

药用植物活性成分生物合成中 P450 的研究进展

马莹^{1#}, 蔡媛^{2#}, 马晓晶¹, 崔光红¹, 唐金富¹, 曾雯¹, 张水寒²,
郭娟^{1*}, 黄璐琦^{1*}

(1. 中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;

2. 湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南长沙 410006)

摘要: 药用活性成分多来源于药用植物次生代谢产物, 是其发挥药效的物质基础。细胞色素 P450s (cytochrome P450s, P450s) 是一类分布广泛、由超基因家族编码的含血红素的单加氧酶, 在植物的代谢网络中发挥重要作用。本文以熟知的几类药用植物活性成分为对象, 对其生物合成途径中 P450 相关功能进行介绍, 通过对 P450 在萜类、生物碱、黄酮以及苯丙烷类等常见药用植物活性成分生物合成中的功能进行综述, 为药用植物次生代谢产物的生物合成及调控研究提供参考。

关键词: 细胞色素 P450; 药用植物; 次生代谢产物; 生物合成

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)07-1573-17

Research progress of P450 in the biosynthesis of bioactive compound of medicinal plants

MA Ying^{1#}, CAI Yuan^{2#}, MA Xiao-jing¹, CUI Guang-hong¹, TANG Jin-fu¹, ZENG Wen¹,
ZHANG Shui-han², GUO Juan^{1*}, HUANG Lu-qi^{1*}

(1. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

Abstract: Most of the active ingredients of herbs are secondary metabolites of plants. Cytochrome P450s (P450s) are hemoglobin-containing monooxygenases encoded by a super-gene family, which play important roles in the metabolic network of plants. This review focuses on the role of P450s on biosynthesis of secondary metabolites such as terpenoids, alkaloids, flavonoids and phenylpropanoids. This will provide references for biosynthesis and regulation of secondary metabolites in medicinal plants.

Key words: cytochrome P450; medicinal plant; secondary metabolite; biosynthetic pathway

细胞色素 P450 (cytochrome P450, P450) 广泛存在

收稿日期: 2020-01-10; 修回日期: 2020-06-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81822046, 81573532, 81891013, 31961133007); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设”项目 (2060302, ZZXT201807); 湖南省自然科学基金青年基金项目 (2018JJ3310); 湖南省中医药管理局项目 (201810); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (ZZ13-YQ-083).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-64014411-2956, E-mail: guojuanzhy@163.com;

Tel: 86-10-64014411-2956, E-mail: huangluqi01@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0035

于动物、植物和微生物中, 是自然界功能最强大的生物催化剂之一, 因其与一氧化碳的复合物在 450 nm 处有特征光吸收峰而得名。P450 催化反应的机制是通过激活氧分子, 将其中一分子氧插入到底物中, 通过黄素蛋白从 NAD(P)H 传递电子至 P450, 同时还原另一分子氧形成水^[1]。P450 参与的最典型的催化反应是羟基化, 同时也催化其他复杂多样类型的生物合成反应, 包括连续氧化反应、芳香化合物的环氧化反应和胺类及其衍生物的甲基或氨基转移反应等, 是植物代谢网络

中的关键酶^[2]。

P450作为植物代谢中最大的酶蛋白家族,约占植物蛋白编码基因的1%^[3],根据其氨基酸序列同源性的低分为家族和亚家族,同源性大于40%归属为同一个家族,同源性大于55%归属为同一个亚家族。植物P450的分化被认为与陆生植物的生存进化紧密相关,广泛参与植物的初生代谢和次生代谢过程^[4],主要分为以下4类:①植物界中保守的P450家族:包括参与甾体生物合成的CYP51家族和CYP710家族的基因,以及参与叶黄素生物合成中的CYP97家族。②在陆生植物中相对保守的P450家族:包括参与苯丙烷类化合物生物合成的CYP73A家族和CYP98A家族、参与脂肪酸合成的CYP86家族、CYP94家族和CYP703家族。③开花植物进化过程中产生的一些与植物激素的合成过程相关的P450家族:包括参与了生长素、细胞分裂素、脱落酸、油菜素内酯、独脚金内酯以及新的信号分子的合成和代谢的来自16个P450家族的基因^[5]。④参与植物次生代谢(包括药用植物活性成分)生物合成的P450基因家族:主要由初生代谢途径的P450经过复制、分化以及新功能化产生,是植物产生纷繁复杂次生代谢产物的原动力,在植物应对环境变化、吸引传粉、抵抗病虫害侵袭等过程中发挥积极作用^[5]。

药用植物的次生代谢产物是其发挥药效的主要活性成分,种类繁多且生物合成途径千差万别^[6]。通过解析药用植物特定次生代谢途径,明确活性成分生物合成途径中关键酶的催化功能,通过代谢工程或合成生物学实现以有效成分为目标的遗传改造或者异源合成生产^[7]。目前植物次生代谢产物生物合成上游途径解析较为透彻,主要包括:①异戊二烯途径,产生萜类化合物等;②醋酸-丙二酸途径,产生脂肪酸类、酯类、萜醌类等化合物;③氨基酸途径,产生生物碱类成分;④桂皮酸途径,产生苯丙烷类、香豆素类、木质素类及黄酮类化合物;⑤由以上几种途径组成的复合途径,生成结构较为复杂的天然化合物^[8]。

药用植物中具有良好活性的次生代谢产物多为修饰程度较高、结构复杂的天然产物,在不同种类化合物的结构修饰过程中,P450发挥了极大作用^[4]。P450参与的次生代谢产物结构修饰一方面丰富了化合物的生物学活性,另一方面也为化合物的甲基化、糖基化等结构修饰提供基团。目前,关于药用植物次生代谢产物合成相关的P450研究已取得了一定进展,但是由于植物中P450基因家族庞大、物种间同源性较低、内质网膜定位等特性使得P450的筛选和功能研究依然是植物次生代谢研究中的难点。本文将选取研究较为深入的与药用植物萜类、生物碱、苯丙烷类化合物生物合成

相关的P450功能进行综述,并对其在药用植物次生代谢产物中的研究前景进行展望,为药用活性成分生物合成途径解析提供参考。

1 萜类和甾体类化合物生物合成中的P450基因

萜类和甾体类化合物是植物中骨架多样、数量巨大的天然产物,在植物的应激和防御中发挥作用并为生物医药生产提供丰富多样的原材料^[9,10]。萜类化合物由支链异戊烷骨架的五碳单位组成,根据化合物所含的碳原子数目不同可以分为单萜、倍半萜、二萜、三萜和四萜等,通过萜类合酶和结构修饰酶在共同前体化合物的基础上催化生成。萜类和甾体类化合物的前体异戊烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)主要通过两条途径产生,包括存在于细胞质中的甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)和存在于叶绿体和质体中的甲基苏糖醇磷酸途径(methylerythritol phosphate pathway, DXP)。目前研究者们已经通过代谢工程和合成生物学方法,获得高产异戊二烯的大肠杆菌和酵母基因工程菌株,并应用到萜类化合物前体的合成生物学生产中^[11,12]。萜类化合物下游途径的环化和修饰决定了萜类化合物的结构多样性,是生物合成途径研究的重点。植物中超过93%的萜类化合物含有两个及以上的氧原子,其中P450在萜类化合物生物合成途径中的羟基化、环氧化等过程中发挥重要的修饰作用^[5](表1)。

1.1 参与单萜类化合物生物合成的P450基因 单萜是挥发油的重要组成成分之一,在药用植物中广泛存在并且具有多种异构体,作为重要的工业原料广泛用于医药、香料、化妆品等。绝大多数单萜是环状化合物,其生物合成在牻牛儿焦磷酸(geranylpyrophosphate, GPP)的基础上经过环合酶催化生成环合产物,比如蒎烯类等,除此之外更多的是在环化产物的基础上经过P450等结构修饰酶的催化生成结构多样的产物。其中柠檬烯(limonene)、薄荷醇(menthol)、芳樟醇(linalool)和香叶醇(geraniol)^[13]等因其较大的工业价值以及在植物中相对较高的含量,成为单萜化合物生物合成途径研究的典型。P450参与的氧化反应通过增加化合物的极性、调节其化学性能从而大大提升其应用空间,同时在其结构多样性产生过程中P450的催化杂泛性起到了重要的作用。现今发现的柠檬烯、薄荷醇和香芹酮(carvone)等环状单萜化合物生物合成中的P450酶均属于CYP71D亚家族,并且多具有底物杂泛性^[13]。例如,紫苏(*Perilla frutescens*)中的CYP71D174能够催化(-)-柠檬烯的C3、C6和C7位发生羟基化^[14],并且C3位可以被其进一步氧化生成异薄荷二

烯酮 (isopiperitenone)。而薄荷 (*Mentha haplocalyx*) 中 CYP71D13、CYP71D15 和 CYP71D18 等能够特异催化 (+, -)-柠檬烯羟基化^[15], 其中 CYP71D18 催化 (+)-(4R)-柠檬烯产生包含不同旋光性 C6 位羟基化产物、C1,2 位氧桥产物和 C3 位羟基化的 5 种同分异构体 (图 1A)。CYP71D13 和 CYP71D18 还能够识别多种柠檬烯类似物, 如 1,4-二甲基环己烯等, 分别在其相似碳位羟基化。并且随着底物分子与柠檬烯结构相似度降低, CYP71D13 和 CYP71D18 对底物羟基化位置的特异性也不断降低, 形成多样化结构修饰的产物^[15], 这些研究能够为环状单萜化合物生物合成的解析以及 P450 结构和功能研究提供参考^[13]。

1.2 参与倍半萜类化合物生物合成的 P450 基因 青蒿素 (artemisinin) 作为倍半萜类化合物中的明星分子, 其生物合成途径备受研究者关注。Teoh 等^[16,17]通过构建黄花蒿 cDNA 文库, 克隆得到青蒿素生物合成途径的 P450 基因 *CYP71AV1*, *CYP71AV1* 是一个多功能催化酶, 能够连续氧化紫穗槐二烯生成青蒿醇再生成青蒿醛, 最后羧化生成青蒿酸 (图 1B)。*CYP71AV1* 的催化功能具有底物杂泛性, 能够催化双氢青蒿醇氧化生

成双氢青蒿醛。*CYP71AV1* 作为青蒿酸生成的关键酶基因被应用到青蒿素合成生物学研究中, Keasling 教授课题组对酵母菌株进行工程化操作, 通过优化 FPP 生物合成途径使青蒿酸合成量达到 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[18-20], 青蒿素合成生物学的发展促进萜类骨架底盘菌株的构建以及萜类化合物的微生物异源合成研究。

Celedon 等^[21]比较了檀香 (*Santalum album* L.) 中不同部位的转录组信息, 筛选得到了与目标化合物积累呈正相关且转录丰度较高的 P450, 通过工程菌株表达确定了 CYP736A167 在檀香倍半萜烯醇的生物合成中起到立体选择性催化功能, 可以将烯醇底物催化成特定的顺式异构醇 (图 1C)。倍半萜包括大环、单环、双环和三环骨架以及各种重排结构, Takahashi 等^[22]从天仙子 (*Hyoscyamus muticus*) 中克隆得到可以催化普萘哌二烯 (premnaspirodiene)、香橙烯 (valencene) 等倍半萜烯骨架结构的 C2 位羟基化的 CYP71D55 (图 1D), 并且通过分子对接和定点突变对该 P450 的底物结合区进行深入研究, 发现底物结合位点 5 和 6 对催化反应的稳定性非常重要, 进一步通过突变和体外酶促实验获得了区别于野生型的多种倍单萜产物。

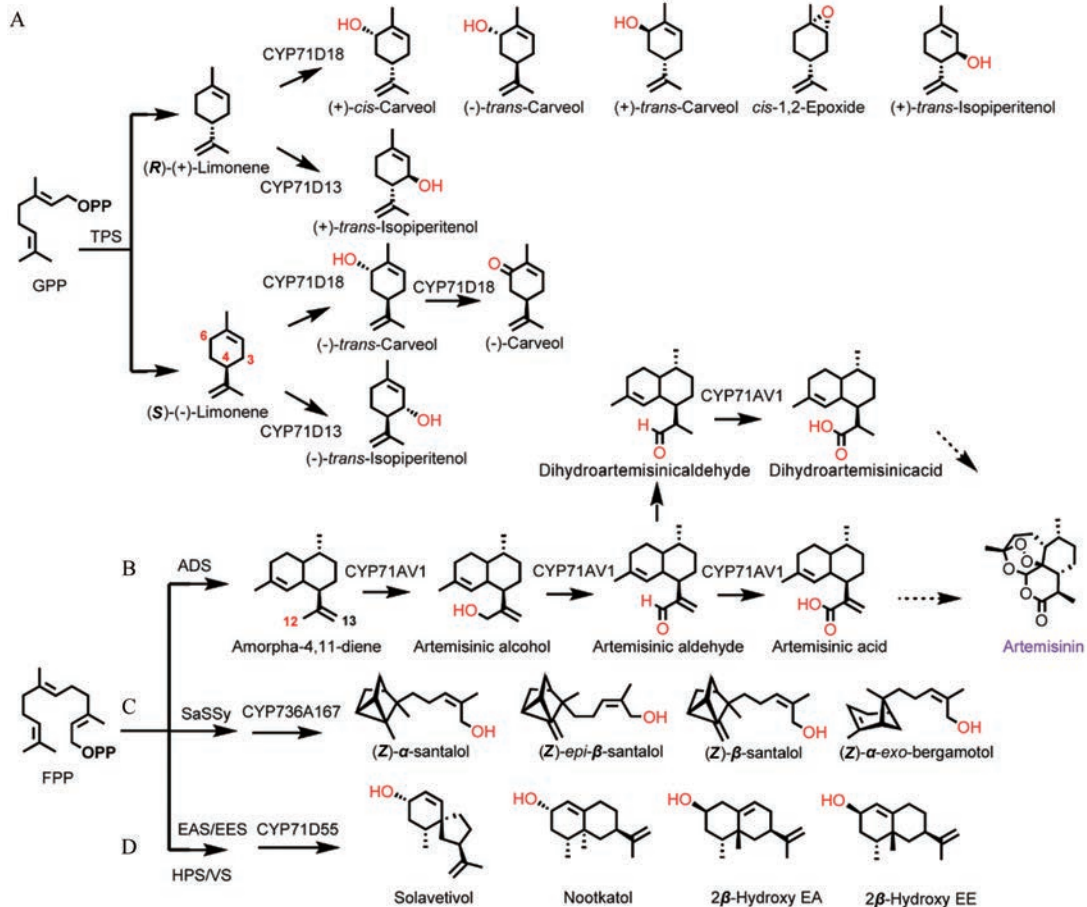


Figure 1 P450s involved in biosynthesis of monoterpenes and sesquiterpenes mentioned in this paper

1.3 参与二萜类化合物生物合成的P450基因 二萜类化合物生物合成途径中P450研究在近些年来取得较大进展, 研究者们利用酵母表达体系、二萜类工程菌模块体系和烟草表达体系等多种功能基因研究方法解析了包括丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)、灌木鼠尾草 (*Salvia frutescens*)、毛喉鞘蕊花 (*Coleus forskohlii*) 等药用植物中的多个P450的催化功能。Guo等^[23]通过高通量测序, 结合丹参比较转录组分析筛选了多个与丹参酮 (tanshinones) 生物合成途径相关P450基因。通过酵母表达体系和体外酶促反应筛选发现, CYP76AH1能够催化丹参酮骨架结构次丹参酮二烯至铁锈醇。结合酵母工程菌株的构建和丹参毛状根遗传转化体系, CYP76AH3和CYP76AK1的生物学功能也相继被解析。其中CYP76AH3是具有混杂催化性的P450, 能够分别催化铁锈醇的C11位羟基化和C6位羧基化生成11-羟基铁锈醇、柳杉酚和11-羟基柳杉酚, 其C6的羧基化功能导致丹参酮的生物合成途径可能扩展到另一个分支, 从而形成复杂的催化网络。而CYP76AK1是丹参酮类化合物生物合成途径中的关键酶之一, 对多个底物具有特异性的C20羟基化功能^[24](图2)。随着丹参酮生物合成途径P450基因的报道, 松香烷型二萜生物合成途径P450结构修饰酶的研究逐渐受到关注, 研究者通过分析鼠尾草和迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*) 的转录组数据, 相继从中克隆了鼠尾草酸 (carnosic acid) 生物合成途径的P450基因 (图2)。Ignea等^[25]将松香烷型二萜类化合物的生物合成途径分成萜类前体、骨架形成和结构修饰3个模块并在酵母中成功重构其骨架形成的两个模块, 形成能稳定生产萜类骨架结构次丹参酮二烯的酵母工程菌, 进而通过向工程菌中导入CYP76AH、AK亚家族P450从而验证其催化功

能, 利用这种边验证边合成的方式获得了能够产生鼠尾草酸的酵母工程菌。Scheler等^[26]根据P450对二萜骨架不同碳位的催化作用将CYP76家族分成11-羟基铁锈醇合酶 (11-hydroxyferruginol synthase, HFS) 和C20氧化酶两类, 并且对CYP76AH亚家族蛋白进行以同源蛋白为基础的定向突变实验, 深入研究了CYP76AH亚家族蛋白的活性位点, 并且成功在酵母工程菌中生产了鼠尾草酸。松香烷型二萜生物合成途径P450功能基因的研究, 系统深入地解析了这些酶的催化机制并加以利用, 为萜类化合物生物合成途径解析及其开发利用提供了很好的案例。

与酵母表达体系相比, 烟草体系在膜蛋白表达、翻译后修饰、前体供应、产物耐受、分区化合成等方面具有明显的优势, 相较于酵母表达体系能够更好地模拟P450蛋白在植物中的催化过程。毛喉素 (forskolin) 是半日花烷型二萜化合物, 具有环AMP增强剂的活性, 临床上用于治疗青光眼和心力衰竭。Pateraki等^[27]将毛喉鞘蕊花中的CYP76AH亚家族的5个P450通过不同组合在烟草中表达, 最终发现联合表达CYP76AH15、CYP76AH11和CYP76AH16与乙酰转移酶组合可以催化13R-甘露糖基氧化物直接产生毛喉素, 为毛喉素的细胞工厂生产奠定基础。

紫杉醇 (taxol) 是从红豆杉植物中提取的重要次生代谢产物, 具有显著的抗癌疗效, 被广泛用于治疗卵巢癌、肺癌、膀胱癌、子宫癌等^[28,29]。紫杉醇的基本骨架是一个紫杉烷类的三环二萜, 侧链包括3个芳香环和1个环氧丙烷环。P450介导的氧化反应是紫杉烯合成巴卡亭III的必经反应, 紫杉烷骨架形成后, 其C1、C2、C4、C5、C7、C9、C10和C13位发生进一步修饰, 包括羟基化、酰基化、酮基化等^[30], 最终形成紫杉醇的前

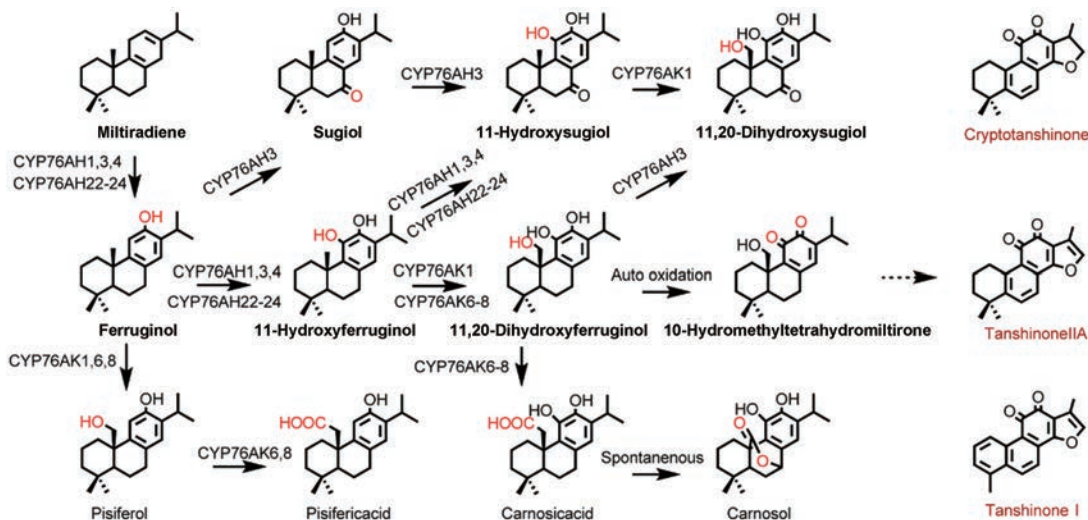


Figure 2 P450s involved in biosynthesis of tanshinones and carnosic acid mentioned in this paper

体巴卡亭III^[31,32]。研究者通过酵母表达体系先后鉴定紫杉醇生物合成途径中催化紫杉烷不同位点羟基化的P450酶,包括紫杉烯5 α -羟化酶(T5H)、紫杉烷10 β -羟化酶、紫杉烷-13 α -羟化酶、紫杉烷2 α -羟化酶和紫杉烷7 β -羟化酶等^[33],这些酶的发现对利用细胞工厂生产紫杉醇具有重要意义。Li等^[34]利用报道的紫杉醇生物合成途径的催化酶在烟草中首次实现了紫杉醇关键中间体紫杉二烯5 α 醇的植物底盘异源合成,该研究首先将紫杉二烯合酶(TS)、T5H及P450还原酶导入本氏烟草体系中。通过荧光共聚焦显微检测发现这些酶在细胞中定位于不同的区域,即P450酶T5H在内质网上表达,而其底物产生于叶绿体。因此进一步通过叶绿体分区工程化策略,将T5H及P450还原酶进行叶绿体定位改造,该代谢通路在同一空间内进行,成功实现了5 α -羟基紫杉二烯的异源合成。紫杉醇是非常重要的植物次生代谢产物,并且在原植物中含量非常低,但是由于其生物合成途径的复杂性以及至少19步催化过程,至今尚未完全解析,受全世界广泛关注。

