

青蒿倍半萜合酶(环化酶)研究进展

Advances in Sesquiterpene Synthases Cyclases of *Artemisia annua*

申海燕^{1,3}, 李振秋², 王 红^{1*}, 马兰青¹, 刘本叶¹, 颜 芳¹, 李国凤¹, 叶和春¹

SHEN Hai-Yan^{1,3}, LI Zhen-Qiu², WANG Hong^{1*}, MA Lan-Qing¹, LIU Ben-Ye¹, YAN Fang¹,
LI Guo-Feng¹ and YE He-Chun¹

1 中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093

2 河北大学生命科学学院, 保定 071002

3 中国科学院研究生院, 北京 100039

1 Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

2 College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

3 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘 要 青蒿素是从中药青蒿中分离得到的抗疟有效单体,是含有过氧基团的新型倍半萜内酯化合物,是目前世界上最有效的疟疾治疗药物。青蒿素的生物合成途径属于类异戊二烯代谢途径中的倍半萜类分支途径,倍半萜合酶是该途径的关键酶之一,目前已从青蒿中克隆了多个倍半萜合酶基因。综述了青蒿中已克隆的几种倍半萜合酶基因的研究进展。

关键词 青蒿, 青蒿素, 倍半萜合酶

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-0976-06

Abstract Artemisinin, a new and a very potent antimalarial drug, is produced by the plant *Artemisia annua* L. with a very low yield ranging from 0.01% to 0.8% on a dry-weight basis. This makes artemisinin an expensive drug. Several studies reported chemical synthesis of the artemisinin, but none of them seems a viable economical alternative compared with the isolation of artemisinin from the plant. Hence, a higher artemisinin concentration in the plant is necessary for cheap antimalarial drug production. Many types of cyclic sesquiterpenes in *Artemisia annua* have been characterized to date, each derived from the common cyclic precursor FDP in a reaction catalyzed by a sesquiterpene synthase. Sesquiterpene synthases are widely regarded as the rate-determining regulatory enzymes in the pathways they participate, and a number of sesquiterpene synthases have been cloned from *Artemisia annua* up to now. This report is a brief review on the following sesquiterpene synthases: epi-cedrol synthase, amorpha-4,11-diene synthase, β -caryophyllene synthase, (E)- β -farnesene synthase, germacrene A synthase, as well as a new sesquiterpene synthase whose function remains largely unknown. The report is of help for a better understanding of metabolic engineering of *Artemisia annua*.

Key words *Artemisia annua* L., artemisinin, sesquiterpene synthase

Received: February 12, 2007; Accepted: March 27, 2007.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672623, 30371740).

* Corresponding author. Tel.: +86-10-62836239; E-mail: wangh@ibcas.ac.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 30672623, 30371740)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

青蒿素是我国学者在 70 年代初从中药青蒿 (*Artemisia annua* L.) 中分离得到的抗疟有效单体, 是含有过氧基团的新型倍半萜内酯化合物, 分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$ ^[1]。青蒿素与过去已知抗疟药有着不同的作用方式, 具有高效、低毒的特点, 被世界卫生组织认为是最有潜力的抗疟药剂。青蒿素主要存在于青蒿植株的叶片中, 含量一般很低(约占干重的 0.01% ~ 0.8%)^[2]。尽管化学合成青蒿素已经成功, 但由于成本高、毒性大、产量低而未能投入商业化生产。目前青蒿素的生产主要是从青蒿植株中直接提取, 因此提高青蒿植株中青蒿素的含量或扩大青蒿素的来源成为众多科学家关注的焦点^[3]。近年来, 随着分子生物学技术的迅速发展和对青蒿素生物合成途径知识的积累, 青蒿素生物合成途径中的一些关键酶基因已被克隆, 使得通过基因工程方法获得青蒿素高产株系成为该研究领域的热点^[4]。

青蒿素的生物合成途径属于类异戊二烯代谢途径中的倍半萜类分支途径。倍半萜类化合物是以法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FDP)为共同底物, 在倍半萜合酶的催化作用下形成的。倍半萜合酶基因是以基因家族的形式存在, 家族中不同成员基因表达催化生成不同的倍半萜终产物^[5]。参与青蒿素生物合成的倍半萜合酶-紫穗槐二烯合酶(amorpha-4, 11-diene synthase)的基因已被几个实验室克隆^[6-9]。目前已从青蒿中克隆的其它倍半萜合酶基因包括: 柏木脑合酶(epi-cedrol synthase)基因、 β -石竹烯合酶(β -caryophyllene synthase)基因、(E)- β -法呢烯合酶((E)- β -farnesene synthase)基因和大根香叶烯 A 合酶(germacrene A synthase)基因, 它们虽然不直接参与青蒿素的生物合成, 但都与青蒿素的生物合成竞争共同底物 FDP(图 1)。本文结合本实验室的有关工作, 就青蒿已被克隆的几种倍半萜合酶基因的最新研究进展进行简要综述。

1 柏木脑合酶(epi-cedrol synthase)

柏木脑合酶催化 FDP 形成表柏木脑(epi-cedrol)和少量的柏木脑(cedrol)两种产物。在青蒿中, 是第一个被报道的倍半萜合酶基因。

1.1 柏木脑合酶基因的克隆、功能分析

1999 年, Hua^[10]等和 Mercke^[11]等同时分别克隆了青蒿的柏木脑合酶基因。该基因编码区为 1641bp, 推测编码 547 个氨基酸, 编码蛋白分子量为 63.5kD。具有 38bp 的 5'端非翻译区和 272bp 的 3'端非翻译区, 在大肠杆菌中表达后催化 FDP 形成柏

木脑。对其酶活性研究的结果表明, 柏木脑合酶的最适 pH 值为 8.5 ~ 9.0 (以 FDP 作为底物), 其 K_m 值为 $0.4\mu\text{mol/L}$ (pH 7), $1.3\mu\text{mol/L}$ (pH 9), 其 pI 值为 4.94。据推测其氨基酸序列与从其它被子植物中克隆的倍半萜合酶的同源性为 32% ~ 43%, 和单萜与二萜的氨基酸序列也有显著的相似性, 有一高度保守区(DDXXD), 富含天冬氨酸, 这个结构特点在其它萜类合酶中都存在, 该酶位于细胞质中^[10]。2003 年, Jackson 等把青蒿的柏木脑合酶基因在野生酵母中表达时, 能把内源的 FDP 转化生成柏木脑^[12]。

1.2 柏木脑合酶的催化机理

FDP 首先发生异构化形成橙花叔醇焦磷酸(nerolidyl diphosphate), 橙花叔醇焦磷酸经过电离和环化作用形成单环没药(酰基) monocyclic bisabolyl⁺阳离子, 生成的氢化物通过两步环化作用, 发生转变形成含有三环的柏木酰基(cedryl⁺)阳离子, 如果羟基是以反方向的位置加上去的, 就形成表柏木脑, 否则就形成柏木脑(cedrol)^[10]。

2 紫穗槐二烯合酶(amorpha-4, 11-diene synthase)

紫穗槐二烯合酶被认为是直接参与青蒿素生物合成的一种倍半萜合酶, 在青蒿素生物合成途径中紫穗槐二烯合酶催化 FDP 生成紫穗槐二烯等倍半萜类化合物。该酶的基因已被克隆并已进行了功能鉴定^[13]。1999 年, Bouwmeester 等报道了紫穗槐二烯可能是青蒿生物合成途径中的烯类倍半萜中间体, 同时分离纯化了紫穗槐二烯合酶。在青蒿中紫穗槐二烯的丰度非常低, 但紫穗槐二烯合酶的活性却相对较高, 这表明由 FDP 环化形成紫穗槐二烯的过程是一个限速步骤。因此, 克隆紫穗槐二烯合酶基因, 并在青蒿中大量表达此基因有可能打破青蒿生物合成的限速步骤, 从而提高青蒿素含量。

2.1 紫穗槐二烯合酶的分离、纯化

1999 年, Bouwmeester 等首次从青蒿中分离到青蒿的紫穗槐二烯合酶, 该酶催化 FDP 形成青蒿素生物合成的倍半萜中间产物紫穗槐二烯。对青蒿幼嫩叶片的粗提蛋白进行 FDP 酶活分析, 通过 GC-MS 检测发现, 紫穗槐二烯合酶是一种主要的倍半萜合酶。该酶具有典型的倍半萜合酶的特性, 如较宽的 pH 范围(最适 pH 值为 6.5 ~ 7.0), 分子量为 56kD, K_m 为 $0.6\mu\text{mol/L}$ ^[14]。

