

植物 型聚酮合酶的研究进展¹

张 萍, 陈国神

(浙江省医学科学院药物所, 浙江 杭州 310013)

摘 要:综述了近 10 年来从植物中克隆、鉴定的 型聚酮合酶(PKS)的研究进展。 型 PKS 即查耳酮合酶超家族, 能催化生成一系列结构各异、具有不同生理活性、具有查耳酮合酶(CHS)基本骨架的植物次生代谢产物, 对这些 PKS 的基因进行调控可用于合成一些难以化学合成的新型天然化合物。目前, 国内对 型 PKS 在药学领域的应用研究甚少, 此研究对于活性成分的生物合成具有重要意义。

关键词: 型聚酮合酶(PKS); 生物合成; 查耳酮合酶

中图分类号: R 282. 12 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2008)02- 0309- 05

Advances in studies on type polyketide synthases from plants

ZHANG Ping, CHEN Guo-shen

(Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Key words: type polyketide synthases (PKS); biosynthesis; chalcone synthase (CHS)

聚酮化合物是一类含有由碳、氧原子构成的大环结构的次生代谢产物, 广泛分布于生物界, 具有抗菌、抗肿瘤、抗寄生虫和免疫抑制等药理活性^[1]。聚酮化合物通常在聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)的作用下生成。根据蛋白的结构可将 PKS 分为 、 和 型^[2~7]。其中 、 型 PKS 仅存在于微生物界; 型 PKS 即查耳酮合酶(chalcone synthase, CHS)超家族, 主要分布于植物界, 但也存在于微生物界。

型 PKS 能催化生成一系列结构各异、具有不同生理活性、含 CHS 基本骨架的植物次生代谢产物(如查耳酮、二苯乙烯、苯甲酮、吡喃酮、间苯三酚、间苯二酚、吡喃酮、苯并- γ -吡喃酮等)^[8]。由于其独特的结构、作用机制、催化活性, PKS 的研究在过去 10 年备受瞩目。许多能催化形成不同产物的 PKS 不断地被发现和鉴定。对这些 PKS 的基因进行调控可用于合成一些难以化学合成的新型化合物^[9~14]。本文就植物型 PKS 的研究进展进行综述。

1 目前已发现的植物 型 PKS

近几年来, 一系列功能不同的植物 型 PKS 不断被克隆和鉴定, 如 CHS、 stilbene synthase, STS)^[15~17]、吡喃酮合酶(2-pyrone synthase, 2-PS)^[18, 19]、苯甲酮合酶(benzalacetone synthase, BAS)^[20]、芦荟松合酶(aloesone synthase, ALS)^[21]、吡喃酮合酶(acridone synthase, ACS)^[22]、聚五酮色原酮合酶(pentaketide chromone synthase, PCS)^[23]、聚八酮合酶(octaketide synthase, OKS)^[24]等, 其氨基酸序列相似性达 60% ~ 75%。

1.1 CHS: STS: CHS 广泛存在于多种植物中, 目前已从苔藓、蕨类、裸子植物和被子植物中克隆了约 1 000 个 CHS 基

因, 涉及的主要有豆科的苜蓿、大豆、豌豆, 十字花科的拟南芥, 禾本科的水稻、玉米, 葡萄科的葡萄, 碧冬茄属的矮牵牛等。CHS 基因编码 400 多个氨基酸, 相对分子质量为 4.2×10^4 。作为类黄酮生物合成的关键酶, CHS 以 *p*-香豆酰辅酶 A 作为起始底物, 经 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 经 Claisen 型环化反应, 生成含一个新芳香环系统的聚四酮 4, 2', 4', 6'-四羟基查耳酮。

STS 被认为是植物在进化过程中从 CHS 基因进化而来的, 彼此之间有 65% 以上的氨基酸同源序列。目前已从松树、花生、葡萄等植物中克隆得到。STS 基因可分为两种类型: 一类是以 *p*-香豆酰辅酶 A 作为起始底物, 经 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 生成白藜芦醇(resveratrol, 3, 4', 5-trihydroxy-stilbene); 另一类是以肉桂酰辅酶 A(cinnamoyl-CoA) 作为起始底物, 经丙二酰辅酶 A 缩合, 生成赤松素(pinosylvin)。葡萄、花生等植物中的 STS 属于前一种类型, 而存在于苏格兰赤松和东方白松等的 STS 属于后一种类型。CHS 和 STS 的催化反应见图 1。

1.2 2-PS: 从观赏植物雏菊 *Gerbera hybrida* 中克隆得到, 以乙酰辅酶 A 作为起始底物, 经 2 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 生成三乙酸内酯(TAL)^[18, 19]。催化反应见图 2。

编码 *G. hybrida* 2-PS 的 cDNA 所含开放阅读框为 1 206 bp, 编码 402 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 43 749, 与其他植物来源的 CHS 超家族酶比较, 氨基酸序列相似性在 60% ~ 70%。*G. hybrida* 2-PS 保留了所有 型 PKS 酶中均高度保守的催化活性中心 Cys164、His303、Asn336, 然而 CHS 活性位点残基 Thr197、Gly256、Ser338(*Medicago sativa*

¹ 收稿日期: 2007-05-28

作者简介: 张 萍(1976—), 女, 浙江浦江人, 助理研究员, 硕士, 主要从事中药及天然药物、中药生物技术等领域的研究工作。

Tel: (0571) 88215630 E-mail: sally7612@163.com

va CHS 中的氨基酸位置数)相应地被 Leu、Leu、Ile 所替代。

1.3 ACS: 从芸香科植物芸香 *Ruta graveolens* L. 中克隆得到, 以 *N*-甲基邻氨基苯酰辅酶 A 作为起始底物, 经 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 生成 1,3-二羟基-*N*-甲基吡啶酮^[2]。催化反应见图 3。

编码 *R. graveolens* ACS 的 cDNA 所含开放阅读框为 1 173 bp, 编码 391 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 42 681, 与其他植物来源的 CHS 超家族酶比较, 氨基酸序列相似性在 60%~70%。*R. graveolens* ACS 保留了在所有型 PKS

酶中均高度保守的催化活性中心 Cys164、His303、Asn336。研究发现, Ser132、Ala133、Val265 为其活性位点残基, 分别被 Thr132、Ser133、Phe265(*M. sativa* CHS 中的氨基酸位置数)相应的替代后, 功能上完全转变为 CHS 的活性^[25]。

1.4 BAS: 从蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* Linn. 中克隆得到, 它能催化 1 分子 *p*-coumaroyl-CoA 作为起始底物, 经 1 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 脱羧, 形成 C₆-C₄ 骨架, 生成具有抗炎作用的苯乙烯基丙酮^[21]。催化反应见图 4。

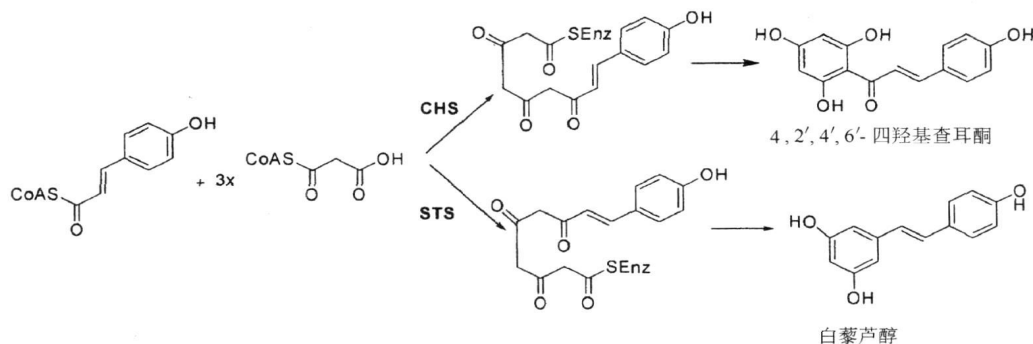


图 1 CHS 或 STS 催化反应

Fig. 1 Reaction catalyzed by CHS or STS

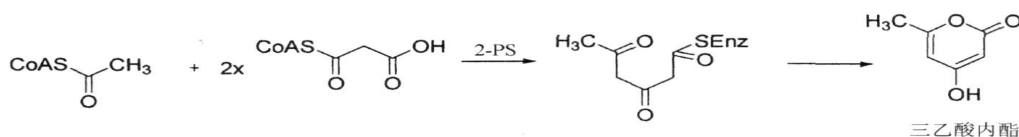


图 2 2-PS 催化反应

Fig. 2 Reaction catalyzed by 2-PS

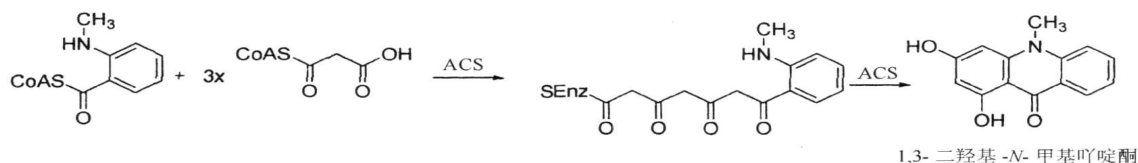


图 3 ACS 催化反应

Fig. 3 Reaction catalyzed by ACS

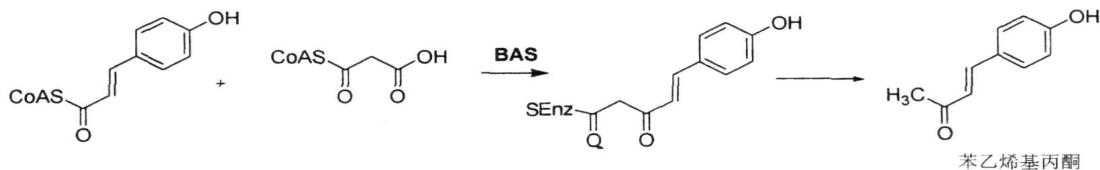


图 4 BAS 催化反应

Fig. 4 Reaction catalyzed by BAS

编码 *R. palmatum* BAS 的 cDNA 所含开放阅读框为 1 152 bp, 编码 384 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 42 223, 与其他植物来源的 CHS 超家族酶比较, 氨基酸序列相似性在 60%~75%。*R. palmatum* BAS 保留了在所有型 PKS 酶中均高度保守的催化活性中心 Cys164、His303、Asn336(*M. sativa* CHS 中的氨基酸位置数), 但是缺少其他型 PKS 酶

保守的活性位点残基 Phe215。

1.5 ALS: 也是从蓼科植物掌叶大黄中克隆得到^[21], 其是首个能催化 6 分子的乙酰辅酶 A, 经 aldol 型环化, 羧基端去羧基后形成芦荟松 (aloesone, 2-acetonyl-7-hydroxy-5-methylchromone) 的植物特异性型 PKS。芳香性聚七酮是中药植物抗免疫剂芦荟苦素 (aloesin) 生物合成的先导物^[21]。催化反应见图 5。

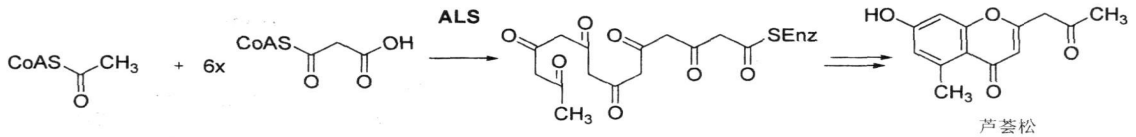


图 5 ALS 催化反应

Fig. 5 Reaction catalyzed by ALS

编码 *R. palatum* ALS 的 cDNA 所含开放阅读框为 1 176 bp, 编码 391 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 43 343, 与其他植物来源的 CHS 超家族酶比较, 氨基酸序列相似性在 50% ~ 60%。*R. palatum* ALS 保留了在所有型 PKS 酶中均高度保守的催化活性中心 Cys164、His303、Asn336 与大部分 CHS 活性位点残基 Met137、Gly211、Phe215、Gly216、Phe265 和 Pro375。然而, CHS 活性位点残基 Thr197、Ile254、

Gly256、Ser338(*M. sativa* CHS 中的氨基酸位置数)相应地被 Ala、Met、Leu、Thr 所替代。

1.6 PCS: 从百合科植物木立芦荟 *Aloe arborescens* Mill. 中克隆得到的新型型 PKS 酶, 它能催化丙二酰辅酶 A 生成 5, 7-二羟基-2-甲基苯并-γ-吡喃酮 (5, 7-dihydroxy-2-methylchromone)^[23], 后者是呋喃并色酮类止喘药 kehellin 和齿阿米素 (甲氧苄呋素, visnagin) 生物合成的先导物。催化反应见图 6。

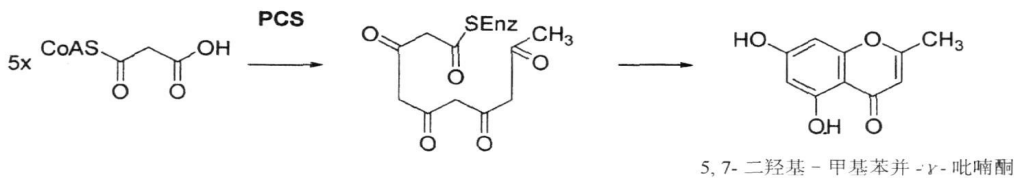


图 6 PCS 催化反应

Fig. 6 Reaction catalyzed by PCS

编码 *A. arborescens* PCS 的 cDNA 所含开放阅读框为 1 212 bp, 编码 403 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 44 568, 与其他植物来源的 CHS 超家族酶比较, 氨基酸序列相似性在 50% ~ 60%。*A. arborescens* PCS 保留了大部分辅酶 A 结合位点, 催化活性中心 Cys164、His303、Asn336 在所有型 PKS 酶中均高度保守, 与 Phe215、Phe265 一样, 活性位点残

基 Met137、Gly211、Gly216、Pro375 在 PCS 中也保守。*A. arborescens* PCS 中, CHS 活性位点残基 Thr197、Gly256、Ser338 相应地被 Met、Leu、Val 所替代。

1.7 OKS: 也是从百合科植物木立芦荟中克隆得到^[23], 催化丙二酰辅酶 A 生成 SEK4 和 SEK4b, 是目前单一型 OKS 酶催化产生的最长聚酮^[24]。催化反应见图 7。

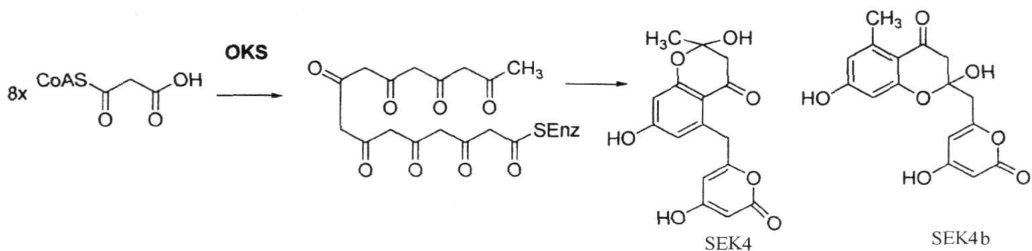


图 7 OKS 催化反应

Fig. 7 Reaction catalyzed by OKS

编码 *A. arborescens* OKS 的 cDNA 所含开放阅读框为 1 212 bp, 编码 403 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 44 568, 与其他植物来源的 CHS 超家族酶比较, 氨基酸序列相似性在 50% ~ 60%。*A. arborescens* OKS 保留了在所有型 PKS 酶中均高度保守的催化活性中心 Cys164、His303、Asn336 与大部分 CHS 活性位点残基 Met137、Gly211、Phe215、Gly216、Phe265 和 Pro375。然而, CHS 活性位点残基 Thr197、Gly256、Ser338 相应地被 Gly、Leu、Val 所替代。

