基于组学的丹参酮生物合成途径新基因 *CYP71D375*克隆和功能研究

浦香东, 徐志超, 宋经元*

中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: jysong@implad.ac.cn

收稿日期: 2017-09-16; 接受日期: 2017-11-26; 网络版发表日期: 2018-02-05

中国医学科学院医学与健康科技创新工程(批准号: 2016-I2M-3-016)和协和青年科研基金(批准号: 2017350014)资助

摘要 丹参酮能有效治疗心脑血管疾病, 其生物合成途径解析是国内外研究热点, 其中CYP450氧化酶超家族的关键修饰作用最受关注. 基于药用模式植物丹参的基因组及转录组数据分析, 本研究克隆到一个新的CYP450氧化酶编码基因, 命名为*SmCYP71D375*, 全长1515 bp, 编码504个氨基酸, 差异表达分析显示, 该基因在丹参的根及根周皮部位显著高表达, 与丹参酮合成和积累的部位一致, 推测其催化丹参酮的生物合成. 进一步构建RNAi转基因毛状根体系, 通过化学检测及代谢组学分析发现抑制*SmCYP71D375*的基因表达导致羟基丹参新酮、丹参新酮、隐丹参酮、丹参酮II A等含量显著降低, 证实*SmCYP71D375*在丹参体内催化丹参酮的生物合成. 本研究为解析丹参酮的生源途径提供新思路, 对植物高氧化次生代谢产物合成途径研究具有重要示范意义.

关键词 丹参, 丹参酮, 生物合成, *SmCYP71D375*, 本草基因组学

本草基因组学的提出及发展推动丹参作为药用植物活性成分生物合成和调控机制研究的理想模式植物^[1,2]. 丹参酮类化合物为丹参中一种高度氧化的天然产物, 在心脑血管疾病的治疗方面效果显著^[3-5], 其生物合成途径尚不清晰. 丹参酮的萜类前体物质为牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(*geranylgeranyldiphosphate*, GGPP), 由甲羟二羧酸途径(*mevalonate pathway*, MVA)和2-甲基-*D*-赤藓糖醇-4-磷酸途径(*2-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway*, MEP)合成; GGPP经二萜合酶柯巴基焦磷酸合酶(*copalyl diphosphate synthase*, CPS)和类贝壳杉烯合酶(*kaurene synthase-like*, KSL)催化生

成丹参酮骨架次丹参酮二烯(*miltiradiene*); 次丹参酮二烯再经一系列细胞色素P450单加氧酶(CYP450)的修饰作用最终生成丹参酮类化合物^[6-10].

CYP450是含有亚铁血红素的一类酶, 约占植物蛋白编码基因的1%, 是参与植物次生代谢活动最大的氧化酶超家族, 具有复杂的底物选择性和催化活性^[11,12]. CYP450s参与植物信号传导与防御、聚合反应(木质素、软木脂、角质、孢粉素等)、复杂结构(花粉外膜、花药角质层等), 在植物次生代谢产物结构多样性进化中发挥重要的氧化修饰功能. 萜类化合物在植物天然产物中分布最多, 已鉴定到的就有超过40000种,

引用格式: 浦香东, 徐志超, 宋经元. 基于组学的丹参酮生物合成途径新基因*CYP71D375*克隆和功能研究. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 390–398
Pu X D, Xu Z C, Song J Y. Cloning and functional identification of novel *CYP71D375* related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2018, 48: 390–398, doi: [10.1360/N052017-00196](https://doi.org/10.1360/N052017-00196)

其结构的多样性主要取决于萜类合酶和CYP450s: 前者催化形成不同类别的萜类骨架, 如单萜、倍半萜、二萜、三萜等; 后者氧化修饰骨架物质形成结构多样的萜类化合物。目前, 研究证明丹参SmCYP76AH1催化次丹参酮二烯合成铁锈醇(ferruginol); SmCY-P76AH3 催化铁锈醇合成羟基化铁锈醇(11-hydroxy ferruginol)、柳杉酚(sugiol)、羟基化柳杉酚(11-hydroxy ferruginol); SmCYP76AK1催化二羟基铁锈醇(11,20-dihydroxy ferruginol)和二羟基柳杉酚(11,20-dihydroxy sugiol)的生成^[13,14]。丹参酮高氧化活性以及复杂的网络化合成途径, 导致其途径解析进展缓慢, 仍有一系列CYP450s氧化酶的功能亟待验证。

基于丹参全基因组及全长转录组研究, 研究者们预测33个丹参根周皮显著高表达的CYP450s参与丹参酮的生物合成^[15-20], 本研究克隆丹参根显著高表达的新基因*SmCYP71D375*, 阐述其系统进化、基本理化性质; 通过RNA干扰技术构建转基因丹参毛状根; 利用UPLC及代谢组技术检测丹参酮含量变化, 验证SmCYP71D375在丹参酮生物合成中的催化功能, 对丹参酮生物合成途径分子机制的解析具有重要的科学意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 *SmCYP71D375*的基因克隆及生物信息学分析

取丹参根的3个组织(周皮、韧皮部和木质部)及丹参根、茎、叶、花为材料(来源于中国医学科学院药用植物研究所试验田)。采用QIAGEN RNeasy Plus Mini Kit (Cat. 74134)试剂盒提取RNA; 经Prime-Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Cat. 6210A)试剂盒合成一链cDNA; 基于丹参全长转录组数据, 设计特异引物(5'-ATGGAGTTCAACATCC-CATCAACA/3'-TCAAGCAGCTGCACGCAA); 使用TaKaRa Ex Taq DNA聚合酶克隆*SmCYP71D375*全长基因, 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收后连接T载体测序。

采用ExPASy Proteomics Server提供的在线工具ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)预测SmCYP71D375的理化性质; Predictprotein在线预测蛋白的二级结构(<https://www.predictprotein.org/>); PFAM预测SmCYP71D375保守结构域(<http://pfam.xfam.org/search/batch>); 使用DNAMAN软件对丹参中

不同的CYP450蛋白的氨基酸序列进行多序列比对分析; SWISS-MODEL进行蛋白质的三维同源建模(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)。

1.2 *SmCYP71D375*的序列及系统进化分析

将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的CYP450s (来自于CYP450数据库, <http://drnelson.uthsc.edu/Arablinks.html>)、已验证功能的丹参SmCYP76AH1, SmCY-P76AH3, SmCYP76AK1、百脉根LcCYP71D353、烟草NtCYP71D20、薄荷MhCYP71D13、MhCYP71D18与本研究克隆得到的SmCYP71D375氨基酸序列进行比对, 采用MEGA软件构建NJ (neighbor-joining)系统进化树, bootstrap设置为1000次。

1.3 *SmCYP71D375*基因的差异表达分析及RNAi遗传转化体系

基于丹参基因组, 设计特异qPCR引物(5'-F-A G T C C T T C C G C C A C A T A A G A / 3'-R-GTCATCGTTCGCACTCTG), 扩增长度为166 bp, 使用ABI 7500 real-time PCR检测系统, 以丹参管家基因*SmACTIN*作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因在丹参不同组织部位的相对表达, 采用IBM SPSS 20软件的一-way ANOVA分析多样品间的差异显著性。

对*SmCYP71D375*基因设计特异Gateway引物(5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATG-GAGTTCAACATCCCATC/3'-GGGGACCACTTTG-TACAAGAAAGCTGGGTTCAGCAGCTGCACG-CAAAG)进行RNAi片段的扩增, 通过Gateway® Technology的BP和LR反应构建RNAi载体, 获得的重组质粒pK7GWIWG2D(II)-RNAi经冻融转化法导入发根农杆菌ACC10060。含有重组质粒的发根农杆菌侵染丹参叶盘, 愈伤分化出的毛状根经卡那霉素(kanamycin)抗性筛选及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)筛选后采用液体培养基大量富集。选择含质粒PK7GWIWG2D(II)的发根农杆菌侵染丹参叶片作为对照实验(PK)。6,7-V液体培养30天后, 采用荧光定量qPCR鉴定目的基因的RNAi效率; 阳性毛状根暗培养2~3个月, 用于代谢物分析^[21,22]。

1.4 转基因毛状根代谢物检测

将新鲜转基因丹参毛状根置于45℃干燥后研磨成

细粉, 取1.0 g粉末加入5.0 mL甲醇超声提取15 min, 离心(2500×g) 10 min后取上清液, 过0.22 μm的聚四氟乙烯膜, 即得丹参酮提取液. 分别取16.0 μg丹参酮 I、丹参酮 II A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、铁锈醇、丹参新酮溶于1.0 mL甲醇中作为标准品. 通过超高效液相色谱(ultra-performance liquid chromatography, UPLC)检测, 采用Waters公司(美国)的超高效液相色谱(Waters UPLC system BCH C18 column), 流动相为体积比3:1的甲醇和水^[23].

通过UPLC-MS/MS进行代谢组学分析, 将Shim-pack UPLC SHIMADZU CBM20A UPLC系统与Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (1.8 μm, 2.1×100 mm)柱联用. 流动相为乙腈和水(各含0.04%的乙酸), 柱温为40℃, 流速0.4 mL/min, 进样体积为4.0 μL, 0~12 min流动相乙腈浓度从5%线性增长至95%, 12~15 min流动相为95%乙腈. 使用Biosystems 4500 QTRAP系统进行MS分析, 优化后的质谱条件为: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)电压5500 V, 温度550℃, 帘气为25 psi, 碰撞诱导电离(collisional activation dissociation, CAD)参数设置为高, 所得到的数据利用软件Analyst 1.6.1 (AB SCIEX)进行处理.

2 结果与分析

2.1 *SmCYP71D375*的基因克隆及理化性质分析

*SmCYP71D375*定位于丹参基因组Scaffold5609, 基因组DNA序列长度2514 bp. cDNA克隆结果显示, *SmCYP71D375*的可读框(open reading frame, ORF)长度为1515 bp, 包含两个外显子和一个内含子, 在基因组DNA的888~1886 bp处为内含子序列. 克隆结果与基因组序列相比在3个位点处发生变异, 分别是101 bp处A变异为G, 106 bp处T变异为C, 279 bp处A变异为C, 对应至氨基酸34位N变异为S, 36位S变异为P, 9位K变为N, 通过与3个阳性单菌落的测序结果对比分析可知在丹参基因组中此基因的个别位点测序存在错误. *SmCYP71D375*基因编码的蛋白理化性质在线分析推测该蛋白分子式为C₂₆₀₈H₄₁₂₀N₇₁₂O₇₁₁S₂₁, 分子量是57.4 kD, 等电点PI 9.13, 带正电残基(Arg+Lys)为66, 负电残基(Asp+Glu)为57, 该蛋白的不稳定系数为44.56, 脂肪系数为97.18, 亲水性系数为-0.117. 二级结构在线预测结果表明, *SmCYP76AK5*蛋白的二级结

构中α-螺旋占49.01%, β-折叠占7.34%, 无规卷曲占43.65%. PFAM预测*SmCYP71D375*的保守结构域, 结果显示该基因编码的蛋白在38~493位点具有CYP450保守结构域(PF00067). *SmCYP71D375*与*SmCYP76AK1*, *SmCYP76AH1*, *SmCYP76AH3*的氨基酸序列一致性分别为30%, 29%, 28%. 截至目前, NCBI蛋白数据库已收录532440条CYP450蛋白序列, 然而, 蛋白质数据库(protein databank, PDB)查询发现仅有829种CYP450的晶体结构得到解析, 其中大部分为细菌和人类中的CYP450, 植物中仅有拟南芥中的8种CYP450晶体结构得到解析. 用SWISS-MODEL预测*SmCYP71D375*蛋白三级结构, 其与人的细胞色素P450 17A1 (human cytochrome P450 17A1) (PDB ID: 5irj)序列相似性最高, 为32%, 故选其为模板, 在第4~502位氨基酸处建模, 模型覆盖率为92% (图1A). 基因序列上传NCBI, GenBank登录号MF445421.

2.2 *SmCYP71D375*的系统进化分析

通过NCBI下载拟南芥的266条CYP450序列, 从中筛选出具有代表性的76条拟南芥的CYP450序列结合丹参中已被鉴定的*SmCYP76AK1*, *SmCYP76AH1*, *SmCYP76AH3*与本实验所研究的*SmCYP71D375*氨基酸序列进行比对后构建NJ系统进化树, 结果显示80条CYP450分为9个clan, 分别为CYP74, CYP710, CYP85, CYP51, CYP86, CYP97, CYP72, CYP711, CYP71, 其中*SmCYP71D375*与*SmCYP76AK1*, *SmCYP76AH1*, *SmCYP76AH3*聚为一大支, 属于CYP71 clan^[11], 与*LcCYP71D353*, *NtCYP71D20*, *MhCYP71D13*, *MhCYP71D18*聚为一小支, 属于CYP71D亚家族 (图1B).

