จุฑามาส คำวงษา : การศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูโคซิเดส S9BGLU31 (FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF OS9BGLU31 TRANSGLUCOSIDASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 116 หน้า.

เอนไซม์ข้าว Os9BGlu31 เป็นทรานส์กลูโคซิเดสในตระกูล Glycoside hydrolase family 1 (GH1) ที่มีความสามารถในการย้ายหมู่น้ำตาลกลูโคสให้กับสารในกลุ่มของกรดฟีโนลิก ฟลาโวนอยส์ และสารกลุ่มฮอร์โมนพืช เอนไซม์ Os9BGlu31 มีความจำเพาะเจาะจงต่อฟีโนลิก 1-*O*-β-กลูโคสเอสเทอร์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้ (Donor) ได้ดีกว่าไกลโคไซด์ (Glycoside) นอกจากนี้กรดฟีโนลิกอิสระของเอสเทอร์นี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวรับ (Acceptor) ที่ดีอีกด้วย จากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์โดย homology model พบว่ากรดอะมิโนที่อยู่รอบๆ บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Os9BGlu31 ตัวนี้มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่มากจึงได้ทำการสร้างตัวกลายพันธุ์ I172T L183Q L241D และ W243N พบว่าตัวกลายพันธุ์ W243N มีประสิทธิภาพสูงสุด และการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง W243 (A D M N F และ Y) มีอัตราส่วนในการเติมกลูโคสให้กับแนฟทอล และ1-แนฟทาลีนอะซิติกแอซิค อย่างน้อยสองเท่าในการทำปฏิกิริยาทรานส์กลูโคซิเลชันเมื่อเทียบกับ wild type จึงทดลองใช้เคมเฟอรอล ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยส์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลอยู่ 4 ตัว มาใช้เป็นสารตั้งต้นตัวรับกลูโคส พบว่าตัวกลายพันธุ์ W243N มีประสิทธิภาพสูงกว่า wild type เอนไซม์ ดังนั้นตำแหน่งจำเพาะเจาะจงของการเติมหมู่กลูโคสให้กับเคมเฟอรอล จึงถูกนำมาเปรียบเทียบกับ wild type Os9BGlu31 และตัวกลายพันธุ์ W243 อื่นๆ ผลปรากฏว่า wild type Os9BGlu31 สามารถผลิตเคมเฟอรอล 7-*O*-กลูโคไซค์ได้เพียงหนึ่งชนิดเท่านั้น ในขณะที่ตัวกลายพันธุ์ W243 สามารถผลิตเคมเฟอรอลโมโนกลูโคไซค์ ได้ถึงสามชนิด และเคมเฟอรอลไดกลูโคไซค์ อีกสามชนิด การศึกษาตำแหน่งที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสให้เคมเฟอรอลถูกวิเคราะห์โดยเทคนิคการใช้ประจุลบ tandam mass spectrometry เพื่อแยกชนิดของเคมเฟอรอลโมโนกลูโคไซค์ที่ตำแหน่ง 3-*O* 7-*O* และ 4'-*O* กลูโคไซค์ และเคมเฟอรอลไดกลูโคไซค์ ที่ตำแหน่ง 3-*O* 7-*O* และ 4'-*O* ไดกลูโคไซค์ ตามหลักความเสถียรของการทำให้เกิดอณุมูลอิสระหลังการเสียหมู่กลูโคส ตัวกลายพันธุ์ Os9BGlu31 W243 ยังสามารถใช้ เคมเฟอรอล 3-*O*-กลูโคไซค์เป็นสารตั้งต้นตัวให้กลูโคสได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังสรุปได้ว่า W243F และ W243Y ให้ผลคล้ายกับ wild type จากผลดังกล่าวนี้พบว่าตัว W243 มีความจำเพาะอย่างยิ่งต่อสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์ของ Os9BGlu31

เอนไซม์ทรานส์กลูโคซิเดส Os9BGlu31 มีบทบาทในเมทาบอลิสมของพืชรวมทั้งในข้าวด้วย จากการศึกษาด้วยเครื่อง Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) ในการดูเมทาบอไลท์โปรไฟล์ของสารสกัดจากใบธงของข้าว พบว่าสารสกัดจากใบธงของข้าว

