Abstract

β-Glucosidases play many roles in living organisms and are important industrial enzymes for biomass utilization, and they and related transglycosidases can be used for production of glycosides for various purposes. Our group has nearly 20 years of experience studying β-glucosidase structure and function and in the current work we also demonstrated some new applications for these enzymes. In this project, we studied the structure, function and applications of glycoside hydrolase (GH) family GH1, GH3, GH116 β-glucosidases and transglucosidases. We demonstrated that rice Os4BGlu18 and its close relatives can act as monolignol β-glucosidases to modulate monolignol glucoside levels *in planta*, and solved the X-ray crystal structure of Os4BGlu18, the first for a monolignol β-glucosidase. We also demonstrated that the GH1 enzyme Os12BGlu38 is critical for pollen development. In a mutagenesis study, we identified variants of Os9BGlu31 transglucosidase that had the highest activity for several acceptor substrates, including water for hydrolysis in some cases. Machine learning could identify determinants of the activity on certain substrates, and the variants could be used to produce useful products, such as phytohormone glucoconjugates for further studies. In the GH3 work, two exoglucanases and a β-xylosidase from rice were characterized and found to be similar to previously described enzymes. Mutagenesis of barley HvExoI was combined with structural and computational studies to identify the mechanism by which glucose is released from the active site, which explained the basis for processive oligosaccharide/polysaccharide hydrolysis in a pocket-shaped active site. Continuing on from our previous solution of the first GH116 structure, that of TxGH116, we solved several more structures of acid/base mutants to support the conclusion of a vertical protonation mechanism, which is different from previously reported retaining GH. We also made several mutations of the active site substrate-binding residues and characterized the activities of the enzymes, and additional nucleophile residue mutations. The acid/base and nucleophile mutation variants were found to efficiently transglycosylate azide to make azido-β-D-glucose and azido-α-D-glucose, respectively, which could be used to make various glucosyl triazoles by copper-catalyzed Click chemistry. The β-glucosyl triazoles were found to be efficient inhibitors of bacterial GH116 β-glucosidase, but not human β-glucosidases, while the α-glucosyl triazoles hold promise as α-glucosidase inhibitors. Some of the active site TxGH116 mutations also improved the tolerance to glucose and substrates, which will be important if the enzyme is used for biomass conversion in the future. In addition, we also expressed and characterized the cyanobacterium β-glucosidase *Thermosynechococcus elongatus* TeGH116. This enzyme strongly preferred β-D-glucoside, but had low levels of activity on β-D-galactoside, N-acetyl-β-D-glucosaminide and β-D-mannoside as well, and could hydrolyze oligosaccharides. It may act to help recycle cell wall cellulo-oligosaccharides from the cell wall of the bacterium. We were able to crystalize and solve the structure of this enzyme, which could be the second structure from the GH116 family. This work contributed to the theses of three PhD students, as well as postdoctoral fellows and assistants, and has so far led to the publication of one national and four international journal papers and two patent application submissions. In the future, more papers and applications are coming out, once futher development is carried out.

