การโคลนและลักษณะสมบัติของยีนอะไซคลิกเทอร์ปีนอยด์ไฮดรอกซิเลสจากเปล้าน้อย Croton stellatopilosus Ohba

นางสิริลักษณ์ สินธุพาชี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

CLONING AND CHARACTERIZATION OF TERPENOID HYDROXYLASE GENE FROM *Croton stellatopilosus* Ohba

Mrs. Siriluk Sintupachee

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Thesis Title	CLONING AND CHARACTERIZATION OF TERPENOID HYDROXYLASE GENE FROM Croton stellatopilosus Ohba
By	Mrs. Siriluk Sintupachee
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr. rer. nat.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Vudhichai Parasuk, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

.....Examiner
(Yupyn Chintapakorn, Ph.D.)

.....Examiner
(Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

.....External Examiner
(Assistant Professor Worapan Sitthithaworn, Ph.D.)

สิริลักษณ์ สินธุพาชี : การโคลนและลักษณะสมบัติของยีนอะไซคลิกเทอร์ปินอยด์ไฮดรอกซิเลสจากเปล้าน้อย Croton stellatopilosus Ohba. (CLONING AND CHARACTERIZATION OF TERPENOID HYDROXYLASE GENE FROM Croton stellatopilosus Ohba) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร วันชัย ดีเอกนามกูล, 130 หน้า.

ไซโทโครม P450 (CYP หรือ P450) เป็นโปรตีนที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบและเป็นไมโครโซมอลโปรตีนเนื่องจากฝังตัวที่ชั้นเมมเบรนของเอนโดพลาสมิคเรติคูลัม ในกระบวนการชีวสังเคราะห์สารประกอบทุติยภูมิในพืช P450 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นโดยทำงานร่วมกับไซโทโครม P450 รีดักเทส (cytochrome P450 reductase, CPR) ซึ่งทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนให้ P450 เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์สารเปลาโนทอล ซึ่งเป็นสารกลุ่มไดเทอร์ปีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในเปล้าน้อย โดยที่ในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการชีวสังเคราะห์จะเป็นการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นของเจอรานิลเจอรานิออลเพื่อให้ได้เปลาโนทอล ในการศึกษานี้จึงใช้เปล้าน้อยเป็นพืชตัวอย่างในการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมการสร้าง P450 และ CPR ผลจากการโคลนยีน การศึกษาลำดับกรดอะมิโน และ การวิเคราะห์โดยใช้ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ พบยีน P450 ในเปล้าน้อย คือ CsCYP97 และยีนที่มีความสัมพันธ์กับ P450 คือ CsCPR ยีนทั้ง 2 ชนิดแสดงออกใน E. coli สายพันธุ์ BL21(DE3) ในพลาสมิด pET32a ผลการตรวจสอบแอคติวิตี้พบว่า CsCYP97 สามารถทำงานในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ CsCPR อยู่เท่านั้น โดย CsCYP97 สามารถเปลี่ยนเจอรานิลเจอรานิออลไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เคลื่อนที่ใกล้เคียงกับเปลาโนทอลจากการตรวจสอบบนแผ่นโครมาโทกราฟี เอนไซม์ CsCYP97สามารถแสดงคุณสมบัติเฉพาะของ P450 คือสามารถทำปฏิกิริยากับคาร์บอนมอนนอกไซด์ แล้วเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสง จาก 413 นาโนเมตร เป็น 426 นาโนเมตร แอคติวิตี้ของ CsCPR โดยการตรวจสอบ steady state ของ cytochrome c และ NADPH มีค่า Kmcyt C, KmNADPH และ Vmax ตามลำดับ ดังนี้ 10.32 + 2.11 μM, 44.77 + 6.047 μM และ 0.099 ± 0.005 μM min-1 ผลการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนทั้ง 2 ชนิดในใบอ่อนของเปล้าน้อย พบว่ามีการแสดงออกที่สัมพันธ์กับยีนอื่นๆในวิถีสังเคราะห์เปลาโนทอล โดยยีนจะแสดงออกในอัตราส่วนสูงในใบที่มีปริมาณสารเปลาโนทอลสูง ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่ยีนอาจจะมีส่วนในวิถีสังเคราะห์เปลาโนทอล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5173869623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: PLANT AYTOCHROME P450/CYTOCHROME P450 REDUCTASE/CROTON STELLATOPILOSUS OHBA

SIRILUK SINTUPACHEE: CLONING AND CHARACTERIZATION OF TERPENOID HYDROXYLASE GENE FROM CROTON STELLATOPILOSUS OHBA. ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. NATTAYA NGAMROJANAVANICH, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D., 130 pp.