2.2 紫穗槐二烯合酶基因的克隆、功能分析

随后, Chang 等^[6]、Mercke 等^[7]、Wallaart 等^[8]和

李振秋等^[15]先后报道了青蒿中紫穗槐二烯合酶基因的克隆、表达和功能分析。青蒿的紫穗槐二烯合酶 cDNA 全长约 2100bp, 编码区为 1641bp, 推测约编码 546 个氨基酸, 编码蛋白分子量为 63.9kD, 略高于已纯化的青蒿紫穗槐二烯合酶(56kD)。推测该酶的 pI 值为 5.6 左右。青蒿的紫穗槐二烯合酶的 pI 值和分子量与已报道的其他植物的倍半萜合酶相近。该酶的氨基酸序列与青蒿中其他的倍半萜合酶的同源性约为 50%, 与其他被子植物中的倍半萜合酶具有许多同样的保守区, 不同的倍半萜合酶之间的这种同源性为进一步了解它们的三维结构提供了很好的依据。在大肠杆菌中表达后, 能催化 FDP 形成紫穗槐二烯。该酶定位于细胞质中, 因为它缺少质体定位的靶序列, 这与倍半萜类物质在细胞质中合成是一致的。

最近, Lindahl 等通过单拷贝同源重组和质粒两种方式把青蒿的紫穗槐二烯合酶基因转入到酵母中, 从酵母表达的蛋白提取物中, 能检测到紫穗槐二烯合酶活性, 通过 GC-MS 分析发现, 也能检测到青蒿素的前体物紫穗槐二烯的存在, 但是发现通过这两种方式导入的基因在酵母中表达后, 其产物紫穗槐二烯的产量有很大的差别, 后者约是前者的 6 倍多^[16]。

我们实验室的刘彦, 李振秋等利用 RACE 方法从青蒿高产株系 001 中克隆了紫穗槐二烯合酶的 cDNA 和基因组 DNA^[15]。将该 cDNA 在大肠杆菌中表达后, 体外酶促反应结果表明, 该酶能催化 FDP 形成紫穗槐二烯。Southern 分析表明紫穗槐二烯合酶基因在青蒿基因组中至少有 4 个拷贝。其基因组 DNA 有一个复杂的结构, 包含有 7 个外显子和 6 个内含子。RT-PCR 分析表明, 该基因在叶片、茎和花中表达, 而在根中没有表达, 这与青蒿素的积累部位相一致。

2.3 紫穗槐二烯合酶的催化机理

青蒿紫穗槐二烯合酶的催化机理与柏木脑合酶非常类似, 在这两个化学反应过程中没药酰基阳离子是其共同的中间产物, 不同的是随后的化学反应中此中间产物——没药酰基阳离子氢离子的转移导致的环的形成方式不同, 紫穗槐二烯合酶催化过程中是 C1, C10 闭合形成环, 而柏木脑合酶催化过程中则是 C6, C10 闭合形成环。这两个青蒿倍半萜合酶的氨基酸序列的高度相似性为我们研究萜类合酶的结构特性提供了很好的实验体系^[9, 14, 17]。

3 β -石竹烯合酶(β -caryophyllene synthase)

在青蒿中 β -石竹烯合酶催化 FDP 生成以 β -石竹烯(β -caryophyllene)为主的一些倍半萜类化合物。 β -石竹烯是植物中普遍存在的一种重要的三环倍半萜烯化合物, β -石竹烯对病原菌具有较强的抑制作用, 所以 β -石竹烯及其衍生物在植物防御病原侵袭过程中扮演着重要角色。另外, β -石竹烯还具有抗癌作用^[18]。

2002 年 Cai 等从青蒿中克隆了 β -石竹烯合酶基因, 该基因 cDNA 全长约为 1902bp, 编码区为 1644bp, 编码蛋白分子量为 60.3kD, 在大肠杆菌表达后, 能催化 FDP 形成 β -石竹烯。推测其氨基酸序列和青蒿的柏木脑合酶、紫穗槐二烯合酶的氨基酸序列的同源性均为 60%。 β -石竹烯合酶的氨基酸序列和其他被子植物的倍半萜合酶的氨基酸序列同源性达 40%~60%, 而且和其他倍半萜合酶具有同样的催化反应机制^[19]。

β -石竹烯合酶具有和其他被子植物的倍半萜合酶相同的 GVDYXEP 元件, 并且具有其他萜类合成酶中高度保守的二价金属离子结合区 DDXXD。 β -石竹烯合酶基因序列无 N 端组织定位的信号肽序列, 这和推测的倍半萜类化合物在胞质中合成是一致的。该酶具有较宽的 pH 范围, 适宜的 pH 值最高接近 7.7; 其 K_m 值为 $1.8\mu\text{mol/L}$, 推测其 K_{cat} 为 0.04s^{-1} 。据报道, β -石竹烯合酶在青蒿中的转录水平随着青蒿苗龄的增长而降低, 该酶的诱导表达是迅速而短暂的^[19]。

4 (E)- β -法呢烯合酶((E)- β -farnesene synthase)

在青蒿中 (E)- β -法呢烯合酶催化 FDP 形成 (E)- β -法呢烯(β -farnesene)。(E)- β -法呢烯合酶在催化反应中只形成单一的产物 (E)- β -法呢烯, 而没有其它的副产物生成。青蒿中其它的倍半萜合酶在催化反应中, 除了有一种主要产物生成外, 相应的还有许多副产物生成, 这说明 (E)- β -法呢烯合酶具有较其他倍半萜合酶更高的产物选择性。该酶纯化后, 发现其最适 pH 值为 6.5~7.0, 植物倍半萜合酶一般具有的最适 pH 值为中性, 这与推测的倍半萜合酶定位于胞质中是一致的。该酶的基因已被克隆并已进行了功能鉴定^[20]。

2005 年 Picard 等报道了青蒿中 (E)- β -法呢烯

合酶基因的克隆、大肠杆菌表达和功能分析。青蒿的(E)- β -法呢烯合酶基因的编码区为1746bp,推测编码574个氨基酸,编码蛋白分子量为66.9kD。通过氨基酸序列比对发现(E)- β -法呢烯合酶基因N-端具有22个亲水氨基酸残基的延伸,这22个氨基酸残基并不具有信号序列,而青蒿中其他倍半萜合酶基因则没有这一特征。据推测其pI值为5.03,与其他植物的倍半萜合酶很相似,具有较低的pI值和分子量。青蒿的(E)- β -法呢烯合酶基因氨基酸序列和其他倍半萜合酶,特别是青蒿的倍半萜合酶基因,具有很高的同源性。在大肠杆菌中表达后,能催化FDP形成单一的倍半萜类化合物(E)- β -法呢烯^[21]。

5 大根香叶烯 A 合酶(germacrene A synthase)

大根香叶烯 A 合酶在青蒿中催化 FDP 形成大根香叶烯 A (germacrene A)。最近 Berteau 等人也从青蒿中克隆了大根香叶烯 A 合酶,并对其进行了大肠杆菌表达和功能分析。除大根香叶烯 A 合酶外,青蒿中的其他几种倍半萜合酶基因的克隆是从青蒿叶片 cDNA 文库中筛选所需的基因或是通过基因的同源性克隆目的基因。而大根香叶烯 A 合酶是首次从青蒿的腺毛 cDNA 文库中克隆目的基因,因为青蒿的腺毛中富含萜类物质。

对该基因的全长序列进行分析发现,青蒿的大根香叶烯 A 合酶基因编码区为1689bp,推测约编码562个氨基酸。分析发现该基因也具有其它倍半萜合酶的一些特征,比如无质体定位的信号肽序列,定位于细胞质中,通过序列比对发现青蒿大根香叶烯 A 合酶基因序列和菊苣科大根香叶烯 A 合酶基因序列相似性高达81%。在大肠杆菌中表达后,能催化FDP形成大根香叶烯 A。大根香叶烯 A 合酶在催化FDP的反应中只形成单一的产物大根香叶烯 A,而没有其他的副产物生成。与(E)- β -法呢烯合酶一样,说明该酶也具有很高的产物选择性^[22,23]。

6 一种新的倍半萜合酶(sesquiterpene synthase)

我们实验室的刘彦等用 RACE 方法从青蒿高产株系 001 中克隆了一个新的1886bp的全长倍半萜合酶 cDNA。该倍半萜合酶氨基酸序列与烟草马兜铃烯合酶、莨菪岩兰螺旋二烯合酶、棉花杜松烯合酶的一致性分别为39%、38%和41%;与青蒿柏木脑合酶、紫穗槐二烯合酶和一个推测的倍半萜合酶

cASC12X 可能是(E)- β -法呢烯合酶)的一致性为50%、48%和59%。cDNA 序列被克隆至原核表达载体 pET30a,并在大肠杆菌中诱导表达,但过量表达的蛋白主要是以不溶性蛋白形式存在。RT-PCR 分析表明,此基因在茎、叶和花中表达,在根中不表达^[24]。

