

植物类型 III 聚酮合酶超家族晶体结构与功能

吕鹤书¹, 柳春梅¹, 路平², 师光禄¹, 马兰青¹, 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 北京农学院 农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206

吕鹤书, 柳春梅, 路平, 等. 植物类型 III 聚酮合酶超家族晶体结构与功能. 生物工程学报, 2012, 28(1): 1-14.

Lü HS, Liu CM, Lu P, et al. Plant-specific type III polyketide synthases superfamily: crystal structures and functions. Chin J Biotech, 2012, 28(1): 1-14.

摘要: 植物类型 III 聚酮化合物合酶 (PKS) 催化合成多种植物次生代谢产物的基本分子骨架, 参与植物体许多重要生物学功能的行使, 一直是研究蛋白结构与功能关系、基于结构进行分子改造的重要模式分子家族。目前在蛋白质数据库 (PDB) 中有超过 80 个不同种属来源的类型 III PKS 的三维结构被报道, 其中包括了研究最为透彻的查尔酮合酶在内的 7 种酶的晶体结构, 这些结构的发表对于阐明该类酶复杂多变的底物专一性、链延伸和不同的环化反应机制奠定了结构基础。三维空间结构解析以及基于定点突变的结构功能分析是进行酶工程、基因工程的基础。以下系统综述了植物类型 III PKS 超家族晶体结构和功能的研究进展。

关键词: 聚酮合酶, 查尔酮合酶, 晶体结构

Plant-specific type III polyketide synthases superfamily: crystal structures and functions

Heshu Lü¹, Chunmei Liu¹, Ping Lu², Guanglu Shi¹, Lanqing Ma¹, 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 New Technology in Agricultural Application of Beijing, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Received: May 20, 2011; **Accepted:** September 27, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30872029), Key Natural Science Foundation of Beijing Municipality (No. 5111001), Foundation of Beijing Municipal Education Committee (No. KM201110020001), Funding Project for Academic Human Resources Development in Institutions of Higher Learning Under the Jurisdiction of Beijing Municipality (Nos. PHR20090516, PHR201108279).

Corresponding author: Lanqing Ma. Tel/Fax: +86-10-80797305; E-mail: lanqingma@gmail.com

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

国家自然科学基金 (No. 30872029), 北京市自然科学基金重点项目 (No. 5111001), 北京市教委面上项目 (No. KM201110020001), 北京市属高校人才强教深化计划项目 (Nos. PHR20090516, PHR201108279) 资助。

Abstract: Plant type III polyketide synthase (PKS) generates backbones of a variety of plant secondary metabolites with diverse functions, and has long been models to elucidate the relationship between the three-dimensional structure and function. More than 80 type III PKS crystal structures with different functions have been reported in Protein Data Bank, including the crystal structures of the well-studied Chalcone Synthase of plant type III PKS, as well as the 6 other kinds of PKSs in the family, which are critical for understanding the structural basis for diverse starter molecule selectivity, polyketide chain length and the cyclization reaction. Structure-based analysis and site-directed mutagenesis are foundation for the investigation of enzyme engineering, genetic and metabolic engineering. This review summarized 7 plant-specific type III PKS in the aspects of their crystal structures and functions.

Keywords: polyketide synthase, chalcone synthase, crystal structure

查尔酮合酶 (Chalcone synthase, CHS) 超家族, 又称植物类型III聚酮化合物合酶超家族 (Plant-specific type III polyketide synthase superfamily) 催化合成多种植物次生代谢产物的基本分子骨架, 包括查尔酮、白藜芦醇、间苯三酚、间苯二酚、二苯甲酮、联苯、色酮、异香豆素、吡啶酮、喹啉酮、吡喃酮等^[1-2]。自 1983 年第一个 *chs* 基因从西芹 *Petroselinum hortense* 中被分离以来^[3], 超过 20 种不同功能的植物和细菌的 PKSs 被相继克隆和定性。其中包括了: CHS^[4-8]、芪合酶 (Stilbene synthase, STS)^[9-11]、苯亚甲基丙酮合酶 (Benzalacetone synthase, BAS)^[12-17]、2-吡喃酮合酶 (2-Pyrone Synthase, 2-PS)^[8,18]、吡啶酮合酶 (Acridone synthase, ACS)^[19-22]、戊烯酮-色酮合酶 (Pentaketide chromone synthase, PCS)^[23-24]、辛烯酮合酶 (Octaketides synthase, OKS)^[25]、4-香豆酰甘油酸合酶 (*p*-Coumaroyl triacetic acid synthase, CTAS)^[26]、联苯合酶 (Bibenzyl synthase, BBS)^[27]、二苯甲酮合酶 (Benzophenone synthase, BPS)^[28]、联苯合酶 (Biphenyl synthase, BIS)^[29]、芦荟松合酶 (Aloesone synthase, ALS)^[30]、苯戊酮合酶 (Valerophenone synthase, VPS)^[31]、芪-羧酸酯合酶 (Stilbenecarboxylate synthase, STCS)^[32]、姜黄素

合酶 (Curcuminoid synthase, CUS; Curcumin synthase 1-3, CURS1-3)^[33-35,45-46]等。

植物类型III PKSs 家族成员具有 30%~95% 氨基酸序列同一性 (图 1), 其结构和催化机制不同于主要存在于微生物中的 I 型和 II 型 PKSs。可重复使用的约 400 个氨基酸构成的多肽形成同源二聚体, 利用辅酶 A 连接底物在酶活性中心进行了完整的脱羧、缩合、环化反应^[1-3]。植物类型III PKSs 功能多样性主要体现在: 起始底物分子的不同, 丙二酰辅酶 A 缩合数目的不同, 以及环化机制的不同。其中, CHS、ACS、VPS、BPS 利用 Claisen 型环化, STS 利用 aldol 型环化, 2PS 利用 lactonization 型环化, 而 BAS 和 CUS 只催化缩合反应不进行环化反应。

由于聚酮化合物具有显著多样的生物学活性, 参与多种重要生物学功能的行使, 一直是研究蛋白结构与功能关系、基于结构进行分子改造的重要模式分子家族^[1-2]。就功能不同的植物类型III PKSs 成员的基因结构、功能及代谢产物, 本研究组已经作了系统的总结^[36]。本篇综述主要针对目前 NCBI 结构数据库中报道的植物类型III PKSs 晶体三维结构和定点突变功能研究的进展进行总结, 为超家族成员在酶工程、基因工程上的应用奠定结构基础。

| | | |
|----------|--|-----|
| Ms_CHS2 |MVSVSEIRKAQRAEGPATILLAGTANPNACVBSSTYPDFYFKITNSEHKTELKFKPQVGDKSMIKRRYMYLTFEELKEN | 80 |
| Gh_2PS |MGSYSSDDVEVIREAGRAQGLATILLAGTATPPNCVACADYADYFVFTKSEHMVDLKEKFKRICEKTAIKKRYLALTEDYLQEN | 85 |
| Ps_STS |MGVDFFGFRKLQRADGFASILLAGTANPNAYDCSTYPDFYFRITGNEHNTLKKFKRICEKTAIKORYMYLTFEELKKN | 82 |
| Aa_PCS | MSSLSNSLPLMEDVQGIKKAQKADCTATVMAIGTAHPPEIFPCDTYADYFVRATNSEHKVELKFKFDHICKKTMIGKRYFNDEEFLKKY | 90 |
| Aa_OKS | MSSLSNSHLMEDVQGIKKAQKADCTATVMAIGTAHPPEIFPCDTYADYFVRATNSEHKVELKFKFDHICKKTMIGKRYFNDEEFLKKY | 90 |
| Rp_BAS |MATEBMKKLATVMAIGTANPNCCYQADFDFYFRVNTSDHLINLKKFKRICEKTAIKRYLHVTFEELKEN | 73 |
| Os_CUS | MAPTITMGSALYPLGEMRRSQRADGLAAVLAIGTANPNCCVQEEIPDFYFRVNTSDHLINLKKFKRICEKTAIKRYLHVTFEELKEN | 90 |
| CI_CURS1 |MANLHARRRQRAQGPATILLAGTATPPNLYBOSTFPDFYFRVNTSDHQLKFKRICEKTAIKRYLHVTFEELKEN | 80 |
| Ms_CHS2 | PNVCEYMA.PSLDARODMVFVPRLEKREAAYKAIKEWGRPKSKI132133THLIVCTTSGVDMPGADYQLTKLGLRPSVKRYMMVQGGCFAGGT | 169 |
| Gh_2PS | PTMCFEMA.PSLNARODLVVTVGPMLEKREAAYKAIKEWGLPKSKI132133THLIFCTTAGVDMPGADYQLTKLGLRPSVKRYMLYQGGCAAGGT | 174 |
| Ps_STS | PDVCAFEVPSLDARCAMLAMEVPRLEAKEADEKAIKEWQSKSKI132133THLIFCSTTTPDLPGADFEVAKLLGLHPSVKRVRVFGHGFAGGT | 172 |
| Aa_PCS | PNITSYDE.PSLNDRODICVPGVPALGTEAAVKAIEWGRPKSEI132133THLVFCTSCGVDMPSADFCQAKLLGLHANVNYCYVMQGCYAGGT | 179 |
| Aa_OKS | PNITSYDE.PSLNDRODICVPGVPALGTEAAVKAIEWGRPKSEI132133THLVFCTSCGVDMPSADFCQAKLLGLRNTVNYCYVMQGCYAGGT | 179 |
| Rp_BAS | PNIAAYEA.TSLNVRHKMQKGYAELGKEAALKAIEWGRPKSKI132133THLIVCLAGVDMPGADYQLTKLGLRPSVKRVMFYHLGCVYAGGT | 162 |
| Os_CUS | PEFVDRDA.PSLDARLDIAADAVPELAAEAARKAIEWGRPAAD132133THLVVTTNSGAHVPGVDFRLVPLLGLRPSVRRMTLHLNGCFAGCA | 179 |
| CI_CURS1 | PKLCSYKE.ASFDDRQDIVVEEIPRLAKEAARKAIEWGRPKSEI132133THLVFCSISGIDMPGADYRLATLLGLPLTVNRLMIVSQAACHMGA | 169 |
| Ms_CHS2 | VLRLEAKDLAENNGARVLLVCSSEITAVTFRGPDTHLDSLVGQALFGDGAAL194197IVGSDPVPETEKPIFEMVWTAQTIADDSEGAI1256DGLH | 259 |
| Gh_2PS | VLRLEAKDLAENNGARVLLVCSSEITAVTFRGPDTHLDSLVGQALFGDGAAL194197IVGSGPHLAVERP1FEIVSTDOTI1LPDTEKAMKHLH | 264 |
| Ps_STS | VLRMAKDLAENNGARVLLVCSSETTAVTFRGPDSETHLDSLVGQALFGDGAAL194197IVGADPIPOVEKACFEIVWTAQTVVNSGAI1GGKVR | 262 |
| Aa_PCS | VMRYAKDLAENNGARVLLVCAELTITMLRAPNETHLDAI194197IVGSDPIIGVEKPMFEIVCTKQIVINTEEDVI1HLHLR | 269 |
| Aa_OKS | VHRYAKDLAENNGARVLLVCAELTITIGLRGPNESHLDNAI194197IVGSDPIIGVEKPMFEIVCAKQIVIPNSEDVI1HLHVR | 269 |
| Rp_BAS | VLRLEAKDLAENNGARVLLVCSSEITTCFRGPDSETHLDSMIGQAL194197IVGADPDLTVERP1FELVSTAQTI1VPEHGA1EGHLL | 252 |
| Os_CUS | ALRLEAKDLAENNGARVLLVAAELTILMYITGPDEGCFRTLLVQGLFGDGAAL194197IVGADLADDVERPLFEIVSAAQTI1IPESDHALNMRFT | 268 |
| CI_CURS1 | MLRLEAKDLAENNGARVLLVAGEITVLSFRGNPGEFALAGACAGFGDGAAGV194197VADLEGL1EKP1YE1AAAMCETVA1ESQVAGGHLR | 259 |
| Ms_CHS2 | EAGLTFHL1KDVPGI1YSKNTKALVEAFEP.LG1S...DYN1S1FW1AH1PGGPA1LDQVEK1L1K1PEK1VNA1TREV1SEYGNM1SSA1CVLF1 | 345 |
| Gh_2PS | EGGLTFQL1HRD1PLM1VAKNI1ENAAEKAL1SP.LG1T...DWN1S1FV1W1HP1GGRA1LDQVEK1L1N1L1EDK1LRAS1RHV1SEYGNL1ISA1CVLF1 | 350 |
| Ps_STS | EVGLTFQL1KGAV1PDL1SAN1ENC1VEAF1SQ.FK1S...DWN1K1FV1W1N1P1GGPA1LDR1VEAK1N1LD1PTK1L1P1TRH1V1SEYGNM1SSA1CFH1I | 348 |
| Aa_PCS | ETGM1FYL1SKGS1PMT1SN1VEACL1DVFKS.VG1T1P1PE1D1W1SL1FW1P1HP1GGRA1LDQVEAK1L1R1PEK1FRA1ART1V1LD1W1GNM1SSA1SV1Y1I | 358 |
| Aa_OKS | EAGL1FYL1SKDS1PET1SN1VEACL1DVFKS.VG1M1P1PE1D1W1SL1FW1P1HP1GGRA1LDQVEAK1L1R1PEK1FRAT1RT1V1LD1W1GNM1SSA1CV1Y1I | 358 |
| Rp_BAS | ESGL1S1EHL1YKT1PTL1SN1IK1TCL1SDA1TP.LN1S...DWN1S1FW1AH1PGGPA1LDQV1AK1VGL1E1KEK1L1KV1TRQ1V1KDY1GNM1SSA1TV1F1I | 338 |
| Os_CUS | ERRLD1GV1L1GRQ1V1GL1GD1NVE1RCL1DM1GPL1GGD1GG1G1W1DL1FV1AW1HP1G1S1T1MDQ1V1DA1AL1GLE1PK1LAAS1RR1V1LSD1Y1GNM1SGA1TV1I1FA | 358 |
| CI_CURS1 | AFGWT1TY1FLN1Q1PA1I1AD1NL1GR1SL1ERAL1AP.LG1VR...E1W1ND1FV1W1AH1PG1N1VA1IDA1EAK1QL1S1PDK1L1STAR1HV1ETE1Y1GNM1QSA1TV1Y1V | 345 |
| Ms_CHS2 | LDEM1R1K1S1TQ1N1L1KT1G1EG1L1GV1L1FG1FG1P1GL1T1E1TV1V1L1RS1VA1..... | 389 |
| Gh_2PS | LDEV1R1K1R1S1MAE1G1K1S1T1G1E1L1D1CG1V1L1FG1FG1P1GM1T1VE1TV1V1L1RS1VR1V1TAA1VANG | 401 |
| Ps_STS | LDC1TR1K1AS1L1EN1CF1S1T1G1E1L1E1GV1L1FG1FG1L1GL1T1E1TV1V1L1K1S1V1I1Q1..... | 392 |
| Aa_PCS | LDEM1R1R1K1S1AAK1LE1TY1G1E1L1E1GV1L1L1G1FG1P1T1VE1T1L1L1H1S1L1PLM1..... | 403 |
| Aa_OKS | LDEM1R1R1K1S1ADE1S1LE1TY1G1E1L1E1GV1L1L1G1FG1P1T1VE1T1L1L1H1S1L1PLM1..... | 403 |
| Rp_BAS | MD1EM1R1K1S1L1EN1Q1A1T1G1E1L1E1GV1L1FG1FG1P1T1VE1TV1V1L1RS1V1P1V1S1..... | 384 |
| Os_CUS | LDEL1RR1Q1.R1KE1AAA1AGE1V1PE1L1GV1M1AF1G1P1M1T1VD1AML1L1HAT1SHVN1..... | 402 |
| CI_CURS1 | MD1EL1R1K1R1S1AVE1GR1S1T1G1D1G1L1Q1GV1L1L1G1FG1P1L1S1T1E1TV1V1L1RS1M1PL1..... | 389 |

图1 植物类型III PKS超家族成员氨基酸序列比较. 参照 *M. sativa* CHS2 标出重要氨基酸序列. 催化三联体 (Cys164, His303, Asn336) 和关键活性位点残基 (Thr132, Ser133, Thr194, Thr197, Phe215, Gly256, Phe265, Asn336, Ser338) 序列参照紫花苜蓿 CHS2 序列被标出

Fig. 1 Sequence alignment of CHS superfamily type III PKSs. The catalytic triad (Cys164, His303, and Asn336), and the critical residues lining the active-site cavity (Thr132, Ser133, Thr194, Thr197, Phe215, Gly256, Phe265, Asn336, Ser338) are marked and numbered in *M. sativa* CHS2.

1 植物类型 III PKSs 结构研究概况

在蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中共报道了 81 个不同种属来源的类型 III PKSs

的三维结构, 其中包括了 33 个植物来源、32 个微生物来源 (包括 11 个针对链霉素类型 III PKSs 的 NMR 结构), 以及 5 个人类来源的结构。除了最早发表的 14 个针对紫花苜蓿 *Medicago sativa*

CHS2 野生型或突变体的 Apo (Apoenzyme) 或复合物结构外, 陆续有几个研究组报道了另外 6 种植物类型 III PKSs 的晶体结构 (表 1)。上述研究显示植物类型 III PKSs 超家族成员具有相似的三维结构和催化机制, 其中以 *M. sativa* CHS2 晶体结构研究最为透彻^[4]。CHS 蛋白具有 389 个氨基酸残基, 催化来自丙二酰辅酶 A (Malonyl-CoA) (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) (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) (图 2), 其为类黄酮化合物生物合成的前体^[4-8]。

2 查尔酮合酶 (CHS) 晶体结构和功能

2.1 *M. sativa* CHS2 整体结构

Noel 等于 1999 年报道了 *M. sativa* CHS2 的第一个 1.56 Å 晶体结构^[4]。除了 Apo 结构外, 还包括了与多种底物、产物类似物相复合的共 6 个晶体结构。基于结构和重要残基定点突变的生化结果提出了关于植物类型 III PKS 的催化机制的详尽信息^[5-6]。如图 3A 所示的 *M. sativa* CHS2 整体结构, 约 42 kDa 的单体蛋白围绕晶体学二重轴形成同型二聚体, 作为行使功能的基本单位。由每个单体的 N 端 α 螺旋和 6 个氨基酸环区 (Thr132-Met137) 构成了约 1580 Å² 的分子间接接触包埋表面。每个单体包括 2 个结构域, 上部的结构域呈现出 $\alpha\beta\alpha\beta$ 假对称模块样式。CHS 同型二聚体每个单体都含有 2 个功能上独立的活性位点, 位于上下结构域的交界处, 每个单体中由 6 个氨基酸构成的环区 (Thr132-Met137) 将 2 个

单体的活性位点分隔开, 其中每个单体蛋白的 Met137 突出到另一单体参与相邻单体活性腔的构成。

2.2 *M. sativa* CHS2 活性腔结构

M. sativa CHS2 的活性腔由 3 个内部相连的小腔构成: 包括长约 16 Å 的辅酶 A 结合通道 (CoA-binding tunnel)、香豆酰结合口袋 (Coumaroyl binding pocket) 和向下延伸口袋 (Downward-expanding pocket)。后两个小腔构成了深埋在内部的一个大的“起始、延长、环化”活性腔 (Active site cavity)^[4]。Cys164、His303 和 Asn336 构成酶活性中心催化三联体, 位于香豆酰结合口袋的顶部 (图 3B)。辅酶 A 结合通道与外界相通使底物能够进入到催化中心。结合通道相对于底物和产物而言略窄, 暗示其具有一定的柔性便于芳香族底物和产物的结合和释放。香豆酰结合口袋位于辅酶 A 结合通道的末端, 选择性结合香豆酰辅酶 A 的芳香基团作为起始底物。伴随着聚酮链的延伸, 香豆酰衍生部分进入到向下延伸口袋内部。与 CHS 产物柚皮素查尔酮的香豆酰衍生部分接触的残基主要包括了 Ser133、Glu192、Thr194、Thr197、Gly216、Ser338。丙二酰衍生部分与活性腔接触的残基主要包括了 Thr132、Met137、Phe215、Ile254、Gly256、Phe265 和 Pro375。

位于活性腔的多个残基被认为对酶底物产物专一性具有决定意义, 包括 Thr132、Ser133、Thr194、Thr197、Gly256、Phe265 和 Ser338, 它们在 CHS 中保守, 在其他类型 III PKS 中被相应的氨基酸所替代^[4] (图 1)。

