

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG4580087

ชื่อโครงการ: การโคลนและการศึกษาการแสดงออกของยีนทรานสปอร์ตเตอร์สำหรับบีเทน/คาร์นิทีนโคลีน จากอะฟาโนทีคิ ฮาโลฟิติก

ชื่อนักวิจัย: ดร. ธีรพงษ์ บัวบุชา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Email Address: Teerapong.B@Chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

อะฟาโนทีคิ ฮาโลฟิติก (*Aphanothece halophytica*) เป็นไซยาโนแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถเติบโตได้ในภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 3 โมลาร์ เมื่อระดับออสโมลาริตีภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นเซลล์จะสะสมไกลซีนบีเทนซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีหมู่ quaternary ammonium ภายในไซโทพลาซึมเพื่อปรับความดันออสโมติกภายในเซลล์ให้เหมาะสม การสะสมไกลซีนบีเทนนอกจากจะเกิดจากการสร้างใหม่ภายในเซลล์แล้วยังมีรายงานว่าเซลล์อะฟาโนทีคิ ฮาโลฟิติกสามารถดึงไกลซีนบีเทนเข้ามาจากภายนอกเซลล์โดยอาศัยโปรตีนทรานสปอร์ตเตอร์บางชนิด อย่างไรก็ตามยีนและโปรตีนที่ทำหน้าที่ดังกล่าวยังไม่ถูกค้นพบ การค้นหาและศึกษายีนนี้จึงจะนำไปสู่ความเข้าใจในกลไกรวมทั้งการควบคุมการสะสมไกลซีนบีเทนของเซลล์อะฟาโนทีคิ ฮาโลฟิติกในสภาวะที่มีเกลือสูงได้ ในงานวิจัยนี้จากการค้นลำดับภายในจีโนมของอะฟาโนทีคิ ฮาโลฟิติก โดยใช้โปรตีน OpuD ซึ่งเป็นโปรตีนทรานสปอร์ตเตอร์สำหรับลำเลียงไกลซีนบีเทนจากบาซิลลัส ซับทิลิส (*Bacillus subtilis*) เป็นคำถาม (query) ผู้วิจัยค้นพบยีนสร้างโปรตีนหนึ่งที่มีความคล้าย (similarity) กับ OpuD มาก และสามารถโคลนยีนดังกล่าวโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR) และตั้งชื่อว่า *ApBet* ซึ่งจากการวิเคราะห์โดย DNA gel blot พบว่า *ApBet* เป็นยีนเพียงชุดเดียวและไม่มียีนที่คล้ายคลึงกันภายในจีโนมอีก และในการศึกษาการแสดงออกของยีน *ApBet* โดยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR) และการวิเคราะห์โดย DNA gel blot พบว่าปริมาณ mRNA ภายในเซลล์อะฟาโนทีคิ ฮาโลฟิติกลดลงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ภายนอกสูงขึ้น ยีน *ApBet* ถูกทำนายได้ว่าสร้างโปรตีนที่มีจำนวนกรดอะมิโน 564 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 62 kDa ลำดับกรดอะมิโนของ *ApBet* นี้คล้ายกับโปรตีนทรานสปอร์ตเตอร์ในกลุ่มที่เรียกว่า Betaine/Carnitine/Choline Transporters (BCCT) จากการทำนายโครงสร้าง *ApBet* คาดว่าประกอบด้วย transmembrane domain 12 ตำแหน่ง และมีบริเวณที่ลำดับเป็นเอกลักษณ์ตามรูปแบบของโปรตีนในกลุ่ม BCCT คือ [GSDN]-W-T-[LIVM]-X-[FY]-W-X-W-W

คำสำคัญ การแสดงออกของยีน ไกลซีนบีเทน อะฟาโนทีคิ ฮาโลฟิติก

Abstract

Project Code: TRG4580087

Project Title: Cloning and Expression Studies of a Putative Betaine/Carnitine/Choline
Secondary Transporter Gene from *Aphanothece halophytica*

Investigator: Teerapong Buaboocha, Ph.D.
Department of Biochemistry, Faculty of Science
Chulalongkorn University

Email Address: Teerapong.B@Chula.ac.th

Project Period: 2 years

Aphanothece halophytica is a halotolerant cyanobacterium that can grow in high external salinity up to 3.0 M NaCl. Under increased extracellular osmolarity, glycine betaine, a quaternary ammonium compound is accumulated within cytoplasm which potentially acts as an osmoprotectant in the *A. halophytica* cell. In addition to accumulation by synthesis, *A. halophytica* has been shown to accumulate glycine betaine in response to salt stress by rapid uptake. However, the gene(s) responsible for this activity has not been found. Identifying and characterizing the gene(s) involved will be a crucial step to better understand how the accumulation occurs in medium of high osmolarity as well as how this process is regulated. In this report, the *A. halophytica* genomic sequence was searched for a glycine betaine transporter gene using the amino acid sequence of OpuD, which is a symporter for glycine betaine from *Bacillus subtilis* as a query. A gene encoding a putative glycine betaine transporter referred as ApBet was identified and isolated by PCR amplification. DNA gel blot analysis indicates a single copy gene encodes ApBet and no closely related gene is present. Expression studies by PCR and DNA blot analysis shows that the *ApBet* mRNA level is decreased under salt stress. The gene was predicted to encode a protein of 564 amino acids and molecular weight of about 62 kDa. The deduced amino acid sequence shares a high level of similarity to several transport proteins belonging to a protein family known as BCCT (Betaine/Carnitine/Choline Transporters). It is predicted to possess 12 transmembrane regions and contains the consensus pattern [GSDN]-W-T-[LIVM]-X-[FY]-W-X-W-W which is a signature of proteins in the BCCT family.

Keywords: *Aphanothece halophytica*, betaine/carnitine/choline transporter, compatible solute, gene expression; glycine betaine