

细菌中倍半萜生物合成的研究进展

薛娇 赵明侠 李微 邓子新 朱冬青*

(武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室 湖北 武汉 430071)

摘要: 萜类化合物是一大类小分子天然产物, 在生物体内扮演重要的角色。植物和真菌中萜类化合物的生物合成已被广泛研究, 但是在真核生物中克隆或改造萜类化合物生物合成途径还有较大难度。许多细菌同样可以产生萜类化合物。在过去十多年间细菌萜类合酶的研究进展为我们对萜类化合物生物合成的理解做出了显著的贡献。这里我们主要关注细菌中合成的倍半萜化合物, 概述其化学结构、倍半萜合酶对法尼基焦磷酸环化的机制、后修饰酶特别是氧化还原酶所参与的后修饰、代谢调控以及合成途径中尚未解决的问题等。

关键词: 萜, 倍半萜环化酶, 生物合成, 细菌

Research progress of bacterial sesquiterpenoid biosynthesis

XUE Jiao ZHAO Ming-Xia LI Wei DENG Zi-Xin ZHU Dong-Qing*

(Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: Terpenoids are a diverse group of natural products and play important roles in all living organisms. Terpenoid biosynthesis has been extensively studied in plants and fungi. However, cloning and engineering terpenoid pathways in these eukaryotic organisms remain challenging. Terpenoids are also produced by numerous bacteria. The research progress in bacterial terpenoid synthesis for decades made significant contributions to our understanding of terpenoid biosynthesis. Here we will focus on bacterial sesquiterpenoids and briefly review their chemical structures, the mechanisms of farnesyl diphosphate cyclization catalyzed by sesquiterpene cyclases, post modifications of sesquiterpenes by enzymes especially oxidoreductases, metabolic regulations and unsolved problems in biosynthetic pathways.

Keywords: Terpenoid, Sesquiterpene cyclase, Biosynthesis, Bacteria

萜类化合物是数量庞大的一类小分子天然产物, 数以万计, 接近 400 个结构家族。其中许多作为药物、天然杀虫剂、香料、调味剂甚至生物柴油

等, 应用于生产生活的方方面面。大多数对这类化合物的分离确定、生物活性和生物合成机制的研究集中于陆地或者海洋来源的植物和真菌中, 细菌中

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81373305, 31401057)

***Corresponding author:** Tel: 86-27-68756730; E-mail: DZhu2011@whu.edu.cn

Received: August 10, 2015; **Accepted:** October 10, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 06, 2015
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81373305, 31401057)

***通讯作者:** Tel: 86-27-68756730; E-mail: DZhu2011@whu.edu.cn

收稿日期: 2015-08-10; 接受日期: 2015-10-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-11-06

的研究相对较少。早期研究遵循传统方法: 化合物首先被分离, 确定结构和活性; 然后从总蛋白中分离纯化负责该化合物合成的酶, 分析其生化特性、蛋白 N 端测序等; 设计引物获得探针, 构建基因组文库或者 cDNA 文库并进行筛选, 最后得到完整的基因和蛋白序列。用这种方法获得的细菌倍半萜合酶中最典型的例子是 1994 年确定的 Pentalenene 合酶基因^[1]。进入 21 世纪, 随着 DNA 测序技术的发展和成本的降低, 大量物种基因组先后被测序, 特别是原核生物基因组, 基因组挖掘这一方法的应用使细菌来源萜类化合物的研究有了长足的进展。研究者可以从基因组中选出可能的萜类合酶, 通过实验确定其底物和产物, 例如 2003 年确定的 Geosmin 合酶^[2-3]。到 2015 年, Yamada 等对细菌基因组中 262 个可能的萜合酶进行了生物信息学分析, 选取了部分在链霉菌中异源表达, 其中 29 个确定了产物, 包括 2 个单萜合酶、20 个倍半萜合酶和 7 个二萜合酶。这些产物中 13 个为全新的结构, 包括 2 个倍半萜和 11 个二萜^[4-5]。

萜类化合物生物合成需要的最基本的结构单元是二甲基烯丙基焦磷酸 (Dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 和异戊烯基焦磷酸 (Isopentenyl diphosphate, IPP)。DMAPP 和 IPP 有两种来源, 分别是甲羟戊酸途径和脱氧木酮糖磷酸酯途径, 原核生物多采用后一种。不同数量的 DMAPP 和 IPP 首尾聚合形成单萜合酶的底物香叶基焦磷酸 (Geranyl pyrophosphate, GPP)、倍半萜合酶的底物法尼基焦磷酸 (Farnesyl diphosphate, FPP, 1) 和二萜合酶的底物香叶基香叶基焦磷酸 (Geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 等。这里我们仅关注细菌中倍半萜的生物合成。

倍半萜化合物包括链状和环状, 环状倍半萜起始于 FPP 环化酶对 FPP 的一次或者多次环化。倍半萜环化酶催化的第一次环化反应根据机理的不同可分为两大类, 如图 1 所示。第一大类属于离子化-环化反应, FPP 脱掉焦磷酸离子化, 亲电进攻另

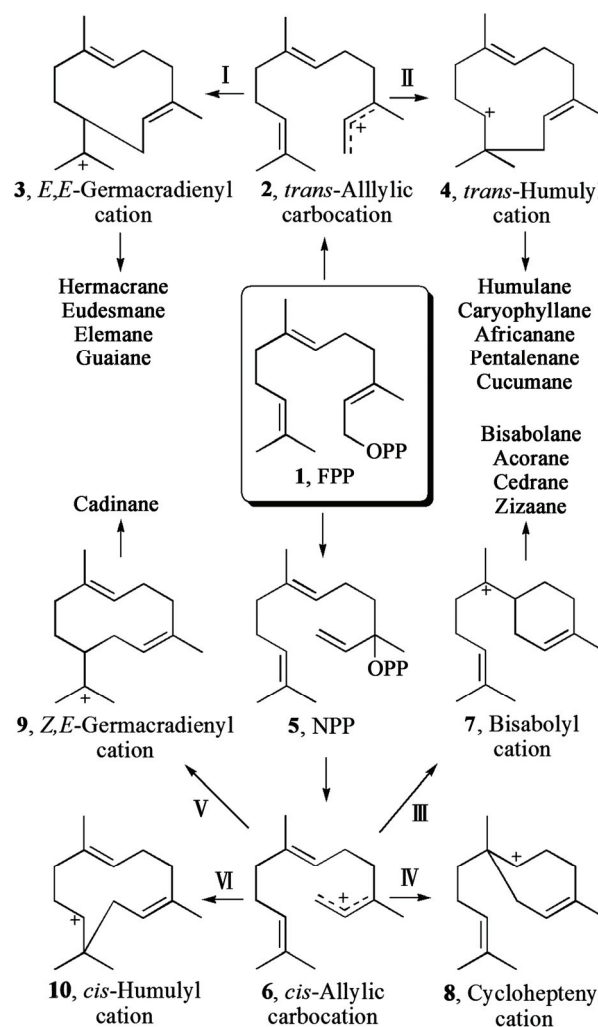


图 1 倍半萜环化酶催化法尼基焦磷酸环化的机理

Figure 1 The mechanisms of farnesyl diphosphate cyclization catalyzed by sesquiterpene cyclases

一末端的双键生成 10 元环的碳正离子中间体 *E,E*-Germacradienyl cation (3) 或者 11 元环的碳正离子中间体 *trans*-Humulyl cation (4), 2 种中间体的双键均为反式, 即途径 I 和途径 II。后文所提到的具有大根香叶烷 Germacrane、桉叶烷 Eudesmane、榄烷 Elemene 或愈创木烷 Guaiane 等骨架的倍半萜一般经由途径 I 生成, 具有蛇麻烷 Humulane、丁香烷 Caryophyllane、Pentalenane 或 Cucumane 等骨架的倍半萜一般经由途径 II 生成。第二大类属于离子化-异构化-离子化-环化反应, 首先 FPP 离子化和异

构化生成橙花叔醇二磷酸(Nerolidyl diphosphate, NPP, **5**), 脱掉焦磷酸离子化, 亲电进攻双键, 分别生成 6 元环的碳正离子中间体 Bisabolyl cation (**7**)、7 元环的碳正离子中间体 Cyclopentenyl cation (**8**)、10 元环的碳正离子中间体 *Z,E*-Germacradienyl cation (**9**)或 11 元环的碳正离子中间体 *cis*-Humulyl cation (**10**), 4 种中间体都含有 1 个顺式的双键, 即途径 III、IV、V 和 VI。后文所提到的具有没药烷 Bisabolane、菖蒲烷 Acorane、柏木烷 Cedrane 或深冬烷 Zizaane 骨架的倍半萜一般经由途径 III 生成, 具有 Daucane 骨架的倍半萜可能经由途径 IV 生成, 具有杜松烷 Cadinane 骨架的倍半萜一般经由途径 V 生成。第一步环化后形成的各种碳正离子中间体可能还需要进行下一步的环化、氢负离子迁移、甲基转移或者 Wagner-Meerwein 重排, 脱去质子或者汲取质子生成最后的产物。

以下我们将从这几条途径依次对细菌中部分倍半萜的生物合成进行总结。

1 经途径 I 合成的倍半萜

微生物产生的双环倍半萜化合物土味素(Geosmin, **11**)是水的净化和酒类发酵生产过程中需要检测的重要指标性气味分子, 由具有大根香叶烷骨架的化合物在进一步环化过程中脱掉 3 个碳生成。1965 年第一次从链霉菌中分离纯化出土味素^[6], 并确定结构^[7]。2003 年, 基因敲除证明 *Streptomyces coelicolor* 中的基因 SCO6073 参与土味素的生物合成^[2], 体外实验数据说明 SCO6073 催化产物主要是 Germacradienol (**12**), 占 85%^[3]; 此外 Germacrene D (**13**)占 15%^[8], 而 Geosmin 只占产物中的 2.5%^[9]。不同条件下各化合物比例有所不同, 但是产物均以 **12** 为主。*S. avermitilis* 中的同源蛋白 SAV_2163 催化 FPP 产生的产物也存在类似的情况, 同时发现另外一种微量的产物 Octalin (**14**)^[10]。

一般细菌的萜合酶大小在 300 aa 左右, 而 SCO6073 为 726 aa, 有两个同源但相对独立的结构域, 两个结构域都含有萜合酶的关键保守氨基酸。

N 端结构域负责 FPP 环化生成 **12** 和 **13**, 而 C 端结构域负责催化 **12** 生成 Geosmin^[11]。SCO6073 催化 FPP 生成 Geosmin 的机理如图 2A 所示, 首先催化 FPP 经途径 I 生成中间体 **3**, 接下来产生了两条分支, 一条首先发生 1,3-氢负离子迁移和失去质子生成了副产物 **13**, 而另一条则失去质子形成双环中间产物 Isolepidozene (**15**)。15 在一分子水的参与下形成 **12**。**12** 从 N 端结构域释放, 进入 C 端结构域, 脱掉一分子丙酮^[12]形成 **14**, 接下来一分子水参与, 1,2-氢负离子迁移形成终产物 Geosmin。

自然界中能够合成 Geosmin 的并不局限于链霉菌, 还包括其他很多微生物, 例如 *Stigmatella aurantiaca* 和 *Myxococcus xanthus* 等粘细菌^[13-16], *Nostoc punctiforme*、*Phormidium*、*Anabaena circinalis*、*Geitlerinema*^[17]、*Leptolyngbya bijugata*^[18] 等蓝细菌, 以及一些引起植物病害和水果腐烂的植物病原真菌等。

除 Geosmin 外, Avermitilol (**16**)是通过基因组挖掘发现的由 *S. avermitilis* 中的倍半萜合酶 SAV_76 合成的三环倍半萜, SAV_76 同时可以产生微量的 Viridiflorol (**17**)、Germacrene A (**18**)和 Germacrene B (**19**)^[19]。合成机理如图 2B 所示, 首先 FPP 环化生成中间物 **3**, 少量 **3** 的不同位置失去质子生成副产物 **18** 和 **19**。大部分 **3** 进一步生成中间物 **15**, 接下来一分子水参与反马氏环化生成三环的主产物 **16**, 少量发生马氏环化生成副产物 **17**。在实验室条件下发酵 *S. avermitilis* 并没有发现 **16** 的产生, 在链霉菌宿主中对 SAV_76 进行异源表达检测到的主产物并不是 **16**, 而是 Avermitilone, 即 **16** 的羟基被氧化生成酮的产物(结构未展示), 推测可能是宿主中的某种氧化还原酶参与其中造成的^[19]。

Germacrene A (**18**)是 SAV_76 催化的副产物, 而在来自蓝细菌 *Nostoc* sp. PCC7120 的倍半萜合酶 Alr4685 催化 FPP 时合成的主产物为 **18**^[20]。在链霉菌宿主中对 Alr4685 进行异源表达检测到 **18** 和 β -Elemene (**20**)^[4]。来源于 *Anabaena variabilis* 的

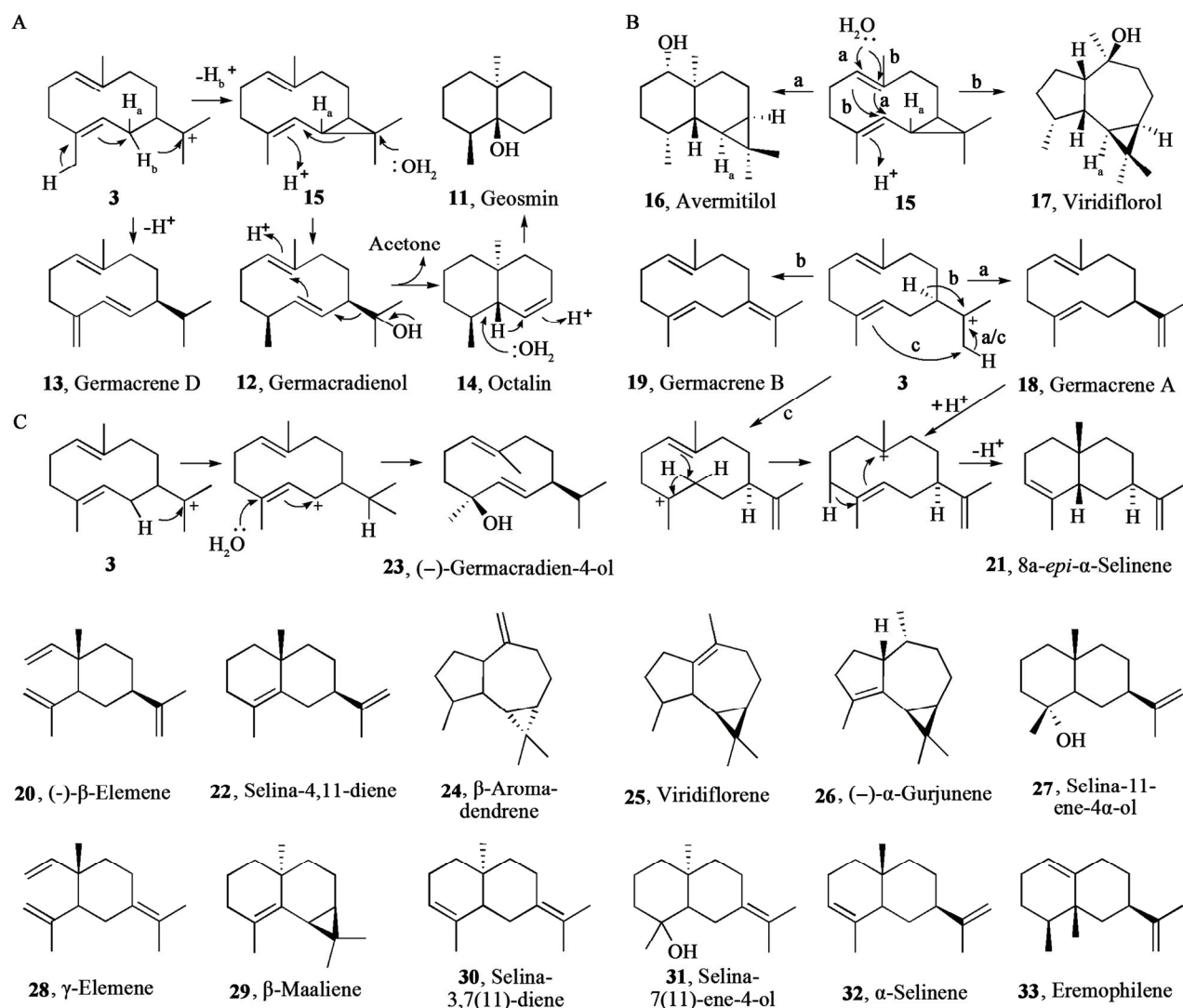


图2 经途径 I 合成的部分倍半萜化合物的化学结构或生物合成途径

Figure 2 Chemical structures or biosynthetic pathways of some sesquiterpenes by Mechanism I

注: A: 土味素生物合成途径; B: Avermitol、Viridiflorol 和 Germacrene 生物合成途径; C: Germacradien-4-ol 生物合成途径; 底部: 其他化合物化学结构。

Note: A: Biosynthetic pathway of Geosmin; B: Biosynthetic pathways of Avermitol, Viridiflorol and Germacrene; C: Biosynthetic pathway of Germacradien-4-ol; Bottom: Other chemical structures.

