

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU5380015
ชื่อโครงการ : ชีวสังเคราะห์สารมีตราภัยนิน: การศึกษาโครงสร้างคาร์บอนโดยเทคนิคป้อนสารไอโซโทป การโคลน และศึกษาคุณลักษณะของ tryptophan decarboxylase จากต้นกระท่อม
ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
E-mail address: juraithip.w@psu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (พ.ศ. 2553-2556)

สารมีตราภัยนินจัดเป็นเทอร์ปีนอยด์อินโดลแอลคาลอยด์ที่พบในต้นกระท่อมและเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ระงับปวด จึงเป็นโจทย์ที่น่าสนใจในการศึกษาชีวสังเคราะห์และแนวทางการพัฒนาการเพิ่มปริมาณการสร้างสารดังกล่าวในต้นกระท่อม ผลการวิเคราะห์รูปแบบการสร้างสารโดยวิธี $^1\text{H-NMR}$ และ HPLC พบว่าใบกระท่อมมีการสร้างและสะสมสารเซโคโลกันนิน กรดคาเฟอิก กรดแกลลิก และอีพิกอลโลคาเตซินในปริมาณมาก และไม่พบปริมาณทริปตามีนและทริปโตฟาน จากผลวิเคราะห์ดังกล่าวสรุปว่าสารทริปตามีนที่สังเคราะห์ผ่านชีวสังเคราะห์ซิกิมเมทิตัวจำกัด (limiting factor) ในชีวสังเคราะห์ของมีตราภัยนิน และเมื่อป้อนสารตั้งต้นได้แก่ ทริปตามีน ทริปโตฟาน เบนิลอลานีน ทัยโรซีน พบว่าระดับมีตราภัยนินที่พบในใบมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นั่นก็หมายความว่าหากมีการเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นโดยเฉพาะทริปตามีนให้กับเซลล์พืชด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องเข้าสู่พืช ก็จะทำให้ปริมาณการสร้างมีตราภัยนินเพิ่มขึ้นกว่าเดิม

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสร้างทริปตามีนโดยตรง คือเอนไซม์ tryptophan decarboxylase (TDC) ที่เร่งปฏิกิริยา decarboxylation ของทริปโตฟานไปเป็นทริปตามีน การศึกษานี้ได้โคลนยีนจากใบกระท่อม (*MsTDC*) อาศัยเทคนิค RACE ซึ่งคุณลักษณะของ cDNA ที่ได้ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1521 คู่เบส และเมื่อถอดรหัสเป็นสายกรดอะมิโน ได้ลำดับกรดอะมิโนจำนวน 506 หน่วย และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Prosite พบส่วน pyridoxal phosphate (PLP)-binding site ตรงตำแหน่ง 313-334 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับความเหมือนกับ TDC ที่พบในพืชอื่นๆ พบว่ามีค่าความเหมือนระหว่าง 68-76% และเมื่อทดลองเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *MsTDC* ในเชื้อ *Escherichia coli* และ IPTG พบว่าโปรตีน TDC ที่ได้เมื่อวิเคราะห์บน SDS-PAGE พบว่า *MsTDC* มีขนาดโปรตีนประมาณ 57 กิโลดาลตัน/ซับยูนิต และเมื่อวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวพบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยา decarboxylation ของทริปโตฟานไปเป็นทริปตามีนได้ในหลอดทดลอง เมื่อติดตามการระดับ mRNA ของยีน *MsTDC* ในต้นกระท่อมที่ถูกกระตุ้นด้วย methyl jasmonate ด้วยเทคนิค RT-qPCR พบว่าปริมาณมีตราภัยนินที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน *MsTDC* ที่เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อทำการถ่ายยีนที่สังเคราะห์ในพลาสมิด pCambia1300 ที่ควบคุมผ่าน 35S promoter การถ่ายยีน *MsTDC* เข้าไปในเซลล์พืชผ่านระบบรากที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* ATTC 15834 ผลการทดลองพบว่าในรากขนอ่อนที่มียีน *MsTDC* มีปริมาณทริปตามีนสะสมเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

