

## 甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶(CYP51)的研究进展

杨娇艳<sup>1</sup>, 廖明军<sup>1,2</sup>, 杨劭<sup>1</sup>

1 华中师范大学生命科学院, 武汉 430079

2 中国科学院病毒研究所 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071

**摘要:** 甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶(CYP51)是分布最广的细胞色素 P450 家族成员, 是生物甾醇合成过程中的关键酶。故 CYP51 不仅是细胞色素 P450 蛋白结构、功能、结构与功能关系等研究的模板, 而且是重要的降胆固醇药物、抗真菌药物和除草剂作用靶标, 具有重要的经济价值。以下就 CYP51 家族的序列特征、功能(生理功能和生化特征)、结构、结构与功能的关系、CYP51 活性的抑制等方面的研究进展进行了综述。并对 CYP51 抑制剂的研局限方面进行了讨论, 探讨了 CYP51 抑制剂设计开发的相关问题。

**关键词:** CYP51, 14 $\alpha$ -去甲基化酶, 功能, 结构, 抑制

## Advances in Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51)

Jiaoyan Yang<sup>1</sup>, Mingjun Liao<sup>1,2</sup>, and Shao Yang<sup>1</sup>

1 College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

2 State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

**Abstract:** Sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51), the most widely distributed member of the P450 superfamily, is the key enzyme in sterol biosynthesis pathway. CYP51 is not only an important model for fundamental P450 structure/function studies, but also an important target protein of cholesterol-lowering agents, antifungal drugs and herbicides. This article reviewed the research advances in CYP51 at various aspects, including sequence characteristics, physiological roles, catalytic properties in vitro, protein structure, structure-function relationships and inhibition of CYP51. The problems remained in current research and designations of CYP51 inhibitors are also discussed.

**Keywords:** CYP51, sterol 14 $\alpha$ -demethylase, function, structure, inhibition

甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶(Sterol 14 $\alpha$ -demethylase, P450<sub>14DM</sub>, CYP51)是生物甾醇合成过程中的一个关键酶<sup>[1]</sup>, 属于细胞色素 P450 超家族, 催化甾醇前体 14 $\alpha$ -甲基羟基化反应<sup>[2,3]</sup>。大多数甾醇如胆固醇(动物)、麦角甾醇(真菌)和谷甾醇(植物)都是质膜的组分<sup>[4]</sup>, 甾醇的缺乏导致膜结构和功能消失, 故 CYP51 作为生

物甾醇合成过程中的一个关键酶, 成为降胆固醇药物、抗真菌药物和除草剂作用的重要靶标<sup>[2,5]</sup>。

CYP51 已经有 30 多年的研究历史<sup>[6]</sup>。1984 年首次从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中纯化出能催化底物 14 $\alpha$ -去甲基的酶<sup>[7]</sup>, 随后测定了其氨基酸序列, 将其归入 CYP51 家族。接着 1986 年在老鼠<sup>[8]</sup>,

**Received:** February 23, 2008; **Accepted:** May 27, 2008

**Supported by:** the National Basic Research Program of China (No. 2004CCA00100), the National Natural Science Foundation of China (No. 30370273).

**Corresponding author:** Shao Yang. Tel: +86-27-67867915; E-mail: yang-shao@tom.com

国家重大基础研究前期研究专项项目(No. 2004CAA00100)和国家自然科学基金(No. 30370273)资助。

1996年在高粱(*Sorghum bicolor*)<sup>[9]</sup>, 2000年在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中接连发现CYP51<sup>[10]</sup>。截至2007年9月, 已经在82个物种中发现了100多个CYP51序列, 其中某些植物和真菌中含有多个CYP51基因, 比如水稻(10)、黑燕麦(3)、烟草(2)、拟南芥(2)、小麦赤霉菌(*Fuzarium graminearum*) (3)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) (2)、构巢曲霉(*A. nidulans*) (2)、米曲霉(*A. orizae*) (3)。CYP51是唯一在细菌、真菌、低等真核生物、高等植物和哺乳动物体内都存在的P450酶。

因其重要的基础研究价值和潜在的经济效益, CYP51自发现以来就成为生物学家和药学家们关注的热点, 多年来取得了丰富的研究成果。以下结合本实验室的有关工作, 对CYP51的研究进展进行综述。

## 1 体内生理功能

CYP51是单加氧酶, 在生物体甾醇合成途径中催化甾醇前体14 $\alpha$ -甲基羟基化反应(图1)。该过程包括3步, 每一步都需要一分子氧和一分子NADPH<sup>[3]</sup>。前2步遵循细胞色素P450超家族蛋白单氧化循环通式, 14 $\alpha$ -甲基依次被单氧化成14 $\alpha$ -羟甲基、14 $\alpha$ -醛基, 最后一步14 $\alpha$ -醛基以甲酸形式释放, 并生成 $\Delta^{14,15}$ 双键<sup>[2,3]</sup>。C-C键的断裂比较复杂, 已经提出2种可能的机制(自由基反应或离子反应)<sup>[11]</sup>。

CYP51具有底物特异性<sup>[2,12]</sup>。到目前为止发现CYP51有5种天然底物, 包括羊毛甾醇, 24, 25-二氢

羊毛甾醇、24-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇、钝叶醇、4 $\beta$ -去甲基羊毛甾醇<sup>[13]</sup>(图2)。哺乳动物CYP51的底物是羊毛甾醇和24,25-二氢羊毛甾醇, 高等植物CYP51的底物是钝叶醇, 酿酒酵母等少数真菌CYP51的底物是羊毛甾醇, 其余大部分真菌(如白色念珠菌(*Candida albicans*), 新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)等)CYP51的底物是24(28)-亚甲基-24, 25-二氢羊毛甾醇, 细菌CYP51的天然底物还不清楚。

14 $\alpha$ -去甲基反应产物是甾醇合成途径中的中间产物, 生成的终产物在动物中为胆固醇, 在真菌中为麦角甾醇, 在植物、藻和原生动物中为多种24-烷基化和烯炔化甾醇<sup>[14]</sup>。大多数甾醇如胆固醇(动物)、麦角甾醇(真菌)和谷甾醇(植物)都是质膜的组分, 在膜流动性、渗透性、调节和分配整合蛋白和信号传导途径等中具有重要作用<sup>[4]</sup>。另外一些甾醇如哺乳动物甾类激素、植物油菜素甾类激素和昆虫蜕皮激素等, 作为生物活性分子前体参与控制发育过程<sup>[4]</sup>。

## 2 体外催化活性

到目前为止, 已有12个CYP51通过直接纯化或异源表达系统纯化<sup>[2]</sup>。其中有9个来自真核细胞微粒体(3个来自哺乳动物——鼠、猪和人, 1个来自植物高粱, 3个来自真菌——酿酒酵母、白色念珠菌、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*), 2个来自锥虫——布鲁斯氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、克鲁斯氏锥虫(*T. cruzi*)), 均为膜结合蛋白; 另外3个来源于细菌——结核分枝杆菌、阴垢分枝杆菌(*Mycobacterium*

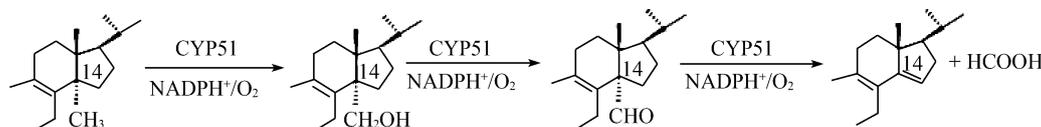


图1 CYP51介导的甾醇14 $\alpha$ -去甲基反应<sup>[3]</sup>

Fig. 1 CYP51-mediated sterol 14-demethylation reaction

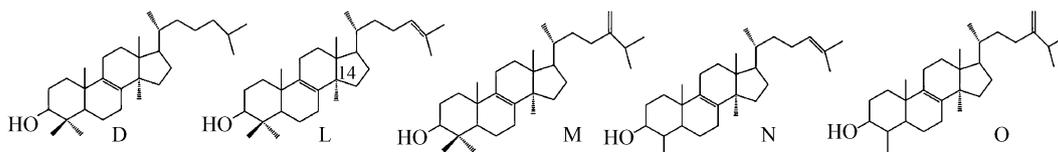


图2 CYP51的五种天然底物

Fig. 2 Five natural substrates of sterol 14 $\alpha$ -demethylase

D: 24, 25-dihydrolanosterol; L: lanosterol; M: 24-methylenedihydrolanosterol; N: 4 $\beta$ -norlanosterol; O: obtusifoliol

*smegmatis*)、嗜甲烷菌(*Methylococcus capsulatus*), 均是水溶性的。本实验室克隆了稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)和小麦赤霉病菌(*F. graminearum*)的 CYP51, 并在大肠杆菌中获得了过量表达<sup>[15]</sup>。在实验过程中我们发现 N 端氨基酸对真核 CYP51 在原核系统中的表达非常重要, 全长 CYP51 在大肠杆菌中不表达, 去除 N-端跨膜区残基后获得表达。

利用重组表达和纯化的 CYP51, 在体外构建了 CYP51 的重组反应, 重组活性较高的报道见表 1。人和白色念珠菌的 CYP51 以相似的速率催化所有 5 种底物 14 $\alpha$ -去甲基反应, 且与其他 CYP51 相比催化速率最快<sup>[13]</sup>。玉米黑粉菌的 CYP51 仅催化其天然底物 24-亚甲基二氢羊毛甾醇<sup>[16]</sup>。高粱的 CYP51 对 C4-单甲基化甾醇有高度特异性, 对天然底物钝叶醇的催化活性是最高的<sup>[9]</sup>。布鲁斯锥虫的 CYP51 对 C4-单甲基甾醇有强特异性, 但是克鲁斯氏锥虫更偏好 24, 25-二氢羊毛甾醇<sup>[13]</sup>。结核分枝杆菌的 CYP51 能催化所有五种底物(其中钝叶醇转化速率最高)<sup>[13]</sup>, 阴垢分枝杆菌和嗜甲烷菌的 CYP51 对底物的选择性还没有报道。总的来说, CYP51 对底物都有偏好性, 细菌 CYP51 催化活性比真核 CYP51 低 1~2 个数量级。体外重组反应对反应条件依赖性非常大, 如果反应在相同或相似的条件下进行, 并利用内源还原酶系统提供电子, 这样比较的结果会更可信。

