

ผลงานวิจัยดีเด่นของ มหาวิทยาลัยมหิดล

งานสารสนเทศงานวิจัย กองบริหารงานวิจัย
สำนักงานอธิการบดีมหาวิทยาลัยมหิดล
โทร. 02-849-6241-6 โทรสาร 02-849-6247
E-mail : dircopra@mahidol.ac.th



มหาวิทยาลัยมหิดล
ปัญญาแห่งแผ่นดิน

Hydrogen Peroxide Elimination from C4a-hydroperoxyflavin in a Flavoprotein Oxidase Occurs through a Single Proton Transfer from Flavin N5 to Peroxide Leaving Group

สารตัวกลาง C4a-hydroperoxyflavin พบทั่วไปในปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม monooxygenase ซึ่งสารตัวอย่างดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อะตอมออกซิเจนกับสารตั้งต้นในปฏิกิริยา เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการพบสารตัวกลางดังกล่าวเกิดขึ้นในปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่ม oxidase ด้วย เอนไซม์ไพราโนส 2-ออกซิเดส (pyranose 2-oxidase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลในกลุ่มแอลโดไพราโนสโดยมีโมเลกุลออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลคีโตสและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าว ได้ตรวจพบสารตัวกลาง C4a-hydroperoxyflavin ก่อนที่จะกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ (H_2O_2 elimination) ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการทดลองในตัวทำละลาย D_2O เพื่อศึกษา solvent kinetic isotope effects (SKIE) ของปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ที่โคแฟกเตอร์อยู่ในรูปถูกรีดิวซ์ กับโมเลกุลออกซิเจน โดยใช้ความรู้ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาในช่วงเวลาที่ปฏิกิริยาดำเนินไปก่อนถึงสภาพคงตัว (transient kinetics) ผลการทดลองพบว่า ตัวทำละลาย D_2O ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการสร้างสารตัวกลาง C4a-hydroperoxyflavin ในปฏิกิริยา แต่กลับส่งผลกระทบต่ออัตราการสลายสารตัวกลางดังกล่าว ซึ่งเมื่อสารตัวกลางนี้ถูกสลายแล้วจะเกิดการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ การทดลองในตัวทำละลาย D_2O ให้ค่า SKIE เท่ากับ 2.8 นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตอนและดิฟฟิวสิวิตีในปฏิกิริยากำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าให้กราฟเป็นเส้นตรง จึงสรุปได้ว่า เกิดการถ่ายโอนโปรตอนหนึ่งโปรตอน (single-proton transfer) ขณะที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การทดลองเพื่อศึกษาปฏิกิริยาในช่วงเวลาที่ปฏิกิริยาดำเนินไปก่อนถึงสภาพคงตัว ในตัวทำละลาย H_2O พบว่า เมื่อใช้โคแฟกเตอร์ในรูปที่ถูกรีดิวซ์ซึ่งมีอะตอมดิฟฟิวสิวิตีเกาะอยู่ที่ตำแหน่ง N5 นั้นทำให้ได้ค่า SKIE ใกล้เคียงกับค่า SKIE ที่ได้จากการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ที่อยู่ในตัวทำละลาย D_2O จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า โปรตอนที่เกาะที่ตำแหน่ง N5 นั้นทำให้เกิด SKIE และโปรตوندังกล่าวเป็นโปรตอนที่ถูกถ่ายโอนขณะเกิดปฏิกิริยา และกลไกการเกิดผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากสารตัวกลาง C4a-hydroperoxyflavin นั้นสอดคล้องกับกระบวนการถ่ายโอนโปรตอนหนึ่งโปรตอนจากตำแหน่ง N5 ของโคแฟกเตอร์ไปยังเปอร์ออกไซด์ที่เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง C4 ซึ่งกระบวนการนี้อาจเกิดขึ้นผ่านพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของสารตัวกลาง (intramolecular hydrogen bridge)

ติดต่อขอรายละเอียดเพิ่มเติม



หัวหน้าโครงการ : รองศาสตราจารย์พิมพ์ใจ ใจเย็น
ที่อยู่ : ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

โทร : 0-2201-5004
Email : scpcy@mahidol.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย :
ที่อยู่ :

โทร :
Email :

รูป

Mahidol University Research Excellence

Research Management and Development
Office of the President
Tel : 02-849-6241-6 Fax : 02-849-6247
E-mail : dircopra@mahidol.ac.th



MAHIDOL UNIVERSITY
Wisdom of the Land

Hydrogen Peroxide Elimination from C4a-hydroperoxyflavin in a Flavoprotein Oxidase Occurs through a Single Proton Transfer from Flavin N5 to Peroxide Leaving Group

C4a-hydroperoxyflavin is found commonly in the reactions of flavin-dependent monooxygenases, in which it plays a key role as an intermediate that incorporates an oxygen atom into substrates. Only recently has evidence for its involvement in the reactions of flavoprotein oxidases been reported. Previous studies of pyranose 2-oxidase (P2O), an enzyme catalyzing the oxidation of pyranoses using oxygen as an electron acceptor to generate oxidized sugars and hydrogen peroxide (H_2O_2), have shown that C4a-hydroperoxyflavin forms in P2O reactions before it eliminates H_2O_2 as a product (Sucharitakul, J., Prongjit, M., Haltrich, D., and Chaiyen, P. (2008) *Biochemistry* 47, 8485-8490). In this report, the solvent kinetic isotope effects (SKIE) on the reaction of reduced P2O with oxygen were investigated using transient kinetics. Our results showed that D_2O has a negligible effect on the formation of C4a-hydroperoxyflavin. The ensuing step of H_2O_2 elimination from C4a-hydroperoxyflavin was shown to be modulated by an SKIE of 2.8 ± 0.2 , and a proton inventory analysis of this step indicates a linear plot. These data suggest that a single-proton transfer process causes SKIE at the H_2O_2 elimination step. Double and single mixing stopped-flow experiments performed in H_2O buffer revealed that reduced flavin specifically labeled with deuterium at the flavin N5 position generated kinetic isotope effects similar to those found with experiments performed with the enzyme pre-equilibrated in D_2O buffer. This suggests that the proton at the flavin N5 position is responsible for the SKIE and is the proton-in-flight that is transferred during the transition state. The mechanism of H_2O_2 elimination from C4a-hydroperoxyflavin is consistent with a single proton transfer from the flavin N5 to the peroxide leaving group, possibly via the formation of an intramolecular hydrogen bridge.

For More Information



Name (PI) : Associate Professor Pimchai Chaiyen, Ph.D.
Address : Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Mahidol University
Tel. : 0-2201-5004
Email : scpcy@mahidol.ac.th



Name :
Address :
Tel. :
Email :