

- protein from a mutant amyloid  $\beta$  protein precursor. Science, 1993, **259** (5094): 514~ 516
- 8 Citron M, Westaway D, Xia W, *et al.* Mutant presenilin of Alzheimer's disease increases production of 42-residue amyloid  $\beta$  protein in both transfected cells and transgenic mice. Nat Med, 1997, **3** (1): 67~ 72
  - 9 Xia W, Zhang J, Perez R, *et al.* Interaction between amyloid precursor protein and presenilin in mammalian cells: Implication for the pathogenesis of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (15): 8208~ 8213
  - 10 Guo Q, Sopher B L, Furukawa K, *et al.* Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. J Neurosci, 1997, **17** (11): 4212~ 4222
  - 11 Mattson M P, Barger S W, Cheng B, *et al.*  $\beta$ -amyloid precursor protein metabolites and loss of neural  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in Alzheimer's disease. Trends Neurosci, 1993, **16** (10): 409~ 414
  - 12 Moechars D, Lorent K, De Strooper B, *et al.* Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the  $\alpha$ -secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. EMBO J, 1996, **15** (6): 1265~ 1274
  - 13 Haass C, Capell A, Citron M, *et al.* The Vacuolar  $\text{H}^{+}$ -ATPase inhibitor bafilomycin  $\text{A}_1$  differentially affects proteolytic processing of mutant and wild type  $\beta$  amyloid precursor protein. J Biol Chem, 1995, **270** (11): 6186~ 6192
  - 14 Klafki H W, Abramowski D, Swoboda R, *et al.* The carboxyl termini of  $\beta$ -amyloid peptide 1~ 40 and 1~ 42 are generated by distinct  $\gamma$ -secretase activities. J Biol Chem, 1996, **271** (45): 28655 ~ 28659
  - 15 Selkoe D J, Yamazaki T, Citron M, *et al.* The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta protein. Ann N Y Acad Sci, 1996, **777**: 57~ 64
  - 16 Le Page R N, Fosang A J, Fuller S J, *et al.* Gelatinase A possesses a beta-secretase-like activity in cleaving the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. FEBS Lett, 1995, **377** (2): 267~ 270
  - 17 Munger J S, Haass C, Lemere C A, *et al.* Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A beta peptides: a distinct role for cathepsin S. Biochem J, 1995, **311** (Pt 1): 299~ 305
  - 18 Xu H, Sweeney D, Greengard P, *et al.* Metabolism of Alzheimer beta-amyloid precursor protein: regulation by protein kinase A in intact cells and in a cell-free system. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (9): 4081~ 4084
  - 19 Hung A-Y, Selkoe D J. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of  $\beta$  amyloid precursor protein. EMBO J, 1994, **13** (3): 534~ 542
  - 20 Nitsch R M, Deng M, Growdon J H, *et al.* Serotonin 5-HT $_2\text{a}$

and 5-HT $_2\text{c}$  receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. J Biol Chem, 1996, **271** (8): 4188 ~ 4194

**Advances in the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease.** CHEN Pei-Li, TONG Tan-Jun, ZHANG Zong-Yu ( Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

**Abstract** Alzheimer's disease (AD) is a primary neurodegenerative disorder mainly affecting aged people over 60 years old. It is characterized by extracellular senile plaques (SPs) and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) in patients' brains. The major component of SP is  $\beta$ -amyloid peptide ( $\beta\text{A}$ ) with molecular weight of about 4 ku which is a neurotoxic derivative of  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) and can cause cell damage mainly through oxidative stress and being able to form calcium channels in lipid bilayers. The precursor, APP, whose function is not yet elucidated in detail but evidence exists that it may mediate cell adhesion, maintain synaptic plasticity and so on, can be processed in conventional secretory way by several putative secretases and alternatively in endosomal/lysosomal way. Longer  $\beta\text{A}$  is more predisposed to aggregate to form SP than its shorer counterpart, so some APP mutants may cause familial AD through producing more longer  $\beta\text{As}$  or increasing the production of shorter ones. The changes of some factors which are important for the metabolism of APP, for example, mutations of presenilins, may also cause AD by increased generation of  $\beta\text{A}$ .

**Key words** Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid precursor protein,  $\beta$ -amyloid peptide

## 抗真菌药物作用靶酶羊毛甾醇 14 $\alpha$ 去甲基化酶研究\*

季海涛 张万年 周有骏  
(第二军医大学药学院, 上海 200433)

**摘要** 羊毛甾醇 14 $\alpha$  去甲基化酶是普遍存在于高等植物、真菌和哺乳动物体内的 P450 蛋白, 是氮唑类抗真菌药

\* 军队“九五”重点课题 (96z030) 和国家自然科学基金资助课题 (39470830). 收稿日期: 1997-10-07, 修回日期: 1998-02-23

物作用靶酶. 到目前为止已分别确定了高等植物、真菌和哺乳动物体内该酶的氨基酸序列. 该酶对底物的催化包括三个单加氧步骤, 涉及自由基的生成和消除, 血红素辅基在酶催化过程中起重要作用. 底物羊毛甾醇只能结合在酶活性位点血红素辅基 Nc 吡咯环上方, 其余血红素吡咯环被氨基酸残基封闭. 底物羊毛甾醇的 3 $\beta$  羟基、 $\Delta^{8(9)}$  双键和 17 位侧链是与酶活性位点正确结合的关键官能团. 该酶两大类抑制剂 (底物类似物和氮唑类抗真菌药物) 结构-活性关系研究可为进一步优化和设计新型高效酶抑制剂提供基础.

关键词 羊毛甾醇 14 $\alpha$  去甲基化酶, 氨基酸序列, 代谢机理, 抑制剂设计

学科分类号 Q554

羊毛甾醇 14 $\alpha$  去甲基化酶 (P450<sub>14DM</sub>) 是真菌细胞膜麦角甾醇生物合成过程中一个关键酶. 麦角甾醇是真菌细胞膜基本组成成分, 它的缺乏将导致膜结构和功能消失, 最终导致真菌死亡. 目前临床上口服治疗深部真菌病的氮唑类抗真菌药物就是通过抑制 P450<sub>14DM</sub>, 使真菌体内麦角甾醇生物合成缺乏而起药效作用的. 为了搞清氮唑类抗真菌药物的作用机理, 设计高效专一性强的抗真菌新药, 国内外学者对 P450<sub>14DM</sub> 进行了大量研究, 现将有关研究进展综合报告如下.

1 概 述

P450<sub>14DM</sub> 是细胞色素 P450 超家族蛋白质一个成员, 在细胞内, 其氨基端结合在内质网膜上, 其余部分游离在细胞质中. P450<sub>14DM</sub> 中含有血红素辅基, 由蛋白质半胱氨酸残基提供 S<sup>-</sup> 作为血红素第五配基, 使该酶的还原形式与 CO 复合后在 450 nm

处出现特征的 Soret 吸收. P450<sub>14DM</sub> 是单加氧酶, 它催化底物羊毛甾醇 (lanosterol) (图 1a) 14 $\alpha$  位甲基羟基化反应, 化学反应式如下:



P450<sub>14DM</sub> 广泛存在于高等植物、真菌、哺乳动物体中, 但在高等植物、真菌、哺乳动物体中, 其天然底物各不一样. 在高等植物体中 P450<sub>14DM</sub> 的底物是钝叶醇 (obtusifoliol. 4 $\alpha$ . 14 $\alpha$ -二甲基麦角-8, 24 (28)-二烯-3 $\beta$ -醇, 图 1b), 在哺乳动物体中其底物是羊毛甾醇和 24, 25-二氢羊毛甾醇 (24, 25-dihydrolanosterol, DHL, 图 1c), 在真菌体中, 啤酒酵母等少数酵母菌底物是羊毛甾醇, 在其余大部分真菌中 (如白色念珠菌, 新型隐球菌等) 底物是 24 (28)-亚甲基-24, 25-二氢羊毛甾醇 (24 (28)-methylenedihydrolanosterol, 图 1d).

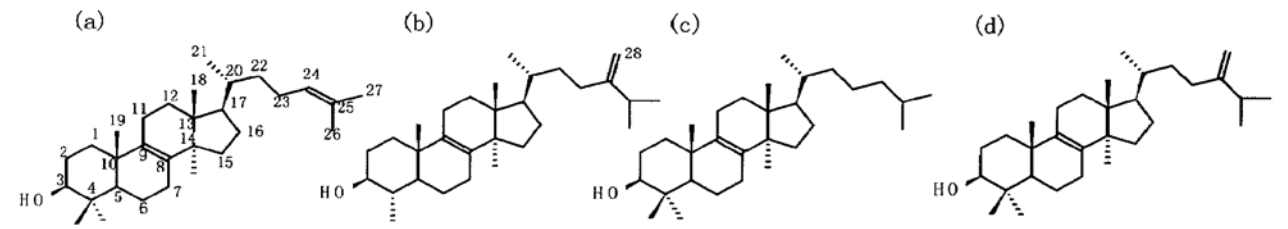


图 1 羊毛甾醇 14 $\alpha$  去甲基化酶四个天然底物的化学结构

(a) 羊毛甾醇; (b) 钝叶醇; (c) 24, 25-二氢羊毛甾醇; (d) 24 (28) -亚甲基-24, 25-二氢羊毛甾醇.

2 结构分析

P450<sub>14DM</sub> 是唯一发现在高等植物、真菌、哺乳动物体内都存在的 P450 酶, 目前, 已经分别从高等植物<sup>[1]</sup>、真菌<sup>[2]</sup>、哺乳动物<sup>[3]</sup> 体内克隆出 P450<sub>14DM</sub> 的基因并测序分析. 所有 P450<sub>14DM</sub> 都含 500 至 560 个氨基酸残基, 多序列联配结果表明高等植物、真菌、哺乳动物之间有 35% ~ 42% 的序

列等同率, 真菌 P450<sub>14DM</sub> 各序列之间有 45% ~ 70% 的序列等同率, 人与大鼠 P450<sub>14DM</sub> 序列有 93% 的序列等同率, 表明 P450<sub>14DM</sub> 是非常古老且保守的 P450 蛋白<sup>[4]</sup>.

高等植物、真菌、哺乳动物 P450<sub>14DM</sub> 的序列结构分析发现其具有 P450 超家族蛋白质共同性质. 与所有微粒体 P450 蛋白相同, 在蛋白质一级序列的 N 端都具有一段 18~ 22 个疏水残基, 紧接着为带正电荷的碱性残基, 推测为跨内质网膜段.

I 螺旋至 C 端序列保守性很强, 且大多数结构保守区与 P450 蛋白质结构和功能需求相适应. 在 I 螺旋具有保守的 A/G-G-X-X-T 结构单元参与底物催化; K 螺旋具有 E-X-X-R 结构, 其和 K” 螺旋-Meander 区保守性的 F/Y/W-X-P-X-X-F/Y-X-P-X-R/H/N-F/Y/W 结构单元一起稳定 P450 蛋白三维结构; 血红素辅基结合区有保守性 F-G/S-X-G-X-H/R-X-C-X-G-X-I/L/F-A 结构单元, 其中 Cys 残基是血红素第五配基. 序列 N 端至 I 螺旋区, 各 P450 蛋白质差异性较大, 但该区域具有决定底物结合特异性的 B 螺旋-C 螺旋区和 F 螺旋的羧基端. 定点突变研究<sup>[5]</sup>发现 P450<sub>14DM</sub> 的 I 螺旋参与底物的结合与催化, 但其他活性位点残基, 特别是序列的

N 端 I 螺旋之间决定 P450<sub>14DM</sub> 底物结合特异性的残基还有待进一步研究.

3 催化作用机理

P450<sub>14DM</sub> 的 14α 位去甲基化过程包括三个步骤, 其中第一步是酶限速反应, 反应过程中生成的中间体保留在活性位点中为下一步反应提供反应物, 直到终产物 Δ<sup>14(15)</sup>-羊毛甾醇生成时, 底物才脱离活性位点. 其中, 前两个步骤是 14α 甲基被单氧化成 14α 羟甲基, 随后被单氧化成偕二醇, 脱水成 14α 醛基, 这两个步骤遵循细胞色素 P450 超家族蛋白单氧化循环通式<sup>[6]</sup> (图 2).

