

植物萜类化合物的天然合成途径及其相关合酶

张长波, 孙红霞, 巩中军, 祝增荣*

水稻生物学国家重点实验室, 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310029

Plant Terpenoid Natural Metabolism Pathways and Their Synthases

ZHANG Chang-Bo, SUN Hong-Xia, GONG Zhong-Jun, ZHU Zeng-Rong*

State Key laboratory of Rice Biology, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

摘要: 文章概述植物萜类次生代谢产物的生物代谢途径及与其相关关键酶的研究进展。

关键词: 萜类化合物; 生物合成途径; 合酶

萜类化合物(terpenoids)是植物次生代谢产物中最大的一个家族, 在自然界中广泛分布, 由异戊二烯(isoprene, C_5)单元组成的化合物及其衍生物, 按碳原子的数目可以分为单萜(C_{10})、倍半萜(C_{15})、二萜(C_{20})、三萜(C_{30})和多萜等。由于多数萜类化合物分子中具有不同的碳环数, 因此又可分为链萜、单环萜、双环萜和三环萜等。

萜类化合物在植物与其生境的互动中发挥作用:(1)植物对植食性昆虫的直接与间接防御反应, 直接防御反应中可以作为毒素、取食或产卵干扰素; 植物在受到植食性昆虫攻击后会释放一些挥发性萜类吸引天敌, 从而形成其对攻击者的间接防御反应。(2)增强植物抗病能力, 植物倍半萜抗毒素如脱氧-6-甲氧基棉酚等对真菌有显著的抑制作用。(3)化感作用, 如植物释放某些物质抑制其他植物种子萌发及幼苗生长的异株克生现象, 调节群体密度、影响种群格局和群落演替的自毒作用。(4)与其他生物种群的互利关系, 如诱导昆虫授粉、产卵、寄主定向等。

萜类化合物已广泛应用于工农业生产和医药卫生中。如青蒿中的青蒿素对恶性疟疾有速效作用, 短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)中的二萜类化合物紫杉醇具有良好的抗癌活性。许多萜类化合物还可以作为香料, 如姜的根茎是常用的食品调味香料, 其中含有姜烯、 β -麝子油烯、水芹烯等萜类化合物。

近年来, 随着分子生物学、生物化学、生物信息学等学科的发展, 萜类化合物的研究日趋深入, 其生物合成途径也逐渐明晰, 许多关键酶基因已得到克隆和分析。本文概述萜类化合物生

物合成途径及其相关酶的研究进展。

1 萜类化合物的合成途径

植物萜类化合物通过两个途径独立合成, 即位于细胞质中的甲羟戊酸(mevalonate pathway, MVA)途径(Chappell 等 1995)和位于质体中的脱氧木酮糖-5-磷酸途径(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway, DXP) (Rohmer 等 1993)或甲基赤藓醇 4-磷酸途径(methylerythritol 4-phosphate pathway, MEP)。这两个途径大体上可分为 3 个阶段, 即中间体异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP, C_5)及其双键异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP, C_5)的生成、直接前体物质的生成和萜类生成及其修饰阶段。

MVA途径(Newman和Chappell 1999)是以 2 个乙酰CoA分子(acetyl-CoA)在乙酰乙酰CoA硫解酶(acetoacetyl-CoA thiolase, ATOT)作用下形成乙酰乙酰CoA(acetoacetyl-CoA), 经羟甲基戊二酰CoA合酶(hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, HMGS)催化形成 3-羟基-3-甲基戊二酰CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA), 在羟甲基戊二酰CoA还原酶(hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, HMGR)和 2 分子 NADPH 催化下生成 MVA, 之后 MVA 在 MVA 激酶(mevalonate kinase, MK)的作用下, 形成甲羟戊酸-5-磷酸(mevalonate-

收稿 2007-05-08 修定 2007-07-09

资助 国家自然科学基金(30370935、30571259)和浙江省长江三角洲重大科技协作项目(2004E60055)。

* 通讯作者(E-mail: zrzh@zju.edu.cn; Tel: 0571-86971623)。

5-phosphate, MVAP), 接着在二氧磷基 MVA 激酶(phosphomevalonate kinase, PMK)作用下生成 MVA-5-二磷酸(mevalonate-5-diphosphate, MVAPP), 最终在 MVA 焦磷酸脱羧酶(mevalonate pyrophosphate decarboxylase, MPD)作用下生成 IPP (图 1)。

DXP途径由丙酮酸和甘油醛-3-磷酸在脱氧木酮糖-5-磷酸合酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS)的作用下转化成 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP), 在脱氧木酮糖磷酸盐还原异构酶(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, DXR)的催化下, 将 DXP 转化成 2C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸(2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, MEP) (Lange 和 Croteau 1999)。MEP 经 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇合酶(4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase, CMS)环化作用下 (Rohdich 等 2001)生成 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基赤藓醇(4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol, CDP-ME), 之后在 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基赤藓糖激酶(4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase, CMK)作用下生成 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇-2-磷酸(4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 2-phosphate, CDP-ME2P), 在 2-甲基赤藓糖-2,4-环二磷酸合酶(2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, MCS)作用下生成 2C-甲基-D-赤藓醇 2,4-环二磷酸(2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate, ME-2,4cPP), 在 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基 4-二磷酸合酶[1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase, HDS]作用下形成 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基 4-二磷酸[1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate, HMBPP], 最后催化形成 IPP 的是异戊烯基单磷酸激酶(isopentenyl monophosphate kinase, IPK) (Schwender 等 2001) (图 1)。

IPP 是两条途径的共同中间体, 也可以说是交汇处, 因为两条途径所产生的 IPP 可以穿过质体膜互为对方所用(Laule 等 2003)。IPP 在古细菌、真菌以及动物体内主要通过 MVA 途径合成, 而在大多数细菌、藻类和植物体内则主要以 DXP

途径合成(Rohdich 等 2001; Rodríguez-Concepción 和 Boronat 2002)。IPP 在异戊烯基二磷酸异构酶(isopentenyl diphosphate isomerase, IDI)的作用下部分转化为双键异构体 DMAPP, 这两种物质是所有萜类化合物的前体物质。高等植物体内 IPP 形成后, 即与其异构体 DMAPP 各 1 分子在香叶基二磷酸合酶(geranyl diphosphate synthase, GPPS)的作用下经头尾缩合生成具 C₁₀ 骨架的香叶基二磷酸(geranyl diphosphate, GPP); 2 分子 IPP 和 1 分子 DMAPP 在法呢基二磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPPS)催化下形成具 C₁₅ 骨架的法呢基二磷酸(farnesyl diphosphate, FPP); 3 分子 IPP 和 1 分子 DMAPP 在香叶基香叶基二磷酸合酶(geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)催化下形成具 C₂₀ 骨架的香叶基香叶基二磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)。

萜类合成途径在 3 种直接前体物质 GPP、FPP 和 GGPP 合成后, 即进入最重要的萜烯生成阶段, 萜烯合酶(terpene synthase, TPS)在此阶段发挥着至关重要的作用。GPP 在单萜烯合酶(monoterpene synthase)作用下生成单萜烯(monoterpene, C₁₀), FPP 在倍半萜烯合酶(sesquiterpene synthase)作用下生成倍半萜烯(sesquiterpene, C₁₅), GGPP 在二萜烯合酶(diterpene synthase)作用下生成二萜烯(diterpene, C₂₀)。植物体内萜类次生代谢产物种类多种多样, 这种多样性的产生一方面是由于 TPS 种类的多样性, 另一方面还因为有大量的修饰酶类的存在。

2 萜类生物合成途径中的相关酶

迄今, 萜类化合物的生物合成途径已基本阐明, 生物合成中的相关酶的克隆、表达和调控是目前的研究热点, 已有多种植物的萜类合成相关酶得到克隆, 研究较多的酶有如下几类。

2.1 羟甲基戊二酰CoA还原酶(HMGR) HMGR 是 MVA 途径中的重要酶, 催化 HMG-CoA 形成 MVA, 认为是 MVA 途径中的第 1 个限速酶, 也是细胞质萜类代谢中的重要调控位点。1986 年 HMGR 已被分离提纯, 为一种与膜结合的疏水蛋白质, 分子量 180 kDa, 共有 4 个亚基, 均为 45 kDa, 等电点为 5.9 (Bach 等 1986)。

现在已知 HMGR 是由 3 个基因(*hmgr-1*、*hmgr-*

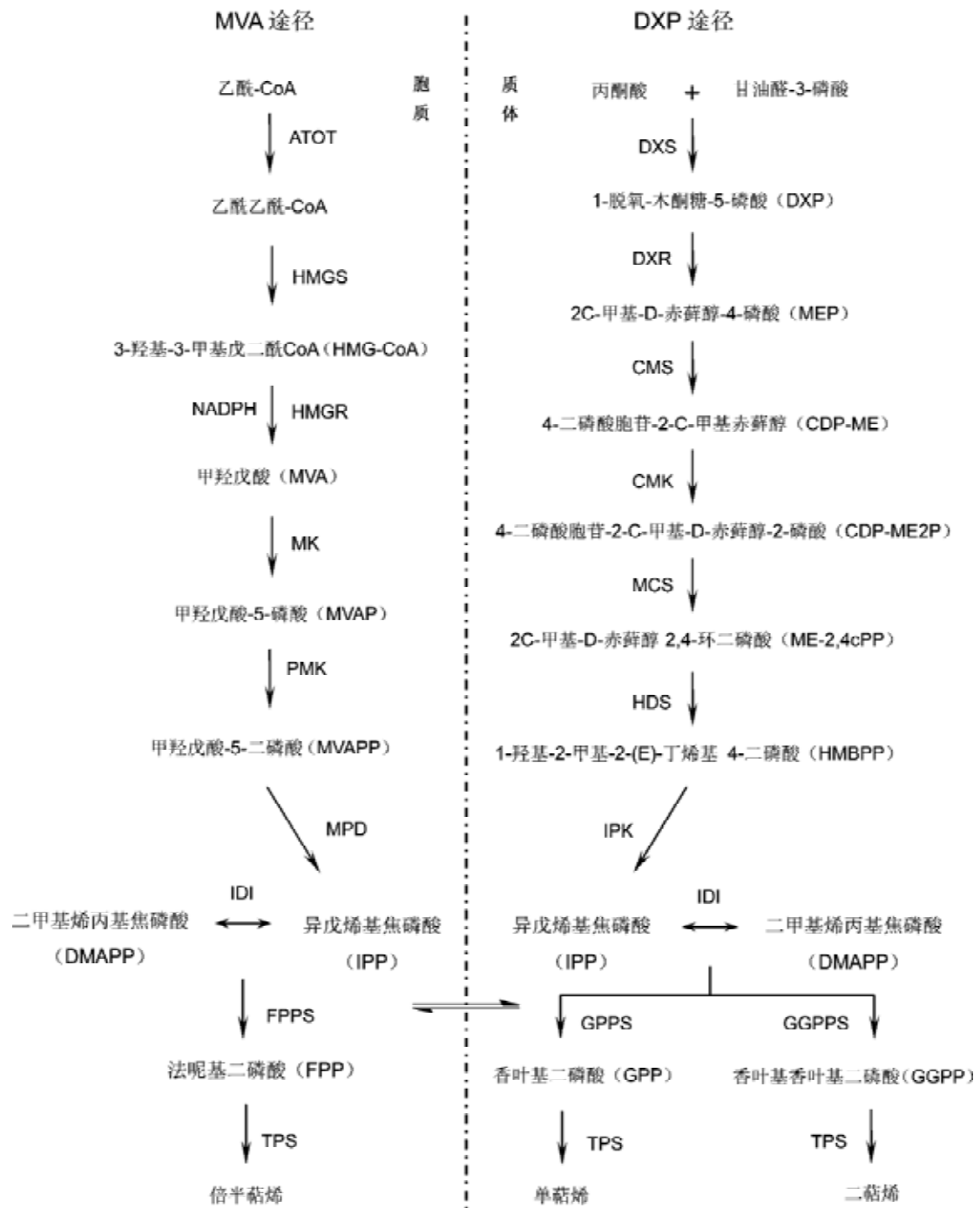


图1 植物萜烯的生物合成途径(Hsieh 和 Goodman 2005 ; Withers 和 Keasling 2007)

ATOT: 乙酰乙酰 CoA 硫解酶; HMGS: 羟甲基戊二酰 CoA 合酶; HMGR: 羟甲基戊二酰 CoA 还原酶; MK: MVA 激酶; PMK: 二氧磷基 MVA 激酶; MPD: MVA 焦磷酸脱羧酶; DXS: 脱氧木酮糖-5-磷酸合酶; DXR: 脱氧木酮糖磷酸盐还原异构酶; CMS: 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇合酶; CMK: 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基赤藓醇激酶; MCS: 2-甲基赤藓醇-2,4-环二磷酸合酶; HDS: 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基 4-二磷酸合酶; IPK: 异戊烯基单磷酸激酶; IDI: 异戊烯基二磷酸异构酶; FPPS: 法呢基二磷酸合酶; GPPS: 香叶基二磷酸合酶; GGPPS: 香叶基香叶基二磷酸合酶; TPS: 萜烯合酶。

2、*hmgr-3*)组成的基因家族编码, Enfissi等(2005)将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *HMGR*基因家族中的 *hmgr-1* 转入番茄, 在花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子作用下, 以 MVA 为中间产物的植物甾醇含量提高 2.4 倍。Jiang 等(2006)从杜仲橡胶(*Eucommia ulmoides*)中克隆到一个 *HMGR* 基因 *EuHMGR*, 全长 2 281 bp, 开放阅读框 1 770 bp, 编码 590 个氨基酸, 生物信息学分析表明, 它含有 2 个跨膜区, 此基因是看家基因(housekeeping gene), 在 *HMGR* 缺失的酵母突变体 JRY2394 中表达, *EuHMGR* 能有效地调控 MVA 途径。

2.2 脱氧木酮糖-5-磷酸合酶(DXS) DXS 催化 DXP 途径的第一步反应, 将丙酮酸和甘油醛-3-磷酸转化生成 DXP, 现在普遍认为 DXS 是 DXP 途径的限速酶(Estévez 等 2001)。它是新型抗生素、抗疟药物和除草剂的靶标物质。2006 年已得到 DXS 晶体结构(Xiang 等 2007), 有 3 个功能域(I、II、III), 活性位点位于功能域 I 和 II 单体表面, 辅酶焦磷酸硫胺素(thiamine pyrophosphate, TPP)大部分埋于复合体中, 但其噻唑环(thiazolium ring)中第 2 个 C 原子暴露于复合体结合底物的袋状结构中。Gong 等(2006)从银杏(*Ginkgo biloba*)中克隆 DXS 的基因, 其含有 2 154 bp 的开放阅读框, 生物信息学分析表明, 此酶的氨基酸序列与其它植物 DXS 有很高的同源性, 有一个保守的转运肽、一个 TPP 结合位点和一个转酮醇酶(transketolase)模块。系统发育分析表明, 它属于 *DXS1* 基因簇, 比其它植物的 DXS 都较为古老。

编码 DXS 的为一个多基因家族, Walter 等(2002)从蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中分离获得 3 个 DXS 的 cDNA 序列, 但只有 2 个 DXS 的原核表达产物具有活性。另外, 有人从拟南芥基因组以及 EST(表达序列标签)序列信息中预测出 3 个 DXS 基因, 但经证实只有 1 个 DXS 蛋白有功能(Estévez 等 2000; Rodríguez-Concepción 和 Boronat 2002)。Kim 等(2005)在水稻中发现有 3 个 DXS 基因(*dxs1*、*dxs2* 和 *dxs3*)共同表达。Munoz-Bertomeu 等(2006)将拟南芥 DXS 基因转入薰衣草(*Lavandula latifolia*)后, 转基因薰衣草中的主要成分单萜烯精油的量显著提高, 并且子一代仍然具有转基因亲本的特性, 但形态和生长习性等生态特征均无

变化。不过 Morris 等(2006)将细菌中 *DXS* 基因转入马铃薯后, 38 株转基因植株中只有 24 株马铃薯块茎有明显伸长, 而且发芽明显提前, 其中有 9 株在收获时块茎就已发芽, 非转基因块茎在储存休眠 56~70 d 后才发芽。

2.3 脱氧木酮糖磷酸盐还原异构酶(DXR) DXR 催化 DXP 生成 MEP, 是 DXP 途径的限速酶。与 DXS 一样, DXR 也是潜在的抗生素、抗疟药物和除草剂的靶标位点, 而且是一个更有效率的靶标位点。膦胺霉素(fosmidomycin)是传统的 DXR 抑制剂, Kuntz 等(2005)报道, 在 2 个新型 DXR 抑制剂 4-(hydroxyamino)-4-oxobutylphosphonic acid 和 4-[hydroxy(methyl)amino]-4-oxobutyl phosphonic acid 中, 后者也表现出很高的抑制 DXR 的活性。DXR 已在细菌、藻类、植物和原生动物中发现, 但目前人体中还未找到, 因此用 DXR 这一靶标位点研制抗菌和抗疟药物更加引起了人们的兴趣。

Rohdich 等(2006)在研究拟南芥的 *DXR* 基因中, 将去除 N 端转运肽序列后的重组体在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达, 通过亲和色谱法得到的纯化蛋白可用 DXP 催化形成 MEP, 催化速率为 $5.6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (蛋白), 此反应需要二价金属离子 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} , 最适 pH 值为 8.0, 需 NADPH 参与, NADPH 虽然可用 NADH 替代, 但替代后的反应速率降至原来的 14%。

2.4 异戊烯基转移酶

2.4.1 香叶基二磷酸合酶(GPPS) GPPS 催化各一分子 IPP 和 DMAPP 形成一分子 GPP。迄今, 所有报道的 GPPS 大多来自于植物, 细菌与动物中的报道比较少。植物中的 GPPS 与 GGPPS 的进化关系比 FPPS 更近。2004 年 Tholl 等从金鱼草(*Antirrhinum majus*)和伯惠绣衣(*Clarkia breweri*)中分别克隆得到 *GPPS* 基因, 其编码蛋白是异构二聚体, 并且金鱼草和伯惠绣衣 GPPS 蛋白序列分别与 Burke 等(1999)报道的薄荷(*Mentha haplocalyx*)中 GPPS 二聚体的小亚基序列相似性为 53% 和 45%; 有意思的是, 分别在大肠杆菌中单独表达金鱼草和伯惠绣衣的 *GPPS* 基因时, 检测不到异戊烯转移酶的活性, 但如将其分别与前面提到的薄荷中 GPPS 二聚体的小亚基共表达时却有活性。

2.4.2 法呢基二磷酸合酶(FPPS) FPPS 催化 2 个

IPP分子和1个DMAPP分子头尾相连缩合形成中间物GPP和终产物FPP。业已证实此酶存在于细胞质、线粒体(Cunillera等1997)、叶绿体(Sanmiya等1999)和过氧化物体(Oliver和Krisans 2000)中。几个物种的FPPS序列比对显示有7个保守区(Koyama等1993)和2个特异性的富含天冬氨酸的模块,一个在II区的DDXX(X)D(D为天冬氨酸,X为任意氨基酸)片段,称为FARM(first Asp-rich motif),这个模块在所有已知的E-异戊烯转移酶中都是高度保守的;第2个模块在VI区,序列为DDXXD,称为SARM(second Asp-rich motif)。

Liu等(1999)从棉花(*Gossypium arboreum*)中克隆到一个FPPS基因*garfps*,当用植物黄萎病原菌(*Verticillium dahliae*)接种到悬浮培养的棉花细胞时,FPPS可得到大量诱导表达,这与植物在受到侵害时释放萜类化合物的现象相吻合。FPPS编码一个基因家族,在拟南芥(Cunillera等1997)、水稻(Sanmiya等1999)和三齿蒿(*Artemisia tridentata*) (Hemmerlin等2003)中都发现有至少2个不同的FPPS异构体。Hemmerlin等(2003)从三齿蒿cDNA文库中分离到3个异戊烯转移酶基因*FDS-1*、*FDS-2*和*FDS-5*,三者有高达89%的相似性。

2.4.3 香叶基香叶基二磷酸合酶(GGPPS) GGPPS催化三分子IPP和一分子DMAPP头尾相连形成中间产物GPP和FPP以及终产物GGPP。GGPPS都有FARM模块。Kojima等(2000)用同源性通过PCR从野甘草(*Scoparia dulcis*)和巴豆(*Croton sublyratus*)中克隆到2个GGPPS基因,在大肠杆菌中表达后表现出相当高的GGPPS活性,可催化FPP和IPP形成GGPP,与其它植物的GGPPS氨基酸序列相似性达60%~70%,并且含有高度保守的FARM模块,在替换FARM区前第四和第五位置的氨基酸残基或在FARM区插入中2个氨基酸后,此酶能催化DMAPP形成FPP,但却不能生成GGPP,可见FARM区结构对此酶的活性至关重要。Takaya等(2003)从橡胶树(*Hevea brasiliensis*)的叶片和胶乳的cDNA文库中分离到一个GGPPS基因,其原核表达产物具有明显的催化产生GGPP的活性,此酶反应所需的最适条件为40℃,pH值8.5。

2.5 萜烯合酶(TPS) TPS通常也称为环化酶,因为此类酶的产物通常为环化结构。萜类合酶催化

分子内环化反应,将GPP、FPP和GGPP这三种非环化的底物转化成不同的萜类。萜类合酶催化的反应和异戊烯转移酶的反应类似,只是萜类合酶的亲电耦合反应发生在分子内部。这两类酶在一级结构和物理性质上也有许多相似之处,植物萜类合酶也含有富含天门冬氨酸的DDXXD片段(Lesburg等1997)。从植物中得到的萜类合酶与从微生物中得到的相同功能的萜类合酶在三级结构的相似性较高,但一级结构的相似性则较小(Bohlmann等1998)。

2.5.1 单萜烯合酶 单萜合酶产生非环化、单环和二环的烯类、醇类和二磷酸脂的产物。现已从植物中分离出多种单萜合酶,但在裸子植物和被子植物中分离出的单萜合酶性质却有所不同,裸子植物中所有的单萜合酶的催化反应都需要一价的金属阳离子(如K⁺),并且需要二价金属阳离子Mn²⁺或Fe²⁺的参与,最适pH值偏碱性(Bohlmann等1997);被子植物中的单萜合酶的催化反应不需要一价的金属阳离子,只需要二价金属阳离子Mn²⁺或Mg²⁺,最适pH值接近中性(Alonso和Croteau 1991)。Yang等(2005)从樟树(*Cinnamomum tenuipilum*)叶片中克隆到一个香叶醇合酶基因*CtGES*,原核表达后此酶用GPP特异性地生成香叶醇,催化反应是依赖Mg²⁺和Mn²⁺的,*CtGES*基因在基因组中为单拷贝,原位杂交显示*CtGES*只存在于叶的油腺细胞中。

2.5.2 倍半萜烯合酶 倍半萜合酶经过最初的离子异构化后环化形成各种阳离子中间产物,最终通过去质子反应或捕获亲核试剂进一步环化形成一系列的倍半萜。Picaud等(2005)从黄花蒿(*Artemisia annua*)中分离到一个倍半萜烯合酶(E)-β-法呢烯合酶[(E)-beta-farnesene synthase],开放阅读框1746bp,编码574个氨基酸(66.9 kDa),此酶的氨基酸序列与其它被子植物倍半萜烯合酶氨基酸序列的相似性约为30%~50%,大肠杆菌原核表达此酶的产物可催化FPP形成单一产物β-法呢烯,反应最适pH值为6.5,反应依赖Mg²⁺、Mn²⁺或Co²⁺。

最新的研究表明,某些倍半萜合酶具有异戊烯转移酶活性,Green等(2007)将从苹果(*Malus domestica*)中克隆的α-法呢烯合酶导入大肠杆菌中原核表达后,此酶能催化GPP和IPP形成α-法呢

烯,只是效率为以 FPP 为底物的催化反应的 1%;另外,此种倍半萜合酶还能催化单萜烯底物 GPP 生成单萜类产物,有意思的是,若加入单价阳离子 K^+ ,此酶的单萜合酶活性则会降低,而其倍半萜合酶活性提高。

2.5.3 二萜烯合酶 二萜合酶的起始底物为 GGPP,经过双键质子化后再环化形成各种阳离子中间产物,最终通过去质子或捕获亲核物质进一步环化形成一系列的二萜(Hamano 等 2002),这种交替的环化机制与三萜合酶中的鲨烯合酶非常相似。二萜合酶含有富含天冬氨酸的 DDXXD 模块。

Ro 和 Bohlmann (2006)从火炬松(*Pinus taeda*)中克隆到一个二萜合酶 PtTPS-LAS,它能催化 GGPP 形成海松二烯(levopimaradiene)、松香二烯(abietadiene)、新松香二烯(neoabietadiene)和 palustradiene 等,绿色荧光融合蛋白检测表明,它定位于细胞质体中。

3 结语

植物体内萜类次生代谢具有许多特点:(1)酶和底物的多样性,一种合酶能催化同一底物生成一种或多种产物;一种酶也可能有多种底物,不同合酶也可以作用于相同底物生成多种产物(Tholl 2006)。(2)表达和调控的时空特异性,植物体内许多萜烯成分经常存在于特定的种属,并且这些化合物在某一植物体内往往还存在于某一类器官、组织、细胞或细胞器中,且受到独立的调控(Lange 等 2000);在生长发育的特定阶段表达,防御反应诱导中瞬时表达。(3)含量低,由于萜类化合物为次生代谢产物,一般萜类合酶在植物中含量较低,难于分离纯化,例如,紫杉醇在紫杉树皮中的含量每千克只有 40~100 mg (Sato 等 2001)。由于植物体内大多数萜类相关酶的表达量低,难于纯化,原核异源表达可能是获取大量酶以进行后续研究的重要途径,因此,通过基因工程改造细胞代谢途径有可能为提高萜类产量提供一个平台(Wu 等 2006)。

现在,植物萜类合成相关酶基因的克隆主要采用 3 种策略(杨涛和曾英 2005):(1)依据萜类合酶氨基酸序列的相似性设计简并引物,以 cDNA 为模板进行 PCR 特异性扩增,得到相关酶的特异性探针。采用特异性探针筛选 cDNA 文库,分离

克隆酶的基因(Kojima 等 2000; Prosser 等 2006)。(2)分离纯化植物体内的天然酶,测定氨基酸序列,推测核酸序列,之后设计并制备核酸探针。利用探针筛选 cDNA 文库,分离克隆酶的基因,此方法特异性较强,能直接得到某一种具体的萜类合酶,但因萜类合酶基因一般在植物中表达量较低,难于分离纯化,并且表达有时空特异性,只有得到表达量较大的萜类合酶时才可进行。(3)通过诱导技术促使特定组织或培养的细胞高表达某些酶类,这样有可能分离所需的合酶。

植物萜类化合物在植物与环境的关系中的作用很重要但又复杂。植物与其植食性昆虫之间的“明争暗斗”也时刻在进行。为抵御植食性昆虫的危害,苜蓿(*Medicago truncatula*)在受到侵害时可以诱导产生皂苷和挥发性萜类的生成,当其受到甜菜夜蛾侵袭时,萜类合成的相关酶的表达水平明显升高,但奇怪的是,如果危害程度继续加重,植物体内萜类合成途径的相关酶的表达量并未随之升高,其原因是昆虫唾液中的葡萄糖氧化酶达到一定浓度时会反过来抑制植物萜类合成相关酶的表达,这些调控均发生在萜类合成途径的早期步骤(Bede 等 2006)。这些错综复杂的调控与反调控也可能普遍存在于生物界,其间的互作关系迄今尚不完全清楚。

萜类合酶家族催化一类庞大的天然产物的生物合成,随着大量有益萜类的发现,萜类合酶已成为萜类化合物生物合成和调控研究的焦点。随着植物基因工程的发展,人们通过 DNA 重组技术优化萜类合成代谢途径中的某些反应步骤,或者转基因到不含特定萜类的生物中合成特定的萜类,以满足人们对有益萜类的需求。但如何提高有益萜类化合物的产量和寻找新的有益萜类化合物仍需探讨。

现在,从单个酶或多个酶角度探讨萜类化合物的整个合成代谢途径都有研究。植物萜类化合物的合成途径是多样性的,但产生这种多样性的分子机制,如基因的沉默、修饰、微调控和转录后修饰等问题都还没有完全清楚,仍需深入研究。

参考文献

杨涛,曾英(2005). 植物萜类合酶研究进展. 云南植物研究, 27

- (1): 1~10
- Alonso WR, Croteau R (1991). Purification and characterization of the monoterpene cyclase gamma-terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. Arch Biochem Biophys, 286: 511~517
- Bach TJ, Rogers DH, Rudney H (1986). Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings. Eur J Biochem, 154 (1): 103~111
- Bede JC, Musser RO, Felton GW, Korth KL (2006). Caterpillar herbivory and salivary enzymes decrease transcript levels of *Medicago truncatula* genes encoding early enzymes in terpenoid biosynthesis. Plant Mol Biol, 60 (4): 519~531
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 4126~4133
- Bohlmann J, Steele CL, Croteau R (1997). Monoterpene synthase from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4S)-limonene synthase, and (-)-(1S, 5S)-pinene synthase. J Biol Chem, 272: 21784~21792
- Burke CC, Wildung MR, Croteau R (1999). Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. Proc Natl Acad Sci USA, 96 (23): 13062~13067
- Chappell J, Wolf F, Proulx J, Cuellar R, Saunders C (1995). Is the reaction catalysed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? Plant Physiol, 109 (4): 1337~1343
- Cunillera N, Boronat A, Ferrer A (1997). The *Arabidopsis thaliana* *FPS1* gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. J Biol Chem, 272: 15381~15388
- Enfissi EMA, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. Plant Biotechnol J, 3 (1): 17~27
- Estévez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jiménez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y, Leon P (2000). Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxy-xylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 124: 95~104
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P (2001). 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. J Biol Chem, 276: 22901~22909
- Gong YF, Liao ZH, Guo BH, Sun XF, Tang KX (2006). Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* *DXS* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. Planta Med, 72 (4): 329~335
- Green S, Friel EN, Matich A, Beuning LL, Cooney JM, Rowan DD, Macrae E (2007). Unusual features of a recombinant apple alpha-farnesene synthase. Phytochemistry, 68 (2): 176~188
- Hamano Y, Kuzuyama T, Itoh N, Furihata K, Seto H, Dairi T (2002). Functional analysis of eubacterial diterpene cyclases responsible for biosynthesis of a diterpene antibiotic, terpentecin. J Biol Chem, 277: 37098~37104
- Hemmerlin A, Rivera SB, Erickson HK, Poulter CD (2003). Enzymes encoded by the farnesyl diphosphate synthase gene family in the big sagebrush *Artemisia tridentata* ssp. *spiciformis*. J Biol Chem, 278: 32132~32140
- Hsieh MH, Goodman HM (2005). The Arabidopsis IsPh homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. Plant Physiol, 138 (2): 641~653
- Jiang J, Kai G, Cao X, Chen F, He D, Liu Q (2006). Molecular cloning of a HMG-CoA reductase gene from *Eucommia ulmoides* Oliver. Biosci Rep, 26 (2): 171~181
- Kim BR, Kim SU, Chang YJ (2005). Differential expression of three 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase genes in rice. Biotechnol Lett, 27 (14): 997~1001
- Kojima N, Sitthithaworn W, Viroonchatapan E, Suh DY, Iwanami N, Hayashi T, Sankaw U (2000). Geranylgeranyl diphosphate synthases from *Scoparia dulcis* and *Croton sublyratus*. cDNA cloning, functional expression, and conversion to a farnesyl diphosphate synthase. Chem Pharm Bull (Tokyo), 48 (7): 1101~1103
- Koyama T, Obata S, Osabe M, Takeshita A, Yokoyama K, Uchida M, Nishino T, Ogura K (1993). Thermostable farnesyl diphosphate synthase of *Bacillus stearothermophilus*: molecular cloning, sequence determination, overproduction, and purification. J Biochem, 113: 355~363
- Kuntz L, Tritsch D, Grosdemange-Billiard C, Hemmerlin A, Willem A, Bach TJ, Rohmer M (2005). Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase. Biochem J, 386: 127~135
- Lange BM, Croteau R (1999). Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. Arch Biochem Biophys, 365 (1): 170~174
- Lange BM, Wildung MR, Stauber EJ, Sanchez C, Pouchnik D, Croteau R (2000). Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 2934~2939
- Laule O, Fürholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Grisse W, Lange BM (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 6866~6871
- Lesburg CA, Zhai G, Cane DE, Christianson DW (1997). Crystal structure of pentalene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. Science, 277: 1820~1824
- Liu CJ, Heinstein P, Chen XY (1999). Expression pattern of genes

