

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาเอนไซม์และยีนดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส
ในกระบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในข้าวไทย

Study on the DNA methyltransferase
enzyme and gene in DNA methylation process
in *Oryza sativa* ssp. Indica

ผู้วิจัย

ศศ. ดร. จริญญา ธรรมะชวณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ทุนพัฒนานักวิจัยปี 2538 (เมธีวิจัยรุ่นที่ 2)

สัญญาเลขที่ RSA/4/2538

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 กันยายน 2538 - 31 สิงหาคม 2541 (3 ปี)

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาเอนไซม์และยีนดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส
ในกระบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในข้าวไทย

**Study on the DNA methyltransferase
enzyme and gene in DNA methylation process
in *Oryza sativa ssp. Indica***

ผู้วิจัย

ผศ. ดร. จริญญา ฌรงกะชวนะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ทุนพัฒนานักวิจัยปี 2538 (เมธีวิจัยรุ่นที่ 2)

สัญญาเลขที่ RSA/4/2538

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 กันยายน 2538 - 31 สิงหาคม 2541 (3 ปี)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในทุนพัฒนานักวิจัยปี 2538 (เมธีวิจัยรุ่นที่ 2) สัญญาเลขที่ RSA/4/2538 รหัสโครงการ RSA 3880004 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 3 ปี (1 กันยายน 2538 - 31 สิงหาคม 2541)

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในลักษณะการศึกษาค้นคว้าพื้นฐานเกี่ยวกับการศึกษาบทบาทและการควบคุมดีเอ็นเอเมทิลเลชันในข้าว ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและเป็นอาหารของโลก และขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยเพิ่มเติมสำหรับโครงการวิจัยนี้จากกองทุนประเดิมอุดหนุนวิชาชีพวิทยาศาสตร์

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสงกรานต์ จิตรากร (ศูนย์วิจัยข้าว ปทุมธานี) สำหรับเมล็ดพันธุ์ข้าวตลอดการทดลอง ขอขอบคุณ ศ. มรว. ชัยฉัตร สวัสดิวัตน์ รศ. ศกรณ์ มงคลสุข และ ผศ. เสาวนีย์ ธรรมสถิต (มหาวิทยาลัยมหิดล) สำหรับคำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย ขอขอบคุณ Prof. Timothy H. Bester (Harvard Medical School, USA) Prof. Roger Adams (University of Glasgow, UK) Dr. Anke Nebendahl (IPK, Germany) Dr. Jean Finnegan (CSIRO, Australia) Prof. Stephen Dellaporta (Yale University, USA) และ Dr. Marjori Matzke (Austrian Academy of Sciences, Austria) สำหรับความเอื้อเฟื้อ Antibody ของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส และข้อมูลตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอบคุณนางสาวพาลิกา กาญจนเวชกุล และ นางสาวนพณี วิริยะวุฒิกรณ์ (นักศึกษาระดับปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ซึ่งได้เข้าร่วมทำงานวิจัยในโครงการนี้จนสำเร็จเป็นอย่างดี

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการที่ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล

30 กันยายน 2541

สรุปโครงการวิจัย

การศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชมีความจำเป็น และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติต่างๆของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกลไกที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนเริ่มต้น และมีรายงานว่าผลกระทบอย่างมากต่อการกีดกันการแสดงออกของยีนและความเสถียรของยีนในสิ่งมีชีวิตที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีน แม้ดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะถูกพบในจีโนมของพืชทุกชนิด แต่ข้อมูลการศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืชยังมีอยู่น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น สำหรับโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะมุ่งเน้นการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในข้าวไทย (*Oryza sativa* spp. Indica) โดยจะทำการสกัดและแยกเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA MTase) ให้บริสุทธิ์ เพื่อนำมาศึกษาชนิดและคุณสมบัติจำเพาะต่างๆของเอนไซม์ และจะทำการแยกยีน DNA MTase ดังกล่าวมาวิเคราะห์ลำดับเบส และศึกษาการแสดงออก

การดำเนินงานวิจัยของโครงการนี้ในช่วง 3 ปี (1 กันยายน 2538 - 31 สิงหาคม 2541) ผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีการเตรียมเอนไซม์ DNA MTase ที่มีความบริสุทธิ์สูง จาก nuclei extract ของยอดอ่อนต้นข้าว rice DNA MTase บริสุทธิ์ที่แยกได้มีขนาดประมาณ 130 kDa (native) และ 55 kDa (ใน SDS-PAGE) เป็น maintenance cytosine DNA MTase ซึ่งมีความจำเพาะกับ hemi-methylated DNA substrate สามารถ methylate DNA substrate ใน *in vitro* ได้ดีขึ้นกว่าใน *in vivo* โดย eukaryotic DNA methylation inhibitor และ demethylating agent สามารถ inhibit activity ของ rice DNA MTase ได้ rice DNA MTase ไม่ต้องการ co-factor ใดๆ มี optimal pH ในช่วง 7.6-8.0 และ optimal temperature ที่ 25°C เอนไซม์นี้ไม่ stable และ ไม่มี demethylating activity มีค่า K_m ต่อ rice DNA substrate = 50 $\mu\text{g/ml}$, K_m ต่อ synthetic hemi-methylated DNA substrate = 16.67 $\mu\text{g/ml}$ และ K_m ต่อ S-adenosylmethionine (methyl donor) = 2.63 μM

ผู้วิจัยสามารถ clone cDNA ของ rice DNA MTase จาก cDNA library ที่เตรียมได้ โดย พบ insert ที่มีขนาดประมาณ 4.7 kbp ตั้งชื่อว่า pRM1 (rice DNA MTase clone #1)

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ putative cloned cDNA ของ rice DNA MTase ใน pRM1 พบว่า total nucleotide sequence ที่ clone ได้ คือ 4,712 nucleotides โดย open reading frame (translation region) เป็น 4,506 nucleotides และ inferred amino acid sequence 1,502 amino acids ผลการวิเคราะห์ functional domains ของ rice DNA MTase inferred amino acid sequence เมื่อเปรียบเทียบกับ known sequence พบว่า มี linker และ conserved motif ต่างๆ ของ DNA MTase เช่น SAM binding site และ Active site ในบริเวณ C-terminal region เมื่อทำ alignment ส่วน conserved motifs ของ rice DNA MTase amino acid sequence เปรียบเทียบกับ known sequence ของพืชอื่น พบว่า ส่วน conserved motifs ของ DNA MTase ของ ข้าว ข้าวโพด แครอท มะเขือเทศ ถั่ว และ *Arabidopsis* มี identity สูง ผลการทำ Southern blot hybridization ซึ่งให้เห็นว่า ยีน DNA MTase ใน genome ของข้าว อาจมีเพียง copy เดียว จากการศึกษาการแสดงออกของ ยีน DNA MTase ในขั้นตอนต่างๆระหว่างการพัฒนาของต้นข้าว โดย Northern blot hybridization พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีนนี้ใน dry embryo แต่เมื่อเมล็ดข้าวถูกแช่น้ำ เริ่มการ germination จะมีการแสดงออกของ DNA MTase เพิ่มขึ้น จนกระทั่งสูงสุดที่ seedling อายุ 10 วัน แล้วมีการแสดงออกที่ค่อนข้างคงที่ จนถึง mature plant นอกจากนั้น ในรากพบการแสดงออกของยีน DNA MTase น้อยกว่าในใบข้าว ซึ่งเมื่อพิจารณาประกอบกับข้อมูลระดับ methylated cytosine ใน genome และ DNA MTase enzyme activity ที่ได้ ศึกษาในเบื้องต้นแล้ว ผลการทดลองนับว่าสอดคล้องกัน

คาดว่าข้อมูลพื้นฐานต่างๆเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ทำให้สามารถเข้าใจกลไกการควบคุมและการทำงานของเอนไซม์ DNA MTase ตลอดขบวนการ development ในระยะต่างๆของพืชได้มากและดียิ่งขึ้น เอนไซม์และยีน DNA MTase ที่แยกได้ จะมีประโยชน์ในการศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืชได้อย่างลึกซึ้งขึ้น

SUMMARY

Studies of mechanisms governing differential gene expression in specific organs and at appropriate growth stages are necessary for potential improvement of plant properties. DNA methylation is a specific structural modification of DNA molecules which can effect gene expression and has been suggested to affect the stability of transgene in genetic transformation processes. Generally, the plant genome is extensively methylated. However, our understanding of DNA methylation in plants has remained primitive and be a conspicuous black box in plant molecular biology.

We have attempted to investigated on the role and regulation of DNA methylation in plants by focusing on rice, which is an economically improtant plant of Thailand. In spite of the possible important of DNA methylation in plants, the enzyme involving in these modification of DNA have been recieved little attention. The ultimate goal of this research project is to purify and characterize the DNA methyltransferase (DNA MTase) enzyme. The further study is to clone, sequence and characterize the regulation of expression of this gene. Rice DNA MTase appeared to be located entirely within the nuclear fractions. Nuclear DNA MTase was prepared from nuclei by salt extraction and subsequently purified by three different chromatography. The purified rice DNA MTase contained relatively high specific activity. The native enzyme was approximately 130 kDa and showed 55 kDa in SDS-PAGE. Sequence specificity of methylation had been investigated *in vitro* using purified enzyme

with various substrates. Others properties of rice DNA MTase were studied and discussed.

A cDNA encoding DNA MTase of rice had been cloned and sequenced. The nucleotide sequence contained an open reading frame of 4,506 nucleotides sufficient to encode a polypeptide of 1502 amino acid residues, which was close to the apparent size of DNA MTase found in rice extract. Like the other eukaryotic DNA MTase, the inferred protein had a presumed regulatory N-terminal region linked to a catalytic C-terminal domain, which had ten conserved motifs found in prokaryotic DNA MTase. Southern blot analysis of rice genomic DNA indicated the presence of a single gene. Using Northern blot analysis of total RNA from different developmental stages and different tissues, we had observed that expression is confined mostly to the rapidly dividing tissues of the plant.

Since DNA methylation may involve in developmental stages of plants, the investigation of the role and regulation of DNA methylation in relation to plant embryogenesis, and somaclonal variation is of interest for plant regeneration aspects. Furthermore, the expression and stability of transgene in transgenic plant has been postulated to be interfered by DNA methylation. Thus, overall studies on mechanisms that regulate plant DNA methylation is expected to provide an important basic knowledge for understanding plant development as well as for potential improvement of plant and transgenic plant processes.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สรุปโครงการวิจัย	ii
SUMMARY	iv
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วัตถุประสงค์ของโครงการ	10
ขอบเขตของการวิจัย	10
การดำเนินงานวิจัยและผลงานวิจัย	11
1) การสกัดแยกเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA MTase) จากต้นข้าว	12
1.1) การพัฒนาวิธีเหมาะสมในการตรวจสอบ activity ของ DNA MTase จากต้นข้าว	12
1.2) การตรวจสอบ activity ของ DNA MTase ในต้นข้าวที่สภาวะต่างๆ	15
1.3) การศึกษาระดับของ methylated cytosine ในต้นข้าวที่สภาวะต่างๆ	15
1.4) การศึกษา location ของ DNA MTase ใน compartment ต่างๆ ของเซลล์ข้าว	19
1.5) การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของ เอนไซม์ในระหว่างการสกัด	21
1.6) การศึกษาวิธีการสกัดแยกเอนไซม์ DNA MTase จากต้นข้าวให้บริสุทธิ์	25
2) การศึกษาชนิดและคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ DNA MTase	35
2.1) การตรวจสอบขนาดของเอนไซม์ DNA MTase ที่บริสุทธิ์	35

	หน้า
2.2) การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ DNA MTase บริสุทธิ์	38
2.2.1) Substrate specificity	38
2.2.2 Enzyme inhibitor	40
2.2.3) Salt concentration	40
2.2.4) Optimal pH	45
2.2.5) Optimal temperature	50
2.2.6) Enzyme kinetic	50
2.2.7) De-methylation activity	50
2.2.8) Enzyme stability	50
2.3) การวิเคราะห์ amino acid sequence ของ เอนไซม์ DNA MTase บริสุทธิ์	55
3) การแยกยีน DNA MTase และ วิเคราะห์ลำดับเบส	57
3.1) การ clone cDNA ของ DNA MTase	57
3.1.1) การสร้าง cDNA library ของข้าว	57
3.1.2) การเตรียม probe สำหรับคัดเลือก rice putative DNA MTase clone	57
3.1.3) การ ตรวจหา putative cDNA clone ของ rice DNA MTase จาก cDNA library	62
3.2) การวิเคราะห์ลำดับเบสของ putative cloned cDNA ของ rice DNA MTase	62
3.3) การวิเคราะห์ functional domains และ conserved motifs ของ rice DNA MTase sequence เมื่อเปรียบเทียบกับ known sequence	65
4) การศึกษาการแสดงออกของยีน DNA MTase ในข้าว	73
4.1) การตรวจสอบยีน DNA MTase ใน genome ของข้าว	73

	หน้า
4.2) ศึกษาการแสดงออกของยีน DNA MTase ใน different developmental stage และ tissue specific ในข้าว	73
บทสรุป	77
เอกสารอ้างอิง	81
Output ที่ได้จากโครงการวิจัย	83
Output Award	
Output Publications	
Output Proceedings	
รายงานการเงินตลอดโครงการ	85

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชสามารถเกิดได้หลายระดับ และมีความแตกต่างกันตามชนิดและระยะการเจริญของพืช การศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในส่วนต่างๆและในระยะต่างๆของการเจริญของพืชจึงมีความจำเป็นและเป็นข้อมูลสำคัญในการนำมาใช้ประยุกต์เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติต่างๆของพืชได้ การแสดงออกของยีนในเซลล์มีชีวิตชั้นสูงเริ่มต้นจากการปะทะสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับดีเอ็นเอแล้วจึงเกิด transcription และ translation เป็นโปรตีนที่จำเพาะ กลไกสำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนเริ่มต้น ได้แก่ ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase, DNA MTase) ทำการเคลื่อนย้ายหมู่เมทิลไปต่อยังเบสจำเพาะบนสายของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ แล้วส่งผลให้คุณสมบัติเดิมของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป โดยอาจมีผลกระทบสำคัญยิ่งต่อความมีชีวิต ทั้งในแง่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน และการเป็น hot-spot สำหรับการเกิด mutagenesis

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2498 ได้มีการค้นพบ methylated base โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 5-methylcytosine (5-mC) ในดีเอ็นเอของแบคทีเรีย พืช สัตว์ รวมทั้งคนด้วย ในแบคทีเรียระบบเมทิลเลชันเป็นกลไกการป้องกัน restriction endonuclease ย่อยดีเอ็นเอของตัวเอง ส่วนในเซลล์สัตว์ได้มีรายงานมากมายเกี่ยวกับบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในการควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ได้มีการค้นพบว่าระดับเมทิลเลชันของดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับสภาวะมะเร็งของเซลล์ รวมทั้งความชราที่คือเซลล์เข้ามาสู่เซลล์ อีกทั้งระบบเมทิลเลชันอาจมีความสัมพันธ์กับการกำหนดเพศของทารก และเกี่ยวข้องกับขั้นตอนในกระบวนการวิวัฒนาการด้วย การค้นพบนี้ก่อให้เกิดการตื่นตัวสนใจศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันใน organism อื่นๆมากขึ้น แต่สำหรับในพืชเป็นที่น่าแปลกใจที่แม้มีการพบว่าระดับของ 5-mC ในจีโนมของพืชมีสูงมากถึง 30% ของ cytosine ทั้งหมด ซึ่งมากกว่าแบคทีเรีย (มี 5-mC ประมาณ 1%) และเซลล์สัตว์ (มี 5-mC ประมาณ 2-6%) แต่กลับมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืชน้อยมาก จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2531 เป็นต้นมา ผู้วิจัยและคณะเป็น

กลุ่มแรกที่รายงานการค้นพบบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในนิวเคลียสและออร์กาเนลของพืชชั้นสูง ได้แก่ เมเปิ้ล มะเขือเทศ พริกหวาน และข้าวโพด จากการศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง ต่อจากนั้นได้มีรายงานจากนักวิจัยสาขาพืชกลุ่มอื่นเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของดีเอ็นเอเมทิลเลชันเพิ่มขึ้น ผลงานส่วนใหญ่สอดคล้องกันในแง่บทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในการกดการแสดงออกของยีนที่ไม่จำเป็นในพืช สำหรับงานวิจัยที่ผู้วิจัยและคณะได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ระหว่างปีพ.ศ. 2535-2537 เป็นการศึกษาความรู้พื้นฐานของบทบาทของระบบเมทิลเลชันของดีเอ็นเอในพืช และการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของสารเปลี่ยนแปลงระดับ methylated base จำเพาะในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเน้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทย และขณะนี้กำลังติดตามผลความเสถียรของลักษณะดังกล่าวในรุ่นลูกต่อไป

จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืชอย่างต่อเนื่องมานานกว่า 8 ปี ทำให้ผู้วิจัยเห็นความสำคัญและสนใจงานวิจัยพื้นฐานระดับเอนไซม์ในกระบวนการเกิดเมทิลเลชันของดีเอ็นเอในพืช เมื่อพิจารณาในแง่ของข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์ในระบบเมทิลเลชันของดีเอ็นเอในเซลล์ตัว ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้อย่างจริงจัง เนื่องจากมีผู้พบว่าเอนไซม์นี้มีความสำคัญในการควบคุมรูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันและสัมพันธ์กับการเกิดเซลล์มะเร็ง แต่สำหรับในพืชกลับพบว่ามียีนเกี่ยวกับเอนไซม์ในระบบเมทิลเลชันของดีเอ็นเอเอนน้อยมาก อีกทั้งยังมีความขัดแย้งกันในข้อมูลจากต่างกลุ่มนักวิจัย สำหรับโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในข้าวไทย (*Oryza sativa* ssp. *Indica*) โดยจะทำการสกัดและแยกเอนไซม์ DNA MTase ให้บริสุทธิ์ เพื่อนำมาศึกษาชนิดและคุณสมบัติจำเพาะต่างๆของเอนไซม์ และจะทำการแยกยีน DNA MTase ดังกล่าวมาวิเคราะห์ลำดับเบส ศึกษาการแสดงออก และการควบคุมด้วย คาดว่าข้อมูลพื้นฐานต่างๆ เหล่านี้จะเป็นประโยชน์ทำให้สามารถเข้าใจกลไกการควบคุมและการทำงานของเอนไซม์ตลอดกระบวนการ development ในระยะต่างๆ ของพืชได้มากและดียิ่งขึ้น เอนไซม์และยีนที่แยกได้จะมีประโยชน์ในการศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืชได้อย่างลึกซึ้งขึ้น และนอกจากนี้ในปัจจุบันมีรายงานว่ากลไกของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

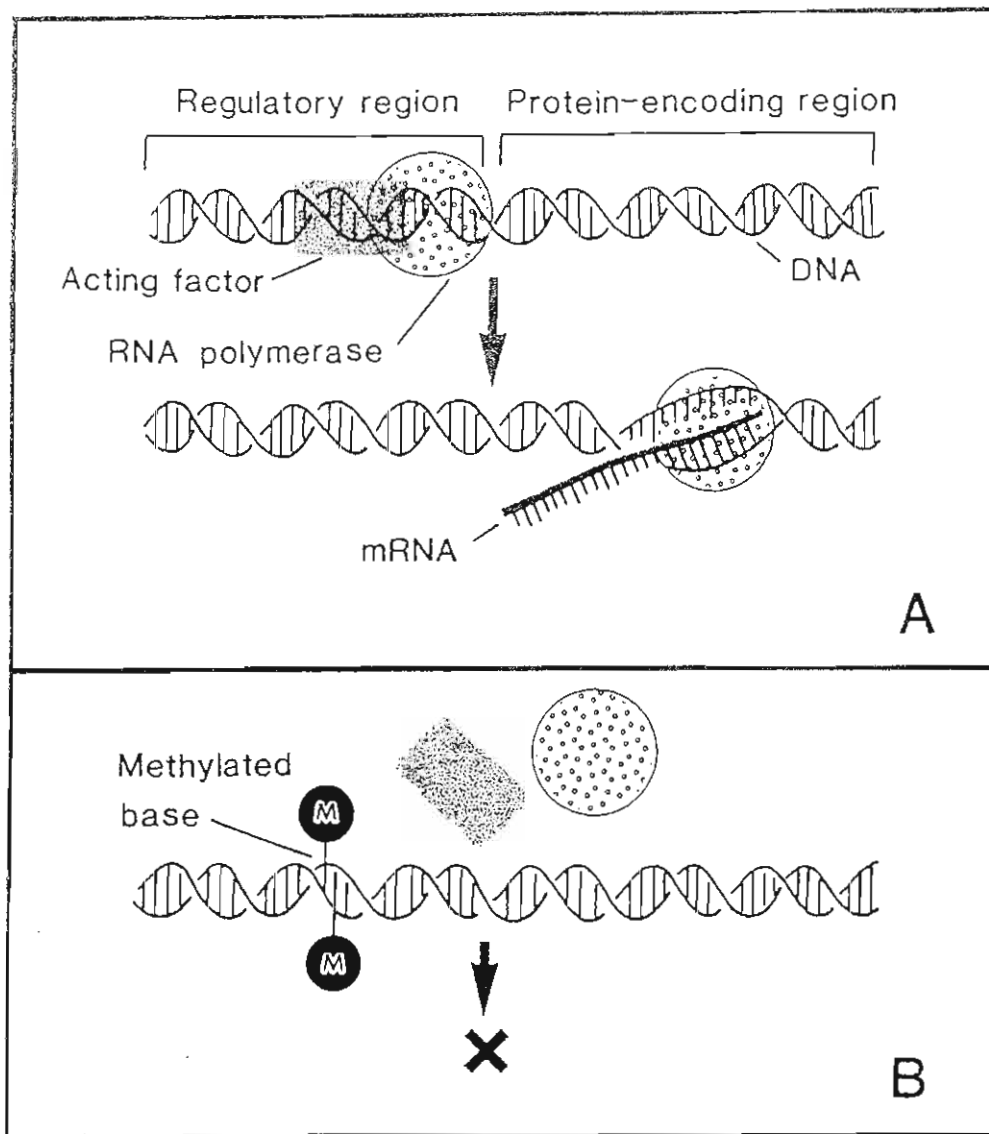
มีผลกระทบอย่างมากต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีน ทำให้นักวิทยาศาสตร์ส่วนหนึ่งเริ่มให้ความสนใจศึกษาเรื่องนี้อย่างจริงจัง โดยเฉพาะในส่วนวิจัยของบริษัทผลิตพืชพันธุ์ใหม่ๆ ใน USA และ Europe ได้เร่งศึกษาปัญหาความเสถียรของ transgene ใน transgenic plant ที่สร้างขึ้น จึงคาดว่าข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการศึกษาบทบาทและการควบคุมดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืช จะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในพืชได้ ดังนั้นการทำงานวิจัยเรื่องนี้อย่างต่อเนื่องในประเทศไทย จึงมีความสำคัญไม่เฉพาะแต่การเข้าใจถึงความรู้พื้นฐานของกลไกในระบบเมทิลเลชันของดีเอ็นเอในพืชเท่านั้น แต่ยังหมายถึงโอกาสที่จะนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายในอนาคตอันใกล้ และสามารถเข้าไปมีส่วนช่วยพัฒนาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนที่กำลังเริ่มเป็นที่สนใจมากในวงการพันธุวิศวกรรมของพืช

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) เป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนเริ่มต้นได้ เกิดจากการที่เอนไซม์ DNA methyltransferase (DNA MTase) ทำการเคลื่อนย้ายหมู่เมทิล(methyl) จาก S-Adenosyl methionine (SAM) ซึ่งเป็น methyl donor ไปต่อยังเบสบนสายของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะแล้วส่งผลให้คุณสมบัติเดิมของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปโดยอาจมีผลกระทบสำคัญยิ่งต่อความมีชีวิต ทั้งในแง่การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนและการเป็น hot-spot สำหรับ mutagenesis โดยที่มีรายงานว่า 5-methylcytosine (5-mC) มีอัตราสูงในการเกิด spontaneous deamination เป็น uracil และ thymine (1)

ได้มีการค้นพบ methylated base โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 5-mC ในดีเอ็นเอของแบคทีเรีย พืช สัตว์ รวมทั้งคนด้วยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2498 ในแบคทีเรียระบบเมทิลเลชันเป็นกลไกการป้องกัน restriction endonuclease ย่อยดีเอ็นเอของตัวเอง ส่วนในเซลล์สัตว์ ได้มีรายงานมากมายเกี่ยวกับบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในการควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ได้มีการค้นพบว่าระดับเมทิลเลชันของดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับสภาวะมะเร็งของเซลล์ รวมทั้งความชราที่เกือบคลานเข้ามาสู่เซลล์ อีกทั้งระบบเมทิลเลชันอาจมีความสัมพันธ์กับการกำหนดเพศของทารกและเกี่ยวข้องกับขั้นตอนในกระบวนการวิวัฒนาการด้วย การค้นพบนี้ก่อให้เกิดการตื่นตัวสนใจศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันมากขึ้น (2,3) '

สำหรับในพืชเป็นที่น่าสนใจที่แม้มีการพบว่าระดับของ 5-mC ในจีโนมของพืชมีสูงถึง 30% ของ cytosine ทั้งหมด ซึ่งมากกว่าแบคทีเรีย (มี 5-mC ประมาณ 1%) และเซลล์สัตว์ (มี 5-mC ประมาณ 2-6%) แต่กลับมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืชน้อยมาก จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2531 ผู้วิจัยและคณะ (4-8) เป็นกลุ่มแรกที่รายงานการค้นพบบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในนิวเคลียสและออร์แกเนลของพืชชั้นสูง จากการศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง โดยใช้เนื้อเยื่อเฉพาะเลี้ยงของเมเปิ้ล(Sycamore, *Acer pseudoplatanus*



Regulation of transcription of a gene by DNA methylation

- A) Transcription of a gene can be initiated when an acting factor (protein or proteins), recognizing a specific base sequence in the gene's regulatory region, binds to the DNA. Such binding enables an enzyme known as RNA polymerase to transcribe the protein-encoding region of DNA into mRNA. The mRNA is later translated into the specified protein.
- B) Methylation of DNA, shown in black circles, can inactivate a gene by preventing the binding of an essential activating protein. Alternatively methylation might facilitate binding of an inhibitory protein.

L.) เป็นโมเดลเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อที่ไม่มีการสังเคราะห์แสง(สีขาว)กับเนื้อเยื่อที่สามารถทำการสังเคราะห์แสง(สีเขียว) พบว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นมีความเกี่ยวข้องในการกดดันการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสงในเนื้อเยื่อสีขาว ต่อจากนั้น ผู้วิจัยและคณะ (9-10) ยังได้ขยายสมมติฐานเพื่อพิสูจน์ว่ากลไกเดียวกันนี้เกิดในพืชทั่วไปด้วยหรือไม่ โดยตรวจสอบบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในผลมะเขือเทศระหว่างการพัฒนาสุก และพบว่าระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นเพิ่มสูงขึ้นในช่วงที่มีการสุก อีกทั้งปรากฏการณ์เดียวกันนี้ยังพบใน Bell pepper อีกด้วย ในปี พ.ศ. 2532 ผู้วิจัยและคณะ (11) ได้รายงานปรากฏการณ์ที่แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นเกี่ยวข้องกับกระบวนการ differentiation ของเซลล์สองชนิด (mesophyll และ bundle sheath) ในข้าวโพด ต่อจากนั้นได้มีรายงานจากนักวิจัยสาขาพืชกลุ่มอื่นๆเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นเพิ่มขึ้น ผลงานส่วนใหญ่สอดคล้องกันในแง่บทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในการกดดันการแสดงออกของยีนที่ไม่จำเป็น นอกจากนั้นได้มีรายงานเกี่ยวกับบทบาทในการควบคุมการทำงานของtransposon รวมทั้งเกี่ยวกับการกดดันการแสดงออกของยีนหลังจากการถ่ายยีนผ่าน *Agrobacterium* เข้าเซลล์พืชอีกด้วย (12,13)

ผู้วิจัยและคณะมีความสนใจการศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นโดยคิดวิธีการเปลี่ยนแปลงระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น แล้วศึกษาผลกระทบในระบบที่ต้องการวิเคราะห์ จากการวิจัยเบื้องต้นในปีพ.ศ. 2533 โดยการเปลี่ยนแปลงระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นโดยใช้สารเคมีบางชนิด ผู้วิจัยพบว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในพืช (14) ซึ่งคาดว่าอาจนำมาใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน สำหรับงานวิจัยที่ผู้วิจัยและคณะได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ระหว่างปีพ.ศ. 2535 - 2537 เป็นการศึกษาความรู้พื้นฐานของบทบาทรวมไปถึงการควบคุมระบบเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอในพืช และการประยุกต์ใช้ประโยชน์โดยเน้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทย โดยทำการจัดตั้งระบบตรวจสอบระดับของ 5-mC และ 6-methyladenine (6-mA) ในส่วนต่าง ๆ ของข้าวที่ได้จากการปลูกในสภาวะต่าง ๆ และเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ศึกษาพบการกระจายตัวที่แตกต่างกัน ของเบสที่ถูกเมทิลเลชั่นบนจีโนมของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษา

ความจำเพาะของสาร 16 ชนิดที่สามารถนำไปใช้เปลี่ยนระดับของเบสจำเพาะที่ถูกเมทิลเลชั่นบนดีเอ็นเอของพืชทดลองได้ และพบความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนจำเพาะด้วย เมื่อเลือกสาร 2 ชนิดไปประยุกต์ใช้ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของพืชในหลอดทดลอง พบว่าสารดังกล่าวชักนำให้ข้าว ยาสูบ และ *Arabidopsis* มีลักษณะเปลี่ยนไปอย่างน่าสนใจ เช่น ลักษณะต้นเตี้ย หรือหลายยอด หรือโตเร็ว หรือทนเค็มได้ตามสภาวะที่คัดเลือก จึงทำการทดสอบความเป็นไปได้ของการนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้กับพืชเศรษฐกิจโดยเน้นที่การเพิ่มระดับความทนเค็มของข้าว และขณะนี้กำลังติดตามผลความเสถียรของลักษณะดังกล่าวในรุ่นลูกต่อไป

จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในพืชอย่างต่อเนื่องมานานกว่า 8 ปี ทำให้ผู้วิจัยเห็นความสำคัญและสนใจงานวิจัยพื้นฐานระดับเอนไซม์ในกระบวนการเกิดเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอในพืช เมื่อพิจารณาในแง่ของข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์ในระบบเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอ ในเซลล์ตัวจะพบว่าปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้อย่างจริงจัง เนื่องจากมีผู้พบว่าเอนไซม์นี้มีความสำคัญในการควบคุมรูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นและสัมพันธ์กับการเกิดเซลล์มะเร็ง โดยในเซลล์ตัวเอนไซม์ DNA MTase นี้ มี activity 2 แบบคือ maintenance methylation (เพื่อคงรูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นและถ่ายทอดสู่เซลล์ใหม่) และ De novo methylation (เพื่อเปลี่ยนรูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นและเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเพื่อตอบสนองต่อสภาวะต่าง ๆ ทั้งภายในและนอกเซลล์) (15) แต่สำหรับในพืชกลับมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ในระบบเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอน้อยมาก ผู้วิจัยคาดว่า หากมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์นี้ในแง่ของการทำงานและการควบคุมจะทำให้เราสามารถเข้าใจสาเหตุและสามารถอธิบายปรากฏการณ์ต่างๆของพืชได้ดีขึ้น พืชเป็นสิ่งมีชีวิตที่เคลื่อนที่ไม่ได้จึงจำเป็นต้องมีกลไกบางอย่างในการรับสัญญาณสิ่งเร้าจากภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป เพื่อตอบสนองโดยควบคุมการแสดงออกของยีนเป็นโปรตีนจำเป็นเพื่อความอยู่รอด หากเราสามารถเข้าใจกลไกเหล่านี้ตลอดกระบวนการ development ของพืชจะทำให้สามารถปรับปรุงคุณสมบัติต่างๆของพืชได้เต็มศักยภาพที่พืชสามารถให้กับมนุษย์ได้ดียิ่งขึ้น ในปีพ.ศ. 2512 มีรายงานการแยกและศึกษาเอนไซม์ DNA MTase ในพืชชนิดแรก คือ ถั่ว (16) แต่พบว่ามี activity ต่ำมาก ในปีพ.ศ. 2523 ได้มีรายงานการศึกษา

เอนไซม์นี้ใน *Chlamydomonas* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวสีเขียว เป็น lower eukaryote ที่มีระดับ 5-mC ต่ำ (17, 18) จากนั้นในปีพ.ศ. 2530 และ 2534 ได้มีรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติที่ขัดแย้งกันของเอนไซม์นี้จาก ข้าวสาลี และ ถั่ว (19, 20) ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และ ถั่ว ตามลำดับ ส่วนในแง่ของข้อมูลระดับยีน ในปี พ.ศ. 2538 ซึ่งผู้วิจัยเริ่มดำเนินโครงการนี้ มีเพียงรายงานการแยกและศึกษายีนจาก *Arabidopsis* sp. ของนักวิจัยสองกลุ่มเท่านั้นซึ่งก็ยังไม่มีย่อสรุปที่แน่ชัด (21, 22) ต่อมา มีรายงานการแยกและศึกษายีนนี้จาก ถั่ว มะเขือเทศ แครอท และข้าวโพด (23, 24, 25) ดังที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วว่า ผู้วิจัยศึกษาพบการกระจายตัวที่แตกต่างกัน ของเบสที่ถูกเมทิลเลชันบนจีโนมของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ ดังนั้นการศึกษาข้อมูลระดับเอนไซม์และยีนของ DNA MTase ในต้นข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจึงน่าสนใจมาก อีกทั้งกลุ่มนักวิจัยที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ในระบบเมทิลเลชันของดีเอ็นเอในต้นข้าวก็ยังไม่ มี ในกลางปี พ.ศ. 2537 ผู้วิจัยจึงได้เริ่มการศึกษาข้อมูลเบื้องต้น เกี่ยวกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันในข้าวและพบว่าในยอดข้าวมี activity ของเอนไซม์นี้ค่อนข้างสูง สำหรับงานวิจัยในโครงการนี้ จะทำการสกัดและแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เพื่อนำมาศึกษาชนิดและคุณสมบัติจำเพาะต่างๆ นอกจากข้อมูลพื้นฐานของเอนไซม์แล้ว คาดว่าอาจจะสามารถใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ในการทำ *in vitro* methylation ของยีนพืช เพื่อการศึกษาที่จำเพาะมากขึ้นได้ เนื่องจากเอนไซม์จากแบคทีเรียหรือเซลล์สัตว์อาจมีความจำเพาะในการเมทิลเลชันในรูปแบบที่แตกต่างจากพืช นอกจากนี้จะทำการแยกยีนของเอนไซม์ดังกล่าวมาศึกษาการแสดงออกและการควบคุม รวมถึงอาจจะสามารถใช้ในการศึกษาผลของ over or suppression of expression ในขั้นตอน development ของพืชด้วย

ในปัจจุบันพบว่ากลไกของดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีผลกระทบอย่างมากต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีน (26, 27) ทำให้นักวิทยาศาสตร์ส่วนหนึ่งเริ่มให้ความสนใจศึกษาเรื่องนี้อย่างจริงจัง โดยเฉพาะในส่วนวิจัยของบริษัทผลิตพืชพันธุ์ใหม่ๆ ใน USA และ Europe ได้เร่งศึกษาปัญหาความเสถียรของ transgene ใน transgenic plant ที่สร้างขึ้น นอกจากนี้ในกระบวนการถ่ายยีนของพืชและการขยายพันธุ์พืชจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งพืชบางชนิดจะมีปัญหาในการ regeneration เป็นต้นใหม่ ผู้วิจัยสนใจปัญหาของ

embryogenesis และ somaclonal variation ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น ซึ่งหากใช้สารเปลี่ยนระดับเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมในขั้นตอนที่พอเหมาะกับการพัฒนาของพืช คาดว่าอาจแก้ปัญหานี้ได้ ผู้วิจัยยังสนใจศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีน โดยเฉพาะในแง่ของความเสถียรของการคงอยู่และการแสดงออกของยีน ซึ่งอาจมีผลกระทบจากบริเวณจำเพาะของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นได้ คาดว่าข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการศึกษาบทบาทและการควบคุมดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในพืชในระดับเอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการใช้สารเปลี่ยนระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น จะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนในพืชได้ ดังนั้นการทำงานวิจัยเรื่องนี้อย่างต่อเนื่องในประเทศไทย จึงมีความสำคัญไม่เฉพาะแต่การเข้าใจถึงความรู้พื้นฐานของกลไกในระบบเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอในพืชเท่านั้น แต่ยังหมายถึงโอกาสที่จะนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายในอนาคตอันใกล้ และสามารถเข้าไปมีส่วนช่วยพัฒนาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนที่กำลังเริ่มเป็นที่สนใจมากในวงการพันธุวิศวกรรมของพืช

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อทำการสกัดและแยกเอนไซม์ DNA MTase จากต้นข้าวให้บริสุทธิ์
- 2) เพื่อนำเอนไซม์ DNA MTase มาศึกษาชนิดและคุณสมบัติจำเพาะต่างๆ
- 3) เพื่อทำการแยกยีน DNA MTase มาวิเคราะห์ลำดับเบส
- 4) เพื่อศึกษาการแสดงออก และการควบคุมของยีน DNA MTase

ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเอนไซม์และยีนดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA MTase) ในกระบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในข้าวไทย การวิจัยตลอดโครงการนี้จะครอบคลุมวัตถุประสงค์ทั้ง 4 ข้อดังกล่าวมาแล้ว การดำเนินการจะใช้พืชทดลองคือ ข้าว (*Oryza sativa ssp. Indica*) โดยเน้นเรื่องการสกัดเอนไซม์ DNA MTase ที่บริสุทธิ์ แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ จากนั้นทำการโคลนยีน DNA MTase เพื่อนำมาศึกษาลำดับเบส การแสดงออก และการควบคุมของยีน

การดำเนินงานวิจัยและผลงานวิจัย

พืชทดลอง : ข้าว (*Oryza sativa ssp. Indica* cv. RD23)

เมล็ดพันธุ์จาก ศูนย์วิจัยข้าว ปทุมธานี

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 หัวข้อหลัก ดังต่อไปนี้ :

- 1) การสกัดแยกเอนไซม์ DNA MTase จากต้นข้าว
- 2) การศึกษาชนิดและคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ DNA MTase
- 3) การแยกยีน DNA MTase และ วิเคราะห์ลำดับเบส
- 4) การศึกษาการแสดงออกของยีน DNA MTase ในข้าว

1) การสกัดแยกเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA MTase) จากต้นข้าว

1.1) การพัฒนาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบ activity ของ DNA MTase จากต้นข้าว

เอนไซม์ DNA MTase ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายหมู่ methyl จาก methyl donor (S-adenosyl methionine, SAM) ไปยังตำแหน่งจำเพาะของเบสจำเพาะบนสายดีเอ็นเอ หลักการในการตรวจวัด activity ของเอนไซม์นี้คือ การใช้ methyl-³H-SAM เป็น methyl donor และ purified DNA เป็น DNA substrate เมื่อทำปฏิกิริยาแล้ว ทำการตกตะกอน ³H-methylated DNA ออกมาวัด ³H-methyl group ที่ incorporate เข้าไปที่เบสบน DNA substrate ก็จะสามารถคำนวณเป็นค่า activity unit ของเอนไซม์ได้ สำหรับโครงการนี้ใช้วิธีการวัด activity ของเอนไซม์ DNA MTase โดยปรับปรุงจากวิธีที่รายงานโดย Theiss G. และคณะ (19)

ในการวัด activity ของเอนไซม์ DNA MTase โดยวิธีทั่วไปเท่าที่มีรายงานจะพบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการวัด activity ของเอนไซม์นี้ในเซลล์สัตว์ ซึ่งคาดว่าอาจไม่เหมาะสมกับเอนไซม์ในพืช จึงได้ทำการศึกษาพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบ activity ของ DNA MTase ในยอดอ่อนของข้าว โดยปรับปรุงขั้นตอนและศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. Optimal pH of assay buffer (Table 1)
2. DNA substrate (Table 2)
3. Optimal temperature (Table 3)
4. Incubation time (Figure 1)

จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบ activity ของ DNA MTase จากยอดอ่อนของข้าวอายุ 10 วัน คือ ทำการตรวจสอบ activity ใน assay buffer pH 7.6 ใช้ DNA ที่สกัดจากยอดอ่อนของข้าว อายุ 10 วันเป็น DNA substrate โดยให้ทำปฏิกิริยาที่ 25°C เป็นเวลา 60 นาที

Table 1 Effect of pH of assay buffer on rice DNA MTase activity^a

Assay buffer	DNA MTase specific activity (units/mg protein) ^b
pH 7.0	1.24
pH 7.2	2.38
pH 7.4	3.10
pH 7.6	7.54
pH 7.9	5.30

^aThe crude DNA MTase was extracted from 10-day-old rice shoot and further assay under standard assay condition in the assay buffer at various pH.

Table 2 Effect of DNA substrate on rice DNA MTase activity^a

DNA substrate	DNA MTase specific activity (units/mg protein) ^b
Salmon sperm DNA	3.04
Dry embryo rice DNA	1.88
5-day-old shoot rice DNA	4.85
10-day-old shoot rice DNA	7.54
Mature leaf rice DNA	3.64

^aThe crude DNA MTase was extracted from 10-day-old shoot rice and further assay under standard assay condition using various DNA substrates.

Table 3 Effect of assay temperature on rice DNA MTase activity^a

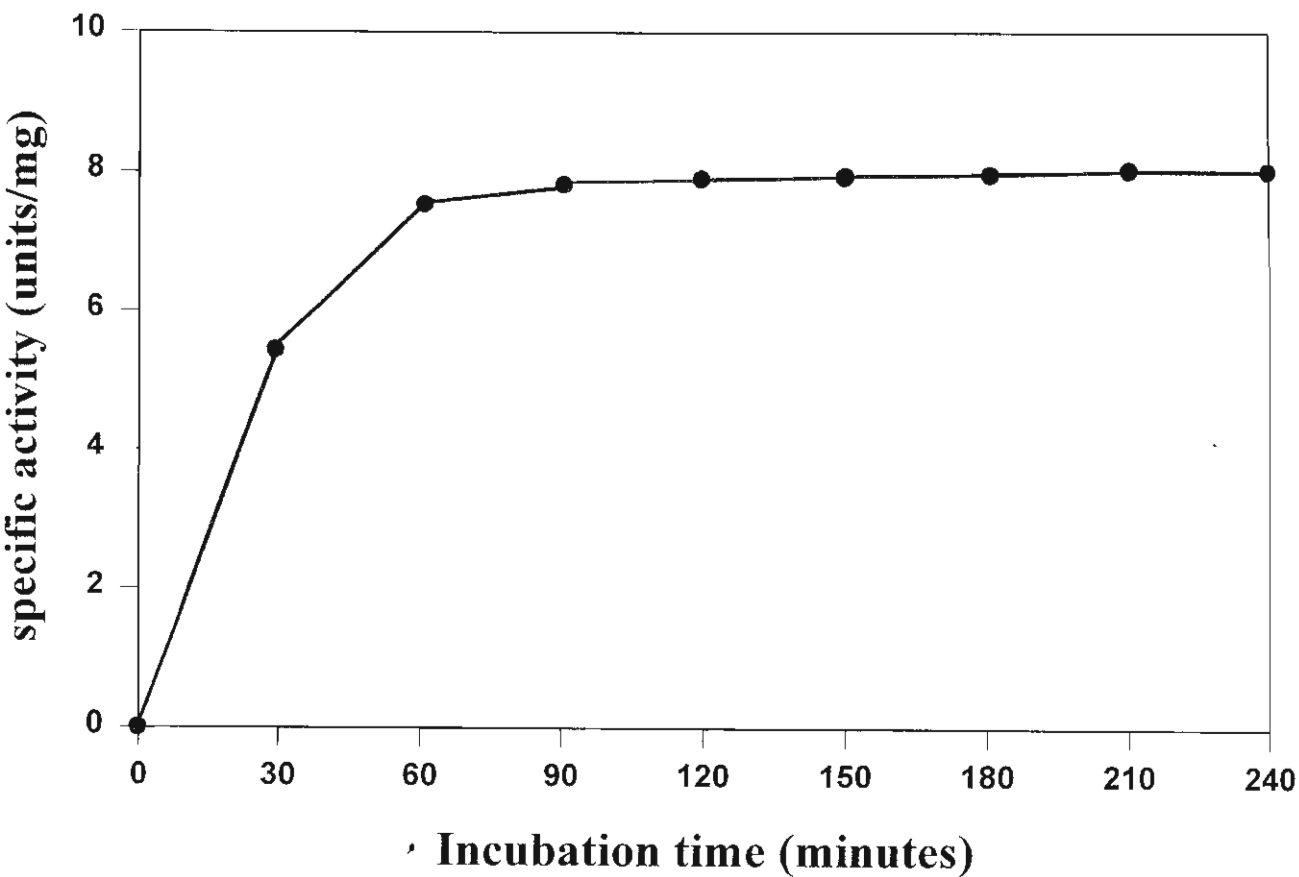
Temperature (°C)	DNA MTase specific activity (units/mg protein) ^b
20	3.24
25	7.54
30	4.62
37	3.18

^aThe crude DNA MTase was extracted from 10-day-old shoot rice and further assay under standard assay condition at the different temperature.

^bOne unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

Figure 1 Time dependence of rice DNA MTase activity at 25°C.

The crude DNA MTase was extracted from 10-day-old rice shoot and further assay under standard assay condition. The reaction was stop at each time interval. One unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.



1.2) การตรวจสอบ activity ของ DNA MTase ในต้นข้าวที่สภาวะต่างๆ

ได้ทำการตรวจสอบ activity ของ DNA MTase โดยใช้วิธีที่พัฒนาจากข้อ 1.1 (ในการทดลองนี้ใช้ Salmon sperm DNA เป็น DNA substrate เพื่อ minimize ผลของ substrate specificity) โดยเตรียม crude extract จากส่วนต่างๆ ของข้าวที่เจริญเติบโตในสภาวะต่างๆ และอายุต่างๆ กัน ผลการทดลองที่แสดงใน Table 4 และ Figure 2 ซึ่งให้เห็นว่ายอดอ่อนของข้าว Hydroponically grown seedling ที่มีอายุ 10 วัน มี specific activity ของ DNA MTase สูงสุด จึงเลือกใช้เป็น material ในการทดลองสกัดแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

1.3) การศึกษาาระดับของ methylated cytosine ในต้นข้าวที่สภาวะต่างๆ

ได้ทำการวัดระดับ total 5-methylcytosine (mC) ใน purified total DNA ของ sample ต่างๆ ที่ได้ตรวจสอบ activity ของ DNA MTase ในข้อ 1.2 โดยใช้ Reversed Phase-HPLC ผลการศึกษาที่แสดงใน Table 5 ซึ่งให้เห็นว่า cell culture มีระดับ methylated cytosine สูงกว่า differentiated tissues, ในระหว่างข้าวออกระดับ methylated cytosine ลดลงอย่างรวดเร็วถึงระดับหนึ่งที่อายุประมาณ 3 วัน จากนั้นจะค่อนข้างไม่เปลี่ยนแปลง, และ Non-photosynthetic tissue เช่น ราก และ etiolated seedling จะมีระดับ methylated cytosine สูงกว่า photosynthetic tissues

เมื่อเปรียบเทียบ Table 4 และ Table 5 จะพบว่าระดับของ methylated cytosine ในแต่ละ tissue ไม่ค่อยมีความสัมพันธ์กับ specific activity ของ DNA MTase โดยตรง คล้ายกับเป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละ tissue และสังเกตพบว่าใน tissue ที่มีระดับ methylated cytosine ค่อนข้างคงที่ จะพบว่า activity ของ DNA MTase ก็ค่อนข้างคงที่ด้วย

สิ่งที่น่าสนใจมาจากการเปรียบเทียบ Table 4 และ Table 5 คือข้อมูลชี้ให้เห็นว่าในขณะที่เมล็ดแห้งของข้าวถูกแช่น้ำให้เริ่มงอก ระดับของ methylated cytosine ลดลงอย่าง

Table 4 Variation in rice DNA MTase activity with different culture system, location and age. The values presented are the average of ten independent analyses^a.

Plant material			DNA MTase specific activity (units/mg protein) ^b	
			Light grown	Dark grown
Callus		5 d	-	2.25
		10 d	-	2.46
		15 d	-	2.82
Suspension cultured cells		5 d	-	2.76
		10 d	-	2.42
		15 d	-	2.40
<i>In vitro</i> seedling	leaf	5 d	2.54	-
		10 d	2.38	-
		15 d	2.35	-
	root	5 d	2.02	-
		10 d	2.05	-
		15 d	2.05	-
		Dry embryo		
Imbibed embryo	1 d	1.04	-	
	2 d	2.22	-	
	3 d	2.32	-	
Hydroponically grown seedling	leaf	5 d	2.42	2.28
		10 d	3.06	2.34
		15 d	2.80	2.39
	root	5 d	1.98	1.92
		10 d	1.99	1.95
		15 d	1.90	1.94
Soil grown seedling	leaf	5 d	2.48	-
		10 d	2.56	-
		15 d	2.60	-

^aThe crude DNA MTase was extracted from various tissues of rice and further assay under standard assay condition using Salmon sperm DNA as DNA substrate.

^bOne unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

Figure 2 Variation of rice DNA MTase activity in shoots of hydroponically grown rice seedling with different age.

The crude DNA MTase was extracted from different age of shoots and further assay under standard assay condition using Salmon sperm DNA as DNA substrate. The values presented are the average of three independent analyses. One unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

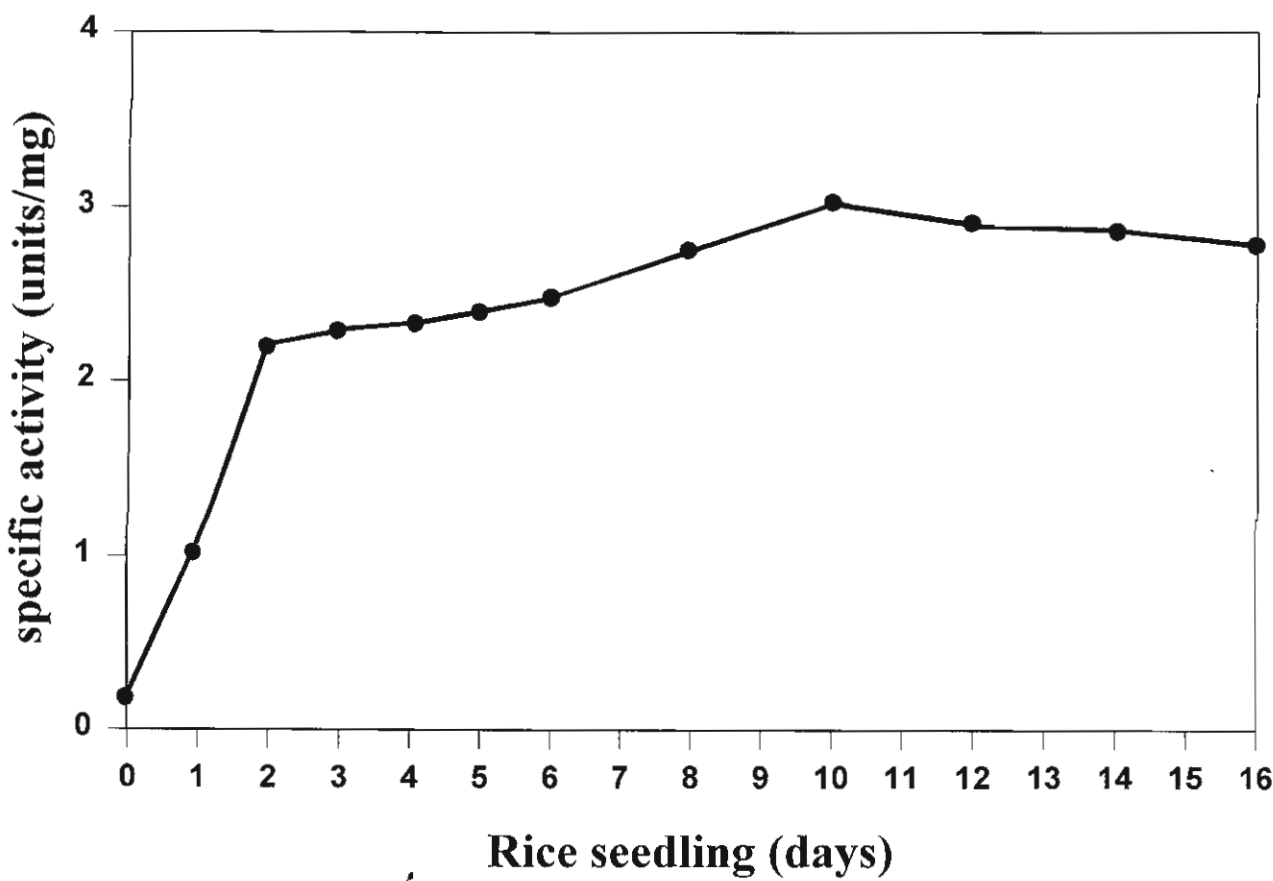


Table 5 Specific levels of 5-methylcytosine (mC) in purified total DNA from various tissues of rice. The values presented are the average of ten independent analyses.

