บทคัดย่อ

ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลี่ที่ 1 (GH1) ประกอบด้วยบีตา-กลูโคซิเดสซึ่งสามารถย่อยอนุพันธ์ของกลูโคสได้หลากหลาย และทรานส์กลูโคซิเดสซึ่งย้ายกลูโคสจากโมเลกุลหนึ่งไปยังโมเลกุลอื่น จากการศึกษาก่อนหน้าและในการศึกษานี้ Os9BGlu31 เป็นเอนไซม์จากข้าวที่แสดงกิจกรรมเหมือนทรานส์กลูโคซิเดส ทั้งนี้ วิธีการ 2 วิธี ได้นำมาใช้เพื่อหาสารตั้งต้นทางชีวภาพสำหรับ Os9BGlu31 วิธีที่ 1 สารสกัดจากพืชข้าวด้วยแอลกอฮอล์ถูกใช้เป็นตัวรับในปฏิกิริยาทรานส์กลูโคซิเลชั่นในปฏิกิริยาที่ใช้ Os9BGlu31 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวมีการจัดจำแนกโดยทำให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์โดย mass spectrometry (MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) วิธีที่ 2 สกัดสารจากพืชข้าวที่มีการแทรก T-DNA ในยีน Os9BGlu31 และเปรียบเทียบสารเมแทบอไลท์ที่สกัดได้กับสารสกัดจากพืชข้าวที่ไม่มีการแทรก T-DNA โดยวิธี LCMSMS เมื่อนำข้อมูลจากวิธีการทั้งสองมาแปลผล เราสามารถแสดงให้เห็นว่าเอสเทอร์ของกรดไขมัน, 1-O-oleoyl β-D-glucose และ 1-O-linoleoyl β-D-glucose สามารถทำหน้าที่เป็นผลิตภัณฑ์หรือสารตั้งต้นของ Os9BGlu31 และสร้างในพืชข้าวที่ขาด Os9BGlu31 นอกจากนี้เรายังได้ทำต้นข้าวกลายพันธุ์ที่บริเวณรอบๆ บริเวณเร่งปฏิกิริยาของ Os9BGlu31 เพื่อติดตามว่าเราจะสามารถเปลี่ยนกิจกรรมของ Os9BGlu31 เป็นไฮโดรเลสหรือไม่ และเพื่อทำความเข้าใจพื้นฐานของกิจกรรมทรานส์กลูโคซิเดส แม้ว่าไม่มีต้นข้าวกลายพันธุ์ที่ให้กิจกรรมไฮโดรไลซิสสูงกว่ากิจกรรมทรานส์กลูโคซิเดส แต่การกลายที่ W243N (Tryptophan residue 243 to Asparagine) ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมทรานส์กลูโคซิเดสสูงขึ้นและมีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายกว่า Os9BGlu31 จากต้นข้าวสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้ เรายังสามารถระบุจำนวนของไกลโคไซด์และบิส-ไกลโคไซด์ของ flavonol kaempferol ที่สร้างขึ้นโดย Os9BGlu31 W243N โดยอาศัยข้อมูลตามรูปแบบการกระจายตัวของมวลสารสเปกโตรมิเตอร์ งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า Os9BGlu31 สามารถนำมาใช้ในการผลิตสารประกอบต่างๆ รวมทั้ง phytohormone glucoconjugates เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการและนักวิจัยอื่นที่ศึกษาในด้านนี้ การทำงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับการโคลนและการแสดงออกของเอนไซม์ GH1 Cluster At / Os6 Os1BGlu5 และ Os6BGlu22 ใน *Escherichia coli* ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์จากโปรตีนที่แสดงออก อย่างไรก็ตาม กิจกรรมทรานส์กลูโคซิเดสของ Os9BGlu31 ก็ยังคงมีประโยชน์สำหรับการสังเคราะห์สารที่มีความหลากหลาย รวมถึงยังสามารถปรับเปลี่ยนรูปแบบของกิจกรรมโดยอาศัยการกลายพันธุ์เพื่อใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีเอกลักษณ์

Abstract

Glycoside hydrolase family 1 (GH1) contains β-glucosidases that hydrolyze various glucoconjugates and transglucosidases, which instead transfer glucose from one molecule to another. Os9BGlu31 is the rice enzyme that has been shown to function as a transglucosidase during this and previous work. In order to determine the biological substrates for Os9BGlu31, two approaches were used. First, alcoholic extracts from rice plants were used as transglycosylation reaction acceptors in reactions with Os9BGlu31 and the compounds that were transglycosylated identified by purification, mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Second, rice plants containing a T-DNA insertion in the gene for Os9BGlu31 were extracted and the metabolites compared to those of wild type by LCMSMS. By combining these methods, we were able to show that the fatty acid esters, 1-O-oleoyl β-D-glucose and 1-O-linoleoyl β-D-glucose, can serve as products or substrates of Os9BGlu31 and build-up in plants deficient in Os9BGlu31. We also mutated Os9BGlu31 at sites around the active site to see if we could change it to a hydrolase, in order to understand the basis for transglucosidase activity. Although none of the mutations made hydrolysis activity higher than transglucosidase activity, the W243N (Tryptophan residue 243 to Asparagine) mutation resulted in an enzyme with higher activity and greater substrate range than wild type Os9BGlu31. Moreover, we could identify a number of glycosides and bis-glycosides of the flavonol kaempferol that were created by Os9BGlu31 W243N, based on their mass spectrometric fragmentation patterns. This work suggested that Os9BGlu31 could be used to produce a number of compounds, including phytohormone glucoconjugates, of use to our lab and other investigators in the field. Additional work on expression of the other relatively highly expressed GH1 Cluster At/Os6 enzymes Os1BGlu5 and Os6BGlu22 were cloned and expressed in *Escherichia coli*, but no activities could be detected from the expressed proteins. Nonetheless, the transglucosidase activity of Os9BGlu31 is useful for synthesis of various compounds and can be modulated by mutations to produce unique products.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี