บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันจุลินทรีย์ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์เพิ่มมากยิ่งขึ้นโดยพบว่าจุลินทรีย์หลากหลายชนิดสามารถถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ อาทิ เช่น อุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และอุตสาหกรรมการผลิตยา เนื่องจากจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิดมีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งผลิตสารชีวภาพ ที่มีคุณสมบัติที่ดี เช่น สารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง สารกำจัดแมลง สารต้านจุลชีพและสารปฏิชีวนะ ได้แก่ รา *Penicillium chrysogenum* ผลิตยา Penicillin รา *Aspergillus terrus* ผลิตสาร Lovastatin มีฤทธิ์ในการลดระดับ cholesterol ในเส้นเลือด [1] [2]

ในสภาวะปัจจุบัน พบว่ามีจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดมีวิวัฒนาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotics resistant) ที่มีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ยาปฏิชีวนะบางชนิดไม่สามารถรักษาโรคให้หายขาดได้และนอกจากนั้นยังพบว่ามีจุลินทรีย์ ก่อโรคชนิดใหม่ ๆ เกิดขึ้นตลอดเวลา เช่น ไข้หวัดนก ซาร์ย โรคเอดส์ ฯ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ในปัจจุบัน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จากหลาย ๆ ประเทศ มีความพยายามที่จะคิดค้นหาตัวยาใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นเพื่อใช้ทดแทนตัวยาเดิม เช่น การหาสารสกัดออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร หรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพก่อโรค และสารที่ได้ต้องมีความปลอดภัยต่อการบริโภค ซึ่งกระบวนการทั้งหมดต้องใช้ระยะเวลานานและการลงทุน มหาศาลจึงจะได้ยาใหม่ ที่มีประสิทธิภาพในการรักษา [2]

ในช่วงระยะเวลาที่ผ่าน การพัฒนาเทคโนโลยีด้านพันธุวิศวะกรรมมีความก้าวหน้าอย่างมาก และมีเทคนิคที่ช่วยเพิ่ม โอกาสในการค้นหาตัวยาใหม่ ซึ่งทำได้เร็วและลงทุนน้อยลงที่เรียกว่า Combinatorial biosynthesis [3] [4] นอกจากนั้นยังสามารถใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวะกรรมในการดัดแปลงพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถควบคุมจุลินทรีย์ผลิตสาร metabolite ที่มีความหลากหลายและ กำหนดคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ หรือสังเคราะห์สารที่มีโมเลกุลใหญ่และมีโครงสร้างที่ซับซ้อนได้อย่างไม่จำกัด ซึ่งเทคนิคที่กล่าวมาเป็นการดัดแปลงพันธุกรรมแบบสุ่ม โดยนักวิทยาศาสตร์ ต้องทำการตัดต่อพันธุกรรม ของสิ่งมีชีวิตที่มีความน่าจะเป็นในทุก ๆ กรณี ถ้าหากว่าไม่เข้าใจวิถีการสังเคราะห์ของสารที่ต้องการนั้น จะทำให้ระยะเวลาที่นานแต่ถ้าหากมีความรู้และเข้าใจถึงวิถีการสังเคราะห์ของสารที่ต้องการได้ ก็จะสามารถทำนายออกแบบและควบคุมการสังเคราะห์สารให้มีโครงสร้างตามที่ต้องการได้

ราในกลุ่ม *Xylaria* เป็นราที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากมายหลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotics) สารต้านมะเร็ง (antitumor) antihypercholesterolemic และสารพิษในกลุ่ม cytotoxin เป็นต้น ประเทศไทยเป็นประเทศมีภูมิอากาศแบบเขตร้อนชื้นเหมาะต่อการเจริญของรา *Xylaria* เป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นจึงสามารถแยกรา *Xylaria* sp. BCC1067 ได้จากป่าในประเทศไทย จากการศึกษาพบว่ารา สายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้หลายชนิด เช่น depudecin, phaseolinone, phomenone, 19,20-epoxycytochalacin Q และ (E)-methyl-3-(4-methoxyphenoxy)-propenoate เป็นต้น [5] ซึ่งสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ที่ผลิตจาก *Xylaria* sp. BCC1067 อย่างน้อยจำนวน 2 ชนิด จัดเป็นสารประกอบในกลุ่ม polyketide คือ depudecin และ

