

黄酮6位羟基化酶催化机制的理论研究与应用

白杰^{1,3}, 李从雨^{1,3}, 张鹤渐^{1,3}, 黄蓉^{1,3}, 张磊^{2,3}, 王千³, 刘晓楠³, 骆健美¹, 江会锋^{3*}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 武汉轻工大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430023

3 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

白杰, 李从雨, 张鹤渐, 黄蓉, 张磊, 王千, 刘晓楠, 骆健美, 江会锋. 黄酮6位羟基化酶催化机制的理论研究与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4635-4646.

BAI Jie, LI Congyu, ZHANG Hejian, HUANG Rong, ZHANG Lei, WANG Qian, LIU Xiaonan, LUO Jianmei, JIANG Huifeng. Theoretical analysis and practical applications of the catalytic mechanism of flavonoid 6-hydroxylase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4635-4646.

摘要: 灯盏乙素发酵生产过程中, 黄酮6位羟基化酶催化效率不足, 导致产生至少约18%的副产物。本研究以2种黄酮6位羟基化酶CYP82D4与CYP706X为研究目标, 通过分子动力学模拟与量子化学计算, 对两种黄酮6位羟基化酶的催化机制进行解析。结果表明, CYP82D4与CYP706X在反应决速步的能垒几乎相同, 应当具有相似的反应速率, 而CYP82D4相对较小的底物结合能可能有利于产物释放, 是其具有更高催化效率的直接原因。最后, 基于对底物进出过程的研究, CYP82D4的L540A突变将催化效率提高了1.37倍, 证明了理论计算指导黄酮6位羟基化酶改造优化的可行性。本研究揭示了黄酮6位羟基化酶的催化机制, 为对其进行改造优化以提高灯盏乙素的发酵生产效率提供了参考。

关键词: 灯盏乙素; 黄酮6位羟基化酶; 细胞色素P450; 催化机制; 底物结合能

资助项目: 中国博士后科学基金(2019M661032); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-CYFH-011)

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (2019M661032) and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CYFH-011).

*Corresponding author. E-mail: jiang_hf@tib.cas.cn

Received: 2023-03-25; Accepted: 2023-06-15

Theoretical analysis and practical applications of the catalytic mechanism of flavonoid 6-hydroxylase

BAI Jie^{1,3}, LI Congyu^{1,3}, ZHANG Hejian^{1,3}, HUANG Rong^{1,3}, ZHANG Lei^{2,3}, WANG Qian³, LIU Xiaonan³, LUO Jianmei¹, JIANG Huifeng^{3*}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 College of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China

3 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Insufficient catalytic efficiency of flavonoid 6-hydroxylases in the fermentative production of scutellarin leads to the formation of at least about 18% of by-products. Here, the catalytic mechanisms of two flavonoid 6-hydroxylases, CYP82D4 and CYP706X, were investigated by molecular dynamics simulations and quantum chemical calculations. Our results show that CYP82D4 and CYP706X have almost identical energy barriers at the rate-determining step and thus similar reaction rates, while the relatively low substrate binding energy of CYP82D4 may facilitate product release, which is directly responsible for its higher catalytic efficiency. Based on the study of substrate entry and release processes, the catalytic efficiency of the L540A mutation of CYP82D4 increased by 1.37-fold, demonstrating the feasibility of theoretical calculations-guided engineering of flavonoid 6-hydroxylase. Overall, this study reveals the catalytic mechanism of flavonoid 6-hydroxylases, which may facilitate the modification and optimization of flavonoid 6-hydroxylases for efficient fermentative production of scutellarin.

Keywords: scutellarin; flavonoid 6-hydroxylase; cytochrome P450; catalytic mechanism; substrate binding energy

黄酮类(flavonoids)化合物普遍存在于高等植物中,是以 2-苯基色原酮(2-phenylchromone)为核心衍生的一系列次级代谢产物,部分黄酮类化合物有极高药用价值,在心脑血管疾病的预防和治疗方面有巨大潜力^[1]。灯盏乙素(scutellarin)及其生物合成前体物质野黄芩素(scutellarein)已经在临床被用于治疗心脑血管疾病^[2],并且在酿酒酵母^[3]与解脂耶氏酵母^[4]中实现了发酵全合成。然而,在发酵产物中存在大量副产物芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷(apigenin-7-O-glucuronide) [(酿酒酵母(34%),解脂耶氏酵母(18%)]^[5],使产物无法直接满足灯盏花素口服药物的国家标准(灯盏乙素>90%)^[5],需要进行后续高成本的产物分离。

酿酒酵母与解脂耶氏酵母中分别使用了两种具有黄酮 6 位羟基化活性的 P450 酶,分别是来自灯盏花(*Erigeron breviscapus*)的 CYP706X^[3]和来自黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的 CYP82D4^[6],其中 CYP82D4 被证明具备更高的催化效率。黄酮 6 位羟基化酶(flavonoid 6-hydroxylase, F6H)可以催化芹菜素(apigenin, API) 6 位羟基化生成野黄芩素,随后黄酮 7 位葡萄糖醛酸转移酶(flavonoid 7-glucuronosyltransferase, F7G)将野黄芩素 7 位羟基糖醛酸化产生灯盏乙素。由于结构高度相似,黄酮 7 位糖基化酶可以接受芹菜素为底物,产生副产物芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷(图 1)。在解脂耶氏酵母中的研究表明,黄酮 7 位葡萄糖醛酸转移酶与黄酮 6 位羟基化酶竞

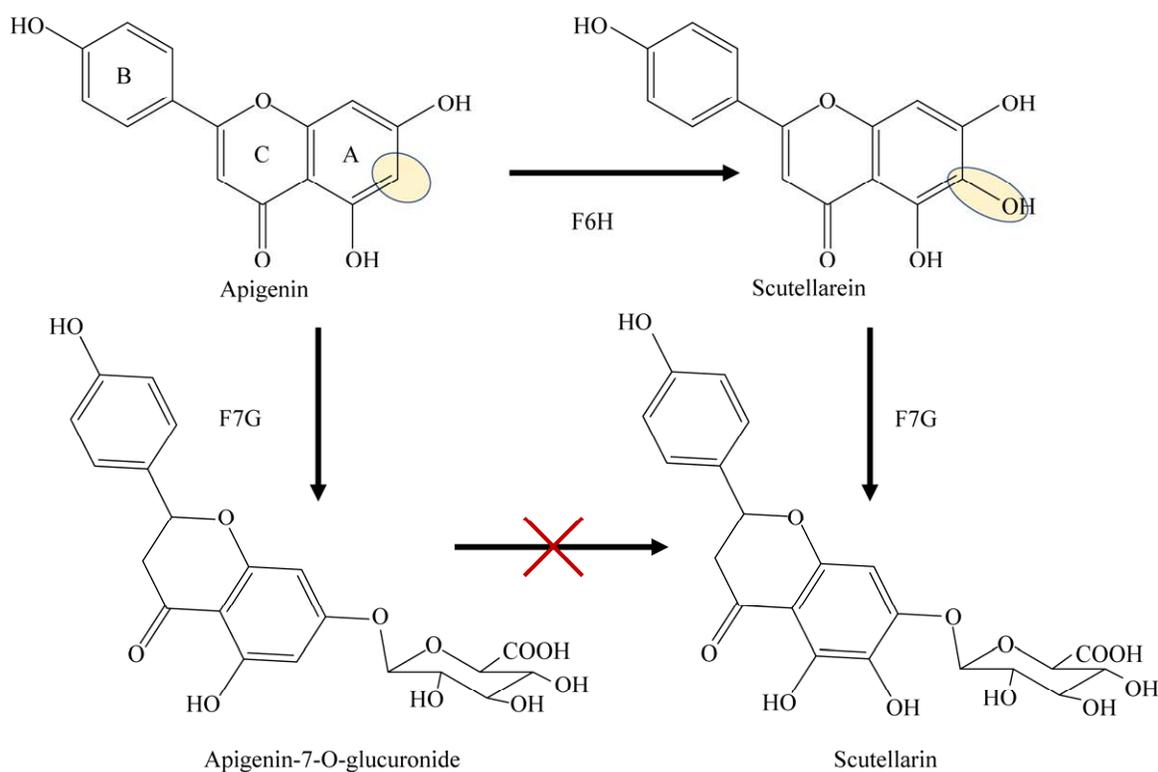


图 1 灯盏乙素生物合成副产物机制^[4]

Figure 1 Mechanisms of by-products formation in the biosynthesis of scutellarin^[4].

争底物芹菜素,具有更高催化效率的黄酮 6 位羟基化酶可以高效地将芹菜素转化为野黄芩素,从而减少副产物的产生^[4]。但是,目前活性最高的 CYP82D4 的催化效率仍无法满足发酵生产需求,需要对其进行进一步改造设计来提高活性,以解决实际生产问题。

本文以 CYP706X 与 CYP82D4 为研究目标,通过分子动力学模拟与量子化学计算,对 CYP706X 与 CYP82D4 的催化机制进行解析,阐明了 CYP706X 与 CYP82D4 催化反应的机理和底物结合与释放过程的自由能变化,揭示了 CYP82D4 具有更高催化效率的潜在机制,并基于分析结果设计突变,实现 CYP82D4 催化效率的进一步提升,为 CYP82D4 的后续改造设计奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

酿酒酵母 W303 与质粒 YcPlac22-SbaiCYP82D4-ATR2^[6]由本实验室构建及保存。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DMT 感受态细胞(DH5 α T1 Phage Resistant Competent Cells),引入 *tonA* 基因,可以在体内特异性降解甲基化质粒模板,购自北京全式金生物技术股份有限公司。

1.1.2 试剂和仪器

PrimerSTAR Max DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司; Minerva Super Fusion Cloning Mix 试剂盒购自 Everbright 公司; 鲑鱼精 ssDNA 购自北京索莱宝科技有限公司; 质粒小提试剂

盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司；LC-20ADXRHPLC 液相系统购自岛津公司；微生物恒温培养箱购自赛默飞世尔科技公司；高速振荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 方法

PCR 体系为 PrimerSTAR Mix DNA Polymerase 25 μL ，引物 F/R 1 μL ，模板 1 μL ，加 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 反应程序：95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，55–58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，循环 30 次；72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.2.2 连接转化及验证

使用 Minerva Super Fusion Cloning Mix 试剂盒进行同源重组连接，将连接产物转化到 DMT 感受态细胞中，冰浴 30 min，42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 45 min，立即冰浴 2 min，随后添加无抗生素的培养基复苏 1 h，将液体涂至含有对应抗生素的固体培养基上，挑取单菌落进行验证。

1.2.3 酵母细胞转化方法

将酿酒酵母 W303 甘油菌划线活化，30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，挑取单克隆菌落至 50 mL YPD 培养基，30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 220 r/min 培养至 OD 为 0.8–1.0 时，3 600 r/min 离心 5 min 收集菌体，用灭菌后的 ddH₂O 洗两遍，转入 1 mL ddH₂O 在 1.5 mL 离心管中进行分装，每管 100 μL 分装后离心，弃上清。转化体系：PEG3350 溶液(50%) 240 μL ；LiAc 溶液(1 mol/L) 36 μL ；ssDNA 10 μL ；质粒 400 ng；补水至总体积 360 μL 。

1.2.4 发酵及产物萃取

取质粒转化成功的酿酒酵母菌株单克隆菌落至孔板(24 \times 10 mL 方孔)的 3 mL CM 培养基中，培养 24 h，加入底物母液(200 mmol/L，溶剂为二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)，0.2 μm 过滤除菌)，终浓度为 0.5 mmol/L，30 $^{\circ}\text{C}$ 、500 r/min 发酵培养 4 d，发酵结束后取 800 μL 发酵液加入

等体积甲醇，超声萃取 30 min，12 000 r/m 离心 20 min，取上清进行检测。

1.2.5 产物检测方法

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测条件为：光电二极管阵列检测器波长 335 nm，Kinetex 5 μm Biphenyl 100 \AA LC Column (4.6 mm \times 250 mm，5 μm 粒径)色谱柱，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量 20 μL ，流动相 A：水(0.1%甲酸)，B：乙腈，C：甲醇，流速为 1 mL/min，梯度洗脱条件：0–20 min：A (73%)、B (22%)和 C (5%)；20–22 min，A (65%)、B (30%)和 C (5%)；25–30 min：A (73%)、B (22%)和 C (5%)。保留时间：野黄芩素为 8.5 min；芹菜素为 15.8 min。

1.3 计算方法

1.3.1 建模和底物对接

通过 Alphafold2^[7]对 CYP82D4 与 CYP706X 进行结构预测，并选取 5 个模型中得分最高的结构。手动对接 CPDI (高反应性中间体 compound I) 使其与半胱氨酸共价连接后，底物 API 使用 Rosetta^[8]程序在 CPDI 轴向氧附近 8 \AA 范围内进行柔性对接，过滤所有反应位点碳与轴向氧距离大于 4 \AA 的对接结果后，选取得分最高的对接结果进行后续分析。

1.3.2 分子动力学模拟

模拟体系构建：CPDI 使用已报道文献的力场参数^[9]。对于 API 的力场参数，首先使用 Orca^[10]对 API 在 M06-2XD4^[11]/def2-SVP 理论水平下进行结构优化，随后使用 Multiwfn^[12]基于波函数信息得到 API 的 RESP 电荷，之后使用 AmberTools21^[13]在 gaff^[14]力场基础上生成。包含底物的酶-底物复合体置于边界距离其至少 10 \AA 的水盒中并添加 Na⁺或 Cl⁻作为抗衡离子，ff19SB^[15]力场用于描述蛋白质部分，水分子由 OPC^[16]力场描述。

分子动力学模拟：(1) 能量最小化。对主链

施加 50 kcal/(mol·Å²)约束力后, 使用 5 000 步最速下降法与 5 000 步共轭梯度法优化残基侧链, 随后去除约束, 以同样步骤对整体能量最小化。(2) 体系热浴。对主链施加 50 kcal/(mol·Å²)的约束力, 在 NVT 系综下使体系温度在 50 ps 内从 0 K 提升至 300 K。(3) 密度平衡: 在 NPT 系综下维持体系压力在 101 325 Pa, 温度 300 k 持续 50 ps 使体系达到密度平衡。(4) 预模拟: 对主链与底物重原子施加 10 kcal/(mol·Å²)约束力后, 在 NPT 系综下, 压力 101 325 Pa, 温度 300 k 进行 5 ns 分子动力学模拟, 随后去除约束在同样条件下进行 5 ns 分子动力学模拟。(5) 正式模拟: 在 NPT 系综下, 压力 101 325 Pa, 温度 300 k 进行 1 000 ns 分子动力学模拟。(6) 代表性构象: 对最后 500 ns 模拟轨迹基于底物均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)进行聚类, 得到代表性构象。

自适应偏置分子动力学 (adaptive bias molecular dynamics, ABMD): (1) 以代表性构象为起点, 使用拉伸分子动力学 (stretch molecular dynamics, SMD) 将底物推离活性中心, 平行进行 10 次, 以确定底物通道。(2) 使用 SMD 获得底物均匀分布在通道的 8 个构象。(3) 并行进行 8 个 ABMD 模拟, 以 CPDI 轴向氧与芹菜素 C6 的距离为反应坐标, 获得底物进出平均力势。

1.3.3 量子化学计算

结构优化使用 L-BFGS 方法, 过渡态定位通过 Py-chemshell^[17]程序使用 Dimer 方法, 所有能量与梯度计算均使用 Orca 程序进行, 其中结构优化与频率分析在 UB3LYP-D4/def2-SVP 级别下进行, 单点能计算中计算级别提升至 UB3LYP-D4/def2-TZVP。结构优化时团簇中所有残基的 C α 与 C β 均被冻结坐标并以隐式溶剂 (CPCM, $\epsilon=4$)^[18]处理以近似酶环境。由于存在冻结原子, 过渡态均目视检查确定虚频, 并确保除反应特征振动外其余虚频小于 100 cm⁻¹^[19]。

2 结果与分析

2.1 底物结合模式和团簇模型的构建

以团簇模型进行酶催化机制的研究需要对活性中心进行合理的切割与保留, 以兼顾运算速度与精度, 因此首先基于代表性构象对 CYP82D4 与 CYP706X 的底物结合关键残基进行分析。CYP82D4 与 CYP706X 的底物结合方向存在显著差异, 结合口袋与关键残基如图 2 所示, 其中 CYP82D4 从羧基方向倾斜接近高反应性中间体 compound I (CPDI) 的轴向氧, 而 CYP706X 则近乎垂直于 CPDI 的铁卟啉平面, 这 2 种芳香类底物与 CPDI 之间不同的朝向被称为正面朝向 (face-on) 与侧面朝向 (side-on)^[20]。两种 F6H 口袋均主要由疏水性残基构成, CYP82D4 中底物远离反应位点的 B 环被疏水性残基与 R108 环绕, R108 与 F126 分别位于 B 环的两侧, 其中 R108 与 CPDI 羧基以盐键相互作用, 与底物 B 环仅存在范德华力相互作用, 而 F126 与底物的 B 环之间存在 pi-pi 相互作用, 两者共同作用稳定结合 B 环, A 环与 C 环则位于由 CPDI、V319、A323、L504、T327 与 A393 构成的半包围反应中心, 存在较大活动空间, 这可能是 CYP82D4 存在 8 位羟基化副产物的原因之一^[21]。CYP706X 的底物结合口袋同样存在 F120 与底物的 B 环之间形成 pi-pi 相互作用, 并且 F120 和与之相对的 L312 以及 I495 共同组成固定 B 环的合页结构, A 环与 C 环则受 I 螺旋的主链结构与 A317、L376、L382 以及 A122 环绕, 活动空间相比 CYP82D4 较小。

因此, 对于用于研究 CYP82D4 催化机制的团簇模型, 远离反应区域的 B 环以及与 B 环结合的残基被排除在外, 仅保留 A 环和 C 环附近的残基和与 CPDI 配位的半胱氨酸, CPDI 的铁卟啉环部分的侧链全部截去, 仅保留卟吩核心部

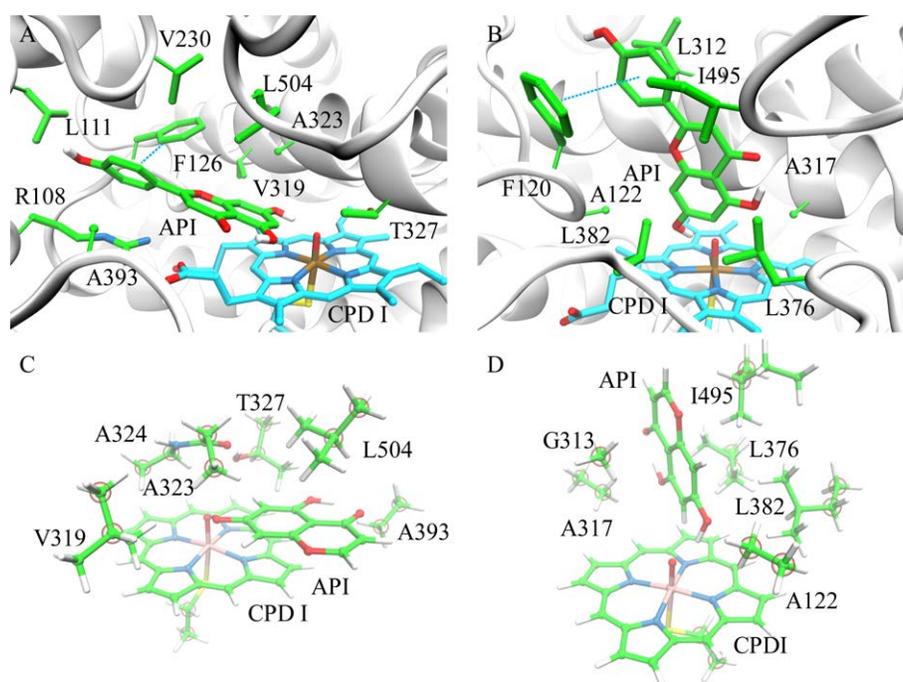


图 2 CYP82D4 与 CYP706X 底物结合残基与量子化学团簇 A: CYP82D4 底物结合口袋残基. B: CYP706X 底物结合口袋残基. C: CYP82D4 量子化学团簇, 冻结原子以红色小球标识. D: CYP706X 量子化学团簇, 冻结原子以红色小球标识

Figure 2 Binding residues and quantum chemical clusters of CYP82D4 and CYP706X. A: CYP82D4 substrate binding pocket residues. B: CYP706X substrate binding pocket residues, the frozen atoms are identified by red ball. C: CYP82D4 quantum chemical cluster. D: CYP706X quantum chemical cluster, the frozen atoms are identified by red ball.

分。同样, CYP706X 的团簇模型仅保留 A 环与 C 环及其周围的残基和配位半胱氨酸以及卟吩核心。团簇中的残基均保留 α 碳原子, 对于连续的残基则保留肽键部分, 所有截断区域均不涉及双键, 截断的共价键均使用氢原子饱和。CYP82D4 与 CYP706X 的量子化学团簇如图 2 所示, 其中在结构优化过程中冻结的原子以红色透明小球标识, 2 个团簇的体系总电荷均为 0, 体系自旋多重度均为 $2^{[22-24]}$ 。

2.2 CYP82D4 及 CYP706X 催化芹菜素羟基化机制

P450 酶催化 C-H 键羟基化的机制已有较为深入的研究, 目前普遍认为, 对于脂肪烃类底物, P450 酶以“氢抽提-回弹”机制将 C-H 键羟

基化^[25], 而对于芳香类底物, P450 酶以“直接进攻-重排”机制使底物羟基化^[20,23]。然而, 目前对于 P450 酶催化芹菜素羟基化的重排路径仍不明确, 反应的决速步骤仍不清楚。因此, 使用量子化学计算方法(密度泛函)对 CYP82D4 与 CYP706X 催化芹菜素羟基化的反应机理及其势能面进行研究。

P450 酶催化芳香类底物羟基化的第一步是 CPDI 对羟基化位点碳原子的直接进攻, 如图 3 所示, 芹菜素羟基化反应第一步的过渡态结构中, CYP82D4 的反应位点碳原子与 CPDI 轴向氧(C6-O)距离由反应前的 3.23 Å 减小至 2.07 Å, 同时铁离子与轴向氧(Fe-O)以及配位半胱氨酸硫原子(Fe-S)的距离分别由 1.63 Å 和 2.56 Å 变

为 1.71 Å 和 2.31 Å。同样, CYP706X 在反应第一步发生类似距离变化, C6-O、Fe-O 和 Fe-S 分别由 2.96、1.62 Å 和 2.50 Å 变化为 2.06、1.73 Å 和 1.31 Å。随后, 在中间体状态时 CYP82D4 与 CYP706X 的 C6-O 距离分别减小至 1.35 Å 和 1.36 Å, C6-O 成键, 反应位点碳原子(C6)键连饱和, 形成四面体中间体(tetrahedral intermediate)。此时 Fe-S 距离进一步缩短至 2.23 Å, Fe-O 距离则分别缩短至 2.08 Å (CYP82D4)与 1.98 Å (CYP706X)。该反应步骤中, CYP82D4 能垒(ΔE^\ddagger)为 18.32 kcal/mol, 能变(ΔE)为-12.11 kcal/mol, CYP706X 的 ΔE^\ddagger 与 ΔE 分别为 18.12 kcal/mol 与 -13.23 kcal/mol。

四面体中间体形成后, 在底物为正向朝向的 CYP82D4 中, 中间体可以进一步重排为环氧化产物(epoxidation, EPO)或将氢转移到邻位碳

(NIH-shift, NIH)生成酮^[26], 图 4 展示了 CYP82D4 不同重排路径的过渡态及产物的构象与势能面。在环氧化重排路径, 羟基化位点邻位 C7 与轴向氧(C7-O)之间的距离在该步骤中缩短成键, 关键原子对 C6-O、C7-O、Fe-O 和 Fe-S 在过渡态的键长数据为 1.41、1.83、2.01 和 2.18 Å, ΔE^\ddagger 为 16.86 kcal/mol, ΔE 为 11.37 kcal/mol。在氢邻位转移路径, C6 位氢(C6-H)向邻位转移, 与 C7 位碳原子键连(C7-H), 过渡态关键原子对 C6-H、C7-H、C6-O、Fe-O 和 Fe-S 的键长数据为 1.42、1.46、1.27、2.21 和 2.20 Å, ΔE^\ddagger 为 14.18 kcal/mol, ΔE 为 3.53 kcal/mol。相比之下, 氢邻位转移路径具有更低的 ΔE^\ddagger 与 ΔE , 表明在 CYP82D4 中四面体中间体将以氢邻位转移机制重排为酮, 随后, 环氧化物或酮异构体可以在水溶液或碱性环境重排为野黄芩素^[23]。

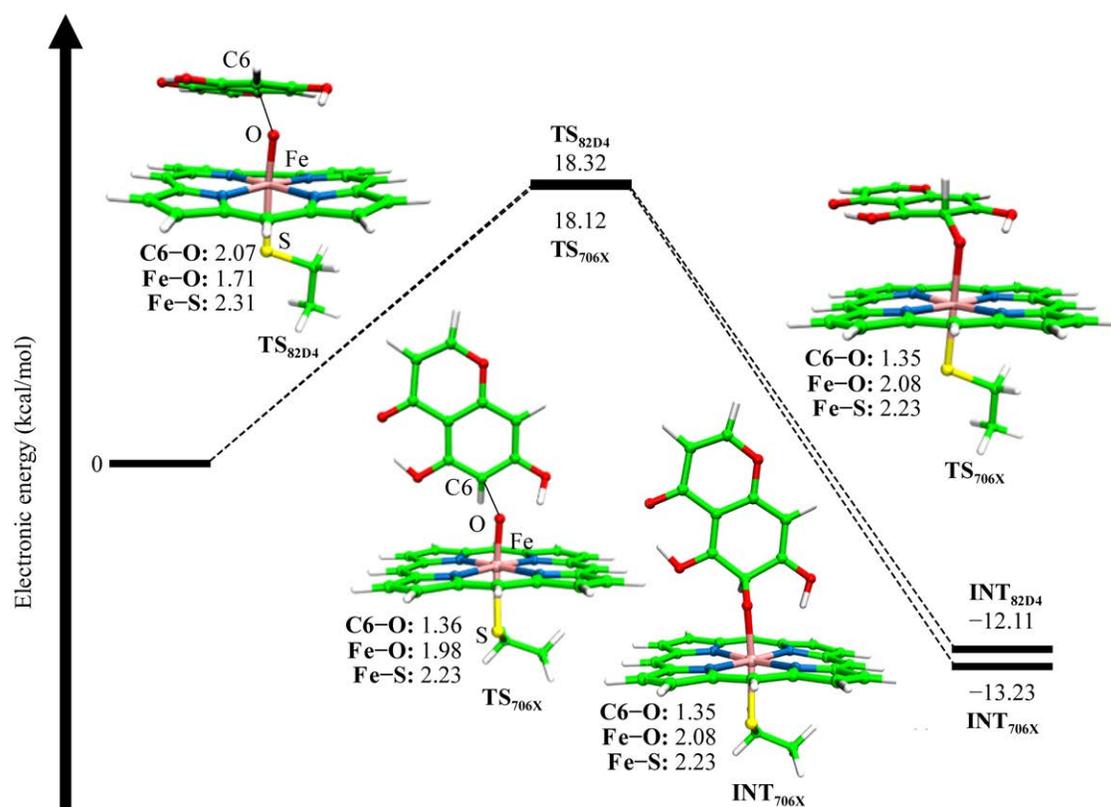


图 3 CPDI直接进攻形成四面体中间体

Figure 3 CPDI direct attacks to form tetrahedral intermediates.

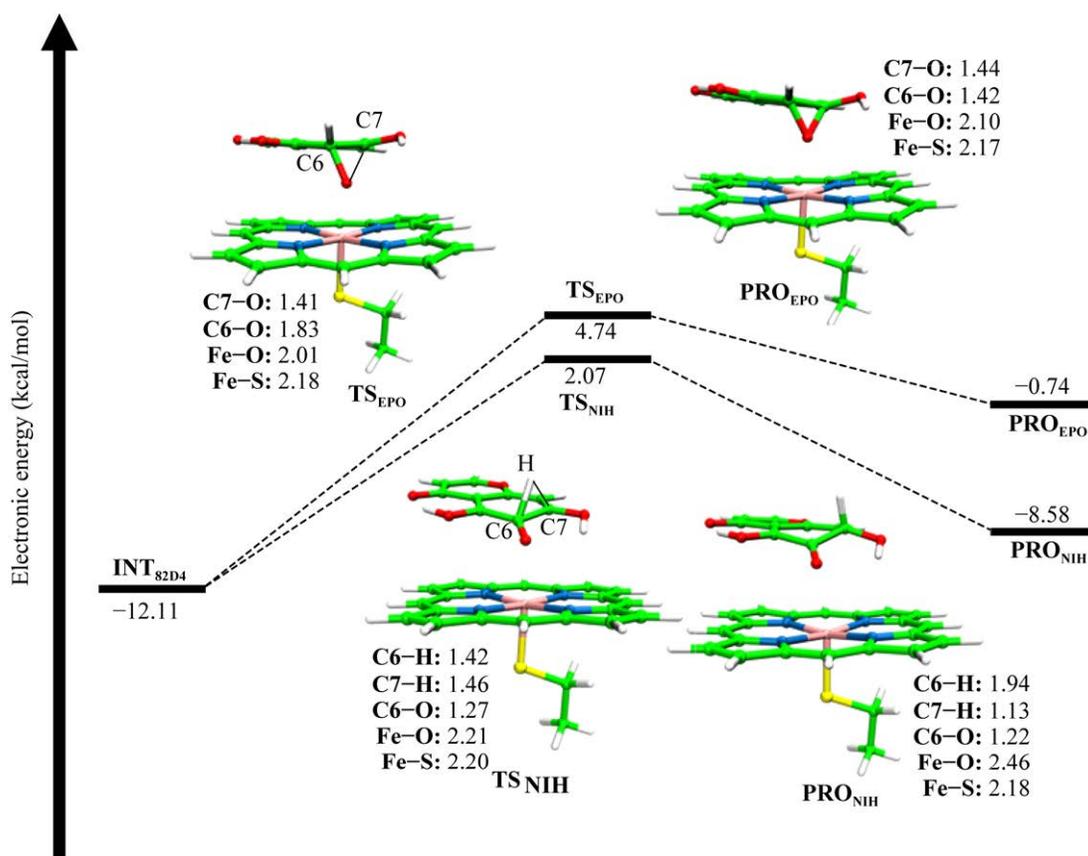


图 4 CYP82D4 以氢邻位转移机制重排为酮

Figure 4 CYP82D4 rearranges as a ketone by the NIH-shift mechanism.

CYP706X 在环氧化或氢邻位转移重排路径中发生与 CYP82D4 类似的键长变化。环氧化路径中, 关键原子对 C6-O、C7-O、Fe-O 和 Fe-S 在过渡态的键长数据为 1.43、1.74、2.17 和 2.19 Å, ΔE^\ddagger 为 14.91 kcal/mol, ΔE 为 12.85 kcal/mol。可以发现, 由于 C7 位羟基所带来的空间位阻, 在环氧化过渡态时, CYP706X 中 Fe-O 距离 (2.17 Å) 相对于 CYP82D4 (2.01 Å) 更长, 这可能是导致 CYP706X 的 ΔE^\ddagger 更小的原因之一。氢邻位转移路径中, 过渡态关键原子对 C6-H、C7-H、C6-O、Fe-O 和 Fe-S 的键长数据为 2.02、1.13、1.22、2.15 和 2.17 Å, ΔE^\ddagger 为 14.71 kcal/mol, ΔE 为 -9.98 kcal/mol。

底物侧面朝向的 CYP706X 除环氧化和氢邻

位转移重排方式外还可以通过称为质子穿梭 (proton-shuttle, PS)^[22,24] 的机制借助铁卟啉环直接重排为羟基化产物, 该步骤中 C6 位氢首先转移至铁卟啉环的氮原子上 (H-N), 随后转移至轴向氧 (H-O)。在氢向氮原子转移的过程中, 关键原子对 C6-H、H-N、C6-O、Fe-O 和 Fe-S 在过渡态的键长数据为 1.36、1.49、1.35、1.96 和 2.23 Å, ΔE^\ddagger 为 12.78 kcal/mol, ΔE 为 -13.36 kcal/mol。在氢向轴向氧转移的过程中, 关键原子对 H-N、H-O、C6-O、Fe-O 和 Fe-S 在过渡态的键长数据为 1.36、1.37、1.34、2.08 和 2.19 Å, 该步骤无势垒, ΔE 为 -35.48 kcal/mol。因此, 与 CYP82D4 不同, CYP706X 中四面体中间体将以质子穿梭机制直接重排为野黄芩素 (图 5)。

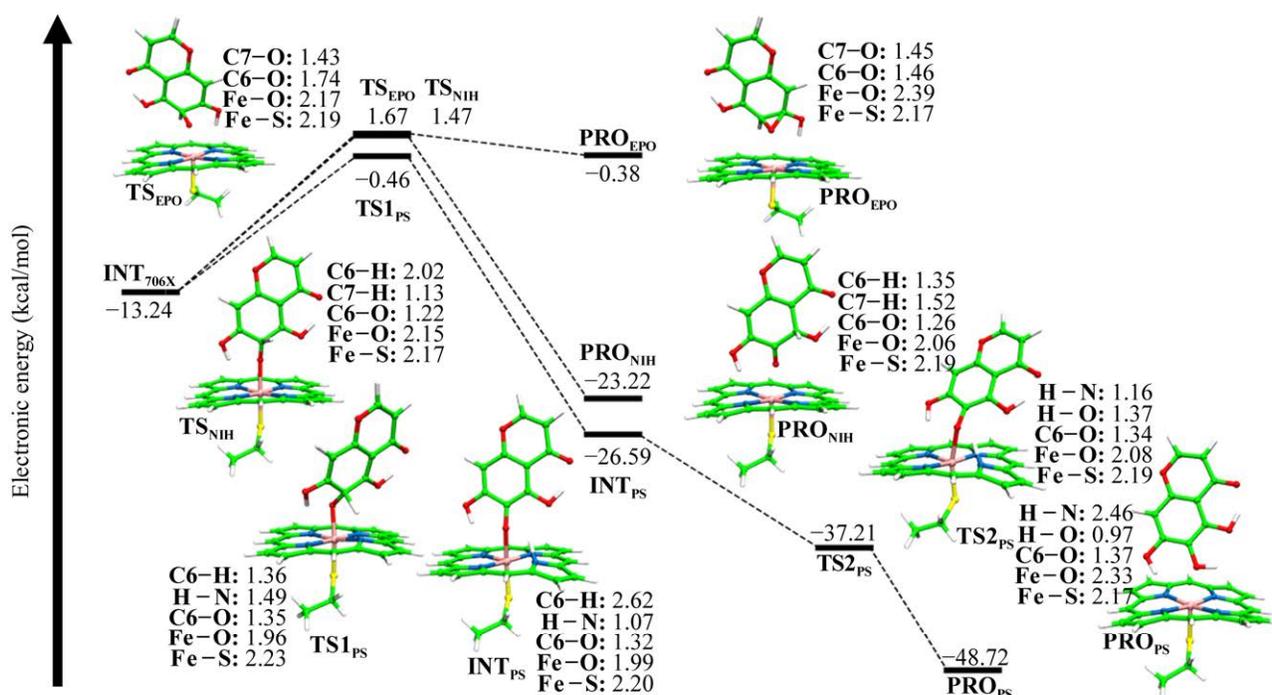


图5 CYP706X以质子穿梭机制直接重排为野黄芩素

Figure 5 CYP706X rearranges to scutellarein by the proton-shuttle mechanism.

2.3 底物结合自由能和通道改造设计

底物的结合与释放是决定酶催化效率的关键步骤,为了进一步研究 CYP82D4 与 CYP706X 之间的催化性质差异,使用拉伸分子动力学(SMD)和自适应偏置分子动力学(ABMD)方法,对 2 个 P450 酶的底物进出过程的自由能变化进行了研究。通过 SMD 方法推动底物离开活性中心, CYP82D4 和 CYP706X 各自呈现唯一的底物通道,其中 CYP82D4 的底物通道被 B'螺旋所在的柔性区域包围,而 CYP706X 的底物通道则位于 B'螺旋和 I 螺旋之间(图 6A、6B)。将反应坐标定义为 C6 与 CPDI 轴向氧的距离,距离为 3.5 Å 时视为底物结合,30 Å 时视为底物释放,则 CYP82D4 与 CYP706X 的底物结合自由能分

别为 30.34 kcal/mol 与 35.11 kcal/mol。其中 CYP82D4 底物进出过程中存在两处较小的阻碍,第一处对应通道中 L504 所在,第二处则对应 B'螺旋所在的通道入口,而 CYP706X 仅存在一处阻碍,对应口袋中 I459 所在。

