

植物聚酮合酶在合成“非天然小分子”中的应用

张乐^{a,#} 王娟^{a,#} 李彬^a 高博闻^a 王晓晖^a
史社坡^{*,a} 屠鹏飞^{*,a,b}

(^a 北京中医药大学 中药现代研究中心 北京 100029)

(^b 北京大学药学院 天然药物及仿生药物国家重点实验室 北京 100191)

摘要 植物聚酮合酶催化起始底物(酰基辅酶A)反复地与丙二酰辅酶A进行缩合,通过C—C键的形成生成链状聚酮中间体,再经 Claisen 环合、Aldol 环合等形式并经芳香化生成结构新颖多样的天然产物及“非天然小分子”。对近年来发现的植物聚酮合酶的功能及来源、催化机制以及在合成“非天然小分子”中的应用进行综述。

关键词 植物聚酮合酶; 非天然小分子; 组合合成; 组合生物合成

Synthesis of Unnatural Small Molecules by Plant Specific Polyketide Synthases

Zhang, Le^{a,#} Wang, Juan^{a,#} Li, Bin^a Gao, Bowen^a Wang, Xiaohui^a
Shi, Shepo^{*,a} Tu, Pengfei^{*,a}

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

(^b State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191)

Abstract Plant polyketide synthases (PKSs) catalyze iterative decarboxylative condensations of malonyl units (Claisen-type C—C bond formation) with a CoA-linked starter molecule to produce linear chain polyketide intermediates. By Claisen, aldol cyclization, or lactonization, and aromatization, the linear chain polyketide intermediates produce varied unnatural small molecules. In this review, the functions of the known plant PKSs are summarized, and the catalytic mechanisms and applications of plant PKSs in the synthesis of unnatural small molecules are covered.

Keywords plant polyketide synthases; unnatural small molecules; combinatorial synthesis; combinatorial biosynthesis

聚酮合酶(Polyketide synthases, PKSs)是生物体中催化合成大环内酯及芳香环类抗生素、聚烯及聚醚类天然产物,还有植物中的间苯三酚、黄酮、蒽醌等多元酚类化合物的一大类酶的统称。根据聚酮合酶蛋白结构及催化机制的不同,聚酮合酶分为 I, II, III 三种类型。I 型聚酮合酶(Type I PKSs)主要来源于微生物中,由多个功能模块(modular)组成,每个模块均包含一套完整的非重复使用的催化功能域(domain),程序性的催化完成聚酮类化合物底物的装载、链的延长修饰、环合及终产物的释放等一系列步骤(Figure 1A),催化合成大环内酯类抗生

素(如红霉素)、聚烯及聚醚类化合物^[1]。II 型聚酮合酶(Type II PKSs)是一个多功能酶复合体,聚酮合成过程中底物的装载、链的延长修饰、环合及终产物的释放在同一套可重复使用的功能结构域中完成(Figure 1B)。II 型聚酮合酶也主要来源于微生物中,主要催化合成芳香环类抗生素(如四环素)类化合物的生物合成^[2]。III 型聚酮合酶(Type III PKSs)结构较 I 和 II 型聚酮合酶简单,不需要酰基载体蛋白(ACP)的参与,整个反应由一个同源蛋白(40~45 kDa)二聚体完成(Figure 1C)。III 型聚酮合酶基因最初是由植物中克隆出来,随后发现 III 型聚酮合

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

Received July 12, 2013; revised August 8, 2013; published online August 21, 2013.

Project supported by the Trans-Century Training Program Foundation for the Talents of Humanities and Social Science by the State Education Commission (No. NCET-11-0604) and the Natural Science Foundation of Beijing (No. 5132022).

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)资助项目。

#并列第一作者(These authors contributed equally to this work).

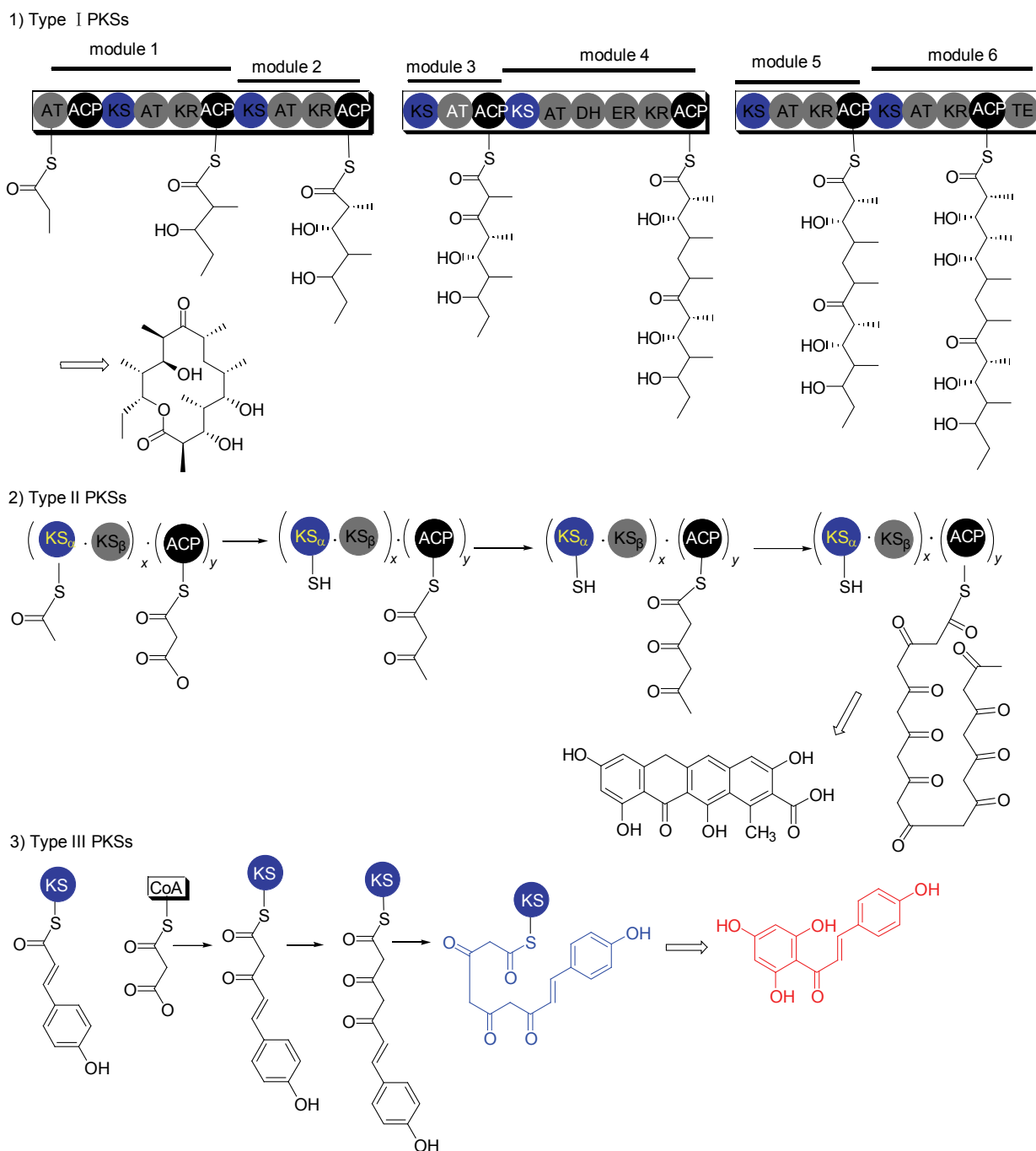


图1 聚酮合酶催化合成聚酮类化合物的机制

Figure 1 Mechanism for synthesis of polyketides by polyketide synthases

酶在植物界广泛分布, 被称为植物特有的聚酮合酶. 由于 III 型聚酮合酶催化 4-羟基肉桂酰辅酶 A 和 3 分子丙二酰辅酶 A 缩合, 生成黄酮类化合物的重要前体查尔酮, 因此 III 型聚酮合酶又称为查尔酮合成酶超家族^[3]. 但近年来, 从某些微生物也相继发现了 III 型聚酮合酶^[4].

植物聚酮合酶在植物体内主要催化合成查尔酮、二苯乙烯、间苯三酚、喹诺酮、吡啶酮、色原酮等^[3]次生代谢产物. 体外酶活性分析发现, 植物聚酮合酶不仅可以接受生理性来源的天然底物, 而且可以接受人工合成

的非天然底物催化合成结构多样的“非天然小分子”. 酶氨基酸残基的微小改变, 就有可能引起酶催化功能的完全改变, 生成结构完全不同的化合物. 因此, 植物聚酮合酶在合成结构新颖多样的“非天然小分子”方面显示出巨大的潜力. 本文在对目前已经报道的植物聚酮合酶的种类、功能及催化机制进行简单介绍的基础上, 重点对植物聚酮合酶在合成“非天然小分子”中的应用进行总结, 并对其在活性先导化合物发现中的应用进行展望.

1 目前已经报道的植物聚酮合酶的名称、来源及功能

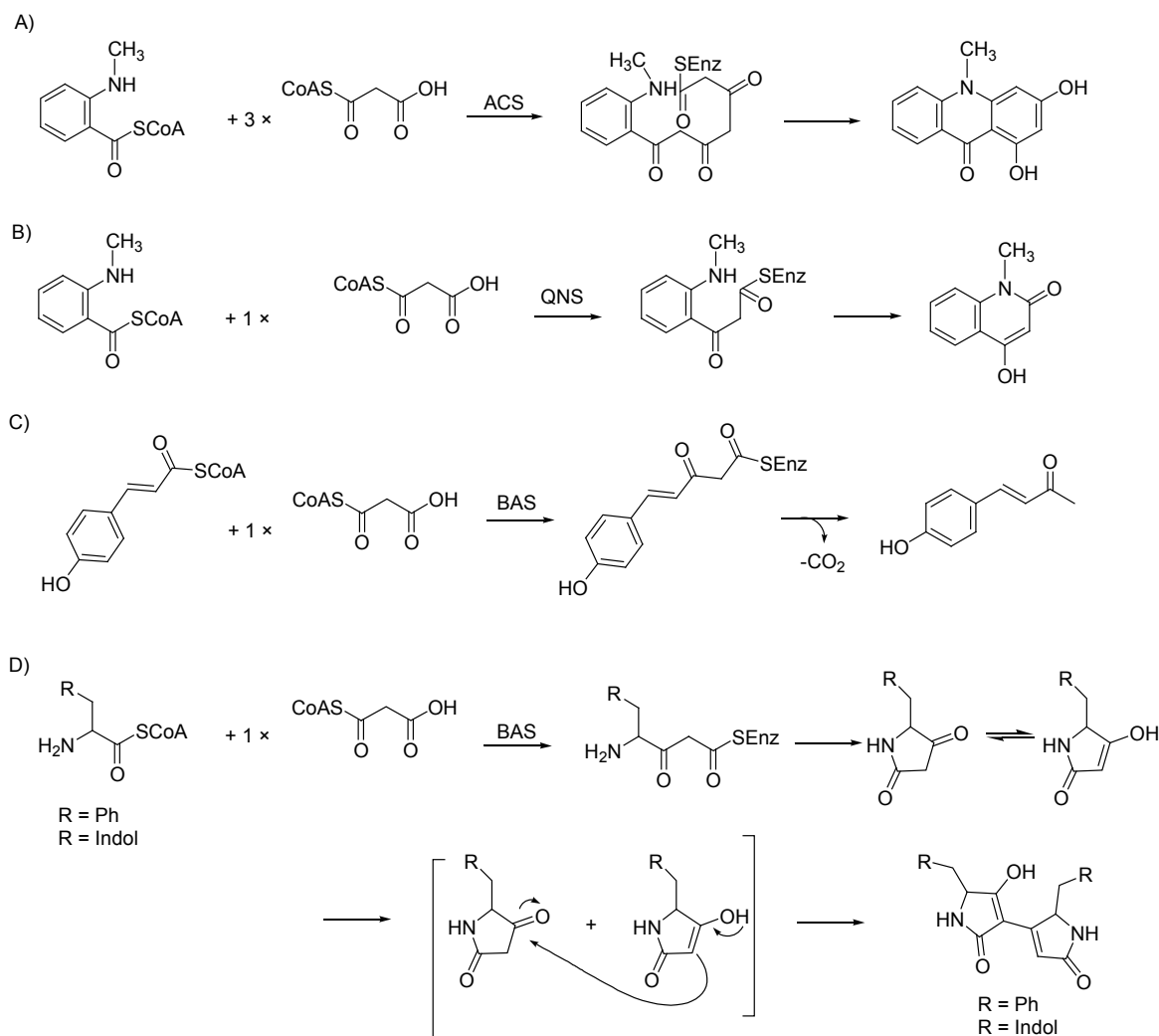
植物聚酮合酶在植物界中广泛分布, 自从 1983 年第一个植物聚酮合酶从西芹(*Petroselinum hortense*)中分离鉴定以来^[5], 目前在 NCBI 中注册的植物聚酮合酶基因已经有 2000 多个. 植物聚酮合酶在氨基酸序列上具有高度的同源性(30%~95%), 根据酶的催化功能, 目前已经鉴定催化功能的植物聚酮合酶有近 20 种.

1.1 吡啶酮合成酶(Acridone synthase, ACS)、喹诺酮合成酶(Quinolone synthase, QNS)及苄基丙酮合成酶(Benzalacetone synthase, BAS)

ACS 是从芸香科植物芸香(*Ruta graveolens*)中克隆表达的植物聚酮合酶, 可以催化 2-*N*-甲基苄甲酰辅酶 A 与 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成吡啶酮类生物碱(Scheme 1A)^[6].

QNS 最近才从芸香科植物木桔(*Aegle marmelos*)中

克隆表达成功^[7]. 在氨基酸序列上其与吡啶酮合成酶显示 79%的同源性, 但在体外酶催化反应中, QNS 虽然也可以接受 2-*N*-甲基苄甲酰辅酶 A 作为起始底物, 但只能催化 2-*N*-甲基苄甲酰辅酶 A 与 1 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成 *N*-甲基-4-羟基喹诺酮(Scheme 1B). 在 QNS 被成功克隆表达之前, 从大黄(*Rheum palmatum*)中克隆表达的 BAS 在体外不仅可以催化 4-羟基肉桂酰辅酶 A 和 1 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 然后脱羧生成苄基丙酮(Scheme 1C), 而且 BAS 具有 QNS 同样的功能, 催化 2-*N*-甲基苄甲酰辅酶 A 合成 *N*-甲基-4-羟基-喹诺酮^[8]. 与其他植物聚酮合酶相比, BAS 催化合成苄基丙酮的过程中没有环合反应发生, 氨基酸序列分析发现其他植物聚酮合酶中普遍存在的苯丙氨酸(Phe215)在 BAS 中被亮氨酸(Leu215)代替, 晶体结构分析发现, 此亮氨酸残基是决定 BAS 催化合成苄基丙酮的关键^[9]. 非常有意思的是, BAS 还可以接受 *D/L*-苯丙氨酸辅酶 A 以及 *D/L*-色氨酸辅酶 A 为底物, 和 1 分子的丙二酰辅酶 A 进行缩



Scheme 1

合, 并发生内酰胺化生成 tetramic acid 衍生物, 进一步自发聚合生成 tetramic acid 衍生物二聚体(Scheme 1D)^[10]. 除了 BAS 外, 从千层塔(*Huperzia serrata*)中克隆、表达的查尔酮合成酶(HsPKS1)也具有合成吡啶酮和喹诺酮的功能^[11].

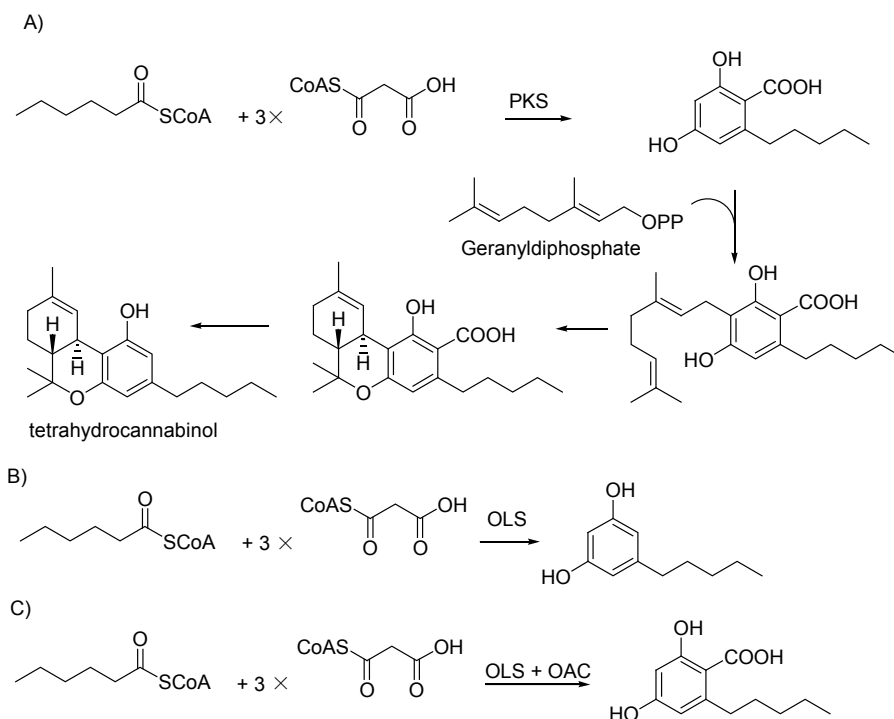
1.2 5-戊基-1,3-二羟基苯合成酶(Olivetol synthases, OLS)及戊基二羟基苯甲酸环合酶(Olivetolic acid cyclase, OAC)

四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol, THC)是大麻植株中含有的具有致幻作用的成分, 其生物合成途径一直是研究关注的热点. 研究推测四氢大麻酚的生物合成与植物聚酮合酶有关, 植物聚酮合酶催化己酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 缩合生成戊基二羟基苯甲酸是四氢大麻酚合成的重要前体, 然后在异戊烯基转移酶及相应的环合酶的作用下, 生成四氢大麻酚酸并经脱羧生成四氢大麻酚(Scheme 2A)^[12]. 但是在对大麻中的植物聚酮合酶进行研究时, 表达出来的植物聚酮合酶——5-戊基-1,3-二羟基苯合成酶(Olivetol synthase, OLS)在体外催化己酰辅酶 A 与 3 分子丙二酰辅酶 A 缩合, 生成 5-戊基-1,3-二羟基苯(Scheme 2B), 而非戊基二羟基苯甲酸^[13]. Page 等推测 OLS 不能催化合成戊基二羟基苯甲酸的原因有可能是其缺少有关的辅助蛋白(如多酮环合酶)引起的. 为此, Page 等^[14]对大麻雌花腺毛的转录组序列进行分析, 并成功克隆表达了戊基二羟基苯甲酸环合酶(OAC). 体外活性分析发现, 只有在将 OLS 和 OAC 同时作用下, 才

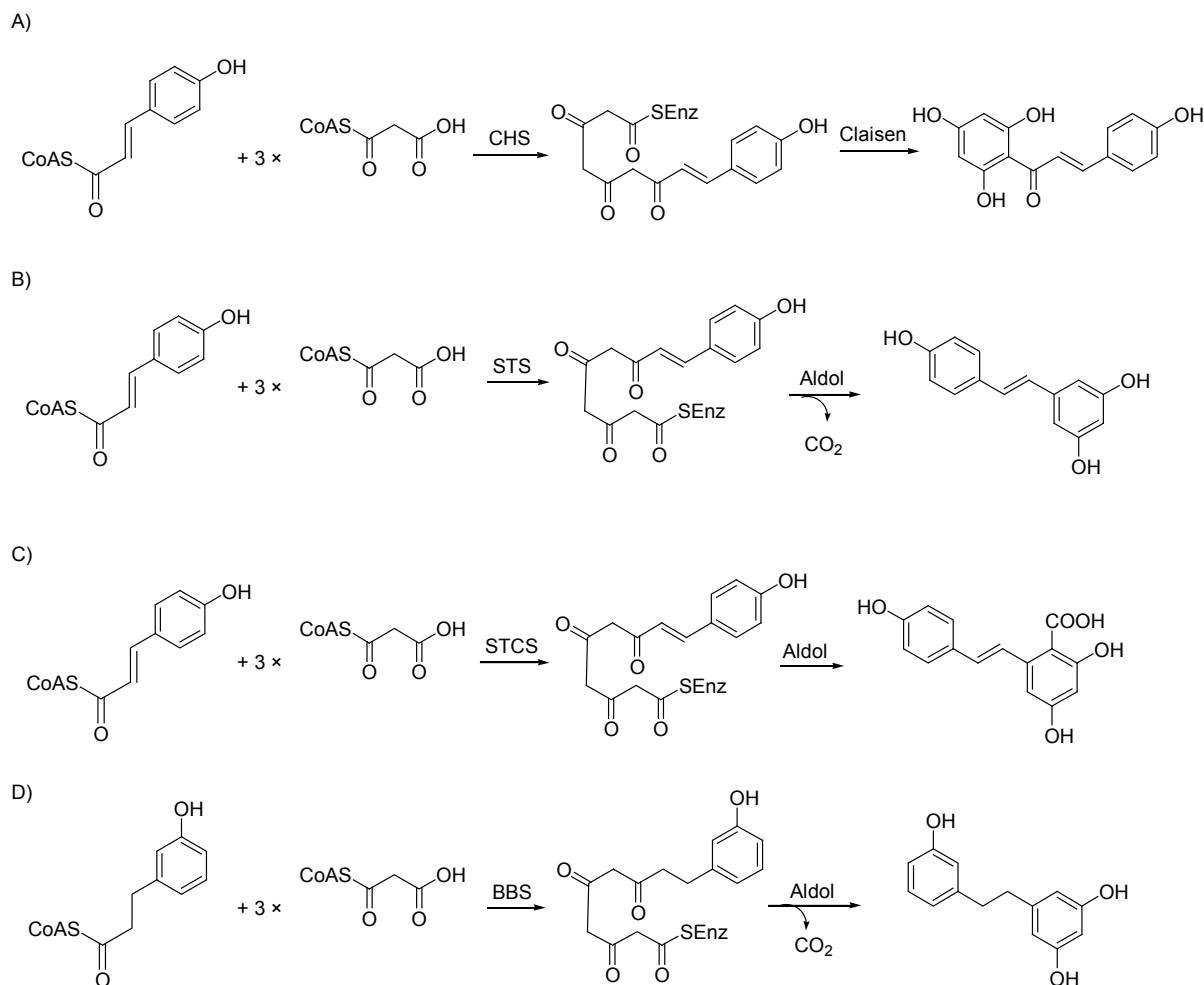
能催化己酰辅酶 A 与 3 分子丙二酰辅酶 A 缩合生成戊基二羟基苯甲酸(Scheme 2C). OAC 的克隆表达与鉴定成功地解决了有关四氢大麻酚生物合成途径中中间体戊基二羟基苯甲酸的来源问题, 并提示植物多酮环合酶在催化合成结构多样的植物多酚类化合物中可能具有非常重要的作用.

1.3 查尔酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)、二苯乙烯合成酶(stilbene synthase, STS)、羧酸二苯乙烯合成酶(Stilbenecarboxylate synthase, STCS)及联苯合成酶(bibenzyl synthase, BBS)

CHS 在植物中广泛存在, 如矮牵牛(*Petunia hybrid*)、黄芩(*Scutellaria baicalensis*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)等^[15]. CHS 催化肉桂酰辅酶 A 和 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 经 Claisen 环合生成柚皮素查尔酮(naringenin chalcone) (Scheme 3A). STS 在赤松(*Pinus sylvestris*)、花生(*Arachis hypogaea*)、葡萄(*Vitis vinifera*)等植物中均有存在, 催化对羟基肉桂酰辅酶 A 和 3 分子丙二酰辅酶 A 进行缩合并发生 Aldol 环合, 生成白藜芦醇^[16]. 白藜芦醇在植物抗病虫害中具有重要作用, 同时具有显著的抗氧化、抗肿瘤活性^[17]. 有意思的是, CHS 和 STS 虽然均可以接受肉桂酰辅酶 A 作为底物, 并催化其和 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 但由于最终的环合方式不同, 生成的产物完全不同(Schemes 3A~3B). 氨基酸序列比对分析发现, CHS 和 STS 具有高度同源性, 并且催化活性中心关键的氨基酸残基相同, 但对赤松中



Scheme 2



Scheme 3

克隆表达的 STS 的晶体结构进行分析发现, 一个被称之为“Aldol-switch”的氢键网络对直链型多酮中间体的环合方式起主要作用. 在 CHS 的结构中, 由于没有“Aldol-switch”, 发生 Claisen 环合, 而在 STS 的结构中, 在“Aldol-switch”的作用下, 发生 Aldol 环合^[18].

STCS 是从虎耳草科植物绣球花 (*Hydrangea macrophylla*) 中克隆、表达而来, 其不能接受肉桂酰辅酶 A 为底物, 但却能够催化对羟基肉桂酰辅酶 A 和 3 分子丙二酰辅酶 A 缩合生成羧酸二苯乙烯 (Scheme 3C)^[19]. 有关该酶的晶体结构及其催化机制, 目前尚无详细报道. BBS 是从蝴蝶兰 (*phalaenopsisishybride*) 中克隆、表达出来, 催化 3-羟基苯丙酰辅酶 A 和 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成联苄类化合物 (Scheme 3D)^[20].

1.4 八聚酮合酶 (Octaketide synthase, OKS)、五聚酮合酶 (Pentaketide synthase, PCS) 及芦荟松合成酶 (Aloesone synthase, ALS)

OKS, PCS 和 ALS 都是从木立芦荟 (*Aloe arborescens*) 中克隆、表达的植物聚酮合酶. OKS 催化 8 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成两个八聚酮 SEK4 和 SEK4b, 这

两个化合物是目前野生型植物聚酮合酶所能催化合成的最长链的多酚类化合物 (Scheme 4A)^[21], 以前曾有报道, 只有 II 型聚酮合酶才可以催化合成这两个化合物. PCS 催化 5 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成色酮类化合物 (Scheme 4B)^[22]. ALS 催化 7 分子丙二酰辅酶 A 缩合生成芦荟松 (Aloesone) (Scheme 4C)^[23].

1.5 姜黄素合成酶 (Curcumin synthase, CURS) 和类姜黄素合成酶 (Curcuminoid synthase, CUS)

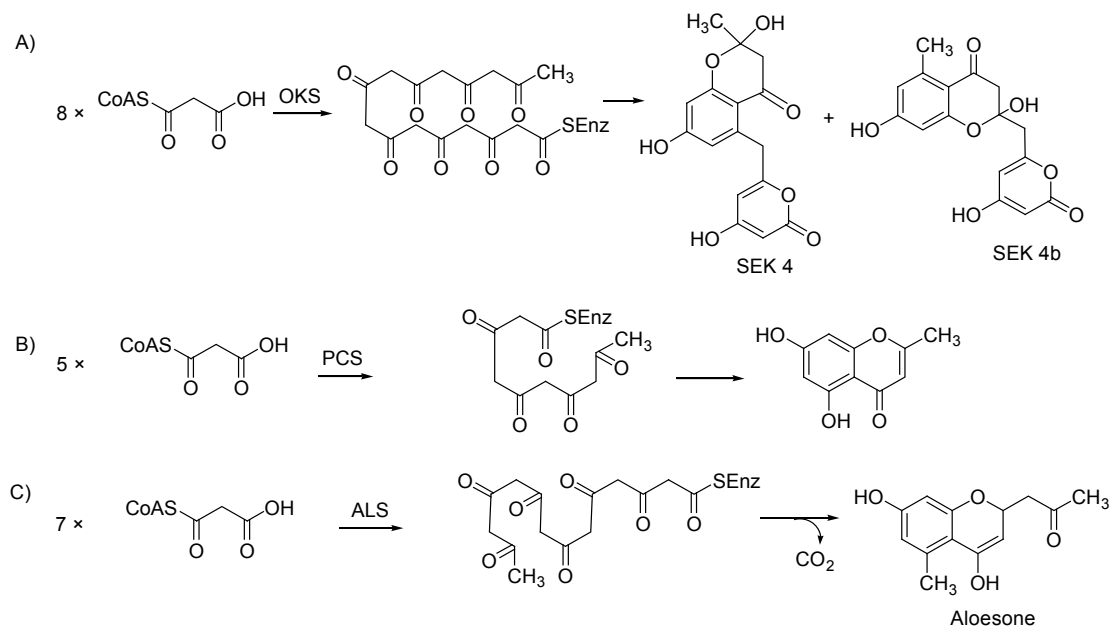
姜黄素是姜黄及姜中的主要活性成分, 具有显著的抗肿瘤和抗氧化作用^[24]. 其生物合成途径是由姜黄素合成酶 (Curcumin synthase, CURS) 和一个二聚酮合酶 (diketide-CoA synthase, DCS) 共同催化合成. 首先, 在 DCS 的催化作用下阿魏酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 脱羧形成 diketide-CoA, 产生的 diketide-CoA 又与阿魏酰辅酶 A 在 CURS 的催化作用下生成姜黄素 (Scheme 5)^[25].

目前从姜黄中克隆、表达的姜黄素合成酶还有 CURS2, CURS3, 这两个酶对底物的选择性有所差别, CURS2 比较优先接受阿魏酰辅酶 A 作为起始底物, 而对于 CURS3 而言, 阿魏酰辅酶 A 和 4-羟基肉桂酰辅酶 A

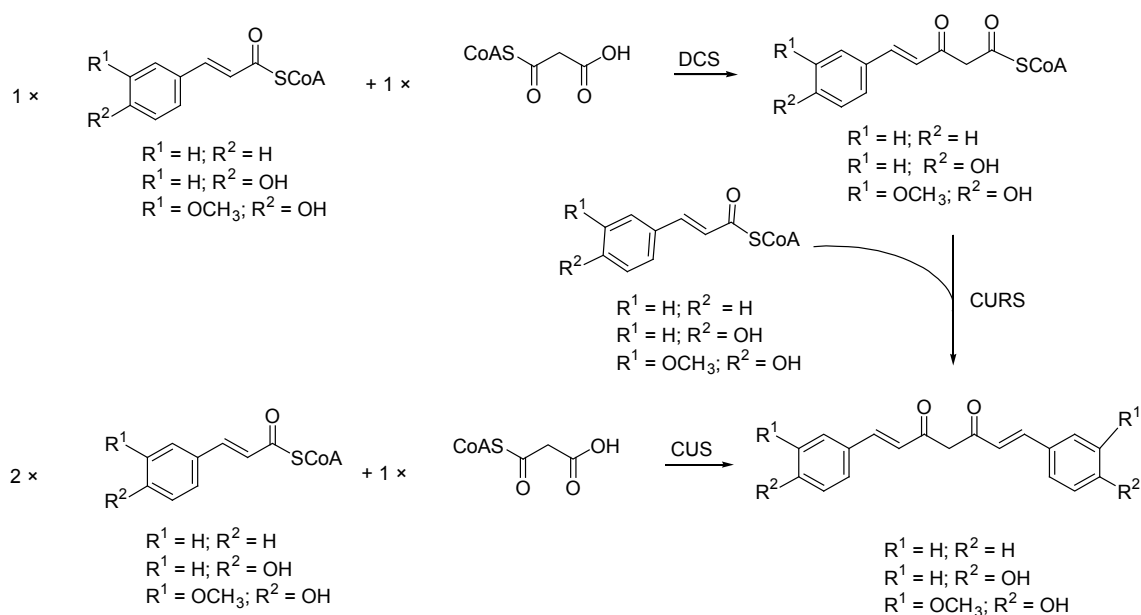
A 均可很好的被其接受^[26], 这也有可能是引起姜黄中姜黄素类成分结构多样及含量不同的主要原因。有意思的是, 从粳稻(*Oryza sativa*)中分离的类姜黄素合成酶(Curcuminoid synthase, CUS)可以直接催化 2 分子肉桂酰辅酶 A 与 1 分子丙二酰辅酶 A 反应生成姜黄素类成分 dicinnamoylmethane, 同时具有 CURS 和 DCS 的双重功能, 除了可以利用肉桂酰辅酶 A 作为起始底物之外, CUS 还可以接受 4-羟基肉桂酰辅酶 A 和阿魏酰辅酶 A 作为起始底物, 生成 bisdemethoxycurmin 和 curcumin, 但 4-羟基肉桂酰辅酶 A 是 CUS 最为容易接受的底物(Scheme 5)^[27]。

1.6 二苯甲酮合成酶(benzophenone synthase, BPS)和联苯合成酶(biphenyl synthase, BIS)

BPS 是从金丝桃(*Hypericum androsaemum*)及山竹(*Garcinia mangostana*)中克隆、表达出来的催化苯甲酰辅酶 A 和 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成二苯基甲酮(Scheme 6A)^[28], 二苯甲酮是口山酮类成分的重要合成前体。用酵母提取物处理后的花楸(*Sorbus aucuparia*)组织细胞中检测到一个植物聚酮合酶, 它催化苯甲酰辅酶 A 和 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成联苯类化合物(Scheme 6B), 被称之为联苯合成酶 BIS。BIS 和 BPS 都可以催化苯甲酰辅酶 A 和 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合,

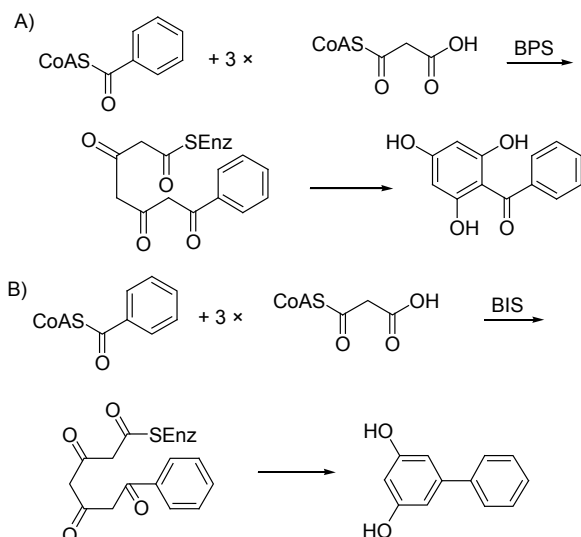


Scheme 4



Scheme 5

像 CHS 和 STS 一样, 由于所生成的链状多酮中间体的环合方式不一样, BIS 和 BPS 所催化合成的产物也不一样. BIS 除接受苯甲酰辅酶 A 作为底物之外, 还可以接受 2-羟基苯甲酰辅酶 A、3-羟基苯甲酰辅酶 A 为底物生成联苯类成分, 但 BIS 却很难接受 4-羟基辅酶 A、咖啡酰辅酶 A、4-羟基肉桂酰辅酶 A^[29].



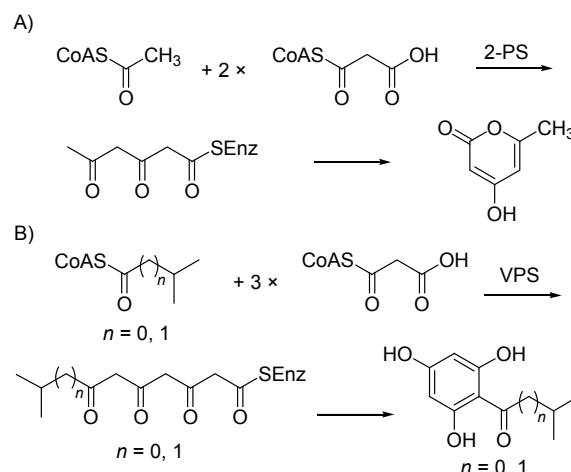
Scheme 6

1.7 2-吡喃酮合成酶(2-pyrone synthase, 2PS)和苯戊酮合成酶(valerophenone synthase, VPS)

2-PS 是从观赏雏菊(*Gerbera hybrida*)中克隆、表达, 催化乙酰辅酶 A 作为起始底物, 催化乙酰辅酶 A 与 2 分子丙二酰辅酶 A 进行缩合并经内酯化生成 6-甲基-4-羟基-2-吡喃酮(Scheme 7A), 2-PS 不能利用 4-羟基肉桂酰辅酶 A, 但可以利用苯甲酰辅酶 A 生成 6-苯基-4-羟基-2-吡喃酮^[30]. VPS 从啤酒花(*Humulus lupulus*, hops)中克隆、表达, VPS 以脂肪酰辅酶 A——异戊酰基或异丁酰基辅酶 A 为起始底物, 和 3 分子丙二酰辅酶 A 缩合生成 Phlorisovalerophenone 或 Phlorisobutyrophenon (Scheme 7B)^[31].

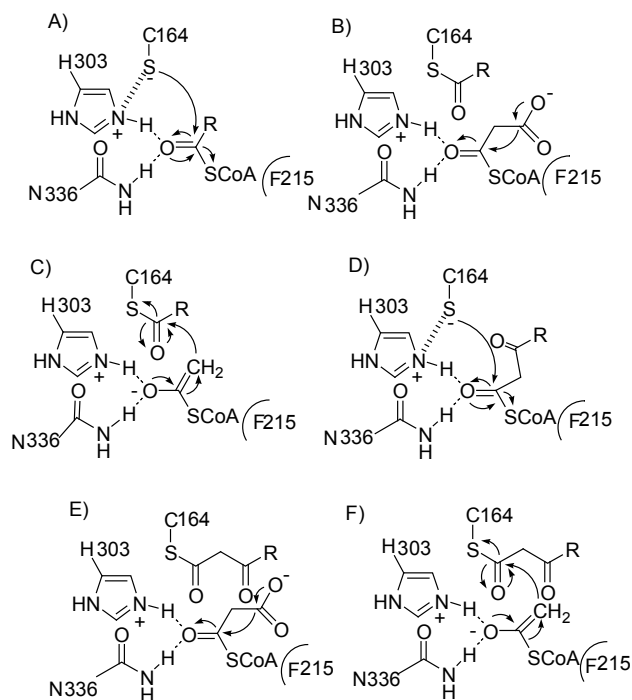
2 植物聚酮合酶的催化机制

1999 年, Novel 等^[32]首次报道了从紫苜蓿(*Medicago sativa*)中克隆、表达的聚酮合酶的晶体结构, 为深入探讨 III 型聚酮合酶的催化机制奠定了基础, 后又经过一系列的定点突变实验, 发现位于催化活性中心的半胱氨酸-组氨酸-天冬酰胺(Cys164-His303-Asn336)三联体结构决定着底物的结合、链的延伸、环化等关键步骤, 而位于 Cys-His-Asn 活性中心周围的氨基酸残基 Thr197, Phe215, Gly256 和 Ser338 也对酶的催化功能起重要的作用, 这些氨基酸残基可以通过调控催化活性腔的空间大小决定起始底物的选择性和聚酮链的延伸长度.



Scheme 7

植物聚酮合酶催化合成酚性化合物的步骤主要包括以下几步: 1)作为起始底物的酰基辅酶 A 进入聚酮合酶的催化活性中心, 在 His303 和 Asn336 的参与下, 酰基辅酶 A 与 Cys164 的巯基之间发生亲核取代反应, 酰基辅酶 A 脱去 CoA 并被转移至 Cys164, 形成起始底物-酶复合物(Scheme 8A); 2)作为链增长单位的丙二酰辅酶 A 进入聚酮合酶的催化活性中心, 与 His303 和 Asn336 形成稳定的氢键并发生脱羧反应形成亲核中间体(Scheme 8B~8C); 3)由丙二酰辅酶 A 生成的亲核中间体进攻 Cys164 上起始底物的羰基, 使起始底物与 Cys164 解离形成链长增加两个碳单位的二聚酰辅酶 A 中间体(Scheme 8D); 4)二聚酰辅酶 A 中间体重复步骤 1, 将链



Scheme 8

状二聚酮转移到 Cys164 上, 生成二聚酮-酶复合物 (Scheme 8E); 5) 重复上述步骤 2~4, 即可完成链长增加两个碳单位的链延长反应. 参与链延长的丙二酰辅酶 A 的分子数, 是由酶和底物的结构决定的; 6) 当完成链的增长反应之后, 在酶的作用下, 链状多聚酮经特定的方式环合并经酮式和烯醇式转化(芳香化)生成最终产物. 其中环合的方式可以通过 Claisen 环合、Aldol 环合、内酯化环合的方式实现, 如 CHS 和 STS 在催化合成查尔酮和二苯乙烯的反应时, 虽然起始底物和链增长单位相同, 但产物完全不一样.

3 植物聚酮合酶在合成“非天然小分子”中的应用

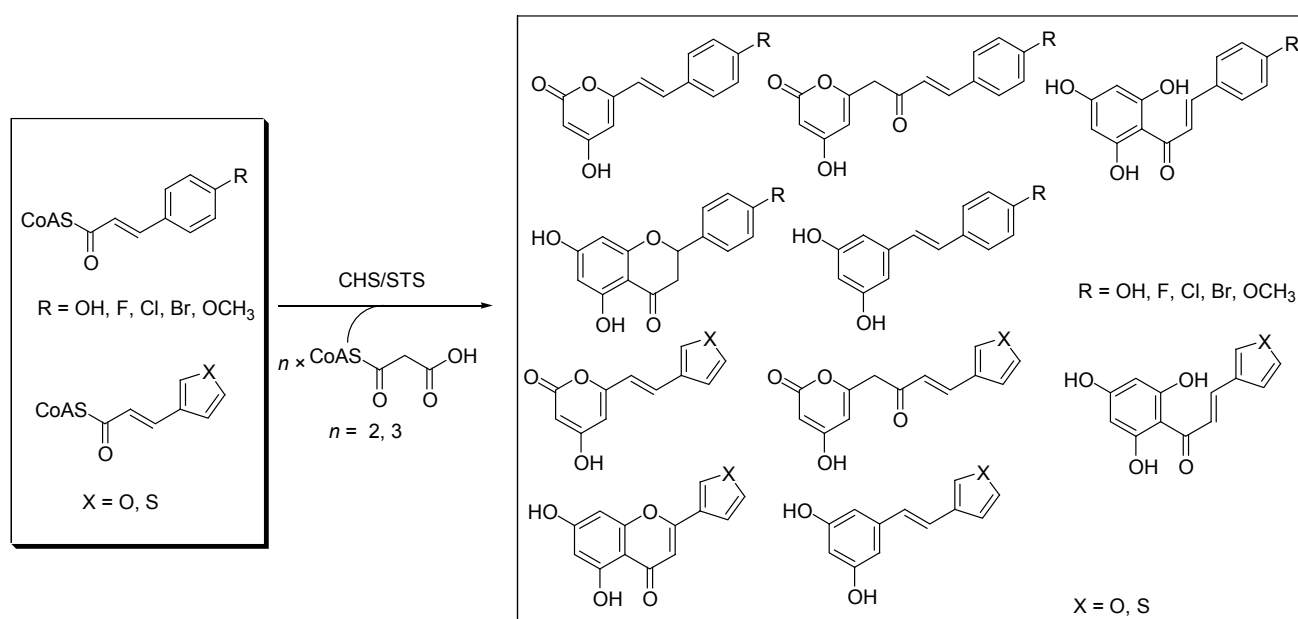
根据植物聚酮合酶催化合成多酚类化合物的机制和特点, 不难看出起始底物、链的增长单位、起始底物与链增长单位缩合的分子数、链状聚酮中间体环合方式等对酶催化产物的结构起决定性作用. 体外酶催化反应

研究证明, 植物聚酮合酶对起始底物的选择性非常宽泛, 不仅可以接受脂肪酰辅酶 A (如己酰辅酶 A、棕榈酰辅酶 A 等), 还可以接受芳香性辅酶 A (如 4-羟基肉桂酰辅酶 A、苯甲酰辅酶 A、阿魏酰辅酶 A 等); 不仅可以接受分子体积较小的起始底物 (如乙酰辅酶 A), 还可以接受分子体积较大的起始底物 (如 2-N-甲基苯甲酰辅酶 A 等); 不仅可以接受天然的生理性起始底物 (如肉桂酰辅酶 A、乙酰辅酶 A 等), 还可以接受人工合成的非天然底物 (如 N-乙酰基半胱胺硫乙酯、N-乙酰基半胱胺硫丙二酯等). 对于链的增长单元, 通常以丙二酰辅酶 A 作为链增长单元的最多, 但还可以以甲基丙二酰辅酶 A 等作为链的增长单元. 起始底物与链增长单元缩合

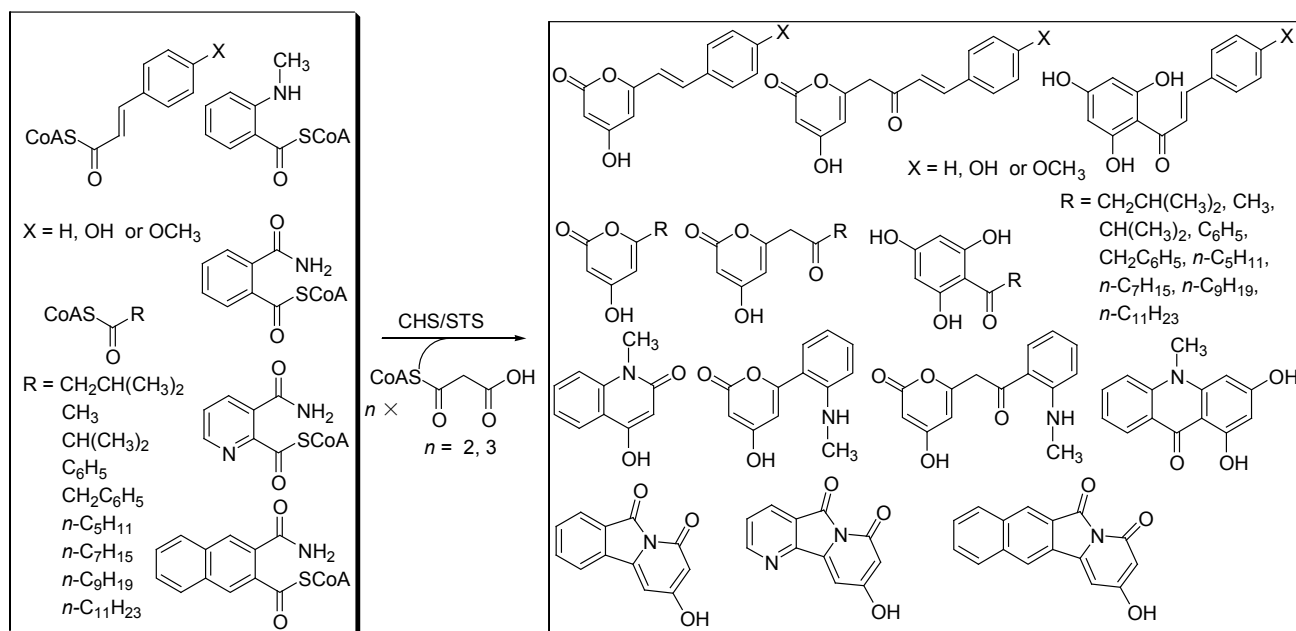
的分子数也根据不同的酶从 1 分子到 10 分子不等; 链状中间体的环合方式可以是 Claisen 环合, 也可以是 Aldol 环合方式或者内酯化环合方式, 甚至不环合等多种形式完成^[33]. 因此充分利用植物聚酮聚合酶催化合成结构新颖多样的小分子, 并结合活性筛选, 对于新型“非天然小分子”的合成及活性小分子的发现将具有非常广阔的应用前景.

3.1 基于底物为导向的“非天然小分子”化合物的合成

在体外条件下, 植物聚酮合酶对底物的选择性是广泛的, 开展以底物为导向酶催化合成, 可以得到数目可观、结构新颖的“非天然小分子”群(库). Abe 等^[34]合成了系列含有卤素原子(F, Cl, Br)、硫原子等非生理底物作为起始底物, 在 *S. baicalensis* CHS 和 *A. hypogaea* STS 的催化下与丙二酰辅酶 A 反应, 结果证明这两个聚酮合酶除了可以接受生理性底物如肉桂酰辅酶 A 作为起始底物外, 还可以接受所合成的非生理性底物, 与丙二酰辅酶 A 发生缩合生成一系列含有卤素原子、硫原子等杂原子的“非天然小分子” (Scheme 9). 千层塔中克隆、表达的聚酮合酶 HsPKS1, 具有非常宽泛的底物选择性, 可以接受肉桂酰辅酶 A、阿魏酰辅酶 A、苯甲酰辅酶 A、脂肪酰辅酶 A 等生成结构类型多样的化合物, 而且可以接受含氮底物如 2-N-甲基苯甲酰辅酶 A、2-氨基酰基苯甲酰辅酶 A、2-氨基酰基吡啶甲酰辅酶 A、2-氨基酰基萘甲酰辅酶 A 等为起始底物生成结构新颖的生物碱 (Scheme 10)^[11,35]. 从贯叶连翘 (*Hypericum perforatum*) 中克隆、表达的聚酮合酶 HpPKS2 可以接受乙酰辅酶 A、异丁酰辅酶 A、苯甲酰辅酶 A、己酰辅酶 A 等与丙二酰



Scheme 9



Scheme 10

辅酶 A 发生缩合生成近 30 个聚酮类化合物(Scheme 11)^[36].

丙二酰辅酶 A 作为链延伸单元, 在植物体内合成多酚类化合物中最为常见, 但在体外, 聚酮合酶也可以接受甲基丙二酰辅酶 A 作为链的延长单元, 生成一系列多甲基的酚性化合物. 如从黄芩(*S. baicalensis*)中克隆表达的 CHS、落花生(*A. hypogaea*)中克隆表达的 STS、大黄(*R. palmatum*)中克隆表达的 BAS 都可以接受 4-羟基肉桂酰辅酶 A、苯甲酰辅酶 A、己酰辅酶 A 等多种起始底物与甲基丙二酰辅酶 A 缩合, 生成多甲基“非天然小分子”(Scheme 12)^[37].

3.2 基于蛋白质结构修饰为导向的“非天然小分子”的合成

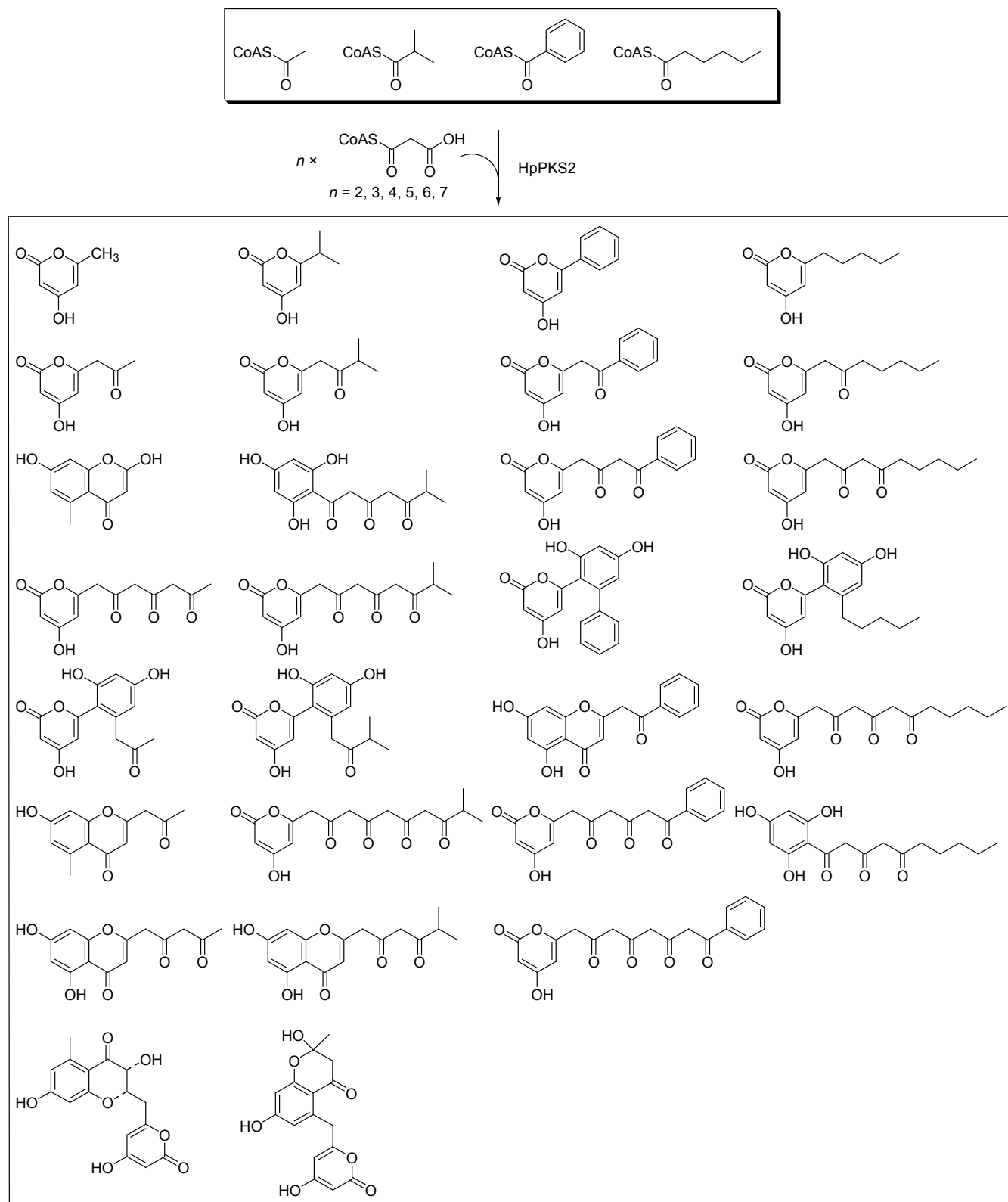
III 型聚酮合酶晶体结构的成功解析, 为基于蛋白质结构修饰的组合合成奠定了基础. 虽然 III 型聚酮合酶的氨基酸序列具有高度同源性, 位于催化活性中心的 Cys-His-Asn 三联体结构具有高度保守性. 但实验证明, 改变催化活性中心周围的个别氨基酸残基, 就有可能彻底改变酶的催化活性. 因此, 通过分析蛋白质晶体结构或者 3D-模拟结构, 对关键位点的氨基酸残基进行突变, 就可能完全改变酶的催化活性, 合成出全新结构骨架的“非天然小分子”.

Abe 研究组^[38]在这方面做了大量的工作, 对从木立芦荟(*A. arborescens*)中克隆、表达的两个聚酮合酶 OKS 和 PCS 的催化活性进行了深入的研究. OKS 催化 8 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成八聚酮 SEK4 和 SEK4b (Scheme 4A), PCS 催化 5 分子的丙二酰辅酶 A 缩合生成

五聚酮(Scheme 4B). 对 PCS 和其突变体 PCS M207G 的晶体结构研究发现, PCS 中, M207 对催化活性中心的大小具有决定性作用, 影响着起始底物链增长的方向及起始底物与链增长单元缩合的分子数. 根据 PCS 的晶体结构, 将 M207 人为突变为 G207, 结果发现 PCS M207G 具有和 OKS 同样的催化活性, 能够催化合成八聚酮 SEK4 和 SEK4b, 在功能上实现了 PCS 向 OKS 的转化. Abe 等^[21,38,39]通过对 OKS 和 PCS 的晶体结构进行分析比较, 发现通过对一些关键位点氨基酸残基进行人为突变, 可以对链增长反应进行有效的控制, 使得丙二酰辅酶 A 的缩合数从 4 分子到 10 分子不等(Scheme 13). 最近, Abe 等^[40]又成功的利用 OKS 的双突变体 OKS F66L/N222G 合成出了十二聚酮 TW95a (Scheme 14A), TW95a 是到目前为止, 利用植物聚酮合酶合成出来的最长链的聚酮类化合物, 只有微生物来源的 II 型聚酮合酶才能够催化合成该化合物. 此外, Abe 研究组还对从千层塔 *H. serrata* 中克隆、表达的聚酮合酶 HsPKS1 的结构进行分析, 成功的构建了 HsPKS1 S348G, 突变重组酶可以接受 2-氨甲酰基苯甲酰辅酶 A 为底物, 催化其和 3 分子的丙二酰辅酶 A 缩合, 生成一个具有 6/7/6 稠环结构的新生物碱(Scheme 14B)^[35].

3.3 基于植物聚酮合酶-底物-后修饰酶为导向的“非天然小分子”的组合合成

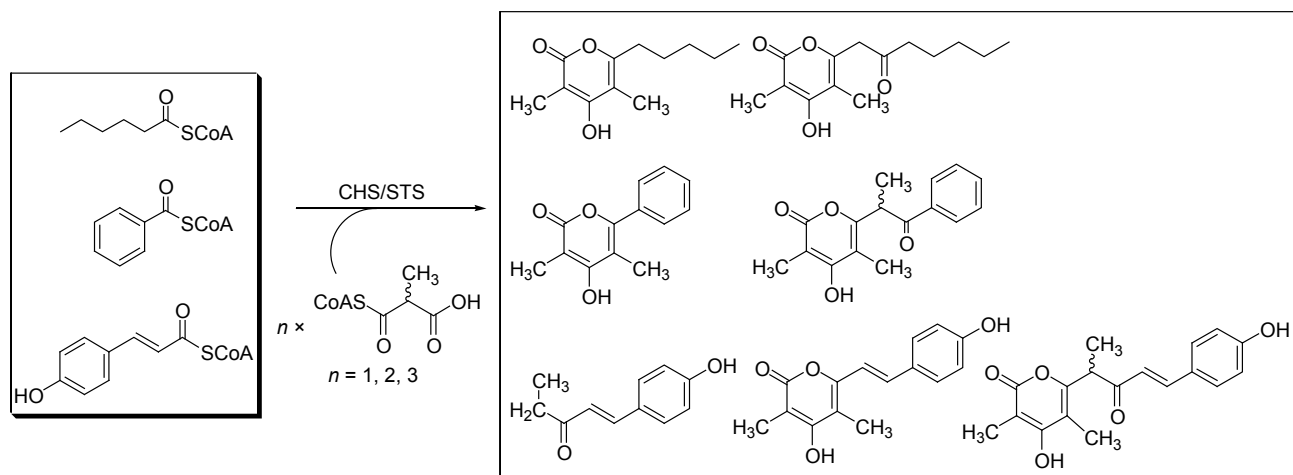
起始底物、链延伸单元、环合方式的多样性, 以及蛋白质结构的可修饰性(人工定点突变)为开展非天然小分子的组合合成提供了条件. 此外, 天然产物的多样性, 很大一部分主要是由后修饰酶的作用来实现的, 如异



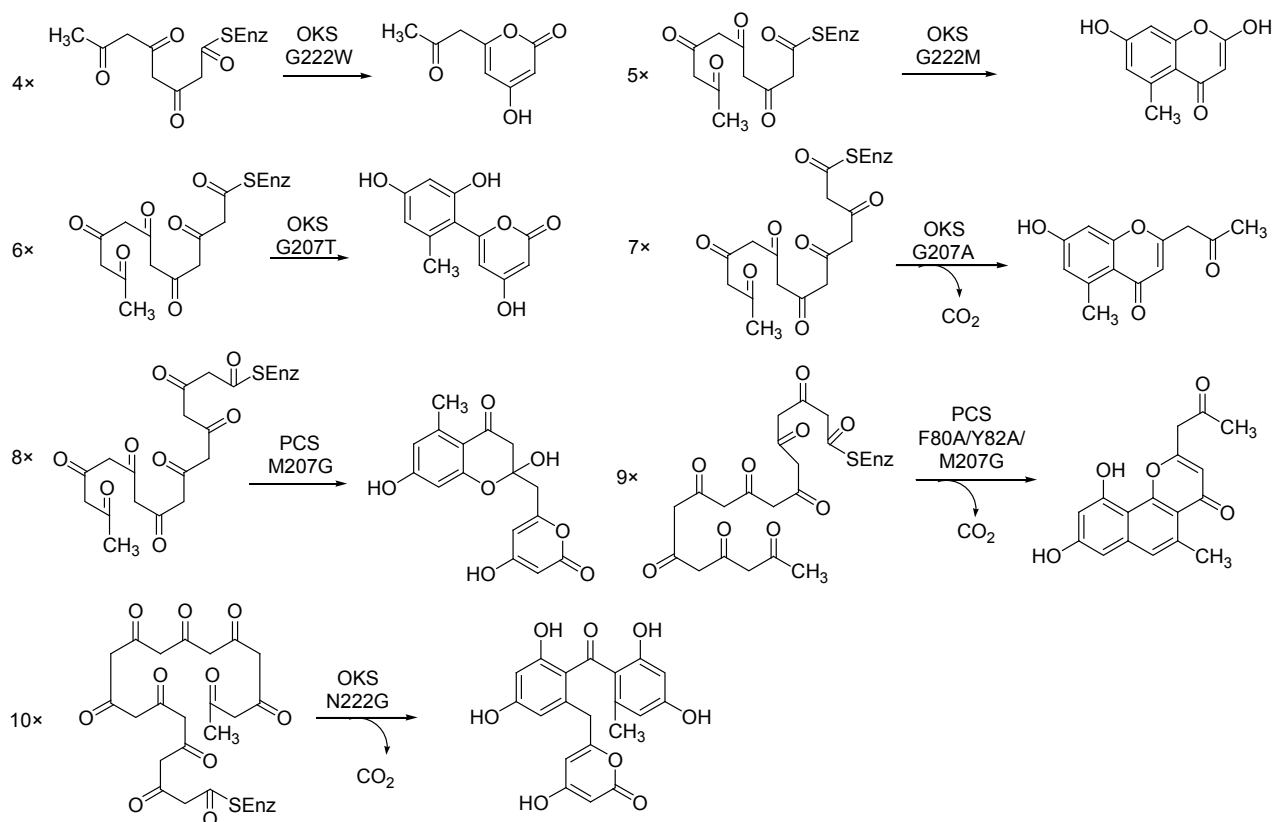
Scheme 11

戊烯基转移酶、甲基化酶、过氧化酶、糖基转移酶等。可以预计, 如果将聚酮合酶、底物及后修饰酶组合开展组合合成, 将会产生数目可观、结构新颖的“非天然小分

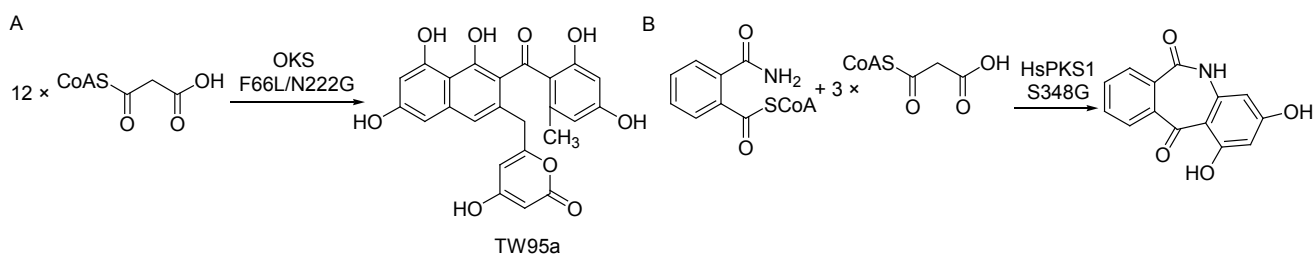
子”化合物库, 如果与现代先进的活性筛选技术相结合, 对于活性小分子的发现将具有重要的意义. Dordick等^[41]利用这种策略, 成功地构建了一个近 200 个非天然



Scheme 12

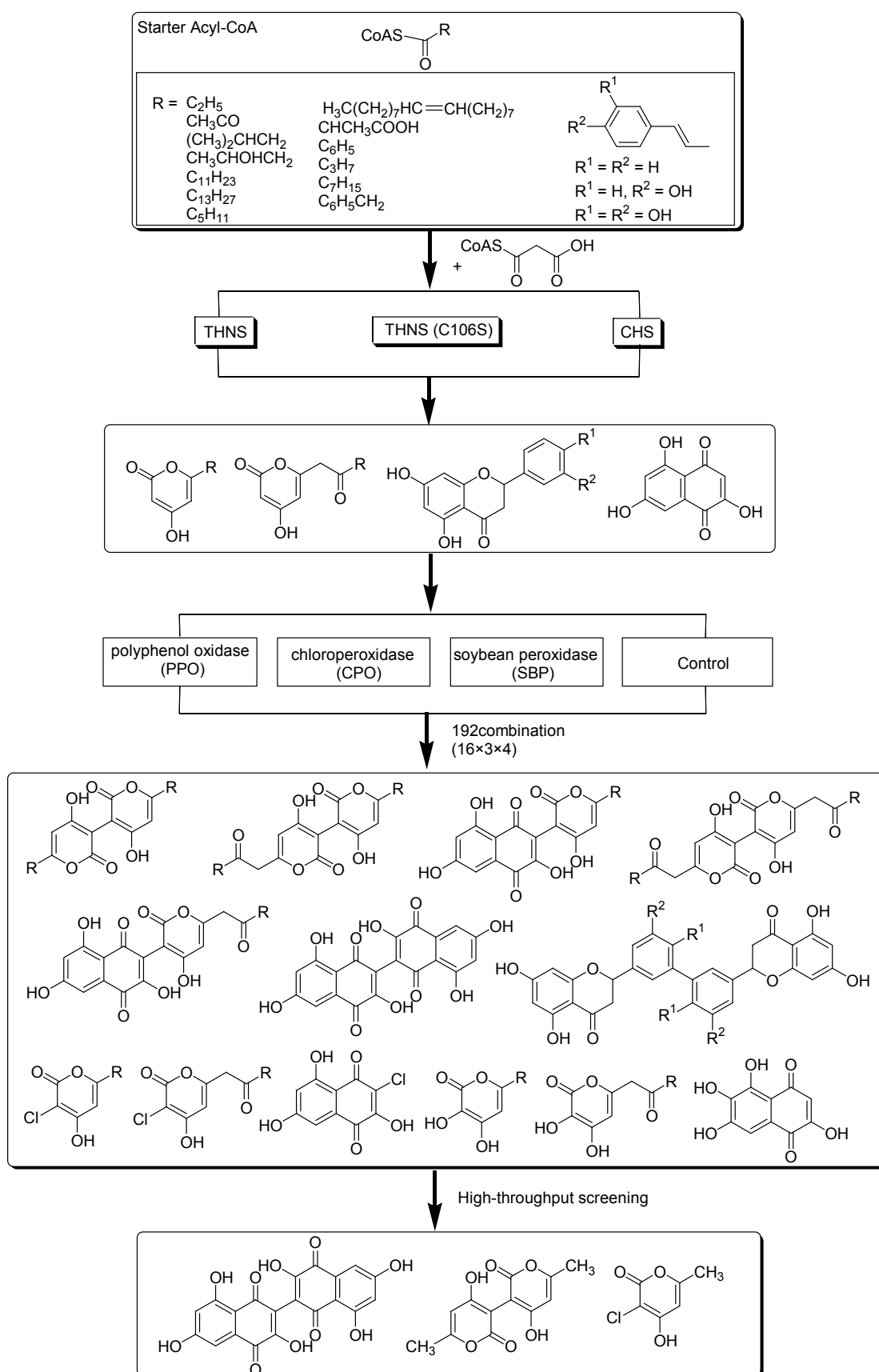


Scheme 13



Scheme 14

小分子化合物库, 结合高通量筛选, 成功地筛选出了 3 个具有人酪氨酸激酶抑制活性的“非天然小分子” (Scheme 15).



Scheme 15

3.4 基于植物聚酮合酶的组合生物合成

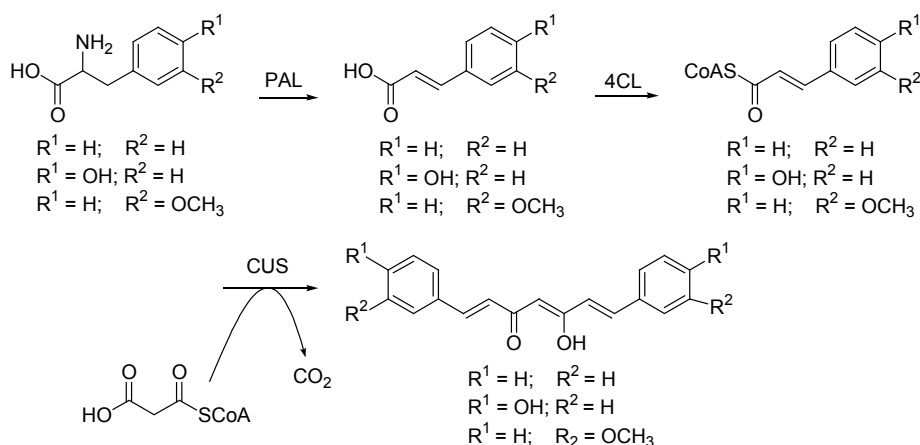
组合生物合成(Combinatorial Biosynthesis)是随着人们对大环内酯类抗生素的生物合成基因簇及非核糖体多肽类抗生素生物合成基因簇的发现而发展起来的,其本质是在基因水平上,对某些重要的天然产物的生物合成途径中的调控基因进行删除、添加、取代以及重组,然后导入到一个适当的微生物宿主中并定向合成所需的一系列化合物^[42]。目前,利用植物聚酮合酶开展对大豆异黄酮、姜黄素、白藜芦醇等重要活性分子的组合生物合成,已经取得了成功。Horinouchi 等^[43]将来源于酵母(*Rhodotorula rubra*)中的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、来源于紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)中的 4-羟基肉桂酰辅酶 A 连接酶(4CL)、来源于水稻(*O. sativa*)中的姜黄素合成酶(CUS)成功地构建于大肠杆菌 *E. coli* 中,所构建的生物工程菌可以利用酪氨酸、苯丙氨酸、肉桂酸、阿魏酸、4-羟基肉桂酸等为底物合成姜黄素类化合物,产率可以达到 100 mg/L (Scheme 16)。Schmit-Dannert 等^[44a]将来源于拟南芥(*A. thaliana*)中的 4-羟基肉桂酰辅酶 A 连接酶(4CL1)和来源于落花生(*A. hypogaea*)中的二苯乙烯合成酶 STS 构建于大肠杆菌 *E. coli* 中,与 4-羟基肉桂酸共培养,成功地合成二苯乙烯类化合物白藜芦醇,产率达 100 mg/L (Scheme 17); Koffas 等^[44b]最近又成功利用 *E. coli* 重组工程菌,使白藜芦醇的产量高达 2.3 g/L。将合成大豆异黄酮的相关酶如苯丙氨酸解氨酶(PAL)、

4-羟基肉桂酰辅酶 A 连接酶(ScCCL)、查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、异黄酮合成酶(IFS)构建于大肠杆菌 *E. coli* 及酵母 *S. cerevisiae* 中,以酪氨酸为原料,与所构建的基因工程菌进行共培养,成功合成大豆异黄酮,产率约 6 mg/L (Scheme 18)^[45]。

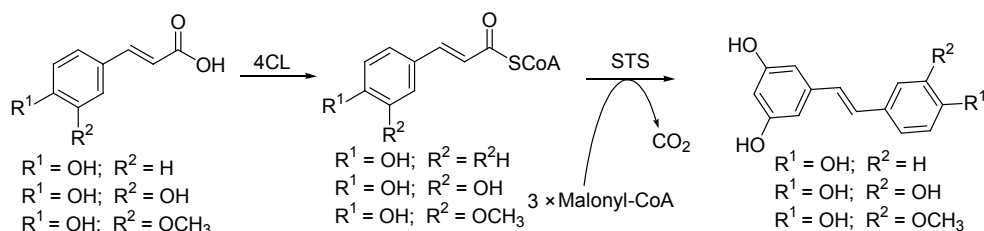
除了定向合成目标性活性天然小分子之外, Hiroshinoguchi 等^[46]将合成黄酮、二苯乙烯类化合物的相关酶类成功构建于大肠杆菌中,利用所构建的生物工程菌,与不同的底物进行共培养,成功构建了一个近 100 个“非天然小分子”化合物库(图 2)。

4 结论

植物聚酮合酶以酰基辅酶 A 为起始底物,以丙二酰辅酶 A、甲基丙二酰辅酶 A 等为链的延长单元,经过重复的脱羧、缩合形成新的 C—C 键并完成链的延长反应,再经环合、芳香化等步骤,合成结构多样的酚性小分子。起始底物、链延伸单元、起始底物与链延伸单元缩合的分子数及环合方式的多样性,决定了生成产物结构的多样性,这些特点为开展组合合成提供了先决条件。植物聚酮合酶不仅催化 C—C 键的形成,而且还可以催化 C—N 键的形成,使得利用植物聚酮合酶构建结构新颖的生物碱化合物群(或库)成为可能。随着蛋白质结晶及分析技术的发展,对植物聚酮合酶的克隆表达、结晶及



Scheme 16



Scheme 17

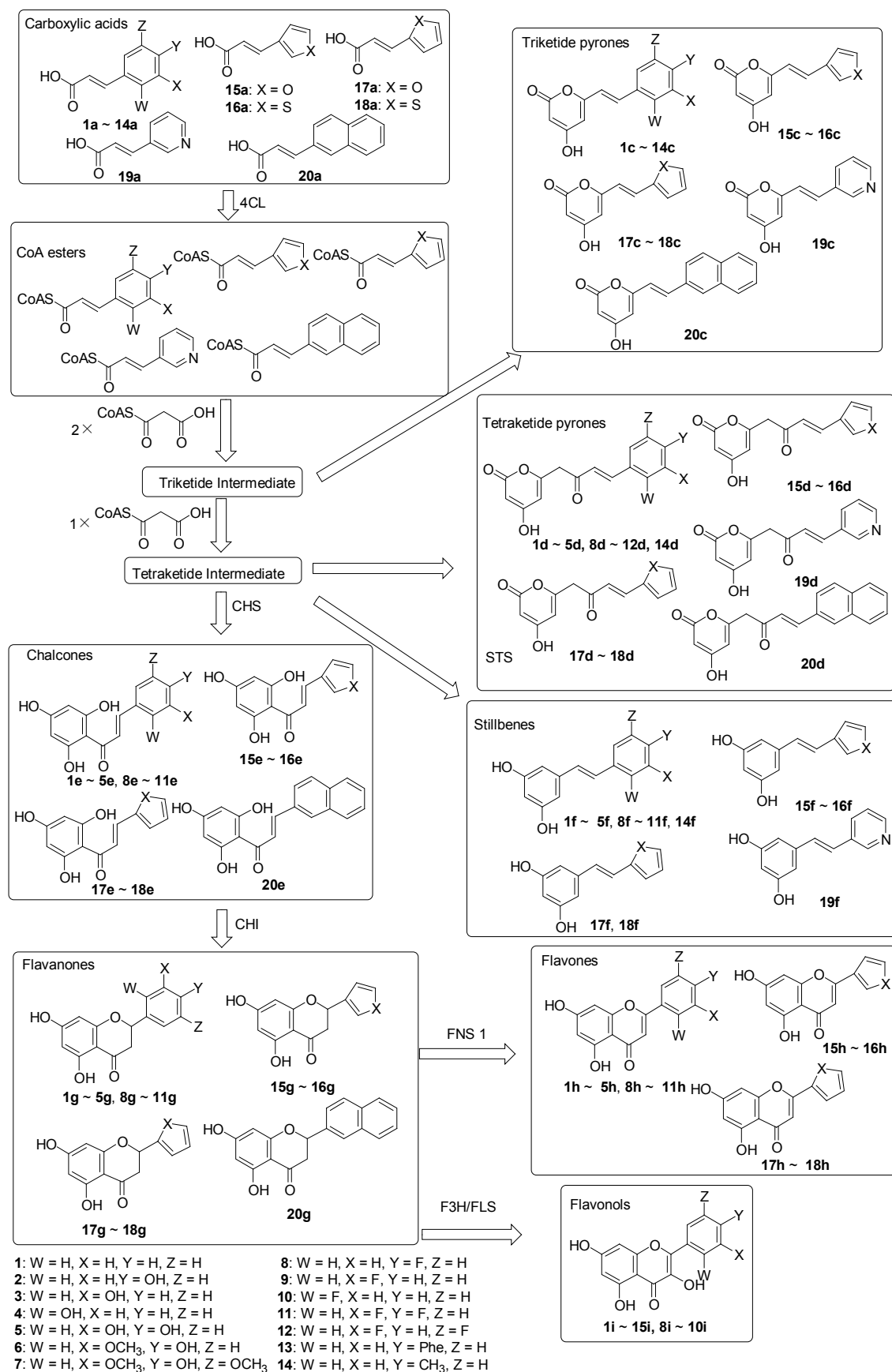
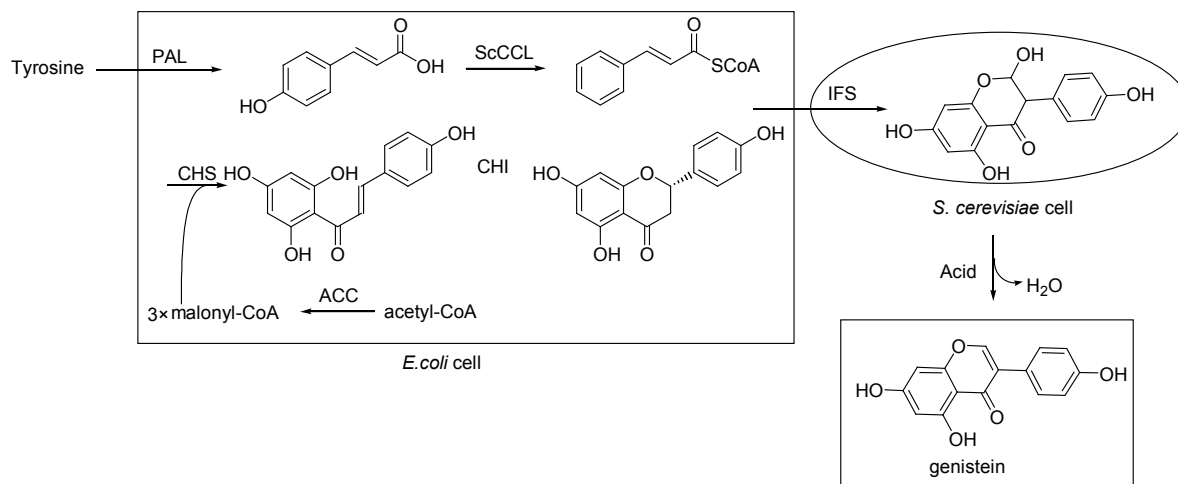


图2 组合生物合成策略构建“非天然小分子”化合物库

Figure 2 Construction of unnatural small molecules library by combinatorial biosynthesis



Scheme 18

结构分析、关键位点突变等技术已经相对成熟,以蛋白质结构修饰为导向,可以合成出全新骨架类型的“非天然小分子”用于活性小分子的发现。因此,利用植物聚酮合酶构建结构新颖多样的“非天然小分子”群(或库)并结合药理活性筛选,用于活性小分子的发现成为未来植物聚酮合酶研究中的一个重要内容。另一方面,植物聚酮合酶通过 40~45 kDa 的同源蛋白二聚体即可完成起始底物的装载、链的延长、环合等步骤,相对于 I 和 II 聚酮合酶而言,植物聚酮合酶结构简单,更容易实现在微生物体内成功表达并构建生物工程菌,用于活性小分子的规模化生产,以满足药物研发的需求。但目前有关利用植物聚酮合酶开展的组合生物合成,还存在着产率低等问题,如何优化条件,提高目标产物的收率是利用植物聚酮合酶开展组合生物合成的关键。总之,植物聚酮合酶催化的非天然小分子的合成,作为一种绿色的合成技术,在未来有机合成及药物研发方面将会有巨大的潜力和应用前景。

References

- [1] (a) Rawlings, B. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 190.
(b) Rawlings, B. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 231.
(c) Keatinge-Clay, A. T. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1050.
- [2] (a) Zhang, W.; Tang, Y. *Methods Enzymol.* **2009**, *459*, 367.
(b) Hertweck, C.; Luzhetskyy, A.; Rebets, Y.; Bechthold, A. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162.
(c) Zhan, J. X. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1598.
- [3] (a) Abe, I.; Morita, H. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 809.
(b) Shi, S. P.; Morita, H.; Wanibuchi, K.; Mizuuchi, Y.; Noguchi, H.; Abe, I. *Curr. Org. Synth.* **2008**, *5*, 250.
(c) Austin, M. J.; Noel, J. P. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79.
(d) Abe, I. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 179.
(e) Flores-Sanchez, I. J.; Verpoorte, R. *Plant Physiol. Biochem.* **2009**, *47*, 167.
- [4] (a) Yu, D. Y.; Xu, F. C.; Zeng, J.; Zhan, J. X. *IUBMB Life* **2012**, *64*, 285.
(b) Li, S.; Crüschow, S.; Dordick, J. S.; Sherman, D. H. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12765.
(c) Gross, F.; Luniak, N.; Perlova, O.; Gaitatzis, N.; Jenke-kodama, H.; Gerth, K.; Gottschalk, D.; Dittmann, E.; Müller, R. *Arch. Microbiol.* **2006**, *185*, 28.
(d) Zha, W.; Rubin-Pitel, S. B.; Zhao, H. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32036.
(e) Tseng, C. C.; McLoughlin, S. M.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **2004**, *43*, 970.
- [5] Reimold, U.; Kröger, M.; Kreuzaler, F.; Hahlbrock, K. *EMBO J.* **1983**, *10*, 1801.
- [6] (a) Lukacin, R.; Springob, K.; Urbanke, C.; Schröder, G.; Matern, U. *FEBS Lett.* **1999**, *448*, 135.
(b) Junghanns, K. T.; Kneusel, R. E.; Gröger, D.; Matern, U. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 403.
- [7] Resmi, M. S.; Verma, P.; Gokhale, R. S.; Soniya, E. V. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 7271.
- [8] Shimokawa, Y.; Morita, H.; Abe, I. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 1.
- [9] Morita, H.; Shimokawa, Y.; Tanio, M.; Kato, R.; Noguchi, H.; Sugio, S.; Kohnno, T.; Abe, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 669.
- [10] Wakimoto, T.; Mori, T.; Morita, H.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4746.
- [11] Wanibuchi, K.; Zhang, P.; Abe, T.; Morita, H.; Kohnno, T.; Chen, G. S.; Noguchi, H.; Abe, I. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1073.
- [12] (a) Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 131.
(b) Fellermerier, M.; Bacher, E. A.; Zenk, M. H. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1596.
- [13] Taura, F.; Tanaka, S.; Taguchi, C.; Fukamizu, T.; Tanaka, H.; Shoyama, Y.; Morimoto, S. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2061.
- [14] Gagne, S. J.; Stout, J. M.; Liu, E.; Boubakir, Z.; Clark, S. M.; Page, J. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 12811.
- [15] (a) Koes, R. E.; Spelt, C. E.; van den Elzen, P. J. M.; Mol, J. N. M. *Gene* **1989**, *81*, 245.
(b) Abe, I.; Morita, H.; Nomura, A.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11242.
(c) Ferrer, J. L.; Jez, J. M.; Bowman, M. E.; Dixon, R. A.; Noel, J. P. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 775.
- [16] (a) Schoppner, A.; Kindl, H. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6806.
(b) Sparvoli, F.; Martin, C.; Scienza, A.; Gavazzi, G.; Tonelli, C. *Plant Mol. Biol.* **1994**, *24*, 743.
(c) Raiber, S.; Schröder, G.; Schröder, J. *FEBS Lett.* **1995**, *361*, 299.
(d) Schanz, S.; Schröder, G.; Schröder, J. *FEBS Lett.* **1992**, *313*, 71.

- [17] (a) Dixon, R. A. *Nature* **2001**, *411*, 843.
(b) Roupe, K. A.; Remsberg, C. M.; Yáñez, J. A.; Davies, N. M. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2006**, *1*, 81.
- [18] Austin, M. B.; Bowman, M. E.; Ferrer, J.; Schröder, J.; Noel, J. P. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1179.
- [19] Eckermann, C.; Schröder, G.; Eckermann, S.; Strack, D.; Schmidt, J.; Schneider, B.; Schröder, J. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 271.
- [20] Preisig-Müller, R.; Gnau, P.; Kindl, H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *317*, 201.
- [21] Abe, I.; Oguro, S.; Utsumi, Y.; Sano, Y.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12709.
- [22] Abe, I.; Utsumi, Y.; Oguro, S.; Morita, H.; Sano, Y.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1362.
- [23] (a) Mizuuchi, Y.; Shi, S. P.; Wanibuchi, K.; Kojima, A.; Morita, H.; Abe, I. *FEBS J.* **2009**, *276*, 2391.
(b) Abe, I.; Utsumi, Y.; Oguro, S.; Noguchi, H. *FEBS Lett.* **2004**, *562*, 171.
(c) Abe, I.; Watanabe, T.; Lou, W.; Noguchi, H. *FEBS J.* **2006**, *273*, 208.
- [24] (a) Prasanna, R.; Chandramoorthy, H. C.; Ramaiyapillai, P.; Sakthisekaran, D. *Biomed. Prev. Nutr.* **2011**, *1*, 153.
(b) Wei, X. C.; Du, Z. Y.; Zheng, X.; Cui, X. X.; Conney, A. H.; Zhang, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 235.
(c) Rong, S.; Zhao, Y. T.; Bao, W.; Xiao, X.; Wang, D.; Nussler, A. K.; Yan, H.; Yao, P.; Liu, L. G. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 545.
(d) Strasser, E. M.; Wessner, B.; Manhart, N.; Roth, E. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 552.
(e) Wei, Q. Y.; Chen, W. F.; Zhou, B.; Yang, L.; Liu, Z. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 70.
- [25] Katsuyama, Y.; Kita, T.; Funa, N.; Horinouchi, S. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 11160.
- [26] Katsuyama, Y.; Kita, T.; Horinouchi, S. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2799.
- [27] Katsuyama, Y.; Matsuzawa, M.; Funa, N.; Horinouchi, S. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 37702.
- [28] (a) Nualkaew, N.; Morita, H.; Shimokawa, Y.; Kinjo, K.; Kushiro, T.; Wanchai, D.-E.; Ebizuka, Y.; Abe, I. *Phytochemistry* **2012**, *77*, 60.
(b) Liu, B.; Falkenstein-Paul, H.; Schmidt, W.; Beerhues, L. *Plant J.* **2003**, *34*, 847.
- [29] Liu, B.; Beuerle, T.; Klundt, T.; Beerhues, L. *Planta* **2004**, *218*, 492.
- [30] Eckermann, S.; Schröder, G.; Schmidt, J.; Strack, D.; Edrada, R. A.; Helariutta, Y.; Elomaa, P.; Kotilainen, M.; Kilpeläinen, I.; Proksch, P.; Teeri, T. H.; Schröder, G. *Nature* **1998**, *396*, 387.
- [31] (a) Okada, Y.; Ito, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 150.
(b) Paniego, N. B.; Zuurbier, K. W. M.; Fung, S. Y.; Heijden, R. V.; Scheffer, J. J. C.; Verpoorte, R. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *262*, 612.
- [32] Ferrer, J. L.; Jez, J. M.; Bowman, M. E.; Dixon, R. A.; Noel, J. P. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 775.
- [33] Jr, C. S.; Vickery, C. R.; Burkart, M. D.; Noel, J. P. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2013**, *16*, 1.
- [34] Abe, I.; Morita, H.; Nomura, A.; Noguchi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11242.
- [35] Morita, H.; Yamashita, M.; Shi, S. P.; Wakimoto, T.; Kondoc, S.; Kato, R.; Sugio, S.; Kohno, T.; Abe, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 33.
- [36] Karppinen, K.; Hokkanen, J.; Mattila, S.; Neubauer, P.; Hohtola, A. *FEBS J.* **2008**, *275*, 4329.
- [37] (a) Abe, I.; Takahashi, Y.; Noguchi, H. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 21.
(b) Abe, I.; Takahashi, Y.; Lou, W. W.; Noguchi, H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 8.
- [38] Morita, H.; Kondo, S.; Oguro, S.; Noguchi, H.; Sugio, S.; Abe, I.; Kohno, T. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 359.
- [39] (a) Abe, I.; Morita, H.; Oguro, S.; Noma, H.; Wanibuchi, K.; Kawahara, N.; Goda, Y.; Noguchi, H.; Kohno, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5976.
(b) Shi, S. P.; Wanibuchi, K.; Morita, H.; Endo, K.; Noguchi, H.; Abe, I. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 551.
- [40] Wanibuchi, K.; Morita, H.; Noguchi, H.; Abe, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2083.
- [41] Kwon, S. J.; Lee, M. Y.; Ku, B.; Sherman, D. H.; Dordick, J. S. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 419.
- [42] (a) Hutchinson, C. R. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 319.
(b) Nielsen, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 297.
(c) Floss, H. G. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 242.
(d) Menzella, H. G.; Reeves, C. D. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 238.
- [43] Katsuyama, Y.; Matsuzawa, M.; Nobutaka, F.; Horinouchi, S. *Microbiology* **2008**, *154*, 2620.
- [44] (a) Watts, K. T.; Lee, P. C.; Schmidt-Dannert, C. *BMC Biotechnol.* **2006**, *6*, 22.
(b) Lim, C. G.; Fowler, Z. L.; Hueller, T.; Schaffer, S.; Koffas, M. A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3451.
- [45] Katsuyama, Y.; Miyahisa, Y.; Nobutaka, F.; Horinouchi, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1143.
- [46] Katsuyama, Y.; Nobutaka, F.; Miyahisa, I.; Sueharu, H. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 613.

(Lu, Y.)