

综述

植物类型 III 聚酮合酶超家族基因结构、功能及代谢产物

马兰青¹, 师光禄¹, 叶和春², 刘本叶², 王有年¹

1 北京农学院 农业部都市农业 (北方) 重点开放实验室, 北京 102206

2 中国科学院植物研究所 中国科学院光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093

摘要: 植物聚酮类化合物主要包括酚类、芪类及类黄酮化合物等, 在植物花色、防止紫外线伤害、预防病原菌、昆虫危害以及作为植物与环境互作信号分子方面行使着重要的生物学功能。该类化合物具有显著多样的生物学活性, 对人体保健及疾病治疗有显著意义。植物类型 III 聚酮化合物合酶 (PKS) 在该类化合物生物合成起始反应中行使着关键作用, 决定该类化合物基本分子骨架建成和代谢途径碳疏走向, 为合成途径关键酶和限速酶。以查尔酮合酶为原型酶的植物类型 III PKS 超家族是研究系统进化和蛋白结构与功能关系的模式分子家族, 目前已经分离得到 14 种植物类型 III PKS 基因, 这些同祖同源基因及其表达产物既有共性, 也表现出许多独特个性, 这些个性赋予此类次生代谢产物结构上的多样性。以下综述了植物类型 III PKS 超家族基因结构、功能及代谢产物研究进展。

关键词: 聚酮合酶, 查尔酮合酶, 次生代谢

Plant-specific type III polyketide synthase superfamily: gene structure, function and metabolites

Lanqing Ma¹, Guanglu Shi¹, Hechun Ye², Benye Liu², and Younian Wang¹

1 Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture China, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

2 Key Laboratory of Phytochemistry and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: Plant-specific type III polyketide synthase (PKS) produces a variety of plant secondary metabolites with notable structural diversity and biological activity. So far 14 plant-specific type III PKS have been identified according to their enzymatic products, and the corresponding genes have been cloned and characterized. The differences among the various PKS are mainly in their substrate specificities, the number of their condensation reactions, and the type of ring closure of their products. However, numerous studies have revealed the common features among the plant-specific type III PKS, which include sequence homology, similar gene structure, conserved amino acid residues in the reaction center, enzymatic characteristics and reaction mechanism. We briefly reviewed 14 plant-specific type III PKS to better understand genetic and metabolic engineering of plant-specific type III PKS.

Keywords: polyketide synthase, chalcone synthase, secondary metabolism

Received: January 19, 2010; **Accepted:** June 18, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30170759, 30571506), Beijing Municipal Natural Science Foundation (No. 6071001), Funding Project for Academic Human Resources Development in Institutions of Higher Learning under the Jurisdiction of Beijing Municipality (Nos. PXM2007-014207-044536, PXM2007-014207-044538).

Corresponding author: Benye Liu. Tel: +86-10-62836244; Fax: +86-10-62836249; E-mail: benyel@ibcas.ac.cn

Younian Wang. Tel/Fax: +86-10-80799006; E-mail: lqma@bac.edu.cn

国家自然科学基金项目 (Nos. 30170759, 30571506), 北京市自然科学基金重点项目 (No. 6071001), 北京市属高校人才强教计划 (Nos. PXM2007-014207-044536, PXM2007-014207-044538) 资助。

聚酮类化合物 (Polyketide, PK) 是由细菌、真菌、放线菌及植物产生的一大类次生代谢产物, 主要包括大环内酯类、四环素类、萜环类、聚醚类、酚类、芪类以及类黄酮化合物等。由于生物合成途径及机制复杂多变, 造成聚酮化合物数量和分子结构极其庞大繁杂, 从而使该类化合物具有显著多样的生物学活性。微生物来源的聚酮化合物家族包括了大多数抗生素和一些重要药物 (抗癌药、免疫抑制剂等)。如临床上已经应用的红霉素、四环素、利福霉素、两性霉素、阿霉素、洛伐他丁、FK506、雷帕霉素等重要抗生素, 以及农牧业上使用的阿弗菌素和莫能星、泰乐菌素等都属于这个家族^[1]。植物聚酮类化合物主要包括酚类、芪类以及类黄酮化合物等, 其中, 众多化合物具有抗肿瘤、心血管保护、抗氧化功能^[2-3]。目前, 来源于聚酮化合物的药物每年销售额已超过 100 亿美元。

聚酮化合物虽然种类繁多、结构多变, 但其生物合成有着共同的机制, 均由聚酮化合物合酶 (Polyketide synthase, PKS) 催化合成。目前发现的 PKS 大体上可分为 3 类: I 型 PKS 是以模块形式存在的多功能酶, 每一模块含有一套独特的、非重复使用的催化功能域, 主要催化合成大环内酯、聚烯及聚醚类化合物; II 型 PKS 是含有一组可重复使用单元的多酶复合体, 主要催化芳香族聚酮化合物的生物合成, I 型和 II 型 PKS 主要存在于微生物中; III 型 PKS 属于查尔酮合成酶 (Chalcone synthase, CHS) (EC 2.3.1.74) 类, 主要存在于植物和细菌中, 是一种可重复使用的同源双亚基蛋白, 主要负责单环或双环芳香族聚酮化合物的生物合成^[1]。本文主要针对植物类型 III PKS 超家族基因结构、功能及代谢产物进行分析。

1 植物类型 III PKS 超家族成员

CHS 普遍存在于植物中。1972 年, CHS 的体外酶促活性首次在欧芹悬浮细胞培养物中被发现^[4]。1983 年首个 CHS 的基因序列从欧芹中被克隆^[5]。漫长的进化过程中, CHS 基因在不同植物谱系中发生了不同程度的重复和分化, 导致在多数植物基因组中存在具不同表达特性的 CHS 重复基因, 并在部分

植物基因组中出现由 CHS 基因分化形成的具有新的底物选择性和产物特异性的“类 CHS (CHS-Like)”基因^[6]。这些结构相似、功能相关、但表达模式及编码产物催化特性有一定差异的基因组成了一个庞大的基因家族——查尔酮合酶基因超家族 (Chalcone synthase superfamily), 又称为植物类型 III PKS 基因超家族 (Plant-specific type III polyketide synthase superfamily)。

目前, 已经从苔藓、蕨类、裸子和被子植物中分离了 14 种植物类型 III PKS 基因。这些不同 PKS 的差别主要体现在起始底物特异性、缩合反应次数 (聚酮链延伸长度) 以及产物合成所使用的不同环化方式等。这些 PKS 的名称、催化方式见表 1。以细菌类型 III PKS 为外类群的系统发育分析结果表明, 植物类型 III PKS 按照苔藓、蕨类, 裸子和被子植物分类, 每一类型植物中的 CHSs 和功能异化的类型 III PKS (CHS-like) 分别构成独立的组群 (图 1)^[10]。

2 植物类型 III PKS 超家族基因结构

植物类型 III PKS 超家族不同成员具有许多共同特征, 主要包括基因结构、序列相似性、活性中心、酶学性质以及共同的催化机制等^[6-7]。保守的基因结构是高等植物类型 III PKS 的一个共同特征。显花植物 (裸子植物和被子植物) 中, 除一个早期报道的金鱼草 *Antirrhinum majus* CHS (*AMCHS*) 含有 2 个内含子 (Intron) 外^[7], 迄今 20 余年研究中, 所有报道的类型 III PKS 基因均含有 1 个内含子且该内含子位置保守^[3,8]。金鱼草 *AMCHS* 两个内含子中, 第一内含子的位置与其他基因相同, 第二内含子位于第二个外显子 (Exon) 内部, Sommer 和 Saedler^[7] 推测第二内含子是在金鱼草这一物种形成后获得的。然而作者及后续的研究并未对 *AMCHS* 的基因特性、表达特性及 *AMCHS* 酶学性质, 具体功能作进一步的研究, 也没有金鱼草及其相关科属植物中类型 III PKS 超家族其他成员基因结构方面的报道。

有趣的是, 在我们工作中 2 个含有 3 个内含子的类型 III PKS 基因 (*PcPKS1*, 经系统发育和功能研究证明其编码产物为具有双酶活性的 CHS;

表 1 植物类型 III PKSs 超家族成员

Table 1 Plant-specific type III polyketide synthase superfamily

Name	Start substrate	Number of condensation reaction	Type of ring closure	Product	Reference
Chalcone synthase (CHS)	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	3	Claisen	Naringenin chalcone	[2]
Benzalacetone synthase (BAS)	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	1	No	<i>p</i> -Hydroxybenzalacetone	[17]
<i>p</i> -Coumaroyl triacetic acid synthase (CTAS)	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	3	Lactone	Tetraketide lactone	[18]
Stilbene synthase (STS)	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	3	Aldol	Stilbene	[20]
Bibenzyl synthase (BBS)	dihydro- <i>m</i> -Coumaroyl-CoA	3	Aldol	3,3'-Trihydroxybibenzyl	[27]
Stilbenecarboxylate synthase (STCS)	dihydro- <i>p</i> -Coumaroyl-CoA	3	Aldol (without decarboxylation)	5-Hydroxylunularic acid	[29]
Acridone synthase (ACS)	<i>n</i> -Methanthranioyl-CoA	3	Claisen	Acridone	[30]
Benzophenone synthase (BPS)	Benzoyl-CoA	3	Claisen	Benzophenone	[34]
Biphenyl synthase (BIS)	Benzoyl-CoA	3	Aldol	Biphenyl	[35]
2-Pyrone synthase (2PS)	Acetyl-CoA	2	Lactone	Pyrone	[38]
Aloesone synthase (ALS)	Acetyl-CoA	6	Aldol	Aloesone	[15]
Valerophenone synthase (VPS)	Isovaleryl-CoA and Isobutyryl-CoA	3	Claisen	Phlorisovalerophenone and Phlorisobutyrophenone	[42]
Pentaketide chromone synthase (PCS)	Malonyl-CoA	4	Claisen	5,7-dihydroxy-2-methylchromone	[43]
Octaketides synthase (OKS)	Malonyl-CoA	7	Claisen	SEK4 and SEK4b	[44]

PcPKS2, 经过分析确认其编码产物为苯亚甲基丙酮合酶, Benzalacetone synthase, BAS) 相继从虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc 中被分离和鉴定, 3 个内含子在上述 2 个基因中的插入位置完全保守^[9-10]。与 *PcPKS1* 和 *PcPKS2* 内含子 2 相比, 金鱼草 *AMCHS* 第二个内含子的插入位置相对保守, 向前移动了一个碱基^[9-10]。*PcPKS1* 和 *PcPKS2* 的 3 个内含子之间没有发现显著的相似性^[9-10]。迄今为止, *CHS* 是高等植物中最共同和分布最广泛的类型 III PKS, 所有已经得到功能验证的植物类型 III PKS 超家族其他成员 (*CHS*-like) 都来自于 *CHS* 广泛重复和后续的遗传变异^[2]。除了 *PcPKS1* 和 *PcPKS2*, 我们进一步的工作发现在虎杖中存在一个含有 1~2 个内含子基因组成的植物类型 III PKS 基因家族。其中包括一个单内含子 *CHS* 基因 (EU647246)、一个单内含子 *CHS*-like 基因 (DQ459349)、一个双内含子 *CHS*-like 基因 (EU647245)。考虑到 *PcPKS1* 和 *PcPKS2* 3 个内含子保守的插入位点以及系统发育分析结果 (图 1), 我们推测虎杖中 *PcPKS2* 极有可能通过一个单基因重复事件从一个 3 内含子 *CHS* (*PcPKS1*) 进化而来^[10]。隐花植物中, 新近一项研究

也发现了植物类型 III PKS 超家族特殊的基因结构, 新型模式植物小立碗藓 *Physcomitrella patens* 假定的 19 个类型 III PKS 基因中, 有 6 个不含内含子, 4 个含有 1 个内含子, 而剩余的基因含有 2 个内含子^[11]。苔藓植物大约在 4.5 亿年前从维管植物的祖先中分离出来^[11], 因此类型 III PKS 非正常的基因结构在显花植物和隐花植物中都是存在的。植物 β -酮酯酰合酶 (β -ketoacyl synthases, KS) 被认为是植物类型 III PKS 的祖先, 大部分的 β -酮酯酰合酶在其编码区不含内含子^[12]。目前, 还没有类型 III PKS 基因内含子功能方面的报道。然而一些研究表明, 内含子对于植物基因的功能是有作用的^[13]。近些年来, 虽然类型 III PKS 的家族成员不断从各种植物中被鉴定, 但对该家族基因的基因组分布状况知之甚少。植物类型 III PKS 在基因组水平上复杂的进化变化极有可能是不断适应产生具有植物种属特性化学信号的结果。因此非正常的基因结构也极有可能存在于那些已经经过功能鉴定的类型 III PKS 超家族其他成员 (*CHS*-like) 基因中。进一步的工作需要阐明植物类型 III PKS 多内含子基因结构在高等植物中的分布状况。

