

# 基于定点突变的植物III型聚酮合酶结构与功能研究进展

李星<sup>1,2</sup>, 陈默<sup>1</sup>, 柴团耀<sup>1</sup>, 王红<sup>1</sup>

1 中国科学院大学, 北京 100049

2 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

李星, 陈默, 柴团耀, 等. 基于定点突变的植物III型聚酮合酶结构与功能研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(4): 473–488.

Li X, Chen M, Chai TY, et al. Advances in structure-function relation of plant type III polyketide synthases by site-directed mutagenesis. Chin J Biotech, 2018, 34(4): 473–488.

**摘 要:** 植物III型聚酮合酶 (Polyketide synthases, PKSs) 催化形成一系列结构迥异、生理活性不同的聚酮类化合物的基本骨架结构, 是聚酮类化合物生物合成途径的关键酶。目前已从植物中克隆和鉴定了多种功能不同的III型 PKSs。定点突变技术是研究蛋白质结构与功能之间复杂关系的重要方法。文中综述了近年来基于定点突变的植物III型 PKSs 结构与功能关系的研究进展, 包括利用定点突变技术修饰各种可能影响植物III型 PKSs 结构的氨基酸残基, 来研究其对功能的影响 (如控制起始底物的特异性、缩合反应次数以及中间产物环化方式), 以期对植物III型 PKSs 结构与功能关系的研究提供参考。

**关键词:** 聚酮类化合物, 植物III型聚酮合酶, 结构与功能, 定点突变

## Advances in structure-function relation of plant type III polyketide synthases by site-directed mutagenesis

Xing Li<sup>1,2</sup>, Mo Chen<sup>1</sup>, Tuanyao Chai<sup>1</sup>, and Hong Wang<sup>1</sup>

1 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

2 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Plant type III polyketide synthases (PKSs), the pivotal enzymes in the biosynthesis of polyketides, produce backbones of many structurally diverse and functionally different polyketides. So far, a variety of functionally diverse plant type III PKSs have been cloned and identified from plant origin. Site-directed mutagenesis is a useful technique to study the complex relationship between protein structure and function. This review summarized advances in the structure-function relation of plant type III polyketide synthases by site-directed mutagenesis in recent years, including the modification of the amino acid residues influencing enzyme architectures (such as controlling the specificity of starter substrates, the number of

**Received:** July 21, 2017; **Accepted:** September 12, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 61672489, 61379081).

**Corresponding authors:** Hong Wang. Tel: +86-10-69672628; E-mail: hwang@ucas.ac.cn

Tuanyao Chai. Tel: +86-10-88256343; E-mail: tychai@ucas.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 61672489, 61379081) 资助。

condensation reactions, and the cyclization reactions of the intermediate product). This review provides information to study the structure-function relation of plant type III polyketide synthases.

**Keywords:** polyketides, plant type III polyketide synthases, structure and function, site-directed mutagenesis

聚酮类化合物 (Polyketides) 是一大类在植物、微生物中广泛存在的结构复杂、功能多样的天然产物, 具有抗菌、消炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤和免疫抑制等药理活性。聚酮类化合物虽然种类繁多、结构复杂, 但在生物体内具有共同的合成机制, 聚酮合酶 (Polyketide synthases, PKSs) 是催化聚酮类化合物合成的关键酶。根据 PKSs 酶系的结构, 可将其分为 I、II 和 III 型 PKSs。其中, I 型 PKSs 多存在于细菌和真菌中, 是一类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<sup>[1]</sup>。II 型 PKSs 存在于土壤微生物中, 是一个多功能酶复合体, 只包含一套可重复使用的结构域。III 型 PKSs 即查尔酮合酶超家族 (Chalcone synthase superfamily, CHS superfamily), 主要分布在植物界, 近年来在细菌和真菌中也鉴定了多种 III 型 PKSs<sup>[2]</sup>。植物 III 型 PKSs 与 I 型和 II 型 PKSs 相比结构简单, 由 40–45 kDa 的同源二聚体组成, 每个亚基的活性中心具有多种活性, 能够完成底物加载、聚酮链延伸、特定的环化和产物的释放。

植物 III 型 PKSs 催化形成一系列结构迥异、生理活性不同的聚酮类化合物的骨架结构, 包括查尔酮 (Chalcone)、二苯乙烯 (Stilbene)、间苯三酚 (Phloroglucinol)、间苯二酚 (Resorcinol)、萘 (Naphthalene)、吡啶酮 (Acridone)、吡喃酮 (Pyrone)、联苳 (Bibenzyl)、苯亚甲基丙酮 (Benzalacetone)、二苯甲酮 (Benzophenone)、色原酮 (Chromone)、联苳 (Biphenyl)、喹诺酮 (Quinolinone)、姜黄素 (Curcuminoid)、异香豆素 (Isocoumarin)、芪-羧酸酯 (Stilbenecarboxylate) 等<sup>[3-4]</sup>。植物 III 型 PKSs 的功能多样性主要体现在对起始底物的选择性、缩合反应次数 (聚酮链延

伸的长度) 以及产物的不同环化方式等<sup>[5]</sup>。植物 III 型 PKSs 可以利用多种酰基辅酶 A (Coenzyme A, CoA) 作为起始底物, 包括脂肪族酰基 CoA 和芳香族酰基 CoA, 从较小的乙酰 CoA 到较大的 *N*-甲基邻氨基苯甲酰-CoA (*N*-methylantraniloyl-CoA), 从极性的丙二酰 CoA 到非极性的 *N*-己酰 CoA 均可以作为其底物。尽管多数植物 III 型 PKSs 催化 3 次缩合反应, 但不同的植物 III 型 PKSs 催化的缩合反应次数可以从 1 次到 8 次不等。植物 III 型 PKSs 催化产物环化反应的方式主要包括: C6→C1 Claisen 型环化 (Claisen-type cyclization), 如查尔酮合酶 (Chalcone synthase, CHS)、吡啶酮合酶 (Acridone synthase, ACS)、苯戊酮合酶 (Valerophenone synthase, VPS)、二苯甲酮合酶 (Benzophenone synthase, BPS); C2→C7 Aldol 型环化 (Aldol-type cyclization), 如芪合酶 (Stilbene synthase, STS)、二羟基戊苯合酶 (Olivetol synthase, OLS); 内酯化 (Lactonization), 如 2-吡喃酮合酶 (2-Pyrone synthase, 2-PS)。另外, 还有一些植物 III 型 PKSs 产物不经过环化, 如苯亚甲基丙酮合酶 (Benzalacetone synthase, BAS) 和姜黄素合酶 (Curcuminoid synthase, CUS)<sup>[3]</sup> (图 1)。正是由于植物 III 型 PKSs 起始底物的特异性、缩合反应次数以及产物环化方式三个方面的不同决定了植物聚酮类化合物的数量、结构以及生理活性的多样性<sup>[3, 5]</sup>。

紫花苜蓿 CHS (*Medicago sativa* CHS, MsCHS) 等植物 III 型 PKSs 晶体结构的解析和定点突变研究表明, 植物 III 型 PKSs 家族成员具有相似的三维结构和催化机制<sup>[6-8]</sup>。Cys164、His303 和 Asn336 (以 MsCHS 氨基酸序列编号, 以下未特别说明均按此编号) 3 个位点的氨基酸残基在已发现的植物 III 型 PKSs 中高度保守, 它们组成酶活性中心

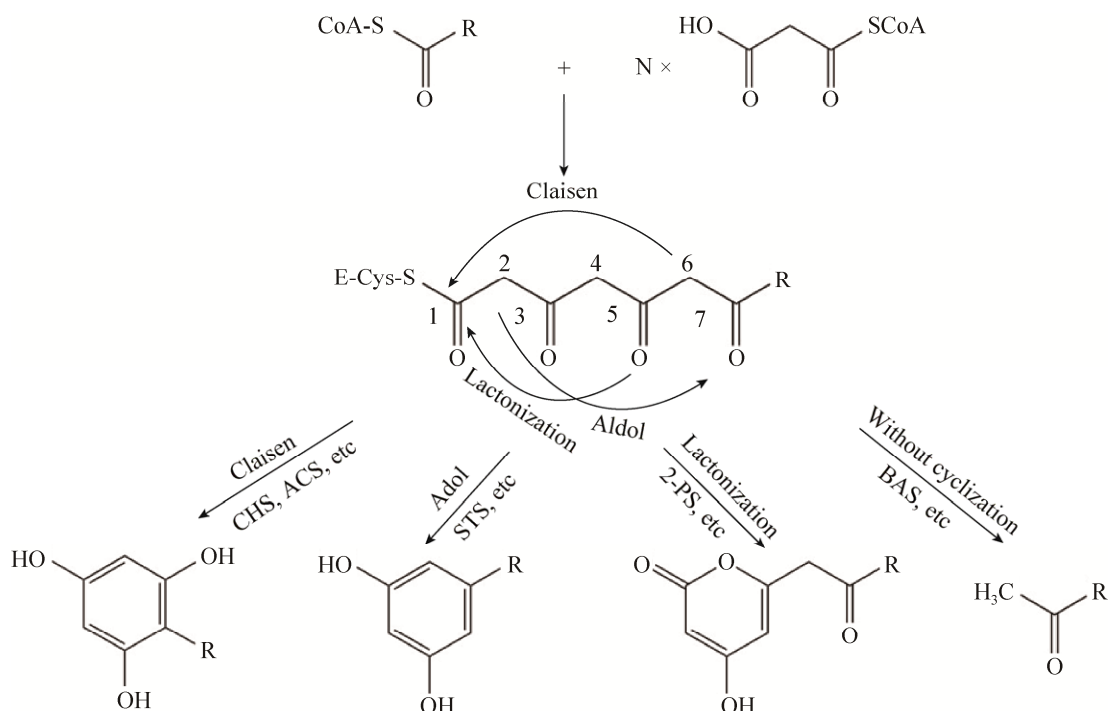


图1 植物Ⅲ型PKSs所催化的反应及产物(环化反应类型及位置在图中标出)

Fig. 1 Typical enzyme reactions catalyzed by plant type III PKSs (The position and type of cyclization reaction of the presumed linear polyketide intermediate are depicted). ACS: acridone synthase; BAS: benzalacetone synthase; CHS: chalcone synthase; 2-PS: 2-pyrone synthase; STS: stilbene synthase.

催化三联体 (Catalytic triad)。其中 Cys164 是聚酮链形成过程中的亲核活性位点, 通过共价键与起始底物分子和反应中间体结合, 而 His303 和 Asn336 则起着稳定或活化起始底物和延伸底物的作用。植物Ⅲ型 PKSs 的催化机制为: 1) 起始底物-CoA 加载到酶活性中心 Cys164 的 SH 基团; 2) 延伸底物丙二酰 CoA 脱羧形成乙酰 CoA; 3) 聚酮链开始延伸; 4) 聚酮中间体-酶复合物完成环化和芳构化<sup>[7]</sup>。MsCHS 晶体结构的解析鉴定了位于活性腔内对起始底物的选择性和聚酮链的延伸长度具有决定作用的多个氨基酸残基, 包括 Thr132、Ser133、Thr194、Thr197、Gly256、Phe265 和 Ser338, 这些氨基酸残基在 CHS 中保守, 但在其他Ⅲ型 PKSs 中被相应的氨基酸替代, 正是由于特定位置上这些重要氨基酸的替换决定了不同

的植物Ⅲ型 PKSs 对起始底物的选择性和聚酮链延伸长度的不同, 从而形成不同的产物<sup>[7-8]</sup>。

定点突变技术是研究蛋白质结构与功能之间复杂关系的重要工具, 近年来随着不同的植物Ⅲ型 PKSs 基因的克隆和鉴定, 人们通过定点突变技术对各种可能影响Ⅲ型 PKSs 所催化反应(如控制聚酮链长、催化腔大小和环化机制)的氨基酸残基进行了定点突变研究以揭示这类酶的结构与功能的关系。本文将综述近年来基于定点突变技术的植物Ⅲ型 PKSs 结构与功能关系的研究进展。

## 1 已鉴定的植物Ⅲ型 PKSs

植物Ⅲ型 PKSs 家族中, 发现最早、分布最广泛、研究最为透彻的是查尔酮合酶 CHS。1983 年, Reimold 等从欧芹 *Petroselinum hortense* 的培养细

胞中克隆了第一个植物Ⅲ型 PKSs 家族成员——查尔酮合酶基因<sup>[9]</sup>, 目前已从苔藓、蕨类、裸子植物和被子植物中克隆到大量的 *CHS* 基因。该酶是类黄酮类化合物生物合成途径的关键酶, 它催化来自丙二酰辅酶 A (Ⅲ型 PKSs 的延伸底物) 的 3 个乙酰基团通过连续 3 步缩合反应连接到 4-香豆酰辅酶 A (Ⅲ型 PKSs 的起始底物) 分子上, 形成四酮 (Tetraketide) 中间体, 之后通过克莱森型 (Claisen type) 环化反应生成芳香族聚酮化合物柚皮素查尔酮 (Naringenin chalcone)——类黄酮类化合物生物合成的前体。芪合酶 *STS* 是另一个被广泛研究的植物Ⅲ型 PKSs 家族成员, 系统发育分析表明, 该基因是植物在进化过程中由 *CHS* 进化来的, 不同植物中二者之间具有 65% 以上的氨基酸序列同源性。1988 年, Schröder 等首次从花生 *Arachis hypogaea* 培养细胞中克隆了 *STS* 基因<sup>[10]</sup>, 目前已从被子植物、裸子植物、蕨类植物中克隆到多个 *STS* 基因<sup>[11]</sup>。*STS* 利用与 *CHS* 相同的起始底物 4-香豆酰 CoA, 催化 3 分子丙二酰 CoA 缩合形成与 *CHS* 相同的四酮中间体, 但随后二者的环化方式不同, *STS* 催化四酮中间体通过分子内 C2→C7 Aldol 型缩合形成白藜芦醇, 其中 C1 以 CO<sub>2</sub> 形式被脱去。与植物中普遍存在的 *CHS* 不同, *STS* 只存在于能够产生白藜芦醇的植物中。

除了 *CHS* 和 *STS*, 植物中已鉴定的Ⅲ型 PKSs 还包括联苺合酶 (Bibenzyl synthase, *BBS*)<sup>[12]</sup>、2-PS<sup>[13]</sup>、C-methylchalcone synthase (*PstrCHS2*)<sup>[14]</sup>、*VPS*<sup>[15]</sup>、*p-Coumaroyltriactetic acid synthase*, (*CTAS*)<sup>[16]</sup>、*ACS*<sup>[17]</sup>、*BAS*<sup>[18]</sup>、*BPS*<sup>[19]</sup>、*Stilbenecarboxylate synthase* (*STCS*)<sup>[20]</sup>、芦荟松合酶 (*Aloesone synthase*, *ALS*)<sup>[21]</sup>、聚五酮色原酮合酶 (*Pentaketide chromone synthase*, *PCS*)<sup>[22]</sup>、聚八酮合酶 (*Octaketide synthase*, *OKS*)<sup>[23]</sup>、联苯合酶 (*Biphenyl synthase*, *BIS*)<sup>[24]</sup>、*CUS*<sup>[25]</sup>、聚六酮合酶 (*Hexaketide synthase*, *HKS*)<sup>[26-27]</sup>、*Isobutyrophenone synthase* (*BUS*)<sup>[28]</sup>、*OLS*<sup>[29]</sup>、喹诺酮

合酶 (*Quinolone synthase*, *QNS*)<sup>[30]</sup>、5-甲基间苯二酚合酶 (*Orcinol synthase*, *ORS*)<sup>[31]</sup>、烷基乙酰 CoA 合酶 (*Alkyldiketide-CoA synthase*, *ADS*)和烷基喹诺酮合酶 (*Alkylquinolone synthase*, *AQS*)<sup>[32]</sup>等。不同的植物Ⅲ型 PKSs 之间的差别主要体现在起始底物的特异性、缩合反应次数 (聚酮链延伸的长度) 以及产物合成所采取的不同环化方式等<sup>[5]</sup>。现在一般认为植物 PKSs 起源于脂肪酸合酶 (*Fatty acid synthases*, *FASs*) 系统, 由具有类似结构的 *KS III* (*Ketoacyl synthase III*) 进化而来, 后者与现在的 PKSs 具有相似的三级结构和底物结合位点<sup>[5]</sup>。

## 2 植物Ⅲ型 PKSs 序列分析

随着越来越多的植物Ⅲ型 PKSs 被鉴定, 序列分析表明, 植物Ⅲ型 PKSs 之间氨基酸序列相似性在 60%–75% 以上, 都编码约 400 个氨基酸的蛋白质, 在体内通常以同源二聚体的形式存在和发挥功能<sup>[3]</sup>。查尔酮合酶基因在裸子植物和被子植物中大多以多个拷贝存在, 同时, 由于查尔酮合酶基因和其他植物Ⅲ型聚酮合酶基因的核苷酸序列具有很高的的一致性和相似性, 这意味着很可能现在的植物Ⅲ型聚酮合酶家族基因是由查尔酮合酶基因经过基因的复制和变异进化而来的<sup>[33]</sup>。

本文所涉及的植物Ⅲ型 PKSs 的氨基酸序列比对结果见图 2。从图中可以看出, 组成酶活性中心催化三联体的 3 个氨基酸残基 Cys164、His303 和 Asn336 在所有已发现的Ⅲ型 PKSs 中绝对保守; 起到“Gatekeeper”作用的 2 个氨基酸残基 Phe215 和 Phe265, 具有调节活性腔与 CoA 结合通道之间的空间结构的功能, 这 2 个氨基酸残基在大多数 PKSs 中高度保守, 但在有些 PKSs 中被其他氨基酸所替换, 如掌叶大黄 *Rheum palmatum* 的 *BAS* 中 Phe215 被 Leu 替代<sup>[18]</sup>, 虎杖 *Polygonum cuspidatum* 的 *PcPKS2* (功能上是 1 个 *BAS*) 中,

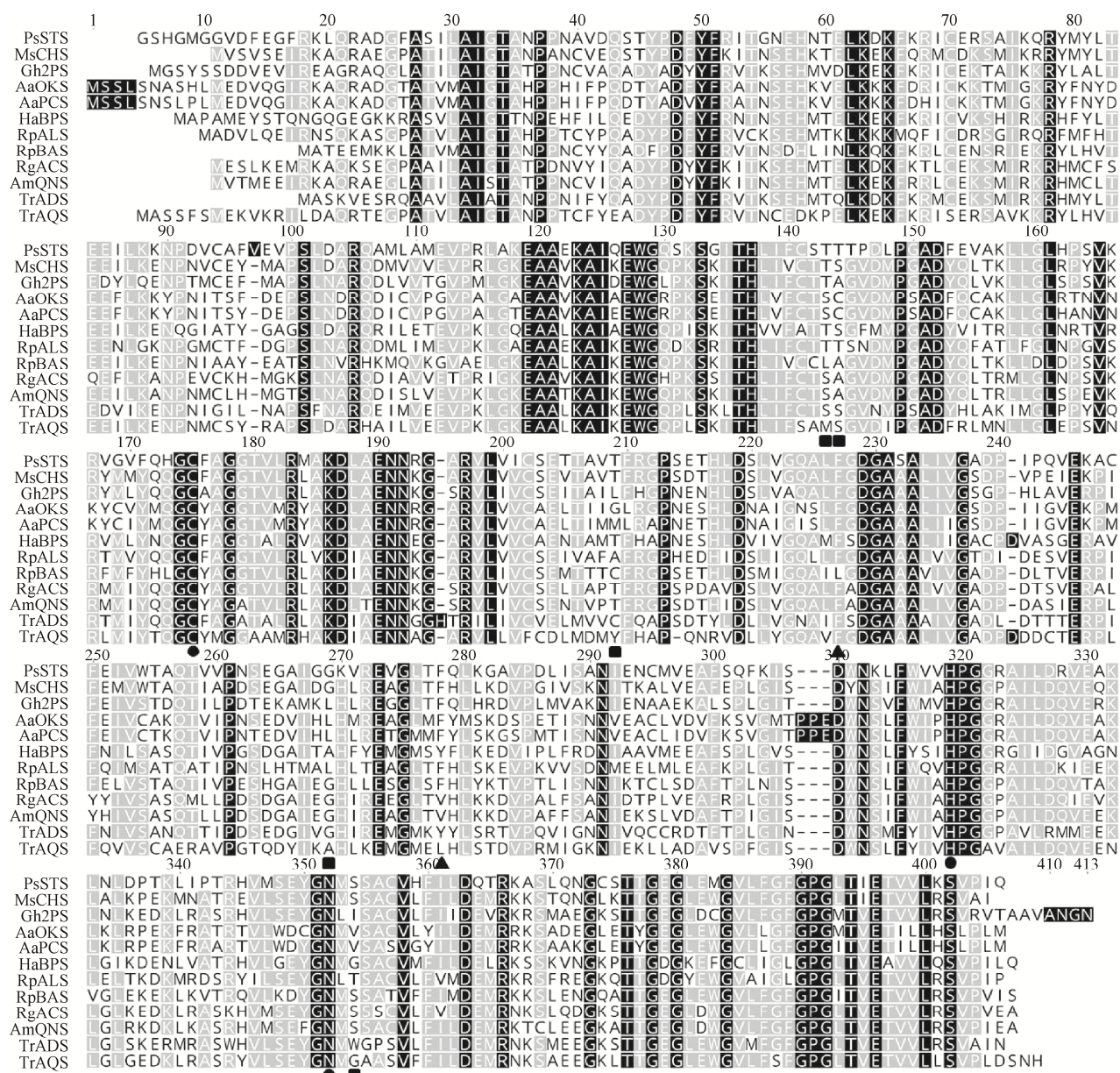


图2 植物III型PKSs家族成员氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of the amino acid sequences of plant type III PKSs. The catalytic triad (Cys164, His303, Asn336) are marked with dots. The two gatekeepers (Phe 215 and Phe 265) are marked with triangles. The critical residues lining the active-site cavity (Thr132, Ser133, Thr197, Gly256 and Ser 338) are marked with squares (numbering in MsCHS). PsSTS: *Pinus sylvestris* stilbene synthase; MsCHS: *Medicago sativa* chalcone synthase; Gh2PS: *Gerbera hybrid* 2-pyrone synthase; AaOKS: *Aloe arborescens* octaketide synthase; AaPCS: *A. arborescens* pentaketide chromone synthase; HaBPS: *Hypericum androsaemum* benzophenone synthase; RpALS: *Rheum palmatum* loesone synthase; RpBAS: *R. palmatum* bezalacetone synthase; RgACS: *Ruta graveolens* acridone synthase; AmQNS: *Aegle marmelos* quinolone synthase; ErADS: *Evodia rutaecarpa* alkylidiketide-CoA synthase; ErAQ5: *E. rutaecarpa* alkylquinolone synthase.

Phe215 和 Phe265 分别被 Leu 和 Cys 取代<sup>[34]</sup> (图 2)。另外, 位于活性中心腔内的多个氨基酸残基, 包括 Thr132、Ser133、Thr194、Thr197、Gly256、Phe265 和 Ser338, 被认为对聚酮链的延伸长度以及对起始底物和产物的特异性具有决定作用。这些氨基酸残基在 CHS 中保守, 而在其他不同功能 III 型 PKSs 中则被相应的氨基酸替代 (图 2)。因此, 这些氨基酸残基通常是研究 III 型 PKSs 结构与功能关系、基于结构的 III 型 PKSs 分子定向改造的重要靶点。

