เบตากลูโคซิเดสของข้าว (PROTEIN CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY DETERMINATION OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF RICE β-GLUCOSIDASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รจนา โอภาสศิริ, 104 หน้า

เอนไซม์ Os4BGlu12 ซึ่งเป็นเอนไซม์เบตากลูซิเดสที่จัดอยู่ในตระกูล Glycosyl hydrolase 1 (GH1) สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส 3 ถึง 6 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) และไดแซคคาไรด์ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,3)ได้ เอนไซม์ Os4BGlu12 ถูกผลิตในเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ OrigamiB(DE3) โดยที่ปลายอะมิโนของโปรตีนมีโปรตีนไทโอรีดอกซินและบริเวณที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเรียงต่อกัน 6 ตัวต่ออยู่ ได้แยกโปรตีนสายผสมนี้ให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโต กราฟีแบบจำเพาะที่มีโคบอลต์เป็นลิแกนด์ต่ออยู่กับเรซิน (IMAC) หลังจากที่ใช้เอนไซม์เอนเทอโรไคเนสตัดโปรตีนไทโอรีดอกซินและบริเวณที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเรียงต่อกัน 6 ตัวออกจากโปรตีนด้วยแล้ว ได้แยกส่วนนี้ออกไปด้วยวิธี IMAC และได้เอนไซม์ Os4BGlu12 ขนาด 55 kDa ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 95% ออกมา เอนไซม์ Os4BGlu12 ในสภาพธรรมชาติและที่มีสารยับยั้ง 2,4-dinitrophenyl 2-fluoro-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (G2F) ได้ถูกตกผลึกที่ 15 องศาเซลเซียส ผลึกโปรตีนในสภาพธรรมชาติได้ถูกผลิตขึ้นจากวิธี microbatch ในสารละลายตกผลึกที่ประกอบด้วย 25% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 4000, 0.1 M Tris-HCl, pH8.5, 0.20 M NaCl ต่อมาได้ปรับเปลี่ยนส่วนประกอบในสารละลายที่พบผลึกนี้เพื่อผลิตผลึกที่มีคุณภาพด้วยวิธี hanging-drop vapour diffusion ร่วมกับเทคนิค microseeding จนได้ผลึกของโปรตีนในสภาพธรรมชาติ และผลึกโปรตีนที่มีสารยับยั้ง G2F ในสารละลายตกผลึกที่ประกอบด้วย 19% (w/v) PEG 3350, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.16 M NaCl และ 19% (w/v) PEG 2000 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.16 M NaCl ตามลำดับ ผลึกทั้งสองชนิดสามารถหักเหรังสีเอกเรย์ได้ความละเอียดถึง 2.50 และ 2.45 อังสตรอม ตามลำดับ โดยมีกลุ่มสมมาตรโมเลกุลเป็น tetragonal และ มี space group แบบ $P4_32_12$ โครงสร้างสามมิติของโปรตีนในสภาพธรรมชาติถูกสร้างขึ้นด้วยวิธี molecular replacement โดยอาศัยโครงสร้างของ 1CBG เป็นโครงสร้างแม่แบบ และพบว่าในโครงสร้างสามมิติของโปรตีนมีโปรตีนสองโมเลกุลในหน่วยอสมมาตร มีปริมาณน้ำในผลึกประมาณ 49.98% และค่าสัมประสิทธิ์ของ Matthews คือ 2.46 $Å^3\ Da^{-1}$ สำหรับโครงสร้างสามมิติของโปรตีนกับตัวยับยั้ง G2F ถูกสร้างขึ้นด้วยวิธี rigid body refinement โดยใช้โครงสร้างของโปรตีนในสภาพธรรมชาติเป็นโครงสร้างแม่แบบ ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ของ Matthews เท่ากับ 2.68 $Å^3\ Da^{-1}$ และมีปริมาณน้ำในผลึกประมาณ 54.17% จากการเปรียบโครงสร้างสามมิติกับเอนไซม์ชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลเดียวกัน พบว่าโครงสร้างโดยรวมมีลักษณะเหมือนกัน แต่แตกต่างกันตรงโครงสร้างรอบๆ บริเวณทางเข้าของตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีลักษณะเป็นช่อง และมีความลึก

