

拟南芥和油菜 3-磷酸甘油酰基转移酶的关键活性位点鉴定

林怡馨¹, 陈丹丹¹, 刘宏波¹, 柯星星¹, 郑月萍^{1,2}, 郑志富^{1,2}

(1. 浙江农林大学 现代农学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 油料作物种质创新与利用研究所, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】3-磷酸甘油酰基转移酶 (GPAT) 催化三酰甘油 (TAG) 生物合成途径中的第 1 步酰化反应, TAG 合成能力是油料作物的关键性状, 但亦与人类肥胖症密切相关, 了解 GPAT 结构与功能的内在关系对于这一性状的遗传或化学遗传调控至关重要。本研究旨在鉴定调控植物 GPAT 活性的关键氨基酸位点。【方法】运用定点突变技术构建了 58 个 *GPAT9* 突变基因, 结合 GPAT 特异的酵母遗传互补法, 剖析单一和多个氨基酸位点改变对 *GPAT9* 酶活性的影响。【结果】通过对拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *AtGPAT9* 和油菜 *Brassica napus* *BnGPAT9* 的 19 个氨基酸残基进行分析发现: *AtGPAT9* 的 N 端 6 个磷酸化位点的单独突变 (T10A、S11A、S13A、S28A、S30A 和 S31A) 不能增强 *AtGPAT9* 在酵母异源表达时的活性。相反, 其他 6 个位于酰基转移酶保守结构域外的氨基酸残基 (85、114、119、230、237、322 位) 的改变能够显著影响 *GPAT9* 酶活性。发现这些氨基酸残基之间存在交互作用, 例如, 3 个位点同时突变 (Y85W/N119H/S237N) 能使 *AtGPAT9* 活性大幅上升, 加速酵母的生长并促进 TAG 的合成, 表达这一突变酶的酵母中的 TAG 含量比表达野生型 *BnGPAT9* 的增加了 45.7%。更值得注意的是, 在 114 和 237 位磷酸化氨基酸残基对酰基转移酶活性产生负面效应, 暗示植物 *GPAT9* 活性可能受磷酸化和非磷酸化机制调节。【结论】本研究获得了 6 个未经报道的关键 GPAT 酶活性调控位点, 其中 W85 和 H119 是 *GPAT9* 正常功能所必需的, 而 L114、D230、N237 和 A322 有利于维持 *GPAT9* 活性。图 7 表 2 参 37

关键词: 拟南芥; 油菜; 3-磷酸甘油酰基转移酶; 结构与功能关系; 定点突变; 酵母遗传互补

中图分类号: Q946.5 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)04-0695-12

Identification of key amino acid residues controlling the activities of glycerol-3-phosphate acyltransferases in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*

LIN Yixin¹, CHEN Dandan¹, LIU Hongbo¹, KE Xingxing¹, ZHENG Yueping^{1,2}, ZHENG Zhifu^{1,2}

(1. College of Advanced Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;
2. Institute for Oilseed Crop Germplasm Innovation and Utilization, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) catalyzes the first acylation reaction in the triacylglycerol (TAG) biosynthetic pathway. Understanding the structure-function relationship of GPAT is important for genetic or chemogenetic manipulation of the TAG biosynthetic capacity as a key trait in oilseed crops but associated with human obesity disease. This study aimed to identify key amino acid residues controlling the activity of *GPAT9* in plants. [Method] Site-directed mutagenesis was employed to construct 58 *GPAT9* mutant genes, and yeast genetic complementation specific for GPAT enzyme was utilized to dissect the effects of alterations of single and multiple amino acid residues on the activities of *GPAT9* from *Arabidopsis*

收稿日期: 2022-12-15; 修回日期: 2023-03-02

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (32100209); 浙江省自然科学基金青年基金资助项目 (Q21C020003); 国家自然科学基金面上资助项目 (31871660, 32071929)

作者简介: 林怡馨 (ORCID: 0009-0007-3438-0354), 从事植物生物技术研究。E-mail: 642402291@qq.com。通信作者: 郑志富 (ORCID: 0000-0002-8247-5629), 教授, 从事植物生化和代谢研究。E-mail: zzheng@zafu.edu.cn

thaliana and *Brassica napus*. [Result] By analyzing 19 amino acid residues of AtGPAT9 and BnGPAT9, it was found that single mutations (T10A, S11A, S13A, S28A, S30A, S31A) at the N-terminus of AtGPAT9 could not enhance its activity when the respective variants were expressed heterologously. In contrast, the alteration of the other six amino acid residues at positions 85, 114, 119, 230, 237, and 322, respectively, which are located outside the conserved domains of acyltransferases significantly affected GPAT9 enzymatic activity. Additionally, mutual interactions were evident between these amino acids. For instance, the simultaneous mutation of the three residues (Y85W, N119H, S237N) greatly increased the activity of AtGPAT9, as exemplified by the findings that the expression of the corresponding mutant enzyme could accelerate the growth of yeast cells and enhanced the synthesis of TAG by 45.7%, compared with that of yeast cells expressing BnGPAT9. Noticeably, the presence of potentially phosphorylated amino acids at positions 114 and 237 was detrimental to acyltransferase activity, implying that plant GPAT9 activity may be regulated through protein phosphorylation and non-phosphorylation. [Conclusion] This study describes six previously unreported amino acid residues key to the regulation of GPAT enzymatic activity. Among them, W85 and H119 are prerequisite for the proper functioning of GPAT9, and L114, D230, N237, and A322 are beneficial to maintaining the activity of GPAT9. [Ch, 7 fig. 2 tab. 37 ref.]

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *Brassica napus*; glycerol-3-phosphate acyltransferase; structure-function relationship; site-directed mutagenesis; yeast genetic complementation

甘油脂的从头生物合成途径 (*de novo* glycerolipid biosynthesis) 是细胞中最基本的代谢过程。3-磷酸甘油酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) 催化甘油脂从头合成的初始步骤, 生成的溶血磷脂酸 (LPA) 在 LPA 酰基转移酶 (lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT) 的作用下转化为磷脂酸 (PA)^[1-6]。PA 是调节真核生物中多种细胞过程的重要信号分子, 也是极性甘油磷脂与中性三酰甘油 (TAG) 的生物合成前体。在磷酸酶的催化下 PA 转化为二酰甘油, 后者可经脂酰辅酶 A-依赖型二酰甘油酰基转移酶 (acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 和 (或) 磷脂-依赖型二酰甘油酰基转移酶 (phospholipid-dependent diacylglycerol acyltransferase, PDAT) 作用生成 TAG^[7-10]。TAG 合成能力是油料作物的关键性状, 同时与人类肥胖症等疾病密切相关。因而, 运用遗传或化学遗传方法操控 TAG 生物合成, 提高油料作物含油量, 降低与肥胖症相关联的人类疾病, 具有重要实践意义^[11-16]。

脂酰基转移酶在 TAG 生物合成过程中发挥重要作用, 但目前对于这类酶的结构与功能的内在关系知之甚少, 参与第 1 步酰化反应的 GPAT 亦不例外, 仅有少量关于其结构与功能关系的报道^[17-18]。已知 GPAT、LPAAT、磷酸二羟丙酮酰基转移酶 (dihydroxyacetone-phosphate acyltransferase, DHAPAT) 等脂酰基转移酶均含 4 个高度保守的结构域, 结构域 I 的组氨酸 (H)、天冬氨酸 (D), 结构域 III 的甘氨酸 (G) 和结构域 IV 的脯氨酸 (P) 是 GPAT 催化所必需的; 而结构域 II 的精氨酸 (R) 与结构域 III 的谷氨酸 (E) 在结合底物 3-磷酸甘油中起作用^[18-20]。迄今为止, 对于保守结构域外的其他氨基酸残基在酰基转移酶活性调控中的作用, 及与保守结构域中的氨基酸残基存在的潜在互作关系的了解非常有限。