2 催化作用机制

型 PKS 为同二聚物, 蛋白相对分子质量为 $4 \times 10^4 \sim 4.5 \times 10^4$ 。对其结晶构造解析和定点突变研究表明, 这些酶

均具有高度保守的 Cys-His-Asn 催化活性中心, 催化聚酮合成的机制为催化相关的辅酶 A (起始底物) 在活性位点半胱氨酸残基 Cys164 上结合, 经丙二酰辅酶 A 的一系列脱羧缩合, 使得聚酮链延长, 随之酶中间产物的闭环和芳构化, 形成复杂的天然产物(图 8)^[14,19]。

3 酶反应产物

型 PKS 的酶反应一般生成 3 种类型的产物: (1) 完全反应得到的酶反应产物; (2) 经过 3 个缩合反应但不形成芳香环的 CTAL 类型的吡喃酮旁支产物^[4]; (3) 经过两个缩合反应后得到的 BNY 类型的吡喃酮旁支产物^[3]。后两者为酶反应的副产物(图 9)^[26]。

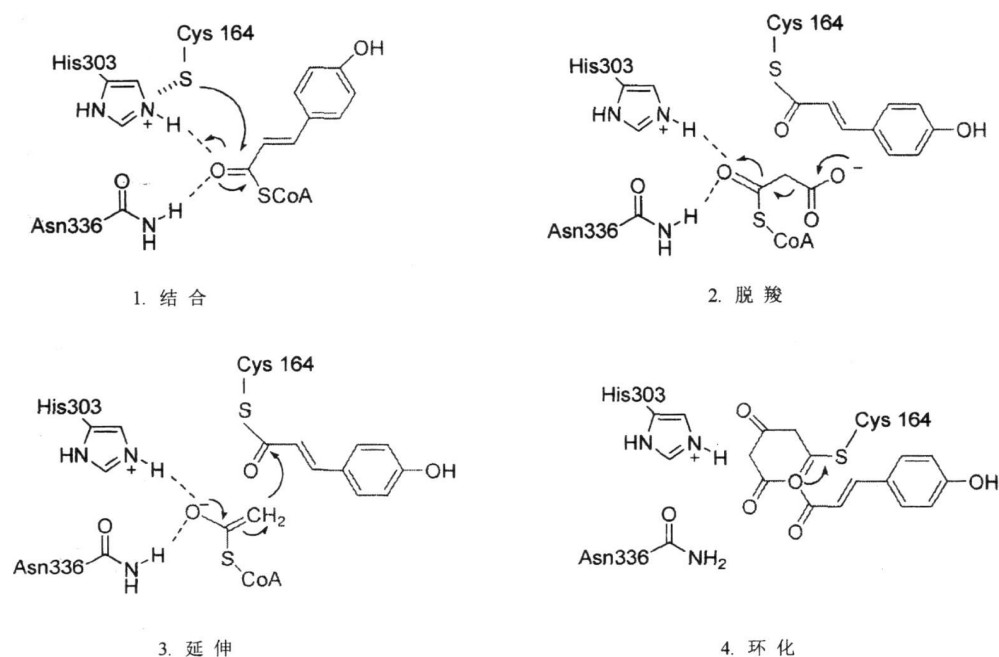


图 8 型 PKS 的催化作用机制

Fig. 8 Catalytic mechanism of type PKS

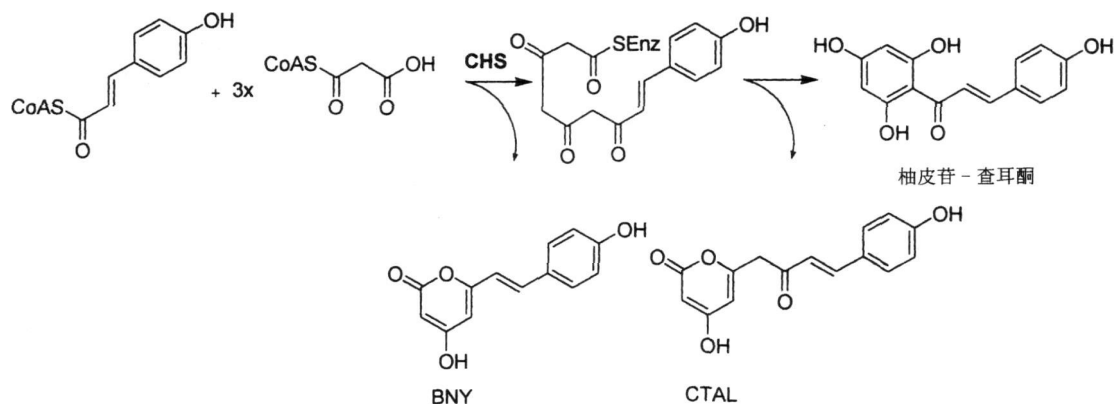


图 9 型 PKS 的酶反应产物

Fig. 9 Enzyme reaction products of type PKS

型 PKS 的功能多样化源于起始底物的选择、聚酮链延伸数目、环化反应的不同。同时，型 PKS 有广泛的底物适用性，可接受许多芳香族和脂肪辅酶 A 内酯作为底物，得到一系列化学和结构均不同的非天然聚酮^[23, 24]。

4 三维结构

型 PKS 具有高度保守的催化活性中心 (Cys164-His303-Asn336)。位于活性中心腔内的活性氨基酸残基有 Thr197、Phe215、Gly256、Ser338。这些氨基酸残基通过调控腔内的空间大小决定了起始底物的选择性和聚酮链的长度^[23]。

Phe215 位于活性位点腔与 CoA 结合通道之间，利于丙二酰辅酶 A 脱羧，以及一系列缩合反应中适合的底物和中间产物的进入^[26, 27]。

Thr197 协同 Gly256、Ser338，在调控起始底物的选择性和产物的特异性中发挥至关重要的作用。Thr197 的立体空

间大小决定聚酮链的长度。紫苜蓿 *Medicago sativa* CHS 的晶体结构中，Thr197 位于一延伸至活性位点腔底部的包埋口袋的入口处。体积较大的 Gly256 通过构建活性位点腔来调控起始底物的选择性^[23]。

活性位点腔的形状和体积决定底物的选择性和产物的链长^[14]。不同功能的型 PKS，其活性位点氨基酸残基略有不同，导致活性位点结构也略有不同。活性位点结构微小的不同，足以戏剧性地产生不同的产物^[28]。

5 展望

在型 PKS 的作用下，催化生成具有重要药理活性的植物聚酮，能从根本上解决药源问题，并应用于新药的开发。

参考文献:

- [1] Simpson T. Polyketide biosynthesis [J]. *J Chem Ind*, 1995, 11: 407-411.

- [2] Staunton J, Weissman K. Polyketide biosynthesis: a millennium review [J]. *J Nat Prod Rep*, 2001, 18: 380-416.
- [3] Hopwood D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases [J]. *Chem Rev*, 1997, 97: 2465-2497.
- [4] Staunton J, Wilkinson B. The biosynthesis of aliphatic polyketides [J]. *Top Curr Chem*, 1998, 195: 49-92.
- [5] Funo N, Ohnishi Y, Fujii I, *et al*. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms [J]. *Nature*, 1999, 400: 897-899.
- [6] Shen B. Biosynthesis of aromatic polyketides [J]. *Top Curr Chem*, 2000, 209: 1-51.
- [7] Jez J M, Bowman M E, Dixon R A, *et al*. Structure and mechanism of chalcone isomerase: an evolutionarily unique enzyme in plants [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 786-791.
- [8] Austin M B, Noel J P. The chalcone synthase superfamily of type polyketide synthases [J]. *Nat Prod Rep*, 2003, 20: 79-110.
- [9] Pieper R, Luo G, Cane D E, *et al*. Cell-free synthesis of polyketides by recombinant erythromycin polyketide synthases [J]. *Nature*, 1995, 378: 263-266.
- [10] McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood D A, *et al*. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits [J]. *Nature*, 1995, 375: 549-554.
- [11] Gokhale R S, Tsuji S Y, Cane D E, *et al*. Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases [J]. *Science*, 1999, 284: 482-485.
- [12] Pfeifer B A, Admiraal S J, Gramajo H, *et al*. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli* [J]. *Science*, 2001, 291: 1790-1792.
- [13] Cane D E, Walsh C T, Khosla C. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations [J]. *Science*, 1998, 282: 63-68.
- [14] Jez J M, Austin M B, Ferrer J, *et al*. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases [J]. *Chem Biol*, 2000, 7: 919.
- [15] Schroder G, Brown J W, Schroder J. Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase [J]. *Eur J Biochem*, 1988, 172: 161-169.
- [16] Schoppner A, Kindl H. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut [J]. *J Biol Chem*, 1984, 259(11): 6806-6811.
- [17] Schanz S, Schroder G, Schroder J. Stilbene synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*) [J]. *FEBS Lett*, 1992, 313: 71-74.
- [18] Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, *et al*. Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 47-60.
- [19] Eckermann S, Schroder G, Schmidt J, *et al*. New pathway to polyketides in plants [J]. *Nature*, 1998, 396: 387-390.
- [20] Abe I, Takahashi Y, Morita H, *et al*. Benzalacetone synthase: a novel plant polyketide synthase that plays a crucial role in the biosynthesis of phenylbutanones in *Rheum palmatum* [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 3354-3359.
- [21] Abe I, Utsumi Y, Oguro S, *et al*. The first plant type polyketide synthase catalyzing formation of aromatic heptaketide [J]. *FEBS Lett*, 2004, 562: 171-176.
- [22] Jungmanns K T, Kneusel R E, Baumert A, *et al*. Molecular cloning and recombinant expression of acridone synthase from elicited *Ruta graveolens* L. [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 4: 681-692.
- [23] Abe I, Utsumi Y, Oguro S, *et al*. A plant type polyketide synthase that produces tetraketide chromone [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 1362-1363.
- [24] Abe I, Oguro S, Utsumi Y, *et al*. Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type polyketide synthase [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12709-12716.
- [25] Lukacin R, Springob K, Urbanke C. Native acridone synthases and from *Ruta graveolens* L. form homo-dimers [J]. *FEBS Lett*, 1999, 448(1): 135-140.
- [26] Jez J M, Ferrer J L, Bowman M E, *et al*. STS, stilbene synthase, TLC, thin-layer chromatography [J]. *Biochemistry*, 2000, 39: 890-902.
- [27] Jez J M, Bowman M E, Noel J P. Expanding the biosynthetic repertoire of plant type polyketide synthases by altering starter molecule specificity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5319-5324.
- [28] Austin M B, Bowman M E, Ferrer J L, *et al*. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type polyketide synthases [J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 1179-1194.

青蒿素产量影响因素的研究进展¹

范振涛¹, 马小军^{2*}, 张明庆¹

(1. 首都师范大学资源环境与旅游学院, 北京 100037; 2. 中国医学科学院
中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 青蒿素(artemisinin)是抗疟特效药, 其原料植物黄花蒿 *Artemisia annua* 的生产是亟需解决的问题。从黄花蒿的分布、种质资源, 以及气候因素、土壤条件、人工栽培措施、采集时间、采集方式等方面对影响青蒿素产量的因素研究进行综述。不同地理环境中的青蒿素产量高低存在差异, 气候、种质对其有影响, 而土壤的影响则不显著; 采集方式以及人工栽培措施的改进, 可以提高青蒿素的量。并对今后研究方向予以展望。

关键词: 黄花蒿; 青蒿素; 影响因素

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0313-04

¹ 收稿日期: 2007-04-05

基金项目: 广西壮族自治区科技厅资助项目(桂科攻 0663003)

作者简介: 范振涛(1983—), 男, 北京平谷人, 首都师范大学在读硕士研究生, 主要从事地理学、物候学方面的研究。

E-mail: donalddvan@sina.com

* 通讯作者 马小军 Tel: (010) 62890692 E-mail: xjma@public.bta.net.cn