表 1 植物类型 III PKSs 超家族成员三维结构

Table 1 Summary of three-dimensional structures of plant type III PKSs

| Name | Species | Apo/Complex | PDB Code | References |
|-------------|--------------------------------|--|----------|------------|
| CHS | <i>Medicago sativa</i> | Apo | 1BI5 | [4] |
| | | Coenzyme A | 1BQ6 | [4] |
| | | Naringenin | 1CGK | [4] |
| | | Resveratrol | 1CGZ | [4] |
| | | Hexanoyl-CoA | 1CHW | [4] |
| | | Malonyl-CoA | 1CML | [4] |
| | | C164A, apo | 1D6F | [6] |
| | | N336A, Coenzyme A | 1D6H | [6] |
| | | H303Q, apo | 1D6I | [6] |
| | | G256A, apo | 1I86 | [5] |
| | | G256V, apo | 1I88 | [6] |
| | | G256I, apo | 1I89 | [6] |
| | | G256F, apo | 1I8B | [6] |
| | | F215S, apo | 1JWX | [7] |
| | | STS-like 18 sites mutant, apo | 1U0V | [9] |
| | | STS-like 18 sites mutant, resveratrol | 1U0W | [9] |
| 2-PS | <i>Gerbera hybrid cultivar</i> | Acetoacetyl-CoA | 1EE0 | [8] |
| | | Apo | 1QLV | [8] |
| STS | <i>Pinus sylvestris</i> | Apo | 1U0U | [9] |
| | | Indol-3-yl pyruvic acid | 1XES | N/A |
| | Methylmalonyl CoA | 1XET | N/A | |
| | <i>Arachis hypogaea</i> | Apo | 1Z1E | [11] |
| Resveratrol | | 1Z1F | [11] | |
| PCS | <i>Aloe arborescens</i> | Coenzyme A | 2D3M | [24] |
| | | M207G, apo | 2D51 | [24] |
| | | M207G, CoA | 2D52 | [24] |
| BAS | <i>Rheum palmatum</i> | Apo | 3A5Q | [17] |
| | | 4-Coumaroyl-primed monoketide intermediate | 3A5R | [17] |
| | | I207L/L208F, apo | 3A5S | [17] |
| CUS | <i>Oryza sativa</i> | Apo | 3ALE | [33] |
| | | Apo | 3OIT | [34] |
| CURS1 | <i>Curcuma longa</i> | Malonic acid and ethylene glycol | 3OV2 | [35] |
| | | G211F, malonic acid | 3OV3 | [35] |

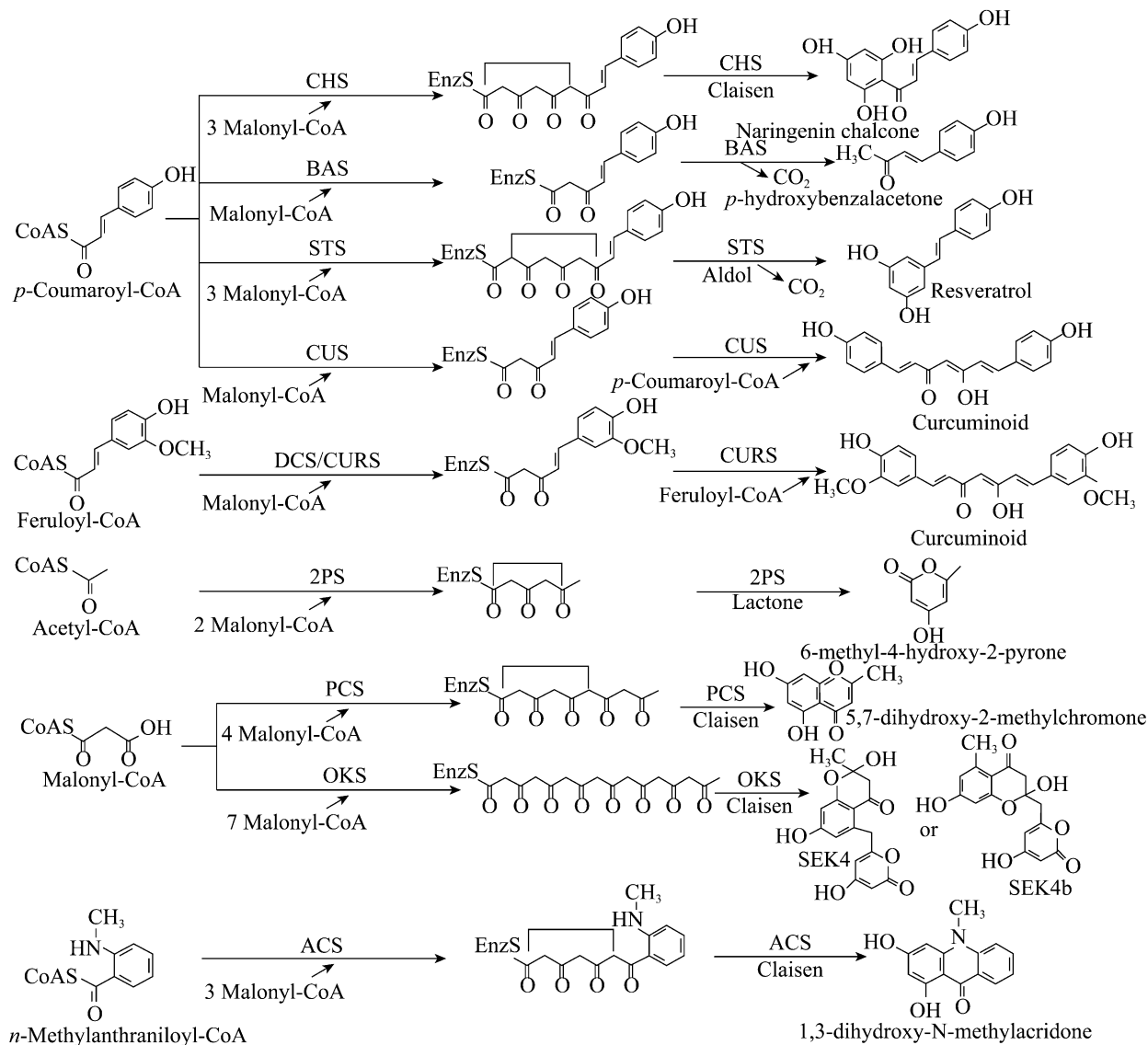


图2 植物类型III PKS 超家族成员催化反应过程及产物

Fig. 2 Comparison of the reactions and products of divergent plant type III PKSs.

门卫氨基酸 Phe215 和 Phe265 位于辅酶 A 结合通道和活性腔结合部的下部, 具有调节其空间结构的功能, 被认为能帮助于烯酮中间体的正确折叠和在环化反应中的正确定位^[7]。F215S 突变导致活性腔入口增大可以容纳 N-methylanthraniloyl 辅酶 A 作为底物, 而野生型

CHS 则不能接受其作为底物。

芸香 *Ruta graveolens* ACS 的 Ser132、Ala133 和 Val265 (基于 *M. sativa* CHS2 序列顺序) 被认为是 ACS 选择以 N-methylanthraniloyl 辅酶 A 为底物具有吡啶酮生成活性的重要氨基酸^[19-20,37-38]。

