

# Baeyer-Villiger 单加氧酶非保守 Hinge 影响酶的催化活性和立体选择性

梁秋玲<sup>1,2</sup>, 吴胜<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

梁秋玲, 吴胜. Baeyer-Villiger 单加氧酶非保守 Hinge 影响酶的催化活性和立体选择性. 生物工程学报, 2015, 31(3): 361–374.

Liang QL, Wu S. Nonconserved hinge in Baeyer-Villiger monooxygenase affects catalytic activity and stereoselectivity. Chin J Biotech, 2015, 31(3): 361–374.

**摘要:** Baeyer-Villiger 单加氧酶是一种重要的生物催化剂, 可用于合成一系列有价值的酯和内酯化合物。通过序列比对和晶体结构分析推测连接 NADPH 结构域和 FAD 结构域的一段非保守 Hinge 可能在酶对底物识别和催化氧化过程中扮演着重要角色。在以环己酮单加氧酶为模型的研究中发现, 对该 Hinge 结构进行同源序列替换得到的突变体几乎完全丧失了催化活性, 证明了其整体水平的重要性。丙氨酸扫描突变揭示其中一些位点对酶的功能有显著影响: K153 位点的改变使酶的活性下降, 立体选择性却更优化; L143 位点的改变对酶的活性影响较小, 却降低了立体选择性; L144 位点的改变则同时大幅度削弱酶的活性和立体选择性。将同样的方法运用在苯丙酮单加氧酶中, 我们得到了相似的结论, 证明这些位点的重要功能在 Baeyer-Villiger 单加氧酶家族中有一定的普遍性。这一研究增进了对 Baeyer-Villiger 单加氧酶的结构与功能关系的认识, 有助于底物结合口袋的精确描述和 Baeyer-Villiger 单加氧酶催化图景的进一步细化, 对未来相关的理性设计和定向改造研究提供了借鉴。

**关键词:** Baeyer-Villiger 单加氧酶, 环己酮单加氧酶, 同源替换, 丙氨酸扫描突变

**Received:** May 27, 2014; **Accepted:** June 4, 2014

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31070718), Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-J-6).

**Corresponding author:** Sheng Wu. Tel: +86-10-62628482; Fax: +86-10-64807429; E-mail: shengwu@im.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 31070718), 中国科学院微生物所基础前沿研究项目 (No. KSCX2-EW-J-6) 资助。

# Nonconserved hinge in Baeyer-Villiger monooxygenase affects catalytic activity and stereoselectivity

Qiuling Liang<sup>1,2</sup>, and Sheng Wu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Baeyer-Villiger monooxygenases (BVMOs) are important biocatalysts to synthesize a series of valuable esters and lactones. Based on protein sequence alignment and crystal structure analysis, a nonconserved hinge which linked NADPH domain and FAD domain was speculated to play an important role in substrate recognition and catalytic oxidation process. Cyclohexanone monooxygenase (CHMO) was selected as a model. Mutants obtained by homologous replacement of the whole hinge almost completely lost its original catalytic activity, demonstrating that the overall hinge structure was of great importance. Some significant sites were identified to greatly affect the catalytic activity and stereoselectivity by alanine scanning mutagenesis, accompanied by enzyme activity assessments and chiral kinetic resolutions. Altering K153 decreased the activity of the enzyme but enhanced the stereoselectivity. Changing L143 site reduced stereoselectivity but had little effect on enzyme activity. Mutation at L144 site dramatically weakened both activity and stereoselectivity. Subsequently, these corresponding sites in phenylacetone monooxygenase were also illustrated to follow a similar rule, revealing a universal importance of these sites in the BVMO family. These results expanded our understanding of the structure-activity relationship of these enzymes and provided more proofs for future directed evolution of BVMOs.

**Keywords:** Baeyer-Villiger monooxygenase, cyclohexanone monooxygenase, function, homologous replacement, alanine scanning mutagenesis

Baeyer-Villiger 氧化反应是一类重要的有机化学反应, 它能实现功能基的转化, 活化 C-C 键进行环扩张, 进而合成一系列有价值的手性酯和内酯化合物<sup>[1]</sup>。这一反应在 1899 年就被首次报道<sup>[2]</sup>, 人们也一直致力于研究使用各种有效的催化剂来实现这一反应<sup>[3]</sup>。但是由于化学催化剂本身固有的弱点, 催化效率低、选择性低、污染以及反应过程复杂副产物多等, 研究者们开始向生物酶催化领域寻找更优越的催化剂。

早在 1976 年, 第一个 Baeyer-Villiger 单加氧酶 CHMO 就已经被发现和分离<sup>[4]</sup>, 此后又有许多各种不同类型的 BVMO 被发现。本世纪初相继有类固醇单加氧酶 (Steroid monooxygenase, STMO)<sup>[5]</sup>、对羟基苯乙酮 (4-Hydroxyacetophenone

monooxygenase)<sup>[6]</sup>、环戊酮单加氧酶(Cyclopentanone monooxygenase, CPMO)<sup>[7-8]</sup>等新型 BVMO 的报道。2002 年, I 型 BVMO 的特异性序列被首次提出<sup>[9]</sup>, 以此为基础, 人们通过基因组挖掘 (Genome mining) 的方法, 在细菌和真菌基因组中都发现大量 I 型 BVMO 特异性序列的分布, 在动物和植物细胞中则不存在 I 型 BVMO<sup>[10]</sup>。近年来, 关于 BVMO 多样性的报道越来越多<sup>[11-12]</sup>, 有许多 BVMO 都在微生物代谢途径中起着重要作用<sup>[13-14]</sup>。

这些酶的发现无疑给涉及 Baeyer-Villiger 单加氧反应的工业生产和药物生产带来了革新的希望<sup>[15-16]</sup>。事实上, 许多研究证明, BVMO 还在许多其他领域表现出很好的运用价值, 例

如, 潜在的药物靶点设计<sup>[17]</sup>、潜在的基团保护方式等<sup>[18]</sup>。因为其广泛的作用, 近年来, 人们对各类新型 BVMO 从晶体结构、催化机制、底物谱和立体选择性等方面进行了大量的研究, 也取得了一系列重要突破。其中具有划时代意义的是 2004 年 PAMO 晶体结构的首次提出<sup>[19]</sup>。PAMO 晶体结构由两个结构域组成: FAD 和 NADPH 结构域, 其催化活性位点位于晶体表面的一个凹缝处。2009 年, 又有第 2 个 BVMO 的晶体结构被解析出<sup>[20]</sup>, 揭示了 CHMO 两种不同状态的晶体结构。“开”、“闭”两种结构的展示进一步细化了 BVMO 的催化图景, 说明 BVMO 催化反应是一个动态的过程, 辅基会在其催化位点发生位移。同年还发现了另一种不依赖于 FAD 和 NADPH 的 BVMO——MtmOIV 的晶体结构, 这一类 BVMO 被称为 II 型 BVMO<sup>[21-22]</sup>。2012 年, Yachnin 等<sup>[23]</sup>首次报道了 CHMO 与底物小分子环己酮相结合的晶体结构, 向我们清晰地展示了 BVMO 催化过程中与底物结合形成的重要中间体的形态。这些晶体的解析有助于深入理解这一类酶的底物识别及催化机制, 并为酶的分子改造提供重要的结构信息。近些年来, 结合结构信息和实验室定向进化的手段建立突变酶库, 并从中筛选出最适用于生产应用的突变株已经成为 BVMO 的研究热点。其中研究背景最悠久的 CHMO 和热稳定性最好的 PAMO 成为研究工作者们青睐的对象。

蛋白晶体的解析、结构信息的阐释以及众多分子定向进化的成功例子都让我们对 BVMO 的底物识别、催化机制等有了更深的认识。但是催化过程中的位移细节乃至催化的精确机制至今未知, 包括底物和氧气分子的激活、中间体如何形

成、中间体如何稳定等。特别是这些过程如何精细调控了各种 BVMO 独特的底物特异性和立体选择性还有待进一步深入研究。为了探索这些问题的答案, 本研究首先对 BVMO 的基因序列和晶体结构进行深入分析, 在底物结合口袋附近发现了一段连接 NADPH 结构域和 FAD 结构域在 BVMO 催化过程中形态难以固定的区域, 即 Hinge I 结构。迄今为止, 对 Hinge 的认识多数还停留在结构数据支撑上, 并没有系统地对酶催化功能影响的研究, 少数研究也只是浅尝辄止<sup>[24-25]</sup>。本课题以 CHMO 为模型, 旨在探索非保守 Hinge 对酶催化行为的影响, 通过改进的 Quick-change 和 overlap PCR 方法获得一系列 CHMO 突变酶, 包括两个 Hinge I 同源序列替换突变体 CHMO<sup>PAMO</sup>、CHMO<sup>STMO</sup> 以及 Hinge I 序列的丙氨酸扫描突变体。通过对突变体进行酶的活性检测和立体选择性的研究, 得到了一些影响 CHMO 活性和选择性的重要位点, 证明了 Hinge I 这一结构在 CHMO 中乃至整个 BVMO 家族的催化过程中都起着重要作用。这一研究有助于 BVMO 催化图景的进一步细化, 给我们未来对 BVMO 理性进化设计和定向改造研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 工具酶与试剂

PCR 所用的 Ex Taq 酶以及 T 载体质粒扩增系统、KOD Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA 连接酶分别购自 TaKaRa 公司 (TaKaRa Bio Group)、日本 Toyobo 公司、NEB (New England Biolabs) 公司以及 MBI (MBI Fermentas) 公司; 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶电泳回收试剂盒购自

天根生化科技(北京)有限公司;阿拉伯糖购自北京赛百盛基因技术有限公司;蛋白胨、酵母膏、氯化钠均为国产分析纯试剂。

### 1.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10、BL21(DE3) Gold 以及质粒 pBAD、pET22b 均为本实验室保存。

### 1.1.3 培养基

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 蒸馏水定容 1 L, pH 调为 7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 固体培养基时加 1.5% 琼脂。TB 培养基: 蛋白胨 12 g, 酵母提取物 24 g, 甘油 4 mL, 各组分溶解后高压灭菌, 冷却到 60 °C, 再加入 100 mL 灭菌的 170 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 0.72 mol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的溶液 (2.31 g 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 12.54 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  溶在足量的水中, 使终体积为 100 mL), 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

## 1.2 方法

### 1.2.1 突变体构建

PAMO/CHMO/STMO 的基因序列分别来自 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的嗜热裂孢菌 *Thermobifida fusca* (AAZ55526), 不动杆菌 *Acinetobacter* sp. NCIMB9871 (BAA86293) 和玫瑰色红球菌 *Rhodococcus rhodochrous* (BAA24454)。

同源序列替换突变体构建: 将 CHMO 的 Hinge I 序列分别替换成 PAMO 和 STMO 的 Hinge I 序列, 得到突变体  $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$  and  $\text{CHMO}^{\text{STMO}}$ 。具体替换过程见补充材料 2 (SM2)。 $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$  和  $\text{CHMO}^{\text{STMO}}$  被连接到 pET22b 中, 最后将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) Gold 中进行蛋白表达。

丙氨酸扫描突变体构建: 使用 Quick-change PCR<sup>[24]</sup> 方法构建以下突变体: 1) CHMO:

Leu143Ala/Leu144Ala/Ser145Ala/Pro147Ala/Asn148Ala/Leu149Ala/Pro150Ala/Leu151Ala/Ile152Ala/Lys153Ala; 2) PAMO: Gln152Ala/Leu153Ala/Ser154Ala/Val155Ala/Pro156Ala/Gln157Ala/Leu158Ala/Pro159Ala/Asn160Ala/Phe161Ala/Pro162Ala。

PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$  终体积: 10 $\times$ KOD 缓冲液 (2.5  $\mu\text{L}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (1  $\mu\text{L}$ , 0.025 mol/L), dNTPs (5  $\mu\text{L}$ , 每种核苷酸浓度为 0.002 mol/L), 引物 (0.5  $\mu\text{L}$ , 正反引物浓度均为 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ), 模板质粒 (1  $\mu\text{L}$ , 10 ng/ $\mu\text{L}$ ) 和 1 单位 KOD DNA 聚合酶。PAMO 的 PCR 反应循环条件为: 94 °C 10 min; 94 °C 变性 40 s, 53 °C 退火 40 s 以及 72 °C 延伸 50 s, 循环 35 次; 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min 以及 72 °C 延伸 7 min, 循环 35 次; 最后在 72 °C 下延伸 30 min。CHMO 的 PCR 条件中, 第 2 次循环的退火温度为 56 °C, 延伸时间为 8 min, 其他参数与 PAMO 相同。

PCR 之后取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 加入 1.2  $\mu\text{L}$  NEB 缓冲液, 1  $\mu\text{L}$  Dpn I, 37 °C 处理 3 h。最后转入 *E. coli* Top10 或者 *E. coli* BL21(DE3) Gold 宿主菌。

### 1.2.2 突变体基因表达

重组质粒 pET22b-CHMO 转入 *E. coli* BL21(DE3) Gold, 细胞在含有 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 °C 过夜培养。每 5 mL 过夜培养的培养基再转入 200 mL 含有 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 TB 培养基, 37 °C 培养至  $OD_{600}$  到达 0.6, 此时加入终浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$  IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) 诱导, 并将培养温度调至 20 °C, 转速调至 150 r/min, 培养 12 h。最后, 细胞以 0.9% NaCl 洗涤收集。重组质粒 pBAD-PAMO 转入 *E. coli* Top10 中, 5 mL 过夜培养物转入 200 mL 含有 0.1% 阿拉伯糖诱

导剂和 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 TB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 20 h。最后细胞同样以 0.9% NaCl 洗涤收集。这两种重组细胞都将用于全细胞生物催化和酶活检测。

### 1.2.3 全细胞催化

通过测定  $OD_{600}$  的方法将表达不同突变蛋白的细胞调成相同浓度, 然后将细胞悬浮于 10 mL 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 中。取其中 500  $\mu\text{L}$ , 放入终浓度为 1 mmol/L 底物进行反应, PAMO 对绝大部分底物反应温度设置为 35  $^{\circ}\text{C}$ , 芳香环酮类底物反应温度设置为 37  $^{\circ}\text{C}$ 。CHMO 反应温度均为 32  $^{\circ}\text{C}$ 。所有反应均在 13 000 r/min 的振荡器中完成, 反应时间控制在 12 h (CHMO) 或者 2 h (PAMO) (PAMO 与芳香环酮类底物的反应时间为 12 h)。反应结束后, 样品以 700  $\mu\text{L}$  乙酸乙酯萃取, 有机层经无水碳酸钠干燥后进行气相色谱分析。

### 1.2.4 蛋白纯化及酶活检测

将收集的新鲜细胞悬浮于 10 mL 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 中, 进行超声破碎。CHMO 及其突变体因纯化非常困难, 以细胞破碎液直接进行酶活检测; PAMO 及其突变体蛋白进行亲和层析的进一步纯化, 镍柱的纯化步骤为: 10 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 30 min; 将上清加入已被平衡过的 GE 公司 His 标签蛋白纯化预装柱 GE Healthcare Hisrap FF Crude column (5 mL) 上; 以含有 500 mmol/L NaCl 和 25 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl 冲洗杂蛋白; 以含有 500 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl 冲洗得到目的蛋白。镍柱纯化之后, 将目的蛋白进行过夜透析, 最后在 441 nm 下测其吸光值, 以此数值作为突变体蛋白的相对浓度。酶活检测实验中,

底物均以 20 mmol/L 终浓度溶解于乙腈中, NADPH 以 2 mmol/L 终浓度溶于 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中。反应体系如下: 总体积 200  $\mu\text{L}$ , 底物和 NADPH 终浓度分别为 1 mmol/L 和 100  $\mu\text{mol/L}$ , 酶用量各有不同, 最后以 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 补足 200  $\mu\text{L}$  总反应体系。将反应体系置于分光光度计 (Spectrophotometer Beckman Counter DU800) 下测 340 nm 下的光吸收, 从其吸光度随反应时间的变化测定其反应初速度, 进而计算其酶活<sup>[25]</sup>。PAMO 及其突变蛋白的蛋白浓度以在 441 nm 下的吸光值度量<sup>[26]</sup>, 而 CHMO 及其突变蛋白浓度以 Bradford 蛋白测定法测定<sup>[27]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 BVMO 基因序列与晶体结构分析

为了探索 BVMO 的构效关系, 我们以 NCBI 以及 PDB 等数据库中 BVMO 的相关信息为基础, 对 BVMO 进行了生物信息学分析和晶体结构分析, 如图 1 所示。BVMO 晶体结构主要由 FAD 结构域和 NADPH 结构域组成, 两者之间存在特殊的 Hinge 结构。此结构包括两条链, 且在晶体结构中恰好与 BVMO 的底物结合口袋在空间上相近。Hinge 结构的序列比对结果中, 两条链中的短链 (Hinge II) 保守性非常高而另外一条长链 (Hinge I) 保守性非常低。Hinge I 在 CHMO 与底物结合的晶体结构中是缺失的, 表明这一段序列在催化过程中柔性比较大, 形态难以在晶体中固定, 推测其在底物识别和催化氧化过程中扮演着重要的角色。本研究以 CHMO 为研究模型, 并选取了如图 2 所示的各种酮类 (包括脂肪酮、环戊酮和环己酮类脂环酮

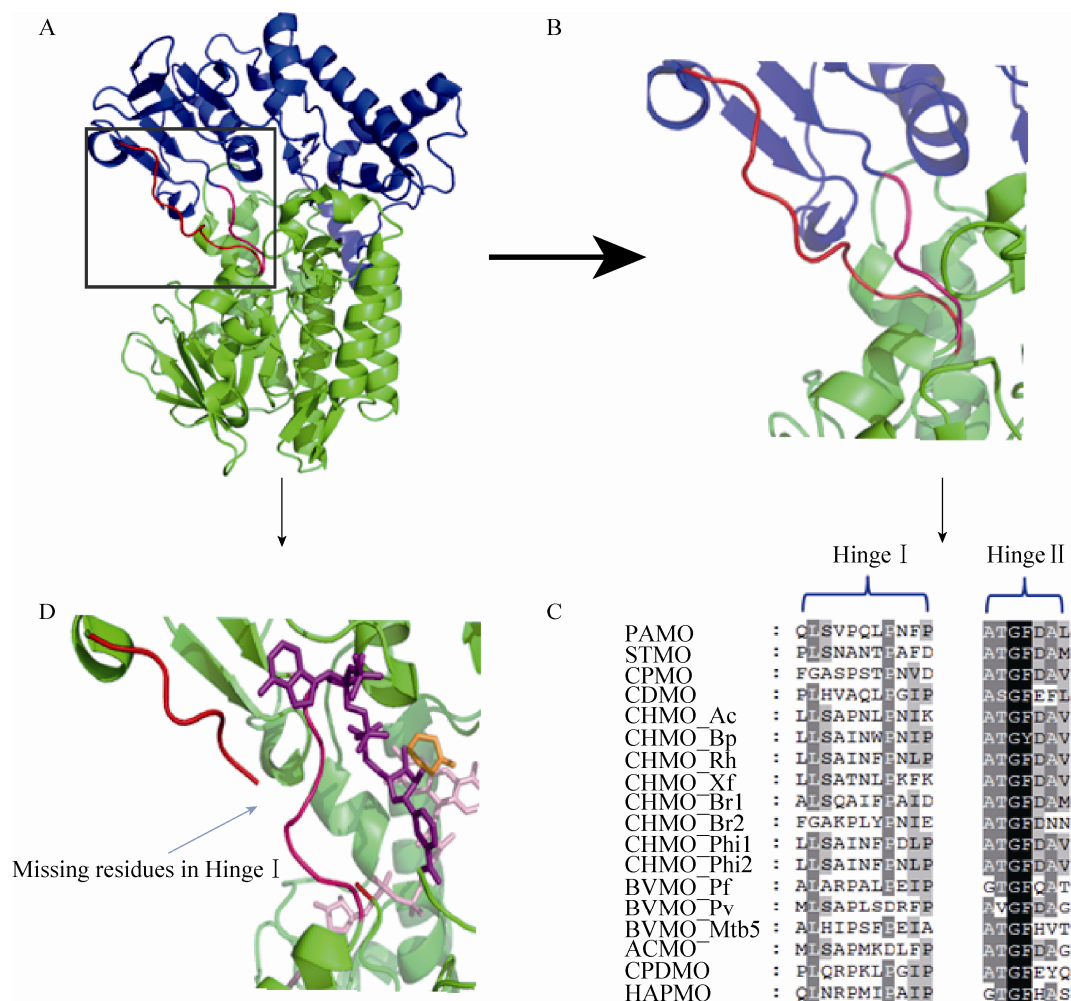


图 1 BVMO 晶体结构分析以及 Hinge 结构序列比对

Fig. 1 Analysis of BVMO crystal structure and hinge sequences. (A) BVMO crystal structure contains two domains, FAD binding domain (Colored in green) and NADPH binding domain (Colored in blue), which are connected by two hinges. Hinge I is in red and Hinge II is in hotpink. (B) An enlarged view of hinge region. (C) Sequence alignments of Hinge I and Hinge II among various BVMOs. The sequences are: phenylacetone monooxygenase (PAMO) from *Thermobifida fusca* (Q47PU3), steroid monooxygenase (STMO) from *Rhodococcus rhodochrous* (BAA24454), cyclopentanone monooxygenase (CPMO) from *Comamonas testosteroni* (CAD10798), cyclododecanone monooxygenase (CDMO) from *Rhodococcus ruber* (AAL114233), CHMO\_Ac from *Acinetobacter* sp. NCIMB9871 (BAA86293), CHMO\_Bp from *Brachymonas petroleovorans* (AAR99068), CHMO\_Rh from *Rhodococcus* sp. TK6 (AAR27824), CHMO\_Xf from *Xanthobacter flavus* (CAD10801), CHMO\_Br1 from *Brevibacterium* sp. HCU (AAG01289), CHMO\_Br2 from *Brevibacterium* sp. HCU (AAG012690), CHMO\_Phi1 from *Rhodococcus* sp. Phi1 (AAN37494), CHMO\_Phi2 from *Rhodococcus* sp. Phi1 (AAN37491), BVMO\_Pf from *Pseudomonas fluorescens* (AAC36351), BVMO\_Pv from *Pseudomonas veronii* (ABI15711), BVMO\_Mtb5 from *Mycobacterium tuberculosis* (NP\_217565), acetone monooxygenase (ACMO) from *Gordonia* sp. TY-5 (BAF43791), cyclopentadecanone 1,2-monooxygenase (CPDMO) from *Pseudomonas* sp. HI-70 (BAN84077), and 4-hydroxyacetophenone monooxygenase (HAPMO) from *Pseudomonas fluorescens* (Q93TJ5). Hinge I is less conserved while Hinge II is quite conserved. (D) An enlarged view of hinge region in CHMO crystal structure complexed with FAD, NADPH and substrate. The cofactors, FAD and NADPH is shown in (Colored in light pink), the orange molecule is a typical substrate of CHMO, cyclohexanone. There is a missing gap in Hinge I, revealing a very flexible conformation during catalytic process.

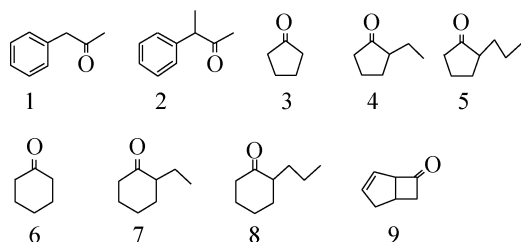


图2 本研究中涉及的主要底物

Fig. 2 Substrates used in this study.

等) 作为底物, 从底物特异性、催化活性和立体选择性等多个方面探索突变对 BVMO 催化行为的影响, 试图揭示非保守 Hinge I 的功能。

## 2.2 Hinge I 功能检测——整体水平

为了从整体水平上考察 Hinge I 结构的功能, 采用改进的 PCR 方法组合其他分子克隆手段得到了两个同源序列替换的突变体,  $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$  和  $\text{CHMO}^{\text{STMO}}$ , 它们是以 CHMO 为母体链的 Hinge I 位置分别被替换成 PAMO 和 STMO 的 Hinge I 的重组 CHMO 序列。将野生型 CHMO 与重组型进行全细胞水平的 SDS-PAGE 蛋白电泳, 检测到三者的表达水平相似 (图 3), 证明 Hinge I 的整段替换并没有影响其表达水平。将它们分别对各种底物进行全细胞催化, 并用气相色谱检测产物生成情况 (表 1)。

对于  $\text{CHMO}^{\text{STMO}}$  来说, 细胞基本上完全失活, 只有底物 9 有极少量的产物生成。同源替换突变体  $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$  则对简单脂肪环酮和底物 9 有较差的活性。野生型 CHMO 对这些底物有很高的催化活性。同时, 那些野生型催化活性较低的底物则完全不能被  $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$  所转化。可以看到, Hinge I 序列的同源替换极大地损害了 CHMO 的催化活性, 证明完整的 Hinge I 序列对 CHMO 的催化功能至关重要。

另外,  $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$  突变体进行活性测试的底物中, 不仅包括 CHMO 的活性底物, 还包括 PAMO 的活性底物。PAMO Hinge I 替换到 CHMO Hinge I 中, 不但剥夺了 CHMO 本身的活性能力, 而且也并没有赋予它任何类似 PAMO 的活性能力。说明不管对于 CHMO 还是 PAMO, Hinge I 结构同蛋白分子的其他部分都是协调合作共同起到相应的底物识别和催化作用的,

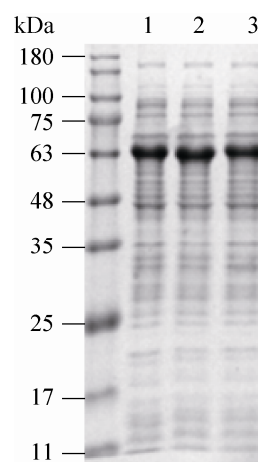


图3 同源序列替换突变体表达水平检测

Fig. 3 Expression level assessments of homologous replacement mutants. 1: wild type CHMO; 2:  $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$ ; 3:  $\text{CHMO}^{\text{STMO}}$ .

表 1 全细胞催化同源序列替换突变体  $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$  和  $\text{CHMO}^{\text{STMO}}$

Table 1 Qualitative analysis of activity of  $\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$  and  $\text{CHMO}^{\text{STMO}}$  based on whole-cell biotransformation

Entries	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9
CHMO <sub>wt</sub>	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
$\text{CHMO}^{\text{PAMO}}$	-	-	+	+	+	+	+	+	+
$\text{CHMO}^{\text{STMO}}$	-	-	-	-	-	-	-	-	+

K: is abbreviated for ketone. +++: represents 50%–100% conversion; ++: 10%–50% conversion; +: 0–10% conversion; -: no conversion. Biotransformation was conducted at 32 °C, lasted for 12 h.

“拆分嫁接”的后果就是两者整体性都被破坏,从而使酶失去催化功能。

### 2.3 Hinge I 功能检测——个体水平

通过定点突变得到了 10 个 CHMO Hinge I 序列的丙氨酸扫描突变体,分别是: Leu143Ala、Leu144Ala、Ser145Ala、Pro147Ala、Asn148Ala、Leu149Ala、Pro150Ala、Leu151Ala、Ile152Ala 和 Lys153Ala。其中 146 位本身是丙氨酸,故而不在于突变之列。

#### 2.3.1 丙氨酸扫描突变体蛋白表达水平检测

所有的丙氨酸扫描突变体都用 SDS-PAGE 电泳的方法进行了蛋白表达水平的检测。与同源系列替换的突变体情况类似,所有的丙氨酸扫描突变体几乎都和 CHMO 野生型一样能大量表达,突变压力并没有给蛋白表达造成显著性影响。后文中我们得到的全细胞催化、气相检测和手性拆分中突变酶相对于野生型的改变并

没有蛋白表达量的影响,其性质改变的原因源于酶本身的变化。

#### 2.3.2 丙氨酸扫描突变体的活性检测

同样是全细胞催化、气相检测的手段鉴定各突变体的底物谱,得到表 2。大多数突变体的活性都有部分下降,有些突变体活性改变较少,而有些突变体例如 L144A 的催化能力被大幅度削弱,特别是它与苯基丙酮的反应,在长达 12 h 的转化时间下转化率仍然为零。P147A、P150A 和 L151A 则是活性较高的一类突变体,特别是在转化 2 位取代环己酮时,表现出比野生型更高的活性。

为了得到更为精确可靠的底物谱,还采用了细胞破碎、酶活测定的方法进一步检测突变酶的反应活性。由于 CHMO 纯化过程中损耗非常大,纯化过程困难,并且我们已经证明了野生型 CHMO 和突变型之间表达水平差异不大,

表 2 全细胞催化检测 CHMO 丙氨酸扫描突变体的活性

Table 2 Substrate profiling using whole-cell biotransformation for CHMO

Description of enzyme	RA (%) of								
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9
WT	100 (12%)	100 (18%)	100 (87%)	100 (89%)	100 (92%)	100 (80%)	100 (97%)	100 (98%)	100 (78%)
L143A	89	88	92	94	96	87	89	91	82
L144A	0	4	10	11	7	40	39	51	37
S145A	80	86	63	55	68	90	83	91	89
P147A	73	76	92	95	99	92	103	106	87
N148A	45	54	64	64	71	32	21	44	30
L149A	63	53	66	73	80	54	66	73	40
P150A	92	88	87	90	95	90	86	111	83
N151A	96	88	87	93	96	90	99	110	95
I152A	53	49	50	58	57	61	62	63	50
K153A	45	38	30	31	35	41	59	53	32

K: is abbreviated for “ketone”; RA: relative activity. For a fair comparison, all incubations were for 12 h and relative activities are expressed as the rate of conversion normalized to that obtained with wild-type CHMO. Absolute conversion values for the wild-type CHMO are given in parentheses.



所以以细胞破碎液 (粗酶) 为检测样品来比较野生型与突变型之间的酶活差异是合理的。将野生型 CHMO 和 10 个突变体的细胞破碎液分别与底物混合, 并加入反应必需的辅基 NADPH, 反应体系放到紫外分光光度计下检测 25 °C 和 340 nm 波长下的光吸收变化, 从吸光值对时间的比率中可以得出反应初速率, 再通过反应体系中的酶浓度即可得到能反映酶的催化能力的动力学指标——酶的比活。数据结果用图 4 的坐标轴方式清晰地展示出来。野生型 CHMO 在催化大部分底物中仍然是活性最高的一个, 除了在催化 2 位取代环己酮时 P147A 和 N151A 两种突变体有微弱的优势。L144A 在所有纵轴中都是排行最低的, 证明其对比于野生型和其他突变体, 在所有底物上都表现出最差的催化活性。图中 K153A 也是一个活性较差的突变体, 尽管它在全细胞催化活性检测时并没有突出的表现。其他位于轴线中部的突变体比野生型 CHMO 催化能力差, 但仍维持着中等的活性。

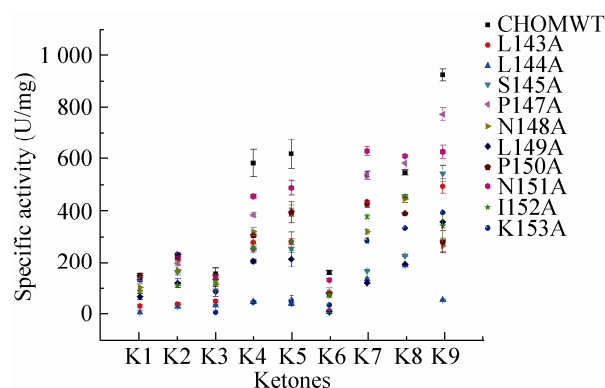


图 4 酶活测定检测 CHMO 丙氨酸扫描突变体活性  
Fig. 4 Substrate profiling with cell extracts of CHMO. Each of the longitudinal axis stands for a kind of substrate; each kind of the various shapes of points stands for a certain mutant.

图 4 的实验结果与表 2 基本上一致, 除了 K153A 外, 只有 L143A 在全细胞表达中产率较高而在细胞破碎液酶活测定中活性相对较低。同样作为检测催化能力的手段, 全细胞催化着眼于整个活细胞的催化功能, 不单单由酶本身的性质决定, 更有酶的表达量以及细胞内 NADPH 浓度等各种其他因素的影响; 而酶活检测则是细胞外相对精确的定量实验, 更能体现酶本身的催化性质。

### 2.3.3 丙氨酸扫描突变体对映选择性检测

经过萃取得到 CHMO 及其突变体全细胞催化反应之后体系中的有机相, 然后用手性气相色谱柱进行动力学拆分, 得到一系列拆分数据, 其中与野生型对映选择性有明显差异的部分如表 3 所示。L144A 因其催化得到外消旋产物而再次成为表现突出的突变体, 而在酶活检测中和 L144A 行为相似的 K153A 却有较高的化学选择性, 特别是在催化 2-丙基环戊酮时, 甚至有比野生型更高的  $E$  值 ( $E$  值是度量催化剂立体选择性的指标,  $E$  值越大代表选择性越好<sup>[28]</sup>)。

双环 [3,2,0] 庚-2-烯-6-酮 (Bicyclo [3.2.0] hept-2-en-6-one, 底物 9) 是研究 BVMO 化学选择性的重要模式底物, 因同时存在立体选择性和区域选择性, 它在被 BVMO 催化时通常能产生各种构型构象的产物组合, 如图 5 所示。有报道证明 CHMO 在催化底物 9 时有较高的立体选择性和较差的区域选择性<sup>[29]</sup>, 我们的结论与之一致。大部分 CHMO 突变体的行为也与野生型相似, 反应生成 (1*S*,5*R*) “正常”型酯和 (1*R*,5*S*) “非正常”型酯。L144A 在催化底物 9 时表现出较低的立体选择性, 并且更倾向于生成“非正常”型酯, 如表 4 所示。

表 3 CHMO 及其突变体的对映选择性检测

Table 3 Enantioselectivity of CHMO mutants as catalysts in the BV reaction

Mutants	Specific activity (U/mg)	Conversion (%)	Substrates ee (%)	Products ee (%)	Absolute conformation	<i>E</i> -value
Ketone 4: 2-ethyl cyclopentanone						
CHMO	593±52	45	21	89	S	38
L143A	288±30	36	36	72	S	9
L144A	55±2	43	27	33	S	3
K153A	53±6	49	46	89	S	47
Ketone 5: 2-propyl cyclopentanone						
CHMO	630±56	33	4	99	S	≥200
L143A	290±11	35	2	41	S	3
L144A	49±2	37	4	3	S	1
K153A	60±19	50	3	99	S	≥200
Ketone 7: 2-ethyl cyclohexanone						
CHMO	546±16	45	57	83	S	22
L143A	445±3	45	64	40	S	3
L144A	143±5	49	23	25	S	2
K153A	295±10	49	23	84	S	29
Ketone 8: 2-propyl cyclohexanone						
CHMO	557±11	50	22	99	S	≥200
L143A	460±1	34	13	99	S	≥200
L144A	196±1	46	0	21	S	2
K153A	342±2	31	61	99	S	≥200

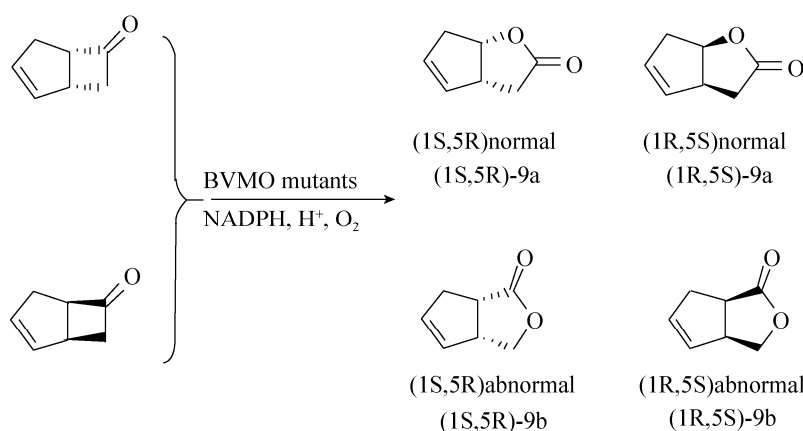


图 5 BVMO 催化底物 9 的可能结果

Fig. 5 Regio-plus enantiochemical outcomes of ketone 9, bicycle [3.2.0] hept-2-en-6-one, catalyzed by wildtype CHMO and its mutants.

表 4 CHMO 及其突变体催化底物 9 的化学选择性

Table 4 Regio-enantioselectivity of CHMO mutants as catalysts in the BV reaction of ketone 9, bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one

Mutants	Specific activity (U/mg)	Conversion (%)	“Normal” lactone		“Abnormal” lactone		Ratio (“normal”/“abnormal”)
			ee (%)	Absolute conformation	ee (%)	Absolute conformation	
CHMOWT	939±23	78	98	(1R,5S)	89	(1S,5R)	51/49
L143A	504±28	79	97	(1R,5S)	99	(1S,5R)	51/49
L144A	63±3	29	78	(1R,5S)	95	(1S,5R)	42/58
S145A	553±31	70	99	(1R,5S)	99	(1S,5R)	53/47
P147A	785±26	48	99	(1R,5S)	98	(1S,5R)	52/48
N148A	275±23	33	97	(1R,5S)	98	(1S,5R)	52/48
L149A	366±35	32	97	(1R,5S)	96	(1S,5R)	51/49
P150A	290±43	49	99	(1R,5S)	99	(1S,5R)	54/46
L151A	637±26	43	95	(1R,5S)	94	(1S,5R)	52/48
I152A	352±49	70	93	(1R,5S)	99	(1S,5R)	51/49
K153A	403±4	80	99	(1R,5S)	98	(1S,5R)	52/48

## 2.4 PAMO Hinge I 的功能检测

从 CHMO 的实验结果中我们得到了一些显著影响其功能的重要位点, 为了证明这些位点在其他 BVMO 中是否同样关键, 将同样的研究方法运用于 PAMO, 得到的结论与 CHMO 非常一致。在催化 PAMO 经典底物如苯基丙酮、3-苯基-2-丁酮时, 大部分突变体都显示出中等催化活性, 与 CHMO 中 L144A 的对应突变体 L153A 则出现大幅度活性下降, 立体选择性也下降。在催化非经典底物如 2-丙基环戊酮、Bicyclo [3.2.0] hept-2-en-6-one (底物 9) 时, 大部分突变体催化活性呈现出和野生型一样的低催化活性, 而 L153A 则活性相对较高。另外 PAMO 中还有非常值得注意的一个位点是 Q152, 其丙氨酸扫描突变体的活性和立体选择与 L153A 一样大幅度下降, 对 PAMO 的影响程度不亚于 K153。此外, CHMO 中的对应位点突变体 L143A 在活性和选择性上也对 CHMO 有较

大负面影响。我们还用 SDS-PAGE 检测了突变体的蛋白表达情况, 发现其蛋白表达与野生型 PAMO 基本一致。

以上发现都说明 Hinge I 的重要位点在 BVMO 中很有可能具有普遍的影响力, 为研究新型 BVMO 提供了宝贵的借鉴, 同时给 BVMO 的定向改造和进化提供了新的突破口。

## 3 讨论

本研究以 BVMO 序列比对和晶体结构分析为基础, 主要通过同源序列替换以及丙氨酸扫描突变的过程, 得到了一系列 BVMO 突变酶; 然后以改进的分子克隆技术、色谱技术以及酶学性质研究技术等为手段获得大量关于 BVMO 突变酶的底物选择性、反应活性以及对映选择性的实验数据。我们发现这些突变体在催化活性和化学选择性上相对于野生型来说有诸多改变, 这些实验证据使我们能从中获取更多关于

BVMO 重要的构效信息。

从整体水平上, Hinge I 的多氨基酸替换突变直接导致了 CHMO 催化功能的几乎完全丧失。事实上, 在通过多个基因同时突变的手段来研究 BVMO 酶功能的变化时, Dudek 等<sup>[31]</sup>就提到过“累积假说”的概念, 即多个位点同时突变对酶功能的影响是由每个位点突变所产生的效应累积而成的。同源序列替换导致的活性完全丧失, 表明了在此 11 个位点中, 必然有能严重影响 CHMO 活性的位点存在, 这也从侧面说明了本课题最开始的设想——Hinge I 结构的重要性是符合事实的。当然, 长达 11 个氨基酸的替换使酶活丧失, 还有一个可能是其蛋白结构发生了重大改变从而无法进行任何催化造成的, 但是我们替换进去的 Hinge I 序列是 BVMO 同源序列, 同样能起到支持蛋白结构的作用。故而其酶活丧失最有可能的原因就是其中的某些非保守氨基酸残基在催化作用中起着关键性的作用。

从个体水平上, Hinge I 丙氨酸扫描突变体表现各异, 大多数维持着部分活性, 少数活性与野生型相似, 极少数活性得到了加强, 比如 PAMO L153A 催化 2-丙基环戊酮以及 CHMO P147A 催化 2 位取代环己酮, 这或许可以成为我们拓展或者改变 BVMO 底物谱、定向改造 BVMO 的一个新的突破口。还有一类就是几乎完全丧失活性的突变, 例如 CHMO L144A。CHMO L144A 是所有突变体中活性最低的一个, 也是所有突变体中立体选择性最差的一个。我们知道“克利己”(Criegee) 中间体是 BVMO 催化过程中的一个关键形态, 酶结构域的相对运动与酶和底物识别、结合密切相关, 也即

“Criegee”中间体的形成密切相关。CHMO 与底物结合的晶体结构模型中, 也可以看作是“Criegee”中间体模型中, Hinge I 是一段在催化过程中有着非常频繁结构变动的区域。这段区域影响着整个酶的形态变化以及催化行为。作为这段区域的第一个氨基酸残基位点, L144 或许在整条链的摆动运动中有着重要地位, 直接影响着整个 BVMO 的催化过程。丙氨酸和 CHMO 此位置上原始的亮氨酸结构上差异并不大, 只有一个单位的  $\text{CH}_2$  的差异, 但是却能使酶产生如此大的变化——酶活大大下降, 选择性几乎完全丧失。可见这一位点在 CHMO 中的关键作用。CHMO L144 位点有着很高的研究价值和改造潜能。

对比其他的 BVMO, CHMO L144 位点上的亮氨酸非常保守。我们将其对应位点 PAMO 的 L153 位点突变成丙氨酸后, 也发现有催化能力的剧烈下降。研究发现此位点同 Q152 位点一样, 处于底物结合区域的 5 Å 范围之内<sup>[31]</sup>, 它的突变将有很大可能性对 PAMO 产生影响。CHMO L144 位点和 PAMO L153 位点的相似性表明, 这一位点的重要性在所有的 BVMO 中很可能具有普遍性。

在 CHMO 突变体的催化选择性检测中, 我们发现 K153A 突变体的活性有所降低, 但是在立体选择性上却比野生型 CHMO 更加优秀, 这是一个令人惊喜的正向进化。值得注意的是, 在大多数 BVMO 的此位点上, 都是脯氨酸(Proline), 包括 PAMO 在内。可见 CHMO 这个位点的赖氨酸对其立体选择性有着十分重要的影响。赖氨酸的侧链长度比脯氨酸长很多, 这个位点很可能是通过侧链的构造影响底物结合

