

· 综述 ·

二萜合酶的研究进展

何云飞^{1,2}, 高伟³, 刘塔斯², 李文渊¹, 黄璐琦^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208;
3. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

摘要: 植物二萜类化合物广泛存在于自然界中, 是一类重要的天然化合物。随着一些具有重要经济价值的二萜不断被发现, 其生物合成中的二萜合酶也倍受关注。二萜合酶催化活性的多样性决定了终产物(二萜化合物)的丰富性。本文重点探讨了近年来二萜生物合成途径和二萜合酶的类型、克隆、催化机制及其合成生物学应用等研究进展。

关键词: 二萜合酶; 生物合成途径; 克隆; 催化机制; 合成生物学

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 09-1019-07

Research advances of diterpene synthase

HE Yun-fei^{1,2}, GAO Wei³, LIU Ta-si², LI Wen-yuan¹, HUANG Lu-qi^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. School of Chinese Materia Medica, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
3. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Diterpenes, an important class of natural compounds, are widely distributed in nature. As the valuable diterpenoids continue to be found, diterpene synthase in the course of diterpene synthesis get as much attention as possible. The multiformity of end-product—diterpenoids were also due to the diversity of diterpene synthase. This paper focuses on the advances in recent biosynthesis pathway of diterpene and types, cloning, catalytic mechanism, synthetic biology application.

Key words: diterpene synthase; biosynthesis pathway; cloning; catalytic mechanism; synthetic biology

植物二萜类化合物主要分布于真核生物和高等动、植物体内, 具有广泛的生理活性, 在医药、工农业生产等方面具有重要实用价值及经济价值, 在医药行业主要的二萜类化合物有: 用于治疗肿瘤的重要药物紫杉醇^[1]; 治疗心血管系统疾病、抗菌消炎效果良好的丹参酮^[2]; 具有抗菌、消炎、抗肿瘤等生物活性以及对皮肤、口腔及胃肠道黏膜强烈的刺激性和致炎、致癌等双重生理活性的大戟属松香烷内酯^[3]

等。在农业上主要有高效调控植物生长发育的赤霉素^[4]等。二萜是由四个异戊二烯结构单元组成的 C₂₀ 类萜类化合物, 二萜类化合物的结构类型按习惯可分为无环(链状)、单环、双环、三环、四环类二萜, 自然界存在的主要是双环和三环的二萜类化合物。二萜类化合物的形成一般是在二萜合酶的催化作用下逐渐形成的。本文着重从二萜生物合成途径, 二萜合酶的种类、克隆、催化机制及合成生物学应用等方面进行初步探讨。

1 二萜类化合物生物合成途径

萜类的生物合成途径有两条: 甲羟戊酸途径(MVA pathway) 和丙酮酸途径(DXP pathway)。MVA途径是以3个乙酰CoA分子(acetyl-CoA)为原料经

收稿日期: 2011-03-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072990); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(30901965); 北京市自然科学基金资助项目(5102009).

*通讯作者 Tel: 86-10-64014411-2956, Fax: 86-10-64013996,

E-mail: huangluqi@263.net

过甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA), 逐步合成为异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP), IPP 异构化形成二甲丙烯焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)。两种同分异构体结合为牻牛儿基焦磷酸 (geranyl pyrophosphate, GPP), IPP 与 GPP 以头尾方式连接, 产生法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP), IPP 与 FPP 相接, 形成牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP), 这是二萜的共同前体。DXP 途径最初的前体物质是丙酮酸 (pyruvate) 和 3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde 3-phosphate, G3P), 二者在 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXPS) 的催化作用下聚合成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP), DXP 经异构中间体、磷酸化、环化等步骤形成 2-甲基赤藓糖醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 中间体, 再经过磷酸化、环化等步骤生成异戊烯基二磷酸 (IPP), 从而衍生出二萜类化合物^[5-7]。

MVA 途径的发现早于 DXP 途径^[8]。研究表明, MVA、DXP 途径分别在不同的亚细胞区域进行, 前者位于细胞质中, 后者位于质体中。IPP 是两条途径的共同中间体, 且可以穿过质体膜互为对方所用^[9], 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^[10, 11]。二萜类化合物通常以 GGPP 为底物, 在二萜合酶的催化作用下形成, 即 IPP 通过一系列的化学形成 GGPP 后, 二萜合酶以 GGPP 为起始底物, 经过最初的离子异构化后环化形成各种阳离子中间产物, 最终通过去质子或捕获亲核物质进一步环化形成一系列的二萜, 因此二萜合酶是合成二萜次生代谢终产物的关键酶。

2 二萜合酶及其相关基因的克隆

二萜化合物生物合成途径中的相关酶, 特别是二萜合酶是近年来研究的热点, 二萜生物合成过程中的主要二萜合酶有紫杉烯合酶 (taxadiene synthase, TS)、对映柯巴基焦磷酸合酶 (*ent*-copalyl diphosphate synthase, *ent*-CPS)、对映贝壳杉烯合酶 (*ent*-kaurene synthase, *ent*-KS)、顺式柯巴基焦磷酸合酶 (*syn*-copalyl diphosphate synthase, *syn*-CPS)、松香二萜合酶 (abietadiene synthase, AS)、西柏烯合酶 (casbene synthase, CS)、*ent*-cassa-12, 15-diene synthase、*ent*-sandara copimaradiene synthase、*ent*-pimara-8, 15-diene synthase、*stemar*-13-ene synthase、*syn*-pimara-7, 15-diene synthase 和 *fusicocca*-2, 10-diene synthase 等。二

萜合酶大多是位于 GGPP 下游的直接催化形成二萜骨架或终产物的环化酶, 然后常常通过细胞色素 P450 修饰底物结构生成最终的二萜类化合物, 结构修饰也多种多样, 主要包括羟基化、甲基化、异构化、脱甲基化、加成和还原等, 目前二萜合酶相关基因的主要克隆策略有多种直接克隆法、基因组步移法、反向基因克隆法以及基于生物合成途径的筛选法^[12]。此外, 还有基于药用植物功能基因克隆新方法——成分差异表型克隆法^[13]。表 1 是目前对主要二萜合酶相关基因的克隆情况的简述。

3 二萜合酶催化机制

目前基于二萜合酶的催化途径有以下几条: ① GGPP 在 TS 的催化下形成含紫杉烷结构的紫杉烯 (*taxa*-4, 11-diene); ② GGPP 在 *ent*-CPS 的催化下形成对映柯巴基焦磷酸 (*ent*-copalyl diphosphate, *ent*-CPP); ③ GGPP 在 CPS 的催化下生成柯巴基焦磷酸 (CPP) 中间体, 继而生成 abietadiene、levopimaradiene、*neo*-abietadiene、palustradiene、isopimara-7, 15-diene 等二萜类化合物; ④ GGPP 在 *syn*-CPS 的作用下生成 *syn*-CPP, 然后分别在不同合酶的作用下生成 *stemar*-13-ene、aphidicolan-16 β -ol、9 β -pimara-7, 15-diene 等二萜类化合物^[28]; ⑤ GGPP 在柯巴基焦磷酸合酶 (*Salvia miltiorrhiza* CPS, SmCPS) 的催化下生成 CPP 中间体, 继而在类贝壳杉烯合酶 (*Salvia miltiorrhiza* kaunene synthase like, SmKSL) 的催化下生成次丹参酮二烯 (miltiradiene), 这是一条新的分支^[29]; ⑥ GGPP 在 casbene 合酶、*fusicocca*-2, 10-diene 合酶的作用下分别生成 casbene、*fusicocca*-2, 10-diene 等。除此以外, KEGG 数据库中记载, GGPP 还可以在不同酶的作用下生成 cembrene、sclareol 以及 plaunotol 等化合物。

研究发现, 不同二萜合酶的催化机制有两种起端, 一种起始于 GGPP 二磷酸的离子化, 如图 1 中二萜合酶催化 GGPP 形成 casbene 的 (i) 途径, 这种环化类型称为 Type A 环化; 另一种起始于 GGPP 14, 15-双键的质子化, 如图 1 中 GGPP 经不同二萜合酶形成 CPP 及其异构体的 b、c、d、e 途径, 这些环化类型称为 Type B 环化; 部分二萜合酶催化 GGPP 形成二萜同时包含以上两种类型的环化, 按照催化顺序分为 Type A-Type B 环化和 Type B-Type A 环化, 如图 1 中 a 途径, GGPP 被紫杉烯合酶单个酶催化, 先经历 Type A 环化, 后经历 Type B 环化; GGPP 到 *ent*-kaur-16-ene 的形成经历了 c 途径和 f 途径, 先是 Type B 环化, 后是 Type A 环化。GGPP 到 abieta-7, 13-diene

表 1 二萜合酶相关基因的克隆情况

二萜合酶	序列号	物种	参考文献
Taxadiene synthase	U48796	<i>Taxus brevifolia</i>	[14]
	AY424738	<i>Taxus baccata</i>	GenBank
	AY364469	<i>Taxus canadensis</i>	GenBank
	AY007207	<i>Taxus chinensis</i>	GenBank
	AY365032	<i>Taxus chinensis var.mairei</i>	GenBank
	DQ305407	<i>Taxus cuspadata</i>	GenBank
	DQ092389	<i>Taxus wallichiana var.mairei</i>	GenBank
	AY931015	<i>Taxus wallichiana var.mairei</i>	GenBank
	Copalyl diphosphate synthase	XM-002967320	<i>Selaginella moellendorffii</i>
AY602991		<i>Oryzasativa</i>	[15]
XM-002306741		<i>Populus trichocarpa</i>	GenBank
AF049906		<i>Cucurbita maxima</i>	[16]
GU045757		<i>Picea sitchensis</i>	[17]
GU045755		<i>Picea glauca</i>	GenBank
FJ409842		<i>Coffea arabica</i>	GenBank
AB439590		<i>Triticum aestivum</i>	[18]
EU003997		<i>Salvia miltiorrhiza</i>	GenBank
AB031204		<i>Lactuca sativa</i>	[19]
AB015675		<i>Splanum lycopersicum</i>	GenBank
AY562491		<i>Zea mays</i>	[20]
AB109763		<i>Cucurbita</i>	GenBank
AB066271		<i>Oryza sativa</i>	GenBank
Abietadiene synthase	U50768	<i>Abies grandis</i>	GenBank
	AY473621	<i>Picea abies</i>	[21]
	EU439295	<i>Pinus densiflora</i>	GenBank
Kaurene synthase	L37750	<i>Zea mays</i>	GenBank
	U11034	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GenBank
	AF097311	<i>Stevia rebaudiana</i>	[22]
	U63652	<i>Pisum sativum</i>	[23]
	GU144565	<i>Picea glauca</i>	GenBank
	GU045758	<i>Picea sitchensis</i>	[17]
	AB302933	<i>Physcomitrella patens</i>	GenBank
	AB563712	<i>Jungermannia subulata</i>	GenBank
	XM-002964699	<i>Selaginella moellendorffii</i>	GenBank
	U43904	<i>Cucurbita maxima</i>	[24]
	FN689859	<i>Helianthus annuus</i>	GenBank
	EF635966	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	GenBank
	AB045310	<i>Cucumis sativus</i>	GenBank
Stemar-13-ene synthase	AB118056	<i>Oryza sativa</i>	GenBank
Casbene synthase	GU332591	<i>Euphorbia esula</i>	[25]
	GU332590	<i>Triadica sebifera</i>	[25]
	XM-002513294	<i>Ricinus communis</i>	GenBank
ent-Cassa-12, 15-diene synthase	AB089272	<i>Oryza sativa</i>	[26, 27]

也是被单个酶催化, 催化类型为 Type B-Type A 环化。比较不同二萜合酶的氨基酸序列发现了两种特有的保守基序 motif a 和 motif b。motif a 和 motif b 为 GGPP 环化酶的保守区, motif a 为 DDxxD 特征序列, motif b 为 DDDTAM 特征序列。如 CS (LIDDTID) 和 ent-kaurene synthase (VVDDFYD) 的序列中只包括

了 motif a, 且环化是以二磷酸的离子化开始的; ent-CPS (DIDDTAM) 序列中只包括了 motif b, 且 motif b 离 N 端较近, 这种结构可使初期的正电荷稳定, 被 GGPP 的 14, 15-双键质子化, 之后形成二萜骨架或二萜。结合上述酶的环化类型, 初步认为被含有 motif a 的二萜合酶催化而成的二萜其环化类型为 Type A 环

化; 被含有 motif b 的二萜合酶催化而成的二萜其环化类型为 Type B 环化; 若被同时含有 motif a 和 motif b 的酶催化形成的二萜, 其催化类型为 Type A-Type B 环化或 Type B-Type A 环化, 如 AS 催化 GGPP 是经多级序列的 Type B-Type A 环化为 abietadiene; TS 也包含 motif a 和被改良且不与其他环化酶结合的 motif b^[30], 催化类型为 Type A-Type B 环化。目前, 研究较多且已经被克隆出相关基因的二萜合酶有如下几种。

3.1 紫杉烯合酶 (TS) 紫杉醇是从太平洋紫杉的树皮中得到的一种强效抗癌药。如图 1a 途径所示, TS 催化 taxa-4, 11-diene 的形成是通过一系列环化步骤进行的, 以二磷酸离子化开头, 接着感应质子环化, 最终得到二萜产物。Lin 等^[31]在新陈代谢的研究中证实了 GGPP 到 taxa-4, 11-diene 的形成是在单个酶的作用下先经 Type A 催化, 再经 Type B 催化形成 taxa-4, 11-diene 的。目前紫杉烯合酶的 cDNA 已经从短叶紫杉^[32]、短叶红豆杉、欧洲红豆杉、南洋红豆杉^[33]、云南红豆杉^[34]等物种中克隆出来。

3.2 柯巴基焦磷酸合酶 (CPS) CPS 是植物三环二萜类生物合成过程中的起始环化酶, CPS 催化线性结构的 GGPP 环化形成的 4 种可能的柯巴基焦磷酸 (CPP) 异构体, 如图 1 所示, *E, E, E*-GGPP 根据构象的不同, 在不同酶的作用下, C-10 进攻 C-15, C-7 进攻 C-11, 14, 15-双键质子化, 最终产生 4 种可能的产物。GGPP 椅式-椅式构象得到了正常反式的柯巴基焦磷酸 (CPP), 其立体构象如图 1b 途径产物所示; GGPP 正相反的椅式-椅式构象得到了对映异构体反式的对映-柯巴基焦磷酸 (*ent*-CPP), 其立体构象如图 1c 途径产物所示; GGPP 椅式-船式构象得到了正常的顺式柯巴基焦磷酸 (*syn*-CPP), 其立体构象如图 1d 途径产物所示; GGPP 正相反的椅式-船式构象得到了对映异构体顺式的顺式-对映-柯巴基焦磷酸 (*syn-ent*-CPP), 其立体构象如图 1e 途径产物所示; 每一种环化类型都可以从对中间产物的深加工形成的萜类的研究中推断出来, 例如隐丹参酮和铁锈醇中 1, 2 位甲基的转移就是立体选择性反应的结果^[30]。

E, E, E-GGPP 经各种 CPS 环化为不同产物的环

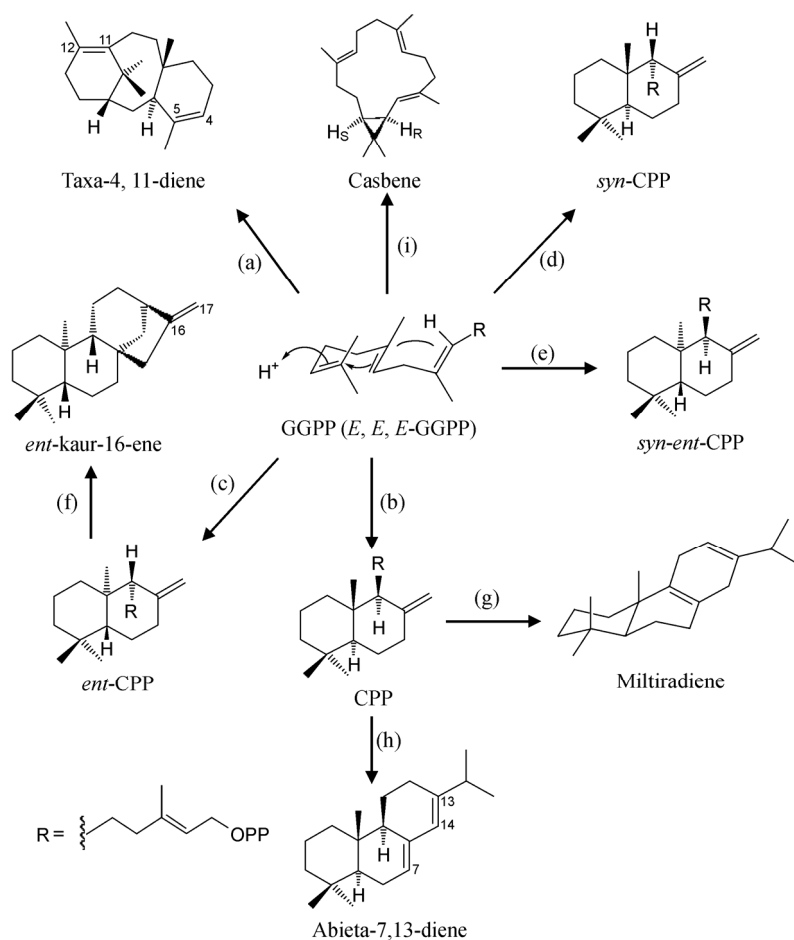


图 1 二萜合酶的催化途径及其产物

化类型均为 Type B 环化, 环化论证来自于对 *ent*-CPS 的氨基酸序列对比分析, 发现和其他植物环化酶相似, 其中只包括基序 b, 从玉米中得到的 An1 基因包含的 motif b 也可能编码一种 *ent*-CPS, 之后 GGPP 的 14, 15-双键质子化, 继而形成二萜^[30]。

syn-CPS 催化 GGPP 形成 *syn*-CPP, *syn*-CPP 经酶催化在水稻中能够生成植物保护素等次生代谢产物。CPS 同样催化 GGPP 形成 CPP, CPP 在 AS 的催化下形成松香二烯, 最终生成二萜化合物松香酸。不同物种中已克隆出的 CPS 也有多种, 高伟等^[35]在研究丹参酮生物合成的功能基因组学及其相关二萜合酶功能鉴定时, 克隆出了 SmCPS 基因, 且该基因被认为是被子植物门中首条被克隆且鉴定有确切功能的基因。

3.3 贝壳杉烯合酶 (*ent*-kaur-16-ene synthase, KS)

如图 1f 途径所示, 催化 *ent*-CPP 形成 *ent*-kaur-16-ene 是在 KS 的参与下通过二磷酸感应环化而成的, *ent*-CPP 环化为 *ent*-kaur-16-ene 为 Type A 环化, 这是因为该环化过程涉及到 KS, 将该酶从近亲种中纯化, 进行基因编码、克隆、基因表达得到重组蛋白, 重组蛋白催化 *ent*-CPP 的产物序列中包含了一个可能的质体-目标 N 端序列和 motif a。通常认为 GGPP 形成 *ent*-kaur-16-ene 是通过两个不同的环化步骤, 即在两种酶 (*ent*-CPS 和 KS) 的参与下完成的, *ent*-kaur-16-ene 从 GGPP 首先经历被 CPS 催化 GGPP 到 *ent*-CPP 的 Type B 环化, 后经 KS 催化 *ent*-CPP 到 *ent*-kaur-16-ene 的 Type A 环化。据报道贝壳杉烯合酶已经从玉米须^[36]、拟南芥^[37]等物种中克隆出来。

3.4 类贝壳杉烯合酶 (Kaunene synthase like, KSL)

对贝壳杉烯合酶家族的研究也增热了与其结构或功能相近的 KSL 的研究。高伟等^[28]在研究丹参酮生物合成中探讨了一些功能基因的催化机制, 发现 SmKSL 是 normal CPP 中第一个明确的 KSL 并且是第一个从被子植物中发现的 abietane 类产生的一级二萜合酶。如图 1g 途径所示, CPP 被 SmKSL 催化, 经一系列中间体, 最终形成次丹参酮二烯 (miltiradiene)。

3.5 松香二烯合酶 (AS) AS 催化 GGPP 也是通过一系列的环化步骤, 如图 1h 所示, 起初是感应质子环化, 接着是二磷酸离子化, 最后形成 abieta-7, 13-diene。AS 催化 GGPP 的环化类型为 Type B-Type A 环化。这是因为通过对 AS 的氨基酸序列分析, 发现其中包含 motif a 和 motif b 两种基序; 且 AS 主要存在于美国黑松的茎和伤口可诱导的巨冷杉的茎中, 研究发现, 从巨冷杉中部分纯化的可溶性天然蛋白

在二价阳离子尤其是 Mg^{2+} 的存在下催化 GGPP 环化为 abietadiene (90%) 和 sandaracopimaradiene (95%)。用从伤口可诱导的茎中提取的 cDNA 进行 PCR, 最终得到 3 个 cDNA 克隆且在大肠杆菌中进行功能性表达, 从而证实单个的蛋白催化 GGPP 是经多级序列的 Type B-Type A 环化转化为 abietadiene 的^[30]。

3.6 西柏烯合酶 (CS) Casbene 是一种植物抗毒素, casbene 的形成被认为是 GGPP 经 CS 催化在 C-1、C-14、C-15 位环化成经典环丙烷环的 casbene, 其环化类型为 Type A 环化。如图 1i 途径所示, 经典的中间体碳正离子说明了环丙烷环的形成是由于 GGPP 中 14, 15-双键 re, re-face 同面接近于 C-1, 并且 GGPP C-1 位立体定向损失 pro-S 氢。整个转化过程由单一酶 CS 催化。天然的 CS 已经从蓖麻子的种子中净化了出来, 从蓖麻子籽苗中得到了一个接近于全长的 CS cDNA, 推测其氨基酸序列不包含清楚的原质体目标序列, 却包含了 Type A 特征, 即含有 motif a 的 DDxxD 序列, 此为 Type A 环化的证据。

4 二萜合酶参与的合成生物学研究

目前萜类天然产物的代谢工程主要集中于: ① 萜类化合物的异源生产; ② 增加途径中关键酶的拷贝量; ③ 改造 MVA 途径, 使前体供应量增加; ④ 改造碳源代谢途径, 使萜类生物合成的通量增加等^[12]。而利用合成生物学的原理和策略, 设计和改造异源微生物菌株生产天然活性产物已被国际认为是一种最有潜力的方法和研究方向。如 2006 年 Keasling 课题组在《Nature》发表了酵母工程菌中生产倍半萜——青蒿素前体青蒿酸 (artemisinic acid) 最高达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的研究成果^[38]。在二萜合酶参与的二萜天然产物研究方面, 银杏内酯类 (ginkgolides) 前体左旋海松二烯 (levopimaradiene), 在改造后的大肠杆菌工程菌中达到 $700 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的产量^[39]。Huang 等^[40]通过体外酶促和大肠杆菌基因工程均得到了紫杉醇的重要中间体紫杉烯。最近, Ajikumar 课题组^[41]报告了一个多元模块化代谢途径工程的方法, 将紫杉烯的代谢途径分成两个模块: 一个是内源的上游甲基赤藓糖醇磷酸 (MEP) 途径形成异戊烯焦磷酸和一个外源的下游萜类化合物形成的途径; 系统化多元探索两个代谢途径模块的最佳平衡条件, 以最大限度地提高紫杉烯的产量以及最小限度的控制吲哚积累, 紫杉烯的产量在工程大肠杆菌中成功地提高 15 000 倍, 达到 $1 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

5 展望

二萜类化合物作为一种重要的萜类化合物, 其

结构复杂、生物活性广泛,还有许多具有潜在生物活性的物质等待人们去开发利用。目前对二萜类化合物的认识还远远不够,分子生物学及相关学科的发展,越来越多的二萜化合物生物合成途径将不断被完善。二萜合酶作为二萜生物合成中的关键酶,其分子克隆和功能鉴定对二萜化合物生物合成途径的揭示及分子调控具有重要意义。通过二萜合酶基因及其他途径上基因的调节,对二萜代谢工程进行定向改造,从而提高二萜化合物的产量,是未来代谢工程发展的一个趋势。此外,通过对二萜生成的基因、二萜合酶、代谢途径等合成生物学中核心元件的发掘及进一步标准化、合理组装方式的分析,建立生物体预测性和调控性的代谢途径,必将推动二萜药用成分的合成生物学的发展,为构建人工细胞行为来实现药物的大规模生产奠定基础。

References

- [1] Zhang LP, Cheng KD, Zhu P. Biotransformation of taxanes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 153-157.
- [2] Du GH, Zhang JT. The general situation and progress of the modern research of red sage root (*Radix salviae miltiorrhizae*) [J]. Her Med (医药导报), 2004, 23: 355-360.
- [3] Zhang DY, Shi LY, Wu XM. Progress in *ent*-abietane euphorbiae diterpene lactones [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2009, 29: 188-196.
- [4] Zhang GH, Zhang YJ, Cong RC, et al. Advances on gibberellins mechanism [J]. Acta Bot Boreal Occid Sin (西北植物学报), 2009, 29: 412-419.
- [5] Zhang CB, Sun HX, Gong ZJ, et al. Plant terpenoid natural metabolism pathways and their synthases [J]. Plant Physiol Comm (植物生理学通讯), 2007, 43: 779-786.
- [6] Chen J, Zhao DG. Research advances on the enzymes and their coding gene involved in plant terpene biosynthesis [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2004, 2: 757-764.
- [7] Luo YM, Liu AH, Li Q, et al. Study development on the biosynthesis path of plant terpenoids and its key enzyme [J]. J Jiangxi Coll Tradit Chin Med (江西中医学院学报), 2003, 15: 45-51.
- [8] Rohmer M, Knani M, Simonin P, et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. Biochem J, 1993, 295: 517-524.
- [9] Laule O, Furholz A, Chang HS, et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100: 6866-6871.
- [10] Rohdich F, Kis K, Bacher A, et al. The nonmevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates [J]. Curr Opin Chem Biol, 2001, 5: 535-540.
- [11] Rodriguez-Concepción M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics [J]. Plant Physiol, 2002, 130: 1079-1089.
- [12] Liu L, Hu CH. Advance in fungal diterpene cyclase [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2010, 50: 1438-1445.
- [13] Wang XY, Cui GH, Gao W, et al. New method of "ingredient difference phenotypical cloning" for functional gene cloning from medicinal plants [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2009, 34: 14-17.
- [14] Wildung MR, Croteau RA. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis [J]. J Boil Chem, 1996, 271: 9201-9204.
- [15] Prisic S, Xu M, Wilderman PR, et al. Rice contains two disparate *ent*-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions [J]. Plant Physiol, 2004, 136: 4228-4236.
- [16] Smith MW, Yamaguchi S, Ait-Ali T, et al. The first step of gibberellin biosynthesis in pumpkin is catalyzed by at least two copalyl diphosphate synthases encoded by differentially regulated genes [J]. Plant Physiol, 1998, 118: 1411-1419.
- [17] Keeling CI, Dullat HK, Yuen M, et al. Identification and functional characterization of monofunctional *ent*-copalyl diphosphate and *ent*-kaurene synthases in white spruce reveal different patterns for diterpene synthase evolution for primary and secondary metabolism in gymnosperms [J]. Plant Physiol, 2010, 152: 1197-1208.
- [18] Toyomasu T, Kagahara T, Hirose Y, et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding *ent*-copalyl diphosphate synthases in wheat: insight into the evolution of rice phytoalexin biosynthetic genes [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73: 772-775.
- [19] Sawada Y, Katsumata T, Kitamura J, et al. Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness [J]. J Exp Bot, 2008, 59: 3383-3393.
- [20] Harris LJ, Saparno A, Johnston A, et al. The maze An2 gene is induced by Fusarium attack and encodes an *ent*-copalyl diphosphate synthase [J]. Plant Mol Biol, 2005, 59: 881-894.
- [21] Martin DM, Faldt J, Bohlmann J. Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily [J]. Plant Physiol,

- 2004, 135: 1908–1927.
- [22] Richman AS, Gijzen M, Starratt AN, et al. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway [J]. *Plant J*, 1999, 19: 411–421.
- [23] Ait-Ali T, Swain SM, Reid JB, et al. The LS locus of pea encodes the gibberellin biosynthesis enzyme *ent*-kaurene synthase A [J]. *Plant J*, 1997, 11: 443–454.
- [24] Yamaguchi S, Saito T, Abe H, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent*-kaurene synthase B from pumpkin [J]. *Plant J*, 1996, 10: 203–213.
- [25] Kirby J, Nishimoto M, Park JG, et al. Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71: 1466–1473.
- [26] Ohyanagi H, Tanaka T, Sakai H, et al. The rice annotation project database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. Japonica genome information [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 741–744.
- [27] Cho EM, Okada A, Kenmoku H, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding *ent*-cassa-12, 15-diene synthase, a putative diterpenoid phytoalexin biosynthetic enzyme, from suspension-cultured rice cells treated with a chitin elicitor [J]. *Plant J*, 2004, 37: 1–8.
- [28] Gao W. Molecular Cloning and Functional Studies of Tanshinones Biosynthesis Related Genes in *Salvia miltiorrhiza* [D]. China Academy of Chinese Medical Sciences (中国中医科学院), 2008.
- [29] Gao W, Matthew LH, Huang LQ, et al. A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights [J]. *Org Lett*, 2009, 22: 5010–5173.
- [30] MacMillan J, Beale MH. *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids, Including Carotenoids and Steroids* [M]. Oxford: Pergamon Press, 1999: 217–243.
- [31] Lin X, Hezari M, Koeppe AE, et al. Mechanism of taxadiene synthase, a diterpene cyclase that catalyzes the first step of taxol biosynthesis in *Pacific yew* [J]. *Biochemistry*, 1996, 35: 2968–2977.
- [32] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93: 2325–2327.
- [33] Hao da C, Huang B, Yang L. Phylogenetic relationships of the genus *Taxus* inferred from chloroplast intergenic spacer and nuclear coding DNA chloroplast intergenic spacer and nuclear coding DNA Biol [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31: 260–265.
- [34] Hao da C, Yang L, Huang B. Molecular evolution of paclitaxel biosynthetic genes TS and DBAT of *Taxus* species [J]. *Genetica*, 2009, 135: 123–135.
- [35] Gao W, Cui GH, Kong JQ, et al. Optimizing expression and purification of recombinant *Salvia miltiorrhiza* copalyl diphosphate synthase protein in *E.coli* and preparation of rabbit antiserum against SmCPS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 766–772.
- [36] Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, et al. Cloning and characterization of the maize An1 gene [J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 75–84.
- [37] Sun TP, Kamiya Y. The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 1509–1518.
- [38] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the anti-malarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440: 940–943.
- [39] Leonard E, Ajikumar PK, Thayer K. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 13654–13659.
- [40] 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.
- [41] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330: 70–74.