

• 工具酶的功能表征 •

王伟 中国医学科学院药物研究所研究员、博士研究生导师。主要从事天然药物生物合成途径关键代谢反应的解析及其生物催化的研究。研究成果包括构建了大肠杆菌生物合成紫杉醇前体紫杉烯、3个合成途径组合生物合成谷胱甘肽、异源宿主酵母或大肠杆菌合成糖基供体UDP-葡萄糖、UDP-葡萄糖醛酸和双功能的酰基和糖基供体酰基葡萄糖酯等功能模块并用于天然药物的结构修饰，还解决了多肽药物结构改造且可口服给药的技术难题。



植物丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶的结构、功能和应用

王宇, 杨燕, 刘恣之, 王伟

中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/国家卫生健康委员会天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050

王宇, 杨燕, 刘恣之, 等. 植物丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶的结构、功能和应用. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1887-1899.
Wang Y, Yang Y, Liu MZ, et al. Structure, function and application of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plants. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 1887-1899.

摘要: 植物丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶与丝氨酸羧肽酶相比具有相似的结构特点和很高的同源性, 能够催化酰基葡萄糖酯的酰基转移反应, 参与植物次生代谢产物的酰基化修饰, 丰富天然产物结构多样性, 改善化合物水溶性、稳定性等理化性质。本文重点介绍植物来源丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶家族的结构特点、催化机制、功能鉴定及其生物催化应用等方面的研究进展, 为促进此类酰基转移酶基因的功能表征和利用合成生物技术合成活性次生代谢产物提供参考。

关键词: 丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶, 酰基化反应, 双功能酰基和糖基供体, 生物催化

Received: March 3, 2021; **Accepted:** March 26, 2021

Supported by: Chinese Academy of Medical Science Initiative for Innovative Medicine (No. 2016-I2M-3-012), National Natural Science Foundation of China (Nos. 81903487, 82073757), PUMC Disciplinary Development of Synthetic Biology (No. 201920100801).

Corresponding author: Wei Wang. Tel/Fax: +86-10-63165196; E-mail: wwang@imm.ac.cn

中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (No. 2016-I2M-3-012), 国家自然科学基金 (Nos. 81903487, 82073757) 资助, 北京协和医学院合成生物学学科建设专项 (No. 201920100801) 资助。

Structure, function and application of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plants

Yu Wang, Yan Yang, Minzhi Liu, and Wei Wang

State Key Laboratory of Bioactive and Function of Natural Medicines & Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products of National Health Commission of the People's Republic of China, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: Plant serine carboxypeptidase-like acyltransferases (SCPL-AT) have similar structural characteristics and high homology compared to the serine carboxypeptidase. They can transfer the acyl from acyl glucose esters to many natural products, participate in the acylation modification of plant secondary metabolites, enrich the structural diversity of natural products, and improve the physicochemical properties such as water solubility and stability of compounds. This review summarizes the structural characteristics, catalytic mechanism, functional characterization, and biocatalytic applications of SCPL-AT from plants. This will help to promote the functional characterization of these acyltransferase genes and the biosynthesis of useful plant secondary metabolites by synthetic biotechnology.

Keywords: serine carboxypeptidase-like acyltransferase, acylation, bifunctional acyl and glucosyl donor, biocatalysis

植物的次生代谢产物具有广泛的结构多样性, 其中酰基化反应与羟基化、甲基化、糖基化相结合是形成结构多样化的分子基础。最常见的酰基转移反应由辅酶 A 硫酯 (Coenzyme A, CoA) 依赖的酰基转移酶催化, 属于 BAHD (根据 4 种酶中的首字母, 包括苯甲醇 *O*-乙酰基转移酶 (Benzylalcohol *O*-acetyltransferase, BEAT)、花青素羟化肉桂酰基转移酶 (Anthocyanin *O*-hydroxycinnamoyltransferase, AHCT)、邻氨基苯甲酸 *N*-羟化肉桂酰基/苯甲酰基转移酶 (Anthranelate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase, HCBT) 和去乙酰化 vindoline 4-*O*-乙酰基转移酶 (Deacetylvindoline 4-*O*-acetyltransferase, DAT)) 酰基转移酶 (BAHD-AT) 超家族^[1-2]。除了 CoA 硫酯外, 由 UDP-糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferases, UGTs) 形成的葡萄糖酯 (或缩醛酯, β -acetal ester) 也具有很高的基团转移潜能, 既可以作为糖基供体, 又可以作为酰基供体, 进行糖基或酰基转移反应^[3-4]。植物中依赖葡萄糖酯的酰基转移酶与丝氨酸羧肽酶 (Serine carboxypeptidase, SCP) 具有序列同源性, 称为丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶 (Serine carboxypeptidase-like acyltransferase, SCPL-AT), 属于大分子 α/β 水解酶蛋白超家族,

SCPL-ATs 与 SCPs 不同, 不具有催化肽水解活性^[2,5-6]。本文从 SCPL-ATs 的结构特点、催化机制、功能鉴定及其生物催化应用等方面综述分析, 希望对其在合成生物学方面的应用提供参考。

1 SCPL-AT 的结构特征及其催化机制

1.1 SCPL-AT 的结构特点

鉴于 SCPL-ATs 具有出人意料的丝氨酸羧肽酶同源性, 最初被描述为“蛋白酶衣兜中的酰基转移酶 (Acyltransferases in protease's clothing)”^[7], 此后被归类为丝氨酸羧肽酶样 (SCPL) 酰基转移酶。第一个被系统地进行功能鉴定的 SCPL-AT 是野生番茄 *Lycopersicon penellii* 合成多酰基葡萄糖的葡萄糖酰基转移酶 (Glucose acyltransferase, GAC), 催化 2 分子 1-*O*-酰基- β -葡萄糖生成 1,2-二酰基- β -葡萄糖以及 1-*O*-酰基- β -葡萄糖和葡萄糖之间的酰基交换 (歧化反应)^[8-9], LpGAC 含有 2 个大小分别为 34 kDa 和 24 kDa 的亚基并通过 2 个亚基之间的内部连接肽 (CDLPYLMGILQETPTNG QSVFPIAGPWC) 的二硫键形成相互作用的复合体; 经蛋白质 N-测序确定小亚基的 N-端肽序列为 (GQSVFPIAGP)^[9]。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中发现的芥子酰基葡萄糖酯: 苹果酸酰基转移酶

(1-*O*-sinapoyl- β -glucose:L-malate sinapoyltransferase, SMT) 首先被研究证实其定位于液泡^[10], 更多的研究报道证实了 SCPL-AT 是一类定位于液泡的酰基转移酶, 而 BAHD 则是定位于胞质内的酰基转移酶。SCPL-ATs 除了含有信号肽结构和多个 N-糖基化 (NXT/S, X 是脯氨酸外的其他氨基酸残基) 位点外, 另一个区别于 SCP 的重要特征是还含有保守的五肽基序“GDSYS”, 而 SCP 是“GESYA”^[11]。为进一步分析 SCPL-ATs 的结构特点, 我们以飞燕草 *Delphinium grandiflorum* DgSCPL1 (AB811448)^[3] 的氨基酸序列为研究目标进行 GenBank BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析, 结果发现 100 条氨基酸序列一致性在 54.8%–71.4% 之间, 其中在 100 条氨基酸序列中有 71 条基因含有“GDSYS”基序, 其余基序分别是 11 个“GDSYA”、4 个“GVSYT”、3 个“GVSYG”; 同时选取这些未进行功能注释的 SCPL-ATs 的内部连接肽序列进行比对分析, 结果如图 1A 所示, 绝大多数 SCPL-ATs 富含脯氨酸残基和具有保守 2 个或 3 个碱性氨基酸 (KR、RR、KRR、RRR) 的内部连接肽, 其长度为 25–40 个氨基酸残基; 另一部分 SCPL-ATs 的内部连接肽同样富含脯氨酸残基且具有一个保守的天门冬酰胺残基 (图 1B); SCPL-ATs 富含脯氨酸残基说明内部连接肽在其形成的二硫键之间形成环 (Loop) 结构, 暴露于复合体的表面, 易被蛋白酶识别剪切加工。LpGAC 属于后一类型的内部连接肽 (CDLPYLMGILQETPTNGQSVFPI AGPWC), 根据 Li 等测定的小亚基 N-端肽序列 N24 为“GQSVFPIAGP”^[9], 我们可推定 LpGAC 是转运到液泡后由定位于液泡内蛋白加工酶即天门冬酰胺内肽酶 (Asparaginyl endopeptidase) 剪切加工成熟^[12]; 可能受限于天门冬酰胺内肽酶研究较少, 作者没有提出其剪切加工成熟机制。同时, 基于酵母分泌转运系统中定位于反面高尔基体定位的内肽酶 Kex2 研究, 可推测植物细胞内反面高尔基体具有类似的剪切“KR 或 RR”基序的蛋白酶并

参与 SCPL-ATs 内部连接肽的加工成熟和酶复合体的转运。此外, 在单子叶植物拟南芥中鉴定的 SCPL-ATs 内部连接肽长度短于双子叶植物的 SCPL-ATs 内部连接肽, 但是在拟南芥中已被广泛研究的芥子酰基葡萄糖:胆碱酰基转移酶 (Sinapoyl-Glc:choline sinapoyltransferase, AtSCT)^[13] 和芥子酰基葡萄糖:花青素酰基转移酶 (Sinapoyl-Glc:anthocyanin sinapoyltransferase, AtSAT)^[14] 含有保守的碱性氨基酸基序的内部连接肽, 而芥子酰基葡萄糖:葡萄糖酰基转移酶 (Sinapoyl-Glc:sinapoyl-Glc sinapoyltransferase, AtSST)^[14] 和 AtSMT^[15] 则含有一个保守天门冬酰胺残基的内部连接肽。

1.2 SCPL-AT 的催化机制

SCPL-ATs 除了具有 SCPs 的整体序列同源性之外, 二者都含有 α/β 水解酶折叠和催化三联体 (Ser-His-Asp) (其中 Ser 为五肽基序“GDSYS”中划线的保守氨基酸残基), 其构成了用于底物结合的氢键网络和用于稳定反应中间体的氧阴离子孔 (Oxyanion hole)。迄今为止, 研究人员 SCPL-ATs 介导的酰基转移酶反应提出了两种可能的机制: 双置换 (ping-pong) 机制 (图 2A) 和随机序列 (bi-bi) 机制 (图 2B), 该机制要求酰基供体和受体分子同时结合才能进行反应^[6,16]。在双置换反应中, 与酰基转移酶活性位点结合的酰基葡萄糖供体被催化三联体中的丝氨酸残基作用, 形成酶-酰基中间体, 同时释放葡萄糖 (反应产物之一)。酰基受体随后与酰基转移酶结合并亲核攻击酶-酰基中间体以形成酰化产物, 随后其与酶分离 (图 2A)。与双置换机制不同的是, 在酰基受体附着到酰基转移酶之前, 其中一个反应产物被释放, 酰基供体和受体分子都以随机顺序机制与酰基转移酶结合, 并形成四面体酶中间复合物。然后酰基受体亲核攻击酶-酰基中间体形成酰化产物 (图 2B)^[6,16]。由于随机顺序机制不允许水进入酶活性位点, 采用这种反应机制的 SCPL-ATs 可能不具有固有的水解酶活性。

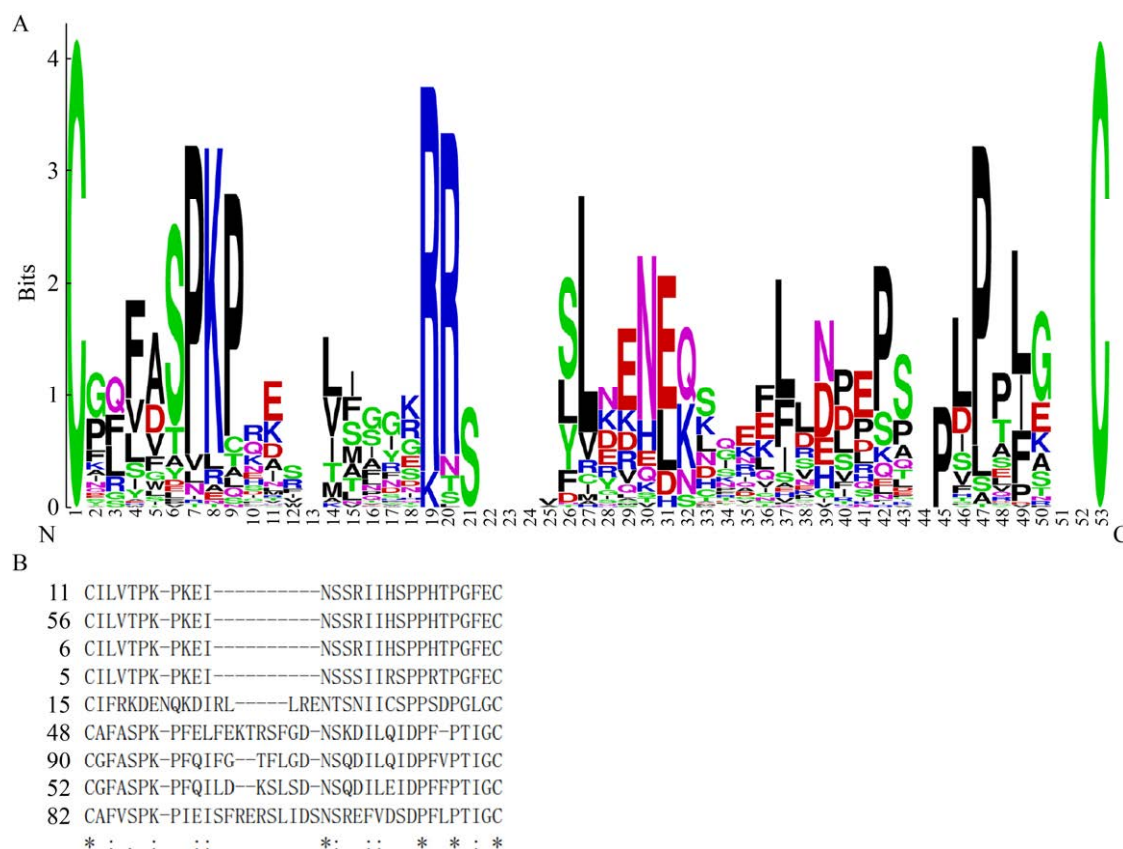


图1 SCPL 酰基转移酶的内部连接肽的统计分析

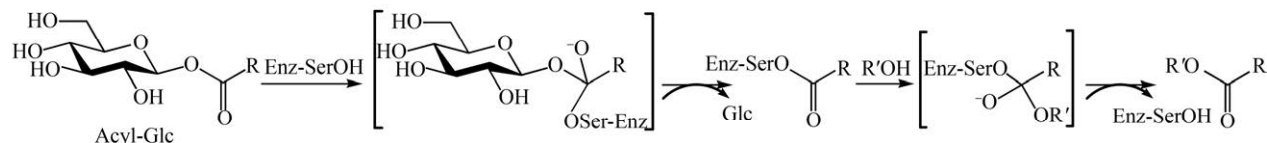
Fig. 1 Statistical analysis of the internal linker peptides of 100-hit SCPL-ATs selected by BlastP search with *D. grandiflorum* SCPL1 (BAO04182) as a SCPL candidate. (A) Logos corresponds to SCPL linker peptides with the conserved di- or tri-basic motifs (KR, RR, KRR or RRR). (B) Alignment of the internal linker peptides selected with a conserved asparagine.

2 SCPL-AT 家族基因功能研究

SCPL-ATs 仅参与植物次生代谢途径, 这支持了 SCPL-ATs 的进化与植物次生代谢发展相关的假设^[14]。目前, 已通过植物突变体及酰化产物积累差异的正向遗传筛选方法鉴定了在拟南芥中累积芥子酰基葡萄糖的突变体 *sng1* (编码的 AtSMT 催化合成芥子酰苹果酸)^[15]和 *sng2* (编码的 AtSCT 催化合成芥子酰胆碱) 以及燕麦 *Avena strigose* 中编码 AsSCPL1 的皂甙缺乏因子 7 (*Sad7*) 的表达^[17]。通过蛋白纯化再对野生番茄 GAC 酶进行酶活性测定及氨基酸残基序列的鉴定^[8-9]。利用反向遗传方法通过对拟南芥

AtSMT 和 AtSCT 的分析, 促进了 AtSAT 和 AtSST 表达模式及其功能鉴定^[14]; 依据不断增加的基因组和转录组数据, 加速了 SCPL-ATs 基因的功能鉴定, 如参与酰化花青素 (DcSAT)^[18]、没食子酰表儿茶素 (CsSCPL11、CsSCPL13、CsSCPL14)^[19]、莨菪碱中间体 littorine (AbLS)^[20]等基因的功能鉴定。图 3 是对已完成功能鉴定的和功能转录相关 SCPL-ATs 的系统进化分析, 结果印证了 SCPL-ATs 与 SCPs 功能进化的相关性, 其中催化功能相似的 SCPL-ATs 分别形成了合成芥子酰胆碱、酰化花青素、没食子酰黄烷-3-醇等分支; 此外还呈现出物种相关性。下文将针对这些已完成功能鉴定的 SCPL-ATs 进行概述。

A Double displacement (ping-pong) mechanism



B Random sequential (bi-bi) mechanism

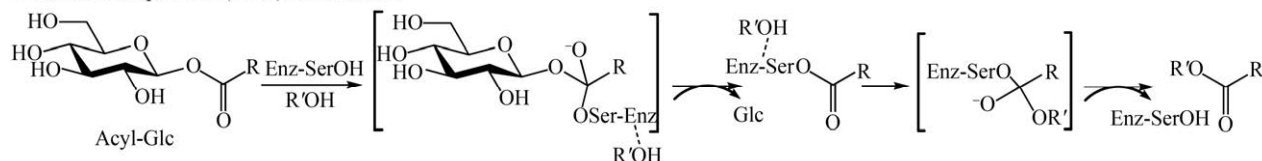
图 2 SCPL 酰基转移酶的催化反应机理^[6,16]

Fig. 2 Catalytic mechanism of SCPL-AT^[6,16]. Double displacement (ping-pong) (A) and random sequential (bi-bi) (B) reaction mechanisms proposed for SCPL-AT catalyzed reactions. 1-*O*- β -D-acylglucose (Acyl-Glc) is used as an example for acyl donors. Enz-SerOH: SCPL-AT with the catalytic serine residue; Glc: glucose; R: an alkyl or aryl group; R'OH: acyl acceptor.

2.1 简单酰基葡萄糖酯的合成

野生番茄品种 *L. pennellii* 的腺毛体可以分泌糖聚酯如 2,3,4-三酰基-葡萄糖酯, 这些酰化葡萄糖酯对很多如马铃薯蚜虫等害虫具有抗虫性。Li 等对野生番茄进行蛋白纯化并鉴定了一种催化异丁酰基葡萄糖酯生成 1,2-双异丁酰基-葡萄糖酯形成的酰基转移酶。这个酰基转移酶蛋白经 SDS-PAGE 分析证实含有 34 kDa 和 24 kDa 亚基组成的异源四聚体^[8]。该酰基转移酶被克隆到酿酒酵母中异源表达, 用 Blast 比对发现这个酰基转移酶蛋白序列与丝氨酸羧肽酶(如大麦羧肽酶 I、II 和 III、小麦丝氨酸羧肽酶 II 和酵母羧肽酶 II) 具有很高的序列相似性; 其对比大麦羧肽酶 I 的相似性和同源性分别为 76% 和 35%。不仅如此, 这个酰基转移酶也同样具有高保守的催化三联体, 以及对丝氨酸抑制剂同样也表现出敏感性。因此这个酰基转移酶被认定为丝氨酸羧肽酶样酰基转移酶 (SCPL-AT)^[9]。

二异丁酰-葡萄糖酯作为一类简单的脂肪酸酰化物, 并非植物次级代谢的最终产物。Li 等在实验中未检测有 2,3,4-三酰基-葡萄糖酯等高阶酰

化糖酯, 只是对终产物 2,3,4-三酰基-葡萄糖酯的合成途径和机制进行了预测, 这表明了野生番茄植物体内其他可能具有催化更复杂酰化糖酯的特异性 SCPL 尚待发掘^[8]。

图 3 与野生番茄 LpGAC 聚在一组的柿树 (*Diospyros kaki* Thunb) DkSCPL1 经功能预测其参与没食子酰黄烷-3-ol 的合成^[21], 其功能还有待更深入的研究确定。

2.2 芥子酰类化合物的合成

芥子酸酯是一组由苯丙氨酸衍生的一类抗辐射、抗氧化的次级代谢产物, 通常在植物体内通过苯丙氨酸途径产生。拟南芥和其他十字花科植物体内主要有 3 种芥子酸酯: 芥子酰葡萄糖酯、芥子酰胆碱、芥子酰苹果酸酯。在这些芥子酰类化合物的生物合成途径中, 芥子酰葡萄糖酯是合成芥子酰胆碱和芥子酰苹果酸酯的酰基供体。

2.2.1 芥子酰苹果酸酯

1996 年 Lorenzen 等设计了用甲磺酸乙酯作为诱导剂诱导拟南芥植物突变, 再用 TLC 分析植物叶片甲醇提取物, 从而分离出了芥子酰葡萄糖酯积累且芥子酰苹果酸酯缺乏的植物突变体

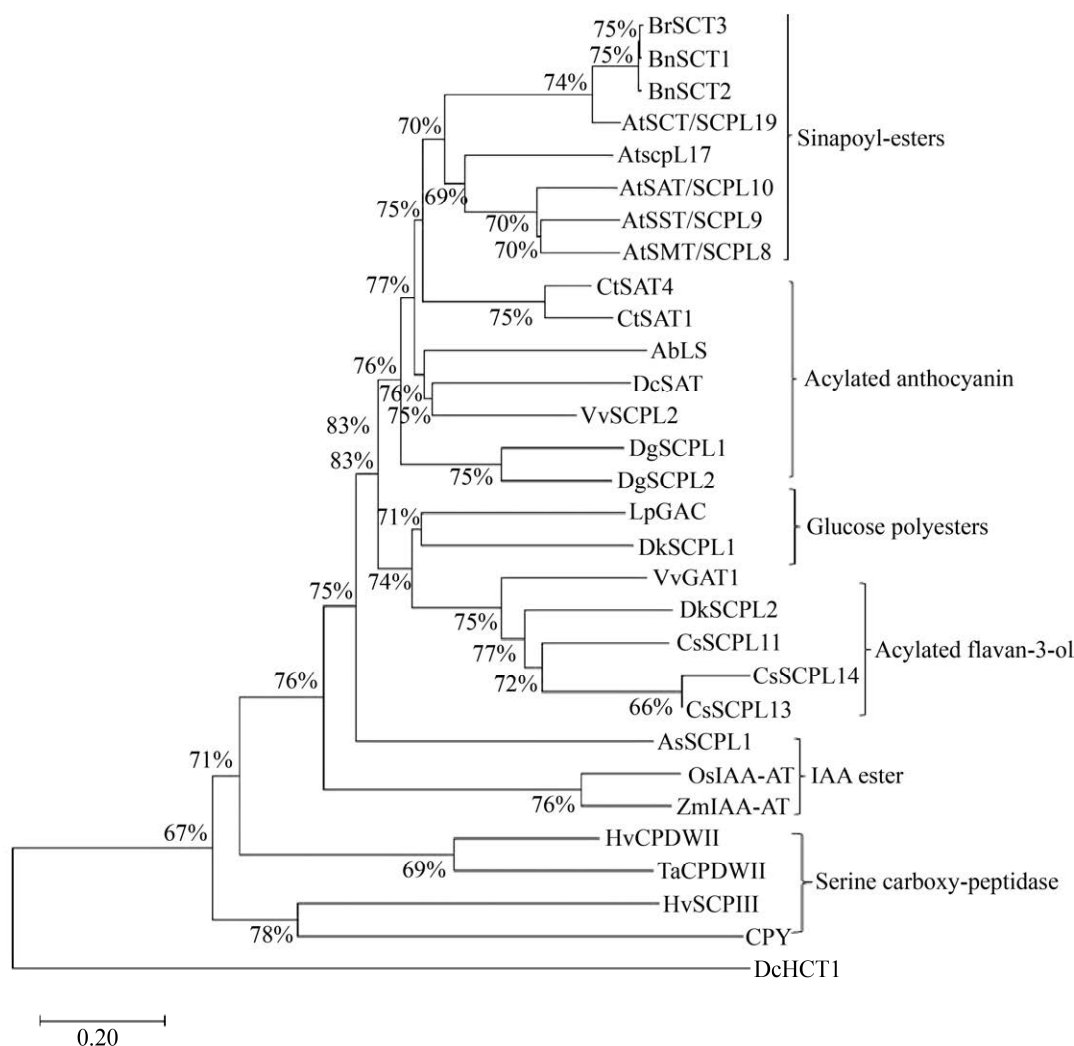


图3 已功能表征和预测的SCPL 酰基转移酶的系统分析

Fig. 3 Phylogeny of functionally characterized and predicted SCPL-AT with SCP proteins and a BADH acyltransferase as outgroups. Phylogenies were inferred using MEGA X by Neighbor-Joining methods. The Neighbor-Joining tree is shown. *Atropa belladonna* AbLS (GemBank Accession No. MN256146); *Camellia sinensis* CsSCPL14 (GemBank Accession No. MK843828), CsSCPL13 (GemBank Accession No. MK843827), CsSCPL11 (GemBank Accession No. MK843826); *Daucus carota* DcSAT (GemBank Accession No. MK572824); *Brassica rapa* subsp. *Oleifera* BrSCT3 (GemBank Accession No. AM706348); *B. napus* var. *napus* BnSCT2 (GemBank Accession No. AM706350); *B. napus* BnSCT1 (GemBank Accession No. AY383718); *L. penellii* LpGAC (GemBank Accession No. AF248647); *Clitoria ternatea* CtSAT4 (GemBank Accession No. AB267672), CtSAT1 (GemBank Accession No. AB267671); *D. grandiflorum* SCPL1 (GemBank Accession No. AB811448), SCPL2 (GemBank Accession No. AB811449); *Vitis vinifera* VvSCPL2 (GemBank Accession No. XM_002283377), VvGAT1 (GemBank Accession No. MF383341); *D. kaki* Thunb. DkSCPL1 (GemBank Accession No. AB195285), DkSCPL2 (GemBank Accession No. AB473186); *A. strigosa* AsSCPL1 sad7 (GemBank Accession No. FJ475130); *A. thaliana*, AtSST SCPL9 (GemBank Accession No. At2g23010, NM_201788); AtSAT SCPL10 (GemBank Accession No. At2g23000, NM_001335834); AtSMT SCPL8 (GemBank Accession No. At2g22990, AF275313); AtSCT SCPL19 (GemBank Accession No. At5g09640, AY033947); AtSCPL17 (GemBank Accession No. AT3G12240); *Zea mays* ZmIAA-AT (GemBank Accession No. BT016677); *Oryza sativa* OsIAA-AT (GemBank Accession No. CM000139); *Hordeum vulgare* CPDIII (GemBank Accession No. Y09604); wheat (*Triticum aestivum*) CPDW II (GemBank Accession No. AJ890016); yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) CPY (GemBank Accession No. NM_001182806); *D. carota* DcHCT1 (GemBank Accession No. KR559236). The scale bar represents 0.2 substitutions per site.

sng1^[22]; Lehfelgt 等研究发现 *sng1* 位点编码 AtSMT 基因与丝氨酸羧肽酶表现出同源性, 推测 AtSMT 可能参与植物次生代谢转酰基化反应。*sng1* 位点位于 2 号染色体上, 该染色体上有 5 个注释为 SCPL 的基因; AtSMT 在大肠杆菌中表达纯化, 利用芥子酰葡萄糖酯和苹果酸进行催化反应, 用高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 检测出芥子酰苹果酸酯的生成^[15]。

Hause 等对 AtSMT 进行了更为深入的研究, 利用免疫印迹法证实了 AtSMT 在拟南芥中除了种子和幼苗, 在叶、花、茎、果实中均有大量表达, 在老苗、莲座叶中最为丰富, 根中较少表达; 在拟南芥叶片切片的荧光标记中, 定位于叶肉和表皮细胞的中央液泡中。在拟南芥中表达的蛋白与大肠杆菌中有 8 kDa 大小差异, 这可能是由于真核系统 N 糖基化修饰造成的差异。由此推测 SMT 在翻译成前蛋白后, 在高尔基体和内质网中加工成成熟蛋白随后被运送到液泡, 并在植物成熟期大量表达, 以应对各种逆境胁迫^[10]。

2.2.2 芥子酰胆碱

基于对 AtSMT 的功能鉴定, 研究发现拟南芥另一个突变体 *sng2* 具有类似 *sng1* 突变体积聚芥子酰葡萄糖酯的化学表型, 但导致芥子酰胆碱合成缺陷并增加胆碱水平。同样, 利用大肠杆菌异源表达和酶促催化活性分析确定 *sng2* 位点编码一个芥子酰葡萄糖:胆碱芥子酰转移酶 (AtSCT)^[13]。

甘蓝型油菜种子含量最高的芥子酰化合物是芥子酰胆碱。在种子萌发时期, 芥子酰葡萄糖酯可以在胆碱芥子酰基转移酶 SCT 的作用下转化为芥子酰胆碱。种子萌发时, 芥子酰胆碱酯酶 (Sinapine esterase, SCE) 催化种子储备的芥子酰胆碱水解。油菜 *Brassica napus* 中第一个参与芥子酰胆碱合成的 BnSCT1 是采用分子探针并结合 PCR 克隆的方法获得目标编码基因, 进行了结构分析后, 利用大肠杆菌进行异源表达, 获得目标

蛋白后进行了功能鉴定^[23]。为了获得 BnSCT1 功能的遗传证据, 转化拟南芥的 *sng2* 突变体, 实验证实突变体转化子中芥子碱积累的恢复伴随着种子芥子酰基葡萄糖含量的降低。利用 BnSCT1 基因编码框两端的序列对基因组分析, 获得第 2 个合成芥子酰胆碱的 BnSCT2。同时还从另外 2 个油菜品种 *B. rapa* 和 *B. oleracea* 中克隆获得 BrSCT (AM706348) 和 BoSCT (AM706347)^[24]。图 3 中这 3 个 BnSCTs 与拟南芥合成芥子酰酯类的 SCPL-ATs 聚在一个功能组。

2.2.3 芥子酰葡萄糖酯

1,2-二-O-芥子酰基-β-D-葡萄糖可以通过 AtSMT 合成, 它也是 1,2-二-O-芥子酰基-β-D-葡萄糖:芥子酰基葡萄糖芥子酰转移酶 (AtSST) 的特异催化产物。AtSST 的表达量和活性远低于高水平表达的 AtSMT, 只有在抑制 AtSMT 的植物体内, AtSST 的活性才得以揭示。AtSST 氨基酸与 AtSMT 有 78% 同源性, 不产生苹果酸芥子酯。通过结构建模分析发现 AtSST 具有严格的底物特异性可归因于苹果酸的静电排斥作用, 通过 AtSST 的单一氨基酸突变 (即 AtSMT C323 对应于 AtSST D327) 以及在 AtSST 中二硫键的丢失 (AtSMT C78-C323 对应 AtSST C80 和 D327 残基), 底物特异性降低。同样, AtSST D327C 突变体形成了类似 AtSMT 结构中的二硫键并拓宽其识别的底物类型^[14,25]。

此外, 除上述酰基糖酯外, AtSCT 还催化苯甲酰葡萄糖和胆碱形成苯甲酰胆碱^[26], AtSCPL17 还可以催化合成苯甲酰和芥子酰硫代葡萄糖酯^[26]。

2.3 酰化花青素类化合物合成

花青素及其衍生物广泛存在于植物组织中, 在紫外线照射、寒冷、干旱和氧化胁迫下积累时起到保护作用, 同时花青素有抗氧化、消除人体自由基、保护心脑血管、抗炎、抗癌等功效, 在食品、药品和美容保健等方面存在着巨大的发展潜力和良好的应用前景。花青素通过类黄酮途径

产生并储存在液泡中,它是一类具有 2-苯基苯并吡喃阳离子结构的多羟基酚类化合物,随着酚羟基的个数增多其稳定性会降低。对花色素苷的酰化促进了它们的颜色稳定性,酰化和非酰化花青素形式的相对含量指导了它们作为保健品和天然着色剂在食品工业中的应用^[27]。

花青素是紫胡萝卜 *Daucus carota* L. 贮藏根中积累的主要花青素类型,其中花青素-3-(2"-木糖-半乳糖苷) (Cyanidin-3-(2"-xylose-galactoside), Cy3XG) 和花青素-3-(2"-木糖-6-葡萄糖-半乳糖苷) (Cyanidin-3-(2"-xylose-6-glucose-galactoside), Cy3XGG) 是非酰化花青素的两种主要形式,使用芥子酰基、阿魏酰基或对香豆酰基葡萄糖酯作为酰基供体,通过酯交换将 Cy3XGG 酰化,分别形成花青素-3-(2"-木糖-6"-芥子酰-葡萄糖-半乳糖苷) (Cyanidin-3-(2"-xylose-6"-sinapoyl-glucose-galactoside), Cy3XSGG)、花青素-3-(2"-木糖-6"-阿魏酰-葡萄糖-半乳糖苷) (Cyanidin-3-(2"-xylose-6"-feruloyl-glucose-galactoside), Cy3XFGG) 或花青素-3-(2"-木糖-6"- (4-香豆酰)葡萄糖-半乳糖苷) (Cyanidin-3-(2"-xylose-6"- (4-coumaroyl)glucose-galactoside), Cy3XCGG)。在所有研究的紫色胡萝卜品种中, Cy3XSGG 和 Cy3XFGG 始终是贮藏根中存在的两种主要的酰化花色苷形式,占总花青素的 25%–85%。Curaba 等研究发现紫胡萝卜一个控制根中花青素酰化的显性基因位于 576 kb Raa1 区域,包含 29 个预测基因;经同源性和系统发育分析,从该区域内鉴定出一个由 3 个 SCPL 酰基转移酶编码基因 (DcSCPL1、DcSCPL2 和 DcSCPL3) 组成的基因簇;蛋白质序列分析表明只有 DcSCPL1 含有酰基转移酶活性所需的所有保守结构域,而 DcSCPL2 和 DcSCPL3 分别在 N-端信号肽和催化结构域存在部分缺失。比较转录组 (RNA-Seq) 和基因表达 (RT-qPCR) 证实 DcSCPL2 和 DcSCPL3 在受试样品中不表达,只有 DcSCPL1 (DcSAT) 是位于 Raa1 区域的唯一的

酰基转移酶基因,在所有紫色 (相对于非紫色) 根样本中表达和上调。结果表明 DcSCPL1 是由控制花青素生物合成的转录组因子 DcMYB7 正向调节表达的 SCPL-AT 基因 (MK572824)^[18]。

已报道的植物蓝色花色是由多酰基化花青素形成的,在飞燕草 *D. grandiflorum* 植物中,作为双功能供体的对羟基苯甲酰葡萄糖 (*p*-hydroxybenzoyl-Glc, pHBG) 是合成飞燕草素 3-*O*-芸香苷-7-葡萄糖苷 (Delphinidin 3-*O*-rutinoside-7-*O*-glucoside) 和/或紫飞燕草素 (Viodelphin) [飞燕草素 3-*O*-芸香苷-7-*O*-(6-*O*-(4-*O*-(葡萄糖基)-氧化苯甲酰基)-葡萄糖苷)] (Delphinidin 3-*O*-rutinoside-7-*O*-(6-*O*-(4-*O*-(glucosyl)-oxybenzoyl)-glucoside)) 的糖基和酰基供体。Nishizaki 等利用兼并引物 PCR 方法获得了 2 个 SCPL-ATs 基因 (*DgSCPL1* 和 *DgSCPL2*), 可能分别催化酰化合成 Dp3R7BG (Delphinidin 3-*O*-rutinoside-7-*O*-(6-*O*-(*p*-hydroxybenzoyl)-glucoside) 和 Dp3R7d(BG) (Delphinidin 3-*O*-rutinoside-7-*O*-(6-*O*-(4-*O*-(6-*O*-(*p*-hydroxybenzoyl)-glucosyl)-oxybenzoyl)-glucoside)^[3]。在白花突变体 WW 中未检测 *DgSCPL2* 的表达,基因组 DNA 测序验证表明 *DgSCPL2* 突变产生一个提前终止密码子,说明缺失的 *DgSCPL2* 活性导致了酰基化花青素积累减少。利用 *DgSCPL2* 信号肽与绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 构建融合基因,在洋葱表皮细胞中表达并定位在液泡中^[3]。

在模式植物拟南芥中花青素最常见的形式是芥子酰化花青素衍生物 3-*O*-[6-*O*-(4-*O*- β -D-glucopyranosyl)-*p*-coumaroyl]-2-*O*-(2-*O*-sinapoyl- β -D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]-5-*O*-(6-*O*-malonyl- β -D-glucopyranosyl) cyanidin, 通过分析 *sng1-1*、*sng1-5* 和 *sng1-6* 突变体来确定编码 AtSAT 的基因。野生型拟南芥植物和 *sng1-1* 突变体积累了大量的芥子酰化花青素,但 *sng1-5* 和 *sng1-6* 突变体没有积累酰化花青素^[14]。*sng1-5* 和 *sng1-6* 突变体都缺乏 *sng1* 和 At2g23000, *sng1-5* 突变体的缺失仅跨越这两个基因。用 *sng1* 基因转化 *sng1-5*

突变体也未能恢复芥子酰化花青素的积累,从而证明 At2g23000 是拟南芥中唯一的 AtSAT。自 AtSAT 的初步鉴定以来,已发现一种自然发生的 Pna-10 缺失突变体,其缺失 SNG1 和 At2g23000,缺乏芥子酰化花青素和芥子酰苹果酸^[28]。由于其与 AtSMT 和 AtSCT 具有很高相似性,也催化相同的底物芥子酰葡萄糖;但也不能排除 AtSMT 也有催化合成芥子酰化花青素的活性^[14]。针对已进行功能鉴定的 SCPL-ATs 的系统分析结果可以看出 AtSAT 与拟南芥的其他 SCPL-ATs 聚在一起,既有来自同一物种的相关性,也与识别催化相同底物的进化有关。此外,另外 46 个拟南芥 SCPL 蛋白的研究有可能进一步阐明 SCPL-ATs 在植物次生代谢中的功能进化。

Bontpart 等利用基因表达和代谢产物积累的相关性分析鉴定了 VvGAT1 和 VvSCPL2 参与酰化花青素的生物合成^[29],但系统分析结果表明 VvGAT1 聚在没食子酰黄烷-3-醇分支。

2.4 皂苷酰基化

燕麦 *A. strigosa* 在其根部会产生一种酰基化抗菌三萜苷 Avenacins,可防止土壤中各种病原体入侵。Avenacins 在 C-21 位置与 N-甲基邻氨基苯甲酸酯或苯甲酸酯发生转酰基反应,这个位点的酰基化修饰对于三萜类化合物在生物活性方面有至关重要的意义^[17]。AsSCPL1 是燕麦 *Sad7* 编码的一个 SCPL-AT, *Sad7* 也是 Avenacin 生物合成基因簇的一部分。燕麦植物体内这个转酰基反应需要 N-甲基邻氨基苯甲酸糖酯作为酰基供体,在 Avenacin 生物合成基因簇内,已鉴定出由 *Sad10* 编码的糖基转移酶基因 UGT74H5 催化 N-甲基邻氨基苯甲酸糖酯形成, *Sad9* 编码邻氨基苯甲酸酯 N-甲基转移酶 MT1,这 3 个酶在同一个较宽的基因簇内共同完成 Avenacin 的合成^[17]。

2.5 没食子酰黄烷醇

没食子酰黄烷-3-醇如儿茶素没食子酸酯 (Catechin gallate, CG)、表儿茶素没食子酸酯

(Epicatechin gallate, ECG)、没食子酸儿茶素没食子酸酯 (Gallocatechin gallate, GCG) 和表没食子酸儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin gallate, EGCG) 具有保护膜免受氧化损伤的重要生物活性^[30]。黄烷-3-醇的没食子酸化需要活化的没食子酰葡萄糖酯 (β -glucogallin) 作为酰基供体,催化没食子酸和 UDP-葡萄糖合成没食子酰葡萄糖酯的糖基转移酶 (UGT) 已在茶树 *Camelia sinensis* 中得到鉴定^[31]。Liu 等从茶树分离纯化并获得了可利用没食子酰葡萄糖酯催化 EC 和 EGC 的没食子酰化形成 ECG 和 EGCG 的 SCPL-AT^[31]。最近 Ahmad 等利用转录组分析方法对茶树基因组中的 SCPL-AT 基因进行了全基因组鉴定。其中 28 个相关基因在幼叶和营养芽中有差异表达,用重组酶鉴定了 3 种对表儿茶素具有没食子酸酰化活性的 SCPL-AT 酶 (CsSCPL11、CsSCPL13、CsSCPL14)。这些 SCPL-AT 基因的表达水平不仅与没食子酰儿茶素的积累相一致,而且利用大肠杆菌表达纯化的重组酶也显示利用没食子酰葡萄糖:儿茶素没食子酰基转移酶活性^[19]。

Akagi 等利用基因表达和代谢产物积累的相关性分析鉴定了 2 个可能参与没食子酰黄烷醇生物合成候选 SCPL-ATs (DkSCPL1, DkSCPL2)^[21];但系统分析结果表明仅 DkSCPL2 与茶的 3 个 SCPL-ATs 聚在没食子酰黄烷-3-醇分支。

2.6 莨菪碱中间体 Littorine 合成

茄科的一些药用植物产生药用的托品烷生物碱 (Tropane alkaloids, TA),如莨菪碱和东莨菪碱。Littorine 是莨菪碱和东莨菪碱生物合成途径中的关键中间体。然而,前体苯乳酸和托品烷形成 Littorine 的机制尚不完全清楚。Qiu 等利用功能基因组学方法寻找颠茄 *Atropa belladonna* 生物合成相关的 UDP-葡萄糖:苯乳酸糖基转移酶 (UGT1) 和 Littorine 合酶 (Littorine synthase, LS) 的功能基因。使用 UGT 保守域 (PF00201) 从颠茄转录组中鉴定出 102 个编码基因。利用

SCPL-ATs 和 SCP (均属于 α/β 水解酶超家族) 中的保守结构域 (PF00450) 从颠茄转录组中获得 33 个编码基因。TA 在次生根中合成, 已知托品烷生物碱生物合成基因在次生根中特异表达。根据表达谱分析确定 102 个 UGT 基因中的 7 个和 33 个 SCP 基因中的 2 个显示出与特征性托品烷生物碱生物合成基因相似的组织表达谱。然后利用 RNAi 技术分析 UGT1 和 LS 与托品烷生物碱积累的相关性, 利用大肠杆菌异源表达纯化了 UGT1 并进行酶促催化活性的鉴定; 而 LS 利用烟草表达系统与 UGT1 共表达, 在添加苯乳酸和阿托品的情況下确定 LS 的催化活性^[20]。

2.7 吲哚-3-乙酰基肌醇合成

生长素尤其是吲哚-3-乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA) 调节植物的许多生长和发育过程, 其中一种机制是 IAA 通过酯键与糖和醇结合, 或通过酰胺键与氨基酸、肽和蛋白质结合。IAA 酯结合物是单子叶植物中植物激素的主要形式, 在水稻 *O. sativa* 籽粒中, 酯结合物占内源生长素总量的 62%–70%, 其中 10% 是吲哚-3-乙酰基肌醇 (Indole-3-acetyl-myoinositol, IAI nos)。IAA 结合物不具有典型的生长素活性, 但被认为参与 IAA 运输、生长素分解代谢或保护植物激素免受氧化降解等过程, 并可作为生长素的临时储存。Ciarkowska 等基于对玉米和水稻中 SCPL-AT 催化合成 IAI nos 的酶学生化研究^[32-34], 利用酵母和细菌表达系统对 OsIAA-AT 基因进行了克隆和表达。在两种表达系统中功能性表达的蛋白酶均显示 1-O-IA Glc (1-O-indole-3-acetyl- β -D-glucose) 依赖的酰基转移酶活性。氨基酸序列分析证实水稻 IAI nos 合酶属于 SCPL 蛋白家族^[35]。

3 SCPL-ATs 的异源表达及应用

SCPL-ATs 通过分泌途径表达并定位于植物液泡, N-末端信号肽将新生多肽引导到内质网, 在内质网中经历折叠的处理步骤——信号肽断裂

和二硫键形成, 正确折叠的 SCPL-ATs 蛋白通过高尔基体运输, 在高尔基体中进行 N-X-S/T 基序内天冬酰胺残基的 N-糖基化 (其中 X 不是脯氨酸)。液泡相关转运因子识别 SCPL-ATs 的转运信号序列, 将 SCPL-ATs 转运定位到液泡囊腔。

由于 SCPL-ATs 的表达需要广泛的翻译后加工且异源宿主内运输困难, 被功能鉴定的 SCPL-ATs 并不多; 在常用的基因工程宿主表达系统中工程改造的酵母和植物烟草相对有效地实现了 SCPL-AT 的功能表达。例如, AtSCT 的细胞外分泌表达是利用酿酒酵母液泡定位蛋白 1 (*vpl1*) 突变型的菌株 W2579 促进其大量分泌蛋白^[36]; 为促进细胞内 SCPL-ATs 在酵母细胞内的表达, Stehle 等开发了宿主载体系统 BY4741 (*Agal1*)/pDIONYSOS, 半乳糖激酶缺乏引起的酿酒酵母 BY4741 菌株 (*Agal1*) 不能代谢半乳糖; 为提高表达活性 AtSMT, 还对影响翻译起始的序列、N-端信号肽和密码子适应性进行了一系列的优化并证实酿酒酵母 PEP4 的 N-端信号肽能很好地促进 AtSMT 的表达^[37]。

最常用的植物烟草表达系统, 能为 SCPL-ATs 的功能表达提供一个适宜的生长环境并确保正确的翻译、折叠和翻译后修饰。作为一个瞬时表达系统, 以豌豆花叶病毒 (Cowpea mosaic virus, CPMV) 为基础已成功用于燕麦 SAD7、油菜 BnSCT1 和 BnSCT2 以及 AbLS 等 SCPL-ATs 的异源表达和功能鉴定^[17,20,24]。

有关已功能鉴定的 SCPL-ATs 应用, Matsuba 等以紫背天牛 *Gomphrena globosa* 芥子酸葡萄糖基转移酶重组蛋白为原料并利用拟南芥蔗糖合成酶的 UDP-葡萄糖循环系统合成了 4 种 1-O-羟基肉桂酰- β -D-葡萄糖 (1-O-hydroxycinnamoyl- β -D-glucose, HCA-Glcs), 检测胡萝卜和北沙参 *Glehnia littoralis* 两种植物的蛋白质提取物依赖 HCA-Glc 酰基转移酶的活性, 结果发现两种植物培养细胞的蛋白质提取物对阿魏酰-Glc 的活性比芥子酰-Glc 更高, 也说明体内产生和积累的酰基

供体分子控制着不同酰基化的花色苷分子的合成^[38]。Srinivasan 等利用合成生物学技术在酵母细胞内完成了从单糖和氨基酸开始生物合成药用生物碱莨菪碱和东莨菪碱的合成途径构建,把来自酵母、细菌、植物和动物的超过 20 种蛋白质基因分布定位在 6 个亚细胞位置中表达,以重现植物中托烷生物碱生物合成的空间组织。其中最主要的元件就是 AbLS 的功能表达,通过利用红色荧光蛋白 (DsRed) 与 AbLS 的融合实现了 AbLS 定位液泡的表达,重现了植物中托烷生物碱的空间组织定位合成。这是把 SCPL-AT 基因元件利用合成生物学技术应用于植物次生代谢生物合成的成功范例^[39]。

4 问题与展望

到目前为止,已有 18 个 SCPL-ATs 酶蛋白进行了功能鉴定研究,随着转录组学和基因组学技术的发展,已有很多通过生物信息学分析预测为具有 SCPL-AT 结构的编码基因,如何快速地进行功能注释这些基因需要解决 2 个难题:一是建立简便易得的酰基葡萄糖酯的合成制备方法,目前已完成功能鉴定的 SCPL-ATs 多数是基于体内代谢产物差异或遗传互补的策略^[13-15,17],只有少数几个是从植物体内纯化酰基葡萄糖酯作为酰基供体,再结合酶学生化研究完成功能鉴定^[19,35],还有利用参与酰基供体合成的糖基转移酶与 SCPL-AT 共同在体表达进行功能鉴定^[20];二是需要系统地研究 SCPL-AT 蛋白酶成熟剪切机制,此类蛋白复合体成熟形成由二硫键共价作用的异源二聚体,图 1 是我们对两个亚基之间内部连接肽的系统分析,两类连接肽的剪切加工还需要对其成熟的蛋白酶进行实验验证。

目前已有很多合成酰基葡萄糖酯的糖基转移酶得到功能鉴定^[4,38],本文未作综述;可以利用这些糖基转移酶建立高效合成酰基葡萄糖酯的生物表达系统,既可方便纯化制备用于 SCPL-ATs

的体外酶促活性分析,也可直接建立一个体内共表达的功能分析平台,促进 SCPL-ATs 的功能注释研究。同时,可通过蛋白质工程策略改变 SCPL-ATs 的亚细胞区室化表达及其成熟过程的调控,就如同托品烷生物碱生物合成^[39]的技术启示,利用合成生物学技术把 SCPL-ATs 应用到植物次生代谢产物的生物合成研究。

REFERENCES

- [1] D'Auria JC. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(3): 331-340.
- [2] Bontpart T, Cheynier V, Ageorges A, et al. BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *New Phytol*, 2015, 208(3): 695-707.
- [3] Nishizaki Y, Yasunaga M, Okamoto E, et al. *P*-hydroxybenzoyl-glucose is a zwitter donor for the biosynthesis of 7-polyacylated anthocyanin in *Delphinium*. *Plant Cell*, 2013, 25(10): 4150-4165.
- [4] Yang Y, Liu M, Zhang W, et al. Identification and characterization of two new 1-*O*-acyl-glucose-ester forming glucosyltransferases from *Erigeron breviscapus*. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(10): 2848-2855.
- [5] Milkowski C, Strack D. Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry*, 2004, 65(5): 517-524.
- [6] Wilson AE, Matel HD, Tian L. Glucose ester enabled acylation in plant specialized metabolism. *Phytochem Rev*, 2016, 15(6): 1057-1074.
- [7] Steffens JC. Acyltransferases in protease's clothing. *Plant Cell*, 2000, 12(8): 1253-1255.
- [8] Li AX, Eannetta N, Ghangas GS, et al. Glucose polyester biosynthesis. Purification and characterization of a glucose acyltransferase. *Plant Physiol*, 1999, 121(2): 453-460.
- [9] Li AX, Steffens JC. An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6902-6907.
- [10] Hause B, Meyer K, Viitanen PV, et al.

- Immunolocalization of 1-*O*-sinapoylglucose: malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2002, 215(1): 26-32.
- [11] Mugford ST, Milkowski C. Serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plants. *Methods Enzymol*, 2012, 516: 279-297.
- [12] Yamada K, Basak AK, Goto-Yamada S, et al. Vacuolar processing enzymes in the plant life cycle. *New Phytol*, 2020, 226(1): 21-31.
- [13] Shirley AM, McMichael CM, Chapple C. The *sng2* mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose: choline sinapoyltransferase. *Plant J*, 2001, 28(1): 83-94.
- [14] Fraser CM, Thompson MG, Shirley AM, et al. Related *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like sinapoylglucose acyltransferases display distinct but overlapping substrate specificities. *Plant Physiol*, 2007, 144(4): 1986-1999.
- [15] Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, et al. Cloning of the SNG1 gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell*, 2000, 12(8): 1295-1306.
- [16] Stehle F, Brandt W, Stubbs MT, et al. Sinapoyltransferases in the light of molecular evolution. *Phytochemistry*, 2009, 70(15/16): 1652-1662.
- [17] Mugford ST, Qi X, Bakht S, et al. A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. *Plant Cell*, 2009, 21(8): 2473-2484.
- [18] Curaba J, Bostan H, Cavagnaro PF, et al. Identification of an SCPL gene controlling anthocyanin acylation in carrot (*Daucus carota* L.) root. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1770.
- [19] Ahmad MZ, Li P, She G, et al. Genome-wide analysis of serine carboxypeptidase-like acyltransferase gene family for evolution and characterization of enzymes involved in the biosynthesis of galloylated catechins in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Front Plant Sci*, 2020, 11: 848.
- [20] Qiu F, Zeng J, Wang J, et al. Functional genomics analysis reveals two novel genes required for littorine biosynthesis. *New Phytol*, 2020, 225(5): 1906-1914.
- [21] Akagi T, Ikegami A, Suzuki Y, et al. Expression balances of structural genes in shikimate and flavonoid biosynthesis cause a difference in proanthocyanidin accumulation in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Planta*, 2009, 230(5): 899-915.
- [22] Lorenzen M, Racicot V, Strack D, et al. Sinapic acid ester metabolism in wild type and a sinapoylglucose-accumulating mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1996, 112(4): 1625-1630.
- [23] Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, et al. Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J*, 2004, 38(1): 80-92.
- [24] Weier D, Mittasch J, Strack D, et al. The genes BnSCT1 and BnSCT2 from *Brassica napus* encoding the final enzyme of sinapine biosynthesis: molecular characterization and suppression. *Planta*, 2008, 227(2): 375-385.
- [25] Franziska FS. Snap-shot of serine carboxypeptidase-like acyltransferase evolution: the loss of conserved disulphide bridge is responsible for the completion of neo-functionalization. *J Phylogen Evolution Bio*, 2013, 1: 115.
- [26] Lee S, Kaminaga Y, Cooper B, et al. Benzoylation and sinapoylation of glucosinolate R-groups in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2012, 72(3): 411-422.
- [27] Zhao CL, Yu YQ, Chen ZJ, et al. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chem*, 2017, 214: 119-128.
- [28] Li X, Bergelson J, Chapple C. The *ARABIDOPSIS* accession Pna-10 is a naturally occurring *sng1* deletion mutant. *Mol Plant*, 2010, 3(1): 91-100.
- [29] Bontpart T, Ferrero M, Khater F, et al. Focus on putative serine carboxypeptidase-like acyltransferases in grapevine. *Plant Physiol Biochem*, 2018, 130: 356-366.
- [30] Saffari Y, Sadrzadeh SMH. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage *in vitro*. *Life Sci*, 2004, 74(12): 1513-1518.
- [31] Liu Y, Gao L, Liu L, et al. Purification and

- characterization of a novel galloyltransferase involved in catechin galloylation in the tea plant (*Camellia sinensis*). J Biol Chem, 2012, 287(53): 44406-44417.
- [32] Kowalczyk S, Jakubowska A, Zielińska E, et al. Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-myoinositol in immature endosperm of *Zea mays*. Physiol Plant, 2003, 119(2): 165-174.
- [33] Starzyńska E, Kowalczyk S. Novel 1-*O*-indole-3-acetyl- β -D-glucose-dependent acyltransferase transferring indoleacetyl moiety to some mono-di- and oligosaccharides. Acta Physiol Plant, 2012, 34(1): 53-63.
- [34] Ciarkowska A, Ostrowski M, Jakubowska A. Abiotic stress and phytohormones affect enzymic activity of 1-*O*-(indole-3-acetyl)- β -D-glucose: myo-inositol indoleacetyl transferase from rice (*Oryza sativa*). J Plant Physiol, 2016, 205: 93-96.
- [35] Ciarkowska A, Ostrowski M, Jakubowska A. A serine carboxypeptidase-like acyltransferase catalyzes synthesis of indole-3-acetic (IAA) ester conjugate in rice (*Oryza sativa*). Plant Physiol Biochem, 2018, 125: 126-135.
- [36] Shirley AM, Chapple C. Biochemical characterization of sinapoylglucose: choline sinapoyltransferase, a serine carboxypeptidase-like protein that functions as an acyltransferase in plant secondary metabolism. J Biol Chem, 2003, 278(22): 19870-19877.
- [37] Stehle F, Stubbs MT, Strack D, et al. Heterologous expression of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase and characterization of the kinetic mechanism. FEBS J, 2008, 275(4): 775-787.
- [38] Matsuba Y, Okuda Y, Abe Y, et al. Enzymatic preparation of 1-*O*-hydroxycinnamoyl- β -D-glucoses and their application to the study of 1-*O*-hydroxycinnamoyl- β -D-glucose-dependent acyltransferase in anthocyanin-producing cultured cells of *Daucus carota* and *Glehnia littoralis*. Plant Biotechnol, 2008, 25(4): 369-375.
- [39] Srinivasan P, Smolke CD. Biosynthesis of medicinal tropane alkaloids in yeast. Nature, 2020, 585(7826): 614-619.

(本文责编 陈宏宇)