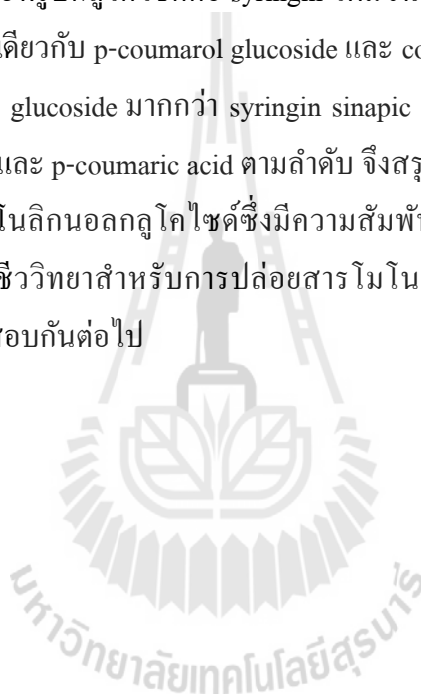


สุภาพรณ์ ไบยา : การวิเคราะห์หน้าที่ของเอนไซม์โมโนลิกนอลเบตา-กลูโคซิเดสในข้าว
(FUNCTIONAL ANALYSIS OF RICE MONOLIGNOL β -GLUCOSIDASES)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 140 หน้า.

ในพืชชั้นสูงเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสจัดอยู่ในตระกูลไกลโคไซไฮโดรเลส กลุ่มที่ 1 มีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง รวมไปถึงกระบวนการสร้างลิกนิน จากการวิเคราะห์ phylogenetic ของเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสในข้าว พบว่า Os4BGlu14 Os4BGlu16 และ Os4BGlu18 มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความใกล้เคียงกับเอนไซม์ในกลุ่มโมโนลิกนอลเบตา-กลูโคซิเดสมากที่สุด จึงนำมาสู่สมมติฐานว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนิน cDNA ของโมโนลิกนอลเบตา-กลูโคซิเดส ยีน Os4BGlu14 และ Os4BGlu18 ถูกโคลน ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส นิวคลีโอไทด์ และตัดต่อเข้าไปในพลาสมิด pET32a จากนั้นพลาสมิดที่ถูกตัดต่อยีนเหล่านี้ ถูกนำเข้าไปใน *Escherichia coli* เพื่อนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ โดยมี thioredoxin และ His₆ tags ต่อที่ปลาย N-terminal เนื่องจากตำแหน่ง acid/base ของ Os4BGlu14 ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนกลูตามีน ซึ่งกรดอะมิโนนี้อาจทำให้เอนไซม์ Os4BGlu14 ไม่สามารถทำงานได้เหมือนเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสโดยทั่วไป ดังนั้น การตัดแปลงกรดอะมิโนกลูตามีนไปเป็นกลูตามะจึงถูกทำขึ้นด้วยเทคนิค QuikChange site-directed mutagenesis อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ Os4BGlu14 ได้ทั้งในเอนไซม์ดั้งเดิมและเอนไซม์ที่ถูกตัดแปลงกรดอะมิโน และเนื่องจากมีปัญหาในการโคลน Os4BGlu16 จึงทำการสังเคราะห์ยีนของ Os4BGlu16 ขึ้นเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ตัวนี้ในยีสต์ เอนไซม์ Os4BGlu16 ที่ถูกผลิตและปล่อยออกมาจากผนังเซลล์ของยีสต์ถูกนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ส่วนเอนไซม์ Os4BGlu18 ถูกสกัดมาจาก *E. coli* และนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย anion exchange chromatography hydrophobic interaction chromatography และ IMAC column ตามลำดับ เอนไซม์ Os4BGlu16 และ Os4BGlu18 สามารถย่อยโมโนลิกนอลกลูโคไซด์สับสเตรท coniferin (ด้วย k_{cat}/K_M , $21.6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ สำหรับ Os4BGlu16 และ $31.9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ สำหรับ Os4BGlu18) syringin (ด้วย k_{cat}/K_M , $22.8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ สำหรับ Os4BGlu16 และ $24.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ สำหรับ Os4BGlu18) และ p-coumarol glucoside (ด้วย k_{cat}/K_M , $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ สำหรับ Os4BGlu16 และ $1.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ สำหรับ Os4BGlu18) ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าสับสเตรทตัวอื่น

ในการตรวจหาการแสดงออกของยีนโมโนลิกนอลเบตา-กลูโคซิเดสในข้าว พบว่า mRNA ของ Os4BGlu14 มีการตรวจพบมากที่สุดในส่วนของเมล็ด รวง และเกสร ส่วน mRNA ของ

Os4BGlu16 พบมากที่สุดในส่วนของใบจากต้นข้าวสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 10 เอนโดสเปิร์ม และเปลือกเมล็ดส่วนนอก และ mRNA ของ Os4BGlu18 ส่วนใหญ่ถูกพบในช่วงแรกของการเจริญเติบโตตั้งแต่สัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 4 และยังคงพบในเกสรและเปลือกเมล็ดส่วนนอกอีกด้วย ข้อมูลเหล่านี้บ่งบอกถึงการทำงานของเอนไซม์โมโนลิคนอลเบตา-กลูโคซิเดสเกิดขึ้นทั้งในช่วงเจริญเติบโตจนถึงช่วงออกผลผลิต การศึกษาปริมาณของสารโมโนลิคนอล โมโนลิคนอลกลูโคไซด์ และสารที่เกี่ยวข้องในข้าวโดยใช้เครื่อง UPLC-MS เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และสับสเตรทที่ถูกผลิต พบว่า ปริมาณ sinapyl alcohol ถูกพบในส่วนของรากและกาบใบอายุ 10 ถึง 40 วัน ในขณะที่รูปกลูโคไซด์คือ syringin เพิ่มขึ้นในช่วงอายุ 2-3 เดือนทั้งในราก ใบ กาบใบ และข้อปล้อง เช่นเดียวกับ p-coumarol glucoside และ coniferin ในส่วนของดอกข้าว พบว่ามีปริมาณของ p-coumarol glucoside มากกว่า syringin sinapic acid coniferin caffeic acid sinapyl alcohol coniferyl alcohol และ p-coumaric acid ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์นี้จะถูกสร้างขึ้นในระหว่างการสร้างสารโมโนลิคนอลกลูโคไซด์ซึ่งมีความสัมพันธ์กันทางด้านกระบวนการชีวเคมีและการศึกษาสภาพทางชีววิทยาสำหรับการปล่อยสารโมโนลิคนอลสำหรับกระบวนการสร้างลิกนินยังคงต้องมีการทดสอบกันต่อไป



SUPAPORN BAIYA : FUNCTIONAL ANALYSIS OF RICE

MONOLIGNOL BETA-GLUCOSIDASES. THESIS ADVISOR :

PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 140 PP.

GLYCOSIDE HYDROLASE/CHARACTERIZATION/RICE/MONOLIGNOL
 β -GLUCOSIDASE/MONOLIGNOL COMPOUNDS

In higher plants, β -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 (GH1) have been implicated in several fundamental processes, including lignification. Phylogenetic analysis of rice (*Oryza sativa* L.) GH1 β -glucosidases indicated that Os4BGlu14, Os4BGlu16, and Os4BGlu18 are closely related to known monolignol β -glucosidases, leading to the hypothesis that they may release monolignols from their inactive glucosides. The cDNAs for Os4BGlu14 and Os4BGlu18 genes were cloned, sequenced, and ligated into pET32a, and the resulting recombinant plasmids were used to express fusion proteins with N-terminal thioredoxin and His₆ tags in *Escherichia coli*. Because the conserved acid/base glutamate position of Os4BGlu14 is replaced with glutamine residue 191, the cDNA of Os4BGlu14 was mutated to glutamate at this position to produce Os4BGlu14 Q191E. However, no activity could be detected for proteins expressed from pET32a/Os4BGlu14 and pET32a/Os4BGlu14Q191E. Due to difficulty in cloning a functional cDNA for *E. coli* expression, an optimized Os4BGlu16 cDNA was synthesized for expression of the protein in *Pichia pastoris*. The secreted Os4BGlu16 fusion protein was purified from induced *P. pastoris* culture media by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) to yield a single prominent protein band on SDS-PAGE analysis and strong β -glucosidase activity. In contrast, active Os4BGlu18 β -glucosidase fusion protein with N-terminal thioredoxin and His₆ tags was successfully

expressed and extracted from *E. coli* cells, and was purified by anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and IMAC. Os4BGlu16 and Os4BGlu18 hydrolyzed the monolignol glucosides coniferin (k_{cat}/K_M , 21.6 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for Os4BGlu16 and 31.9 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for Os4BGlu18), syringin (k_{cat}/K_M , 22.8 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for Os4BGlu16 and 24.0 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for Os4BGlu18), and *p*-coumarol glucoside (k_{cat}/K_M , 6.2 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for Os4BGlu16 and 1.4 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for Os4BGlu18) with much higher catalytic efficiencies than other substrates.

By quantitative RT-PCR, highest Os4BGlu14 mRNA levels were detected in seed, panicle and pollen. Os4BGlu16 was detected at highest levels in leaf from 4 to 10 weeks, endosperm and lemma, while Os4BGlu18 mRNA was most abundant in vegetative tissues from 1 week to 4 weeks old and in pollen and lemma. These data suggest a role for monolignol β -glucosidases in both vegetative and reproductive rice tissues. The relative amounts of monolignols, their glycosides and related compounds in rice tissues were analyzed by UPLC-MS to relate the enzyme expression levels to levels of putative substrates and products. Sinapyl alcohol was detected in root and leaf sheath from 10-40 days, whereas its glucoside, syringin, was dramatically increased in 2-3 month-old roots, leaf, leaf sheath, and stem, as were the levels of *p*-coumarol glucoside and coniferin. In rice flower extracts, *p*-coumarol glucoside was highest, followed by syringin, sinapic acid, coniferin, caffeic acid, sinapyl alcohol, coniferyl alcohol, and *p*-coumaric acid, respectively. Thus, the enzymes appear to be present during the build-up of monolignol glucosides, although the exact biological context for the release of the monolignols from these compounds remains to be determined.

School of Biochemistry

Student's signature_____

Academic Year 2014

Advisor's signature_____