ทิพย์วรินทร์ ริมลำดวน : การศึกษาสมบัติและโครงสร้างของเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสจากข้าว (CHARACTERIZATION AND STRUCTURAL STUDIES OF RICE β-GALACTOSIDASE อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 185 หน้า

เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสจากพืชถูกจำแนกให้อยู่ในตระกูลของไกลโคไซด์ไฮโดรเลสกลุ่มที่ 35 ซึ่งเอนไซม์นี้พบในพืชหลายชนิดและมีส่วนทางด้านปลายคาร์บอกซิลิคที่มีหน้าที่คล้ายกับเลคตินจากหอยแม่นทะเลที่ทำหน้าที่ในการจับกับน้ำตาลกาแลคโตสแม้ว่าปัจจุบันบทบาทหน้าที่ในการจับกับคาร์โบไฮเดรตของส่วนทางด้านปลายคาร์บอกซิลิคของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้มีการศึกษาไปบ้างแล้ว แต่เพื่อเข้าใจบทบาทหน้าที่และโครงสร้างทางด้านปลายคาร์บอกซิลิคของเอนไซม์กลุ่มนี้ที่มาจากข้าว ดีเอ็นเอคู่สมของยีนเบตากาแลคโตซิเดสส่วนทางด้านปลายคาร์บอกซิลิค (OsBGal1 Cter) ถูกเพิ่มจำนวนโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและทำการโคลนเข้าเวคเตอร์ pET32b(+) โปรตีน OsBGal1 Cter ถูกผลิตโดยทั้งแบบไม่ติดฉลาก และแบบติดฉลากไอโซโทป ^{15}N หรือ ^{13}C หรือทั้ง ^{15}N และ ^{13}C โปรตีน OsBGal1 Cter มีน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน ส่วนของโปรตีนไทโอรีดอกซินและบริเวณที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเรียงต่อกันอยู่ที่ส่วนทางด้านปลายอะมิโนของโปรตีนถูกตัดออกด้วยเอนไซม์ทรอมบิน โปรตีน OsBGal1 Cter ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ IMAC 2 ครั้ง และตามด้วยคอลัมน์เบนซามิดีน จากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของ OsBGal1 Cter โปรตีนที่ถูกทำให้เสียสภาพ มีน้ำหนักประมาณ 13 กิโลดาลตัน และเมื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลแบบธรรมชาติของโปรตีนตัวนี้เท่ากับ 15 กิโลดาลตัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนตัวนี้เป็นโมเลกุลเดี่ยวในสารละลาย ทำการตรวจหาโครงสร้างหลักของโปรตีนโดยวิธี 3D HNCO CBCA(CO)NH และ HNCACB นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และส่วนของหมู่โซ่ข้างของ OsBGal1 Cter โดยวิธี C(CO)NH และ HCCH-TOCSY นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ โครงสร้างทุติยภูมิของ OsBGal1 Cter ประกอบด้วยแผ่นเบตา 5 แผ่น และเกลียวอัลฟา 1 เกลียว โครงสร้างสามมิติของโปรตีนชนิดนี้คล้ายกับโครงสร้างของส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับคาร์โบไฮเดรตจากสัตว์ แต่มีความแตกต่างกันในส่วนของวงลูป โดยที่วงลูปเอ และวงลูปซีของโปรตีน OsBGal1 Cter นั้นมีความยาวกว่าวงลูปของแลโทรฟิลิน-1 จากหนู และส่วนของเลคตินจากปลาแซลมอน นอกจากนี้โครงสร้างของวงลูปเอของ OsBGal1 Cter ไม่สามารถระบุได้แน่ชัด ชี้ให้เห็นว่าส่วนนี้เป็นบริเวณที่มีความยืดหยุ่นสูง ถึงแม้ว่าโปรตีน OsBGal1 Cter จะถูกทำนายว่าเป็นส่วนของเลคตินที่สามารถจับกับน้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลแรมโนสได้ แต่ผลจากการทดสอบการจับกันกับน้ำตาลแรมโนส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลราฟฟิโนส โดยวิธีเอชเอสคิวซีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่า โปรตีน OsBGal1 Cter ไม่สามารถจับกับน้ำตาลที่กล่าวมาได้

ส่วนการทดสอบการจับกันระหว่างโปรตีน OsBGal1 Cter กับน้ำตาลจำพวกโอลิโกแซคคาไรด์และโพลิแซคคาไรด์ โดยวิธีคาร์โบไฮเดรตไมโครแอเรย์นั้นพบว่า โปรตีนนี้สามารถจับกับน้ำตาลอะราบิโนไตรโอส และน้ำตาลกาแลคโตไบโอส ในขณะที่ผลการทดลองจากวิธีเอสทีดีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าโปรตีน OsBGal1 Cter ไม่สามารถจับกับน้ำตาลตัวนี้ได้

ในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสแบบเต็มโมเลกุลนั้น เอนไซม์ตัวนี้ถูกพัฒนาโดยการเปลี่ยนรหัสโคดอนของดีเอ็นเอคู่สมให้เหมาะสมต่อการแสดงออกของเอนไซม์ตัวนี้ในเชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* การแสดงออกของเอนไซม์ตัวนี้ถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เรียกชื่อใหม่ว่า OsBGal1opt เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสที่ได้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 97 กิโลดาลตัน และมีการเติมคาร์โบไฮเดรตที่ตำแหน่งไนโตรเจน 2 ตำแหน่ง เอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

THIPWARIN RIMLUMDUAN : CHARACTERIZATION AND STRUCTURAL STUDIES OF RICE β-GALACTOSIDASE. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 185 PP.

β-GALATOSIDASE/C-TERMINAL DOMAIN/NMR/RICE/CARBOHYDRATE BINDING

Plant β-galactosidases are classified in glycoside hydrolase family 35 (GH 35). Many plant BGals have an additional C-terminal domain similar to galactose-binding lectin from sea urchin, although its role in carbohydrate-binding has only been speculated to date. To understand the function and structure of the C-terminal domain from rice β-galactosidase OsBGal1, the cDNA encoding the OsBGal1 C-terminal domain (OsBGal1 Cter) was amplified by PCR and cloned into pET32b(+). The recombinant OsBGal1 Cter was expressed with and without labeling with ^{15}N, ^{13}C or ^{15}N and ^{13}C. The OsBGal1 Cter fusion protein had a denatured molecular weight of approximately 33 kDa. The fusion protein was cleaved with thrombin protease to remove the N-terminal thioredoxin and His tags. The OsBGal1 Cter protein was purified by 2 steps of IMAC and benzamidine column. The free OsBGal1 Cter had a denatured molecular weight of approximately 13 kDa and an apparent native molecular weight of about 15 kDa, indicating that the free OsBGal1 Cter is a monomer in solution. The backbone assignments of OsBGal1 Cter were constructed from 3D HNCO, CBCA(CO)NH and HNCACB nuclear magnetic resonance (NMR) spectra. Side chain peaks for the OsBGal1 Cter were assigned from C(CO)NH and HCCH-TOCSY spectra. NOESY spectra provided constraints for calculation of the 3-

dimensional structure. The secondary structure of OsBGal1 Cter had 5 β-stands and 1 α-helix. The structure of this domain was similar to carbohydrate binding domains from animals, but showed differences in the loops. Loops A and C of OsBGal1 Cter are longer than the corresponding loops from mouse latrophilin-1 and the chum salmon lectin domain. Loop A of OsBGal1 Cter was not well-defined, suggesting it is flexible. Although OsBGal1Cter was predicted to be a galactose/rhamnose-binding lectin, titration with rhamnose, galactose, glucose and raffinose showed no binding in the HSQC NMR spectra. OsBGal1Cter appeared to bind to α-(1,5)-L-arabinotriose and β-(1,5)-D-galactobiose, as well as several other oligosaccharides and polysaccharides, on a carbohydrate array. The OsBGal1 Cter binding to α-(1,5)-L-arabinotriose was tested by STD NMR, but no signs of binding were observed.

To study the whole β-galactosidase structure and function, rice OsBGal1 β-galactosidase was expressed from a codon-optimized cDNA in *Pichia pastoris*. Protein expression was induced 1% methanol at 20°C to yield the recombinant enzyme, designated OsBGal1opt. This enzyme had an apparent molecular mass of 97 kDa and a slight smearing of the band to upper molecular weight suggested the protein was glycosylated at one or both of the two putative N-glycosylation sites observed in the OsBGal1 sequence. The optimum pH for OsBGal1 expressed in this system was found to be 4.5 and the optimum temperature was at 55°C.

School of Biochemistry Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature_____