Plant material ^a			mC X 100 / mC + C (%)	
			Light grown	Dark grown
Callus		5 d	-	26.01
		10 d	-	26.08
		15 d	-	26.11
Suspension cultured cells		5 d	-	21.10
		10 d	-	21.15
		15 d	-	21.08
<i>In vitro</i> seedling	leaf	5 d	15.03	-
		10 d	15.10	-
		15 d	15.11	-
	root	5 d	18.94	-
		10 d	18.96	-
		15 d	18.97	-
Dry embryo			29.10	-
Imbibed embryo		1 d	20.09	-
		2 d	17.10	-
		3 d	15.08	-
Hydroponically grown seedling	leaf	5 d	15.03	16.15
		10 d	15.02	17.02
		15 d	15.06	17.03
	root	5 d	19.01	19.12
		10 d	19.03	19.09
		15 d	19.07	19.10
Soil grown seedling	leaf	5 d	15.09	-
		10 d	15.01	-
		15 d	15.04	-

^aThe purified total DNA from various tissues of rice were prepared and subsequently analyzed for mC levels.

รวดเร็วจนค่อนข้างคงที่ตั้งแต่อายุ 3 วัน แต่ในทางตรงข้าม activity ของ DNA MTase กลับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2 วันแรก แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่อายุ 10 วัน ทำให้ผู้วิจัยสนใจในกระบวนการลดระดับ methylated cytosine ซึ่งเรียกว่า De-methylation คาดว่าอาจมี activity ของ enzyme demethylase ในระบบนี้ ซึ่งต้องพัฒนาวิธีการตรวจวัด activity ต่อไป อย่างไรก็ตาม ในโครงการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นศึกษา enzyme DNA methyltransferase เป็นหลักก่อน

1.4) การศึกษา location ของ DNA MTase ใน compartment ต่างๆ ของเซลล์ข้าว

ได้ทำการแยก nuclei, plastid และ mitochondria จากยอดอ่อนและรากข้าวที่ปลูกแบบ hydroponic ในที่มีมืดและสว่าง อายุ 10 วัน แล้วเตรียม extract ของ nuclei, plastid และ mitochondrial fraction เพื่อนำไปตรวจสอบ activity ของ DNA MTase เปรียบเทียบกับ homogenate โดยใช้ nuclear DNA จากยอดอ่อนข้าวอายุ 10 วันเป็น DNA substrate ผลการทดลองใน Table 6 แสดงว่า DNA MTase ที่มี specific activity สูงสุดอยู่ใน nuclei fraction ของยอดอ่อนที่เจริญในที่สว่าง โดยพบ activity เล็กน้อยใน plastid fraction และไม่พบเลยใน mitochondrial fraction

เมื่อทดลองใช้ DNA substrate ให้ตรงกับ source of enzyme โดยใช้ chloroplast DNA เป็น DNA substrate สำหรับตรวจสอบ activity ของ DNA MTase ใน plastid fraction (ข้อมูลในวงเล็บ b, Table 6) พบว่า plastid fraction ใน non-photosynthetic tissues เช่น ราก และ etiolated shoot แสดง specific activity ต่อ chloroplast DNA ค่อนข้างสูงอย่างน่าสนใจ ในขณะที่ chloroplast fraction จาก photosynthetic tissues กลับมี activity ต่ำ ส่วนใน mitochondria แม้จะใช้ mitochondrial DNA เป็น DNA substrate ในการตรวจสอบ activity ของ DNA MTase ใน mitochondrial fraction (ข้อมูลในวงเล็บ c, Table 6) ก็พบว่าไม่มี activity ของ DNA MTase ใน mitochondrial fraction แต่อย่างใด

Table 6 Location of DNA MTase activity in various organelles of rice cells

Source of enzyme ^a		DNA MTase specific activity (units/mg protein) ^d	
		Light grown	Dark grown
Homogenate	shoot	7.58	2.84
	root	2.99	2.85
Nuclei	shoot	86.12	23.63
	root	23.68	23.74
Plastid	shoot	2.26	2.49
		(2.42) ^b	(68.79) ^b
	root	2.86	2.89
		(68.82) ^b	(68.86) ^b
Mitochondria	shoot	0	0
		(0) ^c	(0) ^c
	root	0	0
		(0) ^c	(0) ^c

^aRice seedling were grown by hydroponic technique for 10 days , either under continuous light or dark,before harvesting. The nuclei, plastid and mitochondrial fractions were prepared and subsequently assayed for DNA MTase activity under standard assay condition using nuclear DNA from 10-day-old shoot rice as DNA substrate. The values presented are the average of three independent analyses.

^bThe assay was done using chloroplast DNA, prepared from light grown rice seedlings, as DNA substrate.

^cThe assay was done using mitochondrial DNA, prepared from light grown rice seedlings, as DNA substrate.

^dOne unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

จากการพิจารณาระดับของ methylated cytosine ใน DNA จาก nuclei, plastid และ mitochondria ที่แสดงผลใน Table 7 พบว่า plastid DNA ใน non-photosynthetic tissues ซึ่งมี specific activity ของ DNA MTase ต่อ chloroplast DNA สูงนั้น มีระดับของ methylated cytosine สูงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบ methylated cytosine ใน DNA จาก plastid ของ non-photosynthetic tissues ในพืชอื่นด้วย (5, 8, 10, 11) ในขณะที่ chloroplast fraction ซึ่งมี DNA MTase activity ต่ำมาก พบว่าใน chloroplast DNA ไม่มี methylated cytosine ถูกตรวจพบเลย ดังนั้น chloroplast DNA จึงเหมาะสำหรับใช้เป็น DNA substrate ของเอนไซม์ใน plastid fraction นอกจากนี้การที่ไม่พบ methylated cytosine ใน mitochondrial DNA ก็สอดคล้องการไม่พบ activity ของ DNA MTase ใน fraction นี้ด้วย อย่างไรก็ตาม ในโครงการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นศึกษาการสกัดแยก DNA MTase จาก nuclei fraction ของยอดอ่อนข้าวที่ปลูกแบบ hydroponic ในที่สว่างอายุ 10 วัน เป็นหลักก่อน

1.5) การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ในระหว่างการสกัด

โดยที่ DNA MTase จากยอดอ่อนของข้าวมีความเสถียรต่ำมาก เมื่อเตรียมแล้ว สังเกตพบว่ามี การลดลงของ activity รวดเร็ว (ลดลง 50 % ภายใน 20 ชั่วโมง ที่ 4°C) จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์นี้เพื่อหาสภาวะเหมาะสมในการสกัดแยก โดยศึกษา pH ของ extraction buffer (buffer M ซึ่งประกอบด้วย MOPS-NaOH, EDTA, NaN₃, DTT และ PMSF) ผลการทดลองใน Table 8 แสดงว่า pH 7.2 ของ extraction buffer มีความเหมาะสมที่จะใช้เตรียม fraction ของ nuclear DNA MTase

ในขั้นตอนของการสกัดแยก DNA MTase จาก nuclei fraction เพื่อให้บริสุทธิ์ จะต้องมีการใช้เทคนิคทาง Chromatography หลายขั้นตอนที่ 4°C ซึ่งทำให้ใช้เวลานานมาก จึงจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลช่วยให้ยืดยาวของเอนไซม์ระหว่างการสกัดได้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของ preservative agent (glycerol, PEG และ sucrose) และ protease inhibitor (pepstatin A, leupeptin และ chymostatin) ที่เติมลงใน buffer M เพื่อช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ DNA MTase ที่ 4°C ผลการทดลองใน Figure 3 แสดง

Table 7 Specific levels of 5-methylcytosine (mC) of purified DNA from various organelles of rice cells. The values presented are the average of three independent analyses.

Source of DNA ^a		mC X 100 / mC + C (%)	
		Light grown	Dark grown
Nuclei	shoot	15.02	15.02
	root	15.03	15.09
Plastid	shoot	0	25.84
	root	25.80	25.75
Mitochondria	shoot	0	0
	root	0	0

^aRice seedling were grown by hydroponic technique for 10 days, either under continuous light or dark, before harvesting. The nuclei, plastid and mitochondrial DNA were prepared and subsequently analyzed for mC levels.

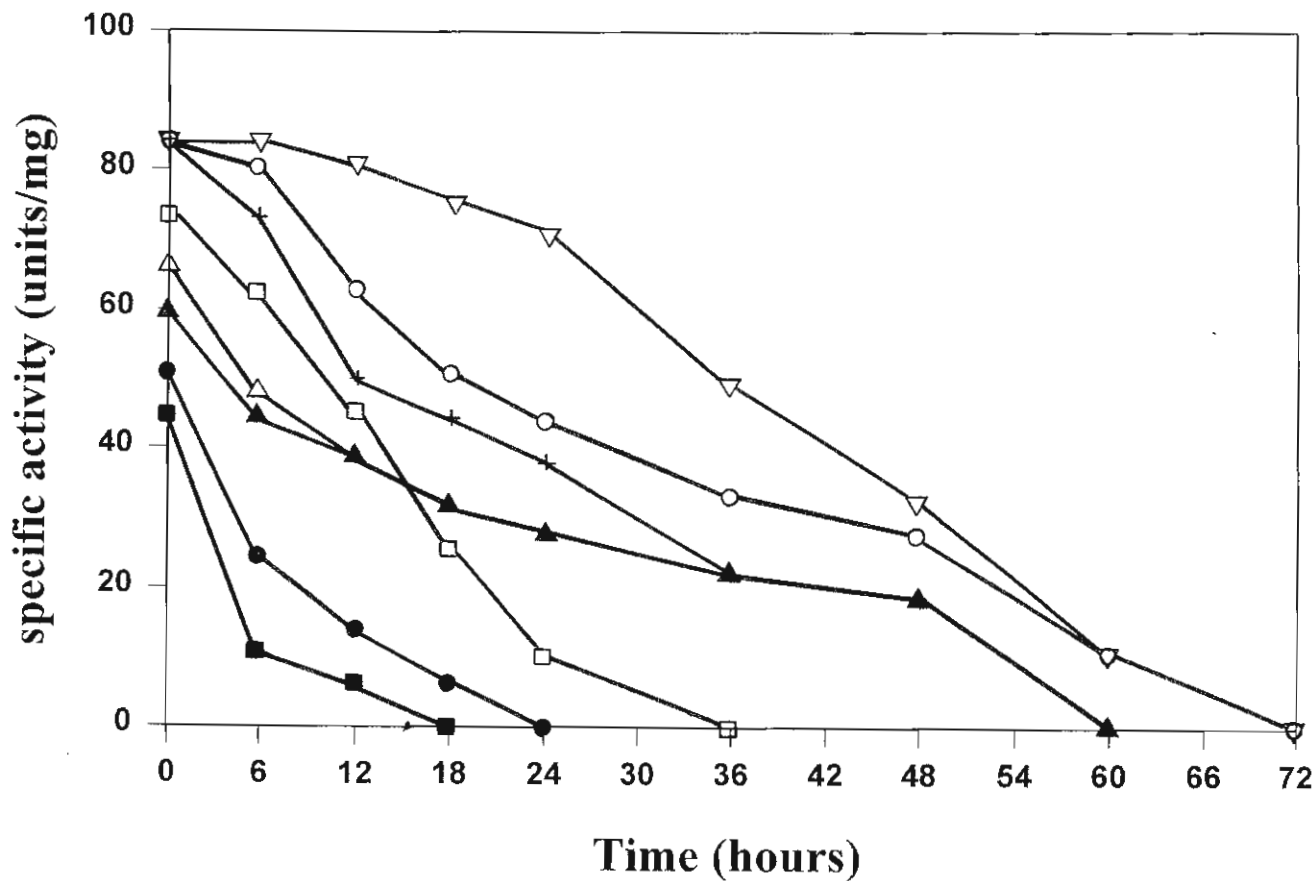
Table 8 Effect of pH of extraction buffer and assay buffer on rice DNA MTase activity^a

Extraction buffer	DNA MTase specific activity (units/mg protein) ^b				
	Assay buffer				
	pH 7.0	pH 7.2	pH 7.4	pH 7.6	pH 7.9
pH 7.0	0.82	1.22	1.42	1.68	1.43
pH 7.2	1.24	2.38	3.10	7.56	5.30
pH 7.4	1.13	1.84	2.26	4.10	3.10
pH 7.6	1.02	1.62	2.10	3.82	2.86
pH 7.9	0.94	1.24	1.49	1.74	1.68

^aThe crude DNA MTase was extracted from 10-day-old rice shoot in extraction buffer at various pH and further assay under standard assay condition in the assay buffer at various pH.

^bOne unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

Figure 3 Effect of preservative agents and protease inhibitors adding in extraction buffer on DNA MTase activity of nuclear extract fraction from rice. The nuclear DNA MTase was prepared in extraction buffer (buffer M) (+), and buffer M containing 10% Glycerol (○), 50% PEG (▲), 0.25M Sucrose (△), 1 mg/l Pepstatin A (■), 1 mg/l Leupeptin (□), 1 mg/l Chymostatin (●) or 10% Glycerol + 1 mg/l Leupeptin (▽). The prepared enzyme was kept at 4°C, and each sample was picked up by time interval and immediately measured the activity by standard assay condition. One unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.



ให้เห็นว่า nuclear extract ที่เตรียมโดยใช้ standard buffer (buffer M) จะมี activity ของ DNA MTase ลดลงอย่างรวดเร็วโดยลดลง 50 % ภายใน 20 ชั่วโมง และ จะหมด activity ภายใน 60 ชั่วโมง ผู้วิจัยพบว่าการเติม glycerol และ leupeptin ลงใน buffer M จะช่วยให้ activity ของ DNA MTase ลดลงอย่างช้าๆ ใน 12 ชั่วโมงแรก แม้หลังจากนั้น activity จะลดลง แต่ก็สามารถยืดอายุเอนไซม์ได้โดยเอนไซม์ยังมี activity อยู่ประมาณ 50% ที่ 40 ชั่วโมง และ หมด activity ภายใน 72 ชั่วโมง

1.6) การศึกษาวิธีการสกัดแยกเอนไซม์ DNA MTase จากต้นข้าวให้บริสุทธิ์

ผู้วิจัยได้เลือก plant material เป็นยอดอ่อนของข้าวที่ปลูกแบบ hydroponic อายุ 10 วัน ดังแสดงใน Figure 4 จะเห็นว่า สามารถปลูกได้คราวละหลายๆ ได้ plant material ที่สม่ำเสมอ สะอาด เหมาะสำหรับการใช้ในการสกัดแยกเอนไซม์

ในช่วงแรกได้ทำการเตรียม crude homogenate จาก plant material แล้ว purify โดยผ่าน DEAE-cellulose column, Hitrap-Heparin column และ Sephadex G-200 column ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงใน Table 9 จะเห็นว่าได้ purification fold เพียง 37 เท่า และ recovery เพียง 4% of total activity

ผู้วิจัยจึงทำการเตรียม nuclei pellet แล้วปรับปรุงขั้นตอนของการ extract nuclei ด้วย NaCl ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการ treat ด้วย micrococcal nuclease เปรียบเทียบกับการใช้ homogenizer ดังผลการทดลองแสดงใน Table 10 จะเห็นว่าการ extract nuclei pellet ด้วย 0.4 M NaCl แล้ว homogenize fraction นั้น ก่อนการนำไป centrifuge และ dialyze จะทำให้ได้ nuclei fraction ที่มีปริมาณ protein สูงขึ้น และมี specific activity สูง เหมาะสมสำหรับนำไปแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีทาง chromatography ต่อไป

จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการเตรียม nuclei extract จาก plant material แล้ว purify โดยผ่าน Econo-Pac Q column, Hitrap-Heparin column และ Superdex-200 column ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงใน Figure 5, 6 และ 7 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสรุปผลการ purify

Figure 4 Hydroponically grown rice seedlings

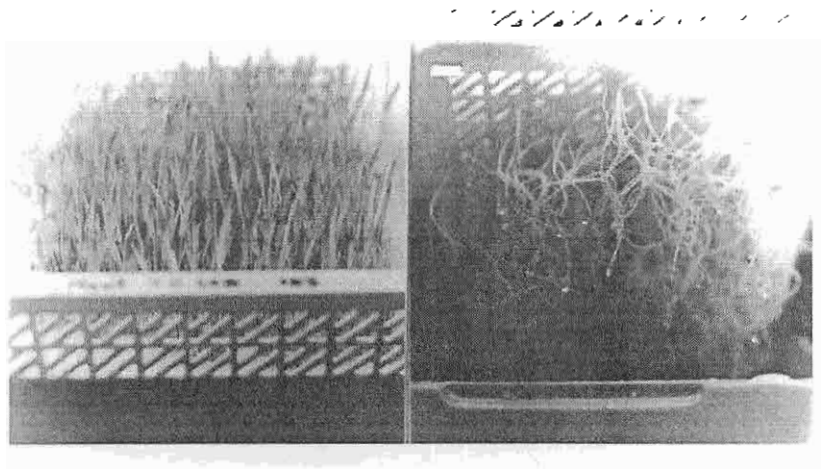
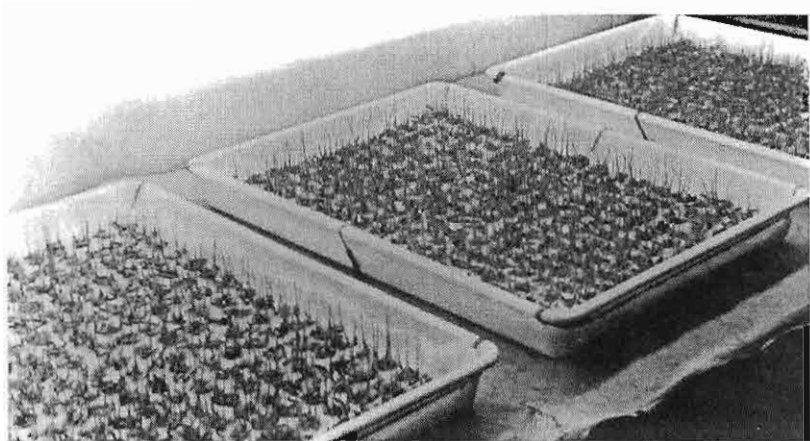


Table 9 Purification of rice DNA MTase from crude homogenate

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg) ^b	Purification fold	Recovery %
Homogenate ^a	568.0	4,305.44	7.58	1	100
DEAE-cellulose	52.0	1,479.40	28.45	4	34
Hitrap-Heparin	4.9	1,080.84	220.58	29	25
Sephadex G-200	0.6	169.58	282.64	37	4

^aThe crude homogenate was obtained from 100 g of 10-day-old rice shoot and all procedures were carried out on ice or at 4°C.

^bOne unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

Table 10 Effect of micrococcal nuclease treatment, homogenization and salt extraction of nuclei fraction on rice DNA MTase specific activity and yield.

Nuclei extraction ^a	Total protein (mg)		Total activity (units)	Specific activity (units/mg) ^d	Yield %
	NaCl (M)				
Micrococcal nuclease treatment ^b	0	78	6,717.36	86.12	100
	0.2	97	8,378.86	86.38	125
	0.4	105	9,462.60	90.12	141
	0.6	89	7,857.81	88.29	117
Homogenization ^c	0	92	8,115.32	88.21	121
	0.2	118	10,622.36	90.02	158
	0.4	145	13,363.20	92.16	199
	0.6	132	12,043.68	91.24	179

^aThe nuclei pellet was obtained from 100g of 10-day-old rice shoot and all procedures were carried out on ice or at 4°C.

^bThe nuclei pellet was treated with micrococcal nuclease prior to reextract with NaCl. The resulting suspension was centrifuged and the supernatant was further dialyzed.

^cThe nuclei pellet was extracted with NaCl prior to homogenization. The resulting suspension was centrifuged and the supernatant was further dialyzed.

^dOne unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

Figure 5 Purification of nuclear DNA MTase by Econo-Pac Q column chromatography.

The Econo-Pac Q cartridge column (Bio-Rad) was equilibrated with buffer M before the sample was applied. The enzyme was obtained by eluting with a linear gradient of 0 to 1 M NaCl at the flow rate 1.5 ml/min (the straight line is the salt gradient). One unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

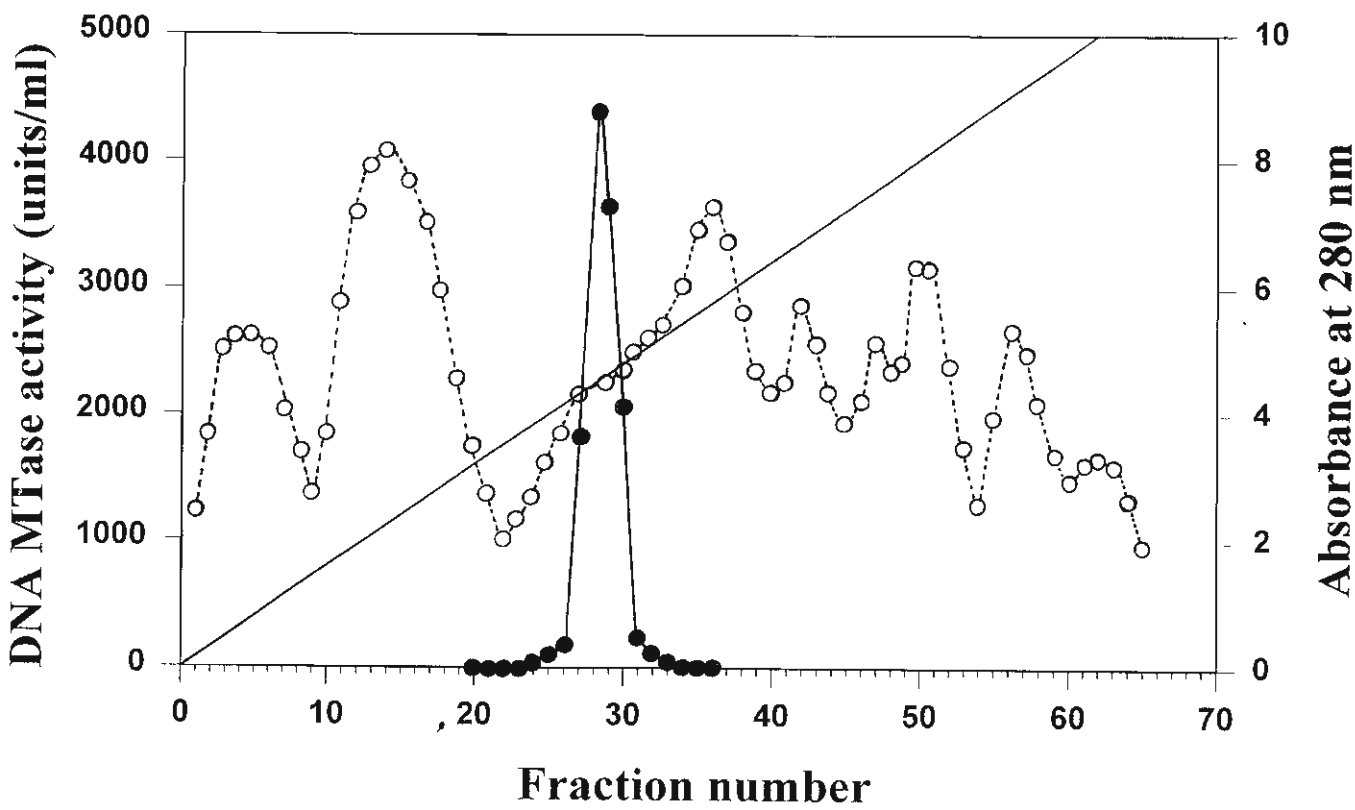


Figure 6 Second step for purification of nuclear DNA MTase by Hitrap-Heparin column chromatography.

