Thesis Title Proteomic Analysis of Acid-Induced *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

Author Mr. Napat Puranamaneewiwat

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup Chairperson

Prof. Dr. Shegeyuki Tajima Member

ABSTRACT

Bradyrhizobium japonicum is an agriculturally important microbe due to its capacity to nitrogen-fixing symbiosis with plant legumes, especially soybean (*Glycine max*). In this report, we studied acid-tolerance metabolism of *B. japonicum* USDA110 using proteome analysis. From studying growth curves and pH curves of *B. japonicum* USDA110 at various pHs in HM medium, the bacteria could grow at pH 6.8, 6, 5.5, 5 and 4.7. During the growth, decreased pHs of medium were detected. However, negligible growth rate was observed at pH 4.5. It can be concluded that the *B. japonicum* USDA110 was able to grow in mild acid condition (pH 4.7).

Two-dimensional electrophoresis gel image analysis revealed 568 and 628 protein spots of cells grown at pH 4.7 and pH 6.8, respectively. Only 84 protein spots were further identified by Matrix-assisted desorption ionization time-of-flight mass

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

spectrometry (MALDI-TOF MS). The annotated proteins were assigned to four different classes: (i) proteins produced only in pH 4.7 condition (15 proteins such as D-alanine aminotransferase, 2-haloalkanoic acid dehalogenase and periplasmic mannitol-binding protein); (ii) proteins produced under both conditions but strongly induced in pH 4.7 (27 protein spots such as triosephosphate isomerase, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase); (iii) proteins down-regulated during growth in pH 4.7 (25 proteins such as GroEL, acyl-CoA dehydrogenase and ATP synthase beta chain), and (iv) proteins specific to only in pH 6.8 (17 proteins such as ATP-dependent protease ATP-binding subunit, N-utilization substance protein A and 2-isopropylmalate synthase).

The identified proteins were classified to 4 categories using COG database: category I: the protein of cellular metabolism such as carbohydrate transport and metabolism group, amino acid transport and metabolism group, lipid transport and metabolism group, etc. For category II, the proteins of this category is cellular processes and signaling proteins such as signal transduction mechanisms group, cell wall/membrane biogenesis group, cell mobility group. The information processing proteins were classified to category III such as transcription group and translation. The last category is a group of proteins which was poorly characterized including dehydrogenase, Glyoxalase II, and 2-haloalkanoic acid dehalogenase, etc.

The acid tolerance property of *B. japonicum* USDA110 was related to a wide range of bacterial metabolic pathway including bacterial transport system (blr2269, bll5782, and blr3208, etc.), β-oxidation of fatty acid (blr0573 and blr1158), posttranslational modification (blr5308, blr5626, and blr5626), glycolytic pathway (bll1523), and ATP synthesis (bll0440 and blr1378, etc.).

The data of the differential protein expression can be used for preparation of mutants in order to further characterize their functions in the acid response of *B. japonicum* USDA110.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ทางโปรติโอมิกของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยกรด

ผู้เขียน นายณภัทร์ ปุรณมณีวิวัฒน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	ประธานกรรมการ
ศ. ดร. ชิเงยูกิ ทาจิมะ	กรรมการ

บทคัดย่อ

Bradyrhizobium japonicum เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญอย่างมากทางด้านเกษตรกรรม เนื่องด้วยความสามารถในการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะในถั่วเหลือง (*Glycine max*) ในรายงานนี้เราจะศึกษาเกี่ยวกับสภาวะการทนกรดของ *B. japonicum* USDA110 โดยใช้การวิเคราะห์ทางโปรติโอม จากการศึกษากราฟการเจริญเติบโต และ กราฟค่าพีเอช ของใช้ *B. japonicum* USDA110 แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ที่ พีเอช 6.8, 6, 5.5, 5 และ4.7 โดยที่ พีเอช ของอาหารเลี้ยงจะลดลงระหว่างการเจริญเติบโตดังกล่าว อย่างไรก็ตาม สภาวะพีเอช 4.5 เชื้อแบคทีเรียนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ สรุปได้ว่า *B. japonicum* USDA110 สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน

การวิเคราะห์ภาพของเจลอิเลคทรอฟอริซิสแบบสองมิติ พบว่าเราสามารถพบ จุดโปรตีนจำนวน 568 และ 628 จุด สำหรับเซลล์ที่เจริญใน พีเอช 4.7 และ 6.8 ตามลำดับ แต่เพียง 84 จุดที่ถูกบ่งชี้ต่อไปโดย Matrix-assisted desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(MALDI-TOF MS) เราจะจัดแบ่งโปรตีนที่วิเคราะห์ออกเป็น 4 จำพวกที่แตกต่างกันคือ (1) โปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นในสภาวะพีเอช 4.7 เท่านั้น (ซึ่งพบเพียง 15 ตัว เช่น D-alanine aminotransferase, 2-haloalkanoic acid dehalogenase และ periplasmic mannitol-binding protein เป็นต้น) (2) โปรตีนที่ถูกผลิตภายใต้ทั้งสองสภาวะแต่ถูกเหนี่ยวนำมากกว่านพีเอช 4.7 (พบโปรตีนจำนวน 25 ตัว เช่น triosephosphate isomerase, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase เป็นต้น) (3) โปรตีนที่มีปริมาณน้อยลงระหว่างที่เชื้อเจริญในสภาวะ พีเอช 4.7 (พบโปรตีนจำนวน 25 ตัว เช่น GroEL, acyl-CoA dehydrogenase และ ATP synthase beta chain เป็นต้น) และ (4)โปรตีนที่พบเฉพาะในสภาวะ พีเอช 6.8 (พบโปรตีนจำนวน 17 ตัว เช่น ATP-dependent protease ATP-binding subunit, N-utilization substance protein A และ 2-isopropylmalate synthase เป็นต้น)

โปรตีนที่ถูกวิเคราะห์แล้วจะถูกจัดเป็น 4 จำพวก โดยใช้ฐานข้อมูล COG ได้แก่ พวกที่ 1 ซึ่งเป็นโปรตีนของเมตาบอลิซึมเซลล์ เช่น กลุ่มการขนส่งและเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต, กลุ่มการขนส่งและเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน, กลุ่มการขนส่งและเมตาบอลิซึมของไขมัน เป็นต้น สำหรับพวกที่ 2 โปรตีนพวกนี้คือ โปรตีนที่เกี่ยวกับกระบวนการและการให้สัญญาณของเซลล์ เช่น กลุ่มกลไกสัญญาณทรานดักชัน, กลุ่มการสร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์, กลุ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ เป็นต้น โปรตีนที่เกี่ยวกับกระบวนการทางข้อมูลถูกจัดไว้ในพวกที่ 3 เช่น กลุ่มการถอดรหัสพันธุกรรม และการแปลรหัสพันธุกรรม พวกสุดท้ายเป็นโปรตีนที่บ่งชี้ลักษณะไม่ชัดเจน เช่น dehydrogenase, Glyoxalase II และ 2-haloalkanoic acid dehalogenase เป็นต้น

คุณสมบัติทนกรดของ *B. japonicum* USDA110 มีความสัมพันธ์กับวิธีทางเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียหลายส่วน รวมถึงระบบการขนส่งในเซลล์แบคทีเรีย (blr2269, bll5782 และ blr3208 เป็นต้น), เบตาออกซิเดชันของกรดไขมัน (blr0573 และ blr1158), การดัดแปลงโมเลกุลภายหลังการแปลรหัสพันธุกรรม (blr5308, blr5626 และ blr5626), วิถีไกลโคไลซิส (bll1523), และการสังเคราะห์พลังงานในรูป ATP (bll0440 และ blr1378 เป็นต้น)

ข้อมูลของการแสดงโปรตีนที่แตกต่างกันสามารถนำไปใช้ในการเตรียมเชื้อกลายพันธุ์ เพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่ของโปรตีนในการตอบสนองต่อกรดของ *B. japonicum* USDA110 ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved