การคัดเลือกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ยีนแมคโครไลด์ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซิเลสจาก Streptomycetes ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

นางสาวสิทธินีย์ แสนมี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6032-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING AND IDENTIFICATION OF MACROLIDE CYTOCHROME P-450 HYDROXYLASE GENE FROM STREPTOMYCETES ISOLATED IN THAILAND

Miss Sittinee Saenmee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-17-6032-9

Thesis Title	Screening and identification of macrolide cytochrome P-450 hydroxylase gene from streptomycetes isolated in Thailand
By	Miss Sittinee Saenmee
Department	Biotechnology
Thesis Advisor	Suchart Chanama, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Manee Chanama, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

.... Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.... Chairman

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D)

.... Thesis Advisor

(Suchart Chanama, Ph.D.)

.... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Manee Chanama, Ph.D.)

.... Member

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

.... Member

(Assistant Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิทธินีย์ แสนมี : การคัดเลือกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ยีนแมคโครไลด์ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซิเลสจาก Streptomycetes ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย (SCREENING AND IDENTIFICATION OF MACROLIDE CYTOCHROME P-450 HYDROXYLASE GENE FROM STREPTOMYCETES ISOLATED IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร.สุชาติ ชะนะมา, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณี ชะนะมา, 80 หน้า, ISBN 974-17-6032-9

Streptomyces เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีความสำคัญทางการแพทย์เนื่องจากสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพประเภทแมคโครไลด์ที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรค เช่น ยาปฏิชีวนะ และยาต้านมะเร็ง ในกระบวนการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ cytochrome P-450 hydroxylase ในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นในขั้นตอนสุดท้ายเพื่อให้ได้สารที่มีความเป็นฤทธิ์ทางชีวภาพ การวิจัยนี้ได้ทำการตรวจหาและพิสูจน์ยีนของเอนไซม์ cytochrome P-450 hydroxylase ใน *Streptomyces* spp.ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย จากการทำไฮบริไดเซชั่นแบบจุด (dot blot hybridization) โดยใช้ยีน *picK* cytochrome P-450 hydroxylase เป็นตัวติดตาม (probe) สามารถคัดเลือก *Streptomyces* จำนวน 20 สายพันธุ์ซึ่งมียีนแมคโครไลด์ P-450 ในยีโนมและพบว่าสามารถแยกและเพิ่มจำนวนยีนแมคโครไลด์ P-450 จากตัวอย่างที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี PCR เพียง 14 สายพันธุ์ การวิเคราะห์ยีน P-450 ที่คัดแยกได้จาก *Streptomyces* 3 สายพันธุ์แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสของยีน P-450 สายพันธุ์ SMC 48, SMC 59 และ SMC 78 มีความคล้ายคลึงกับยีน P-450 ของ *Streptomyces* ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นในการสังเคราะห์สารประเภทแมคโครไลด์ การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ายีนที่แยกได้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดสามารถจัดอยู่ในสายวิวัฒนาการที่มาจากต้นกำเนิดที่เป็นแบคทีเรีย *Streptomyces* เดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา................ เทคโนโลยีชีวภาพ.......	ลายมือชื่อนิสิต.......สิทธินีย์ แสนมี.......
สาขาวิชา.............. เทคโนโลยีชีวภาพ.......	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.......สุชาติ ชะนะมา.......
ปีการศึกษา............2547........................	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.......มณี ชะนะมา.......

4372539223 MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD : *Streptomyces*/ cytochrome P-450 hydroxylase / *picK*/ macrolide/ phylogenetic tree

SITTINEE SAENMEE: SCREENING AND IDENTIFICATION OF MACROLIDE CYTOCHROME P-450 HYDROXYLASE GENE FROM STREPTOMYCETES ISOLATED IN THAILAND. THESIS ADVISOR: SUCHART CHANAMA, Ph.D, THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF.MANEE CHANAMA, Ph.D, 80 pp. ISBN 974-17-6032-9

Streptomyces is a gram positive filamentous bacteria that produce phamaceutically important metabolites (macrolide) including antimicrobial and antitumor. Macrolide cytochrome P-450 hydroxylase catalyzes the hydroxylation reaction of macrolide lead compound in the tailoring step of the macrolide biosynthesis. We attempted to screen and identify macrolide cytochrome P-450 hydroxylase gene from *Streptomyces* spp. isolated in Thailand. Twenty genomic DNA isolated from *Streptomyces* isolates existing the macrolide P-450 genes were determined by dot blot hybridization using *picK* P-450 hydroxylase gene probe. Fourteen macrolide P-450 genes from twenty positively hybridized genomic DNA samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products containing putative macrolide P-450 of *Streptomyces* strains SMC 48, SMC 59 and SMC 78 were cloned and sequenced. Sequence analyses of their nucleotide and deduced amino acid sequences showed high homology to members of the P-450 genes which catalyze hydroxylation of macrolide lead compound. The phylogenetic analysis demonstrated that the putative macrolide P-450 genes of our isolates have evolutionary relationships to the P-450s of the same bacterial origin,streptomycetes.

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department..........Biotechnology.......	Student's signature...สิทธินีย์ แสนหมี........................
Field of study........Biotechnology.......	Advisor's signature...Suchart Chanama........................
Academic year...........2004.............	Co-advisor's signature...Manee Chanama......................

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would not be completed without a good advice from many people. I am indebted to my advisor, Dr. Suchart Chanama, and my co-advisor, Asst. Prof. Dr. Manee Chanama, for valuable advice and encouragement throughout the course of the thesis.

Also, I would like to thank Assoc. Prof. Dr. Piamsook Pongsawasdi, Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed and Asst. Prof. Dr. Chanpen Chanchao for serving as thesis chairman and committee members.

I wish to send my sincere thanks to staff and friends of the Department of Biochemistry and Biotechnology Program for their kindness, helpfulness and friendships.

Finally, I would like to express my deep appreciation and gratefulness to my family for their love, care, and support throughout my life.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Pages

THAI ABSTRACT....iv

ENGLISH ABSTRACT....v

ACKNOWLEDGMENTS....vi

CONTENTS....vii

LIST OF FIGURES....ix

ABBREVIATIONS....xiii

CHAPTER I: LITERATURE REVIEW

Introduction....1

Streptomyces as Bioactive Compound Producers....2

Polyketide Biosynthesis of *Streptomyces*....3

Post-Polyketide Synthase Tailoring Enzymes....6

Picromycin Biosynthesis of *Streptomyces venezuelae*....7

Importance of Cytochrome P-450 Monooxygenases....9

Mechanism of Cytochrome P-450....12

Functions of Cytochrome P-450s....12

Structure of Cytochrome P-450 Enzymes....15

CHAPTER II: MATERIALS AND METHODS

Bacterial Cultivation....21

Isolation of Genomic DNA from *Streptomyces*....21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS (CONTINUED)

Pages

Dot Blot Hybridization..22

Polymerase Chain Reaction (PCR)..24

Cloning of PCR Product for DNA Sequencing...24

Sequence Analysis...25

CHAPTER III: RESULTS

Screening of Polyketide Cytochrome P-450 Hydroxylase Gene 26

Isolation of Putative Polyketide Cytochrome P-450 gene From *Streptomyces*

Genomic DNA...30

Identification of Polyketide Cytochrome P-450 Hydroxylase Gene....................30

Sequence Analysis of Putative Cytochrome P-450 Genes................................36

CHAPTER IV: DISCUSSIONS..64

CHAPTER V: CONCLUSIONS...67

REFERENCES...68

APPENDICES..76

BIOGRAPHY...80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Pages

1 Aromatics and complexes polyketides......... 5

2 Polyketide biosynthesis in the Pik PKS system..8

3 Hydroxylations catalyzed by Pick cytochrome P-450 hydroxylase
of *S. venezuelae*..8

4 Classification of P-450 system...11

5 The catalytic cycle of cytochrome P-450..13

6 The representation of tertiary structure of cytochrome P-450_{BM-3}..........................17

7 Substrates for the cytochrome P-450...17

8 Crystal structure of EryF cytochrome P-450 hydroxylase and its hydroxylation
reaction...18

9 Dot blot hybridization of 92 samples genomic DNA from *Streptomyces* spp...........28

10 Dot blot hybridization of 8 samples genomic DNA from *Streptomyces* spp............29

11 Agarose gel electrophoresis of PCR product of SMC 12, SMC 24,
S.hygroscopicus, SMC 30, SMC 59, SMC 78, SMC 23, *S.lividans*, SMC 23,
SMC 48, SMC 40 and SMC 11...31

