บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอ-เรส (CGTase) ไอโซไซม์ จาก Bacillus circulans A11 โดยวิเคราะห์บริเวณเร่ง ตรวจสอบกรดอะมิโนและเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ รวมทั้งการศึกษาผลของไกลโคซิเลชันต่อแอคติวิตีและโครงสร้างของไอโซไซม์ เพื่อนำข้อมูลมาประกอบการวิเคราะห์การเกิดหลายรูปแบบของเอนไซม์ ในขั้นตอนแรกได้ทำการแยกไอโซไซม์ทั้ง 4 ของ CGTase ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ preparative แล้วบ่มแต่ละไอโซไซม์ด้วยสารเคมีที่จำเพาะต่อหมู่ฟังก์ชันเพื่อดัดแปรกรดอะมิโน และใช้เทคนิคการป้องกันบริเวณเร่งด้วยสับสเตรทเมทธิล-บีต้าไซโคลเดกซ์ทรินก่อนการดัดแปร ผลการทดลองพบว่า กรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่ง และมีความสำคัญต่อแอคติวิตีของ CGTase ไอโซไซม์ทั้ง 4 ได้แก่ ทริปโตเฟน ฮิสติดีน ไทโรซีน และกรดอะมิโนในกลุ่มคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ ไอโซไซม์ 2 และ 4 ยังมีเซรีน และไอโซไซม์ 3 ยังมีไลซีนอยู่ในบริเวณเร่งอีกด้วย ในการตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N รวมทั้งกรดอะมิโนและเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของทุกไอโซไซม์เหมือนกัน คือใน 5 ตำแหน่งแรกเป็น APDTS ซึ่งเหมือนกับในเอนไซม์ CGTase ก่อนแยกไอโซไซม์ ในส่วนองค์ประกอบกรดอะมิโนของทุกไอโซไซม์ก็ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และเมื่อวิเคราะห์เพปไทด์ที่เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินด้วยคอลัมน์ C_{18}-HPLC แบบ reverse phase ได้ผลว่า จำนวนและชนิดของเพปไทด์ (ที่แยกโดยความแตกต่างของโพลาริตี้) ของทุกไอโซไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อศึกษาผลของไกลโคซิเลชันต่อไอโซไซม์โดยการทำ deglycosylation ด้วยเอนไซม์ Endo H และ PNGase F และด้วยสารเคมี trifluoromethanesulfonic acid สรุปได้ว่า deglycosylation ไม่มีผลต่อขนาดและประจุสุทธิของทุกไอโซไซม์ แต่มีผลต่อแอคติวิตีของไอโซไซม์ 3 และ 4 เล็กน้อย จากการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในไอโซไซม์ด้วยคอลัมน์ C_4-HPLC พบว่า ทุกไอโซไซม์ประกอบด้วยพีคหลัก 2 พีค ที่มีอัตราส่วนต่างกัน จากข้อมูลที่ได้ อาจสรุปได้ว่า หลายรูปแบบของ CGTase เกิดจากโปรตีนชนิดเดียวที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังการถอดรหัสและแปรรหัสจากยีน

TE135295

Abstract

The aim of this work was to characterize the structure of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) isozymes from Bacillus circulans A11. Active site, amino acid and peptide composition, and effect of glycosylation on activity and structure of isozymes were studied. The information obtained was used to analyze the formation of multiple forms of the enzyme. In the first step, isolation of four CGTase isozymes by preparative gel electrophoresis was carried out. Each isozyme was then incubated with group-specific reagents which chemically modified certain amino acids, and substrate protection using methyl-β-cyclodextrin prior to modification was also performed. It was found that amino acids localized in the active site and were essential for activity of all isozymes were tryptophan, histidine, tyrosine, and carboxylic amino acids. In addition to these residues, serine in isozymes 2 and 4 and lysine in isozyme 3 were also protected by the substrate suggesting their presence at the active site. For determination of N-terminal residues, amino acid and peptide composition, the result showed that N-terminus of all isozymes were APDTS which were the same as those in unfractionated enzyme. While amino acid composition of all isozymes was similar. When peptides from tryptic digestion were analyzed by reverse phase C_{18}-HPLC, the number and type of peptides (separated by polarity difference) from all isozymes were not different. For the effect of glycosylation on CGTase isozymes, enzymatic deglycosylation by the enzyme Endo H and PNGase F and chemical deglycosylation by trifluoromethanesulfonic acid were performed. It was found that deglycosylation had no effect on the size and net charge of all isozymes but exerted some effect on activity of isozymes 3 and 4. Analysis of each isozyme by reverse phase C_4-HPLC column showed that they were composed of two main protein peaks with different ratios. The overall data suggests that multiple forms of CGTase was the result of post-translational modification of the transcribed and translated form of the enzyme.