

细胞色素 P450 在植物倍半萜类化合物生物合成中的作用研究进展

高世玺¹, 戎梅¹, 彭俊祥¹, 徐艳红^{1*}, 魏建和^{1,2*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室, 海南海口 570311)

摘要: 倍半萜类化合物是基本骨架含 15 个碳原子的天然萜类化合物, 主要存在于植物挥发油中, 具有重要的生理作用和药用价值。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是一类超基因家族编码的单加氧酶, 是植物中最大的基因家族之一, 参与萜类、生物碱等多种次生代谢产物的合成与代谢。在萜类生物合成过程中, CYP450 酶通过引入羟基、羧基、羰基等官能团参与萜类化合物的后修饰阶段, 为丰富萜类化合物多样性起到了重要作用。参与倍半萜合成的 CYP450 酶及底物催化特异性机制已有一些研究, 本文简要介绍了植物倍半萜类化合物的生物合成途径、P450 酶的结构和分类, 对参与倍半萜生物合成的 CYP450 酶进行了总结, 以期为更深入探究 CYP450 酶在合成倍半萜类化合物中的作用提供参考。

关键词: 倍半萜; 细胞色素 P450; 生物合成调控; 次生代谢产物; 药用植物

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)02-0313-09

Research progress on the role of cytochrome P450 in plant sesquiterpene biosynthesis

GAO Shi-xi¹, RONG Mei¹, PENG Jun-xiang¹, XU Yan-hong^{1*}, WEI Jian-he^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China)

Abstract: Sesquiterpenes are natural terpenoids with 15 carbon atoms in the basic skeleton, which mainly exist in plant volatile oil and have important physiological and medicinal value. Cytochrome P450 (CYP450) is a kind of monooxygenase encoded by supergene family, which is one of the largest gene families in plants. It is involved in the synthesis and metabolism of terpenoids, alkaloids and other secondary metabolites. In the process of terpene biosynthesis, CYP450 participates in the post-modification stage of terpenes by introducing functional groups such as hydroxyl, carboxyl and carbonyl, which plays an important role in enriching the diversity of terpenes. The CYP450 enzymes involved in sesquiterpene synthesis and their substrate catalytic specificity

收稿日期: 2023-05-30; 修回日期: 2023-09-11.

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (7222286); 国家自然科学基金项目 (82173925); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程一重大协同创新项目 (2021-1-12M-032).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-57833359, E-mail: xuyanhong99@163.com;

Tel / Fax: 86-10-57833358, E-mail: wjianh@263.net

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0677

mechanisms have been partially investigated. In this paper, the biosynthetic pathway of plant sesquiterpenes, the structure and classification of CYP450 enzymes were briefly introduced, and the CYP450 enzymes involved in sesquiterpene biosynthesis were summarized, in order to provide a reference for intensive study of the role of CYP450 enzymes in the synthesis of sesquiterpenoids.

Key words: sesquiterpenes; cytochrome P450; biosynthesis regulation; secondary metabolite; medicinal plant

倍半萜是由3个异戊二烯单元构成的萜类化合物,骨架类型丰富,是萜类化合物中数目最多的一类,广泛存在于唇形科、菊科、芸香科、茄科等药用植物中。现代研究表明,倍半萜类化合物有抗菌^[1]、抗肿瘤^[2]、抗炎^[3]、抗病毒^[4]等生物活性,是一类具有重要药用价值的次生代谢产物。法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 是倍半萜生物合成的前体物质,在萜烯合酶 (terpene synthases, TPS) 的作用下形成不同类型的倍半萜碳骨架,细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450, CYP450) 进一步对倍半萜骨架进行修饰,部分倍半萜还会在脱氢酶、甲基转移酶、酰基转移酶和糖基转移酶的作用下反应,产生复杂多样的倍半萜化合物 (图1)。

植物 CYP450s 是一种单加氧催化蛋白酶,多定位于内质网,和还原态 CO 结合后,在 450 nm 处吸光度最高,因此命名为 CYP450s。CYP450s 是一个多成员超基因家族,包括超过 1 000 个家族和 2 500 个亚家族^[5],参与萜类、生物碱、黄酮、脂肪酸等的生物合成^[6],对植物的生命活动有重要的调节作用。CYP450s 基因种类众多,植物基因组注释表明 CYP450s 基因占整个基因组基因数目的 1%^[5]。随着技术的发展和研究的不断深入,研究人员已经从植物中分离了大量的 CYP450s。第一个研究发现参与倍半萜生物合成的 CYP450 是棉花中的 (+) δ -杜松烯-8-羟化酶 (CYP706B1),催化棉酚生物合成的第二步反应^[7]。

本文对参与药用植物倍半萜类化合物生物合成的 CYP450s 及其功能进行了总结,以期为解析倍半萜类化合物的生物合成机制提供参考。

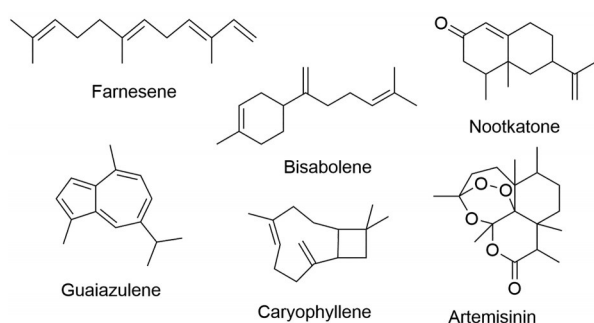


Figure 1 Representative sesquiterpenes from medicinal plants

1 倍半萜生物合成途径

倍半萜生物合成分为三个阶段,包括上游前体物质生成阶段、骨架形成阶段及后修饰阶段。FPP 是倍半萜类化合物共同的前体物质,由二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 与异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 缩合而成。DMAPP 与 IPP 有两种合成途径,一种是甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径,另一种是甲基赤藓糖醇磷酸 (methylerythritol phosphate, MEP) 途径,倍半萜的合成大多是通过 MVA 途径。

MVA 途径主要发生在植物的细胞质基质中,以两分子的乙酰辅酶 A 为原料,在乙酰乙酰基辅酶 A 硫解酶 (acetyl-CoA C-acetyl transferase, AACT)、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase, HMGS)、3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGR)、甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase, MVK)、磷酸甲羟戊酸激酶 (phosphomevalonate kinase, PMK)、焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (pyrophosphomevalonate decarboxylase, MVD) 的作用下,经过六个酶促反应,形成 IPP。最终 IPP 在异戊二烯焦磷酸异构酶 (isopentenyl pyrophosphate isomerase, IPPI) 的作用下异构形成 DMAPP。DMAPP 和 IPP 在焦磷酸金合欢酯合酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS) 的作用下缩合生成 FPP。

MEP 途径主要发生在植物质体 (叶绿体、有色质体、白质体中)。以丙酮酸和磷酸甘油醛为原料,在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS)、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, DXR)、2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸胞苷酰转移酶 (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyl-transferase, MCT)、4-(5'-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶 (4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase, CMK)、2-C-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环二磷酸合酶 (2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase, MDS)、4-羟基-3-甲基丁-2-烯基二磷酸合酶 (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase, HDS)、4-羟基-

3-甲基丁-2-烯基二磷酸还原酶 (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase, HDR) 的作用下, 经过七步酶促反应, 转化为 IPP。

不同的 TPS 与 FPP 结合, 通过异构化、离子化、重排等反应过程形成结构各异的倍半萜骨架。随后, 后修饰酶进一步将环化骨架修饰成各种萜类化合物 (图2)。

2 CYP450 的结构与分类

CYP450 催化的反应极其多样, 但通常基于分子氧的活化和裂解, 所以被称为单加氧酶。CYP450 都有一个共同的催化中心。尽管在氨基酸水平上的序列一致性较低 (可能小于 20%), 但 CYP450 显示出共同的整体拓扑结构和三维折叠。CYP450s 有三个极为保守的残基, 分别是血红素结合域 FxxGxRxCxG、电子传递通道残基 PERF 和 K 螺旋中的 EXXR 残序^[8]。常见的 CYP450 催化系统组分有三类^[9]: 第一类是由 CYP450 氧化酶、含黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 的还原酶和铁氧还蛋白组成的三组分系统。包含大多数细菌 CYP450 系统以及真核生物的线粒体 P450 系统。第二类组分是真核细胞中最常见的, 由 CYP450 酶和 CYP450 还原酶 (cytochrome P450 reductase, CPR) 组成, CPR 含有 FAD 和黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN)。参与植物倍半萜类化合物合成的 P450 酶多属于此类。第三类是 CYP450 酶与氧化还原伴侣蛋白结构域融合的单组分系统, 其中还存在少量直接从 NAD(P)H 中获取电子的 P450 酶。

不同基因氨基酸序列的同源性是区分不同家族或亚家族的重要依据。当两条序列同源性大于 40%, 则

同属于一个基因家族, 否则属于 2 个不同的家族; 序列同源性在 40%~55%, 则属于同一家族的不同亚家族; 同源性大于 55%, 则属于同一亚家族的不同成员^[10]。如棉花中 CYP706B1 表示 CYP706 家族 B 亚家族 1 号成员, 玉米中 CYP71Z18 表示 CYP71 家族 Z 亚家族 18 号成员。如果两个 P450 酶的氨基酸序列相似性大于 97%, 那么这两个 P450 酶被称为等位变异体。等位基因在阿拉伯数字后加 v, 再加阿拉伯数字区分, 如 CYP76F37v1。

3 植物 CYP450 的进化

CYP450 是一类序列高度分化的超基因家族。在植物中最初被分为 A 型和非 A 型两个分支, 参与次生代谢产物合成的 CYP450 大都聚集在 A 型分支^[11,12]。随着基因组测序和亲缘关系以及非维管束植物谱系的研究发展, 使得 CYP450 家族进化关系更加细致和完善。现有的植物 CYP450s 被分成 11 个家族簇: CYP51、CYP74、CYP97、CYP710、CYP711、CYP727、CYP746、CYP71、CYP72、CYP85 及 CYP86, 每个簇中最小家族编号为该簇的名号。其中, 前 7 个亚家族为单家族簇, 后 4 个为多家族簇^[5]。CYP51、CYP74、CYP97、CYP710 和 CYP86 在绿藻和整个陆地植物中保守, 在新陈代谢中执行重要的催化反应^[13]。并且发现最初被确定为 A 型的群体为现在的 CYP71 分支。维管植物中的 10 个 P450 簇的其中 6 个 (CYP51、CYP74、CYP97、CYP710、CYP711、CYP727) 在拟南芥中只包含一个家族, 它们通常是脂肪、类固醇和类胡萝卜素代谢和信号传递等祖先功能所必需的^[5]。另外四个家族 CYP71、CYP72、CYP85 和 CYP86 通过密集基因复制和多样性而进

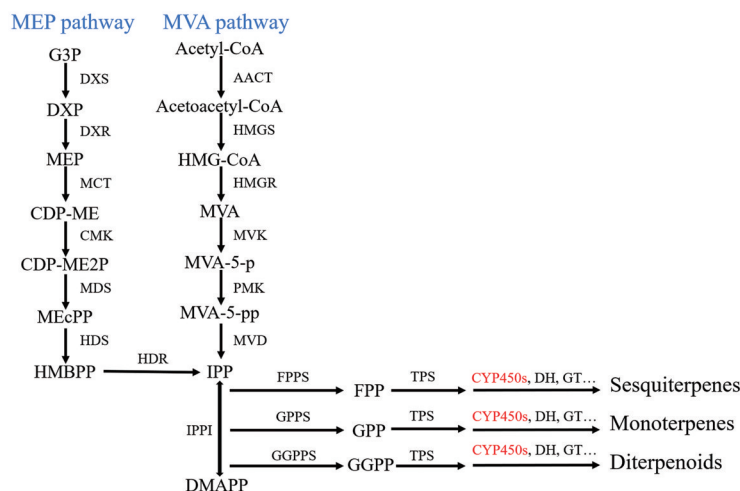


Figure 2 Terpene biosynthetic pathways. MVA: Mevalonate pathway (occurs mainly in the cytoplasmic matrix); MEP: Methylerythritol phosphate pathway (occurs mainly in the plastid); IPP: Isopentenyl pyrophosphate; DMAPP: Dimethylallyl diphosphate; FPP: Farnesyl pyrophosphate; GPP: Geranyl pyrophosphate; GGPP: Geranylgeranyl pyrophosphate; TPS: Terpene synthases; DH: Dehydrogenases; GT: Glycosyl transferases

化。其中有三个家族似乎是十字花科特有的: CYP705 (属于 CYP71 家族)、CYP708 和 CYP702 (属于 CYP85 家族), 它们似乎已经共同进化, 形成了萜类相关的途径^[14,15]。在进化历史中, CYP71 家族连续发生基因复制事件产生了家族扩张。因此, P450 (亚) 家族的成员如 CYP71A、CYP71B、CYP705 和 CYP81 在不同染色体上重复串联排列。

活跃的基因复制有时会导致非功能化的大量假基因, 但有时也会分化获得新的功能。串联组织的复制基因有时会进化为编码酶, 催化同一途径中的连续步骤。同一家族的成员可能包含不同的途径, 如 CYP71D 亚家族中来源于薄荷的 CYP71D13/D15 可以催化柠檬烯羟基化^[16], 来源于大豆的 CYP71D9 可以催化黄酮-6-羟基化反应^[17]。然而, 这种类型的功能差异在同一植物物种中更为罕见, 并且支持一个事实, 即基因复制是物种形成的驱动力。Hamberger 等^[18]提出, 化学多样化导致的适应能力增加是推动新 P450 进化的一种力量, 原始基因是从一般新陈代谢中招募的。这一过程的证据可以在水稻基因组中观察到, 五个 CYP701A 同源物组成了一个小的多基因家族, 而只有 CYP701A6 是赤霉素生物合成所必需的。它的同系物 CYP701A8 是从一般代谢复制而来的, 已经经历了新的功能化, 现在参与了水稻抗真菌植物保卫素的生物合成^[19]。一个新的 P450 亚家族的创始成员, CYP706M1, 被证明催化诺卡酮的形成。有趣的是, 与先前发现的具有价烯氧化酶活性的 P450 相比, CYP706M1

的氨基酸同源性程度不超过 30%, 这表明特定的倍半萜氧化酶的进化可能是通过独立的事件发生的^[20]。

4 参与倍半萜合成的 CYP450

迄今为止, 直接参与倍半萜代谢的 CYP450s 很有限, 仅存在于 CYP71 家族中的九个亚家族 CYP71AV、CYP71D、CYP706B、CYP71Z、CYP706A、CYP71BA、CYP76F、CYP736A、CYP71BE 中, 见表 1^[7,10,21-33]。另外, 还有一些 CYP450s 间接参与倍半萜下游代谢, 见表 2^[28,34-37]。现将参与倍半萜合成的 CYP450s 及其作用通路汇总如图 3 所示。它们通过对倍半萜骨架进行羟基化、羰基化和羧基化的修饰丰富倍半萜成分的多样性。

青蒿素是倍半萜类的代表性化合物, 是由黄花蒿茎叶提取而得。它是一种倍半萜内酯类药物, 因其高效的抗疟作用被广泛应用, 解析其生物合成路径实现工业化生产尤为必要。Teoh 等^[10]最早从黄花蒿中鉴定了具有氧化功能的 CYP71AV1, 将其在酿酒酵母中异源表达, 发现它能连续氧化, 将紫穗槐二烯依次催化为青蒿醇、青蒿醛和青蒿酸, 为解析青蒿素合成通路奠定了基础。

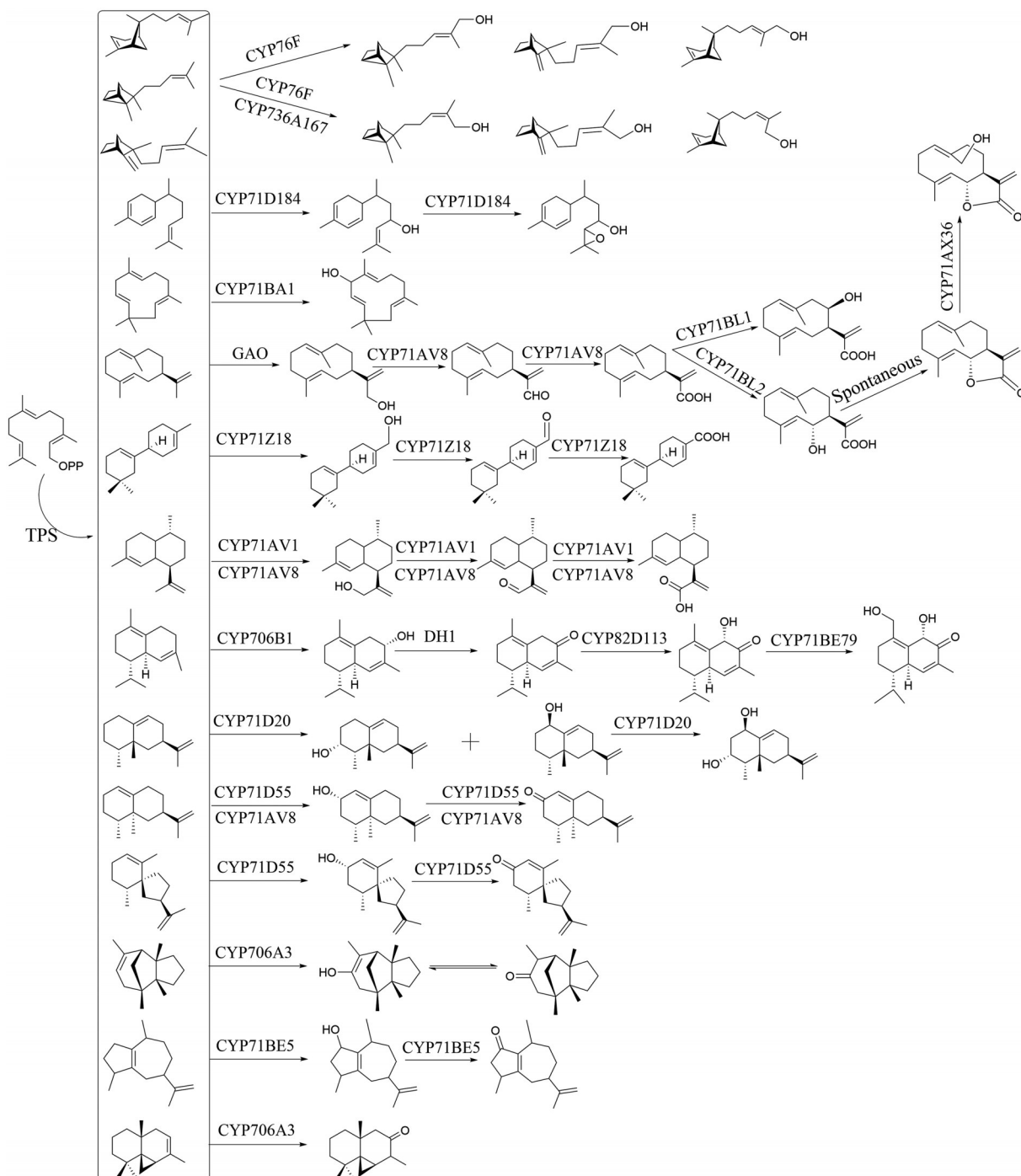
棉酚是棉花中的特有成分, 属于倍半萜酮类化合物。Luo 等^[7]将 CYP706B1 蛋白在酿酒酵母中异源表达后, 发现它能催化杜松烯 8 位羟基化生成 8-羟基-杜松烯。这是第一个被确定其功能的 CYP706 家族成员。但后来 Tian 等^[37]通过 ¹³C NMR 和异核相关谱发现, CYP706B1 的功能是 7 位羟基化, 而非先前的 8 位

Table 1 CYP450 directly catalyzes sesquiterpene skeleton formation

Species	Protein	Substrate	Type of catalysis	Product	Genbank number	Reference
<i>Artemisia annua</i>	CYP71AV1	Amorphadiene	Continuous oxidation	Artemisinic acid	ABC41927.1	[10]
<i>Nicotiana tabacum</i>	CYP71D20	5- <i>epi</i> -Aristolochene	C1-Hydroxylation C3-Hydroxylation	Capsidiol	AAK62342.2	[21]
<i>Gossypium arboreum</i>	CYP706B1	Cadinene	C7-Hydroxylation	7-Hydroxy-cadinene	AAK60517.1	[7]
<i>Zea mays</i>	CYP71Z18	β -Macrocarpene	Continuous oxidation	Zealexin	NP001141366.1	[22]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CYP706A3	α -Barbatene	Continuous oxidation	6- <i>O</i> - α -Barbatene	BAH20251.1	[23]
		Thujopsene	C1-Carbonylation	1- <i>O</i> -Thujopsene		
<i>Zingiber zerumbet</i>	CYP71BA1	α -Humulene	C8-Hydroxylation	8-Hydroxy- α -humulene	BAJ39893.1	[24]
<i>Hyoscyamus muticus</i>	CYP71D55	Premnapirodiene	C2-Carbonylation	Solavetivone	ABS00393.1	[25]
		Valencene	C2-Hydroxylation	Nootkatol		
		Aristolochene		2-Hydroxy-aristolochene		
<i>Santalum album</i>	CYP76F/ CYP736A167	Santalene Bergamotene	C1-Hydroxylation	Santalol Bergamotol	AMR44190.1	[26] [27]
<i>Cynara cardunculus</i>	CYP71AV9	Germacrene A	Continuous oxidation	Germacrene A acid	AIA09035.1	[28]
<i>Cichorium intybus</i>	CYP71AV8	Valencene	C2-Carbonylation	Nootkatol	ADM86719.1	[29]
		Germacrene A	Continuous oxidation	Germacrene A acid		
		Amorphadiene		Artemisinic acid		
<i>Vitis vinifera</i>	CYP71BE5	α -Guaiene	C2-Carbonylation	Rotundone	BAT70338.1	[30]
<i>Thapsia garganica</i>	CYP76AE2	<i>epi</i> -Kunzeaol	Continuous oxidation	<i>epi</i> -Dihydroconstunolide	AQY76213.1	[31]
<i>Thapsia laciniata</i>	CYP76AE4	<i>epi</i> -Kunzeaol	C8-Hydroxylation	Tovarol	AZL40029.1	[32]
<i>Solanum habrochaites</i>	CYP71D184	Zingiberene	C9-Hydroxylation C10,C11-Epoxidation	9-Hydroxy-zingiberene 9-Hydroxy-10,11-epoxy-zingiberene	MT786523.1	[33]

