

植物五环三萜类化合物生物合成途径研究进展

李传旺^{1,2}, 张 贺^{1,2}, 饶 攀^{1,2}, 郑东然^{1,2}, 王 宇^{1,2*}, 李玉花^{1,2*}

1. 黑龙江省植物天然活性物质的生物合成与利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 东北林业大学 东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 五环三萜类化合物是一类重要的植物次生代谢产物, 由 6 个异戊二烯单元组成, 在自然界中普遍存在, 具有广泛的药理作用。五环三萜类化合物结构丰富多样, 根据其苷元不同, 可分为齐墩果烷型、羽扇豆烷型、乌苏烷型和木栓烷型 4 大类。植物五环三萜类化合物主要由甲羟戊酸途径和戊糖磷酸途径合成, 2,3-环氧角鲨烯前体在氧化鲨烯环化酶的作用下环化为不同的骨架, 继而在细胞色素 P450 以及糖基转移酶的修饰下形成多种皂苷。综述了植物五环三萜类化合物生物合成途径的研究进展, 对参与合成途径的关键家族基因进行系统分析和催化机制的解读, 为寻找未知五环三萜类化合物生物合成途径关键基因和五环三萜化合物异源生物合成提供参考。

关键词: 五环三萜; 氧化鲨烯环化酶; 细胞色素 P450; 糖基转移酶; 生物合成

中图分类号: R284.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)11-3436-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.032

Research progress on biosynthesis pathway of pentacyclic triterpenoids in plants

LI Chuan-wang^{1,2}, ZHANG He^{1,2}, RAO Pan^{1,2}, ZHENG Dong-ran^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, LI Yu-hua^{1,2}

1. Heilongjiang Key Laboratory of Plant Bioactive Substance Biosynthesis and Utilization, Harbin 150040, China

2. Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Pentacyclic triterpenoids are secondary metabolites from plants composed of six isoprene units, which are ubiquitous in nature with extensive pharmacological effects. Pentacyclic triterpenoids display a variety of structures. Based on the carbon skeleton, they are divided into four common subgroups: oleanane, lupane, ursane, and xylene. Biosynthesis of pentacyclic triterpenoids in plants proceeds via mevalonate pathway and 2-C-methyl-derythritol 4-phosphate pathway. Under the catalysis of oxidosqualene cyclase, 2,3-oxidosqualene is biosynthetically oxidized to various cyclic triterpene skeletons. Cyclized triterpenes are further oxidized by cytochrome P450-dependent monooxygenases and subsequently glycosylated by uridine diphosphate-glucosyltransferases to form various saponins. Research progress on biosynthesis pathway of pentacyclic triterpenoids in plants are reviewed in this paper. In addition, key family genes involved in the synthesis pathway are systematically analyzed and catalytic mechanism is interpreted, in order to provide a reference for finding key genes for biosynthesis pathway of pentacyclic triterpenoids and heterobiosynthesis of pentacyclic triterpenoids.

Key words: pentacyclic triterpenes; oxidosqualene cyclase; cytochrome P450; glycosyltransferase; biosynthesis

萜类是分子骨架以异戊二烯单元为基本结构单元的化合物及其衍生物, 普遍存在于自然界中, 是构成植物香精、树脂、色素等次生代谢物的主要成分。根据萜类分子中异戊二烯单位数目的不同可分

为单萜、倍半萜、二萜、二倍半萜、三萜、四萜、多聚萜等。三萜类化合物是一类基本母核由 30 个碳原子组成的重要植物次生代谢产物, 在自然界中以游离形式或与糖结合成苷或酯的形式广泛存在,

收稿日期: 2020-11-10

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发重大项目 (GA16C106); 中央高校基本科研业务费项目 (2572016BA06, 2572018CP04)

作者简介: 李传旺, 硕士研究生, 研究方向为发育生物学。E-mail: 996266577@qq.com

*通信作者: 李玉花, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为发育生物学。E-mail: lyhshen@126.com

王 宇, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为发育生物学。E-mail: wangyu@nefu.edu.cn

具有抗癌、抗病毒、降低胆固醇等药理作用。三萜类物质根据结构中含环数量的不同又分为单环三萜、双环三萜、三环三萜、四环三萜和五环三萜等,其中四环三萜和五环三萜化合物种类较多。五环三萜类化合物的碳骨架存在多种修饰类型,结构复杂

多样,使其具有多种功能而被广泛关注。根据其苷元的不同,可分为齐墩果烷型(如齐墩果酸、甘草酸和山楂酸)、羽扇豆烷型(如白桦酸、羽扇豆醇和白桦脂醇)、乌苏烷型(如熊果酸和积雪草酸)和木栓烷型(如雷公藤红素)4 大类,见图 1。

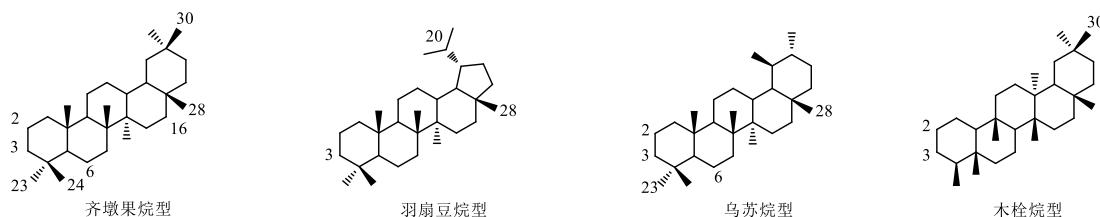


图 1 五环三萜化合物的 4 种主要类型

Fig. 1 Four main types of pentacyclic triterpenoids

五环三萜类化合物具有广泛的药理作用和重要的生物活性,尤其在抗炎、降血糖、抗肿瘤以及抗艾滋病等方面已经显现良好的药理特性。如白桦脂醇能通过增加脂肪细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) 的活性,增强胰岛素刺激葡萄糖的吸收^[1];熊果酸可通过减少视网膜血管内皮生长因子、环氧化酶-2 和基质金属蛋白酶 2 表达,抑制新生血管的形成,通过抵抗氧化应激延缓糖尿病视网膜病变的发展^[2];积雪草酸通过抑制氧化应激和恢复线粒体功能,改善缺血/再灌注诱导的大鼠肝损伤和缺氧/复氧诱导的大鼠肝线粒体损伤^[3];此外, Jamkhane 等^[4]研究发现山楂酸具有与抗坏血酸类似的抗氧化活性。近些年来,研究者们不仅对五环三萜类化合物药理学功能的研究日益增多,而且更多研究者开始关注对五环三萜类化合物生物合成途径的解析,并取得了一些进展。

1 五环三萜类化合物骨架的合成

植物三萜类化合物的合成主要是通过胞质中的甲羟戊酸 (mevalonate, MVA) 途径和质体中的甲基赤藓糖醇磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径。质体中由丙酮酸和甘油醛-3-磷酸经由 7 个酶反应来合成异戊烯二磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP), IPP 被运输至胞质中参与萜类合成。在 IPP 异构酶 (isopentenyl diphosphate-isomerase, IDI) 的作用下, IPP 与二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 相互转换。在胞质的 MVA 途径中,乙酰辅酶 A 为初始供体生成 IPP; IPP 与 DMAPP 在二磷酸合成酶 (farnesyl pyrophosphate synthase, FPS) 作用下转化

成二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP), 又在鲨烯合成酶 (squalene synthase, SQS) 的作用下合成角鲨烯, 然后经鲨烯环氧化酶 (squalene epoxidase, SE) 催化转变为 2,3-氧化鲨烯^[5]。2,3-氧化鲨烯经过氧化鲨烯环化酶 (oxido squalene cyclase, OSC) 的环化生成各种四环和五环三萜类骨架。然后这些骨架依赖细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450, CYP) 和以尿苷二磷酸 (uridine diphosphate glycoside, UDP) 为糖基供体的糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferase, UGT) 进行氧化、置换及糖基化等化学修饰, 最终生成各种五环三萜类化合物 (图 2)。

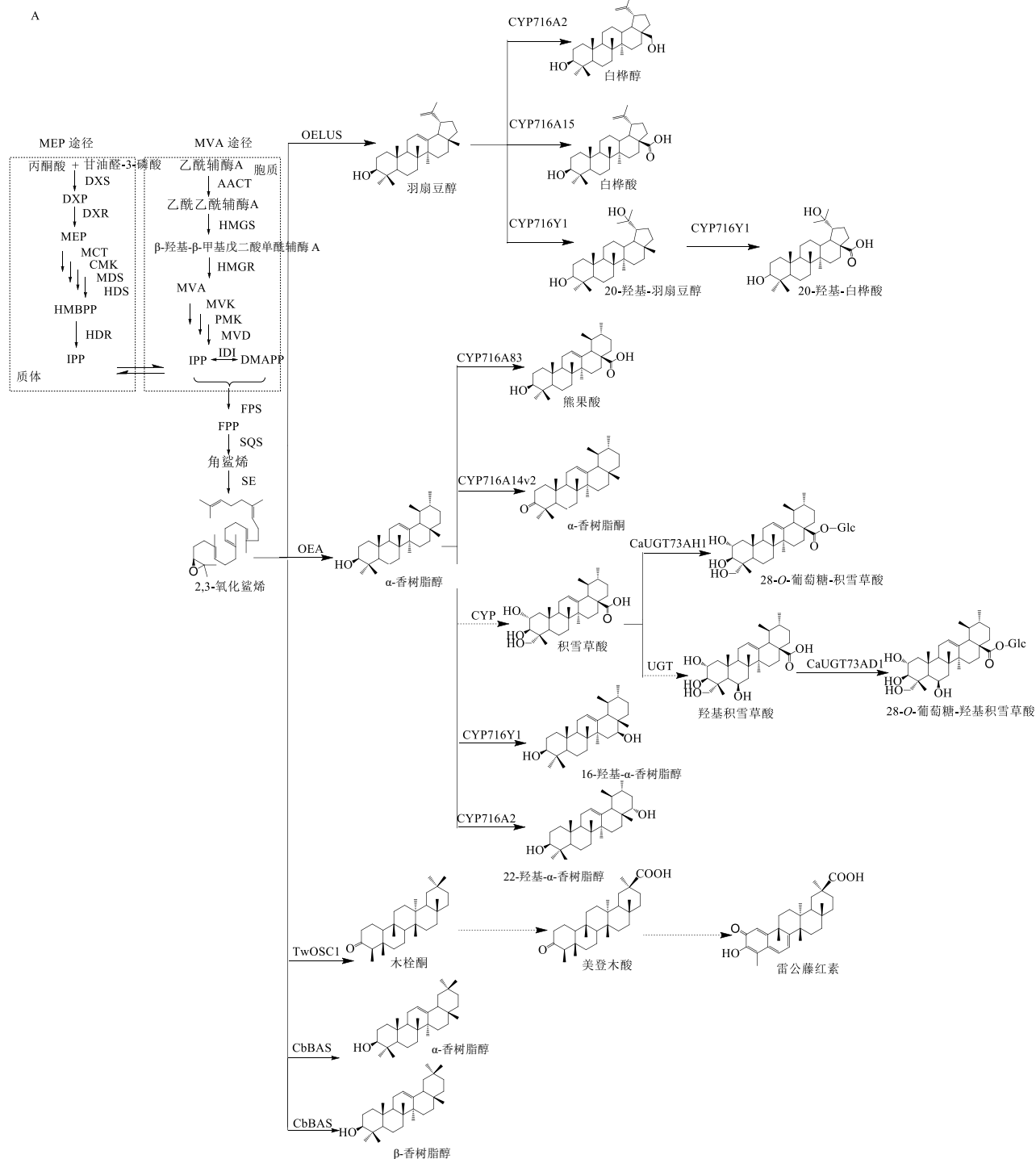
2 OSC 环化 2,3-氧化鲨烯生成五环三萜类化合物骨架

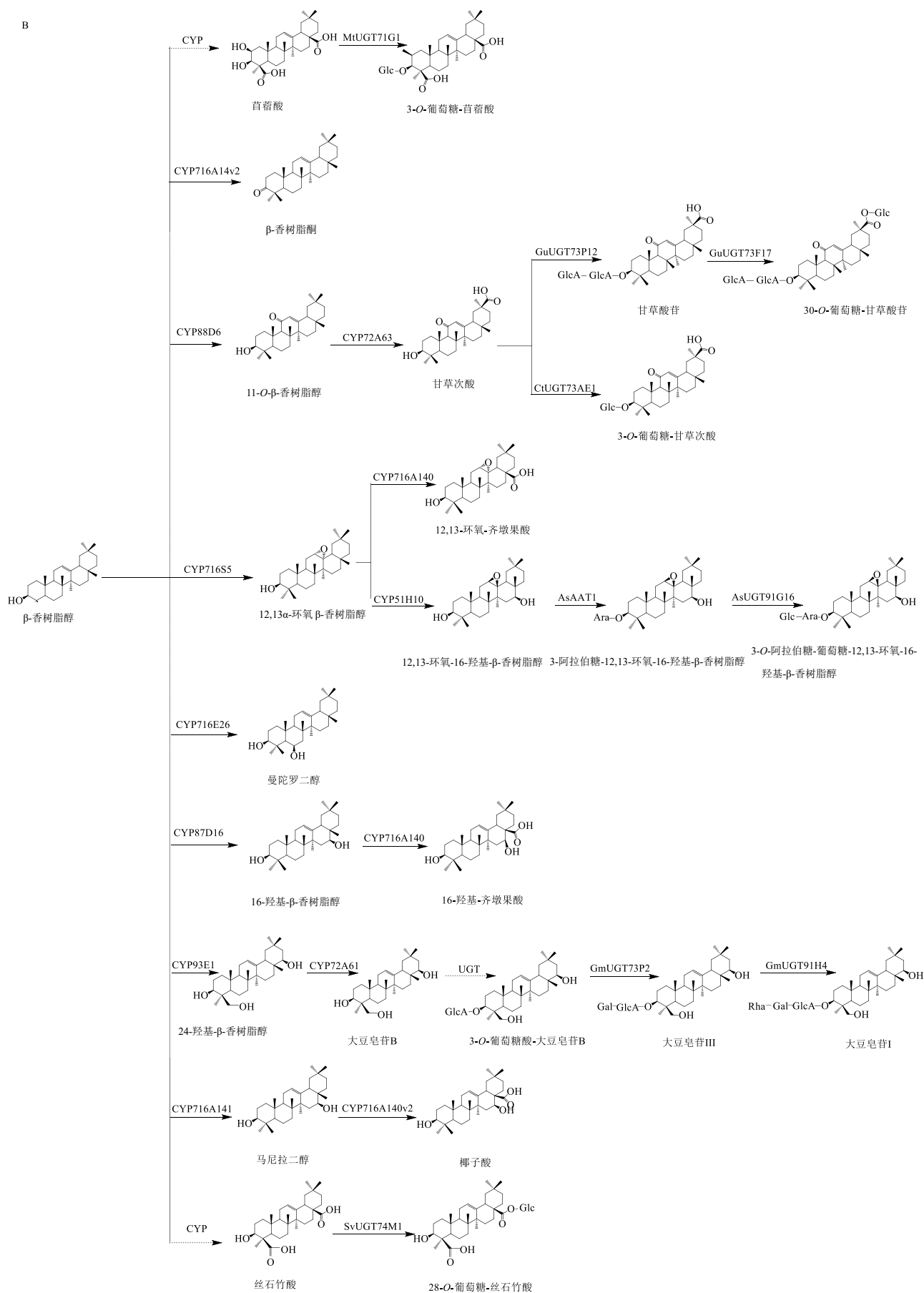
OSC 可催化 2,3-氧化鲨烯生成甾醇和三萜类前体物质, 是该反应的关键酶, 也是产生三萜类产物多样性的关键步骤。OSC 可催化 2,3-氧化鲨烯环化生成 100 多种不同碳骨架的三萜类化合物, 其催化的环化作用是经一系列的质子化、环化、重排和去质子化作用完成的。OSC 催化 2,3-氧化鲨烯环化为不同的构象而形成不同的三萜骨架, 如大多数四环骨架甾醇, 包括环阿屯醇、羊毛甾醇和帕克醇, 都是通过椅式-船式-椅式 (chair-boat-chair, C-B-C) 构象衍生出来的。而达玛烷型四环三萜骨架和大多数五环三萜骨架, 包括羽扇豆醇和 β -香树脂醇都是通过椅式-椅式-椅式 (chair-chair-chair, C-C-C) 构象的达玛烯基阳离子形成^[6]。OSC 以基因家族形式存在, 该家族成员具有 DCTAE 和 QW 等高度保守序列。保守序列 DCTAE 可能与底物结合相关, 保守序列 QW (QXXXXXW) 是带有负电性的芳香族氨基酸区域, 其作用是在 2,3-氧化鲨烯环化反应中稳

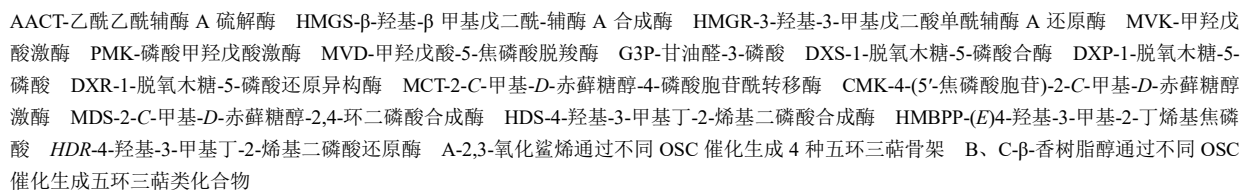
定碳阳离子, 这些重复序列可能与稳定蛋白质结构和其功能相关。

随着现代生物技术的不断发展, 越来越多的 OSC 基因被分离和克隆出来。截至目前已经在拟南芥、大豆、苜蓿、白桦、人参、甘草等植物中都发现了参与五环三萜类化合物生物合成的 OSC (表 1)。这些 OSC 主要催化生成 4 种不同的五环三萜骨架: α -香树脂醇、 β -香树脂醇、羽扇豆醇和木栓酮 (图 2-A)。有些植物

中存在多个 β -香树脂醇合成酶, 如苹果、人参和苜蓿等植物存在催化活性不同的 β -香树脂醇合成酶^[7-9], 且 OSC 基因具有组织表达特异性, 不同的 OSC 负责不同组织的三萜类化合物的合成; 而有些植物的 OSC 具有多重功能, 如雷公藤 TwOSC1 可以将 2,3-氧化鲨烯环化同时生成 β -香树脂醇、 α -香树脂醇和木栓酮^[10], 紫荆花 BfOSC1 可以将 2,3-氧化鲨烯环化同时生成 β -香树脂醇、 α -香树脂醇和羽扇豆醇^[11]。







AACT-acetoacetyl-CoA thiolase HMGS-3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A synthase HMGR-3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase MVK-mevalonate kinase PMK-phosphomevalonate kinase MVD-mevalonate 5-diphosphate decarboxylase G3P-glyceraldehyde 3-phosphate DXS-1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase DXP-1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate DXR-1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductase MCT-2-*C*-methyl-*D*-erythritol-4-phosphate cytidylyltransferase CMK-4-(cytidine-5'-diphosphate)-2-*C*-methyl-*D*-erythritol kinase MDS-2-*C*-methyl-*D*-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase HDS-1-hydroxy-2-methyl-2-*E*-butenyl-4-diphosphate synthase HMBPP-(*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphate HDR-1-hydroxy-2-methyl-3-*E*-butenyl-4-diphosphate reductase A-synthesis of four main types of pentacyclic triterpenoids catalyzed by different OSC from 2,3-oxidized squalene B and C-synthesis of pentacyclic triterpenoids catalyzed by different OSC from β -amyrin

图 2 五环三萜类化合物的合成途径

Fig. 2 Synthetic pathway of pentacyclic triterpenoids

表 1 五环三萜类化合物生物合成相关的 OSC 信息

Table 1 OSC related to biosynthesis of pentacyclic triterpenoids

名称	蛋白 ID	物种	产物	文献
CbBAS	ASW22752	康乃馨	β -香树脂醇	12
OEA	BAF63702	橄榄	α -香树脂醇	13
AsBAS1	CAC84558	燕麦	β -香树脂醇	14
BPY	BAB83088	白桦	β -香树脂醇	15
BPW	BAB83087	白桦	羽扇豆醇	15
EtAS	BAE43642	绿玉树	β -香树脂醇	16
GgBAS1	BAA89815	甘草	β -香树脂醇	17
MtAMY1	CAD23247	苜蓿	β -香树脂醇	8
MtBAS1	AAO33578	苜蓿	β -香树脂醇	8
PNY1	BAA33461	人参	β -香树脂醇	9
PNY2	BAA33722	人参	β -香树脂醇	9
PSY	BAA97558	豌豆	β -香树脂醇	18
BgbAS	BAF80443	木榄	β -香树脂醇	19
BgLUS	BAF80444	木榄	羽扇豆醇	19
cOSC1	BAE53429	莲花	β -香树脂醇	20
cOSC3	BAE53430	莲花	羽扇豆醇	20
NsbAS1	ACH88048	紫苜蓿	β -香树脂醇	21
SITTS1	ADU52574	番茄	β -香树脂醇	22
SvBS	ABK76265	王不留行	β -香树脂醇	23
GgLUS1	BAD08587	甘草	羽扇豆醇	24
OELUS	BAA86930	橄榄	羽扇豆醇	25
TRW	BAA86932	蒲公英	羽扇豆醇	25
TaOSC1	QIR30795	阿江榄仁	β -香树脂醇	26
TaOSC2	QIR30796	阿江榄仁	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	26
TaOSC4	QIR30798	阿江榄仁	羽扇豆醇	26
BfOSC1	BBI55112	紫荆花	β -香树脂醇、 α -香树脂醇、羽扇豆醇	11
BfOSC2	BBI55113	紫荆花	β -香树脂醇、羽扇豆醇	11
BfOSC3	BBI55114	紫荆花	α -香树脂醇	11
EjAS	AFP95334	枇杷	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	27
KsBAS1	ALO23119	刺楸	β -香树脂醇	28
CaDDS	AAS01523	积雪草	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	29
LsOSC1	AZS32327	大叶紫薇	β -香树脂醇、羽扇豆醇	30
LsOSC2	AZS32328	大叶紫薇	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	30
TcOSC3	QBO24613	蒲公英	β -香树脂醇	31
RcLUS	ABB76766	蓖麻	羽扇豆醇	32
WsLS	AGA17939	睡茄	羽扇豆醇	33
MdOSC1	ACM89977	苹果	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	7
MdOSC4	AMS36882	苹果	β -香树脂醇、羽扇豆醇	7
MdOSC5	AMS36883	苹果	β -香树脂醇、羽扇豆醇	7
TwOSC1	AWK97810	雷公藤	β -香树脂醇、 α -香树脂醇、木栓酮	10
TwOSC2	AWK97811	雷公藤	β -香树脂醇	10
TwOSC3	AWK97812	雷公藤	β -香树脂醇、 α -香树脂醇、木栓酮	10
TwOSC8	QBJ05694	雷公藤	β -香树脂醇	34
QsOSC1	QJX36710	软木橡树	羽扇豆醇	35
QsOSC2	QJX36711	软木橡树	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	35
QsOSC3	QJX36712	软木橡树	β -香树脂醇、木栓酮	35
CrAS1	AFJ19235	长春花	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	36
IaAS1	AIS39793	梅叶冬青	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	36
IaAS2	AIS39794	梅叶冬青	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	37
McBAS	BBN67122	苦瓜	β -香树脂醇	38

3 CYP450 对五环三萜类化合物的修饰

CYP450 是广泛存在于动物、植物、细菌及真菌等细胞内的血红素-铁硫蛋白,由血红素蛋白、黄素蛋白及磷脂组成,相对分子质量约 5×10^4 , 具有一个保守的血红素结构域。CYP450 家族成员之间的一级结构差异较大,但空间结构十分相似,均具有由含铁血红素和半胱氨酸组成的活性中心,活性中心的铁离子一侧与半胱氨酸的硫络合,另一侧与水中的氧分子络合。绝对保守的半胱氨酸与催化活性

中心亚铁血红素中铁元素形成硫醇盐离子键,成为铁的一个配体^[39],从而使 CYP450 中的铁能与一氧化碳络合,在波长 450 nm 处有最大吸收峰,CYP450 也由此得名。

目前,已鉴定出约 67 种 CYP450 可以修饰植物五环三萜类骨架(表 2),其中大多数属于 CYP716 家族成员。其他 CYP450 家族 CYP51、CYP71、CYP72、CYP87、CYP88 和 CYP93 也参与对五环三萜的修饰^[39]。

表 2 五环三萜化合物生物合成相关的 CYP450s 信息

Table 2 CYP450s related to biosynthesis of pentacyclic triterpenoids

名称	蛋白 ID	物种	功能	底物	文献
CYP716A154	AEX07772	长春花	C28 氧化	α -香树脂醇	40
CYP716A83	AOG74832	积雪草	C28 氧化	β -香树脂醇	41
CYP716A86	AOG74831	积雪草	C28 氧化	β -香树脂醇	41
CYP716A140	AOG74836	桔梗	C28 氧化	β -香树脂醇	41
CYP716A252	AFZ44057	甜香罗勒	C28 氧化	β -香树脂醇	42
CYP716A179	BAW34647	甘草	C28 氧化	α -香树脂醇	43
CYP716A14v2	AHF22083	青蒿	C3 氧化	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	44
CYP716A80	ALR73782	欧洲山芥	C28 氧化	β -香树脂醇	45
CYP716A141	AOG74838	桔梗	C28 氧化	β -香树脂醇	46
CYP716A44	XP_004239296	番茄	C28 氧化	α -香树脂醇	47
CYP716Y1	AHF45909	黑柴胡	C16 α 羟化	β -香树脂醇、 α -香树脂醇	48
CYP51H10	ABG88961	燕麦	C12-C13 β 环氧、C16 β -羟化	β -香树脂醇	49-50
CYP72A67	ABC59075	紫花苜蓿	C2 β -羟化	齐墩果酸、常春藤皂苷	51-53
CYP93E5	AIN25417	鹰嘴豆	C24 羟化	β -香树脂醇	54
CYP93E1	Q9XHC7	大豆	C24 羟化	β -香树脂醇	55-56
CYP87D16	AFH22090	披针杜茎山	C16 α 羟化	β -香树脂醇	57
CYP716A52v2	AFO63032	人参	C28 氧化	β -香树脂醇	58
CYP716A12	CBN88268	紫花苜蓿	C28 氧化	羽扇豆醇	59
CYP716A79	ANY30854	藜麦	C28 氧化	β -香树脂醇	60
CYP72A63	H1A981	紫花苜蓿	C30 氧化、C30 羟化	11-O- β -香树脂醇、齐墩果酸	61
CYP72A61	XP_003605471	紫花苜蓿	C22 羟化	24-羟基- β -香树脂醇	62
CYP72A68	XP_013463952	紫花苜蓿	C23 氧化	齐墩果酸、2 β -羟基-常春藤皂苷	63
CYP716A179	BAW34647	甘草	C28 氧化	β -香树脂醇	43
CYP716A110	AOG74847	洛矶山耬斗菜	C28 氧化	β -香树脂醇	41
CYP716A83	AOG74832	积雪草	C28 氧化	α -香树脂醇	41
CYP716A252	AFZ44057	甜香罗勒	C28 氧化	α -香树脂醇	42
CYP716A253	AFZ44058	甜香罗勒	C28 氧化	α -香树脂醇	42
CYP716A15	NP_001268115	葡萄	C28 氧化	α -香树脂醇	59
CYP716A12	CBN88268	紫花苜蓿	C28 氧化	α -香树脂醇	59

续表 2

名称	蛋白 ID	物种	功能	底物	文献
CYP716A80	ALR73782	欧洲山芥	C28 氧化	α -香树脂醇	45
CYP716A81	ALR73781	欧洲山芥	C28 氧化	α -香树脂醇	45
CYP716A1	At5g36110	拟南芥	C28 氧化	α -香树脂醇	45
CYP716A154	AEX07772	长春花	C28 氧化	羽扇豆醇	40
CYP716A15	NP_001268115	葡萄	C28 氧化	羽扇豆醇	59
CYP716A180	AHL46848	白桦	C28 氧化	羽扇豆醇	47
CYP716A179	BAW34647	甘草	C28 氧化	羽扇豆醇	43
CYP716A80	ALR73782	欧洲山芥	C28 氧化	羽扇豆醇	45
CYP716A81	ALR73781	欧洲山芥	C28 氧化	羽扇豆醇	45
CYP716A1	At5g36110	拟南芥	C28 氧化	羽扇豆醇	45
CYP716E26	XP_004241821	番茄	C6 β 羟化	β -香树脂醇	47
CYP716A179	BAW34647	甘草	C22 α 羟化	β -香树脂醇、 α -香树脂醇、羽扇豆醇	43
CYP716A140v2	BAX04007	桔梗	C28 氧化	β -香树脂醇、马尼拉二醇	46
CYP716A140	AOG74836	桔梗	C28 氧化	16 β -羟基- β -香树脂醇、12,13 α -环氧- β -香树脂醇	41
CYP716A141	AOG74838	桔梗	C28 氧化、C16 β 羟化	β -香树脂醇、齐墩果酸	46
CYP716E41	AOG74834	积雪草	C6 β 羟化	齐墩果酸、山楂酸	41
CYP716S5	AOG74839	桔梗	C12-C13 α 环氧	β -香树脂醇、齐墩果酸	41
CYP716A2	BAU61505	拟南芥	C16、C22 α 、C18 羟化	β -香树脂醇、 α -香树脂醇、羽扇豆醇	45
CYP716A81	ALR73781	欧洲山芥	C28 氧化	β -香树脂醇	45
CYP716A1	At5g36110	拟南芥	C28 氧化	β -香树脂醇	45
CYP716A15	NP_001268115	葡萄	C28 氧化	β -香树脂醇	59
CYP716A17	NP_001268076	葡萄	C28 氧化	β -香树脂醇	59
CYP716A12	CBN88268	紫花苜蓿	C28 氧化	β -香树脂醇	59
CYP72A154	H1A988	甘草	C30 氧化	11-oxo- β -香树脂醇	61
CYP716A111	APG38190	青蒿	C16 β 羟化	β -香树脂醇	41
CYP71D353	AHB62239	莲藕	C20 羟化、C28 氧化	羽扇豆醇、20-羟基-羽扇豆醇	46
CYP93E9	AIN25421	菜豆	C24 羟化	β -香树脂醇	55
CYP93E4	AIN25416	花生	C24 羟化	β -香树脂醇	55
CYP93E3	BAG68930	甘草	C24 羟化	β -香树脂醇	55
CYP93E6	AIN25418	洋甘草	C24 羟化	β -香树脂醇	55
CYP93E2	ABC59085	蒺藜苜蓿	C24 羟化	β -香树脂醇	55
CYP93E7	AIN25419	兵豆	C24 羟化	β -香树脂醇	55
CYP93E8	AIN25420	豌豆	C24 羟化	β -香树脂醇	55

3.1 CYP716 家族对五环三萜类化合物的修饰

大部分植物 CYP716 家族可以参与五环三萜类骨架的修饰。CYP716 家族参与五环三萜类化合物生物合成的第 1 个证据来自拟南芥, 研究显示 CYP716A1 和 CYP716A2 与 PEN3(OSC) 共表达^[40]。此后, 结合代谢组、转录组和基因组分析, 从植物

中鉴定出了其他 CYP716A 家族^[41-43]。Carelli 等^[44]发现 CYP716A12 可以催化 β -香树脂醇 C28 位的连续 3 步氧化生成齐墩果酸。之后利用异源体系进行体外和体内研究, 发现 CYP716A12 还可以将 α -香树脂醇和羽扇豆醇 C28 位置连续 3 步氧化分别生成熊果酸和桦木酸。大约 40 种 CYP716A 具有香树脂

醇、羽扇豆醇 C28-氧化酶活性。这些 CYP716A 大多数催化香树脂醇、羽扇豆醇骨架 C28 的连续 3 步氧化, 分别连续形成羟基、醛基和羧基。一些植物的 CYP716A 也靶向香树脂醇骨架的其他碳原子, 如作用于 C22 α 羟化的拟南芥 CYP716A2, 作用于 C3 氧化的青蒿 CYP716A14v2 和作用于 C16 β 羟化的青蒿 CYP716A111 和桔梗 CYP716A141^[41,45-46]。

除 CYP716A 亚家族成员外, CYP716C、CYP716E、CYP716S 和 CYP716Y 亚家族成员也能够氧化五环三萜骨架。积雪草 CYP716C11 催化齐墩果酸、6 β -羟基齐墩果酸和熊果酸的 C2 α 羟基化^[41]; 番茄 CYP716E26 和积雪草 CYP716E41 具有分别以 α -香树脂醇、 β -香树脂醇和齐墩果酸、熊果酸、山楂酸为底物的 C6 β -羟化酶活性^[41,47]; 桔梗 CYP716S5 则能催化 β -香树脂醇和齐墩果酸的 C12-C13 α 环氧化。此外, 柴胡 CYP716Y1 是一种 C16 α -羟化酶, 它对 β -香树脂醇和 α -香树脂醇骨架具有修饰作用^[41,48]。

3.2 CYP 其他家族对五环三萜类化合物的修饰

CYP51H 是专门修饰五环三萜骨架的亚家族。CYP51H10 催化 β -香树脂醇 C 环 C12-C13 β -环氧化和 β -香树脂醇 D 环的 C16 位 β -羟基化, 最终形成 12,13 β -环氧-16 β -羟基- β -香树脂醇, 即燕麦白蛋白生物合成途径的中间体^[49-50]。CYP72A 亚家族成员也普遍参与五环三萜类化合物的生物合成, 苜蓿和甘草的 CYP72As 与豆类特异性五环三萜类化合物的生物合成有关。已报道有 4 种苜蓿 CYP72A (CYP72A61、CYP72A63、CYP72A67 和 CYP72A68) 和一种甘草 CYP72A (CYP72A154) 参与齐墩果烷五环三萜骨架的氧化^[51-53]。CYP72A67 和 CYP72A68 分别属于 C2 β -羟化酶 (齐墩果酸、常春藤 C2 β -羟化酶) 和 C23-氧化酶 (齐墩果酸、常春藤、2 β -羟基常春藤 C23-氧化酶)^[51,53]。CYP88D6 是与乌拉尔甘草甜素生物合成相关的酶^[54]。CYP88D6 催化 β -香树脂醇 C11 位的连续 2 步氧化以产生 CYP72A154 的底物 11-氧代- β -香树脂醇。CYP93E 亚家族成员参与豆科植物三萜皂苷的生物合成^[55]。大豆 CYP93E1 被第 1 个证明属于 C24-羟化酶^[56], 它将 β -香树脂醇和槐二醇转化为 24-羟基- β -香树脂醇和大豆皂苷 B。迄今为止, 8 种豆科物种已鉴定出 8 种 CYP93E (E2-E9), 它们均具有 C24-羟化酶活性。而杉木 CYP87D16 是目前发现的与五环三萜骨架修饰相关的唯一 CYP87D 亚家族成员^[57], CYP87D16 通过催化 β -香树脂醇 C16 α -羟基化参与五环三萜类化合物的合成。

4 UGT 对五环三萜类化合物的修饰

在五环三萜类化合物合成过程中, 骨架的糖基化是关键修饰反应, 该反应通过糖基转移酶来实现。糖基转移酶使糖基和天然产物之间形成特定的糖苷键来合成糖苷类化合物, 通过糖基化反应参与维持细胞代谢稳态。糖基转移酶能够识别多种受体, 催化活化的糖基从供体分子转移到受体分子上, 改变受体分子的化学稳定性、水溶性以及受体分子的转运能力和生物活性等, 进而有助于提高其生物利用度和生物活性等。

糖基转移酶是高度分化的超级酶家族, 随着对其研究的深入, 越来越多的糖基转移酶被鉴定出来。截至目前, 碳水化合物活性酶数据库 (carbohydrate-active enzyme database, CAZy) 中共收录了高达 736 091 个不同物种的糖基转移酶氨基酸序列, 包括 17 115 个尚未分类的序列。根据糖基转移酶序列的相似度、催化底物的特异性和催化产物的立体化学结构, CAZy 数据库将糖基转移酶分为 111 个家族 (GT1~GT111), 同一家族成员间的氨基酸序列一致性高于 40%, 而同一亚家族成员间氨基酸序列一致性高于 60%^[64]。参与植物次生代谢的糖基转移酶主要分布在 GT1 家族。GT1 家族糖基供体为核苷-2-磷酸糖, 其中 UGT 的供体分子主要包括 UDP-葡萄糖、UDP-葡萄糖醛酸、UDP-鼠李糖和 UDP-木糖等^[65-67]。

五环三萜类化合物的糖链合成是通过将 UDP 的糖基转移至皂苷元上的连续反应来实现的。目前, 在大豆、燕麦、山芥、甘草以及苜蓿等植物中已鉴定出 31 种参与植物五环三萜类化合物后修饰的糖基转移酶 (表 3), 对这些已知功能的 UGT 利用 neighbor-joining 的方法构建了系统进化树 (图 3), 发现这些糖基转移酶主要分布在 UGT73、UGT74、UGT91、UGT99 等家族。

4.1 UGT73 家族对五环三萜类化合物的修饰

在植物中, 大多数 UGT73 家族糖基转移酶被发现参与五环三萜类化合物的糖基修饰, 负责在齐墩果酸、常春藤皂苷等的 C3、C23 和 C28 位转移糖基。目前, 在山芥中找到了 10 种参与五环三萜类化合物糖基修饰的 UGT, Augustin 等^[68]发现糖基转移酶 UGT73C10 和 UGT73C11 可以催化常春藤皂苷和齐墩果酸的 C3 位葡萄糖糖基化, UGT73C12 和 UGT73C13 可以连续催化常春藤皂苷以及齐墩果酸的 C3 位转移 2 个葡萄糖基生成 3-O-葡萄糖-葡萄糖-

表 3 五环三萜类化合物合成相关 UGTs 信息

Table 3 Summary of UGTs related to the synthesis of pentacyclic triterpenoids

名称	蛋白 ID	物种	功能	底物	文献
BvUGT73C10	AFN26666	山芥	C3-1 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	68
BvUGT73C11	AFN26667	山芥	C3-1 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	68
BvUGT73C12	AFN26668	山芥	C3-1 Glc/C3-2 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	68
BvUGT73C13	AFN26669	山芥	C3-1 Glc/C3-2 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	68
BvUGT73C21	AVW82175	山芥	C3-1 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	69
BvUGT73C22	AVW82178	山芥	C3-1 Glc/C28 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	69
BvUGT73C23	AVW82184	山芥	C3-1 Glc/C23 Glc/C28 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	69
BvUGT73C25	AVW82181	山芥	C3-1 Glc/C23 Glc/C28 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	69
BvUGT73C26	AVW82168	山芥	C3-1 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	69
BvUGT73C27	AVW82172	山芥	C3-1 Glc	常春藤皂苷、齐墩果酸	69
MtUGT73K1	AAW56091	苜蓿	C3-1 Glc/C28 Glc	常春藤皂苷	70
MtUGT73F3	ACT34898	苜蓿	C28 Glc	常春藤皂苷/齐墩果酸	71
GuUGAT	ANJ03631	甘草	C3-1 GlcA/C3-2 GlcA	甘草次酸	72
GuUGT73P12	BBN60799	甘草	C3-2 GlcA	3-O-葡萄糖酸-甘草次酸	73
GuUGT73F17	AXS75258	甘草	C30 Glc	甘草酸苷	74
CtUGT73AE1	AJT58578	红花	C3 Glc	甘草次酸	75
GmUGT73P2	BAI99584	大豆	C3-2 Gal	大豆皂苷 B 单葡萄糖醛酸	76
CaUGT73AH1	AUR26623	积雪草	C28 Glc	积雪草酸	77
CaUGT73AD1	ALD84259	积雪草	C28 Glc	积雪草酸、羟基积雪草酸	78
PzGAT1	AYA60330	姜状三七	C3-1 GlcA	齐墩果酸	79
PzGAT2	AYA60331	姜状三七	C3-1 GlcA	齐墩果酸	79
PzGAT3	AYA60332	姜状三七	C3-1 GlcA	齐墩果酸	79
PjGAT1	AYA60333	竹节参	C3-1 GlcA	齐墩果酸	79
GmUGT73F4	BAM29363	大豆	C22 Xyl	大豆皂苷 A	80
GmUGT73F2	BAM29362	大豆	C22 Glc	22-O-木糖-大豆皂苷 A	80
MtUGT71G1	AAW56092	苜蓿	C3-1 Glc	常春藤皂苷/苜蓿酸	70
SvUGT74M1	ABK76266	王不留行	C28 Glc	丝石竹酸	23
GmUGT91H4	BAI99585	大豆	C3-3 Rha	大豆皂苷 III	76
AsUGT91G16	QHG10987	燕麦	C3-2 Glc	3-O-阿拉伯糖-12,13-环氧-16 β -羟基- β -香树脂醇	81
AsAAT1	AZQ26921	燕麦	C3-1 Ara	12,13 β -环氧-16 β -羟基- β -香树脂醇	82
AsTG1	QHG10988	燕麦	C3-3 Glc	3-O-阿拉伯糖-葡萄糖-12,13-环氧-16 β -羟基- β -香树脂醇	81

常春藤皂苷和 3-O-葡萄糖-葡萄糖-齐墩果酸。在其他植物中, Naoumkina 等^[71]用全面的基因表达聚类分析鉴定得出苜蓿糖基转移酶 UGT73F3 可以催化常春藤皂苷以及齐墩果酸的 C28 位羧基的葡萄糖基化。另外, Achnine 等^[70]通过对苜蓿转录谱和代谢

谱的整合分析确认苜蓿中的糖基转移酶 UGT73K1 可以分别催化常春藤皂苷 C3、C28 位 2 个不同位置的葡萄糖糖基化, 同时发现 UGT73K1 可以催化大豆皂苷 C3、C22 和 C23 位的葡萄糖糖基化。Shibuya 等^[76]通过比对大豆和蒺藜苜蓿的表达序列标签信

息,成功鉴定出大豆中参与大豆皂苷I生物合成的糖基转移酶 UGT73P2,体外酶活分析显示 UGT73P2 从 UDP-半乳糖中转移 1 个半乳糖基至大豆皂苷 B 单葡萄糖醛酸苷上从而合成大豆皂苷III。Sayama 等^[80]发现大豆糖基转移酶 UGT73F4 和 UGT73F2 依次从 UDP-木糖基和 UDP-葡萄糖基中转移糖基至大豆皂苷 A 的 C22 位生成 22-O-木糖-葡萄糖-大豆皂苷 A。

在 UGT73 家族中,存在一类特异识别 UDP-葡萄糖醛酸基的 UGT,如 Tang 等^[79]从姜状三七以及竹节参中发现了 PzGAT1、PzGAT2、PzGAT3、PjGAT1 4 个糖基转移酶,它们具有相同的功能,可以催化齐墩果酸的 C3 位葡萄糖醛酸化。其中,姜状三七中发现的 3 个葡萄糖醛酸基糖基转移酶均属于 UGT73 家族,并且相互之间序列差异较小,同在姜状三七根部特异表达。Nomura 等^[73]发现糖基转移酶 UGT73P12 通过将 UDP-葡萄糖醛酸的葡萄糖醛酸基转移至 3-O-葡萄糖酸-甘草次酸的 C3-2 位来生产甘草酸苷。此外,Xu 等^[72]发现了甘草中与香树脂醇合酶协同表达的糖基转移酶 GuUGAT,体外验证 GuUGAT 可以连续催化甘草次酸的 C3-1 和 C3-2 位添加葡萄糖醛酸基,最终生成甘草酸苷。

目前只在积雪草中发现了 2 个参与乌苏烷型皂苷糖基修饰的 UGT,均属于 UGT73 家族。de Costa 等^[78]发现糖基转移酶 CaUGT73AD1 可以将积雪草酸和羟基积雪草酸的 C28 羧基部分葡萄糖基化。此外, Kim 等^[77]通过茉莉酸甲酯处理积雪草叶片后转录组测序分析到 6 个糖基转移酶表达显著上调,其中糖基转移酶 UGT73AH1 可以催化五环三萜类化合物的糖基化,负责积雪草酸的 C28 位葡萄糖基糖基转移。

4.2 其他糖基转移酶对五环三萜类化合物的修饰

除了 UGT73 家族,其他家族的 UGT 也被报道参与五环三萜类化合物的糖基修饰,如 Meesapyodsuk 等^[23]从石竹科王不留行发育种子的表达序列标签中发现了 1 个五环三萜羧酸葡萄糖基转移酶 UGT74M1,可以从 UDP-葡萄糖基中转移 1 个葡萄糖基至丝石竹酸 C28 位的羧基生成 28-O-葡萄糖-丝石竹酸。Shibuya 等^[76]发现 GmSGT3 (UGT91H4) 可以从 UDP-鼠李糖中转移鼠李糖基至大豆皂苷III 的 C3-3 位生成大豆皂苷I。Achnine 等^[70]利用茉莉酸甲酯处理蒺藜苜蓿,结合转录谱、代谢谱和体外功能分析实验发现糖基转移酶 UGT71G1 不仅可以催化五环三萜类化合物,催化苜蓿酸和常春藤皂苷

C3 位的葡萄糖基糖基化,也可以黄酮类化合物为底物进行糖基修饰,将槲皮素糖基化为多种槲皮素葡萄糖苷。Louveau 等^[82]结合转录组学和系统发育学分析,在燕麦中找到了催化 12,13 β -环氧,16 β -羟基- β -香树脂醇的 C3-1 位阿拉伯糖糖基转移酶 AsAAT1。而后,Orme 等^[81]发现在燕麦的基因簇上同时存在 1 个糖基转移酶 AsUGT91G16 和 1 个糖苷酶 AsTG1,他们共同参与了燕麦皂苷的合成,依次在 12,13 β -环氧,16 β -羟基- β -香树脂醇的 C3-2、C3-3 位添加 2 个葡萄糖基生成下游燕麦根皂苷合成的前体物质。值得注意的是 AsTG1 并不是 UGT 家族成员,而是属于 GH1 的糖苷酶,与 GT 亲缘关系较远(图 3),是目前在植物中首次发现具有萜类化合物糖基转移酶活性的糖苷酶。除此之外,亚细胞定位发现糖基转移酶 AsUGT91G16 定位在细胞质中,而糖苷酶 AsTG1 定位在液泡中,说明萜类化合物可以在细胞器之间运输和合成。

4.3 糖基转移酶的特异活性位点

根据糖基转移酶三维结构的折叠特征,可以将其分为 GT-A、GT-B、GT-C 和 GT-D 4 种类型。目前已经解析的植物糖基转移酶的结构均属于 GT-B 折叠方式,含有 2 个罗斯曼折叠的 $\beta/\alpha/\beta$ 结构域。目前一共有 13 个植物 GT 的结构被解析出来,其中 MtUGT71G1 (PDB ID: 2ACV)^[83]是同时作用于五环三萜类化合物和黄酮类化合物的糖基转移酶,其晶体结构常被用于参与萜类化合物糖基化的糖基转移酶三维结构的预测(图 4-A)。

晶体结构分析发现 MtUGT71G1 的 N 端结构域和 C 端结构域之间形成一条细长的缝隙,其中 N 端结构域的保守性较差,主要参与结合糖基受体,但是参与糖基化催化反应的重要氨基酸位点(His22 组氨酸和 Asp121 天冬氨酸)是高度保守的,分别定点突变 His22 和 Asp121,糖基转移酶活性完全丧失^[84]。糖基供体通过与植物 GTC 端结构域 PSPG (putative secondary plant glycosyltransferase) 区域的氨基酸残基之间的多个氢键相互作用,从而与糖基转移酶稳定地结合。PSPG 无论在长度还是氨基酸序列上都高度保守(图 4-C),保守的 PSPG 结构单元与糖基供体进行主要的相互作用,构成结合口袋的一面。植物糖基转移酶 PSPG 的 44 个氨基酸残基中,至少 10 个高度保守氨基酸残基与 UDP-糖发生直接相互作用,与糖部分形成氢键^[85]。如 MTUGT71G1 结构中参与供体分子接触的氨基酸残基 Trp339、Gln342、

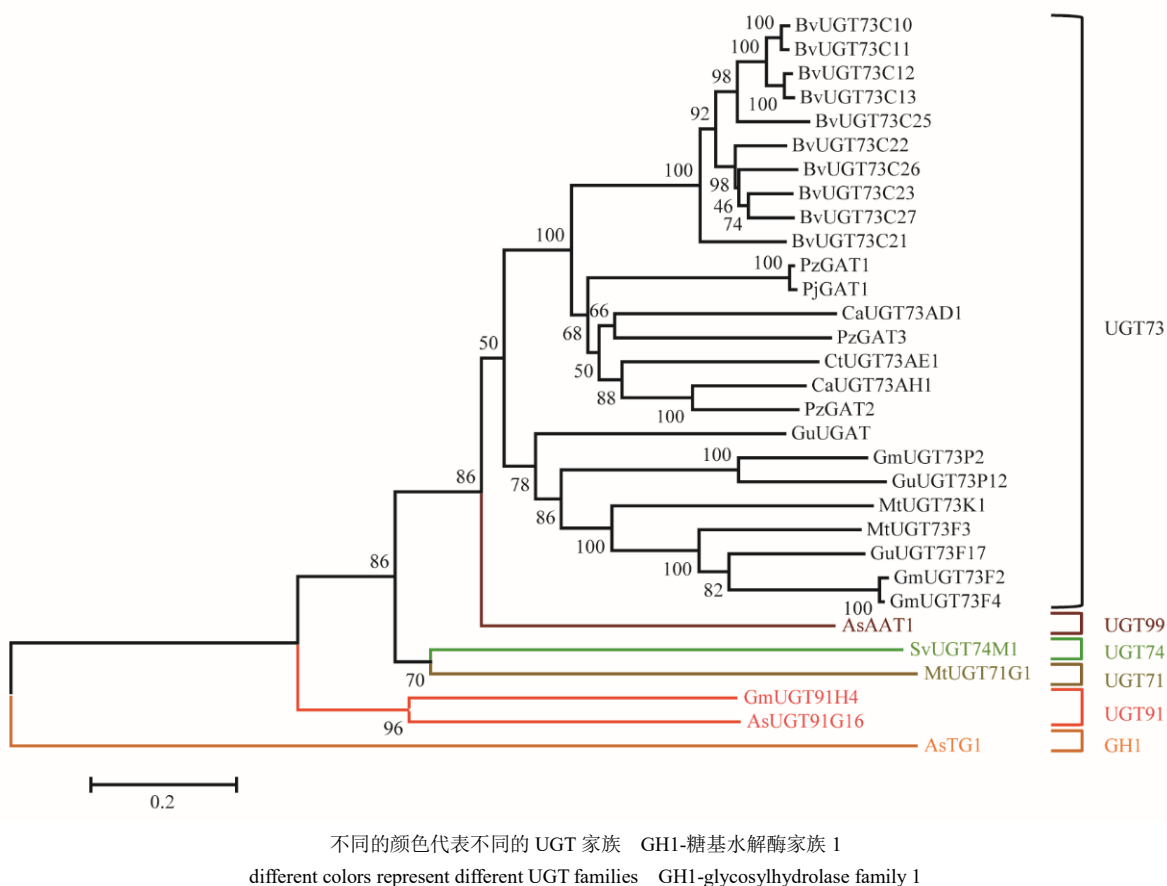


图 3 参与五环三萜化合物生物合成的糖基转移酶进化分析

Fig. 3 Evolutionary analysis of glycosyltransferase involved in biosynthesis of pentacyclic triterpenoids

His357 和 Glu365 在植物 UGTs 一级序列中保守存在。Gln382 在葡萄糖糖基转移酶中保守，而相对的 His382 在半乳糖糖基转移酶中保守。Glu381 和 Gln382 这 2 个位点被推测对于糖基专一性至关重要，Glu381 在有的蛋白中被天冬氨酸所代替。Trp360、Glu381 和 Gln382 这 3 个残基与糖形成氢键保守存在（图 4-B、C）^[83]，位于糖基供体结合中心的相对保守的苏氨酸 Thr143 被认为在糖基供体识别过程中发挥非常重要的作用^[86]。

具有阿拉伯糖糖基转移酶活性的 AsAAT1 具有 1 个关键的保守组氨酸残基，用于特异性的识别糖供体，位于 PSPG 区域的末端。该组氨酸 H404 和 P154 的突变将 AsAAT1 从阿拉伯糖糖基转移酶转化为葡萄糖糖基转移酶^[82]。此外，Arg32 被认为是甘草糖基转移酶 UGT73P12 的必需氨基酸残基，它对 UDP-葡萄糖醛酸具有高度特异的催化能力。Arg32 突变为 Ser32，UGT73P12 会失去对葡萄糖醛酸的高特异性，并获得对 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖的高选择性。His29 或 Asp131 突变，则会导致

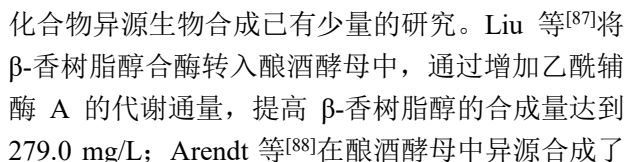
UGT73P12 蛋白失活^[73]。

确定植物 UGTs 的糖基供体专一性、受体专一性以及 UGTs 催化活性是非常复杂的过程，为了更精确的理解这一过程，解析 UDP-葡萄糖以外的糖基供体分子复合物的结构会很有帮助。

5 结语与展望

五环三萜类化合物结构多样，涉及修饰酶基因种类繁多，目前对其合成途径的了解还不够深入，仍需对五环三萜骨架后修饰阶段进行研究。4 种类型的五环三萜类化合物骨架的生物合成途径已经比较完善，但对羽扇豆烷型和木栓烷型皂苷元氧化、羟化等修饰的具体机制了解还知之甚少。糖基转移酶参与糖基修饰时对于位点识别特异性较强，因此，已知糖基转移酶的鉴定和催化机制的研究将会有助于对植物中未知糖基转移酶的挖掘。

