

ผลงานวิจัยดีเด่นของ มหาวิทยาลัยมหิดล

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



มหาวิทยาลัยมหิดล
ปัญญาแห่งแผ่นดิน

Identification of a Catalytic Base for Sugar Oxidation in the Pyranose 2-Oxidase Reaction

เอนไซม์ไพราโนส 2-ออกซิเดส (pyranose 2-oxidase) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลในกลุ่ม แอลโดไพราโนส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลคีโตสและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เราได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรด อะมิโนฮิสติดีน 548 และ แอสปาราจิน 593 เพื่อศึกษากลไกหน้าที่ของกรดอะมิโนทั้งสองของเอนไซม์โดยการศึกษา จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาในช่วงเวลาที่ปฏิกิริยาดำเนินไปก่อนถึงสภาพคงตัว (transient kinetics) และศึกษาความเป็นกรด-เบสที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา (pH-dependence studies) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน ฮิสติดีน 548 เพียงตำแหน่งเดียวทำให้เกิดการผสมระหว่างประชากรของเอนไซม์ที่จับกับ โคแฟกเตอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์และไม่ได้จับกับโคแฟกเตอร์ด้วยพันธะเดียวกัน จึงทำให้ต้องเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนสองตำแหน่ง คือฮิสติดีน 167 เปลี่ยนเป็นอะลานีน ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรของเอนไซม์ที่ไม่ได้จับกับโคแฟกเตอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์เท่านั้น ร่วมด้วยกับการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนฮิสติดีน (H167A/H548 mutants) ผลจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนทั้งเพียงตำแหน่งเดียวและสองตำแหน่งของเอนไซม์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถถูกรีดิวซ์ด้วยกลูโคสได้ มีเพียงการเปลี่ยนแปลงฮิสติดีน 167 เป็นอะลานีน และฮิสติดีน 548 เป็นอาร์จินีน (H167A/H548R) ที่สามารถทำให้เอนไซม์ถูกรีดิวซ์ด้วยกลูโคสได้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาของ เอนไซม์ที่มีการเปลี่ยนแปลง ฮิสติดีน 167 ไปเป็นอะลานีนเพียงตำแหน่งเดียวประมาณ 220 เท่า จากการศึกษาคือความเป็นกรด-เบสที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ H167A/H548R พบว่าเมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาวะเบสมากขึ้น อัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชันเพิ่มขึ้นประมาณ 360 เท่า โดยมีค่า pK_a มากกว่า 10.1 ในขณะที่ปฏิกิริยารีดักชันของเอนไซม์ต้นแบบ (wild type) และเอนไซม์ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรด อะมิโนฮิสติดีน 167 เป็นอะลานีน (H167A) นั้นไม่ขึ้นกับความเป็นกรด-เบส ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าค่า pK_a ที่มากกว่า 10.1 นั้นเกี่ยวข้องกับการแตกตัวให้โปรตอนของกรดอะมิโนอาร์จินีน 548 ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงมาจากกรดอะมิโนฮิสติดีน โดยกรดอะมิโนดังกล่าวต้องอยู่ในรูปขาดโปรตอน (unprotonated form) จึงจะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพ จากข้อมูลข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า กรดอะมิโนฮิสติดีน 548 ในเอนไซม์ต้นแบบ (wild type) ควรจะอยู่ในรูปขาดโปรตอนตลอดช่วงกรด-เบสที่ทำการศึกษา โดยกรดอะมิโนดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นเบส ไปดึงโปรตอนตำแหน่ง 2-hydroxyl ของน้ำตาลกลูโคส และเกิดการถ่ายโอนhydride กลูโคสไปยังโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ สำหรับการเปลี่ยนแปลงแอสปาราจิน 593 ไปเป็นฮิสติดีน (N593H) นั้นพบว่าปฏิกิริยารีดักชันของเอนไซม์ดังกล่าวเกิดช้ากว่าเอนไซม์ต้นแบบ (wild type) 114 เท่า และไม่ขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงกรด-เบสของปฏิกิริยา ขณะที่ค่าคงที่การแตกตัวสำหรับปฏิกิริยาที่ใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นมากกว่าเอนไซม์ต้นแบบ (wild type) 19 เท่า

ติดต่อขอรายละเอียดเพิ่มเติม



รูป

หัวหน้าโครงการ	:	รองศาสตราจารย์พิมใจ ไจเย็น
ที่อยู่	:	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
โทร	:	0-2201-5004
Email	:	scpcy@mahidol.ac.th
ผู้ร่วมวิจัย	:	
ที่อยู่	:	
โทร	:	
Email	:	

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

Identification of a Catalytic Base for Sugar Oxidation in the Pyranose 2-Oxidase Reaction

Pyranose 2-oxidase (P2O) catalyzes the **oxidation** of aldopyranoses to form **2-keto sugars** and H_2O_2 . In this study, the mechanistic role of the conserved residues His548 and Asn593 in P2O was investigated by using site-directed mutagenesis, transient kinetics, and pH-dependence studies. As single mutants of H548 resulted in mixed populations of noncovalently bound and covalently linked FAD, double mutants containing H167A were constructed, in which the covalent histidyl-FAD linkage was removed in addition to having the H548 mutation. Single mutants H548A, H548N, H548S, H548D and double mutants (with H167A) could not be reduced by D-glucose. For the H167A/H548R mutant, the flavin could be reduced by D-glucose with the reduction rate constant about 220 times lower than that of the H167A mutant. The pH-dependence studies of H167A/H548R indicated that the rate constant of flavin reduction increased about 360-fold upon a pH rise corresponding to $pK_a > 10.1$, whereas the **reactions** of the wild-type and H167A mutant enzymes were pH independent. Therefore, the data suggest that a pK_a value of > 10.1 in the mutant enzyme is associated with the Arg548 residue, and that this residue must be unprotonated to efficiently catalyze flavin reduction. The data imply that for the wild-type P2O, the conserved His548 should be unprotonated in the pH range studied. The unprotonated His548 can act as a general **base** to abstract the 2-hydroxyl proton of D-glucose and initiate hydride transfer from the substrate to the flavin. Studies of the single mutant N593H showed that the flavin reduction rate constant was 114 times lower than that of the wild-type enzyme and was pH independent, while the K_d for D-glucose binding was 19 times greater.

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 :