การหาโครงสร้าง 3 มิติของ xylan-binding xylanase จาก *Bacillus fimus* K-1 ด้วยวิธี homology modeling

พัตราพร จอมเมืองบุตร [1] **คิน เลย์ คู** [2] **กนก รัตนะกนกชัย** [3*]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

และ สุรพงษ์ พินิจกลาง [4]

มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ดินแดง กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการหาโครงสร้าง 3 มิติของ xylan-binding xylanase (XBX) จาก *Bacillus firmus* K-1 ที่ทราบลำดับกรดอะมิโนจากการโคลน และแสดงออกของยีน *xbx* ใน *Escherichia coli* ด้วยวิธี homology modeling โดยใช้โครงสร้าง 3 มิติของไซลาเนสจาก *Bacillus circulans* (1BVV) เป็นแม่แบบ พบว่าโครงสร้าง 3 มิติของ XBX มีลักษณะคล้ายกับ “close right hand” ซึ่งประกอบด้วย 14 β-sheets และ 1 α-helix โดยมี Glu78 และ Glu171 เป็น catalytic site ที่อยู่ในทิศทางตรงกันข้ามและยื่นส่วนของ side chain เข้าไปภายใน cleft Glu78 มีบทบาทเป็น nucleophile โดยสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Gln126 Tyr69 และ Tyr80 ขณะที่ Glu171 เป็น acid/base catalyst ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Asn35 เพียงตำแหน่งเดียว เมื่อพิจารณาค่า Root mean square deviation (RMSD) ที่ได้จากการ superposition โครงสร้างหลักและแต่ละอะตอมภายในโครงสร้างของ XBX กับ 1BVV พบว่ามีค่าเท่ากันคือ 0.329 Å แสดงให้เห็นว่าโครงสร้าง 3 มิติที่หาได้จากวิธี homology modeling มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการหาโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ที่ใช้ระยะเวลาน้อย

คำสำคัญ : *Bacillus firmus* K-1/ Homology Modeling/ โครงสร้าง 3 มิติ/ Xylan-binding Xylanase

**Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

[1] *นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[2] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[3] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[4] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์*

Determination of Three-Dimensional Structure of Xylan-Binding Xylanase from *Bacillus firmus* K-1 by Homology Modeling

Pattraporn Jommuengbout [1], Khin Lay Kyu [2], Khanok Ratanakhanokchai [3]*,

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

and Surapong Pinitglang [4]

University of the Thai Chamber of Commerce, Dindaeng, Bangkok 10400

Abstract

Three-dimensional structure of xylan-binding xylanase (XBX) from *Bacillus firmus* K-1 which had been cloned and expressed xbx in *Escherichia coli* was determined by homology modeling using the X-ray structure of *Bacillus circulans* (1BVV) xylanase as a template. The result showed that the three-dimensional structure of XBX had a shape as a "closed right hand". It contains 14 β-sheets and 1 α-helix. The catalytic sites of XBX are Glu78 and Glu171, which are located opposite to each other in an open cleft and reach into this cleft. Glu78, which is nucleophile, holds in place by interaction to Gln126, Tyr69 and Tyr80, while Glu171, which is acid/base catalyst, forms hydrogen bond with only Asn35. The same Root mean square deviation (RMSD) which was obtained from superposition backbone structure and each atom between XBX and 1BVV were 0.329 Å. These results reveal three-dimensional structure from homology modeling is correctable and believable. This method is an alternative for determination of the three-dimensional structure of enzyme within a short time.

Keywords : *Bacillus firmus* K-1 / Homology Modeling / Three-dimensional Structure / Xylan-Binding Xylanase

**Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

[1] *Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[2] *Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[3] *Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[4] *Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Facutty of Science.*

1. บทนำ

ไซลาเนสจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืช ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ 1-4, β-D xylosidic ในโครงสร้างหลักของไซแลน [1] โดยทั่วไปเอนไซม์กลุ่มนี้ภายในโครงสร้างประกอบด้วยบริเวณ catalytic domain และ noncatalytic domain [2] นักวิจัยหลายท่านสนใจบริเวณ noncatalytic polysaccharide-binding domains เช่น starch- cellulose- และ xylan-binding domains เนื่องจากเป็นบริเวณที่ช่วยให้เอนไซม์ย่อยสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ [3] โดยทำให้เอนไซม์สามารถยึดจับได้อย่างจำเพาะกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำและเกิดปฏิกิริยาอย่างใกล้ชิดระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ [4]

จากการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มวิจัย พบว่าแม้ว่า alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ผลิต XBX ขนาด 23 kDa ที่มีเพียง catalytic domain เมื่อเปรียบเทียบกับไซลาเนสจากแหล่งอื่น แต่ XBX มีส่วนประกอบพิเศษที่สามารถยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้อย่างจำเพาะ (xylan-binding domain) จึงสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายในขั้นตอนเดียว [5] ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่ผลิตไซลาเนสที่สามารถยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่า XBX มีสมบัติเด่น 2 ประการ ประการแรก สามารถย่อยไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ เช่น เปลือกข้าวโพด ฟางข้าว และชานอ้อย ให้เป็นน้ำตาลโดยไม่ต้องผ่านการปรับสภาพต่างๆ ได้ดี [5] การนำไซลาเนสมาย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนอกจากจะได้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารที่มีมูลค่าสูงต่างๆ เช่น แหล่งพลังงานเชื้อเพลิง เอทานอล และสารให้ความหวาน [6] แล้วยังช่วยลดค่าใช้จ่ายของเกษตรกรในการกำจัดวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวที่มีปริมาณสะสมเพิ่มมากขึ้นในแต่ละปี และประการที่สอง สามารถย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษได้ดี ทำให้มีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ [7]

การหาโครงสร้าง 3 มิติด้วยวิธี homology modeling อาศัยหลักการที่เอนไซม์ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันจะมีลักษณะโครงสร้าง 3 มิติเหมือนกัน ซึ่งวิธีนี้มีขั้นตอนในการดำเนินการไม่ยุ่งยาก เพียงแค่ทราบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่ต้องการหาโครงสร้าง จึงทำให้ใช้ระยะเวลาน้อย [8] เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี X-ray crystallography และ multidimensional nuclear magnetic resonance ซึ่งเป็นวิธีที่มีความยุ่งยากในการเตรียมโปรตีนเพื่อนำมาวิเคราะห์ และต้องการผู้เชี่ยวชาญในการแปลผลของข้อมูล จึงทำให้ใช้ระยะเวลานาน [9]

Chang และคณะ [10] ทำการโคลน และแสดงออกของยีน *xyn11A* ซึ่ง encode XBX ของไซลาเนสจาก *Bacillus firmus* K-1 ใน *Escherichia coli* ทำให้ทราบลำดับกรดอะมิโนของ XBX และพบว่าจัดอยู่ใน glycosyl hydrolase family 11 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเพื่อหาโครงสร้าง 3 มิติของ XBX ด้วยวิธี homology modeling และศึกษาบริเวณเร่งปฏิกิริยาและสมบัติของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างของ XBX เพื่อเป็นแนวทางในการวิเคราะห์หา subsites ของ substrate-binding site และ xylan-binding domain ซึ่งคาดว่าจะเป็นแฟมิลีใหม่ในโอกาสต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 ข้อมูลลำดับกรดอะมิโน

ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ XBX ได้มาจาก Chang และคณะ [10] ซึ่งมี GenBank accession number คือ AY376352

2.2 การหาโครงสร้าง 3 มิติของ XBX ด้วยวิธี homology modeling

2.2.1 การค้นหาโครงสร้าง 3 มิติของไซลาเนสแฟมิลี 11

ทำการค้นหา ID-code ของไซลาเนสแฟมิลี 11 จากแหล่งอื่นที่ทราบโครงสร้าง 3 มิติในฐานข้อมูล Carbohydrate-active enzyme [11] จากนั้นเข้าฐานข้อมูลธนาคารโปรตีน (Protein data bank) [12] เพื่อค้นหาโครงสร้าง 3 มิติของไซลาเนสในแต่ละ ID-code แล้วจึงบันทึกไฟล์ในนามสกุล .pdb

2.2.2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนแบบ Multiple sequence alignment

ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนแบบ Multiple sequence alignment โดยใช้ฐานข้อมูล T-Coffee [13]

2.2.3 การเลือกแม่แบบโครงสร้าง 3 มิติของไซลาเนสแฟมิลี 11

ทำการค้นหาโครงสร้าง 3 มิติของไซลาเนสแฟมิลี 11 จากฐานข้อมูล Carbohydrate active enzyme และ Protein data bank จากนั้นเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างไซลาเนสแฟมิลี 11 จากแหล่งอื่นกับ XBX ด้วยวิธี Pairwise sequence alignment [14] โดยใช้โปรแกรม Homology (Insight II) [8] ที่ทำงานบนเครื่องคอมพิวเตอร์ Silicon graphic รุ่น O2 (Silicon graphics, Inc., USA) จะได้ความเหมือนกันของกรดอะมิโน (% identity) สำหรับเลือกโครงสร้างของไซลาเนสที่จะใช้เป็นแม่แบบ โดยไซลาเนสที่มี % identity สูงสุดจะถูกเลือกมาเป็นแม่แบบในการทำนายโครงสร้าง 3 มิติของ XBX

การคัดเลือกโครงสร้างของเอนไซม์ที่ใช้เป็นแม่แบบเป็นสิ่งสำคัญที่สุดในการหาโครงสร้างด้วยวิธี homology modeling ถ้าโครงสร้างที่ใช้เป็นแม่แบบมี % identity สูง จะทำให้ได้โครงสร้าง 3 มิติที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ

2.2.4 การสร้างโครงสร้าง 3 มิติ

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง XBX กับไซลาเนสที่ใช้เป็นแม่แบบ โดยการเปิดไฟล์โครงสร้างของแม่แบบ (นามสกุล .pdb) ด้วยโปรแกรม Insight II จากเครื่องคอมพิวเตอร์ Silicon graphic รุ่น O2 [8] และใช้โปรแกรม Homology เรียกดูข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของแม่แบบ (ตัวพิมพ์ใหญ่) และ XBX (ตัวพิมพ์เล็ก) แล้วจึงทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ทั้งสอง ด้วยวิธี Pairwise sequence alignment เพื่อจัดตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันให้มาอยู่ใกล้กัน จากนั้นทำการสร้างโครงสร้าง 3 มิติ โดยโปรแกรม Homology จะค่อยๆ เลียนแบบพิกัดของอะตอมต่างๆ ในโครงสร้างของแม่แบบไปเป็นโครงสร้าง 3 มิติของ XBX

เมื่อการสร้างโครงสร้าง 3 มิติของ XBX เสร็จสมบูรณ์แล้ว ลำดับกรดอะมิโนของ XBX จะเปลี่ยนจากอักษรตัวพิมพ์เล็กไปเป็นอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนบริเวณของลำดับกรดอะมิโนที่ยังไม่ได้สร้างจะเป็นอักษรตัวพิมพ์เล็กเช่นเดิม

2.2.5 การตรวจสอบความถูกต้องของโครงสร้าง 3 มิติ

ตรวจสอบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันของ XBX กับไซลาเนสที่เป็นแม่แบบ เพื่อหาความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในระหว่างที่ทำการสร้างโครงสร้าง และแก้ไขให้ได้โครงสร้าง 3 มิติที่ถูกต้องและสมบูรณ์ ซึ่งเรียกตำแหน่งดังกล่าวว่า "mismatch" โดยโปรแกรม Homology จะเปลี่ยน side chain ของกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวให้เป็นกรดอะมิโนของ XBX ขณะที่สร้างโครงสร้าง 3 มิติ แล้วเก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไว้ในไฟล์ mutated side chain

ตรวจสอบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ไม่สร้างพันธะเปปไทด์ ซึ่งสังเกตได้จากโครงสร้างแบบ Ribbon โดยตำแหน่งดังกล่าวจะทำให้โครงสร้างในบริเวณนั้นขาด นอกจากนี้สามารถสังเกตได้จากการเรียกดูลำดับกรดอะมิโน โดยจะเห็นสัญลักษณ์ "-" (gap) คั่นอยู่ระหว่างตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ไม่สร้างพันธะ จากนั้นขยายโครงสร้างด้วยโปรแกรม Insight II จะทำให้ทราบตำแหน่งและชนิดของกรดอะมิโนดังกล่าว โดยต้องสังเกตด้วยว่าด้านที่ไม่เกิดพันธะเป็นด้าน C-terminal หรือ N-terminal แล้วจึงทำการสร้างพันธะเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Biopolymer (Insight II) [8]

