正交氧化还原体系及其应用

王磊^①, 刘武军^①, 刘玉雪^①, 王雪颖^①, 赵宗保^{①②*}^① 中国科学院大连化学物理研究所, 生物技术研究部, 大连 116023;^② 中国科学院大连化学物理研究所, 催化基础国家重点实验室, 大连 116023

* 联系人, E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn

收稿日期: 2015-03-26; 接受日期: 2015-05-22

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB721103)和国家自然科学基金(批准号: 21325627)资助

doi: 10.1360/N052015-0054

摘要 氧化还原反应是最常见的代谢反应类型之一, 其中绝大部分通过辅因子依赖型氧化还原酶催化实现. 由于辅因子广泛参与细胞内氧化还原反应及其他生物学过程, 因代谢途径改造而扰动辅因子水平的生物学效应尚难以预测. 设计构建基于人工辅因子的正交体系, 是减少人工代谢途径与内源代谢网络相互干扰、降低系统复杂度、提高调控代谢网络有效性的新策略. 本文探讨了正交氧化还原体系的构建方法, 并结合实例说明其对提高能量传递特异性和人工代谢途径效率的重要意义.

关键词正交氧化还原
合成生物学
化学生物学
辅因子
代谢工程

细胞内代谢过程除以碳骨架结构改变为主的物质转化外, 通常还伴随辅因子介导的能量转移. 物质转化和能量转移高度耦合, 显著增加了代谢系统的复杂度. 氧化还原辅因子通过在氧化态和还原态之间循环再生传递电子, 将物质转化途径关联成复杂的代谢网络^[1]. 据不完全统计, 在微生物中仅吡啶核苷酸辅酶 (nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate), NAD(P)) 及其还原态参与的生化反应就超过 1000 种^[2], 这还不包括它们参与的其他生物学过程. 传统生物化学研究提供了大量生物学元件^[3,4], 系统生物学研究建立了各种代谢模型^[5,6], 分子生物学发展提供了有效的遗传操作方法, 使设计和构建新的高效、受控的物质转化途径成为可能. 然而, 辅因子在代谢网络中的节点作用使各种生化反应建立起复杂的相互作用网络, 极大地影响了外源途径在底盘细胞代谢环境中的功能. 以氧化还原代谢为例,

新途径可能破坏宿主内源氧化还原平衡, 从而抑制生长, 使新途径难以产生预期效果^[7]. 人工构建的外源途径对底盘细胞中天然代谢网络的相互干扰, 特别是氧化还原环境的干扰, 是影响外源合成途径与底盘细胞适配性的重要因素. 通过调节胞内辅因子水平, 如控制酶的表达水平、优化代谢途径、改造酶的辅因子偏好性以及敲除竞争代谢途径等, 可以优化外源途径与底盘细胞的适配性, 在一定程度上提高代谢调控效率^[8-10]. 但辅因子扰动的生物学效应的可控性和可预见性低. 例如, 琥珀酸生产需要维持胞内较高 NADH 水平, 但高 NADH 水平影响菌株对培养条件的适应性^[11]. 设计脂肪酸生产菌株时需要使脂肪酸合成途径与宿主 NADPH 供给能力相匹配, 但由于无法确定扰动 NADPH 水平对代谢造成的全局性影响, 无法预测合适的外源基因表达强度, 需要筛选不同表达强度的启动子表达外源基因^[12]. 辅因子

引用格式: 王磊, 刘武军, 刘玉雪, 等. 正交氧化还原体系及其应用. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 969-975

Wang L, Liu W J, Liu Y X, et al. Orthogonal redox systems and their potential applications. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 969-975, doi: 10.1360/N052015-0054

关联作用导致的复杂性也是限制代谢途径可移植性的重要因素。例如, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中构建的高效丁醇合成途径, 移植到蓝细菌(*Cyanobacteria*)中就难以达到积累丁醇的效果, 因为蓝细菌倾向于积累 NADPH 而非 NADH^[13,14]。

因此, 提高人工代谢途径在底盘细胞中的适配性、可预见性和可移植性需要降低代谢系统, 特别是辅因子依赖型氧化还原系统的复杂度。

1 正交氧化还原体系

为降低代谢系统复杂度, 可设计独立于生长代谢的合成途径及独立的辅因子循环再生体系。这种在复杂代谢体系中执行系统子功能, 并且其执行过程独立于系统其他组件的子系统称为正交体系。正交体系的设计构建过程即“正交化”^[15]。正交氧化还原体系是指电子传递独立于系统其他氧化还原辅因子系统的一种氧化还原体系。目前主要有两种策略可用于构建正交氧化还原体系: (i) 在空间上分隔辅因子依赖型体系, 即“空间正交氧化还原体系”; (ii) 构建利用人工辅因子代替天然辅因子的体系, 即“生物正交氧化还原体系”^[8,15]。设计构建正交氧化还原体系, 是减少外源途径对底盘细胞中天然代谢网络的干扰, 提高外源合成途径与底盘细胞适配性的重要策略。以下综述正交氧化还原体系的设计和应用特点。

2 空间正交氧化还原体系

空间正交氧化还原体系通过将相关的酶及辅因子限定在特定区域, 提高局部底物和辅因子浓度、减少或避免与其他子系统的相互作用^[16,17], 目前主要通过构建融合蛋白和设计蛋白锚定支架实现, 并已有多个成功应用的报道。另外, 最近发现, 细胞内可形成一些特殊的微区室(microcompartment), 可以有效限制辅因子或代谢中间体扩散, 从而避免胞内辅因子水平干扰微区室内氧化还原代谢^[18,19]。利用微区室也可构建空间正交氧化还原体系^[15]。

蛋白融合技术通过基因工程手段将多个酶用短肽序列连接形成融合蛋白, 通过调整连接肽特性和酶的连接方向控制酶的空间定位(图 1A), 优化级联催化过程中底物和能量传递^[20]。蛋白锚定支架技术通过调整支架上的锚定位点距离、各种锚定位点的数

图1 空间正交氧化还原体系构建策略及影响因素(网络版彩图)

A: 蛋白融合技术, 影响因素为酶的融合方向和连接肽特性; B: 蛋白锚定支架技术, 影响因素为酶在支架上的空间分布、各种锚定位点数量比例和连接肽特性, 五边形和圆形表锚定结构域, 长方形表蛋白锚定支架。箭头表示还原力传递方向, 三角形表还原力供体酶, 方形表还原力消耗酶, 菱形表连接肽氨基酸残基

量和连接肽特性 3 种方式调整酶的空间定位和比例(图 1B), 可降低代谢网络对目标途径的影响, 提高目标途径底物和辅因子的局部浓度, 减少与环境的相互影响^[21]。

两种空间正交氧化还原体系构建策略都受到连接肽特性的影响, 由于连接肽及蛋白结构和功能的多样性, 需要通过筛选确定合适的连接肽柔性和长度, 优化酶的空间定位^[2,22]。连接肽通常使用柔性序列 GGGGS(G₄S)^[23-26], 通过调整其拷贝数改变连接肽长度, 但有时利用刚性氨基酸延长连接肽效果更好, 如将恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)细胞色素 P450(P450cam)、假单胞氧还蛋白(putidaredoxin, PdX)和假单胞氧还蛋白还原酶(putidaredoxin reductase, PdR)分别与硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)融合时, 比较两组连接肽 G₄S-(P₅)_n-G₄S($n=1\sim5$)和(G₄S)_n($n=1\sim6$)效果, 以 G₄S-(P₅)₄-G₄S 连接时活性最高((6.5±0.3) μmol/(L min)), 而(G₄S)_n($n=1\sim6$)最高活性(G₄S)₅ 约为 5 μmol/(L min)^[22]。相比于柔性, 调节连接肽长度效果通常更显著, 上述实例中最适连接肽长度对应活性比 $n=1$ 时提高两倍。长度选择也是最常见的连接肽优化方式。在 P450 单加氧酶 CinA 的 C-末端融合黄素氧还蛋白 CinC, 催化桉树醇转化为 2-羟基-桉树醇, 发现当连接肽长度为 10 个氨基酸时产量最高, 少于 4 个氨基酸时检测不到催化活性^[2]。

除了连接肽特性, 空间正交氧化还原体系构建还需要综合优化多种因素以提高体系独立性的同

时获得更好的催化活性. 构建融合蛋白要考虑融合方向对催化效率的影响. 将丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 来源的氢酶(hydrogenase, H2ase)融合铁氧还蛋白(ferredoxin, FD)促进产氢时, 用 2 个氨基酸残基连接时, FD 连在 H2ase 的 C-末端对产氢过程无促进作用, 而连在 N-末端氢气产量提高约 3 倍^[26]. 这是因为 H2ase 与 FD 作用位点在氢酶 N-末端, N-末端融合更利于两个蛋白相互作用. 这种融合蛋白组合的催化效率也受连接肽长度的影响, 以 14 个氨基酸残基连接效果最好, 产氢效率提高近 5 倍, 延长至 46 个氨基酸残基几乎没有促进作用^[26].

与蛋白融合技术相比蛋白锚定支架技术可更自如地设计酶的空间分布和计量关系^[27,28]. 仍以上述 H2ase 与 FD 生物转化产氢途径为例: 将真核信号转导相关的 PDZ(postsynaptic density protein of 95 kilodaltons, disc large, zona occludens-1), SH3(sarcoma homology 3)和 GBD(gelatin binding domain) 3 种结构域整合到支架蛋白上, 通过配体肽段将催化生物合成的酶特异性结合到支架蛋白的对应位置, 这种设计可以通过调整 H2ase 和 FD 在支架上的结合位置、酶与支架配体间连接肽的长度、结合域数量等调整酶的空间分布与比例^[26]. 结合域在支架上间距靠近时产氢效率高; 结合域相对位置相同, FD 与支架蛋白的连接肽长度分别为 10, 20, 40 个氨基酸时, 延长肽链长度可使氢气产量提高 3~5 倍; 通过调整支架蛋白上的 PDZ, SH3 和 GBD 结合域比例调整 FD:H2ase 比率, 比率越小产氢效率越高^[26].

除了蛋白, DNA, RNA 等大分子也可作为蛋白锚定支架^[20,29,30], 并且随着 DNA 合成技术发展及对 DNA, RNA 结构预测能力的提高, 基于核酸的支架受到更多重视. 利用 DNA 整合 NAD(P)H: 黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)氧化还原酶和荧光素酶, 还原力 NADH 经过 NAD(P)H:FMN 氧化还原酶传递给 FMN, 然后传递给荧光素酶, 与分别连在两条不同 DNA 链上的游离状态相比, 连在同一 DNA 链上时活性提高到 2~3 倍^[31]. 支架可以是单个分子, 也可以是可自组装的蛋白亚基. 如将前述 P450cam, PdX, PdR 和亚磷酸脱氢酶分别与 PCNA 融合时, 构建融合蛋白 PCNA-PdR, PCNA-P450cam 和 PTDH-PCNA-PdX, 3 个融合蛋白的 PCNA 亚基通过自组装形成三聚体将 4 个酶进行空间整合, 促进反应中的电子传递, 组装复合体比游离酶催化速率提高 2 倍^[22,32].

以上空间正交氧化还原体系的应用表明, 通过减少天然氧化还原体系的干扰, 可以有效提高目标氧化还原体系的效率和可预见性.

3 生物正交氧化还原体系

空间正交氧化还原体系通过限制环境因素对体系的影响提高催化效率和可控性, 仍然难以避免天然辅因子与底盘细胞中天然代谢网络的相互影响. 如果突破相应生物化学反应对天然辅因子的依赖, 建立生物正交氧化还原体系, 将可能从根本上解决能量特异性传递问题.

3.1 生物正交氧化还原体系构建

构建生物正交氧化还原体系, 需要合成不被天然代谢系统识别的人工辅因子, 并获得特异性识别人工辅因子的突变型酶, 组成具有催化功能的配对^[15,33]. 利用蛋白工程和化学生物学方法, 构建独立于天然生物反应的非天然配体/受体配对, 即生物正交体系, 已取得过一些降低生物体系复杂度的成功例子^[34,35]. 生物正交的配体/受体配对设计策略可分为两种: (i) 策略以配体改造为中心, 即先改造受体并筛选获得不识别天然配体的新受体, 再合成具有一定结构多样性的配体类似物文库, 然后筛选得到该新受体与特定配体类似物配对的功能组合; (ii) 策略以受体改造为中心, 即先选定一种不被天然受体利用的配体类似物, 再构建受体文库, 然后筛选得到该配体类似物与新受体的配对功能组合^[36].

以设计筛选 NAD 类似物-依赖型氧化还原酶为例, 说明正交氧化还原体系构建过程^[33]. 对于 NAD 分子, 可认为由单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)和烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)两部分组成(图 2A), 其中 NMN 参与电子传递, 而 AMP 部分参与分子识别, 对辅因子特异性有重要影响^[37]. 改造 NAD 结构的腺嘌呤环部分, 可在保留电子传递功能的同时改变其与受体相互作用. 因此, 以其他杂环代替腺嘌呤环部分合成一系列 NAD 类似物, 同时以 NAD 依赖型苹果酸酶(malic enzyme, ME)为例构建其突变体表达文库. 利用以上合成的特定 NAD 类似物为辅因子, 筛选 ME 突变体文库, 得到具有催化活性的功能配对^[33,38,39].

以 5-氟代胞嘧啶环代替腺嘌呤环的类似物烟酰

图2 NAD 及 NFCD 类似物(NXCD)的化学结构

胺氟代胞嘧啶二核苷酸(nicotinamide flucytosine dinucleotide, NFCD)(图2B)为辅因子, 野生型 ME 催化效率仅为以 NAD 为辅因子时的 0.93%。在 ME 突变文库中筛选利用 NFCD 的突变体 ME*(ME L310R/Q401C), ME*以 NFCD 为辅因子的催化效率与野生型组合相当, 而以 NAD 为辅因子的催化效率仅为以 NFCD 为辅因子的 0.37%。而且, ME*保留了对底物苹果酸的立体选择性。因此, ME*-NFCD 组合可作为生物正交氧化还原体系执行天然的 ME-NAD 体系的催化功能^[33]。进一步合成了其他 NAD 类似物(图3B), 发现 ME*与 NBrCD 配对的催化效率可达到野生型配对催化活性的 73%。表明 NAD 类似物与 ME*组成的配对可达到与天然体系相近的催化效率, 即构建了不依赖天然辅因子的正交氧化还原体系^[39]。

基于 NFCD 类似物(NFCD analog, NXCD)的正交氧化还原体系构建策略具有可扩展性。氧化还原酶与 NAD 的结合区域通常具有保守的 Rossmann 折叠结构^[40]。ME*的关键突变位点 L310 位于其保守序列 GX(X)GXXG 的 N-末端, 对苹果酸脱氢酶和乳酸脱氢酶的相应保守位点的氨基酸进行定点突变, 均获得了偏好 NFCD 的突变体^[33]。说明同样的突变策略可应用于改造其他吡啶核苷酸辅酶依赖型氧化还原酶, 构建相应的正交反应体系。

构建生物正交氧化还原体系的难点在于设计筛选生物正交的配体-蛋白组合。虽然不断完善的配体-蛋白组合辅助设计工具降低了工作难度^[41-43], 获取高活性配体-蛋白组合仍需高通量筛选策略^[44]。由于氧化还原酶具有较高的结构保守性^[40], 识别 NAD 类似物所蕴涵的信息可用于指导改造其他氧化还原酶。目前使用的 NXCD 系列类似物合成成本较高, 使用过程中可以选择循环再生策略降低使用成本^[33]。

3.2 生物正交氧化还原体系的应用

由于正交氧化还原体系独立于天然辅因子循环体系, 可进行途径特异性还原力传递, 因此理论上可用表达突变型功能酶的粗酶液进行选择生物转化。以大肠杆菌细胞裂解液催化转化苹果酸生产丙酮酸为例, 对于表达野生苹果酸酶的体系, 在 NAD 存在下, 苹果酸氧化脱羧生成丙酮酸并伴生 NADH^[45]。而内源的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)以 NADH 为辅因子, 进一步将丙酮酸还原为乳酸(图3A)。丙酮酸和乳酸收率分别为 70%和 26%, 即 26%丙酮酸被转化成乳酸。而利用过表达 ME*的粗酶液在外加 NFCD 的条件下, 丙酮酸收率达到 79%时, 乳酸收率仅为 5%。这是因为, 内源乳酸脱氢酶难以利用 NFCDH 为辅因子还原丙酮酸(图3B)。

可见, 利用生物正交氧化还原体系, 可以使电子特异性地在该体系内部传递, 避免与内源途径相互干扰, 提高体系效率的同时排除副反应。这一特性表明正交氧化还原体系可降低外源途径与底盘细胞中天然代谢网络的相互干扰, 提高外源合成途径与底盘细胞适配性。由于目前还没有在胞内检测到 NXCD 的相关报道, 应用正交氧化还原体系需要解

图3 正交氧化还原体系选择性传递还原力

A: 过表达 NAD 依赖型 ME 工程菌株的裂解液催化转化苹果酸; B: 过表达 NFCD 依赖型 ME*的裂解液催化转化苹果酸

决将 NXCD 导入胞内的问题. 通过化学合成获得 NXCD, 再利用细胞透性化技术^[46,47]或转运蛋白^[48-50]可将 NXCD 导入细胞.

作者近期利用拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)来源的 NAD 转运蛋白^[50]将胞外 NCD 导入大肠杆菌工程菌, 成功地在胞内构建生物正交氧化还原体系^[51]. 该体系利用突变型亚磷酸脱氢酶氧化亚磷酸再生 NCDH, NCDH 特异性推动 ME*催化丙酮酸还原羧化产生苹果酸^[51,52]. 而对于天然体系, 由于 NADH 被天然代谢系统消耗, ME 利用 NAD 催化苹果酸氧化脱羧反应. 这些结果表明, 基于 NCD 的正交体系可有效避免与天然体系相互干扰, 选择性传递氧化还原力. 正交氧化还原体系的应用将显著提高外源合成途径与底盘细胞适配性.

4 展望

正交氧化还原体系对提高辅因子调控效率和可预见性具有重要意义, 有利于提高外源合成途径与底盘细胞适配性. 可通过空间正交化和生物正交化

两种策略构建正交氧化还原体系. 其中空间正交化策略在空间上隔离辅因子依赖型代谢反应, 其推广应用依赖于发现更高效的蛋白锚定支架系统或组装新的微区室. 生物正交化策略可从根本上解决辅因子依赖型反应相互干扰的问题, 是辅因子调控技术发展的重要方向, 其发展依赖于分子间相互作用的分析设计能力和配体/受体组合的筛选能力, 以获得功能更丰富的生物正交氧化还原体系, 并提高生物正交特异性. 其中在 NCD 基础上设计烟酰胺胞嘧啶二核苷酸磷酸(nicotinamide cytosine dinucleotide phosphate, NCDP)化学合成或生物合成途径, 并筛选构建 NCDP-功能酶正交组合, 将极大地提高生物正交氧化还原体系组件的设计构建效率, 提供多种辅因子水平和氧化还原状态选择, 为基于生物正交氧化还原体系的代谢途径设计提供更广阔的应用和研究空间.

正交氧化还原体系提供了一种提高胞内辅因子调控效率和可预见性的新思路, 与其他工程策略组合使用, 对设计微生物细胞工厂乃至生命系统具有重要价值.

参考文献

- 1 Wang Y, San K Y, Bennett G N. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24: 994-999
- 2 Belsare K D, Ruff A J, Martinez R, et al. P-Link: a method for generating multicomponent cytochrome P450 fusions with variable linker length. *Biotechniques*, 2014, 57: 13-20
- 3 Way J C, Collins J J, Keasling J D, et al. Integrating biological redesign: where synthetic biology came from and where it needs to go. *Cell*, 2014, 157: 151-161
- 4 Slusarczyk A L, Lin A, Weiss R. Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits. *Nat Rev Genet*, 2012, 13: 406-420
- 5 Orth J D, Conrad T M, Na J, et al. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Mol Syst Biol*, 2011, 7: 535
- 6 Zomorodi A R, Maranas C D. Improving the iMM904 *S. cerevisiae* metabolic model using essentiality and synthetic lethality data. *Bmc Syst Biol*, 2010, 4: 178
- 7 de Graef M R, Alexeeva S, Snoep J L, et al. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1999, 181: 2351-2357
- 8 Chen X L, Li S B, Liu L M. Engineering redox balance through cofactor systems. *Trends Biotechnol*, 2014, 32: 337-343
- 9 王白云, 王晓玥, 王智文, 等. 大肠杆菌氧化还原辅因子代谢工程. *化学进展*, 2014, 26: 1609-1618
- 10 San K Y, Bennett G N, Berrios-Rivera S J, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4: 182-192
- 11 Liang L, Liu R, Chen X, et al. Effects of overexpression of NAPRTase, NAMNAT, and NAD synthetase in the NAD(H) biosynthetic pathways on the NAD(H) pool, NADH/NAD⁺ ratio, and succinic acid production with different carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biochem Eng J*, 2013, 81: 90-96
- 12 Xu P, Gu Q, Wang W Y, et al. Modular optimization of multi-gene pathways for fatty acids production in *E. coli*. *Nat Commun*, 2013, 4: 1409

- 13 Shen C R, Lan E I, Dekishima Y, et al. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 2905–2915
- 14 Lan E I, Liao J C. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. *Metab Eng*, 2011, 13: 353–363
- 15 Mampel J, Buescher J M, Meurer G, et al. Coping with complexity in metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 52–60
- 16 Bartek T, Blombach B, Zonnchen E, et al. Importance of NADPH supply for improved *L*-valine formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Progr*, 2010, 26: 361–371
- 17 Castellana M, Wilson M Z, Xu Y, et al. Enzyme clustering accelerates processing of intermediates through metabolic channeling. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1011–1018
- 18 Chowdhury C, Sinha S, Chun S, et al. Diverse bacterial microcompartment organelles. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014, 78: 438–468
- 19 Huseby D L, Roth J R. Evidence that a metabolic microcompartment contains and recycles private cofactor pools. *J Bacteriol*, 2013, 195: 2864–2879
- 20 陈必强, 崔彩霞, 谢荣, 等. 多酶催化剂的制备及其应用. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2014, 41: 1–8
- 21 Dueber J E, Wu G C, Malmirchegini G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 753–759
- 22 Haga T, Hirakawa H, Nagamune T. Fine tuning of spatial arrangement of enzymes in a PCNA-mediated multienzyme complex using a rigid poly-L-proline linker. *PLoS One*. 2013, 8: e75114
- 23 Aslan F M, Yu Y, Mohr S C, et al. Engineered single-chain dimeric streptavidins with an unexpected strong preference for biotin-4-fluorescein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8507–8512
- 24 Zhou Y J, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for mitratriene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 3234–3241
- 25 Hirakawa H, Nagamune T. Molecular assembly of P450 with ferredoxin and ferredoxin reductase by fusion to PCNA. *ChemBiochem*, 2010, 11: 1517–1520
- 26 Agapakis C M, Ducat D C, Boyle P M, et al. Insulation of a synthetic hydrogen metabolism circuit in bacteria. *J Biol Eng*, 2010, 4: 3
- 27 Chen R, Chen Q, Kim H, et al. Biomolecular scaffolds for enhanced signaling and catalytic efficiency. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 28: 59–68
- 28 Liu Y F, Zhu Y Q, Ma W L, et al. Spatial modulation of key pathway enzymes by DNA-guided scaffold system and respiration chain engineering for improved *N*-acetylglucosamine production by *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*, 2014, 24: 61–69
- 29 Conrado R J, Wu G C, Boock J T, et al. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 1879–1889
- 30 Delebecque C J, Lindner A B, Silver P A, et al. Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies. *Science*, 2011, 333: 470–474
- 31 Niemeyer C M, Koehler J, Wuerdemann C. DNA-directed assembly of bienzymic complexes from *in vivo* biotinylated NAD(P)H:FMN oxidoreductase and luciferase. *ChemBiochem*, 2002, 3: 242–245
- 32 Watanabe H, Hirakawa H, Nagamune T. Phosphite-driven self-sufficient cytochrome P450. *Chemcatchem*, 2013, 5: 3835–3840
- 33 Ji D, Wang L, Hou S, et al. Creation of bioorthogonal redox systems depending on nicotinamide flucytosine dinucleotide. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 20857–20862
- 34 Islam K, Chen Y, Wu H, et al. Defining efficient enzyme-cofactor pairs for bioorthogonal profiling of protein methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 16778–16783
- 35 Cohen M S, Zhang C, Shokat K M, et al. Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science*, 2005, 308: 1318–1321
- 36 Chockalingam K, Zhao H. Creating new specific ligand-receptor pairs for transgene regulation. *Trends Biotechnol*, 2005, 23: 333–335
- 37 Aktas D F, Cook P F. Proper positioning of the nicotinamide ring is crucial for the *Ascaris suum* malic enzyme reaction. *Biochemistry*, 2008, 47: 2539–2546
- 38 Hou S, Ji D, Liu W, et al. Identification of malic enzyme mutants depending on 1,2,3-triazole moiety-containing nicotinamide adenine dinucleotide analogs. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 1307–1309
- 39 Ji D, Wang L, Liu W, et al. Synthesis of NAD analogs to develop bioorthogonal redox system. *Sci China Chem*, 2012, 56: 296–300
- 40 Rossmann M G, Moras D, Olsen K W. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, 1974, 250: 194–199
- 41 Geertz-Hansen H M, Blom N, Feist A M, et al. Cofactory: sequence-based prediction of cofactor specificity of Rossmann folds. *Proteins*, 2014, 82: 1819–1828