表 1 CYP51 的体外重组活性<sup>[2]</sup>

Table 1 Enzyme activity of reconstituted CYP51<sup>[2]</sup>

Species	Turnover (nmol substrate/nmol P450/min)				
	D	L	M	N	O
Eukaryote					
Human	30	29	27	23	29
Rat	20	14	ns	ns	ns
<i>C. albicans</i>	25	24	29	17	27
<i>S. cerevisiae</i>	3.9	6.2	6.8	ns	ns
<i>U. maydis</i>	ns	ns	7.7	ns	ns
<i>T. cruzi</i>	1.6	0.6	2.4	0.03	0.06
<i>T. brucei</i>	<0.01	<0.01	<0.01	3.0	6.2
<i>S. bicolor</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.9	5.1
Prokaryote					
<i>M. tuberculosis</i>	0.18	0.15	0.12	0.18	0.45
<i>M. smegmatis</i>	ns	0.7	ns	ns	ns
<i>M. capsulatus</i>	ns	0.26	ns	ns	ns

ns: not studied

D: 24,25-dihydrolanosterol; L: lanosterol

M: 24-methylenedihydrolanosterol; N: 4 $\beta$ -norlanosterol

O: obtusifoliol

### 3 序列特征

目前已知的 CYP51 的氨基酸序列相似性大约为 30%<sup>[2,12]</sup>。不同物种间 CYP51 的序列相似性不同, 亲缘关系近的物种间序列相似性较高(如哺乳动物 CYP51 间高达 95%), 高度分化的低等真核生物间序列相似性较低(只有 41%), 整个生物界 CYP51 的序列相似性降为 23%~34%。更为有趣的是, 同一物种 CYP51 多个拷贝间的序列相似性程度为中等, 比如水稻的 10 个 CYP51 间序列相似性为 45%~78%, 曲霉的 3 个 CYP51 序列相似性约为 60%, 拟南芥的 2 个 CYP51 序列相似性约为 72%<sup>[2]</sup>。按 P450 的分类原则, 序列相似性大于 40% 才能被归于同一个 P450 家族, 但是不同来源的 CYP51 因为具有严格的催化活性, 虽然序列间相似性只有 30% 左右, 也被归于同一家族<sup>[2]</sup>。

CYP51 严格的催化活性需要相应功能区域的氨基酸序列具有保守性。氨基酸序列比对表明从细菌到动物, CYP51 共有 29 个氨基酸保守, 保守区与其结构和功能需求相适应<sup>[2]</sup>(图 3)。这些保守氨基酸中有 7 个是甘氨酸, 在结核分枝杆菌 CYP51 中它们分割二级结构区域。结核分枝杆菌 CYP51 中这 7 个甘氨酸的定点突变结果, 表明它们对于维持 CYP51 的三维柔性结构是必须的<sup>[5]</sup>。其余大多数保守氨基酸形成 6 个区, 包括 5 个底物结合区(Substrate binding region, SRS)和血红素辅基结合区<sup>[2]</sup>。血红素辅基结合区一般在 P450 家族中均保守, 但与其他 P450 不同的是, CYP51 的 SRS 区高度保守, 这是 CYP51 的一个特点<sup>[1]</sup>。在 5 个底物结合区中 SRS-1 和 SRS-4 最保守, 因此被认为是 CYP51 的特征信号, SRS-1 中 -YxxF/l(i)xxPxFGxxVxF/YD/a- 和 SRS-4 中 -GQ/hHT/sS- 可以用来鉴定某一 P450 是否属于 CYP51 家族<sup>[2]</sup>。血红素辅基结合区有保守性 -FG/sxGxH/rxCxGxxF/i(l)A- 结构单元, 其中 Cys 残基是血红素第五配基。

### 4 结构分析及其与功能的关系

#### 4.1 结晶解析

所有真核生物的 CYP51 都是膜结合蛋白, 且分子量较大, 约为 55 kD 左右, 通过 X-ray 晶体衍射和核磁共振等手段对其结构进行解析相当困难<sup>[17,18]</sup>。所以到目前为止, 只有细菌——结核分枝杆菌的水

溶性 CYP51 的晶体结构(MTCYP51)得以阐明<sup>[3]</sup>。2001 年 Podust 等<sup>[19]</sup>获得结核分枝杆菌 CYP51(大肠杆菌异源表达产物)的高分辨率 X-ray 晶体衍射数据,首次获得了有关 CYP51 的结构特征的重要信息。结果发现结核分枝杆菌 CYP51 与其他 P450 不同的结构特征有 2 处(图 4): (1)I 螺旋较长,并中断成两段,折叠形成一条通向活性位点的通道。(2)BC 环区形成一个开口,形成另一条通向活性位点的通道。Podust 等提出其中一条可能是底物进入的通道,另一条可能是代谢物输出的通道<sup>[19]</sup>。

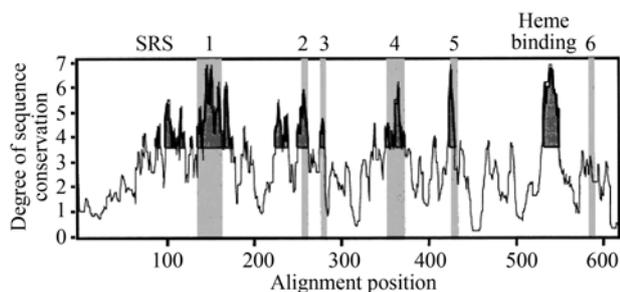


图 3 CYP51 保守氨基酸与 SRS 区的关系<sup>[12]</sup>

Fig. 3 The relationship between the highly conserved region of CYP51s and SRSs of P450

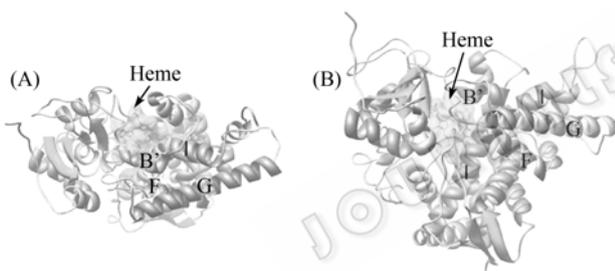


图 4 结核分枝杆菌 CYP51 蛋白晶体结构(PDB: 1e9x)<sup>[3]</sup>  
Fig. 4 Schematic representation of the CYP51 structure from *Mycobacterium tuberculosis* [1e9x]

(A) upper view; (B) distal view  
Heme and helices B', F, G, I helix are also marked

结核分枝杆菌 CYP51 的晶体结构为研究 CYP51 结构和功能的关系提供了重要的依据。但是哪些结构决定底物结合特异性,哪些结构在去甲基过程中固定中间产物起关键作用,到目前还没有阐明,需要进一步的研究和分析。

#### 4.2 同源建模

尽管同源建模获得的结构信息没有通过 X-ray 晶体衍射和核磁共振等实验手段得到的精确,但是当没有实验数据时它们可以提供一些有用的参考。通过同源建模,可以获得关于蛋白质和药物相互作用

的可能机制,探索蛋白质的哪些残基在结合药物过程中起关键作用,及药效基团怎样修饰可能增加或减低药物和蛋白质的亲和作用。

在结核分枝杆菌 CYP51 晶体结构解析之前,已经有许多 P450 蛋白的晶体结构已经解析,包括 P450cam、P450terp、P450eryF 和 P450BM3 等,这给 CYP51 结构的研究奠定了基础。尽管 P450 家族成员间的相似性较低(仅有 10%~30%),但是它们的拓扑结构却非常相似,这说明 P450 结构折叠保守<sup>[20]</sup>。所以已知的 P450 晶体结构数据都可以作为 CYP51 同源建模的模板,以获得 CYP51 的三维结构及其与 14 $\alpha$ -去甲基化酶抑制剂的相互作用模型。Boscott 和 Grant<sup>[21]</sup>, Tsukuda<sup>[22]</sup>, Höltje<sup>[17]</sup> 等以 P450cam 和 P450eryF 的晶体结构为模板建模了白色念珠菌 CYP51 的三维结构。Ji 等<sup>[18]</sup>以已知的原核 P450 晶体结构为模板建模了白色念珠菌的三维结构。通过建模结果,鉴别了 CYP51 重要的结构和功能残基,比如血红素辅基结合区位点残基,参与氧化还原蛋白作用和/或电子传递过程的残基,底物通道内侧的残基,与底物或抑制剂结合的残基等。

2001 年可溶性的结核分枝杆菌 CYP51 晶体解析为真核 CYP51 的结构研究提供了新的机遇。Xiao<sup>[23]</sup>, Gollapudy<sup>[24]</sup>, Rupp<sup>[25]</sup> 等根据结核分枝杆菌 CYP51 的晶体结构建模了白色念珠菌、烟曲霉和人等真核生物 CYP51 的三维结构,并构建了 CYP51 与不同抑制剂的结合模型。发现在血红素辅基结合区附近的氨基酸在与抑制剂结合中起重要作用,他们的突变会导致菌株抗性的产生。我们实验室以结核分枝杆菌 CYP51 的晶体结构(PDB: 1e9x)建模了稻瘟病菌和小麦赤霉病菌 CYP51 的三维结构,并将 4 种三氮唑抗真菌剂对接入建模的稻瘟病菌 CYP51 三维结构,发现血红素辅基结合区附近的氨基酸形成 1 个疏水口袋,其中有 5 个氨基酸与 4 种药物作用时起关键作用,包括 T112、F120、F220、H308 和 F497,它们可能在与药物识别、结合和 14 $\alpha$ -去甲基反应中有重要作用。

结核分枝杆菌 CYP51 的三维结构是否是真核 CYP51 同源建模的合适模板呢?从功能区保守氨基酸来看,可以说在一定程度上它是真核 CYP51 同源建模的合适模板。但是与可溶性的细菌 CYP51 不同,真核 CYP51 都是膜结合蛋白,两者间与细胞内定位

有关的结构不同。对结核分枝杆菌和人 CYP51 的保守氨基酸的定点突变实验也表明在多数所有情况下结核分枝杆菌 CYP51 是真核 CYP51 同源模建的合适模板,但不是所有情况都合适,比如人 CYP51 的 D146A 突变结果表明 BC 环区可能嵌于微粒体膜上,与结核分枝杆菌 CYP51 的 BC 环拓扑结构不同<sup>[26]</sup>。所以进行进一步的定点突变研究对于了解不同 CYP51 的结构关系是非常有必要的。

### 4.3 定点突变研究

序列比对表明 CYP51 有许多保守氨基酸,并且这些保守氨基酸主要位于 SRS 区和血红素辅基结合区,对于维持 CYP51 的结构和功能有重要的作用。科学家对这些保守氨基酸首先进行了研究。Nitahara 等通过定点突变构建了 45 个与小鼠 CYP51 的 27 个保守残基有关的突变体,研究了保守氨基酸突变对 CYP51 功能的影响<sup>[27]</sup>。实验结果总结于表 2。在 9 个突变位置上观察到 CYP51 功能有巨大改变,其中 Y131 和 F139 在 SRS-1 区, D231 在 SRS-2 区, H314、T315 和 S316 在 SRS-4 区, E369、R372 和 R382 在 SRS-5 区。Y131、E369、R372 和 R382 在稳定酶结构, F139、D231、H314、T315 和 S316 在维持酶活中起重要作用(表 2)。

表 2 结核分枝杆菌和小鼠 CYP51 中部分保守氨基酸定点突变对酶活的影响

Table 2 Effect on the enzymatic activity by site-directed mutagenesis of conserved amino acid residues in CYP51s from *M. tuberculosis* and rat

Effect of activity	Mutants of CYP51	
	<i>M. tuberculosis</i>	Rat
No changes	V87I A197S	
Decreased	L172 V	F139A D231A(E) H314F(A,K,D) T315S(A) S316A(T,V,L)
Increased	A197G	D146A
Inactive	Y76 F(T,A,N) F83Y(A,D,R) G84A(T) D90A G154A L172A(G) G175 A(T) R194A(K) G257 A G388A	Y131F(S) H314F(A,K,D) T315S(V,K,N) E369A R372A R382A

研究中对 SRS-4 中 I 螺旋的-HTS-三联体功能进行了重点讨论。(1)T315K 突变明显引起 Soret 吸收的红移,这表明 K 的 $\epsilon$ -氨基和血红素铁形成第 6 个配位,分子建模和光谱实验支持了这种推论。T315 在某些真菌 CYP51 里的对应位置是 S,小鼠 CYP51

的 T315S 突变只使其活性降低到原来的 76%, T315 突变为其他氨基酸如 A、V、K 或者 N 则明显引起活性降低,这说明这个位置为羟基氨基酸对保持 CYP51 的功能是必需的。(2)H314 在所有 CYP51 中均保守。H314D 突变导致 CYP51 酶活的明显降低,说明 H314 对保持 CYP51 的活性结构是必需的。结核分枝杆菌 CYP51 的晶体结构也表明恰是在这个位置 I 螺旋发生中断并折叠,而 I 螺旋的这种折叠对于形成活性通道是非常重要的。(3)S316 也在所有 CYP51 中均保守。S316 突变为体积小的 A 时, CYP51 活性改变较小,突变为体积较大的氨基酸如 V 或 L 时, CYP51 活性下降较多, S316T 突变体活性只有对照的 50%。尽管在这个位置上氨基酸保守性很高,但是不一定非要是羟基氨基酸,而且此残基和底物间存在空间位阻效应。

结核分枝杆菌 CYP51 的氨基酸定点突变实验也已经进行<sup>[26]</sup>。Lepesheva 等构建了结核分枝杆菌 CYP51 的保守氨基酸的突变体,检测了这些氨基酸突变对 CYP51 催化活性和分子特性的影响,发现 Y76、F83、G84、D90、L172、G175 或者 R194 的突变导致催化活性的丧失,并且随着底物 24,25-二氢羊毛甾醇的增加 I 型光谱变化也随着消失,这表明它们与底物结合有关。(1)X-ray 晶体衍射分析显示 Y76 是距离血红素辅基结合区最近的残基之一,它的苯环羟基和卟啉环的丙酸酯侧链之间的形成氢键。结核分枝杆菌 CYP51 的 Y76F 突变体和相对应的人 CYP51 的 Y131F 突变体蛋白没有活性,这说明这种氢键作用对于维持 CYP51 的活性可能是必要的。(2)F83 位于血底物结合口袋的上表面。F83Y 突变体和相对应的人 CYP51 的 F139Y 突变体没有催化活性,老鼠 CYP51 的 F139A 突变体活性显著降低,这说明这个保守的苯基丙氨酸对维持老鼠、人和结核分枝杆菌的活性可能是必要的。(3)D90 在 BC 环区,位于底物结合通道的开口部分。Lepesheva 等提出 D90 可以移向底物结合分子,并且在催化过程中很可能通过与甾醇的 3-羟基形成氢键参与底物定位,在将底物固定在活性位点中可能起关键性作用。不过,对应的人和老鼠 CYP51 的 D146A 突变体活性变化不大,分别为对照的 54% 和 106%<sup>[26, 27]</sup>。因此这个保守的天冬氨酸的作用至今还没有被证实。

## 5 14 $\alpha$ -去甲基化酶抑制剂研究现状及发展方向

CYP51 除了较多的基础生物学研究之外, 在应用研究中也是一个重要的药物设计的靶酶<sup>[2,5]</sup>。抑制甾醇 14 $\alpha$ -去甲基酶活性会阻碍甾醇合成, 甾醇合成减少或导致真菌细胞膜受损而死亡, 或影响植物生长发育过程, 或使动物中的内源性胆固醇合成减少等, 故 14 $\alpha$ -去甲基化酶抑制剂(DMI inhibitors, DMIs) 可以作为抗真菌剂、除草剂和降低胆固醇的药物。并且随着抗药性出现及世界范围内真菌感染机会(HIV 感染, 癌症化疗, 器官和骨髓移植等导致免疫缺陷型宿主增加)和肺结核等初期感染患者的增加, 对 DMIs 的需求日益增长。

DMIs 是治疗人霉菌病和防止作物病害中使用最广泛的抗真菌剂, 而三氮唑类是其中最重要的一类<sup>[2]</sup>。三氮唑环 N 原子的孤对电子与 CYP51 血红素辅基 Fe 原子形成配位键结合, 使血红蛋白失去了与氧原子结合的机会, 阻断了底物羟基化反应, 从而抑制 CYP51 的活性<sup>[28]</sup>。唑类与其他抗真菌药物相比, 低毒、便宜、使用广泛<sup>[20]</sup>。目前商品化了的三氮唑类药物主要有氟康唑(fluconazole)、伊曲康唑(itraconazole)、伏立康唑(voriconazole)和泊沙康唑(Posaconazole), 还有一些在开发当中<sup>[29]</sup>。针对已合成的大量的 DMIs 竞争性抑制剂, 大量的构效相关性研究表明 14 $\alpha$ -去甲基化酶抑制剂必须具有以下 3 种基团<sup>[30]</sup>: 能与酶活性位点血红素辅基螯合的特定基团; 能与酶活性位点疏水空穴结合的专一疏水基团; 能与酶活性位点及底物进出通道残基作用的基团。

已有或正在研究的三氮唑类药物都存在着一定的局限性, 首先, 三氮唑类药物虽然高效低毒, 但是长期使用产生了一些耐药菌株, 从而影响抗菌效果。导致抗性产生可能的原因<sup>[29]</sup>包括: (1)真菌 CYP51 的突变<sup>[31,32]</sup>, 如白色念珠菌 CYP51 的 Y132H、S405F、G464S、G465S、R467K 和 I471T 等突变都导致 CYP51 和药物的亲和力下降, 从而导致抗性产生; (2)CYP51 表达量的提高<sup>[33,34]</sup>, 如光滑假丝酵母 CYP51 含量的提高, 导致其对氟康唑、酮康唑和伊曲康唑的抗性; (3)唑类代谢速度加快或者渗透性降低<sup>[34]</sup>, 细胞内的唑类含量下降导致抗性产生。因此合成出既具有较好抗菌活性又不容易产生

耐药菌株的新型三氮唑类抗真菌药物, 已成为利学家们亟待解决的问题; 其次, 三氮唑类药物的作用机理为其氮原子与 CYP51 的血红素辅基 Fe 原子形成配位键, 从而抑制 CYP51 的活性, 但是由于哺乳动物体内也存在细胞色素 P450, 因此该类药物可与人体内的 P450 蛋白血红素辅基 Fe 原子配位结合, 普遍导致对人体的肝肾有一定的毒性, 氟康唑、伊曲康唑对人体的毒性已有不少报道<sup>[35]</sup>。因此, 如何增强该类药物的选择性来降低该类药物的毒害作用也已经成为科学家们亟待解决的问题; 再次, 由于目前还没有测定出真菌 P450 的晶体结构, 制约了三氮唑类药物与 14 $\alpha$ -去甲基化酶相互作用机制的研究, 阻碍了基于羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶的活性位点进行新型、高效、低毒抑制剂的先导结构设计<sup>[20]</sup>。

