

毛萼香茶菜二萜合酶IeCPS的立体特异性研究

杜刚^{1,3,*}, 龚海艳^{1,*}, 高娟¹, 付小莉¹, 卢山², 曾英^{1,**}

¹中国科学院昆明植物研究所, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201; ²南京大学生命科学学院, 南京210093; ³中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 对映-贝壳杉烷型二萜是药用植物香茶菜抗菌抗肿瘤的核心组分, 其生物合成的酶分子机制尚未完全明了。前期我们克隆并鉴定了毛萼香茶菜二萜合酶柯巴基焦磷酸合酶基因*IeCPS1*和*IeCPS2*。本文通过与拟南芥对映-贝壳杉烷型二萜合酶AtKS配对进行偶联反应, 以及GC-MS鉴定酶联反应产物, 证实毛萼香茶菜二萜合酶*IeCPS1*和*IeCPS2*的立体特异性为对映型(*ent*-CPS)。

关键词: 二萜合酶; 柯巴基焦磷酸合酶; 酶偶联反应; 毛萼香茶菜; 生物合成

Analysis on Stereospecificity of Diterpene Synthases IeCPS from *Isodon eriocalyx*

DU Gang^{1,3,*}, GONG Hai-Yan^{1,*}, GAO Juan¹, FU Xiao-Li¹, LU Shan², ZENG Ying^{1,**}

¹State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; ²School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: *Ent*-kaurane diterpenoids, isolated from the Chinese medicinal herbs, *Isodon* L., are principle components showing potent bioactivities of antitumor and anti-autoimmune inflammation. Despite a large number of *ent*-kaurane diterpenoids isolated from *Isodon* plants, little is known about the enzymatic machinery involved in their biosynthesis. *IeCPS1* and *IeCPS2* encoding copalyl diphosphate synthases (CPS) were previously cloned from the *I. eriocalyx* leaves and functionally characterized. Here we verified that *IeCPS1* and *IeCPS2* were *ent*-CPSs that produced CPP of *ent*-stereochemistry, by GC-MS analysis of enzymatic products from coupled reactions with a known *Arabidopsis ent*-kaurene synthase stereospecific for *ent*-CPP.

Key words: diterpene synthase; copalyl diphosphate synthase; coupled enzymatic reaction; *Isodon eriocalyx*; biosynthesis

唇形科香茶菜属(*Isodon*)植物具有抗菌、消炎和祛无名肿毒之功效, 是我国民间广泛使用的药草。在河南, 当地医生用冬凌草(*I. rubescens*)防治食道癌和贲门癌, 收效显著。如今, 主要用冬凌草制成的抗菌、消炎和抗肿瘤药物已进入医药市场; 此外, 以产自云南的多年生草本植物毛萼香茶菜(*I. eriocalyx*)研制开发的抗菌消炎药“咽康舒”、以溪黄草(*I. serra*)等香茶菜属植物研制开发的药品也相继面市(孙汉董等2001)。我国自上世纪70年代成立河南省冬凌草协作组并鉴定抗癌活性成分冬凌草甲素(oridonin, 又名rubescensin A, 图1)以来, 已有不少学者对该属植物进行了基础和开发研究, 发现20余个二萜化合物具有潜在的开发应用价值(Sun等2006), 其中, 抗癌化合物毛萼乙素(*eriocalyxin* B, 图1)的药用前景令人瞩目(Kong等2014; Lu等2013; Wang等2007)。

毛萼乙素与冬凌草甲素都属于对映-贝壳杉烷型二萜(*ent*-kaurane diterpenoids)。从生源和化学结构上分析, 对映-贝壳杉烷型二萜同赤霉素(gibberellin, GA)、甜菊苷(stevioside)、水稻防卫素二萜、以及丹参酮(tanshinone)等二萜化合物的生物合成途径都要经过类似于CPP (labdadienyl/copalyl diphosphate)的双环焦磷酸酯中间体(Peters 2010)。模式植物拟南芥和水稻的赤霉素生物合成研究表明(张迎迎和何祖华2010; 杨海燕等2010), 在二萜合酶(diterpene synthase, diTPS)的催化下,

收稿 2015-04-14 修定 2015-06-01

资助 云南省自然科学基金重点项目(2015FA029)和植物分子遗传国家重点实验室。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: biochem@mail.kib.ac.cn; Tel: 0871-65223210)。

线性前体分子焦磷酸香叶基香叶酯(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)接连发生两步环合反应(图1), 即首先在II型diTPS对映-柯巴基焦磷酸合酶(*ent*-copalyl diphosphate synthase, *ent*-CPS)的作用下发生第一次环合反应形成双环中间体对映-CPP(*ent*-copalyl diphosphate, *ent*-CPP), 然后经由I型diTPS对映-贝壳杉烯合酶(*ent*-kaurene synthase, *ent*-KS)催化的第二次环合形成四环二萜对映-贝壳杉烯(*ent*-kaurene), 紧接着第19位碳(C-19)被对映-贝壳杉烯氧化酶氧化为羧基, 再经过包括氧化

在内的不同后修饰反应, 最终形成130多个赤霉素类化合物(Sakamoto等2004; Yamaguchi 2006)。赤霉素是植物体内普遍存在的植物激素, 根据赤霉素的生物合成途径, 可以推测香茶菜对映-贝壳杉烷型二萜生物合成从GGPP起始的前两步环合反应在酶催化机理上与赤霉素的相同, 即GGPP依次在*ent*-CPS和*ent*-KS的催化下连续发生两步环合形成对映-贝壳杉烯, 之后经过立体选择性各不相同的氧化反应分别生成化学多样性极为丰富的赤霉素和香茶菜对映-贝壳杉烷类二萜化合物(图1)。

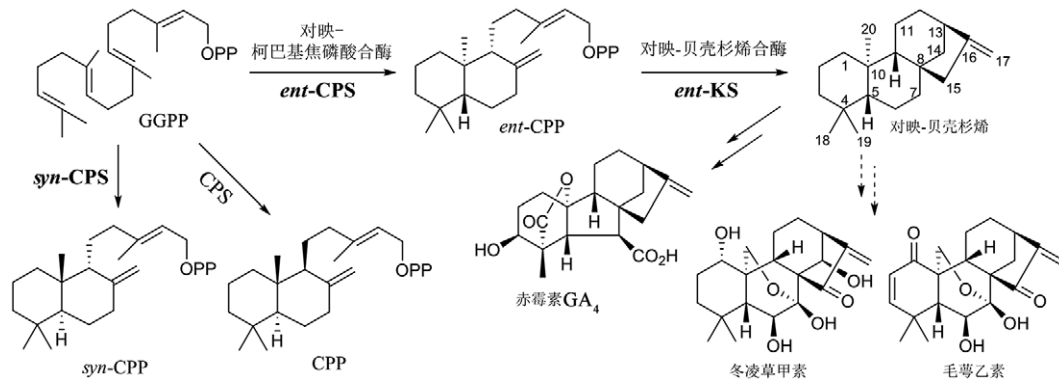


图1 赤霉素和香茶菜对映-贝壳杉烷型二萜的生物合成

Fig.1 Biosynthetic pathway for GA and *Isodon ent*-kaurane diterpenoids

虚线表示未知酶反应。

酶催化的立体化学特异性决定了酶在生物合成中可能参与的特定代谢通路, 对于二萜合酶diTPS尤其如此, 因为diTPS既参与初级代谢如赤霉素的生物合成, 也在次级代谢中扮演主角(Gong等2014)。例如, 水稻表达的3个CPS基因包括*OsCPS1*、*OsCPS2*和*OsCPS4*, 其中*OsCPS1*和*OsCPS2*编码的酶催化GGPP生成*ent*-CPP, 与下游不同的I型diTPS配合, 分别负责赤霉素和防卫素(oryzalides A-C, oryzalexins A-F, phytocassanes A-E)的生物合成(Cho等2004; Otomo等2004; Pristic等2004; Sakamoto等2004; Xu等2007); 而*OsCPS4*编码的酶则催化GGPP生成*syn*-CPP(图1), 和相应的diTPS组成另外的代谢通路形成oryzalexin S和具有防卫/化感双重功能的momilactones(Nemoto等2004; Otomo等2004; Wilderman等2004; Xu等2004)。此外, 药用植物丹参(*Salvia miltiorrhiza*)负责丹参酮生物合成的SmCPS酶催化GGPP生成normal型(9*S*,10*S*)-CPP

(CPP, 图1), 后者在SmKSL(kaurene synthase-like)酶的作用下发生环合反应形成松香烷型(abietane-type)二萜骨架, 丹参SmCPS和SmKSL酶催化的立体化学特异性在被子植物中还是首次报道(Gao等2009)。前期研究中, 我们采取同源基因克隆法从毛萼香茶菜叶片获得了3条II型二萜合酶CPS的同源基因, 分别命名为*IeCPS1*、*IeCPS2*和*IeCPS2a*, 通过大肠杆菌异源表达和GC-MS鉴定催化活性, 证明*IeCPS1*和*IeCPS2*的重组蛋白能够催化GGPP形成产物柯巴醇(copalol, 来自经碱性磷酸酶水解的CPP), 但GC-MS标准谱库没有列入特定构型的柯巴醇, 因此其立体构型并未确定(Li等2012)。缺乏立体特异性研究的酶化学证据, 也就难以确定*IeCPS*的酶功能及其参与的代谢通路。

本文用异源表达的*IeCPS1*和*IeCPS2*分别与拟南芥I型二萜合酶对映-贝壳杉烯合酶(*ent*-型AtKS)配对进行酶偶联反应, 添加CPS酶底物GGPP, 酶联

反应产物通过气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)鉴定为对映-贝壳杉烯,说明偶联反应中的IeCPS酶催化GGPP产生了 ent -CPP,后者被 ent -型特异的AtKS催化形成对映-贝壳杉烯产物。从而证实香茶菜IeCPS1和IeCPS2酶催化的立体特异性为对映型,是对映型柯巴基焦磷酸合酶(ent -CPS)。以上酶化学证据进一步表明, IeCPS1和IeCPS2很可能参与香茶菜对映-贝壳杉烯型二萜的生物合成。

材料与amp;方法

1 实验材料、仪器和试剂

从柳杉叶子精油制备的对映-贝壳杉烯标准品由台湾大学森林资源系张惠婷馈赠(郑森松等2006)。GGPP (geranylgeranyl diphosphate)购自Sigma, 镍离子螯合层析介质(Ni-NTA agarose)购自Qiagen。反转录试剂盒SuperScript™ III First-strand Synthesis system for RT-PCR购自Invitrogen, 内切酶购自Fermentas (MBI), PCR试剂及克隆试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara), 引物合成及测序由上海生工生物公司完成。

气相色谱-质谱联用仪型号为Agilent HP6890/5973。

2 实验方法

2.1 拟南芥AtKS基因的克隆和异源表达

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) Columbia-0生态型植株幼苗总RNA经过反转录得到1st cDNA, 根据AtKS基因(GenBank登录号NM_106594.3)序列合成特异的上游引物5' AGTCGTCAAGGCTAATTC-GT 3'和下游引物5' CAAACCTCTTCTTGTTCTGA 3', 以1st cDNA为模板进行PCR扩增, 胶回收PCR产物连接到pMD18T载体(Takara), 测序验证序列正确的质粒用于构建表达质粒。

AtKS的N端质体信号肽长度为29个氨基酸, 设计去除信号肽的上游引物5' CGGATCCGCTAA-CAATGTGAGCTT 3' (下划线表示BamHI酶切位点) 和下游引物5' CCCTCGAGTCAAGTTA-AAGATTCT 3' (下划线表示XhoI酶切位点), 用高保真酶PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara)扩增不含信号肽编码区的AtKS基因, 连接到大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达载体pET32a(+). 经测序

确认DNA序列正确后, 将表达质粒转入大肠杆菌表达菌株BL21 (DE3), 进行融合蛋白的诱导表达。加入诱导剂IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, 终浓度0.1 mmol·L⁻¹) 在20 ℃ 诱导12 h, 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳检测重组蛋白的表达量和可溶性, 融合表达的去信号肽AtKS蛋白分子量大约为104 kDa。诱导表达菌经过8 000×g、4 min离心5 min收集菌体, 液氮速冻后-80 ℃ 保存。

参照我们已发表的文章(Li等2012)将香茶菜IeCPS1全长序列和IeCPS2去信号肽编码区的序列分别载入pET32a(+), 在大肠杆菌BL21 (DE3)中实现异源表达, 加入诱导剂IPTG (终浓度0.2 mmol·L⁻¹) 在15 ℃ 诱导18 h。融合表达的IeCPS1和IeCPS2分子量应分别为81和104 kDa。

2.2 重组酶的纯化

从-80 ℃ 取出保存的诱导菌(50 mL菌液来源)置冰上化冻, 加入2.0 mL超声缓冲液(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5或8.5)分成5管, 分别在冰乙醇中间歇超声破碎3 min, 取20 μL作为含可溶蛋白及包涵体的全蛋白电泳样品; 然后12 000×g、4 min离心10 min收集上清液, 取20 μL作为可溶蛋白电泳样品, 其余上清液中加入300 mmol·L⁻¹ NaCl和2 mmol·L⁻¹ 咪唑, 转移到镍离子螯合层析柱(Ni-NTA agarose, 2.0 mL), 与介质混匀后置冰浴缓缓摇晃1 h, 然后依次用3 mL洗涤缓冲液(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5或8.5, 500 mmol·L⁻¹ NaCl, 50 mmol·L⁻¹ 咪唑)、3 mL洗脱缓冲液(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5或8.5, 500 mmol·L⁻¹ NaCl, 200 mmol·L⁻¹ 咪唑)过柱, 分别收集流出液并取样电泳; 含有融合表达蛋白的洗脱液立即用Sephadex G-25 (GE Health)脱盐, 用50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液(pH 7.5或8.0)平衡及洗脱; 收集到的蛋白组分经过6 000×g、4 min离心浓缩(Amicon Ultra-15, Millipore)至300 μL左右, 加入甘油8%、5 mmol·L⁻¹ MgCl₂、2 mmol·L⁻¹ DTT, 立即进行酶反应或冰浴暂时保存。

上述pH 8.5及8.0的缓冲液分别用于拟南芥AtKS重组酶的纯化及最后的脱盐处理, 而IeCPS1和IeCPS2重组酶的纯化过程始终采用pH 7.5的缓冲液。

2.3 酶偶联反应

5 mL磨口玻璃管内依次加入10 μL GGPP溶液

(1 mg·mL⁻¹, Sigma)、150 μL IeCPS1或IeCPS2纯化酶液、以及150 μL AtKS纯化酶液, 轻轻混匀, 用磨口塞密封管口, 30 ℃水浴6 h进行酶反应。

剩余的150 μL酶液分别加入5 μL GGPP作为单酶反应对照, 同样在30 ℃水浴6 h; 之后往反应体系中加入10mg碱性磷酸酶(1.7 U·mg⁻¹, Sigma P-3877), 37 ℃水浴3 h。

往上述酶反应管内加入2倍体积的正己烷萃取2遍, 经4 000×g、3 min离心分层, 用玻璃吸管将上层正己烷相转入干净的玻璃管中; 加入0.2 g无水Na₂SO₄干燥1 h, 将正己烷相转移到质谱瓶中, 抽气挥发或吹氮气浓缩至30 μL; 进行GC-MS检测, 上样2.0 μL。同时检测对映-贝壳杉烯标准品。

2.4 GC-MS检测条件

GC: HP-5MS石英毛细管柱(30 mm×0.25 mm×0.25 μm); 柱温起始温度60 ℃, 保持5 min, 程序升温10 ℃·min⁻¹至260 ℃, 保持50 min; 柱流量为1.0 mL·min⁻¹; 进样口温度250 ℃; 柱前压100 kPa; 分流比10:1; 载气为高纯氮气。

MS: 电离方式EI; 电子能量70 eV; 传输线温度250 ℃; 离子源温度230 ℃; 四极杆温度150 ℃; 质量范围35~450; 采用wiley7n.1标准谱库检索进行化合物定性分析。

结果与讨论

1 拟南芥*ent-KS*的融合表达

SDS-PAGE电泳检测表明, 去信号肽的拟南芥对映-贝壳杉烯合酶AtKS在pET32a(+)/大肠杆菌BL21 (DE3)表达体系中, 以包涵体的形式大量表达融合蛋白。但是, 随着超声缓冲液pH值从7.5升高到8.5, 融合蛋白的可溶性明显增加。因此, 选定pH值为8.5的缓冲液用于拟南芥AtKS重组酶的纯化, 该缓冲液中融合表达的蛋白质表现为部分可溶(图2)。考虑到pH值过高可能不利于酶反应, 因此脱盐时更换为pH 8.0的缓冲液, 随后浓缩并立即加入甘油、MgCl₂和DTT等酶反应成分。融合表达的IeCPS1也是部分可溶, 而IeCPS2则几乎完全可溶(图2), 与我们之前报道的研究结果一致(Li等2012)。

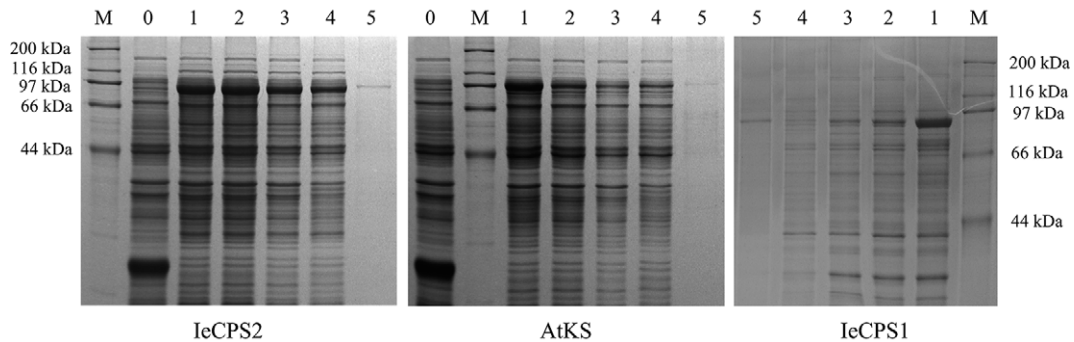


图2 IeCPS1和IeCPS2在pET32a(+)/大肠杆菌BL21 (DE3)中的表达及重组酶的纯化

Fig.2 Expression of IeCPSs and IeCPS2 in pET32a(+)/*E. coli* BL21 (DE3) and purification of recombinant fusion proteins

0: 空载体; 1: 全蛋白(含可溶蛋白及包涵体); 2: 可溶蛋白; 3: 穿透液; 4: 洗涤液; 5: 洗脱液(纯化酶)。

2 酶催化的立体特异性

将单酶反应作为对照, 一方面是为了明确异源表达的IeCPS纯化酶是否具有预期的酶活性, 即催化GGPP生成CPP, 后者经碱性磷酸酶水解产生能够被GC-MS检测到的二萜成分柯巴醇。另一方面, 通过GC-MS检测单个酶与底物GGPP保温是否能产生只有配对酶偶联反应才能形成的特定产物对映-贝壳杉烯, 佐证特定产物来自于酶偶联反应。如图3所示, 重组酶IeCPS2的产物峰(24.59

min)质谱图与标准谱库检索到的柯巴醇质谱图无论是分子(m/z 290)还是主要子离子(m/z 275、257、137和109), 都一一吻合, 表明本实验的IeCPS2纯化酶具有预期的酶催化活性。IeCPS1的产物峰也同样如此。另外, 所有单酶反应包括AtKS或IeCPS纯化酶单独与底物GGPP进行酶反应, 都没有检测到化合物对映-贝壳杉烯。

根据GC-MS的检测结果, 对映-贝壳杉烯标准品的保留时间在22.92 min, 其主要质谱峰为 m/z

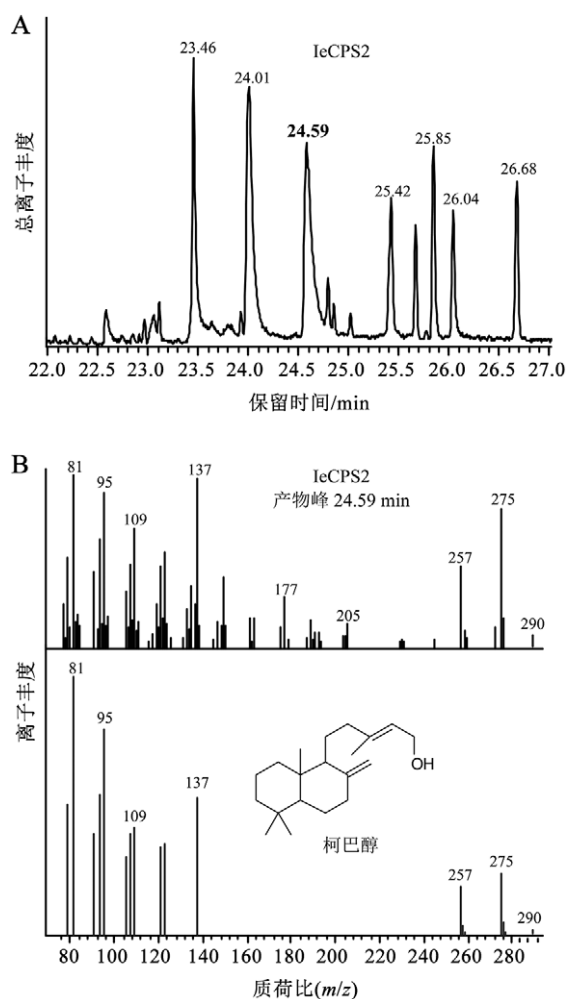


图3 GC-MS检测IeCPS2酶产物去磷酸化形成的柯巴醇
 Fig.3 GC-MS analyses of the dephosphorylated reaction products from GGPP produced by purified recombinant IeCPS2
 分子量 290 Da, 保留时间24.59 min. A: 气相色谱图; B: 质谱图, 其中标注化学结构的为wiley7n.l标准谱库检索到的柯巴醇质谱图。

272、257、229、213、187和147等, 比较标准谱库的对映-贝壳杉烯质谱图, 两者完全一致(图4)。当纯化的IeCPS1和IeCPS2分别与AtKS配对进行酶偶联反应, 产物经GC-MS检测发现保留时间为22.88 min的产物峰, 进一步分析其质谱图与对映-贝壳杉烯标准品的质谱图相吻合, 根据保留时间和质谱确定该产物为对映-贝壳杉烯(图4)。说明偶联反应中的IeCPS酶催化GGPP产生了 ent -CPP, 后者被 ent -型特异的AtKS酶催化形成对映-贝壳杉烯产物, 从而证实香茶菜IeCPS1和IeCPS2酶催化的立体特异性为对映型, 是对映型柯巴基焦磷酸合酶(ent -CPS)。

已有研究表明, 在相当一部分二萜化合物的生物合成中, 前体分子GGPP都要接连发生两步环合/重排反应。其中, 第一次环合反应由II型diTPS催化GGPP环合形成类似于CPP的双环焦磷酸酯中间体, 紧接的第二次环合与(或)重排反应由I型diTPS负责完成。被子植物和细菌通常利用两个不同的单功能diTPS通过串联催化完成上述的两步环合反应(Caniard等2012; Gong等2014; Morrone等2009; Sallaud等2012; Smanski等2011; Xu等2014), 而裸子植物(Martin等2004; Vogel等1996; Zerbe等2012)、苔藓与石松类植物(Hayashi等2006; Mafu等2011)、以及真菌(Kawaide等1997; Oikawa等2001)往往采用合二为一的双功能diTPS催化GGPP的两步环合反应。

