

千层塔中 III 型聚酮合酶基因的克隆、表达与功能鉴定

叶金翠¹, 张萍^{1*}, 孙洁胤¹, 郭潮潭¹, 陈国神¹, 阿部郁朗², 野口博司²

(1. 浙江省医学科学院药物研究所, 浙江 杭州 310013; 2. 日本静冈县立大学药学院, 日本 静冈)

摘要: III 型聚酮合酶是以合成聚酮类化合物为主的一类重要生物合成酶。本文利用逆转录聚合酶链反应从中草药千层塔新鲜嫩叶中扩增聚酮合酶基因, 得到一个 III 型聚酮合酶全长 cDNA。该基因全长 1 212 bp, 编码 404 个氨基酸。与已知的其他植物来源的聚酮合酶氨基酸序列有约 50%~66% 的同源性。cDNA 经双酶切后克隆至 pQE81L, 并导入大肠杆菌 (*E. coli*) M15 中表达, 产生大量带寡聚组氨酸标记的重组酶, 重组酶分子质量大小约为 46.4 kDa。酶活性鉴定研究表明, 该重组酶可催化芳香族底物、脂肪族底物生成系列非天然聚酮产物, 尤其是其可催化 *N*-甲基邻氨基苯甲酰 CoA 和丙二酰 CoA 生成 1, 3-二羟基-*N*-甲基-吡啶酮, 吡啶酮生物碱一直被认为只能由吡啶酮合酶合成。该工作为研究千层塔中 III 型聚酮合酶在天然药物石杉碱甲生物合成中的作用奠定基础。

关键词: 千层塔; III 型聚酮合酶; 基因克隆

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 10-1273-06

Cloning, expression and functional identification of a type III polyketide synthase gene from *Huperzia serrata*

YE Jin-cui¹, ZHANG Ping^{1*}, SUN Jie-yin¹, GUO Chao-tan¹, CHEN Guo-shen¹,
ABE Ikuro², NOGUCHI Hiroshi²

(1. Institute of Materia Medica, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou, 310013, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan)

Abstract: A cDNA encoding novel type III polyketide synthase (PKS) was cloned and sequenced from young leaves of Chinese club moss *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. by RT-PCR using degenerated primers based on the conserved sequences of known CHSs, and named as *H. serrata* PKS2. The terminal sequences of cDNA were obtained by the 3'- and 5'-RACE method. The full-length cDNA of *H. serrata* PKS2 contained a 1 212 bp open reading frame encoding a 46.4 kDa protein with 404 amino acids. The deduced amino acid sequence of *H. serrata* PKS2 showed 50%–66% identities to those of other chalcone synthase super family enzymes of plant origin. The recombinant *H. serrata* PKS2 was functionally expressed in *Escherichia coli* with an additional hexahistidine tag at the N-terminus and showed unusually versatile catalytic potency to produce various aromatic tetraketides, including chalcones, benzophenones, phloroglucinols, and acridones. In particular, the enzyme accepted bulky starter substrates *N*-methylantraniloyl-CoA, and carried out three condensations with malonyl-CoA to produce 1, 3-dihydroxy-*N*-methylacridone. Interestingly, *H. serrata* PKS2 lacks most of the consensus active site sequences with acridone synthase from *Ruta graveolens* (Rutaceae).

Key words: *Huperzia serrata*; type III polyketide synthase; gene expression

收稿日期: 2011-06-25.

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y208631); 浙江省卫生厅项目 (2008A003).

*通讯作者 Tel: 86-571-88215623, Fax: 86-571-88861093, E-mail: sally7612@163.com

千层塔 [*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.] 为我国名贵珍稀中药材, 从中分离得到的生物碱石杉碱甲 (huperzine A, Hup A) 是一种高效、可逆、高选择性的乙酰胆碱酯酶抑制剂, 已成为国内外治疗早老性痴呆症最有效的药物之一^[1, 2]。Hup A 的化学合成复杂, 至今无法实现工业化, 仍从日渐匮乏的野生千层塔中提取, 来源有限, 价格昂贵, 难以满足临床需要, 其应用面临资源瓶颈。

利用生物技术解决 Hup A 的药源问题成为新的发展方向^[3-5], 通过对 Hup A 生物合成途径中关键酶基因的基因操纵与遗传转化, 实施次生代谢工程构建高效表达 Hup A 或其重要前体的基因工程细胞株, 是解决 Hup A 药源问题最有前途的方法之一, 千层塔中的基因研究备受关注^[4-6]。最近我国学者利用高通量测序技术对包括千层塔在内的药用植物进行基因研究, 试图为植物中活性成分的生物合成途径研究提供帮助^[4, 5, 7]。Hup A 在结构上属于石松生物碱, 根据石松生物碱 (包括 Hup A) 的生物合成途径假说, III 型聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 参与了 Hup A 的生物合成^[8, 9]。PKS 是存在于微生物、植物中以合成聚酮类化合物为主的一类生物合成酶。聚酮类化合物在抗感染、抗肿瘤、抗真菌、免疫抑制方面具有巨大应用价值 (著名药物如红霉素、阿霉素、洛伐他丁等)。按蛋白结构 PKS 可分为 I、II、III。PKS I、II 存在于微生物界, 合成多烯类、聚醚类和安莎类聚酮化合物及合成大环内酯和芳香环结构的抗生素, PKS III 广泛存在于植物界, 属于查尔酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 类, 能催化产生一系列结构各异、具有不同生理活性的植物次生代谢产物, 如生物碱 (吡啶酮)、类黄酮 (查尔酮、二苯乙烯、苯甲酮、间苯三酚、间苯二酚、吡喃酮、苯并- γ -吡喃酮等)。近年, 一系列功能不同的植物 PKS III 不断被克隆和鉴定^[10], 如芪合酶 (stilbene synthase, STS)、吡喃酮合酶 (2-pyrone synthase, 2PS)、苯甲酮合酶 (benzalacetone synthase, BAS)、芦荟松合酶 (aloesone synthase, ALS)、吡啶酮合酶 (acridone synthase, ACS)、聚八酮合酶 (octaketide synthase, OKS)、聚五酮色原酮合酶 (pentaketide chromone synthase, PCS) 等。前期工作中, 作者已首次从千层塔中克隆得到一个全新编码 III 型 PKS 的 cDNA 序列^[6], 并进行了功能鉴定。本文报道千层塔中另一个 III 型 PKS 的成功克隆、表达和初步功能鉴定, 为下一步探索其在天然药物 Hup A 生物合成中的作用奠定基础。

材料与方法

材料及试剂 千层塔新鲜植物采自浙江磐安山区 (经浙江省医科院刘骅副研究员鉴定), 新鲜嫩叶经 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 次氯酸钠消毒 15 min 后, 用双蒸水冲洗干净, 放置液氮冻存。特异性引物由理科研株式会社合成 (日本), 2 \times ligation mix 购自 Wako 公司 (日本); Agarose L 购自和光纯药工业株式会社 (日本); SYBR Green、Ex Taq 酶、10 \times Ex Taq buffer、dNTP mix 等购自 TAKARA 公司 (日本); [2-¹⁴C] 丙二酰辅酶 A (Coenzyme A, CoA) 购自 Moravек Biochemicals 公司 (Brea, CA, USA)。底物 4-香豆酰 CoA、肉桂酰 CoA、苯乙酰 CoA、己酰 CoA、苯甲酰 CoA、二氢香豆酰 CoA、邻氨基苯甲酰 CoA 和 *N*-甲基邻氨基苯甲酰 CoA 参见作者之前的文献由实验室化学合成^[11-14]。丙二酰 CoA 和其他的脂肪族 CoA 购自 Sigma 公司 (St Louis, MO, USA)。氨苄青霉素 (AMP)、异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、异丙醇、乙醇等其他材料均来源于商业途径。