GPAT9 位于植物细胞的内质网, 参与膜脂和 TAG 的生物合成, 其功能缺失会导致种子发育异常、油脂合成减弱^[20-22]。本实验室前期的酵母遗传互补研究也显示: 油菜 *Brassica napus* BnGPAT9 的异源表达能够恢复酵母条件致死型双敲除突变体 (ZAFU1) 因 GPAT 酶活性缺失引起的生长缺陷。然而, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* AtGPAT9 却不具备这种互补能力^[23-25], 尽管 AtGPAT9 与 BnGPAT9 的进化关系密切^[26-27], 两者氨基酸序列的一致性高达 94.1%, 且两者在 4 个酰基转移酶保守结构域的氨基酸残基完全一致。因此, 可以假设保守结构域之外的某些氨基酸残基对 GPAT9 的活性起着重要的调节作用。本研究充分利用 AtGPAT9 和 BnGPAT9 在酵母异源系统中表现出的不同性质, 并结合定点突变与酵母遗传互补技术, 剖析单个和多个氨基酸残基改变对 GPAT9 酶活性的影响, 鉴定新的关键活性位点, 以深化对脂酰基转移酶结构与功能内在关系的认知, 为酰基转移酶的分子改造与结构优化、真核生物中 TAG 合成途径的改良以及全新 TAG 从头合成途径的构建提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 序列分析

通过 Vector NTI 11.5.4 软件对 *AtGPAT9* (Genebank 登录号: ACT32031.1) 和 *BnGPAT9* (Genebank 登录号: ANV28166.1) 的氨基酸序列进行比对。使用 TMHMM 2.0 和 Protter 进行跨膜结构域和蛋白质拓扑异构模型预测^[28-29]。由 I-TASSER 预测三维结构^[30]。

1.2 基因定点突变

将 *AtGPAT9* 和 *BnGPAT9* 编码序列分别通过 BamH I/Xho I 和 BamH I/EcoR I 双酶切位点克隆至 pMD19-T 载体, 得到新的质粒 pMD19-T-*AtGPAT9* 和 pMD19-T-*BnGPAT9*; 以之为模板, 对 *AtGPAT9* 和 *BnGPAT9* 进行定点突变。具体方法如下: 利用包含突变位点的引物 (表 1), PCR 扩增整个质粒; 质粒 DNA 经 Dpn I 消化与纯化后, 转入大肠埃希菌 *Escherichia coli* 并进行测序分析; 序列正确的质粒经 BamH I 和 Xho I 双酶切后, 连接到经相同酶切处理的 pYES2-yADH1-Kan V2 酵母表达载体, 并对产生的重组质粒再次进行 DNA 测序分析, 以确保突变位点的正确性。需要说明的是, 选择 pMD19-T 质粒作为定点突变过程中的中间质粒, 而非直接在 pYES2-yADH1-Kan V2 质粒上进行 *GPAT9* 基因的定点突变, 是因为后者 DNA 长度 (6 998 bp) 是前者 (2 660 bp) 的 2.6 倍, 采取这样的策略可以降低因 PCR 扩增时间延长导致潜在的错误碱基出现频率。

表 1 拟南芥 *AtGPAT9* 和油菜 *BnGPAT9* 定点突变所用的引物序列

Table 1 Sequences of the primers used for site-directed mutagenesis of *A. thaliana AtGPAT9* and *B. napus BnGPAT9*

突变位点	引物序列 (5'→3')	突变位点	引物序列 (5'→3')
<i>BnGPAT9</i> (R40S)	AGCCTCGTGGCAAGCTCAGCCTGCG TGATTTGCTAGACAT	<i>AtGPAT9</i> (N119H)	TTTCATTGTTTATCCCTGTACACGCG TTGCTGAAAGGTCAAG
<i>BnGPAT9</i> (W85Y)	TCTACTTGTTTCCTTATACTGCTGT GGTGTGTGTTAG	<i>AtGPAT9</i> (D230N)	TTGTAGCAAAAAAGTTAAGGAACCA TGTCCAAGGAGCTGAC
<i>BnGPAT9</i> (C87F)	TTGTTTCCTTTATGGTGCTTTGGTGT TGTTGTTAGATACT	<i>AtGPAT9</i> (A235T)	TAAGGGACCATGTCCAAGGAAGTGA CAGTAATCCTCTTCTC
<i>BnGPAT9</i> (I102F)	TTCTCTTCCCTTGAGGTGCTTCACT TTAGCTTTTGGATG	<i>AtGPAT9</i> (S237N)	ACCATGTCCAAGGAGCTGACAATAA TCCTCTTCTCATATTTCC
<i>BnGPAT9</i> (F109I)	CATCACTTAGCTTTTGGATGGATTA TTTTCTTCAACG	<i>AtGPAT9</i> (D230N/A235T)	TTGTAGCAAAAAAGTTAAGGAACCA TGTCCAAGGAAGTCAAG
<i>BnGPAT9</i> (T114L)	TGGTTTATTTTCTTTCATTGTTTATC CCTGTACACTCTC	<i>AtGPAT9</i> (A235T/ S237N)	TAAGGGACCATGTCCAAGGAAGTGA CAATAATCCTCTTCTCATATTTTC
<i>BnGPAT9</i> (H119N)	TTCAACGTTTATCCCTGTAAAATTCTC TCCTGAAAGGTCAG	<i>AtGPAT9</i> (D230N/A235T/ S237N)	TTGTAGCAAAAAAGTTAAGGAACCA TGTCCAAGGAAGTCAAG
<i>BnGPAT9</i> (N230D)	GTAGCAAGAAAGTTAAGGGACCAT GTTCAAGGAAGTCAAG	<i>AtGPAT9</i> (G332A)	CATAAGGCCCGGTGAAACAGCAATT GAATTTGCAGAGAGGG
<i>BnGPAT9</i> (T235A)	TAAGGAACCATGTTCAAGGAGCTGA CAATAACCTCTTCT	<i>AtGPAT9</i> (L335H)	GGTCAGAGACATGATATCTCATCGG GCGGGTCTCAAAAAGG
<i>BnGPAT9</i> (N237S)	CATGTTCAAGGAAGTCAAGTAACC CTCTTCTTATATTTT	<i>AtGPAT9</i> (P355S)	TGAAGTATTCGAGACCAAGCTCCAA GCATAGTGAACGCAAG
<i>BnGPAT9</i> (A322G)	AAGGCCTGGTGAACAGGAATTGA GTTTGCAGAGAGGGTC	<i>AtGPAT9</i> (T10A)	GTACGGCAGGGAGGCTCGTGGCTTC AAAATCCGAGCTTGAC
<i>AtGPAT9</i> (S40R)	ATGAACCTCGCGGCAAGCTCCGCCT GCGTGATTTGCTAGA	<i>AtGPAT9</i> (S11A)	CGGCAGGGAGGCTCGTACTGCAAA ATCCGAGCTTGACCTC
<i>AtGPAT9</i> (Y85W)	ATTTACTTATCCCACATATGGTGCTT TGGGGTGTGTTAG	<i>AtGPAT9</i> (S13A)	GGAGGCTCGTACTTCAAAAGCCGA GCTTGACCTCGATCAC
<i>AtGPAT9</i> (F87C)	CTTATCCCCTATACTGCTGTGGGG TTGTTGTTAGATACT	<i>AtGPAT9</i> (S28A)	AACATCGAAGATTACCTTCTGCTG GTTCTTCCATCAATGAAC
<i>AtGPAT9</i> (F102I)	TCCTCTTCCCTTGAGGTGCATCACT TTAGCTTTTGGGTGG	<i>AtGPAT9</i> (S30A)	GAAGATTACCTTCTTCTGGTGTCTC CATCAATGAACCTCGCG
<i>AtGPAT9</i> (I109F)	TCACTTTAGCTTTTGGGTGTTTATT TTCTTTCATTGTTT	<i>AtGPAT9</i> (S31A)	GATTACCTTCTTCTGGTGTCTGCCAT CAATGAACCTCGCGCA
<i>AtGPAT9</i> (L114T)	GGGTGGATTATTTCTTTCACCGTT TATCCCTGTAAAATGCG		

1.3 酵母遗传转化

条件致死型酵母双突变体 ZAFU1[BY4742, *gat1Δgat2Δ+(pGAL1::AtGPAT1 Leu2)*]^[25,31], 可在半乳糖的培养基上生长, 但在葡萄糖培养基上丧失了生长能力。基于菌株 ZAFU1 建立的酵母遗传互补法对 GPAT 的鉴定具有很强的专一性^[25,31], 本研究运用它鉴定不同氨基酸残基突变对 GPAT9 活性的影响。

使用基于醋酸锂的标准方法将重组酵母表达质粒导入菌株 ZAFU1 感受态细胞^[25,31], 复苏 4 h, 分别涂布转化液于以葡萄糖 (Glu) 或半乳糖 (Gal) 为碳源, 不含尿嘧啶、组氨酸和亮氨酸的培养基 (SC-Ura-His-Leu) 上, 30 °C 下培养 3~5 d。为了准确地比较不同氨基酸残基突变对酶活性的影响, 挑取在半乳糖培养基上生长的不同单菌落酵母进行浓度梯度稀释培养实验: 从半乳糖培养基上随机挑选生长良好的单菌落至 SC-Ura-His-Leu+Gal 液体培养基, 30 °C 振荡培养 1~2 d 至光密度 $[D(600)]$ 为 2.000 0~3.000 0, 稀释菌液浓度至 $D(600)$ 为 1.000 0、0.200 0、0.040 0、0.008 0 和 0.001 6, 取 5 μ L 接种于 SC-Ura-His-Leu+Glu 和 SC-Ura-His-Leu+Gal 固体培养基上, 30 °C 培养 3~5 d。

1.4 酵母生长曲线测定及油脂分析

30 °C 下, 将表达不同 GPAT9 突变基因的 ZAFU1 细胞在 SC-Ura-His-Leu+Gal 液体培养基中培养至 $D(600)$ 为 3.000 0~4.000 0, 稀释接种于 SC-Ura-His-Leu+Glu 液体培养基至 $D(600)$ 为 0.100 0, 振荡培养并定时记录 $D(600)$ 。

将平台生长期收获的细胞在真空冷冻干燥机中干燥, 提取酵母总脂质^[32], 点样于硅胶板, 通过薄层色谱法分离总脂质。喷洒质量浓度为 0.05% 樱草黄显色剂, 在紫外灯下观察板上的脂质, 从硅胶中提取 TAG, 并通过气相色谱法定量分析 TAG 含量^[32]。

2 结果与分析

2.1 AtGPAT9 和 BnGPAT9 的结构差异

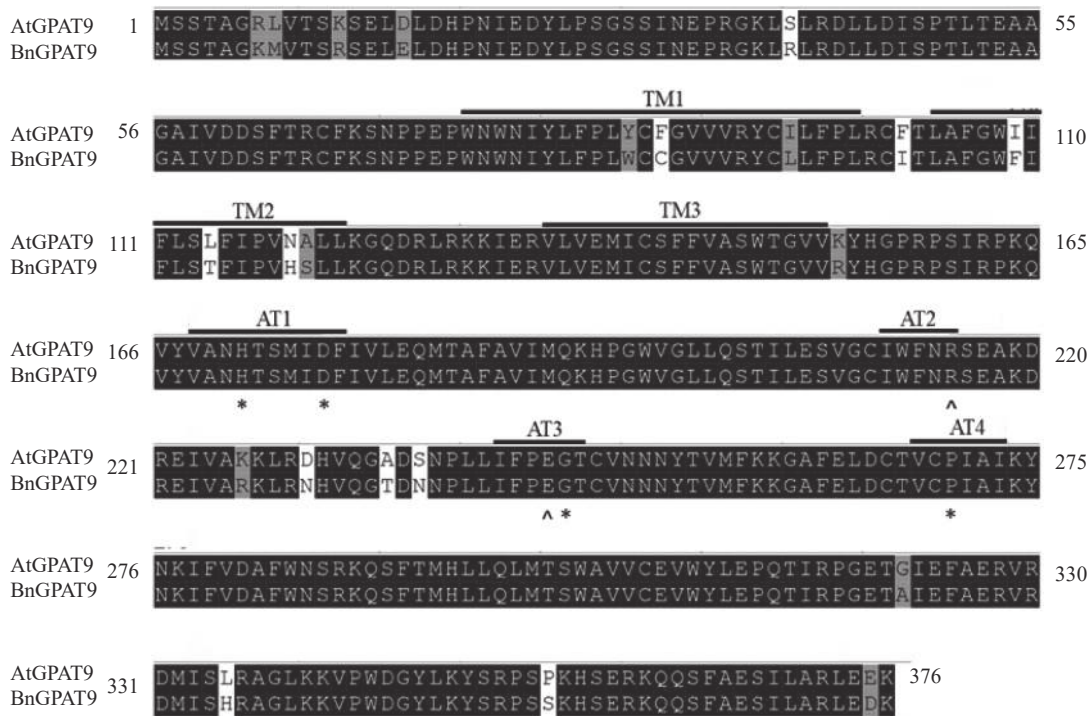
早期研究发现: 在酵母中异源表达时, 拟南芥 AtGPAT9 与油菜 BnGPAT9 表现出不同的活性^[23-24]。为了找出潜在的关键活性调控位点, 对 AtGPAT9 与 BnGPAT9 进行了序列比对。AtGPAT9 和 BnGPAT9 均由 376 个氨基酸组成, 两者序列一致性高达 94.1%, 4 个保守的酰基转移酶结构域和 C 端内质网定位必需的疏水五肽结构域 (—ILARL—) 的氨基酸残基完全一致^[18,20], 且在 N 端都含多个潜在的磷酸化位点, 主要由丝氨酸和苏氨酸组成 (图 1)。它们之间共有 22 个不同的氨基酸残基, 其中 11 个具有相似的性质。基于 TMHMM 和 Protter 的跨膜结构域预测显示: 跨膜区结构具有较高相似性, 但 3 个跨膜区域中有 7 个不同的氨基酸残基 (图 1)。另外, 基于 I-TASSER 的三维结构预测发现: AtGPAT9 和 BnGPAT9 在 40、109、114、119、230、235、237 和 322 位氨基酸残基的不同, 可能会引起两者三维空间结构的差异, 因此它们成为本研究重点剖析的位点 (图 2)。

2.2 AtGPAT9 和 BnGPAT9 的定点突变

为了明确哪些氨基酸位点对 GPAT 酶活性起着重要调控作用, 据上述 AtGPAT9 和 BnGPAT9 中存在的氨基酸残基差异, 运用定点突变技术对两者相应位置的氨基酸位点进行相互替代, 即将 AtGPAT9 中的单个或多个氨基酸残基同时替换成与 BnGPAT9 中相应位置完全相同的氨基酸残基, 反之亦然。本研究共构建了 58 种不同的 GPAT9 突变基因 (表 2)。

2.3 单个氨基酸残基突变对 GPAT9 活性的影响

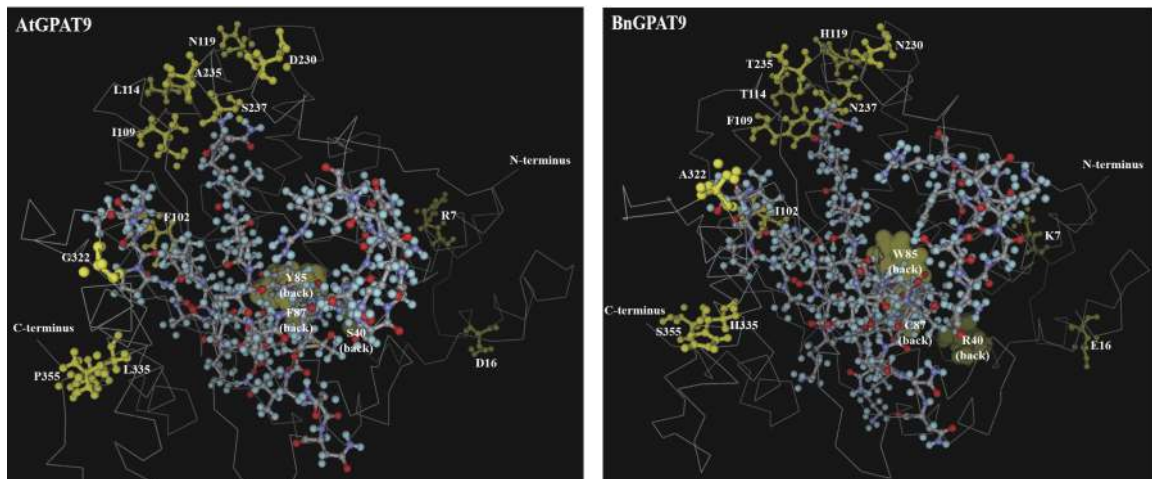
将不同 GPAT9 突变基因克隆至带有葡萄糖诱导启动子 (*ADHI*) 的质粒中, 并以空载体与含野生型 *AtGPAT9* 的质粒为阴性对照, 以含野生型 *BnGPAT9* 的质粒为阳性对照, 将这些重组质粒导入到 ZAFU1 菌株中, 测定不同 GPAT9 突变基因恢复 ZAFU1 在葡萄糖培养基上的生长缺陷能力。根据转化酵母细胞的生长速率, 可以比较直观地评估不同突变位点对 GPAT9 酶活性的影响。结果显示: 当 ZAFU1 突变体在葡萄糖培养基上培养时, W85Y 或 H119N 的单位点替换导致 BnGPAT9 丧失对突变体生长缺陷的恢复能力 (图 3A), 说明 W85 和 H119 是 BnGPAT9 正常功能所必需的。另外, 与野生型 BnGPAT9 相比, 含 N237S 或 A322G 突变位点的 BnGPAT9 对 ZAFU1 菌株生长的促进作用下降 (图 3A), 表明这 2 个位点亦参与 BnGPAT9 活性的调节。相反, 其他 5 个单位点替换 (R40S、C87F、I102F、F109I、T235A) 对 BnGPAT9 的活性不产生明显影响 (图 3A)。特别是 N230D 和 T114L 单位点替换增强了



相同的氨基酸残基以黑色表示,相似的氨基酸残基以灰色表示,不同的氨基酸残基以白色表示。酰基转移酶保守结构域被标记为 AT1、AT2、AT3 和 AT4。预测的跨膜区被标记为 TM1、TM2 和 TM3。*表示 GPAT 催化必需的氨基酸残基,^表示结合底物 3-磷酸甘油所必需的氨基酸残基。

图 1 拟南芥 AtGPAT9 和油菜 BnGPAT9 氨基酸序列比对

Figure 1 Alignment of the amino acid sequences of *A. thaliana* AtGPAT9 and *B. napus* BnGPAT9



氨基酸残基以缩写和位点的形式表示,如 S237 代表 237 位丝氨酸。

图 2 AtGPAT9 和 BnGPAT9 三维结构预测

Figure 2 Prediction of three-dimensional structures of AtGPAT9 and BnGPAT9

BnGPAT9 活性,这种上调作用对于 BnT114L 而言尤为突出。如图 4 所示:与野生型 BnGPAT9 相比,含 T114L 突变位点的 BnGPAT9 在酵母突变体中的表达能促使细胞生长速率大幅度提高,表现为经 2 d 培养,表达 BnGPAT9 (T114L) 的菌落在葡萄糖培养基上生长的数量为野生型 BnGPAT9 的 4 倍,且每个单菌落表面积更大。

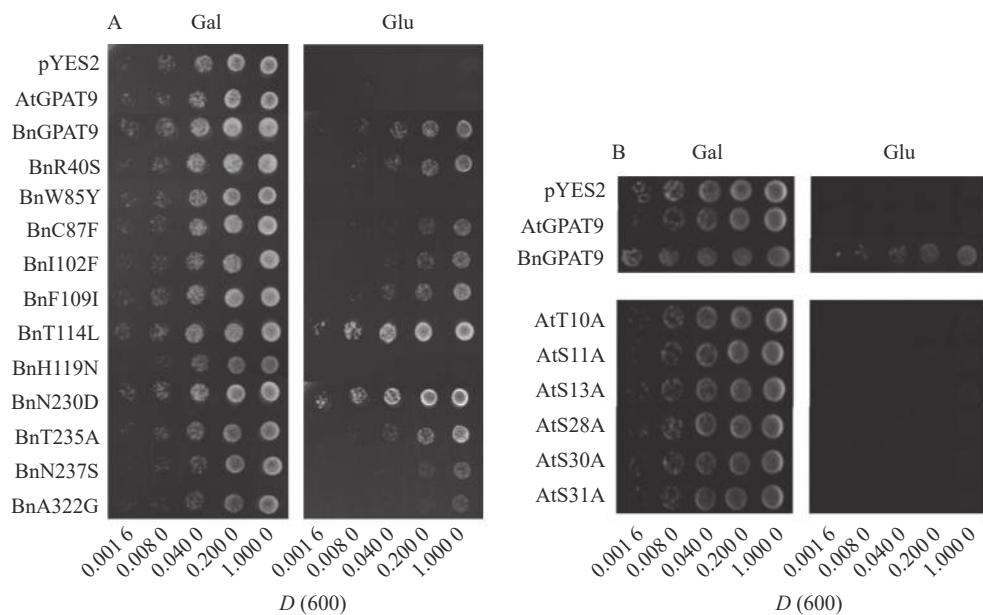
类似地,对 19 个不同的 *AtGPAT9* 突变基因进行了酵母遗传互补鉴定,其中的 6 个编码蛋白分别在 N 端的潜在磷酸化位点发生 T10A、S11A、S13A、S28A、S30A 和 S31A 替换,另外 13 个分别发生了 S40R、Y85W、F87C、F102I、I109F、L114T、N119H、D230N、A235T、S237N、G322A、L335H 和 P355S 替换。结果显示:N 端 6 个潜在磷酸化位点分别替换成中性氨基酸残基并不能改善 AtGPAT9 活性

表2 AtGPAT9和BnGPAT9中单和多位点氨基酸残基的定点突变

Table 2 Site-directed mutagenesis of amino acid residues at single and multiple sites in AtGPAT9 and BnGPAT9

单个氨基酸残基突变		AtGPAT9氨基酸残基突变组合	
BnGPAT9	AtGPAT9		
BnR40S**	AtT10A	AtF102I/S237N	AtY85W/D230N
BnW85Y	AtS11A	AtI109F/S237N	AtY85W/A235T
BnC87F**	AtS13A	AtD230N/A235T	AtY85W/S237N**
BnI102F**	AtS28A	AtD230N/S237N	AtY85W/D230N/A235T
BnF109I**	AtS30A	AtA235T/S237N	AtY85W/D230N/S237N
BnT114L***	AtS31A	AtD230N/A235T/S237N	AtY85W/A235T/S237N
BnH119N	AtS40R	AtS237N/G322A	AtY85W/D230N/A235T/S237N
BnN230D***	AtY85W	AtY85W/N119H***	AtS40R/Y85W/S237N**
BnT235A**	AtF87C	AtY85W/L114T/N119H*	AtN119H/D230N
BnN237S*	AtF102I	AtY85W/N119H/S237N***	AtN119H/A235T
BnA322G*	AtI109F	AtY85W/L114T/N119H/S237N***	AtN119H/S237N***
	AtL114T	AtY85W/N119H/D230N**	AtN119H/D230N/A235T
	AtN119H*	AtY85W/N119H/A235T**	AtN119H/D230N/S237N**
	AtD230N		AtN119H/A235T/S237N***
	AtA235T		AtN119H/D230N/A235T/S237N
	AtS237N		
	AtG322A		
	AtL335H		
	AtP355S		

说明：每种突变以物种的首字母缩写和突变前后的氨基酸残基缩写表示，如 AtS40R/S237N 代表 AtGPAT9 的 40 位由丝氨酸 (S) 变为精氨酸 (R)，237 位由丝氨酸 (S) 变为天冬酰胺 (N)。*代表基因的异源表达能够恢复酵母双突变体 ZAFU1 的生长缺陷；*数目代表恢复能力的大小，数目越多，能力越强。



A. 单位点突变对 BnGPAT9 酶活性的影响; B. 单位点突变对 AtGPAT9 酶活性的影响。为了评估氨基酸残基替换对 GPAT9 酶活性的影响,携带不同突变位点的 AtGPAT9 或 BnGPAT9 在条件致死型双突变体酵母 ZAFU1 中表达,表达产物的活性通常与酵母菌的生长速率呈正相关。相关的酵母细胞浓度梯度稀释培养实验,在不同时期至少重复了 4 次,每次结果的趋势一致。除了用空载体 pYES2 作为阴性对照外,野生型拟南芥 AtGPAT9 和油菜 BnGPAT9 分别作为阴性对照和阳性对照。

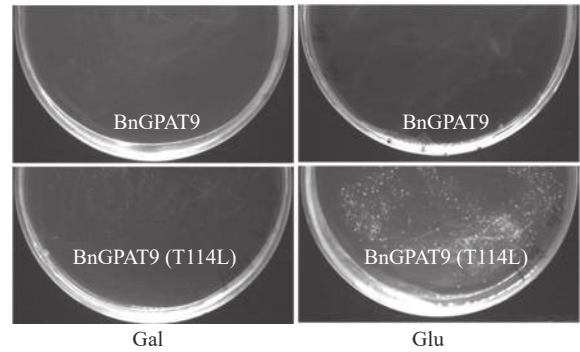
图3 不同单位点突变对 AtGPAT9 和 BnGPAT9 酶活性的影响

Figure 3 Effects of different single mutations on AtGPAT9 and BnGPAT9 activities

(图 3B)。除了 N119H，其他的单位点突变亦对 AtGPAT9 在酵母异源系统中的活性不产生可见影响(表 2)。在酵母菌浓度梯度稀释培养实验中，N119H 替换能使 AtGPAT9 恢复 ZAFU1 突变体在葡萄糖上的生长缺陷，但这种作用相对较弱(表 2，图 5D)。

2.4 多个氨基酸残基突变对 GPAT9 活性的交互影响

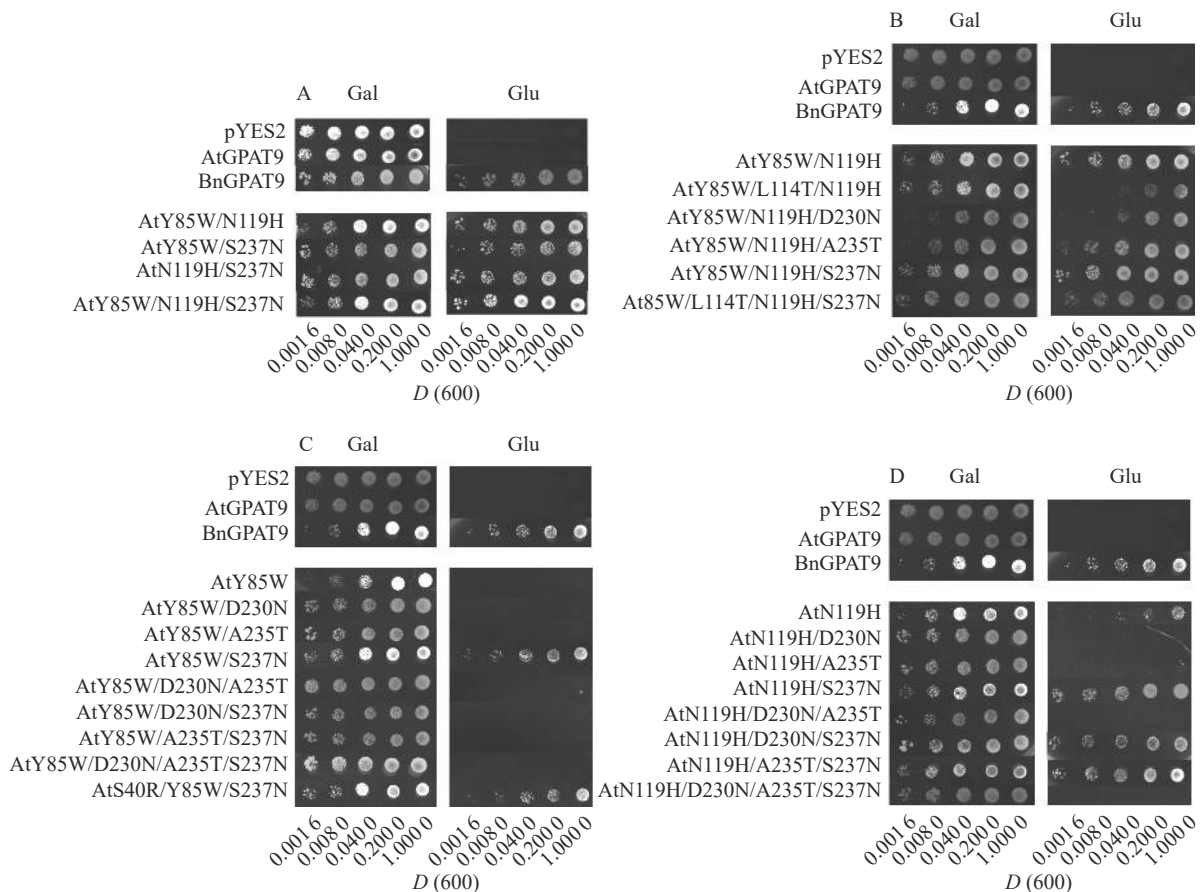
基于相邻与非相邻氨基酸残基之间均可能对酶活性产生某种特定的互作效应的假设，根据 AtGPAT9 和 BnGPAT9 之间存在的氨基酸差异，进一步构建了 28 个含有 2~4 个氨基酸残基替换的 AtGPAT9 突变酶。与 W85、H119 和 N237 位点对 BnGPAT9 活性产生重要调节作用一致，同步替换 AtGPAT9 上 2 或 3 个相应位点的氨基酸残基(Y85W、N119H、S237N)均能大幅提高 AtGPAT9 酶活性，表现为携带 Y85W/N119H、Y85W/S237N、N119H/S237N、Y85W/N119H/S237N 突变的 AtGPAT9 均能互补菌株 ZAFU1 的生长缺陷(图 5A)；不过，单位点突变对 AtGPAT9 活性的影响十分有限(表 2)。进一



转化酵母在固体培养基上生长 48 h 后进行拍摄，以比较野生型 BnGPAT9 和突变基因对 ZAFU1 突变体酵母细胞生长速度的影响。经约 3 d 的生长，表达野生型 BnGPAT9 的酵母菌落呈可见状态，而 T114L 突变使肉眼可见的菌落出现时间提前大约 1 d。BnGPAT9(T114L)为携带 T114L 的 BnGPAT9。

图 4 亮氨酸替换 114 位的苏氨酸(T114L)对 BnGPAT9 活性的影响

Figure 4 Effects of the substitution of threonine for leucine at residue 114 (T114L) on BnGPAT9 activity



A. 85、119、237 位点突变对 AtGPAT9 酶活性的影响；B. 114 位点与其他位点突变组合对 AtGPAT9 酶活性的影响；C. 85 位与其他位点突变组合对 AtGPAT9 酶活性的影响；D. 119 位与其他位点突变组合对 AtGPAT9 酶活性的影响。为了评估氨基酸残基替换对 GPAT9 酶活性的影响，携带不同突变位点的 AtGPAT9 在条件致死型双突变体酵母 ZAFU1 中表达，表达产物的活性通常与酵母菌的生长速率呈正相关。相关的酵母细胞浓度梯度稀释培养实验，在不同时期至少重复了 4 次，每次结果的趋势一致。除了用空载体 pYES2 作为阴性对照外，野生型拟南芥 AtGPAT9 和油菜 BnGPAT9 分别作为阴性对照和阳性对照。

图 5 多位点突变对 AtGPAT9 酶活性的影响

Figure 5 Effects of mutations at multiple sites on AtGPAT9 activity

步调查发现：携带 Y85W/N119H 或 Y85W/N119H/S237N 突变组合的 AtGPAT9 比野生型 BnGPAT9 更能促进菌株 ZAFU1 的生长，且与携带 T114L 突变的 BnGPAT9 具有相近的作用效果 (图 3A, 图 5A)。

为了更好地剖析 114 位氨基酸性质对 GPAT9 活性的调节作用以及与其他氨基酸相互作用产生的效应，将双位点突变酶 AtGPAT9 (Y85W/N119H) 和三位点突变酶 AtGPAT9 (Y85W/N119H/S237N) 的 114 位亮氨酸 (L114) 替换为 BnGPAT9 相应位置存在的苏氨酸 (T)。结果显示：生成的三位点突变酶 AtGPAT9 (Y85W/L114T/N119H) 的活性明显弱于 AtGPAT9 (Y85W/N119H)，但四位点突变酶 AtGPAT9 (Y85W/L114T/N119H/S237N) 仍与 AtGPAT9 (Y85W/N119H/S237N) 的活性相当 (图 5B)。对这种现象的可能解释是，当 2 个潜在磷酸化位点即 T114 和 S237 同时出现于 AtGPAT9 (Y85W/L114T/N119H) (其中含 S237) 或 BnGPAT9 (N237S) (其中含 T114) 时，GPAT9 的磷酸化程度可能加剧，从而抑制酶的活性。因此，推测植物 GPAT9 活性可能受磷酸化和非磷酸化机制调节，野生型 GPAT9 中存在的 2 个潜在磷酸化位点 T114 和 S237 可能对酰基转移酶活性产生负面效应。

进一步研究发现：230 位氨基酸残基能与 85、119 位氨基酸残基产生互作效应而影响 GPAT 活性。虽然 D230N 本身或与 A235T、S237N 组合突变未能对 AtGPAT9 酶活性产生明显影响 (表 2)，但当与 N119H、Y85W/N119H 或 Y85W/S237N 结合时，D230N 突变能对 AtGPAT9 活性产生抑制作用。这是因为，与表达含 N119H、Y85W/N119H 或 Y85W/S237N 突变位点的酶的菌株相比，表达 AtGPAT9 (N119H/D230N)、AtGPAT9 (Y85W/N119H/D230N) 或 AtGPAT9 (Y85W/D230N/S237N) 的菌株 ZAFU1 在葡萄糖培养基上呈现生长速率明显减弱或不能生长的现象，暗示着 D230N 的替换不利于 AtGPAT9 活性 (表 2, 图 5B~D)。这一推测得到下述结果的支持，即 N230D 替换能提高 BnGPAT9 活性 (图 3A)。但是 AtGPAT9 (N119H/D230N/S237N) 与 AtGPAT9 (N119H/S237N) 的活性相当，这说明 D230N 的负效应依赖于其他氨基酸的互作关系 (表 2, 图 5D)。

另外，N119H/D230N/S237N 和 N119H/A235T/S237N 三突变组合均能提高 AtGPAT9 活性，使之具有拯救 ZAFU1 生长缺陷的能力，但在前者 and 后者中分别添加 A235T 和 D230N 得到的 N119H/D230N/A235T/S237N 四突变组合，能使相应蛋白丧失 GPAT 活性，如野生型 AtGPAT9 一样，无法恢复 ZAFU1 的生长缺陷 (表 2, 图 5D)。此外，无论是 S237N 和 G322A 单或双替换，均不能增强 AtGPAT9 在酵母中表达时的活性 (表 2)，这与 N237S 或 A322G 的替换导致 BnGPAT9 活性下降现象不一致。由此可见，尽管在 237 位保留非磷酸化氨基酸 (天冬酰胺, N) 对 BnGPAT9 活性有利，但其效应取决于其他位置的氨基酸性质。

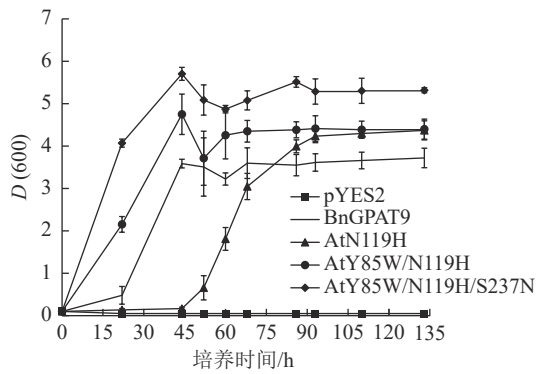
综上所述，GPAT9 的酶活性受 85、114、119、230、237 和 322 位氨基酸残基性质的影响，它们之间存在互作效应；当这些位置的氨基酸残基分别为色氨酸 (W)、亮氨酸 (L)、组氨酸 (H)、天冬氨酸 (D)、天冬酰胺 (N) 和丙氨酸 (A) 时，酰基转移酶的活性较高。上述多位点突变增强 AtGPT9 酶活性的事实说明：运用分子设计能有效地改造和优化酰基转移酶的结构，并使之产生新的特性，这对将来人为操控甘油脂的从头合成十分有益。

2.5 异源表达突变酶对酵母油脂合成的影响

为进一步探究氨基酸位点突变对 GPAT9 功能的影响，选取了 3 个活性程度不同的 AtGPAT9 突变酶，分别含 N119H、Y85W/N119H 和 Y85W/N119H/S237N 突变，使其进行异源表达，测定其表达对酵母细胞中 TAG 合成的影响；阳性对照为野生型 BnGPAT9。当相应酵母细胞的生长进入平台生长期时，提取总脂质，经薄层层析分离后，采用气相色谱法测定 TAG 含量。

需要指出的是，因不同突变酶活性的差异，相应酵母菌到达平台生长期所需的培养时间不一，且平台生长期时的细胞密度也不完全相同。譬如，表达 BnGPAT9、AtGPAT9 (Y85W/N119H) 和 AtGPAT9 (Y85W/N119H/S237N) 的酵母细胞在平台生长期时的细胞密度，以 $D(600)$ 表示，分别为 3.72、4.40、5.32 (图 6)。总体而言，酶活性愈大，细胞生长越快、密度越高。

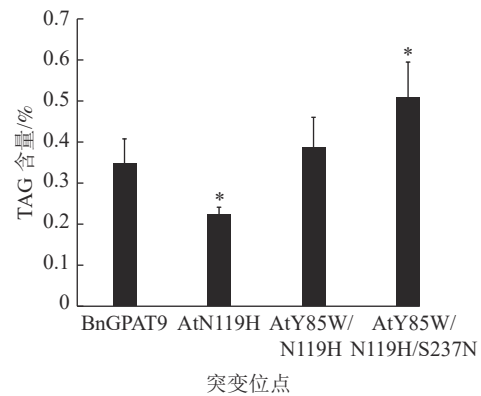
脂质分析显示：AtGPAT9 (Y85W/N119H/S237N) 的表达使突变体酵母 ZAFU1 细胞中的 TAG 含量达 0.51%，而 BnGPAT9 和 AtGPAT9 (Y85W/N119H) 的表达则分别产生 0.35% 和 0.39% 的含油量，前者比后两者分别增加了 45.7% 和 30.8% (图 7)。与 AtGPAT9 (N119H) 具有相对较低的活性一致，表达此酶的酵母细胞，其 TAG 含量仅为 0.22%，显著低于表达 BnGPAT9 的酵母细胞 (0.35%)。以上结果表明：酵



结果以平均值±标准差 ($n=3$) 表示, AtN119H、AtY85W/N119H 和 AtY85W/N119H/S237N 分别代表携带 N119H、Y85W/N119H 和 85W/N119H/S237N 突变位点的拟南芥 AtGPAT9。油菜 BnGPAT9 为阳性对照, 空载体 pYES2 为阴性对照。

