

# 青蒿素生物合成分子调控研究进展

王红 叶和春\* 刘本叶 李振秋 李国凤

(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)

**摘要** 青蒿素是目前世界上最有效的疟疾治疗药物。通过对青蒿素的生物合成途径,青蒿素生物合成途径的关键酶,青蒿素生物合成的分子调控的介绍,综述了青蒿素生物合成分子调控的最新研究进展。

**关键词** 青蒿,青蒿素,生物合成,分子调控

中图分类号 Q756 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)06-0646-05

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  $C_{15}H_{22}O_5$ <sup>[1]</sup>。青蒿素是一个与过去抗疟药作用方式完全不同的新结构类型药物,是所有抗疟药中起效最快、疗效最好、毒性最低的化合物,特别是对脑型疟疾和抗氯喹恶性疟疾的疗效更为突出。由于青蒿素能够解决抗氯喹恶性疟疾的难题,所以青蒿素一被发现即得到国内外有关方面,特别是世界卫生组织(WHO)的重视,被 WHO 推荐为目前世界上最有效的疟疾治疗药物。

目前世界上青蒿素类药物的生产主要是从青蒿植株中提取,而青蒿植株中青蒿素的含量一般较低(约占干重的 0.01%~0.6%),且提取环节多、费时费力,使青蒿素的生产成本高、产量低,难以满足市场需求<sup>[2]</sup>。青蒿素虽已能化学合成,但因成本高、毒性大、产量低而未能投入商业化生产<sup>[3]</sup>。80 年代起,国内外学者试图通过生物技术手段生产青蒿素,由于青蒿素生物合成与细胞高度分化密切相关,在细胞培养物中未能检测到青蒿素。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新的热点。本文结合本实验室的有关工作,就该领域国内外的最新研究进展进行简要综述。

## 1 青蒿素的生物合成途径

### 1.1 从乙酰辅酶 A 到法呢基焦磷酸(FDP)

青蒿素的生物合成途径属于植物类异戊二烯代谢途径。近年来的研究表明,植物类异戊二烯的生物合成至少存在两条途径,即甲羟戊酸途径和丙酮酸/磷酸甘油醛途径。青蒿素等倍半萜类的生物合成途径属于甲羟戊酸途径,该途径在细胞质中进行。首先,由 3 个乙酰辅酶 A 缩合生成 3-羟基-3-甲基戊二单酰辅酶 A(HMG-CoA),随后,在 HMG-CoA 还原

酶(HMGR)的作用下,产生甲羟戊酸(MVA)。以后 MVA 经焦磷酸化及脱羧脱水作用,形成  $C_5$  的异戊烯基焦磷酸(IPP)。在这个过程中,由于甲羟戊酸的生成是一个不可逆的过程,因此, HMGR 被认为是该途径中的第一个限速酶<sup>[4,5]</sup>。然后, IPP 与其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(DAMPP)在法呢基焦磷酸合酶(FDPS)的催化下,通过亲电反应机制形成牻牛儿基焦磷酸(GPP),进而形成法呢基焦磷酸(FDP),如图 1 所示。



图 1 植物类异戊二烯代谢途径示意图(\*为该途径的关键酶)

Fig.1 Schematic map of plant isoprenoid metabolic pathway

### 1.2 从法呢基焦磷酸到青蒿素

Akhila 等<sup>[6,7]</sup>通过放射性同位素示踪法研究了青蒿素的生物合成途径,提出青蒿素生物合成的框架为:法呢基焦磷酸(FDP)→青蒿酸→二氢青蒿酸→青蒿素。在此过程中,首先由 FDP 经过酶促反应形成一种未知的倍半萜类中间产

物,该步反应被认为是青蒿素形成过程的重要限速步骤。1999年,Bouwmeester等<sup>[8]</sup>从青蒿叶片中分离到青蒿素生物合成途径的重要倍半萜类中间产物—*amorpha-4,11-diene*,并进一步分离了催化 *amorpha-4,11-diene* 形成的酶,该酶是催化青蒿素生物合成的关键酶。

最近,Wallaart等<sup>[9,10]</sup>从青蒿中分离到另外两种参与青蒿素生物合成的中间产物:二氢青蒿酸(Dihydroartemisinic acid)和二氢青蒿酸氢过氧化物(Dihydroartemisinic acid hydroperoxide),并通过<sup>1</sup>H和<sup>13</sup>C光谱证实了其结构。通过与体内条件相同的光化学反应能使二氢青蒿酸转变成青蒿素,反应中间产物是二氢青蒿酸氢过氧化物。二氢青蒿酸和二氢青蒿酸氢过氧化物的分离及体外转化反应为青蒿体内由二氢青蒿酸到青蒿素的非酶促光化学反应提供了有力的证据。

## 2 青蒿素生物合成途径的关键酶

青蒿素生物合成途径属于植物类异戊二烯代谢途径,该途径中与青蒿素生物合成相关的酶类主要有3种:3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMGR)、法呢基焦磷酸合酶(FDPS)和倍半萜合酶(环化酶),下面介绍青蒿素生物合成途径中这三种酶的研究进展。

### 2.1 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMGR)

HMGR催化HMG-CoA形成甲羟戊酸(MVA),由于MVA的形成是一个不可逆过程,因此,HMGR被认为是动物、植物、真菌可能也是昆虫的类异戊二烯代谢途径的一个限速酶<sup>[11]</sup>。许多研究者都报道,类异戊二烯生物合成途径的诱导,尤其是倍半萜类物质的合成,与HMGR活性成正相关。Chappell和Nable<sup>[12]</sup>报道,在烟草悬浮细胞培养物中加入真菌诱导子会导致培养液中倍半萜类物质 capsidiol 的积累,同时也检测到HMGR瞬时峰值的出现。1995年,Chappell等<sup>[11]</sup>将仓鼠的HMGR基因置于CaMV 35S启动子下转入烟草。结果表明,转基因烟草的HMGR活性增加了3~6倍,同时,总固醇类物质的积累也增加了3~10倍。但固醇类终产物如:谷固醇(Sitosterol)、菜油固醇(Campesterol)和豆固醇(Stigmasterol)的含量仅增加了2倍,而固醇类生物合成的中间产物环阿屯醇(Cycloartenol)的含量却增加了100多倍。这些结果进一步说明,总的固醇类含量受HMGR活性控制,一个或多个固醇类生物合成后期的酶类参与了控制固醇类终产物的相对含量。

以后的进一步研究表明,与HMGR相关存在着一个基因家族,在这个基因家族中,不同同源基因的表达,可能控制着细胞质中甲羟戊酸代谢途径中“碳流”的流向<sup>[5,13]</sup>。对一些模式植物(如马铃薯)的研究结果表明,HMGR是甲羟戊酸代谢途径中起“宏观”调控作用的关键酶,该代谢的分支分别受到HMGR基因家族的特定成员调控,其中HMGR II 亚基因家族的成员表达与倍半萜类植素的合成密切相关<sup>[13]</sup>。HMGR作为甲羟戊酸代谢途径的早期酶类,它决定“碳流”的流向,而各支路中最终产物的合成却受到各支路中其它关键酶的控制,如鲨烯合酶、倍半萜合酶等。

青蒿中的HMGR基因业已被克隆(Kang *et al*, GenBank accession No. U14624 和 U14625),我们实验室也克隆了青蒿

的一个HMGR基因(陈大华,叶和春等, GenBank accession No. AF 142473),功能分析和遗传转化的工作还未见报道。

### 2.2 法呢基焦磷酸合酶(FDPS)

法呢基焦磷酸合酶(Farnesyl diphosphate synthase FDPS)是一种1'-4-异戊二烯基转移酶,它催化IPP和DMAPP通过缩合作用形成GPP及GPP和IPP缩合形成FDP。其反应机制是DMAPP(GPP)由于其头部焦磷酸基团的存在,失去少量电子而形成正离子化的碳离子(即C1与焦磷酸基团形成的离子对),而IPP的C4由于共轭双键的存在形成富电子的碳原子,在法呢基焦磷酸合酶的作用下,DMAPP(GPP)的C1亲电子攻击IPP的C4,从而发生亲电聚合反应。

青蒿的FDPS在1996年已被克隆,它编码343个氨基酸,推测编码蛋白的分子量为39.42 kD,其氨基酸序列与拟南芥、白羽扁豆和玉米的同源性分别为76%、84%和72%;与鼠、人类的同源性分别为46%和45%,在多聚异戊二烯转移酶中普遍存在的两个保守区域也存在于青蒿的FDPS中。在大肠杆菌中表达后,在体外能检测到FDPS活性<sup>[14-16]</sup>。

