

- 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

水杨酸 (salicylic acid, SA) 是植物体内普遍存在的一种酚类化合物, 已经证实它在植物体内具有多种生理调节作用, 例如它能诱导植物提高抗病性, 引起天南星科植物佛焰花序生热, 抑制乙烯的生物合成, 调节某些植物的光周期, 影响黄瓜的性别分化等, 因而 Raskin 提出 SA 是一种新的植物激素^[1]. 90 年代以来, 围绕 SA 能诱导植物抗病性的许多研究证实, SA 不仅是植物产生过敏反应 (hypersensitive response, HR) 和系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 所必需, 而且也是病原物侵染植物后活化一系列防卫反应的信号传递过程中的重要组成成分, 本文介绍近年来有关 SA 诱导植物抗病性的新进展.

1 SA 在植物抗病性中的作用

植物-病原物非亲和性互作引起的 HR 是一种典型的快速防卫抗病反应. Delaney 等^[2]发现在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和寄生霜霉 (*Peronospora parasitica*) 的互作过程中所引起的 HR 需要 SA, 而且证明即使在传统的基因对基因的互作系统中, SA 也可以作为一种抗病性的调节物.

SA 也是植物产生 SAR 所必需的. 如把细菌中的编码水杨酸羟化酶 (salicylate hydroxylase) 的 *nahG* 基因转入烟草和拟南芥后发现, 病原物侵染后这两种转基因植物 SA 的积累受到了抑制, 从而削弱了它们限制病原物扩展和产生 SAR 的能力^[2,3].

此外, SA 预处理也可以增强植物多种防卫反应机制, 包括植保素 (phytoalexin, PA) 及其有关合成酶类、病程相关 (pathogenesis-related, PR) 蛋白和各种活性氧的产生, 从而最终提高植物的抗病性. 早在 1979 年, White 就证实外源 SA 及其衍生物乙酰水杨酸 (阿司匹林) 处理可以诱导烟草 PR 蛋白的合成和对烟草花叶病毒 (TMV) 的抗性^[4].

总之, SA 与植物抗病密切相关.

2 SA 诱导植物抗病性的分子机理

2.1 SA 与过氧化氢酶

Chen 等^[5,6]首先从烟草叶片中鉴定出 SA 介导的信号传递中的一种组成成分, 发现它是一种分子质量为 240~280 ku 的可溶性水杨酸结合蛋白 (salicylic acid binding protein, SABP), 由一个分子

质量为 57 ku 的亚基和一个或多个多肽链所组成, 对 SA 的解离常数 (dissociation constant, K_d) 为 14 $\mu\text{mol/L}$, 这与病原物侵入植物后 SA 的生理浓度变化范围是一致的. 以后通过分子生物学和酶学的研究均表明这种 SABP 就是过氧化氢酶 (catalase, CAT), 并初步指出 SA 可能通过专一地抑制 CAT 活性从而增加植物体内 H_2O_2 的含量, 最终导致与 SAR 有关的防卫基因表达和植物抗病性的诱导^[7].

通过对 40 种酚类和异烟酸类化合物的鉴定结果也表明, 这些化合物结合 CAT 的能力与它们诱导 PR 基因表达和增强植物抗病性的能力是一致的, 例如乙酰水杨酸、2, 6-二羟基水杨酸、4-氯水杨酸、5-氯水杨酸和 3, 5-二氯水杨酸以及另一种 PR 基因表达和抗病性的诱导物——2, 6-二氯异烟酸 (2, 6-dichloroisonicotinic acid, INA), 就是通过与植物体内 CAT 结合, 从而抑制其活性才具有与 SA 相同的诱导植物抗病性的生理效应; 此外, 已经证实由 SA 和 INA 诱导的 PR 基因表达也可以被抗氧化剂所抑制. 另一方面, 分子生物学的研究也表明, 植物中至少存在三类 *Cat* 基因, 并且以组织特异性的形式合成 CAT 同工酶. 如水稻幼苗中由 *CatA* 基因所编码的 CAT 同工酶基本不被 SA 所抑制, 而它与烟草叶片中对 SA 敏感的 CAT 同源性较低; 相反, 同源性较高的由 *CatB* 基因所编码的, 存在于水稻根部和细胞悬浮培养液中的 CAT 同工酶则可以被一定浓度的 SA 所抑制^[8]; 此外还发现, 抑制植物 CAT 的 SA 浓度远大于远离病原物侵染部位的组织中的 SA 浓度, 而且 H_2O_2 及其诱导物虽能诱导野生型烟草 PR-1 基因的表达, 但对 *nahG* 转基因植物中 PR-1 基因的诱导却是失败的^[7,9,10]. 上述结果显示 SA 诱导植物抗病性可能并非单纯依靠抑制 CAT 活性, 从而提高内源 H_2O_2 来实现的.

2.2 SA 与抗坏血酸过氧化物酶

植物中 H_2O_2 是叶绿体光合电子传递链、线粒体呼吸链、光呼吸和脂肪酸 β -氧化的副产物, 包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等酶催化的某些酶促反应也是产生 H_2O_2 的重要来源. 同时植物体内也存在着丰富的 H_2O_2 清除酶类, 除了存在于过氧化物酶体、乙醛酸循环体、线粒体、液泡以及非特异性微体的 CAT 以外, 通过抗坏血酸-谷胱甘肽氧化还原途径 (又称 Halliwell-Asada 途径) 清除植物 H_2O_2 也是一种重要方式,

其中后者直接负责清除 H_2O_2 的酶是抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX), 它对 H_2O_2 的亲合力远大于 CAT. 已经证明高等植物的 APX 存在着多种同工酶, 一类是光合器官型, 包括位于叶绿体基质中的 APX (stroma APX, sAPX) 和与类囊体膜结合的 APX (thylakoid APX, tAPX); 另一类是非光合器官型, 在胞浆、线粒体和乙醛酸循环体中均已发现, 而且上述两类 APX 的酶学特性是明显不同的^[11].

Durner 等^[12]发现高浓度的 SA 和 INA 几乎完全抑制烟草叶片中可溶性 APX 活性, 而且这个过程是可逆的, 与不可逆的 APX 自杀性底物对-氨基苯酚对 APX 的抑制是完全不同的; 至于抑制机理, 有人认为 SA 是通过螯合铁离子从而专一性地抑制诸如 CAT、APX、顺乌头酸酶和氧化酶等含铁的酶类^[13], 而 Durner 等^[12]则认为在 H_2O_2 存在的情况下, SA 或其他酚类化合物抑制 CAT/APX 是通过充当它们的过氧化活性的单电子供体底物来实现的, 相应地, CAT/APX 则由氧化型的中间产物 (复合物 I) 转变为呈失活状态的部分还原型的中间产物 (复合物 II), 而 SA 或其他酚类化合物则转变为水杨酸自由基 ($SA\cdot$) 或酚自由基, 不仅改变细胞内氧化还原环境, 而且可以启动脂质过氧化和修饰生物大分子, 由此产生的过氧化产物可能促进 PR 基因的表达和 SAR 的建立. 上述 Durner 等提出的抑制机理与 SA、乙酰水杨酸和其他酚类化合物抑制髓过氧化物酶和辣根过氧化物酶的机理是一致的, 而且已经发现其他能螯合铁离子的化合物, 如 3, 4-二羟基苯甲酸和 3, 4, 5-三羟基苯甲酸, 不能抑制烟草叶片中对 SA 敏感的 CAT. 此外, SA 还可以诱导 SOD 和松柏醇过氧化物酶 (coniferylalcohol peroxidase, CA-POX) 的活性, 但对愈创木酚过氧化物酶 (guaiacol peroxidase, POX) 和谷胱甘肽还原酶 (gultathione reduase, GR) 没有影响^[14].

2.3 其他 SABP

最新资料表明采用高比活的 [3H] SA, Du 等^[15]在烟草叶片中还发现与 SA 具有高度亲和性、低丰度的可溶性 SABP2, 且与 Chen 等发现的 SABP (CAT) 在分子质量大小、丰度和与 SA 结合的特性等方面均显著不同, 例如 SABP2 分子质量约为 25 ku, 在烟草叶片中的含量很低, 每毫克可溶性蛋白质中仅含有 10 fmol 左右; 而 CAT 分子质量约为 240 ku, 且在植物中含量很高; 另外,

SABP2 在 0~ 4℃ 下与 SA 结合达到平衡的时间是 15~ 20 min, 而 CAT 是 90~ 120 min. 值得注意的是, SABP2 对 SA 的 K_d 仅为 90 nmol/L, 说明其对 SA 的亲合力分别高于 CAT、APX ($K_d = 78 \mu\text{mol/L}$) 约 150 倍和 870 倍.

由于病原物侵染植株后, 侵染部位和远离侵染部位的植物组织中 SA 含量相差很大, 前者达到 100~ 150 $\mu\text{mol/L}$, 后者仅有 0.5~ 9 $\mu\text{mol/L}$, 暗示 SABP2 可能和远离侵染部位的 SA 充分结合, 从而起到发送 SA 信号的作用; 而 CAT 和 APX 的作用部位可能仅在病原物侵染部位附近; 此外在某一个特定的细胞器中所积累的 SA 也足以与 CAT/APX 充分结合, 从而抑制它们的活性; 当然也不排除由于 SA 抑制 CAT/APX 所产生的 $SA\cdot$ 可以诱导脂质过氧化的链式反应, 即使是少量的 SA 对 CAT/APX 的很小的抑制所产生的 $SA\cdot$, 也能达到较高浓度的 SA 所具有的相同生理效应. 另外 SA 具有螯合铁的性质, 也已经在它能抑制顺乌头酸酶最终诱导交替呼吸和抑制 ACC 氧化酶从而阻断乙烯的生物合成上得到了证实. 综上所述, SA 可能通过对不同代谢酶类具有相异的抑制机理, 从而达到调节植物体内多种特殊的生物代谢过程, 最终呈现不同的生理效应.

2.4 SA 与 H_2O_2 的相互作用

许多研究表明在植物过敏反应的最初阶段, 病原物或激发子与位于原生质体膜上的受体结合后, G 蛋白可能通过活化蛋白激酶增加与诸如 O_2^- 、 H_2O_2 等活性氧密切相关的原生质体膜上的 NAD (P) H 氧化酶、依赖于 NADH 的过氧化物酶和超氧化物合酶等活性, 从而最终导致氧化迸发 (oxidative burst). 而 O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧不仅可以直接杀伤病原物, 参与膜脂过氧化, 介入 HR, 而且 H_2O_2 还可以促进细胞壁木质化和 HR 细胞的死亡; 此外由于 H_2O_2 是一种可以自由扩散的小分子, 因而能跨过细胞膜进入病原物侵染部位以外的组织中, 作为第二信使来激活防卫基因的表达, 从而最终导致对病原物的抗性^[16].

已经发现病原物侵染后 SA 水平急剧增加, 而且 SA 可以同时通过增加 SOD 等 H_2O_2 产生酶类的活性和抑制 CAT/APX 等降解酶类的活性, 最终积累 H_2O_2 来提高植物的抗病性^[14]. 但是 León 等^[17]发现 H_2O_2 还可以通过两种途径促进烟草叶片中 SA 的生物合成, 包括直接诱导催化游离苯甲酸 (benzoic acid, BA) 转化为 SA 的苯甲酸-2-羟化

酶 (benzoic acid 2-hydroxylase, BA2H) 活性和 BA 含量的增加; 当然由于 BA2H 是一种以 O_2 、NADPH 为底物的可溶性细胞色素 P-450 单加氧酶, 也不排除 CAT/APX 把氧化迸发所产生的大量 H_2O_2 降解为 O_2 , 从而直接作为 BA2H 底物的可能性, 上述暗示 H_2O_2 也可能可以处于 SA 介导的 SAR 建立的上游, 而并非仅仅处于下游. 另外一些研究还表明在建立 SAR 的初期, H_2O_2 的含量并无较大的变化, 暗示 SA 介导的 SAR 建立可能并不需要 H_2O_2 累积; 此外, SA 对 CAT/APX 活性的抑制涉及 H_2O_2 , 但单独 H_2O_2 处理反而促进 CAT/APX 活性, 同时发现 SA 诱导的脂质过氧化和氧化伤害虽然需要 H_2O_2 的介入, 但并不是由于 H_2O_2 含量的升高所直接导致的^[10, 14]. 由此可见, 上述 SA 与 H_2O_2 及其代谢酶类的相互作用所产生的 $SA\cdot$ 更有可能直接与植物的抗病性密切相关, 而并非仅仅由于 SA 抑制 CAT/APX 所导致的 H_2O_2 累积. 当然, SA 和 H_2O_2 含量的升高也会诱导与木质素合成直接相关的 CA-POX 活性, 这也是一种植物抗病的防卫机制.

3 展 望

以上的研究结果表明, SA 可能通过多种途径来调节植物的各种生理代谢过程, 从而达到不同的生理效应, 而且不同植物或相同植物的各个不同组织在 SA 诱导植物抗病性的机制上均可能有所不同, SABP 的多样性也证明了这点. 值得注意的是, 已经发现 CAT/SOD 的各种同工酶存在 SA 不敏感的类型, 那么 APX 及 SA 其他的靶酶也可能存在类似的现象; 而且也不排除病原体侵染后会调节植物对 SA 的敏感性, 甚至还会发现与 SA 亲和力更大的 SABP, 这些都值得今后进一步进行研究.

参 考 文 献

- Raskin I. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol*, 1992, **99** (3): 799~ 803
- Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, *et al.* A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 1994, **266** (5188): 1247~ 1250
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, *et al.* Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 1993, **261** (5122): 754~ 756
- White R F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 1979, **99** (2): 410~ 412
- Chen Z, Klessig D F. Identification of a soluble salicylic acid binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (18): 8179~ 8183
- Chen Z, Ricigliano J W, Klessig D F. Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (20): 9533~ 9537
- Chen Z, Silva H, Klessig D F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, **262** (5141): 1883~ 1886
- Chen Z, Iyer S, Caplan A, *et al.* Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol*, 1997, **114** (1): 193~ 201
- Bi Y M, Kenton P, Mur L, *et al.* Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J*, 1995, **8** (2): 235~ 245
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, *et al.* Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J*, 1995, **8** (2): 227~ 233
- 沈文飏, 黄丽琴, 徐朗莱 (Shen W B, Huang L Q, Xu L L). 植物抗坏血酸过氧化物酶. *生命的化学 (Chemistry of Life)*, 1997, **17** (5): 24~ 26
- Durner J, Klessig D F. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2, 6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (24): 11312~ 11316
- Ruffer M, Steipe B, Zenk M H. Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Lett*, 1995, **377** (1): 175 ~ 180
- Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P, *et al.* Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress, and H_2O_2 metabolizing enzymes. *Plant Physiol*, 1997, **115** (1): 137~ 149
- Du H, Klessig D F. Identification of a soluble, high-affinity salicylic acid-binding protein in tobacco. *Plant Physiol*, 1997, **113** (4): 1319~ 1327
- Mehdy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, 1994, **105** (2): 467~ 472
- León J, Lawton M A, Raskin I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol*, 1995, **108** (4): 1673~ 1678

New Progress in Plant Disease Resistance Induced by Salicylic Acid. SHEN Wen-Biao, XU Lang-Lai, YE Mao-Bing (College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China).

Abstract Accumulated evidence suggests that salicylic acid is an important endogenous signal molecule in the activation of several plant defense responses. The function of salicylic acid involved in plant disease resistance is introduced, and the molecular mechanisms of salicylic acid inducing plant disease resistance have been established at the interaction of salicylic acid with hydrogen peroxide and its metabolizing enzymes. Finally, some important aspects for further studying are suggested.

Key words salicylic acid, hydrogen peroxide, hydrogen peroxide metabolizing enzymes, interaction, plant disease resistance