

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-008

基于非天然结构组件的人工酶设计与应用

袁飞燕, 于洋, 李春

(北京理工大学化学与化工学院生化工程系, 合成生物系统研究所, 北京 100081)

摘要: 人工酶是由人类设计得到的具有类似天然酶活性的催化剂。人工酶设计可能成为天然酶研究的补充, 揭示天然酶的催化机理, 实现天然酶尚未实现的作用。酶由20种天然氨基酸残基以及有限种类的辅因子组成, 限制了蛋白质可实现的结构、反应性和功能空间。通过在蛋白质中引入非天然结构组件, 包括非天然氨基酸和非天然辅因子, 可以得到具有较高催化活性或全新反应性的人工酶。本文总结了引入非天然氨基酸和非天然辅因子构建人工酶和高效制备此类人工酶的策略, 并以参与氧化还原反应的人工金属酶为例, 探讨构建人工酶的方法, 包括通过基因密码子扩展技术引入含生物正交反应基团或金属螯合基团的非天然氨基酸, 或通过非共价、共价相互作用在骨架蛋白中引入非天然金属卟啉和其他金属有机催化剂, 展望了引入非天然结构组件结合计算设计或代谢工程构建人工酶的新方法, 这有助于实现媲美天然酶效率的人工酶的设计与应用。

关键词: 人工酶设计; 非天然氨基酸; 非天然辅因子; 引入策略; 氧化还原反应

中图分类号: Q814.9 **文献标志码:** A

Artificial enzyme designs and its application based on non-natural structural elements

YUAN Feiyan, YU Yang, LI Chun

(Department of Biochemical Engineering, Institute for Synthetic Biosystem, School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: Artificial enzymes are catalysts designed by humans beings with similar activities to those of natural enzymes. The design of artificial enzymes may be a supplement for the study of natural enzymes, which can reveal the catalytic mechanism of natural enzymes and lead to catalysts for novel reactions. Enzymes are composed of 20 kinds of natural amino acids residues and a limited number of cofactors, which limits the structure, reactivity and functional space that proteins can access. Artificial enzymes with high catalytic activity or novel reactivity can be obtained by introducing non-natural structural components, including unnatural amino acids and non-natural cofactors into proteins. This article summarizes strategies for construction of artificial enzymes and efficient preparations of such artificial enzymes with unnatural amino acids and non-natural cofactors. Taking artificial metalloenzymes involved in the redox

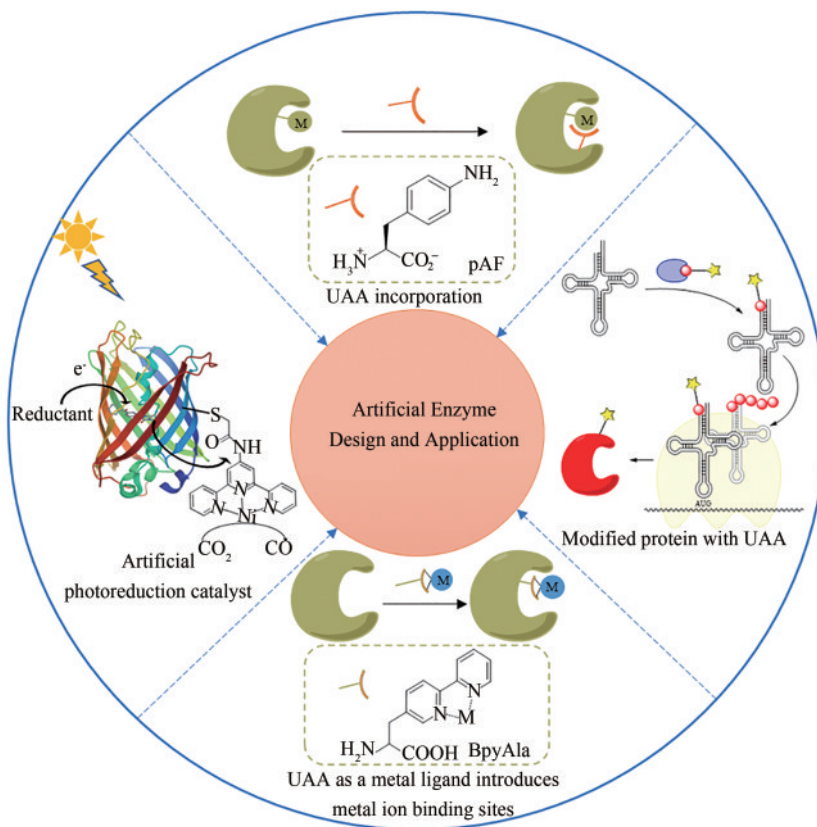
收稿日期: 2020-02-09 修回日期: 2020-04-30

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0903300, 2016YFA0502400)

引用本文: 袁飞燕, 于洋, 李春. 基于非天然结构组件的人工酶设计与应用[J]. 合成生物学, 2020, 1(6): 685-696

Citation: YUAN Feiyan, YU Yang, LI Chun. Artificial enzyme designs and its application based on non-native structural elements[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(6): 685-696

reactions as examples, this review discusses methods to construct artificial enzymes through introduction of unnatural amino acids containing bio-orthogonal reaction groups or metal chelating groups by genetic codon expansion, or through introduction of non-natural metalloporphyrins and other organometallic cofactors into scaffold proteins by covalent or non-covalent attachments. Emerging methods for construction of artificial enzymes using non-natural structural elements combined with computational design or metabolic engineering is prospected. These will be helpful to accelerate the design and preparation of artificial enzymes, leading to artificial enzymes with comparable activities to the native enzymes, and they will have great potential for industrial applications.



