

紫穗槐-4,11-二烯合酶及其代谢工程研究进展

孔建强, 黄 勇, 沈君豪, 王 伟, 程克棣, 朱 平*

(中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所, 卫生部天然药物生物合成重点实验室、
中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050)

摘要: 紫穗槐-4,11-二烯合酶催化 FPP (farnesyl pyrophosphate, 法尼基焦磷酸) 生成青蒿素前体紫穗槐-4, 11-二烯, 是青蒿素生物合成途径中的关键酶。本文对紫穗槐-4, 11-二烯合酶的分子生物学和代谢工程研究进行了综述。紫穗槐-4, 11-二烯合酶编码基因及其相关核酸序列已经得到了克隆。紫穗槐-4, 11-二烯合酶 cDNA 全长 1 641 bp, 编码 546 aa。紫穗槐-4, 11-二烯合酶最适 pH 范围较宽, 但需要二价金属离子作为辅酶才能发挥作用, 其产物和底物的特异性不高。在紫穗槐-4, 11-二烯合酶作用下, FPP 首先进行的是 1, 6-合环, 然后是 1, 10-合环, 形成紫穗槐-4, 11-二烯。由于紫穗槐-4, 11-二烯合酶在青蒿素生物合成中具有重要的意义, 自从其基因被克隆测序后, 先后被导入 *E.coli*、*S.cerevisiae*、烟草、拟南芥和 *A.nidulans*, 获得了能产生紫穗槐-4, 11-二烯的各种工程菌或细胞, 研究通过不同方式提高工程菌中紫穗槐-4, 11-二烯产量的方法。

关键词: 紫穗槐-4, 11-二烯; 紫穗槐-4, 11-二烯合酶; 青蒿素; 工程菌

中图分类号: R915.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 12-1320-08

Recent advances in the study of amorpha-4,11-diene synthase and its metabolic engineering

KONG Jian-qiang, HUANG Yong, SHEN Jun-hao, WANG Wei, CHENG Ke-di, ZHU Ping*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College,
Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products, Ministry of Health of PRC & Key Laboratory of Bioactive Substances and
Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education of PRC, Beijing 100050, China)

Abstract: Amorpha-4,11-diene synthase (ADS) can convert farnesyl pyrophosphate (FPP) to amorpha-4, 11-diene, a precursor of artemisinin. ADS plays an important role in the biosynthesis of artemisinin. This review summarizes the molecular biology and metabolic engineering study of ADS in recent years. The genomic DNA and its cDNA sequences of amorpha-4, 11-diene synthase were cloned from *Artemisia annua* L. The cDNA encoding amorpha-4, 11-diene synthase contains a 1 641 bp open reading frame coding for 546 amino acids. ADS shows a broad pH optimum and an absolute requirement for divalent metal ions as cofactors. The specificity of ADS to the substrates and products is not high and the formation of amorpha-4, 11-diene by ADS from FPP is achieved by an initial 1, 6-closure with subsequent 1, 10-closure. The ADS cDNA cloned from *Artemisia annua* L, or totally synthesized by PCR, was introduced into different hosts including *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Nicotiana tabacum* L. *Arabidopsis thaliana* and *A. nidulans* resulting in varied engineering microorganisms and cells producing amorpha-4, 11-diene. The way to improve the production of amorpha-4, 11-diene was investigated by two strategies such as improving the supply of substrate and directing FPP flux to amorpha-4, 11-diene production from competing pathways.

收稿日期: 2009-04-01.

基金项目: 科技部“863”重点项目资助项目 (2007AA021501); 国家自然科学基金资助项目 (30701061); 北京市自然科学基金资助项目 (7082063); 教育部博士点新教师基金资助项目 (20070023077); 药物所基本科研业务费 (2006QN05) 资助项目.

*通讯作者 Tel: 86-10-63165197, Fax: 86-10-63017757, E-mail: zhuping@imm.ac.cn

Key words: amorpha-4, 11-diene; amorpha-4, 11-diene synthase; artemisinin; engineering microorganism

青蒿素是从中药青蒿中提取出来的抗疟药物^[1], 同时, 还有抗肿瘤等作用^[2, 3]。不断扩展的适应症要求青蒿素有一个稳定的来源。直接从青蒿中提取青蒿素是目前青蒿素供应的主要来源, 但由于天然青蒿中青蒿素含量很低 (0.1~0.5%)^[4], 存在自交不亲和性, 不同基因型青蒿以及青蒿不同组织之间的青蒿素含量差异很大, 加之青蒿中青蒿素的含量受外界因素影响很大, 这些不稳定因素增加了青蒿常规栽培的难度, 导致青蒿供应不稳定, 不利于世界贫困人口疟疾的治疗。此外, 通过大量栽培青蒿来提高产量必然会占用更多的土地, 不可能将青蒿素的成本降低到目前市售价的十分之一, 从可持续发展的目标来看, 这种方法应改进。因此, 建立一种不污染环境、具价格优势的青蒿素生产方法将是未来解决青蒿素来源问题的重中之重。

青蒿素代谢工程主要是指将青蒿素生物合成相关基因导入微生物中, 在微生物中重构一条青蒿素的生物合成途径, 利用微生物生长繁殖快的特点, 生产大量廉价的青蒿素。青蒿素代谢工程研究近几年取得了迅猛的进展, 有望在未来成为生产青蒿素的主要方法^[5, 6]。在青蒿素生物合成途径中^[7], 紫穗槐-4, 11-二烯合酶 (amorpha-4, 11-diene synthase, ADS) 催化萜类前体 FPP (farnesyl pyrophosphate, 法尼基焦磷酸) 形成青蒿素前体紫穗槐-4, 11-二烯 (amorpha-4, 11-diene, AD) (图 1)。ADS 是青蒿素生物合成途径的限速酶^[8], 其催化形成的紫穗槐-4, 11-二烯产量直接决定了最终的青蒿素产量, 因此, 对 ADS 进行研究具有很深的意义。

1 紫穗槐-4, 11-二烯合酶及其编码基因的发现历史

尽管许多实验早就证明青蒿酸和二氢青蒿酸都是青蒿素的前体^[9-14], 但对于 FPP 到青蒿酸这一段途径的阐明则相对较晚。直到 1999 年, 荷兰的 Bouwmeester 等^[15]才首次从青蒿提取物中检测到紫穗槐-4, 11-二烯, 根据紫穗槐-4, 11-二烯的结构, 以及紫穗槐-4, 11-二烯的特点, 推断紫穗槐-4, 11-二烯有可

能是青蒿酸的前体, 并且部分纯化出了紫穗槐-4, 11-二烯合酶。2000 年, 瑞典的 Mercke 等^[7]和韩国的 Chang 等^[16]几乎同时报道从青蒿中克隆出了紫穗槐-4, 11-二烯合酶编码 cDNA, 并将其导入 *E. coli*, 进行了功能鉴定。几个月后, 芬兰的 Wallaart 等^[17]也从青蒿中克隆出了 ADS 基因, 并鉴定了功能。同年, 中国科学院植物所叶和春研究组从青蒿中克隆得到 ADS cDNA 和基因组 DNA, 但相关的文章直到 2006 年才发表^[18]。2004 年, 叶和春研究组通过直接递交给 GenBank 的方式公开了 ADS 基因的启动子序列。2006 年, 韩国的 Kim 等^[19]也在 GenBank 上公开了 ADS 基因的启动子序列, 并对其进行了较为详细的分析和研究。至此, 和紫穗槐-4, 11-二烯合酶相关的核酸序列都已经得到克隆 (表 1)。由于 ADS 在青蒿素生物合成途径中发挥着关键作用^[8], ADS cDNA 序列的克隆, 极大地推动了青蒿素代谢工程研究。

2 紫穗槐-4, 11-二烯合酶编码基因的特点

紫穗槐-4, 11-二烯合酶 cDNA 全长 1 641 bp^[7], 其基因组序列中含有 7 个外显子和 6 个内含子, 根据内含子/外显子特点, 该合酶属于第 III 类植物萜类合酶^[18]。迄今为止, 在 GenBank 中注册的和 ADS 基因相关的序列已经有 13 条 (表 1), 包括一条 ADS 基因组序列和一条根据酿酒酵母偏爱密码子人工合成的 ADS 序列^[20]。由于来源于不同产地的青蒿, 这些 ADS 序列的核苷酸, 甚至于氨基酸序列相互间存在一定差异。但这些差异对 ADS 的功能没有影响。不同基因型青蒿中, ADS 基因的拷贝数存在差异。Chang 等^[16]发现 ADS 基因在青蒿基因组中以单拷贝形式存在。而 Li 等^[18]通过对一株青蒿素高产植株进行研究表明, ADS 基因在这种青蒿基因组中至少存在 4 个拷贝, 由此说明青蒿素产量与 ADS 基因的拷贝数呈正相关。

ADS 基因在植物青蒿中表达具有 (器官) 特异性和发育特异性的特点。Li 等^[18]的实验表明, ADS 基因主要在叶、花和幼茎中表达, 在根部没有表达, 这

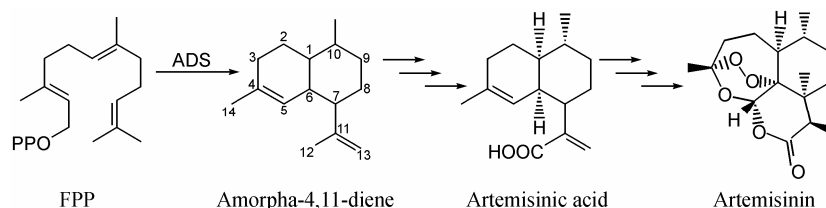


Figure 1 The biosynthetic pathway of artemisinin

Table 1 *ADS* sequences (by Mar.24,2009)

