หวง เหมิง: บทบาทของกรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ *Tx*GH116 ที่เกี่ยวข้องกับการจับและทำปฏิกิริยากับกลูโคส (THE ROLES OF ACTIVE SITE AMINO ACID RESIDUES OF *Tx*GH116 IN GLUCOSE BINDING AND CATALYSIS)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 160 หน้า.

เอนไซม์ *Tx*GH116 จากเชื้อแบคทีเรีย *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* เป็นเบตากลูโคซิเดสที่ทนความร้อนได้ ซึ่งเอนไซม์นี้ถูกศึกษาโครงสร้างเป็นตัวแรกจากตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดร-เลส GH116 การอนุรักษ์ของกรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาของตระกูล GH116 ในระดับสูงบ่งชี้ถึงความสำคัญของกรดอะมิโนเหล่านี้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการกลายพันธุ์อย่างเป็นระบบของกรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่น่าจะเกี่ยวข้องกับหน้าที่เร่งปฏิกิริยา เพื่อหาปริมาณการมีส่วนร่วมของแต่ละโซ่ข้างในการเร่งปฏิกิริยา

ประการแรก ทำการวิเคราะห์การทำงานอย่างเป็นระบบของกรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ *Tx*GH116 ที่ตำแหน่งจับกับน้ำตาลไกลโคน ได้แก่ กรดอะมิโน D452 H507 T591 E730 W732 E777 R786 และ R792 ในการจับซับสเตรตและการเร่งปฏิกิริยา จากจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์และซับสเตรท และการวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์ ได้อธิบายบทบาทของกรดอะมิโนแต่ละตัว โดยทั่วไปปฏิกิริยาการจับอย่างง่ายกับไกลโคนของซับสเตรท ไม่สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงการทำงานได้อย่างชัดเมื่อมีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่จับกับกลูโคส และการกระจายประจุ และความเสถียรของกรดอะมิโนที่สภาวะทรานซิชันดูเหมือนจะมีความสำคัญมากกว่า โดยพิจารณาจากผลกระทบต่อค่า k_{cat} มากกว่า K_M

ประการที่สอง ตรวจสอบกรดอะมิโนที่จับกับตัวเร่งปฏิกิริยากรด/เบส และนิวคลีโอไฟล์ การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่ารูปแบบ “ทรีโอนีน-นิวคลีโอไฟล์-ไทโรซีน” ของตัวเร่งปฏิกิริยาถูกอนุรักษ์ไว้แบบทั่วไป ซึ่งทรีโอนีนมีพันธะไฮโดรเจนที่เป็นทั้งตัวให้และตัวรับกลูตามีน 727 ในรูปแบบ “กลูตามีน-กรด/เบส-ไทโรซีน” ไม่ได้มีการอนุรักษ์อย่างสูง ในขณะที่ไทโรซีน 523 มีบทบาทสำคัญในการปรับตัวเร่งปฏิกิริยากรด/เบสในการให้โปรตอน เอนไซม์กลายพันธุ์ T450A และ Y790F ที่เกี่ยวข้องกับตัวเร่งปฏิกิริยานิวคลีโอไฟล์สามารถทำงานได้ลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์ดั้งเดิม เอนไซม์กลายพันธุ์ T450A มีพีเอชโปรไฟล์ที่แคบและมีค่าพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานเป็นกลาง แต่ Y790F มีพีเอชโปรไฟล์ที่กว้าง เอนไซม์กลายพันธุ์ Y523F Q727A และ Q727E ที่เกี่ยวข้องกับตัวเร่งปฏิกิริยากรด/เบสมีพีเอชโปรไฟล์ที่แคบ และเอนไซม์กลายพันธุ์ของ Q727 มีค่า k_{cat} สูงกว่าเอนไซม์ *Tx*GH116 ดั้งเดิม

ประการที่สาม อธิบายบทบาทของกรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ *Tx*GH116 ที่มีโซ่ข้างเป็นอะโรมาติกในตำแหน่งจับ +1 และ +2 จากจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์และการวิเคราะห์โครงสร้างแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน Y445 มีบทบาทสำคัญในการซ้อนจับกับสับสเตรตในตำแหน่งจับ +1 และยังช่วยรักษาเสถียรภาพของสภาวะทรานซิชันเหมือนออกโซคาร์บิเนียมไอออน (oxocarbinium ion-like transition state) การกำจัดโซ่ข้างอะโรมาติกของไทโรซีนส่งผลให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ลดลงอย่างมาก ทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์กลายพันธุ์ Y445L ที่ลดลงแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ Y445 ในการจับกับโมเลกุลตัวรับในระหว่างกระบวนการกลูโคซิลทรานส์เฟอเรส กรดอะมิโน W525 ไม่เพียงแต่ให้การซ้อนจับซับสเตรตในตำแหน่งจับ +1 และ +2 แต่อาจจะทำหน้าที่ในการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์และการจดจำซับสเตรท การกลายพันธุ์ W*525*F ส่งผลให้เกิดการจับซับสเตรตสังเคราะห์ดีขึ้น และเอนไซม์กลายพันธุ์ W525L มีค่า k_{cat} สูงกว่าเอนไซม์ดั้งเดิม ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์กลายพันธุ์ W525L บ่งชี้ถึงบทบาทสำคัญของ W525 ในการกำหนดอัตราส่วนของการไฮโดรไลซิสต่อการทรานส์ไกลโคซิเลชันใน *Tx*GH116

การศึกษานี้ช่วยทำให้เข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์นี้ โดยการหาความสัมพันธ์ที่สำคัญของกรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยาในการจับกับซับสเตรท และตัวยับยั้ง ซึ่งอาจนำไปสู่ปรับเปลี่ยนเอนไซม์เบตากลูโคซิเดส *TxGH*116 เพื่อการประยุกต์ใช้ที่ดีขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนักศึกษา Hung Meng
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา James R Tu G

HUANG MENG: THE ROLES OF ACTIVE SITE AMINO ACID RESIDUES OF *Tx*GH116 IN GLUCOSE BINDING AND CATALYSIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JAMES KETUDAT-CAIRNS, PhD., 160 PP.

GLYCOSIDE HYDROLASE/KINETICS/MUTAGENESIS/CRYSTALLOGRAPHY

*Tx*GH116 from *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* is a thermostable β-glucosidase that was the first structurally characterized enzyme from glycoside hydrolase family GH116. High conservation of the amino acid residues in the GH116 family active-site pocket indicate the importance of these residues. Here, we systematically mutated the active-site amino acids residues that appeared to be related with catalytic function to quantify the contribution of each side chain to catalysis.

Firstly, we conducted the systematic functional analysis of *Tx*GH116 active site glycone sugar binding residues: D452, H507, T591, E730, W732, E777, R786 and R792 in substrate binding and catalysis. From enzyme substrate kinetics and structural analysis, we clarified the roles of each amino acid residue. In general, simple binding interactions with the glycone of the substrate cannot fully explain the activity changes upon mutation of the glucose binding molecule and their charge-distribution and stabilization of the transition state appear to be more critical, based on larger effects on k_{cat} than K_M.

Secondly, our work investigated the amino acid residues that interact with the catalytic acid/base and nucleophile. Sequence alignment of these residues shows that the “Thr-nucleophile–Tyr” pattern of catalytic residues is generally conserved, in

which threonine has both hydrogen-bond dornor and acceptor functions. The glutamine 727 residue in "Gln-acid/base-Tyr" is not highly conserved, while the tyrosine 523 residue is and plays an essential role in modulating acid/base residue protonation. Catalytic nucleophile-binding residue mutants T450A and Y790F had large decreases in activity, while T450A had a narrow pH profile with an optimum close to neutral, but Y790F had a broad pH profile. Catalytic acid/base-binding residue mutants Y523F, Q727A and Q727E all show narrow pH optima profile and the Q727 mutants have higher k_{cat} values than wild type *Tx*GH116.

Thirdly, we elucidated the role of aromatic residues in the *Tx*GH116 slot like active site subsites +1 and +2. Enzyme kinetics and structural analysis showed that the Y445 plays a pivotal role in stacking the substrate moiety in subsite +1 and also helps to stabilize the oxocarbinium ion-like transition state. Elimination of the tyrosine aromatic platform resulted in a large reduction in hydrolytic activity. The decreased transglycosylation in the *Tx*GH116 Y445L mutant indicated the importance of the Y445 in acceptor molecule binding during the glucosyl transferase process. The W525 residue not only provides substrate stacking in subsites +1 and +2, but may also act in product release and substrate recognition. The W525F mutation resulted in improved synthetic substrate binding and W525L has a higher k_{cat} value than WT. The increased hydrolysis activity from the W525L mutant indicated the pivotal role of W525 in determining the ratio of hydrolysis to transglycosylation in *Tx*GH116.

These studies improve our understanding of how this enzyme functions which may allow the modification of *Tx*GH116 β-glucosidase for improved application.

School of Chemistry
Academic Year 2020

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____