

Abstract

This project investigated the protein structure-function relationship using the rice BGlu1 β -glucan β -glucosidase and *Dalbergia* isoflavonoid β -glucosidases as models. The structure of the rice BGlu1 β -glucosidase was solved in the free form at 2.2 Å resolution and in the covalent complex intermediate with 2-F-glucoside at 1.55 Å resolution. These structures showed the enzyme forms a typical glycosyl hydrolase family 1 (GH1) (β/α)₈-barrel structure with the catalytic acid base (E176) and the catalytic nucleophile (E386) at the carboxyl terminal ends of β -sheets 4 and 7, respectively. The loops at the ends of the β -strands, which show the most variation compared to other known GH1 structures, form a deep active site in BGlu1, suitable for binding its oligosaccharide substrates. The identification of the acid/base and nucleophile were confirmed by site-directed mutagenesis and rescue of the activity in acid/base and nucleophile mutants, in addition to the structural evidence. The interactions involved in substrate binding beyond the -1 subsite, which contained the 2-F-glucoside in the intermediate complex structure, were surmised by computational docking of laminaribiose, cellobiose and cellotriose into the active site of the free BGlu1 structure, and by a complex of the E176Q mutant with cellopentaose. Four residues thought to interact with substrates in the +1 and +2 subsites were mutated to those of barley BGQ60, which has different preferences for cellobiose vs. cellotriose and β -mannoside vs. β -glucoside compared to BGlu1. The kinetics of these BGlu1 mutants for hydrolysis of the differential substrates showed that I179, N190 and N245 interact with the substrate, though their mutation could not convert the specificity of BGlu1 to that of barley BGQ60.

Characterization of the natural substrates of *Dalbergia nigrescens* β -glucosidase and its activity toward them and other isoflavonoid glycosides showed that the enzyme is an isoflavonoid 7-O- β -glucosidase with diglycosidase activity. The two most abundant substrates for the enzyme were dalpatein 7-O- β -D-apiofuranosyl-1,6- β -D-glucospyranoside and dalnigrein 7-O- β -D-apiofuranosyl-1,6- β -D-glucospyranoside, from which the enzyme removes the sugar as a disaccharide (acuminose). The *D. nigrescens* cDNA was cloned and the enzyme expressed in *Pichia pastoris* and shown to have activity similar to that from seed. Like the seed enzyme, it much preferred the *D. nigrescens* isoflavonoid-7-O-diglycosides to the dalcochinin β -D-glucoside substrate of *D. cochinchinesis* dalcochinase, which is 81% identical, while dalcochinase showed the opposite preference. Molecular models indicated two putative substrate aglycone binding residues were different between the recombinant *D. nigrescens* β -glucosidase (Dnbglu2) and the dalcochinase. When these residues in dalcochinase to the corresponding residues in Dnbglu2, little change occurred in the single mutant, but the double mutant hydrolyzed the dalpatein 7-O- β -D-apiofuranosyl-1,6- β -D-glucospyranoside and dalnigrein 7-O- β -D-apiofuranosyl-1,6- β -D-glucospyranoside more effectively. In addition, the *D. nigrescens* β -glucosidase effectively hydrolyzed isoflavonoid glycosides in soy flour suspensions to release their antioxidant isoflavones. The knowledge of rice and legume β -glucosidases gained in these studies helps explain their actions and suggests their applications to agriculture and food processing.

บทคัดย่อ

โครงการนี้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ โดยใช้ BGlul β -glucan β -glucosidase ของข้าว และ isoflavonoid β -glucosidases ของฉนวนและพะยูนเป็นต้นแบบ ได้ศึกษาโครงสร้างผลึกของ BGlul β -glucosidase ของข้าวในสภาพที่ไม่มีสารยับยั้งที่ค่า resolution ประมาณ 2.2 Å และผลึกเอนไซม์ในสภาพที่เชื่อมต่อกับ 2-F-glucoside ซึ่งเป็นสารยับยั้งที่ค่า resolution ประมาณ 1.55 Å และพบว่าโครงรูปของ BGlul ของข้าวมีลักษณะทั่วไปคล้ายกับเอนไซม์ในกลุ่ม glycosyl hydrolase family 1 (GH1) คือประกอบด้วยแผ่นจิบเบิ้ลและเกลียวแอลฟาอย่างละ 8 สาย เรียงสลับกัน และมีกรดอะมิโนหมู่เร่ง ได้แก่ กลูตามัท ตำแหน่งที่ 176 (E176) ซึ่งมีหมู่แขนงข้างทำหน้าที่เป็นหมู่ให้โปรตอน และ กลูตามัท ตำแหน่งที่ 386 (E386) ซึ่งมีหมู่แขนงข้างเป็นหมู่รับโปรตอน โดยพบอยู่ที่ปลายคาร์บอกซีของแผ่นจิบเบิ้ลลำดับที่ 4 และ 7 ตามลำดับ ตรงส่วนที่โค้งที่ต่อจากส่วนปลายของแผ่นจิบเบิ้ลแต่ละสายได้มาประกอบกันขึ้นเป็นบริเวณเร่งที่มีความลึก ซึ่งรูปร่างดังกล่าวเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ในการเข้าจับกับสับสเตรทซึ่งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอะมิโนที่อยู่บริเวณนี้มีความผันแปรอย่างมากเมื่อเทียบกับโครงสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม GH1 ชนิดอื่นๆ

นอกจากนี้ยังได้ใช้วิธี site-directed mutagenesis ในการดัดแปลงชนิดกรดอะมิโนเพื่อยืนยันตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นหมู่เร่ง เอนไซม์ BGlul มีบริเวณจับกับโมเลกุลน้ำตาลหน่วยย่อยในสายโอลิโกแซคคาไรด์แบ่งเป็นร่องย่อยๆ ได้นำข้อมูลโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ในสภาพที่จับอยู่กับ 2-F-glucoside มาสร้างแบบจำลองเพื่อศึกษาอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณเร่งตำแหน่ง -1 ของเอนไซม์กับสับสเตรท สวมชนิด ได้แก่ laminaribiose, cellobiose และ cellotriose รวมทั้งศึกษาอันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ที่ได้ดัดแปลงกรดอะมิโนหมู่เร่งคือกลูตามัทตำแหน่ง 176 ไปเป็นกลูตามีน กับ cellopentaose จากการเปรียบเทียบความจำเพาะต่อสับสเตรทระหว่างเอนไซม์ BGlul ของข้าว กับเอนไซม์ BGQ60 ของข้าวบาร์เลย์ พบว่าเอนไซม์ของข้าวบาร์เลย์ย่อย cellobiose และ β -mannoside ได้ดีกว่าเอนไซม์ของข้าว ในขณะที่ BGlul ของข้าวกลับสามารถย่อย cellotriose และ β -glucoside ได้ดีกว่าเอนไซม์ของข้าวบาร์เลย์ ด้วยเหตุนี้จึงได้ดัดแปลงกรดอะมิโน 4 ตัว ของ BGlul ตรงบริเวณเร่งตำแหน่ง +1 และ +2 ซึ่งคาดว่าจะทำหน้าที่จับกับสับสเตรท ไปเป็นกรดอะมิโนชนิดที่พบบนเอนไซม์ของข้าวบาร์เลย์ จากการศึกษาจลนศาสตร์ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลายพันธุ์กับสับสเตรทชนิดต่างๆ พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่ง I179, N190 และ N245 มีส่วนร่วมในการเข้าจับกับสับสเตรท อย่างไรก็ตามความจำเพาะในการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์กลายพันธุ์ของข้าวเหล่านี้กลับไม่เหมือนกับเอนไซม์ของข้าวบาร์เลย์อย่างที่คาดการณ์ไว้

ได้ศึกษาความจำเพาะในการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์ Dnbglu2 β -glucosidase ของฉนวนโดยทดสอบกับสับสเตรทที่แยกได้จากเมล็ดฉนวน และ isoflavonoid glycosides ชนิดต่างๆ พบว่า เอนไซม์สามารถย่อย isoflavonoid 7-O- β -glucoside ได้ดี โดยตัดน้ำตาลโคแซคคาไรด์ที่ต่ออยู่ในโมเลกุลสารนี้ออกมา สับสเตรทธรรมชาติในเมล็ดฉนวน ที่พบมากที่สุดมีสองชนิดคือ dalpatein 7-O- β -D-apiofuranosyl-1,6- β -D-glucospyranoside และ dalnigrein 7-O- β -D-apiofuranosyl-1,6- β -D-

glucospyranoside เอนไซม์สามารถจะย่อย acuminose ซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์ออกจากโมเลกุลไกลโคไซด์ทั้งสองชนิด ได้เพิ่มจำนวน Dnbglu2 cDNA ของฉนวน แล้วนำไปใช้ผลิตเอนไซม์ในยีสต์สายพันธุ์ *Pichia pastoris* เอนไซม์ที่ผลิตได้มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาล้ำกับเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่พบในเมล็ดของฉนวน โดยสามารถย่อย isoflavonoid-7-O-diglycosides ของฉนวนได้ดีกว่า dalcochinin β -D-glucoside ของพะยูน ซึ่งตรงข้ามกับเอนไซม์ของพะยูน จากการศึกษาโครงสร้างจำลองของเอนไซม์ของฉนวนและพะยูนพบความแตกต่างตรงกรดอะมิโน 2 ตำแหน่งที่จับกับส่วน aglycone ของสับสเตรท เมื่อดัดแปลงกรดอะมิโนบนเอนไซม์ของพะยูน ตรงตำแหน่งที่ความแตกต่างดังกล่าว ให้กลายเป็นกรดอะมิโนชนิดที่พบบนเอนไซม์ Dnbglu2 ของฉนวน พบว่าความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พะยูนที่กลายพันธุ์เปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนทั้งสองตำแหน่งพบว่า เอนไซม์พะยูนที่กลายพันธุ์สามารถย่อย dalpatein 7-O- β -D-apiofuranosyl-1,6- β -D-glucospyranoside และ dalnigrein 7-O- β -D-apiofuranosyl-1,6- β -D-glucospyranoside ได้ดีขึ้น นอกจากนี้เบต้ากลูโคซิเดสของฉนวนยังสามารถย่อยน้ำตาลออกจาก isoflavonoid glycosides ที่พบในถั่งเหลืองได้ดี ซึ่ง isoflavones ที่ถูกปลดปล่อยออกมามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความรู้ที่ได้จากการศึกษาเบต้ากลูโคซิเดสของข้าว ฉนวนและพะยูนนี้ สามารถนำมาอธิบายการทำงานของเอนไซม์ และพบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร