หยานหลิง หัว : การสังเคราะห์สารประกอบกลูโคซิลจิบเบอเรลลิน (GA) และการศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ GA เบตากลูโคซิเดสจากข้าว (SYNTHESES OF GIBBERELLIN (GA) GLUCOSYL CONJUGATES AND FUNCTIONAL STUDIES OF RICE GA β-GLUCOSIDASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 157 หน้า.

เพื่อตรวจหาเอนไซม์เบตา-ดี-กลูโคซิเดสที่สามารถไฮโดรไลส์สารประกอบจิบเบอเรลลิน (gibberellins, GA) จากข้าว สารประกอบจิบเบอเรลลิน 9 ชนิด ได้แก่ acetylated และ deacetylated gibberellin GA_4 glucosyl ester (GA_4-Glc) acetylated และ deacetylated GA_3 glucosyl ester GA_4 methyl ester GA_3 methyl ester 3-O-β-D-glucopyranosyl gibberellin A_3 methyl ester 13-O-β-D-glucopyranosyl gibberellin A_3 methyl ester และ β-D-glucopyranosyl gibberellin A_4 methyl ester ถูกสังเคราะห์ขึ้น และโครงสร้างของสารเหล่านี้ถูกวิเคราะห์ด้วย NMR และ LC-MS spectrometry

เพื่อตรวจหาเอนไซม์ GA เบตา-ดี-กลูโคซิเดสจากข้าว เอนไซม์เบตา-ดี-กลูโคซิเดสสกัดจากต้นและใบของข้าวที่มีอายุ 10 วัน และแยกให้บริสุทธิ์ด้วย 7 ขั้นตอนแล้วตรวจหาเอนไซม์โดยการตรวจวัดการย่อยสลายของ *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPGlc) และ GA_4-Glc พบเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส ตระกูล family 1 glycoside hydrolase (GH1) ที่สามารถย่อย GA_4-Glc ได้คือเอนไซม์ OS4BGlu13 เบตากลูโคซิเดส ซึ่งพิสูจน์ได้โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS ของเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ทริปซิน

แนวทางที่สองที่ใช้ตรวจหาเอนไซม์ GA เบตา-ดี-กลูโคซิเดสคือการทดสอบการย่อยสลาย *p*NPGlc และ GA_4-Glc โดยเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสตระกูล GH1 ซึ่งเป็นเอนไซม์สายผสมจากข้าว 5 ชนิด ได้แก่ Os3BGlu6 Os3BGlu7 (BGlu1) Os4BGlu12 Os3BGlu18 และ Os9BGlu31 พบว่า เอนไซม์ Os3BGlu6 มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลาย GA_4-Glc เพื่อเปรียบเทียบกลไกการย่อยสลายของเอสเทอร์ (ester) และไกลโคไซด์ และการศึกษาการจับของ GA_4-Glcโดยเอนไซม์ เอนไซม์ Os3BGlu6 และเอนไซม์กลายพันธุ์ที่มีการดัดแปลงกรดอะมิโน M251N E178Q E178A E394D และ E394Q ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อทดสอบการย่อยสลายของ *p*NPGlc และ GA_4-Glc พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ Os3BGlu6 M251N สามารถย่อยสลาย *p*NPGlc ได้ร้อยละ 52 และ GA_4-Glc ได้ร้อยละ 89 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ดั้งเดิม Os3BGlu6 เอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งแอซิด-เบส E178Q และ E178A ไม่สามารถย่อยสลาย *p*NPGlc ได้ แต่ยังคงสามารถย่อยสลาย GA_4-Glc ได้ร้อยละ 13 และ ร้อยละ 22 ตามลำดับเมื่อเทียบกับเอนไซม์ดั้งเดิม เอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง นิวคลีโอไฟล์ E394D และ E394Q ไม่สามารถย่อยสลายได้ทั้ง *p*NPGlc และ GA_4-Glc

การทดสอบการโยกย้ายหมู่น้ำตาลของเอนไซม์ Os3BGlu6 ดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ พบว่าเอนไซม์ Os3BGlu6 E178Q และ E178A สามารถสร้างผลผลิตจากการเคลื่อนย้ายหมู่น้ำตาลได้เมื่อ *p*NPGlc หรือ GA_4-Glc เป็นน้ำตาลหมู่ให้และเอไซด์เป็นหมู่รับ ซึ่งแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกจากกันด้วย HPLC และวิเคราะห์ด้วย NMR และ mass spectrometry ของผลผลิตที่ได้ตรงกับ β-D-gluco-

