

综述

海绵硅蛋白研究进展

曹旭鹏¹, 曹恒^{1,2}, 虞星炬¹, 张卫^{1,3}

1 中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物产品工程组, 大连 116023

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

3 澳大利亚 Flinders 大学 海洋分子生物过程及生物产品实验室, 阿德莱德 SA5042

摘要: 海绵是生物进化过程中最古老的多细胞动物, 其中大部分能够利用二氧化硅在常温水环境下合成功能、大小和结构极为丰富的硅质骨骼。随着近年来人们发现其骨骼的基本组成单位骨针具有优异的光导性能和机械性能, 海绵生物硅化过程及仿生纳米和微米硅质生物材料合成的研究成为生物技术和材料科学的热点。在海绵生物硅化过程中, 一类被称为硅蛋白(Silicatein)的蛋白质表现出了特殊的催化活性, 也因此得到了生物学家、化学家和材料学家的关注。以下将对硅蛋白的国际研究现状进行了评述, 以期促进国内相关领域的研究。

关键词: 海绵硅质骨针, 硅蛋白, 生物硅化, 生物硅质材料

Progress in silicatein from sponges

Xupeng Cao¹, Heng Cao^{1,2}, Xingju Yu¹, and Wei Zhang^{1,3}

1 Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academic of Sciences, Dalian 116023, China

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Flinders Centre for Marine Bioprocessing and Bioproducts, Flinders University, Adelaide SA5042, Australia

Abstract: Sponges (Porifera) are the oldest living metazoan in the world, among which most of them (Demospongia) can produce silicic skeleton from orthosilicic acid in the seawater under the natural environmental conditions. These biosilicic materials exhibit good mechanical and optical properties as well as good biocompatibility. During the biosilicification process of sponges, a protein, named as silicatein, plays an important role and has attracted great attention from biologist, chemists and material scientists. This mini review highlights the discovery of silicateins and its function as both an enzymatic catalyst and an organic template for biosilicification. The studies since 1999 were briefly introduced on the application of silicatein as a biocatalyst and template for synthesis of silica-based and other inorganic materials. It is expected to stimulate the interests in the related researches in China.

Keywords: spicule, silicatein, biosilicification, biosilic material

1 生物硅化材料

硅元素(Si)在地壳中的丰度为 28%, 是仅次于氧元素丰度第二高的元素, 同时也广泛分布在生物

圈中, 在所有生物中都能找到硅的存在, 其中一些生物能够用来构成稳定的结构(如骨骼, 主要是以二氧化硅形式)。据估计, 二氧化硅是仅次于碳酸盐的第二大量生物矿物^[1]。这种生物矿化二氧化硅主要

Received: September 22, 2009; Accepted: November 3, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA09Z435).

Corresponding author: Wei Zhang. Tel: +86-411-84379069; Fax: +86-411-84379069; E-mail: wei.zhang@dicp.ac.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA09Z435)资助。

存在于各种单细胞藻类^[2](60 000~100 000 种硅藻)、细菌、海绵(约 6000 种)、原生动物的^[3]如稀孔虫目(Phaeodaria)、领鞭毛虫(Choanoflagellates)、硅鞭毛虫(Silicoflagellates)和高等植物体内^[1,4]。生物体通过生物矿化过程合成二氧化硅的过程被成为生物硅化作用(Biosilicification)。其中海绵与硅藻是海洋中主要的生物硅化者^[5]。其中超过 90%的海绵能够通过生物硅化作用构建起硅质骨骼。

传统纳米至介孔尺度无机材料的制备需要高温固态反应(如大于 1000°C)或在强酸碱和较低温度(100°C~200°C)条件下完成湿法化学反应^[6], 而生物硅化过程具有底物浓度低(一般海水原硅酸浓度低于 2 $\mu\text{mol/L}$ 、常温(0°C~30°C)、近中性 pH(天然海水 pH 值 7~8)、产物形态可控(其产物为海绵硅质骨针, 具有种属特异性, 是海绵种属鉴定的重要指标, 见图 1)等特点^[7]。尤其是当人们发现海绵硅质骨针具有与商用光导纤维相近的光导性能^[8]、但是机械性能更为优秀^[9]后, 海绵硅质骨针形成机制以及相关酶系的应用成为生物技术和材料科学研究的新热点。美国和欧洲的科学家在分子水平和细胞水平开展了大量海绵骨针形成的研究, 并在仿生纳米和微米硅质生物材料合成领域进行了开创性的尝试, 展现了广泛的应用前景。

2 海绵硅质骨针轴丝与硅蛋白

20 世纪 70 年代 Drum^[12]以及 Schwab 等^[13-14]发现海绵硅质骨针内部具有一个细的核心, 并把它命名为轴丝(Filament)。1972 年 Shore^[15]证实轴丝主要由蛋白质组成。由于折光性的不同, 在光学显微镜下能够清楚地观察到轴丝。轴丝横截面为三角形或六边形, 少数为四边形。轴丝广泛存在于寻常海绵和六放海绵的硅质骨针中, 包括大骨针和小骨针。但是由于海绵硅质骨针轴丝直径小于 1 μm , 受当时实验技术条件限制, 很长时间人们一直无法了解它的成分以及结构。直到抗体技术、电镜技术以及多种分子生物学技术的应用, 才对轴丝有了更深入的了解, 并且在轴丝中发现了与硅沉积相关的蛋白^[16-17]。

1998 年 Shimizu 等^[16]对 *Tethya aurantia* 海绵硅质骨针轴丝进行分析, 从中发现了一类被称作硅蛋白(Silicatein)的蛋白。*T. aurantia* 轴丝中这类蛋白共有 3 种成分, 根据分子量被分别命名为 Silicatein (Silica proteins) α 、 β 和 γ , 其相应分子量为 29、28 和 27 kD, 相对含量为 12: 6: 1。这些硅蛋白占骨针轴丝质量的 91%。该类蛋白也广泛存在于其他硅质海绵中^[6], 不过数目不一, 如产自贝加尔湖的淡水海绵 *Lubomirskia baicalensis* 中, 已发现 4 种硅蛋白 α 的同工型^[18]。

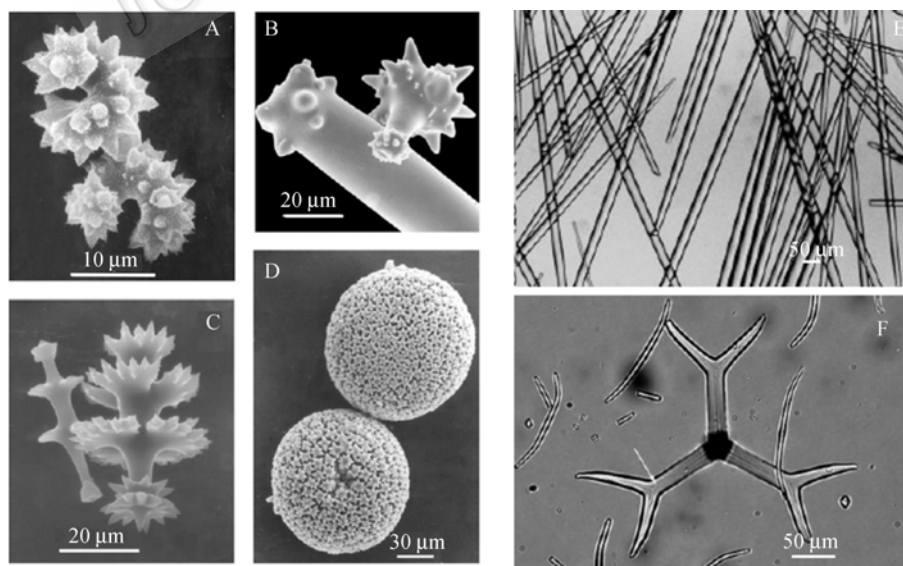


图 1 几种海绵骨针

Fig. 1 Spicules from sponges. (A-D) Microscleres from sponge *Spirastrella*, *Discorhabdella*, *Latrunculia* and *Geodia*^[10], respectively. (E) Spicules from *Tethya aurantia*. (F) A dichotriaene from *Penares saccharis*^[11].

3 硅蛋白催化机制及应用机理研究进展

以天然轴丝或重组硅蛋白进行离体实验表明, 硅蛋白具有催化硅酸或其他硅酸类似物(如 TEOS, 甲基-和卞基-三乙氧基硅烷)聚合的能力。与工业中常用的条件不同, 硅蛋白催化的反应是在常温、常压及近中性 pH 条件下完成^[16-17]。实验还发现, 当以 TEOS 为底物时, 所获产物成小球状堆积在轴丝表面, 与骨针中观测到的结构类似^[11, 20]。

硅蛋白基因序列以及蛋白质序列分析结果表明, 发现这一类蛋白与 Cathepsin L 家族和木瓜蛋白酶家族具有很高的同源性^[16], 拥有相同的胱氨酸二硫键以及保守的活性位点, 因此推测硅蛋白的三维构象应该与这两种已知蛋白酶相似。并且, 与 Cathepsin L 家族相比, 二者都具有 N 端蛋白酶切位点。

推测离体硅蛋白与 TEOS 的作用机理可能如图 2 所示。硅蛋白中起关键作用的是丝氨酸-26 上的羟基和组氨酸-165 侧链上咪唑基团。硅蛋白加速了硅氧烷的水解, 而这一过程是聚合反应的限速步骤, 在常规的化学反应中需要酸-碱催化。不过仍不清楚是否在海绵中也发生了类似的过程, 因为“有机物-硅”复合物是否在海绵内存在仍然没有被证实。

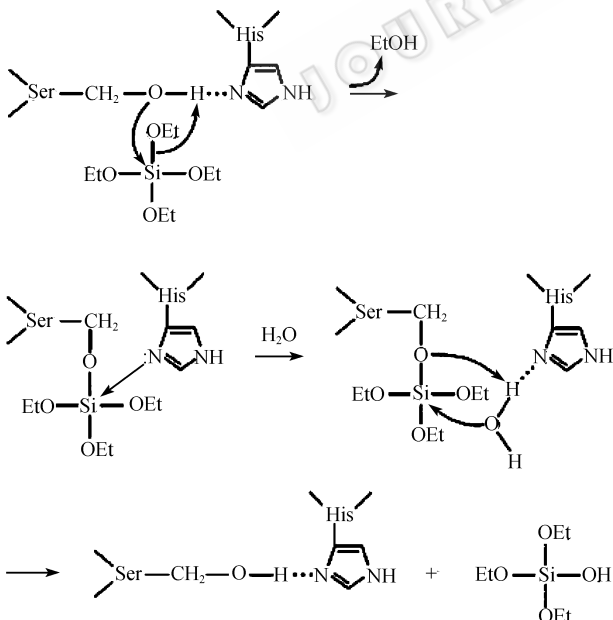


图 2 推测的 Silicatein 催化 TEOS 水解的示意图

Fig. 2 Mechanism proposed for silicatein-mediated catalysis. Hydrolysis of TEOS releases the silanol product, and the silanol will form silicon further under the neutral pH^[19].

由于硅具有一定的金属性, 人们推测硅蛋白可能具有催化一系列金属氧化物合成的能力。因此, 重组硅蛋白被用来尝试催化其他氧化聚合物的形成, 包括二氧化钛、氧化锆等一系列金属氧化物^[21-26]。Silicatein 的催化活性主要归功于氢键, 通过构建类似嵌段多肽化合物^[27]以及小分子物质^[28], 也能有效催化 TEOS 等在室温条件聚合。此外, 通过在海绵及海绵细胞培养过程中加入复杂有机硅, 如硅烷偶联剂三甲氧基氨基丙基硅烷, 能够在其硅质骨针中引入其他有机基团^[29]。

4 国内研究现状

我国海绵硅质骨针收集及研究最早集中在分类学方面, 代表人物是中国科学院海洋研究所李锦和研究员。国内对海绵骨针材料特性的起步很早, 早在 1986 年地质科学院的王毅民等就已测定了从大洋科考中发现的海绵硅质骨针样品的光导性能和热效应^[30]。但遗憾的是后续研究没能继续。作为海绵形态学鉴定的重要指标和主要依据, 不同海绵具有不同的骨针形态和分布(图 1), 海绵生物硅化过程中对产物形态的控制至今也是未解之谜, 而这除了具有生物学意义和生态学意义^[31], 同时也有助于开发基于生物过程的形态可控硅氧聚合物或其他金属氧化物生产工艺^[32]。因此 2001 年开始, 中国科学院大连化物所通过与德国美因茨大学合作参与欧盟第五框架计划项目(硅生物技术: 纳米结构硅的生物制造及在工业和医学中的应用, QLRT-2001-01967), 构建海绵外植体和具有专利技术原细胞富集海绵细胞聚集体培养体系^[33-34], 开始了对海绵生物硅化过程系统的生物学研究。通过对野生潮间带海绵繁茂膜海绵周期性生长过程的追踪, 分析了骨针几何尺寸在海绵不同发育时期的变化情况, 结合材料性质及统计分析结果, 对照同时期硅蛋白表达量的变化趋势, 对骨针的生长发育阶段进行定量的描述, 并提出了海绵硅质骨针成熟度判定标准, 并发现繁茂膜海绵硅质骨针的长径比实际是受到材料性质的约束^[35]。同时, 根据海绵硅质骨针的生成机制, 首次以硅烷偶联剂三甲氧基氨基丙基硅烷作为硅源进行海绵外植体和海绵细胞聚集体培养, 探索了其对于繁茂

膜海绵硅化作用及其他生理活性的影响,并在骨针中成功地引入了额外的有机基团,为进一步了解海绵硅化过程奠定了基础^[29]。

最近,地质科学院的王晓红研究员等在国家自然科学基金的资助下也开始了海绵硅质骨针材料学性质的进一步研究^[30],并通过国际合作在海绵硅质骨针形成和材料结构方面有所发现。

5 展望

尽管海绵硅化过程还有许多需要进一步研究^[36-39],但是海绵硅质骨针及其生成机制已经在两方面表现出了应用潜力,包括,模拟硅质骨针材料和结构特征,改善和改良现有工艺;应用硅蛋白及其类似物,开发新的生产工艺和材料。

海绵硅质骨针优异的光学性能和材料性能对现有光导纤维加工工艺有重要的借鉴意义。目前光导纤维只要是以SiO₂为基础的石英光导纤维和玻璃光导纤维,其合成过程需要使用包括高纯SiCl₄在内的众多昂贵原料,同时加工过程中需要高温等条件,技术、资金要求高,环境压力大;相比之下海绵生产硅质骨针直接利用水体中低浓度原硅酸,在常温常压的温和条件下进行。产品方面,光导纤维最大的弱点在于怕“水”。水的存在加剧光导纤维表面裂痕的传递,同时会增加羟基数目,引起光导性能的快速衰减。为了避免水的影响,光导纤维生产后需要进行复杂的防水处理。海绵硅质骨针直接在水体中生成,并在水体中稳定存在,同时对裂痕传递有很好的抑制能力。因此,研究海绵硅质骨针的生成机制,将有助于改善或革新生产工艺。小骨针精确的形态控制也有助于微型光学元器件以及半导体元件的生产。

生物硅质材料具有良好的生物相容性,在医疗、组织工程领域也有广阔的应用前景。如为了增强蛛丝蛋白的硬度和耐受性,Foo等尝试将蛛丝蛋白与具有从硅藻中发现的生物硅化活性的蛋白融合,构建增强型蛛丝蛋白^[40]。Curnow等分别考察了天然和重组硅蛋白对丙交酯聚合反应的影响,并尝试包被活体大肠杆菌细胞^[41]。利用硅蛋白类似物催化TEOS等聚合,在常温常压中性pH条件下对绿色荧光蛋白和带有荧光蛋白的大肠杆菌的包埋,并维持

高的生理活性^[28]。硅蛋白本身也被直接用于半导体材料或金属氧化物的合成方面^[21-22,24,28],或者通过仿生手段予以实现^[42-45]。

致谢 (感谢地质科学院检测中心王晓红研究员、王毅民研究员、德国美国茨大学Müller教授、Schröder教授和中国科学院海洋研究所秦松研究员、李锦和研究员的大力协助。)

