

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.60853

吴迎梅, 廖庆刚, 尚轶, 龚振平, 苟君波. 多组学助力紫杉醇合成生物学研究[J]. 植物科学学报, 2022, 40(6): 853-866

Wu YM, Liao QG, Shang Y, Gong ZP, Gou JB. Recent progress of paclitaxel biosynthesis aided by multi-omics[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(6): 853-866

多组学助力紫杉醇合成生物学研究

吴迎梅¹, 廖庆刚², 尚轶^{1,2}, 龚振平³, 苟君波^{2*}

(1. 云南师范大学生命科学学院, 马铃薯科学研究院, 云南省马铃薯生物学重点实验室, 昆明 650500;

2. 中国农业科学院农业基因组研究所, 农业部基因组分析重点实验室, 广东省岭南现代农业实验室,

广东深圳 518124; 3. 唐山市农业科学研究院, 河北唐山 063001)

摘要: 紫杉醇是高效的天然抗癌产物, 广泛用于多种癌症的临床治疗。目前紫杉醇的生产主要是从红豆杉属 (*Taxus*) 植物中提取天然前体 (如巴卡亭Ⅲ) 然后再化学合成。受制于红豆杉植物资源, 导致制药成本高。合成生物学的兴起为紫杉醇原料药的获取提供了新途径, 但紫杉醇合成生物学的研究还有待推进。近年来, 多组学被逐步应用到紫杉醇的合成生物学研究中。本文综述了多组学助力紫杉醇合成通路基因、调控基因和异源合成研究的最新进展, 为紫杉醇的合成生物学研究提供了新的见解。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 多组学; 合成生物学

中图分类号: TQ463

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)06-0853-14

Recent progress of paclitaxel biosynthesis aided by multi-omics

Wu Ying-Mei¹, Liao Qing-Gang², Shang Yi^{1,2}, Gong Zhen-Ping³, Gou Jun-Bo^{2*}

(1. School of Life Science, The AGISCAAS-YNNU Joint Academy of Potato Sciences, Yunnan Normal University, Yunnan Key Laboratory of Potato Biology, Kunming 650500, China; 2. Shenzhen Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Shenzhen Key Laboratory of Agricultural Synthetic Biology, Genome Analysis Laboratory of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen, Guangdong 518124, China; 3. Tangshan Academy of Agricultural Sciences, Tangshan, Hebei 063001, China)

Abstract: Taxol (generic name paclitaxel) is a highly effective anti-cancer agent widely used in the clinical treatment of various cancers. At present, the production of paclitaxel is primarily based on artificial semi-synthesis from extracted intermediates (such as baccatin Ⅲ). This commercial method still relies on *Taxus* plant resources, resulting in high medical costs. The rise of synthetic biology provides a novel approach to acquire sufficient paclitaxel, but research on its biosynthesis is yet to be advanced. Recently, multi-omics approaches have been applied in biosynthesis research on paclitaxel. In the present paper, we review recent progress on the biosynthesis, regulation, and heterologous production of paclitaxel aided by multi-omics, providing new insights into paclitaxel biosynthesis.

Key words: *Taxus*; Paclitaxel; Multi-omics; Biosynthesis

红豆杉 (*Taxus*) 是古老的珍稀抗癌植物, 被称为“植物界的大熊猫”, 也是我国一级珍稀濒危保护植物^[1]。红豆杉科是从现存裸子植物门的柏目分化

出来, 与其亲缘关系最近的科是三尖杉科^[2]。红豆杉属约有 14 ~ 24 个种, 主要分布在欧洲、亚洲和北美洲^[3]。红豆杉植物具有很好的生态、经济和药用

收稿日期: 2022-06-07, 修回日期: 2022-07-18。

基金项目: 国家自然科学基金 (32000236); 国家重点研发项目 (2019YFA09006200)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (32000236) and the National Key R&D Program of China (2019YFA09006200)。

作者简介: 吴迎梅 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学 (E-mail: ymn243110@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: junbogou@163.com)。

价值，其因抗癌明星分子“紫杉醇”的发现而闻名^[4]。

紫杉醇的研究(图 1)简述如下：1958 年，美国癌症研究中心发起天然植物抗癌活性物质筛选计划；1963 年，Wani 和 Wall 发现红豆杉粗提物的细胞毒性活性；1967 年，Wani 等^[5]分离到抗肿瘤活性成分紫杉醇，并于 1971 年通过 X-射线分析确定了紫杉醇的结构。1979 年，紫杉醇抗肿瘤作用机制被解析^[6]，随后开展了临床试验^[7]。1991 年，实现从中间体巴卡亭 III 半合成紫杉醇^[8]。1992 年，FAD 首次批准卵巢癌二期临床试验^[9]，同年美国国会通过了《太平洋紫杉法案》，立法保护红豆杉物种^[10]。1994 年，FAD 批准乳腺癌二期临床试验^[11]，同年实现了紫杉醇全合成^[12]。紫杉醇生物合成通路多个结构基因和调控基因被鉴定，紫杉醇前体化合物在大肠杆菌、酵母、真菌以及植物底盘中实现从头合成^[13]。近年来，多组学技术(转录组^[14]、代谢组^[15]、蛋白组^[16]等)被应用到紫杉醇合成生物学研究中，推动着紫杉醇合成和调控机理的研究。2021 年，李闯团队将紫杉醇全合成路线从 24 步简化到 21 步^[17]；Beth Weaver 团队发现了紫杉醇治疗肿瘤的新机制，即诱导细胞

多级分裂和染色体不稳定^[18]；中国研究团队先后公布了南方红豆杉(*T. chinensis* var. *Mairei* (Lemée & H. Lév.) W. C. Cheng & L. K. Fu)^[19]、喜马拉雅红豆杉(*T. wallichiana* Zucc.)^[20]和云南红豆杉(*T. yunnanensis* W. C. Cheng & L. K. Fu)^[21]的基因组信息。

至今，紫杉醇依然是优秀和畅销的天然抗癌药物，广泛用于多种癌症(如卵巢癌和乳腺癌等)的临床治疗。然而，紫杉醇原药的供应仍依赖于红豆杉植物资源，受限于植物生长和环境等因素，加之近年来癌症患者激增，致使紫杉醇原药供不应求，部分癌症患者得不到治疗，从而失去生命^[22]。合成生物学的兴起为紫杉醇原料药的供应提供了新途径，但必须先解析其全部合成通路基因。多组学(如基因组、转录组、蛋白组和代谢组等)手段能从基因的染色体分布、时空表达、翻译修饰以及代谢物动态变化等方面为植物源天然产物合成路径的解析提供多维度信息。本文重点综述了多组学助力紫杉醇生物合成通路基因、调控基因以及异源合成等方面研究的最新进展，并对多组学、新方法及新技术助力紫杉醇合成生物学的研究进行了展望。

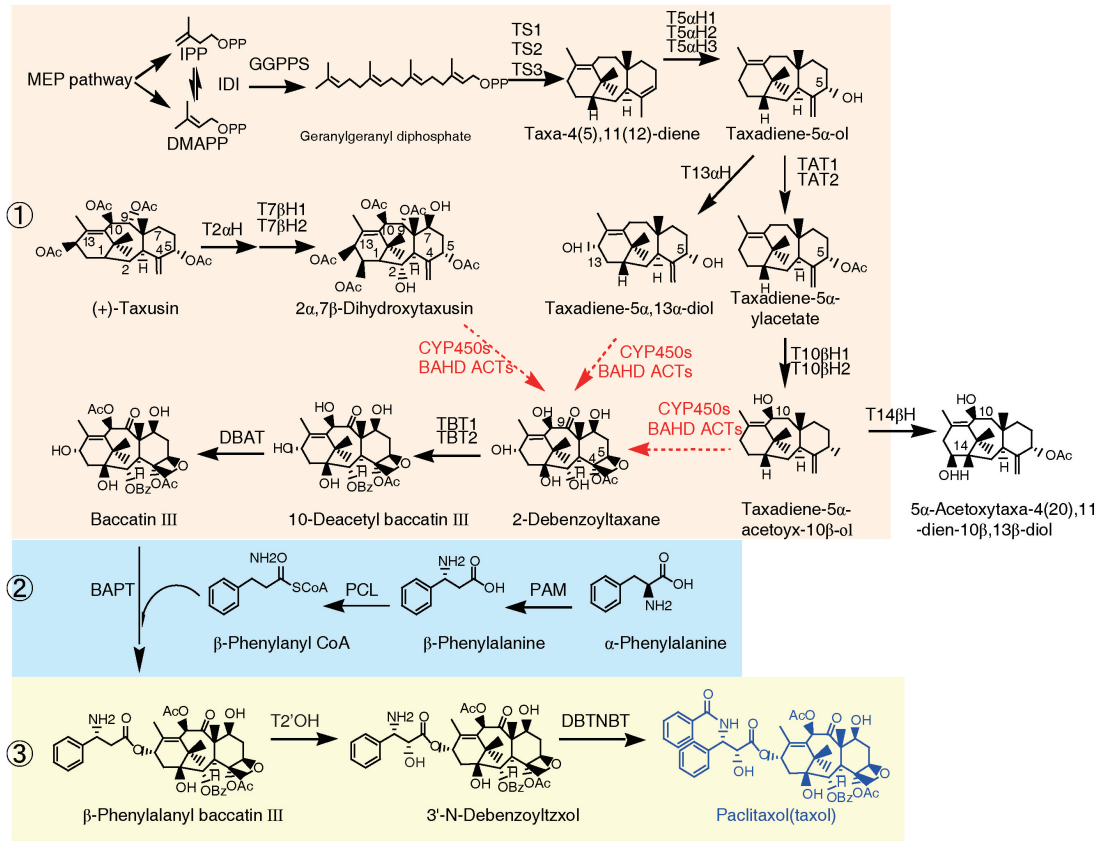


图 1 紫杉醇的研究历程
Fig. 1 Research history of paclitaxel
© Plant Science Journal <http://www.plantscience.cn>

1 紫杉醇生物合成通路的解析

紫杉醇生物合成通路包括 19 步酶促反应，分为 3 个阶段^[23]：①紫杉烷骨架生成巴卡亭Ⅲ；②侧链苯丙氨酸辅酶 A 的形成；③巴卡亭Ⅲ骨架 C13 酰基与侧链的连接以及修饰(图 2)。详细过程如下：首先，磷酸甲基赤藓糖醇途径 (Methylerythritol phosphate, MEP) 合成二萜化合物共同前体牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (Geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)，紫杉二烯合成酶 (Taxadiene synthase, TS) 催化 GGPP 形成紫杉烷骨架

紫杉二烯 [taxa-4(5), 11(12) - diene]，紫杉二烯进一步经多个 P450 酶的羟化或异构化 (C1、C2、C5、C7、C9、C10 和 C13 位) 生成巴卡亭Ⅲ；其次，苯丙氨酸氨基转移酶 (α -Phenylalanine, PAM) 和 β -苯丙氨酸-辅酶 A 连接酶 (β -Phenylalanine CoA ligase, PCL) 进一步将 α -苯丙氨酸异构化为 β -苯丙氨酸，并与乙酰辅酶 A 相结合生成 β -phenylalanyl CoA；第三，巴卡亭Ⅲ 3-氨基-3-苯丙醇基转移酶 (Baccatin Ⅲ: 3-amino-3-phenylpropanoyl-transferase, BAPT) 催化巴卡亭Ⅲ的 C13 位酰化 (酰基供体为 β -phenylalanyl CoA)，生



黑色实线箭头为已知的合成通路，红色虚线箭头为推测的合成通路。不同背景颜色表示紫杉醇生物合成通路的 3 个合成阶段。MEP pathway, MEP 途径；IPP, 异戊二烯焦磷酸；DMAPP, 二甲基烯丙基焦磷酸盐；GGPPS, 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合酶；TS, 紫杉二烯合酶；T5 α H, 紫杉二烯-5 α -羟化酶；TAT, 紫杉二烯-5 α -醇 O-乙酰基转移酶；T13 α H, 紫杉二烯 13 α -羟化酶；T2 α H, 紫杉二烯 2 α -羟化酶；T7 β H, 紫杉二烯 7 β -羟化酶；T10 β H, 紫杉二烯 10 β -羟化酶；T14 β H, 紫杉二烯 14 β -羟化酶；TBT, 紫杉烷 2 α -O-苯甲酰基转移酶；DBAT, 10-去乙酰巴卡亭Ⅲ 10-O-乙酰基转移酶；BAPT, 巴卡亭Ⅲ 3-氨基-3-苯丙基-13-O-转移酶；PAM, 苯丙氨酸氨基变位酶；PCL, β -苯丙氨酸-辅酶 A 连接酶；T2' α H, 紫杉烷 2' α -羟化酶；DBTNBT, 3'-N-去苯甲酰-2'-脱氧紫杉醇-N-苯甲酰基转移酶。

Black arrows represent known pathways and dotted red arrows represent speculated pathways. Different background colors represent three stages of paclitaxel biosynthetic pathway. MEP pathway; IPP, isopentenyl pyrophosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; GGPPS, geranylgeranyl pyrophosphate synthase; TS, taxadiene synthase; T5 α H, taxadiene 5 α -hydroxylase; TAT, taxadienol 5 α -o-acetyl transferase; T13 α H, taxoid 13 α -hydroxylase; T2 α H, taxoid 2 α -hydroxylase; T7 β H, taxoid 7 β -hydroxylase; T10 β H, taxoid 10 β -hydroxylase; T14 β H, taxoid 14 β -hydroxylase; TBT, taxane-2 α -O-benzoyltransferase; DBAT, 10-deacetyl baccatin Ⅲ-10-O-acetyltransferase; BAPT, baccatin Ⅲ: 3-amino-3-phenylpropanoyl transferase; PAM, phenylalanine aminomutase; PCL, β -phenylalanine-CoA ligase; T2' α H, taxane 2'- α -hydroxylase; DBTNBT, 3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol-N-benzo-yl-transferase.

图 2 红豆杉中推测的紫杉醇生物合成通路
Fig. 2 Speculated biosynthetic pathway of paclitaxel in *Taxus*

成 β -phenylalanyl baccatin III; 然后, 紫杉烷 2' α -羟基酶 (Taxane 2'- α -hydroxylase, T2' α H) 和 3'-N-去苯甲酰-2'-脱氧紫杉醇-N-苯甲酰基转移酶 (3'-N-Debenzoyl-2'-deoxytaxol N-penzoyl-transferase, DBTNBT) 分别催化 β -phenylalanyl baccatin III 侧链 C2' 位的羟化和 C3' 位的苯甲酰化, 最终形成紫杉醇。

目前, 紫杉醇生物合成通路中 14 步酶促反应已被成功解析^[24], 包括 6 个羟化酶 (T2 α H、T5 α H、T7 β H、T10 β H、T13 α H 和 T2' OH)、5 个转移酶 (BAPT、TAT、TBT、DBA 和 DBTNBT)、2 类环化酶 TS (TS1、TS2)、1 个变位酶 PAM 和 1 个 β -phenylalanyl-CoA 连接酶 (PCL)。其中, 12 个酶于 2004 年之前被鉴定, 而 PCL、T2' OH 和第二类环化酶 TS2 最近才被发现^[25]。不过, C1、C9 位氧化修饰, 4,5-环氧丙烷环的形成以及不同羟基化反应的顺序至今仍不明确。

1.1 紫杉二烯合酶

紫杉二烯合酶 (Taxadiene synthase, TS) 催化 GGPP 生成紫杉二烯 (Taxadiene)^[26], 是催化紫杉醇生物合成第一步的酶。1995 年, 通过传统生化方法, 证实了 TS1 酶在红豆杉中的存在; 随后, 通过同源克隆方法从多个红豆杉物种中均克隆到 TS1 基因的 cDNA 片段或全长, 因其序列相似性高 (90% 以上), 研究者们默认红豆杉植物中只存在一类 TS1^[27]。

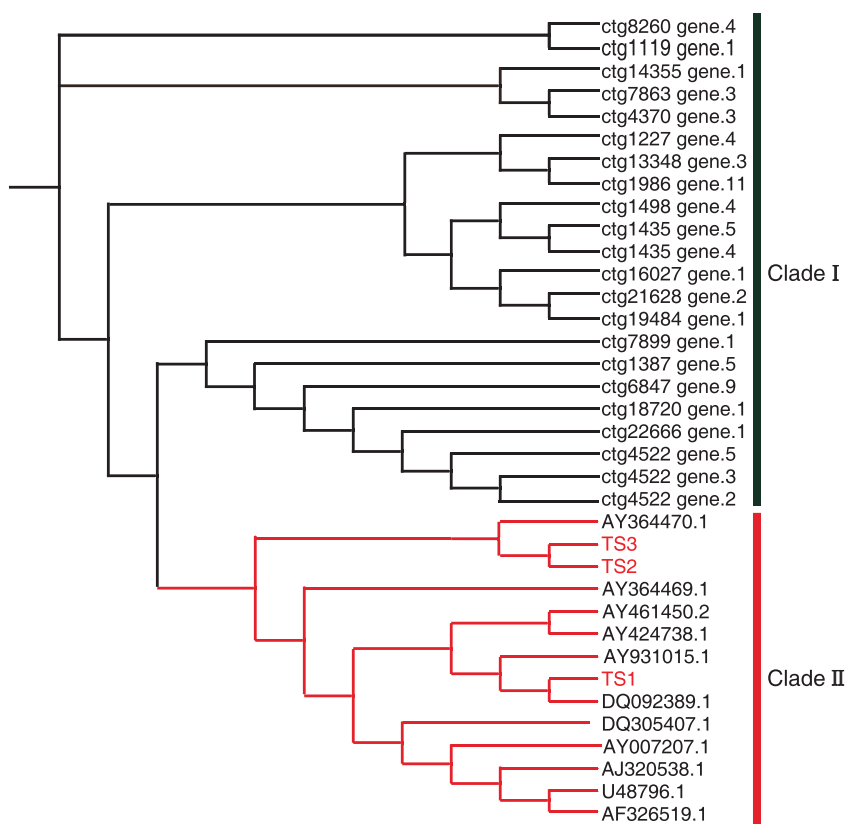
TS 酶催化机理研究表明, TS1 催化 GGPP 生成两种主要的紫杉二烯异构体, 紫杉-4(5), 11(12)-二烯和紫杉-4(20), 11(12)-二烯, 后者是紫杉醇分子的核心骨架, 但其所占酶促产物比例仅为 5% 左右, TS 的催化特性严重限制了紫杉醇异源生产^[28]。为了提高 TS 合成紫杉-4(20), 11(12)-二烯的活性, 一方面, 研究者尝试采用量子力学/分子力学 (QM/MM)、计算辅助蛋白质设计策略对 TS 进行改造, 并取得一定成效^[29, 30], 但 TS 的限速问题仍未能彻底解决; 另一方面, 研究者设法从红豆杉植物中寻找天然高效的 TS 酶。2021 年, 3 个红豆杉属物种基因组成功组装, 红豆杉基因组中 TS 的情况才明了。南方红豆杉包含两类 TS 酶, 即 TS1 和 TS2/TS3 (不同拷贝), 均聚集在 9 号染色体上, 它们的产生是由基因复制导致 (两次裸子植物古代复制和一次红豆杉属植物特

有的复制事件)^[19]。喜马拉雅红豆杉中也包含两类 TS 酶 (TS-1 和 TS-2), 均位于 10 号染色体上。进化分析表明 TS 催化 GGPP 生成紫杉二烯的功能起源于两亿年前的柏目^[20]。同样地, 云南红豆杉中也鉴定到两类 TS 酶 (TXS-1 和 TXS-2), 聚集在 12 号染色体的 sub-cluster II 中。TXS-1 在树皮中高表达, 而 TXS-2 在叶中高表达^[21]。南方红豆杉环化酶进化树分析表明, 两类 TS 酶及其他红豆杉物种中报道的 TSs 聚在 Clade I, 展现紫杉二烯合酶活性, 而剩余无紫杉二烯合酶活性的萜烯环化酶聚在 Clade II (图 3)。更为重要的是, 新发现的 TS2 有 3 个重要特征: 酶促效率高, 为茉莉酸甲酯 (Methyl jasmonate, MeJA) 诱导型酶, 大肠杆菌底盘中合成 Taxadiene 能力强^[19]。整合基因表达谱数据, 推测两类 TS 酶在红豆杉植物精准调控紫杉烷类物质的合成中有重要生态意义^[19]。综上所述, 红豆杉植物中两类 TS 酶 (氨基酸同源性为 75% ~ 83%) 的演化过程得到了较好阐述, 但其催化机理、调控及在合成生物学中的应用仍然值得深入研究。

1.2 细胞色素 P450 酶

紫杉醇生物合成通路中几乎一半的酶促反应都由细胞色素 P450 酶 (CYP450s) 完成。目前已经克隆和功能鉴定的有 C2 位^[31]、C5 位^[32]、C7 位^[33]、C10 位^[34]、C13 位^[35] 和 C2' 位^[25], 但 C1 位和 C9 位的羟基化酶至今尚未被分离鉴定。

近年来, 多组学技术在 CYP450s 的发掘过程中起到了一定作用。Hao 等^[16]通过比较蛋白组研究, 在两种红豆杉 (*T. media* Rehder 和 *T. mairei* (Lemée et H. Lév.) S. Y. Hu ex T. S. Liu) 中鉴定到 51 个 CYP450s, 其中 6 个新 CYP450s 与功能已知的 6 个 CYP725A 同聚在 85 族。Yu 等^[15]通过比较代谢组研究, 发现紫杉醇和其中间体化合物在红豆杉 *T. yunnanensis* 中含量高于 *T. fuana* Nan Li & R. R. Mill; 而紫杉醇的竞争化合物 Taxusin 及其衍生物在 *T. fuana* 中含量高于 *T. yunnanensis*, 表明 Taxusin 和其衍生物以及其催化的基因 T2 α H 和 T7 β H, 可以作为紫杉醇合成通路分析的靶点。Liao 等^[36]和 Kuang 等^[14]使用二代测序 (NGS) 或三代测序 (TGS) 平台对红豆杉物种进行转录组测序, 对其 CYP450s 进行系统分类, 并结合基因差异表达和对激素不同响应的分析, 分别鉴定到 15 和 9 个 CYP450s, 它们可能是紫杉醇生物合成的先



Clade I 表示南方红豆杉中功能未知的环化酶，Clade II 表示红豆杉中功能已知的环化酶；TS1–3 及环化酶数据来源于南方红豆杉基因组 (https://figshare.com/articles/dataset/contigs_of_taxus_genome/15000672) 和 NCBI (National Center for Biotechnology Information)；建树软件为 MEGA 7，方法为 Maximum Likelihood。

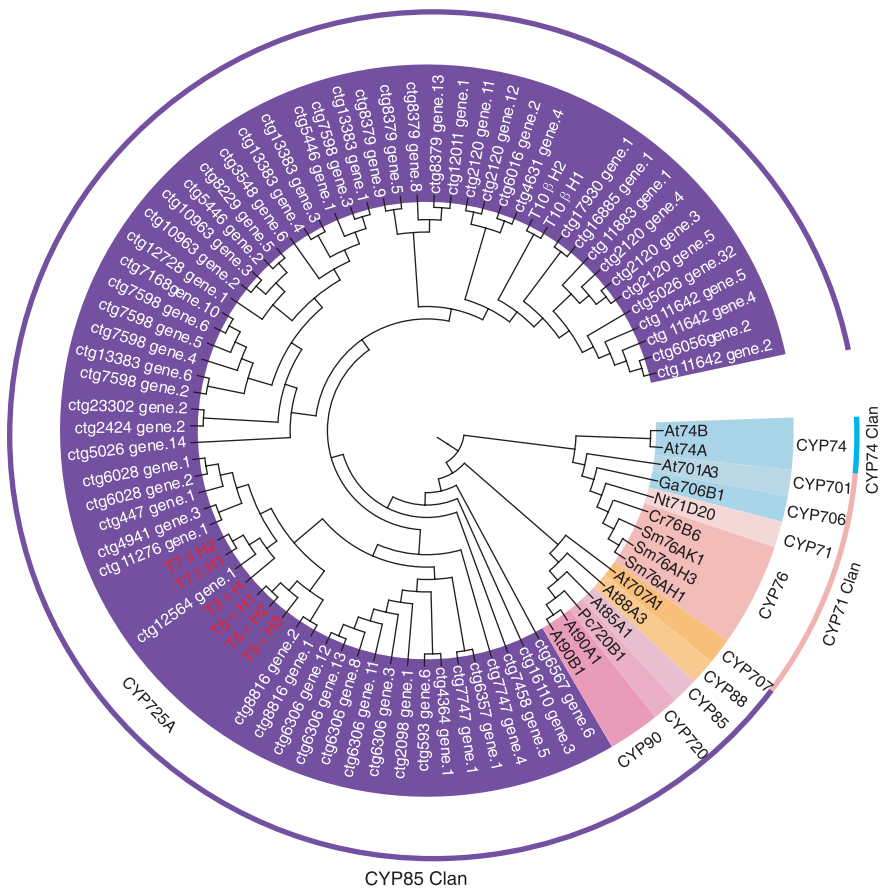
Clade I represents undefined terpene cyclases in *T. chinensis* var. *mairei*, Clade II represents defined terpene cyclases in *Taxus*. Amino acid sequences of terpene cyclases (containing TS1–3) were obtained from *T. chinensis* var. *mairei* genome (https://figshare.com/articles/dataset/contigs_of_taxus_genome/15000672) and NCBI. Tree was constructed using MEGA 7 software and Maximum Likelihood method.

图 3 红豆杉中萜烯环化酶的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Taxus* terpene cyclases

导候选基因。2021 年，3 个红豆杉属物种基因组测序完成，揭开了红豆杉植物中细胞色素 P450 的面纱。南方红豆杉基因组中共有 649 个细胞色素 P450 基因，其中与紫杉醇合成相关的细胞色素 P450 家族被聚集到 *CYP725A* 亚家族 (图 4)。该亚家族基因在红豆杉基因组中发生显著扩张，且经历了独立进化，基因串联复制是其进化的主要驱动力 (75% 的 *CYP725A* 基因聚集在 9 号染色体上)。紫杉醇合成通路已知基因 *CYP725A* 存在多个拷贝 (如 *T5αH1/2/3*、*T7βH1/2*、*T10βH1/2*)，且在 9 号染色体上发现紫杉醇合成基因簇，包含紫杉醇合成前两步关键酶 TS 和 *T5αH* (构成 *TS/T5αH* 或 *TPS-d/CYP725A* 基因对) 以及 2 个功能未知的 *CYP725A* 基因。整合基因组、转录组、代谢组和 MeJA 诱导表达分析，最终筛选到 17 个潜

在的紫杉醇合成相关候选 *CYP725A* 基因^[19]。在喜马拉雅红豆杉基因组中，共鉴定到 564 个细胞色素 P450 基因，同样发现与紫杉醇合成相关的 *CYP725A* 亚家族基因在 10 号染色体上发生显著扩张，由基因串联复制驱动。红豆杉科 *CYP725A* 亚家族基因从柏目分化出来以后，发生过两次扩张，第一次扩张发生在约 1.8 亿年前，导致 *T5αH*、*T14βH*、*T2αH* 和 *T7βH* 的功能分化。第二次扩张发生在大约 1.5 亿年前，导致 *T10βHs* 的出现。*T5αH* 和 *T10βH* 存在 2 个拷贝。通过与已知通路基因共表达分析，最终筛选到 28 个潜在的与紫杉醇合成相关的候选 *CYP725A* 基因^[20]。云南红豆杉基因组中包含 624 个细胞色素 P450 基因，同样地，*CYP725A* 亚家族基因也发生了显著扩张，且与紫杉醇合成通路功能已知的基因一起聚集在 12 号



红色字体表示紫杉醇合成通路已知基因；不同填充颜色表示不同 CYP450s 家族，外圈不同颜色表示 CYP450s 的不同族。红豆杉 CYP725A 亚家族基因来源于南方红豆杉基因组 (https://figshare.com/articles/dataset/contigs_of_taxus_genome/15000672)，其他植物已知二萜氧化酶 CYP450s 基因来自 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。建树软件为 MEGA 7，方法为 Maximum Likelihood。

Red font represents known enzymes in paclitaxel biosynthetic pathway; Different background colors indicate different CYP450s families, and outer circle with different colors indicates different CYP450s clans. Amino acid sequences of CYP725A and diterpene-modifying cytochrome P450s were obtained from *T. chinensis* var. *mairei* genome (https://figshare.Com/articles/dataset/contigs_of_taxus_genome/15000672) and NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), respectively. Tree was constructed using MEGA7 software and Maximum-Likelihood method.

图 4 红豆杉 CYP725A 和其他物种中功能已知的二萜骨架修饰 CYP 的进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Taxus* CYP725A with diterpene-modifying cytochrome P450s from other plants

染色体上 (76.2 Mb 区域)，形成紫杉醇合成相关的 3 个 sub-cluster，并鉴定到 15 个潜在的紫杉醇合成相关候选 CYP725A 基因^[21]。上述研究为紫杉醇合成通路未知 CYP450s 基因 (C1 位和 C9 位羟基化酶基因) 的挖掘提供了进化依据和候选基因资源。

1.3 转移酶

紫杉烷骨架的酰基化修饰进一步增加了红豆杉植物中紫杉烷类化合物的复杂性且影响其药理活性，这些酰基化修饰主要由植物特异性酰基辅酶 A 依赖的转移酶 (ACTs) (又称为 BAHDs: BEAT, benzylalcohol O-acetyltransferase; AHCT, anthocyanin O-

hydroxycinnamoyl-transferase; HCBT, anthranilate N-hydroxy-cinnamoyl/benzoyltransferase 和 DAT, deacetylindoline 4-O-acetyltransferase) 催化形成^[37]。目前，紫杉醇结构中 5 个位置的酰化修饰酶 ACTs (包括 TAT、TBT、DBAT、BAPT 和 DNT-BAT) 已被成功鉴定^[37]。最近，Shirazi 等^[38]通过槽式 PCR 方法从欧榛 (*Corylus avellana* L.) 中分离和鉴定到 TAT 的同源基因 *CaTDAT*。Srividya 等^[37]基于 *Taxus* 转录组数据和生化方法，对可能催化紫杉醇及其类似物侧链部分酰基化的酶进行了系统研究，鉴定了 17 个酰基化酶 (AAEs) 基因。植物化学研究表明，红豆杉植物中包含约 500 多

个紫杉烷类单体化合物,部分单体化合物具有与紫杉醇相似的药理活性,这些化合物结构中包含不同位置 and 不同类型的酰基基团,而催化它们的转移酶仍然不清楚^[39]。Kuang 等^[14]采用 NGS 和 TGS 转录组测序技术,对东北红豆杉(*T. cuspidata* Siebold & Zucc.)中的转移酶做了系统分析,共鉴定到 39 个 ACTs,其中 31 个含有 HXXXD 和 DFG-WG 保守结构域,可将其划分为 5 个 Clade,其中 Clade V 包含紫杉醇合成通路中功能已知的 5 个 ACTs。结合基因表达分析,最后鉴定到 7 个新的 ACTs,可能参与红豆杉植物中紫杉烷类物质的生物合成。Xiong 等^[19]破译了南方红豆杉基因组,共发现 127 个 ACTs,归属为 5 个 Clade,在 Clade V 中包含 3 个 group,其中 group 1 包含所有已知紫杉醇合成通路上的 ACTs,并整合多组学方法筛选出 4 个新的 ACTs 基因,可能涉及紫杉烷类化合物的酰基化修饰。Cheng 等^[20]在喜马拉雅红豆杉基因组中共发现 247 个 ACTs 基因,其中 50% 的 ACTs 基因在 1 号染色体上发生扩张,由基因串联复制驱动。蛋白结构模型分析表明,喜马拉雅红豆杉 ACTs 底物转运通道附近有一个明显的疏水区,有助于将疏水底物吸引到活性中心,且仅在喜马拉雅红豆杉中发现。ACTs 基因的扩张和疏水区的特殊进化,为紫杉醇及其类似物特殊结构的形成创造了机会。上述总结为红豆杉紫杉醇合成中转移酶的发掘提供了新的信息资源。

2 紫杉醇生物合成调控基因研究

转录因子(TF)在紫杉醇生物合成中起重要作用,AP2/ERF、MYB、WRKY、bHLH 和 MYC 等家族被报道调控紫杉醇的合成。在 AP2/ERF 家族中,Zhang 等^[40]从中国红豆杉(*T. chinensis* (Pilger) Rehd.)中鉴定到两个茉莉酸(Jasmonic acid, JA)响应的转录因子 TcERF12 和 TcERF15,它们分别通过识别 TS 基因启动子区的 GCC 盒而阻遏或激活 TS 基因的表达。姚瑞枫等^[41]利用酵母单杂交技术筛选到与 DBAT 基因启动子顺式元件相结合的 6 个 AP2/ERF 家族基因。戴怡龄^[42]从东北红豆杉中分离和克隆到能与 TS、T5 α H、T10 β H 和 T13 α H 启动子相结合的 AP2 类转录因子 TcDREB。随后,Zhang 等^[43]和 Zhang 等^[44]采用转录组测序方法,对中国红豆杉和曼地

亚红豆杉(*T. \times media*)中 AP2/ERF 家族进行系统研究,分别鉴定出 27 个和 49 个 TmAP2/ERF 家族基因,均鉴定到新亚家族蛋白,并对它们的分类、演化、表达及其对紫杉醇代谢的调控进行了分析。

在 WRKY 家族中,WRKY1、WRKY8、WRKY33 和 WRKY47 被证实正调控紫杉醇通路基因的转录水平^[45]。Li 等^[46]采用酵母单杂交、过表达和 RNAi 干扰实验,从中国红豆杉悬浮细胞 cDNA 文库中克隆和证实了一个正调控 DBAT 基因表达的转录因子 TcWRKY。Chen 等^[47]过表达或 RNAi 干扰 TcWRKY33 证实其能调控 DBAT 和 TS 基因的表达,分子实验进一步证实 TcWRKY33 能直接结合 DBAT 启动子区,正调控 DBAT 基因的表达,同时 TcWRKY33 还可以结合 TS 基因的激活子 TcERF15 的启动子区,间接调控 TS 基因的表达。

在 bHLH 家族中,已经鉴定在茉莉酸信号通路中调控紫杉醇生物合成途径基因的转录因子有 TcMYC2a、TcJAMYC1、TcJAMYC2 和 TcJAMYC4^[48]。Cui 等^[49]进一步采用转录组测序技术,对 MYC 家族转录因子在茉莉酸信号通路中对紫杉醇合成的调控机制进行了系统研究,鉴定到 22 个全长基因,发现 MYC2、MYC3 和 MYC4 可以激活 DBTNBT、T2 α H、T7 β H、T5 α H、T13 α H、DBAT、T10 β H、PAM、GGPPS 和 TS 的转录活性。

