

## วิศวกรรมเมแทบอลิซึมในวิถีซิกิเมตกับการสร้างสารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ

### Metabolic engineering in the shikimate pathway and secondary metabolites production

วิภาวรรณ วิทยากฤตศิริกุล<sup>1</sup>, อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต<sup>2\*</sup>

Vipawan Vitayakritsirikul<sup>1</sup>, Arinthip Thamchaipinet<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

<sup>2</sup>ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

<sup>1</sup>Division of Physical Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn 10540, Thailand

<sup>2</sup>Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

\*Corresponding author: arinthip.t@ku.ac.th

#### บทคัดย่อ

วิถีซิกิเมต (shikimate pathway) เป็นวิถีที่สังเคราะห์กรดคลอริสมิก (chorismic acid) เพื่อเป็นสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็น และสารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ เช่น โฟเลต (folate) ยูบิควิโนน (ubiquinone) โคเอนไซม์คิวเทน (coenzyme Q10) รวมทั้งยาปฏิชีวนะหลายชนิด สารตัวกลางในวิถีนี้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ เช่น กรดซิกิเมต (shikimic acid) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาที่เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดส (neuraminidase inhibitor) ต้านไวรัสโรคหวัด เป็นต้น ดังนั้นบทความนี้เป็นบทความสรุปและทบทวนการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ วิศวกรรมเมแทบอลิซึมในวิถีซิกิเมตของแบคทีเรีย เพื่อให้แบคทีเรียสะสมสารตัวกลางในวิถีนี้เพิ่มมากขึ้น หรือเพื่อให้แบคทีเรียต่างๆ สามารถสร้างยาปฏิชีวนะ เช่น คลอแรมเฟนิคอล ได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทบทวนการศึกษาเอนไซม์ในวิถีนี้ ที่เกี่ยวข้องกับการหาเป้าหมายที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด

#### ABSTRACT

Chorismic acid, an end product of the shikimate pathway, is a precursor for the production of essential amino acids and secondary metabolites

such as folate, ubiquinone, coenzyme Q10 and antibiotics. Intermediates of this pathway such as shikimic acid was used as a precursor for the production of neuraminidase inhibitor for treatment of influenza. Thus, this paper summarized or reviewed the research studies of metabolic engineering in shikimate pathway of bacteria to improve the accumulation of important intermediates or by product such as chloramphenicol. Furthermore, the study of enzymes in the shikimate pathway were reviewed as potential drug targets for antipathogenic bacteria.

