

accuracy of solution protein structures determined by NMR, and extended the molecular weight limit. Several structures of proteins of 30 ku have been solved using ^{15}N , ^{13}C , ^2H labeling multidimensional NMR techniques, and this limit will probably be

surpassed in the near future.

Key words nuclear magnetic resonance, protein three-dimensional structure, liquid crystal, dipolar coupling, isotope labeling

纤维素酶分子结构和功能研究进展*

阎伯旭 齐 飞 张颖舒 高培基¹⁾

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

摘要 概述了近 10 年来利用结构生物学和蛋白质工程技术在纤维素酶分子结构和功能方面研究的进展, 包括: 酶分子结构域的拆分、催化域和纤维素结合结构域的结构和功能的研究, 纤维素酶的分子折叠, 并展望了该领域的研究前景.

关键词 纤维素酶, 催化结构域, 纤维素结合域结构域, 分子折叠, 活性位点, 双置换机制

学科分类号 Q936

纤维素这一巨大可再生资源的有效利用对解决环境污染、食品短缺、能源危机具有重大现实意义, 利用微生物产生的纤维素酶来分解和转化纤维素则是纤维素利用的有效途径, 故对纤维素酶的研究越来越引起人们的重视. 纤维素酶的研究, 自从 1904 年在蜗牛消化液中被发现, 至今已经历三个发展阶段. 第一阶段是 80 年代以前, 主要工作是利用生物化学的方法对纤维素酶进行分离纯化. 但由于纤维素酶来源广泛、组分复杂、纯化甚为困难, 故进展缓慢. 第二阶段是 1980 年至 1988 年, 主要工作是利用基因工程的方法对纤维素酶的基因进行克隆和一级结构的测定. *Trichoderma reesei* 的内切酶 (EG I、EG III) 和外切酶 (CBH I、CBH II)、*Cellulomonas fimi* 的内切酶 (CenA、CenB、CenC、CenD) 和外切酶 (CbhA、CbhB、Cex)、*Clostridium thermocellum* 的内切酶 (CelA、CelB、CelC、CelD) 的基因已被克隆和测序, 并在大肠杆菌、酵母菌等中得到表达. 第三阶段是 1988 年至今, 主要工作是利用结构生物学及蛋白质工程的方法对纤维素酶分子的结构和功能进行研究, 包括纤维素酶结构域的拆分、解析、功能性氨基酸的确定、水解的双置换机制的确立, 分子折叠和催化机制关系的探讨.

1 纤维素酶分子结构域的拆分

1986 年 Tilbeurgh^[1] 用木瓜蛋白酶有限酶切

Trichoderma reesei 的 CBH I 分子得到具有独立活性的两个结构域: 一个是具有催化功能的催化域 (catalytic domain, CD), 另一个是具有结合纤维素功能的纤维素结合 (吸附) 区 (cellulose binding domain, CBD), 之后用类似的方法在多种细菌和真菌的纤维素酶中发现类似的结构. CBD 在纤维素酶中位于氨基端或羧基端, 它通过一段高度糖基化的 linker 与催化区相连.

细菌纤维素酶的 linker 富含 Pho、Thr, 而真菌纤维素酶的 linker 富含 Gly、Ser、Thr; 细菌纤维素酶的 CBD 与 CD 夹角为 135° , 而真菌为 180° ; 细菌纤维素酶有两个酶切位点可将 CBD 与 linker 分别切去, 而真菌纤维素酶一般只有一个酶切位点可将 CBD 与 linker 一同切去.

由于纤维素全酶分子呈蝌蚪状、其 linker 高度糖基化且具有较强柔韧性, 故很难得到结晶. 而结构域的拆分使呈球形催化域的结晶成为可能, 为纤维素酶的结构和功能研究开辟了道路.