口袋的形态,进而影响产物构型形成的。

综上所述,作为连接两个结构域的在催化过程中有着明显摆动的 Hinge I 结构对 BVMO 的催化功能有着关键作用,其中最开始的两个氨基酸以及最后一个氨基酸影响作用最为明显,是构成整条链的重要性的主要原因。对 BVMO 家族中非保守 Hinge I 结构的研究结果有助于精确描述 BVMO 底物结合口袋,进一步细化催化图景并对未来 BVMO 理性进化和定向改造研究奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Renz M, Meunier B. 100 years of Baeyer-Villiger oxidations. *Eur J Org Chem*, 1999, 1999(4): 737–750.
- [2] Baeyer A, Villiger V. Einwirkung des Caro'schen reagens auf ketone. *Ber Dtsch Chem Ges*, 1899, 32(3): 3625–3633.
- [3] Strukul G. Transition metal catalysis in the Baeyer-Villiger oxidation of ketones. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 36(13/14): 1198–1209.
- [4] Donoghue NA, Norris DB, Trudgill PW. The purification and properties of cyclohexanone oxygenase from *Nocardiogloborula* CL1 and *Acinetobacter* NCIB 9871. *Eur J Biochem*, 1976, 63(1): 175–192.
- [5] Morii S, Sawamoto S, Yamauchi Y, et al. Steroid monooxygenase of *Rhodococcus rhodochorus*: sequencing of the genomic DNA, and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *J Biochem*, 1999, 126(3): 624–631.
- [6] Kamerbeek NM, Moonen MJH, van der Ven JGM, et al. 4-Hydroxyacetophenone monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* ACB. *Eur J Biochem*, 2001, 268(9): 2547–2557.
- [7] Iwaki H, Hasegawa Y, Wang S, et al. Cloning and characterization of a gene cluster involved in cyclopentanol metabolism in *Comamonas* sp. strain NCIMB 9872 and biotransformations effected by *Escherichia coli*-expressed cyclopentanone 1,2-monooxygenase. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(11): 5671–5684.
- [8] Pazmiño DET, Dudek HM, Fraaije MW. Baeyer Villiger monooxygenases: recent advances and future challenges. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14(2): 138–144.
- [9] Fraaije MW, Kamerbeek NM, van Berkel WJH, et al. Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Lett*, 2002, 518(1): 43–47.
- [10] Torres Pazmiño DE, Dudek HM, Fraaije MW. Baeyer-Villiger monooxygenases: recent advances and future challenge. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14(2): 138–144.
- [11] Van Beilen JB, Mourlane F, Seeger MA, et al. Cloning of Baeyer-Villiger monooxygenases from *Comamonas*, *Xanthobacter* and *Rhodococcus* using polymerase chain reaction with highly degenerate primers. *Environ Microbiol*, 2003, 5(3): 174–182.
- [12] Mascotti ML, Ayub MJ, Dudek H, et al. Cloning, overexpression and biocatalytic exploration of a novel Baeyer-Villiger monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* Af293. *AMB Express*, 2013, 3(1): 33.
- [13] Kotani T, Yurimoto H, Kato N, et al. A novel acetone metabolism in a propane-utilizing bacterium *Gordonia* sp. Strain TY-5. *J Bacteriol*, 2007, 189(3): 886–893.
- [14] Iwaki H, Wang S, Grosse S, et al. *Pseudomonad* cyclopentadecanone monooxygenase displaying an uncommon spectrum of Baeyer-Villiger oxidations of cyclic ketones. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(4): 2707–2720.
- [15] Mihovilovic MD, Bianchi DA, Rudroff F. Accessing tetrahydrofuran-based natural products by microbial Baeyer-Villiger biooxidation. *Chem Commun*, 2006, 14(30): 3214–3216.
- [16] Gibson M, Nur-e-alam M, Lipata F, et al. Characterization of kinetics and products of the

- Baeyer-Villiger oxygenase MtmOIV, the key enzyme of the biosynthetic pathway toward the natural product anticancer drug mithramycin from *Streptomyces argillaceus*. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(50): 17594–17595.
- [17] Willand N, Dirié B, Carette X, et al. Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide. *Nat Med*, 2009, 15(5): 537–544.
- [18] Moonen MJH, Rietjens I, van Berkel WJH. 19F NMR study on the biological Baeyer–Villiger oxidation of acetophenones. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, 26(1/2): 35–42.
- [19] Malito E, Alfieri A, Fraaije MW, et al. Crystal structure of a Baeyer-Villiger monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(36): 13157–13162.
- [20] Mirza IA, Yachnin BJ, Wang S, et al. Crystal structures of cyclohexanone monooxygenase reveal complex domain movements and a sliding cofactor. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(25): 8848–8854.
- [21] Kamerbeek NM, Olsthoorn AJJ, Fraaije WM, et al. Substrate specificity and enantioselectivity of 4-hydroxyacetophenone monooxygenase. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 419–426.
- [22] Beam MP, Bosserman MA, Noinaj N, et al. Crystal structure of Baeyer-Villiger monooxygenase MtmOIV, the key enzyme of the mithramycin biosynthetic pathway. *Biochem*, 2009, 48(21): 4476–4487.
- [23] Yachnin BJ, Sprules T, McEvoy MB, et al. The substrate-bound crystal structure of a Baeyer-Villiger monooxygenase exhibits a Criegee-like conformation. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(18): 7788–7795.
- [24] Hogrefe HH, Cline J, Youngblood GL, et al. Creating randomized amino acid libraries with the QuikChange® multisite-directed mutagenesis kit. *Biotechniques*, 2002, 33(5): 1158–1165.
- [25] Suske WA, van Berkel WJH, Kohler HPE. Catalytic mechanism of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase, a flavoprotein from *Pseudomonas azelaica* HBP1. *J Biol Chem*, 1999, 274(47): 33355–33365.
- [26] Reetz MT, Wu S. Laboratory evolution of robust and enantioselective Baeyer-Villiger monooxygenases for asymmetric catalysis. *J Am Chem Soc*, 131(42): 15424–15432.
- [27] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248–254.
- [28] Straathof, AJJ, Jongejan JA. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 21(8): 559–571.
- [29] Alphand V, Furstoss R. Microbiological transformations. 22. Microbiologically mediated Baeyer-Villiger reactions: a unique route to several bicyclic gamma-lactones in high enantiomeric purity. *J Org Chem*, 1992, 57(4): 1306–1309.
- [30] Szolkowy C, Eltis LD, Bruce NC, et al. Insights into sequence–activity relationships amongst Baeyer-Villiger monooxygenases as revealed by the intragenomic complement of enzymes from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Chem Bio Chem*, 2009, 10(7): 1208–1217.
- [31] Dudek HM, de Gonzalo G, Pazmiño DET, et al. Mapping the substrate binding site of phenylacetone monooxygenase from *Thermobifida fusca* by mutational analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(16): 5730–5738.

(本文责编 陈宏宇)