**คำสำคัญ:** วิถีซิกิเมต; วิศวกรรมเมแทบอลิซึม

**Keywords:** shikimate pathway; metabolic engineering

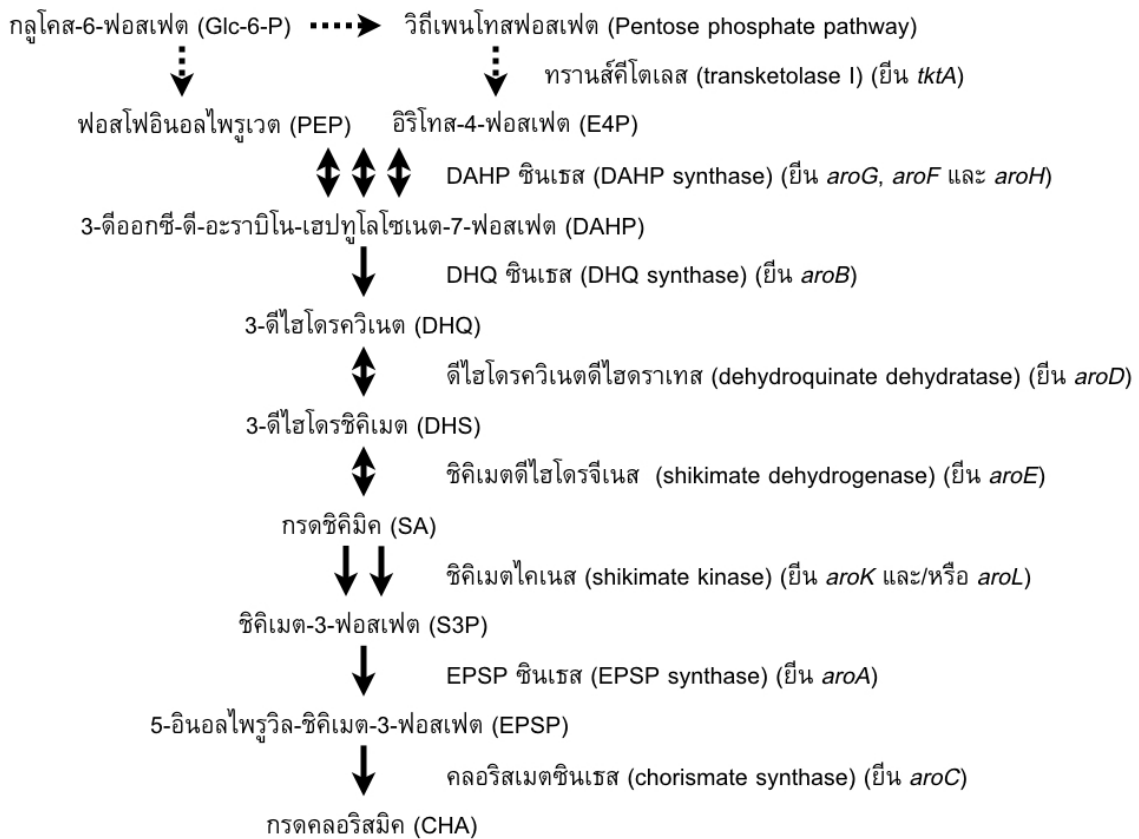
#### บทนำ

วิถีซิกิเมต (shikimate pathway) ประกอบด้วย 7 ปฏิกิริยา (รูปที่ 1) ดังนี้ ปฏิกิริยาแรกคือ การรวมเข้ากันระหว่างฟอสโฟอินอลไพรูเวต (phosphoenolpyruvate, PEP) และ อิริโทส-4-ฟอสเฟต (erythrose-4-phosphate, E4P) เพื่อสร้าง 3-ดีออกซี-ดี-อะราบินโน-เฮปทูลอโซเนต-7-ฟอสเฟต (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP) ด้วยเอนไซม์ DAHP ซินเทส (DAHP

synthase) (ยีน *aroG*, *aroF* และ *aroH* ตามลำดับ) ปฏิกริยาที่สองคือ การสร้าง 3-ดีไฮโดรควิเนต (3-dehydroquinate, DHQ) จาก DAHP ด้วยเอนไซม์ DHQ ซินเนส (DHQ synthase) (ยีน *aroB*) ตามด้วยปฏิกริยาที่สามคือ การดึงน้ำออกจาก DHQ ด้วยเอนไซม์ดีไฮโดรควิเนตดีไฮเดรเทส (dehydroquinate dehydratase) (ยีน *aroD*) เพื่อสร้าง 3-ดีไฮโดรชิคิเมต (3-dehydroshikimate, DHS) ปฏิกริยาที่สี่คือการเกิดปฏิกริยารีดักชัน DHS เพื่อสร้างกรดชิคิเมตหรือชิคิเมต (shikimic acid หรือ shikimate, SA) ด้วยเอนไซม์ชิคิเมตดีไฮโดรจีเนส (shikimate dehydrogenase) (ยีน *aroE*) จากนั้นเอนไซม์ชิคิเมตไคเนส (shikimate kinase) (ยีน *aroK* และ/หรือ *aroL*) เร่งปฏิกริยาที่ห้า คือ นำหมู่ฟอสเฟตจาก ATP เติมลงในโมเลกุลของกรดชิคิเมต ได้ชิคิเมต-3-ฟอสเฟต (shikimate-3-phosphate, S3P) ปฏิกริยาที่หกคือ การสังเคราะห์ 5-อินอลไพรูวิล-ชิคิเมต-3-ฟอสเฟต (5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate, EPSP) ด้วยเอนไซม์ EPSP ซินเนส (EPSP synthase) (ยีน *aroA*)

จากนั้นปฏิกริยาสุดท้ายคือ การสังเคราะห์กรดคลอริสมิกหรือคลอริสเมต (chorismic acid หรือ chorismate, CHA) ด้วยเอนไซม์คลอริสเมตซินเนส (chorismate synthase) (ยีน *aroC*) วิธีชิคิเมต นี้พบได้ในพืช ปรสิต จุลินทรีย์ เช่นแบคทีเรีย รา เป็นต้น แต่ไม่พบวิธีนี้ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Herrmann *et al.*, 1999)

กรดคลอริสมิกเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ ฟีนอลอะลานีน, ทริปโตเฟน และไทโรซีน นอกจากนี้ยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) อื่นๆ หลายชนิด (Herrmann, 1995) ได้แก่ โฟเลต (folate) ยูบิควิโนน (ubiquinone) โคเอนไซม์คิวเทน (coenzyme Q10) แทนนิน (tannin) ลิกนิน (lignin) และสารให้สีในดอกไม้ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) รวมทั้งสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรีย เช่น คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) (Chang *et al.*, 2001)



รูปที่ 1 วิธีชิคิเมต (shikimate pathway)

มีการนำสารตัวกลางในวิถีซิกิเมตมาใช้ประโยชน์ เช่น DHS มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Richman *et al.*, 1996) นำไปใช้ในการถนอมและยืดอายุอาหาร ทำให้อาหารคงคุณภาพ (Chang *et al.*, 2003)