การเติมสารยับยั้ง mevinolin (ยับยั้งชีวสังเคราะห์เมวาโลเนต) และ/หรือ fosmidomycin (ยับยั้งชีวสังเคราะห์ไดออกซีไซลูโลส) ให้กับต้นกระท่อมอายุ 2 เดือน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเซโคโลกันนินและมีตราภัยนินด้วย HPLC ผลการทดลองสรุปได้ว่าสารทั้งสองชนิดมีแนวโน้มจะมีชีวสังเคราะห์ผ่านทั้งสองแบบ (ส่วนการป้อนสารตั้งต้นที่ติดฉลากให้กับต้นกระท่อมอยู่ระหว่างการทดลอง) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าชีวสังเคราะห์ของสารมีตราภัยนินถูกจำกัดโดยวิถีชีวสังเคราะห์ซิกิมเมทมากกว่าวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์

คำหลัก : *Mitragyna speciosa*, mitragynine, inhibitor treatment, tryptophan decarboxylase, RT-qPCR, isotopic feeding

Abstract

Project Code: RMU5380015

Project Title: Mitragynine Biosynthesis: Study on Carbon Blocks Using Isotopic Feeding Technique, Cloning and Characterization of Tryptophan Decarboxylase from *Mitragyna speciosa*

Investigator: Juraithip Wungsintaweekul, Dr.rer.nat., Associate Professor
Faculty of Pharmaceutical Sciences Prince of Songkla University

E-mail address: juraithip.w@psu.ac.th

Project Period: 3 years (2010-2013)

One strategy to boost the yield of pharmaceutical compounds in medicinal plants is elevating enzyme activities of rate-limiting steps in their biosynthesis by introducing or over-expressing the genes involved. Mitragynine, a terpenoid indole alkaloid present in *Mitragyna speciosa*, has been received attention due to its analgesic properties and utilization as an alternative drug. As often for secondary metabolites in plants, mitragynine is only present in low amounts in *M. speciosa*. Based on HPLC and ^1H NMR analysis, secologanin, caffeic acid gallic acid and epigallocatechin were found to be present in high content in *M. speciosa* leaves, but neither tryptamine nor tryptophan was detected. This suggested that the shikimate pathway is inadequate to supply sufficient tryptamine which is a key of the mitragynine biosynthesis. Moreover, when *M. speciosa* plantlets were supplied with tryptamine and amino acid precursors, the amount of mitragynine appeared to increase compared to the control. Providing the tryptamine to plant cells by introducing or over-expressing the gene involved may also lead to high accumulation of the mitragynine in *M. speciosa*.

Tryptophan decarboxylase (TDC) catalyzes the decarboxylation of tryptophan to tryptamine in mitragynine biosynthesis via the shikimate pathway. Using Rapid Amplification cDNA Ends (RACE) technique, the gene encoding TDC from *M. speciosa* was cloned and designated as *MsTDC*. The *MsTDC* cDNA contained an open reading frame (ORF) of 1,521 base pairs, encoding 506 amino acid residues. It showed the pyridoxal-phosphate (PLP)-binding site at the amino acid position 313-334. Multiple alignments of *MsTDC* with others TDCs in higher plants indicated that the *MsTDC* has the identity between 68-76%. Heterologous expression of *MsTDC* in *Escherichia coli* strains was performed. After induction with 0.1 mM IPTG, the recombinant *E. coli* harboring pQE30-*MsTDC* cells could produce the soluble protein of *MsTDC* (ca. 57 kDa) on the SDS-PAGE. Enzyme activity of *MsTDC* was determined and showed that it could catalyze the formation of the tryptamine. In methyl jasmonate treated *M. speciosa*, the mRNA expression levels of *MsTDC* was found to be related to the mitragynine amount. By using *M. speciosa* hairy roots, the construction of *MsTDC* into pCambia1300-*gfp* was made in order to optimize the effect of *MsTDC* overexpression under 35S promoter. The transgenic hairy root, as confirmed by the presence of the green fluorescence protein (GFP), showed an increase of tryptamine accumulation.

Treatments of mevinolin or/and fosmidomycin, inhibitors of the mevalonate (MVA) pathway and deoxyxylulose phosphate (DXP) pathway, respectively were performed in the 2-month old *M. speciosa*. The secologanin and mitragynine contents were determined by HPLC. The results concluded that the biosynthesis of mitragynine biosynthesis was performed via the mixed (DXP & MVA) pathway. Feeding of isotopic glucose for the labeling pattern analysis is in progressed. In summary, the sole operation of mitragynine biosynthesis is appeared via the DXP and MVA pathways. Nevertheless, the metabolite profiles suggested the availability of tryptophan rather than secologanin was important for the regulation of mitragynine biosynthesis.

Keywords: *Mitragyna speciosa*, mitragynine, inhibitor treatment, tryptophan decarboxylase, RT-qPCR, isotopic feeding