

雷公藤中2,3-氧化鲨烯环化酶基因家族分析及功能表征

刘 远¹, 屠李婵², 卢 鑫¹, 夏 梦¹, 高 伟^{1,3*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 浙大城市学院医学院, 浙江 杭州 310015;
3. 首都医科大学北京世纪坛医院, 北京 100038)

摘要: 雷公藤具有抗肿瘤、抗炎、免疫抑制等多种药理活性, 是极具研究价值的药用植物。三萜类化合物是其发挥药理作用的主要活性成分之一, 然而以雷公藤红素为主的三萜化合物在植物中含量低, 化学合成困难, 难以得到理想的产量。因此, 解析雷公藤中三萜化合物生物合成途径, 为异源合成这些化合物提供了行之有效的新思路。2,3-氧化鲨烯环化酶 (OSC) 是催化形成三萜母核多样性的关键酶基因, 本研究基于雷公藤基因组和转录组数据, 共挖掘出 16 条 OSC 基因, 并对 16 条基因进行了生物信息学分析。系统进化树显示 16 条 TwOSC 蛋白主要聚为 β -香树脂醇合酶、木栓酮合酶、多功能香树脂醇合酶和环阿屯醇合酶四支。成功克隆得到了 TwOSC6, 酵母表达和体外发酵结果显示 TwOSC6 可催化 2,3-氧化鲨烯生成 α -香树脂醇和 β -香树脂醇, 属于多功能香树脂醇合酶。以上研究为雷公藤三萜化合物的多样性提供了新的基因资源, 为三萜化合物的生物合成提供了新的基因元件。

关键词: 雷公藤; 2,3-氧化鲨烯环化酶; 三萜; α -香树脂醇; 功能鉴定

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)12-3370-07

Identification and functional characterization of 2,3-oxidosqualene cyclase genes family in *Tripterygium wilfordii*

LIU Yuan¹, TU Li-chan², LU Yun¹, XIA Meng¹, GAO Wei^{1,3*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. School of Medicine, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China; 3. Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: *Tripterygium wilfordii* Hook. f. is a valuable medicinal plant, with anti-tumor, anti-inflammatory, immunosuppressive and other pharmacological activities. Triterpenoids are one of the main active components that exert pharmacological effects. However, the content of triterpenoids dominated by triptolide is very low in *Tripterygium wilfordii*, and the analysis of the biosynthetic pathway of triterpenoids in *Tripterygium wilfordii* provides an effective new idea for obtaining these compounds. 2,3-Oxidosqualene cyclases (OSCs) are the key enzyme that catalyzes the formation of triterpene skeleton diversity. Based on the genome and transcriptome data of *Tripterygium wilfordii*, 16 OSC genes were identified and analyzed. Phylogenetic analysis showed that 16 TwOSC proteins could be mainly classified as four groups. They are β -amyrin synthase group, friedelin synthase group, multifunctional amyrin synthase and cycloartenol synthase group. TwOSC6 was successfully cloned. Functional characterization analysis revealed that TwOSC6 can catalyze the formation of α -amyrin and β -amyrin. This indicates that TwOSC6 is a multifunctional amyrin synthase. This provides new gene resources for the diversity of *Tripterygium wilfordii* triterpenoids, as well as new gene elements for biosynthesis triterpenoids.

Key words: *Tripterygium wilfordii*; 2,3-oxidosqualene cyclase; triterpenoid; α -amyrin; function characterization

收稿日期: 2021-11-15; 修回日期: 2021-12-06.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973418); 国家重点研发计划项目 (2020YFA0908000).

*通讯作者 Tel: 86-10-83916572, E-mail: weigao@ccmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1628

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 是中药雷公藤的植物来源, 为卫矛科雷公藤属植物, 具有良好的药用价值, 其根、茎、叶均可入药。其中萜类是雷公藤的主要药理活性成分, 三萜化合物雷公藤红素以其良好的抗炎、抗肿瘤以及抗肥胖作用^[1,2]而备受国内外研究者关注。现代药理活性研究已在雷公藤红素药理作用机制方面取得许多重要研究进展, 研究发现雷公藤红素可以通过抑制Hsp90-Cdc37结合, 抑制血管生成、肿瘤侵袭和迁移以及影响细胞凋亡与自噬等发挥抗肿瘤作用; 同时, 雷公藤红素具有瘦素增敏作用, 在抗肥胖药物开发利用方面具有良好的前景^[3,4]。随着雷公藤中药用活性成分的深入开发利用, 雷公藤红素等三萜类化合物的获取将成为一个值得关注的问题。雷公藤的生长年限较长, 次生代谢产物在植物体内含量较低, 使得雷公藤红素等三萜化合物的开发利用受到了一定的限制。合成生物学为雷公藤红素等三萜的获取提供了一个新的方式, 目前合成生物学已经在许多天然产物的合成方面取得了很好的研究进展^[5-8]。通过分子生物学手段, 探究天然产物形成的分子机制, 解析其生物合成途径, 再通过体外异源重组的方式, 将植物来源的酶在酿酒酵母等中表达, 可以实现雷公藤红素等三萜化合物的“不种而获”。

