



评述

持续性催化酶类机理研究及其分子动力学模拟

黄彬^①, 耿存亮^①, 潘龙强^①, 王禄山^{①*}, 张冬菊^②, 高培基^①^① 山东大学生命科学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100;^② 山东大学理论化学研究所, 济南 250100

* 联系人, E-mail: lswang@sdu.edu.cn

收稿日期: 2012-04-27; 接受日期: 2012-07-09

国家重点基础研究发展规划(批准号: 2011CB707401)、国家自然科学基金(批准号: 31070063)和山东省中青年科学家科研奖励基金(批准号: BS2009SW021)资助项目

doi: 10.1360/052012-174

摘要 酶分子催化机理研究是生命科学研究领域一个重要的问题. 近 80 年来, 过渡态理论在解释酶催化机理问题上占据了主导地位, 结合热力学循环、锁钥学说、诱导契合学说以及酶活性中心柔性学说等理论, 可以很好地解释多种酶分子的催化过程. 近年来, 随着蛋白质结构解析方法、单分子分析检测技术及计算机模拟技术的发展, 人们对酶分子催化机理的认识愈加深刻. 但持续性催化酶类的催化动力研究表明, 过渡态理论的解释并不充分. 本文对酶催化机理研究的相关进展进行了综述, 并针对持续性酶类催化动态过程的特点提出了可能的研究方向及可行的研究方法.

关键词持续催化酶类
酶催化机理
过渡态理论
外切纤维素酶
分子动力学模拟

生命代谢活动的基础是一系列酶分子催化的化学反应, 而这些反应能够高效进行, 与酶分子对其底物的高度专一性和具有高效催化能力的特点密切相关. 实验表明, 与没有酶催化情况相比, 在酶分子的催化作用下, 底物的反应速率提高了 $10^{10} \sim 10^{20}$ 倍, 这远远超出了任何人工合成催化剂的效率, 因此针对酶分子催化反应的机理研究很早便引起了人们的兴趣.

早在 1918 年, Lewis^[1]针对化学反应过程的分子机理提出了碰撞理论(Collision Theory), 它可以解释部分简单化学反应, 由于其假设分子都是硬球, 所以无法处理生物大分子等复杂结构, 因此难以确定相应的修正因子, 但该理论提出化学反应速率与反应浓度相关及有效碰撞的观点对酶催化过程研究具有指导意义.

20 世纪 30 年代, 随着热力学、动力学、统计力

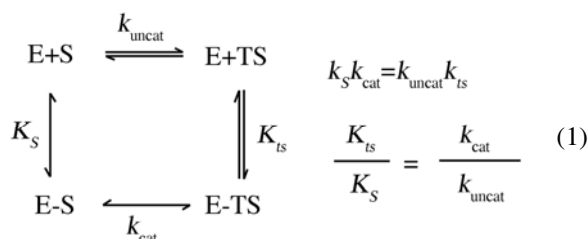
学领域相关理论的快速发展, Pelzer 与 Wigner^[2]于 1932 年提出了化学反应过程势能面(potential energy surface)与鞍点(saddle point)的概念. 在此基础上, Eyring^[3]于 1935 年提出了过渡态理论假说, 认为反应速率可以利用处于活化状态的分子所占比例与其分解速率的乘积来获得. 与其他理论相比, 过渡态理论更易于解释酶分子的催化过程, 并帮助认识复杂反应的发生机理, 所以其后 80 多年里, 此理论成为解释化学反应机理的经典假说.

过渡态理论又称为绝对反应速度理论(Theory of Absolute Reaction Rates), 根据分子结构与性质以及非动力学的的数据, 可以计算出基元反应速率常数的绝对值. 过渡态理论通过波恩-奥本海默近似(Born-Oppenheimer approximation, B-O approximation), 利用核构型(nuclear configuration)勾画出反应势能面,

反应分子在势能面上移动, 形成了反应路径(reaction coordinate), 反应物区与产物区通过反应路径上的分隔面来完成区分, 而过渡态就是分隔面附近的构象空间区域. 从能量上看, 它位于反应路径的最高点. 传统过渡态理论认为分隔面恰好通过鞍点, 反应速率由过渡态复合物的分解速率来决定. 根据这个理论, 人们可以预测相关化学反应速率的上限值^[4]. 当利用过渡态理论解释化学反应机理, 尤其是酶分子催化反应机理时, 采用过渡态复合物进行探究.

1 基于过渡态理论解释酶分子催化机理

1946 年, Pauling^[5]利用过渡态理论解释酶分子的催化动力问题, 并预言酶分子的催化动力来源与酶分子和底物及过渡态结构的结合强度密切相关^[5]. 1963 年, Kuz^[6]利用热力学循环(thermodynamic cycle)及 Eyring 公式, 定量解释了 Pauling 的假说, 酶分子催化活力与结合强度密切相关(公式 1^[7]).



酶分子催化反应的热力学循环, K_s 与 K_{ts} 分别为底物、过渡态结构与酶分子的结合常数; k_{uncat} 与 k_{cat} 分别为无酶分子及存在酶分子情况下的催化常数.

过渡态理论将反应过程的动力学与热力学参数联系在一起. 从结构上分析, 酶分子与底物的有效结合形成复合物使得有效反应浓度明显增大, 同时由于反应基团互相靠近, 有利于反应的进行. 从能量上看, 底物与酶分子形成过渡态复合物, 相互作用明显增强, 体系熵值降低, 从而“活化能”相对减小, 反应更易进行. 如磷酸丙糖异构酶(triose-phosphate isomerase, TIM)催化反应, 其反应机理的过渡态解释最为经典, TIM 为二聚体复合物, 催化二羟丙酮磷酸(dihydroxyacetone phosphate, DHAP)形成 D-甘油醛-3-磷酸(glyceraldehyde-3-phosphate, GAP), 酶分子与底物间的相关残基形成静电作用使活化能相比无酶催化时降低了 11~13 kcal/mol^[8]; 而酪氨酸磷酸化酶(tyrosine phosphatase), 氢键作用在稳定过渡态中起到重要作用, 其过渡态复合物的构象变化使得氢键距离

变短, 相互作用强度变大, 能量降低 5~6 kcal/mol^[9,10].

过渡态理论可解释部分酶分子的催化机理, 而随着计算模拟技术、单分子研究手段及量子理论的发展, 人们认识到该理论存在一些问题. 首先, 过渡态的定义不明确, 部分假设过于简单, 过渡态在势能面上的位置存在争议, 不同算法其过渡态位置有所不同; 另外, 由于过渡态存在时间很短, 实验上很难获得过渡态的构象, 所以对于过渡态是否真实存在仍有争议. 同时, 过渡态理论建立在一系列假设基础上, 在 B-O 近似下反应体系的核运动是绝热的^[11], 反应过程无返假设(即全部反应坐标轨迹都仅一次穿过分隔面而不会返回到反应物区域)与平衡假设也受到质疑^[8,12]; 其次, 对于该公式的量子化处理并不成功, 近 50 年来, 人们认识到传统过渡态理论是经典的, 没有考虑量子效应, 所以许多研究一直致力于建立严格的、完整的量子过渡态理论, 但是量子力学中的测不准原理(uncertainty principle)使得建立量子过渡态理论成为基本不可能的事情^[4]. 过渡态理论中, 对隧穿效应(tunneling effect)解释的不充分使得部分酶类动力学同位素效应(kinetic isotope effect)的解释不合理. 例如, 20 世纪 90 年代在大豆脂肪氧合酶-1(soybean lipoxygenase-1, SLO-1)的研究中 SLO-1 初级氘原子 KIE 效应达到了 80, 远远大于半经典过渡态得到的 7, 通过 bell 修正模型也仅获得 10~12^[13,14]; 另外, Klinman^[7]认为, 过渡态理论在解释酶催化机理过程中没有充分考虑酶分子与底物的分子动态变化.

相对低分子量活性物质的反应机理^[15,16]研究, 目前有关酶分子催化机理的研究更关注于酶分子与底物的分子动态学行为. 无论是酶分子与底物的识别结合过程还是催化断键过程, 都涉及到酶分子与底物的构象变化. 传统研究借助结构解析方法(X 射线晶体分析法、NMR、电子显微镜)可获得某时刻反应体系的相关结构. 但最近研究表明, 仅认识这些静态结构远远不够, 除了三维空间结构以外, 还需要加入第四维“时间”来准确描述反应体系的动态行为特征.

早在 1894 年, Fischer^[17]提出的锁钥学说(key-lock theory)就强调酶分子识别并结合底物过程中的专一性与互补性. 而 Koshland^[18]于 1958 年提出的诱导契合学说(Induced Fit Theory)认为, 酶分子与底物接近时, 酶分子受到底物诱导而发生利于结合底物分子的构象变化, 从而互补契合进行高效反应^[18]. 邹承鲁等人^[19,20]认为, 应该区分开活性中心的柔性 with 整体分子的柔性, 并提出活性中心的柔性学

说(conformational flexibility of enzyme active sites), 即只有酶活性中心的柔性与其催化能力密切相关. 最近“构象选择”学说(conformational selection)认为, 在底物结合酶分子之前, 酶分子就具有一系列不同构象, 而底物分子会选择其中一种构象与其结合, 从而改变酶分子不同构象的分布平衡^[21]. 该学说得到许多实验数据的支持, 说明酶分子识别结合过程中其构象分布受到底物分子的明显影响. 所以酶分子催化机理的研究除分析复合物分子的过渡态及化学键催化断键过程外, 更应该分析酶分子与底物之间随时间的分子动态行为.

酶分子催化过程为蛋白质识别结合底物分子的

物理过程与催化断键发生电子转移的化学过程的结合. 底物分子在天然状态下也具有多种构象, 但无催化剂存在时其落入过渡态范畴内(即形成活化构象)的构象所占比例很小, 所以提高活性构象的分布概率可以促进反应进行. 酶分子识别并结合底物改变了该分子构象的分布平衡, 从而增加活性构象的概率, 促进了反应的进行. 如浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*) β -1,3-1,4-葡聚糖酶(1,3-1,4- β -Glucanase)催化过程, 该酶为糖苷水解酶家族 16 家族的内切纤维素酶, 采用保留型机制来打断 β -1,4-糖苷键. 实验发现, 当它与底物结合后, -1 位点的糖环构象为扭曲 1S_3 构象, 而非 4C_1 椅式构象,

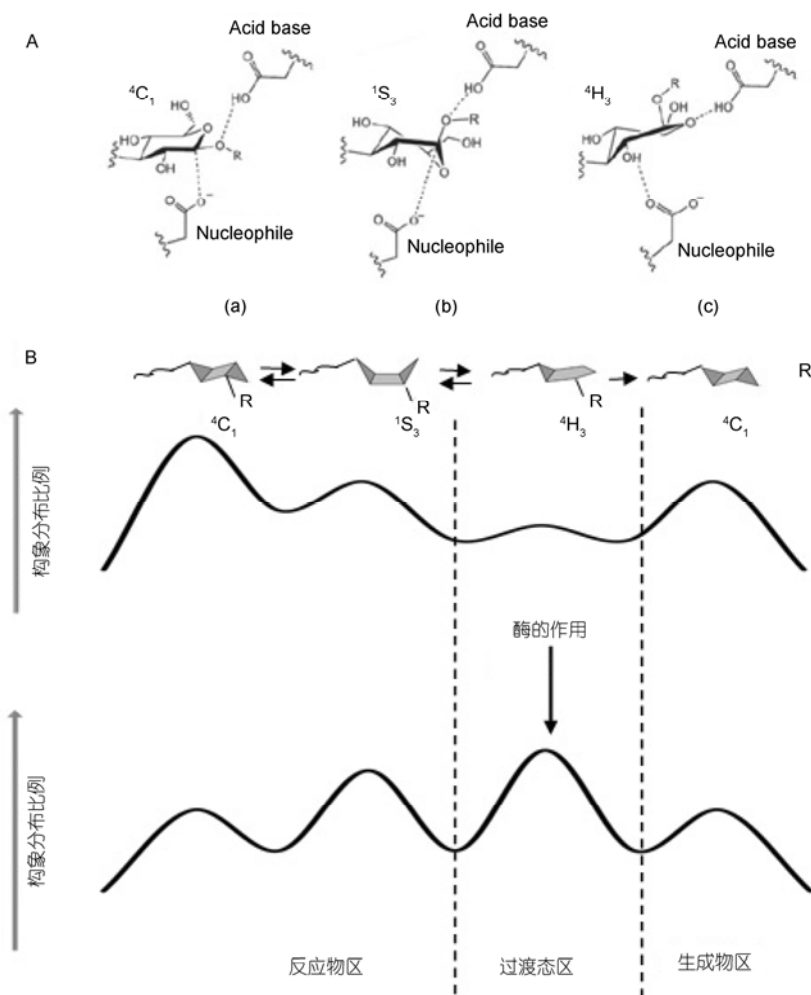


图 1 浸麻类芽孢杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶结合底物分子改变底物构象的分布概率示意图

A: (a) 为 4C_1 椅式构象; (b) 为 1S_3 构象; (c) 为过渡态 4H_3 半椅式构象^[22]; B: 酶分子影响糖分子底物构象分布示意图, 反应式中各构象分别对应分布图中各峰

1S_3 构象在结构和电性上都与过渡态 4H_3 构象类似(图 1A). 计算模拟表明, 仅有底物存在时, 4C_1 椅式构象能稳定存在, 而 1S_3 构象会转变为 $^1^4B$ 船式构象, 即 4C_1 椅式构象在分布中占主要部分. 当酶分子作用时, 1S_3 构象能够稳定存在, 并比 4C_1 椅式构象更稳定, 所以底物更倾向采取 1S_3 构象, 此构象分布比例变大(图 1B)^[22]. β -1,3-1,4-葡聚糖酶与底物相互作用过程中, 降低了体系熵值, 限制了底物构象变化, 提高了底物分子活化构象存在几率, 进而提高了转化成产物的反应速率. 此外, 温度可以提高过渡态构象出现的频率, 进而有效提高反应速率.

2 持续性催化酶类及催化过程的分子动力学行为

持续性催化酶类(processive enzyme)在催化过程中, 酶分子相对线性底物分子单方向运动, 酶分子结合底物后至解离前可执行上千次持续性的催化, 如 DNA 解旋酶、RNA 聚合酶 II、外切纤维素酶(cellobiohydrolase, CBH)等^[23]. 酶分子活性中心一般是一个开放的裂隙, 而持续性催化酶分子的活性中心一般都是孔道或深陷的凹槽, 该类酶分子一般催化线性聚合物分子的合成与降解过程(表 1).

持续性催化能力与酶活性中心的结构密切相关, 孔道型活性中心具有高效的持续性能力, 深陷凹槽型次之, 而开放裂隙型最弱^[23]. 如 DNA 限制性内切酶可持续 200 次左右降解催化, 而 T4 噬菌体 DNA 聚

合酶可以进行近 20000 次的催化(表 1). 一般酶类反应一次时间在 ps~ms 级, 而持续性催化酶类一般在 ms 级以上, 因此该类酶分子的分子识别与结合底物过程较其他催化断键经历更长时间, 其分子动态学行为与催化过程更为复杂. 以瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)分泌的外切纤维素酶 I (CBH I, 又称 Cel7A)为例, CBHI 持续性催化过程可以分为催化断键过程与线穿进位过程, 前者通过 QM/MM 模拟计算, 发现可以进一步分成两步基元反应, 其中第一步反应为限速步骤, 势垒为 14.1 kcal/mol^[31]. 通过 Arrhenius 方程估算常温下理论反应时间:

$$\tau = \tau_0 \exp(\Delta G^+ / RT), \tag{2}$$

公式中, τ 为跨越势垒所需最少时间, τ_0 为扩散系数, 约等于 1 ps, ΔG^+ 为势垒大小, R 为气体常数, T 为温度, 估算得常温下理论反应时间约为 18 ms, 但实验测得约为 0.1 s^[32,33], 远远大于理论预测. 一方面, CBH I 催化结构域持续性降解初步线穿过程中, 由于催化孔道较长, 底物分子链从晶面上解离后, 准确进入催化孔道的-7 位, 进入孔道后, 底物分子链要持续性运动 4 nm 左右才能到达+1/+2 位发生糖苷键的催化断键, 这是非常耗时的步骤, 整个反应过程不可逆^[34]; 另一方面, 在持续性降解循环中, 产物排放后底物需要重新进行线穿运动, 同时还可能发生催化流产或者产物抑制现象^[35], 从而进一步减缓反应速度. 由此可见, 持续性催化酶类反应过程复杂, 其催化动力来源不能简单地用过渡态理论解释.

表 1 可持续催化的相关酶类

酶分子	底物	结合位点结构	可持续催化次数
脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(APE1) ^[24]	双链 DNA	深陷凹槽型	200
逆转录酶 ^[25]	单链 RNA, 单链 DNA	深陷凹槽型	<50
酵母菌 RNA 聚合酶 II ^[26]	双链 DNA	深陷凹槽型	1000000
PcrA 解旋酶 ^[27]	双链 DNA	深陷凹槽型	20
透明质酸裂解酶	透明质酸	深陷凹槽型	未知
外切纤维素酶 Cel 48A, Cel E4	纤维素	深陷凹槽型	未知
外切纤维素酶 Cel6, Cel 7	纤维素	孔道型, 不对称	>200
核酸外切酶 I (exol) ^[28]	单链 DNA	孔道型, 不对称	>900
Slc35 溶菌糖基转移酶	肽聚糖	孔道型, 不对称	未知
T7 DNA 聚合酶(DNAP)(含硫氧还蛋白) ^[29]	双链 DNA	孔道型, 不对称	>1000
T4 gp45(T4 DNA 聚合酶全酶组分)	双链 DNA	孔道型, 螺旋状	>20000
多核苷酸磷酸化酶	单链 RNA	孔道型, 螺旋状	未知
20S 蛋白酶体 ^[30]	多肽	孔道型, 螺旋状	$\approx 140^a$

a) 降解结果为多肽而非单个氨基酸

对于此类持续性催化酶类催化机理的解释需要引入“分子机器”理论,当然也存在多种争论.以 RNA 聚合酶 II 为例^[36],动力冲程机制假说(power stroke mechanism)认为,持续性前进的动力来自于 NTP 断键后形成磷酸二酯键时所释放的能量. NTP 断键后释放出的能量会引起构象变化,经过传导可以起到推动作用.而另一种较为主流的观点认为,布朗棘轮模型(brownian ratchet motion)能够有效解释持续

性催化的动力来源,该模型认为 RNA 聚合酶的运动符合棘轮模型,热能以布朗运动的形式提供动力,使得聚合酶的运动具有双向可能性,而聚合酶中某部分的结构充当“棘爪”(pawl),使聚合酶能够定向运动. Bar-Nahum 等人^[36]认为, RNA 聚合酶的布朗棘轮模型中存在两种“棘爪”:静止棘爪与往复运动棘爪,前者阻止聚合酶发生后退,而后者通过自身运动推动聚合酶单向前进(图 2).

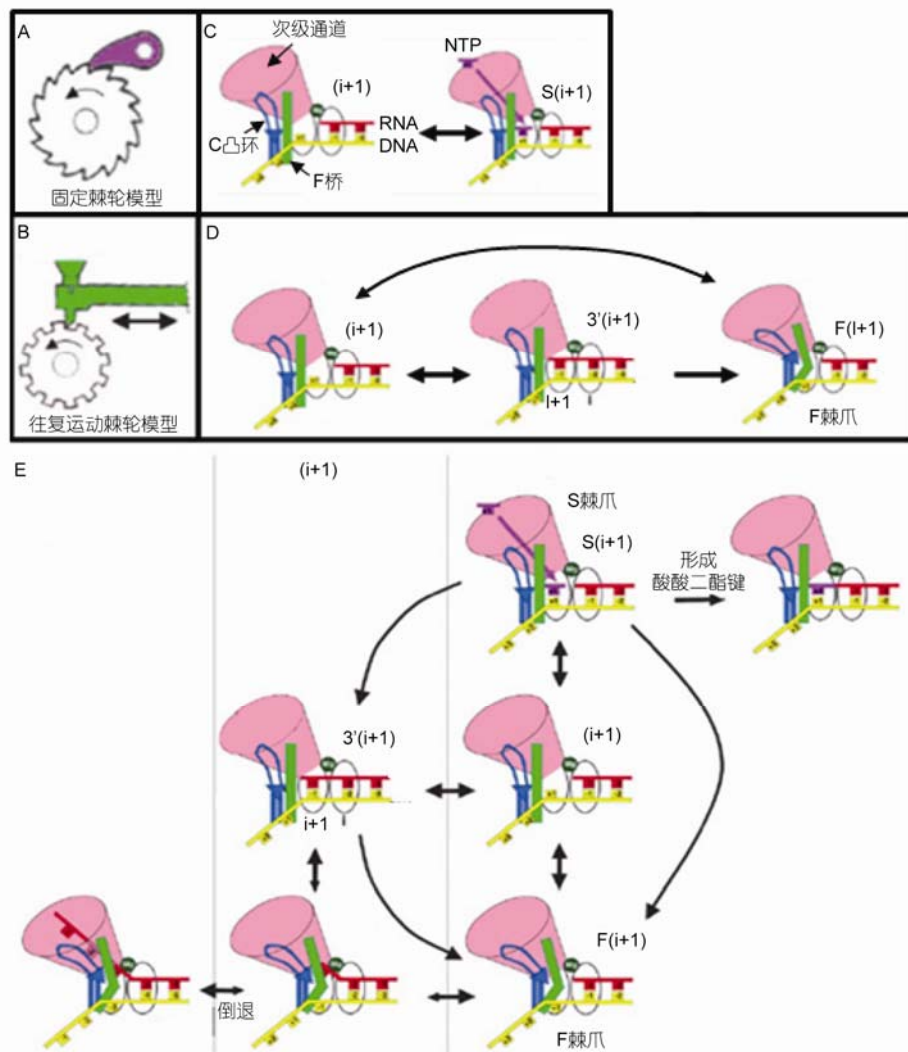


图 2 持续性催化的 RNA 聚合酶 II 布朗棘轮模型示意图^[36]

模型包括两种比较普遍的机械棘轮模型:一个是“棘爪”固定的棘轮模型(A),另一个是“棘爪”可往复运动的棘轮模型(B).在固定型棘轮模型中,轮子可以随机地前后运动,但是“棘爪”(A中粉色显示)能够阻止轮子的反向运动.“棘爪”的形状及位置决定了轮子运动的方向.在往复运动型棘轮中,“棘爪”(B中绿色显示)前后振动,可以推动轮子往单方向运动. RNA 聚合酶延伸复合物的催化中心同时拥有两种类型的棘轮. $i+1$ 位配对的核苷酸底物(C中粉色显示)发挥类似固定“棘爪”的功能,防止 RNA 聚合酶相对于核酸序列反方向运动.而 F 桥结构(D中绿色显示)发挥类似往复运动“棘爪”功能,它在弯曲与伸直的构象间来回变化,从而推动 RNA 聚合酶向前运动.两种模型的协调配合使得 RNA 聚合酶 II 能够持续性催化 RNA 链的合成,若出现错配等情况,转录过程发生倒退,切除错误区域,严重者可能导致转录失败(E)

3 持续性酶分子催化过程的分子动力学模拟

在酶催化机理研究中, QM/MM 方法可用于分析开放裂隙活性中心的催化断键过程. 然而, 有些体系在达到过渡态之前, 通常在亚稳态阱 (metastable basin) 内长时间的波动. 该过程涉及多自由度的激活, 如蛋白质构象的变化及底分子系统中的一阶相变, 由于其势能面不平整, 因而不能采用鞍点法过渡态去分析^[37]. 持续性酶分子的催化过程, 特别是持续性运动过程, 与酶分子的构象变化紧密相关, 所以鞍点法并不适合, 但利用分子动力学模拟 (molecular dynamics simulation) 的方法, 却可以从分子动态轨迹中提取出精确反应坐标, 给出热力学和动力学信息, 为反应过程机理分析提供严格方法与策略. 其基本思想是对分子在相空间中的运动状态进行取样统计, 与量子力学方法不同, 分子动力学模拟利用 B-O 近似简化了能量计算, 用力场方法取代求解薛定谔方程来计算势能. 力场包含分子内相互作用和分子间相互作用, 前者为成键作用, 后者为非成键作用. 力场参数可以通过实验或量子力学计算获得, 而且具有一定的可移植性.

在研究持续性酶类的持续性运动时, 最直接的方法是观察运动过程中构象的变化. 以 RNA 聚合酶为例, 无论是动力冲程机制还是布朗棘轮模型, 都涉及酶分子结构的动态变化. 实验上, 人们很难获得全部构象变化信息, 无法达到遍历性 (ergodicity) 的要求, 特别是不稳定的活化构象更难检测与跟踪. 分子动力学模拟可以对分子动力行为进行大量的构象取样, 在足够长的时间内达到遍历性. 另外, 持续性运动过程中基本不涉及成键作用, 仅分析酶分子与底物分子之间的非成键作用, 正是分子动力学模拟研究的主要领域之一.

然而, 分子动力学模拟分析对分子大体系的长时间模拟较难实现, 另外模拟过程中常会遇到陷入局部极小值区域, 无法收敛到全局最小值区域. 为解决这些问题, 通过以下方法进行改进^[37]: (i) 提高计算机计算能力, 在过去 30 年里, 高性能计算机与并行计算方法的应用已经将模拟时间提高了 $10^4 \sim 10^5$ 倍; (ii) 改进算法, 特别是解决非键相互作用计算的耗时问题, 在这方面最成功的是计算长程静电作用的 PME 算法; (iii) 简化模拟模型, 包括采用蛋白结构的粗粒化模型、隐式溶剂及多尺度模拟方法等; (iv)

利用增强取样技术来提高跨越势垒的速度. 副本交换分子动力学模拟 (replica-exchange molecular dynamics simulation, REMD simulation), 由伞状取样改进而来, 是多个偏置模拟的并行耦合. 该方法使得不同偏置条件下交换构象成为可能. 副本交换分子动力学模拟一般在不同的温度下进行, 而最低的温度通常对应目标温度. 温度副本交换模拟 (T-REMD) 中包含 M 个独立模拟 (即副本), 在每个副本中使用不同的温度, 并同时模拟^[38].

$$\begin{cases} i = i(m) \equiv f(m) \\ m = m(i) \equiv f^{-1}(i) \end{cases}, \quad (3)$$

公式(3)中, $i(i=1, \dots, M)$ 代表副本编号, $m(m=1, \dots, M)$ 代表温度编号, $f(m)$ 代表 m 的置换函数, $f^{-1}(i)$ 代表 i 的反函数. 在一定时间间隔后, 一般是 1 ps 的倍数, 相邻副本 i 和 j 的能量进行比较, 然后根据几率 P 按 Metropolis 准则进行交换:

$$w(X \rightarrow X') \equiv w(x_m^{(i)} | x_n^{(j)}) = \begin{cases} 1, & \Delta \leq 0 \\ \exp(-\Delta), & \Delta > 0 \end{cases}, \quad (4)$$

$$\Delta \equiv [\beta_n - \beta_m](E(q^{(j)}) - E(q^{(i)})), \quad (5)$$

公式(4), (5)中, $w(X \rightarrow X')$ 是交换的几率, $\beta = 1/k_B T$, k_B 是波尔兹曼常数, T 是温度. $E(q^{(i)})$ 和 $E(q^{(j)})$ 是相邻副本 i 和 j 的势能. 温度副本交换模拟 (T-REMD) 中, 温度越高, 越利于势垒的跨越, 原因是提供更大的动能.

CBH I 是持续性催化酶类, 催化结晶纤维素过程中其活性的丧失是纤维素酶解过程中速率降低的主要原因^[39], 其催化结构域属于糖苷水解酶第 7 家族. CBH I 由三部分组成, 分别为纤维素结合结构域 (CBD), 连接肽 (Linker)^[40] 及催化结构域 (CD). CBH I 通过 CBD 吸附到结晶纤维素疏水表面上^[41], 破坏结晶纤维素表面, 解离纤维素链的游离还原端^[42]. 游离分子链还原端进入 CD 催化孔道, 形成复合物. CBH I-CD 每次水解产生一个纤维二糖, 然后发生线穿运动, 并排出纤维二糖, 进入催化循环过程 (图 3)^[43].

相比其他体系, CBH I 糖苷键水解释放的能量不大, 尚不足高能磷酸键水解能量 (≈ -30 kJ/mol) 的一半^[33]. 这导致糖苷键水解后酶分子整体构象变化不大, 所建立的模拟模型会更加合理, 分子动力学模拟过程会更加准确. 在利用分子动力学模拟技术研究的各类持续性催化酶类中, 持续性降解纤维素链的 CBH I 系统可能是相关研究中较为典型的体系^[44,45].

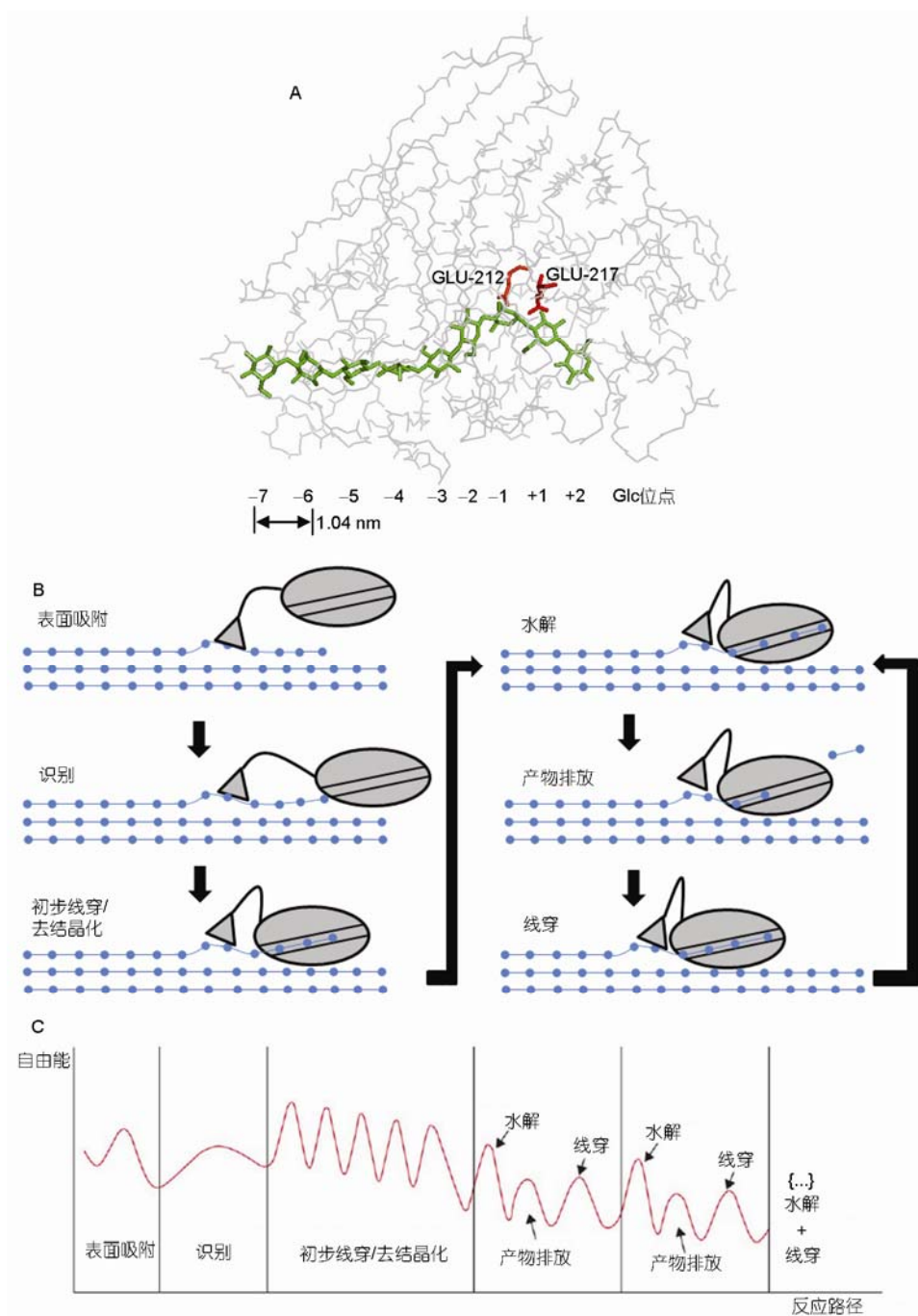


图3 瑞氏木霉 CBH I 降解结晶纤维素的过程及能量变化示意图^[43]

A: CBH I 吸附结构域含 36 个氨基酸, 连接肽含有 O 糖基化位点, 催化结构域含有 N 糖基化位点及长 5 nm 的催化孔道, 可进入 9 个左右的糖单元, 灰色主链为 CD 骨架, 红色残基为 212 与 217 位 Glu 催化残基, 绿色为糖链分子, 两个糖单元间间距为 1.04 nm; B: 推测的 CBH I 降解结晶纤维素的步骤; C: 每步自由能变化示意图

本实验室为研究 CBH I 中纤维素分子链的线穿及纤维二糖排放过程, 简化模型, 仅选用 CD 结构及 9 个糖单元的纤维素链, 使用 T-REMD 方法, 设立 128 个

副本来增强取样, 同时使用了 PME 技术来计算长程静电相互作用. 模拟计算使用国家超级计算济南中心的千万亿次集群, 经过两个月的模拟, 初步分析结果

表明, 本次分子动力学模拟获得了足够的体系构象变化信息, 观察到了纤维二糖排放与纤维素链持续性线穿的分子动态行为, 但关于产物排放反应坐标的确定以及 CBH I 解催化机理的分析仍在进行中。

4 展望

关于酶分子催化动力从何而来这一问题, 一直存在争论。半经典过渡态理论引入了可逆系数, 遂穿系数及非平衡系数来弥补过渡态理论假设的不足, 并进行了局部量子化。同时, Kuznetsov 和 Ulstrup^[46]等人基于转氢酶(hydrogen-transfer enzyme)研究提出了全遂穿模型理论(full tunneling model), 认为反应体系是通过隧穿机制完成断键的。另外, 该理论考虑了大、小尺度的蛋白质运动, 并在公式中赋予了相应的意义。全隧穿模型理论可以较好地解释过渡态理论无法解释的动力学同位素效应^[47], 并在转氢酶的催化机理方面取得了很好的效果。Klinman^[7]认为, 该理论可阐明酶分子催化的机理。

对于持续性催化酶类的催化动力来源问题成为新的研究热点, 这是因为该类酶催化过程涉及很重要的生化过程, 如 DNA 解旋、RNA 转录以及生物物质的高效降解转化, 所以相关催化过程研究非常重要也非常迫切。借助分子模拟技术, 可以对构象进行有效取样, 提供更多的分子结构及动态学行为数据, 为实验的理性设计指明方向。

分子动力学模拟由于计算精度的问题, 现在还不能完全取代实验, 模拟的准确性还受到诸多因素影响, 如模型的合理性、参数的准确性、模拟时间的长短等。即使是副本交换模拟也存在明显缺点^[37]: 所设置温度并非一定合理, 高温不仅会加速跨越势垒的速率, 同时也可能改变整体的势能面, 使其偏向于高熵状态, 如高温模拟中蛋白质可能解构, 形成非折叠构象, 而这些非折叠构象与天然态动力学行为不存在相关性, 从而会使折叠温度以上的副本设置失去意义, 所以副本交换分析首先要以实验校正其合理性。另外, 由于能差的波动随着体系的增大而降低, 所以对于多自由度的模拟体系(如使用显式溶剂的模拟体系)而言, 其副本间隔要非常密集才能达到取样的充分交叠, 从而失去高效性。

虽然动力学模拟还存在一系列问题与困难, 但是近几十年的发展表明使用计算机模拟手段研究生物学问题的技术在不断进步, 并且能切实解决一些问题。特别是随着计算机计算能力进入千万亿次时代, 以及将来“十二五”规划末亿亿次计算机的出现, 模拟时间将进一步延长。同时, 结合模拟算法的不断改良, 模拟的收敛性与遍历性也将更加准确。而计算机模拟手段的增强将使对于酶催化机理的研究更加直观与动态。以模拟获得的信息来指导实验理性设计, 包括对于酶活性的改造与提高, 会更具针对性, 并且更加高效。总之, 未来计算机模拟技术在生物学领域的应用将更加广泛、普遍。

参考文献

- 1 Lewis W C M. XLI.—Studies in catalysis. Part IX. The calculation in absolute measure of velocity constants and equilibrium constants in gaseous systems. *J Chem Soc Trans*, 1918, 113: 471–492
- 2 Pelzer H, Wigner E. Über die Geschwindigkeitskonstante von Austauschreaktionen. *Z Phys Chem*, 1932, B15: 445–463
- 3 Eyring H. The activated complex in chemical reactions. *J Chem Phys*, 1935, 3: 107–115
- 4 罗渝然. 过渡态理论的进展. *化学通报*, 1983, 10: 8–14
- 5 Pauling L. Molecular architecture and biological reactions. *Chem Eng News*, 1946, 24: 1375–1377
- 6 Kurz J L. Transition state characterization for catalyzed reactions. *J Am Chem Soc*, 1963, 85: 987–991
- 7 Klinman J P. An integrated model for enzyme catalysis emerges from studies of hydrogen tunneling. *Chem Phys Lett*, 2009, 471: 179–193
- 8 Garcia-Viloca M, Gao J, Karplus M, et al. How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science*, 2004, 303: 186–195
- 9 Alhambra C, Wu L, Zhang Z-Y, et al. Walden-inversion-enforced transition-state stabilization in a protein tyrosine phosphatase. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 3858–3866
- 10 Hansson T, Nordlund P, Aqvist J. Energetics of nucleophile activation in a protein tyrosine phosphatase. *J Mol Biol*, 1997, 265: 118–127
- 11 Ma B, Kumar S, Tsai C-J, et al. Transition-state ensemble in enzyme catalysis: possibility, reality, or necessity? *J Theor Biol*, 2000, 203: 383–397

- 12 邓从豪. 化学反应速率的量子理论. 中国科学, 1980, 6: 542–549
- 13 Glickman M H, Wiseman J S, Klinman J P. Extremely large isotope effects in the soybean lipoxygenase-linoleic acid reaction. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 793–794
- 14 Hwang C C, Grissom C B. Unusually large deuterium isotope effects in soybean lipoxygenase are not caused by a magnetic isotope effect. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 795–796
- 15 胡明, 张为灿, 卢雪梅, 等. 黄孢原毛平革菌产生的具有氧化性活力低分子肽类物质的分离纯化与性质鉴定. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2006, 36: 43–50
- 16 王璐, 闫文超, 陈嘉川, 等. 杂色云芝分泌的具有螯合铁离子活性的低分子量成分在木素生物降解中作用机制的研究. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38: 173–179
- 17 Fischer E. Influence of configuration on the action of enzyme. *Ber Dtsch Chem Ges*, 1894, 27: 2985–2993
- 18 Koshland D E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958, 44: 98–104
- 19 邹承鲁. 酶活性部位的柔性. 科学通报, 1989, 5: 7–12
- 20 邹承鲁, 周筠梅, 周海梦. 酶活性部位的柔性. 山东: 山东科学技术出版社, 2004
- 21 Changeux J-P, Edelstein S. Conformational selection or induced-fit? 50 years of debate resolved. *PLoS Biol Rep*, 2011, 3: 19–33
- 22 Biarnes X, Nieto J, Planas A, et al. Substrate distortion in the Michaelis complex of *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase insight from first principles molecular dynamics simulations. *J Biol Chem*, 2006, 281: 1432–1441
- 23 Breyer W A, Matthews B W. A structural basis for processivity. *Protein Sci*, 2001, 10: 1699–1711
- 24 Carey D C, Strauss P R. Human apurinic/aprimidinic endonuclease is processive. *Biochem*, 1999, 38: 16553–16560
- 25 Avidan O, Hizi A. The processivity of DNA synthesis exhibited by drug-resistant variants of human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 1713–1717
- 26 Mooney R A, Landick R. Rna polymerase unveiled. *Cell*, 1999, 98: 687–690
- 27 Soutanas P, Dillingham M S, Wigley D B. *Escherichia coli* ribosomal protein L3 stimulates the helicase activity of the *Bacillus stearothermophilus* PcrA helicase. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 2374–2379
- 28 Brody R S, Doherty K G, Zimmerman P D. Processivity and kinetics of the reaction of exonuclease I from *Escherichia coli* with polydeoxyribonucleotides. *J Biol Chem*, 1986, 261: 7136–7143
- 29 Tabor S, Richardson C C. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 4767–4771
- 30 Akopian T N, Kisselev A F, Goldberg A L. Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem*, 1997, 272: 1791–1798
- 31 Li J, Du L, Wang L. Glycosidic-bond hydrolysis mechanism catalyzed by cellulase Cel7A from *Trichoderma reesei*: a comprehensive theoretical study by performing MD, QM, and QM/MM calculations. *J Phys Chem B*, 2010, 114: 15261–15268
- 32 Igarashi K, Uchihashi T, Koivula A, et al. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science*, 2011, 333: 1279–1282
- 33 Igarashi K, Koivula A, Wada M, et al. High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. *J Biol Chem*, 2009, 284: 36186–36190
- 34 武彬, 王禄山, 高培基. 对硝基苯纤维二糖苷(PNPC)结合于外切纤维素酶 I (CBH I) 时分子构型和构象变化的研究. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38: 527–535
- 35 赵越, 武彬, 阎伯旭. 纤维二糖抑制外切纤维素酶水解作用机理的分析. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2003, 33: 454–460
- 36 Bar-Nahum G, Epshtein V, Ruckenstein A E, et al. A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. *Cell*, 2005, 120: 183–193
- 37 Mark R N. Computational modeling in lignocellulosic biofuel production. Washington DC: American Chemical Society, 2010. 155–322
- 38 Sugita Y, Okamoto Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chem Phys Lett*, 1999, 314: 141–151
- 39 Wang L, Zhang Y, Gao P, et al. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 93: 443–456
- 40 Beckham G T, Bomble Y J, Matthews J F, et al. The O-glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* Family 7 cellulase is a flexible, disordered protein. *Biophys J*, 2010, 99: 3773–3781
- 41 Taylor C B, Talib M F, McCabe C, et al. Computational investigation of glycosylation effects on a family 1 carbohydrate-binding module. *J Biol Chem*, 2012, 287: 3147–3155
- 42 王禄山, 张玉忠, 高培基. 纤维二糖水解酶 I 吸附结构域的新功能. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38: 678–686

- 43 Beckham G T, Bomble Y J, Bayer E A, et al. Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. *Curr Opin Biotech*, 2011, 22: 231–238
- 44 Payne C M, Bomble Y J, Taylor C B, et al. Multiple functions of aromatic-carbohydrate interactions in a processive cellulase examined with molecular simulation. *J Biol Chem*, 2011, 286: 41028–41035
- 45 Bu L, Beckham G T, Shirts M R, et al. Probing carbohydrate product expulsion from a processive cellulase with multiple absolute binding free energy methods. *J Biol Chem*, 2011, 286: 18161–18169
- 46 Kuznetsov A M, Ulstrup J. Proton and hydrogen atom tunnelling in hydrolytic and redox enzyme catalysis. *Can J Chem*, 1999, 77: 1085–1096
- 47 Nagel Z D, Klinman J P. A 21st century revisionist's view at a turning point in enzymology. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 543–550

How Processive Enzymes Work: the Application of Molecular Dynamics Simulation to Study the Catalytic Mechanism

HUANG Bin¹, GENG CunLiang¹, PAN LongQiang¹, WANG LuShan¹, ZHANG DongJu² & GAO PeiJi¹

1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China;

2 Institute of Theoretical Chemistry, Shandong University, Jinan 250100, China

Enzyme catalytic mechanism is a key issue for the research in life science. In the latest 80 years, transition-state theory plays the predominate role to explain how process occurs, with the combination of thermodynamic cycles, lock-and-key theory, “induced fit” theory and so on. Recently, advances in methods to analyze protein structure, single molecular technology and computational simulation technology provide us a deeper insight into the sources of enzyme catalysis. However, relevant studies on processive enzymes' mechanism show that the explanation by Transition-state theory is not sufficient. We present an overview of latest research of enzyme catalytic mechanism, and put forward the possible strategies and methods to study processive enzymes' catalytic process.

processive enzyme, enzyme catalytic mechanism, transition-state theory, cellobiohydrolase, molecular dynamics simulation

doi: 10.1360/052012-174