Table 2 CYP450 involved in the downstream biosynthesis of sesquiterpenes

Species	Protein	Substrate	Type of catalysis	Product	Genbank number	Reference
<i>Lactuca sativa</i>	CYP71BL2	Germacrene A acid	C6-Hydroxylation	6-Hydroxy-germacrene A acid	AEI59780.1	[34]
<i>Helianthus annuus</i>	CYP71BL1	Germacrene A acid	C8-Hydroxylation	8-Hydroxy-germacrene A acid	AEI59773.1	[34]
	CYP71AX36	Costunolide	C14-Hydroxylation	14-Hydroxy-costunolide	AWK77745.1	[35]
<i>Cynara cardunculus</i>	CYP71BL5	Germacrene A acid	C6-Hydroxylation	Costunolide	AIA09038.1	[28]
<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	CYP71BL4	Germacrene A acid	C6-Hydroxylation	Costunolide	AGO03790.1	[36]
<i>Gossypium hirsutum</i>	CYP71BE79	8-Hydroxy-7-keto-cadinene	C11-Hydroxylation	8,11-Dihydroxy-7-keto-cadinene /		[37]
	CYP82D113	7-Keto-cadinene	C8-Hydroxylation	8-Hydroxy-7-keto-cadinene		

**Figure 3** Cytochrome P450 (CYP450) involved in sesquiterpene biosynthesis. The yellow, blue and green boxes represent the hydroxyl, carbonyl and carboxyl groups obtained after oxidation, respectively

羟基化。另外, Tian 等^[37]还通过转录组差异表达分析和共表达分析从陆地棉中获得了 146 个与棉酚生物合成有关的基因, 经筛选发现了乙醇脱氢酶 DH1、CYP450 酶 CYP82D113 和 CYP71BE79, 并将这些蛋白分别在大肠杆菌和酿酒酵母中异源表达、功能验证, 研究发现, 它们可以依次将 7-羟基-杜松烯氧化生成 7-羰基-杜松烯、8-羟基-7-羰基-杜松烯和 8,11-二羟基-7-羰基-杜松烯, 并预测了下游棉酚合成通路, 为解析棉酚形成通路做出了贡献。

本文对直接修饰倍半萜骨架的 CYP450s 做了进化树分析, 如图 4。总体来说, 同一亚族由于序列相近被归为一簇。同一亚族通常有相近的功能, 如 CYP76F 家族, 均能作用于檀香烯, 佛手柑油烯; 同一家族的 CYP71D20 与 CYP71D55, CYP71AV1 与 CYP71AV8 也可以作用于相同的底物。但也有些例外, 如来源拟南芥的 CYP706A3 和来源棉花的 CYP706B1 虽然属于同一家族, 被归为同一簇, 但它们的作用底物结构不同, 说明系统发育上相距较近的蛋白也会有不同的功能。同样的, 在系统发育上相距较远的 P450 也可能作用于结构相似的底物。如 CYP71D55^[25]和 CYP71AV8^[29]分属于不同的亚家族, 但是均可以在香橙烯 2 位加上羟基变为诺卡醇。另外, CYP450 还具有底物杂泛性, 一种酶可以催化不同骨架类型的底物, 如拟南芥中克隆出的 CYP706A3 可以分别催化两种骨架类型不同的底物 α -barbatene 和 罗汉柏烯^[23]。P450 酶还可以连续氧

化。如来源于黄花蒿的 CYP71AV1 和来源于菊苣的 CYP71AV8 可以催化紫穗槐二烯先羟基化, 再羰基化, 最后形成羰基生成青蒿酸, P450 的底物杂泛性和连续氧化功能进一步增加了倍半萜化合物的多样性。

将课题组前期从白木香中克隆得到的 CYP450G2、CYP450G4、CYP450G5、CYP450G6 与这些已经功能鉴定的 CYP450 共同做进化树, 发现可以集簇, 其中 CYP450G5 和 CYP71BE5 距离较近, 推测可能具有相似的功能。

5 参与倍半萜合成的 CYP450 结构及其改造

蛋白质分子特定的三维结构是决定其功能的重要因素。因此, 蛋白质结构和功能关系的研究也是酶研究的核心问题之一。目前, 参与倍半萜合成的 CYP450 三维结构的研究处于预测阶段, 还没有晶体解析的报道。

Boachon 等^[23]构建了 CYP706A3 活性位点的三维结构模型以及相关底物的分子对接 (图 5)。该结构有两个主要的通道, 一个通道连接到膜, 另一个指向膜-水界面。CYP706A3 血红素口袋显示出一个很小、受约束且基本疏水的空腔, 主要由无极性残基组成, 空腔上部也主要是疏水的, 带有一个带电荷的残基, 这些特性使活性位点很好地适应倍半萜类化合物。Takahashi 等^[25]也通过分子对接和定点突变对 CYP71D55 的底物结合区进行了研究 (图 6), 发现底物结合位点 5 (图 6 蓝色部分) 和结合位点 6 (图 6 红色部分) 对催化反应的稳定性非常重要。Park 等^[38]使用一种基于发光杆菌 CipB