บทคัดย่อ

บีตากลูโคซิเดสมีบทบาทมากมายในสิ่งมีชีวิตและเป็นเอนไซม์อุตสาหกรรมที่สำคัญสำหรับการใช้ประโยชน์จากชีวมวล และเอนไซม์เหล่านี้และทรานส์ไกลโคซิเดสที่เกี่ยวข้องสามารถใช้สำหรับการผลิตไกลโคไซด์สำหรับวัตถุประสงค์ต่างๆ กลุ่มของเรามีประสบการณ์เกือบ 20 ปีในการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของบีตากลูโคซิเดสและในงานปัจจุบันเรายังได้ประยุกต์ใช้งานใหม่ๆ สำหรับเอนไซม์เหล่านี้ ในโครงการนี้เราได้ศึกษาโครงสร้าง หน้าที่และการประยุกต์ใช้งานของบีตากลูโคซิเดสและทรานส์กลูโคซิเดสในตระกูลไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (GH) ที่ 1 3 และ 116 เราแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Os4BGlu18 จากข้าวและเอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสามารถทำหน้าที่เป็นโมโนลิกนอลบีตากลูโคซิเดสเพื่อรักษาสมดุลของโมโนลิกนอลกลูโคไซด์ในพืช และหาโครงสร้างผลึกของ Os4BGlu18 ซึ่งเป็นโครงสร้างแรกของโมโนลิกนอลบีตากลูโคซิเดส นอกจากนี้ เรายังแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Os12BGlu38 ในตระกูล GH1 นั้นมีความสำคัญต่อการพัฒนาละอองเรณู ในการศึกษาการกลายพันธุ์ เราได้วิเคราะห์หาเอนไซม์กลายพันธุ์ของทรานส์กลูโคซิเดส Os9BGlu31 ที่มีการทำงานสูงสุดสำหรับสารตั้งต้นตัวรับหลากหลาย รวมทั้งน้ำสำหรับการไฮโดรไลซิสในบางกรณี ซึ่งสามารถใช้เป็นแบบอย่างในการเรียนรู้การทำงานของเอนไซม์กับสารตั้งต้นและเอนไซม์กลายพันธุ์สามารถนำไปใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ เช่น ไฟโตฮอร์โมนที่เป็นอนุพันธุ์ของกลูโคสสำหรับการศึกษาเพิ่มเติม ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในตระกูล GH3 ได้แก่ เอนไซม์เอกโซกลูคาเนส 2 ชนิด และบีตาไซโลซิเดสจากข้าว พบว่ามีการทำงานคล้ายกับเอนไซม์ที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ การกลายพันธุ์ของเอนไซม์ HvExoI จากข้าวบาร์เลย์ ร่วมกับการศึกษาโครงสร้างและการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อระบุกลไกที่กลูโคสถูกปล่อยออกมาจากบริเวณเร่ง ได้อธิบายพื้นฐานสำหรับการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโอลิโกแซ็กคาไรด์หรือโพลีแซ็กคาไรด์ในบริเวณเร่งที่มีรูปทรงกระเป๋า ดำเนินการต่อจากการศึกษาก่อนหน้าของโครงสร้าง GH116 แรกของเอนไซม์ TxGH116 เราได้หาโครงสร้างของเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรด/เบสอีกหลายตัวเพื่อรองรับข้อสรุปของกลไกการให้โปรตรอนในแนวตั้งซึ่งแตกต่างจากกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ retaining ของ GH116 ที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้ นอกจากนี้เรายังได้ทำการกลายพันธุ์ของบริเวณเร่งที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่จับกับสารตั้งต้นและศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลายพันธุ์ รวมทั้งทำการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไฟล์ พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรด/เบสและนิวคลีโอไฟล์มีประสิทธิภาพในการเคลื่อนย้ายกลูโคสไปยังอะไซด์ ในการสร้าง อะซิโด-บีตา-ดี-กลูโคส และ อะซิโด-แอลฟา-ดี-กลูโคส ตามลำดับ ซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อสังเคราะห์กลูโคซิลไตรอะโซลชนิดต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาคลิกเคมีที่เร่งด้วยคอปเปอร์ จากการศึกษาพบว่า บีตา-กลูโคซิลไตรอะโซล เป็นสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพของบีตากลูโคซิเดสในตระกูล GH116 จากแบคทีเรีย แต่ไม่ใช่จากคน ในขณะที่ แอลฟา-กลูโคซิลไตรอะโซล ถือเป็นสารยับยั้งแอลฟากลูโคซิเดส การกลายพันธุ์ของ TxGH116 ในบริเวณเร่งบางตัวยังช่วยเพิ่มความทนทานต่อกลูโคสและสารตั้งต้นซึ่งจะมีความสำคัญหากใช้เอนไซม์นี้สำหรับการเปลี่ยนชีวมวลในอนาคต นอกจากนี้เรายังทำการแสดงออกของยีนและศึกษาการทำงานของบีตากลูโคซิเดส TeGH116 จากไซยาโนแบคทีเรีย *Thermosynechococcus elongatus* เอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีมากกับสารตั้งต้นบีตา-ดี-กลูโคไซด์ แต่ทำงานได้ไม่ดีในบีตา-ดี-กาแลคโตไซด์ เอ็น-อะซิติล-บีตา-ดี-กลูโคซามิไนด์ และ บีตา-ดี-แมนโนไซด์ และสามารถไฮโดรไลซ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ เอนไซม์นี้อาจทำหน้าที่ช่วยรีไซเคิลผนังเซลล์ที่เป็นเซลลูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เราสามารถตกผลึกและหาโครงสร้างของเอนไซม์นี้ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สองของตระกูล GH116 โครงการนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาระดับปริญญาเอก 3 คน นักวิจัยหลังปริญญาเอกและผู้ช่วย และนำไปสู่การตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ 1 ฉบับและนานาชาติ 4 ฉบับและการยื่นคำขอสิทธิบัตร 2 ฉบับ ในอนาคตจะมีตีพิมพ์ในวารสารและการประยุกต์ใช้เพิ่มขึ้นอีกเมื่อมีการพัฒนาเพิ่มเติม