

针叶树萜类合成酶研究进展*

龚 治^{1,2} 李典谟¹ 张 真³

(1. 中国科学院动物研究所 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100101 ; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049 ; 3. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 国家林业局森林保护学重点开放性实验室 北京 100091)

摘 要 : 萜类化合物是植物一类重要的次生代谢物 , 在寄主识别和信息通讯及 3 层营养关系等生态关系上具有重要功能。萜类合成酶是萜烯生物合成途径中的重要调控酶之一 , 特别是在萜烯化合物多样性的调控上具有重要作用。在针叶树中 , 萜类合成酶的深入研究有助于更好地利用萜类化合物以进行病虫害的防御。综述近年来针叶树中萜烯合成酶的理化性质、基因和氨基酸序列特征以及调控等方面的研究成果 , 为我国开展这方面的研究工作提供有益的参考。

关键词 : 萜类化合物 ; 萜类合成酶 ; 针叶树

中图分类号 : S718.7 文献标识码 : A 文章编号 : 1001 - 7488(2010)01 - 0123 - 08

Research Progress of Terpene Synthases in Conifers

Gong Zhi^{1,2} Li Dianmo¹ Zhang Zhen³

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents Institute of Zoology , Chinese Academy of Sciences Beijing 100101 ; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences Beijing 100049 ; 3. Key Open Lab. of Forest Protection of State Forestry Administration Research Institute of Forest Ecology , Environment and Protection CAF Beijing 100091)

Abstract : Terpenoid is an important secondary metabolites of plant , and it is involved in host recognition , information communication , and tritrophic system relation. Terpene synthases is one of most important regulatory enzymes in biosynthetic pathway of terpenoids , specially in regulation of terpene biodiversity. In conifers , studying terpene synthases deeply could make us use terpenoids to defend diseases and insect pests well. This paper focus on physical and chemical properties , gene and amino acid sequence characteristics , and regulation of conifer terpene synthases in recent years so that benefit research work in China.

Key words : terpenoid ; terpene synthases ; conifers

当植物受到昆虫或致病菌的侵害时 , 植物体内化学成分的种类和数量均会发生变化 , 从而对昆虫和致病菌产生忌避作用和抑制作用。这些变化包括营养物质含量、比例的改变以及次生代谢的增加 , 如植物被诱导产生高浓度的萜烯、酚、单宁、生物碱、蛋白酶抑制剂等他感化合物(allelochemical)。植物次生代谢物(plant secondary metabolites)曾一度被认为是代谢的废弃物。然而随着研究的深入 , 发现次生代谢物在植物的生命活动中扮演重要的作用 , 而且广泛地应用于工业、医药卫生等方面。已有研究证明 , 当松树受害后 , 其体内的营养物质、挥发性及非挥发性次生物质在含量上均会发生不同程度的变化 , 表现为 : 营养物质可溶性糖含量下降 , 各次生代谢物质(单宁、酚类物质) 含量增加 , 从而达到防

御松毛虫的目的(李镇宇等 , 1999 ; 王燕等 , 2000)。

萜类化合物(terpenoids)是植物次生代谢物中的一类重要化合物 , 许多萜类化合物被植物用于防御外来植食性害虫和其伴生致病真菌的侵害 , 同时也是针叶树的重要防御物质。目前已知针叶树萜类化合物能够被某些植食性昆虫诱导生成。如白松木蠹象(*Pissodes strobi*)取食云杉(*Picea asperata*)后 , 可导致(-) - 芳樟醇的释放量增多(Miller *et al.* , 2005)。萜类化合物在针叶树中通常以复杂的混合物形式存在 , 其数量和特性 , 特别是其对映体组成 , 会影响萜烯类化合物对潜在的致病菌和植食性昆虫的防御作用。萜类化合物具有重要的生态作用 , 特别是单萜化合物在寄主的识别选择、信息素信号(引导小蠹虫聚集和侵殖)及 3 层营养关系中具有

收稿日期 : 2008 - 04 - 20。

基金项目 : “ 973 ” 国家重点基础发展规划项目 “ 农业危险生物入侵机理与控制基础研究 ” (2002CB11140) ; “ 十一五 ” 科技支撑项目 (2006BAD08A192)。

* 张真为通讯作者。

不可替代的作用。除此之外,萜类化合物对蛀干害虫还有一定的毒性作用(Phillips *et al.*, 1999b; Trapp *et al.*, 2001a)。如柠檬烯和 3-萜烯均可通过与其他生物活性因子协同作用来阻碍昆虫的侵害(Raffa *et al.*, 1983)。目前,萜类化合物已成为针叶树研究领域中的热点问题。

萜类合成酶(terpene synthases, TPS)是萜类化合物生物合成过程中的关键酶之一。TPS 分别催化前体底物香叶酯二磷酸(geranyl diphosphate, GPP)、法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)形成单萜、倍半萜和二萜。目前,在针叶树中已报道了 70 多种 TPS,包括 50 多个核苷酸序列(表 1)。已报道的针叶树 TPS 主要集中在松科(Pinaceae)植物中,其中以大冷杉(*Abies grandis*)居多,挪威云杉(*Picea abies*)次之,而火炬松(*Pinus taeda*)、北美云杉(*Picea sitchensis*)、花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、红杉(*Abies magnifica*)只占少部分。对萜类合成酶及其编码基因的深入研究,可以使我们通过 DNA 重组技术来改造萜类合成细胞中的代谢途径,以提高萜类最终产量或在不含萜类的生物中合成萜类,为促进有用萜类合成提供新的机会(黄瑛等, 2006)。如通过对紫杉醇生物合成途径中关键酶基因的分离、克隆并对其进行基因改造和遗传转化,构建高效表达紫杉醇或其重要前体紫杉烷的基因工程细胞株,并建立其相应的基因表达调控方法,从而解决紫杉醇的药源问题。本文对国内外针叶树萜类合成酶方面的研究做一综述,从而为我国油松(*Pinus tabulaeformis*)在这方面的研究工作提供有益的参考。

1 萜类合成酶的理化特性

大多数萜类合成酶都是可溶性的酸性蛋白,天然分子质量在 35~80 ku 之间,其催化反应依赖 2 价金属阳离子(如 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} 等)(Phillips *et al.*, 1999a; Trapp *et al.*, 2001a; 2001b),反应底物主要是以 GPP, FPP 和 GGPP 为主(图 1)。

萜烯合成酶根据其功能可以分为 3 大类,分别是单萜合成酶(monoterpene synthase)、倍半萜合成酶(sesquiterpene synthase)和二萜合成酶(diterpene synthase)。其中单萜合成酶的等电点值(isoelectric point, pI)大约在 pH 6 左右,其最佳 pH 范围在 6.8~7.8 之间。通常裸子植物的萜烯合成酶要比被子植物的萜烯合成酶偏高些(Bohlmann *et al.*, 1998a; 1998b)。

裸子植物单萜合成酶的催化作用不仅依赖 2 价金属离子(但更偏好 Mn^{2+}),而且还需要单价阳离子(如 K^+)来激活,该特性是被子植物单萜合成酶所不具有的(Bohlmann *et al.*, 1997)。裸子植物单萜合成酶的最适 pH 值为碱性(Bohlmann *et al.*, 1997; Lewinsohn *et al.*, 1992; Savage *et al.*, 1994),而被子植物的最适 pH 值接近中性(Alonso *et al.*, 1991; Croteau *et al.*, 1979; 1980; Gambliel *et al.*, 1982; Hallahan *et al.*, 1988; Poulouse *et al.*, 1978)。

1.1 萜类合成酶在细胞区室化

所有的萜类化合物都共有一个共同的前体——异戊烯基二磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)。IPP 在 IPP 异构酶的作用下形成二甲丙烯焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMADP),IPP 和 DMADP 在异戊烯基转移酶的作用下形成 GDP、FDP 和 GGDP(图 1)。这些非环化的中间体在萜类合成酶的作用下形成各种闭环的萜类物质。通常单萜来自于 GDP、倍半萜来自于 FDP、二萜来自于 GGDP,故萜类合成酶通常也称为环化酶。

研究发现萜类化合物生物合成有 2 条分别独立的途径,即甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)(Chappell, 1995)和丙酮酸途径(DXP)(Eisenreich *et al.*, 1998; Lichtenthaler, 1999)。这 2 条合成途径分别在细胞溶质(cytosolic)和细胞质体(plastids)中形成 5C 单位的 IPP 和 DMAPP,从而使萜烯的生物合成具有区室化的特点。与 FPP 生物合成、倍半萜和三萜合成有关的酶主要在细胞溶质中,而负责异戊二烯(isoprene)、单萜、二萜和四萜形成的酶主要位于细胞质体中(Tholl, 2006)。每个部分都有 IPP 异构酶和异戊烯基转移酶,都可以独立完成相关萜类的生物合成。

1.2 萜类合成酶的多样性

在 3 大类萜类合成酶中,大部分萜类合成酶的产物是唯一的。然而有少数萜类合成酶则不然,如大冷杉的(-)蒎烯合成酶能够产生(-)- α 和(-)- β 蒎烯。虽然每一类酶的底物相同,然而同一种酶在不同植物中的产物却不尽相同(Bohlmann *et al.*, 1998a; 1998b)。如烟草(*Nicotiana tabacum*)倍半萜环化酶产物是 5- ϵ -pi-马兜铃烯,而在棉花(*Gossypium hirsutum*)中相应酶的产物是(+)- δ -杜松烯(Bohlmann *et al.*, 1998a; 陈晓亚等, 1996)。同一种萜类合成酶能够产生多种产物(Phillips *et al.*, 1999a; Savage *et al.*, 1994)。比如,从大冷杉中分离出的 2 种萜烯合成酶 γ -h 蛇麻烯合酶和 δ -

表 1 部分已克隆的萜烯合成酶
Tab. 1 Partial cloned terpene synthases

酶 Enzyme	树种 Species	登记号 Accession No.	参考文献 Reference
单萜合成酶 Monoterpene synthases			
(-)-莰烯合成酶(-)-Camphene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i>	AAB70707	Bohlmann <i>et al.</i> (1999)
(-)-(4S)-柠檬烯合成酶(-)-(4S)-Limonene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i>	AAB70907	Bohlmann <i>et al.</i> (1997)
(-)-柠檬烯/(-)- α -蒎烯合成酶(-)-Limonene/(-)- α -Pinene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i>	AAF61455	Bohlmann <i>et al.</i> (1999)
香叶烯合成酶 Myrcene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i>	AAB71084	Bohlmann <i>et al.</i> (1997)
β -水芹烯合成酶 β -Phellandrene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i>	AAF61453	Bohlmann <i>et al.</i> (1999)
(-)-蒎烯合成酶(-)-Pinene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i> 西岸云杉 <i>Picea sitchensis</i>	AAB71085 AAP72020	Bohlmann <i>et al.</i> (1997) McKay <i>et al.</i> (2003)
萜品油烯合成酶 Terpinolene synthase			
柠檬烯/莰醇合成酶 Limonene/borneol synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i> 道格拉斯冷杉 <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AAF61454 AAX07264	Bohlmann <i>et al.</i> (1999) Huber <i>et al.</i> (2005)
(+)-3-萜烯合成酶(+)-3-Carene synthase	日本扁柏 <i>Chamaecyparis obtuse</i> 挪威云杉 <i>Picea abies</i>	BAC92722 AA073863	Katch <i>et al.</i> (2003) Fäldt <i>et al.</i> (2003)
(-)-柠檬烯合成酶(-)-Limonene synthase	挪威云杉 <i>Picea abies</i> 西岸云杉 <i>Picea sitchensis</i>	AAS47694 —	Martin <i>et al.</i> (2004) Byun-McKay <i>et al.</i> (2006)
(-)-芳樟醇合成酶(-)-Linalool synthase	挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AAS47693	Martin <i>et al.</i> (2004)
香叶烯合成酶 Myrcene synthase	挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AAS47696	Martin <i>et al.</i> (2004)
(-)- α/β -蒎烯合成酶(-)- α/β -Pinene synthase	挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AAS47692	Martin <i>et al.</i> (2004)
(-)- α -蒎烯合成酶(-)- α -Pinene synthase	火炬松 <i>Pinus taeda</i>	AA061225	Phillips <i>et al.</i> (2003)
(+)- α -蒎烯合成酶(+)- α -Pinene synthase	火炬松 <i>Pinus taeda</i>	AA061228	Phillips <i>et al.</i> (2003)
α -松油醇 α -Terpineol synthase	火炬松 <i>Pinus taeda</i>	AA061227	Phillips <i>et al.</i> (2003)
(-)- α -蒎烯/(-)-莰烯合成酶(-)- α -Pinene/(-)-camphene synthase	道格拉斯冷杉 <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AAX07267	Huber <i>et al.</i> (2005)
倍半萜合成酶 Sesquiterpene synthases			
(E)- α -红没药烯合成酶(E)- α -Bisabolene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i> 挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AAC24192 AAS47689	Bohlmann <i>et al.</i> (1998a) Martin <i>et al.</i> (2004)
γ -蛇麻烯合成酶 γ -Humulene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i>	AAC05728	Steele <i>et al.</i> (1998)
δ -桉叶烯合成酶 δ -Selinene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i>	AAC05727	Steele <i>et al.</i> (1998)
(EE)- α -法呢烯合成酶(EE)- α -Farnesene synthase	挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AAS47697	Martin <i>et al.</i> (2004)
长叶烯合成酶 Longifolene synthase	挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AAS47695	Martin <i>et al.</i> (2004)
α -法呢烯合成酶 α -Farnesene synthase	火炬松 <i>Pinus taeda</i>	AA061226	Phillips <i>et al.</i> (2003)
(E)- γ -红没药烯合成酶(E)- γ -Bisabolene synthase	道格拉斯冷杉 <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AAX07266	Huber <i>et al.</i> (2005)
(E)- β -法呢烯合成酶(E)- β -Farnesene synthase	道格拉斯冷杉 <i>Pseudotsuga menziesii</i>	AAX07265	Huber <i>et al.</i> (2005)
二萜合成酶 Diterpene synthases			
Abietadiene synthase	大冷杉 <i>Abies grandis</i>	AAB05407	Vogel <i>et al.</i> (1996)
Levopimaradiene synthase	银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	AAL09965	Schepmann <i>et al.</i> (2001)
Isopimara-7,15-diene synthase	挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AAS47690	Martin <i>et al.</i> (2004)
Levopimaradiene/abietadiene synthase	挪威云杉 <i>Picea abies</i>	AAS47691	Martin <i>et al.</i> (2004)
Levopimaradiene/abietadiene synthase	火炬松 <i>Pinus taeda</i> 欧洲红豆杉 <i>Taxus baccata</i>	AAX07435 CAC42773	Ro <i>et al.</i> (2005) Goerhardt (2001)
紫杉烯合成酶 Taxadiene synthase	太平洋紫杉 <i>Taxus brevifolia</i> 红豆杉 <i>Taxus chinensis</i> 南方红豆杉 <i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	AAC49310 AAG02257 AAR15329	Wildung <i>et al.</i> (1996) Wang <i>et al.</i> (2002) Lung(2005)
Taxa-4(5),11(12)-diene synthase	曼地亚红豆杉 <i>Taxus x media</i> 加拿大红豆杉 <i>Taxus canadensis</i>	AAS18603 AAR13860	Kai <i>et al.</i> (2005) Long <i>et al.</i> (2004)

桉叶烯合成酶(Steele *et al.*, 1995; 1998), 在异源表达后可分别产生 34 种和 52 种倍半萜。

2 结构特征

2.1 基因结构

在各种萜类合成酶的核酸序列中, 其内含子和

外显子的位置分布大致一致, 因而其酶蛋白表现出较高的同源性。图 2 是植物中萜类合成酶基因的一般结构示意图(Trapp *et al.*, 2001b)。

研究揭示, 植物的萜类合成酶有相似的反应机理、保守的基因结构和序列特征, 包括同源的氨基酸序列、保守序列功能域(即保守序列基序)、内含子

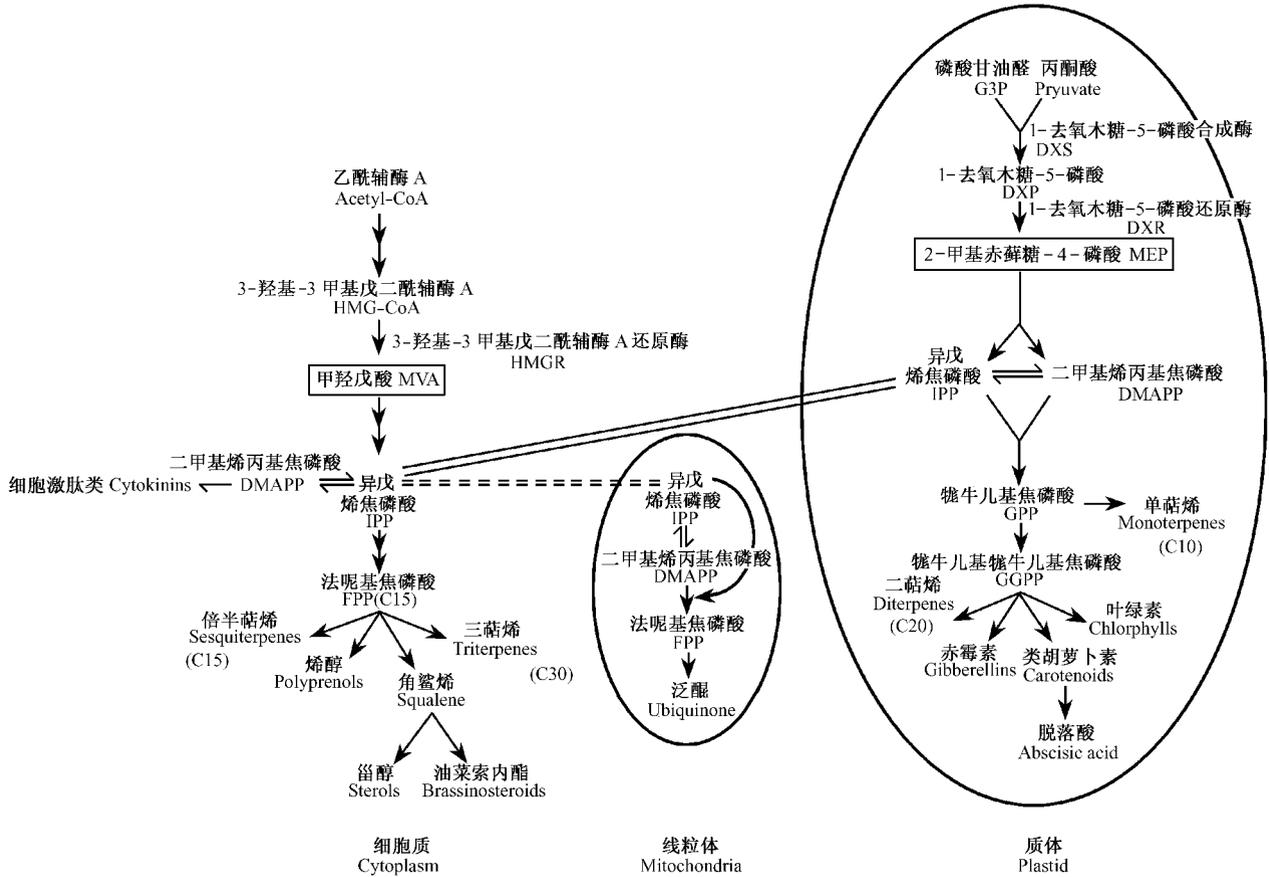


图 1 萜烯生物合成途径

Fig. 1 The Biosynthetic pathway of terpene

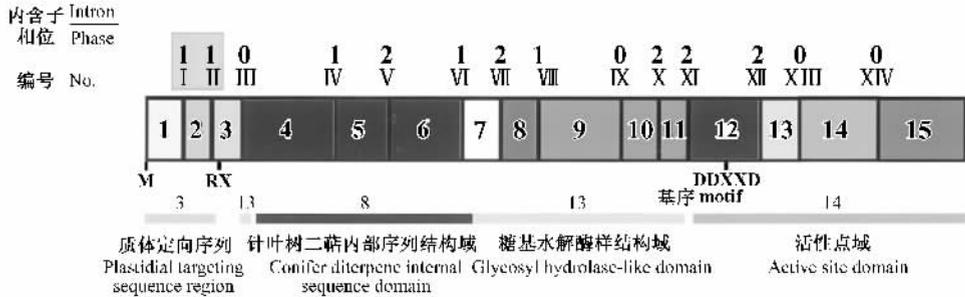


图 2 萜类合成酶基因结构示意图

Fig. 2 Gene schematic of terpene synthase

数量和外显子的大小, 因而是由一个共同的祖先进化而来(Trapp *et al.* , 2001b)。通过分析不同的萜类合成酶基因序列, 萜类合成酶似乎发生了一连串内含子和内部基因序列的丢失。萜类合成酶的祖先可能与古老的松类二萜合成酶类似, 其保守区至少包含 12 个内含子和 13 个外显子。一般说来, 内含子丢失越多, 进化程度则越高。近来有研究对分属 6 个基因亚家族的裸子植物和被子植物的 33 种萜类合成酶的氨基酸序列进行分析, 结果表明, 参与初生代谢和次生代谢的萜类合成酶的分支, 发生在被子植物与裸子植物分离之前(Bohlmann *et al.* ,

2000)。裸子植物的萜类合成酶基因形成了相对独立的家族, 并且与被子植物的萜类合成酶存在着差异。

利用反义基因方法并根据其氨基酸序列的相关性, 萜类合成酶基因又可分为 6 类(依据最低同源性不得低于 40%), 它们分别是 Tpsa, Tpsb, Tpsc, Tpsd, Tpse, Tpd(Bohlmann *et al.* , 1998a ; Keeling *et al.* , 2006 ; Trapp *et al.* , 2001b)。Tpsa 包括被子植物的倍半萜和二萜合成酶; Tpsb 主要包括被子植物唇形科(angiosperms of the Lamiaceae)的单萜合成酶; Tpsd 包括 11 种裸子植物单萜、倍半萜和二萜合

成酶; 从序列比对和系统发育树构建来看, 裸子植物的萜烯合成酶形成了一个独立的分支(Bohlmann *et al.*, 1998a), 即 Tpsd。Tpsc、Tpsf 和 Tpse 则与 Tpsa、Tpsb、Tpsd 有较远的亲缘关系。有研究表明, Tpsd 基因家族还可根据系统发生学进行亚分类, Tps - d 可分为: Tps - d1、Tps - d2、Tps - d3(Keeling *et al.*, 2006)。它们分别包括主要的单萜合成酶、倍半萜合成酶和二萜合成酶。针叶树 TPS 基因在 TPS - d1、TPS - d2 和 TPS - d3 亚家族中表现出高度的核酸序列相关性(Byun-McKay *et al.*, 2006)。

2.2 氨基酸结构

通过对几个萜类合成酶晶体结构 X 线 - 衍射研究发现, 萜类合成酶大多具有相似的蛋白 3 维结构。萜类合成酶通常具有 2 个非常明显的结构域, 即酶蛋白的 C - 末端活性区域和 N - 末端活性区域。这 2 个结构域在结构上类似糖基水解(glycosyl hydrolysases)反应的核心。在 C - 末端活性位点区域, 萜类合成酶含有 1 个富含天冬氨酸的 DDXXD 基序(motif)。该基序被认为与 2 价金属阳离子和酶底物连接有关(Lesburg *et al.*, 1997), 是酶的催化活性中心。该基序在进化上高度保守, 通过与底物质子化而启动反应。而在 N - 末端活性位点区域, 萜类合成酶则含有基序 RRR₃W。

以柠檬烯合酶为例, 其氨基酸序列上有 2 个和功能相关的保守域。第 1 个保守域是在 58、59 位的连续 2 个精氨酸(R58、R59), 它出现在所有的单萜合成酶序列之中(Williams *et al.*, 1998)。不过也有例外, 如最近发现的香叶醇合成酶则没有 RR 单元(Iijima *et al.*, 2004)。缺失第 1 个或者替换第 2 个精氨酸残基都会使柠檬烯合酶完全失去利用 GPP 的能力。深入研究表明: R58 和 R59 可能与 GPP 离子 - 异构化形成(3S) - LPP 有关。第 2 个保守域是 DD_xXD, 该保守域为整个萜类合成酶共有, 并且也存在于异戊烯基转移酶中, 推测是二磷酸酯的结合部位。

单萜合成酶由 600 ~ 650 个氨基酸组成(Bohlmann *et al.*, 1997; 1998a; Keeling *et al.*, 2006), 比倍半萜合成酶多 50 ~ 70 个氨基酸。其原因是单萜合成酶定位于质体中, 而倍半萜合成酶定位于细胞质中, 故单萜合成酶需要一个 N - 末端转移肽定向与质体结合(图 3)(Keeling *et al.*, 2006)。这些“多余”的氨基酸序列位于高度保守的 RR 片断的氨基端上游, 但并非单萜合成酶活性所必需。它们虽然在一级结构上差异很大, 但都具有丝氨酸和苏氨酸含量高、酸性氨基酸含量低的特点。而在

