อนุพงษ์ ทานกระโทก : การวิเคราะห์โครงสร้างของกลไกการจับและการย่อยน้ำตาลโดยเอนไซม์ บีตาแมนโนซิเดส OS7BGLU26 จากข้าว (STRUCTURAL ANALYSIS OF THE MECHANISM OF SUGAR BINDING AND HYDROLYSIS BY RICE OS7BGLU26 β-MANNOSIDASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 119 หน้า.

เอนไซม์ Os7BGlu26 เป็นเอนไซม์ของข้าว (*Oryza sativa*) ซึ่งจัดอยู่ในตระกูล glycoside hydrolase family 1 (GH1) สามารถใช้ 4-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside เป็นสับสเตรทได้ดีกว่า 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside เพื่อที่จะเข้าใจความจำเพาะต่อสับสเตรทและกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้ จึงทำการตกผลึกเอนไซม์ Os7BGlu26 นี้ร่วมกับลิแกนด์ต่างๆ เช่น น้ำตาลแมนโนส ตัวยับยั้ง 2,4-dinitrophenyl-2-deoxy-2-fluoroglucoside (dNPG2F) ตัวยับยั้ง isofagomine ตัวยับยั้ง mannoimidazole และตัวยับยั้ง glucoimidazole เอนไซม์ Os7BGlu26 มีโครงสร้างโดยทั่วไปเป็นแบบคลาสิก TIM-barrel เหมือนกับโครงสร้างของโปรตีนอื่นๆ ในตระกูลนี้ โครงสร้างเชิงซ้อนของ Os7BGlu26 กับน้ำตาลแมนโนสหรือโครงสร้างของเอนไซม์กับผลิตภัณฑ์ พบว่าโครงรูปของน้ำตาลแมนโนสเป็นแบบเรือเอียง $^{1}S_{5}$ เมื่อนำโครงรูป $^{1}S_{3}$, $^{1}S_{5}$, $^{2}S_{O}$, และ $^{3}S_{1}$ ของสับสเตรท 4NPMan และ 4NPGlc เข้าไปอยู่ในบริเวณเร่งของ Os7BGlu26 พบว่า โครงรูปแบบ $^{1}S_{5}$ และ $^{1}S_{3}$ มีค่าพลังงานต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบ docked conformers กับโครงสร้างของเอนไซม์ GH1 อื่นจากข้าว พบมีความแตกต่างของ กรดอะมิโนที่มีอันตรกิริยากับกรดอะมิโนตัวเร่งปฏิกิริยากรด/เบสระหว่างเอนไซม์ที่มี และไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์บีตาแมนโนซิเดส การกลายพันธุ์ของ Tyr134 ไปเป็น Trp ของ Os7BGlu26 เป็นผลให้อัตราส่วนของค่า k_{cat}/K_{m} ระหว่าง 4NPMan ต่อ 4NPGlc ลดต่ำลง ในขณะที่เอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Tyr134 ไปเป็น Phe อัตราส่วนนี้เพิ่มขึ้น 13 เท่า การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ที่ตำแหน่ง Cys182 เป็น Thr กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองแบบลดลง และลดความจำเพาะต่อแมนโนส สรุปได้ว่าอันตรกิริยากับกรดอะมิโนตัวเร่งตัวเร่งปฏิกิริยากรด/เบสมีบทบาทสำคัญต่อความจำเพาะกับน้ำตาล โครงสร้างเชิงซ้อนของ Os7BGlu26 กับตัวยับยั้ง dNPG2F แสดงการจับกันของลิแกนด์นี้ที่ตำแหน่งจับ +1 ถึง +2 และร่องที่สันนิษฐานว่าจับกับสับสเตรท แทนที่จะเป็นตำแหน่งจับ -1 ถึง +1 ในทางกลับกับผลึกเอนไซม์กลายพันธ์ที่กรดอะมิโนตัวเร่งที่ทำหน้าที่ให้และรับโปรตรอน E179Q ที่แช่ด้วยตัวยับยั้งเดียวกันนี้ แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างมัธยันต์แบบโควาเลนต์กับ G2F ที่มีโครงรูปเป็นแบบเก้าอี้ $^{4}C_{1}$ โครงสร้างของ Os7BGlu26 ร่วมกับตัวยับยั้งเอนไซม์ไกลโคซิเดส isofagomine และตัวยับยั้งที่คล้ายกับช่วง

