Research report

Cloning of oxidosqualene cyclase gene involved in corosolic acid biosynthesis from *Lagerstroemia speciosa* leaves and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*

(การโคลนยีนออกซิโดสควาลีนไซเคลส ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของกรดโคโรโซลิกจากใบอินทนิลน้ำและการแสดงออกของยีนในยีสต์)

Pimpimon Tansakul

Sireewan Kaewsuwan

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Prince of Songkla University

This project was funded by Prince of Songkla University

Fiscal Year 2011-2012

บทคัดย่อ

กรดโคโรโซลิก เป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นไตรเทอร์ปีนกลุ่มเออร์แซน ได้จากใบอินทนิล ซึ่งมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด คาดว่ากรดโคโรโซลิกมีชีวสังเคราะห์มาจากสารตั้งต้น 2,3-ออกซิโดสควาลีน ผ่านทางอัลฟ่าอะมัยริน โดยเอนไซม์มัลติฟังค์ชันนัลไตรเทอร์ปีนซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มย่อยของ ออกซิโดสควาลีนไซเคลส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการโคลนยีนออกซิโดสควาลีนไซเคลสจากซีดีเอ็นเอของอินทนิล โดยผลการวิจัยสามารถโคลนส่วนกลางของซีดีเอ็นเอของออกซิโดสควาลีนไซเคลสได้ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และการออกแบบไพร์เมอร์ให้คล้ายกับยีนที่จะโคลน ผลการทำปฏิกิริยาพบว่าได้ชิ้นส่วนของยีนในส่วนกลางของยีนในขนาด 726 คู่เบส ตั้งชื่อว่า LsOSC ซึ่งถอดรหัสได้เป็นกรดอะมิโน 242 ตัว ซึ่งลำดับกรดอะมิโนที่ได้นี้มีความใกล้เคียง (81%) กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ออกซิโดสควาลีน OEA ที่โคลนได้จากมะกอกฝรั่ง แม้จะมีความพยายามในการโคลนส่วนปลาย 5' และปลาย 3' ของยีนนี้หลายครั้ง แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จ เมื่อใช้ข้อมูลจากส่วนกลางของยีน LsOSC มาศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอในพืช โดยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอมากที่สุดในส่วนดอก และเมื่อนำส่วนหนึ่งของยีนที่โคลนได้ขนาด 405 คู่เบส ใส่แทนที่ในตำแหน่งเดียวกันบนพลาสมิด pYES2-OEA แล้วศึกษาบทบาทของยีนในยีสต์สายพันธุ์จีไอเอล77 พบว่ายีสต์ที่มียีนดังกล่าว (pYES2-OEALsnot) สามารถสร้างไตรเทอร์ปีนชนิดซูโดทาแรกซา-สเตอรอล เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับยีน *oea* เดิม การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนส่วนกลางของ LsOSC มีความสำคัญต่อชีวสังเคราะห์ของ ซูโดทาแรกซา-สเตอรอล ส่วนการสร้างอัลฟ่าอะมัยริน และ เบต้าอะมัยริน แม้จะลดลงในภาพรวม แต่อัตราส่วนของ อัลฟ่าอะมัยริน ต่อ เบต้าอะมัยริน ยังคงใกล้เคียงกับยีน *oea* เดิม

คำสำคัญ: อินทนิล ออกซิโดสควาลีนไซเคลส การโคลนซีดีเอ็นเอ กรดโคโรโซลิก

Abstract

Corosolic acid, an ursane-type triterpene, obtained from leaves of *Lagerstroemia speciosa*. It possesses hypoglycemic activity. Corosolic acid has been proposed to be biosynthesized from 2,3-oxidosqualene via α-amyrin by multifunctional triterpene synthase (MTS), a member of oxidosqualene cyclase (OSC) enzymes. To clarify the biosynthesis of triterpenes in *L. speciosa*, a core fragment of OSC gene was cloned by homology-based PCR method. The results showed the core fragment contained 726-bp partial LsOSC gene encoding a deduced peptide of 242 amino acid residues. The partial amino acid sequence shared the highest homology (81%) to OEA, an oxidosqualene cyclase from *Olea europaea*. Attempts were made in this study to clone 5'- and 3'-end fragments using several RACE techniques but have not been successful. The nucleotide data of LsOSC core fragment were used for mRNA expression of this gene using semi-quantitative RT PCR technic. The level of mRNA expression of LsOSC transcript was highest in flower. The substitution of a 405-bp LsOSC core fragment to the pYES2-OEA plasmid at the same OSC position, to obtain a pYES2-OEALsnot plasmid following by its expression in yeast GIL77 revealed the increasing of ψ-taraxasterol formation compared with the native pYES2-OEA products. This chimeric study indicated that a partial LsOSC core fragment was involved in a biosynthesis of ψ-taraxasterol. Although the formation of α-amyrin and β-amyrin products were decreased in the chimera clone, but the production ratio α-amyrin and β-amyrin was similar to the native *oea* genes.

Keywords: *Lagerstroemia speciosa*, oxidosqualene cyclase, cDNA cloning, corosolic acid