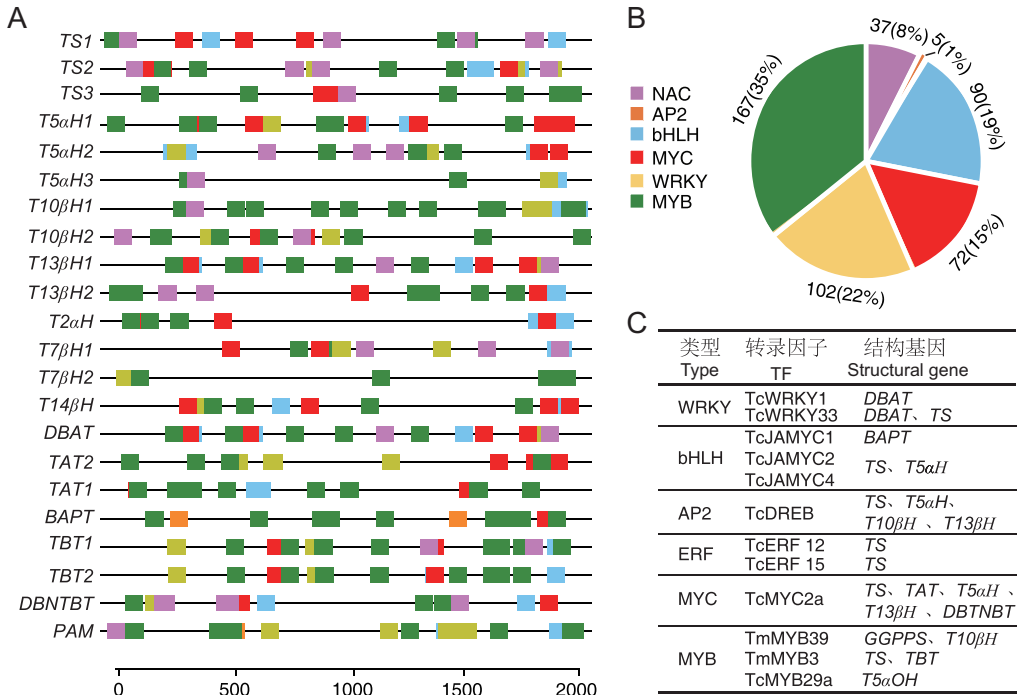
在 MYB 家族中,Yu 等^[50]整合代谢组和蛋白组学方法,在曼地亚红豆杉中发现了一个 R2R3-MYB 成员 TmMYB3,可通过促进 TBT 和 TS 基因的转录,在韧皮部特异的紫杉醇生物合成中发挥潜在作用。Yu 等^[51]通过比较不同性别红豆杉的代谢组和转录组,鉴定出 59 个 MYB 家族成员,并发现 TmMYB39 基因在雌株曼地亚红豆杉中显著表达,证明 TmMYB39-TmbHLH13 复合体显著提高 GGPPS 和 T10 β H 基因的表达。Cao 等^[52]通过分子实验证实 TcMYB29a 能结合 T5 α H 启动子区域,激活其表达从而促进紫杉醇合成。目前,采用二代和三代测序技术,对红豆杉中所有 TF 进行了分析。Kuang 等^[14]从红豆杉中共鉴定了 1940 个 TF,分布于 61 个家族,包括 bZIP、bHLHs、WRKY 和 MYB。Zhou 等^[53]从红豆杉属 3 个物种(曼地亚红豆杉、南方红豆杉、东北红豆杉)中鉴定了 48 个茉莉酸相关 TF,包括 10 个 MYB、5 个 ERF、4 个 AP2、3 个 MYC 和 26 个其他 TF。同时,他们还对比了红豆杉

属 17 个主要家族的 736 个可能的 TF 编码基因进行了分析，鉴定了 174 个 *MYB* 家族基因、90 个 *ARF* 家族基因和 61 个 *WRKY* 家族基因。Xiong 等^[19]从南方红豆杉基因组中共鉴定到 698 个 TF，包含 251 个 AP2、116 个 bHLH、236 个 MYB、48 个 NAC 和 47 个 WRKY，在基因组水平阐述了红豆杉中紫杉醇生物合成调控基因的全貌。根据公布的基因组信息，我们进一步对 22 个紫杉醇合成结构基因上游 2 kb 调控区转录因子的结合 motif 类型进行统计分析，结果表明 *MYB* 家族基因占 35%，*WRKY* 家族基因占 22%，*bHLH* 家族基因占 19%，*MYC* 家族基因占 15%，*NAC* 家族基因占 8%，*AP2* 家族基因占 1%(图 5)。上述进展为紫杉醇生物合成调控机理的研究提供了基因资源和参考。

3 异源底盘中生物合成研究

随着合成生物学的飞速发展，代谢工程策略、蛋白工程和多组学技术等广泛应用到紫杉醇合成生物学研究中，目前已在大肠杆菌、酿酒酵母、真菌和植物底盘中实现部分紫杉醇合成通路的组装和部分前体物质的异源合成^[54](图 6)。

2001 年，Huang 等^[55]报道在大肠杆菌中实现了紫杉二烯合酶通路的组装，紫杉二烯产量为 1.3 mg/L。目前，大肠杆菌中合成紫杉二烯报道产量最高的是 Ajikumar 等^[56]通过多元模块化代谢工程(MMME)策略，使得产量高达 1 g/L，但当尝试在此基础上继续组装 T5αH 通路后，发现紫杉二烯氧化物显著减少，总产量为 116 mg/L。2016 年，



A: 紫杉醇生物合成已知通路基因上游 2 kb 序列中顺式作用元件 motif 类型。
B: 紫杉醇生物合成已知通路基因上游 2 kb 中顺式作用元件 motif 数量统计饼图。
C: 已报道的杉醇生物合成调控基因。紫杉醇生物合成已知通路基因上游 2 kb 序列来自南方红豆杉基因组 (https://figshare.com/articles/dataset/contigs_of_taxus_genome/15000672)，在线软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 用于顺式作用元件 motif 分析；不同颜色分析表示调控基因不同结合 motif 类型。
A: Summary of cis-elements motifs in 2 kb upstream sequence of defined paclitaxel biosynthetic pathway genes.
B: Pie chart of summary of cis-elements motifs in 2 kb upstream sequence of defined paclitaxel biosynthetic pathway genes.
C: Defined regulatory genes of paclitaxel biosynthesis. The 2 kb upstream sequences of defined paclitaxel biosynthetic pathway genes were obtained from *T. chinensis* var. *mairei* genome (https://figshare.Com/articles/dataset/contigs_of_taxus_genome/15000672) and motifs of cis-elements were analyzed using online software (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Different colors in the figure indicate different types of binding motifs.

图 5 红豆杉中调控紫杉醇生物合成的基因
Fig. 5 Regulated genes of paclitaxel biosynthesis in *Taxus*

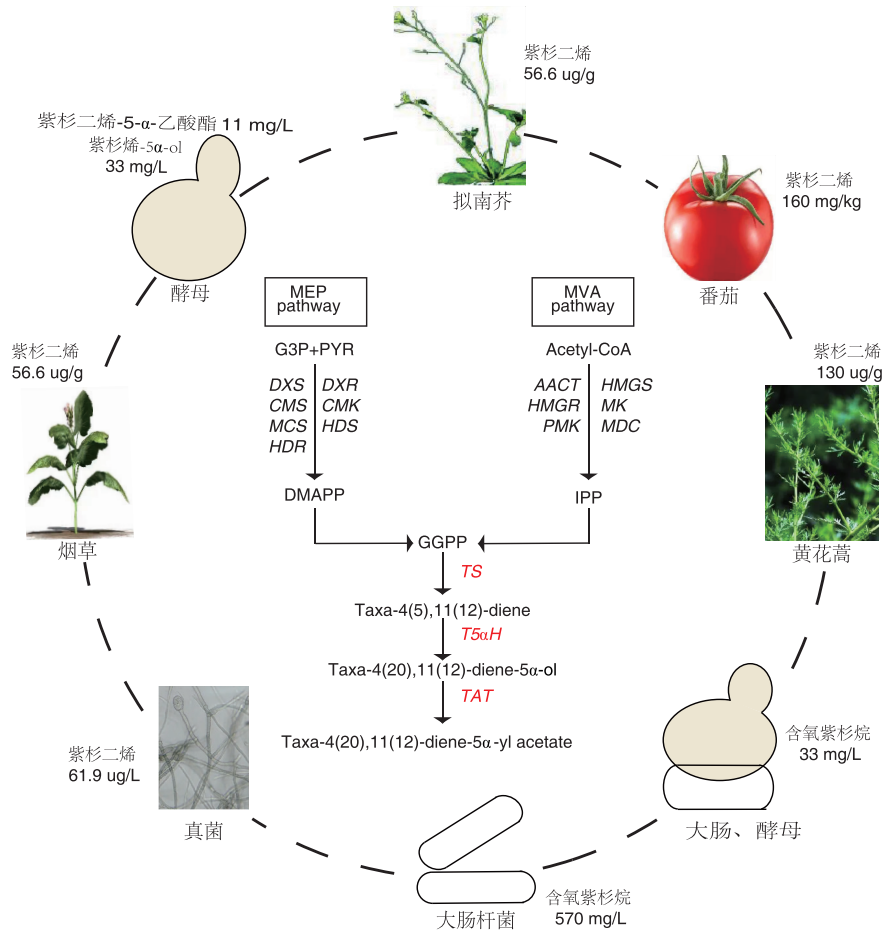
Biggs 等^[57]通过平衡和优化 T5 α H 与 CPR 模块、N 端修饰、拷贝数优化、染色体整合以及发酵条件优化等策略,将紫杉二烯氧化物总产量提高到 (570 \pm 45) mg/L。更重要的是,他们将靶向转录组学和蛋白组学方法应用到代谢工程领域,精准示踪工程菌株中异源组装通路基因在转录和翻译水平上的情况,为代谢工程策略深入优化提供了依据。尽管研究者在大肠杆菌中尝试了多种策略来提高紫杉二烯和紫杉二烯氧化物的产量,但由于大肠杆菌缺少完整的内膜系统(紫杉醇合成通路包含 8 个 CYP450s 基因),加上在组合较多基因后,能量代谢、筛选标记、质粒兼容性等均存在问题,因此,紫杉醇生物合成通路在大肠杆菌中的组装仍存在局限性。但大肠杆菌系统仍然被用于紫杉醇及其前体的半生物合成的生产,如朱平团队在大肠杆菌中基于计算机辅助半理性设计改造 DBAT(即基于酶的三维结构和双突变实验),获得催化效率提高 6 倍的突变体 DBATG38R/F301V,利用该突变体酶与 β -木糖苷酶一起,在体外成功将支路紫杉烷化合物 7- β -木糖基-10-去乙酰紫杉醇转化为紫杉醇^[58]。该团队还通过在大肠杆菌中混合构建乙酰辅酶 A 和 DBAT 通路,实现了从 10-DAB 出发,规模化生产巴卡亭 III,产量达 g/L 级别^[59]。

酿酒酵母被广泛用于复杂产物的合成,如大麻素^[60]和生物碱^[61]等。元英进团队先后对 GGPP 合成模块和 TS 合成模块与不同酵母底盘的适配性进行了研究,并通过组合设计 T5 α H/CPR 通路,分别构建了产紫杉二烯和紫杉烯-5 α 醇的工程酵母^[62]。Nowrouzi 等^[63]将 TS 与助溶标签蛋白融合,并整合到酵母基因组中,优化 TS 信号肽序列截短长度、Mg²⁺ 浓度和培养温度,实现了紫杉二烯在酵母中的生产,产量为 (129 \pm 15) mg/L。目前, Walls 等^[64]已在酵母中成功组装紫杉醇前 3 步合成通路 TS-T5 α H/CPR-TAT,结合先进的生物工艺策略,发酵检测到紫杉烯-5 α 醇量为 33 mg/L,紫杉二烯-5- α -乙酸酯为 11 mg/L。同时, Cas9 介导的组装方法已被应用到酵母代谢工程领域,并成功将 TS 通路组装到酵母基因组中^[65]。Zhou 等^[66]尝试组装了 TS-T5 α H/CPR-TAT-T10 β H 通路,最终生成 33 mg/L 氧化紫杉烷产物(其中包括单乙酰化的双氧紫杉烷和紫杉二烯-5 α -乙酸酯-10 β 醇)。很多研究者转向通过计算方法和蛋白工程对关键限

速酶的催化机理和关键活性位点进行的研究, Escorcia 等^[29]和 Rijn 等^[30]等采用计算工具(如量子力学/分子力学 QM/MM 和气相计算)分别对 TS 的催化机理及影响催化活性的关键氨基酸位点做了研究,发现 TS 是慢启动酶,并找到了一系列关键活性位点(如 W753、Y835、C830 等)。Edgar 等^[67]对 T5 α H 机理进行研究,提供了 T5 α H 环氧化酶活性的化学和生物学证据。Schrepfer 等^[68]和 Edgar 等^[69]采用结构建模和蛋白质工程策略对 TS 和 T5 α H 进行定向改造,以期获得催化活性强、产物专一的突变体,实现了将 Taxa-4(20), 11(12)-diene 的比例从 4.5% 提高到 11%,将紫杉烯-5 α 醇产量提高了 2.5 倍。

丝状真菌是天然产物生物合成的优良底盘。林俊芳实验室尝试在食用真菌中表达紫杉醇及其中间化合物的合成通路,最终在灵芝(*Ganoderma lucidum* (Leyss. Ex Fr.) Karst.) 中成功组装 TS 通路并检测到紫杉二烯产物^[70]。Bian 等^[71]开发了一种农杆菌介导的转化方法(ATMT),在真菌(*Alternaria alternata* TPF6)中过表达 *tHMG1* 和 *IDI*(截短型 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶和异戊烯基二磷酸异构酶基因),并组装 TS 通路,发酵检测到 (61.9 \pm 6.3) μ g/L 的紫杉二烯。朱泽燕等^[72]在红豆杉内生真菌烟曲霉(*Aspergillus fumigatus* TMS-26)中过表达 *TxPAM* 基因,优化发酵条件,检测到紫杉醇产量为 721.87 μ g/L。

植物底盘有很多优势,如固有的光合作用和碳利用机制。目前,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、番茄(*Solanum lycopersicum* L.)、黄花蒿(*Artemisia annua* L.)和烟草(*Nicotiana benthamiana* Domin)等拥有成熟遗传转化体系的植物底盘中均成功组装了紫杉二烯及紫杉二烯-5 α 醇合成通路(图 6)。如 Besumbes 等^[73]在拟南芥中导入去除信号肽和 C 端融合 His 标签的 TS,检测到 600 ng/g 紫杉二烯干重产物。Kovacs 等^[74]在黄果番茄品系中组装 TS,能从 1 kg 冻干番茄中提取出 160 mg 高纯度的紫杉二烯产物。Li 等^[75]在黄花蒿中组装 TS,在茎中紫杉二烯的积累量高达干重 130 μ g/g。2019 年, Li 等^[76]通过叶绿体分区工程化策略,将紫杉二烯-5 α 醇合成通路进行叶绿体定位改造,保证 GGPP-TS-T5 α H/CPR 代谢通路的空间一致性,并通过共强化



黑色字体表示异源底盘自身基因；红色字体表示已经异源组装的紫杉醇合成通路基因。
Black font represents endogenous genes of heterogenous host cells; red font represents exogenously assembled genes of paclitaxel biosynthetic pathway in host cells.

图 6 紫杉醇前体化合物异源合成
Fig. 6 Heterologous bioproduction of paclitaxel precursors

DXS 和 GGPPS, 成功实现了紫杉二烯 ((56.6 ± 3.2) $\mu\text{g/g}$ FW) 和紫杉二烯-5 α 醇 ((1.3 ± 0.5) $\mu\text{g/g}$ FW) 的合成。

总体来说, 紫杉醇前体物质在不同宿主底盘的异源合成均面临一个共同的问题, 即 TS、T5 α H 和 TAT 催化功能的杂乱性问题。虽然紫杉醇合成通路中 19 步酶促反应只实现了 3 ~ 4 步的异源组装, 离完全实现紫杉醇的异源从头生物合成还有一定的距离, 但前期研究所积累的经验为将来紫杉醇的异源合成提供了参考, 打下了基础。

4 展望

多组学在紫杉醇生物合成通路基因、调控基因以及异源合成研究等方面均取得了一定的进展。未来想要通过分子育种技术提高红豆杉中紫杉醇含量

或加快红豆杉的生长速度, 或利用合成生物学技术实现紫杉醇的异源生物合成, 仍然离不开多组学大数据和新方法(基因大片段克隆和组装技术^[77]、基因编辑和转化方法^[78]、CRISPR 组装技术^[79]等)的助力。

(1) 合成通路中未知基因(T1 β H 和 T9 α H)的挖掘和四元氧杂环形成机制的解析依旧是紫杉醇合成生物学研究的重点任务。多组学整合研究已成功将这些未知通路基因锁定在特定的染色体区域和 CYP450 亚家族(如 CYP725A)。通过进一步提升基因组质量和更全面地整合多种组学数据, 提供更精准的候选基因集, 结合先进的植物化学方法分离或者化学合成手段获得更多紫杉烷中间体底物, 加上 CYP450s 酶表达体系的逐渐成熟, 并辅以先进的检测技术, 未来有望全面打通紫杉醇合成通路。

(2)紫杉醇合成前3步酶(TS、T5 α H和TAT)功能的混乱属性是紫杉醇合成生物学研究中的瓶颈问题。红豆杉属约有14~24个种,多数物种中均检测到紫杉醇的合成,且不同物种含量差异明显。目前只完成了3种红豆杉植物的基因组测序,其他物种的紫杉醇合成情况仍不清楚。因此,可以将多组学方法应用到其他红豆杉植物或其近缘物种,寻找天然、专一和高效的酶替代TS、T5 α H和TAT。如Xiong等^[19]从南方红豆杉中找到一个新类型的TS2,在大肠杆菌中合成紫杉二烯的能力比TS1高12倍。Shirazi等^[38]从欧榛中分离到TAT的同源基因*CaTDAT*。另一方面,可采用结构生物学策略^[80](冷冻电镜技术,X射线晶体学等)解析3步酶的晶体结构及其催化机理,根据酶的催化活性中心,结合蛋白工程手段定向改造它们,并将靶向代谢组和转录组方法运用于代谢流和基因表达的监测,获得在异源底盘中催化活性高且产物单一的突变体,用于紫杉醇的异源生产。

(3)烟草系统值得用于尝试组装紫杉醇合成通路。近年来该系统被看好用于组装复杂天然产物通路,特别是像紫杉醇这类合成通路中包含多个细胞色素P450的天然化合物^[76]。如能将大片段克隆技术、CRISPR技术、组装技术等应用于紫杉醇的合成研究中,尝试将红豆杉基因组中发现的紫杉醇合成基因簇在烟草底盘中进行组装,并将靶向代谢组和转录组方法运用于代谢流和基因表达水平的实时监测,将会大大提高从头生产紫杉醇的可能。

(4)考虑到紫杉醇合成通路中细胞色素P450参与几乎一半的酶促反应步骤,且至少3步酶仍然未被发掘,当前异源底盘从头合成紫杉醇难度较大。因此,回到红豆杉自身细胞中,进行代谢改造生产紫杉醇更具有可行性。然而,红豆杉植物遗传转化体系还不成熟,紫杉醇生物合成的调控机理也待深入研究。可将多组学方法用于探索农杆菌与红豆杉植物的相互作用机制、紫杉烷类天然化合物对植物再生及遗传转化效率的影响等方面的研究,以期红豆杉植物遗传转化体系的建立找到新的突破点。另外, Maher等^[81]报道了将发育调控DRs基因和基因编辑技术相结合来创造转基因植物,类似的新方法值得在红豆杉植物中进行尝试。

(5)紫杉醇其他支路化合物的生物合成和调控机制也值得关注。部分紫杉醇类似单体化合物能通

过几步简单的酶促转化生产紫杉醇,如7- β -木糖基-10-去乙酰紫杉醇在 β -木糖苷酶与DBAT作用下生成紫杉醇^[64]。在现有的多组学数据库中重新对合成这些类似物的结构基因和调控基因的分布规律和表达情况及其分子衍生化机制进行研究,可为紫杉醇原料的生产提供新的可能途径,在一定程度上缓解红豆杉植物资源的短缺问题。此外,已鉴定的紫杉烷14 β -羟化酶(T14 β H)是催化产生紫杉烷支路化合物的关键酶^[82],抑制该酶的表达也将有助于提高红豆杉中紫杉醇的含量。

参考文献:

- [1] 陆小鸿. “珍稀抗癌”红豆杉[J]. 广西林业, 2017(4): 21–22.
- [2] Ji YH, Liu CK, Landis JB, Deng M, Chen JH. Plastome phylogenomics of *Cephalotaxus* (Cephalotaxaceae) and allied genera[J]. *Ann Bot*, 2021, 127(5): 697–708.
- [3] World Botanical [EB/OL]. [2021-03-09]. <http://www.worldbotanical.com/TAXNA.HTM>.
- [4] Howat S, Park B, Oh IS, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects [J]. *New Biotechnol*, 2014, 31(3): 242–245.
- [5] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325–2327.
- [6] Schiff P, Fant J, Horwitz S. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol[J]. *Nature*, 1979, 277: 665–667.
- [7] Crown J, O’Leary M, Ooi WS. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience[J]. *Oncologist*, 2004, 9(S2): 24–32.
- [8] Baloglu E, Kingston DGI. A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(7): 1214.
- [9] Trimble EL, Adams JD, Vena D, Hawkins MJ, Friedman MA, et al. Paclitaxel for platinum-refractory ovarian cancer: results from the first 1000 patients registered to national cancer institute treatment referral center 9103 [J]. *J Clin Oncol*, 1993, 11(12): 2405–2410.
- [10] Walsh V, Goodman J. Cancer chemotherapy, biodiversity, public and private property: the case of the anticancer drug taxol [J]. *Soc Sci Med*, 1999, 49(9): 1215–1225.
- [11] Suffness M. Taxol: Science and Applications [M]. Boca Raton: CRC Press, 1995: 436.
- [12] Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, et al. Total synthesis of taxol [J]. *Nature*, 1994, 367(6464): 630–634.

- [13] Mutanda I, Li JH, Xu FL, Wang Y. Recent advances in metabolic engineering, protein engineering, and transcriptome-guided insights toward synthetic production of taxol[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 632269.
- [14] Kuang XJ, Sun SJ, Wei JH, Li Y, Sun C. Iso-Seq analysis of the *Taxus cuspidata* transcriptome reveals the complexity of taxol biosynthesis[J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 210.
- [15] Yu CN, Luo XJ, Zhan XR, Hao J, Zhang L, *et al.* Comparative metabolomics reveals the metabolic variations between two endangered *Taxus* species (*T. fuana* and *T. yunnanensis*) in the Himalayas[J]. *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 197.
- [16] Hao J, Guo H, Shi XN, Wang Y, Wan QH, *et al.* Comparative proteomic analyses of two *Taxus* species (*Taxus × media* and *Taxus mairei*) reveals variations in the metabolisms associated with paclitaxel and other metabolites[J]. *Plant Cell Physiol*, 2017, 58(11): 1878–1890.
- [17] Hu YJ, Gu CC, Wang XF, Min L, Li CC. Asymmetric total synthesis of taxol[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(42): 17862–17870.
- [18] Scribano CM, Wan J, Esbona K, Tucker JB, Lasek A, *et al.* Chromosomal instability sensitizes patient breast tumors to multipolar divisions induced by paclitaxel[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(610): eabd4811.
- [19] Xiong XY, Gou JB, Liao QG, Li YL, Zhou Q, *et al.* The *Taxus* genome provides insights into paclitaxel biosynthesis[J]. *Nat Plants*, 2021, 7(8): 1026–1036.
- [20] Cheng J, Wang X, Liu XN, Zhu XX, Li ZH, *et al.* Chromosome-level genome of Himalayan yew provides insights into the origin and evolution of the paclitaxel biosynthetic pathway[J]. *Mol Plant*, 2021, 14(7): 1199–1209.
- [21] Song C, Fu FF, Yang LL, Niu Y, Tian ZY, *et al.* *Taxus yunnanensis* genome offers insights into gymnosperm phylogeny and taxol production[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1203.
- [22] WHO (World Health Organization) [EB/OL]. [2022-01-03] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [23] Wang T, Li LY, Zhuang WB, Zhang FJ, Shu XC, *et al.* Recent research progress in taxol biosynthetic pathway and acylation reactions mediated by *Taxus* acyltransferases[J]. *Molecules*, 2021, 26(10): 2855.
- [24] Ramírez-Estrada K, Altabella T, Onrubia M, Moyano E, Notredame C, *et al.* Transcript profiling of jasmonate-elicited *Taxus* cells reveals a β -phenylalanine-CoA ligase[J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(1): 85–96.
- [25] Sanchez-Muñoz R, Perez-Mata E, Almagro L, Cusido RM, Bonfill M, *et al.* A novel hydroxylation step in the taxane biosynthetic pathway: a new approach to paclitaxel production by synthetic biology[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 410.
- [26] Hezari M, Lewis NG, Croteau R. Purification and characterization of taxa-4(5), 11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 322(2): 437–444.
- [27] Guerra-Bubb J, Croteau R, Williams RM. The early stages of Taxol biosynthesis; an interim report on the synthesis and identification of early pathway metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(6): 683–696.
- [28] Kai GY, Zhao LX, Zhang L, Li ZG, Guo BH, *et al.* Characterization and expression profile analysis of a new cDNA encoding taxadiene synthase from *Taxus media*[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38(6): 668–675.
- [29] Escorcía AM, Van Rijn JPM, Cheng GJ, Schrepfer P, Bruck TB, Thiel W. Molecular dynamics study of taxadiene synthase catalysis[J]. *J Comput Chem*, 2018, 39(19): 1215–1225.
- [30] Van Rijn JPM, Escorcía AM, Thiel W. QM/MM study of the taxadiene synthase mechanism[J]. *J Comput Chem*, 2019, 40(21): 1902–1910.
- [31] Chau MD, Croteau R. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 α -hydroxylase involved in taxol biosynthesis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 427(1): 48–57.
- [32] Rontein D, Onillon S, Herbet G, Lesot A, Werck-Reichhart D, *et al.* CYP725A4 from yew catalyzes complex structural rearrangement of taxa-4(5), 11(12)-diene into the cyclic ether 5(12)-oxa-3(11)-cyclotaxane[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(10): 6067–6075.
- [33] Chau MD, Jennewein S, Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7 β -hydroxylase [J]. *Chem Biol*, 2004, 11(5): 663–672.
- [34] Schoendorf A, Rithner CD, Williams RM, Croteau RB. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 β -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1501–1506.
- [35] Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau RB. Taxol biosynthesis: taxane 13 α -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13595–13600.
- [36] Liao WF, Zhao SY, Zhang M, Dong KG, Chen Y, *et al.* Transcriptome assembly and systematic identification of novel cytochrome P450s in *Taxus chinensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1468.
- [37] Srividya N, Lange I, Hartmann M, Li QR, Mirzaei M, Lange BM. Biochemical characterization of acyl activating enzymes for side chain moieties of taxol and its analogs

- [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(15): 4963–4973.
- [38] Shirazi MR, Rahpeyma SA, Monfared SR, Zolala J, Lohrasbi-Nejad A. Identification and in-silico characterization of taxadien-5 α -ol-O-acetyltransferase (TDAT) gene in *Corylus avellana* L. [J]. *PLoS One*, 2021, 16(8): e0256704.
- [39] Wang YF, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, Cong B. Natural taxanes: developments since 1828 [J]. *Chem Rev*, 2011, 111(12): 7652–7709.
- [40] Zhang M, Li ST, Nie L, Chen QP, Xu XP, et al. Two jasmonate-responsive factors, TcERF12 and TcERF15, respectively act as repressor and activator of *tasy* gene of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 89(4–5): 463–473.
- [41] 姚瑞枫, 张蒙, 张鹏, 李书涛, 陈丽, 等. 筛选 *dbat* 启动子顺式元件结合蛋白的酵母单杂交文库的构建 [J]. 生物技术通报, 2009(9): 117–120.
- Yao RF, Zhang M, Zhang P, Li ST, Chen L, et al. Construction of yeast one-hybrid library for screening the binding proteins of *dbat* promoter cis-element [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009(9): 117–120.
- [42] 戴怡龄. 红豆杉中与异戊二烯代谢途径相关的 AP2 类转录调控因子的克隆与功能研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2008: 52–112.
- [43] Zhang M, Chen Y, Jin XF, Cai YX, Yuan YY, et al. New different origins and evolutionary processes of AP2/EREBP transcription factors in *Taxus chinensis* [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 413.
- [44] Zhang KK, Jiang LY, Wang X, Han H, Chen DF, et al. Transcriptome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors involved in regulating taxol biosynthesis in *Taxus × media* [J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 171: 113972.
- [45] Zhang M, Chen Y, Nie L, Jin XF, Liao WF, et al. Transcriptome-wide identification and screening of WRKY factors involved in the regulation of taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 5197.
- [46] Li S, Zhang P, Zhang M, Fu C, Yu L. Functional analysis of a WRKY transcription factor involved in transcriptional activation of the *DBAT* gene in *Taxus chinensis* [J]. *Plant Biol*, 2013, 15(1): 19–26.
- [47] Chen Y, Zhang H, Zhang M, Zhang WL, Ou ZQ, et al. Salicylic acid-responsive factor TcWRKY33 positively regulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* in direct and indirect ways [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 697476.
- [48] Zhang M, Jin XF, Chen Y, Wei M, Liao WF, et al. TcMYC2a, a basic helix-loop-helix transcription factor, transduces JA-signals and regulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 863.
- [49] Cui YP, Mao RJ, Chen J, Guo ZG. Regulation mechanism of MYC family transcription factors in jasmonic acid signaling pathway on taxol biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1843.
- [50] Yu CN, Luo XJ, Zhang CC, Xu XY, Huang JF, et al. Tissue-specific study across the stem of *Taxus media* identifies a phloem-specific TmMYB3 involved in the transcriptional regulation of paclitaxel biosynthesis [J]. *Plant J*, 2020, 103(1): 95–110.
- [51] Yu CN, Huang JF, Wu QC, Zhang CC, Li XL, et al. Role of female-predominant MYB39-bHLH13 complex in sexually dimorphic accumulation of taxol in *Taxus media* [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhac062.
- [52] Cao XY, Xu LX, Li LD, Wan W, Jiang JH. TcMYB29a, an ABA-responsive R2R3-MYB transcriptional factor, upregulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 804593.
- [53] Zhou T, Luo XJ, Yu CN, Zhang CC, Zhang L, et al. Transcriptome analyses provide insights into the expression pattern and sequence similarity of several taxol biosynthesis-related genes in three *Taxus* species [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 33.
- [54] Tong YR, Luo YF, Gao W. Biosynthesis of paclitaxel using synthetic biology [J]. *Phytochem Rev*, 2022, 21(3): 863–877.
- [55] Huang QL, Roessner CA, Croteau R, Scott AI. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol [J]. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(9): 2237–2242.
- [56] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, Wang Y, Simeon F, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70–74.
- [57] Biggs BW, Lim CG, Sagliani K, Shankar S, Stephanopoulos G, et al. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated taxol precursor synthesis in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(12): 3209–3214.
- [58] Li BJ, Wang H, Gong T, Chen JJ, Chen TJ, et al. Improving 10-deacetylbaccatin III-10- β -O-acetyltransferase catalytic fitness for taxol production [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 15544.
- [59] Wang H, Zhang BY, Gong T, Chen TJ, Chen JJ, et al. Construction of acetyl-CoA and DBAT hybrid metabolic pathway for acetylation of 10-deacetylbaccatin III to baccatin III [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(10): 3322–3334.
- [60] Luo XZ, Reiter MA, d’Espaux L, Wong J, Denby CM, et al. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast [J]. *Nature*, 2019, 567(7746): 123–126.
- [61] Srinivasan P, Smolke CD. Biosynthesis of medicinal tro-

- pane alkaloids in yeast [J]. *Nature*, 2020, 585 (7826): 614–619.
- [62] 翟芳, 宋田青, 肖文海, 丁明珠, 乔建军, 元英进. 产5 α 羟化紫杉二烯醇人工酵母的组合设计构建[J]. *化工学报*, 2016, 67(1): 315–323.
- Zhai F, Song TQ, Xiao WH, Ding MZ, Qiao JJ, Yuan YJ. Combinatorial design and construction of artificial yeast for production of taxadien-5 α -ol [J]. *CIESC Journal*, 2016, 67(1): 315–323.
- [63] Nowrouzi B, Li RA, Walls LE, d’Espaux L, Malci K, *et al.* Enhanced production of taxadiene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 200.
- [64] Walls LE, Martinez JL, Del Rio Chanona EA, Rios-Solis L. Definitive screening accelerates taxol biosynthetic pathway optimization and scale up in *Saccharomyces cerevisiae* cell factories [J]. *Biotechnol J*, 2022, 17(1): 2100414.
- [65] Apel AR, d’Espaux L, Wehrs M, Sachs D, Li RA, *et al.* A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(1): 496–508.
- [66] Zhou K, Qiao KJ, Edgar S, Stephanopoulos G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(4): 377–383.
- [67] Edgar S, Li FS, Qiao KJ, Weng JK, Stephanopoulos G. Engineering of taxadiene synthase for improved selectivity and yield of a key taxol biosynthetic intermediate [J]. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(2): 201–205.
- [68] Schrepfer P, Buettner A, Goerner C, Hertel M, van Rijn J, *et al.* Identification of amino acid networks governing catalysis in the closed complex of class I terpene synthases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(8): E958–E967.
- [69] Edgar S, Zhou K, Qiao KJ, King JR, Simpson JH, Stephanopoulos G. Mechanistic insights into taxadiene epoxidation by taxadiene-5 α -hydroxylase [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(2): 460–469.
- [70] 辛燕花, 肖招燕, 尤琳峰, 郭丽琼, 林俊芳. 紫杉二烯合酶基因在灵芝中的表达 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(3): 546–552.
- Xin YH, Xiao ZY, You LF, Guo LQ, Lin JF. Heterologous expression of taxadiene synthase gene in *Ganoderma lucidum* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(3): 546–552.
- [71] Bian GK, Yuan YJ, Tao H, Shi XF, Zhong XF, *et al.* Production of taxadiene by engineering of mevalonate pathway in *Escherichia coli* and endophytic fungus *Alternaria alternata* TPF6 [J]. *Biotechnol J*, 2017, 12(4): 1600697.
- [72] 朱泽燕, 李军超, 王启明, 杨淑慎. 农杆菌介导 *Txpam* 基因转化烟曲霉 TMS-26 及其产紫杉醇效果评价 [J]. *菌物学报*, 2021, 40(8): 2087–2101.
- Zhu ZY, Li JC, Wang QM, Yang SS. Agrobacterium-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus* TMS-26 with a phenylalanine aminomutase gene and evaluation of the transformant potential for paclitaxel production [J]. *Mycosystema*, 2021, 40(8): 2087–2101.
- [73] Besumbes Ó, Sauret-Güeto S, Phillips MA, Imperial S, Rodríguez-Concepción M, Boronat A. Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of taxol [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88(2): 168–175.
- [74] Kovacs K, Zhang LN, Linforth RST, Whittaker B, Hayes CJ, Fray RG. Redirection of carotenoid metabolism for the efficient production of taxadiene [taxa-4(5), 11(12)-diene] in transgenic tomato fruit [J]. *Transgenic Res*, 2007, 16(1): 121–126.
- [75] Li MY, Jiang FS, Yu XL, Miao ZQ. Engineering isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua* L. for the production of taxadiene; a key intermediate of taxol [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 504932.
- [76] Li JH, Mutanda I, Wang KB, Yang L, Wang JW, Wang Y. Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4850.
- [77] Liang MD, Liu LS, Xu F, Zeng XQ, Wang RJ, *et al.* Activating cryptic biosynthetic gene cluster through a CRISPR-Cas12a-mediated direct cloning approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(6): 3581–3592.
- [78] Venegas-Rioseco J, Ginocchio R, Ortiz-Calderón C. Increase in phytoextraction potential by genome editing and transformation: a review [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 11(1): 86.
- [79] Lim S, Kim J, Kim YJ, Xu DW, Clark DS. CRISPR/Cas-directed programmable assembly of multi-enzyme complexes [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56(36): 4950–4953.
- [80] Köksal M, Jin YH, Coates RM, Croteau R, Christianson DW. Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis [J]. *Nature*, 2011, 469(7328): 116–120.
- [81] Maher MF, Nasti RA, Vollbrecht M, Starker CG, Clark MD, Voytas DF. Plant gene editing through de novo induction of meristems [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(1): 84–89.
- [82] Jennewein S, Rithner CD, Williams RM, Croteau R. Taxoid metabolism; taxoid 14 β -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 413(2): 262–270.

(责任编辑:李惠英)