

ตำแหน่งแก้ไขอาร์เอ็นเอของยีน ATP Synthase

ในไมโทคอนเดรียของตาลโตนด

RNA Editing Sites of Mitochondrial ATP-Synthase Gene in *Borassus flabellifer* L.

อาภากร สกุลสถาพร^a และสมศักดิ์ อภิสทิวานิช^{a*}

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

ศุภชัย วุฒิพงษ์ชัยกิจ

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Arpakorn Sakulsathaporn^a and Somsak Apisitwanich^{a*}

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,

Kamphaengsaen, Nakhon Pathom 73140

Supachai Vuttipongchikij

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

การแก้ไขอาร์เอ็นเอ (RNA editing) เป็นการเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมบนอาร์เอ็นเอในระดับ โปสทรานสคริปชัน ซึ่งพบทั้งในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ โดยทั่วไปเบสไซโตซีน (C) ที่ตำแหน่งจำเพาะบน อาร์เอ็นเอจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเบสยูราซิล (U) เพื่อให้ได้รหัสสำหรับการแปลเป็นโปรตีนนั้นทำหน้าที่ได้ อย่างไรก็ตาม กลไกของกระบวนการการแก้ไขอาร์เอ็นเอนั้นยังไม่กระจ่างชัด ยีนเอทีพี ซินเทส (ATP-synthase) ทำหน้าที่สร้าง เอทีพีคอมเพลกซ์ (ATP complexes) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญทำหน้าที่สังเคราะห์ ATP ในไมโทคอนเดรีย ใน การศึกษาครั้งนี้ ได้ตรวจสอบตำแหน่งการแก้ไขอาร์เอ็นเอในสมาชิกของยีนกลุ่ม (ATP-synthase) ในไมโทคอนเดรีย ของตาลโตนด เมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งการแก้ไขอาร์เอ็นเอของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* โดยใช้โปรแกรมทำนาย ตำแหน่งและลำดับเบสที่โคลนได้จากจีโนมของไมโทคอนเดรียและซีดีเอ็นเอ พบการแก้ไข 11, 25 และ 10 ตำแหน่ง ในยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* ตามลำดับ การแก้ไขทั้งหมดเกิดในเบสชนิด C เปลี่ยนไปเป็นเบส U โดยส่วนใหญ่เกิด

^aศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้รับผิดชอบบทความ : fscissa@ku.ac.th

ที่ตำแหน่งเบสที่สองของโคดอนและพบบ้างในตำแหน่งเบสที่หนึ่งของโคดอน การเปลี่ยนแปลงเป็นเบส U นี้เป็นสาเหตุการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในทุกตำแหน่ง ผลการทดลองนี้สนับสนุนความสำคัญของการแก้ไขอาร์เอ็นเอสำหรับการผลิตเอนไซม์ ATP-synthase ที่ทำหน้าที่อยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย

คำสำคัญ : ยีนเอทีพี ซินเทส; ตาลโตนด; การแก้ไขอาร์เอ็นเอ

Abstract

RNA editing is a post transcriptional RNA modification process that alters genetic information on mRNA of both mitochondria and chloroplast. Commonly, specific cytosine residues in mRNA molecules are substituted with uracil residues to provide coding sequences for functional proteins. However, the mechanism of this RNA editing process is still unclear. ATP-synthase genes encode ATP complexes, which are important enzymes synthesizing ATP in mitochondria. In this study, we investigated RNA editing sites in the members of ATP-synthase genes in the mitochondria of *Borassus flabellifer*. RNA editing sites of *atp1 atp6* and *atp9* transcripts were analyzed by using both RNA editing prediction program and gene cloning and sequencing of using mtDNA and cDNA. The analysis showed 11, 25 and 10 RNA editing sites in *atp1 atp6* and *atp9* transcripts, respectively. All of the editing sites were C bases substituted with U bases. These mostly occurred at the second base of each codon, and occasionally at the first base position. Consequently, these U substitutions caused amino acid changes from original transcripts in all edited mRNA. These results support the essential of RNA editing process for controlling the production of functional ATP-synthase in the mitochondrial inner membrane.

Keywords: ATP-synthase gene; *Borassus flabellifer*; RNA editing

1. บทนำ

ตาลโตนด (Asian Palmyra palm) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Borassus flabellifer* Linn. เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่แยกกิ่งก้านสาขา มีจำนวนโครโมโซม $2n = 36$ [1] อยู่ในวงศ์ Arecaceae หรือวงศ์หมากมะพร้าว ซึ่งในอดีตใช้ชื่อวงศ์ Palmae หรือวงศ์ปาล์ม อยู่ในวงศ์ย่อย Coryphoideae เช่นเดียวกับอินทผลัม อยู่ในเฝ้า Borasseae และอยู่ในสกุล *Borassus* ซึ่งสกุลนี้จำแนกได้ 6 ชนิด (species) คือ *B. aethiopicum*, *B. akeassii*, *B. flabellifer*, *B. heineanus*, *B. madagascariensis* และ *B. sambiranensis* ส่วน

ใหญ่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของแอฟริกา แต่ *B. flabellifer* หรือตาลโตนดพบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตาลโตนดเป็นปาล์มที่มีขนาดใหญ่ สูงได้ถึง 30 เมตร มีใบเป็นรูปพัด มีดอกที่ไม่สมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่คนละต้น (dioecious plant) ตาลโตนดมีการเจริญเติบโตได้บนดินทุกชนิด ทั้งในสภาพแห้งแล้งและน้ำท่วม ตาลโตนดเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายส่วนทั้ง ลำต้น ใบ กาบใบ โดยเฉพาะน้ำหวานจากดอกเพศผู้และเพศเมียสามารถนำมาต้มเป็นเครื่องดื่มหรือนำมาเคี้ยวทำเป็นน้ำตาลโตนด นอกจากนี้ผลตาลอ่อนยังสามารถนำมาบริโภค

สด และน้ำในผลอ่อนมีสาร saponin steroid ที่เรียกว่า flabelliferins ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ [2] ผลแก่สามารถนำมาทำขนมพื้นบ้านได้ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำหวานและผลตาลมีราคาค่อนข้างสูง ตาลโตนดจึงเป็นพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ไม่ควรมองข้าม

การที่ตาลโตนดเป็นพืชแยกเพศที่โตช้า จะออกดอกช่อแรกได้ต้องใช้เวลานานไม่ต่ำกว่า 12 ปี [3] จึงเป็นปัญหาสำคัญของการระบุเพศในช่วงต้นก่อนออกดอกเพื่อใช้ในการวางแผนการปลูกในอัตราส่วนต้นเพศผู้และเพศเมียที่เหมาะสม ในปัจจุบันมีการเลือกใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD) ในการแยกเพศตาลโตนด พบว่าไพรเมอร์ OPBE-12, OPBA-13 และ OPA-06 แสดงความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้โดยไพรเมอร์ OPBE-12 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส และไพรเมอร์ OPA-06 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส ในเพศผู้เท่านั้น ส่วนไพรเมอร์ OPBA-13 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส ในเพศเมียเท่านั้น [4] อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายอาร์เอพีดีมีข้อจำกัดในการทำซ้ำระหว่างห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP, SSR, RFLP และ ISSR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบุเพศของตาลโตนดแต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ [5-7]

พืชในเผ่า Borasseae มีรายงานว่าดอกเพศเมียพบเกสรเพศผู้ที่ไม่พัฒนา (staminode) [8] เช่นเดียวกับ *Borassodendron machadonis* [9], *Chamaedorea radicalis* [10] และ *Phoenix dactylifera* [11] ซึ่งพบว่าการทำงานที่ผิดปกติของ mitochondrial ATP synthase มีผลต่อการบกพร่องของการพัฒนาเกสรเพศผู้ในออร์บิตอพซิส [12-14] นอกจากนี้ยังพบว่าการแก้ไขในระดับอาร์เอ็นเอ (RNA editing) ของยีนในกลุ่ม ATP-synthase เช่น *atp6* มี

ความสัมพันธ์ต่อความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ (cytoplasmic male sterility) ในข้าวและข้าวโพด [15,16] ส่วน *atp9* มีความสัมพันธ์ต่อความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ในข้าวสีม่วงสายพันธุ์ยูนิานและถั่วเหลือง [17,18]

การแก้ไขอาร์เอ็นเอ (RNA editing) คือกระบวนการแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ระดับอาร์เอ็นเอในลำดับเบสที่จำเพาะซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการโพส-ทรานสคริปชัน มีการเปลี่ยนเบส cytidine (C) ไปเป็น uridine (U) เพื่อให้โปรตีนที่แสดงออกอย่างถูกต้องโดยกลุ่มของโปรตีนพีพีอาร์ (PPR) หรือ pentatricopeptide repeat protein complex มีบทบาทในการจดจำลำดับเบส จำนวน 22 เบส ที่ใกล้เคียงกับเบส C เป้าหมาย อย่างไรก็ตาม ชนิดของชิ้นส่วนพีชเนื้อเยื่อและระยะของการพัฒนามีผลต่อการเกิดการแก้ไขอาร์เอ็นเอ [19,20]

งานวิจัยก่อนหน้าพบว่าการแก้ไขอาร์เอ็นเอของยีน mitochondrial ATP-synthase มีความสัมพันธ์กับความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ในข้าวและข้าวโพด ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ในการวิเคราะห์การเกิดการแก้ไขอาร์เอ็นเอของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* ทั้งในตาลเพศผู้และเพศเมีย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างตาลโตนด

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของตาลโตนดเพศเมียและเพศผู้ชนิดละ 5 ตัวอย่าง จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

2.2 สกัดดีเอ็นเออาร์เอ็นเอ และการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA)

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนตาลโตนดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอพืช DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, USA) หลังจากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ

ดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{260}/OD_{280} และ OD_{260}/OD_{230} และอิเล็กโตรโพรเซสใน 1 %

สกัดอาร์เอ็นเอจากไบอ้อนตาลโตนดด้วย ชุดสกัดอาร์เอ็นเอพีช GF-1 Total RNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ จากอาร์เอ็นเอตาลโตนดด้วยชุด Protoscrip M-MuLV First Strand cDNA kit (NEB, UK).

2.3 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (PCR) และการวิเคราะห์ลำดับเบส

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและซีดีเอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ด้วยเอนไซม์ Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, UK) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอพอลิเมอร์สที่มีความถูกต้องในการเติมเบสสูง โดยปฏิกริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับ melting temperatures ของไพรเมอร์ นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ และนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มาแยกโดยการทำอิเล็กโตรโพรเซส บน 1 % เจลอะกาโรส และตัดเจลและสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากชุดสกัดเจลของบริษัท Flavogen (Taiwan) หลังจากนั้นจึงส่งวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี Sanger sequencing (Macrogen, Korea)

2.4 การทำนายตำแหน่งที่เกิดการแก้ไขอาร์เอ็นเอ

ทำนายตำแหน่งที่เกิดการแก้ไขอาร์เอ็นเอ บนลำดับดีเอ็นเอของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* ด้วยโปรแกรม PREP-Mt (<http://prep.unl.edu>)

2.5 การหาตำแหน่งที่เกิดการแก้ไขอาร์เอ็นเอ

จากการทดลอง

นำลำดับเบสซีดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสของดีเอ็นเอในยีนเดียวกันด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) เพื่อหาตำแหน่งการเกิด RNA editing

2.6 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน

นำลำดับกรดอะมิโนของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* ทั้งก่อนและหลังการเกิด RNA editing มาทำนายโครงสร้างทุติยภูมิด้วยโปรแกรม SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html)

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการทำนายตำแหน่งที่เกิดการแก้ไขอาร์เอ็นเอของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* และการตรวจสอบผลการทำนายจากการทดลอง

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สจากดีเอ็นเอและซีดีเอ็นเอของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* ของตาลโตนดทั้งเพศผู้และเพศเมียรวมทั้งหมด จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า ยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* มีขนาด 1,527, 795 และ 240 คู่เบส ตามลำดับ และมีลำดับเบสเหมือนกันระหว่างตาลเพศผู้และเพศเมีย เมื่อทำนายการแก้ไขอาร์เอ็นเอด้วยโปรแกรม PREP-Mt พบว่าน่าจะมีการแก้ไขอาร์เอ็นเอจำนวน 11, 25 และ 10 ตำแหน่งในยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* ตามลำดับ

เมื่อตรวจสอบตำแหน่งการแก้ไขอาร์เอ็นเอจากการทดลอง โดยเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอของโมโคคอนเดรียและซีดีเอ็นเอทั้งเพศผู้และเพศเมียด้วยโปรแกรม clustalW พบว่ามีการแก้ไขอาร์เอ็นเอในตำแหน่งตรงกันทั้งหมดในเพศผู้และเพศเมียในยีนทั้ง 3 ยีน และทุกตำแหน่งนั้นตรงตามผลการทำนายด้วยโปรแกรม PREP-Mt (ตารางที่

1) โดยโปรแกรม PREP-Mt เป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์สามารถทำนายตำแหน่งที่เกิดการแก้ไขอาร์เอ็นเอได้แม่นยำในจีโนมของพืชอีกหลายชนิด เช่น

Magnolia tripetala, *Mimulus guttatus*, *Citrullus lanatus* และ *Cucurbita pepo* [21-23]

ตารางที่ 1 ตำแหน่งแก้ไขอาร์เอ็นเอจากการทำนายและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* ของตาลโตนด

| gene | nucleotide | amino acid | edited codon | base | edited codon | amino acid | predicted | experimental identification | | gene | nucleotide | amino acid | edited codon | base | edited codon | amino acid | predicted | experimental identification | |
|-------------|------------|------------|--------------|---------|--------------|------------|-----------|-----------------------------|--------|-------------|------------|------------|--------------|---------|--------------|------------|-----------|-----------------------------|--------|
| | | | | | | | | Male | Female | | | | | | | | | Male | Female |
| <i>atp1</i> | 670 | 224 | 1 | C-U | cca-Uca | P-S | + | + | + | <i>atp6</i> | 514 | 177 | 1 | C-U | cct-Ucu | P-S | + | + | + |
| | 971 | 324 | 2 | C-U | tcg-uUg | S-L | + | + | + | | 517 | 178 | 1 | C-U | cat-Uau | H-Y | + | + | + |
| | 1039 | 347 | 1 | C-U | ccc-Ucc | P-S | + | + | + | | 539 | 185 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + |
| | 1064 | 355 | 2 | C-U | tcg-uUg | S-L | + | + | + | | 581 | 199 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + |
| | 1168 | 390 | 1 | C-U | cgc-Ugc | R-C | + | + | + | | 602 | 206 | 2 | C-U | tct-uUu | S-F | + | + | + |
| | 1178 | 393 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + | | 653 | 223 | 2 | C-U | cct-cUu | P-L | + | + | + |
| | 1262 | 421 | 2 | C-U | ccc-cUc | P-L | + | + | + | | 689 | 235 | 1 | C-U | ccg-cUg | P-L | + | + | + |
| | 1292 | 431 | 2 | C-U | ccc-cUc | P-L | + | + | + | | 710 | 242 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + |
| | 1415 | 472 | 2 | C-U | cca-cUa | P-L | + | + | + | | 718 | 245 | 1 | C-U | cat-UaU | H-Y | + | + | + |
| | 1490 | 497 | 2 | C-U | cca-cUa | P-L | + | + | + | | 725 | 247 | 2 | C-U | tct-uUu | S-F | + | + | + |
| 1499 | 500 | 2 | C-U | tct-cUt | S-F | + | + | + | 734 | 250 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + | | |
| <i>atp6</i> | 91 | 31 | 1 | C-U | cca-Uca | P-S | + | + | + | 761 | 259 | 2 | C-U | aca-aUa | T-I | + | + | + | |
| | 101 | 34 | 2 | C-U | tct-uUu | S-F | + | + | + | 772 | 263 | 1 | C-U | caa-Uaa | Q-stop | + | + | + | |
| | 170 | 57 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + | <i>atp9</i> | 20 | 7 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + |
| | 208 | 70 | 1 | C-U | cat-Uau | H-Y | + | + | + | | 50 | 17 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + |
| | 221 | 74 | 2 | C-U | ccg-cUg | P-L | + | + | + | | 82 | 28 | 1 | C-U | ctc-Uuc | L-F | + | + | + |
| | 227 | 76 | 2 | C-U | ccg-cUg | P-L | + | + | + | | 92 | 31 | 2 | C-U | tcg-uUg | S-L | + | + | + |
| | 278 | 93 | 2 | C-U | tcc-uUc | S-F | + | + | + | | 134 | 45 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + |
| | 283 | 95 | 1 | C-U | cgc-Ugc | R-C | + | + | + | | 182 | 61 | 2 | C-U | tcg-uUg | S-L | + | + | + |
| | 290 | 97 | 2 | C-U | tcg-uUg | S_L | + | + | + | | 191 | 64 | 2 | C-U | cca-cUa | P-L | + | + | + |
| | 308 | 103 | 2 | C-U | tcg-uUg | S_L | + | + | + | | 203 | 68 | 2 | C-U | tct-uUu | S-F | + | + | + |
| | 316 | 106 | 1 | C-U | cgt-Ugu | R-C | + | + | + | | 212 | 71 | 2 | C-U | tca-uUa | S-L | + | + | + |
| | 323 | 108 | 2 | C-U | ccc-cUc | P-L | + | + | + | | 223 | 75 | 1 | C-U | cga-Uga | R-stop | + | + | + |

3.2 ผลจากการแก้ไขอาร์เอ็นเอของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9*

การแก้ไขอาร์เอ็นเอทั้ง 46 ตำแหน่ง ของยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* เป็นการเปลี่ยนเบส C เป็น U

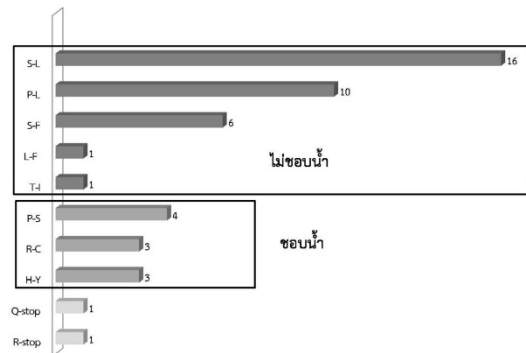
ทั้งหมด และพบการแก้ไขที่ตำแหน่งที่ 1 และ 2 ของโคดอนเท่านั้น โดยการแก้ไขที่ตำแหน่งที่ 1 ของโคดอนมี 14 ตำแหน่ง และการแก้ไขที่ตำแหน่งที่ 2 ของโคดอนมี 32 ตำแหน่ง การการแก้ไขอาร์เอ็นเอดังกล่าว

ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน โดยพบว่าส่งผลให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากทรีโอนีน เป็นไอโซลูซีน (T-I) 1 ตำแหน่ง ลูซีนไปเป็นฟีนิลอะลานีน (L-F) 1 ตำแหน่ง ฮิสติดีนเป็นไทโรซีน (H-Y) 3 ตำแหน่ง อาร์จินีนเป็นซิสเทอีน (R-C) 3 ตำแหน่ง โปรีลีนเป็นเซอร์รีน (P-S) 4 ตำแหน่ง เซอร์รีนเป็นฟีนิลอะลานีน (S-P) 6 ตำแหน่ง โปรีลีนเป็นลิวซีน (P-L) 10 ตำแหน่ง และเซอร์รีนเป็นลิวซีน (S-L) 16 ตำแหน่ง และเกิดเป็นสตอปโคดอน 2 ตำแหน่ง (รูปที่ 1)

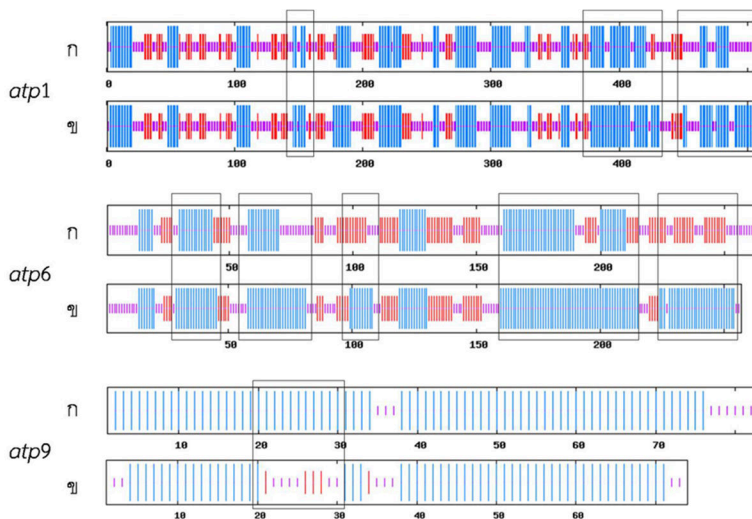
3.3 ผลของการแก้ไขอาร์เอ็นเอต่อโครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิ

การวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิด้วยโปรแกรม SOPMA ทั้งก่อนและหลังการแก้ไขอาร์เอ็นเอ พบว่าตำแหน่ง atp1_670, atp1_1168, atp1_1490, atp6_91, atp6_101, atp6_208, atp6_211, atp6_518, atp6_653, atp6_689, atp6_710, atp6_718, atp6_725, atp6_734, atp6_772, atp9_20 atp9_82 และ atp 9_92 มีผลต่อองค์ประกอบของโครงสร้างโปรตีนระดับทุติยภูมิใน

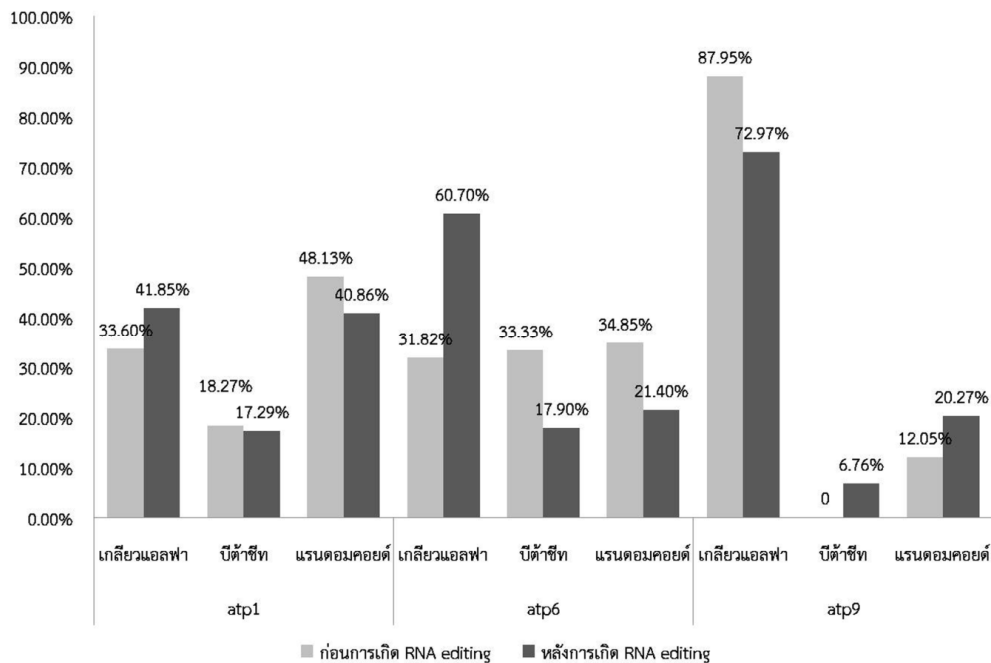
บริเวณใกล้เคียงกับตำแหน่งที่มีการแก้ไขอาร์เอ็นเอ โดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นในโครงสร้างของเกลียวแอลฟา (alpha helix) ในโปรตีน atp1 และ atp6 แต่ก่อให้เกิดการลดเกลียวแอลฟาในโปรตีน atp9 (รูปที่ 2 และ 3) โดยรวมเมื่อมีการแก้ไขอาร์เอ็นเอจะส่งผลให้โปรตีนทั้งสามในกลุ่ม ATP-synthase มีเปอร์เซ็นต์โครงสร้างของเกลียวแอลฟามากกว่าบีตชีต (b-Sheet) และแรนดอมคอยล์ (random coil)



รูปที่ 1 จำนวนและชนิดของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปจากการแก้ไขอาร์เอ็นเอในยีนกลุ่ม ATP-synthase ในไมโทคอนเดรียของตาลโดนด



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิที่เกิดจากการแก้ไขอาร์เอ็นเอ แถบสีฟ้าแทนเกลียวแอลฟา แถบสีแดงแทนบีตชีต แถบสีม่วงแทนแรนดอมคอยล์ โดย (ก) โครงสร้างทุติยภูมิก่อนการแก้ไข และ (ข) โครงสร้างทุติยภูมิหลังเกิดการแก้ไข



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบขององค์ประกอบโครงสร้างทุติยภูมิก่อนและหลังการแก้ไขอาร์เอ็นเอในยีนกลุ่ม ATP-synthase ในไมโทคอนเดรียของตาลโดนด

4. วิจารณ์

ATP-synthase เป็นโปรตีนในไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ผลิต ATP ให้กับเซลล์ เอนไซม์ ATP-synthase ของไมโทคอนเดรียจะฝังตัวอยู่ระหว่างชั้นของเยื่อหุ้มชั้นใน โดยโครงสร้างประกอบไปด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย ได้แก่ F_0 และ F_1 โปรตีน atp1, atp6 และ atp9 เป็นองค์ประกอบของโครงสร้าง F_0 และมีการแก้ไขลำดับเบสบนสายเอ็มอาร์เอ็นเอก่อนเกิดกระบวนการทรานสเลชัน จากผลการทดลองพบการแก้ไขอาร์เอ็นเอของทั้ง 3 ยีน เหมือนกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยการแก้ไขอาร์เอ็นเอของ atp1, atp6 และ atp9 ของตาลโดนดตรงกับตำแหน่งการแก้ไขของมะพร้าวทุกตำแหน่ง ยกเว้น atp9_203 [24] จึงชี้ให้เห็นว่าการแก้ไขอาร์เอ็นเอช่วยเพิ่มการอนุรักษ์ของพอลิเปปไทด์ที่เป็นโฮโมโลกัสกันระหว่างทั้งสองชนิด เพื่อช่วยในการรักษาหน้าที่ของโปรตีน

เหล่านี้น่าให้คงไว้ในจีโนมของไมโทคอนเดรีย หากกระบวนการแก้ไขอาร์เอ็นเอในยีนกลุ่ม ATP synthase บกพร่องไปย่อมส่งผลต่อกระบวนการสร้างพลังงาน และการเจริญเติบโตของพืช เช่น เมื่อเกิดการบกพร่องของการแก้ไขอาร์เอ็นเอในยีน atp4-59, nad7-383 และ ccmFN-302 ในข้าวโพดส่งผลต่อการลดลงของกิจกรรมของ mito-chondrial complex I, complex III และ complex IV ในขณะที่เดียวกันจะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอและเอนโดสเปิร์มในอะราบิดอปซิส [25]

ผลการแก้ไขอาร์เอ็นเอของยีนในกลุ่ม ATP synthase ของตาลโดนดเกิดในตำแหน่งที่ 1 และ 2 ของโคดอนส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามสมบัติหมู่ R ของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ (1) การเปลี่ยนแปลงไปเป็นโคดอนหยุดในยีน atp6_772 และ

