

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20180522.002

潘丽霞,朱婧,王青艳,等. 细胞色素 P450 酶生物转化及新催化反应的最新进展[J]. 广西科学,2018,25(3):258-261.

PAN L X,ZHU J,WANG Q Y,et al. The latest advance of biotransformation and new catalytic reaction of cytochrome P450 enzymes[J]. Guangxi Sciences,2018,25(3):258-261.

细胞色素 P450 酶生物转化及新催化反应的最新进展^{*}

The Latest Advance of Biotransformation and New Catalytic Reaction of Cytochrome P450 Enzymes

潘丽霞¹,朱婧¹,王青艳¹,杨登峰^{2**}

PAN Lixia¹,ZHU Jing¹,WANG Qingyan¹,YANG Dengfeng²

(1. 广西科学院,非粮生物质酶解国家重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西生物质产业化工程院,广西生物炼制重点实验室,广西南宁 530007;2. 广西科学院,广西北部湾海洋研究中心,广西海洋天然产物与组合合成生物化学重点实验室,广西南宁 530007)

(1. State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology,National Engineering Research Center of Non-food Biorefinery,Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute,Guangxi Key Laboratory of Biorefinery,Guangxi Academy of Sciences,Nanning,Guangxi,530007,China; 2. Guangxi Beibu Gulf Marine Research Center,Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry,Guangxi Academy of Sciences,Nanning,Guangxi,530007,China)

摘要:细胞色素 P450 酶(P450s 或 CYPs)是一类广泛存在于生命体中,依赖于亚铁血红素催化多种底物的单加氧酶。一方面,它涉及许多高活性天然产物生物合成的关键步骤,对其生物转化研究有助于提高活性分子的产率和活性;另一方面,其催化涉及金属元素以及辅助因子,其蛋白质改造和新催化反应的研发也不断取得新突破。本文就细胞色素 P450 酶这两方面的最近研究进展进行了总结与论述。

关键词:酶工程 细胞色素 P450 酶 生物转化 新催化反应

中图分类号:R978.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)03-0258-04

Abstract: Cytochrome P450 enzymes (P450s or CYPs) are a widespread large super family of mono-oxygenase that catalyzes the different substrates via heme in life beings. On the one hand,P450s involves in the key step of high-active natural product biosynthetic pathway,its biotransformation studies will help to increase the yield and activity of active molecules. On the other hand,its catalysis involves in metal elements and cofactors,new breakthroughs have been made in the protein modification and new catalytic reaction of P450s. In this article the latest

advances in these two aspects of cytochrome P450 enzymes have been summarized and discussed.

Key words: enzyme engineering, cytochrome P450 enzymes, biotransformation, new catalytic reaction

收稿日期:2018-04-24

作者简介:潘丽霞(1981-),女,硕士,副研究员,主要从事酶工程和结构生物学研究,E-mail:panlixia10@163.com。

* 国家自然科学基金项目(31660251)和广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198010)资助。

** 通信作者:杨登峰(1979-),男,副研究员,主要从事天然产物合成生物学与结构生物学研究,E-mail:yangdengfeng@gxas.cn。

0 引言

细胞色素 P450 酶(P450s 或者 CYPs)是一类依赖于亚铁血红素,催化多种复杂氧化反应的多功能酶。它可以催化的底物多种多样,广泛存在于各种生物体内,包括细菌、真菌、哺乳动物以及人体。由于在催化过程中,其与亚铁血红素相互结合,形成硫醇-亚铁-一氧化碳复合物,该复合物在 450 nm 处具有最大特征吸收波谱,得名 P450^[1]。P450 酶不但在有害物质的脱毒、类固醇的生物合成以及人体的药物代谢中起非常重要的作用^[2],而且在天然产物的生物合成中也起到非常关键的作用^[2-3]。

在合成生物学蓬勃发展的今天,人们尝试用各种简单的生物体系去廉价地生产植物来源的结构复杂、活性优良的天然产物分子。在这些分子中,往往存在一个或者多个 P450 酶,这些酶对天然产物骨架起到后修饰作用,或者是直接增强天然产物的活性,或者是改变天然产物的构型和构象,为下一步的反应做准备。而且,这样的后修饰作用往往是一个限速步骤,对最终产量起到决定作用^[4-5]。除了细菌来源的 P450 酶,真菌和植物来源的 P450 酶更加复杂,如何解决这些 P450 酶的异源表达是一个棘手的问题。甚至有时连起催化功能的 P450 酶都没有报道,要通过其他替代的 P450 酶来实现这样的功能转化。

近年,化学研究人员参与到 P450 酶的研究中成为一个趋势。从化学的角度研究 P450 酶,结合有机化学和金属化学的知识,使 P450 酶的研究取得了全新的结果。在这方面,美国加州理工大学的 Frances H. Arnold 教授做了很多具有突破性的工作。另外,在化学合成中,碳氢活化反应是将氧原子插入到不活泼的碳氢键上,是反应最困难和研究最热门的反应之一,这类反应也可以由 P450 催化完成^[6-8]。这些工作都使得 P450 酶成为目前在酶工程以及有机化学中,研究最为广泛的酶之一。本文就 P450 酶的生物转化和新催化反应这两个方面的最新进展进行了综述。

1 P450 酶的生物转化

1.1 有效的电子传递体系

P450 酶的催化体系是除了自身以外,还需要铁氧化还原蛋白来维持电子传递的循环。有效的铁氧化还原蛋白对产物的产率影响显著。在抗癌药物埃博霉素的合成中,EpoK 是负责埃博霉素生物合成中最后一步环氧化的 P450 酶。Kern 课题组通过筛选自然或者异源的铁氧化还原蛋白体系,得到了 P450

酶的高效转化,该体系被证明在其他 P450 酶中也同样使用。进一步通过对 11 个不同铁氧化还原体系的测试,发现电子传递体系的不同还会导致最终产物的不同^[9-10]。

1.2 de novo 设计的 P450 酶的生物转化

很多天然产物是来自于植物的,这些天然产物含量稀少,价格昂贵。如何把这些分子在简单的细菌或者酵母中进行廉价生产,一直是合成生物学家们的研究目标。但植物复杂的基因合成机制,使得这些植物来源的 P450 酶的发现十分困难。DeLoache 课题组报道了利用酿酒酵母生产一种生物碱的中间体 S-reticuline。为了提高第一个中间体的产量,利用荧光生物感应器的原理,得到了来自于甜菜的 CYP76AD1 完成了色氨酸的羟化作用^[11]。另外,Trenchard 课题组也成功获得了一个制备 S-reticuline 的代替途径^[12]。

1.3 植物来源 P450 酶的生物转化

不同于细菌可溶性的 P450 酶,植物的 P450 酶往往结合在细胞的内膜膜上。这使得异源重构变得更加困难。由于大肠杆菌缺少内膜系统,人们的研究较多地集中在酿酒酵母中。Galanie 课题组构建了一个从 norlaudanoline 到 berberine 的代谢途径^[13];而 Trenchard 课题组也利用多个 P450 酶构建了一个从 norlaudanoline 到 sanguinarine 的代谢途径^[14]。

除了酿酒酵母,大肠杆菌体系也有成功的例子。Ajikumar 课题组利用紫杉醇代谢中的第一个 P450 酶在高产 taxadiene 的大肠杆菌中表达,可以得到 570 mg/L 氧化的紫杉烷^[15]。

2 P450 酶的新催化反应

2.1 P450 酶利用卡宾开发的新催化反应

在过渡金属催化中,常常用到卡宾试剂作为介导,完成碳碳双键和碳氢键的功能化。在自然界的反应中,之前是没有的,最早的工作是由 Arnold 课题组在 2013 年完成的,在这个反应中,重氮盐乙基重氮基醋酸酯作为卡宾,将卡宾试剂替代氧气完成反应,催化烯烃的环丙烷化^[16]。这个工作是将有机化学的方法应用到生物催化中。随后,P450 酶的卡宾化学也完成了环丙烷化反应的拓展,在含有该基团的活性天然产物的不对称合成中得到了大量的应用,例如 Ticagrelor 和 Tranylecypromine 等^[17-18]。

2016 年,一个基于卡宾的新的应用完成,就是利用 P450 完成了碳硅键的合成,这是第一个酶法催化形成的有机硅。Arnold 课题组利用 P450 酶和卡宾

试剂介导的反应,酶法合成具有立体选择性的产物,通过定向进化后活力提高 15 倍^[19]。

2017 年,Arnord 课题组又利用 P450 酶和卡宾系统介导的反应,开发出碳硼键的合成。该反应仍然具有良好的立体选择性。通过定向进化,酶活力比天然状态提高了 400 倍左右^[20]。

2.2 P450 酶利用氮宾开发的新催化反应

磺胺类化合物是典型的氮宾试剂,作为第一个 P450 酶氮宾的供体得到了应用。利用分子内的碳氢插入完成手性原子的胺化反应。Singh 等^[21]将 Carbonazidates 作为氮宾的供体,合成手性的恶唑烷酮类化合物。随后,还开发了一系列的相关反应。

2.3 P450 酶新催化的反马氏反应

反马氏反应是有机合成中非常有用的一个反应,而在生物体的反应中,是很少见到的。Arnold 课题组利用以一个具有马氏和反马氏混合反应的 P450 酶进行定向进化的手段,筛选出一个适合反马氏反应的酶^[22],该酶利用氧气就可以完成该反应。

3 P450 酶的工程化

3.1 P450 酶与配体结合方式的分子改造

亚铁血红素是 P450 酶催化的辅助因子,在催化过程中起到重要作用。将 P450 BM3 的 Cys 突变为 Ser 可以稳定二价铁,降低氧气的活化,导致环丙烷化活力增强^[23]。接下来的研究表明 His 和 Ser 分别对环丙烷化和氨基化反应是有利的^[24]。来自于硫化叶菌的、热稳定的 P450 CYP119,是第一个获得晶体结构的、以组氨酸连接 heme 的 P450 酶,它的结构发生了较大的变化。而且,它和 heme 可以以任意氨基酸连接^[25]。

3.2 P450 酶利用不同过渡金属配体的新催化反应

通过不引入铁元素的原卟啉配体,可以引入不同的金属元素到 P450 的反应中去,就是所谓的“换心”,从而实现铁元素无法完成的新的过渡金属化学反应^[26]。另外,hartwig 课题组发展出利用过渡金属铱和卟啉配体为辅因子的 P450 酶 CYP119,该酶表现出良好的催化特性,可以高效地选择性合成,对映异构性超过 98%,整体转化数(Total turnover number, TTN)达到 35 000^[27]。

3.3 P450 酶的区域选择性的改造

TxtE 是第一个报道的能有效催化硝化底物色氨酸的酶,分子改造是改变其底物结合位点,将硝化反应的位点从色氨酸的碳 5 位变为色氨酸的碳 4 位。其单独的晶体结构和含有色氨酸底物复合物的晶体结构已经得到解析,但是由于天然状态下该酶 F-G

环的不稳定,导致目前还没有搞清楚该环是如何与底物色氨酸相互作用的。借助计算机分子动态模拟软件,使用马尔科夫状态,对 F-G 环的开环、闭环和过渡态 3 种状态进行了重构。处于 F-G 环上的 His176 对于酶的不同状态起到关键的控制作用^[28]。计算结果显示 176 位的空间位阻增加了,并导致底物结合位点的偏移。

4 展望

P450 酶作为自然界中存在最广泛和催化最多样的酶之一,到目前为止对它的研究还只是一小部分,还有很多相关的研究有待于进一步开展。P450 酶作为一个金属蛋白,在催化过程中,可以说借助蛋白为载体,实现了金属催化。而更多化学背景的研究人员开始利用 P450 酶完成一些新的催化反应,将酶催化和过渡金属催化相结合,让生物学和化学充分融合,相信这个方向还会有更多有意思的研究出现。同时,借助计算机的动态模拟和共结晶的晶体学手段,从分子水平对 P450 酶的催化机制做进一步解析,相信可以促进 P450 酶的研究更上一个台阶,为后续的蛋白质改造奠定理论基础。结合定向改造的方法,让这些酶发挥出更大的作用,完成更多特异性的反应。另外,基因组研究的快速发展加速了酶的研究,人们不再单纯地依赖表型或现象去发现酶,全基因组测序技术可以马上发现所有备选的酶,为快速研究酶提供了新的可能。目前,本课题组已围绕部分链霉菌的 P450 展开结构生物学研究,相关工作会在后续报道。

参考文献:

- [1] KLINGENBERG M. Pigments of rat liver microsomes [J]. Arch Biochem Biophys, 1958, 75: 376-386.
- [2] GUENGERICH F P. In Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry [M]. [S. l.]: Springer International Publishing, 2015.
- [3] PODUST L M, SHERMAN D H. Diversity of P450 enzymes in the biosynthesis of natural products [J]. Nat Prod Rep, 2012, 29(10): 1251-1266.
- [4] EUSTAQUIO A S, CHANG L P, STEELE G L, et al. Biosynthetic engineering and fermentation media development leads to gram-scale production of spliceostatin natural products in *Burkholderia* sp. [J]. Metab Eng, 2016, 33: 67-75.
- [5] MCLEAN K J, HANS M, MEIJRINK B, et al. Single-step fermentative production of the cholesterol-lowering drug pravastatin via reprogramming of *Penicillium chrysogenum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2015, 112(9): 2847-2852.

- [6] SAKAKI T. Practical application of cytochrome P450 [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(6):844-849.
- [7] FASSAN R. Tuning P450 enzymes as oxidation catalysts[J]. *ACS Catalysis*, 2012, 2(4):647-666.
- [8] GIRVAN H M, MUNRO A W. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 31:136-145.
- [9] KERN F, DIER T K F, KHATRI Y, et al. Highly efficient CYP167A1 (EpoK) dependent epothilone B formation and production of 7-ketone epothilone D as a new epothilone derivative[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:14881.
- [10] SUN Y, MA L, HAN D F, et al. In vitro reconstitution of the cyclosporine specific P450 hydroxylases using heterologous redox partner proteins[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44:161-166.
- [11] POLTURAK G, BREITEL D, GROSSMAN N, et al. Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants [J]. *New Phytol*, 2016, 210:269-283.
- [12] TRENCHARD I J, SIDDIQUI M S, THODEY K, et al. De novo production of the key branch point benzyli-soquinoline alkaloid reticuline in yeast[J]. *Metab Eng*, 2015, 31:74-83.
- [13] GALAINE S, SMOLKE C D. Optimization of yeast-based production of medicinal protoberberine alkaloids [J]. *Microb Cell Factor*, 2015, 14:144.
- [14] TRENCHARD I J, SMOLKE C D. Engineering strategies for the fermentative production of plant alkaloids in yeast[J]. *Metab Eng*, 2015, 30:96-104.
- [15] BIGGS B W, LIM C G, SAGLIANI K, et al. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated taxol precursor synthesis in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113:3209-3214.
- [16] COELHO P S, BRUSTAD E M, KANNAN A, et al. Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes[J]. *Science*, 2013, 339(6117):307-310.
- [17] HERNANDEZ K E, RENATA H, LEWIS R D, et al. Highly stereoselective biocatalytic synthesis of key cyclopropane intermediate to ticagrelor[J]. *ACS Catal*, 2016, 6:7810-7813.
- [18] BAJAJ P, SREENILAYAM G, TYAGI V, et al. Gram-scale synthesis of chiral cyclopropane-containing drugs and drug precursors with engineered myoglobin catalysts featuring complementary stereoselectivity[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55:16110-16114.
- [19] KAN S B, LEWIS R D, CHEN K, et al. Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life[J]. *Science*, 2016, 354:1048-1051.
- [20] KAN S B J, HUANG X, GUMULYA Y, et al. Genetically programmed chiral organoborane synthesis[J]. *Nature*, 2017, 552(7683):132-136.
- [21] SINGH R, KOLEV J N, SUTERA P A, et al. Enzymatic C (sp³)-H amination: P450-catalyzed conversion of carbonazidates into oxazolidinones[J]. *ACS Catal*, 2015, 5(3):1685-1691.
- [22] HAMMER S C, KUBIK G, WATKINS E, et al. Anti-Markovnikov alkene oxidation by metal-oxo-mediated enzyme catalysis [J]. *Science*, 2017, 358 (6360):215-218.
- [23] HYSTER T K, ARNOLD F H. P450_{BM3}-axial mutations: A gateway to non-natural reactivity [J]. *Isr J Chem*, 2015, 55(1):14-20.
- [24] TINOCO A, STECK V, TYAGI V, et al. Highly diastereo- and enantioselective synthesis of trifluoromethyl-substituted cyclopropanes via myoglobin-catalyzed transfer of trifluoromethylcarbene [J]. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(15):5293-5296.
- [25] MCLINTOSH J A, HEEL T, BULLER A R, et al. Structural adaptability facilitates histidine heme ligation in a cytochrome P450[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(43):13861-13865.
- [26] KEY H M, DYDIO P, CLARK D S, et al. Abiological catalysis by artificial haem proteins containing noble metals in place of iron[J]. *Nature*, 2016, 534 (7608):534-537.
- [27] DYDIO P, KEY H M, NAZARENKO A, et al. An artificial metalloenzyme with the kinetics of native enzymes[J]. *Science*, 2016, 354(6308):102-106.
- [28] DODANI S C, KISS G, CAHN J K, et al. Discovery of a regioselectivity switch in nitrating P450s guided by molecular dynamics simulations and Markov models [J]. *Nat Chem*, 2016, 8(5):419-425.

(责任编辑:陆雁)