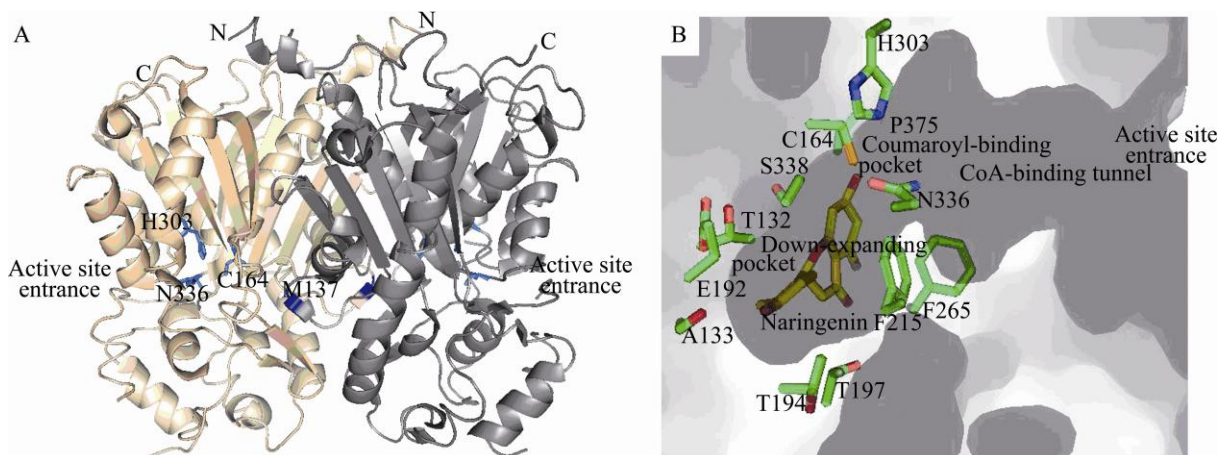


图 3 *M. sativa* CHS2 三维整体结构和活性位点腔结构。(A) 三维整体结构：单体分别以橙色和灰色标出，催化三联体 (Cys164, His303, Asn336) 和 Met137 以蓝色球棍模型标出。(B) 活性位点腔结构：催化三联体 (Cys164, His303, Asn336)、其他活性位点残基 (Thr132, Ser133, Glu192, Thr194, Thr197, Phe215, Phe265, Ser338, Pro375) 侧链结构以球棍模型显示，碳原子为绿色；柚皮素查尔酮结构以黄色球棍模型显示

Fig. 3 Enzyme reaction, overall structure and detailed active site cavity structure of *M. sativa* CHS2. (A) The overall three-dimensional structure of the CHS2 homodimer. The monomers are colored in orange and grey. The catalytic triad (Cys164, His303, and Asn336), and Met137 are shown as blue stick models. (B) Detailed structures of the active-site cavity. The side chains of Thr132, Ser133, Thr194, Thr197, Phe215, Gly256, Phe265, Ser338, Pro375 are shown as stick models with carbons in green; Naringenin is shown as yellow stick models.

Gly256 位于 CHS 活性腔表面直接参与接触丙二酰辅酶 A 聚酮链，G256A, G256V, G256L 和 G256F 突变通过改变活性腔的体积影响聚酮链长度，从而改变了产物构成^[5]。

3 植物类型 III 超家族其他成员晶体结构和功能

3.1 2-吡喃酮合酶 (2-PS)

杂交非洲菊 *Gerbera hybrid* cultivar 2-PS 与 *M. sativa* CHS2 具有 74% 序列同源性。2-PS 不能利用香豆酰辅酶 A 作为起始底物生成查尔酮，而是利用乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 缩合生成三乙酸内酯 (Triacetic Lactone, TAL) (图 2)。

G. hybrid cultivar 2-PS 2.05 Å 的晶体结构显示具有与 CHS 相似的三维折叠、相同的催化残基、高度保守的辅酶 A 结合位点，然而其活性腔的体积只有 CHS 的三分之一^[8] (图 4A、4B)。体积的减少是由于 CHS 的 T197、G256 和 S338 在 2-PS 中分别被 Leu、Leu 和 Ile 取代，它们被认为是控制活性位点腔的体积和形状的重要残基，决定了起始底物选择性和丙二酰辅酶 A 的缩合次数。CHS 三突变体 T197L/G256L/S338I 具有与 2-PS 相似的功能，即通过乙酰辅酶 A 和两分子丙二酰辅酶 A 产生 TAL。这项结果第一次为活性位点的形状和体积影响植物类型 III PKSs 功能的多样性提供了结构基础。

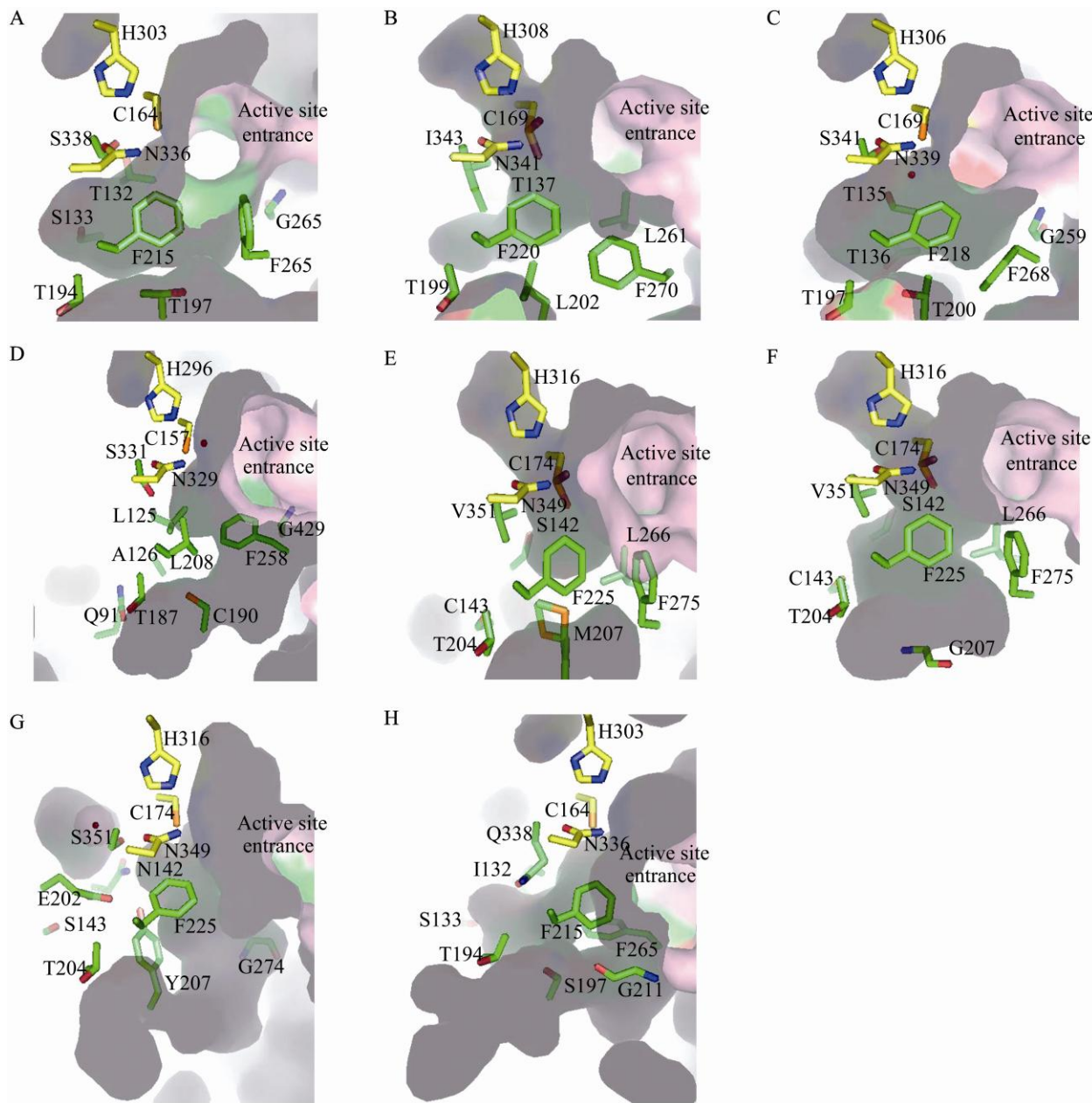


图4 植物类型III PKSs 超家族成员活性位点腔结构比较. (A) CHS. (B) 2-PS. (C) STS. (D) BAS. (E) PCS. (F) PCS M207G mutant. (G) CUS. (H) CURS1. 催化三联体 (Cys-His-Asn) 以球棍模型显示, 碳原子为黄色; 其他

Received: May 20, 2011; Accepted: September 27, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30872029), Key Natural Science Foundation of Beijing Municipality (No. 5111001), Foundation of Beijing Municipal Education Committee (No. KM201110020001), Funding Project for Academic Human Resources Development in Institutions of Higher Learning Under the Jurisdiction of Beijing Municipality (Nos. PHR20090516, PHR201108279).

Corresponding author: Lanqing Ma. Tel/Fax: +86-10-80797305; E-mail: lanqingma@gmail.com

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

国家自然科学基金 (No. 30872029), 北京市自然科学基金重点项目 (No. 5111001), 北京市教委面上项目 (No. KM201110020001), 北京市属高校人才强教深化计划项目 (Nos. PHR20090516, PHR201108279) 资助。

重要活性位点残基侧链结构碳原子为绿色，以球棍模型显示；所有的 Gly 显示为主链结构；活性水分子显示为红色圆点

Fig. 4 Comparison of the active site cavities of type III PKSs. (A) CHS. (B) 2-PS. (C) STS. (D) BAS. (E) PCS. (F) PCS M207G mutant. (G) CUS. (H) CURS1. The catalytic triads (Cys-His-Asn) are shown as stick models with carbons in yellow. The side chains of critical active site residues are shown as green stick models, with exception of all Glycines shown as main chains. Active water molecules are shown as red dots.

3.2 戊烯酮-色酮合酶 (PCS) 和辛烯酮合酶 (OKS)

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^[23]，而 OKS 催化丙二酰辅酶 A 分子间连续 7 步的缩合反应产生辛烯酮产物—Octaketides SEK4 和 SEK4b^[25,39]。定点突变研究显示了 PCS 中的 Met207 (对应于 *M. sativa* CHS2 的 Thr197) 和 OKS 的 Gly207 决定了聚酮链的长度和底物专一性^[23,25]。掌叶大黄的 PCS 和 OKS 具有 91% 的序列同源性，可以因为单一氨基酸如 PCS M207G 的突变功能上可以与 OKS 互相转化。而氨基酸侧链增大的突变，如 OKS 中 (G207A, G207T, G207M, G207L, G207F, G207W) 会导致不能合成辛烯酮，而产生短的聚酮链，如丁烯酮至庚烯酮。这个结果揭示了，单个活性腔残基侧链大小足以控制丙二酰辅酶 A 缩合的次数和聚酮链的长度。

木立芦荟 *Aloe arborescens* PCS 野生型和合成辛烯酮 M207G 突变体的晶体结构揭示了与 *M. sativa* CHS2 活性中心构象相比活性腔的较大收缩^[24] (图 4E、4F)。PCS 中对应于 *M. sativa* CHS2 Gly256 的 Leu266 产生了明显的横向空间限制，结果 PCS 和 OKS 不再接受香豆酰辅酶 A 作为起始底物合成查尔酮，支持了之前 CHS 定点突变研究结果^[5]，显示了 256 位点残基决定了 *M. sativa* CHS2 和掌叶大黄 ALS 的底物选择^[41]。

此外，PCS M207G 突变体晶体结构显示，在残基的主链构象和野生型几乎相同的情况下，M207G 突变活性腔的体积被扩增了超过 2.6 倍，几乎与野生 *M. sativa* CHS2 的活性腔具有相同体积。PCS 突变体活性腔具有独特的形状和位置，可以容纳长的底物分子。在野生型 PCS 中，大侧链 Met207 阻断了向下延伸口袋的入口，而在 M207G 突变体为包埋的口袋开了一个入口，使聚酮链的长度从 5 个丙二酰辅酶 A 分子间的缩合增加至 8 个分子。207 位点对链长度的控制同样反映在合成辛烯酮的木立芦荟 PKS3^[42]、合成庚烯酮的掌叶大黄 ALS^[41] 的结构中，暗示这些酶具有相似的活性腔构造和催化机理。

F80A/Y82A/M207G 突变体的构建进一步加长了 PCS 中隐含的向下延伸的活性腔，同源模建结果显示了 PCS 突变后的活性腔体积增大为野生型的 4 倍，以丙二酰辅酶 A 为起始底物催化合成了全新活性的九聚酮分子 (Nonaketide)^[43-45]。

3.3 芪合酶 (STS)

STS 和 CHS 利用相同的底物，即香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 形成相同的丁烯酮中间体。在后续反应中 STS 通过催化 C2/C7 aldol 环化生成白藜芦醇，而 CHS 通过催化 C6/C1 克莱森环化生成柚皮素查尔酮。

松树 *Pinus sylvestris* STS 和花生 *Arachis*

hypogaea STS-白藜芦醇 (Resveratrol) 复合物 2.1 Å 和 2.4 Å 的晶体结构^[9,11]被报道。活性腔结构中 (图 4C), Thr 132 的一个位移使其侧链羟基基团能够与一个水分子形成氢键,从而使 Thr 132 在 STS 和 CHS 不同的环化机制中发挥了至关重要的作用^[9]。由于 Thr 132 在类型 III PKS 序列中高度保守,其位置的移动改变了围绕催化 Cys164 形成了“aldol-switch”硫酯酶样氢键网络,从而使 STS 采用了与 CHS 不同的环化机制。

Austin 等基于以上假设进一步对 CHS 序列中 4 段肽链上共 18 个位点的氨基酸进行替代产生了功能上类似 STS 的产白藜芦醇的 *M. sativa* CHS 分子 (STS-like 18xCHS),并解析了 18xCHS apo 和白藜芦醇复合物^[9]的晶体结构,进一步确认了由于“aldol-switch”类的结构变化引起的区别于 CHS 的环化反应机理。

3.4 苯亚甲基丙酮合酶 (BAS)

植物中的 BAS 催化 4-香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 通过一步脱羧缩合反应生成苯亚甲基丙酮,苯亚甲基丙酮是一系列具有重要生物学活性苯丁烷类化合物及其衍生物的前体化合物^[12]。Morita 等报道了掌叶大黄 *Rheum palmatum* 野生型 BAS 和合成查尔酮 I207L/L208F 突变体 1.8 Å 晶体结构、以及单酮香豆酰中间体共价交联于催化 Cys 残基的野生型 BAS 1.6 Å 的晶体结构,提供了类型 III PKS 应用 Cys 作为亲核攻击以及定位形成聚酮中间体的直接证据^[17]。