因此在以后的研发中要加快高效低毒抗真菌药物的创新研究。设计合成具有光学活性的三氮唑类药物作为 14 $\alpha$ -去甲基化酶的抑制剂, 整个分子构型还必须符合一定的空间构型才能与高度立体特异性的 P450 多功能氧化酶的活性部位相结合, 发挥高效低毒的抗菌作用<sup>[36]</sup>; 研发 CYP51 的底物类似物作为抑制剂是一条避免抗性产生的重要的途径<sup>[2]</sup>; 另外可以通过计算机辅助药物设计, 将分子模拟技术和组合化学技术应用到抗真菌药物研究, 建立抗真菌药物和受体的作用模型, 并通过药物和靶酶对接研究, 找出最佳活性物质, 完成化学合成, 最后以靶酶为靶标进行分子筛选, 从而得到最佳活性药物<sup>[37]</sup>。本实验室和教育部农药及化学生物学重点实验室合作, 结合同源建模、分子对接、药物和靶酶的结合光谱<sup>[38]</sup>, 分析发现稻瘟病菌 CYP51 的 F220 和 F497 是特异稻瘟菌 CYP51 抑制剂设计的靶点, 并且通过计算机辅助药物设计已经设计、合成并筛选到了一系列新型稻瘟菌 CYP51 抑制剂的先导化合物(另文发表)。

## 6 展望

14 $\alpha$ -去甲基化酶是生物甾醇合成过程中的关键酶, 已经成为降胆固醇药物、抗真菌药物和除草剂作用的重要靶标, 在医疗和农业上有重要的应用价值和前景。

目前 CYP51 的研究已经取得了重要进展, 不同来源 CYP51 的基因特征、体内生理功能和体外生理

生化特性已经基本清楚。结核分枝杆菌 CYP51 的晶体结构已经阐明, 并且对其部分保守氨基酸的功能有所研究。但是还有一些问题仍需进一步的研究探讨, 比如 CYP51 中不保守氨基酸的功能, CYP51 结构与功能间的关系, 为什么一些植物和微生物会有多个有功能的 CYP51, 对 DMIs 抗性产生的分子机制以及高效特异性 DMIs 抑制剂的研发等。CYP51 的研究不仅会加深对 P450 超家族生物学功能和机理的认识, 而且对农业和医疗行业具有重要的意义。

## REFERENCES

- [1] Yoshida Y, Aoyama Y, Noshiro M, *et al.* Sterol 14 alpha-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **273**(3): 799–804.
- [2] Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1770**(3): 467–477.
- [3] Waterman MR, Lepesheva GI. Sterol 14 alpha-demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **338**(1): 418–422.
- [4] Schaller H. The role of sterols in plant growth and development. *Prog Lipid Res*, 2003, **42**(3): 163–175.
- [5] Lepesheva GI, Waterman MR. CYP51: The omnipotent P450. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, **215**(1-2): 165–170.
- [6] Gibbons FG, Pullinger CR, Mitropoulos KA. Studies on the mechanism of lanosterol 14 alpha-demethylation. A requirement for two distinct types of mixed-function-oxidase systems. *Biochem J*, 1979, **183**(2): 309–315.
- [7] Yoshida Y, Aoyama Y. Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 alpha-demethylation. I. Purification and spectral properties. *J Biol Chem*, 1984, **259**(3): 1655–1660.
- [8] Trzaskos J, Kawata S, Gaylor JL. Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. Purification of lanosterol 14 alpha-methyl demethylase cytochrome P-450 from hepatic microsomes. *J Biol Chem*, 1986, **261**(31): 14651–14657.
- [9] Kahn RA, Bak S, Olsen CE, *et al.* Isolation and reconstitution of the heme-thiolate protein obtusifoliol 14alpha-demethylase from *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J Biol Chem*, 1996, **271**(51): 32944–32950.
- [10] Bellamine A, Mangla AT, Nes WD, *et al.* Characterization and catalytic properties of the sterol 14alpha-demethylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**(16): 8937–8942.
- [11] Shyadehi AZ, Lamb DC, Kelly SL, *et al.* The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 alpha-demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 alpha-demethylase, P-45014DM, and CYP51). *J Biol Chem*, 1996, **271**(21): 12445–12450.
- [12] Aoyama Y. Recent progress in the CYP51 research focusing on its unique evolutionary and functional characteristics as a diversozyme P450. *Front Biosci*, 2005, **10**: 1546–1557.
- [13] Lepesheva GI, Zaitseva NG, Nes WD, *et al.* Cyp51 from *Trypanosoma cruzi* - A phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 alpha-demethylase. *J Biol Chem*, 2006, **281**(6): 3577–3585.
- [14] Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, *et al.* The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 2005, **309**(5733): 416–422.
- [15] Yang JY, Zhang QY, Xiao WJ, *et al.* Expression and homology modeling of sterol 14 alpha-demethylase from *Magnaporthe grisea*. The 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Shanghai, China, 2008.
- [16] Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, *et al.* Expression, purification, reconstitution and inhibition of *Ustilago maydis* sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51; P45014DM). *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **169**(2): 369–373.
- [17] Holtje H-D, Fattorusso C. Construction of a model of the *Candida albicans* lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase active site using the homology modelling technique. *Pharm Acta Helv*, 1998, **72**(5): 271–277.
- [18] Ji H, Zhang W, Zhou Y, *et al.* A three-dimensional model of lanosterol 14alpha-demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J Med Chem*, 2000, **43**(13): 2493–2505.
- [19] Podust LM, Poulos TL, Waterman MR. Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Aca Sc USA*, 2001, **98**(6): 3068–3073.
- [20] Ruge E, Korting HC, Borelli C. Current state of three-dimensional characterisation of antifungal targets and its use for molecular modelling in drug design. *Int J Antimicrob Ag*, 2005, **26**(6): 427–441.
- [21] Boscott PE, Grant GH. Modeling cytochrome P450 14 alpha demethylase (*Candida albicans*) from P450cam. *J Mol Graph*, 1994, **12**(3): 185–192.
- [22] Tsukuda T, Shiratori Y, Watanabe M, *et al.* Modeling, synthesis and biological activity of novel antifungal agents (1). *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, **8**(14): 1819–1824.
- [23] Xiao L, Madison V, Chau AS, *et al.* Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Ch*, 2004, **48**(2): 568–574.
- [24] Gollapudy R, Ajmani S, Kulkarni SA. Modeling and

- interactions of *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14-alpha demethylase 'A' with azole antifungals. *Bioorgan Medl Chem*, 2004, **12**(11): 2937–2950.
- [25] Rupp B, Raub S, Marian C, *et al.* Molecular design of two sterol 14 alpha-demethylase homology models and their interactions with the azole antifungals ketoconazole and bifonazole. *J Comput Aid Mol Des*, 2005, **19**(3): 149–163.
- [26] Lepesheva GI, Virus C, Waterman MR. Conservation in the CYP51 family. Role of the B' helix/BC loop and helices F and G in enzymatic function. *Biochemistry*, 2003, **42**(30): 9091–9101.
- [27] Nitahara Y, Kishimoto K, Yabusaki Y, *et al.* The amino acid residues affecting the activity and azole susceptibility of rat CYP51 (sterol 14-demethylase P450). *J Biochem (Tokyo)*, 2001, **129**(5): 761–768.
- [28] Ji H, Zhang W, Zhang M, *et al.* Structure-based de novo design, synthesis, and biological evaluation of non-azole inhibitors specific for lanosterol 14alpha-demethylase of fungi. *J Med Chem*, 2003, **46**(4): 474–485.
- [29] Lupetti A, Danesi R, Campa M, *et al.* Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*, 2002, **8**(2): 76–81.
- [30] Sheng CQ, Ma R, Lü XW, *et al.* Structure-activity Relationship of Triazole Antifungals. *Prog Pharm Sci*, 2003, **27**(6): 336–340.  
盛春泉, 马瑞, 吕小伟, 等. 三唑类抗真菌药物构效关系. *药学进展*, 2003, **27**(6): 336–340.
- [31] Asai K, Tsuchimori N, Okonogi K, *et al.* Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **43**(5): 1163–1169.
- [32] Wyand RA, Brown JKM. Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fung Genet Biol*, 2005, **42**(8): 726–735.
- [33] Hankins EG, Gillespie JR, Aikenhead K, *et al.* Upregulation of sterol C14-demethylase expression in *Trypanosoma cruzi* treated with sterol biosynthesis inhibitors. *Mol Biochem Parasitol*, 2005, **144**(1): 68–75.
- [34] Brun S, Berges T, Poupard P, *et al.* Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, **48**(5): 1788–1796.
- [35] Zhang W, Ramamoorthy Y, Kilicarslan T, *et al.* Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metab Dispos*, 2002, **30**(3): 314–318.
- [36] Upadhayaya RS, Sinha N, Jain S, *et al.* Optically active antifungal azoles: synthesis and antifungal activity of (2R,3S)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(5-{2-[4-aryl-piperazin-1-yl]-ethyl}-tetrazol-2-yl/1-yl)-1-[1,2,4]-triazol-1-yl-butane-2-ol. *Bioorgan Med Chem*, 2004, **12**(9): 2225–2238.
- [37] Sheng CQ, Zhang WN, Ji HT, *et al.* Innovative design of novel antifungal agents. *Chin J New Drugs*, 2004, **13**(2): 97–102.  
盛春泉, 张万年, 季海涛, 等. 抗真菌药物的创新设计研究. *中国新药杂志*, 2004, **13**(2): 97–102.
- [38] Xiao M, Yang JY, Xiao WJ, *et al.* Application of binding spectra in DMIs fungicide screening. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(6): 1129–1134.  
肖敏, 杨娇艳, 肖文精, 等. 结合光谱法在DMIs类杀真菌剂筛选中的应用. *生物工程学报*, 2007, **23**(6): 1129–1134.

## 第二届“生物实验室工具书网上联展”活动正式开始!

为进一步推广生命科学发展, 更好的服务于广大读者。科学出版社生物分社联手几大著名生物网站, 推出第2届“生物实验室工具书网上联展活动”, 时间为2008年8月1日~2008年10月30日。此次活动分为4个板块:

1. 生物实验室工具书网上联展图书
2. “生命科学实验指南系列” logo 有奖竞猜
3. 读者反馈
4. 此次联展参与网站

详情请登陆生命科学图书网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎关注!