สุกัญญา เลือง : การทำงานของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสและบีตากลูแคนเอกโซไฮโดรเลสจากข้าวและบาร์เล่ย์ (FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF β-GLUCOSIDASES AND β-GLUCAN EXOHYDROLASE FROM RICE AND BARLEY) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 183 หน้า.

พบความหลากหลายต่อความจำเพาะในการย่อยสับสเตรตของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสตระกูล Glycoside hydrolase family 1 (GH1) ในข้าวจากการพิสูจน์ด้วยการผลิตเอนไซม์สายผสม Os7BGlu26 และ Os9BGlu31 และการแสดงลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ Os7BGlu26 เป็นเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส/แมนโนซิเดสที่มีลำดับกรดอะมิโนและความจำเพาะต่อการย่อยสับสเตรตคล้ายกับเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส rHvBII ของข้าวบาร์เล่ย์ คือมีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย 4-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside ดีกว่าการย่อยสลาย 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (4NPGlc) และสามารถย่อยสลาย β-(1,4)-manno-oligosaccharides ได้ แต่แตกต่างจาก rHvBII ตรงที่ Os7BGlu26 ย่อยสลาย cellobiose ได้ไม่ดีซึ่งไปคล้ายกับสมบัติของเอนไซม์บีตากลูโคซิเดส Os3BGlu7 ของข้าว ส่วนเอนไซม์ Os9BGlu31 ที่ถึงแม้มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์ hydroxyisourate hydrolase (HIUHase) ซึ่งประกอบไปด้วยช่วงลำดับของกรดอะมิโน TVNEP และ IHENG ที่อยู่รอบ ๆ catalytic acid/base และ nucleophile เหมือนกัน แต่ Os9BGlu31 ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตของ HIUHase ได้ Os9BGlu31 ย่อยสลาย 4NPGlc ได้ช้า (k_{cat}/K_M เท่ากับ 0.02 ± 0.001 $mM^{-1}.s^{-1}$) และสามารถย่อยสลาย dhurrin ซึ่งเป็น cyanogenic glucoside ได้เร็วกว่าการย่อยสลาย 4NPGlc 10 เท่า glucono δ-lactone และ 2,4-dinitrophenyl-β-D-2-deoxy-2-fluoro-glucopyranoside ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ Os9BGlu31 ได้ ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์บีตากลูโคซิเดสโดยทั่วไป จากการศึกษาการทำงานของ Os7BGlu26 และ Os9BGlu31 แสดงให้เห็นว่าความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนอาจนำมาใช้คาดเดาความจำเพาะต่อการย่อยสับสเตรตของเอนไซม์ที่ไม่ทราบการทำงานได้บ้าง แต่เอนไซม์ที่แม้จะอยู่ในตระกูล GH1 เหมือนกันอาจมีการทำงานที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง

ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าเอนไซม์บีตากลูแคนเอกโซไฮโดรเลสไอโซเอนไซม์ที่หนึ่ง (HvExoI) ในตระกูล Glycoside hydrolase family 3 (GH3) ของข้าวบาร์เล่ย์สามารถย่อยสลายสับสเตรตของ β-linked gluco-oligosaccharides ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ Os7BGlu26 และเอนไซม์บีตา-กลูโคซิเดสใน GH1 อื่น ๆ ได้ผลิตเอนไซม์สายผสม HvExoI (rHvExoI) ใน *Pichia pastoris* ให้ได้โปรตีนที่แตกต่างจาก HvExoI ดั้งเดิม โดยมีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นมา 11 ตัว (AHHHHHHHHAA) เชื่อมต่อที่

ปลายอะมิโนของสายโปรตีนและชนิดของน้ำตาลที่ต่อกับแอสพาราจีน 3 ตำแหน่ง (Asn221 Asn498 และ Asn600) rHvExoI มีความจำเพาะต่อการย่อยสับสเตรตได้หลากหลายและสามารถย่อยสลาย (1,2)- (1,3)- (1,4)- และ (1,6)-β-linked gluco-oligosaccharides และพอลิแซคคาไรด์ laminarin และ barley (1,3;1,4)-β-D-glucan ของบาร์เล่ย์ได้เหมือนกับ HvExoI ดั้งเดิม ยิ่งไปกว่านั้นโครงสร้างสามมิติของ rHvExoI น่าจะเหมือนกันอีกด้วย เนื่องจากผลึกของ rHvExoI สามารถกำเนิดจากผลึกขนาดเล็กของ HvExoI ดั้งเดิมในสารละลายที่ใช้ในการตกผลึกของ HvExoI และในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 1.8 M หรือ 2.2 M ใน malate-MES-Tris, pH 5.0 โดยปราศจากผลึกของ HvExoI

กรดอะมิโนที่พบว่ามีบทบาทสำคัญในตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาในโครงสร้างของ HvExoI ได้ถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นใน rHvExoI ดังนี้ D95A D95N R158A E161A E161Q K206V E220A E220Q D285A D285N W286A W434A E491A E491Q และ R158A/E161A ถึงแม้เอนไซม์กลายพันธุ์ส่วนใหญ่จะสูญเสียการทำงาน แต่การเปลี่ยนกรดอะมิโน W434 ด้วยอะลานีนทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการย่อยสลาย β-(1,2) β-(1,4) และ β-(1,6)-oligosaccharides การแทนที่กรดอะมิโน E220 เป็นอะลานีนทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายสับสเตรตและค่า k_{cat} ลดลงโดยเฉพาะต่อ cellobiose และ 4NPGlc และยังทำให้ค่า K_i ต่อ glucono δ-lactone เพิ่มขึ้น เอนไซม์กลายพันธุ์ทั้งสองชนิดได้สูญเสียความสามารถในการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ จากการศึกษาเหล่านี้ยืนยันความสำคัญของ catalytic nucleophile D285 catalytic acid/base E491 และกรดอะมิโนที่อยู่รอบ ๆ และ W434 ที่อยู่ใน +1 subsite มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะในการย่อยสับสเตรตของเอนไซม์ rHvExoI

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SUKANYA LUANG : FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF β-GLUCOSIDASES AND β-GLUCAN EXOHYDROLASE FROM RICE AND BARLEY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 183 PP.

β-GLUCOSIASE/β-MANNOSIDASE/BARLEY β-GLUCAN EXOHYDROLASE/ SUBSTRATE SPECIFICITY/MUTAGENESIS

Diverse substrate specificity has been found in rice glycoside hydrolase family 1 (GH1) β-glucosidases, as demonstrated by the recombinant expression and characterization of two GH1 enzymes, Os7BGlu26 and Os9BGlu31. Os7BGlu26 is a β-glucosidase/β-mannosidase that shares amino acid sequence and substrate specificity similarity with barley rHvBII, in terms of hydrolysing 4-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside more efficiently than 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (4NPGlc) and hydrolysing β-(1,4)-manno-oligosaccharides. However, unlike HvBII, Os7BGlu26 hydrolyses cellobiose poorly, similar to rice Os3BGlu7 β-glucosidase. In contrast, despite sequence similarity to hydroxyisourate hydrolase (HIUHase) and having the same TVNEP and IHENG sequences around the catalytic acid/base and nucleophile, respectively, rice Os9BGlu31 β-glucosidase has no HIUHase activity. Os9BGlu31 hydrolyses 4NPGlc slowly (k_{cat}/K_M of 0.02 ± 0.001 $mM^{-1}.s^{-1}$) and the cyanogenic glucoside dhurrin with 10-fold higher relative activity than 4NPGlc. The activity of Os9BGlu31 was not inhibited by glucono δ-lactone and 2,4-dinitrophenyl-β-D-2-deoxy-2-fluoro-glucopyranoside, unlike most other β-glucosidases. Based on these observations of the GH1 β-glucosidases Os7BGlu26 and Os9BGlu31, sequence similarity can sometimes be used to predict the substrate specificity of unknown proteins, but sometimes similar GH1 enzymes have completely different activities.

On the other hand, it was found that the GH3 barley β-D-glucan exohydrolase I

(HvExoI) acts similar to Os7BGlu26 and similar GH1 β-glucosidases in terms of its hydrolysis of β-linked gluco-oligosaccharides. Recombinant HvExoI (rHvExoI), was expressed in *Pichia pastoris*, to produce a protein different from native HvExoI in the presence of an extra 11 residues (AHHHHHHHHAA) at the N-terminus and in the type of sugar attached at the three N-glycosylation sites of native HvExoI (Asn221, Asn498 and Asn600). The rHvExoI exhibited broad substrate specificity and was able to hydrolyse (1,2)-, (1,3)-, (1,4)-, and (1,6)-β-linked gluco-oligosaccharides, and the polysaccharides laminarin, and barley (1,3;1,4)-β-D-glucan, similar to native HvExoI. Moreover, the structure of rHvExoI is likely to also be nearly identical, since tetragonal crystals of rHvExoI grew in the same conditions used for cystallisation of native HvExoI by macroseeding with native crystal seeds and in the conditions of 1.8 M and 2.2 M ammonium sulfate in malate-MES-Tris buffer, pH 5.0, without seeds.

Amino acid residues that appeared to be essential to the active site, based on the HvExoI structure, were mutated in rHvExoI as follows: D95A, D95N, R158A, E161A, E161Q, K206V, E220A, E220Q, D285A, D285N, W286A, W434A, E491A, E491Q and R158A/E161A. Although most of these mutations resulted in lack of detectable activity, the substitution of W434 by alanine led to an active enzyme that lost its ability to hydrolyse β-(1,2), β-(1,4), and β-(1,6)-oligosaccharides. Another mutation, E220A, decreased the hydrolytic rate and the k_{cat} values, especially for cellobiose and 4NPGlc, and increased the K_i constant value of glucono δ-lactone. Both mutants lost the ability to hydrolyse polysaccharides. These studies confirm the importance of the catalytic nucleophile, D285, the catalytic acid-base, E491, and the surrounding amino acids and suggest that W434, which helps form the +1 subsite of rHvExoI is critical to substrate specificity.

School of Biochemistry Student's signature _____

Academic Year 2010 Advisor's signature _____

Co-advisor's signature _____