บทคัดย่อ

จิบเบอริลิน (gibberellins, GA) เป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทหลายอย่างในการเจริญเติบโตของพืช เช่น การเจริญเติบโตของต้นอ่อน การงอกของเมล็ด การสร้างเมล็ด และอื่นๆ ในพืช ฮอร์โมนจิบเบอริลิน จะถูกจับกับน้ำตาล และไม่ใช่น้ำตาลซึ่งจะทำให้ฮอร์โมนจิบเบอริลินไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งคิดว่าเอนไซม์กลุ่มเอ็นไซม์กลูโคซิลทรานส์เฟอเรส (glycosyltransferases) ทำหน้าที่เติมกลูโคสทำให้จิบเบอริลินอยู่ในรูปกลูโคไซด์ (glucosides) และ ต่อกับน้ำตาลด้วยพันธะเอสเทอร์ (glucose esters) ได้มีการทดสอบพบว่าเอนไซม์ เบตา-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) ทำหน้าที่ตัดกลูโคสออกจากจิบเบอริลินเพื่อให้จิบเบอริลินอยู่ในรูปทำงานได้ ในการศึกษานี้เราหาวิธีที่จะแยกและศึกษา gibberellin β-glucosidase จากข้าว ขั้นตอนแรกเราได้สังเคราะห์ gibberellin A4 glucose ester (GA_4-GE) เพื่อใช้ทดสอบกับเอนไซม์ เบตา-กลูโคซิเดส ที่ผลิตจากแบคทีเรีย และ ที่ได้จากต้นอ่อนข้าว ซึ่งได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วเลือกเฉพาะตัวอย่างมีเอนไซม์ หลังจากตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ อีก 6 ขั้นตอนพบว่ามีโปรตีน 2 ขนาด จากตัวอย่างที่สามารถย่อย GA_4-GE และได้ 0.18% ของกิจกรรมของเอนไซม์จากเดิมและความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 337 เท่า ของเอนไซม์หลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนทั้ง 2 ขนาดถูกยืนยันโดยการย่อยโปรตีนที่ได้โดยการย่อยของเอนไซม์ทริปซิน เปปไทด์ที่ได้ทำการเคราะห์ด้วยเครื่อง mass spectrometer โดยหนึ่งในสอง ของโปรตีนนั้นพบเอนไซม์ไกลโคไซม์ ไฮโดรเลส ตระกูล family1 (glycoside hydrolase family 1 protein (GH1)) คือ Os4BGlu13 ที่สามารถย่อย GA_4-GE ได้ หรือมีชื่ออีกอย่างว่า tuberonic acid β-glucosidase. ในการตรวจหาเอนไซม์ที่สามารถย่อย GA_4-GE นั้นพบว่า Os3BGlu6 มีความจำเพาะต่อเอนไซม์สูง Os3BGlu6 ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรด-เบส และ นิวคลีโอไฟล์พบว่ามีความจำเพาะต่อ GA_4-GE ลดลง ซึ่งเป็นไปตามความคาดหมาย และนอกจากนั้นความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenylglucoside (*p*NPGlc) และซับสเตรทอีกสองชนิดก็ให้ผลคล้ายกันเพื่อ glucosyl azides จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์สามารถตัด glucosyl ester โดยใช้กลไกและความต้องการคล้ายกัน จากการศึกษาทำให้เราเข้าใจ การทำงาน ของ gibberellin gluco-conjugates ในข้าว รวมไปถึงการตัดของ glucose-1-esters.

Abstract

Gibberellins are plant hormones that play roles in a number of processes, including shoot elongation, germination, seed formation and others. In plants, gibberellins are found in both free aglycone forms and as glycosides, which are lacking or attenuated in activity. While glucosyltransferases are thought to glucosylate the gibberellins to form glucosides and glucose esters, β-glucosidases have been shown to release the active aglycones from these glucoconjugates. Here, we sought to isolate and characterize a gibberellin β-glucosidase from rice. First gibberellin A4 glucose ester (GA_4-GE) was synthesized, then it was used to screen previously expressed recombinant rice β-glucosidases and to select fractions for the purification of rice β-glucosidase from seedling extract. After ammonium sulfate precipitation and 6 steps of chromatography, two bands of protein were left in the fraction which hydrolyzed GA_4-GE, and 0.18% of the activity was remaining at 337-fold purification from the crude precipitant solution. The two bands were identified by tryptic digestion and mass spectrometric analysis, and one of these was the glycoside hydrolase family 1 protein Os4BGlu13, also known as tuberonic acid β-glucosidase. This suggests that Os4BGlu13 can also serve as a gibberellin glucose ester β-glucosidase. In screening of recombinant enzymes for GA_4-GE hydrolysis, Os3BGlu6 was identified as an enzyme with relatively high activity toward the gibberellin substrate. Mutation of the catalytic acid/base and nucleophile of Os3BGlu6 showed that this had the expected decrease in activity with GA_4-GE substrate, as well as *p*-nitrophenylglucoside and the two substrates gave similar rescue with azide to produce the expected glucosyl azides. These results show that the enzyme hydrolyzes the glucosyl ester with a similar mechanism and requirements to its hydrolysis of glycosides. Overall, these results help us to understand the turnover of gibberellin gluco-conjugates in rice, as well as the hydrolytic hydrolysis of glucose-1-esters.