

· 合成生物技术 ·

新型争论贪噬菌 *Variovorax paradoxus* S110 的细胞色素 P450 酶的异源表达及催化特性分析

李晨星, 侯晓冬, 郭保党, 饶义剑

江南大学 生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

李晨星, 侯晓冬, 郭保党, 等. 新型争论贪噬菌 *Variovorax paradoxus* S110 的细胞色素 P450 酶的异源表达及催化特性分析. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1346–1355.

Li CX, Hou XD, Guo BD, et al. Expression and characterization of a novel cytochrome P450 enzyme from *Variovorax paradoxus* S110. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1346–1355.

摘要: 细胞色素 P450 单加氧酶 (Cytochrome P450 monooxygenases) 是一种广谱催化剂, 可以催化多种类型反应而参与生物体外源物质代谢与天然产物的合成。为丰富 P450 作为合成生物学的酶元件库, 并探索新型催化反应, 利用生物信息学手段从争论贪噬菌 *Variovorax paradoxus* S110 中挖掘出一种新型电子自供体细胞色素 P450_{VpMO} 单加氧酶, 属于 CYP116B 家族, 它可以在大肠杆菌 *Escherichia coli* 异源可溶表达。酶学性质研究表明 P450_{VpMO} 最适 pH 和最适温度分别为 8.0 和 45 °C, 并且在温度低于 35 °C 时具有良好的稳定性, K_m 值为 0.458 mmol/L, k_{cat} 为 2.438 min⁻¹; 重要的是重组 P450_{VpMO} 可以催化一系列包含污染物的含甲氧基底物进行脱甲基反应, 其中对 4-甲氧基苯乙酮的脱甲基反应转化率高达 91%。相比于其他 CYP116B 家族的 P450 酶, P450_{VpMO} 表现出较强的酶活性, 这为后期进一步研究 P450_{VpMO} 提供了基础。

关键词: P450 单加氧酶 P450_{VpMO}, 争论贪噬菌, 一氧化碳示差法, 酶学性质, 脱甲基反应

Expression and characterization of a novel cytochrome P450 enzyme from *Variovorax paradoxus* S110

Chenxing Li, Xiaodong Hou, Baodang Guo, and Yijian Rao

Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Cytochrome P450 monooxygenases as powerful biocatalysts catalyze a wide range of chemical reactions to facilitate exogenous substances metabolism and biosynthesis of natural products. In order to explore new catalytic reactions and increase the number of P450 biocatalysts used in synthetic biology, a new self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase (P450_{VpMO}), belongs to CYP116B class, was mined from *Variovorax paradoxus* S110 genome and expressed in *Escherichia coli*. Based on characterization of the enzymatic properties, it shows that the optimal pH and temperature for

Received: November 28, 2019; **Accepted:** February 4, 2020

Supported by: National Key R&D Program of China (No. 2018YFA0901700).

Corresponding author: Yijian Rao. Tel: +86-510-85912322; E-mail: raoyijian@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0901700) 资助。

P450_{VpMO} reaction activity are 8.0 and 45 °C, respectively. P450_{VpMO} is relatively stable at temperatures below 35 °C. The K_m and k_{cat} of P450_{VpMO} toward 4'-Methoxyacetophenone are 0.458 mmol/L and 2.438 min⁻¹, respectively. Importantly, P450_{VpMO} was able to catalyze the demethylation reaction for a range of substrates containing methoxy group. Its demethylation reactivity is reasonably better than other P450s belongs to CYP116B class, particularly, for 4-methoxyacetophenone with a great conversion efficiency at 91%, showing that P450_{VpMO} could be used as a great biocatalyst candidate for further analysis.

Keywords: P450_{VpMO}, *Variovorax paradoxus*, CO-difference spectroscopy, enzymatic property, demethylation

合成生物学的基础是对各种生物元件进行人工设计并经过有序组装, 以实现复杂的、新的生物功能, 从而建立药物、功能材料或能源替代品等的绿色生物制造; 而其中催化元件, 即功能酶分子的挖掘和应用是合成生物学研究的核心^[1]。细胞色素 P450 单加氧酶 (Cytochrome P450 monooxygenases, EC: 1.14.14.1) 是一类广泛存在于自然界中的含有亚铁血红素-硫醇盐 (Heme-thiolate) 的超家族氧化酶^[2-3]。它可在温和条件下, 立体选择性地催化各种类型的化学反应, 如 C-H 羟基化、烯烃环氧化和 O-脱烷基化等^[4-5], 而参与生物体一系列初级和次级代谢产物的生物合成, 如类固醇、萜类、生物碱、类黄酮等^[6], 因此, P450 酶已成为一类重要的合成生物学催化元件, 并用于一系列的绿色生物催化有机合成反应^[7-9]。并且由于 P450 酶的氧化功能较化学氧化反应而言优势明显^[10], 因而被广泛应用于药物、维生素、杀虫剂、香料等产品的生产^[11]; 特别是能在抗癌药物紫杉醇合成过程中起重要作用^[12]。此外, P450 酶也可以参与外源性难降解有机物的生物氧化, 在环境污染物的降解和生态修复等方面也发挥着重要的作用^[13-14]。

基于电子传递系统的不同, P450 酶在传统上可以分为 2 大类^[15-16]: Class I 为利用铁硫簇 (Fe₂S₂) 的铁氧还蛋白 (Ferredoxin, Fdx) 与 FAD 的铁氧还蛋白还原酶 (Ferredoxin reductase, FdR) 进行分子间电子传递; Class II 为通过含有 FAD/FMN 的细胞色素 P450 酶还原酶 (Cytochrome P450 reductase, CPR) 进行分子间电子传递, 然而它们通常是以独立的蛋白存在来催化各种化学