RR 片断的下游, 单萜合成酶的氨基酸序列具有明显的相似性, 因此 RR 片断为成熟蛋白的氨基端起始的大概位置。

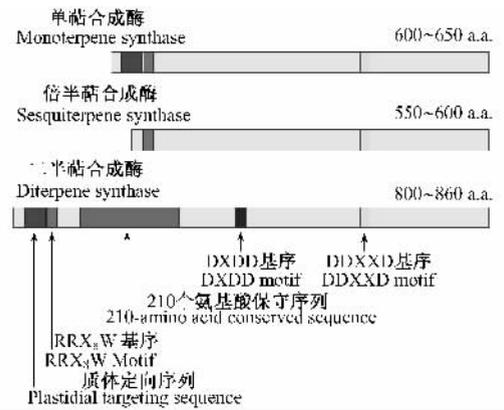


图 3 萜类合成酶氨基酸结构示意图

Fig. 3 Amino acids schematic of terpene synthase

由于多出一个在序列和位置上均相对保守的内部元件, 大多数二萜合成酶又比单萜合成酶长出大约 210 个氨基酸(Bohlmann *et al.*, 1998a)。在所有二萜合成酶中, 该插入片断位于氨基端活性结构域, 在序列和位置上相当保守, 可能与环化机制有关, 但不直接起催化作用, 而可能与稳定、结合和控制有关, 具体情况尚不清楚。

3 催化机制

萜类合成酶的催化机制首先是各种底物在相应萜类合成酶的催化下, 进行亲电性的异构化 - 环化反应(Cane *et al.*, 1991; Lesburg *et al.*, 1997)。以单萜为例, GDP 在 2 价金属离子协助下被离子化, 解离形成烯正碳离子与焦磷酸基负离子的离子对, 然后与酶结合, 重排形成异构体 LDP(3R - or 3S - linalyl diphosphate, 取决于 GDP 底物的起始折叠构象), 经旋转成顺式构象, 接着 LDP 离子化并进行亲电子攻击双键富电碳原子而环化, 生成相应的 4R - 或 4S - α - 松油烯正碳离子(α - terpinyl cation)。由这一中间体, 通过加成、重排和进一步环化等多条路线, 形成不同的单萜化合物。所有的单萜合成酶均能催化以上异构化和环化反应, 并且这些一系列离子对的反应步骤均发生在酶的不同活性位点上。亲电子异构化 - 环化反应决定了单萜的骨架类型、立体异构体和衍生物。只有少数单萜合成酶催化生成链状产物如月桂烯和芳樟醇。

4 调控

萜类合成酶的活性常常会受到外界因素的影响

响,如创伤、蛀干害虫及其伴生的致病性真菌的侵害和各种激素类化学物质均能影响萜类合成酶的活性。研究证明,萜类合成酶活性是在基因转录水平上受到控制(Tholl, 2006)。用甲基茉莉酸酯(MeJA)处理挪威云杉后,MeJA能够诱导树脂道形成,同时诱导萜类合成酶的活性增高和萜烯化合物积累。其原因是MeJA能够诱导树干组织中单萜合成酶和二萜合成酶转录水平的暂时增加(Fäldt *et al.*, 2003)。白松木蠹象抗性树和易感树在单萜、倍半萜、二萜合成酶组成性表达上均没有什么差异。但是在创伤后的16天之内,抗性树与易感树的单萜合成酶和倍半萜合成酶在转录水平上表现出显著性差异。创伤都能导致抗性树和易感树的萜类合成酶在转录水平上的增加。创伤后6h,萜类合成酶的转录水平就开始增加,并在创伤后的第4到7天达到最高,而且在第7天的时候,抗性树与易感树间的差异最显著。创伤16天后,萜类合成酶的转录水平开始降低(Byun-McKay *et al.*, 2006)。萜类合成酶基因的诱导表达也可以在白松象鼻虫攻击锡特卡云杉(*Picea sitchensis*)的树干部后见到(Tholl, 2006)。

单萜、倍半萜和二萜合成酶都能受到创伤的诱导,从而导致转录水平的变化(Steele *et al.*, 1998)。不过它们之间的反应时间有差异。单萜合成酶的mRNA积累发生在创伤2h内,通常在2~4天达到最大值。二萜合成酶的基因诱导表达类似单萜合成酶,但时间延后。而(E)- α -红没药烯合成酶的mRNA水平在创伤后12天才达到最大值。萜类合成酶基因诱导表达的时间反应不同与相应萜烯化合物的防御作用相一致,即有毒性的单萜在小蠹虫攻击后立即释放,二萜树脂酸在延后一些动员。

昆虫是已知的能够诱导针叶树萜烯类化合物增加的因素之一。太平洋黄松(*Pinus ponderosa*)针叶的单萜合成酶活性,黑松(*Pinus contorta*)、白冷杉(*Abies concolor*)针叶的单萜合成酶活性在虎蛾幼虫取食后增加(Litvak *et al.*, 1999)。白松木蠹象取食西岸云杉(*Picea sitchensis*)后能够诱导一些萜烯合成酶转录体的表达,如(-)-Pinene synthase(催化(-)- α -Pinene和(-)- β -Pinene的生物合成)(McKay *et al.*, 2003)。西岸云杉针叶中的(-)-Linalool synthase基因诱导表达进一步证明了活性的挥发物释放是由于应激压力诱导的结果(Keeling *et al.*, 2006)。

5 展望

萜烯合成酶的研究从单个酶的研究进入到萜类

合成酶系统的研究。大冷杉已成为针叶树在这方面的研究的模式物种。我国针叶树资源丰富,特别是油松为我国的特有物种,具有广阔的应用价值。怎样利用生物工程技术,来改造油松,提高其抗逆性和改善其生产性能,是一个重要的课题。相信随着萜类合成酶的深入研究,人们将会弄清楚萜类化合物在生态系统中的作用机制,为更好地利用这些植物次生代谢物提供基础,特别是调控酶基因的各种调控因素,还需要进一步深入研究。

由于针叶树的生长周期长,这给研究带来了很大的阻力。另外,针叶树的次生代谢物如多糖、多酚等较多且繁杂,也给研究工作带来了许多困难。如何克服这些困难,需要人们借助许多其他学科的研究方法,如分子、细胞生物学、基因芯片、蛋白质组学等研究手段。

参 考 文 献

- 陈晓亚,刘培. 1996. 植物次生代谢的分子生物学及基因工程. 生命科学 8(2):8-11.
- 黄瑛,曾庆平. 2006. 萜类生物合成的基因操作. 中国生物工程杂志 26(1):60-64.
- 李镇宇,王燕,陈华盛,等. 1999. 赤松毛虫的危害对小油松针叶内物质含量的影响. 北京林业大学学报 21(5):41-45.
- 王燕,李镇宇,戈峰. 2000. 马尾松受害诱导的化学物质滞后变化. 昆虫学报 43(3):291-296.
- Alonso W R, Croteau R. 1991. Purification and characterization of the monoterpene cyclase gamma-terpinene synthase from *Thymus vulgaris*. Arch Biochem Biophys 286(2):511-517.
- Bohlmann J, Steele C L, Croteau R. 1997. Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)- α -Limonene synthase, and (-)- β -pinene synthase. Journal of Biological Chemistry (USA) 272(35):21784-21792.
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. 1998a. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. P Natl Acad Sci USA 95(8):4126-4133.
- Bohlmann J, Crock J, Jetter R, *et al.* 1998b. Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)- α -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). P Natl Acad Sci USA 95(12):6756-6761.
- Bohlmann J R, Martin D, Oldham N J, *et al.* 2000. Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a Myrcene/(E)- β -Ocimene synthase. Arch Biochem Biophys 375(2):261-269.
- Byun-McKay A, Godard K, Toudefallah M, *et al.* 2006. Wound-induced terpene synthase gene expression in sitka spruce that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil. Plant Physiol 140(3):1009-1021.
- Cane D E, Abell C, Harrison P H, *et al.* 1991. Terpenoid biosynthesis

- and the stereochemistry of enzyme-catalysed allylic addition-elimination reactions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 332(1263): 123 – 129.
- Chappell J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46(1): 521 – 547.
- Croteau R, Felton M, Ronald R C. 1980. Biosynthesis of monoterpenes : preliminary characterization of i-endo-fenchol synthetase from fennel (*Foeniculum vulgare*) and evidence that no free intermediate is involved in the cyclization of geranyl pyrophosphate to the rearranged product. *Arch Biochem Biophys* 200(2): 534 – 546.
- Croteau R, Karp F. 1979. Biosynthesis of monoterpenes : preliminary characterization of bornyl pyrophosphate synthetase from sage (*Salvia officinalis*) and demonstration that Geranyl pyrophosphate is the preferred substrate for cyclization. *Arch Biochem Biophys* 198(2): 512 – 522.
- Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, et al. 1998. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem Biol* 5(9): 221 – 233.
- Fäldt J, Martin M, Miller M, et al. 2003. Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): Methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+) – 3 – Carene synthase. *Plant Mol Biol* 51(1): 119 – 133.
- Gambliel H, Croteau R. 1982. Biosynthesis of (+/-) – alpha – Pinene and (-) – beta – Pinene from geranyl pyrophosphate by a soluble enzyme system from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Biological Chemistry* 257(5): 2335 – 2342.
- Goerhardt B. 2001. Biosynthesis of the taxols : cloning and expression of the taxal-4(5),11(12) – diene synthase gene from *Taxus baccata*. Thesis. Technische Universitaet Berlin, Berlin, Germany.
- Hallahan T W, Croteau R. 1988. Monoterpene biosynthesis : demonstration of a geranyl pyrophosphate : sabinene hydrate cyclase in soluble enzyme preparations from sweet marjoram (*Majorana hortensis*). *Arch Biochem Biophys* 264(2): 618 – 631.
- Huber D P W, Philippe R N, Godard K, et al. 2005. Characterization of four terpene synthase cDNAs from methyl jasmonate-induced Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii*. *Phytochemistry*, 66 : 1427 – 1439.
- Iijima Y, Gang D R, Fridman E, et al. 2004. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiol* 134(1): 370 – 379.
- Katch S, Hyatt D, Ogawa K, et al. 2003. NCBI Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/35764438>.
- Kai G, Zhao L, Zhang L, et al. 2005. Characterization and expression profile analysis of a new cDNA encoding taxadiene synthase from *Taxus media*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(6): 668 – 675.
- Keeling C I, Bohlmann J. 2006. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol* 170(4): 657 – 675.
- Lesburg C A, Zhai G, Cane D E, et al. 1997. Crystal structure of pentalene synthase : Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* 277(5333): 1820 – 1824.
- Lewinsohn E, Gijzen M, Croteau R. 1992. Wound-inducible pinene cyclase from grand fir : purification, characterization, and renaturation after SDS-PAGE. *Arch Biochem Biophys* 293(1): 167 – 173.
- Lichtenthaler H K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50(1): 47 – 65.
- Litvak M E, Madronich S, Monson R K. 1999. Herbivore-induced monoterpene emissions from coniferous forests : Potential impact on local tropospheric chemistry. *Ecol Appl* 9(4): 1147 – 1159.
- Long R M, Williams R M, Croteau R, et al. 2004. NCBI Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/38201489>.
- Lung J. 2005. NCBI Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/38260105>.
- Martin D M, Fäldt J, Bohlmann J. 2004. Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol* 135(4): 1908 – 1927.
- McKay S A B, Hunter W L, Godard K, et al. 2003. Insect attack and wounding induce traumatic resin duct development and gene expression of (-) – pinene synthase in Sitka spruce. *Plant Physiol* 133(1): 368 – 378.
- Miller B, Madilao L L, Ralph S, et al. 2005. Insect-induced conifer defense. White pine weevil and methyl jasmonate induce traumatic resinosis, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and putative octadecanoid pathway transcripts in sitka spruce. *Plant Physiol* 137(1): 369 – 382.
- Phillips M A, Wildung M R, Williams D C, et al. 2003. cDNA isolation, functional expression, and characterization of (+) – alpha – pinene synthase and (-) – alpha – pinene synthase from loblolly pine (*Pinus taeda*): Stereocontrol in pinene biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 411(2): 267 – 276.
- Phillips M A, Savage T J, Croteau R. 1999a. Monoterpene synthases of loblolly pine (*Pinus taeda*) produce pinene isomers and enantiomers. *Arch Biochem Biophys* 372(1): 197 – 204.
- Phillips M A, Croteau R B. 1999b. Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci* 4(5): 184 – 190.
- Poulose A J, Croteau R. 1978. gamma-Terpinene synthetase : A key enzyme in the biosynthesis of aromatic monoterpenes. *Arch Biochem Biophys* 191(1): 400 – 411.
- Raffa K F, Berryman A A. 1983. The role of host plant resistance in the colonization behavior and ecology of bark beetles (Coleoptera : Scolytidae). *Ecol Monogr* 53(1): 27 – 49.
- Ro D K, Arimura G I, Lau S Y, et al. 2005. Loblolly pine abietadienol/abietadienal oxidase PtAO (CYP720B1) is a multifunctional, multisubstrate cytochrome P450 monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(22): 8060 – 8065.
- Ro D K, 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.
- Savage T J , Hatch M W , Croteau R. 1994. Monoterpene synthases of *Pinus contorta* and related conifers. A new class of terpenoid cyclase. *Journal of Biological Chemistry* 269(6) : 4012 – 4020.
- Schepmann H G , Pang J H , Matsuda S. 2001. Cloning and characterization of *Ginkgo biloba* levopimaradiene synthase , which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 392(2) 263 – 269.
- Steele C L , Lewinsohn E , Croteau R. 1995. Induced oleoresin biosynthesis in Grand Fir as a defense against bark beetles. *P Natl Acad Sci USA* 92(10) : 4164 – 4168.
- Steele C L , Crock J , Bohlmann J , *et al.* 1998. Sesquiterpene synthases from Grand Fir (*Abies grandis*) comparison of constitutive and wound-induced activities , and cDNA isolation , characterization , and bacterial expression of δ -selinene synthase and γ -humulene synthase. *J Biol Chem* 273(4) : 2078 – 2089.
- Tholl D. 2006. Terpene synthases and the regulation , diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 9(3) : 297 – 304.
- Trapp S C , Croteau R. 2001a. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Plant Mol Biol* 52 : 689 – 724.
- Trapp S C , Croteau R B. 2001b. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* , 158 (2) : 811 – 832.
- Vogel B S , Wildung M R , Vogel G , *et al.* 1996. Abietadiene synthase from Grand Fir (*Abies grandis*) cDNA isolation , characterization , and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase involved in resin acid biosynthesis. *J Biol Chem* 271(38) : 23262 – 23268.
- Wang W , Shi Q , Zhu P , *et al.* 2002. cDNA cloning , expression and characterization of taxadiene synthase , a diterpene cyclase from *Taxus chinensis*. *Acta Botany Sinica* , 44(2) : 181 – 187.
- Wildung M R , Croteau R. 1996. A cDNA clone for taxadiene synthase , the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem* 271(16) : 9201 – 9204.
- Williams D C , McGarvey D J , Katahira E J , *et al.* 1998. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active ' pseudomature ' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* , 37 (35) : 12213 – 12220.

(责任编辑 朱乾坤)