

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-053

还原伴侣对细胞色素 P450 酶 MycG 功能调控的研究

杨超凡, 姜玉超, 桑茉莉, 李盛英, 张伟

(山东大学微生物技术研究院, 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 细胞色素 P450 酶负责催化许多天然产物生物合成过程中的关键反应, 是自然界中最具催化多样性的生物催化剂。还原伴侣蛋白对 P450 催化功能至关重要, 在进化过程中两者之间通过融合或分离方式演化出多种不同的催化系统。还原伴侣与 P450 酶的适配性往往是造成 P450 酶功能重建失败或低效的关键因素, 也能够影响和改变 P450 酶的催化功能和性质。不同还原伴侣与 P450 酶的组合与互作如何影响 P450 酶的催化功能、催化效率和产物分布是值得深入探究的科学问题。本研究以还原伴侣蛋白 RhFRED 和 P450 酶 MycG 为研究对象, 通过构建不同的融合和分离蛋白组合, 系统研究了还原伴侣与 P450 酶的适配和相互作用模式对 P450 酶催化功能的影响。将 RhFRED 两个结构功能域拆解为两个独立蛋白 FMN 和 Fe_2S_2 , 与 P450 酶 MycG 三者之间利用还原伴侣工程构建分离或融合型蛋白, 通过体外生化反应探究不同组合方式下 MycG 对底物麦新米星 M-IV 催化功能以及电子传递效率的影响。在构建的 20 个还原伴侣与 P450 酶的“非天然”催化组合中, 16 个组合能够成功重建 MycG 的催化功能, 其中 12 个组合中 MycG 能够催化产生 3 种氧化产物麦新米星 M-I、M-II 和 M-V 以及 1 种脱甲基产物 dMe-M-IV; 4 个组合仅产生氧化产物 M-I、M-II 和 M-V; 剩余 4 个组合未检测到任何反应产物。通过模拟自然进化, 系统研究了还原伴侣与 P450 酶构成的 3 种不同催化系统 (单、双、三组分) 以及单组分和双组分系统中不同的蛋白组织形式对 MycG 催化功能和性质的影响, 结果表明不同还原伴侣系统和组合/组织方式能够通过蛋白-蛋白相互作用显著影响 P450 的催化功能、催化效率和催化性质。

关键词: 细胞色素 P450 酶; 还原伴侣; MycG; RhFRED; 还原伴侣工程

中图分类号: Q936 **文献标志码:** A

Studies on the functional modulating effect of redox partners on the cytochrome P450 enzyme MycG

YANG Chaofan, JIANG Yuchao, SANG Moli, LI Shengying, ZHANG Wei

(Microbial Technology Institute, State key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China)

Abstract: Cytochrome P450 enzymes, which are widely involved in the key biosynthetic steps of many natural

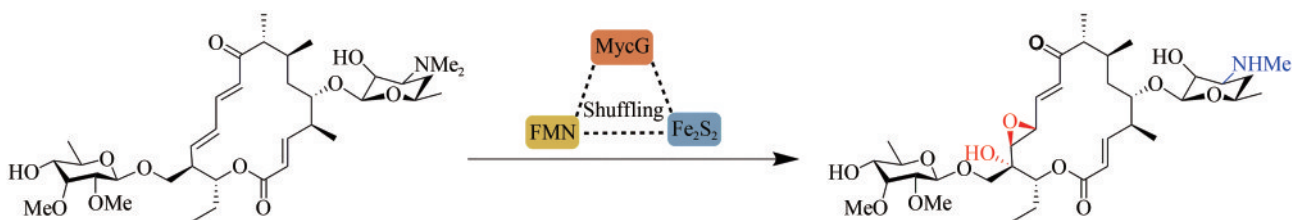
收稿日期: 2021-04-30 修回日期: 2021-06-08

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0905700, 2019YFA0905100); 国家自然科学基金 (82022066, 32000039)

引用本文: 杨超凡, 姜玉超, 桑茉莉, 李盛英, 张伟. 还原伴侣对细胞色素 P450 酶 MycG 功能调控的研究[J]. 合成生物学, 2022, 3(3): 587-601

Citation: YANG Chaofan, JIANG Yuchao, SANG Moli, LI Shengying, ZHANG Wei. Studies on the functional modulating effect of redox partners on the cytochrome P450 enzyme MycG[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(3): 587-601

products, are considered as the most versatile biocatalysts in the nature. Redox partners responsible for electron transfer are indispensable for most P450 catalytic reactions. During the long evolution process, various P450-redox partner systems have been constituted by protein fusion and recombination. The protein-protein interaction and recognition between P450 and redox partner(s) are not only the key factor for functional reconstitution of P450s, but also can affect and change the catalytic functions and properties of P450 enzymes. To address the issue that how the choice and recombination of different redox partners affect the catalytic behaviors (reaction type, catalytic efficiency, product distribution, and electron transport) of the P450 enzyme, a number of fusion and separation P450 systems were constructed based on the two-domain redox partner protein RhFRED and P450 MycG. Specifically, the two domains of RhFRED were separated and expressed as stand-alone FMN and Fe₂S₂ proteins. The positions of these two domains and MycG were shuffled and engineered. *In vitro* biochemical reactions were carried out to explore the effect of different redox partner combinations on the MycG-catalyzed bioconversion of mycinamicin-IV (M-IV) and the electron transfer efficiency as well. As results, among the 20 tested catalytic systems, the functions of the multifunctional P450 enzyme MycG were successfully reconstituted through 12 combinations, in which three oxidative products including M-I, M-II and M-V, and one demethylation product dMe-M-IV were produced. Besides, 4 combinations only led to the production of three oxidative products. In addition, no products were detected in the other 4 combinations. By simulating natural evolutionary strategy, the effects of three different catalytic systems of redox partner(s) and P450 enzymes, together with different protein organization forms on the functional modulating of MycG, were studied systematically. These results indicate that the P450 catalytic properties are affected and modulated by not only the identity, but also the position and organization of redox partner (s), probably *via* alternative protein-protein interactions.



Keywords: cytochrome P450 enzymes; redox partners; MycG; RhFRED; redox partner engineering

细胞色素 P450 酶能够催化包括“碳氢键选择性氧化”在内的 20 余类、数以万计的氧化还原反应，其生物学功能广泛涉及人类与脊椎动物异源物质代谢与激素合成，植物与微生物天然产物生物合成以及微生物降解代谢等，其催化的反应具有高度的位点和立体选择性，是化学催化剂的重要瓶颈^[1-3]。氧化还原伴侣蛋白（简称还原伴侣，redox partner）在绝大多数 P450 酶催化反应中不可或缺，负责将来自辅因子 NAD(P)H 的 2 个电子依次传递到亚铁血红素（heme）反应中心以激活氧分子^[4]。P450 酶和还原伴侣在长期进化过程中，通过基因

融合与分离的方式，演化出多种不同的催化系统。根据 P450 酶和还原伴侣构成的电子传递链的不同，可分为 3 种主要类型：第 1 类为三组分系统，P450 酶、铁氧还蛋白（ferredoxin, Fdx）和铁氧还蛋白还原酶（ferredoxin reductase, FdR）均以独立蛋白的形式存在，其电子传递链一般为 NAD(P)H→FAD→FeS→heme，常见于细菌及线粒体 P450 催化系统，如铜绿恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）来源的 PdR/Pdx^[5]、牛（Bovine）来源的 AdR/Adx^[6] 和菠菜（*Spinach oleracea*）来源的 FdR/Fdx^[7] 等。第 2 类为双组分系统，还原伴侣由 FAD 和 FMN 双结

构域融合形成细胞色素 P450 还原酶 (cytochrome P450 reductase, CPR)^[8], 常见于真核细胞, 与 P450 蛋白组成双组分系统; 另外, 自然界也存在 P450 酶与铁氧化蛋白 FMN 或者铁硫簇 FeS 融合形式的双组分系统, 如来自 *Methylococcus capsulatus* 的 CYP51FX (N-P450-Fe₃S₄-C)^[9] 和来自 *Rhodococcus rhodochrous* 11Y 的 XplA (N-FMN-P450-C)^[10]。第3类则为单组分系统, 其还原伴侣与 P450 蛋白融合形成一个完整蛋白, 能够在只添加辅因子 NAD(P)H 的条件下实现 P450 催化功能, 因此常被称为“催化自主型”P450 酶 (图1)。目前发现的天然融合单组分系统, 一般采用 N 端 P450 酶和 C 端还原伴侣融合的结构组织形式, 如在巨大芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中发现的 P450 BM3, 即 N-BM3-CPR-C (CYP102A1)^[11] 和来自于红球菌 (*Rhodococcus* sp. NCIMB 9784) 的 P450 RhF, 即 N-P450-RhFRED-C (CYP116A1)^[12-14]。

单组分 P450 催化系统因其催化自主特性在近年来受到广泛关注^[12]。例如, 李盛英等^[13] 首创将委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) 来源的 P450 酶 PikC 与含有 21 个氨基酸残基天然连接肽 (L21) 的 RhFRED 蛋白进行融合表达获得了“催化自主型”PikC-RhFRED, 在只添加 NADPH 的条件下, 在体外 (*in vitro*) 成功实现了对底物 12 元大环内酯 YC-17 及 14 元大环内酯 narbomycin 的羟化反应。Misawa 等^[14] 利用“催化自主型”的快速构建策略——“分子乐高”法 (Molecular Lego), 实现了将还原伴侣 RhFRED 与不同 P450 酶融合到一起形成“非天然”融合蛋白 P450-RhFRED, 通过异源宿主 *E. coli* 的体内 (*in vivo*) 反应成功重建了多种 P450 酶的催化功能; 并利用该系统首次成功鉴定了 CYP153A 的催化功能, 为多种细菌 P450

酶的功能鉴定提供了有效策略和开发系统。van den Berg 等^[15] 通过将来自 *Amycolatopsis orientalis* 的 CYP105AS1 进行密码子优化和定向进化改造后, 与 RhFRED 融合获得 P450_{prava}-RhFRED, 以该酶为基础构建了药物普伐他汀的一步发酵法生产途径。

以来自于稀有放线菌淡灰红小单孢菌 (*Micromonospora griseorubida*) 麦新米星 (mycinamicin) 生物合成途径中的多功能 P450 酶 MycG 为研究对象, 构建了 MycG-RhFRED 单组分催化系统, 在仅提供 NADPH 的条件下实现了 MycG 对底物 mycinamicin IV (M-IV) 的识别和催化, 产生 mycinamicin I (M-I) 和 mycinamicin V (M-V), 后者能够被 MycG 继续环氧化得到终产物 mycinamicin II (M-II), 但 M-I 则不能被 MycG 识别, 是另一个终产物 (图2, i)^[16]。当 MycG 与还原伴侣 RhFRED 处于双组分系统状态时, 同样可以识别和催化底物 M-IV 产生 3 种氧化产物, 但同时产生了“非天然”脱甲基产物 dMe-M-IV (图2, ii)^[17]。该发现暗示还原伴侣在 P450 酶催化过程中, 不只是作为电子传递的载体, 也能够影响乃至塑造 P450 酶的催化功能^[17]。

还原伴侣 RhFRED 与 P450 酶在融合 (单组分) 和分离 (双组分) 条件下均能够实现 P450 酶的功能重建, 暗示 P450 酶与还原伴侣之间的适配具有一定的鲁棒性, 为进一步探索和研究 P450 酶与还原伴侣的蛋白组成形式 (单组分对多组分) 和在融合蛋白中的相对位置对 P450 催化性质的影响提供了良好的研究材料。RhFRED 的分子内电子传递系统是由 FMN 和 Fe₂S₂ 两个结构功能域组成的, 两者之间通过含有 9 个氨基酸残基的连接肽 (L9) 融合形成 N-FMN-Fe₂S₂-C^[12]。本研究将 FMN 和 Fe₂S₂

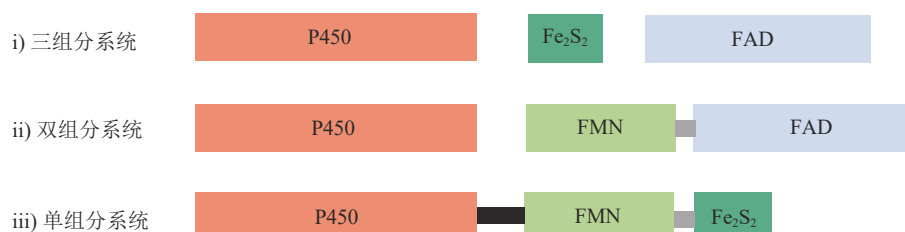


图1 基于还原伴侣分类的P450催化系统

Fig. 1 Classification of P450 systems based on redox partners

从L9处拆分为两个独立蛋白，与MycG进行融合和分离，共获得14种组合方式。第一，两个独立表达的FMN和 Fe_2S_2 蛋白，与MycG组合形成三组

分催化系统（图3，A1）。第二，模拟单组分系统，利用天然连接肽（L21或L9）将MycG、FMN和 Fe_2S_2 三个蛋白的相对位置进行搭配组合，

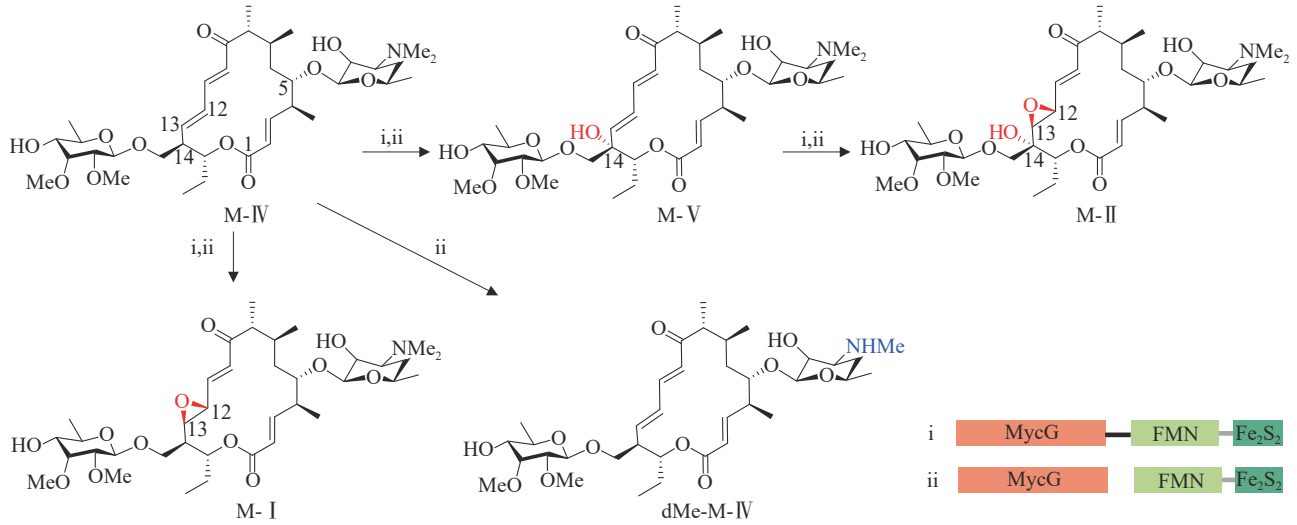


图2 多功能P450酶MycG催化的麦新米星IV的氧化和脱甲基反应

Fig. 2 Oxidative and demethylative reactions of M-IV catalyzed by MycG

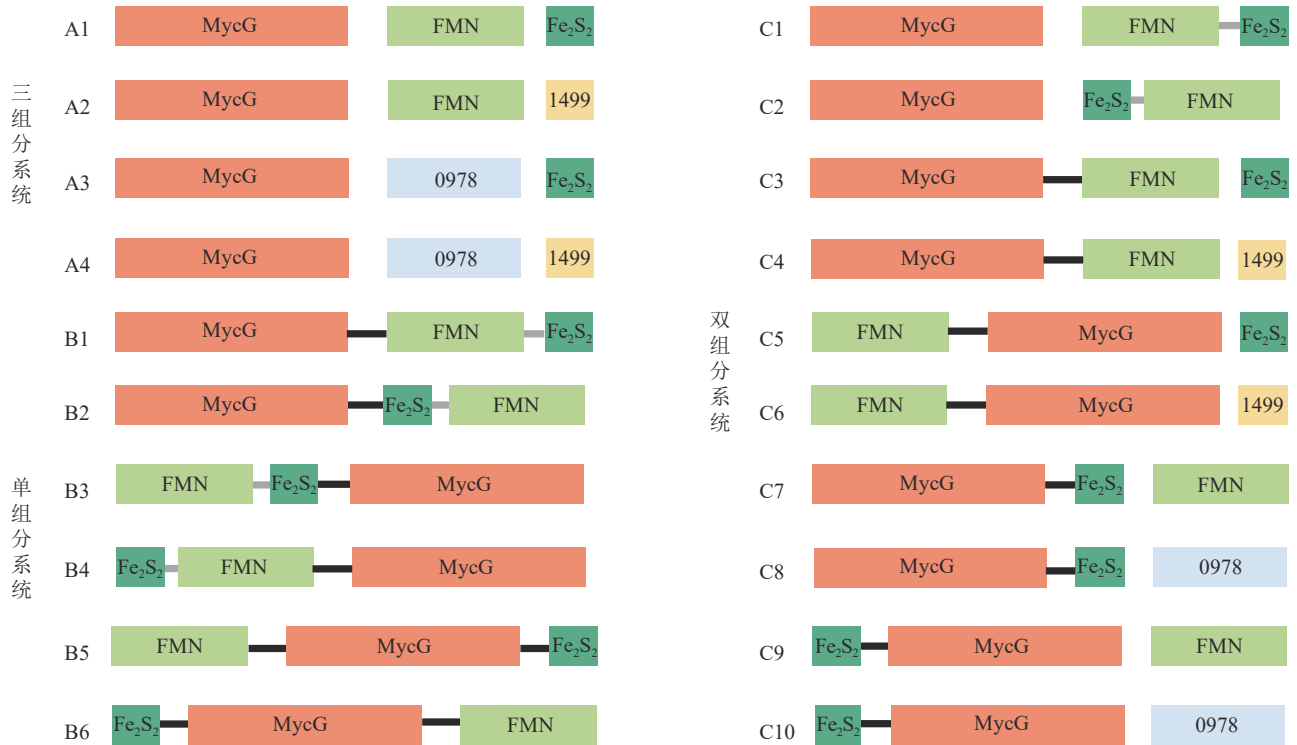


图3 P450酶MycG与还原伴侣组成的不同催化系统

(0978和1499分别代表来自细长聚球藻 *Synechococcus elongates* PCC 7942的铁氧还蛋白还原酶 *SelfdR0978* 和铁氧还蛋白 *Selfdx1499*；黑色 linker: L21, HQVAMLRDGDSFGGGPRHGAG；灰色 linker: L9, GERREIRVD)

Fig. 3 Constructed P450 systems based on the recombination and reorganization of MycG and different redox partners

(0978 and 1499 represent the ferredoxin reductase *SelfdR0978* and ferredoxin *Selfdx1499* from *Synechococcus elongates* PCC 7942, respectively; Black linker: L21, HQVAMLRDGDSFGGGPRHGAG; Gray linker: L9, GERREIRVD)

重组“催化自主型”P450系统的不同蛋白组织形式(图3, B1~B6);第三,模拟双组分催化系统,将FMN和 Fe_2S_2 融合位置互换产生N- Fe_2S_2 -FMN-C(图3, C1、C2);另外,将两个结构域分别融合在MycG的C端或N端,获得N-MycG-FMN/ Fe_2S_2 -C和N-FMN/ Fe_2S_2 -MycG-C(图3, C3~C10)。通过MycG对底物M-IV的底物转化率和产物分布分析,结合电子传递效率差异来研究不同组合的人工还原伴侣对MycG催化系统功能和性质的影响。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用于分子克隆的宿主菌 *E. coli* DH5 α 菌株、用于蛋白表达的宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株均购自擎科生物技术(青岛)股份有限公司,寡核苷酸引物也由该公司合成。本研究所用的菌株和质粒见表1,本研究所用的寡核苷酸序列见表2。

表1 本研究使用的菌株和质粒

Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

菌株	用途	来源
<i>E. coli</i> DH5 α	用于本研究重组质粒克隆	擎科生物公司
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	用于本研究重组蛋白表达	擎科生物公司
BL21/pACYC-MycG	用于表达质粒pACYC-MycG	本实验室
BL21/pET28b-RhFRED	用于表达质粒pET28b-RhFRED	本实验室
BL21/pET28b-MycG-RhFRED	用于表达质粒pET28b-MycG-RhFRED	本实验室
BL21/pET28b- <i>Sei</i> /Fdr0978	用于表达质粒pET28b- <i>Sei</i> /Fdr0978	本实验室
BL21/pET28b- <i>Sei</i> /Fdx1499	用于表达质粒pET28b- <i>Sei</i> /Fdx1499	本实验室
DH5 α /BL21/pET28b-FMN	用于克隆/表达质粒pET28b-FMN	本研究
DH5 α /BL21/pET28b- Fe_2S_2	用于克隆/表达质粒pET28b- Fe_2S_2	本研究
DH5 α /BL21/pET28b- Fe_2S_2 -FMN	用于克隆/表达质粒pET28b- Fe_2S_2 -FMN	本研究
DH5 α /BL21/pET28b-MycG-FMN	用于克隆/表达质粒pET28b-MycG-FMN	本研究
DH5 α /BL21/pET28b-MycG- Fe_2S_2	用于克隆/表达质粒pET28b-MycG- Fe_2S_2	本研究
DH5 α /BL21/pET28b-FMN-MycG	用于克隆/表达质粒pET28b-FMN-MycG	本研究
DH5 α /BL21/pET28b- Fe_2S_2 -MycG	用于克隆/表达质粒pET28b- Fe_2S_2 -MycG	本研究
DH5 α /BL21/pET28b-MycG- Fe_2S_2 -FMN	用于克隆/表达质粒pET28b-MycG- Fe_2S_2 -FMN	本研究
DH5 α /BL21/pET28b- Fe_2S_2 -FMN-MycG	用于克隆/表达质粒pET28b- Fe_2S_2 -FMN-MycG	本研究
DH5 α /BL21/pET28b-FMN- Fe_2S_2 -MycG	用于克隆/表达质粒pET28b-FMN- Fe_2S_2 -MycG	本研究
DH5 α /BL21/pET28b- Fe_2S_2 -MycG-FMN	用于克隆/表达质粒pET28b- Fe_2S_2 -MycG-FMN	本研究
DH5 α /BL21/pET28b-FMN-MycG- Fe_2S_2	用于克隆/表达质粒pET28b-FMN-MycG- Fe_2S_2	本研究

表2 本研究所用的引物名称与核苷酸序列

Tab. 2 Oligos used in this study

引物名称	核苷酸序列(5'~3')
arm-FP	catatggctgccgcg
arm-RP	tagctcagcaccacc
Fe_2S_2 -FP	gagcagccttcgacctga
Fe_2S_2 -RP	tcagagtcgagggccagcc
FMN-FP	gtcaccgtcagcgcctgga
FMN-RP	cgaggtgaagtctcgacgt
MycG-FMN-FP	ggcagccatgatcttc
MycG-FMN-RP	cgaggtgaagtctcgacgt
Fe_2S_2 -arm-FP	cgcgccgagccatattggcagcagccttcgacctc
Fe_2S_2 -arm-RP	ggtggtggtctcagtcagagtcgagggccag
FMN-arm-FP	cgcgccgagccatattggtcaccgtcagcgcctg
FMN-arm-RP	ggtggtggtctcagtcagagtcgaggtgaagtctcgacctc
MycG-FMN-arm-FP	cgcgccgagccatattgacctcagctgaacctaggcc
MycG-FMN-arm-RP	ggtggtggtctcagtcagagtcgaggtgaagtctcgacctc

续表

引物名称	核苷酸序列(5'~3')
MycG-Fe ₂ S ₂ -WL-FP	ttcagctgaagtcacatcatatggctgccgcg
MycG-Fe ₂ S ₂ -WL-RP	gcggtgtcccgcaccgagcacgccttcgacctegaa
MycG-L9-FP	atgacttcagctgaacctagggc
MycG-L9-RP	ggtgcgggacaccg
Fe ₂ S ₂ -L9-FP	gcgctcgacggtgacgacgtccggatcgagcggcggagggagagtcgcagg
Fe2S2-L9-RP	acgtcgagcacttcacctctgactcgagcaccaccacca
FMN-WL-FP	catatggctgcccgcgcggcacc
FMN-WL-RP	gtcaccgtcgagcgcctggacc
MycG-FP	acttcagctgaacctagggc
MycG-FP2	accatcggagaaccgccgcccggcgggtgtcccgcaccacttcagctgaacctaggg
MycG-RP	ccacacgaccggcagctcga
MycG-Fe ₂ S ₂ -FMN-WL-FP	aggttcagctgaagtcacatagctgccgcgcgg
MycG-Fe ₂ S ₂ -FMN-WL-RP	gcgggtgtcccgcaccgagcacgccttcgacc
Fe ₂ S ₂ -FMN-G-WL-FP	gggttctccgatggtgaccggtgatggcgggtgcagcaccgaggtgaagtgtctgacg
Fe ₂ S ₂ -FMN-G-WL-RP	ctgccggtcgtgtggtgactcgagcaccaccac
FMN-L9-FP	gtcaccgtcgagcgcctgga
FMN-L9-RP	gacgtccggatcgagcgcgg
FMN-L21-FP	gtcaccgtcgagcgcctgga
FMN-L21-RP	taggttcagctgaagtgggtc
Fe ₂ S ₂ -L21-FP	gagcacgccttcgacctcga
Fe ₂ S ₂ -L21-RP	taggttcagctgaagtgggtc
FMN-Fe ₂ S ₂ -G-WL-FP	ctcgatccggacgtcgagcacgccttcgac
FMN-Fe ₂ S ₂ -G-WL-RP	gcgctcgacggtgacctatggctgccgcgcgg
FMN-G-Fe ₂ S ₂ -WL-FP	gcgctcgacggtgacctatggctgccgcgcgg
FMN-G-Fe ₂ S ₂ -WL-RP	acttcagctgaacctagggc
Fe ₂ S ₂ -G-FMN-WL-FP	aggctgaaggcgtgctccataggtgcccgcg
Fe ₂ S ₂ -G-FMN-WL-RP	acttcagctgaacctagggc
FMN-MycG-WL-FP	ctgccggtcgtgtgtagctcgagcaccaccac
FMN-MycG-WL-RP	gggttctccgatggtgaccggtgatggcgggtgcagcaccgaggtgaagtgtctgacg
Fe2S2-MycG-WL-FP	ctgccggtcgtgtgtagctcgagcaccaccac
Fe2S2-MycG-WL-RP	tgatggcgggtgcagcacgagtcgagggccagcc

1.1.2 培养基和试剂

本研究所用的LB琼脂和LB肉汤培养基采购于青岛海博生物技术有限公司；TB肉汤培养基采购于生工生物科技有限公司；DNA聚合酶PrimerSTAR Max DNA Polymerase PrimerSTAR Max DNA Polymerase和DNA Marker购自宝日生物技术有限公司（Takara日本）；2×TsingKe Master Mix购自擎科生物技术有限公司；DNA纯化试剂盒（Gel Extraction Kit D2500）购自Omega（美国）；用于同源重组的Exnase II连接酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；镍柱琼脂糖树脂Ni-NTA Sefinose Resin（G915DA0001）采购于上海生工生物工程有限公司；4S Red Plus核酸染色剂采购于BBI生物科技有限公司；超滤管（50/30/10 kDa）购自美国Millipore公司；50×TAE与10×TBE电泳缓冲液购自北京索莱宝科技公司；所有无机盐采购于国药集团化学试剂有限公司和索

莱宝有限公司。

1.2 基因克隆和表达质粒的构建

本研究中对每个基因独立片段采用两步扩增法进行PCR扩增：首先以含有目的基因DNA的MycG-RhFRED质粒作为模板，用相应的引物进行PCR扩增得到目的编码基因，将该DNA片段用Omega Bio-tek DNA纯化试剂盒进行纯化后作为PCR模板，并用带有同源臂的引物再次进行PCR扩增，将用于同源重组连接的同源臂片段加到基因的两端并进行胶回收纯化。利用PCR获得含有同源臂的质粒线性片段，将两个DNA片段用诺唯赞的Exnase II酶进行同源重组连接后，利用化学法转化至*E. coli* DH5α感受态并涂布到含有50 mg/L卡那霉素的LB固体培养基，于37℃静置培养过夜。挑取平板生长的单克隆并以T7-P/T为引物进行菌落

PCR 验证, 获得正确片段的质粒由擎科生物技术有限公司进行测序验证。

1.3 重组蛋白的表达和纯化

1.3.1 重组蛋白的表达

将测序验证正确质粒分别转化到大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3) 进行松弛培养后, 离心取上清并涂布到含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板, 37 °C 培养 16~18 h。挑取单克隆于 50 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 摇床培养过夜。按 1% 接种量接种至含 500 mL TB (含 50 mg/L 卡那霉素) 培养基的 2 L 三角瓶中, 37 °C、160 r/min 培养至 $A_{600}=0.6\sim 1$ 。如果重组蛋白为 P450 酶, 需在培养基中加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 5-氨基乙酰丙酸盐 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 和 1 mmol/L VB_1 , 随后加入终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)。培养液于 16 °C、100 r/min 培养 20~24 h 诱导目的蛋白的表达。发酵液于 4 °C、6000 r/min 离心 10 min, 将菌体收集后置于 -80 °C 冰箱冷藏备用。

1.3.2 重组蛋白的纯化

将含有重组蛋白的菌体从 -80 °C 冰箱取出, 置于冰上融化。加入 30~40 mL Lysis buffer (50 mmol/L 磷酸二氢钠, 300 mmol/L 氯化钠, 10% 甘油 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0), 涡旋振荡重悬菌体, 倒入置于冰水混合液的烧杯中, 利用 JY92-IIDN 超声破碎仪 (宁波新芝生物科技公司), 破碎裂解细胞至菌液为清澈状态 (工作 5 s, 停顿 5 s, 功率 25%, 工作时间 30 min)。裂解后的悬液 10 000 r/min、4 °C 离心 60 min, 将上清转至离心管中, 加入 1~2 mL Ni-NTA 树脂于 4 °C 孵育 60 min。转入 Ni-NTA 重力柱, 用 Wash buffer (50 mmol/L 磷酸二氢钠, 300 mmol/L 氯化钠, 10% 甘油, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 清洗 250 mL。用 4 mL Elution buffer (50 mmol/L 磷酸二氢钠, 300 mmol/L 氯化钠, 10% 甘油, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 对目的蛋白进行洗脱收集; 收集液用合适的 Millipore 超滤离心管浓缩至约 1 mL; 用 PD-10 脱盐柱 (GE Healthcare) 脱盐收集目标蛋白, 混匀后分装, 经液氮速冻后置于 -80 °C 保存备用。

1.4 蛋白浓度的测定

1.4.1 P450 蛋白活性浓度测定

P450 蛋白浓度测定采用 CO 差光谱进行测定^[18]: 取 100 μL 纯化 P450 蛋白转至 1.5 mL 离心管, 加入 900 μL Desalting buffer; 向蛋白样品中通入 CO 气体约 1 min, 迅速转入比色皿中, 利用酶标仪采集 350~500 nm 吸光谱 (A1); 加入适量保险粉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 后轻轻混匀, 用酶标仪再次采集 350~500 nm 吸光谱 (A2)。计算不同吸光度下差值, 以吸光度为横坐标、差值为纵坐标。在 450 nm 处有吸收峰的 P450 蛋白, 可以认定为活性 P450 酶。蛋白浓度的计算公式为:

$$c(\mu\text{mol/L})=(A_{450}-A_{490})/91\ 000\times\text{稀释倍数}\times 10^6 \quad (1)$$

1.4.2 Se/FdR0978 浓度测定

将 Se/FdR0978 从 -80 °C 冰箱取出, 置于冰上融化; 以 Desalting buffer 做空白对照, 将蛋白用 Desalting buffer 稀释 20 倍后, 用酶标仪测量 456 nm 处吸光度。蛋白浓度计算公式为^[19]:

$$c(\mu\text{mol/L})=A_{456}/10\ 400\times\text{稀释倍数}\times 10^6 \quad (2)$$

1.4.3 含有 Fe_2S_2 结构域的还原伴侣蛋白浓度测定

将含有 Fe_2S_2 结构域的还原伴侣蛋白从 -80 °C 冰箱取出, 置于冰上融化; 以 Desalting buffer 作空白对照, 将蛋白用 Desalting buffer 稀释 20 倍后, 用酶标仪测量 420 nm 处吸光度。蛋白浓度计算公式为^[19]:

$$c(\mu\text{mol/L})=A_{420}/9700\times\text{稀释倍数}\times 10^6 \quad (3)$$

1.4.4 含有 FMN 结构域的还原伴侣蛋白浓度测定

将含有 FMN 结构域的还原伴侣蛋白从 -80 °C 冰箱取出, 置于冰上融化; 以 Desalting buffer 作空白对照, 将蛋白用 Desalting buffer 稀释 20 倍后, 用酶标仪测量 445 nm 处吸光度。蛋白浓度计算公式为^[20-21]:

$$c(\mu\text{mol/L})=A_{445}/12\ 500\times\text{稀释倍数}\times 10^6 \quad (4)$$

1.5 重组蛋白体外反应

1.5.1 体外反应体系和条件

反应体系中包含 3 $\mu\text{mol/L}$ MycG, 10 $\mu\text{mol/L}$ Fdx (Fe_2S_2), 5 $\mu\text{mol/L}$ FdR (FMN), 0.1 mmol/L 底物 M-IV, 2.5 mmol/L NADPH, 反应缓冲液 (50 mmol/L 磷酸二氢钠, 10% 甘油, pH 7.4) 补充

至 100 μL ；反应条件为 28 $^{\circ}\text{C}$ ，水浴 2 h。加等体积甲醇涡旋振荡以终止反应。

1.5.2 HPLC 检测条件

反应体系经甲醇终止反应后，14 000 r/min 离心 10 min 后取上清，利用 HPLC 对样品进行分析。色谱柱：YMC-Triart C_{18} ，4.6 mm \times 250 mm，5 μm 。流动相：A 相，水+0.1% 三氟乙酸；B 相，乙腈+0.1% 三氟乙酸。HPLC 洗脱方法：0~12 min，40% B；12~13 min，40%~100% B；13~16 min，100% B；16~17 min，100~40% B；17~20 min，40% B；流速 1 mL/min。

1.6 测定电子传递效率

1.6.1 测定铁氰化钾的还原速率

反应体系中含有 0.7 mmol/L 铁氰化钾、500 $\mu\text{mol/L}$ NADPH、0.01 $\mu\text{mol/L}$ FdR/FMN/融合蛋白，加入反应缓冲液补充至 1 mL；酶标仪记录样品在 420 nm 处吸光度的变化，计算铁氰化钾的还原速率 [$\epsilon_{420}=1000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$] [22-23]。

1.6.2 测定细胞色素 C 的还原速率

反应体系中含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 细胞色素 C，500 $\mu\text{mol/L}$ NADPH，0.1 $\mu\text{mol/L}$ FdR (FMN)/Fdx (Fe_2S_2)/融合蛋白，加入反应缓冲液补充至 1 mL；利用酶标仪记录样品在 550 nm 处吸光度的变化，计算细胞色素 C 的氧化速率 [$\epsilon_{550}=19 100 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$] [18, 22-23]。

2 结果与分析

2.1 MycG 与还原伴侣不同组合对 M-IV 体外反应的影响

2.1.1 MycG、FMN 和 Fe_2S_2 组成的三组分系统

在细菌 I 型 P450 系统中，P450 酶、FdR 和 Fdx 均以独立蛋白的形式存在。为了模拟自然界中存在的三组分催化系统，将 RhFRED 的两个结构域 (FMN 和 Fe_2S_2) 在 L9 处进行拆解后，构建为两个独立的蛋白表达质粒。在 FMN、 Fe_2S_2 与 MycG 组成三组分系统中 (图 3, A1)，以 M-IV 为底物进行体外反应 2 h 后，HPLC 和 LC-MS 检测分析发现该反应未产生任何氧化或脱甲基产物，底物 M-IV

未见明显消耗 [图 4(a)v/vi；图 5, A1]。

为了证实拆解之后独立表达获得的 FMN 和 Fe_2S_2 蛋白是否具有支持 MycG 催化功能的能力，分别选择细长聚球藻 *S. elongates* PCC 7942 的铁氧还原蛋白还原酶 *Se/FdR0978* 和铁氧还蛋白 *Se/Fdx1499* 分别替代 FMN 和 Fe_2S_2 [19]，获得 MycG+FMN+1499 (图 3, A2) 和 MycG+0978+ Fe_2S_2 (图 3, A3) 组合，并以 MycG+0978+1499 (图 3, A4) 组合作为阳性对照。

经 HPLC 检测，MycG+0978+1499 阳性对照组合将 M-IV (最大吸收波长 280 nm) 彻底转化为 M-V (280 nm)、M-II (240 nm) 和 M-I (240 nm) [图 4(a)vii/viii]，3 种产物的比例为 M-I : M-II : M-V = 1.0 : 1.2 : 0.2 (图 5, A2)。这一结果说明当 *Se/FdR0978* 和 *Se/Fdx1499* 存在时，MycG 倾向于催化 C-14 位的羟基化反应，并以 M-II 为主要产物形式。

MycG+FMN+1499 组合催化的反应在 280 nm 检测条件下，能够观察到 M-II 的产生 (4.95 min) [图 4(a)ix]。由于 M-V 和 M-II 的保留时间非常相近，经 LC-HRMS (ESI⁺) 分析发现该产物峰包含了两个分子离子峰，分别为 728.4225 和 712.4270，与 M-II (*cald.* 728.4221) 和 M-V (*cald.* 712.4272) 分子离子峰吻合 [图 4(b)]。该反应产物在 240 nm 下能够观测到保留时间为 7.97 min 的产物峰 [图 4(a)x]，LC-HRMS 分析证实该峰分子离子峰为 712.4277，与 M-I (*cald.* 712.4272) 一致 [图 4(b)]。以上结果表明 MycG+FMN+1499 组合能够催化 M-IV 的氧化反应，产生 3 个氧化产物 M-I、M-II 与 M-V，但产物生成率仅为 MycG+0978+1499 组合的约 50%，产物分布也产生了变化 (M-I : M-II : M-V = 1.0 : 0.9 : 2.1) (图 5, A3)，虽然同样倾向于在 C-14 位进行羟基化，但以中间产物 M-V 为主要产物形式。

对于 MycG+0978+ Fe_2S_2 组合，除了 3 种氧化产物 M-I、M-II 和 M-V，同时在 280 nm 检测波长下观测到保留时间为 7.22 min 的产物峰，经 LC-HRMS 分析发现该峰的分子量为 682.4168，与 dMe-M-IV (*cald.* 682.4160) 一致 [图 4(a)ix、(b)]。4 种产物比例为 M-I : M-II : M-V : dMe-M-IV = 1.0 : 3.6 : 6.2 : 0.3 (图 5, A4)，以中间产物 M-V 为主要存在形式。该结果说明 Fe_2S_2 存在时，可能通过

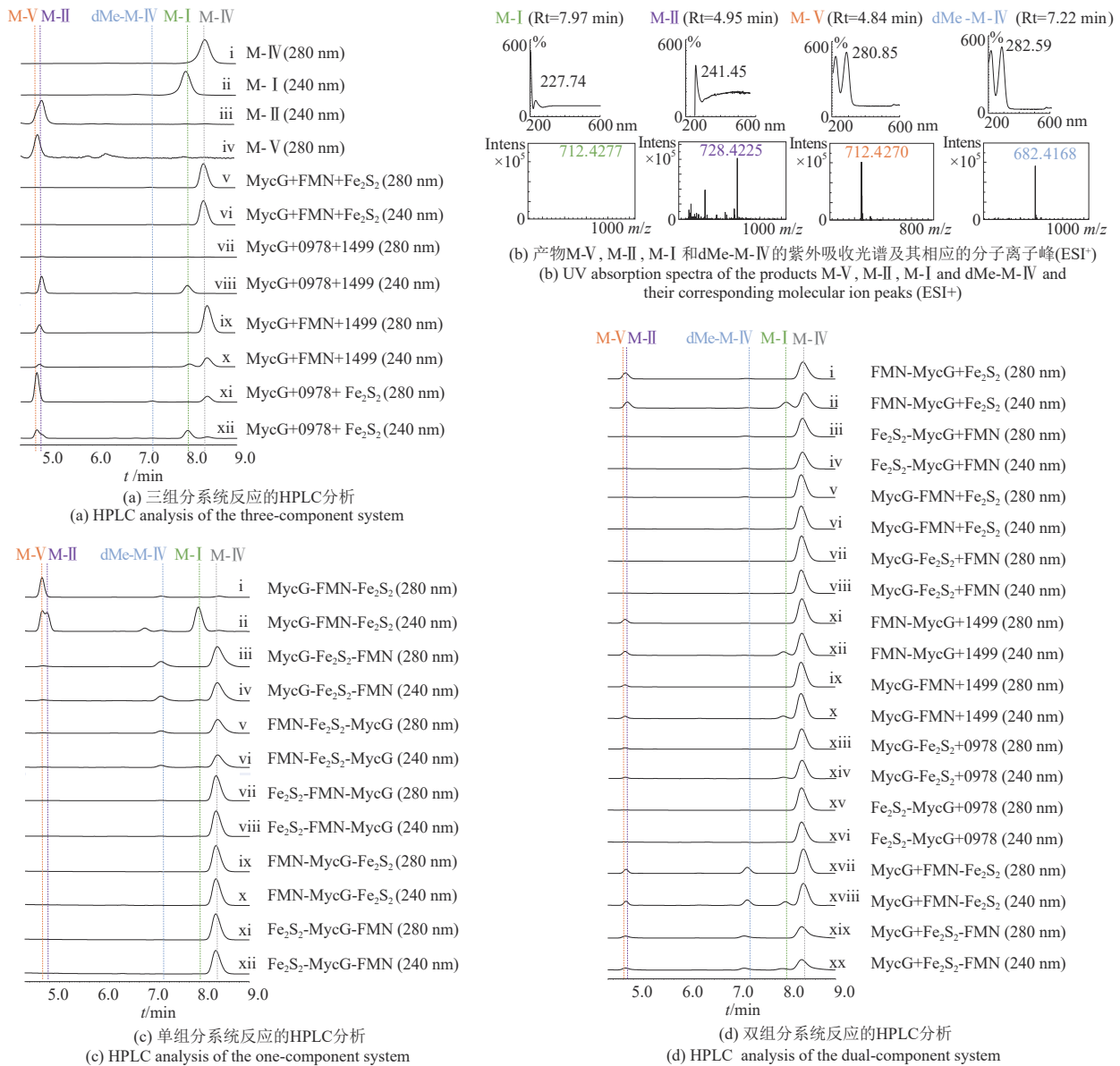


图4 MycG催化麦新米星M-IV产生氧化和脱甲基产物高压液相色谱和高分辨率质谱分析

Fig. 4 HPLC and LC-HRMS analysis of the oxidative and demethylative products produced from M-IV under the catalysis of P450 MycG

蛋白-蛋白相互作用影响MycG的催化构象，产生非天然的脱甲基产物，与之前的结果相符^[17]。

FMN和 Fe_2S_2 以独立蛋白形式分别与*SeIFdx1499*和*SeIFdR0978*组合时，MycG能够实现底物M-IV的转化，说明FMN和 Fe_2S_2 均为活性蛋白，而催化效率的差异可能是由于*SeIFdR0978*与FMN的电子传递效率造成的。另外， Fe_2S_2 的存在可能造成MycG催化构象的改变，从而产生了脱甲基产物dMe-M-IV。但是，MycG+FMN+ Fe_2S_2 组合中未能检测到任何产物，暗示两个结构域由融合蛋白变为独立蛋白之后，蛋白的构象可能均发

生了改变，组合后两者之间无法产生有效识别和分子间的电子传递，因而无法支持MycG的催化功能。这些结果表明FMN和 Fe_2S_2 的融合状态对于维持RhFRED蛋白的活性与反应构象具有重要作用。

2.1.2 MycG、FMN和 Fe_2S_2 组成的单组分系统

一些P450酶和还原伴侣在进化过程中，融合形成一个单组分、“催化自主型”的P450酶，能够在只提供NAD(P)H的条件下实施催化功能，可能代表了进化上的一种优势组合。“催化自主型”P450酶的典型代表有P450 BM3 (CYP102A1)^[11]和P450-RhFRED (CYP116A1)^[24]。在这两种蛋白

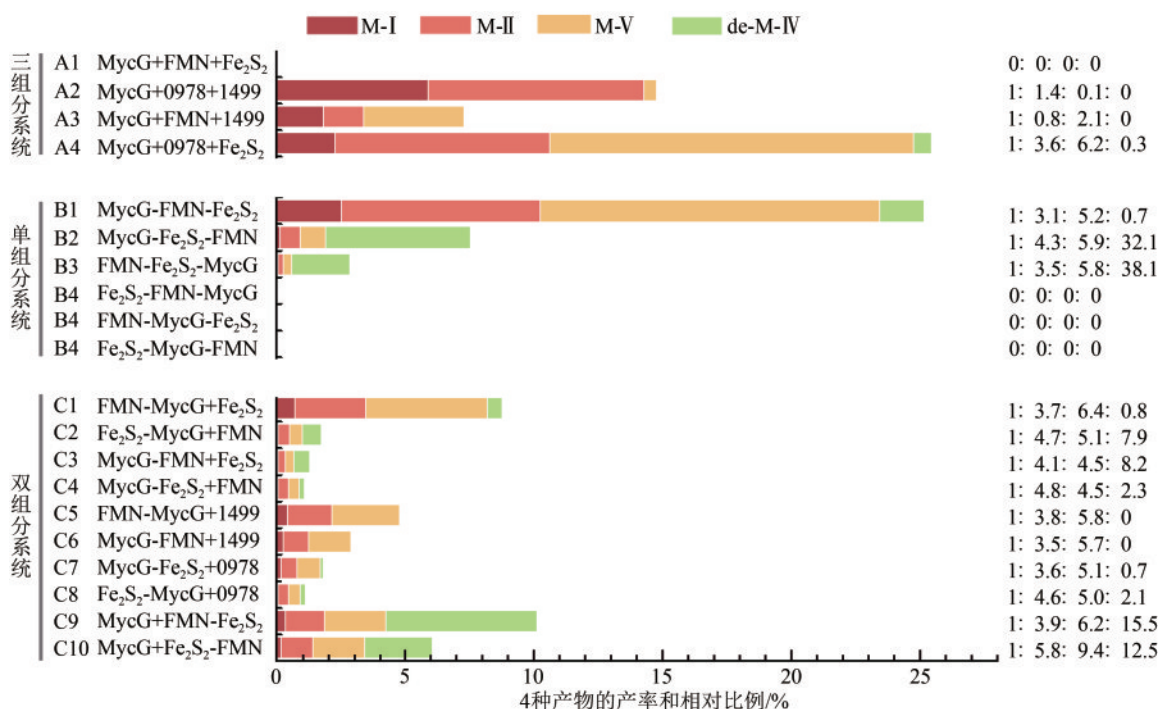


图5 不同还原伴侣系统中MycG催化M-IV反应的产物分布及催化效率

Fig. 5 Product distribution and catalytic efficiencies of MycG toward M-IV with different redox partner systems

中, P450和双结构域的还原伴侣蛋白在结构组织方式均为N-P450-CPR/RhFRED-C, 迄今为止自然界中尚未发现位于P450酶N端的双结构域还原伴侣蛋白^[12]。

在本研究中, 以MycG与RhFRED双结构域FMN和Fe₂S₂为研究对象, 通过不同的组织方式设计了6种人工“单组分”融合蛋白(图3, B1~B6)。N-MycG-FMN-Fe₂S₂-C(即MycG-RhFRED)(图3, B1)、N-MycG-Fe₂S₂-FMN-C(图3, B2)和N-FMN-Fe₂S₂-MycG-C(图3, B3)能够在仅添加NADPH的条件下, 催化M-IV反应产生氧化产物M-I、M-II、M-V和脱甲基产物dMe-M-IV共计4种产物, 但催化效率差异显著[图4(c) i/ii, iii/iv, v/vi; 图5, B1~B3]。例如: 当还原伴侣位于MycG的C端时, 催化效率显著降低, 且产物分布发生了明显变化, 以脱甲基产物dMe-M-IV为主(图5, B3)。以上结果说明, 在催化自主型P450系统中, P450酶和还原伴侣相对位置的改变, 能够对P450酶的催化效率和产物分布造成显著影响。

Fe₂S₂-FMN-MycG、FMN-MycG-Fe₂S₂和Fe₂S₂-MycG-FMN 3种融合蛋白在以M-IV为底物的体外反应测试中, 未能检测到相应的产物峰[图4(c)

vii/viii, ix/x和xi/xii; 图5, B4~B6]。CO差光谱测定发现, 该3种“单组分”融合蛋白未能检测到P450典型吸收峰。该结果暗示FMN、Fe₂S₂和MycG相对位置的改变可能造成了人工蛋白的异常折叠, 使得MycG丧失了P450酶催化功能。

2.1.3 MycG、FMN和Fe₂S₂组成的双组分系统

自然界中存在的P450双组分催化系统中, P450酶与还原伴侣蛋白常以独立组分的形式存在, 如真核生物中常见的P450酶与CPR组合^[12]。P450酶仅与Fdx或FdR发生融合的情况较为罕见, 目前仅有两例P450酶与Fdx形成融合蛋白的报道, 分别是来自于*M. capsulatus*的CYP51FX(N-P450-Fe₂S₂-C)^[9]和来自于*R. rhodochrous* 11Y的XplA(N-FMN-P450-C)^[10], 这种融合方式可能代表了一种由双组分融合蛋白向单组分融合蛋白进化的中间状态。值得指出的是, CYP51FX和XplA均需要在同时提供FdR和NADPH的条件下才能实现其催化功能^[9-10]。将RhFRED蛋白的两个结构域FMN和Fe₂S₂分别融合到MycG的N端或C端, 构建获得N-Fe₂S₂/FMN-MycG-C或N-MycG-Fe₂S₂/FMN-C 4种融合形式并成功表达纯化获得目的蛋白, CO差光谱分析证实纯化获得的融合蛋白均具有P450典型

吸收峰。在以 M-IV 为底物的体外反应中添加还原伴侣蛋白的相应缺失组分 (FMN 或 Fe_2S_2) 后, HPLC 分析发现 4 种组合均可以不同程度重建 MycG 的活性, 催化产生 3 种氧化产物和 1 种脱甲基产物 [图 4(d) i/ii, iii/iv, v/vi 和 vii/viii], 但产物分布差别较大: N-FMN-MycG-C、N- Fe_2S_2 -MycG-C、N-MycG-FMN-C 和 N-MycG- Fe_2S_2 -C 的产物比例 (M-I : M-II : M-V : dMe-M-IV) 分别为 1.0 : 3.7 : 6.4 : 0.8、1.0 : 4.7 : 5.1 : 7.9、1.0 : 4.1 : 4.5 : 8.2 和 1.0 : 4.8 : 4.5 : 2.3, 且主产物也不尽相同, 分别为 M-V、dMe-M-IV、dMe-M-IV 和 M-II (图 5, C1~C4), 其中 N-FMN-MycG-C 的催化效率明显优于另外 3 种融合蛋白 [图 4(d) i/ii, xi/xii; 图 5, C1, C5]。值得指出的是, 当 FMN 或 Fe_2S_2 融合在 MycG 的 N 端或者 C 端时, 脱甲基产物 dMe-M-IV 的产量均发生显著改变。当游离的 Fe_2S_2 被 *SeIFdx1499* 替换后, 反应体系不再产生脱甲基产物 dMe-M-IV; 而当 *SeIFdR0978* 将游离的 FMN 替换后, 脱甲基产物产量也出现降低。以上结果暗示 RhFRED 蛋白的两结构域在脱甲基产物 dMe-M-IV 的产生过程中均发挥重要作用, 其中 Fe_2S_2 结构域的影响大于 FMN 结构域。

对于 RhFRED 蛋白本身, 通过 FMN 和 Fe_2S_2 结构域相对位置互换构建了 N- Fe_2S_2 -FMN-C (图 3, C2) “非天然”融合蛋白。反应结果显示 MycG+N- Fe_2S_2 -FMN-C 组合仍然能够产生氧化产物 M-I、M-II、M-V 和脱甲基产物 dMe-M-IV [图 4(d) xvii/xviii, xix/xx], 其与 MycG+N-FMN- Fe_2S_2 -C (即 RhFRED) 相比, 产物分布变化不明显, 分别为 1.0 : 5.8 : 9.4 : 12.1 和 1.0 : 3.9 : 6.2 : 15.1, 但是产物生成效率下降约 50% (图 5, C9, C10)。该结果表明双组分系统中 Fe_2S_2 和 FMN 相对位置改变会影响两者之间电子传递效率, 但对 P450 酶催化构象、反应偏好及其产物分布的影响较小。

2.2 MycG 与还原伴侣融合方式和组织形式对电子传递效率的影响

在 P450 催化系统中, 来自于 NAD(P)H 的两个电子依次经过 FdR (FMN)→Fdx (Fe_2S_2)→heme 的传递过程。电子传递链各组分之间的电子传递效率是影响 P450 催化活性的关键因素。因此, 分别以

铁氰化钾和细胞色素 C 作为替代型电子受体^[16-17], 测定不同融合方式和组织形式对电子传递效率的影响。如表 3 所示, 与自然进化形成的天然融合蛋白 N-FMN- Fe_2S_2 -C (RhFRED) 相比, 两个结构域互换之后得到的 N- Fe_2S_2 -FMN-C 蛋白, 对铁氰化钾和细胞色素 C 的还原速率都有所下降, 表明 RhFRED 蛋白的两个结构域相对位置的改变, 造成两者之间 [FMN→ Fe_2S_2 , $34.38 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.05 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $24.37 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.02 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$] 以及与 P450 蛋白之间 (Fe_2S_2 →heme, $13.57 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $10.21 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$) 电子传递效率的下降, 进而影响到 P450 酶的催化效率和产物产率: 在 N- Fe_2S_2 -FMN-C 组成的双组分反应体系中, MycG 催化 M-IV 产生相应产物的效率约为含有 N-FMN- Fe_2S_2 -C (RhFRED) 双组分体系的 60% (图 5, C9、C10)。

在 6 种不同蛋白组织结构类型的“单组分”融合蛋白中, N-FMN- Fe_2S_2 -MycG-C、N- Fe_2S_2 -FMN-MycG-C 与 N-MycG-FMN- Fe_2S_2 -C (MycG-RhFRED) 对铁氰化钾的还原速率相当 [FMN→ Fe_2S_2 , $26.07 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.03 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $25.36 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.02 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $21.82 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.02 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$], 说明还原伴侣位于 P450 酶 MycG 的 N 端, 或者 FMN 和 Fe_2S_2 相对位置改变对 FMN 与 Fe_2S_2 之间的电子传递效率影响较小。但是, N-FMN- Fe_2S_2 -MycG-C、N- Fe_2S_2 -FMN-MycG-C 对细胞色素 C 的还原速率都低于 N-MycG-FMN- Fe_2S_2 -C [Fe_2S_2 →heme, $10.22 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $6.0 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $10.45 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$] (表 3), 表明当还原伴侣蛋白位于 MycG 的 N 端时, Fe_2S_2 将电子传递给 P450 酶的能力减弱 (N-FMN- Fe_2S_2 -MycG-C 和 N- Fe_2S_2 -FMN-MycG-C 的产率分别约为 N-MycG-FMN- Fe_2S_2 -C 的 10% 和 25%), 可能是造成 MycG 催化效率降低的主要因素之一 (图 5 B3、B4)。

将 MycG 置于 FMN 和 Fe_2S_2 之间获得的两种人工融合蛋白 N-FMN-MycG- Fe_2S_2 -C 和 N- Fe_2S_2 -MycG-FMN-C, 以及通过结构域置换获得的融合蛋白 N-MycG- Fe_2S_2 -FMN-C 蛋白, 对铁氰化钾的还原速率约为 N-MycG-FMN- Fe_2S_2 -C (MycG-RhFRED) 的 30% [FMN→ Fe_2S_2 , $6.92 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/$

表3 不同重组蛋白的电子传递效率

Tab. 3 Electron transfer efficiencies of different recombinant proteins

组合	铁氰化钾/[$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$]	细胞色素 C/[$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$]	
FMN- Fe_2S_2	34.38 \pm 0.05		13.57 \pm 0.01
Fe_2S_2 -FMN	24.37 \pm 0.02		10.21 \pm 0.01
MycG-FMN- Fe_2S_2	21.82 \pm 0.02		10.45 \pm 0.01
FMN-MycG- Fe_2S_2	6.92 \pm 0.003		8.42 \pm 0.01
Fe_2S_2 -MycG-FMN	6.64 \pm 0.02		3.23 \pm 0.01
FMN- Fe_2S_2 -MycG	26.07 \pm 0.03		10.22 \pm 0.01
MycG- Fe_2S_2 -FMN	5.85 \pm 0.006		5.04 \pm 0.009
Fe_2S_2 -FMN-MycG	25.36 \pm 0.02		6.0 \pm 0.01
MycG-FMN	33.97 \pm 0.03	Fe_2S_2 : 3.94 \pm 0.06	<i>Se/Fdx1499</i> : 7.04 \pm 0.03
FMN-MycG	19.81 \pm 0.03	Fe_2S_2 : 10.37 \pm 0.02	<i>Se/Fdx1499</i> : 9.56 \pm 0.02
<i>Se/FdR0978</i>	24.23 \pm 0.04	Fe_2S_2 : 1.63 \pm 0.02	<i>Se/Fdx1499</i> : 3.75 \pm 0.01
FMN	5.04 \pm 0.07	Fe_2S_2 : 0.46 \pm 0.03	<i>Se/Fdx1499</i> : 1.86 \pm 0.02

注：在细胞色素 C 还原效率测试实验中，分别测定了 FMN 结构域与铁氧还蛋白 Fe_2S_2 结构域，以及 FMN 结构域与 *Se/Fdx1499* 之间的电子传递效率。

($\text{L}\cdot\text{min}$) vs 6.64 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.02 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs 5.58 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs 21.82 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.02 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$], 这 3 个融合蛋白对细胞色素 C 的还原速率也同时降低 [$\text{Fe}_2\text{S}_2 \rightarrow \text{heme}$, 8.42 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.003 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs 3.23 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.009 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs 5.04 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.009 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs 10.45 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.009 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$] (表 3), 表明 FMN 和 Fe_2S_2 结构域与 MycG 相对位置的改变也会造成电子传递效率的降低。更为重要的是, 尽管能够检测到电子传递, 这 3 个反应体系均无法检测到反应产物的产生, 结合 CO 测定无法得到 P450 酶的特征吸收峰, 暗示 3 个融合蛋白中的 P450 功能域因某些未知原因丧失了催化功能。

由表 3 可知, *Se/FdR0978* 对铁氰化钾的还原速率约为游离状态 FMN 的 5 倍 [FMN $\rightarrow \text{Fe}_2\text{S}_2$, 24.23 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.04 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs 5.04 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.07 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$], 在不同反应组合中当将 FMN 替换为 *Se/FdR0978* 时, 产物的产率都获得了不同程度的提高 (图 5)。例如: MycG+ Fe_2S_2 +FMN 组合检测不到反应产物, 而当 FMN 替换为 *Se/FdR0978* 后, MycG+ Fe_2S_2 +0978 的组合成功实现了对 M-IV 的催化反应 (图 5 A1、A3); N-MycG- Fe_2S_2 -C+0978 组合的产率也略高于 N-MycG- Fe_2S_2 -C+FMN (图 5 B7、B8), 表明 FdR/FMN $\rightarrow \text{Fe}_2\text{S}_2$ 的

电子传递效率是影响 P450 酶催化效率的重要因素。

相较于游离状态的 Fe_2S_2 , *Se/Fdx1499* 对细胞色素 C 的还原效率更高 (Fdx/ $\text{Fe}_2\text{S}_2 \rightarrow \text{heme}$), 与含有 *Se/Fdx1499* 的 MycG 催化系统比含有游离 Fe_2S_2 催化系统的产率更高的结果相符。与天然融合蛋白 N-MycG-FMN- Fe_2S_2 -C (MycG-RhFRED) 相比, 当改变重组蛋白各组分结构组织方式时, 大部分组合的铁氰化钾还原速率以及细胞色素 C 还原速率均出现降低, 表明重组蛋白的融合方式和组分相对位置的改变会影响电子传递效率, 进而影响 P450 酶的催化效率和产物分布。

3 讨论

为模拟自然界中 P450 酶与还原伴侣经过进化形成的不同组织形式, 探究还原伴侣与 P450 酶的融合或分离状态以及融合蛋白中功能域的组织方式对 P450 酶催化功能的影响, 以 P450 酶 MycG 与还原伴侣 RhFRED 为研究对象, 构建了 13 种重组蛋白 (图 3), 以麦新米星 M-IV 作为反应底物进行体外 MycG 催化的生化反应, 系统比较了不同还原伴侣组合中 MycG 对 M-IV 的催化效率和产物分布, 以及不同组合中的电子传递效率, 探究还原伴侣影响和重塑 MycG 催化功能的潜在功能和机制。

在还原伴侣与MycG组成的“非天然”催化系统中，所有蛋白均获得可溶性表达，16个组合能够成功重建MycG的催化功能，其中12个组合中MycG能够催化产生3个氧化产物M-I、M-II和M-V以及1个脱甲基产物dMe-M-IV。4个组合仅产生氧化产物M-I、M-II和M-V，剩余4个组合未检测到反应产物的产生（图4、图5）。值得注意的是，可检测到反应产物的16个组合中，有12个组合产生了脱甲基产物dMe-M-IV，其催化体系中均含有游离或者融合状态的 Fe_2S_2 结构域。

在4个未检测到任何反应产物的组合中，同样含有游离或者融合的 Fe_2S_2 结构域，其中MycG+FMN+ Fe_2S_2 组合可能是由于将天然融合的双结构域FMN和 Fe_2S_2 拆分后，造成蛋白构象变化影响到电子传递过程，进而丧失了催化活性。游离状态的FMN和游离状态的 Fe_2S_2 之间的电子传递效率最低，对细胞色素C的还原效率仅为 $0.46 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.03 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ，仅为RhFRED(N-FMN- Fe_2S_2 -C)的0.03%；游离的FMN从NADPH获取电子的速率也是最低的 [$5.04 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.07 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$]（表3）。含有 Fe_2S_2 结构域的融合蛋白N-MycG- Fe_2S_2 -FMN-C、N-FMN-MycG- Fe_2S_2 -C和N- Fe_2S_2 -MycG-FMN-C，虽然成功获得可溶性蛋白，但均检测不到420 nm的特征吸收峰和450 nm迁移峰，可能是因为还原伴侣和MycG相对位置的改变，使得“非天然”融合蛋白在折叠的过程中构象发生了改变，未能获得活性形式的P450酶。3种融合蛋白对铁氰化钾和细胞色素C均具有还原能力（表3）：FMN→ Fe_2S_2 ， $5.58 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $6.92 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.01 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $6.64 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.02 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ； Fe_2S_2 →heme， $5.04 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.009 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $8.42 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.003 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ vs $3.23 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}) \pm 0.009 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ ，暗示融合蛋白不同组分之间仍然能够建立电子传递链。

