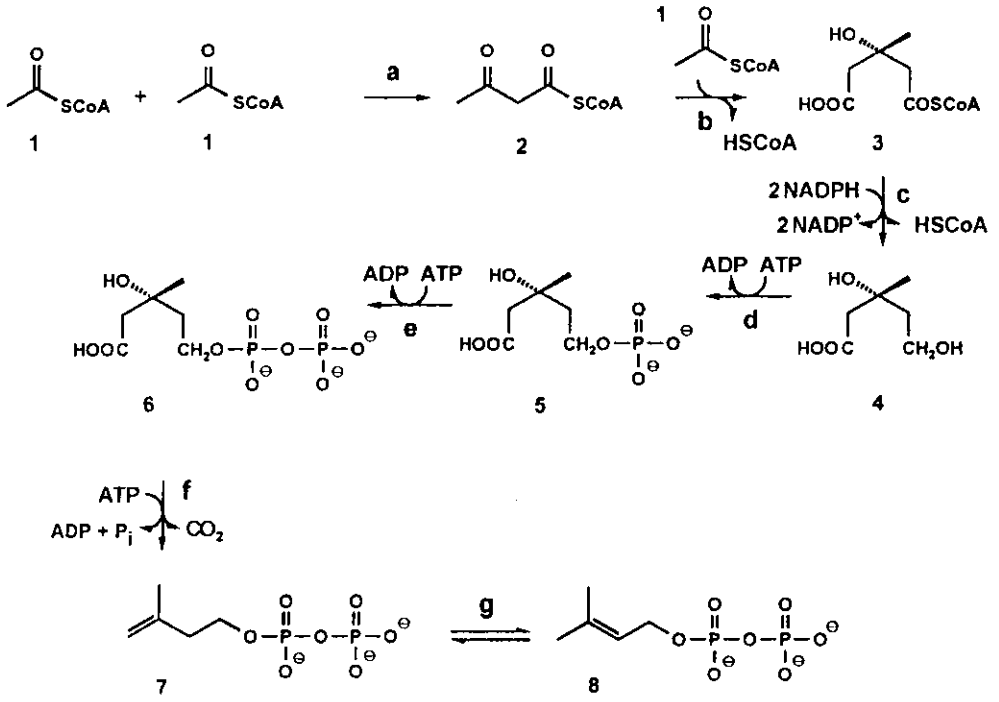
บทนำ (Introduction)

สารเทอร์ปีน (Terpene compound) จัดเป็นกลุ่มสารที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างอย่างมากกลุ่มหนึ่ง และมีความสำคัญเป็นอย่างมากทั้งในด้านการแพทย์และเภสัชกรรม ส่วนหนึ่งของตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ให้สารเทอร์ปีนที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น Taxol® (Paclitaxel) ที่ได้จากเปลือกต้นยิว (Yew Tree) ที่นำมาใช้เป็น cytostatic agent, carotenoids ที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant, lycopene เป็น oncopreventive agent (Sacchettini and Poulter 1997) รวมไปถึง Kelnac® (Plaunotol) ที่ได้จากต้นเปล้าน้อยนำมาใช้เป็น anti-peptic ulcer ด้วย (Koga et al, 1996)

สารเทอร์ปีนเป็นสารที่ถูกประกอบขึ้นผ่านวิถีชีวสังเคราะห์จาก Isoprene unit ที่ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 5 อะตอม เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าวิถีชีวสังเคราะห์ของ Isoprene unit ในเซลล์สัตว์และยีสต์ถูกสร้างผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ที่เรียกว่า mevalonate pathway (รูปที่ 1, Bochar et al.1999) โดยจะเริ่มจากโมเลกุลของ acetyl CoA (**1**) จำนวน 2 โมเลกุล เกิดเป็น acetoacetyl CoA (**2**) โดยเอนไซม์ thiolase (**a**) จากนั้นอีกหนึ่งโมเลกุลของ acetyl CoA รวมตัวเข้ากับ acetoacetyl CoA เกิดเป็น HMG-CoA (**3**) โดยเอนไซม์ HMG CoA synthase (**b**) ต่อมา HMG CoA ถูกรีดิวซ์ได้เป็น mevalonic acid (**4**) ในภาวะที่มี NADPH โดยเอนไซม์ HMG CoA reductase (**c**) ต่อจากนั้น mevalonic acid เกิดปฏิกิริยา phosphorylation ได้เป็น mevalonic 5-phosphate (**5**) และ mevalonic acid 5-diphosphate (**6**) โดยเอนไซม์ mevalonate kinase (**d**) และ mevalonate 5-phosphate kinase (**e**) ตามลำดับ สุดท้าย mevalonic acid 5-diphosphate เกิดปฏิกิริยา decarboxylation และ dehydration ได้เป็น isopentenyl diphosphate (**7**, IPP) โดยเอนไซม์ mevalonate 5-diphosphate decarboxylase (**f**) และ IPP ถูก isomerized ได้เป็น dimethylallyl diphosphate (**8**, DMAPP) โดยเอนไซม์ IPP isomerase (**g**) (Qureshi and Porter, 1981)

แต่ในช่วงประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา ได้มีการค้นพบวิถีชีวสังเคราะห์ของ isoprene unit แบบใหม่โดยกลุ่มวิจัยของ Rohmer และ Arigoni เมื่อทั้งสองกลุ่มวิจัยได้พบว่า isotopic labeling pattern ของสารกลุ่มเทอร์ปีนที่สนใจอยู่นั้น ไม่ได้เป็นตามทฤษฎีที่ได้กล่าวไว้ตามวิถีชีวสังเคราะห์ของ mevalonate pathway ในทุกกรณีศึกษา ผลการศึกษาโดยป้อนสารติดฉลาก ^{13}C-glucose ในเซลล์ของ *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Alicyclobacillus* และ *Gingko biloba* (Broers 1994, Schwarz 1994, Rohmer et al. 1993, 1996) พบว่าสาร hopanoids และ ubiquinones จากแบคทีเรีย และ gingkolides จากต้นแป๊ะก๊วย มี isotopic labeling pattern ที่ไม่สม่ำเสมอและไม่เป็นไปตามทฤษฎีของวิถีชีวสังเคราะห์แบบ mevalonate pathway เพื่อต้องการอธิบายวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเทอร์ปีนให้กระจ่าง จึงมีการตั้งสมมติฐานใหม่เกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มเทอร์ปีน โดยทดลองป้อนสารติดฉลากของ acetate และ glucose เพื่อทำการเปรียบเทียบระหว่าง mevalonate pathway และวิถีชีวสังเคราะห์แบบใหม่ ในพืชและสาหร่ายสีเขียว ได้แก่ *Scenedesmus obliquus*, *Lemna gibba*, *Hordeum vulgare*, *Daucus carota* , เซลล์เพาะเลี้ยงของ *Taxus chinensis* และ *Mentha piperita* (Schwender et al. 1996, Lichtenthaler et al. 1997, Eisenreich et al. 1996, 1997) ผลสรุปในที่สุดก็คือในแบคทีเรียและในพืชมีวิถีชีวสังเคราะห์ 2 แบบ กล่าวคือสารกลุ่ม steroids



รูปที่ 1 Classical mevalonate pathway

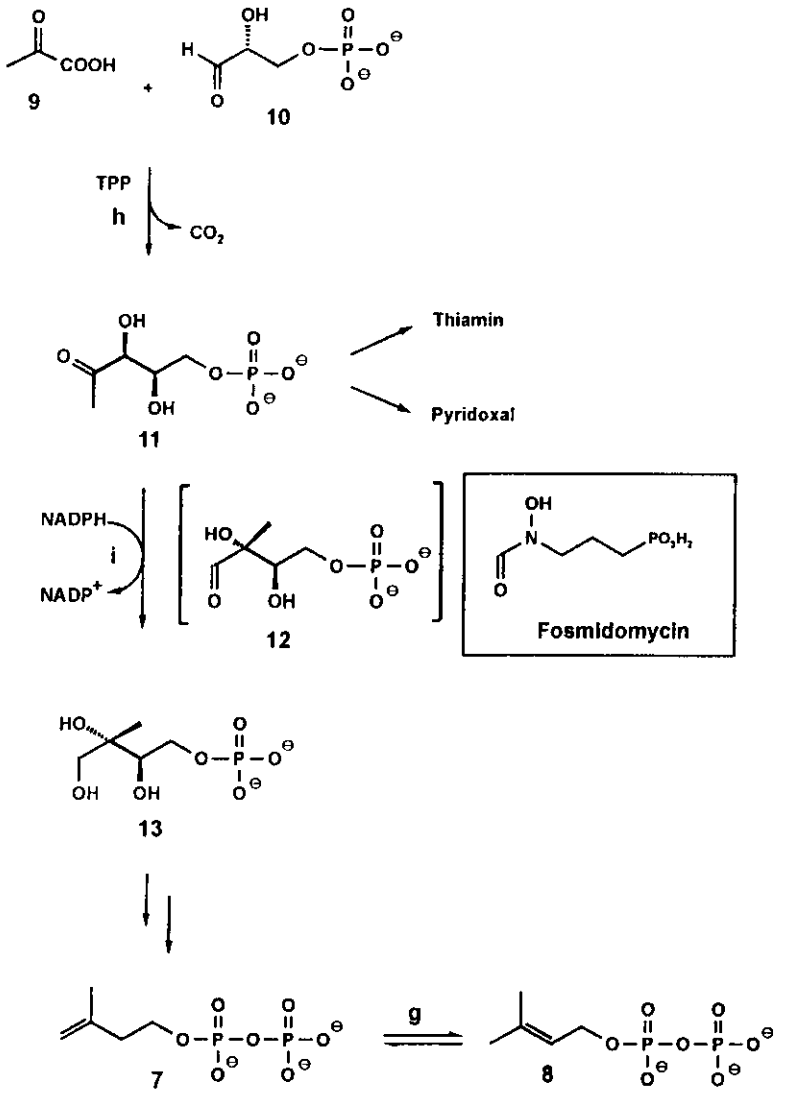
a, thiolase; b, HMG CoA synthase; c, HMG CoA reductase;

d, mevalonate kinase; e, mevalonate 5-phosphate kinase;

f, mevalonate 5-diposphate decaboxylase; g, IPP isomerase

สร้างผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ mevalonate pathway ส่วนสารกลุ่มเทอร์ปีนนั้นสร้างผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบใหม่ หรือที่เรียกว่า non-mevalonate pathway

ในกรณีของพืช วิถีชีวสังเคราะห์แบบ non-mevalonate pathway หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Deoxyxylulose phosphate pathway เกิดขึ้นใน chloroplast (Lichtenthaler et al. 2000) ดังแสดงในรูปที่ 2 วิถีชีวสังเคราะห์แบบ deoxyxylulose phosphate pathway เริ่มจากการเชื่อมกันระหว่าง pyruvate (**9**) และ glyceraldehyde 3-phosphate (**10**) โดยปฏิกิริยา thiamin-diphosphate dependent decarboxylation ได้ intermediate ที่สำคัญคือ 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate โดยเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS, **h**)(Broers 1994, Schwarz 1994) จากนั้นจึงเกิด Skeletal rearrangement และ reduction เป็น 2*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate (**13**) ในภาวะที่มี NADPH และ 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (IspC, **I**) เร่งปฏิกิริยา (Takahashi et al. 1998) นักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้ค้นพบและรายงานว่า Fosmidomycin สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของ DXR ได้ (Kuzuyama et al. 1998) และ Fosmidomycin มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะ, ยาต้านมาเลเรีย, และยาฆ่าแมลงได้ในอนาคต ทั้งนี้เนื่องจาก ในแบคทีเรีย, ปรสิต และพืช ใช้วิถีชีวสังเคราะห์ชนิด deoxyxylulose phosphate pathway (Lichtenthaler et al. 2000)



รูปที่ 2 Deoxyxylulose phosphate pathway (Non-mevalonate pathway)
h, deoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS);
I, deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR)

ต่อมา 2*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate จะเกิดปฏิกิริยาการเติม cytidylyl group จาก CTP, phosphorylation ณ ตำแหน่ง 2-OH และ cyclization ได้เป็น 2*C*-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate ซึ่งเป็นผลของการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ 4-diphosphocytidyl 2C-methyl-D-erythritol synthase (IspD), 4-diphosphocytidyl 2C-methyl-D-erythritol kinase (IspE) และ 2*C*-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) ตามลำดับ (Eisenreich et al. 2001)

มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษา recombinant protein ใน *E. coli* โมเลกุลของ 2*C*-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate สูญเสียโมเลกุลน้ำ 1 โมเลกุลได้เป็น 1-hydroxy-2methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ IspG จากนั้นเอนไซม์ IspH เร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่มี flavodoxin, flavodoxin reductase และ NADPH ได้เป็นโมเลกุลของ IPP และ DMAPP ในอัตราส่วน 6:1

กล่าวโดยสรุปคือ วิถีชีวสังเคราะห์ของหน่วย isoprene ชนิด deoxyxylulose phosphate ใน E. coli จะเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์รวมทั้งสิ้น 7 เอนไซม์ ได้แก่ DXS, IspC, IspD, IspE, IspF, IspG และ IspH

วิถีชีวสังเคราะห์ชนิด Deoxyxylulose phosphate มีการกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการป้อนสาร deoxyxylulose ใน bacteria, algae, plant และ plant cell culture แสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตดังกล่าวได้นำ deoxyxylulose ไปในการสร้าง IPP และ DMAPP อย่างไรก็ดีวิถีชีวสังเคราะห์ชนิด classical mevalonate pathway และ deoxyxylulose phosphate ก็ปรากฏในสิ่งมีชีวิตแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) กล่าวโดยสรุปคือ archaea และแบคทีเรียบางชนิด รวมถึงยีสต์ รา โปรโตซัวและในสัตว์ การสร้าง IPP และ DMAPP เกิดขึ้นจาก mevalonate pathway ส่วนในแบคทีเรีย (ส่วนใหญ่ที่ก่อให้เกิดโรค) สาหร่ายสีเขียว และเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ใช้ deoxyxylulose phosphate pathway และใน Streptomycetes, algae, mosses, liverworts, marine diatoms และในพืชชั้นสูง ใช้วิถีชีวสังเคราะห์ทั้งสองแบบ

ในพืชชั้นสูง วิธีชีวสังเคราะห์ของ IPP และ DMAPP เกิดขึ้นโดยใช้วิถีชีวสังเคราะห์ทั้งสองแบบ โดยสารกลุ่ม sterols, sesquiterpenes และ ubiquinones เกิดผ่าน mevalonate pathway ใน cytoplasm และ mitochondria ส่วน isoprenoids จำพวก monoterpenes, diterpenes และ carotenoids เกิดผ่าน deoxyxylulose phosphate pathway ใน chloroplast อย่างไรก็ดีก็มีลักษณะ "Cross talk" ขึ้น ดังเห็นจากผลจากการป้อน deoxyxylulose และ mevalonate พบว่ามีการนำสารทั้งสองชนิดไปใช้ในการสร้างสารทุติยภูมิในพืชเช่นกัน โดยผลดังกล่าวอธิบายได้โดยเกิดปรากฏการณ์แลกเปลี่ยนสารทุติยภูมิระหว่าง cytoplasm และ plastid ซึ่งปรากฏการณ์นี้จะเกิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและความเข้มข้นของสารตั้งต้นในเซลล์ โดยจะพบปรากฏการณ์นี้จะพบในเซลล์เพาะเลี้ยงมากกว่าในพืชปกติ (Eisenreich et al. 2001)

ตารางที่ 1 การกระจายวิถีชีวสังเคราะห์ของหน่วยไอโซปรีนในสิ่งมีชีวิต (Eisenreich et al. 2001)

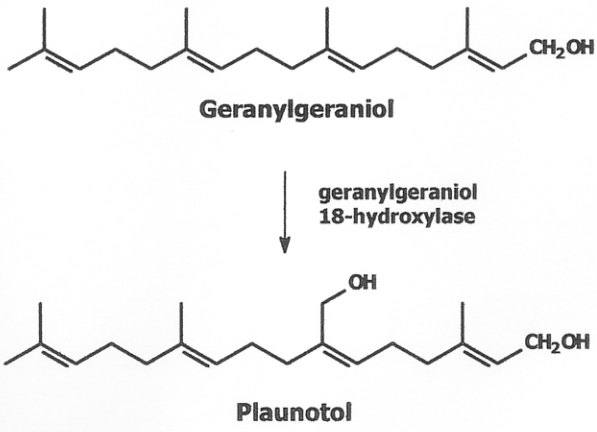
	Mevalonate		Deoxyxylulose phosphate
Bacteria	✔	or	✔
Archaea	✔		
Fungi	✔		
Algae	✔	and/or	✔
Higher plants			
Plastidic compartment			✔
Cytosolic compartment	✔		
Protozoa	✔		✔
Animals			

พืชสมุนไพรไทยที่ให้สารกลุ่มเทอร์ปีนและมีความสำคัญอย่างมากในปัจจุบันก็คือ ต้นเปล้าน้อย (Plau-noi) หรือ *Croton stellatopilosus* Ohba. (ชื่อเดิม คือ *Croton sublyratus* Kurz.)เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นแหล่งผลิตสารที่มีความสำคัญชื่อว่า Plaunotol มีคุณสมบัติรักษาโรคกระเพาะ (Cytoprotective antiulcer agent) โดยออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกระเพาะในทางเดินอาหาร ที่มี

ชื่อว่า *Helicobacter pyroli* (Koga et al, 1996) ในปัจจุบันมีการผลิตยาเพื่อทางการค้าภายใต้ชื่อ Kelnac® (Sankyo) ออกสู่ท้องตลาด

Plaunotol เป็นสารพวก acyclic diterpene alcohol ประกอบด้วยคาร์บอนรวม 20 อะตอม (4 หน่วยของ isoprene unit) เป็น 18-hydroxy derivative ของ geranylgeraniol (GGOH) plaunotol นี้สร้างมาจากการเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ของ geranylgeraniol (GGOH) โดยเอนไซม์ geranylgeraniol-18-hydroxylase (Tansakul and De-Eknamkul, 1998)(รูปที่ 3) และ plaunotol จะถูกเก็บในรูปของ oil globule สะสมใน chloroplast (De-Eknamkul and Potduang, 2000)

ต้นเปล้าน้อย (*Croton stellatopilosus* Ohba., Euphorbiaceae)



รูปที่ 3 การสร้าง plaunotol จาก geranylgeraniol โดย geranylgeraniol-18-hydroxylase

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์แบบ non-mevalonate pathway ในพืชชั้นสูง และมีรายงานใน *Arabidopsis thaliana*, *Mentha piperita*, *Lycopersicon esculentum*, และเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Taxus chinensis* (Schwender et al. 1999, Eisenreich et al. 1996, 1997, Lois et al. 2000) สร้างสารเทอร์ปีนผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ non-mevalonate pathway ซึ่งผลจากการเข้าใจในวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเทอร์ปีนในพืชได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตสารทุติยภูมิในพืช ใช้เป็นแบบจำลองเพื่อการศึกษาค้นหาสารที่มีศักยภาพไปเป็นยาฆ่าแมลงในอนาคต (Lichtenthaler et al. 2000)

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาถึงวิถีชีวสังเคราะห์ของ isoprene unit ในต้นเปล้าน้อย ว่าได้ถูกสร้างขึ้นผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ mevalonate pathway หรือ non-mevalonate pathway ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นถึงการศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเทอร์ปีนในต้นเปล้าน้อย โดยการติดตามสารเทอร์ปีนที่ถูกสะสมอยู่ในต้นเปล้าน้อย เมื่อทำการให้สารตั้งต้นที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ทั้งสองแบบดังกล่าวข้างต้น โดยรูปแบบการทดลองใช้เทคนิคการป้อนสารติดฉลากไอโซโทปเสถียรแก่ยอดเปล้าน้อย บ่มในระยะเวลาที่เหมาะสม แยกสาร 2 ชนิด คือ plaunotol และ phytosterols ซึ่งสารทั้งสองมีรายงานการสะสมสารใน chloroplast และ cytoplasm ตามลำดับ ดังนั้นการติดตามรูปแบบการติดฉลากของสารทั้ง 2 ชนิด สะท้อนให้เห็นวิถีชีวสังเคราะห์ของสารที่ต่าง compartment วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มเทอร์ปีน ซึ่งได้แก่ plaunotol และ phytosterols ภายในต้นเปล้าน้อยว่าใช้กระบวนการชีวสังเคราะห์แบบ Classical mevalonate pathway และ/หรือ แบบ Non-mevalonate pathway (Deoxyxylulose phosphate pathway) โดยใช้เทคนิคด้าน Feeding Experiments และ Spectroscopy โดยผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่เพื่อความเข้าใจในกระบวนการสร้างสารเทอร์ปีนในเปล้าน้อย ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านเอนไซม์และงานด้านพันธุวิศวกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์และผลผลิตของ plaunotol จากต้นเปล้าน้อยในอนาคต