2 催化域结构和功能的研究

采用 X 光衍射的方法 1990 年 Rouvinen^[2] 对 *T. reesei* 的 CBH II 的催化域、1992 年 Juy^[3] 对 *C. thermocellum* 的 CelD 的催化域、1993 年 Spezio^[4]

* 国家教委博士点基金资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-02-19, 修回日期: 1998-05-29

对 *T. fusca* 的 E2 的催化域、1994 年 Divne^[5] 对 *T. reesei* 的 CBH I 的催化域进行了结晶和解析。三维结构的研究为内切酶和外切酶底物的特异性作出了合理的解释：内切酶的活性位点位于一个开放的 cleft 中，它可结合与纤维素链的任何部位并切断纤维素链；外切酶的活性位点位于一个长 Loop 所形成的 tunnel 里面，它只能从纤维素链的非还原性末端切下纤维二糖。1995 年 Meinke^[6] 利用蛋白质工程的方法将 *C. fimi* 的外切酶 CbhA 分子的 Loop 删除后，发现该酶的内切酶活性果然提高，这进一步证实了上述分析。

催化域功能的研究。1990 年 Sinnott^[7] 从化学机制的角度出发论述了酶催化糖基转移的机制，他认为糖苷配基的离去是涉及到两个氨基酸残基的酸碱催化的双置换反应，这实际与溶菌酶的作用机制是相似的。1988 年至 1994 年采用定点突变技术和酶专一性抑制剂做了大量研究^[8-12]，终于证明 Glu 位于细菌、真菌的内切酶、外切酶、葡萄糖苷酶的活性位点；在异头碳原子位通过构型的保留或构型的转化完成催化反应，其中两个保守的羧基氨基酸分别作为质子供体和亲核试剂^[13,14] 水解双置换机制得以证明。

3 纤维素结合 (吸附) 区结构和功能的研究

自从 1986 年 Tilbeurgh 用木瓜蛋白酶有限酶切 *T. reesei* 的 CBH I 分子发现 CBD 以来，之后用类似的方法和序列缺失的方法在多种细菌、真菌的纤维素酶和半纤维素酶中发现了 CBD。1995 年 Tomme^[15] 根据 CBD 分子大小及氨基酸的相似性将已知的 CBD 分成了 10 个家族，大部分的 CBD 位于家族 I、II、III。家族 I 的 CBD 包括 33~40 个氨基酸残基，所有真菌的 CBD 都属于家族 I；家族 II 的 CBD 包括 95~108 个氨基酸残基，*C. fimi* 的 CBD 都属于家族 I；家族 III 的 CBD 位于那些能产生纤维小体的梭菌中。1989 年 Kraulis^[16] 用核磁共振的方法对 *T. reesei* CBH I 的 CBD、1995 年 Xu^[17] 对 *C. fimi* Cex 的 CBD 的三维结构进行了研究；1996 年 Tormo^[18] 用 X 光衍射的方法对 *C. thermocellum* 的 Cip 的 CBD 三维结构进行了研究。图 1 为它们的结构比较：尽管它们在分子大小和折叠构型上不同 (CBH I 的 CBD 是一个 β 折叠片形成的楔形结构，一面疏水、一面亲水，疏水面与底物表面接触；而后两者是 2 个 β 折叠片面对面形成的一个 β -sandwich)，但它们的吸附面是相似

的，都比较平坦、暴露了几个芳香族氨基酸 (CBH I 的 CBD 是 3 个 Tyr, Cex 的 CBD 是 2 个 Trp) 及一些潜在的氢键形成残基。

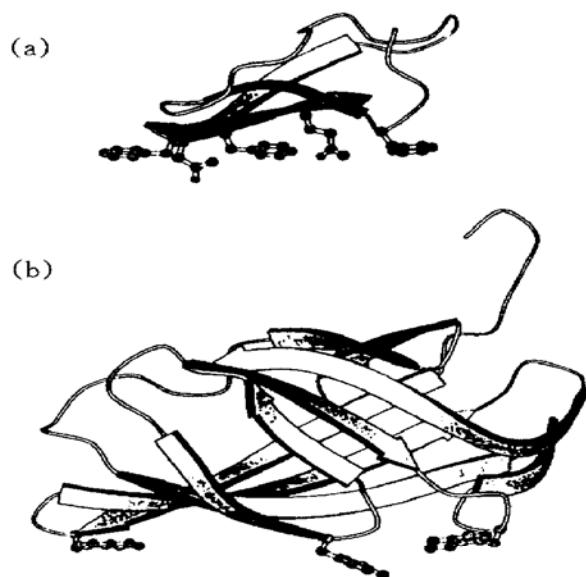


图 1 CBD 的骨架结构

(a) *T. reesei* CBH I 的 CBD; (b) *C. fimi* Cex 的 CBD.

CBD 功能的研究。CBD 的去除实验^[19] 表明：纤维素酶去除 CBD 后对可溶性底物活力影响较小，而对结晶纤维素的吸附和水解活力则有明显降低。化学突变和定点诱变^[20,21] 表明芳香族氨基酸在与结晶纤维素的吸附中发挥重要作用，它们的突变会导致 CBD 对结晶纤维素的吸附能力急剧下降。序列比较^[22] 表明与 CBH I 的 CBD 同族的几个 CBD 是用 Phe 或 Trp 代替了 Tyr。目前人们推测^[18]：CBD 可能通过芳香环与葡萄糖环的堆积力吸附到纤维素上，由 CBD 上其余的氢键形成残基与相邻葡萄糖链形成氢键将单个葡萄糖链从纤维素表面疏解下来，以利于催化区的水解作用。

纤维素酶分子结构和功能的研究使其对纤维素分子链 β -1, 4 糖苷键作用的底物特异性、水解机制作出了基本阐明。但关于 CBD 是如何吸附到纤维素表面、吸附后 CBD 是如何与催化区相互作用降解纤维素的问题目前尚未作出合理解释，因为它涉及到纤维素聚合物解链、解聚等超分子结构的变化。这一问题的解决将会为有效工程菌的构建、经济利用纤维素打下基础。

4 纤维素酶的分子折叠

糖苷酶主要包括水解酶和转移酶，根据其氨基

酸序列的相似性至少可分为 45 个族^[23, 24], 其中第 1, 2, 5, 10, 17, 30, 35, 39, 42 族中的水解酶分子的催化域近来认为可能是来自同一祖先^[25, 26], 这其中 150 余个酶的氨基酸序列得到了测定, 它们对 16 种不同的底物表现出了水解活力。

纤维素酶和半纤维素酶是这个庞大家族中的成员, 这些酶分子一般由催化结构域、纤维素结合域和一个连结二者的连接桥三部分组成。结晶结构的证据表明: 同一族的酶分子遵循相同的机制; 这些酶水解葡萄糖苷键通过一般的酸催化机制。与此相反, 不同族的酶分子可能有不同的机制, 并且可能有不同的折叠模型^[27]。在纤维素酶和半纤维素酶的研究中, 人们又根据同源性将它们分成九个族 (A~J)^[28]。目前, A, B, C, E, F 族中已有酶分子的结晶结构得到解析。这里我们讨论其分子折叠与催化的关系。

A 族, 这是九个族中最大的一族, 其中 *Clostridium thermocellum* 的内切酶 Celc 催化域的结构已得到解析^[29] (图 2a)。这个分子折叠成一个 $(\alpha/\beta)_8$ 的桶状结构, Glu 280, Glu 140 分别作亲核试剂和质子供体, Arg46, Asn139, His90, His198, Tyr200 和 Trp313 参与底物结合。

B 族, *Trichoderma reesei* 菌产生的外切酶 II (CBH II) 是这一族的代表^[30], 这个分子折叠成

$(\alpha/\beta)_7$ 折叠桶 (图 2b)。Asp175, Asp221 分别作为亲核试剂和质子供体, 色氨酸残基参与底物结合。

C 族, *Trichoderma reesei* 产生的外切酶 CBH I, *Fusarium oxysporum* 的内切酶 EG I 是这个族中的代表^[5]它们由 Loop 结构连接的 α/β 结构组成。EGIZ 中 Glu202 作为一般酸催化剂, Glu197 作为亲核试剂。Trp347, Trp356 参与底物结合 (图 2c)。

E 族, *Clostridium thermocellum* 的内切酶 CelD 属于这个族。它具有一个由 α/β 折叠成的桶状结构 (图 2d)。Glu555, Asp201 对其催化作用的执行发挥重要作用, Trp457, Trp400 参与底物结合。

F 族, *Cellomonas fimi* 中的外切酶 (Cex) 和 *Clostridium thermocellum* 中的木聚糖酶 (XynZ) 同属于这个族。XynZ 分子折叠与 Cex 相似, Glu574, Glu645 分别作为亲核试剂和质子供体。Trp795, Gln721, Trp600, His723 参与催化 (图 2e)。

已经确定所有的蛋白质折叠数量少于几千个, 这就产生了糖基水解酶的起源问题, 而且也揭示了具有不同底物专一性的水解酶可以有相似的折叠。在已知结构的几个酶分子中, 同一族的分子具有相似的折叠模型, 不同族之间也可以有相似的折叠。

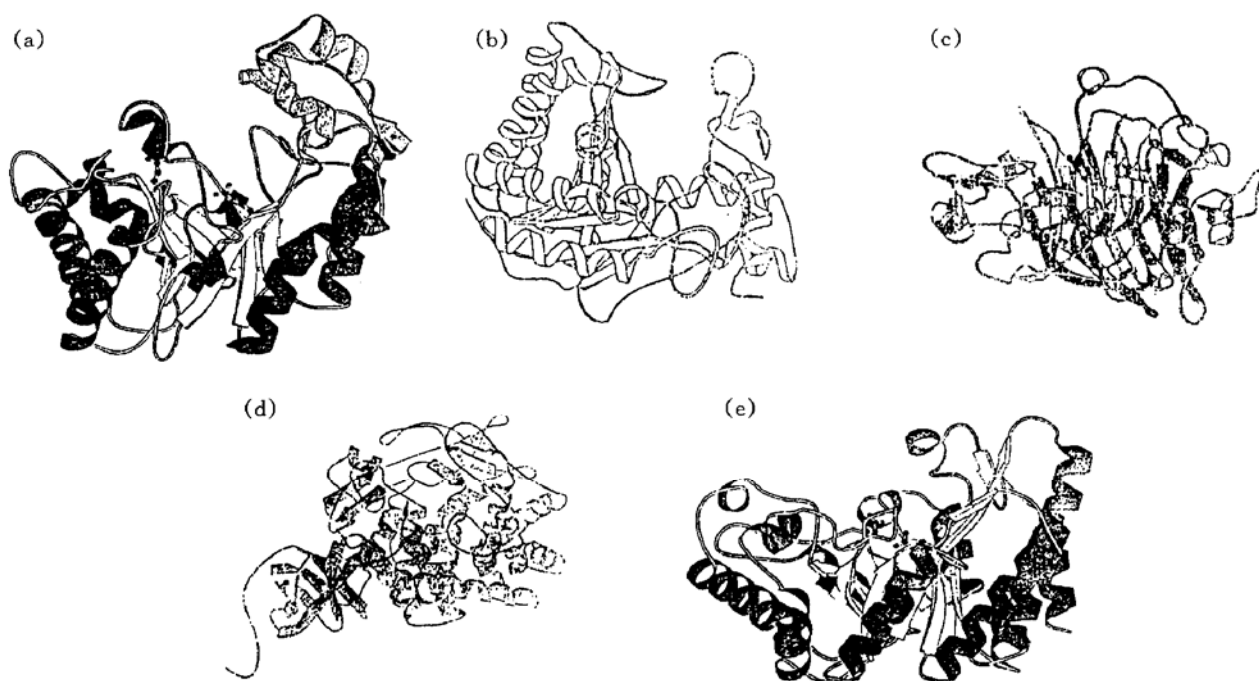


图 2 几个纤维素酶分子的折叠模型

(a) *Clostridium thermocellum* 的内切酶 Celc; (b) *Trichoderma reesei* 菌产生的外切酶 II (CBH II); (c) *Fusarium oxysporum* 的内切酶 EG I; (d) *Clostridium thermocellum* 的内切酶 CelD; (e) *Clostridium thermocellum* 的木聚糖酶 (XynZ)。

但它们都遵循双置换机制. 这表明了它们的活性位点具有相似的拓扑结构性^[27]. 鉴于蛋白质折叠比其氨基酸序列更具保守性, 则几族糖基水解酶完全有可能具有相似的折叠. A 族中的 Celc 和 F 族的 XynZ 两分子氨基酸序列的同源性和分子的底物专一性相差很大, 人们将它们分在不同的族内, 可它们整体结构 (图 2a, 2e) 和活性位点结构具有明显相似性 (图 3). 在同一族内, 活性位点的氨基酸残基是不变的, 但纤维素酶和木聚糖酶之间有所差别. 这也许同它们之间的底物专一性的差别有关, 这种差别主要在两个酶分子中与亲核试剂相关联的残基, 在 Celc 是 His198, tyr200; 在 XynZ 是 Gln721, His723. 这些残基都暴露于酶的活性位点的口袋中. 另一个差别是 Celc 中 Arg46, 它同几个酸性或极性的残基相互作用 (Asn9, asp88, Glu136, Asn139, Glu280), 这个残基在 A 族中是严格保守的, 但在 F 族中, 这个位置是一个 Val, 所以人们推测它们可能来源于同一祖先, 但不同的进化途径导致了它们具有不同的底物专一性, 这种进化的观点目前已有了较多的证据^[25, 26].

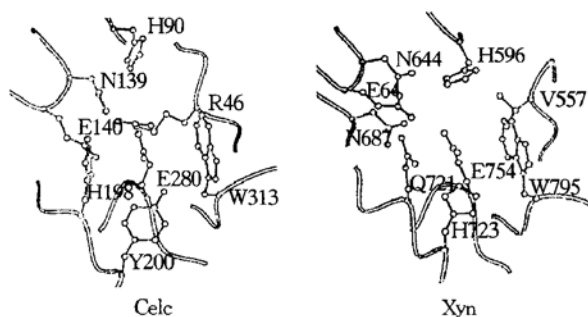


图 3 Celc 和 XynZ 分子活性位点结构

Celc 分子中的 His90 和 XynZ 分子中的 His596z 在各自的族中是严格保守的, 在二者的对比序列中没有处于相应的位置, 但在活性位点却占据了相似的位置. 它们已被证明对酶的活力是必需的.

5 展 望

利用微生物对木素、纤维素的降解能力来实现木纤材料生物量 (biomass) 的全转化利用, 是多年来的研究热点. 特别是近年来人们对环境、生态问题有更高的要求之后, 对此方面有了更多的期望. 阐明纤维素、木素的降解机制, 实现木质纤维材料生物量的全利用, 对我国目前正在开展的纤维蛋白饲料、生物制浆、纤维废物转化为酒精、纤维素酶半纤维素酶类在纺织造纸工业上的应用等研究工作都将发挥重要的推动作用, 具有重大的经

济、社会效益. 此项工作需要多学科的协作, 微生物降解机制研究特别是在分子水平上阐明其降解机制则是整个工作的基础. 目前, 对纤维素酶和半纤维素酶的催化降解机制的主要框架已有所了解, 怎样利用这种机制去指导应用, 可能是今后的主要研究方向, 也是下游工程的主要任务.

参 考 文 献

- 1 Tilbeurgh H, Tomme P, Claeysens M, *et al.* Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *T. reesei*. FEBS Lett, 1986, **204** (2): 223~227
- 2 Rouvinen J, Bergfors T, Teeri T. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *T. reesei*. Science, 1990, **249** (4967): 380~386
- 3 Juy M, Amit A G, Alzari P M, *et al.* Crystal structure of a thermostable bacterial cellulose degrading enzyme. Nature, 1992, **357** (6373): 89~91
- 4 Spezio M, Wilson D B, Karplus P A. Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. Biochemistry, 1993, **32** (38): 9906~9916
- 5 Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, *et al.* The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Science, 1994, **265** (5171): 524~528
- 6 Meinke A, Damude H G, Tomme P, *et al.* Enhancement of the endo-beta-1, 4-glucanase activity of an exocellobiohydrolase by deletion of a surface loop. J Bio Chem, 1995, **270** (9): 4383~4386
- 7 Sinnott M L. Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfers. Chem Rev, 1990, **90** (12): 1171~1192
- 8 Mitsuishi Y, Nitisinprasert S, Saloheimo M, *et al.* Site-directed mutagenesis of the putative catalytic residue of *T. reesei*. FEBS Lett, 1990, **275** (1): 135~138
- 9 Macarron R, Beeumen J, Henrissat B, *et al.* Identification of an essential Glutamate residue in the active site of endoglucanase III. FEBS Lett, 1993, **316** (2): 137~140
- 10 Trimbur D E, Warren R A, Withers S G. Region-directed mutagenesis of residues surrounding the active site nucleophile in beta-glucosidase from *Agrobacterium faecalis*. J Biol Chem, 1992, **267** (15): 10248~10251
- 11 Tull D, Withers S G, Gilkes N R, *et al.* Glutamic acid 274 is the nucleophile in the active site of a retaining exoglucanase. J Biol Chem, 1991, **266** (24): 15621~15625
- 12 Wang Q, Tull D, Meinke A, *et al.* Glu280 is the nucleophile in the active site of *Clostridium thermocellum* CelC, a family A endo-beta-1, 4-glucanase. J Biol Chem, 1993, **268** (19): 14096~14102
- 13 Tomme P, Warren R A, Gilkes N R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv Microb Physiol, 1995, **37** (1): 1~81
- 14 Kraulis P J, Jones T A. Determination of three-dimensional protein structures from nuclear magnetic resonance data using fragments of known structures. Proteins, 1987, **2** (1): 188~201
- 15 Xu G Y, Ong E, Gilkes N, *et al.* Solution structure of a cellulose-binding domain from *Cellulomonas fimi* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry, 1995, **34** (21): 6993~7009
- 16 Tormo J, Lamed R, Chirino A J, *et al.* Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. EMBO J, 1996, **15** (21): 5739~