GGPP在立体特异性不同的II型二萜合酶CPS酶催化下, 相应形成立体构型也不一样的CPP产物, 迄今已被证明相关生物合成二萜合酶的CPP有3种构型, 分别是 ent -CPP、 syn -CPP以及 $normal$ 型的CPP。其中, ent -和 $normal$ 型CPS二萜合酶比较常见, ent -CPS参与诸如赤霉素、甜菊苷(Richman等1999)、平板霉素(platensimycin; Smanski等2011)的生物合成; 已证实 $normal$ 型CPS负责丹参酮生物合成中的GGPP环合产生 $normal$ 型CPP (Gao等2009), 裸子植物形成松脂(rosin)以及银杏内酯(ginkgolide)也要经过 $normal$ 型CPP中间体继而发生第二次环合, 但这两步环合反应是由同一个酶(双功能)催化完成的(Martin等2004; Schepmann等2001; Vogel等1996)。目前, 有报道的 syn -CPS还非常之少, 仅见于水稻防卫素二萜生物合成中的Os-CPS4 (Nemoto等2004; Otomo等2004; Wilderman等2004; Xu等2004)、以及真菌(*Phomabetae*)产生抗肿瘤活性天然小分子aphidicolin时采用的双功能二萜合酶aphidicolan-16 β -ol synthase (Oikawa等2001)。

酶产物的立体构型决定酶催化的立体化学特异性。如果产物为新化合物, 则必须直接分离纯化并通过波谱学以及晶体学进行结构鉴定, 需要的酶产物量比较大(毫克级)。产物若是已知化合物, 则要求同标准品比对分析。在缺乏标准品的情况下, 可以同已知立体化学特异性的酶进行偶联反应, 实现功能互补并生成绝对构型已知的产

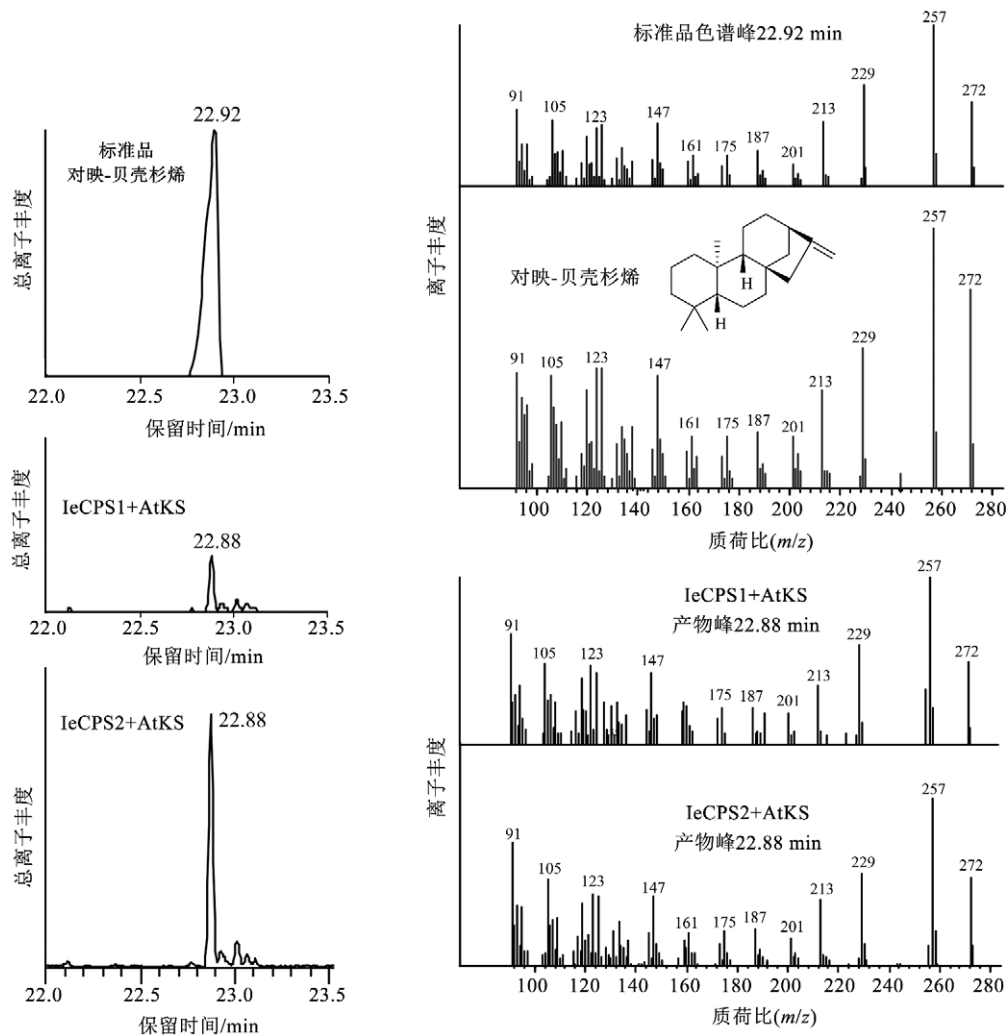


图4 GC-MS检测对映-贝壳杉烯标准品及IeCPS1或IeCPS2分别与AtKS酶偶联反应产物

Fig.4 GC-MS analyses of *ent*-kaurene as an authentic standard and enzyme assay products from GGPP produced by IeCPS1 or IeCPS2 coupled with AtKS

左边为气相色谱图; 右边是质谱图, 其中标注化学结构的为wiley7n.1标准谱库检索到的对映-贝壳杉烯质谱图。

物, 从而确定未知酶产物的构型。运用配对酶偶联法, Gao等(2009)、Keeling等(2010)和Xu等(2007)分别对丹参、云杉和水稻二萜合酶的立体特异性进行了鉴定, 并由此推测二萜合酶基因功能的进化关系。在本实验中, 我们采用酶偶联法将未知立体特异性的IeCPS同已知*ent*-型特异的拟南芥AtKS配对, 添加IeCPS的酶反应底物GGPP, 酶联反应产物通过GC-MS鉴定为对映-贝壳杉烯, 说明偶联反应中的IeCPS酶催化GGPP产生了*ent*-CPP, 后者被*ent*-型特异的AtKS酶催化而形成对映-贝壳杉烯产物, 从而证实香茶菜IeCPS1和IeCPS2酶催化的立体特异性为对映型, 是对映型二萜合酶(*ent*-

CPS)。以上酶化学证据进一步表明, IeCPS1和IeCPS2很可能参与香茶菜对映-贝壳杉烯型二萜的生物合成, 而IeCPS1还可能参与赤霉素的生物合成, 因为毛萼香茶菜萌发种子显著表达*IeCPS1*基因(Li等2012)。

参考文献

- 孙汉董, 许云龙, 姜北(2001). 香茶菜属植物二萜化合物. 北京: 科学出版社, 4~115
- 杨海燕, 刘成前, 卢山(2010). 异戊二烯类植物激素赤霉素和脱落酸的代谢调控. 植物生理学通讯, 46 (11): 1083~1091
- 张迎迎, 何祖华(2010). 高等植物赤霉素的代谢与信号转导. 植物生理学通讯, 46 (7): 623~630
- 郑森松, 张惠婷, 古惠菁, 古乔云, 张上镇(2006). 黑心柳杉造林木精

- 油及其成分之抗真菌活性. 中华林学季刊, 39 (4): 557~574
- Caniard A, Zerbe P, Legrand S, Cohade A, Valot N, Magnard JL, Bohlmann J, Legendre L (2012). Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. *BMC Plant Biol*, 12: 119
- Cho EM, Okada A, Kenmoku H, Otomo K, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Sassa T, Yajima A, Yabuta G, Mori K et al (2004). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding *ent*-cassa-12,15-diene synthase, a putative diterpenoid phytoalexin biosynthetic enzyme, from suspension-cultured rice cells treated with a chitin elicitor. *Plant J*, 37 (1): 1~8
- Gao W, Hillwig ML, Huang L, Cui G, Wang X, Kong J, Yang B, Peters RJ (2009). A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights. *Org Lett*, 11 (22): 5170~5173
- Gong HY, Zeng Y, Chen XY (2014). Diterpene synthases and their responsible cyclic natural products. *Nat Prod Bioprospect*, 4 (2): 59~72
- Hayashi K, Kawaide H, Notomi M, Sakigi Y, Matsuo A, Nozaki H (2006). Identification and functional analysis of bifunctional *ent*-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS Lett*, 580 (26): 6175~6181
- Kawaide H, Imai R, Sassa T, Kamiya Y (1997). *ent*-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. *J Biol Chem*, 272 (35): 21706~21712
- Keeling CI, Dullat HK, Yuen M, Ralph SG, Jancsik S, Bohlmann J (2010). Identification and functional characterization of monofunctional *ent*-copalyl diphosphate and *ent*-kaurene synthases in white spruce reveal different patterns for diterpene synthase evolution for primary and secondary metabolism in gymnosperms. *Plant Physiol*, 152 (3): 1197~1208
- Kong LM, Deng X, Zuo ZL, Sun HD, Zhao QS, Li Y (2014). Identification and validation of p50 as the cellular target of ericalyxin B. *Oncotarget*, 5 (22): 11354~11364
- Li JL, Chen QQ, Jin QP, Gao J, Zhao PJ, Lu S, Zeng Y (2012). *IeCPS2* is potentially involved in the biosynthesis of pharmacologically active *Isodon*diterpenoids rather than gibberellin. *Phytochemistry*, 76: 32~39
- Lu Y, Chen B, Song JH, Zhen T, Wang BY, Li X, Liu P, Yang X, Zhang QL, Xi XD et al (2013). Eriocalyxin B ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing Th1 and Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (6): 2258~2263
- Mafu S, Hillwig ML, Peters RJ (2011). A novel labda-7,13E-dien-15-ol-producing bifunctional diterpene synthase from *Selaginella moellendorffii*. *Chem Bio Chem*, 12 (13): 1984~1987
- Martin DM, 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
- Morrone D, Chambers J, Lowry L, Kimc G, Anterola A, Bender K, Peters RJ (2009). Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate *ent*-copalyl diphosphate and *ent*-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Lett*, 583 (2): 475~480
- Nemoto T, Cho EM, Okada A, Okada K, Otomo K, Kanno Y, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Sassa T, Minami E et al (2004). Stemar-13-ene synthase, a diterpene cyclase involved in the biosynthesis of the phytoalexin oryzalexin S in rice. *FEBS Lett*, 571: 182~186
- Oikawa H, Toyomasu T, Toshima H, Ohashi S, Kawaide H, Kamiya Y, Ohtsuka M, Shinoda S, Mitsuhashi W, Sassa T (2001). Cloning and functional expression of cDNA encoding aphidicolan-16 β -ol synthase: a key enzyme responsible for formation of an unusual diterpene skeleton in biosynthesis of aphidicolin. *J Am Chem Soc*, 123 (21): 5154~5155
- Otomo K, Kenmoku H, Oikawa H, Konig WA, Toshima H, Mitsuhashi W, Yamane H, Sassa T, Toyomasu T (2004). Biological functions of *ent*- and *syn*-copalyl diphosphate synthases in rice: key enzymes for the branch point of gibberellin and phytoalexin biosynthesis. *Plant J*, 39 (6): 886~893
- Peters RJ (2010). Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. *Nat Prod Rep*, 27 (11): 1521~1530
- Prisic S, Xu MM, Wilderman PR, Peters RJ (2004). Rice contains two disparate *ent*-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiol*, 136 (4): 4228~4236
- Richman AS, Gijzen M, Starratt AN, Yang ZY, Brandle JE (1999). Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *Plant J*, 19 (4): 411~421
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K et al (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*, 134 (4): 1642~1653
- Sallaud C, Giacalone C, Töpfer R, Goepfert S, Bakaher N, Rösti S, Tissier A (2012). Characterization of two genes for the biosynthesis of the labdane diterpene *Z*-abienol in tobacco (*Nicotiana tabacum*) glandular trichomes. *Plant J*, 72 (1): 1~17
- Schepmann HG, Pang J, Matsuda SPT (2001). Cloning and characterization of *Gink gobiloba* levopimaradiene synthase, which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 392 (2): 263~269
- Smanski MJ, Yu Z, Casper J, Lin S, Peterson RM, Chen Y, Wendt-Pienkowski E, Rajska SR, Shen B (2011). Dedicated *ent*-kaurene and *ent*-atiserene synthases for platensimycin and platencin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (33): 13498~13503
- Sun HD, Huang SX, Han QB (2006). Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities. *Nat Prod Rep*, 23 (5): 673~698
- Vogel BS, Wildung MR, Vogel G, Croteau R (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 L, Zhao WL, Yan JS, Liu P, Sun HP, Zhou GB, Weng ZY, Wu WL, Weng XQ, Sun XJ et al (2007). Eriocalyxin B induces apoptosis of t (8;21) leukemia cells through NF- κ B and MAPK signaling pathways and triggers degradation of AML1-ETO on-

- coprotein in a caspase-3-dependent manner. *Cell Death Differ*, 14 (2): 306~317
- Wilderman PR, Xu M, Jin Y, Coates RM, Peters RJ (2004). Identification of *syn-pimara-7,15-diene* synthase reveals functional clustering of terpene synthases involved in rice phytoalexin/allelochemical biosynthesis. *Plant Physiol*, 135 (4): 2098~2105
- Xu M, Hillwig ML, Lane AL, Tiernan MS, Moore BS, Peters RJ (2014). Characterization of an orphan diterpenoid biosynthetic operon from *Salinispora arenicola*. *J Nat Prod*, 77: 2144~2147
- Xu M, Hillwig ML, Pristic S, Coates RM, Peters RJ (2004). Functional identification of rice *syn-copalyl diphosphate synthase* and its role in initiating biosynthesis of diterpenoid phytoalexin/allelopathic natural products. *Plant J*, 39 (3): 309~318
- Xu M, Wilderman PR, Morrone D, Xu J, Roy A, Margis-Pinheiro M, Upadhyaya NM, Coates RM, Peters RJ (2007). Functional characterization of the rice kaurene synthase-like gene family. *Phytochemistry*, 68 (3): 312~326
- Yamaguchi S (2006). Gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Phytochem Rev*, 5 (1): 39~47
- Zerbe P, Chiang A, Yuen M, Hamberger B, Hamberger B, Draper JA, Britton R, Bohlmann J (2012). Bifunctional *cis-abienol synthase* from *Abies balsamea* discovered by transcriptome sequencing and its implications for diterpenoid fragrance production. *J Biol Chem*, 287 (15): 12121~12131