1.4 参与三萜和甾体类化合物生物合成的P450基因
三萜和甾体类化合物是以异戊二烯为结构单元组成的具有多种结构的30碳和27碳的天然产物,是许多重要药用植物如人参(*Panax ginseng*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、柴胡(*Bupleurum roots*)、积雪草(*Centella asiatica*)、重楼(*Paris polyphylla*)等的重要活性成分,因其具有良好的抗肿瘤、抗炎、抗凝血、免疫调节等药理活性^[35,36],其生物合成途径的P450研究和合成生物学研究也广受关注。

三萜化合物包括30余种结构类型,其中主要的结构类型包括:羊毛甾烷型、达玛烷型、葫芦烷型、齐墩果烷型、乌苏烷型以及羽扇豆烷型等^[37]。P450在三萜的结构多样性和活性形成过程中发挥重要作用,已鉴定超过80个P450酶参与植物三萜生物合成,分别来源于30多个不同的物种^[38]。

人参皂苷类化合物(ginsenosides)是五加科人参属植物人参、西洋参(*P. quiquefolium*)和三七(*P. pseudoginseng*)的主要活性成分。迄今为止,已从人参中鉴定出150多种天然人参皂苷^[39],根据苷元骨架的不同,可分为达玛烷型和齐墩果烷型两大类。近年来,研究者们基于高通量测序对人参皂苷的主要来源植物人参、西洋参、三七进行转录组分析筛选参与人参皂苷合成途径中的P450。Han等^[40]通过茉莉酸甲酯诱导人参不定根,获得分属11个家族的53个P450,筛选获得了能够催化达玛烷原二醇C-12位的羟基化生成原人参二醇(protopanaxadiol)的CYP716A47,原人参二醇进而在CYP716A53v2的催化下发生C6位羟基化生成原

人参三醇(protopanaxatriol)^[41]。经P450的修饰后,通过多个糖基转移酶的糖基化修饰分别生成Rh₂、Rg₃、Rd等具有良好药理活性的人参皂苷。齐墩果烷型人参皂苷自碳骨架 β -香树脂醇(β -amyrin)开始,经过CYP716A52v2催化形成C28位羧基化产物齐墩果酸(oleanolic acid)^[42],进而通过糖基化形成人参皂苷R₀。随着对齐墩果酸生物合成研究的不断深入,来自多种植物的C28位氧化酶逐渐被挖掘,研究发现CYP716A亚家族基因在齐墩果烷型三萜化合物C28位修饰中起到决定性作用。例如,五加科植物刺楸(*Kalopanax septemlobus*)中的CYP716A94^[43]、豆科植物紫苜蓿(*Medicago truncatula*)中的CYP716A12^[44]、桔梗科植物桔梗(*Platycodon grandiflorus*)中的CYP716A141等来自多种科属的CYP716A亚家族P450均被验证具有 β -香树脂醇C28氧化酶功能(图3A)^[45]。

甘草酸(glycyrrhetic acid)是药用植物甘草的主要活性成分,是以 β -香树脂醇为骨架经P450连续修饰产生的齐墩果烷型五环三萜类化合物,具有显著的抗炎及保肝解毒作用。甘草中的CYP88D6和CYP72A154是参与甘草酸生物合成的关键P450酶,均具有连续催化功能并具有底物杂泛性。CYP88D6具有 β -香树脂醇-11-氧化酶活性,体外实验表明该酶催化 β -香树脂醇经两步氧化反应生成11-羰基- β -香树脂醇。11-羰基- β -香树脂醇作为甘草酸的前体化合物,由CYP72A154连续催化3步氧化反应生成甘草次酸^[46,47],进而经过糖基转移酶修饰形成甘草酸苷(glycyrrhizin)(图3B)。

C-2 α 羟基化的三萜化合物包括山楂酸(maslinic acid)、科罗索酸(corosolic acid)和麦珠子酸(alphitolic acid)等,具有抗HIV、抗肿瘤和抗糖尿病等活性,但是催化C-2 α 羟基化的步骤一直未解析。Dai等^[48]利用代谢工程的方法构建了高产多种三萜骨架的酵母底盘菌,从山楂(*Crataegus pinnatifida*)的悬浮细胞转录组中筛选到了62个P450基因,通过转化酵母工程菌株筛选功能,发现CYP716C49对达玛烷型四环三萜骨架并没有催化功能,但能够催化齐墩果酸、桦木酸(betulinic acid)和熊果酸(ursolic acid)等3种化合物C-2 α 的羟基化,这一发现为合成生物学生产具有多种药理活性的五环三萜的活性化合物奠定了基础。

胆固醇类化合物是甾体化合物,被广泛用于心血管病、癌症、老年性疾病的治疗当中。环杷明(cyclopamine)是治疗基底细胞癌以及由于部分信号转导系统缺陷所致肿瘤的重要药物,克隆自药用植物北美山蒺藜(*Veratrum californicum*)的CYP90B27、CYP90G1和CYP94N1可以分别修饰胆固醇碳22位、26位的羟基

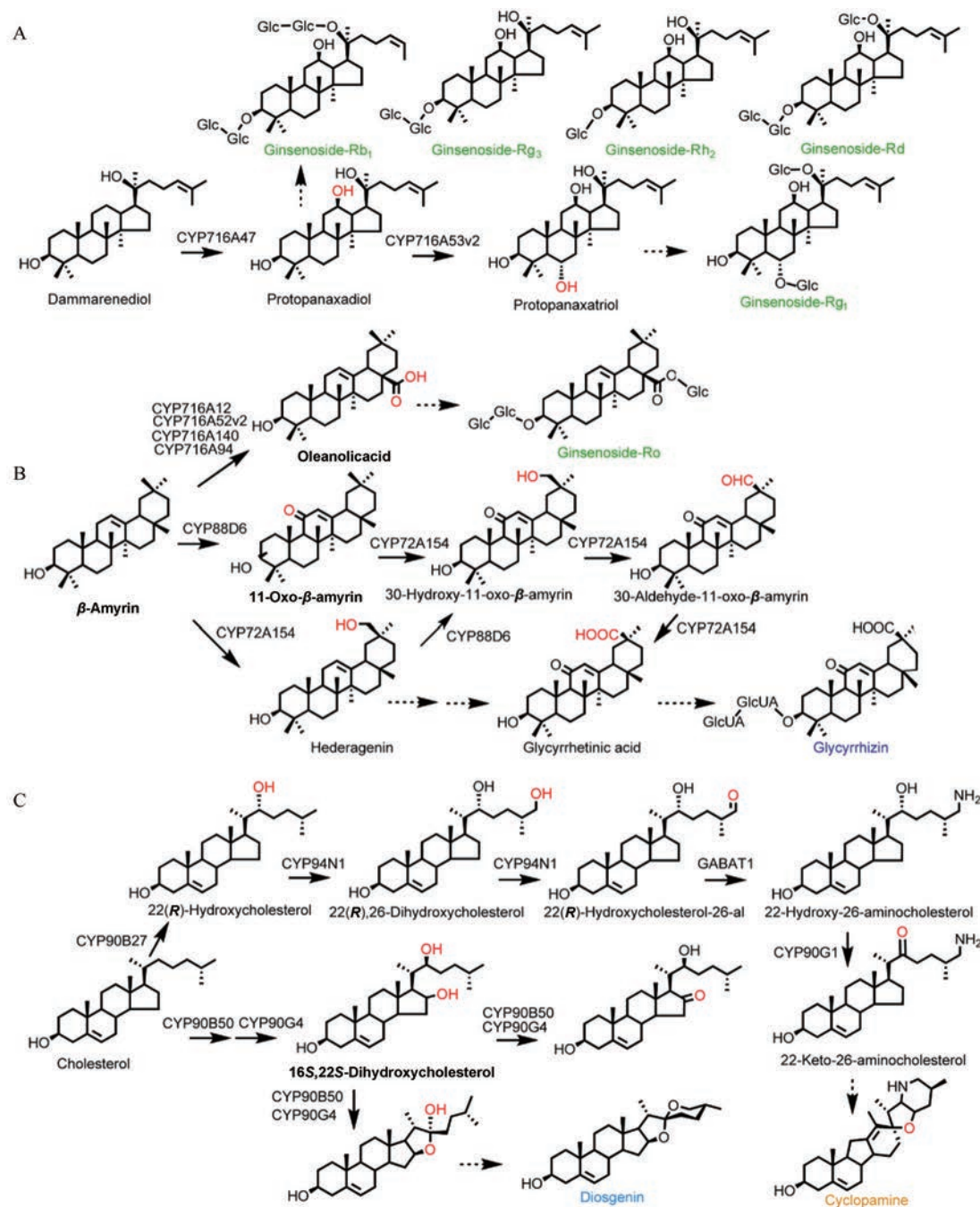


Figure 3 P450s involved in biosynthesis of ginsenosides, glycyrrhizin, cyclopamine and diosgenin

化和酮基化, 进而生成环杷明^[49]。薯蓣皂苷 (diosgenin) 是从植物中提取的一种螺酮甾体类天然产物, 是甾体激素的重要前体。Christ 等^[50]利用烟草瞬时表达技术, 通过逐步递减混合库的筛选方法分别从单子叶植物重楼和双子叶植物葫芦巴 (*Trigonella foenum-graecum*) 中筛选出催化胆固醇 C5 和 C6 的螺缩酮化生成薯蓣皂苷元的关键 P450 基因 (*PpCYP90G4* 和 *TfCYP90B50*)。系统进化分析表明这两种植物催化同一个反应的 P450 基因是独立进化的, 该研究为薯蓣皂苷元及其结构衍生物的异源生产提供了依据 (图 3C)。

2 生物碱生物合成中的 P450 基因

生物碱是广泛存在的一类含氮化合物, 根据其基本结构类型分为异喹啉类生物碱、吡啶类生物碱、莨菪烷类生物碱、吲哚类生物碱和有机胺类生物碱^[51]。生物碱是药用植物中具有多种生物活性的一类化学成分, 在人类抗病历史上发挥着重要作用。典型的生物碱类化合物如喜树碱 (camptothecin)、长春花碱 (vinblastine)、吗啡 (morphine)、可待因 (codeine)、小檗碱 (berberine)、血根碱 (sanguinarine) 等, 在临床上具有抗肿瘤、抗炎和抗病毒、止痛、抗疟疾等重要药理活性^[52]。

Table 1 P450s involved in biosynthesis of terpenoids and steroids in medicinal plants

