

## 真菌二萜环化酶的研究进展

刘莉, 胡昌华\*

(西南大学药学院现代生物医药研究所, 重庆 400716)

**摘要:**二萜类化合物广泛存在于植物和真菌中, 是一类具有重要商业价值的天然产物。二萜环化酶作为催化牻牛儿牻牛儿焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)形成二萜的关键生物合成酶, 在不同生物中的特异性决定了二萜化合物的结构多样性和生物活性多样性。对不同物种中二萜环化酶基因的分离、克隆和表达特征的分析有利于二萜类化合物的生物合成及调控研究。相比植物, 真菌二萜化合物和二萜环化酶的研究刚刚起步。本文综述了近几年真菌二萜环化酶的研究进展, 重点叙述了真菌二萜化合物的生物合成途径、二萜环化酶的特征及其克隆策略, 并对二萜环化酶的代谢工程作了简要概述。

**关键词:**真菌, 二萜环化酶, 生物合成, 克隆策略, 代谢工程

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1438-08

萜类化合物种类丰富, 是天然产物中的最大家族, 在人类发展的历史长河中扮演了重要的角色。到目前为止已发现了 55000 多种结构不同的萜类化合物, 而且以每十年翻一番的速度增长<sup>[1]</sup>。萜类化合物是由异戊二烯(isoprene, C<sub>5</sub>)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<sub>10</sub>)、倍半萜(C<sub>15</sub>)、二萜(C<sub>20</sub>)、三萜(C<sub>30</sub>)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。由此可见, 萜类化合物从简单的线型碳氢链结构到复杂的环状结构充分体现了其结构多样性, 这种结构多样性在一定程度上决定了它们的生物活性多样性<sup>[2]</sup>。

二萜类化合物作为萜类家族中的一大代表, 以其独特的生物活性成为萜类化合物中的研究重点。二萜类化合物主要来源于植物和真菌, 如来源于植物红豆杉(*Taxaceae*)的紫杉醇、银杏(*Ginkgo biloba*)的银杏内酯、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的赤霉素; 来源于真菌 *Cephalosporium aphidicola* 的阿非迪霉素、*Phomopsis amygdali* 的壳梭孢(菌)素、*Clitopilus*

*scyphoides* 的截短侧耳素等<sup>[3]</sup>。二萜类化合物是 C<sub>20</sub> 单位的类异戊二烯前体 GGPP 在二萜环化酶的环化作用下生成二萜母核骨架, 再经过进一步的修饰如氧化、还原、甲基化、糖基化等得到的终产物。二萜环化酶作为二萜类化合物生物合成途径中的关键酶, 在不同生物中表现出一定的特异性<sup>[4]</sup>, 不同物种中作用机制也存在差异, 从而也在一定程度上决定了二萜化合物的结构多样性和生物活性多样性。近年来, 更多不同的二萜化合物结构和生物活性被挖掘, 如克罗烷(clerodane)的啡啡样活性, 12-deoxyphorbol 13-acetate 的抗 AIDS 活性等<sup>[3]</sup>。因此, 对不同物种中二萜环化酶基因的分离、克隆和表达特征的分析将会指导二萜类化合物的生物合成及调控研究。

植物二萜环化酶的研究比真菌起步早, 并且已经取得了较大的进展。自 1994 年第一个植物二萜环化酶蓖麻烯合成酶的基因被克隆以来<sup>[5]</sup>, 越来越多的植物二萜环化酶基因被认识, 如拟南芥中贝壳杉烯合成酶基因, 短叶红豆杉中紫杉烯合成酶基因以及水稻中合成赤霉素和一系列植物抗毒素的二萜

**基金项目:** 重庆市科技攻关重点项目(CSTC 2009AB1029)

\* 通信作者。Tel: +86-23-68250520; E-mail: chhhu@swu.edu.cn

**作者简介:** 刘莉(1985-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事真菌分子遗传研究。E-mail: liuli124125@126.com

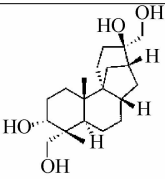
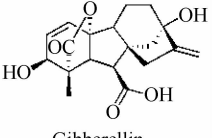
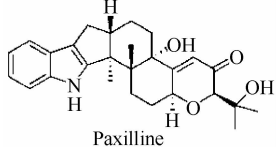
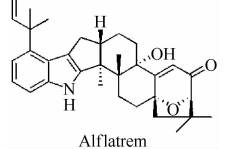
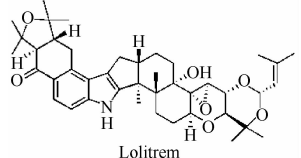
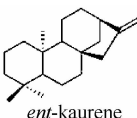
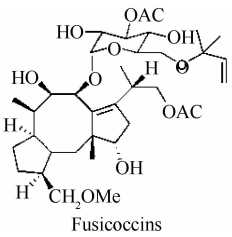
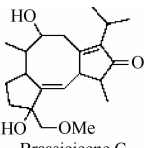
**收稿日期:** 2010-04-14; **修回日期:** 2010-05-25

环化酶基因等<sup>[6]</sup>。由于植物中二萜环化酶基因具有同源性较高、内含子和外显子位置相当保守等特点,Lichtenthaler 推测它们可能起源于同一个单基因祖先<sup>[7]</sup>,这对植物二萜环化酶的研究提供了坚实的理论基础,同时也为更多未被认识的植物二萜环化酶研究提供了理论依据。

相比植物,真菌中二萜环化酶的研究还处于一个探索阶段,自1997年从 *Phaeosphaeria* sp. L487 中克隆到第一个真菌二萜环化酶到目前为止只报道了10个真菌二萜类化合物生物合成途径中的二萜环化酶(表1)。本文结合本实验室的有关工作就真菌中已发现的几种二萜环化酶的最新进展进行简要综述。

表1 二萜环化酶已被认识的真菌二萜化合物

Table 1 The diterpenoid whose diterpene cyclase were identified from fungi

Fungus strain	Structure of the diterpenoid	Reference
<i>Phoma betae</i>	 <p>Aphidicolin</p>	Toymoasu <i>et al.</i> 2007 <sup>[8]</sup>
<i>Gibberela fujikuroi</i> <i>Sphaceloma manihoticola</i>	 <p>Gibberellin</p>	Tudzynski <i>et al.</i> 1998 <sup>[9]</sup> Omke <i>et al.</i> 2008 <sup>[10]</sup>
<i>Penicillium paxilli</i>	 <p>Paxilline</p>	Young <i>et al.</i> 2001 <sup>[11]</sup>
<i>Aspergillus flavus</i>	 <p>Aflatoxin</p>	Zhang <i>et al.</i> 2004 <sup>[12]</sup>
<i>Epichloe festucae</i> <i>Neotyphodium lolii</i>	 <p>Lolitrein</p>	Young <i>et al.</i> 2005 <sup>[13]</sup>
<i>Phaeosphaeria</i> sp. L487	 <p>ent-kaurene</p>	Kawaide <i>et al.</i> 1997 <sup>[14]</sup>
<i>Phomopsis amygdale</i>	 <p>Fusicoccins</p>	Toyomasu <i>et al.</i> 2007, 2008 <sup>[15-16]</sup>
<i>Alternaria brassicicola</i>	 <p>Brassicene C</p>	Minami <i>et al.</i> 2009 <sup>[17]</sup>

## 1 真菌二萜类化合物的生物合成途径

根据萜类化合物生物合成的共同前体异戊二烯焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 生物合成来源和机制的不同, 萜类化合物生物合成 (类异戊二烯生物合成) 可以分为两条不同的途径。分别是甲羟戊酸途径 (MVA 途径) 和甲基赤藓糖磷酸 (MEP 途径)<sup>[18]</sup>。

到目前为止所发现的真菌二萜类化合物的合成途径均为 MVA 途径。MVA 途径起始由 3 分子乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 酰基转移酶和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 合成酶的共同作用下缩合成 HMG-CoA; 随后, HMG-CoA 还原酶 (HMGR) 催化 HMG-CoA 不可逆地形成具有 6 个碳原子的中间体甲羟戊酸 (mevalonate, MVA); 在 ATP 和二价金属离子的参与下, 甲羟戊酸激酶 (mevalonate kinase, MK) 和磷酸甲羟戊酸激酶 (phosphomevalonate kinase, MPK) 将 MVA 磷酸化, 形成磷酸甲羟戊酸 (phosphomevalonate, MVAP) 和焦磷酸甲羟戊酸 (5-

pyrophosphomevalonate, MVAPP); 最后, MVAPP 在焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶 (pyrophosphomevalonate decarboxylase, MDC) 的作用下脱羧形成 IPP<sup>[19]</sup>。IPP 在 I 型或 II 型 IPP 异构酶的作用下异构化为二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl-pyrophosphate, DMAPP), 活化的 DMAPP 再与 3 个 IPP 分子依次在牻牛儿焦磷酸合成酶 (geranyl diphosphate synthase, GPS)、法尼基化焦磷酸合成酶 (farnesyl diphosphate synthase, FPS)、牻牛儿牻牛儿焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS) 的作用下缩合形成 GGPP<sup>[20]</sup>。大部分功能性的二萜类化合物是由非环状的 GGPP 在各种二萜环化酶的环化作用下最终形成相应的环状二萜化合物 (图 1)。

## 2 真菌二萜环化酶的分类与特征

二萜环化酶作为二萜类化合物生物合成的限速酶, 在不同生物中表现出一定的特异性, 二萜环化酶发挥作用首先需要底物 GGPP 形成高活性碳阳离子, 再经过多步精确的环化反应将碳阳离子中间体

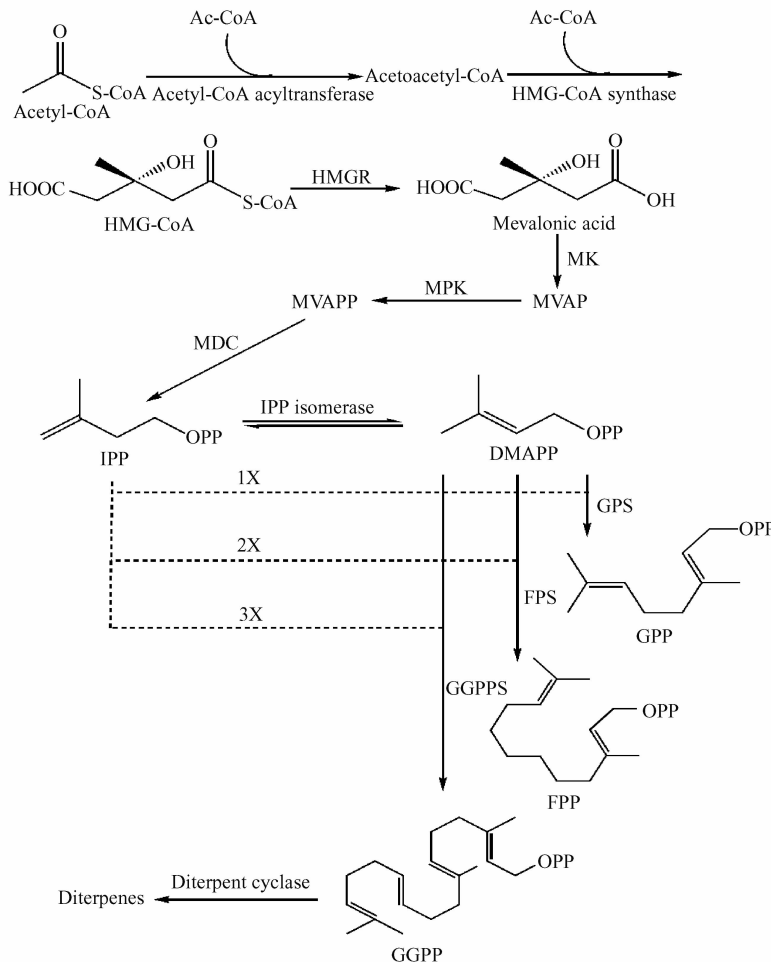


图 1 真菌二萜类化合物生物合成途径

Fig. 1 The biosynthesis pathway of fungal diterpenoid.

环化成二萜化合物<sup>[21]</sup>。然而由于二萜环化酶活性位点折叠方式的不同会产生不同的二萜环化酶立体结构, 这样的立体结构决定着碳阳离子中间体的形成方式, 不同的碳正阳离子中间体, 会实现不同的结构重排, 这也是形成二萜化合物的化学多样性和结构多样性的主要原因之一<sup>[22]</sup>。

按照碳阳离子的形成机制, 二萜环化酶可分为离子化依赖型和质子化依赖型环化酶<sup>[23]</sup>。离子化依赖型环化酶, 又称 A 型环化酶。它是依靠结合二价金属离子 ( $Mg^{2+}$  或  $Mn^{2+}$ ) 使环化酶底物焦磷酸烯丙基分子的离去基团焦磷酸分子更容易离去, 从而获得碳阳正离子。这类酶具有 DDXXD/E (富含天冬氨酸域) 和 NSE/DTE 两个能结合  $Mg^{2+}$  以及不同异戊二烯焦磷酸的结构域。其中以二萜化合物蓖麻烯生物合成途径中的关键酶蓖麻烯合成酶为代表<sup>[5]</sup>。质子化依赖型环化酶, 又称 B 型环化酶。它是依靠天冬氨酸残基提供质子质子化环氧环或是碳碳双键 ( $-C=C-$ ) 从而形成碳阳正离子, 这类酶含有 DXDD 保守结构域, 如柯巴酰焦磷酸合成酶 (copalyl diphosphate synthase, CPS)。

真菌的二萜环化酶主要以双功能环化酶形式存在, 这类酶同时具有上述两类环化酶的活性位点, 它既能完成质子化的环化过程也能完成离子化的环化过程, 它不同于植物中的二萜环化酶需要经过两种不同的酶完成两步环化反应, 而是在一种双功能环化酶的作用下实现底物 GGPP 的环化。如在植物中赤霉素前体对映-贝壳杉烯的合成需要先由质子型环化酶 CPS 的作用下将 GGPP 环化成柯巴酰焦磷酸 (copalyl diphosphate, CDP), 进一步在离子型环化酶对映-贝壳杉烯合成酶 (*ent*-kaurene synthase, KS) 的作用下将 CDP 环化成对映-贝壳杉烯。而在真菌 *Phaeosphaeria* sp. L487 中 KS 是以双功能的环化酶形式存在的, 它直接将 GGPP 环化成对映-贝壳杉烯, 经氨基酸序列分析, 该酶的羧基端有 DDXXD 保守区, 在氨基端有 DXDD 保守区, 并与植物中的 CPS 和 KS 具有同源性<sup>[14]</sup>。 *Phoma betae* 中阿非迪霉素的合成酶<sup>[24]</sup>、 *Gibberella fujikuroi* 中赤霉素前体对映-贝壳杉烯的合成酶 KS<sup>[9]</sup> 也是双功能环化酶。

2007 年, Toyomasu 等用基因组步移的方法从 *Phomopsis amygdali* 中克隆到了壳梭孢 (菌) 素的二萜环化酶基因 *PaFS*。通过生物信息学分析该酶的氨基端与萜类合成酶有较高的相似性, 羧基端与异戊烯转移酶有很高的同源性。结合异源表达以及点突变等功能验证方法证明该二萜环化酶 *PaFS* 以一

种特殊的嵌合形式存在, 它将异戊烯转移酶区域和二萜环化酶区域嵌合为一体, 能直接将五碳的异戊二烯单位转化为壳梭孢 (菌) 素的前体 Fusicocca-2, 10(14)-diene<sup>[15]</sup>。这一发现揭示了真菌中二萜环化酶存在一种新形式, 为研究真菌二萜环化酶提供了新方向。以 *PaFS* 这种新形式的二萜环化酶为线索, Minami 等通过在基因组数据库中进行同源基因搜索, 从 *Alternaria brassicicola* ATCC 96838 中找到了与 *PaFS* 具有 47% 同源性的 *orf8* 基因, 并且通过功能验证证明该基因是与 *PaFS* 具有相同功能的嵌合型二萜环化酶<sup>[17]</sup>。他们的结果为我们课题组研究截短侧耳素生物合成途径中的二萜环化酶提供了新的思路。

截短侧耳素 (pleuromutilin) 是由真菌 *Clitopilus scyphoides* 产生的一种三环二萜类抗生素, 对革兰氏阳性菌和支原体有强抗菌活性, 先后被用于半合成新型兽用抗生素泰妙菌素、沃尼妙林及新型人用抗生素瑞他莫林, 标志着截短侧耳素妙林类化合物的开发实现了从兽用抗生素到人用抗生素的飞跃<sup>[25]</sup>。二萜环化酶作为截短侧耳素生物合成途径中的关键酶, 还未见相关的报道。因此对截短侧耳素二萜环化酶基因的分离和克隆研究将会为截短侧耳素的基因工程和代谢工程研究提供基础。Yao 等采用了基于基因序列同源性的直接克隆方法、探针杂交、基因组步移等方法对 *Pleurotus passeckerianus* 中截短侧耳素的二萜环化酶进行克隆均未取得成功<sup>[26]</sup>, 说明截短侧耳素的二萜环化酶与其它已知真菌中的二萜环化酶同源性较低, 或者并非以一种普通的形式存在。鉴于壳梭孢 (菌) 素和截短侧耳素具有相似的碳骨架结构, 都属于三环二萜类化合物, 因此推测它们的二萜环化酶可能具有相同的特点。本课题组试图从嵌合酶形式入手, 根据文献中提到的一些假设的真菌嵌合二萜环化酶基因序列为参考设计简并引物对 *Clitopilus scyphoides* 中的截短侧耳素二萜环化酶进行分离克隆, 相关工作正在进行中。

### 3 真菌二萜环化酶基因的克隆策略

#### 3.1 基于序列同源性的直接克隆法

根据二萜环化酶的高保守性序列设计简并引物, 经 PCR 扩增得到相关酶的特异性探针, 筛选 cDNA 文库, 分离克隆酶基因。如 1997 年 Kawaide 等人根据植物中的 CDP 合成酶保守序列设计引物经 PCR 扩增从 *Phaeosphaeria* sp. L487 的 cDNA 文库中获得了第一个真菌二萜环化酶基因<sup>[14]</sup>。使用

同样的方法从 *Gibberella fujikuroi*<sup>[9,27]</sup> 和 *Phoma betae*<sup>[24]</sup> 中也成功地克隆到了相应的二萜环化酶基因。对于较小的二萜环化酶基因,除了用探针在 cDNA 文库中进行钓取外,还可以通过保守序列克隆核心片段,再通过 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 技术获得基因全长。

基于序列同源性的克隆法是一种直接简便的方法,在基因克隆中通常被研究者们当作首选,但是在真菌二萜环化酶的克隆中具有一定的局限性<sup>[28]</sup>。原因是已被克隆的二萜环化酶基因主要集中在植物中,对真菌二萜环化酶基因的认识较少,而且大部分真菌与植物的二萜环化酶环化过程和机制不同,甚至是真菌与真菌之间也存在很大差异,环化酶的基因序列同源性较低。因此这种方法在克隆真菌二萜环化酶基因中受到了一定的限制。

### 3.2 基因组步移法

真菌中很多次级代谢产物生物合成基因都是成簇存在的,这种特性主要体现在聚酮类化合物、非核糖体多肽类化合物和萜类化合物的生物合成中<sup>[29]</sup>。据研究显示,在真菌的二萜类化合物的生物合成途径中,GGPP 合成酶基因(*ggs*)通常位于二萜化合物的生物合成基因簇上<sup>[8,11,15-16,30]</sup>。因此通过克隆 *ggs* 进行基因组步移可以得到二萜环化酶基因。如 *Phoma betae* 中阿非迪霉素的二萜环化酶<sup>[24]</sup>、*Phomopsis amygdali* 中劳丹脂二萜环化酶<sup>[16]</sup> 和壳梭孢(菌)素合成酶<sup>[15]</sup> 等都是通过 *ggs* 进行基因组步移得到的。这种方法不需要建 cDNA 文库,也不依赖于环化酶基因的同源性,是一种发现新的二萜环化酶基因的有效策略。

### 3.3 基于纯化酶的反向基因克隆方法

通过分离纯化真菌中的二萜环化酶,测定氨基酸序列信息,再合成与其相对应的核苷酸序列以制备核苷酸探针,筛选 cDNA 文库,是克隆真菌二萜环化酶基因的又一重要策略。虽然该方法在真菌的二萜环化酶研究中还没有得以成功运用的例子,但在其他萜类合成酶中已有相关报道,如杉木中 abietadiene 二萜合成酶基因等的克隆<sup>[31]</sup>。此方法针对性较强,能在不知基因信息的情况下直接得到某一种具体的二萜合成酶,但是因为二萜合成酶一般表达量较低,难于分离纯化,因此分离纯化二萜合成酶就成了关键步骤。2004 年 Kohl 等<sup>[32]</sup> 从海洋无脊椎动物 *Pseudopterogorgia elisabethae* 中成功分离纯化出伪蕨素二萜环化酶,这不仅为伪蕨素二萜环化酶基因的克隆创造了良好的条件,同时也为其他

生物中二萜环化酶的分离纯化和基因克隆提供了参考。

### 3.4 基于生物合成途径的筛选

在构建了 MVA 途径的大肠杆菌中,累积的 IPP 会对菌体产生毒性而抑制生长<sup>[33]</sup>。2007 年 Withers 等人在该菌株中引入能合成 FPP 的基因和倍半萜合成酶基因后解除了这种生长抑制作用。基于这样的现象他们在枯草芽孢杆菌的 DNA 文库中筛选出了能解除这种生长抑制的基因片段,并证明该基因作为一个半萜合成酶,从而开辟出了一条寻找萜类环化酶基因的新途径<sup>[28]</sup>。同样二萜环化酶能够利用 IPP 生成二萜化合物从而解除 IPP 对菌体的毒性作用,根据此原理可以从真菌的 cDNA 文库中筛选出二萜环化酶基因。该方法不依赖于序列的同源性,尤其适用于寻找基因信息完全未知的萜类环化酶基因。

## 4 基于二萜环化酶基因的代谢工程

随着基因工程的快速发展,以基因工程为基础的代谢工程已成为提高萜类化合物产量的主要途径之一。目前萜类代谢工程的研究主要集中于:(1)萜类化合物的异源生产;(2)增加途径中关键酶(如:萜类环化酶)的拷贝量;(3)改造 MVA 途径,使前体(IPP 或 DMAPP)供应量加强;(4)改造碳源代谢途径,使萜类生物合成的通量增加等。通过上述方法,青蒿酸<sup>[34-35]</sup>、劳丹脂<sup>[36]</sup> 的代谢工程已相继取得突破性的进展。相比其它萜类化合物,二萜代谢工程方面的研究较少,主要集中于具有巨大医疗价值的抗肿瘤药物紫杉醇的代谢工程。二萜环化酶作为二萜类化合物生物合成的关键酶之一,是二萜代谢工程的重要靶标,一方面通过增加拷贝数提高二萜化合物产量,另一方面通过定向突变二萜环化酶基因改变酶的特性从而获得高产量的二萜化合物或新结构物质<sup>[37]</sup>。Huang 等<sup>[38]</sup> 在大肠杆菌中导入经改造后去掉了氨基端 78 个氨基酸的紫杉烯合酶(taxadiene synthase, TS)基因,从而获得了能高效表达的可溶性酶,当 TS 基因与 IPP 还原酶和 GGPP 合成酶基因同时表达并高效表达 1-脱氧-5-磷酸木酮糖(D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, DXP)合酶基因时,可得到高产的紫杉醇的重要中间产物紫杉烯。Dejong 等<sup>[39]</sup> 在酿酒酵母中将 *Taxus cuspidate* 的 TS 基因与 GGPP 合成酶基因、细胞色素 P450,紫杉二烯-5 $\alpha$ -羟化酶(taxadiene 5 $\alpha$ -hydroxylase, TYH5a)基因共同表达,也得到了高产的紫杉烯。二萜代谢工程所取得的这些初步成果将会为实现二萜类物

质完整的途径工程奠定坚实的基础。认识并获得各种二萜物质生物合成途径中的二萜环化酶基因, 从关键酶基因水平上对二萜类生物合成进行人工调控, 通过蛋白质工程等技术改造细胞代谢途径, 提高二萜类最终产量或在不含二萜类的生物中合成新的二萜类物质将是二萜化合物代谢工程的重要方向。

## 5 展望

二萜类化合物作为萜类化合物中的一大类, 过去几十年的研究主要集中于植物中。真菌作为二萜类化合物的重要资源刚刚引起人们重视, 其中还有许多具有潜在生物活性的物质等待人们的开发和利用。然而我们对产生菌以及产生菌中二萜化合物的生物合成途径和生物合成途径中关键酶的认识还远远不够。随着分子生物学和各种组学等相关学科的飞速发展, 越来越多萜类化合物的生物合成途径和萜类合成酶将被揭示。真菌二萜环化酶基因的克隆和分析对二萜化合物生物合成的分子调控具有重要意义, 有利于阐明真菌特有二萜类生物合成机理, 也有利于利用代谢工程手段定向改造生产菌种从而提高二萜化合物的产量或产生新的萜类化合物。

**致谢** 感谢中国科学院微生物研究所刘钢研究员在本文写作和修改过程中提出的宝贵意见和建议。

## 参考文献

- [ 1 ] Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, Stephanopoulos G. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Molecular pharmaceuticals*, 2008, 5(2): 167-190.
- [ 2 ] Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 2007, 3(7): 408-414.
- [ 3 ] Hanson JR. Diterpenoids. *Natural product reports*, 2009, 26(9): 1156-1171.
- [ 4 ] Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature reviews*, 2005, 3(12): 937-947.
- [ 5 ] Mau CJ, West CA. Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(18): 8497-8501.
- [ 6 ] Toyomasu T. Recent advances regarding diterpene cyclase genes in higher plants and fungi. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2008, 72(5): 1168-1175.
- [ 7 ] Lichtenthaler HK. The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 47-65.
- [ 8 ] Toyomasu T, Nakaminami K, Toshima H, Mie T, Watanabe K, Ito H, Matsui H, Mitsuhashi W, Sassa T, Oikawa H. Cloning of a gene cluster responsible for the biosynthesis of diterpene aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase alpha. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 2004, 68(1): 146-152.
- [ 9 ] Tudzynski B, Kawaide H, Kamiya Y. Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. *Current genetics*, 1998, 34(3): 234-240.
- [ 10 ] Bomke C, Rojas MC, Gong F, Hedden P, Tudzynski B. Isolation and characterization of the gibberellin biosynthetic gene cluster in *Sphaceloma manihoticola*. *Applied and environmental microbiology*, 2008, 74(17): 5325-5339.
- [ 11 ] Young C, McMillan L, Telfer E, Scott B. Molecular cloning and genetic analysis of an indole-diterpene gene cluster from *Penicillium paxilli*. *Molecular microbiology*, 2001, 39(3): 754-764.
- [ 12 ] Zhang S, Monahan BJ, Tkacz JS, Scott B. Indole-diterpene gene cluster from *Aspergillus flavus*. *Applied and environmental microbiology*, 2004, 70(11): 6875-6883.
- [ 13 ] Young CA, Bryant MK, Christensen MJ, Tapper BA, Bryan GT, Scott B. Molecular cloning and genetic analysis of a symbiosis-expressed gene cluster for lolitrem biosynthesis from a mutualistic endophyte of perennial ryegrass. *Molecular genetics and genomics*, 2005, 274(1): 13-29.
- [ 14 ] Kawaide H, Imai R, Sassa T, Kamiya Y. Ent-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria sp. I487*. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 1997, 272(35): 21706-21712.
- [ 15 ] Toyomasu T, Tsukahara M, Kaneko A, Niida R, Mitsuhashi W, Dairi T, Kato N, Sassa T. Fusicoccins are biosynthesized by an unusual chimera diterpene synthase in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(9): 3084-3088.

- [16] Toyomasu T, Nuda R, Kenmoku H, Kanno Y, Miura S, Nakano C, Shiono Y, Mitsuhashi W, Toshima H, Oikawa H, Hoshino T, Dairi T, Kato N, Sassa T. Identification of diterpene biosynthetic gene clusters and functional analysis of labdane-related diterpene cyclases in *Phomopsis amygdali*. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 2008, 72(4): 1038-1047.
- [17] Minami A, Tajima N, Higuchi Y, Toyomasu T, Sassa T, Kato N, Dairi T. Identification and functional analysis of brassicicene C biosynthetic gene cluster in *Alternaria brassicicola*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2009, 19(3): 870-874.
- [18] Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 2002, 66(8): 1619-1627.
- [19] Allen CM, Alworth W, Macrae A, Bloch K. A long chain terpenyl pyrophosphate synthetase from *Micrococcus lysodeikticus*. *The Journal of biological chemistry*, 1967, 242(8): 1895-1902.
- [20] Ohnuma S, Hirooka K, Tsuruoka N, Yano M, Ohto C, Nakane H, Nishino T. A pathway where polyprenyl diphosphate elongates in prenyltransferase. Insight into a common mechanism of chain length determination of prenyltransferases. *The Journal of biological chemistry*, 1998, 273(41): 26705-26713.
- [21] Lesburg CA, Caruthers JM, Paschall CM, Christianson DW. Managing and manipulating carbocations in biology: terpenoid cyclase structure and mechanism. *Current opinion in structural biology*, 1998, 8(6): 695-703.
- [22] Christianson DW. Chemistry. Roots of biosynthetic diversity. *Science (New York, NY)*, 2007, 316(5821): 60-61.
- [23] Davis EM, Croteau R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Topics in Current Chemistry*, 2000, 209: 53-95.
- [24] Oikawa H, Toyomasu T, Toshima H, Ohashi S, Kawaide H, Kamiya Y, Ohtsuka M, Shinoda S, Mitsuhashi W, Sassa T. Cloning and functional expression of cDNA encoding aphidicolan-16 beta-ol synthase; a key enzyme responsible for formation of an unusual diterpene skeleton in biosynthesis of aphidicolin. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(21): 5154-5155.
- [25] Hu C, Zou Y. Mutilins derivatives; from veterinary to human-used antibiotics. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2009, 9(12): 1397-1406.
- [26] Yao Q. Biosynthetic studies of fungal diterpene antibiotics. Oregon State University, Thesis, 2007.
- [27] Toyomasu T, Kawaide H, Ishizaki A, Shinoda S, Otsuka M, Mitsuhashi W, Sassa T. Cloning of a full-length cDNA encoding ent-kaurene synthase from *Gibberella fujikuroi*: functional analysis of a bifunctional diterpene cyclase. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 2000, 64(3): 660-664.
- [28] Withers ST, Gottlieb SS, Lieu B, Newman JD, Keasling JD. Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73(19): 6277-6283.
- [29] Keller NP, Hohn TM. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 1997, 21(1): 17-29.
- [30] Tudzynski B, Holter K. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal genetics and biology*, 1998, 25(3): 157-170.
- [31] LaFever RE, Vogel BS, Croteau R. Diterpenoid resin acid biosynthesis in conifers: enzymatic cyclization of geranylgeranyl pyrophosphate to abietadiene, the precursor of abietic acid. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1994, 313(1): 139-149.
- [32] Kohl AC, Kerr RG. Identification and characterization of the pseudopteroin diterpene cyclase, elisabethatriene synthase, from the marine gorgonian, *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2004, 424(1): 97-104.
- [33] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature biotechnology*, 2003, 21(7): 796-802.
- [34] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MC, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [35] Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, Burd H, Eng D, Paddon CJ, Newman JD, Keasling JD. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC biotechnology*, 2008, 8: 83.
- [36] Morrone D, Lowry L, Determan MK, Hershey DM, Xu M, Peters RJ. Increasing diterpene yield with a modular metabolic engineering system in *E. coli*: comparison of MEV and MEP isoprenoid precursor pathway engineering.

- Applied microbiology and biotechnology*, 2010, 85 (6): 1893-1906.
- [37] Muntendam R, Melillo E, Ryden A, Kayser O. Perspectives and limits of engineering the isoprenoid metabolism in heterologous hosts. *Applied microbiology and biotechnology*, 2009, 84(6): 1003-1019.
- [38] Huang Q, Roessner CA, Croteau R, Scott AI. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2001, 9(9): 2237-2242.
- [39] Dejong JM, Liu Y, Bollon AP, Long RM, Jennewein S, Williams D, Croteau RB. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 2006, 93 (2): 212-224.

## Advance in fungal diterpene cyclase—A review

Li Liu, Changhua Hu\*

(Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** Diterpenoid is a huge group of nature products isolated from plants and fungi. Diterpene cyclase, which is responsible for the diterpene carbon skeleton formation from geranylgeranyl diphosphate (GGPP), is a key enzyme in the biosynthetic pathway of diterpene. The specificity of diterpene cyclase in different species results in structural diversity and bioactivity variety of diterpenoid. Isolation and characterization of the diterpene cyclase in various species will facilitate studies on the biosynthesis and regulation of diterpenoid in future. Compared to plant diterpenoids, few fungal diterpenoid and diterpene cyclase were studied. This article reviews the research advancement of fungal diterpene cyclase in recent years, especially describes the biosynthesis pathway of diterpenoid, the characteristics and cloning strategies of fungal diterpene cyclase, and the metabolic engineering of diterpenoid.

**Keywords:** Fungi, Diterpene cyclase, Biosynthesis, Cloning strategy, Metabolic engineering

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Chongqing Key Science and Technology Research Program (CSTC 2009AB1029)

\* Corresponding author. Tel: +86-23-68250520; E-mail: chhhu@swu.edu.cn

Received: 14 April 2010/ Revised: 25 May 2010

### 《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。