

综述与进展

REVIEW

细胞色素 P450 酶在生物合成及有机合成中的催化功能及其应用

蒋媛媛 ^{a,b} 李盛英*,a,b

(^a中国科学院青岛生物能源与过程研究所 山东省合成生物学省级重点实验室 中国科学院生物燃料重点实验室 青岛 266101) (^b中国科学院大学 北京 100049)

摘要 细胞色素 P450 酶分布广泛, 主要参与生物体外源物质代谢与天然产物生物合成, 能以结构多样的有机化合物作为底物催化多种类型的化学反应. P450 酶可在温和条件下实现底物分子中 C—H 键的选择性氧化, 因而在精细化学品、化学中间体及药物分子的生产上具有很高的实用价值及多年的应用历史. 随着蛋白质工程、氧化还原伴侣工程、底物工程、代谢工程与合成生物学的发展, 目前己可初步实现根据反应需求来理性设计或定向进化改造 P450 酶催化系统来高效催化多种有机反应, 拓宽了 P450 酶在生物合成与有机合成反应中的应用范围. 总结了近年来由细胞色素 P450 酶 参与催化的主要反应类型, 归纳了拓宽 P450 酶催化反应类型、提高催化活性和选择性的一些重要策略, 并对未来 P450 酶在生物合成及有机合成反应中的应用发展前景和挑战进行了展望.

关键词 细胞色素 P450 酶; 生物合成; 有机合成; 蛋白质工程; 底物工程; 代谢工程; 合成生物学; 氧化还原伴侣

Catalytic Function and Application of Cytochrome P450 Enzymes in Biosynthesis and Organic Synthesis

Jiang, Yuanyuan^{a,b} Li, Shengying^{*,a,b}

(^a Shandong Provincial Key Laboratory of Synthetic Biology, CAS Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101) (^b University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract Cytochrome P450 enzymes are widely distributed in nature, which mainly participate in xenobiotics metabolism and natural product biosynthesis. These enzymes are able to recognize various substrates to produce many useful oxidative products through diverse reaction types. P450 enzymes can catalyze selective oxidation of C—H bonds in their substrates under mild conditions. Therefore, a lot of P450 enzymes have been applied in the production of fine chemicals, drugs and chemical intermediates for quite a long time. With the development of protein engineering, redox partner engineering, substrate engineering, metabolic engineering and synthetic biology, it has become possible to obtain the P450 biocatalysts with the desired properties such as high activity, the substrate specificity of interest, and great selectivity to meet the industrial requirements, through rational design and direct evolution of P450 enzymes. Thus, the application scope of P450 enzymes, and the strategies to broaden the reaction scope and to enhance the catalytic efficiency and selectivity are summarized. Finally, the challenges and prospects in the application of cytochrome P450 enzymes in biosynthesis and organic synthesis are discussed. **Keywords** cytochrome P450 enzyme; biosynthesis; organic synthesis; protein engineering; substrate engineering; metabolic engineering; metabolic engineering; synthetic biology; redox partner

细胞色素 P450 酶(cytochrome P450 enzymes)是一类 含有 B 型血红素(heme B)的蛋白超家族, 血红素作为 P450 酶的辅基与绝对保守的半胱氨酸相连, 使得其还 原态与一氧化碳结合时在 450 nm 处产生特征吸收峰而 得名^[1]. 在自然界中 P450 酶主要参与人体对药物和毒 素的代谢反应、植物及微生物次级代谢产物的生物合成



^{*} Corresponding author. E-mail: lishengying@qibebt.ac.cn

Received May 30, 2018; revised June 29, 2018; published online July 24, 2018.

Project supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2017ZB0207) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81741115, 21472204).

山东省自然科学基金重大基础研究(No. ZR2017ZB0207)和国家自然科学基金(Nos. 81741115, 21472204)资助项目.

过程以及一些微生物降解途径等;其催化反应类型多达 20 余类,如羟化、环氧化、脱烷基化、碳-碳偶联、氧 化裂解等^[2].细胞色素 P450 酶能在温和条件下催化复 杂化合物中惰性 C—H 键的区域和立体选择性氧化反 应,具有化学氧化难以比拟的优势,因而被广泛用于生 产药物、维生素、香料、杀虫剂等高附加值产品^[3].

近年来,随着人们对 P450 酶催化机制的深入认识, 发现其催化循环中不同的反应中间体负责驱动不同的 化学反应类型,为改造并利用该类"万能生物催化剂" 赋予了理论基础^[4].与此同时,有机化学家和生物化学 家们也逐渐将目光更多地投向了对 P450 酶及其衍生酶 或仿酶的设计改造,利用理性设计和定向进化等策略不 断拓宽 P450 酶在合成重要有机分子过程中的应用,以 期解决化学氧化过程中选择性控制困难、副产物多、反 应条件苛刻、依赖贵金属或有毒试剂带来的环境不友好 等诸多问题^[5].目前,一些人工改造获得的新型 P450 催 化剂,不但可以一步催化完成一些有机合成化学方法极 难突破的反应类型,而且开始创造新型生物催化反应, 展现出强大的催化潜力和广阔的应用前景.

1 细胞色素 P450 酶概述

1.1 分布与分类

P450 酶广泛分布于自然界不同阶元的生命体中, 包括人类、动物、植物、微生物,甚至病毒等^[2a,6].1968 年首次被成功纯化的 P450 体系来源于兔肝微粒体 (microsome),随着哺乳动物 P450 酶的不断表征,越来 越多的证据显示哺乳动物中至少存在一种以上的微粒 体 P450 酶^[2a,7].近年来随着基因组高通量测序及分析技 术的长足进步,已知人类基因组上的 P450 基因数为 57 个,在其它重要模式生物如结核分枝杆菌、线虫、果蝇 及植物拟南芥中都发现存在不同数量的 P450 基因^[2a,8]. 为了规范越来越多 P450 酶的记录和分类, Nelson等提出 了目前被广泛接受的 P450 酶系统命名法^[9].根据 P450 酶蛋白序列的同源性,序列等同度 > 40%的归为族 (family: 1, 2, 3……);等同度 > 55%的归为亚族 (subfamily: A, B, C……),接着再对亚族中不同的 P450 酶进行编号(1, 2, 3……),如 CYP3A4、CYP152A1等.

由于几乎所有 P450 酶都需要利用氧化还原伴侣蛋白(redox partner protein)从 NAD(P)H 依次传递两个电子到血红素反应中心来激活分子氧以完成催化过程^[2a],根据氧化还原伴侣的不同类型可将 P450 催化系统分为五个主要类型:第一类(Class I)为三组分系统,包括 P450 酶、含铁硫簇(Fe_xS_y)的铁氧化还原蛋白(ferredoxin,缩写为 Fdx)以及含有一分子黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的铁氧化还原蛋白还原酶(ferredoxin reductase,缩写为 FdR),

原核生物与真核生物线粒体的 P450 酶往往属于此类; 第二类(Class II)为双组分系统,多见于真核生物(动植 物及真菌等)来源的 P450 酶,其氧化还原伴侣为同时含 有 FAD 和黄素单核苷酸(FMN)的细胞色素 P450 还原酶 (CPR)^[1a];第三类(Class III)和第四类(Class IV)均为单组 分系统,以来自巨大枯草芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) 的 P450 BM3 为典型代表的 Class III 系统中 P450 结构 域与含 FAD/FMN 的氧化还原伴侣结构域天然融合^[10]; 而 Class IV 系统中 P450 结构域则与含 Fe₂S₂/FMN 的氧 化还原伴侣结构域天然融合.此外,自然界中还存在少 量不需要氧化还原伴侣,直接从 NAD(P)H 获取电子的 P450 酶(Class V),如一氧化氮还原酶 P450 nor 等^[11].值 得一提的是,由于 Class III~V 系统无需独立的氧化还 原伴侣蛋白支撑催化活性,因此均被称为自给自足型 (self-sufficient) P450 酶.

1.2 结构与功能

细胞色素 P450 酶具有一个共同的整体折叠形式和 拓扑结构^[12]. 保守的 P450 结构核心是由三个平行的 α 螺旋结构 D、L、I 以及一个反平行的 α 螺旋结构 E 组成 的四螺旋束^[13](图 1). 绝对保守的半胱氨酸的硫原子与 血红素铁(heme-iron)配位相连,并与相邻的主链酰胺基 团形成两个氢键. 虽然 P450 酶整体折叠形式是高度保 守的,但其"底物识别位点" (substrate recognition sites, SRSs)^[14]的序列和结构多样性足以支撑不同 P450 酶与 结构各异的底物识别/结合^[6]. 一般认为 P450 酶的底物 特异性是由 6 个 SRSs^[14],即 6 个非保守蛋白区域序列所 控制,包括 B'螺旋区域(SRS1)、F 和 G 螺旋的一部分 (SRS2 和 SRS3)、螺旋 I 的一部分(SRS4)、螺旋 K 的 β 发夹区(SRS5)以及 β2 连接区域(SRS6),上述结构区域 在诱导契合机制下与不同底物结合,随后进行催化反 应^[15].

1.3 催化机制

绝大多数的细胞色素 P450 酶具有类似的催化过程, 通过产生高反应活性中间体来催化各种化学反应. 恶臭 假单胞菌(*Pseudomonas putida*)来源的 P450cam^[16]首次 被发现经历连续两个电子还原和存在多个活性中间体, P450 酶的催化循环从 1968 年第一次提出后不断完 善^[6,17], 直至获得如 Scheme 1 所示的经典催化循环模型. P450 酶催化循环始于血红素 Fe^{III} 六配位的静息态(中间 体 A), 底物的结合通过驱离一个配位的水分子来提高 Fe^{III} 的氧化还原电位(中间体 B), 从而启动第一个来自 NAD(P)H 由氧化还原伴侣介导的电子传递, 五配位的 Fe^{III} 被还原为 Fe^{II}(中间体 C), 进而与分子氧结合形成铁 超氧化物络合物[Cys-Fe^{II}-O₂]与[Cys-Fe^{II}-OO]⁻(中间体



图 1 代表性 P450 酶 PikC 的晶体结构(PDB ID:2BVJ)

Figure 1 Crystal structure of the representative P450 enzyme PikC (PDB ID:2BVJ) (a) The crystal structure with secondary structures; (b) the substrate recognition sites, SRS1, SRS2, SRS3, SRS4, SRS5, and SRS6





D和E), 随后催化中心获得第二个电子形成铁过氧中间 化形成铁氢过氧化物[Cys-Fe^{III}-OOH]⁻,即中间体 F2,

接着第二个质子化和 O—O 键的异裂伴随着失去一个水 体[Cys-Fe^{III}-OO]²⁻(中间体 F1),该中间体会被迅速质子 分子获得高铁氧中间体[Cys-Fe^{IV}=O]⁺,即 Compound I, 这个具有极高反应活性的中间体能够夺取底物中临 近 C—H 键的氢原子,产生底物自由基和[Cys-Fe^{IV}-OH],即 Compound II,其中羟基与底物自由基重新结合后形成的羟化产物(中间体 I)从活性位点释放,P450 酶重新恢复至起始静息态,完成整个催化循环.

虽然大多数 P450 酶都需要氧化还原伴侣蛋白将来 自 NAD(P)H 的两个电子传递到血红素铁反应中心激活 氧分子. P450 酶亦可直接利用过氧化氢通过"走捷径" (shunt pathway, Scheme 1)的方式来完成催化反应^[18],即 中间体 **B** 可以跳过电子传递步骤直接与过氧化氢结合 形成中间体 F2. 例如 CYP152 家族成员 P450 OleT_π即 可利用过氧化氢为氧供体和电子供体,高效催化游离脂 肪酸的氧化性脱羧反应^[19].

P450 酶催化反应类型具有高度多样性,其催化机制也不尽相同.例如脱羧反应、醇或醛的氧化反应等的催化机制与羟化反应类似(Scheme 1),由 Compound I 拔取氢原子;然而,也有一些P450 酶并不使用 Compound I 催化反应,例如中间体 F1 或 F2 能够介导环氧化和磺化反应,在一些情况下还可以催化 C—C 键裂解反应^[20]等.此外,中间体E 被认为在P450 酶催化的硝化反应中具有重要作用^[21].

2 细胞色素 P450 酶催化的有机合成反应

细胞色素 P450 酶是自然界催化多能性最高的生物 催化剂,不仅能够催化多种反应类型,而且具有极为宽 泛的底物谱,可以识别芳香族、聚酮类、萜类、肽类、 糖类等诸多结构类型的底物.其催化反应类型包括羟化 反应、环氧化反应、成环反应、偶联反应、碳-碳裂解 反应、官能团迁移反应、消除反应、脱羧反应、脱烷基 化反应、硝化反应、胺化反应、反马氏加成及 Kemp 消 除反应等.

2.1 羟化反应

兼具位点和立体选择性的羟化反应被认为是 P450 酶最为常见且极具工业应用价值的反应,其对复杂底物 的骨架结构没有显著改变,但是对于化合物水溶性及生 物活性的提高具有重要作用^[22].一个应用广泛的案例 是利用 P450 酶选择性羟化维生素 D3 生成 1*a*,25-OH 维 生素 D3,一种治疗骨质疏松和慢性肾功能衰竭的药物. 1*a*,25-OH 维生素 D3 可由胆固醇经过 20 多步化学合成 步骤得到,但整体收率不足 1%^[23].因此,可直接羟化的 P450 酶法转化倍受关注.研究发现在变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*)中异源表达 CYP105A2(又名 P450_{VD25}),可以催化维生素 D3 的 25 位选择性羟化得到 25-OH 维生素 D3^[24];随后,Yasutake等^[25]报道了分离于 自养无枝酸菌(*Pseudonocardia autotrophica*)的 CYP107 家族成员 P450Vdh 能够催化维生素 D3 连续羟化生成为 1a,25-羟基维生素 D3 (Scheme 2).





直链烷烃中亚甲基 C一H 键的高惰性以及缺乏介导 催化作用的官能团使得该类化合物的选择性羟化极具 挑战,使用仿生过渡金属配合物作为催化剂和过氧化物 作为氧化剂对烷烃氧化的选择性控制十分困难;Amold 等^[26]通过定向进化改造 P450 BM3,获得的突变体 BM3 9-10A-A328V 可以催化辛烷选择性羟化生成 S-2-辛醇 (40% ee),总转换数(TTN)可达 2000 (Eq. 1);烷烃在常 温下的选择性氧化具有潜在的工业价值,一直以来, P450 酶虽然被发现可以氧化很多烷烃,但对于如乙烷 甚至甲烷的羟化活性一直未被发现,Wong 等^[27]通过改 造来自于恶臭假单菌的 P450cam 在体外实现了乙烷直 接氧化生成乙醇,为气态烷烃的生物转化提供新思路 (Eq. 2).



烷基酚中烷基侧链的选择性氧化一直都是有机合成中的难题.近期,我们^[28]发现谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)来源的 Class I P450 酶催化系统 CreJEF (CreJ、CreE 和 CreF 分别为 P450 酶、FdR 和 Fdx) 联合磷酸化酶 CreHI 与水解酶 CreD 形成一种独特的生

物氧化系统,通过由 CreHI 介导的磷酸基团的"安装"、 CreJEF 对磷酸化中间体的氧化以及 CreD 对氧化产物磷 酸基团的"卸载",成功实现了一系列对位和间位烷基 酚中烷基侧链的选择性氧化.由于该法与化学氧化中 "保护/氧化/去保护"的策略如出一辙,我们将其命名为 "仿化"(chemonimetic)生物氧化系统(Scheme 3).以对 乙酚和间乙酚为例,上述系统可选择性地生成 S 构型(ee >99%)的苄位羟化产物.



图式 3 细胞色素 P450 酶催化的代表性羟化反应 Scheme 3 Representative hydroxylation reactions catalyzed by P450 enzymes

2.2 环氧化反应

环氧化合物是一类用途广泛的有机合成中间体,在 化工及生物医药领域扮演着重要的角色.目前有机合成 中环氧化反应体系涉及多步保护的化学催化,副产物 多,收率低^[29].碳-碳双键的环氧化反应在天然产物和 药物合成等过程中较为普遍,例如大环内酯类抗肿瘤化 合物埃博霉素 C 和 D 可以被纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)中 P450 EpoK 催化, C(12)=C(13)双键环氧化 生成埃博霉素 A 和 B,活性得到显著提高^[30](Eq. 3).



末端烯烃的不对称环氧化反应在化学催化体系的 建立中多涉及钛-钽酸盐或铁-卟啉络合物等较为复杂 的催化剂,相较简单有效的线性叔胺烯烃的不对称催化 剂尚未出现^[31]; Arnold 等^[32]利用定向进化技术改造细胞 色素 P450 BM3, 以 1-己烯为底物, 获得两个高活性突 变体 SH-44 和 RH-47, 可将一系列末端烯烃(C₅~C₈)转 化为 *R*-或 *S*-环氧化合物(*ee* 值可达 83%), 并具有很高的 环氧化反应选择性(可达 95%) (Eq. 4).



相较于纯粹的羟化和环氧化反应,多功能细胞色素 P450 酶介导的连续羟化或者环氧化的组合式反应也受 到广泛关注^[33].例如,来自稀有放线菌淡灰红小单孢菌 (*Micromonospora griseorubida*)的 P450 单加氧酶 MycG 可以连续羟化和环氧化十六元环大环内酯类抗生素麦 新米星 IV (mycinamicin IV),生成麦新米星 V 和麦新米 星 II; MycG 还可以直接催化麦新米星 IV 的 C(12)= C(13)环氧化生成麦新米星 I^[34](Scheme 4).

2.3 成环反应

成环反应是一类应用范围广泛的有机合成反应,能 显著改变一些化合物如天然产物与合成药物的结构骨 架和活性^[22].成环反应可细分为环化反应、扩环反应和 缩环反应.

2.3.1 环化反应

P450 酶可以通过不同机制催化分子内环化反应. 例如来自 Penicillum aethiopicum 的 P450 酶 VrtK 具有类 似于 II 型萜类环化酶的功能,通过形成关键的碳正离子 中间体以及进一步的电子重排实现萜类侧链环化,从而 建立独特的螺双环系统,实现鲜绿青霉毒素前体 previridicatumtoxin 中的香叶基环化生成鲜绿青霉毒素 (viridicatumtoxin)^[35](Scheme 5). 手性环丙烷作为特殊结 构单元存在于西司他汀、除虫菊酯等多种药物分子中, 一直是有机合成化学中的热点; Arnold 研究组^[36]通过研 究发现 P450BM3 T268A 突变是实现苯乙烯高活性环丙 烷化的关键,进一步优化的突变体 9-10A-TS-F87V-T268A 可以形成 ee 值>90%的非对映异构体,且显示出 对底物的强烈偏好(cis:trans=71:29),是一个有效的 环丙烷化催化剂(TTN=199) (Scheme 5).

2.3.2 扩环反应

扩环反应是比较罕见的 P450 酶催化反应,通常是 底物进入 P450 酶活性口袋经分子内化学键重排形成更 稳定的五元环或六元环结构单元^[2a].例如昆虫病原真菌 *Beauveria bassiana*产生 2-吡啶酮天然产物卵孢白僵菌 素(tenellin)的过程中, P450 酶 TenA 通过 Compound I 夺 取氢原子引发重排导致 pretenellin-A 氧化扩环形成 pretenellin-B^[37](Scheme 6).



图式 4 多功能细胞色素 P450 酶 MycG 催化的羟化及环氧化反应

Scheme 4 Hydroxylation and expoxidation reactions catalyzed by the multifunctional cytochrome P450 enzyme MycG



图式 5 P450 酶介导的环化反应 Scheme 5 Cyclization reactions mediated by P450 enzymes

© 2018 Chinese Chemical Society & SIOC, CAS



pretenellin-B

图式6 P450 酶 TenA 催化的扩环反应

Scheme 6 Ring expansion reaction mediated by P450 enzyme TenA

2.3.3 缩环反应

CYP3A4可以催化2,2,6,6-四甲基哌啶缩环生成2,2-二甲基四氢吡咯; Watanabe 等^[38]发现 P450 酶 FtmG 可以 催化烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)中去甲氧基烟曲霉毒 素 C (demethoxyfumitremorgin C)中六元环缩环为五元 环,形成吲哚类生物碱 spirotryprostatin B 等(Scheme 7).

2.4 芳基偶联反应

芳基偶联反应是有机合成反应中的重要难题之一, 因为需要同时兼顾立体选择性和位点选择性. C—C 键 和 C—O 键的芳基偶联反应较常见于 P450 酶介导的植 物和真菌天然产物(如生物碱)的生物合成反应以及细菌 中抗生素的生物合成过程^[39],包括分子内芳基偶联反 应和分子间芳基偶联反应.

2.4.1 分子内芳基偶联反应

在植物的次级代谢过程中常见到分子内芳基偶联



图式7 P450 酶催化的缩环反应

Scheme 7 Ring contraction reactions mediated by P450 enzymes

反应^[40],例如镇痛剂生物碱吗啡的生物合成就含有一步较为典型的由 P450 酶介导的分子内芳基偶联反应, 来源于罂粟(*Papaver somniferum*)的 CYP719B1 催化 *R*-网脉碱(*R*-reticuline)分子内 C—C 苯基偶联形成沙罗泰 里啶(salutaridine)^[41].另一个可以催化分子内 C—C 苯酚 偶联的是来源于日本柳杉(*C. japonica*)的 CYP80G2,可 将 *S*-网脉碱 (*S*-reticuline)转化为 *S*-紫堇块茎碱 (*S*-corytuberine)^[42](Scheme 8).

2.4.2 分子间芳基偶联反应

Müller 等^[43]报道了真菌可以利用 Class II P450 酶进 行具有区域和立体选择性的酚类化合物分子间偶联,例 如来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)的 P450 酶 KtnC 可在 重组酿酒酵母(*Saceharomyces cerevisiae*)细胞中催化单 体香豆素 7-demethylsiderin 通过具有高区域和立体选择 性的分子间偶联生成二聚体 *P*-orlandin; P450 酶 DesC 也 可以催化 7-demethylsiderin 发生选择性不同的双分子偶 联形成 *M*-desertorin A. 一些植物来源的 P450 酶也可以 催化分子间 C一O 芳基偶联反应,如小檗属植物 (*Berberis stolonifera*)中的 CYP80A1 作为黄芦木碱合成 酶催化 *R*-和 *S-N*-甲基乌药碱(*R/S-N*-methylcoclaurine)的 分子间 C一O 偶联生成双苄基异喹啉类生物碱黄芦木碱 (berbamunine)^[44]等(Scheme 9).

2.5 碳-碳键裂解反应

碳-碳键的断裂反应在有机合成反应中不仅可实现 全新碳骨架的构建,而且能够同时引入两个不同的官能 团. 传统有机合成中通常使用过渡金属作为催化剂帮助 实现碳-碳键的断裂,而 P450 酶可以实现一步断键高效 合成多官能团化合物. 断马钱子苷(secologanin)是单萜 吲哚生物碱如抗肿瘤药物长春花碱(vinblastine)合成的 重要前体,由 CYP72A1 催化长春花(*catharanthusroseus*) 马钱子苷(loganin)中环戊烷的分子内开环反应生成^[45];



图式 9 P450 酶介导的分子间芳基偶联反应 Scheme 9 Intermolecular aryl coupling reactions mediated by P450 enzymes

烟曲霉素(fumagillin)是由烟曲霉(A. fumigatus)产生的高 氧杂萜,具有抑制血管生成的作用,多功能细胞色素 P450 酶 Fma-P450 在其核心骨架的构造中起着关键作 用,尤其是能够催化双环倍半萜 β-反式香柠檬烯 (β-trans-bergamotene)中 C—C 键的氧化裂解^[46] (Scheme 10).

2.6 官能团迁移反应

官能团迁移反应是一种较为快速构建复杂有机分子的有效方法,在有机化学中迁移位点的选择性一直都是研究的热点和难点.在一些植物来源的天然产物如2-羟基异黄酮(2-hydroxyisoflavanone)的生物合成中就涉及到 P450 酶催化的 C—C 键迁移反应.2-羟基异黄酮是主要存在于豆科植物中的一类化学防御剂,来自刺甘草(Glycyrrhiza echinata L.)的 CYP93C2 可以催化 2S-黄烷

酮(2S-flavanone) C(2)位置的酚环重排到C(3)位置,进而 生成2-羟基异黄酮^[47]. 官能团的迁移反应也存在于一些 药物分子的生物合成途径中,如水仙子(*Hyoscyamus nigar*)中的CYP80F1可以催化 *R*-littorine 进行莨菪烷环 的碳骨架重排形成的天仙子胺醛(hyoscyamine aldehyde),是一种治疗眩晕药物 *S*-东莨菪碱(*S*-scopolamine) 的直接前体物质^[48](Scheme 11).

2.7 其它非常规细胞色素 P450 酶催化反应

除了上文提到的催化反应类型,一些非常规的催化反应更加全面地展现了细胞色素 P450 酶多能的一面. P450 酶催化的脱羧反应之前一直被认为只存在于药物 合成和代谢过程中,直到 2011 年来自于咸海鲜球菌 (*Jeotgalicoccus sp.* ATCC 8456)的 P450 过氧化物酶 OleT_{IE}被发现可以催化脂肪酸的氧化性脱羧合成一种十





图式 11 细胞色素 P450 催化底物的官能团迁移 Scheme 11 Examples of group migration reactions mediated by P450 enzymes 分重要的基础化工原料 a 烯烃. 近年来针对该类 P450 脂肪酸脱羧酶的研发为未来生物燃料、合成润滑油、聚 合材料及洗涤剂等化工产品的生物合成开辟了新道 路^[19](Eq. 5).



有机合成中脱烷基化反应很容易伴随副产物的生成,因此专一性强的生物催化剂在脱烷基化应用中具有很大的潜力.对一些生物碱天然产物尤其是三级胺结构的改造经常会用到脱烷基化反应,许多细胞色素 P450 酶可以催化脱烷基化反应,主要包括 *N*-脱烷基化、*O*-脱烷基化和 *S*-脱烷基化.在一些体内由 P450 酶系介导的药物分子代谢中常涉及到 *N*-脱烷基化的作用,如抗抑郁药物丙米嗪(imipraminum)可以被 CYP2C19 与CYP1A2 催化 *N*-脱烷基化代谢为活性物质地昔帕明(desipramine)^[49](Eq. 6)等.



硝基化芳香族化合物是一种重要的化工原料, 被广 泛应用于食品添加剂、高能材料及药品合成中; 但面对 有机合成中的高污染、低产率等问题, 来自链霉菌 (*Streptomyces scabiei*)的细胞色素 P450 酶 TxtE (CYP1048A1)有望为解决这些问题提供新的思路. TxtE 能够通过独特的质子转移途径, 利用 NO、O₂ 及 NADPH 实现特异性催化 *L*-色氨酸吲哚环 C(4)位的硝基化反应, 形成 4-硝基色氨酸^[21,50](Eq. 7).



因含氮官能团在天然产物中较为常见,且在生物医 药领域应用广泛,高选择性的 C—H 键胺化受到广大有 机化学家们的高度关注. C—H 键胺化在有机合成中过 度依赖昂贵的过渡金属,如已报道的钌、铑等作为催化 剂,科学界长时间并未发现有 P450 酶可以直接催化该 类反应的先例. 近期 Amold 等^[51,52]发现 P450 BM3 能够 以较低效率催化烷烃分子内 C—H 键胺化生成苄胺,氨 基化试剂甲苯磺酰亚胺先与亚铁卟啉生成的铁氮化物 中间体,之后类氮化合物插入到烷烃的 C—H 键中进而 形成苄胺产物. 经过在一些位点(如半胱氨酸)进行突变 之后,活性得到大幅提高^[51];进一步以 P450 BM3 为模 板,利用定向进化方法获得了可以高效催化苄位不对称 C—H 键胺化作用的 P450 突变体 P411_{CHA},其总转换数 TON (turnover number)可达 1300^[52](Eq. 8).

$$R \xrightarrow{Me} \frac{TsN_3}{P411_{CHA}} R \xrightarrow{Me} (8)$$

N II. 177

烯烃的反马氏氧化反应一直以来都是有机合成中 的重要难题,它可以简化从烯烃到一些精细化学品和药 物的有机合成路线,对于利用氧气作为末端氧化剂来实 现不对称烯烃的反马氏氧化无疑具有很高的吸引力.来 自红球菌属团聚拉布伦茨氏菌(*Labrenzia aggregata*)的 P450 LA1,在苯乙烯环氧化反应中可以催化产生反马 氏羰基化合物,因此被选作改造烯烃反马氏氧化反应的 起始酶.经过定向进化后得到新型细胞色素 P450 工程 酶 aMOx,可以高效催化烯烃如苯乙烯的不对称反马氏 氧化反应^[53](Eq. 9).

Kemp 消除反应是一类重要的有机合成反应,通常 用来合成一些药物,如异噁唑基药品的中间体,Reetz 等^[54]发现细胞色素 P450 BM3 可以通过 Kemp 消除反应 实现 5-硝基-苯并异噁唑到 2-氰基-4-硝基苯酚的一步转 化. 该发现阐明了一种不同于常规酸碱催化机制的氧化 还原介导新机制,且在抗炎治疗药物来氟米特 (leflunomide)与其代谢产物特立氟胺(teriflunomide)中的 转化中得到验证 (Eq. 10).



硅烷是著名的有机合成中间体,在自然界中含有 C—Si 键或可以形成 C—Si 键的生物分子至今依然未被 发现.受到定向进化蛋白质获得 N—H 和 S—H 键卡宾 插入反应的启发, Amold 等^[55]以苯基二甲基硅烷和 2-重 氮丙酸乙酯为底物对一些血红素蛋白进行筛选,以期获 得 Si—H 键卡宾插入反应活性的"超自然"生物催化剂. 来自海洋红嗜热菌(*Rhodothermus marinus*)的细胞色素 C(以及一些 P450 酶)可以催化该反应, *ee* 值高达 97%; 在定向进化的选择压力下,三突变体 V75T M100D M103E 将反应 *ee* 值提高到 99%, TTN>1500,比传统的 有机合成金属催化剂提高了 15 倍多(Eq. 11).



杂原子氧化也是一类重要的有机合成反应,例如硫 醚(thioether)的氧化可生成具有广谱生物活性的砜类物 质,而且砜类化合物是有机合成中重要的中间体,在生 物医药领域中应用较为广泛.在有机合成中,常利用金 属氧化物、有机氧化剂等实现该类氧化反应,但副产物 较多^[56]. 丛志奇等^[57]近期实现了细胞色素 P450 BM3 过 氧化物酶体系在双功能小分子的协助下催化硫醚专一 性生成亚砜(sulfoxide), TON 达到 3436, *ee* 值 32% (Eq. 12).



上述这些非常规反应的不断发现、挖掘和创造,在 拓展细胞色素 P450 酶可催化反应类型的同时也为合成 化学家及生物化学家们突破各种合成化学难题带来了 新思路.

3 拓宽细胞色素 P450 酶在有机合成反应中应 用的主要策略

细胞色素 P450 酶可以在温和条件下催化众多底物 分子的高选择性氧化反应, 介导的催化反应类型多样, 且一些全新催化活性也在不断被挖掘, 因此有望成为寻 找应对挑战性有机合成反应生物催化剂的新宝库.为了 拓宽 P450 酶在有机合成反应中的应用, 在合成生物学 理念指导下, 蛋白质工程、氧化还原伴侣工程、底物工 程及代谢工程等多种工程化改造手段相继被应用于细 胞色素 P450 酶的改造优化及其化学空间的拓展(图 2).

3.1 蛋白质工程

蛋白质工程是基于蛋白质的折叠原理和分子结构 进行定向改造,从而获得目的特性提升的蛋白质,以弥 补天然蛋白质稳定性差、活性低、选择性差及应用空间 受限等缺陷.定向进化和理性改造是细胞色素 P450 酶 蛋白质工程化改造的主要手段,这两种策略互不排斥, 定向进化不依赖于蛋白质空间结构和功能的解析及其 相互之间的关联,因此适用范围极广,但往往需要对库 容量超大的突变体库进行筛选;理性改造则是建立在较 为清晰的结构、功能以及相关催化机制的基础上进行的 (半)理性修饰,突变体库容量小且相对阳性率高.

3.1.1 定向进化

定向进化(directed evolution)在细胞色素 P450 酶的 蛋白质工程改造中应用广泛,包括基因突变的迭代步 骤、突变体库的表达与筛选等,每轮进化都是在人为施 加的选择压力下进行^[58];从已有的 P450 酶(天然或者改 造过的)出发,引入突变,然后筛选具有活性增强、接受 非天然底物的新型活性、催化模式改变(如高效利用"过 氧化物捷径")、热稳定性提升或对映选择性改变的后 代突变体^[5].易错聚合酶链式反应(error-prone polymerase chain reaction, epPCR)^[59]、饱和突变(saturation mutagenesis)^[60]和 DNA 洗牌(DNA shuffling)^[61]是最为常用 的基因突变技术.产生分子多样性和定向筛选是定向进 化策略中的两个核心环节. 筛选是定向进化的限速瓶 颈, 大量的工作需要建立在高通量培养和分析的基础之 上, Reetz 等发展的迭代饱和突变(Iterative Saturation Mutagenesis, ISM)^[62] 和组合活性位点饱和实验 (Combinatorial Active-Site Saturation Test, CAST)^[63]被广 泛用来建立库容精减的高质量突变体库[64].

来自巨大芽孢杆菌(Bacillus megaterium)的 P450 BM3, 是一个结构已解析的自给自足型细胞色素 P450 酶,其对天然底物的转化数高达17000 min⁻¹,是一个很 好的定向进化亲本酶^[65].对于其热稳定性以及针对特 定底物的位点和立体选择性提升是一直以来的重点关 注对象. 如 Reetz 等发现减小了空间位阻的单突变体 P450 BM3 F87A 可以催化睾酮底物非选择性地产生1: 1 的 2β 和 15β 异构体羟化产物.为了提高选择性,选用 组合位点饱和突变(CAST)技术,基于已报道的 P450 BM3 晶体结构,将选择的 20 个单位点分成 9 个多随机 位点,在第一轮筛选 8700 个突变体后得到了突变体 P450BM3 A330W/F87A, 可选择性地催化产生 97% 的 2β 羟化产物 (Eq. 13); 而突变体 P450 BM3 V78L/A82F/F87A, 能够选择性地催化产生 91%的 15β 羟化产物.为了进一步提高 15β 选择性,又进行了一轮 迭代饱和突变(ISM),得到了高活性的突变体 P450 BM3 R47Y/T49F/V78L/A82M/F87A, 展现出96%的区域选择 性和 100%的非对映立体选择性[66].

Arnold^[53]作为蛋白质定向进化领域的先驱,在过去的几十年里不断拓宽细胞色素 P450 酶的化学反应类型. 例如:新型工程酶 P450 aMOx 可以高效催化烯烃的反马氏氧化,这为一直困扰有机合成界的难题提供了新的解决途径.来自红球菌属团聚拉布伦茨氏菌(*Labrenzia aggregata*)的P450 LA1在苯乙烯环氧化反应中可以产生反马氏羰基化合物,因而被选作改造烯烃反马氏氧化反应的起始酶,在其突变体反应中可以检测到苯乙醛的产生,但伴随着大量的环氧化合物;于是采用定向进化方



testosterone

将苯乙烯生成苯乙醛的反应选择性提升至 81%[53].

 15β -selectivity

 \cap

法提高 P450 LA1 的选择性和反应活性. 在该酶的血红 素位点引入随机突变筛到一个五重突变体,将总转化数 (TTN)提高了 12 倍, 但选择性未有明显改变; 继续对酶 的活性位点和血红素结合位点展开了单点饱和突变,结 合所有有利突变得到突变体细胞色素 P450 aMOx, 成功

近年来对 P450 BM3 的定向进化还不断挖掘出更多 的新型非天然反应, 尤其是一些有机合成化学家已知而 在生物中未曾发现的反应. 例如, 烯烃环丙烷化的催化

活性则是基于细菌 P450 酶的催化特性进行定向进化而

 2β -selectivity

(13)

获得,可用于合成抗抑郁药物左旋体米那普仑 (levomilnacipran)的手性顺式环丙烷前体^[36]; P450 BM3 保守的半胱氨酸被改造后的突变体 P411,通过定向进 化在不断提高活性的同时,发现除了可以催化分子内 C—H 键胺化,还可以催化分子间的氮杂环丙烷化及不 对称硫醚酰亚胺化^[52];除此之外,进化改造后的细胞色 素 P411_{CHA},可以催化苄位不对称 C—H键胺化,解决了 长期以来化学催化方法所面临的难题;近日,又利用定 向进化技术对 P450 基因编码的蛋白质在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)中的功能进行优化,从而获得可以生 产高能量结构双环丁烷的工程菌,为许多有机合成中手 性结构的获得提供了新途径^[67].

上述成功案例证实了定向进化是一种有效的提高 细胞色素 P450 酶催化活性、区域及立体选择性或获得 全新催化反应类型,进而拓宽了 P450 酶在有机合成反 应中应用范围的有效策略.

3.1.2 理性设计

定向进化在获得催化新活性、提高催化选择性时常 伴随着低酶活及较弱的稳定性,往往需要大量突变体的 进一步筛选;相比之下,结合理性设计(rational design) 的饱和突变可以产生较小却有效的突变体库^[68].由于 细胞色素 P450 酶结构与功能之间的关联不是十分清晰, 因此结合定向进化与理性改造进行半理性突变是进一 步提高酶活和选择性的常见策略.

基于 P450 酶的结构信息,改造主要针对与底物直 接作用或活性位点附近的氨基酸残基,进行特定的单饱 和突变或组合饱和突变经常是行之有效的方法.例如基 于对己知的 29 个细胞色素 P450 酶的晶体结构与 6379 个 P450 酶序列的系统计算分析,发现靠近血红素中心 的两个疏水性氨基酸最有可能在发生反应时与底物接 触;在 P450 BM3 中这两个氨基酸对应的是残基 F87 和 A328,随后将这两个位点突变为非极性氨基酸(A、V、F、L和I),获得只有24个突变体的库,发现其中一些突变体可以改变或提高各种线性萜烯、环状单萜和环倍半萜的氧化活性;突变体A328V相较于野生型,催化环辛烷的羟化活性提高了近100倍^[69].而在一些定向进化获得的新型催化活性突变体后,往往会对个别位点进行理性改造,如在前文提到的反马氏加成催化反应中,对于定向进化筛选到的突变体进行了活性位点和血红素结合位点的单点饱和突变,较快获得了活性更高的突变体酶P450 aMOx^[53].

理性设计也可用于对催化选择性进行改造,如对细胞色素 P450 酶 PikC 与底物那波霉素(narbomycin)和 YC-17 共晶获得的结构数据进行分析,认为有三个氨基酸位点(D50、E85 及 E94)对于酶的底物结合和催化活性可能具有重要作用,将这三个酸性氨基酸位点定点突变为非极性的丙氨酸(A)或天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q),发现催化活性相较于野生型都有明显的提高;在对 YC-17 的羟化反应中,不同于野生型产生等量产物新酒霉素(neomethymycin)和酒霉素(methymycin),活性显著提高的突变体 PikC D50N 的主要产物为新酒霉素(neomethymycin)(Scheme 12)^[70].

综上所述,理性设计是改变 P450 酶催化活性和选择性的有效策略,虽然 P450 酶的晶体结构能够提供一些有益信息,但复杂的底物与残基之间的互作关系需要进一步结合一些其它分析技术,如分子动力学模拟(molecular dynamic simulations)和底物对接(substrate docking)来提高预测的准确性^[1a,71];在有机合成反应的应用中,理性设计相较于设计全新催化活性而言更适合对定向进化之后的突变体进行一些调整优化,以获得更稳定或者活性/选择性更高的突变体酶.



图式 12 经蛋白质工程改造的 P450 酶催化的代表性反应 Scheme 12 Representative reactions catalyzed by engineered P450 enzymes

3.2 氧化还原伴侣工程

氧化还原伴侣蛋白(redox partner)涉及电子传递过 程,在大多数P450酶催化反应中不可或缺.目前大量的 P450 催化系统的体外重建受限于无法获得自体氧化还 原伴侣或者异源替代氧化还原伴侣来支持其催化活性, 因此拓宽细胞色素 P450 酶的应用还需对氧化还原伴侣 蛋白的选择以及相互作用进行优化,从而达到重建活 性、提高活性以及改变反应类型的目的.

由于天然氧化还原伴侣处于未知状态,一些较为常 用的非天然氧化还原伴侣如菠菜(Spinach oleracea)中的 铁氧化还原蛋白/铁氧化还原蛋白还原酶(ferredoxin/ ferredoxin reductase, Fdx/FdR)^[72]、来源于恶臭假单胞菌 (Pseudomonas putida)的假单孢铁氧化还原蛋白/假单孢 铁氧化还原蛋白还原酶(putidaredoxin/putidaredoxin reductase, Pdx/PdR)^[73]以及牛(bovine)的肾上腺皮质铁氧 化还原蛋白/肾上腺皮质铁氧化还原蛋白还原酶 (adrenodoxin/adrenodoxin reductase, Adx/AdR)^[74]等常被 用作替代氧化还原伴侣帮助一些 P450 酶重建体外活性. 不同氧化还原伴侣的选择, 会对 P450 酶的催化活性产 生不同程度的影响,如Bureik等^[75]利用不同来源的氧化 还原伴侣与人线粒体细胞色素 P450 酶在裂殖酵母 (Schizosaccharomyces pombe)中进行共表达时,发现这 28 株重组裂殖酵母在进行全细胞催化类固醇激素的氧 化反应时,不同来源的氧化还原伴侣不仅会影响 P450 酶的催化效率,而且使产物的构型发生改变;我们^[76]在 利用来源于细菌和蓝藻的不同氧化还原伴侣在体外重 建 CYP-sb21 对环孢菌素 A (cyclosporine A)的选择性羟 化活性时发现,来源于细长聚球藻(Synechococcus elongates PCC7942)的氧化还原伴侣 SeFdx/SeFdR 具有 最高的 P450 支撑活性.

选择不同来源的氧化还原伴侣会对 P450 酶的催化 效率和产物分布产生较大影响,而近期我们发现氧化还 原伴侣的选择及其与 P450 酶的相互作用方式还会导致 反应类型的改变甚至产生全新产物.具体而言,我们在 对来自稀有放线菌浅灰红小单孢菌(*Micromonospora griseorubida*)的大环内酯类抗生素麦新米星 (mycinamicins)生物合成途径中的 P450 酶 MycG 进行研 究时发现, MycG 与异源氧化还原伴侣蛋白 RhFRED 处 于分离或融合状态时,以完全不同的方式对麦新米星进 行结构修饰;处于分离状态时,相较于融合状态可以进 行常规的羟化和环氧化反应外(图4c),还可以针对不同 的麦新米星底物催化全新的 *N*-脱甲基反应^[77],揭示了 一种通过改变 P450 酶与氧化还原伴侣蛋白的作用方式 来衍生出新结构"天然产物"的全新策略.

3.3 代谢工程

代谢工程与合成生物学的发展也为细胞色素 P450 酶在有机合成中应用的不断开拓提供了新思路和新途 径.代谢工程(metabolic engineering)能够将不同宿主来 源的酶分子在细胞内进行组合构建全新的代谢途径,可 以更加简便地实现天然产物、化学中间体、生物燃料等 的合成;如利用微生物合成生物液体燃料,刘奕等^[78]通 过将 P450 脂肪酸脱羧酶 OleT_{IE} 引入大肠杆菌高产脂肪 酸系统,优化氧化还原伴侣体系,理性提高脂肪烃的产 量,使α烯烃的总产量达到 97.6 mg/L.

一些高附加值的精细化学品和药物往往是天然代 谢途径所不能合成的,合成生物学(synthetic biology)的 发展,能够为突破上述瓶颈提供新思路,即利用人工合 成的新催化元件构建新的生物系统,从而提高代谢途径 的可能性与可控性.如抗疟疾药物青蒿素(artemisinin) 的生产,Keasling 等^[79]设计了一条在大肠杆菌以及酿酒 酵母中都不存在的合成青蒿素前体青蒿酸(artemisininc acid)的全新合成途径,将来自植物黄花蒿(*Artemisia annua*)、大肠杆菌以及酵母中的多种基因实现精确的组 装和调控,优化关键基因的表达,削弱前体物质酵母中 焦磷酸法尼酯(FPP)的支路途径,表达来自黄花蒿的 P450 酶 CYP71AV1,成功构建了青蒿酸产量达到 2.5 g/L 的工程菌株,并实现了工业化生产.

细胞色素 P450 酶在比较大规模的反应体系中,因 酶的不稳定性导致催化活性不高,在应用中会受到限 制. 全细胞催化(whole-cell biotransformation)的应用可 以解决这一问题. 全细胞催化可在两相体系(水-有机溶 剂体系)中进行,从而很大程度上解决由于大多数 P450 酶的底物或产物疏水性高以及酶不耐受有机溶剂的问 题;如在利用重组大肠杆菌 BL21(DE3)菌株过表达突变 体 P450 BM3 V26T /R7F/A7G/F8V/L188K 将双环单萜α-蒎烯(α-pinene)氧化为马鞭草烯醇(verbenol)时,选择邻 苯二甲酸二异壬酯(Diisononyl phthalate)作为一种生物 相容性有机载体溶剂,能削弱 α-蒎烯引起的毒性效应, 同时有效地提取产物,使生物反应体系放大^[80].此外, 大肠杆菌作为应用最为广泛的宿主细胞,常用来构建生 物催化系统,如 Sohng 等^[81]将来自链霉菌 Streptomyces peuceticus 的 CYP107P3 与来自恶臭假单胞菌 (Pseudomonas putida)的氧化还原伴侣Pdx和PdR在大肠 杆菌中共表达,可以实现催化 7-乙氧基香豆素 (7-ethoxycumarin)的 O-脱烷基化生成 7-羟基香豆素 (7-hydroxycumarin).

3.4 底物工程

底物工程(substrate engineering)作为一种有效策略 越来越多地应用于拓宽细胞色素 P450 酶的底物谱,即

根据酶与底物分子结构之间的关系,设计特殊结构的分子基团协助非天然底物进入活性位点,实现催化反应. 例如:利用 P450 酶 PikC 在催化反应中对去氧糖胺 (desosamine)依赖的特性,利用该分子协助多种类型的 非天然工程化底物实现了具有高选择性的碳氢键氧 化^[82];在 P450 PikC 与底物 YC17 或 narbomycin 共晶结 构基础上, Sherman 等^[83]依据 PikC 催化过程中形成锚 定盐桥的特点,设计一组带有二甲氨基锚定基团的薄荷 醇(menthol)衍生物,成功实现 PikC 对非天然底物薄荷 醇的选择性羟化.

近日,基于过氧化物酶(peroxidase)与过加氧酶 (peroxygenase)在活性中心具有保守的酸碱性氨基酸残 基的特性,丛志奇等^[57]设计了一类双功能小分子,一端 带有"咪唑基团"作为催化基团活化过氧化氢,另外一 端则带有起特异识别作用的"酰基氨基酸"将小分子固 定到活性口袋,模拟天然过加氧酶的催化机制,将 P450 BM3 改造为可以利用 H₂O₂的过加氧酶,可在简化氧化 还原伴侣蛋白传递电子复杂途径的同时进一步提高对 烯烃的环氧化以及苄基型羟化等多个反应的催化活性. 综上,根据细胞色素 P450 酶特异性识别一些小分子基 团的特性,可以通过结合化学或生物合成将小分子锚定 基团连接到目标底物,进而实现 P450 酶对非天然目标 底物的选择性氧化.

4 总结与展望

现代有机合成化学要求催化反应必须具有高反应 效率和高选择性, 酶催化方法被认为能够与传统的有机 合成方法相互补充, 来弥补有机合成方法目前存在的一 些不足. 细胞色素 P450 酶能在室温, 中性条件下, 以及 底物官能团非保护情况下进行反应, 具有高效性、高选 择性和反应温和性等特点; 这在一定程度上可减少高温 高压带来的如分解、重排等副反应, 同时酶的可降解性 也可避免传统有机化学合成中重金属催化剂对环境造 成的压力. P450 酶的手性催化性质能够加速立体和区域 化学反应产物的形成, 某些酶的反应速度亦是化学催化 剂所望尘莫及的.

细胞色素 P450 酶的魅力在于超乎人们想象力的催 化反应类型多样性、立体结构专一性和底物结构多样性, 这是其它家族酶蛋白所无法比拟的,因而极大丰富了有 机化学家及生物化学家们理性设计复杂有机化合物半 合成或全合成的工具箱.与此同时,P450 酶催化机制的 解析为"仿生"催化、新型化学催化剂的理性设计也提 供了重要借鉴.合成生物学和多门类生物工程学的发展 为 P450 酶在有机合成反应中的应用提供了更广阔的空 间.随着未来对血红素中心、活性位点以及配体的深入 研究, 必将促进 P450 酶的催化效率提升、稳定性改善以 及底物谱和反应类型的拓展.如 Hartwig 等^[84]尝试利用 不同的金属卟啉 IX(M-PIX)替代天然 P450 酶中铁卟啉 IX(Fe-PIX), 获得的 Ir-PIX 在芳香烯烃加成等反应中具 有很好的催化活性,并且展现出全新的催化功能, 开启 了人工改造天然酶的新思路.基于 P450 酶的催化特点 与传统有机化学反应相结合,可以衍生出极为有效的化 学酶法(chemoenzymatic method)来合成药物分子及许多 重要的化工产品,如 2013 年 Sherman 等^[85]利用有机化 学合成结合 P450 PikC 的生物催化, 成功实现了十二元 环及十四元环大环内酯苦霉素(pikomycin)与酒霉素 (methymycin)的全合成.

未来在 P450 酶辅助有机合成以及合成生物学领域, 基于自动化高通量筛选技术的快速发展,可以通过定向 进化改造具有天然融合氧化还原伴侣和超高催化活性 的 P450 BM3 或催化机制理解透彻的 P450cam,实现对 更多精细化学品和药物的高位点选择性和对映选择性 的调控.此外,还可利用 P450 过氧化物酶(如 CYP152 亚族)来简化繁琐、限速的电子传递过程,实现 P450 酶 在有机合成反应中更加广泛的应用;对于反应过程中高 浓度过氧化氢导致酶失活的问题可以通过光系统等原 位再生过氧化氢技术^[86]实现 H₂O₂ 浓度的精确调控.

本文基于对细胞色素 P450 酶丰富多样的催化反应 类型及其在精细化学品、药物中间体或药物以及生物燃 料等合成反应中的应用,展现了它们卓著的催化多能 性.然而,必须承认的是天然来源的大多数 P450 酶的催 化效率仍然难以达到工业应用要求,对于其它 P450 酶 的改造应用还需考虑到解偶联问题、氧化还原伴侣的优 化以及酶稳定性的提高等因素.由于异源表达的限制, 对于植物和真菌来源 P450 酶的催化功能挖掘仍有待进 一步提高.随着蛋白质工程、底物工程、代谢工程与合 成生物学的快速发展,研究人员可以不断去拓宽细胞色 素 P450 酶介导的全新有机合成反应,根据生产需要理 性设计稳定、高效、高选择性的 P450 工程酶,通过生物 催化与合成化学融合造福人类.

作者简介



蒋媛媛, 2012 年至 2016 年就读于南昌大学食品学院, 获得学士学位, 同年进入中国科学院青岛生物能源

与过程研究所攻读微生物学博士学位,导师为李盛英研究员.主要研究方向为细胞色素 P450 酶的生物工程改造等.



李盛英,中国科学院青岛生物能源与过程研究所研 究员,博士生导师,现任山东省合成生物学重点实验室 主任.主要研究方向包括:微生物次级代谢产物(如:生 物燃料、抗生素等)的生物合成;细胞色素 P450 酶的酶 学与酶工程研究以及工业微生物菌株遗传改造等.

References

- (a) Urlacher, V. B.; Girhard, M. *Trends Biotechnol.* 2012, *30*, 26.
 (b) Keasling, J. D.; Mendoza, A.; Baran, P. S. *Nature* 2012, *492*, 188.
- [2] Guengerich, F. P. Chem. Res. Toxicol. 2001, 14, 611.
- [3] Sakaki, T. Biol. Pharm. Bull. 2012, 35, 844.
- [4] Mcintosh, J. A.; Farwell, C. C.; Arnold, F. H. Curr. Opin. Chem. Biol. 2014, 19, 126.
- [5] Arnold, F. H. Angew. Chem., Int. Ed. 2017. 56, 4143.
- [6] Denisov, I. G.; Maris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. Chem. Rev. 2005, 105, 2253.
- [7] (a) Lu, A. Y.; Coon, M. J. J. Biol. Chem. 1968, 243, 1331.
 (b) Hildebrandt, A.; Remmer, H.; Estabrook, R. W. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968, 30, 607.
- [8] Li, Z.; Zhang, W.; Li, S. Y. Acta Microbiol. Sin. 2016, 56, 496 (in Chinese).

(李众,张伟,李盛英,微生物学报,2016,56,496.)

- [9] Nebert, D. W.; Adesnik, M.; Coon, M. J.; Estabrook, R. W.; Gonzalez, F. J.; Guengerich, F. P.; Gunsalus, I. C.; Johnson, E. F.; Kemper, B.; Levin, W. DNA 1987, 6, 1.
- [10] Ruettinger, R. T.; Fulco, A. J. J. Biol. Chem. 1981, 256, 5728.
- [11] Daiber, A.; Shoun, H.; Ullrich, V. J. Inorg. Biochem. 2005, 99, 185.
 [12] Hasemann, C. A.; Kurumbail, R. G.; Boddupalli, S. S.; Peterson, J.
- A.; Deisenhofer, J. Structure 1995, 3, 41.
 [13] Presnell, S. R.; Cohen, F. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1989, 86, 6592.
- [14] Gotoh, O. J. Biol. Chem. 1992, 267, 83.
- [15] Pylypenko, O.; Schlichting, I. Annu. Rev. Biochem. 2004, 73, 991.
- [16] (a) Conrad, H. E.; Lieb, K.; Gunsalus, I. C. J. Biol. Chem. 1965, 240, 4029.
- (b) Katagiri, M.; Ganguli, B. N.; Gunsalus, I. C. J. Biol. Chem. 1968, 243, 3543.
- [17] (a) Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, R. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Sligar, S. G. *Science* 2000, 287, 1615.
 (b) Groves, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 3569.
 (c) Shaik, S.; Cohen, S.; Wang, Y.; Chen, H.; Kumar, D.; Thiel, W. *Chem. Rev.* 2010, 110, 949.
 (d) Grangerick E. P. *J. Psych. art. Math. Twistel* 2007, 24, 162.
 - (d) Guengerich, F. P. J. Biochem. Mol. Toxicol. 2007, 21, 163.
- [18] Montellano, P. O. D. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 4th ed., Springer International Publishing, Switzerland, 2015, p. 1.
- [19] Rude, M. A.; Baron, T. S.; Brubaker, S.; Alibhai, M.; Cardayre, S. B. D.; Schirmer, A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1718.

- [20] (a) Cryle, M. J.; De Voss, J. J. Angew. Chem., Int. Ed. 2006, 45, 8221.
- (b) Jin, S.; Makris, T. M.; Bryson, T. A.; Sligar, S. G.; Dawson, J. H. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 3406.
- [21] Barry, S. M.; Kers, J. A.; Johnson, E. G.; Song, L.; Aston, P. R.; Bhumit, P.; Krasnoff, S. B.; Crane, B. R.; Gibson, D. M.; Rosemary, L. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 814.
- [22] Zhang, X.; Li, S. Nat. Prod. Rep. 2017, 34, 1061.
- [23] Zhu, G. D.; Okamura, W. H. Chem. Rev. 1995, 95, 1877.
- [24] Kawauchi, H.; Sasaki, J.; Adachi, T.; Hanada, K.; Beppu, T.; Horinouchi, S. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, *1219*, 179.
- [25] Yasutake, Y.; Fujii, Y.; Cheon, W. K.; Arisawa, A.; Tamura, T. Acta Crystallogr. 2009, 65, 372.
- [26] Peters, M. W.; Meinhold, P.; Glieder, A.; Arnold, F. H. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 13442.
- [27] Xu, F.; Bell, S. G.; Lednik, J.; Insley, A.; Rao, Z.; Wong, L. L. Angew. Chem., Int. Ed. 2005, 117, 4097.
- [28] Du, L.; Dong, S.; Zhang, X.; Jiang, C.; Chen, J.; Yao, L.; Wang, X.; Wan, X.; Liu, X.; Wang, X.; Huang, S.; Cui, Q.; Feng, Y.; Liu, S.; Li, S. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2017, 114, E5129.
- [29] Woodley, J. M. Trends Biotechnol. 2008, 26, 321.
- [30] Ogura, H.; Nishida, C. R.; Hoch, U. R.; Perera, R.; Dawson, J. H.; Pr, O. D. M. *Biochemistry* 2004, 43, 14712.
- [31] (a) Katsuki, T.; Sharpless, K. B. J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 5974.
- (b) Islam, S. M.; Roy, A. S.; Mondal, P.; Mobarok, M.; Roy, B.; Salam, N.; Paul, S.; Mondal, S. *Monatsh. Chem.* **2012**, *143*, 815.
- [32] Kubo, T.; Peters, M. W.; Meinhold, P.; Arnold, F. H. Chemistry 2006, 12, 1216.
- [33] (a) Podust, L. M.; Sherman, D. H. *Nat. Prod. Rep.* 2012, 29, 1251.
 (b) Li, S.; Tietz, D. R.; Rutaganira, F. U.; Kells, P. M.; Anzai, Y.; Kato, F.; Pochapsky, T. C.; Sherman, D. H.; Podust, L. M. J. Biol. Chem. 2012, 287, 37880.
- [34] Anzai, Y.; Li, S.; Chaulagain, M. R.; Kinoshita, K.; Kato, F.; Montgomery, J.; Sherman, D. H. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 950.
- [35] Chooi, Y. H.; Hong, Y. J.; Cacho, R. A.; Tantillo, D. J.; Tang, Y. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 16805.
- [36] Coelho, P. S.; Brustad, E. M.; Kannan, A.; Arnold, F. H. Science 2013, 339, 307.
- [37] Halo, L. M.; Heneghan, M. N.; Yakasai, A. A.; Song, Z.; Williams, K.; Bailey, A. M.; Cox, R. J.; Lazarus, C. M.; Simpson, T. J. J. Am. *Chem. Soc.* 2008, 130, 17988.
- [38] Tsunematsu, Y.; Ishikawa, N.; Wakana, D.; Goda, Y.; Noguchi, H.; Moriya, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. *Nat. Chem. Biol.* 2013, 9, 818.
- [39] Guengerich, F. P.; Munro, A. W. J. Biol. Chem. 2013, 288, 17065.
- [40] Mizutani, M.; Sato, F. Arch. Biochem. Biophys. 2011, 507, 194.
- [41] Gesell, A.; Rolf, M.; Ziegler, J.; Díaz Chávez, M. L.; Huang, F. C.; Kutchan, T. M. J. Biol. Chem. 2009, 284, 24432.
- [42] Ikezawa, N.; Iwasa, K.; Sato, F. J. Biol. Chem. 2008, 283, 8810.
- [43] Mazzaferro, L. S.; Hüttel, W.; Fries, A.; Müller, M. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 12289.
- [44] Kraus, P. F.; Kutchan, T. M. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995, 92, 2071.
- [45] Irmler, S.; Schroder, G.-P. B.; Crouch, N. P.; Hotze, M.; Schmidt, J. *Plant J.* 2000, 24, 797.
- [46] Lin, H. C.; Chooi, Y. H.; Dhingra, S.; Xu, W.; Calvo, A. M.; Tang, Y. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 4616.
- [47] Akashi, T.; Aoki, T.; Ayabe, S. FEBS Lett. 1998, 431, 287.
- [48] Li, R.; Reed, D. W.; Liu, E.; Nowak, J.; Pelcher, L. E.; Page, J. E.; Covello, P. S. Chem. Biol. 2006, 13, 513.
- [49] (a) Brosen, K. Drug Metabol. Pers. Ther. 2015, 30, 147.
 (b) Morinobu, S.; Tanaka, T.; Kawakatsu, S.; Totsuka, S.; Koyama, E.; Chiba, K.; Ishizaki, T.; Kubota, T. Psychiatry Clin. Neurosci. 1997, 51, 253.
- [50] Yu, F.; Li, M.; Xu, C.; Wang, Z.; Zhou, H.; Yang, M.; Chen, Y.; Tang, L.; He, J. *PloS One* **2013**, *8*, e81526.
- [51] Prier, C. K.; Zhang, R. K.; Buller, A. R.; Brinkmannchen, S.; Arnold, F. H. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 629.

2322 http://sioc-journal.cn/

- [52] Mcintosh, J. A.; Coelho, P. S.; Farwell, C. C.; Wang, Z. J.; Lewis, J. C.; Brown, T. R.; Arnold, F. H. Angew. Chem., Int. Ed. 2013, 52, 9309.
- [53] Hammer, S. C.; Kubik, G.; Watkins, E.; Huang, S.; Minges, H.; Arnold, F. H. *Science* 2017, 358, 215.
- [54] Li, A.; Wang, B.; Ilie, A.; Dubey, K. D.; Bange, G.; Korendovych, I.
 V.; Shaik, S.; Reetz, M. T. *Nat. Commun.* 2017, *8*, 14876.
- [55] Kan, S. B.; Lewis, R. D.; Chen, K.; Arnold, F. H. Science 2016, 354, 1048.
- [56] (a) Mcreynolds, M. D.; Dougherty, J. M.; Hanson, P. R. Chem. Rev. 2004, 35, 2239.

(b) Feng, M.; Tang, B.; Liang, S. H.; Jiang, X. Curr. Top. Med. Chem. 2016, 16, 1200.

- [57] Ma, N.; Chen, Z.; Chen, J.; Chen, J.; Wang, C.; Zhou, H.; Yao, L.; Shoji, O.; Watanabe, Y.; Cong, Z. Angew. Chem., Int. Ed. 2018, 57, 7628.
- [58] Bornscheuer, U. T. Angew. Chem., Int. Ed. 1998, 37, 65.
- [59] Yang, J.; Ruff, A. J.; Arlt, M.; Schwaneberg, U. Biotechnol. Bioeng. 2017, 114, 1921.
- [60] Georgescu, R.; Bandara, G; Sun, L. Methods Mol. Biol. 2003, 231, 75.
- [61] Crameri, A.; Raillard, S. A.; Bermudez, E.; Stemmer, W. P. Nature 1998, 391, 288.
- [62] Reetz, M. T.; Carballeira, J. D. Nat. Protoc. 2007, 2, 891.
- [63] Reetz, M. T.; Bocola, M.; Carballeira, J. D.; Zha, D.; Vogel, A. Angew. Chem., Int. Ed. 2010, 117, 4264.
- [64] Roiban, G. D.; Reetz, M. T. Chem. Commun. 2015, 51, 2208.
- [65] Warman, A. J.; Roitel, O.; Neeli, R.; Girvan, H. M.; Seward, H. E.; Murray, S. A.; Mclean, K. J.; Joyce, M. G.; Toogood, H.; Holt, R. A. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 747.
- [66] Kille, S.; Zilly, F. E.; Acevedo, J. P.; Reetz, M. T. Nat. Chem. 2011, 3, 738.
- [67] Chen, K.; Huang, X.; Kan, S.; Zhang, R. K.; Arnold, F. H. Science 2018, 360, 71.
- [68] Wong, L. L.; Whitehouse, C. J. C.; Yang, W.; Yorke, J. A.; Blanford, C. F.; Bell, S. G.; Bartlam, M.; Rao, Z. Drug Metab. Rev. 2010, 11, 2549.
- [69] Seifert, A.; Vomund, S.; Grohmann, K.; Kriening, S.; Urlacher, V. B.; Laschat, S.; Pleiss, J. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1426.
- [70] Sherman, D. H.; Li, S.; Yermalitskaya, L. V.; Kim, Y.; Smith, J. A.; Waterman, M. R.; Podust, L. M. J. Biol. Chem. 2006, 281, 26289.
- [71] Vermeulen, N. P. E.; Graaf, C. D.; Stjernschantz, E.; Feenstra, A.; Oostenbrink, B. C. International Society for the Study of Xenobiot-

ics Meeting, Sendai, Japan, 2007, pp. 223~232.

- [72] Morigasaki, S.; Takata, K.; Sanada, Y.; Wada, K.; Yee, B. C.; Shin, S.; Buchanan, B. B. Arch. Biochem. Biophys. 1990, 283, 75.
- [73] Sibbesen, O.; De Voss, J. J.; Montellano, P. R. J. Biol. Chem. 1996, 271, 22462.
- [74] Lambeth, J. D.; Seybert, D. W.; Kamin, H. J. Biol. Chem. 1980, 255, 4667.
- [75] Neunzig, I.; Widjaja, M.; Peters, F. T.; Maurer, H. H.; Hehn, A.; Bourgaud, F.; Bureik, M. Appl. Biochem. Biotechnol. 2013, 170, 1751.
- [76] Ma, L.; Du, L.; Chen, H.; Sun, Y.; Huang, S.; Zheng, X.; Kim, E. S.; Li, S. Appl. Environ. Microbiol. 2015, 81, 6268.
- [77] Zhang, W.; Liu, Y.; Yan, J.; Cao, S.; Bai, F.; Yang, Y.; Huang, S.; Yao, L.; Anzai, Y.; Kato, F.; Podust, L. M.; Sherman, D. H.; Li, S. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 3640.
- [78] Liu, Y.; Wang, C.; Yan, J.; Zhang, W.; Guan, W.; Lu, X.; Li, S. Biotechnol. Biofuels 2014, 256, 130.
- [79] Ro, D. K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J. *Nature* **2006**, *440*, 940.
- [80] (a) Chefson, A.; Auclair, K. *Mol. BioSyst.* 2006, *2*, 462.
 (b) Schewe, H.; Holtmann, D.; Schrader, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, *83*, 849.
- [81] Shrestha, P.; Oh, T. J.; Sohng, J. K. Biotechnol. Lett. 2008, 30, 1101.
- [82] Li, S.; Chaulagain, M. R.; Knauff, A. R.; Podust, L. M.; Montgomery, J.; Sherman, D. H. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009, 106, 18463.
- [83] Narayan, A. R.; Jiménez-Osés, G.; Liu, P; Negretti, S.; Zhao, W; Gilbert, M. M.; Ramabhadran, R. O.; Yang, Y. F.; Furan, L. R.; Li, Z.; Podust, L. M.; Montgomery, J.; Houk, K. N.; Sherman, D. H. *Nat. Chem.* 2015, 7, 653.
- [84] Key, H. M.; Dydio, P.; Clark, D. S.; Hartwig, J. F. Nature 2016, 534, 534.
- [85] Hansen, D. A.; Rath, C. M.; Eisman, E. B.; Narayan, A. R.; Kittendorf, J. D.; Mortison, J. D.; Yoon, Y. J.; Sherman, D. H. J. Am. *Chem. Soc.* 2013, 135, 11232.
- [86] (a) Perez, D. I.; Grau, M. M.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. *Chem. Commun.* 2010, *41*, 6848.
 (b) Girhard, M.; Kunigk, E.; Tihovsky, S.; Shumyantseva, V. V.; Urlacher, V. B. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2013, *60*, 111.
 (c) Paul, C. E.; Churakova, E.; Maurits, E.; Girhard, M.; Urlacher, V. B.; Hollmann, F. *Biorg. Med. Chem.* 2014, *22*, 5692.

(Zhao, C.)