在还原伴侣的电子传递链中，铁氧还蛋白Fdx与P450直接发生相互作用，Fdx将来自于FdR的电子传递到P450酶的heme铁催化中心。相较于FdR，Fdx与P450的适配性是P450催化系统中更为主要的因素^[19]。例如P450_{cam}对其特有的铁氧还

蛋白Pdx具有高度严谨的选择性，在对P450_{cam}与Pdx复合物的三维结构解析中发现，Pdx不仅具有传递电子的功能，还具有诱导P450_{cam}发生构象变化的作用^[25]。张丽兰等^[26]利用X射线晶体学技术，成功解析了“自给自足P450酶”CYP116B46的高分辨率蛋白结构：由两段连接肽相连3个结构域，从N端到C端依次为P450、FMN和 Fe_2S_2 ，电子的传递方向为FMN→ Fe_2S_2 →heme，FMN和 Fe_2S_2 之间的直线距离为0.79 nm，但 Fe_2S_2 和heme的直线距离为2.53 nm，超过目前认定的有效电子可直接传递的距离，因此两者的氨基酸可能在电子传递过程中扮演着重要角色，该结果也证明了 Fe_2S_2 结构域不仅具有传递电子的功能。

本研究实验结果发现，还原伴侣RhFRED或者其结构域蛋白（FMN与 Fe_2S_2 ）存在时，MycG催化M-IV获得的产物多样性提高，既含有氧化产物M-I、M-II和M-V，又产生脱甲基产物dMe-M-IV，暗示不同类型还原伴侣能够影响和改变P450催化效率和产物组成^[17]。值得一提的是，单组分融合蛋白N-MycG- Fe_2S_2 -FMN、N-FMN- Fe_2S_2 -MycG-C和双组分系统MycG+N-FMN- Fe_2S_2 -C（RhFRED）3种组合中，脱甲基产物dMe-M-IV为主产物（图5 B2、B3和C9）；而在单组分系统N-MycG-FMN- Fe_2S_2 -C，双组分系统N-FMN-MycG-C+ Fe_2S_2 和三组分系统MycG+0978+ Fe_2S_2 组合中，羟基化产物M-V为主产物（图5 B1、C1和A2）。上述结果说明，除还原伴侣的选择之外^[27-28]，还原伴侣与P450酶的融合方式和催化系统蛋白组成的改变均会对产物分布造成影响。

不同于传统P450蛋白自身的改造，本研究通过模拟P450酶与还原伴侣的不同进化形式，利用还原伴侣工程策略构建“非天然”P450催化系统，通过改变还原伴侣和P450酶的融合方式和相对位置，成功影响和改变了MycG反应的产物分布和产物类型，是一种有效的酶工程策略，将有助于开发最佳的细胞色素P450酶及其还原伴侣催化系统，实现特定的目标化学反应。值得指出的是，还原伴侣影响和改变P450酶催化性质的隐藏机制，以及P450催化构象和产物偏好性的选择性机制仍需更加深入的研究和探索。

致谢: 本工作得到国家重点研发计划(2019YFA0905700和2019YFA0905100)、国家自然科学基金项目(82022066和32000039)和山东大学微生物技术国家重点实验室开放课题(M2021-4)支持。感谢日本Toho University的Yojiro Anzai教授为本研究提供麦新米星M-I、M-II、M-IV和M-V等标准品化合物;感谢山东大学微生物技术国家重点实验室生命环境研究公共技术平台的朱敬、曲径遥和黎志凤老师在LC-HRMS样品检测 and 数据分析方面提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] GIRVAN H M, MUNRO A W. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 31: 136-145.
- [2] GUENGERICH F P, MUNRO A W. Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(24): 17065-17073.
- [3] LAMB D C, WATERMAN M R. Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1612): 20120434.
- [4] GUENGERICH F P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2001, 14(6): 611-650.
- [5] SEVRIOUKOVA I F, GARCIA C, LI H Y, et al. Crystal structure of putidaredoxin, the [2Fe-2S] component of the P450_{cam} monooxygenase system from *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 333(2): 377-392.
- [6] KEIZERS P H J, MERSINLI B, REINLE W, et al. A solution model of the complex formed by adrenodoxin and adrenodoxin reductase determined by paramagnetic NMR spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(32): 6846-6855.
- [7] MATSUBARA H, SASAKI R M, CHAIN R K. Spinach ferredoxin (I): Amino acid composition and terminal sequences[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1968, 243(8): 1725-1731.
- [8] RUETTINGER R T, FULCO A J. Epoxidation of unsaturated fatty acids by a soluble cytochrome P450-dependent system from *Bacillus megaterium*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(11): 5728-5734.
- [9] JACKSON C J, LAMB D C, MARCZYLO T H, et al. A novel sterol 14 α -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCC-YP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(49): 46959-46965.
- [10] JACKSON R G, RYLOTT E L, FOURNIER D, et al. Exploring the biochemical properties and remediation applications of the unusual explosive-degrading P450 system XpIA/B[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(43): 16822-16827.
- [11] MUNRO A W, DAFF S, COGGINS J R, et al. Probing electron transfer in flavocytochrome P-450 BM3 and its component domains[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 239(2): 403-409.
- [12] MCLEAN K J, LUCIAKOVA D, BELCHER J, et al. Biological diversity of cytochrome P450 redox partner systems[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, 851: 299-317.
- [13] LI S Y, PODUST L M, SHERMAN D H. Engineering and analysis of a self-sufficient biosynthetic cytochrome P450 PikC fused to the RhFRED reductase domain[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(43): 12940-12941.
- [14] NODATE M, KUBOTA M, MISAWA N. Functional expression system for cytochrome P450 genes using the reductase domain of self-sufficient P450RhF from *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(4): 455-462.
- [15] 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]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(9): 2847-2852.
- [16] ANZAI Y, LI S Y, CHAULAGAIN M R, et al. Functional analysis of MycCI and MycG, cytochrome P450 enzymes involved in biosynthesis of mycinamicin macrolide antibiotics[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(9): 950-959.
- [17] ZHANG W, LIU Y, YAN J Y, et al. New reactions and products resulting from alternative interactions between the P450 enzyme and redox partners[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(9): 3640-3646.
- [18] GUENGERICH F P, MARTIN M V, SOHL C D, et al. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-Cytochrome P450 reductase[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(9): 1245-1251.
- [19] ZHANG W, DU L, LI F W, et al. Mechanistic insights into interactions between bacterial class I P450 enzymes and redox partners[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(11): 9992-10003.
- [20] TASNIM H, LANDRY A P, FONTENOT C R, et al. Exploring the FMN binding site in the mitochondrial outer membrane protein mitoNEET[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 156: 11-19.
- [21] HEIKAL A A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies[J]. *Biomarkers in Medicine*, 2010, 4(2): 241-263.
- [22] LACOUR T, OHKAWA H. Engineering and biochemical characterization of the rat microsomal cytochrome P4501A1 fused to ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase from plant chloroplasts[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure*

- and Molecular Enzymology, 1999, 1433(1/2): 87-102.
- [23] WANG Q, HUANG X N, ZHANG J J, et al. Engineering self-sufficient aldehyde deformylating oxygenases fused to alternative electron transfer systems for efficient conversion of aldehydes into alkanes[J]. Chemical Communications, 2014, 50(33): 4299.
- [24] HUNTER D J B, ROBERTS G A, OST T W B, et al. Analysis of the domain properties of the novel cytochrome P450 RhF[J]. FEBS Letters, 2005, 579(10): 2215-2220.
- [25] TRIPATHI S, LI H Y, POULOS T L. Structural basis for effector control and redox partner recognition in cytochrome P450[J]. Science, 2013, 340(6137): 1227-1230.
- [26] ZHANG L L, XIE Z Z, LIU Z W, et al. Structural insight into the electron transfer pathway of a self-sufficient P450 monooxygenase[J]. Nature Communications, 2020, 11: 2676.
- [27] SADEGHI S J, MEHARENNA Y T, FANTUZZI A, et al. Engineering artificial redox chains by molecular 'LEGO' [J]. Faraday Discussions, 2000(116): 135-153.
- [28] LI Z, JIANG Y Y, GUENGERICH F P, et al. Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechno-

logical applications[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(3): 833-849.



通讯作者: 张伟(1982—),男,博士,教授。主要研究方向为合成生物学、天然产物生物合成、酶工程。

E-mail: zhang_wei@sdu.edu.cn



第一作者: 杨超凡(1997—),女,硕士研究生。主要研究方向为酶工程、合成生物学。

E-mail: yangchaofan@mail.sdu.edu.cn