

紫杉醇生物合成的研究进展*

甘烦远 沈月毛 郝小江 * *

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

摘要 本文对近年来研究紫杉醇的生物合成及生物合成途径中关键酶的进展进行了评述。目前紫杉醇的生物合成途径已经基本明了,其生物合成途径中环化酶的基因已经克隆成功。在分子及基因水平上大量生产紫杉醇的曙光已经出现。

关键词 紫杉醇 生物合成 关键酶

紫杉醇(taxol)作为一种作用机制独特的植源性抗癌新药,自问世以来一直受到人们的重视。但由于紫杉醇在天然红豆杉(*Taxus spp.*)中的含量很低,加上红豆杉资源本身亦非常贫乏,因此限制了紫杉醇的进一步开发和应用。为了解决这个问题,近些年来科学家在寻找及扩大紫杉醇药源途径上(如筛选高产量红豆杉栽培品种、化学合成、生物技术及微生物中生产等)进行了艰苦的研究工作^[1],在这些研究领域特别是生物技术研究领域中,由于目前对紫杉醇的生物合成及生物合成途径中关键酶研究所取得的进

展^[2~4],已使人们相信基因工程可能成为生产紫杉醇的途径之一。本文报道近年来有关紫杉醇生物合成及生物合成途径中关键酶研究所取得的进展。

1 紫杉醇的生物合成

紫杉醇及其相关的带有 C13 位侧链化合物的生物合成途径大致可分为三个主要的生物合成阶段：紫杉环碳环系统的生物合成，侧链的生物合成，紫杉烷环系统和侧链的酯化反应，形成完整的紫杉醇分子(图 1)。

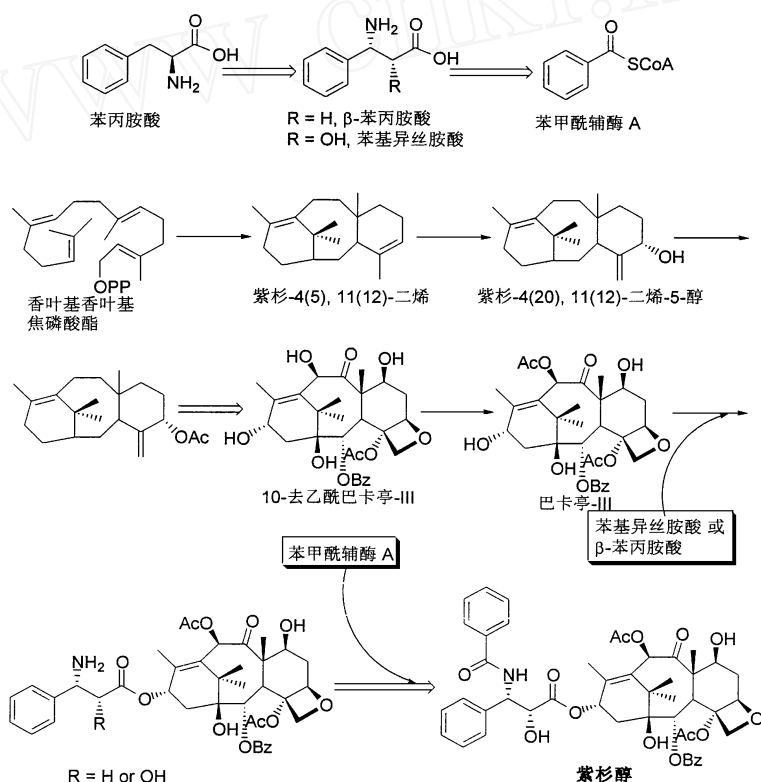


图 1 紫杉醇的生物合成途径

*中国科学院生物科学与技术特别资助项目(STZ-1-11)和云南省人才培养基金及应用基础研究基金项目(97C025G)