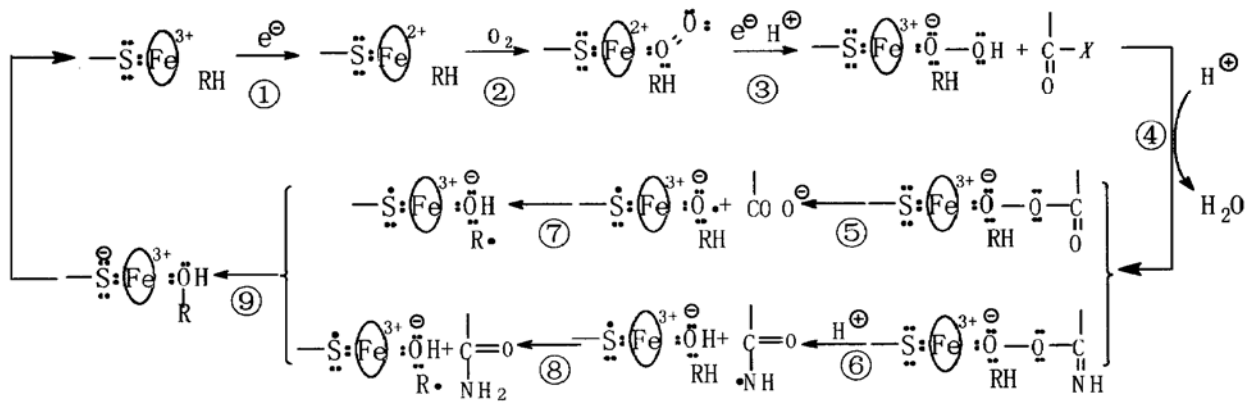


图 2 细胞色素 P450 超家族蛋白单加氧循环的一般流程

X = O<sup>-</sup>, NH<sub>2</sub>.

在此反应过程中, 配体 RH 通过疏水作用等结合到酶活性位点, 去除血红素辅基铁原子第六配体 OH<sup>-</sup> (或水分子), 使铁原子由低自旋状态转变为高自旋状态, 同时改变其氧化还原电位, 接受 NADPH-细胞色素 P450 还原酶提供的第一个电子 (步骤 ①), 将 Fe<sup>3+</sup> 还原为 Fe<sup>2+</sup>. 随后 Fe<sup>2+</sup> 与 O<sub>2</sub> 配位形成复合物 (步骤 ②), 接受 NADPH-细胞色素 P450 还原酶或细胞色素 b<sub>5</sub>-细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶提供的第二个电子, 周围环境提供 H<sup>+</sup>, 形成过氧醇结构 (步骤 ③). 此后与周围环境提供的羧酸负离子或酰胺基形成过氧酸酯或过氧亚氨基酸酯, 同时生成一分子水 (步骤 ④).

形成的复合物可通过两种不同方式裂解生成活性氧原子, 过氧酸酯复合物中, 血红素第五配体 S<sup>-</sup> 上有丰富的电子, 促使 O—O 键极化, 异裂生成 COO<sup>-</sup> 和 (•S-Fe<sup>3+</sup>-O<sup>-</sup>) 复合物 (步骤 ⑤). 过氧亚氨基酸酯复合物则发生均裂生成酰氨自由基和

(•S-Fe<sup>3+</sup>-OH<sup>-</sup>) 复合物, S<sup>-</sup> 是良好的单电子供体, 促使生成的自由基中间体稳定, 促使反应顺利进行 (步骤 ⑥). 在发生异裂反应后, (•S-Fe<sup>3+</sup>-O<sup>-</sup>) 复合物夺取 RH 中的 H• 生成 (•S-Fe<sup>3+</sup>-OH<sup>-</sup>) 和 R• 自由基 (步骤 ⑦); 均裂反应后, 酰氨自由基也夺取 RH 中的 H•, 生成 R• 自由基 (步骤 ⑧). 最后, 新生成的 R• 自由基与羟基自由基迅速结合生成产物 (步骤 ⑨). 在上述反应循环中第二个电子的获得、O<sub>2</sub> 发生均裂或异裂反应生成活性氧以及最终产物的离去是限速过程.

P450<sub>14DM</sub> 催化 14α 醛基羊毛甾醇氧化成 14α 羧酸羊毛甾醇及随后脱羧生成终产物的反应机理<sup>[7]</sup> 如图 3 所示, 铁-过氧醇复合物进攻 14α 醛基, 形成过氧化加成物, 此后过氧键发生异裂或均裂反应. 在发生异裂反应后, 14α 位由于有活性氧, 发生 Baeyer-Villiger 重排生成 14α 羧酸基产物 (路线 I), 随后 15α 位氢原子在生成的 Fe-OH<sup>-</sup> 协助下

脱氢生成  $\Delta^{14(15)}$  终产物。由此可见，如果甾醇 15 $\alpha$  位没有氢原子，则该反应不能继续，15 $\alpha$  取代的羊毛甾醇是底物羊毛甾醇的竞争性抑制剂。均裂反应

后，14 $\alpha$  位首先脱羧生成羊毛甾醇 14 $\alpha$  位脱甲基自由基中间体，在  $\text{Fe-OH}^-$  协助下，生成  $\Delta^{14(15)}$  双键 (路线 II)。

