



## 刘成伟

东北林业大学生命科学学院教授，博士生导师，黑龙江省酶与类酶工程重点实验室学术带头人。主要研究方向为：1.大型真菌药用活性天然产物生物合成途径解析；2.沉默基因挖掘与新化合物发现；3.利用合成生物学手段高效生产有应用价值的化合物。开创了应用子囊属真菌表达担子菌含有内含子基因的米曲霉异源表达体系，为担子菌天然产物异源生产提供了新的可用宿主。

## 大型担子菌中二萜化合物生物合成研究进展

周一鸣<sup>1</sup>，祁建钊<sup>1,3</sup>，段应策<sup>1</sup>，赵敏<sup>1,2\*</sup>，刘成伟<sup>1,2\*</sup>

1 东北林业大学生命科学学院，黑龙江 哈尔滨 150040

2 黑龙江省酶与类酶工程重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150040

3 西北农林科技大学化学与药学院，陕西 杨凌 712100

**摘要：**大型担子菌分布广泛，种类繁多，它们是重要的食药资源宝库。萜类化合物是其主要活性成分之一，包括倍半萜、二萜和三萜等，这些化合物具有预防、缓解或治疗癌症、抑郁症、糖尿病和高脂血症等多种疾病的功效。目前，从担子菌中分离出的二萜类化合物基本骨架结构特征主要为鸟巢烷(cyathanes)型、截短侧耳素(pleuromutilins)型、guanacastanes型、海松烷(pimaranes)型、松香烷(abietanes)型和毛皮伞烷(crinipellins)型 6 大类型。本文综述了担子菌中二萜类化合物的结构特点、生物活性和生物合成的研究进展，对参与担子菌中二萜化合物生物合成的二萜合成酶进行了分类，对两种重要的二萜化合物生物合成途径进行了系统总结和论述。本文将为未知二萜化合物生物合成途径及关键基因功能解析提供参考。

**关键词：**担子菌；二萜；二萜合成酶；生物活性；生物合成

## [引用本文]

周一鸣，祁建钊，段应策，赵敏，刘成伟，2023. 大型担子菌中二萜化合物生物合成研究进展. 菌物学报，42(1): 101-117  
Zhou YM, Qi JZ, Duan YC, Zhao M, Liu CW, 2023. Research progress of the biosynthesis of diterpenoids in macro-basidiomycetes. Mycosystema, 42(1): 101-117

资助项目：中央高校基本科研业务费专项资金资助(2572020DP07)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2572020DP07).

\*Corresponding authors. E-mail: liuchw@nefu.edu.cn; 82191513@163.com

ORCID: LIU Chengwei (0000-0003-2746-2080), ZHAO Min (0000-0001-9751-454X)

Received: 2022-09-30; Accepted: 2022-10-13

## Research progress of the biosynthesis of diterpenoids in macro-basidiomycetes

ZHOU Yiming<sup>1</sup>, QI Jianzhao<sup>1,3</sup>, DUAN Yingce<sup>1</sup>, ZHAO Min<sup>1,2\*</sup>, LIU Chengwei<sup>1,2\*</sup>

1 College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

2 Key Laboratory for Enzyme and Enzyme-like Material Engineering of Heilongjiang, Harbin 150040, Heilongjiang, China

3 College of Chemistry & Pharmacy, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** Macro-basidiomycetes are widely distributed and diverse. They are not only important food resources, but also a treasure of medicinal resources. Terpenoids are one of the main active ingredients found in the fruiting bodies of macrobasidiomycetes, including sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, etc. These compounds have effects of preventing, relieving or treating cancer, depression, diabetes, hyperlipidemia, and other diseases. At present, the basic backbone structure characteristics of diterpenoids isolated from basidiomycetes can be divided into six types: cyathanes, pleuromutilins, guanacastanes, pimaranes, abietanes, and crinipellins. In this review, the structural characteristics, biological activities, and biosynthesis of diterpenoids in basidiomycetes were summarized. Diterpene synthase involved in the biosynthesis of diterpenoids in basidiomycetes is classified, and two important biosynthetic pathways of diterpenoids are systematically summarized and discussed.

**Keywords:** basidiomycetes; diterpenoids; diterpene synthetases; biological activities; biosynthesis

大型担子菌是一类能够形成大型子实体且能够形成担子和担孢子的重要真菌类群,该类真菌数量大、种类多、分布广泛,截至2019年,全球已收录超过 4.8 万余种(魏铁铮等 2020; 魏杰等 2021),近年来仅中国就发现该类真菌近 1 000 种(戴玉成等 2021; Wu *et al.* 2022)。此类真菌能够产生许多具有重要生物活性的天然产物(Wu *et al.* 2019),其中萜类化合物是主要的次级代谢产物之一。

萜类化合物种类丰富,是天然产物的最大家族,到目前为止,已经发现了 95 000 多种结构不同的萜类化合物(Quin *et al.* 2014; Christianson 2017)。这类化合物结构具有(C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub>通式,分子骨架是以异戊二烯单元为基本结构单元的化合物及其衍生物。它们普遍存在于自然界中,是构成植物香精、树脂和色素等次级代谢产物的主要成分(李传旺等 2021)。萜类化合物生物合

成的共同前体是异戊二烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP),根据 IPP 生物合成来源和机制的不同可以将萜类化合物的生物合成分为两条不同的途径,分别是甲羟戊酸途径(MVA 途径)和甲基赤藓糖磷酸途径(MEP 途径)(Kuzuyama 2002)。萜类化合物按照碳原子的数目可以分为单萜(C<sub>10</sub>)、倍半萜(C<sub>15</sub>)、二萜(C<sub>20</sub>)、三萜(C<sub>30</sub>)和多萜等。由于多数萜类化合物分子中具有不同的碳环数,因此又可以分为链萜、单环萜、双环萜和三环萜等(刘莉和胡昌华 2010)。由此可见,萜类化合物从简单的线型碳氢链结构到复杂的环化结构充分体现了其结构多样性,这种结构多样性在一定程度上决定了它们生物活性的多样性(Gershenzon & Dudareva 2007)。

二萜类化合物作为萜类化合物的代表之

一, 广泛存在于植物和真菌中, 是一类具有重要价值的天然产物, 并且以其广泛的生物活性成为国内外的研究热点。根据目前的文献记载显示, 真菌中发现的二萜都是由 MVA 途径合成而来。IPP 在 I 型或者 II 型 IPP 异构酶的作用下异构化形成 DMAPP (刘莉和胡昌华 2010), 然后 DMAPP 在香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS) 的作用下再与 3 分子的 IPP 缩合形成香叶基香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) (Ohnuma *et al.* 1998)。大部分功能性二萜是由非环状的 GGPP 在二萜环化酶的作用下生成二萜母核骨架, 然后再经过进一步的加工修饰如氧化、还原、甲基化和糖基化等得到最终产物 (刘莉和胡昌华 2010)。二萜类化合物结构的复杂性和多样性, 使其具备了多种不同的生物活性, 因此, 这类化合物被广泛用作临床药物, 具有非常高的应用和经济价值, 从而受到越来越多的关注 (益萱等 2019)。例如, 从大型真菌中分离出的一些鸟巢烷型二萜化合物 (cyathane) 已被证明可以促进某些神经因子生长或合成, 是治疗某些神经退行性疾病如阿尔茨海默病的先导化合物 (汪锴等 2015)。

本文总结了大型担子菌发现的 6 大典型二萜化合物的化学结构、生物活性以及生物合成途径, 将为担子菌中二萜类化合物生物活性和生物合成途径解析提供参考, 同时对其生物活性挖掘利用提供理论依据。

## 1 大型担子菌中 6 种二萜类化合物基本骨架的概述

根据目前从大型担子菌中发现的二萜类化合物结构特点可将其分为 6 大类, 分别为鸟巢烷 (cyathanes) 型、截短侧耳素 (pleuromutilins) 型、guanacastanes 型、海松烷 (pimaranes) 型、松香烷 (abietanes) 型和毛皮伞烷 (crinipellins) 型 (图 1)。

### 1.1 鸟巢烷 (cyathanes) 型二萜

Cyathanes 型二萜, 即鸟巢烷型二萜, 是担子菌二萜类化合物中数量最多的类型之一 (Zhang & Feng 2022)。根据近十年来的文献报道已经有近百种该类型二萜被发现。鸟巢烷型二萜主要从 *Cyathus* 属、*Hericium* 属和 *Sarcodon* 属以及 3 个特殊物种 *Phellodon niger*、*Laxitextum incrustatum* 和 *Strobilurus tenacellus* 中分离得到 (Chen & Liu 2017)。此类化合物最初于 1971 年从看起来像鸟巢的 *Cyathus* 属中分离出来, 并以此命名 (Johri & Brodie 1971)。例如, 从胡可黑蛋巢菌 *Cyathus hookeri* 中的 Martin 液体培养物中分离出一个 cyathanes 型二萜蛋巢菌素 (cyathin I) (1), 该化合物对脂多糖激活的巨噬细胞中的一氧化氮合成具有抑制作用,  $IC_{50}$  为  $15.5 \mu\text{mol/L}$  (Xu *et al.* 2013)。该类化合物具有 5/6/7 三元环杂合基本骨架, 且表现出多种生物活性 (Yin *et al.* 2019), 包括刺激神经突起的生长和神经元营养的双功能、抗炎、抗菌及抗肿瘤等 (张成宸 2016; 彭勤颖等 2021)。

Kawagishi *et al.* (1994) 从猴头菌 *Hericium erinaceum* 液体发酵菌丝体中首次分离并鉴定了含有鸟巢烷基本骨架和木糖基团的二萜化合物 erinacine A-C (2-4)。Tzeng *et al.* (2016) 证实了化合物 2 能够改善阿尔茨海默病的病理症状, 表现为可减轻脑部斑块沉积、提高大脑皮层胰岛素降解酶的水平、增加神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 与 NGF 前体的比值以及促进海马神经生长。Bailly & Gao (2020) 在该类化合物的活性作用机制方面做了系统性的论述, 化合物 2 可以通过干扰 TrkA-NGF 受体-配体复合物来调节 NGF 的刺激效应的能力, 从而发挥神经保护作用; 同时诱导神经细胞内各种过氧化物酶的产生, 减少毒素激发的细胞凋亡从而起到保护神经的作用。正是由于鸟巢烷二萜的生物活性, 此类化合物有望被开发为神经保护剂, 应用于包括阿尔茨海默病、帕金森病等神

## Primary skeletons

## Structure of diterpenoid

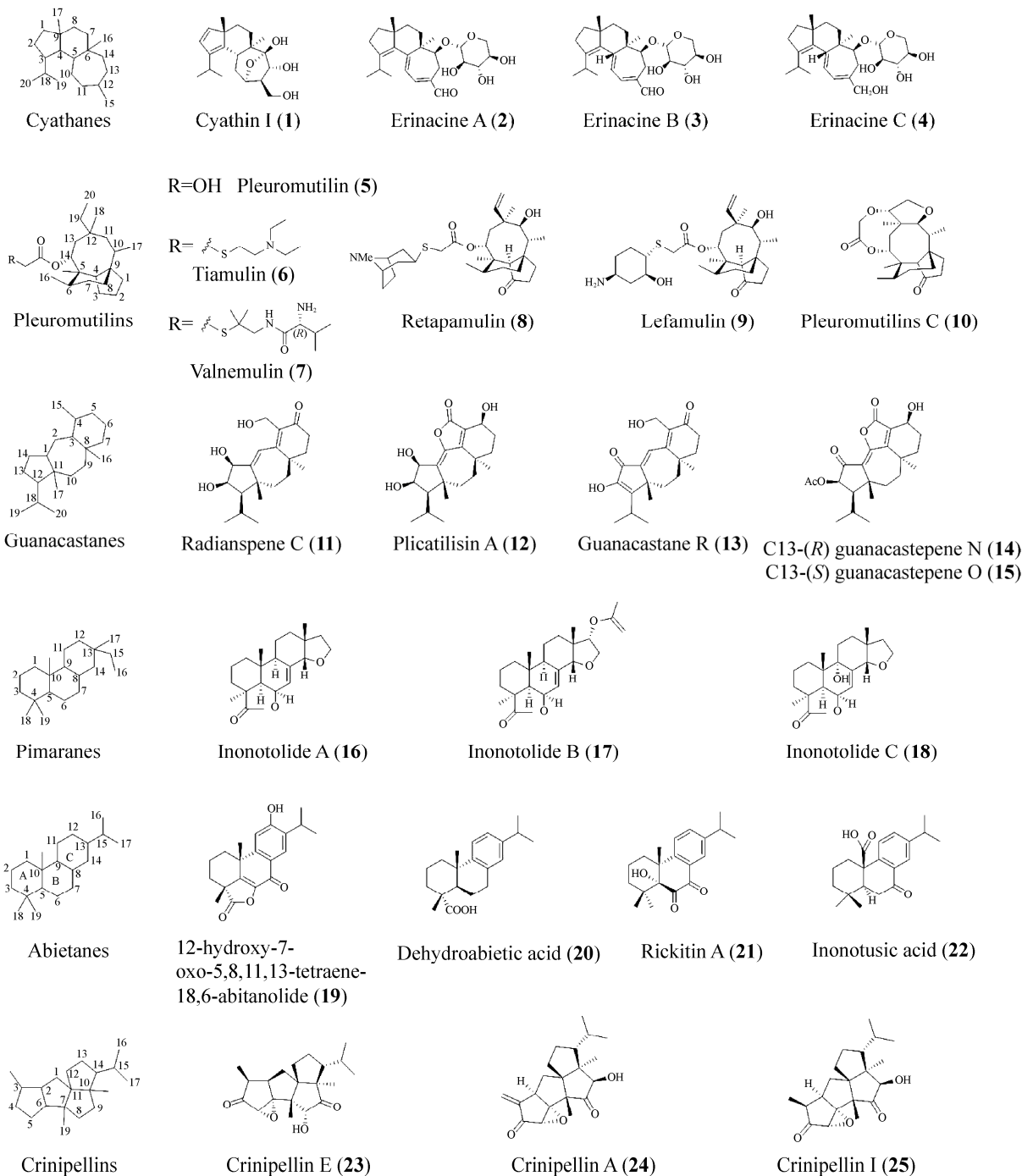


图1 大型担子菌中二萜化合物6种类型及化合物

Fig. 1 Six types and compounds of diterpenoids in macro-basidiomycetes.

经退行性疾病(张成宸 2016)。

## 1.2 截短侧耳素(pleuromutilins)型二萜

Kavanagh & Robbins (1951)首次在2种担子菌中(*Pleurotus passeckerianus* 和亚脐菇杯状斜

盖伞 *Clitopilus scyphoides*)分离了截短侧耳素(pleuromutilins) (5)。该化合物的结构特点是具有5/6/8三环骨架组成。化合物5通过与50S核糖体亚基的相互作用抑制原核蛋白合成而发挥其抗菌

活性(Hodgin & Högenauer 1974; Högenauer 1975; Poulsen *et al.* 2001)。另外, 化合物 **5** 对青霉素和链霉素耐药的葡萄球菌和支原体都显示出更强的抑制活性。为了提高抗菌活性, 人们合成了许多化合物 **5** 的衍生物, 到目前为止, 已经批准了 4 种化合物 **5** 的衍生物用于感染性疾病, 包括作为兽药的 tiamulin (**6**)和 valnemulin (**7**)、作为治疗疱疹病毒的抗生素 retapamulin (**8**)以及用于治疗社区获得性细菌性肺炎(CABP)的 lefamulin (**9**) (Dornhelm & Högenauer 1978; Poulsen *et al.* 2001; Yan *et al.* 2006; Paukner *et al.* 2013)。此外, Guo *et al.* (2022)从 *Omphalina mutila* 固体培养物中分离得到一系列化合物 **5** 的衍生物, 其中, 化合物 pleuromutilins C (**10**)对金黄色葡萄球菌和粪肠球菌有较强的抑制作用。

### 1.3 guanacastanes 型二萜

Guanacastanes 型二萜的特征是含有 5/7/6 环融合结构, 该类型化合物在大型真菌的次生代谢产物中比较少见, 主要来自于 *Coprinus* 属(Kinghorn *et al.* 2017)。该类化合物对癌细胞具有较强的杀伤作用(Ou *et al.* 2012)。其中从 *C. radians* 中分离出的化合物 radianspene C (**11**)对人乳腺癌细胞具有生长抑制活性,  $IC_{50}$  值为  $0.91 \mu\text{mol/L}$ 。从 *C. plicatilis* 中分离出的化合物 plicatilis A (**12**)对 HepG2、HeLa、MDA-MB-231、BGC-823 和 HCT 116 人癌细胞具有细胞毒作用,  $IC_{50}$  值在  $1.2\text{--}6.0 \mu\text{mol/L}$  之间(Liu *et al.* 2012)。2014 年从担子菌 *Psathyrella candollana* 的培养物中分离得到化合物 guanacastane R (**13**), 化合物 **13** 对人和小鼠的  $11\beta$ -HSD1 同工酶均有抑制活性,  $IC_{50}$  值分别为  $6.2$  和  $13.9 \mu\text{mol/L}$  (Yin *et al.* 2014)。由于 guanacastane 复杂的多环结构和良好的生物活性, 其总合成也引起了人们的关注, Gampe & Carreira (2011)实现了 guanacastepene N (**14**)和 guanacastepene O (**15**)的全合成研究。这将有助于进一步研究此类二萜的生物性质。

### 1.4 海松烷(pimaranes)型二萜

Pimaranes 型二萜的特征是含有 6/6/6 融合的碳环体系(Reveglia *et al.* 2018)。该类型二萜大多数在植物和子囊菌中发现, 而在担子菌中被报道的 pimaranes 型二萜并不多。

Ding *et al.* (2018)对 *Inonotus sinensis* 的培养液和菌丝体进行萃取, 对粗提物进行硅胶柱层析分离, 得到了 3 个 pimaranes 型二萜, 命名为 inonotolide A–C (**16–18**)。基于光谱分析阐明其结构, 并通过单晶 X 射线晶体分析证实了化合物 **16** 的结构。Pimaranes 型二萜的骨架有被氧化的趋势, 并且在已经报道的 pimaranes 结果中, C-19 的甲基经常被氧化成一个羧基基团。许多 pimaranes 型二萜被报道具有细胞毒性或抗炎活性(Kinghorn *et al.* 2017)。

### 1.5 松香烷(abietanes)型二萜

Abietanes 类二萜属于三环二萜类化合物, 大多数具有异构体和旋光性, 且骨架多变, 结构复杂。Abietanes 类二萜中的 A、B、C 3 个环常带有不同的官能团, 常以 C 环是否氧化脱氢等不同形式的变化使结构丰富多样(张义等 2019)。Abietanes 型二萜主要作为植物次级代谢产物存在。具有一定的抗肿瘤、抗炎和抗菌等药理作用。Wang *et al.* (2006)和 Jang & Yang (2011)分别从 *Phellinus igniarius* 和 *Phellinus pini* 中分离出 2 个此类型二萜, 12-hydroxy-7-oxo-5,8,11,13-tetraene-18,6-abitanolide (**19**)和 dehydroabietic acid (**20**), 其中 **20** 能够轻微抑制 NO 的生成,  $IC_{50}$  值为  $98.9 \mu\text{mol/L}$ 。Hypoxylon *rickii* 的次生代谢产物 rickitin A (**21**)对金黄色葡萄球菌 DSM 346 表现出较弱的抗菌活性, MIC 值为  $33.3 \mu\text{g/cm}^3$ 。对 KB3.1 宫颈癌细胞株和 L929 小鼠成纤维细胞进行细胞毒作用,  $IC_{50}$  值分别为  $18.0$  和  $23.0 \mu\text{g/cm}^3$  (Kuhnert *et al.* 2015)。Liu *et al.* (2014)从桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 中分离出一个该类型化合物, 即 inonotusic acid (**22**), 体外实验表明, 化合物 **22** 对 D-氨基半乳糖诱导的 WB-F344 细胞损伤有明

显的保护作用,其抑制率为 34.4%–81.2%。

### 1.6 毛皮伞烷(crinipellins)型二萜

Crinipellins 是一类具有四萜烷骨架的二萜化合物,这些化合物由大型担子菌 *Crinipellis* 产生。直到 1985 年,crinipellins 的结构才被确定(Chen & Liu 2017)。2017 年,从 *Crinipellis* 物种的液体培养物中分离出了 4 种 crinipellins 型二萜,其中 crinipellin E (23) 具有抗炎作用。生物实验表明,该化合物对 LPS/IFN- $\gamma$  诱导的瞬时转染人 MonoMac6 细胞 CXCL10 启动子活性具有剂量依赖性,IC<sub>50</sub> 值为 15  $\mu\text{mol/L}$  (Rohr *et al.* 2017)。Han *et al.* (2018) 从 *C. rhizomaticola* 的培养滤液中分离得到了 2 个 crinipellins 型二萜 crinipellin A (24) 和 crinipellin I (25), 化合物 24 对金黄色葡萄球菌、稻瘟病菌、灰霉病菌和马铃薯晚疫病菌具有广泛的体外抗真菌活性(MICs 分别为 1、8、31 和 31  $\mu\text{g/mL}$ )。

### 1.7 其他类型二萜

最近几年在大型担子菌中还产生了其他类型的二萜类化合物,扩大了已知大型担子菌产生

萜类化合物的多样性(Chen & Liu 2017) (图 2)。

Tsukamoto *et al.* (2003) 从口蘑属 *Tricholoma* sp. 子实体的甲醇提取物中分离得到 3 个新的二萜 tricholomalides A–C (26–28), 并根据其光谱数据对其结构进行了鉴定。在 100  $\mu\text{mol/L}$  浓度下, 26–28 显著诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC-12)的突起生长。Zhou *et al.* (2009) 对合生地花菌 *Albatrellus confluens* 进行培养, 得到了 2 种新型二萜, 分别是 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\beta$ -trihydroxycleistanth-13(17),15-dien-18oic acid (29) 和 8 $\beta$ -hydroxy-18-norcleistanth-4(5),13(17),15-trien-3-one (30)。Wang *et al.* (2012) 从食用菌 *Pleurotus eryngii* 的固体培养物中分离出一个具有新型骨架的二萜 eryngiolide A (31), 它是由 1 个环十二烷核与 2 个  $\gamma$ -内酯单元融合而成的。在体外实验中, 它对 2 种人类癌症细胞系(Hela 和 HepG2)显示出中等的细胞毒性。在生物遗传学上, 该化合物可能是第一个未通过 GGPP 单元合成的二萜, 这为自然界中二萜的生物合成开辟了一条全新的途径。Lee *et al.* (2015) 和 Kinghorn *et al.* (2017) 从粉红枝瑚菌

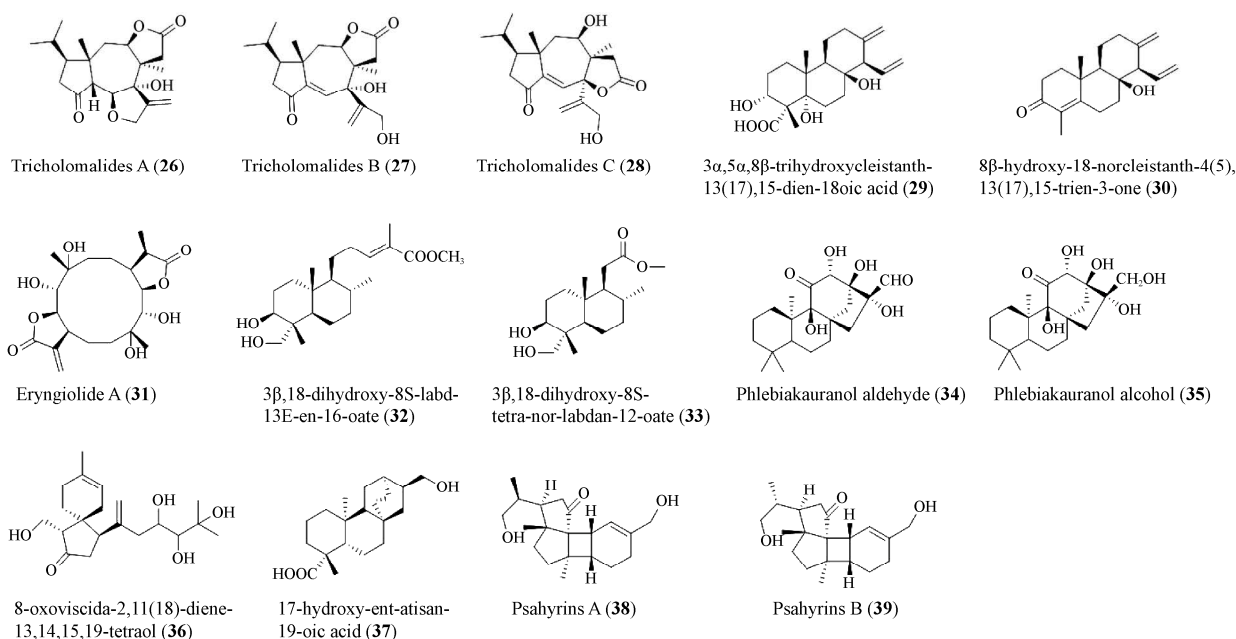


图 2 大型担子菌中其他类型二萜化合物

Fig. 2 Other types of diterpenoids in macro-basidiomycetes.



*Ramaria formosa* 的子实体中分离出 2 种半日花烷型(labdane)二萜(32, 33), 生物活性实验表明, 这 2 种化合物对人类中性粒细胞弹性蛋白酶均有一定抑制作用。其他类型的二萜类化合物, 如 kauranes 型(34, 35)、viscidane 型(36)、atisane 型(37), 代表从大型担子菌中分离出来的一组混合的二萜类化合物(Anke *et al.* 1987; Arnone *et al.* 2005; Ying *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015)。Liu *et al.* (2020)从黄盖小脆柄菇 *Psathyrella candolleana* 的培养物中鉴定了 2 个具有新型骨架的四环二萜化合物 Psahyrins A (38)和 Psahyrins B (39), 它们具有新颖的 5/5/4/6 融合环体系, 实验表明, 化合物 38 和 39 抑制了葡萄球菌和肠道沙门氏菌的生长。

## 2 大型担子菌中二萜化合物的生物合成研究进展

### 2.1 Pleuromutilin 的生物合成途径

Pleuromutilin (5)是具有良好前景的用于人类疾病治疗的抗生素(Poulsen *et al.* 2001), 但随着对新抗生素需求的不断增长, 专门用于人类化合物 5 的衍生物开发急剧增加(Bailey *et al.* 2016)。Bailey *et al.* (2016)在 *C. passeckerianus* 中发现了一种二萜合成酶(Pl-cyc)。它是负责催化化合物 5 的关键二萜合成酶。该课题组通过 RT-PCR、Northern 分析和基因沉默的方法确定了合成化合物 5 的基因簇。由于在天然宿主中对该基因簇操作没能实现该化合物产量的增加, 因此在米曲霉 *Aspergillus oryzae* 中重建了化合物 5 的总生物合成。从 *C. passeckerianus* 中克隆所需 7 个基因的 cDNA 序列, 并将其在米曲霉中异源表达, 重组菌株化合物 5 的最高产量可达 84.24 mg/L, 与野生型菌株化合物 5 的产量 8 mg/L 相比, 增加了 11 倍。

Yamane *et al.* (2017)利用 GGPP 合成酶对 *C. pseudopinsitus* 基因组的测序数据进行 BLAST 搜

索, 搜索出了一条簇(Ple)具有 GGPP 合成酶、萜烯合成酶、细胞色素 P450、短链脱氢酶和酰基转移酶(图 3)。该基因簇结构与 Bailey *et al.* (2016)的报道非常相似。之后该课题组通过米曲霉异源表达和体外酶反应实验提出了参与化合物 5 生物合成的所有生物合成酶的功能特征, 并阐明了生物合成路径(图 3)。法尼基焦磷酸(FPP)经 Ple4 (GGPP 合酶)催化形成 GGPP, Ple3 (Pl-cyc)将 GGPP 转化为 premutilin (40), 化合物 40 在 Ple5 和 Ple6 (P450)的作用下, 分别在五元环的 C-3 位和八元环的 C-11 位发生羟基化生成化合物 3,11-hydroxypremutilin (41), 当 Ple6 单独催化化合物 40 时, 则只在五元环的 C-3 位发生羟基化产生化合物 3-hydroxypremutilin (42), 同时也证明了化合物 42 通过 Ple5 的催化作用可以产生 41, 化合物 40 经 Ple5 催化, 在八元环 C-11 发生羟基化产生 11-hydroxypremutilin (43), 这些结果揭示了从化合物 40 到化合物 41 的两条氧化途径参与了生物合成。化合物 40 在 Ple5、Ple6 和 Ple7 (短链脱氢酶)的共同作用下生成 mutilin (44), 化合物 44 在 Ple2 (乙酰转移酶)的催化下生成化合物 14-O-acetylmutilin (45), 随后 Ple1 (氧化还原酶)催化 45 的乙酰基侧链的  $\alpha$  位置上的羟基化从而生成最终化合物 5。同时, 通过体外酶反应和突变分析实验表明, 二萜合酶 Ple3 催化 GGPP 到具有特征性 5/6/8-三环碳骨架的化合物 40 的 2 轮环化。

