สุปรียา เชชาดริ : การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์เบตากลูโคซิเดสจากข้าว (FUNCTIONAL AND STRUCTURAL STUDIES OF RICE β-GLUCOSIDASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. เจมส์ เกตุทัต คาร์นส์, 144 หน้า.

เอนไซม์เบตากลูโคซิเดสในตระกูล Glycoside Hydrolase Family 1 (GH1) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของพืช เช่น การสร้างสารต่อต้านแมลงศัตรูพืช การย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช การควบคุมไฟโตฮอร์โมน (phytohormone) และการสร้างลิกนิน (lignification) เอนไซม์ Os3BGlu6 เป็นหนึ่งในเอนไซม์ 34 ชนิดของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสใน GH1 ที่ตรวจพบในจีโนมของข้าว (*Oryza sativa* L.) และเป็นหนึ่งในแปด ของ phylogenetic clusters ในจีนข้าว และ *Arabidopsis* เอนไซม์ Os3BGlu6 ถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและวิเคราะห์หาโครงสร้างสามมิติ เอนไซม์ Os3BGlu6 ถูกผลิตใน *E. coli* Origami (DE3) ในรูปของโปรตีนที่มี thioredoxin และ His_6 tags อยู่ที่ปลายอะมิโน ของโปรตีนเอนไซม์ Os3BGlu6 สามารถย่อยสับสเตรท *p*-nitrophenyl (*p*NP) β-D-fucoside (k_{cat}/K_m = 66.8 $mM^{-1}s^{-1}$) *p*NP-β-D-glucoside (k_{cat}/K_m = 6.2 $mM^{-1}s^{-1}$) และ *p*NP-β-D-galactoside (k_{cat}/K_m = 1.6 $mM^{-1}s^{-1}$) ได้ดี และสามารถย่อย alkyl glycosides *n*-octyl-β-D-glucoside (k_{cat}/K_m = 2.7 $mM^{-1}s^{-1}$) ได้ดีกว่า *n*-heptyl β-D-glucoside (k_{cat}/K_m = 0.85 $mM^{-1}s^{-1}$) นอกจากนี้ยังสามารถย่อยไดแซคคาไรด์ที่มี β-(1→3)-linked (k_{cat}/K_m = 1.7 $mM^{-1}s^{-1}$) และ β-(1→2)-linked (k_{cat}/K_m = 0.96 $mM^{-1}s^{-1}$) ได้ดีกว่าไดแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ

ได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ Os3BGlu6 อิสระ เอนไซม์ที่รวมอยู่กับ 2-deoxy-2-fluoroglucoside และ *n*-octyl-β-D-thioglucopyranoside ซึ่งเป็น non-hydrolyzable analogue ของ *n*-octyl-β-D-glucoside โดยผลึกทั้ง 3 ชนิดสามารถหักเหรังสีเอกซเรย์ได้ความละเอียดถึง 1.83 1.81 และ 1.80 อังสตรอม ตามลำดับ พบว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์ มีความยาวจากส่วนที่ลึกที่สุดของบริเวณเร่งถึงบริเวณทางเข้าของตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 14 อังสตรอม ซึ่งสั้นกว่าความยาวของบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Os3BGlu7 4 อังสตรอม ส่วนที่แคบที่สุดของบริเวณเร่งปฏิกิริยามีความกว้าง 5.3 อังสตรอม และมีส่วนที่กว้างที่สุดเท่ากับ 7.6 อังสตรอม พบ Tris 1 โมเลกุลซึ่งมีโครงรูปที่แตกต่างกัน 2 แบบในโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์อิสระ ซึ่งสอดคล้องกับการทำงานของโมเลกุลนี้ที่สามารถเป็นตัวยับยั้งแบบอ่อน ของเอนไซม์ Os3BGlu6 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์กับ 2-deoxy-2-fluoroglucosyl พบว่า 2-deoxy-2-fluoroglucosyl อยู่ในโครงรูปผ่อนคลายของเก้าอี้แบบ $^4C_1$ ซึ่งเกิดพันธะโควาเลนท์กับกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น nucleophile บริเวณตำแหน่งที่จับกับสับสเตรทด้านใน (glycone-binding subsite) คล้ายกับการเกิดพันธะโควาเลนท์เชิงซ้อนในโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ Os3BGlu7 จากข้าวกับ 2-deoxy-2-fluoroglucosyl ส่วนโครงสร้าง

