植物酶催化组合合成黄酮及 4-羟基- δ -内酯类化合物

莫 婷^{a,b,†} 王 娟^{a,b,†} 高博闻^{a,b} 张 乐^{a,b}
 刘 晓^a 王晓晖^a 屠鹏飞^{*,a} 史社坡^{*,a}

(^a 北京中医药大学中药现代研究中心 北京 100029)

(^b 北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘要 以黄酮类化合物生物合成过程中的两个关键酶: 4-香豆酰辅酶 A 连接酶(4-coumarate coenzyme A ligase, 4CL)和查尔酮合成酶(chalcone synthase, CHS)为工具酶, 探讨酶催化组合合成在合成“非天然天然产物”群(库)中的应用. 结果发现在 4CL 和 CHS 的共同作用下, 仅利用 8 个简单的有机酸就可以产生包括 8 个黄酮类似物、16 个 4-羟基- δ -内酯和 1 个苯基丙酮共计 25 个“非天然天然产物”群, 为构建结构多样的小分子化合物群(库)提供方法学参考.

关键词 植物聚酮合成酶; 非天然天然产物; 4-香豆酰辅酶 A 连接酶; 黄酮; 4-羟基- δ -内酯

Combinatorial Synthesis of Flavonoids and 4-Hydroxy- δ -lactones by Plant-Originated Enzymes

Mo, Ting^{a,b,†} Wang, Juan^{a,b,†} Gao, Bowen^{a,b} Zhang, Le^{a,b}
 Liu, Xiao^a Wang, Xiaohui^a Tu, Pengfei^{*,a} Shi, Shepo^{*,a}

(^a Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

(^b School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102)

Abstract 4-Coumarate coenzyme A ligase (4CL) and chalcone synthase (CHS), the two pivotal enzymes involved in the biosynthesis of flavonoids were applied to combinatorially synthesize varied unnatural natural products. As result, 25 unnatural natural products including eight flavonoid analogues, 16 4-hydroxy- δ -lactones and one benzalacetone were synthesized by 4CL and CHS. The synthetic methodology would be useful for the construction of library of structurally diverse of small molecules.

Keywords plant polyketide synthases; unnatural natural products; 4-coumarate coenzyme A ligase; flavonoids; 4-hydroxy- δ -lactones

自然界生物在长期的进化演变过程中, 为了适应环境需要(如实现个体间信号传递、拒食、防紫外损伤等自我防御需要), 会产生结构丰富、活性多样的次生代谢产物, 这些次生代谢产物一直是创新药物发现的重要源泉^[1~3]. 随着生物技术的发展, 生物次生代谢产物的合成与调控成为当前国际研究的热点. 一些与药物生产紧密相关的活性中间体的生物合成调控基因或生物合成途径被阐明, 通过对相关调控基因的人为修饰或者对相

关生物合成途径的异源重构, 可以实现目标产物的定向合成或规模化生产. 这方面比较成功的例子如大环内酯类抗生素、非核糖体多肽类抗生素等的发现与合成^[4~6], 以及植物来源的紫杉醇、青蒿素、吲哚类生物碱等在生物工程菌(或生物工程植株)中的规模化合成^[7~9]. 国内在生物次生代谢产物的生物合成研究方面虽然起步相对较晚, 但目前在结构复杂的抗生素类化合物, 如井冈霉素(validamycin)、南昌霉素(nanchangmycin)、杀念菌

* E-mail: shishepo@163.com, pengfeitu@163.com; Tel.: 010-64286350.

Received September 25, 2014; revised December 25, 2014; published online January 7, 2015.

Project supported by the Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-11-0604), the Beijing Natural Science Foundation (No. 5132022) and the Independent Subject of Beijing University of Chinese Medicine (No. 2014-JYBZZ-XS-091).

教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-11-0604)、北京市自然科学基金(No. 5132022)、北京中医药大学自主选题(No. 2014-JYBZZ-XS-091)资助项目.

† 共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

素(candidicin)、阿 嗉 霉 素(azinomycin)、氯 丝 菌 素(chlorothricin)等的生物合成方面取得了突出成绩^[10~12]. 最近, 国内学者利用组合合成策略, 在抗霉素(antimycin)、苯二酚内酯(benzenediol lactone)类似物的合成方面也取得突破, 合成了一系列结构新颖的类似物^[13,14]. 另一方面, 随着蛋白质研究技术的发展, 很多与次生代谢产物生物合成相关的调节酶被克隆表达并鉴定, 其晶体结构被解析, 结构和功能的关系得以深入研究. 研究证明, 很多酶在体外具有非常广泛的底物选择性, 不仅可以接受生理性底物, 而且还可以接受一系列人工合成的非生理性底物生成结构多样的“非天然的自然产物”(unnatural natural products)^[15,16]. 此外, 酶的催化功能与其结构紧密相关, 人为改变其催化活性中心的一个或者少数几个氨基酸残基, 就有可能改变酶的活性, 生成结构完全不同的产物^[17~19]. 如 Abe 等^[20]基于底物和蛋白质的结构为导向, 成功地合成了一系列结构新颖的生物碱类化合物. 广泛的底物选择性和蛋白结构的可修饰性, 为开展体外的酶催化组合合成提供了基本条件.

黄酮是一类具有 C₆-C₃-C₆ 骨架的酚性化合物, 具有抗癌、抗炎、抗菌、抗病毒、抗血栓、抗骨质疏松和抗动脉粥样硬化等多种生物活性^[21]. 在植物体内, 多酮合成酶家族的查尔酮合成酶(Chalcone synthases, CHS)能以 4-香豆酰辅酶 A 为起始底物, 与 3 分子的丙二酰辅酶 A 进行缩合, 形成链状多酮中间体, 然后经 Claisen 缩合形成 4,2',4',6'-四羟基查尔酮(naringenin chalcone), 4,2',4',6'-四羟基查尔酮在溶液中容易异构环合成二氢黄酮(5,7,4'-trihydroxyflavanone). CHS 体外催化的酶反应, 除了能生成查耳酮外, 还可以生成两个 4-羟基- δ -内酯类化合物 bis-noryangonin (BNY-type lactone)和 *p*-coumaroyl-triacetic acid lactone (CTAL-type lactone)

(Scheme 1)^[16,22,23]. 研究证明 CHS 在体外具有非常广泛的底物选择性, 不仅可以接受 4-香豆酰辅酶 A 为底物, 还可以接受苯甲酰辅酶 A、长链脂肪酰辅酶 A 等为底物^[16], 生成结构多样的“非天然的自然产物”, 这种特点为利用 CHS 为工具酶, 催化合成“非天然的自然产物”群(库)提供了可能性. 然而, CHS 催化的体外酶反应, 底物必须以辅酶 A 硫酯的形式才能够被酶接受, 引发链的增长反应, 这就需要耗费大量的时间去合成、制备能够被 CHS 所接受的底物, 严重影响了 CHS 在合成结构多样的“非天然的自然产物”中的应用. 另一方面, 已有报道在植物体内, 4-香豆酰辅酶 A 连接酶(4-coumarate coenzyme A ligase, 4CL)能够催化 4-香豆酸生成其相应的辅酶 A 硫酯^[24]. 因此, 如果能克隆表达出具有广泛底物选择性的 4CL 及 CHS, 在体外开展酶催化反应, 快速合成出结构多样的“非天然的自然产物”群(库)在理论上具有可行性.

本文成功克隆表达了拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中的 4-香豆酰辅酶 A 连接酶(At4CL)以及千层塔 *Huperzia serrata* 中的查尔酮合成酶(HsPKS1), 并以这两个酶作为工具酶, 初步探讨了体外酶催化法在合成“非天然的自然产物”群(库)中的应用. 在 4CL 和 CHS 的共同作用下, 利用 8 个简单的有机酸合成了包括 8 个黄酮及其类似物、16 个 4-羟基- δ -内酯、1 个苄基丙酮类化合物在内共计 25 个“非天然的自然产物”, 为构建结构多样的“非天然的自然产物”群(库)提供了方法学参考(Scheme 2).

1 结果与讨论

1.1 At4CL 催化的辅酶 A 硫酯的合成与鉴定

4-香豆酰辅酶 A 连接酶(4CL)在植物中存在非常广泛, 文献报道拟南芥中的 4CL 具有较为广泛的底物选择

图式 1 CHS 催化合成黄酮和 4-羟基- δ -内酯类化合物的反应机制
Scheme 1 Proposed mechanism for synthesis of flavonoid and 4-hydroxy- δ -lactones by CHS

图式 2 At4CL 和 HsPKS1 催化合成黄酮类似物及 4-羟基- δ -内酯类化合物
Scheme 2 Flavonoid analogues and 4-hydroxy- δ -lactones synthesized by At4CL and HsPKS1

性, 可以催化多种含有苯丙烯酸结构片段的有机酸与辅酶 A 结合形成硫酯^[24]. 利用 4-香豆酸(*p*-coumaric acid) (1)、肉桂酸(cinnamic acid) (2)、咖啡酸(caffeic acid) (3)、阿魏酸(ferulic acid) (4)和 4-氟肉桂酸(4-Fluoro cinnamic acid) (5)为底物在 At4CL 催化下成功地合成了各自相应的辅酶 A 硫酯. 虽然报道 At4CL 仅可以接受含有苯丙烯酸结构片段的底物, 但有意思的是, 当以 4-羟基苯丙酸[3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid] (6)、反式-3-(3-吡啶)丙烯酸[*trans*-3-(3-pyridyl)acrylic acid] (7)、2-呋喃丙烯酸(2-furanacrylic acid) (8)为底物时, 同样也能被 At4CL 接

受并生成相应的辅酶 A 硫酯.

1.2 HsPKS1 催化的黄酮类化合物与 4-羟基- δ -内酯类化合物的合成与鉴定

已经报道千层塔中的查尔酮合成酶 HsPKS1 可以接受 4-香豆酰辅酶 A 为底物, 生成 BNY 型内酯和 CTAL 型内酯以及查尔酮^[25], 查尔酮在酸性溶液中容易异构化成二氢黄酮^[26]. 实验中以 4-香豆酸为底物, 在 At4CL 和 HsPKS1 的作用下进行酶催化反应, 利用 LCMS-IT-TOF 对酶反应产物进行分析, 通过对产物的 MS、MS/MS 以及 UV 数据和文献报道进行对比^[15,27], 并结合

查尔酮合成酶 HsPKS1 已经报道的功能特点, 酶反应产物鉴定为二氢黄酮 **9a**, 同时伴有少量的 BNY 型内酯 **9b** 和 CTAL 型内酯 **9c**(图 1a), 研究中查尔酮异构化为二氢黄酮的主要原因可能是终止酶反应时加入了 20% HCl, 查尔酮自发环合异构生成二氢黄酮. 当以肉桂酸、咖啡酸和阿魏酸作为底物时, 根据产物的 MS 数据及裂解规律, 并结合 UV 数据和 HsPKS1 催化合成黄酮类化合物的特点, 酶反应产物中同样可以鉴定出二氢黄酮型产物 (**10a**, **11a**, **12a**)、BNY 型内酯(**10b**, **11b**, **12b**)和 CTAL 型内酯(**10c**, **11c**, **12c**)产生(图 1b, 1c, 1d). 有意思的是, 当选用阿魏酸进行反应, 除了生成三种常规类型的产物之外, 还检测到 4-(3-甲氧基-4-羟基苯基)-3-丁烯-2-酮的产生(图 1d), 其结构通过和对照品的 UV、MS 数据进行比较得到确证, 此前从未 HsPKS1 能生成此类产物的报道,

只有从大黄(*Rheum palmatum*)中克隆的苯基丙酮合成酶 (Benzalacetone synthase, BAS)能够催化 4-香豆酸和 1 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成 4-(4-羟基苯基)-3-丁烯-2-酮^[28,29].

当选用 4-羟基苯丙酸和含有氮杂环的反式-3-(3-吡啶)丙烯酸为底物的时候, 同样可以检测到黄酮(**14a**, **15a**)、BNY (**14b**, **15b**)及 CTAL 型内酯(**14c**, **15c**)三种类型产物的产生, 但均以 BNY 型内酯产物为主. 其中, 以 4-羟基苯丙酸为底物时, 黄酮类产物为查尔酮(**14a**)(图 1e); 以含有氮杂环的反式-3-(3-吡啶)丙烯酸为底物时, 黄酮类产物为二氢黄酮(**15a**), 但二氢黄酮和 CTAL 型内酯极少(图 1f). 其中化合物 **14c** 和 **15a** 虽然为新化合物, 但根据 HsPKS1 的催化活性特点, 并结合已知化合物的 MS 及 UV 数据, **14c** 的结构鉴定为 4-hydroxy-6-[4-(4-

图 1 不同底物在 At4CL 和 HsPKS1 酶催化下反应产物 HPLC 图谱

Figure 1 HPLC chromatogram of enzymatic reaction products produced by At4CL and HsPKS1 from varied start substrates

hydroxyphenyl)-2-oxobutyl]-2H-pyran-2-one, **15a** 的结构鉴定为 5,7-dihydroxy-2-(pyridin-3-yl)chroman-4-one. 在化合物 **14c** 的 HRESIMS 图谱中, 给出 $[M-H]^-$ 峰 273.0769, 对应分子式 $C_{15}H_{13}O_5$ (计算值: 273.0763), 在其 MS/MS 图谱中, 可以发现 $[M-H-C_7H_7O]^-$ 峰 m/z 167.0439, $[M-H-C_9H_7O_2]^-$ 峰 m/z 125.0278, 与已知化合物 **9c** 的 MS 数据比较发现二者都出现 $m/z=125$ 的碎片, 不同的是 **14c** 比 **9c** 结构中少了一个双键. 在 UV 图谱中, 化合物 **14c** 的最大吸收出现在 283 nm, 而不像化合物 **9c** 那样在 331 nm 有最大吸收, 进一步证明化合物 **14c** 结构中比化合物 **9c** 少了一个双键. 在化合物 **15a** 的 HRESIMS 图谱中, 给出 $[M-H]^-$ 峰 m/z 256.0621, 对应分子式 $C_{14}H_{11}NO_4$ (计算值: 256.0615), 在其 MS/MS 图谱中, 出现黄酮类化合物典型的 RDA 裂解碎片 $[M-H-C_7H_7N]^-$ 峰 m/z 151.0070. 化合物 **15a** 的 UV 图谱和已知化合物 **9a**, **10a**, **11a** 等黄酮类化合物非常相似, 在 290 nm 出现最大吸收, 说明化合物 **15a** 和 **9a**, **10a**, **11a** 具有类似的母核.

此外, At4CL 与 HsPKS1 还可以接受苯环上含有吸电子基的有机酸如 4-氟-肉桂酸, 含有五元芳杂环的有

机酸如 2-呋喃苯丙烯酸为底物, 生成相应的黄酮(**13a**, **16a**)、BNY 型内酯(**13b**, **16b**)及 CTAL 型内酯(**15c**, **16c**) (图 1g, 1h). 各产物的 UV、MS 数据见表 1. 从图 1 和表 1 中可以看出, 不同底物, 各类型产物的比例不同, 导致这种情况的原因与酶的活性腔的大小、活性腔周围氨基酸的种类及电子云密度、底物空间体积的大小及电子云密度等多种因素有关, 目前尚无法明确其详细机制.

2 结论

通过对 At4CL 与 HsPKS1 催化的 8 个简单有机酸所生成的 25 个产物来看, At4CL 和 HsPKS1 在体外都具有非常广泛的底物选择性, 能够接受结构多样的底物产生数目可观的“非天然天然产物”群. At4CL 不仅对含有苯丙烯酸结构片段的底物有活性, 而且对 4-羟基苯丙酸、2-呋喃丙烯酸、反式-3-(3-吡啶)丙烯酸等这些不含苯丙烯酸结构片段或者含有氮杂原子的底物具有活性, 其催化生成的辅酶 A 硫酯也能被 HsPKS1 接受, 生成相应的产物. 然而, 虽然 At4CL 和 HsPKS1 能接受不同的底物生成数目可观的化合物群, 但由于酶催化底物产生相应产物的机制相同, 使得产物的基本母核非常相似,

表 1 酶反应产物 HPLC-MS 分析数据
Table 1 HPLC-MS data of varied enzymatic products

底物	产物	R_t/min	Area/%	UV $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$[M-H]^- m/z$	MS ⁿ m/z
9	9a	20.98	100.0	238, 289	271.0562	151.0037, 119.0513, 107.0146
	9b	19.07	48.2	243, 363	229.0460	185.0591, 143.0504
	9c	15.90	61.2	244, 331	271.0561	227.0684, 145.0322, 125.0295
10	10a	30.47	100.0	289	255.0660	213.0570, 151.0070, 185.0619
	10b	27.15	59.6	256, 348	213.0578	169.0683, 141.0752
	10c	20.12	85.6	298	255.0667	211.0770, 187.0786, 145.0687
11	11a	18.43	23.4	287	287.0577	151.0084, 107.0169
	11b	16.40	91.8	250, 370	245.0452	201.0582, 159.0481
	11c	13.39	100.0	255, 348	287.0557	243.0667, 161.0286, 125.0276, 133.0333
12	12a	20.89	30.9	288	301.0711	151.0067, 107.0169
	12b	19.16	100.0	249, 369	259.0613	215.0715, 200.0599, 173.0627
	12c	15.98	33.7	253, 345	301.0709	257.0832, 175.0433, 125.0282
13	13a	30.13	76.5	249, 289	273.0578	231.0477, 151.0081, 203.0540
	13b	28.72	87.5	255, 348	231.0472	187.0580, 159.0653
	13c	20.89	100.0	298	273.0578	205.0695, 163.0608
14	14a	21.15	43.8	285	273.0774	167.0381, 123.0486
	14b	16.59	100.0	229, 283	231.0666	125.0278
	14c	14.28	12.9	283	273.0769	167.0439, 125.0278
15	15a	14.04	1.5	290	256.0621	214.0561, 151.0070, 186.0565
	15b	9.65	100.0	210, 248, 346	214.0531	170.0646, 142.0747
	15c	7.88	0.8	210, 290	256.0617	188.0661
16	16a	20.80	43.8	290	245.0429	203.0334, 177.0558, 159.0419, 135.0461
	16b	20.06	100.0	258, 362	203.0331	159.0458, 131.0526
	16c	16.75	52.4	330	245.0436	201.0550, 177.0568, 135.0467

限制了产物结构的多样性. 因此, 如果要构建结构多样的“非天然天然产物”群(库), 应当在酶能接受的前体下, 扩大底物结构的多样性, 增加工具酶的种类, 如可以使用异戊烯基转移酶、糖基转移酶、氧化酶等. 同时利用合适的活性筛选模型进行活性筛选, 对于活性先导化合物的发现将具有重要意义.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

LCMS-IT-TOF (Shimadzu, 日本), ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm) (Agilent, 美国), HPLC (Agilent, 美国), TSK gel column (ODS-100V 5 μ m, 4.6 mm×250 mm) (Shimadzu, 日本) RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant mini kit (Qiagen, 美国), 反转录酶 M-MLV (Promega, 美国), LA DNA Polymerase, 限制性内切酶 BamH I, Xho I, T₄ DNA 连接酶, PMD19-T (Takara, 日本), 凝胶回收试剂盒 Gel/PCR extraction Kit (Biomiga, 中国), Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), 肉桂酸及类似物 **1~8** (Sigma, 中国), 超滤离心管 Centricon Plus-80 (Millipore, Billerica, MA, 美国), 其余试剂均为国产分析纯.

3.2 实验方法

3.2.1 At4CL 与 HsPKS1 基因克隆

分别从拟南芥 *A. thaliana* 和千层塔 *H. serrata* 新鲜嫩叶中提取总 RNA, 用反转录酶 M-MLV 将 mRNA 反转录得到 cDNA, 并以此为模板进行 PCR 扩增. At4CL 正向引物为: 5'-ATGGCGCCACAAGAACAAGCAG-3'; 反向引物为: 5'-TCACAATCCATTTGCTAGTTTTGC-3'. HsPKS1 正向引物为: 5'-ATGACAATCAAGGGATC-AGGGTCAGC-3', 反向引物为 5'-TCAAATGTTGATC-CTTCTCAGCAAAAGTG-3'. PCR 反应体系为: 2.0, 0.3 μ L LA DNA Polymerase, 5 μ L 10×LA buffer, 加 ddH₂O 补至 50 μ L. PCR 反应程序为 98 °C 预变性 1 min; 98 °C, 10 s; 48 °C, 15 s; 72 °C, 2 min 10 s; 35 个循环; 72 °C 保温 6 min. PCR 产物经 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 含有目的基因的条带用 Gel/PCR extraction Kit 凝胶回收试剂盒回收、纯化. PCR 产物连入克隆载体 PMD19-T 中, 挑选阳性克隆送样测序. 测序结果分析表明, At4CL 和 HsPKS1 PCR 产物长度分别为 1686 和 1200 bp, 所得目的基因的氨基酸序列与已报道序列相似度为 100.00%^[25,30].

依据 PET-28a 载体酶切位点分析, 在序列 N-端和 C-端分别引入限制性酶切位点 BamH I 和 Xho I (划线处为酶切位点). At4CL 正向引物序列为: 5'-CGCGGATCC-ATGGCGCCACAAGAACAAGC-3'; 反向引物序列为:

5'-CCGCTCGAGTCACAATCCATTTGCTAGTTTTG-3'. HsPKS1 正向引物为: 5'-CGCGGATCCATGACAATC-AAGGGATCAG-3', 反向引物为: 5'-CCGCTCGAGTC-AATGTTGATACTTCTCAG-3'. PCR 产物和 PET-28a 质粒, 用 T₄ DNA 连接酶连接后, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 用 50 μ g·mL⁻¹ 卡那霉素 LB 固体培养基筛选阳性菌落并提取质粒进行双酶切鉴定和测序.

3.2.2 At4CL 和 HsPKS1 蛋白表达

从 *E. coli* DH5 α 表达菌株中挑选阳性且测序正确的 PET28a-At4CL 和 PET28a-HsPKS1 重组质粒, 分别在 *E. coli* BL21 (DE3) 中诱导表达. 从平板上挑取含重组质粒的 BL21 (DE3) 单菌落于 LB 液体培养基 (含卡那霉素 50 μ g·mL⁻¹), 37 °C 培养至 OD₆₀₀=0.6. 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol·L⁻¹, 继续培养, 23 °C 诱导表达 16 h 左右.

3.2.3 At4CL 和 HsPKS1 蛋白纯化

离心法 (10000 g, 4 °C, 每次 10 min) 收集菌体后重新悬浮于预冷的裂解缓冲液 (40 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄, pH 7.9, 5 mmol·L⁻¹ Imidazole, 100 mmol·L⁻¹ NaCl) 冰浴超声破碎, 4 °C, 10000 g, 离心 40 min, 上清液 0.45 μ m 滤膜滤过, Ni²⁺ 螯合树脂亲和柱纯化, 超滤离心管 Centricon Plus-80 浓缩除盐, SDS-PAGE 检测.

3.2.4 At4CL 催化的辅酶 A 硫酯的合成

根据文献^[31]报道进行优化如下: Tris-HCl 缓冲液 (100 mmol·L⁻¹, pH 7.5), MgCl₂ (62.5 mmol·L⁻¹), 17.25 mg ATP, 16.50 mg 底物酸 **1~8** 和 5.00 mg CoA, 加 500 μ g At4CL 蛋白, 加入 ddH₂O 补至总体积为 50 ml. 加入酶后反应开始, 30 °C 反应 2 h, 补加 17.25 mg ATP, 5.00 mg CoA 和 100~200 μ g At4CL, 继续反应 3 h 后加 4% 的醋酸铵溶液终止反应. 反应液用 0.45 μ m 滤膜滤过, 参照文献^[32]的方法进行纯化.

4-香豆酰辅酶 A (**9**): UV $\lambda_{\max}$: 265, 330 nm; ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ : 0.68 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 1.83 (s, 1H), 2.36~2.41 (m, 2H), 3.03~3.07 (m, 2H), 3.33~3.37 (m, 2H), 3.38~3.41 (m, 2H), 3.48 (dd, *J*=10.0, 6.0 Hz, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.76 (dd, *J*=10.0, 6.0 Hz, 1H), 3.95 (s, 1H), 4.15~4.19 (m, 2H), 4.47~4.49 (m, 1H), 5.97 (d, *J*=6.0 Hz, 1H), 6.52 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.78 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.33 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.36 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.37 (s, 1H).

肉桂酰辅酶 A (**10**): UV $\lambda_{\max}$: 260, 310 nm; ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ : 0.69 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 1.84 (s, 1H), 2.36~2.40 (m, 2H), 3.02~3.08 (m, 2H), 3.32~3.35 (m, 2H), 3.35~3.41 (m, 2H), 3.48 (dd, *J*=10.0, 5.0 Hz, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.77 (dd, *J*=10.0, 5.0 Hz, 1H), 3.96 (s, 1H), 4.14~4.17 (m, 2H), 4.47~4.50 (m, 1H), 5.98 (d, *J*=5.0

Hz, 1H), 6.68 (d, $J=16.0$ Hz), 7.30~7.36 (m, 3H), 7.41 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.43~7.46 (m, 2H, 1H), 7.99 (s, 1H), 8.33 (s, 1H).

咖啡酰辅酶 A (**11**): UV $\lambda_{\max}$: 257, 350 nm; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ : 0.66 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 2.34~2.38 (m, 2H), 2.98~3.07 (m, 2H), 3.31~3.34 (m, 2H), 3.35~3.39 (m, 2H), 3.46 (dd, $J=10.0, 4.5$ Hz, 1H), 3.74 (dd, $J=10.0, 4.5$ Hz, 1H), 3.92 (s, 1H), 4.13~4.16 (m, 2H), 4.43~4.45 (m, 1H), 5.93 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.20 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.37 (s, 1H).

阿魏酰辅酶 A (**12**): UV $\lambda_{\max}$: 260, 350 nm; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ : 0.69 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 1.83 (s, 1H), 2.35~2.41 (m, 2H), 3.01~3.09 (m, 2H), 3.32~3.37 (m, 2H), 3.37~3.42 (m, 2H), 3.48 (dd, $J=10.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.74 (dd, $J=10.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.95 (s, 1H), 4.13~4.17 (m, 2H), 4.45~4.49 (m, 1H), 5.94 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.28 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 8.34 (s, 1H).

氟代苯丙烯酰辅酶 A (**13**): UV $\lambda_{\max}$: 265, 310 nm; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ : 0.69 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 2.34~2.38 (m, 2H), 3.00~3.35 (m, 2H), 3.30~3.34 (m, 2H), 3.35~3.40 (m, 2H), 3.47 (dd, $J=9.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.63 (s, 1H), 3.75 (dd, $J=9.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.94 (s, 1H), 4.13~4.16 (m, 2H), 4.45~4.48 (m, 1H), 5.95 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J=16.5$ Hz, 1H), 6.98~7.03 (m, 2H), 7.34 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 7.40~7.44 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 8.36 (s, 1H).

4-羟基苯丙酰辅酶 A (**14**): UV $\lambda_{\max}$: 258; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ : 0.67 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 1.83 (s, 1H), 2.24~2.28 (m, 2H), 2.72~2.76 (m, 2H), 2.76~2.80 (m, 2H), 2.83~2.87 (m, 2H), 3.15~3.19 (m, 2H), 3.30~3.35 (m, 2H), 3.47 (dd, $J=10.0, 5.5$ Hz, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.75 (dd, $J=10.0, 5.0$ Hz, 1H), 3.94 (s, 1H), 4.13~4.16 (m, 2H), 4.48~4.50 (m, 1H), 6.05 (d, $J=6.5$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 8.13 (s, 1H), 8.44 (s, 1H).

反式-3-(3-吡啶)丙烯酰辅酶 A (**15**): UV $\lambda_{\max}$: 262, 299 nm; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ : 0.68 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 1.83 (s, 1H), 2.26 (s, 1H), 2.32~2.38 (m, 2H), 3.01~3.06 (m, 2H), 3.26~3.33 (m, 2H), 3.34~3.38 (m, 2H), 3.47 (dd, $J=9.5, 4.5$ Hz, 1H), 3.75 (dd, $J=9.5, 4.5$ Hz, 1H), 3.95 (s, 1H), 4.10~4.16 (m, 2H), 4.43~4.48 (m,

1H), 5.98 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.38 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.39 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H).

2-呋喃丙烯酰辅酶 A (**16**): UV $\lambda_{\max}$: 260, 335 nm; ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ : 0.66 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 2.31~2.35 (m, 2H), 2.95~3.00 (m, 2H), 3.26~3.30 (m, 2H), 3.32~3.36 (m, 2H), 3.46 (dd, $J=9.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.73 (dd, $J=9.5, 5.0$ Hz, 1H), 3.92 (s, 1H), 4.11~4.14 (m, 2H), 4.45~4.48 (m, 1H), 6.00 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.71 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.40 (s, 1H).

3.2.5 HsPKS1 催化的黄酮类化合物与 4-羟基- δ -内酯类化合物的合成

反应体系如下: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoA 硫酯 **9~16**, 20 μg HsPKS1, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙二酰辅酶 A, 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液(pH 7.0), 调至终体积为 300 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜, 20 μL 20% HCl 终止反应, 乙酸乙酯萃取, 真空浓缩至干后 50 μL 甲醇溶解, LCMS-IT-TOF 分析. 液相条件为: ZORBAX SB-C₁₈ HPLC 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm); 流动相: 甲醇和水(含 0.1%甲酸)梯度洗脱, 0~5 min, 30%甲醇; 5~17 min, 30%~60% 甲醇; 17~25 min, 60%甲醇; 25~27 min, 60%~70%甲醇; 27~35 min, 70%甲醇; 35~40 min, 70%~100% 甲醇; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 280 nm.

辅助材料(Supporting Information) 辅酶 A 硫酯 **9~16** 的 ^1H NMR 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Dixon, R. A. *Nature* **2001**, *411*, 843.
- [2] Newman, D. J.; Gragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461.
- [3] Newman, D. J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589.
- [4] Rawlings, B. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 190.
- [5] Rawlings, B. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 231.
- [6] Kohli, R. M.; Walsh, C. T.; Burkart, M. D. *Nature* **2002**, *418*, 658.
- [7] Arjikumar, P. K.; Xiao, W. H.; Tyo, K. E. J.; Wang, Y.; Simeon, F.; Leonard, E.; Mucha, O.; PHon, T. H.; Pfeifer, B.; Stephanopoulos, G. *Science* **2010**, *330*, 70.
- [8] Ro, D. K.; Paradise, E. M. P.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; Chang, M. C.; Withers, S. T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J. D. *Nature* **2006**, *440*, 940.
- [9] Runguphan, W.; Qu, X. D.; O'Connor, S. E. *Nature* **2010**, *468*.
- [10] Deng, Z. X.; Bai, L. Q. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 811.
- [11] Zhao, Q.; He, Q.; Ding, W.; Tang, M.; Kang, Q.; Yu, Y.; Deng, W.; Zhang, Q.; Fang, J.; Tang, G.-L.; Liu, W. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 693.
- [12] Jia, X. Y.; Tian, Z. H.; Shao, L.; Qu, X. D.; Zhao, Q. F.; Tang, J.

- Tang, G. L.; Liu, W. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 575.
- [13] Yan, Y.; Chen, J.; Zhang, L.; Zheng, Q.; Han, Y.; Zhang, H.; Zhang, D.; Awakawa, T.; Abe, I.; Liu, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 12308.
- [14] Xu, Y.; Zhou, T.; Zhang, S.; Espinosa-Artiles, P.; Wang, L.; Zhanga, W.; Lin, M.; Gunatilaka, A. A. L.; Zhan, J.; Molnár, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12354.
- [15] Abe, I.; Morita, H.; Nomura, A.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11242.
- [16] Abe, I.; Morita, H. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 809.
- [17] Abe, I.; Oguro, S.; Utsumi, Y.; Morita, H.; Sano, Y.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12709.
- [18] Shi, S. P.; Wanibuchi, K.; Morita, H.; Noguchi, H.; Abe, I. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 551.
- [19] Shi, S. P.; Morita, H.; Noguchi, H.; Abe, I. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2150.
- [20] Morita, H.; Yamashita, M.; Shi, S. P.; Wakimoto, T.; Kondo, S.; Kato, R.; Sugio, S.; Kohno, T.; Abe, I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 13504.
- [21] Nijveldt, R. J.; Van Nood, E. L. S.; Van Hoorn, D. E.; Boelens, P. G.; Van Norren, K.; Van Leeuwen, P. A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 418.
- [22] Zhang, L.; Wang, J.; Li, B.; Gao, B. W.; Wang, X. H.; Shi, S. P.; Tu, P. F. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 2469 (in Chinese). (张乐, 王娟, 有机化学, **2013**, *33*, 2469.)
- [23] Shi, S. P.; Morita, H.; Wanibuchi, K.; Mizuuchi, Y.; Noguchi, H.; Abe, I. *Curr. Org. Synth.* **2008**, *5*, 250.
- [24] Maybelle, K. G.; Jeng, Y. C.; Vivian, W. N. C.; Yan, P. L.; Wen, S. Y. *Biochemistry* **2012**, *51*, 4568.
- [25] Wanibuchi, K.; Zhang, P.; Abe, T.; Morita, H.; Kohno, T.; Chen, G. S.; Noguchi, H.; Abe, I. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1073.
- [26] Morita, H.; Takahashi, Y.; Noguchi, H.; Abe, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *279*, 190.
- [27] Yang, W. Z.; Ye, M.; Qiao, X.; Wang, Q.; Bo, T.; Guo, D. A. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2012**, *18*, 493.
- [28] Shimokawa, Y.; Morita, H.; Abe, I. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 1.
- [29] Morita, H.; Shimokawa, Y.; Tanio, M.; Kato, R.; Noguchi, H.; Sugio, S.; Kohno, T.; Abe, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 669.
- [30] Lee, D.; Ellard, M.; Wanner, L. A.; Davis, K. R.; Douglas, C. J. *Plant Mol. Biol.* **1995**, *28*, 871.
- [31] Costa, M. A.; Bedgar, D. L.; Moinuddin, S. G. A.; Kim, K.-W.; Cardenas, C. L.; Cochrane, F. C.; Shockey, J. M.; Helms, G. L.; Amakura, Y.; Takahashi, H.; Milhollan, J. K.; Davin, L. B.; Browse, J.; Lewis, N. G. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2072.
- [32] Beuerle, T.; Pichersky, E. *Anal. Biochem.* **2002**, *302*, 305.

(Li, L.; Fan, Y.)