

บทคัดย่อ

เบต้ากลูโคซิเดส (β -D-glucopuranoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะไกลโคซิดิกจากปลายที่ไม่มีหมู่อินทรีย์ เพื่อปลดปล่อยหมู่ไกลโคซิดออกจากโมเลกุลของไกลโคไซด์และโอลิโกแซคคาไรด์ จากความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโน พบว่าเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากพืชส่วนใหญ่ จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส กลุ่มที่ 1 (GH1) เมื่อพิจารณาถึงยีนในกลุ่ม GH1 จำนวน 34 ยีน ของข้าว พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มย่อย โดยแต่ละกลุ่มย่อยจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนจาก *Arabidopsis thaliana* มากกว่าโปรตีนจากข้าวที่อยู่ในกลุ่มย่อยอื่น ในชุดโครงการวิจัยนี้ประกอบไปด้วย 3 โครงการที่ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ในกลุ่ม GH1 ของข้าวที่ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ตามธรรมชาติ โดยโครงการแรกได้ทำการสังเคราะห์สาร gibberellin glucosides และสาร gibberellin GA₄ glucosyl eater (GA₄-GE) ที่สังเคราะห์ขึ้นถูกใช้เพื่อตรวจหาเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายประกอบเหล่านี้จากริคอมบิแนนท์เอนไซม์ในกลุ่ม GH1 ที่ผลิตขึ้นโดย *Escherichia coli* และเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้าวโดยตรง เอนไซม์ Os3BGlu6 จากกลุ่มย่อย At/Os1 มีความสามารถในการสลาย GA₄-GE ได้ค่อนข้างดี ซึ่งเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้าวก็มีความสามารถในการย่อยสลายสารนี้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถแยกเอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีกิจกรรมสูงได้ ในโครงการที่สอง เอนไซม์ Os1BGlu4 ซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพียงชนิดเดียวจาก GH1 ของข้าวในกลุ่มย่อย At/Os3 ที่มีการทำนายว่าอาจมีการแสดงออกและมีเป้าหมายอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ดังกล่าวทำโดยอาศัยริคอมบิแนนท์เอนไซม์ Os1BGlu4 ที่ผลิตขึ้นโดย *E. coli* จากการศึกษาพบว่า Os1BGlu4 มีความสามารถในการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ของกลูโคส และไกลโคไซด์อื่น ๆ บางชนิดได้ดี และในโครงการสุดท้ายได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Os9BGlu31 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม GH1 กลุ่มย่อย At/Os6 พบว่าเอนไซม์นี้มีความสามารถในการเกิดเร่งปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน โดยมีความสามารถค่อนข้างสูงต่อสารในกลุ่ม phenolic 1-O-acyl β -glucosyl ester เช่น feruloyl glucose ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับกลูโคส และมี aglycones ทำหน้าที่เป็นตัวให้กลูโคส รูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ชี้ให้เห็นว่าเป็นยีนที่น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการแก่ของใบ การพัฒนาของเมล็ด และการงอกของเมล็ด รวมไปถึงการตอบสนองต่อความเครียด เช่น ความแห้งแล้ง และความเครียดจากฮอร์โมนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง

โครงการชุดนี้ได้พัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และกลูโคซิเดสคอนจูเกตในข้าว ซึ่ง ณ ปัจจุบันสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ 2 เรื่อง และคาดว่าจะมีการตีพิมพ์เพิ่มเติมอีกในโครงการต่อเนื่อง อีกทั้งชุดโครงการนี้ยังได้มีการพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่เพิ่มขึ้นอีกหลายท่าน

Abstract

Beta-glucosidases (β -D-glucopyranoside glucohydrolases, E.C. 3.2.1.21) are enzymes that release nonreducing terminal glucosyl residues from glycosides and oligosaccharides via hydrolysis. Based on amino acid sequence relationships, most characterized plant β -glucosidases belong to glycoside hydrolase family GH1. The thirty-four active rice (*Oryza sativa*) GH1 genes that have been identified in the rice genome have been divided into 8 phylogenetic clusters, the members of which each have more amino acid sequence similarity with related proteins from the dicot *Arabidopsis thaliana* than with other rice proteins outside that cluster. In this project set, the three projects characterized the activities of GH1 enzymes for which the natural functions have yet to be defined. In the first project, gibberellin glucosyl conjugates were synthesized and the gibberellin GA₄ glucosyl ester (GA₄-GE) produced was used to screen for enzymes that hydrolyze it among GH1 enzymes produced in recombinant *Escherichia coli* and in rice extracts. The rice GH1 At/Os cluster 1 β -glucosidase Os3BGlu6 was identified as an enzyme with relatively high GA₄-GE hydrolysis ability, while such ability was identified in rice tissues, but the responsible enzyme has yet to be purified and identified. In the second project, Os1BGlu4, the only rice GH1 enzyme predicted to be expressed in the cytoplasm and a member of At/Os cluster 3, was expressed in *E. coli* and its enzymatic activity characterized. Os1BGlu4 was found to be a β -glucosidase with relatively high activity toward gluco-oligosaccharides and a few glycosides. In the third project, we characterized the activity of Os9BGlu31, a GH1 At/Os cluster 6 representative was found to be a transglucosidase with broad specificity and with high activity toward phenolic 1-O-acyl β -glucosyl esters, such as feruloyl glucose, as acceptors and the corresponding aglycones as donors. Its expression pattern suggests a role in senescing leaves, developing seeds and germinating seeds, as well as in response to stress, such as drought, and to stress related phytohormones. These studies have advanced the understanding of β -glucosidases and glucosyl conjugates in rice, and have contributed to publication of two international journal papers, with more expected from continuing work, in addition to training several scientists.