* * 通讯联系人

1.1 紫杉烷碳环系统的生物合成

1.1.1 紫杉烷碳环骨架的生物合成

紫杉烷碳环系统是一类二萜化合物,因此猜测它是通过异戊二烯途径由甲羟戊酸衍生而来的。Zamir 等^[5]将放射性同位素标记的(3RS)(5RS)(5-³H)-甲羟戊酸和乙酸饲喂至温室种植的欧洲红豆杉(*Taxus baccata*)加拿大红豆杉(*Taxus canadensis*),能产生具有放射性标记的紫杉醇。然而,紫杉醇的放射性强度低,而且没有用进一步的降解实验来测定产物被标记的位置。所以不能排除该实验中产物紫杉醇的放射性是来自其乙酰基而不是紫杉烷骨架。Zenk 等^[6]报道紫杉烷碳环骨架不是来源于甲羟戊酸。他们于中国红豆杉(*Taxus chinensis*)的细胞培养系中饲喂泛¹³C 标记的葡萄糖、[1-¹³C]葡萄糖和[1,2-¹³C₂]乙酸,通过核磁共振(NMR)分析 taxuyunnanin C,发现[1,2-¹³C₂]乙酸仅标记其乙酰基部分,而两种¹³C 标记的葡萄糖既掺合到了 taxuyunnanin C 的乙酰基部分,且标记了其碳骨架。通过分析¹³C 标记葡萄糖饲喂产物 taxuyunnanin C 的远程¹³C 偶合,观察到在异戊二烯单元的形成过程中一个来自葡萄糖的三碳前体发生分子内重排。这些实验结果表明紫杉烷骨架的生物合成不是经过乙酸/马瓦茱酸途径^[7],而是经过甘油醛 3-磷酸酯/丙酮酸途径^[8]。

目前的实验已证明,紫杉环骨架是由 GGPP (geranylgeranyl pyrophosphate) 环化而来的。GGPP 环化形成紫杉二烯(紫杉环骨架)然后此双萜萜中间体进行不同程度的氧化(官能化),形成完整的紫杉环系统^[9]。从太平洋紫杉(*T. brevifolia*)幼苗得到的游离细胞制备物能催化[1-³H] GGPP 形成一个环化的双萜烯,当接种到茎切段时,能以很高的放射化学产率转换成一些高度官能化的紫杉烷类化合物如 10-deacetyl-baccatin 及紫杉醇等。加入标记的 GGPP 到紫杉茎提取液中,并进行放射化学方面的分离,最后通过二维 NMR 光谱方法证实 GGPP 环化的产物紫杉二烯的结构为 4(5),11(12)-taxadiene,因此紫杉醇生物合成的第一步重要反应应是自然界广泛存在的双萜烯前体 GGPP 环化形成 4(5),11(12)-taxadiene,而不是原先基于很多紫杉烷化合物在 4(20),11(12)位置存在的双键结构而推测的 4(20),11(12)-taxadiene^[10]。

1.1.2 紫杉烷碳环骨架的官能化反应

随着紫杉烷碳环骨架的建立,环上复杂的官能化反应亦随之发生。这些基团官能化包括:羟基化、羟基组上的酰基化、酮基化、苯基化以及环氧系统的

生成等。目前已知的第一步官能化反应是紫杉二烯的 C5 在细胞色素 P450 作用下的羟基化,形成 5 α -hydroxy-4(20),11(12)-taxadiene^[11]。其他的官能化反应发生的顺序目前还缺少直接的实验数据。但通过天然产生的紫杉烷类化合物的结构比较可获得一些信息^[12]。目前分离到的最低官能化产物至少有二个氧取代,于 C5 和 C10 位上,因此在反应顺序中此二个氧反应可能是首先进行的,然后是 C2 及 C9 位上氧化,但是存在于氧化基团上的一些酰基化反应可能先于新的氧化反应发生之前。C7 及 C1 位上氧化反应可能是较后进行的,后者可能甚至在氧环形成之后产生,环氧化反应及氧环形成是最后步骤,但先于 C13 位与侧链前体的酰基化及 C9 位上的酮基化反应^[2]。研究清楚 C13 位氧化顺序是非常重要的,上述推测的中间体或紫杉烷的官能化反应都不含有 C13 位羟基。而目前从天然红豆杉中分离到的紫杉烷类化合物中绝大部分均含有 C13 位羟基^[12]。经饲喂试验已证明诸如 taxusin^[2]等及其相应的四醇都不是紫杉醇生物合成的中间体,因此我们推测紫杉二萜中的 C13 位羟基化,是该二萜骨架官能化作用的终止符。C13 位羟基化反应形成之后(即形成 baccatin)的生物合成反应在紫杉环骨架上最没有骨架碳原子的官能化反应了。这些推测还需经过试验证明之后才能得以证实。紫杉环骨架官能化反应的最终结果是形成紫杉醇的直接前体 baccatin, baccatin- C13 位羟基与侧链产生酯化反应生物合成终产物紫杉醇。这个结论已早有报道^[13]。

1.2 紫杉醇侧链的生物合成

天然紫杉烷类化合物的侧链有三种形式:N-酰基(2R,3R)-3-苯基异丝氨酸、(3R)-N,N-二甲基-苯丙氨酸(Winstein's acid)和桂皮酸(图 2)。早在 1966 年,Leete 和 Bodem 等通过饲喂 D,L-[3-¹⁴C]苯丙氨酸、化学降解饲喂产物,发现产物 92% 的放射性在(3R)-N,N-二甲基-苯丙氨酸的 3 位碳上,从而推测(3R)-N,N-二甲基-苯丙氨酸是来源于苯丙氨酸的桂皮酸的氨加成产物^[14]。然而,十八年后,Haslam 等^[15]报道在苯丙氨酸转化为(3R)-N,N-二甲基-苯丙氨酸的过程中,失去 *pro*-3R 氢且保留 *pro*-3S 氢;而苯丙氨酸脱氨生成桂皮酸时,失去 *pro*-3S 氢,否定了 Leete 和 Bodem 等的推测。Strobel 等^[16]在 *Taxus brevifolia* 的韧皮组织饲喂泛¹⁴C 标记的 L-苯丙氨酸,产物紫杉醇中有 5.8% 的放射性。该紫杉醇碱水解后,76% 的放射性分布在水相,24% 在有机相。该研究小组还在真菌 *Taxomyces*

andreanae 的发酵液中饲喂了泛 ^{14}C 标记的 L-苯丙氨酸,其产物紫杉醇和 baccatin^[17] 都掺含有放射性。然而,真正用实验来探讨紫杉醇的 N-苯甲酰基 3-苯基异丝氨酸生物合成过程的是 Floss 研究小组^[2]。在使用 *T. brevifolia* 饲喂实验^[18] 和体外实验^[19] 的基础上,他们提出 3-苯基异丝氨酸的形成过程可能与 *Bacillus brevis*^[20] 中酪氨酸转化为 -酪氨酸或 *Streptomyces* L-1689-23^[21] 中 -赖氨酸转化为 -赖氨酸类似,是一个分子内氨基从 1 位到 2 位的迁移反应^[18,19,22]。Floss 等合成了一系列带标记的可能的侧链合成中间体,然后把这些前体分别饲喂到太平洋紫杉的茎及内皮层组织中,共培养 96 小时后,分析其中的化学成分,经分析后,作者得出以下结论:桂皮酸及其环氧化物未结合到紫杉醇上,L-苯丙氨酸、-苯丙氨酸和苯基异丝氨酸能明显地结合到紫杉醇上,所有同位素均滞留在侧链上。这些数据表明紫杉醇的侧链的酰基苯基异丝氨酸是通过 -苯丙氨酸而来。N-上的苯甲酰基亦是通过 -苯丙氨酸而来的^[18]。紫杉醇侧链是苯丙氨酸可能通过一个氨基转移酶的反应,产生 -苯丙氨酸,然后 C2 位羟基化及 C3 上氨基的苯甲酰化生成紫杉醇的侧链^[23]。苯甲酰基部分也是通过 -苯丙氨酸及可能的苯基异丝氨酸而不是通过桂皮酸降解而来。在植物细胞悬浮培养系 *T. Media* 中饲喂 ^{13}C 标记的 -苯丙氨酸和桂皮酸却显示紫杉醇中的两个苯甲酰基都来源于桂皮酸,而 ^{13}C 标记的 -苯丙氨酸饲喂实验所产生的紫杉醇中没有 ^{13}C 增强信号^[24]。上述文献数据表明在植物细胞悬浮培养系和植物组织中,从苯丙氨酸形成紫杉醇侧链(N-苯甲酰基 3-苯基异丝氨酸)的途径可能不同。郝小江等鉴于从云南红豆杉分离得到一微量成分,13-桂皮酰基 baccatin⁻,主张复合 Leete 和 Bodem 等的假说:紫杉醇中

C13 位的 3-苯基异丝氨酸基可能是同一位置上的桂皮酰基双键的水合氨化产物;而 Floss 则认为 13-桂皮酰基 baccatin⁻ 可能是 13- -苯丙氨酸基 baccatin⁻ 的脱氢产物。平息该争执的实验应当是饲喂同位素标记的 13-桂皮酰基 baccatin⁻,有关研究还在进行之中^[24]。

1.3 紫杉环系统与侧链的酯化反应

关于侧链与紫杉烷 C13 位羟基的连接, Potier^[25] 提出了一个假说,认为含氮的侧链如 -苯丙胺酸以及其衍生物(3R)-N,N-二甲基- -苯丙胺酸先是连接在没有氧丁环的紫杉烷中间体的 C5 位,尔后经过一步分子内酯基迁移转移到 C13 位上。Floss 等^[2] 的研究结果表明: -苯丙胺酸或 3-苯基异丝氨酸连接到 baccatin⁻ 的 C13 位和随后的 N-苯甲酰化是紫杉醇生物合成途径的最后反应步骤。至于侧链 C2 位上的羟基化和 N-苯甲酰化的先后顺序,目前还未完全得以证实。

综上所述,紫杉醇生物合成的基本途径已经明了(图 1),但要完全研究清楚其每一步反应途径,还需要进行大量的研究工作和加倍的努力^[26]。对紫杉醇生物合成途径的研究为我们进行其生物合成途径中关键酶的提取、分离及纯化,最终克隆到其关键基因,并通过基因工程手段来实现紫杉醇的工业化生产提供了基础。

2 紫杉醇生物合成中的关键酶

目前,对紫杉醇生物合成过程中的关键酶研究已取得一些积极进展^[3,27-29]。早在 1992 年, Lewis 和 Croteau 等人就从太平洋紫杉树皮中制备到一种粗酶提取物,这种粗酶提取物具有催化 GGPP 环化形成 4(5),11(12)-taxadiene 的能力^[27],只是反应的产率很低。此后他们部分纯化到了这种环化酶,又

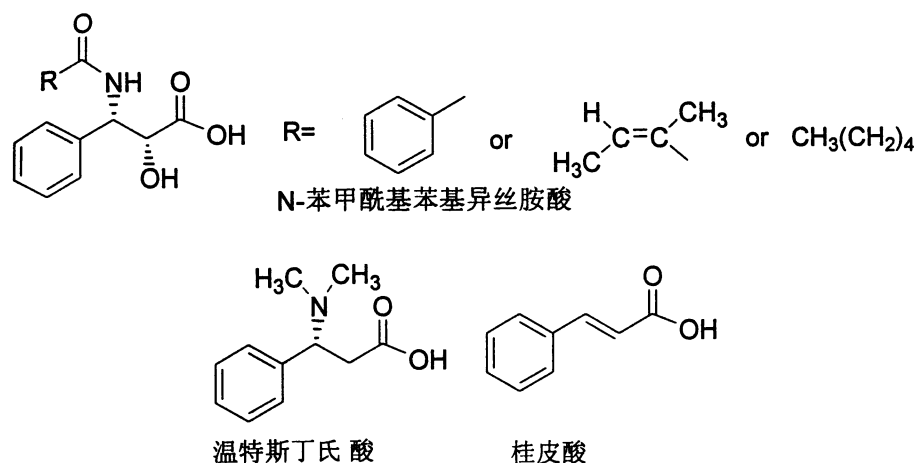


图 2 天然紫杉烷类化合物中常见的侧链结构

称紫杉二烯合成酶,同时测定了此酶的性质。他们通过酶的催化反应证实由 GGPP 环化成 4(5),11(12)-taxadiene 的合成步骤是紫杉醇生物合成过程中的一个限速反应步骤。紫杉二烯合成酶与其他植物的萜类环化酶在很多性质上是相似的,但要纯化到足够量的酶来制备抗体及进行 cDNA 克隆是非常困难的。由于已经证实在紫杉醇生物合成途径中,由 GGPP 环化成紫杉二烯是一个慢的或限速的反应步骤,因此增强环化反应就会提高紫杉烷的含量,所以环化酶就是一个用作基因分离的最好的目标。Croteau 等在成功地分离到环化酶之后,于 1996 年又成功地克隆到了环化酶的 cDNA^[29]。为了获得相应的 cDNA 克隆,他们根据相关单萜、倍半萜及双萜环化酶的一致序列构建了一系列的简并引物,在这些引物中,两个能扩增在序列上与环化酶相似的片段的引物被用来作为筛选从太平洋紫杉茎中提取的 Poly(A) RNA 中构建的 cDNA 库的杂交探针,他们共分离到 12 个插入位点超过 1kb 碱基对的独立的克隆,并且已部分得到他们的序列顺序,这些 cDNA 克隆中的一个在大肠杆菌中具有表达功能,产生的一个蛋白质具有催化活性,能催化 GGPP 形成 4(5),11(12)-taxadiene。序列指定一个有 2586 个核苷酸的公开可读的结构,一个完全推断的多肽,包括一个长的假定的质粒靶多肽,含有 862 个氨基酸残基,分子量为 98303da,而原先的酶的分子量为 79000da,与植物中单萜、倍半萜和双萜环化酶的序列相比较^[30],证明在这些酶之间具有相当高的同源性。此紫杉二烯合成酶与从冷杉中得到的一种二萜环化酶即松香烯合成酶最为相似(46 %同源)^[31]。

此后,他们又成功地利用细胞色素 P450 中的氧化酶,实现了紫杉二烯中 C5 位的羟基化,该反应也被认为是一个慢速反应^[11]。

此外,有人报道在东北红豆杉(*T. cuspidata*)细胞培养中,存在于微粒体中的 HMGR(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)活性与紫杉醇积累之间的关系^[31],此酶对于甲羟戊酸的合成来说是必要的,并且在光生长的细胞中具有明显的活性。最近据报道,美国的 Cytolonal 公司已得到生产在紫杉醇生物合成过程中关键限速步聚酶的红豆杉树基因的许可证^[4]。此基因也就是由 Croteau 等人分离到的,他们宣布:“已拥有能使我们简单地提高生产效率的基因”。虽然目前该公司尚未决定如何利用该基因,但其中一个可能是直接向产生紫杉醇的真菌中导入,以产生具有较高紫杉醇产量的转基因真菌。

乙酰基在紫杉烷类化合物中相当常见,因此可以认为乙酰基转移酶也是一类起重要作用的酶。Croteau 等^[32]报道紫杉二烯的 C5 羟基化之后,紧接着的是该羟基的乙酰化。Zocher 等^[33]用 *T. Baccata* 根的无细胞粗酶催化了 10-去乙酰基 baccatin 转化为 baccatin,但是他们没有证明该反应是否是专一性反应。沈月毛等^[24]使用提取自 *T. Media* 的无细胞粗酶,通过底物竞争反应,证明了 10-去乙酰基 baccatin 在酶催化下专一性地转化为 baccatin,而 10-去乙酰基 taxol 在同样条件下不能转化为 taxol,从而说明 10-去乙酰基 baccatin 转化为 taxol 是 taxol 生物合成途径的正常步骤,10-去乙酰基 taxol 则可能是 taxol 的去乙酰降解产物。由此推测,天然紫杉烷类化合物的普遍酰基化现象可能是由于专一性和非专一性的酰基转移酶共同作用造成的,这也是影响紫杉醇产量的主要因素。因为在红豆杉中,尽管紫杉烷的含量很低,然而总紫杉烷的含量却相当可观(>1%)。因此,通过抑制非专一性酰基转移酶的活性或提高专一性酰基转移酶的活性,有可能在一定程度上提高紫杉醇的产量。

总之可以预测,不久的将来,利用基因工程大量生产紫杉醇可能成为现实。

参考文献

- [1] 梅兴国,胡道伟,李春光. 国外医药·植物药分册,1996,11, 247
- [2] Floss H G, Mocek U. Biosynthesis of Taxol in Taxol: Science and Applications, Suffness M Ed, CRC: Boca Raton: FL, 1995
- [3] Widung M. R, Croteau R J. Bio. Chem. 1996, 271, 9201
- [4] 孙雷心. 生物技术通报, 1997, (1): 32 (译自: Bechnology News, 1996, 16: 2)
- [5] Zamir L O, Nedeak ME, Garneau FX. Tetrahedron Lett 1992, 33: 5235
- [6] Eisenreich W, Menhard B, Hylands PJ, Zenk MH, Bacher A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 431
- [7] Voet D, Voet J G. Biochemie, VCH: Weinheim, 1994, P. 639
- [8] Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H. Biochem. J. 1993, 295, 517
- [9] Koepp AE, Hezari M, Croteau R. J. Bio. Chem. 1995, 270, 8686
- [10] Croteau R, Hezari M, Hefner J, Koepp A, Lewis NG. Paclitaxel Biosynthesis: The Early Steps in Taxane Anticancer Agents: Basic Science and Current Status, Geory GI, Chen TT, Ojima I, Vyas DM. Eds. American Chemical Society: Washington, DC, 1995, p72
- [11] Hefner J, Croteau R. Chemistry and Biology, 1996, 3, 479
- [12] Kingston DGI, Molinero AA, Rimoldi JM. Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 1993, 61, 1
- [13] Fleming PE, Floss HG, Haertel M. Biosynthetic studies on tax-

- ol. Pure & Appl Chem ,1994 ,66 :2045
- [14] Leete E ,Bodem GB. Tetrahedron Lett ,1966 ,3925
- [15] Platt RV ,Opie CT ,Haslam ,E. Phytochemistry 1984 ,23 ,2211
- [16] Strobel GA ,Stierle A ,van Kuik FJ GM. Plant Sci 1992 ,84 ,65
- [17] Stierle A ,Strobel G ,Stierle D. Science ,1993 ,260 ,214
- [18] Fleming PE ,Mocek U ,Floss HG. J. Am. Chem. Soc. 1993 ,115 ,805
- [19] Walker KD ,Floss HG. J. Am. Chem. Soc. 1998 ,120 ,5333
- [20] Parry RJ , Kurylo-Borowska Z. J. Am. Chem. Soc. 1980 ,102 ,836
- [21] Thiruvengadam TK ,Gould ST ,Aberhart DJ ,Lin H. J. Am. Chem. Soc. 1983 ,105 ,5470
- [22] Rohr J. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1997 ,36 ,2190
- [23] Fleming PE ,Knaggs AR ,Floss HG. J Am Chem Soc ,1994 ,116 :4137
- [24] 沈月毛 ,博士学位论文 ,中国科学院昆明植物研究所 ,1998
- [25] Gueritte-Voegelein F ,Guenard D ,Potier P. Taxol and derivatives ,a biogenetic hypothesis J. Nat. prod. 1987 ,50 ,9
- [26] Heinsteins PF ,Chang CJ. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol ,1994 ,45 ,663
- [27] Hezari M ,Lewis NG ,Croteau R. Arch Biochem Biophys. 1995 ,322 ,437
- [28] Lin XY ,Hezari M ,Koepp AE. Biochemistry 1996 ,35 ,2968
- [29] Hezari M ,Ketchum REB ,Gibson DM. Arch Biochem Biophys. 1997 ,337 ,185
- [30] Chappell J. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1995 ,46 ,521
- [31] Fett-Neto AG ,Pennington JJ ,DiCosmo F. J Plant Physiol. 1995 ,146 ,584
- [32] [30] Hezari M ,Croteau R. Planta Med. 1997 ,63 ,291
- [33] Zocher R ,Weckwerth W ,Hacker C ,Kammer B. Hornbogen T ,Ewald D. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996 ,299 ,16

Recent Advance on Taxol Biosynthesis

Can Fanyuan Shen Yuemao and Hao Xiaojiang

(Kunming Institute of Botany ,Chinese Academy of Sciences ,Kunming ,650204)

Abstract Recent advances in the studies on taxol biosynthesis and concerning key enzymes were reviewed in this paper. Now ,the taxol biosynthesis pathway has been studied more in details ,and the gene of taxadiene synthase ,a diterpene clase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis has been cloned successfully. This means that the mass production of taxol on the level of molecular and gene will be achieved rapidly in the future.

Key words Taxol ,Biosynthesis ,Key enzyme