五环三萜类化合物因其优越的药理活性逐步进入人们的生活，但由于植物中五环三萜类化合物的含量较少，提取步骤复杂，植物资源稀缺，急需开发可以高效合成五环三萜类化合物的方法。随着研



齐墩果酸、苜蓿酸、贝萼皂苷、常春藤皂苷、羽扇豆醇和白桦酸等多种五环三萜类化合物,并发现磷酸酯酶磷酸酶的缺失会导致酵母内质网膜面积增加,从而促进五环三萜类化合物及其糖基化产物的生成。

尽管已有一些成功异源合成五环三萜类化合物的例子,但目前的技术仍未达到工业生产级别。构建高产量的微生物细胞工程合成五环三萜类化合物还存在几个主要限制因素:(1)大部分植物五环三萜类化合物的合成途径尚未解析;(2)部分植物来源的酶在微生物宿主细胞中难以表达,可溶性低;(3)五环三萜类化合物合成过程中需要消耗大量的辅酶和供体;(4)部分五环三萜类化合物对微生物宿主细胞有毒性。针对上述问题,快速发展的代谢组学和基因组学分析技术有助于解决植物代谢途径解析的问题;酶结构改造以及内质网工程的应用可以提高微生物宿主中植物来源酶的表达能力和催化活性;通过合成生物学对宿主代谢流向优化来解决辅酶和供体不足的问题;通过宿主选择和细胞器区域化生产有望解决产物对宿主产生细胞毒性的问题。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ko B S, Kang S N, Moon B R, *et al.* A 70% ethanol extract of mistletoe rich in betulin, betulinic acid, and oleanolic acid potentiated β -cell function and mass and enhanced hepatic insulin sensitivity [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 7836823.
- [2] 孙艳, 孙晓楠, 王芳, 等. 熊果酸对糖尿病视网膜病变小鼠视网膜新生血管形成及氧化应激的抑制作用 [J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(32): 2589-2593.
- [3] Lu Y P, Kan H W, Wang Y, *et al.* Asiatic acid ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats via mitochondria-targeted protective mechanism [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 338: 214-223.
- [4] Jamkhande P G, Pathan S K, Wadher S J. In silico PASS analysis and determination of antimycobacterial, antifungal, and antioxidant efficacies of maslinic acid in an extract rich in pentacyclic triterpenoids [J]. *Int J Mycobacteriol*, 2016, 5(4): 417-425.
- [5] 罗祖良, 张凯伦, 马小军, 等. 三萜皂苷的合成生物学研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(10): 1806-1814.
- [6] 焉雅涛, 王义, 王康宇, 等. 氧化鲨烯环化酶 (OSC) 基因家族研究进展 [J]. *人参研究*, 2015, 27(2): 49-53.
- [7] Andre C M, Legay S, Deleruelle A, *et al.* Multifunctional oxidosqualene cyclases and cytochrome P450 involved in the biosynthesis of apple fruit triterpenic acids [J]. *New Phytol*, 2016, 211(4): 1279-1294.
- [8] Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K, *et al.* Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(5): 731-743.
- [9] Kushiro T, Shibuya M, Ebizuka Y. Beta-amyrin synthase: Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 256(1): 238-244.
- [10] Zhou J W, Hu T Y, Gao L H, *et al.* Friedelane-type triterpene cyclase in celastrol biosynthesis from *Tripterygium wilfordii* and its application for triterpenes biosynthesis in yeast [J]. *New Phytol*, 2019, 223(2): 722-735.
- [11] Srisawat P, Fukushima E O, Yasumoto S, *et al.* Identification of oxidosqualene cyclases from the medicinal legume tree *Bauhinia forficata*: A step toward discovering preponderant α -amyrin-producing activity [J]. *New Phytol*, 2019, 224(1): 352-366.
- [12] Sun R, Liu S, Zi - Zhong Tang, *et al.* β -Amyrin synthase from *Conyzablinii* expressed in *Saccharomyce cerevisiae* [J]. *Wiley-Blackwell Online Open*, 2017, 7(10): 1575-1585.
- [13] Saimaru H, Orihara Y, Tansakul P, *et al.* Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(5): 784-788.
- [14] Haralampidis K, Bryan G, Qi X, *et al.* A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(23): 13431-13436.
- [15] Zhang H, Shibuya M, Yokota S, *et al.* Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: Molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants [J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(5): 642-650.
- [16] Kajikawa M, Yamato K T, Fukuzawa H, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase from petroleum plant *Euphorbia tirucalli* L. [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(15): 1759-1766.
- [17] Hayashi H, Huang P, Kirakosyan A, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(8): 912-916.
- [18] Morita M, Shibuya M, Kushiro T, *et al.* Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) new alpha-amyrin-producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267(12): 3453-3460.
- [19] Basyuni M, Oku H, Tsujimoto E, *et al.* Triterpene synthases from the Okinawan mangrove tribe, Rhizophoraceae [J].

- FEBS J*, 2007, 274(19): 5028-5042.
- [20] Sawai S, Shindo T, Sato S, *et al.* Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus* [J]. *Plant Sci*, 2006, 170(2): 247-257.
- [21] Scholz M, Lipinski M, Leupold M, *et al.* Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanaxsaponin I in *Nigella sativa* [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(4): 517-522.
- [22] Wang Z H, Guhling O, Yao R N, *et al.* Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato fruit cuticular triterpenoids [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(1): 540-552.
- [23] Meesapyodsuk D, Balsevich J, Reed D W, *et al.* Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs encoding beta-amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(2): 959-969.
- [24] Hayashi H, Huang P Y, Takada S, *et al.* Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(7): 1086-1092.
- [25] Shibuya M, Zhang H, Endo A, *et al.* Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 266(1): 302-307.
- [26] Srivastava G, Sandeep, Garg A, *et al.* Transcriptome analysis and functional characterization of oxidosqualene cyclases of the *Arjuna* triterpene saponin pathway [J]. *Plant Sci*, 2020, 292: 110382.
- [27] Yu Y, Chang P, Yu H, *et al.* Productive amyrin synthases for efficient α -amyrin synthesis in engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(10): 2391-2402.
- [28] Han J Y, Chun J H, Oh S A, *et al.* Transcriptomic analysis of *Kalopanax septemlobus* and characterization of KsBAS, CYP716A94 and CYP72A397 genes involved in hederagenin saponin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(2): 319-330.
- [29] Kim O T, Um Y, Jin M L, *et al.* A novel multifunctional C-23 oxidase, CYP714E19, is involved in asiaticoside biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(6): 1200-1213.
- [30] Sandeep, Misra R C, Chanotiya C S, *et al.* Oxidosqualene cyclase and CYP716 enzymes contribute to triterpene structural diversity in the medicinal tree Banaba [J]. *New Phytol*, 2019, 222(1): 408-424.
- [31] Han J Y, Jo H J, Kwon E K, *et al.* Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases involved in taraxasterol, taraxerol and bauerenol triterpene biosynthesis in *Taraxacum coreanum* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2019, 60(7): 1595-1603.
- [32] Guhling O, Hobl B, Yeats T, *et al.* Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 448(1/2): 60-72.
- [33] Dhar N, Rana S, Razdan S, *et al.* Cloning and functional characterization of three branch point oxidosqualene cyclases from *Withania somnifera* (L.) dunal [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(24): 17249-17267.
- [34] Liu Y, Zhou J W, Hu T Y, *et al.* Identification and functional characterization of squalene epoxidases and oxidosqualene cyclases from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Plant Cell Rep*, 2020, 39(3): 409-418.
- [35] Busta L, Serra O, Kim O T, *et al.* Oxidosqualene cyclases involved in the biosynthesis of triterpenoids in *Quercus suber* cork [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8011.
- [36] Wen L L, Yun X Y, Zheng X S, *et al.* Transcriptomic comparison reveals candidate genes for triterpenoid biosynthesis in two closely related *Ilex* species [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 634.
- [37] Wu Z X, Xu H, Wang M L, *et al.* Molecular docking and molecular dynamics studies on selective synthesis of α -amyrin and β -amyrin by oxidosqualene cyclases from *Ilex asprella* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): E3469.
- [38] Takase S, Kera K, Hirao Y, *et al.* Identification of triterpene biosynthetic genes from *Momordica charantia* using RNA-seq analysis [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(2): 251-261.
- [39] 杨杰, 詹亚光, 肖佳雷, 等. 细胞色素P450在植物三萜和甾醇骨架修饰中的功能研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学版, 2018, 48(10): 1065-1083.
- [40] Ghosh S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1886.
- [41] Miettinen K, Pollier J, Buyst D, *et al.* The ancient CYP716 family is a major contributor to the diversification of eudicot triterpenoid biosynthesis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14153.
- [42] Misra R C, Sharma S, Sandeep, *et al.* Two CYP716A subfamily cytochrome P450 monooxygenases of sweet basil play similar but nonredundant roles in ursane- and oleanane-type pentacyclic triterpene biosynthesis [J]. *New Phytol*, 2017, 214(2): 706-720.
- [43] Tamura K, Seki H, Suzuki H, *et al.* CYP716A179 functions as a triterpene C-28 oxidase in tissue-cultured stolons of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(3): 437-445.
- [44] Carelli M, Biazzi E, Panara F, *et al.* *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the

- biosynthesis of hemolytic saponins [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(8): 3070-3081.
- [45] Yasumoto S, Fukushima E O, Seki H, *et al.* Novel triterpene oxidizing activity of *Arabidopsis thaliana* CYP716A subfamily enzymes [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(4): 533-540.
- [46] Tamura K, Teranishi Y, Ueda S, *et al.* Cytochrome P450 monooxygenase CYP716A141 is a unique b-amyrin C-16b oxidase involved in triterpenoid saponin biosynthesis in *Platycodon grandiflorus* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(6): 1119.
- [47] Yasumoto S, Seki H, Shimizu Y, *et al.* Functional characterization of CYP716 family P450 enzymes in triterpenoid biosynthesis in tomato [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 21.
- [48] Wang J, Li J X, Li J L, *et al.* Transcriptome profiling shows gene regulation patterns in ginsenoside pathway in response to methyl jasmonate in *Panax quinquefolium* adventitious root [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37263.
- [49] Kunii M, Kitahama Y, Fukushima E O, *et al.* B-Amyrin oxidation by oat CYP51H10 expressed heterologously in yeast cells: The first example of CYP51-dependent metabolism other than the 14-demethylation of sterol precursors [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(5): 801-804.
- [50] Geisler K, Hughes R K, Sainsbury F, *et al.* Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(35): E3360-E3367.
- [51] Biazzi E, Carelli M, Tava A, *et al.* CYP72A67 catalyzes a key oxidative step in *Medicago truncatula* hemolytic saponin biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(10): 1493-1506.
- [52] Seki H, Sawai S, Ohyama K, *et al.* Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(11): 4112-4123.
- [53] Fukushima E O, Seki H, Sawai S, *et al.* Combinatorial biosynthesis of legume natural and rare triterpenoids in engineered yeast [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(5): 740-749.
- [54] Seki H, Ohyama K, Sawai S, *et al.* Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 14204-14209.
- [55] Moses T, Thevelein J M, Goossens A, *et al.* Comparative analysis of CYP93E proteins for improved microbial synthesis of plant triterpenoids [J]. *Phytochemistry*, 2014, 108: 47-56.
- [56] Shibuya M, Hoshino M, Katsube Y, *et al.* Identification of beta-amyrin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay [J]. *FEBS J*, 2006, 273(5): 948-959.
- [57] Moses T, Pollier J, Faizal A, *et al.* Unraveling the triterpenoid saponin biosynthesis of the African shrub *Maesa lanceolata* [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 122-135.
- [58] 王斌, 李德远. 细胞色素 P450 的结构与催化机理 [J]. *有机化学*, 2009, 29(4): 658-662.
- [59] Huang L L, Li J, Ye H C, *et al.* Note added in proof to: Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus* [J]. *Planta*, 2012, 236(5): 1583.
- [60] Fiallos-Jurado J, Pollier J, Moses T, *et al.* Saponin determination, expression analysis and functional characterization of saponin biosynthetic genes in *Chenopodium quinoa* leaves [J]. *Plant Sci*, 2016, 250: 188-197.
- [61] Fukushima E O, Seki H, Muranaka T. *Fifty Years Cytochrome P450 Research* [M]. Tokyo: Springer, 2014: 125-133.
- [62] Yano R, Takagi K, Takada Y, *et al.* Metabolic switching of astringent and beneficial triterpenoid saponins in soybean is achieved by a loss-of-function mutation in cytochrome P450 72A69 [J]. *Plant J*, 2017, 89(3): 527-539.
- [63] Fukushima E O, Seki H, Ohyama K, *et al.* CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(12): 2050-2061.
- [64] Augustin J M, Kuzina V, Andersen S B, *et al.* Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(6): 435-457.
- [65] Ishikura N, Mato M. Partial purification and some properties of flavonol 3-O-glycosyltransferases from seedlings of *Vigna mungo*, with special reference to the formation of kaempferol 3-O-galactoside and 3-O-glucoside [J]. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34(2): 329-335.
- [66] Martin R C, Mok M C, Mok D W. A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris* [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120(2): 553-558.
- [67] Jones P, Messner B, Nakajima J, *et al.* UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(45): 43910-43918.
- [68] Augustin J M, Drok S, Shinoda T, *et al.* UDP-glycosyltransferases from the UGT73C subfamily in *Barbarea vulgaris* catalyze saponin 3-O-glucosylation in saponin-mediated insect resistance [J]. *Plant Physiol*, 2012, 160(4): 1881-1895.

- [69] Erthmann P Ø, Agerbirk N, Bak S. A tandem array of UDP-glycosyltransferases from the UGT73C subfamily glycosylate saponins, forming a spectrum of mono- and bisdesmosidic saponins [J]. *Plant Mol Biol*, 2018, 97(1/2): 37-55.
- [70] Achnine L, Huhman D V, Farag M A, *et al.* Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2005, 41(6): 875-887.
- [71] Naoumkina M A, Modolo L V, Huhman D V, *et al.* Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 850-866.
- [72] Xu G J, Cai W, Gao W, *et al.* A novel glucuronosyltransferase has an unprecedented ability to catalyze continuous two-step glucuronosylation of glycyrrhetic acid to yield glycyrrhizin [J]. *New Phytol*, 2016, 212(1): 123-135.
- [73] Nomura Y, Seki H, Suzuki T, *et al.* Functional specialization of UDP-glycosyltransferase 73P12 in licorice to produce a sweet triterpenoid saponin, glycyrrhizin [J]. *Plant J*, 2019, 99(6): 1127-1143.
- [74] He J B, Chen K, Hu Z M, *et al.* UGT73F17, a new glycosyltransferase from *Glycyrrhiza uralensis*, catalyzes the regiospecific glycosylation of pentacyclic triterpenoids [J]. *Chem Commun*, 2018, 54(62): 8594-8597.
- [75] Xie K, Chen R, Li J, Wang R, Chen D, Dou X, Dai J. Exploring the catalytic promiscuity of a new glycosyltransferase from *Carthamus tinctorius* [J]. *Org Lett*, 2014, 16(18): 4874-4877.
- [76] Shibuya M, Nishimura K, Yasuyama N, *et al.* Identification and characterization of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of soyasaponin I in *Glycine max* [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(11): 2258-2264.
- [77] Kim O T, Jin M L, Lee D Y, *et al.* Characterization of the asiatic acid glucosyltransferase, UGT73AH1, involved in asiaticoside biosynthesis in *Centella asiatica* (L.) urban [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): E2630.
- [78] de Costa F, Barber C J S, Kim Y B, *et al.* Molecular cloning of an ester-forming triterpenoid: UDP-glucose 28-O-glucosyltransferase involved in saponin biosynthesis from the medicinal plant *Centella asiatica* [J]. *Plant Sci*, 2017, 262: 9-17.
- [79] Tang Q Y, Chen G, Song W L, *et al.* Transcriptome analysis of *Panax zingiberensis* identifies genes encoding oleanolic acid glucuronosyltransferase involved in the biosynthesis of oleanane-type ginsenosides [J]. *Planta*, 2019, 249(2): 393-406.
- [80] Sayama T, Ono E, Takagi K, *et al.* The Sg-1 glycosyltransferase locus regulates structural diversity of triterpenoid saponins of soybean [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(5): 2123-2138.
- [81] Orme A, Louveau T, Stephenson M J, *et al.* A noncanonical vacuolar sugar transferase required for biosynthesis of antimicrobial defense compounds in oat [J]. *PNAS*, 2019, 116(52): 27105-27114.
- [82] Louveau T, Orme A, Pfalzgraf H, *et al.* Analysis of two new arabinosyltransferases belonging to the carbohydrate-active enzyme (CAZY) glycosyl transferase Family1 provides insights into disease resistance and sugar donor specificity [J]. *Plant Cell*, 2018, 30(12): 3038-3057.
- [83] Shao H, He X Z, Achnine L, *et al.* Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 3141-3154.
- [84] He X Z, Wang X Q, Dixon R A. Mutational analysis of the *Medicago* glycosyltransferase UGT71G1 reveals residues that control regioselectivity for (iso)flavonoid glycosylation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(45): 34441-34447.
- [85] 刘美子, 王丹丹, 秦超, 等. 植物糖基转移酶的结构与机理及糖基化工程的研究进展 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(9): 1133-1142.
- [86] Offen W, Martinez-Fleites C, Yang M, *et al.* Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification [J]. *EMBO J*, 2006, 25(6): 1396-1405.
- [87] Liu H, Fan J J, Wang C, *et al.* Enhanced β -amyrin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by coupling an optimal acetyl-CoA supply pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(13): 3723-3732.
- [88] Arendt P, Miettinen K, Pollier J, *et al.* An endoplasmic reticulum-engineered yeast platform for overproduction of triterpenoids [J]. *Metab Eng*, 2017, 40: 165-175.

[责任编辑 崔艳丽]