ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2555

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด)43.54

การทำวิศวกรรมโปรตีนของเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสจากข้าว Oryza sativa เพื่อความจำเพาะต่อสับเสรต

(1)นลวัฒน์ บุญญาลัย,

(1)Nonlawat Boonyalai,

บทคัดย่อ

ในข้าวหอม (Oryza sativa) พบว่ามีเอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (BADH) อยู่ 2 ไอโซฟอร์ม คือ OsBADH1 และ OsBADH2 โดยที่ OsBADH1 นั้นพบว่าจะมีส่วนในเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอะซีตัลดีไฮด์ในเพอรอกซิโซม ส่วน OsBADH2 นั้นพบว่าหากเอนไซม์สูญเสียหน้าที่การทำงานไปนั้น จะมีผลเกี่ยวข้องกันกับการสะสมของ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ที่เป็นสารหอมระเหยที่สำคัญในข้าวหอม ในงานวิจัยนี้ต้องการหาความจำเพาะต่อสับเสตรทของทั้ง 2 เอนไซม์นี้ ที่มีต่อบีเทนอัลดีไฮด์ (Bet-ald) และแกมมาอะมิโนบิวทีรัลดีไฮด์ (GAB-ald) โดยใช้หลายวิธีศึกษาได้แก่ site-directed mutagenesis, molecular docking และ molecular dynamics simulation จากผลการทดลองทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์นั้นพบว่าเอนไซม์ทั้งคู่สามารถเร่งปฏิกิริยาต่อ GAB-ald ได้ดีกว่า Bet-ald และเอนไซม์กลายพันธุ์ OsBADH1 W172F และ OsBADH2 W170F ก็มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาต่อ GAB-ald สูงมากกว่า Bet-ald ในงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีการโมเดลโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างอัลดีไฮด์สับเสตรและ OsBADH โดยใช้วิธี molecular docking และ molecular dynamics simulation ผลการทดลองพบว่ากรดอะมิโน E262, L263, C296 และ W461 ของ OsBADH1 กับกรดอะมิโน E260, L261, C294 และ W459 ของ OsBADH2 ที่อยู่บริเวณเร่งภายใน 5 ? ของเอนไซม์ OsBADH ทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม จะเกิดการอันตรกิริยากับ GAB-ald โดยการเกิดพันธะไฮโดรเจน ส่วนกรดอะมิโน W163, N164, Q294, C296 และ F397 ของ OsBADH1 กับกรดอะมิโน Y163, M167, W170, E260, S295 และ C453 ของ OsBADH2 จะเกิดการอันตรกิริยากับ Bet-ald ในขณะที่ E260 ของ OsBADH2 จะมีค่าพลังงานในการจับกับ Bet-ald ถึง -14.21 กิโลแคลอรี่ต่อโมล นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอะมิโนที่ไม่อนุรักษ์คือตำแหน่ง A290 ของ OsBADH1 และ W288 ของ OsBADH2 มีความสำคัญในการจดจำสับเสตรทซึ่งคล้ายกันกับเอนไซม์อะมิโนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสจากถั่ว Pisum sativum (PsAMADH) ที่ได้มีการรายงานออกมาก่อนหน้านี้ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้อาจจะช่วยอธิบายถึงการจดจำสับเสตรทที่แตกต่างกันของ BADH ในข้าวทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม และได้เข้าใจถึงคุณลักษณะและบทบาททางชีวภาพที่สำคัญของทั้งสองเอนไซม์

คำสำคัญ : เอนไซม์บีเทนอัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส , การจำลองการจับกันระดับโมเลกุล , การจำลอง

ไดนามิกระดับโมเลกุล , ข้าวหอม

ABSTRACT

Fragrance rice (Oryza sativa) contains two isoforms of BADH, named OsBADH1 and OsBADH2. OsBADH1 is implicated in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes, while the non-functional OsBADH2 is believed to be involved in the accumulation of 2 -acetyl-1-pyrroline, the major compound of aroma in fragrance rice. In the present study, site-directed mutagenesis, molecular docking and molecular dynamics simulation studies were used to investigate the substrate specificity towards betaine aldehyde (Bet-ald) and ?-aminobutyraldehyde (GAB-ald). Consistent with our previous study, kinetics data indicated that the enzymes catalyze GAB-ald better than Bet-ald, and the OsBADH1 W172F and OsBADH2 W170F mutants displayed a higher catalytic efficiency towards GAB-ald than Bet-ald. Molecular docking analysis and molecular dynamics simulations for the first time provided models for aldehyde substrate-bound complexes of OsBADHs. The amino acid residues, E262, L263, C296 and W461 of OsBADH1 and E260, L261, C294 and W459 of OsBADH2 located within 5 ? of the OsBADH active site mainly interacted with GAB-ald forming strong hydrogen bonds in both OsBADH isoforms. Residues W163, N164, Q294, C296 and F397 of OsBADH1-Bet-ald and Y163, M167, W170, E260, S295 and C453 of OsBADH2-Bet-ald formed the main interaction sites while E260 of OsBADH2 showed an interaction energy of -14.21kcal/mol. Unconserved A290 in OsBADH1 and W288 in OsBADH2 appeared to be important for substrate recognition similar to that observed in aminoaldehyde dehydrogenase from Pisum sativum (PsAMADH). Overall, the results here help to explain how two homologous rice BADHs recognize the aldehyde substrate differently, which is a key property to their biological roles.

Key words : Betaine aldehyde dehydrogenase , Molecular docking , Molecular dynamics simulation , Fragrance rice

---

(1)ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน

(1)Faculty of Science