Plant cytochrome P450 (CYP or P450) is a heme-containing enzyme located on the membrane of endoplasmic recticulum (ER) as a microsomal type. It plays an important role in catalyzing a vast variety if metabolic reactions. P450s are closely associated with the cytochrome P450 reductases (CPRs), another group of membrane-bound enzymes required for electron transfer to P450s. Among various groups of secondary metabolites, the terpenoids, which represent the largest class of characterized natural plant compounds, are often substrates for the P450s hydroxylation reactions. Since Croton stellatopilosus Ohba (Euphorbiaceae), the Thai medicinal plant producing the acyclic diterpenoid plaunotol, has been shown to involve the P450-dependent hydroxylation in the final step of the biosynthetic pathway of plaunotol, the plant was used in this study as a model for searching the involved P450 and CPR genes. Through the steps of gene cloning, characterization, sequence analysis, and phylogenetic analysis, one candidate of the P450, namely CsCYP97 and one of the associated CPR, namely CsCPR were found from the plant. All the three genes could be expressed in Escherichia coli (BL21(DE3)) in pET32a. The microsomal fractions of the P450 protein CsCYP97 appeared it have their enzyme activity only in the presence of CsCPR. The CsCYP97 could catalyze the conversion, presumably hydroxylation, of geranylgeraniol to an unknown compound co-chromatographed closely with plaunotol on TLC plate. The CsCYP97 was proved to be P450 as characterized by rate limiting state of the carbon monoxide, with shifting of the absorbance peak from 413 to 426 nm. For the CsCPR, its activity assay at the steady-state for cytochrome c and NADPH was determined to have its kinetic values for KmctyC, KmNADPH and Vmax of 10.32±2.11 μM, 44.77±6.047 μM and 0.099±0.005 μM.min-1, respectively. Real-time PCR analysis of transcripts of CsCYP97 and CsCPR from the shoot to leaves in each position indicated that the expression pattern of CsCPR gene is correlated to the expression of the genes involved in the biosynthesis of plaunotol. Until the current report, the whole genome elucidation of C. stellatopilosus Ohba is not available in database. Therefore, the cloning and functional studies of the P450 and CPR enzymes will lead to a better understanding of the metabolic control of plaunotol biosynthetic pathway in the future.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2013

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like grateful thanks to Assoc. Prof. Dr. Nattaya Ngamrojanavanich my advisor for her advices and encouragement.

I would like to express my deepest sincere and gratitude to my supervisor, Assoc. Prof. Dr. Wanchai De-Eknamkul who gave me a great opportunity to do research and finished Ph.D. Also I wish to thank him for his kindness, invaluable advice and encouragement throughout and for all things while I was his advisee.

I would like to thank Assist. Prof. Dr. Worapan Sittithavorn for her helpful advices and encouragement throughout I had thesis work at Chulalongkorn University.

I am grateful thank also due to many people especially for Ms. Prapaipit Pumthong who advices me for protein expression and inclusion body experiment. I wish thank to Dr. Kittipat Sopitthummakhun for his advices in enzymatic reaction, Dr. Worrawat Promden for cloning suggestions. I thanks to Assoc. Prof. Dr. Pornpimol Rongnoparat for her kindly advices for P450 characterization and facilities in her laboratory at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University.

Especially for friends and colleagues who supported me throughout my study at Chulalongkorn University. I am grateful thank to all the people who I could not list their names here but they were my backup in every moments.

I extend my sincrere and deepest gratitude to my family for their supports, real love, patients, encouragement and understanding.

Finally, I would like to acknowledge the fund support provide by Office of the Higher Education Commission, the Program Strategic Frontier Research Network (year 2008)

Siriluk Sintupachee

CONTENTS

Page

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES