

· 工业生物技术 ·

电子传递链的适配提高孕酮 17 α 羟基化生物催化效率

王蓝蓝^{1,2}, 赵昕^{1,2}, 李杰^{1,2}, 艾佳莹^{1,2}, 孙静^{1,2}, 毛淑红^{1,2*}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

王蓝蓝, 赵昕, 李杰, 艾佳莹, 孙静, 毛淑红. 电子传递链的适配提高孕酮 17 α 羟基化生物催化效率[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4608-4620.

WANG Lanlan, ZHAO Xin, LI Jie, AI Jiaying, SUN Jing, MAO Shuhong. Adaptation of the electron transport chain improves the biocatalytic efficiency of progesterone 17 α hydroxylation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4608-4620.

摘要: 17 α 羟化酶是转化孕酮制备各种孕激素药物中间体的关键酶。为提高该酶在生物催化中的特异性羟基化能力, 本研究将来源于纤维素黏性细菌(*Sorangium cellulosum*) Soce56 的羟化酶 CYP260A1 与大肠杆菌(*Escherichia coli*) K-12 来源的 Fpr 和牛肾上腺来源的 Adx₄₋₁₀₈ 组建成新的电子传递系统, 用于孕酮的生物转化。通过对 CYP260A1 进行选择性的突变, 获得 17 α 羟化酶活性显著提高的突变体 S276I, 经体外催化体系的优化设计, 使 17 α -OH 孕酮的产率达到 58%。此外, 利用定点突变技术探究铁氧还蛋白 Adx₄₋₁₀₈ 的模拟磷酸化对 17 α 羟化酶活性的影响, 结果显示, 突变体 Adx₄₋₁₀₈T69E 向 S276I 传递电子, 进一步增强了对孕酮 C17 位的特异性, 17 α -OH 孕酮的产率最终提高到 74%。本研究为细菌来源的 17 α 羟化酶特异性转化生产 17 α -OH 孕酮提供了新的方案, 为孕激素类药物在工业上利用生物转化法生产奠定了理论基础。

关键词: 17 α 羟化酶; 孕酮; 电子传递链; 蛋白突变

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFA0905300)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905300).

*Corresponding author. E-mail: shuhongmao@tust.edu.cn

Received: 2023-04-13; Accepted: 2023-06-13

Adaptation of the electron transport chain improves the biocatalytic efficiency of progesterone 17 α hydroxylation

WANG Lanlan^{1,2}, ZHAO Xin^{1,2}, LI Jie^{1,2}, AI Jiaying^{1,2}, SUN Jing^{1,2}, MAO Shuhong^{1,2*}

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

2 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education Tianjin 300457, China

Abstract: 17 α hydroxylase is a key enzyme for the conversion of progesterone to prepare various progestational drug intermediates. To improve the specific hydroxylation capability of this enzyme in steroid biocatalysis, the CYP260A1 derived from cellulose-mucilaginous bacteria *Sorangium cellulosum* Soce56 and the Fpr and bovine adrenal-derived Adx₄₋₁₀₈ derived from *Escherichia coli* str. K-12 were used to construct a new electron transfer system for the conversion of progesterone. Selective mutation of CYP260A1 resulted in a mutant S276I with significantly enhanced 17 α hydroxylase activity, and the yield of 17 α -OH progesterone reached 58% after optimization of the catalytic system *in vitro*. In addition, the effect of phosphorylation of the ferredoxin Adx₄₋₁₀₈ on 17 α hydroxyl activity was evaluated using a targeted mutation technique, and the results showed that the mutation Adx₄₋₁₀₈T69E transferred electrons to S276I more efficiently, which further enhanced the catalytic specificity in the C17 position of progesterone, and the yield of 17 α -OH progesterone was eventually increased to 74%. This study provides a new option for the production of 17 α -OH progesterone by specific transformation of bacterial-derived 17 α hydroxylase, and lays a theoretical foundation for the industrial production of progesterone analogs using biotransformation method.

Keywords: 17 α hydroxylase; progesterone; electronic transmission chain; protein mutation

甾体激素类药物作为仅次于抗生素的第二大类临床用药,根据药融云数据库(<https://www.pharnexcloud.com/>)统计显示,自 2016–2021 年全球皮质甾体激素和性激素甾体原料药消耗量呈现持续增长态势,至 2021 年达到 876.9 t。甾体激素类药物一般分为三大类:肾上腺皮质激素、性激素和蛋白同化激素^[1]。孕酮是由卵巢黄体分泌的天然孕激素,其在 17 α 羟化酶的作用下可以合成多种孕激素药物如醋酸甲羟孕酮、醋酸氯丙酮、己酸羟孕酮等^[2-3]。17 α -OH 孕酮及其衍生物在调节女性经期、维持妊娠、防止子宫内膜增生等妇科疾病领域发挥重要作用,对乳腺癌等肿瘤疾病也具有一定辅助治疗

的意义^[4-6]。

早期 17 α -OH 孕酮的获得,以薯蓣皂素、剑麻皂素和番麻皂素为原料,经开环、乙酰化、氧化和水解等多步反应来制备^[7]。这种化学制备方法存在环境污染严重、合成步骤繁琐、反应过程危险和产率低等缺点。而生物转化法具有底物选择性高、反应条件温和等优势。目前已经发现能够催化孕酮进行 17 α 羟化反应的酶为细胞色素 P450 单加氧酶,主要发现在一些哺乳动物(大鼠、牛、鲨鱼)中^[8-11]。P450 酶(CYP17A1)普遍存在于哺乳动物肾上腺皮质、睾丸和卵巢的微粒体中,该酶在体内表现出两种活性,即羟化酶活性和 17,20-裂解酶活性^[12]。

其中 CYP17A1 催化羟基化的区域特异性因物种而异。例如,来自一些高级灵长类(人类、黑猩猩)的 CYP17A1 除了催化孕酮 C17 羟基化外,还具有生成少量 16 α -OH 孕酮的能力^[13]。因此, CYP17A1 的低特异性成为限制其高效生产 17 α -OH 孕酮的关键因素。

为获得高选择性、高活性的羟化酶,通过对原核生物来源的 P450 酶进行挖掘,发现巨大芽孢杆菌(*Priestia megaterium*) CYP106A2、纤维素黏性细菌(*Sorangium cellulosum*) CYP260A1 也表现出对孕酮不同位置的羟基化能力^[14]。其中 Bernhardt 等^[15]对截短的 CYP260A1 进行蛋白质的半理性设计,实现了孕酮在 C1 和 C17 位置的羟基化。考虑到 P450 活性需要氧化还原伴侣蛋白通过电子传递链将电子从辅因子 NAD(P)H 传递到 P450 催化中心,因此氧化还原伴侣蛋白与 P450 的适配性也是影响酶催化特异性的关键因素。例如 Sagadin 等^[16]通过测试了 11 种不同的氧化还原伴侣组合,优化了 CYP106A2 的电子传递系统,以此改善孕酮产物的形成。

本研究选择原核来源的纤维素黏性细菌(*S. cellulosum* Soce56) CYP260A1,充分利用了该酶在大肠杆菌中可溶性、稳定、高表达的优势,通过构建全新的电子传递系统,用于转化孕酮的研究,并对体外催化体系中影响孕酮转化率的因素进行了优化探究。另外,选取位于血红素铁中心附近的 5 个氨基酸残基,研究相关残基对羟化酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) C43 和 BL21 与质粒 pET28a/pET22b 均为本实验室保藏。羟化酶 CYP260A1 来源于纤维素黏性细菌(*S. cellulosum*

Soce56)(GenBank 登录号: CAN91746.1); 氧化还原伴侣蛋白 Fpr 来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*) K-12 (GenBank 登录号: NC_000913.3); Adx 来源于牛肾上腺(PDB ID: 1AYF), CYP260A1 和 Adx₄₋₁₀ 基因片段由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 培养基及试剂

LB 液体培养基: 酵母粉 0.5 g, 氯化钠 1 g, 胰蛋白胨 1 g, 加入约 90 mL 自来水,充分混匀后,定容至 100 mL, 121 °C 高压灭菌 20 min。

TB 液体培养基: 酵母粉 2.4 g, 胰蛋白胨 1.2 g, 甘油 400 μ L, 90 mL 去离子水, 121 °C 高压灭菌 20 min, 使用前加入 10 mL 的 0.17 mol/L 磷酸盐缓冲液。

孕酮和 17 α -OH 孕酮, 购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 CYP260A1 和氧化还原伴侣蛋白的构建

通过 NCBI 数据库获得截短的 CYP260A1 (N 端缺失 50 个氨基酸残基)和 Adx₄₋₁₀₈ 基因,按照大肠杆菌密码子偏爱性进行优化合成基因。以上述合成的目的基因为模板,设计引物,并引入酶切位点,通过酶切连接方式将 CYP260A1 和 Adx₄₋₁₀₈ 分别连接到 pET22b(+)和 pET28a 中;以大肠杆菌 K12 基因组为模板设计引物,扩增得到 Fpr 目的片段,采用同源重组方法插入到 pET22b(+). 挑取测序正确的质粒导入到宿主菌中,最终得到重组菌株 *E. coli* C43/pET22b-CYP260A1、*E. coli* BL21/pET28a-Adx₄₋₁₀₈、*E. coli* C43/pET22b-Fpr。用于扩增的寡核苷酸引物如表 1 所示。

1.4 酶的定点突变

使用 pET22b-CYP260A1 为模板,突变点作为引物上下游起始点,设计引物,对质粒使用 Pyrobest 酶进行 PCR 扩增,扩增过后的产物加入 1 μ L Dpn I, 37 °C 消化 3 h 去掉模板,经

表 1 本实验所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
CYP260A1-F	GGAATTCCATATGGATTTTCCGCTGGCCAAT	31
CYP260A1-R	AAGCTTATGCAGCAGAACCGGCAG	24
Adx ₄₋₁₀₈ -F	GGAATTCCATATGGAAGATAAAATTACCGTTCATTTTATT	40
Adx ₄₋₁₀₈ -R	AAGCTTCGGAACACGAACGGTCATATT	27
Fpr-F	ACTTTAAGAAGGAGATATAATGGCTGATTGGGTAACAG	38
Fpr-R	CGAGTGC GCGCCCGCCAGTAATGCTCCGCTGTCA	33
L228A-F	TTTGGTGTTCGCGTATGGTTGAAC	25
L228A-R	CCATACGCGCAACACCAAAAAGAAGA	25
G229V-F	CTGGTGGGTTATGAAACCACCTCTTG	26
G229V-R	ACCCACCAGAATCAGAGACAGAACAATC	28
F277W-F	ATTTGGGGTGTCTGCGTATGGTTGAAC	28
F277W-R	ACCCCAAATAGACGACACCAACG	24
S276I-F	CCGTCTATTTTGGTGTCTGCGTATG	27
S276I-R	ACCGGCAATACCGGCCAGG	19
L280A-F	ACGCGCAACACCAAAAATAGACGGAC	26
L280A-R	ACGCGCAACACCAAAAATAGACGGAC	26
V382A-F	GCGGCCCATGGTCCGGATAAAC	22
V382A-R	GGCCGCAGAATCTTTGGCACCATACAT	27
Adx ₄₋₁₀₈ T69E-F	ATTGAAGATGAAGAAAATGATATGCTGG	28
Adx ₄₋₁₀₈ T69E-R	ATCTTCAATGGCTTCCAGTTT	21

纯化回收后, 将回收产物热击转化到 *E. coli* JM109 菌株中进行验证。用于突变的寡核苷酸引物如表 1 所示。PCR 扩增在 25 μ L 体积中反应, 条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 反应进行 25 个循环。pET28a-Adx₄₋₁₀₈T69E 参考 CYP260A1 突变体构建。

1.5 重组菌株诱导表达及纯化

CYP260A1 的表达: 将重组表达菌株 *E. coli* C43/pET22b-CYP260A1 单菌落接种于含 100 μ g/mL 氨苄抗性的 LB 试管中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h, 将上述一级种子液以 2% 的接种量转接到含 100 μ g/mL 氨苄抗性的 200 mL TB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 $OD_{600}=0.8$, 加入 0.25 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-galactothioglycoside, IPTG), 0.5 mmol/L 5-氨基

乙酰丙酸盐(5-aminolevulinic acid hydrochloride, 5-ALA), 28 $^{\circ}$ C、120 r/min 诱导 48 h。

铁氧还蛋白 Adx₄₋₁₀₈ 的表达: 表达菌株 *E. coli* BL21/pET28a-Adx₄₋₁₀₈ 单菌落接种于 50 μ g/mL 卡那抗性的 LB 试管中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h 作为一级种子液, 然后以 2% 的接种量转接到 400 mL 的 LB 培养基中, 同样加入终浓度 50 μ g/mL 的卡那抗性, 相同条件下培养至 $OD_{600}=0.8$, 加入 0.25 mmol/L 的 IPTG, 16 $^{\circ}$ C、120 r/min 诱导 20 h。*E. coli* C43/pET22b-Fpr 参考 Adx₄₋₁₀₈ 的表达。

重组菌株诱导结束后, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, Lysis Buffer 重悬菌体, 加入 1% 溶菌酶, 1% PMSF, 冰浴条件下磁力搅拌 25 min。超声破碎重悬后的菌体 25 min, 破碎后 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 30 min。镍柱亲和

层析法对 CYP260A1、Fpr、Adx₄₋₁₀₈ 进行蛋白纯化, 经上清液与镍柱充分结合, 上柱、洗杂、洗脱和置换后得到纯酶液。利用 SDS-PAGE 凝胶电泳和蛋白浓度测定仪分析酶的纯化效果及浓度。

1.6 孕酮羟化反应体系的建立及优化设计

孕酮体外催化体系如下, 包含 CYP260A1 (0.5 μmol/L)、Fpr (1.5 μmol/L)、Adx₄₋₁₀₈ (5 μmol/L)、MgCl₂ (1 mmol/L) 和孕酮 (100 μmol/L), 反应在 pH 7.4、20 mmol/L 的磷酸钾缓冲液中进行, 最后加入 1 mmol/L NADPH 启动反应。30 °C、150 r/min 转化 2 h。等体积乙酸乙酯萃取转化液, 终止反应。

为探究羟化酶与氧化还原伴侣蛋白比率对底物转化效率的影响, 筛选最优的蛋白比率体系, 即(CYP:Fpr:Adx=1:4:20、2:4:20、1:3:20、1:4:30、1:4:40、1:4:50、1:4:60), 其他条件不变。测定反应时间对转化率的影响时, 定时取样 (0.5、1、1.5、2、3、5、6 h) 测转化率。针对 pH 和温度的改变对酶催化活性的影响, 配制不同 pH (pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0) 的 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 其他条件不变, 30 °C 转化 6 h, 测定转化率。将体外反应置于不同温度的水浴锅中 (25、30、35、40、50 °C) 进行, 测定其转化率。另外还分析了有机溶剂对酶催化活性的影响, 分别用 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液、甲醇、乙醇、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和 2-羟丙基 β-环糊精 (hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, HP-β-CD) 溶解孕酮, 制备 10 mmol/L 底物母液, 其他条件不变。上述均进行 3 次平行实验。

1.7 转化产物的检测分析

TLC 检测法: 用毛细管取少量萃取好的样品在 GF254 硅胶板上点样, 展开剂为氯仿: 乙酸乙酯=3:1, 于密闭层析缸中静置 20 min, 至展开剂跑到硅胶板上边沿 1 cm 处, 取出板子自

然干燥后, 放置在 254 nm 紫外灯下, 对其进行观察。

高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测法: 取适量经过乙酸乙酯萃取后的上清至 Ep 管中, 在室温条件下让其挥发, 加入适量的乙腈溶解。使用 Agilent 1 260 高效液相色谱仪和迪马 C18 (5 μm, 250 mm×4.6 mm) 型色谱柱, 流动相为乙腈: 水=65:35, 流速 1 mL/min, 进样 10 μL, 检测信号 241 nm, 柱温 30 °C。

2 结果与分析

2.1 重组菌株的构建

2.1.1 CYP260A1、Fpr 和 Adx₄₋₁₀₈ 重组质粒的构建

对重组质粒 pET22b-CYP260A1、pET22b-Fpr、pET28a-Adx₄₋₁₀₈ 进行菌落 PCR 验证, 如图 1A 所示, 分别在 1 500、750 和 250 bp 左右处出现目的条带, 与 CYP260A1 (1 191 bp)、Fpr (744 bp) 和 Adx₄₋₁₀₈ (333 bp) 理论大小相符, 经测序验证目的条带正确, 成功构建出以上 3 个重组质粒。

2.1.2 CYP260A1 单突变体

基于 Khatri 等^[15]对血红素铁活性中心的 3 个氨基酸残基 (Ser225、Ser275 和 Ser276) 进行饱和突变, 发现了能够提高孕酮 17 位羟基化选择性的突变体 S276I, 本研究利用 Pymol 软件对 CYP260A1 的晶体结构进行进一步分析, 选择了位于血红素铁中心的孕酮 5 Å 范围内的 5 个氨基酸残基, L228、G229、F277、L280 和 V382, 对 5 个残基分别进行定点突变, 除了 277 位突变为色氨酸, 229 位突变为缬氨酸之外, 其余 3 个位点全部突变为丙氨酸。如图 1B 所示, 泳道 5 为 pET22b 线性化片段, 对 L228A 挑取 3 个转化子验证, 泳道 1-2 显示未突变成功, 泳道 3 结果表明 L228A 突变成功, 符合理论值, 泳道 4

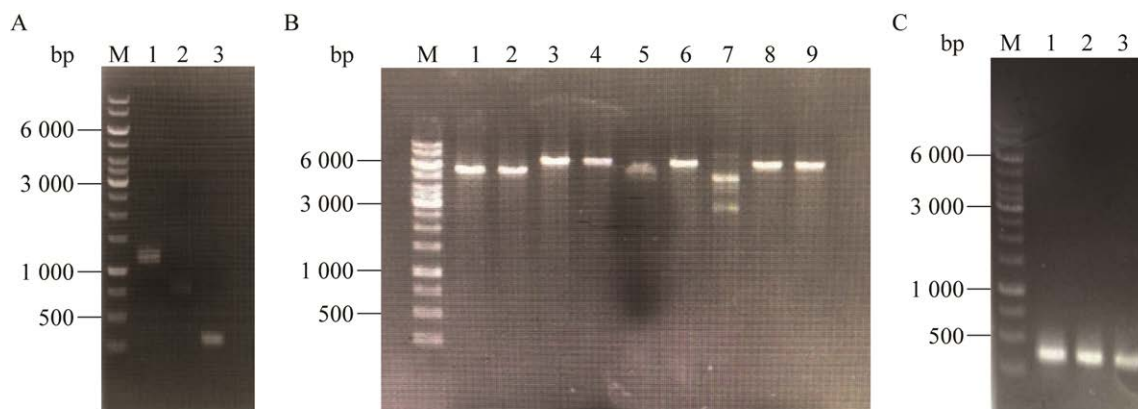


图 1 重组质粒的验证

Figure 1 Validation of the recombinant plasmids. A: Validation of colony PCR for CYP260A1, Fpr and Adx₄₋₁₀₈. 1: CYP260A1; 2: Fpr; 3: Adx₄₋₁₀₈. B: Single mutant validation results for CYP260A1. 1: L228A-1; 2: L228A-2; 3: L228A-3; 4: G229V-1; 5: pET22b; 6: L280A1-1; 7: L280A-2; 8: V382A-1; 9: F277W-1. C: Validation results for the Adx₄₋₁₀₈T69E mutant. 1: Adx₄₋₁₀₈T69E-1; 2: Adx₄₋₁₀₈T69E-2; 3: Adx₄₋₁₀₈T69E-3. M: Marker.

为 G229V 突变结果, 泳道 6–7 为 L280A 转化子, 其中泳道 6 符合理论值, 泳道 8 和 9 为 V382A 和 F277W 的线性化条带。对 3、4、6、8、9 这 5 个理论值正确的转化子送测序, 经测序验证目的条带正确。

2.1.3 Adx₄₋₁₀₈T69E(AdxT71E)突变体

图 1C 为 pET28a-Adx₄₋₁₀₈T69E 的菌落 PCR 验证图, 泳道 1–3 所示条带在 250 bp 左右, 与 Adx₄₋₁₀₈T69E 理论值(333 bp)接近, 经测序验证, 成功构建突变体 pET28a-Adx₄₋₁₀₈T69E。

2.2 重组菌株的表达纯化

重组质粒 pET28a-Adx₄₋₁₀₈ 导入大肠杆菌 BL21 表达菌株中, pET22b-CYP260A1、pET22b-Fpr 分别导入大肠杆菌 C43 表达菌株中进行异源表达。蛋白表达纯化结果如图 2A 所示, 泳道 1 为 CYP260A1 蛋白样、泳道 2 为 Fpr 蛋白样、泳道 3 为 Adx₄₋₁₀₈ 蛋白样。蛋白条带大小与 CYP260A1 (44.5 kDa)、Fpr (27 kDa)、Adx₄₋₁₀₈ (12 kDa) 目标大小一致, 本研究成功表达并纯化了 3 种异源蛋白。

针对构建成功的 CYP260A1 突变体 S276I、

L228A、G229V、F277W、L280A 和 V382A 进行蛋白表达验证, 结果如图 2B 所示, 泳道 1–6 分别为 S276I、L228A、G229V、F277W、L280A 和 V382A 蛋白样。在 45 kDa 左右均有目标蛋白条带, 符合 CYP260A1 (44.5 kDa) 的蛋白大小, 证明突变体构建成功, 并且能够成功表达。

2.3 CYP260A1 对孕酮的体外转化分析

含 CYP260A1、Fpr 和 Adx₄₋₁₀₈ 的体外重组体系中, 30 °C 转化 2 h 后, 分析底物转化情况。HPLC 检测结果图 3C 所示, CYP260A1 体外催化孕酮, 在 6.3 min 处存在 17 α -OH 孕酮产物峰。这一结果表明本文构建的含 Fpr 和 Adx₄₋₁₀₈ 的电子传递链可以成功转化孕酮, 即 CYP260A1 能接受从 Fpr 和 Adx₄₋₁₀₈ 传递而来的电子。

2.4 体外催化体系的优化设计

对体外催化体系中的酶比例、转化时间、pH、温度和有机溶剂对孕酮转化率的影响进行分析, 结果如图 4 所示。图 4A 中, 羟化酶和氧化还原伴侣蛋白的比率对孕酮转化率影响很大, 在一定范围内, 其转化率随铁氧还蛋白的增多而显著提高, 当 CYP260A1:Fpr:Adx₄₋₁₀₈ 为 1:4:50

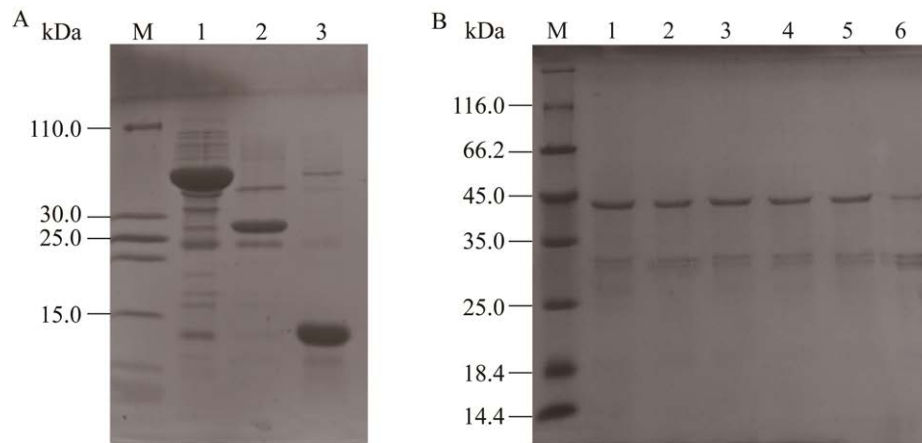


图 2 氧化还原酶、CYP260A1 及突变体蛋白胶图

Figure 2 Protein gel images of oxidoreductase, CYP260A1 and mutants. A: Expression results of proteins CYP260A1, Fpr, and Adx₄₋₁₀₈. 1: CYP260A1; 2: Fpr; 3: Adx₄₋₁₀₈. B: CYP260A1 mutant protein expression results. 1: S276I; 2: L228A; 3: G229V; 4: F277W; 5: L280A; 6: V382A. M: Marker.

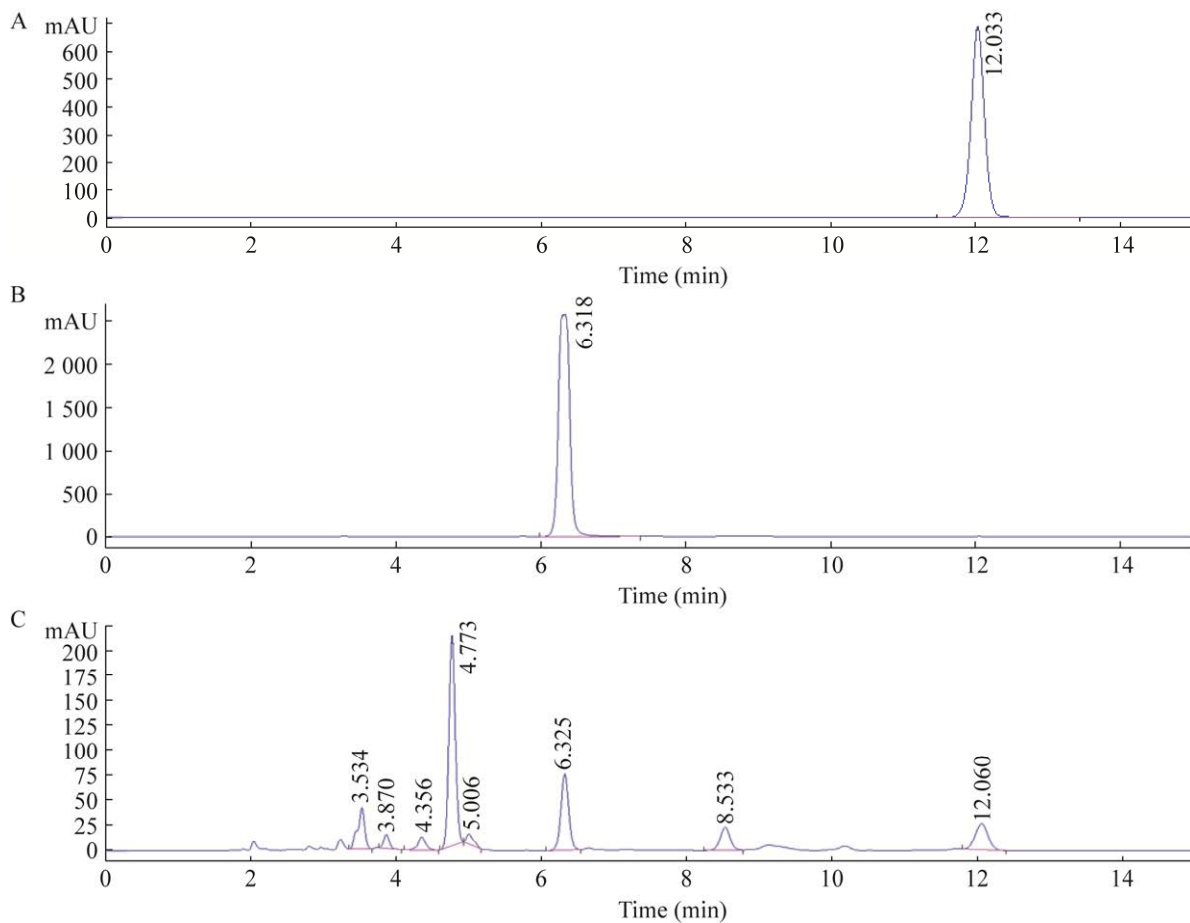


图 3 CYP260A1 体外转化的 HPLC 分析

Figure 3 HPLC analysis of progesterone by CYP260A1 *in vitro*. A: Progesterone. B: 17 α -hydroxyprogesterone. C: *In vitro* conversion of CYP260A1.

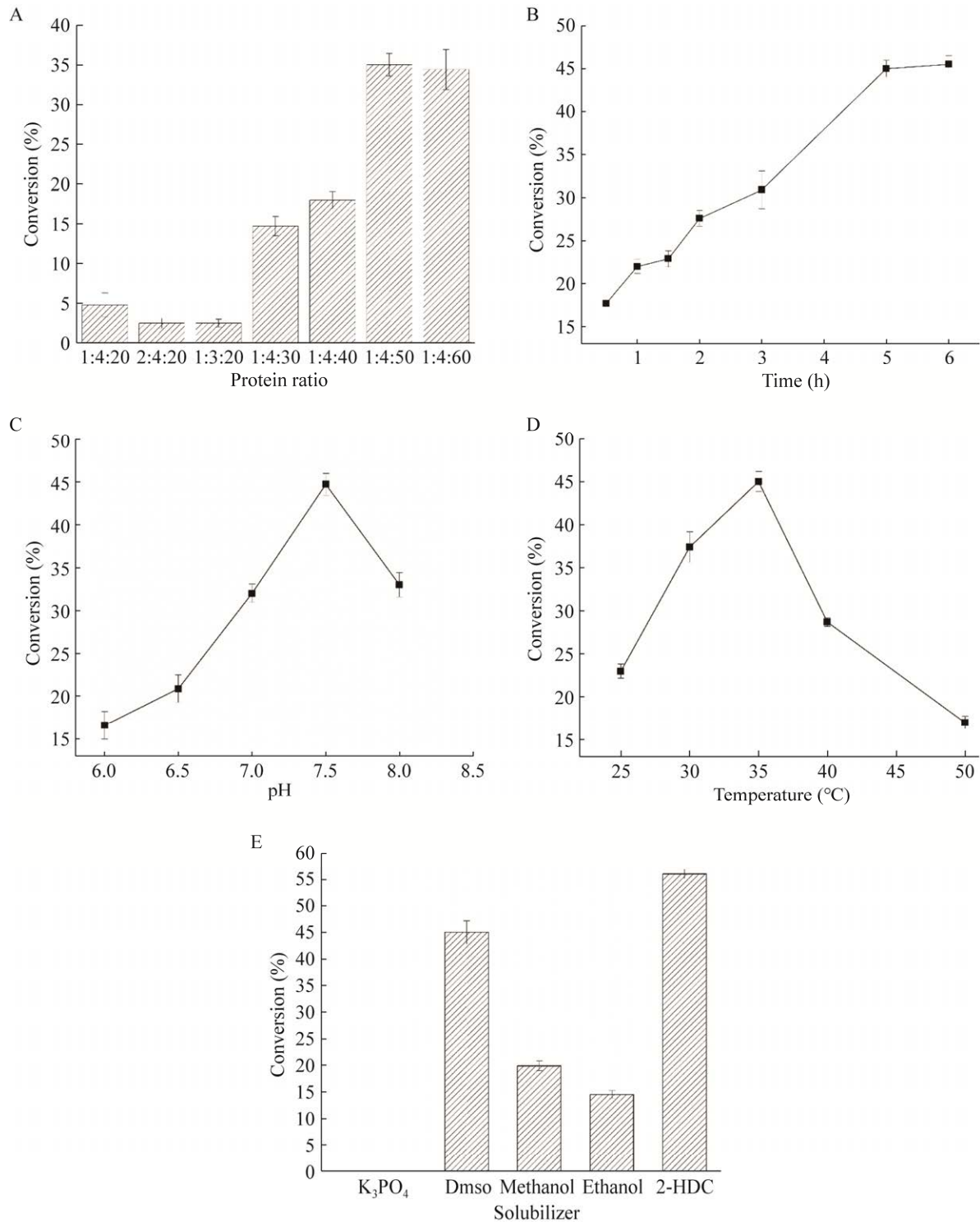


图 4 体外转化中酶比例(A)、转化时间(B)、pH (C)、温度(D)和有机溶剂(E)对转化率的影响

Figure 4 Influence of enzyme ratio, conversion time, pH, temperature and organic solvent on conversion rate *in vitro*. A: Enzyme ratio. B: Conversion time. C: pH. D: Temperature. E: Organic solvent.

时, 转化率达到最佳(35%)。图 4B, 探究了底物最佳的转化时间。总产物量随时间的增加而上升, 当转化时间达到 5 h 后产物量增加缓慢, 底物不再进一步转化。推测与无持续的 NADPH 供应, 阻碍了 CYP 的催化循环过程有关^[17]。图 4C 显示 pH 对底物转化的影响, pH 为 7.5 时, 底物转化率达到 45%。图 4D 是温度对转化率的影响, 在 35 °C 反应条件下底物转化率最高, 随着温度升高转化率显著降低, 在 50 °C 时转化率低于 20%。图 4E 展示了不同溶剂溶解孕酮时对反应体系中底物转化率的影响。结果表明, 使用磷酸钾缓冲液溶解孕酮时, 转化率为零, 这一现象与孕酮这类类固醇激素水难溶性有关。甲醇和乙醇作为促溶剂时, 孕酮转化率约 20%。DMSO 作为脂溶性药物的助溶剂, 其转化效果优于甲醇和乙醇。在本研究中, 当 2-羟丙基 β -环糊精作为促溶剂时, 底物的转化率达到 56%。

2.5 CYP260A1 突变体对孕酮的转化

为了提高 CYP260A1 催化孕酮的 17 α 羟活性, 本研究对 CYP260A1 的 6 个突变体进行孕酮的转化研究。表 2 中显示了不同点突变对 CYP260A1 转化孕酮的区域选择性的影响。与野生型 CYP260A1 相比, 突变体 L228A 和 G229V 对孕酮 17 α 羟活性显著降低, 其中 L228A 使 17 α -OH 孕酮产率仅为 1.1%, G229V 更是未产生 17 α -OH 孕酮。I 螺旋作为构成 CYP260A1 催化中心的关键部位, 具有一定的柔性。位于 I 螺旋上的 L228 和 G229 的改变可能引起活性中心的空间结构发生变化, 使得孕酮在活性口袋内部存在多种结合方式。L228A 造成孕酮 D 环 C17 位取代基不能特异性地指向底物识别位点, 减少了 17 α -OH 孕酮的生成, 同时导致了副产物的增多。针对 G229V 对孕酮转化率显著降低的问题, 研究将甘氨酸突变为

表 2 CYP260A1 对孕酮体外转化的产物分布的比较

Table 2 Comparison of product distribution of *in vitro* transformation of progesterone by CYP260A1 mutants

Mutant	17 α -OH progesterone (%)	Byproduct (%)
CYP260A1-WT	36.3	53.4
L228A	1.1	52.7
L280A	2.4	8.3
F277W	0.0	74.4
G229V	0.0	14.5
V382A	38.6	49.7
S276I	58.0	17.5

疏水性的缬氨酸, 造成活性口袋内部过于疏水, 影响了活性中心的内部环境。另外, 该残基突变前与血红素铁距离很近, 当氨基酸侧链变大, 血红素铁被推远, 底物进入活性中心后, 无法与血红素铁形成最佳的氧化距离, 导致催化活性降低。L280 在蛋白三维结构中距离血红素中心较远, 不是参与底物识别的关键残基, 该氨基酸的突变降低了孕酮的转化效率, 推测这可能影响了 CYP 与氧化还原伙伴之间的相互作用, 阻碍电子向血红素中心的传递。

S276 和 F277 位于底物识别位点附近, 其中 S276 被预测为能与孕酮 C3 酮键形成氢键的氨基酸, 当用异亮氨酸取代后, 17 α -OH 孕酮的产量提高到 58%, 同时副产物也显著减少。而 F277W 不再对孕酮 17 位羟基化, 其产物是以另一种主要副产物的形式存在, 这一突变可能与底物结合方式发生改变有关, S276I 与孕酮的对接姿势如图 5A 所示。V382 作为参与孕酮甾体环相互作用的氨基酸, 与底物形成疏水性接触, 起到稳定疏水环境的作用, 但由于不是参与催化的关键残基, 因此, V382A 突变并未引起较大的转化差异, 其 17 α -OH 孕酮产率与野生型基本一致。

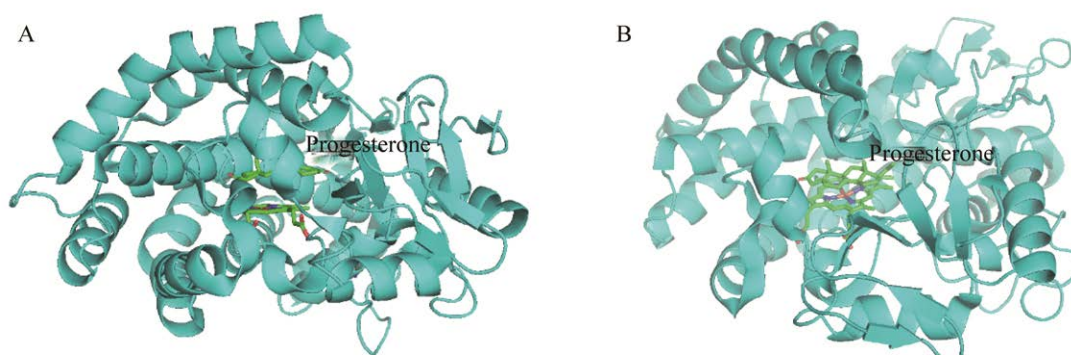


图 5 孕酮进入 CYP260A1 的姿势^[15]

Figure 5 The posture of progesterone entering CYP260A1^[15]. A: Posture II (PDB: 6F8C). B: Posture I (PDB: 6F88).

2.6 铁氧还蛋白 Adx₄₋₁₀₈T69E(AdxT71E) 对 S276I 催化效率的影响

图 6 为模拟磷酸化状态的突变体铁氧还蛋白 Adx₄₋₁₀₈T69E 参与孕酮转化的结果, 与野生型相比, 突变体 Adx₄₋₁₀₈T69E 将 17 α -OH 孕酮的产率提高到 74%。

3 讨论与结论

为了建立高选择性的 17 α -OH 孕酮生物酶催化体系, 本文利用细菌来源的羟化酶 CYP260A1

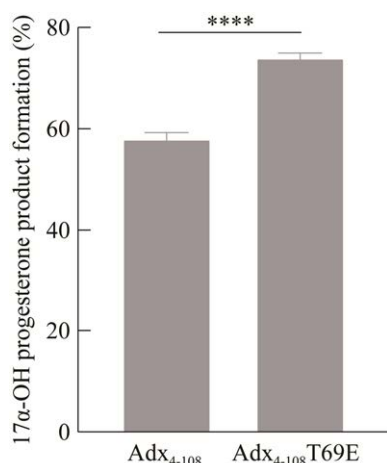


图 6 Adx₄₋₁₀₈ 及突变体的体外转化

Figure 6 Transformation of Adx₄₋₁₀₈ and mutant *in vitro*. ****: $P < 0.0001$.

与两种异源的氧化还原伴侣蛋白 Fpr-Adx₄₋₁₀₈ 成功构建了一个新的、可有效转化孕酮的电子传递系统。在 Ringle 等^[18]研究中也证明了 Fpr-Adx 氧化还原伴侣蛋白可以实现 CYP264A1 对 4-甲基-3-苯基香豆素的转化。因此, Fpr-Adx 可以尝试作为一组通用的电子传递组合向不同的 P450 酶传递电子。目前, 针对电子传递组合多样性的研究还相对较少, 更多的仍是围绕常见的电子传递链展开, 如菠菜氧化还原伴侣蛋白 Fdx/FdR、牛肾上腺来源的氧化还原伴侣蛋白 AdR/Adx、恶臭假单胞菌来源的 PdR/Pdx 等。Bernhardt 等^[15]利用 AdR/Adx₄₋₁₀₈ 向 CYP260A1 传递电子催化孕酮, 但作为膜蛋白的 AdR, 其在大肠杆菌中低表达、难纯化的特点不利于孕酮的体外转化研究。本文利用大肠杆菌来源的黄素氧还原酶 Fpr 代替肾上腺铁氧还蛋白还原酶 AdR, 打破了这一蛋白表达纯化的限制, 同时, 在一定程度上拓展了 CYP260A1 催化孕酮的电子传递组合。

大多数 P450 酶需要利用氧化还原伴侣蛋白从 NAD(P)H 获得氧裂解和底物羟基化所需的电子进而传递到 P450 酶的活性中心^[19]。在这一催化过程中, 可以影响酶催化效率的因素有

很多, Bernhardt 等^[20]证明了电子传递系统中各组分的比率对底物转化的影响。例如, 当 CYP260A1:AdR:Adx 为 1:3:20 时底物 11-脱氧皮质酮(11-deoxycorticosterone, DOC)的转化率最高, 研究认为, Adx 还原当量的增加加快了电子的传递速率, 实现了有效的底物转化。Child 等^[21]在研究氧化还原伴侣蛋白浓度对线粒体 P450 酶催化反应的影响实验中也发现 Adx 浓度必须足够高才能支持最佳的底物周转率。作为同样含铁硫簇, 在还原酶催化过程中介导电子转移的铁氧还蛋白 KshB, Zhu 等^[22]指出 KshB 的浓度是 KSH (KshAB, 一种含里斯克加氧酶 KshA 和铁氧还蛋白还原酶 KshB 的 3-酮甾体 9 α -羟化酶)催化 AD 的限速步骤, 其 9 α -羟基-4-雄烯-3,17-二酮(9 α -hydroxy-4-androsten-3,17-dione, 9-OHAD)的产率随 KshB 的减少而降低, 该研究还通过向 KshB 的 N 末端添加额外的铁硫簇结构域形成融合蛋白, 进一步提高了 9-OHAD 的产率, 这一结果指出铁硫簇的增加提高了催化系统中的电子传递效率, 一方面 KshB 浓度的增加可能提高了 KshA 的稳定性, 另一方面可能与铁硫簇和还原酶中的 FAD 之间的距离变短有关。本研究通过对反应体系中蛋白比率的调整, 获得了 CYP260A1 与 Fpr-Adx₄₋₁₀₈ 之间最佳的反应比例, 在一定范围内, 其转化率随铁氧还蛋白的增多而显著提高, 这一结果说明了适宜的蛋白比率对孕酮转化的促进作用。

针对反应体系中的溶剂环境对底物转化效率的影响, 研究表明, 过酸、过碱的溶剂环境会导致酶分子内部基团所带电荷发生变化, 不利于氨基酸残基微环境的稳定, 或诱导了酶构象变化, 致部分酶失活。另外, 过高的反应温度, 会使酶的整个三维结构不稳定甚至变性, 进而阻碍了酶与底物的有效接触。为了增强底物与酶的接触, 提高酶的催化效率, 改善孕酮

这类甾体化合物的水溶性也是一种有效策略, 本研究使用了有机试剂(如甲醇、乙醇和 DMSO)以增强孕酮在溶液中的溶解性, 在一定程度上优于磷酸钾溶液的溶解效果, 但有机试剂与酶的直接接触会争夺酶表面的水分子, 使酶缺乏维持结构稳定的氢键, 造成酶的构象过于刚性, 也会影响酶与底物的有效结合^[23]。环糊精作为常用的药物运载体可以提高甾体化合物的稳定性和利用度, 与疏水性小分子物质形成独特的外部亲水内部疏水性结构, 稳定的包合物状态使物质溶于体系的同时高效地进入酶的活性中心。Hesselink 等^[24]指出环糊精在催化反应中仅起到类固醇增溶剂和载体的作用, 并不影响酶对甾体侧链的催化活性。因此本研究选择 2-羟丙基 β -环糊精作为促溶剂, 底物的转化率达到 56%。

针对孕酮转化的区域选择性问题, Khatri 等^[15]对底物进入酶活性中心的方式进行了研究, 通过对晶体结构分析发现孕酮主要以两种姿势进入酶的活性中心。姿势 I 和 II 的甾体环与酶活性中心的血红素铁近乎平行, 只是孕酮的方向发生了 180° 旋转。当孕酮以姿势 I 进入酶的活性中心时, 即甾体 A 环的 C3 取代基指向 I 螺旋; 当孕酮以姿势 II 进入活性中心, 此时 D 环的 C17 取代基指向 I 螺旋。如图 5 孕酮对接结果所示, 结果表明, S276I 催化孕酮是以姿势 II 的形式实现了 17 位的特异性羟基化。而 F277W 不再对孕酮 17 位羟基化, 其产物是另一种主要副产物, 这一突变可能与底物结合方式发生改变有关, 如姿势 I。

蛋白的磷酸化是指为蛋白带上磷酸基团, 一般发生在丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)残基上。Monnier 等^[25]证明了铁氧还蛋白 Adx 是一种可磷酸化蛋白。同时, Bureik 等^[26]研究发现, 被磷酸化后的 Adx 作为 CYP11A1 的电子传递体时, 转化结果显示产物孕烯醇酮显著

增加, 为了探究肾上腺铁氧还蛋白磷酸化对酶催化活性的影响, Bureik 提出了两种磷酸化方式, 一种是添加 CK2 蛋白激酶, 在 ATP 参与下实现 Adx 的磷酸化, 另一种是直接将 Adx71 位的 T 突变为 E, 模拟磷酸化状态。经过突变设计模拟该位置磷酸化后, 提高的催化活性与添加 CK2 的催化活性相当。因此本实验在使用显著提高 17 α 羟活性的突变体 S276I 基础上, 利用经截短并突变后的 Adx₄₋₁₀₈T69E 探究对羟化酶催化活性的影响, 这是模拟磷酸化后的 Adx 作为 CYP260A1 电子传递体的首次尝试。

结果表明, 17 α -OH 孕酮产率提高到 74%, 与野生型相比提高了 70%, 与现有报道的 17 α -OH 孕酮产率相比提高了 15.6%^[15]。该结果表明, 蛋白质带有带电基团(如磷酸基团)的共价修饰可能会改变蛋白质的空间位置、静电和氢键特性, 在截短的 Adx₄₋₁₀₈ 中, 残基 Thr69 参与发夹结构的形成, 处于蛋白相互作用结构域中, 该残基的突变一方面为蛋白本身创造了带电环境, 引入额外的负电荷, 影响了这一识别区域的酸度, 另一方面可能使蛋白与蛋白之间、蛋白与底物间的结合行为发生改变, 进而增强了 P450 与底物间的亲和力^[27]。

综上所述, 本研究为纤维素黏性细菌羟化酶 CYP260A1 提供了一组适配的电子传递组合 Fpr-Adx₄₋₁₀₈。通过探究系统中蛋白比率、溶剂 pH、反应温度、时间和底物溶解性对孕酮转化的影响, 得到了较优的体外催化条件, 使孕酮转化率达到 56%。另外, 研究了靠近血红素铁中心的几个氨基酸残基突变对产物模式的影响, 并利用突变体 Adx₄₋₁₀₈T69E 提高了 CYP260A1 对孕酮的 17 α 羟基化水平。

REFERENCES

- [1] FERNÁNDEZ-CABEZÓN L, GALÁN B, GARCÍA JL. New insights on steroid biotechnology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 958.
- [2] PIETTE P. The history of natural progesterone, the never-ending story[J]. *Climacteric: the Journal of the International Menopause Society*, 2018, 21(4): 308-314.
- [3] FEGAN KS, RAE MT, CRITCHLEY HD, HILLIER SG. Anti-inflammatory steroid signalling in the human peritoneum[J]. *The Journal of Endocrinology*, 2008, 196(2): 369-376.
- [4] POSACI C, SMITZ J, CAMUS M, OSMANAGAOGU K, DEVROEY P. Progesterone for the luteal support of assisted reproductive technologies: clinical options[J]. *Human Reproduction*, 2000, 15(suppl_1): 129-148.
- [5] CARP HA. Progestogens and pregnancy loss[J]. *Climacteric: the Journal of the International Menopause Society*, 2018, 21(4): 380-384.
- [6] KIM JJ, CHAPMAN-DAVIS E. Role of progesterone in endometrial cancer[J]. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2010, 28(1): 81-90.
- [7] CHOWDHURY PRITISH K, BORDOLOI M, BARUA NABIN C, SARMAH HERAMBA P, GOSWAMI PRADIP K, SAHARMA RAM P, BARUAH AJOY P, MATHUR RAJ K, GHOSH ANIL C. Process for the production of 16-dehydropregnenolone acetate from diosgenin. US 19960589708[P]. 1996-01-22.
- [8] URLACHER VB, GIRHARD M. Cytochrome P450 monooxygenases in biotechnology and synthetic biology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(8): 882-897.
- [9] FEVOLD HR, LORENCE MC, MCCARTHY JL, TRANT JM, KAGIMOTO M, WATERMAN MR, MASON JI. Rat P45017 α from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both Δ 4- and Δ 5-steroid-17,20-lyase reactions[J]. *Molecular Endocrinology*, 1989, 3(6): 968-975.
- [10] MILLER WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis[J]. *Endocrine Reviews*, 1988, 9(3): 295-318.
- [11] TRANT JM. Heterologous expression of the spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*) cytochrome P450c17 (17 α -hydroxylase) in *Escherichia coli*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1996, 102(2): 173-182.
- [12] SINGH H, KUMAR R, MAZUMDER A, SALAHUDDIN, MAZUMDER R, ABDULLAH MM. Insights into interactions of human cytochrome P450

- 17A1: a review[J]. *Current Drug Metabolism*, 2022, 23(3): 172-187.
- [13] SWART P, SWART AC, WATERMAN MR, ESTABROOK RW, MASON JI. Progesterone 16 alpha-hydroxylase activity is catalyzed by human cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1993, 77(1): 98-102.
- [14] LISUREK M, KANG MJ, HARTMANN RW, BERNHARDT R. Identification of monohydroxy progesterones produced by CYP106A2 using comparative HPLC and electrospray ionisation collision-induced dissociation mass spectrometry[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 319(2): 677-682.
- [15] KHATRI Y, JÓŹWIK IK, RINGLE M, IONESCU IA, LITZENBURGER M, HUTTER MC, THUNNISSEN AM WH, BERNHARDT R. Structure-based engineering of steroidogenic CYP260A1 for stereo- and regioselective hydroxylation of progesterone[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(4): 1021-1028.
- [16] SAGADIN T, RIEHM JL, MILHIM M, HUTTER MC, BERNHARDT R. Binding modes of CYP106A2 redox partners determine differences in progesterone hydroxylation product patterns[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 99.
- [17] MUNRO AW, MCLEAN KJ, GRANT JL, MAKRIS TM. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(1): 183-196.
- [18] RINGLE M, KHATRI Y, ZAPP J, HANNEMANN F, BERNHARDT R. Application of a new versatile electron transfer system for cytochrome P450-based *Escherichia coli* whole-cell bioconversions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(17): 7741-7754.
- [19] HANNEMANN F, BICHET A, EWEN KM, BERNHARDT R. Cytochrome P450 systems: biological variations of electron transport chains[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1770(3): 330-344.
- [20] KHATRI Y, SCHIFRIN A, BERNHARDT R. Investigating the effect of available redox protein ratios for the conversion of a steroid by a myxobacterial CYP260A1[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(8): 1126-1140.
- [21] CHILD SA, REDDISH MJ, GLASS SM, GOLDFARB MH, BARCKHAUSEN IR, GUENGERICH FP. Functional interactions of adrenodoxin with several human mitochondrial cytochrome P450 enzymes[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2020, 694: 108596.
- [22] ZHU ZL, GAO X, SONG Z, LI C, LU FP, TANOKURA M, QIN HM. Development of engineered ferredoxin reductase systems for the efficient hydroxylation of steroidal substrates[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(44): 16720-16730.
- [23] PENG LF. Effect of organic solvents on enzymatic activity and selectivity[J]. *Progress in Chemistry*, 2000, 12: 296-304.
- [24] HESSELINK PGM, van VLIET S, de VRIES H, WITHOLT B. Optimization of steroid side chain cleavage by *Mycobacterium* sp. in the presence of cyclodextrins[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1989, 11(7): 398-404.
- [25] MONNIER N, DEFAYE G, CHAMBAZ EM. Phosphorylation of bovine adrenodoxin[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 169(1): 147-153.
- [26] BUREIK M, ZÖLLNER A, SCHUSTER N, MONTENARH M, BERNHARDT R. Phosphorylation of bovine adrenodoxin by protein kinase CK2 affects the interaction with its redox partner cytochrome P450_{sec} (CYP11A1)[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(10): 3821-3830.
- [27] MÜLLER A, MÜLLER JJ, MULLER YA, UHLMANN H, BERNHARDT R, HEINEMANN U. New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108)[J]. *Structure*, 1998, 6(3): 269-280.

(本文责编 陈宏宇)