Plant	Gene	Function	GeneBank ID
<i>Mentha haplocalyx</i> Briq.	<i>CYP71D13</i>	(-)-(4S)-Limonene-3-hydroxylase	Q9XHE7.1
	<i>CYP71D15</i>	(-)-(4S)-Limonene-3-hydroxylase	Q9XHE6.1
	<i>CYP71D18</i>	(-)-(4S)-Limonene-6-hydroxylase	Q9XHE8.1
<i>Perilla frutescens</i>	<i>CYP71D174</i>	(-)-Limonene-7-hydroxylase	ADC94830.1
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>CYP706B1</i>	(+)- δ -Cadinene-8-hydroxylase	AAK60517.1
<i>Callitropsis nootkatensis</i>	<i>CYP706M1</i>	Valencene-2-oxidase	AGJ03150.1
<i>Artemisia annua</i>	<i>CYP71AV1</i>	Amorpha-4,11-diene-12 oxidase	BAM68819.1
<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>	<i>CYP71AV9</i>	Costunolide synthase	AIA09040.1
<i>Mucuna pruriens</i>	<i>CYP71D55</i>	Premnaspirodiene oxygenase	RDY12970.1
<i>Coleus forskohlii</i>	<i>CYP71D381</i>	13R-Manoyloxidase	KT382342
	<i>CYP76AH8-11</i>		KT382346-KT382349,
	<i>CYP76AH15-17</i>		KT382358-KT382360
<i>Euphorbia lathyris</i>	<i>CYP71D445</i>	Casbene-9-oxidase	KR350668
	<i>CYP726A27</i>	Casbene-5-oxidase	KR350669
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>CYP716B</i>	Taxoid-9 α -hydroxylase	KF773141
	<i>CYP701A</i>	<i>ent</i> -Kaurene oxidase	JF929910
<i>Jatropha curcas</i>	<i>CYP726A35</i>	Casbene-5,6-oxidase	KX060558
	<i>CYP71D495</i>	Casbene-9-oxidase	KX060559
<i>Ricinus communis</i>	<i>CYP726A14,17-18</i>	Casbene-5-oxidase	KF986810, KF986813, KF986814
	<i>CYP726A16</i>	5-Keto-casbene-7,8-epoxidase	KF986812
	<i>CYP726A15</i>	Neocembrene-5-oxidation	KF986811
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>CYP76AH22/23</i>	Ferruginol synthase	KP091843/KP091844
	<i>CYP76AH4</i>	Ferruginol synthase	[53]
	<i>CYP76AK7/8</i>	11-Hydroxyferruginol-20-oxidase	KX431219/KX431220
<i>Salvia fruticosa</i>	<i>CYP76AH24</i>	Ferruginol synthase/Ferruginol-11-hydroxylase	KP091842
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	<i>CYP76AK6</i>	11-Hydroxyferruginol-20-oxidase	KX431218
	<i>CYP76AH1</i>	Ferruginol synthase	JX422213
<i>Salvia fruticosa</i>	<i>CYP76AH3</i>	Ferruginol/sugiol-11-hydroxylase	KR140168
	<i>CYP76AK1</i>	11-Hydroxyferruginol-20-hydroxylase	KR140169
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	<i>CYP701A</i>	<i>ent</i> -Kaurene oxidase	KJ606394
<i>Salvia pomifera</i>	<i>CYP71BE52</i>	Ferruginol-2-synthase	KT157042
	<i>CYP76AH24</i>	Ferruginol synthase/Ferruginol-11-hydroxylase	KT157044
	<i>CYP76AK6</i>	11-Hydroxyferruginol-20-oxidase	KT157045
<i>Stevia rebaudiana</i>	<i>CYP701A5</i>	<i>ent</i> -Kaurene oxidase	AY364317
<i>Taxus canadensis</i>	<i>CYP725A6</i>	Taxoid 2 α -hydroxylase	AY518383
<i>Taxus cuspidata</i>	<i>CYP725A1</i>	5 α -Taxadienol-10 β -hydroxylase	AF318211
<i>Stevia rebaudiana</i>	<i>CYP725A2</i>	Taxane 13 α -hydroxylase	AY056019
<i>Taxus canadensis</i>	<i>CYP725A3</i>	Taxane-14 β -hydroxylase	AY188177
<i>Taxus cuspidata</i>	<i>CYP725A4</i>	Taxadiene-5 α -hydroxylase	AY289209
<i>Vitex agnus-castus</i>	<i>CYP725A5</i>	Taxoid-7 β -hydroxylase	AY307951
<i>Lotus corniculatus</i> L.	<i>CYP76BK1</i>	Peregrinol-16-hydroxylase	MG696754.1
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>CYP71D353</i>	20-Hydroxylyupeol-28-oxidase	AHB62239.1
	<i>CYP716AL1</i>	β -Amyrin-28-hydroxylase	AEX07773.1
<i>Bupleurum roots</i>	<i>CYP716Y1</i>	β -Amyrin-16-hydroxylase	AHF45909.1
<i>Glycyrrhizae uralensis</i>	<i>CYP88D6</i>	β -Amyrin-11-oxidase	QBC36431.1
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>CYP93E3</i>	β -Amyrin-24-hydroxylase	BAG68930.1
<i>Bupleurum roots</i>	<i>CYP72A154</i>	β -Amyrin-30-oxidase	H1A988.1
<i>Medicago truncatula</i>	<i>CYP93E2</i>	β -Amyrin-24-hydroxylase	ABC59085.1
	<i>CYP716A12</i>	α,β -Amyrin-28-oxidase	ABC59076.1
	<i>CYP72A63</i>	β -Amyrin-30-hydroxylase	H1A981.1
<i>Medicago truncatula</i>	<i>CYP72A68v2</i>	β -Amyrin-23-hydroxylase	BAL45204.1
<i>Panax ginseng</i>	<i>CYP93E2</i>	β -Amyrin-24-hydroxylase	ABC59085.1
	<i>CYP716A12</i>	β -Amyrin-28-oxidase	ABC59076.1
	<i>CYP716A52v2</i>	β -Amyrin-28-oxidase	AFO63032.1
	<i>CYP716A47</i>	Dammareniol-12-hydroxylase	AEY75212.1
	<i>CYP716A53v2</i>	Protopanaxadiol-6-hydroxylase	I7CT85.1
<i>Platycodon grandiflorus</i>	<i>CYP716A140</i>	β -Amyrin-28-oxidase	AOG74836.1

Continued

Plant	Gene	Function	GeneBank ID
<i>Centella asiatica</i>	<i>CYP716A141</i>	Dammareniol-12-hydroxylase	AOG74838.1
	<i>CYP716S5</i>	Oleanolic acid-12,13 α -epoxidase	AOG74839.1
	<i>CYP716A83/86</i>	β -Amyrin-28-oxidase	AOG74832/AOG74831
	<i>CYP716E41</i>	Oleanolic acid-6 β -oxidase	AOG74834.1
	<i>CYP716C11</i>	Oleanolic acid-2 α -oxidase	AOG74835.1
<i>Veratrum californicum</i>	<i>CYP90B27v1</i>	Cholesterol-22-hydroxylase	KJ869252
	<i>CYP90G1</i>	22-Hydroxy-26-amincholesterol-22-oxidase	KJ869260
	<i>CYP94N1</i>	22-Hydroxycholesterol-26-oxidase	KJ869255
<i>Ajuga reptans</i>	<i>CYP71D443</i>	Cholesterol-22-hydroxylase	BAS30379.1
<i>Paris polyphylla</i>	<i>CYP90B27</i>	Cholesterol-22-hydroxylase	KX904822
	<i>CYP90G4</i>	Cholesterol-5,6-spiroketaloxidase	QDS03628
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	<i>CYP90B50</i>	Cholesterol-5,6-spiroketaloxidase	QDS03633.1

虽然吗啡、长春花碱等生物碱的合成生物学研究已较深入^[54,55],但是国内药用植物生物碱的研究大多集中在化学成分研究,更多来源于药用植物的生物碱类化合物的生物合成途径值得深入研究。

2.1 苄基异喹啉生物碱生物合成的P450基因 苄基异喹啉生物碱因含有吗啡、小檗碱等重要的生物碱,其生物合成途径备受关注。作为吗啡和可待因的主要来源植物罂粟 (*Papaver somniferum*),其苄基异喹啉类生物碱合成网络、代谢工程研究取得了突破进展,已经成为了苄基异喹啉类生物碱研究的模式植物^[56]。苄基异喹啉类生物碱的主要生物合成途径以及部分分支途径已基本解析,P450在结构羟基化修饰、结构异构化以及结构偶联过程中发挥重要作用。目前主要有3个CYP家族参与了BIA骨架的形成与修饰:CYP80、CYP82和CYP719(表2)。CYP80s接受1-苄基异喹啉底物,催化多种反应,包括羟基化、C-O和C-C偶联。CYP719s能够接受1-苄基异喹啉和原小檗碱型生物碱底物催化C-C苯酚偶联和亚甲基二氧桥形成反应。CYP82s接受1-苄基异喹啉、原小檗碱、普罗托品等化合物,催化多种羟基化反应^[57]。

在苄基异喹啉生物合成途径中,上游途径从去甲乌药碱到牛心果碱 (reticuline),化合物类型均为1-苄基异喹啉类,CYP80s催化1-苄基异喹啉骨架修饰及双苄基异喹啉类骨架形成。*N*-甲基乌药碱是上游一个重要的前体,在罂粟中,*N*-甲基乌药碱在CYP80B3的催化下进行3'位碳的羟基化生成3-羟基-*N*-甲基乌药碱,该化合物进一步在甲基转移酶的催化下生成牛心果碱^[58]。而来自于小檗属植物匍匐小檗 (*Berberis stolonifera*)的P450酶CYP80A1则可以催化(*R*)-和(*S*)-*N*-甲基乌药碱分子间C-O芳基偶联反应生成双苄基异喹啉类化合物(图4A)^[59],该酶能够偶联一分子(*R*)-*N*-甲基乌药碱和一分子(*S*)-*N*-甲基乌药碱形成大叶小檗碱 (berbamunine),也能够将两分子(*R*)-*N*-甲

基乌药碱结合生成大叶小檗碱的非对映异构体 *guat-tegaumerine*。

牛心果碱是苄基异喹啉类生物碱生物合成途径中的重要中间体,是小檗碱、血根碱、蒂巴因 (thebaine)、可待因等不同结构类型化合物的共同前体。由(*S*)-牛心果碱翻转构型生成(*R*)-牛心果碱是罂粟中形成吗啡类生物碱的必要且关键的步骤,2015年两篇文章同时对催化这一反应的酶进行了报道,催化这一异构化的酶是一个同时具有P450模块和醛-酮还原酶模块的天然融合蛋白。Winzer等^[60]利用突变分别对其两个模块的功能进行了研究,发现其中P450模块负责催化(*S*)-牛心果碱生成1,2-二氢牛心果碱,而醛-酮还原酶则负责催化1,2-二氢牛心果碱生成(*R*)-牛心果碱。Farrow等^[61]在酵母中分别表达来自罂粟的融合蛋白酶的氧化区、还原区以及来自于大红罂粟 (*Papaver bracteatum*)的同源酶,利用不同底物进行酶促反应,深入探究该P450酶和醛-酮还原酶的催化条件、催化活性及融合蛋白的结构,认为融合蛋白缩短底物反应路径,使其高效转化,为合成生物学代谢流调控提供思路。

