

ราในกลุ่ม Xylariaceae เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม polyketide และ nonribosomal peptide ที่มีศักยภาพสูงที่สามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้หลายชนิด ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน nonribosomal peptide synthetase (NRPS) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ nonribosomal peptide จาก genomic library ของ *Xylaria* sp. BCC 1067 โดยใช้ homologous probe ให้ชื่อยีนนี้ว่า *nrpsxy* ยีนนี้มี ORF ขนาด 10,641 bp ถอดรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 3,546 หน่วย และมี intron 1 ตำแหน่งขนาด 61 bp นอกจากนี้ยังพบอีกหนึ่งยีนอยู่ด้านหน้ายีน *nrpsxy* ซึ่งคาดว่าทำหน้าที่เป็น efflux pump ให้ชื่อยีนนี้ว่า *efxy* จากการวิเคราะห์โครงสร้างของยีน *nrpsxy* พบว่ายีนนี้จัดอยู่ใน NRPS ชนิด iterative ที่สร้างสารในกลุ่ม cyclodepsipeptide ซึ่งประกอบด้วย 2 modules ที่มี catalytic domain จัดเรียงตัวตามลำดับดังนี้คือ Condensation Adenylation Thiolation Condensation Adenylation N-Methylation Thiolation Thiolation Condensation และ Reductase domain (C-A-T-C-A-M-T-T-C-R) ยีน *nrpsxy* นี้มีความคล้ายกับยีน *enniatin synthetase* ถึง 74% อย่างไรก็ดีเมื่อทำการศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยวิธี precursor directed biosynthesis ไม่สามารถตรวจพบสารประกอบประเภท *enniatin* ได้ จากการศึกษาหน้าที่ของยีนโดยวิธี gene disruption และเปรียบเทียบ metabolite profile ของ mutant กับ wild type โดยใช้ HPLC พบสารที่คาดว่าสร้างโดยยีน *nrpsxy* ที่ retention time 51.15 นาที จากข้อมูลโดยรวมทั้งหมดพอสรุปได้ว่ายีนที่โคลนได้อาจไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม *enniatin* แต่คาดว่าเป็น NRPS ที่สร้างสารในกลุ่ม cyclodepsipeptide ที่น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ได้มีการโคลนยีน NRPS จากราในกลุ่ม Xylariaceae

The fungi in Xylariaceae are rich sources of novel bioactive compounds of possible pharmaceutical interest. Many of them are active peptides that are synthesized by nonribosomal peptide synthetases (NRPSs). In the present work, a NRPS gene of *Xylaria* sp. BCC 1067 was isolated by screening the genomic DNA library of *Xylaria* sp. BCC 1067 with a homologous probe, and designated as *nrpsxy*. The nucleotide sequence of *nrpsxy* was revealed to contain a single open reading frame of 10,641 bp, interrupted by 1 intron of 61 bp, encoding 3,546 amino acid residues. In the proximity of *nrpsxy*, a second gene with high similarity to an efflux pump was identified and named as *efxy*. The genetic architecture and domain organization of the *nrpsxy* suggest that it is an iterative NRPS, comprising of two complete elongation modules. Their active domains are organized in the following order: Condensation, Adenylation, Thiolation, Condensation, Adenylation, *N*-Methylation, Thiolation, Thiolation, Condensation and Reductase domain (C-A-T-C-A-M-T-T-C-R). Its domain organizations resemble those of the enzymes in cyclodepsipeptide synthetase group, particularly, with highest similarity (74%) to enniatin synthetase. However, the study of precursor-directed biosynthesis technique, demonstrated that *Xylaria* sp. BCC 1067 could not produce enniatin at the condition tested, implying that *nrpsxy* might not involve in the synthesis of enniatin. Gene inactivation by selectable marker-assisted mutation and metabolite profiling analyses by HPLC were also carried out, to further determine the functional property of *nrpsxy*. The result revealed a mutant incapable of producing a product at the retention time of 51.15 minutes, when compared to metabolite profiles of the wild type, indicating that it is the product of *nrpsxy*. Taken all together, it could be speculated that *nrpsxy* is a member of cyclodepsipeptide synthetases with high potentials in producing natural products of biological activity importance, for which its clear function has to be further elucidated. This is the first report of the cloning and characterization of a NRPS gene from a fungus in Xylariaceae.