图 6 含不同突变位点的 AtGPAT9 表达对不同生长期酵母菌株 ZAFU1 的细胞密度影响

Figure 6 Effects of expression of AtGPAT9 bearing different mutation sites on cell density of the yeast strain ZAFU1 in different periods of growth



结果以平均值±标准差 ($n=3$) 显示, 使用单因素方差分析进行统计分析。*表示与表达 BnGPAT9 的 ZAFU1 细胞有显著差异 ($P<0.05$)。AtN119H、AtY85W/N119H 和 AtY85W/N119H/S237N 分别代表携带 N119H、Y85W/N119H 和 85W/N119H/S237N 突变位点的拟南芥 AtGPAT9。油菜 BnGPAT9 为阳性对照。

图 7 含不同突变位点的 AtGPAT9 表达对平台生长期酵母菌株 ZAFU1 的 TAG 含量影响

Figure 7 Effects of expression of AtGPAT9 bearing different mutation sites on TAG content of the yeast strain ZAFU1 at the stationary phase

母细胞中 TAG 的合成能力受 GPAT 活性的调节, 而 GPAT 活性大小与特定位置的氨基酸性质密切相关, 因此通过分子设计优化 GPAT9 的氨基酸组成将有助于修饰细胞中 TAG 的合成能力。

3 讨论

提高油料作物油脂的合成对于保障食用油的供需平衡至关重要; 相反, 人类细胞中油脂合成能力的增强并非对健康有利, 因为这会诱发肥胖症和心血管疾病等。目前人们试图运用遗传或化学遗传方法操控 TAG 的生物合成^[11-16], 但仍存在诸多因素影响, 如人们对 TAG 合成途径中酶的结构与功能的内在关系知之甚少, 这阻碍了酶结构的优化, 并限制了基于翻译后修饰机制调控酶活性的技术开发。本研究充分利用 GPAT 专一的酵母遗传互补法^[25,31], 鉴定控制植物 GPAT9 酶活性的关键氨基酸位点以及不同位点之间存在的互作效应, 以深化对酰基转移酶结构与功能内在关系的认知, 为将来运用合成生物学等手段有效操控真核生物中 TAG 的合成提供基础。

植物 GPAT9 与哺乳动物 GPAT3 结构相似, 两者均参与极性膜脂和中性三酰甘油的生物合成^[20-22]。尽管 AtGPAT9 和 BnGPAT9 序列相似性大于 90%, 它们在酵母异源表达时呈现的活性却相去甚远^[23-24], 这一特性有助于有效寻找调控酶活性的候选位点。在此基础上, 本研究首次明确了酰基转移酶保守结构域外的 6 个氨基酸位点对植物 GPAT 酶活性的重要调节作用。

3.1 W85 和 H119 对 GPAT9 膜结合性质的影响

AtGPAT9 的 N 端和 C 端均暴露于细胞质, 意味着该蛋白应有偶数个跨膜结构域^[20], 然而这与生物信息学预测结果不一致, 即 AtGPAT9 含 3 个潜在的跨膜结构域。对于这一现象的可能解释是, 位于 N 端的几个脯氨酸残基可能会形成一个铰链状结构, 使得疏水结构域 I 不能跨膜, 而是附着在内质网的表面^[20]。基于 85 和 119 位氨基酸残基分别位于预测的第 I 和 II 个疏水结构域这一特点推测, 将 85 位的疏水色氨酸替换成亲水的酪氨酸 (Y) 或将 119 位带正电荷的组氨酸替换成中性的天冬酰胺, 可能会改变 GPAT9 在膜中的组装方式^[33], 这可能是构成 AtGPAT9 的酶活性低于 BnGPAT9 的原因之一。

3.2 磷酸化机制调节对 GPAT9 活性的影响

本研究结果表明: 尽管 AtGPAT9 的 N 端的 6 个磷酸化位点单独突变 (T10A、S11A、S13A、S28A、S30A 和 S31A) 不能增强 AtGPAT9 在酵母异源表达时的活性, 但 T114L 替换能增强 BnGPAT9 酶活性, 而 N237S 替换则降低其活性。当 114 和 237 位氨基酸残基为非磷酸化氨基酸, 即亮氨酸和天冬酰胺, 而

不是潜在的磷酸化位点苏氨酸 (T) 和丝氨酸 (S) 时, AtGPAT9 和 BnGPAT9 突变酶保持较高活性。因此, 推测 GPAT9 的活性受磷酸化机制调节, 在 114 和 237 位点的磷酸化程度升高不利于维持酰基转移酶的活性。这种假设可以在某种程度上得到过去研究的支持。蛋白质磷酸化与非磷酸化修饰是酶活性的一种重要调节方式, 已有研究报道哺乳动物线粒体 GPAT (mtGPAT1) 通过其 C 端 S632 和 S639 残基的磷酸化修饰调节其活性, 酵母 GPAT (Gat1p 和 Gat2p) 的 C 端氨基酸残基发生磷酸化后也能使酶活性下调^[34-35]。

3.3 多个氨基酸位点的互作效应对酰基转移酶活性的影响

当多个氨基酸残基同时突变时, 它们之间的物理相互作用会导致蛋白质分子内的上位效应^[36]。某些氨基酸残基突变组合可以产生协同作用, 即产生正向上位效应, 如 Y85W、N119H 和 S237N 任意突变组合均能增强 AtGPAT9 活性。相反, 其他突变组合可能形成拮抗作用, 导致负向上位效应, 下调酶活性或彻底损伤蛋白质功能, 正如 AtGPAT9 (N119H/D230N/A235T/S237N) 突变酶中 4 个氨基酸残基相互间的某种拮抗作用导致该突变酶在酵母 ZAFU1 中无法发挥功能。230、235 和 237 位氨基酸残基位置相近, 且位于酰基转移酶保守结构域 II 中的精氨酸 (R215) 和 III 中的谷氨酸 (E245) 之间; 鉴于 R215 和 E245 这 2 个氨基酸残基对 GPAT 的底物结合至关重要^[18], 推测 230、235 和 237 位氨基酸残基与其他位点之间存在的复杂互作效应对酶活性的影响可能与其干扰 3-磷酸甘油底物结合区域的三维结构有关^[37]。

尽管 N237S 或 A322G 单位点突变均能降低 BnGPAT9 的活性, 但无论是 S237N 和 G322A 单或双替换均不能增强 AtGPAT9 的活性, 这从一个侧面说明 237 和 322 位氨基酸的作用均极大地受到其他氨基酸的理化性质影响。但需要指出的是, 两者的作用方式可能不一。如前所述, 237 位氨基酸的磷酸化状态可能对酶活性产生某种调节作用, 而 322 位的丙氨酸被甘氨酸取代可能会影响蛋白构象的稳定性, 这是因为甘氨酸侧链小, 仅有 1 个氢原子, 这不利于 α -螺旋结构的稳定。与此一致, 三维空间结构预测显示: BnGPAT9 中的 A322 与 AtGPAT9 中的 G322 相比, 前者在空间上更靠近 114、119、230、235、237 位氨基酸残基 (它们可能与酶活性中心形成有关), 这可能会对 GPAT9 活性产生正面效应。鉴于 237 与 322 位氨基酸的重要作用, 将来有必要进一步探究在这 2 个氨基酸位点的何种替换有利于增强酰基转移酶的活性。

4 结论

本研究首次报道了 6 个位于酰基转移酶保守区域外的 GPAT9 酶活性调控位点及其复杂的互作效应, 从而深化了对酰基转移酶结构与功能内在关系的认知, 为酰基转移酶的分子改造与结构优化提供了理论基础。另外, 构建的 GPAT9 变异基因可用于探索植物中 TAG 的生物合成机制, 特别是磷酸化-非磷酸化调控机制对 GPAT 酶活性的调节作用。