- 5751
- 17 Gilkes N R, Warren R A J, Miller R C, *et al.* Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J Biol Chem*, 1988, **263** (21): 10401~ 10407
 - 18 Linder M, Mattine M L, Kontteli M, *et al.* Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Sci*, 1995, **4** (6): 1056~ 1064
 - 19 Linder M, Lindeberg G, Reinikainen T, *et al.* The difference in affinity between two fungal cellulose-binding domains is dominated by a single amino acid substitution. *FEBS Lett*, 1995, **372** (1): 96~ 98
 - 20 Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1991, **280** (2): 309~ 316
 - 21 Henrissat, B. Beta-glucosidase, beta-galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold beta/alpha architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of beta-strands four and seven. *FEBS Lett*, 1995, **362** (2): 281~ 285
 - 22 Jenkins J. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (15): 7090~ 7094
 - 23 Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, *et al.* Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (15): 7090~ 7094
 - 24 McCarter J D. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol*, 1994, **4** (3): 885~ 892
 - 25 Gebler J. Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1, 4-glucanases and beta-1, 4-xylanases. *J Biol Chem*, 1992, **267** (18): 12559~ 12561
 - 26 Gilkes N R. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Rev*, 1991, **55** (2): 303~ 15
 - 27 Dominguez R. A common protein fold and similar active site in two distinct families of beta-glycanases. *Nat Struct Biol*, 1995, **2** (2): 569~ 576
 - 28 Sulzenbacher G. Structure of the *Fusarium oxysporum* endoglucanase I with a nonhydrolyzable substrate analogue: substrate distortion gives rise to the preferred axial orientation for the leaving group. *Biochemistry*, 1996, **35** (48): 15280~ 15287
 - 29 Orengo C. Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature*, 1994, **367** (6464): 631~ 634
 - 30 Varghese J N, Garrett T P, Colman P M, *et al.* Three-dimensional structures of two plant beta-glucan endohydrolases with distinct substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (7): 2785~ 2789

Progress in Structure-Function Studies of Cellulases.

YAN Bo-Xu, QI Fei, ZHANG Ying-Shu, GAO Pei-Ji (*State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China*).

Abstract The recent advance in structure-function studies of cellulases by structural biology and protein engineering is reviewed. The separation of structural domains and the structure-function studies of catalytic domains and cellulose-binding domains are included. The research prospects of cellulases are forecasted. According to the sequence similarity of amino acid, cellulase and hemicellulase can be divided into nine families, and in five families there are some enzymes that three dimension structure have been resolved. Here, three dimension structure of some cellulase and xylanase were compared, and the relationship between its molecular folding and catalytic mechanism were also analyzed.

Key words cellulase, catalytic domains, cellulose-binding domains, molecular folding, active site, two-step substitution mechanism

水杨酸诱导植物抗病性的新进展*

沈文飏 徐朗莱 叶茂炳

(南京农业大学理学院, 南京 210095)

摘要 水杨酸是一种重要的能激活一系列植物抗病防卫反应的內源信号分子. 首先介绍了水杨酸在植物抗病性中的作用, 并从水杨酸与过氧化氢及其代谢酶类相互作用的角度初步探讨了水杨酸诱导植物抗病性的分子机理, 最后概述了目前这一领域中需要进一步研究的若干问题.

关键词 水杨酸, 过氧化氢, 过氧化氢代谢酶类, 相互作用, 植物抗病性

学科分类号 S432.2