REFERENCES

- [1] Brümmer F. Living inside a glass box—silica in diatoms//Müller E, ed. *Silicon Biomineralization* (33). Berlin: Springer, 2003: 3–10.
- [2] Martin-Jézéquel V, Lopez PJ. Silicon—a central metabolite for diatom growth and morphogenesis//Müller E, ed. *Silicon Biomineralization* (33). Berlin: Springer, 2003: 99–124.
- [3] Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P. *An Illustrated Guide to the Protozoa*. 2nd ed. Lawrence: Society of Protozoologists, 2000: 1–1432.
- [4] Simpson TL, Volcani BE. *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*. New York: Springer, 1981.
- [5] Maldonado M, Carmona C, Velasquez Z, et al. Siliceous sponges as a silicon sink: an overlooked aspect of benthopelagic coupling in the marine silicon cycle. *Limnol Oceanogr*, 2005, **50**(3): 799–809.
- [6] Brutchey RL, Morse DE. Silicatein and the translation of its molecular mechanism of biosilicification into low temperature nanomaterial synthesis. *Chem Rev*, 2008, **108** (11): 4915–4934.
- [7] Zaremba CM, Stucky GD. Biosilicates and biomimetic silicate synthesis. *Curr Opin Solid St M*, 1996, **1**(3): 425–429.
- [8] Cattaneo-Vietti R, Bavestrello G, Cerrano C, et al. Optical fibers in an antarctic sponge. *Nature*, 1996, **383**(6599): 397–398.
- [9] Sarikaya M, Fong H, Sopp JM, et al. Biomimetics: nanomechanical design of materials through biology. 15th ASCE Engineering Mechanics Conference, 2002.
- [10] Uriz MJ, Turon X, Becerro MA, et al. Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: origin, diversity, ultrastructural patterns, and biological functions. *Microsc Res Tech*, 2003, **62**(4): 279–299.
- [11] Weaver JC, Morse DE. Molecular biology of demosponge axial filaments and their roles in biosilicification. *Microsc Res Tech*, 2003, **62**(4): 356–367.
- [12] Drum RW. Electron microscopy of siliceous spicules from the freshwater sponge heteromyenia. *J Ultrastruct Res*, 1968, **22**(1): 12–21.
- [13] Schwab DW, Shore RE. Fine structure and composition of a siliceous sponge spicule. *Biol Bull*, 1971, **140**(1): 125–136.
- [14] Schwab DW, Shore RE. Mechanism of internal stratification of siliceous sponge spicules. *Nature*, 1971, **232**(5311): 501–502.

- [15] Shore RE. Axial filament of siliceous sponge spicules, its organic component and synthesis. *Biol Bull*, 1972, **143**: 689–698.
- [16] Shimizu K, Cha J, Stucky GD, *et al.* Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(11): 6234–6238.
- [17] Cha JN, Shimizu K, Zhou Y, *et al.* Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(2): 361–365.
- [18] Wiens M, Belikov SI, Kaluzhnaya OV, *et al.* Molecular control of serial module formation along the apical-basal axis in the sponge *Lubomirskia baicalensis*: silicateins, mannose-binding lectin and mago nashi. *Dev Genes Evol*, 2006, **216**(5): 229–242.
- [19] Zhou Y, Shimizu K, Cha JN, *et al.* Efficient catalysis of polysiloxane synthesis by silicatein alpha requires specific hydroxy and imidazole functionalities. *Angew Chem Int Edit*, 1999, **38**(6): 780–782.
- [20] Tahir MN, Theato P, Muller WEG, *et al.* Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein. *Chem Commun*, 2004, **24**: 2848–2849.
- [21] Curnow P, Bessette PH, Kisailus D, *et al.* Enzymatic synthesis of layered titanium phosphates at low temperature and neutral pH by cell-surface display of silicatein-alpha. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(45): 15749–15755.
- [22] Tahir MN, Theato P, Müller WEG, *et al.* Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein. *Chem Commun*, 2005, **44**: 5533–5535.
- [23] Kisailus D, Truong Q, Amemiya Y, *et al.* Self-assembled bifunctional surface mimics an enzymatic and templating protein for the synthesis of a metal oxide semiconductor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(15): 5652–5657.
- [24] Brutchey RL, Yoo ES, Morse DE. Biocatalytic synthesis of a nanostructured and crystalline bimetallic perovskite-like barium oxo-fluorotitanate at low temperature. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**(31): 10288–10294.
- [25] Kisailus D, Choi JH, Weaver JC, *et al.* Enzymatic synthesis and nanostructural control of gallium oxide at low temperature. *Adv Mater*, 2005, **17**(3): 314–318.
- [26] Kisailus D, Najarian M, Weaver JC, *et al.* Functionalized gold nanoparticles mimic catalytic activity of a polysiloxane-synthesizing enzyme. *Adv Mater*, 2005, **17**(10): 1234–1239.
- [27] Cha JN, Stucky GD, Morse DE, *et al.* Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides. *Nature*, 2000, **403**(6767): 289–292.
- [28] Roth KM, Zhou Y, Yang W, *et al.* Bifunctional small molecules are biomimetic catalysts for silica synthesis at neutral pH. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(1): 325–330.
- [29] Cao XP, Yu XJ, Zhang W. Comparison of spiculogenesis *in vitro* ADPCP-primmorph and explants culture of marine sponge *Hymeniacidon perleve* with 3-TMOSPU supplementation. *Biotechnol Prog*, 2007, **23**(3): 707–714.
- [30] Wang XH, Wang YM. An introduction to the study on natural characteristics of sponge spicules and bionic applications, *Adv Earth Sci*, 2006, **21**(10): 1008–1031.
- 王晓红, 王毅民. 海绵骨针特性及其仿生学研究. *地球科学进展*, 2006, **21**(10): 1008–1013.
- [31] Maldonado M, Uriz MJ. Decline in Mesozoic reef-building sponges explained by silicon limitation. *Nature*, 1999, **401**(6755): 785–788.
- [32] Dahl JA, Maddux BLS, Hutchison JE. Toward greener nanosynthesis, *Chem Rev*, 2007, **107**: 2228–2269.
- [33] Zhang XY, Cao XP, Zhang W, *et al.* Primmorphs from archaeocytes-dominant cell population of the sponge *Hymeniacidon perleve*: improved cell proliferation and spiculogenesis. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **84**(5): 583–590.
- [34] Sun LM, Song YF, Qu Y, *et al.* Purification and *in vitro* cultivation of the archaeocytes (stem cells) of marine sponge *Hymeniacidon perleve* (demospongiae). *Cell Tissue Res*, 2007, **328**(1): 223–237.
- [35] Cao XP, Fu WT, Yu XJ, *et al.* Dynamics of spicule evolution in marine sponge *Hymeniacidon perlevis* during *in vitro* cell culture and the seasonal development in field. *Cell Tissue Res*, 2007, **329**(3): 595–608.
- [36] Robinson DB, Rognien JL, Bauer CA, *et al.* Dependence of amine-accelerated silicate condensation on amine structure, *J Mater Chem*, 2007, **17**: 2113–2119.
- [37] Tilburey GE, Patwardham SV, Huang J, *et al.* Are hydroxyl-containing biomolecules important in biosilicification? A model study. *J Phys Chem B*, 2007, **111**: 4630–4638.
- [38] Fairhead M, Johnson KA, Kowatz T, *et al.* Crystal structure and silica condensing activities of silicatein a–cathepsin L chimeras. *Chem Commun*, 2008, (15): 1765–1767.
- [39] Matsunaga S, Sakai R, Jimbo M, *et al.* Long-chain polyamines (LCPAs) from marine sponge: possible implication in spicule formation. *ChemBioChem*, 2007, **8**: 1729–1735.
- [40] Foo CWP, Patwardhan SV, Belton DJ, *et al.* Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(25): 9428–9433.
- [41] Curnow P, Kisailus D, Morse DE. Biocatalytic synthesis of poly (L-lactide) by native and recombinant forms of the silicatein enzymes. *Angew Chem Int Edit*, 2006, **45**(4): 613–616.
- [42] Chen X, Mao SS. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem Rev*, 2007, **107**: 2891–2959.
- [43] Lee SY, Gao X, Matsui H. Biomimetic and aggregation-driven crystallization route for room-temperature material synthesis: growth of β -Ga₂O₃ nanoparticles on peptide assemblies as nanoreactors. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**: 2954–2958.
- [44] Ahmad G, Dickerson MB, Cai Y, *et al.* Rapid bioenabled formation of ferroelectric BaTiO₃ at room temperature from an aqueous salt solution at near neutral pH. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**: 4–6.
- [45] Adamson DH, Dabbs DM, Pacheco CR, *et al.* Non-peptide polymeric silicatein a mimic for neutral pH catalysis in the formation of silica. *Macromolecules*, 2007, **40**: 5710–5717.