



## 甾体微生物转化反应关键酶 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶的研究进展

贾红晨<sup>1</sup> 李芳<sup>1</sup> 郑鑫铃<sup>1</sup> 崔慧林<sup>1</sup> 骆健美<sup>\*1,2</sup> 申雁冰<sup>1</sup> 王敏<sup>\*1</sup> 田妥<sup>3</sup> 丁安鹏<sup>3</sup>

1 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室 天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心 天津科技大学生物工程学院 天津 300457

2 南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300457

3 天津天药药业股份有限公司 天津 300462

**摘要:** 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶是甾体化合物微生物代谢的关键酶,负责催化 3-酮基类甾体化合物 A 环上的 C1,2 位脱氢反应。其不仅在甾体母核的早期降解途径中发挥重要作用,而且能通过 A 环 C1,2 位上双键的导入显著提高甾体化合物的生理活性。本文详细阐述了 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶在微生物中的种属分布和序列特征、酶的生物学特性、生理作用、催化机理以及分子改造等,为深入研究该酶在甾体生物转化领域中的应用提供重要参考。

**关键词:** 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶, 甾体 C1,2 脱氢反应, 生物学特性, 生理作用, 催化机理

## Research progress of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase, a key enzyme for steroid microbial conversion

JIA Hong-Chen<sup>1</sup> LI Fang<sup>1</sup> ZHENG Xin-Ling<sup>1</sup> CUI Hui-Lin<sup>1</sup> LUO Jian-Mei<sup>\*1,2</sup>  
SHEN Yan-Bing<sup>1</sup> WANG Min<sup>\*1</sup> TIAN Tuo<sup>3</sup> DING An-Peng<sup>3</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education; Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology; Tianjin Engineering Research Center of Microbial Metabolism and Fermentation Process Control; College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology of Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300457, China

3 Tianjin Tianyao Pharmaceuticals Company Limited, Tianjin 300462, China

**Abstract:** 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase is one of the key enzymes in microbial steroid catabolism,

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905300); National Natural Science Foundation of China (21978220); Tianjin Natural Science Foundation (18JCZDJC32500); Tianjin Technical Expert Project (19JCTPJC50800); Open Fund Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology of Ministry of Education in Nankai University; Tianjin Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (201910057099)

**\*Corresponding authors:** Tel: 86-22-60601256

E-mail: LUO Jian-Mei: luojianmei@tust.edu.cn; WANG Min: minw@tust.edu.cn

**Received:** 16-03-2020; **Accepted:** 02-06-2020; **Published online:** 10-06-2020

**基金项目:** 国家重点研发计划(2019YFA0905300); 国家自然科学基金(21978220); 天津市自然科学基金(18JCZDJC32500); 天津市企业科技特派员项目(19JCTPJC50800); 南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室开放课题; 天津市大学生创新创业训练计划(201910057099)

**\*通信作者:** Tel: 022-60601256

E-mail: 骆健美: luojianmei@tust.edu.cn; 王敏: minw@tust.edu.cn

**收稿日期:** 2020-03-16; **接受日期:** 2020-06-02; **网络首发日期:** 2020-06-10

which catalyzes  $\Delta^1$ -dehydrogenation of A ring of 3-ketosteroid substrates. The enzyme not only plays a critical role in the early step of the degradation of the steroid nucleus, but also introduces the double bond at the C1,2 position of the A ring to significantly improve the physiological activity of the steroidal compound. In this paper, the species distribution in microorganisms and sequence characteristics, biological properties, physiological role, catalytic mechanism and molecular modification of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase are reviewed. It provides reference for further study of the 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase application in the steroid biotransformation field.

**Keywords:** 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase,  $\Delta^1$ -dehydrogenation of steroid, Biological characteristics, Physiological role, Catalytic mechanism

甾体化合物(steroids), 又称类固醇化合物, 是一类特殊的多元环萜类化合物, 通常含有一个由 A、B、C 和 D 四个环组成的环戊烷多氢菲母核, 其中 A、B、C 环为完整封闭的六元环, D 环为五元环(图 1); 甾体化合物广泛存在于动物、植物组织和某些微生物中, 如动物组织中的胆固醇、胆酸、皮质醇和皮质酮等肾上腺皮质激素和孕酮、雄酮、雌二醇、睾酮等性激素; 植物中的薯蓣皂素、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、菜籽甾醇等; 以及酵母细胞中的麦角甾醇等<sup>[1]</sup>。甾体母核上有多种取代基并具有多个手性中心, 如母核的第 10 和 13 位常有角甲基( $-\text{CH}_3$ ), 第 3、11、17 位可能有羟基( $-\text{OH}$ )或酮基( $-\text{C}=\text{O}$ )或烷基, A、B 和 C 环部分位置存在双键, 第 17 位常有  $\beta$ -构型存在的长短不同的侧链。这种母核结构上取代基、双键位置或立体构型的多样性形成了种类繁多的甾族化合物。与之相对应, 这些化合物产生了一系列独特的生理活性, 如抗肿瘤、抗炎抗敏、抗菌抗病毒、抗休克以及改善生育能力等<sup>[2]</sup>。甾体类药物是指分子结构中含有典型甾体结构的药物, 主要包括肾上腺皮质激素、性激素和蛋白同化激素三大类,

作为目前临床上用量仅次于抗生素的第二类药物, 全球年产量已超过 100 万  $\text{t}$ <sup>[1-2]</sup>。国际市场甾体类药物的销售额每年以 10%–15% 的速度递增, 2018 年全球销售额约为 1 200–1 300 亿美元, 占医药销售总额的 6%, 我国是世界最大的甾体原料药生产国, 年销售额超 1 000 亿元, 占我国医药销售额的 8% 左右<sup>[1,3-4]</sup>。

甾体化合物的微生物转化是指利用微生物细胞或者其体内的酶选择性地修饰或改造甾体化合物的某一特定部分(基团), 从而获得结构上类似但生理活性提高的化合物或中间体。与化学合成法相比, 微生物转化法不仅具有合成步骤少、生产周期短、收率高、副反应少、反应条件温和、环境友好等优点, 而且具有高度的立体选择性和区域选择性, 能实现传统化学合成难以或者无法进行的反应, 如 A 环 C1,2 位脱氢、11 $\alpha$ -羟基化、11 $\beta$ -羟基化等<sup>[5]</sup>。此外, 微生物资源丰富、种类繁多, 细胞内有可能发生组合转化反应, 因此在获取结构新颖、形式多样的产物上表现出更大优势。目前, 微生物转化法已成为甾体药物及其中间体合成路线中不可缺少的关键技术。

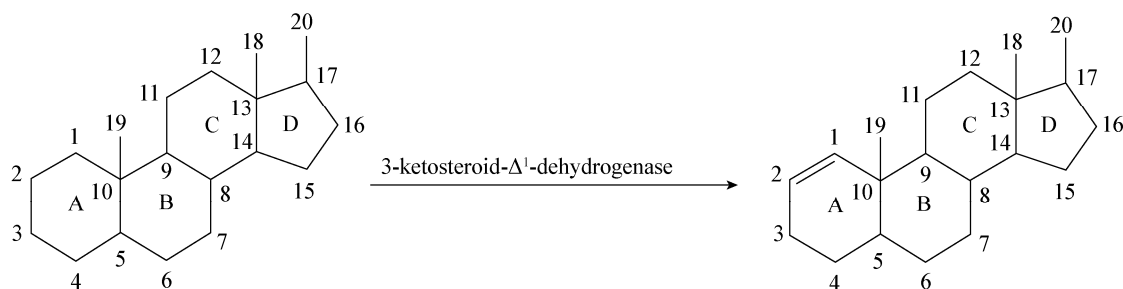


图 1 甾体化合物的 C1,2 脱氢反应

Figure 1  $\Delta^1$ -dehydrogenation of steroid

甾体化合物的微生物转化反应多种多样,其中,甾体 A 环的 C1,2 脱氢反应(图 1)受到广泛关注。这是因为该反应不仅是甾体母核结构早期降解的重要步骤,更重要的是,甾体化合物 A 环 C1,2 位引入双键后,其抗炎活性成倍增加。例如,醋酸可的松经 C1,2 脱氢反应后生成的醋酸泼尼松,其抗炎活性增加了 3-4 倍;目前临床上许多重要甾体化合物的生产过程中均涉及到微生物的甾体 C1,2 脱氢反应,包括氢化泼尼松、地塞米松、帕拉米松、倍他米松、曲安西龙、甲基强的松龙等大多数具有抗炎能力的肾上腺皮质激素<sup>[4]</sup>。因此,甾体 C1,2 脱氢反应是工业生产氢化泼尼松及其同系物最有价值的一种反应,是工业上采取微生物转化法生产甾体药物的典型代表。3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶(KsdD 或 KstD) [4-烯-3-酮甾醇:(受体)-1-烯-氧化还原酶] (EC 1.3.99.4)能催化 3-酮基甾体类化合物的 C1( $\alpha$ )和 C2( $\beta$ )位氢原子的反式轴向消除反应,是催化甾体 C1,2 脱氢反应的关键酶。本文详细介绍了 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶在不同种属微生物中的分布情况以及酶分子的序列特征、生物学特性、生理作用、催化机理以及分子改造方面的研究进展,探讨了后续研究的思路和方法,为深入研究该酶在甾体生物转化领域中的应用提供重要参考。

### 1 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶在微生物中的种属分布及序列特征

按照文献[6]的方法,通过 Enzyme 数据库(<http://www.expasy.ch/enzyme/>)和 GO 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)的检索并结合文献调研,发现 272 种不同的细菌和至少 1 种真菌[烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)<sup>[7]</sup>]中均含有 KsdD。

由表 1 可知,含有 KsdD 的微生物主要归属于放线菌门(38 个属 165 个种)、变形菌门(45 个属 91 个种)和厚壁菌门(9 个属 11 个种)。按照所包含种的数量对属进行排序,从高到低依次为:分枝杆菌属(*Mycobacterium*, 67 个种)、红球菌属(*Rhodococcus*, 16 个种)、假单胞菌属(*Pseudomonas*,

表 1 含有 KsdD 的微生物种属分布情况

Table 1 Species distribution of microorganisms containing KsdD

门名称 Phylum	属的数量(个) The number of genus	种的数量(个) The number of species
放线菌门 <i>Actinobacteria</i>	38	165
变形菌门 <i>Proteobacteria</i>	45	91
厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>	9	11
拟杆菌门 <i>Bacteroidetes</i>	3	3
浮霉菌门 <i>Planctomycetes</i>	2	2
子囊菌门 <i>Ascomycota</i>	1	1
总计 Total	98	273

14 个种)、链霉菌属(*Streptomyces*, 13 个种)、诺卡氏菌属(*Nocardia*, 10 个种)、类诺卡氏菌属(*Nocardioideis*, 6 个种)和戈登氏菌属(*Gordonia*, 6 个种)。目前常见的甾体 C1,2 脱氢反应菌株主要来自分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioideis*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)和曲霉属(*Aspergillus*)。其中,新金分枝杆菌(*Mycobacterium neoaurum*)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)、偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)、简单节杆菌[*Arthrobacter simplex*, 又称简单类诺卡氏菌(*Nocardioideis simplex*)]、红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、紫红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*)、赤红球菌(*Rhodococcus ruber*)、云豹粪便戈登氏菌(*Gordonia neofelifaecis*)和烟曲霉菌中的 KsdD 受到广泛关注(表 2)。

为了获得不同来源 KsdD 的序列特征,我们选取了甾体转化反应中常见的 61 个菌株,利用 MEGA 7.0 软件中的邻近法对其含有的 KsdD 构建系统进化树。由图 2 可知,环形的进化树上,不同

表 2 含有 KsdD 的主要甾体转化反应菌株  
Table 2 The main steroid-transformation strains containing KsdD

属名	种名	属名	种名
Genus name	Species name	Genus name	Species name
分枝杆菌	新金分枝杆菌 <i>Mycobacterium neoaurum</i>	链霉菌	白色链霉菌 <i>Streptomyces albus</i>
<i>Mycobacterium</i>	耻垢分枝杆菌 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Streptomyces</i>	灰色链霉菌 <i>Streptomyces griseus</i>
	偶发分枝杆菌 <i>Mycobacterium fortuitum</i>		维吉尼亚链霉菌 <i>Streptomyces virginiae</i>
红球菌	红平红球菌 <i>Rhodococcus erythropolis</i>	诺卡氏菌	巴西诺卡氏菌 <i>Nocardia brasiliensis</i>
<i>Rhodococcus</i>	马红球菌 <i>Rhodococcus equi</i>	<i>Nocardia</i>	鼻疽诺卡氏菌 <i>Nocardia farcinica</i>
	贾斯汀红球菌 <i>Rhodococcus jostii</i>		犬股诺卡氏菌 <i>Nocardia canicruria</i>
	浑浊红球菌 <i>Rhodococcus opacus</i>	类诺卡氏菌	简单类诺卡氏菌 <i>Nocardioides simplex</i>
	紫红红球菌 <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>Nocardioides</i>	独岛类诺卡氏菌 <i>Nocardioides dokdonensis</i>
	赤红球菌 <i>Rhodococcus ruber</i>	戈登氏菌	云豹粪便戈登氏菌 <i>Gordonia neofelifaecis</i>
假单胞菌	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Gordonia</i>	土地戈登氏菌 <i>Gordonia terrae</i>
<i>Pseudomonas</i>	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	芽孢杆菌	香肠芽孢杆菌 <i>Bacillus salsus</i>
	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Bacillus</i>	球形芽孢杆菌 <i>Bacillus sphaericus</i>
	睾酮假单胞菌 <i>Pseudomonas testosteroni</i>		耐热芽孢杆菌 <i>Bacillus sporothermodurans</i>
棒状杆菌	谷氨酸棒状杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	曲霉菌	烟曲霉菌 <i>Aspergillus fumigatus</i>
		<i>Aspergillus</i>	

种属来源的 150 个 KsdD 分布在 13 个分支, 这说明该酶具有多样的进化关系。其中, 大多数 KsdD 主要集中在分支 1、2、3、5、7。每个分支内不同来源的 KsdD 具有较近的亲缘关系。但由于种属间的差异, 又会各自聚集形成小的分支, 显著地被区分开, 如分支 1 中的分枝杆菌和红球菌, 这反映了 KsdD 具有明显的种属特异性。对于同一菌株的多个 KsdD 同工酶, 有时分布于同一个分支, 如豚鼠耳炎诺卡氏菌(*Nocardia otitidiscaviarum*) NEB252 的 3 个 KsdD 同工酶都分布在分支 1 上, 但这种情况极为少见; 大多数情况下, 同工酶并不分布在同一个分支上, 如新金分枝杆菌 ATCC25795 的 3 个 KsdD 同工酶分布在完全独立的 3 个分支中; 同样具有此类分布特征的还有新金分枝杆菌 DSM 1381、红平红球菌 SQ1、简单类诺卡氏菌 VKM Ac-2033D、云豹粪便戈登氏菌 NRRL B-59395、新星诺卡氏菌(*Nocardia nova*) SH22a 等菌株中的 KsdD 同工酶, 这种同一个菌株的 KsdD 同工酶表现出的进化关系的差异性可能也是该菌株具有多种催化性能的重要原因。值得注意的是, 云豹粪便戈登氏菌 NRRL B-59395 的 KsdD5 (WP\_009678243)

独立成一个分支, 这可能与其较小的氨基酸长度(仅 375 aa)有关; 类似的情况也出现在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv 的 KsdD2 (NP\_215299)。

不同来源 KsdD 的序列大小长短不一, 其中, 云豹粪便戈登氏菌 NRRLB-59395 的 KsdD5 最短, 为 375 个氨基酸; 浑浊红球菌(*Rhodococcus opacus*) PD630 的 KsdD1 (AHK28217)最长, 为 611 个氨基酸。氨基酸序列比对的结果表明, 不同来源的 KsdD 在氨基酸序列上呈现出相似的分布特征(图 3)。如, 都存在 3 处相似性比较高的区域, 其中, N 端保守区有 FAD 结合位点[GSG(A/G)(A/G)(A/G)X17E], C 端可能是酶和底物的结合位点, 中间区域则有可能是酶的活性中心。如, 对于简单节杆菌, 活性中心是位于 219–245 位的 27 个氨基酸残基: RRAIRARRGVLLAAGGFEEANDELRLQKY。这种氨基酸结构上的相似性对于保证 KsdD 酶的催化功能具有重要意义。但不同来源的 KsdD 也表现出明显的序列差异, 如, 简单节杆菌的 KsdD (WP\_038682818) 由 515 个氨基酸组成, 而睾酮假单胞菌 ATCC 17140 中的 KsdD (AAA25679)要多出 58 个氨基酸, 这些

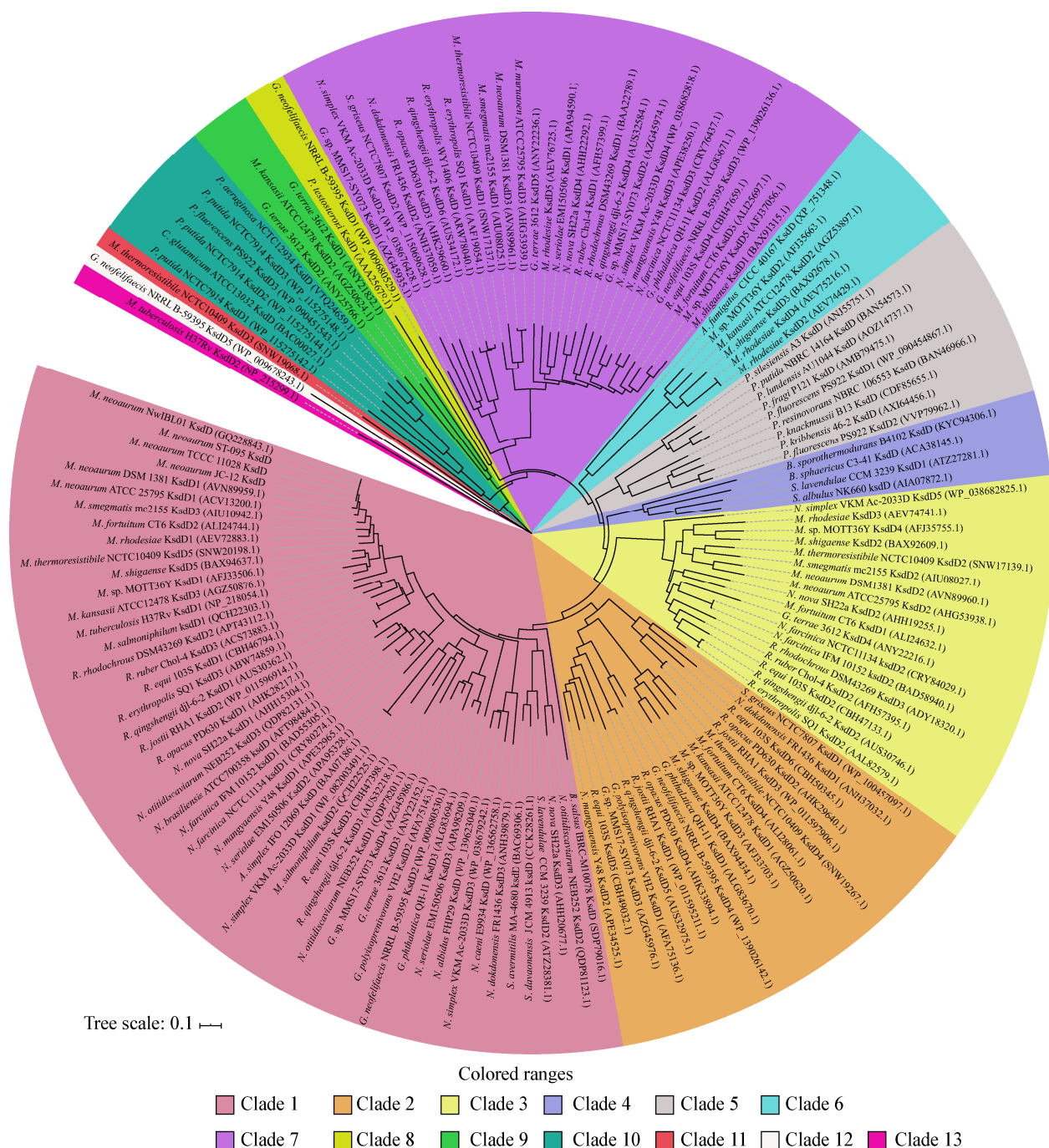


图2 不同微生物来源的 KsdD 的系统进化树(刻度长度设置为 0.1)

Figure 2 Phylogenetic tree of KsdDs from different microorganisms (the scale length was set at 0.1)

多出来的氨基酸在 FAD 结构域的 C 端聚集成簇形成了一个额外的结构域<sup>[8]</sup>。KsdD 一级结构上的保守性和差异性决定了其在生物学特性和生理作用上的多样性。

## 2 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶的生物学特性

利用各种蛋白分离纯化技术,研究者先后从以限制诺卡氏菌(*Nocardia restrictus*)<sup>[9]</sup>、珊瑚诺卡氏菌(*Nocardia corallina*)<sup>[10]</sup>、红平红球菌 IMET



## A Conserved N-terminal region

<i>R. erythropolis</i> SQ1 KsdD1 (100)	.....MQDTSEQVIVVSSCGGALTGAYTAAACITTIIVLEK	38
<i>A. fumigatus</i> CICC 40167 KsdD (32.72)	.....MAARQLRLSLPLTHLPPIRPHVRLGTAQINCHRFDHETJLITVSSCAGLTALRSHEHCISSLVIEK	70
<i>A. simplex</i> KsdD4 (45.30)	.....MDWAEYVIVVSSCAGGAGTYTAARECISVCLVEA	37
<i>G. neofelfaecis</i> NRRL B-59395 KsdD5 (16.08)	.....MNIDWVIVVSSCAGGIVGLHAAHDDICISVILIER	35
<i>M. neoaurum</i> ATCC25795 KsdD1 (37.72)	.....MEYMTAQDYSVIVVSSCAGGIVGLHAAHDDICISVIVVEK	42
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 KsdD1 (46.12)	.....MPDORSESGRFDVIVVSSCAGGIVGLHAAHDDICISVILVEA	44
<i>P. testosteronei</i> KsdD (30.62)	.....MABQEVIVVSSCAGGIVGLHAAHDDICISVILVEK	36
<i>R. opacus</i> PD630 KsdD1 (31.70)	.....MRTPTGFHCNVPSCILLASVILPCKKGLITTPSFYNVFMKHEYJLITVSSCAGGIVGLHAAHDDICISVILVEK	75
<i>R. rhodochrous</i> DSM43269 KsdD2 (35.71)	.....MITQEVJLITVSSCAGGIVGLHAAHDDICISVILVEK	36
<i>R. ruber</i> Chol-4 KsdD2 (32.16)	.....MAINPVPVSPHTDTIVLITVSSCAGGIVGLHAAHDDICISVILVEK	45
Consensus	.....d gsg g	