Alberti *et al.* (2017)通过在米曲霉中的异源表达, 对参与化合物 5 生物合成的步骤进行了功能表征。进一步建立了米曲霉作为化学修饰的化合物 5 衍生物生物转化的平台, 并将其用于合成比化合物 5 活性更强的衍生物。在化合物 46 存在下培养含有乙酰转移酶和 P450 的米曲霉菌株(Ple2 和 Ple6 基因), 证实了化合物 46 可以转化为化合物 47 和化合物 48 (图 3)。随后通过平板生物测定法研究了化合物 5、47 和 48 对枯草杆菌的抗菌活性。实验表明, 化合物 47 与 5 的抗

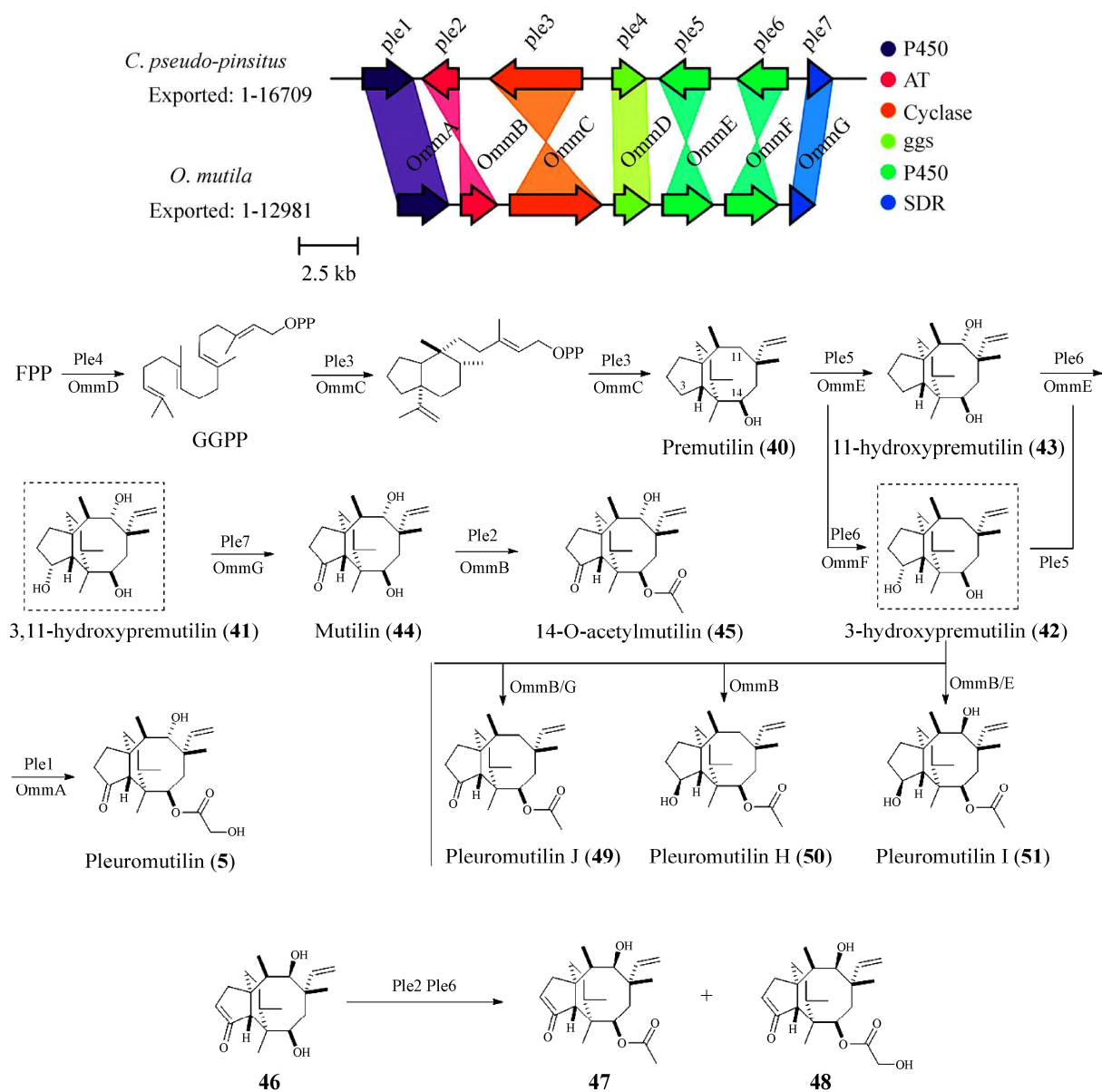


图3 Pleuromutilin 的基因簇、生物合成途径及衍生物的生物转化

Fig. 3 Gene cluster, biosynthetic pathway of pleuromutilin and biotransformation of pleuromutilin derivatives.

菌活性相当, 化合物 **47** 对枯草杆菌生长的抑制区为 $(12.7 \pm 0.6)$  mm, 化合物 **5** 为 $(12.8 \pm 0.8)$  mm。化合物 **48** 的抗菌活性要强于化合物 **47** 和 **5**, 化合物 **48** 对枯草杆菌生长的抑制率为 $(15.7 \pm 1.8)$  mm。这为获得有潜力的半合成衍生物开辟了新的途径。

Guo *et al.* (2022) 鉴定了 *Omphalina mutila* 中化合物 **5** 的生物合成基因簇(omm 基因簇)(图 3), 并在酿酒酵母中进行了表达。二萜合

成酶(ommC)导入酿酒酵母后产生 12.2 mg/L 的化合物 **40**, 然后, 将 2 个细胞色素 P450 酶(ommE/F)整合到重组菌株中获得了化合物 **42** 和 **41**, 随后在短链脱氢酶/还原酶(ommG)的作用下生成化合物 **44**, 化合物 **44** 在酰基转移酶(ommB)的催化下生成化合物 **45**, 在细胞色素 P450 酶(ommA)的催化下最终生成化合物 **5**。随后通过提高 ommA 的拷贝数使化合物 **5** 的效价



比亲本菌株提高了 7.3 倍(从 5.8 mg/L 增加到 42.4 mg/L)。并且通过在酿酒酵母中与不同修饰酶共表达二萜环化酶, 获得了 3 种新的“非天然” pleuromutilins (49–51), 其中 pleuromutilin I (51)对金黄色葡萄球菌和粪肠球菌具有较强的抗菌活性。

## 2.2 猴头菌素的生物合成途径

Yang *et al.* (2017)在猴头菌的基因组中发

现一条猴头菌素的生物合成基因簇, 该基因簇由 EriE (GGPP 合成酶)、EriG (ubiA 型二萜环化酶)、EriACI (P450 酶)、EriJ (糖基转移酶)和 EriBH (短链脱氢酶)组成, 利用体外酶反应实验鉴定了 EriG 是合成 cyathine 基本骨架的二萜合成酶(图 4)。由于该基因簇缺少乙酰转移酶基因, 而乙酰转移酶基因可能是生物合成猴头菌素所必需的基因(Kenmoku *et al.* 2004),

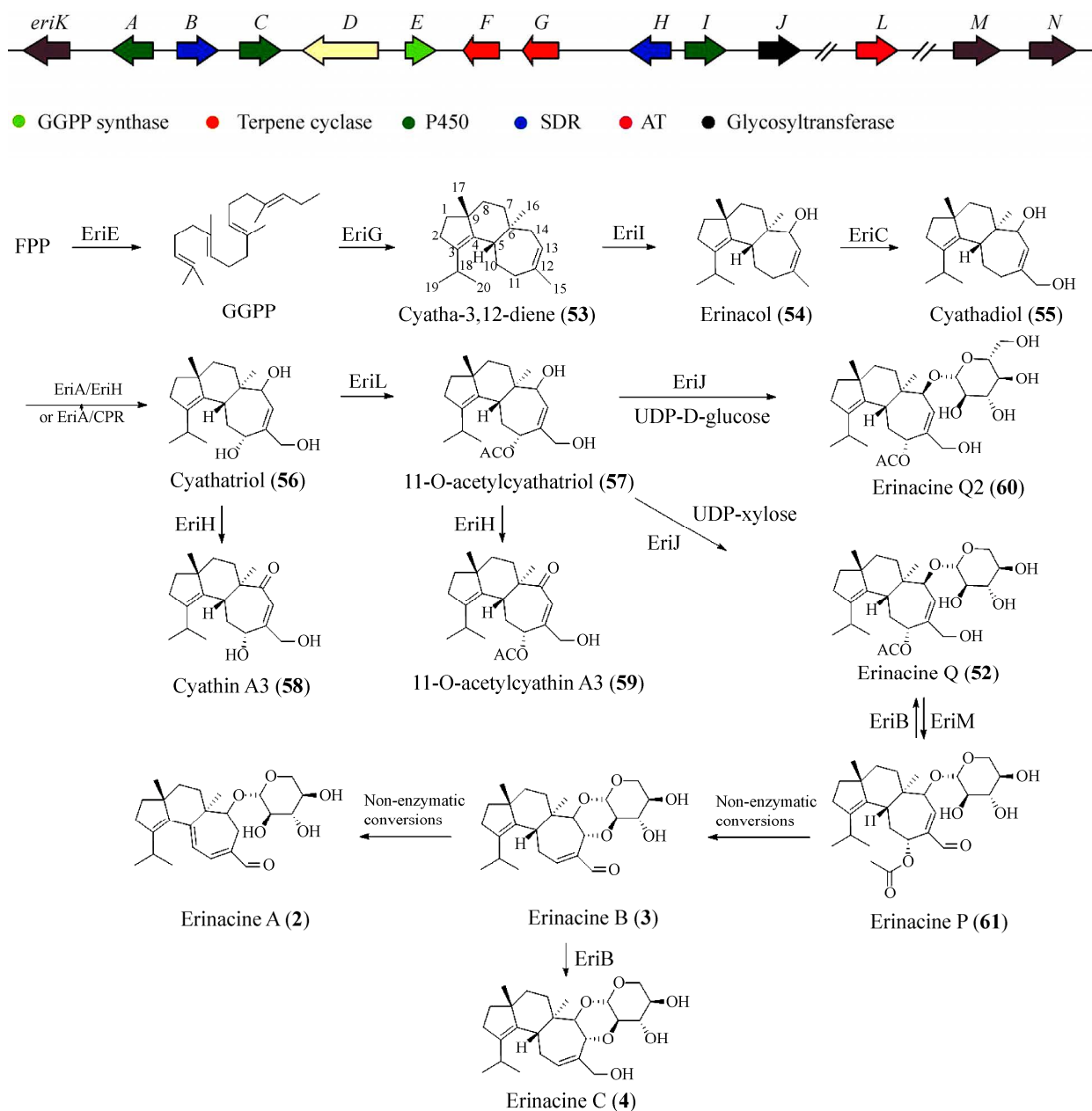


图 4 Erinacines 基因簇及生物合成途径

Fig. 4 Gene clusters and biosynthetic pathways of erinacines.

因此 Liu *et al.* (2019)重新检查了猴头菌基因组来寻找其他相关基因,以参与化合物 **5** 生物合成的 Ple2 (乙酰转移酶)为查询序列寻找乙酰转移酶(Yamane *et al.* 2017),鉴定出同源基因 *eriL*。随后在米曲霉中重组了 erinacine 生物合成基因簇并阐明了 erinacine Q (**52**)的生物合成路径(Liu *et al.* 2019)(图 4)。FPP 在 EriE 的催化下形成 GGPP, GGPP 在 EriG 的作用下转化为 (-)-cyatha-3,12-diene (**53**),化合物 **53** 经过 EriI 的催化在七元环烯丙基 C-14 处羟基化产生 erinacol (**54**),随后化合物 **54** 的七元环 C-15 处被 EriC 催化发生羟基化随即产生 cyathadiol (**55**)。EriA 需要在 EriH 或 CPR (细胞色素 P450 还原酶)的共同参与下起到催化作用,催化化合物 **55** 的 C-11 处发生羟基化产生化合物 cyathatriol (**56**),化合物 **56** 又在 EriL 的催化下生成 11-O-acetylcathatriol (**57**),EriH 进一步催化化合物 **56** 和 **57** 分别产生 cyathin A3 (**58**)和 11-O-acetylcathin A3 (**59**),糖基转移酶 EriJ 催化化合物 **56** 与糖基供体 UDP-木糖发生糖基化反应产生化合物 **52**,当以 UDP-D-葡萄糖为糖基供体时可产生化合物 erinacine Q2 (**60**)。化合物 **60** 的转化效率比化合物 **52** 低 8 倍,说明 EriJ 的天然糖供体底物为木糖基(C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>)而不是葡萄糖基(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>)。

Ma *et al.* (2021)在上述研究成果的基础上鉴定了一个非聚集的 FAD 依赖性氧化酶 EriM 和一个依赖于 NADP (H)的还原酶 EriB 的功能,同时,还证明了 erinacines A–C (**2–4**)生物合成中烯丙醛引发的非酶促反应。该课题组鉴定了在 C-15 处负责醛缩的酶。在与 *eri* 簇相似的梅里克式菌 *Rickenella mellea* 的 *rim* 簇中发现了 2 个 FAD 依赖性氧化酶基因(*RimF* 和 *RimL*),以这 2 个基因为查询序列,从猴头菌中鉴定出同源基因 *EriM* (*RimL* 相似度 65.6%)。随后通过酵母异源表达以确定 EriM 的功能,结果表明,重组菌株产生

了代谢产物 erinacine P (**61**),接下来,该课题组又证明 EriB 能够将化合物 **61** 和 **3** 分别转化为 **52** 和 **4**。根据 Kenmoku *et al.* (2000)报道的化合物 **61** 通过 Michael 加成消除将化合物 **3** 转化为化合物 **2**,提出了化合物 **2** 形成的非酶促反应。随后通过底物喂养化合物 **61** 和体外培养实验后经 HPLC 分析显示,化合物 **61** 能够转化为化合物 **2** (产率 29%),证明了由化合物 **61** 生物合成化合物 **2**、**3** 的过程中存在 FAD 酶驱动的自发 Michael 加成消除反应。

### 3 大型担子菌中 I 型二萜合成酶

I 型二萜合成酶是基于二价金属离子(Mg<sup>2+</sup> 或 Mn<sup>2+</sup>)的结合,以促进环化酶底物烯丙基的焦磷酸分子的脱离,从而获得碳正阳离子,这类酶具有 DDXXD/E 和 NSE/DTE 2 个能结合 Mg<sup>2+</sup>以及不同异戊二烯焦磷酸的结构域(Davis & Croteau 2000; 刘莉和胡昌华 2010)。

Li *et al.* (2019)从已测序的担子菌基因组序列中挖掘未知的二萜合成酶,首先尝试检索基因组序列中的 GGPPS 基因,因为从生物化学角度出发真菌的二萜合成酶通常位于接近 GGPPS 的位置。之后使用 BLAST 检索以 EriE 氨基酸序列作为查询序列,在 220 株担子菌 GGPPS 基因两侧的区域共鉴定出 25 种推测的二萜合成酶。其中有 14 个推测的基因序列属于 I 型二萜合成酶,9 个推测的基因序列属于 UbiA 型二萜合成酶家族,2 个推测的 di-TPSs 属于双功能型二萜合成酶家族(图 5)。

该课题组合成了 14 个 I 型二萜合成酶的编码序列,并在工程化高产 GGPP 酿酒酵母中表达。在测定的 I 型二萜合成酶中只有来自 *S. histurum* 的 SteTC1 具有活性。在表达 SteTC1 的酿酒酵母菌丝提取物的 GC-MS 显示有新化合物的产生。SteTC1 的重组纯化蛋白能够将 GGPP 转化为二萜,但不能接受 GPP 和 FPP。随后,

确定新化合物结构为(-)-(R)-nephthenol (**62**) (Li *et al.* 2019)。已知化合物 **62** 是一种西松烷型二萜(cembrane)，目前报道的 cembrane 型二萜主要来自软珊瑚和一些植物中，真菌中较少发现 (Schwabe *et al.* 1988; Rahelivao *et al.* 2016)。据报道，能够产生 cembrane 型二萜的几种酶(来自蓖麻 *Ricinus communis* 的 CAS2，来自链霉

菌 *Streptomyces* sp. SANK 60404 的 DtcycA 和 DtcycB，来自美花烟草 *Nicotiana sylvestris* 的 NsCBTS2a、NsCBTS2b 和 NsCBTS3) (Ennajdaoui *et al.* 2010; Kirby *et al.* 2010; Meguro *et al.* 2014)，与 SteTC1 相比无序列相似性，因此，SteTC1 是真菌中首次发现的一种能够合成 cembrane 型骨架的新型二萜合成酶(Li *et al.* 2019)。

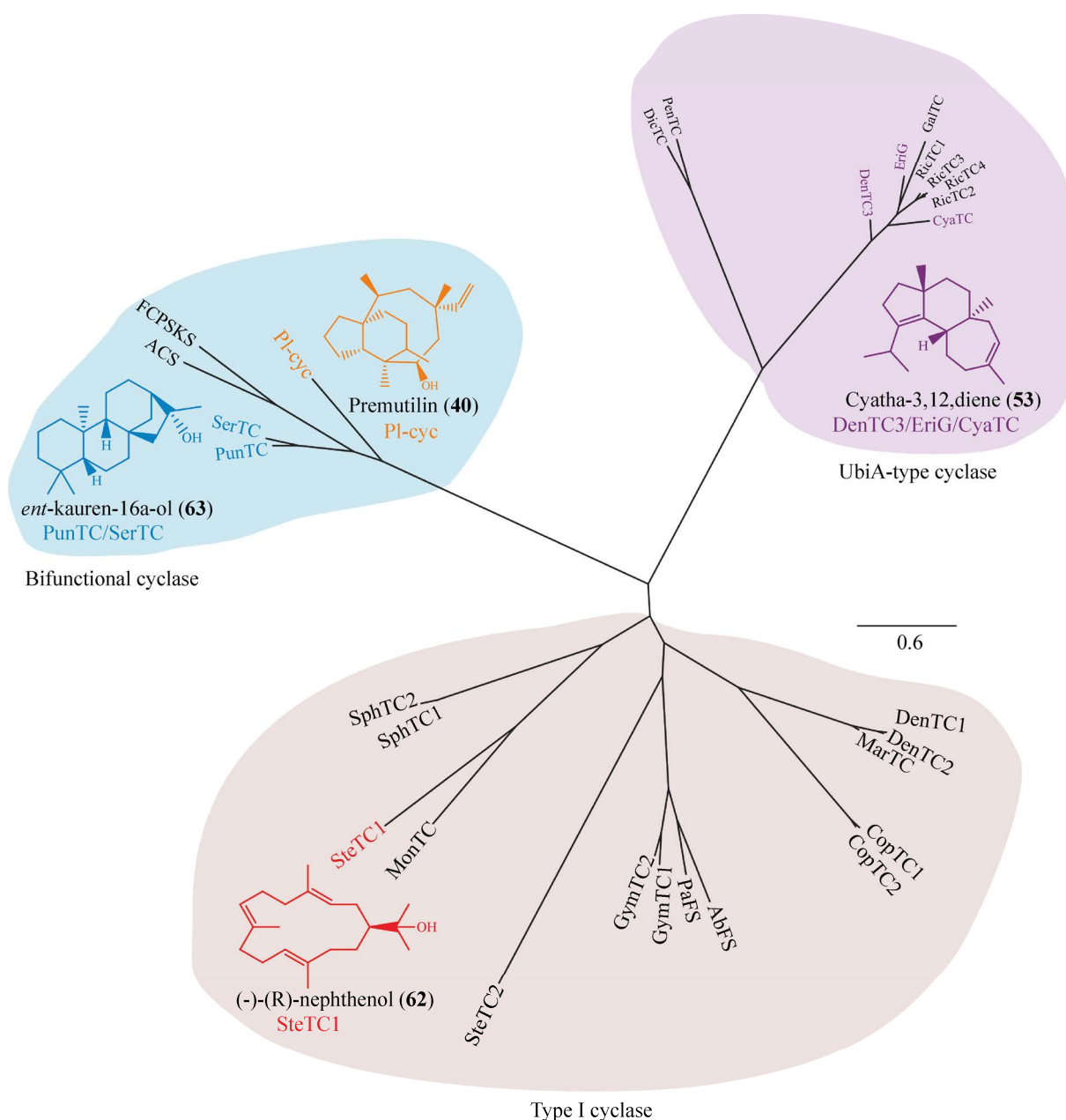


图5 大型担子菌中二萜合成酶的系统发育分析及相应的环化产物

Fig. 5 Phylogenetic analysis of diterpene synthases and corresponding cyclized products in macrobasidiomycetes.

## 4 大型担子菌中 UbiA 型二萜合成酶

UbiA 型二萜环化酶是近年发现的一种新型二萜合成酶家族(Yang *et al.* 2017), UbiA 原型是一种参与泛醌生物合成的异戊烯基转移酶, 它通过从异戊二烯基焦磷酸前体中提取焦磷酸而起作用(Li 2016)。UbiA 型二萜环化酶是一种膜内酶, 在生物合成泛醌的过程中催化对羟基苯甲酸的苯丙基化(Siebert *et al.* 1992)。这种反应是由焦磷酸的提取和苯酚的富电子邻位的亲核攻击引起的, 因此类似于 I 型二萜合成酶催化的反应, 它们也通过焦磷酸提取催化底物反应。UbiA 原型具有 2 个富含天冬氨酸的基序, 并且也依赖于  $Mg^{2+}$ , 但整体氨基酸序列和酶结构与 I 型二萜合成酶不同(Cheng & Li 2014), 这表明 UbiA 型二萜合成酶是独立进化的。目前在担子菌中有 3 个 UbiA 型二萜合成酶的功能已被鉴定(Dickschat 2019)。

Yang *et al.* (2017)鉴定了 *H. erinaceum* 和 *C. striatus* 基因组中所有的 GGPPS 基因和邻近基因, 在 *H. erinaceum* 的基因组发现了一个基因簇(命名为 *eri*), 它包括 1 个 GGPPS 和 2 个注释过的 UbiA 异戊烯基转移酶(EriF 和 EriG); 在 *C. striatus* 基因组中也发现了一条类似的基因簇(命名为 *cya*)。考虑到 *erinacines* 和 *cyathins* 化合物的结构, 因此, 他们推测 *eri* 和 *cya* 簇中 UbiA 相关基因可能与 *cyathane* 型二萜的生物合成有关。

为了研究 EriF 和 EriG 在猴头菌素 *erinacines* 生物合成中的作用, Yang *et al.* (2017)合成了这 2 个基因的编码区并克隆到表达载体中。在酿酒酵母中表达该基因, 利用粗酶进行体外实验反应, 当与 GGPP 和  $Mg^{2+}$  共同孵育时, 在 GC-MS 中观察到 EriG 产生新的产物, 但并没有检测到 EriF 的产物。为了确定化合物的结构, EriG 在生产 GGPP 工程大肠杆菌 *Escherichia coli*

BW25113 中表达, 通过 GC-MS 分析, 在提取物中检测到一种分子质量为 272 的高度疏水化合物。通过大规模的发酵培养, 得到了 3 mg/L 的该化合物, 核磁共振分析进一步证实该化合物为 **53** (Kenmoku *et al.* 2001) (图 5)。当以 GPP 和 FPP 为底物时, 未检测到产物。下一步, 该课题组试图确定 CyaJ 和 CyaP 在 *C. striatus* 中的功能, 但在大肠杆菌 BW25113 的正己烷提取物中没有检测到预期的产物。随后从 *C. africanus* 菌株中克隆了 *cyaP* 的同源基因 *cyaTC* 的完整编码序列, CyaTC 的氨基酸序列与 CyaP 的同源性为 90%, 与 EriG 的同源性为 68%, 粗制的重组 CyaTC 酶催化 GGPP 生成化合物 **53**, 这些结果证明了 EriG 和 CyaTC 是负责生物合成的二萜环化酶。

此外, Li *et al.* (2019)克隆来自 *Dentipellis* sp. 的 *DenTC3* 基因对异源表达的酵母菌丝提取物的 GC-MS 分析显示, 与标准品 **53** 的数据完全匹配。结合 *DenTC3* 与 EriG 的同源性为 70.3%, 确定 *DenTC3* 为 **53** 合酶。体外酶学表明, 重组蛋白能够将 GGPP 转化为二萜类化合物。这表明 *Dentipellis* 是能够挖掘 *cyathane* 类二萜的潜在资源(Yang *et al.* 2017; Li *et al.* 2019)。

## 5 大型担子菌中双功能型二萜合成酶

二萜环化酶根据其反应机理和催化结构域可分为两类, I 类和 II 类。I 类环化酶具有 2 个保守的结合基序(DDXXD 和 (N,D)DXX(S,T)XXXE), 它们直接结合二价金属离子以触发底物焦磷酸基团的脱离。II 类环化酶包含通过底物质子化促进碳正离子形成的 DXDD 基序(Yang *et al.* 2017)。而双功能型二萜合成酶同时具有以上 2 种酶的保守结合基序和活性位点, 双功能型二萜合成酶既可以完成质子化的环化过程也能完成离子化的环化过程。担子菌的双功能型二萜合成酶不同于植物中的二萜环化酶需

要经过 2 种不同的酶完成两步环化反应,而是在一种双功能环化酶的作用下实现底物 GGPP 的环化(刘莉和胡昌华 2010)。

Gao 课题组在推测的 2 个双功能型二萜合成酶中,来自 *Punctularia strigosozonata* 的 PunTC 和来自 *Serpula lacrymans* 的 SerTC 在工程酿酒酵母中异源表达并且产生了相同的环状产物,与数据图谱中的 16R-ent-kaurano (**63**)和已在 Su *et al.* (2017)发表的数据完全匹配。为了明确该化合物的结构,用正己烷提取了表达 PunTC 的酿酒酵母菌株,并进行大规模的发酵。通过硅胶柱层析等方法进一步证实该化合物为 **63**。以上结果表明, PunTC 和 SerTC 都是 **63** 合酶。重组纯化蛋白 PunTC 和 SerTC 分别能够将 GGPP 转化为二萜,而不接受 GPP 和 FPP。表明这 2 个基因簇的产物是更为复杂的二萜类化合物(Li *et al.* 2019)。

## 6 结语与展望

二萜是萜类化合物中的一大类,在过去的几十年中,人们主要研究植物中二萜化合物的生物活性、酶反应机理和生物合成途径等。过去主要对大型真菌三萜化合物进行了系统研究(滕李铭等 2021; 王琼等 2021; 尹媛媛等 2021),真菌二萜化合物在过去并未受到重视(刘莉和胡昌华 2010),随着分子生物学、测序技术的不断发展以及二萜合酶底物的单一性和结构独特性,越来越多的二萜合酶被陆续报道。但由于真菌的基因通常含有许多内含子序列,这加大了对基因进行准确注释和预测的难度。而且二萜骨架的后修饰酶具有一定的复杂性,因此,对真菌中二萜化合物生物合成途径的阐明并不多,这也为持续研究提供了广阔的前景。

大型担子菌除了在碳循环和生态系统功能中发挥重要作用外,还表现出生物和药理学特性(Schmidt-Dannert 2016),近年来报道了从大型

担子菌中发现的重要天然产物。酶数据库中加入了功能新颖的特征酶,如参与构建 cyathane 二萜骨架的 UbiA 同源酶 EriG,便于对生物合成基因簇的准确预测和注释(Chen *et al.* 2017)。转录组学和其他外源表达宿主可以有效地表征担子菌的生物合成基因。由于大多数担子菌属真菌在遗传转化上难以操作,因此需要开发异源表达宿主来进行蛋白表达和生物合成途径重建。除了大肠杆菌、酿酒酵母等一些较为成熟的酶功能表征系统外,一些真菌异源宿主,如米曲霉,已被证明是途径组装和重建的优秀系统。此外,现代遗传工具的应用,如 CRISPR-Cas9,能够在异源表达系统中实现定点和有效的基因整合(Chen *et al.* 2017; Sugano *et al.* 2017)。

总而言之,大型担子菌中二萜类化合物具有显著的生物活性,但是其生物合成机制尚不完全清楚,仍有大量的二萜合成酶尚未被开发,对二萜合酶的基因进行分析有利于进一步阐明真菌中二萜化合物的生物合成途径,对生物合成的分子调控具有重要意义。

## [REFERENCES]

- Alberti F, Khairudin K, Venegas ER, Davies JA, Hayes PM, Willis CL, Bailey AM, Foster GD, 2017. Heterologous expression reveals the biosynthesis of the antibiotic pleuromutilin and generates bioactive semi-synthetic derivatives. *Nature Communications*, 8(1): 1831
- Anke H, Casser I, Steglich W, Pommer EH, 1987. Phlebiakauranol aldehyde an antifungal and cytotoxic metabolite from *Punctularia atropurpurascens*. *The Journal of Antibiotics*, 40(4): 443-449
- Arnone A, Bava A, Fronza G, Nasini G, Ragg E, 2005. Concavine, an unusual diterpenic alkaloid produced by the fungus *Clitocybe concava*. *Tetrahedron Letters*, 46(46): 8037-8039
- Bailey AM, Alberti F, Kilaru S, Collins CM, de Mattos-Shiple K, Hartley AJ, Hayes P, Griffin A, Lazarus CM, Cox RJ, Willis CL, O'Dwyer K, Spence DW, Foster GD, 2016. Identification and manipulation of the pleuromutilin gene cluster from *Clitopilus passeckerianus* for increased rapid antibiotic production. *Scientific Reports*, 6: 25202

- Bailly C, Gao JM, 2020. Erinacine A and related cyathane diterpenoids: molecular diversity and mechanisms underlying their neuroprotection and anticancer activities. *Pharmacological Research*, 159: 104953
- Chen HP, Liu JK, 2017. Secondary metabolites from higher fungi. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 106: 1-201
- Chen J, Zeng X, Yang YL, Xing YM, Zhang Q, Li JM, Ma K, Liu HW, Guo SX, 2017. Genomic and transcriptomic analyses reveal differential regulation of diverse terpenoid and polyketides secondary metabolites in *Hericium erinaceus*. *Scientific Reports*, 7(1): 10151
- Cheng W, Li W, 2014. Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes. *Science*, 343(6173): 878-881
- Christianson DW, 2017. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chemical Reviews*, 117(17): 11570-11648
- Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Wu G, Yuan HS, Zhou LW, He SH, Ge ZW, Wu F, Wei YL, Yuan Y, Si J, 2021. Diversity and systematics of the important macrofungi in Chinese forests. *Mycosystema*, 40: 770-805 (in Chinese)
- Davis EM, Croteau R, 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Topics in Current Chemistry*, 209(1): 53-95
- Dickschat JS, 2019. Bacterial diterpene biosynthesis. *Angewandte Chemie*, 58(45): 15964-15976
- Ding JH, Li ZH, Feng T, Liu JK, 2018. Inonotolides A-C, isopimarane diterpenoid lactones from *Inonotus sinensis*. *Fitoterapia*, 127: 410-412
- Dornhelm P, Högenauer G, 1978. The effects of tiamulin, a semisynthetic pleuromutilin derivative, on bacterial polypeptide chain initiation. *European Journal of Biochemistry*, 91(2): 465-473
- Ennajdaoui H, Vachon G, Giacalone C, Besse I, Sallaud C, Herzog M, Tissier A, 2010. Trichome specific expression of the tobacco (*Nicotiana sylvestris*) cembratrien-ol synthase genes is controlled by both activating and repressing cis-regions. *Plant Molecular Biology*, 73(6): 673-685
- Gampe CM, Carreira EM, 2011. Total syntheses of guanacastepenes N and O. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(13): 2962-2965
- Gershenzon J, Dudareva N, 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7): 408-414
- Guo C, Dai H, Zhang M, Liao H, Zhang R, Chen B, Han J, Liu H, 2022. Molecular networking assisted discovery and combinatorial biosynthesis of new antimicrobial pleuromutilins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 243: 114713
- Han JW, Oh M, Lee YJ, Choi J, Choi GJ, Kim H, 2018. Crinipellins A and I, two diterpenoids from the basidiomycete fungus *Crinipellis rhizomaticola*, as potential natural fungicides. *Molecules*, 23(9): 2377
- Hogenauer G, 1975. The mode of action of pleuromutilin derivatives. *European Journal of Biochemistry*, 52(1): 93-98
- Hodgin LA, Högenauer G, 1974. The mode of action of pleuromutilin derivatives. *European Journal of Biochemistry*, 47(3): 527-533
- Jang HJ, Yang KS, 2011. Inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages by diterpenoids from *Phellinus pini*. *Archives of Pharmacal Research*, 34(6): 913-917
- Johri BN, Brodie HJ, 1971. The physiology of production of the antibiotic cyathin by *Cyathus helenae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 17(9): 1243-1245
- Kavanagh F, Robbins H, 1951. Antibiotic substances from basidiomycetes: VIII. *Pleurotus multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus passeckerianus* Pilat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(9): 570-574
- Kawagishi H, Shimada A, Shirai R, Okamoto K, Ojima F, Sakamoto H, Ishiguro Y, Furukawa S, 1994. Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters*, 35(10): 1569-1572
- Kenmoku H, Kato N, Shimada M, Omoto M, Mori A, Mitsuhashi W, Sassa T, 2001. Isolation of (-)-cyatha-3,12-diene, a common biosynthetic intermediate of cyathane diterpenoids, from an erinacine-producing basidiomycete, *Hericium erinaceum*, and its formation in a cell-free system. *Tetrahedron Letters*, 42(42): 7439-7442
- Kenmoku H, Sassa T, Kato N, 2000. Isolation of erinacine P, a new parental metabolite of cyathane-xylosides, from *Hericium erinaceum* and its biomimetic conversion into erinacines A and B. *ChemInform*, 31(22): 4389-4393
- Kenmoku H, Tanaka K, Okada K, Kato N, Sassa T, 2004. Erinacol (cyatha-3,12-dien-14 $\beta$ -ol) and 11-O-acetylcyathin A(3), new cyathane metabolites from an erinacine Q-producing *Hericium erinaceum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(8): 1786-1789
- Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi JI, 2017. *Progress in the chemistry of organic natural products* 106. Springer International Publishing. 1-236
- Kirby J, Nishimoto M, Park JG, Withers ST, Nowroozi F, Behrendt D, Rutledge E, Fortman JL, Johnson HE, Anderson JV, 2010. Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*,



- 71(13): 1466-1473
- Kuhnert E, Surup F, Wiebach V, Bernecker S, Stadler M, 2015. Botryane, noreudesmane and abietane terpenoids from the ascomycete *Hypoxylon rickii*. *Phytochemistry*, 117: 116-122
- Kuzuyama T, 2002. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66(8): 1619-1627
- Lee IS, Kim KC, Yoo ID, Ha BJ, 2015. Inhibition of human neutrophil elastase by labdane diterpenes from the fruiting bodies of *Ramaria formosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(12): 1921-1925
- Li CW, Zhang H, Rao P, Zheng DR, Wang Y, Li YH, 2021. Research progress on biosynthesis pathway of pentacyclic triterpenoids in plants. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 52(11): 17 (in Chinese)
- Li W, 2016. Bringing bioactive compounds into membranes: the UbiA superfamily of intramembrane aromatic prenyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(4): 356-370
- Li XL, Xu YX, Li Y, Zhang R, Hu TY, Su P, Zhou M, Tang T, Zeng Y, Yang YL, Gao W, 2019. Rapid discovery and functional characterization of diterpene synthases from basidiomycete fungi by genome mining. *Fungal Genetics and Biology*, 128: 36-42
- Liu C, Zhao C, Pan HH, Kang J, Yu XT, Wang HQ, Li BM, Xie YZ, Chen RY, 2014. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their biological activities. *Journal of Natural Products*, 77(1): 35-41
- Liu CW, Minami A, Ozaki T, Wu J, Kawagishi H, Maruyama J, Oikawa H, 2019. Efficient reconstitution of basidiomycota diterpene erinacine gene cluster in Ascomycota host *Aspergillus oryzae* based on genomic DNA sequences. *Journal of the American Chemical Society*, 141(39): 15519-15523
- Liu L, Hu CH, 2010. Advance in fungal diterpene cyclase: a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 50(11): 1438-1445 (in Chinese)
- Liu Y, Li Y, Ou Y, Xiao S, Lu C, Zheng Z, Shen Y, 2012. Guanacastane-type diterpenoids with cytotoxic activity from *Coprinus plicatilis*. *Bioorganic Medicinal & Chemistry Letters*, 22(15): 5059-5062
- Liu YP, Dai Q, Wang WX, He J, Liu JK, 2020. Psathyryns: antibacterial diterpenoids from *Psathyrella candolleana*. *Journal of Natural Products*, 83(5): 1725-1729
- Ma K, Zhang Y, Guo C, Yang Y, Han J, Yu B, Yin W, Liu H, 2021. Reconstitution of biosynthetic pathway for mushroom-derived cyathane diterpenes in yeast and generation of new "non-natural" analogues - science direct. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(9): 2945-2956
- Meguro A, Tomita T, Nishiyama M, Kuzuyama T, 2014. Corrigendum: identification and characterization of bacterial diterpene cyclases that synthesize the cembrane skeleton. *ChemBioChem*, 14(3): 316-321
- Ohnuma S, Hirooka K, Tsuruoka N, Yano M, Ohto C, Nakane H, Nishino T, 1998. A pathway where polyprenyl diphosphate elongates in prenyltransferase. Insight into a common mechanism of chain length determination of prenyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(41): 26705-26713
- Ou YX, Li YY, Qian XM, Shen YM, 2012. Guanacastane-type diterpenoids from *Coprinus radians*. *Phytochemistry*, 78: 190-196
- Paukner S, Sader SH, Ivezić-Schoenfeld Z, Jones RN, 2013. Antimicrobial activity of the pleuromutilin antibiotic BC-3781 against bacterial pathogens isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2010. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9): 4489-4495
- Peng QY, Zou G, Gao LH, Bai LQ, Tan Y, Wu YY, 2021. Research progress on cyathanes from macrofungi. *Acta Edulis Fungi*, 28(2): 140-154 (in Chinese)
- Poulsen SM, Karlsson M, Johansson LB, Vester B, 2001. The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Molecular Microbiology*, 41(5): 1091-1099
- Quin MB, Flynn CM, Schmidt-Dannert C, 2014. Traversing the fungal terpenome. *Natural Product Reports*, 31(10): 1449-1473
- Rahelivao MP, Gruner M, Lubken T, Islamov D, Kataeva O, Andriamanantoanina H, Bauer I, Knolker HJ, 2016. Chemical constituents of the soft corals *Sinularia vanderlandi* and *Sinularia gravis* from the coast of Madagascar. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(3): 989-1001
- Reveglia P, Cimmino A, Masi M, Nocera P, Berova N, Ellestad G, Evidente A, 2018. Pimarane diterpenes: natural source, stereochemical configuration, and biological activity. *Chirality*, 30(10): 1115-1134
- Rohr M, Oleinikov K, Jung M, Sandjo LP, Erkel G, 2017. Anti-inflammatory tetraquinane diterpenoids from a *Crinipellis* species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(2): 514-522
- Schmidt-Dannert C, 2016. Biocatalytic portfolio of basidiomycota. *Current Opinion in Chemical Biology*, 31: 40-49
- Schwabe R, Farkas I, Pfander H, 1988. Synthese von (-)-(R)-nephthenol und (-)-(R)-cembren A. *Helvetica Chimica Acta*, 71(1): 292-297
- Siebert M, Bechthold A, Melzer M, May U, Heide L, 1992.

- Ubiquinone biosynthesis cloning of the genes coding for chorismate pyruvate-lyase and 4-hydroxybenzoate octaprenyl transferase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 307(3): 347-350
- Su P, Guan H, Zhang Y, Xing W, Gao L, Zhao Y, Hu T, Zhou J, Ma B, Tu L, Tong Y, Huang L, Gao W, 2017. Probing the single key amino acid responsible for the novel catalytic function of ent-kaurene oxidase supported by NADPH-cytochrome P450 Reductases in *Tripterygium wilfordii*. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1756
- Sugano SS, Suzuki H, Shimokita E, Chiba H, Noji S, Osakabe Y, Osakabe K, 2017. Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system. *Scientific Reports*, 7(1): 1260
- Teng LM, Tian XM, Wu F, Dai YC, 2021. A comparison of triterpenoids and polysaccharides in 13 species of wild *Ganoderma*. *Mycosystema*, 40(7): 1811-1819 (in Chinese)
- Tsukamoto S, Macabalang AD, Nakatani K, Obara Y, Ohta T, 2003. Tricholomalides A-C, new neurotrophic diterpenes from the mushroom *Tricholoma* sp. *Journal of Natural Products*, 66(12): 1578-1581
- Tzeng TT, Chen CC, Lee LY, Chen WP, Lu CK, Shen CC, Huang FCY, Chen CC, Shiao YJ, 2016. Erinacine A-enriched *Hericium erinaceus* mycelium ameliorates Alzheimer's disease-related pathologies in APPsw/PS1dE9 transgenic mice. *Journal of Biomedical Science*, 23(1): 1-12
- Wang K, Chen BS, Bao L, Ma K, Han JJ, Wang Q, Guo SX, Liu HW, 2015. A review of research on the active secondary metabolites of *Hericium* species. *Mycosystema*, 34(4): 553-568 (in Chinese)
- Wang Q, Xu MM, Liu GQ, Cao CL, Shi GY, Ding ZY, 2021. An efficient strategy to enhance triterpenoid production by liquid superficial-static culture (LSSC) of *Ganoderma lingzhi*. *Mycosystema*, 40(3): 656-667 (in Chinese)
- Wang SJ, Li YX, Bao L, Han JJ, Yang XL, Li HR, Wang YQ, Li SJ, Liu HW, 2012. Eryngiolide A, a cytotoxic macrocyclic diterpenoid with an unusual cyclododecane core skeleton produced by the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Organic Letters*, 14(14): 3672-3675
- Wang Y, Wang SJ, Mo SY, Li S, Yang YC, Shi JG, 2006. An abietane diterpene and a sterol from fungus *Phellinus igniarius*. *Chinese Chemical Letters*, 2006(4): 481-484
- Wei J, Gao W, Huang CY, 2021. A checklist of edible ectomycorrhizal mushrooms in China. *Mycosystema*, 40(8): 1938-1957 (in Chinese)
- Wei TZ, Jiang L, Yao YJ, Wang K, Yu XD, Li Y, Wu HJ, Wu HM, Wang YH, Wei XD, 2020. Assessment of the threatened status of macro-basidiomycetes in China. *Biodiversity Science*, 28(1): 13 (in Chinese)
- Wu F, Zhou LW, Vlasák J, Dai YC, 2022. Global diversity and systematics of Hymenochaetaceae with poroid hymenophore. *Fungal Diversity*, 113: 1-192
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Xu Z, Yan S, Bi K, Han J, Chen Y, Wu Z, Chen Y, Liu HW, 2013. Isolation and identification of a new anti-inflammatory cyathane diterpenoid from the medicinal fungus *Cyathus hookeri* Berk. *Fitoterapia*, 86: 159-162
- Yamane M, Minami A, Liu C, Ozaki T, Takeuchi I, Tsukagoshi T, Tokiwano T, Gomi K, Oikawa H, 2017. Biosynthetic machinery of diterpene pleuromutilin isolated from basidiomycete fungi. *ChemBioChem*, 18(23): 2317-2322
- Yan K, Madden L, Choudhry AE, Voigt CS, Copeland RA, Gontarek RR, 2006. Biochemical characterization of the interactions of the novel pleuromutilin derivative retapamulin with bacterial ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11): 3875-3881
- Yang YL, Zhang S, Ma K, Xu Y, Tao Q, Chen Y, Chen J, Guo S, Ren J, Wang W, Tao Y, Yin WB, Liu H, 2017. Discovery and characterization of a new family of diterpene cyclases in bacteria and fungi. *Angewandte Chemie*, 56(17): 4749-4752
- Yi X, He QL, Liu W, 2019. The biosynthesis of diterpenoids from plants. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 31(5): 15 (in Chinese)
- Yin X, Feng T, Li ZH, Leng Y, Liu JK, 2014. Five new guanacastane-type diterpenes from cultures of the fungus *Psathyrella candolleana*. *Natural Products and Bioprospecting*, 4(3): 149-155
- Yin X, Wei J, Wang WW, Gao YQ, Stadler M, Kou RW, Gao JM, 2019. New cyathane diterpenoids with neurotrophic and anti-neuroinflammatory activity from the bird's nest fungus *Cyathus africanus*. *Fitoterapia*, 134: 201-209
- Yin YY, Wang XL, Xue FF, Huang J, Zhang SB, Liu GQ, 2021. Signal transduction and gene expression analysis of triterpenoid acid synthesis induced by 9,10-cyclomethylheptadecanoic acid in *Ganoderma lingzhi*. *Mycosystema*, 40(9): 2317-2329 (in Chinese)
- Ying YM, Zhang LY, Zhang X, Bai HB, Liang DE, Ma LF, Shan WG, Zhan ZJ, 2014. Terpenoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Phytochemistry*, 108: 171-176
- Zhang CC, 2016. Studies on the neurotrophic action of

cyathane diterpenoids and meroterpenoids in high fungi. PhD Dissertation, Northwest A&F University, Xi'an. 1-153 (in Chinese)

Zhang FL, Feng T, 2022. Diterpenes specially produced by fungi: structures, biological activities, and biosynthesis (2010–2020). *Journal of Fungi*, 8(3): 244

Zhang L, Li ZH, Dong ZJ, Li Y, Liu JK, 2015. A viscidane diterpene and polyacetylenes from cultures of *Hypsizygus marmoreus*. *Natural Products and Bioprospecting*, 5(2): 99-103

Zhang Y, Li Y, Ye JH, Zhang JJ, Zou J, Pan LT, 2019. The abietane type diterpenes from *Isodon* (Bl.) Hassk. *Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy*, 28(11): 40-47 (in Chinese)

Zhou ZY, Liu R, Jiang MY, Zhang L, Niu Y, Zhu YC, Dong ZJ, Liu JK, 2009. Two new cleistanthane diterpenes and a new isocoumarine from cultures of the basidiomycete *Albatrellus confluens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 57(9): 975-978

#### [附中文参考文献]

戴玉成, 杨祝良, 崔宝凯, 吴刚, 袁海生, 周丽伟, 何双辉, 葛再伟, 吴芳, 魏玉莲, 员媛, 司静, 2021. 中国森林大型真菌重要类群多样性和系统学研究. *菌物学报*, 40: 770-805

李传旺, 张贺, 饶攀, 郑东然, 王宇, 李玉花, 2021. 植物五环三萜类化合物生物合成途径研究进展. *中草药*, 52(11): 17

刘莉, 胡昌华, 2010. 真菌二萜环化酶的研究进展. *微生物学报*, 50(11): 1438-1445

彭勤颖, 邹根, 高利慧, 白林泉, Tan Y, 吴莹莹, 2021. 大型真菌来源鸟巢烷型二萜研究进展. *食用菌学报*, 28(2): 140-154

滕李铭, 田雪梅, 吴芳, 戴玉成, 2021. 13 种野生灵芝菌丝体中胞内三萜与多糖含量的比较. *菌物学报*, 40(7): 1811-1819

汪锴, 陈保送, 宝丽, 马轲, 韩俊杰, 王琦, 郭顺星, 刘宏伟, 2015. 猴头菌属药用真菌活性次级代谢产物研究概况. *菌物学报*, 34(4): 553-568

王琼, 徐萌萌, 刘高强, 曹春蕾, 石贵阳, 丁重阳, 2021. 灵芝液体浅层静置培养高效生产三萜的研究. *菌物学报*, 40(3): 656-667

魏杰, 高巍, 黄晨阳, 2021. 中国菌根食用菌名录. *菌物学报*, 40(8): 1938-1957

魏铁铮, 蒋岚, 姚一建, 王科, 于晓丹, 李熠, 吴海军, 吴红梅, 王永会, 卫晓丹, 2020. 中国大型担子菌受威胁现状评估. *生物多样性*, 28(1): 13

益萱, 贺庆利, 刘文, 2019. 植物来源的二萜化合物的生物合成研究. *生命科学*, 31(5): 15

尹媛媛, 王晓玲, 薛菲菲, 黄佳, 张少冰, 刘高强, 2021. 9,10-环甲基十七烷酸诱导灵芝三萜酸合成的信号转导和基因表达分析. *菌物学报*, 40(9): 2317-2329

张成宸, 2016. 高等真菌鸟巢烷二萜和杂萜的神经突起生长作用研究. 西北农林科技大学博士论文, 西安. 1-153

张义, 李毅, 叶江海, 张敬杰, 邹娟, 潘炉台, 2019. 香茶菜属植物中松香烷二萜的研究概况. *中国民族民间医药*, 28(11): 40-47