2.2.6 การทำให้โครงสร้างมีความเสถียร

หลังจากที่สร้างพันธะเปปไทด์ด้วยโปรแกรม Biopolymer เรียบร้อยแล้ว จึงทำการ minimization เพื่อทำให้โครงสร้างมีความเสถียร โดยการเติมอะตอมของไฮโดรเจนภายในโครงสร้างของ XBX ที่ pH = 7.0 ด้วยโปรแกรม Biopolymer โดยกำหนดค่า charge และ potential ด้วยโปรแกรม Force field (Insight II) [8] จากนั้นเติมโมเลกุลของน้ำแบบ layer (น้ำช่วยตรึงโครงสร้างของเอนไซม์) ซึ่งบรรจุอยู่ในกล่องขนาด 60x60x60 Å ที่ครอบทั้งโมเลกุลของ XBX แล้วทำการ minimization โดยใช้โปรแกรม Discover (Insight II) [8] ด้วยวิธี Steepest Descent จำนวน 1,000 ครั้ง ซึ่งมี derivative เท่ากับ 0.5 Å [15] และวัดความแตกต่างระหว่างโครงสร้างทั้ง 2 ในรูปของค่า RMSD โดยนำโครงสร้าง 3 มิติของ XBX และโครงสร้างแม่แบบมาทำการ superposition ระหว่างโครงสร้างหลักและแต่ละอะตอมในโครงสร้างของทั้งสองเอนไซม์

2.3 การศึกษาลักษณะโครงสร้าง 2 มิติของ XBX

คำนวณลักษณะโครงสร้าง 2 มิติของ XBX ด้วยโปรแกรม Homology จากนั้นศึกษากรดอะมิโนและพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นภายในบริเวณเร่งปฏิกิริยาด้วยโปรแกรม Insight II และศึกษาสมบัติการละลายน้ำของกรดอะมิโนจากข้อมูลของ Black และ Mould [16] ซึ่งบ่งชี้ด้วยค่า hydrophobicity โดยกำหนดให้ค่า hydrophobicity ของ phenylalanine เท่ากับ 1.0 (ละลายน้ำได้ค่อนข้างยาก) ขณะที่ค่า hydrophobicity ของ arginine เท่ากับ 0.0 (ละลายน้ำได้ดีมาก)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การหาโครงสร้าง 3 มิติของ XBX ด้วยวิธี homology modeling

3.1.1 การค้นหาโครงสร้าง 3 มิติของไซลาเนสแฟมิลี 11 จากแหล่งต่างๆ

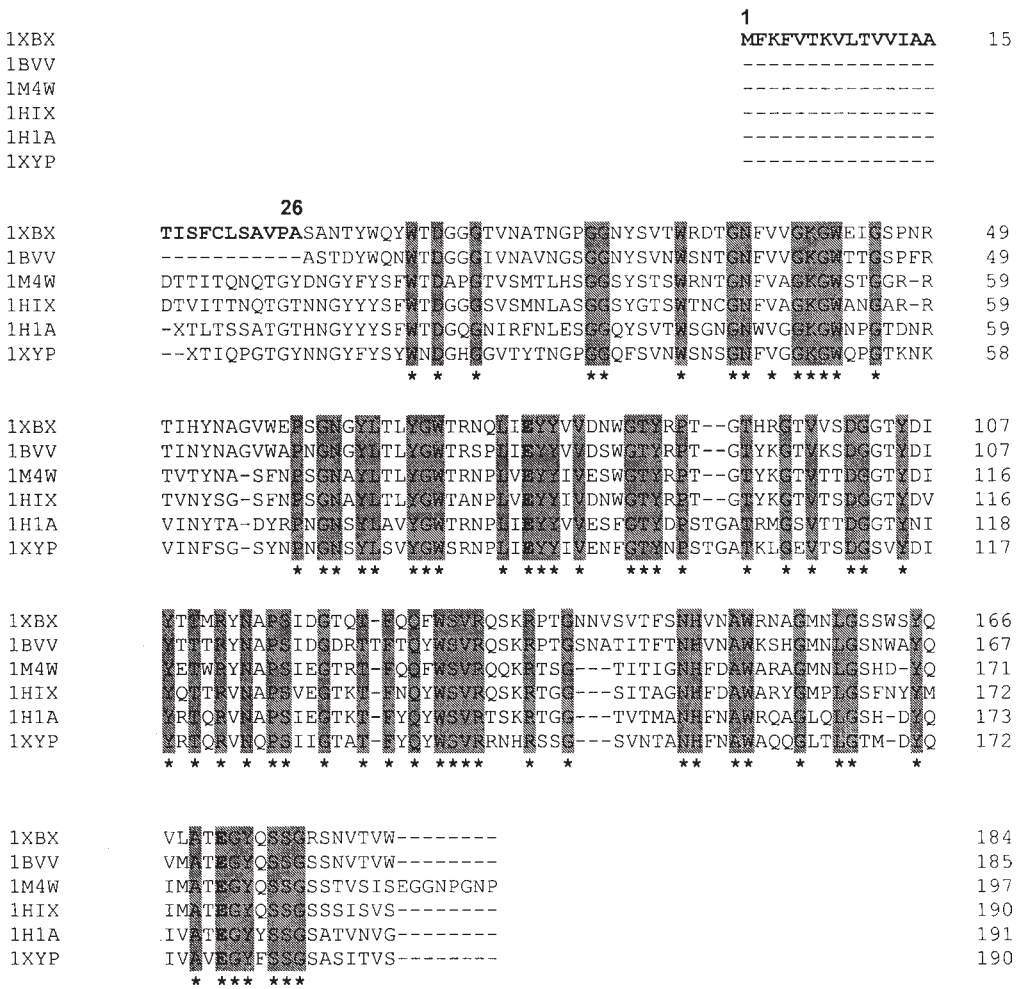
จากการค้นหาไซลาเนสแฟมิลี 11 ที่ทราบโครงสร้าง 3 มิติจากฐานข้อมูล Carbohydrate active enzyme [11] พบว่ามีทั้งหมด 13 โครงสร้าง จากจุลินทรีย์ 13 ชนิด โดยทั้งหมดวิเคราะห์โครงสร้าง 3 มิติด้วยวิธี X-ray diffraction ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโน (% identity) ระหว่าง XBX กับไซลาเนสแฟมิลี 11ที่ได้จากฐานข้อมูล Carbohydrate active enzyme [11] และด้วยวิธี Pairwise sequence alignment

ลำดับที่	จุลินทรีย์	GenBank accession number	SwissProt accession number	รหัส PDB	% Identity
1	*Bacillus circulans*	AF490980	P09850	1BVV	77.84
2	*Nonomuraea flexuosa*	AJ508952	Q8GMV7	1M4W	60.00
3	*Streptomyces sp. S38*	X98518	Q59962	1HIX	58.00
4	*Chaetomium thermophilum*	AY366479	Q8J1V6	1H1A	56.30
5	*Hypocrea jecorina*	X69573	P36217	1XYP	55.60
6	*Trichoderma harzianum*	-	P48793	1XND	51.10
7	*Paecilomyces varioti bainier*	-	P81536	1PVX	49.50
8	*Bacillus subtilis*	-	Q7SID8	1IGO	47.80
9	*Bacillus agaradhaerens*	A48223	-	1H4G	44.88
10	*Hypocrea jecorina*	X69574	P36218	1XYN	44.40
11	*Dictyoglomus thermophilum*	U76545	P77853	1F5J	44.20
12	*Aspergillus kawachii*	S45138	P33557	1BK1	42.86
13	*Aspergillus niger*	A19535	P55329	1UKR	40.95

3.1.2 การเลือกแม่แบบโครงสร้าง 3 มิติของไซลาเนสแฟมิลี 11

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง XBX กับไซลาเนสแฟมิลี 11 ด้วยวิธี Pairwise sequence alignment พบว่าไซลาเนสจาก *Bacillus circulans* ที่มีรหัส PDB เป็น 1BVV ซึ่งได้จากการโคลนและแสดงออกของยีนใน *Escherichia coli* [17] เช่นเดียวกับ XBX มี % identity สูงสุด (77.84%) (ตารางที่ 1) ดังนั้นจึงเลือก 1BVV เป็นแม่แบบในการหาโครงสร้าง 3 มิติของ XBX



รูปที่ 1 Multiple sequence alignment ด้วยวิธี T-Coffee [13] ของ XBX กับไซลาเนสแฟมิลี 11 ที่ได้จากฐานข้อมูล Protein data bank ได้แก่ ไซลาเนสจาก *Bacillus circulans* (1BVV) *Nonomuraea flexuosa* (1M4W) *Streptomyces* sp. S38 (1HIX) *Chaetomium thermophilum* (1H1A) และ *Hypocrea jecorina* (1XYP) สำหรับสัญลักษณ์ "-" คือ gap และสัญลักษณ์ "*" คือบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์

3.1.3 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนแบบ Multiple sequence alignment ด้วยวิธี T-Coffee

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ XBX กับไซลาเนสแฟมิลี 11 จากเชื้อ 5 ชนิดที่มี % identity สูงสุด จากตารางที่ 1 ได้แก่ 1BVV 1M4W 1HIX 1H1A และ 1XYP แสดงดังรูปที่ 1 จากรูปสังเกตเห็นว่ากรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 26 (ตัวหนา) ของ XBX เป็นบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนที่ไม่ปรากฏใน 1BVV และไซลาเนสจากเชื้ออื่น คาดว่าบริเวณดังกล่าวน่าจะเป็น signal sequence ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนใน *Escherichia coli* เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนลำดับที่ 1-28 ที่เป็นบริเวณ signal sequence ของ 1BVV [18] ซึ่งถูกตัดออก ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของ XBX จึงตัดลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1 ถึง 26 ออก ทำให้ XBX มีลำดับกรดอะมิโนเหลือทั้งหมด 184 residues (จากเดิม 210 residues) โดยเริ่มนับจาก

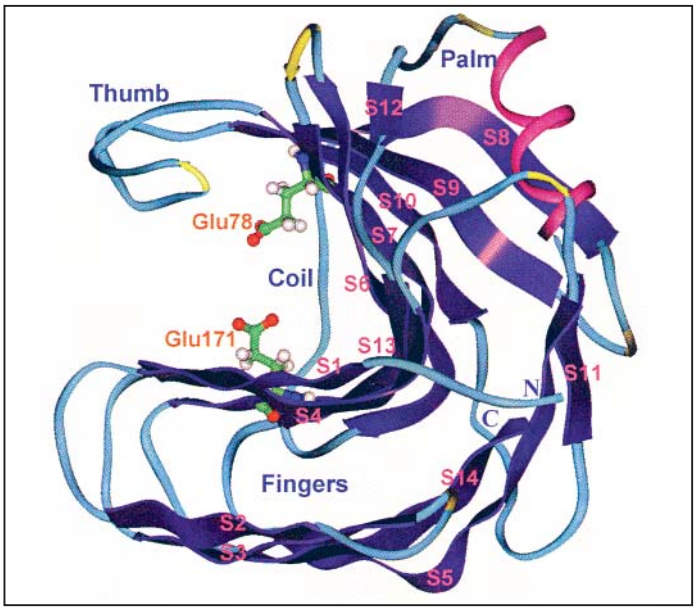
serine ตำแหน่งที่ 1 จนถึง tryptophan ตำแหน่งที่ 184 นอกจากนี้พบว่า Glu78 และ Glu171 ของ XBX เป็นบริเวณอนุรักษ์ของ glycosyl hydrolases family 11 ซึ่งมีบทบาทเป็น catalytic site ของเอนไซม์ [19]

3.1.4 การสร้างโครงสร้าง 3 มิติ

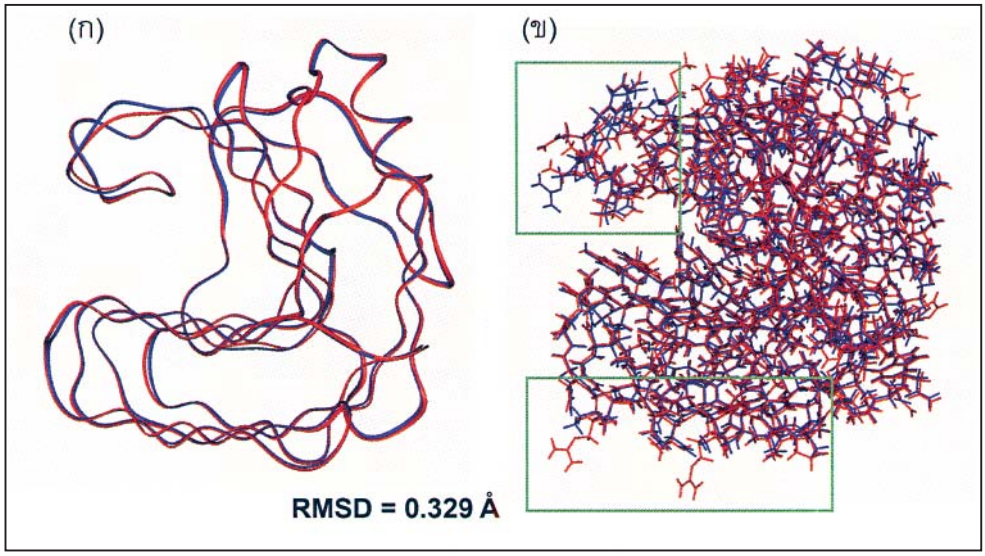
ผลจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง XBX (ตัวพิมพ์เล็ก) กับ 1BVV (ตัวพิมพ์ใหญ่) ด้วยวิธี Pairwise sequence alignment แสดงดังรูปที่ 2 จากนั้นทำการสร้างโครงสร้าง 3 มิติของ XBX โดยการเลียนแบบพิกัดของอะตอมต่างๆ ในโครงสร้าง 3 มิติของไซลาเนสจาก *Bacillus circulans* (1BVV) ที่ใช้เป็นแม่แบบ ซึ่งโปรแกรม Homology จะค่อยๆ สร้างกรดอะมิโนทีละ residue และเชื่อมแต่ละ residue ด้วยพันธะเปปไทด์ ตั้งแต่ serine ตำแหน่งที่ 1 จนถึง tryptophan ตำแหน่งที่ 184 แล้วจึงตรวจสอบความถูกต้องของโครงสร้าง พบว่าด้าน -COOH ของ Thr123 ไม่สร้างพันธะเปปไทด์กับด้าน -NH_2 ของ Phe124 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวทำให้โครงสร้างแบบ Ribbon ขาด และมี gap เกิดขึ้นระหว่าง Thr123 กับ Phe124 ภายในลำดับกรดอะมิโน จึงสร้างพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนทั้งสองโดยใช้โปรแกรม Biopolymer และทำการ minimization เพื่อให้โครงสร้างมีความเสถียรและใกล้เคียงกับสภาวะจริง ทำให้ได้โครงสร้าง 3 มิติของ XBX ที่สมบูรณ์ (รูปที่ 3)

```
1BVV(1)    ASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFR   (49)
XBX (1)    santywqywtdgggtvnatngpggnysvtwrdtgnfvvgkgweigspnr   (49)

1BVV(50)   TINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTV   (98)
XBX (50)   tihynagvwepsgngyltlygwtrnqlieyyvvdnwgtyrptgthrgtv   (98)

1BVV(99)   KSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFT   (147)
XBX (99)   vsdggtydiyttmrynapsidgtqt-fqqfwsvrqskrptgnnvsvtfs   (146)

1BVV(148)  NHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTVW              (185)
XBX (147)  nhvnawrnagmnlgsswsyqvlategyqssgrsnvtvw              (184)
```

รูปที่ 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง XBX (184 residues) กับ 1BVV (185 residues) ด้วยวิธี Pairwise sequence alignment



รูปที่ 3 โครงสร้าง 3 มิติของ XBX จาก *Bacillus firmus* K-1 ที่ได้จากวิธี homology modeling และแสดงบริเวณของ β-sheet และ α-helix ภายในโครงสร้าง



รูปที่ 4 การ superposition (ก) โครงสร้างหลัก และ (ข) แต่ละอะตอมภายในโครงสร้าง 3 มิติของ XBX (สีแดง) กับ 1BVV (สีน้ำเงิน) ที่ใช้เป็นแม่แบบ โดยกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวแสดงตำแหน่งของ side chain ที่ไม่ซ้อนทับกัน

เมื่อพิจารณาค่า RMSD ที่ได้จากการ superposition ระหว่างโครงสร้างหลัก (backbone) และแต่ละอะตอมภายในโครงสร้าง 3 มิติของ XBX (สีแดง) กับ 1BVV (สีน้ำเงิน) พบว่าได้ค่า RMSD เท่ากันคือ 0.329 Å แสดงว่าโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จากทั้ง 2 แหล่งเหมือนกันมาก (ค่า RMSD เป็นค่าทางสถิติที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่าง 2 โครงสร้างหรือมากกว่า กรณีที่ค่า RMSD อยู่ในช่วง 0.0-0.5 Å แสดงว่าโครงสร้างทั้งสองเหมือนกันมาก และกรณีที่ค่า RMSD <1.5 Å แสดงว่าโครงสร้างทั้งสองแตกต่างกันเล็กน้อย [20]) จากรูปที่ 4 ก สังเกตเห็นว่าโครงสร้างแบบ Ribbon ของไซลาเนสทั้งสองชนิดมีลักษณะการม้วนและบิดตัวภายในโครงสร้างหลักใกล้เคียงกัน แสดงว่าโครงสร้าง 3 มิติของ XBX ที่ได้จากวิธี homology modeling เหมือนกับโครงสร้าง 3 มิติของ 1BVV ที่ได้จากวิธี X-ray diffraction แต่จากการ superposition แต่ละอะตอมภายในโครงสร้างของไซลาเนสทั้งสอง ดังรูปที่ 4 (ข) พบว่ามีบางตำแหน่งที่ side chain ไม่ซ้อนทับกัน ได้แก่ บริเวณ hairpin loop thumb (กรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวด้านบน) และบริเวณด้านล่างของ β-sheet ที่เป็น sandwich (กรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวด้านล่าง) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลำดับกรดอะมิโนของ XBX กับ 1BVV เหมือนกันเพียง 78% และเหลืออีก 22% เป็นตำแหน่งของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน จึงเป็นผลให้ side chain ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างของบริเวณดังกล่าวมีการหมุนพันธะในทิศทางที่แตกต่างกัน

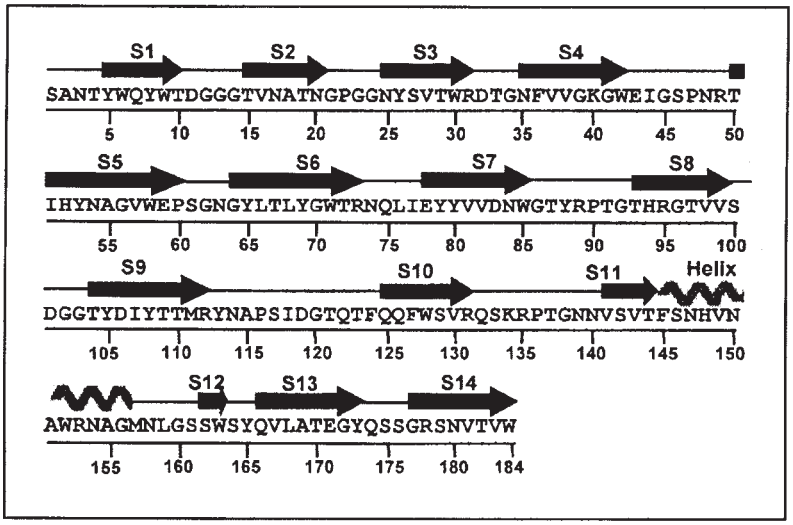
3.2 การศึกษาลักษณะโครงสร้าง 2 มิติของ XBX

3.2.1 การศึกษาลักษณะโครงสร้าง 2 มิติ

ลักษณะโครงสร้าง 2 มิติของ XBX ประกอบด้วย 14 β-sheets และ 1 α-helix ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 5 ลักษณะโครงสร้าง 3 มิติโดยรวมของ XBX คล้ายกับ “close right hand” (รูปที่ 3) ที่ประกอบด้วย 3 บริเวณที่สำคัญ บริเวณแรกคือ thumb hairpin loop ที่เปรียบเสมือนนิ้วหัวแม่มือ ซึ่งอยู่ระหว่าง sheet 9 และ sheet 10 บริเวณที่สองคือ loop ที่เรียกว่า palm ที่เปรียบเสมือนฝ่ามือ ซึ่งอยู่ระหว่าง α-helix กับ sheet 12 และบริเวณที่สามคือ β-sheet ที่เปรียบเสมือนนิ้วมือ ซึ่งอยู่ด้านล่าง ได้แก่ sheet 1, 2, 3, 4, 5, 13 และ 14 จัดเรียงตัวสลับกันไปมาคล้ายกับ sandwich นอกจากนี้ยังมี loop ที่เรียกว่า coil ซึ่งอยู่ระหว่าง sheet 7 และ sheet 8 พาดอยู่บริเวณปากของ cleft

ตารางที่ 2 ตำแหน่งและชนิดของกรดอะมิโนใน XBX ที่จัดเรียงตัวเป็น β-sheet และ α-helix

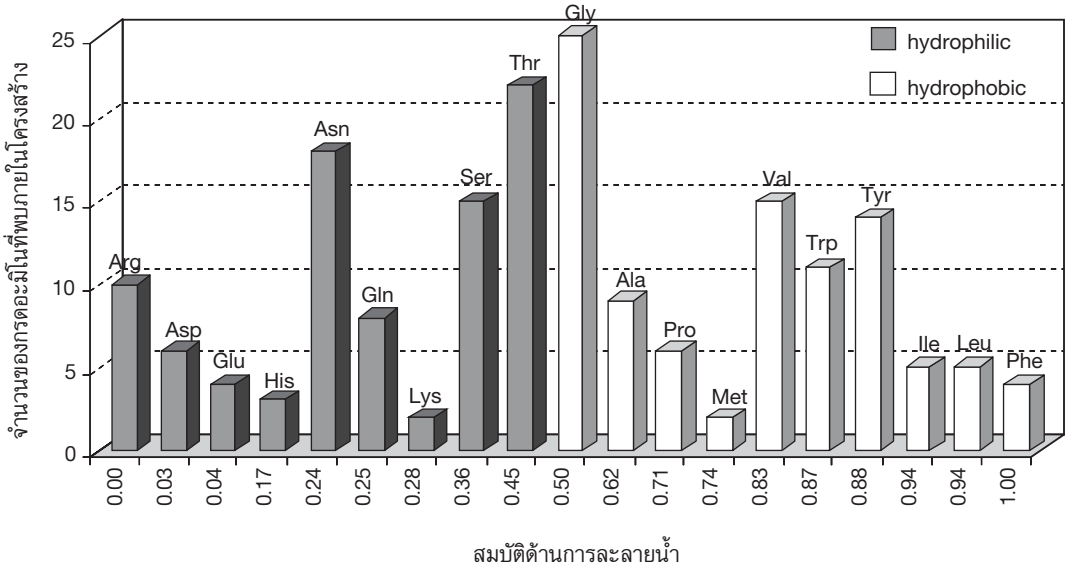
β-sheet	ตำแหน่งของกรดอะมิโน		จำนวนของกรดอะมิโน	ลำดับกรดอะมิโน
	Start	End		
1	5	10	6	YWQYWT
2	15	20	6	TVNATN
3	25	31	7	NYSVTWR
4	35	42	8	NFVVGKGW
5	50	60	11	TIHYNAGVWEP
6	64	73	10	GYLTLYGWTR
7	78	85	8	EYYVVDNW
8	93	99	7	THRGTVV
9	104	111	8	TYDIYTTMR
10	125	131	7	QQFWSVR
11	141	144	4	VSVT
Helix	145	156	12	FSNHVNAWRNAG
12	162	163	2	SW
13	166	173	8	QVLATEGY
14	177	184	8	GRSNVTVW



รูปที่ 5 ไดอะแกรมแสดงตำแหน่งและชนิดของกรดอะมิโนที่จัดเรียงตัวเป็น β-sheet และ α-helix ภายในโครงสร้าง 2 มิติของ XBX (S หมายถึง β-sheet)

3.2.2 การศึกษาสมบัติของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างของ XBX

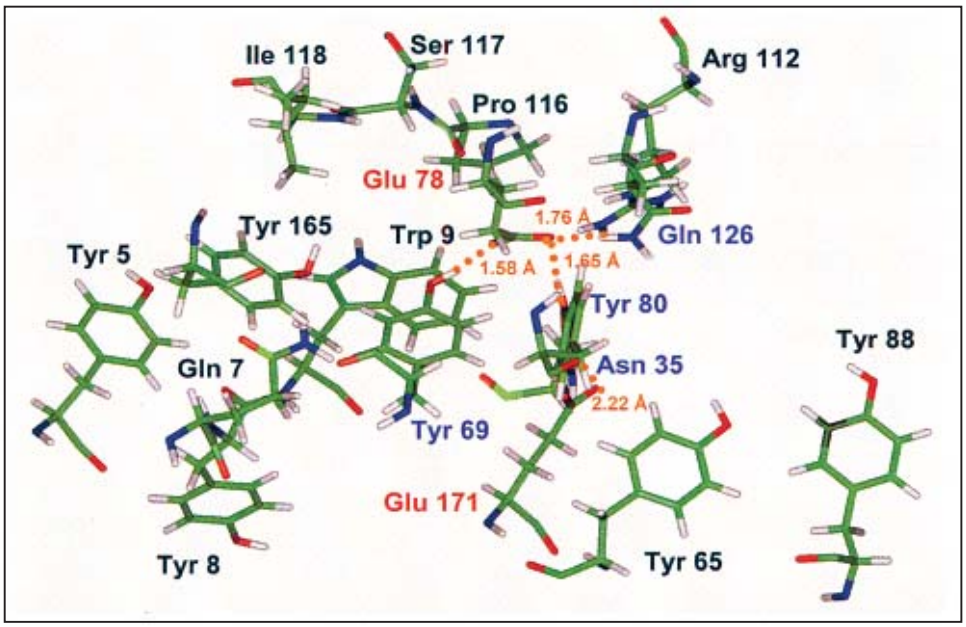
โครงสร้างของ XBX ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 19 ชนิด ไม่พบชนิดเดียวคือ cysteine โดยแต่ละชนิดกระจายอยู่ทั่วไปในโครงสร้างในปริมาณที่แตกต่างกัน และเมื่อพิจารณาสมบัติด้านการละลายน้ำของกรดอะมิโนภายในโครงสร้าง โดยบ่งชี้ความสามารถในการละลายน้ำในรูปของค่า hydrophobicity [16] ซึ่งกรดอะมิโนที่มีค่า hydrophobicity น้อยกว่า 0.5 เป็นพวก hydrophilic ซึ่งละลายน้ำได้ค่อนข้างดี ขณะที่กรดอะมิโนที่มีค่า hydrophobicity มากกว่า 0.5 เป็นพวก hydrophobic ละลายน้ำได้ค่อนข้างยาก จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนจำนวน 184 residues ของ XBX พบกลุ่มของ hydrophobic (F, L, I, Y, W, V, M, P, C, A และ G) ทั้งหมด 96 residues และกลุ่มของ hydrophilic (T, S, K, Q, N, H, E, D และ R) ทั้งหมด 88 residues ดังรูปที่ 6



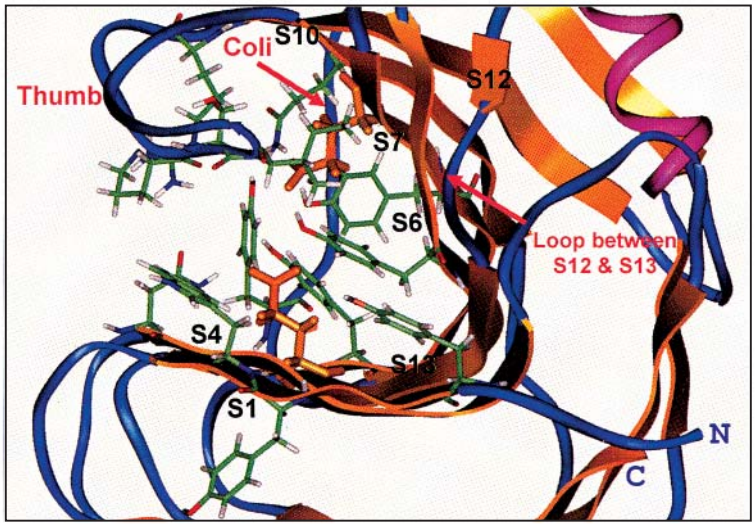
รูปที่ 6 จำนวนของกรดอะมิโนที่พบภายในโครงสร้างของ XBX โดยเรียงลำดับกรดอะมิโนที่มีค่า hydrophobicity จากน้อยไปมาก

3.2.3 การศึกษากรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ XBX

กรดอะมิโนภายใน cleft (รูปที่ 7) เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ XBX ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น catalytic site ได้แก่ Glu78 และ Glu171 ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์ของไซลาเนสแฟมิลี 11 [19, 21, 22, 23] และบริเวณที่ทำหน้าที่เป็น substrate-binding site มีทั้งหมด 15 residues ได้แก่ Tyr5 Gln7 Tyr8 Trp9 Asn35 Tyr65 Tyr69 Tyr80 Tyr88 Arg112 Pro116 Ser117 Ile118 Gln126 และ Tyr165 ดังรูปที่ 7 และ ตารางที่ 3



รูปที่ 7 กรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ XBX และพันธะไฮโดรเจน (เส้นประสีส้ม) ที่เกิดขึ้นระหว่าง Glu78 และ Glu171 กับกรดอะมิโนข้างเคียง



รูปที่ 8 ตำแหน่งของ β-sheet (สัญลักษณ์ “S”) และ loop ที่เรียงตัวกันทำให้ได้โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นร่องภายในโครงสร้างของ XBX

เมื่อพิจารณาตำแหน่งของกรดอะมิโนภายในโครงสร้าง 2 มิติ จากตารางที่ 3 และรูปที่ 8 พบว่า บริเวณเร่งปฏิกิริยาของ XBX ประกอบด้วยส่วนของโครงสร้างที่เป็น β-sheet ได้แก่ S1 S4 S6 S7 S10 และ S13 สำหรับ Glu78 และ Glu171 พบใน S7 และ S13 ตามลำดับ และส่วนของโครงสร้างที่เป็น loop ได้แก่ loop ที่เรียกว่า thumb, coil และ loop ที่อยู่ระหว่าง S12 และ S13 จัดเรียงตัวกันทำให้ได้โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นร่องเรียกว่า cleft ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไซแลน

ตารางที่ 3 ตำแหน่งกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ XBX และแสดงลักษณะของ side chain ของกรดอะมิโน และตำแหน่งที่พบภายในโครงสร้าง 2 มิติของ XBX

ตำแหน่งกรดอะมิโนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา	ลักษณะของ side chain	ตำแหน่งที่พบภายในโครงสร้าง 2 มิติ
Tyr5	hydroxyl และ aromatic	β-Sheet 1
Gln7	amide	β-Sheet 1
Tyr8	hydroxyl และ aromatic	β-Sheet 1
Trp9	aromatic	β-Sheet 1
Asn35	amide	β-Sheet 4
Tyr65	hydroxyl และ aromatic	β-Sheet 6
Tyr69	hydroxyl และ aromatic	β-Sheet 6
Glu78	acidic	β-Sheet 7
Tyr80	hydroxyl และ aromatic	β-Sheet 7
Tyr88	hydroxyl และ aromatic	Coil
Arg112	basic	Thumb
Pro116	-	Thumb
Ser117	hydroxyl	Thumb
Ile118	aliphatic hydrocarbon	Thumb
Gln126	amide	β-Sheet 10
Tyr165	hydroxyl และ aromatic	ระหว่าง β-Sheet 12 และ β-Sheet 13
Glu171	acidic	β-Sheet 13

ในสภาวะที่ยังไม่มีไซแลนเข้าทำปฏิกิริยา catalytic site ของ XBX จะเกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้นระหว่าง glutamic acid ทั้งสองตำแหน่งกับกรดอะมิโนชนิดอื่นที่อยู่ใกล้เคียง [24, 25] ดังรูปที่ 7 ซึ่งพบว่า Glu78 สร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Tyr69 Tyr80 และ Gln126 โดยมีระยะห่างเท่ากับ 1.58 1.65 และ 1.76 Å ตามลำดับ ขณะที่ Glu171 สร้างพันธะไฮโดรเจนกับ Asn35 เพียงตำแหน่งเดียว โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.22 Å เนื่องจาก Glu78 มีบทบาทเป็น nucleophile จึงต้องอาศัย Gln126 Tyr69 และ Tyr80 ช่วยให้อิเล็กตรอนวิ่งไปมา เพื่อสามารถให้อิเล็กตรอนได้ดี ขณะที่ Glu171 มีบทบาทเป็น acid/base catalyst เมื่อเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ Asn35 ซึ่งเป็นพวก amide ทำให้สามารถให้และรับอิเล็กตรอนได้

