

ผลงานวิจัยดีเด่นของ มหาวิทยาลัยมหิดล

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



มหาวิทยาลัยมหิดล
ปัญญาแห่งแผ่นดิน

การเกิดความคงตัวของ C4a-ไฮโดรเปอร์ออกซีฟลาวิน ในเอนไซม์โมโนออกซิเจนเนสชนิดสององค์ประกอบและอาศัยฟลาวิน เกิดขึ้นโดยผ่านการปฏิสัมพันธ์ที่อะตอม N5 และ C4a ของฟลาวิน

เอนไซม์ พารา-ไฮดรอกซีเฟนิลอะซีเตต 3-ไฮดรอกซีเลส เป็นเอนไซม์โมโนออกซิเจนเนสชนิดสององค์ประกอบ และอาศัยฟลาวินในการทำงาน จากโครงสร้างผลึกขององค์ประกอบออกซิเจนเนส (C_2) กรดอะมิโน His-396 มีระยะห่างจากตำแหน่ง C4a ของฟลาวิน $4.5 \text{ \AA}$ ในขณะที่กรดอะมิโน Ser-171 ห่างจากตำแหน่ง N5 ของฟลาวิน $2.9 \text{ \AA}$. ทางกลุ่มคณะของเราได้ทำการศึกษาถึงบทบาทของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่งนี้ ต่อการเกิดความคงตัวของสารตัวกลาง C4a-hydroperoxy-FMN จากผลการศึกษาบ่งชี้ว่า ค่าคงที่อัตราปฏิกิริยาการเกิด C4a-hydroperoxy-FMN ลดลงประมาณ 30 เท่า ในเอนไซม์กลายพันธุ์ H396N, 100 เท่า ในเอนไซม์ H396A และ 300 เท่า ในเอนไซม์ H396V เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ wild-type การกลายพันธุ์ดังกล่าวพบว่ามีผลน้อยกว่าในปฏิกิริยาการกำจัด H_2O_2 ขั้นตอนถัดมา จากการศึกษาผลของพีเอชแสดงให้เห็นว่าค่าคงที่อัตราปฏิกิริยาการกำจัด H_2O_2 ในเอนไซม์ H396N และ H396V เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น พร้อมค่า $pK_a > 9.6$ และ $pK_a > 9.7$ ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่วัดได้ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับผลที่เกิดขึ้นในเอนไซม์ wild-type ($pK_a > 9.4$) จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า His-396 มีความสำคัญในปฏิกิริยาการเกิดสารตัวกลาง C4a-hydroperoxy-FMN แต่ไม่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการกำจัด H_2O_2 จากการศึกษา transient kinetics ของปฏิกิริยาของเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Ser-171 กับออกซิเจน แสดงให้เห็นว่าค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาการกำจัด H_2O_2 เพิ่มขึ้น เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นและแสดงค่า pK_a ประมาณ 8.0 ผลเหล่านี้บ่งชี้ว่าการเกิดปฏิสัมพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลบนโซ่แขนงของ Ser-171 กับ N5 ของฟลาวิน เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการทำให้คงตัวของสารตัวกลาง C4a-hydroperoxy-FMN ในปฏิกิริยาของเอนไซม์กลายพันธุ์ที่มีการดัดแปลงกรดอะมิโนสองตำแหน่ง S171A/H396V กับออกซิเจน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟลาวินในรูปแบบออกซิไดส์ซึ่งเกิดขึ้นโดยตรง ปราศจากการเกิดความคงตัวของสารตัวกลาง C4a-hydroperoxy-FMN ซึ่งยืนยันผลการค้นพบที่ได้จากเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ดัดแปลงกรดอะมิโนหนึ่งตำแหน่งที่ระบุว่า His-396 มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาการสร้าง และ Ser-171 มีความสำคัญต่อการเกิดเสถียรภาพของสารตัวกลาง C4a-hydroperoxy-FMN ในเอนไซม์ C_2

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

Stabilization of C4a-Hydroperoxyflavin in a Two-component Flavin-dependent Monooxygenase Is Achieved through Interactions at Flavin N5 and C4a Atoms

p-Hydroxyphenylacetate (HPA) 3-hydroxylase is a two-component flavin-dependent monooxygenase. Based on the crystal structure of the oxygenase component (C(2)), His-396 is 4.5 Å from the flavin C4a locus, whereas Ser-171 is 2.9 Å from the flavin N5 locus. We investigated the roles of these two residues in the stability of the C4a-hydroperoxy-FMN intermediate. The results indicated that the rate constant for C4a-hydroperoxy-FMN formation decreased ~30-fold in H396N, 100-fold in H396A, and 300-fold in the H396V mutant, compared with the wild-type enzyme. Lesser effects of the mutations were found for the subsequent step of H(2)O(2) elimination. Studies on pH dependence showed that the rate constant of H(2)O(2) elimination in H396N and H396V increased when pH increased with $pK(a) > 9.6$ and > 9.7 , respectively, similar to the wild-type enzyme ($pK(a) > 9.4$). These data indicated that His-396 is important for the formation of the C4a-hydroperoxy-FMN intermediate but is not involved in H(2)O(2) elimination. Transient kinetics of the Ser-171 mutants with oxygen showed that the rate constants for the H(2)O(2) elimination in S171A and S171T were ~1400-fold and 8-fold greater than the wild type, respectively. Studies on the pH dependence of S171A with oxygen showed that the rate constant of H(2)O(2) elimination increased with pH rise and exhibited an approximate $pK(a)$ of 8.0. These results indicated that the interaction of the hydroxyl group side chain of Ser-171 and flavin N5 is required for the stabilization of C4a-hydroperoxy-FMN. The double mutant S171A/H396V reacted with oxygen to directly form the oxidized flavin without stabilizing the C4a-hydroperoxy-FMN intermediate, which confirmed the findings based on the single mutation that His-396 was important for formation and Ser-171 for stabilization of the C4a-hydroperoxy-FMN intermediate in C(2).

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 :