

降解纤维素的“超分子机器”研究进展*

王金兰^{1, 2)} 王禄山^{1)**} 刘巍峰¹⁾ 陈冠军^{1, 2)} 高培基¹⁾

(¹⁾ 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100; ²⁾ 山东大学威海分校, 威海 264209)

摘要 综述了目前关于纤维小体组装模式、纤维小体结构多样性及人工设计纤维小体等方面的研究进展。纤维小体是某些厌氧菌产生的由多个亚基共同组装而成的大分子机器, 是致力于组织、协调多种酶组分协同高效催化降解木质纤维素的胞外蛋白质复合体。纤维小体是厌氧微生物水解纤维素的主体, 具有非常高效的打破结晶纤维素的结晶结构和降解纤维素链的作用。纤维小体对木质纤维素降解的高效性来自于其自发组装而成的复杂的高级结构, 其结构的复杂性因不同的厌氧微生物而有所不同。

关键词 纤维小体, 粘连模块, 对接模块, 脚手架蛋白, 超分子复合体

学科分类号 Q936

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00278

木质纤维素(lignocellulose)是当今最丰富的可再生性生物质资源。通过生物技术将木质纤维素高效转化成生物化工产品 and 燃料, 可以降低温室气体排放, 促进国家可持续发展^[1]。目前, 新一代的生物质转化技术——统合生物工艺(consolidated bioprocessing, CBP)的相关策略, 已经提出利用水解纤维素的厌氧菌和厌氧糖化菌的共培养体系来降解纤维素和半纤维素, 并将寡糖和单糖转化为乙醇, 这个转化工艺和其他工艺相比具有生产成本低和资本投资低、转化效率高等潜在优势^[2]。由于纤维小体(cellulosome)这一独特的多酶复合体的高效催化能力, 在 CBP 共培养体系的高效转化中将起到重要的作用。

纤维小体超分子复合体是某些厌氧菌产生的由多个亚基共同组装而成的大分子机器, 是致力于组织、协调多种酶组分协同高效催化降解木质纤维素的胞外蛋白质复合体^[3]。纤维小体的独特性在于, 现在没有报道过像它一样大小和复杂性的胞外蛋白质复合物。它的分子质量在 2×10^6 到 6×10^6 u 之间, 直径大约 18 nm, 包含 14 到 50 个多肽, 且这些多肽的分子质量在 37 到 210 ku 之间。纤维小体是厌氧菌水解纤维素的主力, 在打破和利用结晶纤维素方面起到至关重要的作用。目前认为, 将纤维素酶组织成纤维小体是所有微生物的纤维素降解系统中

最有效的方式^[3-4]。纤维小体对木质纤维素降解的高效性来自于其自发组装而成的复杂的高级结构。本文综述了目前关于纤维小体超分子复合体组装模式及其应用前景的研究进展。

1 纤维小体的一般组装模式

纤维小体包括一组多模块(module)的蛋白质, 其中一部分是其构建超分子结构所必需的组分, 另一部分是其含有的各种酶组分。纤维小体中关键的非催化亚基被称之为脚手架蛋白(scaffoldin), 其上含有多个粘连模块(cohesins), 这些粘连模块通过与酶蛋白上对接模块(dockerin)特异性地相互作用, 将各种酶蛋白稳定在复合体的超分子结构中。此外, 脚手架蛋白和部分酶蛋白中还含有能与纤维素特异性结合的碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM), 其对底物具有定向效应。

1.1 粘连模块

粘连模块是脚手架蛋白的组成部分, 其通过与

* 国家自然科学基金(30970092)和山东省自然科学基金(Y2008D10)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0531-88366202, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

收稿日期: 2010-05-22, 接受日期: 2010-06-10

对接模块的相互作用决定纤维小体的结构. 不同厌氧微生物脚手架蛋白上粘连模块的数目不一, 而且序列差异也很大. 根据粘连模块的系统发生关系, 目前已知的粘连模块至少包括 3 种类型, 即 I 型、II 型和 III 型. 有的微生物中只发现了一种类型的粘连模块, 如嗜温梭菌(解纤维梭菌 *Clostridium cellulolyticum*、嗜纤维梭菌 *Clostridium cellulovorans*、约氏梭菌 *Clostridium josui*、丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum*). 有的微生物中含有多种类型的粘连模块, 如热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)初级脚手架蛋白的粘连模块为 I 型, 而锚定脚手架蛋白的粘连模块为 II 型, 黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)ScaA 和 ScaB 的粘连模块为 III 型, 并且 ScaC 的粘连模块是与前 3 种粘连模块都不同的类型^[5-6].

某些微生物的纤维小体中 I 型粘连模块的三维结构已被揭示. 例如热纤梭菌中初级脚手架蛋白上 2 号粘连模块的晶体结构显示其为一长圆锥形分子, 该分子由一个 9 β 链三明治(β -sandwich)和一个泛芳香族核心组成^[7]. II 型粘连模块的结构也已在最近得以测定. 例如溶纤维素拟杆菌(*Bacteroides cellulosolvens*)ScaA 中 II 型粘连模块具有与 I 型粘连模块相似的果冻卷形拓扑结构, 包括一个 α 螺旋和两个与正常 β 链结构不同的“ β 瓣”(β -flaps)结构^[8].

1.2 对接模块

对接模块由通过一个连接片段(linker)连接的两条重复序列组成, 每个重复序列一般约含有 22 个氨基酸残基, 而连接片段含有的氨基酸残基数目在不同微生物的对接模块中不同. 对接模块也至少包括 3 种类型(I 型、II 型和 III 型), 其系统发生在很大程度上反映了与粘连模块的对应关系. 与 I 型粘连模块发生作用的纤维小体酶上的 I 型对接模块组成一组, 并且与 II 型粘连模块相互作用的 II 型对接模块组相距甚远. 与黄色瘤胃球菌中 III 型粘连模块相互作用的 III 型对接模块、古生球菌(*Archaeoglobus*)中的对接模块及丙酮丁醇梭菌中酶上的对接模块各具有独立的分支, 且与其粘连模块的分支情况相对应.

热纤梭菌 Cel48S 的 I 型对接模块由 70 个氨基酸残基组成, 它的溶液结构显示出其结构构象为一对钙结合的环-螺旋模体, 两螺旋体相对于一个折叠的轴心伪对称分布^[9]. 热纤梭菌 Cel48S 中 I 型对接模块及其初级脚手架蛋白 CipA 中 II 型对接模块

的生理和结构分析显示, 钙促使对接模块折叠, 并为稳定其三级结构和粘连模块-对接模块的相互作用所必需^[10]. 结合钙的 Cel48S 对接模块在溶液中成单体形态^[9], 而钙存在时 CipA 对接模块则形成同型二聚体^[10].

1.3 粘连模块和对接模块相互作用

粘连模块与对接模块的相互作用决定了纤维小体超分子复合体的组成与结构, 并且实验证实将纤维小体各亚基整合为纤维小体复合体仅仅依赖于粘连模块与对接模块间的特定相互作用^[11]. 这两种蛋白质间主要以疏水作用相联系, 并辅以相对较少的分子间氢键联系. 粘连模块与对接模块间的相互作用还具有钙离子依赖性. 热纤梭菌中粘连模块与对接模块的结合非常紧密, 经测算其相互作用的解离常数(K_D)约为 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ mol/L, 甚至更低^[12]. 热纤梭菌中 I 型粘连模块与对接模块的相互作用是目前已知最强的蛋白质间相互作用之一.

粘连模块与酶上对接模块在种内的结合是非选择性的, 而在种间的相互作用却是专一性的. 粘连模块-对接模块相互作用的种专一性在热纤梭菌与解纤维梭菌间、热纤梭菌与约氏梭菌间均被证实. 但也存在少数例外情况: 热纤梭菌 Xyn11A 中的对接模块能够结合到约氏梭菌的粘连模块上^[12]; Xyn11A 及 Xyn11B 中的对接模块均被发现能够结合到热纤梭菌和解纤维梭菌的粘连模块上^[13]. 目前的实验结果揭示, 粘连模块-对接模块相互作用的种专一性可能是粘连模块上的 3 个氨基酸残基(如热纤梭菌粘连模块上的 Ala36、Asn37 及 Glu131)^[14]与对接模块上的 4 个(如热纤梭菌 Cel48S 对接模块第一片段中第 17、18 位以及第二片段中 49、50 位的丝氨酸残基对和苏氨酸残基对)^[15]甚至更多残基的相互作用决定的^[16](图 1a).

1.4 催化组分

纤维小体上的催化组分与游离纤维素酶系统中糖苷水解酶的催化类型相同, 都含有内切葡聚糖酶和两种分别从链的还原端或者非还原端水解纤维素链的纤维二糖水解酶组分. 纤维小体中的酶组分无论是游离态还是组装成纤维小体都具有游离酶系统那样的协同作用^[17]. 在结构和机制方面, 纤维小体的催化组分也与游离酶系统中发现的组分差不多, 它们属于相同的糖苷水解酶家族, 它们的活性和专一性由相似的结构特点调节.

以热纤梭菌为例, 它既有纤维小体酶系, 也有游离的非纤维小体酶. 区别纤维小体酶与游离酶的

关键特征是, 纤维小体酶带有对接模块. 热纤梭菌纤维小体上的酶组分还包括: 纤维素酶(包括内切葡聚糖酶和纤维二糖水解酶)、木聚糖酶、甘露聚糖酶、果胶酶和果胶裂解酶、糖酯酶、糖苷酶、几丁质酶和混合连接 β - 葡聚糖酶. 其中主要的 7 个作用于 β -1, 4- 葡聚糖的组分具有不同的酶活性, Cel48S、Cel9K、Cel9R 和 Cbh9A 是持续性降解酶类, 并且 Cel9K 和 Cbh9A 的产物是纤维二糖, Cel9R 的产物是纤维四糖, Cel48S 的产物是混合纤维糊精^[18], Cel8A、Cel5G 和 Cel9N 是内切葡聚糖酶, 其中 Cel8A 占主要地位(图 1b).

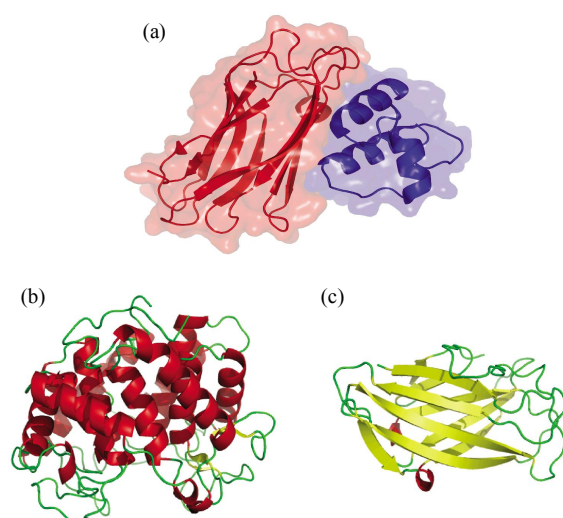


Fig. 1 Three-dimensional structure of several components of cellulosome

图 1 纤维小体各组件结构示意图

(a)热纤梭菌 I 型粘连模块(红色)和 I 型对接模块(蓝色)相互作用示意图(蛋白质结构 pdb 号: 1ohz). (b)热纤梭菌 Cel8A 结构示意图(蛋白质结构 pdb 号: 1cem). (c)热纤梭菌脚手架蛋白上的碳水化合物结合模块(CBM)结构示意图(蛋白质结构 pdb 号: 1nbc).

1.5 CBM

脚手架蛋白上往往包含一个 CBM, 它被认为负责将多酶复合体锚定在相应底物上(虽然在瘤胃球菌的纤维小体中没有发现 CBM). 脚手架蛋白上的 CBM 是 A 型的. 几种梭菌型纤维小体的脚手架蛋白都包含一个 3a 家族 CBM, 它位于脚手架蛋白的 N 端或者序列的中间^[9]. 热纤梭菌脚手架蛋白 CBM 的三维结构已经被解析^[19], 其拓扑结构为一个由 9 个 β 片层组成的果冻卷(图 1c). 同时这个结构含有一个 Ca^{2+} , 其不直接参与对纤维素底物的吸附, 可能具有稳定 CBM 结构的作用. 解纤维梭菌脚手架蛋白 CBM 的三维结构也被解析了, 其与热

纤梭菌非常相似^[20]. 脚手架蛋白的 CBM 对纤维小体作用于结晶纤维素表面的活性具有重要作用. 有实验数据证明与没有 CBM 的同源结构相比, 脚手架蛋白 CBM 的出现可使纤维素降解率提高 3 倍^[17].

纤维小体上的许多酶组分也具有 CBM. 酶上的 CBM 不是保持酶复合体接近底物表面所必需的结构. 然而其 CBM 具有潜在的功能, 似乎是单个酶专一性结合底物, 特别是其在分子水平上结合单个底物分子链(如可溶性的 β - 葡聚糖或木聚糖链)时所必需的^[21].

1.6 纤维小体与细胞连接的方式

纤维小体与细胞表面的结合是非常紧密的. 结合酶组分的初级脚手架蛋白通过粘连蛋白 - 对接蛋白相互作用被固定到锚定脚手架蛋白上, 而锚定脚手架蛋白则通过自身的 1 个或多个细胞表面结合模块与细菌细胞表面的肽聚糖共价相连.

锚定脚手架蛋白中最常见的细胞表面结合模块是表层同源结构域(S-layer homology module, SLH)^[22-24]. 而黄色瘤胃球菌的锚定脚手架蛋白则通过分选酶基序(Sortase)共价结合在细胞表面^[25-26]. 还有一些细菌, 如嗜纤维梭菌和解纤维梭菌(*Clostridium cellulolyticum*), 它们的锚定脚手架蛋白上含有 2 个或 4 个亲水结构域(HLD). HLD 结构域可能具有双重的功能, 结合实验显示出它与细胞表面和纤维素都具有亲和性^[27]. 这表明 HLD 既能和 EngE 一起将纤维小体与细胞表面相连, 也能和 CBM 一起将纤维小体与底物相连.

2 纤维小体超分子复合体组装模式的多样性

在不同厌氧微生物中发现的纤维小体, 它们的结构组成与组装方式具有明显的多样性. 厌氧细菌纤维小体超分子复合体的组装形式的多样性主要表现在脚手架蛋白的数量、组成及结构的多样性(图 2). 某些嗜温梭菌(如嗜纤维梭菌)的纤维小体之间具有很大的相似性, 它们只有一个初级脚手架蛋白, 而没有锚定脚手架蛋白, 到目前为止, 在这些细菌中只发现了 I 型的粘连模块和对接模块. 而另一些细菌产生的纤维小体含有几个相互作用的脚手架蛋白, 复杂程度较高. 例如, 溶纤维素拟杆菌具有一种庞大且粘连模块类型颠倒的纤维小体, 解纤维醋弧菌(*Acetivibrio cellulolyticus*)可以产生两类不同的纤维小体超分子复合体, 热纤梭菌具有多个含有不同数量粘连模块的锚定脚手架蛋白, 可以形成多类不同的纤维小体, 瘤胃中降解纤维素的主要

微生物之一——黄色瘤胃球菌产生的纤维小体似乎更具复杂性和广泛性, 并且其不同菌株产生的纤维小体超分子结构也具有多样性^[28-29]。而厌氧真菌

纤维小体虽然表现出与厌氧细菌相似的组装模式, 但它们之间在序列上却没有任何的同源性。

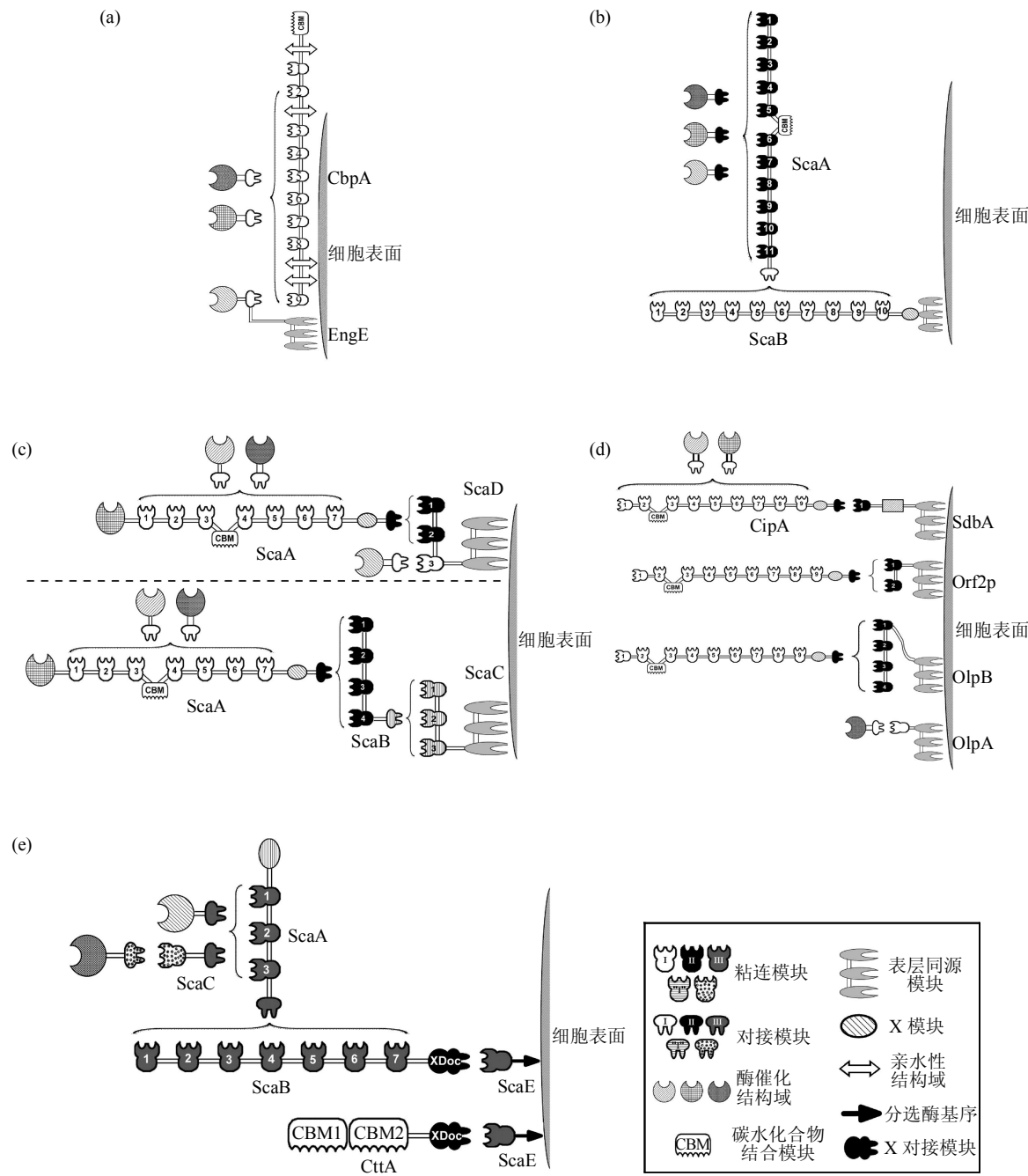


Fig. 2 The diversity of the assembly mode of cellulosomes macromolecular complexes

图 2 纤维小体超分子复合体组装模式的多样性

(a)嗜纤维梭菌纤维小体结构示意图(改绘自: J Bacteriol, 2004, 186: 6351-6359). (b)溶纤维素拟杆菌纤维小体结构示意图(改绘自: J Mol Biol, 2005, 348: 1-12). (c)解纤维醋弧菌纤维小体结构示意图(改绘自: J Bacteriol, 2004, 186: 5782-5789). (d)热纤维梭菌纤维小体结构示意图(改绘自: Journal of Structural Biology, 1998, 124: 221-234). (e)黄色瘤胃球菌 17 纤维小体结构示意图(改绘自: Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2009, 77: 699-709).

2.1 嗜纤维梭菌纤维小体

嗜纤维梭菌的纤维小体由一个脚手架蛋白 CbpA(分子质量为 189 ku)和一系列酶单位组成(图 2a)。CbpA 是由 N 端的 CBM、4 种亲水性结构域(HLD)和 9 个保守的疏水粘连模块组成,每个结构域分子质量大约是 15~20 ku。CBM 首先与底物的结晶纤维素部分结合^[30],通过纤维小体将细胞与基质连接。纤维小体酶组分通过它们的对接模块与 CbpA 的粘连模块结合。纤维小体酶组分 EngE 是一个令人感兴趣的部分,因为它有 3 个表层同源(SLH)结构域(位于 N 端)和一个对接模块^[31]。对接模块与 CbpA 上的粘连模块相结合,SLH 结构域与细胞表面连接。因此 EngE 不仅是纤维小体的组成部分,而且与结合细胞表面的功能有关。

2.2 溶纤维素拟杆菌纤维小体

溶纤维素拟杆菌的脚手架蛋白基因簇测序显示该基因簇只有两个基因^[23,32]。但它们相似尺寸的基因编码了目前为止发现的最大的纤维小体组件——一个含有 11 个粘连模块的初级脚手架蛋白 ScaA 和一个含有 10 个粘连模块的锚定脚手架蛋白 ScaB(图 2b),它们组成的纤维小体理论上可在单个复合体中含有 110 种不同的纤维小体亚基。然而,最令人惊奇的是它们粘连模块的类型被倒转了。大多数微生物产生的纤维小体,其初级脚手架蛋白具有 I 型粘连模块,锚定脚手架蛋白具有 II 型粘连模块,然而溶纤维素拟杆菌纤维小体的初级脚手架蛋白具有 II 型粘连模块,锚定脚手架蛋白具有 I 型粘连模块。

2.3 解纤维醋弧菌纤维小体

对解纤维醋弧菌脚手架蛋白基因簇测序的结果显示,该菌有两种不同的纤维小体系统(图 2c)。解纤维醋弧菌的初级脚手架蛋白 ScaA 通过 7 个 I 型粘连模块结合酶组件,并且其本身具有一个独特的构成整体所必需的酶组件^[33]。ScaA 有两种可以通过锚定脚手架蛋白结合在细胞表面上的方式,所以产生了两种纤维小体系统。其中一种具有一个新型脚手架蛋白——接头脚手架蛋白(adaptor scaffoldins)^[24],接头脚手架蛋白 ScaB 通过“假 I 型”对接模块结合到锚定脚手架 ScaC 的“假 I 型”粘连模块上。ScaB 扩大了结合到纤维小体上的酶蛋白数量,另一种纤维小体系统也很独特,它的锚定脚手架蛋白 ScaD 是双功能的,因为它含有两种类型的粘连模块,所以具有两种结合专一性^[22]。一方面,ScaD 能够通过 II 型粘连模块结合

两个 ScaA,另一方面,ScaD 能够通过它的 I 型粘连模块直接将单个酶结合到纤维小体上。在两种系统中,ScaC 和 ScaD 都是通过它们的 SLH 模块结合到细胞表面上。

2.4 热纤维梭菌纤维小体

如果依据每毫克分泌蛋白的酶活性进行比较,热纤维梭菌是目前已知的最高效的纤维素降解菌^[34],这种极为高效的降解机制是由于热纤维梭菌在生长过程中形成了大量的纤维小体,热纤维梭菌纤维小体具有多种脚手架蛋白^[35](图 2d)。纤维小体的核心是一个与各种酶结合的初级脚手架蛋白 CipA, CipA 分子质量为 250 ku,具有一个 CBM、9 个高度同源的 I 型粘连模块、一个未知功能的 X 结构模块和一个位于 C 端的 II 型对接模块。锚定脚手架蛋白 OlpB、Orf2、SdbA 和 OlpA(先前称之为 Orf3)均带有 C 端 SLH 模块,SLH 模块将这些锚定脚手架蛋白锚定在细胞表面上。OlpB、Orf2 与 SdbA 分别含有 4 个、2 个和 1 个 II 型粘连模块,OlpA 含有 1 个 I 型粘连模块。在热纤维梭菌中,I 型粘连模块与酶亚基上的 I 型对接模块结合,II 型粘连模块则与脚手架蛋白 CipA 的 II 型对接模块结合。

2.5 黄色瘤胃球菌 17 纤维小体

最新的研究揭示了黄色瘤胃球菌 17 (*R. flavefaciens* 17)的纤维小体复合体结构^[6,36-38]。这是一个非常复杂的纤维小体结构,其中包括 4 种具有粘连模块的脚手架蛋白,ScaA、ScaB、ScaC 和 ScaE(图 2e)。

ScaA,通过基因推测其分子质量为 92.5 ku,但在自然状态下是一个 130 ku 的糖基化蛋白。ScaA 含有 3 个十分相似的 III 型粘连模块,均可与酶上的对接模块结合。此外,ScaA 还包含一个 C 端对接模块序列,可与 ScaB 上的粘连模块结合^[9]。

ScaB,通过基因推测其分子质量为 180.8 ku,但在自然状态下是一个 300 ku 左右的高度糖基化的蛋白质。ScaB 含有 7 个 III 型粘连模块,它们与 ScaA 的 III 型粘连模块有很大的序列差异。在一个大的酶复合物中,ScaB 提供了一个锚定平台,可锚定多达 7 个 ScaA 和 21 个酶。没有证据表明酶的对接模块排斥与 ScaB 的粘连模块相结合。

ScaC,只含有一个粘连模块,并且这个粘连模块与其他已知粘连模块(包括 ScaA 和 ScaB 的粘连模块)在序列上十分不同。ScaC 的 C 端有一个对接模块,能够与 ScaA 上的粘连模块结合。ScaC 能够与多种蛋白质结合,并且与 ScaA 可识别的蛋白

质集合没有明显的重合^[37]。因此 ScaC 似乎能够识别一组特别的蛋白质, 这些蛋白质被推测具有与已知对接模块不同的尚未识别的对接模块。

ScaE, 包含一个 N 端粘连模块和一个 C 端类似 LPXTG 的基序(motif), 这暗示它能够通过溶蛋白性裂解和分选酶(Sortase)- 介导的附着机制共价结合在细胞表面^[26]。

此外, 黄色瘤胃球菌 17 还具有一种含 C 端 XDoc 的蛋白 CttA, 这种蛋白质能与 ScaE 的粘连模块相互作用^[39]。CttA 具有两个推测能结合到结晶纤维素上的 CBM, 可能与细胞和纤维素的结合有关。

2.6 厌氧真菌纤维小体

厌氧真菌存在于许多食草动物的瘤胃中, 大部分厌氧真菌分泌的糖苷水解酶都结合到纤维小体上, 形成分子质量大小约 10^3 ku, 包含 10 到 20 多个多肽的复合物。厌氧真菌中的纤维小体与热纤梭菌和其他厌氧细菌中的纤维小体似乎具有相似的结构^[40]。因此, 厌氧真菌纤维小体的酶和其他蛋白质具有类似对接模块的非催化对接结构域(NCDD), 这些 NCDD 将它们结合到脚手架蛋白粘连模块上。然而, 目前发现, 细菌的对接模块和真菌的 NCDD 无序列同源性^[41]。所以可能真菌的脚手架蛋白和厌氧细菌的脚手架蛋白也不同。对于厌氧真菌的脚手架蛋白分离和测序的工作仍然有待开展。

3 微型人造纤维小体

随着对纤维小体研究的不断深入, 人们已经意识到纤维小体在纤维素转化中的价值, 纤维小体实际上是一个微型而高效的纤维素降解机器。现在已经有学者提出了通过人工设计并通过工程手段改造天然纤维小体的新思路^[42]。已有多个实验室通过采用缩短的、含有特定专一性粘连模块的脚手架蛋白^[43]或一个含有不同粘连模块的嵌合脚手架蛋白^[44], 以及通过在游离酶上添加对接模块等方法人工构建了纤维小体。通过构建人造纤维小体^[42, 45-46], 可以使特定的酶组分被结合在特定位置上。

Fierobe 等^[17, 42]发展了一系列具双功能的嵌合纤维小体, 这些嵌合纤维小体的脚手架蛋白包含一个 CBM 和两个具不同结合专一性的粘连模块。两个含有对接模块标签的纤维素酶, 来自解纤维梭菌的一个内切葡聚糖酶和一个持续性的内切纤维素酶, 分别与两个粘连模块互补结合, 从而组装成复合体。通过在双功能嵌合纤维小体上添加来自热纤梭

菌的粘连模块构建了具三种功能的嵌合纤维小体, 它的比活力比游离酶提高了 7 倍。Cha 等^[43]用含有 1 个、2 个或 4 个嗜纤维梭菌粘连模块的微型脚手架蛋白, 构建了含有一个降解纤维素的内切葡聚糖酶或降解半纤维的木聚糖酶的微型纤维小体, 这个微型纤维小体协同作用降解不同纤维素或玉米纤维的比活力比游离酶提高了 11~18 倍。

体外设计合成纤维小体是一个非常有发展前景的方法策略, 可以通过人工设计灵活地组合不同的纤维素酶和其他酶组分, 能使酶水解活性的比活性成倍增加^[47]。若仅利用纯化的重组蛋白进行大规模的应用, 如应用于生物乙醇生产, 其生产成本将是一个限制因素^[48]。但从基因方面改造和优化合成纤维小体的微生物将会更具有成本效益的优势。

4 展 望

当前随着天然超分子复合物表征技术的进步, 如冷冻电镜技术、超分子复合物的结晶技术等, 人们探索相应超分子复合体结构与功能的手段发生着日新月异的变化, 这就为阐明酶蛋白之间、酶-细胞之间、酶-底物之间、以及细胞-底物之间的相互作用奠定了基础。纤维小体系统为微生物转化生物质过程中细胞和分子之间相互作用的研究提供了一个理想的素材。目前纤维小体相关的研究主要集中在基因、基因组水平, 相对缺乏蛋白质超分子结构与功能的相关研究, 现在人们仍然不清楚纤维小体上酶组分如何协同高效降解天然纤维素。基于超分子复合体的体外自组装结构基础、不同组分之间协同机理及其高效催化的动力学过程的阐明, 将会促进生物化学、生物物理学相关领域的发展。本文中提及的关于纤维小体组装模式及其应用的研究进展, 可能会为揭示这种多酶复合物的功能提供新的线索, 进而为通过微生物高效降解植物生物质并推广至工业化应用这一远景目标的实现提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H, *et al.* The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 2006, **311**(5760): 484-489
- [2] Lynd L R, van Zyl W H, McBride J E, *et al.* Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**(5): 577-583
- [3] Bayer E A, Belaich J P, Shoham Y, *et al.* The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*, 2004, **58**: 521-554
- [4] Doi R H, Kosugi A. Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme

- complexes. *Nat Rev Microbiol*, 2004, **2**(7): 541–551
- [5] Ding S Y, Rincon M T, Lamed R, *et al.* Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *J Bacteriol*, 2001, **183**(6): 1945–1953
- [6] Rincon M T, Ding S Y, McCrae S I, *et al.* Novel organization and divergent dockerin specificities in the cellulosome system of *Ruminococcus flavefaciens*. *J Bacteriol*, 2003, **185**(3): 703–713
- [7] Shimon L J, Bayer E A, Morag E, *et al.* A cohesin domain from *Clostridium thermocellum*: the crystal structure provides new insights into cellulosome assembly. *Structure*, 1997, **5**(3): 381–390
- [8] Noach I, Frolow F, Jakoby H, *et al.* Crystal structure of a type- II cohesin module from the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome reveals novel and distinctive secondary structural elements. *J Mol Biol*, 2005, **348**(1): 1–12
- [9] Lytle B L, Volkman B F, Westler W M, *et al.* Solution structure of a type I dockerin domain, a novel prokaryotic, extracellular calcium- binding domain. *J Mol Biol*, 2001, **307**(3): 745–753
- [10] Adams J J, Webb B A, Spencer H L, *et al.* Structural characterization of type II dockerin module from the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: calcium-induced effects on conformation and target recognition. *Biochemistry*, 2005, **44**(6): 2173–2182
- [11] Fierobe H P, Pages S, Belaich A, *et al.* Cellulosome from *Clostridium cellulolyticum*: molecular study of the Dockerin/Cohesin interaction. *Biochemistry*, 1999, **38**(39): 12822–12832
- [12] Jindou S, Soda A, Karita S, *et al.* Cohesin-dockerin interactions within and between *Clostridium josui* and *Clostridium thermocellum*: binding selectivity between cognate dockerin and cohesin domains and species specificity. *J Biol Chem*, 2004, **279**(11): 9867–9874
- [13] Barak Y, Handelsman T, Nakar D, *et al.* Matching fusion protein systems for affinity analysis of two interacting families of proteins: the cohesin-dockerin interaction. *J Mol Recognit*, 2005, **18** (6): 491–501
- [14] Nakar D, Handelsman T, Shoham Y, *et al.* Pinpoint mapping of recognition residues on the cohesin surface by progressive homologue swapping. *J Biol Chem*, 2004, **279**(41): 42881–42888
- [15] Pages S, Belaich A, Belaich J P, *et al.* Species-specificity of the cohesin-dockerin interaction between *Clostridium thermocellum* and *Clostridium cellulolyticum*: prediction of specificity determinants of the dockerin domain. *Proteins*, 1997, **29**(4): 517–527
- [16] Mechaly A, Fierobe H P, Belaich A, *et al.* Cohesin-dockerin interaction in cellulosome assembly: a single hydroxyl group of a dockerin domain distinguishes between nonrecognition and high affinity recognition. *J Biol Chem*, 2001, **276**(13): 9883–9888
- [17] Fierobe H P, Bayer E A, Tardif C, *et al.* Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *J Biol Chem*, 2002, **277** (51): 49621–49630
- [18] Kruus K, Wang W K, Ching J, *et al.* Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, a major cellulosome component. *J Bacteriol*, 1995, **177**(6): 1641–1644
- [19] 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
- [20] Shimon L J, Pages S, Belaich A, *et al.* Structure of a family IIIa scaffoldin CBD from the cellulosome of *Clostridium cellulolyticum* at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr*, 2000, **56**(Pt 12): 1560–1568
- [21] Bras N F, Cerqueira NMFS, Fernandes P A, *et al.* Carbohydrate-binding modules from family 11: Understanding the binding mode of polysaccharides. *International J Quantum Chemistry*, 2008, **108**(11): 2030–2040
- [22] Xu Q, Barak Y, Kenig R, *et al.* A novel *Acetivibrio cellulolyticus* anchoring scaffoldin that bears divergent cohesins. *J Bacteriol*, 2004, **186**(17): 5782–5789
- [23] Xu Q, Bayer E A, Goldman M, *et al.* Architecture of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome: description of a cell surface-anchoring scaffoldin and a family 48 cellulase. *J Bacteriol*, 2004, **186** (4): 968–977
- [24] Xu Q, Gao W, Ding S Y, *et al.* The cellulosome system of *Acetivibrio cellulolyticus* includes a novel type of adaptor protein and a cell surface anchoring protein. *J Bacteriol*, 2003, **185** (15): 4548–4557
- [25] Rincon M T, Cepeljnik T, Martin J C, *et al.* Unconventional mode of attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome to the cell surface. *J Bacteriology*, 2005, **187**(22): 7569–7578
- [26] Ton-That H, Marraffini L A, Schneewind O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1694**(1–3): 269–278
- [27] Kosugi A, Amano Y, Murashima K, *et al.* Hydrophilic domains of scaffolding protein CbpA promote glycosyl hydrolase activity and localization of cellulosomes to the cell surface of *Clostridium cellulovorans*. *J Bacteriol*, 2004, **186**(19): 6351–6359
- [28] Bayer E A, Lamed R, White B A, *et al.* From cellulosomes to cellulosomics. *Chemical Record*, 2008, **8**(6): 364–377
- [29] Jindou S, Brulc J M, Levy-Assaraf M, *et al.* Cellulosome gene cluster analysis for gauging the diversity of the ruminal cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Fems Microbiology Letters*, 2008, **285**(2): 188–194
- [30] Murashima K, Kosugi A, Doi R H. Site-directed mutagenesis and expression of the soluble form of the family IIIa cellulose binding domain from the cellulosomal scaffolding protein of *Clostridium cellulovorans*. *J Bacteriol*, 2005, **187**(20): 7146–7149
- [31] Tamaru Y, Doi R H. Three surface layer homology domains at the N terminus of the *Clostridium cellulovorans* major cellulosomal subunit EngE. *J Bacteriol*, 1999, **181**(10): 3270–3276
- [32] Ding S Y, Bayer E A, Steiner D, *et al.* A scaffoldin of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome that contains 11 type II cohesins. *J Bacteriol*, 2000, **182**(17): 4915–4925
- [33] Ding S Y, Bayer E A, Steiner D, *et al.* A novel cellulosomal scaffoldin from *Acetivibrio cellulolyticus* that contains a family 9 glycosyl hydrolase. *J Bacteriol*, 1999, **181**(21): 6720–6729
- [34] Lynd L R, Weimer P J, van Zyl W H, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol*

- Rev, 2002, **66**(3): 506–577
- [35] Bayer E A, Shimon L J W, Shoham Y, *et al.* Cellulosomes-Structure and ultrastructure. *J Structural Biology*, 1998, **124**(2–3): 221–234
- [36] Flint H J, Bayer E A. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Incredible Anaerobes: from Physiology to Genomics to Fuels*, 2008, **1125**:280–288
- [37] Rincon M T, Martin J C, Aurilia V, *et al.* ScaC, an adaptor protein carrying a novel cohesin that expands the dockerin-binding repertoire of the *Ruminococcus flavefaciens* 17 cellulosome. *J Bacteriol*, 2004, **186**(9): 2576–2585
- [38] Alber O, Noach I, Rincon M T, *et al.* Cohesin diversity revealed by the crystal structure of the anchoring cohesin from *Ruminococcus flavefaciens*. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2009, **77**(3): 699–709
- [39] Rincon M T, Cepeljnik T, Martin J C, *et al.* A novel cell surface-anchored cellulose-binding protein encoded by the sca gene cluster of *Ruminococcus flavefaciens*. *J Bacteriol*, 2007, **189**(13): 4774–4783
- [40] Ljungdahl L G. The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use. *Incredible Anaerobes: from Physiology to Genomics to Fuels*, 2008, **1125**:308–321
- [41] Raghothama S, Eberhardt R Y, Simpson P, *et al.* Characterization of a cellulosome dockerin domain from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Nat Struct Biol*, 2001, **8**(9): 775–778
- [42] Fierobe H P, Mingardon F, Mechaly A, *et al.* Action of designer cellulosomes on homogeneous versus complex substrates: controlled incorporation of three distinct enzymes into a defined trifunctional scaffoldin. *J Biol Chem*, 2005, **280**(16): 16325–16334
- [43] Cha J, Matsuoka S, Chan H, *et al.* Effect of multiple copies of cohesins on cellulase and hemicellulase activities of *Clostridium cellulovorans* mini-cellulosomes. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**(11): 1782–1788
- [44] Mingardon F, Chanal A, Tardif C, *et al.* Exploration of new geometries in cellulosome-like chimeras. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(22): 7138–7149
- [45] Mingardon F, Chanal A, Lopez-Contreras A M, *et al.* Incorporation of fungal cellulases in bacterial minicellulosomes yields viable, synergistically acting cellulolytic complexes. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(12): 3822–3832
- [46] Mitsuzawa S, Kagawa H, Li Y, *et al.* The rosettazyme: a synthetic cellulosome. *J Biotechnol*, 2009, **143**(2): 139–144
- [47] Nordon R E, Craig S J, Foong F C. Molecular engineering of the cellulosome complex for affinity and bioenergy applications. *Biotechnology Letters*, 2009, **31**(4): 465–476
- [48] Ding S Y, Xu Q, Crowley M, *et al.* A biophysical perspective on the cellulosome: new opportunities for biomass conversion. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, **19**(3): 218–227

Research Advances on The Assembly Mode of Cellulosomal Macromolecular Complexes*

WANG Jin-Lan^{1,2)}, WANG Lu-Shan^{1)**}, LIU Wei-Feng¹⁾, CHEN Guan-Jun^{1,2)}, GAO Pei-Ji¹⁾

(¹⁾ State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China; (²⁾ Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China)

Abstract Cellulosomes produced by certain anaerobic microbes are commonly assembled from multiple subunits to macromolecular machines, and are extracellular protein complexes, which could organize and coordinate a variety of enzymic components to synergistically and effectively degrade lignocelluloses. Cellulosomes are the main forces of anaerobic hydrolytic celluloses, and play a vital role in breaking and using crystalline celluloses. The highly-efficient degradation on lignocelluloses of cellulosomes come from their self-assembled complex high-level structures, and the complex structures of the different anaerobic microorganisms have the astonishing diversity. The research advances on the diversity of assembly mode, structure, and the artificial design of cellulosomes were introduced.

Key words cellulosome, cohesin, dockerin, scaffoldin, macromolecular complexes

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00278

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30970092) and Natural Science Foundation of Shandong Province (Y2008D10).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88366202, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

Received: May 22, 2010 Accepted: June 10, 2010