## FAD-binding Domain

## B Active center

<i>R. erythropolis</i> SQ1 KsdD1 (100)	....TQRTKANRGVILMAAGCTECNAEMREQGTEGKATWSMGFFCANTGDAISAGIAGVGATATILECAWFCFGEVQ	287
<i>A. fumigatus</i> CICC 40167 KsdD (32.72)	....ERSTIRARCGVILCAGCAHNGGLREYGPVEANAEWISAARGDNGDAIVAGVRVGAAATALMDEAWGFTLRD	368
<i>A. simplex</i> KsdD4 (45.30)	....RRATIRARCGVILCAGCAHNGGLREYGPVEANAEWISAARGDNGDAIVAGVRVGAAATALMDEAWGFTLRD	289
<i>G. neofelfaecis</i> NRRL B-59395 KsdD5 (16.08)	....HCLLYLAFPAVADCAEMERCALQMLITEDGIRVPEAVLTATSLIRYDFAETSAARALPRILERFELEFA	269
<i>M. neoaurum</i> ATCC25795 KsdD1 (37.72)	....ESAPKLTIRARCGVILCAGCAHNGGLREYGPVEANAEWISAARGDNGDAIVAGVRVGAAATALMDEAWGFTLRD	332
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 KsdD1 (46.12)	....RLRVARRCGVILCAGCAHNGGLREYGPVEANAEWISAARGDNGDAIVAGVRVGAAATALMDEAWGFTLRD	295
<i>P. testosteronei</i> KsdD (30.62)	....RQCTNARRCGVILCAGCAHNGGLREYGPVEANAEWISAARGDNGDAIVAGVRVGAAATALMDEAWGFTLRD	328
<i>R. opacus</i> PD630 KsdD1 (31.70)	....POVERARRCGVILCAGCAHNGGLREYGPVEANAEWISAARGDNGDAIVAGVRVGAAATALMDEAWGFTLRD	360
<i>R. rhodochrous</i> DSM43269 KsdD2 (35.71)	....TRVIRARRCGVILCAGCAHNGGLREYGPVEANAEWISAARGDNGDAIVAGVRVGAAATALMDEAWGFTLRD	321
<i>R. ruber</i> Chol-4 KsdD2 (32.16)	....EVIVTARRCGVILCAGCAHNGGLREYGPVEANAEWISAARGDNGDAIVAGVRVGAAATALMDEAWGFTLRD	331
Consensus	....g a	

## Active center

## C Conserved C-terminal region

<i>R. erythropolis</i> SQ1 KsdD1 (100)	ALTAENGFFYAAARVILSDIGTKGGLVILVNGRVLIRADGSAIDGLYAAGNTASISLGRFVYEGFVPLGTAMVSYRAA	505
<i>A. fumigatus</i> CICC 40167 KsdD (32.72)	NIGAVRIFFYAIPLVFGDITGKGLITIEHARVIREDTFVQGLYAAGNTASVWGRVYEGFVPLGTAMVSYRAA	588
<i>A. simplex</i> KsdD4 (45.30)	FVLSDEGFFHAAAFGISDITGKGLIRITTSARVITADCTPIGLYAAGNTAAFSCTIYEGGNPIGTSMIFSHLAV	506
<i>G. neofelfaecis</i> NRRL B-59395 KsdD5 (16.08)	NIGETKHFYAAAKVFGDITGKGLIRITTSARVITADCTPIGLYAAGNTAAFSCTIYEGGNPIGTSMIFSHLAV	375
<i>M. neoaurum</i> ATCC25795 KsdD1 (37.72)	NIGETKHFYAAAKVFGDITGKGLIRITTSARVITADCTPIGLYAAGNTAAFSCTIYEGGNPIGTSMIFSHLAV	559
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 KsdD1 (46.12)	FVLSDEGFFHAAAFGISDITGKGLIRITTSARVITADCTPIGLYAAGNTAAFSCTIYEGGNPIGTSMIFSHLAV	512
<i>P. testosteronei</i> KsdD (30.62)	NIGETKHFYAAAKVFGDITGKGLIRITTSARVITADCTPIGLYAAGNTAAFSCTIYEGGNPIGTSMIFSHLAV	553
<i>R. opacus</i> PD630 KsdD1 (31.70)	SIGALAKAFFYAFKVFVFGDITGKGLIRITTSARVITADCTPIGLYAAGNTAAFSCTIYEGGNPIGTSMIFSHLAV	587
<i>R. rhodochrous</i> DSM43269 KsdD2 (35.71)	SIGVVDKAFYAFKVFVFGDITGKGLIRITTSARVITADCTPIGLYAAGNTAAFSCTIYEGGNPIGTSMIFSHLAV	548
<i>R. ruber</i> Chol-4 KsdD2 (32.16)	NIRPFTDGFYAFKVFVFGDITGKGLIRITTSARVITADCTPIGLYAAGNTAAFSCTIYEGGNPIGTSMIFSHLAV	557
Consensus		

图3 不同来源 KsdD 的氨基酸序列分析

Figure 3 Amino acid sequence analysis of KsdD from various microorganisms

注: 括号里的数字代表该菌株中 KsdD 与红平红球菌 SQ1 的 KsdD1 氨基酸序列的一致性(%)。

Note: The number in parenthese represents the amino acid sequence identity (%) between KsdD of this strain and KsdD1 of *R. erythropolis* SQ1.

7030<sup>[11]</sup>、红色分枝杆菌(*Mycobacterium rubrum*)和球形节杆菌(*Arthobacter globiformis*)<sup>[12]</sup>、近缘腐败粘液菌(*Septomyxa affinis*) ATCC6737<sup>[13]</sup>和 *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D<sup>[14]</sup>直接获得了 KsdD。与直接从细胞中分离纯化相比, 蛋白的异源表达能显著提高表达量和活性, 是更为有效的纯酶制备方法。但 KsdD 蛋白中普遍存在的跨膜区域是限制其活性表达的重要瓶颈, 如简单节杆菌中 KsdD 的两个疏水性氨基酸区段(193–214 和 379–401)构成了跨膜区。研究者通过对表达宿主、载体和条件(包括诱导条件、培养基组成、培养 pH 和外源添加相容性溶质等)的系统优化, 已成功实现了多个微生物中 KsdD 的有活性及可溶性表达和纯化。这些工作主要包括红平红球菌 SQ1 中的 KsdD1 (AAF19054)<sup>[15]</sup>、KsdD2 (AAL82579)<sup>[16]</sup>

和 KsdD3 (ABW74859)<sup>[17]</sup>、WY1406 的 KsdD (ARW78040)<sup>[18]</sup>、紫红红球菌 IFO 3338 的 KsdD<sup>[19]</sup>、睾酮假单胞菌 ATCC17140 的 KsdD<sup>[8]</sup>、新金分枝杆菌 NwIB-01 的 KsdD (GQ228843)<sup>[20]</sup>、黄变链霉菌(*Streptomyces flavovariabilis*)的 KsdD、新星诺卡氏菌 SH22a-1 的 KsdD、耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 的 KsdD1 (AIU08025)和 KsdD2 (AIU08027)<sup>[18]</sup>在大肠杆菌中的表达; 新金分枝杆菌 JC-12 的 KsdD 在钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum*)<sup>[21]</sup>、大肠杆菌<sup>[22]</sup>和枯草芽孢杆菌<sup>[23–24]</sup>中的表达; 新金分枝杆菌 DSM1381 中 3 个 KsdD 同工酶在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的表达<sup>[25]</sup>; 简单节杆菌中的 KsdD 在变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)<sup>[26–27]</sup>、大肠杆菌<sup>[28–32]</sup>和枯草芽孢杆菌<sup>[33]</sup>中的表达; 烟曲霉菌 CICC 40167 的 KsdD 在大肠杆菌和毕赤酵母中的表

达<sup>[7]</sup>。分析不同来源 KsdD 的生化特性,发现其具有一些共同特点,如大都是分子量范围为 56–62 kD 的单亚基蛋白,都属于典型的黄素蛋白,辅因子为黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD),位于细胞膜上,存在跨膜区域,需要底物诱导,异源表达时活性主要分布在胞内或者细胞膜。此外, KsdD 对巯基而非羰基试剂表现敏感,这说明巯基而非羰基在酶的催化功能中发挥重要作用<sup>[27]</sup>,但金属螯合剂对酶活无明显影响,说明该酶不需要金属离子<sup>[21,27,34]</sup>。值得注意的是,有的 KsdD 具有明显不同的生化特性。如, *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D 中的 KsdD 由 34 kD 和 23 kD 的两个亚基构成,主要存在于细胞质中,胞外和膜上的酶活较小<sup>[14]</sup>;近缘腐败粘液菌 ATCC6737 的 KsdD 不仅具有 C1,2 脱氢的活力,还能同时使 5 $\alpha$ 、5 $\beta$  和 C4,5 位不饱和的甾体化合物以及具有 C11 位羟基的甾体化合物脱氢<sup>[13]</sup>;珊瑚诺卡氏菌的 KsdD 在吩噻硫酸甲酯作为电子受体时,具有催化甾体 C4,5 脱氢反应的活性,但 AD 存在时该活性丧失<sup>[10]</sup>;烟曲霉菌 CICC 40167 的 KsdD 在毕赤酵母和大肠杆菌中异源表达时主要分布在细胞质中<sup>[7]</sup>。研究者分别从球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)、以限制诺卡氏菌和简单棒状杆菌(*Corynebacterium simplex*)的细胞中分离鉴定到维生素 K2(35),发现该物质是 KsdD 的天然电子接受体,外源添加能显著激活内源菌株和外源菌株(如近缘腐败粘液菌)无细胞提取液的反应活力,这可能与其它能和其他系统耦合完成黄素-连接的甾体脱氢酶还原形式的再生有关<sup>[13,35]</sup>。

酶的最适温度、最适 pH 以及稳定性是生物学特性的重要内容,但不同种属甚至同种不同株的微生物中其 KsdD 的酶学性质存在明显差异。新金分枝杆菌 DSM1381 中 KsdD2 (AVN89960)的最适温度和 pH 分别为 40 °C 和 8.0<sup>[34]</sup>,而该种另一个菌株 JC-12 的 KsdD 的最适温度和 pH 分别为 30 °C 和 7.0<sup>[18]</sup>;金属离子 Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>均能抑制

2 个 KsdD 的酶活,而 Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>的作用表现出明显的菌株特异性。简单节杆菌 IFO12069 中 KsdD (BAA07186)的最适温度和 pH 值分别为 40 °C 和 10.0, K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对酶活无影响, Ag<sup>+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>完全抑制酶活<sup>[26]</sup>。但另一个简单节杆菌 156 中 KsdD3 (WP\_038682818)和 KsdD4 (WP\_038682825)的最适温度分别是 30 °C 和 35 °C,最适 pH 分别是 7.5 和 7.0,其中, KsdD3 对甲醇、乙醇、异丙醇、DMSO 等有机溶剂表现出良好的稳定性<sup>[31-32]</sup>。

根据 KsdD 能否催化 C11 位有取代基(酮基或羟基)的甾体化合物(如可的松和氢化可的松),研究者将 KsdD 分为两类。如睾酮假单胞菌的 KsdD 不能催化 C11 位有羟基或者甾酮的化合物,而一些革兰氏阳性菌中的 KsdD 却对这些化合物表现出活性。表 3 对目前甾体转化反应重要菌株中 KsdD 的底物偏好性进行了小结。由表 3 可知,耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 的 KsdD1 具有最广的底物谱(14 种底物),而云豹粪便戈登氏菌 NRRL B-59395 的 KsdD1 (WP\_009680529)具有最窄的底物谱,只能转化 AD。其中,一些 KsdD 能够催化 C11 为有取代基的甾体化合物,如简单节杆菌 156 的 KsdD4 (WP\_038682825)、新金分枝杆菌 DSM1381 的 KsdD2、耻垢分枝杆菌的 KsdD1、红平红球菌的 WY 1406 的 KsdD 能够转化氢化可的松;而简单节杆菌 156 的 KsdD3 (WP\_038682818)和 KsdD4 (WP\_038682825)能够转化可的松。大部分的 KsdD 尤其偏好 C4–C5 位存在不饱和双键的底物,如 AD、9 $\alpha$ -OH-AD、睾酮、孕酮。对于 21-DC,只有简单节杆菌 156 的 KsdD3 (WP\_038682818)具有活性。值得注意的是,云豹粪便戈登氏菌 NRRL B-59395 的 KsdD3 (WP\_139026136)<sup>[39]</sup>能分别转化 4,9(11)-AD 和 AD 生成雄甾-1,4,9(11)-三烯-3,17-二酮和 ADD,其中,4,9(11)-AD 的转化率达到了 96%。该反应是糖皮质激素生产中的关键步骤之一。这些结果说明,云豹粪便戈登氏菌 NRRLB-59395 的

表 3 不同微生物来源 KsdD 的底物偏好性

Table 3 Substrate preference of KsdDs from different microorganisms

菌株	酶	底物
Strain	Enzyme	Catalytic substrate
<i>Mycobacterium neoaurum</i> ATCC25795 <sup>[36]</sup>	KsdD1 (ACV13200) <sup>CE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, Testosterone*, 5 $\alpha$ -T*
	KsdD2 (AHG53938) <sup>CE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, Testosterone*, 5 $\alpha$ -T*
	KsdD3 (AHG53939) <sup>CE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, Testosterone*
<i>Mycobacterium neoaurum</i> DSM1381 <sup>[34]</sup>	KsdD2 (AVN89960) <sup>PE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Hydrocortisone**, 17 $\alpha$ -OH-P*, NSC 44826*, HA**, RSA*, 16,17 $\alpha$ -epoxyprogesterone*, Canrenone*
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 <sup>[18]</sup>	KsdD1 (AIU08025) <sup>PE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, Hydrocortisone**, 21-Cl*, 17-carboxylic acid*, Testosterone*, PT*, Cortisone**, 17 $\alpha$ -OH-P*, Triene*, Diene*, HA**, Cortisolone*
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv <sup>[17]</sup>	KsdD1 (NP_218054) <sup>CE</sup>	Progesterone*, 5 $\alpha$ -T*, 5 $\alpha$ -AD*
<i>Rhodococcus erythropolis</i> SQ1 <sup>[17]</sup>	KsdD1 (AAF19054) <sup>CE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, 23,24-bisnor-5 $\alpha$ -cholestan-3-one acid*, 11 $\beta$ -cortisol**, 5 $\alpha$ -T*, 5 $\alpha$ -AD*, 5 $\alpha$ -P*
	KsdD2 (AAL82579) <sup>CE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, 23,24-bisnor-5 $\alpha$ -cholestan-3-one acid*, 11 $\beta$ -cortisol**, 5 $\alpha$ -T*, 5 $\alpha$ -AD*, 5 $\alpha$ -P*
	KsdD3 (ABW74859) <sup>CE</sup>	Progesterone*, 5 $\alpha$ -T*, 5 $\alpha$ -AD*, 5 $\alpha$ -P*
<i>Rhodococcus erythropolis</i> WY 1406 <sup>[18]</sup>	KsdD (ARW78040) <sup>PE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Hydrocortisone**, Progesterone*, Diene*, 17-carboxylic acid*, Testosterone*, Cortisone**, Cortisolone*, 17 $\alpha$ -OH-P*, Triene*, 21-Cl*, HA**
<i>Rhodococcus ruber</i> Chol-4 <sup>[37]</sup>	KsdD1 (AFH57399) <sup>CE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, Testosterone*, 19-hydroxy-4-androstene-3,17-dione*, Deoxycorticosterone*, 4-pregnen-3-one-20 $\beta$ -carboxylic acid*, Corticosterone**
	KsdD2 (AFH57395) <sup>CE</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, Testosterone*, Corticosterone*, 19-hydroxy-4-androstene-3,17-dione*, Deoxycorticosterone*, 4-pregnen-3-one-20 $\beta$ -carboxylic acid*
	KsdD3 (ACS73883) <sup>CE</sup>	Progesterone*, Deoxycorticosterone*, 5 $\alpha$ -T*
<i>Arthrobacter simplex</i> 156	KsdD3 (WP_038682818) <sup>PE [31]</sup>	AD*, 9 $\alpha$ -OH-AD*, Progesterone*, Testosterone*, 17-MT*, CA**, 11 $\alpha$ -OH-P**, 21-DC**, Cortisone**
	KsdD4 (WP_038682825) <sup>PE [32]</sup>	AD*, Testosterone*, Methyltestosterone*, Hydrocortisone**, Progesterone*, CA**
<i>Arthrobacter simplex</i> IFO 12069 <sup>[26]</sup>	KsdD (BAA07186) <sup>PE</sup>	AD*, Testosterone*, Progesterone*, Corticosterone**, Cortisone**, Adrenostene, 19-nortestosterone*, 11 $\alpha$ -hydroxy progesterone*
<i>Gordonia neofelifaecis</i> NRRL B-59395	KsdD1 (WP_009680529) <sup>RS [38]</sup>	AD*
	KsdD2 (WP_009680530) <sup>RS [38]</sup>	Progesterone*, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxyprogesterone*, Cholest-4-en-3-one*
	KsdD3 (WP_139026136) <sup>RS [38]</sup>	AD*, Progesterone*, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxyprogesterone*, Cholest-4-en-3-one*
	KsdD3 (WP_139026136) <sup>RS,CE [39]</sup>	AD*, Progesterone*, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxyprogesterone*, 4,9(11)-androstadiene-3,17-dione*
	KsdD4 (WP_139026142) <sup>RS [38]</sup>	AD*, Cholest-4-en-3-one*
	KsdD5 (WP_009678243) <sup>RS [38]</sup>	Progesterone*, 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxyprogesterone*, Cholest-4-en-3-one*

Note: <sup>CE</sup>: Crude enzyme; <sup>PE</sup>: Purified enzyme; <sup>RS</sup>: Recombinant strain. \*: No substituent at the C11 position; \*\*: The hydroxyl or ketone group at the C11 position. AD: 4-androstene-3,17-dione; 9 $\alpha$ -OH-AD: 9 $\alpha$ -hydroxy-4-androstene-3,17-dione; HA: Hydrocortisone acetate; 21-Cl: 21-chloro-17-hydroxy-pregna-4,9(11)-diene-3,20-dione; Triene: 21-acetoxy-pregna-4,9(11),16-triene-3,20-dione; 17-carboxylic acid: 4-andr-osten-3-one-5-ene-17-carboxylic acid; PT: Pregna-4,9(11),16-triene-3,20-dione; 17 $\alpha$ -OH-P: 17 $\alpha$ -hydroxypregn-4-ene-3,20-dione; NSC 44826: Androsta-4,9(11)-diene-3,17-dione; RSA: 17 $\alpha$ ,21-dihydroxyprogesterone 21-acetate; 5 $\alpha$ -T: 5 $\alpha$ -testosterone; 5 $\alpha$ -P: 5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione; 5 $\alpha$ -AD: 5 $\alpha$ -androstane-3,17-dione; 17-MT: Methyltestosterone; CA: Cortisone acetate; 11 $\alpha$ -OH-P: 11 $\alpha$ -hydroxy- 16,17 $\alpha$ -epoxyprogesterone; Diene: Androst-4,9(11)-diene-3,17-dione; 21-DC: Deoxycortisone.



KsdD3 在 9-卤代甾体的商业化生产上具有潜在的应用价值<sup>[39]</sup>。

A 环结构是否饱和以及 C17 位烷烃侧链的长度和结构也会影响 KsdD 的活性。由表 3 可知,只有红平红球菌 SQ1 的 KsdD3、结核分枝杆菌 H37Rv 的 KsdD1 和赤红球菌 Chol-4 的 KsdD3 (ACS73883) 对具有饱和 A 环的 3-酮基类甾体化合物表现出良好活性,如 5 $\alpha$ -甾酮。简单节杆菌 156 的 KsdD3 (WP\_038682818)和 KsdD4 (WP\_038682825)对 C17 位连接更小侧链基团(如羰基和羟基)表现出更高活性,对含有更长 C17 位侧链的底物(如醋酸可的松,氢化可的松)表现出适中的活性,这与耻垢分枝杆菌中的 KsdD1 (对氢化可的松和孕酮具有较高活性)和红平红球菌 WY 1406 中的 KsdD (对 Diene 具有较高活性,对 AD 活性适中)明显不同<sup>[31]</sup>。而另一个简单节杆菌 IFO12069 的 KsdD 对含有 11 $\alpha$ -羟基和 11 $\beta$ -羟基的甾体化合物的转化效率较低<sup>[26]</sup>。类似地,云豹粪便戈登氏菌 NRRL B-59395 的 KsdD3 对具有 3-酮基-4-烯结构且 C17 位上含有小的脂肪族侧链或不含脂肪族侧链的 A 环不饱和的底物(如 AD 和孕酮)具有较高的活性,而红平红球菌 SQ1 的 KsdD1 对 AD 具有良好活性,但对孕酮活性较低。云豹粪便戈登氏菌 NRRL B-59395 的 KsdD3 对 C17 位上连接较长侧链的底物,如胆甾醇-4-烯-3-酮(胆固醇代谢的第 2 个中间产物)和 (25R)-胆甾烯-26-油酸(侧链降解的第 1 个产物)没有活性,这一点与红平红球菌 SQ1 中的 3 个 KsdD 和结核分枝杆菌 H37Rv 的 KsdD 相同。该菌株中的 KsdD3 对 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$  环氧孕酮的转化率比孕酮低 3.5 倍,说明除了 17-烷基侧链的长度,D-环上附加的分子基团也会影响 KsdD3 的催化活性<sup>[39]</sup>。

同一微生物中的多个 KsdD 同工酶的底物偏好性表现明显的差异性。红平红球菌 SQ1 的 KsdD1 和 KsdD2 比 KsdD3 具有更宽的底物谱,二者更偏好的底物是 AD 和 9 $\alpha$ -OH-AD。但 KsdD3 对这两种化合物完全没有活性,其更偏好 A 环饱和的 3-甾酮化合物(如 5 $\alpha$ -AD、5 $\alpha$ -甾酮和 5 $\alpha$ -孕酮),这和

与其具有较近进化关系的结核分枝杆菌 H37Rv 的 KsdD1 类似,但后者具有更窄的底物谱<sup>[17]</sup>。赤红球菌 Chol-4 的 KsdD1 (AFH57399)对 9 $\alpha$ -OH-AD 与甾酮的活性比较高,KsdD2 (AFH57395)对孕酮的活性最高;但 KsdD3 对 5 $\alpha$ -甾酮表现较高的活性,这与和其位于同一进化分支的红平红球菌 SQ1 的 KsdD3 的性质相似<sup>[17,37]</sup>。新金分枝杆菌 ATCC 25795 中的 3 个 KsdD 同工酶分别处于不同的进化分支,但它们均可以转化 AD、9 $\alpha$ -OH-AD、孕酮和甾酮;值得注意的是,KsdD1 (ACV13200)和 KsdD2 (AHG53938)还能转化 A 环饱和的底物 5 $\alpha$ -甾酮,且 KsdD2 的表观  $K_m$  值近乎是 KsdD1 的 2.3 倍,但 KsdD3 (AHG53939)对此化合物则没有活性;比较动力学参数发现,KsdD1 对 9 $\alpha$ -OH-AD 表现出最高的活性和底物亲和力,而与其进化关系较近的红平红球菌 SQ1 里的 KsdD3 (一致性 68%)对 9 $\alpha$ -OH-AD 没有活性<sup>[17,36]</sup>。KsdD2 对 9 $\alpha$ -OH-AD 的活性最高,但对甾酮的亲和力最大;KsdD3 对甾酮的活性最高,但对 AD 的亲和力最大<sup>[36]</sup>。然而对于另一个新金分枝杆菌 DSM1381,3 个 KsdD 同工酶中只有 KsdD1 (AVN89959)对植物甾醇表现出较高活性,只有 KsdD2 对 AD 和 4HP 表现出较高活性,而 KsdD3 (AVN89961)则对上述化合物没有明显活性,这可能与位于催化域的 Tyr<sup>318</sup> 附近的 8 处取代有关<sup>[25]</sup>。

