

Abstract

The project aims to study the structure-function relationship in the family of enzyme β -glucosidases using three Thai plants β -glucosidases as model enzymes. Dalcochinase is an isoflavonoid β -glucosidase, purified from Thai rosewood (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre). Dnbglu2 is an isoflavonoid β -diglycosidase from blackwood (*D. nigrescens* Kurz). Linamarase is a cyanogenic β -glucosidase present in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). These three enzymes catalyse the same hydrolytic reactions, but are remarkably different in their specificities for natural substrates. Dalcochinase can perform reverse hydrolysis well, and catalyse transglucosylation using primary and secondary alcohols as acceptor, but not tertiary alcohol. In contrast, linamarase is exceptional at catalyzing transglucosylation using primary, secondary and tertiary alcohols as acceptor, but poor in catalyzing reverse hydrolysis. Understanding the mechanisms underlying these differences should lead us to better applications of the enzymes via protein engineering.

In this project, recombinant dalcochinase and Dnbglu2 have been cloned, expressed in yeast *Pichia pastoris* and purified from culture medium. Both purified recombinant enzymes exhibited similar kinetic properties to their respective natural enzymes isolated from seeds. Site-directed mutagenesis was performed to investigate the roles of amino acid residues in the aglycone binding pocket of these enzymes that might be responsible for differences in their catalytic properties. Ten dalcochinase mutants, namely I185A, N189F, M195V, H253F, V255F, N323Q, G367S, K402Y, A454N and E455I, were made by replacing residues in dalcochinase with the corresponding residues in linamarase, and were expressed and purified from *P. pastoris* cultures. Kinetic studies showed that most mutant enzymes decreased their specificities toward *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (a commercial substrate) and dalcochinin β -D-glucoside (a natural substrate of dalcochinase). Notably, a 70- and 22-fold reduction shown by I185A, toward each respective substrate, suggested the importance of residue I185 in dalcochinase for substrate specificity. However, the hydrolytic activities towards linamarin (a natural substrate of linamarase) did not improve. In transglucosylation studies, three mutants showed improved transglucosylation abilities: I185A and V255F with both primary and secondary alcohol acceptors, N189F with only primary alcohol acceptors. So, residues A201, F205 and F271 in linamarase seemed to play prominent roles in catalysing transglucosylation. However, none of the mutant enzyme could catalyze the transfer of glucose to tertiary alcohol. Thus, it is expected that mutations at more than one position may generate new dalcochinase mutants which may function similarly to linamarase, in terms of substrate specificity and transglucosylation.

Furthermore, the differences in the aglycone binding pocket of dalcochinase and Dnbglu2 are compared, since they exhibit marked differences in substrate specificities, despite having 81% sequence identity. Three dalcochinase mutants, namely A454S and E455G single mutants and A454S/E455G double mutant, were

made by replacing residues in dalcochinase with the corresponding residues in Dnbglu2, and were expressed and purified from *P. pastoris* cultures. Kinetic studies showed that the hydrolytic efficiency toward *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside of both single mutants were similar to that of dalcochinase, but increased 2-fold by the double mutant. Furthermore, their activities for dalcochinin β -glucoside remained unchanged. For hydrolysis of isoflavonoid diglycosides dalpatein 7-O- β -D-apiosyl-1,6- β -D-glucoside and dalnigrein 7-O- β -D-apiosyl-1,6- β -D-glucoside (natural substrates of Dnbglu2), the single mutants showed similar hydrolysis of compared with the wild-type dalcochinase, whereas the double mutant showed 4-7 fold increases in relative activity toward both isoflavonoid diglycosides. However, this increased activity was only 3% that of Dnbglu2, indicating other determinants are important for isoflavonoid diglycoside hydrolysis.

As for cloning of cassava linamarase, four full-length cDNA sequences were obtained from RT-PCR and cloned into pPICZ α B for methanol-inducible expression in *P. pastoris*, similar to the cloning strategies used for dalcochinase. However, no β -glucosidase activities could be detected in *P. pastoris* culture media. So these four cDNA sequences were to be cloned into pYEX-BX as an N-terminal fusion product with the signal sequence of yeast *SUC2* invertase followed by a polyhistidine tag for expression in *Saccharomyces cerevisiae* under the control of yeast copper metallothionein (*CUP1*) promoter.