反应。近些年来, 随着 P450 酶元件的不断挖掘, 发现 P450 酶分子可以与电子供体蛋白天然融合成一体, 而实现分子内的电子自给自足高效传递 (Self-sufficient electron transfer systems)。比如, 来自巨大芽孢杆菌 *Bacillus megatherium* 的 P450BM3 (CYP102A) 融合了双黄素 (FAD/FMN) 氧化还原伴侣结构域 (CPR) 和 P450 结构域^[17-18]; 红球菌 *Rhodococcus* NCIMB9784 的 P450_{RhF} (CYP116B2) 融合了 Fe-S 簇铁氧还蛋白 (Fe/S)、黄素单核苷酸 (FMN) 氧化还原伴侣结构域以及 P450 催化结构域^[19]。由于这类 P450 酶分子具有高效的电子传递效率, 可以实现 P450 酶催化反应的快速发生。因此, 对于该类 P450 酶分子的挖掘、改造和定向进化已成为研究热点。

前期的研究发现争论贪噬菌 *Variovorax paradoxus* 可以有效地降解环境中的蒽、对酞酸二甲酯等污染物, 且发现在对酞酸二甲酯的降解过程中发生脱甲基反应^[20]。由于细胞色素 P450 酶清除环境污染物的主要功能之一为脱甲基^[21], 因而推测 *V. paradoxus* 的此功能与其体内所含有的 P450 酶相关。为此, 本研究从基因库中检索了一个来源于 *V. paradoxus* S110 的细胞色素 P450 单加氧酶基因^[22], 经过系统命名属于 CYP116 家族, CYP116B256V2, 简称为 P450_{VpMO}, 之后经密码子优化后实现在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 中异源表达。重组 P450_{VpMO} 经过纯化后, 以 4-甲氧基苯乙酮为模式底物测定其酶学性质, 同时对其他多种含甲氧基底物进行底物谱拓展分析 (图 1), 发现其对这些底物均有较高的酶催化活性。

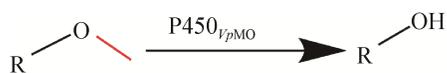


图1 P450_{VpMO}脱甲基反应方程式

Fig. 1 The proposed demethylation reaction by P450_{VpMO}.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

大肠杆菌 *E. coli* TOP10 和 BL21 (DE3) 由本实验室保存, 分别用于质粒抽提和蛋白表达; 载体 pET-21b 由本实验室保存, 用于重组质粒的构建。LB 培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L 氯化钠; 2×YT 培养基: 16 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L 酵母提取物, 5 g/L 氯化钠。

1.2 主要试剂及仪器

异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG)、5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 和质粒提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 标准分子量蛋白购自大连 TaKaRa 公司; 葡萄糖脱氢酶 (GDH) 由本实验室制备保存; 4-甲氧基苯乙酮 (1)、6-甲氧基喹啉 (2)、7-甲氧基香豆素 (3)、4-甲氧基苯甲腈 (4)、6-甲氧基-1-萘满酮 (5)、2'-羟基-4'-甲氧基苯乙酮 (6)、7-甲氧基-1-萘满酮 (7) 和 4-甲氧基二苯甲酮 (8)、甲氧苄啶 (9) 购置于萨恩化学技术有限公司。

AKTA pure 蛋白纯化仪购自美国 GE 公司; 安捷伦 1260 高效液相色谱 (HPLC) 购自美国安捷伦公司。

1.3 P450_{VpMO} 基因的克隆

在 UniProt 上检索并获得来源于 *V. paradoxus* S110 细胞色素 P450 家族的氨基酸序列 (UniProt: C5CTM5) 及基因序列 (GenEMBL: ACS20213 或 GenBank: WP_012748691)。基于 *E. coli* 密码子偏好性对基因序列优化, 并在 5'端加入 6×His-tag 核酸序列用于后期的纯化, 之后由天霖生物科技 (上海) 有限公司合成, 并连接至 pET-21b 表达载

体上获得重组质粒 pET-21b-P450_{VpMO}, 导入至 *E. coli* Top10 感受态中, 提取质粒进行 DNA 测序验证。正确的 pET-21b-P450_{VpMO} 转化至 *E. coli* BL21 表达菌株中得到重组菌 *E. coli*/P450_{VpMO}。

1.4 重组 P450_{VpMO} 在 *E. coli* 中的表达与纯化

挑取重组菌 *E. coli*/P450_{VpMO} 转接到含 100 μg/mL 的氨苄青霉素的 LB 培养基中于 37 °C、200 r/min 振荡培养 10 h, 以 2% (V/V) 接种量转接至 500 mL 的 2×YT 培养基中, 37 °C、200 r/min 下培养至 OD₆₀₀ 在 0.8–1.0 时加入终浓度均为 0.2 mmol/L 的 IPTG 和 ALA (其中 IPTG 为诱导剂, ALA 为 P450 辅酶因子血红素前体物质 5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid)) 于 16 °C 诱导培养 16 h 后, 离心收集菌体^[23]。湿菌体用缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 10% 甘油, pH 8.0) 重悬制备 100 mg/mL 菌悬液。高压匀浆机破碎细胞后于 4 °C、40 000×g 离心 30 min, 收集上清液。上清液采用镍柱进行纯化, 用含 100 mmol/L 咪唑缓冲液 (pH 8) 对目的蛋白洗脱收集; 用脱盐柱 (Histrp™ 5 mL Desalting) 脱盐, 脱盐缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10% 甘油), 脱盐后超滤浓缩至 10 mg/mL, -80 °C 保存。

1.5 重组 P450_{VpMO} 的光谱特性分析

采用一氧化碳示差法对重组 P450_{VpMO} 进行光谱鉴定^[24-25]。首先, 在玻璃比色皿中加入 150 μL 10 mg/mL P450_{VpMO} 纯酶液和 2.85 mL 磷酸钾缓冲液 (100 mmol/L, pH 8.0, 含 1 mmol/L EDTA, 20% 甘油和 1 μg/mL 藏红 T) 混合均匀, 采用紫外可见型分光光度计 (日立 U-3900) 在 400–500 nm 的波长范围内扫描。然后, 在玻璃比色皿中加入适量连二亚硫酸钠将氧化态 P450_{VpMO} 还原后, 在 400–500 nm 的波长范围内扫描。最后, 通入一氧化碳 30 s 使得一氧化碳与还原态 P450_{VpMO} 充分结合后, 在 400–500 nm 的波长范围内扫描, 观察 3 种状态 P450_{VpMO} 特征吸光值的变化。以磷酸钾缓冲

液作为空白对照。

1.6 重组 P450_{VpMO} 的酶活力测定方法

以 4-甲氧基苯乙酮为模式底物, 测定重组 P450_{VpMO} 的酶活力。构建 200 μ L Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 反应体系: 2 mmol/L 底物、5 mmol/L 葡萄糖、0.5 mmol/L 辅酶 NADP⁺、0.24 mg/mL GDH 和 1.3 mg/mL 的 P450_{VpMO} 纯酶, 于 30 $^{\circ}$ C 下反应 10 min 后, 加入等体积甲醇终止反应, 样品使用 HPLC 检测。酶活力单位 (U) 定义为每分钟生成 1 μ mol 的产物所需的酶量。

HPLC 检测条件: 色谱柱为 XDB-C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 检测波长为 280 nm, 流动相为甲醇 (A) 和水 (B), 梯度洗脱程序为: 0–20 min 由 20% A 线性变化至 100% A。4-甲氧基苯乙酮及其产物的出峰时间分别为 13.3 min 和 9.4 min。

1.7 重组 P450_{VpMO} 的酶学性质分析

1.7.1 pH 与温度对重组 P450_{VpMO} 酶活力的影响

配制不同 pH 缓冲液 (50 mmol/L 醋酸-醋酸钠 pH 5.5–6.0; 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.0–7.5; Tris-HCl pH 7.5–9.0)。按照方法 1.6, 测定 P450_{VpMO} 在不同 pH 条件下的酶活力。在最适 pH 下, 按方法 1.6 测定 P450_{VpMO} 在不同温度下 (20–55 $^{\circ}$ C) 的酶活力。最适反应 pH 和温度分别定义为最高酶活力 (以相对酶活力 100% 计) 所对应的 pH 值和温度。

1.7.2 重组 P450_{VpMO} 的温度稳定性

将 P450_{VpMO} 酶液分别置于 20–45 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h 后于冰上冷却, 按照方法 1.6 测定 P450_{VpMO} 的残余酶活力。将 P450_{VpMO} 分别置于 35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C 和 45 $^{\circ}$ C 温度下孵育不同时间, 按照方法 1.6 测定 P450_{VpMO} 的残余酶活力。半衰期 $t_{1/2}$ 指在不同温度下处理后残余酶活力为 50% 时所对应的时间。以未经处理的酶液作为对照。

1.7.3 重组 P450_{VpMO} 的动力学参数测定

以不同浓度 (0.2–3.0 mmol/L) 的 4-甲氧基

苯乙酮作为底物, 按方法 1.6 测定 P450_{VpMO} 的初始反应速率, 利用 GraphPad Prism8 按米氏方程进行非线性拟合, 计算 P450_{VpMO} 的动力学参数 K_m 与 V_{max} 值。

1.8 重组 P450_{VpMO} 的底物谱分析

选定 8 种含甲基底物进行 P450_{VpMO} 底物谱分析。构建 200 μ L Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 反应体系: 0.5 mmol/L 底物, 5 mmol/L 葡萄糖, 0.5 mmol/L NADP⁺, 0.24 mg/mL GDH 和 1.3 mg/mL P450_{VpMO} 纯酶, 于 30 $^{\circ}$ C 条件下反应 3.5 h, 加入等体积甲醇终止反应, 样品采用 HPLC 检测。

HPLC 检测条件: 底物 1–8 除检测波长 (1: 280 nm, 2: 232 nm, 3: 232 nm, 4: 254 nm, 5: 280 nm, 6: 280 nm, 7: 254 nm, 8: 280 nm) 差异外, 其他工作条件为通用条件; 色谱柱为 XDB-C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 流动相为甲醇 (A) 和水 (B); 梯度洗脱程序为: 0–20 min 由 20% A 线性变化至 100% A。底物 9 的液相检测条件为: 色谱柱为 XDB-C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 流动相为 0.1% 磷酸水和 0.1% 磷酸-乙腈溶液; 等度洗脱程序为: 88% 的 0.1% 磷酸-乙腈溶液与 12% 的 0.1% 磷酸水溶液等度洗脱 15 min; 检测波长为 240 nm。

2 结果与分析

2.1 重组 P450_{VpMO} 的一级结构分析

P450_{VpMO} 的一级结构分析表明, 该酶含 782 个氨基酸 (aa), 由 P450 催化结构域 (15–439 aa)、黄素单核苷酸 (FMN) 还原酶结构域 (475–682 aa) 和 Fe-S 簇铁氧还蛋白结构域 (698–781 aa) 组成。根据电子传递分类规则, 表明 P450_{VpMO} 为电子自供体类型的 P450s^[26]。将 P450_{VpMO} 氨基酸序列提交细胞色素 P450 国际命名委员会 (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>), 被命名为 CYP116B256V2, 进一步采用 MEGA5.0 构建已报道 15 种 CYP116B 亚家族 P450s 的系统

发育进化树(图2),结果显示 P450_{VpMO}与其他15种 P450s 相似度为 51.2%–75.2%,为一种新型 CYP116B 亚家族 P450s 成员,其性质和功能值得进一步探索。

2.2 重组 P450_{VpMO} 的表达与纯化

重组菌 *E. coli*/P450_{VpMO} 经 IPTG 诱导 P450_{VpMO} 表达, SDS-PAGE 结果如图 3A 所示,与 *E. coli*/P450_{VpMO} 未诱导全细胞相比比较, *E. coli*/P450_{VpMO} 破碎上清液和 Ni 柱纯化后重组 P450_{VpMO} 中均在 87 kDa 处有明显的条带,其表现分子量与理论分子量符合;此外,纯化的该酶样品与其他类型酶如葡萄糖脱氢酶 GDH 相比呈现出 P450 酶分子特有的结合血红素带来的浅红色(图 3B),表明 P450_{VpMO} 在 *E. coli* 中实现了可溶表达。

2.3 重组 P450_{VpMO} 的光谱特性分析

由于细胞色素 P450 单加氧酶都具有特定的

光谱学特征^[24]。首先应用一氧化碳示差法来测定重组 P450_{VpMO} 是否有相关特性。经过测定,当使用纯化后重组 P450_{VpMO} 直接进行光谱特性分析时,重组 P450_{VpMO} 在 420 nm 处有特定的吸收波长如图 4A,然后用连二亚硫酸钠将其还原后其特征峰如图 4B 所示,最后通入一氧化碳,其吸收波长会偏移至 450 nm 处(图 4C)。这一特殊的光谱特性,进一步证实该酶为细胞色素 P450 单加氧酶。

2.4 pH 与温度对重组 P450_{VpMO} 酶活力的影响

如图 5A 所示,当 pH 为 8.0 时 P450_{VpMO} 酶活力最高;当 pH 小于 8.0 时,其酶活力缓慢下降;当 pH 大于 8.5 时其活力快速下降;pH 为 5.5 和 9.0 时,仅为 15% 和 8% 的相对酶活。如图 5B 所示, P450_{VpMO} 酶活力随温度的提高而升高,当温度高于 45 °C 时 P450_{VpMO} 的酶活力迅速降低。由此确定重组 P450_{VpMO} 最适反应 pH 和温度分别为 8.0

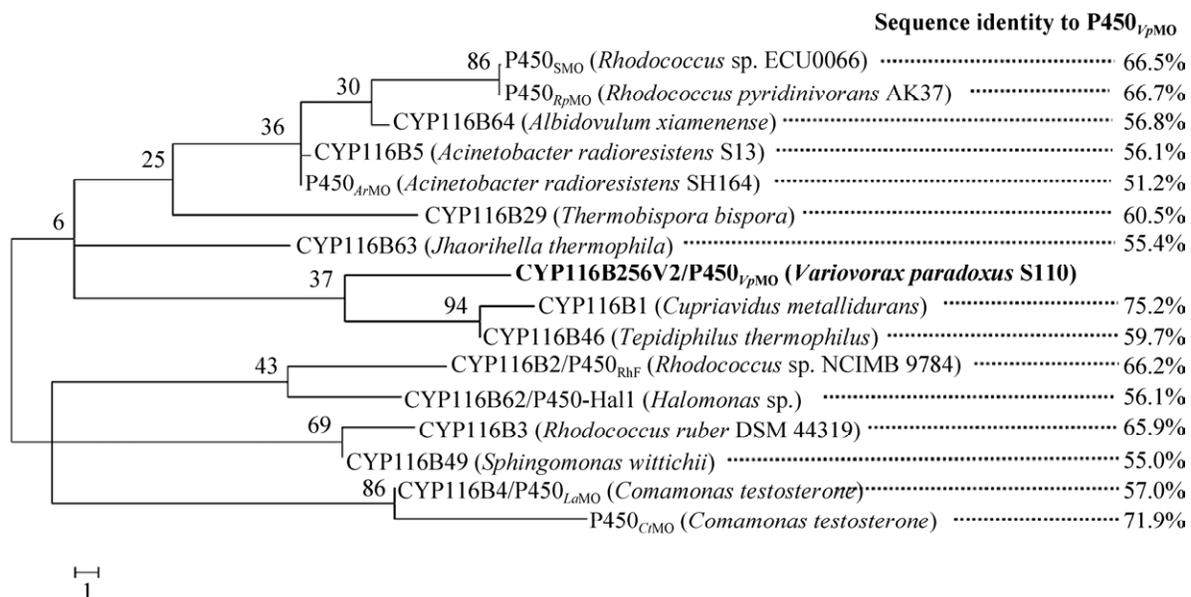


图 2 已报道的 CYP116B 亚家族 P450s 与 P450_{VpMO} 的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the reported P450s from CYP116B subfamily and P450_{VpMO}. CYP116B1 (Q1LDI2)^[27], CYP116B2 (Q8KU27)^[19], CYP116B3 (Q52TE7)^[28], CYP116B4 (A0P0F6)^[23], CYP116B5 (G9BWN9)^[29], CYP116B29 (D6Y814)^[30], CYP116B46 (A0A0K6ITW2)^[31], CYP116B49 (A5VAX9), CYP116B62 (A0A2P1MAG0)^[32], CYP116B63 (A0A1H5TZK0)^[26], CYP116B64 (A0A1G8Z9C6)^[26], P450_{SMO} (C7SFP5)^[33], P450_{RpMO} (H0JTW1)^[26], P450_{ArMO} (DOT4J7)^[26], P450_{CtMO} (H1RWRO)^[26] and CYP116B256V2 (C5CTM5, this study). The UniProt numbers are in brackets.

和 45 °C。如表 1 所示, P450_{VpMO} 酶的最适 pH 与 CYP116B 家族中 P450_{LaMO} 的相同, 而最适温度均高于 CYP116B 家族中的 P450_{LaMO} (40 °C)^[23] 和 P450_{SMO} (30 °C)^[33]。

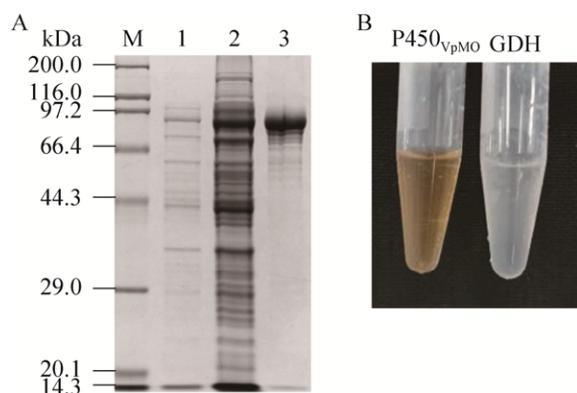


图 3 重组 P450_{VpMO} 表达纯化的 SDS-PAGE 分析以及纯化后 P450_{VpMO} 与 GDH 颜色对比图

Fig. 3 Characterization of P450_{VpMO}. (A) SDS-PAGE analysis of the expression and purification of P450_{VpMO}. M: protein marker, lane 1: the cell-free extract of *E. coli*/P450_{VpMO} without induction; lane 2: the supernatant of *E. coli*/P450_{VpMO} with IPTG induction; lane 3: purified P450_{VpMO}. (B) The special color of P450_{VpMO} in contrast with GDH.

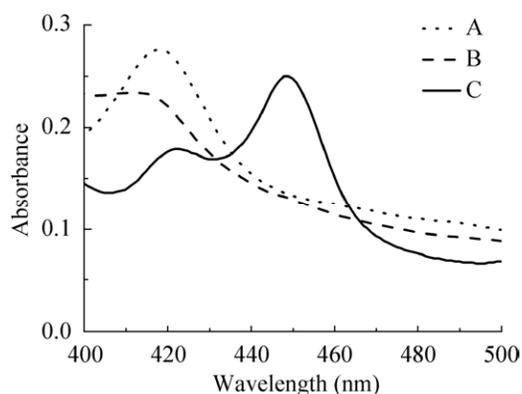


图 4 重组 P450_{VpMO} 的吸收光谱图

Fig. 4 UV/Vis absorption spectra of purified P450_{VpMO}. A: the oxidized enzyme. B: the dithionite-reduced enzyme was shown. C: the reduced P450_{VpMO} CO-bound complex.

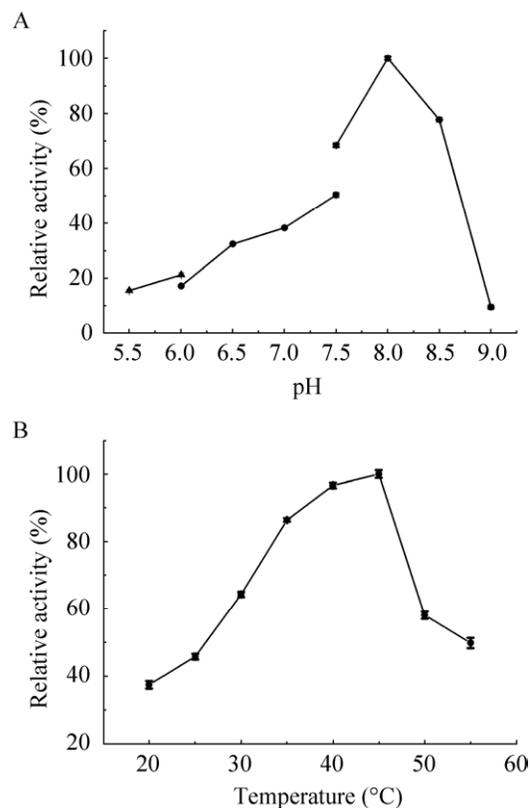


图 5 pH (A) 和温度 (B) 对重组 P450_{VpMO} 酶活力的影响

Fig. 5 Effects of pH (A) and temperature (B) on the activity on recombinant P450_{VpMO}.

表 1 CYP116B 家族 P450 酶的酶学性质比较

Table 1 A comparison of enzymatic characterization of CYP116B family

P450s	pH	T_m (°C)	T_{50} (°C)
P450 _{VpMO}	8	45	38
P450 _{SMO}	7	30	—
P450-Hal1	8.5	—	34
P450 _{LaMO}	8	40	—

“—” indicate which was not reported; pH indicates the optimal pH; T_m indicates the optimal temperature; T_{50} indicates the half-inactivation temperature.

2.5 温度对重组 P450_{VpMO} 稳定性的影响

接下来测定重组 P450_{VpMO} 在不同温度下孵育 1 h 后其残余酶活力。如图 6A 所示, 当温度低于

30 °C时, P450_{VpMO} 的残余酶活力可保持 80% 以上;40 °C和 45 °C 孵育 1 h,其残余酶活力仅为 40% 和 0%。其半失活温度大约为 38 °C, 略高于 CYP116B62 的半失活温度 (34 °C)^[32]。如图 6B 所示, 重组 P450_{VpMO} 在 35 °C、40 °C 和 45 °C 条件下孵育不同时间测定残余酶活力, 其半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 130 min、40 min 和 4 min (图 6B)。在低于 35 °C 时, 重组 P450_{VpMO} 稳定, 故选择 30 °C 作为其催化反应温度用于后续的反应测试。此外, 将重组 P450_{VpMO} 的相关酶学性质与同类酶相比较 (表 1), 发现其最适温度和半失活温度均高于同类酶, 表明该酶具有良好温度稳定性, 适合后期应用研究。

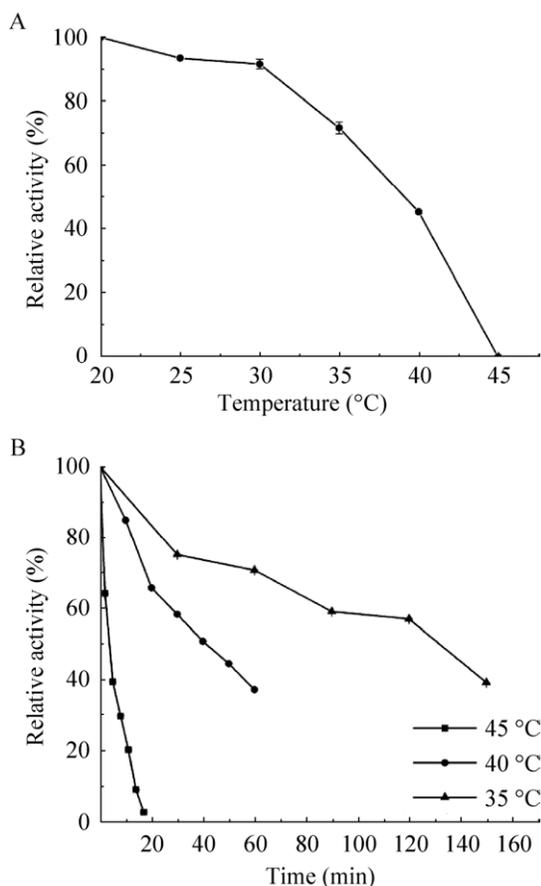


图 6 温度对重组 P450_{VpMO} 稳定性的影响
Fig. 6 Effect of temperature on stability of recombinant P450_{VpMO}.

2.6 P450_{VpMO} 动力学参数测定

由于 *V. paradoxus* 具备可以降解环境中含有甲氧基的污染物的能力^[20], 为此本实验选择以结构相对简单的 4-甲氧基苯乙酮为模式底物, 按照方法 1.6 研究和测定 P450_{VpMO} 的动力学常数。非线性拟合的结果符合 Michaelis-Menten 方程 (图 7), 测得重组 P450_{VpMO} 的 K_m 和 V_{max} 值分别为 0.458 mmol/L 和 0.028 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 以分子量为 87.072 kDa 计算其 k_{cat} 值为 2.438 min^{-1} , 催化效率 k_{cat}/K_m 为 5.318 $\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。

2.7 重组 P450_{VpMO} 的底物谱探索

最后按照方法 1.8, 检测重组 P450_{VpMO} 是否也可以催化其他能够被不同 CYP116B 家族 P450 催化而脱甲基的底物, 分别为 4-甲氧基苯乙酮^[30] (1)、6-甲氧基喹啉^[23] (2)、7-甲氧基香豆素^[32] (3)、4-甲氧基苯甲脒^[30] (4)、6-甲氧基-1-萘满酮^[21] (5)、2'-羟基-4'-甲氧基苯乙酮^[30] (6)、7-甲氧基-1-萘满酮^[21] (7) 和 4-甲氧基二苯甲酮^[30] (8)。结果如图 8 所示, 重组 P450_{VpMO} 对这些含甲氧基的底物均具有较强的脱甲基功能。相比于 CYP116B 家族其他 P450, 重组 P450_{VpMO} 对 4-甲氧基苯乙酮的转化率高于 P450-TT (CY116B46, 32%)^[30], 对 7-甲氧基香豆素的转化率高于 P450Hal-1 (CYP116B62, 35%)^[32]; 对 4-甲氧基二苯甲酮的转化率高于 P450_{RhF} (CYP116B2, 13%)^[30]; 对 2'-羟基-4'-甲氧基苯乙酮的转化率高于 P450-AX (CYP116B64,

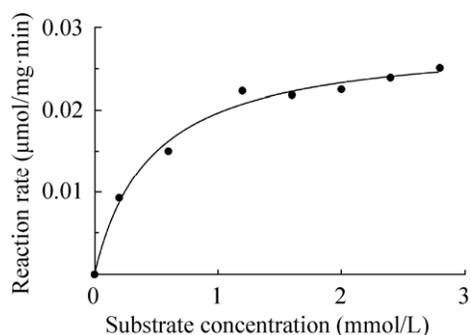


图 7 重组 P450_{VpMO} 的动力学参数的非线性拟合
Fig. 7 Nonlinear fitting curves of kinetic parameters of recombinant P450_{VpMO}.

10%)^[30]; 对 4-甲氧基苯甲腈的转化率高于 P450-TB (CYP116B29, 12%)^[30]。由此结果显示重组 P450_{VpMO} 在同类酶中转化效率较高, 具有一定研究价值。

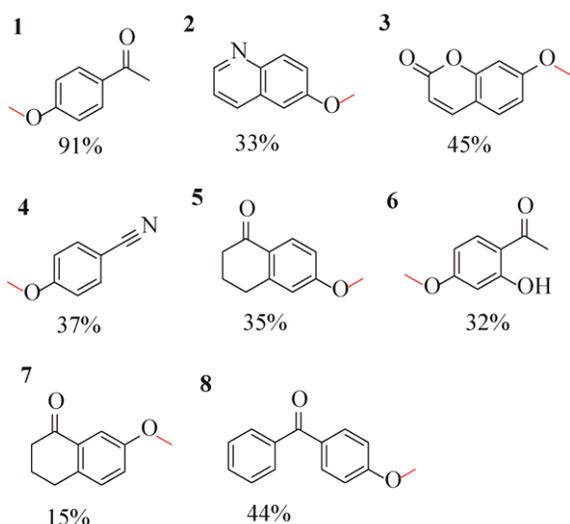


图 8 重组 P450_{VpMO} 对催化不同含甲氧基底物的转化率
Fig. 8 The conversion of different methoxy-substrates catalyzed by recombinant P450_{VpMO}.

2.8 重组 P450_{VpMO} 对甲氧苄啉的降解测试

鉴于 P450_{VpMO} 酶有较好的脱甲基功能, 随后测定其能否降解含甲氧基的抗生素污染物甲氧苄啉, 实验表明该酶对甲氧苄啉有一定降解作用(图 9)。然而, 该反应降解效率不到 5%, 故在后续研究中会进一步对反应条件进行优化, 并利用分子生物学技术对 P450_{VpMO} 进行定向进化来提高该酶对甲氧苄啉的降解效率。

3 结论

由于细胞色素 P450 单加氧酶可催化多种不同类型的化学反应而参与天然产物的生物合成, 因此, 它是合成生物学重要的催化元件和绿色的生物催化剂。本研究全基因合成了一种来源于争论噬菌 *V. paradoxus* S110 的细胞色素 P450 单加氧酶基因, 并成功地在大肠杆菌中可溶表达。通

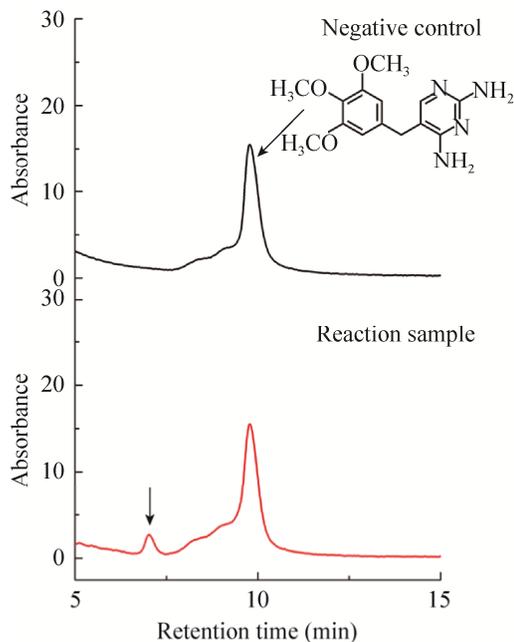


图 9 P450_{VpMO} 催化甲氧苄啉的 HPLC 检测
Fig. 9 Analysis of Trimethoprim degradation catalyzed by P450_{VpMO}.

过一级序列和一氧化碳示差法分析表明 P450_{VpMO} 为一种新型电子自供体类 P450s, 隶属于为 CYP116B 亚家族; 并对这种新型电子自供体 P450_{VpMO} 的酶学性质和脱甲基功能作了初步探索, 发现该酶具有降解抗生素甲氧苄啉的重要作用, 这为后期对该酶的定向进化改造以及拓展该类酶的应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Girvan HM, Munro AW. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 31: 136–145.
- [2] Nelson DR. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochim Biophys Acta (BBA)–Prot Proteom*, 2018, 1866(1): 141–154.
- [3] Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1996, 6(1): 1–42.