The Hitrap-Heparin cartridge column (Pharmacia) was equilibrated with buffer M before the sample was applied. The enzyme was obtained by eluting with a linear gradient of 0 to 1.5 M NaCl at the flow rate 1.5 ml/min (the straight line is the salt gradient). One unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ^3H -methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

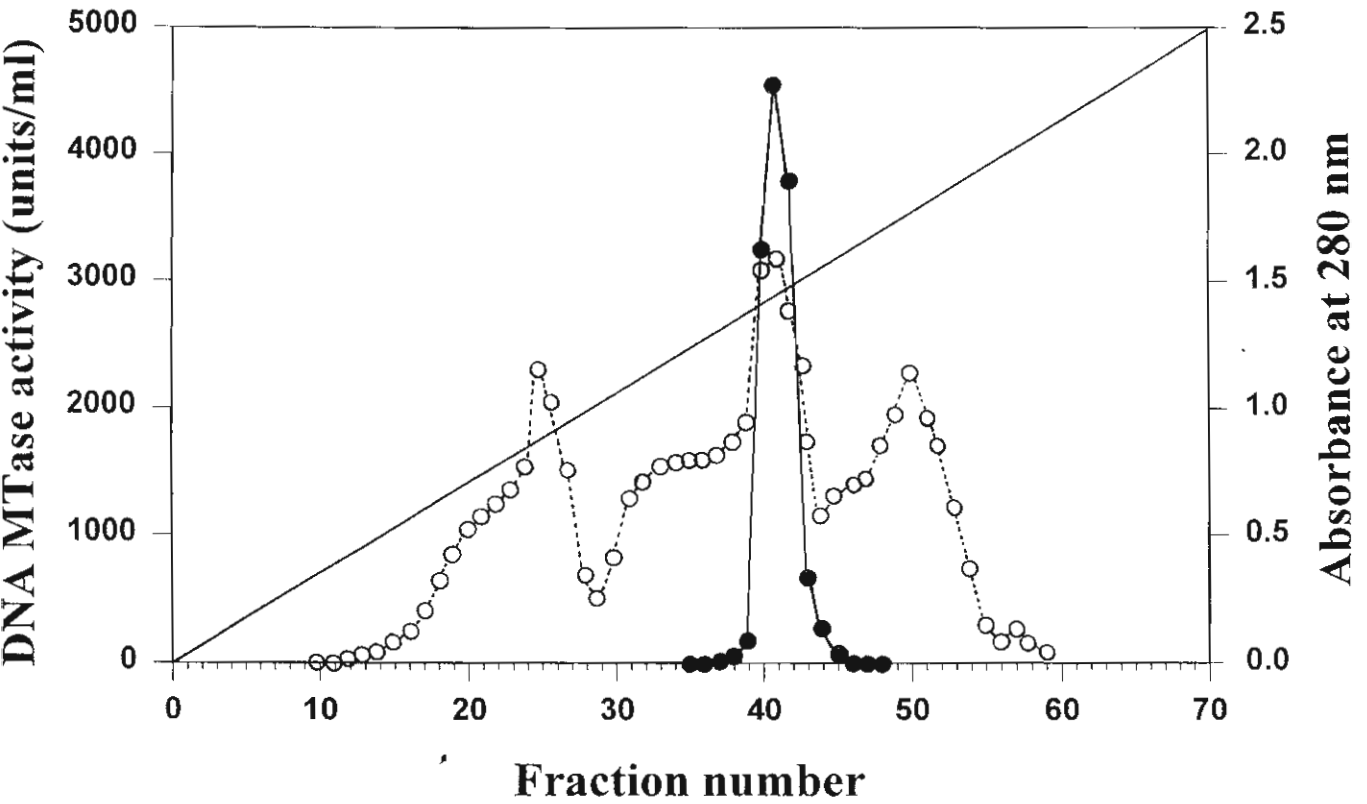
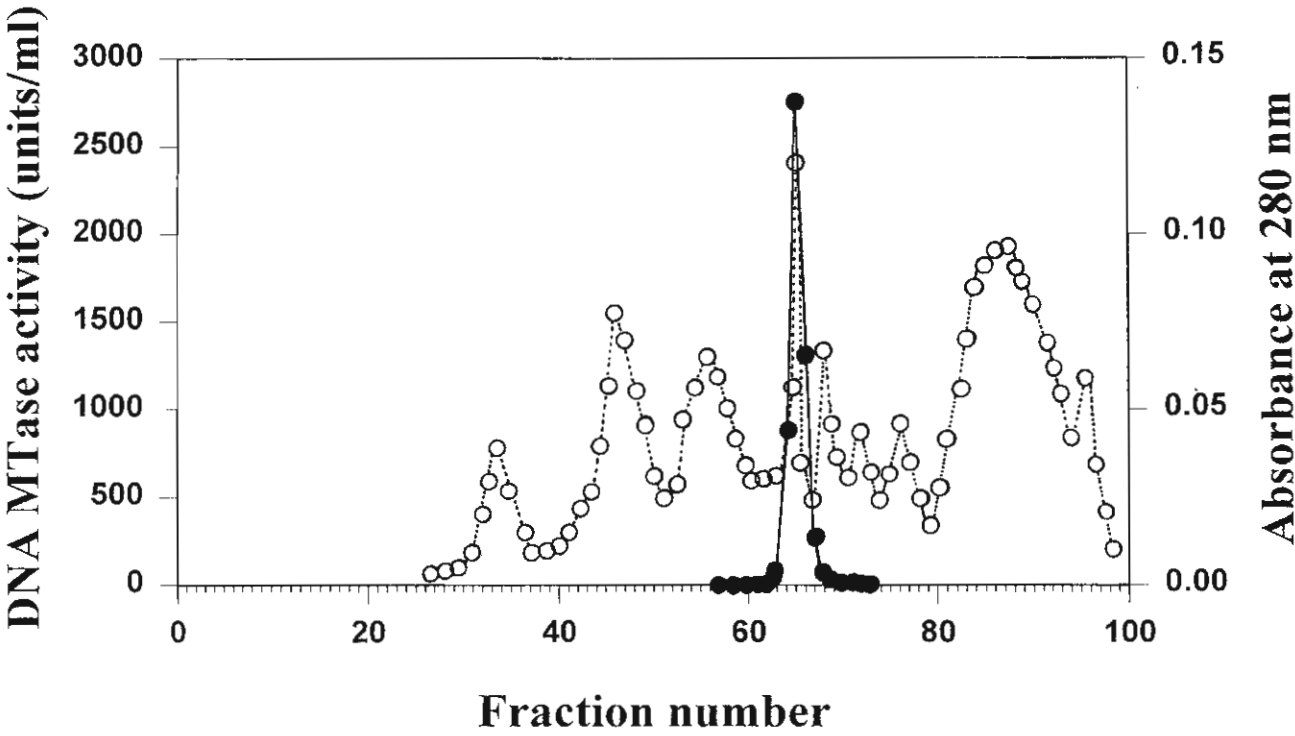


Figure 7 Third step for purification of nuclear DNA MTase by Superdex-200 column chromatography.

The Superdex-200 column (Pharmacia) was equilibrated with buffer M containing 0.2 M NaCl before the sample was applied. The enzyme was obtained by eluting with buffer M at the flow rate 0.15 ml/min. The column was calibrated with the following standard proteins : ferritin (450 kDa), catalase (240 kDa), aldolase (150 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), and ovalbumin (45 kDa), before loading the sample. One unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.



enzyme DNA MTase จาก nuclei extract ของยอดอ่อนข้าวอายุ 10 วัน ดังแสดงใน Table 11 จะเห็นว่าการทดลองครั้งนี้สามารถ purify enzyme ได้โดยมี purification fold สูงสุดทำได้ถึง 800 เท่า และ recovery ได้ 33% of total activity เอนไซม์ fraction ที่ได้มี specific activity สูงมาก แต่มีปริมาณน้อย

เนื่องจากจะเห็นว่า DNA substrate ที่ใช้ในการติดตาม activity ของ purified enzyme ดังแสดงใน Table 11 เป็น DNA จากยอดอ่อนของข้าวอายุ 10 วัน ดังนั้น activity ที่วัดได้อาจเป็น maintenance activity รวมกับ *de novo* activity เนื่องจาก DNA substrate ได้มาจากการสกัดจากยอดข้าวโดยตรง จึงอาจมีรูปแบบของ DNA เหมาะทั้งสำหรับ maintenance activity และ *de novo* activity ปะปนกันอยู่ แต่โดยที่โครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยมุ่งเน้นศึกษา maintenance DNA MTase ผู้วิจัยจึงทำการ purify เอนไซม์นี้อีกครั้งจากยอดอ่อนของข้าวอายุ 10 วัน น้ำหนัก 1,000 กรัม โดยเตรียม nuclei pellet แล้ว extract ด้วย 0.4 M NaCl นำไป homogenize ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ผ่าน Econo-PacQ column, Hitrap-Heparin column และ Superdex-200 column ตามลำดับ โดยติดตาม specific activity ต่อ synthetic substrate ที่เป็น hemi-methylated DNA ซึ่งโดยวิธีนี้เอนไซม์ที่ purify ได้ จะมี maintenance activity เป็นหลัก (Table 12) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่า รูปแบบของ purification profile ใน chromatography ทั้ง 3 แบบ เป็นเช่นเดิมดังได้แสดงใน Figure 5-7 เมื่อเปรียบเทียบกับ การ purify DNA MTase enzyme จากพืชอื่นเท่าที่มีรายงาน คือ ถั่ว (20) และ ข้าวสาลี (19) จะพบว่า riceDNA MTase enzyme ที่เตรียมได้จากโครงการนี้ มีความบริสุทธิ์สูง และได้ yield สูงกว่า

Table 11 Purification of rice DNA MTase from nuclei extract

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg) ^b	Purification fold	Recovery %
Homogenate ^a	2,852.0	21,561.12	7.56	-	-
Nuclei extract	728.0	67,121.60	92.20	1	100
Econo-Pac Q	67.0	179,148.62	2,673.86	29	267
Hitrap-Heparin	3.2	87,922.05	27,475.64	298	131
Superdex-200	0.3	22,128.02	73,760.08	800	33

^aThe crude homogenate was obtained from 500 g of 10-day-old rice shoot and all procedures were carried out on ice or at 4°C.

^bOne unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C.

Table 12 Purification of rice DNA MTase from nuclei extract using hemi-methylated DNA as substrate for enzyme activity assay

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg) ^b	Purification fold	Recovery %
Homogenate ^a	7,135.0	56,937.30	7.98	-	-
Nuclei extract	2,010.2	194,667.77	96.84	1	100
Econo-Pac Q	209.0	586,777.95	2,807.55	29	301
Hitrap-Heparin	14.6	421,201.97	28,849.45	298	216
Superdex-200	2.4	185,875.40	77,448.08	800	95

^aThe nuclei was obtained from 1,000 g of 10-day-old rice shoot and all procedures were carried out on ice or at 4°C.

^bOne unit of enzyme activity was defined as 1 pmole of ³H-methyl group incorporated into DNA by the reaction of enzyme per hour at 25°C. The assay was done using hemi-methylated DNA substrate, poly (dI-mdC). poly (dI-dC), which was synthesized as described in J. Biol. Chem. 261: 7600 - 7602 (1986).

2) การศึกษาชนิดและคุณสมบัติจำเพาะของเอนไซม์ DNA MTase

2.1) การตรวจสอบขนาดของเอนไซม์ DNA MTase ที่บริสุทธิ์

เมื่อได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์จากข้อ 1.6 แล้ว ขั้นตอนต่อไปเป็นการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ ข้อมูลเบื้องต้นจากการ calibrate ด้วย Gel filtration chromatography (Figure 7) ทำให้ทราบว่า rice DNA MTase ที่เตรียมได้มีขนาดประมาณ 130 kDa

