



สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเมแทบอลไลต์ฟลูออรีน Fluorometabolite Natural Products

พิทักษ์ นาสมใจ¹

บทคัดย่อ

ฟลูออรีนเป็นธาตุที่มีปริมาณมากเป็นอันดับที่ 13 ในเปลือกโลกและมากที่สุดในธาตุแฮโลเจน แต่สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเมแทบอลไลต์ฟลูออรีนกลับพบในปริมาณที่น้อยมาก จนถึงปัจจุบันได้มีการค้นพบสารเมแทบอลไลต์ฟลูออรีนเพียง 15 สาร เท่านั้น ซึ่งพบในพืชและแบคทีเรีย 2 ชนิด สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งที่เป็นสารพิษและยาปฏิชีวนะ บทความปริทัศน์นี้นำเสนอการค้นพบ ชีวสังเคราะห์ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเมแทบอลไลต์ฟลูออรีน และโดยเฉพาะชีวสังเคราะห์ในแบคทีเรีย *Streptomyces cattleya* ที่นำไปสู่การค้นพบเอนไซม์ฟลูออรีเนส ที่มีความสามารถในการสร้างพันธะ C-F รวมทั้งการใช้ประโยชน์เอนไซม์นี้ในการสังเคราะห์สารออร์แกนอฟลูออรีนอื่น ๆ ด้วย

ABSTRACT

Fluorine is ranked 13th most abundant element in the Earth's crust and the most abundance halogen. However, fluorometabolites are exceedingly rare and only 15 compounds have been officially identified confining in plants and two bacteria. In this article the discovery, biosynthetic pathways, and bioactivities of fluorometabolites are reviewed. In particular, the most advanced study in bacterium *Streptomyces cattleya* is highlighted. The discovery of Fluorinase enzyme and its application as a synthetic tool for instalment of a C-F bond to organic molecules is also discussed.

คำสำคัญ: สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ออร์แกนโอแฮโลเจน เมแทบอลไลต์ฟลูออรีน

Keywords: Natural Product, Organohalogen, Fluorometabolite

¹หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

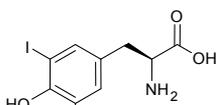
บทนำ

สารออร์แกโนแฮโลเจน (organohalogen) เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีธาตุแฮโลเจนภายในโมเลกุล (F, Cl, Br และ I) ในธรรมชาติมีแหล่งกำเนิดจากสิ่งมีชีวิต (biogenesis) และสิ่งไม่มีชีวิต (abiogenesis) สารกลุ่มนี้มีความหลากหลายทั้งในแง่ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจึงเป็นที่ดึงดูดความสนใจของนักวิจัยเป็นอย่างยิ่ง นับตั้งแต่มีรายงานการค้นพบสารออร์แกโนแฮโลเจน ชนิดแรกคือ ไดไอโอโดไทโรซีน (diiodotyrosine, **1**) ในปี 1896 จนถึงปัจจุบันมีการค้นพบสารออร์แกโนแฮโลเจน มากกว่า 4,500 สาร (Gribble, 2010) ในจำนวนนี้สารออร์แกโนคลอรีนและสารออร์แกโนโบรมีนพบมากที่สุด (มากกว่า 4,000 สาร) สารออร์แกโนไอโอดีนมากกว่า 150 สาร และสารออร์แกโนฟลูออรีนซึ่งมากกว่า 30 สาร สำหรับสารออร์แกโนฟลูออรีนที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต หรือ สารเมแทบอลิต์ฟลูออรีน (fluorometabolite) มีรายงานเพียง 15 สารเท่านั้น แม้ว่าพบในปริมาณที่น้อยมาก แต่สารออร์แกโนฟลูออรีนมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เคมีภัณฑ์ที่มีธาตุฟลูออรีนในโมเลกุลมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ตัวอย่างที่จำหน่ายในปัจจุบันมีมากกว่าร้อยละ 20 ที่เป็นสารออร์แกโนฟลูออรีน เช่น อโทรวาสแตติน (atorvastatin, **2**) ยาลดระดับ

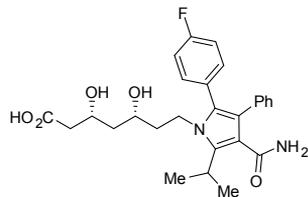
โคเลสเตอรอล ฟลูติเคโซน (fluticasone, **3**) รักษาโรคหอบหืด และซิพรอบ (ciprofloxacin, **4**) ยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้เคมีภัณฑ์ทางการเกษตรมีมากกว่าร้อยละ 30 ที่เป็นสารออร์แกโนฟลูออรีนและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (Müller, 2007) บทความนี้นำเสนอการค้นพบวิธีชีวสังเคราะห์ และฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารเมแทบอลิต์ฟลูออรีน โดยเฉพาะการศึกษาในแบคทีเรีย *Streptomyces cattleya*

สมบัติของฟลูออรีน

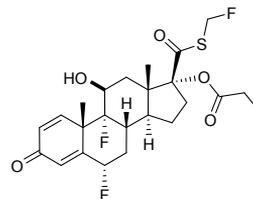
สมบัติบางประการของฟลูออรีนแสดงดังตารางที่ 1 ฟลูออรีนเป็นธาตุที่มีค่าสภาพไฟฟ้าลบ (electronegativity, χ) สูงที่สุด (4.0) มีขนาดอะตอมเล็กเป็นอันดับที่สองรองจากไฮโดรเจน (รัศมีแวนเดอร์วาลส์ 1.20 Å) ฟลูออรีนเป็นธาตุที่มีปริมาณมากเป็นอันดับที่ 13 ของธาตุทั้งหมด ส่วนใหญ่อยู่ในแร่ฟลูออไรต์ (fluorite, CaF_2) แร่ฟลูออโรอะพาไทต์ (fluorapatite, $\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$) แร่โครโอไลต์ (cryolite, Na_3AlF_6) และแร่อื่น ๆ ในปริมาณน้อย (Lide, 2009) มีการนำแร่ฟลูออไรต์ไปใช้เตรียมกรดไฮโดรฟลูออริก (HF) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ออร์แกโนฟลูออรีน



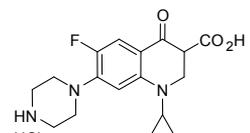
Diiodotyrosine (**1**)