ประมาณ 20 อังสตรอม ตรงบริเวณที่ลึกสุดของตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนกับตัวยับยั้ง G2F มีกรดอะมิโนลำดับอนุรักษ์ทำพันธะไฮโดรเจนอยู่กับกลูโคสซึ่งพบเช่นเดียวกับเอนไซม์อื่นในตระกูลเดียวกัน แต่กลับพบความหลากหลายของกรดอะมิโนที่อยู่รอบๆบริเวณ aglycone binding site ของเอนไซม์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวเกี่ยวข้องกับความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนที่จับกับตัวยับยั้ง G2F กับโปรตีนในสภาพธรรมชาติพบว่าตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น nucleophile (Glu393)ไม่แตกต่างกัน ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์เบตากลูโคซิเดสชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลเดียวกัน นอกจากนี้ตำแหน่งของกรดอะมิโน Glu393 ในโครงสร้างของ Os4BGlu12 ที่จับอยู่กับตัวยับยั้งมีความคล้ายคลึงกับที่พบในเอนไซม์ S-glycosidase ทั้งขนาดของมุมและระยะทางระหว่างกรดอะมิโนกับคาร์บอนตำแหน่งที่หนึ่งของ G2F ซึ่งสอดคล้องกับการที่เอนไซม์สามารถย่อยสับเสตรต S-glycoside ได้

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

SOMPONG SANSENYA : PROTEIN CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY DETERMINATION OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF RICE β-GLUCOSIDASE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RODJANA OPASSIRI, Ph.D. 104.PP.

GLYCOSYL HYDROLASE FAMILY 1/β-GLUCOSIDASE/RICE/PROTEIN CRYSTALLIZATION/THREE DIMENSIONAL STRCUTURE

Rice Os4BGlu12, a glycosyl hydrolase family 1 (GH1) β-glucosidase hydrolyzes β-(1,4)-linked oligosaccharides of 3-6 glucosyl residues and the β-(1,3)-linked disaccharide laminaribiose. Os4BGlu12 was expressed as an N-terminal thioredoxin/His_6 fusion protein in OrigamiB(DE3) *Escherichia coli*. The fusion protein was purified by immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) with cobalt resin. After the thioredoxin/His_6 tag was excised from the protein with enterokinase, the fusion tag was removed by adsorption to the IMAC resin, which yielded a 55 kDa Os4BGlu12 with >95% purity. The free Os4BGlu12 enzyme and a complex with 2,4-dinitrophenyl 2-fluoro-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (G2F) inhibitor were crystallized at 15°C. Microbatch crystallization screening generated the native crystals in 25% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 4000, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.20 M NaCl. The conditions were further optimized by the hanging-drop vapor-diffusion method with microseeding. Native crystals and crystals of Os4BGlu12 complexed with G2F were obtained in 19% (w/v) PEG 3350, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.16 M NaCl and 19% (w/v) PEG 2000, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.16 M NaCl, respectively. Crystals of free Os4BGlu12 and Os4BGlu12-G2F complex were diffracted to 2.50 and 2.45 Å resolution, respectively, and their unit cell symmetry

determined to be in the tetragonal $P4_32_12$ space group. The structure of native Os4BGlu12 was solved by molecular replacement with the 1CBG structure as a search model and had two molecules per asymmetric unit with a solvent content of 49.98% and a Mathews Coefficient (V_M) of 2.46 $Å^3$ Da^{-1}. The native Os4BGlu12 structure further served as a template for rigid body refinement to solve the Os4BGlu12 with G2F data set, which had a V_M of 2.68 $Å^3$ Da^{-1} and 54.17% solvent content. The structures were similar to previous known GH1 enzymes, but the significant differences were seen at the main-chain trace of loop surrounding the active site. The active site is located at the bottom of an approximately 20 Å deep slot-like pocket surrounded by a large surface loop. In the innermost part of the active site in the crystal structure of G2F complex, the surrounding conserved amino acid residues seen in other GH1 enzymes formed hydrogen bonds with the glucosyl unit. On the other hand, residues around the aglycone binding site are not conserved, which might indicate the substrate specificity of the enyzme. There was no movement of Glu393 nucleophile residue in glycosyl-enzyme intermediate complex when compared to free Os4BGlu12 structure, which is different from the other known GH1 β-glucosidases. In addition, the position of the Glu393 nucleophilic residue of Os4BGlu12-G2F has the angle and distance to the anomeric carbon of G2F similar to an S-glycosidase, consistent with its ability in the hydrolysis of S-glycosides.

School of Biochemistry Student's Signature _____

Academic Year 2008 Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature_____