pyranosyl azide การทำงานของเอนไซม์กับค่าพีเอชสำหรับการเคลื่อนย้ายหมู่น้ำตาลระหว่างเอไซด์และ GA_4-Glc ถูกทดสอบในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตทและ MES พบว่าเอนไซม์ Os3BGlu6 E178Q และ E178A มีค่าพีเอชเหมาะสมต่อการทำงานในบัฟเฟอร์ MES คล้ายกัน แต่มีค่าพีเอชเหมาะสมที่แตกต่างกันในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท โดยพบว่าไอออนอะซิเตททำงานเป็นนิวคลีโอไฟล์ ซึ่งทำให้เอนไซม์สามารถกลับมาทำหน้าที่ของการไฮโดรไลลีสได้ การปรับความเข้มข้นของน้ำตาลหมู่ให้ GA_4-Glc และน้ำตาลหมู่รับโซเดียมเอไซด์เพื่อทดสอบผลกระทบต่อการเคลื่อนย้ายหมู่น้ำตาล พบว่าโซเดียมเอไซด์ที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Os3BGlu6 E178Q แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Os3BGlu6 E178A เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมเอไซด์เพิ่มขึ้นถึง 400 mM การย่อยสลายและการเคลื่อนย้ายหมู่น้ำตาลของเอนไซม์ Os3BGlu6 และเอนไซม์กลายพันธุ์ยืนยันกลไกการทำงานของเอนไซม์และหน้าที่ของกรดอะมิโน M251 E178 และ E394 ต่อการทำงานของเอนไซม์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

YANLING HUA : SYNTHESES OF GIBBERELLIN (GA) GLUCOSYL CONJUGATES AND FUNCTIONAL STUDIES OF RICE GA β–GLUCOSIDASE. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 157 PP.

GIBBERELLIN/GIBBERELLIN A_4-GLUCOSYL ESTER/β-GLUCOSIDASE/RICE /RECOMBINANT EXPRESSION/TRANSGLUCOSYLATION

In order to monitor the extraction of β-D-glucosidases that can hydrolyze gibberellin (GA) conjugates from rice, 9 GA conjugates, which included acetylated and deacetylated gibberellin GA_4 glucosyl esters (GA_4-Glc), acetylated and deacetylated GA_3 glucosyl esters, GA_4 methyl ester, GA_3 methyl ester, 3-O-β-D-glucopyranosyl gibberellin A_3 methyl ester, 13-O-β-D-glucopyranosyl gibberellin A_3 methyl ester and β-D-glucopyranosyl gibberellin A_4 methyl ester, were synthesized. Their structures were identified with nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

To identify a GA β-D-glucosidase from rice, ten-day rice seedling shoots and leaves were extracted and the β-D-glucosidase activities were purified with seven purification steps. The fractions were monitored for hydrolysis of *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPGlc) and GA_4-Glc. A family 1 glycoside hydrolase with relatively high activity to hydrolyze GA_4-Glc, Os4BGlu13 β-glucosidase, was identified in the final fraction by LC-MS of peptides generated by tryptic digestion.

In a second approach to identify a GA β-D-glucosidase, five recombinantly expressed rice GH1 enzymes, Os3BGlu6, Os3BGlu7 (BGlu1), Os4BGlu12, Os3BGlu18 and Os9BGlu31, were tested for relative hydrolysis activities toward *p*NPGlc and GA_4-Glc. Os3BGlu6 was found to have the highest hydrolysis activity to GA_4-Glc among these

enzymes. To compare the mechanism of hydrolysis of esters and glycosides and study GA_4-Glc binding, Os3BGlu6 and its mutants M251N, E178Q, E178A, E394D and E394Q were produced and their kinetic parameters for hydrolysis of *p*NPGlc and GA_4-Glc determined. The relative activities of Os3BGlu6 M251N were 52% for *p*NPGlc, 89% for GA_4-Glc compared to its wild type. The acid-base mutants E178Q and E178A were unable to hydrolyze *p*NPGlc, but maintained 13% and 22% of their activities toward GA_4-Glc compared to their wild type, respectively. The nucleophile mutants E394D and E394Q were found to completely lose hydrolytic activity for both *p*NPGlc and GA_4-Glc.

The transglucosylation activities were studied for Os3BGlu6 and its mutants. Both Os3BGlu6 E178Q and E178A could produce transglucosylation products when *p*NPGlc or GA_4-Glc was used as donor and sodium azide as acceptor. The prominent transglucosylation product was isolated by HPLC, and identified by NMR and mass spectra as β-D-glucopyranosyl azide. The activities versus pH profiles for transglucosylation of azide with GA_4-Glc donor were determined in sodium acetate and MES buffers. The Os3BGlu6 E178Q and E178A mutants showed similar optimum pH ranges in MES buffer, but different optimum pH in sodium acetate buffer. The acetate ion was found to act as a nucleophile in the reaction to rescue the hydrolysis activity. The concentrations of GA_4-Glc donor and sodium azide acceptor were varied to test their effects on transglucosylation kinetics. High concentrations of sodium azide were found to inhibit the reaction for Os3BGlu6 E178Q, but not for Os3BGlu6 E178A when the concentration of Na-azide was increased up to 400 mM. The hydrolysis and transglucosylation activities for Os3BGlu6 and its mutants confirmed its retaining catalytic mechanism, and the roles of the residues M251, E178 and E394 in the catalytic process.

School of Biochemistry Student's signature_____

Academic Year 2012 Advisor's signature_____