MVA和MEP途径产生的IPP和DMAPP是三萜类化合物的共同前体, 二者可以在法呢基焦磷酸合酶作用下形成法呢基焦磷酸(FPP), 鲨烯合酶(squalene synthase)催化两分子的FPP缩合, 形成链状的鲨烯, 鲨烯在鲨烯环氧化酶(squalene epoxidase, SQE)作用下形成植物三萜和甾醇化合物的共同前体2,3-氧化鲨烯。作者课题组前期在雷公藤三萜类化合物生物合成途径解析及合成生物学研究方面已经取得了一定的研究成果。已经克隆得到了7条雷公藤鲨烯环氧化酶基因, 利用*ERG1*基因缺陷的酵母工程菌验证了其功能, 同时基于茉莉酸甲酯诱导表达分析和组织表达特异性, 推测在雷公藤根中高表达且响应茉莉酸甲酯诱导的*TwSQE1* (MF989106)可能与雷公藤红素生物合成相关^[9]。根据转录组数据, 克隆得到了生成木栓酮的2,3-氧化鲨烯环化酶(2,3-oxidosqualene cyclase, OSC)基因两条, 通过底物饲喂和RNA干扰实验证实了木栓酮是雷公藤红素前体, 结合合成生物学手段, 将木栓酮产量提升至37.07 mg·L⁻¹^[10]。

2,3-氧化鲨烯环化酶又称三萜环化酶, 被认为是三萜生物合成中的第一个关键酶基因, 与后修饰酶基因, 包括细胞色素P450、糖基转移酶、酰基转移酶等, 共同影响着三萜结构的多样性^[11,12]。氧化鲨烯环化酶属于超家族酶, 在植物体内具有较高保守性, 包含DCTAE

及MXCYCR等保守区域, 可以催化2,3-氧化鲨烯质子化、环化、重排和去质子化形成拟南芥宁醇、环阿屯醇、羊毛甾醇、达玛烷二烯醇、羽扇豆醇、 α -香树脂醇、 β -香树脂醇、木栓酮等三萜骨架^[13-15]。对雷公藤中的OSC基因进行系统的研究, 有助于研究雷公藤三萜化合物的生物合成机制, 对探究雷公藤中三萜化合物形成的分子机制具有重要意义。

本文通过对雷公藤基因组和转录组数据进行分析, 利用隐马尔可夫模型检索, 结合BlastP分析策略, 从雷公藤全基因组蛋白数据中筛选得到了16条OSC基因。生物信息分析表明16条OSC基因编码611~779个氨基酸, 具有相似的保守基序。多重序列对比显示除了TwOSC16外, 其他蛋白均含有DCTAE保守基序, 其中14条OSC包括MWCXXR序列。进化树显示16条OSC蛋白主要聚为4组, 分别为 β -香树脂醇合酶组、木栓酮合酶组、多功能香树脂醇合酶组和环阿屯醇合酶组。系统进化树显示TwOSC4和TwOSC6与雷公藤中其他OSC蛋白相聚较远, 由于*TwOSC4*前期已经克隆得到(Genbank编号: MK541923), 并且经验证不具备催化形成 β -香树脂醇或 α -香树脂醇的功能^[16]。因此本文重点对*TwOSC6*基因进行功能研究, 期望为雷公藤三萜化合物的母核形成多样性研究提供新的候选基因元件。

材料与方法

试剂 雷公藤植物来自福建永安国有林场; 雷公藤基因组下载自NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>, GenBank Project: PRJNA689611); 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、FastKing cDNA第一链合成试剂盒和RNA纯化试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; Phusion[®] Hot Start Flex 2X Master Mix(美国NEB公司); 大肠杆菌DH5 α 感受态细胞pEASY[®]-Blunt Zero vector载体(北京全式金生物技术有限公司); 引物合成及测序(北京睿博兴科生物科技有限公司); α -香树脂醇(纯度98%)购自Sigma-Aldrich; β -香树脂醇(纯度95%)购于上海源叶生物科技有限公司。

OSC基因家族鉴定 从Pfam官网(<http://pfam.xfam.org/>)下载2,3-氧化鲨烯环化酶基因的隐马尔可夫模型PF13243和PF13249, 利用PF13243.hmm和PF13249.hmm文件, 采用Hmsearch工具, 选取默认参数, 检索雷公藤全基因组蛋白数据, 得到候选基因序列。将候选基因使用NCBI在线BlastP工具, 进行分析, 选取注释为2,3-氧化鲨烯环化酶基因的序列且为最长转录本OSC基因, 用于后续的分析。

生物信息学分析 采用MEME在线网站(<https://>

meme-suite.org/meme/tools/meme) 对 *OSC* 基因进行保守基序分析; 采用 ExPASy (<https://web.expasy.org/prot-param/>) 分析蛋白分子质量、等电点等; 采用 MCScanX 和 TBtools 对 *OSC* 基因染色体定位和共线性情况进行分析及结果可视化^[17]; 采用 Jalview 进行多重序列对比结果可视化^[18]; 采用 Muscle 进行 *OSC* 氨基酸序列对比, 将对比后的序列采用 MEGA-X 基于最大似然法 (maximum likelihood)^[19], 构建系统进化树, 步长设为 1 000。构建系统进化树所用其他物种的 *OSC* 蛋白下载自 NCBI、MiFRS (APG38073.1)、PdFRS (ART66198.1)、PjbAS (AKN23431.1)、PgbAS (ASB17950.1)、GibAS (ARB43794.1)、TcLUS (QBO24615.1)、ToLUS (BAA86932.1)、AaLUS (AJE29379.1)、AcLUS (PSS20732.1)、PaCAS(XP_021806956.1)、PyCAS (PQQ11009.1)、PjCAS (ALB38665.1)、KsCAS (AUC63275.1)、PsCAS (AMT75535.1)、MdOSC3 (ACM89977.1)、BfOSC1 (BBI55114.1)。采用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 对蛋白跨膜结构进行预测; 采用 PRABI-GERLAND (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl) 进行二级结构预测, 使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行二级结构分析和蛋白三维同源建模。

总 RNA 提取和 cDNA 合成 将雷公藤新鲜的根、茎、叶组织, 于液氮中研磨粉碎, 取约 0.05 g 于 2 mL EP 管中, 按照改良的 CTAB 法提取不同组织的总 RNA [2×CTAB 缓冲液: 2% 的 CTAB、100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0)、25 mmol·L⁻¹ 的 EDTA、2 mol·L⁻¹ 的 NaCl], 利用 RNA 纯化试剂盒进行精制, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, NanoDrop™ One 超微量紫外-可见分光光度计测量浓度。质量合格的 RNA 按照 FastKing RT Kit (with gDNase) 说明书合成雷公藤第一链 cDNA。

基因克隆与表达载体构建 参考雷公藤基因组注释信息, 获得雷公藤 2,3-氧化鲨烯环化酶 *TwOSC6* 基因序列和开放阅读框, 设计引物, 进行 cDNA 克隆, 将雷公藤不同组织部位的 cDNA 取少量混合, 作为克隆 *OSC* 基因的模板。根据 Phusion® Hot Start Flex 2X Master Mix 使用说明配制反应体系: Phusion® Hot Start Flex 2X Master Mix 25 μL, 正反向引物各 2.5 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 18 μL。反应程序: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 60 s, 重复 35 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物切胶回收后连接 pEASY®-Blunt Zero vector 载体, 转化至大肠杆菌 *Trans1-T1* 克隆感受态细胞中。采用构建表达载体引物扩增含有载体同源臂的目的基因, PCR 产物切胶回收; 将酵母表达载体 pYES2 采用 *Bam*HI 和

*Xho*I 进行双酶切处理, 将酶切后的产物切胶回收; 采用 pEASY®-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 试剂盒将载体和目的基因片段进行重组连接, 获得重组质粒 pYES2-TwOSC6, 转化至 *Trans1-T1* 克隆感受态细胞中, 涂布在含有 100 mg·L⁻¹ Amp 的 LB 固体平板上过夜培养, 选取单克隆菌落, 于 1 mL LB+100 mg·L⁻¹ Amp 的液体培养基中培养数小时后, 进行 PCR 实验, 并将阳性结果送测序验证。

TwOSC 体外功能验证 将对照质粒 pYES2 和重组质粒 pYES2-TwOSC6 分别转化至羊毛甾醇缺陷的酵母菌株中, 按照 $A_{600} = 0.1$ 接种到 30 mL 的 Sc-Ura + 2% 葡萄糖的培养基中, 30 °C、200 r·min⁻¹ 培养 12 h, 更换 Sc-Ura+2% 半乳糖培养基, 继续培养 48 h。离心收集菌体, 加入 10 mL 20% KOH 和 50% EtOH 溶液, 加热回流 5 min 提取产物, 上清液用等体积的正己烷萃取 3 次。合并 3 次萃取液, 旋蒸蒸干溶剂后, 用 2 mL 正己烷复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜后进 GC/MS 分析。

GC/MS 检测发酵产物 使用安捷伦 7250 GC/Q-TOF 对发酵产物进行检测, 使用 DB-5 MS 气相色谱柱 (30 m × 0.25 mm, 0.10 μm), 进样量为 1 μL, 流速为 1 mL·min⁻¹, 升温程序: 50 °C, 随后以 50 °C·min⁻¹ 梯度升温至 290 °C, 290 °C 保持 5 min, 随后以 20 °C·min⁻¹ 梯度升温至 305 °C, 305 °C 保持 9 min; 离子源温度 250 °C, 电离能 70 eV, 质量扫描范围为 m/z 50~550。

结果与分析

1 雷公藤中 *OSC* 基因家族鉴定及基本特性分析

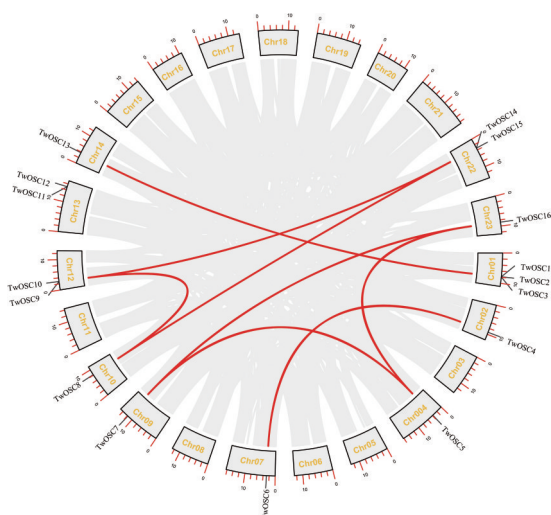
基于隐马尔可夫模型检索和 BlastP 结果, 从雷公藤基因组中分析得到 24 条候选 *OSC* 基因, 选取其中最长的转录本, 进一步得到了 16 条 *OSC* 基因。16 条基因编码氨基酸长度在 611~779 之间, ExPASy 在线分析结果显示分子质量为 70.78~89.07 kDa, 理论等电点为 5.82~7.53。染色体定位分析显示 16 条基因不均匀分布在 1、2、4、7、9、10、12、13、14、22 和 23 等 11 条染色体 (表 1)。共线性分析可以帮助预测同源序列, 辅助分析物种的进化事件, MCScanX 运算结果显示, 雷公藤 *OSC* 基因之间存在共线性关系, 结果采用 Circos 图展示 (图 1)。从图中可以看出, *TwOSC4* 和 *TwOSC6* 具有较高同源性, 与系统进化树结果一致。

2 TwOSC 蛋白保守基序预测和系统进化树分析

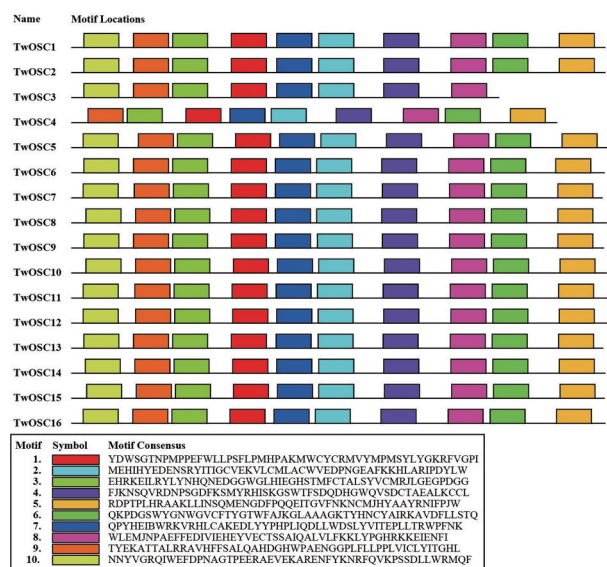
采用 MEME 软件预测了 *OSC* 蛋白的 10 个 motif (图 2), 发现大部分 *TwOSC* 蛋白具有这 10 个 motif, *TwOSC3* 和 *TwOSC4* 相对于其他 *OSC* 蛋白, 缺失部分 motif; *TwOSC3* 缺失 C 端的两个 motif, 而 *TwOSC4* 缺少 N 端的一个 motif, 保守基序的缺失可能对其发挥功

Table 1 The informations of *TwOSC* genes and its coding protein

Gene	Quantity of amino acids	Molecular weight/kDa	PI	GenBank	Location
<i>TwOSC1</i>	763	87.85	6.26	XM_038869109.1	Chr01:7826994-7832114
<i>TwOSC2</i>	763	87.65	5.99	XM_038845497.1	Chr01:7887967-7893111
<i>TwOSC3</i>	611	70.78	5.82	XM_038843004.1	Chr01:7836525-7841185
<i>TwOSC4</i>	694	80.13	6.13	XM_038855641.1	Chr02:9291030-9295851
<i>TwOSC5</i>	779	89.07	6.44	XM_038844316.1	Chr04:3824215-3836183
<i>TwOSC6</i>	762	87.99	6.34	XM_038849963.1	Chr07:2865933-2872294
<i>TwOSC7</i>	759	86.05	6.37	XM_038854108.1	Chr09:11823416-11836614
<i>TwOSC8</i>	765	88.42	6.15	XM_038858298.1	Chr10:8171748-8177354
<i>TwOSC9</i>	761	87.73	5.95	XM_038860902.1	Chr12:2798501-2803484
<i>TwOSC10</i>	765	88.01	5.91	XM_038861801.1	Chr12:2811651-2815449
<i>TwOSC11</i>	767	87.98	7.53	XM_038864955.1	Chr13:15036700-15041216
<i>TwOSC12</i>	768	87.92	6.41	XM_038864954.1	Chr13:15036700-15041216
<i>TwOSC13</i>	760	87.88	6.07	XM_038866587.1	Chr14:3732688-3739202
<i>TwOSC14</i>	763	87.66	5.82	XM_038838351.1	Chr22:3315580-3321187
<i>TwOSC15</i>	762	87.00	6.00	XM_038837156.1	Chr22:3304062-3314975
<i>TwOSC16</i>	763	87.74	6.21	XM_038841071.1	Chr23:8733490-8745206

**Figure 1** Chromosome mapping information and collinearity analysis of *TwOSC* genes

能有影响。其中研究相对较多的保守序列 DCTAE 和 MWCXXR 分别包含在 motif 4 和 motif 1 中, 有研究表明 DCTAE 与底物识别有关, 而 MWCXXR 可能与控制 β -香树脂醇的形成有关。多重序列对比结果显示, *TwOSC1*~*16* 蛋白具有较高的同源性, 除了 *TwOSC16* 外, 均包含 DCTAE 保守域, 另外有 14 条 OSC 包括 MWCXXR 序列, *TwOSC6* 包含 MFCYCR, *TwOSC10* 包含 IWCYCR 序列 (图 3)。与其他植物来源 OSC 基因一起构建系统进化树分析, 发现 16 条 OSC 蛋白主要聚为 4 支 (图 4)。其中有 *TwOSC1*、*2*、*3*、*9*、*13*、*14* 聚在了 β -香树脂醇合酶组, *TwOSC8* 和 *TwOSC10* 聚在了木栓酮合酶组, *TwOSC5*、*7*、*11*、*12*、*15*、*16* 聚在了环阿屯醇合酶组。*TwOSC4* 和 *TwOSC6* 与之前报道的多功能香树脂醇合酶 *MdOSC1* 和 *BfOSC3* 聚为一支。木栓酮是雷公藤红

**Figure 2** The motifs analysis of *TwOSC* proteins

素的前体, 因此对与其他植物中木栓酮合酶聚为一支的 *TwOSC8* 和 *TwOSC10* 进行分析, 结果表明这两条基因对应之前报道的雷公藤中的多功能木栓酮合酶基因 *TwOSC3* (Genbank 编号: KY885469) 和 *TwOSC1* (Genbank 编号: KY885467)^[10], 说明系统进化树聚类分析与前期实验结果一致, 能作为 OSC 功能分类的依据。

3 *TwOSC6* 的克隆和生物信息学分析

系统进化分析表明 *TwOSC4* 和 *TwOSC6* 蛋白与多功能香树脂醇合酶聚成一支, 由于 *TwOSC4* 基因对应之前报道的 *TwOSC7* (Genbank 编号: MK541923), 该基因功能已经做了研究, 因此针对 *TwOSC6* 基因进行了功能研究。利用 *TwOSC6* 序列设计特异性扩增引物 (表 2), 以雷公藤组织 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 获得 *TwOSC6* 的全长开放阅读框。测序结果显示 *TwOSC6* 开

