

ผลงานวิจัยดีเด่นของ มหาวิทยาลัยมหิดล

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



มหาวิทยาลัยมหิดล
ปัญญาแห่งแผ่นดิน

การปฏิสัมพันธ์กับหมู่ฟีนอลิกของสารตั้งต้นจำเป็นต่อปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลขององค์ประกอบออกซิเจนในเอนไซม์ พารา-ไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตท 3-ไฮดรอกซีเลส

พารา-ไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตท 3-ไฮดรอกซีเลส เป็นเอนไซม์โมโนออกซิเจนสที่มีโครงสร้างเป็นฟลาโวโปรตีนชนิดที่มีสององค์ประกอบ ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับสารตั้งต้น พารา-ไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตท (HPA) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตท (DHPA) จากโครงสร้างขององค์ประกอบออกซิเจน (C₂) กรดอะมิโน His-120 และ Ser-146 ทั้งสองตำแหน่งนี้ตั้งอยู่ห่างจากหมู่ไฮดรอกซิลของ HPA ประมาณ 2.8 °A เอนไซม์ที่มีการดัดแปลงกรดอะมิโนชนิดต่างๆ H120N, H120Q, H120Y, H120D และ H120E สามารถสร้างสาร C4a-hydroperoxy-FMN (สารตัวกลางว่องไวที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล) แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับ HPA ได้ การสูญเสียการทำงานของ H120N ไม่ได้เกิดเนื่องจากการเข้าจับกับสารตั้งต้นเนื่องจากว่าเอนไซม์ดังกล่าวยังสามารถจับกับ HPA ได้ อยู่ในทางตรงกันข้าม เอนไซม์ H120K เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลได้ด้วยประสิทธิภาพเทียบเท่ากับเอนไซม์ชนิด wild-type; ค่าคงที่อัตราปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลของเอนไซม์ H120K เท่ากับ $5.7 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$, และอัตราส่วนการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 75%, เมื่อเทียบกับเอนไซม์ wild-type ที่มีค่าดังกล่าวเท่ากับ 16 s^{-1} และ 90% เอนไซม์ H120R สามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลได้เช่นเดียวกันเป็นสิ่งที่บ่งชี้ว่าประจุบวกบนกรดอะมิโนตำแหน่ง 120 สามารถใช้แทนที่ His-120 สำหรับปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโน เนื่องจากปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลของเอนไซม์ wild-type C₂ ไม่ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ในช่วงระหว่างพีเอช 6 และ 10 สถานะในรูปที่ถูกเติมโปรตอนของกรดอะมิโนที่สำคัญนี้จำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งเป็นไปได้ว่ายังคงอยู่ในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงพีเอชดังกล่าวนี้ His-120 อาจอยู่ในรูปประจุบวกเพื่อเข้าจับแบบเฉพาะเจาะจงกับ HPA ในรูปแบบฟีนอเลต นั่นคือการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน $\text{His}^{\delta+} \cdot \text{HPA}^{\delta-}$ ซึ่งช่วยสนับสนุนการเคลื่อนย้ายออกซิเจนผ่านกลไกปฏิกิริยาการแทนที่แบบ electrophilic aromatic substitution mechanism ส่วนการวิเคราะห์ของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ดัดแปลงตรงกรดอะมิโน Ser-146 แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวนี้มีความจำเป็นแต่ไม่ได้เกี่ยวข้องโดยตรงกับปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล การสร้างผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ S146A ไม่ขึ้นกับพีเอชและปริมาณผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นคงที่ประมาณ 70% ที่ช่วงพีเอช 6-10 ขณะที่การสร้างผลิตภัณฑ์ของ S146C ลดลงจาก 65% ที่พีเอช 6.0 ไปเป็น 27% ที่พีเอช 10.0 ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าการแตกตัวเป็นไอออนของ Cys-146 ในเอนไซม์ S146C มีผลในด้านตรงกันข้ามต่อปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล อาจเกิดจากการรบกวนการสร้างสารประกอบเชิงซ้อน $\text{His}^{\delta+} \cdot \text{HPA}^{\delta-}$ ซึ่งจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล

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

Interactions with the Substrate Phenolic Group Are Essential for Hydroxylation by the Oxygenase Component of p-Hydroxyphenylacetate 3-Hydroxylase

p-Hydroxyphenylacetate (HPA) 3-hydroxylase is a two-component flavoprotein monooxygenase that catalyzes the hydroxylation of p-hydroxyphenylacetate to form 3,4-dihydroxyphenylacetate. Based on structures of the oxygenase component (C_2), both His-120 and Ser-146 are located ~ 2.8 Å from the hydroxyl group of HPA. The variants H120N, H120Q, H120Y, H120D, and H120E can form C4a-hydroperoxy-FMN (a reactive intermediate necessary for hydroxylation) but cannot hydroxylate HPA. The impairment of H120N is not due to substrate binding because the variant can still bind HPA. In contrast, the H120K variant catalyzes hydroxylation with efficiency comparable with that of the wild-type enzyme; the hydroxylation rate constant for H120K is $5.7 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$, and the product conversion ratio is 75%, compared with values of 16 s^{-1} and 90% for the wild-type enzyme. H120R can also catalyze hydroxylation, suggesting that a positive charge on residue 120 can substitute for the hydroxylation function of His-120. Because the hydroxylation reaction of wild-type C_2 is pH-independent between pH 6 and 10, the protonation status of key components required for hydroxylation likely remains unchanged in this pH range. His-120 may be positively charged for selective binding to the phenolate form of HPA, i.e. to form the $\text{His}^{\delta+} \cdot \text{HPA}^{\delta-}$ complex, which in turn promotes oxygen atom transfer via an electrophilic aromatic substitution mechanism. Analysis of Ser-146 variants revealed that this residue is necessary for but not directly engaged in hydroxylation. Product formation in S146A is pH-independent and constant at $\sim 70\%$ over a pH range of 6-10, whereas product formation for S146C decreased from $\sim 65\%$ at pH 6.0 to 27% at pH 10.0. These data indicate that the ionization of Cys-146 in the S146C variant has an adverse effect on hydroxylation, possibly by perturbing formation of the $\text{His}^{\delta+} \cdot \text{HPA}^{\delta-}$ complex needed for hydroxylation.

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 :