从牛心果碱到吗啡和可待因的生物合成过程中,还有一步由P450酶介导的分子内芳基偶联反应。研究发现来源于罂粟的CYP719B1能催化(*R*)-牛心果碱分子内C-C苯基偶联形成沙罗泰里啉 (salutaridine),进一步在其他酶的催化下生成吗啡和可待因(图4A)^[62]。在诺思卡品 (noscapine)、小檗碱和血根碱的生物合成过程中,CYP719家族参与了多步分子内偶联反应,在亚甲基二氧基的形成过程中发挥重要催化作用,包括花菱草 (*Eschscholzia californica*)中的碎叶紫堇碱合酶 (cheilanthifoline synthetase) CYP719A5^[63]、罂粟中的氢化小檗碱合酶 (canadine synthetase) CYP719A21^[64]。而来源于薊罂粟 (*Argemone mexicana*)中的CYP719A13具有较强的底物杂泛性,能催化碎叶紫堇碱、氢化小檗碱和四氢非洲防己碱 (tetrahydrocolumbamine) 形成亚

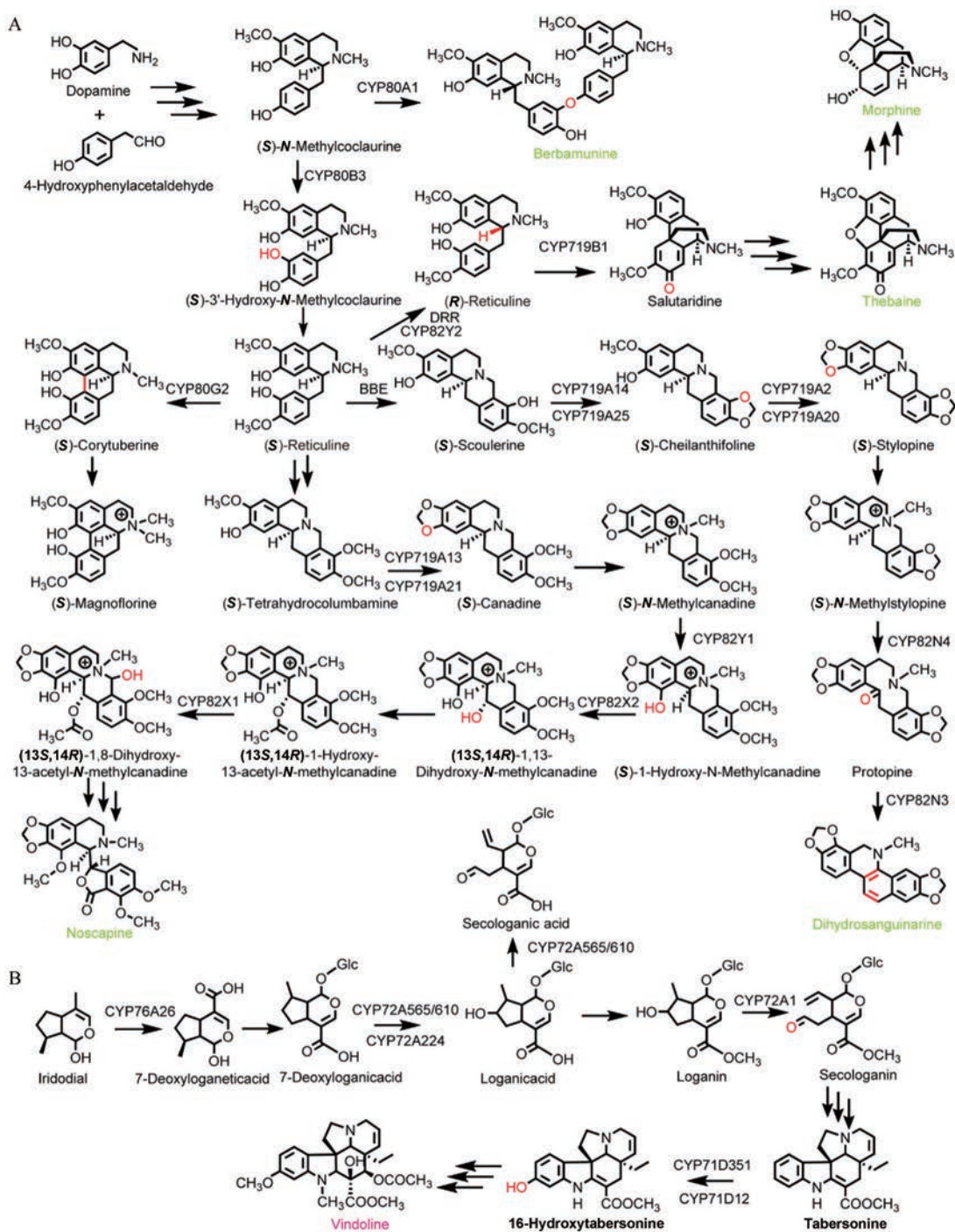


Figure 4 P450s involved in biosynthesis of benzyloisoquinoline alkaloids

甲基二氧基键(图4A)^[65]。在植物生物碱的生物合成过程中分子内芳基偶联反应比较常见^[66],另一个可以催化分子内C-C苯酚偶联的是来源于日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)的CYP80G2,可将S-牛心果碱转化为S-紫堇碱(图4A)^[67]。

除了CYP719家族参与的分子内偶联反应,CYP82家族的基因同样也在诺思卡品和血根碱的生物合成中扮演重要角色。在诺思卡品的生物合成途径上

CYP82Y1催化C1位的羟基化,CYP82X2进一步在此基础上进行C13位的羟基化,为进一步的酰基化提供活化位点,接着CYP82X1在此基础上催化N-C位的开环反应,形成4'-O-去甲基-3-O-乙酰化罂粟碱,再在一系列酶的作用下生成诺思卡品^[56]。在血根碱的生物合成途径上,甲基罂粟碱羟化酶(methylstylophinehydroxylase)CYP82N4催化(s)-cis-N-甲基罂粟碱羟基化并开环生成原阿片碱(protopine),在CYP82N3的催

化下生成6-羟基-普罗托品,经自发反应生成二氢血根碱(dihydrosanguinarine)(图4A)^[68]。

2.2 单萜吲哚生物碱生物合成的P450基因 萜类吲哚生物碱也是生物碱中的一大类,其中75%以上是单萜吲哚生物碱,包括长春花碱、阿吗碱(ajmalicine)、喜树碱、喹啉(quinine)等。其中,抗肿瘤药物长春花碱由于卓越的生物学活性和药理药效,其生物合成颇受关注。

长春花碱和喜树碱是单萜吲哚生物碱的典型代表,均为抗肿瘤化合物,其生物合成途径包括单萜途径和吲哚途径。其中单萜生物合成途径中香叶醇的C8位羟基化由P450介导,来自长春花和喜树(*Campotheca acuminata*)中的G8H已被发现并验证其催化功能,在白花蛇根草(*Ophiorrhiza pumila*)的毛状根中联过表达长春花的G8H和异胡豆苷合酶基因可以提高其中喜树碱的产量^[69]。另外CYP76家族,包括CYP76B、CYP76C^[70,71]、CYP76F^[72]等亚家族的多个P450酶,也能够催化香叶醇在C8位羟基化形成8-羟基香叶醇,参与单萜类吲哚生物碱和环烯醚萜类单萜的生物合成。有趣的是,已发现的单萜途径中的P450均具有底物杂泛性,Hofer等^[71]研究发现CYP76B、CYP76C亚家族蛋白不仅能够催化芳樟醇、香叶醇,还能够识别薰衣草醇(lavandulol)、松油醇(terpineol)和香茅醇(citronellol)等化合物并在其不同位置进行氧化,为单萜吲哚生物碱的生物合成和合成生物学研究提供催化元件和改造空间。

异胡豆苷(strictosidine)是单萜吲哚生物碱的共同前体,其合成包括环烯醚萜合成和吲哚合成两部分。环烯醚萜途径主要是从单萜前体GPP生成断马钱子苷(secologanin)的过程,断马钱子苷生物合成途径的P450酶CYP72A1于2000年就被鉴定,催化马钱子苷环戊烷的分子内开环反应生成断马钱子苷^[73]。2014年,Miettinen等^[74]完成断马钱子苷生物合成途径的全解析,该研究通过整合转录组和蛋白质组学的方法,共发现了4个功能基因,其中2个是P450基因。CYP76A26是一个多功能酶,能够催化硫乙二醛羟基化和脱水形成7-脱氧马钱子酸;CYP72A224则催化7-脱氧马钱子酸羟基化生成马钱子酸(loganic acid)(图4B)。长春花中断马钱子苷的生物合成途径全解析也为其他单萜吲哚生物碱生物合成途径研究提供指导。2019年,Yang等^[75]从喜树中克隆得到同属于CYP72A家族的催化喜树碱生物合成的两个CYP72s家族基因CYP72A565和CYP72A610,与CYP72A224不同的是,这两个基因均能同时催化7-脱氧马钱子酸的碳7位羟基化生成马钱子酸,并进一步催化碳7和碳8位的C-C键断裂,产生

分子内的环戊烷开环反应,同时这两个基因也能催化马钱子酸的分子内开环生成断马钱子酸(图4B)。

长春花碱是由文多灵(vindoline)和长春质碱(catharanthine)聚合而成,从单萜吲哚生物碱的共同前体异胡豆苷到长春花碱的生物合成共有11步,P450主要参与了从它波宁(tabersonie)到文多灵的过程中,P450与甲基转移酶和乙酰基转移酶共同催化这一过程,包括T16H(CYP71D351和CYP71D12)、D4H、DAT分别催化它波宁碳16位羟基化、16-甲氧基它波宁的碳3位羟基化、去乙酰氧基文多灵的碳4位羟基化,最后经过乙酰化生成文多灵(图4B)^[76,77]。

此外,在阿吗灵(ajmaline)的生物合成途径研究中发现,来自萝芙木(*Rauwolfia serpentina*)的维诺任碱羟化酶(vinorine hydroxylase)CYP82S18既能使维诺任碱羟基化形成阿吗灵的前体化合物萝芙木勒宁,也能进一步催化萝芙木勒宁非氧化异构化为霹雳萝芙木碱,CYP82S18的双重催化活性在生物碱途径形成分支过程中起到重要作用^[78]。

3 苯丙烷类化合物生物合成中的P450基因

苯丙烷类化合物包括木质素、亚精胺类、香豆素及其衍生物、简单苯丙烷类化合物以及黄酮类化合物,其中黄酮类化合物包括花青素、黄酮醇、黄酮、黄烷酮、异黄酮、原花色素等,是苯丙烷类中最大的一类^[79]。苯丙烷类化合物是许多中药的活性成分,如:黄芩苷(baicalin)、甘草素(liquiritigenin)、灯盏花素(brevi-scapsine)等。苯丙烷类化合物生物合成途径共用一条非常短的代谢途径,从莽草酸途径开始,以苯丙氨酸或酪氨酸为前体,在L-苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)或者酪氨酸解氨酶(tyrosine ammonialyase, TAL)催化下分别生成肉桂酸和香豆酸,肉桂酸在肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H, CYP73As)的催化下生成香豆酸^[80],香豆酸进一步在香豆酸辅酶A连接酶(4-coumarate: CoA ligase, 4CL)的催化下生成香豆酰-CoA,香豆酰-CoA是苯丙烷类化合物生物合成途径一个重要的中间体,进一步经过羟基化、甲基化、缩合、糖基化和乙酰化生成结构丰富多样的化合物^[81]。苯丙烷代谢途径中研究较为深入的P450包括C4H、对香豆酰基莽草酸3'羟化酶(coumaroyl-shikimate 3'-hydroxylase, C3H, CYP98s)和松柏醛-5羟化酶(coniferaldehyde 5-hydroxylase, C5H, CYP84s)^[82](表3)。C4H是第一个被鉴定的植物P450单加氧酶,也是第一个被克隆和确定功能的植物P450,具有高度的底物特异性,不同的植物中C4H具有一定的保守性,在系统进化树中通常聚为一个分支^[83]。许多药用植物中的C4H基因已被克隆并进行了功能验证,例如丹参^[82]、黄芩

Table 2 P450s involved in biosynthesis of alkaloids in medicinal plants

Plant	Gene	Function	Gene Bank ID
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>CYP72A224</i>	7-Deoxyloganic acid-7-hydroxylase	AGX93062.1
	<i>CYP71BJ1</i>	Tabersonine/lochnericine-19-hydroxylase	ADZ48681.1
	<i>CYP76B6</i>	Geraniol-8-hydroxylase	AJ251269
	<i>CYP72A1</i>	Secologanin synthase	Q05047.1
	<i>CYP76A26</i>	7-Deoxyloganic acid synthase	AHX24370.1
	<i>CYP71D351</i>	Tabersonine-16-hydroxylase	U5HKE8
	<i>CYP71D12</i>	Tabersonine-16-hydroxylase	FJ647194.1
<i>Papaver somniferum</i>	<i>CYP80B1</i>	(S)-N-Methylcoclaurine-3'-hydroxylase	AAF61400.1
	<i>CYP719B1</i>	Salutaridine synthase	ABR14720.1
	<i>CYP82Y1</i>	(S)-N-Methylcanadine-1-hydroxylase	QBG82621.1
	<i>CYP82X1</i>	(13S,14R)-13-O-Acetyl-1-hydroxy-N-methylcanadine-8-hydroxylase	AFB74614.1
	<i>CYP82N4</i>	(S)-cis-N-Methylstylopine-14-hydroxylase	L7X3S1
	<i>CYP82N3</i>	Protopine-6-hydroxylase	L7XOL7
	<i>CYP719A21</i>	(S)-Canadine synthase	I3QBP4.1
<i>Berberis stolonifera</i>	<i>CYP80A1</i>	Berberamine synthase	P47195.1
<i>Camptotheca acuminata</i>	<i>CYP76B4</i>	Geraniol-8-hydroxylase	AES93118
	<i>CYP72A565</i>	7-Deoxyloganic acid-7-oxidase/Loganin synthase/secologanin synthase	QDC27812
	<i>CYP72A610</i>		QDC27813
<i>Hyoscyamusniger</i>	<i>CYP80F1</i>	Littorine mutase	ABD39696.1
<i>Coptis japonica</i>	<i>CYP80B2</i>	(S)-N-Methylcoclaurine-3'-hydroxylase	BAB12433.1
	<i>CYP719A1</i>	Canadinesynthase (methylenedioxy bridge-forming)	BAB68769.1
	<i>CYP80G2</i>	(S)-Corytuberine synthase	BAF80448.1
<i>Rauwolfia serpentina</i>	<i>CYP82S18</i>	Vinorine hydroxylase	KY926696
<i>Argemone mexicana</i>	<i>CYP719A13</i>	(S)-Stylopine synthase/(S)-Nandinine synthase/(S)-Canadine synthase	B1NF19.1
<i>Eschscholzia californica</i>	<i>CYP719A5</i>	Cheilanthisfoline synthase	B5UAQ8.1
	<i>CYP719A9</i>	Reticulineoxidase (methylenedioxy bridge-forming)	BAG75114.1

(*Scutellaria baicalensis*)^[84]、忍冬 (*Lonicera ja ponica*)^[85]。C3'H 主要参与木质素 (lignin) 及一些重要活性成分如咖啡酸 (caffeic acid)、绿原酸 (chlorogenic acid)、迷迭香酸 (rosmarinic acid) 等生物合成, 是苯丙烷途径一个重要的限速酶基因, 通过保守序列分析、共表达分析, 最终确定 C3'H 是属于 CYP98 家族的 P450^[86,87]。C3'H 主要催化 4-香豆酰莽草酸酯或者奎宁酸、4-香豆酮等的 C3 位的羟基化, 不同物种来源的 C3'H 能够接受不同的底物进行 C3 位或者 C3' 位羟基化生成绿原酸、迷迭香酸等及其下游产物。比如来自丹参的 SmC-YP98A14 能够催化 2-氧-(4-香豆酰)-3-(4-羟基苯)-乳酸的 C3' 位羟基化生成迷迭香酸作为丹酚酸 B 的合成前体^[88]。C5H 主要催化松柏醛或者松柏醇的 C5 位羟基化, 是木质素和芥子酸酯 (sinapate esters) 生物合成途径中的重要限制因素^[83]。

黄酮类化合物是苯丙烷途径上非常重要的化合物类型, 是许多药用植物的活性成分, 生物合成途径研究较深入。黄酮生物合成中的 P450 多具有底物杂泛性, 能够催化多个结构相似化合物的同一位点, 并且, 相同亚家族的 P450 蛋白多能够催化黄酮类化合物的同一位点, 具有较强的家族专一性^[89]。例如, CYP75 家族 P450 参与花青素和缩合单宁类化合物的生物合成, 能够催化黄酮类化合物 C3' 位 (CYP75Bs) 和 C3', 5' 位

(CYP75As) 羟基化, CYP93B 亚家族 P450 能够催化黄酮类化合物 C2 位羟基化, 并脱水形成 C-C 双键等^[89] (图 5)。甘草中的 CYP81E1 可以催化异黄酮、大豆苷元和芒柄花素的 2' 位羟基化, 分别生产 2'-羟基异黄酮等化合物^[90]。而 2-羟基异黄酮主要存在于豆科植物中, 甘草中的异黄酮合酶 CYP93C2 可以催化 2S-黄酮酮 C2 位置的酚环重排到 C3 位置, 进而生成 2-羟基异黄酮 (图 5)^[91]。

黄芩素 (baicalein)、汉黄芩素 (woogonin) 和野黄芩素 (scutellarein) 等都是黄芩、灯盏草等中发挥活性的成分。黄芩素和汉黄芩素是中药黄芩 (*Scutellaria baicalensis*) 的主要活性成分, 具有抗氧化、抗凋亡以及改善学习记忆能力等广泛药理学活性, 有望成为广谱抗肿瘤药物及治疗阿尔茨海默症的潜在理想药物。野黄芩素存在于黄芩和菊科植物灯盏花 (*Erigeron breviscapus*) 中, 具有消炎止痛、活血化瘀和祛风除湿等功效。研究人员在前期基础上, 通过从黄芩的转录组数据中搜索同源序列, 筛选克隆得到了 *CYP82D1.1* 和 *CYP82D2* 两个 P450 基因, 生化分析表明这两个基因分别催化 6 位的羟基化和 8 位的羟基化。进一步对黄芩毛状根 RNAi 实验验证分析认为, *CYP82D1.1* 主要负责黄芩素和野黄芩素的合成, 而 *CYP82D2* 则催化产生去甲基汉黄芩素 (图 5)^[92]。Li 等^[93]进一步利用 7

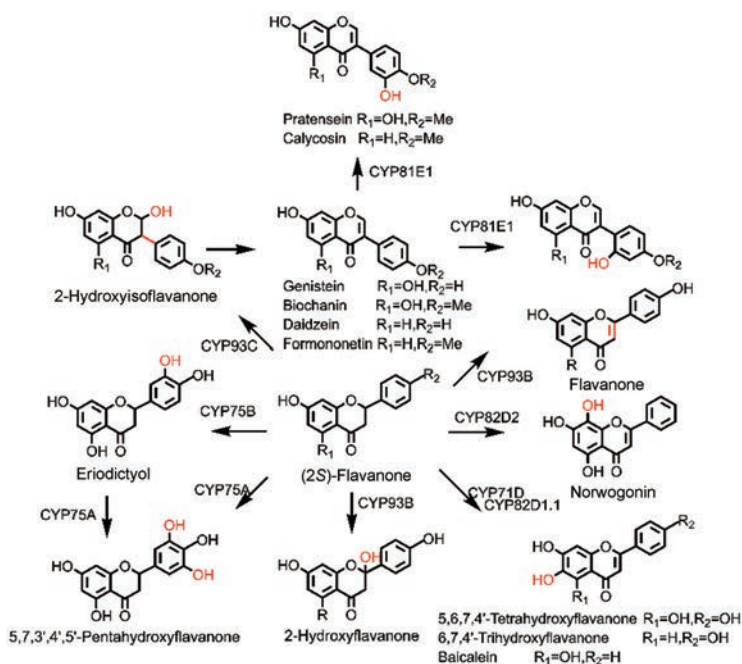


Figure 5 P450s involved in flavonoid biosynthesis

个不同物种来源的 11 个基因构建了一种能定向合成黄芩素或野黄芩素的大肠杆菌。首先将 4CL、FNSI、PAL、CHS、CHI 等酶的基因构建了黄酮的重要中间体白杨素/芹菜素的合成模块, 将 *CYP82D1.1* 及拟南芥的 *CPR* 基因结合构建了 F6H (flavone-6-hydroxylase) 功能模块, 实现了黄芩素和野黄芩素的异源合成, 最终在大肠杆菌中实现了黄芩素 $23.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和野黄芩素 $106.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的产量 (摇瓶发酵水平)。

灯盏花素是灯盏花的主要成分之一, 临床上用于扩张脑血管、抗凝等, 包括灯盏乙素 (scutellarin) 和少量的芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸。2018 年, 《Nature Communications》报道了我国科学家利用化学分类学与进化基因组学相结合的策略, 分析了菊科植物灯盏花、莴苣 (*Lactuca sativa*) 和红花 (*Carthamus tinctorius*) 等 5 个测序物种中灯盏花素含量, 与来自其他 3 个代表性植物类群的包括长春花、拟南芥和烟草在内的 8 个测序物种的灯盏花素含量相比较, 发现野黄芩素只产于菊科的 5 种研究物种, 这表明灯盏花中 F6H 的编码基因可能是菊科特异性基因。通过工程菌株表达鉴定 F6H (CYP706X) 可以转化芹菜素的碳 6 位羟基化生成黄芩素, 同时也可催化芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷的 C6 位羟基化生成灯盏乙素^[94], 通过该研究最终实现灯盏乙素在酵母细胞工厂中的全合成。

4 其他次生代谢产物生物合成中的 P450 基因

除了上述几种药用植物中主要的次生代谢产物外, P450 在其他次生代谢产物的代谢通路上的后修饰

过程也发挥着重要作用。新疆紫草是中药紫草的重要来源之一, 其根部富含紫草素衍生物, 是一类萘醌类红色色素, 具有抗肿瘤、抗 HIV、抑制拓扑异构酶、镇静抗炎等活性, 有极高的药用价值和经济价值。Wang 等^[95] 通过转录组差异谱分析筛选得到 21 条与紫草素生物合成相关的候选 P450 基因。将候选基因进行酵母表达, 以香叶基氢醌 (geranylhydroquinone, GHQ) 为底物进行酶促活性筛选, 发现 CYP76B74 具有催化 GHQ 的 3' 位羟基化的功能, 并且通过 RNAi 实验在紫草毛状根中验证这一催化步骤。CYP76B74 是紫草素生物合成途径发现的第一个 P450 修饰酶, 对于紫草素生物合成途径的解析具有重要意义, 也为植物中萘醌类化合物生物合成途径的解析奠定基础。

5 应用与展望

细胞色素 P450 一直被推崇为生物界的魔法师, 发挥着广泛的生物催化作用。随着高通量测序技术与生物信息学的快速发展, P450 特异性表达模式的检测加快了参与生物合成途径 P450 的筛选研究, 许多植物的 P450 功能陆续被鉴定。近年来, 次生代谢产物合成途径的合成生物学研究一直是药用植物次生代谢领域的研究热点。利用合成生物学模块化工程策略, 将药用植物有效成分进行异源微生物高效生产, 可以为获取药用植物活性成分提供新的思路, 解决中药资源匮乏的现状^[96]。但是由于植物中 P450 基因家族庞大, 而且尚未有较好的方法来准确预测 P450 的催化功能, 从目前的研究结果看, 除了序列同源性较高或者化合物结

Table 3 P450 involved in biosynthesis of phenylpropanoids and other compounds in medicinal plants

Plant	Gene	Function	Gene Bank ID
<i>Catharanthus roseus</i>	CYP75A8	Flavonoid-3',5'-hydroxylase	AJ011862
<i>Glycyrrhiza echinata</i> L.	CYP93C2	2-Hydroxyisoflavanone synthase	AB023636
	CYP81E1	Isoflavone 2'-hydroxylase	AB001379
<i>Erigeron breviscapus</i>	CYP706X	Flavone-6-hydroxylase	Ebre_g017226
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	CYP82D1.1	Flavone-6-hydroxylase	ASW21050.1
	CYP82D2	Flavone-8-hydroxylase	ASW21052.1
<i>Medicago truncatula</i>	CYP73A3	Cinnamate-4-hydroxylase	DQ335792.1
<i>Antirrhinum majus</i>	CYP93B3	Flavone synthase II	AB028151
<i>Perilla frutescens</i>	CYP93B6	Flavone synthase II	AB045592
	CYP75B4	Flavonoid 3'-hydroxylase	AB045593
	CYP98A6	ρ -Coumaroyl ester 3'-hydroxylase	BBB04707.1
<i>Ruta graveolens</i>	CYP98A22	ρ -Coumaroyl ester 3'-hydroxylase	AEG19446.1
<i>Eucalyptus cladocalyx</i>	CYP71B103	Mandelonitrile synthase	AYN73069.1
	CYP706C55	Phenylacetaldoximedehydralase	AYN73068.1
<i>Fallopia sachalinensis</i>	CYP71AT96	Phenylacetone nitrile synthase	BAU59406.1
<i>Hypericum perforatum</i>	CYP81AA1	1,3,7-Trihydroxyxanthone synthase	ANC33510.1
<i>Croton stellatopilosus</i>	CYP76F45	Geraniol-8-hydroxylase	AIO11760.1
<i>Arnebia euchroma</i>	CYP76B74	Geranylhydroquinone-3"-hydroxylase	AZU97066.1

构类似对P450功能研究具有一定的指导,单从P450的序列或者系统进化关系上并不能很好地预测其催化功能或者催化底物。不同的P450基因家族可能具有类似的催化活性,而同一基因家族甚至亚家族可能催化完全不同的反应,比如在诺思卡品生物合成途径中,同样来自CYP82X亚家族的P450, CYP82X2主要催化C13位的羟基化,而CYP82X1则催化C-N断裂开环反应^[56], P450的这些特征导致植物次生代谢途径解析进展缓慢。因此在未来一段时间,植物次生代谢途径P450基因的高效筛选和高通量功能验证是解决途径解析的重要任务。

P450作为药用活性成分合成生物学研究中的一个重要调控靶点,对其进行结构改造,能显著提升其催化效率,降低中间产物积累,提高目标产物产量。有研究报道通过定向进化对来源于细菌的P450进行蛋白改造有效提升P450的催化活性,从而提高基因工程菌中目标代谢物的产量^[97,98],最近作者实验室通过对来自丹参的两个CYP76AH亚家族的基因进行蛋白质工程改造,将两个基因的功能整合至一个基因上,并利用突变体构建了高产基因工程菌。该研究简化合成生物学构建步骤,缩短反应过程中底物运输路径,大大提高底物利用效率(待发表)。植物P450数量庞大且催化功能具有杂泛性,既可以催化不同底物或者同一底物不同位点,来源于不同亚家族P450也被发现可以催化同一反应步骤,这些功能丰富的P450的发现对于催化机制研究具有重要意义,同时也为合成生物学以及生物催化提供了丰富的元件库。通过深入解析药用植物P450的催化机制,利用定向进化技术获得高效催化的蛋白元件,能最大化发挥其催化活性,实现次生代谢产

物底盘催化最大速率化,拓展P450酶在药用活性成分合成生物学研究中的应用。

另一方面通过获得P450与底物小分子结合的蛋白质-底物复合物晶体并解析其立体结构,可以找出目标P450与底物结合的特殊位点,深入研究其催化原理,从而进行理性改造。然而参与植物次生代谢途径的P450基因主要为A-type型的P450,其内质网定位以及表达量低的特性使得晶体结构解析一直是研究者们面临的难点。2019年作者课题组联合北京大学常振战教授课题组通过X-Ray衍射方法解析了丹参酮生物合成途径第一个P450酶CYP76AH1和P450酶抑制剂4-phenylimidazole的复合物晶体在2.6Å的分辨率范围内的立体结构和与其催化功能相关的关键氨基酸位点^[99],虽然该报道的晶体结构分辨率尚有很大的提升空间,但是作为首个植物次生代谢途径P450晶体结构的报道,为药用植物功能基因的同源建模实验提供了更精确的模型参考,对通过分子对接分析蛋白活性位点或预测蛋白功能具有重要参考意义。目前药用植物次生代谢途径中P450的晶体结构研究尚未获得更大的突破性进展,植物次生代谢途径P450功能基因的挖掘和生物合成途径的解析依然是研究的热点和重点,相信随着分子生物学技术的发展,计算技术的提升,通过对P450的晶体结构解析,揭示P450结构与功能的关系,为有目标地寻找药用活性成分生物合成途径的P450,并对其强大催化功能深度开发具有重要意义。

作者贡献: 马莹、蔡媛是本文的并列第一作者,负责整理文献并撰写文章初稿;马莹、曾雯负责绘图;蔡媛负责制作表格;崔光红负责校验萜类章节;马晓晶负责校验生物碱类章节;唐金富负责校验黄酮及苯丙烷类章节;张水寒负责稿件

修改;郭娟和黄璐琦为本文的通讯作者,负责文章设计、把握文章方向以及稿件修改。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story [J]. *Genome Biol*, 2000, 1: S3003.
- [2] Coon MJ. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45: 1-25.
- [3] Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution [J]. *Plant J*, 2011, 66: 194-211.
- [4] Mizutani M, Ohta D. Diversification of P450 genes during land plant evolution [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 291-315.
- [5] Hamberger B, Bak S. Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368: 20120426.
- [6] Kroymann J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 246-251.
- [7] Facchini PJ, Bohlmann J, Covello PS, et al. Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites [J]. *Trends Biotechnol*, 2012, 30: 127-131.
- [8] Pan RC. *Plant Physiology (植物生理学)* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2008.
- [9] Wang LJ, Fang X, Yang CQ, et al. Secondary metabolism and regulation of terpenoids in plants [J]. *Sci Sin Vit (中国科学生命科学)*, 2013, 43: 1030-1046
- [10] Thulasiram HV, Erickson HK, Poulter CD. Chimeras of two isoprenoid synthases catalyze all four coupling reactions in isoprenoid biosynthesis [J]. *Science*, 2007, 316: 73-76.
- [11] Yang C, Gao X, Jiang Y, et al. Synergy between methylerythritol phosphate pathway and mevalonate pathway for isoprene production in *Escherichia coli* [J]. *Metab Eng*, 2016, 37: 79-91.
- [12] Zhou YJ, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 3234-3241.
- [13] Weitzel C, Simonsen HT. Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono- and sesquiterpenes [J]. *Phytochem Rev*, 2015, 14: 7-24.
- [14] Mau CJ, Karp F, Ito M, et al. A candidate cDNA clone for (-)-limonene-7-hydroxylase from *Perilla frutescens* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71: 373-379.
- [15] Wust M, Little DB, Schalk M, et al. Hydroxylation of limonene enantiomers and analogs by recombinant (-)-limonene 3- and 6-hydroxylases from mint (*Mentha*) species: evidence for catalysis within sterically constrained active sites [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 387: 125-136.
- [16] Teoh KH, Polichuk DR, Reed DW, et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the anti-malarial sesquiterpene lactone artemisinin [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 1411-1416.
- [17] Shen Q, Chen YF, Wang T, et al. Overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase (cyp71av1) and cytochrome P450 reductase (cpr) genes increased artemisinin content in *Artemisia annua* (Asteraceae) [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11: 3298-3309.
- [18] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440: 940-943.
- [19] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 796-802.
- [20] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496: 528-532.
- [21] Celedon JM, Chiang A, Yuen MM, et al. Heartwood-specific transcriptome and metabolite signatures of tropical sandalwood (*Santalum album*) reveal the final step of (Z)-santalol fragrance biosynthesis [J]. *Plant J*, 2016, 86: 289-299.
- [22] Takahashi S, Yeo YS, Zhao Y, et al. Functional characterization of premnaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 31744-31754.
- [23] Guo J, Zhou YJ, Hillwig ML, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 12108-12113.
- [24] Guo J, Ma X, Cai Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones [J]. *New Phytol*, 2016, 210: 525-534.
- [25] Ignea C, Athanasakoglou A, Ioannou E, et al. Carnosic acid biosynthesis elucidated by a synthetic biology platform [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 3681-3686.
- [26] Scheler U, Brandt W, Porzel A, et al. Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12942.
- [27] Pateraki I, Andersen-Ranberg J, Jensen NB, et al. Total biosynthesis of the cyclic AMP booster forskolin from *Coleus forskohlii* [J]. *Elife*, 2017, 6: e23001.
- [28] Wang L, Yu RS, Yang WL, et al. Effects of paclitaxel loaded-drug micelles on cell proliferation and apoptosis of human lung cancer A549 cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1240-1245.
- [29] Li BW, Zhang M, He HW, et al. Synergic effects of the combination of VEGF-targeted shRNA and taxol on human prostate cancer DU145 both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 296-302.
- [30] Kong J, Wang W, Zhu P, et al. Recent advances in the biosynthesis of taxol [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 358-365.

- [31] Croteau R, Ketchum RE, Long RM, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 75-97.
- [32] Wheeler AL, Long RM, Ketchum RE, et al. Taxol biosynthesis: differential transformations of taxadien-5 alpha-ol and its acetate ester by cytochrome P450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 390: 265-278.
- [33] Kaspera R, Croteau R. Cytochrome P450 oxygenases of taxol biosynthesis [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 433-444.
- [34] Li J, Mutanda I, Wang K, et al. Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 4850.
- [35] Cao M, Yu HS, Song XB, et al. Advances in the study of derivatization of ginsenosides and their anti-tumor structure-activity relationship [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 836-843.
- [36] Fan ZZ, Zhao WH, Guo J, et al. Antidepressant effect of glycyrrhizin and its protective effect on nerve regeneration in hippocampus [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 1612-1617.
- [37] Yao XS. *Natural Pharmaceutical Chemistry (II) (天然药物化学 (第二版))* [M]. Beijing: People's Health Press, 1988.
- [38] Zhang FS, Kong RR, Chen TY, et al. P450s mediate the biosynthesis of triterpenoids in oleanolan plants [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1000-1009.
- [39] Christensen LP. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2009, 55: 1-99.
- [40] Han JY, Kim HJ, Kwon YS, et al. The Cyt P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 2062-2073.
- [41] Han JY, Hwang HS, Choi SW, et al. Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 1535-1545.
- [42] Han JY, Kim MJ, Ban YW, et al. The involvement of beta-amyrin 28-oxidase (CYP716A52v2) in oleanane-type ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54: 2034-2046.
- [43] Han JY, Chun JH, Oh SA, 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: 319-330.
- [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: 3070-3081.
- [45] Tamura K, Teranishi Y, Ueda S, et al. Cytochrome P450 monooxygenase CYP716A141 is a unique beta-amyrin C-16beta oxidase involved in triterpenoid saponin biosynthesis in *Platycodon grandiflorus* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58: 874-884.
- [46] 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: 948-959.
- [47] 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: 4112-4123.
- [48] Dai Z, Liu Y, Sun Z, et al. Identification of a novel cytochrome P450 enzyme that catalyzes the C-2alpha hydroxylation of pentacyclic triterpenoids and its application in yeast cell factories [J]. *Metab Eng*, 2019, 51: 70-78.
- [49] Augustin MM, Ruzicka DR, Shukla AK, et al. Elucidating steroid alkaloid biosynthesis in *Veratrum californicum*: production of verazine in Sf9 cells [J]. *Plant J*, 2015, 82: 991-1003.
- [50] Christ B, Xu C, Xu M, et al. Repeated evolution of cytochrome P450-mediated spiroketal steroid biosynthesis in plants [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3206.
- [51] Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 29-66.
- [52] Cheng HX, Lin Q, Cheng WM. Progress of study on pharmacological activities and mechanisms of benzyloquinoline alkaloids [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志)*, 2006, 25: 392-399.
- [53] Zi J, Peters RJ. Characterization of CYP76AH4 clarifies phenolic diterpenoid biosynthesis in the Lamiaceae [J]. *Org Biomol Chem*, 2013, 11: 7650-7652.
- [54] Nakagawa A, Matsumura E, Koyanagi T, et al. Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli* [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10390.
- [55] Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast [J]. *Science*, 2015, 349: 1095-1100.
- [56] Singh A, Menéndez-Perdomo IM, Facchini PJ. Benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy: an update [J]. *Phytochem Rev*, 2019, 18: 1457-1482.
- [57] Dastmalchi M, Park MR, Morris JS, et al. Family portraits: the enzymes behind benzyloquinoline alkaloid diversity [J]. *Phytochem Rev*, 2018, 17: 249-277.
- [58] Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 735-769.
- [59] Kraus PF, Kutchan TM. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 2071-2075.
- [60] Winzer T, Kern M, King AJ, et al. Morphinan biosynthesis in opium poppy requires a P450-oxidoreductase fusion protein [J]. *Science*, 2015, 349: 309-312.
- [61] Farrow SC, Hagel JM, Beaudoin GA, et al. Stereochemical inversion of (S)-reticuline by a cytochrome P450 fusion in opium

- poppy [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 728-732.
- [62] Gesell A, Rolf M, Ziegler J, et al. CYP719B1 is salutaridine synthase, the C-C phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in *opium poppy* [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 24432-24442.
- [63] Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica* [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 123-133.
- [64] Dang TT, Facchini PJ. Cloning and characterization of canadine synthase involved in noscapine biosynthesis in opium poppy [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588: 198-204.
- [65] Diaz CM, Rolf M, Gesell A, et al. Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 507: 186-193.
- [66] Mizutani M, Sato F. Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 507: 194-203.
- [67] Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C-C phenol coupling of (*S*)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 8810-8821.
- [68] Beaudoin GA, Facchini PJ. Isolation and characterization of a cDNA encoding (*S*)-*cis*-*N*-methylstylopine 14-hydroxylase from opium poppy, a key enzyme in sanguinarine biosynthesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431: 597-603.
- [69] Cui L, Ni X, Ji Q, et al. Co-overexpression of geraniol-10-hydroxylase and strictosidine synthase improves anti-cancer drug camptothecin accumulation in *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8227.
- [70] Boachon B, Junker RR, Miesch L, et al. CYP76C1 (cytochrome P450)-mediated linalool metabolism and the formation of volatile and soluble linalool oxides in *Arabidopsis* flowers: a strategy for defense against floral antagonists [J]. *Plant Cell*, 2015, 27: 2972-2990.
- [71] Hofer R, Boachon B, Renault H, et al. Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides [J]. *Plant Physiol*, 2014, 166: 1149-1161.
- [72] Sintupachee S, Promden W, Ngamrojanavanich N, et al. Functional expression of a putative geraniol 8-hydroxylase by reconstitution of bacterially expressed plant CYP76F45 and NADPH-cytochrome P450 reductase CPR I from *Croton stellatopilosus* Ohba [J]. *Phytochemistry*, 2015, 118: 204-215.
- [73] Irmeler S, Schroder G, St-Pierre B, et al. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase [J]. *Plant J*, 2000, 24: 797-804.
- [74] Miettinen K, Dong L, Navrot N, et al. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3606.
- [75] Yang Y, Li W, Pang J, et al. Bifunctional cytochrome P450 enzymes involved in camptothecin biosynthesis [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 1091-1096.
- [76] Rafael Zárate VR. Strategies for the genetic modification of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 2-3: 475-491.
- [77] El-Sayed M, Verpoorte R. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6: 277-305.
- [78] Dang TT, Franke J, Tatsis E, et al. Dual catalytic activity of a cytochrome p450 controls bifurcation at a metabolic branch point of alkaloid biosynthesis in *Rauwolfia serpentina* [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56: 9440-9444.
- [79] Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, et al. The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48: 123-152.
- [80] Booij-James IS, Dube SK, Jansen MA, et al. Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1275-1284.
- [81] Noel JP, Austin MB, Bomati EK. Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 249-253.
- [82] Ma XH, Ma Y, Tang JF, et al. The biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Molecules*, 2015, 20: 16235-16254.
- [83] Ehrling J, Hamberger B, Million-Rousseau R, et al. Cytochromes P450 in phenolic metabolism [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 239-270.
- [84] Kim YS, Kim YB, Kim Y, et al. Overexpression of cinnamate 4-hydroxylase and 4-coumaroyl CoA ligase prompted flavone accumulation in *Scutellaria baicalensis* hairy roots [J]. *Nat Prod Commun*, 2014, 9: 803-807.
- [85] Qin SS, Huang LQ, Yuan Y, et al. Analysis of critical genes expression of chlorogenic acid and luteolin biosyntheses in *Lonicera confuse* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 2469-2472.
- [86] Matsuno M, Nagatsu A, Ogihara Y, et al. CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis [J]. *FEBS Lett*, 2002, 514: 219-224.
- [87] Alber AV, Renault H, Basilio-Lopes A, et al. Evolution of coumaroyl conjugate 3-hydroxylases in land plants: lignin biosynthesis and defense [J]. *Plant J*, 2019, 99: 924-936.
- [88] Di P, Zhang L, Chen J, et al. ¹³C tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 1537-1548.
- [89] Ayabe S, Akashi T. Cytochrome P450s in flavonoid metabolism [J]. *Phytochem Rev*, 2006, 5: 271-282.
- [90] Akashi T, Aoki T, Ayabe S. CYP81E1, a cytochrome P450 cDNA of licorice (*Glycyrrhiza echinata* L.), encodes isoflavone 2'-hy-

- droxylase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251: 67-70.
- [91] Akashi T, Aoki T, Ayabe S. Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice [J]. *Plant Physiol*, 1999, 121: 821-828.
- [92] Zhao Q, Cui MY, Levsh O, et al. Two CYP82D enzymes function as flavone hydroxylases in the biosynthesis of root-specific 4'-deoxyflavones in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Mol Plant*, 2018, 11: 135-148.
- [93] Li J, Tian C, Xia Y, et al. Production of plant-specific flavones baicalein and scutellarein in an engineered *E. coli* from available phenylalanine and tyrosine [J]. *Metab Eng*, 2019, 52: 124-133.
- [94] Liu X, Cheng J, Zhang G, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 448.
- [95] Wang S, Wang R, Liu T, et al. CYP76B74 catalyzes the 3"-hydroxylation of geranylhydroquinone in shikonin biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2019, 179: 402-414.
- [96] Huang LQ, Gao W, Zhou YJ. Application of synthetic biology to sustainable utilization of Chinese materia medica resources [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 37-43.
- [97] Knight AM, Kan SBJ, Lewis RD, et al. Diverse engineered heme proteins enable stereodivergent cyclopropanation of unactivated alkenes [J]. *ACS Cent Sci*, 2018, 4: 372-377.
- [98] Chen K, Huang X, Kan SBJ, et al. Enzymatic construction of highly strained carbocycles [J]. *Science*, 2018, 360 (aar42396384): 71.
- [99] Gu M, Wang M, Guo J, et al. Crystal structure of CYP76AH1 in 4-PI-bound state from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511: 813-819.