

· 资源与质量评价 ·

一个紫芝多产物倍半萜合酶的功能鉴定

褚丽华¹, 王丽芝², 陈士林³, 曾欣宜¹, 徐江³, 李滢¹, 孙超^{1*}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

2. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193; 3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:紫芝是我国最著名的药用真菌之一,作为担子菌亚门的模式药用真菌,其倍半萜合酶的功能鉴定对真菌倍半萜的生物合成与调控研究具有重要意义。方法:通过挖掘紫芝基因组数据发现一个灵芝倍半萜合酶基因,将其与已经鉴定的两个紫芝倍半萜合酶和非冗余蛋白数据库(Nr数据库)中与其同源性最高的3个萜类合酶进行多重序列比对分析其保守结构域。然后,在大肠埃希菌中进行异源表达,通过SDS-PAGE对其蛋白表达情况进行检测。利用固相微萃取收集挥发性物质,并通过GC-MS对其产物进行检测。结果:该酶含有倍半萜保守基序DDXXDE和NSE/DTE,可在大肠埃希菌中可溶性表达,GC-MS分析发现,该酶可以内源性法尼基焦磷酸(FPP)为底物合成11种倍半萜类化合物,出峰时间为18.6 min的产物 α -cadinol是主要产物,已有研究表明 α -cadinol具有明显的抗癌活性。通过与对照品比对进一步确定其中3个产物分别是 γ -muurolene, α -muurolene和 δ -cadinene。结论:紫芝多产物倍半萜合酶的功能鉴定可推动其产物多样性的形成机制研究,为通过酶工程技术改良酶的催化活性生产稀有或新型倍半萜类化合物奠定基础。

[关键词] 紫芝; 倍半萜合酶; 固相微萃取; 生物合成

[中图分类号] R284.1;R2-031;R22;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0151-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20191216

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190418.1447.020.html>

[网络出版时间] 2019-04-19 14:38

Functional Identification of a Multi-product Sesquiterpene Synthase from *Ganoderma sinense*

CHU Li-hua¹, WANG Li-zhi², CHEN Shi-lin³, ZENG Xin-yi¹, XU Jiang³, LI Ying¹, SUN Chao^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. School of Chinese Material Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** *Ganoderma sinense* is one of the most famous medicinal fungi in China. Because it is a model medicinal fungus of basidiomycete, the functional identification of its sesquiterpene synthase is of great significance for the biosynthesis and regulation studies of fungal sesquiterpene. **Method:** A sesquiterpene synthase gene was discovered by mining the genome data of *G. sinense*. The sesquiterpene's conservative motifs was analyzed through multiple sequence alignment with two identified sesquiterpene synthases of *G. sinense* and three terpenoid synthases in the Nr database, which have the highest similarity to it. Subsequently, heterologous expression was observed in *Escherichia coli*, and protein expression was detected by SDS-PAGE. Volatile compounds were collected by solid phase microextraction (SPME) and detected by GC-MS. **Result:** The enzyme containing

[收稿日期] 20190325(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573704)

[第一作者] 褚丽华,在读硕士,从事药用植物功能基因组学研究,Tel:010-57833197,E-mail:chulihua0427@163.com

[通信作者] *孙超,研究员,从事药用植物功能基因组学研究,Tel:010-57833197,E-mail:csun@implad.ac.cn

sesquiterpene conserved motifs DDXXDE and NSE/DTE were efficiently expressed in *E. coli*, and 11 sesquiterpenes were synthesized with endogenous FPP as the substrate. The product α -cadinol at 18.6 min was considered to be the main product, and previous studies showed a significant anticancer activity. According to the comparison with chemical standards, three products were identified as γ -muurlene, α -muurolene and δ -cadinene, respectively. **Conclusion:** The functional identification of multi-product sesquiterpene synthase from *G. sinense* can promote the study on the mechanism underlying its product diversity, and lay a foundation for the production of rare or novel sesquiterpenes by improving the catalytic activity of enzymes with enzyme engineering technology.

[**Key words**] *Ganoderma sinense*; sesquiterpene synthase; solid phage microextraction; biosynthesis

紫芝 (*Ganoderma sinense*) 又称中国灵芝、木芝等,为担子菌亚门多孔菌目灵芝科真菌紫芝的子实体,是我国大宗中药材之一,具有 2 000 多年的应用历史,始载于《神农本草经》,列为上品^[1]。紫芝气味甘、性温、无毒,具有利关节、治耳聋、保神益精、坚筋骨、好颜色、久服延年益寿的作用,与赤芝一同作为药用灵芝收录记载于 2015 年版《中国药典》^[2]。现代药理研究表明,紫芝具有抑菌、抗肿瘤、增强免疫、强心、镇静以及促进核酸与蛋白质代谢等功效^[3]。

目前,已经从紫芝中化学分离三萜、多糖、甾体、生物碱等 160 多种生物活性成分^[3,4],但是关于其挥发性萜类物质的研究报道较少,目前仅在紫芝中分离鉴定出一种倍半萜类物质 ganosinensine^[5]。倍半萜由倍半萜合酶以法尼基焦磷酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP) 或其异构体橙花叔醇焦磷酸 (nerolidyl pyrophosphate, NPP) 为底物,通过一系列的高度复杂的环化反应催化产生。尽管担子菌是倍半萜类化合物的主要生产者之一。然而,与植物相比,在真菌,尤其是担子菌中,被鉴定的倍半萜合酶数量相对较少。目前,已鉴定的担子菌倍半萜合酶仅来源于发光脐菇 (*Omphalotus olearius*)^[6],灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)^[7],褐腐菌 (*Postia placenta*)^[8],高卢密环菌 (*Armillaria gallica*)^[9]和灵芝^[10]等少数物种。

已有两种来自于紫芝的倍半萜合酶被鉴定,它们能够分别合成 4 种和 5 种倍半萜^[10]。本研究从紫芝基因组中发掘出 1 个新的倍半萜合酶,通过在大肠埃希菌中表达并检测其催化产物,发现该酶能产生 11 种倍半萜类物质,经与对照品比对,确定其中 3 个产物分别为 γ -muurlene, α -muurolene 和 δ -cadinene。该多产物倍半萜合酶的功能鉴定为灵芝萜类合成酶产物多样性的形成机制研究奠定了基础,同时也将推动基于酶工程技术改良酶的催化活性生产稀有或新型倍半萜的研究,为倍半萜类药物

的研发提供新化合物来源。

1 材料

紫芝菌株 CGMCC5.0069 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;大肠埃希菌 DH5(, BL21 (DE3) 感受态细胞均购自北京天根生化科技有限公司。

QiaGen RNeasy[®] Mini 试剂盒(德国 QIAGEN, 批号 740904); PrimeScript[®] 1st Strand cDNA 试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司,批号 6110B]; 新快速 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司,批号 ZD304A-2); pGEM-T Easy Vector System I [北京普洛麦格(promega) 生物科技有限公司,批号 A1360]; 质粒小提试剂盒(批号 DP103-03), 快速扩增酶 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (批号 R010Q), 琼脂糖回收试剂盒(批号 DP209-03), 限制性内切酶 NdeI 和 HindIII, Premixed Protein Marker (Low), 4 × Protein Loading Buffer, DL5000 DNA Marker [宝日医生物技术(北京)有限公司,批号依次为 A190905A, A181613A, C2001A, A2401A, A301A]; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PAD, 青岛海博生物有限公司,批号 HB0233-12); IPTG (武汉卡诺斯科技有限公司,批号 kns977544110); pET28a 为本实验室保存。

移液器(德国 Eppendorf); MiNI-P TET 型蛋白电泳系统(美国伯乐公司); VCX750 型超声破碎仪(美国 Sonics 公司); 固相微萃取 (SPME) 装置(美国 Supelco 公司); 7890B 型气相色谱仪与离子质谱仪(HP MSD 三轴仪联用,德国 Agilent Technologies 公司)。

2 方法

2.1 菌株培养 将紫芝菌株转接至 PDA 固体培养基活化,用打孔器取含有生长旺盛菌丝的培养基 2~3 块 (< 0.5 cm) 接种至马铃薯液体培养基中。28 °C, 160 r·min⁻¹ 振荡培养 6~7 d, 收集菌丝,液氮速冻,于 -80 °C 冰箱保存。

2.2 紫芝倍半萜合酶的生物信息学分析 利用在线软件 ExPASy Proteomics Server 的 ProtParam 对该

蛋白质的理论等电点等蛋白性质进行预测,利用在线 Signal P 5.0 Server 软件对其蛋白序列中的信号肽进行分析,利用 WOLF PSORT (<http://wolfsort.org/>) 在线工具预测该蛋白的亚细胞定位情况,利用 TMHMM 软件对蛋白跨膜结构区进行分析,利用 NCBI 数据库对该酶进行 BLAST 分析,利用 DNAMAN 软件进行多序列比对分析,利用 MAGE6.0 软件构建系统进化树。

2.3 紫芝菌丝总 RNA 的提取和倍半萜合酶基因克隆 根据 QiaGen RNeasy[®] Mini 试剂盒说明书提取紫芝总 RNA。利用 TaKaRa PrimeScript[®] 1st Strand cDNA kit 合成 cDNA。利用 Primer premier 6 引物设计软件设计特异性引物,并在两端分别引入限制性内切酶酶切位点,引物序列为 GS02363-F/R: 5'-ATGGCTGTAAGTCCCGCCTCCG-3'/5'-TTAGGCACGGGGCGCTGAG-3', 酶切位点分别为 NdeI 和 HindIII。以上述获得的 cDNA 为模板,采用 TAKARA PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,PCR 扩增程序为 94 ℃ 预变性 15 s;98 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 5 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收目的条带后连接到 pGEM-T easy 载体上,并转化大肠埃希菌 DH5 α ,通过菌落 PCR 挑选阳性转化子进行测序,挑选测序正确的克隆进行酶切,回收含外源基因片段克隆入表达载体 pET28a,并转化大肠埃希菌 DH5 α ,菌落 PCR 挑选阳性克隆。

2.4 紫芝倍半萜合酶的异源表达和蛋白检测 将构建成功的含 GS02363 基因的表达载体和空载体,转化大肠埃希菌 BL21(DE3)。分别挑取阳性单克隆于 LB 液体培养基(含有 50 mg·L 的卡那霉素)中 37 ℃ 振荡培养过夜。以 5% 的转接量转接到 50 mL 新鲜 LB 培养液中进行活化培养。待其吸光度 A_{600} 达到 0.6 时,加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.5 mmol·L⁻¹,16 ℃ 诱导表达 24 h。取完成诱导的菌液 6 mL 离心,收集菌体,超声破碎,分别取上清和全菌样品进行处理,然后通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对其蛋白表达情况进行检测。

2.5 GC-MS 检测紫芝倍半萜合酶催化产物 取完成诱导的菌液 10 mL 于 20 mL 的顶空瓶中,60 ℃ 水浴加热,将固相微萃取针(萃取纤维 PDMS,100 μ m)悬空于顶空瓶中,萃取 30 min。以固相微萃取针为进样针,通过 GC-MS 检测产物。本实验使用安捷伦

7890B 气相色谱仪与离子阱质谱仪 HP MSD 三轴仪联用。进样口温度 250 ℃,脱附时间 10 min。色谱条件:60 ℃ 保持 1 min,以 6 ℃·min⁻¹ 升到 250 ℃,保持 5 min,氦气流速 1 mL·min⁻¹。质谱条件:离子源为电子轰击离子源,扫描范围 m/z 5~300。

3 结果

3.1 紫芝倍半萜合酶 GS02363 的生物信息学分析

根据紫芝基因组注释信息,发现 GS02363 基因可能编码 1 个萜类合酶。该基因编码蛋白的相对分子质量为 39.59 kDa,等电点为 4.66,不稳定系数为 40.67,为不稳定蛋白。蛋白一级序列分析未发现信号肽序列和疏水的跨膜区,亚细胞定位的预测结果显示其主要存在于细胞质中。将该蛋白序列在 NCBI 的 Nr 数据库中进行 BLAST 比对,发现其与来自担子菌 *Dichomitus squalen* 的 1 个萜类合酶(XP_007362515.1)有最高的同源性(92.0%),在已鉴定真菌萜类合酶中,该酶与来自担子菌 *Lignosus rhinoceroti* 的 GME3634 同源性最高,相似性达到 86.7%。将 GS02363 与 Nr 数据库中同源性最高的 3 个萜类合酶,及 2 个已经鉴定的紫芝倍半萜合酶 GS11330 和 GS14272 一起进行蛋白多序列比对,发现了 2 个倍半萜合酶的高度保守基序 DDXDE 和 NSE/DTE 基序,见图 1。二者位于蛋白的 C-末端,可以辅助金属离子的附着,促进底物 FPP/NPP 在活性部位的电离,从而帮助倍半萜合酶与底物结合^[11]。将 GS02363 与已经鉴定的 32 个担子菌倍半萜合酶一起通过邻间法建立系统进化树,所有倍半萜合酶共聚成 5 个进化枝,与过去报道一致^[8]。倍半萜合酶 GS02363 属于进化枝 I,该分支含有 13 个已鉴定的酶,是目前包含已鉴定酶最多的 1 个进化分支。已鉴定的紫芝倍半萜合酶 GS14272 也位于这分支,而另 1 个已鉴定紫芝倍半萜合酶 GS11330 位于进化枝 IV。见图 2。

3.2 紫芝倍半萜合酶 GS02363 基因的克隆和原核表达 提取紫芝总 RNA,并反转录得到 cDNA。根据紫芝倍半萜合酶 GS02363 基因序列设计引物,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,回收 PCR 产物并连接 T 载体,通过菌落 PCR 挑选阳性克隆送至测序公司测序,获得长 1 041 bp 的基因序列,与基因组数据库中的基因序列完全一致。将 GS02363 基因亚克隆至大肠埃希菌表达载体 pET28a 中,并转化大肠埃希菌 BL21(DE3)获得原核表达的工程菌。在 16 ℃ 低温条件下诱导 24 h。蛋白在较低温度下缓慢合成,这有益于蛋白的正确折叠并以可溶性蛋白的形

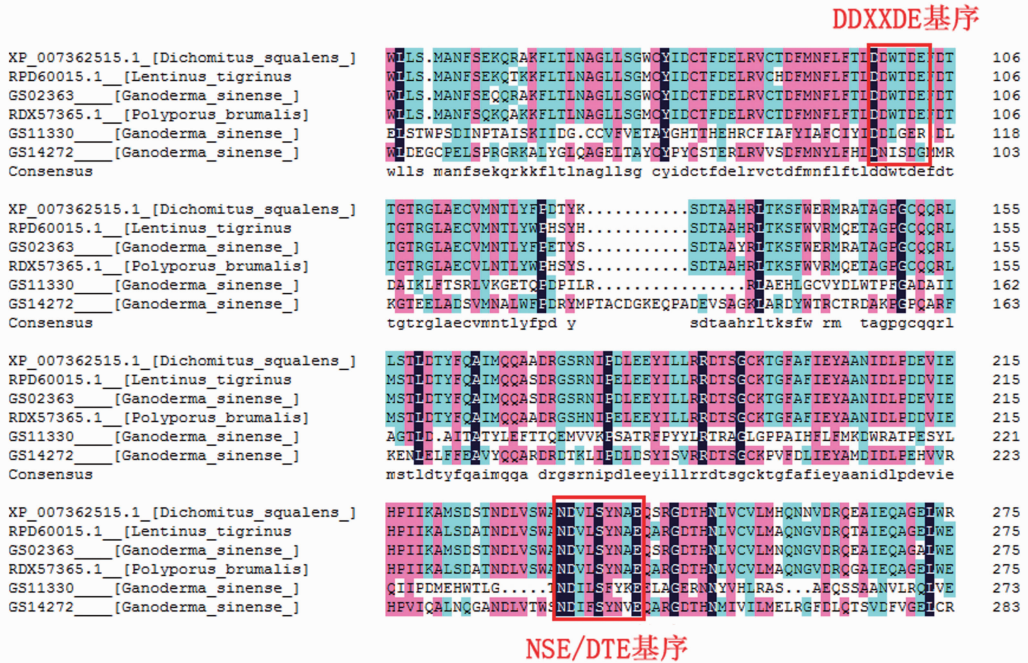


图 1 紫芝倍半萜合酶 GS02363 的保守基序分析

Fig.1 Conservative motif analysis of *Ganoderma sinense* sesquiterpene synthase GS02363

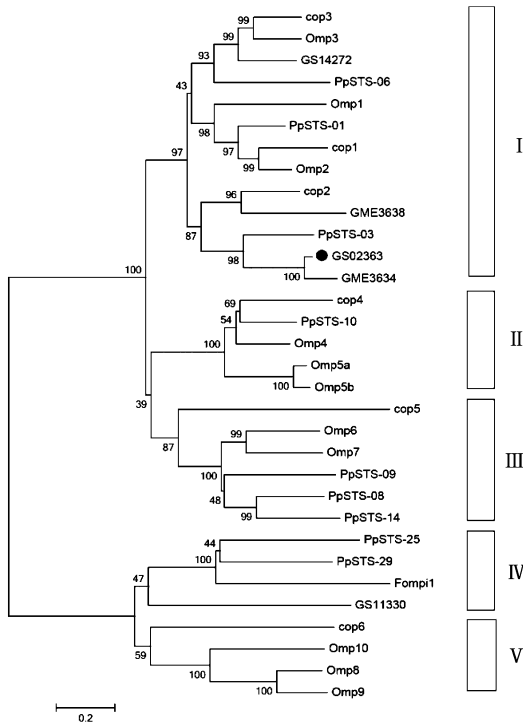


图 2 紫芝倍半萜合酶 GS02363 与其他已经鉴定的担子菌倍半萜合酶的系统进化分析

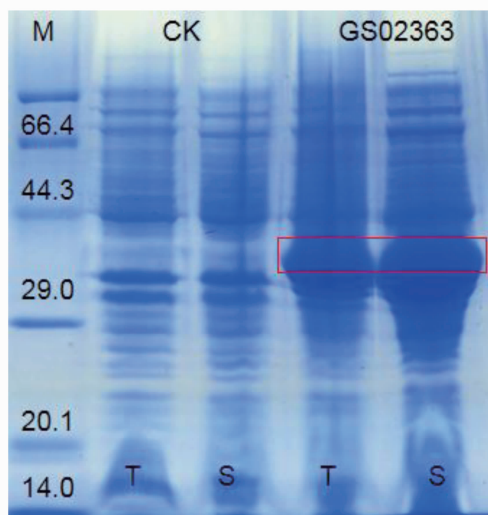
Fig.2 Phylogenetic analysis of *Ganoderma sinense* sesquiterpene synthases GS02363 and other identified Basidiomycete sesquiterpene synthases

式存在。同时,延长诱导时间可以促进可溶性蛋白的积累,增加蛋白表达。诱导完成后,离心收集菌

体,超声破碎,分别取全菌液和上清液进 SDS-PAGE 检测,确定蛋白的表达情况。与空载对照相比,含倍半萜合酶 GS02363 基因的工程菌的全菌和上清液均在 29.0 ~ 44.3 kD 之间出现了特异性的蛋白条带,蛋白相对分子质量与预测大小一致。蛋白电泳结果表明紫芝倍半萜合酶 GS02363 可以在大肠埃希菌中以可溶性蛋白形式表达,从而有助于形成空间折叠结构正确的有活性的倍半萜合酶。见图 3。

3.3 紫芝倍半萜合酶 GS02363 的产物检测与鉴定

含紫芝 GS02363 基因的工程菌经 IPTG 诱导 24 h 后,采用固相微萃取方法收集挥发性萜类物质。通过 GC-MS 分析检测到 11 种挥发性化合物。通过质谱分析发现其相对分子质量均为 204 Da,与倍半萜的相对分子质量一致。将化合物质谱图与美国国家标准与技术研究院 (NIST) 的质谱文库比对后,结合文献报道初步鉴定了 10 个倍半萜化合物的结构。见表 1,图 4。保留时间 18.6 min 处的产物 α -cadinol 被认为是主要产物。保留时间 16.56, 16.68, 18.44 min 对应的代谢产物 γ -cadinene, δ -cadinene 和 T-cadinol 为次要产物。为了进一步确认化合物的结构,将已报道的担子菌倍半萜合酶基因 COP3 在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 中进行诱导表达,在相同的 GC-MS 分析条件下,检测到与文献报道一致的产物 γ -muurelone, α -muurelone 和 δ -cadinene^[7]。通过比较 COP3 和 GS02363 催化产物的 GC-MS 结果,



T. 全菌; S. 上清液; 方框内的特异条带表明 GS02363 在大肠废希菌中以可溶性蛋白形式表达

图 3 紫芝倍半萜合酶 GS02363 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE Analysis of *Ganoderma sinense* sesquiterpene synthase GS02363

表 1 紫芝倍半萜合酶 GS02363 的催化产物信息

Table 1 Information on catalytic products of sesquiterpene synthase GS02363 from *Ganoderma sinense*

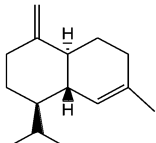
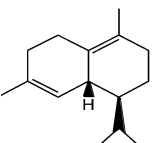
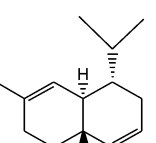
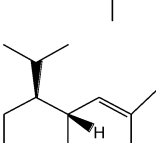
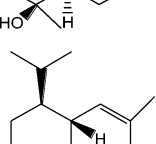
No.	t_R /min	倍半萜化合物	CAS	得分	结构
1	15.49	<i>cis</i> -muurola-3,5,-diene	1000365-95-4	88.44	
2	15.78	bicyclo[4.4.0]dec-1-en,2-isopropyl-5-methyl-9-methylene	150320-52-8	87.13	
3	15.97	γ -muurolene	30021-74-0	87.07	
4	16.24	α -cubeben	17699-14-8	84.98	
5	16.33	α -muurolene	31983-22-9	89.89	

确认 GS02363 也可以催化合成倍半萜化合物 γ -muurolene, α -muurolene 和 δ -cadinene, 这与质谱库检索的预测结果一致。

4 讨论

作为真菌主要的次生代谢产物之一, 倍半萜类化合物具有很高的药用价值。如担子菌 *O. olearius* 合成的挥发性萜类物质 illudins 具有显著的抗癌作用, 可有效治疗转移性前列腺癌等多种肿瘤^[6]。担子菌倍半萜合酶 COP1 催化产生的 β -elemene 能抑制肿瘤细胞生长, 诱发肿瘤细胞凋亡, 具有广谱抗癌活性, 对白血病、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、喉癌、宫颈癌和肺癌等均具有活性^[12]。伞形菌 *L. rhinoceroti* 倍半萜合酶 GEM3638 主要产物倍半萜烯醇 torreyol 对人口腔、肝、肺和结肠黑色素瘤以及白血病的细胞有细胞毒性, 成为潜在的抗癌药物^[13]。紫芝倍半萜合酶 GS02363 的主产物为倍半萜烯醇 α -cadinol, 已有研究表明其对胰腺癌细胞有明显的细胞毒性, 并且通过抑制蛋白激酶 B (Akt)/雷帕霉素靶蛋白