我们实验室于1998年克隆了青蒿中两个法呢基焦磷酸合酶的cDNA(*fps1*和*fps2*) (陈大华,叶和春等, GenBank accession No. AF136602和AF112881)。功能分析的结果表明,其中*fps1*具有FDP合酶活性。经(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>分级和FPLC纯化后对其酶学特性进行了研究,其催化活性低于酵母的FPS,但大大高于南瓜的FPS,其*K<sub>cat</sub>*为0.7<sup>[17]</sup>。

### 2.3 倍半萜合酶(环化酶)

倍半萜合酶催化法呢基焦磷酸通过分子内部环化以及各种氧化-还原修饰,最后形成倍半萜类化合物。青蒿中存在一系列的倍半萜合酶(倍半萜合酶基因家族)。因为倍半萜合酶对底物的立体专一性要求很高,立体结构不同的倍半萜类化合物是由不同的倍半萜合酶催化形成的。青蒿中参与青蒿素生物合成的倍半萜环化酶是*amorpha-4,11-diene*合酶,该酶的基因已被克隆并已进行了功能鉴定<sup>[18-20]</sup>。

**2.3.1 *Amorpha-4,11-diene* 合酶的分离、纯化:**1999年,Bouwmeester等<sup>[8]</sup>首次从青蒿中分离到青蒿的*amorpha-4,11-diene*合酶,该酶催化FDP形成青蒿素生物合成的倍半萜中间产物*amorpha-4,11-diene*。部分纯化后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56 kD,*K<sub>m</sub>*为0.6 μmol/L。

**2.3.2 *Amorpha-4,11-diene* 合酶基因的克隆、功能分析及异源表达:**最近,朝鲜的Chang等<sup>[18]</sup>、瑞典的Mercke等<sup>[19]</sup>、荷兰的Wallaart等<sup>[20]</sup>和刘彦、叶和春等先后报道了青蒿中*amorpha-4,11-diene*合酶基因的克隆、表达和功能分析。青蒿的*amorpha-4,11-diene*合酶cDNA全长约2100 bp,编码区为1641 bp,推测约编码546个氨基酸,编码蛋白分子量为63.9 kD,略高于已纯化的青蒿*amorpha-4,11-diene*合酶(56 kD)。推测pI值为5.6左右。青蒿的*amorpha-4,11-diene*合酶的pI值和分子量与已报道的其它植物的倍半萜合酶相近<sup>[21,22]</sup>。在大肠杆菌中表达后,能催化FDP形成*amorpha-4,11-diene*。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<sup>[23,24]</sup>。Wallaart等<sup>[20]</sup>还将青蒿的*amorpha-4,11-diene*合酶基因转入烟草(烟草不含内源倍半萜合酶),结果表明,在烟草中能检测到该酶的表达。

达活性 转 *amorpha-4,11-diene* 合酶烟草叶片中 *amorpha-4,11-diene* 的水平为 0.2 ~ 1.7 ng/g (FW)。

**2.3.3 青蒿中已克隆的其它倍半萜合酶基因**:1999年, Hua等<sup>[25]</sup>和 Mercke等<sup>[26]</sup>同时分别克隆了青蒿的 *epi-cedrol* 合酶基因。该基因编码区为 1641 bp, 推测编码 547 个氨基酸, 编码蛋白分子量为 63.5 kD。在大肠杆菌表达后, 催化 FDP 形成 *epi-cedrol*。

2000年, Van Geldre等<sup>[27]</sup>从青蒿中分离到 2 个倍半萜环化酶的 cDNA 克隆 *cASC34* 和 *cASC125*, 其中 *cASC34* 全长为 2026 bp, 推测编码 549 个氨基酸, 编码蛋白分子量为 64.2 kD, *pI* 值为 5.28; *cASC125* 全长为 1843 bp, 编码 577 个氨基酸, 编码蛋白分子量为 67.4 kD, *pI* 值为 5.50。这两个克隆所编码蛋白的氨基酸序列与其它植物的倍半萜合酶有很高的同源性。2001年, 刘彦等<sup>[28]</sup>从青蒿中克隆了一种新的倍半萜合酶 (*ASES*) 基因, 该基因 cDNA 全长为 1886 bp, 编码一个 573 个氨基酸的多肽, 编码蛋白分子量为 66.8 kD, *pI* 值为 5.49。最近, Cai等<sup>[29]</sup>克隆了青蒿中的另一种新的倍半萜合酶- $\beta$ -石竹烯合酶基因, 该基因 cDNA 全长为 1902 bp, 编码蛋白分子量为 60.3 kD, 在大肠杆菌中表达后, 能催化 FDP 形成  $\beta$ -石竹烯。

### 3 青蒿素生物合成的基因调控

目前国外关于青蒿素生物合成调控的研究主要集中在青蒿素生物合成关键酶基因的克隆上, 青蒿遗传转化方面的工作未见报道。近年来, 我们实验室在青蒿素生物合成的基因调控方面进行了大量工作, 取得了许多有意义的结果。

#### 3.1 青蒿发根和丛生芽培养体系的建立

1994年, Weathers等<sup>[30]</sup>和秦明波、叶和春等<sup>[31]</sup>几乎同时建立了青蒿的发根培养体系, 随后刘本叶、叶和春等<sup>[32]</sup>又进一步研究了 Ri 质粒转化青蒿的各种影响因素, 确定了最佳的转化条件, 并利用筛选出的高产发根系, 进行了不同理化因子对发根生长及青蒿素生物合成调控的研究。

1996年, Vergauwe等<sup>[33]</sup>通过根癌农杆菌感染青蒿叶片, 建立了 Ti 质粒介导的青蒿转化体系; 1998年, 他们又详细研究了各种参数如外植体苗龄、种类、根癌农杆菌菌株类型及二元载体类型等对于青蒿转化的影响<sup>[34]</sup>。

1999年, 陈大华、叶和春等<sup>[35]</sup>以 GFP 为报告基因, 建立了 Ti 质粒介导的青蒿转化体系, 随后又以青蒿叶片、花蕾和不同发育阶段的花器官为外植体, 分别诱导出丛生芽。在丛生芽中检测到了青蒿素, 并进一步研究了影响青蒿丛生芽诱导、生长和青蒿素生物合成的各种理化因子, 确定了适合于丛生芽生长和青蒿素生物合成的最佳培养基。HPLC 测定结果表明, 以花器官为外植体诱导的丛生芽中青蒿素含量比用叶片诱导的丛生芽青蒿素含量提高 1 倍<sup>[36]</sup>。

#### 3.2 异源类异戊二烯合成途径相关基因对青蒿素生物合成的调控

青蒿素生物合成前体为青蒿酸, 青蒿酸则具有典型的杜松烯骨架, 来源于杜松烯, 而杜松烯由杜松烯合酶催化形成。已有文献表明<sup>[37]</sup>, 青蒿植株提取物中存在杜松烯及其类似物, 这些结果暗示青蒿素生物合成与棉毒素的生物合成可能具有相似的途径。为此, 我们将来源于棉花的 (+)- $\delta$ -杜

松烯合酶的 cDNA (*cad*) 插入到植物表达载体中, 通过发根农杆菌 15834 介导转化青蒿, 并获得了转基因发根。结果表明, 外源基因的表达能够影响青蒿素的生物合成。TLC 分析显示, 转 *cad* 发根提取物中青蒿酸、青蒿甲素、青蒿乙素等青蒿素前体或衍生物在含量上与对照存在差异。研究还发现, 转 *cad* 发根 C-37 中, 外源基因的导入和表达可能相应地促进青蒿转基因发根自身的法呢基焦磷酸合酶基因的表达<sup>[38]</sup>。

法呢基焦磷酸 (FDP) 不仅为重要的初生代谢物甾醇的合成提供前体, 同时也为青蒿素等倍半萜类的合成提供前体, FDP 由 FDP 合酶催化合成, 因此 FDP 合酶在青蒿素生物合成中也具有重要作用, 被认为是青蒿素生物合成途径的关键酶之一。为了进一步提高青蒿发根和植株中青蒿素的含量, 我们将来源于棉花的 FDP 合酶基因的 cDNA 置于 CaMV35S 启动子控制下插入到植物表达载体中, 通过发根农杆菌 15834 和根癌农杆菌 LBA4404 介导转化青蒿, 分别获得了转基因发根和转基因植株。青蒿素含量的 HPLC 检测结果表明, 转法呢基焦磷酸合酶发根系 F-26 中的青蒿素含量最高, 达到 3.01 mg/g (DW), 与对照相比, 青蒿素含量提高 3 ~ 4 倍<sup>[39]</sup>。转基因植株的青蒿素含量测定结果显示, 转 FDP 合酶基因的再生植株中, 青蒿素含量最高可达 10.08 mg/g (DW), 与对照相比, 青蒿素含量提高 2 ~ 3 倍<sup>[40]</sup>。上述结果表明, 外源基因的导入, 对青蒿转基因材料倍半萜类物质的生物合成具有明显的调控作用。

#### 3.3 细胞分裂素合成相关基因对青蒿素生物合成的调控

细胞分裂素能促进叶绿体的发育和叶绿素的生物合成, 而青蒿中青蒿素的合成在营养生长后期达到高峰, 这个时期青蒿中叶绿素和青蒿素在含量上有什么关系呢? 青蒿中叶绿素含量的增加能否促进青蒿素的生物合成呢? 为此, 我们将起源于农杆菌的异戊烯转移酶基因 (*ipt*) 插入到植物表达载体中, 根癌农杆菌通过介导获得转基因植株。对转基因植株的分析结果表明, 转基因植株中的叶绿素、细胞分裂素和青蒿素的含量都有不同程度的提高。与对照相比, 细胞分裂素中的 *thereinto* 提高了 2 ~ 3 倍, 叶绿素提高 20% ~ 60%, 青蒿素提高 30% ~ 70%, 说明内源细胞分裂素含量的提高能促进叶绿素和青蒿素的含量的提高, 而且, 这三者在含量上存在正相关性<sup>[41]</sup>。

### 4 总结和展望

青蒿素作为治疗疟疾的特效药, 在国际市场上供不应求。自从青蒿素被发现以来, 科学家们便通过各种努力试图提高青蒿素的产量。由于对青蒿素生物合成位点、合成时期, 特别是对于青蒿素生物合成代谢途径的调控等基础研究资料的缺乏, 国内外调控青蒿素生物合成的技术措施带有很大的经验性和盲目性, 难以打破青蒿素生物合成的限速步骤。

近年来, 随着分子生物学技术的迅速发展, 人们试图通过基因工程途径来提高青蒿中青蒿素的含量。近来已取得了一些可喜的进展。青蒿素生物合成途径的重要倍半萜中间产物 *amorpha-4,11-diene* 已被分离, 催化 *amorpha-4,11-diene* 合成的酶也已被分离并部分纯化, 这将有助于进一步阐明

青蒿素的生物合成途径。青蒿素生物合成途径的重要关键酶 amorpha-4,11-diene 合酶的基因已被几个实验室克隆,已进行了功能分析,并在烟草中得到表达。另外,青蒿中的鲨烯合酶基因和 amorpha-4,11-diene 合酶以外的几种倍半萜合酶基因已经被克隆,这些酶虽然不直接催化青蒿素的生物生成,但它们与 amorpha-4,11-diene 合酶的底物是相同的,都是以 FDP 为底物,它们可能与 amorpha-4,11-diene 合酶竞争底物。上述这些合酶基因的克隆为我们进一步通过基因工程途径提高青蒿素含量奠定了基础。我们可以用这些酶的正义(amorpha-4,11-diene)和反义(鲨烯合酶或 amorpha-4,11-diene 合酶以外的倍半萜合酶)基因分别转化青蒿,使青蒿中与青蒿素生物合成相关酶的基因过量表达,而抑制与青蒿素合成竞争底物的酶的基因表达,从而有目的地调控青蒿素的生物合成,提高转基因器官或植株中青蒿素的含量。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Qinghaosu coordinating research group(青蒿素结构协作组). A new sesquiterpene lactone-Qinghaosu. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1977, **3**: 142
- [ 2 ] Dhingra V, Vishweshwar Rao K, Narasu M L. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. *Life Sci*, 2000, **66**: 279 - 300
- [ 3 ] Schmid G, Hofheinz W. Total synthesis of qinghaosu. *J Am Chem Soc*, 1983, **105**: 624 - 625
- [ 4 ] Bach T J. Synthesis and metabolism of mevanoic acid in plants. *Plant Physiol Biochem*, 1987, **25**: 163 - 178
- [ 5 ] Choi D, Word B L, Bostock R M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell*, 1992, **4**: 1333 - 1344
- [ 6 ] Akhila A, Thakur R S, Popli S P. Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 1987, **16**: 1927 - 1930
- [ 7 ] Akhila A, Rani K, Thakur R S. Biosynthesis of artemisinic acid in *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 1990, **29**: 2129 - 2132
- [ 8 ] Bouwmeester H J, Wallaart T E, Janssen M H A *et al.* Amorpha-4, 11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 1999, **52**: 843 - 854
- [ 9 ] Wallaart T E, van Uden W, Lubberink H G M *et al.* Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its role in the biosynthesis of artemisinin. *J Nat Prod*, 1999, **62**: 430 - 433
- [ 10 ] Wallaart T E, Pras N, Quax W J. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid hydroperoxide from *Artemisia annua*: a novel biosynthetic precursor of artemisinin. *J Nat Prod*, 1999, **62**: 1161 - 1162
- [ 11 ] Chappell J, Wolf F, Proulx J, Cuellar R, Saunders C. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant Physiol*, 1995, **109**: 1337 - 1343
- [ 12 ] Chappell J, Nable R. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitors. *Plant Physiol*, 1987, **85**: 469 - 473
- [ 13 ] Yang Z, Park H, Lacy G H, Cramer C L. Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and pathogen challenge. *Plant Cell*, 1991, **3**: 397 - 405
- [ 14 ] Matsushita Y, Kang W Y, Charlwood B V. Cloning and analysis of a cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from *Artemisia annua*. *Gene*, 1996, **172**: 207 - 209
- [ 15 ] Ashby M N, Edwards P A. Elucidation of deficiency in two yeast coenzyme Q mutants: characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 13157 - 13164
- [ 16 ] Math S K, Hearst J E, Poulter C D. The crtE in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **89**: 6761 - 6764
- [ 17 ] Zhao Y J, Ye H C, Li G F, Chen D H, Liu Y. Cloning and enzymology analysis of farnesyl pyrophosphate synthase gene from a superior strain *Artemisia annua* L. *Chin Sci Bull*, 2003, **48**: 163 - 167
- [ 18 ] Chang Y J, Song S H, Park S H, Kim S U. 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
- [ 19 ] Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester H J *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
- [ 20 ] Wallaart T E, Bouwmeester H J, Hille J. 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
- [ 21 ] Chen X Y, Chen Y, Heinstein P, Davidsson V J. Cloning, expression and characterization of (+)- $\delta$ -cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 1995, **324**: 255 - 266
- [ 22 ] Crock J, Wilding M, Croteau R. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermin(*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- $\beta$ -farnesene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 12833 - 12838
- [ 23 ] Mc-Garvey D J, Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 1995, **7**: 1015 - 1026
- [ 24 ] Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. Plant terpenoid synthase: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 4126 - 4133
- [ 25 ] Hua L, Matsuda S P T. The molecular cloning of 8-epicedrol synthase from *Artemisia annua*. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **369**: 208 - 212
- [ 26 ] Mercke P, Crock J, Croteau R, Brodelius P E. Cloning, expression and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. *Arch Biochem Biophys*, 1999, **369**: 213 - 222
- [ 27 ] Van Geldre E, Pauw I D, Inze D, Van montagu M, Van Den Eeckhout E. Cloning and molecular analysis of two sesquiterpene cyclases from *Artemisia annua* L. *Plant Sci*, 2000, **158**: 163 - 171
- [ 28 ] Liu Y, Ye H C, Li G F. Cloning, *E. coli* expression and Molecular analysis of a novel sesquiterpene synthase gene from *Artemisia annua*. *Acta Botanica Sinica*, 2002, **44**(12): 1450 - 1455
- [ 29 ] Cai Y, Jia J W, Crock *et al.* A cDNA clone for beta-caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 2002, **61**: 523 - 529

- production by transformed roots of *Artemisia annua*. *BioTechnol Lett*, 1994, **16**: 1281 - 1286
- [ 31 ] QIN M B ( 秦明波 ), LI G Z ( 李国珍 ), YUN Y ( 云月 ) *et al.* Induction of hairy root from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes* and its culture *in vitro*. *Acta Bot Sin* ( 植物学报 ), 1994, **36** ( suppl. ): 165 - 170
- [ 32 ] LIU B Y ( 刘本叶 ), YE H C ( 叶和春 ), LI G F ( 李国凤 ) *et al.* Studies on dynamic of growth and artemisinin biosynthesis of hairy root of *Artemisia annua* L. *Chin J of Biotechnol* ( 生物工程学报 ), 1998, **14** ( 4 ): 401 - 404
- [ 33 ] Vergauwe A, Cammaert R, Vandenberghe D, Genetello C, Inze D, Van Montagu M, Van Den Eeckhout E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 1996, **15**: 929 - 933
- [ 34 ] Vergauwe A, Van Geldre E, Inze D, Van Montagu M, Van Den Eeckhout E. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *artemisia annua* L. *Plant Cell Rep*, 1998, **18**: 105 - 110
- [ 35 ] Chen D H ( 陈大华 ), Ye H C ( 叶和春 ), Li G F ( 李国凤 ), *et al.* Expression of green fluorescent protein gene in transgenic shoots of *Artemisia annua*. *Acta Bot Sin* ( 植物学报 ), 1999, **41**: 490 - 493
- [ 36 ] GENG S ( 耿飒 ), YE H C ( 叶和春 ), LI G F ( 李国凤 ) *et al.* Flowering of *Artemisia annua* L. test-tube plantlets and artemisinin production with shoot cultures induced from flower organ explants. *Chin J Appl Environ Biol* ( 应用与环境生物学报 ), 2001, **7** ( 3 ): 201 - 206
- [ 37 ] Brown G D. Cadinane from *Artemisia annua* that may be intermediates in the biosynthesis of artemisinin. *Phytochemistry*, 1994, **36**: 637 - 641
- [ 38 ] CHEN D H ( 陈大华 ), MENG Y L ( 孟玉玲 ), YE H C ( 叶和春 ) *et al.* Culture of transgenic *Artemisia annua* hairy root with cotton cadinene synthase gene. *Acta Bot Sin* ( 植物学报 ), 1998, **40**: 711 - 714
- [ 39 ] Chen D H, Liu C J, Ye H C *et al.* Ri-mediated transformation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1999, **57**: 157 - 162
- [ 40 ] Chen D H, Ye H C, Li G F. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci*, 2000, **155**: 179 - 185
- [ 41 ] Geng S, Ma M, Ye H C *et al.* Effects of ipt gene expression on the physiological and chemical characteristics of *Artemisia annua* L. *Plant Sci*, 2001, **160**: 691 - 198

## Advances in Molecular Regulation of Artemisinin Biosynthesis

WANG Hong YE He-Chun\* LIU Ben-Ye LI Zhen-Qiu LI Guo-Feng

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

**Abstract** Artemisinin, a new and a very potent antimalarial drug, is produced by the Chinese medicinal herb *Artemisia annua* L. It is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide bridge and is active against chloroquine resistant forms of *Plasmodium falciparum*. The relatively low yield ( 0.01% ~ 0.6% ) of artemisinin in *A. annua* is a serious limitation to the commercialization of the drug. Therefore, a through understanding of the biosynthetic pathway and the characterization of the involved enzymes are important for the biology production of artemisinin. This review is focused on the recent progress in the molecular regulation of artemisinin biosynthesis from the following aspects: the biosynthetic pathway of artemisinin, the key enzymes involved in artemisinin biosynthesis, and the molecular regulation of artemisinin biosynthesis. The biosynthetic pathway of artemisinin belongs to the isoprenoid metabolite pathway, the key enzymes involved in the biosynthesis of artemisinin include: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase ( HMGR ), farnesyl diphosphate synthase ( FDPS ), and amorpha-4,11-diene synthase, of which amorpha-4,11-diene synthase catalyzes the cyclisation of the ubiquitous precursor farnesyl diphosphate to the highly specific olefinic sesquiterpene skeletons and has been postulated as the regulatory step in the biosynthesis of artemisinin. Recently the gene encoding of the amorpha-4,11-diene synthase has been cloned and the functional expressions have been studied by several research teams, therefore, the breakthroughs in production of artemisinin could hopefully be achieved by metabolic engineering of the plant, in particular, by over-expressing enzyme(s) catalyzing the rate limiting step(s) of artemisinin biosynthesis or by inhibiting the enzyme(s) of other pathway competing for its precursors. Besides, the effects of the heterogenesis isoprenoid pathway related genes on artemisinin biosynthesis of the transformed plants were also discussed.

**Key words** *Artemisia annua* L., artemisinin, biosynthesis, molecular regulation

Received: 05-22-2003

This work was supported by grant from National Natural Science Foundation of China ( No. 30171142 ).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62591431 ~ 6249; Fax: 86-10-82591016; E-mail: hcy@ns.ibcas.ac.cn