Studies on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymeA Synthase Genes from *Hevea brasiliensis*

Nualpun Sirinupong

Doctor of Philosophy Thesis in Biochemistry

Prince of Songkla University

2004

T
QK
Sub Key 142961
21 ก.ค. 2547

Thesis Title	Studies on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymeA Synthase Genes from *Hevea brasiliensis*
Author	Miss Nualpun Sirinupong
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2003

Abstract

Rubber tree is an important economic crop in Thailand, generating revenues from production and export of natural rubber to the world market. Previous work in our laboratory had identified a 1.8 kb cDNA (*hmgs1*) encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase) from *Hevea brasiliensis* involved in rubber biosynthesis pathway. It was suggested that more than one gene encoding HMG-CoA synthase in *H. brasiliensis*, may exist as is the case of other plants. The goal of this study was to investigate a new *hmgs* gene in *H. brasiliensis*. A new cDNA encoding HMG-CoA synthase was obtained by using the *hmgs1* cDNA as a probe. The isolated full-length *hmgs2* cDNA consisted of 1,916 bp which encoded a protein of 464 amino acids with a predicted molecular mass of 51.27 kDa and an isoelectric point of 6.02. HMG-CoA synthase 1 and 2 share 92% nucleotide and 94% amino acid sequences identity. Semiquantitative RT-PCR analysis indicated that *hmgs2* mRNA was more highly expressed in laticifer and petiole than in leaf. Sequence alignment of HMG-CoA synthase and its relative condensing enzyme, ACP synthase III, obtained from searching for HMG-CoA synthase in GenBank database identified three completely conserved residues, Cys^{117}, His^{247}, and Asn^{326}.

Site-directed mutagenesis was employed to construct *hmgs*1 mutants, C117A, N326A, and C117/N326A. These mutant enzymes lacked activity indicating importance of C117 and N326 in the catalytic activity of HMG-CoA synthase. A phylogenetic tree constructed based on the proper multiple alignment, indicated that HMG-CoA synthase 1 and 2 result from recent gene duplication. This is also the case for HMG-CoA synthase and ACP synthase III, which arose from an ancient gene duplication event of an ancestral condensing enzyme in the past. Therefore, a possible secondary structure of HMG-CoA synthase could be predicted based on the X-ray crystallographic model of ACP synthase III. The predicted structure displays a five-layered core structure, α-β-α-β-α, where each α comprises two α-helices and each β is made of a five-strand, mixed β-sheet.

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษายีนสำหรับเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์เอซินเทส จากยางพารา
ผู้เขียน	นางสาวนวลพรรณ ศิรินุพงศ์
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2546

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งทำรายได้จากการผลิตและส่งออกยางธรรมชาติสู่ตลาดโลก จึงน่าสนใจที่จะศึกษาวิถีชีวบวนการสงเคราะห์น้ำยางจากต้นยางพารา เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์เอซินเทส (HMG-CoA synthase) เป็นเอนไซม์หนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในวิถีชีวบวนการสังเคราะห์ยางธรรมชาติ ก่อนนี้ได้มีการโคลนยีนสำหรับ HMG-CoA synthase; *hmgs1* จากยางพาราและพบว่าน่าจะมีมากกว่า 1 ยีน เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น การศึกษานี้ได้ทำการแยกและโคลนยีน สำหรับ HMG-CoA synthase ใหม่, (*hmgs2*) โดยใช้ *hmgs1* เป็นตัวตรวจจับ พบว่า *hmgs2* มีจำนวน 1,916 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนของนิวคลีโอไทด์ 1,392 คู่เบสที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน จำนวน 464 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 51.27 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 6.02 เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ HMG-CoA synthase 1และ 2 มีความเหมือนกัน 92% และ 94% ตามลำดับ การศึกษาการแสดงออกของ *hmgs2* mRNA โดยวิธี semiquantitative RT-PCR ในเนื้อเยื่อต่างๆจากต้นยางพาราที่กำลังให้ผลผลิตพบว่า มีการแสดงออกของ *hmgs2* มากที่สุดในน้ำยางพารา ก้านใบ และใบ ตามลำดับ เช่นเดียวกับ *hmgs1* จาก การค้นหาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จากฐานข้อมูล GenBank พบเอนไซม์ เบตาคีโตอะซิล อะซิล แคริเออโปรตีนซินเทส (β-ketoacyl acyl carrier protein synthase III; ACP Synthase III) จึงนำมาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างเอนไซม์ HMG-CoA synthase และ ACP Synthase III พบกรดอะมิโนที่ไม่เปลี่ยนแปลง (conserved residues) ซึ่งมีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสอง 3 กรดอะมิโน ได้แก่ Cys^{117}, His^{247} และ Asn^{326}

การทำ site-directed mutagenesis และศึกษาการแสดงออกของยีน *hmgs1* ทั้งใน wild type และ mutant พบว่า mutate HMG-CoA synthase ที่ตำแหน่ง Cys^{117} และ Asn^{326} ถูกเปลี่ยนไปเป็นAla มีค่าความว่องไวของเอนไซม์ลดลงแสดงว่าทั้ง Cys^{117} และ Asn^{326} มีผลต่อกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของ HMG-CoA synthase การสร้าง Phylogenetic tree จากการนำการเรียงตัวของกรดอะมิโนมาจัดโดยใช้โปรแกรม multiple sequence alignment ของ HMG-CoA synthase และACP synthase III แสดงว่า HMG-CoA synthase 1 และ 2 เกิดจาก gene duplication เช่นเดียวกับ HMG-CoA synthase

และ ACP synthase III ซึ่งเกิดขึ้นจาก gene duplication ของยีนสำหรับ condensing enzyme ในอดีต ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กัน จึงสามารถทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยอาศัยข้อมูลจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ACP synthase III พบว่า โครงสร้างหลักของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ประกอบด้วย 5 ส่วน คือ α-β-α-β-α, ตามลำดับ ซึ่งแต่ละ α ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยของ α-helices และแต่ละ β ประกอบด้วย 5 หน่วยย่อยของ β-sheet