Ava_1982 在氨基酸序列上与 Alr4685 高度同源, 在链霉菌宿主中对 Ava_1982 进行异源表达检测到的产物与 Alr4685 相同^[4]。

来自蓝细菌 *N. punctiforme* PCC73102 的倍半萜合酶 Npun_R3832 合成 8a-*epi*- α -Selinene (21)^[20], 在链霉菌宿主中对 Npun_R3832 进行异源表达检测到 21 和 Selina-4,11-diene (22)^[4]。研究者对于化合物 21 的合成给出了 2 种可能的机理: (1) FPP 环化形

成中间产物 18, 然后汲取质子, 丢失质子, 生成终产物 21; (2) 18 并不是 21 合成的中间产物, FPP 环化形成中间物 3, 氢负离子迁移, 失去质子, 生成终产物 21。研究者认为第二种可能性高于第一种。

S. citricolor 中 SC1 (BAL14866) 合成 Germacradien-4-ol (23), 合成机理如图 2C 所示^[21]。*S. lactacystinaeus* 中 SLT18_1246 与 BAL14866 在氨基酸序列上一致性为 62%, 相似性为 71%, 在链霉

菌宿主中对 SLT18_1246 进行异源表达, 检测到的产物除了 **23** 还包括: 化合物 **20**, 具有与 Viridiflorol (**17**) 相同碳骨架的 β -Aromadendrene (**24**) 和 Viridiflorene (**25**), 以及明显属于杜松烷骨架的化合物 α -Copaene (**91**)、 α -Cadinene (**95**)、 β -Cadinene (**96**)、 γ -Cadinene (**97**)、T-Cadinol (**98**)、 α -Cubebene (**99**)和 β -Cubebene (**100**)^[4]。

来源于 *S. clavuligerus* 的 SCLAV_p0635 在链霉菌素宿主中进行异源表达, 检测到产物 **20**、**22**、Selina-11-ene-4 α -ol (**27**); 来源于 *Streptomyces* sp. SK 1894 的 SspSK_3051 在链霉菌素宿主中进行异源表达, 检测到产物 γ -Elemene (**28**)、 β -Maaliene (**29**)、Selina-3,7(11)-diene (**30**)、Selina-7(11)-ene-4-ol (**31**); 来源于 *Mycobacterium marinum* 的 MMAR_3220 在链霉菌素宿主中进行异源表达, 检测到产物 **12**、**20** 和 **28**; 来源于 *Herpetosiphon aurantiacus* 的 Haur_2988 在链霉菌素宿主中进行异源表达, 检测到产物 **20** 和 **32**; 来源于 *Sorangium cellulosum* 的 S8552 在链霉菌素宿主中进行异源表达, 检测到产物 Eremophilene (**33**)^[4]。

2 经途径 II 合成的倍半萜

2.1 具有蛇麻烷、丁香烷或 Africanane 骨架的倍半萜

Caryolan-1-ol (**34**) 或者称为 β -Caryophyllene alcohol, 具有香味, 作为添加剂广泛应用于化妆品和洗涤剂等领域^[22], 最初是从植物中分离确定的一种微量的倍半萜类化合物, 相关合成基因尚未确定。与 **34** 类似的化合物 β -Caryophyllene (**35**) 是植物中的一类重要倍半萜化合物, 已知的植物 β -Caryophyllene 合酶并不具备合成 **34** 的能力, 所以曾一度推测 **34** 是 **35** 的非酶催化的副产物。

2011 年, 在灰色链霉菌 *S. griseus* 基因组中确定 SGR_2079(*gcoA*) 负责环化 FPP 生成终产物 **34**, 而 **35** 作为中间产物在体外反应中微量存在^[23], 如图 3A 所示。

链霉菌中普遍存在一种全局性的调控通路, 即

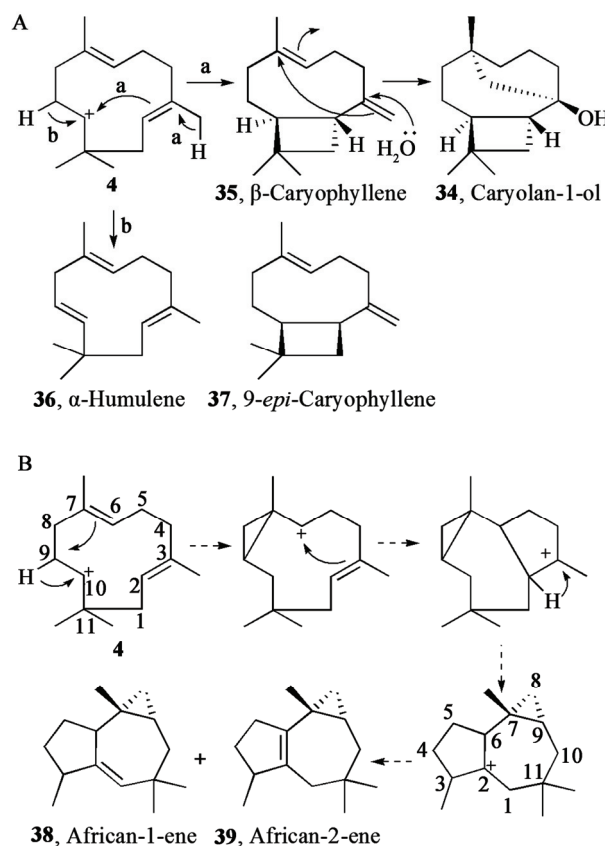


图 3 经途径 II 合成的部分倍半萜化合物的化学结构或生物合成途径

Figure 3 Chemical structures or biosynthetic pathways of some sesquiterpenes by Mechanism II

注: A: Caryolan-1-ol 和 α -Humulene 生物合成途径; B: African-1-ene 和 African-2-ene 推测的生物合成途径。

Note: A: Biosynthetic pathway of Caryolan-1-ol and α -Humulene; B: Hypothetic biosynthetic pathway of African-1-ene and African-2-ene.

A 因子调控通路。AdpA 是 A 因子调控通路中处于中心位置的转录调控因子, 直接或间接控制大量与链霉菌形态分化和次生代谢相关基因的转录。*S. griseus* 敲除 *adpA* 基因后不能再合成 **34**, 回补菌株恢复产生 **34** 的能力^[23]。这一实验数据证明 **34** 的生物合成受控于 A 因子调控通路, 这是第一例其生物合成非常明确受控于 A 因子调控通路的倍半萜。

来源于 *S. clavuligerus* 的 SCLAV_p0985 在链霉菌素宿主中进行异源表达, 可以检测到的产物为 α -Humulene (**36**)、9-*epi*-Caryophyllene (**37**),

African-1-ene (38)、African-2-ene (39)以及具有与 Viridiflorol (17)相同碳骨架的 α -Gurjunene (26)。虽然植物中推测的 26 合成机理与细菌中 17 的合成并不相同,但研究者都认为这类化合物骨架要首先经过途径 I 发生第一次环化生成中间物 3,而非经过途径 II 生成中间物 4^[24]。

这里需要特别指出的是,并不是所有具有蛇麻烷或丁香烷骨架的化合物都被认为由途径 II 合成,例如植物中 γ -Humulene 的合成,被认为是由途径 VI 经中间物 10 后形成。

依据真菌中 Africanane 骨架形成的机制^[25],我们推测 38 和 39 可能是中间产物 4 先发生 1,2-氢负离子迁移生成 C9 正离子中间体,亲电进攻 6,7 位碳双键,发生 7,9 位碳闭环,生成 2 环的 C6 正离子中间体,亲电进攻 2,3 位碳的双键,发生 2,6 位碳闭环,生成 3 环的 C3 正离子中间体, Africanane 骨架形成。接下来为 1,2-氢负离子迁移生成 C2 正离子中间体, C1 脱去质子生成 38 或者 C6 脱去质子生成 39。

2.2 具有 Pentalenane 或 Cucumane 骨架的倍半萜

戊丙酯菌素(Pentalenolactone, PL, 40)是在链霉菌中发现的三环倍半萜类抗生素^[26-27],1969 年确定其化学结构,其后 10 年左右的时间陆续发现了与 PL 结构类似的化合物^[28-35]。PL 具有抑制细菌和真菌等生物学活性^[36-39],作用于糖酵解途径中 3-磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH 活性中心的半胱氨酸,使之烷基化而失活^[40-44]。PL 的抗性基因 *gapR* 首先在 PL 的产生菌 *S. arenae* 中被发现^[45-47]。1994 年在 PL 的另一株产生菌 *S. exfoliatus* 中确定了第一个与 PL 合成相关的基因 *penA*, PenA 催化 FPP 环化生成 Pentalenene (41),这是第一个在原核生物中确定的倍半萜合酶^[1,48]。

与前面提到的萜类化合物不同,从 Pentalenene (41)到 PL (40)显然还需要很多氧化步骤,确定这些步骤以及每一步的合成基因成为以后研究的重点。2006 年在 *S. avermitilis* 的基因组中发现了一簇基因

(SAV_2989-SAV_3002)中的 2 个 SAV_2998(*ptlA*)和 SAV_2990(*gapI*)所编码的蛋白分别与 Pentalenene 合酶 PenA 和 PL 抗性蛋白 GapR 高度相似,实验数据也证明了其分别具有对应的功能,因此此基因簇被认为是 PL 的生物合成基因簇,并命名为 *ptl* 基因簇^[49]。SAV_2999(*ptlI*)编码 P450 单加氧酶,被认为负责 Pentalenene (41)支链上 13 位 C 的羧基化,即生成 Pentalen-13-ol (42)、Pentalen-13-al (43)和 1-Deoxypentalenic acid (44)。体外实验数据证明了 PtlI 催化 41 生成 42 和 43,但最后一步 44 并没有实现^[50]。我们认为可能是因为没有找到合适的反应条件或者合适的电子传递链辅助蛋白造成的。SAV_2991(*ptlH*)编码双加氧酶,负责 44 的 C11 位羟基化,生成 1-Deoxy-11 β -hydroxypentalenic acid (45)^[51-52]。SAV_2993(*ptlF*)编码短链脱氢酶,负责 45 的 C11 位进一步氧化生成酮,即 1-Deoxy-11-oxopentalenic acid (46)^[53]。SAV_2994(*ptlE*)编码 Baeyer-Villiger 单加氧酶,理论上应该实现 46 在 C11 和 C12 之间加氧生成内酯,即 Pentalenolactone D (PL-D, 47),但体内体外实验结果表明其产物并不是 47,而是 Neopentalenolactone D (neoPL-D, 51),即氧加在 C9 和 C11 之间^[54]。

2011 年我们从两株 PL 产生菌 *S. exfoliatus* 和 *S. arenae* 中克隆了 PL 的生物合成基因簇,分别命名为 *pen* 基因簇和 *pnt* 基因簇。其中 PtlE 的同源蛋白 PenE 和 PntE 可以催化 46 生成 47^[55]。这一组同源蛋白催化过程中表现出不同的区域选择性。双加氧酶 PenD 和 PntD 同源于 SAV_2995(PtlD),催化 47 的 C9 和 C10 之间脱氢生成双键即 PL-E (48),进一步生成环氧键即 PL-F (49)^[55]。P450 单加氧酶 PenM 和 PntM 负责催化 49 的 C2 和 C3 的脱氢形成双键,以及 C2 位上甲基向 C1 位上转移,生成终产物 PL (40),在 *ptl* 基因簇中没有任何基因编码 PenM 和 PntM 的同源蛋白^[56]。

在 PL 的合成途径中出现了几处分支:(1) Pentalenic acid (50)是发酵产物中常被检测到的 PL 类似物,阿维链霉菌中 SAV_7469 催化 44 的 C1 位

发生羟化生成 **50**^[57]; (2) 阿维链霉菌因为 PtlE 催化时表现出不同的区域选择性, 并且缺少 PenM 和 PntM 的同源蛋白, 因此并不合成终产物 PL, 而是产生 neoPL-D (**51**)、neoPL-E (**52**)和 neoPL-F (**53**); (3) 发酵产物中的 PL-H (**54**)和 PL-G (**55**), 从结构上推断, **54** 来自于 **49** 的 C1 位羟化, **54** 进一步氧化脱氢生成 **55**, 这两步反应由哪些酶催化还不清楚; (4) 发酵产物中的 PL-O (**56**)和 PL-I (**57**), **56** 可能是 **40** 环氧键水解形成, **57** 则应该需要卤化酶参与完成; (5) PL-A (**58**)、PL-B (**59**)和 PL-P (**60**), 可能是在 **49** 或者 **40** 基础上酶催化生成的; (6) 一些 PL 产生菌中发现 PL 糖基化的产物 Deoxypentalenylglucuron (结构未展示), 从结构上分析, 应该存在一个糖基转移酶, 催化化合物 **44** 在 13 位羧基碳上转入一个糖基。

以上为 PL 的基本生物合成途径, FPP 环化后涉及到许多氧化步骤, 是目前发现的最复杂的倍半萜生物合成途径, 在此途径中还存在一些尚未解决的问题。

1986 年研究者就发现 PL (**40**)能够反馈抑制 PL 的生物合成^[58]。在 PL 的生物合成基因簇存在调控基因 *penR* 和 *pntR*, 同源于 SAV_2989, 编码 MarR 家族的转录调控蛋白, 为 PL 合成的途径专一性正调控因子。而 PL (**40**)可以作为 PenR/PntR 的效应物分子与蛋白结合, 从而解除这种正调控^[59]。

来源于 *S. clavuligerus* 的 SCLAV_p1407 和来源于 *S. lactacystinaeus* 的 SLT18_1880 分别在链霉菌中进行异源表达, 检测到的产物分别为三环倍半萜 Isohirsut-1-ene (**61**)和 Isohirsut-4-ene (**62**)^[4]。目前并没有对这两种化合物生物合成机制研究的详细报道。根据已有文献可以推测 Cucumane 骨架可能是如何形成的^[25], 如图 4B 所示, 中间物 **4** 首先 1,2-氢负离子迁移, C2 和 C9 闭合生成 2 环的 C3 正离子中间体, 这部分与 PL 合成类似。接下来 C3 和 C6 闭合生成 C7 位碳正离子的 3 环中间体, 连续两次 Wagner-Meerwein 重排生成 Cucumane 骨架的

碳正离子中间体。

3 经途径 III 合成的倍半萜

3.1 具有没药烷、菖蒲烷或柏木烷骨架的倍半萜

S. citricolor 中 SC2 (BAL14867)合成具有没药烷骨架的没药醇 *epi-α*-Bisabolol (**63**)^[21]。没药醇因为具有修复皮肤细胞而被用于化妆品中, 同时还具有抗炎、杀菌、抗原虫以及诱导癌细胞凋亡的作用。

3 种放线菌 *Kribbella flavida*、*Stackebrandtia nassauensis* 和 *Catenulispora acidiphila* 具有 Geosmin (**11**)生物合成基因, 但在实验室条件下检测不到 Geosmin (**11**)以及相关化合物的产生, 检测到的是 FPP 经过途径 III 环化产生的萜类化合物: *K. flavida* 可以产生大量的 (*Z*)- α -Bisabolene [(*Z*)-**64**], 以及痕量的 (*E*)- α -Bisabolene [(*E*)-**64**]、 β -Bisabolene (**65**)和 α -Alaskene (**72**); *St. nassauensis* 产生大量的 (*Z*)-**64** 以及痕量的 (*E*)-**64**、**65**、**72**、 α -Acoradiene (**73**)和 β -Cedrene (**75**); *C. acidiphila* 产生 **65**、 γ -Curcumene (**67**)、 β -Curcumene (**68**)和其氧化产物 α -Curcumene (**69**)、(*Z*)-Nuciferal (**70**), 以及 (*E*)-Nerolidol (结构未展示, 为含羟基的直链倍半萜)。负责合成这些化合物的基因尚不明确。

如图 5 所示, 这一组化合物首先从 FPP 经过途径 III 发生第一次环化产生碳正离子中间体 **7**, 接下来产生 3 个分支: (1) 羟化生成 **63**; (2) 脱去质子生成双键, 即 **64** 或者 **65**; (3) 1,2-氢负离子迁移生成碳正离子中间体 **66**。**66** 的去向有 2 条: (1) 脱去质子生成双键, 即 **67** 或者 **68**, **67** 和 **68** 可以氧化生成 **69**, **69** 进一步氧化生成 **70**; (2) 碳正离子亲电进攻支链上的双键, 发生第 2 次环化, 生成中间物 **71**。**71** 或者失去质子生成 **72** 和 **73**, 或者发生第 3 次环化生成中间物 **74**。**74** 失去质子生成终产物 **75**。

3.2 具有深冬烷骨架的倍半萜

具有深冬烷 Zizaane 骨架的三环倍半萜 Albalflavenone (**76**)于 1993 年从链霉菌中分离, 同时发现其对枯草芽胞杆菌具有一定的杀菌活性^[60]。

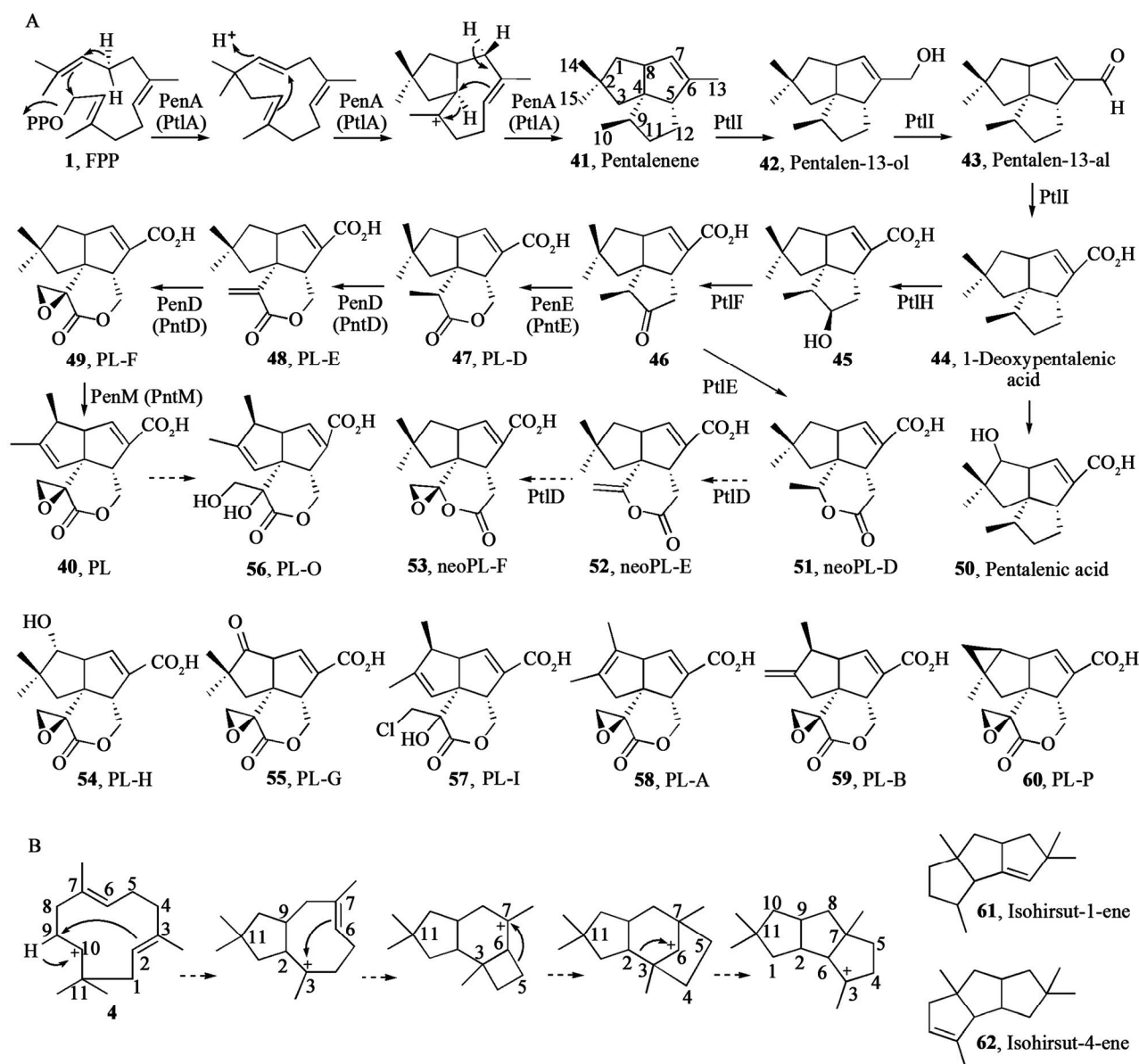


图4 经途径 II 合成的戊丙酯菌素和 cucumane 骨架的生物合成途径

Figure 4 Biosynthetic pathways of pentalenolactone and cucumane skeleton by Mechanism II

注: A: Pentalenolactone生物合成途径; B: Cucumane骨架推测的生物合成途径。

Note: A: Biosynthetic pathway of pentalenolactone; B: Hypothetic biosynthetic pathway of cucumane skeleton.

2006年,与合成 Albaflavenone 相关的基因 SCO5222 在 *S. coelicolor* 中确定, SCO5222 催化 FPP 生成 (+)-*epi*-Isozizaene (**77**)^[61]。环化机理如图 6 所示,与图 5 类似, FPP 经过第一次和第二次环化生成中间物 **71**。但第 3 次环化并不生成中间物 **74**, 而是生成中间物 **78**。**78** 经过一次 Wagner-Meerwein 重排生成 **79**, 1,2-甲基迁移生成 **80**, 脱掉质子生成

产物 **77**^[62-63]。

与 SCO5222 紧邻的 SCO5223 编码 P450 单加氧酶, 可以催化 **77** 的 C4 位发生羟化, 生成 Albaflavenol (**81**), 然后进一步氧化生成终产物 **76**^[64]。SCO5223 是双功能酶, 除了 P450 单加氧酶的氧化功能外还具有法尼烯合酶的功能^[65-66]。法尼烯一般是植物产生的链状倍半萜化合物, 具有重要

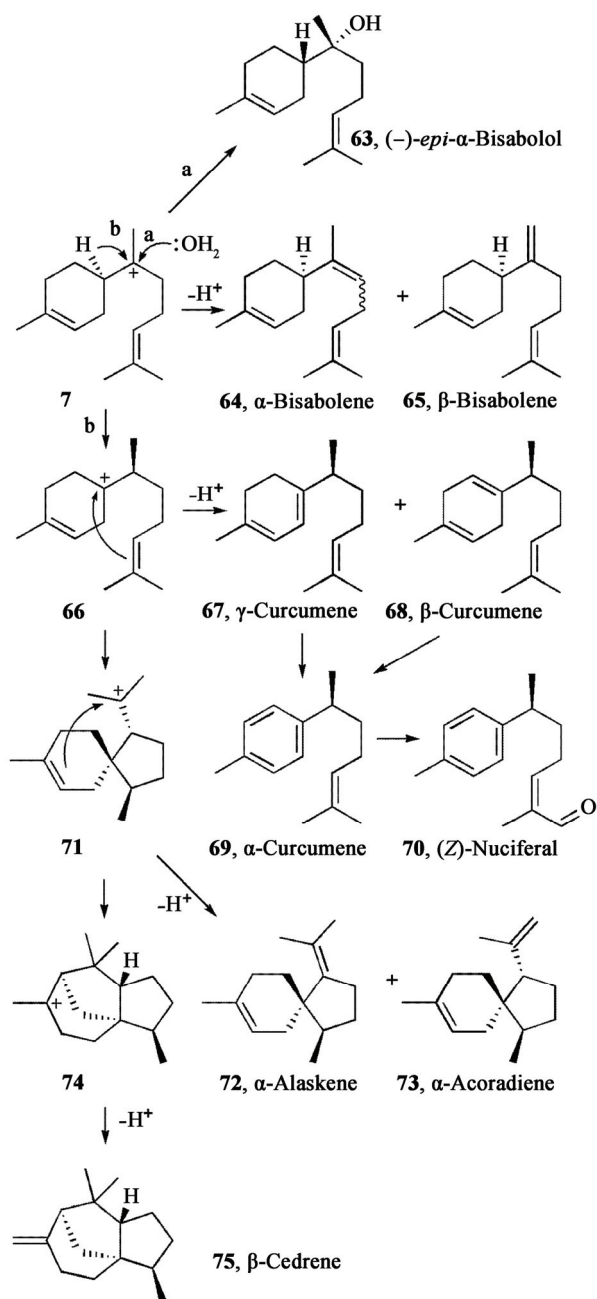


图5 经途径III合成的部分倍半萜化合物的化学结构或生物合成途径

Figure 5 Chemical structures or biosynthetic pathways of some sesquiterpenes by Mechanism III

的生理活性。此前法尼烯合酶基因也仅在植物基因组中发现,在特定情况下、特定组织器官中转录表达。SCO5223及其同源蛋白是到目前为止唯一一例细菌中的法尼烯合酶。

虽然 *S. avermitilis* 含有与 SCO5222 和 SCO5223 的同源基因,分别是 SAV_3032 和 SAV_3031,但是并不能从其发酵产物中检测到 **76** 及其相关产物。通过替换启动子使沉默的基因转录,检测到了化合物 **76**、**77** 和 **81**,同时发现一种新的化合物 4β,5β-epoxy-2-*epi*-Zizaan-6β-ol (**82**),推测可能是 (4*S*)-**81** 通过其他氧化途径产生的^[67],而负责这一氧化途径的基因到目前为止并不清楚。

有报道在其他一些链霉菌中可以检测到一些可能具有深冬烷骨架的化合物,例如 *epi*-Prezizaene (**83**)、*epi*-Zizaene (**84**)和化合物 **85**^[68]。**83** 被认为是 **79** 脱质子生成的,**84** 被认为是 **80** 脱掉质子生成的,**85** 被认为是 **84** 羟化后的产物。

目前并没有发现针对 Albaflavenone 的调控基因,仅有的涉及到调控的报道来自 2011 年对 *S. coelicolor* 的 SCO1596 研究,SCO1596 与 *S. avermitilis* 中 SAV_6741 同源,编码一个组氨酸激酶。该基因敲除后,Albaflavenone 合成基因在转录水平上明显上升。研究者给出的解释是:突变株中主代谢发生变化,特别是负责乙酰 CoA 羧化的相关基因表达量上调,使次生代谢水平随之上升^[69]。

4 可能经途径IV合成的倍半萜

来源于 *S. venezuelae* 的 SVEN_0552 在链霉菌中进行异源表达,检测到的产物为 (+)-Dauca-8,11-diene (**86**)^[4]。目前并没有对其生物合成机制详细研究的报道。我们依据其化学结构可以推测其可能是由途径IV首先生成碳正离子中间物 **8**,然后 C6 和 C10 闭合生成具有 Daucane 骨架的 2 环 C11 碳正离子中间体,脱去质子生成双键,即终产物 **86**,如图 7 所示。

5 经途径V合成的倍半萜

二环倍半萜化合物 (+)-*epi*-Cubenol (**87**)、(+)-T-Murolol (**88**)和 (-)-δ-Cadinene (**89**)等是具有杜松烷骨架的倍半萜化合物。FPP 经过途径 V 形成正离子中间体 **9**,第 2 次环化形成共同的正离子中间体 **90**,接下来经不同途径形成不同的最终产物,

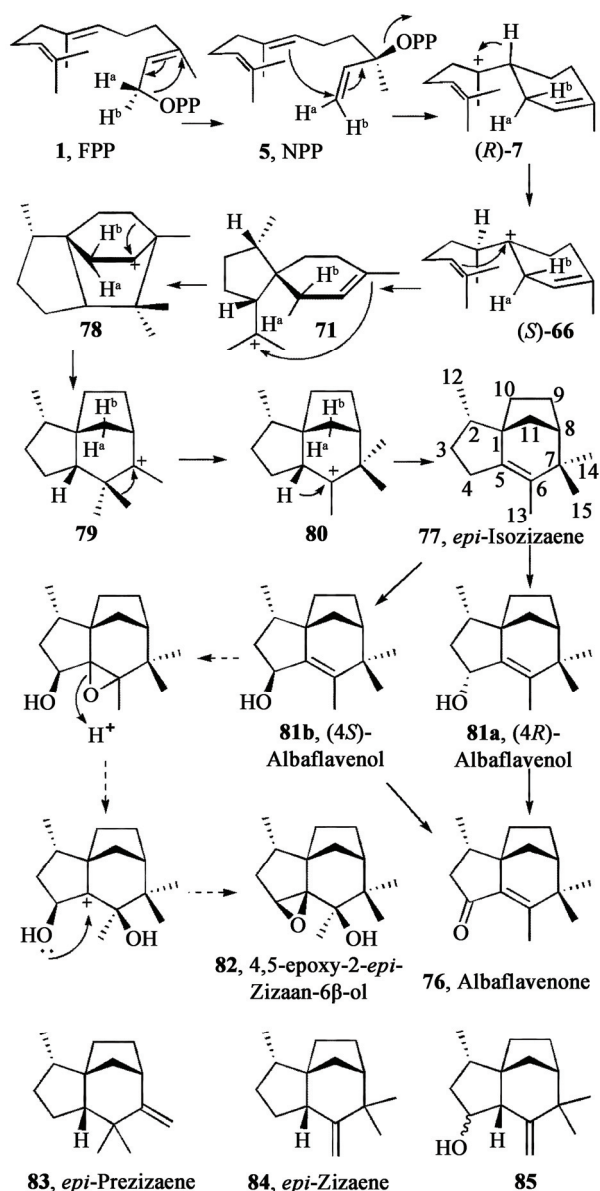


图6 部分具有深冬烷 zizaane 骨架的倍半萜化合物的化学结构或生物合成途径

Figure 6 Chemical structures or biosynthetic pathways of some sesquiterpenes with zizaane skeleton

如图8所示。

首先 Epicubenol 于 1971 年从链霉菌中被分离到, 1993 年开始对其合酶进行了部分的分离纯化和生化特性确定^[70]。直到 2012 年在 *S. griseus* 中确定 SGR_6065(GecA)负责环化 FPP 生成主产物 (+)-*epi*-Cubenol^[71]。SGR_6065 在链霉菌中进行异源

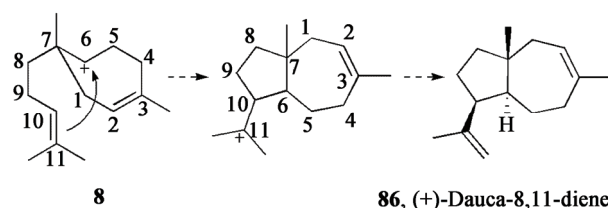


图7 (+)-Dauca-8,11-diene 可能的生物合成途径

Figure 7 Hypothetic biosynthetic pathway of (+)-Dauca-8,11-diene

表达时除了能够产生 (+)-*epi*-Cubenol 外, 还检测到少量的 α -Copaene (91)、 α -Muurolene (92)、Cadina-1(10),4-diene (即化合物 δ -Cadinene, 89)和 Cadina-1,4-diene (93)等^[4]。

2009 年第一次从一株海洋链霉菌中分离到 T-Muurolol 类化合物^[72]。2011 年在 *S. clavuligerus* 中确定了倍半萜合酶 SSCG_03688 (即 SCLV_p0068) 负责合成 (+)-T-Muurolol (88)^[73]。SSCG_03688 基因上游为相同方向的 P450 基因 SSCG_03690 (即 SCLAV_p0067), 当 SSCG_03688 与其在链霉菌宿主中进行异源表达时检测到二环倍半萜化合物 (-)-Drimenol (94)^[4]。94 明显不是在 88 基础上进一步氧化的产物, 两者的结构骨架并不相同, 而且在植物中负责合成 94 的只有一个倍半萜合酶, 并没有其他氧化还原酶参与^[74]。因此这里 SSCG_03690 在 94 的合成中所起的作用需要进一步确认。另外, SSCG_03688 基因下游为相同方向且紧密相连的 P450 基因 SSCG_03687 (即 SCLAV_p0069 和 SCLAV_p0070, 这里的 P450 基因并不完整, 可能在进化过程中基因内部密码子突变产生终止密码子) 和甲基转移酶基因 SSCG_03686 (即 SCLAV_p0071), 目前没有实验数据说明其是否参与萜类化合物的生物合成。在链霉菌宿主中对来源于 *Roseiflexus castenholzii* 的 Rcas_0622 和来源于 *Roseiflexus* sp. 的 RoseRS_3509 分别在链霉菌中进行异源表达, 检测到的产物均是 88^[4]。

S. clavuligerus 中倍半萜合酶 SSCG_02150 (即 SCLV_p0328)合成 (-)- δ -Cadinene (89)^[73]。

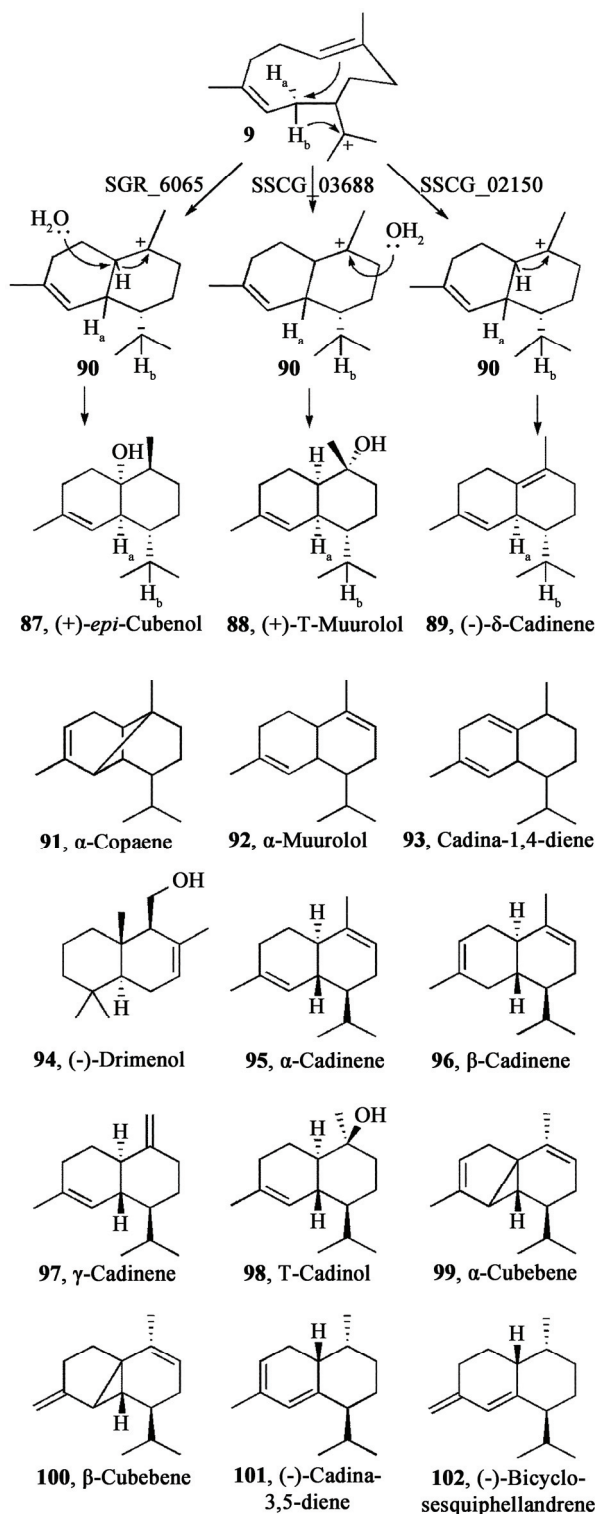


图 8 部分具有杜松烷骨架的倍半萜化合物的化学结构或生物合成途径

Figure 8 Chemical structures or biosynthetic pathways of some sesquiterpenes with cadinane skeleton

SSCG_02150 上游为甲基转移酶基因, 下游为 P450 单加氧酶基因, 三者方向相同且紧密相连, 目前同样没有实验数据证明其是否参与萜类化合物的生物合成。

以上 3 种倍半萜合酶的产物非常类似, 但在氨基酸序列上并没有表现出明显的高度同源性。

来源于粘细菌 *So. cellulorum* 的 Sce6369 在链霉菌中进行异源表达, 检测到的产物包括 α -Cubebene (99)、 β -Cubebene (100)、Cadina-3,5-diene (101) 和 Bicyclosquiphellandrene (102)^[4]。

6 经途径 VI 合成的倍半萜

除了前文中提到的 γ -Humulene 外, 植物产生的具有雪松烷 Himachalane 或长叶蕨烷 Longipinane 骨架的倍半萜化合物被认为是经途径 VI 合成^[75-76]。目前尚无在细菌中发现此类化合物的报道, 因此这里不作赘述。

7 小结

以上对细菌中倍半萜合成的研究状况进行了概述。细菌中的倍半萜合酶(以及单萜合酶)在氨基酸序列上都具有两个保守的 Motif, 富含天冬氨酸的 DDXX(D/E)区域和(N/D)DXX(S/T)XX(K/R)(D/E)区域, 用来结合催化所需要的二价镁离子。这两个区域是判断一个蛋白是否属于倍半萜合酶的基本依据, 但是任意两个产物不同的倍半萜合酶在其他区域的氨基酸序列同源性并不高, 因此一个可能的倍半萜合酶如果不与已知产物的倍半萜合酶高度同源, 那么就无法仅仅根据氨基酸序列来推测其产物是什么, 甚至属于倍半萜合酶还是单萜合酶都无法确定, 必需要通过体外或者体内的实验数据来一一检测^[77]。

一些倍半萜合酶的产物并非仅有一种, 除了主要产物外, 还能够合成一种或者多种少量的其他化合物。这些其他化合物或者是没有被完全催化而产生的中间物, 或者是合成机制与主产物不同的其他化合物。这为通过蛋白质工程手段对其进行改造以获得能够合成新产物的酶提供了便利。例如对

(+)-*epi*-Isozizaene 合酶的改造, 获得了 6 种不同的倍半萜合酶, 但改造后酶催化活性下降是一个需要解决的问题^[78]。

细菌中合成的萜类化合物绝大多数都可以在植物或真菌中找到, 相对于真核生物而言, 细菌作为研究对象明显更简单, 更容易操作, 周期也更短。因此当我们希望从植物中提取一些有价值的或者生产所需的萜类化合物时, 可以尝试去选择一些能够产生相同化合物的细菌作为生产的来源。同时对细菌中萜类化合物合成机理和相关合酶的研究也为真核生物中同类化合物的相关研究提供参考。

到目前为止, 细菌倍半萜的研究已有很大的进展, 但还存在一些问题。例如: 在细菌基因组中还有大量可能的倍半萜合酶的功能尚未确定; 2012 年和 2013 年, 德国 Jeroen S. Dickschat 教授组对近 60 种放线菌进行发酵, 系统分析了发酵产物中的挥发性萜类化合物^[68,79], 其中许多萜类化合物对应的合成基因没有明确; 作为有重要生物活性的次生代谢产物, 萜类化合物在细胞内合成的调控机制也是很重要的, 但并没有被重视; 放线菌(特别是链霉菌)因其丰富的次生代谢产物而被作为细菌萜类化合物的研究重点, 相对来说对其他种类细菌的研究明显不足。这些都是可以继续深入研究的方向。

针对这些问题, (1) 需要继续加强对已知的和推测的倍半萜合酶生物信息学分析, 总结规律, 提出合理的推测, 为具体实验提出指导性意见。(2) 常规的通过体外蛋白表达纯化、生化反应、产物结构确定, 依然是确定一个倍半萜合酶最有效和直接的方法。(3) 如果希望通过异源表达的方法确定一个基因是否是倍半萜合酶基因, 产物结构是什么, 宿主的选择是最重要的。最适合的宿主应该具有成熟的遗传操作系统、成熟的发酵条件和技术、干净的背景(基因组完成测序, 并且本身的次生代谢产物尽可能少, 无关的次生代谢基因和基因簇尽可能被敲除干净)、底物供应充足等特性。日本 Haruo Ikeda 教授组构建并使用的阿维链霉菌 SUKA22^[4-5], 作为放线菌来源的基因进行异源表达宿主非常成功。但

从理论上讲, 用 SUKA22 异源表达非放线菌来源的基因不一定是合适的, 发展其他与待检测基因来源菌的进化关系尽可能近的异源表达宿主是一个可以努力的方向。(4) 我们在这里强调传统的遗传操作的重要性。与体外生化反应和在遗传操作系统已经成熟的模式菌株中进行的异源表达相比, 对大量遗传操作系统不完善的非模式菌株进行基因敲除等尝试是一件耗时费力的事情, 但这种研究是具有重要意义和价值的, 生化反应和异源表达并不能解决所有科学问题, 很多还是需要回到原始菌株中通过基因敲除和回补、不同条件下发酵产物的比较来解答。不仅对萜类生物合成研究如此, 其他方向的研究也是如此。

参 考 文 献

- [1] Cane DE, Sohng JK, Lamberson CR, et al. Pentalenene synthase. Purification, molecular cloning, sequencing, and high-level expression in *Escherichia coli* of a terpenoid cyclase from *Streptomyces* UC5319[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(19): 5846-5857
- [2] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546
- [3] Cane DE, Watt RM. Expression and mechanistic analysis of a germacadienol synthase from *Streptomyces coelicolor* implicated in geosmin biosynthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1547-1551
- [4] Yamada Y, Kuzuyama T, Komatsu M, et al. Terpene synthases are widely distributed in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(3): 857-862
- [5] Yamada Y, Arima S, Nagamitsu T, et al. Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2015, 68(6): 385-394
- [6] Gerber NN, Lechevalier HA. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes[J]. *Applied Microbiology*, 1965, 13(6): 935-938
- [7] Gerber NN. Geosmin, from microorganisms, is trans-1, 10-dimethyl-trans-9-decalol[J]. *Tetrahedron Letters*, 1968, 9(25): 2971-2974
- [8] He XF, Cane DE. Mechanism and stereochemistry of the germacadienol/germacrene D synthase of *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(9): 2678-2679
- [9] Jiang JY, He XF, Cane DE. Geosmin biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* germacadienol/germacrene D synthase converts farnesyl diphosphate to geosmin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(25): 8128-8129
- [10] Cane DE, He XF, Kobayashi S, et al. Geosmin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular cloning, expression, and mechanistic study of the germacadienol/geosmin synthase[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2006, 59(8): 471-479
- [11] Jiang JY, He XF, Cane DE. Biosynthesis of the earthy odorant

- geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme[J]. Nature Chemical Biology, 2007, 3(11): 711-715
- [12] Jiang JY, Cane DE. Geosmin biosynthesis. Mechanism of the fragmentation-rearrangement in the conversion of germacradienol to geosmin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(2): 428-429
 - [13] Dickschat JS, Wenzel SC, Bode HB, et al. Biosynthesis of volatiles by the myxobacterium *Myxococcus xanthus*[J]. ChemBioChem, 2004, 5(6): 778-787
 - [14] Dickschat JS, Bode HB, Wenzel SC, et al. Biosynthesis and identification of volatiles released by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*[J]. ChemBioChem, 2005, 6(11): 2023-2033
 - [15] Dickschat JS, Bode HB, Mahmud T, et al. A novel type of geosmin biosynthesis in myxobacteria[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2005, 70(13): 5174-5182
 - [16] Nawrath T, Dickschat JS, Müller R, et al. Identification of (8S, 9S, 10S)-8, 10-dimethyl-1-octalin, a key intermediate in the biosynthesis of geosmin in bacteria[J]. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(2): 430-431
 - [17] Giglio S, Jiang JY, Saint CP, et al. Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(21): 8027-8032
 - [18] Wang ZJ, Xiao P, Song GF, et al. Isolation and characterization of a new reported cyanobacterium *Leptolyngbya bijugata* coproducing odorous geosmin and 2-methylisoborneol[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(16): 12133-12140
 - [19] Chou WKW, Fanizza I, Uchiyama T, et al. Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: cloning and characterization of SAV_76, the synthase for a new sesquiterpene, avermitilol[J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132(26): 8850-8851
 - [20] Agger SA, Lopez-Gallego F, Høye TR, et al. Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. strain PCC 7120[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(18): 6084-6096
 - [21] Nakano C, Kudo F, Eguchi T, et al. Genome mining reveals two novel bacterial sesquiterpene cyclases: (–)-germacradien-4-ol and (–)-epi- α -bisabolol synthases from *Streptomyces citricolor*[J]. ChemBioChem, 2011, 12(15): 2271-2275
 - [22] Bhatia SP, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on β -caryophyllene alcohol[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(11 Suppl): S95-S96
 - [23] Nakano C, Horinouchi S, Ohnishi Y. Characterization of a novel sesquiterpene cyclase involved in (+)-caryolan-1-ol biosynthesis in *Streptomyces griseus*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(32): 27980-27987
 - [24] Schmidt CO, Bouwmeester HJ, Bülow N, et al. Isolation, characterization, and mechanistic studies of (–)- α -gurjunene synthase from *Solidago canadensis*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1999, 364(2): 167-177
 - [25] Quin MB, Flynn CM, Schmidt-Dannert C. Traversing the fungal terpenome[J]. Natural Product Reports, 2014, 31(10): 1449-1473
 - [26] Takeuchi S, Ogawa Y, Yonehara H. The structure of pentalenolactone (PA-132)[J]. Tetrahedron Letters, 1969(32): 2737-2740
 - [27] Martin DG, Slomp G, Mizsak S, et al. The structure and absolute configuration of pentalenolactone (PA 132)[J]. Tetrahedron Letters, 1970, 11(56): 4901-4904
 - [28] Aizawa S, Akutsu H, Satomi T, et al. AA-57, a new antibiotic related to pentalenolactone[J]. The Journal of Antibiotics, 1978, 31(7): 729-731
 - [29] Seto H, Yonehara H. Studies on the biosynthesis of pentalenolactone. III. Isolation of a biosynthetic intermediate hydrocarbon, pentalenene[J]. The Journal of Antibiotics, 1980, 33(1): 92-93
 - [30] Takahashi S, Takeuchi M, Arai M, et al. Studies on biosynthesis of pentalenolactone. V isolation of deoxypentalenylglucuron[J]. The Journal of Antibiotics, 1983, 36(3): 226-228
 - [31] Tillman AM, Cane DE. Pentalenolactone F, a new metabolite isolated from *Streptomyces*. Isolation and structure elucidation[J]. The Journal of Antibiotics, 1983, 36(2): 170-172
 - [32] Seto H, Noguchi H, Sankawa U, et al. Studies on the biosynthesis of pentalenolactone VI. The X-ray crystal structure investigation of pentalenolactone G and structural revision of pentalenolactone F[J]. The Journal of Antibiotics, 1984, 37(7): 816-817
 - [33] Seto H, Sasaki T, Yonehara H, et al. Studies on the biosynthesis of pentalenolactone. VII. Isolation of pentalenolactones P and O[J]. The Journal of Antibiotics, 1984, 37(9): 1076-1078
 - [34] Williard PG, Sohng JK, Cane DE. The X-ray crystal structure of pentalenolactone F methyl ester (epi-pentalenolactone F)[J]. The Journal of Antibiotics, 1988, 41(1): 130-133
 - [35] Uyeda M, Mizukami M, Yokomizo K, et al. Pentalenolactone I and hygromycin A, immunosuppressants produced by *Streptomyces filipinensis* and *Streptomyces hygroscopicus*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(5): 1252-1254
 - [36] Nakagawa A, Tomoda H, Hao MV, et al. Antiviral activities of pentalenolactones[J]. The Journal of Antibiotics, 1985, 38(8): 1114-1115
 - [37] Nagle WA, Moss AJ, Henle KJ. Sensitization of cultured Chinese hamster cells to 42°C hyperthermia by pentalenolactone, an inhibitor of glycolytic ATP synthesis[J]. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine, 1985, 48(5): 821-835
 - [38] Duszko M, Mecke D. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone in *Trypanosoma brucei*[J]. Molecular and Biochemical Parasitology Molecular and Biochemical Parasitology, 1986, 19(3): 223-229
 - [39] Ikeda M, Fukuda A, Takagi M, et al. Inhibitory effect of pentalenolactone on vascular smooth muscle cell proliferation[J]. European Journal of Pharmacology, 2001, 411(1/2): 45-53
 - [40] Hartmann S, Neeff J, Heer U, et al. Arenaemycin (pentalenolactone): a specific inhibitor of glycolysis[J]. FEBS Letters, 1978, 93(2): 339-342
 - [41] Duszko M, Balla H, Mecke D. Specific inactivation of glucose metabolism from eucaryotic cells by pentalenolactone[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1982, 714(2): 344-350
 - [42] Cane DE, Sohng JK. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone: kinetic and mechanistic studies[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1989, 270(1): 50-61
 - [43] Willson M, Lauth N, Perie J, et al. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by phosphorylated epoxides and α -enones[J]. Biochemistry, 1994, 33(1): 214-220
 - [44] Cane DE, Sohng JK. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone. 2. Identification of the site of alkylation by tetrahydropentalenolactone[J]. Biochemistry, 1994, 33(21): 6524-6530
 - [45] Maurer KH, Pfeiffer F, Zehender H, et al. Characterization of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes from the pentalenolactone producer *Streptomyces arenae*[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 153(2): 930-936
 - [46] Fröhlich KU, Wiedmann M, Lottspeich F, et al. Substitution of a pentalenolactone-sensitive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by a genetically distinct resistant isoform accompanies pentalenolactone production in *Streptomyces arenae*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(12): 6696-6702
 - [47] Fröhlich KU, Kannwischer R, Rüdiger M, et al. Pentalenolactone-insensitive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptomyces arenae* is closely related to GAPDH from thermostable eubacteria and plant chloroplasts[J]. Archives of Microbiology, 1996, 165(3): 179-186

- [48] Lesburg CA, Lloyd MD, Cane DE, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant pentalenene synthase[J]. Protein Science, 1995, 4(11): 2436-2438
- [49] Tetzlaff CN, You Z, Cane DE, et al. A gene cluster for biosynthesis of the sesquiterpenoid antibiotic pentalenolactone in *Streptomyces avermitilis*[J]. Biochemistry, 2006, 45(19): 6179-6186
- [50] Quaderer R, Omura S, Ikeda H, et al. Pentalenolactone biosynthesis. Molecular cloning and assignment of biochemical function to PtlI, a cytochrome P450 of *Streptomyces avermitilis*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(40): 13036-13037
- [51] You Z, Omura S, Ikeda H, et al. Pentalenolactone biosynthesis. Molecular cloning and assignment of biochemical function to PtlH, a non-heme iron dioxxygenase of *Streptomyces avermitilis*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(20): 6566-6567
- [52] You Z, Omura S, Ikeda H, et al. Crystal structure of the non-heme iron dioxxygenase PtlH in pentalenolactone biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(50): 36552-36560
- [53] You Z, Omura S, Ikeda H, et al. Pentalenolactone biosynthesis: Molecular cloning and assignment of biochemical function to PtlF, a short-chain dehydrogenase from *Streptomyces avermitilis*, and identification of a new biosynthetic intermediate[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 459(2): 233-240
- [54] Jiang JY, Tetzlaff CN, Takamatsu S, et al. Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: A biochemical Baeyer-Villiger reaction and discovery of a new branch of the pentalenolactone family tree[J]. Biochemistry, 2009, 48(27): 6431-6440
- [55] Seo MJ, Zhu DQ, Endo S, et al. Genome mining in *Streptomyces*. Elucidation of the role of Baeyer-Villiger monooxygenases and non-heme iron-dependent dehydrogenase/oxygenases in the final steps of the biosynthesis of pentalenolactone and neopentalenolactone[J]. Biochemistry, 2011, 50(10): 1739-1754
- [56] Zhu DQ, Seo MJ, Ikeda H, et al. Genome mining in *Streptomyces*. Discovery of an unprecedented P450-catalyzed oxidative rearrangement that is the final step in the biosynthesis of pentalenolactone[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(7): 2128-2131
- [57] Takamatsu S, Xu LH, Fushinobu S, et al. Pentalenic acid is a shunt metabolite in the biosynthesis of the pentalenolactone family of metabolites: hydroxylation of 1-deoxypentalenic acid mediated by CYP105D7 (SAV_7469) of *Streptomyces avermitilis*[J]. The Journal of Antibiotics, 2011, 64(1): 65-71
- [58] Maurer KH, Mecke D. Regulation of enzymes involved in the biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic pentalenolactone in *Streptomyces arenae*[J]. The Journal of Antibiotics, 1986, 39(2): 266-271
- [59] Zhu DQ, Wang YP, Zhang MM, et al. Product-mediated regulation of pentalenolactone biosynthesis in *Streptomyces* species by the MarR/SlyA family activators PenR and PntR[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(6): 1255-1266
- [60] Gürtler H, Pedersen R, Anthoni U, et al. Alabaflavone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology[J]. The Journal of Antibiotics, 1994, 47(4): 434-439
- [61] Lin X, Hopson R, Cane DE. Genome mining in *Streptomyces coelicolor*: molecular cloning and characterization of a new sesquiterpene synthase[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(18): 6022-6023
- [62] Lin X, Cane DE. Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic alabaflavone in *Streptomyces coelicolor*. Mechanism and stereochemistry of the enzymatic formation of epi-isozizaene[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(18): 6332-6333
- [63] Aaron JA, Lin X, Cane DE, et al. Structure of epi-isozizaene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), a platform for new terpenoid cyclization templates[J]. Biochemistry, 2010, 49(8): 1787-1797
- [64] Zhao B, Lin X, Lei L, et al. Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic alabaflavone in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(13): 8183-8189
- [65] Zhao B, Lei L, Vassilyev DG, et al. Crystal structure of alabaflavone monooxygenase containing a moonlighting terpene synthase active site[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(52): 36711-36719
- [66] Moody SC, Zhao B, Lei L, et al. Investigating conservation of the alabaflavone biosynthetic pathway and CYP170 bifunctionality in streptomycetes[J]. The FEBS Journal, 2011, 279(9): 1640-1649
- [67] Takamatsu S, Lin X, Nara A, et al. Characterization of a silent sesquiterpenoid biosynthetic pathway in *Streptomyces avermitilis* controlling epi-isozizaene alabaflavone biosynthesis and isolation of a new oxidized epi-isozizaene metabolite[J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4(2): 184-191
- [68] Citron CA, Gleitzmann J, Laurenzano G, et al. Terpenoids are widespread in actinomycetes: a correlation of secondary metabolism and genome data[J]. ChemBioChem, 2012, 13(2): 202-214
- [69] Lu YH, He JM, Zhu H, et al. An orphan histidine kinase, OhkA, regulates both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(12): 3020-3032
- [70] Cane DE, Ke N. Epicubenol synthase. Origin of the oxygen atom of a bacterial sesquiterpene alcohol[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, 10(2): 105-107
- [71] Nakano C, Tezuka T, Horinouchi S, et al. Identification of the SGR6065 gene product as a sesquiterpene cyclase involved in (+)-epicubenol biosynthesis in *Streptomyces griseus*[J]. The Journal of Antibiotics, 2012, 65(11): 551-558
- [72] Ding L, Pfoh R, Rühl S, et al. T-murolol sesquiterpenes from the marine *Streptomyces* sp. M491 and revision of the configuration of previously reported amorphanes[J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(1): 99-101
- [73] Hu YF, Chou WKW, Hopson R, et al. Genome mining in *Streptomyces clavuligerus*: expression and biochemical characterization of two new cryptic sesquiterpene synthases[J]. Chemistry & Biology, 2011, 18(1): 32-37
- [74] Kwon M, Cochrane SA, Vederas JC, et al. Molecular cloning and characterization of drimenol synthase from valerian plant (*Valeriana officinalis*)[J]. FEBS Letters, 2014, 588(24): 4597-4603
- [75] Steele CL, Crock J, Bohlmann J, et al. 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]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(4): 2078-2089
- [76] Little DB, Croteau RB. Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases δ -selinene synthase and γ -humulene synthase[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 402(1): 120-135
- [77] Cane DE, Ikeda H. Exploration and mining of the bacterial terpenome[J]. Accounts of Chemical Research, 2012, 45(3): 463-472
- [78] Li RQ, Chou WKW, Himmelberger JA, et al. Reprogramming the chemodiversity of terpenoid cyclization by remodeling the active site contour of epi-isozizaene synthase[J]. Biochemistry, 2014, 53(7): 1155-1168
- [79] Rabe P, Citron CA, Dickschat JS. Volatile terpenes from actinomycetes: a biosynthetic study correlating chemical analyses to genome data[J]. ChemBioChem, 2013, 14(17): 2345-2354