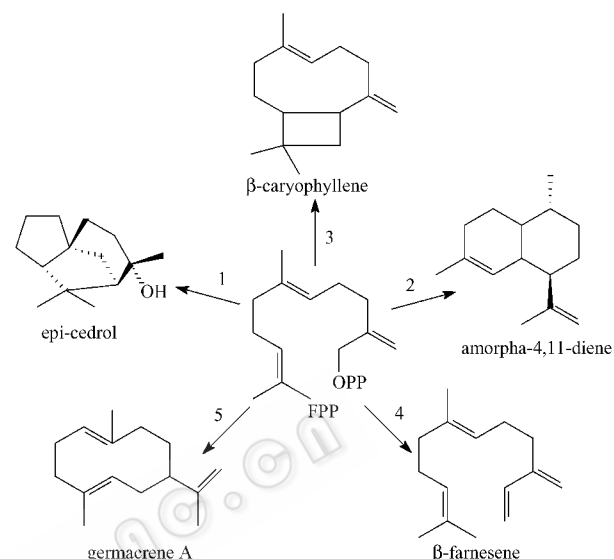


图1 青蒿中已克隆的几种倍半萜合酶的催化反应示意图

Fig.1 Reactions catalyzed by the five sesquiterpene synthases cloned from *Artemisia annua*

1: epi-cedrol synthase(柏木脑合酶,ES);2: amorph-4,11-diene synthase(紫穗槐二烯合酶,ADS);3:(E)- β -caryophyllene synthase(β -石竹烯合酶,CS);4:(E)- β -farnesene synthase((E)- β -法呢烯合酶,FS);5: germacrene A synthase(大根香叶烯 A 合酶,GS)。

7 总结与展望

综上所述,目前从青蒿中克隆的已知功能的倍半萜合酶基因有:柏木脑合酶基因、紫穗槐二烯合酶基因、 β -石竹烯合酶基因、(E)- β -法呢烯合酶基因和大根香叶烯 A 合酶基因等。不同的倍半萜合酶所催化的底物(FDP)都是相同的,但由于不同的倍半萜合酶对底物催化的立体或区域选择性不同,所以形成了不同的倍半萜化合物。除紫穗槐二烯外,青蒿中还含有其他的倍半萜类化合物,如大根香叶烯 D(germacrene D)、(E)- β -法呢烯(β -farnesene)、 β -石竹烯(β -caryophyllene)、 α -古巴烯(α -copaene)、杜松烯(cadinene)、 γ -没药烯(γ -bisabolene)等。因此可以推测,除了目前已克隆的倍半萜合酶基因外,青蒿中可能还存在其他未知的倍半萜合酶基因。目前已克隆的几种青蒿倍半萜合酶基因序列的同源性为30%~63%(图2),由于倍半萜合酶基因是一个基因家族,所以可以根据同源性,设计兼并引物,克隆青蒿

NS	MSTFLVCNASFSPSYGLPSSCDRNSSMNQEIVRNTVKFPFSIWGDQFLTYHEPKKSLTIEKQHVVEEVEIRKKL	75
FS	MSTLPISSVSFSSSTSPLVDDKVSSTKPDVIRHTMNFNA.SIWGDQFLTYDEPEDLVMK.KQLVEELKEEVKKEL	73
ADSMSLTBEKPIRPIANFPFSIWGDQFLIYE.....KQVEQG.VEQIVNDL	42
ESMSLIVEDVIRPNANFPSEIWGDQFLAYDQ.....D.EQEGVEQVIKDL	42
CSMSVKEEKVIRPIVHFPPSVWADQFLIFDD.....KQAEQANVEQVVNEL	44
GSMAAVQANVTGIKANTKTSARPVRPLANFPSPVWGDRFLSFLDRSELERYAIAMEKP.....KED	60
NS	NTAFS..EPKQHTKLH.....LIDSQRLGVSTHFEQIEEALQHVYATHGDQWIGKDNLKSTSQWFRILRQQ	142
FS	ITIKGSNEPMQHVKLIE.....LIDAVQRLGIAYHFEETEEALQHIHVTYGEQWVDKENLQSLWFRLLRQQ	142
ADS	KKEVRQLLKEALDIPMKHANLLKLIDBIQRLGIPYHFEQIDHALQCIYETYGDNDGDRS...SLWFRMLRQ	113
ES	KEEVSELLTALNSPTQHTELLKFDIAIERLGIAYYFEETINQVFQHMITYAYGDKWTGGNT...SLWFRMLRQH	113
CS	REDVRKDLVSSLDVQTEHTNLKLIDAIQRLGIAYHFEETEEALQHIYDITYGDDWGRSP...SLWFRILRQQ	115
GS	LRKLIVDPTMDSNEKLGLIYSVHRLGLTYMFLQIEESQDKLNFKPSLQDYEEVDLTTISINFQVFRHVGYKLPC	135
NS	GFNVSSGIFENHMDDKCFKPEHLSDVQCMGLYEAYMSVGEKELDDALEFTHKLGNIAEDPSQNASLRTKI	217
FS	GFNVSSGVKDFMDEKGFKESELCDAGGILALYEAFMRVEDETILDNALEFTHKVLDTIAEDPSCDSLRTQI	217
ADS	GYVTCDFVNNYKDKDGFQKSLANDVEGLLELYEATSMRVPGEDMLEDALGFTSRSLSIMTDAFSTNPALFTE	188
ES	GFYVSSDIFSTYKDKDGFKESELEKDVHGLLELYEAYMFPVPGEGILDDALVFTRTCLDEIAENPSLNSAVSSQ	188
CS	GFYVSCDIFKNYKKEDGFKESELTDVVEGLLELYEATYLRVQGEGLDDALVFTRTCLEKIANDLVHTNPILSTY	190
GS	DVFNKFDVSSGTFKASITSDVGVVGLYESAQIRIRGEKILDEASVTE.....AKLSVNTLEGLD	198
NS	EQ.ALNRLPKRMPRLLEALHYIPKYQOEASHDET.....LNLAKLIDYNMLDSIHKRBISEICKKWKOLDFSNKL	287
FS	HQ.ALKQPLRRRLARIEALHYMPIYQOETSHDEV.....LKLAKLDFSVLSMHHKELSHICKWKOLDLQNKLP	287
ADS	IQRALKQPLWKRLPRIEAAQYIPFFYQQQDSHNKTL.....LKLAKLEFNLLQSLHKBELSHVCKWKKAFDIKKNAP	259
ES	IREALTQPLHKLRLPRLEALRYIPFFYQQQASHSETL.....LKLAKLGFNQLQSLHKBELSIISKWKKSPDVANNLP	259
CS	IQEALKQPLHKLRLPRLEALRYIPFFYQQQASHNESL.....LKLAKLGFNLLQSLHKBELSEVSRWKKGLDVPNLNP	261
GS	AQQVTSQLSRFFHQGMPLGIRGGSISLTMKNVPLMTHOLAKLHFKYELQKQKELRIVSKWKKDMRFHETTP	273
NS	HYDRRLVETVFWLVGYTFEPQHYRSRMEFLTITSMWLIVLDDTYDMYGTVEELKIFTEAWQRWSLSDLSLPEYMK	362
FS	YVRDRVVEGYFWLVSIYTFEPQHARTRMFLMKTCMWLVLDDTYDMYGTVEELKIFTEAWERWSISCLDMLPEYMK	362
ADS	CLVRDVCYFVWGLGSGFPBPQYSRAVFTTKAVAVITLDDTYDAYGTVEELKIFTEAWERWSISCLDMLPEYMK	334
ES	YARNRVECYFWALAVYTFEPQYSESVFLSRFFSIQTFDDTYDAYGTVEELKIFTEAWERWSISCLDMLPEYMK	334
CS	YARDRMVVECYFWALGVYTFEPQYSQARIPFLAKVISLATVDDTYDAYGTVEELKIFTEAWERWSISCLDMLPEYMK	336
GS	YIRDRVVEVWLVWGLYTFEPYSLARITATKITLFLVWDDTYDAYGTVEELKIFTEAWERWSISCLDMLPEYMK	348
NS	LIVRELINHYGEMEESEVEKECKSYQLFYAKEMVKENCNRN.LLVEAKMLKEGYVPTLEBHMVSVCVITYAYAVMIAN	436
FS	LIVQELVNLHVMEESLEKECKTYQIHVVKEMAKELVRN.YLVEARALKKEGYMPTLEEFMVSVMVTGYTGLMIAR	436
ADS	PVYKLFMDTYTEMEFLAKECRTDLFNOCKEFVKEFVRN.LMVEAKWANECHPTTEBEHDPVVIITGGANLLTTT	408
ES	LIFQMLVKIFEEIEELSKDQKHVNVIKETLKEAVQS.YMTEAKWAKEEYIPTIEBEHTKWSYISIGYKLALVA	408
CS	LLYQGVLDIYIEMEEIMGKEKAHLASYAKESMKEFIRS.YMMEAKWANEGYVPTABEHMSVAFVSSGYMLATT	410
GS	PFYKILLDEYAGNWRKRWLKKGEQILLLLQKKRSKTLARGYLEEAEWNTNSGYVASFPYMKNGLITSAYNVIKSKS	423
NS	SYVGRNVMTEESFKVWAKFPPLVNATCLILRLMDIAGHEBEQBRDHVVSIEICVRNETGASEBDAVKFLSKQV	511
FS	SYVGRGDIVTETFKVWSSYPPIIKASCVIVRLMDIVSHKBEQBRGHVASSIEICVSKESGASDEACEYISRKV	511
ADS	CYLGMSDIFTKESVENVASAPFLFRYSGILGRRNDLMTKAEQBRKHSSSELSMYKMYNNVNEEYATLIYKEV	483
ES	GFACMGDVIADDSFEWFTNPPLVNACCLLORTMDLGSHEKGEQBRKHVASTIEICMYKQFDASEQAYESLNKKV	483
CS	CFVCMGDIVTDEAFKVALTKPIIKASCAIARLMDIHSQKEEKRIHVASVSEVSMKYQDYVTEBHLKVFNKKI	485
GS	ALVGMGEIVSDEALAWESHKTLQASELISLQDDWMTYQFERDEGQSATGVDAITKTYGVSKREAITALKIMI	498
NS	EDAWKVINKECLRPTEIPMSLTIPFLSLARVSDILYKTNNGYNHAGEEVISYIKSLLVHPLV	573
FS	EDAWKVINRESLRTAVPFPPLMPAINLARMCEVLYSVNDGFTHAEGDMKSYMKSFFVHPMVV	574
ADS	EDVWEDINRELYIT.KNIPFPLLMAYIYLCQFLEVQYAGKDNFTRMGDEYKHLIKSLLYVPMIS	546
ES	EDAWKVINREPMITCKDVNIHVAMRVLNFSRSVDVLYKNKDHFTHVGVVINHIKSLFVDAIIT	547
CS	EDAWEDITRESLVR.EDIPMLMRVINLAQVMDVLYKHKDGTNVGEELEKDHKSLLVHPPIPI	548
GS	EDAWEDINEGCLKPRQVSMDLLAPILNLARMIDVVYRYDDGFTFPRKDSERVQSQFLWLVYPV	562

图 2 已克隆的青蒿倍半萜合酶氨基酸序列比较

Fig.2 Alignment of the deduced amino acid sequences of the six sesquiterpene synthases cloned from *Artemisia annua*

NS (novel sesquiterpene synthase): 一种新的倍半萜合酶; FS ((E)- β -farnesene synthase) (E)- β -法呢烯合酶; ADS (amorpho-4, 11-diene synthase) 紫穗槐二烯合酶; ES (epi-cedrol synthase) 柏木脑合酶; CS (β -caryophyllene synthase) β -石竹烯合酶; GS (germacrene A synthase) 大根香叶烯 A 合酶。

中的其他倍半萜合酶基因。

青蒿中一系列倍半萜合酶基因的克隆对青蒿素生物合成的分子调控具有重要意义, 因为不同的倍半萜合酶均是以 FDP 为共同底物的, 如果通过代谢工程手段, 过量表达青蒿素生物合成相关酶的基因

(如紫穗槐二烯合酶基因等), 同时抑制与青蒿素合成竞争底物的酶的基因表达(如 β -石竹烯合酶基因) 将有可能促进青蒿素生物合成途径的代谢流量, 从而促进青蒿素的生物合成。

p450)CYP71AV1 基因^[25]已被克隆,从紫穗槐二烯经过 p450 酶系的三次氧化还原作用生成青蒿酸,细胞色素氧化酶 p450 基因的克隆使得我们对青蒿素生物合成途径的认识更加深入,Ro 等已经将紫穗槐二烯合酶基因和 p450 基因转入酵母中生产青蒿素的前体产物^[25-26]。随着青蒿素生物合成途径中的关键酶基因的克隆,对青蒿素生物合成途径的认识将更加深入,为我们利用基因工程方法生产青蒿素奠定了基础,为缓解青蒿素在市场上供不应求的局面以及降低青蒿素的市场价格提供了可能。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Qinghaosu Coordinating Research Group(青蒿素协作研究组). A new sesquiterpene lactone-qinghaosu. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1977 **3**: 142.
- [2] Wallaart TE, Pras N, Beekman AC, et al. Seasonal variations of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. *Planta Med* 2000 **66**: 57–62.
- [3] Webster HK, Lehnert EK. Chemistry of artemisinin: an overview. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994 **88**: 27–29.
- [4] Van Geldre E, Vergauwe A, Van den Eeckhout E. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Mol Biol*, 1997 **33**: 199–209.
- [5] Dhingra V, Vishweshwar Rao K, Narasu ML. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci* 2000, **66**: 279–300.
- [6] Chang YJ, Song SH, Park SH, et al. Amorpha-4, 11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 2000 **383**: 178–184.
- [7] Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester HJ, et al. Molecular cloning, expression and characterization of amorpha-4, 11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys* 2000 **381**: 173–180.
- [8] Wallaart TE, Bouwmeester HJ, Hille J, et al. Amorpha-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* 2001 **21**: 460–465.
- [9] Picaud S, Olofsson L, Brodelius M, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant amorpha-4, 11-diene synthase from *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys* 2005 **436**(2): 215–226.
- [10] Hua L, Matsuda SP. The molecular cloning of 8-epicedrol synthase from *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys*, 1999 **369**(2): 208–212.
- [11] Mercke P, Crock J, Croteau R, et al. Cloning, expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys*, 1999 **369**: 213–222.
- [12] Jackson BE, Hart-Wells EA, Matsuda SP. Metabolic engineering to produce sesquiterpenes in yeast. *Org Lett*, 2003 **5**(10): 1629–1632.
- [13] Bouwmeester HJ, Wallaart TE, Janssen MHA, et al. Amorpha-4, 11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 1999 **52**: 843–854.
- [14] Kim SH, Heo K, Chang YJ, et al. Cyclization mechanism of amorpha-4, 11-diene synthase, a key enzyme in artemisinin biosynthesis. *J Nat Prod* 2006 **69**(5): 758–762.
- [15] Li ZQ, Liu Y, Liu BY, et al. Cloning, E. coli expression and molecular analysis of amorpha-4, 11-diene synthase from a high-yield strain of *Artemisia annua* L. *J Integr Plant Biol*, 2006 **48**(12): 1486–1492.
- [16] Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P, et al. Production of the artemisinin precursor amorpha-4, 11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech Lett* 2006 **28**: 571–580.
- [17] Picaud S, Mercke P, He XF, et al. Amorpha-4, 11-diene synthase: mechanism and stereochemistry of the enzymatic cyclization of farnesyl diphosphate. *Arch Biochem Biophys*, 2006 **448**: 150–155.
- [18] Van Geldre E, Pauw ID, Inze D, et al. Cloning and molecular analysis of two new sesquiterpene cyclases from *Artemisia annua* L. *Plant Sci* 2000 **158**: 163–171.
- [19] Cai Y, Jia JW, Crock J, et al. A cDNA clone for beta-caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2002 **61**: 523–529.
- [20] Crock J, Wildung M, Croteau R. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint that produces the aphid alarm pheromone (E)-beta-farnesene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997 **94**(24): 12833–12838.
- [21] Picaud S, Brodelius M, Brodelius PE. Expression, purification and characterization of recombinant (E)-beta-farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 2005 **66**: 961–967.
- [22] Bouwmeester HJ, Kodde J, Verstappen FW, et al. Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiol* 2002 **129**(1): 134–144.
- [23] Berteau CM, Voster A, Verstappen FW, et al. Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library. *Arch Biochem Biophys* 2006 **448**: 3–12.
- [24] Liu Y(刘彦), Ye HQ(叶和春), Li GF(李国凤). Cloning, E. coli expression and molecular analysis of a novel sesquiterpene synthase gene from *Artemisia annua*. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2002 **44**: 1450–1455.
- [25] Teoh KH, Polichuk DR, Reed DW, et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNA reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Lett*, 2006 **580**: 1411–1416.
- [26] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid engineered yeast. *Nature* 2006 **440**(7086): 940–943.