2.3 *SmCYP71D375*基因的差异表达分析及RNAi遗传转化体系

根据克隆结果设计qPCR引物进行差异表达分析, 结果显示, *SmCYP71D375*在丹参根3个组织中的表达量由高到低依次为周皮、韧皮部、木质部, 在丹参不同器官中的表达量由高到低依次为根、叶、花、茎, 且在丹参根的周皮中显著高表达, 与丹参酮的合成积累相一致 (图2A).

通过抗性及GFP绿色荧光蛋白初步筛选出阳性转基因丹参毛状根株系, 扩大培养30天后, 进一步对其进

图1 SmCYP71D375的三维结构预测及系统进化分析

A: SmCYP71D375蛋白三维结构预测; B: SmCYP71D375的系统进化分析

行qPCR表达分析, 对比分析后可知*SmCYP71D375*基因在对照组(PK)中的表达量约为转基因丹参毛状根(*CYP71D375*-RNAi)中表达量的3倍, 即*SmCYP71D375*基因被成功抑制(图2B).

2.4 转基因毛状根丹参酮含量的检测

筛选出的阳性转基因丹参毛状根继续培养60~90天后, 通过UPLC法分别在22, 27, 28, 32 min检测到4个明显的吸收峰, 与标准品比较可知其分别为二氢丹参酮 I (dihydrotanshinone I)、隐丹参酮(cryptotanshinone)、丹参酮 I (tanshinone I)、丹参酮 II A (tanshinone II A), 与对照组相比4种化合物的含量均有不同程度的降低(图2C).

2.5 转基因毛状根代谢组学分析

利用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS/MS)对*CYP71D375*-RNAi组和对照组(PK)的代谢物作具体检测分析, 共检测到609种代谢物, 385种为已知化合物. 与对照组相比, 124种化合物的含量在*CYP71D375*-RNAi组显著增加(差异倍数>2), 79种化合物的含量显著降低(差异倍数<0.5). 24种丹参酮类化合物被进一步检测到, 其保留时间、质荷比、分子

量、峰面积等信息如表1. 与对照组相比, 3种丹参酮化合物(cryptojaponol, trijuganone B, salvisyrianone)的含量在*CYP71D375*-RNAi组基本无变化; 19种丹参酮类化合物的含量积累变少; 10种化合物的含量显著降低(差异倍数<0.5), 其中羟基化丹参新酮(1R-hydroxymiltirone)降低最多, 为对照组的0.323倍, 以上数据为*SmCYP71D375*参与丹参体内丹参酮的生物合成提供依据(图3).

3 讨论

基于本草基因组学的理论与技术支撑^[2,24], 本研究系统地筛选并鉴定一个催化丹参酮生物合成途径的新CYP450基因——*SmCYP71D375*. 丹参酮类化合物作为药用模式植物丹参的主要成分之一^[1], 具有结构复杂、高度氧化等特点, 随着丹参基因组学、转录组学及代谢组学技术的发展, 现阶段研究进展较快, 例如, 丹参酮生物合成上游MVA和MEP途径, 关键酶SmCPS和SmKSL以及3个CYP450s (*SmCYP76AH1*, *SmCYP76AH3*, *SmCYP76AK1*)^[6], 但是依然存在许多未知的氧化酶需要进行功能鉴定. Boutanaev等人^[25]和Chen等人^[26]通过分析17种已测序植物基因组发现在双子叶植

图2 SmCYP71D375参与丹参酮生物合成途径的功能验证

A: *CYP76AK5*在丹参不同组织器官的差异表达分析; B: *CYP71D375*的RNAi效率; C: *CYP71D375*-RNAi转基因毛状根中丹参酮类化合物的含量变化. i: 二氢丹参酮 I; ii: 隐丹参酮; iii: 丹参酮 I; iv: 丹参酮 II A; **¹: 以韧皮部和木质部为对照; **²: 以茎、叶、花为对照; PK, PK1, PK2, PK3为含空质粒发根农杆菌侵染的丹参毛状根对照组; *CYP71D375*-RNAi为含RNAi载体质粒发根农杆菌侵染的转基因丹参毛状根; **: 具有显著性差异, $P < 0.05$