Keywords

β -glucosidase, substrate specificity, transglucosylation, *Dalbergia cochinchinensis*, protein engineering, site-directed mutagenesis

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ในเอนไซม์กลุ่มเบต้า-กลูโคซิเดส โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืชไทย 3 ชนิดเป็นตัวอย่างศึกษา เอนไซม์ดัลโคซิเนส (dallochitinase) เป็นไอโซพลาไวโนอยด์ เบต้า-กลูโคซิเดสเอนไซม์ ที่สกัดได้จากเมล็ดพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre หรือ Thai Rosewood) เอนไซม์ Dnbglu2 เป็นไอโซพลาไวโนอยด์ เบต้า-ไดกลูโคซิเดสเอนไซม์ ที่สกัดได้จากเมล็ดขนุน (*D. nigrescens* Kurz) เอนไซม์ลินามาราส (linamarase) เป็นไซยาโนจีนิค เบต้า-กลูโคซิเดสเอนไซม์ ที่ได้จากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz หรือ cassava) เอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดิกได้เหมือนกัน แต่แตกต่างกันในเรื่องความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติ เอนไซม์ดัลโคซิเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) ได้ดี และเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส (transglucosylation) โดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิและทุติยภูมิเป็นตัวรับได้ แต่ใช้แอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิไม่ได้ ในทางตรงกันข้าม เอนไซม์ลินามาราสสามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสโดยใช้แอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ ทุติยภูมิ และตติยภูมิเป็นตัวรับได้ดีมาก แต่เร่งปฏิกิริยาย้อนการสลายได้น้อย การเข้าใจถึงกลไกของความแตกต่างเหล่านี้ จะสามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้เอนไซม์ได้ โดยอาศัยเทคนิคทางวิศวกรรมโปรตีน

ในโครงการวิจัยนี้ รีคอมบิแนนต์ดัลโคซิเนสและ Dnbglu2 ได้ถูกโคลนและแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* และสกัดให้บริสุทธิ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้ว รีคอมบิแนนต์เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ที่คล้ายคลึงกับเอนไซม์ที่สกัดได้จากเมล็ด เอนไซม์รีคอมบิแนนต์ดัลโคซิเนสได้ถูกทำการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-directed mutagenesis) เพื่อศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนในช่องจับกับอะไกลโคอิน ที่อาจทำหน้าที่กำหนดความแตกต่างในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 10 ชนิด (I185A, N189F, M195V, H253F, V255F, N323Q, G367S, K402Y, A454N และ E455I) ได้ถูกสร้างขึ้น โดยการแทนที่กรดอะมิโนในเอนไซม์ดัลโคซิเนส ด้วยกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันในเอนไซม์ลินามาราส และทำการแสดงออกแล้วสกัดให้บริสุทธิ์จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* การศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (สับสเตรททางการค้า) และ dallochinin β -D-glucoside (สับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ดัลโคซิเนส) ลดลง โดยเฉพาะเอนไซม์กลายพันธุ์ I185A ที่มีความจำเพาะลดลง 70 และ 22 เท่า ตามลำดับ ซึ่งชี้ถึงความสำคัญของกรดอะมิโนตำแหน่ง I185 ในเอนไซม์ดัลโคซิเนสในการกำหนดความจำเพาะต่อสับสเตรท อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการสลายลินามาริน (linamarin ซึ่งเป็นสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ลินามาราส) ไม่มีความเปลี่ยนแปลง ในการศึกษาปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสพบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ 3 ชนิด มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคสได้ดีขึ้น กล่าวคือ เอนไซม์กลายพันธุ์ I185A and V255F ใช้แอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิและทุติยภูมิได้ดีขึ้น และเอนไซม์กลายพันธุ์ N189F ใช้แอลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิได้ดีขึ้น ดังนั้น กรดอะมิโนตำแหน่ง A201, F205 และ F271 ในเอนไซม์ลินามาราส น่าจะมีบทบาทเด่นในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคส อย่างไรก็ตาม ไม่พบเอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ชนิดใดที่สามารถย้ายหมู่กลูโคสไปสู่แอลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิ ดังนั้น จึงคาดว่าหากทำการกลายพันธุ์มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง อาจจะทำให้ได้เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ชนิดใหม่ ที่ทำงานได้คล้ายคลึงกับเอนไซม์ลินามาราส ในด้านความจำเพาะต่อสับสเตรทและด้านการย้ายหมู่กลูโคส

นอกจากนี้ งานวิจัยได้เปรียบเทียบความแตกต่างในช่องจับกับอะไกลโคอินของเอนไซม์ดัลโคซิเนส และเอนไซม์ Dnbglu2 เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างในด้านความจำเพาะต่อสับสเตรท ถึงแม้ว่าจะมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันถึง

81% เอนไซม์ดัลโคซิเนสกลายพันธุ์ 3 ชนิด (กลายพันธุ์ตำแหน่งเดียว คือ A454 และ E455I และกลายพันธุ์สองตำแหน่ง คือ A454S/E455G) ได้ถูกสร้างขึ้น โดยการแทนที่กรดอะมิโนในเอนไซม์ดัลโคซิเนส ด้วยกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันในเอนไซม์ Dnbglu2 และทำการแสดงออกแล้วสกัดให้บริสุทธิ์จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* การศึกษาทางจุลชีวเคมีพบว่า เอนไซม์กลายพันธุ์ตำแหน่งเดียวมีประสิทธิภาพในการสลาย *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside คล้ายกับเอนไซม์ดัลโคซิเนสดั้งเดิม แต่เพิ่มขึ้น 2 เท่าในเอนไซม์กลายพันธุ์สองตำแหน่ง นอกจากนี้พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์กลายพันธุ์ต่อ dalcochinin β -glucoside ไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับการสลาย dalpatein 7-O- β -D-apiosyl-1,6- β -D-glucoside และ dalnigrein 7-O- β -D-apiosyl-1,6- β -D-glucoside (สับสเตรตธรรมชาติของเอนไซม์ Dnbglu2) พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ตำแหน่งเดียวสามารถสลายไอโซฟลาโวนอยด์ เบต้า-ไดไกลโคไซด์ 2 ชนิดนี้ได้ดีใกล้เคียงกับเอนไซม์ดัลโคซิเนสดั้งเดิม ในขณะที่เอนไซม์กลายพันธุ์สองตำแหน่งมีความสามารถเพิ่มขึ้น 4-7 เท่า อย่างไรก็ตาม ความสามารถที่เพิ่มขึ้นนี้ คิดเป็นแค่ 3% ของเอนไซม์ Dnbglu2 ซึ่งแสดงว่ามีส่วนอื่นของเอนไซม์ที่สำคัญต่อการกำหนดความสามารถในการสลายไอโซฟลาโวนอยด์ ไดไกลโคไซด์

ในส่วนของการโคลนเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง ได้ทำการโคลน full-length cDNA sequences 4 โคลน จากการทำให้ RT-PCR และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pPICZ α B เพื่อให้เกิดการแสดงออกใน *P. pastoris* โดยใช้เมทานอลเป็นตัวเหนี่ยวนำ ซึ่งคล้ายกับวิธีการโคลนเอนไซม์ดัลโคซิเนส อย่างไรก็ตาม ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* ดังนั้น full-length cDNA sequences 4 โคลนนี้ จึงถูกโคลนลงในเวกเตอร์ pYEX-BX ในรูปของ N-terminal fusion product กับลำดับของ the signal sequence ของ yeast *SUC2* invertase ตามด้วย polyhistidine tag และควบคุมการแสดงออกโดย copper metallothionein (*CUP1*) promoter

คำสำคัญ

เบต้า-กลูโคซิเดส ความจำเพาะต่อสับสเตรต การย้ายหมู่กลูโคส พะยูน วิสวกรรมโปรตีน การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