GenBank ID	<i>ADS</i> sequence	Authors	Country	Time
AF138959	<i>ADS</i> mRNA	Mercke P et al	Sweden	Sept. 25, 2000
AF327526	<i>ADS</i> mRNA	Liu Y et al	China	Mar. 5, 2001
AF327527	<i>ADS</i> Genomic DNA	Liu Y et al	China	Mar. 5, 2001
AY006482	<i>ADS</i> mRNA	Wallaart TE et al	Netherlands	Jul. 3, 2001
AJ251751	<i>ADS</i> mRNA	Chang YJ et al	Korea	Apr. 15, 2005
DQ241826	<i>ADS</i> mRNA	Huang Y et al	China	Nov. 8, 2005
EF197888	<i>ADS</i> mRNA	Kong JQ et al	China	Jan. 28, 2007
EU521651	the Synthetic <i>ADS</i> cDNA	Kong JQ et al	China	Mar. 24, 2008
AY528931	Promoter and 5'UTR of <i>ADS</i> gene	Zhang Y et al	China	Feb. 22, 2004.
DQ448294	Promoter and 5'UTR of <i>ADS</i> gene	Kim SH et al	Korea	Apr. 5, 2006
DQ448295	Promoter and 5'UTR of <i>ADS</i> gene	Kim SH et al	Korea	Apr. 5, 2006
DQ448296	Promoter and 5'UTR of <i>ADS</i> gene	Kim SH et al	Korea	Apr. 5, 2006
DQ448297	Promoter and 5'UTR of <i>ADS</i> gene	Kim SH et al	Korea	Apr. 5, 2006

与青蒿素积累的部位是一致的, 另外, 紫穗槐-4, 11-二烯合酶基因启动子含有许多顺式作用元件^[19]。

3 紫穗槐-4, 11-二烯合酶特点

紫穗槐-4, 11-二烯合酶含有 546 aa (amino acid, 氨基酸), 等电点大约是 5.47, 分子质量 63.9 kDa^[7], 这个数值和 Bouwmeester 等的结果存在差异, 之所以存在这种差异, 可能是测定蛋白质分子量的手段不同。Bouwmeester 等通过凝胶过滤得到的 *ADS* 分子质量是 56 kDa^[15], 而 Mercke 等^[7]、Chang 等^[16]和 Wallaart 等^[17]则是通过 SDS-PAGE 得到的 *ADS* 分子质量。*ADS* 和别的萜类合酶具有很高的相似性和同一性 (表 2)。*ADS* 不含质体肽, 定位于胞质^[7, 16, 17]。此外, *ADS* 还具有以下特点。

3.1 最适 pH 范围宽

和别的萜类合酶一样, *ADS* 的最适 pH 范围较宽。Mercke 等^[7]试验表明, 重组 *ADS* 在 pH 大于 7.0 时活性最强, 最适 pH 介于 7.5 和 9.0 之间, 在 pH 9.0 和

pH 7.5 时, *ADS* 表现出来的活性基本一样。Picaud 等^[21]和 Li 等^[18]的实验表明, 完全纯化的重组 *ADS* 在 pH 6.5~7.0 时, 活性最强; 在 pH 7.5 时, 活性最弱。这和从植物中直接提取出来的 *ADS* 一致^[15]。尽管关于 *ADS* 活性的最适 pH 值在不同的文章中存在差异, 但这些实验都表明 *ADS* 的最适 pH 范围较宽。

3.2 需要金属离子作为辅酶

在催化 FPP 环化反应时, 需要二价金属离子的参与, *ADS* 才能发挥作用。二价金属离子结合到 *ADS* 的 DDXXD (E) 保守区, 形成活性部位, 通过在底物 FPP 带负电的焦磷酸基团和活性部位带负电的残基之间形成离子键来结合底物。不同的金属离子, 对 *ADS* 活性的影响是不同的, 用 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 作为辅助因子, 检测不到 *ADS* 活性; 用 Ni^{2+} 作为辅助因子, 检测到的 *ADS* 活性很低; 而在用 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Co^{2+} 作为辅助因子时, *ADS* 均表示出了很强的活性。其中, 在 pH 6.5 时, Mn^{2+} 和 Co^{2+} 的饱和浓度明显低于 Mg^{2+} ;

Table 2 Amino acid sequence comparison of amorpho-4, 11-diene synthase with other plant terpene synthases

Synthases	Organisms	Identity/%	Similarity/%	References
Farnesene synthase	peppermint	34.8	47.5	7
Germacrene synthase	Cherry tomato	39.6	51.2	7
Vetispiradiene synthase	<i>H.muticus</i>	41	53.1	7
δ -Cadinene synthase	cotton	42.9	54.8	7
Epi-aristolochene synthase	tobacco	40.5	51.8	7
Epi-aristolochene synthase	pepper	41.5	52.8	7
Epi-cedrol synthase	<i>A.annua</i>	51.8	60.4	7
5-epi-Aristolochene synthase	tobacco	36		16
Epi-cedrol synthase	<i>A.annua</i>	51		16
Linalool synthase	<i>A.annua</i>	27		16
(+)- δ -Cadinene synthase	cotton	41		16
A putative sesquiterpene synthase (EMBL ID:AJ249561)	<i>A.annua</i>	50	67	17
(3R)-Linalool synthase	<i>A.annua</i>	31	49	17

在 pH 7.5 时, Mn^{2+} 的饱和浓度明显低于 Mg^{2+} 和 Co^{2+} , 这表明 Mn^{2+} 更能有效地将底物结合到活性位点上。同一 pH 条件下, 不同浓度的金属离子对酶活性的影响是显著的。在 pH 6.5 时, ADS 的酶活性随着 Co^{2+} 浓度的上升而减弱; 相反, 随着 Mg^{2+} 浓度的上升而急剧增强, 在 pH 6.5 时, 可以检测到最高的 ADS 酶活。至于 Mn^{2+} 浓度, 在已经检测的三个浓度中 (0.5, 2.5 和 5.0 mmol·L⁻¹), 浓度为 2.5 mmol·L⁻¹ 时, ADS 活力最强^[21]。

3.3 产物和底物特异性不高

ADS 是一种倍半萜合酶, 在底物选择和产物生成上都表现出了特异性不高的特点。ADS 既能作用于 FPP, 在 Mn^{2+} 存在的条件下, 也能作用于 GPP (geranyl pyrophosphate, 牻牛儿基焦磷酸), 但作用于 FPP 的 K_m 值远小于 GPP^[21], 表示 ADS 的倍半萜合酶活性远高于单萜合酶活性。ADS 不能作用于 GGPP (geranylgeranyl diphosphate, 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸)^[21]。在产物生成上, 当 ADS 以 GPP 为底物时, 会生成 α -terpineol、ocimene、myrcene、limonene 和 linalool 等多种产物 (表 3)^[21]。当其作用于 FPP 时, 也能获得多种产物。Wallaart 等^[17]从 *E.coli* 重组的 ADS 的酶促反应产物中, 检测到了包括紫穗槐-4,11-二烯在内的 5 种产物。Mercke 等^[7]从 ADS 的酶促反应中检测到了包括紫穗槐-4,11-二烯在内的 9 种产物。经过仔细分析, Picaud 等^[21]从酶促反应产物中除了检测到了紫穗槐-4,11-二烯之外, 还发现了另外 15 种产物, 这是迄今为止从 ADS 酶促反应中发现的最多产物数。之所以能产生这么多产物, 推测可能是亲电反应机制造成的, 在亲电反应中, 会形成一系列不稳定的碳正离子中间产物 (carbocationic intermediates), 这些中间产物去质子化或被水淬灭后, 从酶中释放出来, 形成许多产物^[7]。ADS 产生的紫穗槐-4,11-二烯在产物中占绝大部分, 其中在 Wallaart 等的实验中占总产物的 89%^[17], 在 Mercke 等的实验中更是占到总产物的 91.2%^[7]。其他的倍半萜则是次要产物。在 ADS 产物中, 除了紫穗槐-4,11-二烯能转变成青蒿素外, 其他次要产物的生物学意义不很明确。

在不同的 pH 条件下, 产物种类几乎没有变化。但在不同的金属离子存在时, 产物呈现出了较大的差异。在 Mg^{2+} 存在的情况下, ADS 能产生 16 个产物。但在 Mn^{2+} 或 Co^{2+} 存在的条件下, ADS 的反应特异性增强, 主要表现为副产物种类减少。在 Co^{2+} 存在的情况下, ADS 只能产生 10 个产物, 而在 Mn^{2+} 存在的条件下, ADS 产物特异性进一步增强, 只能产生 8 个产

物。在同一 pH 条件下, Mg^{2+} 能促进 AD 相对含量上升。 Mg^{2+} 存在的条件下, AD 的相对含量由 80% 上升到了超过 90%^[21]。

Table 3 Products and substrates of amorpho-4,11-diene synthase

Authors	Substrates	Products	References
Wallaart TE et al	FPP	Amorpha-4,11-diene β -sesquiphellandrene three unknown sesquiterpene	17
Mercke P et al	FPP	Amorpha-4,11-diene (E)- β -farnesene amorpha-4,7(11)-diene γ -humulene β -sesquiphellandrene amorpha-4-en-11-ol amorpha-4-en-7-ol α -bisabolol an unknown olefin	7
Picaud S et al	FPP	Amorpha-4,11-diene (E)- β -farnesene amorpha-4,7(11)-diene γ -humulene β -sesquiphellandrene amorpha-4-en-11-ol amorpha-4-en-7-ol α -bisabolol trans-Nerolidol zingiberene zingiberenol unknown1-5	21
Picaud S et al	GPP	α -Terpineol ocimene myrcene limonene linalool	21

4 紫穗槐-4,11-二烯合酶基因成功克隆的策略

紫穗槐-4,11-二烯合酶在青蒿素生物合成中发挥着重要的作用, 该酶的成功克隆不仅极大地推动了青蒿素代谢工程的发展, 而且克隆该基因的策略对其他倍半萜合酶基因的克隆具有重要的指导意义。

4.1 对植物材料进行必要的胁迫处理

由于萜类合酶在细胞中的浓度很低^[22], 因此, Wallaart 等用未经胁迫的青蒿 RNA 为模板时, 没有扩增到 ADS 基因; 而以经过干旱和光胁迫处理过的青蒿 RNA 为模板时, 却扩增到了条带特异的 ADS 基因^[17], 这表明胁迫能促进 ADS 基因的转录水平。

4.2 适当的取材时间

如上所述, 由于 ADS 基因表达受环境因素的诱导, 为了更有效地克隆 ADS 基因, 必须对青蒿进行胁

迫处理;然而经过胁迫处理的青蒿中也有可能克隆不到 *ADS* 基因,主要是经过胁迫处理后,青蒿中其他萜类合酶基因的转录水平也相应地增加,这样 *ADS* 基因转录产物的相对水平并没有增加而导致克隆困难。为了解决这个问题,Chang 等^[16]选择在 3 月份从温室中取样,这主要是因为他们发现从 3 月份到 8 月份, *ADS* 基因在青蒿叶中会有一定的组成性表达,而其他的诱导型萜类合酶基因则处于沉默状态,在这时候取样,青蒿叶中 *ADS* 基因的转录产物相对水平较高,有利于克隆。

5 紫穗槐-4,11-二烯合酶作用机制

最先对 *ADS* 作用机制作出解释的是瑞典的 Brodelius 课题组^[7]。该课题组认为紫穗槐-4,11-二烯合酶作用机制的中心问题是 FPP 首先进行的是 1,6 合环 (1,6-closure) 还是 1,10 合环 (1,10-closure)。通过对 *ADS* 酶促反应的产物结构进行分析,他们提出紫穗槐-4,11-二烯合酶首先进行 1,6 合环,形成 bisabolyl 碳正离子,然后通过 1,10 合环,形成不同的终产物^[7]。由于在 *ADS* 酶促产物中还检测到了 γ -humulene,他们认为在 *ADS* 作用下, FPP 也可能首先进行 1,11-合环 (1,11-closure)。同年,韩国的 Kim 课题组也对 *ADS* 作用机制作出了自己的解释。对于 FPP 合环的先后顺序,该课题组倾向于首先进行的是 1,10 合环,他们认为 *ADS* 作用时, FPP 首先被离子化,然后异构化,形成 *E*, *Z*-farnesyl 正离子, C10 和 C11 位的双键对 C1 位进行亲核攻击,形成 1,10-合环,通过 1,3-氢移,在 C1 位形成正电荷,导致 C6-C7 位的双键进行亲电攻击,引起 C1 位和 C6 位合环, C7 位带一个电荷,然后通过 1,5-氢移,形成 AD。但是,他们也谨慎地认为,要准确地阐明 *ADS* 作用机制,还需要进一步的实验确证^[16]。2005 年, Brodelius 课题组提出, FPP 通过 1,6-合环形成 Bisabolyl 碳正离子后,接着进行 1,3-氢移或连续两次 1,2-氢移^[21]。2006 年, Picaud^[23]和 Kim^[24]两个课题组均以氘代标记的 FPP 为底物,确证了 Bisabolyl 碳正离子进行的是 1,3-氢移。

6 紫穗槐-4,11-二烯合酶基因的代谢工程研究

自从 *ADS* 基因被克隆出来后,以其为基础的青蒿素前体代谢工程研究取得了突飞猛进的发展。迄今为止, *ADS* 基因已经被成功地导入 *E. coli*、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、烟草和拟南芥中。

6.1 *ADS* 的 *E.coli* 基因工程研究

大肠杆菌是所有工程菌中开发最早,最成熟的一种。尽管缺少糖基化和翻译后加工等功能,但大肠

杆菌具有遗传背景清楚、生长快速、生长周期短、安全性好、可以进行高密度培养、适合表达不同基因产物、成本低及易于操作等优点,因此成为外源基因表达的首选宿主菌。

ADS 基因也不例外。自从被克隆出来后, *ADS* 就被多个实验室导入 *E. coli*, 获得了能产生 AD 的 *E. coli* 工程菌^[7, 16, 17]。其中,美国伯克利分校的 Keasling 课题组构建的 *E. coli* 工程菌是 *ADS* 工程菌中的典型代表。和以前构建的只含单一 *ADS* 基因的 *E. coli* 工程菌不一样,这个工程菌中除了导入了 *ADS* 基因外,还导入了来源于酿酒酵母的 8 个基因,这 8 个基因是甲羟戊酸途径所必需的基因,通过这条重构的甲羟戊酸途径以及 *E. coli* 本身固有的 DXP 途径,可以获得更多的 FPP,从而在 *ADS* 作用下,以石竹烯当量计算,获得了产量高达 $3.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AD^[6]。由于紫穗槐-4,11-二烯容易挥发, Keasling 研究小组认为 2003 年的实验有可能低估了紫穗槐-4,11-二烯的产量,因此,2006 年,他们通过增加底物以及改善发酵条件和产物检测设备,利用 2003 年构建的大肠杆菌紫穗槐-4,11-二烯工程菌,在发酵罐中获得了 $0.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫穗槐-4,11-二烯^[25]。2007 年, Keasling 课题组通过对该工程菌进行进一步分析发现,重构的工程菌中会积累 HMG-CoA,从而抑制细胞的生长,而增加 HMG-CoA 还原酶的拷贝数,能够恢复细胞的生长,这种现象说明平衡异源代谢流对于提高工程菌中目的产物的产量至关重要^[26]。此外, Keasling 课题组还通过增加启动子强度和使用优化密码子,使 2003 年构建的这种工程菌中紫穗槐-4,11-二烯的产量达到 $293 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD600}^{-1}$ ^[8]。2009 年, Tsuruta 等^[27]利用金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的基因取代 2003 年工程菌中的酵母 HMG-CoA 还原酶和 HMG-CoA 合酶基因,同时采用补料分批发酵等方法优化培养条件,使得工程菌中紫穗槐-4,11-二烯的平均产量达到了 $27.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这些结果说明通过对工程菌相关条件进行优化,是完全有可能将工程菌生产目标代谢物的产量提高到工业化的水平。

6.2 *ADS* 的 *S.cerevisiae* 基因工程研究

2006 年,瑞典的 Brodelius 实验室向 *S. cerevisiae* 中导入了 *ADS* 基因,获得了含 *ADS* 基因的质粒型和整合体型两种工程菌。这两种工程菌分别能产生 600 和 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫穗槐-4,11-二烯。尽管产量很低,但这是第一次在真核生物中制备出青蒿素前体物质,为以后利用酵母来生产青蒿素前体物质提供了可能^[28]。

2006 年, 美国 Keasling 实验室以酿酒酵母为宿主菌, 导入了 *ADS* 和紫穗槐-4,11-二烯 P450 氧化还原酶 (CYP71AV1) 基因, 重建了青蒿酸的代谢途径, 通过培养条件优化, 获得了 $115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的青蒿酸和 $153 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫穗槐-4,11-二烯。其中青蒿酸的产量比青蒿中的产量要高 2 个数量级。这是一个里程碑式的结果, 该实验利用合成生物学技术, 实现了在酵母工程菌中大量生产青蒿素前体, 有望将青蒿素药物价格大大降低^[5]。此后, Keasling 实验室继续以这些酵母工程菌为研究对象, 对各种影响产量的因素进行了研究, 获得了系统更为优化的紫穗槐-4,11-二烯酵母工程菌^[29]。2008 年, 他们将 *ADS* 基因克隆到营养缺陷标记 *Leu* 启动子大部分缺失的表达质粒上, 构建的工程菌能产生产量达 $(781 \pm 34) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫穗槐-4,11-二烯^[30]。

作者实验室在紫穗槐-4,11-二烯酵母工程菌中也取得一定的进展。2007 年, 孔建强等构建了质粒型的酵母工程菌, 能产生 $23.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫穗槐-4,11-二烯^[31]。2009 年, 孔建强等人构建了含突变 *ADS* 基因的酿酒酵母工程菌, 产量提高了 5~20 倍, 达到 $123.192 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫穗槐-4,11-二烯^[20]。

6.3 *ADS* 的构巢曲霉基因工程研究

曲霉 (*Aspergillus*) 是丝状真菌, 是发酵工业和食品工业的重要菌种。丝状真菌具有许多优点, 如胞外分泌量大, 表达量高, 对某些大肠杆菌和酿酒酵母不能正确表达的蛋白, 丝状真菌可以产生正确折叠。正因为如此, 随着重组 DNA 技术的发展, 越来越多的曲霉被开发成高效地遗传表达系统, 如黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 和构巢曲霉 (*A.nidulans*) 等。2008 年, Lubertozzi 等将 *ADS* 基因导入构巢曲霉, 发现构巢曲霉工程菌能产生大量的法尼烯 (α -farnesene 和 β -farnesene)、香柑油烯 (α -bergamotene) 和甜没药烯 (β -bisabolene) 等, 而只检测到大约 $5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫穗槐-4,11-二烯。这种产物构成方式与穗槐-4,11-二烯 *E.coli* 工程菌完全不一样, 表明宿主菌内环境对 *ADS* 的表达有影响^[32]。

6.4 *ADS* 的植物基因工程研究

和微生物相比, 植物表达系统有自己的优势, 如具有精细的调控系统, 能通过光合作用获得代谢前体物质等。然而, 利用植物表达系统来制备萜类化合物一直成效不大。2001 年, Wallaart 等将 *ADS* 基因导入烟草中, 转基因烟草从形态和生长状态等方面与非转基因烟草没有差异, 但能产生 $0.2 \sim 1.7 \text{ ngAD/克}$ 鲜重。虽然产量较低, 但这个实验的意义在于, 第一

次将 *ADS* 基因导入了高等真核生物, 并获得成功, 这表明通过植物反应器, 在优化条件下, 有可能获得高水平表达的紫穗槐烯-4,11-二烯, 为将来利用植物反应器来生产青蒿素奠定基础^[17]。2006 年, Wu 等人将 *ADS* 基因分别导入烟草细胞质和质体中, 发现将 *ADS* 基因导入细胞质后, 转基因植物仅能产生 $0.1 \sim 1.1 \text{ ng/克}$ 鲜重的紫穗槐烯-4,11-二烯, 然而, 将 *ADS* 基因导入质体后, 紫穗槐烯-4,11-二烯产量增加了 40 000 倍, 达到了 $28 \text{ } \mu\text{g/克}$ 鲜重。这个结果有重要意义, 它表明通过植物反应系统也可能制备出较高含量的萜类化合物^[33]。

除了烟草, *ADS* 基因还和 GFP 融合导入了拟南芥中, 发现绿色荧光出现在胞质中, 从另一个方面证明了 *ADS* 是一种定位于胞质的蛋白质^[19]。

6.5 提高代谢工程菌中 AD 产量的措施

为提高工程菌中紫穗槐-4,11-二烯的产量, 需要从“开源”和“节流”两方面着手。所谓“开源”, 是指提高工程菌中底物的供应及利用效率, 这是提高工程菌产量的主要方式; 而“节流”则是限制底物流向别的代谢流, 相对增加紫穗槐-4,11-二烯代谢途径中底物的供应, 从而增加紫穗槐-4,11-二烯的含量。在紫穗槐-4,11-二烯工程菌优化过程中, 这两种方式既可以单独应用, 也可以联合应用。

6.5.1 通过“开源”提高紫穗槐-4,11-二烯产量 众所周知, 自然界存在两条萜类生物合成途径: DXP 途径 (deoxy-*D*-xylulose 5-phosphate, 1-去氧木糖-5-磷酸途径) 和 MVA 途径 (mevalonate pathway, 甲羟戊酸途径)。在 *E.coli* 中, FPP 主要通过 DXP 途径合成。为了增加 FPP 的供应, Martin 等^[6]构建了两种能产生紫穗槐-4, 11-二烯的 *E. coli* 工程菌。一种工程菌中增加了 DXP 途径中限速酶基因的拷贝数; 另一种工程菌中导入了 8 个酿酒酵母基因, 重构了一条 MEP 途径。这两种工程菌都能提高 FPP 的供应, 使得 AD 的产量分别上升了 3.6 和 36 倍。

孔建强等^[31]通过增加酵母中 HMG-CoA 还原酶和 FPP 合酶基因拷贝数, 提高了 FPP 的供应, 发现 AD 的产量相应地增加了 1 000 倍左右, 由 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $23.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Ro 等^[5]在只含 *ADS* 基因的酵母工程菌中检测到了 $4.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫穗槐-4, 11-二烯, 但将 *tHMG*R 基因导入该工程菌进行过表达后, AD 的产量增加了 5 倍。

6.5.2 通过“节流”增加紫穗槐-4,11-二烯的产量 在工程菌构建中, 为了显著增加产物产量, 往往不是采取单一“开源”或“节流”方式构建工程菌, 而是

这两种方式的叠加。Ro 等在抑制 *ERG9* 基因的同时, 过表达了 *upc2-1* 和 *tHMGR* 两个基因, 使得酵母工程菌中 AD 的产量增加到了 $153 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 比单独的“开源”或“节流”对工程菌的影响要大, 推测可能是过表达 *tHMGR* 基因增加的 FPP 流向了别的代谢流, 导致了单一方式对工程菌的影响有限^[5]。两年后, Paradise 等用同样的菌株再次确证了这种现象^[29]。

6.5.3 培养条件对紫穗槐-4,11-二烯产量的影响 除了“开源”和“节流”之外, 培养条件对工程菌中紫穗槐-4,11-二烯的产量也有影响。Paradise 发现, 酵母工程菌培养基中碳源对紫穗槐-4,11-二烯的产量有很大的影响^[29]。Martin 等发现, 在培养基中加入甘油, 能提高工程菌中 AD 的产量^[6]。Newman 等通过利用两相分配生物反应器 (two-phase partitioning bioreactor, TPPB)、增加碳源和营养成分, 使 AD 的产量增加了 20 倍, 达到了 $0.48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[25]。

青蒿素是一种重要的抗疟药。近几年来, 世界市场上青蒿素的价格是每公斤 350~1 700 美元, 1 个疗程大约 1 美元, 这个价格是氯喹的 10 倍, 许多国家尚且连氯喹都无法承受, 更别说青蒿素了^[34]。因此, 降低青蒿素价格, 使更多的人能用得起青蒿素成为当前疟疾防治的一个重要问题。从上文可以看出, 利用代谢工程生产大量青蒿素前体, 然后通过半合成制备青蒿素有望在几年后成为青蒿素生产的主要方法。其中, 紫穗槐-4,11-二烯作为青蒿素生物合成途径中的重要中间体, 它在代谢工程菌中的产量直接影响这种方法工业化应用的前景。根据 1 000 kg 青蒿干叶能提取出 5 kg 的青蒿素计算^[35], 利用代谢工程生产的紫穗槐-4,11-二烯产量达到 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 有可能生产出更便宜的青蒿素。Tsuruta 等^[28]的实验使人们有理由相信, 利用代谢工程菌工业化生产青蒿素前体, 进而降低青蒿素售价的日子已经不远了。

References

- [1] Kong JQ, Wang W, Zhu P, et al. Recent advances of artemisinin biosynthesis [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2008, 43: 804–808.
- [2] Chen T, Li M, Zhang R, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13: 1358–1370.
- [3] Hou J, Wang D, Zhang R, et al. Experimental therapy of hepatoma with artemisinin and its derivatives: *in vitro* and *in vivo* activity, chemosensitization, and mechanisms of action [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14: 5519–5530.
- [4] Wallaart TE, Pras N, Quax WJ. Seasonal variations of artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type [J]. Planta Med, 1999, 65: 723–728.
- [5] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. Nature, 2006, 440: 940–943.
- [6] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 796–803.
- [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 [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 381: 173–180.
- [8] Anthony JR, Anthony LC, Nowroozi F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4, 11-diene [J]. Metab Eng, 2009, 11: 13–19.
- [9] El-Feraly FS, Al-Meshal UA, Al-Yahya MA, et al. On the possible role of Qinghao acid in the biosynthesis of artemisinin [J]. Phytochemistry, 1986, 25: 2777–2778.
- [10] Nair MS, Basile DV. Bioconversion of arteannuin B to artemisinin [J]. J Nat Prod, 1993, 56: 1559–1566.
- [11] Akhila A, Thakur RS, Popli SP. Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. Phytochemistry, 1987, 26: 1927–1930.
- [12] Akhila A, Rani K, Thakur RS. Biosynthesis of artemisinic acid in *Artemisia annua* [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 2129–2131.
- [13] Sangwan RS, Agarwal K, Luthra R, et al. Biotransformation of artemisinic acid into arteannuin B and artemisinin in *Artemisia annua* [J]. Phytochemistry, 1993, 34: 1301–1302.
- [14] Wallaart TE, van Uden W, Lubberink HG, et al. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its possible role in the biosynthesis of artemisinin [J]. J Nat Prod, 1999, 62: 430–433.
- [15] Bouwmeester HJ, Wallaart TE, Janssen MH A, et al. Amorpha-4,11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis [J]. Phytochemistry, 1999, 52: 843–854.
- [16] 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 [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 383: 178–184.
- [17] 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 [J]. *Planta*, 2001, 212: 460–465.
- [18] 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]. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48: 1486–1492.
- [19] Kim SH, Chang YJ, Kim SU. Tissue specificity and developmental pattern of amorpha-4, 11-diene synthase (ADS) proved by ADS promoter-driven GUS expression in the heterologous plant, *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta Med*, 2008, 74: 188–193.
- [20] Kong JQ, Wang W, Wang LN, et al. The improvement of amorpha-4,11-diene production by a yeast-conform variant [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106: 941–951.
- [21] Picaud S, Olofsson L, Brodelius M, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant amorpha-4,11-diene synthase from *Artemisia annua* L [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 436: 215–226.
- [22] Croteau R, Cane DE. Monoterpene and sesquiterpene cyclases [J]. *Methods Enzymol*, 1985, 110: 383–405.
- [23] Picaud S, Mercke P, He XF, et al. Amorpha-4, 11-diene synthase: mechanism and stereochemistry of the enzymatic cyclization of farnesyl diphosphate [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 448: 150–153.
- [24] Kim SH, Heo K, Chang YJ, et al. Cyclization mechanism of amorpha-4,11-diene synthase, a key enzyme in artemisinin biosynthesis [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 758–762.
- [25] Newman JD, Marshall J, Chang M, et al. High-level production amorph-4, 11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Biotech Bioeng*, 2006, 95: 684–691.
- [26] Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, et al. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli* [J]. *Metab Eng*, 2007, 9: 193–207.
- [27] Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, et al. High-level production of amorph-4, 11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli* [J]. *PLoS One*, 2009, 4: 1–12.
- [28] Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P, et al. Production of the artemisinin precursor amorph-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 571–580.
- [29] Paradise EM, Kirby J, Chan R, et al. Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulating squalene synthase [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100: 371–378.
- [30] Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, et al. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug [J]. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 83.
- [31] Kong JQ, Cheng KD, Wang LN, et al. Increase of copy number of HMG-CoA reductase and FPP synthase genes improves the amorph-4,11-diene production in engineered yeast [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 1314–1319.
- [32] Lubertozzi D, Keasling JD. Expression of a synthetic *Artemisia annua* amorpha-4,11-diene synthase in *Aspergillus nidulans* yields altered product distribution [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35: 1191–1198.
- [33] Wu SQ, Schalk M, Clark A, et al. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1441–1447.
- [34] White NJ. Qinghaosu (artemisinin): the price of success [J]. *Science*, 2008, 320: 330–334.
- [35] Hale V, Keasling JD, Renninger N, et al. Microbially derived artemisinin: a biotechnology solution to the global problem of access to affordable antimalarial drugs [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 77 (Suppl 6): 198–202.