

紫杉醇生物合成途径中相关酶的研究进展^{*}

黄 新 黄璐琦

(中国中医研究院中药研究所 北京 100700)

邱德有

(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091)

摘要 抗癌新药紫杉醇是具有萜类环状结构的一种重要次生代谢产物,研究紫杉醇的生物合成对于通过基因工程手段提高紫杉醇的产量,解决目前资源紧缺造成的巨大供求矛盾具有重要意义,这就需要对紫杉醇生物合成途径中催化各步反应(尤其是关键步骤)的酶以及编码这些酶的基因有个全面的了解。对近年来紫杉醇生物合成途径中相关酶的研究进行了综述,大部分酶及相关基因已被分离、克隆,但还有一些酶及相关基因没有发现,有待继续深入研究。

关键词 紫杉醇 生物合成 相关酶

紫杉醇(taxol)是 Wall 及其合作者首次从短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中分离得到的一种重要的次生代谢产物^[1],是迄今为止少数几个最具抗癌活性的天然化合物之一。1992 年 12 月 29 日,美国 FDA 正式批准紫杉醇作为治疗晚期卵巢癌的新抗癌药物(商品名为 Paclitaxel),它对卵巢癌、乳腺癌等均有显著疗效^[2,3],目前已进入临床使用。由于紫杉醇在植物体中的含量相当低(目前公认含量最高的短叶红豆杉树皮中也仅有 0.069%),加之紫杉醇本身资源很贫乏,而且红豆杉属植物生长缓慢,这对紫杉醇的进一步开发利用造成了很大的困难。长期以来科学家们为解决这一巨大供求矛盾做出了很大的努力,包括筛选高产红豆杉栽培品种、化学合成、基因工程、细胞培养、真菌发酵、寻找紫杉醇类似物等,在寻找及扩大紫杉醇药源途径的研究上取得了极大的进展。化学合成尽管已完成,目前已有几个设计精美的化学全合成路线,但由于产量低,费用高,不具有商业意义;化学半合成虽然效率较高,但其主要合成原料 10-deacetylbaccatin 必须从紫杉树中分离得到^[4],而植物组织中半合成前体的纯化工作较难;于是人们都在努力地通

过生物技术这一替代方法来产生紫杉醇和其他用于半合成的紫杉烷类物质。因此,在将来的一段时间内,紫杉醇及其半合成前体的供应,将继续依赖于生物学方法,即通过红豆杉植物或者从这些植物中得到的细胞培养来获得。同时,可以通过基因操作,提高关键酶的表达量,从而提高紫杉醇生物合成的水平,这就要求对紫杉醇的生物合成途径、催化各步反应(尤其是关键步骤)的酶以及编码这些酶的基因有个全面的了解,本文对近年来紫杉醇生物合成途径中相关酶的研究进行了综述。

1 紫杉醇骨架生物合成中相关酶的研究

紫杉醇的紫杉烷骨架是由牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate; GGPP)环化而成,由 GGPP 合成酶催化。尽管该酶催化的不是紫杉醇生物合成的关键步骤,但它提供了二萜类生物合成的通用前体。Hefner J 等^[5]从诱导的加拿大红豆杉细胞 cDNA 文库中获得了编码异戊烯转移酶(prenyltransferase)的 cDNA 克隆,该克隆在酵母中表达得到其重组酶,放射色谱分析表明该酶能催化法呢基焦磷酸(farnesyl diphosphate)和异戊烯醇焦磷酸酯(isopentenyl diphosphate)产生 GGPP,并且符合初级动力学特性。该裸子植

^{*}国家自然科学基金资助项目(批准号:39970603)

物的 GGPP 合成酶 (Geranylgeranyl diphosphatesynthase) (含 393 个残基) 与被子植物 GGPP 合成酶在氨基酸序列特征方面很相似, 只是在前者 N-端具有一段 90 - 100 个氨基酸残基长度的质体转移肽。将全长的前体蛋白 (42.6ku) 和两个转移肽被敲除的成熟蛋白分别导入酵母突变体, 功能互补试验显示, 前体蛋白重组体和被敲除最长转运肽的重组体均能与突变体互补。但是当这两种重组体在野生型酵母菌株中过量表达时, 它们具有明显的毒性, 这可能是由于缺乏内源 FPP 作为联合底物引起的。SDS-PAGE 分析表明, 重组酶的体外活性与重组体表达水平平行, 并且与野生酵母菌的毒性和功能恢复突变株的能力有关。通过对加拿大红豆杉悬浮培养细胞中不同时期紫杉醇的产量来分析 GGPP 合成酶和对应的稳态 mRNA 水平, 结果表明, 茉莉酸甲酯诱导后每一个酶的催化活性和相应的 mRNA 水平都得以迅速的提高。紫杉醇生物合成的第一步限速反应由环化酶(二萜烯合成酶)催化^[6,7], Koepf A 等^[6]用 $[1-^3\text{H}]$ 标记的 GGPP 进行环化反应, 结果其产物为 *taxa-4(5), 11(12)-diene* 而不是 *taxa-4(20), 11(12)-diene*, 所得产物与红豆杉幼茎共培养后便可得到 10-去乙酰巴可亭和紫杉醇在内的多种紫杉烷化合物。早在 1992 年, Lewis 等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 *taxa-4(5), 11(12)-diene* 的能力。1995 年, 参与这一环化反应的二萜烯合成酶从太平洋红豆杉中得以分离并进行了部分纯化^[7], 该酶是一个单体蛋白, 分子量为 79000u。其对二价金属离子的需求、动力学常数及分子量等一般特性与其它裸子植物的二萜烯合成酶相似, 但在最适 pH 值和对抑制因子的响应度上却有着明显的不同。1996 年, Lin 等^[8]对其作用机理进行了研究, 认为 GGPP 先在 C11 位上的 β -质子转移到 C7 上, 形成 *verticillyl* 阳离子中间体, 接着 *verticillyl* 阳离子 C11 上的质子转移到 C7 位上, 最后 C5 位去质子形成 *taxa-4(5), 11(12)-diene*, 后来 Williams DC 等^[9]又对该反应中的分子内质子转移进行了研究, 探讨了环化机制。认为它包括 A 环闭合的二磷酸盐电离作用和 C11 质子到 C7 的新表面以促进 B/C 环连接处的闭合及最后的 C5-

面的质子清除。为了获得相应的 cDNA 克隆, Wildung MR 等^[10]根据相关单萜、倍半萜及二萜环化酶的一致序列构建了一系列的简并引物, 其中两对引物扩增了一个 83bp 的片段, 从序列上看, 该片段具有环化酶样作用, 以此为探针筛选以太平洋紫杉茎为材料构建的 cDNA 文库, 共分离到 12 个插入位点超过 2kb 的独立的克隆, 并且已部分得到他们的序列, 其中的一个 cDNA 克隆在大肠杆菌中具有表达功能, 其相应的蛋白能催化 GGPP 形成 *taxa-4(5), 11(12)-diene*。序列有一个含 2586 个核苷酸的开放阅读框, 其蛋白由 862 个氨基酸组成, 分子量为 98303。该紫杉二萜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)。为了更好地评价二萜烯合成酶的作用, Hezari M 等^[11]从一个能产生紫杉醇的可靠的加拿大红豆杉悬浮培养体系中分离出该酶, 该酶的各项特性与从太平洋红豆杉 (*Taxus Brevifolia*) 茎获得的酶一致, 通过对加拿大红豆杉悬浮培养不同时间紫杉醇的产量来分析该酶的催化活性, 结果表明, 尽管此步反应速度很慢, 但它仍然不是紫杉醇生物合成的限速步骤, 并且认为限速步骤应位于环化步骤的后面。Huang KX 等^[12]报道了一种应用可以增加表达蛋白溶解度的硫氧还蛋白融合表达体系, 对编码二萜烯合成酶的 cDNA 在大肠杆菌中进行异源过量表达, 经纯化的重组二萜烯合成酶融合蛋白在稳态动力学参数和硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳迁移率上与天然蛋白一致, 并且该蛋白具有预期的 N-端序列。Williams DC 等^[13]的研究认为二萜烯合成酶(环化酶)的前体蛋白具有一个 N-端靶序列, 用于定位和在质体中的加工。由于该成熟酶的切割位点不能直接确定, 于是建立了一系列 N-端敲除的酶, 其相应 cDNA 在合适载体中表达, 每个酶都进行了纯化和动力学评价, 当失去 79 个氨基酸时能产生活性蛋白, 而失去 93 个或更多的氨基酸时会导致活性的丢失。前体蛋白丢失 60 个氨基酸的伪成熟形式在表达、纯化、溶解性、稳定性、催化活性上与天然酶相比具有优越性。该酶催化产物除了主要为 *taxa-4(5), 11(12)-diene* (94%) 外, 还有少量的异构体 *taxa-4(20), 11(12)-diene* (大约 5%) 和另一个暂时被认为是 *verticillene* (大约 1%)。

接下来的反应是由细胞色素 P450 介导的羟甲基化(烯丙基重排)形成 *taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α -ol*^[14], Hefner J 等^[15]发现用东北红豆杉茎段或太平洋红豆杉悬浮细胞的细胞微粒体制备物催化 *taxa-4(5), 11(12)-diene* 成 *taxa-4(20), 11(12)-diene-5 α -ol*, 并被太平洋红豆杉茎段切片进一步转变成 10-去乙酰巴卡亭、cephalomannine 和紫杉醇。这种加氧酶是红豆杉细胞微粒体细胞色素 P450, 由它催化紫杉醇骨架生物合成的第一步氧化反应。由于此步反应相当慢, 因此, 很可能是紫杉醇骨架生物合成的限速步骤。然后是其反应产物 *taxadienol* (紫杉二烯醇) 进一步的氧化和酰化反应。为了证明 *taxadienol* 及其相应的醋酸酯是否为接下来氧化反应的直接前体, Wheeler AL 等^[16]从诱导的紫杉细胞中分离出细胞色素 P450 酶, 对每一个底物进行实验, 结果表明 *taxadienol* 和 *taxadienyl acetate* 都被细胞色素 P450 酶氧化成二元醇和多元醇, 从 *taxadienyl acetate* 得来的产物经 GC-MS 鉴定为 *taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α -acetoxyl-10 β -ol*, 这表明 *taxadienol* C5 上的酰化反应在细胞色素 P450 介导 C10 位 -羟化反应之前。并且认为余下的紫杉烷核的氧化顺序为 C10, 然后是 C2 和 C9, 接下来是 C13, 最后是 C7 和 C1。但 Jennewein S 等^[17]通过秋粘虫杆状病毒异源表达体系获得了紫杉烷 13- α 羟化酶, 该酶能催化 *taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α -ol* 形成 *taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α , 13 β -diol*。由于该酶的底物亦为紫杉二烯单氧化产物, 因此, 作者认为 13 位的羟化可能发生在紫杉醇生物合成途径的早期, 而不是像以前认为的那样。同时作者还认为紫杉醇的生物合成至少有两条途径, 一条经 *taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α , 10 β -diol-5-acetate*, 另一条经 *taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α , 13 β -diol*, 或者两条途径在后期以多羟化中间体的形式相交。

紫杉醇生物合成的第一步酰化反应是在 *taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α -ol* 上进行的。*taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α -O* 乙酰转移酶已于 1999 年由 Walker K 等^[18]分离得到并进行了部分纯化, 他们从茉莉酸甲酯诱导能产生紫杉醇的加拿大红豆杉和东北红豆杉中获得 *taxadienol-O*-乙酰转移酶, 该酶通过放射色谱和 GC-MS 分析

得以鉴定, 并且经过阴离子交换、疏水作用和固相辅酶 A 树脂亲和层析进行部分纯化。实验表明该酶的最适 pI 和 pH 值为 4.7 和 9.0, 分子量为 5000。该酶对 *taxadienol* and *acetyl CoA* 具有高选择性和亲和力, 并且不催化高一级的紫杉醇前体, 如: 10-去乙酰巴卡亭 或巴卡亭。该酶对一价和二价金属离子也不敏感, 只被对-羟汞苯甲酸酯、N-己基顺丁烯二酰亚胺和辅酶 A 微弱地抑制, 而其一般特性与其他高等植物的一些 O-乙酰转移酶相象。2000 年 Walker K 等^[19]又成功地获得了该酶的 cDNA 克隆并在大肠杆菌中进行了表达。他们从茉莉酸甲酯诱导的紫杉细胞中分离到了 *taxa-4(20), 11(12)-dien-5 α -ol-O-acetyl transferase*, 并进行了部分纯化和特性研究。采用修订的纯化方法获得了该酶的内源氨基酸序列, 并据此设计引物扩增转乙酰酶基因特异片段得到 900bp 的扩增产物, 经放射性标记后以此为探针筛选 M13 诱导的紫杉细胞 cDNA 文库获得全长基因序列。该克隆在大肠杆菌中功能表达, 所得酶的催化产物经放射化学分析结合毛细管 GC-MS 验证为乙酰化产物。该全长 DNA 具有 1317 个核苷酸的开放阅读框, 与天然酶具有高度的序列一致性。该 DNA 编码单体蛋白, 分子量为 49079, 同时具有 N-端器官靶信息。*taxadien-5 α -ol-O*-乙酰转移酶与其他一些植物来源酰基转移酶的序列比较具有 64%~67% 的相似性。并且认为该酶的高催化效率表明该步酰化反应是提高紫杉醇产量的重要基因控制位点。

继 C5 位羟化之后的第二步羟化反应是在 C10 上羟化, 该步反应也是由细胞色素 P450 催化的。该酶的 cDNA 克隆已于 2001 年由 Schoendorf A 等^[20]获得并在酵母中进行了表达。他们基于用茉莉酸甲酯诱导能提高紫杉醇产量的原理, 采用 mRNA 差异显示的方法, 分别以经茉莉酸甲酯诱导 16 小时和未经诱导的 *Taxus cuspidata* 细胞为材料提 RNA, 反转录成 cDNA 作为 PCR 的模板, 以细胞色素 P450 特有序列: CC(T/A/G/C)TT(C/T)GG 作为引物代替随机引物, 锚定引物为 (dT)₉N-1N-1(N-1=A, G, 或 C), 进行差别显示, 经文库筛选及数据处理, 13 个克隆属于一个细胞色素 P450 家族, 它们与 CYP 家族 85, 88 和 90 相象。所得的 13 个克隆经纯化后连

入 pYeDP60 表达载体在酵母中表达,通过喂饲放射性同位素底物对其特定功能进行鉴定,其中有一个克隆具催化功能,并且其催化产物经放射性 HPLC、GC-MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 分析确定为 taxadine-5-acetoxy-10-ol。于是成功地分离到了细胞色素 P450 酶—10-hydroxylase 基因,该基因由 1494bp 组成,编码 498 个氨基酸残基,分子量为 56690。

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巴卡亭,巴卡亭上 C-13 位羟基与侧链产生酯化反应生物合成终产物紫杉醇^[21]。目前研究发现从 10-去乙酰紫杉烷到

巴卡亭的合成需经两步反应,催化该两步反应的酶及其相应的 cDNA 克隆均已分离得到。其中 2-O-苯甲酰转移酶的 cDNA 克隆是 Walker K 等^[22] 从东北红豆杉中分离得到,他们采用同源 PCR 克隆策略产生酰基转移酶寡核苷酸探针,用于筛选由茉莉酸甲酯诱导的红豆杉细胞构建的 cDNA 文库,获得几个酰基转移酶的全长基因,并在大肠杆菌中表达。功能表达的苯甲酰转移酶能催化以 2-debenzoyl-7,13-diacetyl baccatin III 和 benzoyl-CoA 为联合底物的酰化反应,是紫杉醇生物合成中的一个晚期酰化步骤,其产物经放射性

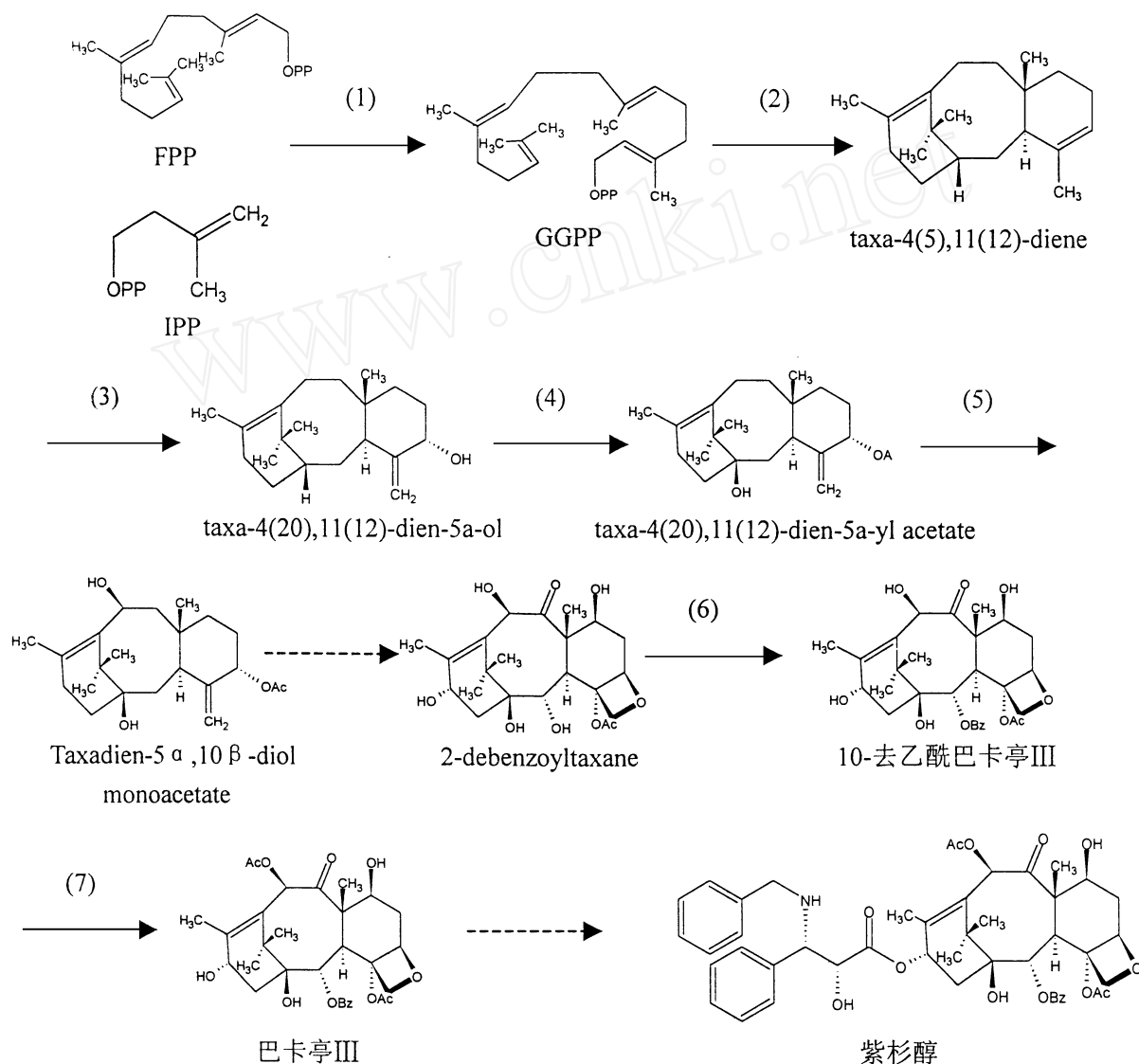


图1 紫杉醇生物合成途径

(1) GGPP 合成酶, (2) 二萜烯合成酶, (3) 紫杉烷 5-羟化酶, (4) taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol-O-乙酰转移酶, (5) 紫杉烷 10-羟化酶, (6) 2-O-苯甲酰转移酶, (7) 10-去乙酰巴卡亭-10-O-乙酰转移酶