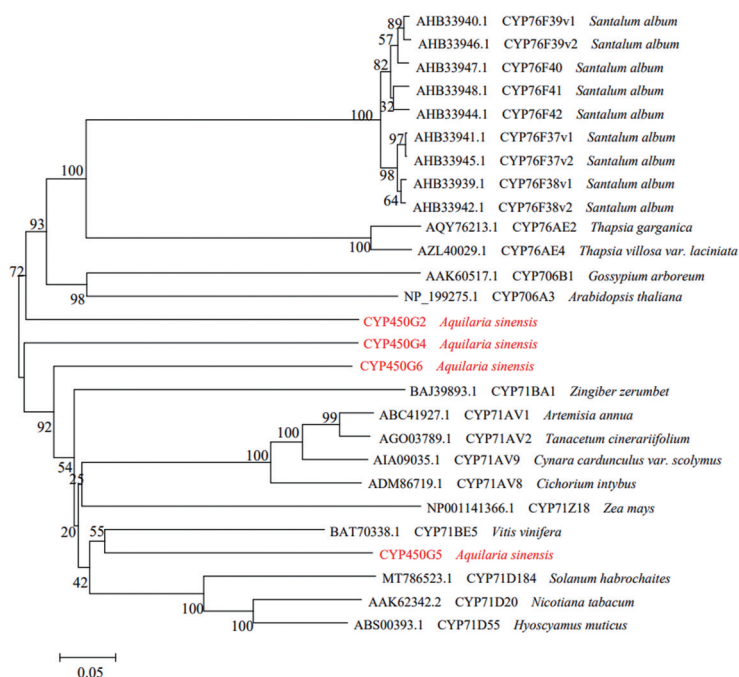


Figure 4 The phylogenetic tree analysis of CYP450 proteins directly involved in sesquiterpene skeleton formation by neighbor-joining method. The red font indicates the unpublished CYP450 of our group

支架蛋白的电子传导策略, 将多种酶组装成功能性蛋白质晶状包涵体, 使得生物合成途径中的相关酶在物理上接近从而实现了 P450s 和还原酶之间的有效电子转移。将密码子优化和 N 端信号肽截断的 V482I/A484I 突变体 CYP71D55 与密码子优化的伴侣还原酶进行组装, 以及在 CipB 和伴侣还原酶/突变体 CYP71D55 之间插入一个柔性连接子序列以减少空间位阻效应, 使菌株产生的诺卡酮达到 $4.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 是对照菌株 NKT1 ($0.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 7.26 倍。对 CYP450 结构的深入研究有助于蛋白功能的解析、预测以及定向改造, 然而与倍半萜生物合成相关 CYP450 结构报道仅限于以上两个蛋白, 仍有待进一步研究。

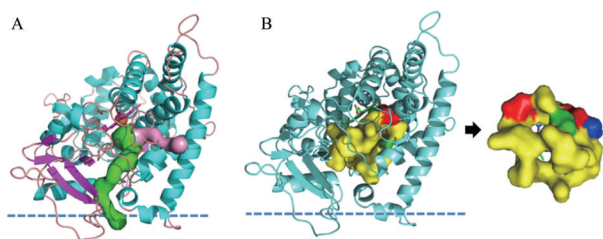


Figure 5 The 3D structural model of the CYP706A3 active site. Reprinted with permission from reference^[23], copyright Danièle Werck-Reichhart. A: Overall structure displaying the two main channels; B: Display of the small internal cavity mostly delineated by hydrophobic residues (in yellow, surface mode). Two apertures are visible, corresponding to egress channels. Polar (green) and charged (red) residues correspond to Thr322 and Asp314, respectively. Thr322 is the only non-hydrophobic residue in contact with the active site cavity

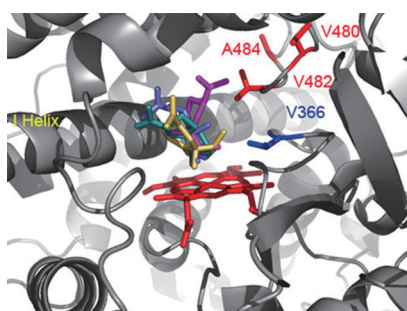


Figure 6 The substrate docking into a modeled CYP71D55 active site. Reprinted with permission from reference^[25], copyright Joe Chappell. A homology model of HPO was created using the mammalian P450 2B4 as template (PDB1SUO), and used for docking experiments with premnaspirodiene (teal), valencene (blue), EA (gold), and EE (magenta)

6 CYP450 的异源表达

具有催化功能的 CYP450 酶已在细菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞中成功表达。在所有表达系统中, 大

肠杆菌表达系统最为简便快捷, 已有大量的 CYP450 在该系统中成功表达。该系统的优势在于方法成熟、成本低廉、易于吸收血红素、背景 P450 干扰小, 以及相对容易获得较高表达水平等, 可供选择的载体与表达菌株较多, 易于对序列进行加工修饰; 同时, 该系统也适合大规模培养。但由于大肠杆菌作为原核生物的固有特性, 该系统面临的最大问题是缺乏真核生物特有的膜系统而无法满足 P450 等膜蛋白的定位要求, 也不能对蛋白进行翻译后或共翻译修饰或正确折叠, 同时缺乏内源性的 CPR 与其他成分来参与 P450 酶系的电子传递。

可以通过多种手段来解决上述问题, 如对序列 N 端进行适当修饰、与 CPR 共表达或融合表达、与分子伴侣共表达、利用细菌信号肽进行细胞周质表达等。Chang 等^[39]的研究利用植物来源的 CYP706B1 和 CYP71AV1 在代谢工程大肠杆菌中成功生产大量的 8-羟基杜松烯和青蒿酸, 表明表达系统的优化、N-末端跨膜结构域的修饰、用从植物内源分离的 CPR 替换拟南芥 CPR, 以及替换表达载体或宿主, 能够大量生产相应的次生代谢产物。另外, Yu 等^[24]将甲氧戊酸下游途径引入到大肠杆菌中, 并与 ZSS1、CYP71BA1 和 CPR 共表达。当甲氧戊酸作为底物时, 工程菌产生了 8-羟基- α -蛇麻烯, 为工程化生产球姜酮奠定了基础。

酵母表达系统相对于大肠杆菌系统更为完善。因为酵母表达系统具有真核生物的内质网膜结构, 通过基因工程改造后可自身表达 CPR 而无需外源引入表达, 使用可诱导启动子有利于产生大量的 P450 蛋白。并且酵母细胞的培养条件简单, 生长周期相对较短, 是研究倍半萜 CYP450s 常用的表达系统。上述参与倍半萜合成的 CYP450 大多是在酵母中异源表达, 从而鉴定功能。较常用的酵母菌株是 WAT11 菌株, 是用拟南芥的 CPR1 替换酵母内源性 CPR 构建的工程化菌株, CPR 效率更高。

然而目前, 次生代谢产物的产生主要限于微生物, 存在很多潜在的问题。比如错误的蛋白质翻译后修饰, 蛋白质微区隔化、底物可获得性、伴侣可获得性、产品毒性和 CPR 的差异。与其他异源系统不同, 植物细胞可能是生产高价值代谢物的一种有前途的替代方案。

利用本氏烟草瞬时表达体系进行 CYP450 酶功能验证与次生代谢产物生产是一种简便快捷的方法, 已被广泛应用。Tian 等^[37]将拟南芥中杜松烯合酶、CYP706B1、乙醇脱氢酶及 CYP82D113 的编码区插入植物双元载体 pCambia1300 中, 转化根癌农杆菌 GV3101, 侵染烟草叶片。在烟草叶片中成功重建了棉酚生物合成的部分通路, 验证了 CYP706B1 的 7-羟基-杜松烯合酶功能

以及CYP82D113的8-羟基-7-酮- σ -杜松烯合酶活性。多毛番茄中的CYP71D184^[33]及毒胡萝卜中的CYP76AE2^[31]也是通过瞬时转化烟草鉴定了活性。然而此方法也存在缺点,比如有些蛋白表达量低或者活性低,不容易产生理想的结果。Eljounaidi等^[28]将刺苞菜蓟中的Germacrene A合酶及CYP71AV9转入烟草,但与对照组相比并没有新产物生成,考虑是该蛋白活性低的原因。

目前一种相对成功的植物生产倍半萜的工程策略利用区隔化的优势已成功开发。通常,倍半萜是通过MVA通路在细胞质中生物合成的,将MVA通路重定向到其他区室如叶绿体^[40]或线粒体^[41-43]可以高效生产倍半萜。例如,将ADS和FDP合成酶靶向到烟草叶绿体中,与ADS在倍半萜生物合成的正常位置细胞质中的表达相比,紫穗槐二烯的产量增加了25 000倍^[40]。这种方法已经通过转基因植物的生产实现了盈利。

7 总结与展望

倍半萜类化合物是自然界中广泛存在的一类萜类天然产物,在植物生命活动、医药、工业等领域发挥重要作用。其上游合成途径的研究已经较为清晰,但从骨架结构的产生到结构多样的终产物的形成,还有多种次级修饰酶的参与。CYP450是一类超基因家族单加氧酶,广泛参与植物次生代谢产物的合成。其数量庞大且催化功能具有杂泛性,来源于不同家族的P450也被发现可以催化同一反应步骤,这些功能丰富的P450为倍半萜类化合物的多样性奠定了基础,同时也为合成生物学以及生物催化提供了丰富的元件库。

目前从植物中分离得到的P450数量不足以解析次生代谢产物合成路径。随着测序技术和生信分析手段的进步,通过系统发育、基因簇和(共)表达分析,可以发现更多新的线索来加速蛋白功能的研究。但这仅仅停留在对候选基因功能的预测方面,由于缺乏底物库的认识,对P450功能的鉴定仍然存在很大的挑战。未来随着基因组、转录组和非靶向代谢组等多组学联合分析,有望发现新的代谢途径中间体和低丰度代谢物,将进一步推动P450功能研究的进展,为更多天然产物合成生物学的研究奠定基础。

作者贡献: 高世玺负责文献检索、分析及文章撰写;戎梅和彭俊祥负责文献检索和分析;徐艳红和魏建和负责文章修改和课题资助。

利益冲突: 所有作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Shi XS, Meng LH, Li XM, et al. Trichocadinins B-G: antimicrobial cadinane sesquiterpenes from *Trichoderma virens* QA-8, an endophytic fungus obtained from the medicinal plant *Artemisia*

- argyi* [J]. *J Nat Prod*, 2019, 82: 2470-2476.
- [2] Tang B, Du X, Long HA, et al. Two new cadinane-type sesquiterpenes from cultures of the basidiomycete *Trichaptum pargame-num* [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31: 2454-2458.
- [3] Xing Y, Li N, Zhou D, et al. Sesquiterpene coumarins from *Ferula sinkiangensis* act as neuroinflammation inhibitors [J]. *Planta Med*, 2017, 83: 135-142.
- [4] Wang X, Zheng B, Ashraf U, et al. Artemisinin inhibits the replication of flaviviruses by promoting the type I interferon production [J]. *Antiviral Res*, 2020, 179: 104810.
- [5] Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution [J]. *Plant J*, 2011, 66: 194-211.
- [6] Leng XF, Qiu XH. Structure, Function and Application Prospects of the Cytochrome P450 Enzyme Family (细胞色素P450酶系的结构、功能与应用前景) [M]. Beijing: Science Press, 2001: 140-171.
- [7] Luo P, Wang YH, Wang GD, et al. Molecular cloning and functional identification of (+)-*d*-cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis [J]. *Plant J*, 2001, 28: 95-104.
- [8] Li XY, Wang ZQ, Sun CY, et al. Cytochrome P450s and their function in plant metabolism [J]. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2016, 44: 129-134.
- [9] Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, et al. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770: 330-344.
- [10] Teoh KH, Polichuk DR, Reed DW, et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the anti-malarial sesquiterpene lactone artemisinin [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 1411-1416.
- [11] Durst F, Nelson DR. Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases [J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 1995, 12: 189-206.
- [12] Paquette SM, Bak S, Feyereisen R. Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Cell Biol*, 2000, 19: 307-317.
- [13] Hansen CC, Nelson DR, Møller BL, et al. Plant cytochrome P450 plasticity and evolution [J]. *Mol Plant*, 2021, 14: 1244-1265.
- [14] Nelson D, Ming R, Alam M, et al. Comparison of cytochrome P450 genes from six plant genomes [J]. *Trop Plant Biol*, 2008, 1: 216-235.
- [15] Field B, Osbourn AE. Metabolic diversification-independent assembly of operon-like gene clusters in different plants [J]. *Science*, 2008, 320: 543-547.
- [16] Haudenschild C, Schalk M, Karp F, et al. Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces*

- cerevisiae* [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 379: 127-136.
- [17] Latunde-Dada AO, Cabello-Hurtado F, Czittrich N, et al. Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 1688-1695.
- [18] Hamberger B, Bak S. Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013, 368: 20120426.
- [19] Wang Q, Hillwig ML, Wu Y, et al. CYP701A8: a rice ent-kaurene oxidase paralog diverted to more specialized diterpenoid metabolism [J]. Plant Physiol, 2012, 158: 1418-1425.
- [20] Cankar K, van Houwelingen A, Goedbloed M, et al. Valencene oxidase CYP706M1 from *Alaska cedar* (*Callitropsis nootkatensis*) [J]. FEBS Lett, 2014, 588: 1001-1007.
- [21] Ralston L, Kwon ST, Schoenbeck M, et al. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-*epi*-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 393: 222-235.
- [22] Mao H, Liu J, Ren F, et al. Characterization of CYP71Z18 indicates a role in maize zealexin biosynthesis [J]. Phytochemistry, 2016, 121: 4-10.
- [23] Boachon B, Burdloff Y, Ruan JX, et al. A promiscuous CYP706A3 reduces terpene volatile emission from arabidopsis flowers, affecting florivores and the floral microbiome [J]. Plant Cell, 2019, 31: 2947-2972.
- [24] Yu F, Okamoto S, Harada H, et al. Zingiber zerumbet CYP71BA1 catalyzes the conversion of α -humulene to 8-hydroxy- α -humulene in zerumbet biosynthesis [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68: 1033-1040.
- [25] Takahashi S, Yeo YS, Zhao Y, et al. Functional characterization of premnaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 31744.
- [26] Diaz-Chavez ML, Moniodis J, Madilao LL, et al. Biosynthesis of sandalwood oil: *Santalum album* CYP76F cytochromes P450 produce santalols and bergamotol [J]. PLoS One, 2013, 8: e75053.
- [27] Celedon JM, Chiang A, Yuen MM, et al. Heartwood-specific transcriptome and metabolite signatures of tropical sandalwood (*Santalum album*) reveal the final step of (*Z*)-santalol fragrance biosynthesis [J]. Plant J, 2016, 86: 289-299.
- [28] Eljounaidi K, Cankar K, Comino C, et al. Cytochrome P450s from *Cynara cardunculus* L. CYP71AV9 and CYP71BL5, catalyze distinct hydroxylations in the sesquiterpene lactone biosynthetic pathway [J]. Plant Sci, 2014, 223: 59-68.
- [29] Cankar K, Houwelingen A, Bosch D, et al. A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene [J]. FEBS Lett, 2011, 585: 178-182.
- [30] Takase H, Sasaki K, Shimori H, et al. Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (*Vitis vinifera*) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (-)-rotundone [J]. J Exp Bot, 2016, 67: 787-798.
- [31] Andersen TB, Martinez-Swatson KA, Rasmussen SA, et al. Localization and in-vivo characterization of *Thapsia garganica* CYP76AE2 indicates a role in thapsigargin biosynthesis [J]. Plant Physiol, 2017, 174: 56-72.
- [32] Andersen TB, Rasmussen SA, Christensen SB, et al. Biosynthesis of tovarol and other sesquiterpenoids in *Thapsia laciniata* Rouy [J]. Phytochemistry, 2019, 157: 168-174.
- [33] Zabel S, Brandt W, Porzel A, et al. A single cytochrome P450 oxidase from *Solanum habrochaites* sequentially oxidizes 7-*epi*-zingiberene to derivatives toxic to whiteflies and various microorganisms [J]. Plant J, 2021, 105: 1309-1325.
- [34] Ikezawa N, Göpfert JC, Nguyen DT, et al. Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism [J]. J Biol Chem, 2011, 286: 21601-21611.
- [35] Frey M, Klaiber I, Conrad J, et al. Characterization of CYP71AX36 from sunflower (*Helianthus annuus* L., Asteraceae) [J]. Sci Rep, 2019, 9: 14295.
- [36] Ramirez AM, Saillard N, Yang T, et al. Biosynthesis of sesquiterpene lactones in pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) [J]. PLoS One, 2013, 8: e65030.
- [37] Tian X, Ruan JX, Huang JQ, et al. Characterization of gossypol biosynthetic pathway [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115: E5410-E5418.
- [38] Park SY, Eun H, Lee MH, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* with electron channelling for the production of natural products [J]. Nat Catal, 2022, 5: 726-737.
- [39] Chang MC, Eachus RA, Trieu W, et al. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s [J]. Nat Chem Biol, 2007, 3: 274-277.
- [40] Wu S, Schalk M, Clark A, et al. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants [J]. Nat Biotechnol, 2006, 24: 1441-1447.
- [41] van Herpen TW, Cankar K, Nogueira M, et al. *Nicotiana benthamiana* as a production platform for artemisinin precursors [J]. PLoS One, 2010, 5: e14222.
- [42] Liu Q, Majdi M, Cankar K, et al. Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and *Nicotiana benthamiana* [J]. PLoS One, 2011, 6: e23255.
- [43] Liu Q, Manzano D, Tanić N, et al. Elucidation and in planta reconstitution of the parthenolide biosynthetic pathway [J]. Metab Eng, 2014, 23: 145-153.