Keywords: artificial enzymes design; unnatural amino acid; non-natural cofactor; introduction strategy; redox reaction

酶的高催化性能促进其在化学品合成和材料催化剂中的应用。部分天然酶存在成本昂贵、产率低、稳定性差等不足。在参与氧化还原反应的酶中，多数酶在反应中需要辅酶或辅基^[1]，这更加大了天然酶的使用成本。人工酶是以酶的催化原理为基础，模拟酶的生物催化功能，用化学法和生物法合成的具有特定催化功能的生物大分子。人工酶可以弥补天然酶的不足。人工酶已被用作控制化学反应的高效催化剂^[2]，同时有助于天然酶机理的深入研究^[3]。此外，天然酶对底物具有

高度专一性而使底物种类受限，影响在工业上的应用，而人工酶可扩大反应底物范围^[4]。

在对天然酶的研究和改造中，研究者发展出了定向进化、理性设计等方法。例如在定向进化中常用到的易错聚合酶链反应（epPCR）和DNA-shuffling。通过在酶的结合口袋内分区饱和诱变也成为一种有效的方法，称为组合活性中心饱和测试（CAST）。而迭代饱和突变（ISM）更适合进一步的遗传优化^[5]。通过改变氨基酸序列对酶进行改造，得到具有特定功能的酶，成为众多研究者

青睐的方法。研究者为了创造新的、具有与天然酶催化能力相当,甚至优于天然酶催化能力的人工催化剂,常常对酶的底物识别位点、活性位点催化基团以及疏水微环境进行设计^[6-7]。Arnold等^[8-19]从具有单加氧活性的P450酶出发,通过定向进化改变氨基酸序列,使P450酶可以催化C—H活化和C—C、C—N、C—S、C—Si键形成,提高其催化效率或产生新的底物特异性,实现了天然酶不能催化,甚至化学方法难以进行的反应。但是蛋白质是由20种天然氨基酸残基(此外还有硒代半胱氨酸和吡咯赖氨酸)以及有限种类天然辅因子组成,这大大限制了蛋白质可实现的结构、反应性、功能空间。而非天然结构组件(包括非天然氨基酸及非天然辅因子)的引入,可以将一些特殊化学基团(如叠氮基、炔基、联吡啶等)掺入蛋白质特定位点,或引入具有荧光等特殊光谱学性质、模拟翻译后修饰等的氨基酸,这都可以为拓展人工酶的性质提供新的科学视角。因此,引入非天然结构组件构建人工酶,已成为新的人工酶的设计策略。本文作者将以参与氧化还原反应的人工金属酶为例,探讨基于非天然结构组件的人工酶的设计方法。展望引入非天然结构组件结合计算设计或代谢工程构建人工酶的新方法,这有助于实现媲美天然酶效率的人工酶的设计与应用。

1 非天然氨基酸的引入策略

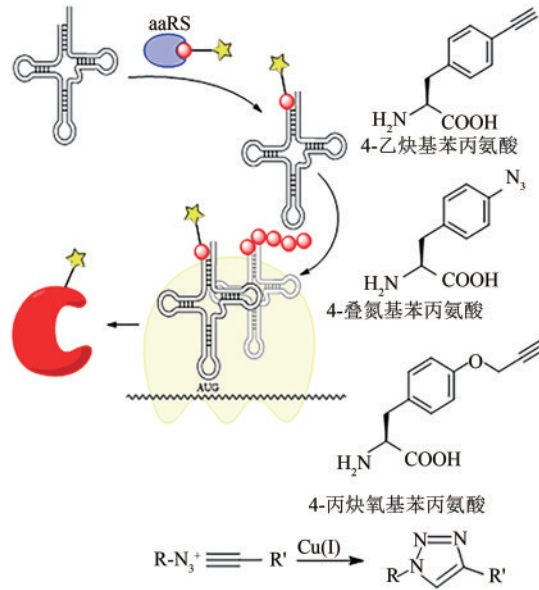
利用非天然氨基酸(UAAs)扩展遗传密码大大增加了蛋白质可供改造的化学空间。基因密码子扩展技术^[20]是利用无义密码子实现蛋白质中非天然氨基酸的定点引入的方法。这种方法的关键是保持正交性。具体而言,UAA的密码子不应编码共同的氨基酸;新的tRNA/氨酰tRNA合成酶(aaRS)都不与任何内源性tRNA合成酶对发生反应;新的合成酶只应识别UAA,保证不识别20种天然氨基酸^[21]。正交aaRS将UAA装载到tRNA上,该tRNA在核糖体中识别mRNA上相应的无义密码子,从而导致UAA掺入目标蛋白中。将具有叠氮、炔基等活性基团的UAA掺入蛋白质中,可以利用Cu(I)催化的叠氮化物-炔烃环加成反应偶联小分子催化剂[图1(a)]^[22-23]。这一技术可

以在蛋白质特定位点引入具有特殊功能或化学性质的非天然氨基酸,为拓展蛋白质的性质或者创造全新的蛋白质提供了强有力的工具。

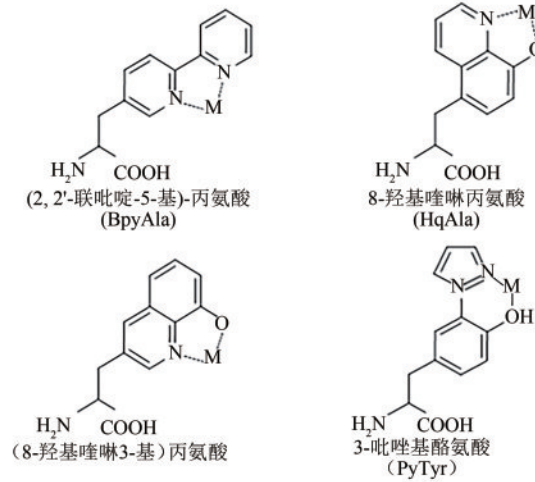
金属是酶催化中的重要辅因子,在蛋白质结构中起着关键的调节作用^[24]。金属酶可以催化氧化还原、水解等多种反应,参与了生物圈重要的物质转化过程。但是,在天然氨基酸中,仅有7种的侧链可以与金属离子配位,而金属离子结合位点需要精确定位多个氨基酸配体,这使得设计全新的金属结合位点,构建人工酶成为巨大的挑战。小分子配位化学研究中有很多常用的多齿配体,在一个分子内通过不同的官能团与金属离子形成配位作用,对金属离子有很高的亲和力。我们可以在蛋白质中方便地通过引入含多齿配体侧链的非天然氨基酸构建高亲和力的金属位点,实现人工酶的设计[图1(b)]^[25]。例如Liu等^[26]在绿色荧光蛋白中引入8-羟基喹啉丙氨酸(HqAla),可以得到对铜的亲和力为fmol/L级别的金属结合位点,这一亲和力已经高于很多天然金属酶。

非天然氨基酸可以用于人工金属酶的构建。大多数的过渡金属催化的反应不能由天然金属酶介导,而引入非天然氨基酸则允许过渡金属的位点特异性配位,从而形成新的人工金属酶。LmrR是一个细菌的转录抑制蛋白,其二聚体间含有一个大的疏水孔,它杂泛的结合口袋为平面分子结合提供了一个合适的环境。Drienovská等将LmrR的基因中M89位突变为对应琥珀终止密码子的TAG,用于非天然氨基酸引入。M89位于疏水口袋的远端,从而避免了金属配合物形成活性差的2:1配体的风险。通过将非天然氨基酸(2,2'-联吡啶-5基)丙氨酸(BpyAla)引入LmrR,提供一个稳定的金属结合位点,使得Cu(II)能被结合到BpyAla上。他们通过遗传方法快速优化构建人工金属酶LmrR_LM_M89X_F93W(其中X为非天然氨基酸BpyAla),可催化不对称Friedel-Crafts烷基化反应。在该人工酶催化的不对称乙烯基Friedel-Crafts烷基化反应中,产物的ee值高达83%^[27-28]。

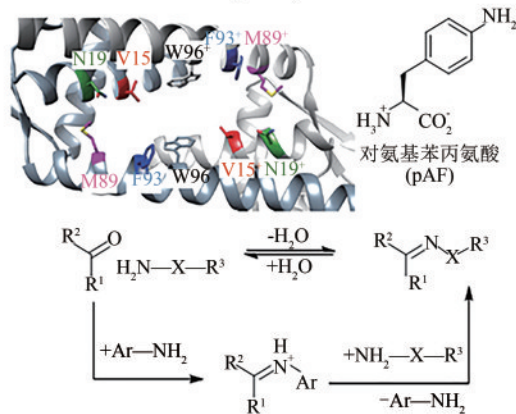
除了通过引入金属离子外,非天然氨基酸中的独特官能团还可以在活性中心直接参与反应。Drienovská等^[29]通过引入对叠氮苯丙氨酸(pAzF)还原的策略将非天然氨基酸引入至LmrR结合口袋附近的四个不同的位置(V15、N19、M89和F93)



(a) 引入含叠氮、炔基等基团的UAA通过生物正交反应偶联小分子催化剂^[22-23]
 (a) Introduction of bio-orthogonal groups and coupling of small molecule catalysts (UAA with azide, alkynyl and other groups)^[22-23]



(b) UAA作为金属配体构建金属离子结合位点 (不同的UAA及金属结合方式)^[25]
 (b) UAA as a metal ligand introduces metal ion binding sites (Different UAA and metal binding methods)^[25]



(c) 在二聚体LmrR疏水孔中引入UAA作为酶活性中心^[29]
 (c) Close-up of the hydrophobic pores of the dimer LmrR. UAA introduces groups as active centers^[29]

图1 利用UAAs构建人工酶的设计策略^[22-23, 25, 29]

Fig. 1 Design strategies for constructing artificial enzymes using UAAs^[22-23, 25, 29]

作为酶活性中心，构建了新的人工酶 [图 1 (c)]^[29]。他们首先在 LmrR 中引入 pAzF，再用三羧基乙基膦 (TCEP) 将其还原成对氨基苯丙氨酸 (pAF)。这解决了直接引入 pAF 导致的低表达率及酪氨酸和苯丙氨酸的错误掺入的问题。构建的人工酶中 LmrR_V15pAF 具有独特的苯胺侧链，增加了酶的反应活性，可以作为形成脎的良好催化剂 (产率为 $72\% \pm 3\%$)。UAA 引入的 pAF 作为活性反应中心，在苯胺的存在下形成亚胺离子中间体，加速了脎 ($X=NH$) 和脎 ($X=O$) 的形成 [图 1 (c)]^[29]。在此基础上，最近 Mayer 等^[30] 将以非天然氨基酸为催化残基的人工酶 LmrR_V15pAF 作为定向进化的起点，通过识别蛋白质支架中的有益突变，增强非天然侧链的固有催化活性，使酶的 k_{cat} 增加至 452 s^{-1} ，相比 LmrR_V15pAF 提高了近 100 倍，促进了脎的高效合成。

2 非天然辅因子的引入策略

天然酶常使用卟啉、钴胺素等金属配合物作为辅因子参与催化反应。天然酶使用的金属局限在铁、铜、锌、钴等少数种类，配体的类型也很单一。随着金属有机催化发展，很多过渡金属，尤其是贵金属被认为具有很好的催化活性。将这类金属配合物作为辅因子与蛋白质结合，可以构建人工酶，催化新的反应。

链霉亲和素 (SAV) 已被广泛用作制造人工金

属酶的支架。Whitesides 等^[31] 在亲和素中引入了一种生物素化的有机金属催化剂，以提供一种混合催化剂，该催化剂结合了酶和有机金属催化剂的特征。生物素化的有机金属辅因子对链霉亲和素的非共价亲和力提供了良好的稳定性，将少量的生物素化有机金属催化剂与 SAV 突变体结合起来，可以产生显著的多样性，从而优化人工金属酶的催化性能 [图 2 (a)]^[32-33]。Jeschek 等^[34] 证明了链霉亲和素生物素技术在体内的适用性的同时，用此策略创造人工金属酶催化天然酶中不存在的一种反应机制——烯烃复分解反应。此方法得到的人工金属酶还可以通过针对不同底物的定向进化继续改进人工酶的活性。

以血红素作为辅因子的蛋白参与氧气运输或氧激活反应，是金属酶研究的焦点之一^[35-37]。其中，肌红蛋白和血红蛋白结构简单，易于获取，被公认为分子工程研究的优良起点^[38]。在 20 世纪上半叶就有研究者通过将蛋白脱辅基、重组在血红蛋白中引入非天然卟啉^[39]。研究人员分别在肌红蛋白中引入非天然卟啉，构建了不同的人工酶^[40-43]。其中，Lu 课题组用非天然血红素和非天然金属离子替代天然的血红素及金属离子，以调节底物亲和力、电子转移速率和酶的活性。例如将非生物辅因子锰-双席夫碱复合物掺入肌红蛋白中，赋予其生物学功能，并证明了金属因子的锚定可以调节酶的对映选择性。此外，他们还探讨了蛋白质主链的相互作用；证明了疏水性和 H 键网络的重要性；以及还原电势是轴向配体疏水性主要决定因素^[43-45]。

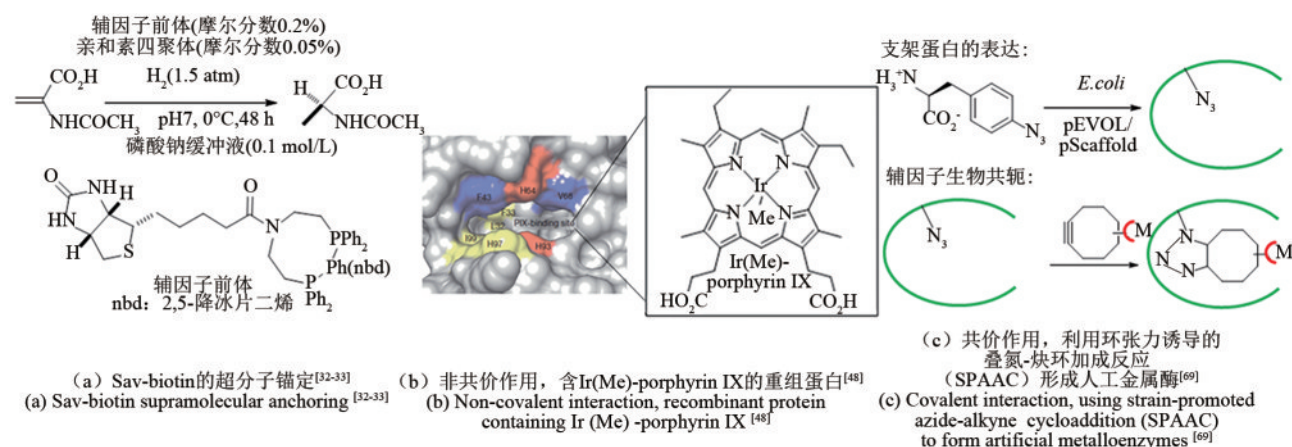


图2 非天然辅因子不同的引入策略^[32-33, 48, 69]

Fig. 2 Different introduction strategies for non-natural cofactors^[32-33, 48, 69]

Hartwig 课题组将金属有机催化的研究经验结合到人工金属酶的构建, 在蛋白质中加入了完整的贵金属复合物, 从而产生了人造金属蛋白。他们将有机金属配合物的反应多样性与酶的选择性相结合, 构建出具有类似天然酶活性的人工酶^[46]。Key 等^[47] 将肌红蛋白中铁卟啉 (Fe-porphyrin IX) 替换为含有 Fe (Cl), Co (Cl), Cu, Mn (Cl), Rh, Ir (Cl), Ir (Me), Ru (CO) 和 Ag 的卟啉结构。其中含有 Ir (Me) -porphyrin IX 的重组蛋白 [图 2 (b)]^[48] 显示出对卡宾转移反应具有一定的催化能力。

含 Ir (Me) -porphyrin IX 的重组肌红蛋白较天然酶的催化速率还相差甚远, 所以 Dydio 等^[46] 选择了热稳定性更好的 P450 酶 CYP119, 将铁卟啉替换为 Ir (Me) -PIX。所得的人工金属酶 Ir (Me) -porphyrin IX CYP119 经过定向进化, 反应速率和选择性大大提高, Ir (Me) -porphyrin IX CYP119 的突变体催化卡宾插入 C—H 键, 其 ee 值高达 98%。最终得到的人工酶催化卡宾插入 C—H 键的 TOF 达到 2550 h⁻¹, 总转化数 35 000, 达到了与天然 P450 酶催化单加氧反应相似的水平。Dydio 等^[49] 证明了 Ir (Me) -CYP119 酶催化 C—H 胺化反应具有较高的化学选择性, 可用于插入硝基苯还原为磺胺。Ir (Me) P450 催化的插入反应容纳了小分子催化剂不能容纳的一系列官能团, 其底物范围比含铁卟啉的酶更广^[50]。以上 Hartwig 课题组提出的人工金属蛋白的制备方法, 为多种卟啉-蛋白质支架和非天然金属辅因子合成人工酶催化的广泛的非生物转化奠定了基础。

改造天然辅因子得到的新的辅因子也可以为新的酶化学提供助力。Ji 等^[51] 合成了三种新的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 类似物。F 作为一个强吸电子基团在 C⁵ 位置损害辅因子结合特性, 因此用 Cl、Br 或甲基取代 F 合成三种新的 NAD 类似物。就它们催化 L-苹果酸的氧化脱羧而言, 每对 NAD 类似物和双突变体 (ME L310R/Q401C) 均与 NAD 和天然大肠杆菌苹果酸酶 ME 具有良好的正交性, 可以进一步探索氧化还原酶与辅因子之间的分子相互作用, 从而产生新的生物正交氧化还原体系。

除了简单的金属离子、金属配位化合物外, 一些酶含有金属团簇, 如固氮酶中的铁钼辅因子、

光系统中的光合放氧中心等, 催化了许多重要的反应^[52-57]。在蛋白质骨架中引入这些团簇是对蛋白质设计的挑战。Mirts 等^[58-62] 选择分子量小且稳定的细胞色素 c 过氧化物酶 (CcP) 作为模型, 其活性位点有一个足以容纳 [4Fe-4S] 簇的空腔。通过体外重组在 Apo-SiRCcP 中加入了一个铁硫簇, 设计了多核人工金属酶用作催化剂。理性设计金属和底物结合位点周围的第二配位层, 三个 Cys 突变 (T180C, W191C, L232C) 以协调 [4Fe-4S], 稳定性突变 M230A 用于缓解空间碰撞, D235V 用以移除干扰 CcP 中的 Cys-Heme 协调附近的负电荷, H175C 突变作为血红素与 [4Fe-4S] 辅因子之间的桥联 Cys 配体, 使其形成了紧密的结构, 这一系列理性设计创造了接近天然酶 SiR 活性的人工金属酶, 这些第二配位相互作用对于优化设计策略以实现人工酶的多电子氧化还原的高活性具有重要意义。此种策略为设计多种人工金属酶提供了机会, 甚至超过小分子催化剂的化学反应活性。

除了直接改造辅因子, 对底物结合口袋的改造也可以实现人工酶的构建, 比如 Watanabe 小组发展的诱饵分子 (decoy molecule) 策略。一种模式 P450 酶, P450 BM3 通常以长链脂肪酸为底物。Watanabe 等通过引入诱饵分子结合在活性口袋中构建特定的底物结合位点, 极大地增强了 P450 酶对小分子非天然底物的催化杂泛性^[63-64], 实现了丙烷、苯等非天然底物的羟化。研究人员将该策略用于小分子底物光脱羧酶^[65] 和烯炔水合酶^[66] 的构建, 显示了这一策略在人工酶设计方面的潜力。Cong 等^[67-68] 报道了双功能小分子 (dual-functional small molecule, DFSM) 策略, 令诱饵分子的酰基氨基酸基团与酶的活性口袋结合, 而咪唑基在 H₂O₂ 的活化中发挥酸碱催化剂的作用, 成功将 P450 单加氧酶改造为过加氧酶 (peroxygenase), 摆脱了对 NADPH 辅酶的依赖。该研究拓展了 P450 酶在有机合成中的潜在用途, 为人工 P450 酶的设计提供了新的途径。

3 非天然氨基酸与非天然辅因子的协同引入策略

非天然氨基酸和非天然辅因子的引入可以大

大扩展蛋白质结构中可及的官能团，拓展现有酶的功能。而同时引入非天然氨基酸和非天然辅因子，可以进一步增加人们对蛋白质的改造能力，得到定制化的人工酶。

相比通过非共价相互作用引入非天然辅因子，将非天然辅因子与骨架蛋白共价偶联可以提高人工酶的鲁棒性。通过基因密码子扩展引入含生物正交基团的非天然氨基酸，可以实现非天然辅因子的定点特异共价锚定。利用环张力诱导的叠氮-炔环加成反应 (SPAAC) 将金属催化剂引入蛋白质，形成人工金属酶，同时消除自然发生的锚定残基带来的选择性、反应性差等限制 [图 2 (c)]^[69]。Yang 等^[69] 通过 pAzF 将含铑配体引入咪唑甘油磷酸合酶的合成酶亚基 (tHisF) 中，实现了卡宾转移和 C—C、C—Si 键成键。

化学家一直致力于设计催化剂，以模仿自然光合系统获取可见光光子的能力，并利用光子吸收的能量来驱动化学反应。Liu 等^[70] 设计了一种光催化 CO₂ 还原酶。他们在黄色荧光蛋白 (sfYFP) 中，使用遗传密码子扩展技术用二苯甲酮-丙氨酸 (BpA) 替换发色团残基 Tyr66，而 Gly65-BpA66-Gly67 可自催化转化为高荧光的对羟基苄基-5-咪唑啉酮的发色团，从而设计得到一种新的光敏蛋白 (PSP)，激发后转换为能够用于较远距离电子转移的三重态，氧化弱牺牲还原剂产生一个强还原自由基，用于驱动 CO₂ 还原催化剂的还原。为了将 PSP 转化为光催化 CO₂ 还原酶，他们使用了三联吡啶镍配合物，成功进行了有效的光化学还原反应，催化 CO₂ 还原为 CO (图 3)^[70]。该策略代表了一种很有前景的光氧化还原酶设计的新方法，同时也为具有非天然光催化活性的人工酶提供了新的方向。

4 人工酶的高效制备策略

由于翻译效率的降低，含 UAA 的蛋白质的产率往往比野生型蛋白质的产率低，但某些非天然氨基酸可以有较好的产率。Schultz 等^[71] 使用 tRNA_{CUA}^{Tyr}/MjTyrRS 正交对将非天然氨基酸 pAcF 分别引入 T4 溶菌酶的第 68 位和酮类固醇异构酶的第 78 位，在这两种情况下都观察到有效的蛋白质表达，

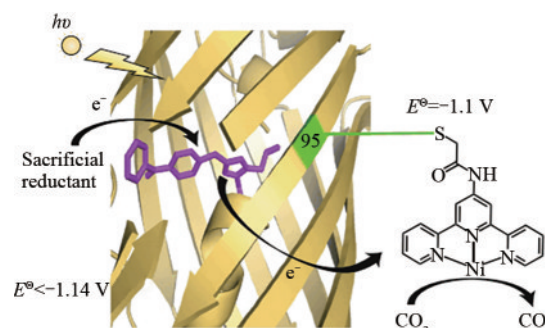


图3 PSP2T 催化机理示意图^[70]

Fig. 3 Schematic diagram of the proposed catalytic mechanism of PSP2T^[70]

其产率相应的约为野生型蛋白的 50%。而对碘苯丙氨酸 (pIPhe)、二氟代酪氨酸 (F2Tyr) 的掺入已经在一系列蛋白质展现出接近野生型的产量^[72-74]。

由于非天然氨基酸和非天然辅因子大部分时候需要通过化学合成，导致人工酶成本较高、难以直接在细胞中直接制备。通过酶工程与代谢工程相结合，可以在细胞内构建非天然氨基酸和非天然辅因子的合成通路，实现人工酶的体内组装并直接参与细胞中的代谢反应。在大肠杆菌中加入生物合成途径以及正交的 tRNA 合成酶-tRNA 对，产生新的大肠杆菌表达系统，可在体内掺入非天然氨基酸，如 pAF^[75] 和吡咯氨基酸 (Pyl)^[76]。pAF 是氯霉素等天然产物合成的中间体。Mehl 等^[75] 在大肠杆菌中引入 *Streptomyces venezuelae* 强化分支酸的合成。过量积累的分支酸被大肠杆菌内源的酪氨酸转氨酶转化生成 pAF。经过代谢强化，内源生产的 pAF 可以被相应的 tRNA 合成酶识别，引入到蛋白质中。

Marchand 等^[77] 确定并表征了一种生物合成途径，用于生产含有卤素、末端烯烃和末端炔烃的氨基酸，并采用了一种氨酰-tRNA 合成酶 (PraRS) 取代 Met 残基的方法，证明这些内源产生的氨基酸可以翻译成蛋白质。这些非天然氨基酸的官能团被引入肽和蛋白质的特定位点为多种下游生物正交化学提供了机会。特别是末端炔基通过 Cu (I) 催化叠氮-炔环加成“点击”反应 (CuAAC) 得以被广泛应用。类似地，非天然氨基酸氟硫酸盐-酪氨酸 (FSY) 被成功引入蛋白质中，利用基因编码的化学转化策略 (GECCO)，通过硫氟化交换 (SUFEX) 选择性与近端氨基酸反应，在活细胞蛋

白质中引入新的化学反应赋予新的共价键能力^[78-79]。

5 总结与展望

在人工酶设计的过程中，无论采取哪种策略都不可避免地存在耗时费力的壁垒，特别是想将蛋白质催化剂的效率提高几个数量级。而理性设计人工酶，引入UAAs等非天然结构组件选择正确的特定位点也是一个挑战。很多通过数据库检索或者组学分析得到的蛋白质往往没有三维结构，同源建模的方法可以基于氨基酸或者核酸序列预测蛋白质的结构。通过计算机辅助或者人工智能可以大大降低人工酶设计的工作量。量子力学/分子力学(QM/MM)模拟计算方法已被用来优化人工酶设计及阐明其机制^[80]。Rosseta等软件基于大数据中得到的能量函数对蛋白质结构进行预测，寻找低能量构像，这种设计方法也被应用到含有非天然氨基酸的酶催化剂的设计中。同时，Mills等^[81]将Rosetta设计方法用于设计金属蛋白，利用Bpy-Ala作为结合金属离子的主要配体。他们设计了一个金属结合位点，由Bpy-Ala、两个蛋白质金属配体以及两种金属结合水分子组成的八面体配位几何结构。Bpy-Ala介导的金属蛋白具有与Co²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺和Ni²⁺等二价阳离子结合的能力。同时，Mills团队对设计的蛋白质进行X射线晶体分析，发现晶体结构与计算设计的模型非常接近，展示了Rosetta对于金属蛋白设计的能力。Yang等^[82]最近对18个蛋白的从头设计，更进一步证明了Rosetta可以更精确地设计蛋白模型。计算方法的改进，为人工酶的计算设计和实验室进化提供了良好的起点^[83-84]。

综上所述，通过引入非天然氨基酸及非天然辅因子等多种策略能有效合成具有新功能和新结构性质的新人工酶。有机金属的合理引入也为人工酶的设计开发了更多的催化性能。非天然氨基酸代谢合成系统的创造，也可用于体内直接合成非天然氨基酸，引入多肽药物中具有新药效的结构，进一步促进生物医药、绿色化学等行业的发展。正交氨酰tRNA合成酶可以在表达宿主体内将

非天然氨基酸特异性地引入蛋白的特定位点，生产修饰蛋白可以避免人工添加非天然氨基酸的烦琐，也能降低生产成本。非天然结构组件与蛋白质的结合为新反应的拓展提供了基础。

目前为止，大部分人工酶只能在纯化后进行反应。随着合成生物学的发展，将具有非天然组件的人工酶与细胞代谢过程进行整合，合成自然界不存在的分子也成为一种前沿课题。Reynolds等改造细胞色素P450，利用空间位阻使其识别小于血红素的卟啉分子，又引入血红素^[85]转运通道ChuA，向细胞内导入非天然卟啉。他们构建了正交酶/辅因子对，可能为增加辅因子多样性和扩大细胞蛋白质化学功能提供一种通用策略，使辅因子选择性地结合到正交蛋白支架，而不与内源性元件发生干扰反应。在一篇ChemRxiv预印本论文中，Huang等^[86]通过与ChuA类似的hug作为卟啉转运体系，将钷卟啉转运进入大肠杆菌细胞中。在大肠杆菌细胞中表达的CYP119突变体可以结合钷卟啉，催化了以香芹酮为底物的卡宾转移反应，合成了一种非天然的萜类化合物。将人工酶与代谢工程结合，可能合成大量的“非天然”的天然产物，拓展现有的分子结构空间。

非天然结构组件的合理利用为快速进化人工酶、建立具有全新功能的平台奠定了基础。纵然应用非天然结构组件的引入策略得到了一些新的人工酶，但实际工作中，高效的人工酶设计往往需要定向进化、计算模拟甚至代谢工程的结合，动力学因素可能是催化活性的关键。这种多元化方法的结合有望推动更多与天然酶催化效率相媲美的人工酶的发现。

参 考 文 献

- [1] MALATESTA F, ANTONINI G, SARTI P, et al. Structure and function of a molecular machine: cytochrome c oxidase[J]. *Bio-physical Chemistry*, 1986, 68(3): 459-470.
- [2] REETZ M T. Directed evolution of artificial metalloenzymes: a universal means to tune the selectivity of transition metal catalysts? [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(2): 336-344.
- [3] WANG J, HUANG Q, PENG W, et al. P450-BM3 catalyzed sulfoxidation versus hydroxylation: a common or two differ-

- ent catalytically active species? [J]. *Journal of American Chemical Society*, 2020, 142(4): 2068-2073.
- [4] NATOLI S N, HARTWIG J F. Noble-metal substitution in hemoproteins: an emerging strategy for abiological catalysis[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(2): 326-335.
- [5] REETZ M T. Laboratory evolution of stereoselective enzymes: a prolific source of catalysts for asymmetric reactions[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011, 50(1): 138-174.
- [6] CHEN Q, CHEN X, FENG J, et al. Improving and inverting C_β-stereoselectivity of threonine aldolase *via* substrate-binding-guided mutagenesis and a stepwise visual screening[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(5): 4462-4469.
- [7] CHEN X, ZHANG H, MARIA-SOLANO M A, et al. Efficient reductive desymmetrization of bulky 1,3-cyclodiketones enabled by structure-guided directed evolution of a carbonyl reductase[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(10): 931-941.
- [8] BRANDENBERG O F, FASAN R, ARNOLD F H. Exploiting and engineering hemoproteins for abiological carbene and nitrene transfer reactions[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 47(4): 102-111.
- [9] CHEN K, HUANG X, JENNIFER KAN S B, et al. Enzymatic construction of highly strained carbocycles[J]. *Science*, 2018, 360(6384): 71-75.
- [10] ZHANG R K, CHEN K, HUANG X, et al. Enzymatic assembly of carbon-carbon bonds *via* iron-catalysed sp³ C-H functionalization[J]. *Nature*, 2019, 565(47): 67-72.
- [11] YANG Y, CHO I, QI X, et al. An enzymatic platform for the asymmetric amination of primary, secondary and tertiary C(sp³)-H bonds[J]. *Nature Chemistry*, 2019, 11(11): 987-993.
- [12] ZHANG J, HUANG X, ZHANG R K, et al. Enantiodivergent α -Amino C-H fluoroalkylation catalyzed by engineered cytochrome P450s[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(25): 9798-9802.
- [13] BRANDENBERG O F, CHEN K, ARNOLD F H. Directed evolution of a cytochrome P450 carbene transferase for selective functionalization of cyclic compounds[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(22): 8989-8995.
- [14] BRANDENBERG O F, MILLER D C, MARKEL U, et al. Engineering chemoselectivity in hemoprotein-catalyzed indole amidation[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(9): 8271-8275.
- [15] LI F L, KONG X D, CHEN Q, et al. Regioselectivity engineering of epoxide hydrolase: near-perfect enantioconvergence through a single site mutation[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(9): 8314-8317.
- [16] YAO P, CONG P, GONG R, et al. Biocatalytic route to chiral 2-substituted-1,2,3,4-tetrahydroquinolines using cyclohexylamine oxidase mutants[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(3): 1648-1652.
- [17] CHEN X, ZHANG H, FENG J, et al. Molecular basis for the high activity and enantioselectivity of the carbonyl reductase from *Sporobolomyces salmonicolor* toward α -haloacetophenones[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(4): 3525-3531.
- [18] GONG X M, QIN Z, LI F L, et al. Development of an engineered ketoreductase with simultaneously improved thermostability and activity for making a bulky atorvastatin precursor[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(1): 147-153.
- [19] 曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1843-1856.
- QU G, ZHU T, JIANG Y Y, et al. Protein engineering: from directional evolution to computational design[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(10): 1843-1856.
- [20] WANG L, BROCK A, HERBERICH B, et al. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2001, 292(5516): 498-500.
- [21] XIE J, SCHULTZ P G. An expanding genetic code[J]. *Methods*, 2005, 36(3): 227-238.
- [22] DUMAS A, LERCHER L, SPICER C D, et al. Designing logical codon reassignment-expanding the chemistry in biology[J]. *Chemical Science*, 2015, 6(1): 50-69.
- [23] DEITERS A, SCHULTZ P G. *In vivo* incorporation of an alkyne into proteins in *Escherichia coli*[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(5): 1521-1524.
- [24] DAY J W, KIM C H, SMIDER V V, et al. Identification of metal ion binding peptides containing unnatural amino acids by phage display[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(9): 2598-2600.
- [25] YU Y, CUI C, WANG J, et al. Biosynthetic approach to modeling and understanding metalloproteins using unnatural amino acids[J]. *Science China Chemistry*, 2017, 60(2): 188-200.
- [26] LIU X, LI J, HU C, et al. Significant expansion of the fluorescent protein chromophore through the genetic incorporation of a metal-chelating unnatural amino acid[J]. *Angewandte Chemie*, 2013, 52(18): 4805-4809.
- [27] DRIENOVSKÁ I, RIOZ-MARTÍNEZ A, DRAKSHARAPU A, et al. Novel artificial metalloenzymes by *in vivo* incorporation of metal-binding unnatural amino acids[J]. *Chemical Science*, 2015, 6(1): 770-776.
- [28] DRIENOVSKÁ I, ALONSO-COTCHICO L, VIDOSSICH P, et al. Design of an enantioselective artificial metallo-hydratase enzyme containing an unnatural metal-binding amino acid[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(10): 7228-7235.
- [29] DRIENOVSKÁ I, MAYER C, DULSON C, et al. A designer enzyme for hydrazone and oxime formation featuring an unnat-

- ural catalytic aniline residue[J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(9): 946-952.
- [30] MAYER C, DULSON C, REDDEM E, et al. Directed evolution of a designer enzyme featuring an unnatural catalytic amino acid[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(7): 2083-2087.
- [31] WILSON M E, WHITESIDES G M. Conversion of a protein to a homogeneous asymmetric hydrogenation catalyst by site-specific modification with a diphosphinerhodium(I) moiety[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1978, 100(1): 306-307.
- [32] HEINISCH T, WARD T R. Artificial metalloenzymes based on the biotin-streptavidin technology: challenges and opportunities[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2016, 49(9): 1711-1721.
- [33] WARD T R. Artificial metalloenzymes based on the biotin - avidin technology: enantioselective catalysis and beyond[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44(1): 47-57.
- [34] JESCHEK M, REUTER R, HEINISCH T, et al. Directed evolution of artificial metalloenzymes for *in vivo* metathesis[J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 661-665.
- [35] 林英武. 人工金属酶分子设计新进展:肌红蛋白研究实例分析[J]. *化学进展*, 2018, 30(10): 1464-1474.
- LIN Y W. Rational design of artificial metalloenzymes: case studies in myoglobin[J]. *Progress in Chemistry*, 2018, 30(10): 1464-1474.
- [36] 林英武, 王江云, 陆艺. 蛋白质分子理性设计与肌红蛋白功能的调控及拓展[J]. *中国科学:化学*, 2014, 57(3): 346-355.
- LIN Y W, WANG J Y, LU Y. Functional tuning and expanding of myoglobin by rational protein design[J]. *Science China Chemistry*, 2014, 57(3): 346-355.
- [37] 于洋. 基于肌红蛋白的氧激活蛋白的理性设计[J]. *生物加工过程*, 2019, 17(1): 23-28.
- YU Y. Rational design of oxygen-activating protein based on myoglobin[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2019, 17(1): 23-28.
- [38] BHAGI-DAMODARAN A, PETRIK I D, MARSHALL N M, et al. Systematic tuning of heme redox potentials and its effects on O₂ reduction rates in a designed oxidase in myoglobin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(34): 11882-11885.
- [39] HILL R, HOLDEN H F. The preparation and some properties of the globin of oxyhaemoglobin[J]. *Biochemical Journal*, 1926, 20(6): 1326-1339.
- [40] OHASHI M, KOSHIYAMA T, UENO T, et al. Preparation of artificial metalloenzymes by insertion of chromium(III) Schiff base complexes into apomyoglobin mutants[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, 42(9): 1005-1008.
- [41] HAYASHI T, HISAEDA Y. New functionalization of myoglobin by chemical modification of heme-propionates[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2002, 35(1): 35-43.
- [42] CAREY J R, MA S K, PFISTER T D, et al. A site-selective dual anchoring strategy for artificial metalloprotein design[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(35): 10812-10813.
- [43] ZHANG J L, GARNER D K, LIANG L, et al. Noncovalent modulation of PH-dependent reactivity of a Mn-Salen cofactor in myoglobin with hydrogen peroxide[J]. *Chemistry*, 2009, 15(30): 7481-7489.
- [44] LIU J, CHAKRABORTY S, HOSSEINZADEH P, et al. Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(8): 4366-4369.
- [45] BHAGI-DAMODARAN A, KAHLE M, SHI Y, et al. Insights into how heme reduction potentials modulate enzymatic activities of a myoglobin-based functional oxidase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(23): 6622-6626.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] NATOLI S N, HARTWIG J F. Noble-metal substitution in hemoproteins: an emerging strategy for abiological catalysis[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(2): 326-335.
- [49] DYDIO P, KEY H M, HAYASHI H, et al. Chemoselective, enzymatic C-H bond amination catalyzed by a cytochrome P450 containing an Ir(Me)-PIX cofactor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(5): 1750-1753.
- [50] GU Y, NATOLI S N, LIU Z, et al. Site-selective functionalization of (sp³)C-H bonds catalyzed by artificial metalloenzymes containing an iridium-porphyrin cofactor[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(39): 13954-13960.
- [51] JI D Bin, WANG L, LIU W J, et al. Synthesis of NAD analogs to develop bioorthogonal redox system[J]. *Science China Chemistry*, 2013, 56(3): 296-300.
- [52] SEEFELDT L C, HOFFMAN B M, DEAN D R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 78(1): 701-722.
- [53] SHAH V K, BRILL W J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(8): 3249-3253.

- [54] ČORIĆ I, HOLLAND P L. Insight into the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from synthetic iron complexes with sulfur, carbon, and hydride ligands[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(23): 7200-7211.
- [55] LIN Y W. Rational design of metalloenzymes: from single to multiple active sites[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2017, 336(4):1-27.
- [56] STIEFEL E I, GEORGE G N. Ferredoxins, hydrogenases, and nitrogenases: metal-sulfide proteins[J]. *Bioinorganic Chemistry*, 1994: 365-453.
- [57] VAN STAPPEN C, DECAMPS L, CUTSAIL G E, et al. The spectroscopy of nitrogenases[J]. *Chemical Reviews*, 2020, 120(12): 5005-5081.
- [58] MIRTS E N, PETRIK I D, HOSSEINZADEH P, et al. A designed heme-[4Fe-4S] metalloenzyme catalyzes sulfite reduction like the native enzyme[J]. *Science*, 2018, 361(6407): 1098-1101.
- [59] MIRTS E N, DIKANOVA S A, JOSE A, et al. A binuclear Cu₂ center designed in an all α -helical protein scaffold[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(32): 13779-13794.
- [60] MIRTS E N, BHAGI-DAMODARAN A, LU Y. Understanding and modulating metalloenzymes with unnatural amino acids, non-native metal ions, and non-native metal cofactors[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(4): 935-944.
- [61] MULLIEZ E, DUARTE V, ARRAGAIN S, et al. On the role of additional [4Fe-4S] clusters with a free coordination site in radical-SAM enzymes[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2017, 5(17): 1-13.
- [62] SMITH A T, LINKOUS R O, MAX N J, et al. The FeO₂ [4Fe-4S] cluster is redox-active and rapidly oxygen-sensitive[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(49): 4935-4949.
- [63] SHOJI O, FUJISHIRO T, NAKAJIMA H, et al. Hydrogen peroxide dependent monooxygenations by tricking the substrate recognition of cytochrome P450_{BSP}[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(20): 3656-3659.
- [64] SHOJI O, AIBA Y, WATANABE Y. Hoodwinking cytochrome P450BM3 into hydroxylating non-native substrates by exploiting its substrate misrecognition[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(4): 925-934.
- [65] ZHANG W, MA M, HUIJBERS M M E, et al. Hydrocarbon synthesis *via* photoenzymatic decarboxylation of carboxylic acids[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(7): 3116-3120.
- [66] DEMMING R M, HAMMER S C, NESTL B M, et al. Asymmetric enzymatic hydration of unactivated, aliphatic alkenes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(1): 173-177.
- [67] CHEN J, KONG F, MA N, et al. Peroxide-driven hydroxylation of small alkanes catalyzed by an artificial P450BM3 peroxxygenase system[J]. *ACS Catalysis*, American Chemical Society, 2019, 9(8): 7350-7355.
- [68] MA N, CHEN Z, CHEN J, et al. Dual-functional small molecules for generating an efficient cytochrome P450BM3 peroxxygenase[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(26): 7628-7633.
- [69] YANG H, SRIVASTAVA P, ZHANG C, et al. A general method for artificial metalloenzyme formation through strain-promoted azide-alkyne cycloaddition[J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(2): 223-227.
- [70] LIU X, KANG F, HU C, et al. A genetically encoded photosensitizer protein facilitates the rational design of a miniature photocatalytic CO₂-reducing enzyme[J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10(12): 1201-1206.
- [71] CHATTERJEE A, SUN S B, FURMAN J L, et al. A versatile platform for single- and multiple-unnatural amino acid mutagenesis in *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(10): 1828-1837.
- [72] GUO J, MELANÇON C E, LEE H S, et al. Evolution of amber suppressor tRNAs for efficient bacterial production of proteins containing nonnatural amino acids[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(48): 9148-9151.
- [73] XIE J, WANG L, WU N, et al. The site-specific incorporation of p-iodo-L-phenylalanine into proteins for structure determination[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(10): 1297-1301.
- [74] LI F, SHI P, LI J S, et al. A genetically encoded 19F NMR probe for tyrosine phosphorylation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(14): 3958-3962.
- [75] MEHL R A, ANDERSON J C, SANTORO S W, et al. Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(4): 935-939.
- [76] EHRLICH M, GATTNER M J, VIVERGE B, et al. Orchestrating the biosynthesis of an unnatural pyrrolysine amino acid for its direct incorporation into proteins inside living cells[J]. *Chemistry*, 2015, 21(21): 7701-7704.
- [77] MARCHAND J A, NEUGEBAUER M E, ING M C, et al. Discovery of a pathway for terminal-alkyne amino acid biosynthesis[J]. *Nature*, 2019, 567(7748): 420-424.
- [78] WANG N, YANG B, FU C, et al. Genetically encoding fluorosulfate-L-tyrosine to react with lysine, histidine, and tyrosine *via* SuFEx in proteins *in vivo*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(15): 4995-4999.
- [79] YANG B, WANG N, SCHNIER P D, et al. Genetically introducing biochemically reactive amino acids dehydroalanine and

- dehydrobutyrine in proteins[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(19): 7698-7703.
- [80] PARK J, SELVARAJ B, MCSHAN A C, et al. *De novo* design of a homo-trimeric amantadine-binding protein[J]. *eLife*, 2019, 8: e47839.
- [81] MILLS J H, KHARE S D, BOLDUC J M, et al. Computational design of an unnatural amino acid dependent metalloprotein with atomic level accuracy[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(36): 13393-13399.
- [82] YANG J, ANISHCHENKO I, PARK H, et al. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(3): 1496-1503.
- [83] 崔颖璐, 吴边. 符合工程化需求的生物元件设计[J]. *中国科学院院刊*, 2018, 33(11): 1150-1157.
CUI Y L, WU B. Biological components design for engineering requirements[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2018, 33(11): 1150-1157.
- [84] 刘海燕. 工业酶研究中的计算化学方法[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1819-1828.
LIU H Y. Computational chemistry approaches in studies on industrial enzymes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(10): 1819-1828.
- [85] REYNOLDS E W, MCHENRY M W, CANNAC F, et al. An evolved orthogonal enzyme/cofactor pair[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(38): 12451-12458.
- [86] HUANG J, LIU Z, BLOOMER B, et al. Artificial biosynthetic pathway for an unnatural terpenoid with an iridium-containing P450[EB/OL]. [2020-03-18]. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11955174>.



第一作者: 袁飞燕 (1993—), 女, 博士研究生。研究方向为蛋白质设计与酶工程。
E-mail: feiyanyuan@163.com



通讯作者: 于洋 (1987—), 男, 博士, 研究员、博士生导师。研究方向为蛋白质设计与酶工程。
E-mail: yang_yu@outlook.com



通讯作者: 李春 (1970—), 男, 博士, 教授、博士生导师。研究方向为合成生物学。
E-mail: lichun@bit.edu.cn