สามมิติของเอนไซม์ Os3BGlu6 กับ *n*-octyl-β-D-thioglucopyranoside พบว่ากรดอะมิโน M251 อยู่บริเวณทางเข้าของสับสเตรทเป็นอุปสรรคในการจับโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีพันธะ β-(1⟶4) สายยาวแต่กลับทำอันตรกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ของ *n*-octyl-β-D-thioglucopyranoside ได้ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงความชอบของเอนไซม์ Os3BGlu6 กับโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นและไกลโคไซด์ที่มีส่วนไม่ชอบน้ำ ดังนั้นความแตกต่างของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาน่าจะมีส่วนทำให้เอนไซม์มีความจำเพาะต่อการย่อยสับสเตรทแตกต่างกัน ซึ่งน่าจะช่วยอธิบายการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากข้าวในเอนไซม์ตระกูล GH1 เช่น Os3BGlu6

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SUPRIYA SESHADRI : FUNCTIONAL AND STRUCTURAL STUDIES OF RICE β-GLUCOSIDASE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 144 PP.

GLYCOSYL HYDROLASE/RECOMBINANT EXPRESSION/β-GLUCOSIDASE/ β-FUCOSIDASE/*n*-OCTYL-β-D-GLUCOSIDE

In plants, glycoside hydrolase family 1 (GH1) β-glucosidases are believed to play important roles in many processes, such as chemical defense against herbivores, hydrolysis of cell wall-derived oligosaccharides, phytohormone regulation, and lignification. Os3BGlu6 is one of the 34 GH1 β-glucosidases predicted from the rice (*Oryza sativa* L.) genome, and it represents one of the eight phylogenetic clusters including both rice and *Arabidopsis* genes. In this study, Os3BGlu6 was characterized for its biochemical properties and its 3D structure was crystallographically determined. Os3BGlu6 was expressed in *E. coli* strain Origami (DE3) as a recombinant fusion protein with N-terminal thioredoxin and His_6 tags. The purified Os3BGlu6 hydrolyzed *p*-nitrophenyl (*p*NP) β-D-fucoside (k_{cat}/K_m=66.8 $mM^{-1}s^{-1}$), *p*NP-β-D-glucoside (k_{cat}/K_m = 6.2 $mM^{-1}s^{-1}$), and *p*NP-β-D-galactoside (k_{cat}/K_m=1.6 $mM^{-1}s^{-1}$) efficiently. It also hydrolyzed the alkyl glycosides *n*-octyl-β-D-glucoside with greater catalytic efficiency (k_{cat}/K_m=2.7 $mM^{-1}s^{-1}$) than *n*-heptyl β-D-glucoside (k_{cat}/K_m=0.85 $mM^{-1}s^{-1}$). Among the oligosaccharides, β-(1→3)-linked (k_{cat}/K_m=1.7 $mM^{-1}s^{-1}$) and β-(1→2)-linked (k_{cat}/K_m=0.96 $mM^{-1}s^{-1}$) disaccharides were hydrolyzed most efficiently.

The three-dimensional structures of native Os3BGlu6, its covalent intermediate with 2-deoxy-2-fluoroglucoside, and its complex with the non-

hydrolyzable analogue of *n*-octyl-β-D-glucoside, *n*-octyl-β-D-thioglucopyranoside, were determined at 1.83 Å, 1.81 Å and 1.80 Å resolution, respectively. The distance from the deepest part of the active site slot to the surface entrance is 14 Å, shorter by 4 Å from that of Os3BGlu7 (18 Å). The narrowest part of aglycone binding site, was about 5.3 Å across, while the broadest region is 7.6 Å. One molecule of Tris in two possible conformations could be seen in the active site of the native structure, consistent with its action as a weak inhibitor for Os3BGlu6. The density for the 2-deoxy-2-fluoroglucosyl residue in a relaxed $^4C_1$ chair conformation covalently bound to the catalytic nucleophile was evident in the glycone-binding subsite and its position was similar to that in a 2-deoxy-2-fluoroglucosyl covalent complex of rice Os3BGlu7. The residue Met251, located at the entrance to the active site of Os3BGlu6, obstructed the binding of longer β-(1→4)-linked oligosaccharides, but interacted with the hydrophobic aglycone of *n*-octyl-β-D-thioglucopyranoside, contributing to the preference of Os3BGlu6 for shorter oligosaccharides and hydrophobic glycosides. This observation suggests that small differences contributed by residues in the active site are likely to account for differences in substrate specificities, which in turn determine the functions of GH1 β-glucosidases in rice, such as Os3BGlu6.

School of Biochemistry Student's signature_____

Academic Year 2008 Advisor's signature_____