Atrovastatin (**2**)
Cholesterol lowering drug



Fluticasone propionate (**3**)
Asthma



Ciprofloxacin (**4**)
Anti-bacteria

รูปที่ 1 สารเมแทบอลิต์ไดไอโอโดไทโรซีนและสารออร์แกโนฟลูออรีนที่เป็นตัวยา

แม้ว่าในธรรมชาติจะมีฟลูออรีนในปริมาณที่สูงแต่พบว่ามีการเมแทบอลิซึมฟลูออรีนในปริมาณที่น้อยมาก สาเหตุหนึ่งมาจากสมบัติที่พิเศษของธาตุฟลูออรีนเองคือ (1) ความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำของแร่ที่มีฟลูออรีนเป็นองค์ประกอบส่งผลให้ปริมาณฟลูออไรด์ไอออน (F⁻) ในสิ่งแวดล้อมมีปริมาณต่ำ เช่น ในน้ำทะเลมีฟลูออไรด์ไอออนเพียง 1.3 ppm เทียบกับปริมาณของคลอไรด์ไอออน (Cl⁻) ที่สูงถึง 19000 ppm (Gribble, 2010) (2) ฟลูออไรด์ไอออนมีพลังงานไฮเดรชัน (heat of hydration) สูงดังนั้นเมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำฟลูออไรด์จึงเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่อ่อน (3) ชีวิตสังเคราะห์ของสารเมแทบอลิซึมแฮโลเจนอาศัยขบวนการแฮโลจีเนชัน (halogenation) โดยเอนไซม์แฮโลเปอร์ออกซิเดส (haloperoxidases) และแฮโลจีเนส (halogenases) ซึ่งอาศัย H₂O₂ และ O₂ ในการออกซิไดซ์แฮไลต์ไอออน (X⁻) ไปเป็นแฮไลต์แคตไอออน (X⁺) เพื่อสร้างไฮโปแฮไลต์ (Hypohalous, HOX) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาแฮโลจีเนชันกับซับสเตรต (Vaillancourt et al., 2006) ชีวิตสังเคราะห์ผ่านกระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้กับ คลอไรด์ (Cl⁻) โบรไมด์ (Br⁻) และไอโอดีน (I⁻) แต่ฟลูออไรด์มีศักย์การออกซิเดชัน (oxidation potential) ที่สูง ดังนั้นการออกซิไดซ์ฟลูออไรด์ไอออน

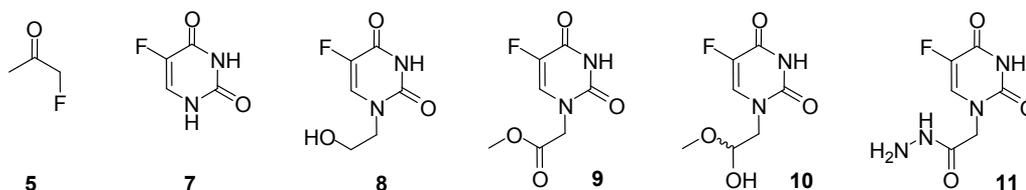
ไปเป็นฟลูออไรด์แคตไอออน (F⁺) จึงเกิดขึ้นได้ยาก (Harper et al., 2003)

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเมแทบอลิซึมฟลูออรีน

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเมแทบอลิซึมฟลูออรีน พบในพืช แบคทีเรีย และฟองน้ำทะเล สารเมแทบอลิซึมฟลูออรีนที่มีการยอมรับว่าเป็นสารแท้จริงมีจำนวน 15 สาร แม้ว่าจะมีรายงานการตรวจพบฟลูออโรแอซิโตน (fluoroacetone, 5) ในรูปอนุพันธ์ แต่การทดลองดังกล่าวน่าจะมีความคลาดเคลื่อนโดยสารที่ตรวจพบน่าจะเป็นสารอนุพันธ์ของฟลูออโรแอซิทัลดีไฮด์ (fluoroacetaldehyde, 6; ดูรายละเอียดในข้อ 5) (O'Hagan and Harper, 1999) นอกจากนี้ได้มีรายงานการค้นพบ 5'-ฟลูออโรยูราซิล (5'-fluorouracil, 7) และอนุพันธ์ (8-10) จากฟองน้ำทะเล *Phakellia fusca* ในทะเลจีนใต้ (Xu et al., 2003) แต่มีข้อสังเกตว่าสาร 5'-ฟลูออโรยูราซิล 7 และสาร 8 เป็นสารสังเคราะห์ที่มีการใช้รักษามะเร็งอยู่ก่อนหน้าแล้ว ซึ่งอาจจะมีการปนเปื้อนเข้าสู่ทะเลทำให้เกิดการสะสมในฟองน้ำชนิดนี้ และเกิดการเมแทบอลิซึมให้สารอนุพันธ์ 9-11 ดังนั้นที่มาของสารกลุ่มนี้ยังต้องการพิสูจน์ต่อไป (Chan and O'Hagan, 2012)

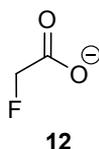
ตารางที่ 1 สมบัติของธาตุแฮโลเจน (Lide, 2009)

แฮไลต์	ค่าสภาพไฟฟ้าลบ(χ)	รัศมีแวนเดอร์วาลส์ (Å)	ศักย์ออกซิเดชัน (V) $2X^- \rightarrow X + 2e^-$	พลังงานไฮเดรชัน (kcal/mol)
F	4.0	1.47	-2.87	117
Cl	3.2	1.75	-1.36	84
Br	3.0	1.85	-1.07	78
I	2.7	1.98	-0.54	68



รูปที่ 2 สารเมแทบอลิต์ฟลูออรีนที่ต่อพิสูจนที่มาจาก ฟลูออโรแอซิโตน (5) และ 5'-ฟลูออโรยูราซิลและอนุพันธ์ (7-11)

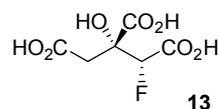
1. ฟลูออโรแอซิเตต (fluoroacetate, 12)



ฟลูออโรแอซิเตตถูกสังเคราะห์ขึ้นในปี 1896 จนกระทั่งปี 1943 จึงมีรายงานการค้นพบในใบของพืชแถบแอฟริกาใต้ชื่อ *Dichapetalum cymosum* (Harper et al., 2003) โดยฟลูออโรแอซิเตตเป็นสารแรกในกลุ่มเมแทบอลิต์ฟลูออรีนที่มีการค้นพบในธรรมชาติ ใบของพืชชนิดนี้มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและอาจทำให้สัตว์ตายได้ นอกจากแอฟริกาใต้แล้วมีรายงานการพบพืชที่สะสมฟลูออโรแอซิเตตกระจายอยู่ในหลายทวีปทั่วโลก เช่น ออสเตรเลียพบในพืชวงศ์ Leguminosae โดยเฉพาะ *Acecia geoginae*, *Gastrolobium grandiflorum* และ *Oxylobium parviflorum* แถบอเมริกาใต้พบในพืช *Pilicourea marcgravi* ปริมาณของฟลูออโรแอซิเตตที่พบในใบและเมล็ดของพืชอยู่ในระดับ 500-8000 ppm โดยเฉพาะพืชวงศ์ *Dichapetalum* (O'Hagan and Harper, 1999)

จนถึงปัจจุบันชีวสังเคราะห์ของฟลูออโรแอซิเตตยังไม่ได้รับการยืนยันแน่นอน แต่จากการศึกษาชีวสังเคราะห์ของสารเมแทบอลิต์ฟลูออรีนในแบคทีเรีย *Streptomyces cattleya* (ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดในข้อ 4) พิสูจน์ว่าสารตั้งต้นของฟลูออโรแอซิเตตคือฟลูออโรอะซิetyl-CoA (Deng et al., 2008)

2. ฟลูออโรซิเตรต (fluorocitrate, 13)