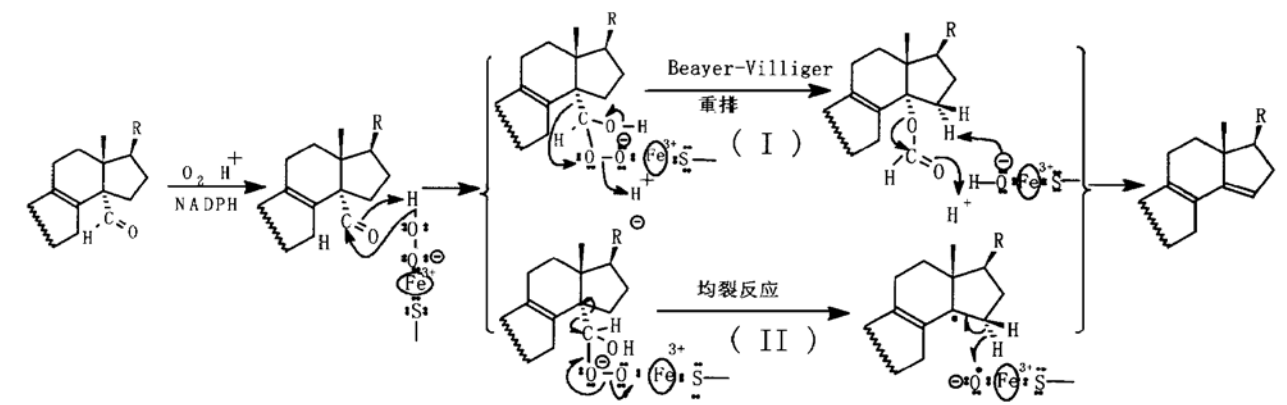


图3 羊毛甾醇 14 $\alpha$  去甲基化酶对底物羊毛甾醇 14 $\alpha$  位去甲基的第三步催化机理

4 活性位点的拓扑结构

Tuck 等<sup>[8]</sup>提出一种研究细胞色素 P450 超家族蛋白质活性位点拓扑结构的新方法，由于该类蛋白血红素辅基可以与苯基形成稳定苯基-铁复合物，铁氰化钾氧化后苯基可迁移到卟啉环氮原子上，形成相应 N-苯基-原卟啉 IX 加成物。在全酶体系中，细胞色素 P450 超家族蛋白质活性位点血红素辅基四个吡咯环可能某些环已被氨基酸残基封闭，使得苯基只可以和血红素未封闭氮原子定向形成 N-苯基-原卟啉 IX 加成物，从而可检测活性位点可及空间和底物在活性位点中的取向。

采用上述方法他们检测发现 P450<sub>14DM</sub> 只和血红素辅基 Nc 环形成复合物，推定只有该处未被氨基酸残基封闭 (图 4a)，此后他们又采用联苯基作为探针同法测定发现也可形成 Nc-联苯基-原卟啉

IX 加成物，推测活性位点顶端距卟啉环底平面垂直距离大于 1 nm。由于底物是羊毛甾醇，催化反应部位是 14 $\alpha$  位甲基，同时 15 $\alpha$  位失去一个氢原子，形成  $\Delta^{14(15)}$  双键，因此推测底物在酶活性位点中应采取近似垂直于卟啉环的空间取向 (图 4b)，14 和 15 位靠近铁原子，17 位侧链处于酶活性位点顶端与氨基酸残基形成疏水作用，维持底物在活性位点中正确的取向。

5 活性位点对配体结构的要求

Aoyama 等从啤酒酵母菌中分离纯化出 P450<sub>14DM</sub> 和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶，重构成活性酶体系，以羊毛甾醇和其结构类似物为配体，系统研究真菌 P450<sub>14DM</sub> 活性位点对配体的结构需要。

羊毛甾醇 3 位羟基对于底物和 P-450<sub>14DM</sub> 的相互作用至关重要。它通过氢键和酶活性位点某特定残基作用 (和甾核的 3 $\beta$ -羟基和  $\alpha$ -羟基都能作用)，确保底物在酶活性位点中的正确取向<sup>[9]</sup>。

甾醇 14 $\alpha$  位甲基面向血红素铁原子，甾核  $\beta$  面与酶活性位点残基作用，特别是  $\beta$  面上的 18、19 位角甲基、4 $\beta$ -甲基和 17 位上侧链与酶活性位点氨基酸残基有立体作用和疏水作用。当  $\Delta^{8(9)}$  迁移或氢化时改变甾核 B 环的构象，从而改变了  $\beta$  面上 18、19 角甲基、4 $\beta$ -甲基和 17 位侧链的位置，使得配体与酶活性位点匹配度降低，使代谢活性降低或丧失<sup>[10]</sup>。Fischer 等<sup>[11]</sup>发现大鼠肝微粒体 P450<sub>14DM</sub> 发挥功效时也必须识别  $\Delta^{8(9)}$ -甾醇。

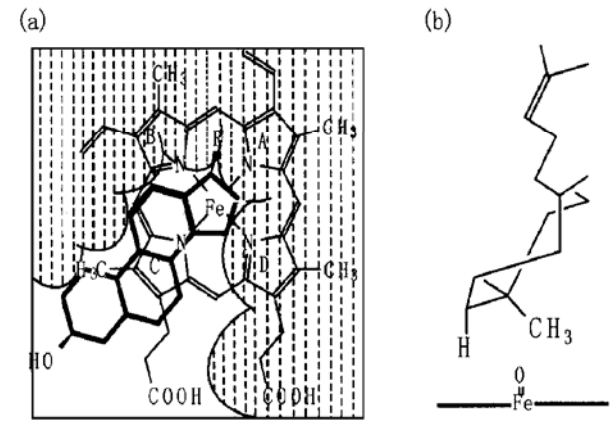


图4 羊毛甾醇 14 $\alpha$  去甲基化酶活性位点中底物的空间取向

羊毛甾醇 17 位侧链终端分叉结构 (即 C25、C26 和 C27) 是其与酶活性位点正确结合和作用的重要官能团。同时, 真菌酶活性位点要求 17 位侧链终端结构平坦<sup>[12]</sup>。Sonoda 等<sup>[13]</sup>采用上述配体研究大鼠肝微粒体 P450<sub>14DM</sub>时, 发现酶和底物甾醇 17 位侧链终端部位结合方式与真菌 P450<sub>14DM</sub>不同。25 位引入羟基后增加了空间位阻降低其与酶活性位点亲和力, 25 位或 26 位引入羟基后, 发现 P450<sub>14DM</sub>对底物催化去甲基能力下降, 提示羊毛甾醇 17 位侧链分叉结构与酶活性位点存在疏水作用, 25 羟基或 26-羟基削弱了这种作用<sup>[14]</sup>。真菌 P450<sub>14DM</sub>对配体的催化效率是: 羊毛甾醇 ≥ 24 (28) -亚甲基-DHL > DHL<sup>[15]</sup>, 推测尽管啤酒酵母天然底物是羊毛甾醇, 但对其他真菌的天然底物——24 (28) -亚甲基-DHL 也有良好的催化活性, 提示不同真菌 P450<sub>14DM</sub>活性位点的结构很相似。大鼠肝微粒体 P450<sub>14DM</sub>对配体的催化效率是: 羊毛甾醇 > DHL > 24 (28) -亚甲基-DHL, 提示真菌和大鼠肝微粒体 P450<sub>14DM</sub>活性位点羊毛甾醇 17 位侧链结合位置处存在重要的结构差别, 从而为设计选择性氮唑类抗真菌药物, 降低其肝毒性提供新的思路。

高等植物 P450<sub>14DM</sub>要求底物不能有甲基, 否则无活性。而真菌 (啤酒酵母) P450<sub>14DM</sub>对底物甾醇 4β 位有无甲基没有结构上的要求<sup>[16]</sup>。

## 6 羊毛甾醇 14α 去甲基化酶抑制剂的设计

为了寻找高效广谱抗真菌药物和治疗高胆固醇血症, 针对 P450<sub>14DM</sub>已合成测试了大量竞争性抑制剂, 发现该酶的高效竞争性抑制剂需要具备三方面的条件: a. 具有能螯合血红素辅基的特定基团; b. 能和酶底物结合部位结合的专一疏水基团; c. 在大体上为疏水环境中存在一个亲水基团。P450<sub>14DM</sub>竞争性抑制剂设计有两种方法: 一是设计羊毛甾醇甾体结构类似物<sup>[17]</sup>, 二是氮唑类抗真菌药物。目前, 针对羊毛甾醇甾体结构改造已设计合成很多化合物, 主要包括: a. 羊毛甾醇 14α 甲基或 (和) 15α 氢被其他取代基取代的类似物<sup>[17,18]</sup>; b. 甾核 7 位氢原子被羰基取代的类似物<sup>[19]</sup>。

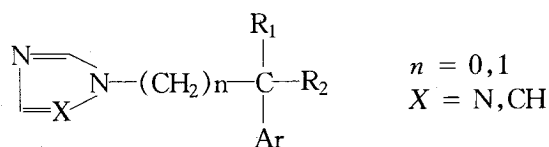
P450<sub>14DM</sub>活性位点羊毛甾醇 14α 位甲基结合位置处可以容纳一定体积的取代基, 如羊毛甾醇 14α 甲基被肟甲基、乙烯羟甲基、环氧丙烯基、环氧乙基、咪唑甲基取代时, 都能很好地抑制 P450<sub>14DM</sub>的活性。但是 14α 环硫丙烷-DHL 则不能抑制酶的

活性, 推测酶活性位点该位置处空间大小也有一定限度。同时, 该位置也有立体需求, 14α-(CH<sub>2</sub>=CH-CHOH)-羊毛甾醇、14α-(1', 2'-环氧丙烯基)-羊毛甾醇等以 14α 取代基中手性碳原子 S 构型时化合物抑制活性更优。

羊毛甾醇 7 位羰基取代的类似物与酶活性位点的亲和力比底物羊毛甾醇高出 50 倍以上, 可竞争抑制底物与酶的结合。7 位羰基类似物阻断细胞色素 P450 单氧化循环过程中第二个电子的传递, 导致氧-铁中间体聚集, 由此可见, 该类化合物 7 位羰基是与活性位点残基作用抑制酶活性的。另外, 7-羰基羊毛甾醇类似物不影响第一个电子的传递, 也提示 P450<sub>14DM</sub>单氧化过程中两个电子传递的机理不一样。

通过羊毛甾醇甾体结构类似物竞争性抑制剂的构效关系分析还发现:

- 该类竞争性抑制剂中 Δ<sup>8(9)</sup>位置很重要, 双键位置迁移可改变甾核 β 面构象, 导致其抑制活性下降。
- 该类竞争性抑制剂要求 3β 位羟基保持游离状态, 酯化或变换成 3-羰基时化合物的抑制活性消失。
- 甾核 4, 4-二甲基取代的该类竞争性抑制剂比没有甲基取代的类似物抑制活性更高。氮唑类抗真菌药物是临床上广泛使用的 P450<sub>14DM</sub>的抑制剂, 通过大量的结构-活性关系研究表明氮唑类药物具有以下的基本结构类型:



a. 分子中氮唑环 (咪唑或三唑环) 是必需基团, 咪唑环的 3 位, 三唑环的 4 位 N 原子与血红素 Fe 原子形成配位键, 竞争性抑制酶的活性。当用其他基团取代时, 抗真菌活性丧失。另外, 比较三唑类和咪唑类化合物可以发现三唑类化合物的治疗指数明显优于咪唑类化合物。

b. 氮唑的取代基必须与氮杂环的 1 位氮原子相连。

c. Ar 基团上各取代基取代后发现苯环 4 位一定体积和 (或) 电负性取代基、苯环 2 位电负性取代基对活性有利。

d. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> 上取代基结构类型变化较大, 其中活性最好的有两大类: a. R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 基团形成取代二

氧戊环结构, 称为芳乙基氮唑环状缩酮类化合物, 代表性药物有酮康唑、伊曲康唑, 该类结构的药物体外、体内活性都很强, 但用于体内治疗时肝毒性较大, 是目前临床上首选的外用抗真菌药物; b. R1 为醇羟基, 代表性药物为氟康唑, 具有该类结构的药物体外无活性, 但体内活性非常强, 是治疗深部真菌病的首选药物

### 参 考 文 献

- 1 Cabellor-Hurtado F, Zimmerlin A, Rahier A, *et al.* Cloning and functional expression in yeast of a cDNA coding for an obtusifoliosol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) in wheat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **230** (2): 381~385
- 2 van Nistelrooy J G M, van den Brink J M, van Kan J A L, *et al.* Isolation and molecular characterisation of the gene encoding eburicol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) from *penicillium italicum*. *Mol Gen Genet*, 1996, **250** (6): 725~733
- 3 Stromstedt M, Rozman D, Waterman M. The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. *Archiv Biochem Biophys*, 1996, **329** (1): 73~81
- 4 Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O, *et al.* Sterol 14-demethylase P450 (P450<sub>14DM</sub>) is one of the most ancient and conserved P450 species. *J Biochem*, 1996, **119** (5): 926~933
- 5 Lamb D C, Kelly D E, Schunck W H, *et al.* The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14  $\alpha$ -demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem*, 1997, **272** (5): 5682~5688
- 6 Bernhardt R. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1995, **127**: 137~221
- 7 Shyadehi A Z, Lamb D C, Kelly S L, *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-450<sub>14DM</sub>, and CYP51). *J Biol Chem*, 1996, **271** (21): 12445~12450
- 8 Tuck S F, Aoyama Y, Yoshida Y, *et al.* Active site topology of *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) and its G310D mutant (Cytochrome P-450<sub>SC1</sub>). *J Biol Chem*, 1992, **267** (19): 13175~13179
- 9 Aoyama Y, Yoshida Y, Sonoda Y, *et al.* The 3-hydroxy group of lanosterol is essential for orienting the substrate in the substrate site of cytochrome P-450<sub>14DM</sub> (lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase). *Biochim Biophys Acta*, 1989, **1006** (2): 209~213
- 10 Aoyama Y, Yoshida Y, Sonoda Y, *et al.* Role of the 8-double bond of lanosterol in the enzyme-substrate interaction of cytochrome P-450<sub>14DM</sub>. *Biochim Biophys Acta*, 1989, **1001** (2): 196~200
- 11 Fischer R T, Stam S H, Johnson P R, *et al.* Mechanistic studies of lanosterol 14 $\alpha$ -methyl demethylase: substrate requirements for the component reactions catalyzed by a single cytochrome P-450 isoenzyme. *J Lipid Res*, 1989, **30** (10): 1621~1632
- 12 Aoyama Y, Yoshida Y, Sonoda Y, *et al.* Role of the side chain of lanosterol in substrate recognition and catalytic activity of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (cytochrome P-450<sub>14DM</sub>) of yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1081** (3): 262~266
- 13 Sonoda Y, Sekigawa Y, Sato Y. Metabolism of 24, 25-dihydrolanosterol analogs by partially purified cytochrome P-450<sub>14DM</sub> from rat liver microsomes. *Chem Pharm Bull*, 1989, **37** (3): 718~722

- 14 Aoyama Y, Yoshida Y, Sonoda Y, *et al.* Structural analysis of the interaction between the side-chain of substrates and the active site of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (P-450<sub>14DM</sub>) of yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1122** (3): 251~255
- 15 Aoyama Y, Yoshida Y. Different substrate specificities of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (P-450<sub>14DM</sub>) of *Saccharomyces cerevisiae* and rat liver for 24-methylene-24, 25-dihydrolanosterol and 24, 25-dihydrolanosterol. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **178** (3): 1064~1071
- 16 Aoyama Y, Yoshida Y. The 4 $\beta$ -methyl group of substrate does not affect the activity of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (P-450<sub>14DM</sub>) of yeast: different between the substrate recognition by yeast and plant sterol 14 $\alpha$ -demethylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **183** (3): 1266~1272
- 17 Tuck S F, Robinson C H, Silverton J V. Assessment of the active-site requirements of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase: evaluation of novel substrate analogues as competitive inhibitors. *J Org Chem*, 1991, **56** (3): 1260
- 18 Trzaskos J M, Ko S S, Magolda R L, *et al.* Substrate-based inhibitors of lanosterol 14 $\alpha$ -methyl demethylase: I. assessment of inhibitor structure-activity relationship and cholesterol biosynthesis inhibition properties. *Biochemistry*, 1995, **34** (30): 9670~9676
- 19 Aoyama Y, Yoshida Y, Sonoda Y, *et al.* 7-oxo-24, 25-dihydrolanosterol: a novel lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (P-450<sub>14DM</sub>) inhibitor which blocks electron transfer to the oxyferro intermediate. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **922** (3): 270~277

**Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase: Target of the Antifungal Drugs.** JI Hai-Tao, ZHANG Wai-Nian, ZHOU You-Jun (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China).

**Abstract** lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, the target enzyme of the azole antifungals, is the only known member of the P450 superfamily to be expressed in higher plant, fungi, and mammals. Amino acid sequences from higher plant, fungi and mammals have been characterized. Oxidative removal of the 14 $\alpha$  methyl group from lanosterol by the enzyme includes three steps and the free radicals are involved in the scheme of the catalytic reaction. The active site of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase appears to be open above heme prosthetic group pyrrole ring C. Pyrrole ring A, B and D are occluded by active site residues; 3 $\beta$ -hydroxyl group,  $\Delta^{8(9)}$ -double bond and 17-side chain of the substrate lanosterol are the key functional groups for the correct enzyme-substrate interaction and high catalytic turnover. The discussion about the structure-activity relationship (SAR) of two series inhibitors of the enzyme, substrate analogues and azole antifungals, provides the better basis for further high potent inhibitors design.

**Key words** lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, amino acid sequence, metabolism, inhibitor design