- 42 Lill M A, Danielson M L. Computer-aided drug design platform using PyMOL. *J Comput Aided Mol Des*, 2011, 25: 13–19
- 43 Pantazes R J, Grisewood M J, Li T, et al. The iterative protein redesign and optimization (IPRO) suite of programs. *J Comput Chem*, 2015, 36: 251–263
- 44 纪德彬. 生物正交氧化还原体系的构建. 博士学位论文. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2012
- 45 纪德彬, 王磊, 周雍进, 等. 利用人工氧化酶体系催化 *L*-苹果酸氧化脱羧反应. *催化学报*, 2012, 33: 530–535
- 46 王磊, 刘玉雪, 谭海东, 等. 基于海泡石的细胞透性化. *生物加工过程*, 2015, 13: 57–59
- 47 Zhang W, O'Connor K, Wang D I, et al. Bioreduction with efficient recycling of NADPH by coupled permeabilized microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 687–694
- 48 Zhou Y J, Wang L, Yang F, et al. Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD⁺-auxotrophic mutant. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77: 6133–6140
- 49 Haferkamp I, Schmitz-Esser S, Linka N, et al. A candidate NAD⁺ transporter in an intracellular bacterial symbiont related to *Chlamydiae*. *Nature*, 2004, 432: 622–625
- 50 Palmieri F, Rieder B, Ventrella A, et al. Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J Biol Chem*, 2009, 284: 31249–31259
- 51 王磊. 基于烟酰胺胞嘧啶二核苷酸的代谢电路研究. 博士学位论文. 大连: 中国科学院大连化学物理研究所, 2014
- 52 Stols L, Donnelly M I. Production of succinic acid through overexpression of NAD⁺-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2695–2701

Orthogonal Redox Systems and their Potential Applications

WANG Lei¹, LIU WuJun¹, LIU YuXue¹, WANG XueYing¹ & ZHAO ZongBao^{1,2}

¹ Division of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

² State Key Laboratory of Catalysis, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Redox chemistry constitutes one of the most important metabolic processes. The majority of enzymes that catalyze redox reactions are cofactor-dependent. Because cofactors are involved in many metabolic reactions as well as other biological events, it remains challenging to predict the consequences of cofactor level manipulation. It is believed that an orthogonal redox system may help reduce the system's complexity and improve the effectiveness of metabolic control by avoiding interactions between artificial and natural systems. Here, we reviewed the advances in developing orthogonal redox systems. Some interesting examples were selected to illustrate the mechanism by which orthogonal redox systems can be applied for pathway-selective electron transmission and more effective metabolic control.

orthogonal redox system, synthetic biology, chemical biology, cofactor, metabolic engineering

doi: 10.1360/N052015-0054