



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาสารปฏิชีวนะต้านเชื้อเอ็มอาร์เอสเอจากสเตรปโตมัยซิส
ทางทะเล แอลที 3-21 โดยมุ่งเป้าหมาย FtsZ โปรตีนที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์
ของแบคทีเรีย

โดย ผศ.ดร. วิณา นุกุลการ และคณะ

มิถุนายน พ.ศ. 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาสารปฏิชีวนะต้านเชื้อเอ็มอาร์เอสเอจากสเตรปโตมัยซิส
ทางทะเล แอลที 3-21 โดยมีเป้าหมาย FtsZ โปรตีนที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์
ของแบคทีเรีย

Discovery of anti-MRSA antibiotics from a marine *Streptomyces* LT3-21
targeting essential bacterial cell division protein FtsZ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. ผศ.ดร. วิณา นกุลการ | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. อ.ดร.คณิต สุวรรณบริรักษ์ | คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. อ.ดร. จตุรงค์ ประเทืองเดชกุล | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. ผศ.ดร. จิตติ ท้าวไ | คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง |
| 5. นางสาวเพ็ญนภา เจริญวิวัฒน์กิจ | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายวิชาการ
คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและบุคลากรที่ให้การสนับสนุนและให้การอนุเคราะห์ในการ
วิจัยครั้งนี้ดังต่อไปนี้

1. หน่วยวิจัยกลาง ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อำนวยความสะดวกด้านการใช้เครื่องมือที่จำเป็นต่อการวิจัย ตลอดจน
เจ้าหน้าที่บุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ
2. อ.ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์ ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่
กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำตลอดการวิจัย
3. The National Bioresource Project (*E. coli* Strain) สำหรับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JE6617 และ
JW0093

สารบัญ

	หน้า
ชื่อเรื่องและชื่อผู้วิจัย	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vii
บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
Executive summary	3
วัตถุประสงค์	5
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
วัสดุอุปกรณ์และระเบียบวิธีวิจัย	14
สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์	14
ระเบียบวิธีวิจัย	15
การสกัดสารสำคัญจากสเตรปโตมัยซีสทางทะเล LT3-21	
และแบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์อื่นๆ	15
การคัดกรองแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น	15
การสกัดแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์จากเชื้อที่คัดกรองในเบื้องต้น	16
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ	16
การตรวจสอบฤทธิ์ด้วยวิธี agar disc diffusion	16
การตรวจสอบฤทธิ์ด้วยวิธี TLC-bioautography	16
การหาค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	17
การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารต่อการทำงานของโปรตีน FtsZ	
โดยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมี	18
การศึกษาผลของสารทดสอบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
ของเชื้อ <i>E. coli</i> strain JE6617	18
การสกัดแยกโปรตีน FtsZ	18
การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการ hydrolysis GTP	19
การศึกษาผลของสารทดสอบต่อลักษณะของ Z-ring	21
ผลการวิจัย	22
ผลการแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีสทางทะเล LT3-21 และแบคทีเรียทางทะเล	
สายพันธุ์อื่นๆ	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพและผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>E. coli</i> strain JE6617 เบื้องต้นของสารสกัดแบคทีเรียทางทะเล	24
ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion	24
ผลการศึกษาผลของสารทดสอบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>E. coli</i> strain JE6617	25
ผลการตรวจสอบฤทธิ์ด้วยวิธี TLC-bioautography	28
ผลการสกัดแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	32
สารสำคัญจากเชื้อของสเตรปโตมัยซิส LT3-21	32
สารสำคัญจากเชื้อของสเตรปโตมัยซิส AN6-2	32
การพิสูจน์โครงสร้างสาร C3-1 จากเชื้อของสเตรปโตมัยซิส AN6-2	33
ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารต่อการทำงานของโปรตีน FtsZ โดยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมี	38
ผลการสกัดแยกโปรตีน FtsZ	38
ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพสาร resistomycin	39
ผลของสารทดสอบต่อการ hydrolysis GTP	40
ผลทดสอบฤทธิ์ของสาร resistomycin ต่อการรบกวนการเกิด Z-ring ของเชื้อ <i>E. coli</i>	41
สรุปผลวิจัย	41
output ที่ได้จากโครงการ	42
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	43

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน FtsZ ใน cytoskeleton ของแบคทีเรีย	11
2 แบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาทดสอบ	22
3 ค่า inhibition zone (mm) ของสารสกัดแบคทีเรียทางทะเลตัวอย่างต่างๆ	25
4 ^1H และ ^{13}C NMR data ของ C3-1 และ resistomycin	37
5 ค่า MIC และ MBC ของสาร resistomycin	39

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. โครงสร้างสาร Abyssomicin C, Diazepinomicin, Salinosporamide A , Sporolides	8
2. assembly และ disassembly ของ FtsZ และ Z ring	10
3. โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน FtsZ ซึ่งได้จากเชื้อชนิดต่างๆ	10
4. การเจริญของไอโซเลต LT 3-21, ลักษณะสปอร์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	22
5. ภาพแสดงลักษณะการเกิด filaments ของเชื้อ <i>E. coli</i> strain JE6617	26
6. 300 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร 9 Hydrogenated micromonosporin A ใน DMSO- d_6	27
7. เครื่องดื่มในรูปผงแห้งจากสารสกัดมันแกว สูตรกาแฟ (รหัส 549) เครื่องดื่มในรูปผงแห้ง จากสารสกัดมันแกว สูตรโกโก้ (รหัส 161) เครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากสารสกัดมันแกว สูตรแครอท (รหัส 585) เครื่องดื่มพร้อมบริโภคจากสารสกัดมันแกว สูตรบัวบก (รหัส 734) 166	
8. เครื่องดื่มในรูปผงแห้งจากสารสกัดรากสามสิบ สูตรกาแฟ (รหัส 628) เครื่องดื่มเสริม อินูลินจากสารสกัดรากสามสิบ สูตรโกโก้ (รหัส 574) เครื่องดื่มเสริมอินูลินจากสารสกัด รากสามสิบ สูตรบัวบก (รหัส 591)	169

สารบัญคำย่อ

°C	degree Celsius
µg	microgram
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
λ	wavelength
BG	Brilliant green agar medium
BS	Bismuth sulfate agar medium
g	gram
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MEB	malt extract broth
MeOH	methanol
mg	milligram
ml	milliliter
mm	micrometer
PDA	potato dextrose agar
ppm	part per million
RH	Relative Humidity
SDA	Sabouraud dextrose agar medium
TSA	soybean-casein digest agar medium
v/v	volume by volume
w/w	weight by weight
w/v	weight/volume

โครงการ การค้นหาสารปฏิชีวนะต้านเชื้อเอ็มอาร์เอสจากสเตรปโตมัยซิสทางทะเล

แอลที 3-21 โดยมุ่งเป้าหมาย FtsZ โปรตีนที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย

Discovery of anti-MRSA antibiotics from a marine *Streptomyces* LT3-21

targeting essential bacterial cell division protein FtsZ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มีมากขึ้น และกำลังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกต้องและมากเกินไปจนทำให้ความจำเพาะของสภาพแวดล้อมของโลกที่เปลี่ยนแปลง เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ยังผลให้เกิดความเสียหายต่อชีวิต ทรัพย์สิน เศรษฐกิจและสังคม และโดยเฉพาะเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยากลุ่ม penicillinase-resistant penicillin หรือที่เรียกว่า methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นปัญหาใหญ่ทางด้านสาธารณสุข ก่อให้เกิดโรคสำคัญในสถานพยาบาลทั่วโลกและมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้น แนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการรักษาเชื้อดื้อยา คือ เร่งศึกษาหาสารต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างจากเดิมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียเป็นเป้าหมายหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาพัฒนายาปฏิชีวนะกลุ่มใหม่ๆ เพราะเกี่ยวข้องกับโปรตีนบางชนิดที่มีความจำเพาะ พบเฉพาะแบคทีเรียและไม่พบในมนุษย์

โครงการวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเชื้อดื้อยากลุ่ม MRSA โดยมุ่งเน้นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อโปรตีน FtsZ ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญ เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย จากการวิจัยในเบื้องต้น ซึ่งได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสทางทะเลทั้งหมด 14 ชนิด พบเชื้อแอคติโนมัยซิสที่น่าสนใจคือ ไอโซเลต LT3-21 จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สกัดแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ พร้อมทั้งศึกษาผลของสารสำคัญต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ

ซึ่งผลสัมฤทธิ์ที่ได้ ทางผู้วิจัยคาดหวังว่าองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นจะก่อให้เกิดประโยชน์ในด้านการศึกษาเพื่อหาสารต้นแบบที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพ และมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยาที่ใช้ในปัจจุบัน เพื่อใช้สำหรับแก้ไขปัญหาการดื้อยาซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศต่อไป

Abstract

The development of multi-drug resistance bacteria becomes one of the most important public health problems in Thailand. The epidemic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is causing a major serious staphylococcal infection. Therefore, the development of new anti-MRSA having novel mechanism of action with high efficiency is required. Cell division has been identified as a potentially important target because it composes of a group of well conserved proteins that are all essential for the viability of bacteria, and their activities are completely different from those of the proteins involved in the division of mammalian cells.

Our research project focuses on searching for compounds which exhibit anti-MRSA targeting on essential cell division protein (FtsZ protein). Since this protein is involved the earliest known step in bacterial cytokinesis and found only in bacteria, its inhibitor has been attractive as a new challenge for many researchers to develop potential antimicrobial agents. To discover new FtsZ inhibitors, a marine *Streptomyces* LT3-21 exhibiting significant antimicrobial activity against MRSA was investigated. Bioassay-guided fractionation was conducted to find the active components. Subsequently, microbiological and biochemical techniques being rapid and accurate were used to confirm their FtsZ inhibitory activity. We expect that our discovered compounds will lead to the generation of compounds with significant therapeutic value for MRSA treatment.

As the outcomes of this project, we expect to develop a platform technology in term of novel drug discovery for potential treatment of multi-drug resistant pathogenic bacteria. The fruitful of our project can be economically and socially useful for Thai people.

Executive Summary

ปัจจุบันปัญหาโรคติดเชื้อยังคงเป็นปัญหาสำคัญ ทั้งในแง่ของอุบัติการณ์การเกิดโรคและการเป็นสาเหตุการเสียชีวิต โดยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะในประชากรกลุ่มเสี่ยง เช่น ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ผู้ป่วยเรื้อรังที่มีอาการรุนแรงและรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน ในขณะเดียวกันการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ในปัจจุบันก็มีอัตราการประสบความสำเร็จที่ต่ำลง เพราะเกิดปัญหาการดื้อยา ซึ่งการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบไปทั่วโลกจนกลายเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลก ส่งผลกระทบต่อทั้งสุขภาพ และเศรษฐกิจ โดยความรุนแรงและความชุกในแต่ละพื้นที่จะต่างกันไป สำหรับในประเทศไทย จากข้อมูลของสถาบันระบบวิจัยสาธารณสุข รายงานว่าประเทศไทยใช้ยาปฏิชีวนะมูลค่ามากกว่าปีละ 10,000 ล้านบาท และในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ.2543-2554) พบเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้น และดื้อยาหลายขนาน คนไทยติดเชื้อดื้อยามากกว่าปีละ 100,000 คน และเสียชีวิตมากกว่าปีละ 30,000 ราย ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นมูลค่ามหาศาล ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดการดื้อยามีหลายสาเหตุ เช่น การใช้การใช้ยาปฏิชีวนะที่มากเกินไปและไม่เหมาะสม รวมถึงการเกิดการดื้อยาตามธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์ หนึ่งในทางแก้ปัญหา คือ การพัฒนายาต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพและมีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างจากยาที่ใช้ในปัจจุบัน เพื่อลดปัญหาการดื้อยาที่เกิดขึ้น

โครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะค้นหาสารต้นแบบจากแบคทีเรียทางทะเลซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากยาเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยทางผู้วิจัยเน้นเป้าหมายไปที่โปรตีนที่จำเป็นในกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ได้แก่ โปรตีน Filamenting Temperature-Sensitive Mutant Z หรือ FtsZ ซึ่งเป็นโปรตีนที่รับผิดชอบในกระบวนการแบ่งเซลล์ในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว โปรตีน FtsZ นี้ จะทำงานคล้ายคลึงกับเอนไซม์ GTPase โดยจะใช้พลังงานจาก GTP เพื่อทำให้เกิดการต่อเป็นสายยาว (polymerization) ที่บริเวณกลางเซลล์ส่วนผนังเซลล์ด้านใน เกิดเป็นโครงสร้างวงแหวนที่มีชื่อว่า FtsZ ring หรือ Z-ring เมื่อเกิดการสร้างวงแหวนข้างต้น จะทำหน้าที่เป็นฐานให้โปรตีนชนิดอื่นที่ทำงานร่วมกันในกระบวนการแบ่งเซลล์มาเกาะ ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ออกเป็นเซลล์ลูกในที่สุด การยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ จะส่งผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย ทำให้เกิดเซลล์ลักษณะที่ผิดปกติไป ซึ่งในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเกือบทุกสปีชีส์จะพบโปรตีนชนิดนี้

ในการวิจัยได้ทำการคัดกรองแบคทีเรียทางทะเลทั้งหมด 14 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์ LT3-21, S08-02, AN4-1, AN6-2, SH2-2, TV1-6 และ CH-17 มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ จากนั้นได้ทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ของจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *E. coli* ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า แบคทีเรียทางทะเลชนิด LT3-21 และ AN6-2 เท่านั้นที่ให้ผลที่น่าสนใจ โดยพบว่าทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียที่ผิดปกติ เกิดเป็นสายยาว จึงได้ทำการสกัดแยกเพื่อให้ได้สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ พบสาร resistomycin จากแบคทีเรีย AN6-2 ส่วนในแบคทีเรีย LT3-21 ไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ได้ เนื่องจากความไม่เสถียรของสาร และจากผลการทดลองพบว่า สาร resistomycin มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้ง MRSA ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.1325

μg/ml เมื่อทดสอบผลของสารต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ โดยดูการเกิด hydrolysis ของ GTP ซึ่งเป็นการวัดการยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ พบว่า สาร resistomycin ให้ค่า IC₅₀ ที่ 6.11 μg/ml นอกจากนี้ทางโครงการยังได้ทดสอบสาร ecteinacidin 770 (ET770) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์จากเพรียงทะเลจากเกาะภูเก็ต พบว่า มีผลยับยั้ง FtsZ เช่นกัน โดยมีค่า IC₅₀ ที่ 10.36 μg/ml เมื่อศึกษาผลของสาร resistomycin ต่อการเกิด Z-ring ของเชื้อ *E. coli* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JW0093 ซึ่งมีโปรตีนที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (GFP) เชื่อมติดกับโปรตีน FtsZ พบว่า ลักษณะการเกิด Z-ring เมื่อให้สาร resistomycin มีความแตกต่างจากสภาวะปกติ ทำให้การแบ่งเซลล์เกิดไม่สมบูรณ์ เห็นลักษณะเซลล์เป็นสายยาว ไม่แบ่งออกจากกันอย่างชัดเจน จากผลการวิจัยทำให้สามารถค้นพบสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ได้แก่ resistomycin และ ET770 ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ ที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัวของแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์

- เพื่อทำการสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือยา MRSA โดยมีผลต่อโปรตีนที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์ (FtsZ protein) จากสารสกัดน้ำหมักเชื้อของสเตรปโตมัยซีสทางทะเล
- เพื่อทดสอบยืนยันฤทธิ์ในการยับยั้ง FtsZ ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมี

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

จำนวนประชากรโลกที่เพิ่มมากขึ้น และสภาพแวดล้อมของโลกที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพมากมาย โดยเฉพาะโรคติดเชื้อซึ่งยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การติดเชื้อยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั้งปริมาณและความรุนแรง เนื่องจากเชื้อที่เกิดการติดเชื้อ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อ *Staphylococcus* spp. *Mycobacterium tuberculosis* หรือ *Streptococcus* spp. รวมทั้งการติดเชื้อราที่มากขึ้น อันเป็นผลมาจากการแพร่ระบาดของโรคเอดส์ หรือการมีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เป็นต้น สำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่พบได้ตามผิวหนังและเยื่อของร่างกาย โดยปกติจะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่หากกลไกการป้องกันตัวเองของคนเราเสียหาย เชื้อก็จะเข้าสู่ร่างกายและทำให้เกิดโรคได้หลายระบบ เช่น ผิวหนังอักเสบ ปอดอักเสบ ติดเชื้อกระแสโลหิต ลิ้นหัวใจอักเสบ ซึ่งอาจจะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ เชื้อชนิดนี้ตามธรรมชาติจะไม่ดื้อยา สามารถใช้ยาต้านจุลชีพ เช่น กลุ่มเพนิซิลลิน รักษาได้ผล แต่ต่อมาเมื่อมีการใช้ยาต้านจุลชีพมากขึ้นโดยไม่ถูกวิธี ทำให้เชื้อมีการปรับตัวและเกิดการดื้อยาที่เคยใช้ได้ผล โดยเฉพาะ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยาในกลุ่ม penicillinase-resistant penicillin หรือที่เรียกว่า Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นปัญหาใหญ่ทางด้านสาธารณสุข ก่อให้เกิดโรคสำคัญในสถานพยาบาลทั่วโลกและมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ (Lee et al., 2007) ตัวอย่างเช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบการติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลเพิ่มจาก 35.9% ในปี ค.ศ. 1992 เป็น 64.4% ในปี ค.ศ. 2003 หรือในสหราชอาณาจักร มีการเพิ่มการระบาดจาก 2% ในปี ค.ศ. 1991 เป็น 43% ในปี ค.ศ. 2002 และสำหรับในประเทศไทยมีการประมาณการณ์ว่าเชื้อ MRSA ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลถึงร้อยละ 30-60 ของ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้มีตั้งแต่ไม่รุนแรงมากจนถึงรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต ปัจจุบันทั่วโลกกำลังวิตกกังวลเกี่ยวกับการรักษาการติดเชื้อ MRSA ในอนาคต เนื่องจากจำนวนผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อนี้เพิ่มขึ้นมากทุกปี รวมทั้งอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อนี้ก็เพิ่มขึ้นทุกปีเช่นกัน เชื้อ MRSA ที่ก่อให้เกิดโรคในโรงพยาบาลนอกจากจะดื้อต่อยา beta-lactam ทุกขนานแล้วยังมักดื้อต่อยากลุ่มอื่นๆด้วย เช่น aminoglycosides, macrolides ซึ่งทำให้การรักษาการติดเชื้อ MRSA มักต้องใช้ยาต้านจุลชีพที่มีราคาแพง และยาหลายตัวก่อให้เกิดผลข้างเคียงมาก แนวโน้มการดื้อยาของเชื้อก็เพิ่มสูงขึ้น เช่น กลายเป็น vancomycin-resistant *S. aureus* ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการรักษาเชื้อดื้อยา คือเร่งศึกษาหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างจากเดิมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา โดยทำการวิจัยค้นหาสารต้นแบบจากแหล่งทรัพยากรที่เป็นต้นกำเนิดสารที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ

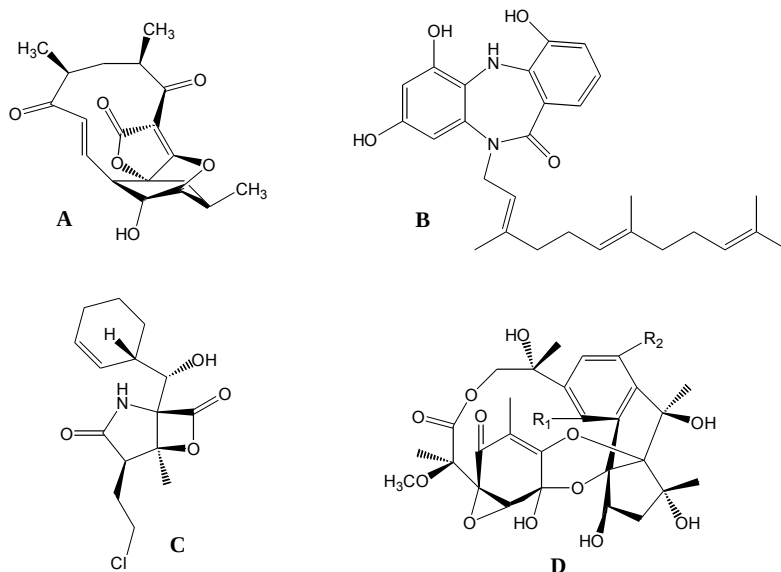
สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเชื้อแอคติโนมัยซีสทางทะเล

ทะเลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นแหล่งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีคุณค่าน่าสนใจ เหตุเพราะทะเลมีความหลากหลายทางชีวภาพ มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างไปจากบนบกอย่างมากทั้งในแง่ของแร่ธาตุ อุณหภูมิ กระแสน้ำ และความดัน สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลจึงมีโครงสร้างที่แตกต่างจากสารที่เคยพบในสิ่งมีชีวิตบนบก จากรายงานพบว่ามีการพบสารใหม่มากกว่า 10,000 ชนิดที่สกัดแยกได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จากทะเล (Proksch *et al.*, 2002) สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้จำนวนมากแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ ซึ่งบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้ (David, and Gordon, 2004) การศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลนั้นในระยะแรกๆ จะมุ่งเน้นไปที่สิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ฟองน้ำ สาหร่าย ปะการัง แต่ข้อจำกัดที่พบได้จากการศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้คือ วัตถุประสงค์ ซึ่งต้องใช้เป็นปริมาณมากเพื่อสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์ เนื่องจากปริมาณสารที่สกัดแยกได้มักจะน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้เหล่านี้มักมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ดังนั้นการสังเคราะห์เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ในปริมาณมากในเชิงอุตสาหกรรมจึงมีความลำบากและต้องลงทุนสูง ปัจจุบันแบคทีเรียทางทะเลจึงนับเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ แบคทีเรียจากทะเลมักจะดำรงชีวิตเป็นอิสระอยู่ในน้ำ ดิน ดินตะกอนใต้ทะเลหรืออาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในทะเล (symbiosis) โดยที่แบคทีเรียแกรมลบนั้นพบได้มากในน้ำทะเลและมีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุด สำหรับ *Pseudomonadaceae* และ *Vibrionaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่พบได้มากที่สุดทะเล ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกทางทะเลมักจะอาศัยอยู่ในดินตะกอนใต้ทะเลหรือบริเวณผิวหน้าของดินตะกอน รวมทั้งอาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตทางทะเลอื่นๆ และมักจะพบแบคทีเรียจำพวก *Bacillus* ได้มากในดินตะกอนใต้ทะเล (Attaway, and Zaborsky, 1993) สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลและดินตะกอนใต้ทะเล (nutrient-poor marine habitat) และจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตทางทะเลอื่นๆ (nutrient-rich marine habitat) (Davidson, 1995) ตัวอย่างเช่น สาร 2-amino-9,13-dimethyl heptadecanoic acid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแยกได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่ในดินตะกอนใต้ทะเลแถบ Livingston island (Blunt *et al.*, 2003) สาร Okadaxanthin อนุพันธ์ของสารแคโรทีน ที่แยกได้จากเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่เพาะมาจากฟองน้ำ *Halichondria okadai* (Miki *et al.*, 1994) เป็นต้น ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทางทะเลชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังสร้างขึ้น หรือบางครั้งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง แท้จริงแล้วอาจมาจากแบคทีเรียที่อยู่ร่วมอาศัยเหล่านี้ ตัวอย่างสารที่เป็นที่รู้จักกันดี เช่น bryostatin ซึ่งเป็นสารจากทะเลที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และกำลังอยู่ในขั้นการทดลองทางคลินิกขั้นที่ 2 เริ่มแรกนั้นสารนี้แยกได้จากไบรโอซัว, *Bugula neritina* ต่อมา Davidson และ Haygood แสดงให้เห็นว่าสาร bryostatin นี้อาจจะมาจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับไบรโอซัวนั้น โดยมีวิถีชีวสังเคราะห์ผ่านเอนไซม์ polyketide synthase type I (Davidson *et al.*,

2001) หรือตัวอย่างสาร Ecteinacidin 743 (ET 743) ซึ่งแยกมาจากเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia turbinata* ก็มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับสาร safracin B ที่ได้จากแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ทำให้ในปัจจุบันการผลิตสาร ET 743 ในเชิงพาณิชย์ได้มาจากการสังเคราะห์บางส่วนจากอนุพันธ์ cyanosafracin B (Cuevas *et al.*, 2000) การศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลจากแบคทีเรียยังมีความน่าสนใจอีกประการตรงที่สามารถเพิ่มผลผลิตสารสำคัญเหล่านั้นได้ในห้องปฏิบัติการ และสามารถประยุกต์ต่อในระดับอุตสาหกรรม ในบางครั้งการคัดแยกและเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากทะเลนั้นอาจจะมีข้อจำกัด เนื่องจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนบกและในน้ำทะเลมีความแตกต่างกัน ดังนั้นเทคนิควิธีการ และสารอาหารที่จะใช้เพาะเลี้ยงจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เชื้อสามารถสร้างสารสำคัญที่มีฤทธิ์ได้ดีที่สุด

แอคติโนมัยซีสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะคล้ายเชื้อราแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เซลล์เป็นเส้นสาย (filament) คล้าย hypha ของราแต่มีขนาดเล็กกว่าและสั้นกว่า นอกจากนี้ยังสร้างสปอร์และอับสปอร์รวมทั้งสร้าง aerial mycelium และ substrate mycelium เช่นเดียวกับรา แอคติโนมัยซีสพบได้ในดินทั่วไป และยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนลึกของหน้าดิน แอคติโนมัยซีสสามารถสร้างสารสำคัญที่มีโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าสารปฏิชีวนะกว่า 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ที่สร้างจากเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีสมาจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* (Berdy, 2005) ปัจจุบัน แอคติโนมัยซีสทางทะเลเป็นแหล่งจุลินทรีย์ที่นักวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันได้ให้ความสนใจในการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความหลากหลายทางสายพันธุ์ที่มีมากกว่าแอคติโนมัยซีสที่อาศัยบนดิน (Gontang *et al.*, 2007) และสารสำคัญที่แยกได้ส่วนใหญ่มีโครงสร้างที่แตกต่างออกไปจากสารสำคัญที่แยกจากแอคติโนมัยซีสบนดิน (Baltz, 2008)

แม้การศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มาจากแอคติโนมัยซีสทางทะเลจะเพิ่งเริ่มไม่นานมานี้ แต่พบว่ามีการค้นพบสารชนิดใหม่จำนวนมากที่ถูกค้นพบ (Lam, 2006) สารเหล่านี้มีความหลากหลายทั้งทางโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างสารดังรูปที่ 1 ได้แก่ สาร abyssomicin C ซึ่งเป็นสาร polycyclic polyketide สกัดแยกได้จาก *Verrucosisspora* sp. มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยา (Riedinger *et al.*, 2004) สาร diazepinomicin (ECO-4601) จาก *Micromonospora* sp. ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้านการอักเสบและต้านเนื้องอก (Charan *et al.*, 2004) สาร salinosporamide A (NPI-0052) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม β -lactone- γ -lactam แยกได้จาก *Salinispora tropica* (Feling *et al.*, 2003) และสารกลุ่ม macrolide ได้แก่ sporolides A, B แยกได้จากเชื้อตัวเดียวกัน (Buchanan, 2005) ซึ่งจากการค้นพบสารต่างๆ ที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแอคติโนมัยซีสทางทะเลเพื่อนำมาพัฒนาหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ



รูปที่ 1 โครงสร้างสาร Abyssomicin C (A), Diazepinomicin (B), Salinosporamide A (C), Sporolides (D)

FtsZ

ยาต้านจุลชีพส่วนใหญ่ที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบัน อาจแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ ยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก การสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หรือที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟิเลต แต่ปัจจุบันความก้าวหน้าทางวิทยาการระดับชีวโมเลกุลได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับจีโนมิกส์ (genomics) และโปรตีโอมิกส์ (proteomics) ของเชื้อจุลชีพต่างๆ มากขึ้น ดังนั้นการพัฒนายาต้านจุลชีพโดยมุ่งเป้าหมายไปที่การทำงานของยีนหรือโปรตีนที่จำเพาะจึงได้รับความสนใจในการศึกษาพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดอาการข้างเคียงของยา กระบวนการแบ่งเซลล์ของเชื้อจุลชีพเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญและยังไม่มียาต้านจุลชีพชนิดใดที่ใช้ทางคลินิกที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อกระบวนการนี้ ดังนั้นกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียจึงเป็นเป้าหมายที่เหมาะสมและน่าสนใจเพื่อพัฒนายาต้านจุลชีพชนิดใหม่ๆ ที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างจากยาชนิดเดิม (Lock and Harry, 2008) แม้ว่ารายละเอียดของกลไกการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ในช่วงทศวรรษที่ 1960 มีการค้นพบยีน FtsZ (filament-forming temperature-sensitive) ซึ่งโปรตีนที่สร้างจากยีนนี้มีความสำคัญในการเกิด septum และการสร้าง Z-ring ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนเริ่มต้นของกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย (Van de Putte et al., 1964; Hirota et al., 1968; Bi and Lutkenhaus, 1991) โปรตีน FtsZ เป็นโปรตีนที่พบในแบคทีเรียส่วนใหญ่ ไม่พบในเซลล์พวก eukaryote ลักษณะโครงสร้างมีความคล้ายกับ ทูบูลิน (Tubulin) สามารถ hydrolyses GTP ได้เช่นเดียวกัน แต่ FtsZ protofilaments จะไม่ได้รวมตัวเป็น microtubule แต่จะรวมตัวเป็นลักษณะ bundles หรือ sheets (Margolin, 2005)

Filamenting Temperature-Sensitive Mutant Z (FtsZ) เป็นโปรตีนที่สำคัญ รับผิดชอบหน้าที่ในกระบวนการแบ่งเซลล์ในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว โปรตีนชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 40 กิโลดาลตัน

โดยประมาณ และประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 370 กรดอะมิโนด้วยกัน สำหรับโครงสร้างของโปรตีน FtsZ นั้นได้มีการค้นพบว่ามันมีต้นกำเนิดเดียวกัน (Homologue) กับ ทูบูลิน อย่างไรก็ตามโปรตีนทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันในด้านความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนเพียง 10-18 %เท่านั้น นอกจากนี้โครงสร้างพื้นฐานของโปรตีนทั้งสองชนิดก็ยังคงแตกต่างกันอีกด้วย โดยทูบูลิน จะมีโครงสร้างพื้นฐานแบ่งออกเป็นหน่วยย่อย 4 หน่วยด้วยกันได้แก่ อัลฟา (Alpha) 2 หน่วย และ เบต้า (Beta) อีก 2 หน่วย รวมกันเป็นลักษณะที่เรียกว่า Heterodimer ในขณะที่โปรตีน FtsZ นั้นจะเป็นหน่วยเดี่ยวๆหน่วยเดียว (Theuretzbacher *et al.*, 2011, Fatma *et al.*, 2008)

โปรตีน FtsZ ประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลัก 4 ส่วนได้แก่

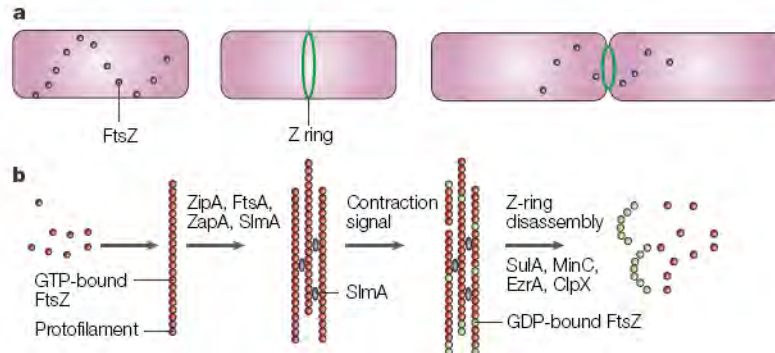
1. N-terminal segment
2. highly conserved core region
3. spacer
4. C-terminal conserved peptide

ส่วนที่เป็น core region นั้นรับผิดชอบในเรื่องของการเข้าจับของ GTP และกระบวนการไฮโดรไลซิส ซึ่งส่วนที่มีการเข้าจับของ GTP นั้นเป็นส่วนที่มีชื่อเรียกว่า T7 loop ในส่วนที่เป็น C-terminal นั้น ทำหน้าที่ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการงานร่วมกับโปรตีนชนิดอื่นๆในกระบวนการแบ่งเซลล์ เช่น FtsA, FtsW, ZipA เป็นต้น (Margolin, 2005, Löwe *et al.*, 2004)

ในเรื่องการทำงาน โปรตีน FtsZ จะทำงานคล้ายคลึงกับเอนไซม์ GTPase โดยจะใช้พลังงานจาก GTP เพื่อทำให้เกิดการต่อเป็นสายยาว (polymerization) ที่บริเวณกลางเซลล์ส่วนผนังเซลล์ด้านใน โดยโครงสร้างดังกล่าวมีชื่อว่า FtsZ ring เมื่อเกิดการสร้างวงแหวนข้างต้น จะทำหน้าที่เป็นฐานให้โปรตีนชนิดอื่นที่ทำงานร่วมกันในกระบวนการแบ่งเซลล์มาเกาะ ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ออกเป็นเซลล์ลูก 2 เซลล์ในที่สุด ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ จะส่งผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้มีลักษณะที่ผิดปกติไป (Ito *et al.*, 2006)

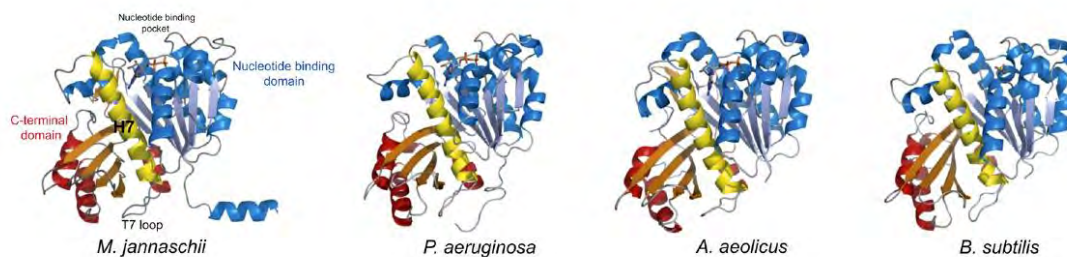
การรวมตัวกันของ FtsZ ถูกควบคุมโดยองค์ประกอบต่างๆ ที่ทำให้เกิดเสถียรภาพของโครงสร้าง ได้แก่ ZapA, ZipA และ FtsA เป็นต้น (Anderson *et al.*, 2004) โดยมีปัจจัยที่ทำให้สูญเสียเสถียรภาพ เช่น SulA, EzrA และ MinCD (รูปที่ 2) ดังนั้นเสถียรภาพของ FtsZ จึงขึ้นอยู่กับสมดุลของปัจจัยทั้งสอง หากขาดการทำงานของ FtsZ แล้ว กระบวนการสร้างผนังกันเซลล์จะไม่สามารถเกิดขึ้นได้เลย โดยการเกิด Z-ring เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับ การเกิด polymerization ของ FtsZ ซึ่งขึ้นกับการเกิด hydrolysis ของ GTP โครงสร้างที่มีความคล้ายคลึงกันมากของ FtsZ และ tubulin ก่อให้เกิดความเป็นไปได้ว่า สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของ tubulin จะสามารถยับยั้งการเกิดการทำงานของ FtsZ ได้ด้วย แต่ในความเป็นจริงแล้ว ความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนระหว่าง FtsZ และ tubulin นั้นมีน้อยมาก (น้อยกว่าร้อยละ 20) แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีความเป็นไปได้สูงที่จะค้นพบสารที่มีความจำเพาะต่อ FtsZ โดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อเซลล์ eukaryote เมื่อเร็วๆ นี้ ได้มีการรายงานถึงสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ FtsZ ซึ่งบางส่วนได้รับการพิสูจน์แล้วว่า จะไปรบกวนการรวมตัวกันของ FtsZ และเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของแบคทีเรีย เช่น zantrins

viriditoxin sanguinarine และอนุพันธ์ taxanes (Huang *et al.*, 2007) ในตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างสารและโครงสร้างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ FtsZ ใน cytoskeleton ของแบคทีเรีย การวิเคราะห์ทางโครงสร้าง และจลนศาสตร์ของสารที่สามารถจับกับ FtsZ ทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยา รวมถึงความสัมพันธ์ทางโครงสร้างของสารดังกล่าว นำมาซึ่งแนวคิดที่สำคัญของการค้นพบยาใหม่ (rational drug discovery)



รูปที่ 2 assembly และ disassembly ของ FtsZ และ Z ring (Margolin, 2005)

จากการศึกษาโปรตีน FtsZ ซึ่งได้จากเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ *Methanococcus jannaschii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aquifex aeolicus* และ *Bacillus subtilis* (รูปที่ 3) โดยเปรียบเทียบทั้งลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างใน 3 มิติ พบว่าความแตกต่างด้านโครงสร้างในส่วน N-terminal และ C-terminal ของ FtsZ homologues ที่พบในเชื้อต่างๆ นั้นไม่มีความสัมพันธ์ในเชิงการจัดกลุ่มทาง phylogenetic หรือในสภาวะการผลิตโครงสร้างผลึก (crystallization) ของ FtsZ แต่อาจเกิดขึ้นจากความแตกต่างระหว่างโครงสร้างตามธรรมชาติบนพื้นฐานของลำดับกรดอะมิโน (primary sequence) ที่แตกต่างกันเอง การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (sequence alignment) ของ FtsZ homologues ที่ได้จากเชื้อต่างๆ แสดงความเหมือน (identity) 33-54% โดยส่วนที่มีความคล้ายคลึง (similarity) สูงนั้นอยู่ที่บริเวณ N-terminal (Oliva *et al.*, 2007) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาเป็นพื้นฐานสำคัญในการวิเคราะห์ถึงบริเวณ binding site ของ FtsZ ในการจับกับโมเลกุลของสาร สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการออกแบบโมเลกุลสารตัวใหม่ ตลอดจนการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง FtsZ อย่างจำเพาะจากฐานข้อมูลทางเคมี และสารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

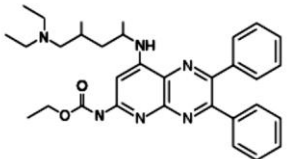
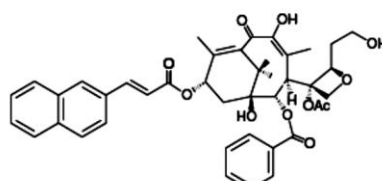
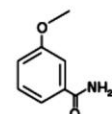
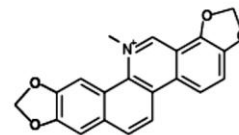


รูปที่ 3 โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีน FtsZ ซึ่งได้จากเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ *Methanococcus jannaschii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aquifex aeolicus* และ *Bacillus subtilis* (Oliva *et al.*, 2007)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน FtsZ ใน cytoskeleton ของแบคทีเรีย (Vollmer, 2006)

Name (source/class)	Structural formula	Target, remarks
8-bromoguanosine 5'-triphosphate (BrGTP) (GTP analogue)		FtsZ, inhibits GTPase activity and polymerization
Viriditoxin (<i>Apergillus</i> sp. MF6890)		FtsZ, inhibits GTPase activity and polymerization
Zantrin Z1 (polyphenol)		FtsZ, inhibits GTPase activity, destabilizes interactions between subunits
Dichamanetin (polyphenol from <i>Uvaria chamae</i>)		FtsZ, inhibits GTPase activity
2'''-hydroxy-5''-benzylisouvarinol-B (polyphenol from <i>X. africana</i>)		FtsZ, inhibits GTPase activity
Zantrin Z2		FtsZ, inhibitor of proto-filament depolymerization
Zantrin Z3		FtsZ, inhibitor of proto-filament depolymerization
PC170942		FtsZ, inhibits GTPase activity
PC58538		FtsZ, inhibits GTPase activity

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Name (source/class)	Structural formula	Target, remarks
SRI-3072 (2-alkoxycarbonyl-aminopyridine)		FtsZ, inhibition of GTPase activity and polymerization
Taxane derivative		FtsZ
3-methoxybenzamide		FtsZ (?)
Sanguinarine (benzophenanthridine alkaloid)		FtsZ, inhibition of polymerization

จากข้อมูลสนับสนุนต่าง ๆ ทำให้ FtsZ กลายเป็นเป้าหมายใหม่ในอนาคตสำหรับการค้นหายาที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์ในแบคทีเรียรูปร่างท่อน จะทำให้แบคทีเรียมีการเจริญที่ช้าและแม้จะยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้ แต่ก็อยู่ได้เพียงไม่กี่รุ่นเท่านั้น ส่วนในแบคทีเรียรูปร่างกลม เช่น *S. aureus* การยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์มีผลต่อการหยุดการเจริญของเชื้อโดยทันที จึงจัดว่า FtsZ inhibitors ออกฤทธิ์เป็น bactericidal ต่อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ (Pinho and Errington, 2003)

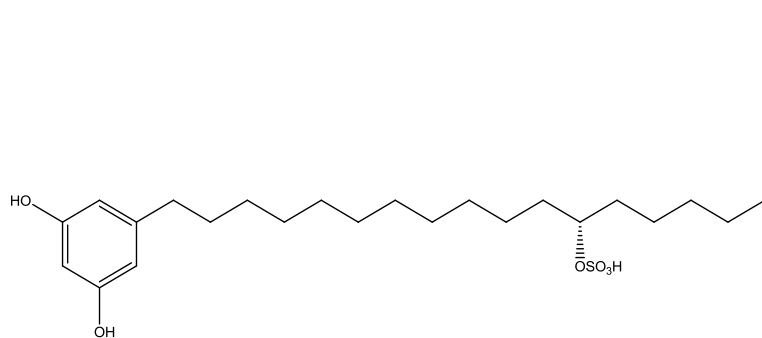
สำหรับการศึกษาสารจากธรรมชาติที่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน FtsZ ยังเพิ่มอยู่ในขั้นเริ่มต้น การศึกษายังมีอยู่น้อย ตัวอย่างสารที่มีรายงานเช่น cinnamaldehyde (Domadia *et al.*, 2007), curcumin (Rai *et al.*, 2008) และ berberine (Domadia *et al.*, 2008) โดยสารทั้งสามชนิดสามารถลดปฏิกิริยา assembly reaction และ bundling ของโปรตีน FtsZ และมีผลต่อ morphology ของ Z-ring ทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งตัวของแบคทีเรีย

curcumin ซึ่งแยกได้จาก *Curcuma longa* ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการจับกลุ่มของโปรตีน FtsZ ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* โดยได้มีการศึกษาพบว่า curcumin เพิ่มการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ แต่ทำให้เกิดผลในการยับยั้งกระบวนการ polymerization โดยจะทำให้ความคงตัวของสายโปรตีนที่มาต่อกันเกิดความเสถียรน้อยลง ระยะเวลาที่เกิด FtsZ ring ลดลง นำไปสู่การยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ ในที่สุด นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการเข้าจับของ curcumin กับ FtsZ โดยใช้เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ พบว่า โปรตีนชนิดนี้เข้าจับในส่วนที่เป็น core domain ของโปรตีน FtsZ

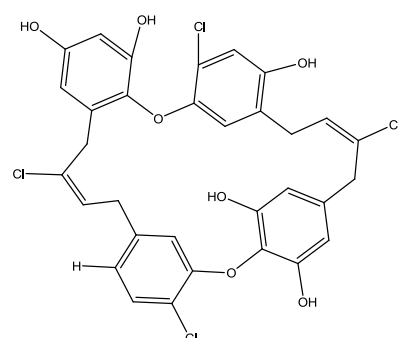
cinnamaldehyde ซึ่งพบได้ใน *Cinnamomum cassia* สามารถยับยั้งการทำงานของ FtsZ จาก *Bacillus subtilis* โดยได้ทำการศึกษาด้วยวิธีทาง nuclear magnetic resonance และวิธีทางคอมพิวเตอร์ พบว่า cinnamaldehyde สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ โดยเข้าจับบริเวณ T-7 loop ในส่วนที่เป็น C-terminal ของโปรตีนชนิดนี้

สารจากธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาในเรื่องฤทธิ์การต้านการทำงานของโปรตีน FtsZ คือ berberine ซึ่งแยกได้จาก *Berberis aquifolium* และ *Berberis aristata* จากการทดลองพบว่า berberine สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ซึ่งแยกมาจาก *E. coli* ได้โดยการยับยั้งการเข้าจับกันของโปรตีนชนิดนี้ โดย berberine จับที่บริเวณ GTP binding pocket ของโปรตีน FtsZ จากเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากการทำ homology modeling โดยใช้ *Methanococcus jannaschii* (PDB code 1FSZ) เป็นต้นแบบ และยับยั้งกระบวนการ cytokinesis นอกจากนี้ยังพบว่า berberine ออกฤทธิ์ทำให้ FtsZ filament เกิดความไม่เสถียร ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการทำงานในที่สุด

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติอื่นๆ เช่น สิ่งมีชีวิตในทะเล ซึ่งปัจจุบันมีรายงานในเรื่องฤทธิ์การต้านการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ ได้แก่ sulfoalkylresorcinol ซึ่งแยกได้จาก *Zygosporium* sp. KNC52 ที่พบได้ในทะเล โดยพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการ polymerization และยังมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียดื้อยาอีกด้วย สารอีกชนิดหนึ่งคือ chrysophaentins A ซึ่งพบใน สาหร่ายทะเล ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Chrysophaeum taylori* ซึ่งสาร chrysophaentins A นี้สามารถยับยั้งการทำงานเชิงเอนไซม์ของโปรตีน FtsZ และกระบวนการสร้าง protofilament ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า สาร chrysophaentins A สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยา ซึ่งได้แก่ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, multiple drug resistant *S. aureus*, and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* อีกด้วย (Kano et al., 2008, Plaza et al., 2010)



Sulfoalkylresorcinol



Chrysophaentins A

วัสดุอุปกรณ์และระเบียบวิธีวิจัย

1. สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1. Chemicals

1.1.1. Extraction and Isolation

1.1.1.1.	dichloromethane (AR)	Labscan Asia
1.1.1.2.	methanol (AR)	Mallinckrodt
1.1.1.3.	ethyl acetate (AR)	Mallinckrodt
1.1.1.4.	hexane (AR)	Mallinckrodt
1.1.1.5.	chloroform-d ₁ deuteration degree	Sigma-Aldrich
1.1.1.6.	silica gel 60 (< 0.063-0.200 mm)	Merck
1.1.1.7.	sephadex LH-20	Sigma-Aldrich

1.1.2. Antibacterial Activity

1.1.2.1.	QuantiChrom™ ATPase/GTPase Assay Kit	Bioassays
1.1.2.2.	FtsZ protein	Cytoskeleton
1.1.2.3.	Media	
1.1.2.3.1.	Yeast extract	Himedia
1.1.2.3.2.	Malt extract	Himedia
1.1.2.3.3.	Sodium chloride	Scharlau
1.1.2.3.4.	Sodium hydroxide	Carlo Erba
1.1.2.3.5.	Agar	Scharlau
1.1.2.3.6.	Tryptic soy broth	Scharlau
1.1.2.3.7.	Tryptic soy agar	Scharlau

1.2. Instruments

1.2.1.	Rotary Evaporator	Büchi
1.2.2.	CARY1E UV-visible spectrophotometer	Varian
1.2.3.	VECTOR 22 spectrometer (FT-IR)	Bruker
1.2.4.	DRX 400 and AV500D NMR spectrometers	Bruker
1.2.5.	microTOF mass spectrometer	Bruker
1.2.6.	Microplate reader	

1.3. Microorganisms

- 1.3.1. Marine microorganisms ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.จิตติ ท้าวไ
- 1.3.2. *Escherichia coli* JE6617 ได้รับความอนุเคราะห์จาก The National Bioresource Project (*E.coli* Srrain) ประเทศญี่ปุ่น

- 1.3.3. *Escherichia coli* ME7876 ได้รับความอนุเคราะห์จาก The National Bioresource Project (*E.coli* Srrain) ประเทศญี่ปุ่น
- 1.3.4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 1.3.5. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- 1.3.6. *Escherichia coli* ATCC 25922
- 1.3.7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- 1.3.8. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* DMST 20651
- 1.4. Molecular Modeling
 - 1.4.1. **Hardware**
 - 1.4.1.1. Intel Core i7 2.66 GHz with 6 GB of RAM with Windows and Linux operating system
 - 1.4.2. **Software**
 - 1.4.2.1. Discovery Studio[®] 2.5 (DS2.5) package of softwares
 - 1.4.2.2. NAMD 2.8 and VMD 1.9
 - 1.4.2.3. ChemSketch v12
 - 1.4.2.4. Vega ZZ 2.4.0

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การสกัดสารสำคัญจากสเตรปโตมัยซีสทางทะเล LT3-21 และแบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์อื่นๆ

สเตรปโตมัยซีสทางทะเล LT3-21 และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ ดังรายชื่อในตารางที่ 1 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.จิตติ ทาไผ่ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และได้ทำการเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อทดสอบฤทธิ์ในเบื้องต้น โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

2.1.1 การคัดกรองแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น

2.1.1.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดปริมาณ 1 ลิตร ใน seed medium (Yeast extract – Malt extract broth) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO_3) โดยเติม inoculum 1% ของ seed medium ลงใน production medium ปริมาตร 5 ลิตร บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-12 วัน

2.1.1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบน้ำมันหักเชื้อ

นำน้ำมันหักเชื้อมารองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตต ในสัดส่วน 1:1 จำนวน 3 ครั้ง สารสกัดที่ได้นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัด

หยาบส่วนเอทิลอะซิเตต นำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยเน้นฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ

2.1.2 การสกัดแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์จากเชื้อที่คัดกรองในเบื้องต้น

2.1.2.1 การหมักเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทางทะเลที่ได้คัดกรองทั้งหมดใน seed medium (Yeast extract – Malt extract broth) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO_3) ประมาณ 50-100 ลิตร โดยเติม inoculum 1% ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-12 วัน

2.1.2.2 การสกัดแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบน้ำหมักเชื้อ

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับตัวทำละลายอินทรีย์ ethyl acetate สารสกัดหยาบที่ได้นำไปแยกองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีควบคู่กับการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioassay-guided purification)

2.1.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

พิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี เช่น NMR, MS, IR, UV

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Methicillin-resistant *S. aureus* DMST 20651

2.2.1 การตรวจสอบฤทธิ์ด้วยวิธี agar disc diffusion

สารสกัดและสารบริสุทธิ์นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี agar disc diffusion โดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 μL /disc ทิ้งให้แห้ง แล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

2.2.2 การตรวจสอบฤทธิ์ด้วยวิธี TLC-bioautography

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี bioautography เริ่มมีรายงานตั้งแต่ปี 1987 โดย Prof. Geoffrey A. Cordell มีหลักการคือ นำแผ่นที่แอลซีที่ผ่านการพัฒนา (developed) แล้ววางใน plate และ

ทำให้แผ่นที่แอลซีปราศจากตัวทำละลายและวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นจึงนำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบซึ่งเลี้ยงอยู่ในอาหารเหลวเททับแผ่นที่แอลซี นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อเจริญ บันทึกแถบสารที่ทำให้เกิดวงใส (clear zone) เปรียบเทียบค่า Rf กับสารมาตรฐาน โดยทั่วไปมีวิธีการทดสอบดังนี้

วิธีที่ 1

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่เหมาะสม เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.15
2. นำก้อนสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในสารละลายเชื้อให้พอหมาด ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวันให้ทั่วผิวหน้า
3. วางแผ่นที่แอลซีที่พัฒนาแล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวัน
4. นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
5. บันทึกผล สังเกตลักษณะ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

วิธีที่ 2

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่เหมาะสม เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
2. เตรียม base agar และอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C 15 นาที
3. เท base agar ลงใน petri dish ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้จนแข็ง
4. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1
5. วางแผ่นที่แอลซีที่พัฒนาแล้วหงายลงบน base agar ที่แข็งตัวแล้ว
6. เทเชื้อจุลินทรีย์ทับลงบนแผ่นที่แอลซี รอจนอาหารแข็ง นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
7. บันทึกผล สังเกตลักษณะ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

2.2.3 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ใช้วิธี microdilution method โดยบ่มเชื้อทดสอบแต่ละชนิดใน TSB media เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการ dilute และถ่ายลงใน 96-well microplate เติมสารทดสอบ และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง วัดความขุ่นแต่ละหลุมด้วย microplate reader สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารทดสอบกับค่าความขุ่นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC)

2.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารต่อการทำงานของโปรตีน FtsZ โดยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมี

2.3.1 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *E. coli* strain JE6617

ทำการทดสอบผลของสารจากสเตรปโตมัยซินทางทะเลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะ filament ใน *E. coli* strain JE6617 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* strain JE6617 ใน TSB broth ที่เติมและไม่เติมสารทดสอบ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทุก 0.5, 1, 2, 3, 4, และ 24 ชั่วโมง ซึ่งผลบวักจะเห็นความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ในแบคทีเรียที่เรียงต่างจากกลุ่มควบคุม สำหรับคุณสมบัติของเชื้อ *E. coli* strain JE6617 ที่นำมาทดสอบ มีรายละเอียดดังนี้

Strain No	JE6617
Strain Name	FA 8401
Sex	F ⁻
Chromosomal Markers	ftsZ ⁸⁴ DE(pro-lac) thi
Parent Donor	LC605T841
Parent Recipient	JE6183
Latest Marker	ftsZ
Selection	Leu ⁺

2.3.2 การสกัดแยกโปรตีน FtsZ

ทำการเตรียมโปรตีน FtsZ จาก *E. coli* ME7876 ซึ่งการสร้างโปรตีน FtsZ จะถูกเหนี่ยวนำโดยสาร IPTG เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียแล้วนำไปแขวนตะกอนในสารละลาย buffer ที่เหมาะสมต่อการทำให้เซลล์แตก โปรตีน FtsZ ในเซลล์ lysate จะถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Romberg *et al.*, 2001) มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- บ่มเชื้อ *E. coli* ME 7678 ใน LB broth 1 L จนได้ O.D. 1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm
- เติม 0.5 mM IPTG แล้วนำไปเขย่าต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- นำเชื้อมา centrifuge ใน falcon tube ด้วยความเร็ว 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนตะกอนมา re-suspend ด้วยสารละลาย 10 ml ซึ่งมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

50 mM Tris HCl

100 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM PMSF

- จากนั้นเติม lysozyme 0.1mg/ml แล้วบ่มต่อ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติม 10 mM magnesium acetate แล้วนำไป sonicate
 - Centrifuge ด้วยความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
 - แยกส่วนส่วนใส (supernatant) นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C
 - นำส่วนใสมาละลาย เติม 10 µg/ml DNase-1 แล้ว incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในน้ำแข็ง
 - Centrifuge 220,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 40 นาที แยกส่วน supernatant
 - เติม 0.25 saturated ammonium sulfate และ incubate ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
 - นำมา centrifuge ด้วยความเร็ว 100,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วน supernatant
 - เติม saturated ammonium sulfate และ incubate ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
 - นำมา centrifuge ด้วยความเร็ว 100,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที
 - นำส่วนตะกอนมา resuspend ด้วย polymerization buffer 5 ml ซึ่งมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้
 - 50 mM NaMES, pH 6.5
 - 25 mM Magnesium acetate
 - 10 mM EGTA
 - เติมลงใน tube ที่เติม 10% sucrose 1 ml (ให้แยกชั้นจากกัน)
 - นำมา centrifuge ด้วยความเร็ว 160,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วน supernatant
 - เติม 10 % glycerol และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
- สำหรับคุณสมบัติของเชื้อ *E. coli* strain ME7876 ที่นำมาแยกสกัดโปรตีน มีรายละเอียดดังนี้

Strain Detail	
Strain No	ME7876
Strain Name	YM914
Plasmid Autonomous	Other pET3Z-1
Prophage	λ^+ λ_{DE3}
Parent Recipient	BL21
Culture Condition	LB + Amp, 37C
Other Remarks	vector expresses FtsZ

2.3.3 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อการ hydrolysis GTP

เนื่องจากโปรตีน FtsZ มีคุณสมบัติเป็น GTPase-like enzyme ซึ่งจะทำงานโดยการ hydrolysis GTP และปลดปล่อยฟอสเฟตออกมา ดังนั้นการวัดค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ สามารถทดสอบได้โดยวัดปริมาณฟอสเฟตที่ปลดปล่อยออกมา ซึ่งในการวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ FtsZ GTPase จะใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีที่เรียกว่า malachite green phosphomolybdate assay (Domadia *et al.*, 2007) โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณของ inorganic phosphate ที่เกิดขึ้นจากการ hydrolysis GTP ระหว่างขบวนการ FtsZ assembly และเมื่อมีการเติมสารทดสอบ โดยนำ FtsZ ที่ได้จากข้อ 2.3.2 มา pre-incubate ร่วมกับตัวอย่างสารสกัดหรือ zantrins (positive control) ใน buffer ที่มี tween 20 เป็นองค์ประกอบ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม GTP ลงไป ทำการเก็บตัวอย่างจากแต่ละปฏิกิริยาทุกๆ 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาในตัวอย่างที่เก็บมาโดยเติม EDTA แล้วทำให้เกิดสีโดยเติม malachite green และ ammonium molybdate แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. เตรียม standard phosphate buffer

- เตรียม premix solution ความเข้มข้น 50 μM ปริมาตร 800 μl โดยปิเปต 40 μl จาก 1 mM standard phosphate
- เติม DI water 760 μl
- นำ premix ที่ได้มาเตรียมต่อดังตารางต่อไปนี้

No.	Premix(μL)+H ₂ O(μL)	Final Volume(μL)	Phosphate concentration(μM)	P moles Phosphate in 40 μL
1	200+0	200	50	2,000
2	160+40	200	40	1,600
3	120+80	200	30	1,200
4	80+120	200	20	800
5	60+140	200	15	600
6	40+160	200	10	400
7	20+180	200	5	200
8	0+200	200	0	0

2. เตรียม series dilution of enzyme in assay buffer

3. เตรียม reaction well และ control well โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

	Reaction well	Control well
Assay buffer (μL)	20	20
Enzyme (μL)	10	-
H ₂ O (μL)	-	10
4mM GTP (μL)	10	10

4. เติม malachite green 200 μl และ incubate 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
5. นำไปวัดด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 nm

Inhibitory assay

1. เตรียม reaction well โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

สาร	Reaction well	Control well
Assay buffer (μL)	19	19
Enzyme (μL)	6	-
H ₂ O/DMSO (μL)	-	11
Inhibitor (μL)	5	-
4mM GTP (μL)	10	10

2. incubate 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. เติม malachite green 200 μL
4. incubate 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดด้วยเครื่อง microplate reader ที่ wavelength 620nm

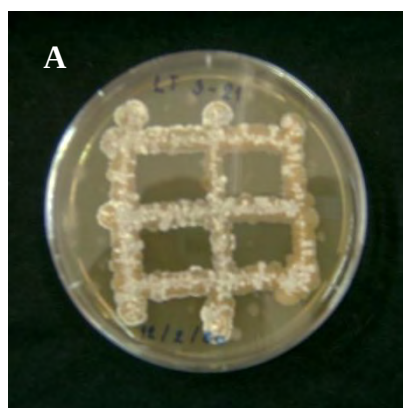
2.3.4 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อลักษณะของ Z-ring (Z-ring characteristics)

ทำการศึกษาผลของสารทดสอบต่อการเกิด Z-ring ของเชื้อ *E. coli* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JW0093 ซึ่งมีโปรตีนที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (GFP) เชื่อมติดกับโปรตีน FtsZ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารทดสอบแล้วทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ ณ เวลาต่างๆ กัน นำตัวอย่างที่ได้ไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล สำหรับผลบวักจะเห็นแบคทีเรียที่มีการแบ่งตัวไม่สมบูรณ์ เกิดการเปลี่ยนรูปของ Z-ring ส่วนในกลุ่มควบคุมจะเห็นการแบ่งตัวของแบคทีเรียเป็นเซลล์เดี่ยวชัดเจน และเห็น Z-ring ที่สมบูรณ์

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกเชื้อไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ LT3-21 และแบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์อื่นๆ

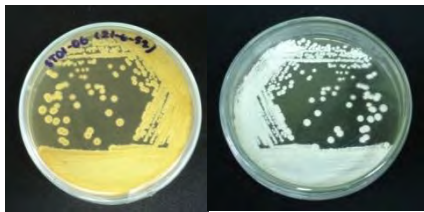
การวิจัยได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสทางทะเลจากดินตะกอนใต้ทะเล บริเวณเกาะลันตา จังหวัดกระบี่ ด้วยอาหาร Humic acid-Vitamin agar และอาหาร Starch casein agar แล้วบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี 21 Cross- streak บนอาหารแข็ง Yeast extract-Malt extract พบเชื้อแอคติโนมัยซีสที่น่าสนใจ ไอโซเลต LT3-21 เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ที่สามารถสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สีเทาและสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สีเหลืองเข้ม สีรุ้งควอดที่ละลายน้ำสีของโคโลนีด้านบนเป็นสีเทาอมเหลือง ส่วนสีของโคโลนีด้านล่างเป็นสีเหลือง พบเส้นใยแพร่ซึมในอาหาร สปอร์มีลักษณะขดเป็นเกลียว (รูปที่ 4)

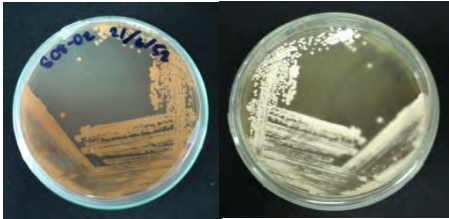
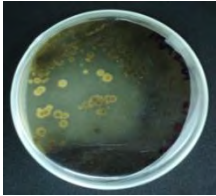
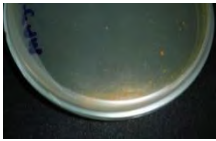
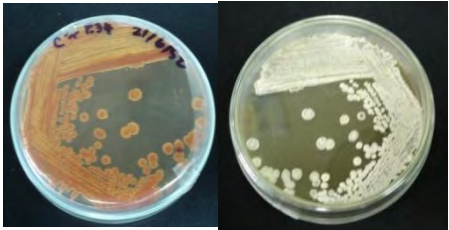
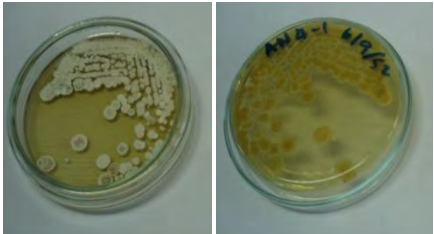
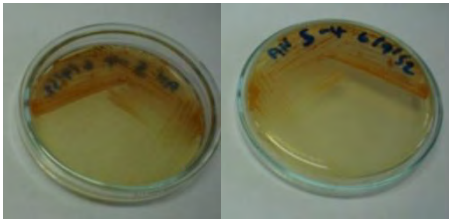
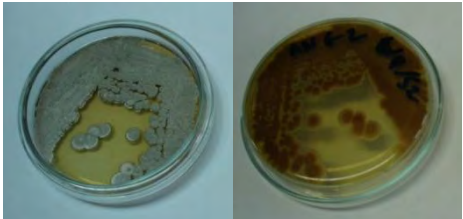


