

微生物细胞色素P450酶及其对异源物质的代谢研究进展*

丁俊美 李国涛 黄遵锡**

云南师范大学生物能源持续开发利用教育部工程中心 昆明 650500

摘要 细胞色素P450是一类广泛存在于动植物和微生物中的亚铁血红素-硫醇盐蛋白超家族,参与外源物质如药物、除草剂、杀虫剂和许多持久性难降解有机污染物等的生物氧化和降解。基于近年来文献综述P450酶的命名及分类、结构和催化机制,并总结微生物来源的P450酶在代谢和降解异源物质方面取得的研究进展。P450基因超家族主要依赖于氨基酸序列一致性进行统一命名和分类;P450酶结构虽较为保守,但其对底物的识别位点缺乏保守性,是构成其催化多样性的结构基础;细菌和真菌来源的部分P450酶能够代谢和降解异源物质,如多环芳烃、除草剂等,但效率较低,实际应用可能性较小。未来结合各种组学,需继续挖掘高效降解异源物质的P450酶资源,并对已有对异源物质有降解作用的P450酶进行蛋白分子改造,提高其活性并实现污染环境的生物修复。(图2参49)

关键词 细胞色素P450;生物修复;异源物质;酶工程

CLC X172 : Q55

Research progress in microbial cytochrome P450 and xenobiotic metabolism*

DING Junmei, LI Guotao & HUANG Zunxi**

Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

Abstract Cytochrome P450 (CYP450s) is a type of heme-mercaptide protein superfamily, which is distributed widely in animals, plants, and microorganisms. CYP450s can oxidize and degrade many exogenous compounds such as drugs, herbicides, pesticides, some persistent organic pollutants, and so on. Based on recent researches, this paper reviews the nomenclature, classification, structure, and catalytic mechanism of P450 enzymes, and summarizes the research progresses in the metabolism and biodegradation of xenobiotics using P450 enzymes from microorganisms. The nomenclature and classification of the P450 gene superfamily mainly rely on the similarities of amino acid sequences. Although the structures of P450 are conserved, their recognition sites towards the substrates are variable. This is also the structural basis for the catalytic diversities of P450 enzymes. Few P450 enzymes from bacteria and fungi can metabolize and degrade xenobiotics such as polycyclic aromatic hydrocarbons, herbicides, and so on. However, these P450 enzymes are less likely be used in practical applications because of their low catalytic activities. In the future, more P450 enzymes with high degradable efficiencies towards xenobiotics are needed to be obtained using multiple omics tools or modifying the existing P450 enzymes, to achieve the bioremediation of the environment.

Keywords cytochrome P450; bioremediation; xenobiotic; enzyme engineering

细胞色素P450酶(Cytochrome P450, CYP450)是一类以还原态与一氧化碳(CO)结合且在波长450 nm处有吸收峰的含血红素的铁硫蛋白^[1],最先在哺乳动物肝微粒体中被发现^[2]。其能插入一个氧原子到疏水性分子中,使它们变得更加有活性或者亲水性,所以又被称为单加氧酶。单加氧酶又称单氧酶、羟化酶、羟氧酶,是一种多酶复合体,一般是由细胞色素P450、黄素蛋白-NADPH-P450还原酶、黄素蛋白-NADH-

细胞色素b5还原酶、细胞色素b5以及磷脂组成,它们共同构成电子传递链^[3]。P450为整个酶系中的末端氧化酶,不仅负责活化氧分子,同时负责与底物结合,并决定酶系底物的专一性,在整个酶系功能中起关键作用,其作用示意图如图1^[4]。

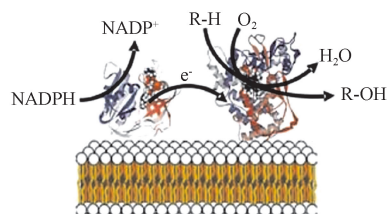


图1 细胞色素P450单加氧酶(右)及还原酶(左)电子传递示意图^[4]。
Fig. 1 Reaction scheme of cytochrome P450 monooxygenases (right) and electron supply by cytochrome P450 reductase (left) ^[4].

