บทคัดย่อ

T160353

Mucor rouxii เป็นราในกลุ่ม oleaginous Zygomycetes ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันที่มีความสำคัญในทางการแพทย์ ได้แก่ gamma-linolenic acid [1-3] เพื่อให้เกิดความเข้าใจในกระบวนการสังเคราะห์สารตั้งต้นในการผลิตกรดไขมันชนิดนี้ จึงได้ทำการโคลน และศึกษาคุณสมบัติของยีน fatty acid synthase *(FAS)* ของ *M. rouxii* โดยการโคลนยีน *FAS* จาก genomic library ของ *M. rouxii* ATCC24905 ด้วย homologous probe ร่วมกับเทคนิค polymerase chain reaction ยีน *FAS* ที่โคลนได้มีขนาด 12,359 bp ถอดรหัสได้ 4,086 กรดอะมิโน (~450 kDa) มี intron 4 ตำแหน่งที่มีขนาดแตกต่างกันได้แก่ 91 bp 129 bp 98 bp และ 77 bp ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีน FAS ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ พบว่า putative FAS ของ *M. rouxii* จัดอยู่ใน Type I FAS ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ primary metabolism ซึ่งประกอบด้วย catalytic domain ที่เรียงลำดับจากปลายด้าน 5' ดังนี้คือ acetyltransferase enoyl reductase dehydratase malonyl/palmitoyl transferase acyl carrier protein 2 ตำแหน่ง β-keto reductase β-keto synthetase และ phosphopantetheinyl transferase ซึ่งการจัดเรียงตัวของ catalytic domain นี้คล้ายคลึงกับการจัดเรียงตัวของเอนไซม์ FAS ของยีสต์ และ ราอย่างไรก็ดี active domain ทั้งหมดของ FAS ของ *M. rouxii* นี้อยู่บนโพลีเปปไทด์สายเดียวกันซึ่งมีลักษณะเหมือนการเชื่อมกันของ subunits ทั้งสองของเอนไซม์ FAS ของยีสต์ในลักษณะ head to tail นอกจากนี้ยังมี ACP 2 ตำแหน่ง ซึ่งต่างจากลักษณะของเอนไซม์ FAS ทั่วไป สำหรับการศึกษาการ

แสดงออกของยีน *FAS* ของ *M. rouxii* นั้นทำโดยอาศัยวิธี complementation ซึ่งผลจากการ transform พลาสมิดที่ประกอบด้วย cDNA ของยีน *FAS* บางส่วนของ *M. rouxii* บริเวณที่มี homology กับยีน *FAS1* ของยีสต์ เข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีความบกพร่องของยีน *FAS1* พบว่าจากการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR มีการแสดงออกของยีนในระดับ transcription อย่างไรก็ตามไม่พบ transformant ใดเลยที่สามารถเจริญในอาหารที่ขาดกรดไขมัน ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุเช่น ไม่เกิดการแสดงออกยีนในระดับ post-transcription translation และ post-translation หรืออาจเพราะปริมาณเอนไซม์ที่ได้มีประสิทธิภาพต่ำในการผลิตกรดไขมัน ทำให้ไม่เพียงพอในการใช้สำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์ หรืออาจเกิดจากการที่โปรตีน FAS ของ *M. rouxii* ไม่สามารถทำงานร่วมกับโปรตีน FAS2 ของยีสต์ได้อย่างสมบูรณ์ ยีน *FAS* ของ *M. rouxii* ที่โคลนได้นี้จัดได้ว่าเป็นยีน putative *FAS* กลุ่มใหม่ และรายงานนี้เป็นรายงานแรกที่ได้มีการศึกษายีน *FAS* ของราในกลุ่ม oleaginous Zygomycetes

Abstract

TE160353

Mucor rouxii is an oleaginous Zygomycetes. It is capable of producing high content of essential fatty acid for medical applications, such as gamma-linolenic acid [1-3]. To gain insight into the understanding of the regulation of the fatty acid synthesis at a molecular level in *M. rouxii,* a *FAS* gene, fatty acid synthase, was cloned from the genomic DNA library of *M. rouxii* ATCC24905, in combination with polymerase chain reaction techniques. The *FAS* gene of *M. rouxii* was found to contain a single open reading frame of 12,359 bp, coding for 4,086 amino acid residues (~450 kDa), and was interrupted by 4 introns of various sizes, including 91 bp 129 bp 98 bp and 77 bp, respectively. By comparing its amino acid sequence with known FASs, the functional catalytic domains of this enzyme were identified. It revealed that FAS of *M. rouxii* is of Type I fatty acid synthase and active domains are organized in the following order: acetyltransferase, enoyl reductase, dehydratase, malonyl/palmitoyl transferase, acyl carrier protein (2 domains), β-keto reductase, β-keto synthase, and phosphopantetheinyl transferase. This domain organization is like a head to tail fusion of the two yeast *FAS* gene subunits, but all domains reside on the same polypeptide chain. Moreover, the presence of 2 domains of acyl carrier protein is quite distinctive from FAS of other organisms. Functional characterization was performed by complementation study. The result of

transformation of partial cDNA of *M. rouxii,* which has homology with *S. cerevisiae FAS1*, into a *S. cerevisiae* strain defective in *FAS1*. The transcription of the gene could be revealed by RT-PCR technique, demonstrating the presence of mRNA of *FAS* gene of *M. rouxii*. However none of the several transformants were capable of growing on medium lacking of fatty acids. The lack of this functional complementation could be due to several reasons, such as post-transcription, translation and post-translation process, which could not take place, or the translation product might not be sufficient to support growth of the fatty acid requiring mutant, or the formation of a functional heterogeneous complex between FAS protein of *M. rouxii* and FAS2 protein of yeast could not occur. The results obtained from this work constitute the first report of the cloning and characterization of putative *FAS* of putative *FAS* of oleaginous fungi, and demonstrate that *FAS* of *M. rouxii* is a novel *FAS*.