atp9_223 ทำให้สายพอลิเพปไทด์มีขนาดสั้นลงเป็น 6 และ 9 กรดอะมิโน ตามลำดับ ในข้าวสาลีมีรายงานการแก้ไขอาร์เอ็นเอ ในยีน *atp9* เกิดการเปลี่ยนแปลงเบส C เป็น U ในโคดอนของอาร์จินีน CGA ไปเป็น UGA ส่งผลให้สายพอลิเพปไทด์สั้นลง 6 กรดอะมิโน [26] (2) การเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่ชอบน้ำ โพรลีนเป็นเซอริน (P-S) ฮิสติดีนเป็นไทโรซีน (H-Y) และอาร์จินีนเป็นซิสเทอีน (R-C) รวมทั้งสิ้น 10 ตำแหน่ง และ (3) การเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ ทรีโอนีนเป็นไอโซลิวซีน (T-I), ลูซีนเป็นฟีนิลอะลานีน (L-F) เซอรินเป็นฟีนิลอะลานีน (S-P) โพรลีนเป็นลิวซีน (P-L) และเซอรินเป็นลิวซีน (S-L) รวมทั้งสิ้น 34 ตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในส่วนใหญ่เกิดชนิดที่เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งคล้ายกันกับปรากฏการณ์ในยีนกลุ่ม *ndh* ในจีโนมคลอโรพลาสต์ของตาลโตเนด [27] การเปลี่ยนแปลงของโคดอนจากกรดอะมิโนที่ชอบน้ำเป็นไม่ชอบน้ำมีผลต่อความเสถียรของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ [28]

ผลจากการแก้ไขอาร์เอ็นเอทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำมากขึ้นเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเกิดมีเกลียวแอลฟามากขึ้นในโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ซึ่งปกติแล้วอนุภาคกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นองค์ประกอบโครงสร้างเกลียวแอลฟา [29] จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิในส่วนของเกลียวแอลฟามีบทบาทสำคัญ เนื่องจากหน้าที่ของเกลียวแอลฟาเป็นโครงสร้างที่ทำให้โปรตีนมีความเสถียร [28] ดังนั้นการเกิดการแก้ไขอาร์เอ็นเอจึงทำให้โปรตีนในกลุ่ม ATP-synthase ทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์

5. สรุป

การตรวจสอบยีน *atp1*, *atp6* และ *atp9* พบการแก้ไขอาร์เอ็นเอซึ่งและส่งผลให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน โดยเปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโนชนิดที่ไม่ชอบน้ำ ส่งผลให้โครงสร้างเกลียวแอลฟามีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้น และคาดว่าส่งผลต่อความเสถียรของโปรตีนในไมโทคอนเดรีย

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2558

6. รายการอ้างอิง

- [1] Venkatasubban, K., 1945, Cytological studies in Palmae, Proc. Ind. Acad. Sci. Sec. B 22: 193-207.
- [2] Ariyasena, D.D., Jansz, E.R. and Abeysekera, A.M., 2001, Some studies directed at increasing the potential use of palmyrah (*Borassus flabellifer* L) fruit pulp, J. Sci. Food Agric. 81: 1347-1352.
- [3] George, J. and Karun, A., 2011, Marker assisted detection of seed sex ratio in palmyrah palm (*Borassus flabellifer* L.), Curr. Sci. (Bangalore) 100: 922-925.
- [4] George, J., Karun, A., Manimekalai, R., Rajesh, M.K. and Remya, P., 2007, Identification of RAPD markers linked to sex determination in palmyrah (*Borassus flabellifer* L.), Curr. Sci. (Bangalore) 93: 1075-1077.
- [5] Ruttajorn, K., 2006, Sex Identifying in

- Palmyra Palm (*Borassus flabellifer* L.) Using Botanical Characteristics and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Marker, M.S. Thesis, Thaksin University, Songkhla, 74 p.
- [6] George, J., Venkataramana, K.T., Nainar, P., Rajesh, M.K. and Karun, A., 2016, Evaluation of molecular diversity of ex situ conserved germplasm of palmyrah (*Borassus flabellifer* L.) accessions using RAPD markers, J. Plant. Crops 44: 96-102.
- [7] Ponnuswami, V., 2010, Genetic diversity in palmyrah genotypes using morphological and molecular markers, Elec. J. Plant Breed. 1: 556-567.
- [8] Noblick, L.R., 1993, The morphology and taxonomy of the Arecaceae (Palmae) in 1st International Symposium on Ornamental Palms, 1: 19-25
- [9] Dransfield, J., 2014, The genus *Borassodendron* (Palmae) in Malesia, Reinwardtia 8: 351-363.
- [10] Berry, E.J. and Gorchoy, D.L., 2004, Reproductive biology of the dioecious understory palm *Chamaedorea radicalis* in a Mexican cloud forest: Pollination vector, flowering phenology and female fecundity, J. Trop. Ecol. 20: 369-376.
- [11] Masmoudi-Allouche, F., Châari-Rkhis, A., Kriaâ, W., Gargouri-Bouzid, R., Jain, S. M. and Drira, N., 2009, *In vitro* hermaphroditism induction in date palm female flower, Plant Cell Rep. 28: 1-10.
- [12] Geisler, D.A., Pöpke, C, Obata, T., Nunes-Nesi, A., Matthes, A., Schneitz, K., Maximova, E, Araújo, W.L., Fernie, A.R. and Persson, S., 2012, Downregulation of the δ -subunit reduces mitochondrial ATP synthase levels, alters respiration, and restricts growth and gametophyte development in Arabidopsis, Plant Cell 24: 2792-2811.
- [13] Carlsson, J., Leino, M., Sohlberg, J., Sundström, J.F. and Glimelius, K., 2008, Mitochondrial regulation of flower development, Mitochondrion 8: 74-86.
- [14] Busi, M.V., Gomez-Lobato, M.E., Turowski, V.R., Casati, P., Zabaleta, E.J., Gomez-Casati, D.F. and Araya, A., 2011, Effect of mitochondrial dysfunction on carbon metabolism and gene expression in flower tissues of Arabidopsis thaliana, Mol. Plant 4: 127-143.
- [15] Wang, J., Cao, M.J., Pan, G.T., Lu, Y.L. and Rong, T.Z., 2009, RNA editing of mitochondrial functional genes *atp6* and *cox2* in maize (*Zea mays* L.), Mitochondrion 9: 364-369.
- [16] Hu, J., Yi, R., Zhang, H. and Ding, Y., 2013, Nucleo-cytoplasmic interactions affect RNA editing of *cox2*, *atp6* and *atp9* in alloplasmic male-sterile rice (*Oryza sativa* L.) lines, Mitochondrion 13: 87-95.
- [17] Wei, L., Yan, Z.X. and Ding, Y., 2008, Mitochondrial RNA editing of F0-ATPase subunit 9 gene (*atp9*) transcripts of