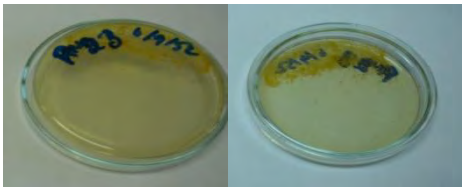
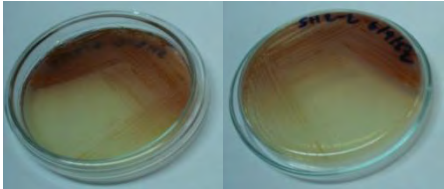
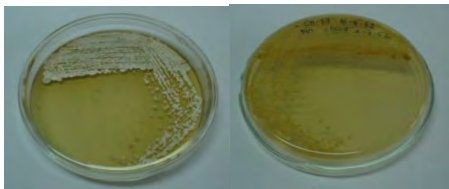
รูปที่ 4 การเจริญของไอโซเลต LT 3-21 (A), ลักษณะสปอร์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (B)

ส่วนแบคทีเรียทางทะเลอื่นๆ ที่นำมาทำการเลี้ยงและสกัดสารทุติยภูมิอื่นๆ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.จิตติ ท้าวไฉ่ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์ต่างๆ ที่นำมาทดสอบ

หมายเลข	รหัส	รูปแบคทีเรีย
1	S01-06	
2	S04-05	

หมายเลข	รหัส	รูปแบบที่เรีย
3	S08-02	
4	MA2-01	
5	MA3-16	
6	S7F-34	
7	AN4-1	
8	AN5-4	
9	AN6-2	

หมายเลข	รหัส	รูปแบบคดีเรีย
10	PN2-3	
11	SH2-2	
12	TV1-6	
13	CH-17	

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพและผลของสารทดสอบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *E. coli* strain JE6617 เบื้องต้นของสารสกัดแบคทีเรียทางทะเล

2.1 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion

เชื้อจุลชีพที่ใช้ทดสอบได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. luteus*, *C. albicans*

นำมาแบคทีเรียทางทะเลแต่ละตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract-Malt extract broth บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10-12 วัน ทำการสกัดน้ำหมักเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตตจนได้สารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar disc diffusion ด้วยปริมาณ 1 mg/disc ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด ได้ผลดังตารางที่ 3

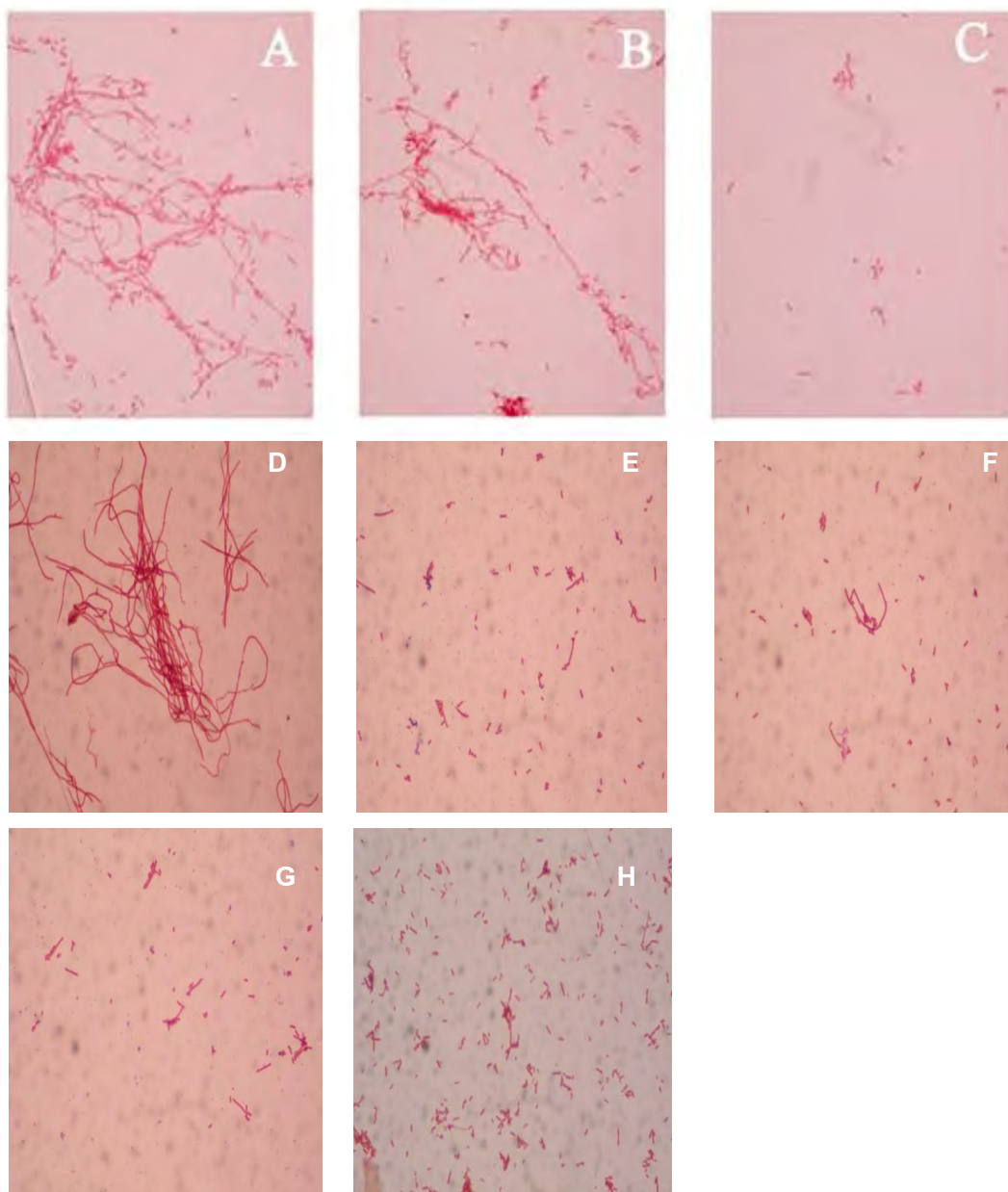
ตารางที่ 3 ค่า inhibition zone (mm) ของสารสกัดแบคทีเรียทางทะเลตัวอย่างต่างๆ

ตัวอย่าง	รหัส	Inhibition zone (mm)					
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>
1	LT3-21	29	30	9	15	28	-
2	ST1-06	-	9	-	-	-	-
3	S04-05	-	-	-	-	-	-
4	S08-02	26	32	15	13	-	-
5	MA2-01	-	9	-	-	-	-
6	MA3-16	-	-	-	-	-	-
7	S7F-34	-	-	-	-	-	-
8	AN4-1	12	13	-	-	15	-
9	AN5-4		12	-	-	11	-
10	AN6-2	24	20	16	11	40	-
11	SH2-2	9	18	-	-	11	-
12	PN2-3	--	-	-	-	-	-
13	TV1-6	11	13	-	-	16	15
14	CH-17	13	11	x	x	15	x

ผลจากตารางดังกล่าวจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์ LT3-21, S08-02, AN4-1, AN6-2, SH2-2, TV1-6 และ CH-17 มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ

2.2 ผลการศึกษาผลของสารทดสอบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *E. coli* strain JE6617

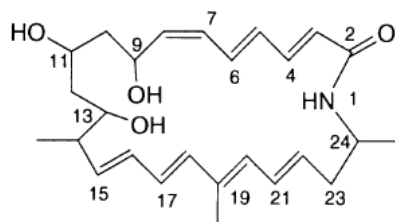
ทำการทดสอบผลของสารสกัดจากแบคทีเรียทางทะเล ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะ filament ใน *E. coli* strain JE6617 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* strain JE6617 ใน TSB broth ที่เต็มและไม่เต็ม สารทดสอบ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทุก 0.5, 1, 2, 3, 4, และ 24 ชั่วโมง โดยผลบวกรจะเห็นความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ในแบคทีเรียต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งจากการทดลองพบว่า แบคทีเรียทางทะเลชนิด LT3-21 และ AN6-2 ให้ผลที่น่าสนใจ ดังรูปที่ 5 ส่วน S08-02, SH2-2, TV1-6 และ CH-17 ลักษณะของ filament ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม



รูปที่ 5 ภาพแสดงลักษณะการเกิด filaments ของเชื้อ *E. coli* strain JE6617 ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อให้สารสกัดจากน้ำหมักเชื้อสเตรปโตมัยซิส LT3-21 (A) สาร curcumin ที่เคยมีรายงานว่าให้ผลบวก (B) เปรียบเทียบกับ control คือ *E. coli* strain JE6617 ใน DMSO (C) AN6-2 (D) S08-02 (E) SH2-2 (F) TV1-6 (G) และ CH-17 (H)

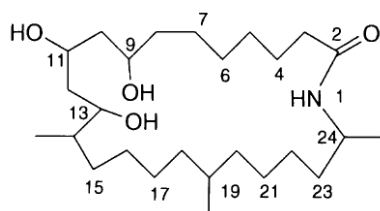
นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบผลของสาร Reniamycin M, Ecteinacidin 770 และ Hydrogenated micromonosporin A ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะ filament ใน *E. coli* strain JE6617 โดยสาร Reniamycin M และ Ecteinacidin 770 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.คณิต สุวรรณปริักษ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนสาร Hydrogenated micromonosporin

A ได้จากการทำปฏิกิริยา hydrogenation กับสาร micromonosporin A จากเชื้อ *Micromonospora* sp. Strain TT1-11 ซึ่งแยกได้จากป่าพรุ จังหวัดพัทลุง (ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจาก ดร.จิตติ ท่าไผ่ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)



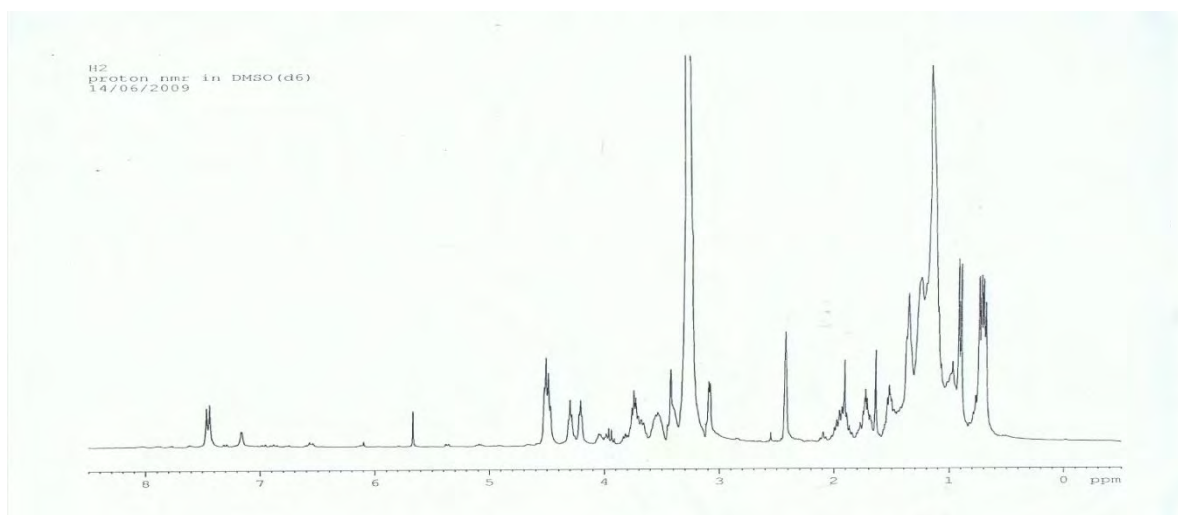
Micromonosporin A

แต่เนื่องจากสารชนิดนี้เป็นสารกลุ่ม polyene ซึ่งไม่เสถียรเมื่อเก็บไว้นาน ดังนั้นในการทดลองจึงได้ทำปฏิกิริยา hydrogenation โดยใช้เครื่อง Parr hydrogenation apparatus โดยมี palladium/carbon เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สาร Hydrogenated micromonosporin A (9,11,13-trihydroxy-14,19,24-trimethyl-1-azacyclotetracosan-2-one) โดยพบว่ามียอดของผลที่ได้โดยเฉลี่ยเท่ากับ 62.06



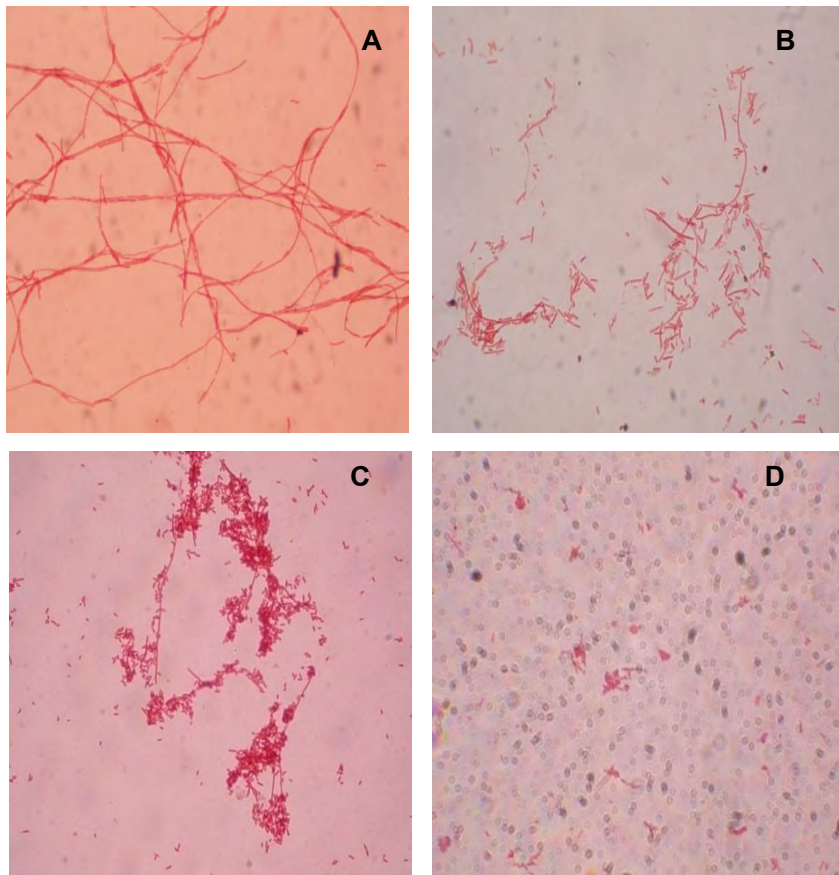
Hydrogenated micromonosporin A

$^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร Hydrogenated micromonosporin A ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 300 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร 9 Hydrogenated micromonosporin A ใน DMSO- d_6

ผลการทดสอบพบว่า ทั้งสาร 3 ชนิด มีผลทำให้ลักษณะของ filament เปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน ดังรูปที่ 7

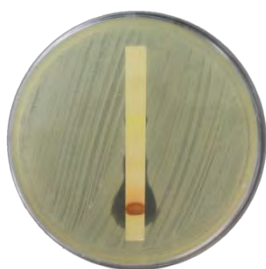


รูปที่ 7 ภาพแสดงลักษณะการเกิด filaments ของเชื้อ *E. coli* strain JE6617 ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อให้สาร Reniamycin M (A) Ecteinacidin 770 (B) Hydrogenated micromonosporin A (C) เปรียบเทียบกับ control คือ *E. coli* strain JE6617 ใน DMSO (D)

2.3 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ด้วยวิธี TLC-bioautography

จากผลในข้อ 2.1 จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากแบคทีเรียทางทะเลรหัส LT3-21 และ AN6-2 ให้ผลเปลี่ยนแปลงลักษณะ filament ของ *E. coli* strain JE6617 อย่างชัดเจน ซึ่งมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ในแบคทีเรียต่างจากกลุ่มควบคุม ดังนั้น ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบตำแหน่งของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้วิธี bioautography ทดสอบกับเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *MRSA*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *S. typhi* ผลปรากฏสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อของสเตรปโตมัยซิส LT3-21 และ AN6-2 ดังรูปที่ 8 จึงได้ทำการสกัดแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในช่วงดังกล่าว โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีต่างๆ

S. aureus

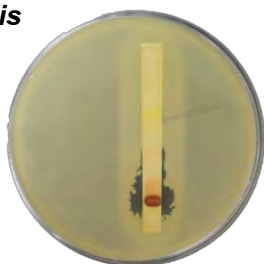


AN-6-2

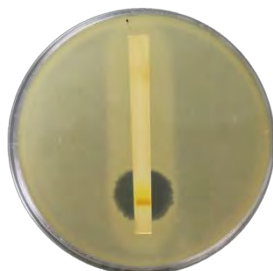


LT3-21

B. subtilis

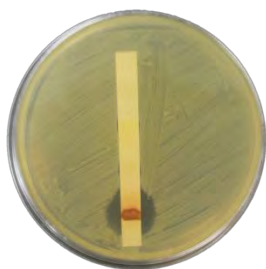


AN-6-2



LT3-21

MRSA



S. aureus

Sample: AN6-2

(Hexane: Ethyl acetate=1:2)

Rf	inhibition zone (cm)
0.00	1.50
0.05	1.50
0.28	0.90
0.55	0.80

S. aureus

Sample: LT3-21

(Hexane: Ethyl acetate=1:2)

Rf	inhibition zone (cm)
0.07	1.67

B. subtilis

Sample: AN6-2

(Hexane: Ethyl acetate=1:2)

Rf	inhibition zone (cm)
0.00	1.55
0.16	0.90
0.27	0.80

B. subtilis

Sample: LT3-17

(Hexane: Ethyl acetate=1:2)

Rf	inhibition zone (cm)
0.04	1.87

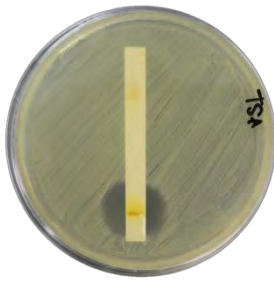
MRSA

Sample: AN6-2

(Hexane: Ethyl acetate=1:2)

Rf	inhibition zone (cm)
0.00	1.67
0.27	0.80
0.53	0.80

รูปที่ 8 TLC-bioautography ของสารสกัด AN6-2 และ LT3-21



LT3-21

MRSA

Sample: LT3-17

(Hexane: Ethyl acetate=1:2)

Rf	inhibition zone(cm)
0.04	2.1

M. luteus



AN6-2

M. luteus

Sample: AN6-2

(Hexane: Ethyl acetate=1:2)

Rf	inhibition zone(cm)
0.00	2.47
0.27	0.80
0.56	0.80



LT3-21

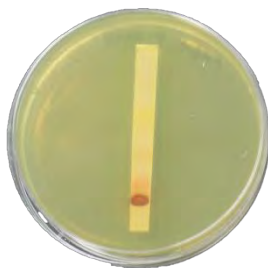
M. luteus

Sample: LT3-17

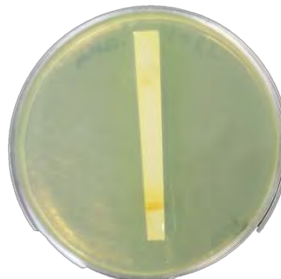
(Hexane: Ethyl acetate=1:2)

Rf	inhibition zone(cm)
0.04	2.30

***P. aeruginosa* - inactive**

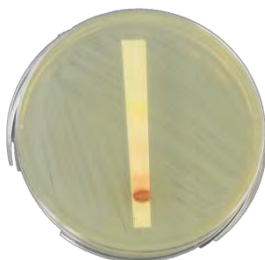


AN6-2



LT3-21

***E. coli* - inactive**



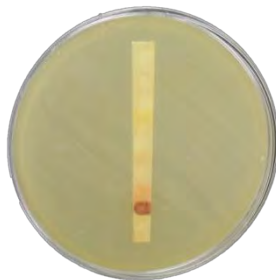
AN6-2



LT3-21

รูปที่ 8 (ต่อ) TLC-bioautography ของสารสกัด AN6-2 และ LT3-21

K. pneumonia - inactive

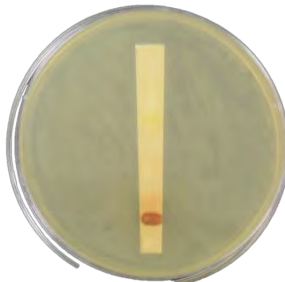


AN6-2

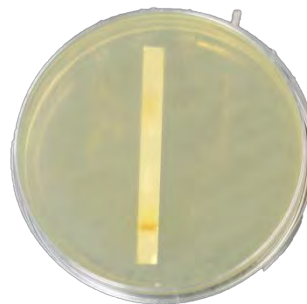


LT3-21

S. typhi - inactive

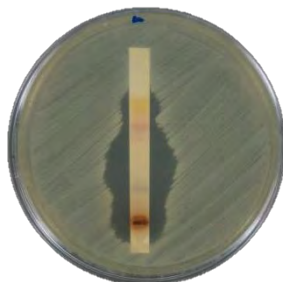


AN6-2



LT3-21

MRSA



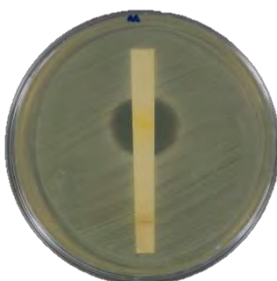
AN6-2

MRSA

Sample: AN6-2

(Dichloromethane: Methanol= 9:1)

Rf	inhibition zone(cm)
0.00	1.73
0.37	2.37
0.67	1.17



LT3-21

MRSA

Sample: LT3-17

(Dichloromethane: Methanol= 9:1)

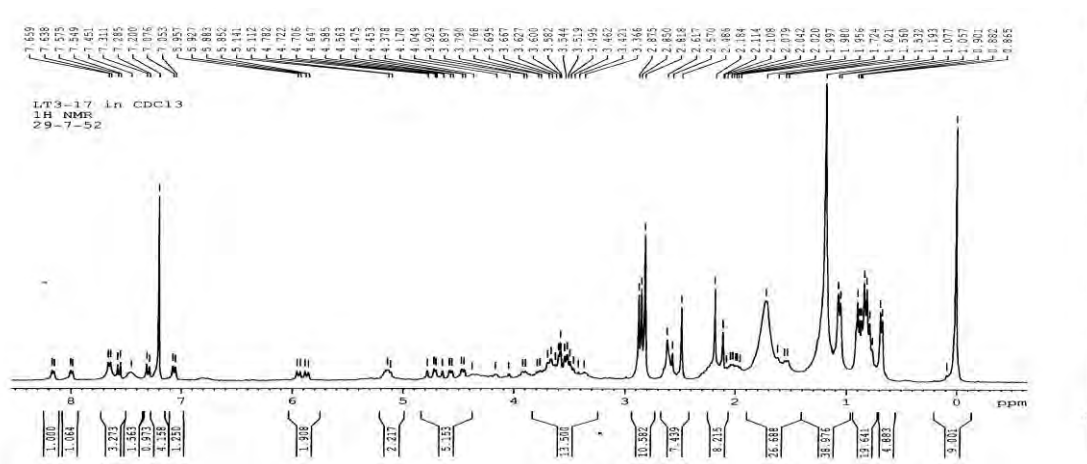
Rf	inhibition zone(cm)
0.55	2

รูปที่ 8 (ต่อ) TLC-bioautography ของสารสกัด AN6-2 และ LT3-21

3. ผลการสกัดแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1 สารสำคัญจากเชื้อของสเตรปโตมัยซิส LT3-21

ได้ทำการหมักเพิ่มปริมาณเชื้อสเตรปโตมัยซิส LT3-21 เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่มีปริมาณเพียงพอสำหรับการสกัดแยกสารสำคัญให้บริสุทธิ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงใน Yeast extract-Malt extract broth ปริมาตร 5 ลิตร เมื่อทำการ partition ด้วยเอธิลอะซิเตต ได้สารสกัดหยาบปริมาณ 627 มิลลิกรัม ทำการสกัดแยกสารสำคัญให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น ใช้ silica gel column โดยใช้ mobile phase system เป็น dichloromethane กับ methanol ในอัตราส่วนต่างๆ แต่จากการทดลองพบว่าสารที่ได้จะไม่เสถียรเมื่อใช้ silica gel ในการแยก เมื่อเปลี่ยนมาใช้ Sephadex LH-20 ในการแยกพบว่าแยกสารได้ดี โดยระบบที่เหมาะสมคือใช้ mobile phase เป็น acetone 100% ได้สารบริสุทธิ์สีเหลือง (A1) ปริมาณ 20 มิลลิกรัม นำไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วย NMR ได้ผลดังรูปที่ 9

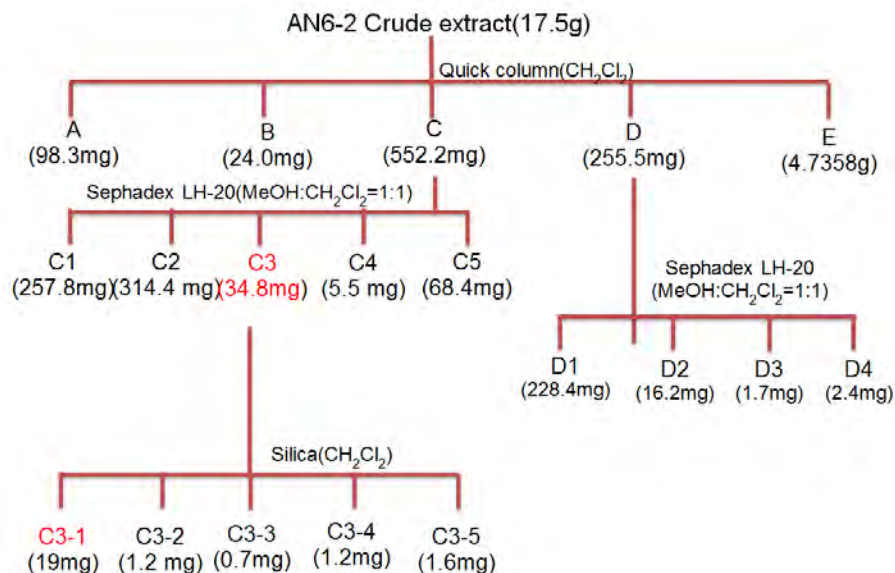


รูปที่ 9 300 MHz ^1H NMR spectrum ของสาร A1

แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าสาร A1 ที่ได้ไม่เสถียร มีการสลายตัวเมื่อเก็บไว้ ไม่สามารถวิเคราะห์โครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ได้ ทางโครงการจึงทำการศึกษารายละเอียดอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต่อโปรตีน FtsZ

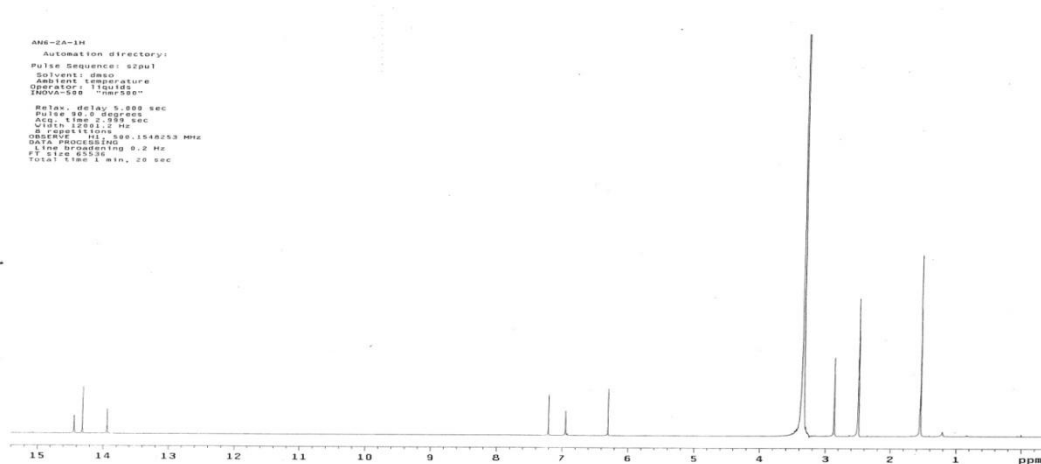
3.2 สารสำคัญจากเชื้อของสเตรปโตมัยซิส AN6-2

ได้ทำการหมักเพิ่มปริมาณเชื้อสเตรปโตมัยซิส AN6-2 เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่มีปริมาณเพียงพอสำหรับการสกัดแยกสารสำคัญให้บริสุทธิ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงใน ISP II broth เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นกรองแยกเซลล์และน้ำหมักเชื้อ ทำการ partition น้ำหมักเชื้อด้วยเอธิลอะซิเตต ได้สารสกัดหยาบปริมาณ 17.5 กรัม ทำการสกัดแยกสารสำคัญให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี โดยมีขั้นตอนต่างๆ ตามแผนภูมิด้านล่าง ได้สารบริสุทธิ์สีเหลือง C3-1 ปริมาณ 19 มิลลิกรัม นำไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีและทดสอบฤทธิ์

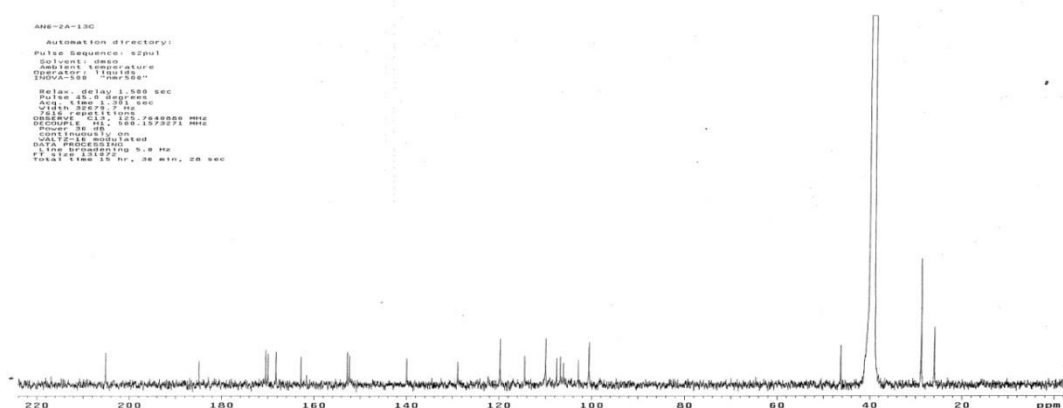


3.3 การพิสูจน์โครงสร้างสาร C3-1 จากเชื้อของสเตรปโตมัยซิส AN6-2

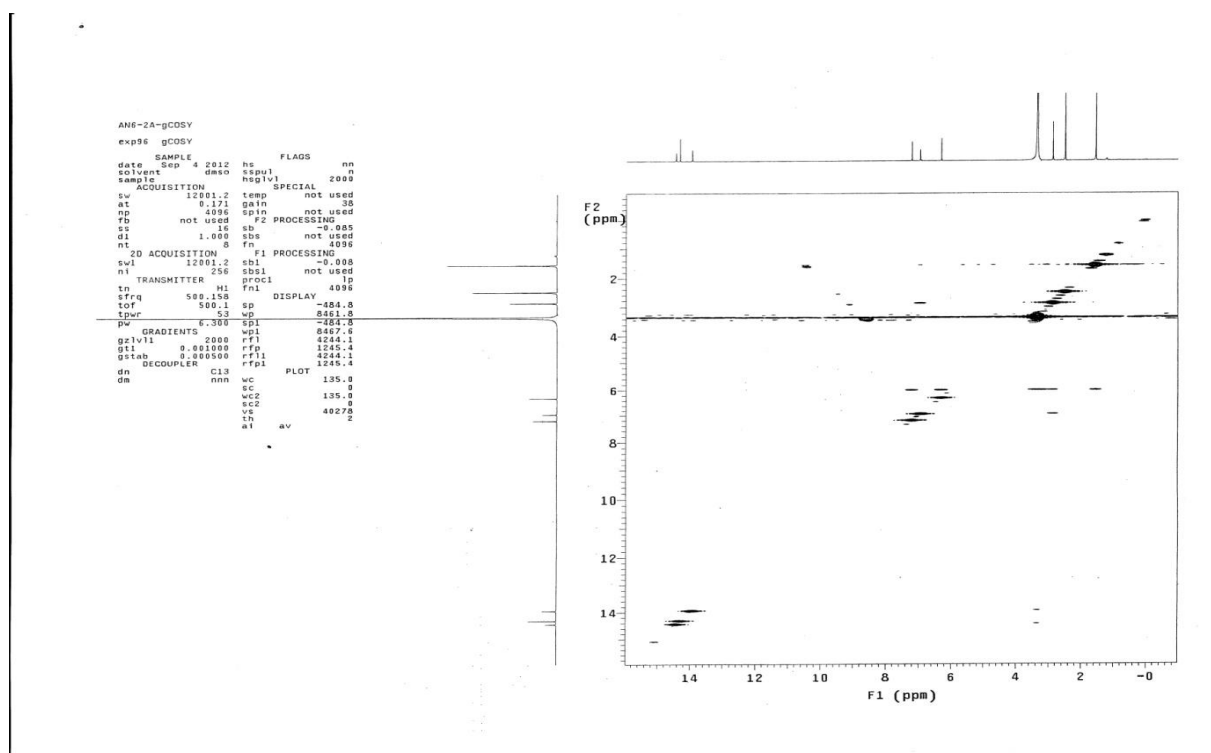
สารบริสุทธิ์ C3-1 นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ได้ข้อมูล 1D และ 2D NMR ดังรูปที่ 10-15



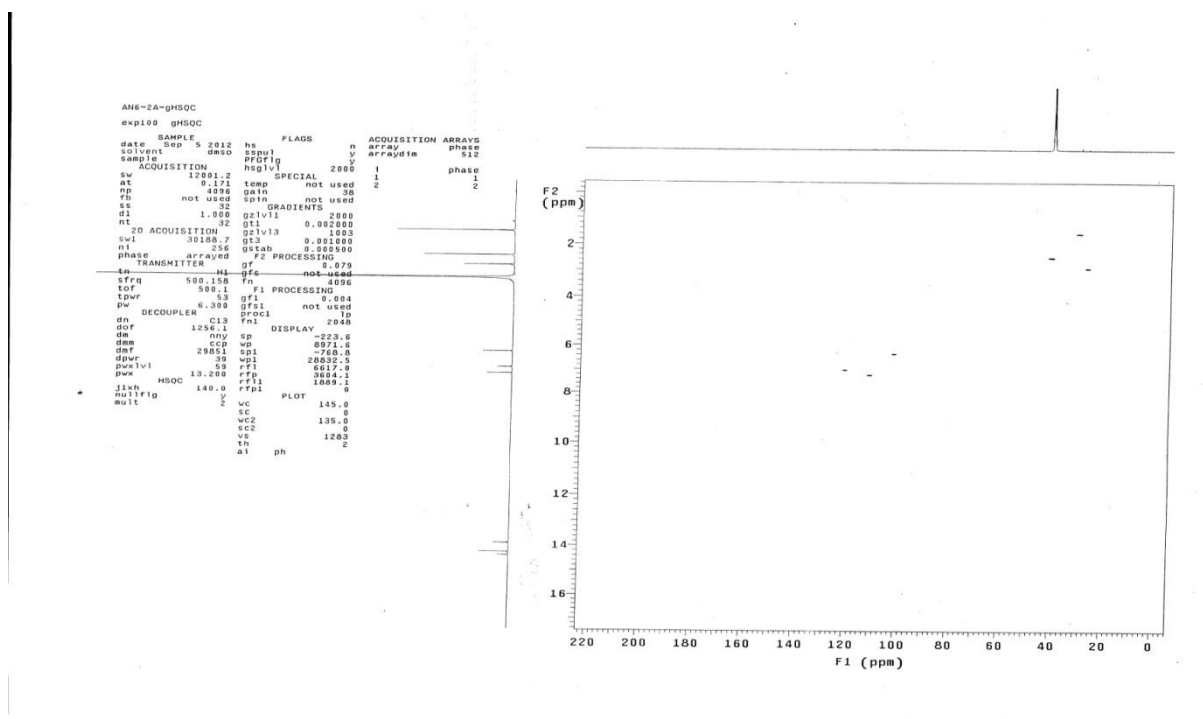
รูปที่ 10 500 MHz ¹H NMR spectrum ของสาร C3-1



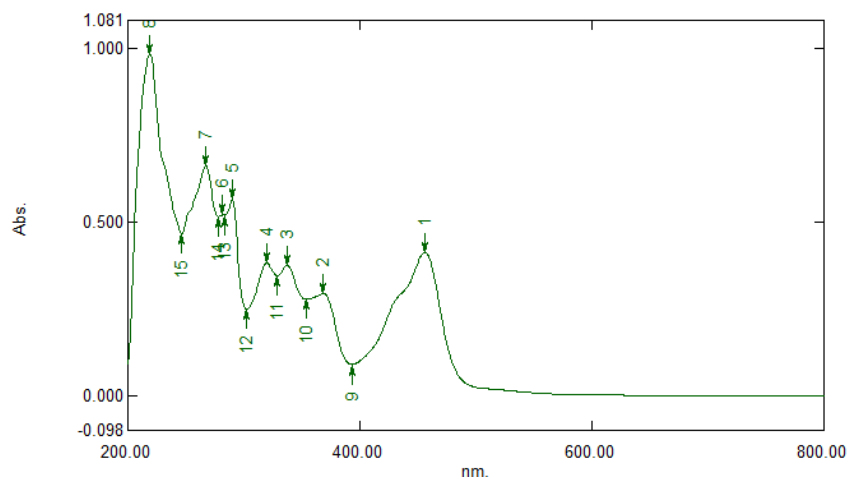
รูปที่ 11 125 MHz ¹³C NMR spectrum ของสาร C3-1



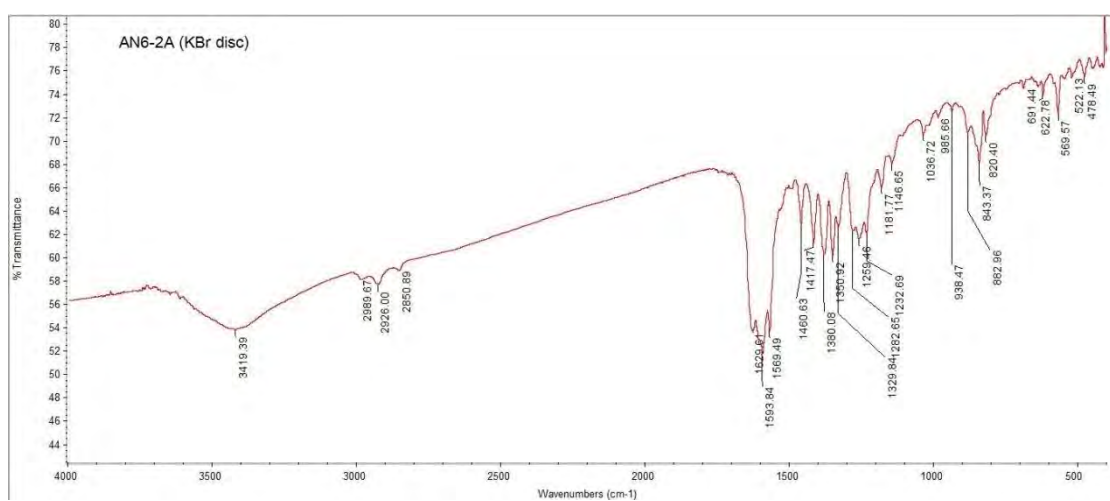
รูปที่ 12 H,H-COSY NMR spectrum ของสาร C3-1



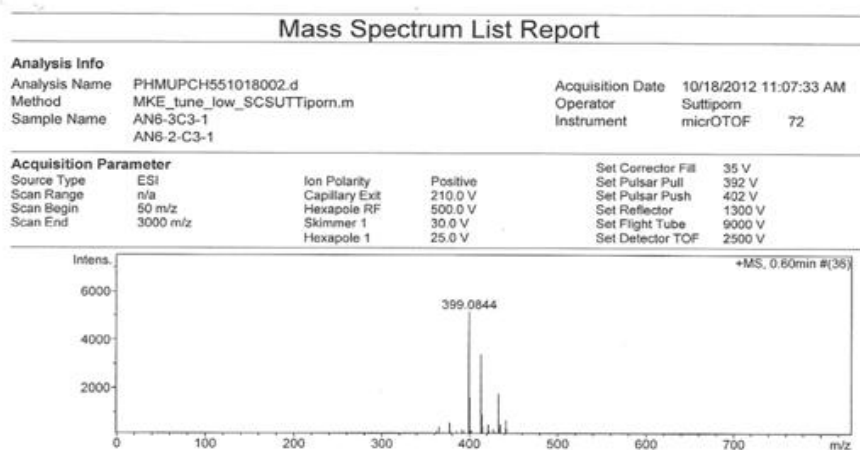
รูปที่ 13 HMOC NMR spectrum ของสาร C3-1



รูปที่ 16 UV spectrum ของสาร C3-1



รูปที่ 17 IR spectrum ของสาร C3-1

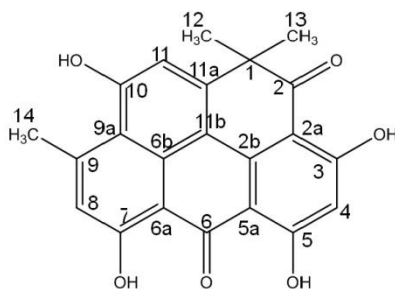


รูปที่ 18 MS spectrum ของสาร C3-1

จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้และเปรียบเทียบกับรายงานที่เคยมีมาก่อน ดังผลในตารางที่ 4 ทำให้สามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสาร C3-1 เป็น resistomycin

ตารางที่ 4 ^1H และ ^{13}C NMR data ของ C3-1 และ resistomycin

NMR	C3-1			Resistomycin	
Position	^1H chemical shift (ppm)	^{13}C chemical shift (ppm)	HMBC chemical shift (ppm)	^1H chemical shift (ppm)	^{13}C chemical shift (ppm)
1	-	46.3	H-11, 1-CH ₃	-	46.5
2	-	205.1	H-4, 1-CH ₃	-	204.7
2a	-	102.9	H-4, 5-OH	-	102.5
2b	-	139.9	H-11	-	139.3
3	13.94(s, 1H)	170.5	H-4, 3-OH, 5-OH	14.42 (s, OH)	170.1
4	6.30(s, 1H)	100.6	3-OH, 5-OH	6.29 (s)	100.1
5	14.31(s, 1H)	169.9	9-CH ₃	14.30 (s, OH)	169.5
5a	-	106.1	H-4, 7-OH	-	105.6
6	-	184.9	H-4, H-8	-	184.2
6a	-	106.8	H-8, 7-OH	-	106.2
6b	-	128.9	-	-	128.3
7	14.43(s, 1H)	168.3	H-4, H-8, 7-OH	13.92 (s, OH)	167.7
8	6.95(s, 1H)	119.8	9-CH ₃ , H-8, H-11, 7-OH	6.93 (s)	119.1
9	-	152.3	9-CH ₃ , H-11	-	151.5
9a	-	114.5	9-CH ₃ , H-8, H-11	-	114.4
10	-	162.8	9-CH ₃ , H-11	-	162.3
11	7.21(s, 1H)	110	-	7.21 (s)	109.6
11a	-	152.8	1-CH ₃ , H-11	-	152.1
11b	-	107.6	H-4, H-8, H-11	-	107.2
12	1.54	28.8	1-CH ₃	1.56 (s)	25.5
13	1.55				
14	2.86(s, 3H)	25.9	9-CH ₃	2.87 (s)	28.4

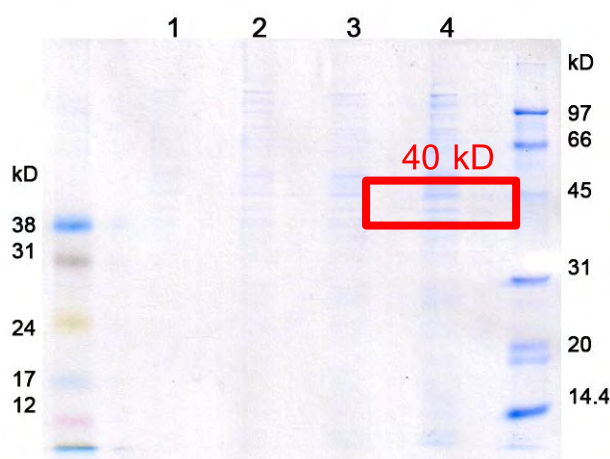


Resistomycin

4. ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารต่อการทำงานของโปรตีน FtsZ โดยวิธีทางจุลชีววิทยาและชีวเคมี

4.1 ผลการสกัดแยกโปรตีน FtsZ

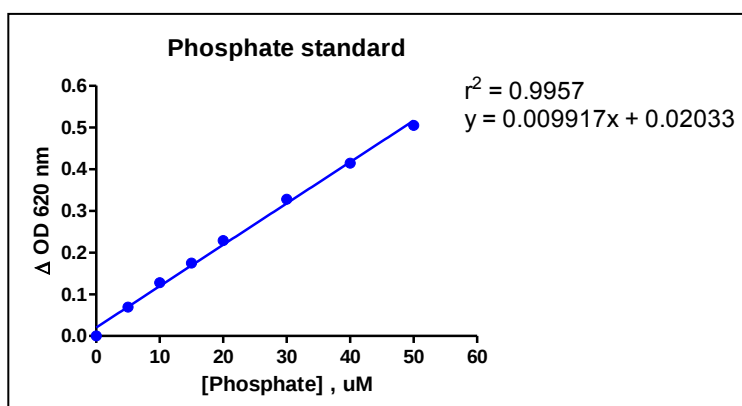
ในส่วนของการแยกโปรตีน FtsZ ได้ทำการทดลองโดยอ้างอิงจากวิธีของ Romberg, L. และคณะ (J. Biol. Chem., 2001, 276, 11748) ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ระดับหนึ่ง โดยทำการแยกสกัดโปรตีนจาก *E. coli* strain FA8401 โดยเลี้ยงเชื้อและปรับปริมาณให้ได้ตามที่กำหนด เหนียวนำไปเชื้อสร้างโปรตีน FtsZ โดยเติม IPTG ลงในอาหารแล้วนำไปบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการแยกเชื้อ ล้างด้วยบัฟเฟอร์ แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง แยกส่วนประกอบของเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำ cell homogenate ที่ได้ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงด้วยความเร็วต่างๆ เพื่อแยกโปรตีน FtsZ ออกมา นำสารละลายโปรตีนที่ปั่นแยกได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าได้สารสกัดหยาบโปรตีนซึ่งมีโปรตีนน้ำหนักประมาณ 40 กิโลดาลตันที่ตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน FtsZ ที่มีรายงานไว้ (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ของสารสกัดหยาบโปรตีน FtsZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ (lane ที่ 1-4)

จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีน FtsZ ที่สกัดแยกได้ โดยทดสอบฤทธิ์ในการเป็น GTPase ซึ่งจะสามารถ catalyze GTP ให้กลายเป็น GDP พร้อมปล่อย free phosphate ออกมาซึ่งวัดปริมาณ free phosphate ด้วยการทำให้เกิดสี ซึ่งในการทดลองขั้นตอนนี้ได้ใช้ชุดทดสอบ GTPase โดยทำการวัดปริมาณของสารประกอบฟอสเฟต ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่าง GTPase กับ GTP โดยฟอสเฟตที่ถูกปลดปล่อยจะทำปฏิกิริยากับสี malachite green เกิดเป็นสารเชิงซ้อนสามารถคำนวณปริมาณฟอสเฟตได้โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งก่อนทำการทดสอบได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของฟอสเฟตที่ปริมาณต่างๆ เมื่อได้กราฟมาตรฐานฟอสเฟต (รูป 20) แล้วทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ GTPase ที่สกัดได้จาก *E. coli* strain

FA8401 โดยการผสมเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กับ GTP แล้วทำการวัดปริมาณ ฟอสเฟตที่ถูกปลดปล่อยออกมาโดยเดียวกับการสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้สามารถทำปฏิกิริยากับ GTP ได้โดยมีลักษณะของปฏิกิริยาที่เกิดเป็นแบบ first order kinetics กล่าวคือปฏิกิริยาจะเกิดเร็วขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 0.15 %v/v แต่อย่างไรก็ตาม โปรตีนที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ ดังนั้น ทางโครงการจึงเลือกที่จะใช้โปรตีน FtsZ จากบริษัท Cytoskeleton Inc. ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่า



รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานของฟอสเฟตที่ปริมาณต่างๆ

4.2ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์สาร resistomycin

หาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยวิธี microdilution method เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Methicillin-resistant *S. aureus* DMST 20651

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสาร resistomycin ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า MIC และ MBC ของสาร resistomycin

	<i>S.aureus</i>	MRSA	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
MIC (μg/mL)	0.0781	0.3125	0.0781	inactive	inactive
MBC on agar (μg/mL)	1.2500	0.3125	1.2500	inactive	inactive

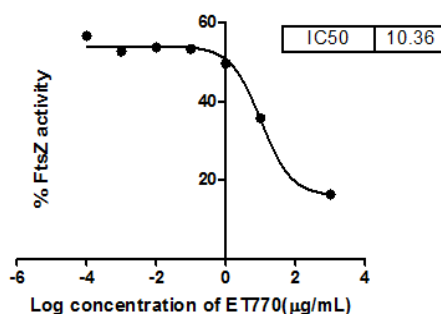
4.3 ผลของสารทดสอบต่อการ hydrolysis GTP

เนื่องจากโปรตีน FtsZ มีคุณสมบัติเป็น GTPase-like enzyme ซึ่งจะทำงานโดยการ hydrolysis GTP และปลดปล่อยฟอสเฟตออกมา ดังนั้นการวัดค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ สามารถทดสอบได้โดยวัดปริมาณฟอสเฟตที่ปลดปล่อยออกมา ซึ่งในการวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ FtsZ GTPase จะใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีที่เรียกว่า malachite green phosphomolybdate assay (Domadia *et al.*, 2007) โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณของ inorganic phosphate ที่เกิดขึ้นจากการ hydrolysis GTP ระหว่างขบวนการ FtsZ assembly และเมื่อมีการเติมสารทดสอบ โดยนำ FtsZ มา pre-incubate ร่วมกับตัวอย่างสารสกัดหรือ zantrins (positive control) ใน buffer ที่มี tween 20 เป็นองค์ประกอบ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม GTP ลงไป ทำการเก็บตัวอย่างจากแต่ละปฏิกิริยาทุกๆ นาที ทำการหยุด 10 ปฏิกิริยาในตัวอย่างที่เก็บมาโดยเติม EDTA แล้วทำให้เกิดสีโดยเติม malachite green และ ammonium molybdate แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา นาที เมื่อครบเวลานำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ซึ่งผลการทดสอบของสารต่างๆ มีดังนี้

- สาร hydrogenated microsporin A และ reneiramycin M ไม่มีผลต่อขบวนการ hydrolysis GTP

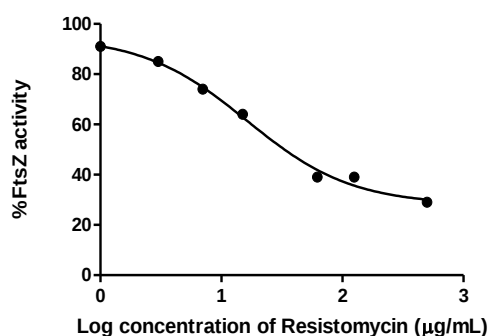
- สาร ecteinacidin 770 และสาร resistomycin ให้ผลยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ โดยลดการปล่อยปริมาณฟอสเฟต ให้ค่าการยับยั้ง IC_{50} ที่ 10.36 และ 6.11 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ดังรูปที่ 21 และ 22 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ

GTPase activity of Ecteinascidin 770(ET770)



รูปที่ 21 ผลการยับยั้ง GTPase activity ของโปรตีน FtsZ เมื่อเติมสาร ET770

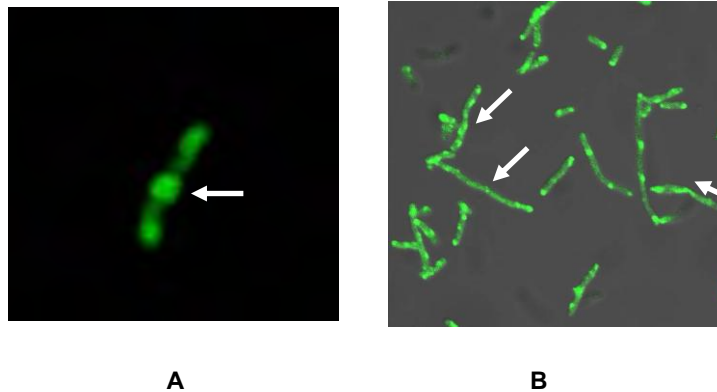
GTPase activity of Resistomycin



รูปที่ 22 ผลการยับยั้ง GTPase activity ของโปรตีน FtsZ เมื่อเติมสาร Resistomycin

4.4 ผลทดสอบฤทธิ์ของสาร resistomycin ต่อการรบกวนการเกิด Z-ring ของเชื้อ *E. coli*

ทำการศึกษาผลของสาร resistomycin ต่อการเกิด Z-ring ของเชื้อ *E. coli* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JW0093 ซึ่งมีโปรตีนที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (GFP) เชื่อมติดกับโปรตีน FtsZ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาร resistomycin แล้วทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ ณ เวลาต่างๆ กัน นำตัวอย่างที่ได้ไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล ได้ผลการทดลองดังรูป 23 พบว่าลักษณะการเกิด Z-ring เมื่อให้สาร resistomycin มีความแตกต่างจากสภาวะปกติ ทำให้การแบ่งเซลล์เกิดไม่สมบูรณ์



รูปที่ 23 ผลการรบกวนการเกิด Z-ring ใน *E. coli*

ลูกศรแสดงตำแหน่งของ Z-ring ลักษณะการเกิด Z-ring ใน *E. coli* สภาวะปกติ (A)

การเปลี่ยนแปลงของ Z-ring เมื่อมีสาร A1ยับยั้งโปรตีน FtsZ ที่เวลา 5 ชั่วโมง (B)

สรุปผลวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีดอยา MRSA รวมถึงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ โดยมีผลต่อโปรตีนที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย (FtsZ protein) จากสารสกัดน้ำหมักเชื้อของสเตรปโตมัยซิสทางทะเลจำนวน 14 ตัวอย่าง โดยพบว่าแบคทีเรียทางทะเลสายพันธุ์ LT3-21, S08-02, AN4-1, AN6-2, SH2-2, TV1-6 และ CH-17 มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ เมื่อนำมาศึกษาถึงผลของสารสกัดจากแบคทีเรียทางทะเล ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะ filament ใน *E. coli* strain JE6617 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* strain JE6617 ใน TSB broth ที่เติมและไม่เติมสารทดสอบ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยผลบวักจะเห็นความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ในแบคทีเรียต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งจากการทดลองพบว่า แบคทีเรียทางทะเลชนิด LT3-21 และ AN6-2 เท่านั้นที่ให้ผลที่น่าสนใจ ส่วน S08-02, SH2-2, TV1-6 และ CH-17 ลักษณะของ filament ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม จึงได้ทำการสกัดแยกเพื่อให้ได้สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ พบสาร resistomycin จากแบคทีเรีย AN6-2 ส่วนสารจาก LT3-21 ไม่สามารถแยกต่อได้ เนื่องจากความไม่เสถียรของสาร และจากผลการทดลองพบว่า สาร resistomycin มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้ง MRSA ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.1325 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อทดสอบผลของสารต่อการ hydrolysis ของ GTP ซึ่งเป็นการวัดการยับยั้งการทำงานของโปรตีน FtsZ

พบว่า สาร resistomycin ให้ค่า IC_{50} ที่ 6.11 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสาร ET770 ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์จากเพรียงทะเล มีค่า IC_{50} ที่ 10.36 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ เมื่อศึกษาผลของสาร resistomycin ต่อการเกิด Z-ring ของเชื้อ *E. coli* โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JW0093 ซึ่งมีโปรตีนที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนท์ (GFP) เชื่อมติดกับโปรตีน FtsZ พบว่า ลักษณะการเกิด Z-ring เมื่อให้สาร resistomycin มีความแตกต่างจากสภาวะปกติ ทำให้การแบ่งเซลล์เกิดไม่สมบูรณ์ เห็นลักษณะเซลล์เป็นสายยาว ไม่แบ่งออกจากกัน ดังนั้นจากผลของการวิจัยทำให้สามารถค้นพบสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ resistomycin และ ecteinacidin 770 ที่ออกฤทธิ์ต่อโปรตีนที่ใช้ในการแบ่งตัวของเซลล์แบคทีเรีย (โปรตีน FtsZ)

output ที่ได้จากโครงการ

ผลของการวิจัยจากโครงการนี้ ทำให้พบสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะเชื้อ MRSA ที่อาจมีกลไกการออกฤทธิ์เกี่ยวเนื่องจากการยับยั้งโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ข้อมูลที่ได้นี้อาจก่อให้เกิดประโยชน์ในการศึกษาและวิจัยพัฒนายาต้านแบคทีเรียที่มีเป้าหมายในการออกฤทธิ์แตกต่างออกไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Anderson, D. E., Gueiros-Filho, F. J., Erickson, H. P. (2004). Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J. Bacteriol.* 186, 5775-5781.
- Attaway, D. H., Zaborsky, O. R. (1993). Marine biotechnology, Vol 1, Pharmaceutical and bioactive natural products, Plenum Press, New York and London.
- Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 1-7.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiotics.* 58, 1-26.
- Bi, E., Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature.* 354, 161-164.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. (2003). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 20, 1-48.
- Buchanan, G. O., Williams, P. G., Feling, R. H., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. (2005). Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Org. Lett.*, 7, 2731-2734.
- Charan, R. D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., Carter, G. T. (2004). Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.* 67, 1431-1433.

- Cuevas, C., Cuevas, F., Gallego, P., Mandez, P., Manzanares, I., Munt, S., Polanco, C., Rodriguez, I. CB 2000/16148, 2000. WO 02022596, 2002.
- Davidson, B. S. (1995). New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Curr. Opi. Biotechnol.* 6, 284-291.
- David, J. N., Gordon, M. C. (2004). Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.* 67, 1216-1238.
- Davidson, S. K., Allen, S. W., Lim, G. E., Anderson, C. M., Haygood, M. G. (2001). Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacteria symbiont "*Candidatus endobugula sertula*" of the bryozoan *Bugula neritina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4531-4537.
- Domadia, P., Bhunia, A., Sivaraman, J., Swarup, S., Dasgupta, D. (2008). Berberine targets assembly of Escherichia coli cell division protein FtsZ. *Biochemistry*, 47, 3225-3234.
- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* 74, 831-840.
- Fatma, A., Amer, E. M., El-Behedy, H.A. (2008). New targets for antibacterial agents. *Biotechnology and molecular biology reviews.* 3, 46-57.
- Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. (2003). Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus Salinospora. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 355-357.
- Gontang, E. A., Fenical, W., Jensen P. R. (2007). Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3272-3282.
- Gould, I. M. (2007). MRSA bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30, S66-S70.
- Hirota, Y., Ryter, A., and Jacob, F. (1968). Thermosensitive mutants of E. coli affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 33, 677-693.
- Huang, Q., Tonge, P., Slayden, R. (2007). FtsZ: A Novel Target for Tuberculosis. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 527-543.
- Ito, H., Ura, A., Oyamada, Y., Tanitame, A., Yoshida, H., Yamada, S., Wachi, M., Yamagishi J. (2006). A 4-aminofurazan derivative-A189-inhibits assembly of bacterial cell division protein FtsZ in vitro and in vivo. *Microbiology and Immunology*, 50, 759-764.
- Kanoh, K., Adachi, K., Matsuda, S., Shizuri, Y., Yasumoto, K., Kusumi, T., Okumura, K., Kirikae, T. (2008). New Sulfoalkylresorcinol from Marine-derived Fungus, *Zygosporium* sp. KNC52. *The Journal of Antibiotics.* 61:192-194.

- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 245-251.
- Lee, S. S., Kim, H. S., Kang, H. J., Kim, J. K., Chung, D. R. (2007). Rapid spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a new hospital in the broad spectrum antibiotic era. *J. Infect.* 55, 358-362.
- Lock, R. R., Harry, E. J. (2008). Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nature Rev. Drug Discov.* 7, 324-338.
- Löwe J., van den Ent F., Amos L. (2004). A. Molecules of the bacterial cytoskeleton. Annual review of biophysics and biomolecular structure. 33, 177-198.
- Margolin, W. (2005). FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 862-871.
- Michie K. A., Löwe J. (2006). Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 467–492.
- Miki, W., Otaki, N., Yokoyama, A., Izumida, H., Shimidzu, N. Okadaxanthin, (1994). a novel C50-carotenoid from a bacterium, *Pseudomonas* sp. KK10260C associated with the marine sponge, *Halichondria okadai*. *Experientia.* 50, 684-686.
- Oliva, M. A., Trambaiolo, D., Löwe, J. (2007). Structural Insights into the Conformational Variability of FtsZ. *J. Mol. Biol.* 373, 1229–1242.
- Pinho, M. G., Errington, J. (2003). Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Mol. Microbiol.* 50, 871-881.
- Plaza, A., Keffer, J. L., Bifulco, G., Lloyd, J. R., Bewley, C. A. (2010). Chrysopaentins A-H, Antibacterial Bisdiarylbutene Macrocycles that Inhibit the Bacterial Cell Division Protein FtsZ. *JACS.* 132, 9069-9077.
- Proksch, P., Edrada, R. A., Ebe, R. (2002). Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 125-34.
- Rai, D., Singh, J. K., Roy, N., Panda, D. (2008). Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem. J.* 410, 147-155.
- Reidinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A.T., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M. et al. (2004). Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosisspora* strain AB-18-032. *J. Antibiot (Tokyo)*, 57, 271-279.
- Romberg, L., Simon, M., Erickson, H. P. (2001). Polymerization of FtsZ, a bacterial homolog of tubulin. *J. Biol. Chem.* 276, 11743-11753.

- Theuretzbacher U. (2011). Resistance drives antibacterial drug development. *Current opinion in pharmacology*. 11, 433-8.
- Van De Putte, P., Van, D., and Roersch, A. (1964). The Selection of mutants of *Escherichia coli* with impaired cell division at elevated temperature. *Mutation Res.* 106, 121-128.
- Vollmer, M. (2006). The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? *Appl. Microbiol. Biotech.* 73, 37–47.
- Wachi, M., Iwai, N., Kuniyama, A., Nagai, K. (1999). Irregular nuclear localization and anucleate cell production in *Escherichia coli* induced by a Ca^{2+} chelator, EGTA. *Biochimie.* 81, 909-913.