สมพงษ์ แสนเสนยา

:การศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์เบตาไกลโคซิเดสจากพืชต่อความจำเพาะกับสับสเตรท (FUNCTIONAL AND STRUCTURAL STUDIES OF PLANT β-GLYCOSIDASE SUBSTRATE SPECIFICITY)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 137 หน้า

ผลึกของเอนไซม์ Os4BGlu12 อิสระ และเอนไซม์ที่รวมอยู่กับสารยับยั้ง 2,4-dinitrophenyl-2-deoxy-2-fluoroglucoside (DNP2FG) และ 2-deoxy-2-fluoroglucose (G2F)และเอนไซม์กลายพันธ์ Os4BGlu12 E179Q ที่รวมอยู่กับ TAG ได้ถูกผลิตขึ้น ผลึกทั้ง 4 ชนิดสามารถหักเหรังสีเอกซเรย์ได้ความละเอียดถึง 2.50 2.45 2.40 และ 3.2 อังสตรอม ตามลำดับ จากการเปรียบโครงสร้างสามมิติกับเอนไซม์ชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลเดียวกันพบว่าโครงสร้างโดยรวมมีลักษณะเหมือนกัน แต่ตรงบริเวณ loop B ของเอนไซม์ Os4BGlu12 จะมี disulfide bridge เพิ่มขึ้นมา บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีลักษณะเป็นช่องและมีความลึกประมาณ 20 อังสตรอม ตรงบริเวณที่ลึกสุดของตำ แหน่งเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กับตัวยับยั้ง G2F จะพบโครงรูปแบบ $^{4}C_{1}$ chair ซึ่งเกิดพันธะโควาเลนท์กับกรดอะมิโนที่ทำ หน้าที่เป็น nucleophile แต่ในขณะเดียวกันตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กับตัวยับยั้ง DNP2FG จะพบโครงรูปแบบ $^{1}S_{3}$ skew boat ซึ่งสอดคล้องกับโครงรูปแบบ $^{4}H_{3}$ half-chair ในสภาวะทรานซิชันของปฏิกิริยาการย่อยสลาย เมื่ อเปรียบเทียบตำ แหน่งของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น nucleophile ในโครงสร้างของเอนไซม์ Os4BGlu12 ที่จับอยู่กับตัวยับยั้ง G2F มีความคล้ายคลึงกับที่พบในเอนไซม์ *Sinapsis alba* myrosinase มากกว่าเอนไซม์ในกลุ่ม O-glucosidase เช่น เอนไซม์ Os3BGlu6 หรือ เอนไซม์ Os3BGlu7 ซึ่งสอดคล้องกับการที่เอนไซม์ Os4BGlu12สามารถย่อยสับสเตรท S-glycoside ได้ โดยไม่พบการย่อยสับสเตรท S-glycoside ในกลุ่ม O-glucosidase ตัวอื่น จากการเปรียบเทียบตำ แหน่ง aglycon biding site ของเอนไซม์ Os4BGlu12 กับเอนไซม์ตัวอื่นที่อยู่ในตระกูลเดียวกันพบว่าบริเวณ aglycon ของตัวยับยั้ง DNP2FG และสับสเตรท TAG ในโครงสร้างของเอนไซม์ Os4BGlu12 ถูกล้อมรอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไม่ชอบน้ำ
และกรดอะมิโนชนิดมีขั้วซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีความแตกต่างกับกรดอะมิโนที่พบใน aglycon biding site ของเอนไซม์ตัวอื่นที่อยู่ในตระกูลเดียวกัน

จากการ เปรียบเทียบโครงสร้างของ เอนไซม์ Os3BGlu6 และ เอนไซม์ Os4BGlu12 กับ เอนไซม์ Os3BGlu7 ที่จับกับโอลิโกแซคคาไลด์ แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน Met251 ในเอนไซม์ Os3BGlu6 กีดขวางการเข้าจับของเซลโลโอลิโกแซคคาไลด์ที่บริเวณ subsite +2 ขณะที่กรดอะมิโน His252 ในเอนไซม์ Os4BGlu12 ในบริเวณสอดคล้องกันนี้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโอลิโกแซคคาไลด์ได้เหมือนกับเอนไซม์ Os3BGlu7 การเปลี่ยนกรดอะมิโน Met251 เป็น Asn ของ เอนไซม์ กลายพันธ์ Os3BGlu6 ทำให้ค่า k_{cat}/K_m ในการย่อย laminaribiose เพิ่มขึ้น 15 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ Os3BGlu6 ดั้งเดิม และค่า k_{cat}/K_m เพิ่มขึ้น 9 ถึง 24 เท่าในการย่อย เซลโลโอลิโกแซคคาไลด์ที่มีหน่วยความยาว 2 ถึง 5 หน่วย ในทางกลับกันการเปลี่ยนกรดอะมิโนAns245 เป็น Met ในเอนไซม์ Os3BGlu7 ทำ ให้ค่า k_{cat}/K_m ในการย่อย laminaribiose ลดลง 6.5 เท่า และ 17 ถึง 30 เท่าสำหรับเซลโลโอลิโกแซคคาไลด์ที่มีหน่วยความยาวสายมากกว่า 2 หน่วย ในขณะที่การเปลี่ยนกรดอะมิโน His252 เป็น Met ในเอนไซม์ Os4BGlu12 ค่า k_{cat}/K_m ลดลง 2 ถึง 6 เท่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SOMPONG SANSENYA : FUNCTIONAL AND STRUCTURAL STUDIES OF PLANT β-GLYCOSIDASE SUBSTRATE SPECIFICITY.

THESIS ADVISOR: PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 135 PP.

GLYCOSIDE HYDROLASE FAMILY 1/β-GLUCOSIDASE/RICE/PROTEIN CRYSTALLIZATION/THREE DIMENSIONAL STRUCTURE/ MUTATION/KINETIC STUDY

The crystal structures of apo wild type Os4BGlu12, and its complexes with 2,4-dinitrophenyl-2-deoxyl-2-fluoroglucoside (DNP2FG) and 2-deoxy-2-fluoroglucose (G2F) and the acid/base mutant Os4BGlu12 E179Q complex with TAG were solved at 2.50, 2.45, 2.40 and 3.2 Å resolution, respectively. The overall structure of rice Os4BGlu12 is typical of GH1 enzymes, but it contains an extra disulfide bridge in the loop B region. 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 (the -1 subsite), the glucose ring of the G2F in the covalent intermediate was found in a $^4C_1$ chair conformation, while that of the noncovalently bound DNP2FG had a $^1S_3$ skew boat, consistent with hydrolysis via a $^4H_3$ half-chair transition state. The $^1S_3$ skew boat conformation of the glucose ring of TAG also fit to the electron density best with the lowest B-factor value when compared to the $^4C_1$ chair conformation. The position of the catalytic nucleophile (Glu393) in the G2F structure was more similar to that of the *Sinapsis alba* myrosinase G2F complex than to that in covalent intermediates of other O-glucosidases, such as rice Os3BGlu6 and Os3BGlu7 β-glucosidases. This correlated with a significant thioglucosidase activity for Os4BGlu12, although with 200-

to 1200-fold lower k_{cat}/K_m values for *S*-glucosides than the comparable *O*-glucosides, while hydrolysis of *S*-glucosides was undetectable for Os3BGlu6 and Os3BGlu7. The aglycones of DNP2FG and TAG were in contact with both hydrophobic and polar residues, which had little similarity to those aglycone-binding residues in other known GH1 β-glucosidase structures.

Superimposition of the structures of Os3BGlu6 and Os4BGlu12 with those of Os3BGlu7 bound to oligosaccharides showed that the corresponding Os3BGlu6 residue, Met251, appears to block the binding of cellooligosaccharides at the +2 subsite, whereas His252 in this position in Os4BGlu12 could hydrogen bond to oligosaccharides. Mutation of Os3BGlu6 Met251 to Asn resulted in a 15-fold increased k_{cat}/K_m value for hydrolysis of laminaribiose compared to wild type Os3BGlu6 and 9 to 24-fold increases in the k_{cat}/K_m values for cellooligosaccharides with degrees of polymerization (DP) of 2-5. On the other hand, mutation of Os3BGlu7 Asn245 to Met decreased the k_{cat}/K_m of hydrolysis by 6.5-fold for laminaribiose and 17 to 30-fold for cellooligosaccharides with DP > 2, while mutation of Os4BGlu12 His252 to Met decreased the corresponding k_{cat}/K_m values 2 to 6-fold.

Together, these studies have clarified the binding and hydrolysis of various substrates in plant GH1 β-glucosidases.

School of Biochemistry Student's Signature _____

Academic Year 2013 Advisor's Signature _____