- encoding farnesyl diphosphate synthase and sesquiterpene cyclase in cotton suspension-cultured cells treated with fungal elicitors. *Mol Plant Microbe Interac*, 12 (12): 1095~1104
- Morris WL, Ducreux LJM, Hedden P, Millam S, Taylor MA (2006). Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *J Exp Bot*, 57 (12): 3007~3018
- Munoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J (2006). Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol*, 142 (3): 890~900
- Newman JD, Chappell J (1999). Isoprenoid biosynthesis in plant: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 34 (2): 95~106
- Olivier LM, Krisans SK (2000). Peroxisomal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1529: 89~102
- Picaud S, Brodelius M, Brodelius PE (2005). Expression, purification and characterization of recombinant (E)-beta-farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 66 (9): 961~967
- Prosser IM, Adams RJ, Beale MH, Hawkins ND, Phillips AL, Pickett JA, Field LM (2006). Cloning and functional characterisation of a cis-muroladiene synthase from black peppermint (*Mentha x piperita*) and direct evidence for a chemotype unable to synthesise farnesene. *Phytochemistry*, 67 (15): 1564~1571
- Ro DK, Bohlmann J (2006). Diterpene resin acid biosynthesis in loblolly pine (*Pinus taeda*): functional characterization of abietadiene/levopimaradiene synthase (*PtTPS-LAS*) cDNA and subcellular targeting of PtTPS-LAS and abietadienol/abietadienal oxidase (PtAO, CYP720B1). *Phytochemistry*, 67 (15): 1572~1578
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*, 130: 1079~1089
- Rohdich F, Kis K, Bacher A, Eisenreich W (2001). The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr Opin Chem Biol*, 5: 535~540
- Rohdich F, Lauw S, Kaiser J, Feicht R, Köhler P, Bacher A, Eisenreich W (2006). Isoprenoid biosynthesis in plants - 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate synthase (IspC protein) of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J*, 273 (19): 4446~4458
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J*, 295: 517~524
- Sanmiya K, Ueno O, Matsuoka M, Yamamoto N (1999). Localization of farnesyl diphosphate synthase in chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 40: 348~354
- Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura K, Choi KB, Morishige T, Fujimoto H, Yamada Y (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (1): 367~372
- Schwender J, Gemünden C, Lichtenthaler HK (2001). Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta*, 212: 416~423
- Takaya A, Zhang YW, Asawatreratanakul K, Witsuwannakul D, Witsuwannakul R, Takahashi S, Koyama T (2003). Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl diphosphate synthase of *Hevea brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta*, 1625 (2): 214~220
- Tholl D (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, 9 (3): 297~304
- Tholl D, Kish CM, Orlova I, Sherman D, Gershenzon J, Pichersky E, Dudareva N (2004). Formation of monoterpenes in *Antirrhinum majus* and *Clarkia breweri* flowers involves heterodimeric geranyl diphosphate synthases. *Plant Cell*, 16: 977~992
- Walter MH, Hans J, Strack D (2002). Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J*, 31: 243~254
- Withers ST, Keasling JD (2007). Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73 (5): 980~990
- Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R, Chappell J (2006). Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat Biotechnol*, 24 (11): 1441~1447
- Xiang S, Usunow G, Lange G, Busch M, Tong L (2007). Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *J Biol Chem*, 282: 2676~2682
- Yang T, Li J, Wang HX, Zeng Y (2005). A geraniol-synthase gene from *Cinnamomum tenuipilum*. *Phytochemistry*, 66 (3): 285~293