4. สรุปผลการวิจัย

การหาโครงสร้าง 3 มิติของ XBX ด้วยวิธี homology modeling ทำได้โดยใช้ไซลาเนสจาก *Bacillus circulans* (1BVV) ซึ่งมี % identity กับ XBX สูงสุดเป็นแม่แบบ โครงสร้าง 3 มิติของ XBX ที่ได้มีลักษณะโดยรวมคล้าย "close right hand" ที่ประกอบด้วย 3 บริเวณที่สำคัญ ได้แก่ thumb (นิ้วหัวแม่มือ) palm (ฝ่ามือ) และ β-sheet ที่อยู่ด้านล่าง (นิ้วมือ) จากการศึกษาลักษณะโครงสร้าง 2 มิติของ XBX ที่คำนวณจากโปรแกรม Homology พบว่าประกอบด้วย 14 β-sheets และ 1 α-helix บริเวณเร่งปฏิกิริยามี Glu78 และ Glu171 ทำหน้าที่เป็น catalytic site ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นบริเวณอนุรักษ์ของไซลาเนสแฟมิลี 11 สำหรับค่า RMSD ที่ได้จากการ superposition โครงสร้างหลัก และแต่ละอะตอมภายในโครงสร้าง 3 มิติของ XBX กับ 1BVV มีค่าเท่ากับ 0.329 Å แสดงว่าลักษณะโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จากวิธี homology modeling และ X-ray diffraction ค่อนข้างเหมือนกัน ดังนั้นการหาโครงสร้าง 3 มิติของ XBX ด้วยวิธีดังกล่าวจึงมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ และสามารถนำไปศึกษาเพื่อหาจำนวนของ subsite ภายใน substrate-binding site และบริเวณ xylan-binding domain ของ XBX ซึ่งคาดว่าจะเป็นแฟมิลีใหม่ได้ในโอกาสต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ที่ให้ทุนวิจัยสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ที่ได้ให้การสนับสนุนการใช้โปรแกรมต่างๆ และเครื่องคอมพิวเตอร์ Silicon graphic รุ่น O2 ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

1. Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P., 1993, "β-1,4-D-Xylan-Degrading Enzyme Systems: Biochemistry, Molecular Biology and Applications," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 17, pp. 259-289.

2. Tomme, P., Warren, R. A. J., and Gilkes, N. R., 1995 "Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi," *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 37, pp. 1-81.

3. Ratanakhanokchai, K., Noiduang, P., and Kyu, K. L., 2002, "Two Extracellular Endoxylanases from Alkaliphilic *Bacillus firmus* Differ in Their Synthesis," *Biotechnology Letters*, Vol. 24, pp. 1487-1490.

4. Nagy, T., Simpson, P., Williamson, M. P., Hazlewood, G. P., Gilbert, H. J., and Orosz, L., 1998, "All Three Surface Tryptophans in Type IIa Cellulose Binding Domains Play a Pivotal Role in Binding Both Soluble and Insoluble Ligand," *FEBS Letter*, Vol. 429, pp. 312-316.

5. Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., and Tanticharoen, M., 1999 "Purification and Properties of Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. K-1," *Appiled and Environmental Microbiology*, Vol. 65, pp. 694-697.

6. Colins, T., Gerday, C., and Feller, G., 2004, "Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases," *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 29, pp. 3-23.

7. Kyu, K. L., Ratanakhanokchai, K., Tanticharoen, M., Ratanarojmongkol, T., and Chen, S. T., 2001, "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials and Kraft Pulps by Xylanolytic Enzymes from Alkaliphlic *Bacillus* sp. K-1," *Journal of the National Research Council of Thailand*, Vol. 33, pp. 40-54.

8. Insight II, Version 2000, San Diego: Accelrys Inc. (http://www.accelrys.com), 2001.

9. MacArthur, M. W., Driscoll, P. C., and Thornton, J. M., 1994, "NMR and Crystallography-Complementary Approaches to Structure Determination," *Trends in Biotechnology*, Vol. 12, pp. 149-153.

10. Chang, P., Tsai, W. S., Tsai, C. L., and Tseng, M. J., 2004, "Cloning and Characterization of Two Thermostable Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus firmus*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 319, pp. 1017-1025.

11. http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/

12. http://www.rcsb.org/pdb/

13. www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html

14. Needleman, S. B., and Wunsch, C. D., 1970, "A General Method Applicable to the Search for Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins", *Journal of Molecular Biology*, Vol. 48, pp. 443-453.

15. Lee, K. W., and Briggs, J. M., 2004, "Molecular Modeling Study of the Editing Active Site of *Escherichia coli* Leucyl-tRNA Synthetase: Two Amino Acid Binding Sites in the Editing Domain," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Vol. 54, pp. 693-704.

16. Black, S. D., and Mould, D. R., 1991, "Development of Hydrophobicity Parameters to Analyze Proteins which Bear Post-or Cotranslational Modifications," *Analytical Biochemistry*, Vol. 193, pp. 72-82.

17. Sidhu, G., Withers, S. G., Nguven, N. T., Mcintosh, L. P., Ziser, L., and Brayer, G. D., 1999, "Sugar Ring Distortion in the Glycosyl-Enzyme Intermediate of a Family G/11 Xylanase," *Biochemistry*, Vol. 38, pp. 5346-5354.

18. http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[UNIPROT-acc:P09850

19. Ko, E. P., Akatsuka, H., Moriyama, H., Shinmyo, A., Hata, Y., Katsube, Y., Urabe, I., and Okada, H., 1992, "Site-Directed Mutagenesis at Aspartate and Glutamate Residues of Xylanase from *Bacillus pumilus*," *Biochemical Journal*, Vol. 288, pp.117-21.

20. http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/bioinfo301/

21. Bray, M. R., and Clarke, A. J., 1994, "Identification of a Glutamate Residue at the Active Site of Xylanase A from *Schizophyllum commune*," *European Journal of Biochemistry*, Vol. 219, pp. 821-827.

22. Wakarchuk, W. W., Campbell, R. L., Sung, W. L., Davoodi, J., and Yaguchi, M., 1994, "Mutational and Crystallographic Analyses of the Active Site Residues of the *Bacillus circulans* Xylanase," *Protein Science*, Vol. 3, pp. 467-475.

23. Miao, S., Ziser, L., Aebersold, R., and Withers, S. G., 1994, "Identification of Glutamic Acid 78 as the Active Site Nucleophile in *Bacillus subtilis* Xylanase using Electrospray Tandem Mass Spectrometry," *Biochemistry*, Vol. 33, pp. 7027-7032.

24. Krengel, U., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., and Dijkstra, B. W., 1996, "Crystallization and Preliminary Crystallographic Analysis of Endo-1,4-β-Xylanase I from *Aspergillus niger*," *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, Vol. 52, pp. 571-576.

25. Torronen, A., and Rouvinen, J., 1997, "Structural and Functional Properties of Low Molecular Weight Endo-1,4-β-Xylanases," *Journal of Biotechnology*, Vol. 57, pp. 137-149.