



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การศึกษาโปรตีน  $IA_{tn}$  ที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งของ  
เอ็นไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเนส

Study of the aspartic proteinase *inhibitor*,  $IA_{tn}$

In silico study and Molecular engineering

ผู้วิจัย

ผศ.ดร. วิชดา จันทร์ข้างแรม

อาจารย์ สุนทรต์ ชูลักษณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุน  
รัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ทุนอุดหนุนการวิจัย  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑ มหาวิทยาลัยบูรพา

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การศึกษาโปรตีน  $IA_m$  ที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งของเอ็นไซม์

ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีเนส

Study of the aspartic proteinase *inhibitor*,  $IA_m$  ;

In silico study and Molecular engineering

ผู้วิจัย

ผศ.ดร. วิชดา จันทร์ข้างแรม

อาจารย์ สุนทรต์ ชูลักษณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล

(งบประมาณแผ่นดิน) ทุนอุดหนุนการวิจัย

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑ มหาวิทยาลัยบูรพา

## ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ สัญญาเลขที่๑๘๔/  
๒๕๖๑

ผศ.ดร.วิชุดา จันทร์ข้างแรม

กรกฎาคม ๒๕๖๑

## บทคัดย่อ

เอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเนส จัดเป็น endopeptidase ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีน เช่น เปปซิน เอนนิน และคาเทปซิน สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และมีความสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและกระบวนการทางชีวภาพ อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญในกลไกการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อต่างๆ เช่น gastric ulcers และ AIDS เป็นต้น ทำให้การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเนสสามารถนำไปสู่วิธีที่จะยับยั้งการเกิดโรคต่างๆชนิดได้ ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนแอสพาร์ติกสองตัวและจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพของแอสพาร์ติกโปรตีนเนส คือ เปปสแตติน ซึ่งยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีโมเลกุลขนาดเล็ก และตัวยับยั้งที่เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่พบในธรรมชาติและปัจจุบันนี้พบเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ซึ่งโปรตีน IA<sub>3</sub> เป็นเปปไทด์สายสั้นๆที่แยกได้จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำหน้าที่ยับยั้ง โปรตีนเนส เอ ซึ่งเป็นแอสพาร์ติกโปรตีนเนส ภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสูงถึงระดับ subnanomolar ซึ่ง IA<sub>3</sub> จะยับยั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดเดียวเท่านั้น เมื่อลองทดสอบกับเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีนเนสชนิดอื่น ๆ IA<sub>3</sub> จะไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นได้เลย อีกทั้งยังถูกย่อยสลายไปด้วย โครงการวิจัยนี้เป็นการใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ในการค้นหาโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้าย IA<sub>3</sub> จากจีโนมของเชื้อรา ยีสต์ และสิ่งมีชีวิตอื่น โดยใช้ Basic local alignment search tools ในการตรวจสอบหา sequence homology จาก fungal sequence databases เพื่อค้นหาว่านอกจากในยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วยังมีสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นอีกหรือไม่ที่มีโปรตีนที่สามารถยับยั้งการทำงานของแอสพาร์ติกโปรตีนเนสอย่างเฉพาะเจาะจง รวมถึงศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของตัวยับยั้งที่ค้นพบนี้ด้วย จากผลการศึกษาพบว่า มีโปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีความคล้ายคลึงกับ IA<sub>3</sub> จาก *S. cerevisiae* อีก ๔ ชนิด คือ *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces eubayanus* และ *Naumovozyma castellii* โดยที่โปรตีนจาก *S. kudriavzevii* มีความเหมือนกับ wild type IA<sub>3</sub> มากที่สุด มีค่า %Identity เท่ากับ ๘๒ เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่มีโครงสร้างของกรดอะมิโน ๒-๓๔ ตัวแรกมีความเหมือนกับ wild type IA<sub>3</sub> มากที่สุดคือ โปรตีนจาก *S. eubayanus* ที่มีค่าของ %Identity เท่ากับ ๘๗ เปอร์เซ็นต์ และพบโปรตีนตัวอื่นที่มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายคลึงกับโปรตีน IA<sub>3</sub> จากการ BLAST ข้อมูลโปรตีนบนฐานข้อมูลฟังไจ พบโปรตีนทั้งหมด ๑๗๒ ตัวที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ IA<sub>3</sub>

**คำสำคัญ** แอสพาร์ติก โปรตีนเนส การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ IA<sub>3</sub> วิวัฒนาการโปรตีนของตัวยับยั้ง

## Abstract

Aspartic proteinases are classified as endopeptidases that play important role in a number of physiological and biological processes. These proteolytic enzymes are characterized by acidic pH optima and the utilization of two aspartic acid residues in their catalytic mechanism and can be found in various organisms. Widely known members of aspartic proteinases included renin, pepsin and cathepsin. It has also been reported that aspartic proteinases associated with several pathological conditions such as gastric ulcers and AIDS. Extensive studies on catalytic mechanisms of these enzymes could be lead to crucial medical and biological applications such as developing a potential drug target for diseases treatment. Two types of aspartic proteinase inhibitors have been identified e.g. small molecule inhibitor and naturally occurring peptides. Most of aspartic proteinases are highly susceptible to inhibition by pepstatins, a series of non-proteinaceous natural products. Pepstatin is an antibiotic that acts as potent inhibitor of aspartic proteinases. However, only a small number of naturally-occurring polypeptide inhibitors of aspartic proteinases have so far been discovered. One among these inhibitors is *S. cerevisiae* IA<sub>m</sub>. The *S.cerevisiae* Proteinase A is solely and potently inhibited by this small polypeptide at subnanomolar level. It was proven that not only IA<sub>m</sub> has no detectable effect against a wide range of aspartic proteinases, but it was also shown to be cleaved as a substrate of these non-target enzymes. Bioinformatics analysis of the IA<sub>m</sub> structure has been undertaken in this study. Extensive database searching for sequence homology from available genome data bank including those of fungi and yeast using BLAST (basic local alignment search tools) revealed that four structurally related, IA<sub>m</sub>-like have successfully been identified from several yeast species namely *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces eubayanus* and *Naumovozyma castellii*, respectively. The IA<sub>m</sub>-like protein *S. kudriavzevii* share highest degree of similarity toward wild type IA<sub>m</sub> (82%) whereas residues 1-14 of a putative IA<sub>m</sub> from *S. eubayanus* showed 87% identity with that of wild type. Moreover, 10 others of IA<sub>m</sub>-structurally related sequences have also been identified from numerous fungi species in this study.

**KEYWORDS;** aspartic proteinase, enzyme inhibition, IA<sub>m</sub>, inhibitor engineering

# สารบัญ

	หน้า
ปกหน้า	ก
ปกใน	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
ประกาศคุณูปการ	จ
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
๑. บทนำ	๑
๑.๑ ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา	๑
๑.๒ วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	๑
๑.๓ สมมุติฐานการทดลอง	๑
๑.๔ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง	๒
๑.๕ ขอบเขตการทดลอง	๒
๒. ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	๓
๒.๑ ทฤษฎี	๓
๒.๑.๑ เอนไซม์โปรตีเอส (EC ๓.๔.x.x)	๓
๒.๑.๒ เซรีนโปรตีเอส (serine protease, alkali protease)	๓
๒.๑.๒.๑ ไคโมทริปซิน (chymotrypsin, EC ๓.๔.๒๑.๑, EC๓.๔.๒๑.๒)	๓
๒.๑.๒.๒ ทริปซิน (trypsin, EC ๓.๔.๒๑.๔)	๓
๒.๑.๒.๓ อีลาสเทส (elastase, EC ๓.๔.๒๑.๓๖)	๔
๒.๑.๒.๔ ซับทิลิซิน (subtilisin, EC ๓.๔.๒๑.๑๔)	๔

๒.๑.๓ ซีสเทอีนโปรตีเอส (cysteine protease, sulfhydryl protease, thiol protease)	๔
๒.๑.๓.๑ พาเพน (papain, EC ๓.๔.๒๒.๒)	๕
๒.๑.๓.๒ โบรมีเลน (bromelain, EC ๓.๔.๒๒.๔)	๕
๒.๑.๓.๓ ฟิซิน (ficin, EC ๓.๔.๒๒.๓)	๕
๕	
๒.๑.๔ เมทัลโลโปรตีเอส (metallo protease)	๕
๒.๑.๔.๑ เทอร์โมไลซิน (thermolysin, EC ๓.๔.๒๔.๒๗)	๖
๒.๑.๕ แอสพาร์ติกโปรตีเอส (aspartic protease, acid protease, carboxyl protease)	๖
๒.๑.๕.๑ เพปซิน (pepsin, EC ๓.๔.๒๓.๑)	๗
๒.๑.๕.๒ เรนนิน (rennin หรือ chymosin, EC ๓.๔.๒๓.๔)	๗
๒.๑.๕.๓ คาเทปซินดี (cathepsin D, EC ๓.๔.๒๓.๕)	
๘	
๒.๑.๕.๔ HIV-๑ protease (EC ๓.๔.๒๓.๑๖)	
๘	
๒.๑.๖ ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนส	๙
๒.๑.๗ โปรตีเนส เอ	๙
๒.๑.๘ โปรตีน IA <sub>๓</sub>	
๑๐	
๒.๑.๙ ชีวสารสนเทศ (Bioinformatic)	๑๒
๒.๑.๑๐ การเปรียบเทียบหา sequence ที่คล้ายคลึงกันด้วยโปรแกรม BLAST	๑๒
๒.๑.๑๑ การทำ Multiple Sequence Alignment	๑๔
๒.๑.๑๒ การศึกษาโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน	๑๕
๒.๒ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	๑๖
๓. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	๑๗

๓.๑	วัสดุ และอุปกรณ์	๑๗
๓.๒	วิธีการทดลอง	๑๗
๓.๒.๑	การสืบค้นข้อมูลพื้นฐานของโปรตีน IA <sub>๓</sub>	๑๘
		<b>หน้า</b>
๓.๒.๑.๑	การสืบค้นข้อมูลพื้นฐานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จาก ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนIA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	๑๘
๓.๒.๑.๒	ค้นหาโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากฐานข้อมูลโปรตีน ของ NCBI	๑๘
๓.๒.๑.๓	ค้นหาโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จากฐานข้อมูล โปรตีนของ NCBI	๑๘
๓.๒.๒	การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของ โปรตีน IA <sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล	๑๘
๓.๒.๒.๑	การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ โปรตีน IA <sub>๓</sub> จาก <i>S. cerevisiae</i> กับโปรตีนตัวอื่นใน <i>Saccharomyces</i> sp. และสปีชีส์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล NCBI	๑๘
๓.๒.๒.๒	การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของ โปรตีน IA <sub>๓</sub> จาก <i>S. cerevisiae</i> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในเห็ด เชื้อรา และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล Fungi	๑๘
๓.๒.๓	การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนของเอนไซม์ โปรตีนเอส เอ กับเอนไซม์ตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล	๑๘
๓.๒.๓.๑	การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน ของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จาก <i>S. cerevisiae</i> กับเอนไซม์ตัวอื่น ในฐานข้อมูล NCBI	๑๘
๓.๒.๔	การทำ Multiple alignment sequence	๒๐
๓.๒.๕	การศึกษาและดัดแปลงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA <sub>๓</sub>	๒๑
๓.๒.๖	Computer-based structural modelling of IA <sub>๓</sub> structure to identify	



potential targets for mutagenesis.	๒๑
๓.๒.๗ Spectrophotometric inhibition assay	๒๒
๓.๒.๘ Kinetic analysis using non-linear estimation on Tightfitvar software	๒๒
๔. ผลการทดลอง	๒๓
๔.๑ ข้อมูลพื้นฐานของโปรตีน IA <sub>m</sub>	๒๓
๔.๒ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA <sub>m</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล	๒๔
๔.๒.๑ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA <sub>m</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI	๒๔
๔.๒.๒ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนเอนไซม์โปรตีนเนส เอ กับเอนไซม์ตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI	๒๖
๔.๒.๓ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA <sub>m</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล Fungi	๒๙
๔.๓ การทำ Multiple alignment sequence	๒๙
๔.๔ โครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA <sub>m</sub>	๖๒
๔.๕ Computer-based structural modelling of IA <sub>m</sub> structure to identify potential targets for mutagenesis	๖๓
๕. อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	๖๕
๕.๑ อภิปรายผลการทดลอง	๖๖
เอกสารอ้างอิง	๗๐
ภาคผนวก ก	๗๑

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
๔-๑ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	๒๒
๔-๒ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	๒๔
๔-๓ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบบนฐานข้อมูล NCBI	๒๕
๔-๔ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก <i>S. kudriavzevii</i> ๒๕	
๔-๕ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก <i>S. arboricola</i>	๒๕
๔-๖ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก <i>S. eubayanus</i>	๒๖
๔-๗ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก <i>N. castellii</i>	๒๖
๔-๘ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ตัวอื่นที่ค้นพบบนฐานข้อมูล NCBI	๒๗
๔-๙ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก <i>S. kudriavzevii</i>	๒๘
๔-๑๐ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก <i>S. arboricola</i>	๒๘
๔-๑๑ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก <i>S. eubayanus</i>	๒๘
๔-๑๒ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก <i>N. castellii</i>	๒๙
๔-๑๓ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จาก <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	๔๔
๔-๑๔ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Chytridiomycota บนฐานข้อมูล Fungi	๔๔
๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi	๔๕
๔-๑๖ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Basidiomycota บนฐานข้อมูล Fungi	๕๕
๔-๑๗ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Microsporidia บนฐานข้อมูล Fungi ๕๘	
๔-๑๘ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Mucoromycota บนฐานข้อมูล Fungi	๖๐

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
๒-๑ โครงสร้างสามมิติของโคโมทรอพซิน	๔
๒-๒ โครงสร้างสามมิติของพาเพน	๕
๒-๓ โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เทอร์โมไลซิน	๖
๒-๔ โครงสร้างสามมิติของเพปซิน	๗
๒-๕ โครงสร้างสามมิติของเรนิน	๘
๒-๖ โครงสร้างสามมิติของโปรตีนเอส เอ	๑๐
๒-๗ ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA <sub>n</sub> จาก <i>S. cerevisiae</i>	๑๑
๒-๘ โครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA <sub>n</sub> จาก <i>S. cerevisiae</i>	๑๑
๒-๙ โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI	๑๓
๒-๑๐ โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล Fungi	๑๓
๒-๑๑ โปรแกรม ClustalX ๒.๑	๑๔
๒-๑๒ โปรแกรม GeneDoc	๑๕
๒-๑๓ โปรแกรม PyMOL	๑๕
๔-๑ FASTA format ของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	๒๒
๔-๒ แสดงโครงสร้าง และบริเวณของลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญของโปรตีน IA <sub>n</sub>	๒๓
๔-๓ FASTA format ของโปรตีน IA <sub>n</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	๒๔
๔-๔ การทำ Multiple alignment sequence ระหว่างโปรตีน IA <sub>n</sub> และโปรตีนอื่นที่ค้นพบ วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence	๓๐
๔-๕ การทำ Multiple alignment sequence ระหว่างโปรตีน IA <sub>n</sub> และโปรตีนอื่นที่ค้นพบ	

วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะของพันธะระหว่างกรดอะมิโน	๓๑
๔-๖ การทำ Multiple alignment sequence ของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔	๓๒
๔-๗ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนจาก <i>S. kudriavzevii</i>	๓๓
<b>ภาพที่</b>	<b>หน้า</b>
๔-๘ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนจาก <i>S. kudriavzevii</i> ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔	๓๔
๔-๙ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนที่ค้นพบจาก <i>S. arboricola</i>	๓๕
๔-๑๐ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนที่ค้นพบจาก <i>S. arboricola</i> ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔	๓๖
๔-๑๑ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนที่ค้นพบจาก <i>S. eubayanus</i>	๓๗
๔-๑๒ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนที่ค้นพบจาก <i>S. eubayanus</i> ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔	๓๘
๔-๑๓ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนที่ค้นพบจาก <i>S. eubayanus</i>	๓๙
๔-๑๔ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA <sub>๓</sub> จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> และโปรตีนที่ค้นพบจาก <i>S. eubayanus</i>	๔๐
๔-๑๕ การทำ Multiple alignment sequence ระหว่างโปรตีนเนส เอ จากยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> กับเอนไซม์เป้าหมายจากยีสต์ตัวอื่นที่ค้นพบ	๔๒
๔-๑๖ โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ ที่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยโปรตีน IA <sub>๓</sub> ๖๒	
๔-๑๗ โครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA <sub>๓</sub>	๖๒

## บทคัดย่อ

เอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีเนส จัดเป็น endopeptidase ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีน เช่น เปปซิน เรมนิน และคาเทปซิน สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และมีความสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและกระบวนการทางชีวภาพ อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญในกลไกการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อต่างๆ เช่น gastric ulcers และ AIDS เป็นต้น ทำให้การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีเนสสามารถนำไปสู่วิธีที่จะยับยั้งการเกิดโรคต่างๆชนิดได้ ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนแอสพาร์ติกสองตัว และจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพของแอสพาร์ติกโปรตีเนส คือ เปปสแตติน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ มีโมเลกุลขนาดเล็ก และตัวยับยั้งที่เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่พบในธรรมชาติและปัจจุบันนี้พบเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ซึ่งโปรตีน IA<sub>3</sub> เป็นเปปไทด์สายสั้นๆที่แยกได้จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำหน้าที่ยับยั้ง โปรตีเนส เอ ซึ่งเป็นแอสพาร์ติกโปรตีเนส ภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสูงถึงระดับ subnanomolar ซึ่ง IA<sub>3</sub> จะยับยั้งยับยั้งได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น เมื่อลองทดสอบกับเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนสชนิดอื่น ๆ IA<sub>3</sub> จะไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นได้เลย อีกทั้งยังถูกย่อยสลายไปด้วย โครงการวิจัยนี้เป็นการใช้ ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ในการค้นหาโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้าย IA<sub>3</sub> จากจีโนมของเชื้อรา ยีสต์ และสิ่งมีชีวิตอื่น โดยใช้ Basic local alignment search tools ในการตรวจสอบหา sequence homology จาก fungal sequence databases เพื่อค้นหาว่านอกจากในยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วยังมีสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นอีกหรือไม่ที่มีโปรตีนที่สามารถยับยั้งการทำงานของแอสพาร์ติกโปรตีเนสอย่างเฉพาะเจาะจง รวมถึงศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของตัวยับยั้งที่ค้นพบนี้ด้วย จากผลการศึกษาพบว่า มีโปรตีนจากยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีความคล้ายคลึงกับ IA<sub>3</sub> จาก *S. cerevisiae* อีก ๔ ชนิด คือ *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces eubayanus* และ *Naumovozyma castellii* โดยที่โปรตีนจาก *S. kudriavzevii* มีความเหมือนกับ wild type IA<sub>3</sub> มากที่สุด มีค่า %Identity เท่ากับ ๘๒ เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่มีโครงสร้างของกรดอะมิโน ๒-๓๔ ตัวแรกมีความเหมือนกับ wild type IA<sub>3</sub> มากที่สุดคือ โปรตีนจาก *S. eubayanus* ที่มีค่าของ %Identity เท่ากับ ๘๗ เปอร์เซ็นต์ และพบโปรตีนตัวอื่นที่มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายคลึงกับโปรตีน IA<sub>3</sub> จากการ BLAST ข้อมูลโปรตีนบนฐานข้อมูลฟงไจ พบโปรตีนทั้งหมด ๑๗๒ ตัวที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ IA<sub>3</sub>

**คำสำคัญ (TH)** แอสพาร์ติก โปรตีเนส การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ IA<sub>3</sub> วิศวกรรมโปรตีนของตัวยับยั้ง

## Abstract

Aspartic proteinases are classified as endopeptidases that play important role in a number of physiological and biological processes. These proteolytic enzymes are characterized by acidic pH optima and the utilization of two aspartic acid residues in their catalytic mechanism and can be found in various organisms. Widely known members of aspartic proteinases included renin, pepsin and cathepsin. It has also been reported that aspartic proteinases associated with several pathological conditions such as gastric ulcers and AIDS. Extensive studies on catalytic mechanisms of these enzymes could be lead to crucial medical and biological applications such as developing a potential drug target for diseases treatment. Two types of aspartic proteinase inhibitors have been identified e.g. small molecule inhibitor and naturally occurring peptides. Most of aspartic proteinases are highly susceptible to inhibition by pepstatins, a series of non-proteinaceous natural products. Pepstatin is an antibiotic that acts as potent inhibitor of aspartic proteinases. However, only a small number of naturally-occurring polypeptide inhibitors of aspartic proteinases have so far been discovered. One among these inhibitors is *S. cerevisiae* IA<sub>m</sub>. The *S.cerevisiae* Proteinase A is solely and potently inhibited by this small polypeptide at subnanomolar level. It was proven that not only IA<sub>m</sub> has no detectable effect against a wide range of aspartic proteinases, but it was also shown to be cleaved as a substrate of these non-target enzymes. Bioinformatics analysis of the IA<sub>m</sub> structure has been undertaken in this study. Extensive database searching for sequence homology from available genome data bank including those of fungi and yeast using BLAST (basic local alignment search tools) revealed that four structurally related, IA<sub>m</sub>-like have successfully been identified from several yeast species namely *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces eubayanus* and *Naumovozyma castellii*, respectively. The IA<sub>m</sub>-like protein *S. kudriavzevii* share highest degree of similarity toward wild type IA<sub>m</sub> (82%) whereas residues 2-84 of a putative IA<sub>m</sub> from *S. eubayanus* showed 67% identity with that of wild type. Moreover, 11 others of IA<sub>m</sub>-structurally related sequences have also been identified from numerous fungi species in this study.

**KEYWORDS;** aspartic proteinase, enzyme inhibition, IA<sub>m</sub>, inhibitor engineering

## บทที่ ๑

### บทนำ

#### ๑.๑ ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนส (aspartic proteinases) จัดอยู่ในกลุ่มของ endopeptidase เป็นโปรตีเนสที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ได้อย่างอิสระ (randomly) ภายในสายโปรตีน เช่น เพปซิน คาเทปซิน ดี และเรนิน (ปราณี อานเป็รื่อง, ๒๕๕๘) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และมีความสำคัญต่อกระบวนการทางสรีระวิทยา และกระบวนการทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการเป็นกลไกที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง และโรคเอดส์ เป็นต้น ทำให้การศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีเนสนี้สามารถนำไปสู่การยับยั้งการเกิดโรคหลาย ๆ ชนิดได้ ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนแอสพาร์ติกสองตัวซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพของแอสพาร์ติกโปรตีเนสคือ เปปสแตติน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ และตัวยับยั้งที่พบในธรรมชาติเช่น โปรตีน  $IA_m$  เป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ ที่แยกออกมาได้จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำหน้าที่ยับยั้งโปรตีเนส เอ ภายในยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของแอสพาร์ติกโปรตีเนสได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยสามารถแสดงประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเมื่อใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยระดับ subnanomolar ( $K_i < 10^{-10}$  M) อย่างไรก็ตาม  $IA_m$  สามารถยับยั้งยับยั้งได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้นเมื่อทำการทดสอบนำ  $IA_m$  ไปทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนสตัวอื่น  $IA_m$  จะไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัวอื่นได้เลย อีกทั้งยังถูกย่อยสลายไปด้วย (Winterburn et al., ๒๐๐๗) ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาโครงสร้าง และกลไกการทำงานของโปรตีน  $IA_m$  รวมทั้งทำการศึกษาค้นหาโปรตีนตัวอื่นที่มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายกับโปรตีน  $IA_m$  ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนสได้ โดยองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการรักษาและป้องกันโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากกลไกการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มของแอสพาร์ติกโปรตีเนสได้ในอนาคต

#### ๑.๒ วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทำการศึกษาค้นหาโครงสร้างของโปรตีน  $IA_m$  จาก *S. cerevisiae* ที่มีความสามารถยับยั้งโปรตีเนส เอ ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีเนสภายในเซลล์ของ *S. cerevisiae* และใช้วิธีทางชีวสารสนเทศ (bioinformatic) ในการค้นหาโปรตีนตัวอื่นที่มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายกับ  $IA_m$  ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนสได้ จากจีโนมของเชื้อรา ยีสต์ และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยใช้ Basic local alignment search tools ในการตรวจสอบหา sequence homology จาก fungal sequence databases

#### ๑.๓ สมมุติฐานการทดลอง

ค้นพบโปรตีนจากเชื้อรา ยีสต์ หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายกับโครงสร้างของ  $IA_m$  จาก *S. cerevisiae* ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนสได้

#### ๑.๔ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

ได้ข้อมูลของโปรตีนตัวอื่นจากเชื้อรา ยีสต์ หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่นอกเหนือจากโปรตีน IA<sub>m</sub> จาก *S. cerevisiae* ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีนเนสได้ และใช้ข้อมูลที่ศึกษาสืบค้นได้เป็นพื้นฐานในการนำไปหาวิธีดัดแปลงโครงสร้างของ IA<sub>m</sub> เพื่อประยุกต์ใช้ในการพัฒนารักษาและ ป้องกันโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากกลไกการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเนส

#### ๑.๕ ขอบเขตของการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของ IA<sub>m</sub> และโปรตีนตัวอื่นที่มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายกับ IA<sub>m</sub> โดยการทำให้ Basic local alignment search tools ข้อมูลโปรตีนจาก NCBI และ Ensembl Fungi ทำการวิเคราะห์หาความเหมือน และความต่างของข้อมูล sequence โปรตีนที่ได้มาโดยใช้ IA<sub>m</sub> เป็นตัวเปรียบเทียบตั้งต้นด้วยโปรแกรม Clustal X และ โปรแกรม GeneDoc เพื่อทำการวิเคราะห์หา %identity และใช้ฐานข้อมูล PDB ในการค้นหาโครงสร้างของโปรตีน IA<sub>m</sub> แบบสามมิติ และใช้โปรแกรม PyMOL ในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ IA<sub>m</sub> แบบละเอียด



## บทที่ ๒

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ๒.๑ ทฤษฎี

##### ๒.๑.๑ เอนไซม์โปรตีเอส (EC ๓.๔.x.x)

เอนไซม์โปรตีเอส มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เพปติเดส (peptidase) โปรตีเอส (protease) โปรตีเนส (proteinase) เพปไทด์ไฮโดรเลส (peptidehydrolase) และเอนไซม์โปรตีโอลิติก (proteolytic enzyme) (ปราณี อานเป็ร็อง, ๒๕๕๘) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีนโดยย่อยตรงพันธะเพปไทด์ พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีทั้งชนิดที่ทำปฏิกิริยาย่อยแบบภายนอกเรียกว่า เอกโซเพปติเดส (exopeptidase) คือย่อยพันธะเพปไทด์จากด้านปลายของกรดอะมิโนทางปลายเอ็น (N-terminal) หรือปลายซี (C-terminal) และชนิดที่ทำปฏิกิริยาย่อยพันธะเพปไทด์ที่อยู่ภายใน เรียกว่า เอนโดเพปติเดส (endopeptidase) เอนไซม์โปรตีเอสบางชนิดจะย่อยพันธะเพปไทด์แบบสุ่ม แต่บางชนิดจะย่อยพันธะเพปไทด์อย่างจำเพาะกับชนิดของกรดอะมิโน เอนไซม์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่มีสมบัติแตกต่างกัน และมีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาต่างกัน จึงมีการแบ่งเอนไซม์โปรตีเอสตามความจำเพาะในการทำปฏิกิริยา เป็น ๔ กลุ่ม ได้แก่ เซรีนโปรตีเอส ซิสเตอีนโปรตีเอส เมทอลโลโปรตีเอสและ แอสพาร์ติกโปรตีเอส (อรัญ หันพงศ์กิตติกุล, ๒๕๖๐)

##### ๒.๑.๒ เซรีนโปรตีเอส (serine protease, alkali protease) (ปราณี อานเป็ร็อง, ๒๕๕๘; อรัญ หันพงศ์กิตติกุล)

เซรีนโปรตีเอส มีเลขตามระบบคือ EC ๓.๔.๒๑ เป็นเอนไซม์เอนโดเพปติเดสที่ย่อยพันธะเพปไทด์ภายในสายพอลิเพปไทด์ โดยตำแหน่งที่จับกับสับสเตรทจะมีกรดอะมิโนเซรีนทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน (nucleophilic amino acid) เอนไซม์เซรีนโปรตีเอสสามารถถูกยับยั้งได้โดย DPF (diisopropylphospho-fluoridate) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ของอนุมูลเซรีล (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ โดยที่บริเวณเร่งจะมีหมู่ฮิสติดีนอยู่ เอนไซม์เซรีนโปรตีเอสเป็นพวก alkali protease มี optimum pH activity ที่  $\text{pH} > ๗$  ( $\text{pH} ๗-๑๑$ ) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้เช่น

##### ๒.๑.๒.๑ ไคโมทรिพซิน (chymotrypsin, EC ๓.๔.๒๑.๑, EC๓.๔.๒๑.๒)

เป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดยตับอ่อนซึ่งอยู่ในรูปของโปรตีนที่ยังไม่แสดงปฏิกิริยา คือ โปรไคโมทริพซิน (prochymotrypsin) แต่เมื่อถูกย่อยด้วยทริพซิน ได้เป็นไคโมทริพซิน ซึ่งมีสายพอลิเพปไทด์ต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ จึงทำให้ไคโมทริพซินสามารถทำงานได้ ตรงตำแหน่งที่เอนไซม์จับกับสับสเตรทเป็น triad ที่ประกอบด้วย ฮิสทีดีนที่ตำแหน่ง ๕๗ ( $\text{His}_{๕๗}$ ) เซรีนที่ตำแหน่ง ๑๙๕ ( $\text{Ser}_{๑๙๕}$ ) และแอสพาร์ติกแอซิดที่ตำแหน่ง ๑๐๒ ( $\text{Asp}_{๑๐๒}$ ) มีความจำเพาะกับเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำคือ ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน และลิวซีน

##### ๒.๑.๒.๒ ทริพซิน (trypsin, EC ๓.๔.๒๑.๔)

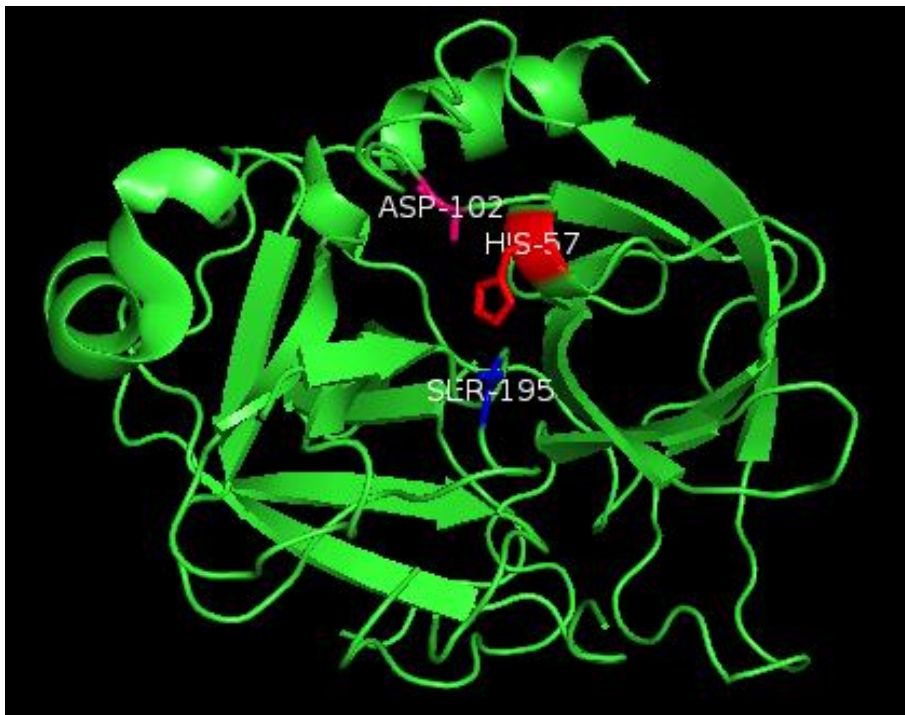
เป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดยตับอ่อน แต่ทำงานในลำไส้เล็กในสภาวะต่าง ที่ pH ๘ ตรงตำแหน่งที่เอนไซม์ จับกับสับสเตรทเป็น triad ประกอบด้วย ฮิสทีดีนที่ตำแหน่ง ๕๗ (His<sub>๕๗</sub>) เซรีนที่ตำแหน่ง ๑๙๕ (Ser<sub>๑๙๕</sub>) และ แอสพาร์ติคแอซิด ที่ ตำแหน่ง ๑๐๒ (Asp<sub>๑๐๒</sub>)

๒.๑.๒.๓ อีลาสเทส (elastase, EC ๓.๔.๒๑.๓๖)

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนอีลาสติน (elastin) ซึ่งพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ตรงตำแหน่งที่เอนไซม์จับกับสับสเตรทขนาดเล็ก จึงสามารถย่อยเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนอะลานีน ไกลซีน และแวลีน

๒.๑.๒.๔ ซับทิลิซิน (subtilisin, EC ๓.๔.๒๑.๑๔)

เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่ย่อยโปรตีนพบในโพรแคริโอตโดยเฉพาะ *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* เอนไซม์นี้มีตำแหน่งที่เอนไซม์จับกับสับสเตรทเป็น triad ประกอบด้วยแอสพาร์ติกแอซิดตำแหน่งที่ ๓๒ (Asp<sub>๓๒</sub>) ฮิสทีดีนที่ตำแหน่ง ๖๔ (His<sub>๖๔</sub>) และ เซรีนที่ตำแหน่ง (Ser<sub>๒๒๑</sub>) เป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในการแปรรูปอาหาร เครื่องสำอาง และผงซักฟอก ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและทนอุณหภูมิสูง



ภาพที่ ๒-๑ โครงสร้างสามมิติของโคโมทรอปซิน แสดงบริเวณ catalytic triad ประกอบด้วย His<sub>๕๗</sub> (สีแดง) Ser<sub>๑๙๕</sub> (สีน้ำเงิน) และ Asp<sub>๑๐๒</sub> (สีชมพู) (ดัดแปลงจาก PDB: ๑AB๙ โดยใช้โปรแกรม PyMOL)

๒.๑.๓ ซีสเทอีนโปรตีเอส (cysteine protease, sulfhydryl protease, thiol protease) (ปราณี อ่านเป็รื่อง, ๒๕๕๘; อรัญ หันพงศ์กิตติกุล)

ซีสเทอีนโปรตีเอส มีเลขตามระบบคือ EC ๓.๔.๒๒ เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่เร่งปฏิกิริยาโดยกรดอะมิโนซีสเทอีนทำงานร่วมกับฮิสทีดีน บางทีเรียกว่า ไทออลโปรตีเอส (thiol protease) เป็นเอนโดเพพทิเดส มีระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ pH ๖-๗.๕ พบมากในผลไม้ นิยมใช้หมักเนื้อให้นุ่ม และนอกจากนี้ยังพบเอนไซม์กลุ่มนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น คาลเพน (calpain, EC ๓.๔.๒๒.๕๒, ๓.๔.๒๒.๕๓) และคาสเพส ๓ (caspase ๓, EC ๓.๔.๒๒.๕๖) ที่เกี่ยวข้องกับโปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis)

๒.๑.๓.๑ พาเพน (papain, EC ๓.๔.๒๒.๒)

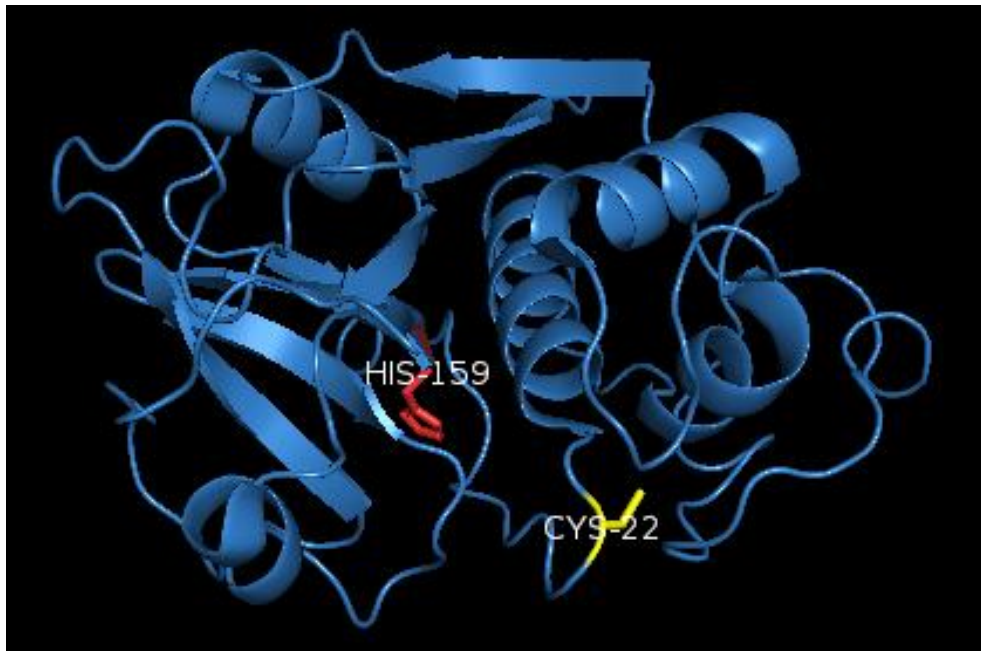
เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่มีในใบ ผล และยางมะละกอ ตรงตำแหน่งที่เอนไซม์จับกับสับสเตรทมี Cys<sub>๒๒</sub> และ His<sub>๑๕๙</sub> เป็นองค์ประกอบ ทำงานได้ดีในช่วง pH ๕-๙ ทนอุณหภูมิสูงต้องใช้อุณหภูมิ ๙๐-๑๐๐ °C จึงจะทำลายได้

๒.๑.๓.๒ โบรมีเลน (bromelain, EC ๓.๔.๒๒.๔)

เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากลำต้นและใบสับปะรด ทำงานได้ดีในช่วง pH ๕-๘ อุณหภูมิ ๓๕-๔๕ °C ถูกทำลายเมื่อให้ความร้อนสูงกว่า ๖๕ °C

๒.๑.๓.๓ ฟิซิน (ficin, EC ๓.๔.๒๒.๓)

เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่มีในผล และยางมะเดื่อ ทำงานได้ดีในช่วง pH ๕.๐-๗.๕ อุณหภูมิ ๕๐-๕๕ °C



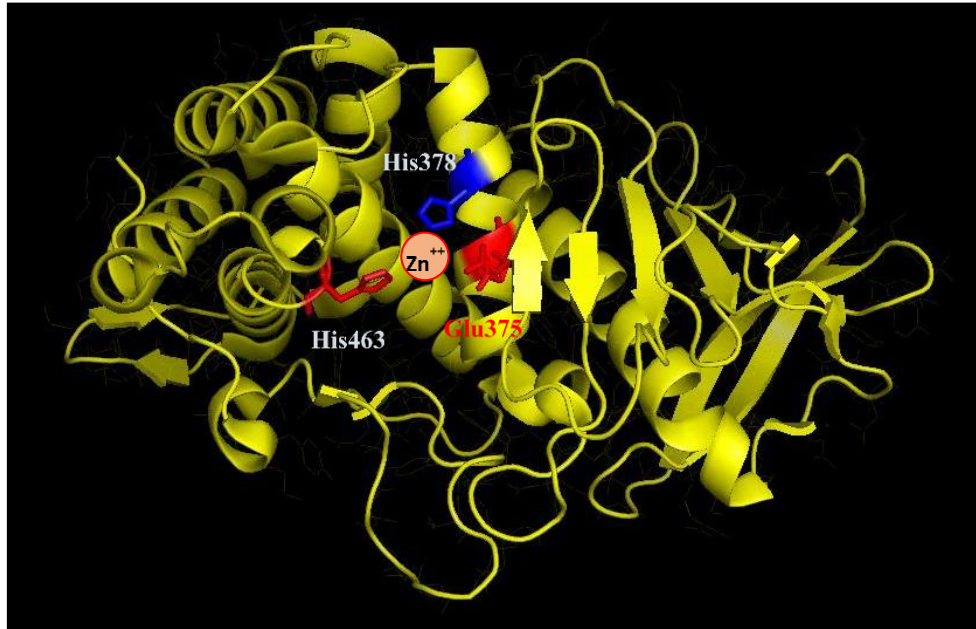
ภาพที่ ๒-๒ โครงสร้างสามมิติของพาเพน แสดงบริเวณ catalytic triad ประกอบด้วย Cys<sub>๒๒</sub> (สีเหลือง) และ His<sub>๑๕๙</sub> (สีแดง) (ดัดแปลงจาก PDB: ๙PAP โดยใช้โปรแกรม PyMOL)

๒.๑.๔ เมทัลโลโปรตีเอส (metallo protease) (ปราณี อ่านเป็เรื่อง, ๒๕๕๘; อรัญ หันพงศ์กิตติกุล)

มีเลขตามระบบคือ EC ๓.๔.๒๔ เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่มีไอออนและโลหะร่วมในการทำปฏิกิริยา โดยอยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ส่วนใหญ่เป็นสังกะสี แต่เอนไซม์บางชนิดจะมีโคบอลต์ร่วมอยู่ เอนไซม์กลุ่มนี้จะทำงานได้ดีในสภาวะเป็นกลาง (pH ๖.๕-๗.๕) มีทั้งชนิดเอนโดเพพทีเดสและเอกโซเพพทีเดส สามารถถูกยับยั้งด้วยสารจับไอออนของโลหะ เช่น ๑,๑๐-phenanthroline, EDTA เนื่องจากมีไอออนของโลหะร่วมปฏิกิริยา ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ

### ๒.๑.๔.๑ เทอร์โมไลซิน (thermolysin, EC ๓.๔.๒๔.๒๗)

เป็นเมทอลโลโปรตีเอสที่ทนอุณหภูมิสูงทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง ผลิตจาก *Bacillus stesrothermoproteolyticus* ต้องการสังกะสีในการทำปฏิกิริยาดังแสดงในภาพที่ ๒-๓ และมีแคลเซียมในโครงสร้าง เอนไซม์นี้จะย่อยพันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ



ภาพที่ ๒-๓ โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เทอร์โมไลซินในกลุ่มของเมทอลโลโปรตีเอส แสดงบริเวณเร่งปฏิกิริยาด้วยสีแดง (Glu๓๗๕ and His๔๖๓) และบริเวณที่โลหะ ( $Zn^{++}$ ) จับกับกรดอะมิโน (His๓๗๘) บนเอนไซม์ด้วยสีน้ำเงิน (ดัดแปลงจาก PDB: ๑FJU โดยใช้โปรแกรม PyMOL)

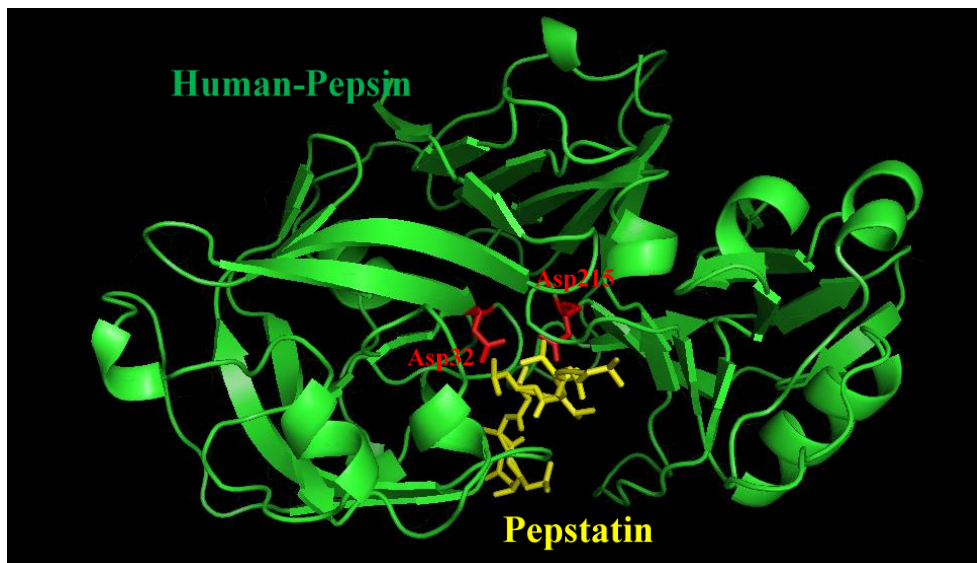
### ๒.๑.๕ แอสพาร์ติกโปรตีเอส (aspartic protease, acid protease, carboxyl protease)

มีเลขตามระบบคือ EC ๓.๔.๒๓ เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่มีช่วง pH ของการไฮโดรไลซ์โปรตีนอยู่ในช่วง pH ของกรด ( $pH < ๗$ ) เอนไซม์กลุ่มนี้มีช่วง pH ที่เหมาะสมระหว่าง ๒-๔ เป็นเอนโดเพพทิเดส ที่บริเวณเร่งจะมีกรดอะมิโนแอสพาร์ติกอยู่สองตำแหน่ง โดยทั่วไปโครงสร้างของแอสพาร์ติกโปรตีเนสจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ๓๓๐ ตัว และมีลำดับกรดอะมิโน ที่เป็น Asp-Thr/Ser-Gly (DT/SG) จะมีระยะห่างระหว่างกรดอะมิโนแอสพาร์ติกสองตำแหน่งอยู่ห่างกันประมาณ ๑๗๐-๑๘๐ กรดอะมิโน เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในบริเวณเร่งและทำหน้าที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยา (Davies, ๑๙๙๐) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่แยกได้จากเชื้อราจะนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการหมัก และอุตสาหกรรมอาหาร โดยทั่วไปแล้ว เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยเปปสแตติน (isovalent-pepstatin) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ โดยเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเอสสามารถแบ่งออกเป็น ๒ กลุ่มใหญ่คือ aspartyl protease และ retroviral aspartyl protease (Szecsi, ๑๙๙๒)

ตัวอย่างเอนไซม์ aspartyl protease เช่น

๒.๑.๕.๑ เพปซิน (pepsin, EC ๓.๔.๒๓.๑)

เป็นโปรตีเอสที่พบในน้ำย่อย (gastric acid) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีความจำเพาะกับการย่อยพันธะเพปไทด์ที่มีหมู่กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ โดยเฉพาะหมู่โอรมาติก มีความเสถียรที่ pH ๒.๕ ถ้า pH ต่างจากนี้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเนื่องจากการเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (ปราณี อ่านเปรื่อง, ๒๕๕๘)

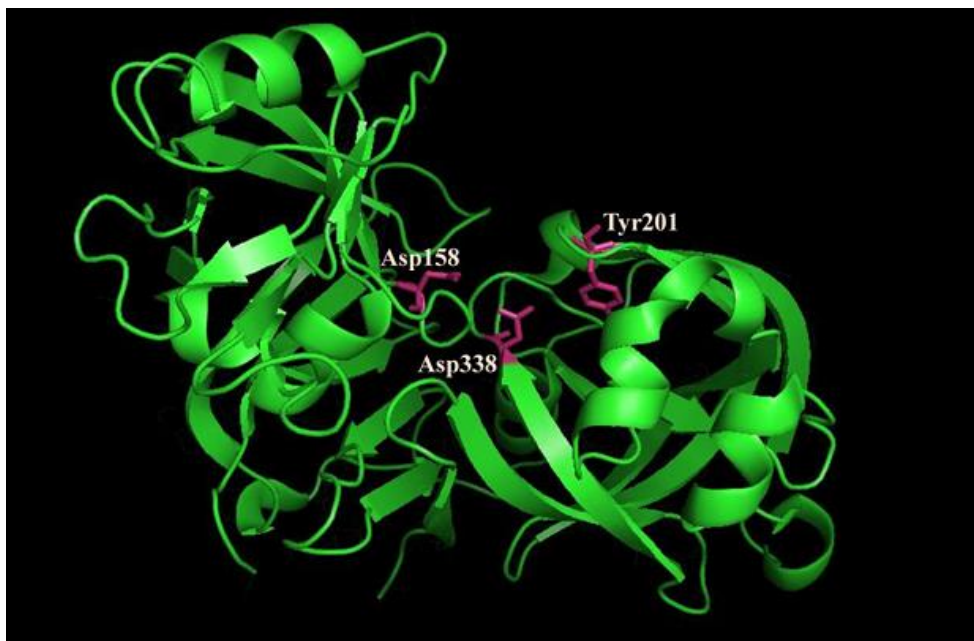


ภาพที่ ๒-๔ โครงสร้างสามมิติของเพปซิน (สีเขียว) จับอยู่กับเปปสแตติน (สีเหลือง) แสดงบริเวณ catalytic triad ประกอบด้วย Asp สองตำแหน่ง (สีแดง) (ดัดแปลงจาก PDB: ๑PSO โดยใช้โปรแกรม PyMOL)

๒.๑.๕.๒ เรนนิน (rennin หรือ chymosin, EC ๓.๔.๒๓.๔)

เป็นเอนไซม์ที่มีต้นกำเนิดมาจากกระเพาะส่วนที่ ๔ ของลูกวัวระยะไม่หย่านม (suckling calf) โดยจะปล่อยออกมาในรูปของไซโมเจน เรียกว่า prorenin คุณสมบัติทั่วไปของเรนนิน เอนไซม์จะมีความเสถียรที่ pH ๕ หาก pH มากขึ้นจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ และถ้าหาก pH น้อยกว่า pH ๓.๕ จะเกิดส่งผลให้เกิด autolysis





ภาพที่ ๒-๕ โครงสร้างสามมิติของเรนิน (สีเขียว) แสดงบริเวณ catalytic triad ประกอบด้วย Asp๑๕๘, Tyr๒๐๑, Asp๓๓๘ (สีชมพู) (ดัดแปลงจาก PDB: ๒BKT โดยใช้โปรแกรม PyMOL)

#### ๒.๑.๕.๓ คาเทปซินดี (cathepsin D, EC ๓.๔.๒๓.๕)

เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่พบในเอนโดโซม (endosome) อยู่ในเซลล์ตับ ทำงานได้ดีที่ค่า pH ๓.๕ และอุณหภูมิ ๓๗ °C (ปราณี อานเป็รื่อง, ๒๕๕๘; อรัญ หันพงศ์กิตติกุล)

ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่ม retroviral aspartyl protease เช่น

#### ๒.๑.๕.๔ HIV-๑ protease (EC ๓.๔.๒๓.๑๖)

เป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่สำคัญในการก่อเชื้อและการเจริญเติบโตของเชื้อ HIV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเอดส์ (Brik and Wong, ๒๐๐๓)

เอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนสจะถูกสังเคราะห์ออกมาในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตในรูปของโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือไซโมเจน (zymogen) ซึ่งจะมีบริเวณที่เรียกว่า pro-part อยู่ทางด้าน N-terminal ทำหน้าที่ในการทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่ inactive คือ ไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ (Tang and Wong, ๑๙๘๗) โดยในส่วนของ pro-part จะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนตั้งแต่ ๒-๑๕๐ ตัวขึ้นไป (Khan et al., ๑๙๙๙) การทำให้ไซโมเจนเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของเอนไซม์ที่เป็น active form สามารถเกิดได้ทั้งแบบ self-activation, auto-activation หรือต้องอาศัยโปรตีเอสชนิดอื่นเข้ามาร่วมด้วย (Sielecki et al., ๑๙๙๑) เช่น ส่วนของ pro-part ของ โปรตีเนส เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae* จะช่วยทำให้โปรตีนม้วนพับเป็นโครงสร้างสามมิติที่เหมาะสมเพื่อให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่ active และทำหน้าที่ทางชีวภาพได้ (Khan and James, ๑๙๙๘)

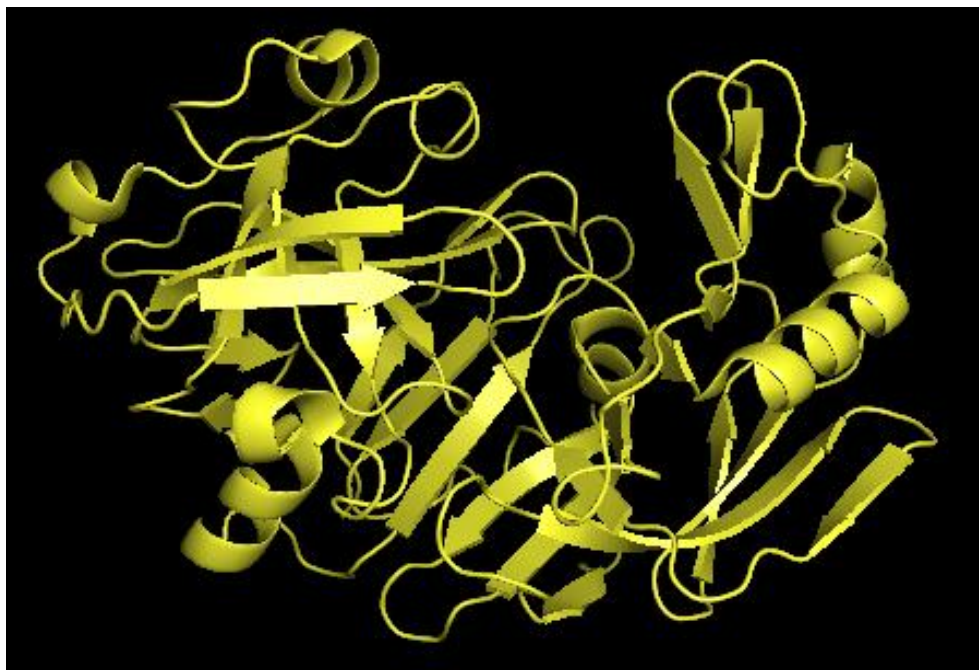
## ๒.๑.๖ ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีเนส

การยับยั้งการทำงานของแอสพาร์ติกโปรตีเนส จะเกิดขึ้นได้โดยการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งโมเลกุลขนาดเล็ก (small molecule inhibitors) และเพปไทด์สายสั้น ๆ ที่พบในธรรมชาติ หรือพบในเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยสิ่งมีชีวิตสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เอง (naturally occurring peptides) การยับยั้งโดยสารโมเลกุลเล็ก ๆ จะเกิดจากสารเปปสแตติน ซึ่งเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ สามารถสกัดได้จากเชื้อ *Actinomyces* ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มนี้แทบทุกชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงถึงระดับความเข้มข้นในหน่วยที่เป็น picomolar (Dunn and Kay, ๑๙๘๕; Kay, ๑๙๘๕) ตัวยับยั้งแอสพาร์ติกโปรตีเนสที่เป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ ที่พบในธรรมชาติ หรือพบในเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยสิ่งมีชีวิตสามารถสังเคราะห์ได้เองนั้นพบได้น้อยมาก เช่น N acetyl-D glucosamine-๒ epimerase หรือ renin-binding protein ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่สามารถยับยั้งเอนไซม์เรนินได้, เอนไซม์ equistatin ซึ่งสกัดได้จากดอกไม้ทะเล หรือ sea anemone, *Actinia equina* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cathepsin D, pepsin-inhibiting protein หรือ PI-๓ ที่สกัดได้จาก nematode parasite, *Ascaris lumbricoides* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพปซิน(Kageyama, ๑๙๙๘; Ng et al., ๒๐๐๐) และโปรตีน IA<sub>๓</sub> ที่สกัดได้จากยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถยับยั้งการทำงานของ saccharopepsin ได้ (Phylip et al., ๒๐๐๑; Takahashi et al., ๒๐๐๕)

## ๒.๑.๗ โปรตีเนส เอ

โปรตีเนส เอ จาก *S. cerevisiae* หรืออีกชื่อหนึ่งคือ saccharopepsin มีเลขตามระบบคือ EC ๓.๔.๒๓.๒๕ จัดอยู่ในกลุ่มของแอสพาร์ติกโปรตีเนสที่มีกรดอะมิโน ๓๒๘ ตัวเป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการกระตุ้น vacuolar hydrolase enzymes หลาย ๆ ชนิดที่ทำหน้าที่สำคัญในระหว่างการเกิด nutritional stress, sporulation และ vegetative growth conditions ให้เกิดเป็น active form และทำหน้าที่ทางชีวภาพได้ (Parr et al., ๒๐๐๗) นอกจากนี้โปรตีเนส เอ ยังมีบทบาทสำคัญภายหลังจากที่มี oxidative damage ในระหว่างการเกิด cell ageing process อีกด้วย (Marques et al., ๒๐๐๖) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีความสำคัญต่อกระบวนการเจริญเติบโต กระบวนการทางสรีรวิทยา และกระบวนการทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญในการเกิด pathogenesis ของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ อีกมากมาย รวมไปถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องใน infectivity ของพวก pathogenic fungi, microbial parasites และ viruses หลายชนิดที่จะถูกกระตุ้นให้อยู่ใน active form ด้วยแอสพาร์ติกโปรตีเนส จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะศึกษาถึงบทบาทหน้าที่การทำงาน และการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มนี้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น (Cooper, ๒๐๐๒)





ภาพที่ ๒-๖ โครงสร้างสามมิติของโปรตีน เอส (ดัดแปลงจาก PDB: ๒JXR โดยใช้โปรแกรม PyMOL)

### ๒.๑.๘ โปรตีน IA<sub>m</sub>

โปรตีน IA<sub>m</sub> จัดเป็นตัวยับยั้งเพปไทด์สายสั้นๆที่พบในธรรมชาติ โดยจะมีการสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ทำหน้าที่ยับยั้งแอสพาร์ติกโปรตีนเอสได้เพียงชนิดเดียวคือ โปรตีน เอส ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* เท่านั้น ไม่สามารถทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเอสตัวอื่น ๆ ได้ โปรตีน IA<sub>m</sub> ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ๖๘ ตัว มีขนาด ๘ กิโลดาลตัน จัดเป็น cytosolic-heat-stable protein ที่มีการสกัดจากเซลล์ยีสต์และนำมาศึกษาเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. ๑๙๗๔ (Saheki, Matsuda and Holzer, ๑๙๗๔) ต่อมาได้มีการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน IA<sub>m</sub> และหาลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด (Schu and Wolf, ๑๙๙๑) จากการศึกษาบริเวณของกรดอะมิโนที่มีหน้าที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพพบว่า เป็นบริเวณของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ ดังภาพที่ ๒-๗ โดยมีตำแหน่งของกรดอะมิโนสำคัญในการทำหน้าที่ยับยั้งทางชีวภาพประกอบด้วย กรดอะมิโนทางปลาย N-terminal ได้แก่ V๘-X-X-๑๑-F๑๒ กรดอะมิโนทางปลาย C-terminal ได้แก่ V๒๖-X-X-A๒๙-F๓๐ โดย X สามารถแทนที่ด้วยกรดอะมิโนตัวใดก็ได้ และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญเฉพาะของโปรตีน IA<sub>m</sub> ได้แก่ โลซีนที่ตำแหน่งที่ ๑๘ (K๑๘) และแอสพาร์ติกแอตซิดที่ตำแหน่งที่ ๒๒ (D๒๒) ซึ่งตำแหน่งของกรดอะมิโนนี้เป็นตำแหน่งสำคัญที่เกิดขึ้นตามรูปแบบ *i,i+๔* (Winterburn et al., ๒๐๐๗)

ATG AAT ACA GAC CAA CAA AAA GTG AGC GAA ATA TTT CAG  
**M N T D Q Q K V S E I F Q**  
 AGC TCA AAG GAA AAA TTG CAG GGC GAT GCA AAG GTA GTG  
**S S K E K L Q G D A K V V**  
 AGT GAC GCT TTT AAG AAA ATG GCT AGT CAA GAC AAG GAC  
**S D A F K K M A S Q D K D**  
 GGC AAG ACT ACC GAT GCT GAT GAA AGT GAA AAA CAC AAC  
**G K T T D A D E S E K H N**  
 TAT CAA GAG CAA TAC AAC AAG CTC AAA GGG GCG GGG CAT  
**Y Q E Q Y N K L K G A G H**  
 AAG AAG GAG  
**K K E**

ภาพที่ ๒-๗ ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>m</sub> จาก *S. cerevisiae* ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด ๖๘ ตัว โดยมีตำแหน่งกรดอะมิโนสำคัญที่ทำหน้าที่ทางชีวภาพคือ กรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ (สีเหลือง) (ที่มา: Li et al., ๒๐๐๐, Phylip et al., ๒๐๐๑)



ภาพที่ ๒-๘ โครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>m</sub> จาก *S. cerevisiae* (ดัดแปลงจาก PDB: ๑DPJ โดย  
 ใช้โปรแกรม PyMOL)

## ๒.๑.๙ ชีวสารสนเทศ (Bioinformatic)

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เป็นศาสตร์ที่ว่าด้วยการจัดเก็บ และการใช้ข้อมูลทางชีววิทยาอย่างเป็นระบบ รวมทั้งการพัฒนาโปรแกรมประยุกต์แบบต่าง ๆ สำหรับเปรียบเทียบ วิเคราะห์ คำนวณ และประเมินผลข้อมูลที่ได้จากการสืบค้นจากคอมพิวเตอร์ระดับองค์กรหรือระหว่างองค์กร ทั้งในและต่างประเทศ ผ่านเครือข่ายสารสนเทศต่าง ๆ ชีวสารสนเทศได้ถูกใช้ในการหาคำตอบหรือตอบคำถามทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพในหลายรูปแบบ ซึ่งเดิมทำได้ยากหรือไม่อาจทำได้เลย นอกจากนี้ยังเป็นเครื่องมือที่ปรับเปลี่ยนรูปแบบหลัก (Paradigm shift) ของการค้นคว้าวิจัย จากแบบดั้งเดิม ซึ่งใช้เวลาส่วนใหญ่ในห้องปฏิบัติการอย่างเดียว มาเป็นการผสมผสานกับการสืบค้น วิเคราะห์ หรือแม้กระทั่งทำการทดลองบนเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยการจำลอง (simulation) โดยใช้ข้อมูล (digital data) เป็นวัตถุดิบ จากนั้นจึงกลับมาวิจัยในห้องปฏิบัติการ (wet lab) เพื่อยืนยันผลลัพธ์ที่ได้จากการประเมินหรือวิเคราะห์ผลจากข้อมูลอันเป็นการประหยัดเวลาและงบประมาณการวิจัย การศึกษาชีวสารสนเทศศาสตร์จะศึกษาเกี่ยวข้องกับข้อมูลทางพันธุศาสตร์และอณูชีววิทยา เช่น ข้อมูลรหัสพันธุกรรม, ข้อมูลลำดับรหัสโปรตีน, ปริมาณชีวโมเลกุล (ระดับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ) แต่ละชนิด (mRNA และโปรตีน), และข้อมูลหมายเหตุ (annotation data) โดยนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการทำการจัดเรียงลำดับรหัสโปรตีน, การจัดโครงสร้างโปรตีน, การทำนายโครงสร้างโปรตีน, การค้นหายีน หรือ การสร้างหุ่นจำลองของวิวัฒนาการ เนื่องจากข้อมูลที่ใช้มีจำนวนมาก ทำให้ใช้พื้นที่จัดเก็บมากตาม และบ่อยครั้งที่ข้อมูลมีความซับซ้อน ทำให้ต้องใช้การประมวลผลมากขึ้นเช่นกัน การศึกษาด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ จึงค้นหาเทคนิควิธีที่จะทำให้การจัดเก็บ สืบค้น และประมวลผลเป็นไปได้โดยสะดวก และมีประสิทธิภาพ (วสันต์ จันทราทิตย์ และวิระพงษ์ ลุธิตานนท์, ๒๕๔๔)

### ๒.๑.๑๐ การเปรียบเทียบหา sequence ที่คล้ายคลึงกันด้วยโปรแกรม BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) เป็นกลุ่มของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่เปรียบเทียบหาความคล้ายกันของดีเอ็นเอหรือโปรตีน ประกอบด้วย ๕ โปรแกรม ดังแสดงในภาพที่ ๒-๙ คือ

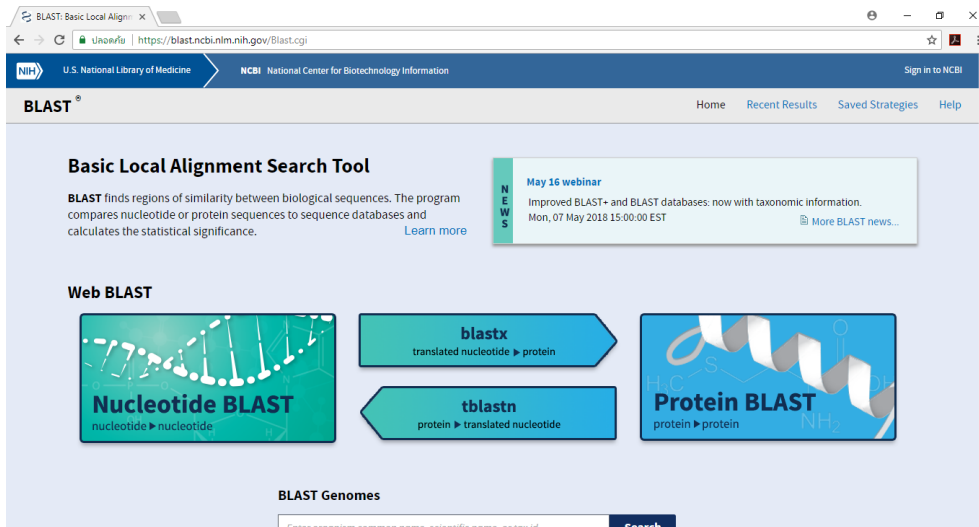
๒.๑.๑๐.๑ blastn เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอกับลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่อยู่ในฐานข้อมูล

๒.๑.๑๐.๒ blastp เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบกรดอะมิโนของพอลิเพปไทด์กับลำดับกรดอะมิโนของพอลิเพปไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล

๒.๑.๑๐.๓ blastx เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง ๖ reading frame ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่สนใจ (จากลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้ง ๒ สาย) โดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของพอลิเพปไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล

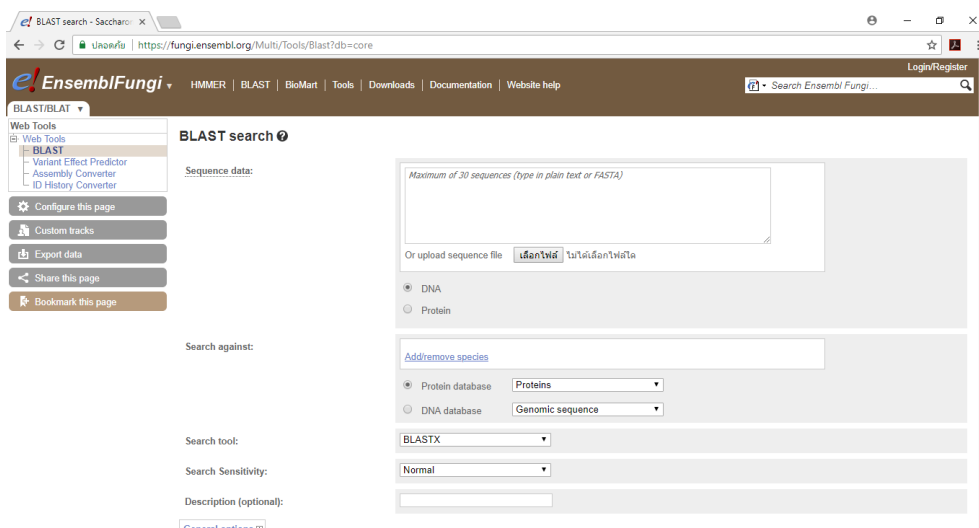
๒.๑.๑๐.๔ tblastn เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของพอลิเพปไทด์กับลำดับกรดอะมิโนทั้ง ๖ reading frame ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่อยู่ในฐานข้อมูล

๒.๑.๑๐.๕ tblastx เป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทั้ง ๖ reading frame ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่สนใจ (จากลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้ง ๒ สาย) โดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนทั้ง ๖ reading frame ที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่อยู่ในฐานข้อมูล (วสันต์ จันทราทิตย์ และวีระพงศ์ กลูติตานนท์, ๒๕๔๔)



ภาพที่ ๒-๙ โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

นอกจากโปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูล NCBI แล้วยังมีโปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูลอื่น ๆ เช่น โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูลของ Fungi เป็นต้น



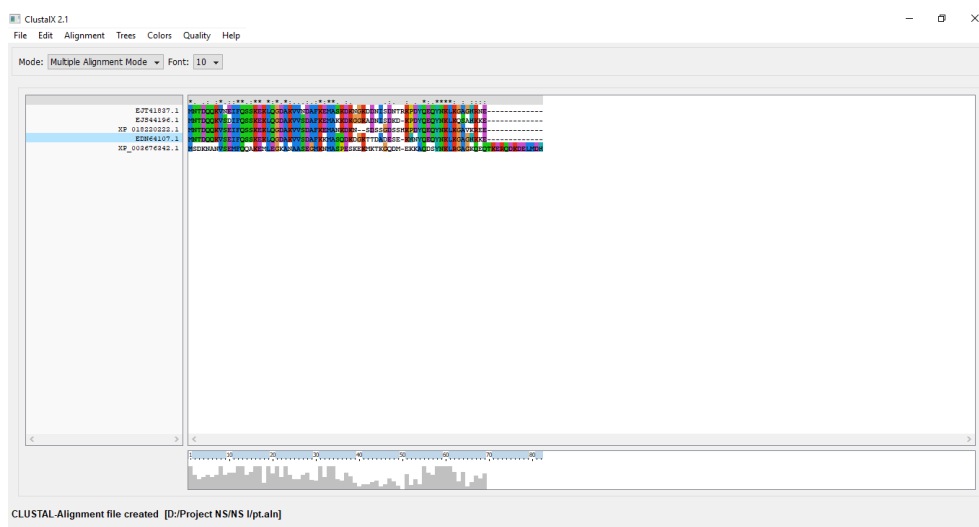
ภาพที่ ๒-๑๐ โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล Fungi (<https://fungi.ensembl.org/Multi/Tools/BLAST>)

## ๒.๑.๑๑ การทำ Multiple Sequence Alignment

Multiple sequence alignment คือการทำ align กรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์แต่ละคู่เพื่อเปรียบเทียบหาพอลิเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันมากที่สุดมาทำการ alignment กันก่อน จากนั้นนำสายพอลิเพปไทด์ที่คล้ายคลึงกันมากในลำดับถัดมา align เรียงต่อไปตามลำดับ

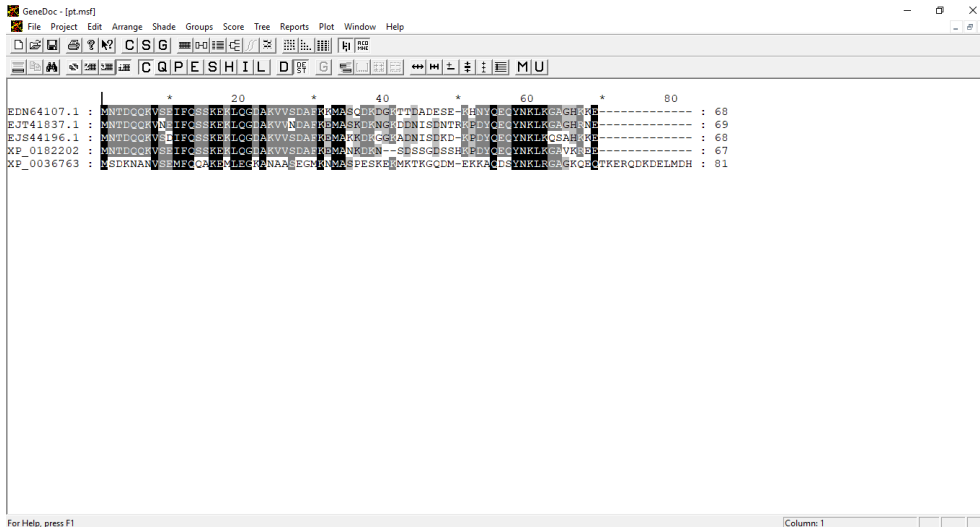
โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้สำหรับทำ multiple sequence alignment

๒.๑.๑๑.๑ โปรแกรม ClustalX เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับทำ multiple sequence alignment ที่คิดค้นและพัฒนาโดยนักวิจัยจาก European Molecular Biology Laboratory ประเทศเยอรมันนี โดยมีโปรแกรมในกลุ่ม Clustal ทั้งหมด ๓ โปรแกรม คือ โปรแกรม ClustalX จะทำงานบนระบบปฏิบัติการ windows โปรแกรม ClustalV และโปรแกรม ClustalW ที่ใช้งานได้ผ่านทางอินเทอร์เน็ต (วสันต์ จันทรา ทิพย์ และวีระพงษ์ ลุกลิตานนท์, ๒๕๔๔)



ภาพที่ ๒-๑๑ โปรแกรม ClustalX ๒.๑

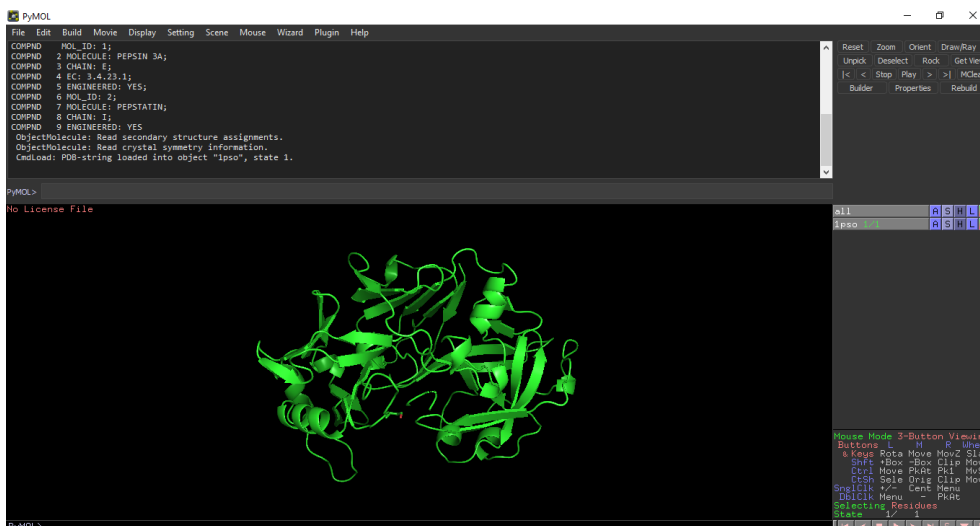
๒.๑.๑๑.๒ โปรแกรม GeneDoc เป็นโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนบนสายพอลิเพปไทด์ เป็นการวิเคราะห์เพิ่มเติมต่อจากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ClustalX โดยโปรแกรม GeneDoc จะใช้สำหรับเปิดไฟล์ประเภท.msf ในการทำ Multiple alignment sequence ด้วยโปรแกรม GeneDoc สามารถเลือกวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนได้หลากหลายรูปแบบตามความต้องการ เช่นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโน (homology sequence) ของลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีนที่ค้นพบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน wild-type โดยกดเลือก C บนแถบ Tool bar หรือการเลือกวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นพบกับโปรตีน wild-type ตามการจัดหมวดหมู่ของกรดอะมิโน โดยกดเลือก P บนแถบ Tool bar หรือการเลือกวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นพบกับโปรตีน wild-type ตาม Physicochemical ของกรดอะมิโนบนโปรตีน โดยกดเลือก H บนแถบ Tool bar เป็นต้น (Nicholas and Nicholas, ๑๙๙๗)



ภาพที่ ๒-๑๑ โปรแกรม GeneDoc

### ๒.๑.๑๒ การศึกษาโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน

ในปัจจุบันมีฐานข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดที่มีการจัดเรียงข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของจีโนมครบสมบูรณ์แล้ว เมื่อมีการพัฒนาจากอดีตจนถึงปัจจุบันเกี่ยวกับเทคนิคต่าง ๆ ทั้งด้านชีวฟิสิกส์ เทคนิคทางด้านเอนไซม์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ ทำให้สามารถทำนายโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน เพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ง่ายขึ้น โดยมีการทำนายและรวบรวมโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนไว้เข้าด้วยกันในฐานข้อมูลโปรตีนที่เรียกว่า PDB (protein data bank) (วสันต์ จันทราทิพย์ และวีระพงศ์ ลุสิตานนท์, ๒๕๔๔) ข้อมูลโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนจะมีลักษณะเป็นตัวอักษรต้องใช้ซอฟต์แวร์ที่เหมาะสมปรับเปลี่ยนตัวอักษรให้เป็นรูปภาพสามมิติ โดยใช้โปรแกรม PyMOL อ่านข้อมูลโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนเป็นรูปสามมิติ (DeLano, ๒๐๐๒)



ภาพที่ ๒-๑๒ โปรแกรม PyMOL

## ๒.๒ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส เอ หรือโปรตีน IA<sub>m</sub> นั้นพบว่า กรดอะมิโนทางปลายด้าน N-terminal (กรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔) จะมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งทางชีวภาพของโปรตีน IA<sub>m</sub> ส่วนบริเวณอื่น ๆ ที่เหลือไม่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง (Li et al., ๒๐๐๐)

จากนั้นมีการใช้ recombinant DNA technology เข้ามาใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีน IA<sub>m</sub> โดยทำการโคลนยีนเก็บรหัสสำหรับโปรตีน IA<sub>m</sub> และนำไปสร้างโปรตีนในแบคทีเรีย จากนั้นทำบริสุทธิ์โปรตีนแล้วนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับเอนไซม์โปรตีนเอส เอ และหาจลนศาสตร์ของเอนไซม์โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์สายสั้น ๆ RS๖ (Lys-Pro-Ile-Glu-Phe\*<sup>p</sup>-nitroPhe-Arg-Leu) เป็นสับสเตรทจากการศึกษาพบว่า recombinant IA<sub>m</sub> สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพถึงระดับความเข้มข้นในหน่วย sub-nanomolar และเมื่อใช้เพปไทด์สังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนลำดับที่ ๒-๓๔ ของโปรตีน IA<sub>m</sub> มาศึกษาพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ได้ในระดับเดียวกันกับ wild type IA<sub>m</sub> และเมื่อนำโปรตีน IA<sub>m</sub> ไปทดสอบกับแอสพาร์ติก โปรตีนเอสชนิดอื่น ๆ พบว่าไม่สามารถทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ และยังถูกย่อยสลายไปเหมือนสับสเตรทด้วย จึงสรุปได้ว่าตัวยับยั้งชนิดนี้มีความเฉพาะเจาะจงกับสับสเตรทเพียงชนิดเดียวเท่านั้น และเมื่อทำการตัดเอากรดอะมิโนลำดับที่ ๒-๑๕ ในโครงสร้างออกไปพบว่า โปรตีนจะสูญเสียความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งไปแทบจะทั้งหมด และเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในลำดับที่ ๓๕-๖๘ พบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อหน้าที่การออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของโปรตีน (Li et al., ๒๐๐๐; Phylip et al., ๒๐๐๑)

ในสภาวะปกติที่ไม่มีเอนไซม์ โปรตีน IA<sub>m</sub> จะมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบในไซโตพลาสซึม แต่เมื่อมีเอนไซม์อยู่ที่ปลายด้าน N-terminal (กรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔) ของตัวยับยั้งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นโครงสร้างทุติยภูมิแบบ  $\alpha$ -helix ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้สับสเตรทของเอนไซม์ไม่สามารถเข้าจับได้ ส่วนปลายด้าน C-terminal (กรดอะมิโนตัวที่ ๓๕-๖๘) นั้นไม่ได้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น  $\alpha$ -helix แต่จะกระจุกกระจายอยู่อย่างไม่เป็นระเบียบต่อไป ในการทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้นพบว่า กรดอะมิโนลำดับที่ ๑๘ (lysine) และ ๒๒ (aspartic acid) มีบทบาทสำคัญในการ interact กับเอนไซม์ (Winterburn et al., ๒๐๐๖) จากงานวิจัยที่ศึกษา in silico structural modelling (Padron-Garcia et al., ๒๐๐๙) ของตัวยับยั้งชนิดนี้โดยใช้ quantitative structure activity relationships (QSAR) (Ganesh et al., ๒๐๐๖; Green et al., ๒๐๐๔; Li et al., ๒๐๐๐)

ดังนั้นเราสามารถนำข้อมูลมาใช้ออกแบบโครงสร้างของโปรตีน IA<sub>m</sub>, สืบค้นข้อมูลเพื่อค้นหาโปรตีนตัวอื่น ๆ ที่มีโครงสร้างของโปรตีนคล้ายกับ IA<sub>m</sub> จากฐานข้อมูลฟังก และสังเคราะห์เพปไทด์เพื่อทดสอบหน้าที่ทางชีวภาพได้ โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะสร้างตัวยับยั้งที่สามารถออกฤทธิ์ได้กับแอสพาร์ติก โปรตีนเอสตัวอื่น ๆ นอกเหนือไปจากโปรตีนเอส เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้กับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคในสิ่งมีชีวิตได้

## บทที่ ๓

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### ๓.๑ วัสดุ และอุปกรณ์

๑. เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal Computer) พร้อมเชื่อมต่อเครือข่ายระบบอินเทอร์เน็ต

Processor: Intel® Core™ i๕-๔๒๐๐M CPU @ ๒.๕๐ GHz ๒.๕๐ GHz

Installed memory (RAM): ๔.๐๐ GB

System type: ๖๔-bit Operating System, x๖๔-based processor

๒. ระบบปฏิบัติการ Microsoft Windows ๑๐

๓. โปรแกรม ClustalX ๒.๑

๔. โปรแกรม GeneDoc

๕. โปรแกรม Notepad

๖. โปรแกรม PyMOL

๗. โปรแกรม Google Chrome

๘. โปรแกรม BLAST ฐานข้อมูล NCBI บนเว็บไซต์ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

๙. โปรแกรม BLAST ฐานข้อมูล Fungi บนเว็บไซต์ <https://fungi.ensembl.org/>

๑๐. เว็บไซต์ <https://www.rcsb.org/> หรือ PDB (Protein Data Bank)

๑๑. เว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> หรือ PubMed

#### ๓.๒ วิธีการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน IA<sub>m</sub> ที่แยกได้จากยีสต์ *S. cerevisiae* ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเอสที่อยู่ภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* สำหรับการศึกษาโปรตีน IA<sub>m</sub> จาก *S. cerevisiae* นั้นจะศึกษาทั้งการทำงานของโปรตีนในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ โครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>m</sub> รวมทั้งค้นหาโปรตีนตัวอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกับ IA<sub>m</sub> จากจีโนมของเชื้อรา ยีสต์ และสิ่งมีชีวิตอื่น โดยใช้การ BLAST (Basic local alignment search tools) ในการตรวจสอบหา sequence homology จาก fungal sequence databases ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ



### ๓.๒.๑ การสืบค้นข้อมูลพื้นฐานของโปรตีน IA<sub>n</sub>

๓.๒.๑.๑ การสืบค้นข้อมูลพื้นฐานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae* และโปรตีน IA<sub>n</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae*

โดยสืบค้นข้อมูลพื้นฐานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae* และโปรตีน IA<sub>n</sub> ที่แยกจากยีสต์ *S. cerevisiae* จากงานวิจัยและบทความต่าง ๆ ที่ได้ทำการทดสอบเกี่ยวกับโปรตีนเอส เอ และโปรตีน IA<sub>n</sub> ก่อนหน้านี้จากฐานข้อมูล PubMed เว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

๓.๒.๑.๒ ค้นหาโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน IA<sub>n</sub> จากฐานข้อมูลโปรตีนของ NCBI

๑. เข้าเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>
๒. ใส่ชื่อของโปรตีน “IA<sub>n</sub>” ลงในช่องค้นหา หลังจากนั้นคลิกที่ Search
๓. คลิกเลือกที่ชื่อข้อมูล IA<sub>n</sub> [*Saccharomyces cerevisiae*]
๔. คลิก FASTA เพื่อดูข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>n</sub>
๕. บันทึกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>n</sub> ลงในโปรแกรม Notepad

๓.๒.๑.๓ ค้นหาโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จากฐานข้อมูลโปรตีนของ NCBI

๑. ข้อมูลจากเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>
๒. ใส่ชื่อเอนไซม์ “proteinase A” ลงในช่องค้นหา หลังจากนั้นคลิกที่ Search
๓. คลิกเลือกที่ชื่อข้อมูล proteinase A [*Saccharomyces cerevisiae*]
๔. คลิก FASTA เพื่อดูข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอสเอ
๕. บันทึกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ลงในโปรแกรม Notepad

### ๓.๒.๒ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>n</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล

๓.๒.๒.๑ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>n</sub> จาก *S. cerevisiae* กับโปรตีนตัวอื่นใน *Saccharomyces* sp. และสปีชีส์ใกล้เคียงในฐานข้อมูล NCBI

๑. เข้าโปรแกรม BLAST ของ NCBI เว็บไซต์ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>
๑. คลิกเลือก Protein BLAST
๒. นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>n</sub> ใส่ลงในช่อง FASTA sequence จากนั้นคลิก BLAST

๓. โปรแกรมจะทำการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>n</sub> กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูล

๔. ทำการเลือกโปรตีนมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน IA<sub>n</sub> จาก *S. cerevisiae* และคลิกเลือกที่ Accession ของโปรตีนที่สนใจแต่ละตัวเพื่อเข้าดูข้อมูลของโปรตีนนั้น ๆ

๕. เมื่อเข้าไปยังข้อมูลของโปรตีนแต่ละตัวแล้ว ให้คลิกที่ FASTA เพื่อดูข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนแต่ละตัวที่ค้นพบ

๖. บันทึกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน IA<sub>n</sub> ลงในโปรแกรม Notepad

๗. ทำการตัดเลือกลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน IA<sub>n</sub> ที่ค้นพบ เลือกเฉพาะลำดับกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ โดยใช้โปรแกรม Notepad จากนั้นทำการบันทึกข้อมูล

๓.๒.๒.๒ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จาก *S. cerevisiae* กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในเห็ด เชื้อรา และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล Fungi

๑. เข้าโปรแกรม BLAST ของ Fungi เว็บไซต์ <https://fungi.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>

๒. นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ใส่ลงในช่อง Sequence data และคลิกเลือกที่ช่องโปรตีน

๓. ทำการ Add/remove species ในช่อง Search against ทำการเลือก Fungi Species ที่ต้องการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนโดยเลือกได้สูงสุดครั้งละ ๒๕ สปีชีส์ จากทั้งหมด ๘๑๑ สปีชีส์ และคลิกเลือก Protein database

๔. โปรแกรมจะทำการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ Fungi

๕. โปรแกรมจะทำการแสดงโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> ขึ้นมาคลิกที่ View result ของโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงที่พบแต่ละตัวเพื่อเข้าสู่ข้อมูลของโปรตีนนั้น ๆ

๖. เมื่อเข้าไปยังข้อมูลของโปรตีนแต่ละตัวแล้ว ให้คลิกที่ Alignment เพื่อดูข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนของข้อมูลโปรตีนที่ค้นพบ โดยโปรแกรมจะตัดแสดงเฉพาะบริเวณส่วนของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ที่คล้ายกันกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> และทำการจับคู่กรดอะมิโนตัวที่เหมือนกัน และคล้ายกันของโปรตีนที่พบกับโปรตีน IA<sub>๓</sub>

๗. บันทึกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> ลงในโปรแกรม Notepad เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูล

### ๓.๒.๓ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ กับเอนไซม์ตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล

๓.๒.๓.๑ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จาก *S. cerevisiae* กับเอนไซม์ตัวอื่นในฐานข้อมูล NCBI

๑. เข้าโปรแกรม BLAST ของ NCBI เว็บไซต์ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>

๒. คลิกเลือก Protein BLAST

๓. นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ใส่ลงในช่อง FASTA sequence จากนั้นคลิก BLAST

๔. โปรแกรมจะทำการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่อยู่ในฐานข้อมูล

๕. ทำการเลือกเอนไซม์เฉพาะเอนไซม์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันกับโปรตีนที่เลือกในข้อ ๓.๒.๒.๑ และคลิกเลือกที่ Accession ของเอนไซม์แต่ละตัวเพื่อเข้าสู่ข้อมูลของเอนไซม์นั้น ๆ

๖. เมื่อเข้าไปยังข้อมูลของเอนไซม์แต่ละตัวแล้ว ให้คลิกที่ FASTA เพื่อดูข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์

๗. บันทึกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ ลงในโปรแกรม Notepad

๘. ทำการตัดเลือกลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ และเอนไซม์อื่นที่ค้นพบเลือกเฉพาะลำดับกรดอะมิโนตัวที่ ๗๗-๔๐๕ (ส่วนของ mature enzyme (Parr et al., ๒๐๐๗)) โดยใช้โปรแกรม Notepad จากนั้นทำการบันทึกข้อมูล

### ๓.๒.๔ การทำ Multiple alignment sequence

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งหมดมาทำ Multiple alignment sequence ทำการ align พอลิเพปไทด์แต่ละคู่เพื่อเปรียบเทียบหาพอลิเพปไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดทำการ alignment กันก่อน จากนั้นนำพอลิเพปไทด์ที่คล้ายกันมากในลำดับถัดมา align เรียงต่อกันตามลำดับ ด้วยโปรแกรม ClustalX(Larkin et al., ๒๐๐๗; Thompson et al., ๑๙๙๗) และโปรแกรม GeneDoc (Nicholas and Nicholas, ๑๙๙๗; Nicholas, Nicholas and Deerfield, ๑๙๙๗)

๑. เปิดโปรแกรม ClustalX ๒.๑

๒. คลิก File เลือก Load Sequence File

๓. เลือกไฟล์ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งหมดที่บันทึกไว้ด้วยโปรแกรม Notepad เพื่อทำการเปิดไฟล์สำหรับทำ alignment

๔. คลิก alignment เลือก Do Complete Alignment ตั้งชื่อ Output Alignment Files เป็น .msf และคลิก OK จะได้ข้อมูลของกรดอะมิโนที่ทำ alignment ที่เสร็จสมบูรณ์

๕. เลือกไฟล์ข้อมูลของกรดอะมิโนทั้งหมดที่ทำการเลือกเฉพาะลำดับกรดอะมิโน ๒-๓๔ ตัวแรก ที่บันทึกไว้ด้วยโปรแกรม Notepad เพื่อทำการเปิดไฟล์สำหรับทำ alignment และทำตามข้อ ๔

๖. เปิดโปรแกรม GeneDoc

๗. คลิก File เลือก Open...

๘. เลือกไฟล์ Multiple Alignment Sequence ของข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งหมด ที่บันทึกเป็นไฟล์ .msf ทำการเปิดไฟล์สำหรับทำ alignment และทำ data analysis

๙. คลิก Configurations Dialog เลือก No consensus ในช่องของ Consensus Line เพื่อนำข้อมูลกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของพอลิเพปไทด์แบบโดยรวมทั้งหมดออก ให้เหลือเฉพาะข้อมูลกรดอะมิโนที่ต้องการวิเคราะห์

๑๐. เลือกคำสั่งการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลในรูปแบบการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นพบเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน  $IA_n$  โดยคลิกเลือกไอคอนตัว C จากแถบ Tool bar ของโปรแกรม โดยเลือกทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งหมดที่ค้นพบเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน  $IA_n$  ก่อน จากนั้นทำการวิเคราะห์แยกเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนที่ค้นพบครั้งละ ๑ ตัวเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน  $IA_n$

๑๑. ทำ data analysis วิเคราะห์ข้อมูลความคล้ายคลึงกันของโปรตีน  $IA_n$  กับโปรตีนตัวอื่นที่มีความคล้ายคลึงกันมากกับโปรตีน  $IA_n$  จากฐานข้อมูล และสรุปผลการวิจัย

๑๒. คำนวณ %identity เพื่อใช้สรุปเป็นข้อมูลค่าของเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของโปรตีน  $IA_n$  กับโปรตีนตัวอื่นที่มีความคล้ายคลึงกันมากกับโปรตีน  $IA_n$  จากฐานข้อมูล

๑๓. เลือกไฟล์ Multiple Alignment Sequence ของข้อมูลลำดับกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ ตัวแรก ของโปรตีนทั้งหมด ที่บันทึกเป็นไฟล์ .msf ทำการเปิดไฟล์สำหรับทำ alignment และทำ data analysis และโดยใช้วิธีทำตามข้อ ๖-๑๒

๑๔. นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์มาทำ Multiple alignment sequence เพื่อวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ โดยใช้วิธีทำแบบเดียวกันกับข้อ ๑-๔ และ ๖-๑๒

### ๓.๒.๕ การศึกษาและดัดแปลงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>n</sub>

#### ๓.๒.๕.๑ การสืบค้นโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>n</sub> จาก PDB

๑. เข้าเว็บไซต์ <https://www.rcsb.org/>
๒. ป้อนข้อมูลลงในช่องค้นหา “IA<sub>n</sub>” จากนั้นกด Go
๓. เลือกโครงสร้างสามมิติของ IA<sub>n</sub> ที่เป็นแบบ wild type
๔. คลิก Download Files เลือก PDB Format

#### ๓.๒.๕.๒ การศึกษาและดัดแปลงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>n</sub> ด้วยโปรแกรม PyMOL (Lill and Danielson, ๒๐๑๑)

๑. เปิดโปรแกรม PyMOL
๒. คลิก File เลือก Open...
๓. เลือกไฟล์โครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>n</sub> ที่ทำการบันทึกไว้ โดยโครงสร้างของโปรตีน IA<sub>n</sub> ที่ทำการบันทึกไว้ได้จาก PDB ID: ๑DPJ เป็นโครงสร้างของโปรตีน IA<sub>n</sub> ที่จับอยู่กับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนเนส โดยไม่มีโมเลกุลของน้ำและโมเลกุลของซัลเฟตอยู่รอบ ๆ โครงสร้างของโปรตีนเนส เอ

๔. ดัดแปลงโครงสร้างสามมิติให้เหลือเฉพาะในส่วนของโปรตีน IA<sub>n</sub> ที่ต้องการ โดยเริ่มจากการเลือกลบโมเลกุลของน้ำออกด้วยการคลิก A ที่กล่องเครื่องมือทางด้านขวาของโปรแกรมเลือกคำสั่ง remove waters จากนั้นทำการลบโมเลกุลของซัลเฟตโดยทำการคลิกเลือกที่ตำแหน่งโมเลกุลของซัลเฟตที่มีทั้งหมดบนช่องของ sequence ที่แสดงในโปรแกรมแล้วคลิกขวาเลือก remove จะทำให้โมเลกุลของซัลเฟตนั้นถูกลบออกไป ขั้นตอนต่อไปจะทำการลบส่วนโครงสร้างของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ ออก โดยทำการคลิกคลุมดำในช่องของ sequence ที่แสดงในโปรแกรมของโปรตีนเนส เอ ทั้งหมดและคลิกขวาเลือก remove จะได้โครงสร้างโปรตีน IA<sub>n</sub> ตามต้องการ

๕. ทำการแสดงบริเวณของลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญของโปรตีน IA<sub>n</sub> โดยคลิกเลือกตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญในช่องของ sequence ที่แสดงในโปรแกรม โดยทำการเลือกแสดงลำดับของกรดอะมิโนที่สำคัญบริเวณ N-terminal ได้แก่ แวลีนที่ตำแหน่งที่ ๘, ไอโซลิวซีนที่ตำแหน่งที่ ๑๑, และฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่งที่ ๑๒ บริเวณ C-terminal ได้แก่ แวลีนที่ตำแหน่งที่ ๒๖, อะลานีนที่ตำแหน่งที่ ๒๙ และฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่งที่ ๓๐ และตำแหน่งลิวซีนที่สำคัญ ได้แก่ ลิวซีนที่ตำแหน่งที่ ๑๘, ลิวซีนที่ตำแหน่งที่ ๑๙ และแอสพาร์ติกแอซิดที่ตำแหน่งที่ ๑๙ จากนั้นคลิก S ในแถบ (sele) ในกล่องเครื่องมือทางด้านขวาของโปรแกรม เลือก side chain และเลือกแสดง side chain แบบ sticks ทำการเปลี่ยนสีของ side chain โดยคลิกที่ C ในแถบเครื่องมือเดียวกันเลือกสีแสดงตามต้องการ

๖. คลิก save session as... เพื่อบันทึกข้อมูลของโครงสร้างที่ดัดแปลงเสร็จเรียบร้อยแล้วเป็นไฟล์ .pse เพื่อใช้เป็นไฟล์สำหรับแก้ไข หรือทำการดัดแปลงโครงสร้างต่อเพิ่มเติม

๗. คลิก File เลือก Export Image As และเลือก PNG เพื่อบันทึกโครงสร้างสามมิติเป็นรูปภาพหลังจากการดัดแปลงโครงสร้างเสร็จสมบูรณ์แล้ว

### ๓.๒.๖ . Computer-based structural modelling of IA<sub>n</sub> structure to identify potential targets for mutagenesis.

จากการศึกษา quantitative structure activity relationships (QSAR) ซึ่งจะได้ความสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนในโครงสร้างของโปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงไปกับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เราสามารถทำนายได้ว่า เมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของ IA<sub>n</sub>

แล้วจะทำให้ตัวยับยั้งใหม่ที่ได้นั้นมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป็นอย่างไร ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างของ IA<sub>3</sub> โดยใช้ QSAR โดย Padron-Garcia และคณะในปี ค.ศ. ๒๐๐๙ นั้นได้สร้างโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในโครงสร้างของ IA<sub>3</sub> กับ binding energy ที่แสดงถึง affinity ในการเข้าจับของตัวยับยั้งที่บริเวณเร่งของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae* และโปรตีนเอส เอ จาก *Aspergillus fumigatus* ซึ่งจากข้อมูลที่ได้นั้น เราจะทำการกำหนดให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเป็นสองช่วงคือ กรดอะมิโนในลำดับที่ ๒-๑๕ และกรดอะมิโนในลำดับที่ ๑๖-๓๒ โดยจะออกแบบให้มีทั้งการเปลี่ยนแปลงเพียงตำแหน่งเดียว ที่ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งดีขึ้นและแย่ลง รวมทั้งออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงหลายตำแหน่ง แล้วทำการสังเคราะห์สายเปปไทด์ (MWG) เพื่อนำมาทดสอบหน้าที่ทางชีวภาพทั้งกับโปรตีนเอส เอ จาก *S. cerevisiae* และโปรตีนเอส เอ จาก *A. fumigatus* รวมถึง human cathepsin D ด้วย

### ๓.๒.๗. Spectrophotometric inhibition assay

ในการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ หรือ inhibition assay โดยโปรตีน IA<sub>3</sub> นั้น จะใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี ซึ่งจะวัดโดยใช้เครื่อง Cary ๕๐ Bio spectrophotometer (Varian Ltd) และใช้ chromogenic peptide (RS๖: Lys Pro Ile Glu Phe Nph Arg Leu) เป็นสับสเตรท ซึ่ง RS๖ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาให้มี p nitrophenylalanine (Nph) ซึ่งทำหน้าที่เป็น reporter group อยู่ในโมเลกุล เมื่อพันธะเปปไทด์ที่อยู่ติดกับ p nitrophenylalanine ถูกไฮโดรไลซ์ไปจะทำให้ เมื่อทำการทดลองที่ pH ต่ำกว่า ๖.๕ หมู่  $\alpha$  amino ของ p nitrophenylalanine จะถูกเติมโปรตอนเข้าไป (protonated) ทำให้มี maximum absorbance wavelength ลดลง สามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้ที่ความยาวคลื่น ๓๐๐ นาโนเมตร ในการทำ inhibition assay จะใช้ควิเวตที่เป็น semi-micro quartz ที่มีระยะแสงผ่านเท่ากับ ๑ เซนติเมตร ปริมาตรของปฏิกิริยา คือ ๘๐๐ ไมโครลิตร ใน ๑๐๐ mM sodium formate buffer, pH ๓.๑ หรือ ๑๐๐ mM sodium acetate buffer, pH ๔.๗

### ๓.๒.๘. Kinetic analysis using non-linear estimation on Tightfitvar software

ค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์จลนศาสตร์ของเอนไซม์และตัวยับยั้งจะถูกนำไปคำนวณแบบ nonlinear estimation assay โดยใช้โปรแกรม Tightfitvar ซึ่งใช้สมการของ Morrison ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้วิเคราะห์กับตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ประเภท tight-binding inhibitors

## บทที่ ๔

### ผลการทดลอง

#### ๔.๑ ข้อมูลพื้นฐานของโปรตีน IA<sub>n</sub>

เอนไซม์โปรตีนเนส เอ (PrA) เป็นโปรติโอติคส์เอนไซม์ พบในยีสต์ *S. cerevisiae* จัดอยู่ในกลุ่มของ แอสพาร์ติกโปรตีนเนส เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะค่า pH เป็นกรด มีการรายงาน amino acid sequence ของ PrA ครั้งแรกเมื่อ ค.ศ.๑๙๘๖ (Parr et al., ๒๐๐๗) มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนทั้งหมด ๔๐๕ ตัวที่เป็น proenzyme และกรดอะมิโนทั้งหมด ๓๒๙ ตัวที่เป็น mature enzyme (กรดอะมิโนตัวที่ ๗๗-๔๐๕) proenzyme มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ ๕๒ kDa ส่วน mature enzyme มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ ๓๕.๘ kDa บริเวณเร่งปฏิกิริยาจะประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสพาร์ติก ๒ ตำแหน่งคือ Asp๗๒ และ Asp๒๑๕ สามารถถูกยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วยโปรตีน IA<sub>n</sub> ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ และมีความจำเพาะสูงกับการยับยั้ง PrA (Parr et al., ๒๐๐๗)

โครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ สามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูล NCBI บนเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> (Johnson et al., ๒๐๐๘) ได้ผลของโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ เป็น FASTA format ดังแสดงในภาพที่ ๔-๑ และข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑

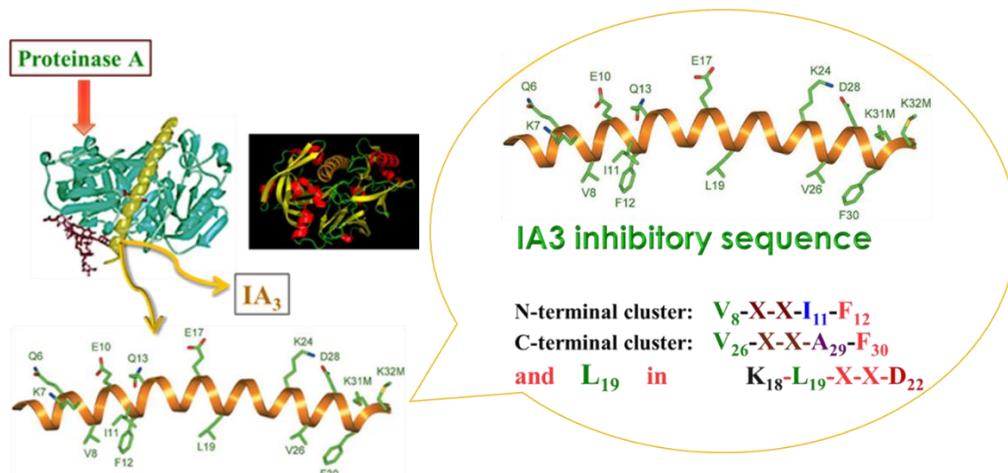
```
proteinase A [Saccharomyces cerevisiae]
GenBank: PJP11498.1
GenPept Identical Proteins Graphics
>PJP11498.1 proteinase A [Saccharomyces cerevisiae]
MFSLKALLPLALLLVSANQVAAKVHAKIYKHELSDSEMKEVTFEQHLAHLGQKYLTQFEKANPEVWFSRE
HPFFTEGGHDVPLTNYLNAQYYTDITLGTTPQNFKVILDTGSSNLWVPSNECGSLACFLHSKYDHEASSS
YKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDLSIGDLTIPKQDFAEATSEPGLTFAFGKFDGILGLGYDTISVDKV
VPPFYNAIQDILLDEKRFAYLGDTSKDTENGGEATFGGIDESKFKGDITWLPVRRKAYWEVKFEGIGLG
DEYAELESHGAAIDTGTSLITLPSGLAEMINAEIGAKKGWTGQYTLDCNTRDNLPLDIFNFNGYNFTIGP
YDYTLEVSGSCISAITPMDPPEPVGPLAIVGDAFLRKYYSIYDLGNNAVGLAKAI
```

ภาพที่ ๔-๑ FASTA format ของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae*

ตารางที่ ๔-๑ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae*

DEFINITION	proteinase A [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]
ACCESSION	PJP๑๑๔๙๘
SEQUENCE	๔๐๕ residues
VERSION	PJP๑๑๔๙๘.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๔๑๔๙๖๖ BioSample: SAMN๐๗๘๑๑๔๓๐
DBSOURCE accession	PEJR๐๑๐๐๐๐๐๔.๑
SOURCE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (baker's yeast)

โปรตีน IA<sub>3</sub> เป็นเพปไทด์สายสั้นขนาด ๖๘ กรดอะมิโน จากยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นโปรตีนที่ในพบธรรมชาติที่มีโครงสร้างแบบ random สามารถทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ saccharopepsin หรือเอนไซม์โปรตีเนส เอ ในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยในตอนแรกโปรตีน IA<sub>3</sub> จะมีโครงสร้างของโปรตีนเป็นแบบ random กระจายอยู่ในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* แต่เมื่อโปรตีน IA<sub>3</sub> พบกับโปรตีเนส เอ จะเกิดการฟอร์มตัวของกรดอะมิโน ๒-๓๔ ตัวแรกเป็น  $\alpha$ -helical เข้าจับแทนที่สับสเตรทของเอนไซม์ ส่งผลให้สับสเตรทไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ทำให้เอนไซม์ไม่ทำงาน จึงเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ขึ้น (Li et al., ๒๐๐๐) ซึ่งมีค่าความสามารถของการยับยั้งอยู่ในระดับ  $K_i < 0.1$  nM แต่มีความจำเพาะกับการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส เอ ที่เป็นเป้าหมายในยีสต์ *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ภายในโครงสร้างของโปรตีน IA<sub>3</sub> ในช่วงของกรดอะมิโนที่ ๒-๓๔ ตัวแรกที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งจะมีบริเวณที่สำคัญประกอบไปด้วย บริเวณ N-terminal จะมีกรดอะมิโนสำคัญ คือ V๘-X-X-I๑๑-F๑๒ บริเวณ C-terminal จะมีกรดอะมิโนที่สำคัญ คือ V๒๖-X-X-A๒๙-F๓๐ และบริเวณของลิวซีนที่ตำแหน่ง K๑๘-L๑๙-X-X-D๒๒ โดย K๑๘ และ D๒๒ เป็นกรดอะมิโนหลักที่มีความสำคัญในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน เอ ของโปรตีน IA<sub>3</sub> ส่วนกรดอะมิโนตั้งแต่ตัวที่ ๓๕-๖๘ ไม่มีความสำคัญในการทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งของโปรตีน (Winterburn et al., ๒๐๐๗) ดังแสดงในภาพที่ ๔-๒



ภาพที่ ๔-๒ แสดงโครงสร้าง และบริเวณของลำดับกรดอะมิโนที่สำคัญของโปรตีน IA<sub>3</sub> ได้แก่ บริเวณ N-terminal มีกรดอะมิโนสำคัญ คือ V๘-X-X-I๑๑-F๑๒ บริเวณ C-terminal จะมีกรดอะมิโนที่สำคัญ คือ V๒๖-X-X-A๒๙-F๓๐ และตำแหน่งของลิวซีน ๑๙ ในบริเวณ K๑๘-L๑๙-X-X-D๒๒ (ดัดแปลงจาก PDB ID: ๑DPJ โดยใช้โปรแกรม PyMOL)

โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน IA<sub>๓</sub> สามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูล NCBI บนเว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> (Johnson et al., ๒๐๐๘) ได้ผลของโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน IA<sub>๓</sub> เป็น FASTA format ดังแสดงในภาพที่ ๔-๓ และข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ดังแสดงในตารางที่ ๔-๒

```

IA3 [Saccharomyces cerevisiae YJM789]
GenBank: EDN64107.1
GenPept Identical Proteins Graphics
>EDN64107.1 IA3 [Saccharomyces cerevisiae YJM789]
MNTDQQKVSEIFQSSKEKLQGDQVSDAFKKMASQDKDGKTTDADESEKHNYQEQYNKLGAGHKKE
    
```

ภาพที่ ๔-๓ FASTA format ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae*

ตารางที่ ๔-๒ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae*

DEFINITION	IA <sub>๓</sub> [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM๗๘๙]
ACCESSION	EDN๖๔๑๐๗
PROTEIN	๖๘ residues
VERSION	EDN๖๔๑๐๗.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๑๓๓๐๔ BioSample: SAMN๐๒๙๕๓๖๑๕
DBSOURCE accession	AAFWo๒๐๐๐๐๒๑.๑
SOURCE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM๗๘๙

## ๔.๒ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล

### ๔.๒.๑ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> มาทำการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนตัวอื่นใน *Saccharomyces* sp. และยีสต์ที่มีสปีชีส์ใกล้เคียงที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic local alignment search tools) พบโปรตีนตัวอื่นที่เปรียบเทียบแล้วว่ามี ความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์กับกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ดังแสดงในตารางที่ ๔-๓ และแสดงข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบ ได้แก่ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *S. kudriavzevii* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๔, ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *S. arboricola* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๕, ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *S. eubayanus* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๖ และข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *N. castellii* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๗



ตารางที่ ๔-๓ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน *Saccharomyces* sp. และยีสต์ที่มีสปีชีส์ใกล้เคียงบนฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

Species	Sequence
<i>S. kudriavzevii</i>	MNTDQQKVNEIFQSSKEKLGDAKVVNDFAFKEMASKDKNGKDDNISDNTRKPDYQEYQYNKLGAGHRNE
<i>S. arboricola</i>	MNTDQQKVSDIFQSSKEKLGDAKVVSDAFKEMAKKDKGGKADNISDKDKPDYQEYQYNKLGQSAHKKE
<i>S. eubayanus</i>	MNTDQQKVSEIFQSSKEKLGDAKVVSDAFKEMANKDKNSDSSGDSSHKPDYQEYQYNKLGAVKREE
<i>N. castellii</i>	MSDKNANVSEMFQQAEMLEGGKANAASEGMKNMASPESKEKMKTKGQDMEKKAQDSYNKLRGAGKQEQTAKERQDKDELMDH

ตารางที่ ๔-๔ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *S. kudriavzevii*

DEFINITION	PAI <sub>๓</sub> -like protein [ <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO ๑๘๐๒]
ACCESSION	EJT๔๑๘๓๗
PROTEIN	๖๙ residues
VERSION	EJT๔๑๘๓๗.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๑๔๔๒ BioSample: SAMN๐๒๙๕๓๕๙๒
DBSOURCE accession	AAI๐๓๐๐๑๙๑๘.๑
SOURCE	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO ๑๘๐๒

ตารางที่ ๔-๕ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *S. arboricola*

DEFINITION	pai <sub>๓</sub> p [ <i>Saccharomyces arboricola</i> H-๖]
ACCESSION	EJS๔๔๑๙๖
PROTEIN	๖๘ residues
VERSION	EJS๔๔๑๙๖.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๘๘๕๓๓ BioSample: SAMN๐๒๙๘๑๔๓๘
DBSOURCE accession	ALIE๐๑๐๐๐๐๔๔.๑
SOURCE	<i>Saccharomyces arboricola</i> H-๖

ตารางที่ ๔-๖ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *S. eubayanus*

DEFINITION	PAI <sub>3</sub> -like protein [ <i>Saccharomyces eubayanus</i> ]
ACCESSION	XP_๐๑๘๒๒๐๒๒๒
PROTEIN	๖๗ residues
VERSION	XP_๐๑๘๒๒๐๒๒๒.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๓๔๒๖๙๔ BioSample: SAMN๐๒๗๑๖๑๑๔
DBSOURCE accession	XM_๐๑๘๓๖๗๒๘๘.๑
SOURCE	<i>Saccharomyces eubayanus</i>

ตารางที่ ๔-๗ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *N. castellii*

DEFINITION	hypothetical protein NCAS_๐D๐๔๐๐๐ [ <i>Naumovozya castellii</i> CBS ๔๓๐๙]
ACCESSION	XP_๐๐๓๖๗๖๓๔๒
PROTEIN	๘๑ residues
VERSION	XP_๐๐๓๖๗๖๓๔๒.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๗๙๓๔๓ BioSample: SAMEA๒๒๗๑๙๘๕
DBSOURCE accession	XM_๐๐๓๖๗๖๒๙๔.๑
SOURCE	<i>Naumovozya castellii</i> CBS ๔๓๐๙

#### ๔.๒.๒ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนเอนไซม์โปรตีนเอส เอ กับเอนไซม์ตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ มาทำการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนกับเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับโปรตีนเอส เอ ที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบเอนไซม์ตัวอื่นที่เปรียบเทียบแล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนของเอนไซม์กับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ โดยทำการเลือกข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันกับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนคล้ายคลึงกันกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>3</sub> ที่ได้จากการ BLAST โปรตีนบนฐานข้อมูล NCBI โดยได้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ ๔ ตัวจาก *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* และ *N. Castellii* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๘ และแสดงข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์ตัวอื่นที่ค้นพบ ได้แก่ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก *S. kudriavzevii* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๙, ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก *S. arboricola* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๐, ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก *S. eubayanus* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๑ และข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก *N. castellii* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๒

ตารางที่ ๔-๘ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ กับเอนไซม์ตัวอื่น  
 ในที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับโปรตีนเอส เอ บนฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST

Species	Sequence
<i>S. kudriavzevii</i>	MFSLKALLPLALLLVCIDPAAAKVHKAKIYKHKLSDEMKEVTFDQHLAHLGQKYLTQFEKANPEVVFSRE HPFFTEGGHDVPLTNYLNAQYYTDITLGTTPQNFKVILDTGSSNLWVPSNECGSLACFLHSKYDHEASSS YKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDTLSIGDLTIKQDFAEATSEPGLTFAFGKFDGILGLGYDTISVDKV VPPFYNAIQDILLDEKKFAFYLGDTSKDSENGGEATFGGIDESKFKGDIWLPVRRKAYWEVKFEGIGLG DEYAELEGHGAAIDTGTSLITLPSGLAEMINAEIGAKKGWTGQYTLDCNTRDLPDLIFNFNGYNFTIGP YDYTLEVSGSCISAITPMDPPEPVGPLAIVGDAFLRKYYSIYDLGNDAVGLAKAI
<i>S. arboricola</i>	MFSLKALLPLALLLVSINPAAAKVHKAKIYKHKLTDEMKEVTFDQHLAHLGQKYLTQFEKANPEVFFSRE HPFFTEGGHEVPLTNYLNAQYYTDITLGTTPQNFKVILDTGSSNLWVPSNECGSLACFLHSKYDHEASSS YKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDTLSIGDLTIKQDFAEATSEPGLTFAFGKFDGILGLGYDSISVDKV VPPFYNAIQDILLDEKKFAFYLGDTSKDSENGGEATFGGIDESKFKGDIWLPVRRKAYWEVKFEGIGLG DEFAELENHGAAIDTGTSLITLPSGLAEMINAEIGAKKGWTGQYTLDCNTRDGLPDLTFNLNGYNFTIGP YDYTLEVSGSCISAITPMDPPEPVGPLAIVGDAFLRKYYSIYDLGNDAVGLAKAI
<i>S. eubayanus</i>	MFSLQALLPLALLLLASINPAAAKVHKAKIYKHELTDEMKEVTFEQHLAHLGQKYLTQFEKANPEVAFSR EHPFFTEGGHDVPLTNYLNAQYYTDISLGNPPQNFKVILDTGSSNLWVPSTECGSLACFLHSKYDHEASS SYKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDTLSIGDLTIKQDFAEATSEPGLTFAFGKFDGILGLGYDTISVDK VPPFYNAIQDILLDEKRFAYLGDTSKDSENGGEATFGGIDESKFKGDVTWLPVRRKAYWEVKFEGIGL GHEFAELEGHGAAIDTGTSLITLPSGLAEMINAEIGAKKGWSGQYALDCNTRDGLPDLTFNFNGYNFTIG PYDYTLEVSGSCISAITPMDPPEPVGPLAIIIGDAFLRKYYSIYDLGKDAVGLAEAI
<i>N. castellii</i>	MLQLKSLPLALLLLNSLDAVNAKVHKLKIQKEDLTLNEDVTFEQHIASLGHKYMNHFERANPEVSFSRD HPFFAEGDGHNVPLTNYLNAQYFADISVGTTPQNFKVILDTGSSNLWVPSSECNSLACFLHSKYDHDASS SYKANGTKFAIQYGSGLLEGYISQDTLNIGDLTIKQDFAEATSEPGLTFAFGKFDGILGLAYDTISVDK VPPFYNAIEQGLLDEKKFAFYLGDTKKDEKNGGEITIGGIDESKFKGDIEWLPVRRKAYWEVKFEGIAL GDQYAALENHGAAIDTGTSLITLPSGLAEIINTEIGAKKGWTGQYTLDCDTRDGLPDLTFNFNGKNFTIS PFDYTLEVSGSCISAIMPMDPPEPMGPMIAIVGDAFLRKYYSIYDLDNHAVGLAEAI

ตารางที่ ๔-๙ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก *S. kudriavzevii*

DEFINITION	PEP๔-like protein [ <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO ๑๘๐๒].
ACCESSION	EJT๔๒๒๑๓
SEQUENCE	๔๐๕ residues
VERSION	EJT๔๒๒๑๓.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๑๔๔๒ BioSample: SAMN๐๒๙๕๓๕๙๒
DBSOURCE accession	AAI๐๓๐๐๑๕๗๔.๑
SOURCE	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO ๑๘๐๒

ตารางที่ ๔-๑๐ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก *S. arboricola*

DEFINITION	pep๔p [ <i>Saccharomyces arboricola</i> H-๖].
ACCESSION	EJS๔๑๔๐๕
SEQUENCE	๔๐๕ residues
VERSION	EJS๔๑๔๐๕.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๘๘๕๓๓ BioSample: SAMN๐๒๙๘๑๔๓๘
DBSOURCE accession	ALIE๐๑๐๐๐๑๙๓.๑
SOURCE	<i>Saccharomyces arboricola</i> H-๖

ตารางที่ ๔-๑๑ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของเอนไซม์จาก *S. eubayanus*

DEFINITION	PEP๔-like protein [ <i>Saccharomyces eubayanus</i> ].
ACCESSION	XP_๐๑๘๒๑๘๘๘๓
SEQUENCE	๔๐๖ residues
VERSION	XP_๐๑๘๒๑๘๘๘๓.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๓๔๒๖๙๔ BioSample: SAMN๐๒๗๑๖๑๑๔
DBSOURCE accession	XM_๐๑๘๓๖๘๓๐๓.๑
SOURCE	<i>Saccharomyces eubayanus</i>

ตารางที่ ๔-๑๒ ข้อมูลทางชีวสารสนเทศของโปรตีนจาก *N. castellii*

DEFINITION	hypothetical protein NCAS_oC๐๑๓๖๐ [ <i>Naumovozya castellii</i> CBS ๔๓๐๙].
ACCESSION	XP_๐๐๓๖๗๕๔๙๓
SEQUENCE	๔๐๖ residues
VERSION	XP_๐๐๓๖๗๕๔๙๓.๑
DBLINK	BioProject: PRJNA๗๙๓๔๓ BioSample: SAMEA๒๒๗๑๙๘๕
DBSOURCE accession	XM_๐๐๓๖๗๕๔๙๕.๑
SOURCE	<i>Naumovozya castellii</i> CBS ๔๓๐๙

#### ๔.๒.๓ การเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล Fungi

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> มาทำการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนตัวอื่นในเห็ด เชื้อรา ยีสต์ และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล Fungi พบโปรตีนตัวอื่นที่เปรียบเทียบแล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์กับกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ด้วยโปรแกรม BLAST บนเว็บไซต์ <https://fungi.ensembl.org/Multi/Tools/Blast> แสดงผลของโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบโดยแบ่งแยกตามไฟล์ของสิ่งมีชีวิตได้แก่ amino acid sequence ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๓, โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Chytridiomycota ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๔, โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Ascomycota ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๕, โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Basidiomycota ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๖, โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Microsporidia ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๗ และโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Mucoromycota ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๘

#### ๔.๓ การทำ Multiple alignment sequence

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> และโปรตีนตัวอื่นที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> ทั้งหมดที่ได้จากการค้นหาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI มาทำ multiple sequence alignment (Chenna et al., ๒๐๐๓; Thompson, Gibson and Higgins, ๒๐๐๒) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน และความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนแต่ละตัวบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ClustalX (Larkin et al., ๒๐๐๗; Thompson et al., ๑๙๙๗) และ GeneDoc (Nicholas and Nicholas, ๑๙๙๗; Nicholas et al., ๑๙๙๗) และค่าควมค่า %Identity เพื่อบ่งบอกถึงเปอร์เซ็นต์ของ homology sequence ของโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> ได้ผล

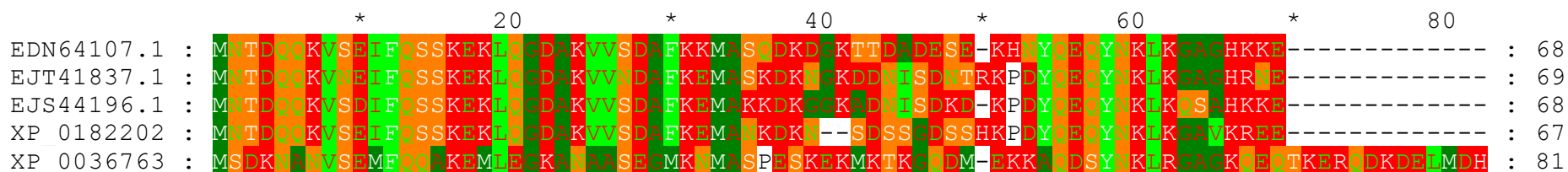
แ ส ด ง ตั ง ภ า พ ที่ ๔-๔ ถึง ภ า พ ที่ ๔-๑๔

```

          *           20           *           40           *           60           *           80
EDN64107.1 : MNTDQQKVSEIFQSSKEKLOGDAKVVSDAFKKMASQDKDGKTTDADESE-KHNYQEYQYNKLGAGHKKE----- : 68
EJT41837.1 : MNTDQQKVNEIFQSSKEKLOGDAKVVNDAFKEMASKDKNGKDDNISDNTRKPDYQEYQYNKLGAGHRNE----- : 69
EJS44196.1 : MNTDQQKVSDFIFQSSKEKLOGDAKVVSDAFKEMAKKDKGGKADNISDKD-KPDYQEYQYNKLGQSAHKKE----- : 68
XP_0182202 : MNTDQQKVSEIFQSSKEKLOGDAKVVSDAFKEMANKDKN--SDSSGDSSHKPDYQEYQYNKLGAVKREE----- : 67
XP_0036763 : MSDKNANVSEMFQQA KEMLEGKANAA SEG MKNMAS PESKE KMKTGQDM-EKKAQDSYNKLRGAGKQEQTKERQDKDELMDH : 81

```

ภาพที่ ๔-๔ การทำ Multiple alignment sequence ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยแสดงบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ, บริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกัน ๔ sequence ด้วยพื้นหลังสีเทาเข้ม และบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกัน ๓ sequence ด้วยพื้นหลังสีเทาอ่อน จากภาพ EDN๖๔๑๐๗.๑ คือโปรตีน IA<sub>๓</sub> จาก *S. cerevisiae*, EJT๔๑๘๓๗.๑ คือโปรตีนจาก *S. kudriavzevii*, EJS๔๔๑๘๖.๑ คือโปรตีนจาก *S. arboricola*, XP\_๐๑๘๒๒๐๒ คือโปรตีนจาก *S. eubayanus* และ XP\_๐๐๓๖๗๖๓ คือโปรตีนจาก *N. castellii*



ภาพที่ ๔-๕ การทำ Multiple alignment sequence ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะของพันธะระหว่างกรดอะมิโน เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ IA<sub>n</sub> ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดยแยกตาม คุณลักษณะของกรดอะมิโน โดยแบ่งเป็นกลุ่ม **DE** **HKR** กลุ่มกรดอะมิโนที่มี side chain ที่แตกตัวและให้ประจุเป็นบวกและประจุลบ กลุ่ม **NO** **ST** กลุ่มกรดอะมิโนที่มี side chain แบบมีขั้วและไม่แตกตัวให้ประจุ กลุ่ม **LIV** **FYW** กลุ่มกรดอะมิโนที่มี side chain แบบไม่มีขั้วและไม่ชอบน้ำ และกลุ่ม **AG** **MC** กลุ่มของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วและไม่ชอบน้ำ จากภาพ EDN๖๔๑๐๗.๑ คือโปรตีน IA<sub>n</sub> จาก *S. cerevisiae*, EJT๔๑๘๓๗.๑ คือโปรตีนจาก *S. kudriavzevii*, EJS๔๔๑๙๖.๑ คือโปรตีนจาก *S. arboricola*, XP\_๐๑๘๒๒๐๒ คือโปรตีนจาก *S. eubayanus* และ XP\_๐๐๓๖๗๖๓ คือโปรตีนจาก *N. castellii*

		*		20		*																															
EDN64107.1	:	M	N	T	D	Q	Q	K	V	S	E	I	F	Q	S	S	K	E	K	L	Q	G	D	A	K	V	V	S	D	A	F	K	K	M	A	:	34
EJT41837.1	:	M	N	T	D	Q	Q	K	V	N	E	I	F	Q	S	S	K	E	K	L	Q	G	D	A	K	V	V	N	D	A	F	K	E	M	A	:	34
EJS44196.1	:	M	N	T	D	Q	Q	K	V	S	D	I	F	Q	S	S	K	E	K	L	Q	G	D	A	K	V	V	S	D	A	F	K	E	M	A	:	34
XP-0182202	:	M	N	T	D	Q	Q	K	V	S	E	I	F	Q	S	S	K	E	K	L	Q	G	D	A	K	V	V	S	D	A	F	K	E	M	A	:	34
XP-0036763	:	M	S	D	K	N	A	N	V	S	E	M	F	Q	Q	A	K	E	M	L	E	G	K	A	N	A	A	S	E	G	M	K	N	M	A	:	34

ภาพที่ ๔-๖ การทำ Multiple alignment sequence ของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ ซึ่งเป็นบริเวณของกรดอะมิโนที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น  $\alpha$ -helix เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยแสดงบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ, บริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกัน ๔ sequence ด้วยพื้นหลังสีเทาเข้ม และบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกัน ๓ sequence ด้วยพื้นหลังสีเทาอ่อน จากภาพ EDN๖๔๑๐๗.๑ คือโปรตีน IA<sub>๓</sub> จาก *S. cerevisiae*, EJT๔๑๘๓๗.๑ คือโปรตีนจาก *S. kudriavzevii*, EJS๔๔๑๙๖.๑ คือโปรตีนจาก *S. arboricola*, XP\_๐๑๘๒๒๐๒ คือโปรตีนจาก *S. eubayanus* และ XP\_๐๐๓๖๗๖๓ คือโปรตีนจาก *N. castellii*



```

          *           20           *           40           *           60
EDN64107.1 : MNTDQQKVS EIFQSSKEKLGDAKVVSDAFKKMASQDKDGKTTD-ADESEKHN YQEQYNKLGAGHKK E : 68
EJT41837.1 : MNTDQQKVN EIFQSSKEKLGDAKVVNDAFKEMASKDKNGKDDNISDNTRKPDYQEQYNKLGAGHRNE : 69

```

ภาพที่ ๔-๗ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA<sub>m</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* (EDN๖๔๑๐๗.๑) และโปรตีนที่ค้นพบจาก *S. kudriavzevii* (EJT๔๑๘๓๗.๑) ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยในแสดงบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันด้วยพื้นหลังสีดำ จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนได้ค่า %Identity เท่ากับ ๘๒ เปอร์เซ็นต์

		*		20		*	
EDN64107.1	:	MNTDQQKVS	SEIFQSSKEK	LQGD	KVVS	DAFKKMA	: 34
EJT41837.1	:	MNTDQQKVN	SEIFQSSKEK	LQGD	KVVN	DAFKEMA	: 34

ภาพที่ ๔-๘ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* (EDN๖๔๑๐๗.๑) และโปรตีนที่ค้นพบจาก *S. kudriavzevii* (EJT๔๑๘๓๗.๑) ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยในแสดง บริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนได้ค่า %identity เท่ากับ ๙๐ เปอร์เซ็นต์

```

          *           20           *           40           *           60
EDN64107.1 : MNTDQQKVS E I FQSSKEKLGDAKVVSDAFK KMASQDKD GKTTDADESEK HNYQEYQYNKLGAG HKKE : 68
EJS44196.1 : MNTDQQKVS D I FQSSKEKLGDAKVVSDAFK EMAKKDKG GKADNIS DKDKP DYQEYQYNKLGQSA HKKE : 68

```

ภาพที่ ๔-๙ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* (EDN๖๔๑๐๗.๑) และโปรตีนที่ค้นพบจาก *S. arboricola* (EJS๔๔๑๙๖.๑) ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยในแสดงบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนได้ค่า %Identity เท่ากับ ๗๖ เปอร์เซ็นต์

	*	20	*					
EDN64107.1 :	MNTDQQKVS	E	IFQSSKEK	LQGD	AKVVS	DAFK	KMA	: 34
EJS44196.1 :	MNTDQQKVS	D	IFQSSKEK	LQGD	AKVVS	DAFK	EMA	: 34

ภาพที่ ๔-๑๐ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* (EDN๖๔๑๐๗.๑) และโปรตีนที่ค้นพบจาก *S. arboricola* (EJS๔๔๑๙๖.๑) ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยในแสดง บริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนได้ค่า %Identity เท่ากับ ๙๓ เปอร์เซ็นต์

```

          *           20           *           40           *           60
EDN64107.1 : MNTDQQKVSEIFQSSKEKLQGDAKVVSDAFKKMASQDKDGGKTTDADESEKHNYQEYQYNKLGAGHKKE : 68
XP_0182202 : MNTDQQKVSEIFQSSKEKLQGDAKVVSDAFKEMANKDKNSDSS-GDSSHKPPDYQEYQYNKLGAVKREE : 67

```

ภาพที่ ๔-๑๑ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* (EDN๖๔๑๐๗.๑) และโปรตีนที่ค้นพบจาก *S. eubayanus* (XP\_๐๑๘๒๒๐๒) ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยในแสดงบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนได้ค่า %Identity เท่ากับ ๘๐ เปอร์เซ็นต์

```

                *           20           *
EDN64107.1 : MNTDQQKVSEIFQSSKEKLOGDAKVVSDAFKKMA : 34
XP-0182202 : MNTDQQKVSEIFQSSKEKLOGDAKVVSDAFKEMA : 34

```

ภาพที่ ๔-๑๒ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* (EDN๖๔๑๐๗.๑) และโปรตีนที่ค้นพบจาก *S. eubayanus* (XP\_๐๑๘๒๒๐๒) ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยในแสดง บริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนได้ค่า %Identity เท่ากับ ๙๗ เปอร์เซ็นต์

```

          *           20           *           40           *           60           *           80
EDN64107.1 : MNTDQQKVSEIFQSSKEKLGDAKVVSDAFKKMASQDKDGKTTDADESEKHNYEQYNKLGAG---HKKE----- : 68
XP_0036763 : MSDKNANVSEMFQQAEMLEGKANAASEGMKNMASPESKEKMKTKGQDMEKKAQDSYNKLRGAGKQEQTKERQDKDELMDH : 81

```

ภาพที่ ๔-๑๓ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* (EDN๖๔๑๐๗.๑) และโปรตีนที่ค้นพบจาก *S. eubayanus* (XP\_๐๐๓๖๗๖๓) ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยในแสดงบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนได้ค่า %identity เท่ากับ ๓๙ เปอร์เซ็นต์

```

          *                20                *
EDN64107.1 : MNTDQQKVSEIFQSSKEKIQGDAKVVSDAFKKMA : 34
XP-0036763 : MSDKNANVSEMFQQAKEMLEGKANAASEGMMKNMA : 34

```

ภาพที่ ๔-๑๔ การทำ Multiple alignment sequence ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* (EDN๖๔๑๐๗.๑) และโปรตีนที่ค้นพบจาก *S. eubayanus* (XP\_๐๐๓๖๗๖๓) ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc วิเคราะห์แยกตามคุณลักษณะ homology sequence โดยในแสดง บริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยพื้นหลังสีดำ จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนได้ค่า %Identity เท่ากับ ๔๓ เปอร์เซ็นต์



นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ และเอนไซม์อื่นที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันกับเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ทั้งหมดที่ได้จากการค้นหาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI มาทำ multiple sequence alignment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน และความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนแต่ละตัวของเอนไซม์ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc และคำนวณค่า %identity เพื่อบ่งบอกถึงเปอร์เซ็นต์ของ homology sequence ของเอนไซม์ตัวอื่นที่ค้นพบเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ได้ผลแสดงดังภาพที่ ๔-๑๕

```

                *           20           *           40           *           60           *           80           *           100           *
PJP11498.1 : --GHDVPLTNYLNAQYYTDITLGTTPPNFKVILDTGSSNLWVPSNECGSLACFLHSHKYDHEASSSYKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDTLSIGDLTI PKQDFAEATSEPLTFAFG : 115
EJT42213.1 : -GGHDVPLTNYLNAQYYTDITLGTTPPNFKVILDTGSSNLWVPSNECGSLACFLHSHKYDHEASSSYKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDTLSIGDLTI PKQDFAEATSEPLTFAFG : 116
EJS41405.1 : -GGHDVPLTNYLNAQYYTDITLGTTPPNFKVILDTGSSNLWVPSNECGSLACFLHSHKYDHEASSSYKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDTLSIGDLTI PKQDFAEATSEPLTFAFG : 116
XP_0182188 : EGGHDVPLTNYLNAQYYTDISLGNPPNFKVILDTGSSNLWVPSNECGSLACFLHSHKYDHEASSSYKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDTLSIGDLTI PKQDFAEATSEPLTFAFG : 117
XP_0036754 : GDGHDVPLTNYLNAQYFADISVGTTPPNFKVILDTGSSNLWVPSNECGSLACFLHSHKYDHEASSSYKANGTEFAIQYGTGSLEGYISQDTLSIGDLTI PKQDFAEATSEPLTFAFG : 117

                120           *           140           *           160           *           180           *           200           *           220           *
PJP11498.1 : KFDGILGLGYDTSV DKKVPPFYNAIQD LLDEKRFAFYLGDTSKDTENGGEATFGGIDESKFKGDIWLPVRRKAYWEVKFEGIGLGEYAELESHGAAIDTGTSLITLPSGLAEM : 232
EJT42213.1 : KFDGILGLGYDTSV DKKVPPFYNAIQD LLDEKRFAFYLGDTSKDTENGGEATFGGIDESKFKGDIWLPVRRKAYWEVKFEGIGLGEYAELESHGAAIDTGTSLITLPSGLAEM : 233
EJS41405.1 : KFDGILGLGYDTSV DKKVPPFYNAIQD LLDEKRFAFYLGDTSKDTENGGEATFGGIDESKFKGDIWLPVRRKAYWEVKFEGIGLGEYAELESHGAAIDTGTSLITLPSGLAEM : 233
XP_0182188 : KFDGILGLGYDTSV DKKVPPFYNAIQD LLDEKRFAFYLGDTSKDTENGGEATFGGIDESKFKGDIWLPVRRKAYWEVKFEGIGLGEYAELESHGAAIDTGTSLITLPSGLAEM : 234
XP_0036754 : KFDGILGLGYDTSV DKKVPPFYNAIQD LLDEKRFAFYLGDTSKDTENGGEATFGGIDESKFKGDIWLPVRRKAYWEVKFEGIGLGEYAELESHGAAIDTGTSLITLPSGLAEM : 234

                240           *           260           *           280           *           300           *           320           *
PJP11498.1 : INAEIGAKKGGWTGQYTLDCNTRDNLDPDLIFNENGNFTIGPYDYTLEVSGSCISAITPMDFFPEPVGPLAIVGDAFLRKYYSIYDLGNNAVGLAKAI : 328
EJT42213.1 : INAEIGAKKGGWTGQYTLDCNTRDNLDPDLIFNENGNFTIGPYDYTLEVSGSCISAITPMDFFPEPVGPLAIVGDAFLRKYYSIYDLGNNAVGLAKAI : 329
EJS41405.1 : INAEIGAKKGGWTGQYTLDCNTRDNLDPDLIFNENGNFTIGPYDYTLEVSGSCISAITPMDFFPEPVGPLAIVGDAFLRKYYSIYDLGNNAVGLAKAI : 329
XP_0182188 : INAEIGAKKGGWTGQYTLDCNTRDNLDPDLIFNENGNFTIGPYDYTLEVSGSCISAITPMDFFPEPVGPLAIVGDAFLRKYYSIYDLGNNAVGLAKAI : 330
XP_0036754 : INAEIGAKKGGWTGQYTLDCNTRDNLDPDLIFNENGNFTIGPYDYTLEVSGSCISAITPMDFFPEPVGPMIAIVGDAFLRKYYSIYDLGNNAVGLAKAI : 330

```

ภาพที่ ๔-๑๕ การทำ Multiple alignment sequence ระหว่างโปรตีน เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae* กับเอนไซม์เป่าหมายจากยีสต์ตัวอื่นที่ค้นพบโครงสร้างของโปรตีนในยีสต์คล้ายกับโปรตีน IA<sub>3</sub> จาก *S. cerevisiae* โดยแสดงบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกันทุก sequence ด้วยตัวอักษรสีขาวพื้นหลังสีดำ, บริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกัน ๔ sequence ด้วยตัวอักษรสีขาวพื้นหลังสีเทา และบริเวณที่มีกรดอะมิโนเหมือนกัน ๓ sequence ด้วยตัวอักษรสีดำพื้นหลังสีเทา จากภาพ PJP๑๑๔๘๘.๑ คือ เอนไซม์โปรตีน เอ จาก *S. cerevisiae*, EJT๔๒๒๑๓.๑ คือ เอนไซม์จาก *S. kudriavzevii*, EJS๔๑๔๐๕.๑ คือเอนไซม์จาก *S. arboricola*, XP\_๐๑๘๒๑๘๘ คือเอนไซม์จาก *S. eubayanus* และXP\_๐๐๓๖๗๕๔ คือเอนไซม์จาก *N. castellii* การวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ได้ค่า %Identity เท่า ๆ กับ ๙๗, ๙๖, ๙๕ และ ๘๔ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทำ multiple sequence alignment ของโปรตีนตัวอื่นจากเห็ด เชื้อรา ยีสต์ และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน IA<sub>3</sub> ที่ค้นหาเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล Fungi ได้แสดงผลการ alignment เปรียบเทียบในฐานข้อมูลในขณะที่ทำการ BLAST ข้อมูลโปรตีน แสดงส่วนของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนหรือความคล้ายคลึงกัน โดยแบ่งแยกกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเหลือง กรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเขียว และกรดอะมิโนที่ไม่มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงด้วยการไม่เติมสี โดยบ่งบอกเปอร์เซ็นต์ของความเหมือนกันของโปรตีนตัวอื่นที่พบกับโปรตีน IA<sub>3</sub> ด้วยค่า %identity และบ่งบอกเปอร์เซ็นต์ของความคล้ายคลึงกันของโปรตีนตัวอื่นที่พบกับโปรตีน IA<sub>3</sub> ด้วยค่า %Similarity ทำการแสดงผลโดยแบ่งโปรตีนอื่นที่ค้นพบตามไฟลัม ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๓, โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Chytridiomycota ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๔, โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Ascomycota ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๕, โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Basidiomycota ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๖, โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Microsporidia ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๗ และโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Mucoromycota ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๘

ตารางที่ ๔-๑๓ ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จาก *Saccharomyces cerevisiae*

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
EDN๖๔๑๐๗.๑	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>MNTDQQKVSEIFQSSKEKLGDAKVVSDAFKKMASQDKDGKTTDA DESEKHNYQEQYNKLLKGAGHKKE</b>	-	-

ตารางที่ ๔-๑๔ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Chytridiomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
OON๐๓๘๗๗	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	<b>OKFWETMASSKAKKGGHSATAIRAAASQESPSKRHKTTPAKNGKS SSHASSSNKKKSSGSKSD</b>	๓๒	๔๑

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเหลือง และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเขียว

ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
SPAC๑๔๐.๐๒.๑	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SSESEEEVEVVEKTEEKKEGSSESSSDSESSSDSSSESGDS DSSSDSESESSSEDEKRRKAEPASEE	๒๑	๔๙
SPAC๑B๓.๐๕.๑	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	AEEKVSADASVQDIAEKEESLDADKELATNDQEDDEEENQAE	๓๔	๕๔
EPX๗๒๘๔๓	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	QKEKENMKNDANAVAEEKPKVKHSTKKSSRKAKSESDRHKSKDKKHKRK	๒๙	๕๑
EPX๗๓๑๓๔	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	GYGHVGLNFAFGDSTSQSKDGETSHANEGENSLQKQEKNEEK	๓๗	๕๖
KIW๐๙๑๘๙	<i>Verruconis gallopava</i>	GDDKTPSPATKQATPEDSSGEDEDEDEWDKSDSEEEEREMTDDDERK	๓๐	๕๑
EWC๔๕๖๑๖	<i>Drechslerella stenobrocha</i>	KVFKSSQKYVEQDSKKISDLAREAAASKANNGAS PDA	๓๓	๗๒
EME๔๖๒๙๙	<i>Dothistroma septosporum</i>	LETDLKAAKEAQSAEEKLKVAI EKAVAASKNAGPAGKDGKGFKADRADQGR LAELEKQL KEA	๓๐	๔๘
EME๔๑๖๗๓	<i>Dothistroma septosporum</i>	DAKKAEEKAKHDAKKVEEFAKHDAEKAEQEA KDDADKDKHDAEKKAKHDAEKAEKKAKDDADK	๒๕	๔๙
EMF๑๔๖๙๖	<i>Sphaerulina musiva</i>	EREREQEA FESLLEKARLDAVEIRKA EKAAAKAENGGVDVSADES EDEDY	๓๔	๕๒
KJX๙๒๖๓๔	<i>Zymoseptoria brevis</i>	DQQVAREKFLQKEREAE GDEFADKEK FVTSAYKEQEE TRRLEEE EK RKAE EDEKRRHAG	๒๖	๔๖

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเขียว และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเขียว

ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
EUC๔๘๑๕๕	<i>Bipolaris oryzae</i>	MANNDKLAQHERDAQVLGRYREQWEKLGAGARKKE	๔๒	๕๓
EUC๕๐๙๗๑	<i>Bipolaris oryzae</i>	DSDEEESSEESAEGEAAKGKAAVPAEKKEEEDDDDEEEDSD DDEEESSEE	๒๕	๕๖
EMD๖๓๗๖๙	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	MANNDKLAQHERDAQVLGRYREQWEKLGAGARKKE	๔๒	๕๓
ENI๐๔๖๔๘	<i>Bipolaris maydis</i>	MANNDKLAQHERDAQVLGRYREQWEKLGAGARKKE	๔๒	๕๓
EUN๒๒๒๘๗	<i>Bipolaris victoriae</i>	MANNDKLAQHERDAQVLGRYREQWEKLGAGARKKE	๔๒	๕๓
EMD๙๒๙๖๖	<i>Bipolaris maydis</i>	MANNDKLAQHERDAQVLGRYREQWEKLGAGARKKE	๔๒	๕๓
EUC๓๖๓๖๔	<i>Bipolaris zeicola</i>	MANNDKLAQHERDAQVLGRYREQWEKLGAGARKKE	๔๒	๕๓
EXJ๖๙๘๖๒	<i>Cladophialophora psammophila</i>	EAFEACKQELSSSHARVTDLTTELSSSQEARETTDAQVAQLSAEL EAYTQLK	๒๙	๕๖
OAP๖๔๐๘๘	<i>Fonsecaea erecta</i>	QEDAKIASDIFTKLREQQPDDKATIAGYVASHAWDDE	๓๘	๕๑
OAP๖๑๖๒๓	<i>Fonsecaea erecta</i>	KEEKERLKAERAKKDEEKKRKEEEKDAARKVREKKKQKDAEKQ EK	๓๐	๔๙
EDU๕๐๘๔๘	<i>Pyrenophora triticirepentis</i>	SDSSESEEEKAAAKAKATSDSSDSADSDADSSSDSDSDEEE	๓๗	๕๑
OAL๔๕๒๘๕	<i>Pyrenochaeta sp.</i>	DREKKKHNDDEKKKYDDEKKKHHDYDEKKKYDDEKKKHHDYDEK KKHDYDEK	๒๘	๕๑
KPI๔๒๒๙๐	<i>Phialophora attae</i>	KVKLEYEAKVKAKKAKKKDDDKDKKDDKEDVEK	๔๓	๕๗
KKY๑๕๕๓๑	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	LATVDFDGKEKDDDETEVHTHLRPWEAIKAEGEEE	๓๔	๕๗

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสี่เหลี่ยม และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสี่เหลี่ยม

ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
ODM๒๒๓๙๑	<i>Aspergillus cristatus</i>	KEKEKEKDGESKEKDGKEKKDADKDKDAKSDEKERDDKINSLKKQ EKAQGGG	๒๗	๕๔
OJK๐๒๐๕๙	<i>Aspergillus aculeatus</i>	AEVATSDAKASDSHDDEQSTSTADDQSDHHEENKGGKPSGDDKDK E	๓๓	๕๐
OJK๐๑๑๑๕	<i>Aspergillus aculeatus</i>	EDAMEDDEKPAADAEEKKTATDDDDLKEYDLHDHYSDEVDEEDGEKF TMFGNVK	๓๑	๔๖
CADACLAP๐๐ ๐๐๓๑๙๙	<i>Aspergillus clavatus</i>	ENDREYVMDAFQDLTLEDADAEQDEAEVEAEAE EEEEE EEEEDAG QRSE	๒๙	๕๑
OGM๔๒๙๒๒	<i>Aspergillus bombycis</i>	KQKQSEDPKSEEAEAQEAKEAKKEKQKEQODKEAKTAAADAAQ KPESKSASDKNK	๓๓	๕๑
EAA๖๓๘๙๗	<i>Aspergillus nidulans</i>	NIDPDSVRHTLLAQKKLRGDFSVNDVAPLIAEEDRTRKRAIAP ERAK	๓๓	๔๗
EAA๖๖๒๘๒	<i>Aspergillus nidulans</i>	EE TEANLAGLSKLVTEQIRKRASQRTNAPTKDADDSD	๓๕	๖๕
CADATEAP๐๐ ๐๐๘๕๒๓	<i>Aspergillus terreus</i>	KLPGAEAKDTADAFARLEGKVEDKKRTE TEQSRILELKERQQR	๓๑	๖๐
EYE๙๖๖๑๖	<i>Aspergillus ruber</i>	ERVNAIFQDSKKSOWEVDGA AVQDAVMKEKKQDLNSNNVEVQKGS E	๒๙	๔๙
OJJ๘๘๕๖๔	<i>Aspergillus glaucus</i>	ERVNAIFQDSKKSOWEADGA AVQDAVIKEKKQDSNSNNVEAQKGS E	๓๑	๕๑
OJZ๘๓๕๑๕	<i>Aspergillus luchuensis</i>	TSNNQGNNTYTQSSDHNHRNAYNHITGGGHSEE	๒๙	๕๐
EPS๓๒๑๐๙	<i>Penicillium oxalicum</i>	SSEKQAQSDAKAGKSETNSEKSKKGEKSDKADKSEKSEKAEKAE K	๓๕	๕๒
OJJ๔๓๓๓๙	<i>Penicillioopsis zonata</i>	LQAEQRQINELLKAASRVEETKAKINEEVORMADADGGGFARKQ EEFRQKELEVEEAKRQIEGHQGE	๑๘	๕๓

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเหลือง และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเขียว

ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
OQE๓๗๒๑๘	<i>Penicillium coprophilum</i>	ENDRDYVLDADFODLTMEDADAKEEQVEVEEEVEVEEYD	๓๑	๕๑
OQD๙๐๕๓๒	<i>Penicillium antarcticum</i>	EAEKKRLEEEAKEAEKQRMIEAAQNDDGGEVKSDDSAWEGFSEY EKPEWLNKKR	๒๕	๕๑
OGE๕๕๓๕๑	<i>Penicillium arizonense</i>	EAEKKRLEEEAKEAEKQRMIEAAQNDDGGEVKSDDSAWEGFSEY EKPEWLNKKR	๒๕	๕๑
OQE๐๙๔๗๗	<i>Penicillium vulpinum</i>	ENDREYVLDADFODLTMEDADAKEEEELEKEEEEAEEYD	๓๑	๕๖
GAD๙๒๖๑๕	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	RISKLAQMQLLEEAQGD LKAAQEA EAEDSAEEKEGEDDDAMEDD	๒๘	๖๓
GAD๙๖๐๘๙	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	EIQAMYDAWKEKMDKKGASAAGLFRKVDARDEDQETDDDDDEE	๒๕	๕๙
KKA๑๙๓๓๒	<i>Rasamsonia emersonii</i>	EKKEGEEAGKEEAKDKQEDKEKDGKKADKDKKEAEKKPQPLGKSK GFG	๓๓	๔๘
KKA๑๗๖๙๖	<i>Rasamsonia emersonii cbs</i>	VESDAAVAAADDNDDATS DTSGRFDDADESEFDNNNNNYN	๓๘	๕๐
GAM๔๐๓๖๖	<i>Talaromyces cellulolyticus</i>	DKSEAEWLLEALADKLERELRKL SDEYRQREKQESDGKSHDNDDE SESSRKQK	๒๑	๖๐
EGE๐๑๐๐๓	<i>Trichophyton equinum</i>	SSESESSSESSSESESEEEKAAAPVKNGAAAAADSSSESSDSDE SESEDEKPVKNGAKAANGKK	๒๘	๔๘

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสี่เหลี่ยม และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสี่เหลี่ยม



ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
EGD๙๖๑๕๕	<i>Trichophyton tonsurans</i>	SSESESSSSDSSSESESEEEEEKAAPVKNGAAAAADSSSESSDSDE SESEDEKPVKNGAKAANGKK	๒๘	๔๘
EFE๓๔๘๓๓	<i>Trichophyton benhamiae</i>	SSESESSSSDSSSESESEEEEEKAAPVKNGAAAAADSSSESSDSDE SESEDEKPVKNGAKVANGKK	๒๖	๔๙
EAS๓๕๓๒๐	<i>Coccidioides immitis</i>	EDTKKSEFKADRKLASGEKRRKMSAREDSSTTDAAEARKKMQQKLNK EHMAGA	๒๙	๕๕
KMP๐๐๕๖๘	<i>Coccidioides immitis</i>	EDTKKSEFKADRKLASGEKRRKMSAREDSSTTDAAEARKKMQQKLNK EHMAGA	๒๙	๕๕
KMU๘๙๕๗๔	<i>Coccidioides immitis</i>	EDTKKSEFKADRKLASGEKRRKMSAREDSSTTDAAEARKKMQQKLNK EHMAGA	๒๙	๕๕
EEH๑๗๑๕๗	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	GDIYEIPEYYSQIVDDHEGDADDYDNEMRHGHENEYTKI	๒๓	๕๐
EHK๙๘๑๓๒	<i>Glarea lozoyensis</i>	LNDDIPRLDTRMOKIGLEVESSAKNLADAQRRIKELSKHQPSQT DDSRVDSLQKDINKL	๒๓	๕๒
CZR๖๕๙๐๙	<i>Phialocephala subalpina</i>	ETGKKAVNGAAKVAKATETSDEDDDEEADSASSDSSNSDEE	๓๒	๕๗
CZT๔๖๖๙๕	<i>Rhynchosporium secalis</i>	EAKSIKEAFKSINGQDVSTKTTMVDKDTKH	๔๓	๖๐
OBT๗๒๗๑๔	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	ENRYNELIQMTPEAQGGELQVVRDKAMLTMQODREGLTRDRDNT	๓๐	๕๒

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสี่เหลี่ยม และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสี่เหลี่ยม

ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
KFY๑๙๖๓๓	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	ENRYNELIQMTPEAQOQGLRQVRDKAMLTMQODREGLTRDRDNT	๓๐	๕๒
KFY๑๘๓๓๔	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	LNTQLGKVAAFQESTFQKLEERANNVSERLKDLAPQDAD	๓๘	๕๙
OBT๖๔๕๖๙	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	VGERATATSWRLPGEDDEEDEFDEEDTDDDEFDSEDEASDDEED YEEEASKTKGKHKKK	๒๖	๕๒
OBT๖๑๔๑๐	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	ENRYNELIQMTPEAQOQGLQQVRDKAMLTMQODREGLTRDRDNT	๓๐	๕๒
OAF๖๒๕๙๖	<i>Pseudogymnoascus</i> <i>destructans</i>	ENRYNELIQMTPEAQOQGLQQVRDRAMLTMQODREGLTRDRDNT	๓๐	๕๒
OAF๖๒๕๑๑	<i>Pseudogymnoascus</i> <i>destructans</i>	SKTAQRIKDNLEGDFKLDKEDVKKIDGLDKKLFNDPSESFGYNF	๓๓	๕๓
ELR๐๑๖๗๗	<i>Pseudogymnoascus</i> <i>destructans</i>	ENRYNELIQMTPEAQOQGLQQVRDRAMLTMQODREGLTRDRDNT	๓๐	๕๒
ELR๐๑๗๕๗	<i>Pseudogymnoascus</i> <i>destructans</i>	SKTAQRIKDNLEGDFKLDKEDVKKIDGLDKKLFNDPSESFGYNF	๓๓	๕๓
KXH๔๗๒๘๙	<i>Colletotrichum salicis</i>	ESKAKKRRKQKALGIAAKALED SAKVVS DLANEGKKTDEKKDS KYGAEKKGKKAEDND QKKE	๒๕	๕๐
EEY๒๑๘๑๘	<i>Verticillium alfalfa</i>	KEAHEAELKKVRDEAEKAASDKATADAEAAKKQLAEQEKA KAA	๓๓	๔๘

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเหลือง และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเขียว  
 ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
EEY๑๕๑๒๖	<i>Verticillium alfalfa</i>	SDSEESHEDTGSSESESGDDEIEAEFEFEKQSSHESSGSES GDDD GSDHEYEDQ	๒๔	๔๘
EGY๑๔๓๓๘	<i>Verticillium dahliae</i>	KEAHEAE LKKVRDEAEKAAKASSDKATADAEAAKKQLAEQEKA KAA	๓๓	๔๘
VDAG_JR๒_C hr๓๓๑๑๑๓๑๐a- ๐๐๐๐๑	<i>Verticillium dahliae</i> jr	KEAHEAE LKKVRDEAEKAAKASSDKATADAEAAKKQLAEQEKA KAA	๓๓	๔๘
KZZ๙๐๗๓๓	<i>Aschersonia aleyrodis</i>	SDAQMDS SDDDEDDKNANADELEGEKELENQAKAKRAAQK	๓๙	๔๙
CCE๓๒๗๙๒	<i>Claviceps purpurea</i>	GDSEDEKEVSKESKHKDKDGKTDADRVKK	๔๓	๖๓
CCE๒๖๙๓๓	<i>Claviceps purpurea</i>	MNEDDEKYSKEDASSKTSSSGDGSVIDGETKLDSPRDKD	๓๘	๕๑
CEJ๘๙๑๓๗	<i>Torrubiella hemipterigena</i>	KDSKAKRRDSASSAGSDGASANGDADGKSKKKGSESDSDSESS SEDEGAPKKRE	๓๒	๕๐
KHN๙๗๕๔๔	<i>Metarhizium album</i>	DMEREDSKLKSEQEQKEADGKVASDKRTEQVTRDEAGAGHESEKA EK	๒๖	๕๗
OAA๖๙๙๕๖	<i>Cordyceps confragosa</i>	DQDEVSVSKLSQMVALRHLSITASDVIRDES DSDSETKSEDDDED EDENGHVKENKVKVVKPVKE	๓๑	๔๕
OAA๖๔๐๒๐	<i>Isaria fumosorosea</i>	ETVEELKVKLEKKASEAQDLVDSAEKEASSDSKDGKESNDDKKG EGKGSKDGKDSGKGAKE	๒๗	๔๘
FVEG_๑๓๖๔๘ To	<i>Fusarium verticillioides</i>	EKLTGDKFEVSHATGAEQEKIGDEKIAKGFSAFGNYLEQFLFAD GAGH	๔๑	๔๕

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเหลือง และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเขียว

ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
FVEG_๑๓๖๓๑ To	<i>Fusarium verticillioides</i>	DSDKRSRSELIEINSDNSQSDNDSLSDAFSDLSDDSEYSDNEAQ MTDDERH	๒๓	๕๔
KPA๔๐๘๐๙	<i>Fusarium langsethiae</i>	ERQRKKKAE EEKKGKKGDKQKKSDDKVKVSEEGKDKKGVKDEG KKSESKDDNKAESKDEGKD	๒๖	๔๙
KPA๔๕๘๔๑	<i>Fusarium langsethiae</i>	DKQKKSDDKVKVSEEGKDKKGVKDEGKKSESKDDNKAESKDEG KDEKPKEEESKEESSDKQKD	๒๘	๔๘
EPE๐๙๓๑๘	<i>Ophiostoma piceae</i>	KSGKEKEEKPDEEKKDEGEKPPASDDKD TKEGDAEGKEKTQKKGNG DEVKTDG	๓๕	๕๒
KND๘๘๖๙๖	<i>Tolypocladium ophioglossoides</i>	EVLATLARKASGDAGVVGKATKSTILSEFKKTRQDSWSVDQKYFTQ EQLEDLEG	๓๒	๔๗
OIW๓๕๒๘๑	<i>Coniochaeta ligniaria</i>	RIMKPSAKKRANGDMDGDDTDDEASHHHNHHSSTN	๓๔	๕๔
KUI๖๖๗๓๘	<i>Valsa mali</i>	EKELSEQGASERKKIQEQVDKKAEKDAKKGTTKKKSKKATSDDEG SDNTENQRNFMKGWIKKKE	๒๗	๔๘
KUI๗๑๕๐๙	<i>Valsa mali</i>	MASEDDDDENDDDEDSEEDSDEEATKKGKKAGDKRK	๓๙	๖๔
KUI๕๖๗๔๓	<i>Valsa mali</i>	EEKRRRSEKKAKKLAEQDEKIQAEAVKAEARRKHLAEVEDKEES EKHAKKSKKKEKSSKAKEE	๒๕	๕๒
EGS๒๑๙๑๖	<i>Chaetomium thermophilum</i>	EQPKTAEESPETKPEEAADSEKKLEEQQQSSSEQKDGOTEQKDQA QPQADQQQAN	๒๕	๕๕
EAQ๙๐๑๔๘	<i>Chaetomium globosum</i>	DRHEDGDKREEEDKKEEEDRKEVEDKKEERGRHEKEDKNEDGDRS ERANEREENKK	๒๗	๕๐

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเหลือง และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเขียว

ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
CAG๘๖๔๑๘	<i>Debaryomyces hansenii</i>	KKKEEEELNKEKLNKEELKSIQQKGESEQKEGQKDDQPENEQK PEDAQENKLNKSEGEQK	๓๑	๔๙
EGW๓๓๖๖๗	<i>Spathaspora passalidarum</i>	VEDEQEFYYGSDAEAYDEDEYDEWDLDNYEYEEYNKKYEQGEPKE	๓๕	๔๗
KHE๘๙๘๐๗	<i>Neurospora crassa</i>	QSIIDKYEGEKESLEKEVKVHKDEIKKLNKQEI TEKKTSLANKQEQE RD	๒๖	๕๗
EDK๓๙๕๕๕	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ITDSFAPMIESIETEVSIEDAILKMHSGD TD TDDSDSDDDEEN	๒๗	๕๓
EAZ๖๓๑๕๘	<i>Scheffersomyces stipites</i>	SEVVQAEREKVEEPGKIEPEAQOTTVYRDASGRIVDIDNRRKQFE QEK	๒๙	๕๒
ODV๖๗๖๖๖	<i>Hyphopichia burtonii</i>	IGDAFKLLSGQESHKSKDSSQVETHQRNVQNNHPEGVNLK	๓๒	๕๑
ODV๖๐๙๔๓	<i>Ascoidea rubescens</i>	MSQNDTVSKITNEDES DNNSQENENK	๔๘	๖๓
KGT๖๙๙๒๙	<i>Candida albicans</i>	EDGDYGT TDSQESNNRSYKTHNFIKGRNH	๔๐	๕๗
KHC๘๗๒๖๕	<i>Candida albicans</i>	EDGDYGT TDSQESNNRSYKTHNFIKGRNH	๔๐	๕๗
AOW๒๙๑๑๔	<i>Candida albicans</i>	SSSEEEEEEEVSEVESEDEDEDEDEDEDEDEDEDEEIREETN K	๓๐	๕๒
AOW๒๘๕๑๔	<i>Candida albicans</i>	EDGDYGT TDSQESNNRSYKTHNFIKGRNH	๔๐	๕๗
KGQ๙๒๔๑๗	<i>Candida albicans</i>	EDGDYGT TDSQESNNRSYKTHNFIKGRNH	๔๐	๕๗
KHC๗๙๐๔๑	<i>Candida albicans</i>	EDGDYGT TDSQESNNRSYKTHNFIKGRNH	๔๐	๕๗

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเขียว และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเหลือง

ตารางที่ ๔-๑๕ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Ascomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
KIP๐๙๕๘๖	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	DHLRAE <b>E</b> KMIQRER <b>E</b> LE <b>G</b> DEFK <b>D</b> KEAFVTQAYK <b>D</b> MA <b>E</b> LRRA <b>E</b> E <b>E</b> ERKH <b>D</b> E <b>E</b> E <b>K</b> KKGRG <b>V</b> G	๒๖	๔๙
KZT๐๐๘๒๑	<i>Laetiporus sulphureus</i>	MDTLDSMA <b>E</b> E <b>I</b> FNANK <b>S</b> RLQ <b>G</b> ESS <b>I</b> AVLVKAH <b>L</b> E <b>E</b> SE <b>D</b> YK <b>V</b> PE <b>E</b> E <b>E</b>	๒๘	๕๓
CDK๒๙๓๗๗	<i>Kuraishia capsulate</i>	SS <b>S</b> KS <b>S</b> YN <b>E</b> D <b>A</b> DA <b>V</b> AD <b>V</b> SM <b>K</b> A <b>E</b> DA <b>D</b> SD <b>D</b> ES <b>D</b> SE <b>D</b> E <b>E</b> E <b>K</b> PK <b>K</b> KE <b>K</b> E K	๓๓	๔๖

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเขียว และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเหลือง

ตารางที่ ๔-๑๖ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Basidiomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
KZV๙๑๒๔๒	<i>Exidia glandulosa</i>	NSYEQDFKQIIQSAQDKLDGDAKDQGEQKATLRRVDMELDEAD E	๓๕	๕๗
KZV๙๕๗๙๓	<i>Exidia glandulosa</i>	NSYEQDFKQIIQSAQDKLDGDAKDQGEQKATLRRVDMELDEAD E	๓๕	๕๗
EMD๓๑๗๖๘	<i>Gelatoporia subvermispora</i>	LNSEEQREDEIISEPEEDSLAGQMAMMRGGSVKKRSESDDESSTDD DEDE	๒๙	๕๓
EKM๕๕๕๘๘	<i>Phanerochaete carnosae</i>	DHLRAEEKMIQRERELEGDEFKDKDAFVTQAYKDOMAELRRAE E EKKREEEERKKKNGMG	๓๑	๔๘
KZT๒๖๓๖๖	<i>Neolentinus lepideus</i>	DHLRAEEKMIQRERELEGDEFKDKDAFVTQAYKDOMAELRRAE E EKQREEEERKKKNG	๒๗	๔๗
EPQ๕๘๒๓๐	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	DHLRAEEKMIQRERELEGDEFKDKDAFVTQAYKQDLAEVRRAE E EKRREEEERKKKNG	๒๗	๔๗
CCM๐๐๕๔๑	<i>Fibroporia radiculosa</i>	LMGNLDEVDDAFRAAASGDEGSSGEDADDVEKPSDKE	๔๑	๕๗
KZT๐๐๘๒๑	<i>Laetiporus sulphureus</i>	MDTLDSMAEEIFNANKSRLQGESYIAVLVKAHLEESSEYKVP EE	๒๘	๕๓
KIP๐๙๕๘๖	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	DHLRAEEKMIQRERELEGDEFKDKDAFVTQAYKDOMAELRRAE E ERKHDEEEKKGKRGV	๒๖	๔๘
CDO๓๑๒๐๙	<i>Trametes cinnabarina</i>	DHLRAEEKMIQRERELEGDEFKDKDAFVTQAYKEOMEELRRAE E EKKREEEERKKKNGMG	๒๖	๔๘
CCM๐๐๕๔๑	<i>Fibroporia radiculosa</i>	LMGNLDEVDDAFRAAASGDEGSSGEDADDVEKPSDKE	๔๑	๕๗
OKY๖๖๕๔๘	<i>Phlebia centrifuga</i>	EQDFKQIIQSIREKLDGDAKDERGEQKKAALRRVEMELDEADE	๔๐	๕๖

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเหลือง และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเขียว

ตารางที่ ๔-๑๖ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Basidiomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
EKM๕๕๕๘๘	<i>Phanerochaete carnosa</i>	DHLRAEEKMIQREERELEGDEFKDKDAFVTQAYKDOMAE LRRAEEE EKKREEEERKKNKGMG	๓๑	๔๘
EMD๓๑๗๖๘	<i>Gelatoporia subvermispora</i>	LNSEEQREDEISEPEEDSLAGQMAMMRGGSVKKRSESDDESSTDD DEDE	๒๙	๕๓
KIM๔๗๕๐๖	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	EIIQTPKFESESISSTVGSRFRPRGAEDDKAETS DAAYEKRRHFKF ETF EKRRRGREKEK	๒๔	๔๙
KDQ๒๖๕๒๔	<i>Pleurotus ostreatus</i>	SDTEKIREEMRKKREKLRGDAESVGGKYQQLLEEVKNAEKTRAE L NE	๓๐	๖๔
KIJ๓๐๖๗๗	<i>Sphaerobolus stellatus</i>	EAKCSNLFNKKKKNKKANQPRTANSQKRILSE DENG DQENDTESV KQNKRRKY	๒๕	๕๕
KIM๖๓๘๕๔	<i>Scleroderma citrinum</i>	DR LR AEEKMLQHEREMEGDQFADKEAFVTQAYKDOMAEVRR AEEE EKQREFAEKKKKGS	๒๕	๔๘
KIM๖๔๐๕๘	<i>Scleroderma citrinum</i>	EKKKKAEIRQSSNMLKGYQKAVGSLIGELTQEERDATAEEADE	๓๐	๕๕
KIK๔๗๐๘๗	<i>Suillus luteus</i>	DHLRAEEKMMQREREAE GDEFADKEAFVTQAYKDOMAEVRKA EEE ERQREFAEKKKRGA	๒๕	๔๕
KWU๔๕๓๔๙	<i>Rhodotorula sp.</i>	AAAESSAHKKKGKANDADEQEWQAVQEQLRKMK	๔๒	๕๕
OCF๕๙๒๓๔	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	NTTLIKEKEVLEKDNERLRMELKEVRDTAKKIDPEVNERKGEDRD ET	๓๒	๕๑
OCF๗๖๕๑๔	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	NTTLIKEKEVLEKDNERLRMELKEVRDTAKKIDPEVNERKGEDRD ET	๓๒	๕๑



หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเขียว และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเหลือง

ตารางที่ ๔-๑๖ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Basidiomycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
OCF๖๙๐๒๗	<i>Kwoniella mangroviensis</i>	NTTLLIKEKEVLEKDNERLRMELKEVRDTAKKIDPEVNERKGEDRD ET	๓๒	๕๑
KNE๙๓๔๕๘	<i>Puccinia striiformis</i>	QDKFSEYSDVAKDLLQSAFKAKSEAHKKMVPQATDLESAGESDGD KFN	๓๗	๕๑
KNZ๕๓๗๑๑	<i>Puccinia sorghi</i>	AELMSRTQVKLEVAAKAVTDACKALVKQVKSISAKSMEMKDQHDY Q	๓๐	๕๔
PTTG_๐๘๔๘๑ Po	<i>Puccinia triticina</i>	RRAGEDEDDGDEDEDEDEEEEEQEQKEEEDAGHQ	๓๗	๕๗
JGI_V๑๑_PST ๑๓๐_P๕๐๐๕ ๒๗	<i>Puccinia striiformis</i>	QDKFSEYSDVAKDLLQSAFKAKSEAHKKMVPQATDLESAGESDGD KFN	๓๗	๕๑
EFP๘๘๒๖๔	<i>Puccinia graminis</i>	KKKQEEEGKKRTEEEAKVKEEEDGQKKAENKDAEGKADEKQEKA KKTTEQEQQSKEQDA	๒๙	๔๗
KDN๕๒๓๗๙	<i>Tilletiaria anomala</i>	ASEDDDEPDTDAEEELRELOKQIDEAKAAG	๔๒	๖๑
KIS๖๖๖๔๖	<i>Ustilago maydis</i>	VSPDIKKQEEEQNKKQEQEQNKKQEEEQNKKQEQEQNKKHD QQQREKKQEQEDEKKQ	๒๓	๕๒
CCF๔๘๘๐๖	<i>Ustilago hordei</i>	KLSKLAISKSKGKSLSSKSDAGRKKRSLKRAKAKDSDEEEND N	๓๕	๕๐

ตารางที่ ๔-๑๗ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาคความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Microsporidia บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
ADM๑๑๙๑๐	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	KQOKKEEQKQOKEEKQKQKQOKEEKQKQKDDKQKEQKQOKKE QKQOKEEKQKQKEAGNQKE	๒๗	๔๗
ADM๑๑๑๓๘	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	SETEDLSTDDDEDVSDISSEDPSEDESVDYDSSDDEDEEDDSEEEYD QEPGKRRK	๓๐	๕๑
ADM๑๑๐๑๒	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	SSEGKKEKEKKEKKKKKKKKKKKKKKEKEKEKEE EGEGERKKD DSKEDDDEEEEEKKKKKHKKK	๒๑	๕๒
CAD๒๕๖๘๔	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	EEPKTTVDKKSVDKIQQQEKTA SDGDNKATAEKSQEKKTMDKAD K	๒๖	๕๔
KMV๖๕๘๗๖	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	EEPKTTVDKKSVDKIQQQEKTA SDGDNKATAEKSQEKKTMDKAD K	๒๖	๕๔
KCZ๗๙๙๔๙	<i>Anncaliia algerae</i>	IKRAFKQLALKYHPDKHSDATEAQKKQYTQKFIIEIKQA	๓๒	๖๓
KCZ๘๑๒๒๘	<i>Anncaliia algerae</i>	DVKTSEERKESSEKKEPEANPVKSATEDMISSDEDELSRKKESS EK	๓๒	๕๕
KCZ๗๖๗๘๘	<i>Anncaliia algerae</i>	EISSSKKRSTKKPVKVNDSKKASSSQKTYEDEVDAAKSRKKNKK SSKSKDEGKKSrk	๒๙	๔๘
KCZ๗๘๙๐๔	<i>Anncaliia algerae</i>	EISSSKKRSTKKPVKVNDSKKASSSQKTYEDEVDAAKSSKKNKK SSKSKDEGKKSrk	๒๙	๔๘
ORD๙๖๓๕๒	<i>Hepatospora eriocheir</i>	QKKAESYKEQKEKLNEEKKNLES SVKKEIDQMKD	๓๗	๕๔
ORD๙๙๑๐๔	<i>Hepatospora eriocheir</i>	QKKAESYKEQKEKLNEEKKNLES SVKKEIDQMKD	๓๗	๕๔
CBQ๗๓๘๒๖	<i>Sporisorium reilianum</i>	RDKLEGD AKHERSREKRRRHDDQDRRSSRHSRSDRHSHRSRH	๒๖	๖๒

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเขียว และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเหลือง

ตารางที่ ๔-๑๗ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Microsporidia บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
KRH๙๔๙๒๕	<i>Pseudoloma neurophilia</i>	KVVDNKKVVGDNKVVGDKVKVVGDKNKIVVTSDKIVDNKNKIV HDKNKV	๒๙	๔๙
KRH๙๔๖๓๘	<i>Pseudoloma neurophilia</i>	E EKITEIFGFIKKKKQKLYKNCHNLFHKKKSKKYESKKYESKYE SKKYESKKYDSKKYESKK	๒๗	๔๘
KRH๙๕๓๓๓	<i>Pseudoloma neurophilia</i>	SESKDEKEKSQKDIKNESEKSEKDKSNDEKAEKEKKQKAEKESK EKSEKAAKNKSDKEK	๒๗	๔๗
KGG๕๑๑๐๖	<i>Mitosporidium daphniae</i>	DMQMISEIFHVAKNALAKDTPTIACLFQKWASSE	๓๘	๕๖
EPR๗๙๗๘๘	<i>Spraguea lophii</i>	INTYISKLEEILYSAENKMSNISMLLVSLSNILSKNKDIEGYAA YKRKEMEFYQEQYKCLR	๒๓	๕๔
EIJ๙๔๐๑๕	<i>Nematocida parisii</i>	SELKESTKKKEESDEKEKNKDEKPNDSQNEKDEEGSEQSKKVK EDLESEKKKADEKKD	๒๗	๕๒
EOB๑๓๑๓๑	<i>Nosema bombycis</i>	INTVDKKINVIGYDSKQKIIEEIPLDSENKLVKVRDLTNKTFK IEFEK	๓๐	๕๔
EOB๑๑๖๕๔	<i>Nosema bombycis</i>	INTVDKKINVIGYDSKQKIIEEIPLDSENKLVKVRDLTNKTFK IEFEK	๓๐	๕๔
ELQ๗๓๗๙๙	<i>Trachipleistophora hominis</i>	EKVKEKEVGEKKKKSVEGKDKEEKEDKMKNKKEEGKAKKKTG EK	๒๖	๕๓
KHN๗๐๑๖๗	<i>Ordospora colligate</i>	KRIYDGIASIKEDVFKKTLNNGKNGRSMANVHKKTYFSRYLNDF VGVSVDK	๒๙	๔๒

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเขียว และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีเหลือง

ตารางที่ ๔-๑๘ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Mucoromycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
ESA๑๗๘๗๖	<i>Rhizophagus irregularis</i>	INELEQELINLDQERIKKLDKRRKELSEIEKELLNKLTSGKNTKE IHKEKDAKQKEMNELQ	๒๘	๕๔
OAQ๓๓๔๙๒	<i>Mortierella elongate</i>	NQDDSKRKKMLSSHDLEDDPTLSRDTDHKLISEIRDGGGSSSS AKRKASNEDKGEQGQDHK	๒๕	๔๘
CDS๐๓๑๓๒	<i>Lichtheimia ramosa</i>	TLEKNNAEELNAAKEQLQAEKEARKEMAAEKRRLDKDRKRREAEE DRQRAREEKLSNIPS GGDPK	๒๓	๔๙
SAM๐๕๔๕๐	<i>Absidia glauca</i>	GETEATYGAHKRNDEKDPPEPTQDLDEQKRHMYELQANLFFK	๓๒	๕๑
KFH๖๒๘๑๑	<i>Mortierella verticillate</i>	KAGQVATIQQEEDDEGEVQLLFDEGENMEDEDSDEDSDDDDSDDD DSDDSTEYLKSA	๒๓	๔๙
OBZ๘๑๔๗๘	<i>Choanephora cucurbitarum</i>	LDIDCEKVEGFTEEDRDGLEAIAAAVVD SYQREPSLDPSDKTTDT EDEE	๒๙	๕๕
EXX๗๗๓๖๖	<i>Rhizophagus irregularis</i>	EAQRISEKIEETEEFAKDESQEKKEEVEEVEDENKDKKEKVVEDES EKEVDVEDENKEK	๒๖	๕๗
EXX๕๒๘๒๔	<i>Rhizophagus irregularis</i>	INELEQRLINLDQERIKKLDKRRKELSEIEKELLNKLTSGKNTKE IHKEKEAKQKEMNELQ	๒๘	๕๔
EXX๕๔๓๗๕	<i>Rhizophagus irregularis</i>	DNNKENEVDNKNKENEVDNNEGEDDDKKNEDDHDNKENEDNN NKKNEKNDNNNKENQKNK	๒๗	๔๑
GAN๐๖๖๔๐	<i>Mucor ambiguus</i>	QEDGNADDDEEEEAEEEEKEGSTTEEDEQDSHTAKEE	๓๒	๕๗
OAD๘๐๒๕๗	<i>Phycomyces blakesleanus</i>	ETGEDGDEKLEGEVEEVEFGDFEDLEDEDANGSSKQAEFEKEQDP VEAERERIAKRKEQ	๒๕	๕๑

หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเขียว และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีชมพู

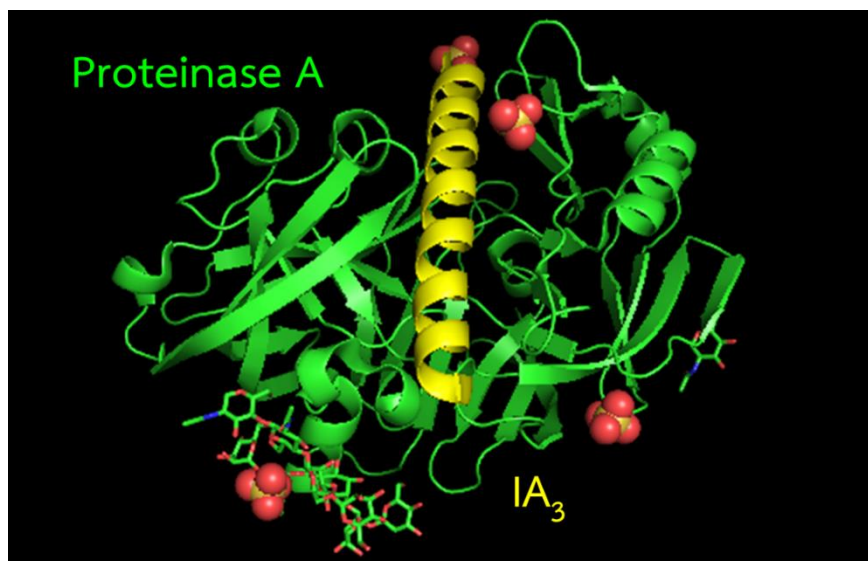
ตารางที่ ๔-๑๘ โปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบจากการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นใน Phylum Mucoromycota บนฐานข้อมูล Fungi ด้วยโปรแกรม BLAST (ต่อ)

Accession number	Species	Amino acid sequence	%Identity	%Similarity
CDH๖๐๐๒๗	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	DARLATASAMSDKLSTTGDDHMKQYFQERYNKLSAA	๔๒	๕๓

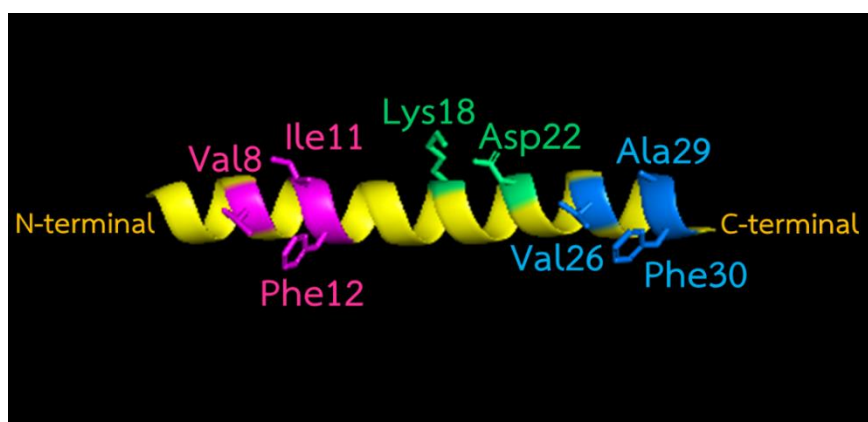
หมายเหตุ: แทนตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันด้วยสีเขียว และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงด้วยสีชมพู

#### ๔.๔ โครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>๓</sub>

จากสืบค้นโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากฐานข้อมูล PDB ด้วยเว็บไซต์ <https://www.rcsb.org/> พบโครงสร้างของ IA<sub>๓</sub> ทั้งหมด ๓ โครงสร้าง มี PDB ID ดังนี้ ๑DP๕, ๑DPJ และ ๑DoV โดยในงานวิจัยนี้จะทำการเลือกศึกษาโครงสร้างของโปรตีน IA<sub>๓</sub> เฉพาะชนิด wild-type ซึ่งตรงกับ PDB ID หมายเลข ๑DPJ ทำการดาวน์โหลดโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>๓</sub> โดยเลือกดาวน์โหลดไฟล์แบบ PDB Format และเปิดไฟล์ PDB Format ด้วยโปรแกรม PyMOL จะได้ภาพสามมิติของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีนเนส เอ ดังภาพที่ ๔-๑๖ จากนั้นใช้โปรแกรม PyMOL ทำการดัดแปลงโครงสร้างสามมิติโดยนำแอนิเมชันโปรตีนเนส เอ ออกให้เหลือแต่โครงสร้างของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ใช้สำหรับศึกษาโครงสร้าง และระบุตำแหน่งของกรดอะมิโนตำแหน่งสำคัญต่าง ๆ บนสายพอลิเพปไทด์ ดังภาพที่ ๔-๑๗



ภาพที่ ๔-๑๖ โครงสร้างสามมิติของแอนิเมชันโปรตีนเนส เอ (สีเขียว) ที่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยโปรตีน IA<sub>๓</sub> (สีเหลือง) โดยมีโอลิโกแซ็กคาไรด์เกาะอยู่กับโปรตีนเนส เอ (โครงสร้างแบบ Strick สีเขียว-แดง) และส่วนของซัลเฟตที่จับกับโปรตีนเนส เอ (โครงสร้างแบบอะตอมสีแดง-เหลือง)



ภาพที่ ๔-๑๗ โครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ที่ดัดแปลงจาก PDB ID : ๑DPJ และระบุตำแหน่งของกรดอะมิโนที่สำคัญบนพอลิเพปไทด์

#### ๔.๕ Computer-based structural modelling of IA<sub>3</sub> structure to identify potential targets for mutagenesis

จากการศึกษา quantitative structure activity relationships (QSAR) ทำให้ได้ความสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนในโครงสร้างของโปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงไปกับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ ทำให้สามารถทำนายได้ว่า เมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของ *S. cerevisiae* -IA<sub>3</sub> แล้วจะทำให้ตัวยับยั้งใหม่ที่ได้นั้นมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์เป็นอย่างไร โดยใช้ข้อมูลจากโมเดลความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในโครงสร้างของ IA<sub>3</sub> กับ binding energy ที่แสดงถึง affinity ในการเข้าจับของตัวยับยั้งที่บริเวณเร่งของเอ็นไซม์โปรตีนเอส เอ จากยีสต์ *S. cerevisiae* และโปรตีนเอส เอ จาก *Aspergillus fumigatus* โดย Padron-Garcia และคณะในปี ค.ศ. ๒๐๐๙

ซึ่งจากข้อมูลที่ได้นั้นผู้วิจัยได้ทำการกำหนดให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเป็นสองช่วงคือ กรดอะมิโนในลำดับที่ ๒-๑๕ และกรดอะมิโนในลำดับที่ ๑๖-๓๒ โดยจะออกแบบให้มีทั้งการเปลี่ยนแปลงเพียงตำแหน่งเดียว ที่ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งดีขึ้นและแย่ลง รวมทั้งออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงหลายตำแหน่ง แล้วทำการสังเคราะห์สายเบปไทด์ (MWG) เพื่อนำมาทดสอบหน้าที่ทางชีวภาพทั้งกับโปรตีนเอส เอ จาก *S. cerevisiae* และโปรตีนเอส เอ จาก *A. fumigatus* รวมถึง human cathepsin D ด้วย

##### ๔.๕.๑ Mutagenesis at key residues involved in inhibitory activity.

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง ๑๘ ๑๙ และ ๒๒ (K, L, D) มีบทบาทสำคัญในการทำปฏิกิริยากับบริเวณ active site ของเอ็นไซม์โปรตีนเอส เอ ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเปลี่ยนกรดอะมิโนที่บริเวณดังกล่าว โดยจะมีทั้งแบบที่เป็น single และ multiple mutations ดังแสดงในตารางที่ ๔-๑๙

ตารางที่ ๔-๑๙ การออกแบบตัวยับยั้งใหม่โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง ๑๘ ๑๙ และ ๒๐ ในโครงสร้างของ *S. cerevisiae* -IA<sub>3</sub>

เปปไทด์	ตำแหน่งที่ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน		
	18	19	20
WT	K	L	D
1	M	L	L
2	I	L	I
3	I	M	I
4	K	L	M

จากนั้นนำไปทดสอบ หน้าที่ทางชีวภาพทั้งกับโปรตีนเอส เอ จาก *S. cerevisiae* และโปรตีนเอส เอ จาก *A. fumigatus* และโปรตีนเอส เอ จาก *Pichia pastoris*

#### ๔.๕.๒ Multiple mutations

ทำการออกแบบและสังเคราะห์ตัวยับยั้งที่การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในโครงสร้างหลายตำแหน่งดังแสดงในตารางที่ ๓ แล้วนำไปทดสอบ หน้าที่ทางชีวภาพทั้งกับโปรตีนเอส เอ จาก *S. cerevisiae* และโปรตีนเอส เอ จาก *A. fumigatus*

ตารางที่ ๔-๒๐. การออกแบบตัวยับยั้งใหม่โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนในหลายๆตำแหน่งในโครงสร้างของ IA<sub>๓</sub>

No.	Name	Amino acid sequence (Residue 2-32)
1	Multiple-๑	NTDQQKVSE IFQSSKEK <b>LK</b> GDFK <b>R</b> V <b>I</b> K <b>V</b> F KK
2	Multiple-๒	NTDQQKVSE IFQSSKEK <b>LK</b> GDR <b>R</b> K <b>R</b> V <b>I</b> K <b>V</b> F KK
3	Multiple-๓	NTDQQKVSE IFQSSKEK <b>LK</b> GDR <b>R</b> <b>R</b> <b>R</b> V <b>I</b> K <b>V</b> F KK

#### ๔.๕.๓ Spectrophotometric inhibition assay

ในการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ หรือ inhibition assay โดยโปรตีน IA<sub>๓</sub> นั้น จะใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี ซึ่งจะวัดโดยใช้เครื่อง Cary ๕๐ Bio spectrophotometer (Varian Ltd) และใช้ chromogenic peptide (RS๖: Lys Pro Ile Glu Phe Nph Arg Leu) เป็นสับสเตรท ซึ่ง RS๖ จะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาให้มี p nitrophenylalanine (Nph) ซึ่งทำหน้าที่เป็น reporter group อยู่ในโมเลกุล เมื่อพันธะเปปไทด์ที่อยู่ติดกับ p nitrophenylalanine ถูกไฮโดรไลซิสไปจะทำให้ เมื่อทำการทดลองที่ pH ต่ำกว่า ๖.๕ หมู่  $\alpha$  amino ของ p nitrophenylalanine จะถูกเติมโปรตอนเข้าไป (protonated) ทำให้มี maximum absorbance wavelength ลดลง สามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้ที่ความยาวคลื่น ๓๐๐ นาโนเมตร ในการทำ inhibition assay จะใช้ควอตซ์ที่เป็น semi-micro quartz ที่มีระยะแสงผ่านเท่ากับ ๑ เซนติเมตร ปริมาตรของปฏิกิริยา คือ ๘๐๐ ไมโครลิตร ใน ๑๐๐ mM sodium formate buffer, pH ๓.๑ หรือ ๑๐๐ mM sodium acetate buffer, pH ๔.๗

#### ๔.๕.๔ Kinetic analysis using non-linear estimation on Tightfitvar software

ค่าพารามิเตอร์ทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์จลนศาสตร์ของเอ็นไซม์และตัวยับยั้งจะถูกนำไปคำนวณแบบ nonlinear estimation assay โดยใช้โปรแกรม Tightfitvar ซึ่งใช้สมการของ Morrison ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้วิเคราะห์กับตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ประเภท tight-binding inhibitors

จากการวิเคราะห์หน้าที่ทางชีวภาพในการเป็นตัวยับยั้งของ เปปไทด์ที่ออกแบบมา จนถึงขณะนี้ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ ๔-๒๑. และ ตารางที่ ๔-๒๒.



ตารางที่ ๔-๒๑. Inhibitory activity เปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง ๑๘ ๑๙ และ ๒๐ ในโครงสร้างของ *S. cerevisiae* -IA<sub>๓</sub> เมื่อทดสอบด้วย โปรตีนเอส เอ จาก *S. cerevisiae* (ScPrA), โปรตีนเอส เอ จาก *Aspergillus fumigatus* (AfPrA) และโปรตีนเอส เอ จาก *Pichia pastoris* (PpPrA)

เปปไทด์	Residue at position			ScPrA K <sub>i</sub> (nM)		PpPrA K <sub>i</sub> (nM)	AfPrA K <sub>i</sub> (nM)
	18	19	20	pH 3.1	pH 4.7	pH 4.7	pH 4.7
WT	K	L	D	1.1±0.4	< 0.1	55±11	NI
1	M	L	L	< 0.1	< 0.1	0.5±0.5	35±5
2	I	L	I	< 0.1	< 0.1	< 0.1	9±1
3	I	M	I	2±0.3	< 0.1	0.6±0.15	13±2
4	K	L	M	2±0.3	< 0.1	ND	ND

ตารางที่ ๔-๒๒. Inhibitory activity ของตัวยับยั้งใหม่ที่ทำการศึกษาการเปลี่ยนกรดอะมิโนในหลายๆตำแหน่ง (multiple mutations) ในโครงสร้างของ IA<sub>๓</sub> เมื่อทดสอบด้วย โปรตีนเอส เอ จาก *S. cerevisiae* (ScPrA), โปรตีนเอส เอ จาก *Aspergillus fumigatus* (AfPrA)

No.	Name	Amino acid sequence (Residue 2-32)	K <sub>i</sub> (nM) (vs ScPrA pH 4.7)	K <sub>i</sub> (nM) (vs AfPrA pH 4.7)
1	Multiple-1	NTDQQKVSE IFQSSKEKLK GDFKRVIKVF KK	๒.๔๕ ±๐.๐๘	๕๕.๑๖ ±๑๐.๑๘
2	Multiple-2	NTDQQKVSE IFQSSKEKLK GDRKRVIKVF KK	๕.๑๙ ±๐.๓๑	๓๒.๖๘ ±๖.๕๘
3	Multiple-3	NTDQQKVSE IFQSSKEKLK GDRWRVIKVF KK	๒.๓๙ ±๐.๑๐	๑๐๗.๔๗ ±๕.๖๕

## บทที่ ๕

### อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### ๕.๑ อภิปรายผลการทดลอง

ในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน IA<sub>m</sub> ที่แยกได้จากยีสต์ *S. cerevisiae* ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเอสที่อยู่ภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเอสมีกลไกที่นำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ ทำให้การศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนเอส และตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสสามารถนำไปสู่การยับยั้งการเกิดโรคหลาย ๆ ชนิดได้ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคมะเร็งเต้านมที่เกิดจากเอนไซม์คาร์เทปซิน ดี (Garcia et al., ๑๙๙๖; Llorca et al., ๒๐๐๕) แลโรคไตเรื้อรังที่เกิดจากเอนไซม์เรนิน (Remuzzi et al., ๒๐๐๕) เป็นต้น

จากการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของโปรตีน IA<sub>m</sub> พบว่า โปรตีน IA<sub>m</sub> เป็นโปรตีนในธรรมชาติ มีลักษณะเป็นเพปไทด์สายสั้นขนาด ๖๘ กรดอะมิโน แยกได้จากยีสต์ *S. cerevisiae* ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ หรือเอนไซม์ saccharopepsin โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ เป็น  $\alpha$ -helical เข้าจับตรงบริเวณ binding site ของเอนไซม์ทำให้สับเตอร์ไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ เอนไซม์จึงถูกยับยั้งการทำงาน ภายในโครงสร้างของโปรตีน IA<sub>m</sub> ในช่วงของกรดอะมิโนที่ ๒-๓๔ ตัวแรกที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งจะมีบริเวณสำคัญที่ประกอบไปด้วย บริเวณ N-terminal จะมีกรดอะมิโนสำคัญคือ V๘-X-X-1๑๑-F๑๒ บริเวณ C-terminal จะมีกรดอะมิโนที่สำคัญคือ V๒๖-X-X-A๒๙-F๓๐ และบริเวณของลิวซีนที่ตำแหน่ง K๑๘-L๑๙-X-X-D๒๒ ดังแสดงในภาพที่ ๔-๒ โดย K๑๘ และ D๒๒ เป็นกรดอะมิโนหลักที่มีความสำคัญในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอส เอ ของโปรตีน IA<sub>m</sub> และ X สามารถแทนด้วยกรดอะมิโนใดก็ได้ (Winterburn et al., ๒๐๐๗) ในการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของปฐมภูมิของโปรตีน IA<sub>m</sub> จากฐานข้อมูลโปรตีนใน NCBI พบโครงสร้างของ protein sequence หมายเลข Accession: EDN๖๔๑๐๗.๑ ซึ่งเป็นข้อมูลโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน IA<sub>m</sub> จากยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีลำดับกรดอะมิโนดังแสดงในภาพที่ ๔-๒ และการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>m</sub> จากข้อมูลในฐานข้อมูล PDB พบโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>m</sub> หมายเลข PDB ID: ๑DPJ เป็นภาพโครงสร้างสามมิติของโปรตีน IA<sub>m</sub> ที่จับอยู่กับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ดังแสดงในภาพที่ ๔-๑๖ จากนั้นได้มีการนำโครงสร้างสามมิติที่ค้นหาได้ทำการตัดแปลงโครงสร้างเลือกเฉพาะส่วนของโปรตีน IA<sub>m</sub> ด้วยโปรแกรม PyMOL ได้โครงสร้างของโปรตีน IA<sub>m</sub> ตามต้องการ ดังแสดงในภาพที่ ๔-๑๗

สำหรับการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>m</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบโปรตีนตัวอื่นที่มีความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>m</sub> จำนวน ๔ ตัว ได้แก่ โปรตีนจาก *Saccharomyces kudriavzevii* หมายเลข Accession: EJT๔๑๘๓๗, โปรตีนจาก *Saccharomyces arboricola* หมายเลข Accession: EJS๔๔๑๙๖, โปรตีนจาก *Saccharomyces eubayanus* หมายเลข Accession: XP\_๐๑๘๒๒๐๒๒๒ และ

โปรตีนจาก *Naumovozya castellii* หมายเลข Accession: XP\_003676342 เมื่อนำโปรตีนทั้ง ๔ ตัว  
ม

๑

ทำการ Multiple alignment sequence เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน และความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนแต่ละตัวบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc และคำนวณค่า %Identity เพื่อบ่งบอกถึงเปอร์เซ็นต์ของ homology sequence ของโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> จากการคำนวณจะได้ค่า %Identity เท่ากับ ๘๒, ๗๖, ๘๐ และ ๓๙ เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อทำการตัดลำดับกรดอะมิโนเฉพาะส่วนกรดอะมิโนตัวที่ ๒-๓๔ ตัวแรกมาทำ Multiple alignment sequence ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc และคำนวณค่า %Identity ของ homology sequence ของโปรตีน พบว่ามีค่า %Identity เท่ากับ ๙๐, ๙๓, ๙๗ และ ๔๓ เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจาก *S. Kudriavzevii*, *S. arboricola* และ *S. Eubayanus* มีลำดับของกรดอะมิโนหลักที่สำคัญคือ K๑๘ และ D๒๒ เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จึงสามารถสันนิษฐานว่าโปรตีน ๓ ตัวที่ค้นพบนั้น มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนเนส เอ ได้เช่นเดียวกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> โดยอ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ส่วน *N. castellii* มีลำดับของกรดอะมิโนหลักที่สำคัญต่างจากโปรตีน IA<sub>๓</sub> จาก K๑๘ เป็น M๑๘ และ D๒๒ เป็น K๒๒ ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทดสอบเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณหลักสำคัญของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จาก K๑๘ และ D๒๒ เป็นกรดอะมิโนอื่น ๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนเนส เอ พบว่าที่ตำแหน่ง K๑๘ เมื่อเปลี่ยนเป็น M๑๘ และ D๒๒ เมื่อเปลี่ยนเป็น K๒๒ โปรตีนสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนเนส เอ ได้ โดยมีได้ค่า K<sub>i</sub> เท่ากับ ๐.๒ nM ซึ่งถือว่าอยู่ในระดับที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ ได้ค่อนข้างดี จึงวิเคราะห์ได้ว่าโปรตีนจาก *N. castellii* น่าจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ ได้เช่นเดียวกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> จาก *S. cerevisiae* (Winterburn et al., ๒๐๐๗)

สำหรับการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ กับเอนไซม์ตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST จากนั้นเลือกข้อมูลของกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่มีที่มาจากสิ่งมีชีวิตเดียวกันกับสิ่งมีชีวิตที่ค้นพบโปรตีนจากการ BLAST โปรตีน IA<sub>๓</sub> เพื่อหาโปรตีนตัวอื่นที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับโปรตีน IA<sub>๓</sub> บนฐานข้อมูล NCBI โดยได้ข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ ๔ ตัว จาก *S. Kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. Eubayanus* และ *N. castellii* เมื่อนำเอนไซม์ทั้ง ๔ ตัวมาทำการ Multiple alignment sequence เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน และความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนแต่ละตัวของเอนไซม์ด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc และคำนวณค่า %Identity เพื่อบ่งบอกถึงเปอร์เซ็นต์ของ homology sequence ของเอนไซม์ตัวอื่นที่ค้นพบเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรตีนเนส เอ จากการคำนวณจะได้ค่า %Identity เท่ากับ ๙๗, ๙๖, ๙๕ และ ๘๔ เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลตำแหน่งของกรดอะมิโนบนเอนไซม์โปรตีนเนส เอ จากงานวิจัยก่อนหน้า (Parr et al., ๒๐๐๗) พบว่าบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรตีนเนส เอ ประกอบด้วยแอสพาร์ติกแอซิด ๒ ตำแหน่ง ได้แก่ Asp๓๒ และ Asp๒๑๕ เมื่อเทียบกับเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตตัวอื่นที่ค้นพบ พบว่าที่ตำแหน่ง Asp๓๒ และ Asp๒๑๕ ของเอนไซม์จาก *S. Kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. Eubayanus* และ *N. Castellii* มี Asp อยู่ที่ตำแหน่ง ๓๒ และ ๒๑๕ เช่นเดียวกัน จึงวิเคราะห์ได้ว่าเอนไซม์ที่ค้นพบเป็น PrA-like หรือเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับโปรตีนเนส เอ เนื่องจากในโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตที่ค้นพบนั้นมีเอนไซม์ที่มี

ลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกันกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีนเอส เอ ใน *S. cerevisiae* และมีโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน IA<sub>๓</sub> จาก *S. cerevisiae* อยู่ในโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ก็น่าจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป้าหมายในสิ่งมีชีวิตเดียวกันได้

จากการทดลองเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตัวในโครงสร้างของตัวยับยั้งนี้ พบว่า สามารถทำให้ความเฉพาะเจาะจงกับสับสเตรทนั้นลดลง แต่ยังคงทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสได้ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกันนี้จากสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์อื่นๆได้อีกด้วย

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> กับโปรตีนตัวอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล Fungi พบโปรตีนตัวอื่นจากเห็ด เชื้อรา ยีสต์ และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในที่จัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจทั้งหมด ๑๗๒ ตัวจากสิ่งมีชีวิตทั้งหมด ๘๑๑ สายพันธุ์ แสดงผลแยกเป็นไฟล์ดังแสดงในตารางที่ ๔-๗ ถึงตารางที่ ๔-๑๒ โดยแบ่งเป็นโปรตีนตัวอื่นที่ค้นพบใน Phylum Chytridiomycota ทั้งหมด ๑ ตัว, Phylum Ascomycota ทั้งหมด ๑๐๕ ตัว, Phylum Basidiomycota ทั้งหมด ๓๒ ตัว, Phylum Microsporidia ทั้งหมด ๒๒ ตัว และ Phylum Mucoromycota ทั้งหมด ๑๒ ตัว บ่งบอกความเหมือนของ sequence ด้วยค่าของ %Identity หรือความคล้ายคลึงกันของ sequence ด้วยค่าของ %Similarity โดยแทนตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันกับกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ด้วยพื้นหลังสีเหลือง และแทนตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันกับกรดอะมิโนบนพอลิเพปไทด์ของโปรตีน IA<sub>๓</sub> ด้วยพื้นหลังสีเขียว จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Multiple alignment sequence แบบอัตโนมัติของโปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล Fungi ของเว็บไซต์ <https://fungi.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>

## เอกสารอ้างอิง

- ปราณี อานเป็รื่อง. (๒๕๕๘). เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วสันต์ จันทราทิตย์, & วีระพงศ์ ลูติตานนท์. (๒๕๔๔). ชีวสารสนเทศศาสตร์ Bioinformatic. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- อรัญ หันพงศ์กิตติกุล. (๒๕๖๐). เทคโนโลยีเอนไซม์ (Enzyme Technology) (Vol. ๒๕๖๐). กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.
- Brik A, Wong CH. (๒๐๐๓). HIV-๑ protease: mechanism and drug discovery. Organic & Biomolecular Chemistry. ๑(๑) : ๕-๑๔.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. (๒๐๐๓). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Research. ๓๑(๑๓) : ๓๔๙๗-๓๕๐๐.
- Cooper JB. (๒๐๐๒). Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. Current Drug Targets. ๓(๒) : ๑๕๕-๑๗๓.
- Davies DR. (๑๙๙๐). The structure and function of the aspartic proteinases. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry. ๑๙ : ๑๘๙-๒๑๕.
- DeLano WL. (๒๐๐๒). The PyMOL molecular graphics system. [online]. แหล่งเข้าถึง <http://www.pymol.org> สืบค้นเมื่อ [๑๑/๐๕/๒๐๑๘]
- Dunn BM, Kay J. (๑๙๘๕). Design, synthesis and analysis of new synthetic substrates for the aspartic proteinases. Biochemical Society Transactions. ๑๓(๖) : ๑๐๔๑-๑๐๔๓.
- Ganesh OK, Green TB, Edison AS, Hagen SJ. (๒๐๐๖). Characterizing the residue level folding of the intrinsically unstructured IAm. Biochemistry. ๔๕ : ๑๓๕๘๕-๑๓๕๙๖.
- Garcia M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet JP, Rochefort H. (๑๙๙๖). Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. Stem Cells. ๑๔(๖) : ๖๔๒-๖๕๐.
- Green TB, Ganesh O, Perry K, Smith L, Phylip LH, Logan TM, Hagen SJ, Dunn BM, Edison AS. (๒๐๐๔). IAm, an aspartic proteinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*, is intrinsically unstructured in solution. Biochemistry. ๔๓(๑๔) : ๔๐๗๑-๔๐๘๑.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. (๒๐๐๘). NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Research. ๓๖ : ๕-๙.

Kageyama T. (1998). Molecular cloning, expression and characterization of an Ascaris inhibitor for pepsin and cathepsin E. European Journal of Biochemistry. 231(1) : 101-108.

Kay J. (1997). Aspartic proteinases and their inhibitors. Biochemical Society Transactions. 25(1) : 101-102.

Khan AR, James MN. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. Protein Science. 7(12) : 2101-2110.

Khan AR, Khazanovich-Bernstein N, Bergmann EM, James MN. (1998). Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral mC protease precursors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95(10) : 5613-5618.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2001). Clustal W and Clustal X version 1.0. Bioinformatics. 17(10) : 754-756.

Li M, Phylip LH, Lees WE, Winther JR, Dunn BM, Wlodawer A, Kay J, Gustchina A. (2000). The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix. Nature Structural Biology. 7(12) : 1011-1016.

Lill MA, Danielson ML. (2001). Computer-aided drug design platform using PyMOL. Journal of Computer-Aided Molecular Design. 15(1) : 1-10.

Llorca J, Dierssen-Sotos T, Combarros O, Berciano J. (2005). Consistency in gene-Alzheimer's disease association studies. Journal of Epidemiology and Community Health. 59(1) : 1-6.

Marques M, Mojzita D, Amorim MA, Almeida T, Hohmann S, Moradas-Ferreira P, Costa V. (2006). The Pep4 vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. 152 : 1011-1020.

Ng KK, Petersen JF, Cherney MM, Garen C, Zalatoris JJ, Rao-Naik C, Dunn BM, Martzen MR, Peanasky RJ, James MN. (2000). Structural basis for the inhibition of porcine pepsin by Ascaris pepsin inhibitor. Nature Structural Biology. 7(12) : 1011-1016.

Nicholas KB, Nicholas HBJ. (1998). Genedoc, a Tool for Editing and Annotating Multiple Sequence Alignments.

Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. (1998). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. EMBL NEWS. 4.

- Padron-Garcia JA, Alonso-Tarajano M, Alonso-Becerra E, Winterburn TJ, Ruiz Y, Kay J, Berry C. (2008). Quantitative structure activity relationship of IA<sub>1</sub>-like peptides as aspartic proteinase inhibitors. Proteins. 71(4) : 833-843.
- Parr CL, Keates RA, Bryksa BC, Ogawa M, Yada RY. (2007). The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. Yeast. 23(1) : 1-10.
- Phylip LH, Lees WE, Brownsey BG, Bur D, Dunn BM, Winther JR, Gustchina A, Li M, Copeland T, Wlodawer A, Kay J. (2006). The potency and specificity of the interaction between the IA<sub>1</sub> inhibitor and its target aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry. 281(1) : 101-108.
- Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. (2005). The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. Kidney International Supplements. 5 : 1-6.
- Saheki T, Matsuda Y, Holzer H. (1984). Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast. European Journal of Biochemistry. 141(1) : 1-6.
- Schu P, Wolf DH. (1983). The proteinase yscA-inhibitor, IA<sub>1</sub>, gene. Studies of cytoplasmic proteinase inhibitor deficiency on yeast physiology. FEBS Letters. 158(1) : 1-4.
- Sielecki AR, Fujinaga M, Read RJ, James MN. (1983). Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 Å resolution. Journal of Molecular Biology. 168(4) : 511-528.
- Szecs PB. (1982). The aspartic proteases. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory. 100 : 1-12.
- Takahashi S, Ogasawara H, Hiwatashi K, Hata K, Hori K, Koizumi Y, Sugiyama T. (2005). Amino acid residues conferring the nucleotide binding properties of N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (renin binding protein). BioMed Research International. 11(1) : 1-6.
- Tang J, Wong RN. (1987). Evolution in the structure and function of aspartic proteases. Journal of Cellular Biochemistry. 31(1) : 1-10.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Current Protocols in Bioinformatics.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. (1994). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 22(12) : 2472-2476.

Winterburn, T. J., Wyatt, D. M., Phylip, L. H., Berry, C., Bur, D., & Kay, J. (2006). Adaptation of the behaviour of an aspartic proteinase inhibitor by relocation of a lysine residue by one helical turn. Journal of Biological Chemistry. ෨෮෧(෪) : ෨෨෪෪-෨෨෪෭.

Winterburn TJ, Wyatt DM, Phylip LH, Bur D, Harrison RJ, Berry C, Kay J. (2007). Key features determining the specificity of aspartic proteinase inhibition by the helix-forming IA<sub>1</sub> polypeptide. Journal of Biological Chemistry, ෨෮෨(෪) : ෨෪෦෪-෨෪෧෨.



ภาคผนวก


# ภาคผนวก ก

## งานวิจัยที่เผยแพร่

### การใช้ชีวสารสนเทศในการศึกษาโปรตีน IA<sub>3</sub> ที่ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติก โปรตีเนส

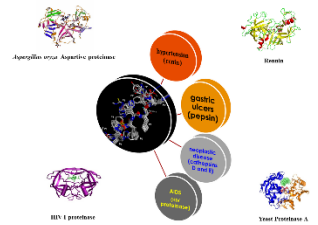
นิชากรีย์ สหิเจริญ<sup>1</sup> วิชุดา จันทร์ข้างแรม<sup>2</sup> และ สุนทรต์ ชูลักษณะ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี 20131  
<sup>2</sup> คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จ.สระแก้ว 27160



### บทนำ (INTRODUCTION)

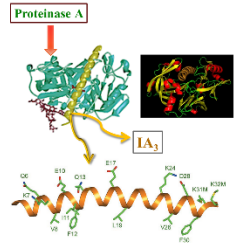
เอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนสจัดเป็น endopeptidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีน เช่น เปปซิน เรมนิน และคาเทปซิน สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และมีความสำคัญต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา และกระบวนการทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญในกลไกการก่อให้เกิดโรคติดต่อต่างๆ เช่น gastric ulcers และ AIDS เป็นต้น ทำให้การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนสจึงจะสามารถนำไปสู่วิธีที่จะยับยั้งการเกิดโรคต่างๆชนิดได้ ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสพาร์ติกสองตัวและเร่งปฏิกิริยาได้ศึกษาได้สภาวะที่เป็นกรด



รูปที่ 1. โรคติดต่อต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนส

ตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพของแอสพาร์ติกโปรตีนสคือ เปปสแตติน ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและตัวยับยั้งที่เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ที่พบในธรรมชาติและปัจจุบันนี้พบเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น เช่น N-acetyl-D-glucosamine-2-epimerase ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเรนนิน และ equistatin ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของคาเทปซิน D

โปรตีน IA<sub>3</sub> เป็นเปปไทด์สายสั้นๆที่แยกได้จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำหน้าที่ยับยั้ง โปรตีเนส เอ ซึ่งเป็นแอสพาร์ติกโปรตีนสภายในเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ได้อย่างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสูงโดยใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยในระดับ subnanomolar ซึ่ง IA<sub>3</sub> จะยับยั้งสับสเตรตได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น เมื่อทดสอบกับเอนไซม์แอสพาร์ติกโปรตีนสชนิดอื่นๆ IA<sub>3</sub> จะไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นได้เลย อีกทั้งยังถูกย่อยสลายไปด้วย ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างและกลไกการทำงานของโปรตีน IA<sub>3</sub> จะสามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการรักษาและป้องกันโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มแอสพาร์ติกโปรตีนส



รูปที่ 2 โครงสร้างของ IA<sub>3</sub>

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (OBJECTIVES)

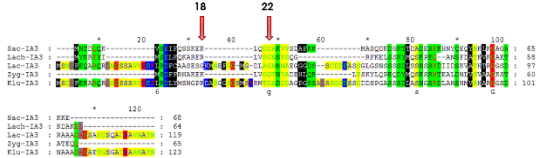
เพื่อทำการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน IA<sub>3</sub> จาก *S. cerevisiae* โดยนำชีวสารสนเทศศาสตร์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบหาโปรตีนที่มีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายกับ IA<sub>3</sub> โดยใช้ Basic local alignment search tools ในการตรวจสอบหา sequence homology จาก fungal sequence databases และศึกษาหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์

### วิธีดำเนินการวิจัย (MATERIALS AND METHODS)

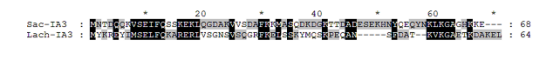
ใช้ bioinformatics ในการค้นหาโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้าย IA<sub>3</sub> จากจีโนมของยีสรา ยีสต์ และสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อค้นหาจากยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วจึงมีสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นอีกหรือไม่ที่มีโปรตีนที่สามารถยับยั้งการทำงานของแอสพาร์ติกโปรตีนสได้อย่างเฉพาะเจาะจง จากนั้นใช้ข้อมูลจากการศึกษาออกแบบสังเคราะห์สายเปปไทด์ของตัวยับยั้งและนำไปทดสอบหน้าที่ทางชีวภาพ

### ผลการวิจัย (RESULTS)

จากผลการศึกษาพบว่า มีโปรตีนจาก fungus สายพันธุ์อื่นที่มีมีความคล้ายคลึงกับ IA<sub>3</sub> จาก *S. cerevisiae* ดังแสดงในรูปที่ 4.



รูปที่ 4. Amino acid alignment ของโปรตีน IA<sub>3</sub> จาก *S. cerevisiae* กับ putative IA<sub>3</sub> orthologs ทั้ง 4 ชนิด จากการทำ Bioinformatics analysis พบว่ามีโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับ โปรตีน IA<sub>3</sub> อยู่ 4 ชนิด (Lach = Lachancea kluyveri, Lac = Lachancea waltii, Zyg = Zygosaccharomyces rouxii, Klu = Kluyveromyces thermotolerans ), ซึ่งเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ putative IA<sub>3</sub> orthologs ทั้ง 4 ชนิด มาเปรียบเทียบกับโปรตีน IA<sub>3</sub> จาก *S. cerevisiae* โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X พบว่ามี ความคล้ายคลึงกันสูงมาก



รูปที่ 5. Amino acids sequence alignment ระหว่าง *S. cerevisiae* IA<sub>3</sub> และ Lk-IA<sub>3</sub>-like proteins แสดงถึง amino acid sequence alignment ระหว่าง *S. cerevisiae* IA<sub>3</sub> และ Lk-IA<sub>3</sub>-like proteins โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X พบมีความเหมือนกันสูงมากโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง: Sac = *S. cerevisiae*, Lach = *Lachancea kluyveri*

จากนั้นเลือกนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ putative IA<sub>3</sub> จาก *Lachancea kluyveri* ไปออกแบบเพื่อสังเคราะห์เปปไทด์และทำการทดสอบหน้าที่ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์ โปรตีเนส เอ และแอสพาร์ติก โปรตีเนสจาก *Aspergillus fumigatus* เอนไซม์ cathepsin D ในคน รวมถึงคำนวณค่าคงที่ของการยับยั้ง (K<sub>i</sub>) จากการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ เปรียบเทียบกับ wild type IA<sub>3</sub>

ตารางที่ 1. การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ของ Lach-IA<sub>3</sub>-like proteins เปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* -IA<sub>3</sub> โดยทดสอบด้วยเอนไซม์ โปรตีเนส เอ จาก *S. cerevisiae* (ScPA), โปรตีเนส เอ จาก *Aspergillus fumigatus* (APFA) และ HuCatD (human cathepsin D)

ID	Name	Amino acid sequence	K <sub>i</sub> vs ScPA (nM)		K <sub>i</sub> vs APFA (nM)		K <sub>i</sub> vs HuCatD (nM)	
			pH 4.7	pH 3.1	pH 4.7	pH 3.1	pH 4.7	pH 3.1
1	Sac-IA <sub>3</sub>	SHKQVQDFKTRRQDSTKQK KPKKPKKPKKPKKPKKPKK KPKKPKKPKKPKKPKKPKK	0.06 ± 0.02	ND	NI	ND	NI	ND
2	Lach-IA <sub>3</sub>	SHKQVQDFKTRRQDSTKQK KPKKPKKPKKPKKPKKPKK KPKKPKKPKKPKKPKKPKK	190 ± 0.11	ND	NI	ND	NI	ND

จากการทดสอบหน้าที่ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์พบว่า Lk-IA<sub>3</sub>-like proteins สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีเนส เอ จาก *S. cerevisiae* ได้ โดยมีค่าคงที่ของการยับยั้ง (K<sub>i</sub>) = 190 ± 0.11 nM ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพที่ดีกว่า wild type IA<sub>3</sub> อยู่พอสมควร และไม่สามารถยับยั้งการทำงานของแอสพาร์ติก โปรตีเนสจาก *Aspergillus fumigatus* และ เอนไซม์ cathepsin D ในคนได้