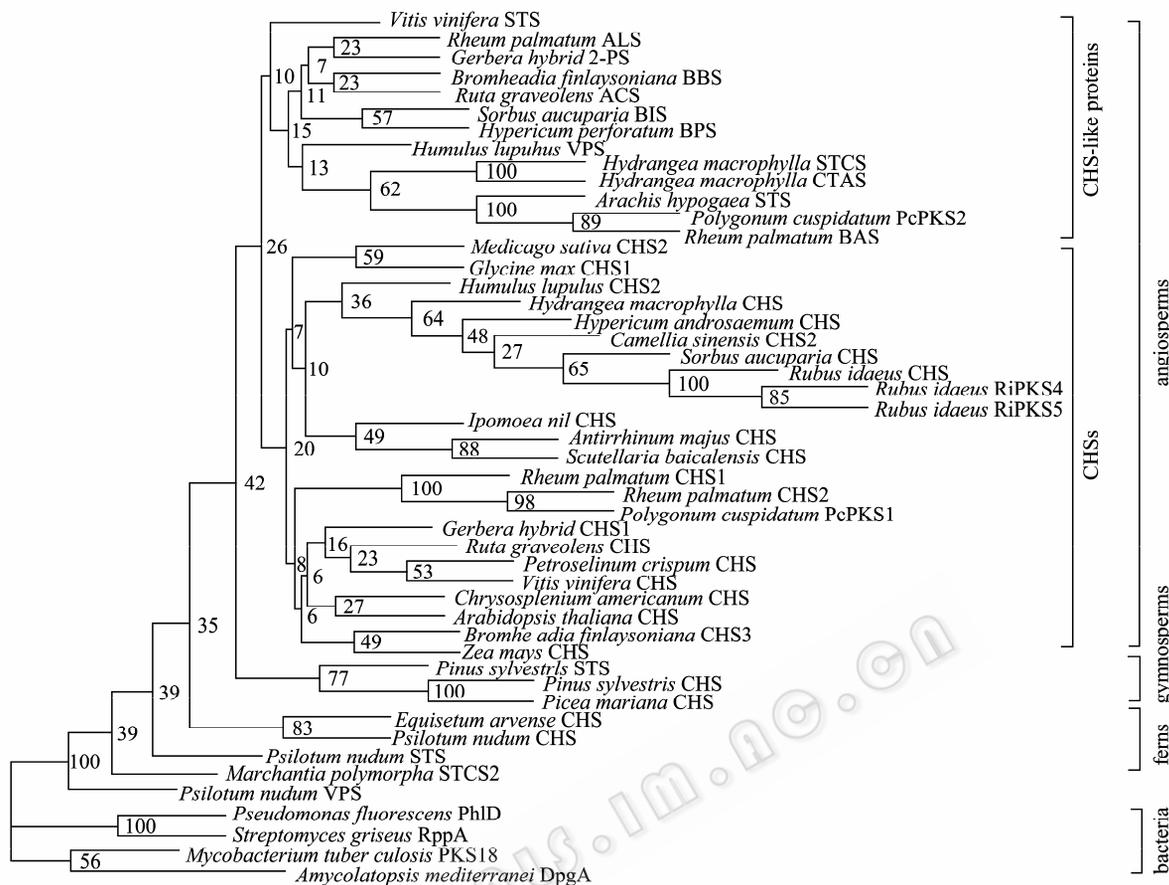


图 1 植物类型 III PKS 超家族成员系统发育分析结果 (以细菌类型 III PKS 为外类群, 用于系统发育分析的基因序列接收号及分析方法见文献[10])

Fig. 1 Neighbor-joining tree of type III PKS. Numbers at the forks are bootstrap values from 100 replicates. Four bacterial type III PKS were used to root the tree. The accession numbers used in the analysis were as previously described [10].

3 植物类型 III PKS 超家族酶功能及其次生代谢产物

植物类型 III PKS 超家族成员底物选择和催化机制非常复杂, 主要体现在 3 个方面: 一是超家族中不同酶有不同的主产物; 二是家族中的很多成员都有着非常宽泛的起始底物特异性; 三是体外酶促反应中, 会产生相当数量的早期脱轨产物——副产物, 如 2 步缩合反应丙烯酮-中间体副产物 Bisnoryangonin (BNY), 3 步缩合反应丁烯酮-中间体副产物 4-Coumaroyltriacticacid lactone (CTAL), 在特定条件下, 副产物的量有时会超过主产物的量。植物聚酮类化合物主要包括酚类、芪类以及类黄酮化合物等。其中, 大部分聚酮类化合物生物合成途径机制尚不明确, 但可以肯定的是植物类型 III PKS

在聚酮化合物生物合成起始反应中行使着关键的作用, 决定着化合物基本分子骨架的建成和代谢途径碳硫走向, 是植物聚酮化合物生物合成途径的关键酶和限速酶。作为重要的植物次生代谢产物, 植物聚酮类化合物及其衍生物在植物色彩、防止紫外线伤害、预防病原菌、昆虫危害以及作为植物与环境之间互作的重要信号分子方面行使着重要的生物学功能。

植物类型 III PKS 超家族中, 目前研究最为透彻的是查尔酮合酶, 其催化来自丙二酰辅酶 A (Malonyl-CoA) (类型 III PKS “延伸”底物) 的 3 个乙酰基团通过连续的缩合反应连接到 4-香豆酰辅酶 A (*p*-Coumaroyl-CoA) (类型 III PKS “起始”底物) 分子上, 之后通过克莱森 (Claisen) 型环化反应生成芳香族聚酮化合物柚皮素查尔酮 (Naringenin chalcone),

其为类黄酮化合物生物合成的前体(图 2)^[2-3]。类黄酮化合物广泛存在于高等植物中,在植物体内绝大部分以糖甙的形式转运和贮存^[14],与植物的花色形成密切相关,并在植物与环境的相互作用中起重要作用,如防止紫外线(UV)损伤、抗虫、抗病、影响豆科植物的根瘤形成等^[2-3]。众多研究结果表明,查尔酮衍生物(即类黄酮化合物)对人体健康和疾病治疗具有积极效果^[2-3]。