- [4] Sono M, Roach MP, Coulter ED, et al. Heme-containing oxygenases. *Chem Rev*, 1996, 96(7): 2841–2888.
- [5] Bernhardt R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol*, 2006, 124(1): 128–145.
- [6] Yin YC. Data mining and catalytic performance of a new self-sufficient monooxygenase in CYP116B family[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2014.
殷曰彩. CYP116B 家族单加氧酶的基因挖掘与催化性能研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014.
- [7] Wei YF, Ang EL, Zhao HM. Recent developments in the application of P450 based biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 43: 1–7.
- [8] Ciaramella A, Minerdi D, Gilardi G. Catalytically self-sufficient cytochromes P450 for green production of fine chemicals. *Rend Fis Acc Lincei*, 2017, 28: S169–S181.
- [9] Zhang XW, Li SY. Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(9): 1061–1089.
- [10] Jiang YY, Li SY. Catalytic function and application of cytochrome P450 enzymes in biosynthesis and organic synthesis. *Chin J Org Chem*, 2018, 38: 2307–2323 (in Chinese).
蒋媛媛, 李盛英. 细胞色素 P450 酶在生物合成及有合成中的催化功能及其应用. *有机化学*, 2018, 38: 2307–2323.
- [11] Sakaki T. Practical application of cytochrome P450. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(6): 844–849.
- [12] Jennewein S, ParK H, DeJong JM, et al. Coexpression in yeast of *Taxus* cytochrome P450 reductase with cytochrome P450 oxygenases involved in Taxol biosynthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(5): 588–598.
- [13] Luo A, Wu YR, Xu Y, et al. Characterization of a cytochrome P450 monooxygenase capable of high molecular weight PAHs oxidization from *Rhodococcus* sp. P14. *Proc Biochem*, 2016, 51(12): 2127–2133.
- [14] Jones JP, O'Hare EJ, Wong LL. Oxidation of polychlorinated benzenes by genetically engineered CYP101(cytochrome P450(cam)). *Eur J Biochem*, 2001, 268(5): 1460–1467.
- [15] Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, et al. Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta (BBA)—General Subj*, 2007, 1770(3): 330–344.
- [16] Erdogan H. One small step for cytochrome P450 in its catalytic cycle, one giant leap for enzymology. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 2019, 23: 1–9.
- [17] Narhi LO, Fulco AJ. Characterization of a catalytically self-sufficient 119 000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem*, 1986, 261(16): 7160–7169.
- [18] Sevrioukova IF, Li H, Zhang H, et al. Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *PNAS*, 1999, 96(5): 1863–1868.
- [19] Roberts GA, Çelik A, Hunter DJB, et al. A self-sufficient cytochrome P450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [2Fe-2S] redox center. *J Biol Chem*, 2003, 278(49): 48914–48920.
- [20] Satola B, Wübbeler JH, Steinbüchel A. Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(2): 541–560.
- [21] Li RJ, Xu JH, Yin YC, et al. Rapid probing of the reactivity of P450 monooxygenases from the CYP116B subfamily using a substrate-based method. *New J Chem*, 2016, 40(10): 8928–8934.
- [22] Han JI, Choi HK, Lee SW, et al. Complete genome sequence of the metabolically versatile plant growth-promoting endophyte *Variovorax paradoxus* S110. *J Bacteriol*, 2011, 193(5): 1183–1190.
- [23] Yin YC, Yu HL, Luan ZJ, et al. Unusually broad substrate profile of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase CYP116B4 from *Labrenzia aggregata*. *ChemBioChem*, 2014, 15(16): 2443–2449.
- [24] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 1964, 239: 2370–2378.
- [25] Guengerich FP, Martin MV, Sohl CD, et al. Measurement of cytochrome P450 and

- NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat Protoc*, 2009, 4(9): 1245–1251.
- [26] Li RJ, Zhang Y, Xu JH, et al. Discovery, characterization and molecular engineering of CYP116B monooxygenase. *Chin J Bioprocess Eng*, 2019, 17(1): 29–35 (in Chinese).
李仁结, 张龔, 许建和, 等. CYP116B 家族单加氧酶的发现、表征及分子改造研究进展. *生物加工过程*, 2019, 17(1): 29–35.
- [27] Warman AJ, Robinson JW, Luciakova D, et al. Characterization of *Cupriavidus metallidurans* CYP116B1–A thiocarbamate herbicide oxygenating P450–phthalate dioxygenase reductase fusion protein. *FFBS J*, 2012, 279(9): 1675–1693.
- [28] Liu L, Schmid RD, Urlacher VB. Engineering cytochrome P450 monooxygenase CYP 116B3 for high dealkylation activity. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(6): 841–845.
- [29] Minerdi D, Sadeghi SJ, Di Nardo G, et al. CYP116B5: a new class VII catalytically self-sufficient cytochrome P450 from *Acinetobacter radioresistens* that enables growth on alkanes. *Mol Microbiol*, 2015, 95(3): 539–554.
- [30] Tavanti M, Porter JL, Sabatini S, et al. Panel of new thermostable CYP116B self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases that catalyze C-H activation with a diverse substrate scope. *ChemCatChem*, 2018, 10(5): 1042–1051.
- [31] Tavanti M, Porter JL, Levy CW, et al. The crystal structure of P450-TT heme-domain provides the first structural insights into the versatile class VII P450s. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(4): 846–850.
- [32] Porter JL, Sabatini S, Manning J, et al. Cloning, expression and characterisation of P450-Hall (CYP116B62) from *Halomonas* sp. NCIMB 172: A self-sufficient P450 with high expression and diverse substrate scope. *Enzyme Microb Technol*, 2018, 113: 1–8.
- [33] Zhang JD, Li AT, Yang Y, et al. Sequence analysis and heterologous expression of a new cytochrome P450 monooxygenase from *Rhodococcus* sp. for asymmetric sulfoxidation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(3): 615–624.

(本文责编 陈宏宇)