

植物萜类化合物生物合成与调控 及其代谢工程研究进展

梁宗锁,方誉民,杨东风

(浙江理工大学,a.生命科学学院;b.浙江省植物次生代谢调控重点实验室,杭州 310018)

摘要: 萜类化合物大多属于次生代谢产物,在自然界中分布广泛、数量众多,并且结构和功能多样,在药品、农业和工业生产中应用广泛。近年来人们对植物萜类化合物进行了大量深入的研究,主要包括萜类化合物的分离鉴定和药理研究,生物合成相关基因的克隆和相关酶的功能鉴定,以及代谢工程等方面。文章从植物萜类化合物的生物合成和调控以及代谢工程进行综述,分析了植物中萜类化合物的研究进展。

关键词: 萜类化合物;生物合成;萜类合酶;细胞色素 P450;调控;代谢工程

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2017) 02-0255-10

0 引言

萜类化合物大多属于次生代谢产物,少数作为初生代谢物在植物的生长发育和生理功能的发挥中起着重要作用,诸如生长发育(植物激素)、呼吸作用(辅酶 Q)、光合作用(叶绿素)、膜结构和功能的维持(固醇类)等。萜类化合物是由异戊二烯单元组成的,其结构有链状的,也有环状的。根据异戊二烯数目,萜类化合物可以分为单萜、倍半萜、双萜、三萜、四萜和多萜。又因多数萜类化合物分子中具有不同的碳环数,根据碳环数的不同可分为链萜、单环萜、双环萜和三环萜等。萜类化合物在生态系统中发挥着重要的作用,其生理生态功能表现在多个方面,如提升植物的抗病能力和化感作用。同时,萜类化合物也具有重要的经济价值。首先,萜类化合物可以作为药物的有效成分,如青蒿素和紫杉醇。其次,萜类化合物及其合成产物在工业中作为风味调料、芳香剂、香料被广泛应用,也应用于香水制造和化妆品中。此外,在农业上某些萜类化合物是优良环保的除草剂和

杀虫剂^[1]。随着生物能源的开发,一些萜类化合物近来被开发应用于生物燃料。合成生物学中基因组资源的挖掘和新兴工具的发展,促进了植物和微生物中高价值萜类化合物产品的代谢工程。萜类化合物的生态重要性已经越来越为人们所关注,形成了可持续的害虫控制和非生物胁迫保护的策略^[2]。萜类化合物在自然界中广泛分布,并且数量众多、结构和功能多种多样。目前,对萜类化合物的生物合成与调控方面的研究已经较为深入,近年来通过代谢工程手段来产生特定的萜类化合物或研究萜类化合物代谢途径已经成为一大研究热点^[2-4]。本文从生物合成和调控及其代谢工程三方面对植物萜类化合物进行阐述。

1 植物萜类化合物的生物合成

萜类化合物的生物合成一般分为 3 个阶段:中间体异戊烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)及其双键异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)的生成;直接前体物质(法尼基二磷酸 FPP、牻牛儿基二磷酸

收稿日期:2016-06-29 网络出版日期:2017-01-19

基金项目:国家自然科学基金项目(81373908, 81403033, 81673536);浙江省自然科学基金重点项目(LZ16H280001)

作者简介:梁宗锁(1965-),男,陕西扶风人,教授,主要从事药用植物次生代谢方面的研究。

GPP、牻牛儿基牻牛儿基二磷酸 GGPP 等)的生成;萜类化合物的生成及其修饰。GPP、FPP 和 GGPP 在法尼基二磷酸合酶(FPPS)、顺式异戊烯转移酶(*cis*-PT)、反式异戊烯转移酶(*trans*-PT)和牻牛儿基牻牛儿基二磷酸合酶(GGPPS)等催化下,最终形成一系列萜类化合物,包括聚异戊二烯醇类,甾醇,泛醌的侧链和植物特定的类异戊二烯(类胡萝卜素、挥发性萜类、生育酚、质体醌和叶绿素)^[5](图 1)。

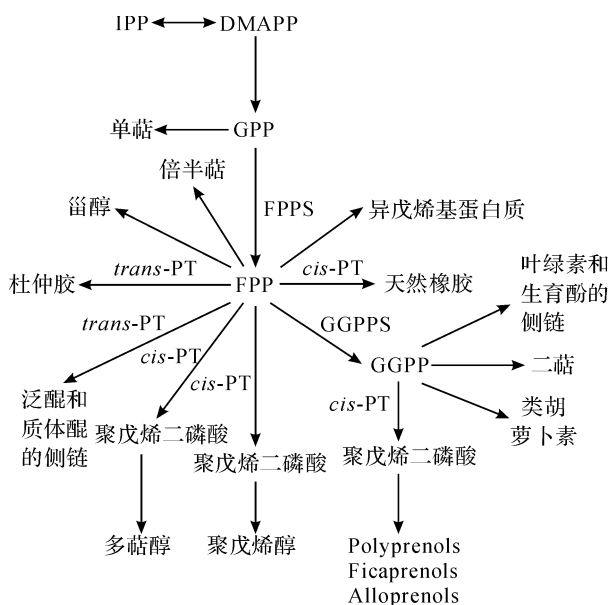
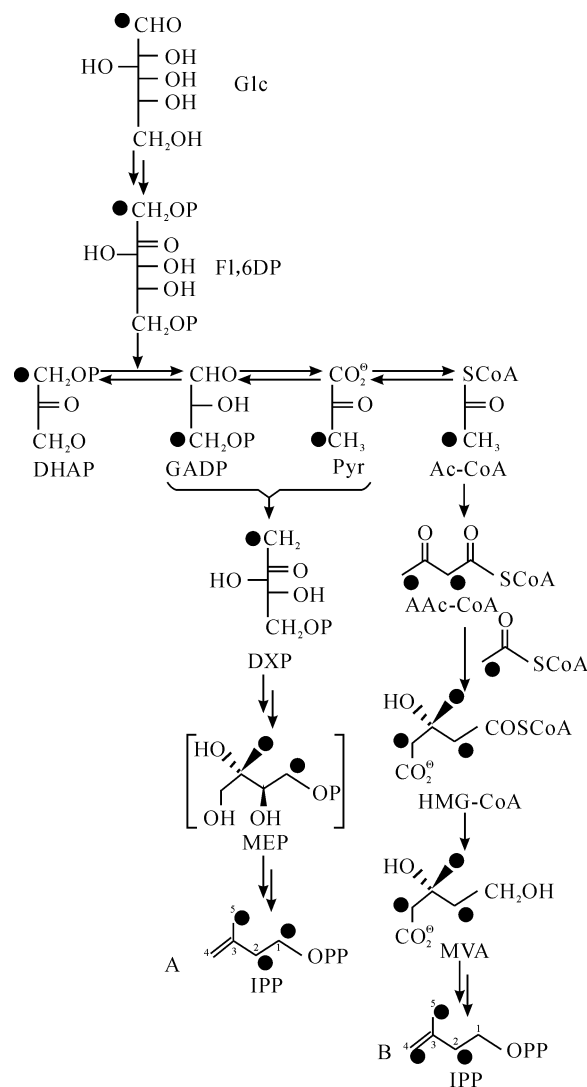


图 1 植物萜类化合物的生源途径^[5]

1.1 IPP 和 DMAPP 的形成

植物中两条生物合成途径负责所有萜类化合物的通用前体 IPP 和 DMAPP 的生物合成。经典的细胞质中甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径从乙酰辅酶 A (CoA) 开始产生 IPP, 而质体中的甲基赤藓醇-4-磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径则从丙酮酸和甘油醛-3-磷酸开始形成 IPP 和 DMAPP。早期研究利用¹³C 同位素标记技术揭示 MEP 途径和 MVA 途径。通过糖酵解途径, 可以预测葡萄糖通过 MEP 或 MVA 途径形成 IPP 的¹³C 转移过程。[1-¹³C]葡萄糖分解成[3-¹³C]3-磷酸甘油醛和[3-¹³C]丙酮酸(MEP 途径的两个前体物质), 随后形成[2-¹³C]乙酰辅酶 A (MVA 途径的直接前体物质)。MEP 途径中 IPP 是[3-¹³C]3-磷酸甘油醛和[3-¹³C]丙酮酸缩合形成的。因此, 可以对 IPP 的两个碳原子进行标记(IPP 和 DMAPP 的 C-1 和 C-5 原子)。在 MVA 途径中, 三分子乙酰辅酶 A 形成 IPP, 可以标记

上 IPP 的三个碳原子(C-2、C-4 和 C-5)(图 2)。进一步使用核磁共振法或质谱法分析标记的化合物结构, 从而揭示 MEP 和 MVA 途径^[5]。尽管两条途径的亚细胞区室化允许它们单独运作, 有报道说明两者之间存在代谢交互^[6]。研究表明, 从 MVA 和 MEP 两条途径生成的 IPP 和 DMAPP 以及继而生成的 GPP 和 FPP 能够穿过质体膜进行运输^[6]。



Glc: 葡萄糖; F1,6DP: 1,6-二磷酸果糖; DHAP: 二羟丙酮磷酸; GADP: 3-磷酸甘油醛; Pyr: 丙酮酸; Ac-CoA: 乙酰辅酶 A; AAc-CoA: 乙酰乙酰辅酶 A; DXP: 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸; HMG-CoA: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A

图 2 来源于[1-¹³C]葡萄糖分解代谢的 MEP(A)和 MVA(B)途径中异戊二烯单元的特定的标记模式^[5]

MVA 途径有三种关键酶: 乙酰 CoA 酰基转移酶(AACT)、3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 合成酶(HMGS)、3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶

(HMGR)。MVA 途径起始于 2 分子乙酰 CoA 在 AACT 作用下缩合形成乙酰乙酰 CoA。乙酰乙酰 CoA 与乙酰 CoA 在 HMGS 作用下缩合生成 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA (HMG-CoA)。HMG-CoA 在 HMGR 的催化下被还原为甲羟戊酸,此反应为 MVA 途径中的限速反应。从甲羟戊酸到 IPP 的下游途径包括分别由甲羟戊酸激酶(MVK)、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)和甲羟戊酸 5-焦磷酸脱羧酶(MVD)催化的两步磷酸化作用和一步脱羧反应。IPP 起源于细胞质中 MVA 途径,进一步在异戊烯基焦磷酸异构酶(IDI)的催化下形成 DMAPP (图 3)。

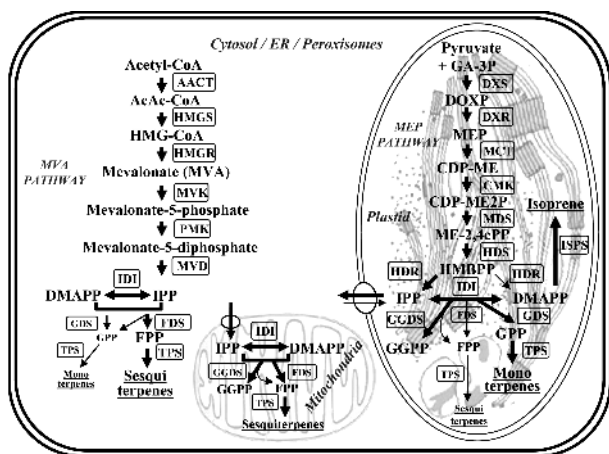


图3 植物萜类化合物生物合成途径^[7]

MEP 途径由参与 IPP 形成和丙酮酸与 3-磷酸甘油醛(GAP)形成 DMAPP 的七步酶促反应组成。这个途径的第一步反应是丙酮酸和 3-磷酸甘油醛在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)催化下形成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(DOXP)。然后 DOXP 在 DXR(DOXP 还原异构酶,也叫 MEP 合酶)催化下转化成 MEP。MEP 进一步通过连续的 2-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸脱氨酰转移酶(MCT)、4-(5-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶(CMK)、2-C-甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸合成酶(MDS)和羟甲基丁烯基-4-磷酸合酶(HDS)酶促作用转变成羟甲基丁烯基-4-磷酸(HMBPP)。最后一步是由单一的酶 1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基-4-焦磷酸还原酶(HDR)同步的酶促作用催化 HMBPP 分支形成 IPP 和 DMAPP(图 3)^[7]。

1.2 直接前体物质的生成

IPP 和 DMAPP 是异构体,两者很活跃,可以结合起来变成更大的分子。IPP 和 DMAPP 在几种异

戊烯基转移酶的催化下,形成单萜、倍半萜和二萜的前体物质。一分子 IPP 和一分子 DMAPP 在牻牛儿基焦磷酸合酶(GPS)的催化下缩合生成牻牛儿基焦磷酸(GPP),成为单萜的前体;两分子的 IPP 和一分子的 DMAPP 在法尼基二磷酸合酶的作用下经过两步缩合反应生成法尼基焦磷酸(FPP),即倍半萜和三萜的前体;三分子的 IPP 和一分子的 DMAPP 在牻牛儿基牻牛儿基二磷酸合酶经过三步缩合反应形成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(GGPP),此为二萜和四萜的前体;FPP 和 GGPP 可以进一步聚合为多萜^[8]。

1.3 萜类化合物生成及其修饰阶段

在几种直接前体物质 GPP、FPP 和 GGPP 等生成之后,由萜类合酶(terpene synthases, TPS)催化相应的前体物质形成各种萜类化合物。GPP 可以在单萜合酶催化下形成单萜,而 FPP 可以在倍半萜合酶作用下形成倍半萜,GGPP 在二萜合酶催化下形成二萜。TPS 不仅可以催化单一底物形成多种产物,而且某些 TPS 还可以通过催化不同的底物产生萜类的混合物,这进一步使萜类化合物种类变得多样。各种萜类的前体物质在 TPS 的作用下形成的直接产物多为挥发性物质,而植物中一些萜类化合物还需要进一步修饰,即通过甲基化、糖基化、羟基化、环氧化、异构化、加成还原、卤化等反应和骨架结构的重排,从而形成终产物。在植物中参与萜类生物合成的修饰酶主要包括甲基转移酶、糖基转移酶、细胞色素 P450 单加氧酶、脱氢酶和还原酶等。这些修饰酶的存在很大程度上使得萜类化合物种类变得更加丰富、结构和生物活性趋向多样化^[9]。因此,TPS 和修饰酶在植物萜类化合物生物合成中起着至关重要的作用,也是萜类化合物多样性的主要诱因。

1.4 萜类合酶

TPS 根据催化产物不同的类型,分为单萜合酶、倍半萜合酶、二萜合酶和三萜合酶等。如图 4 所示,异戊二烯合酶、单萜合酶、倍半萜合酶和二萜合酶催化不同的萜类化合物的生成:从两个同分异构的 5 碳前体“构筑块”形成 5 碳异戊二烯、10 碳单萜、15 碳倍半萜和 20 碳二萜。而根据氨基酸序列的相似性,TPS 又可以分为 7 个亚家族,分别为

TPS a、TPS b、TPS c、TPS d、TPS e、TPS f 和 TPS g。基于已知 TPS 的系统发育和功能,有研究^[10]又将 TPS 重新分为 7 个亚族:TPS-a、TPS-b、TPS-c、TPS-d、TPS-e/f、TPS-g 和 TPS-h(图 5)。TPS-c 亚族在陆生植物中最保守;TPS-e/f 亚族在维管植物中保守性较高;TPS-h 亚族为江南卷柏特有,TPS-d 为裸子植物特有;TPS-b、TPS-g 和 TPS-a 亚族为被子植物特有;TPS-a 亚族进一步分为 2 个组:a-1 为双子叶植物特有、a-2 为单子叶植物特有;TPS-d 亚族进一步分为 3 组(d-1、d-2 和 d-3),这 3 组中 TPS 承担着不同的功能^[10]。旁系同源和直系同源的 TPS 基因的功能趋异是萜类合成多样化的主要机制。然而,使植物 TPS 基因的进化成型,从而导致萜类化合物多样,其进化动力知之甚少。有研究从六个稻属物种(*Oryza* species)中克隆出来一种水稻

萜类合酶基因的直系同源基因 *Oryza* TPS1,间接地参与对昆虫侵害的抵御反应,该研究发现达尔文正选择是 *Oryza* TPS1 功能趋异的一种驱动力^[11]。在丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)次生代谢的研究中,两条丹参酮生物合成途径相关的下游基因被克隆出来,分别为丹参柯巴基焦磷酸合酶基因(*Sm* CPS)和丹参类贝壳杉烯合酶基因(*Sm* KSL)^[12],研究表明由于 *Sm* KSL 在进化中结构域的缺失导致新功能的产生,即 *Sm* KSL 可以催化柯巴基焦磷酸生成次丹参酮二烯^[13]。基于印度檀香木(*Indian Sandalwood, Santalum album* L.)的转录组测序,得知五个基因分别编码两个倍半萜合酶(*Sa* SQS1, *Sa* SQS2),甜没药烯合酶(*Sa* BS)、檀香萜合酶(*Sa* SS)和法呢酰基二磷酸合酶(*Sa* FDS),并对这五个基因进行了克隆和功能鉴定^[14]。

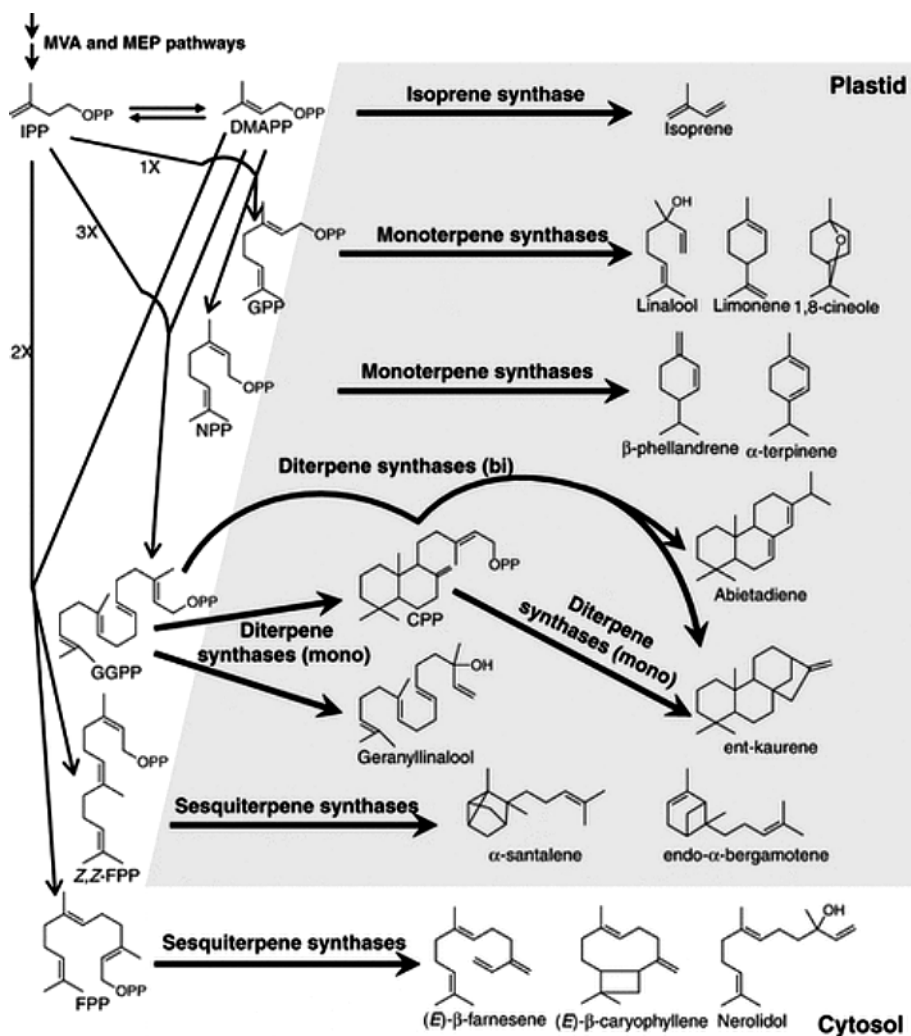


图4 不同萜类合酶催化形成特定的萜类化合物^[10]

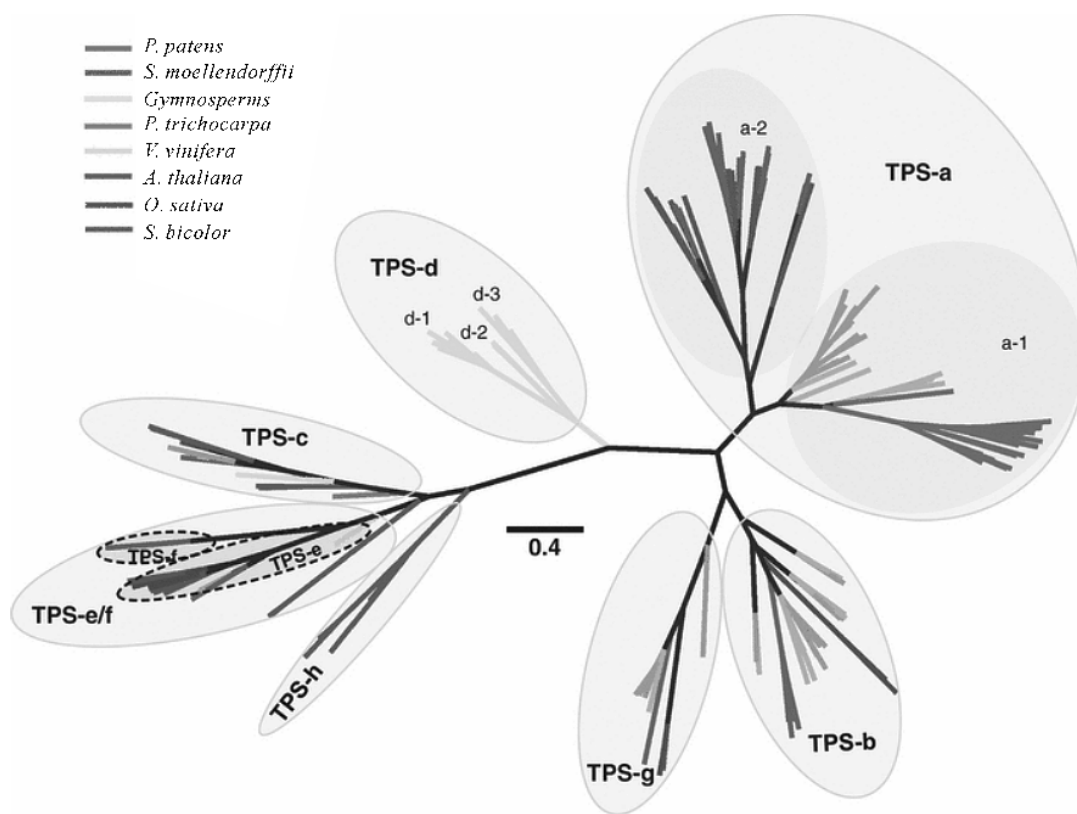


图 5 七种植物基因组中假定的全长萜类合酶和裸子植物中代表性萜类合酶的系统发育分析^[10]

1.5 细胞色素 P450

细胞色素 P450(cytochromes P450, CYPs)在萜类化合物结构多样性的产生中起着至关重要的作用,大约 97%的萜类化合物通过 CYPs 催化进行氧化反应。在植物中 CYPs 是酶中最大的超家族,其基因占有蛋白编码基因的 1%。虽然 CYPs 最常见的催化反应是羟基化,但同时 CYPs 也可以催化许多机制上更为复杂的反应。除了典型部位和特定立体结构的羟基化反应之外,越来越多的研究表明 CYPs 的催化反应是多元化的,可以接受多种反应底物亦或是产生多种产物^[15]。在丹参酮生物合成途径下游结构修饰的研究中,Guo 等^[16]鉴定出了 14 个与次丹参二烯生物合成的 CYPs,发现 CYP76AH1 (miltiradiene oxidase) 催化次丹参酮二烯芳香化形成铁锈醇(ferruginol)。近来有研究鉴定了两种新的 CYPs,分别为 CYP76AH3 和 CYP76AK1,两者循序催化形成分支途径,从而合成丹参中氧化的二萜。该研究发现 CYP76AH3 使铁锈醇的两个不同的碳原子中心发生氧化,形成两种中间产物,而 CYP76AK1 使两种中间产物的 C₂₀ 位置发生羟基化。然而,由于植物基因组数量的巨大,多元化的反应和不易获得底物与产物,这给 CYPs 的功能鉴定带来了一些挑战^[15]。

2 植物萜类化合物生物合成的调控

植物萜类化合物生物合成受到了诸多因素的影响,主要有植物不同发育阶段和昼夜节律性的调控、生物因子的诱导作用、非生物因子等。此外,萜类生物合成相关的酶不仅受到多基因编码和转录水平的调控,还受到了转录后或翻译水平的调控。

2.1 植物发育阶段和昼夜节律性

植物中挥发性萜类化合物经常在特定时间或发育阶段,于特定植物组织中合成并释放。在金鱼草(snapdragon)花中,负责月桂烯(myrcene)、罗勒烯(ocimene)、芳樟醇(linalool)和橙花叔醇(nerolidol)形成的 TPS 基因在花的上唇瓣和下唇瓣部位高表达,并且这两个部位参与这些化合物的产生和释放^[17-18]。金鱼草花发育的 mRNA 表达分析表明月桂烯和罗勒烯合酶 mRNA 首先出现在成熟的花蕾中并且它的水平一直增加直到开花第四天达到顶峰,此后下降。此外,月桂烯和罗勒烯合酶基因的 mRNA 水平展现出有节律的表达,与相关单萜释放有着很大关系。这些表明了月桂烯和罗勒烯的生物合成受到了发育阶段和昼夜节律的共同调控。在葡萄树(grapevine)中三种 TPS 基因的表达在葡萄开花和水果成熟时表现出不同的关联性,这三种 TPS

基因分别为朱槿倍半萜合酶基因(*VvVal*),吉玛烯-D-合酶基因(*VvGerD*)和单萜合酶基因(*VvTer*)。在开花之前所有三种基因在花蕾中很快表现出最强的 mRNA 表达,而在浆果成长期间,只有 *VvVal* 的转录在浆果的晚熟期间被检测到^[19]。在拟南芥(*Arabidopsis*)花中,单萜和倍半萜合酶在花瓣中不表达;反而,它们的表达仅限于柱头、花药、蜜腺和萼片^[20]。在千日红花中挥发性萜类的释放具有昼夜节律性,其释放量在下午 13:00—17:00 最高,而在夜间 21:00—1:00 最低。此外,研究发现该植物自身生物钟控制着这种昼夜节律,其昼夜节律不受光照的诱导^[21]。因此,植物挥发性萜类化合物的合成和释放具有时空特异性,植物发育阶段和昼夜节律性对萜类化合物生物合成具有重要的调控作用。

2.2 生物因子的诱导作用和非生物因子的调控

植物中萜类化合物生物合成受到生物因子的诱导作用,如食草动物和病原体的侵袭。在植物中普遍存在一个生理过程:植物受损后由 13-脂氧合酶催化亚麻酸的过氧化,随后丙二烯氧化物合酶介导环氧化物的形成,再由丙二烯氧化物环化酶催化发生环化作用,再经历三轮 β 氧化反应产生茉莉酸(jasmonic acid)。茉莉酸及其衍生物被认为在抵抗害虫和病原体的防御代谢中起着关键的调控作用^[22-23]。在日本丽金龟侵袭的广玉兰花中,单萜诸如马鞭烯酮(verbenone)、香叶醇(geraniol)和柠檬醛(citral),与倍半萜如 β -毕澄茄油精(β -cubebene)、 α -法尼烯(α -farnesene)和 β -石竹烯(β -caryophyllene)的释放水平均有明显提升^[24]。3-醋酸辣椒醇(capsidiol 3-acetate)在烟草(*Nicotiana benthamiana*)中作为一种抗病毒响应抵抗 RNA 病毒马铃薯病毒 X(Potato Virus X, PVX),研究发现 PVX 感染能强烈诱导 *NbTPS1* 和 *NbEAH* 两个基因,酶活性和基因证据显示这两个基因参与 PVX 诱导的 3-醋酸辣椒醇的生物合成^[25]。

同时,萜类化合物生物合成也受到了非生物因子的调控。环境因素诸如光照强度,空气中 CO_2 浓度、温度、相对湿度和营养状况,对挥发性萜类化合物的合成和释放有着很大的影响。植物在非生物胁迫下,萜类化合物的代谢会发生一些变化。例如,有研究表明植物产生萜类化合物保护自身免于高温胁迫所带来的伤害,在高温下通过 MEP 途径合成萜类化合物的代谢流有所增加^[26]。有研究发现,干旱胁迫可以显著提高碎米莎草叶中萜类化合物的总浓度,热胁迫和机械损伤可以诱导江南卷柏中鲨烯的

合成^[21]。

2.3 基因水平的调控

MVA 和 MEP 途径中几个具有重要调控作用的酶是由小基因家族编码的,这些小基因家族导致酶发生功能趋异。在 MVA 途径中已经鉴定出 AACT、HMGS、HMGR 和 MVD 的旁系同源基因,而 MEP 途径中 DXS、DXR、MCT、MDS 和 HDR 这些酶是由两个或更多的等基因编码的。许多 MVA 和 MEP 途径中同工酶的不同作用取决于它们在特定细胞组织中的表达,并且在初级代谢、生长发育、应激反应和特定代谢中萜类化合物前体物质合成中起着重要作用^[2,27]。研究表明,在植物中存在三种类型的 DXS 基因,一类 DXS 基因(*DXS1*)可能参与初级代谢,二类 DXS 基因(*DXS2*)可能参与萜类化合物生物合成,而三类 DXS 基因(*DXS3*)可能参与植物生存所需物质的生物合成^[28]。*HMGR* 基因家族的不同类型 *HMGR* 基因呈现出时间特异性和组织特异性表达模式^[2]。丹参中有五个 DXS 基因和四个 *HMGR* 基因,并且在不同组织中显著差异表达。*DXS1* 在叶、茎和花中高表达;*DXS2* 主要在叶、茎和根皮中表达;*DXS3* 在叶、茎、根皮和根的中柱中表达;*DXS4* 在茎、叶、花、根皮和根的中柱中表达;*DXS5* 主要在叶和茎中表达,并且其表达水平低于其它四类 DXS 基因。有研究表明 *DXS2* 在丹参萜类化合物的合成中起着重要作用^[29-30]。*HMGR1* 在花、茎和根的中柱中高表达,在叶中的表达最低;*HMGR2* 主要在茎和叶中表达;与其它几个 *HMGR* 基因相比,*HMGR3* 在茎、叶、根皮和根的中柱中高表达;*HMGR4* 在花中特异性表达,在其他组织(茎、叶、根皮和根的中柱)中的表达相较其它 *HMGR* 基因最低。有研究表明 *HMGR1*、*HMGR2* 和 *HMGR3* 在丹参酮合成中起着重要作用^[29-30]。

2.4 转录水平的调控

转录因子亦称为反式作用因子,可以与真核基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用,通过激活或抑制转录调控基因的转录水平。植物萜类物质合成受到了多种转录因子的调控,主要包括 WRKY 类转录因子、AP2/ERF 类转录因子、bZIP 类转录因子、bHLH 类转录因子和锌指类转录因子等^[31]。从丹参中克隆出 61 个 WRKY 基因,多重序列比对表明这些 WRKY 转录因子可以分为 3 大类和 8 个亚族。其中,22、13、4 和 1 个 WRKY 分别主要在根、茎、叶和花中表达,而其它的 21 个 WRKY 主要在两个组织中表达。在茉莉酸甲酯处

理的丹参毛状根中,49个WRKY基因表达发生显著变化,其中26个WRKY基因上调,18个WRKY基因下调,而其余的5个WRKY基因在不同时间点上调或下调。对已公布的转录组序列的分析结果表明,有42个WRKY基因响应酵母提取物和 Ag^+ ,系统分析暗示这些WRKY可能参与丹参酮生物合成调控^[32]。青蒿素(*artemisinin*)是一种从黄花蒿(*Artemisia annua*)叶片的腺毛中产生的物质,可以作为昆虫阻碍素和抗疟药起作用,对黄花蒿的研究表明,AP2/ERF类转录因子是参与倍半萜青蒿素生物合成基因的正调节蛋白^[33]。研究发现,在拟南芥的花发育的过程中,两种R2R3 MYB转录因子MYB21和MYB24能够促进雌蕊群生长和蜜腺发育,并且上调大多数花中(E)- β -石竹烯((E)- β -caryophyllene)倍半萜合酶TPS21基因的表达^[34]。MYC2是一种基础的螺旋-环-螺旋转录因子,研究证实,在拟南芥开花时,它可以结合赤霉素和茉莉酸信号转录调控挥发性倍半萜形成,从而激活倍半萜合酶基因TPS21和TPS11的表达^[35]。MYB14是一种与类异戊二烯途径调控有直接关系的MYB类转录因子,研究表明,在松柏科植物的防御反应中MYB14优先通过MVA途径和茉莉酸代谢调控挥发性萜类化合物生物合成^[36]。

2.5 转录后或翻译水平的调控

转录后或翻译水平对萜类化合物代谢途径也具有重要的调控作用。早期研究发现,在拟南芥突变体中,DXS基因的转录水平下降,而DXS蛋白水平却很高,这表明MEP途径中存在转录后调控^[37]。拟南芥野生植株在磷甘霉素处理后,发现DXS蛋白过量积累。磷甘霉素可以抑制DXR酶的活性,但并不作用于DXS蛋白,这表明MEP途径受到转录后调控。在拟南芥抗磷甘霉素突变体中,DXS和DXR基因的转录和相应蛋白水平并不一致^[38-39]。此外,有研究表明MVA途径受到了翻译水平的调控。HMGR是一种催化MVA途径中重要调控步骤的关键酶,通过蛋白磷酸酶PP2A(protein phosphatase 2A)或者由SUD1基因编码的E3泛素连接酶(E3 ubiquitin ligase)的活动,HMGR酶的活性受到了蛋白质水平的调控^[40-41]。

3 萜类化合物代谢工程

一些具有重要价值的萜类化合物在模式植物或农作物中并不能够积累,与萜类天然产物性状育种相关的遗传资源开发也较少。目前,通过生物本身

或者异源表达宿主的代谢工程来提高产量是一种现实可行的方法^[42]。由于药用植物资源的匮乏和萜类天然产物含量偏低,通过代谢工程的手段提高目标萜类的产量已经成为热点,常见方法包括组织工程、细胞工程、基因工程和生物反应器等。

细胞悬浮培养以及根和枝条等组织培养是典型的快速培养方法,进而通过培养体系的优化提高萜类产量。培养体系的优化包括:培养条件的优化(营养成分、激素配比等),添加前体物质,诱导子处理等^[43]。诱导子是一类能诱发植物产生植保素和防御反应的物质,诱导子可以迅速地、高度专一并且有选择性地诱导特异基因的表达,从而影响次生代谢物质的产生。利用适宜浓度的诱导子处理植物细胞或组织,可以显著提高萜类化合物的含量。生物和非生物诱导子广泛应用于组织培养中,有研究表明联合诱导子的使用比单一诱导子的使用更有效地提高萜类化合物含量^[44]。在丹参毛状根培养中联合使用紫外线B和茉莉酸甲酯,诱导9d后丹参酮含量达到28.21 mg/L(对照组的4.9倍)^[45]。随着对药效成分需求的增加,生物反应器用于扩大植物组织培养,从而满足批量生产需求。生物反应器的常见类型有搅拌式反应器,气升式反应器和喷雾式反应器。此外,波浪式反应器(wave-bioreactor)也用于批量培养毛状根并且带来了可观的产量^[43]。

在异源生物中,如微生物和高等植物,对有经济效益的化合物的生物合成途径进行途径工程,是代谢工程和合成生物学中最重要的研究领域之一^[46]。由于便于进行基因操作,大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是进行代谢工程常见的两种微生物。紫杉烯是紫杉醇生物合成中重要的中间产物,有研究使用多元化模块方法进行代谢工程,在大肠杆菌工程菌株中获得接近1 g/L的紫杉烯^[47]。利用酿酒酵母进行代谢工程也能够实现萜类产物含量的提高,在表达芳樟醇合酶基因的酵母菌株中过表达HMGR,可以使芳樟醇的产量翻倍^[48]。有研究在酿酒酵母中构建了 β -香树脂醇合成途径,并优化合成途径和发酵过程,使 β -香树脂醇产量达到 (156.7 ± 8.62) mg/L(较初始工程菌提高了209倍)^[49]。萜类化合物的代谢工程不仅能够实现一些经济萜类化合物的增产,而且使一些未知的萜类化合物生物合成途径的阐明成为可能,如利用代谢工程技术发现细胞色素P450参与丹参酮下游生物合成途径^[15-16]。

4 展 望

萜类化合物在不同生物间的相互作用、植物的防御反应和环境胁迫等方面发挥着重要的作用。目前萜类化合物中已经有不少被开发应用于农业、工业生产和药物开发等。紫杉醇和青蒿素等萜类化合物作为药物的应用,说明萜类化合物在药物开发中具有巨大的前景。此外,一些萜类化合物可以用作生物燃料,表明萜类化合物是一类潜在的新型生物能源。

在过去的几年中,萜类化合物代谢研究取得了不少突破性进展,并且利用合成生物学的手段和代谢工程技术生产出了高价值的萜类化合物。近年来,通过微生物生产萜类化合物的体系已经建立,并且带来了可观的产量^[4]。然而,由于萜类化合物代谢和调控的复杂网络,植物中萜类化合物代谢研究仍然面临挑战。因此,对萜类化合物的生物合成和调控机理的进一步阐明显得尤为必要。

参考文献:

- [1] SINGH B, SHARMA R A. Plant terpenes; defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications[J]. 3 Biotech, 2015, 5(2):129-151.
- [2] THOLL D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants[M]. Biotechnology of Isoprenoids. Berlin Heidelberg: Springer International Publishing, 2015:63-106.
- [3] OLDFIELD E, LIN F Y. Terpene biosynthesis: modularity rules[J]. Angewandte Chemie: International Edition, 2012, 51(5):1124-1137.
- [4] XIAO H, ZHONG J J. Production of useful terpenoids by higher-fungus cell factory and synthetic biology approaches[J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(3): 242-255.
- [5] SKORUPINSKA-TUDEK K, WOJCIK J, SWIEZEWSKA E. Polyisoprenoid alcohols; recent results of structural studies[J]. Chemical Record, 2008, 8(1):33-45.
- [6] VRANOVA E, COMAN D, GRUISSEM W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 665-700.
- [7] NAGEGOWDA D A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation[J]. FEBS Letters, 2010, 584(14):2965-2973.
- [8] 王凌健, 方欣, 杨长青, 等. 植物萜类次生代谢及其调控[J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(12):1030-1046.
- [9] MOSES T, POLLIER J, THEVELEIN J M, et al. Bioengineering of plant (tri) terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro*[J]. New Phytologist, 2013, 200(1):27-43.
- [10] CHEN F, THOLL D, BOHLMANN J, et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom[J]. Plant Journal, 2011, 66(1):212-229.
- [11] CHEN H, LI G L, KOLLNER T G, et al. Positive Darwinian selection is a driving force for the diversification of terpenoid biosynthesis in the genus *Oryza*[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1):239.
- [12] 高伟, 胡添源, 郭娟, 等. 丹参酮合成生物学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13):2486-2491.
- [13] HILLWIG M L, XU M M, TOYOMASU T, et al. Domain loss has independently occurred multiple times in plant terpene synthase evolution[J]. Plant Journal, 2011, 68(6):1051-1060.
- [14] SRIVASTAVA P L, DARAMWAR P P, KRITHIKA R, et al. Functional characterization of novel sesquiterpene synthases from Indian Sandalwood, *Santalum album* [J]. Scientific Reports, 2015, 5:10095.
- [15] GUO J, MA X H, CAI Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones[J]. New Phytologist, 2016, 210(2): 525-534.
- [16] GUO J, ZHOU Y J J, HILLWIG M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(29): 12108-12113.
- [17] DUDAREVA N, MARTIN D, KISH C M, et al. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily[J]. Plant Cell, 2003, 15(5):1227-1241.
- [18] NAGEGOWDA D A, GUTENSOHN M, WILKERSON C G, et al. Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers[J]. Plant Journal, 2008, 55(2):224-239.
- [19] LUCKER J, BOWEN P, BOHLMANN J. Vitis vinifera terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and

- expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(19):2649-2659.
- [20] THOLL D, CHEN F, PETRI J, et al. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers[J]. *Plant Journal*, 2005, 42(5):757-771.
- [21] 姜一凡. 五种园林植物与花香及胁迫防御相关的挥发性萜类物质的调控与合成[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.
- [22] PIETERSE C M, LEON-REYES A, VAN DER ENT S, et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity[J]. *Nature chemical biology*, 2009, 5(5):308-316.
- [23] WASTERNAK C, HAUSE B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*[J]. *Annals of Botany*, 2013, 111(6):1021-1058.
- [24] LEE S. Exploring the biochemical and evolutionary diversity of terpene biosynthetic enzymes in plants [D]. Kentucky:University of Kentucky, 2008.
- [25] LI R, TEE C S, JIANG Y L, et al. A terpenoid phytoalexin plays a role in basal defense of *Nicotiana benthamiana* against potato virus X [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:9682.
- [26] MONGELARD G, SEEMANN M, BOISSON A M, et al. Measurement of carbon flux through the MEP pathway for isoprenoid synthesis by P-31-NMR spectroscopy after specific inhibition of 2-C-methyl-D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate reductase. Effect of light and temperature[J]. *Plant Cell and Environment*, 2011, 34(8):1241-1247.
- [27] HEMMERLIN A, HARWOOD J L, BACH T J. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? [J]. *Progress in Lipid Research*, 2012, 51(2):95-148.
- [28] CORDOBA E, PORTA H, ARROYO A, et al. Functional characterization of the three genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(6):2023-2038.
- [29] MA Y M, YUAN L C, WU B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7):2809-2823.
- [30] 杨滢. 植物萜类代谢途径关键酶的比较及其在丹参中的表达分析[D]. 西安:陕西师范大学, 2012.
- [31] 高珂, 王玲, 吴素瑞, 等. 调控药用植物药效成分合成的转录因子研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(20):3100-3108.
- [32] LI C L, LI D Q, SHAO F J, et al. Molecular cloning and expression analysis of WRKY transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):200.
- [33] LU X, ZHANG L, ZHANG F Y, et al. AaORA, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea* [J]. *New Phytologist*, 2013, 198(4):1191-1202.
- [34] REEVES P H, ELLIS C M, PLOENSE S E, et al. A regulatory network for coordinated flower maturation [J]. *Plos Genetics*, 2012, 8(2):e1002506.
- [35] HONG G J, XUE X Y, MAO Y B, et al. *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6):2635-2648.
- [36] BEDON F, BOMAL C, CARON S, et al. Subgroup 4 R2R3-MYBs in conifer trees: gene family expansion and contribution to the isoprenoid- and flavonoid-oriented responses[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(14):3847-3864.
- [37] GUEVARA-GARCIA A, SAN ROMAN C, ARROYO A, et al. Characterization of the *Arabidopsis* clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(2):628-643.
- [38] FLORES-PEREZ U, SAURET-GUETO S, GAS E, et al. A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(5):1303-1315.
- [39] SAURET-GUETO S, BOTELLA-PAVIA P, FLORES-PEREZ U, et al. Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(1):75-84.
- [40] DOBLAS V G, AMORIM-SILVA V, POSE D, et al. The SUD1 gene encodes a putative E3 ubiquitin ligase and is a positive regulator of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(2):728-743.

- [41] LEIVAR P, ANTOLIN-LLOVERA M, FERRERO S, et al. Multilevel control of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A [J]. *Plant Cell*, 2011, 23 (4): 1494-1511.
- [42] LANGE B M, AHKAMI A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(2): 169-196.
- [43] BONFILL M, MALIK S, MIRJALILI M H, et al. Production and Genetic Engineering of Terpenoids Production in Plant Cell and Organ Cultures [M]. Natural Products. Berlin Heidelberg: Springer, 2013: 2761-2796.
- [44] CHENG Q Q, HE Y F, LI G, et al. Effects of combined elicitors on tanshinone metabolic profiling and *SmCPS* expression in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures[J]. *Molecules*, 2013, 18(7): 7473-7485.
- [45] WANG C H, ZHENG L P, TIAN H, et al. Synergistic effects of ultraviolet-B and methyl jasmonate on tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2016, 159: 93-100.
- [46] MISAWA N. Pathway engineering for functional isoprenoids [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(5): 627-633.
- [47] AJIKUMAR P K, XIAO W H, TYO K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70-74.
- [48] RICO J, PARDO E, OREJAS M. Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (19): 6449-6454.
- [49] 张根林. 酿酒酵母中 β -香树脂醇合成途径的构建与调控[D]. 北京: 北京理工大学, 2015.

Biosynthesis, Regulation and Metabolic Engineering of Terpenoids in Plants

LIANG Zongsuo, FANG Yumin, YANG Dongfeng

(a. College of Life Science; b. Key Laboratory of Plant Secondary Metabolism and Regulation of Zhejiang Province, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Terpenoids are widespread in nature that have various types, multiple structures and functions, most of which belong to secondary metabolites. In addition, terpenoids have been widely applied to drug development, agricultural purposes and industrial production. Plant terpenoids have been deeply investigated due to their new functions in recent years, including isolation, identification, pharmacological research, biosynthetic genes cloning, functional identification of enzymes and metabolic engineering. The biosynthesis and regulation of plant terpenoids along with metabolic engineering were discussed in this review.

Key words: terpenoids; biosynthesis; terpene synthases; cytochromes P450; regulation; metabolic engineering

(责任编辑: 唐志荣)