

บทคัดย่อ

173792

รา *Xylaria* sp. BCC1067 มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิดที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งได้ เช่น depudecin เป็นสารประกอบกลุ่ม polyketide มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ histone deacetylase ในเซลล์มะเร็งได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาชิ้นที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สาร depudecin โดยการโคลนยีนบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร depudecin จากรา *Xylaria* sp. BCC1067 สายพันธุ์กลายพันธุ์ T170 ที่พัฒนาขึ้นโดยเทคนิค DNA mediated tagged mutagenesis ให้มีความบกพร่องในการสังเคราะห์สารนี้ โดยอาศัยเทคนิค partial library และใช้บางส่วนของยีนที่โคลนได้เป็นตัวติดตามหาส่วนที่เหลือของยีนจาก wild type genomic library ของรา *Xylaria* sp. BCC 1067 จากผลการศึกษาสามารถโคลน NADPH cytochrome P450 oxidoreductase (*XyCPR*) ที่มีขนาด 2,178 คู่เบส สามารถถอดรหัสได้ 713 กรดอะมิโน เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่าประกอบด้วย 3 domain คือ FAD binding FMN binding และ NADPH binding เป็นที่น่าสังเกตว่า *XyCPR* มีความเหมือนกับ CPR ในพืชสูงถึง (60 - 70%) ในขณะที่เหมือนกับ CPR ในราเพียง (30 - 40%) เมื่อทำการศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยเทคนิค gene disruption แล้วเปรียบเทียบความสามารถในการผลิต metabolite ของ wild type กับ mutant โดยใช้เทคนิค HPLC พบว่า mutant มีการผลิต depudecin ลดลงซึ่งสอดคล้องกับที่คุณสมบัติของสายพันธุ์กลายพันธุ์ T170 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า NADPH cytochrome P450 oxidoreductase (*XyCPR*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ depudecin

Abstract

173792

The wood-decaying fungus, *Xylaria* sp. BCC1067 possess the capability of synthesizing various types of bioactive compounds, which could be useful for pharmaceutical development. Among them, a polyketide compound, depudecin, has potential as an anticancer agent with anti-histone deacetylase activity. To understand the biosynthesis pathway of depudecin by studying its biosynthetic gene(s) will provide more information for further pathway modification to generate novel compounds or increase compound activity. In this work, a suitable blocked mutant T170 with defective depudecin production was selected from the DNA mediated tagged mutagenesis *Xylaria* sp. BCC1067 mutant collection. A DNA fragment, derived from the interrupted gene was cloned from a partial library of mutant T170 and used as probe to screen the full length of the gene in wild type genomic library. The corresponding gene of 2,178 bp, designated *XyCPR*, was sequenced and analysed, revealing a putative protein of 713 amino acid residues. The *XyCPR* protein sequence showed high similarity to a range of NADPH cytochrome P450 oxidoreductase (CPR) genes consisting of 3 unique domains: FAD binding, FMN binding and NADPH binding. Interestingly, the gene possesses higher similarity (60 - 70%) to the CPR gene of various plants but less similarity to (30 - 40%) those of fungi. The gene was further studied using gene

173792

disruption technique and depudecin production profiles among the disruptant, mutant T170 and wild type were compared by HPLC analysis. The depudecin production profile of the disruptant showed similar pattern to that of the mutant T170, with a decreased in the depudecin production comparing to wildtype strain, suggesting the involvement of *XyCPR* gene in the depudecin biosynthesis pathway.

Keywords: *Xylaria* sp., Depudecin, NADPH Cytochrome P450 Oxidoreductase (CPR)