12 Agarose gel electrophoresis of PCR product of SMC 74, *S.flavoviridis*, SMC 29,
SMC 89, *S.coerulescens*, *S. roseoviolaceus*, SMC 86 and SMC 91......................32

13 Agarose gel electrophoresis of plasmid isolated from screening clone of SMC 48...33

14 Agarose gel electrophoresis of plasmid isolated from screening clone of SMC 59...34

15 Agarose gel electrophoresis of plasmid isolated from screening clone of SMC 78...35

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Pages

16 Result from Basic Local alignment Search for nucleotide similarity to nucleotide sequence of SMC 48 38

17 Result from Basic Local alignment Search for translated amino acid similarity to translated amino acid sequence of SMC 48 39

18 Result from Basic Local alignment Search for protein similarity to translated amino acid sequence of SMC 78 40

19 pairwise alignment of nucleotide sequence of SMC 48 and P-450 from *S.avermitilis* (AP005027) 41

20 DNA sequence of putative macrolide P-450 from SMC 48 and its translated amino acid sequence 43

21 Pairwise alignment between translated amino acid sequences of SMC 48 and P-450 from *S. avermitilis* (AP005027) 44

22 Multiple sequence alignment of predicted secondary structures of putative P-450 of SMC 48, P-450 from *S. avermitilis* (AP005027) and P-450eryF from *S. erythraea* (M54983) 45

23 Result from Basic Local alignment Search for nucleotide similarity to nucleotide sequence of SMC 59 46

24 Result from Basic Local alignment Search for translated amino acid similarity to translated amino acid sequence of SMC 59 47

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Pages

25 Result from Basic Local alignment Search for protein similarity to translated amino acid sequence of SMC 59 48

26 Pairwise alignment of nucleotide sequence of SMC 59 and P-450 from *S. coelicolor* A3(2) (AL939114) 49

27 DNA sequence of putative macrolide P-450 from SMC 59 and its translated amino acid sequence 51

28 Pairwise alignment between translated amino acid sequences of SMC 59 and P-450 from *S. coelicolor* A3(2) (AL939114) 52

29 Multiple sequence alignment of predicted secondary structures of putative P-450 of SMC 59, P-450 from *S. coelicolor* A3(2) (AL939114) and P-450eryF from *S. erythraea* (M54983) 53

30 Result from Basic Local alignment Search for nucleotide similarity to nucleotide sequence of SMC 78 54

31 Result from Basic Local alignment Search for translated amino acid similarity to translated amino acid sequence of SMC 78 55

32 Result from Basic Local alignment Search for protein similarity to translated amino acid sequence of SMC 78 56

33 Pairwise alignment of nucleotide sequence of SMC 78 and P-450 from *S. rochei* (AB088224) 57

34 DNA sequence of putative macrolide P-450 from SMC 78 and its translated amino acid sequence 59

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Pages

35 Pairwise alignment between translated amino acid sequences of SMC 78 and P-450 from *S. coelicolor* A3(2) (AL939114)....................60

36 Multiple sequence alignment of predicted secondary structures of putative P-450 of SMC 78, P-450 from *S. coelicolor* (AL939114) and P-450eryF from *S. erythraea* (M54983)....................61

37 The parsimony tree of nucleotide sequences alignment of SMC 48, SMC 59 and SMC 78....................63

38 The parsimony tree of amino acid sequences alignment of SMC 48, SMC 59 and SMC 78....................64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A	absorbance, adenosine
bp	base pairs
C	cytidine
^{o}C	degree Celsius
cm	centrimetre
DNA	deoxyribonucleic acid
G	guanosine
kb	kilobase pairs in duplex nucleic acid,
	kilobases in single-standed nucleic acid
l	liter
LB	Luria-Bertani
μg	microgram
μl	microlitre
μM	micromolar
M	mole per liter (molar)
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mM	millimolar
MW	molecular weight
mU	milliunit
N	normal
ng	nanogram
nm	nanometer
OD	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
rpm	revolution per minute
RNase	ribonuclease
sec	second
SDS	sodium dodecyl sulfate
T	thymidine
TE	Tris-EDTA buffer
U	unit
UV	ultraviolet
V	voltage
W	weight