กรดซิกิเมตหรือซิกิเมตจากผลของพืชในกลุ่ม *Illicium* เช่น *Illicium anisatum* มีชื่อสามัญว่า star anise (ไต้ยัก) ภาษาญี่ปุ่นเรียกว่า shikimi no ki ภาษาจีนเรียกว่า mang-tsao (Eykmán, 1881) ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวรามินิเดส (neuraminidase inhibitor) ใช้เป็นยาต้านไวรัสโรคหวัด (oseltamivir หรือ Tamiflu®) (Kim *et al.*, 1997; 1998; Karpf and Trussardi, 2001; Bradley, 2005) การสกัด SA จากผลของต้น *Illicium* ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอที่นำมาผลิตยานั้น ต้องใช้ผลปริมาณมาก มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และมีต้นทุนในการผลิตสูง จึงมีการสกัด SA จากเมล็ดของผล sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) (Enrich *et al.*, 2008) แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องใช้ปริมาณของเมล็ด sweetgum เป็นปริมาณมากเช่นกันในการผลิต Tamiflu® จึงมีแนวคิดพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อผลิต SA ให้ได้ปริมาณสูง โดยใช้ต้นทุนต่ำกว่า (Krämer *et al.*, 2003)

บทความนี้เป็นบทความสรุปหรือทบทวนการศึกษาวิจัย ที่เกี่ยวข้องกับวิศวกรรมเมแทบอลิซึมในวิถีซิกิเมตของแบคทีเรีย เพื่อให้แบคทีเรียสะสมสารตัวกลางในวิถีนี้เพิ่มมากขึ้น หรือเพื่อให้แบคทีเรียอื่นๆ สามารถสร้างยาปฏิชีวนะ เช่น คลอแรมเฟนิคอล ได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทบทวนการศึกษาเอนไซม์ในวิถีนี้ ที่เกี่ยวข้องกับการหาเป้าหมายที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด รวมทั้งยาปราบวัชพืช

### วิศวกรรมเมแทบอลิซึมในวิถีซิกิเมตของแบคทีเรีย

*Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียชนิดแรก ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม โดยการสร้างสายพันธุ์กลาย ด้วยวิธียับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยวิธีดีสรัปชัน (disruption) และเพิ่มการแสดงออกของยีน (overexpression) ในวิถีซิกิเมต ตัวอย่างเช่น การยับยั้งการแสดงออกของยีน *aroK* และ *aroL* และขณะเดียวกันก็เพิ่มการแสดงออกของยีน *aroF*, *aroB* และ *aroE* เข้าไปด้วย ทำให้ *E. coli* SP/1.1pKD12.112 สามารถสังเคราะห์ SA และ DHS ได้

ในปริมาณมากขึ้น (Draths *et al.*, 1999) ต่อมา มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยนำ *E. coli* SP/1.1pKD12.112 มาเพิ่มการแสดงออกของยีน *tktA* ที่สร้างเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส (transketolase I) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ E4P จากกลูโคสด้วยวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) ได้เป็นสายพันธุ์ *E. coli* SP/1.1pKD12.138 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ SA และ DHS จากกลูโคสได้มากขึ้น (Knop *et al.*, 2001) ดังสรุปในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า ยีน *aroL* และ *aroK* ที่ใช้สังเคราะห์เอนไซม์ซิกิเมตโคเนส เป็นยีนเป้าหมาย ในการทำยีนดีสรัปชัน มีการศึกษาเพื่อเพิ่มการสะสมของ SA ใน *E. coli* W3100.shik1 ที่กำจัดยีน *aroL* ออก แล้วนำมาเลี้ยงในสภาวะที่จำกัดแหล่งคาร์บอนและฟอสฟอรัส (Johansson *et al.*, 2005) พบว่า สายพันธุ์ W3100.shik1 มีการสร้าง SA มากกว่าสายพันธุ์ปกติ W3100 ที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนั้นยีน *aroA* ที่สังเคราะห์เอนไซม์ EPSP ซินเทส ก็เป็นอีกยีนที่ทำให้เกิดการกลาย เพื่อเพิ่มการสะสมของ SA (ตารางที่ 1)