### 3 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶的生理作用

不同微生物中含有 KsdD 同工酶的数量不同,而且分布在不同的甾体代谢基因簇上。如贾斯汀红球菌(*Rhodococcus jostii*) RHA1 的基因组有 4 个公认的甾体代谢基因簇:ro02478-ro02492 (基因簇 2)、ro04531-ro04705 (基因簇 1)、ro05788-ro05832 (基因簇 3)和 ro09002-ro09040 (基因簇 4),每个基因簇都有编码 KsdD 酶的基因,但生理作用尚不清楚<sup>[40]</sup>。基于生物信息学分析,利用基因敲除和回补等代谢工程操作,研究者对一些重要甾体转化反应菌株中 KsdD 同工酶的生理作用展开了系统研究(表 4)。

表 4 KsdD 同工酶的生理作用  
Table 4 Physiological role of KsdD isoenzymes

菌株	同工酶	途径	生理作用
Strain	Isoenzyme	Pathway	Physiological role
<i>Rhodococcus erythropolis</i> SQ1 <sup>[15-16,41]</sup>	KsdD1 (AAF19054)	AD→9 $\alpha$ -OH-AD	KsdD1 (Major); KsdD2 (Minor)
	KsdD2 (AAL82579)	9 $\alpha$ -OH-AD catabolism	KsdD1 (Minor); KsdD2 (Major)
	KsdD3 (ABW74859)		
<i>Rhodococcus ruber</i> Chol-4 <sup>[42]</sup>	KsdD1 (AFH57399)	Cholesterol catabolism	KsdD1 (No); KsdD2 (Moderate); KsdD3 (Moderate)
	KsdD2 (AFH57395)		
	KsdD3 (ACS73883)	AD→ADD	KsdD1 (No); KsdD2 (Major); KsdD3 (Minor)
		9 $\alpha$ -OH-AD catabolism	KsdD2 (Major)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> DSM43269 <sup>[43]</sup>	KsdD1 (BAA22789)	AD→9 $\alpha$ -OH-AD	KsdD1 (Minor); KsdD2 (Major)
	KsdD2 (APT43112)	9 $\alpha$ -OH-AD catabolism	KsdD3 (No)
	KsdD3 (ADY18320)		
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 <sup>[44]</sup>	KsdD1 (AIU08025)	Cholesterol→AD/9 $\alpha$ -OH-AD	KsdD1 (Major); KsdD2 (Minor)
	KsdD2 (AIU08027)		
<i>Mycobacterium neoaurum</i> ATCC25795 <sup>[36]</sup>	KsdD1 (ACV13200)	Cholesterol catabolism	KsdD1 (Major); KsdD2 (Negligible); KsdD3 (Minor)
	KsdD2 (AHG53938)		
	KsdD3 (AHG53939)	AD→ADD	KsdD1 (Moderate); KsdD3 (Moderate)
		9 $\alpha$ -OH-AD catabolism	KsdD1 (Moderate); KsdD2 (Negligible); KsdD3 (Moderate)
<i>Mycobacterium neoaurum</i> DSM1381 <sup>[25]</sup>	KsdD1 (AVN89959)	Phytosterols→HPD	KsdD1 (Major); KsdD2 (Minor); KsdD3 (Negligible)
	KsdD2 (AVN89960)	AD→ADD	KsdD2 (Major); KsdD3 (Negligible)
	KsdD3 (AVN89961)		

红平红球菌 SQ1 中有 3 个 KsdD 同工酶；其中，KsdD1 和 KsdD2 在 AD 代谢生成 9 $\alpha$ -OH-AD 和 9 $\alpha$ -OH-AD 的途径中发挥重要作用。KsdD1 在 AD 代谢生成 9 $\alpha$ -OH-AD 的途径中的作用较大，这与处于同一进化树分支的新金分枝杆菌 ATCC 25795 中的 KsdD3 作用相似；然而 KsdD2 在 9 $\alpha$ -OH-AD 代谢途径中的作用较大<sup>[15-17,41]</sup>。赤红球菌 Chol-4 存在 3 个 KsdD 同工酶；其中，KsdD2 和 KsdD3 均参与胆固醇的代谢途径；在 AD 的代谢途径中，KsdD2 是关键酶，而 KsdD3 发挥较小作用；而 KsdD1 对胆固醇和 AD 的代谢没有直接作用，这与处于同一进化树分支的新金分枝杆菌 DSM 1381 的 KsdD3 作用相似；此外，KsdD2 还是 9 $\alpha$ -OH-AD 代谢途径中的必需酶<sup>[25,42]</sup>。紫红红球菌 DSM43269 中有 3 个 KsdD 同工酶，进化树分析确定它们各属于 3 个不同的大类<sup>[43]</sup>。单基因敲除和多基因组合敲除的实验结果表明，KsdD2 (APT43112)是 AD 和 9 $\alpha$ -OH-AD 代谢途径中的关键酶，这与和它分布在不同进化树分支中的 Chol-4 中的 KsdD2 作用相似，但却与处于同一进化树分支的红平红球菌 SQ1 中 KsdD3 和新金分枝杆菌

DSM1381 中 KsdD1 的作用完全不同；KsdD1 (BAA22789)的作用很小，这与跟它分布在同一进化树分支中的新金分枝杆菌 DSM1381 中的 KsdD3 和赤红球菌 Chol-4 中的 KsdD1 的作用相似，但却与处于同一进化树分支的红平红球菌 SQ1 中 KsdD1 的作用完全不同<sup>[17,25,42-43]</sup>。KsdD3 (ADY18320)在上述过程中不起作用，这与和它分布在不同进化树分支中的新金分枝杆菌 ATCC25795 中 KsdD2 的作用相似，却与处于同一进化树分支中的红平红球菌 SQ1 中的 KsdD2 和赤红球菌 Chol-4 中的 KsdD2 作用完全不同(两者都是 9 $\alpha$ -OH-AD 代谢途径中的关键酶)<sup>[43]</sup>。

敲除实验表明，结核分枝杆菌 H37Rv 中的 KsdD1 在胆固醇代谢途径中发挥着重要作用<sup>[45]</sup>。通过生物信息学分析，研究者预测耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 存在 6 个 KsdD 同工酶；基因的敲除和回补实验表明，KsdD1 是胆固醇代谢生成 AD 和 9 $\alpha$ -OH-AD 的关键酶；KsdD2 发挥较小作用，其只有在过表达的情况下才能够恢复 KsdD1 敲除菌株丧失的胆固醇代谢积累 AD 进而生成 ADD 的活力；二者的共同敲除完全抑制了菌株在营养丰富

培养基中的 KsdD 活性, 导致其能代谢胆固醇稳定积累 AD; 但在 AD 或者胆固醇为唯一碳源的基本培养基上, 双基因敲除菌株能够生长, 这可能是因为该条件诱导了该菌株内其他 *ksdD* 基因的表达, 而这些基因在营养丰富培养基里是不表达的; 值得注意的是, 结核分枝杆菌的 KsdD1 (MT3641 而不是 MT0809) 的导入能够回补耻垢分枝杆菌 KsdD1 和 KsdD2 双基因敲除菌株丧失的胆固醇代谢活力<sup>[44-45]</sup>。

即使是亲缘关系很近的微生物(甚至是同一种但却是不同菌株), 其含有的 KsdD 数量和生理作用仍存在明显差异, 有的甚至差别很大。如新金分枝杆菌 NwIB-01 含有 1 个 KsdD, 该基因敲除后的菌株由主要积累 ADD 变成了主要积累 AD, 这说明该 KsdD 是 AD 转化生成 ADD 过程的关键酶<sup>[20]</sup>。2014 年, Yao 等<sup>[36]</sup>报道了新金分枝杆菌 ATCC25795 存在 3 个 KsdD 的同工酶。在胆固醇代谢途径中, KsdD1 发挥着关键作用, 这与和处于同一进化树分支的赤红球菌 Chol-4 的 KsdD3 作用相似; 而 KsdD3 作用较小, 二者相互独立却无法代替; 在 9 $\alpha$ -OH-AD 代谢途径中, KsdD1 和 KsdD3 均发挥着重要作用; 在 AD 代谢途径中, KsdD1 和 KsdD3 发挥着重要作用且存在明显的合作关系; 而 KsdD2 在胆固醇和 9 $\alpha$ -OH-AD 代谢途径中的作用较小<sup>[36,42]</sup>。另一个新金分枝杆菌 DSM 1381 中存在 3 个 KsdD 同工酶, 它们被分在了完全独立的 3 个簇中; 其中, KsdD1 的氨基酸序列和同种不同株的菌株 ATCC25795 的 KsdD1 相似性为 97%, 但和分枝杆菌属的另一菌株 *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1816D 具有最高的相似性(99%); KsdD2 和 KsdD3 的氨基酸序列和同种不同株的菌株 ATCC25795 的 KsdD2 和 KsdD3 的一致性最高(分别为 85%和 97%)<sup>[25]</sup>。植物甾醇诱导下的基因转录水平分析和敲除菌株的转化实验表明, KsdD1 在植物甾醇代谢生成 HPD 的过程中发挥关键作用, KsdD2 作用较小而 KsdD3 几乎无作用; 敲除菌株  $\Delta$ KsdD1 中分别过表达 3 个基因后发现,

KsdD2 在 AD 转化生成 ADD 的过程中发挥着主要作用, 这与红平红球菌 SQ1 的 KsdD1、赤红球菌 Chol-4 和紫红红球菌 DSM43269 中的 KsdD2 主要负责 AD 代谢的作用相似, 但与处于同一进化树分支的新金分枝杆菌 ATCC25795 中的 KsdD2 对 AD 代谢没有作用<sup>[25,36]</sup>。KsdD3 在植物甾醇代谢生成 HPD 和 AD 转化生成 ADD 的途径中几乎没有作用, 这一结果与耻垢分枝杆菌 KsdD3 的作用(对多个底物具有高活性但却对 AD 降解过程无显著作用)相似, 但与处于同一进化树分支的新金分枝杆菌 ATCC25795 KsdD1 的作用(对 AD 降解具有中等活性)略有不同<sup>[25]</sup>。结合图 2 和表 3, 参与胆固醇、AD、9 $\alpha$ -OH-AD 代谢途径的 KsdD 酶主要分布在第一、第三和第七大分支, 但酶的进化关系与其生理作用之间表现出复杂的相关性。

除了关注每个 KsdD 在菌株催化 C1,2 脱氢反应中发挥的特定作用, 研究者还发现 KsdD 同工酶之间存在着复杂的相互关系。如, 红平红球菌 SQ1 中 KsdD1 或 KsdD2 的单敲除不会影响菌株对 AD 和 9 $\alpha$ -OH-AD 的代谢, 但二者的同时敲除则完全阻断了菌株对 9 $\alpha$ -OH-AD 的代谢途径<sup>[15-16,41]</sup>。紫红红球菌 DSM43269 中存在 3 个 KsdD 同工酶, 其中, KsdD1 在 9 $\alpha$ -OH-AD 代谢途径中的作用只有在 KsdD2 敲除后才能表现出来<sup>[43]</sup>。这些结果表明, KsdD 同工酶在甾体 C1,2 脱氢反应过程中的作用表现出明显的菌株特异性, 而且受到催化的底物和其他共存的同工酶的影响。

#### 4 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶的催化机理

KsdD 跨膜区域的存在是限制其结晶工作的瓶颈。受限于未知的三维结构信息, 长期以来, 研究者对 KsdD 的催化机理知之甚少。早期研究认为, KsdD 催化的甾体 C1,2 脱氢反应是底物 C1,2 位上 2 个氢原子的直接消除, 而并非是先羟基化后脱水的过程<sup>[10,46-47]</sup>。之后, 利用同位素标记的底物对反应过程进行监测, 研究者发现脱氢过程通过 3-酮基甾体底物 C1 位上  $\alpha$  氢原子和 C2 位上  $\beta$  氢原子

反式双轴的消除优先进行, KsdD 在抑制酶翻转的条件下催化 C2 位上碱基不稳定的氢原子交换; 这一结果暗示, KsdD 催化反应机理应遵从两步的单分子共轭碱消除(E1cb)理论: 首先, 3-酮基甾体底物 C3 位上的酮基与酶的亲电残基发生强烈的相互作用, 造成了 C-2( $\beta$ )氢键的断裂, 这个氢原子以质子的形式通过一个广义碱基脱除, 形成一个烯醇化物的中间体或者负碳离子的中间体; 之后, C1 和 C2 位之间形成一个双键, 同时, 氢负离子从 C1 位转移到黄素辅酶<sup>[48-50]</sup>。

2012 年, 荷兰格罗宁根大学的 Dijkstra 课题组将红平红球菌 SQ1 的 KsdD1 在大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达, 蛋白经分离纯化后利用坐滴蒸汽扩散法进行结晶, 通过 X-射线衍射获得了包含辅因子 FAD 的 KsdD 三维结构信息(PDB 登录号: 4C3X), 并在此基础上, 解析了产物和酶的共晶结构(PDB 登录号: 4C3Y); 由图 4 可知, KsdD1 由 FAD 结合域(位于底部)和催化域(位于顶部)两部分组成; 其中, FAD 结合域由两个分离的多肽段(氨基酸残基 3-278 位和 449-510 位)组成, 分别形成亚结构域 FAD-A 和 FAD-B, 而催化域位于这两个亚结构域之间(氨基酸残基 279-448 位); 在亚结构域 FAD-A 中存在 Rossmann 折叠的超二级结构, 其前半部分( $\beta$ 1b- $\alpha$ 1- $\beta$ 2- $\alpha$ 7- $\beta$ 5)与基本的拓扑结构类似, 后半部分( $\beta$ 8b- $\alpha$ 9- $\beta$ 19- $\alpha$ 15)由于缺少第 3 个  $\beta$  链略有不同; 此外,  $\Delta^1$ -KsdD1 的 Rossmann 结构的两部分不是通过  $\alpha$ -螺旋而是利用一个三股的  $\beta$ -曲折作为交叉进行连接; 这种折叠结构已在谷胱甘肽还原酶结构家族中发现, 而且在多个含有 FAD 的酶中也观察到<sup>[51-52]</sup>。该团队在 KsdD 蛋白三维结构解析上的成果具有里程碑式的意义, 不仅为酶催化机理的研究提供了必要的理论指导, 也为类似的具有跨膜区域的膜蛋白结晶和结构解析工作提供了重要的方法学指导和可靠的技术保障。

综合分析定点突变结果和三维结构信息, 研究者提出了以下的催化机理: 位于 FAD 结合域的

Tyr<sup>487</sup> 的羟基和 Gly<sup>491</sup> 的酰胺骨架结合在底物分子 C3 位的酮基, 促进了 C3 位的酮-烯醇互变异构化和 C2 位氢原子(非严格立体异构)的活化; 在位于 FAD 结合域的 Tyr<sup>119</sup> 氢键的辅助作用下, 使得位于催化域 Tyr<sup>318</sup> 的基本特征增强, 将 C2 原子中的轴向  $\beta$  氢原子以质子形式脱除, 导致碳负离子的短暂形成, 产生的烯醇化物在 C2 原子处借助 Tyr<sup>318</sup> 的作用与溶剂发生氢原子的交换; 之后, 碳负离子的负电荷迁移到 C1 原子, 同时, C1 原子的轴向  $\alpha$  氢原子断裂, 以氢阴离子的形式转移到 FAD 异咯嗪环的 N5 原子, 这样就在底物 A 环的 C1 和 C2 位之间形成一个双键<sup>[51-52]</sup>。

## 5 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶的关键氨基酸及酶的分子改造

KsdD 关键氨基酸的确定是全面阐明酶催化机理的重要基础, 进而指导酶的分子改造, 最终为高效菌株的构建提供优良的酶分子。表 5 汇总了 KsdD 氨基酸突变对酶催化活性的影响。

最初, 研究者主要通过氨基酸序列的比对预测关键氨基酸。如通过与腐败希瓦氏菌中富马酸还原酶的关键氨基酸比对, 推测简单节杆菌中 KsdD 的 Arg<sup>242</sup> 参与底物结合和定位, Arg<sup>225</sup> 作为亲质子的残基无法进行质子化, 从而为酶提供最适的碱性催化环境(pH 在 9.5 附近); Glu<sup>240</sup> 在碱性环境下为 Arg<sup>242</sup> 提供质子<sup>[57]</sup>。但这种方法由于缺乏实验验证, 可靠性较低。之后, 采取氨基酸化学修饰的方法, 发现紫红红球菌 IFO3338 中 KsdD 的 Tyr<sup>121</sup> 是影响酶催化活性的重要氨基酸, 位于蛋白分子内部的 Tyr<sup>104</sup> 和蛋白分子表面的 Tyr<sup>116</sup> 通过影响酶与甾体底物的结合对酶的催化活性产生重要影响<sup>[53]</sup>。氨基酸化学修饰和 pH 依赖的动力学参数测定相结合的方法发现, 组氨酸是珊瑚诺卡氏菌 KsdD 的关键氨基酸, 精氨酸对酶活发挥具有一定作用<sup>[58]</sup>。研究者通过比较酶活差异菌株中 KsdD 的序列, 也获得了一些关键氨基酸的信息, 如红平红球菌 SQ1

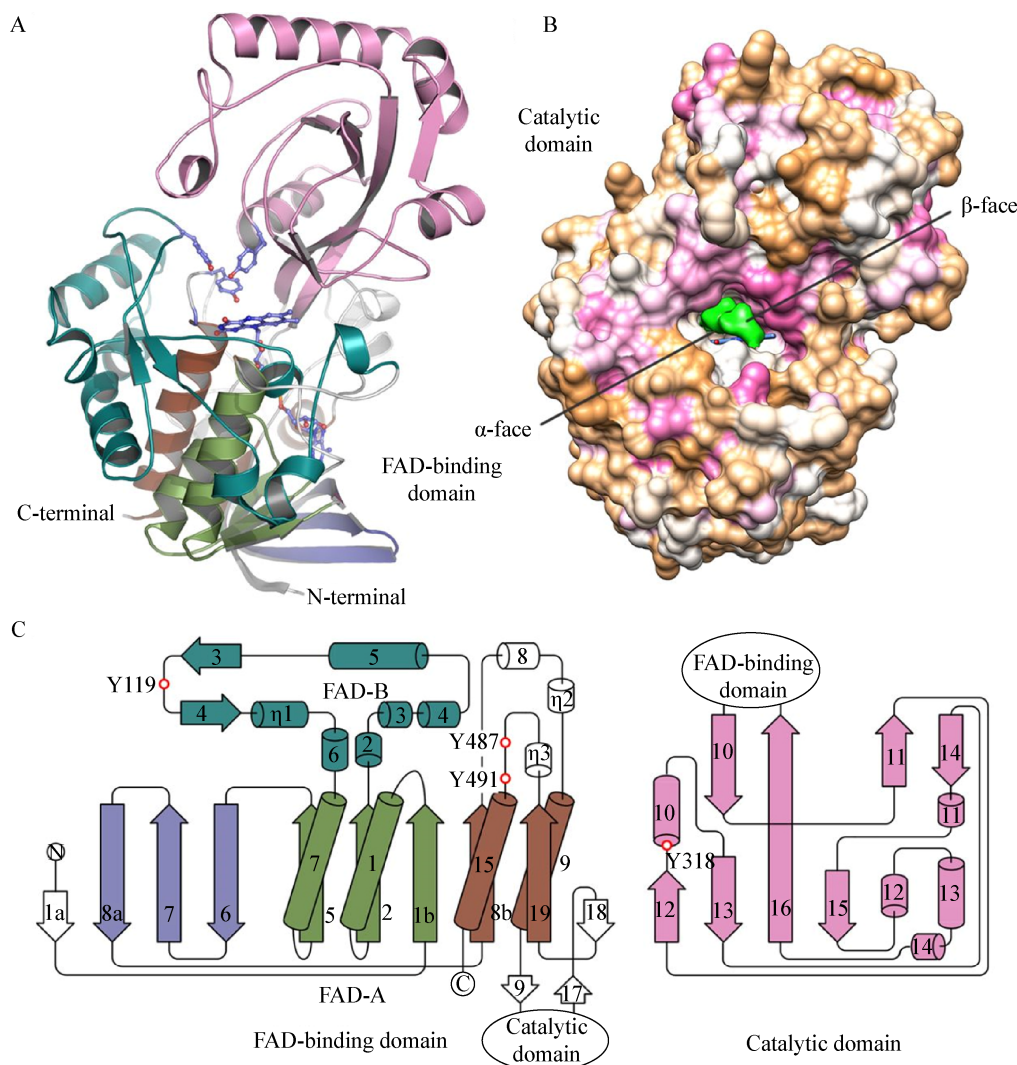


图4 *R. erythropolis* SQ1 的 KsdD1 的晶体结构和拓扑图<sup>[51]</sup>

Figure 4 Crystal structure and topology diagram of KsdD1 from *R. erythropolis* SQ1<sup>[51]</sup>

注: A:  $\Delta^1$ -KsdD1 单体的缎带图, 催化结构域(粉色)位于顶部, FAD 结合域位于底部。在 FAD 结合域中, 浅绿色、棕色和蓝紫色分别代表 Rossmann 折叠(亚结构域 FAD-A)的前半部分、后半部分和  $\beta$ -折叠交叉, 深青色代表亚结构域 FAD-B, 活性位点中三个酪氨酸残基的侧链以及 FAD 用碳原子的球-棍结构(蓝色)表示, 图中放大区域为  $\Delta^1$ -KsdD1 的 Rossmann 折叠(亚结构域 FAD-A)与 FAD 相互作用的缎带图, 各种位于结构域之间和亚结构域的残基被编号并用红色表示, FAD 用碳原子的球-棍结构(蓝色)表示; B:  $\Delta^1$ -KsdD1 的分子表面图, 根据疏水性最小、零和最大分别用棕褐色、白色和深粉色标记, 结合 ADD 配体的电子密度用绿色表面表示, 包括  $\alpha$  和  $\beta$  表面。FAD 用碳原子的球-棍结构(蓝色)表示,  $\Delta^1$ -KsdD1 分子的取向与图 A 大致相同; C:  $\Delta^1$ -KsdD1 的简化二级结构拓扑图(颜色标注同图 A), 圆柱和箭头分别代表螺旋和  $\beta$ -链, 影响酶活的关键氨基酸残基用红色圆圈表示。

Note: A: Ribbon drawing of the  $\Delta^1$ -KsdD1 monomer. The catalytic domain (in pink) is at the top, whereas the FAD-binding domain is at the bottom. In the FAD-binding domain, the first half, the second half, and the  $\beta$ -meander crossover of the Rossmann fold (subdomain FAD-A) are colored pale green, brown, and deep blue, respectively, whereas subdomain FAD-B is in deep teal. The side chains of the three tyrosine residues in the active site, as well as FAD, are shown in ball and stick representation with carbon atoms in blue. B: Molecular surface drawing of  $\Delta^1$ -KsdD1 colored according to its hydrophobicity (minimum, tan; zero, white; maximum, hot pink). The electron density for the bound ADD ligand is represented as a green surface with its faces indicated as  $\alpha$  and  $\beta$ . FAD is depicted in ball and stick representation with carbon atoms in blue. The  $\Delta^1$ -KsdD1 molecule is in approximately the same orientation as in A. C: Simplified secondary structure topology diagram of  $\Delta^1$ -KsdD1 colored in accordance with A. Cylinders and arrows symbolize helices and  $\beta$ -strands, respectively. Key residues for enzyme activity are indicated with red circles.

表 5 KsdD 氨基酸突变对酶的催化活性的影响  
Table 5 The effect of amino acid mutation on KsdD enzyme activity

菌株	KsdD	氨基酸突变位点	结果
Strain		Amino acid mutation	Result
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> IFO3338	KsdD <sup>[53]</sup>	Y104A	$V_{\max}/K_m \downarrow 80.4\%$
		Y116F	$V_{\max}/K_m \downarrow 82\%$
		Y116S	$V_{\max}/K_m \downarrow 90\%$
		Y121S	$V_{\max}/K_m \downarrow 92.7\%$
		Y116A	$V_{\max}/K_m \downarrow 98.2\%$
		Y121A	$V_{\max}/K_m \downarrow 99.95\%$
		Y121F	$V_{\max}/K_m \downarrow 99.97\%$
<i>Rhodococcus erythropolis</i> SQ1	KsdD1 (AAF19054) <sup>[51]</sup>	Y487F	Activity $\downarrow 97.4\%$
		Y119F	Activity $\downarrow 99.5\%$
		Y318F	Activity $\downarrow 100\%$
<i>Mycobacterium neoaurum</i> ST-095	KsdD <sup>[54]</sup>	T503I, S325F	Activity $\downarrow 100\%$
		V366S	Activity $\uparrow 176\%$
		S138L	Conversion $\downarrow 99.47\%$
<i>Mycobacterium neoaurum</i> TCCC 11028	KsdD <sup>[55]</sup>	Y472F	Conversion $\downarrow 1.76\%$
		Y122F	Conversion $\downarrow 60.07\%$
		E140V	Conversion $\downarrow 61.01\%$
		S138A	Conversion $\downarrow 76.36\%$
		Y541F	Conversion $\downarrow 97.48\%$
		Y125F	Conversion $\downarrow 98.56\%$
		Y365F	Conversion $\downarrow 99.48\%$
<i>Mycobacterium neoaurum</i> DSM1381	KsdD2 <sup>[34]</sup>	R178K	Catalytic activity $\downarrow <20\%$
		R178A	Catalytic activity $\downarrow \sim 40\%$
		R178T, R178L	Catalytic activity $\downarrow >95\%$
		R178Y, R178E	Catalytic activity $\downarrow 100\%$
<i>Arthrobacter simplex</i> 156	KsdD3 (WP_038682818) <sup>[30-31]</sup>	G492Y	Conversion $\uparrow 20\%$
		Y320L	NC
		Y488F, Y120R	Conversion $\downarrow \sim 100\%$
		W299A/G/N/Q	Activity $\uparrow >50\%$
		W299E/H	Activity $\uparrow >40\%$
		W299S/T/Y	Activity $\uparrow >20\%$
		W299D/K/M/R, P139A/D	NC
		W299C/F/I/V	Activity $\downarrow >20\%$
		P139E	Activity $\downarrow >50\%$
		W299L	Activity $\downarrow >80\%$
		W299P	Activity $\downarrow >90\%$
		F296A, P139S, W117F/I, Y115A/R	Activity $\downarrow >95\%$
		M361N, D321S, L298V, F296G,	Activity $\downarrow 100\%$
		P155E, I136E/N, H134S, W117A/Y	
		Y115F	NC
	KsdD4 (WP_038682825) <sup>[32]</sup>	Y115A	Activity $\downarrow 50\%$
		E332A	Activity $\downarrow 60\%$

Note: NC: No changed;  $\downarrow$ : Decreased activity;  $\uparrow$ : Increased activity.



中 KsdD2<sup>[16]</sup>高保守性的 Thr<sup>503</sup> 和半保守性的 Ser<sup>325</sup>, 新金分枝杆菌 ST-095 中 KsdD<sup>[54]</sup>的 Val<sup>366</sup> 和 TCCC 11028 中 KsdD<sup>[55]</sup>的 Ser<sup>138</sup>。

2013 年, Rohman 等<sup>[51]</sup>将红平红球菌 SQ1 的 KsdD1 分别位于 FAD 结合域的氨基酸残基 Tyr<sup>119</sup>、Tyr<sup>487</sup> 和位于催化域的 Tyr<sup>318</sup> 均定点突变为苯丙氨酸, 与野生型相比, 突变体 Y119F 和 Y487F 的酶活下降了 99.5%和 97.4%, Y318F 的酶活则完全消失, 说明这 3 个氨基酸是关键氨基酸。目前, PDB 数据库中包含红平红球菌 SQ1 的 KsdD 的两个结构信息, 分别为 4C3X (KsdD 和 FAD 共晶结构)和 4C3Y (KsdD 和 FAD、ADD 共结晶结构)。这也是目前唯一结构解析的 KsdD。因此, 后续的研究主要采取了同源建模和分子对接技术(以 4C3X 为模板)预测, 定点突变和酶活检测验证的思路。2017 年, Qin 等<sup>[56]</sup>确定位于 FAD 结合域的 Tyr<sup>125</sup>、Tyr<sup>541</sup> 和位于催化域的 Tyr<sup>365</sup> 是新金分枝杆菌 TCCC 11028 中 KsdD (与红平红球菌 SQ1 中 KsdD1 的氨基酸序列一致性为 38%)的关键氨基酸, 位于 FAD 结合域的 Tyr<sup>122</sup>、Ser<sup>138</sup>、Glu<sup>140</sup> 在酶的催化活性中发挥一定作用, 位于催化域的 Tyr<sup>472</sup> 不是关键氨基酸。新金分枝杆菌 DSM1381 中 KsdD2<sup>[34]</sup>的重要氨基酸是位于底物结合位点的 Arg<sup>178</sup>。

近年来, 研究者对简单节杆菌中的两个 KsdD 同工酶的关键氨基酸进行了分析。对于 KsdD3 (WP\_038682818) (其与红平红球菌 SQ1 中 KsdD1 的氨基酸序列一致性为 47.2%), 位于催化结构域的 Tyr<sup>120</sup> 和影响互变异构化的 Tyr<sup>488</sup> 是关键氨基酸, 位于催化结构域的 Try<sup>320</sup> 对酶活几乎无影响, 但能提高酶的稳定性, 突变体 G492Y 同时提高了酶的活力和稳定性<sup>[30]</sup>。与底物识别和结合相关的 Tyr<sup>115</sup>、Trp<sup>117</sup>、His<sup>134</sup>、Ile<sup>136</sup>、Pro<sup>155</sup>、Phe<sup>296</sup>、Leu<sup>298</sup>、Asp<sup>321</sup> 和 Met<sup>361</sup> 是关键氨基酸, 而 Pro<sup>139</sup> 不是关键氨基酸; 值得注意的是, 突变体 W299A 提高了酶对 AD 的活性, 这可能是因为扩大了底物结合空腔并减轻了对底物的空间干扰, 从而促进了 C17

羟基/羰基甾体底物的识别<sup>[27]</sup>。在此基础上, 研究者对位于底物结合空腔入口处的 Trp<sup>299</sup> 残基进行饱和突变, 当用 Ala、Glu、Gly、His、Asn、Gln、Ser 和 Tyr 分别替代时, 酶活提高; 当用 Asp、Lys、Met、Arg 分别替代时, 酶活无明显变化; 当用 Cys、Phe、Ile、Leu、Pro 或 Val 分别替代时, 酶活下降; 其中, 突变体 W299A 和 W299G 具有最高的活性, 以 AD 为底物时, 突变体 W299A 和 W299G 相对酶活力比野生型分别提高了 88%和 63%<sup>[31]</sup>。对于另一个 KsdD4 (WP\_038682825) (其与红平红球菌 SQ1 中 KsdD1 的氨基酸序列一致性为 35.8%), 位于底物结合域的 Tyr<sup>115</sup> 和 Glu<sup>332</sup> 对于酶活发挥一定作用<sup>[32]</sup>。深入分析后发现, 酶活与氨基酸残基的位置和性质之间存在着复杂的关系。如 KsdD3 (WP\_038682818)的 117 位和 299 位的色氨酸突变为丙氨酸时, 酶的活力出现了完全相反的变化, 前者使酶失活而后者使酶活提高了约 1 倍; 然而将 KsdD3 (WP\_038682818)的 139 位脯氨酸分别突变为天冬氨酸和丙氨酸时, 酶活无变化; 但突变为丝氨酸时, 酶活完全丧失<sup>[31]</sup>。值得注意的是, KsdD4 (WP\_038682825)的 115 位酪氨酸突变为丙氨酸时酶活下降了 50%, 但 KsdD3 (WP\_038682818)中完全相同的突变却使酶活完全丧失, 这些结果说明, 简单节杆菌这两个 KsdD 同工酶的蛋白结构和催化活性之间具有完全不同的构效关系<sup>[31-32]</sup>。

## 6 展望

3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶是催化甾体 C1,2 脱氢反应的关键酶, 在自然界的很多微生物中普遍存在。截至目前, 仅有红球菌属、分枝杆菌属、节杆菌属中少数菌株 KsdD 的生物学特性和生理作用得到系统报道, 而且表现出明显的菌种特异性和菌株特异性, 在酶的结构解析(只有红平红球菌 SQ1 的 KsdD1)、催化机理和表达调控等方面的研究相对较少。这些研究瓶颈极大地限制了该酶在甾体微生物转化领域的应用。

基于该研究现状, 后续可围绕以下工作展开深

入研究: (1) 采取基因组学、生物信息学分析和代谢工程操作相结合的方法, 挖掘和鉴定更多的新酶分子, 尤其是重要生产菌株中的 KsdD 同工酶; (2) 采取蛋白分离纯化和结晶技术, 获得更多在甾体转化反应中具有重要应用价值的 KsdD 酶的三维结构, 并通过定点(饱和)突变技术阐述酶的催化机理; (3) 通过基于结构的定向改造和随机突变构建高容量和高质量的酶突变文库, 利用高通量筛选技术获得酶活提高或者底物偏好性改变(如扩展新底物)的优良酶分子; (4) 通过各种组学方法(转录组学、蛋白组学和代谢组学)和基因工程技术解析酶的表达调控机制, 筛选影响酶活的关键调控因子; (5) 基于系统生物学、代谢工程和合成生物学的思想, 将酶分子、酶活调控因子和各种表达元件(如启动子、RBS 序列、终止子等)进行系统组合和动态优化, 获得高效的载体 C1,2 脱氢反应菌株。这些工作将共同推动 KsdD 酶的理论研究和产业化应用。

## REFERENCES

- [1] Fernández-Cabezón L, Galán B, García JL. New insights on steroid biotechnology[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 958
- [2] Donova MV, Egorova OV. Microbial steroid transformations: current state and prospects[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1423-1447
- [3] Gupta P, Mahajan A. Sustainable approaches for steroid synthesis[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2019, 17(2): 879-895
- [4] Donova MV. Steroid bioconversions[A]//Barredo JL, Herráiz I. *Microbial Steroids*[M]. New York: Humana Press, 2017: 1645
- [5] Giorgi V, Menéndez P, García-Carnelli C. Microbial transformation of cholesterol: reactions and practical aspects-an update[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(9): 131
- [6] Kisiela M, Skarka A, Ebert B, et al. Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria—A bioinformatic perspective[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 129(1/2): 31-46
- [7] Chen MM, Wang FQ, Lin LC, et al. Characterization and application of fusidane antibiotic biosynthesis enzyme 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase in steroid transformation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(1): 133-142
- [8] Plesiat P, Grandguillot M, Harayama S, et al. Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas testosteroni* gene encoding 3-oxosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(22): 7219-7227
- [9] Sih CJ, Bennett RE. Steroid 1-dehydrogenase of *Nocardia restrictus*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1962, 56: 584-592
- [10] Itagaki E, Wakabayashi T, Hatta T. Purification and characterization of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Nocardia corallina*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1990, 1038(1): 60-67
- [11] Kaufmann G, Thole H, Kraft R, et al. Steroid-1-dehydrogenase of *Rhodococcus erythropolis*: Purification and N-terminal amino acid sequence[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 43(4): 297-301
- [12] Lestrovaia NN. 3-oxosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase localization in *Mycobacterium rubrum* and *Arthobacter globiformis* cells[J]. *Mikrobiologiya*, 1981, 50(4): 619-625
- [13] Abul-Hajj YJ. Stereochemistry of C-1,2 dehydrogenation of 5 $\beta$ -Pregnane-3,11,20-trione by *Septomyxa affinis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247(3): 686-691
- [14] Sukhodolskaya GV, Nikolayeva VM, Khomutov SM, et al. Steroid-1-dehydrogenase of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D strain producing 9 $\alpha$ -hydroxy-androst-4-ene-3, 17-dione from sitosterol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(4): 867-873
- [15] van der Geize R, Hessels GI, van Gerwen R, et al. Targeted disruption of the *kstD* gene encoding a 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2029-2036
- [16] van der Geize R, Hessels GI, Dijkhuizen L. Molecular and functional characterization of the *kstD2* gene of *Rhodococcus erythropolis* SQ1 encoding a second 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase isoenzyme[J]. *Microbiology*, 2002, 148(10): 3285-3292
- [17] Knol J, Bodewits K, Hessels GI, et al. 3-Keto-5 $\alpha$ -steroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism[J]. *Biochemical Journal*, 2008, 410(2): 339-346
- [18] Wang XJ, Feng JH, Zhang DL, et al. Characterization of new recombinant 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenases for the biotransformation of steroids[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(15): 6049-6060
- [19] Morii S, Fujii C, Miyoshi T, et al. 3-Ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase of *Rhodococcus rhodochrous*: sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme[J]. *Journal of Biochemistry*, 1998, 124(5): 1026-1032
- [20] Wei W. Identification and gene modification of key genes about 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase and 3-ketosteroid

- 9 $\alpha$ -hydroxylase involved in steroid nucleus degradation in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01 and strain development via genetic manipulation[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of East China University of Science and Technology, 2010 (in Chinese)
- 魏巍. *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01 降解甾醇母核关键酶 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶和 3-甾酮-9 $\alpha$ -羟化酶基因的鉴定及其基因工程改造[D]. 上海: 华东理工大学博士学位论文, 2010
- [21] Zhang X, Wu D, Yang TW, et al. Over-expression of *Mycobacterium neoaurum* 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase in *Corynebacterium crenatum* for efficient bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2016, 24: 84-90
- [22] Shao ML, Chen YL, Zhang X, et al. Enhanced intracellular soluble production of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* in *Escherichia coli* and its application in the androst-1,4-diene-3,17-dione production[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2017, 92(2): 350-357
- [23] Zhang WQ, Shao ML, Rao ZM, et al. Bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione by recombinant *Bacillus subtilis* expressing *ksdD* gene encoding 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 135: 36-42
- [24] Shao ML, Sha Z, Zhang X, et al. Efficient androst-1,4-diene-3,17-dione production by co-expressing 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase and catalase in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(1): 119-128
- [25] Zhang RJ, Liu XC, Wang YS, et al. Identification, function, and application of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase isozymes in *Mycobacterium neoaurum* DSM 1381 for the production of steroidal synthons[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 77
- [26] Choi KP, Molnár I, Yamashita M, et al. Purification and characterization of the 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase of *Arthrobacter simplex* produced in *Streptomyces lividans*[J]. Journal of Biochemistry, 1995, 117(5): 1043-1049
- [27] Choi KP, Murooka Y, Molnár I. Secretory overproduction of *Arthrobacter simplex* 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase by *Streptomyces lividans* with a multi-copy shuttle vector[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(6): 1044-1049
- [28] Li Y, Wang WH, Lu FP, et al. Expression of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase using different expression system[J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(4): 6-10 (in Chinese)
- 李玉, 王稳航, 路福平, 等. 3-甾酮-1-脱氢酶在不同表达体系中的表达研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(4): 6-10
- [29] Li Y, Wang WH, Liu YH, et al. Heterogenous expression of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase gene (*ksdD*) in *E. coli*[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(3): 115-118 (in Chinese)
- 李玉, 王稳航, 刘逸寒, 等. 3-甾酮-1-脱氢酶基因在大肠杆菌中的表达及菌株转化研究[J]. 生物技术通报, 2008(3): 115-118
- [30] Li J, Yu L, Zhao XY, et al. The clone, expression and site-directed mutagenesis of 3-ketosteroid-delta(1)-dehydrogenase from *Arthrobacter Simplex*[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2017, 17(25): 4801-4806 (in Chinese)
- 李婕, 余磊, 赵晓雅, 等. 简单节杆菌 3-甾酮- $\Delta^1$ -脱氢酶基因的克隆表达及定点突变研究[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(25): 4801-4806
- [31] Mao SH, Wang JW, Liu FF, et al. Engineering of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase based site-directed saturation mutagenesis for efficient biotransformation of steroidal substrates[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 141
- [32] Mao SH, Guo QQ, Xu PP, et al. Biochemical and structural characterization of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase, a candidate enzyme for efficient bioconversion of steroids[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2019, 94(1): 309-316
- [33] Li Y, Lu F, Sun T, et al. Expression of *ksdD* gene encoding 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* in *Bacillus subtilis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(5): 563-568
- [34] Zhang RJ, Xu XX, Cao HJ, et al. Purification, characterization, and application of a high activity 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* DSM 1381[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(16): 6605-6616
- [35] Gale PH, Page AC Jr, Stoudt TH, et al. Identification of vitamin K<sub>2(35)</sub>, an apparent cofactor of a steroidal 1-dehydrogenase of *Bacillus sphaericus*[J]. Biochemistry, 1962, 1(5): 788-792
- [36] Yao K, Xu LQ, Wang FQ, et al. Characterization and engineering of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase and 3-ketosteroid-9 $\alpha$ -hydroxylase in *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795 to produce 9 $\alpha$ -hydroxy-4-androstene-3, 17-dione through the catabolism of sterols[J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 181-191
- [37] Guevara G, de las Heras LF, Perera J, et al. Functional differentiation of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase isozymes in *Rhodococcus ruber* strain Chol-4[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 42
- [38] Zhang QY, Ren Y, He JZ, et al. Multiplicity of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase enzymes in *Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395 with preferences for different steroids[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 1961-1971
- [39] Wang WY, Ge FL, Ma CH, et al. Heterologous expression and characterization of a 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Gordonia neofelifaecis* and its utilization in the

- bioconversion of androst-4,9(11)-dien-3,17-dione[J]. 3 Biotech, 2017, 7(1): 19
- [40] Mohn WW, Wilbrink MH, Casabon I, et al. Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp.[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(24): 6712-6719
- [41] van der Geize R, Hessels GI, van Gerwen R, et al. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205(2): 197-202
- [42] de las Heras LF, van der Geize R, Drzyzga O, et al. Molecular characterization of three 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase isoenzymes of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 132(3/5): 271-281
- [43] Liu Y, Shen YB, Qiao YQ, et al. The effect of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase isoenzymes on the transformation of AD to 9 $\alpha$ -OH-AD by *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(9): 1303-1311
- [44] Brzostek A, Śliwiński T, Rumijowska-Galewicz A, et al. Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*[J]. Microbiology, 2005, 151(7): 2393-2402
- [45] Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize Cholesterol[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(21): 6584-6591
- [46] Hayano M, Ringold HJ, Stefanovic V, et al. The stereochemical course of enzymatic steroid 1,2-dehydrogenation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1961, 4(6): 454-459
- [47] Levy HR, Talalay P. Bacterial oxidation of steroids. II. Studies on the enzymatic mechanism of ring A dehydrogenation[J]. Journal of Biological Chemistry, 1959, 234(8): 2014-2021
- [48] Itagaki E, Matsushita H, Hatta T. Steroid transhydrogenase activity of 3-ketosteroid- $\delta$ -dehydrogenase from *Nocardia corallina*[J]. Journal of Biochemistry, 1990, 108(1): 122-127
- [49] Jerussi R, Ringold HJ. The mechanism of the bacterial C-1,2 dehydrogenation of steroids. III. kinetics and isotope effects[J]. Biochemistry, 1965, 4(10): 2113-2126
- [50] Ringold HJ, Hayano M, Stefanovic V. Concerning the stereochemistry and mechanism of the bacterial C-1,2 dehydrogenation of steroids[J]. Journal of Biological Chemistry, 1963, 238: 1960-1965
- [51] Rohman A, van Oosterwijk N, Thunnissen AMWH, et al. Crystal structure and site-directed mutagenesis of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 explain its catalytic mechanism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(49): 35559-35568
- [52] Rohman A, van Oosterwijk N, Dijkstra BW. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1[J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications, 2012, 68(5): 551-556
- [53] Fujii C, Morii S, Kadode M, et al. Essential tyrosine residues in 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Rhodococcus rhodochrous*[J]. The Journal of Biochemistry, 1999, 126(4): 662-667
- [54] Shao ML, Zhang X, Rao ZM, et al. A mutant form of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase gives altered androst-1, 4-diene-3,17-dione/androst-4-ene-3,17-dione molar ratios in steroid biotransformations by *Mycobacterium neoaurum* ST-095[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(5): 691-701
- [55] Xie RL, Shen YB, Qin N, et al. Genetic differences in *ksdD* influence on the ADD/AD ratio of *Mycobacterium neoaurum*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(4): 507-513
- [56] Qin N, Shen YB, Yang X, et al. Site-directed mutagenesis under the direction of *in silico* protein docking modeling reveals the active site residues of 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(7): 146
- [57] Molnár I, Choi KP, Yamashita M, et al. Molecular cloning, expression in *Streptomyces lividans*, and analysis of a gene cluster from *Arthrobacter simplex* encoding 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase, 3-ketosteroid- $\Delta^5$ -isomerase and a hypothetical regulatory protein[J]. Molecular Microbiology, 1995, 15(5): 895-905
- [58] Matsushita H, Itagaki E. Essential histidine residue in 3-ketosteroid- $\delta^1$ -dehydrogenase[J]. The Journal of Biochemistry, 1992, 111(5): 594-599