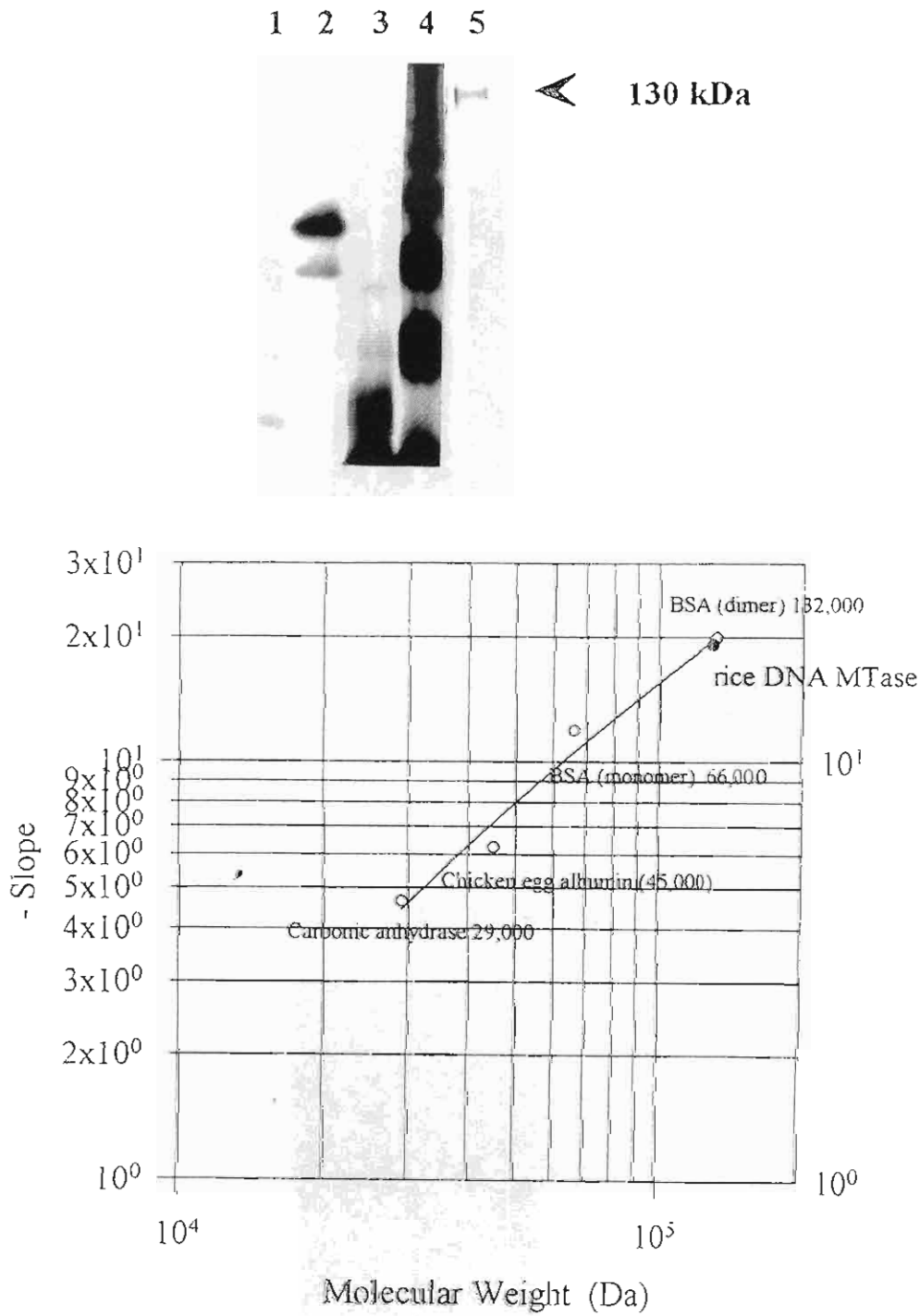
ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ขนาดของเอนไซม์นี้ด้วย Native-PAGE โดยการเปรียบเทียบกับ standard protein molecular weight marker (Sigma) คำนวณจาก statistic curve ใน Native-PAGE ที่มีเปอร์เซ็นต์ polyacrylamide ต่างกัน โดยวิธีที่แนะนำใน Instruction manual of nondenatured protein molecular weight marker kit ของ บริษัท Sigma ดังตัวอย่างแสดงใน Figure 8 จากการคำนวณพบว่า rice DNA MTase มีขนาดประมาณ 130 kDa ซึ่งตรงกับที่คำนวณจาก Gel filtration chromatography

จากผลการทดลองใน Figure 9 ซึ่งทำการวิเคราะห์ protein profile ของ fraction ต่างๆ ที่ได้ในขั้นตอนการสกัดแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ใน SDS-PAGE 12.5% จะเห็นว่า rice DNA MTase มีขนาดประมาณ 55 kDa ใน SDS-PAGE และ fraction ที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายเมื่อผ่าน Superdex-200 column แล้วมีความบริสุทธิ์มาก ซึ่งสังเกตจะพบ protein เพียง 1 band (ที่มีขนาดประมาณ 55 kDa) โดย Silver staining (Figure 9, lane 8)

นอกจากนี้เพื่อยืนยันว่า protein 1 band ที่พบใน fraction สุดท้าย ที่ทำการแยกได้นั้นเป็น DNA MTase จึงได้ทำการตรวจสอบโดย Western blot analysis สำหรับ Antibody ต่อ Wheat DNA MTase นั้น ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Anke Nebendahl, IPK (Germany) ผลการทดลองแสดงใน Figure 10 ซึ่งให้เห็นว่า rice DNA MTase สามารถถูกจับด้วย Antibody ต่อ wheat DNA MTase และแสดง molecular weight ~ 55

Figure 8 Analysis of purified rice DNA MTase by Native-PAGE.

The determination of native molecular size of rice DNA MTase was performed by 6.25% (as in this figure), 5%, 7%, and 8% of native-PAGE. The analysis was done by statistic curve in various percentage of polyacrylamide in native-PAGE (Sigma). Lane 1 : α -Lactalbumin; lane 2 : Carbonic anhydrase; lane 3 : Chicken egg albumin; lane 4 : Bovine serum albumin; lane 5 : Fraction of DNA MTase activity peak from Superdex-200 column.



Typical standard curve of molecular weight versus -Slope of standard protein molecular weight marker on Native-PAGE.

* represents a -Slope of purified rice DNA MTase

Figure 9 Analysis of rice DNA MTase from the different purification steps on SDS-PAGE 12.5%.

Lane 1: Standard protein molecular weight marker; lane 2: Nuclei pellet; lane 3: Salt extraction of nuclei pellet; lane 4: Supernatant from centrifugation of lane 3 after homogenization; lane 5: Pellet from centrifugation of lane 3 after homogenization; lane 6 : Fraction of DNA MTase activity peak from Econo-Pac Q column; lane 7 : Fraction of DNA MTase activity peak from Hitrap-Heparin column; lane 8 : Fraction of DNA MTase activity peak from Superdex-200 column.

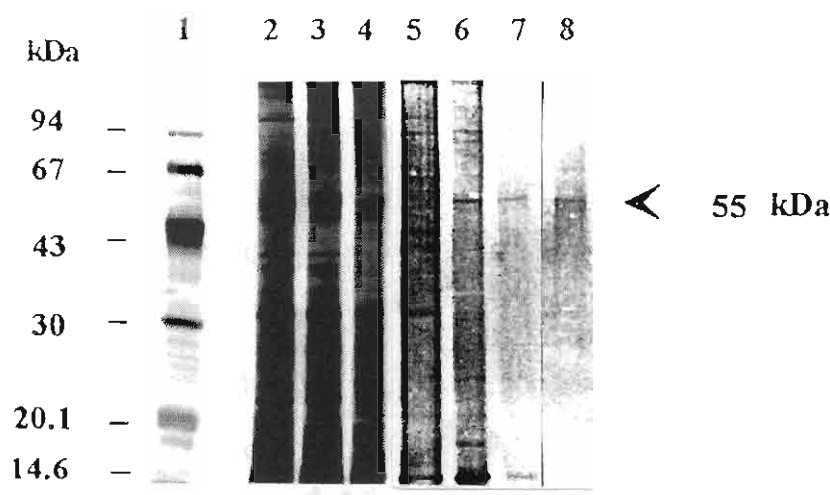
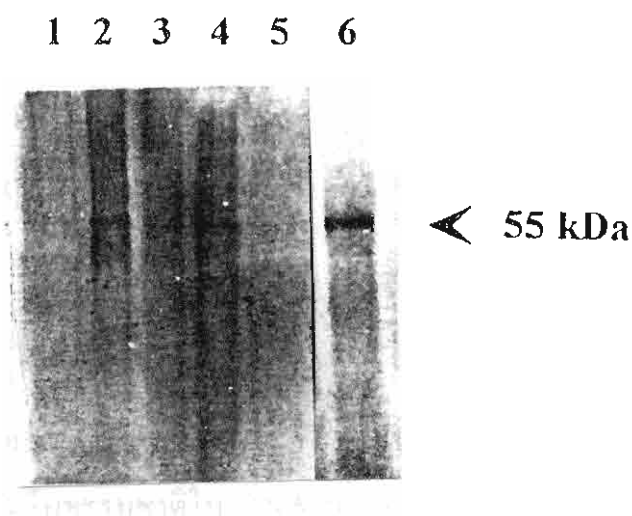


Figure 10 Immunodetection of rice DNA MTase by an antibody against wheat DNA MTase.

Lane 1: Standard protein molecular weight marker; lane 2: Fraction of DNA MTase activity peak from Econo-Pac Q column; lane 3 : Fraction of DNA MTase activity peak from Hitrap-Heparin column; lane 4 and 6 : Fraction of DNA MTase activity peak from Superdex-200 column.



kDa ใน SDS-PAGE ผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่า DNA MTase enzyme ในข้าวอาจประกอบเป็น subunit

2.2) การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ DNA MTase บริสุทธิ์

2.2.1) Substrate specificity

ได้ทำการศึกษา substrate specificity ของ purified rice DNA MTase โดยเปรียบเทียบ DNA substrate ชนิดต่าง ๆ (Table 13) พบว่า เอนไซม์ที่ purify ได้มี activity สูง เมื่อใช้ hemi-methylated DNA เป็น substrate เช่น poly (dI-mdC).poly (dI-dC), poly (dG-mdC).poly (dG-dC), 10 d-rice seedling DNA และมี activity น้อยมากเมื่อ DNA substrate ปลอดจาก methylates base เช่น poly (dI-dC).poly (dI-dC), poly (dG-dC).poly (dG-dC) นอกจากนี้ยังพบว่า activity ต่อ substrate ที่เป็น adenine ก็น้อยมาก โดยสังเกตจากเมื่อใช้ substrate ที่เป็น poly (dI-dA), poly (dI-dA) และ hemi-methylated poly (dI-mdA), poly (dI-dA) อย่างไรก็ตามเอนไซม์นี้ยังสามารถ methylate DNA substrate ที่มี high methylated cytosine ได้บ้าง เช่น Etiolates leaf -rice DNA, Dry embryo -rice DNA, mature leaf -rice DNA , Salmon sperm DNA และ *E. coli* DNA

ผลการทดลองทำให้สามารถทราบได้ว่า เอนไซม์ DNA MTase ที่แยกได้นี้เป็น maintenance cytosine DNA MTase ซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกับ *de novo* DNA MTase แต่อาจเป็นไปได้ที่ ขั้นตอนต่าง ๆ ในการ purify อาจแยก co-factor บางชนิดที่สำคัญต่อ *de novo* activity หรือ อาจเป็นไปได้ที่ *de novo* activity อาจต้องการ proteolytic process ของเอนไซม์เดียวกันนี้ก่อน

เมื่อทำการศึกษา sequence specificity ของ purified rice DNA MTase ใน *in vitro* โดยใช้ DNA ของข้าวอายุ 10 วัน เป็น substrate เปรียบเทียบกับ sequence specificity methylation ที่เกิดในธรรมชาติใน DNA ของข้าว โดยใช้เทคนิค Nearest-

Table 13 Substrate specificity of purified rice DNA MTase^a

DNA substrate	Relative enzyme activity (%)
poly (dI-mdC). poly (dI-dC)	100
poly (dI-dC). poly (dI-dC)	5
poly (dG-mdC). poly (dG-dC)	69
poly (dG-dC). poly (dG-dC)	4
poly (dI-mdA). poly (dI-dA)	< 1
poly (dI-dA). poly (dI-dA)	< 1
Etiolated leaf-rice DNA	17
Dry embryo-rice DNA	12
10-day-old shoot-rice DNA	95
Mature leaf-rice DNA	35
Salmon sperm DNA	29
<i>E.coli</i> DNA	63

^aThe purified DNA MTase was extracted from 10-day-old shoot of rice and further assay under standard assay condition using various DNA substrates.

neighbor analysis ผลการทดลองดังแสดงใน Table 14 แสดงให้เห็นว่า ใน *in vitro* purified rice DNA MTase สามารถทำการเติม methyl group เข้าที่ sequence CA, CT และ CC เพิ่มขึ้น 3-4 เท่า แสดงว่า *in vitro* methylation มี sequence specificity ทั้งแบบ CG dinucleotide และ CNG trinucleotide (N = G, A, T, or C)

2.2.2 Enzyme inhibitor

Figure 11 แสดง inhibitor ของ DNA methylation ที่มีรายงานใน animal system ผู้วิจัย ได้ทำการศึกษาผลของ S-adenosylhomocysteine และ DL-ethionine ต่อ activity ของ rice DNA MTase ผลการทดลองแสดงใน Figure 12 ซึ่งให้เห็นว่า S-adenosylhomocysteine ซึ่งเป็น potent inhibitor methyl-donor analog ใน transmethylation reaction โดยทั่วไป สามารถ inhibit activity ของ rice DNA MTase ได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก เช่นเดียวกับ DL-ethionine โดยที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.025-0.050 mM inhibitor ทั้ง 2 ชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน แต่ S-adenosylhomocysteine สามารถ inhibit activity ได้ดีกว่า ethionine ที่ความเข้มข้น 0.1-0.5 mM

Figure 13 แสดงผลของ demethylating agent ในรูปของ base analog ในการ inhibit activity ของ rice DNA MTase พบว่าทั้ง 5-azacytosine และ N⁶-benzyladenine มีผล inhibit activity ของ rice DNA MTase โดย N⁶-benzyladenine ให้ผล inhibit ที่ชัดเจนรวดเร็วที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 5-azacytosine

2.2.3) Salt concentration

ใน animal system มีรายงานว่า NaCl สามารถ inhibit activity ของ DNA MTase ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาผลของ monovalent cation (NaCl และ KCl) ; divalent cation (MgCl₂ และ CaCl₂); และ cationic amine (spermidine และ spermine) ต่อ activity ของ rice DNA MTase

Table 14 Sequence specificity of rice DNA methyltransferase ^a

Sequence	Methylation		
	<i>in vitro</i> (%)	original (%)	increase (fold)
d (C-G)	92	86	1.1
d (C-A)	65	15	4.3
d (C-T)	52	15	3.5
d (C-C)	22	7	3.1

^a Excess methyl groups were introduced enzymatically into native 10-days-old shoot -rice DNA and a nearest-neighbor analysis performed by nick-translation as described in Nucleic Acids Res. 6: 2125-2132 (1979).