

DOI: 10.13376/j.cbls/2019110

文章编号: 1004-0374(2019)09-0894-08

## 海洋来源硫酸软骨素降解酶的研究进展

王文爽, 许莹莹, 石立冉, 李福川\*  
(山东大学国家糖工程技术研究中心, 青岛 266237)

**摘要:** 硫酸软骨素作为糖胺聚糖的一类, 广泛分布于细胞膜表面及细胞基质中, 参与了一系列生理和病理过程。硫酸软骨素的功能多样性与其结构多样性密切相关, 而硫酸软骨素降解酶在硫酸软骨素 / 硫酸皮肤素构效关系研究中发挥了重要作用。该文结合笔者工作, 全面阐述了目前商品化硫酸软骨素降解酶的种类、作用机制, 以及近期在海洋细菌中发现和鉴定的硫酸软骨素降解酶。最后, 对海洋来源硫酸软骨素降解酶进行了展望。

**关键词:** 硫酸软骨素; 海洋细菌; 水解酶; 裂解酶

**中图分类号:** Q55      **文献标志码:** A

## Research progress in chondroitinase from marine bacteria

WANG Wen-Shuang, XU Ying-Ying, SHI Li-Ran, LI Fu-Chuan\*  
(National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Qingdao 266237, China)

**Abstract:** As a class of glycosaminoglycans, chondroitin sulfate is widely distributed on the cell membrane surface and in the cell matrix, and participates in a series of physiological and pathological processes. The functional diversity of chondroitin sulfate is closely related to its structural diversity, and chondroitin sulfate-degrading enzymes play a huge role in the study of chondroitin sulfate/dermatan sulfate structure-activity relationship. This paper comprehensively illuminates the types and mechanisms of commercial chondroitin sulfate-degrading enzymes and the chondroitin sulfate-degrading enzymes recently discovered and identified in the marine bacteria. Finally, the marine source enzymes are prospected.

**Key words:** chondroitin sulfate; marine bacteria; hydrolase; lyase

糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 又称为黏多糖, 是由重复二糖单位组成的酸性直链多糖, 主要包括透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、肝素 / 硫酸乙酰肝素 (heparin/heparan sulfate, Hep/HS)、硫酸软骨素 / 硫酸皮肤素 (chondroitin sulfate/dermatan sulfate, CS/DS) 和硫酸角质素 (keratan sulfate, KS)(图 1)。GAG 广泛存在于动物细胞表面及细胞基质中<sup>[1-4]</sup>, 除 HA 外, 在动物体内常常以蛋白聚糖的形式存在, 并通过与一系列特殊蛋白结合参与神经系统发育<sup>[5-7]</sup>、组织形态发生<sup>[8]</sup>、细胞分裂<sup>[9-10]</sup>、炎症<sup>[11]</sup>、肿瘤发生发展<sup>[12-14]</sup> 和病毒侵染<sup>[15-17]</sup> 等多种生理和病理过程。作为 GAG 的主要种类, CS 是由 D- 葡萄糖醛酸 (GlcA) 和 N- 乙酰氨基半乳糖 (GalNAc) 经  $\beta$ -1,3-糖苷键组成的二糖单位经  $\beta$ -1,4-糖苷键重复组成的

直链多糖。在生物合成过程中, 在各种修饰酶的作用下 CS 链变得异常复杂, 主要包括: GlcA 在 C5 差向异构酶的作用下, 转变为 L- 艾杜糖醛酸 (IdoA), 从而形成 DS 区<sup>[18-19]</sup>。因此, CS 和 DS 常常同时存在于一条糖链中, 形成 CS/DS 杂合链。此外, GlcA/IdoA 的 C2 或 C4 位及 GalNAc 的 C4 和 (或) C6 位的硫酸基团在硫酸基转移酶的作用下进行进一步的硫酸化修饰<sup>[10]</sup>, 从而使得 CS/DS 糖链变得更为复杂。依据硫酸化模式不同, CS 二糖单位又

收稿日期: 2019-03-28; 修回日期: 2019-05-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31570071, 31800665);

山东省自然科学基金项目(ZR2018BC013)

\*通信作者: E-mail: fuchuanli@sdu.edu.cn

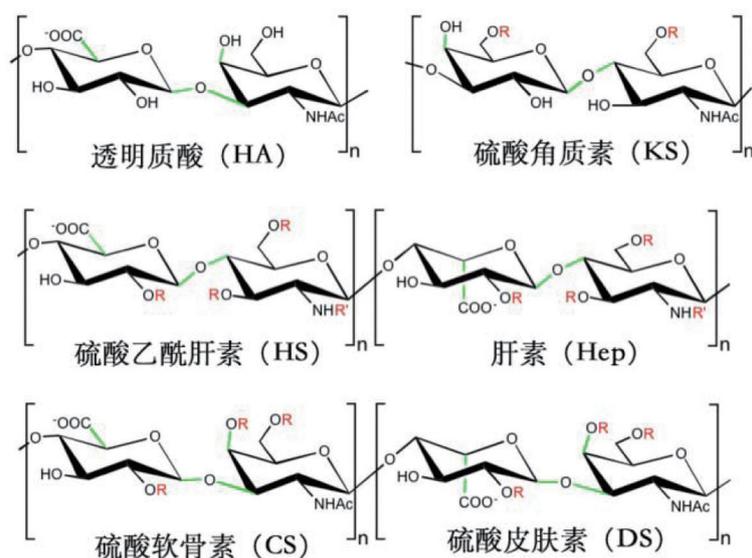


图1 不同种类糖胺聚糖多糖结构图

常分 O 单元 (GlcA $\beta$ 1-3GalNAc)、A 单元 (GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4S))、B 单元 (GlcA(2S) $\beta$ 1-3GalNAc(4S))、C 单元 (GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(6S))、D 单元 (GlcA(2S) $\beta$ 1-3GalNAc(6S))、E 单元 (GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4,6S))、K 单元 (GlcA(3S) $\beta$ 1-3GalNAc(4S))、L 单元 (GlcA(3S) $\beta$ 1-3GalNAc(6S))、M 单元 (GlcA(3S) $\beta$ 1-3GalNAc(4,6S))、T 单元 (GlcA(2S) $\beta$ 1-3GalNAc(4,6S)) 等<sup>[20-22]</sup>。自然界中大多数的 CS 主要是由 A 单元和 C 单元两种二糖单位组成的, 通常将以 A 单元为主组分的 CS 称为 CS-A, 如来自猪、牛、羊等软骨的 CS; 以 C 单元为主组分的 CS 称为 CS-C, 如来自于鲨鱼软骨的 CS。此外, 对于一些富含稀有二糖单元的 CS, 分别依据所含的稀有二糖进行命名, 如来自鲨鱼翅富含 D 单元的 CS-D 和来自鱿鱼软骨的富含 E 单元的 CS-E 等。

CS/DS 的结构多样性是导致其功能多样性的主要原因, 高度复杂的糖链结构严重阻碍了 CS/DS 结构和功能的研究。传统分析方法, 如高分辨质谱、磁共振等波谱技术在结构较为简单的 CS/DS 寡糖结构研究中具有重要应用, 但在分析复杂 CS/DS 多糖和高相对分子质量寡糖时遇到了巨大的挑战。目前, 对于复杂 CS/DS 糖链结构和功能的分析主要通过酶法降解和波谱分析相结合的方法, 其中, CS/DS 特异性降解酶发挥了至关重要的作用<sup>[23-24]</sup>。此外, CS/DS 降解酶在制备结构均一、活性确定、易于吸收利用的高活性 CS/DS 寡糖, 开发新型 CS/DS 寡糖类药物及功能食品中也有重要应用。

作为生命的诞生和孕育之地, 海洋覆盖地球表面约 70% 的面积, 蕴含着丰富的海洋生物资源, 同时, 它更在人类文明演变中扮演了极为重要的角色。海洋动物是 CS/DS 的重要来源, 五种商品化应用的 CS/DS 中, 有 3 种来自于海洋动物, 它们分别是来自于鲨鱼软骨的 CS-C、来自于鲨鱼翅的 CS-D 和来自于鱿鱼软骨的 CS-E。此外, 近年来, 本实验室及其他研究小组还从各种海洋动物组织中分离和鉴定了一系列含有特殊二糖单元, 具有抗肿瘤、抗凝血、抗病毒等多种生物活性的新型 CS/DS, 包括在鲨鱼、帝王蟹、海参、乌贼中发现的含有 GlcA 的 C3 位硫酸化二糖单位 K 单元和 L 单元的 CS, 以及乌贼软骨中含有的 GlcA 的 C3 位硫酸化和 GalNAc 的 C4 和 C6 位同时硫酸化的三硫酸化二糖单位 T 单元和 M 单元的 CS<sup>[25-26]</sup>。结构丰富多样的 CS/DS 在海洋中大量存在, 预示着可以降解和利用这些 CS/DS 的微生物在海洋中也必然存在, 从而参与海洋乃至地球碳循环和硫循环。因海洋具有特殊的环境, 参与海洋生物代谢过程的各种酶类在性质、功能上与陆地生物有很大不同。开发海洋资源并从海洋生物中筛选出具有特殊活性和应用价值的酶类, 成为海洋生物资源开发的重要方面。海洋生物特别是海洋微生物是获取新型酶的重要资源, 并且这些海洋细菌新型酶逐渐应用于各行各业中。本文将对硫酸软骨素降解酶的主要类型和近期海洋细菌来源硫酸软骨素降解酶的研究状况及发展趋势进行综述, 以期对相关研究提供参考和启示。

## 1 硫酸软骨素降解酶分类

依据酶的降解机制，硫酸软骨素降解酶可分为两类：真核生物来源的水解酶和原核生物来源的裂解酶(图2)。依据硫酸软骨素降解酶与其他酶的氨基酸序列相似度分析，水解酶属于多糖水解酶家族(glycoside hydrolase, GH)<sup>[27]</sup>，通过水解机制切割糖胺聚糖的糖苷键，并引入一分子水<sup>[28]</sup>；而裂解酶属于多糖裂解酶家族(polysaccharide lyase, PL)，通过裂解机制降解已糖胺与己糖醛酸之间的糖苷键，并在非还原端糖醛酸的C4和C5间脱去一分子水形成不饱和双键，酶解产物在232 nm处有最大吸收，可用于裂解酶裂解活性及寡糖产物的检测<sup>[29]</sup>。

