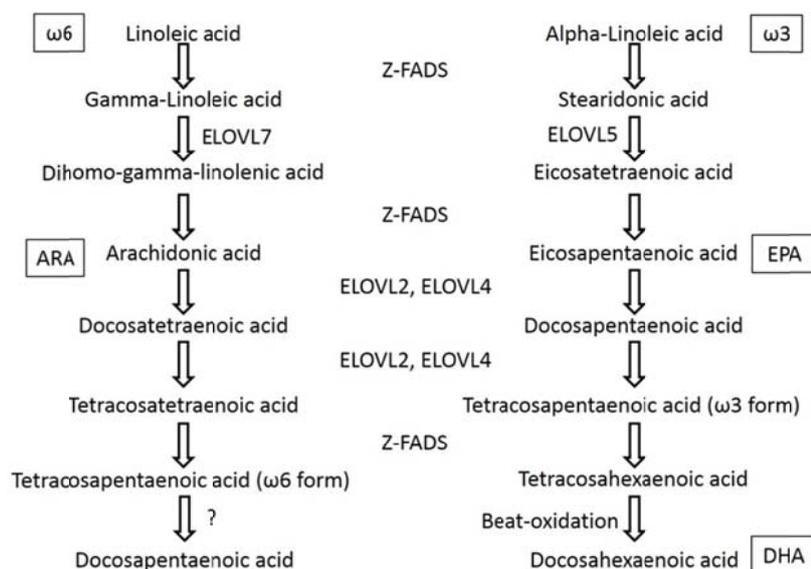
實驗室的研究團隊嘗試將斑馬魚*fads*、*elovl2*、*elovl4*及*elovl5*基因轉染至HeLa細胞後，以 $\alpha$ -次亞麻油酸( $\alpha$ -inolenic acid, ALA)作為反應物，以氣相層析(GC)監測並計算DHA及EPA生成量。在此實驗中，細胞同時轉染四種基因後，可以明顯看到DHA增加50%，而EPA為DHA生合成途徑之中間物，也發現增加37.5%。此結果可以推論斑馬魚Z-FADS為多功能性蛋白，同時具有 $\Delta 6$ 及 $\Delta 5$ 去飽和酶作用，其中的 $\Delta 6$ 去飽和酶活性，可以有兩種不同的反應物，一種為18個碳的ALA，另一種為24個碳5雙鍵的Tetracosapentaenoic acid。

此結果證明斑馬魚只需要一個去飽和酶即可直接生合成DHA及EPA，也證明斑馬魚DHA及EPA生合成途徑為先由18個碳的ALA透過Z-FADS第一次去飽和作用(第一種反應物之 $\Delta 6$ 去飽和酶活性)產生18碳4雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸(stearidonic acid)、而stearidonic acid經過ELOVL5延伸後產生20個碳4雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸(Eicosatetraenoic acid, ETA)，而ETA則透過Z-FADS第二次去飽和作用( $\Delta 5$ 去飽和酶活性)產生20個碳5雙鍵之EPA。斑馬魚會使用EPA作為ELOVL2及ELOVL4的反應物生合成24個碳5雙鍵之Tetracosapentaenoic acid。Tetracosapentaenoic acid則再次經過Z-FADS第三次去飽和作用(第二種反應物之 $\Delta 6$ 去飽和酶活性)產生24個碳6雙鍵之長鏈不飽和脂肪酸，再透過 $\beta$ -氧化作用合成DHA (圖二)。

A



B



圖二、脂肪酸甲酯化分析與斑馬魚長鏈不飽和脂肪酸生成途徑圖。(A)為為斑馬魚 *fads*、*elov12*、*elov14*及*elov15*基因共轉染HeLa細胞後之DHA及EPA氣相層析圖譜，(B)為斑馬魚 $\omega 3$ 及 $\omega 6$ 系列脂肪酸生成途徑圖。

## 未來挑戰與展望

長鏈不飽和脂肪酸是脊椎動物生長所不可或缺的營養源，早期的觀念皆認為大多數生物無法自行合成DHA與EPA，因此許多科學家致力於篩選含有大量長鏈不飽和脂肪酸的特殊藻類，希望能以飲食來源方式補充長鏈不飽和脂肪酸。但在目前的研究中指出，生物體本身即具有可合成長鏈不飽和脂肪酸之相關酵素，而於體內實驗(*in vivo*)結果也證明此生成途徑的正確性。但由於脂肪酸去飽和酶的蛋白質立體構型尚未解析出，且各蛋白間彼此交互作用部位也尚未明瞭，目前的相關研究皆致力於立體構型的了解，及去飽和酶在整個生成途徑中所扮演的角色。有鑑於體內實驗結果，我們未來的發展除了探討立體構型的問題之外，也可以將酵素催化反應實用化，將酵素純化後以固定化方式固定於載體上，在體外進行催化反應，進一步以人工方式生成長鏈不飽和脂肪酸。