基因的克隆 从千层塔新鲜嫩叶中提取总 mRNA, 在逆转录酶 (Wako, 日本) 的作用下以 Oligo (dT)₁₂₋₁₈(RACE 32 = 5'-GGCCACGCGTCGACT AGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') 为引物合成第一链 cDNA, 建立 cDNA 文库: 以 cDNA 文库为模板, 根据多功能 PKS III 型查尔酮合酶中高度保守的序列设计简并引物 (380A, 112S, 368A, 174S), 进行套式 PCR, 先以 112S 和 380A 引物扩增, 再以 174S 和 368A 扩增获得一个长度为 534 bp 的 DNA 序列。380A、112S、368A、174S 分别代表其在紫花苜蓿查尔酮合酶 (*M. sativa* CHS) 对应的氨基酸位置^[6]。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 共 35 个循环。PCR 扩增产物经试剂盒 (QIAGEN 公司, 德国) 凝胶回收后, 克隆到 pT7 Blue T-载体 (Novagene 公司, 德国), 并转化到 *E. coli* Nova blue 感受态细胞, LB 琼脂平板培养, PCR 确认重组子。摇床培养阳性克隆单菌落, 用 GFX 质粒提取试剂盒提取质粒 (Amersham Biosciences, 美国), 测序。根据获得的核心序列, 设计基因特异引物, 经基因末端快速扩增法 (3' RACE 和 5' RACE) 快速扩增出 cDNA 的 5' 端和 3' 端片段。3'-RACE 系利用 mRNA 的 3' 端有 poly(A)⁺ 存在的特点, 将 RACE32 作为反义引物, 以前述合成的 cDNA 为模板, 通过特异引物 (5'-GTCTTCGAAATTCAGTGGGCTGGAGAG-3' 和 5'-CTGTTTATCCAGGCGGTCCAGCTAT-3') 获

得 3' 端基因片断。5' RACE 系采用 Marathon™ cDNA 扩增试剂盒 (CLONTECH, 美国), 合成双链 cDNA, 纯化, 然后在 T₄ DNA 连接酶作用下连接上衔接子引物 (AP1、AP2) 作为模板, 根据已知的核心序列, 设计基因特异引物 (5'-GTCAGGAAGGATCAGCTCTC CAGCCCA-3' 和 5'-CCATCTCCAAATAAAGCAGAT CCCAC-3'), 与试剂盒的衔接子引物组合, 获得 5' 端基因片断。

原核表达载体构建和诱导表达 根据 cDNA 全长序列, 设计带酶切位点的 5' 端上游引物 (Fw-Sal I primer: 5'-CTGCTGGTTCGACATGCCTGCAACTGAA TTAG-3', 划线处为酶切位点) 和 3' 端下游引物 (Rv-Hind III primer: 5'-CCGCCGAAGCTTTTAGAGTTGA GTACTTCTCAG-3'), 经 Sal I 和 Hind III 双酶切后克隆至带 6 个组氨酸标记的 pQE81L (QIAGEN, 德国) 原核表达载体的酶切位点上, 用 T₄ DNA 连接酶连接后, 转化 Nova Blue 感受态细胞, 用 100 μg·mL⁻¹ 氨苄青霉素筛选阳性菌落并提取质粒进行双酶切鉴定和测序。测序证明克隆片段正确后将表达质粒转化 *E. coli* M15 宿主菌中, 于 5 mL 含 100 μg·L⁻¹ AMP 的 LB 液体培养介质培养过夜。取过夜菌液接种于新鲜的 1 L LB 培养液中, 24 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 后, 在 1 mmol·L⁻¹ IPTG 下诱导表达产生带寡聚组氨酸标记的重组酶。

重组酶的纯化 经诱导表达的细菌培养液室温下离心 30 min (10 000×g), 收集菌体。菌落重悬于特定的缓冲液中, 经超声破碎, 离心, 含重组蛋白的上清液过柱, 经与组氨酸高度亲和的金属镍螯合树脂亲和柱 (Amersham Bioscience, 美国) 色谱纯化后, 得到纯化的重组酶, 经蛋白电泳 SDS-PAGE 确定其分子量大小。重组酶经滤膜过滤浓缩后以牛血清蛋白作标准用 Bradford 方法 (Bio-Rad Protein Assay Kit) 测定浓度。

重组酶的催化功能鉴定 分别以芳香族 CoA (4-香豆酰 CoA、肉桂酰 CoA、苯乙酰 CoA、己酰 CoA、苯甲酰 CoA、二氢香豆酰 CoA、邻氨基苯甲酰 CoA、*N*-甲基邻氨基苯甲酰 CoA) 和 C₆-C₂₀ 脂肪族 CoA 作为起始底物, 在 *H. serrata* 重组酶的催化下, 与丙二酰 CoA 在 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中反应, 酶反应条件参见作者之前的工作^[6]。反应液过夜后加 20% 盐酸 50 μL 终止反应。加 1 mL 乙酸乙酯 (EtOAc), 充分振荡, 离心, 取 EtOAc 层经离心浓缩挥去 EtOAc (CVE/3100, 日本东京理化 eyela 公司), 以甲醇 50 μL

或丙酮 30 μL 溶解。以芳香族 CoA 为底物的样品以 HPLC 梯度洗脱分析后经 HPLC-ESI-MS (Agilent, 美国) 进一步测定产物的 *m/z*, 推测其分子及结构^[6]。以脂肪族 CoA 为底物的样品, 点样于硅胶板, 层析缸中展开, 展开剂为 EtOAc-hexane-AcOH 63:27:5 (v/v/v)。薄层板展开剂挥干后避光保存过夜, 供放射自显影 BAS-2000II (富士胶卷)。酶催化反应产物的鉴定通过与以前研究的已知物直接对照而得^[11, 13-15], 新的产物通过收集、纯化结晶经核磁共振作进一步分析。

结果与讨论

1 千层塔中一个 III 型聚酮合酶基因的分离

基于查尔酮合酶高度保守序列设计简并引物, 利用 RT-PCR 方法, 再次从民间草药千层塔的新鲜嫩叶中克隆得到一个编码 III 型聚酮合酶的 cDNA, 命名为 *H. serrata* PKS2。序列分析表明: *H. serrata* PKS2 具有完整的阅读框架, 基因全长 1 212 bp, 编码 404 个氨基酸。与已知的其他植物来源的 PKS 氨基酸序列有约 50%~66% 的同源性 (图 1), 例如, 与苜蓿查尔酮合酶 (*Medicago sativa* CHS) 的同源性为 66.8%; 与圆叶大黄芪合酶 (*Rheum tataricum* STS) 的同源性为 53.7%; 与掌叶大黄苯甲酰合酶 (*R. palmatum* BAS) 的同源性为 55.8%; 与掌叶大黄芦荟松合酶 (*R. palmatum* ALS) 的同源性为 53.8%; 与吡喃酮合酶 (*G. hybrida* 2PS) 的同源性为 54.1%; 与芸香吡喃酮合酶 (*R. graveolens* ACS) 的同源性为 56.8%; 与木立芦荟戊烯酮-色酮合酶 (*A. arborescens* PCS) 的同源性为 50.6%。同时, 与之前作者成功克隆的 *H. serrata* PKS1 的氨基酸有 73.8% 的相似性, 具有所有植物来源的 III 型聚酮合酶高度保守的催化活性中心 (即 CoA 结合位点, Cys-His-Asn)^[6, 16]。III 型 PKS 催化聚酮合成的机制为催化相关的 CoA 起始底物在活性位点半胱氨酸残基 (Cys164) 上结合, 经丙二酰 CoA 的一系列脱羧缩合, 使得聚酮链延长, 随之酶中间产物闭环和芳构化, 形成复杂的天然产物。位于活性中心腔内的活性氨基酸残基有 Thr197、Phe215、Gly256 和 Ser338 (*M. sativa* CHS 中的氨基酸位置数)。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^[17]。

2 *H. serrata* PKS2 的原核表达载体构建

H. serrata PKS2 全长基因序列的 cDNA 经双酶切后, 连接到原核表达载体 pQE81L 中, 获得重组表

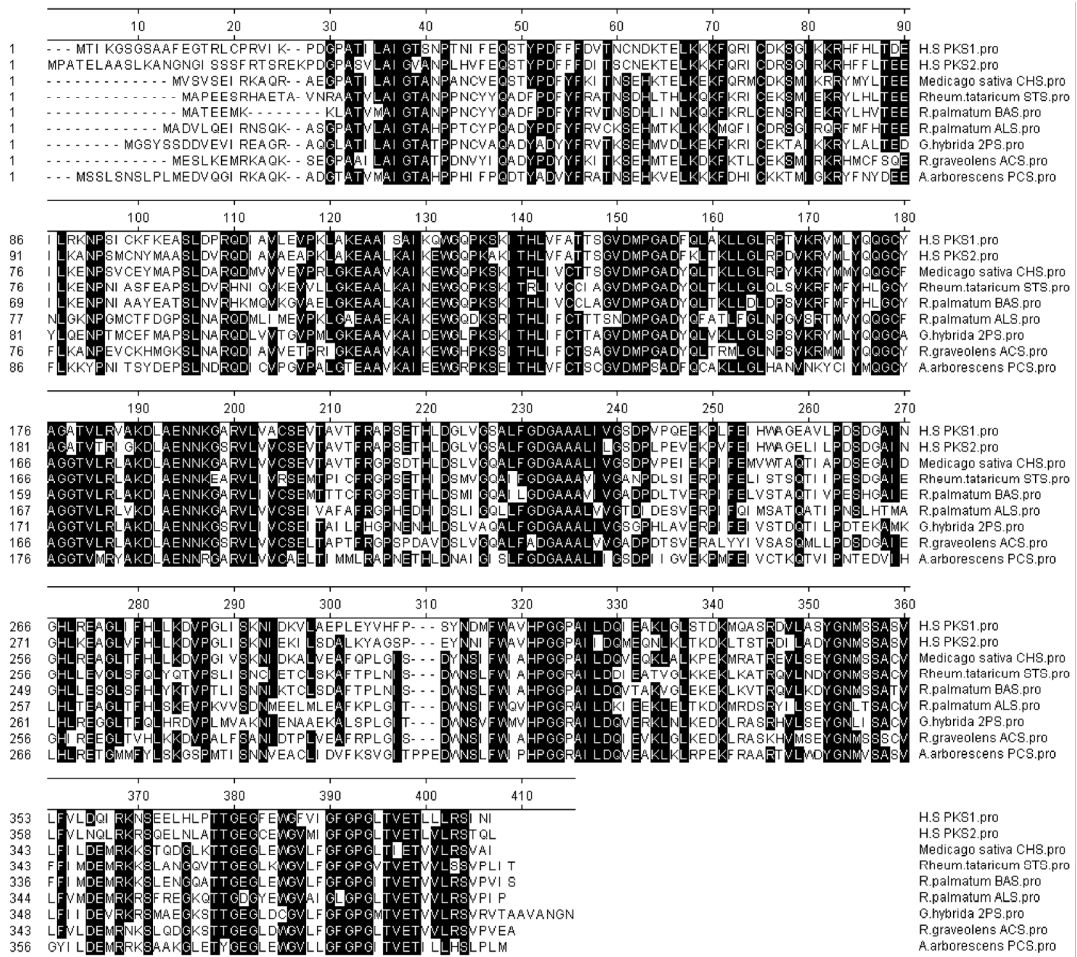


Figure 1 Comparison of primary sequences of *H. serrata* PKSs and other CHS-superfamily enzymes

达质粒 pQE/PKS, 将重组表达质粒转化大肠杆菌 M15, 在 IPTG 诱导下表达产生大量带寡聚组氨酸标记的重组酶。经过与组氨酸结合金属螯合树脂亲和柱色谱纯化后, 得到纯化的 *H. serrata* PKS 重组酶。经 SDS-PAGE 确定其分子质量大小为 46.4 kDa (图 2)。上述研究结果表明此酶在大肠杆菌中可高效表达。

3 *H. serrata* PKS2 的催化功能

初步催化功能鉴定研究结果表明, *H. serrata* PKS2 和作者之前报道的 *H. serrata* PKS1 一样具有较广的底物选择性, 可催化芳香族底物、脂肪族底物生成系列产物。它可接受芳香性 CoA, 如香豆酰 CoA、苯甲酰 CoA、苯乙酰 CoA、己酰 CoA、肉桂酰 CoA、二氢香豆酰 CoA 和 *N*-甲基邻氨基苯甲酰 CoA 作为起始底物, 催化丙二酰 CoA 发生一系列缩合反应, 生成新型的非天然聚酮产物 (图 3); 同时, 它也接受长链脂肪酸 CoA C6 (*n*-hexanoyl) 到 C12 (*n*-dodecanoyl) 作为起始底物, 催化丙二酰 CoA 发生一系列缩合反应, 生成主产物为聚三酮 α -吡喃酮 (图 4)。酶活性

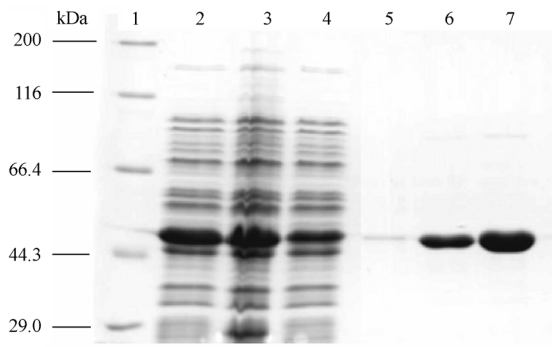


Figure 2 SDS-PAGE analysis of the purification of the recombinant *H. serrata* PKS2. 1: Marker; 2: Supernatant of the *E. coli* lysate; 3: Precipitation of the *E. coli* lysate; 4: Column flow-through fraction; 5: Discarded washing fractions; 6: Eluates containing recombinant *H. serrata* PKS2; 7: Recombinant *H. serrata* PKS2 concentrated

研究结果与作者之前从千层塔中成功克隆的重组酶一样^[6], *H. serrata* PKS2 可催化 *N*-甲基邻氨基苯甲酰 CoA 和 1 分子丙二酰 CoA 生成聚二酮 4-羟基-1-甲基-2 (1*H*)-喹诺酮和副产物 1, 3-二羟基-*N*-甲基-吡