HPLC、¹H-NMR 和 HPLC-MS 鉴定为 7, 13-diacetylbaccatin III。该全长 cDNA 具有 1320bp 的开放阅读框,其编码的蛋白含 440 个氨基酸残基,分子量为 50089。酶的特性分析表明,该重组苯甲酰转移酶的最适 pH 值为 8.0,对紫杉烷底物和苯甲酰辅酶 A 的 K_m 值分别为 0.64 μ m 和 0.3 μ m,并对 2- α -羟基根类的酰化反应有明显的立体专一性。10-去乙酰巴卡亭-10-O 乙酰转移酶及其 cDNA 克隆也是由 Walker K 等^[23]分离得到的。他们从酰基转移酶的汇编软件和许多未知功能的假定蛋白获得它们的共有序列,采用同源 PCR 克隆策略,从紫杉中扩增出了推定的紫杉烷 C-10 羟乙酰转移酶的 911bp 起始片段。该扩增产物用于筛选茉莉酸甲酯诱导的紫杉细胞 cDNA 文库,获得了 10-deacetylbaccatin III-10-O-transacetylase 的全长序列。该全长基因的开放阅读框在大肠杆菌中表达得到了一个有功能的酶,以 10-deacetylbaccatin III 和 acetyl CoA 为底物进行催化反应,其产物经 ¹H-NMR 和 MS 验证为巴卡亭。该全长基因有一个 1320bp 的开放阅读框,其对应的蛋白为 440 个氨基酸残基,分子量为 49052,这与单体、天然乙酰转移酶一致。该重组酶的最适 pH 为 7.5,对 10-deacetylbaccatin III 和 acetyl CoA 的 K_m 值分别为 10 μ m 和 8 μ m。10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase 的氨基酸序列与 taxadienol-5-O-acetyl transferase 和其他植物来源的 acyl transferases(酰基转移酶)比较具有 80%和 64%~67%的相似性(具体合成途径见图 1^[24])。

2 紫杉醇侧链的生物合成中相关酶的研究

早在 1966 年,Leete 等^[25]对 (3R)-二甲基-3-苯丙氨酸(winterstein acid)的生物合成进行了研究,结果表明苯丙氨酸是 winterstein 的最好前体。Strobel^[26]和 Zamir^[27]都用放射性同位素标记的前体进行喂饲实验进一步证明了这个结论。后来 Fleming 等^[28]又对苯丙氨酸合成紫杉醇侧链的具体途径进行了研究。他们发现放射性同位素标记的肉桂酸及其环氧化物都未掺入到紫杉醇及其类似物三尖杉宁碱(cephalomannine,又称 taxol B)中,而同位素标记的 - 苯丙氨酸和苯基异丝

氨酸则掺入到紫杉醇和三尖杉宁碱的侧链中。因此认为紫杉醇的侧链是由苯丙氨酸在氨基变位酶的作用下形成 - 苯丙氨酸, - 苯丙氨酸经过 C2 位羟基化形成苯基异丝氨酸(phenylisoserine),最后经过 NH₂ 基的酰基化而形成的。

3 紫杉环系统与侧链的酯化反应中相关酶的研究

紫杉环骨架形成及进行官能化反应后形成了紫杉醇的直接前体巴卡亭,此前体与侧链苯基异丝氨酸可能在酯基转移酶作用下进行酯化反应,形成紫杉醇的一个中间体(去苯乙酰基紫杉醇),然后此化合物侧链苯基异丝氨酸 N-位上苯甲酰化,形成了紫杉醇。

4 结论与展望

可以说,科学家们在紫杉醇尤其是紫杉醇生物合成的研究上付出了很大的努力,尽管紫杉醇的整个生物合成途径已基本明了,但这与紫杉醇的商业化生产而满足用药需求、解决目前资源紧缺造成的巨大供求矛盾还差得很远。而且,紫杉醇生物合成途径中至少还剩下几个催化紫杉烷环(C1、C2、C5、C7 和 C9)和侧链发生氧化反应的羟化酶还没有发现,还有 C9 位上的羰基形成所需的酶以及其他一些酶也有待于继续研究。但是,随着紫杉醇生物合成的进一步深入研究,通过红豆杉细胞培养进行基因工程改造,对合成途径中的慢反应步骤进行基因操作,使这些酶基因过量表达,能够提高紫杉醇及其紫杉烷类似物的产量,也可通过顺义、反义技术来控制一些分支步骤以提高紫杉醇产量,或许我们还可以因此获得一些新型的紫杉醇衍生物,我们可以预测在不久的将来,紫杉醇的大量生产将变为现实。

参考文献

- [1] Wani M C, H L Taylar, Wall M E, et al. plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc, 1971, 93: 2325 ~ 2327
- [2] Arbuck S G, Blaylock B A. in taxol: Science and Applications (Suffness, M; Ed.). (1995) 370 ~ 415, CRC Press, Boca Raton, FL
- [3] Holmes F A, Kudelka A P, Kavanagh J J, et al. in taxane

- anticanceragents: Basic Science and Current Status (Georg G I, Chen, T T, Ojima I, and Vyas D M. Eds.), ACS Symposium Series 3, (1995), 31 ~ 57, American Chemical Society, Washington DC.
- [4] Jennewein S, Croteau R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, Oct; 57(1-2): 13 ~ 19
- [5] Hefner J, Ketchum RE, Croteau R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 360(1): 62 ~ 74
- [6] Koeppe AE, Hezari M, Zajicek J, et al. Cyclization of geranylgeranyl diphosphate to taxadiene is the committed step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *J Biol Chem*, 1995, 270(15): 8686 ~ 8690
- [7] Hezari M, Lewis NG, Croteau R. Purification and characterization of taxadiene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 322(2): 437 ~ 444
- [8] Lin X, Hezari M, Koeppe AE, et al. Mechanism of taxadiene synthase, a diterpene cyclase that catalyzes the first step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *Biochemistry*, 1996, 35(9): 2968 ~ 2977
- [9] Williams DC, Carroll BJ, Jin Q, et al. Intramolecular proton transfer in the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to the taxadiene precursor of taxol catalyzed by recombinant taxadiene synthase. *Chem Biol*, 2000, 7(12): 969 ~ 977
- [10] Wildung MR, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem*, 1996, 271(16): 9201 ~ 9204
- [11] Hezari M, Ketchum RE, Gibson DM, et al. Taxol production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 337(2): 185 ~ 190
- [12] Huang KX, Huang QL, Wildung MR, et al. Overproduction, in *Escherichia coli*, of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the Taxol biosynthetic pathway. *Protein Expr Purif*, 1998, 13(1): 90 ~ 96
- [13] Williams DC, Wildung MR, Jin AQ, et al. Heterologous expression and characterization of a "Pseudomature" form of taxadiene synthase involved in paclitaxel (Taxol) biosynthesis and evaluation of a potential intermediate and inhibitors of the multistep diterpene cyclization reaction. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 379(1): 137 ~ 146
- [14] Hefner J, Rubenstein SM, Ketchum RE, et al. Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of taxadiene to taxadien-5 α -ol: the first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chem Biol*, 1996, 3(6): 479 ~ 489
- [15] Hefner J, Rubenstein SM, Ketchum RE, et al. Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of taxadiene to taxadien-5 α -ol: the first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chem Biol*, 1996, 3(6): 479 ~ 489
- [16] Wheeler AL, Long RM, Ketchum RE, et al. Taxol biosynthesis: differential transformations of taxadien-5 α -ol and its acetate ester by cytochrome P450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 390(2): 265 ~ 278
- [17] Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, et al. Taxol biosynthesis: taxane 13 α -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(24): 13595 ~ 13600
- [18] Walker K, Ketchum RE, Hezari M, et al. Partial purification and characterization of acetyl coenzyme A: taxadien-5 α -ol O-acetyl transferase that catalyzes the first acylation step of taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 364(2): 273 ~ 279
- [19] Walker K, Schoendorf A, Croteau R. Molecular cloning of a taxadien-5 α -ol O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374(2): 371 ~ 380
- [20] Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, et al. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(4): 1501 ~ 1506
- [21] Fleming P E, Floss H G, Haertel M, et al. Biosynthetic studies on taxol. *Pure Appl Chem*, 1994, 66: 2045 ~ 2048
- [22] Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(25): 13591 ~ 13596
- [23] Walker K, Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetyl baccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(2): 583 ~ 587
- [24] Walker K, Croteau R. Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry*, 2001, 58: 1 ~ 7
- [25] Leete E, Bodem G B. The biosynthesis of 3-dimethylamino-3-phenyl propanoic acid in yew. *Tetrahedron Lett*, 1966, 7: 3925 ~ 3927
- [26] Strobel GA, Sierle A, F J G M van Kuijk. Factors influencing the in vitro production of radiolabeled taxol by Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Plant Science*, 1992, 84: 65 ~ 74
- [27] Zamir L O, Nedeau M E, Garneau F X. Biosynthetic building blocks of *Taxus canadensis* taxanes. *Tetrahedron Letters*, 1992, 33(36): 5235 ~ 5236
- [28] Fleming P E, Mocek U, Floss H G. Biosynthesis of taxoids. mode of formation of the taxol side chain. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 805 ~ 807

Progresses in the Study of Taxol Biosynthetic Enzymes

Huang Xin Huang Luqi

(Institute of Chinese Materia Medica China Academy of Traditional Chinese Medicine Beijing 100700)

Qiu Deyou

(Institute of Forestry Chinese Academy of Forestry Beijing 100091)

Abstract To improve production yield of taxol of *Taxus* cells, it is important to understand the pathway, the enzymes and the genes involved in Taxol biosynthesis, especially those enzymes that catalyze the committed steps and their corresponding genes. Recent progresses of the studies on the enzymes in Taxol biosynthesis pathway were reviewed in this paper. Up to now, about half of the enzymes and the corresponding genes of this important pathway have been studied and identified. The other enzymes and genes are still unknown and remain to be further studied.

Key words Taxol Biosynthesis Pathway Enzymes

《中国新药杂志》征订启事

《中国新药杂志》由国家药品监督管理局主管,中国药学会、中国医药集团总公司、中国医药科技出版社共同主办。是一份专门报道新药科研、生产、技术成果,临床应用及评价,新药质量、市场和管理方面内容,集学术、科研和信息交流服务为一体,具有很强的专业性、实用性和新颖性的权威性科技期刊。辟有论坛、综述、实验研究、药物化学、制剂研究、生物技术、质量与标准、临床药学、临床试验与生物统计、新药与临床、药物不良反应、新药介绍与评价、讲座、药品管理、药品保护、市场之行等十几个栏目。本刊被列为“中国期刊方阵‘双效’期刊”,已入选中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊)、全国中文药学核心期刊、中国生物医学期刊引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库期刊源期刊,并被《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》、《中国药学文摘》、《中文科技资料目录·中草药》等主要数据库和检索期刊收录;荣获首届《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》执行优秀奖。读者对象为高中级医药卫生工作者,广大从事药品研究、生产、临床、管理、经营、情报资料工作及医药院校师生。

为感谢广大读者对本刊的支持,凡订阅本刊 2003 年度的读者可直接获得“中国新药网(<http://www.newdrug.net.cn>)”的高级会员资格,可以免费上网查阅资料。

本刊为月刊,大 16 开本,每期定价 10 元,全年 120 元(含邮费),邮发代号:82-488。欢迎广大读者到本地邮局订阅,若有漏订者,请直接汇款至我刊编辑部。地址:北京市崇文区永外三元西巷甲 12 号《中国新药杂志》编辑部,邮编:100077,电话:(010) 87274021,87240527,(010) 67254449 转 2633,传真:(010) 87240527,E-mail: cnkj@public.fhnet.cn.net。银行汇款:工商银行北京新街口北展分理处,帐号:0200025509014401838。