วิถีชีวสังเคราะห์ของฟลูออโรซิเตรตแสดงในแผนภาพที่ 1 เมื่อฟลูออโรแอซิเตตเข้าสู่สิ่งมีชีวิตจะผ่านเข้าสู่วัฏจักรกรดซิตริก (citric acid cycle) ภายในไมโทคอนเดรียโดยเกิดปฏิกิริยาควบแน่นที่จำเพาะเจาะจงทางสเตอริโอเคมีกับออกซาโลแอซิเตต (Oxaloacetate 15) ให้ (2R,3R)-2-ฟลูออโรซิเตรต (Lauble et al., 1996) มีรายงานการศึกษาขั้นสูงทางกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์โมเลกุล โดยแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์ (high-level quantum mechanics/molecular mechanics modelling, QM/MM) อธิบายว่าการควบแน่นระหว่างฟลูออโรแอซิetyl-CoA (fluoroacetyl-CoA, 14) กับ ออกซาโลแอซิเตต เกิดผ่าน E-enolate มีพลังงานก่อกัมมันต์ (activation energy) ต่ำกว่าการเกิดผ่าน Z-enolate (1.80 และ 2.05 kcal/mol ตามลำดับ) (van der Kamp et al., 2011)

ในขั้นตอนถัดมา (2R,3R)-2-ฟลูออโรซิเตรตถูกเปลี่ยนไปเป็น ฟลูออโร-ซิส-แอกอนิเตต (fluoro-cis-aconitate, 19) ตามด้วยปฏิกิริยาการแทนที่ฟลูออรีนด้วยไฮดรอกไซด์ไอออนผ่านกลไกแบบ S_N2' ให้สาร 4-ไฮดรอกซี-ทรานส์-อะโคนิเตต (4-hydroxy-trans-aconitate, 20) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) กับขั้นสเตอริโอเคมี

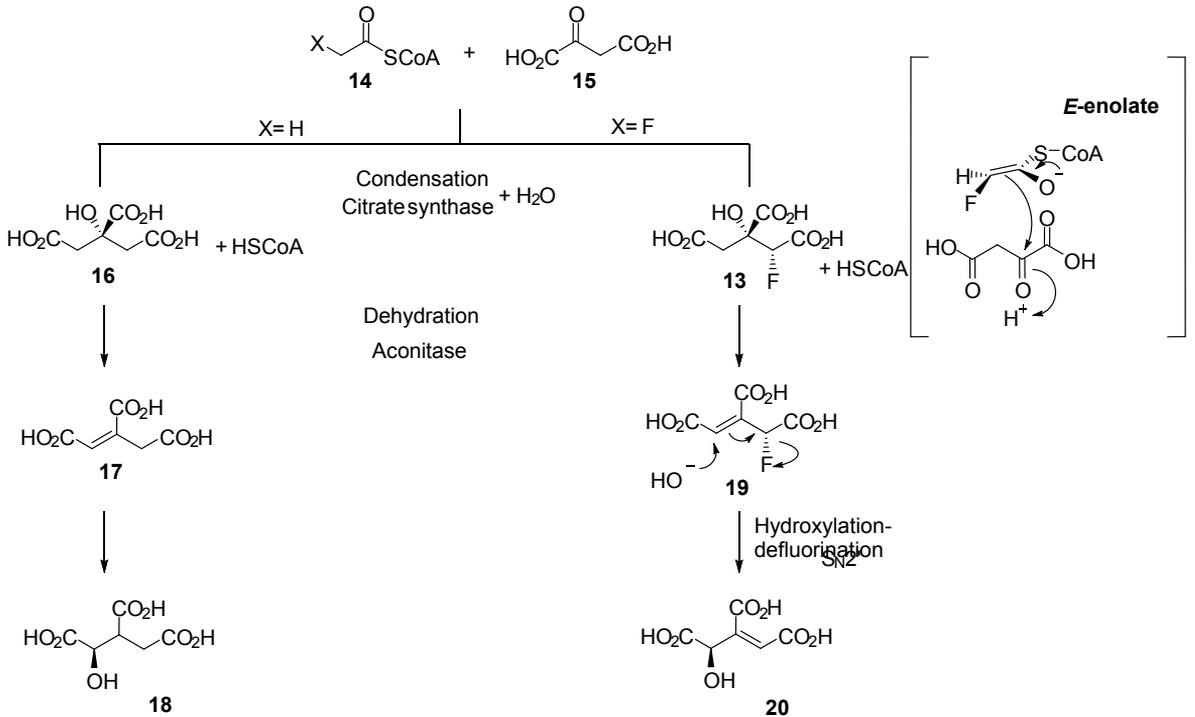
ไอโซซิเตรต (isocitrate, **18**) ของเอนไซม์อะโคนิตาส (aconitase) ข้อมูลโครงสร้างผลึกจากเทคนิค X-ray แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อะโคนิตาสยึดจับกับตัวยับยั้งแบบแข่งขัน **20** ได้แข็งแรงมากกว่ากับสารยับยั้งธรรมดาธรรมชาติไอโซซิเตรต **18** (Lauble et al., 1996; Lauble et al., 1994)

เมื่อเอนไซม์อะโคนิตาสถูกยับยั้ง วัฏจักรกรดซิตริกซึ่งเป็นขบวนการสร้างพลังงานหลักในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน จึงถูกยับยั้งและส่งผลให้สิ่งมีชีวิตตายในท้ายที่สุด และด้วยเหตุนี้จึงได้ชื่อว่า “Lethal synthesis” นอกจากนี้ฟลูออโรซิเตรตยังยับยั้งการเคลื่อนย้ายสารซิเตรต เข้า-ออก ไมโทคอนเดรียทำให้เกิดการสะสมของสารซิเตรต ซึ่งจับกับแคลเซียมได้ดี ส่งผลให้เกิดภาวะหมดสติในมนุษย์และสัตว์ (Goncharov, 2006) ฟลูออโรซิเตรตพบได้ในพืช เช่น

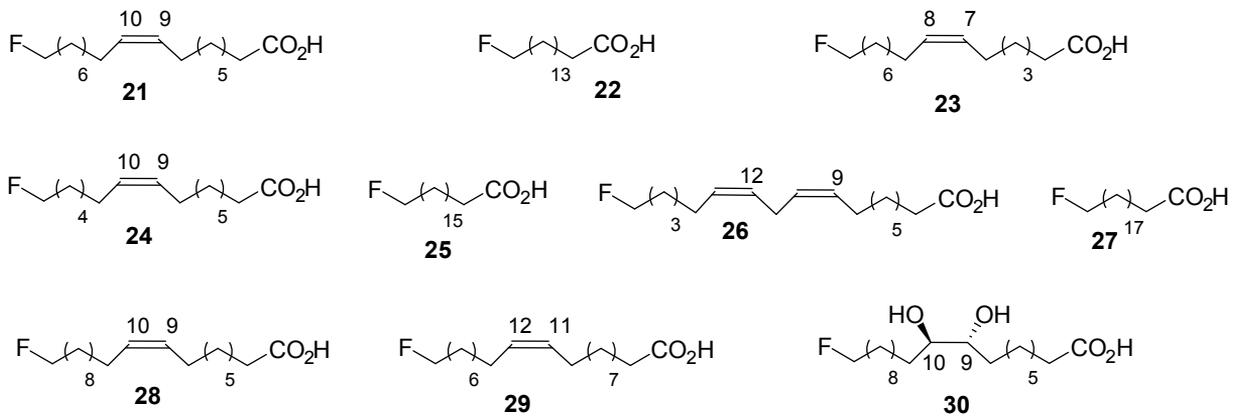
ใบชา (<300 ppm) และข้าวโอ๊ต (<62 ppm) ซึ่งปริมาณที่พบต่ำกว่าระดับที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (O’Hagan et al., 1993)

3. กรดไขมันโอเมกาฟลูออรีน (ω-fluorofatty Acid)

ในพืช *D. toxicarium* นอกจากจะสะสมฟลูออโรแอซิเตตในใบแล้ว ส่วนของผลยังมีการสะสมของ สารเมแทบอไลต์ฟลูออรีนคือ กรดไขมันโอเมกาฟลูออรีนในปริมาณที่สูงด้วย (Peters et al., 1960) ซึ่งน้ำมันจากเมล็ดมีปริมาณกรดไขมันโอเมกาฟลูออรีนหนึ่งในห้าของกรดไขมันทั้งหมด โดยร้อยละ 3 ของน้ำมันทั้งหมดเป็น กรดโอเมกาฟลูออโรโอเลอิก (ω-fluorooleic acid, **21**) การศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography/



แผนภาพที่ 1 ชีวสังเคราะห์ของยับยั้งธรรมชาติไอโซซิเตรต (**18**) และตัวยับยั้ง 4-ไฮดรอกซี-ทรานส์-แอกูนิเตต (**20**) ของเอนไซม์อะโคนิตาส (Ojima and Takeo, 2009; van der Kamp et al., 2011)



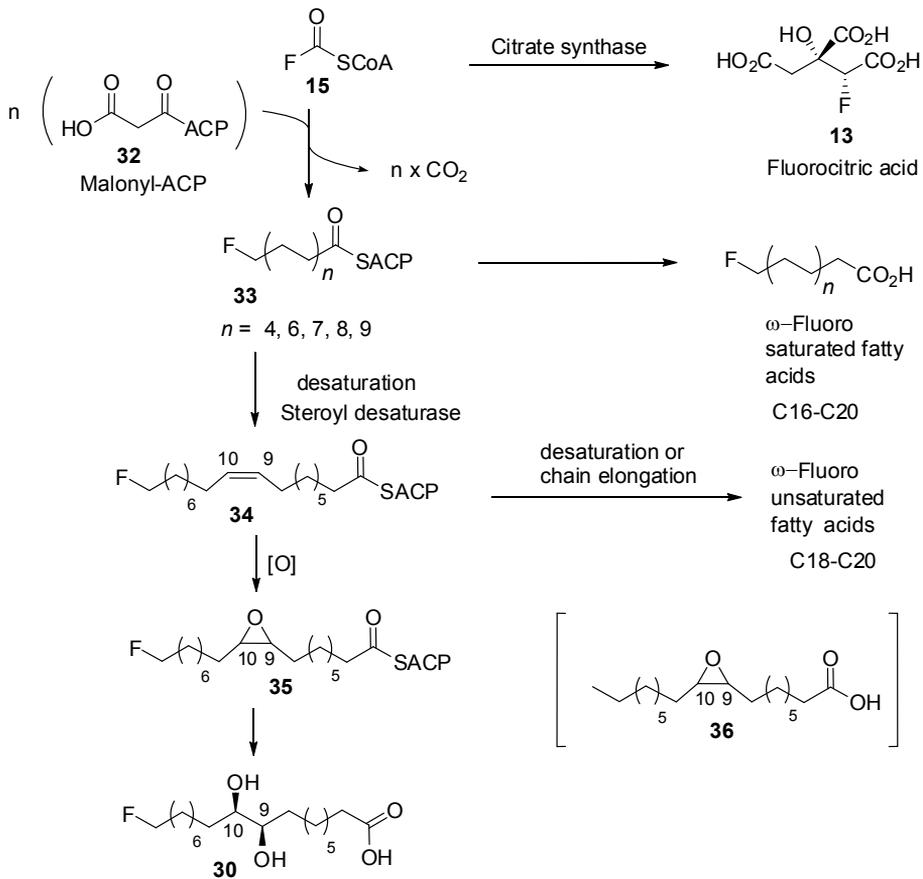
รูปที่ 3 สารเคมีแบบอไลด์ฟลูออรีนที่เป็นกรดไขมันโอเมกาฟลูออรีน

mass spectrometry, GC/MS) ด้วยการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดไขมันกับ 4,4-dimethyloxazoline และ picolinyl ester ทำให้สามารถระบุตำแหน่งของฟลูออรีนและพันธะคู่ในสายโซ่ของกรดไขมันได้และพบกรดไขมันโอเมกาฟลูออรีนเพิ่มจำนวน 8 สารได้แก่ 16-ฟลูออโรปาล์มิติกแอซิด (16-fluoropalmitic acid, 22) (Z)-16-ฟลูออโรเฮกซะเดค-7-อีโนอิกแอซิด ((Z)-16-fluorohexadec-7-enoic acid, 23) 16-ฟลูออโรปาล์มิตอเลอิกแอซิด (16-fluoropalmitoleic acid, 24) 18-ฟลูออโรสเตียริกแอซิด (18-fluorostearic acid, 25) 18-ฟลูออโรลิโนเลอิกแอซิด (18-fluorolinoleic acid, 26) 20-ฟลูออโรอะราคิติกแอซิด (20-fluoroarachidic acid, 27) (Z)-20-ฟลูออโรไอโคส-9-อีโนอิกแอซิด ((Z)-20-fluoroicos-9-enoic acid, 28) 20-ฟลูออโรไอโคซีนอิกแอซิด (20-fluoroeicosenoic acid, 29) (Hamilton and Harper, 1997; Christie et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบสาร *ทรีโอ*-18-ฟลูออโร-9,10-ไดไฮดรอกซีสเตียริกแอซิด (*threo*-18-fluoro-9,10-dihydroxystearic acid, 30) อีกด้วย (Harper et al., 1990)

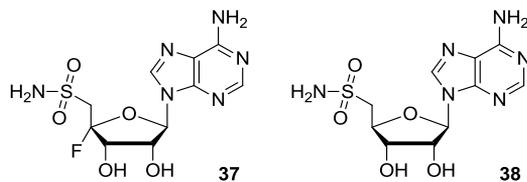
ชีวสังเคราะห์ของกรดไขมันโอเมกาฟลูออรีนดังในแผนภาพที่ 2 (Harper et al., 2003) มีสารตั้งต้นเดียวกันกับชีวสังเคราะห์ของกรดฟลูออโรซิทริกคือ

ฟลูออโรแอซิติลโคเอนไซม์ เอ (14) ซึ่งควบคุมกับ malonyl acyl carrier protein (malonyl-ACP, 32) ให้กรดไขมันอิ่มตัวโอเมกาฟลูออรีน C16-C20 ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่ม C18 และ C20 เริ่มสังเคราะห์จากปฏิกิริยาสร้างพันธะคู่ (desaturation) ของ ฟลูออโรสเตียโรอิล-เอซีที (fluorostearoyl-ACP, 33 (n = 7)) ให้ฟลูออโรอิลีล-เอซีที (fluorooleyl-ACP, 34) และเกิดปฏิกิริยาอีพอกซิเดชัน (epoxidation) ให้สาร 35 ซึ่งเปิดวงอีพอกไซด์ให้กรดไขมัน *ทรีโอ*-18-ฟลูออโร-9,10-ไดไฮดรอกซีสเตียริกแอซิด (30) แม้ว่าอาจจะไม่พบสารตัวกลางอีพอกไซด์ 35 แต่ สาร 9,10-อีพอกซีสเตียริกแอซิด (9,10-epoxystearic acid, 36) พบในน้ำมันจากเมล็ด *D. toxicarium* และพืชชนิดอื่น ๆ ด้วย (Spitzer et al., 1994; Hamilton and Harper, 1997)

กรดไขมันโอเมกาฟลูออรีนมีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และกรดไขมันที่มีสายโซ่คาร์บอนเลขคู่เท่านั้นที่มีความเป็นพิษ สอดคล้องกับขบวนการคาตาโบลิซึม (catabolism) ของกรดไขมันโอเมกาฟลูออรีนผ่านขบวนการบีตา-ออกซิเดชัน (β -oxidation) ที่สลายตัวในรูปของโมเลกุลแอซิติลโคเอนไซม์ เอ และฟลูออโรแอซิติลโคเอนไซม์ เอ ซึ่งจะถูกละลายเป็นสารพิษฟลูออโรแอซิด



แผนภาพที่ 2 ชีวสังเคราะห์ของกรดไขมันโอเมก้าฟลูออรีน ในพืช *D. Toxicarium* (Harper et al., 2003)



รูปที่ 3 สารนิวคลีโอซิดิน

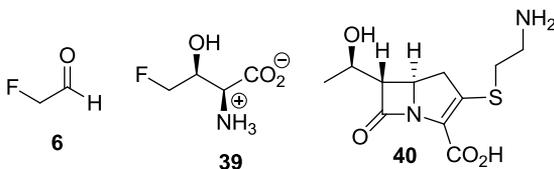
4. นิวคลีโอซิดิน (nucleocidin, 37)

มีแบคทีเรียเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถสังเคราะห์สารเมแทบอลิต์ฟลูออรีนจากฟลูออไรด์ ไอออนได้แก่ *Streptomyces calvus* และ *Streptomyces catleya* โดยแบคทีเรียชนิดแรกคือ *S. calvus* แยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศอินเดีย จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

ชนิดนี้พบสารนิวคลีโอซิดิน (Thomas et al., 1956-7) หรือ 4'-fluoro-5'-O-sulfamoyl adenosine (Moton et al., 1969; Jenkins et al., 1976) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กว้างและเป็นตัวยับยั้งชีวสังเคราะห์สารไซโรเดอฟอร์มในเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุของไข้วัณโรค (Gupte et al., 2008) ชีวสังเคราะห์ของนิวคลีโอซิดินยังไม่ได้รับ

การพิสูจน์ที่แน่ชัด ซึ่งจากการทดลองซ้ำหลายครั้งพบว่าเชื้อ *S. calvus* ไม่สามารถผลิตสารนิวคลีโอซิดินได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสามารถแยกสาร 38 จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptomyces* ที่แยกจากตัวอย่างดินในประเทศอินโดนีเซียได้ (Harper et al., 2003) ซึ่งอาจจะเปิดโอกาสให้การศึกษาชีวสังเคราะห์ของนิวคลีโอซิดินให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น

5. ฟลูออโรอะซิทิลไทด์ (6) และ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน (4-fluorothreonine, 39)



S. cattleya เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการใช้ผลิตยาปฏิชีวนะประเภทบีตา-แลคแทม (β -lactam) คือ thienamycin (thienamycin, 40) นักวิจัยค้นพบโดยบังเอิญว่าแบคทีเรียนี้สามารถสังเคราะห์สารเมแทบอลิต์ฟลูออรีน ฟลูออโรอะซิเตต และ (2S,3S)-4-ฟลูออโรทรีโอนีนได้ ซึ่งพบว่าการปนเปื้อนของฟลูออไรด์ในโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ใช้ และเมื่อให้แหล่งของฟลูออไรด์จากภายนอก (exogenous) ที่ความเข้มข้นระดับมิลลิโมลาร์พบว่าฟลูออไรด์ถูกเมแทบอลิต์ไปเป็นฟลูออโรอะซิเตต และ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน ได้ทั้งหมด (Sanada et al., 1986)

Prof. David O'Hagan (UK) ได้ศึกษาชีวสังเคราะห์ของ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน ใน *S. cattleya* อย่างต่อเนื่องทำให้ทราบว่าชีวสังเคราะห์ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังแสดงในแผนภาพที่ 3 ขั้นแรกฟลูออไรด์นิวคลีโอไฟล์เข้าทำปฏิกิริยาการแทนที่กับซัลเฟอร์อะตอมของอะดีโนซีน เมไธโอนีน (S-adenosyl methionine, SAM, 41) ผ่านกลไกแบบ S_N2 โดยมี แอล-เมไธโอนีน (L-methionine, 42) หลุดออกให้สาร 5'-ฟลูออโร-5'-ดีออกซี อะดีโนซีน (5'-fluoro-5'-deoxyadenosine,

5'-FDA, 43a) โดยอาศัยเอนไซม์ 5'-ฟลูออโร-5'-ดีออกซีอะดีโนซีนซินเทส (5'-FDA synthase) หรือเอนไซม์ฟลูออรีเนส (fluorinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถสร้างพันธะ C-F ได้ (O'Hagan et al., 2002) นอกจากนี้ เอนไซม์ฟลูออรีเนสยังสามารถสังเคราะห์ สารเมแทบอลิต์คลอรีน เมื่อใช้คลอไรด์ไอออนแทนฟลูออไรด์ไอออน (Deng et al., 2006)

ปฏิกิริยาในขั้นถัดมาเอนไซม์พิวรีน นิวคลีโอไทด์

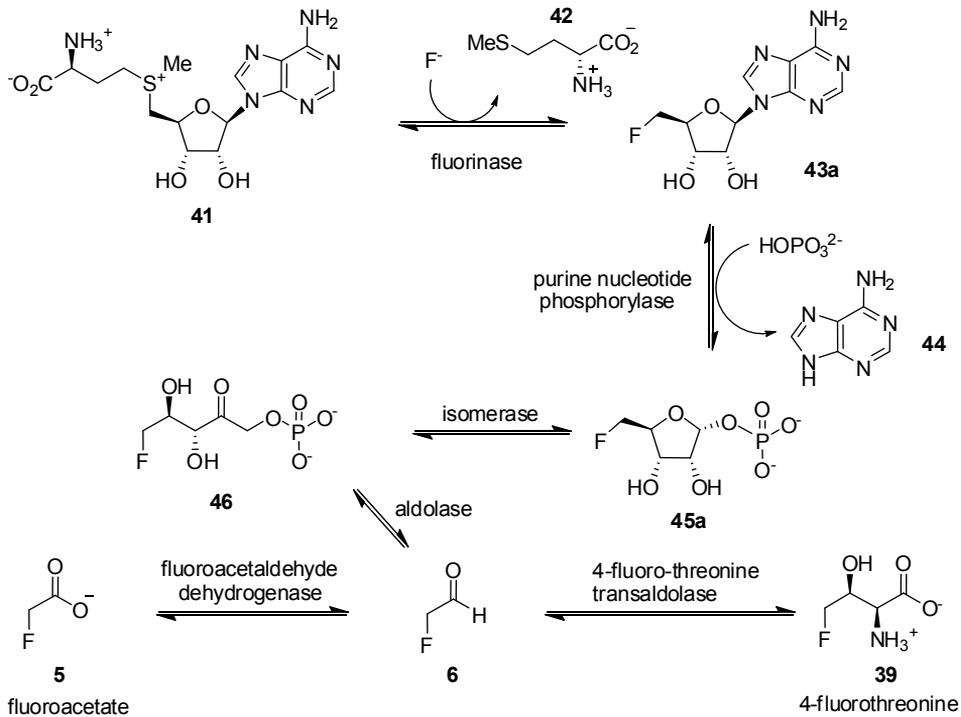
ฟอสฟอริเลส (purine nucleotide phosphorylase, PNP) เร่งปฏิกิริยาการแทนที่หมู่อะดีโนซีนของ 5'-FDA ด้วยหมู่ฟอสเฟต ให้สาร 5'-ฟลูออโร-5'-ดีออกซีไรโบส-1-ฟอสเฟต (5'-fluoro-5'-deoxyribose-1-phosphate, 45a) ต่อด้วยปฏิกิริยาการเปิดวงของสาร 45a โดยเอนไซม์ไอโซเมอเรส (isomerase) ให้ สาร 5-ฟลูออโร-5-ดีออกซีไรบูโลส-1-ฟอสเฟต (5-fluoro-5-deoxyribulose-1-phosphate, 46) ในขั้นถัดมาปฏิกิริยา retro-aldol ของสาร 46 โดยเอนไซม์แอลโดเลส (aldolase) สลายตัวให้ ฟลูออโรอะซิทิลไทด์ (6) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทั้งฟลูออโรอะซิเตต และ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน (Deng et al., 2008)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟลูออโรอะซิทิลไทด์ โดยเอนไซม์ฟลูออโรอะซิทิลไทด์ ดีไฮโดรจีเนส (fluoroacetaldehyde dehydrogenase) ซึ่งเป็น NAD^+ -dependent ให้ฟลูออโรอะซิเตต (Murphy et al., 2001) และปฏิกิริยา aldol addition ระหว่างฟลูออโรอะซิทิลไทด์กับกรดอะมิโนทรีโอนีน (threonine) โดยเอนไซม์ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน ทรานส์-แอลโดเลส (4-fluoro threonine transaldolase, 4-FTase) เข้าร่วมปฏิกิริยาให้ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน (Schaffrath et al., 2001)

วิธีชีวสังเคราะห์ของฟลูออโรแอสิทิลไฮด์ และฟลูออโรทรีโอนีนได้รับการพิสูจน์ความถูกต้องจากชีวสังเคราะห์ภายนอกเซลล์ (*in vitro* synthesis) โดยเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิดได้แก่ ฟลูออรีเนส, PNP, ไอโซเมอเรส แอลโดเลส และทรานส์แอลโดเลส พร้อมกับโคแฟกเตอร์ได้แก่ KF, SAM, PLP และ L-เมไทโอนีน ถูกใส่เข้าไปในหลอดเซนตริฟิวจ์และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการปั่นเหวี่ยงแล้วตรวจวัดสารละลาย (supernatant) ด้วย ¹⁹F NMR และ GC/MS สามารถตรวจพบทั้ง

ฟลูออโรแอสิทิลไฮด์ และ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน (Deng et al., 2008; Zhao et al., 2012)

แม้ชีวสังเคราะห์ของฟลูออโรแอสิทิลไฮด์ และ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน มีการพิสูจน์ชัดเจนแล้ว แต่ยังมีขั้นตอนที่ยังไม่ชัดเจนคือ กลไกการของปฏิกิริยาไอโซเมอเรชันของสาร **45a** ซึ่งการพิสูจน์โดยจำลองโมเลกุลที่เป็นสารตัวกลางหรือตัวบ่งชี้ของเอนไซม์ ไอโซเมอเรสยังไม่ประสบความสำเร็จ (Nasomjai et al., 2009)



แผนภาพที่ 3 ชีวสังเคราะห์ของฟลูออโรแอสิทิลไฮด์ (5) และ 4-ฟลูออโรทรีโอนีน (39) ในแบคทีเรีย *S. cattleya*. (Deng et al., 2008)

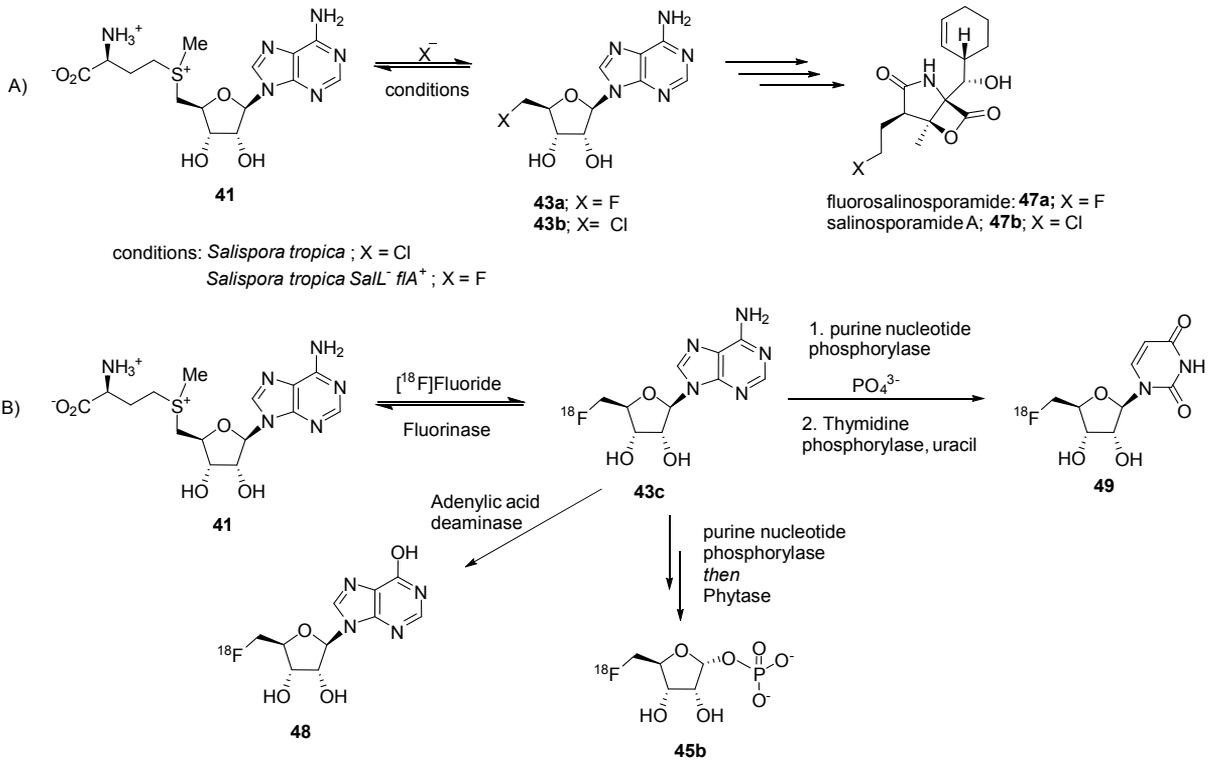
การกำจัดสารพิษฟลูออโรแอซิเตตในแบคทีเรีย *S. cattleya*

แบคทีเรีย *S. cattleya* ไม่สามารถจำแนก ระหว่างซัสเตรดธรรมชาติ แอซิเตต กับสารพิษฟลูออโรแอซิเตตได้ แต่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยระงับการสังเคราะห์ฟลูออโรแอซิเตต ในช่วงที่แบคทีเรียเจริญเติบโตและช่วงที่มีการสร้างฟลูออโรแอซิเตต วัฏจักรกรดซิตริกภายในเซลล์จะถูกระงับไว้ชั่วคราว (Walker et al., 2012) อย่างไรก็ตาม Weeks และ Chang (Weeks and Chang, 2012) แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์สำคัญที่ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ต้านทานสารพิษได้คือ ฟลูออโรแอซิติลโคเอนไซม์ เอ โรโอเอสเตอเรส (fluoroacetyl-CoA thioesterase FIK) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของฟลูออโรแอซิติลโคเอนไซม์ เอ ย้อนกลับไปเป็นฟลูออโรแอซิเตต ซึ่งเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ แอซิติลโคเอนไซม์ เอ ถึงล้านเท่า เนื่องจากอิทธิพลของฟลูออรีนที่เป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนนั่นเอง ดังนั้นการสังเคราะห์สาร 4-ไฮดรอกซี-ทรานซ์-อะคูนิเตด ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์อะโคไนเตสจึงถูกยับยั้ง

การสร้างพันธะ C-F โดยใช้เอนไซม์ฟลูออริเนส

เอนไซม์ฟลูออริเนสเป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวที่สามารถ สร้างพันธะ C-F ได้ มีการศึกษาพันธะวิศวกรรมในแบคทีเรีย *Salinispora tropica* ที่สังเคราะห์สารต้านมะเร็ง ซาลิโนสปอราไมด์ เอ (salinosporamide A, 47b) โดยการแทนที่ ยีนคลอ

ริเนส *sall* (chlorinase gene *sall*) ด้วย ยีนฟลูออริเนส *flA* (fluorinase gene *flA*) พบว่าสามารถเปลี่ยนแบคทีเรียนี้ให้สังเคราะห์สารฟลูออโรซาลิโนสปอราไมด์ (fluorosalinoporamide, 47a) ได้เมื่อมีฟลูออไรด์ไอออน (Eustàquio et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ประโยชน์เอนไซม์ฟลูออริเนสเพื่อสังเคราะห์สารติดตาม (tracer) ในเทคนิคโพซิตรอนอีมิสชันโทโมกราฟี (positron emission tomography scan, PET scan) ซึ่งใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค เช่น เนื้องอก ความผิดปกติที่สมอง หรือใช้ติดตามการกระจายตัวหรือการสลายตัวของยาที่อยู่ในช่วงการทดลองทางคลินิก (clinical trial) นิยมใช้ [¹⁸F]-ฟลูออไรด์เป็นตัวปล่อยโพซิตรอน (positron emitter) นอกเหนือจาก [¹¹C]-คาร์บอน เพราะข้อดีคือ มีครึ่งชีวิตยาวนาน (109.8 นาที) และให้ radiochemical yield สูง (Cai et al., 2008) เอนไซม์ฟลูออริเนส ได้ถูกนำไปใช้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นในปฏิกิริยาการสังเคราะห์แบบ one-pot (แผนภาพที่ 4) ของ 5'-[¹⁸F] ฟลูออโร-5'-ดีออกซีอินโนซีน (5'-[¹⁸F]fluoro-5'-deoxyinosine, 48) 5'-[¹⁸F]-5'-ดีออกซี-5'-ฟลูออโร ยูริดีน (5'-[¹⁸F]-5'-deoxy-5'-fluorouridine, 49) (Winkler et al., 2008) และ 5'-ดีออกซี-[¹⁸F]ฟลูออโร-ดี-ไรโบส (5'-deoxy-5'-[¹⁸F]fluoro-D-ribose, 45b) (Onega et al., 2009) ซึ่งให้ radiochemical yield สูงและมีขั้นตอนในการสังเคราะห์ที่สั้นเพียง 2 ขั้นตอน ความเป็นไปได้ในการนำสารกลุ่มนี้ไปใช้ในเป็นสารติดตามในเทคนิค PET scan ยังอยู่ระหว่างการพัฒนา



แผนภาพที่ 4 การใช้เอนไซม์ฟลูออรีเนสในการสร้างพันธะ C-F: A) พันธะนิวคลีโอไทด์ในแบคทีเรีย *S. tropica* ในชีวิตสังเคราะห์ salinosporamide A (47b) และ fluorosalinosporamide (47a) และ B) การสังเคราะห์แบบ one-pot ของสารติดตาม 5'-[¹⁸F] ฟลูออโร-5'-ดีออกซีอินโนซีน (48) 5'-ดีออกซี-[¹⁸F]ฟลูออโร-ดี-ไรโบส (45b) และ 5'-[¹⁸F]-5'-ดีออกซี-5'-ฟลูออโรยูริดีน (49) เพื่อใช้ในเทคนิค PET scan (Winkler et al., 2008; Onega et al., 2010; Eustàquio et al., 2010)

บทสรุป

ปัจจุบันสารออร์แกนอฟลูออรีนมีความสำคัญมากขึ้นเรื่อยๆ ทั้งทางการแพทย์และทางเกษตรกรรม ในขณะที่ยีสส์สารเมแทบอลิต์ฟลูออรีนในธรรมชาติกลับมีจำนวนน้อยมาก และตั้งแต่การค้นพบ 4-ฟลูออโร-ทรีโอนีนยังไม่มีรายงานสารใหม่เลย การศึกษาขบวนการชีวสังเคราะห์ของเมแทบอลิต์ที่มีอยู่อย่างลึกลับจึงมีความจำเป็น โดยเฉพาะในแบคทีเรีย *S. cattleya* ซึ่งนำไปสู่การค้นพบเอนไซม์ชนิดใหม่คือฟลูออรีเนส ที่มีศักยภาพในการสร้างพันธะ C-F ในโมเลกุลสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น การสังเคราะห์สาร

ติดตามเพื่อใช้ในเทคนิค PET scan แม้ว่าค้นพบสารเมแทบอลิต์ฟลูออรีนจะหยุดชะงักเป็นเวลานาน แต่การวิจัยทางด้านเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติยังดำเนินไปอย่างเข้มข้นและการค้นพบสารเมแทบอลิต์ฟลูออรีนใหม่ๆ ยังคงรอคอยอยู่ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Cai, L., Lu, S. And Pike, V. W. (2008). Chemistry with [¹⁸F]fluoride ion. *Eur. J. Org. Chem.* 17: 2853-2873.

Chan, K. K. J. and O'Hagan, D. (2012). The Rare Fluorinated natural products and

- biotechnological prospects for fluorine enzymology. *Meth. Enzymol.* 516: 219-235.
- Christie, W. W., Hamilton, J. T. G. and Harper, D. B., (1998). Mass spectrometry of fluorinated fatty acids in the seed oil of *Dichapetalum toxicarium*. *Chem. Phys. Lipids.* 97: 41-47.
- Deng, H., Cobb, S. L., McEwan, A. R., McGlinchey, R. P., Naismith, J. H., O'Hagan, D., Robinson, D. A. and Spencer, J. B. (2006). The Fluorinase from *Streptomyces cattleya* is also a chlorinase. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45(5): 759-762.
- Deng, H., Cross, S. M., McGlinchey, R. P., Hamilton, J. T.G. and O'Hagan, D. (2008). In vitro reconstituted biotransformation of 4-fluorothreonine from fluoride ion: application of the fluorinase. *Chem. Biol.* 15(12): 1268-1276.
- Eustáquio, A., O'Hagan, D. and Moore, B. S. (2010). Engineering fluorometabolites production: fluorinase expression in *Salinispora tropica* yields fluorosalinosporamide. *J. Nat. Prod.* 73(3): 378-382.
- Goncharov, N. V., Jenkins, R. O. and Radilov, A. S. (2006). Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible direction for therapy research. *J. Appl. Toxicol.* 26: 148-161.
- Gribble, G. W. (2010). Natural occurring organohalogen compounds-A comprehensive update. Germany: Springer Wein New York. pp. 1-8.
- Gupte, A., Boshoff, H. I., Wilson, D. J., Neres, J., Labello, N. P., Somu, R. V. Xing, C., Barry III, C. E., and Aldrich, C. C. (2008). Inhibition of siderophore biosynthesis by 2-triazole substituted analogues of 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl]adenosine: antibacterial nucleosides effective against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* 51(23): 7495-7507.
- Hamilton, J. T. G. and Harper, D. B., (1997). Fluoro fatty acids in seed oil of *Dichapetalum toxicarium*. *Phytochemistry.* 44(6):1129-1132.
- Harper, D. B., Hamilton, J. T. G. and O'Hagan, D. (1990). Identification of threo-ig-fluoro-9,10-dihydroxystearic acid: a novel cofluorofatty acid from *Dichapetalum toxicarium* seeds. *Tetrahedron Lett.* 31(52): 766-7662.
- Harper, D. B., O'Hagan D., Murphy, C. D. (2003). Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part P, pp. 141-169.
- Jenkins, I. D., Verheyden, J. P. H. and Moffatt, J. G. (1976). 4'-Substituted nucleosides. 2. Synthesis of the nucleoside antibiotic nucleocidin. *J. Am. Chem. Soc.* 98(11): 3346-3357.
- Lauble, H., Kenedy, M. C., Beinert, H. and Stout, C. D. (1994). Crystal structures of aconitase with *trans*-aconitate and nitro citrate bound. *J. Mol. Biol.* 237: 437-451.
- Lauble, H., Kenedy, M. C., Emptage, M. and Stout, C. D. (1996). The reaction of citrate and aconitase and crystal structure of the enzyme inhibitor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 13699-13703.
- Lide, D. R. (2009). Handbook of Chemistry and Physics. 90th edn. New York, CRC Press.
- Morton, G. O., Lancaster, G. E., Van Lear, G. E., Fulmor, W. and Meyer, W. E. (1969). The structure of nucleocidin (a new structure). *J. Am. Chem. Soc.* 91(6): 1535-1537.
- Müller, K., Faeh, C. and Diederich, F. (2007). Fluorine in Pharmaceuticals: Looking beyond intuition. *Science.* 317: 1881-1886.
- Nasomjai, P., O'Hagan, D. and Slawin, A. M. (2009). Synthesis of phosphonate and phosphonate

- analogues of ribose-1-phosphates. *Beilstein J. Org. Chem.* 5(37): 1-7.
- Ojima, I. and Takeo, T. (2009). *Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*. New York: Blackwell Publishing. pp. 3-46.
- O'Hagan, D., Perry, R., Lock, J. M., Meyer, J. J. M., Dasaradht, L., Hamilton, D. B. (1993). High levels of Fluoroacetate in *Dichapetalum braunii*. *Phytochemistry*. 33(5): 1043-1045.
- O'Hagan, D. and Harper D. B. (1999). Fluorine-containing natural products. *J. Fluorine Chem.* 100: 127-133.
- O'Hagan, D., Schaffrath, C., Cobb, S. L., Hamilton, J. T. G. and Murphy, C. D. (2002). A fluorinase enzyme has been discovered that catalyses carbon-fluorine bond formation. *Nature*. 416: 279.
- Onega, M., Dormarkas, J., Deng, H., Schweiger, L. F., Smith, T. A. D., Welch, A. E., Plisson, C., Gee, A. D. and O'Hagan, D. (2010). Fluorinase mediated chemoenzymatic synthesis of [¹⁸F]-fluoroacetate. *Chem. Commun.* 46(41): 7819-7821.
- Peters, R. A., Hall, R. J. and Ward P. F. V. (1960). The chemical nature of the toxic compounds containing fluorine I in the seeds of *Dichapetalum toxicarium*. *Biochem. J.* 77: 1-22.
- Sanada, M., Miyano, T., Iwadare, S., Williamson, J. M., Arison, B. H., Smith, J. L., Douglas, A. W., Liesch, J. M. and Inamine, E. (1986). Biosynthesis of fluorothreonine and fluoroacetic acid by thienamycin producer, *Streptomyces cattleya*. *J. antibiotics*. 39: 259-265.
- Schaffrath, C., Murphy C. D. and O'Hagan, D. (2001). Identification of a PLP-dependent threonine transaldolase: a novel enzyme involved in 4-fluorothreonine biosynthesis in *Streptomyces cattleya*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40(3): 4479-4481.
- Spitzer, V., Bordignon, S. A. de L., Schenkel, E. P. and Marx, F. (1994). Identification of nine acetylenic fatty acids, 9-hydroxystearic acid and 9,10-epoxystearic acid in the seed oil of *Jodina rhombifolia* hook et arn. (Santalaceae). *J. Am Oil Chem. Soc.* 71(12): 1343-1348.
- Thomas, S. O., Singleton, V. L., Lowery, J. A., Sharpe, R. W., Pruess, L. M., Porter, J. N., Mowatt, J. H. and Bohonos, N. (1956-7). Nucleocidin, a new antibiotic with activity against trypanosomes. *Antibiotics Annual*. 716-721.
- Vaillancourt F. H., Yeh, E., Vosburg, D. A., Tsoikova, S. G. and Walsh, C. T. (2006). Nature's inventory of halogenation catalysis: oxidative strategies predominate. *Chem. Rev.* 106: 3364-3378.
- van der Kamp, M. W., McGeagh, J. D. and Mulholland, A. J. (2011). Lethal synthesis of fluorocitrate by citrate synthase explained through QM/MM modelling. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (44): 10349-10351.
- Walker, M. C., Wen, M., Weeks, A. M. and Chang, M. C. Y. (2012). Temporal and fluoride control of secondary metabolism regulates cellular organofluorine biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* 7(9): 1576-1585.
- Weeks, A. M. and Chang, M. C. Y. (2012). Catalytic control of enzymatic fluorine specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(48): 19667-19672.
- Winkler, M., Domarkas, J., Schweiger, L. F. and O'Hagan, D. (2008). Fluorinase-coupled base swaps: synthesis of [¹⁸F]-5'-deoxy-5'-

- fluorouridines. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47(43): 10141-10143.
- Xu, X. H., Yao, G. M., Li, Y. M., Lu, J. H., Lin, C. J., Wang, X. and Kong, C. H. (2003). 5-fluorouracil derivatives from the sponge *Phakellia fusca*. *J. Nat. Prod.* 66(2): 285-288.
- Zhao, C., Li, P., Deng, H., Ou, H. Y., McGlinchey, R. P. and O'Hagan, D. (2012). Insights into fluorometabolites biosynthesis in *Streptomyces cattleya* DSM46488 through genome sequence and knock out mutants. *Bioorganic Chemistry.* 44: 1-7.

