



当前位置：首页 > 新闻动态 > 科研进展

## 青岛能源所提出理性设计P450过加氧酶的隧道工程新策略

供稿部门：单碳酶催化

发布时间：2023-02-16 | 【大】 【中】 【小】 | 【打印】 【关闭】

细胞色素P450单加氧酶是自然界中最重要的氧化酶之一，广泛参与生物体内重要内外源物质的合成与代谢，不但在医学和药学等生命健康领域得到广泛研究，而且其对极具挑战性的惰性碳-氢键选择氧化反应的优异催化能力，也激起合成化学与合成生物学等相关领域科学家的极大兴趣。然而自然界中以氧气（O<sub>2</sub>）作为末端氧化剂的绝大多数P450单加氧酶要通过一个复杂的氧化还原系统来实现其催化功能。利用还原态的过氧化氢（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）替代O<sub>2</sub>将P450从单加氧酶改造为过加氧酶，被认为是开发更为简单实用性P450生物催化剂的一条有效途径。但这面临着绝大多数P450在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下仅有极弱，甚至没有催化活性的挑战！

青岛能源所丛志奇研究员带领的单碳酶催化研究组致力于P450过加氧酶的分子设计和创制，近年来在国际上首次提出双功能小分子协同P450催化概念，成功将P450单加氧酶改造为能高效利用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的P450过加氧酶（*Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 7628. Very Important Paper），并通过合作阐明了双功能小分子协同P450过加氧酶的结构基础和催化机理（*ACS Catal.* **2021**, 8774）。研究人员进而结合蛋白质工程技术，先后开发出了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>驱动的P450丙烷羟化酶（*ACS Catal.* **2019**, 7350）、高度*R*-对映选择性的P450苯乙烯环氧化酶（*Chem. Sci.* **2021**, 6307）、高效P450过氧化物酶（*ACS Catal.* **2021**, 8449）、碳-氢键的区域和立体多样性羟化P450工程酶（*Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, e202215088. Hot Paper）、不饱和烃直接硝化的P450硝化酶（*Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, e202217678.）。尽管这些P450酶呈现出具有工业应用潜力的高催化活性，但研究人员发现其高活性大多建立在需要高出底物浓度数倍的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>投料基础上（理想情况下化学计量比应为1:1），这对更具实用性P450酶催化剂的开发提出了新的挑战。

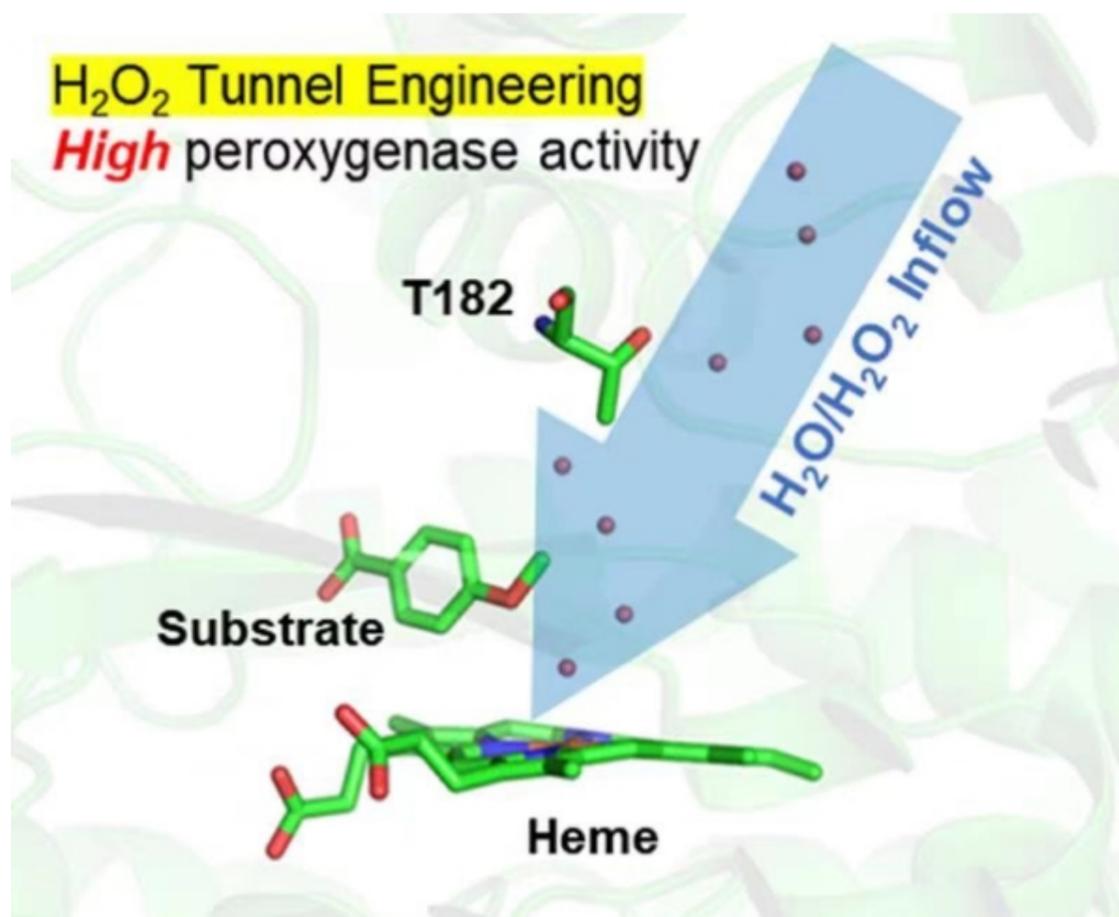


图1. 过氧化氢隧道工程增强P450过加氧酶活性

研究人员通过与自然界中能够直接利用 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的天然过氧化物酶和过加氧酶进行结构比对分析发现：这些酶的血红素活性中心更多的暴露于蛋白质表面或有着较为开放的底物通道与表面相通， $\text{H}_2\text{O}_2$ 分子可以更容易的到达活性中心；相反，烟酰胺辅因子NAD(P)H依赖型P450的活性中心大都深埋在蛋白质内部， $\text{H}_2\text{O}_2$ 分子可能不容易通过其疏水性底物通道进入活性中心，导致工程化P450过加氧酶在进行催化反应时往往需要高浓度的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。鉴于P450酶结构中存在连接蛋白表面与活性中心的 $\text{H}_2\text{O}$ 分子隧道（water tunnel），研究人员提出通过P450酶的水隧道设计来促进 $\text{H}_2\text{O}_2$ 进入其内部血红素活性中心，增强P450过加氧酶的催化活性（图1）。研究人员利用Caver软件预测出P450酶血红素活性中心与溶剂环境之间的水隧道，并基于计算分析，鉴定出可能影响 $\text{H}_2\text{O}_2$ 流入活性中心的隧道入口或瓶颈处的氨基酸残基，结合定点突变和多轮反应筛选，成功将两种NADH依赖型P450单加氧酶（CYP199A4和CYP153A<sub>M.aq</sub>）改造为工程化P450过加氧酶，工程酶催化活性比野生型酶分别调高183倍和15倍。高分辨率晶体结构分析结果表明：水隧道瓶颈处关键残基的突变可能是 $\text{H}_2\text{O}_2$ 更容易进入活性中心的原因，有力支持了最初的假设。此外，将上述策略应用到此前开发的双功能小分子协同P450BM3过加氧酶体系，获得预期产物所需 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度被降低了95%以上、且 $\text{H}_2\text{O}_2$ 与产物的耦合效率达到95%。这些实验结果表明：本研究提出的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 隧道工程有望成为一个将P450单加氧酶改造为过加氧酶的普适性新策略，为新型P450过加氧酶生物催化剂的开发提供了新的思路和工具，有望进一步拓展P450在合成化学和合成生物学中的应用空间。

相关工作近日已在线发表于国际权威期刊Journal of the American Chemical Society《美国化学会志》。青岛能源所博士生赵盼霞和孔繁慧，以及姜谊平博士为论文共同第一作者，丛志奇研究员为通讯作者。本研究得到国家自然科学基金和国家重点研发计划项目的大力支持。

(文/图 赵盼霞 孔繁慧 姜谊平 丛志奇)

原文链接：<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jacs.3c00195>

Zhao, P.#, Kong F.#, Jiang Y.#, Qin, X., Tian X., and Cong, Z\*. Enabling Peroxygenase Activity in Cytochrome P450 Monooxygenases by Engineering Hydrogen Peroxide Tunnels. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**. DOI 10.1021/jacs.3c00195.

电话: +86-532-80662776 传真: +86-532-80662778

