วัชลี ชื่นช่อ : ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์เบตากลูโคซิเดส BGLU1 ในข้าว (STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN RICE BGLU1 β-GLUCOSIDASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 189 หน้า.

เอนไซม์ BGlu1 ของข้าวพบมากในช่วงที่ข้าวออกดอกและกำลังงอกเมล็ด ทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช เพื่อศึกษาความจำเพาะในการย่อยสับสเตรตโดยเอนไซม์เบตากลูโคซิเดสในตระกูล Glycosyl hydrolase 1 (GH1) โดยเฉพาะเอนไซม์ในพืชต่อการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ ผลึกโปรตีนสี่ชนิดคือ ผลึกโปรตีนดั้งเดิม ผลึกโปรตีนดั้งเดิมกับสารยับยั้ง 2-deoxy-2-fluoroglucoside ผลึกโปรตีนกลายพันธุ์ E176Q และผลึกโปรตีนกลายพันธุ์กับสับสเตรตโอลิโกแซคคาไรด์ cellopentaose ถูกนำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ โดยผลึกทั้ง 4 ชนิดสามารถหักเหรังสีเอ็กเรย์ได้ความละเอียดถึง 2.20 1.52 1.35 และ 1.80 อังสตรอม ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติกับเอนไซม์ชนิดอื่นในตระกูลเดียวกันพบว่า โครงสร้างโดยรวมเหมือนกันแต่แตกต่างกันเฉพาะบริเวณโครงสร้างภายนอกที่เป็นบริเวณทางเข้าของตำแหน่งเร่งปฏิกริยา ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวมีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนในเอนไซม์ตระกูลเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการกำหนดความจำเพาะต่อสับสเตรต จากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ BGlu1 พบว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์เหมาะสมต่อการย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 เนื่องจากมีลักษณะเป็นร่องลึกขนาดยาวที่ใหญ่บริเวณทางเข้าและแคบที่บริเวณด้านใน โครงสร้างสามมิติของโปรตีนดั้งเดิมกับตัวยับยั้ง แสดงให้เห็นภาพการเกิดปฏิกริยา transglycosylation ซึ่งเกิดได้ดีโดยการเร่งของเอนไซม์ BGlu1 โดยมีโมเลกุลกลีเซอรอลเข้ามาทำปฏิกริยาเป็นตัวรับกลูโคสที่เกิดจากการเร่งปฏิกริยา การศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนกลายพันธุ์ E176Q กับสับสเตรต cellopentaose พบการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณผิวนอกของ loop C ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน Y341 V342 และ F343 ซึ่งพบว่ากรดอะมิโน Y341 มีหน้าที่ในการจับวงแหวนกลูโคสที่ 4 และ 5 ของสับสเตรต

เนื่องจากเอนไซม์เบตากลูโคซิเดส BGlu1ในข้าว และ BGQ60 ในบาร์เลย์มีความจำเพาะต่อการย่อยสับเสรต cellobiose และ cellotriose แตกต่างกัน ดังนั้นกรดอะมิโนที่บริเวณตำแหน่งที่ทำหน้าที่จับกับสับเสรตด้านปลาย (aglycone binding site) ของเอนไซม์ในข้าว จึงถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ในบาร์เลย์ แม้การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวนั้น ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงความจำเพาะต่อสับเสรตได้ แต่จากการศึกษาจลศาสตร์การเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์กลายพันธุ์พบว่า กรดอะมิโน I179 N190 และ N245 จับกับสับสเตรตและเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์ การศึกษาจลศาสตร์การเร่งของเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่

ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์ BGlu1 (nucleophile และ acid/base residues) สามารถยืนยันได้ว่ากรดอะมิโนทั้งสอง (E386 และ E176) เป็นตัวเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์ BGlu1 นอกจากนั้นตัวเร่งที่ทำหน้าที่ให้และรับโปรตอน (acid/base residue) ยังสามารถกลับมาเร่งปฏิกริยาได้ใหม่ในสภาวะที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่มีประจุลบเข้ามาทำหน้าที่ในการรับโปรตอนแทน และเอนไซม์กลายพันธุ์ E176Q มีความสามารถในการย่อยสับสเตรท *p*-nitrophenol glucoside ได้ดีกว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ตัวอื่นที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

WATCHALEE CHUENCHOR : STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN RICE BGLU1 β-GLUCOSIDASE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 189 PP.

STRUTURE-FUNCTION/β-GLUCOSIDASE/X-RAY CRYSTALLOGRAPHY/ CELLOOLIGOSACCHARIDES/ENZYME-SUBSTRATE INTERACTIONS

Rice BGlu1, a plant β-glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot, hydrolyzes cell wall-derived oligosaccharides. To understand the basis of substrate specificity in glycosyl hydrolase family 1 (GH1) β-glucosidases, especially plant enzymes acting on oligosaccharides, crystals were generated and the crystal structures of free wild type BGlu1, its covalently bound complex with 2-deoxy-2-fluoroglucoside, E176Q mutant BGlu1, and E176Q BGlu1 in complex with cellopentaose were solved at 2.20, 1.52, 1.35, and 1.80 Å resolution, respectively. The structures were similar to previous GH1 β-glucosidases, but showed several differences in the loops around the active site, which lead to an open active site with a narrow slot at the bottom, compatible with the hydrolysis of long β-1,4-linked oligosaccharides. The complex with the 2-fluoroglucoside provides a snap shot of the transglycosylation reaction, which is efficiently catalyzed by rice BGlu1, with a glycerol from the cryoprotectant playing the role of the incoming acceptor sugar. Two alternative conformations were found for the flexible loop C at residues Y341, V342, and F343, which are located at the entrance to the active site, in the E176Q mutant structure, though Y341 appeared to orient Glc4 and Glc5 of cellopentaose bound in the active site of E176Q mutant.

As the rice and barley enzymes have different preferences for cellobiose and cellotriose, putative aglycone binding residues were mutated to those of barley enzyme. Though no single residue appeared to be responsible for these differences, I179, N190 and N245 did appear to interact with the substrates and play a role in catalysis. Two catalytic residues (E386 and E176) were confirmed by kinetic analysis of nucleophile and acid/base mutants. The role of the acid/base catalyst was assessed by chemical rescue of the E176Q mutant with addition of anionic nucleophiles, which showed that this residue is indeed the catalytic acid/base and this mutant was especially active with *p*-nitrophenol glucoside compared to previously studied acid/base mutants.

School of Biochemistry Student's Signature_____

Academic Year 2007 Advisor's Signature_____