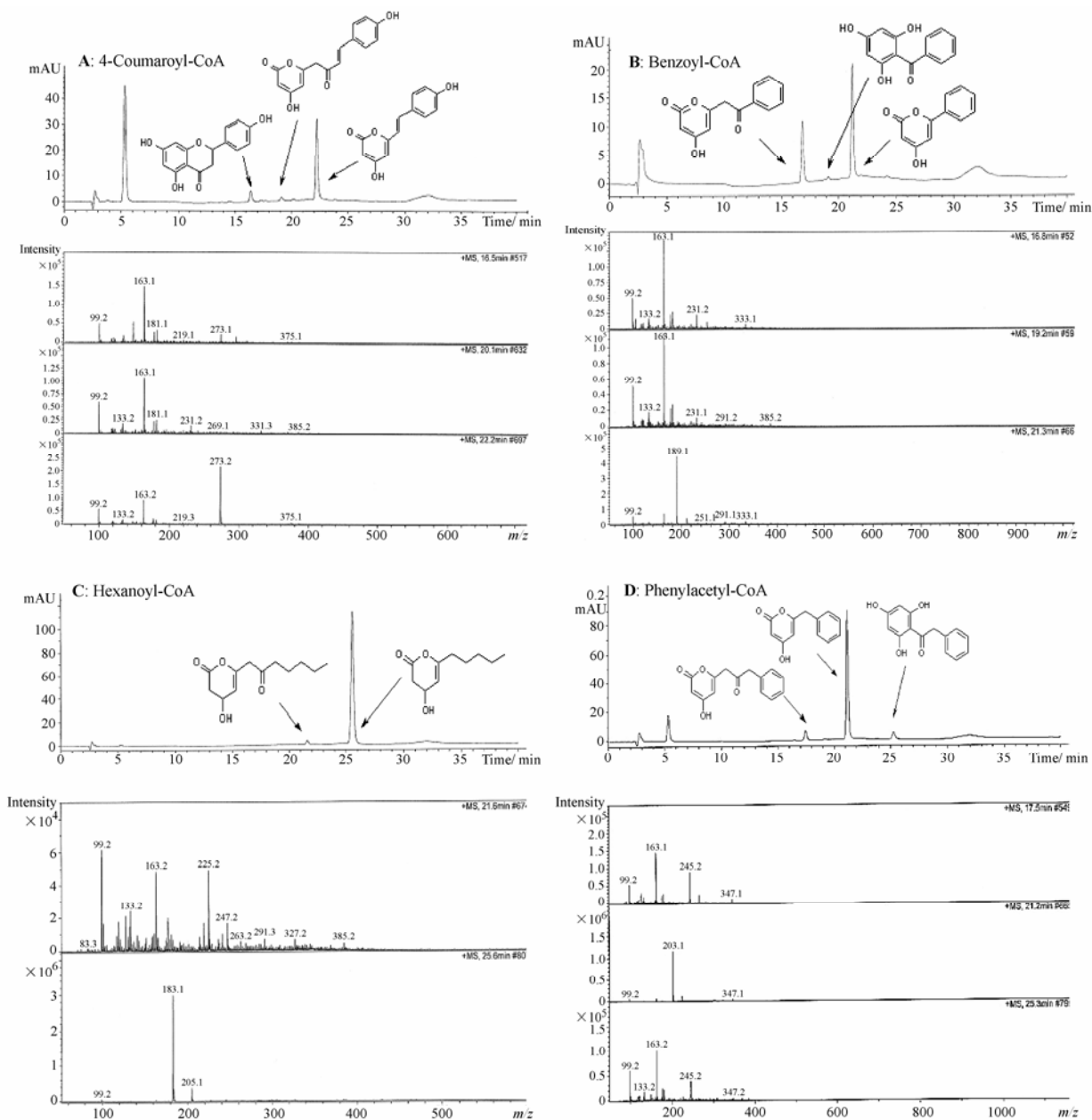


Figure 3 HPLC-MS profile of *H. serrata* PKS enzyme reaction products from malonyl-CoA and (A) 4-coumaroyl-CoA, (B) benzoyl-CoA, (C) hexanoyl-CoA, (D) phenylacetyl-CoA

吡啶酮。芸香吡啶酮合酶是目前唯一发现能接受 *N*-甲基邻氨基苯甲酰 CoA 合成吡啶酮生物碱的 III 型 PKS^[6, 18], 而千层塔中的 *H. serrata* PKS2 缺乏芸香科植物来源吡啶酮合酶接受 *N*-甲基邻氨基苯甲酰 CoA 所具备的主要活性中心如 Ser132、Ala133 和 Val265 等。这里再次证明吡啶酮生物碱可由非芸香科植物的 III 型 PKS 合成, 但尚无从千层塔中提取得到吡啶酮生物碱的报道, 作者推测 *H. serrata* PKS2 可能参与天然药物石杉碱甲的生物合成, 但有待于进一步的研究证实。

聚酮类化合物是一类具生物活性的重要天然次级代谢物, 尽管聚酮类化合物的化学结构复杂多样, 但其生物合成机制基本相似, 通常在 PKS 的作用下催化生成。千层塔中 III 型 PKS 基因的研究, 不仅为开展 Hup A 生物合成途径研究, 实施次生代谢工程, 应用生物技术方法大量生产石杉碱或其中间体, 解决 Hup A 的药源问题打基础; 而且对聚酮合酶资源的研究做出贡献。聚酮合酶作为未来化学发展的重要资源, 可用于发展绿色化学, 合成一些重要中间体以及一些难以化学合成的新型化合物。

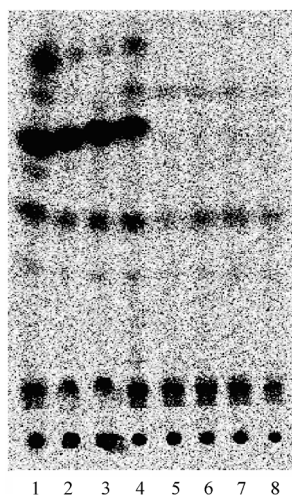


Figure 4 TLC based analysis of radiolabeled products of CoA-esters of long-chain fatty acid by *H. serrata* PKS2. 1: *n*-Hexanoyl (C6); 2: *n*-Octanoyl (C8); 3: *n*-Decanoyl (C10); 4: *n*-Dodecanoyl (C12); 5: *n*-Tetradecanoyl (C14); 6: *n*-Hexadecanoyl (C16); 7: *n*-Octadecanoyl (C18); 8: *n*-Eicosanoyl (C20)

References

- [1] Rafii MS, Walsh S, Little JT, et al. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2011, 76:1389–1394.
- [2] Ye JC, Zeng S, Zheng GL, et al. Pharmacokinetics of huperzine A after transdermal and oral administration in beagle dogs [J]. *Int J Pharm*, 2008, 356: 187–192.
- [3] Zhu D, Wang J, Zeng Q, et al. A novel endophytic huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata* [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 109: 1469–1478.
- [4] Luo HM, Sun C, Li Y, et al. Analysis of expressed sequence tags from the *Huperzia serrata* leaf for gene discovery in the areas of secondary metabolite biosynthesis and development regulation [J]. *Physiol Plant*, 2010, 139: 1–12.
- [5] Luo HM, Li Y, Sun C, et al. Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serrata* and *Phlegmariurus carinatus* reveals putative genes involved in lycopodium alkaloid biosynthesis and developmental regulation [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 209.
- [6] Wanibuchi K, Zhang P, Abe T, et al. An acridone-producing novel multifunctional type III polyketide synthase from *Huperzia serrata* [J]. *FEBS J*, 2007, 274: 1073–1082.
- [7] Li Y, Sun C, Luo HM, et al. Transcriptome characterization for *Salvia miltiorrhiza* using 454 GS FLX [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2010, 45: 524–529.
- [8] Ma XQ, Gang DR. The Lycopodium alkaloids [J]. *Nat Prod Rep*, 2004, 21: 752–772.
- [9] Huang Q, Roessner CA, Croteau R, et al. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol [J]. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9: 2237–2242.
- [10] Zhang P, Chen GS. Advances in studies on type III polyketide synthases from plants [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs* (中草药), 2008, 39: 309–313.
- [11] Abe I, Morita H, Nomura A, et al. Substrate specificity of chalcone synthase: enzymatic formation of unnatural polyketides from synthetic cinnamoyl-CoA analogues [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 11242–11243.
- [12] Abe I, Watanabe T, Noguchi H. Enzymatic formation of long-chain polyketide pyrones by plant type III polyketide synthases [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2447–2453.
- [13] Abe I, Abe T, Wanibuchi K, et al. Enzymatic formation of quinolone alkaloids by a plant type III polyketide synthase [J]. *Org Lett*, 2006, 8: 6063–6065.
- [14] Morita H, Takahashi Y, Noguchi H, et al. Enzymatic formation of unnatural aromatic polyketides by chalcone synthase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279: 190–195.
- [15] Abe I, Utsumi Y, Oguro S, et al. The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide [J]. *FEBS Lett*, 2004, 562: 171–176.
- [16] Jez JM, Austin MB, Ferrer J, et al. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases [J]. *Chem Biol*, 2000, 7: 919–930.
- [17] 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]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 12709–12716.
- [18] Rohde B, Hans J, Martens S, et al. Anthranilate *N*-methyltransferase, a branch-point enzyme of acridone biosynthesis [J]. *Plant J*, 2008, 53: 541–553.