物中参与二萜类化合物氧化修饰的CYP450s主要归类于CYP71 clan的CYP71家族、CYP76家族、CYP736家族。本研究克隆得到的SmCYP71D375属于CYP71 clan的CYP71家族; SmCYP71D375基因在丹参根中显著高表达, 根周皮中表达最高, 与丹参酮的分布及积累规律相一致, 因此预测SmCYP71D375参与丹参中丹参酮的生物合成途径。进一步通过RNAi, UPLC, MS等实验技术对其功能进行鉴定, 研究发现*CYP71D375*-RNAi转基因丹参毛状根中10种丹参酮类化合物的含量与对照相比显著降低(差异倍数 < 0.5), 例如, 羟基化丹参新酮(1*R*-hydroxymiltirone)、丹参新酮(miltirone)、隐丹参酮(cryptotanshinone)等, 为SmCYP71D375在丹参体内催化丹参酮的生物合成提供证据。

CYP71D亚家族是CYP450s中的一个亚家族, 在植物界中发现的有400多种, 当前研究表明此亚家族成

员不一定具有相似的功能, 但主要集中于倍半萜烯、环状萜类化合物、吲哚类生物碱和类黄酮类化合物的生物合成。现已验证功能的CYP71D亚家族成员主要在植物萜类化合物生物合成途径中起作用^[27], 例如, 豆科植物百脉根中的LcCYP71D353连续3步将20-羟基羽扇豆醇(20-hydroxylupeol)氧化为20-羟基桦木酸(20-hydroxybetulinic acid)^[28]; 茄科烟草中的NtCYP71D20可在体外将5-*epi*-aristolochene和1-deoxycapsidiol氧化形成甜椒醇^[29]; 唇形科薄荷中的MhCYP71D13和MhCYP71D18分别作用于柠檬烯的C3位和C6形成反式异薄荷烯醇(*trans*-isopiperite)和反式葑醇(*trans*-carveol)^[30]。本研究筛选、克隆并鉴定SmCYP71D375在丹参体内催化丹参酮的生物合成, 但其具体的催化底物及产物仍不明确。从结构上分析认为, 丹参新酮在丹参酮生物合成途径中发挥重要的中间体作用, 结合代谢组数据分析可知抑制基因

图3 转基因丹参毛状根丹参酮类化合物的含量检测

PK为含空质粒发根农杆菌感染的丹参毛状根对照组; CYP71D375-RNAi为含RNAi载体质粒发根农杆菌感染的转基因丹参毛状根; **: 具有显著性差异, $P < 0.05$

*SmCYP71D375*的表达会导致丹参新酮的含量显著降低, 说明此基因催化的反应在丹参新酮合成的上游区域。同时, *CYP71D375-RNAi*株系的隐丹参酮和丹参酮IIA含量显著降低, 结合其结构与二氢丹参酮I、

丹参酮I在C₁~C₄位置不饱和键及侧链甲基数量的差异, 预测隐丹参酮和二氢丹参酮I的合成属于两条通路, 后续分别生成丹参酮IIA和丹参酮I。

本研究证明, CYP71家族新基因*SmCYP71D375*在

表 1 24种丹参酮类化合物的代谢分析

序号	保留时间 (min)	[M+H] ⁺	分子式	质荷比(M/Z)	峰面积		比例	成分名称
					$\overline{PK}$	CYP71D375- RNAi	(CYP71D375- RNAi/ $\overline{PK}$)	
1	8.91	277	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	277, 259, 235, 249, 221, 193, 178	12066667	7140000	0.5917	丹参酮 I
2	8.08	279	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	279, 261, 233, 218, 205, 190, 149	11866667	6560000	0.5528	二氢丹参酮 I
3	7.40	279	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	279, 261, 233, 205, 201, 190, 149	262667	157000	0.5977	亚甲基丹参醌
4	8.38	281	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	281, 263, 248, 235, 220, 192	357667	341000	0.9534	三叶鼠尾酮B
5	7.10	281	C ₁₉ H ₂₀ O ₂	281, 263, 253, 207, 179	64667	33400	0.5165	轮叶婆婆纳对醌A
6	10.09	283	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	283, 265, 240, 223, 208, 195, 153	2090000	960000	0.4593	丹参新酮
7	9.63	293	C ₁₉ H ₁₆ O ₃	293, 278, 263, 250, 235, 222, 204	1800000	986000	0.5478	去氢丹参酮 II A
8	5.66	295	C ₁₈ H ₁₄ O ₄	295, 277, 267, 251, 249, 221	741000	575000	0.7760	羟基次甲丹参醌
9	9.89	295	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	295, 277, 267, 253, 249, 234, 221, 205	2803333	965000	0.3442	丹参酮 II A
10	7.40	297	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	297, 279, 261, 233, 218, 205, 190	11233333	7800000	0.6944	丹参醇B
11	9.01	297	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	297, 282, 279, 267, 254, 221, 193	16566667	8180000	0.4938	隐丹参酮
12	6.71	297	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	297, 279, 261, 251, 233, 205, 190	2626667	1540000	0.5863	丹参新醌A
13	4.70	297	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	297, 279, 261, 251, 233, 205, 190	571667	325000	0.5685	丹参酮 VI
14	7.77	299	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	299, 281, 266, 263, 253, 221, 193, 178	2923333	1470000	0.5029	丹参酮 II B
15	7.15	311	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	311, 293, 278, 275, 265, 251, 247	358000	184000	0.5140	羟基丹参酮 II A
16	6.40	311	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	311, 293, 278, 247, 219, 204, 191	73567	27300	0.3711	一氧代异隐丹参酮
17	7.99	311	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	311, 293, 283, 275, 265, 255, 227, 221	805333	347000	0.4309	丹参二醇B
18	7.04	313	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	313, 295, 277, 266, 249, 235	485333	232000	0.4780	丹参二醇C
19	7.14	313	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	313, 295, 277, 266, 249, 235	6723333	6540000	0.9727	Syrian鼠尾草酮
20	9.07	313	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	313, 295, 277, 267, 253, 241, 227	891333	340000	0.3815	去氢丹参酮 V
21	6.13	313	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	313, 295, 280, 277, 267, 253, 249, 225	991667	999000	1.0074	柳杉树脂酚
22	7.20	331	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	331, 313, 303, 301, 295, 285, 283	7250000	2670000	0.3683	丹参酸甲酯
23	8.42	339	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	339, 279, 261, 233, 205, 190, 149	2856667	1200000	0.4201	小红参醌丙
24	7.53	341	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	341, 281, 263, 235	187667	60600	0.3229	(1R)-羟基-丹参新酮

丹参体内参与丹参酮生物合成途径, 后续需通过重复实验确定其功能, 且其催化底物及催化产物仍未知, 计划通过体外酶促反应结合代谢组数据来进一步解析。

参考文献

- 1 宋经元, 罗红梅, 李春芳, 等. 丹参药用模式植物研究探讨. 药学学报, 2013, 48: 1099–1106
- 2 陈士林, 宋经元. 本草基因组学. 中国中药杂志, 2016, 41: 3881–3889
- 3 Wang X, Morris-Natschke S L, Lee K H. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of tanshen. *Med Res Rev*, 2007, 27: 133–148
- 4 Dong Y, Morris-Natschke S L, Lee K H. Biosynthesis, total syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep*, 2011, 28: 529–542
- 5 Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 408–414
- 6 Xu Z, Ji A, Zhang X, et al. Biosynthesis and regulation of active compounds in medicinal model plant *Salvia miltiorrhiza*. *Chin Herbal Meds*, 2016, 8: 3–11
- 7 Peters R J. Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 1521–1530
- 8 Kitaoka N, Lu X, Yang B, et al. The application of synthetic biology to elucidation of plant mono-, sesqui-, and diterpenoid metabolism. *Mol Plant*, 2015, 8: 6–16
- 9 Cui G H, Duan L X, Jin B L, et al. Functional divergence of diterpene syntheses in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1607–1618
- 10 Ma Y, Yuan L, Wu B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *J Exp Bot*, 2012, 63: 2809–2823
- 11 Nelson D, Werck-Reichhart D. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J*, 2011, 66: 194–211
- 12 Pateraki I, Heskes A M, Hamberger B. Cytochromes P450 for terpene functionalisation and metabolic engineering. *Adv Biochem Eng Biot*, 2015, 148: 107–139
- 13 Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12108–12113
- 14 Guo J, Ma X, Cai Y, et al. Cytochrome P450 promiscuity leads to a bifurcating biosynthetic pathway for tanshinones. *New Phytol*, 2016, 210: 525–534
- 15 Xu Z, Peters R J, Weirather J, et al. Full-length transcriptome sequences and splice variants obtained by a combination of sequencing platforms applied to different root tissues of *Salvia miltiorrhiza* and tanshinone biosynthesis. *Plant J*, 2015, 82: 951–961
- 16 Xu H, Song J, Luo H, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Plant*, 2016, 9: 949–952
- 17 Luo H, Zhu Y, Song J, et al. Transcriptional data mining of *Salvia miltiorrhiza* in response to methyl jasmonate to examine the mechanism of bioactive compound biosynthesis and regulation. *Physiol Plantarum*, 2014, 152: 241–255
- 18 Zhang X, Luo H, Xu Z, et al. Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Sci Rep*, 2015, 5: 11244
- 19 李滢, 孙超, 罗红梅, 等. 基于高通量测序454 GS FLX的丹参转录组学研究. 药学学报, 2010, 45: 524–529
- 20 Ji A J, Luo H M, Xu Z C, et al. Genome-wide identification of the *AP2/ERF* gene family involved in active constituent biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Genome*, 2016, 9: 1–11
- 21 Kai G, Xu H, Zhou C, et al. Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Metab Eng*, 2011, 13: 319–327
- 22 Wang J W, Wu J Y. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88: 437–449
- 23 Xu Z, Song J. The 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily participates in tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza*. *J Exp Bot*, 2017, 68: 2299–2308
- 24 Chen S L, Song J Y, Sun C, et al. Herbal genomics: examining the biology of traditional medicines. *Science*, 2015, 347: S27–S28

- 25 Boutanaev A M, Moses T, Zi J, et al. Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 112: E81–E88
- 26 Chen F, Tholl D, Bohlmann J, et al. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J*, 2011, 66: 212–229
- 27 Tsukagoshi Y, Ohyama K, Seki H, et al. Functional characterization of CYP71D443, a cytochrome P450 catalyzing C-22 hydroxylation in the 20-hydroxyecdysone biosynthesis of *Ajuga hairy roots*. *Phytochemistry*, 2016, 127: 23–28
- 28 Krokida A, Delis C, Geisler K, et al. A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol*, 2013, 200: 675–690
- 29 Ralston L, Kwon S T, Schoenbeck M, et al. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-epi-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Arch Biochem Biophys*, 2001, 393: 222–235
- 30 Wüst M, Little D B, 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. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 387: 125–136

Cloning and functional identification of novel *CYP71D375* related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*

PU XiangDong, XU ZhiChao & SONG JingYuan

Key Lab of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China

Tanshinones, extracted from *Salvia miltiorrhiza*, are best known for the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases, whose biosynthesis is a subject of considerable interest. Studies in elucidating tanshinone biosynthesis mainly focus on the function of CYP450 oxidase. Based on the genome and transcriptome of *Salvia miltiorrhiza*, a medicinal model plant, a *SmCYP71D375* gene related to tanshinone biosynthesis was identified, with the entire open reading frame of 1515 base pair (bp), in length encoding one polypeptide of 504 amino acids. The expression of *SmCYP71D375* was the highest in the periderm, in accordance with the synthesis and accumulation of tanshinone, indicating that *SmCYP71D375* might be involved in tanshinone biosynthesis. The content of 1R-hydroxymiltirone, miltirone, cryptotanshinone, and tanshinone IIA were decreased significantly by expression inhibition of *SmCYP71D375* via RNAi transgenic hairy root system, confirming that *SmCYP71D375* catalyzed the biosynthesis of tanshinones *in vivo*. This study will help to elucidate the biosynthetic pathway of tanshinones, and pave the way for the research of synthetic pathways of high-oxygen secondary metabolites in the plant kingdom.

***Salvia miltiorrhiza*, tanshinone, biosynthesis, SmCYP71D375, herbgenomics**

doi: [10.1360/N052017-00196](https://doi.org/10.1360/N052017-00196)