

植物纤维素生物合成研究进展

闫绍鹏, 王秋玉, 杨传平* (东北林业大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 综述了植物纤维素生物合成研究进展及最新研究情况, 并展望了该研究的方向及趋势。

关键词 纤维素; 纤维素合酶; KORRIGAN 纤维素酶; 木醋杆菌

中图分类号 Q56 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-09049-03

Research Advances in the Plant Cellulose Biosynthesis

YAN Shao-peng et al (Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract Research progress in the plant cellulose biosynthesis was summarized, and the development trend was prospected.

Key words Cellulose; Cellulose synthases; KORRIGAN cellulase; Acetobacter xylinum

树木的大部分生物量产物是次生木质部, 即木材。在木材中, 纤维素、半纤维素和木质素是次生木质部细胞壁的主要成分。被子植物中木材通常包含大约45%的纤维素、25%的半纤维素、20%的木质素和10%的其他物质^[1]。因此, 纤维素的生物合成对于重要经济树种的生产效益至关重要。

纤维素的基本单位是吡喃式D-葡萄糖, 以-1,4-糖苷键相连, 其葡萄糖残基约为2 000~2 500个。植物中的纤维素主要以小微纤丝的形式存在, 一般微纤丝由36根-1,4-葡萄糖苷键结晶而成, 它是植物细胞壁的主要成分。自然界每年约有1 800亿t的纤维素生成, 是地球上最丰富的生物大分子和重要的可再生资源^[2]。随着社会的快速发展, 人类对植物纤维的需求激增。其相关研究, 特别是植物纤维素生物合成机制的研究越来越多, 因为该研究对木材的材质改良, 定向培育, 进而提高森林重要经济树种纤维的品质与产量, 以及农业、造纸等化工业都十分重要。为此, 笔者以人们对纤维素生物合成研究进展过程为主线, 概述了纤维素生物合成研究的进展及最新研究情况, 并展望了该研究的方向及趋势。

1 木醋杆菌(*Acetobacter*): 纤维素生物合成研究的开始

纤维素生物合成研究的第一个重要突破是发现了环二鸟苷酸(c-di-GMP), 它激活木醋革兰氏阴性菌的纤维素生物合成^[3], 起到促进纯化纤维素合酶、克隆编码催化亚基的基因、调控纤维素微丝分泌和结晶的作用。它的发现使体外获得稳定的、高活性木醋杆菌纤维素合酶成为可能。在此基础上, 2个研究组在木醋杆菌中成功地获得了纤维素生物合成酶, 包括2个多肽, 纤维素合酶的催化亚基和c-di-GMP调控蛋白^[4-5]。对这些蛋白通过光亲和标记方法进行了鉴定, 发现它们都以UDP-葡萄糖或c-di-GMP同系物作为前体合成纤维素合酶。一个木醋纤维素合酶的同源基因在另一个有纤维素合成的土壤杆菌(*Agrobacterium*)中被发现^[6]。土壤杆菌中纤维素生物合成的操纵子被证明有多个基因组成, 包括纤维素合酶基因, 但没有发现c-di-GMP调控蛋白同系物。1995年, Matthyse等提出了土壤杆菌中纤维素生物合成模型^[7]。

各研究组对木醋杆菌和土壤杆菌中纤维素合酶基因采用不同的命名方法。为了避免混淆, Delmer制定了命名规

则, Ces代表Cellulose synthase为纤维素合酶, 将种和属的名字加到前面, 如Ax为*Acetobacter xylinum*, 或Ch为*Gossypium hirsutum*, 基因后面有“A”代表这是一个编码细菌纤维素合酶催化亚基基因的同源体。对木醋杆菌来说, 按照命名规则的名称为AxCesA, 来自棉花的为ChCesA。目前, 植物纤维素合酶基因基本遵循这个命名规则。

2 纤维素合酶保守序列基序的研究

随着木醋杆菌(*Acetobacter*)和土壤杆菌(*Agrobacterium*)的纤维素合酶基因的发现, 人们开始运用探针去分离植物中纤维素合酶基因。然而, 为了找到植物中的同源基因, 运用细菌的CesA基因作为探针去筛选植物的cDNA文库并没有成功。于是, 人们开始寻找纤维素合酶基因和其他糖基转移酶基因中保守的共同基序。2个研究组发现了在AxCesA基因中的1个序列在以UDP-glc或UDP-GlcNac作为前体的一些糖基转移酶中相对保守^[8-9]。后来, Saxena等运用疏水簇分析(Hydrophobic cluster analysis, HCA)寻找糖基转移酶的保守序列(用UDP-glc或相似的核苷酸糖为前体催化-糖基转移)^[10]。HCA鉴定一些以UDP-糖为前体的糖基转移酶的A和B2个结构域(Domain)。在A域内, 特别是在2个保守的天冬氨酸(D)残基周围区域高度保守, 然而在B域内, 另一个天冬氨酸(D)的周围区域也是保守的, 接着是QXXRW基序(图1)。这些区域在所有的细菌CesA基因及其他相关酶类中保守。这些研究在后来鉴定植物纤维素合酶基因中起到了关键的作用。通过后续研究, 人们较为清楚地知道了拟南芥、棉花和杨树等模式植物的CesA蛋白结构。

3 植物纤维素合酶基因的研究

棉花的次生细胞壁几乎由纯纤维组成, 在纤维生长期, 没有其他的多糖类物质产生。因此, 其cDNA将富含纤维素生物合成相关的序列, 并可以通过与已知序列的同源性比较进行分析。Pear等采用cDNA随机测序和序列分析法, 首次从棉花中克隆了编码纤维素合酶催化亚基的-1,4-糖苷转移酶基因, ChCesA1和ChCesA2^[12]。Williamson等运用拟南芥突变体Rsvl对该基因进行了鉴定。纤维素合酶基因编码纤维素合酶的催化亚基, 其基因的大小范围从3.5~5.5 kb, 有9~13个内含子, 它们转录的范围从3.0~3.5 kb, 其内含子和外显子的边界区域是高度保守的。基因结构的差异主要在于内含子的多少, 植物CesA家族的成员在985~1 088个氨基酸, 序列同源性从53%~98%。

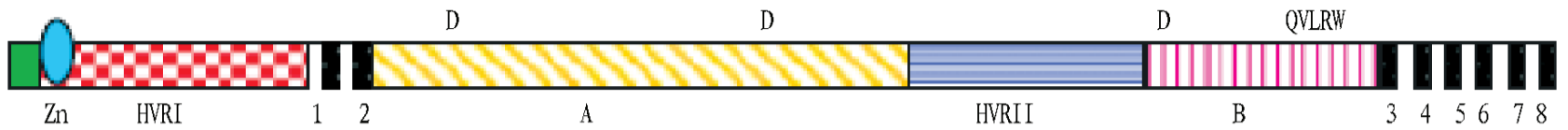
基金项目 国家自然科学基金项目(30571513)。

作者简介 闫绍鹏(1975-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 在读博士, 工程师, 从事遗传学科研和教学工作。* 通讯作者。

收稿日期 2008-04-28

此后,在水稻、拟南芥、玉米、杨树等更多的植物中分离克隆出更多的 *CesA* 基因。*CesAs* 形成一个大的基因家族(图2),家族内的每个酶彼此相关,协同作用。此外,在植物中还存在大量的纤维素合酶相似蛋白(Csl),可能与纤维素生物合

成相关,但其具体功能还不清楚。研究表明,纤维素生物合成是纤维素合成基因、非纤维素多糖合成基因以及结构蛋白与非结构蛋白基因等在细胞发育信号调控下进行协同表达、相互作用的过程。

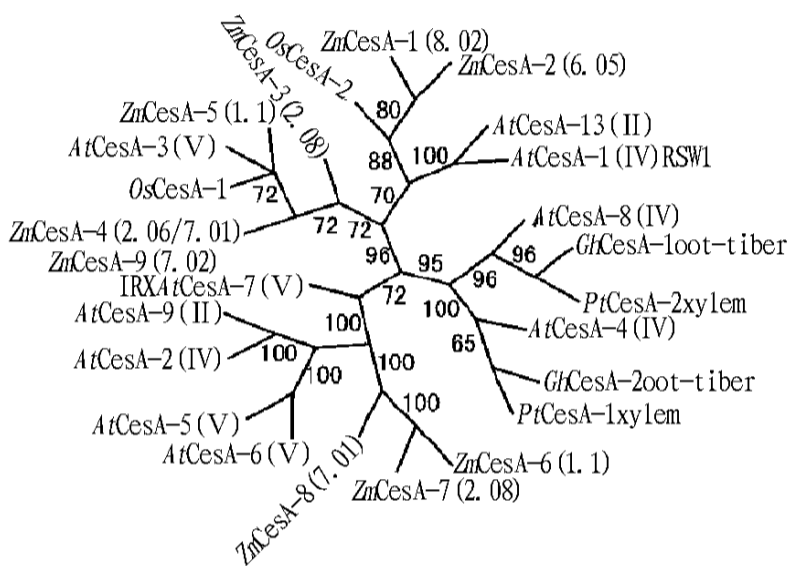


注:Zn 为锌连接区;HVR 为靠近 N 端的超变量区;1~8 为跨膜区(TMDs);亚区 A 和 B 为与其他 *CesA* 蛋白相关的高度保守(80%~90%)的区域;HVR 为中心的超变量区。D,D,D 基序定位在糖基转移酶上。

Note:Zn. Zinc binding domain; HVRI. Hypervariable region near N terminus; 1-8. Transmembrane domains; Subdomains A and B. Highly conserved (80%~90%) part of catalytic domains in relation to other CESA proteins; HVRII. Central hypervariable region. Location of the processive glycosyltransferase motif D, D, D.

图1 杨树 *CesA* 蛋白(*RrCesA*) 结构^[14]

Fig.1 Structure of *CesA* proteins (*Rr CESA*)



注:A 代表拟南芥(*Arabidopsis*);Ch 代表棉花(*Cotton*);Os 代表水稻(*Rice*);Pt 代表白杨(*Populus trembloides*);Zm 代表玉米(*Zea mays*)。蛋白名称后面的圆括弧里的数字指的是这些基因在染色体遗传图谱上的位置。

Note: A. *Arabidopsis*; Ch. *Cotton*; Os. *Rice*; Pt. *Populus trembloides*; Zm. *Zea mays*. Data in the parentheses after protein names stand for the position of the genes in chromosome genetic map.

图2 植物 *CesA* 蛋白的非根树状图

Fig.2 Unrooted dendrogram for plant *CesA* proteins

植物纤维素的生物合成需要多个纤维素合酶基因的共同参与。通过对植物中的 *CesA* 表达分析表明,在同一个细胞的同一个发育阶段有2个到多个 *CesA* 蛋白参与纤维素的生物合成。IRX1 突变体的表型和 IRX3 很相似,都表现为木质部的不规则和纤维素含量的减少,而且还发现这2个基因的表达部位和时期都完全相同^[13];在杨树中 *RrCesA2* 和 *RrCesA1* 分别与 IRX1 和 IRX3 同源,它们在杨树中的表达部位和时期相同,都是在木质部的次生壁形成期表达,推测这2个基因可能在同一个细胞中表达,与次生壁形成相关^[14]。

对于 *CesA* 基因功能的研究,最初人们推测与纤维素的生物合成有关,但仍缺乏直接的试验依据。直到发现植物细胞壁突变体后,植物纤维素合酶基因功能的验证才成为可能。Aidi 等分别发现了拟南芥的射线膨大突变体(*Radial swelling1*, RSW1) 与不规则木质部突变体(*Irregular xylem3*, IRX3)^[15],通过研究其中的突变基因表明,这些突变基因与棉花中已经发现的可以编码纤维素合酶的 cDNAs 高度同源,从而验证了棉花中发现的编码纤维素合酶基因的功能。迄今

为止,在拟南芥中已经发现10个纤维素合酶基因,其中已经获得6个基因突变体(*AtCesA1*, *AtCesA3*, *AtCesA4*, *AtCesA6*, *AtCesA7* 和 *AtCesA8*)。人们对其各自相应的功能都有较清楚的了解,各突变体均有特殊的表现型,不同程度地影响纤维素的合成量和细胞壁的结构。这些突变体的发现是证明纤维素合酶基因参与植物纤维素合成的直接依据。

4 与纤维素生物合成相关的其他酶

当前,人们对于纤维素生物合成基因研究最多的是(*CesA*) 基因,已经从微生物及多种植物中克隆出 *CesA* 基因,但进一步研究表明,纤维素生物合成机制非常复杂,除纤维素合酶外,谷甾醇糖基转移酶、纤维素酶(*Kor*)、蔗糖合酶(*Sucrose synthase SUSY*)、细胞骨架蛋白、Rac13 蛋白等都可能与纤维素合成有关。*KORRIGAN* 基因(*KOR*) 编码 1,4-D 葡糖酶,是一种定位到膜上的内切葡聚糖酶,在拟南芥中表现为与初生和次生细胞壁上的纤维素生物合成相关。*KORRIGAN* 基因突变体表现为纤维素的减少,同时伴随着果胶合成的增加,导致愈伤组织过量形成。内切葡聚糖酶通常与纤维素的降解有关,但是 *KOR* 蛋白在纤维素生物合成过程中的作用还不清楚^[16]。

M. Mølhøj 等从芸苔植物中得到了 *KOR* 酶的同源物,可以用特异酶切消化掉非结晶的 -1,4 葡糖苷链,而对结晶纤维不起作用。这一事实说明 *KORRIGAN* 基因可能与纤维素合成中糖苷链延伸的终止有关^[17]。另一方面,*KOR* 酶还能在体外将甾醇纤维糊精上的固甾醇切除掉,以利于结晶过程的进行。当 *KOR* 酶失活时,首先表现为结晶纤维的减少,游离的非结晶纤维的积累^[18]。可见,*KOR* 酶是植物纤维素生物合成必不可少的酶之一,但它是如何与纤维素合酶复合体相互作用的还有待于进一步研究。

另一个参与纤维素生物合成的酶是蔗糖合酶,它与纤维素生物合成的底物供给有关。试验证明,在不同的3个异养系统中,蔗糖合酶能够提高纤维素生物合成的效率。它可以催化蔗糖和 UDP 反应,生成 UDP-葡萄糖和果糖,直接为纤维素的生物合成提供底物来提高纤维素的合成效率。2004年, Konishi 等的研究进一步证实蔗糖合酶可以利用蔗糖合成 UDP-葡萄糖直接用于纤维素合成。他们将绿豌豆的蔗糖合酶基因转入杨树中,转入的外源蔗糖合酶结合在微粒体膜上的,过量表达这些膜上的蔗糖合酶,可以明显增加标记过的

蔗糖进入纤维素中,同时伴有果糖代谢的循环,可见蔗糖合酶可以直接参与纤维素的生物合成。植物纤维素生物合成是一个非常复杂的过程。随着研究的深入,人们对于这个过程的了解也逐渐清晰,除了以上3种酶类,又相继发现了许多其他物质与纤维素生物合成相关。如2002年分离鉴定了1个新的基因KOBITQ(KOB),它在拟南芥细胞迅速膨大时期,是纤维素合成与分配中所必需的酶。另外,Tichone birefringence(TBRI)基因在拟南芥次生纤维素的分配中也起作用,Alpha glucosidase也是参与纤维素生物合成的基因之一。从以上分析可以看出,纤维素的生物合成是一个高度复杂的生物过程,要彻底阐明其中的机制还需要很漫长的研究历程。

5 纤维素生物合成过程研究

当前植物纤维素生物合成模型预想过程为3步:与原生质膜相关的蔗糖合酶引导UDP-葡萄糖为纤维素合成提供底物;共同表达的多种CesA,组织形成6边形的多聚体,聚合葡萄糖单体成为葡聚糖链,同时回收释放出的UDP返回到蔗糖合酶;与膜相关的纤维素酶,KORRIGAN(KOR)作为一个葡聚糖链转换为纤维素微纤丝的编辑或监视者,切开有缺陷的葡聚糖链^[19-20](图3)。因此,CesA、蔗糖合酶和KOR蛋白相互作用共同调控植物中纤维素的生物合成^[21]。

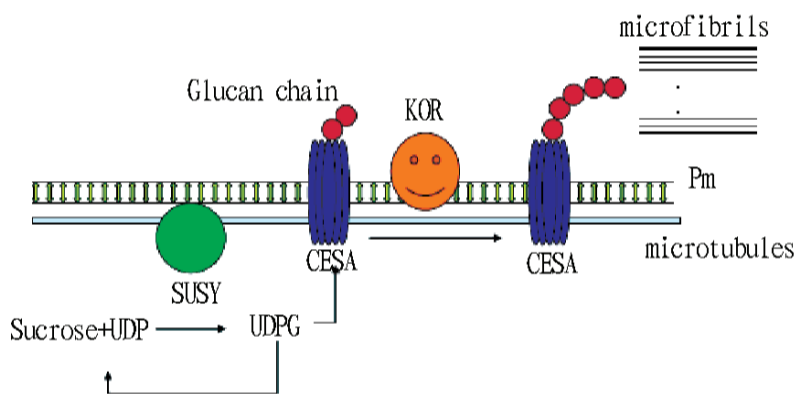


图3 植物中纤维素生物合成模型

Fig.3 Model of cellulose biosynthesis in plants

6 总结和展望

近10年来,在纤维素生物合成关键基因的克隆及功能研究方面取得了显著的进展。随着原有问题的解决,一些新的问题又不断产生。随着研究的深入,还发现了更多参与纤维素生物合成的酶类,纤维素合酶和其他与纤维素生物合成相关酶的相互作用关系及纤维素的生物合成过程尚未研究清楚。许多的研究结果也仅为推测的模型,还需要具体的研究成果加以证明,要彻底地理解纤维素生物合成机理,还需要作许多的工作。但通过逐步了解这些基因的功能,清楚纤维素生物合成过程,最终会达到控制植物细胞壁成分和细胞

纤维素合成的目标,同时应用到经济植物目标性状的改良中,为人类生产、生活创造更大的价值。

参考文献

- [1] FENDEL D, WEGENER G. Chemical composition and analysis of wood [C]// Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1984: 26-65.
- [2] DELMER DP. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 245-276.
- [3] ROSS P, WEINHOUSE H, ALON Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid [J]. Nature, 1987, 325: 279-281.
- [4] LINF C, BROWN R MJR, DRAKE R RJR, et al. Identification of UDP-glucose (UDP-glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-glc [J]. J Biol Chem, 1990, 265: 4782-4784.
- [5] MAYER R, ROSS P, WEINHOUSE H, et al. Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically cross-reacting proteins in higher plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 5472-5476.
- [6] MATTHYSSE A G, THOMAS D O L, WHITE A L. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. J Bacteriol, 1995, 177: 1076-1081.
- [7] MATTHYSSE A G, WHITE S, LIGHFOOT R. Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. J Bacteriol, 1995, 177: 1069-1075.
- [8] SAXENAI M, KUDLICKA K, OKUDA K, et al. Characterization of genes in the cellulose synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: Implications for cellulose crystallization [J]. J Bacteriol, 1994, 176: 5735-5752.
- [9] DELMER DP, AMOR Y. Cellulose biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7: 987-1000.
- [10] SAXENAI M, BROWN R MJR, FEVRE M, et al. Multidomain architecture of beta-glucosyl transferases: implications for mechanism of action [J]. J Bacteriol, 1995, 177: 1419-1424.
- [11] CHANDRASHEKHAR P JOSHI, SUCHTA BHANDARI, PRIYA RANJAN, et al. Genomics of cellulose biosynthesis in poplar [J]. New Phytologist, 2004, 164: 53-61.
- [12] PEAR J R, KAWAGOE Y, SCHRECKENGOST WE, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 12637-12642.
- [13] HA MA, MACKINNONI M, STURCOVA A, et al. Structure of cellulose deficient secondary cell walls from the *irx3* mutant of *Arabidopsis thaliana* [J]. Phytochemistry, 2002, 61(1): 7-14.
- [14] SAMUGA A, JOSHI C P. A new cellulose synthase gene (*PtCesA2*) from aspen xylem is orthologous to *Arabidopsis AtCesA7* (*irx3*) gene associated with secondary cell wall synthesis [J]. Gene, 2002, 296(1/2): 37-44.
- [15] TAYLOR NG, SCHEIBLE WR, CULLER S, et al. The irregular xylem locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis [J]. Plant Cell, 1999, 11(5): 769-780.
- [16] SUCHTA BHANDARI, TAKESH FUJINO, SHVTHAMMANAGOWDA, et al. Xylem-specific and tension stress-responsive co-expression of KORRIGAN endoglucanase and three secondary wall-associated cellulose synthase genes in aspen trees [J]. Planta, 2006, 224: 828-837.
- [17] MICHELLE BABB, CANDACE H HAGLER. Sucrose phosphate synthase activity rises in correlation with high rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems [J]. Plant Physiol, 2001, 127: 1234-1242.
- [18] PENG L, HOCART C H, REMONDJ W, et al. Fractionation of carbohydrates in *Arabidopsis* involved in cellulose production [J]. Planta, 2000, 211: 406-414.
- [19] DELMER DP, HAHLER C H. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants [J]. Metabolic Engineering, 2002, 4: 22-28.
- [20] MOLHOJ M, PAGANT S, HOFIE H. Towards understanding the role of membrane bound endoglucanases in cellulose biosynthesis [J]. Plant Cell Physiology, 2002, 43: 1399-1406.
- [21] READS M, BACIC T. Biotechnology for cellulose [J]. Science, 2002, 295: 59-60.

(上接第9026页)

参考文献

- [1] 万秋红, 吴华, 方盛国. 发现大熊猫秦岭亚种 [J]. 森林与人类, 2006(8): 64-69.
- [2] 国家林业局. 全国第三次大熊猫调查报告 [R]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [3] 刘选珍, 李明喜, 余建秋, 等. 圈养大熊猫主食竹的氨基酸分析 [J]. 经济动物学报, 2005, 9(1): 30-34.

- [4] 朱圣陶, 吴坤. 蛋白质营养价值评价——氨基酸比值系数法 [J]. 营养学报, 1988(10): 187-190.
- [5] FAO WHO. Energy and protein requirements. FAO nutrition meeting report series [M]. Roma: FAO, 1973: 52-63.
- [6] 刘选珍, 李光汉, 余建秋, 等. 大熊猫肌肉氨基酸含量的初步研究 [J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(1): 106-108.
- [7] 刘伟, 王锦. 氨基酸在饲料工业中的应用 [J]. 山东轻工业学院学报, 1999, 13(3): 36-38.