ยีน *aroF*, *aroG*, *aroB* และ *aroE* ในวิถีซิกิเมต ได้ถูกนำมาเพิ่มการแสดงออกของยีน เพื่อให้เพิ่มการสะสมของ SA (ตารางที่ 1) ตัวอย่างเช่น ขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ปกติใช้กลูโคสในการเจริญเติบโต ปริมาณ E4P และ PEP ไม่เพียงพอที่จะนำมาเป็นสารตั้งต้นของวิถีซิกิเมต เนื่องจากปริมาณฟลักซ์คาร์บอน (carbon flux) ที่จะเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟตต่ำ และขณะเดียวกัน PEP ก็จะถูกนำไปใช้ในระบบการส่งต่อหมู่ฟอสเฟต ในวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, PTS) มากกว่าจะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของวิถีซิกิเมต ดังนั้น *E. coli* PB12 (PTS<sup>-</sup> glc<sup>+</sup>) (Lu *et al.*, 1997) จึงเป็นสายพันธุ์ที่ถูกดัดแปลง ทำให้ขาดยีนในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในระบบการส่งต่อหมู่ฟอสเฟต ในวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต แต่ยังสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคส เพื่อเพิ่มปริมาณการสะสมของ SA จึงนำสายพันธุ์ PB12 มากำจัดยีน *aroL* และกำจัดยีน *aroL* และ *aroK* ทั้งสองยีน ได้เป็นสายพันธุ์กลาย PB12.SA1 และ PB12.SA2 ตามลำดับ จากนั้นนำสายพันธุ์ทั้งสองนี้ มาเพิ่มการแสดงออกของยีน *aroF*, *aroG*, *aroH*, *tktA* และ *aroB* ได้

เป็นสายพันธุ์ PB12.SA11 และ PB12.SA21 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสร้างสายพันธุ์ที่เพิ่มเติมจากสายพันธุ์ PB12.SA2 โดยเพิ่มการแสดงออกของยีน *aroF*, *aroG*, *aroH*, *tktA*, *aroB* และ *aroE* ได้เป็นสายพันธุ์ PB12.SA22 และสร้างสายพันธุ์ที่กลาย PB12 โดยการยับยั้งการทำงานของยีน *pykF* ที่สังเคราะห์เอนไซม์ไพรูเวตไคเนส I (pyruvate kinase I) และยีน *pykA* ที่สังเคราะห์เอนไซม์ไพรูเวตไคเนส II (pyruvate kinase II) ได้เป็นสายพันธุ์ PB12.SA3 และ PB12.SA4 ตามลำดับ ทั้งสายพันธุ์ PB12.SA3 และ PB12.SA4 นี้เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน PEP ไปเป็นไพรูเวตได้ จากนั้นนำสายพันธุ์ทั้งสองนี้ มาเพิ่มการแสดงออกของยีน *aroF*, *aroG*, *aroH*, *tktA*, *aroB* และ *aroE* ได้เป็นสายพันธุ์ PB12.SA31

และ PB12.SA41 ตามลำดับ เมื่อนำสายพันธุ์ทั้งหมดดังกล่าวนี้ไปเลี้ยง เพื่อให้มีการสะสมของ SA พบว่า สายพันธุ์ PB12.SA22 สามารถสร้าง SA ได้มากที่สุด (Escalante *et al.*, 2010)

ตารางที่ 1 ยังแสดงให้เห็นว่า การศึกษาการสร้าง SA ให้เพิ่มขึ้น ไม่ได้ทำเฉพาะแต่ใน *E. coli* เท่านั้น ยังมีการใช้แบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Bacillus subtilis* (Iomantas *et al.*, 2002) ยีนที่ศึกษาก็เช่นเดียวกับที่ศึกษาใน *E. coli* คือ มีการดัดยีน *aroI* ที่สังเคราะห์เอนไซม์ซิติเมตไคเนส และมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *aroD* และ *aroA* ที่สร้างเอนไซม์ซิติเมตดีไฮโดรจีเนส และ DAHP ซินเทส ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การสังเคราะห์กรดซิติมิคและกรดดีไฮโดรซิติมิค จากการดัดแปลงพันธุกรรมในแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	SA (กรัมต่อลิตร)	DHS (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
<i>E. coli</i> SP/1.1pKD12.112 ดัดยีน <i>aroK</i> และ <i>aroL</i> และเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>aroF</i> , <i>aroB</i> และ <i>aroE</i>	27.2	4.4	Draths <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> SP/1.1pKD12.138 ดัดยีน <i>aroK</i> และ <i>aroL</i> และเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>aroF</i> , <i>aroB</i> , <i>aroE</i> และ <i>tktA</i>	28	11	Knop <i>et al.</i> , 2001
<i>E. coli</i> PB.12SA22 ยีน <i>aroL</i> และ <i>aroK</i> ไม่ทำงานและเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>aroG</i> , <i>tktA</i> , <i>aroB</i> และ <i>aroE</i>	7.0	0.29	Escalante <i>et al.</i> , 2010
<i>B. subtilis</i> AroI116 ขาดยีน <i>aroI</i>	8.5	9.5	Iomantas <i>et al.</i> , 2002
<i>B. subtilis</i> AroI116 ขาดยีน <i>aroI</i> และเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>aroD(E)</i> ของ <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14	6.8	Iomantas <i>et al.</i> , 2002
<i>B. subtilis</i> AroI116 ขาดยีน <i>aroI</i> และเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>aroA(G)</i>	7.2	20	Iomantas <i>et al.</i> , 2002
<i>B. subtilis</i> ID36 ขาดยีน <i>aroI</i> , เพิ่มการแสดงออกของยีน <i>aroD(E)</i> จาก <i>B. amyloliquefaciens</i> และ <i>aroA(G)</i>	19.7	9.8	Iomantas <i>et al.</i> , 2002
<i>B. subtilis</i> SB130 ขาดยีน <i>aroE</i>	1.1	0.20	Iomantas <i>et al.</i> , 2002
<i>B. subtilis</i> DEI การทำงานของเอนไซม์ EPSP ซินเทสบกพร่องและเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>aroD(E)</i> จาก <i>B. amyloliquefaciens</i>	2.8	1.1	Iomantas <i>et al.</i> , 2002

นอกจากนี้ ยังมี การดัดแปลง ยีน ในวิถีซิกิเมต ทำให้แบคทีเรียเหล่านั้นสามารถสะสม SA หรือ DHS ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติ การดัดแปลงยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ ในวิถีซิกิเมตของ *E. coli* ยังเพิ่มการสร้างกรดอะมิโนจำเป็น ไทโรซีน เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Juminaga *et al.*, 2012)

เมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ DAHP ซินเธส ในวิถีซิกิเมตของ *E. coli* สายพันธุ์กลายสามารถสร้างฟีนิลอะลานีนได้เพิ่มมากขึ้นกว่าสายพันธุ์ปกติ (Dell *et al.*, 1993) และเมื่อมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *aroK* พบว่า *E. coli* สามารถสร้างไทโรซีนได้เพิ่มมากขึ้นด้วย (Lütke-Eversloh *et al.*, 2008)

ใน *Pseudomonas* และ *Streptomyces* สามารถสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ เช่น ฟีนาซีน (phenazine) ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และยับยั้งมะเร็ง พบว่าการสร้างฟีนาซีนจาก *Pseudomonas fluorescens* ใช้กรดคลอริสมิกจากวิถีซิกิเมตเป็นสารตั้งต้น (McDonald *et al.*, 2001)

ใน *Amycolatopsis balhimycina* สามารถเพิ่มการสร้างยาปฏิชีวนะบัลฮิมัยซิน (balhimycin) เมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *dahp* และ *pdh* ที่สังเคราะห์เอนไซม์ DAHP ซินเธส และ เอนไซม์พรีเฟเนตดีไฮโดรจีเนส (prephenate dehydrogenase) ตามลำดับ (Thykaer *et al.*, 2010) มีการศึกษาเช่นเดียวกันนี้ใน *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyeticus* พบว่า เมื่อเพิ่มฟลักซ์คาร์บอนในวิถีซิกิเมตให้มีการสร้าง SA มากขึ้น ทำให้ปฏิกิริยาจาก SA ไปเป็นกรดคลอริสมิกเพิ่มมากขึ้น โดยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ DAHP ซินเธส และ ขณะเดียวกันก็ขัดไม่ให้เอนไซม์ DAHP ซินเธส ถูกยับยั้งแบบการยับยั้งย้อนกลับ (feedback inhibition) และการเพิ่มการแสดงออกของยีน *fkfO* เป็นการเพิ่มการทำงานของ FkfO ทำให้ปฏิกิริยาจากกรดคลอริสมิก ไปเป็น 4,5-ไดไฮดรอกไซโคลเฮกซ์-1-เอนคาร์บอกซิลิกแอซิด (4,5-dihydroxycyclohex-1-enecarboxylic acid) เพิ่มมากขึ้นไปด้วย เนื่องจากสารนี้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แอสโคไมยซิน (ascomycin) ดังนั้นจึงมีการสังเคราะห์แอสโคไมยซิน ได้เพิ่มมากขึ้นไปด้วย (Qi *et al.*, 2014)

## วิศวกรรมเมแทบอลิซึมในวิถีซิกิเมตกับการสร้างคลอแรมเฟนิคอล

*Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 (Vining *et al.*, 1995) สร้างยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol, CHL) ใช้ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) อหิวาตกโรค และไทฟอยด์ โดย CHL จะเข้าไปจับจำเพาะกับหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม เป็นการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดนั้นๆ

การสังเคราะห์ CHL ใน *S. venezuelae* กรดคลอริสมิกถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง 4-อะมิโน-4-ดีออกซีคลอริสมิกแอซิด (4-amino-4-deoxychorismic acid, ADC) ด้วยเอนไซม์ ADC ซินเธส ที่สังเคราะห์จากกลุ่มยีน *pabAB* (Brown *et al.*, 1996; He *et al.*, 2001) หรือ *CmlB* (sven0920; Fernández-Martínez *et al.*, 2014) เมื่อ *pabA* หรือ *pabB* ถูกยับยั้งการทำงาน การสร้าง CHL จะลดลง (Brown *et al.*, 1996; He *et al.*, 2001)

ปัจจุบันมีรายงานว่า *S. venezuelae* มีการสังเคราะห์ CHL ได้ปริมาณมากขึ้น เมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีน *sven0913* (transcriptional activator) ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ CHL (Fernández-Martínez *et al.*, 2014) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ขั้นกำหนดอัตรา (rate limiting step) ในวิถีซิกิเมต คือ *aroB* หรือ *aroK* มีผลต่อการสังเคราะห์ CHL เพิ่มมากขึ้น โดยเพิ่มการแสดงออกของยีน *pabB* มากขึ้นด้วย (Vitayakritsirikul *et al.*, in press)

จะเห็นได้ว่า การดัดแปลงยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ในวิถีปฐมภูมิ (primary metabolism) ใน *Streptomyces* มีผลต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ตัวอย่างเช่น การดัดแปลงยีนในวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) มีผลต่อการสร้างกรดคลาวูลานิก (clavulanic acid) แอคติโนโรดริน (actinorhodin) และออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) เพิ่มขึ้นใน *S. clavuligerus* (Li *et al.*, 2006) *S. coelicolor* (Ryu *et al.*, 2006) และ *S. rimosus* (Tang *et al.*, 2011) ตามลำดับ

## ยาเป้าหมายสำหรับยับยั้งเอนไซม์ในวิถีซิกิเมตของแบคทีเรียก่อโรค

ดังที่กล่าวข้างต้นว่า วิถีซิกิเมตไม่พบในมนุษย์หรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นจึงมีการศึกษาเอนไซม์ในวิถีซิกิเมต เพื่อใช้ในการหาเป้าหมาย (drug target) เพื่อที่จะยับยั้งเอนไซม์เหล่านี้ในแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Helicobacter pylori* ก่อมะเร็งกระเพาะอาหาร และ *Mycobacterium tuberculosis* ก่อวัณโรค เป็นต้น โดยยาเหล่านี้ไม่มีผลข้างเคียงต่อมนุษย์ ตัวอย่างเช่น การหาเป้าหมายที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ซิกิเมตโคเนส (Cheng *et al.*, 2005) และเอนไซม์ซิกิเมตดีไฮโดรจีเนส (Han *et al.*, 2006) เพื่อยับยั้งการเจริญของ *H. pylori*

เมื่อทำการกลายของยีน *aroK* ที่สังเคราะห์เอนไซม์ซิกิเมตโคเนส ด้วยวิธีดีสรับชัน พบว่ามีผลต่อการเจริญของเชื้อ *M. tuberculosis* (Parish *et al.*, 2002) แสดงให้เห็นว่าวิถีซิกิเมต มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคนี้นี้ จึงมีการศึกษาโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์ EPSP ซินเนส เอนไซม์ซิกิเมตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ DHQ ซินเนส โดยโคลนยีน *aroA*, *aroE* และ *aroB* จาก *M. tuberculosis* ตามลำดับ เข้าสู่ *E. coli* เพื่อหาสารที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสาม (Garbe *et al.*, 1990; Fonseca *et al.*, 2006; de Mendonça *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีการนำสารที่น่าจะมีสมบัติเป็นยามาทำดอกกิ้ง (docking) เพื่อดูการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิกิเมตดีไฮโดรจีเนส (Rodrigues *et al.*, 2009) ซิกิเมตโคเนส (Simithy *et al.*, 2014) และ DAHP ซินเนส (Nimal *et al.*, 2015) ของ *M. tuberculosis* เพื่อพัฒนาให้เป็นยารักษาวัณโรคต่อไป

ตัวอย่างสาร (6S)-6-ฟลูโอโรซิกิเมตอซิติกแอซิด ((6S)-6-fluoroshikimate acid) ที่สังเคราะห์จาก SA มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เพราะสามารถยับยั้งเอนไซม์คลอริสเมตซินเนส (Davies *et al.*, 1994) และยับยั้งการสังเคราะห์ 4-อะมิโนเบนโซอิกแอซิด (4-aminobenzoic acid) (Bornemann *et al.*, 1995) นอกจากนี้ (6S)-6-ฟลูโอโรซิกิเมตอซิติกแอซิด ยังยับยั้งการเจริญของปรสิต *Plasmodium falciparum* ที่ก่อโรคมาลาเรียได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาสารนี้เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคมาลาเรีย (McConkey, 1999)

สารตัวอย่างอีกชนิดที่ใช้กันแพร่หลายเพื่อกำจัดวัชพืชคือ ไกลโฟเสต (glyphosate (*N*-(phosphonomethyl)

glycine)) เป็นสารออร์แกโนฟอสฟอรัส (organophosphorous) ที่ยับยั้งเอนไซม์ EPSP ซินเนส ในพืช มีชื่อทางการค้าว่า ราวดัดอัฟ (Roundup) จำหน่ายโดยบริษัทมอนซานโต (Monsanto) (Franz, 1974)

จะเห็นได้ว่าวิศวกรรมเมแทบอลิซึมในวิถีซิกิเมตมีการศึกษาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ ก่อให้เกิดประโยชน์ได้หลายด้าน ทั้งในแง่ของการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดอะมิโนจำเป็น หรือสารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิที่มีประโยชน์ และยาต้านไวรัสโรคหวัด ส่งผลให้วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารดังกล่าวนี้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งวิถีซิกิเมตยังเป็นวิถีเป้าหมายที่อนาคตจะมีแนวทางพัฒนาเพื่อผลิตยาต้านเชื้อก่อโรค เช่น วัณโรค และมาลาเรีย เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง

- Bradley D (2005) Star role for bacteria in controlling flu pandemic. *Nat Rev Drug Discov* 4: 945–946.
- Brown MP, Aidoo KA, Vining LC (1996) A role for *pabAB*, a *p*-aminobenzoate synthase gene of *Streptomyces venezuelae* ISP5230 in chloramphenicol biosynthesis. *Microbiology* 142: 1345–1355.
- Bornemann S, Ramjee MK, Balasubramanian S, Abell C, Coggins JR, Lowe DJ, Thomeley RN (1995) *Escherichia coli* chorismate synthase catalyzes the conversion of (6S)-6-fluoro-5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate to 6-fluorochorismate. *J Biol Chem* 270: 22811–22815.
- Chang, Z, Sun Y, He J, Vining LC (2001) *p*-Aminobenzoic acid and chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: gene sets for a key enzyme, 4-amino-4-deoxychorismate synthase. *Microbiology* 147: 2113–2126.
- Chang YC, Almy EA, Blamer GA, Gray JI, Frost JW, Strasburg GM (2003) Antioxidant activity of 3-dehydroshikimate in liposomes, emulsions, and bulk Oil. *J Agric Food Chem* 51: 2753–2757.
- Cheng WC, Chang YN, Wang WC (2005) Structural basis for shikimate-binding specificity of *Helicobacter pylori* shikimate kinase. *J Bacteriol* 187: 8156–8163.

- Dell KA, Frost J.W. (1993) Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes in the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. *J Am Chem Soc* 115: 11581–11589.
- Davies GM, Barrett-Bee KJ, Jude DA, Lehan M, Nichols WW, Pinder PE, Thain JL, Watkins WJ, Wilson RG (1994). (6S)-6-Fluoroshikimic acid, an antibacterial agent acting on the aromatic biosynthetic pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 403–406.
- Draths KM, Knop DR, Frost JW (1999) Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *J Am Chem Soc* 121: 1603–1604.
- Enrich LB, Scheuermann ML, Mohadjer A, Matthias KR, Eller CF, Newman MS, Fujinaka M, Poon T (2008) *Liquidambar styraciflua*: a renewable source of shikimic acid. *Tetrahedron Lett* 49: 2503–2505.
- Escalante A, Calderon R, Valdivia A, de Anda R, Hernandez G, Ramirez OT, Gosset G, Bolivar F (2010) Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* 9: 1–12.
- Eykman, JF (1881) The Botanical Relations of *Illicium religiosum*, Sieb., *Illicium anisatum*. *Am J Pharm* 53: 5–9.
- Fernández-Martínez LT, Borsetto C, Gomez-Escribano JP, Bibb MJ, Al-Bassam MM, Chandra G, Bibb MJ (2014) New insights into chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 7441–7450.
- Fonseca IO, Magalhães MLB, Oliveira JS, Silva RG, Mendes MA, Palma MS, Santos DS, Basso LA (2006) Functional shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Purification and characterization. *Protein Express Purif* 46: 429–437.
- Franz JE (1974) N-phosphonomethyl-glycine phytotoxicant compositions assigned to Monsanto Company. US patent 3799758 3–26.
- Garbe T, Jones C, Charles I, Dougan G, Young D (1990) Cloning and characterization of the aroA gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 172: 6774–6782.
- Han C, Wang L, Yu K, Chen L, Hu L, Chen K, Jiang H, Shen X (2006) Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. *FEBS J* 273: 4682–4692.
- He J, Magarvey N, Pirae M, Vining LC (2001) The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular nonribosomal peptide synthetase gene. *Microbiology* 147: 2817–2829.
- Herrmann KM (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol* 107: 7–12.
- Herrmann KM, Weaver L (1999) The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 473–503.
- Iomantas YAV, Abalakina EG, Polanuer BM, Yampolskaya TA, Bachina TA, Kozlov YI (2002) Method for producing shikimic acid. US Patent 6,436,664.
- Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen KF, Lidén G (2005) Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnol Bioeng* 9: 541–552.
- Juminaga D, Baidoo EEK, Redding-Johanson AM, Batth TS, Burd H, Mukhopadhyay A, Petzold CJ, Keasling JD (2012) Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 78: 89–98.

- Karpf M, Trussardi R (2001) New, azide-free transformation of epoxides into 1,2-diamino compounds: Synthesis of the anti-influenza neuraminidase inhibitor oseltamivir phosphate (Tamiflu). *J Org Chem* 66: 2044–2051.
- Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY, Laver WG, Stevens RC (1997) Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc* 119: 681–690.
- Kim CU, Lew W, Williams MA, Wu H, Zhang L, Chen X, Escarpe PA, Mendel DB, Laver WG, Stevens RC (1998) Structure–activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *J Med Chem* 41: 2451–2460.
- Knop DR, Draths KM, Chandran SS, Barker JL, von Daeniken R, Weber W, Frost JW (2001) Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. *J Am Chem Soc* 123: 10173–10182.
- Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Müller U, Orf S, Wubbolts M, Raeven L (2003) Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Engineer* 5: 277–283.
- Li R, Townsend CA (2006) Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metab Eng* 8: 240–252.
- Lu JL, Liao JC (1997) Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase. *Biotechnol Bioeng* 53: 132–138.
- Lütke-Eversloh T, Stephanopoulos G (2008) Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression. *Metab Eng* 10: 69–77.
- McDonald M, Mavrodi DV, Thomashow LS, Floss HG (2001) Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the primary shikimate biosynthesis pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid. *J Am Chem Soc* 123: 9459–9460.
- McConkey GA (1999). Targeting the shikimate pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 175–177.
- de Mendonça JD, Ely F, Palma MS, Frazzon J, Basso LA, Santos DS (2007) Functional characterization by genetic complementation of *aroB*-encoded dehydroquinate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its heterologous expression and purification. *J Bacteriol* 189: 6246–6252.
- Nirmal CR, Rao R, Hopper W (2015) Inhibition of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*: *In silico* screening and *in vitro* validation. *Eur J Med Chem* 105: 182–193.
- Parish T, Stoker NG (2002) The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 148: 3069–3077.
- Qi H, Zhao S, Wen J, Chen Y, Jia X (2014) Analysis of ascomycin production by shikimic acid resistance and addition in *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus*. *Biochem Eng J* 82: 124–133.
- Richman JE, Chang YC, Kambourakis S, Draths KM, Almy E, Snell KD, Strasburg GM, Frost JW (1996) Reaction of 3-dehydroshikimic acid with molecular oxygen and hydrogen peroxide: products, mechanism, and associated antioxidant activity. *J Am Chem Soc* 118: 11587–11591.
- Rodrigues Vda S Jr, Basso LA, Santos DS (2009) Homogeneous recombinant *Mycobacterium*



- tuberculosis* shikimate dehydrogenase production: An essential step towards target-based drug design. *Int J Biol Macromol* 45: 200–205.
- Ryu Y-G, Butler MJ, Chater KF, Lee KJ (2006) Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* 72: 7132–7139.
- Simithy J, Reeve N, Hobrath JV, Reynolds RC, Calderón AI (2014) Identification of shikimate kinase inhibitors among anti-*Mycobacterium tuberculosis* compounds by LC-MS. *Tuberculosis* 94: 152–158.
- Tang Z, Xiao C, Zhuang Y, Chu J, Zhang S, Herron PR, Hunter IS, Guo M (2011) Improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus* M4018 by metabolic engineering of the G6PDH gene in the pentose phosphate pathway. *Enzyme Microb Technol* 49: 17–24.
- Thykaer J, Nielsen J, Wohlleben W, Weber T, Gutknecht M, Lantz AE, Stegmann E (2010) Increased glycopeptide production after overexpression of shikimate pathway genes being part of the balhimycin biosynthetic gene cluster. *Metab Eng* 12: 455–461.
- Vining L, Stuttard C (1995) Chloramphenicol. *Biotechnol* 28: 505–530.
- Vitayakritsirikul V, Jaemsaeng R, Lohmaneeratana K, Thanapipatsiri A, Daduang R, Chuawong P, Thamchaipenet A (2016) Improvement of chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 by overexpression of the *aroB* and *aroK* genes catalysing steps in the shikimate pathway. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109:379–88.