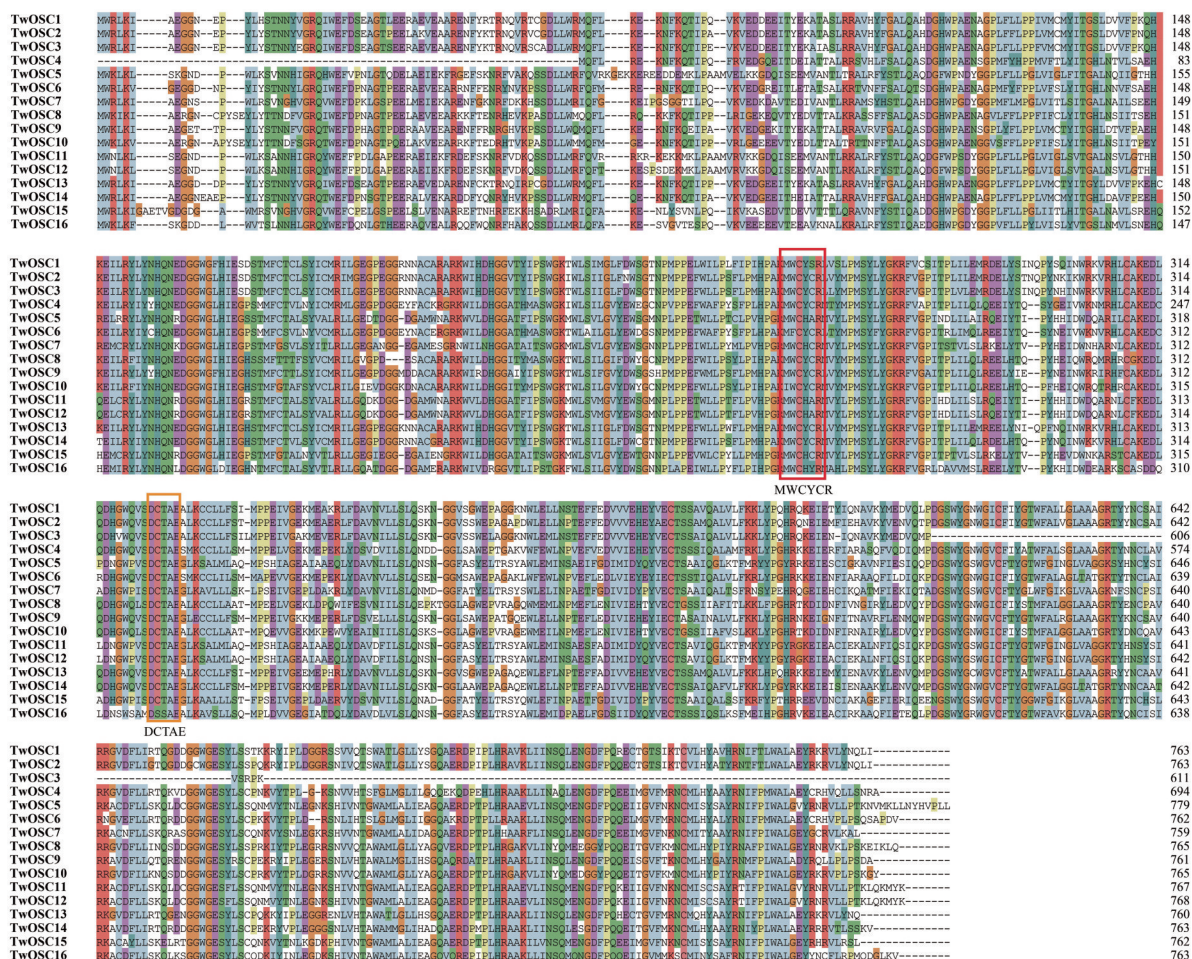


Figure 3 The multiple sequence alignment of TwOSCs

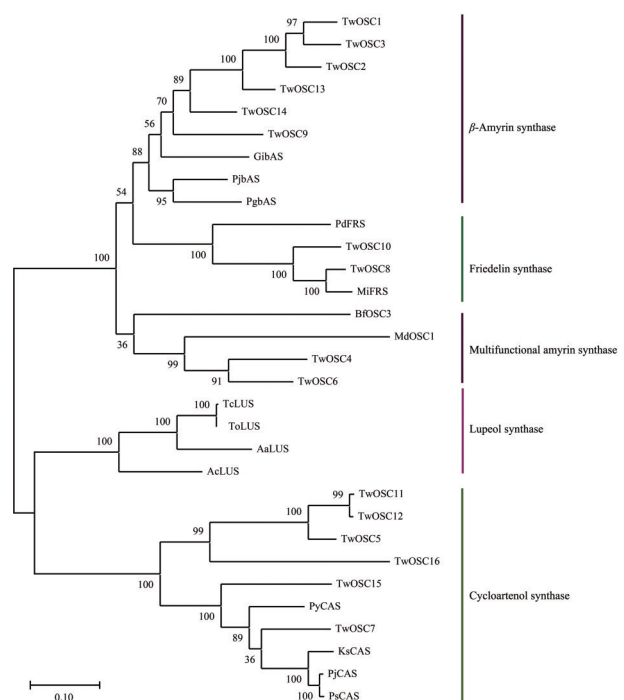


Figure 4 Phylogenetic tree of OSC proteins using maximum likelihood

放阅读框为 2 289 bp, 编码 762 个氨基酸。对 *TwOSC6* 进行跨膜结构分析显示 *TwOSC6* 不存在跨膜结构 (图 5), *TwOSC6* 蛋白的二级结构预测显示, *TwOSC6* 无规则卷曲占 48.03%, α -螺旋结构占 24.28%, 延伸链占 27.69%。采用 SWISS-MODEL 网站进行同源建模, 以人的羊毛甾醇合酶 1w6k (与 *TwOSC6* 同源性为 39.48%) 为模板建模, 三维模型如图 5b 所示, 结果以 cartoon 形式显示。

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
TwOSC6-F1	ATGTGGAGGCTTAAGGT
TwOSC6-R1	TTACACGTCTGGAGCAC
TwOSC6-F2	AAGCTTGGTACCGGATCTCGATCCATGTG
	GAGGCTTAAGGT
TwOSC6-R2	GGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGTTACAC
	GTCTGGAGCAC

4 TwOSC6 功能验证

将 *TwOSC6* 构建至酵母表达载体 pYES2 获得表达载体 pYES2-*TwOSC6*, 将质粒 pYES2 (对照组)、重组质

粒pYES2-TwOSC6分别转入羊毛甾醇合酶缺陷的酵母菌株(购买自ATCC, 细胞株编号4 021 900-ERG7, -ura), 进行发酵, 对发酵产物提取和GC/Q-TOF检测。图6a显示, 与pYES2对照组相比, pYES2-TwOSC6组出现了两个新的产物峰(峰1和峰2)。其中在14.44 min出现产物峰1, 质谱碎片如图6b所示, 对比峰1和 β -香树脂醇的保留时间和质谱碎片信息, 发现两者之间的质谱碎片信息基本一致, 推测产物1为 β -香树脂醇。在14.95 min出现的产物峰2, 质谱碎片如图6b所示, 对比峰2与 α -香树脂醇的保留时间和质谱碎片信息, 发现二者之间质谱碎片信息基本一致, 推测产物2为 α -香树脂醇。通过酵母体内功能研究表明TwOSC6具有催

化2,3-氧化鲨烯环化成 α -香树脂醇和 β -香树脂醇的功能, 其中 α -香树脂醇为主产物。

讨论

雷公藤中含有多种三萜化合物, 然而较低的含量限制了这些三萜化合物的获得。2,3-氧化鲨烯环化酶是三萜骨架形成的关键酶基因, 本文从雷公藤基因组中鉴定了16条OSC基因, 对得到的16条OSC基因编码的蛋白进行了保守基序预测, 发现16条OSC蛋白具有多个保守 motif, 与其他OSC蛋白相比, TwOSC3缺少C端的两个保守 motif; TwOSC4缺少N端的一个 motif, 这些保守基序的缺失可能对其功能会有一些的影响。

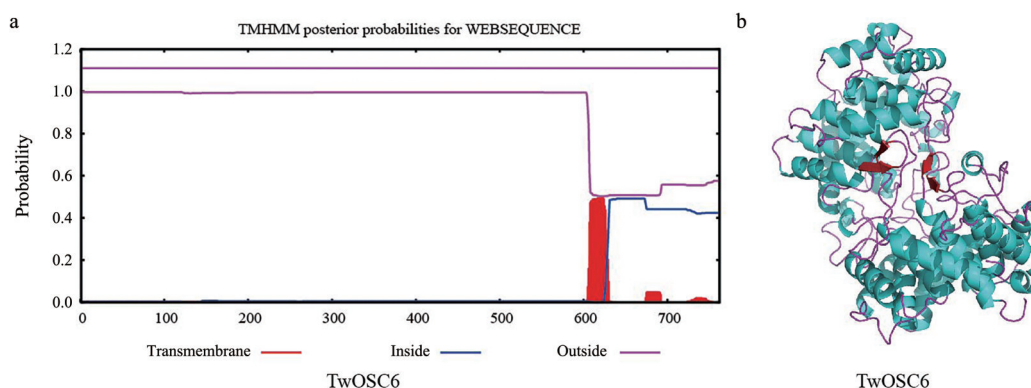


Figure 5 Transmembrane structure and tertiary structure prediction of TwOSC6

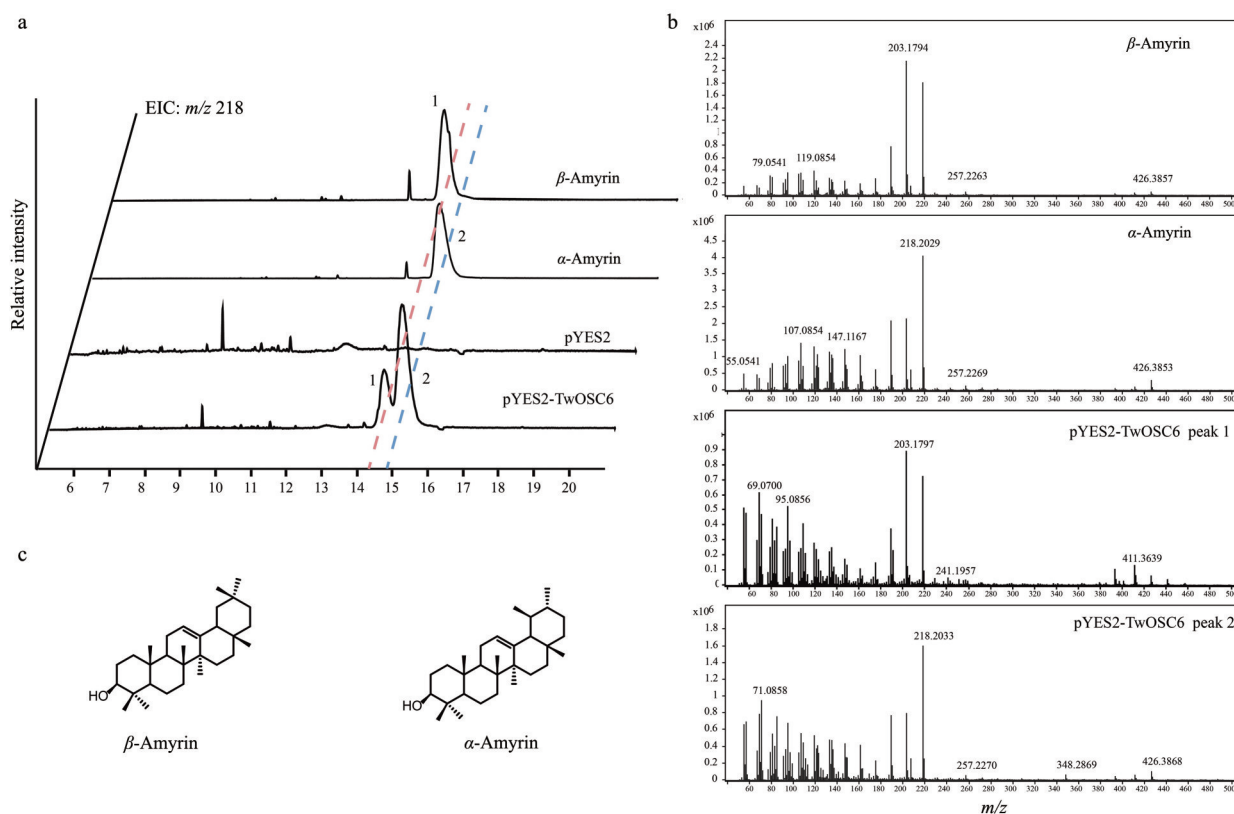


Figure 6 GC/MS analysis of the fermentation products of TwOSC6

在前期研究中,发现克隆得到的 *TwOSC4* 在酵母发酵中未检测到香树脂醇产物^[6],本文对 *TwOSC4* 进行保守基序分析,发现 *TwOSC4* 缺失 N 端的一个 motif,因此推测这个区域的缺失可能是影响其功能的原因之一。在下一步的研究中,对于缺失 motif 的蛋白,可以通过同源重组等手段人为补齐 motif,研究是否可以使得这些基因恢复原有功能。植物在不断的进化过程中,氨基酸的突变和缺失可能会引发功能的丧失或者改变。共线性分析发现 *TwOSC1* 和 *TwOSC2* 和 *TwOSC3* 分布在雷公藤 1 号染色体相邻位置,与 *TwOSC13* 存在共线性关系,而 *TwOSC3* 缺失 C 端缺失两个 motif,在后续的研究中,可以对这 4 条基因的功能进行进一步研究,分析 4 条 OSC 基因功能是否发生了分化。

对雷公藤中 16 条 OSC 蛋白进行系统进化树分析,发现 16 条 OSC 蛋白主要聚为 4 支,分别为 β -香树脂醇合酶组、木栓酮合酶组、多功能香树脂醇合酶和环阿屯醇合酶组。以雷公藤组织 cDNA 为模板,克隆得到了 *TwOSC6*,酵母发酵实验发现 *TwOSC6* 在羊毛甾醇合酶缺陷酵母中表达时,可以形成 α -香树脂醇和 β -香树脂醇,其中 α -香树脂醇为主要产物。上述研究,为雷公藤中三萜化合物的生物合成提供了新的候选基因元件。合成生物学生产高价值的天然产物,需要完整的通路基因元件作为前提条件。保守基序和系统进化树分析对于预测基因功能具有很好的参考价值,雷公藤中具有不同母核类型的三萜化合物,基于基因组和注释文件可以得到丰富的基因资源,这些基因元件可以为后续的合成生物学研究提供更多的选择。

作者贡献: 刘远撰写了论文;高伟构思并设计了实验方案;刘远、屠李婵、卢璿完成了实验部分;屠李婵、夏梦分析了相关实验数据;所有作者均阅读并参与了修改这篇文章。

利益冲突: 本文的作者无任何利益冲突。

References

- [1] Lu Y, Liu Y, Zhou J, et al. Biosynthesis, total synthesis, structural modifications, bioactivity, and mechanism of action of the quinone-methide triterpenoid celastrol [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41: 1022-1060.
- [2] Zhu L, Sun X, Chen J, et al. Celastrol inhibits PAK1 kinase and inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 60-66.
- [3] Liu J, Lee J, Salazar Hernandez MA, et al. Treatment of obesity with celastrol [J]. *Cell*, 2015, 161: 999-1011.
- [4] Feng X, Guan D, Auen T, et al. IL1R1 is required for celastrol's leptin-sensitization and antiobesity effects [J]. *Nat Med*, 2019, 25: 575-582.
- [5] Hu T, Zhou J, Tong Y, et al. Engineering chimeric diterpene synthases and isoprenoid biosynthetic pathways enables high-level production of miltiradiene in yeast [J]. *Metab Eng*, 2020, 60: 87-96.
- [6] Yu Y, Chang P, Yu H, et al. Productive amyirin synthases for efficient alpha-amyirin synthesis in engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 2391-2402.
- [7] Galanie S, Thodey K, Trenchard IJ, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast [J]. *Science*, 2015, 349: 1095-1100.
- [8] Zhu M, Wang C, Sun W, et al. Boosting 11-oxo-beta-amyirin and glycyrrhetic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via pairing novel oxidation and reduction system from legume plants [J]. *Metab Eng*, 2018, 45: 43-50.
- [9] Zhou J, Zhang Y, Hu T, et al. Functional characterization of squalene epoxidase genes in the medicinal plant *Tripterygium wilfordii* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 203-212.
- [10] Zhou J, Hu T, Gao L, 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: 722-735.
- [11] Dinday S, Misra RC, Chanotiya CS, et al. Oxidosqualene cyclase and CYP716 enzymes contribute to triterpene structural diversity in the medicinal tree banaba [J]. *New Phytol*, 2019, 222: 408-424.
- [12] Ma Y, Cai Y, Ma X, et al. Research progress of P450 in the biosynthesis of bioactive compound of medicinal plants [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1573-1589.
- [13] Srisawat P, Fukushima EO, Yasumoto S, et al. Identification of oxidosqualene cyclases from the medicinal legume tree *Bauhinia forficata*: a step toward discovering preponderant alpha-amyirin-producing activity [J]. *New Phytol*, 2019, 224: 352-366.
- [14] Wang Z, Yeats T, Han H, et al. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*: enzymes catalyzing up to 10 rearrangement steps yielding friedelin and other triterpenoids [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 29703-29712.
- [15] Han JY, Ahn CH, Adhikari PB, et al. Functional characterization of an oxidosqualene cyclase (PdFRS) encoding a monofunctional friedelin synthase in *Populus davidiana* [J]. *Planta*, 2019, 249: 95-111.
- [16] Liu Y, Zhou J, Hu T, et al. Identification and functional characterization of squalene epoxidases and oxidosqualene cyclases from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Plant Cell Rep*, 2020, 39: 409-418.
- [17] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13: 1194-1202.
- [18] Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, et al. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1189-1191.
- [19] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35: 1547-1549.