### 1.1 水解酶

由于历史原因，当前并没有酶被命名为硫酸软骨素水解酶，真核生物来源的具有水解硫酸软骨素能力的酶通常被归类于透明质酸水解酶家族。Stern和Jedrzejak<sup>[30]</sup>研究发现，绝大多数透明质酸水解酶除了可以水解透明质酸，还可以以较低的速率水解软骨素和低硫酸化硫酸软骨素。脊椎动物来源的透明质酸水解酶除了具有水解HA、CS的活性，有些还具有糖基转移酶活性<sup>[31]</sup>。在人类基因组中发现了6个疑似HA水解酶基因<sup>[30,32]</sup>，包括HYAL-1、-2、-3、-4和PH20以及一个可以转录成mRNA却不能翻译成蛋白的疑似基因HYAL-Phyal 1(表1)<sup>[30]</sup>。

这6个基因中，HYAL-1、HYAL-2和PH20研究较为透彻。其中HYAL-1是一种存在于血清中的酶，但是其在血清中的含量很低(60 ng/mL)；HYAL-1可以随机地将高相对分子质量HA降解成低分子片段，并最终降解成四糖<sup>[30]</sup>。而HYAL-2只能将高相对分子质量HA降解成约20 kDa大小的寡糖片段。HYAL-2和PH20是糖基磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)锚定蛋白，与卵子受精有关<sup>[33-35]</sup>。与其他HA水解酶相似，来源于人的HA水解酶也具有CS水解酶活性，甚至有些酶的CS降解活性大于HA降解活性。其中PH20的CS水解活性小于HA水解活性，而HYAL-1的CS水解活性明显大于HA水解酶活性<sup>[36]</sup>。值得注意的是，HYAL-4是一个错误的命名，它能以水解的形式降解CS却不能降解HA，应该属于专一性CS水解酶<sup>[32,37-38]</sup>。关于水解酶催化机制的研究表明，人基因组来源的水解酶的催化位点为Glu，底物结合位点为Asp、Tyr和Trp<sup>[30]</sup>。值得注意的是，Cys263参与了HYAL-4的底物与酶的结合，这也是为什么HYAL-4可以专一地结合软骨素并显示硫酸软骨素降解酶活性(表2)<sup>[30]</sup>。

### 1.2 裂解酶

根据底物降解模式的不同，硫酸软骨素裂解酶又分为内切酶和外切酶两种。内切型CS/DS裂解酶

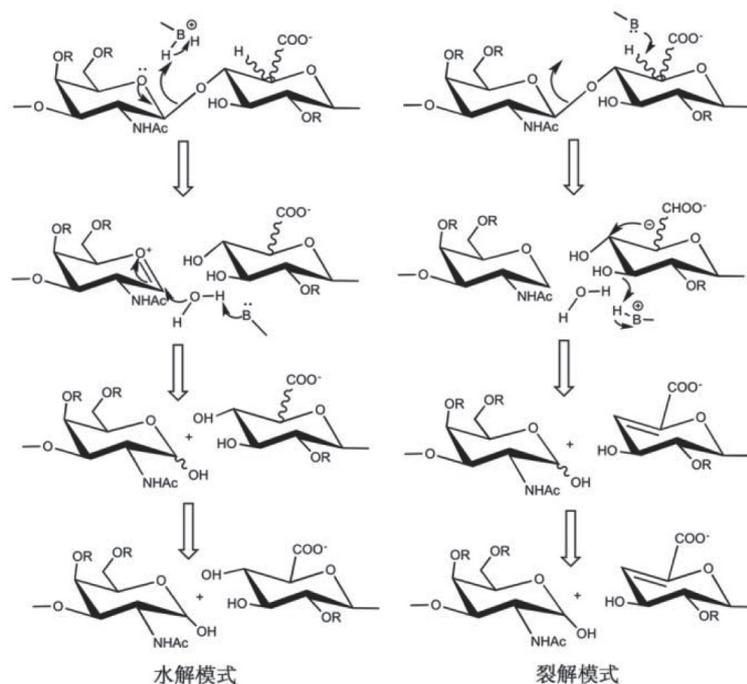


图2 糖胺聚糖降解酶的底物降解模式

表1 硫酸软骨素降解酶的底物及反应特性

名称	底物	来源	降解类型	作用机制	参考文献
HYAL-1	HA和CS	Human自身编码基因	水解	内切型	[39]
HYAL-4	CS	Human自身编码基因	水解	内切型	[40]
PH20	HA和CS	Human自身编码基因	水解	内切型	[41]
CSase ABC I	HA、CS和DS	<i>Proteus vulgaris</i>	裂解	内切型	[42]
CSase ABC II	HA、CS和DS	<i>Proteus vulgaris</i>	裂解	外切型(非还原端)	[42]
CSase AC I	HA和CS	<i>Flavobacterium heparinum</i>	裂解	内切型	[43]
CSase AC II	HA和CS	<i>Arthrobacter aureescens</i>	裂解	外切型(还原端)	[44-45]
CSase B	DS	<i>Flavobacterium heparinum</i>	裂解	内切型	[43]
HCLase	HA和CS	<i>Vribo</i> sp. FC509	裂解	内切型	[46]
HCLase Er	HA和CS	<i>Vribo</i> sp. FC509	裂解	内切型	[47]
HCDLase	HA、CS和DS	<i>Vribo</i> sp. FC509	裂解	外切型(还原端)	[48]
CSase ABCAc	HA、CS和DS	<i>Acinetobacter</i> sp. C26	裂解	内切型	[49]
ChoA1	HA和CS	<i>Arthrobacter</i> sp. MAT3885	裂解	内切型	[50]

表2 与水解酶催化相关的关键氨基酸位点<sup>[30]</sup>

	Hyal-1	Hyal-2	Hyal-3	Hyal-4	PH-20
催化位点	Glu131	135	129	147	148
底物识别位点	Asp129	133	127	145	146
	Tyr202	206	202	218	219
	Tyr247	253	246	Cys263	264
	Trp321	327	319	339	339

通过随机切割 CS/DS 糖链内部的  $\beta$ -1,4 糖苷键, 先产生大相对分子质量寡糖, 再产生小相对分子质量寡糖, 最后产生二糖; 而外切型 CS/DS 裂解酶在反应过程中并不产生大分子寡糖中间产物, 而是从糖链的末端依次切割并释放不饱和二糖。实际上, 和其他多糖降解酶相似, 内切型和外切型 CS/DS 裂解酶常常同时存在于同一细菌的基因组中, 并在 CS/DS 降解过程中协同作用, 这种现象是进化的结果, 以利于更加高效地降解和利用糖胺聚糖糖链。

依据作用底物的不同, 硫酸软骨素裂解酶又分为硫酸软骨素裂解酶 (chondroitinase, CSase) ABC、AC 和 B 等类型 (表 1)。

### 1.2.1 硫酸软骨素裂解酶 ABC (chondroitinase ABC, CSase ABC)

CSase ABC 是一种广谱性 CS/DS 降解酶, 可以彻底降解各种硫酸化模式的 CS/DS 及 HA, 生成相应的不饱和二糖终产物 (图 3)。商品化 CSase ABC 主要从发酵的 *Proteus vulgaris* 菌体纯化制得, 在早期研究中被认为是一个单一酶蛋白, 但随着分离纯化技术的进步, 该酶被证明含有 CSase I 和 II 两个酶, 其中 CSase ABC I 具有内切酶活性, 可以

将 CS/DS 降解为不饱和四糖和二糖, 而 CSase ABC II 是一个外切酶, 可以从 CS/DS 糖链的非还原端依次降解释放出饱和二糖<sup>[51]</sup>。值得注意的是, CSase ABC I 的活性虽然很高, 但并不能将 CS/DS 及 HA 彻底降解为二糖终产物, 必须与 CSase ABC II 协同作用才可以将糖链完全降解。此外, CSase ABC 类广谱性降解酶还在 *Bacteroides thetaiotaomicron* 等细菌中被发现和鉴定<sup>[51]</sup>。CSase ABC 酶主要包含两端的  $\beta$  折叠结构域以及中间的  $\alpha$  螺旋结构域, 而其中  $\alpha$  螺旋结构域是主要的催化区域。基于钙离子结合机制, 通过对 CSase ABC I 定点突变及结构模拟分析发现, 钙离子与 Asp442、Asp444 和 Tyr392 位点结合及底物与酶结合后, His501、Tyr508、Arg560 和 Glu653 参与底物裂解作用<sup>[52-53]</sup>。同样, 通过定点突变实验推测 His454、Tyr461、Arg514 和 Glu628 为 CSase ABC II 的关键氨基酸位点<sup>[54]</sup>。

### 1.2.2 硫酸软骨素裂解酶 AC (chondroitinase AC, CSase AC)

虽然 CSase AC 与 CSase ABC 同属于 PL8 家族, 但是, CSase AC 对于 GlcA 的差相异构现象十分敏感, 只能降解 HA、CS 以及 CS-DS 杂合链中的 CS 片段<sup>[23,55]</sup>。目前, 有两种 CSase AC 酶被商品化应用, 分别是来自于 *Flavobacterium heparinum* 具有内切酶活性的 CSase AC I 和来自于 *Arthrobacter aureescens* 具有外切酶活性的 CSase AC II, 其中后者的糖链切割方向还有待进一步确定<sup>[44,56]</sup>。在 CS/DS 结构分析中, CSase AC I 常被用于糖胺聚糖混合物或 CS-DS 杂合链中 CS 选择性降解和定量分析, 以及 CS/DS 杂合链中 DS 片段的选择性制备<sup>[24,57]</sup> (图 3); 而由

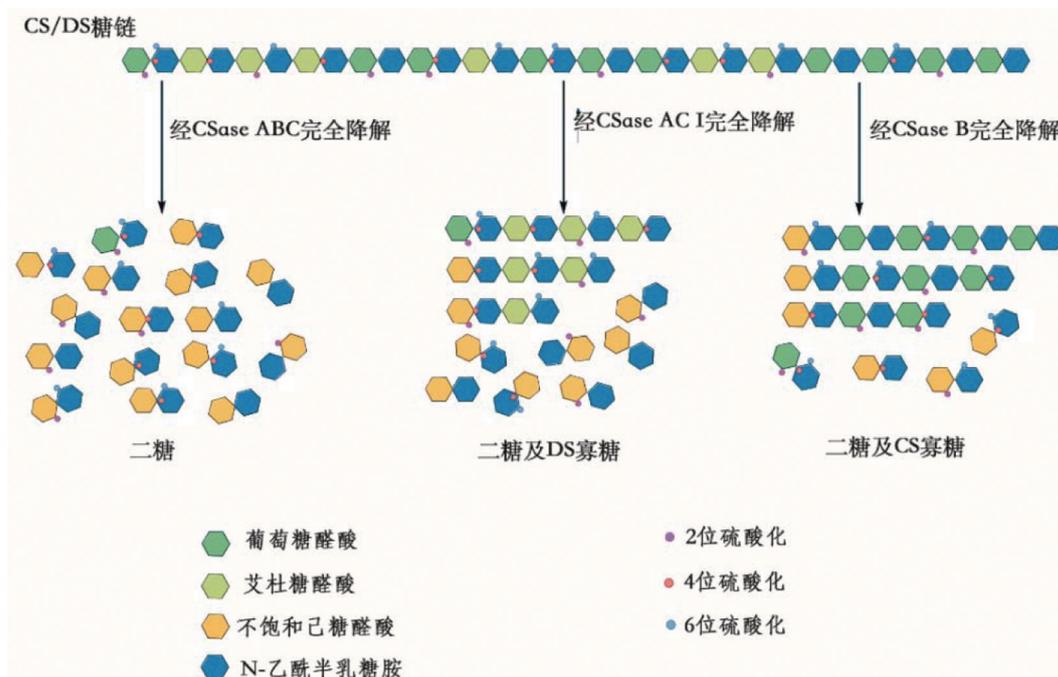


图3 商品化降解酶的底物降解特性

于 CSase AC II 具有的特殊外切酶活性, 使其在 CS 寡糖测序中具有重要应用<sup>[24]</sup>。CSase AC 酶主要包含 N 端的  $\alpha$  螺旋结构域和 C 端的  $\beta$  折叠结构域。通过对 CSase AC I 和 DS/HA 寡糖的酶底物复合晶体进行研究并结合点突变分析发现, His225、Tyr234、Arg288 和 Glu371 参与了酶的催化, 而 Arg292 虽然没有直接参与催化过程但参与了 GalNAc 和硫酸盐基的识别过程<sup>[58-59]</sup>。

### 1.2.3 硫酸软骨素裂解酶B (chondroitinase B, CSase B)

CSase B 并不能降解 CS, 而只能降解 DS 以及 CS/DS 杂合链中的 DS 片段, 这与 CS-B 不是 CS 而是 DS 相似<sup>[60]</sup>。目前商品化的 CSase B 只有一种, 即来源于 *Flavobacterium heparinum* 具有内切活性的 CSase B。与 CSase ABC 和 CSase AC 不同, CSase B 与大部分褐藻胶裂解酶一样属于 PL6 家族。定点突变技术分析表明, Lys250、Arg271、His272 和 Glu333 参与了酶的催化<sup>[61]</sup>。CSase B 作为 DS 专一性降解酶, 在 DS 的分析检测和构效关系研究中被广泛应用<sup>[24,55,62]</sup>(图 3)。

## 2 海洋来源的新型硫酸软骨素降解酶

### 2.1 来源于 *Vibrio* sp. FC509 的系列硫酸软骨素降解酶

上述商品化硫酸软骨素降解酶全部来源于陆地生物, 并且数量和特异性远远达不到结构异常复杂

的硫酸软骨素的研究要求。虽然在海洋中存在有结构多样的 CS, 但是之前并没有相关酶类的报道。直到 2014 年, 本实验室在国际上首次展开了海洋细菌来源的糖胺聚糖降解酶的筛选与鉴定, 并从新分离得到的海洋细菌 *Vibrio* sp. FC509 中发现和鉴定了一系列新型的硫酸软骨素降解酶, 从而揭开了海洋来源硫酸软骨素降解酶研究的序幕。

利用鲨鱼软骨来源的 CS-C 为唯一碳源, 本实验室从来自于青岛沿海的海泥中筛选得到了一株高效降解多种多糖的降解菌。依据 16S rRNA 序列比对, 该多糖降解菌属于弧菌属, 被命名为 *Vibrio* sp. FC509。对该多糖降解菌进行基因组测序, 得到 10 几个与 GAG 多糖降解相关的基因。以下是其中 3 个已鉴定的代表性新型硫酸软骨素降解酶(表 1)。

HCLase 是第一个从海洋细菌中鉴定的硫酸软骨素降解酶, 可以特异性降解各种亚型的 CS 及 HA。氨基酸序列分析表明, HCLase 与其他已鉴定的糖胺聚糖降解酶相似度很低, 与其序列最相近的是一种透明质酸酶, 但相似度也只有 34%。基本酶学特性分析表明: HCLase 具有广泛的温度和 pH 稳定性, 且表现出嗜盐特性, 在 NaCl 浓度接近海水浓度 (0.5 mol/L) 时显示最高活性, 甚至在 1.0 mol/L 时仍有较高活性<sup>[58]</sup>, 这与其他许多来自海洋的酶类具有相似性。该酶降解 CS 及 HA 的酶活是相应商品化酶的数十至上百倍, 在 CS 及 HA 寡糖的规模

化生产中具有重要的应用价值;同时,在促进大分子药物的透皮吸收和组织扩散中也具有良好的应用前景。此外,值得注意的是,尽管 HCLase 能降解各种类型的 CS,产生的主要产物为不饱和二糖,但是,在降解 CS-C 和 CS-D 时发现了一个抗性四糖,酶解测序表明该抗性四糖具有如下结构:  $\Delta\text{HexUA1-3GalNAc(6S)1-4GlcA(2S)1-3GalNAc(6S)}$ 。从其结构看,抗性四糖还原端二糖(D单元)葡萄糖醛酸 2 位的硫酸化抑制了 HCLase 对  $\beta$ 1-4 糖苷键的切割。催化机制初步研究表明, HCLase 对 CS 和 HA 糖链的降解属于酸碱催化机制。

HCDLase 是第一个海洋细菌来源的 CS/DS/HA 外切酶,相对于硫酸化程度较低的 CS/DS/HA, HCDLase 更趋向于降解高硫酸化的 CS, HCDLase 在降解 CS-E 时显示出了最高的活性。与其他外切型糖胺聚糖降解酶相似, HCDLase 的活性容易受到温度、pH 等的影响。降解模式研究表明,该酶从糖链的还原端依次释放不饱和二糖,属于 CS/DS/HA 还原端外切酶。有趣的是,该酶在降解还原端氨基苯甲酰胺(2-AB)荧光标记的寡糖时,可以降解 2-AB 标记的 CS,但不能降解 2-AB 标记的 DS 和非硫酸化的 HA 和软骨素寡糖。HCDase 可以有效降解还原端荧光标记 CS 糖链这一特性,在复杂 CS 糖链的酶法测序中具有重要应用价值。在相关研究中,本实验室已将该酶成功用于硫酸化 CS 八糖的 pmol 级的微量酶法测序,该方法较质谱和核磁共振法具有简单、直接、需要样品量少、易于学习掌握、无需昂贵的设备等优点。

HCLase Er 是一种内切型软骨素裂解酶,可以有效降解除 CS-E 以外的各种 CS 亚型及 HA。研究发现,该酶可以彻底降解 HA、CS-A、CS-C 和 CS-D,生成一系列不同硫酸化模式的不饱和二糖,但在降解 CS-E 时产生了一系列不同聚合度的抗性寡糖。通过对不同聚合度抗性寡糖的二糖组成分析发现,抗性寡糖中 E-(GlcA $\beta$ 1-3GalNAc(4,6S)) 的含量较 CS-E 多糖显著提高。进一步对最小的抗性片段即抗性四糖进行酶解测序发现, HCLase Er 的最小抗性四糖为  $\Delta\text{E-A}$ 、 $\Delta\text{E-C}$  和  $\Delta\text{E-E}$ 。从这些抗性结构看,抗性四糖非还原端的 E 单元抑制了 HCLase Er 对  $\beta$ -1,4-糖苷键的切割。这是首个被鉴定的被 E 单元选择性抑制的硫酸软骨素降解酶。大量研究表明,富含 E 单元的 CS-E 多糖及寡糖具有多种生物学活性,在促进神经突触生长、抗病毒吸附、抗肿瘤转移等方面具有重要应用前景<sup>[14,63-64]</sup>。

而 HCLase Er 的发现,为 CS-E 的构效关系研究,特别是富含 E 单元活性寡糖的选择性降解制备提供了重要工具酶<sup>[59]</sup>。

## 2.2 来源于其他海洋细菌的硫酸软骨素降解酶

来源于 *Acinetobacter* sp. C26 的 chondroitinase ABC (CSase ABCAc) 是由中国海洋大学江晓路课题组鉴定的。该酶相对分子质量远小于其他的 CSase ABC,虽然与 CSase AC 结构更相近,但是可以降解 DS。CSase ABCAc 的基础酶学性质已有研究,但是关于酶的底物特异性及内外切等作用机制并没有详细阐明(表 1)<sup>[61]</sup>。

来源于 *Arthrobacter* sp. MAT3885 的 ChoA1 可以降解 CS 和 HA,不能降解 DS,是一种 CSase AC 酶。其中,天然纯化的酶 ChoA1N 降解 CS-C 产生 O 单元和 C 单元二糖,而基因重组的酶 ChoA1R 降解 CS-C 仅仅产生 C 单元二糖。这可能是酶在不同宿主表达时,其空间结构发生变化或发生糖基化修饰而影响了酶对底物降解的特异性<sup>[62]</sup>。关于此酶的底物特异性、降解特点还需要进一步阐明(表 1)。

## 3 硫酸软骨素降解酶的展望

总体来说,目前可利用的 CS 降解酶数量少、底物选择性差、作用模式和机理研究欠缺。本实验室已经成功地从海洋细菌中筛选鉴定了一系列在酶学性质、酶活、底物特异性和催化模式上表现出一系列独特性质的硫酸软骨素降解酶,这预示着海洋微生物来源的硫酸软骨素降解酶不仅可以弥补目前被广泛应用的陆地微生物来源硫酸软骨素降解酶的不足,也为发现更多具有特异活性的硫酸软骨素酶及其他糖胺聚糖降解酶提供了启示。此外,亟需在发现和鉴定新型 CS 降解酶的基础上,对其底物识别及催化机制进行深入探讨。总之,蕴含着丰富微生物资源的海洋势必将成为新型糖胺聚糖降解酶发现和研究的热点,也必将有力推动复杂糖胺聚糖的结构和功能研究。

### [参 考 文 献]

- [1] Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41: 390-412
- [2] Deepa SS, Umehara Y, Higashiyama S, et al. Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J Biol Chem*, 2002, 277: 43707-16
- [3] Esko JD, Selleck SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*,

- 2002, 71: 435-71
- [4] Linhardt RJ, Toida T. Role of glycosaminoglycans in cellular communication. *Acc Chem Res*, 2004, 37: 431-8
- [5] Smith PD, Coulson-Thomas VJ, Foscarin S, et al. "GAG-ing with the neuron": the role of glycosaminoglycan patterning in the central nervous system. *Exp Neurol*, 2015, 274: 100-14
- [6] Faissner A, Clement A, Lochter A, et al. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J Cell Biol*, 1994, 126: 783-99
- [7] Sugahara K, Mikami T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17: 536-45
- [8] Klüppel M, Wight TN, Chan C, et al. Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis. *Development*, 2005, 132: 3989-4003
- [9] Bülow HE, Hobert O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 375-407
- [10] Sugahara K, Mikami T, Uyama T, et al. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*, 2003, 13: 612-20
- [11] Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J*, 2006, 20: 9-22
- [12] Mizumoto S, Sugahara K. Glycosaminoglycans are functional ligands for receptor for advanced glycation end-products in tumors. *FEBS J*, 2013, 280: 2462-70
- [13] Iida J, Meijne AM, Knutson JR, et al. Cell surface chondroitin sulfate proteoglycans in tumor cell adhesion, motility and invasion. *Semin Cancer Biol*, 1996, 7: 155-62
- [14] Li F, Gerdy B, Murugan S, et al. Involvement of highly sulfated chondroitin sulfate in the metastasis of the Lewis lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2008, 283: 34294-304
- [15] Troeberg L, Lazenbatt C, Anower-E-Khuda MF, et al. Sulfated glycosaminoglycans control the extracellular trafficking and the activity of the metalloprotease inhibitor TIMP-3. *Chem Biol*, 2014, 21: 1300-9
- [16] Bergefall K, Trybala E, Johansson M, et al. Chondroitin sulfate characterized by the E-disaccharide unit is a potent inhibitor of herpes simplex virus infectivity and provides the virus binding sites on gro2C cells. *J Biol Chem*, 2005, 280: 32193-9
- [17] Williams RK, Straus SE. Specificity and affinity of binding of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B to glycosaminoglycans. *J Virol*, 1997, 71: 1375-80
- [18] Silbert JE, Sugumaran G. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life*, 2002, 54: 177-86
- [19] Maccarana M, Olander B, Malmström J, et al. Biosynthesis of dermatan sulfate chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2. *J Biol Chem*, 2006, 281: 11560-8
- [20] Mizumoto S, Watanabe M, Yamada S, et al. Expression of N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase involved in chondroitin sulfate synthesis is responsible for pulmonary metastasis. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 656319
- [21] Mizumoto S, Sugahara K. Fine regulatory mechanism of glycosaminoglycan biosynthesis. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2008, 53(12 Suppl): 1448-55
- [22] Kusche-Gullberg M, Kjellén L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*, 2003, 13: 605-11
- [23] Linhardt RJ, Avci FY, Toida T, et al. CS lyases: structure, activity, and applications in analysis and the treatment of diseases. *Adv Pharmacol*, 2006, 53: 187-215
- [24] Li F, Nandini CD, Hattori T, et al. Structure of pleiotrophin-and hepatocyte growth factor-binding sulfated hexasaccharide determined by biochemical and computational approaches. *J Biol Chem*, 2010, 285: 27673-85
- [25] Kinoshita A, Yamada S, Haslam SM, et al. Novel tetrasaccharides isolated from squid cartilage chondroitin sulfate E contain unusual sulfated disaccharide units GlcA(3-O-sulfate)beta 1-3GalNAc(6-O-sulfate) or GlcA(3-O-sulfate)beta 1-3GalNAc(4,6-O-disulfate). *J Biol Chem*, 1997, 272: 19656-65
- [26] Tamura J, Arima K, Imazu A, et al. Sulfation patterns and the amounts of chondroitin sulfate in the diamond squid, *Thysanoteuthis rhombus*. *Biosci Biotech Biochem*, 2009, 73: 1387-91
- [27] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1991, 280: 309-16
- [28] Zechel DL, Withers SG. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc Chem Res*, 2000, 33:11-8
- [29] Garron ML, Cygler M. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases. *Glycobiology*, 2010, 20: 1547-73
- [30] Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*, 2006, 106: 818-39
- [31] Hoffman P, Meyer K, Linker A. Transglycosylation during the mixed digestion of hyaluronic acid and chondroitin sulfate by testicular hyaluronidase. *J Biol Chem*, 1956, 219: 653-63
- [32] Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol*, 2001, 20: 499-508
- [33] Garg A, Anderson R, Zaneveld L, et al. Biological activity assessment of a novel contraceptive antimicrobial agent. *J Androl*, 2005, 26: 414-21
- [34] Suri A. Sperm specific proteins-potential candidate molecules for fertility control. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2: 10
- [35] Hardy CM, Clydesdale G, Mobbs KJ, et al. Assessment of contraceptive vaccines based on recombinant mouse sperm protein PH20. *Reproduction*, 2004, 127: 325-34
- [36] Yamada S. Role of hyaluronidases in the catabolism of chondroitin sulfate[M]// Chakrabarti A, Surolija A.

- Biochemical roles of eukaryotic cell surface macromolecules. *Advances in experimental medicine and biology*. Switzerland: Springer, 2015: 185-97
- [37] Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*, 2003, 13: 105R-15R
- [38] Jedrzejak MJ, Stern R. Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. *Proteins*, 2005, 61: 227-38
- [39] Linn S, Chan T, Lipeski L, et al. Isolation and characterization of two chondroitin lyases from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J Bacteriol*, 1983, 156: 859-66
- [40] Huang W, Lunin VV, Li Y, et al. Crystal structure of *Proteus vulgaris* chondroitin sulfate ABC lyase I at 1.9Å resolution. *J Mol Biol*, 2003, 328: 623-34
- [41] Prabhakar V, Capila I, Raman R, et al. The catalytic machinery of chondroitinase ABC I utilizes a calcium coordination strategy to optimally process dermatan sulfate. *Biochemistry*, 2006, 45: 11130-9
- [42] Huang WJ, Matte A, Suzuki S, et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of chondroitin sulfate ABC lyases I and II from *Proteus vulgaris*. *Acta Cryst*, 2000, 5: 904-6
- [43] Linhardt R, Galliher P, Cooney C. Polysaccharide lyases. *Appl Biochem Biotechnol*, 1987, 12: 135-76
- [44] Yin FX, Wang FS, Sheng JZ. Uncovering the catalytic direction of chondroitin AC exolyase: from the reducing end towards the non-reducing end. *J Biol Chem*, 2016, 291: 4399-40
- [45] Zhang Z, Park Y, Kemp MM, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry to study chondroitin lyase action pattern. *Anal Biochem*, 2008, 385: 57-64
- [46] Li F, Shetty AK, Sugahara K. Neuritogenic activity of chondroitin/dermatan sulfate hybrid chains of embryonic pig brain and their mimicry from shark liver involvement of the pleiotrophin and hepatocyte growth factor signaling pathways. *J Biol Chem*, 2007, 282: 2956-66
- [47] Fethiere J, Eggimann B, Cygler M. Crystal structure of chondroitin AC lyase, a representative of a family of glycosaminoglycan degrading enzymes. *J Mol Biol*, 1999, 288: 635-47
- [48] Huang W, Boju L, Tkalec L, et al. Active site of chondroitin AC lyase revealed by the structure of enzyme-oligosaccharide complexes and mutagenesis. *Biochemistry*, 2001, 40: 2359-72
- [49] Yamagata T, Saito H, Habuchi O, et al. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J Biol Chem*, 1968, 243: 1523-35
- [50] Pojasek K, Raman R, Kiley P, et al. Biochemical characterization of the chondroitinase B active site. *J Biol Chem*, 2002, 277: 31179-86
- [51] Tkalec AL, Fink D, Blain F, et al. Isolation and expression in *Escherichia coli* of *csIA* and *csIB*, genes coding for the chondroitin sulfate-degrading enzymes chondroitinase AC and chondroitinase B, respectively, from flavobacterium heparinum. *Appl Environ Microb*, 2000, 66: 29-35
- [52] Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, et al. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer*, 2003, 106: 438-45
- [53] Kaneiwa T, Mizumoto S, Sugahara K, et al. Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence. *Glycobiology*, 2010, 20: 300-9
- [54] Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol*, 2001, 20: 515-25
- [55] Hamai A, Hashimoto N, Mochizuki H, et al. Two distinct chondroitin sulfate ABC lyases an endoeliminase yielding tetrasaccharides and an exoeliminase preferentially acting on oligosaccharides. *J Biol Chem*, 1997, 272: 9123-3
- [56] Gu K, Linhardt R, Laliberte M, et al. Purification, characterization and specificity of chondroitin lyases and glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem J*, 1995, 312: 569-77
- [57] Lunin VV, Li Y, Linhardt RJ, et al. High-resolution crystal structure of *Arthrobacter aurescens* chondroitin AC lyase: an enzyme-substrate complex defines the catalytic mechanism. *J Mol Biol*, 2004, 337: 367-86
- [58] Han W, Wang W, Zhao M, et al. A novel eliminase from a marine bacterium that degrades hyaluronan and chondroitin sulfate. *J Biol Chem*, 2014, 289: 27886-98
- [59] Peng C, Wang Q, Wang S, et al. A chondroitin sulfate and hyaluronic acid lyase with poor activity to glucuronyl 4,6-O-disulfated N-acetylgalactosamine (E-type)-containing structures. *J Biol Chem*, 2018, 293: 4230-43
- [60] Wang W, Cai X, Han N, et al. Sequencing of chondroitin sulfate oligosaccharides using a novel exolyase from a marine bacterium that degrades hyaluronan and chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Biochem J*, 2017, 474: 3831-48
- [61] Zhu C, Zhang J, Zhang J, et al. Purification and characterization of chondroitinase ABC from *Acinetobacter* sp. C26. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95: 80-6
- [62] Kale V, Friðjónsson Ó, Jónsson JÓ, et al. Chondroitin lyase from a marine *Arthrobacter* sp. MAT3885 for the production of chondroitin sulfate disaccharides. *Mar Biotechnol*, 2015, 17: 479-92