ทรานซิชันที่เป็นอีพิเมอร์กัน mannoimidazole และ glucoimidazole ได้ทำการตรวจสอบ พบว่าโครงสร้างเชิงซ้อนกับตัวยับยั้ง isofagomine มีลักษณะวงแหวนใกล้เคียงกับโครงรูปเก้าอี้ $^4C_1$ ซึ่งเป็นโครงรูปที่ผ่อนคลายของไกลโคไซด์ และตัวยับยั้งนี้มีค่าคงที่การยับยั้งแบบแข่งขัน (K_i) เท่ากับ 2.97 x 10^{-6} โมลาร์ โครงสร้างของตัวยับยั้ง mannoimidazole แสดงการบิดของวงแหวนระหว่างรูปเรือบิด $^1S_5$ และรูป $B_{2,5}$ ซึ่งสอดคล้องกับโครงรูปของน้ำตาลแมนโนสที่สภาวะทรานซิชันตัวยับยั้งนี้มีค่าคงที่การยับยั้งเท่ากับ 13.2 x 10^{-6} โมลาร์ ตัวยับยั้ง glucoimidazole มีการบิดตัวเป็นรูปซองจดหมาย ^4E ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับโครงรูป $^4H_3$ half chair สภาวะทรานซิชันของน้ำตาลกลูโคสและตัวยับยั้งนี้มีค่าคงที่การยับยั้งแบบแข่งขัน เท่ากับ 54.2 x 10^{-9} โมลาร์ มากไปกว่านั้นความก้าวหน้าของปฏิกิริยา (progress curves) การยับยั้งของตัวยับยั้ง isofagomine mannoimidazole และ glucoimidazole แสดงถึงการยับยั้งเอนไซม์ Os7BGlu26 แบบ slow onset ซึ่งจะพบได้ในการศึกษาการยับยั้งของตัวยับยั้งที่มีลักษณะคล้ายกับสภาวะทรานซิชันของสับสเตรท การศึกษานี้ได้ยืนยันว่า มีเส้นทางการบิดที่แตกต่างกัน 2 เส้นทาง ของน้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลกลูโคสระหว่างการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ Os7BGlu26

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ANUPONG TANKRATHOK : STRUCTURAL ANALYSIS OF THE MECHANISM OF SUGAR BINDING AND HYDROLYSIS BY RICE OS7BGLU26 β-MANNOSIDASE. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 119 PP.

β-MANNOSIDASE/ β-GLUCOSIDASE/TRANSITION STATE ANALOGUE

Rice Os7BGlu26 is one member of glycoside hydrolase family 1 (GH1) which prefers to use 4-nitrophenyl-β-D-mannopyranoside (4NPMan) as a substrate over 4NP-β-D-glucopyranoside (4NPGlc). In order to understand its glycon specificity and catalytic mechanism, Os7BGlu26 is being investigated at the molecular level. The Os7BGlu26 protein was crystallized and soaked with or without ligands (mannose, 2,4-dinitrophenyl-2-deoxy-2-fluoroglucoside (dNPG2F), isofagomine, mannoimidazole and glucoimidazole). The overall structure of native Os7BGlu26 had the classic TIM-barrel, which is similar to other GH1 enzymes. The Os7BGlu26 structure with D-mannose corresponds to a product complex, with β-D-mannose in the $^{1}S_{5}$ skew boat conformation**.** Docking of the $^{1}S_{3}$, $^{1}S_{5}$, $^{2}S_{O}$, and $^{3}S_{1}$ pyranose ring conformations of 4NPMan and 4NPGlc substrates into the active site of Os7BGlu26 indicated lowest energies in $^{1}S_{5}$ and $^{1}S_{3}$ skew boat conformations. Comparison of these docked conformers with other rice GH1 structures revealed differences in the residues interacting with the catalytic acid/base between enzymes with and without significant β-D-mannosidase activities. Mutation of Tyr134 to Trp in Os7BGlu26 resulted in a lower ratio of k_{cat}/K_{m} for 4NPMan to that for 4NPGlc, while mutation of Tyr134 to Phe increased this ratio 13-fold. Mutation of Cys182 to Thr decreased both

activity and selectivity for β-D-mannoside. We conclude that interactions with the catalytic acid/base play a significant role in glycon selection**.** The structure of the Os7BGlu26 complex with dNPG2F showed that one ligand bound at the +1 to +2 subsites and another at a position further out in the putative substrate binding cleft, rather than at the expected subsite -1 to +1 position. In contrast, the E179Q Os7BGlu26 acid/base mutant soaked with this inhibitor yielded the structure of a covalent intermediate with G2F, which was found in a $^4C_1$ chair conformation. The structures of the Os7BGlu26 with the glycosidase inhibitor isofagomine and the epimeric putative transition state mimic inhibitors mannoimidazole and glucoimidazole were also determined. The crystal structure of the complex with isofagomine showed a ring close to a $^4C_1$ chair form, which is proposed to be the relaxed state conformation of glycosides, and this inhibitor had a competitive K_i constant of 2.97 x 10^{-6} M. The crystal structure of mannoimidazole showed a distorted ring between a $^1S_5$ skew boat and a $B_{2,5}$ boat, which is proposed to be the transition state conformation of mannosides, and this inhibitor had a competitive K_i constant of 13.2 x 10^{-6} M. Glucoimidazole also had distortion to a ^4E envelope conformation, which is close to the $^4H_3$ half chair transition state proposed for glucosides, and this inhibitor had a competitive K_i constant of 54.2 x 10^{-9} M. Moreover, the progress curves found that isofagomine, mannoimidazole and glucoimidazole show slow onset inhibition of Os7BGlu26, as seen in other transition state analogue studies. This study supports the use of two different distortion pathways for D-mannosides and D-glucosides during hydrolysis by Os7BGlu26.

School of Biochemistry Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature_____