R. palmatum BAS 的门卫氨基酸在 208 位 (对应 *M. sativa* CHS2 的 Phe215) 的 Leu 取代对于 BAS 的乙烯酮合活性是必需的^[13] (图 4D)。晶体结构中 Leu208 残基主链构象与 *M. sativa*

CHS2 相似,而其侧链伸进 BAS 活性腔内使其缩小。掌叶大黄 BAS 中 Ser331 (对应 *M. sativa* CHS2 Ser338) 对于催化活力的调控同样至关重要, BAS S338V 突变体呈现出两倍的苯亚甲基丙酮生成活性^[13]。由于多个残基取代的结果, BAS 活性腔较 *M. sativa* CHS2 相比缩小仅为其体积的一半,提示活性腔的缩小导致了催化链延长在乙烯酮阶段被打断,从而催化合成苯亚甲基丙酮。

BAS 的 Phe258 对应于 *M. sativa* CHS2 的门卫氨基酸 Phe265,与 *M. sativa* CHS2 结构相比其侧链更加靠近 Leu208 并形成疏水相互作用。两个门卫氨基酸 Leu208 和 Phe258 的构象变化导致了 BAS 活性腔的入口扩大为 *M. sativa* CHS2 的两倍,改变了其底物专一性。

由于 Thr123 (对应 *M. sativa* CHS2 的 Thr132) 在 BAS 中被 Leu 所取代,结构中没有存在类似 STS 的围绕 Thr132 和亲核水分子形成的氢键网络,而是存在另外一个位置不同的亲核的水分子,与 Cys-His-Asn 催化三联体形成氢键网络。推断 BAS 采用了一种区别于 CHS 和 STS 的独特的催化机制进行酶结合中间体硫酯键断裂和最终脱羧反应,即 His296 (对应于 *M. sativa* CHS2 的 His303) 作用于活化的水分子进行亲核攻击产生 β-酮酸,最终经历脱羧产生了 C₆-C₄ 苯亚甲基丙酮。

我们研究工作首次报道了蓼科 (Polygonaceae) 植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的 1 个 BAS (PcPKS2) 和 1 个具有 CHS 和 BAS 活性的双功能酶 (PcPKS1)。在 PcPKS2 中 Phe215 和 Phe265 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

中间体阶段提前结束^[49]。有趣的是, PcPKS1 能同时催化合成柚皮素查尔酮和苯亚甲基丙酮, 而且其催化活性、底物专一性与 pH 有关^[50]。另外, PcPKS1 呈现出极高的 BAS 活性, 其催化效率 (K_{cat}/K_m) 分别比 Rp BAS 和 PcPKS2 高 1.5 和 70 倍^[50]。在 PcPKS1 序列中, 对应 CHS 序列的 Phe215 和 Phe265 保守存在, 预示 PcPKS1 须采用区别于典型 BAS 的特异的重要氨基酸序列决定其 BAS 活性。为了阐明 PcPKS1 拥有 CHS/BAS 活性和高 BAS 活性的结构基础和分子机理, 针对 PcPKS1 和 PcPKS2 的突变和晶体结构解析工作正在进行中。

3.5 姜黄素合酶 (CUS) 和姜黄素合酶 1 (CURS1)

姜黄素是姜黄的主要成分, 因其独特的香气和颜色广被用于传统的中药和作为食物添加剂^[1]。在近期有两个研究组相继报道了两种不同的催化姜黄素合成的水稻 CUS 和姜黄 CURS1 的晶体结构^[33-35]。

3.5.1 姜黄素合酶 (CUS)

水稻 *Oryza sativa* CUS 催化两分子的香豆酰辅酶 A 和一分子的丙二酰辅酶 A 缩合形成去二甲氧基姜黄素 (Bisdemethoxycurcumin) 的双苯庚烷 (Diarylheptanoid) $C_6-C_7-C_6$ 骨架^[46]。Morita 等报道的 *O. Sativa* CUS 晶体结构与已知的类型 III PKS 的整体结构非常相似, 呈现 $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ 折叠^[33]。同时, 结构揭示出其具有独特的未被报道的向下扩展的活性腔结构 (图 4G)。扩大的活性腔长度足以容纳 C_6-C_3 单元和 1 分子的香豆酰单元。酶结合中间体经硫酯键断裂产生香豆酰乙烯酮酸 (4-coumaroyldiketide acid), 之后在向下延长的口袋中进行后续的第 2 个香豆酰辅酶 A 起始

底物的脱羧缩合, 产生去二甲氧基姜黄素 (Bisdemethoxycurcumin)。基于结构的定点突变 M265L 和 G274F (对应于 *M. sativa* CHS2 序列的 G256 和 F265) 能够改变底物产物专一性, 接受 4-hydroxyphenylpropionyl-CoA 作为起始底物产生 Tetrahydrobisdemethoxycurcumin。

Miyazono 等几乎同时报道了水稻 CUS 的结构, 同样具有加长的活性腔^[34], CUS 活性腔的这种改变来自于门卫氨基酸 Phe274 (对应 *M. sativa* CHS2 Phe 265) 被 Gly 所替代。活性腔最深部位距离 Cys174 位点约为 15 Å, 足以容纳香豆酰乙烯酮酸作为延伸底物。

3.5.2 姜黄素合酶 1 (CURS1)

姜黄 *Curcuma longa* 姜黄素合酶 1 (CURS1) 是另外一种催化姜黄素合成的家族成员, 与 CUS 具有约 45% 的序列同一性^[47-48]。在乙烯酮辅酶 A 合酶 (Diketide-CoA Synthase, DCS) 和 CURS1 同时存在时, 两者顺序作用对两分子酰素辅酶 A (Feruloyl-CoA) 和丙二酰辅酶 A 进行高效缩合形成姜黄素 $C_6-C_7-C_6$ 骨架。在 CURS1 单独存在时, 能以较低的活性利用同样的底物独立催化合成姜黄素分子骨架。除了 CURS1 外, 在姜黄中还存在另外两种姜黄素合酶 CURS2 和 CURS3^[48]。

C. longa CURS1 的 2.32 Å 晶体结构中显示了辅酶 A 结合通道具有一个独特的疏水腔^[35] (图 4H)。在生化实验中通过 G211F 突变能极大地降低酶的催化效力, 在 2.5 Å 晶体结构中显示了这个疏水腔被 Phe 211 的侧链占据。生化研究表明 CURS1 具有被扩展的底物专一性, 而且 CURS1 和 β -酮酸之间的疏水相互作用对于 CURS1 利用缺少辅酶 A 基团的底物非常重要。因此, 结构中出现的疏水腔可能负责 CURS1 和 β -酮酸间相互

作用,使 β -酮酸基团能够有效进入 CURS1 的催化位点进行反应。

4 总结和展望

植物类型III PKS 是植物聚酮化合物生物合成的关键酶,具有复杂多变的底物专一性、链延伸和不同的环化反应机制。解析其三维空间结构、对其活性中心构象进行精细的分析,以及基于定点突变的结构功能分析是进行酶工程、基因工程的基础。基于结构的分子改造不仅会产生具有合成全新化合物的蛋白分子,也会改变已有的蛋白催化效力。植物类型III PKS 结构功能研究不仅具有理论研究价值,聚酮化合物的显著多样的生物学活性决定了,针对其结构功能研究的应用必将带来巨大的社会价值。

REFERENCES

- [1] Schröder J. Comprehensive Natural Products Chemistry. Elsevier: Oxford, 1999: 749–771.
- [2] Austin MB, Noel JP. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. Nat Prod Rep, 2003, 20(1): 79–110.
- [3] Reimold U, Kröger 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.
- [4] 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.
- [5] Jez JM, Bowman ME, Noel JP. Structure-guided programming of polyketide chain-length determination in chalcone synthase. Biochemistry, 2001, 40(49): 14829–14838.
- [6] Jez JM, Ferrer JL, Bowman ME, et al. Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. Biochemistry, 2000, 39(5): 890–902.
- [7] Jez JM, Bowman ME, Noel JP. Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(8): 5319–5224.
- [8] Jez JM, Austin MB, Ferrer JL, et al. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. Chem Biol, 2000, 7(12): 919–930.
- [9] Austin MB, Bowman ME, Ferrer JL, et al. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. Chem Biol, 2004, 11(9): 1179–1194.
- [10] Morita H, Noguchi H, Schröder J, et al. Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase. Eur J Biochem, 2001, 268(13): 3759–3766.
- [11] Shomura Y, Torayama I, Suh DY, et al. Crystal structure of stilbene synthase from *Arachis hypogaea*. Proteins, 2005, 60(4): 803–806.
- [12] Abe I, Takahashi Y, Morita H, et al. 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.
- [13] 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.
- [14] Abe I, Abe T, Wanibuchi K, et al. Enzymatic formation of quinolone alkaloids by a plant type III polyketide synthase. Org Lett, 2006, 8(26): 6063–6065.
- [15] Abe T, Morita H, Noma H, et al. Structure function analysis of benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17(11): 3161–3166.
- [16] Morita H, Tanio M, Kondo S, et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a plant

- type III polyketide synthase that produces benzalacetone. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2008, 64(4): 304–306.
- [17] Morita H, Shimokawa Y, Tanio M, et al. A structure-based mechanism for benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(2): 669–673.
- [18] Eckermann S, Schröder G, Schmidt J, et al. New pathway to polyketides in plants. *Nature*, 1998, 396(6709): 387–390.
- [19] Lukačín R, Springob K, Urbanke C, et al. Native acridone synthases I and II from *Ruta graveolens* L. form homodimers. *FEBS Lett*, 1999, 448(1): 135–140.
- [20] Lukačín R, Schreiner S, Matern U. Transformation of acridone synthase to chalcone synthase. *FEBS Lett*, 2001, 508(3): 413–417.
- [21] Wanibuchi K, Zhang P, Abe T, et al. An acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrata*. *FEBS J*, 2007, 274(4): 1073–1082.
- [22] Morita H, Kondo S, Kato R, et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of an acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrata*. *Acta Crystallogr F*, 2007, 63(Pt 7): 576–587.
- [23] 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.
- [24] Morita H, Kondo S, Oguro S, et al. Structural insight into chain-length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from *Aloe arborescens*. *Chem Biol*, 2007, 14(4): 359–369.
- [25] 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.
- [26] Akiyama T, Shibuya M, Liu HM, et al. *p*-Coumaroyltriacetic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii*. *Eur J Biochem*, 1999, 263(3): 834–839.
- [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] Liu BY, Falkenstein-Paul H, Schmidt W, et al. Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant J*, 2003, 34(6): 847–855.
- [29] Liu B, Raeth T, Beuerle T, et al. Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase. *Planta*, 2007, 225(6): 1495–1503.
- [30] 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.
- [31] Zuurbier 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.
- [32] Suzuki H, Ikeda T, Matsumoto T, et al. Polyphenol components in cultured cells of Amacha (*Hydrangea macrophylla* Seiringe var. *thunbergii* Makino). *Agric Biol Chem*, 1978, 42(6): 1133–1137.
- [33] Morita H, Wanibuchi K, Nii H, et al. Structural basis for the one-pot formation of the diarylheptanoid scaffold by curcuminoid synthase from *Oryza sativa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(46): 19778–19783.
- [34] Miyazono KI, Um J, Imai FL, et al. Crystal structure of curcuminoid synthase CUS from *Oryza sativa*. *Proteins*, 2011, 79(2): 669–673.
- [35] Katsuyama Y, Miyazono KI, Tanokura M, et al. Structural and biochemical elucidation of mechanism for decarboxylative condensation of β -keto acid by curcumin synthase. *J Biol Chem*, 2011, 286(8): 6659–6668.

- [36] Ma LQ, Shi GL, Ye HC, et al. Plant-specific type III polyketide synthase superfamily: gene structure, function and metabolites. *Chin J Biotech*, 2010, 26(11): 1482–1492.
马兰青, 师光禄, 叶和春, 等. 植物类型 III 聚酮合酶超家族基因结构、功能及代谢产物. *生物工程学报*, 2010, 26(11): 1482–1492.
- [37] Springob K, Lukačín R, Ernwein C, et al. Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*. *Eur J Biochem*, 2000, 267(22): 6552–6559.
- [38] Lukačín R, Schreiner S, Silber K, et al. Starter substrate specificities of wild-type and mutant polyketide synthases from Rutaceae. *Phytochemistry*, 2005, 66(3): 277–284.
- [39] Abe I, Watanabe T, Morita H, et al. Engineered biosynthesis of plant polyketides: manipulation of chalcone synthase. *Org Lett*, 2006, 8(3): 499–502.
- [40] Morita H, Kondo S, Kato R, et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of an octaketide-producing plant type III polyketide synthase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2007, 63(Pt 9): 947–949.
- [41] Abe I, Watanabe T, Lou WW, et al. Active site residues governing substrate selectivity and polyketide chain length in aloesone synthase. *FEBS J*, 2006, 273(1): 208–218.
- [42] Mizuuchi Y, Shimokawa Y, Wanibuchi K, et al. Structure function analysis of novel type III polyketide synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(12): 2205–2210.
- [43] Abe I, Morita H, Oguro S, et al. Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: formation of an unnatural nonaketide naphthopyrone. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(18): 5976–5980.
- [44] Abe I. Engineering of plant polyketide biosynthesis. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(11):1505–1514.
- [45] Abe I, Morita H. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(6): 809–838.
- [46] Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funa N, et al. *In vitro* synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from *Oryza sativa*. *J Biol Chem*, 2007, 282(52): 37702–37709.
- [47] Katsuyama Y, Kita T, Funa N, et al. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. *J Biol Chem*, 2009, 284(17): 11160–11170.
- [48] Katsuyama Y, Kita T, Horinouchi S. Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb *Curcuma longa*. *FEBS Lett*, 2009, 583(17): 2799–2803.
- [49] 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.
- [50] 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(5): 1077–1086.