5 参考文献

- [1] ATHENSTAEDT K, DAUM G. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, **266**(1): 1–16.
- [2] MURATA N, TASAKA Y. Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, **1348**(1/2): 10–16.
- [3] GIMENO R E, CAO Jingsong. Thematic review series: glycerolipids. mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity [J]. *Journal of Lipid Research*, 2008, **49**(10): 2079–2088.
- [4] WENDEL A A, LEWIN T M, COLEMAN R A. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, **1791**(6): 501–506.
- [5] ZHENG Zhifu, ZOU Jitao. The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(45): 41710–41716.
- [6] ZHENG Zhifu, XIA Qun, DAUK M, *et al.* Arabidopsis AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility [J]. *The Plant Cell*, 2003, **15**(8): 1872–

- 1887.
- [7] ZOU Jitao, WEI Yangdou, JAKO C, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene [J]. *The Plant Journal*, 1999, **19**(6): 645 – 653.
- [8] DAHLQVIST A, STAHL U, LENMAN M, *et al.* Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(12): 6487 – 6492.
- [9] STÅHL U, CARLSSON A S, LENMAN M, *et al.* Cloning and functional characterization of a phospholipid: diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, **135**(3): 1324 – 1335.
- [10] ZHANG Meng, FAN Jilian, TAYLOR D C, *et al.* DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development [J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(12): 3885 – 3901.
- [11] WYDYSH E A, MEDGHALCHI S M, VADLAMUDI A, *et al.* Design and synthesis of small molecule glycerol 3-phosphate acyltransferase inhibitors [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, **52**(10): 3317 – 3327.
- [12] WYDYSH E A, VADLAMUDI A, MEDGHALCHI S M, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally constrained glycerol 3-phosphate acyltransferase inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, **18**(17): 6470 – 6479.
- [13] ELLIS J M, PAUL D S, DEPETRILLO M A, *et al.* Mice deficient in glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 have a reduced susceptibility to liver cancer [J]. *Toxicologic Pathology*, 2012, **40**(3): 513 – 521.
- [14] CAO Jingsong, PEREZ S, GOODWIN B, *et al.* Mice deleted for GPAT3 have reduced GPAT activity in white adipose tissue and altered energy and cholesterol homeostasis in diet-induced obesity [J/OL]. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2014, **306**(10): E1176-1187[2022-12-12]. doi: 10.1152/ajpendo.00666.2013.
- [15] OUTLAW V K, WYDYSH E A, VADLAMUDI A, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of 4- and 5-substituted o-(octanesulfonamido)benzoic acids as inhibitors of glycerol-3-phosphate acyltransferase [J]. *Medchemcomm*, 2014, **5**(6): 826 – 830.
- [16] PELLON-MAISON M, MONTANARO M A, LACUNZA E, *et al.* Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 behaves as a cancer testis gene and promotes growth and tumorigenicity of the breast cancer MDA-MB-231 cell line [J/OL]. *PLoS One*, 2014, **9**(6): e100896[2022-12-12]. doi: 10.1371/journal.pone.0100896.
- [17] TURNBULL A P, RAFFERTY J B, SEDELNIKOVA S E, *et al.* Analysis of the structure, substrate specificity, and mechanism of squash glycerol-3-phosphate (1)-acyltransferase [J]. *Structure*, 2001, **9**(5): 347 – 353.
- [18] LEWIN T M, WANG Ping, COLEMAN R A. Analysis of amino acid motifs diagnostic for the *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction [J]. *Biochemistry*, 1999, **38**(18): 5764 – 5771.
- [19] YANG S U, KIM J, KIM H, *et al.* Functional characterization of *Physcomitrellapatens* glycerol-3-phosphate acyltransferase 9 and an increase in seed oil content in *arabidopsis* by its ectopic expression [J/OL]. *Plants*, 2019, **8**(8): 284[2022-12-12]. doi: 10.3390/plants8080284.
- [20] GIDDA S K, SHOCKEY J M, ROTHSTEIN S J, *et al.* *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, **47**(10): 867 – 879.
- [21] SHOCKEY J, REGMI A, COTTON K, *et al.* Identification of *Arabidopsis* GPAT9 (At5g60620) as an essential gene involved in triacylglycerol biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2016, **170**(1): 163 – 179.
- [22] SINGER S D, CHEN Guanqun, MIETKIEWSKA E, *et al.* *Arabidopsis* GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, **67**(15): 4627 – 4638.
- [23] 陈丹丹. 拟南芥3-磷酸甘油酰基转移酶2/3/9的结构与功能分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
CHEN Dandan. *Structure and Functional Analysis of Arabidopsis thaliana Glycerol-3-phosphate Acyltransferase 2/3/9* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2019.
- [24] 段芊芊, 林怡馨, 丁硕, 等. 13个甘蓝型油菜GPATs编码基因的酵母遗传互补功能鉴定[J]. *农业生物技术学报*, 2020, **28**(7): 1156 – 1164.
DUAN Qianqian, LIN Yixin, DING Shuo, *et al.* Functional identification of 13 *Brassica napus* GPATs encoding genes by

- genetic complementation in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, **28**(7): 1156 – 1164.
- [25] LEI Jie, MIAO Yingchun, LAN Yu, *et al.* A novel complementation assay for quick and specific screen of genes encoding glycerol-3-phosphate acyltransferases [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 353 [2022-12-12]. doi: 10.3389/fpls.2018.00353.
- [26] WASCHBURGER E, KULCHESKI F R, VETO N M, *et al.* Genome-wide analysis of the glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene family reveals the evolution and diversification of plant GPATs [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2018, **41**(suppl 1): 355–370.
- [27] 邢蔓, 周雪晴, 何婷, 等. 甘蓝型油菜*BnGPAT9*基因表达模式及其苗期非生物胁迫表达分析[J]. *中国油料作物学报*, 2017, **39**(4): 454 – 461.
- XING Man, ZHOU Xueqing, HE Ting, *et al.* Expression pattern of *BnGPAT9* gene in *Brassica napus* and its expression under abiotic stresses [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2017, **39**(4): 454 – 461.
- [28] KROGH A, LARSSON B, von HEIJNE G, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **305**(3): 567 – 580.
- [29] OMASITS U, AHRENS C H, MÜLLER S, *et al.* Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data [J]. *Bioinformatics*, 2014, **30**(6): 884 – 886.
- [30] YANG Jianxi, YAN Renxiang, ROY A, *et al.* The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction [J]. *Nature Methods*, 2015, **12**(1): 7 – 8.
- [31] 陈丹丹, 刘宏波. 筛选*GPAT*基因的酵母遗传互补体系的优化[J]. *江苏农业科学*, 2019, **47**(13): 64 – 66.
- CHEN Dandan, LIU Hongbo. Optimization of yeast genetic complementary system for screening *GPAT* genes [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, **47**(13): 64 – 66.
- [32] SUN Baocheng, GUO Xuejie, FAN Chengming, *et al.* Newly identified essential amino acids affecting *Chlorella ellipsoidea* DGAT1 function revealed by site-directed mutagenesis [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**(11): 3462 [2022-12-12]. doi: 10.3390/ijms19113462.
- [33] HEATH R J, ROCK C O. A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(6): 1425 – 1430.
- [34] BRONNIKOV G E, ABOULAICH N, VENER A V, *et al.* Acute effects of insulin on the activity of mitochondrial GPAT1 in primary adipocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, **367**(1): 201 – 207.
- [35] BRATSCHI M W, BURROWES D P, KULAGA A, *et al.* Glycerol-3-phosphate acyltransferases gat1p and gat2p are microsomal phosphoproteins with differential contributions to polarized cell growth [J]. *Eukaryotic Cell*, 2009, **8**(8): 1184 – 1196.
- [36] MITON C M, BUDA K, TOKURIKI N. Epistasis and intramolecular networks in protein evolution [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2021, **69**: 160 – 168.
- [37] HEATH R J, ROCK C O. A missense mutation accounts for the defect in the glycerol-3-phosphate acyltransferase expressed in the *plsB26* mutant [J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**(6): 1944 – 1946.