### 3 利用定点突变研究植物 III 型 PKSs 结构与功能的关系

#### 3.1 2-吡喃酮合酶

2-吡喃酮合酶 2-PS 催化起始底物乙酰 CoA 和 2 分子丙二酰 CoA 缩合形成吡喃酮。2000 年, Jez 等解析了非洲菊 *Gerbera hybrid* 2-PS-乙酰乙酰 CoA 复合物 2.05 Å 的晶体结构。结果表明, 非洲菊 2-PS 与 MsCHS 具有相似的三维折叠、相同的催化残基和高度保守的 CoA 结合位点<sup>[8]</sup>。进一步的结构解析显示, MsCHS 中位于活性腔的 Thr197、Ile254、Gly256 和 Ser338 在非洲菊 2-PS 中分别被 Leu、Met、Leu 和 Ile 替代, 这 4 个氨基酸的替代使得非洲菊 2-PS 催化腔的体积只有 MsCHS 的 1/3, 因此只能利用比 4-香豆酰 CoA 侧链基团更小的乙酰 CoA 作为起始底物, 催化 2 个乙酰基团通过连续的缩合反应连接到乙酰 CoA 上, 之后由内酯化反应生成 6-甲基-4-羟基-2-吡喃酮 (6-Methyl-4-hydroxy-2-pyrone)。作者随后进行的定点突变研究表明, 将 MsCHS 的 197 位、256 位和 338 位 3 个位点的氨基酸同时突变为非洲菊 2-PS 相对应的氨基酸后, 由于 T197L/G256L/S338I 突变后各氨基酸残基的侧链基团较野生型变大, 使得突变体不能接受 4-香豆酰 CoA 为起始底物, 而是以乙酰 CoA 为起始底物与 2 分子丙二酰 CoA

缩合形成较查尔酮分子量更小的吡喃酮, 在功能上已完全转变为 1 个 2-PS (表 1), 这也是首次实现对植物 III 型 PKS 的定向改造<sup>[8]</sup>。他们结合晶体结构信息进一步证明, MsCHS 这 3 个氨基酸残基的突变使其催化腔体积变小, 从而影响了酶对起始底物分子的选择和聚合反应的次数, 从而最终决定了产物分子的大小。基于上述结果, Jez 等提出了空间模型理论 (Steric modulation) 来解释 III 型 PKS 家族蛋白底物和反应类型的多样性。该模型认为, III 型 PKSs 活性口袋空间的大小决定了它们起始底物的大小和聚酮产物延伸的长度。非洲菊 2-PS 的活性口袋大小只有 MsCHS 的 1/3, 所以更适合接受乙酰辅酶 A 这种侧链基团较小的底物<sup>[8]</sup>。此外, Abe 等 (2005) 同源建模的结果表明, 能够催化乙酰 CoA 与丙二酰 CoA 进行 8 次聚合反应的木立芦荟 *Aloe arborescens* 的 OKS, 其催化口袋的体积确实要比仅能催化 3 次聚合反应的 MsCHS 更大, 这也是空间模型理论的证据之一<sup>[23]</sup>。

#### 3.2 吡啶酮合酶

吡啶酮合酶 ACS 催化起始底物 *N*-甲基邻氨基苯甲酰-CoA 和 3 分子丙二酰 CoA 缩合形成吡啶酮。根据芸香 *Ruta graveolens* 的 2 个 ACS (ACS1、ACS2) 与 MsCHS 序列比对和同源建模分析结果, Lukačín 等推测芸香 ACS2 的 Ser132、Ala133 和 Val265 三个氨基酸残基 (MsCHS 中分别为 Thr132、Ser133 和 Phe265, 以 MsCHS 氨基酸序列编号) 可能对其底物选择特异性具有重要作用。随后芸香 ACS2 定点突变结果表明, V265F 突变体的活性只有野生型的 75%, 而且突变体明显地优先选择 4-香豆酰 CoA 为其底物, 而 ACS2 (S132T/A133S/V265F) 三突变体在功能上已完全转变为 CHS (仍具有较弱的 ACS 活性) (表 1)。该研究结果也表明, ACS 是由 CHS 通过少数几个氨基酸的替换进化而来的<sup>[35]</sup>。

表 1 植物Ⅲ型 PKSs 定点突变后底物、产物及功能的比较

Table 1 Comparison of plant type III PKSs in substrates, products and functions after site-directed mutagenesis

Function	Mutant site	Start substrate	Number of condensations	Type of cyclization	Product	Reference
CHS → 2PS	T197L/ G256L/ S338I		3→2	Claisen→ Lactonization		[8]
ACS → CHS	S132T/ A133S/ V265F		3	Claisen		[35]
CHS Modification	G256L G256F		3→2	Claisen→ Lactonization		[36]
CHS Modification	F215S		3	Claisen→ Lactonization		[37]
CHS → OKS	T197G/ G256L/ S338V		3→7	Claisen→ Complex cyclization		[38]
PCS → OKS	M197G		4→7	Claisen→ Complex cyclization		[22]
OKS Modification	Multiple mutations in 197		7→5,4,3	Complex cyclization → Complex cyclization, claisen		[23]
RpALS Modification	197, 256, 338		6→7,5 4,3	Complex cyclization →Complex cyclization, claisen		[39]
CHS → STS	18 Sites		3	Claisen→ Aldol		[49]
STS Modification	T197G		3→4	Aldol		[50]
RpBAS → CHS	214, 215, 132		1→3	Without cyclization → Claisen		[40-41, 52]
CHS → BPS	L263M, F265Y, S338G		3	Claisen		[19]
BPS → PPS	T132L		3→2	Claisen→ Lactonization		[54]
QNS → CHS	S132T/ A133S		1,3→3	Multiple cyclizations→ claisen		[30]

### 3.3 查尔酮合酶

Gly256 位于 CHS 催化腔的表面, 与延伸的聚酮链直接接触, 因此该位点被认为是研究催化腔体积与 III 型 PKSs 聚酮链长度相关性的理想靶点。Jez 等对 MsCHS2 的 Gly256 进行了一系列定点突变 (G256A、G256V、G256L、G256F), 其结果表明, 当以 4-香豆酰 CoA 为底物时, G256A 和 G256V 突变体中四酮内酯 (Tetraketide lactone) 的合成量较野生型明显增加; G256L 和 G256F 突变体中催化腔的体积进一步受到限制, 此时苯乙烯吡喃酮产物 BNY (*bis*-Noryangonin) 的合成量明显增加 (表 1)。进一步的 X-衍射晶体结构分析表明, 第 256 位氨基酸侧链的大小既影响聚合反应的次数, 也影响聚酮中间体的构象。据此他们认为在 III 型 PKS 家族中, 第 256 位氨基酸的特异性进化可能是在不破坏酶的催化活力的前提下快速实现产物多样性的一个重要因素<sup>[36]</sup>。

2002 年, Jez 等推测 MsCHS 活性位点入口处的 2 个被称为“Gatekeepers”的苯丙氨酸残基 (Phe215 与 Phe265) 很可能与酶对起始底物特异性选择有关。他们对这 2 个位点进行了一系列的定点突变, 随后体外添加不同性质和大小 CoA 硫酯作为测试底物, 在检测了突变蛋白对不同底物的利用情况后, 发现 F215S 突变蛋白能利用一种野生型 CHS 蛋白原本并不能接受的 *N*-甲基邻氨基苯甲酰-CoA (*N*-methylantraniloyl-CoA) 作为其底物, 催化产生一种新的生物碱类化合物 (*N*-methylantraniloyltriacetic acid lactone) (表 1)<sup>[37]</sup>。这一研究结果表明, 单一位点的氨基酸残基突变后可以改变酶对底物的选择性, 这也是一个通过体外改造植物 III 型 PKS 使之合成新的次生代谢物的成功实例。

2006 年, Abe 实验室根据黄芩 *Scutellaria baicalensis* SbCHS 与木立芦荟 OKS 活性位点 (197、256、338) 氨基酸序列的差异, 对 SbCHS

的 Thr197、Gly256、Ser338 进行了一系列的单突变、双突变和三突变研究, 发现在以丙二酰 CoA 为底物时 (缺乏 4-香豆酰 CoA), SbCHS 及其突变体均能催化丙二酰 CoA 脱羧缩合, 但聚酮链延伸在三酮阶段终止, 形成三乙酸内酯 (Triacetic acid lactone, TAL) 为主产物, 这与 MsCHS 的 T197L、G256L、S338I 单突变体形成 TAL 的报道一致<sup>[8, 38]</sup>。另外, 通过对 SbCHS S338V 酶促反应产物的仔细检测发现, 该突变体除了形成 TAL 外, 还产生微量的八酮产物 SEK4 和 SEK4b, 而且在 SbCHS (T197G/G256L/S338V) 突变体 (该突变体在功能上类似 OKS) 中形成 SEK4/SEK4b 的活性明显增加 (表 1)。作者推测 SbCHS S338V 催化的机制是由于 S338V 突变为聚酮中间体延伸至埋藏于野生型 CHS 中的 1 个额外的口袋提供了空间引导, 进而导致形成较长的聚酮链<sup>[38]</sup>。该研究表明, 植物中普遍存在的 CHS 可以通过对其单一活性位点的修饰 (S338V) 而使其产生八酮化合物 SEK4/SEK4b, 该位点的重要性也被其他植物 III 型 PKSs 的定点突变研究所证实。如掌叶大黄 ALS T338S 突变体丧失了 ALS 活性<sup>[39]</sup>, 而该植物的 BAS S338V 突变体的 BAS 活性增加了 2 倍<sup>[40-41]</sup>。

2007 年, Wanibuchi 等从苔藓植物蛇足石杉 *Huperzia serrata* 中鉴定了一个多功能的 III 型聚酮合酶 HsPKS1, 在体外酶促反应中, 该酶可以催化形成多种芳香类四酮产物, 包括柚皮素查尔酮、二苯甲酮、间苯三酚和吡啶酮。有趣的是, HsPKS1 还可以利用一些 CHS 不能利用的较大的起始底物, 如 4-甲氧基肉桂酰-CoA (4-methoxycinnamoyl-CoA) 和 *N*-甲基邻氨基苯甲酰-CoA, 与 3 分子丙二酰 CoA 缩合形成 4-methoxy-2',4',6'-trihydroxychalcone 和 1,3-dihydroxy-*N*-methylacridone, 表明该酶具有 1 个较大的底物结合腔<sup>[42]</sup>。进一步的定点突变研究表明, HsPKS1 S348G 突变 (对应 MsCHS Ser338) 使突变体中活性腔的体积扩展, 不仅使



聚酮链延伸的长度增加,而且环化机制也发生了改变,从而可以催化起始底物 2-氨基酰基苯甲酰 CoA (2-Carbamoylbenzoyl-CoA) 与 3 分子丙二酰 CoA 缩合形成一种新颖的聚酮-生物碱类骨架 Dibenzoazepine,表明通过对Ⅲ型 PKSs 的定向改造,可以合成自然界不存在的具有活性的复杂化合物<sup>[43]</sup>。

近年来,本实验室从药用植物虎杖中克隆到多个植物Ⅲ型 PKS 基因,包括 *PcPKS1*<sup>[44]</sup>、*PcPKS2*<sup>[34]</sup>、*PcCHS*、*PcSTS*<sup>[45]</sup>和 *PcCHS1*<sup>[46]</sup>等。其中 *PcCHS1* 是 1 个典型的查尔酮合酶,在 pH 7-8 时能高效地催化合成查尔酮作为单一产物,在 pH 9 时,除合成查尔酮之外,还能合成一定量的苯亚甲基丙酮<sup>[46]</sup>。对 *PcCHS1* 进行了一系列定点突变研究后发现,一些位于非活性位点甚至处在酶蛋白表面的氨基酸残基不仅具有维持蛋白结构的作用,还直接参与对酶活性的调控。例如,当 *PcCHS1* 第 82 位的 Gln 突变为 Pro 后, Q82P 突变蛋白的查尔酮合成活性较野生型降低,且在 pH 9 时不能合成 BA;当第 198 位的 Cys 突变为 Phe 后, C198F 突变蛋白几乎完全失去活性;但是, Q82P/C198F 双突变酶蛋白却能在 pH 8-9 时恢复较高的 BA 合成活性,而且在 pH 9 时,该双突变蛋白还能较大量地催化合成许多 CHS 常见的 2 种脱轨产物 CTAL (4-Coumaroyltriacetic acid lactone) 和 BNY;此外,当 *PcCHS1* 第 105 位的 Arg 突变为 Gln 后, R105Q 突变蛋白改变了野生型蛋白 BA 合成活性对 pH 值的依赖性。这些结果表明,远离活性中心甚至是处在酶蛋白表面的氨基酸残基也可能对Ⅲ型 PKS 的结构与催化活性产生直接的影响<sup>[47]</sup>。

Fukuma 等通过对葛根 *Pueraria lobata* CHS 位于酶蛋白表面保守的精氨酸残基 (Arg68、Arg172、Arg199、Arg328 和 Arg350) 的系列定点突变研究表明, Arg199 和 Arg350 对维持酶蛋白结构的完整性和酶蛋白的可折叠性具有重要作

用,而 Arg68、Arg172 和 Arg326 则通过与其他保守氨基酸残基的互作协助其催化腔的精确定位及维持活性位点的正确拓扑结构,该研究也表明远离活性中心的一些氨基酸残基对酶蛋白的催化活性具有重要影响<sup>[48]</sup>。

### 3.4 聚五酮色酮合酶和聚八酮合酶

木立芦荟的聚五酮色酮合酶 PCS 催化 5 分子丙二酰 CoA 通过分子间连续 4 步缩合反应形成五酮产物 5,7-Dihydroxy-2-methylchromone<sup>[22]</sup>,而来自同一植物的聚八酮合酶 OKS 则催化 8 分子丙二酰 CoA 通过分子间连续 7 步缩合反应形成八酮产物 SEK4 和 SEK4b<sup>[23]</sup>。序列比对结果显示,二者的氨基酸序列具有 91% 的一致性, MsCHS 活性腔保守的 3 个氨基酸 Thr197、Gly256 和 Ser338 在木立芦荟 PCS 中分别被 Met、Leu、Val 替换,而在 OKS 则分别被 Gly、Leu、Thr 替换<sup>[22-23]</sup>。定点突变研究显示,将木立芦荟 PCS 中 207 位的 Met 突变为 OKS 中对应的 Gly 后 (对应 MsCHS Thr197), PCS M207G 突变体在功能上转变为 OKS,即催化 8 分子丙二酰 CoA 缩合形成八酮产物 SEK4 和 SEK4b (表 1)<sup>[22]</sup>。而 OKS 中 G207 由小到大的系列突变 (G207A、G207T、G207M、G207L、G207F 和 G207W) 结果显示,虽然所有突变体均丧失了 OKS 活性,但突变体获得了形成较短的聚酮链产物的活性 (根据侧链大小不同,可以形成从三酮到七酮大小不同的聚酮化合物),其中 OKS G207M 突变体 (将 OKS 中 207 位的 Gly 突变为 PCS 中对应的 Met) 在功能上转变 PCS (表 1)<sup>[23]</sup>。上述结果也被 RpALS A197T 和 A197G 突变体分别催化形成五酮产物和八酮产物的报道所证实<sup>[39]</sup>。这些研究结果清楚地表明, 207 位氨基酸残基 (对应 MsCHS Thr197) 控制着聚酮链延伸的长度及产物的特异性,暗示Ⅲ型 PKSs 的功能多样性可以通过单一位点氨基酸残基的替换进化而来。

### 3.5 芦荟松合酶

掌叶大黄的芦荟松合酶 RpALS 催化乙酰 CoA 为起始底物与 6 分子丙二酰 CoA 脱羧缩合形成七酮化合物芦荟松 (Aloesone)。序列比对显示, MsCHS 活性腔中保守的 3 个氨基酸残基 Thr197、Gly256、Ser338 在 RpALS 中分别被 Ala197、Leu256、Thr338 替换<sup>[21]</sup>。同源建模预测, RpALS 中这 3 个氨基酸残基的替换使得其活性腔的结构更适合利用较 4-香豆酰 CoA 更小的乙酰 CoA 作为起始底物,从而为合成较 CHS 更长的聚酮链提供了足够的空间,使得最终形成七酮产物芦荟松<sup>[39]</sup>。定点突变研究表明,将 RpALS 上述 3 个位点的氨基酸残基分别突变为 MsCHS 对应的氨基酸后, 3 个突变体 (A197T、L256G、T338S) 均完全丧失了原来的七酮合成活性。其中, A197T 突变体形成五酮产物 2,7-dihydroxy-5-methylchromone, 而 L256G 和 T338S 仅能形成三酮产物 TAL (表 1)。进一步定点突变的结果表明, L256G 突变体能够接受原来野生型 RpALS 不能接受的 4-香豆酰 CoA 为起始底物,表明 ALS 中第 256 位氨基酸残基控制着酶对底物的选择性。A197T 突变体能够高效催化乙酰 CoA 与 4 分子丙二酰 CoA 缩合形成五酮产物 2,7-dihydroxy-5-methylchromone, 而 A197G 突变体则形成八酮产物 SEK4 和 SEK4b, 表明 ALS 中第 197 位氨基酸残基控制着聚酮链延伸的长度,与木立芦荟 PCS 和 OKS 中 197 位氨基酸残基控制聚酮链长度的结果相吻合<sup>[22-23]</sup>。RpALS 中 338 位 Thr 靠近催化位点 Cys164,对聚酮中间体进入活性腔提供了空间引导,进而导致七酮的形成。另外, RpALS (A197T/L256G/T338S) 三突变体在功能上已转变为 1 个四酮合酶,该酶利用 4-香豆酰 CoA 为起始底物,形成四酮产物 CTAL<sup>[39]</sup>。

### 3.6 芪合酶

芪合酶 STS 利用与 CHS 相同的底物 (4-香豆

酰 CoA 和丙二酰 CoA) 形成相同的四酮中间体。随后,二者通过不同的机制进行环化, STS 催化四酮中间体通过分子内 C2→C7 Aldol 型缩合,同时以 CO<sub>2</sub> 形式脱去 C1 形成白藜芦醇;而 CHS 则催化四酮中间体通过分子内 C6→C1 Claisen 型缩合形成柚皮素查尔酮。

2004 年, Austin 等报道了欧洲赤松 *Pinus sylvestris* STS 2.1 Å 的晶体结构。结构解析显示,欧洲赤松 STS 与 MsCHS 活性腔的拓扑结构仅存在细微的差异,但这些细微的差异不足以导致这两种酶催化相同的四酮中间体进行不同的环化反应。通过对二者晶体结构的仔细比对发现, STS 活性位点 132-136 残基之间一个环的构象明显改变,使得该处的 Thr132 残基发生了细微的位移,从而使其侧链羟基能够与紧邻催化活性腔 Cys 的 Ser338-stabilized 水分子形成氢键。由于 Thr132 在 III 型 PKSs 中高度保守, STS 中其位置的移动明显地影响催化活性腔 Cys164 周围的氢键网络,形成了所谓的“Aldol-switch”硫酯酶样 (Thioesterase-like) 氢键网络,从而使 STS 的环化机制与 CHS 不同,所以 Thr132 残基在 STS 和 CHS 不同的环化机制中起着至关重要的作用<sup>[49]</sup>。

随后 Austin 等将 MsCHS 中与欧洲赤松 STS 构象不同的 4 个区域内共 18 个位点突变为 STS 中对应的氨基酸而构建 18×CHS 突变体,结果发现该突变体能够合成白藜芦醇,在功能上与 STS 类似 (表 1)。对 18×CHS 突变体 Apo 和白藜芦醇复合物晶体结构的解析发现,突变区域显示 STS-like 的构象变化,证实了硫酯酶样构象变化是导致 STS Aldol 型环化反应的原因。进一步在 18×CHS 突变体的基础上 (保留 18×CHS 中已经引入的 STS-like 构象变化的突变),再引入扰乱其硫酯酶样氢键网络的点突变而构建多个 18×(+1) CHS 突变体 (T132A、S131A、E192Q),结果发现这些突变体中白藜芦醇的合成量减少而查尔酮

的合成量增加,再次确认了 STS 活性腔 Cys164 附近由 Ser338-H<sub>2</sub>O-Thr132-Glu192 形成的氢键网络对其特异的 Aldol 型环化反应具有至关重要的作用<sup>[49]</sup>。

基于对葡萄 *Vitis vinifera* STS 同源建模的结果, Bhan 等预测, 葡萄 STS T197G 突变体中底物结合口袋及环化口袋的体积将增大。体外酶促反应结果显示, 当以 4-香豆酰 CoA 和丙二酰 CoA 为底物时, STS T197G 突变体产生了一种新的由香豆酰衍生的五酮产物 Resorcylic acid (表 1)。进一步研究表明, T197G 替代使得突变体中底物结合及环化口袋的整体体积由 1 029.2 Å<sup>3</sup> 增大至 1 134.3 Å<sup>3</sup>, 从而使突变体较野生型能够多接受 1 个乙酰基而形成五酮中间体, 后者再经过 C2→C7 Aldol 型缩合形成五酮产物 Resorcylic acid<sup>[50]</sup>。该研究表明, 通过对 STS-like 酶的理性改造, 可以通过 C2→C7 Aldol 型缩合而产生自然界不存在的新化合物。

### 3.7 苯亚甲基丙酮合酶

2001 年, Abe 等在掌叶大黄 *R. palmatum* 中首次克隆到苯亚甲基丙酮合酶 (Bezalacetone synthase, BAS) 基因<sup>[18]</sup>。RpBAS 与 CHS 的不同之处在于它仅催化起始底物 4-香豆酰 CoA 与 1 分子丙二酰 CoA 通过一步脱羧缩合形成二酮产物——苯亚甲基丙酮。序列比对结果表明, 在其他植物和细菌的Ⅲ型 PKSs 家族成员中均高度保守的 Phe215 残基在 RpBAS 中被 Leu 替代。CHS 中疏水性的 Phe215 位于活性腔的入口处, 推测该位点控制着聚酮链延伸反应的次数<sup>[37,51]</sup>。

2003 年, Abe 等将 RpBAS 的 <sup>214</sup>IL 突变为 MsCHS 对应的氨基酸残基, 结果发现突变后的 RpBAS I214L/L215F 在 pH 6.5 时表现出 CHS 酶活性, 该结果证实了 <sup>214</sup>IL 残基确实与 RpBAS 二酮产物苯亚甲基丙酮的形成有关, RpBAS 中活性位点 Phe215 的缺失导致聚酮链的延伸在二酮中间体阶段即被打断 (表 1)<sup>[52]</sup>。随后, 他们又将黄

芩 *Scutellaria baicalensis* CHS 的 <sup>214</sup>LF 突变为 IL, 结果黄芩 CHS L214I/F215L 突变体的 CHS 活性明显下降, 三酮化合物 BNY 成为主要产物, 但无论是野生型还是突变体中均未检测到二酮化合物苯亚甲基丙酮。进一步对黄芩 CHS F215 残基进行的一系列突变 (F215W、F215Y、F215S、F215A、F215H 和 F215C) 研究结果显示, 所有突变后的酶蛋白体外酶促反应产物中均未检测到 BA。该结果暗示, RpBAS 可能在进化上晚于 CHS, 前者由后者进化而来。RpBAS 蛋白 215 位置上的 Leu 对于该酶的 BAS 活性是必需的, 对应于 CHS 同一位置上的 Phe 的缺失导致 RpBAS 中聚酮链的延伸在二酮中间体阶段即被打断<sup>[52]</sup>。该研究也是通过修饰活性位点周围的单个氨基酸残基而改变Ⅲ型 PKSs 功能多样性的有趣实例。

2007 年, Abe 等对 RpBAS C197T、C197G、G256L、S338V 定点突变的研究结果表明, 这 4 个突变体的产物模式均未改变, 只是 S338V 突变导致酶活性较野生型增加 2 倍, 而 G256L 突变则使酶活性下降 2 倍, 但 C197T 和 C197G 这 2 个突变体的功能几乎与野生型相同, 该结果排除了 Cys197 可能作为 RpBAS 第 2 个活性位点的推测<sup>[40]</sup>。

2010 年, Morita 等报道了野生型 RpBAS 和合成查尔酮的 RpBAS I207L/L208F (RpBAS 氨基酸编号) 突变体 1.8 Å 的晶体结构<sup>[41]</sup>。RpBAS 与 MsCHS 活性位点的结构对比显示, RpBAS 中 Leu208 残基的主链构象与 MsCHS 相似, 但其侧链伸入 RpBAS 活性腔内, 所以导致其活性腔体积缩小。另外, RpBAS 中紧邻活性位点 Cys 的 Ser331 (对应 MsCHS 的 Ser338) 对于催化活性的调控至关重要, 如前文所述, RpBAS S338V 突变使其苯亚甲基丙酮合成活性增加 2 倍, 也佐证了该位点对于二酮化合物的形成具有重要作用<sup>[40]</sup>。晶体结构解析显示, RpBAS 中 Ser331 的羟基旋转了近 120°, 堵塞了 MsCHS 中香豆酰结合口袋的入口<sup>[7]</sup>。

上述 RpBAS 晶体结构中 Leu208 和 Ser331 构象改变的结果导致 MsCHS 中的香豆酰结合口袋在 RpBAS 活性腔中消失,使其活性腔体积 ( $350 \text{ \AA}^3$ ) 缩小到仅为 MsCHS ( $750 \text{ \AA}^3$ ) 的一半,活性腔体积的缩小导致 RpBAS 中聚酮链的延伸在二酮中间阶段即被打断,从而合成二酮化合物。RpBAS I207L/L208F 突变体晶体结构的解析显示,突变体中第 208 位氨基酸残基的替换为野生型中原本埋藏的香豆酰结合口袋打开了一个入口,使得聚酮链延伸反应次数增加到 3 次,因而突变体恢复了查尔酮形成活性<sup>[41]</sup>。

RpBAS 晶体结构解析还显示, MsCHS 中保守的 Thr132 (对应 MsCHS 氨基酸编号) 在 RpBAS 中被 Leu 所替换,从而导致 RpBAS 活性腔体积缩小,使 RpBAS 只能形成二酮产物而不能形成四酮产物<sup>[41]</sup>。2010 年, Shimokawa 等对 Thr132 进行了一系列的定点突变研究 (L132G, L132A, L132S, L132C, L132T, L132F, L132Y, L132W, L132P), 结果显示, L132T 突变恢复了 RpBAS 的查尔酮合酶活性, 而 L132A、L132S、L132C 突变则增加产物的链长而形成 CTAL (表 1), 同源建模揭示可能是由于这些突变恢复了 RpBAS 活性腔的香豆酰结合口袋<sup>[53]</sup>。

### 3.8 二苯甲酮合酶

金丝桃 *Hypericum androsaemum* 的二苯甲酮合酶 BPS 催化起始底物苯甲酰 CoA 与 3 分子丙二酰 CoA 通过脱羧缩合形成 2,4,6-三羟基二苯甲酮 (2,4,6-trihydroxybenzophenone), 该酶还可以利用 3-羟基苯甲酰-CoA (3-hydroxybenzoyl-CoA) 和 *N*-甲基邻氨基苯甲酰-CoA 为起始底物, 活性分别是苯甲酰 CoA 为起始底物时的 18.8% 和 10.9%, 但不能利用肉桂酰 CoA 为起始底物。但该植物的 CHS 则可以利用肉桂酰 CoA 为起始底物 (活性为香豆酰 CoA 为起始底物时的 87.5%), 同时还可以利用苯甲酰 CoA 和 3-羟基苯甲酰-CoA 为起始底物。

氨基酸序列比对显示, 位于 CHS 活性腔的 Gly256、Leu263、Phe265 和 Ser338 在 BPS 中分别被 Ala260、Met267、Tyr269 和 Gly342 所替代 (BPS 氨基酸编号)。定点突变结果表明, BPS 突变体或者与野生型功能类似 (如 G342S, A260G/M267L/Y269F), 或者丧失二苯甲酮和查尔酮形成活性 (如 A260G, A260G/G342S, M267L/Y269F/G342S, A260G/M267L/Y269L/G342S); 而 CHS L263M/F265Y/S338G 突变体却转变为 1 个对苯甲酰 CoA 较香豆酰 CoA 具有更高活性的酶, 即突变后的 CHS 在功能上已转变为 1 个 BPS (表 1)<sup>[19]</sup>。该研究结果也表明, BPS 可以由 CHS 通过少数几个氨基酸的替换进化而来, 而反过来即由 BPS 转变成 CHS 则很难, 这与芸香 ACS 可以通过 3 个氨基酸的突变 (S132T/A133S/V265F) 转变成 CHS 而 CHS 则很难转变为 ACS 的报道相一致<sup>[35]</sup>。

2009 年, Klundt 等对金丝桃 BPS 活性口袋内的 T135 (对应 MsCHS 中 T132) 突变为 Leu 后发现, 原本催化苯甲酰 CoA 与 3 分子丙二酰 CoA 聚合形成二苯甲酮的 BPS 在功能上转变为 1 个苯基吡喃酮合酶 (Phenylpyrone synthase, PPS)。该位点的突变改变了野生型 BPS 的底物与产物特异性, 突变后的 BPS 催化苯甲酰 CoA 与 2 分子丙二酰 CoA 合成 6-苯基-4-羟基-吡喃酮 (6-phenyl-4-hydroxy-pyrone), 而且与野生型不同的是, 突变后的 BPS 不再接受 3-羟基苯甲酰-CoA 为其底物 (表 1)。同源建模后发现, 金丝桃 BPS T135L 突变体中 Leu 的侧链可能伸进延伸口袋内阻断了聚酮链的延伸路径; 同时, T135L 替换可能在突变体中打开了一个新的口袋 (该口袋入口在野生型中被堵塞), 通过 Leu 侧链与生长中的聚酮链苯基之间的互作, 活性口袋中的三酮中间体被重新定向进入突变体中新形成的口袋中。同源建模显示新口袋的体积为  $168 \text{ \AA}^3$ , 足以容纳 1 个苯基 ( $144 \text{ \AA}^3$ ), 但是却不能容纳生长中的聚酮链再添加

第3个乙酰基,最终三酮中间体经过杂环内酯化形成苯基吡喃酮(Phenylpyrone)<sup>[54]</sup>。同源建模的结果合理解释了T135L突变体底物与产物特异性显著改变的机理,该研究也充分证明,单一活性位点氨基酸残基的改变完全可以彻底改变一种III型PKS原有的活性而产生另一种全新的酶。

### 3.9 喹诺酮合酶

木橘 *Aegle marmelos* 的喹诺酮合酶 QNS 催化喹诺酮类生物碱的合成。2013年,Resmi 等鉴定了木橘的 QNS 并进行了定点突变研究。木橘 QNS 具有广泛的底物特异性,可以接受多种芳香类及脂肪类 CoA 作为起始底物,在以 *N*-methylantraniloyl-CoA 为主要底物时,QNS 在体外酶促反应中可以形成喹诺酮和吡啶酮,可能是1个双功能酶。基于同源性的结构建模发现,Ser132和Ala133是位于QNS活性口袋的2个关键氨基酸残基(MsCHS中对应Thr132和Ser133),为了研究其功能,通过定点突变构建了QNS S132T/A133S双突变体和QNS S132T/A133S/V265F三突变体。同源建模显示,这2个突变体的活性腔体积较野生型明显缩小,丧失了结合较大起始底物的机会。随后的体外酶促反应证实QNS S132T/A133S双突变体能够以香豆酰 CoA 为起始底物催化3分子乙酰 CoA 缩合形成柚皮素查尔酮,即QNS在功能上已完全转变为1个CHS,而QNS S132T/A133S/V265F三突变体以香豆酰 CoA 为起始底物时未能检测到产物(表1)。同时,这2个突变体以 *N*-methylantraniloyl-CoA 为底物时未形成产物,也进一步验证了同源建模的结果<sup>[30]</sup>。该研究也与芸香 ACS 可以通过3个氨基酸的突变(S132T/A133S/V265F)转变成CHS的结果一致<sup>[35]</sup>。该研究也表明,木橘QNS蛋白可能是由CHS超家族中一个进化上相关的成员仅仅通过2个氨基酸残基的替换进化而来,同时该研究也是通过基因操作产生新型生物碱骨架的成功范例。

### 3.10 烷基乙酰 CoA 合酶和烷基喹诺酮合酶

最近,Matsui 等从药用植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* 中鉴定了2个新的植物III型聚酮合酶ADS和AQS,并对其功能进行了研究<sup>[32]</sup>。体外功能分析表明,ADS和AQS能够协同催化 *N*-methylantraniloyl-CoA 和丙二酰 CoA 缩合形成生物碱类物质2-烷基喹诺酮(2-alkylquinolone, 2AQ)。其中ADS能够高效催化癸酰基 CoA (Decanoyl-CoA) 与1分子丙二酰 CoA 脱羧缩合形成癸酰基乙酰 CoA (Decanoyldiketide-CoA),而AQS则特异性催化ADS的羟化产物 Decanoyldiketide acid 与 *N*-methylantraniloyl-CoA 脱羧缩合形成2AQ骨架。随后作者分别解析了ADS与CoA-SH复合物1.80 Å和AQS 2.20 Å的晶体结构,并构建了一系列的ADS和AQS Y215V突变体。ADS系列突变体(W332Q、W332I、W332V、W332A、W332G以及C191G、C191A)的体外功能检测并结合晶体结构解析结果表明,Trp332和Cys191对于ADS产物的形成具有至关重要的作用,这两个位点决定了该酶蛋白活性腔的结构,从而调控其底物和产物的特异性。而对AQS Y215V突变体的体外功能检测并结合晶体结构解析结果显示,AQS的Tyr215残基主要通过控制该酶蛋白的CoA结合通道的构象而调控其底物和产物的特异性<sup>[32]</sup>。

## 4 总结与展望

不同类型的III型PKSs晶体结构解析以及基于定点突变的结构与功能分析表明,活性位点周围的单个或是少数氨基酸残基的性质可以决定活性口袋空间的大小和催化反应的特异性。同时,不同种类的植物III型PKSs催化口袋的体积和活性位点氨基酸残基的性质可以直接影响PKSs底物的特异性和产物类型,从而产生了不同的催化反应和结构迥异的聚酮化合物分子。

近年来,越来越多的具有不同功能的植物III

型 PKSs 基因被克隆和鉴定功能,极大地拓宽了人们对III型 PKSs 催化反应类型的认识。当不同的III型 PKSs 基因被克隆以后,对各种可能影响所催化的反应(如控制聚酮链长、成环机制和催化口袋大小)的氨基酸残基进行定点突变就成为鉴定这类酶的活性残基的首选方法。通常,突变某个III型 PKS 的少数甚至是单个处于活性位点或其附近的氨基酸残基,有可能会使酶蛋白获得新的活性,从而催化产生新的聚酮化合物。通过定点突变对植物III型 PKSs 进行定向改造,不仅可以研究酶蛋白的结构与功能的关系,而且可以丰富聚酮化合物的种类,为一些复杂的、具有重要药用价值的天然或非天然聚酮化合物组合生物合成提供便利。同时,突变以后的III型 PKSs 很可能可以获得新的催化活性,这也可以为研究和阐明植物III型 PKSs 超家族酶的催化机制与进化关系提供新的视野和证据。

## REFERENCES

- [1] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(2): 285–295.
- [2] Lim YP, Go MK, Yew WS. Exploiting the biosynthetic potential of type III polyketide synthases. *Molecules*, 2016, 21(6): 806.
- [3] 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.
- [4] 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 (in Chinese).  
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.
- [5] Austin MB, Noel JP. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(1): 79–110.
- [6] Lü HS, Liu CM, Lu P, et al. Plant-specific type III polyketide synthases superfamily: crystal structures and functions. *Chin J Biotech*, 2011, 28(1): 1–14 (in Chinese).  
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*, 2011, 28(1): 1–14.
- [7] 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.
- [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] 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.
- [10] Schröder G, Brown JWS, Schröder J. Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur J Biochem*, 1988, 172(1): 161–169.
- [11] Chong JL, Poutaraud A, Huguency P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci*, 2009, 177(3): 143–155.
- [12] 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.
- [13] Eckermann S, Schröder G, Schmidt J, et al. New pathway to polyketides in plants. *Nature*, 1998, 396(6709): 387–390.
- [14] Schröder J, Raiber S, Berger T, et al. Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. *Biochemistry*, 1998, 37(23): 8417–8425.
- [15] Zuurbier KWM, 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Liu B, Raeth T, Beuerle T, et al. Biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase. *Planta*, 2007, 225(6): 1495–1503.
- [25] 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.
- [26] Springob K, Samappito S, Jindaprasert A, et al. A polyketide synthase of *Plumbago indica* that catalyzes the formation of hexaketide pyrones. *FEBS J*, 2007, 274(2): 406–417.
- [27] Jindaprasert A, Springob K, Schmidt J, et al. Pyrone polyketides synthesized by a type III polyketide synthase from *Drosophyllum lusitanicum*. *Phytochemistry*, 2008, 69(18): 3043–3053.
- [28] Klingauf P, Beuerle T, Mellenthin A, et al. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry*, 2005, 66(2): 139–145.
- [29] Taura F, Tanaka S, Taguchi C, et al. Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS Lett*, 2009, 583(12): 2061–2066.
- [30] Resmi MS, Verma P, Gokhale RS, et al. Identification and characterization of a type III polyketide synthase involved in quinolone alkaloid biosynthesis from *Aegle marmelos* Correa. *J Biol Chem*, 2013, 288(10): 7271–7281.
- [31] Taura F, Iijima M, Yamanaka E, et al. A novel class of plant type III polyketide synthase involved in orsellinic acid biosynthesis from *Rhododendron dauricum*. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1452.
- [32] Matsui T, Kodama T, Mori T, et al. 2-Alkylquinolone alkaloid biosynthesis in the medicinal plant *Evodia rutaecarpa* involves collaboration of two novel type III polyketide synthases. *J Biol Chem*, 2017, 292(22): 9117–9135, doi: 10.1074/jbc.M117.778977.
- [33] 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, 51(5): 505–509 (in Chinese).  
杨继, 顾红雅. 查尔酮合酶超家族 (chalcone synthase superfamily) 基因重复和分化的式样. *科学通报*, 2006, 51(5): 505–509.
- [34] 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.
- [35] Lukačín R, Schreiner S, Matern U. Transformation of acridone synthase to chalcone synthase. *FEBS Lett*, 2001, 508(3): 413–417.
- [36] Jez JM, Bowman ME, Noel JP. Structure-guided programming of polyketide chain-length

- determination in chalcone synthase. *Biochemistry*, 2001, 40(49): 14829–14838.
- [37] 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): 5319–5324.
- [38] Abe I, Watanabe T, Morita H, et al. Engineered biosynthesis of plant polyketides: manipulation of chalcone synthase. *Org Lett*, 2006, 8(3): 499–502.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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): 669–773.
- [42] 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.
- [43] Morita H, Yamashita K, Shi SP, et al. Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): 13504–13509.
- [44] 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.
- [45] Guo YW, Guo HL, Li X, et al. Two type III polyketide synthases from *Polygonum cuspidatum*: gene structure, evolutionary route and metabolites. *Plant Biotechnol Rep*, 2013, 7(3): 371–381.
- [46] Li X, Wang H. Cloning and characterization of *PcCHS1* from *Polygonum cuspidatum*. *J Graduate Univ Chin Acad Sci*, 2013, 30(2): 206–212 (in Chinese).
- 李星, 王红. 虎杖查尔酮合酶 *PcCHS1* 基因的克隆与功能分析. *中国科学院研究生院学报*, 2013, 30(2): 206–212.
- [47] Shen YL, Li X, Chai TY, et al. Outer-sphere residues influence the catalytic activity of a chalcone synthase from *Polygonum cuspidatum*. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(6): 610–618.
- [48] Fukuma K, Neuls ED, Ryberg JM, et al. Mutational analysis of conserved outer sphere arginine residues of chalcone synthase. *J Biochem*, 2007, 142(6): 731–739.
- [49] 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.
- [50] Bhan N, Li LY, Cai C, et al. Enzymatic formation of a resorcylic acid by creating a structure-guided single-point mutation in stilbene synthase. *Protein Sci*, 2015, 24(2): 167–173.
- [51] 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.
- [52] Abe I, Sano Y, Takahashi Y, et al. Site-directed mutagenesis of benzalacetone synthase: the role of Phe<sup>215</sup> in plant type III polyketide synthases. *J Biol Chem*, 2003, 278(27): 25218–25226.
- [53] Shimokawa Y, Morita H, Abe I. Structure-based engineering of benzalacetone synthase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(17): 5099–5103.
- [54] Klundt T, Bocola M, Lütge M, et al. A single amino acid substitution converts benzophenone synthase into phenylpyrone synthase. *J Biol Chem*, 2009, 284(45): 30957–30964.

(本文责编 陈宏宇)