- Yunnan purple rice cytoplasmic male sterile line and its maintainer line, *Acta Physiol. Plant.* 30: 657-662.
- [18] Jiang, W., Yang, S., Yu, D. and Gai, J. 2011, A comparative study of ATPase subunit 9 (*Atp9*) gene between cytoplasmic male sterile line and its maintainer line in soybeans, *Afr. J. Biotechnol.* 10: 10387-10392.
- [19] Chateigner-Boutin, A.L. and Small, I., 2010, Plant RNA editing, *RNA Biol.* 7: 213-219.
- [20] Bayer-Császár, E., Haag, S., Jörg, A., Glass, F., Härtel, B., Obata, T., Meyer, E.H., Brennicke, A. and Takenaka, M., 2017, The conserved domain in MORF proteins has distinct affinities to the PPR and E elements in PPR RNA editing factors, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1860: 813-828.
- [21] Alverson, A.J., Wei, X., Rice, D.W., Stern, D.B., Barry, K. and Palmer, J.D., 2010, Insights into the evolution of mitochondrial genome size from complete sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae), *Mol. Biol. Evol.* 27: 1436-1448.
- [22] Mower, J.P., Case, A.L., Floro, E.R. and Willis, J.H., 2012, Evidence against equimolarity of large repeat arrangements and a predominant master circle structure of the mitochondrial genome from a monkeyflower (*Mimulus guttatus*) lineage with cryptic CMS, *Genome Biol. Evol.* 4: 670-686.
- [23] Hepburn, N.J., Schmidt, D.W. and Mower, J.P., 2012, Loss of two introns from the *Magnolia tripetala* mitochondrial *cox2* gene implicates horizontal gene transfer and gene conversion as a novel mechanism of intron loss, *Mol. Biol. Evol.* 29: 3111-3120.
- [24] Aljohi, H.A., Liu, W., Lin, Q., Zhao, Y., Zeng, J., Alamer, A., Alanazi, I.O., Alawad, A.O., Al-Sadi, A.M. and Hu, S., 2016, Complete Sequence and Analysis of Coconut Palm (*Cocos nucifera*) Mitochondrial Genome, *PLoS One* 11: e0163990.
- [25] Wang, G., Zhong, M., Shuai, B., Song, J., Zhang, J., Han, L., Ling, H., Tang, Y., Wang, G. and Song, R., 2017, E+ subgroup PPR protein defective kernel 36 is required for multiple mitochondrial transcripts editing and seed development in maize and Arabidopsis, *New Phytol.* 214: 1563-1578.
- [26] Bégu, D., Graves, P.V., Domez, C., Arselin, G., Litvak, S. and Araya, A., 1990, RNA editing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9: direct protein and cDNA sequencing, *Plant Cell* 2: 1283-1290.
- [27] Sakulsathaporn, A., Suputtitada, S., Apisitwanich, S. and Vuttipongchikij, S., 2012, RNA Editing Site of NDH Genes in *Borassus flabellifer*, 1st Mae Fah Luang University International Conference, Chiangrai.
- [28] Yura, K. and Go, M., 2008, Correlation

between amino acid residues converted by RNA editing and functional residues in protein three-dimensional structures in plant organelles, *BMC Plant Biol.* 8: 79.

[29] Singh, M., 2005, Predicting Protein Secondary and Supersecondary Structure in *Handbook of Computational Molecular Biology*, Chapman and Hall/CRC.