

木聚糖酶序列结构功能分析

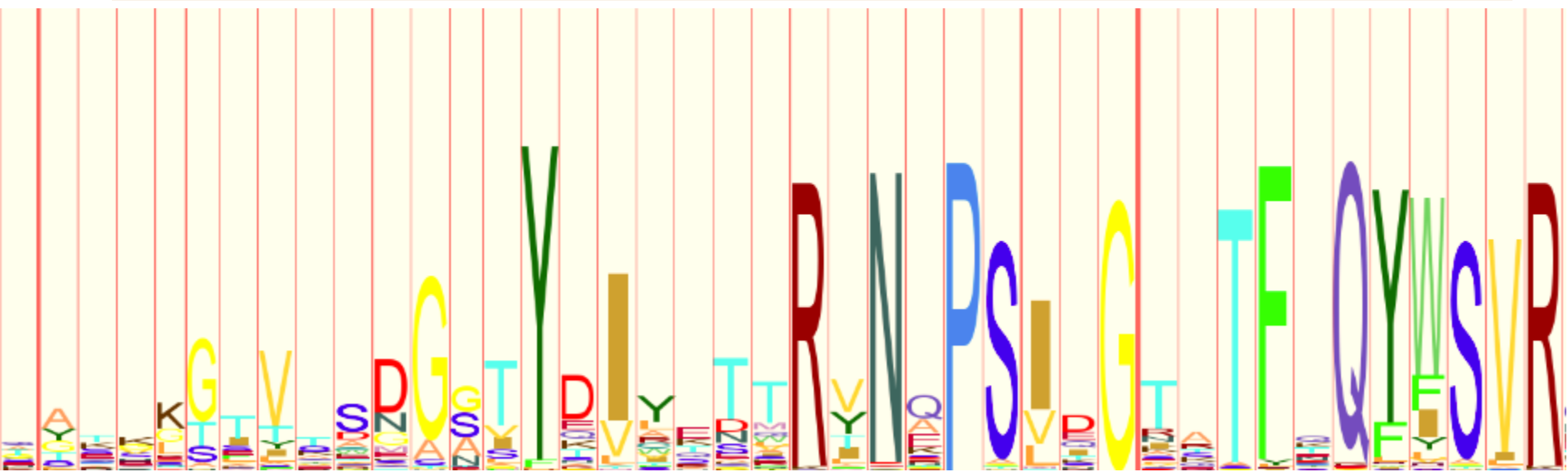
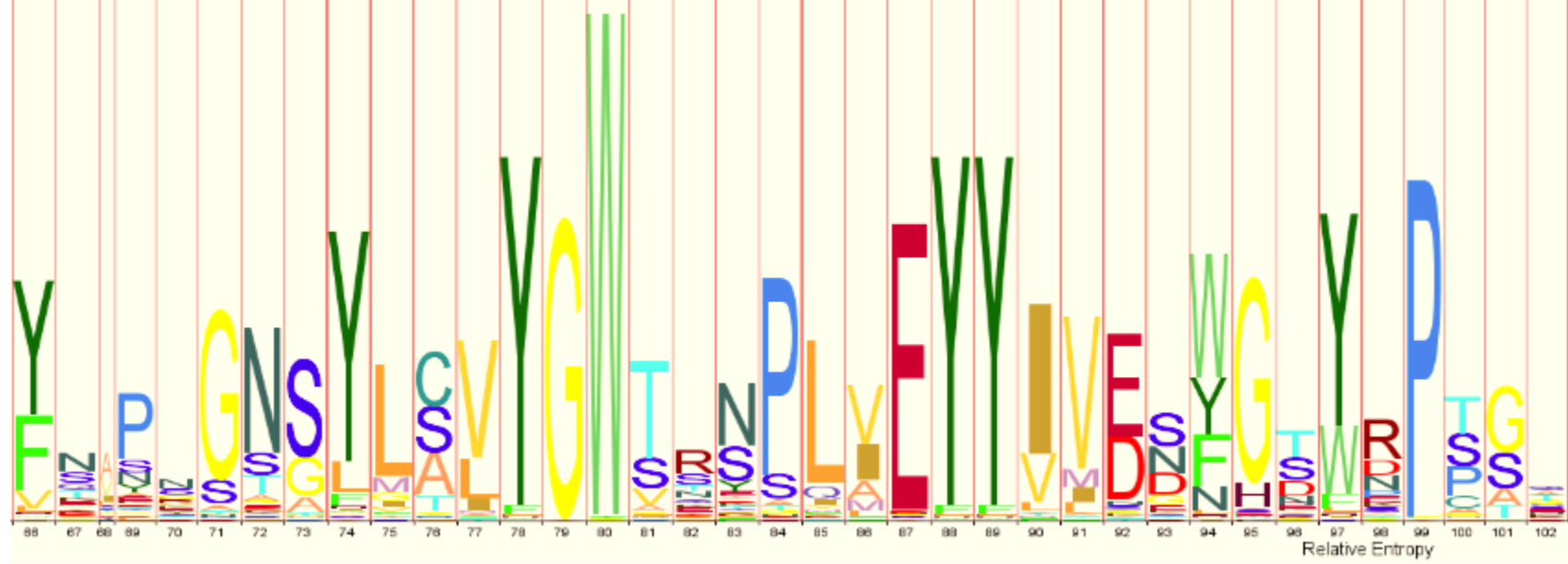
赵军旗 赵艳雨 李中媛 张惠 王迪 刘晓庆 张蕊

王雯雯 蔡红英 朱涛

一班D队
2009年3月

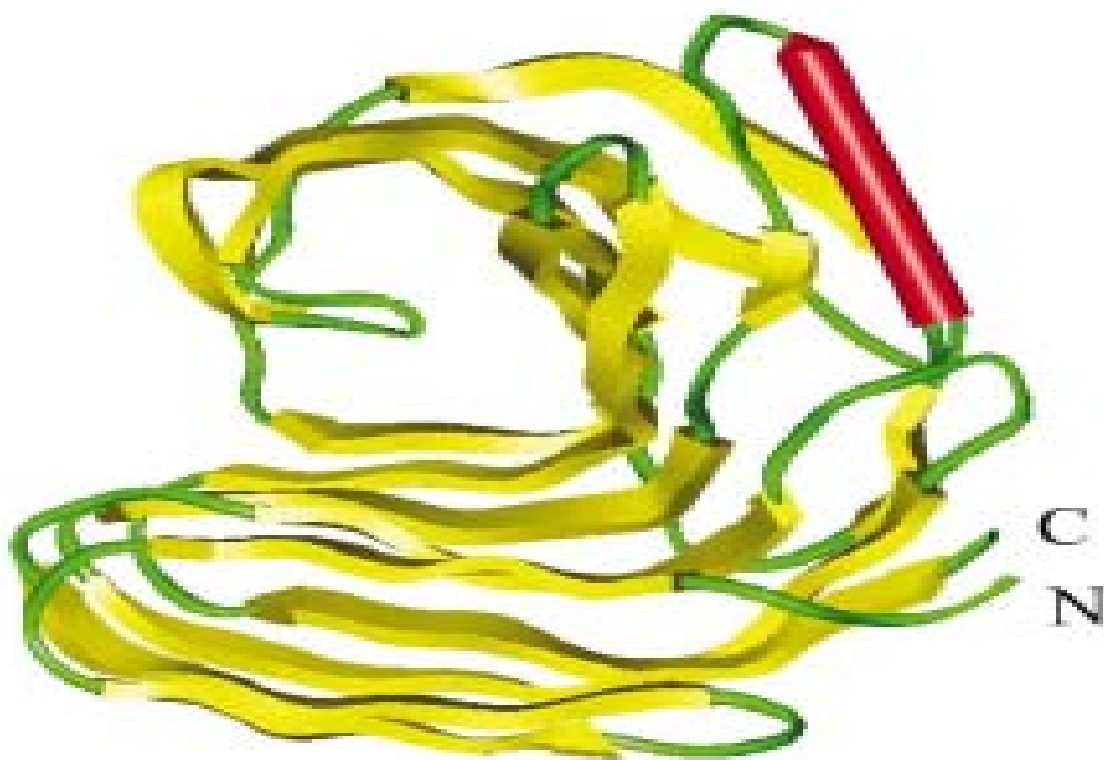
- 木聚糖酶 (**xylanase**) 文献调研
- 木聚糖酶序列特征、结构功能分析
- 突变分析, 结构功能关系分析
- 利用同源建模预测结构、分析可能的性质及部分功能验证

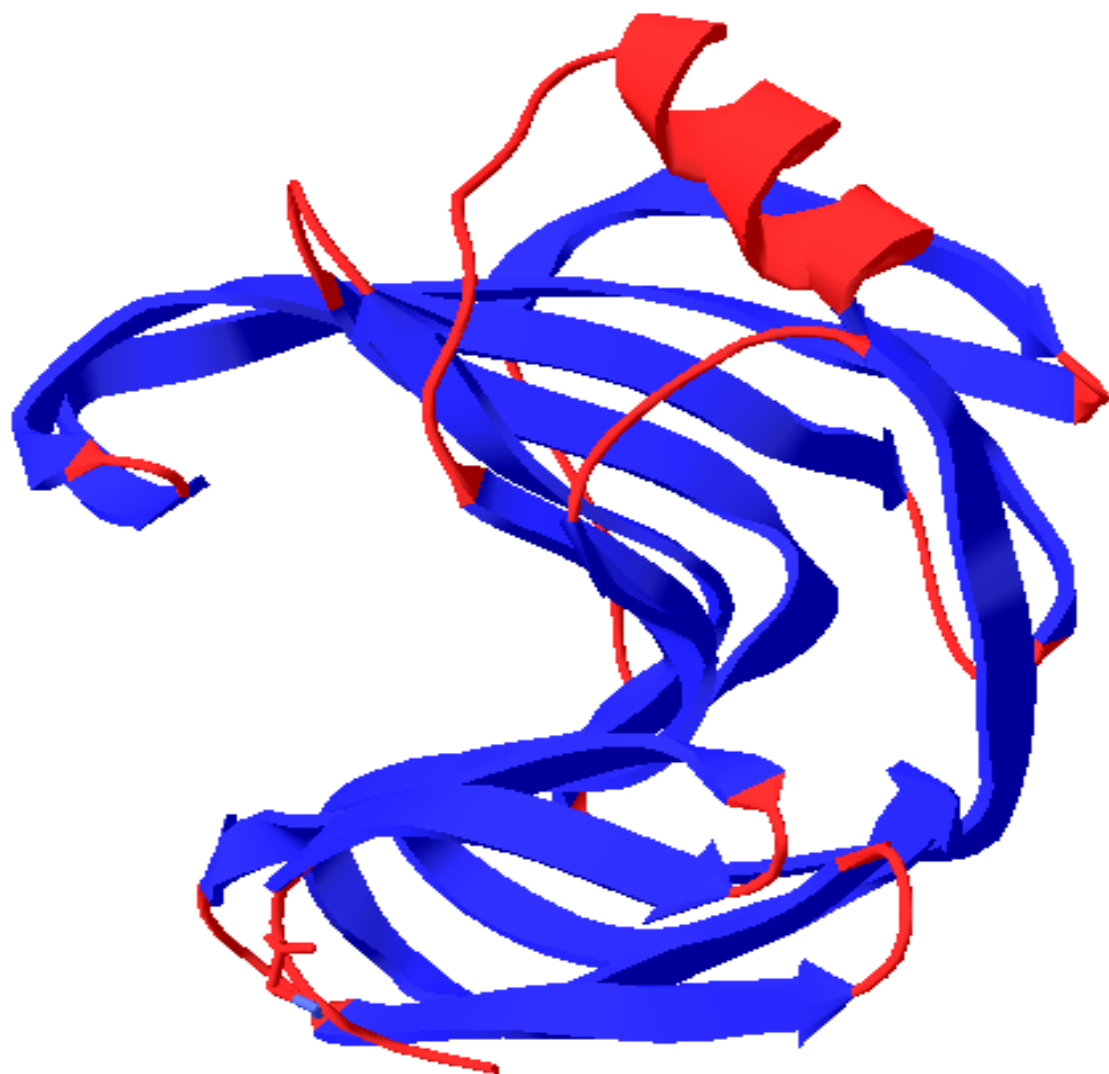
- 木聚糖属于半纤维素多糖，广泛存在于植物细胞壁，由D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖等单糖组成，水解后可产生木糖。
- 木聚糖酶可用于动物饲料、面包、发酵食品和饮料、制药和化学应用、造纸。
- 木聚糖酶催化木聚糖水解，由于木聚糖结构多变，降解木聚糖需要多种酶复合体，研究最多的是木聚糖酶和 β -木糖苷酶。
- 根据序列相似性可将糖苷水解酶分类(CAAEZ)。
- 内源性木聚糖酶主要存在于第10和11家族。第10家族结构为 α/β 型，第11家族为卷饼(β -jelly roll)型。

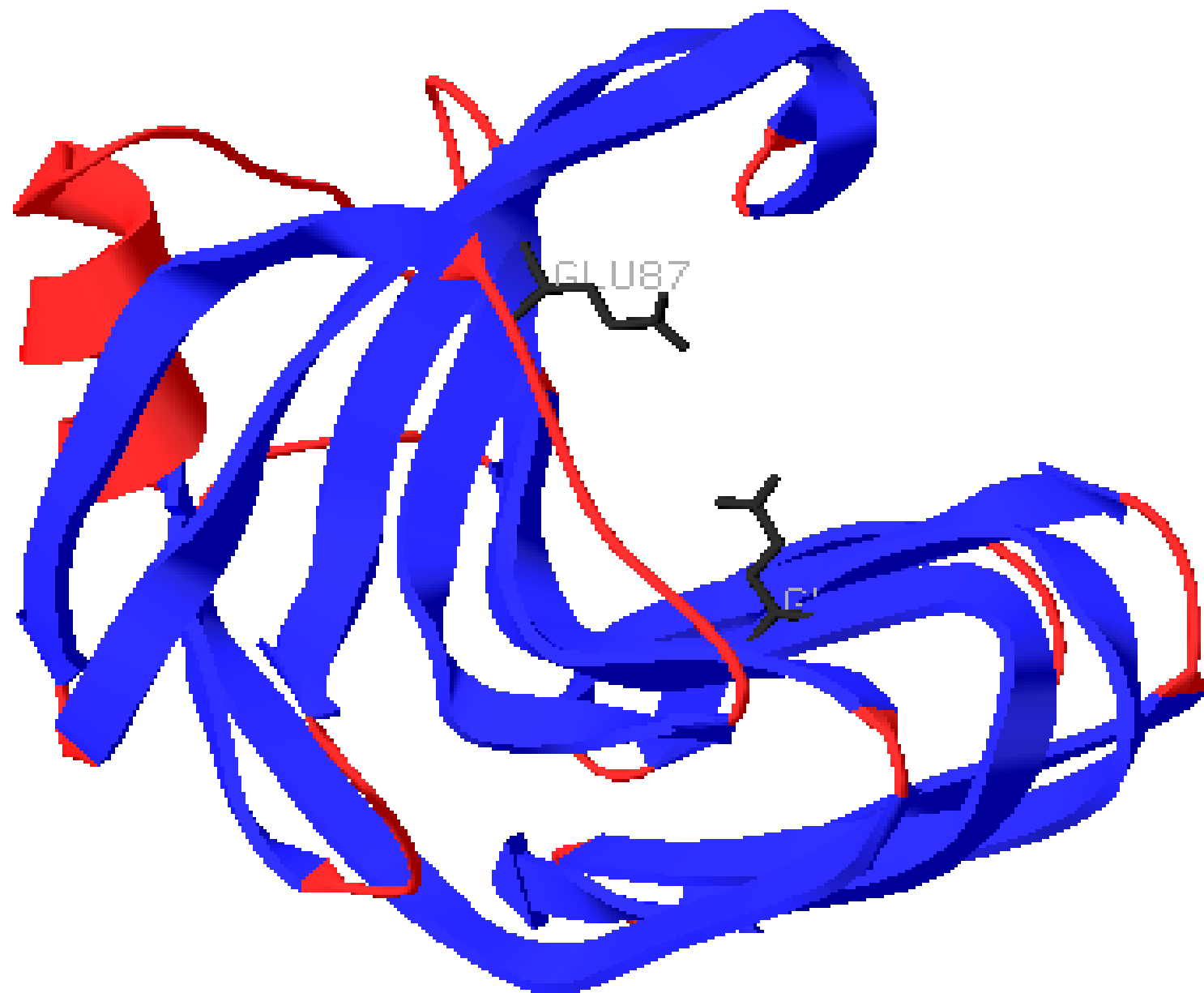


1. 属于保留催化
2. 催化位点：亲核/碱催化起作用的是Glu
3. 催化质子供体起作用的是Glu
4. 所有报道的第十一家族的木聚糖酶结构都显示它含有一个催化结构域，形成三明治型
5. 两个片层直接的cleft可以和底物相结合。

以xyl1为例进行突变分析，其蛋白结构PDB编号是1hix







Xyl1含有一个 α -helix 和14个 β -strands, β -strands形成两个反平行片层，其中Sheet B高度扭曲形成一个很长的沟，从而构成了活性位点。而 α -helix 则在片层外侧。

[1,2] [2,3] [1,10][4]
 ↓ ↓ ↓ ↓
 * * 40 * 60

B.agara. Xyn11 : -QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGGTFSQAQWNNVNNILFRKGGKFFNETQTHQQVG : 64
B.sp 41M-1 XylJ : --AITSNEIGTHDGYDYEFWKDSGGSGSMTLNSGGTFSQAQWSNVNNILFRKGGKFFDETQTHQQIG : 63

B.pumilus XYNA : -RTITNEMGNHSGYDYELWKDYGNT-SMTLNNGGAFSAGWNNIGNALFRKGGKFFDSTRTHHQLG : 63
D.thermophilum XynB : --ALTSNASGTFDGYYYELWKDTGNT-TMTVYTQGRFSCQWSNINNALFRGTGKKYN--QNWQSLG : 60

S.sp S38 Xyl1 : DTVITTNQTGTNNGYYYSFWTDGGGSVSMNLASGGSYGTSWTNCGNFVAGK-----WANGA : 57

S.lividans B : DTVVTTNQEGTNNGYYYSFWTDGQTVSMNMGSGGQYSTSWRNTGNFVAGK-----WANGG : 57
S.EC3 C : ATTITTNQTGYD-GMYYSFWTDGGGSVSMTLNNGGYSYSTQWTNCGNFVAGK-----WGNGG : 56
T.reesei XynII : --QTIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVYTYTNGPGGQFSVNWSNSGNFVGGK-----WQPGTK : 56
B.circulans XynA : -----ASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGK-----WTTGSP : 47
B.D3 : -----NTYWQYWTDGIGYVNAATNGQGGNYSVSWNSGNFVIGK-----WQYGAH : 45



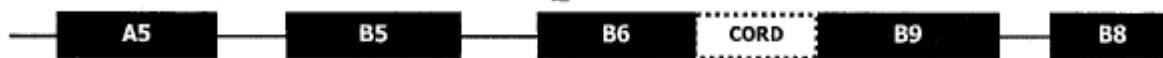
[5] [6] [7] [6,8][7,9]
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
 * 80 * 100 * 120 *

B.agara. Xyn11 : NMSINYG-ANFQPNGNAYLCVYGWTVDPLVEYYIVDSWGNWRP-PGATPKGTITVDGGTYDIYET : 127
B.sp 41M-1 XylJ : NMSINYG-ATYNPNGNSYLTVYGWTVDPLVEFYIVDSWGTWRP-PGGTPKGTINVDGGTYQIYET : 126

B.pumilus XYNA : NISINYN-ASFNPPGNSYLCVYGWTSPLAEYYIVDSWGTYP-RP-TGAY-KGSFYADGGTYDIYET : 125
D.thermophilum XynB : TIRITYS-ATYNPNGNSYLCIYGWSTNPLVEFYIVESWGNWRP-PGATSLGQVTIDGGTYDIYRT : 123

S.sp S38 Xyl1 : RRTVNYS-GSFNPSGNAYLTLYGWTSANPLVEYYIVDNWGTYP-RP-TGTY-KGTVTSDDGGTYDVYQT : 119

S.lividans B : RRTVQYS-GSFNPSGNAYLALYGWTSNPLVEYYIVDNWGTYP-RP-TGEY-KGTVTSDDGGTYDIYKT : 119
S.EC3 C : RRTVRYS-GYFNPSGNGYGLYGWTSNPLVEYYIVDNWGSYRP-TGEY-RGTVYSDGGTYDIYKT : 118
T.reesei XynII : NKVINFS-GSYNPNNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDDGSVYDIYRT : 120
B.circulans XynA : FRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTSRPLIEYYVVDWSGTYP-RP-TGTY-KGTVKSDDGGTYDIYTT : 110
B.D3 : NRVVNYNAGAWQPNGNAYLTLYGWTRNPLIEYYVVDWSGSYRP-TGDY-RGSVYSDGAWYDLYHS : 108



[4,11][11] [9] [8] [5] [3,10]
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
 140 * 160 * 180 *

B.agara. Xyn11 : LRVNQPSIKGIAT-FKQYWSVRRSKRT--S-GTISVSNHFRAWENLGMNMGKM-YEVALTVEGYQ : 187
B.sp 41M-1 XylJ : TRYNQPSIKGTAT-FQQYWSVRTSKRT--S-GTISVSEHFRAWESLGMNMGNM-YEVALTVEGYQ : 186

B.pumilus XYNB : TRVNQPSIIGIAT-FKQYWSVRQTKRT--S-GTVSVAHFRKWESLGMPMGKM-YETAFTVEGYQ : 185
D.thermophilum XynB : TRVNQPSIVGTAT-FDQYWSVRTSKRT--S-GTVTVTDHFRAWANRGLNLGTI-DQITLCVEGYQ : 183

S.sp S38 Xyl1 : TRVNAPSVEGTKT-FNQYWSVRQSKRT--G-GSITAGNHFDAWARYGMPLGSEFNYYMIMATEGYQ : 180

S.lividans B : TRVNKPSVEGTRT-FDQYWSVRQSKRT--G-GTITTGNHFDAWARAGMPLGNFSYYMIMATEGYQ : 180
S.EC3 C : TRYNAPSVEGTRT-FDQYWSVRQSKVI--GSGTITTGNHFDAWARAGMNLGQFQYYMIMATEGYQ : 180
T.reesei XynII : QRVNQPSIIGTAT-FYQYWSVRRNHR--S-GSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIV-AVEGYF : 180
B.circulans XynA : TRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFTNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQ : 175
B.D3 : WRYNAPSIDGTQT-FQQYWSVRQKRP TGSNVSITFENHVNAWGAAGMPMGSSWSYQVLATEGYY : 172



	200	*	pI	optimum pH
<i>B.agara</i> . Xyn11	: SSGSANVYSN TLR ~-----:	200	8.8	7-8
<i>B.sp</i> 41M-1 XylJ	: SSGSANVYSN TLT ~-----:	199	5.4	9
<i>B.pumilus</i> XYNB	: SSGSANVM TNQL FIGN--- :	201	n.d.	6.7
<i>D.thermophilum</i> XynB	: SSGSANITQNTFSQSSS~- :	191	n.d.	6.5
<i>S.sp</i> S38 Xyl1	: SSGSSSISVS----- :	190	9.8	6
<i>S.lividans</i> B	: SSGSSSIN VGGTGG GDS--- :	197	8.4	6.4
<i>S.EC3</i> C	: SSGSSNITVSG----- :	191	9.1	n.d.
<i>T.reesei</i> XynII	: SSGSASITVS----- :	190	9	4.5-5.5
<i>B.circulans</i> XynA	: SSGSSNVTVW----- :	185	9	6
<i>B.D3</i>	: SSGYSNVTVW----- :	182	7.7	6

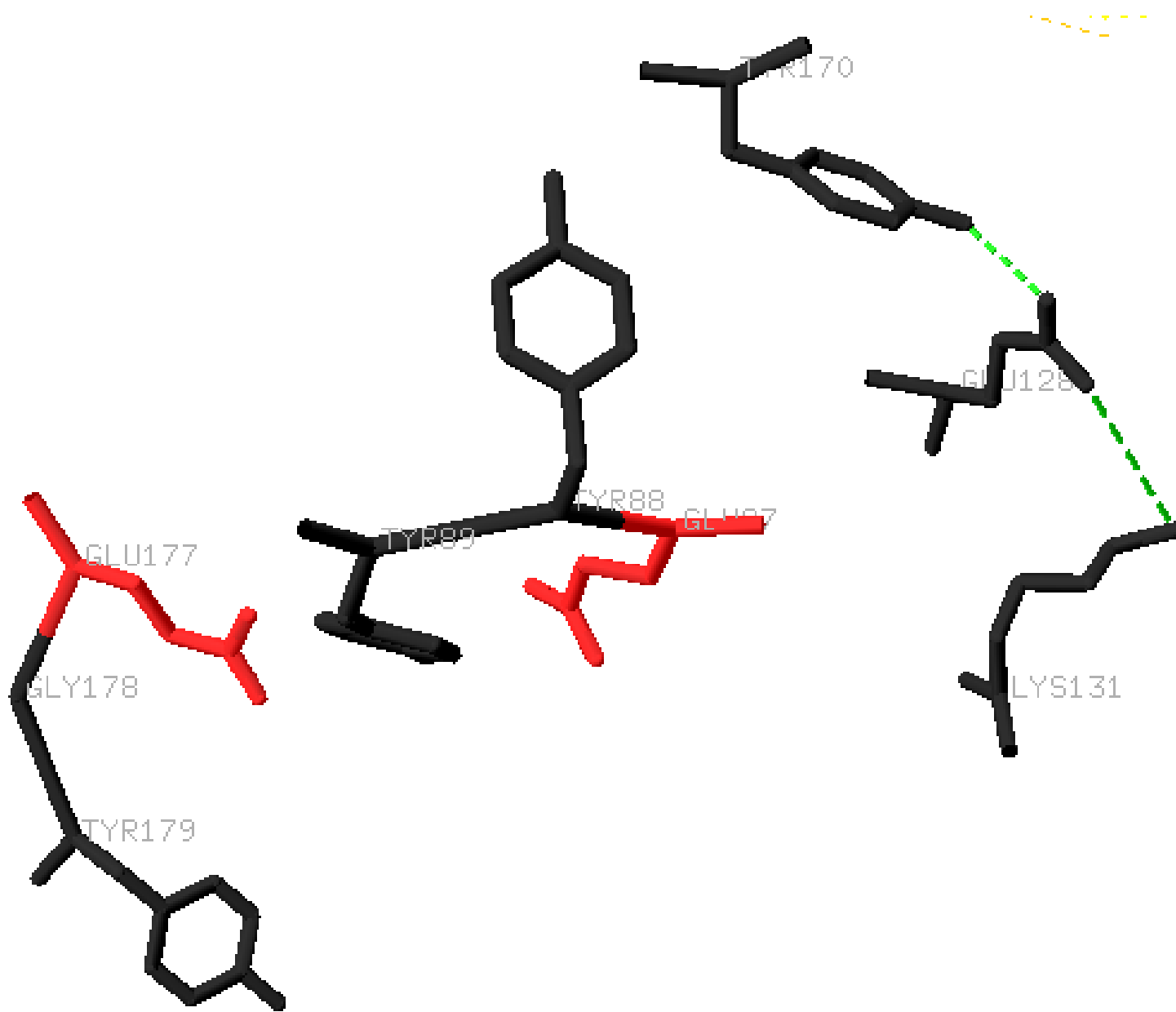
——— **A4** ———

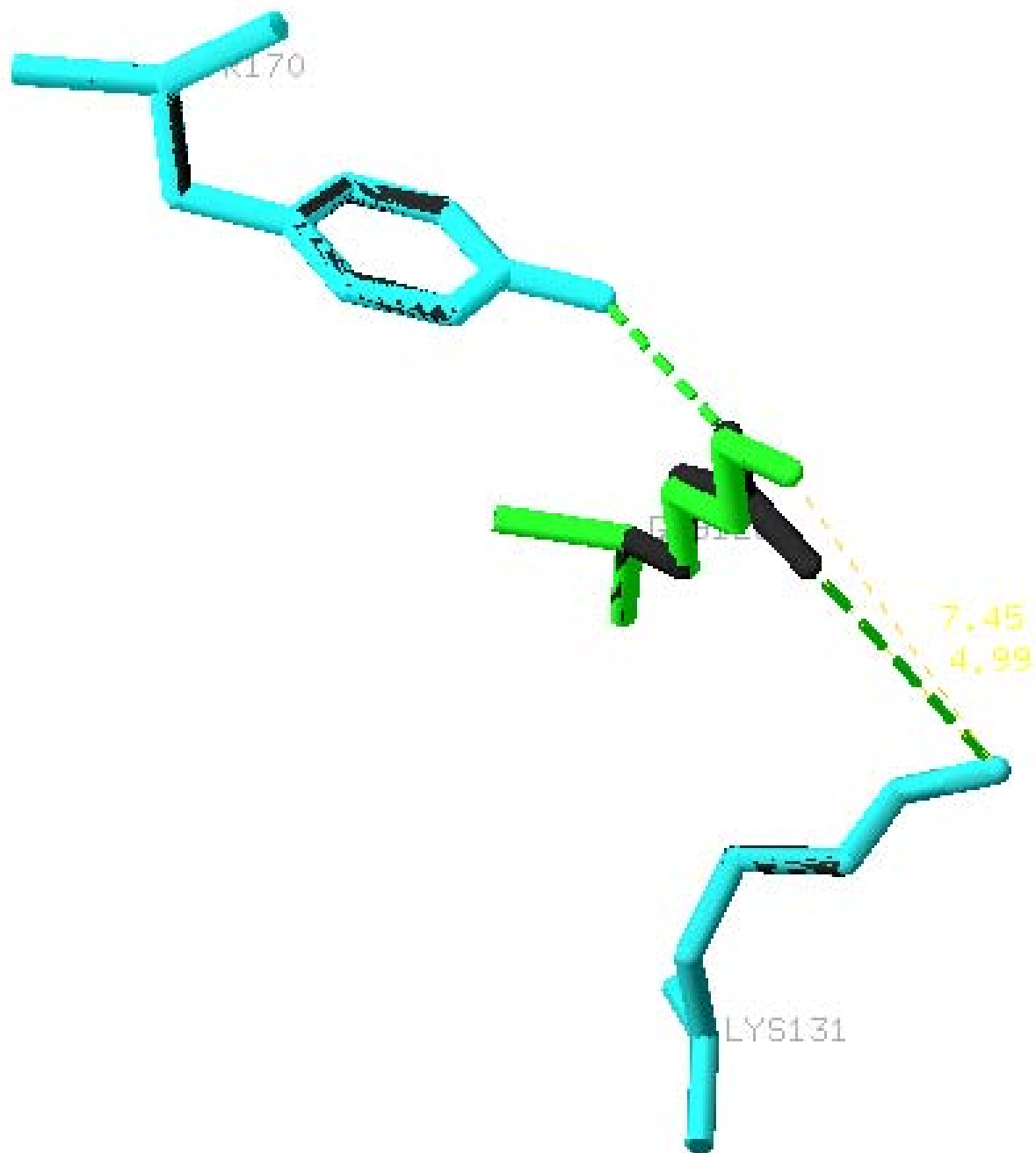
Xyn11是一种嗜碱性酶，其他8种酶最适pH是在中性范围。Xy11和xyn11相比结构上有很大的不同，但是在催化位点都有保守的芳香族氨基酸。Tyr185,tyr194 Trp20, Tyr87, Trp89, Tyr98,Tyr128, Trp149, Tyr185, and Tyr194 严格保守。

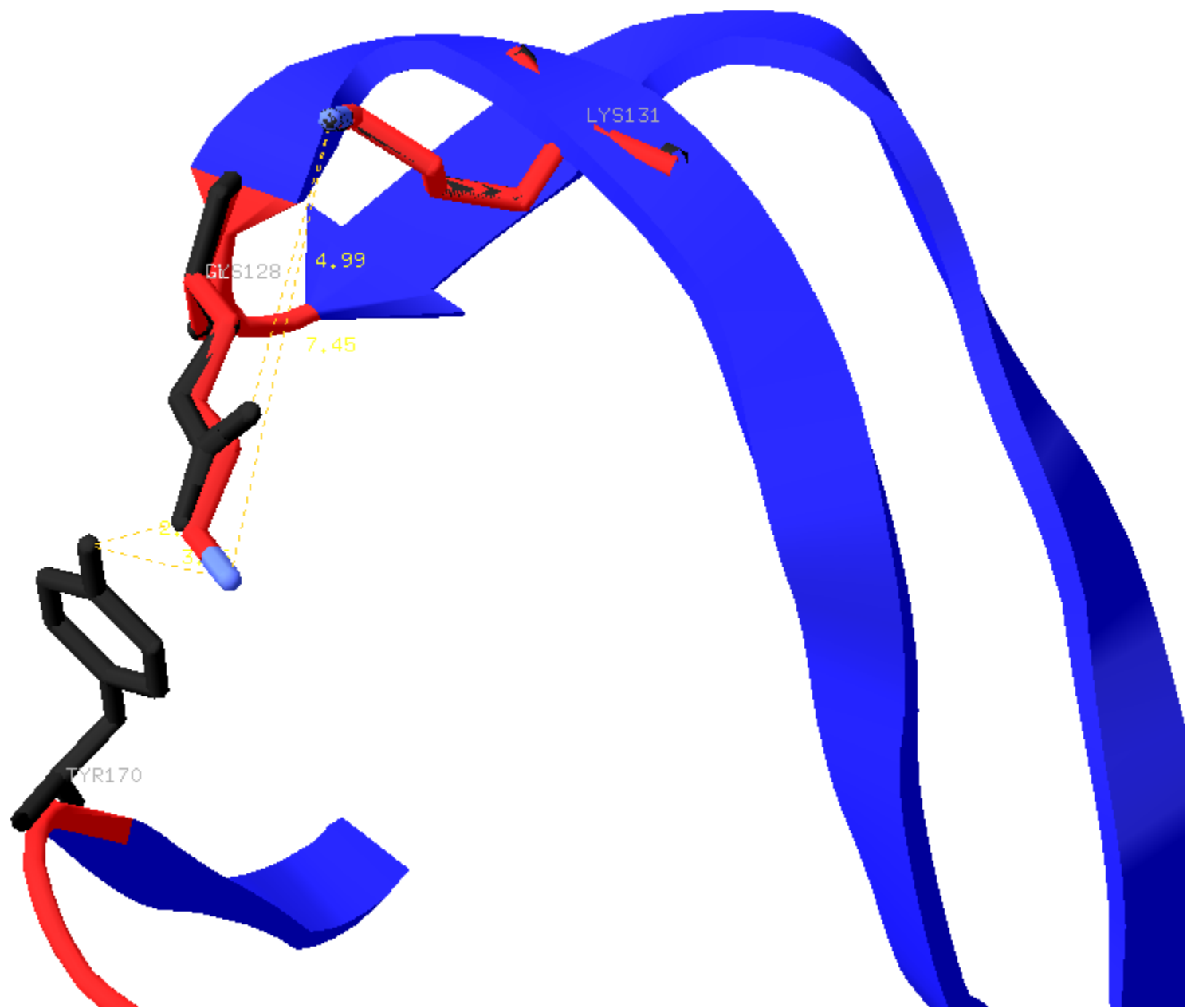
Xyn11的催化位点 含有很多带电残基，Asp16, Glu18, Glu186 对应于 Xyl1中Tyr16, Ser18, 和 Tyr186,而这些基团在XylJ中已经证明会影响其最适pH值，Xyn11 中的Arg50 在Xyl1被gly 取代，Asp92 只在嗜碱酶中存在的被Asn取代。

通过研究Xyn11 的催化位点发现Glu18, Arg50, Lys54, and Glu186 通过四条盐桥相连，并且位于底物的结合位点，Xyn11 共包含10对盐桥，而Xyl1中只有两对，通过分析发现盐桥在嗜碱酶中要多些。而且E139–K142的盐桥只在Xyl1中存在，在嗜碱酶中没有，所以文章做了突变分析。

选择突变的位点在催化的沟内， Y16D, S18E, V48L, G50R, N92D, A135Q, E139K, 和 Y186E ， 组合突变是 Y16D/S18E, S18E/Y186E, G50R/Y186E, N92D/E139K, Y16D/S18E/Y186E, and S18E/G50R/Y186E.







E139k突变可以提高耐受碱的能力，在**pH9**的情况下，天然的酶完全失活，而突变的仍有**80%**活性。

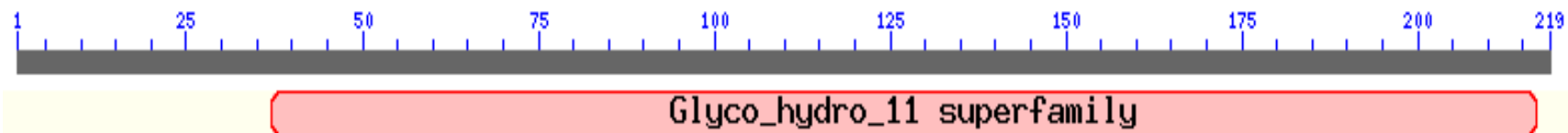
* 20 * 40 * 60 * 80 * 100
 NNGYFYSYVNDGHGGVITYTNGPGGQFSVNWS--NSGNFVGGKQWQPGT-----KNKVINFGSYN-PNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTY
 DGGYYSWWTGAGDATYQNNGGGSYILTWSG-NNGNLVGGKQWNPQA-----ASRSISYSGTYQ-PNGNSYLSVYGWTRSSLIEYYIVESYGSY
 HNGCFWSWSDGGARATYTNAGAGGSYSVSWG--SGGNLVGGKQWNPQT-----A-RTITYSGTYN-YNGNSYLAVYGWTRNPLVEYYVVENFGTY
 AGINYVQNYNGNLADFTYDES-AGTFSMYWEDGVSSDFVVLGWTGTS-----SNATSYSAEYSASGSSSYLAVYGWVNYPQAEYYIVEDYGDY
 ASINYDQNYQ-TGGQVSYS-NTGFSVWNW--TQDDFVVGWWTGTS-----SAPINFGGSFSVNSGTGLLSVYGWSTNPLVEYYIMEDNHNY
 VGGYDYEMNQNQGQASMNPGAGSFTCSWS--NIENFLARMCKNYDSQKKNYKAFGNIVLTYDVEYT-PRGNSYMCVYGWTRNPLMEYYIVEGWGDW
 HGGYDYELWKDYGNTIMELND-GGTFSCQWS--NIGNALFRKGRKFNSDK-TYQELGDIVVEYGCYDYN-PNGNSYLCVYGWTRNPLVEYYIVESWGSW
 HSGYDYELWKDYGNTSMTLNN-GGAFSAGWN--NIGNALFRKGRKFDSTR-THHQLGNISINYNASFN-PGGNSYLCVYGWTSPLAEYYIVDSWGTY
 NGGYDYELWKDYGNTSMTLKN-GGAFSCQWS--NIGNALFRKGRKFDNTQ-TYKQLGNISVNYDCNYQ-PYGNSYLCVYGWTSPLVEYYIVDSWGSW
 NNGYYSFWTDSQGTVSMNMGSGGQYSTSWR--NTGNFVAGKQWANGG-----RRTVQYSGSFN-PSGNAYLALYGWTSNPLVEYYIVDNWGTY
 -DGMYYSFWTGSGSVSMTLNGGGSYSTQWT--NCGNFVAGKQWSTGD-----GN--VRYNGYFN-PVGNYGCLYGWTSNPLVEYYIVDNWGSY
 ASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWS--NTGNFVVGKQWTTGTS-----PFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEYYVVDWGSW
 5 53 W 1 6 G 6 5 6YGW EYY66 5

* 120 * 140 * 160 * 180 * 200
 LGEVTSDGSVYDIYRTQRVNQPSSIIG-TATFYQYWSVRNRNHS-----SGSVNTANHFNAWAQQGLTLG-TMDYQIVAVEGYFSSGSASITV :
 KGSVTCNGATYDILSTWRYNAPSIDG-TQTFEQFWSVRNPKKAPGGSI---SGTVDVQCHFDAWKGLGMNLGSEHNYQIVATEGYQSSGTATITV :
 KGTVTSDGSSYKIAQSTRINQPSIDG-TRTEFQYWSVRQNKRS-----SGSVNMKTHFDAAWASKGMNLG-QHYQIVATEGYFSTGNAQITV :
 LGTVYSDGSTYQVCTDTRINEPSITG-TSTFTQYFSVRESTRTSG-----TVTVANHFNFWAQHGFNS-DFNYQVMAVEAWMSGAGSASVTI :
 KGTVTSDGATYTIWENTRVNEPSIQG-TATFNQYISVRNSPRTSG-----TVTQNHFNWASLGLHLG-QMNYQVVAVEGWGGSGSASQSV :
 KGTVSANGNTYDIRKTMRYNQPSSIDG-TATFQYWSVRQTSGSANNQTNYMKGTTIDVTKHFDAAWASAGLDMSGTLYEVSLNIEGYRSNGSANVKS :
 GTITQWMAGTYEYIYETTRVNQPSIDG-TATEFQYWSVRRTSKRTSG-----TISVTEHFKQWERMGMRMG-KMYEVALTVEGYQSSGYANVYK :
 GSFYADGG-TYDIYETTRVNQPSIIG-IATEFKQYWSVRQTKRTSG-----TVSVSAHFRKWESLGMPLG-KMYETAFTVEGYQSSGSANVMT :
 GTITVDGG-IYDIYETTRINQPSIQG-NTTEFKQYWSVRRTKRTSG-----TISVSKHFAAWESKGMPLG-KMHETAFNIEGYQSSGKADVNS :
 --TVTSDGGTYDIYKTTRVNKPSVEG-TRTEFQYWSVRQSKRT-G-----GTITTGNHFDAAWARGMPLGNFSYIMIMATEGYQSSGSSSINV :
 --TVSSDGGTYDIYQTTRYNAPSVEG-TKTEFQYWSVRQSKVTSGS-----GTITTGNHFDAAWARGMNMGQFRYYMIMATEGYQSSGSSNITV :

>Penicillium sp. 40 xylanase11

MVSFTKLFVAASAVLGAWSAPTPELAERQAITKSQTGMNNGFYYSFWTNGG
GQVSYTNGAAGQYSVNWNNAGDFTCGKGWSKGAARNIKFEANFKPSGNAY
LGVYGWTKGPLIECYILENYGSYNPGSGMQHKGTVYSDGSNYDIYQHTQVN
QPSISGTQTFNQYWSIRQSKRSSGTVTTGNHFNAWAKLGMKLG AHDYQVLLT
EGYHSSGTSTVTVSA

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.



```

A_SCHCO : -----GTDGGYYISWITDAGDATYQNNGGSSYTLTWSG--NNGNLVGGKWNPGA-----ASRSISYSGTYQ--PENGNSYLSVY
11_COCCA : -----GTHNGCFWISWISDGGARATYTNAGGSSYSVSWG--SGGNLVGGKWNPGT-----A-RTITYSGTYN--YNGNSYIAYV
13_ASPKA : -----RSAGINYVQNIINGNLADFTYDES--AGTFSMYWEDGVSSDFVVGLEWTTGS-----SNASISYSAEYSASGSSSYIAYV
11_TRIRE : -----RRASINYDQNIQ--TGGQVSYSPS--NTGFVSNWN--TQDDFVVGVEWTTGS-----SAPINFGGSSVNSGTGLISVY
A_RUMFL : -----GNVGGYDIEMINQNGQGQASMNPGAAGSFTCSWS--NIENFLARMCKNYDSQKKNYKAFGNIVLTYDVEYT--PRGNSYMOVY
A2_CLOS : -----GTHGGYDIELKDYGNTIMELND--GTFSCQWS--NIGNALFRKGRKFNSDK--TYQELGDIVVEYGCDYN--ENGNSYICVY
A_BACPU : -----GNHSGYDIELKDYGNTSMTLNN--GAFSAGWN--NIGNALFRKCKKFDSTR--THHQLGNISINYNASFN--PGNSYICVY
A_CLOSA : -----GVNGGYDIELKDYGNTSMTLKN--GAFSAGWN--NIGNALFRKCKKFDNTQ--TYKQLGNISVNYDCNYQ--PYGNSYICVY
B_STRLI : -----GTNNGYYISFWDTSQGTVMNMGGSGQYSTSWR--NTGNFVAGKRWANGG-----RRTVQYSGSFN--PSGNAYIALY
C_STRLI : -----GT--DGMYYISFWDGGGVSMTLNGGSSYSTQWT--NCGNFVAGKRWSTGD-----GN--VRYNGYEN--EVGNGMGLY
A_BACCI : -----SAASTDYIQNIWDGGGIVNAVNGSGGNSVNS--NTGNFVVGKRWTTGS-----PFRTINYNAGVWAPENGNYITLY
icilliu : MVSFTKLFVAASAVLGAWSAPTPELAERQAITKSQTGMNNGFYYSFWTNGGGQVSYTNGAAGQYSVNWNNAGDFTCGKGWSKGAARNIKFEANFKPSGNAYIGVY
                                     g      5      g      g

```

```

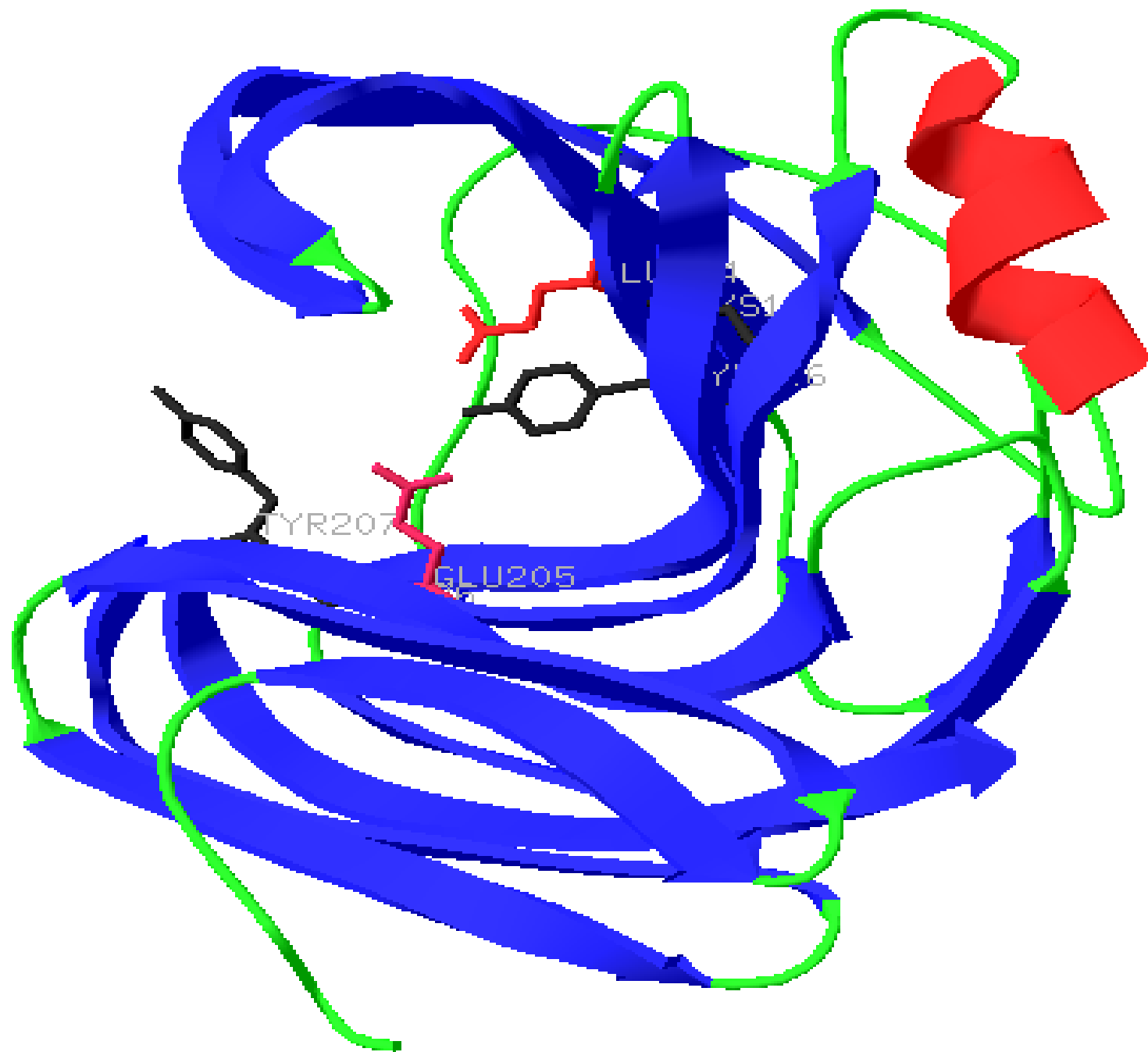
12_TRIRE : GWSRNPLIEYYIVENFGTYN*STG-ATKLGEVTSDESVYDIYRTQRVNQPSIIG-120 140 160 180 200 *
A_SCHCO : GWIRSSLIEYYIVESYGSYD*PSSA-ASHKGSVTCNGATYDILSTWRYNAPSIDG-TQTFEQFWSVRNPKKAPGGSI---SGTVDVQCHFD*DAWKGLGMNLGSEHNY
11_COCCA : GWIRNPLVEYYVVENFGTYD*PSSQ--SQNKGTVTSDESSYKIAQSTRINQPSIDG-TRTEQQYWSVRQNKRS-----SGSVNMKTHEFD*AWASKGMNLG--QHYY
13_ASPKA : GWVNYEQAEEYYIVEDYGDYN*PCSS-ATSLGTVYSDESTYQVCTDTRTNEPSITG-TSTFTQYFSVRESTRISG-----TVTVANHFEN*FWAQHGF*GNS-DFNY
11_TRIRE : GWSTNPLVEYYIMEDNHNYP--AQ-GTVKGTVTSDEATYTIWENTRVNEPSIQG-TATENQYIISVRNSPRI*SG-----TVT*VQNHFEN*AWASLGLHLG--QMNY
A_RUMFL : GWIRNPLMEYYIVEGWDWR*PPGNDGEVKGTVSANENTYDIRKIMRYNQPSLDG-TATEPQYWSVRQTSGSANNQTN*YMKGTIDVTKHFD*AWASAAGLDM*SGTLYE
A2_CLOS : GWIRNPLVEYYIVESWGSWR*PPGA-TPKGTITQWMAGTYEIEYETTRVNQPSIDG-TATEQQYWSVR*TSKRISG-----TISVTEHFKQ*WERMGM*RMG--KMYE
A_BACPU : GWIQSP*IAEYYIVDSWGT*YRPTG--AYKGSFYADG--TYDIYETTRVNQPSIIG-120 140 160 180 200 *
A_CLOSA : GWISSPLVEYYIVDSWGSWR*PPGG-TSKGTITVDG--IYDIYETTRINQPSIQG-NTTEFKQYWSVR*RTKRISG-----TISVSKHFA*AWESKGM*PLG--KMHE
B_STRLI : GWISNPLVEYYIVDNWGT*YRPTGE-YKG--TVTSDGTYDIYK*ITRVNKPSVEG-TRTEFDQYWSVR*QSKRT-G-----GTIT*TTGNHFD*AWARAGM*PLGNFSY
C_STRLI : GWISNPLVEYYIVDNWGS*YRPTGT-YKG--TVSSDGYTYDIYQITRYNAPSVEG-120 140 160 180 200 *
A_BACCI : GWIRSP*LIEYYVVD*SWGT*YRPTGT-YKG--TVKSDGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTEFTQYWSVR*QSKRPTGS-----NATIT*FTNHN*VNAWKSHGMNLG*SNWAY
icilliu : GWIKG*PLIECYIILENYGSYN*PGSGMQHKGTVYSDGSNYDIYQHTIQVNQPSISGTOIFNQYWSIR*QSKR*SSGTVTTGNHFN*AWAKLGM*KLGAH*DYQVIL-----
GW pl EyY66 g 5 p g y r n p s g t t f q s v r hf aw g g

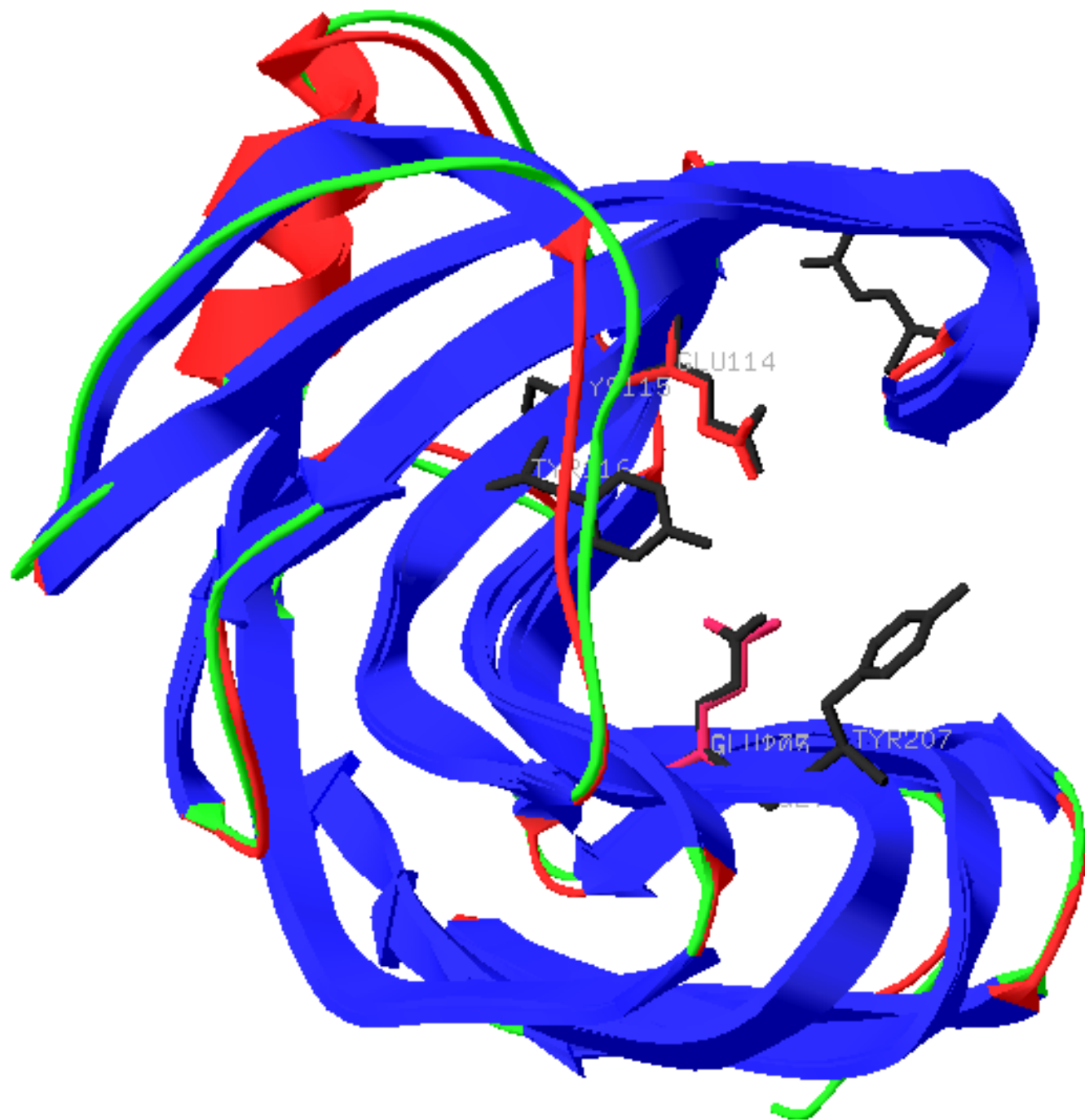
```

```

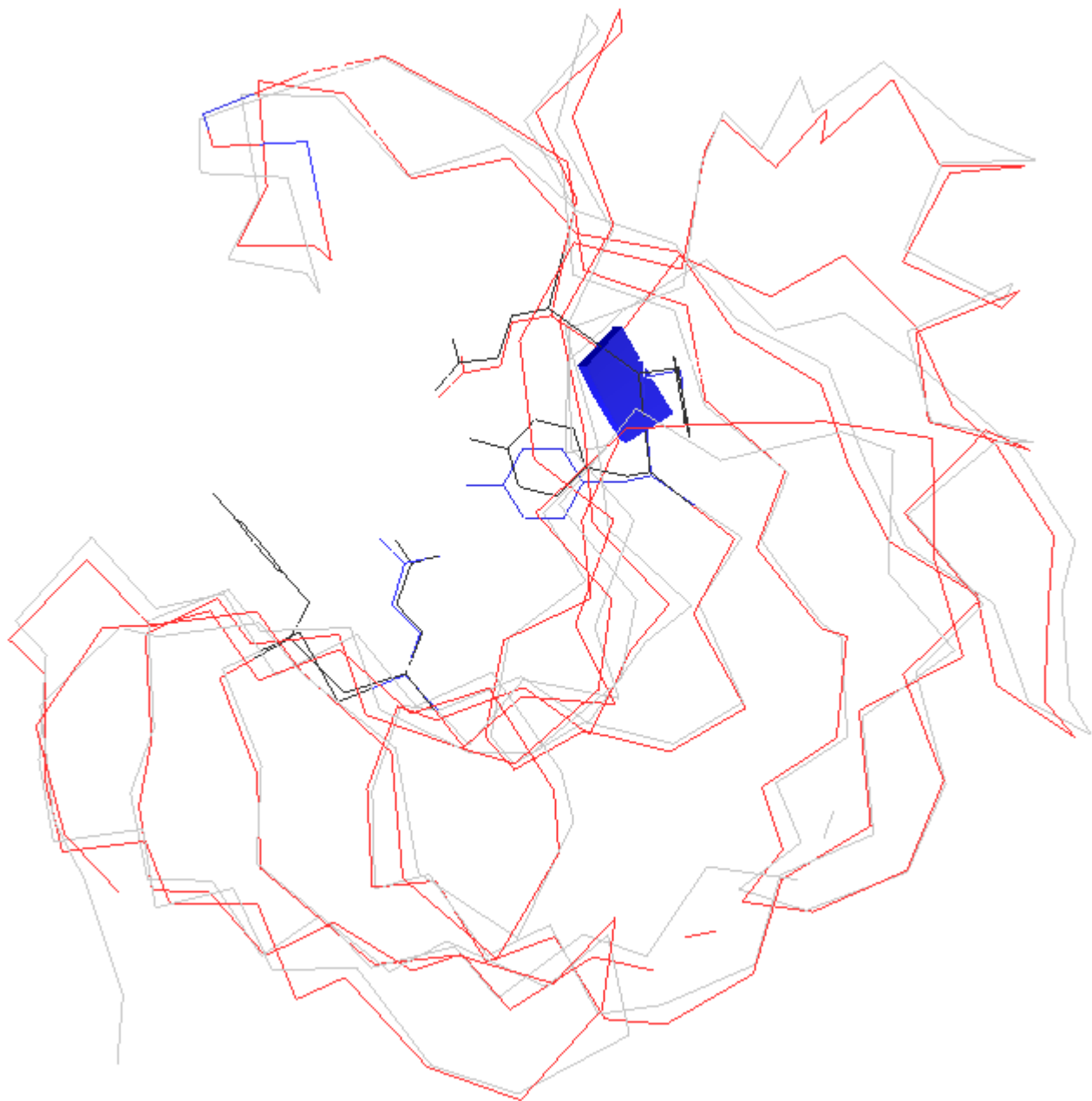
12_TRIRE : QIVAVEGYFSSGSASITV----- : 182
A_SCHCO : QIVATEGYQSSGIATITV----- : 189
11_COCCA : QIVATEGYFSTIGNAQITV----- : 181
13_ASPKA : QVMAVEAWSGAGSASVTI----- : 183
11_TRIRE : QVVAVEGWGGSGSASQSV----- : 178
A_RUMFL : VSLNIEGYRSNGSANVKS----- : 200
A2_CLOS : VAITVEGYQSSGYANVYK----- : 188
A_BACPU : TAFTVEGYQSSGSANVMT----- : 186
A_CLOSA : TAFNIEGYQSSGKADVNS----- : 187

```









谢谢
请大家指正！