

บทคัดย่อ

จากปรากฏการณ์ดื้อยาของเชื้อก่อโรคในมนุษย์ที่พบมากขึ้นในปัจจุบัน ทำให้มีความต้องการอย่างเร่งด่วนในการค้นหาชนิดใหม่ โดยในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าอัตราในการค้นพบยาชนิดใหม่นั้นน้อยลง จึงทำให้ต้องมีการพัฒนากระบวนการในการค้นหาแบบใหม่ จากเทคโนโลยีทางด้าน omics ที่มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วทำให้ปัจจุบันการหาลำดับยีนในสิ่งมีชีวิตเป็นไปได้ง่ายขึ้น โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้นำเทคนิคในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติจากเชื้อราโดยใช้กระบวนการ heterologous expression ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเชื้อรา *Menisporopsis theobromae* BCC 4162 ที่ไม่มีการแสดงออกในสภาวะการเลี้ยงทั่วไป โดยในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำจากศึกษากลุ่มยีนที่ไม่แสดงออกที่คล้ายกับกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สารประกอบ tenellin และกลุ่มยีนที่ประกอบด้วย highly reducing polyketide synthase (HR-PKS) โดยการโคลนยีนดังกล่าวเข้าสู่ multigene expression vector แล้วทำการถ่ายเข้าสู่ *Aspergillus oryzae* NSAR1 ซึ่งจะใช้เป็น host ในการผลิตสาร จากผลการทดลองพบว่า ไม่มีสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ผลิตขึ้นจาก *A. oryzae* NSAR1 ที่ได้ถูกถ่ายยีนกลุ่มยีนที่มีความคล้ายกับกลุ่มยีนที่สังเคราะห์สารประกอบ tenellin ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลมาจาก intron ซึ่งเป็น non-encoding nucleotide ที่ยังคงอยู่ในยีนและไม่ได้ถูกกำจัดออกโดย host ดังนั้น intron ที่อยู่ในยีนของกลุ่มยีนดังกล่าว จึงได้ถูกกำจัดออกโดยใช้เทคนิค PCR ก่อนที่จะทำการโคลนเข้าสู่ expression vector โดยในขณะนี้อยู่ในระหว่างการศึกษาวิเคราะห์สารเมแทโบไลต์ที่ผลิตขึ้นจากกลุ่มยีนดังกล่าวที่ปราศจาก intron สำหรับยีน HR-PKS นั้นภายหลังจากที่ทำการโคลนและถ่ายเข้าสู่ *A. oryzae* NSAR1 แล้ว พบว่ามีสารใหม่ที่ผลิตขึ้นมาเป็นสารหลักจำนวน 2 ชนิด แต่มีปริมาณที่น้อยมาก จึงจะต้องทำการเพิ่มปริมาณเชื้อที่เลี้ยงเพื่อให้ได้สารทั้ง 2 ชนิดในปริมาณที่มากพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้าง และการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

สำหรับชีวสังเคราะห์ของสาร menisporopsin A นั้น ภายหลังจากการวิเคราะห์ transcriptome ของ *M. theobromae* 4162 ในช่วงที่มีการผลิตสาร menisporopsin A พบว่ามี PKS ยีนจำนวน 2 ยีนคือ reducing PKS gene (*men1*) และ non-reducing PKS gene (*men2*) ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของสารประกอบดังกล่าวโดยพบว่า PKS ทั้งสองสามารถสังเคราะห์สาร ascotrichalactone A ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ menisporopsin A โดยวิธีชีวสังเคราะห์ในการสร้างสาร menisporopsin A นั้น อาจจะต้องมีการใช้เอนไซม์ ketoreductase (KR) เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งเอนไซม์ เพื่อที่จะทำให้วิถีชีวสังเคราะห์ของสาร menisporopsin A สมบูรณ์

ผลงานที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถที่จะเป็นรากฐานในการผลิตสารเมแทโบไลต์ชนิดใหม่จากกลุ่มยีนที่ไม่แสดงออก รวมทั้งยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาชีวสังเคราะห์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเชื้อรา ที่จะนำไปสู่การพัฒนาโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยกลไกทางชีวสังเคราะห์

คำสำคัญ: menisporopsin A, macrocyclic polylactone, polyketide synthase

Abstract

With the increased prevalence of drug-resistant human pathogens, new drugs are urgently needed. Over the last decade the rate of drug discovery has declined requiring new approaches for drug discovery. Advances in omics technology have sped up the search for previously undiscovered genes responsible for the biosynthesis of novel natural products. In this work, heterologous expression was used to produce new metabolites from the cryptic natural product biosynthetic gene clusters and also to investigate the menisporopsin A biosynthesis from *Menisporopsis theobromae* BCC 4162. The cryptic tenellin-like and unknown highly reducing polyketide synthase (HR-PKS) gene clusters were constructed into the multiple expression vectors and introduced into the heterologous host, *Aspergillus oryzae* NSAR1, for metabolite production. Unfortunately, no new metabolites could be observed from the transformants containing tenellin-like gene cluster. This may be a result of the existence of introns in the genes that cannot be removed by the host. Therefore, the introns found in the genes of this cluster were removed by PCR technique prior to cloning into the expression vector. Currently, the transformants containing tenellin-like gene cluster are being analyzed for metabolite production. For the HR-PKS, two new major metabolites could be produced by the transformants, however, the amounts of these metabolites are very low. The medium used for culturing the transformants will be scaled up to afford enough metabolites for structure determination and biological activity tests.

The biosynthesis of menisporopsin A was also investigated. Transcriptome analysis of *M. theobromae* during production phase of menisporopsin A identified two PKS genes involved in its biosynthesis i.e. reducing PKS gene (*men1*) and non-reducing PKS gene (*men2*). Our results show that only these two PKSs are sufficient to catalyze the formation of ascotrichalactone A, a structural derivative of menisporopsin A. An additional ketoreductase (KR) is possibly required to complete the menisporopsin A biosynthesis. Results from this project provide us a platform for production of novel metabolites from the cryptic biosynthetic gene clusters and also an approach for biosynthetic studies of fungal natural products. This could help to improve their biological activities by structural modification based on biosynthetic machinery.

Keywords: menisporopsin A, macrocyclic polylactone, polyketide synthase