อีสตีฟตาคุล นิคมาห์ : การตรวจสอบโปรตีนซีรีนคาร์บอกซีเพปทิเดส-ไลค์ (SCPL) ในข้าว (INVESTIGATION OF RICE SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE (SCPL) PROTEINS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 88 หน้า.

คำสำคัญ: สารประกอบฟีนอล/ โปรตีนกลุ่มคาร์บอกซีเพปทิเดส/ แอซิติลทรานสเฟอเรส/ ไฮโดรไลสิส

ข้าว (*Oryza sativa L.*) โดยเฉพาะข้าวสีสามารถสังเคราะห์และประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกเป็นจำนวนมาก เช่น แอนโธไซยานินและฟลาโวนอยด์อื่นๆ ที่อาจมีประโยชน์ทางโภชนาการ ฟีนอลิกไกลโคไซด์อย่างง่ายบางครั้งถูกอะซิเลต ตัวอย่างเช่น บนกลูโคสที่หมู่ 6-hydroxyl ของไซยานินบางชนิดเพื่อสร้างสารประกอบที่ซับซ้อนขึ้น เช่น เม็ดสี ในพืช ยีนของตระกูลหนึ่งซึ่งถอดรหัสเป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับ acylation คือ ซีรีนคาร์บอกซีเพปทิเดส-ไลค์ อะซิลทรานสเฟอเรส (serine carboxypeptidase-like acyltransferase, SCPL-AT) SCPL-AT สามารถถ่ายโอน acyl moieties จาก 1-*O*-β-D-glucose esters ไปยังสารตั้งต้นตัวรับ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมา SCPL-AT บางตัวได้มีการศึกษาลักษณะเฉพาะใน *Arabidopsis thaliana*, *Avena strigose (A. strigose)*, *Brassica napus*, *Delphinium grandiflorum (D. grandiflorum)* และอื่นๆ อีกมากมาย แต่ยีน SCPL-AT ในข้าวยังไม่เคยมีการอธิบายอย่างชัดเจน ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยพยายามตอบคำถามว่ายีนใดบ้างที่ถอดรหัสเป็น SCPL-AT ของข้าว และเพื่อทดสอบว่าเอ็นไซม์สามารถดัดแปลงสารประกอบฟีนอลิกในหลอดทดลองได้หรือไม่

ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ทาง *in silico* เพื่อเลือกยีนที่อาจจะถอดรหัสเป็น SCPL-AT ของข้าว จากการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการพบ SCPL ของข้าวที่น่าสนใจสองชนิดคือ OsSCPL2a และ OsSCPL7 มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ SCPL-AT ที่รู้จักจาก *A. strigosa* (SCPL1) และ *D. grandiflorum* (DgSCPL2) ซึ่งอยู่ใน clade 1A ของตระกูลซีรีนคาร์บอกซีเพปทิเดส (SCP) รวมทั้ง SCPL-AT ที่มีการศึกษาลักษณะเฉพาะก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ทำการแสดงออกของโปรตีน OsSCPL ด้วยระบบการแสดงออกในยีสต์และแบคทีเรีย โดยใช้ *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) และ *Escherichia coli* (*E. coli*) ตามลำดับ โปรตีนถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี immobilized affinity chromatography (IMAC) ที่จับกับ Ni^{2+} ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเจล SDS-PAGE และตรวจสอบลักษณะเฉพาะโดยโครมาโตกราฟีแบบของเหลวและ tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) โปรตีนขนาด 75 kDa จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อเหนี่ยวนำให้แสดงออกของ OsSCPL7 ถูกระบุว่าเป็นแอลกอฮอล์ออกซิเดส 1 (AOX1) ซึ่งเป็นโปรตีน peroxisomal ที่มักจะไม่ถูกปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็นไซม์ AOX1 สามารถจับกับเรซิน IMAC ได้ ซึ่งนำไปสู่การทำให้บริสุทธิ์แทน OsSCPL7 พบว่า AOX1 สามารถเปลี่ยน cyanidin-3-O-glucoside (Cy3G) ไปเป็นสารประกอบที่ไม่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง 520 นาโนเมตร แต่ดูดกลืนแสงได้ค่อนข้างดีที่ 360 นาโนเมตร โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ (UHPLC)

OsSCPL7 พบว่า AOX1 สามารถเปลี่ยน cyanidin-3-O-glucoside (Cy3G) ไปเป็นสารประกอบที่ไม่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง 520 นาโนเมตร แต่ดูดกลืนแสงได้ค่อนข้างดีที่ 360 นาโนเมตร โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงพิเศษ (UHPLC)

ในทางกลับกัน การแสดงออกและการทำให้โปรตีน SCPL ใน *E. coli* บริสุทธิ์ค่อนข้างยาก เนื่องจากโปรตีนที่ผลิตในระบบแบคทีเรียไม่สามารถละลายน้ำได้ การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี IMAC บนเรซินที่จับกับ Co^{2+} ให้แถบโปรตีนที่มีนัยสำคัญของ OsSCPL2a เท่านั้น แต่ไม่มีแถบโปรตีน OsSCPL7 ผู้วิจัยได้เพียงแถบขนาดเล็กของโปรตีนเป้าหมายเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนของ *E. coli* และพบว่าเป็น OsSCPL2a จากการวิเคราะห์ด้วย LC/MS/MS ของทริปติกเปปไทด์ แม้ว่าจะมีสถานการณ์เหล่านั้น ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการทำงานของเอ็นไซม์โดยการเพิ่ม glucose esters ซึ่งเป็นผู้ให้อะซิลกับฟลาโวนอยด์หลายชนิด หลังจากทดสอบด้วย UHPLC พบว่า OsSCPL2a ดูเหมือนจะทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ไฮโดรเลสและมีความจำเพาะต่อการปล่อยกลูโคสที่เชื่อมกับ 7-O ออกจากฟลาโวนอยด์แทนที่จะเป็น acyltransferase ที่ acylates ฟลาโวนอยด์กลูโคไซด์เหล่านั้น ผลลัพธ์เหล่านี้อาจเปิดโอกาสในการค้นหายีนบางตัวที่ถอดรหัสเป็น SCPL-glycosidases ทำให้เข้าใจว่า SCPL ของข้าวบางตัวอาจมีหน้าที่ต่างกัน อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์กว่านี้ซึ่งจะทำให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนขึ้น ควรมีความพยายามในการหาวิธีที่จะผลิต OsSCPL ที่ละลายน้ำได้มากกว่าในระบบการแสดงออกแบบรีคอมบิแนนท์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ISTIFTAKHUN NIKMAH : INVESTIGATION OF RICE SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE (SCPL) PROTEINS. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 88 PP.

Keyword: Phenolic Compounds/ Serine Carboxypeptidase-Like Protein/ Acyltransferase/ Hydrolysis

Rice (*Oryza sativa L.*), especially colored rice, synthesizes and contains a large group of phenolic compounds, such as anthocyanins and other flavonoids, that have shown nutritional benefits. The simple phenolic glycosides are sometimes acylated, to form more complex compounds, such as pigments. In plants, one family of genes encoding enzymes responsible for such acylation are known as serine carboxypeptidase-like acyltransferase (SCPL-AT), which are able to transfer acyl moieties from a 1-*O*-β-D-glucose esters to acceptor substrates, including phenolic compounds. Over the last two decades, some SCPL-ATs have been characterized in *Arabidopsis thaliana, Avena strigosa, Brassica napus, Delphinium grandiflorum,* and many others. As yet, the SCPL-AT genes in rice have not been clearly described. Here, we sought to test genes encoding rice SCPL-AT to see whether the encoded enzymes modify the phenolic compounds *in vitro*.

In silico analysis revealed that two putative rice SCPLs, OsSCPL2a and OsSCPL7, are closely related to the known SCPL-AT from *A. strigosa* (SCPL1) and *D. grandiflorum* (DgSCPL2). First, OsSCPL proteins were expressed in *Pichia pastoris*. The proteins were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resin bound to Ni^{2+}, excised from SDS-PAGE gels, and identified by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). A 75 kDa protein from culture of *P. pastoris* induced to express OsSCPL7 was identified as alcohol oxidase 1 (AOX1), a peroxisomal protein that is not usually released to the medium. The AOX1 protein was found to convert cyanidin-3-O-glucoside (Cy3G) to compounds that no longer exhibit absorbance in the 520 nm range, but absorb relatively strongly at 360 nm, as detected in ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC).

On the other hand, the expression and purification of SCPL protein in *E. coli* yielding a small amount of OsSCPL2a soluble protein after purification by Co^{+}-IMAC resin and detected on LC/MS/MS analysis. After testing the semi-purified OsSCPL2a protein in transglycosylation in reactions monitored by UHPLC, we found that OsSCPL2a appeared to act as a hydrolase enzyme and specifically release 7-O-linked glucose from flavonoids, instead of as an acyltransferase that acylates those flavonoid

glucosides. These results may indicate a new divergent role for SCPL proteins as glycosidases, thereby improving our understanding of this gene family. However, to obtain purer protein from which to make stronger conclusions, efforts should be made to find a way to produce more soluble OsSCPL in the recombinant expression system.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry
Academic Year 2021

Student's signature _____
Advisor's signature _____