ประกอบด้วย ฟลาโวนอยส์อไกลโคน และไกลโคไซด์ โดยมีการเปรียบเทียบสารสำคัญระหว่างข้าวปกติ wild type กับข้าวที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน Os9BGlu31 โดยวิธี homologous T-DNA และ Tos17/2 ซึ่งเป็นการทำให้การแสดงออกของยีน Os9BGlu31 ลดต่ำลงจนถึงไม่มีการแสดงออกของยีนนี้อีกเลย เพื่อศึกษาการเพิ่มขึ้นหรือการลดลงของสารที่เกิดจากการขาดเอนไซม์ Os9BGlu31 จากการศึกษาพบว่ามีสารหนึ่งชนิดที่มีปริมาณเพิ่มในข้าวที่เป็น homologous knockout Os9BGlu31 คือ 1-*O*-feruloyl β-D-glucoside (FAG) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นตัวให้กลูโคสของ Os9BGlu31 ที่มีรายงานการศึกษาแบบ *in vitro* มาก่อนแล้ว การศึกษานี้พบว่าในใบธงของข้าว knockout Os9BGlu31 มี FAG อยู่ในปริมาณมากและยังพบการลดลงของสารที่เทียบเป็น Tricin 4'-(guaiacylglyceryl)ether 7-*O*-glucoside ที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นตัวให้กลูโคสของ Os9BGlu31 ในการทดลองแบบ *in vitro* ครั้งนี้ด้วย สารนี้อาจเป็นสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่สำคัญของข้าว งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ทำการศึกษาการทำงานของ Os9BGlu31 ในข้าว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

JUTHAMATH KOMVONGSA : FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF OS9BGLU31 TRANSGLUCOSIDASE. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 116 PP.

Rice Os9BGlu31 is a glycoside hydrolase family 1 (GH1) transglucosidase that can transfer glucose to phenolic acids, flavonoids, and phytohormones. Os9BGlu31 displays broad specificity, with phenolic 1-*O*-β-D-glucose esters acting as better glucosyl donors than glucosides, whereas the free phenolic acids of these esters are also excellent acceptor substrates. Based on homology modeling of this enzyme, we made single point mutations of residues surrounding the acceptor binding region of the Os9BGlu31 active site, including I172T, L183Q, L241D, and W243N. The most active variant produced was W243N, and all variants with mutations at W243 (to A, D, M, N, F and Y) had at least a 2-fold higher ratio of naphthol to naphthalene acetic acid transglucosylation compared to wild type Os9BGlu31. Kaempferol is a flavanol containing 4 hydroxyl groups, on which the Os9BGlu31 W243N mutant activity was considerably higher than that of wild type recombinant enzyme. Therefore, the regiospecificity for kaempferol glucosylation was compared between Os9BGlu31 wild type and its W243 mutants. The wild type Os9BGlu31 recombinant enzyme produced only 7-*O*-glucoside in significant amounts, while the W243 variants produced up to 3 kaempferol monoglucosides and 3 diglucosides. Fragmentation analysis by negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry identified the kaempferol mono-*O*-glucosides as 3-*O*, 7-*O*, and 4'-*O* glucosides and di-*O*-glucosides as 3,7-*O*, 4'7-*O*, and 3,4'-*O* kaempferol diglucosides, based on the expected stability of different radical products of glucosyl group loss. The Os9BGlu31 W243 mutants were also better able

to use kaempferol 3-*O*-glucoside as a donor substrate, although the W243F and W243Y variants were similar to wild type. Therefore, the W243 residue was found to be critical to the substrate and product specificity of Os9BGlu31.

The role of Os9BGlu31 transglucosidase in rice plant metabolism has only been speculated to date. We tentatively identified various compounds in rice flag leaf extracts, including flavonoid aglycones and glycosides, by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS)-based metabolite profiling. Extracts of homologous T-DNA and Tos17/2 insertion *os9bglu31* knockout lines were compared to those of paired homozygous O*s9BGlu31* wild type lines to identify compounds that accumulated or are decreased in the absence of Os9BGlu31. One compound that accumulated in the homozygous knockout lines, was 1-*O*-feruloyl-β-D-glucoside (FAG), which has been reported as a glucosyl donor substrate of Os9BGlu31 *in vitro*. We discovered that FAG is the substrate for Os9BGlu31 *in vivo*, since FAG is accumulated in flag leaves of Os9BGlu31 knockout lines. Certain compounds in the rice flag leaf extracts, including one with a mass matching tricin 4'-*O*-(guaiacylglyceryl)ether 7-*O*-glucoside, could also serve as Os9BGlu31 donor substrates in an *in vitro* assay, suggesting they may also be potential substrates or products in the plant. This work provides the first experimental evidence for the function of Os9BGlu31 *in planta.*

School of Biochemistry Student's Signature _____

Academic Year 2014 Advisor's Signature_____