



南沙链霉菌来源细胞色素 P450 酶 CYP154C34 的表征及生物转化

高齐霖, 杨建, 李蓉, 赖刚, 许莲花*

浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江 杭州 310018

高齐霖, 杨建, 李蓉, 赖刚, 许莲花. 南沙链霉菌来源细胞色素 P450 酶 CYP154C34 的表征及生物转化[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 502-515.

GAO Qilin, YANG Jian, LI Rong, LAI Gang, XU Lianhua. Characterization and biotransformation of cytochrome P450 CYP154C34 from *Streptomyces nanshensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(2): 502-515.

摘要:【目的】P450 酶作为一种多功能生物催化剂, 可在温和条件下高区域和立体选择性地催化复杂化合物中未活化的 C-H 键, 因此 P450 酶在化工原料合成、环境污染物降解及药物合成等领域都具有重要作用。本文对南沙链霉菌基因组中的一个新颖的 P450 酶 CYP154C34 进行研究, 通过构建异源表达和全细胞生物转化重组菌探究其功能。【方法】构建 2 种全细胞生物转化 BL21(DE3) 重组菌(含 pET28a-CYP154C34-RhFRED 和 pET28a-CYP154C34+pACYCDuet-Pdx/PdR)和 1 种异源表达 BL21(DE3)重组菌(含 pET28a-CYP154C34)。通过全细胞生物转化的方式筛选底物, 分析催化功能及产物结构。比较 2 种全细胞生物转化重组菌和体外酶反应对底物的转化率。分析 CYP154C34 和不同底物及底物类似物的亲和力。【结果】通过底物筛选和产物鉴定发现 CYP154C34 可催化包括孕酮、睾酮、雄烯二酮在内的 9 种甾体化合物 16 α 位羟基化。通过 2 种不同还原伴侣的全细胞体系及体外酶反应对底物转化率的比较, 发现含有 pET28a-CYP154C34-RhFRED 的 BL21(DE3)重组菌的转化率最高, 可对孕酮、睾酮、雄烯二酮等 7 种底物实现超过 90%的转化率。通过亲和力分析发现 CYP154C34 对底物化合物的亲和力比类似物高。【结论】本研究构建了 2 种 CYP154C34 的全细胞生物转化重组菌并鉴定其功能。CYP154C34 催化的底物谱宽并且具有极高的区域和立体选择性及较高的转化率, 具有良好的工业应用前景。

关键词: P450; CYP154C34; 南沙链霉菌; 生物转化; 甾体; 雌二醇

资助项目: 浙江省自然科学基金(LGJ20C010001); 浙江理工大学科研启动基金(18042236-Y)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LGJ20C010001) and the Research Start-up Fund of Zhejiang Sci-Tech University (18042236-Y).

*Corresponding author. E-mail: lianhuaxu@zstu.edu.cn

Received: 2023-07-04; Accepted: 2023-10-26; Published online: 2023-12-13

Characterization and biotransformation of cytochrome P450 CYP154C34 from *Streptomyces nanshensis*

GAO Qilin, YANG Jian, LI Rong, LAI Gang, XU Lianhua*

College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] Cytochrome P450 can catalyze the oxidation of unactivated C–H bonds in complex compounds with high regio- and stereoselectivity under mild conditions. They are multifunctional biocatalysts which play important roles in the synthesis of chemical raw materials, the degradation of environmental pollutants, and drug synthesis. This paper probed into the functions of a novel cytochrome P450 enzyme named CYP154C34 from *Streptomyces nanshensis* by heterologous expression and whole-cell biotransformation. **[Methods]** We constructed two recombinant BL21(DE3) strains for whole-cell biotransformation harboring pET28a-CYP154C34-RhFRED and pET28a-CYP154C34+pACYCDuet-Pdx/PdR, respectively. Additionally, we generated a recombinant BL21(DE3) strain for heterologous expression containing pET28a-CYP154C34. We employed whole-cell biotransformation to screen the substrates and analyzed product structures using standard methods. We then compared the substrate conversion rates of the two strains of whole-cell biotransformation with those of enzyme reactions. Finally, we analyzed the substrate affinity and analogues of CYP154C34. **[Results]** Nine steroids hydroxylated at the 16 α position by CYP154C34 were identified, including progesterone, testosterone, and androstenedione. The BL21(DE3) strain carrying pET28a-CYP154C34-RhFRED showed the highest substrate conversion rate, achieving over 90% conversion rates for seven substrates including progesterone, testosterone, and androstenedione. In addition, CYP154C34 had stronger affinity to its substrates than the analogues. **[Conclusion]** This study constructed two recombinant strains of CYP154C34 for whole-cell biotransformation and identified their catalytic functions. CYP154C34 can efficiently hydroxylate a wide range of steroid substrates at the 16 α position with high conversion rates and excellent regio- and stereoselectivity, serving as a promising candidate for industrial applications.

Keywords: P450; CYP154C34; *Streptomyces nanshensis*; biotransformation; steroids; estradiol

细胞色素 P450 酶(简称 P450 酶)是一类包含血红素的蛋白超家族。P450 酶广泛存在于生物体内, 主要参与内源物质(如甾体激素、天然产物等)合成及外源物质(如药物、环境污染物等)代谢^[1-2]。P450 酶是自然界中发现的催化功能多样性最高的生物催化剂, 可催化羟基化、环氧化、脱氢、脱烷基化、硝基化、碳-碳偶联和重排等 20 种以上的反应类型, 而且底

物多样性涵盖了自然界中发现的几乎所有类别的有机化合物^[3]。P450 酶的底物识别部位(substrate recognition site, SRS)氨基酸不保守, 因此 P450 酶具有不同的底物特异性^[4]。与化学催化合成相比, P450 酶可在更温和的条件下完成催化反应, 并产生更少的副产物, 因此在绿色化学以及生物医药领域具有巨大的开发前景。

甾体类药物是目前市场上最重要的药物之一，分布广泛，具有多种生理活性。至今为止，全球生产的甾体药物高达 400 多种，其中包括甾体激素类、甾体生物碱、甾体皂苷类等^[5]。然而不同甾体药物的活性不同，很多都是由于其母核上的官能团不同。因此，功能基团(如羟基、甲基)引入对于甾体药物的活性提升具有重要作用^[6]。甾体药物的 11-羟基化在抗炎方面具有重要作用；19-羟基化可用于合成炔诺酮、米非司酮、苯丙酸诺龙和替勃龙等多种高效甾体激素药物的中间体，具有巨大的市场价值^[7-8]；2 α -羟基化可以降低甾体药物的雄激素活性从而降低副作用^[9]；此外，16 α -羟基化是皮质甾体类药物合成中的一个重要反应，能够有效降低药物副作用，且能维持其抗炎作用和糖代谢^[10]。

CYP154C 家族是一类可催化甾体化合物不同位点羟基化的亚家族。已报道的 CYP154C 家族 P450 酶除了 CYP154C1 (底物为大环内酯类化合物)外^[11-12]，其余均为甾体羟化酶。来自灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)的 CYP154C3 和来自皮疽诺卡氏菌(*Nocardia farcinica*) IFM 10152 的 CYP154C5 可催化多种甾体的 16 α 位羟基化反应。来自链霉菌(*Streptomyces* sp.) W2233-SM 的 CYP154C8 可对特定的甾体化合物如皮质醇实现 C21 位的羟基化^[13]。来自 *Streptomyces* sp. W2061 的 StCYP154C4-1 和 *Streptomyces* sp. ATCC 11861 的 StCYP154C4-2 可催化睾酮的 2 α 和 2 β 位羟基化^[14]。先前的研究中也鉴定了来自阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*) 的 CYP154C2 可催化睾酮和雄烯二酮的高区域和立体选择性的 2 α 位羟基化反应，并通过基于晶体结构的分子改造提高了转化效率^[15-16]。

通常 P450 酶完成催化反应需要还原伴侣蛋白帮助电子传递，而大部分情况下 P450 酶基因和还原伴侣基因在基因组上不连续排列，为

此在探究新型 P450 酶功能时常常使用异源还原伴侣，如来自恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的 Pdx 和 PdR，以及来自菠菜的铁氧还蛋白和铁氧还蛋白还原酶^[17-18]。此外，一些 P450 酶的 C 端连接还原伴侣结构域构成融合蛋白，如来自巨型芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的 P450 BM3 (CYP102A1)和来自红球菌(*Rhodococcus* sp.) NCIMB 的 P450 RhF (CYP116B2)^[19-21]，可将它们的还原伴侣结构域和其他 P450 酶融合表达以完成催化反应。

CYP154C34 是一种来源于中国南海海域分离的南沙链霉菌(*Streptomyces nanshensis*) SCSIO 01066 的新型 P450 酶。海洋微生物酶在高盐、高压(深海)、低温(或局部高温)等极端环境中保持较高的活性和稳定性，使其具有较高的基础研究及工业应用价值^[22-23]。本研究以海洋来源 CYP154C34 为研究对象，通过异源表达、构建全细胞生物转化重组菌对其功能进行鉴定，为其工业应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

菌株 *Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 购于中国普通微生物菌种保藏中心(保藏号: CGMCC 1.13898)，大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)、*E. coli* DH5 α 为实验室前期保藏，pET28a、pACYCDuet-1 为商业化载体，pET19b-PdX、pET28b-PdR、pET28b-RhFRED 为实验室前期构建并保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器

微生物培养所需的酵母提取物和胰蛋白胨购自 Oxoid 公司；卡那霉素(kanamycin, Kan)和氯霉素(chloramphenicol, Chl)购自生工生物工程股份有限公司；2 \times TransStart[®] FastPfu PCR

SuperMix(-dye)购自北京全式金生物技术股份有限公司; 无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 所有限制性内切酶购自TaKaRa公司; 质粒提取及DNA纯化试剂盒购自杭州新景生物科技有限公司; 雌二醇、雌三醇、泼尼松龙、醋酸可的松、醋酸氢化可的松和醋酸泼尼松龙为浙江仙琚制药股份有限公司提供; 16 α -羟基孕酮购自甄准生物科技有限公司; 16 α -羟基睾酮、16 α -羟基雄烯二酮为实验室先前研究中分离得到^[16]; 其他化合物及试剂均购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

PCR仪, 苏州东胜兴业科学有限公司; 蓝光切胶仪, 苏州宇恒生物科技有限公司; NanoDrop 2000C, Thermo Fisher Scientific; 紫外可见分光光度计, 岛津公司; HPLC E2695 检测系统, Waters公司; HPLC 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), 绿百草生物科技有限公司; YMC ODS-A (250 mm \times 20 mm, 5 μ m)制备色谱柱, YMC株式会社; 核磁共振波谱仪, 东京电子公司。

1.1.3 培养基

LB培养基(g/L): 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10, 调节 pH 至 7.2, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。用于南沙链霉菌培养。

TB培养基(g/L): 酵母提取物 12, 胰蛋白胨 24, K₂HPO₄ 12.56, KH₂PO₄ 2.31, 调节 pH 至 7.4, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。用于蛋白表达及全细胞生物转化重组菌的发酵。

1.1.4 引物

本研究用到的引物均为北京擎科生物科技股份有限公司合成, 采用 PAGE 纯化, 引物序列见表 1。

1.2 CYP154C34 全细胞生物转化重组菌的构建

将甘油管中保藏的 *Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 菌株接种到 50 mL LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 7 d, 高速离心收集菌体。将菌体送至诺禾致源科技股份有限公司提取全基因组并进行二代测序。绘制基因组草图后挖掘新型 P450 酶基因, 并提交至国际 P450 酶命名小组命名^[24]。新型 P450 酶被命名为 CYP154C34 (GenBank 登录号: OR224964), 和其相似性最高的 P450 酶为 CYP154C8, 序列相似性为 78%。

构建含 pET28a-CYP154C34-RhFRED 的 BL21(DE3): 以 pET28a 为模板, pET28a-NdeI 和 pET28a-XhoI 为引物, 使用 2 \times TransStart[®]

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Oligonucleotide	Primer sequence (5'→3')
pET28a-NdeI	ATGGCTGCCGCGCGCACCAG
pET28a-XhoI	GAGCACCACCACCACCACACTGAGATCCG
CYP154C34-F	CGCGCGGCAGCCATATGATGAGCCCTACGCCGAACCC
CYP154C34-R	GCAGCACGCCGCGCGTGCAGCCG
RhFRED-F	ACGGCGGCGTGCTGCACCCGCATCAACCG
RhFRED-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTCAGAGGCGCAGGGCCAGCC
PdR-F	GCCAGGATCCGAATTCTATGAACGAAACGACAACGTGGTCATCGT
PdR-R	ATGCGGCCGCAAGCTTTTAGGCACTACTCAGTTCAGCTTTGGCGGCG
Pdx-F	AAGGAGATATACATAATGTCTAAAGTAGTGTATGTGTCACATGATGGAACGC
Pdx-R	GCGTGGCCGCGGATATCTCACCATTGCCTATCGGGAACATCGACCAC
CYP154C34-single-F	CGCGCGGCAGCCATATGAGCCCTACGCCGAACCC
CYP154C34-single-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTCAGCCGCGTGCAGCCG

FastPfu PCR SuperMix (-dye)扩增 pET28a 质粒, 获得线性化的 pET28a 质粒, 分别以 *Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 基因组和实验室保藏的 pET28b-RhFRED 质粒为模板, 扩增 CYP154C34 和 RhFRED 基因; 使用无缝克隆试剂盒将以上 3 个基因片段重组, 使用热激法转化到 BL21(DE3) 中, 并涂布于含 50 mg/L Kan 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜后筛选阳性克隆。

构建含 pET28a-CYP154C34 和 pACYCDuet-Pdx/PdR 的 BL21(DE3): 使用 Nco I 和 Hind III 对 pACYCDuet-1 质粒双酶切获得线性化载体, 以 pET19b-PdR 为模板扩增 PdR 基因并通过无缝克隆技术与线性化的 pACYCDuet-1 连接, 获得 pACYCDuet-PdR 质粒; 将 pACYCDuet-PdR 转化到 DH5 α 感受态细胞中, 并涂布于含 34 mg/L Chl 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜后筛选阳性克隆。将验证正确的 pACYCDuet-PdR 质粒使用 Nde I 和 EcoR V 进行双酶切, 以 pET28b-Pdx 为模板扩增 Pdx 基因; 将 Pdx 基因和线性化的 pACYCDuet-PdR 质粒使用无缝克隆连接, 获得 pACYCDuet-Pdx/PdR; 将 pACYCDuet-Pdx/PdR 转化到 BL21(DE3) 中, 参考《分子克隆指南》将含有 pACYCDuet-Pdx/PdR 的 BL21(DE3) 制备成感受态备用; 以先前构建的 pET28a-CYP154C34-RhFRED 为模板, 以 CYP154C34-single-F/R 为引物, 扩增两端为 pET28a 同源臂的 CYP154C34 基因, 通过无缝克隆与线性化的 pET28a 连接获得 pET28a-CYP154C34, 将 pET28a-CYP154C34 转化到含 pACYCDuet-Pdx/PdR 的 BL21(DE3) 中, 并涂布于含 50 mg/L Kan 和 34 mg/L Chl 的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜后筛选阳性克隆。

1.3 CYP154C34 底物谱的筛选及产物鉴定

主要根据 CYP154C 家族的底物谱特性, 使用甾体类化合物库对 CYP154C34 底物筛选。如图 1 所示, 本底物筛选实验共使用 18 种甾体化

合物。根据甾体化合物的 C3 和 C21 位 2 个位置基团的不同将化合物分为 4 类: (A) C3 位为酮基; (B) C3 位为羟基; (C) C3 位为酮基且 C21 位有羟基; (D) C3 位为酮基且 C21 位有乙酰基。本研究利用表达 CYP154C34-RhFRED 融合蛋白的重组菌进行底物初筛: 将含 pET28a-CYP154C34-RhFRED 的 BL21(DE3) 接种到 5 mL 含 Kan 的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜; 以 1% 的接种量将菌液接种到含 Kan 的 TB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8; 加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白表达, 22 °C、180 r/min 继续培养 20 h; 离心收集菌体, 并悬浮到 1/10 培养基体积的含 10% 甘油的磷酸钾 (pH 7.4) 缓冲液中; 在无菌 24 孔板中, 每孔加入 1 mL 悬浮菌液和 100 μ mol/L 的甾体化合物, 在 25 °C、250 r/min 条件下孵育 24 h; 10 000 r/min 离心 5 min 后取 500 μ L 上清到新的 EP 管中, 加入等体积的甲醇萃取反应产物; 将反应产物通过 0.22 μ m 滤膜后加入液相瓶中, 使用 HPLC 系统检测反应产物(洗脱条件为: 35%–100% 的甲醇梯度洗脱 10 min, 100% 甲醇继续洗脱 10 min, 35% 甲醇平衡 10 min, 流速设置 1 mL/min, 检测波长设置为 240 nm)。转化率通过 [产物峰面积/(产物峰面积+底物峰面积)] 进行计算; 对照组是使用含 pET28b-RhFRED 的 BL21(DE3), 培养条件和反应条件均和实验组相同。产物的鉴定采用标准品比对的方法, 通过比较反应产物和标准品在相同液相条件下的保留时间从而鉴定反应产物。规模制备时使用 1 L TB 培养基培养菌体, 离心并悬浮于 100 mL 含 10% 甘油的磷酸钾 (pH 7.4) 缓冲液中; 加入 40 mg 底物, 25 °C、250 r/min 振荡 24 h; 加入 100 mL 乙酸乙酯萃取 3 次, 旋蒸去除乙酸乙酯获得粗产物; 将粗产物用甲醇重溶, 使用制备液相制备反应产物; 纯化后的产物将溶剂挥发干后使用 DMSO-d

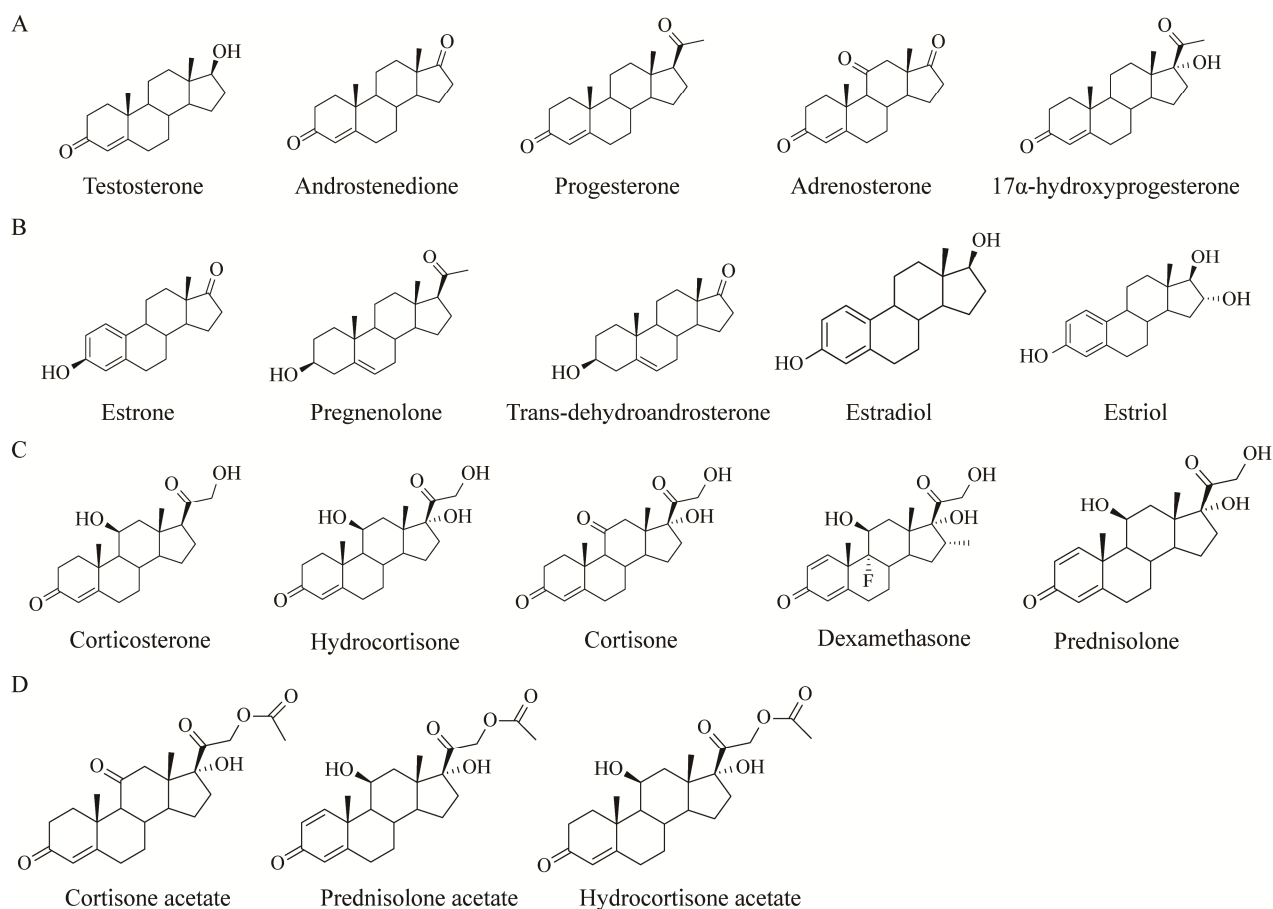


图 1 用于底物筛选的候选甾体化合物

Figure 1 Candidate steroid compounds for substrate screening.

重溶, 使用 JNM-ECZ600R/S1 核磁共振波谱仪采集核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)数据, 并通过 MestReNova 分析碳谱和氢谱。

1.4 CYP154C34 的蛋白表达及酶学特性分析

将 pET28a-CYP154C34 转化到 BL21(DE3) 中后, 使用 1.3 节中相同的发酵条件诱导蛋白表达。离心收集菌体后, 使用 Ni^{2+} 亲和层析纯化蛋白。纯化的蛋白使用 CO 差光谱图判断 P450 酶是否折叠正确^[25]: 将纯化的蛋白用含 10% 甘油的磷酸钾酶储缓冲液适量稀释后扫描 350–600 nm 处的吸收光谱, 标记为氧化态; 向含有酶的比色皿中加入 10 μL 浓度为 0.17 g/mL

的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液, 扫描光谱, 标记为还原态; 向比色皿中通入约 60 个气泡的 CO 气体, 扫描光谱, 标记为还原态+CO; 将还原态+CO 和还原态的光谱相减得到差光谱图, 差光谱的最大值在 450 nm 附近处, 计为 A_{max} , 490 nm 处吸光度值记为 A_{490} , 根据公式(1)计算 P450 酶的浓度。

$$C_{\text{P450}} (\mu\text{mol/L}) = (A_{\text{max}} - A_{490}) / 0.091 \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

1.5 CYP154C34 的体外酶反应及含 pET28a-CYP154C34+pACYCDuet-Pdx/PdR 的 BL21(DE3) 介导的生物转化

体外酶反应在 1.5 mL EP 管中进行: CYP154C34-RhFRED 融合蛋白 10 $\mu\text{mol/L}$ 、葡萄糖脱氢酶 5 U、葡萄糖 10 mmol/L、NADPH

1 mmol/L、底物 100 $\mu\text{mol/L}$ ，使用酶储存缓冲液补充到 100 μL 。反应体系中所有蛋白组分均采用 Bradford 蛋白定量试剂盒定量。反应体系配制完成后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h，用 100 μL 甲醇萃取反应产物并进行 HPLC 检测。含 pET28a-*CYP154C34*+pACYCDuet-*Pdx/PdR* 的 BL21(DE3) 介导的生物转化：大肠杆菌的培养、蛋白的诱导表达、催化反应的进行及产物检测方法均和 1.3 节中相同。

1.6 CYP154C34 和底物亲和力分析

P450 酶和底物结合后，血红素的 Fe^{3+} 会从低自旋态向高自旋态 Fe^{2+} 过渡，其最大吸收峰会从 420 nm 附近向 390 nm 附近移动，通过检测光谱变化可以计算出酶和底物之间的解离常数 K_d ：取稀释后的 CYP154C34 蛋白置于比色皿中，扫描 600–350 nm 的吸收光谱；通过滴定的方式缓慢加入底物，检测含有不同浓度底物时的光谱，当添加底物后光谱不再有明显变化时，再次加入 2–3 次底物保证底物结合达到饱

和；将每组合有底物光谱减去初始光谱获得差光谱图。差光谱图中的最大值和最小值分别会在 390 nm 左右处和 420 nm 左右处取到。用最大值减去最小值可以获得最明显的光谱差，记为 ΔA ；以底物浓度为横坐标， ΔA 为纵坐标，使用 Origin 2018 软件对散点图非线性曲线拟合，由公式(2)计算得到酶与底物的解离常数 K_d 。

$$\Delta A = \frac{B_{\max}}{2[E]} \left\{ (K_d + [E] + [L]) - \sqrt{(K_d + [E] + [L])^2 - 4[E][L]} \right\} \quad (2)$$

式中： B_{\max} 为最大吸收波长差， E 为 P450 酶浓度， L 为底物浓度。

2 结果与分析

2.1 CYP154C34 全细胞生物转化重组菌的构建

构建 pET28a-*CYP154C34*-*RhFRED* 所需的 *CYP154C34*、*RhFRED* 和线性化的 pET28a 三个片段如图 2A、2B 所示；构建 pACYCDuet-

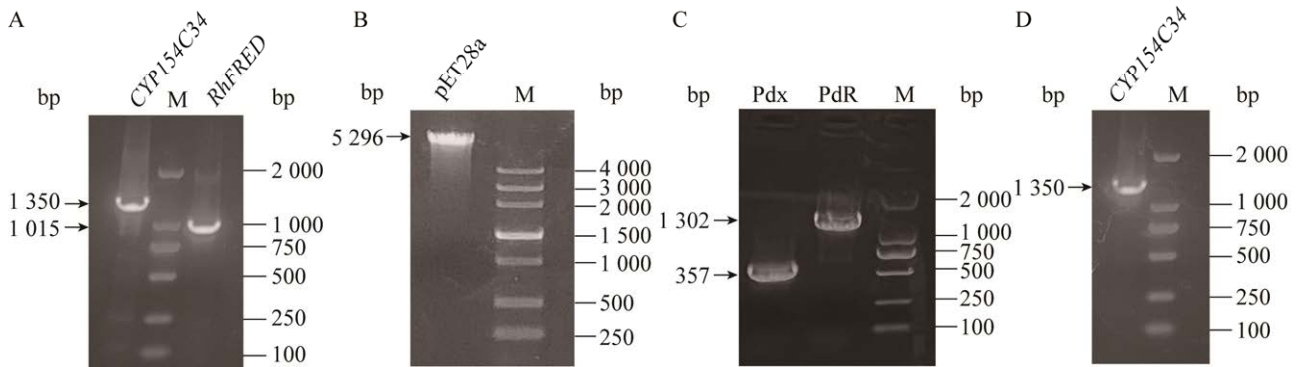


图 2 构建 CYP154C34 重组菌过程中的各片段电泳图

Figure 2 Electrophoretic maps of each fragment were generated during the construction of CYP154C34 recombinant bacteria. M in the figure stands for marker. A: The gene *RhFRED* was amplified using pET28b-*RhFRED* as a template, while the gene *CYP154C34* was amplified using the genome of *Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 as a template. B: To amplify the linearized pET28a with *Nde* I and *Xho* I restriction sites at both ends, the circular pET28a was used as a template to amplify. C: The *PdR* and *Pdx* genes were amplified using pET19b-*PdR* and pET28b-*Pdx* as templates, respectively. D: The *CYP154C34* containing pET28a homology arms at both ends was amplified using pET28a-*CYP154C34*-*RhFRED* as a template. The DNA sequence of *CYP154C34* was amplified using pET28a-*CYP154C34*-*RhFRED* as a template. The amplified product contains homology arms at both ends of the *CYP154C34* sequence.

Pdx/PdR 所需的 *Pdx* 和 *PdR* 如图 2C 所示; 构建 pET28a-*CYP154C34* 所需的线性化的 pET28a 和 *CYP154C34* 如图 2B、2D 所示。*CYP154C34* 全细胞生物转化重组菌的构建所需的所有基因片段均成功扩增, 所有片段连接后均成功转化到 BL21(DE3) 中。

2.2 CYP154C34 底物谱的筛选及产物鉴定

底物谱的筛选使用表达 *CYP154C34*-RhFRED 融合蛋白的全细胞生物转化体系。全细胞生物转化实验的反应产物均通过 HPLC 分析。通过

底物筛选实验发现 *CYP154C34* 可以对 18 个候选甾体化合物中的 9 个化合物进行催化反应, 其名称和结构如图 3C 所示。为了确定产物的结构, 以孕酮作为分析对象, 对羟基化孕酮的标准品(16 α -羟基孕酮、17 α -羟基孕酮、21-羟基孕酮)和反应产物进行比对。结果表明, 16 α -羟基孕酮的保留时间和反应产物保留时间一致(图 4A)。为了确定更多产物的结构, 分析了 9 个底物的结构, 有另外 3 个化合物的 16 α 位羟基化产物的标准品可以获得, 分别是前期研究中分离到

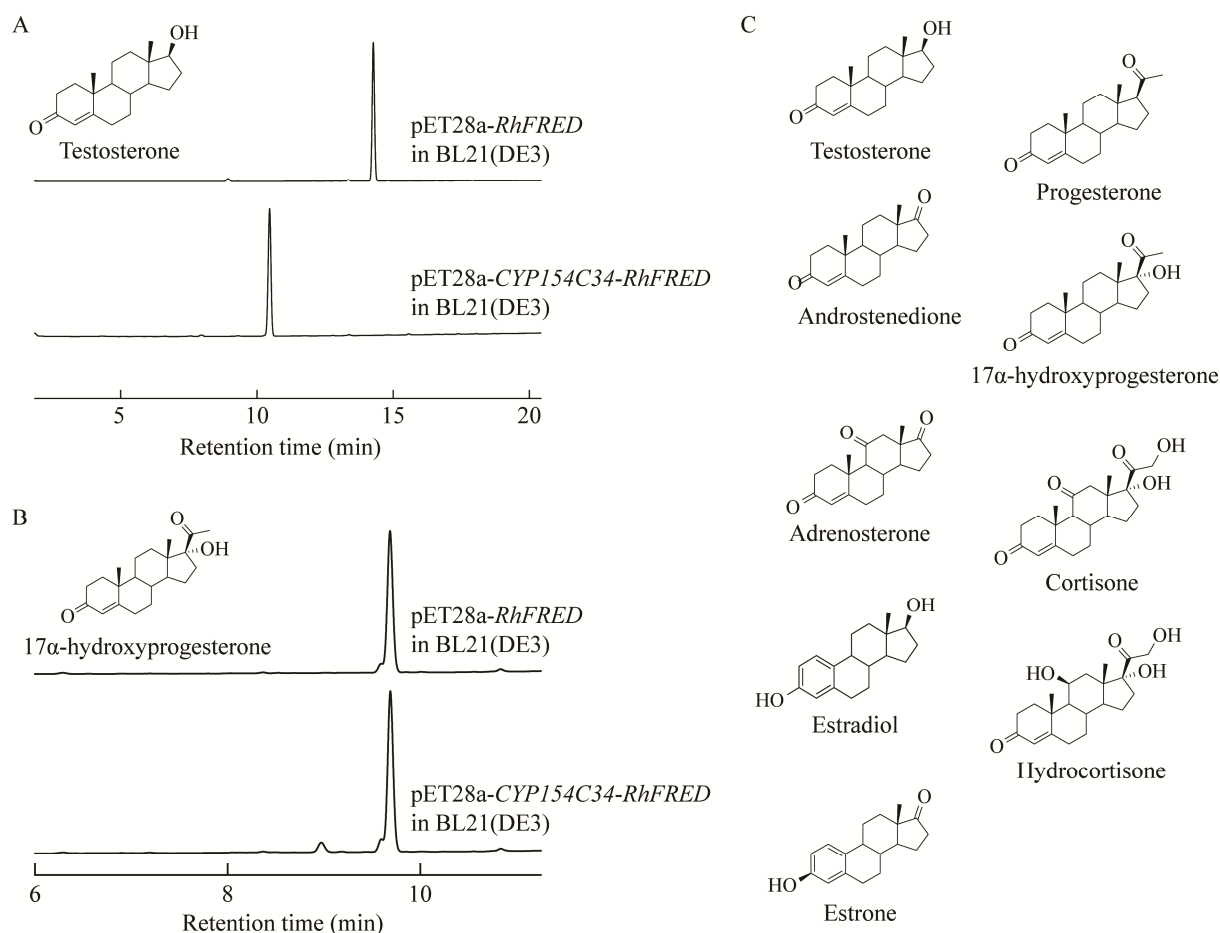


图 3 HPLC 分析及底物筛选

Figure 3 HPLC analysis and substrate screening. A and B represent two typical substrates that can be catalyzed by *CYP154C34*. A: *CYP154C34* can completely convert testosterone into products within 24 h. B: *CYP154C34* cannot fully convert 17 α -hydroxyprogesterone into products within 24 h. C: Steroid substrates that can be catalyzed by *CYP154C34*.

的 16 α -羟基孕酮、16 α -羟基雄烯二酮^[16]。通过标准品的保留时间比对证明 CYP154C34 催化孕酮、孕酮、雄烯二酮及雌二醇的氧化产物均为各自对应的 16 α -羟基化产物(图 4)。此外, 规模制备了 CYP154C34 与雌二醇的反应产物, 通过核磁共振鉴定了其催化产物为 16 α -雌二醇(雌三醇)(图 5)。因此, 推测其余 5 个化合物的氧化产物也均为 16 α -羟基化产物。这个结果表明 CYP154C34 是一种新型的海洋来源的甾体 16 α 位羟化酶。

2.3 CYP154C34 的表达纯化及酶学性质分析

为了更深入地了解 CYP154C34 的酶学特性, 本研究表达并纯化了 CYP154C34 蛋白, 通过紫外-可见光谱分析了酶学性质。纯化后蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 6A 所示。纯化获得的 CYP154C34 使用紫外-可见分光光度计检测。如图 6B 所示, 氧化态的 CYP154C34 在 417 nm 处有索瑞吸收峰, 加入还原剂后吸收强度降低。当还原态的 CYP154C34 通入 CO 后索瑞吸收峰出现在 424 nm 处, 并且在 446 nm 处出现

P450 酶的特征吸收峰。这个结果表明 CYP154C34 部分折叠正确, 具有催化活性。对 CYP154C34 光谱分析时出现了反常现象, 如图 6C 所示, 446 nm 处的索瑞吸收峰在 200 s 内归零。CYP154C34 作为一种新型的海洋来源的 P450 酶可能具有和以往研究的 P450 酶不同的性质, 由于无法从光谱定量, 故后续实验将使用 Bradford 蛋白定量法测定 CYP154C34 的浓度。

2.4 CYP154C34 的体外酶反应及全细胞生物转化分析

本研究表达纯化了 CYP154C34-RhFRED 融合蛋白进行体外酶催化反应。除前面所述表达 CYP154C34-RhFRED 融合蛋白的重组菌以外, 还使用表达 CYP154C34 及 Pdx/PdR 的重组菌进行了全细胞生物转化。底物选用了初筛发现的 9 个甾体化合物, 反应结果如图 7 所示。CYP154C34 在体内和体外均能催化底物羟化, 但转化率有所差别。对于体外酶反应来说, CYP154C34-RhFRED 融合蛋白可在体外酶反应体系中高效地催化孕酮、雄烯二酮、孕

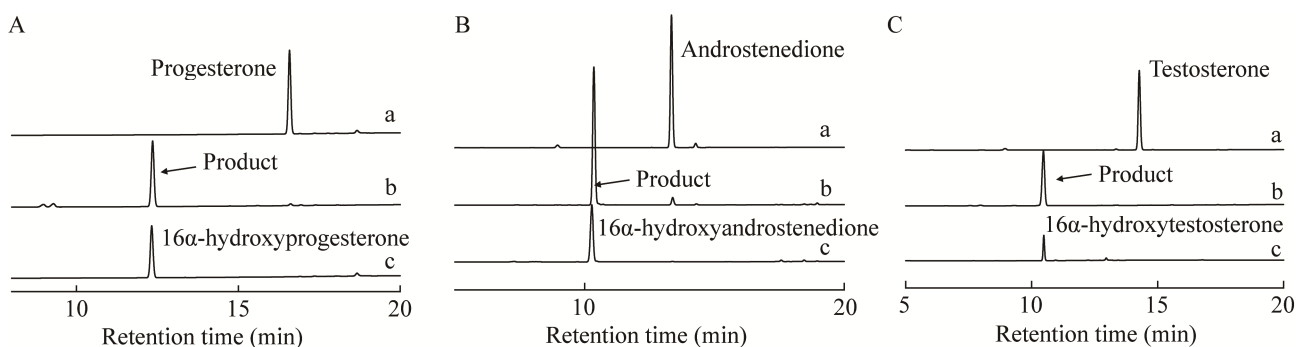


图 4 HPLC 分析及产物结构鉴定

Figure 4 HPLC analysis and identification of product structure. A, B, and C show that CYP154C34 converts progesterone, androstenedione, and testosterone to generate 16 α -hydroxylated products compared with the standard compounds. a shows the HPLC analysis of the conversion substrates using BL21(DE3) harboring pET28a-RhFRED, serving as a control; b shows the HPLC analysis of the conversion substrates by BL21(DE3) harboring pET28a-CYP154C34-RhFRED; c shows the standard compounds of the 16 α -hydroxylated products.

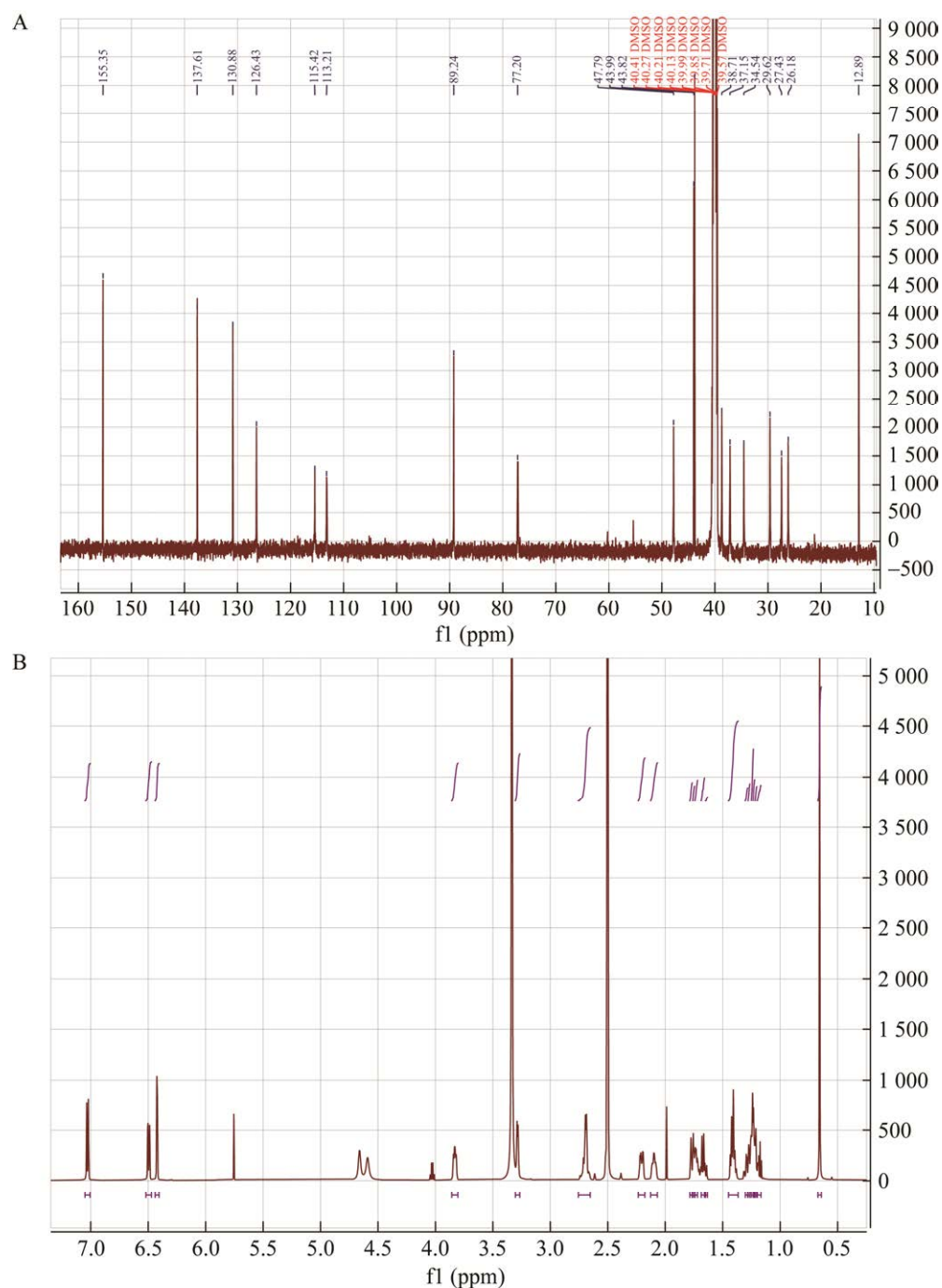


图 5 16 α -雌二醇的碳谱(A)和氢谱(B)

Figure 5 NMR data for 16 α -hydroxyestradiol. ^{13}C -NMR spectrum (A) and ^1H -NMR spectrum (B) are shown. A: ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 155.35, 137.61, 130.88, 126.43, 115.42, 113.21, 89.24, 77.20, 47.79, 43.99, 43.82, 38.71, 37.15, 34.54, 29.62, 27.43, 26.18, 12.89. B: ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.03 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 6.50 (dd, $J=8.4, 2.6$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J=2.6$ Hz, 1H), 3.86–3.80 (m, 1H), 3.29 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 2.70 (dd, $J=10.5, 5.8$ Hz, 2H), 2.21 (dt, $J=9.6, 3.8$ Hz, 1H), 2.13–2.07 (m, 1H), 1.77 (d, $J=3.3$ Hz, 0H), 1.75 (d, $J=3.8$ Hz, 0H), 1.73 (dd, $J=6.7, 4.0$ Hz, 1H), 1.67 (d, $J=9.1$ Hz, 1H), 1.64 (s, 0H), 1.41 (qd, $J=7.8, 2.2$ Hz, 2H), 1.29 (d, $J=3.6$ Hz, 0H), 1.27 (d, $J=3.5$ Hz, 0H), 1.24 (s, 1H), 1.23 (s, 1H), 1.21 (s, 0H), 1.20–1.17 (m, 0H), 0.66 (s, 3H).

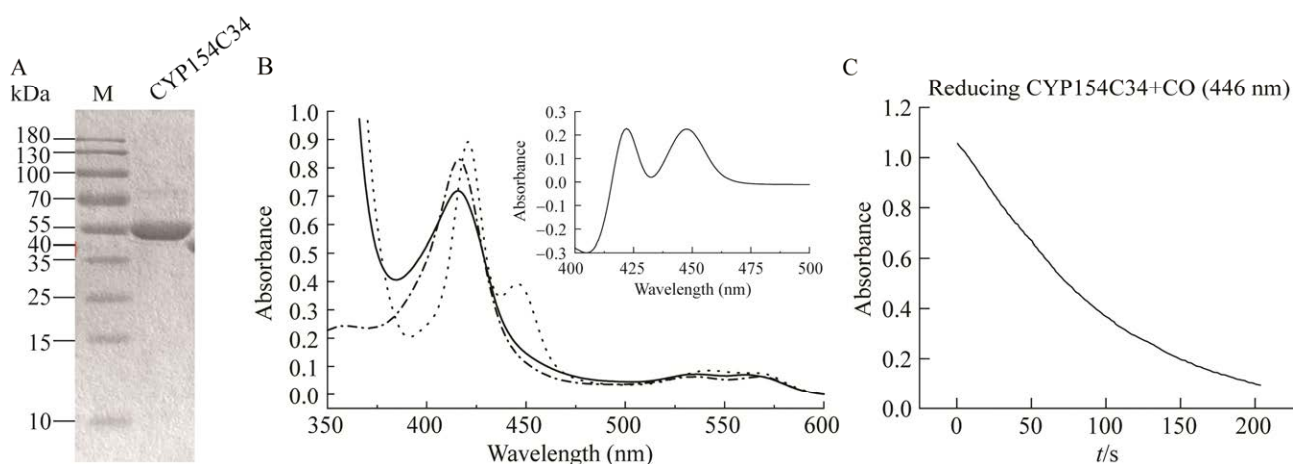


图 6 CYP154C34 的纯化及酶学性质分析

Figure 6 Purification and enzymatic property analysis of CYP154C34. A: The results of SDS-PAGE electrophoresis for CYP154C34 showed that the protein bands were singular, and the molecular weight of the protein was approximately 50 kDa. B: The spectra were measured in a 50 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 10% (V/V) glycerol. Resting state (dash line), reducing state solid line, and reducing+CO state (dotted line) are depicted. Inset: CO difference spectrum ((reducing+CO state)–reducing state). C: The graph depicts the change in absorbance at 446 nm over a period of 200 s, with the absorption level eventually returning to its initial state.

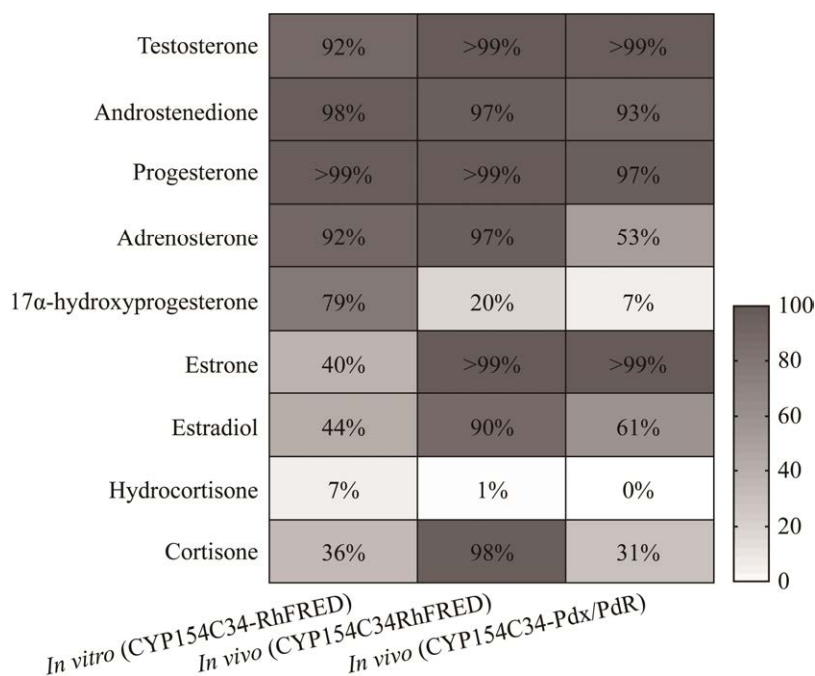


图 7 CYP154C34 在全细胞转化和酶法转化中转化率的比较

Figure 7 Comparison of conversion rate of CYP154C34 in whole-cell conversion (*in vivo*) and enzymatic conversion (*in vitro*). The conversion rate of 10 steroid compounds was analyzed using three catalytic systems and presented in a heat map. The color intensity represents the level of conversion rate, with darker shades indicating higher rates. The calculation of conversion rate was based on the ratio of product peak to the sum of product peak and remaining substrate peak in the reaction product.

酮、 17α 羟基孕酮和肾上腺甾酮羟基化。CYP154C34-RhFRED 的全细胞生物转化体系可以对 9 个化合物中的 7 个(除 17α 羟基孕酮和氢化可的松外)实现超过 90% 的转化率, 其原因可能是微生物胞质环境相比酶溶液体系更加稳定, 有利于融合蛋白维持正确折叠。与此相比, 表达 CYP154C34、Pdx、PdR 三个蛋白的全细胞生物转化体系在 9 个底物的生物转化水平均低于表达 CYP154C34-RhFRED 融合蛋白的生物转化体系。

2.5 CYP154C34 和底物结合亲和力分析

本研究选取了 5 个底物(testosterone、androstenedione、progesterone、corticosterone 和 estradiol)和 2 个底物类似物(trans-dehydroandrosterone 和 pregnenolone)进行了滴定实验, 并计算了 K_d 值。如图 8A 所示, 以 progesterone 为例, 当向 CYP154C34 溶液中滴加底物时, CYP154C34 在 420 nm 左右吸收峰会下降, 随之 390 nm 左右的吸收峰会上升, 最终稳定在完全高自旋状态, 将每次光谱和初始光谱相减获得光谱差图(图 8B)。

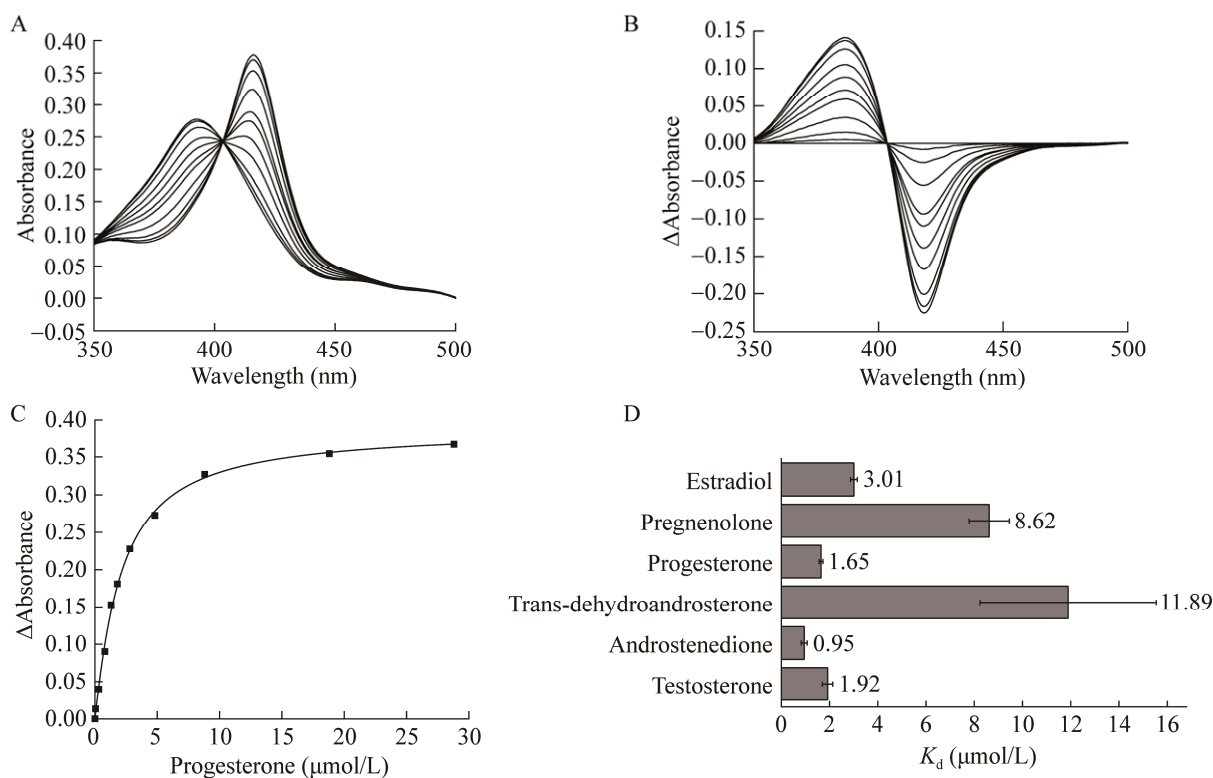


图 8 光谱分析及底物结合亲和力比较

Figure 8 Spectroscopic analysis and comparison of the substrate binding affinity. Equilibrium dissociation constants between CYP154C34 and the substrates were determined by substrate titration. A: The titration curve of progesterone, a representative substrate, showed a continuous decrease in the 418 nm absorption peak of the protein spectrum and a simultaneous increase in the 386 nm absorption peak with an increase in substrate concentration. Eventually, the spectrum stabilizes at a completely high-spin state. B: The difference spectrum between each spectrum and the original spectrum. C: The titration curve was generated by measuring the difference in absorption at 418 nm and 386 nm in the difference spectrum, and plotting it against the concentration of progesterone. The K_d value was calculated as 1.65 $\mu\text{mol/L}$ using curve fitting. D: Comparison of the K_d values for seven different compounds.

通过对7个化合物的 K_d 值分析,发现CYP154C34与底物的结合均较好, K_d 值都在3 $\mu\text{mol/L}$ 以下;2个底物类似物(trans-dehydroandrosterone和pregnenolone)则和CYP154C34的亲合力相比其他5个甾体化合物偏低, K_d 值分别为8.62 $\mu\text{mol/L}$ 和11.89 $\mu\text{mol/L}$ 。本研究结果表明底物的 K_d 值与转化率呈负相关。

3 讨论与结论

本研究鉴定了海洋放线菌 *Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066 来源的一种新型 P450 酶 CYP154C34 的功能。CYP154C34 可以在还原伴侣蛋白的帮助下选择性催化包括睾酮、孕酮在内的9种甾体类化合物的16 α 位羟基化反应。与已报道的CYP154C家族P450酶相比,本次鉴定的CYP154C34首次报道了微生物来源的P450酶对雌二醇的高效16 α -羟基化,转化率高于90%(CYP154C3对雌二醇的转化率低于10%)^[13,26]。雌二醇被CYP154C34催化氧化的产物为雌三醇并且不产生副产物。雌三醇相比于雌二醇具有更高的生物活性,并且具有更高的经济价值,因此本研究成果为雌三醇的生物合成提供了新的路线。

通过2种还原伴侣的全细胞生物转化体系与体外酶反应体系的比较,体内的全细胞生物转化效率要高于体外酶反应。CYP154C34-RhFRED在体内催化时对7种底物的转化率要高于体外酶反应,说明细胞质内的环境更适合CYP154C34-RhFRED融合蛋白保持长时间的正确折叠,并且胞质环境内的其他酶可以帮助NADPH的再生,从而实现了对底物的高效催化。然而表达CYP154C34、Pdx、PdR三种蛋白的全细胞转化体系对底物的转化率则明显低于表达CYP154C34-RhFRED的全细胞转化体系。分析原因可能是3个蛋白分别由3个T7启动子控制,Pdx和PdR蛋

白相比P450酶结构更简单而更容易折叠从而在胞内更优势地表达,细胞为此消耗了过多的能量从而导致CYP154C34蛋白表达过低,最终转化效率不佳。本研究鉴定了CYP154C34可对9种甾体化合物实现高区域和立体选择性的16 α 位羟基化反应,并且摸索出了较为合适的还原伴侣蛋白RhFRED,为CYP154C34的工业应用奠定基础。

致谢

感谢田纳西大学 David R. Nelson 教授在海洋新型 P450 酶的命名工作上提供的帮助。

参考文献

- [1] RUDOLF JD, CHANG CY, MA M, SHEN B. Cytochromes P450 for natural product biosynthesis in *Streptomyces*: sequence, structure, and function[J]. *Natural Product Reports*, 2017, 34(9): 1141-1172.
- [2] IIZAKA Y, SHERMAN DH, ANZAI Y. An overview of the cytochrome P450 enzymes that catalyze the same-site multistep oxidation reactions in biotechnologically relevant selected actinomycete strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(7): 2647-2661.
- [3] LI Z, JIANG YY, GUENGERICH FP, MA L, LI SY, ZHANG W. Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(3): 833-849.
- [4] STOUT CD. Cytochrome P450 conformational diversity[J]. *Structure*, 2004, 12(11): 1921-1922.
- [5] DONOVA MV, EGOROVA OV. Microbial steroid transformations: current state and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1423-1447.
- [6] BRESLOW R, ZHANG XJ, HUANG Y. Selective catalytic hydroxylation of a steroid by an artificial cytochrome P-450 enzyme[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119(19): 4535-4536.
- [7] ZOLLE IM, BERGER ML, HAMMERSCHMIDT F, HAHNER S, SCHIRBEL A, PERIC-SIMOV B. New selective inhibitors of steroid 11 β -hydroxylation in the adrenal cortex. Synthesis and structure-activity relationship of potent etomidate analogues[J]. *Journal*

- of Medicinal Chemistry, 2008, 51(7): 2244-2253.
- [8] SEDEE AJ, van HENEGOUWEN GMJB, de VRIES H, GUIJT W, HAASNOOT CG. The photochemical decomposition of the progestogenic 19-norsteroid, norethisterone, in aqueous medium[J]. Pharmaceutisch Weekblad, 1985, 7(5): 194-201.
- [9] KEILER AM, ZIERAU O, WOLF S, DIEL P, SCHÄNZER W, VOLLMER G, MACHALZ D, WOLBER G, PARR MK. Androgen- and estrogen-receptor mediated activities of 4-hydroxytestosterone, 4-hydroxyandrostenedione and their human metabolites in yeast based assays[J]. Toxicology Letters, 2018, 292: 39-45.
- [10] GOODMAN JJ, SMITH LL. 16 α -hydroxy steroids. XI. 2 β - and 16 α -hydroxylation of 9 α -fluorohydrocortisone by strains of *Streptomyces roseochromogenes*[J]. Applied Microbiology, 1961, 9: 372-375.
- [11] PODUST LM, KIM Y, ARASE M, NEELY BA, BECK BJ, BACH H, SHERMAN DH, LAMB DC, KELLY SL, WATERMAN MR. The 1.92 Å structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) CYP154C1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(14): 12214-12221.
- [12] CHENG Q, LAMB DC, KELLY SL, LEI L, GUENGERICH FP. Cyclization of a cellular dipentaenone by *Streptomyces coelicolor* cytochrome P450 154A1 without oxidation/reduction[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(43): 15173-15175.
- [13] DANGI B, KIM KH, KANG SH, OH TJ. Tracking down a new steroid-hydroxylating promiscuous cytochrome P450: CYP154C8 from *Streptomyces* sp. W2233-SM[J]. ChemBioChem, 2018, 19(10): 1066-1077.
- [14] DANGI B, LEE CW, KIM KH, PARK SH, YU EJ, JEONG CS, PARK H, LEE JH, OH TJ. Characterization of two steroid hydroxylases from different *Streptomyces* spp. and their ligand-bound and-unbound crystal structures[J]. The FEBS Journal, 2019, 286(9): 1683-1699.
- [15] WANG QW, MA BB, FUSHINOBU S, ZHANG CF, XU LH. Regio- and stereoselective hydroxylation of testosterone by a novel cytochrome P450 154C2 from *Streptomyces avermitilis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 522(2): 355-361.
- [16] GAO QL, MA BB, WANG QW, ZHANG H, FUSHINOBU S, YANG J, LIN SS, SUN KK, HAN BN, XU LH. Improved 2 α -hydroxylation efficiency of steroids by CYP154C2 using structure-guided rational design[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(3): e0218622.
- [17] MORIGASAKI S, TAKATA K, SANADA Y, WADA K, YEE BC, SHIN S, BUCHANAN BB. Novel forms of ferredoxin and ferredoxin-NADP reductase from spinach roots[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1990, 283(1): 75-80.
- [18] SIBBESEN O, de VOSS JJ, de MONTELLANO PRO. Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome P450cam triple fusion protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(37): 22462-22469.
- [19] NOBLE MA, MILES CS, CHAPMAN SK, LYSEK DA, MacKAY AC, REID GA, HANZLIK RP, MUNRO AW. Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3[J]. The Biochemical Journal, 1999, 339(Pt 2): 371-379.
- [20] HUNTER DJB, ROBERTS GA, OST TWB, WHITE JH, MÜLLER S, TURNER NJ, FLITSCH SL, CHAPMAN SK. Analysis of the domain properties of the novel cytochrome P450 RhF[J]. FEBS Letters, 2005, 579(10): 2215-2220.
- [21] LI SY, PODUST LM, SHERMAN DH. Engineering and analysis of a self-sufficient biosynthetic cytochrome P450 PikC fused to the RhFRED reductase domain[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(43): 12940-12941.
- [22] RAJIVGANDHI GN, LI WJ. Biomedical application of marine extremozymes[M]//Microbial Extremozymes. Amsterdam: Elsevier, 2022: 111-123.
- [23] BRUNO S, COPPOLA D, di PRISCO G, GIORDANO D, VERDE C. Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications[J]. Marine Drugs, 2019, 17(10): 544.
- [24] DEGTYARENKO KN, ARCHAKOV AI. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems[J]. FEBS Letters, 1993, 332(1/2): 1-8.
- [25] OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1964, 239(7): 2370-2378.
- [26] MAKINO T, KATSUYAMA Y, OTOMATSU T, MISAWA N, OHNISHI Y. Regio- and stereospecific hydroxylation of various steroids at the 16 α position of the D ring by the *Streptomyces griseus* cytochrome P450 CYP154C3[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(4): 1371-1379.