植物类型 III PKS 超家族的酶都是由分子量为 40~45 kDa 大小中亚基组成的同型二聚体,活性位点为 Cys164、His303 和 Asn336,这 3 个在植物类型 III PKS 超家族中绝对保守的氨基酸组成了该类酶的活性中心(三联体活性中心):“起始底物分子结合结构域”和“环化反应结构域”。紫花苜蓿 *Medicago sativa* CHS 晶体结构和定点突变的研究结果揭示了 CHS 催化柚皮素查尔酮形成机制和过程: 1) 起始分子定位于 Cys164 位点; 2) 丙二酰-CoA 脱羧生成乙酰-CoA; 3) 聚酮化合物链开始延伸; 4) 丁烯酮-中间体-CHS 复合物完成环化和芳构化^[15]。此外,CHS 活性位点还包括 Val98、Thr132、Ser133、Met137、Gly163、Thr194、Gly211、Gly216、Ile254、Ser338、Pro375,以及 CHS “门卫”氨基酸 Phe215 和 Phe265^[2]。植物类型 III PKS 超家族其他成员酶(CHS-Like)功能的多样性来自原型酶——CHS 活性位点的小的修饰,这些小的变动改变了起始底物的选择性、链延伸的长度和环化反应机制(表 1、图 2)。

3.1 苯亚甲基丙酮合酶 (BAS)

苯亚甲基丙酮合酶 (BAS) 使用与 CHS 相同的底物,但产物却存在很大差异。掌叶大黄 *Rheum palmatum* BAS 一个显著特点是 Phe215 (*M. sativa* CHS 顺序)被 Leu 取代,定点突变实验结果表明,这个位置上的取代对于该酶的 BAS 活性是必需的,该位置上 Phe 被替换,致使聚酮链的延伸在乙烯酮中间体阶段即被打断(表 1、图 2)^[16]。Austin 和 Noel^[2]认为 CHS “门卫” Phe、Phe215 和 Phe265 可能调节类型 III PKS 活性位点与辅酶 A (CoA) 结合通道之间的空间结构。我们的研究证实,PcPKS2 同样是一个 BAS,有趣的是,Phe215 和 Phe265 在 PcPKS2 中双双缺失,分别被 Leu 和 Cys 取代,导致聚酮链

的延伸在乙烯酮中间体阶段提前结束(图 2)^[9]。另一个非常有趣的结果同样出现在我们的研究中,经序列及系统发育分析表明,PcPKS1 是一个典型的 CHS,然而,功能和酶学分析结果显示 PcPKS1 是一个同时拥有 CHS 和 BAS 活性的双功能酶,且 PcPKS1 的 BAS 活性催化效率 (K_{cat}/K_m) 比 PcPKS2 高 70 倍^[10]。BAS 在构建具有重要药理价值一系列苯丁烷类化合物 (Phenylbutanoids) 及其衍生物的 C₆-C₄ 分子骨架方面具有重要的功能。目前这些苯丁烷类化合物主要包括大黄中的林氏莲花掌素甙 (Glucoside lindleyin)、生姜中的姜酚 (Gingerol) 和姜黄 (Curcumin)^[17],以及覆盆子果实中一种独特的芳香物质覆盆子酮 (Raspberry ketone)^[17]。

3.2 4-香豆酰甘油酸合酶 (CTAS)

八仙花 *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* 4-香豆酰甘油酸合酶 (*p*-Coumaroyl triacetic acid synthase, CTAS) 催化 4-香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 分子间 3 步连续的缩合反应,但 CTAS 缺乏必要的环化机制,导致其催化产物为线性丁烯酮中间体副产物——CTAL^[18](表 1、图 2)。序列分析显示,在 CTAS 中,CHS 活性位点 Thr197 被 Asp 取代,同时在相当于 *M. sativa* CHS 第 290 位氨基酸残基位置上有 6 个氨基酸残基的插入^[2]。CTAS 产物 CTAL 的衍生物 Hydramacroside B 存在于八仙花叶片中,是一种重要的植物抗毒素^[19]。

3.3 芪合酶 (STS)

芪合酶 (Stilbene synthase, STS) 能够利用与 CHS 相同的底物催化合成相同的丁烯酮-中间体产物,然而后续步骤中,二者环化反应机制存在差异,CHS 运用分子内克莱森型缩合反应机制催化丁烯酮-中间体分子 C6 和 C1 位置进行缩合连接生成柚皮素查尔酮;而 STS 则运用分子内醛醇缩合 (Aldol condensation) 反应机制催化丁烯酮-中间体分子 C7 和 C2 位置进行缩合连接生成白藜芦醇 (Resveratrol),且伴有 C1 位置脱羧反应(表 1、图 2)。后续研究显示,STS 与 CHS 之间具有显著的序列相似性^[20],除不同的环化反应机制外,二者之间没有发现其他反应机制的差别^[21]。随着 STS 从松树

(裸子植物)^[22]和葡萄(被子植物)^[23]相继克隆促进了 STS 与 CHS 之间的系统发育分析, 结果显示二者在氨基酸水平存在 60%~90% 的同一性, 在 34 个 CHS 和 4 个 STS 的系统发育分析中, STS 没有单独聚合, 而是与相同或相关植物的 CHS 聚合, 该研究结果说明 STS 从 CHS 多次进化而来。有趣的是, 将花生 *Arachis hypogaea* STS 和野葛 *Pueraria lobata* CHS cDNA 分别在大肠杆菌中表达, 它们的表达产物存在着部分重叠, 即在 CHS 催化产物中有白藜芦醇(约为柚皮素查尔酮的 2.7%~4.2%), 而在 STS 催化产物中含有有柚皮素查尔酮(约为白藜芦醇量的 1.4%~2.3%)^[24]。被子植物 STS 产物白藜芦醇是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物, 是在植物受到病原性进攻和环境恶化时产生的一种植物抗毒素, 广泛存在于种子植物中。花生、葡萄的 STS 在烟草、苜蓿中异源过表达后, 上述两种植物的抵抗真菌能力显著增强^[25]。白藜芦醇不仅是一种重要的植物抗毒素, 还具有众多的药理和保健功能, 主要包括: 抗癌作用; 心血管保护作用; 抗氧化、抗自由基作用; 神经保护作用; 消炎作用; 抗真菌作用; 机体损伤的保护作用; 植物雌激素作用; 对骨代谢和内皮素拮抗剂的影响等。其中, 最令人瞩目和具有发展前景的是其在抗肿瘤、心血管保护、抗氧化方面的作用^[26]。裸子植物 STS 由于使用不同的起始底物肉桂酰辅酶 A (Cinnamoyl-CoA), 其产物为银松素 (Pinosylvin), 也是一种重要的植物抗毒素。

3.4 联苳合酶 (BBS)

联苳合酶 (Bibenzyl synthase, BBS) 的催化方式与 STS 完全相同, 只是起始底物有所差异。BBS 使用联苳-*m*-香豆酰辅酶 A (dihydro-*m*-Coumaroyl-CoA) 为起始底物, 催化来自丙二酰辅酶 A 的 3 个乙酰基团通过连续的缩合反应连接到起始底物分子上, 并运用分子内醛醇缩合反应机制催化中间体分子 C7 和 C2 位置进行缩合连接生成联苳-芪产物 (Dihydrostilbene)——3,3',5'-Trihydroxybibenzyl, 且伴有 C1 位置脱羧反应 (表 1、图 2)^[27]。基于 BBS 序列结构的实验结果显示, CHS 保守位点 Met137、Val98 和 Gly211 分别被 Leu、Ala 和 Thr 取代有可能

直接影响 BBS 起始底物的选择性^[2]。在胁迫或伤处理兰花组织时, 特别是伤口感染内生菌根菌的情况下, 联苳-芪类化合物及其三环衍生物——9,10-Dihydrophenanthrenes 开始大量积累, 推测联苳化合物为一种植物抗真菌植保素^[2]。

3.5 芪-羧酸酯合酶 (STCS)

芪-羧酸酯类化合物存在于八仙花属 (*Hydrangea*)、苔类 (Liverworts)、大麻类植物 (*Cannabis*) 以及毒常春藤 (Poison ivy) 中, 它们中的许多化合物拥有非常有价值的特性, 如叶甜素 (Phyllo dulcin) 的甜味超过蔗糖 600~800 倍^[28]。从该类化合物分子结构判断, 其前体极有可能起源于类型 III PKS 的催化, 然而在体外环境下, 至今没有该类化合物完整的合成途径得到确认和证明^[2]。但在上述植物中, 不断有催化该类反应新的类型 III PKS 被验证。例如, 八仙花 *Hydrangea macrophylla* 芪-羧酸酯合酶 (Stilbenecarboxylate synthase, STCS) 的催化方式与 STS、BBS 的差别主要体现在最适起始底物和脱羧反应机制上, STCS 以联苳-4-香豆酰辅酶 A (Dihydro-4-Coumaroyl-CoA) 为起始底物, 催化来自丙二酰辅酶 A 的 3 个乙酰基团通过连续的缩合反应连接到起始底物分子上, 并运用分子内醛醇缩合反应机制催化中间体分子 C7 和 C2 位置进行缩合连接生成 5-Hydroxylunularic acid, 值得关注的是, 其 C1 位置未发生脱羧反应 (表 1、图 2)^[29]。

3.6 吡啶酮合酶 (ACS)

芸香科植物 (Rutaceae) 具有三环结构吡啶酮分子的基本骨架是由吡啶酮合酶 (Acridone synthase ACS) 催化合成的。ACS 催化来自丙二酰辅酶 A 的 3 个乙酰基团通过连续的缩合反应连接到特异起始底物 N-甲基邻氨基苯 (甲) 酰辅酶 A (*n*-Methylanthraniloyl-CoA) 分子上, 之后通过克莱森 (Claisen) 型环化反应生成吡啶酮化合物——1,3-二甲基-N-甲基吡啶酮 (1,3-dihydroxy-N-methylacridone) (表 1、图 2)^[30]。芸香科植物不论是 CHS 还是 STS 在体外条件下都不能利用 N-甲基邻氨基苯 (甲) 酰辅酶 A 作为起始底物, 而野生型的 ACS 却可以利用 4-香豆酰辅酶 A 合成柚皮素查尔酮, 其活性是以 N-甲基邻氨基苯 (甲) 酰辅酶 A 为起始底

物的 15%^[31]。像其他类型 III PKS 一样, ACS 氨基酸序列中有近 100 处与 CHS 有所差异, 其中 ACS 三联体突变体 (T132S/S133A/F265V) 能够明显降低 ACS 利用 N-甲基邻氨基苯(甲)酰辅酶 A 为起始底物的能力, 却能够显著增加对 4-香豆酰辅酶 A 的亲合性^[32], 这 3 个氨基酸对于 ACS 相对于 CHS 的活性变化非常重要, 然而, ACS 三联体突变体 (T132S/S133A/F265V) 仍然能保持一定吡喃酮合成能力的事实说明, 仍然有其他一些重要的位点对于 ACS 功能有作用^[32]。目前已知的近百种吡喃酮生物碱大部分特异地分布在芸香科植物家族中, 近期也有报道在胡椒科 (Piperaceae) 植物中发现了这类化合物^[30]。该类化合物属于生物碱植物抗毒素, 同时具有许多诱人的生物学活性, 但由于其干扰 DNA 合成, 其在医学治疗方面的作用受到限制^[33]。

3.7 二苯甲酮合酶 (BPS) 和联苯合酶 (BIS)

我们对二苯甲酮合酶 (Benzophenone synthase, BPS)^[34]和联苯合酶 (Biphenyl synthase, BIS)^[35]酶学性质及功能研究结果表明, BPS 和 BIS 之间的功能关联与 CHS 和 STS 之间的关系完全相同, 只是起始底物有所差别。CHS 和 STS 使用 4-香豆酰辅酶 A, 而 BPS 和 BIS 使用苯甲酰辅酶 A (Benzoyl-CoA) 为起始底物。BPS 催化来自丙二酰辅酶 A 的 3 个乙酰基团通过连续的缩合反应连接到苯甲酰辅酶 A 分子上, 之后通过克莱森型环化反应机制生成 Phlorbenzophenone。而 BIS 则能够利用与 BPS 相同的底物催化合成相同的中间体产物, 后续环化反应中, BIS 运用分子内醛醇缩合 (Aldol condensation) 反应机制生成 3,5-二羟基联苯 (3,5-Dihydroxybiphenyl), 且伴有 C1 位置脱羧反应 (表 1、图 2)。BPS 是合成苯甲酮 (Benzophenones) 和 (夹) 氧二苯甲酮 (Xanthenes) C₁₃ 基本骨架的关键酶, 苯甲酮衍生物为天然酚类化合物, 具有诱人的药理学特性, 如 Guttiferone F 具有很强的抗 HIV 和抗微生物活性^[36]。BIS 是合成联苯化合物 (Biphenyls) 的起始酶^[35]。联苯化合物是蔷薇科 (Rosaceae) 苹果亚科 (Maloideae) 中一类植物抗毒素, 且具有明显的种属特性^[37]。该类植物包括了温带常见的观赏和食用植物, 如苹果、梨及花楸、山楂等。

3.8 2-吡喃酮合酶 (2-PS)

2-吡喃酮合酶 (2-PS) 克隆于观赏雏菊 *Gerbera hybrida*。与 CHS 不同, 2-PS 不能利用 4-香豆酰辅酶 A, 而是利用乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 作为起始底物, 其催化来自丙二酰辅酶 A 的 2 个乙酰基团通过连续的缩合反应连接到乙酰辅酶 A 分子上, 之后通过内酯化 (Lactone) 反应生成 6-甲基-4-羟基-2-吡喃酮 (6-methyl-4-hydroxy-2-pyrone) (表 1、图 2)^[37]。在不含乙酰辅酶 A 的体外酶促体系中, 2-PS 也可以利用丙二酰辅酶 A 脱羧后的乙酰辅酶 A 作为起始底物, 只是催化效率下降 10 倍。以 *g2ps1* 为探针, 一系列相似酶从观赏雏菊和其他 4 个菊科植物中被克隆。与 CHS 序列比对结果表明, 在被子植物菊科家族产生进化分化之前, 2-PS 亚家族极有可能通过一个单基因重复事件从一个 CHS 进化而来^[38]。基于紫花苜蓿 *M. sativa* CHS 晶体结构同源模拟结果显示, 与 CHS 相比, 2-PS 的催化腔体积较小^[39]。定点突变研究结果表明, CHS 三联体突变体 (T197L/G256L/S338I) 的功能与 2-PS 完全相同^[40]。2-PS 为 2 种含有还原型甲基吡喃酮基本骨架的化合物 (Gerberin 和 parasorboside) 提供了前体, 这两种化合物的糖甙及其衍生物存在于多种植物中, 具有很好的抑制细菌、真菌和预防昆虫摄食的作用^[37]。体外酶促反应中, 2-PS 可以利用苯甲酰辅酶 A (Benzoyl-CoA) 为起始底物产生 6-苯基-4-羟基-2-吡喃酮 (6-phenyl-4-hydroxy-2-pyrone), 该化合物结构符合 HIV-1 蛋白酶抑制剂家族基本特征, 可能具有潜在的功能^[37]。

3.9 芦荟松合酶 (ALS)

掌叶大黄 *R. palmatum* 芦荟松合酶 (Aloesone synthase, ALS) 同样以乙酰辅酶 A 为起始底物, 以丙二酰辅酶 A 为延伸底物, 值得关注的是, ALS 催化 2 个底物间 6 步连续的缩合反应, 中间产物经环化产生芳香族庚烯酮——芦荟松 (Aloesone) (表 1、图 2)^[15]。ALS 与 CHS 保持有 60% 的氨基酸序列同一性, 并且保有几乎所有的辅酶 A 结合位点, 但在 ALS 中, CHS 活性位点 Thr197、Ile254、Gly256 和 Ser338 分别被 Ala、Met、Leu 和 Thr 所取代, 有意思的是这些氨基酸残基在 2-PS 中同样被取代^[41]。基

于紫花苜蓿 *M. sativa* CHS 晶体结构同源模拟结果显示, ALS 具有与 CHS 相同的三维结构, 但 ALS 催化腔体积 (1173 Å³) 要明显大于 CHS (1019 Å³) 和 2-PS (298 Å³), 此结果暗示着活性中心三维空间体积

有可能决定着聚酮化合物链延伸的长度。ALS 在大黄 (Rhubarb) 中的产物, 如 Aloesone *O*-glucoside (7-*O*-β-D-glucopyranoside) 和 Aloesone *C*-glucoside (8-*C*-β-D-glucopyranoside) 具有很强的消炎活性^[15]。

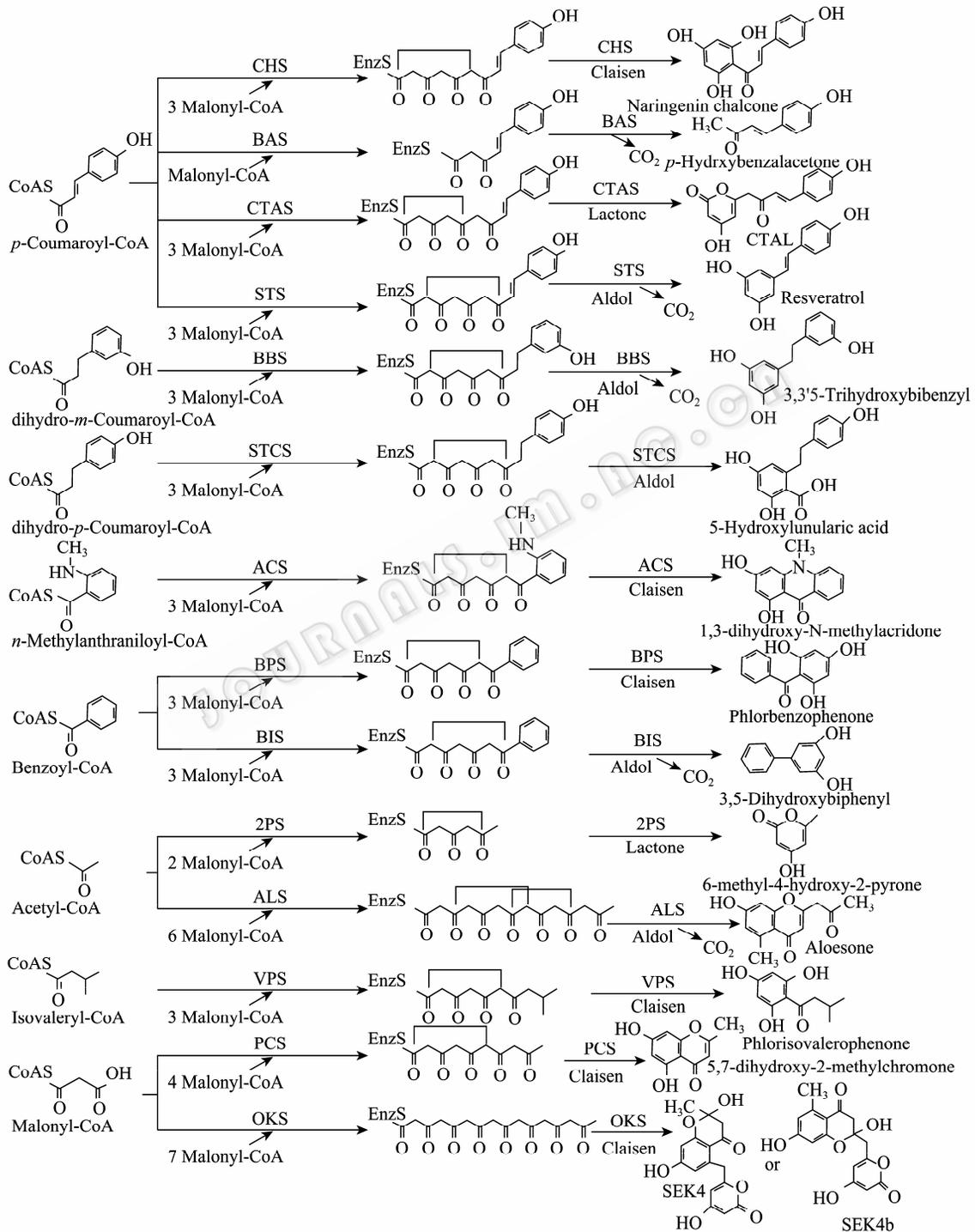


图 2 植物类型 III PKSs 超家族成员催化反应过程及产物 (环化反应类型及位置在图中标出, 反应机制见表 1 参考文献)
 Fig. 2 Comparison of the reactions and products of known divergent plant type III PKSs. The position and type of cyclization reaction (Claisen, aldol, or lactone) of each presumed linear polyketide intermediate is depicted. The reaction mechanism of plant-specific type III PKSs was as described in the references of Table 1.

3.10 苯戊酮合酶 (VPS)

啤酒花 (*Humulus lupulus*, hops) 苯戊酮合酶 (Valerophenone synthase, VPS) 以脂肪酰辅酶 A——异戊酰基或异丁酰基辅酶 A (Isovaleryl-或 Isobutyryl-CoA) 为起始底物, 以丙二酰辅酶 A 为延伸底物, 催化 2 个底物间 3 步连续的缩合反应, 中间产物经克莱森型环化反应生成 Phlorisovalerophenone 或 Phlorisobutyrophenone。有趣的是, 在体外酶促反应中, CHS 可以接受异戊酰基-CoA 为起始底物, 其产物为 Phlorisovalerophenone 和一个丙烯酮内酯副产物的混合物, 而 VPS 却不能利用 CHS 香豆酰辅酶 A 作为起始底物^[42]。VPS 与 CHS 氨基酸序列比对结果表明, 二者在邻近 CHS “起始底物结合结构域” 周围存在许多有意思的差异, CHS 中保守的 Thr132 和 Thr197, 在啤酒花 VPS 中分别被 Gly 和 Ile 取代。第 2 个 VPS 发现于原始维管植物松叶蕨 *Psilotum nudum* 中, 其在 132 和 197 位置上都为 Ser, 且 CHS 和啤酒花 VPS 中保守的 Ser338 在松叶蕨 VPS 中被 Val 取代^[2]。VPS 在啤酒花中的代谢产物, 一系列苦味酸物质, 如蛇麻烯 (Humulone) 和蛇麻酮 (Lupulone) 赋予啤酒独特的口味^[2]。

3.11 戊烯酮-色酮合酶 (PCS) 和辛烯酮合酶 (OKS)

戊烯酮-色酮合酶 (Pentaketide chromone synthase, PCS) 能够催化丙二酰辅酶 A 分子间连续 4 步的缩合反应产生 5,7-dihydroxy-2-methylchromone^[43], 而辛烯酮合酶 (Octaketides synthase, OKS) 则可以催化丙二酰辅酶 A 分子间连续 7 步的缩合反应产生芳香族辛烯酮产物——Octaketides SEK4 和 SEK4b^[44]。序列比对结果显示, OKS 与植物类型 III PKS 超家族其他成员酶保持有 50%~60% 的氨基酸序列同一性, 与 ALS、PCS 及 2-PS 相同, CHS 活性位点 Thr197、Gly256 和 Ser338 分别被其他氨基酸所取代。同源模拟结果显示, OKS 的催化腔体积为 (1124 Å³), 适合其完成连续 7 步的缩合反应。日本芦荟 *Aloe arborescens* PCS 为平喘药 Kehellin 和 Visnagin 生物合成提供了前体化合物^[43]; 而来自相同植物的 OKS 可能为抗生素类药物辛烯酮提供了前体化合物^[44]。

4 总结和展望

植物类型 III PKS 超家族成员功能多样性和底物特异性的冗杂是这个研究领域内公认的。超家族内其他成员酶 (CHS-Like) 功能的多样性均来自其原型酶——CHS 活性位点的小的修饰, 这些小的变动影响了该类酶活性中心空间构象, 这种空间变化极大改变了酶分子的起始底物选择性、链延伸长度和环化反应机制。因此, 揭示植物类型 III PKS 超家族结构与功能间的关联, 对于利用该类酶进行基因工程、代谢工程遗传操作是不可或缺的。

REFERENCES

- [1] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. Polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(2): 285–295.
- [2] Austin MB, Noel JP. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(1): 79–110.
- [3] Schröder J. A family of plant-specific polyketide synthases: facts and predictions. *Trends Plant Sci*, 1997, 2(10): 373–378.
- [4] Kreuzaler F, Hahlbrock K. Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) from *p*-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *FEBS Lett*, 1972, 28(1): 69–72.
- [5] Reimold U, Kroger M, Kreuzaler F, et al. Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme. *EMBO J*, 1983, 2(10): 1801–1805.
- [6] Yang J, Gu HY. Duplication and divergent evolution of the CHS and CHS-like genes in the chalcone synthase (CHS) superfamily. *Chin Sci Bull*, 2006, 5: 505–509.
杨继, 顾红雅. 查尔酮合酶超家族 (chalcone synthase superfamily) 基因重复和分化的样式. *科学通报*, 2006, 51(7): 745–749.
- [7] Sommer H, Saedler H. Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *Mol Gen Genet*, 1986, 202: 429–434.
- [8] Durbin ML, McCaig B, Clegg MT. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(1): 79–92.
- [9] Ma LQ, Pang XB, Shen HY, et al. A novel type III polyketide synthase encoded by a three-intron gene from

- Polygonum cuspidatum*. *Planta*, 2009, **229**(3): 457–469.
- [10] Ma LQ, Guo YW, Gao DY, *et al.* Identification of a *Polygonum cuspidatum* three-intron gene encoding a type III polyketide synthase producing both naringenin and *p*-hydroxybenzalacetone. *Planta*, 2009, **229**(4): 1077–1086.
- [11] Jiang C, Schommer CK, Kim SY, *et al.* Cloning and characterization of chalcone synthase from the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry*, 2006, **67**(23): 2531–2540.
- [12] Blacklock BJ, Jaworski JG. Substrate specificity of *Arabidopsis* 3-ketoacyl-CoA synthases. *Biochem Biophys Res Comm*, 2006, **346**(2): 583–590.
- [13] Lorkovic ZJ, Wieczorek Kirk DA, Lambermon MH, *et al.* Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**(4): 160–167.
- [14] Ma LQ, Gao DY, Wang YN, *et al.* Effects of overexpression of endogenous phenylalanine ammonia-lyase (PALrs1) on accumulation of salidroside in *Rhodiola sachalinensis*. *Plant Biol*, 2008, **10**: 323–333.
- [15] Abe I, Utsumi Y, Oguro S, *et al.* The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide. *FEBS Lett*, 2004, **562**(1/3): 171–176.
- [16] Abe I, Sano Y, Takahashi Y, *et al.* Site-directed mutagenesis of benzalacetone synthase. The role of the Phe215 in plant type III polyketide synthases. *J Biol Chem*, 2003, **278**(27): 25218–25226.
- [17] Abe I, Takahashi Y, Morita H, *et al.* (2001) Benzalacetone synthase. A novel polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum*. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(11): 3354–3359.
- [18] Akiyama T, Shibuya M, Liu HM, *et al.* *p*-Coumaroyltriacytic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*. *Eur J Biochem*, 1999, **263**(3): 834–839.
- [19] Matsuda H, Shimoda H, Uemura T, *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (III): absolute stereostructures of hydramacrosides A and B, secoiridoid glucoside complexes with inhibitory activity on histamine release. *Chem Pharm Bull*, 1999, **47**(12): 1753–1758.
- [20] Schröder G, Brown JW, Schröder J. Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur J Biochem*, 1988, **172**(1): 161–169.
- [21] Tropf S, Kärcher B, Schröder G *et al.* Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthase (stilbenes and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones. *J Biol Chem*, 1995, **270**(14): 7922–7928.
- [22] Fliegmann J, Schröder G, Schanz S, *et al.* Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol Biol*, 1992, **18**(3): 489–503.
- [23] Melchior F, Kindl H. Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme. *FEBS Lett*, 1990, **268**(1): 17–20.
- [24] Yamaguchi T, Kurosaki F, Suh DY, *et al.* Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 1999, **460**(3): 457–461.
- [25] Hain R, Reif HJ, Krause E, *et al.* Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 1993, **361**: 153–156.
- [26] Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, 2000, **66**(8): 663–673.
- [27] Preisig-Müller R, Gnau P, Kindl H. The inducible 9, 10-dihydrophenanthrene pathway: characterization and expression of bibenzyl synthase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Arch Biochem Biophys*, 1995, **317**(1): 201–207.
- [28] Suzuki H, Ikeda T, Matsumoto T, *et al.* Polyphenol components in cultured cells of Amacha (*Hydrangea macrophylla* Seringe var. *thunbergii* Makino). *Agric Biol Chem*, 1978, **42**: 1133–1137.
- [29] Eckermann C, Schröder G, Eckermann S, *et al.* Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. *Phytochemistry*, 2003, **62**(3): 271–286.
- [30] Baumert A, Maier W, Gröger D, *et al.* Purification and properties of acridone synthase from cell suspension cultures of *Ruta graveolens* L. *Z Naturforsch C*, 1994, **49**(1/2): 26–32.
- [31] Springob K, Lukacin R, Ernwein C, *et al.* Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(22): 6552–6559.
- [32] Lukacin R, Schreiner S, Matern U. Transformation of acridone synthase to chalcone synthase. *FEBS Lett*, 2001, **508**(3): 413–417.
- [33] Junghanns KT, Kneusel RE, Baumert A, *et al.* Molecular cloning and heterologous expression of acridone synthase from elicited *Ruta graveolens* L. cell suspension cultures. *Plant Mol Biol*, 1995, **27**(4): 681–692.
- [34] Liu B, Falkenstein-Paul H, Schmidt W, *et al.*

- Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and sitedirected mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant J*, 2003, **34**(6): 847–855.
- [35] Liu B, Raeth T, Beuerle T, *et al.* Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase. *Planta*, 2007, **225**(6): 1495–1503.
- [36] Rubio OC, Cuellar A, Rojas N, *et al.* A polyisoprenylated benzophenone from *Cuban propolis*. *J Nat Prod*, 1999, **62**(7): 1013–1015.
- [37] Kokubun T, Harborne JB. Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry*, 1995, **40**(6): 1649–1654.
- [38] Eckermann S, Schröder G, Schmidt J, *et al.* New pathway to polyketides in plants. *Nature*, 1998, **396**: 387–390.
- [39] Helariutta Y, Kotilainen M, Elomaa P, *et al.* Duplication and functional divergence in the chalcone synthase gene family of Asteraceae: evolution with substrate change and catalytic simplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(17): 9033–9038.
- [40] Ferrer JL, Jez JM, Bowman ME, *et al.* Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol*, 1999, **6**(8): 775–784.
- [41] Jez J M, Austin MB, Ferrer J, *et al.* Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chem Biol*, 2000, **7**(12): 919–930.
- [42] Zurbier KW, Leser J, Berger T, *et al.* 4-Hydroxy-2-pyrone formation by chalcone and stilbene synthase with nonphysiological substrates. *Phytochemistry*, 1998, **49**(7): 1945–1951.
- [43] Abe I, Utsumi Y, Oguro S, *et al.* A plant Type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(5): 1362–1363.
- [44] Abe I, Oguro S, Utsumi Y, *et al.* Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(36): 12709–12716.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

微生物资源学 (第二版)

研究生创新教育系列丛书

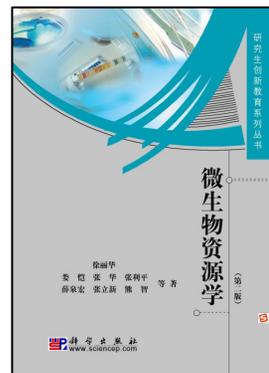
徐丽华 姜恺 张华 等著

978-7-03-029002-1 ¥88.00 2010年9月出版

内容简介

微生物资源学是研究微生物资源的种类和分布、微生物资源与环境的关系、微生物资源合理开发利用的战略和策略、微生物资源有效保护的措施等的科学。本书在第一版的基础上，汇集了最近十多年国内外本领域的新进展、新思想、新技术、新成就，其内容更加丰富。

本书可供微生物学及相关学科的研究人员，大专院校教师、学生、研究生及工程技术人员和管理人员学习参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目