续表 1

No.	t_R /min	倍半萜化合物	CAS	得分	结构
6	16.56	γ -cadinene	39029-41-9	95.82	
7	16.68	δ -cadinene	483-76-1	94.96	
8	16.91	α -cadinene	24406-05-1	93.26	
9	18.44	T-cadinol	5937-11-1	90.10	
10	18.64	α -cadinol	481-34-5	94.00	
11	17.21	unidentified			

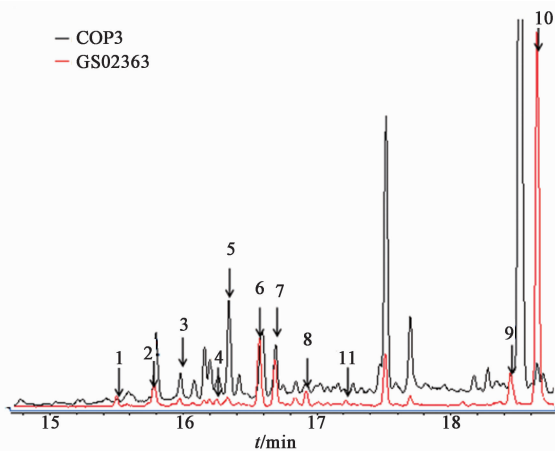


图 4 重组 GS02363 酶催化产物的 GC-MS 分析
Fig. 4 GC-MS analysis of catalytic products synthesized by recombinant GS02363 enzyme

(mTOR)通路的激活和自噬的过度活化,导致营养饥饿期间的胰腺癌细胞 PANC-1 死亡。因此, α -cadinol 成为抗胰腺癌药物的潜在候选者^[14]。倍半萜合酶 GS02363 合成的另一种产物 T-cadinol 可用于基于树突细胞的癌症免疫治疗^[15]。

萜类化合物在天然产物中具有最大的多样性,到目前为止已鉴定出约 8 万种萜类化合物。其中已有超过 300 种倍半萜骨架结构得到鉴定^[16]。萜类合酶是萜类骨架多样性的主要贡献者,骨架的进一步修饰更显著增加了萜类化合物的化学多样性。萜类合酶多为特异底物的混杂酶,具有通过复杂级联反应从单一底物合成多种产物的能力^[17]。除主要产物外,几乎一半的已鉴定的倍半萜合酶产生大量不同的产物,可被归类为多产物合酶。这种产物多样性反映了自然形成的趋势,使用最少数量的生物合成步骤产生最大数量的产物^[18]。来自 *Abies grandis* 的具有 52 种产物的 γ -humulene 合酶和 34 种产物的 δ -selinene 合酶是目前从单一底物 FPP 生产不同倍半萜的记录保持者^[19-20]。紫芝倍半萜合酶 GS02363 至少可以合成 11 种倍半萜产物,这与其具有允许各种构象的底物并且有稳定多个碳阳离子中间体的能力有关。该酶既可以 FPP 为底物,通过 1,10-环化机制产生 (*E,E*)-germacradienyl 阳离子中间体,进而生成 α -cadinol, T-cadinol, γ -muurolene 和

α -muurolene,也可以 NPP 为底物经由 1,10-环化生成(*Z,E*)-germacradienyl 阳离子最终生成 α , γ 和 δ -cadinene。如图 2 所示,在进化树的进化枝 I 中的酶多是多产物酶,一般采用 1,10-环化机制,因此有些产物是相同的。如与 GS02363 进化关系最近的 GME3634 的主产物也是 α -cadinol,此外,也产生 α -muurolene 和 δ -cadinene。而 COP3 和 Omp1 是 α -muurolene 合酶^[6-7]。除了 α -muurolene,Omp1 还合成 β -elemene,和 δ -cadinene。其中 α -muurolene 和 δ -cadinene 也是 GS02363 的产物。

本研究对紫芝倍半萜合酶 GS02363 进行了功能鉴定,发现该酶可以催化合成至少 11 种倍半萜类化合物,包括 α -cadinol 和 T-cadinol 等具有显著药理活性的化合物,因此通过进一步探索倍半萜合酶 GS02363 的结构和功能的相关性,揭示其催化活性的分子机制,有望通过酶工程技术改造该酶,实现对药理活性物质的高效合成。

[参考文献]

[1] ZHU Y J, XU J, SUN C, et al. Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:11087.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:188.

[3] 杜琳,刘玉容,叶峻,等. 紫芝中三萜类化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(10):1669-1673.

[4] 陈若芸,于德泉. 灵芝三萜化学成分研究进展[J]. *药学学报*, 1990, 25(12):940-953.

[5] LIU J Q, WANG C F, LI Y, et al. Isolation and bioactivity evaluation of terpenoids from the medicinal fungus *Ganoderma sinense* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(4):368-376.

[6] Wawrzyn G T, Quin M B, Choudhary S, et al. Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in basidiomycota [J]. *Chem Biol*, 2012, 19(6):772-783.

[7] Agger S, Lopez-Gallego F, Schmidt-Dannert C. Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus* [J]. *Mol Microbiol*, 2009, 72(5):1181-1195.

[8] Ichinose H, Kitaoka T. Insight into metabolic diversity of the brown-rot basidiomycete *Postia placenta* responsible for sesquiterpene biosynthesis: semi-comprehensive screening of cytochrome P450 monooxygenase involved in protoilludene metabolism [J]. *Microb Biotechnol*, 2018, 11(5):952-965.

[9] Engels B, Heinig U, Grothe T, et al. Cloning and

characterization of an *Armillaria gallica* cDNA encoding protoilludene synthase, which catalyzes the first committed step in the synthesis of antimicrobial melleolides [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(9):6871-6878.

[10] 王丽芝,王海英,浦香东,等. 基于紫芝基因组的倍半萜合酶基因的发掘与功能鉴定[J]. *中国科学:生命科学*, 2018, 48(4):447-454.

[11] Quin M B, Flynn C M, Schmidt-Dannert C. Traversing the fungal terpenome [J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(10):1449-1473.

[12] LU J J, DANG Y Y, HUANG M, et al. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curumae*-a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(2):406-411.

[13] Yap H Y, Muria Gonzalez M J, Kong B H, et al. Heterologous expression of cytotoxic sesquiterpenoids from the medicinal mushroom *Lignosus rhinocerotis* in yeast [J]. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1):103.

[14] Dibwe D F, SUN S J, Ueda Junya, et al. Discovery of potential antiausterity agents from the Japanese cypress *Chamaecyparis obtusa* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(21):4898-4903.

[15] Masao T, Akemi U, Shigenobu A. T-cadinol and calamenene induce dendritic cells from human monocytes and drive Th1 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 537(1/3):190-199.

[16] Miller D J, Allemann R K. Sesquiterpene synthases: passive catalysts or active players [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(1):60-71.

[17] Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants [J]. *Phytochem*, 2009, 70(15/16):1621-1637.

[18] Gambliel H, Croteau R. Pinene cyclases I and II. Two enzymes from sage (*Salvia officinalis*) which catalyze stereospecific cyclizations of geranyl pyrophosphate to monoterpene olefins of opposite configuration [J]. *J Biol Chem*, 1984, 259:740-748.

[19] Steele C L, 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 delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(4):2078-2089.

[20] Vattekkatte A, Garms S, Brandt W, et al. Enhanced structural diversity in terpenoid biosynthesis: enzymes, substrates and cofactors [J]. *Org Biomol Chem*, 2018, 16(3):348-362.

[责任编辑 顾雪竹]