มนัสชนก กองดิน : การวิเคราะห์หน้าที่ของเอนไซม์ไฟโตฮอร์โมนเบต้า-กลูโคซิเดสในข้าว (CHARACTERIZATION OF RICE PHYTOHORMONE BETA-GLUCOSIDASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์, 106 หน้า.

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสของพืช จัดอยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส กลุ่มที่ 1 (GH1) ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญ หลายกระบวนการ อาทิ การปลดปล่อยฮอร์โมนพืชจากไกลโคไซที่ถูกกักเก็บ เช่น เอนไซม์ Os4BGlu12 จากข้าวสามารถย่อยสารประกอบ salicylic acid glucoside (SAG) และ tuberonic acid glucoside (TAG) ในขณะที่ เอนไซม์ Os4BGlu13 สามารถย่อยสารประกอบ TAG SAG และ gibberellin glucose ester (GA-GE) นอกจากนี้กรดแอบไซสิก (abscisic acid, ABA) ถูกจัดเป็นฮอร์โมนพืชที่มีความสำคัญทางกระบวนการทางชีววิทยา หนึ่งในบทบาทนั้นคือ การตอบสนองต่อสภาวะเครียด เช่น สภาพดินเค็ม หรือแล้ง และสามารถยับยั้งการยืดตัวของยอดอ่อน ปฏิกิริยา ABA glucose ester (ABA-GE) เป็นกลไกผันกลับได้ที่ทำให้ ABA ของพืชหยุดการทำงาน การทดลองนี้ได้นำเอนไซม์ Os1BGlu4 Os3BGlu7 Os4BGlu12 Os4BGlu13 Os4BGlu18 Os7BGlu26 และ Os9BGlu31 ซึ่งเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวที่ถูกสร้างขึ้นโดย *Escherichia coli* มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการตรวจวัดปริมาณกลูโคสที่ถูกปล่อยปล่อยจาก ABA-GE จากการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์โดยใช้ ABA-GE เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ดังกล่าว พบว่า เอนไซม์ Os4BGlu13 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด โดยมีค่า K_M เท่ากับ 1.66 k_{cat} เท่ากับ 20.59 k_{cat}/K_M เท่ากับ 12.40 รองลงมาคือ เอนไซม์ Os4BGlu12 โดยมีค่า K_M เท่ากับ 10.88 k_{cat} เท่ากับ 7.50 และ k_{cat}/K_M เท่ากับ 0.689 จากนั้นเอนไซม์ Os4BGlu9 Os4BGlu10 Os4BGlu11 Os4BGlu12 and Os4BGlu13 จากข้าว ซึ่งถูกจัดเป็นเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลุ่ม GH1 At/Os7 ได้ถูกนำมาเชื่อมต่อกับโปรตีนเรืองแสงสีเขียว เพื่อติดตามตำแหน่งของโปรตีนในเซลล์พืช โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ส่งถ่ายยีนเข้าสู่ใบของต้นใบยาสูบ จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ทั้ง 5 ตัว เคลื่อนที่ไปสะสมอยู่ระหว่างเซลล์ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของใบยาสูบ จากนั้นทำการตรวจสอบความสามารถในการย่อยซับสเตรท ABA-GE และ GA_4GE ในพืช โดยทำการผลิตต้นอะราบิดอฟซิสที่มีการแสดงของยีนเบต้า-กลูโคซิเดส Os4BGlu9 Os4BGlu10 Os4BGlu11 Os4BGlu12 หรือ Os4BGlu13 จากข้าว พบว่าโปรตีนสกัดจากต้นอะราบิดอฟซิสดังกล่าวสามารถย่อยซับสเตรท ABA-GE, GA_4-GE และ *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPGlc) ได้ดีกว่าโปรตีนที่สกัดจาก