底物结合与释放的过程中, CYP82D4 中 L504 可能对底物进出造成阻碍,因此,尝试对 L504 位点进行突变,将其分别替换为体积较小的 Ala 和 Gly 以及体积较大的 Phe,以验证该位点对 CYP82D4 催化效率的影响。结果如图 7 所示, L504A 突变使 CYP82D4 的催化效率提高至野生型的 1.37 倍, L504G 突变导致完全失活,而 L504F 突变则使催化效率下降至野生型的 10%左右。

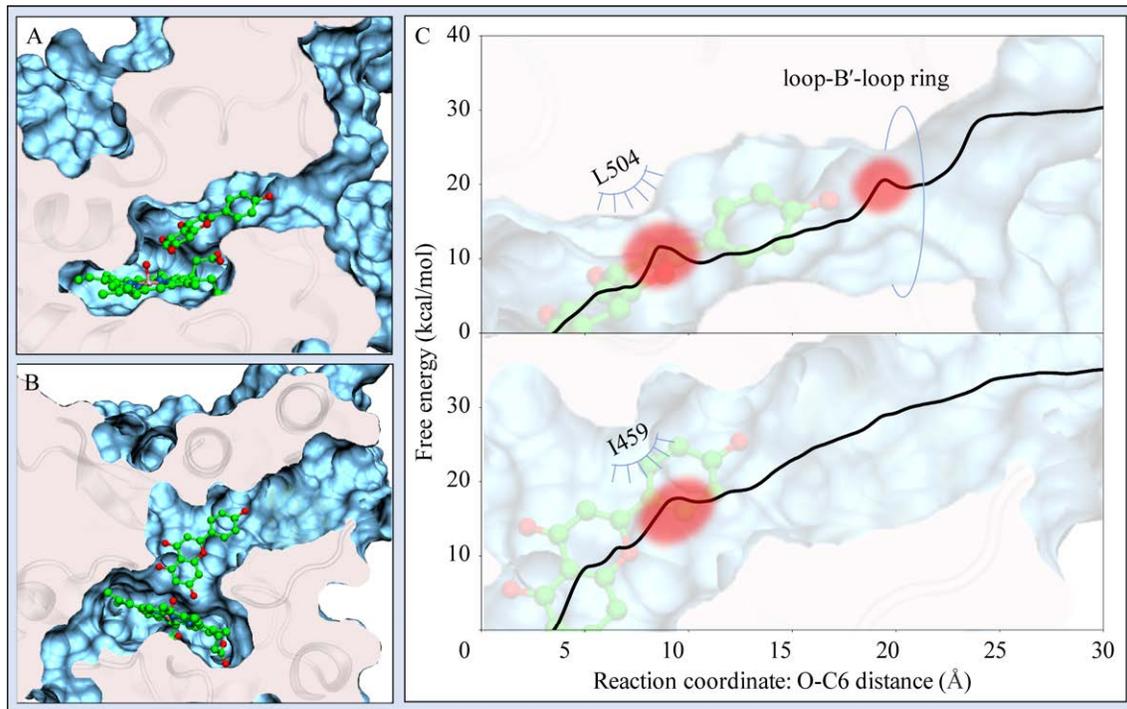


图 6 CYP82D4 与 CYP706X 的底物通道与底物进出平均力势 A: CYP82D4 底物通道. B: CYP706X 底物通道. C: CYP82D4 与 CYP706X 底物进出平均力势

Figure 6 Average force potential of substrate channel and substrate entry and release for CYP82D4 and CYP706X. A: Substrate channel of CYP82D4. B: Substrate channel of CYP706X. C: The potential of mean force for substrate entry and release of CYP82D4 and CYP706X.

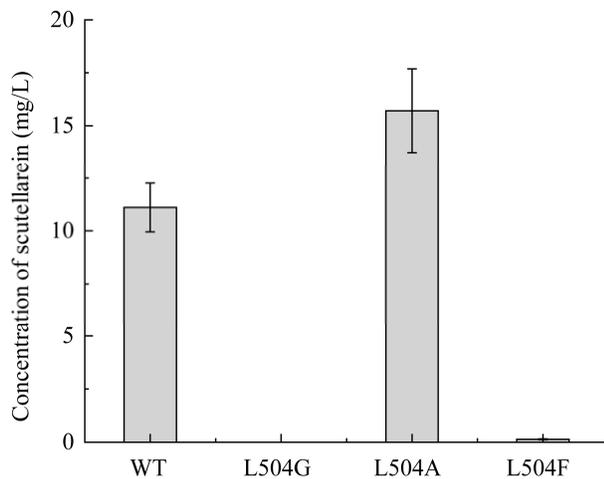


图 7 CYP82D4 野生型与 L504 突变体野黄芩素产物的浓度

Figure 7 Titters of wild scutellarein products by CYP82D4 wild type and its L504 mutants.

3 讨论与结论

基于结构预测和长时间分子动力学模拟得到的高质量结构,以团簇形式通过量子化学计算研究了 CYP82D4 与 CYP706X 催化芹菜素 6 位羟基化的反应机理。研究表明,尽管具有不同的底物结合模式, CYP82D4 与 CYP706X 对芹菜素的羟基化均以 CPDI 对其 C6 位的直接进攻开始,反应第一步中翻越整个反应中最大的能垒,产生相对稳定的四面体中间体,该步骤为整个反应的决速步骤。随后, CYP82D4 与 CYP706X 均不会重排为环氧化产物,而是分别以氢邻位转移机制和质子穿梭机制重排为野黄芩素的酮异构体和直接重排为野黄芩素,其中野黄芩素的 6 位-酮异构体可以在离开酶环境后在

酸性或碱性溶液中快速异构为野黄芩素。CYP82D4 在决速步仅仅具有相较 CYP706X 略微更高的能垒(0.2 kcal/mol), 表明反应机理并非导致 CYP82D4 与 CYP706X 催化效率差异的原因。进一步对底物进出过程的研究表明, 与 CYP706X 相比, CYP82D4 具有更低的底物结合自由能, 推测 CYP706X 较高的底物结合自由能阻碍了其产物释放, 从而导致其催化效率低于 CYP82D4。随后, 对可能阻碍底物进出的 L504 位点单点突变为小体积的 Ala 实现了 CYP82D4 催化效率的小幅度提高, 突变为大体积的 Phe 则活性显著下降, 为理论计算结果提供了有力的支持。此外, 将 L504 位点突变为 Gly 则导致彻底的活性丧失, 推测突变为无侧链的 Gly 可能破坏了酶的局部结构。

总之, 本研究对黄酮 6 位羟基化酶 CYP82D4 与 CYP706X 的催化活性差异机制提供了新的见解, 强调了底物结合与释放的过程对 P450 酶催化效率的重要影响, 为 P450 酶的改造设计提供了参考。

REFERENCES

- [1] YAO LH, JIANG YM, SHI J, TOMÁS-BARBERÁN FA, DATTA N, SINGANUSONG R, CHEN SS. Flavonoids in food and their health benefits[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2004, 59(3): 113-122.
- [2] GAO JL, CHEN G, HE HQ, LIU C, XIONG XJ, LI J, WANG J. Therapeutic effects of breviscapine in cardiovascular diseases: a review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 289.
- [3] LIU XN, CHENG J, ZHANG GH, DING WT, DUAN LJ, YANG J, KUI L, CHENG XZ, RUAN JX, FAN W, CHEN JW, LONG GQ, ZHAO Y, CAI J, WANG W, MA YH, DONG Y, YANG SC, JIANG HF. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 448.
- [4] WANG YN, LIU XN, CHEN BH, LIU W, GUO ZK, LIU XY, ZHU XX, LIU JY, ZHANG J, LI J, ZHANG L, GAO YD, ZHANG GH, WANG Y, CHOUDHARY MI, YANG SC, JIANG HF. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for scutellarin production[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7(3): 958-964.
- [5] ZHANG WD, CHEN WS, WANG YH, YANG GJ, KONG D, LI HT. Studies on the flavone glycosides from the extract of *Erigeron breviscapus*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2000, 31: 565-566.
- [6] LIU XN, CHENG J, ZHU XX, ZHANG GH, YANG SC, GUO XX, JIANG HF, MA YH. *De novo* biosynthesis of multiple pinocembrin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(11): 3042-3051.
- [7] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, GREEN T, FIGURNOV M, RONNEBERGER O, TUNYASUVUNAKOOL K, BATES R, ŽÍDEK A, POTAPENKO A, BRIDGLAND A, MEYER C, KOHL SAA, BALLARD AJ, COWIE A, ROMERA-PAREDES B, NIKOLOV S, JAIN R, ADLER J, BACK T, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [8] COMBS SA, DELUCA SL, DELUCA SH, LEMMON GH, NANNEMANN DP, NGUYEN ED, WILLIS JR, SHEEHAN JH, MEILER J. Small-molecule ligand docking into comparative models with Rosetta[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(7): 1277-1298.
- [9] SHAHROKH K, ORENDT A, YOST GS, CHEATHAM TE 3rd. Quantum mechanically derived AMBER-compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2012, 33(2): 119-133.
- [10] NEESE F. The ORCA program system[J]. *WIREs Computational Molecular Science*, 2012, 2(1): 73-78.
- [11] CALDEWEYHER E, MEWES JM, EHLERT S, GRIMME S. Extension and evaluation of the D4 London-dispersion model for periodic systems[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020, 22(16): 8499-8512.
- [12] LU T, CHEN FW. Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2012, 33(5): 580-592.
- [13] SALOMON-FERRER R, CASE DA, WALKER RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2013, 3(2): 198-210.

- [14] WANG JM, WOLF RM, CALDWELL JW, KOLLMAN PA, CASE DA. Development and testing of a general amber force field[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, 25(9): 1157-1174.
- [15] TIAN C, KASAVAJHALA K, BELFON KAA, RAGUETTE L, HUANG H, MIGUES AN, BICKEL J, WANG YZ, PINCAY J, WU Q, SIMMERLING C. ff19SB: amino-acid-specific protein backbone parameters trained against quantum mechanics energy surfaces in solution[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2020, 16(1): 528-552.
- [16] IZADI S, ANANDAKRISHNAN R, ONUFRIEV AV. Building water models: a different approach[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2014, 5(21): 3863-3871.
- [17] LU Y, FARROW MR, FAYON P, LOGSDAIL AJ, SOKOL AA, CATLOW CRA, SHERWOOD P, KEAL TW. Open-source, python-based redevelopment of the ChemShell multiscale QM/MM environment[J]. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2019, 15(2): 1317-1328.
- [18] BARONE V, COSSI M. Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 1998, 102(11): 1995-2001.
- [19] SHENG X, KAZEMI M, PLANAS F, HIMO F. Modeling enzymatic enantioselectivity using quantum chemical methodology[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(11): 6430-6449.
- [20] BATHELT CM, RIDDER L, MULHOLLAND AJ, HARVEY JN. Mechanism and structure-reactivity relationships for aromatic hydroxylation by cytochrome P450[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004, 2(20): 2998-3005.
- [21] ZHAO Q, CUI MY, LEVSH O, YANG DF, LIU J, LI J, HILL L, YANG L, HU YH, WENG JK, CHEN XY, MARTIN C. Two CYP82D enzymes function as flavone hydroxylases in the biosynthesis of root-specific 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis*[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(1): 135-148.
- [22] de VISSER SP, SHAIK S. A proton-shuttle mechanism mediated by the porphyrin in benzene hydroxylation by cytochrome P450 enzymes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(24): 7413-7424.
- [23] ZHOU JH, ZHANG X, LI YW, FENG SS, ZHANG QZ, WANG WX. Endocrine-disrupting metabolic activation of 2-nitrofluorene catalyzed by human cytochrome P450 1A1: a QM/MM approach[J]. *Environment International*, 2022, 166: 107355.
- [24] KUMAR D, SASTRY GN, de VISSER SP. Axial ligand effect on the rate constant of aromatic hydroxylation by iron(IV)-oxo complexes mimicking cytochrome P450 enzymes[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116(1): 718-730.
- [25] HUANGXY, GROVES JT. Beyond ferryl-mediated hydroxylation: 40 years of the rebound mechanism and C-H activation[J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2017, 22(2): 185-207.
- [26] GUROFF G, RENSON J, UDENFRIEND S, DALY JW, JERINA DM, WITKOP B. Hydroxylation-induced migration: the NIH shift[J]. *Science*, 1967, 157(3796): 1524-1530.

(本文责编 郝丽芳)