19,20-epoxycytochalacin Q พบว่า depudecin เป็นสารที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและมีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการ Histone deacetylase (HDACs) ซึ่งกระบวนการนี้เป็นสาเหตุสำคัญต่อการเกิดการกลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งได้ และพบว่าสาร depudecin มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ HDACs แต่สาร depudecin ก็มีพิษต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้ด้วย ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคทาง combinatorial biosynthesis มาใช้เพื่อดัดแปลงหรือปรับปรุงโครงสร้างสารประกอบ polyketide ให้ได้สารใหม่ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นและไม่มีผลข้างเคียง (side effect) ต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อข้างเคียง แต่เนื่องจากยังไม่มีความเข้าใจถึงวิถีการสังเคราะห์สารประกอบ polyketide ในรา *Xylaria* sp. BCC1067 ในระดับโมเลกุลได้ และไม่ทราบว่ามียีนอะไรบ้างที่เกี่ยวข้องต่อการ สังเคราะห์และควบคุมการสังเคราะห์สาร polyketide จึงทำให้การปรับปรุงโครงสร้างของสาร polyketide ทำได้ยาก

โดยทั่ว ๆ ไป ในจีโนมของรามักจะมีหลาย ๆ ยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ อาธิเช่น ในจีโนม (Genome) ของรา *Aspergillus* sp. มีขนาดจีโนมระหว่าง 29 – 37 Mb และสามารถถอดรหัสยีนได้ประมาณ 9000 - 12000 gene ซึ่งสามารถทำนายหน้าที่ของยีนต่าง ๆ ที่พบในจีโนมของรา *Aspergillus* sp. ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในกลุ่ม Polyketide และ Non-ribosomal peptide ได้ดังตาราง (http://www.aspergillus.org.uk/education/payneAAA06.pdf)

species	Genome size (Mb)	Gene No.	PKS	NRPS	P450
A. fumigatus	29.4	9,926	14	14	65
A. nidulans	30.1	9,541	27	14	102
A. oryzae	36.7	12,079	30	24	151
A. flavus	36.8	12,197	35	24	122

แต่อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจีโนมของรา พบว่ายีนบางชนิดไม่สามารถวิเคราะห์หน้าที่ได้ภายใต้สภาวะการทดลองใด ๆ เช่นจากจีโนมของรา *A. nidulans* พบว่ามียีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในกลุ่ม PK และ NRP อยู่ประมาณ 27 gene และ 14 gene ตามลำดับ แต่จากการเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบว่าราสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ได้เพียง 7 ชนิด เช่น sterigmatocystin, penicillin, terrequnine, triacetylfusarinine, ferricrocin, aspoquinnoione และ aspyridone [10] นอกจากนั้น ยังพบว่าในรา *Xylaria* sp.BCC1067 ที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษาทดลองนั้น มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมตาบอไลต์ในกลุ่ม PK มากถึง 18 gene และมียีน NRP อย่างน้อย 2 gene [1] แต่พบว่าสามารถควบคุมให้รา *Xylaria* ผลิตสารได้เพียง 2 ชนิด คือ depudecin และ cytochalacin

จากการวิจัยเบื้องต้น [การเพิ่มผลผลิตการสังเคราะห์โปรตีนในรา *Aspergillus oryzae* โดยการควบคุมกิจกรรม ของเอนไซม์โปรติเอส (ว.1-ค 2547) และ ศึกษาคุณสมบัติและการแยกยีนที่เกี่ยวข้อง ในวิถีการสังเคราะห์สาร polyketide จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 (ว.1-ค

2548)] คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนารา *A. oryzae* ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับผลิตสารที่มีมูลค่าสูง และยังค้นนพบ ยีนที่เกี่ยวข้องกับ การสังเคราะห์สารในกลุ่ม polyketide ที่มีโครงสร้างการจัดเรียงตัวของบริเวณเข้าทำปฏิกิริยา (active domain) ของยีนที่น่าสนใจ 2 ยีน คือ *pksmt* และ *pksX1* [5] โดยยีน *pksmt* และ *pksX1* ลักษณะการจัดเรียงตัวของ active domain จัดอยู่ในกลุ่ม highly reduce type I polyketide synthase ซึ่งโครงสร้างการจัดเรียงตัวของ active domain ของยีนทั้ง 2 ชนิด มีความน่าสนใจอย่างยิ่งว่าจะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีโครงสร้างสาร และคุณสมบัติอย่างไร ซึ่งจากการศึกษาของ อิซากะและคณะ [6] พบว่ารา *Xylaria* sp.BCC1067 สามารถสังเคราะห์สาร polyketide หลัก ๆ ได้ 2 ชนิด คือ 1) depudecin ซึ่งมีคุณสมบัติที่เป็นสาร antimalaria และ anticancer 2) 19,20-epoxycytochalacin Q ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารลูกผสมระหว่าง polyketide และ nonribosomal peptide โดยมีคุณสมบัติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์หลาย ๆ ชนิดได้ ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถพัฒนานำไปใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งหรือ antiplasmodial

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างสารและหน้าที่ของยีน *pksmt* จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 ที่ถูกผลิตได้ในรา *A. oryzae* ทั้งนี้คาดว่ายีน *pksmt* น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการ สังเคราะห์สาร polyketide ในกลุ่ม depudecin ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง และเป็นสารต้านเชื้อมาลาเรีย และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สาร polyketide ในรา *A. oryzae* โดยอาศัยเทคนิค heterologous expression

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างสารและหน้าที่ของยีน *pksmt* ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์สาร polyketide ที่ได้จากรา *Xylaria* sp. BCC1067 ในรา *A. oryzae*

2.2 เพิ่มศักยภาพในการผลิตสาร polyketide ของยีน *pksmt* ในรา *A. oryzae*

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลสำเร็จของงานวิจัยนี้คือ ทราบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *pksmt* ที่แยกได้จากรา *Xylaria* ต่อการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพภายใต้การควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ในรา *A. oryzae* ด้วยกระบวนการ Heterologous gene expression ซึ่งมีประโยชน์ต่อนำไปใช้ทางการแพทย์ การเกษตร และเทคโนโลยีชีวภาพ โดยสามารถ นำยีนดังกล่าวไปดัดแปลงด้วยเทคนิค combinatorial biosynthesis เพื่อผลิตสารที่มีคุณสมบัติ ในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีขึ้น (new novel compound) ซึ่งสามารถพัฒนานำไปใช้งานได้ในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ชนิด เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมการเกษตร เป็นต้น นอกจากนั้นสามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยใน รูปสิ่งตีพิมพ์ นอกจากนั้น เทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้เพื่อควบคุมให้เซลล์เจ้าบ้าน (heterologous host) ผลิตเอ็นไซม์หรือสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แท้จริงได้

4. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์และหน้าที่ของ *PKSMT* gene ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp. ต่อกระบวนการสังเคราะห์สาร polyketide หรือสาร metabolite อื่น ๆ ในระดับโมเลกุลของรา *A. oryzae* ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาหรือดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ และอาจได้ผลิตภัณฑ์ยาตัวใหม่ที่มีคุณสมบัติที่จำเพาะต่อการนำไปรักษาโรคมากยิ่งขึ้น ซึ่งหน่วยงานที่สามารถนำผลงาน วิจัยไปใช้ประโยชน์ได้แก่ หน่วยงานที่ศึกษาทางด้านการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรา เช่น องค์การเภสัชฯ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมผลิตยาและสารเคมีทางการเกษตร