ต้นอะราบิดอฟซิสที่ไม่มีการถ่ายยีน (wild type) จากนั้นนำเมล็ดของต้นอะราบิดอฟซิสที่มีการแสดงออกของเบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวมาเพาะในอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการย้ายไปเลี้ยงต่อในอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่มีการเติม 0.01 ไมโครโมลาร์ ABA หรือ ABA-GE และ 0.05 ไมโครโมลาร์ GA_4 หรือ GA_4GE จากการทดลองพบว่า กลุ่มทดลองที่มีการเติม 0.01 ไมโครโมลาร์ ABA ต้นอะราบิดอฟซิสที่มีการแสดงออกของเบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าว มีความยาวของต้นและราก ที่ยาวกว่าต้นอะราบิดอฟซิสปกติ (wild type) ส่วนกลุ่มทดลองที่มีการเติม ABA-GE พบว่า ต้นอะราบิดอฟซิสที่มีการแสดงออกของเบต้า-กลูโคซิเดส Os4BGlu13 มีความยาวของต้นและรากสั้นกว่า ต้นอะราบิดอฟซิสปกติ ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ Os4BGlu13 ที่ผลิตจาก *E.coli* ในขณะที่ต้นอะราบิดอฟซิสที่มีการแสดงออกของเบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าวที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี GA_4-GE พบว่าต้นอะราบิดอฟซิสที่มีการแสดงออกของ Os4BGlu12 และ Os4BGlu13 มีความยาวของรากมากกว่า ต้นอะราบิดอฟซิสปกติ จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากข้าว กลุ่มGH1 At/Os7 เป็นโปรตีนที่อยู่ระหว่างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสามารถย่อย ABA-GE หรือ โฮโมนพืชฮอร์โมนพืชไกลโคไซชนิดอื่น ๆ ที่บริเวณอะโพพลาสต์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา Manatcharak Konglin

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

MANATCHANOK KONGDIN : CHARACTERIZATION OF RICE PHYTOHORMONE BETA-GLUCOSIDASE. THESIS ADVISOR : PROF. JAMES R. KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 106 PP.

PHYTOHORMONE/ RICE/ BETA-GLUCOSIDASE/ ABCISIC ACID GLUCOSE ESTER/ GLYCOSIDE HYDROLASE

In plants, β-glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 (GH1) have been implicated in several fundamental processes, including release of bioactive phytohormones from inactive glycoside storage forms. For instance, rice Os4BGlu12 hydrolyzes salicylic acid glucoside (SAG) and tuberonic acid glucoside (TAG), while Os4BGlu13 hydrolyzes TAG, SAG and gibberellin glucose ester (GA-GE). Abscisic acid (ABA) is a phytohormone that plays critical roles in various biological processes. One of its best characterized roles is in adaptive responses to abiotic stresses, such as high salt and dehydration stress, and it also inhibits shoot elongation. ABA glucose ester (ABA-GE) is the major metabolite of reversible ABA inactivation of ABA in plants. Here, several rice β-glucosidases that have been expressed in *Escherichia coli*, including Os1BGlu4, Os3BGlu7, Os4BGlu12, Os4BGlu13, Os4BGlu18, Os7BGlu26 and Os9BGlu31, were screened for release of glucose from ABA-GE. Os4BGlu13 exhibited highest hydrolysis activity with ABA-GE followed by Os4BGlu12. The kinetic parameters of these enzymes for ABA-GE hydrolysis were K_M, 10.88, k_{cat}, 7.50, and k_{cat}/K_M, 0.689 for Os4BGlu12 and K_M, 1.66, k_{cat}, 20.59, k_{cat}/K_M 12. 40 for Os4BGlu13. Rice β- glucosidases in a subclade of phylogenetic cluster At/Os7, including Os4BGlu9, Os4BGlu10, Os4BGlu11, Os4BGlu12 and Os4BGlu13 were

fused to green fluorescent protein (eGFP) to see subcellular localization by Agrobacterium-mediated transformation of tobacco. All five-rice beta-glucosidase-eGFP fusion proteins appeared to be localized to the apoplast. To determine whether the enzymes in At/Os7 are able to hydrolyze ABA-GE and GA_4-GE *in planta*, *Arabidopsis thaliana* lines overexpressing rice Os4BGlu9, Os4BGlu10, Os4BGlu11, Os4BGlu12 or Os4BGlu13 β-glucosidases were produced. The plant extracts of these lines could hydrolyze ABA-GE, GA_4-GE and *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*p*NPGlc) better than wild type plant extract. The Arabidopsis overexpressing rice β-glucosidase were germinated in ½ MS for 7 days and transplanted to plates supplemented with 0.01 μM ABA or ABA-GE or 0.05 μM GA_4 or GA_4-GE. In the ABA treatment, plants overexpressing the rice β-glucosidases exhibited longer root and shoot lengths than wild type. ABA-GE treatment found Arabidopsis overexpressing rice Os4BGlu13 exhibited shorter root and shoot lengths than wild type, which is consistent with the high enzyme activity toward ABA-GE of Os4BGlu13 expressed in *E. coli*. When the Arabidopsis lines overexpressing the rice β-glucosidases were transplanted to media supplemented with GA_4-GE, Os4BGlu12 and Os4BGlu13 exhibited root lengths longer than wild type. Based on these observations we propose that rice β-glucosidase in this subclade of At/Os7 are cell wall proteins which hydrolyze ABA-GE and other phytohormone glucoconjugates in the apoplast.

School of Chemistry

Academic Year 2018

Student's signature Manatchavok Konyin

Advisor's signature