收稿日期 Received: 2017-06-21 接受日期 Accepted: 2017-08-24

*国家自然科学基金项目(31460022, 31600083)和云南省自然科学基金项目(2016FB036)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31460022, 31600083) and the Natural Science Foundation of Yunnan Province (2016FB036)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: huangzunxi@163.com)

细胞色素P450酶系广泛分布于原核生物和真核生物中。在原核生物中, P450酶是一种游离于细胞质中的、可溶性的蛋白; 在真核生物中, P450酶主要分布在微粒体、内质网和线粒体内膜上, 是一种膜结合蛋白^[5]。因其具有较高的区域选择性和立体选择性, 可以在较温和的条件下在有机物化合物中引入氧, 能够参与各种内源性物质, 如甾类激素、脂肪酸和维生素等化合物的生物合成及药物、杀虫剂、除草剂和持久性难降解有机物等异源物质的生物氧化和降解, P450酶系被认为可能是自然界中最具催化作用的生物催化剂之一^[3]。所涉及的催化反应主要包括C-H结合的羟基化反应、N-脱烷基化作用、N-羟基化反应、O-脱烷基化作用、S-氧化作用、环氧化和磺化作用等^[4]。鉴于P450酶具有参与催化反应的多功能、底物多样性和非典型动力学性质, 其在环境修复、工业合成药品、农药和食品材料、毒理学以及癌症研究中都具有重要的研究应用价值和前景, 因此备受各国研究学者关注^[5-6]。

1 细胞色素P450酶

1.1 P450酶的基本分类

1993年, Nelso等制定了P450酶基因超家族内进化关系的统一命名法^[7]: 当新发现的P450基因的氨基酸序列与已报道的P450基因的氨基酸序列一致性> 40%时, 二者可以归为同一个家族, 表示为CYP后标—阿拉伯数字, 如CYP1; 若< 40%时, 该P450基因可被归为一个新的P450家族 (Family: 1, 2, 3……); 若两条P450基因的氨基酸序列一致性> 55%, 二者可以被归为同一个亚家族 (Subfamily: A, B, C……), 表示为在家族的表示后面加一个大写字母, 如CYP1D; 若两个P450基因的氨基酸序列一致性介于40%-55%之间, 则二者可以被归为同一个家族的两个不同亚家族 (如CYP3A, CYP3B等)。

由于P450基因是一个古老的超基因家族, 其数量大、多样性广泛, 除了统一命名法外, 也产生了其他一些分类标准, 主要包括: ① 根据P450酶的来源分为动物P450酶、植物P450酶、真菌P450酶、细菌P450酶和古菌P450酶等^[8]; ② 根据催化反应类型分为异构酶、环氧化酶和羟化酶等^[9]; ③ 根据催化反应过程中P450酶所需的电子传递系统分为Class I-X。Class I电子传递系统包含铁氧还蛋白还原酶 (Ferredoxin reductase, FdR) 和铁氧还蛋白 (Ferredoxin, Fdx), 常见于大部分细菌的可溶性P450蛋白^[10]; Class II, 多见于真核生物, 电子传递系统为NADPH-细胞色素还原酶, 以N端锚定的方式位于膜上 (如内质网膜)^[11]; Class III, 电子传递系统为黄素单核苷酸 (Flavin mononucleotide, FMN)/黄素氧还蛋白 (Flavodoxin, FAD), 最先被报道的为CYP176A蛋白, 分离自布氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter braakii*)^[12]; Class IV, 不需要从NAD(P)H还原酶获得电子, 最先被报道的为CYP119, 分离自嗜酸嗜热的古菌 *Sulfolobus solfataricus*^[13]; Class V, 在C端通过短的连接 (Short linker) 与Fdx的3Fe-4S结合, 代表为来源于荚膜甲基球菌 (*Methylococcus capsulatus*) 的CYP51^[14]; Class VI, 在N端Fdx结构域和C端血红素结构域之间编码一个自然融合蛋白, 典型代表为CYP177A1, 分离自红球菌属 (*Rhodococcus*

rhodochrous)^[15]; Class VII, 含有FMN/Fe₂S₂的还原天然电子供体, 如*Rhodococcus* sp. NCIMB 9784中的CYP116B2^[16]; Class VIII, 此P450酶是一类在C端含有融合了N端血红素结构域和类似于真核CPR结构域的复合体, 最先被发现的是CYP102A1 (P450BM-3), 分离自巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)^[17]; Class IX, 是一类从NADH得到电子的、可溶性的、真核一氧化氮还原酶, 如CYP55, 分离自尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)^[18]; Class X, 此类P450酶不需要氧化还原反应, 依赖于分子内的传输系统, 常见于植物和动物的CYPs^[19]。

1.2 P450酶的结构和催化机制

细胞色素P450酶“多才多艺”, 不仅具有催化反应类型和底物结构多样性等特点, 且其催化反应具有高度的立体和区位选择性。P450酶可识别的底物结构类型包括芳香族化合物、大环内酯、萜类、脂肪酸、甾醇族、生物碱、多肽类等, 催化反应类型多达20余种, 常见的如C=C双键的环氧化、sp³杂化 (sp³ hybridization) 的C—H键的羟基化等。认识P450酶的结构能够更好了解其对不同底物的催化机制。例如人体中很多P450酶是药物的靶标, 对P450酶结构的了解对于药物设计具有很重要的指导作用, 通过对微生物来源的P450酶结构的认知, 能够更好地了解P450酶在催化生物反应过程中的作用机制及根据结构来设计、改造酶分子。

鉴定P450酶的主要特征是其含有一个保守的血红素结合域FxxGxRxCxG^[20]。1985年, Poulos首次解析并报道了来源于恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的P450cam (PDB 1CPP) 晶体结构^[21], 迄今为止, 大约有600个微生物P450酶结构被解析^[20]。由于大部分植物和动物来源的P450酶为膜蛋白, 相对于可溶性的、微生物来源的P450酶的分离和纯化来说较困难, 因此, 在PDB数据库中 (Protein data bank), 哺乳动物来源的P450酶的结构解析数量较微生物来源的要少。目前大约有200个哺乳动物来源的P450酶结构被解析^[22]。P450酶结构较为保守: 其核心结构由4个螺旋 (α-helix) 结构D、E、I和L共同组成。催化过程中氧分子的激活由I螺旋上的氨基酸残基参与完成; 位于L-螺旋N端的半胱氨酸残基通过硫醇键与亚铁血红素中铁原子相连, 具有绝对保守性 (图2)。然而, P450酶对底物的识别位点缺乏保守性, 不同P450酶对底物的识别位点具有很大差异性, 是构成P450酶对底物催化多样性的结构基础^[21]。

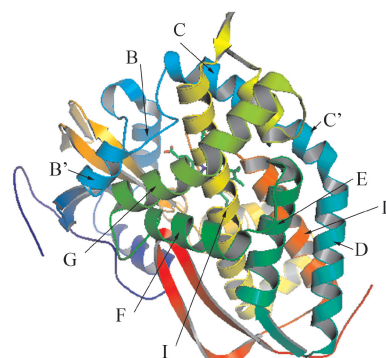


图2 P450cam的晶体结构 (PDB ID: 2CPP)^[23]。
Fig. 2 The crystal structure of P450cam (PDB ID: 2CPP)^[23]。

电子传递系统参与P450酶的催化过程:还原性辅酶II NAD(P)H的2个电子经电子传递系统顺序传递到亚铁血红素反应中心实现O₂分子的激活。在此过程中,一个氧原子与底物结合形成羟基、环氧基等基团,另一个氧原子被还原为一分子水。李众等在细胞色素P450酶与微生物药物创制一文中对P450酶的催化机制进行了详细介绍^[23]。概括来说,此催化反应式为 $RH + O_2 + NAD(P)H + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NAD(P)^+$ (RH代表底物),在这个反应过程中需要FeO³⁺化合物的参与。同理,这个催化反应也应用于去饱和作用、C-C键的断裂、芳基环的耦合(Aryl ring couplings)、杂原子脱烷基化作用(Heteroatom dealkylation)、杂原子的氧化作用和环的形成等^[20]。虽然越来越多的P450酶的结构被解析,其催化机制也逐步被阐释,但仍有很多问题需要解决。例如,目前被解析的基本都是单个P450酶的结构,对于P450酶与底物或者伴侣蛋白复合物的结构解析较少,而P450酶基本都是与还原伴侣蛋白一起发挥作用,因此P450与其他蛋白或者底物复合物的结构解析仍需要将来更加深入和广泛的研究。

2 微生物来源的细胞色素P450酶代谢异源物质

微生物由于个体微小、结构简单、生长繁殖快、代谢类型多、活性强且分布广泛等优势,是CYP450酶研究的较好来源。随着测序技术迅速发展及测序成本不断降低,越来越多的微生物基因组或来源于环境中不可培养微生物的宏基因组被测序,大量P450基因被注释及功能被挖掘,越来越多的P450酶被发现参与环境中异源物质的代谢和降解。因此,P450酶在医药、农业、生物、环保等各个领域中的应用均受到广泛关注。到目前为止,已有超过2万条微生物来源的P450基因被报道(NCBI数据库):真菌来源的P450基因的序列大约有16 688条,细菌来源的P450基因序列大约有7 590条,古菌77条,病毒24条。其中,阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)中有33个P450基因^[20],构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中有111个P450基因^[24],天蓝色链霉菌(*S. coelicolor* A3(2))中有18个P450基因^[25],黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)中有150个P450基因^[26],褐腐菌(*Postia placenta*)中有250个P450基因^[27],包皮垢分支杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中有40个P450基因^[28]。随着对肠道微生物研究的深入,越来越多的肠道微生物的P450基因也被挖掘^[29]。然而,这些已报道的P450基因大部分是基于序列同源性分析推测得到的,并未通过酶学实验证实。以下从细菌和真菌两个来源论述目前已报道的P450酶对异源物质的代谢并分析其不同代谢机制。

2.1 细菌来源的细胞色素P450酶

Sekine等在红球菌、分枝杆菌、变形菌门中以及通过利用宏基因组技术挖掘了很多CYP153家族酶,然而仅是对这些菌株中所分析到的可能的P450基因进行了克隆及异源表达,发现重组菌株在含有烷烃的培养基中能够生长,并未得到可以应用的高效降解异源物质的P450酶基因或重组菌株^[30];Wang等从红球菌属*Rhodococcus* sp. Strain T3-1中鉴定到了CYP450家族的EthBAD能够对除草剂乙草胺进行N-脱

烷基作用转化低除草活性或无除草活性的2-氯-N-乙酰胺,但EthBAD依旧达不到能够在实际应用的水平^[31];Malandain通过对分离自不同环境、不同时间的红球菌IFP 2001, IFP 2005,和IFP 2009对汽油添加剂甲基叔丁醚(MTBE)、乙基叔丁醚(ETBE)和甲基叔戊基醚(TAME)的降解能力进行了比较,发现3株菌均具有利用MTBE、ETBE和TAME的能力,且CYP249在这一过程中发挥了重要作用。而ethB基因(编码细胞色素P450酶)对ETBE的降解起着重要作用,对MTBE和TAME不具有降解作用,说明不同的细胞色素P450酶具有催化降解不同底物的能力^[32]。虽然红球菌IFP 2001、IFP 2005、IFP 2009还未达到实际应用的水平,但却提供了较好的P450酶的基因资源,后续通过对P450酶的分子改造,以期达到实际应用的目的;2012年,Tsotsou等人通过对CYP2C进行改造,当把天冬氨酸和谷氨酸双突变后(Asp251Gly/Gln307His),突变子具有分解双氯芬酸、布洛芬和甲苯磺丁脲的能力^[33];抗辐射不动杆菌*Acinetobacter radioresistens* S13能够在中等碳链长度(C14, C16)和长链烷烃(C24, C36)的培养基上生长,而细胞色素P450酶CYP116B5在烷烃的利用中起着重要作用^[34];2017年,Sun等人报道,来自于链霉菌属(*Sebekia benihana*)和假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia autotrophica*)的微生物具有分解免疫抑制剂环孢菌素A(Cyclosporin A)的能力^[35];来自于*Cupriavidus metallidurans*中的CYP116B1具有催化水解除草剂的能力^[36];来自于*Streptomyces griseus*的P450可以氧化诸如苯并[a]芘、红霉素和睾酮等一系列物质^[37]。而这些研究局限在挖掘P450酶对不同异源物质是否具有分解作用并通过质谱对P450酶与底物反应后的反应物进行检测,真正具有实际应用价值的P450酶较少。

2.2 真菌来源的细胞色素P450酶

相比于细菌,真菌来源的CYP450研究则较为多样,酶系结构也较为复杂。2010年,Syed等人通过基因组筛选的方法在黄孢原毛平革菌中得到6条P450基因,当用不同的多环芳烃(PAHs)诱导时,例如萘、菲、芘和苯并[a]芘等诱导时,6条P450基因的表达量发生了变化,暗示可能参与了PAHs的分解作用。文章仅从基因水平上分析了用PAHs对菌株诱导时,P450基因表达上升,推测P450可能参与多环芳烃代谢,对P450酶对PAHs的降解机制并未进行深入研究^[38];Syed等从黄孢原毛平革菌中鉴定到细胞色素P450酶CYP5136A3对环境PAHs和内分泌干扰物烷基酚具有氧化作用,而CYP5136A3中129位的Trp和324位的Leu在氧化过程中起了重要作用^[39];Syed等从黄孢原毛平革菌中分离鉴定的CYP63A2可以催化多环芳香烃、烷基酚和烷烃类降解,是首次发现的能介导催化多种底物的CYP450,能用于处理环境中的混合污染物等^[40];Ning等发现黄孢原毛平革菌中具有水解农药五氯苯酚的能力,其中细胞色素P450酶在这一过程中起了主要作用^[41];CYP61是结构和功能上比较保守的真菌P450家族,可以代谢芳香烃化合物苯并[a]芘^[42]。对已报道的真菌来源的P450酶仍需对其进行后续改造,提高其对底物的利用效率,实现污染环境的生物修复作用。

此外,近年来,随着肠道微生物学领域的迅速发展,很多来源于肠道微生物中的P450酶逐渐被认知,来源于人类肠道的微生物在代谢药物及人体内其他异源物质过程中发

挥着重要的作用。例如, 2015年, Jandhyala等报道, 肠道微生物具有代谢对甲酚和伊立替康(治疗结肠癌新药)的能力^[43]; 2016年, Jourouva等报道, 肠道微生物在柳氮磺胺吡啶(溃疡性结肠炎药物)、纳布美通(治疗风湿性关节炎)和甲硝唑(用于治疗厌氧菌引起的感染)的代谢过程中发挥着作用^[44]; 从甲虫 *Dendroctonus rhizophagus* 肠道中分离到的微生物 *Candida oregonensis* 中的细胞色素P450酶具有代谢异源物质的能力等^[45]。随着对肠道微生物组研究的深入, 越来越多的肠道微生物中细胞色素P450酶基因将被挖掘和功能验证, 这也是对现有P450酶资源较好的补充。

综上, 虽然阐述了很多关于细菌或真菌来源的P450酶参与异源物质的代谢, 但总体来说, P450酶在原始菌株中存在表达量低、活性不稳定、分离较为困难、寿命较短以及选择的底物范围较小等缺点而不能被广泛应用。对于未知遗传操作体系的非模式微生物来说, 对原始菌株的改造也具有很大难度。因此, 为了达到实际应用的目的, 对分离到的、能够代谢异源物质的P450酶进行合理改造, 也是解决这一问题的一种理想途径。

2.3 细胞色素P450酶新功能的挖掘和改造

蛋白改造的方法主要包括定向进化和依据于蛋白结构的理性设计和半理性设计。定向进化一般通过随机突变和基因重组使P450基因发生突变, 并利用快速高通量筛选方法获得具有目标功能的酶^[23]。利用这两种方法, 已得到对P450酶成功改造并应用于异源物质降解的例子。例如, 2013年, Sideri等人通过对P450 BM3定向改造(易错PCR和DNA重组技术)后, 获得的3个突变子对多环芳烃(屈和芘)的羟化活力较野生酶有较大提高。对于屈的羟基化来说, 野生酶P450 BM3和3个突变子M3、P2和K4对屈的结合和催化活力 K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$) 分别为0.26、185、77和18; 对于芘来说, 由于其可溶性较差, 无法对其进行动力学参数测定。因此, P450酶对芘的催化活性用P450与NADPH的耦合能力(Coupling efficiency, %)来表示: 野生酶P450 BM3和3个突变体M3、P2和K4与NADPH的耦合能力分别为0.07%、78.90%、68.40%、98.40%。且发现3个突变体的突变位点远离活性中心, 因此, 从另一个角度说明定向进化有时具有理性设计不具备的优势^[46]。虽然定向进化方法工作量大、费时、费力、且阳性率较低, 但也是建立功能多样化P450酶库的重要手段; 理性和半理性对P450酶的改造是基于对P450酶三维结构有一定认识的前提下对蛋白进行的改造, 相对于定向进化, 此种方法获得的突变体库较小, 更容易获得目的突变体。例如, Syed等通过对真菌黄孢原毛平革菌来源的P450 CYP5136A3进行理性设计得到突变体。L324F单突变体和W129F/L324F双突变体对芘和菲的氧化活性明显提高^[47]; 此外, Christopher等人利用P450 BM3酶为出发模板, 通过对其改造得到具有新功能的P450酶的突变体, 实现了分子间的氮杂环丙烷化等^[48]。因此, 对已有P450酶的改造, 可以实现其对底物的识别, 进而实现功能的特定选择, 得到目标酶, 如改造后的P450酶可以应用于对特殊污染土壤的生物修复。

鸡枞菌是一种和白蚁共生才能生长的大型食用真菌, 仅在西南、东南几省及台湾地区生长。本课题组前期采用454 GS FLX Titanium高通量测序技术对云南省鸡枞菌子实体转

录组进行了测序, 并对测序结果进行了拼接和序列功能注释^[49]。从鸡枞菌的EST文库中找到了6条可能编码CYP450的基因。NCBI Blast结果显示, 这6条基因与数据库中氨基酸序列的相似性都在51%以下, 属于序列较新的基因。目前, 课题组已得到6条CYP450的基因片段, 完成了在大肠杆菌及毕赤酵母中的异源表达。鉴于云南地区在环境污染修复方面研究的薄弱以及环境生物修复的重要性, 课题组将利用得到的CYP450酶以及后续通过对这些酶进行合理的改造, 赋予酶新的功能和更高的催化活性, 应用它们开展异源环境污染物的降解。已报道的P450酶在异源物质代谢和降解方面的研究为我们对鸡枞菌来源的P450酶的深入研究和工程改造提供了较好的理论数据和前期基础经验支撑。随着测序技术的发展及测序成本的降低, 人类将会有更多的机会和机遇去探讨不为人知的生命奥秘, 也将会有越来越多新的功能基因及其作用机制被挖掘和解析, 其功能也会逐渐被应用。

3 问题与展望

近年来, 随着人类对健康、环境以及微生物耐药性等问题关注度的提高, 能够应用于解决这些问题的P450酶的深入研究备受重视。例如, P450酶能够降解多氯联苯、多环芳烃、二恶英类等环境污染物, 在污染环境的生物修复过程中起重要作用。然而, 由于P450酶对不同底物的识别位点差异较大, 以及P450酶在使用过程中存在低稳定性、低活力以及对于还原伴侣蛋白和辅因子依赖等因素, 导致真正具有实际应用价值、对有害异源物质具有较高代谢活性的P450酶较少。已报道的细菌或真菌来源的P450酶研究局限在其对底物异源物质是否有作用, 然而关于P450酶对底物的代谢机制研究较少, 且真正具有较高活性的P450酶也较少。未来, 结合基因组学、蛋白组学以及转录组学, 新的、具有较高活性的P450酶仍需不断被挖掘; 同时, 跟据实际需要, 对已报道的、对异源物质具有作用的P450酶进行蛋白分子改造, 提高其活性, 达到实际应用的目的。

参考文献 [References]

- Girvan HM, Munro AW. Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology and synthetic biology [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, **31**: 136-145
- Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1958, **75** (2): 376-386
- 李莉. 污泥及土壤中有毒有机污染物的离体生物毒性效应研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2012 [Li L. *In vitro* toxicity of toxic organic pollutants in sewage sludge and soil [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2012]
- Schroer K, Kittelmann M, Lutz S. Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, **106** (5): 699-706
- 安俊峰, 王运浩, 侯鑫. 鸡细胞色素P450 1A5的原核表达与活性重组[J]. 生物技术通报, 2012, **6**: 94-98 [An JF, Wang YH, Hou X. Prokaryotic expression and recombinant activity of chicken cytochrome P450 1A5 [J]. *Biotechnol Bull*, 2012, **6**: 94-98]
- Morel M, Meux E, Mathieu Y, Thuillier A, Chibani K, Harvengt L,

- Jacquot JP, Gelhave E. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2013, **6** (3): 248-263
- 7 Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. The P450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature [J]. *DNA Cell Biol*, 1993, **12** (1): 1-51
 - 8 Burkina V, Rasmussen MK, Pilipenko N, Zamaratskaia G. Comparison of xenobiotic-metabolising human, porcine, rodent, and piscine cytochrome P450 [J]. *Toxicol*, 2017, **375**: 10-27
 - 9 Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, **14** (6): 611-650
 - 10 Chun YJ, Shimada T, Sanchez-Ponce R, Martin MV, Lei L, Zhao B, Kelly SL, Waterman MR, Lamb DC, Guengerich FP. Electron transport pathway for a *Streptomyces* cytochrome P450: cytochrome P450 105D5-catalyzed fatty acid hydroxylation in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282** (24): 17486-17500
 - 11 Tiedje C, Holland DG, Just U, Hofken T. Proteins involved in sterol synthesis interact with Ste20 and regulate cell polarity [J]. *J Cell Sci*, 2007, **120**: 3613-3624
 - 12 Hawkes DB, Adams GW, Burlingame AL, Ortiz de Montellano PR, De Voss JJ. Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (31): 27725-27732
 - 13 Puchkaev AV, Ortiz de Montellano PR. The *Sulfolobus solfataricus* electron donor partners of thermophilic CYP119: an unusual non-NAD(P)H dependent cytochrome P450 system [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, **434** (1): 169-177
 - 14 Jackson CJ, Lamb DC, Marczylo TH, Warrilow AG, Manning NJ, Lowe DJ, Kelly DE, Kelly SL. A novel sterol 14 α -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (49): 46959-46965
 - 15 Chong CS, Sabir DK, Lorenz A, Bontemps C, Andeer P, Stahl DA, Strand SE, Rylott EL, Bruce NC. Analysis of the xplAB-containing gene cluster involved in the bacterial degradation of the explosive hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, **80** (21): 6601-6610
 - 16 Roberts GA, Celik A, Hunter DJ, Ost TW, White JH, Chapman SK, Turner NJ, Flitsch SL. A self sufficient cytochrome P450 with a primary structural organisation that includes flavin domain and a (2Fe-2S) redox center [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (49): 48914-48984
 - 17 Wen LP, Fulco AJ. Cloning of the gene encoding a catalytically self-sufficient cytochrome P450 fatty-acid monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium* and its functional expression and regulation in heterologous (*Escherichia coli*) and homologous (*Bacillus megaterium*) hosts [J]. *J Biol Chem*, 1987, **262** (14): 6676-6682
 - 18 Tomura D, Obika K, Fukamizu A, Shoun I. Nitric oxide reductase cytochrome *P-450* gene, *CYP55*, of the fungus *Fusarium oxysporum* containing a potential binding-site for FNR, the transcription factor involved in the regulation of anaerobic growth of *Escherichia coli* [J]. *J Biochem*, 1994, **116** (1): 88-94
 - 19 Song WC, Funk CD, Brash AR. Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialised for the metabolism of fatty acid hydroperoxides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (18): 8519-8523
 - 20 Guengerich FP, Waterman MR, Egli M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, **37** (8): 625-640
 - 21 Poulos TL, Finzel BC, Gunsalus IC, Wagner GC, Kraut J. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450 [J]. *J Biol Chem*, 1985, **260** (30): 16122-16130
 - 22 Guengerich FP. Human Cytochrome P450 Enzymes [M]//Cytochrome P450. Springer International Publishing, 2015.
 - 23 李众, 张伟, 李盛英. 细胞色素P450酶与微生物药物创制[J]. 微生物学报, 2016, **56** (3): 496-515 [Li Z, Zhang W, Li SY. Cytochrome P450 enzymes and microbial drug development [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2016, **56** (3): 496-515]
 - 24 Kelly DE, Kraševac N, Mullins J, Nelson DR. The CYPome (cytochrome P450 complement) of *Aspergillus nidulans* [J]. *Fungal Genet Biol*, 2009, **46** (1): S53-S61
 - 25 Lamb DC, Skaug T, Song HL, Jackson CJ, Podust LM, Waterman MR, Kell DB, Kelly DE, Kelly SL. The cytochrome P450 complement(CYPome) of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (27): 24000-24005
 - 26 Warrilow A, Ugochukwu C, Lamb D, Kelly D, Kelly S. Expression and characterization of CYP51, the ancient sterol 14-demethylase activity for cytochromes P450(CYP), in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Lipids*, 2008, **43** (12): 1143-1153
 - 27 Ide M, Ichinose H, Wariishi H. Molecular identification and functional characterization of cytochrome P450 monooxygenases from the brown-rot basidiomycete *Postia placenta* [J]. *Arch Microbiol*, 2012, **194** (4): 243-253
 - 28 Kelly SL, Lamb DC, Jackson CJ, Warrilow AG, Kelly DE. The biodiversity of microbial cytochromes P450 [J]. *Adv Microb Physiol*, 2003, **47**: 131-186
 - 29 Hernández-Martínez F, Briones-Roblero CI, Nelson DR, Rivera-Orduna FN, Zuniga G. Cytochrome P450 complement(CYPome) of *Candida oregonensis*, a gut-associated yeast of bark beetle, *Dendroctonus rhizophagus* [J]. *Fungal Biol*, 2016, **120** (9): 1077-1089
 - 30 Van Beilen JB, Funhoff EG, van Loon A, Just A, Kaysser L, Bouza M, Holtackers R, Rothlisberger M, Li Z, Witholt B. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72** (1): 59-65
 - 31 Wang F, Zhou J, Li ZK, Dong WL, Hou Y, Huang Y, Cui ZL. Involvement of the cytochrome P450 system EthBAD in the N-dedthoxymethylation of acetochlor by *Rhodococcus* sp. strain T3-1 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, **81** (6): 2182-2188
 - 32 Malandain C, Fayolle-Guichard F, Vogel TM. Cytochromes P450-mediated degradation of fuel oxygenates by environmental isolates [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2010, **72** (2): 289-296
 - 33 Tsotsou GE, Sideri A, Goyal A, Di Nardo G, Gilardi G. Identification of mutant Asp251Gly/Gln307His of cytochrome P450 BM3 for the generation of metabolites of diclofenac, ibuprofen and tolbutamide [J]. *Chemistry*, 2012, **18** (12): 3582-3588
 - 34 Minerdi D, Sadeghi SJ, Di Nardo G, Rua F, Castrignano S, Allegra P, Gilardi G. CYP116B5: a new class VII catalytically self-sufficient cytochrome P450 from *Acinetobacter radioresistens* that enables growth on alkanes [J]. *Mol Microbiol*, 2015, **95** (3): 539-554

- 35 Sun Y, Ma L, Han DF, Du L, Qi FX, Zhang W, Sun JR, Huang S, Kim ES, Li SY. In vitro reconstitution of the cyclosporine specific P450 hydroxylases using heterologous redox partner proteins [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, **44** (2): 161-166
- 36 Warman AJ, Robinson JW, Luciakove D, Lawrence AD, Marshall KR, Warren MJ, Cheesman MR, Rigby SE, Munro AW, Mclean KJ. Characterization of *Cupriavidus metallidurans* CYP116B1-A thiocarbamate herbicide oxygenating P450-phthalate dioxygenase reductase fusion protein [J]. *FEBS J*, 2012, **279** (9): 1675-1693
- 37 Taylor M, Lamb DC, Cannell R, Dawson M, Kelly SL. Cytochrome P450D1(CYP105D1) from *Streptomyces griseus*: heterologous expression, activity, and activation effects of multiple xenobiotics [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **263** (3): 838-842
- 38 Syed K, Doddapaneni H, Subramanian V, Lam YW, Yadav JS. Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **399** (4): 492-497
- 39 Syed K, Porollo A, Lam YW, Yadav JS. A fungal P450 (CYP5136A3) capable of oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons and endocrine disrupting alkylphenols: role of Trp¹²⁹ and Leu³²⁴ [J]. *PLoS ONE*, 2011, **6** (12): e28286
- 40 Syed K, Porollo A, Lam YW, Yadav JS. CYP63A2, a catalytically versatile fungal P450 monooxygenase capable of oxidizing higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols, and alkanes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, **79** (8): 2692-2702
- 41 Ning DL, Wang H. Involvement of cytochrome P450 in pentachlorophenol transformation in a white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *PLoS ONR*, 2012, **7** (9): e45887
- 42 Kelly SL, Lamb DC, Baldwin BC, Corran AJ, Kelly DE. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272** (15): 86-99
- 43 Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar RD. Role of the normal gut microbiota [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, **21** (29): 8787-8803
- 44 Jourova L, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2016, **160** (3): 317-326
- 45 Hernandez-Martinez F, Briones-Roblero CI, Nelson DR, Rivera-Orduna FN, Zuniga G. Cytochrome P450 complement (CYPome) of *Candida oregonensis*, a gut-associated yeast of bark beetle, *Dendroctonus rhizophagus* [J]. *Fungal Biol*, 2016, **120** (9): 1077-1089
- 46 Sideri A, Goyal A, Di Nardo G, Tsotsou GE, Gilardi G. Hydroxylation of non-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons by cytochrome P450 BM3 engineered by directed evolution [J]. *J Inorg Biochem*, 2013, **120**: 1-7
- 47 Syed K, Porollo A, Miller D, Yadav JS. Rational engineering of the fungal P450 monooxygenase CYP5136A3 to improve its oxidizing activity toward polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2013, **26** (9): 553-557
- 48 Farwell CC, Zhang RK, McIntosh JA, Hyster TK, Arnold FH. Enantioselective enzyme-catalyzed aziridination by active-site evolution of a cytochrome P450 [J]. *ACS Cent Sci*, 2015, **1** (2): 89-93
- 49 Yang F, Xu B, Zhao SJ, Yang YJ, Tang XH, Wang F, Peng MZ, Huang ZX. De novo sequencing and analysis of the termite mushroom (*Termitomyces albuminosus*) transcriptome to discover putative genes involved in bioactive component biosynthesis [J]. *J Biosci Bioeng*, 2012, **114** (2): 228-231