ผลงานวิจัยดีเด่นของมหาวิทยาลัยมหิดล

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

มหาวิทยาลัยมหิดล
ปัญญาของแผ่นดิน

การศึกษาผลของพีเอชแสดงให้เห็นถึงกลไกปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่มีประสิทธิภาพขององค์ประกอบออกซีเจเนสในเอนไซม์ พารา-ไฮดรอกซีฟีนิลอะซีเตท 3-ไฮดรอกซีเลส

เอนไซม์ พารา-ไฮดรอกซีฟีนิลอะซีเตท (HPA) 3-ไฮดรอกซีเลส เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กับ HPA ที่ตำแหน่ง *ortho-* ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะซีเตท (DHPA) เอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์โมโนออกซีเจเนส ชนิดสององค์ประกอบที่อาศัยฟลาวินในการทำงาน ประกอบด้วยองค์ประกอบรีดักเทสและออกซีเจเนส (C_2) C_2 เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลของ HPA โดยใช้ออกซิเจนและ reduced FMN เป็นสารตั้งต้นร่วม ปัจจุบันนี้ผลของพีเอชต่อปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของเอนไซม์โมโนออกซีเจเนสชนิดสององค์ประกอบยังไม่เคยมีการรายงาน งานวิจัยนี้กลุ่มวิจัยของเราได้รายงานถึงจลศาสตร์ของปฏิกิริยาระหว่าง C_2:$FMNH^-$ กับออกซิเจนที่พีเอชต่างๆ ซึ่งทำการศึกษาโดยเทคนิค stopped-flow และ rapid-quench-flow ในกรณีที่ไม่มีสารตั้งต้นค่าคงที่อัตราของปฏิกิริยาการสร้าง C4a-hydroperoxy-FMN (~1.1 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$) ไม่ได้รับผลกระทบในช่วงพีเอช 6.2-9.9 ซึ่งบ่งชี้ว่า pK_a ของ reduced FMN ในรูปที่จับอยู่กับเอนไซม์มีค่าน้อยกว่า 6.2 ค่าคงที่อัตราของปฏิกิริยาการกำจัด H_2O_2 ในขั้นถัดมาเพิ่มขึ้นที่พีเอชสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่า pK_a > 9.4 ในกรณีที่มีสารตั้งต้น HPA ค่าคงที่อัตราสำหรับปฏิกิริยาการสร้าง C4a-hydroperoxy-FMN (~4.8 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$) และของปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในขั้นตอนต่อมา (15-17 s^{-1}) ไม่ได้รับผลกระทบจาก pH ในทางกลับกันในขั้นตอนของปฏิกิริยาการกำจัดน้ำของ C4a-hydroxy-FMN ได้เป็น oxidized FMN เกิดขึ้นผ่าน 2 วิถีทางที่ขึ้นกับพีเอชของปฏิกิริยา วิถีทางแรกเกิดขึ้นมากที่พีเอชต่ำ ซึ่งสามารถทำการตรวจวัดสารตัวกลาง C4a-hydroxy-FMN ที่เกิดขึ้นได้ ในขณะที่วิถีทางที่เกิดขึ้นมากในพีเอชสูงทำให้เกิด oxidized FMN โดยไม่พบการสะสมของสารตัวกลางดังกล่าว อย่างไรก็ตามทั้งสองวิถีทางเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ทำให้เกิดของเสีย H_2O_2 ในปริมาณมากที่พีเอช 6.2-9.9 การสะสมที่ลดลงของสารตัวกลางที่พีเอชสูงเกิดเนื่องจากอัตราการสลายตัวของ C4a-hydroxy-FMN ที่มากกว่า เนื่องจากไม่มีการยับยั้งของสารตั้งต้นเกิดขึ้นในขั้นตอนของปฏิกิริยาการกำจัดน้ำที่พีเอชสูง

ติดต่อขอรายละเอียดเพิ่มเติม

รูป

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

Mahidol University Research Excellence

MAHIDOL UNIVERSITY
Wisdom of the Land

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

pH-dependent studies reveal an efficient hydroxylation mechanism of the oxygenase component of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase

p-Hydroxyphenylacetate (HPA) 3-hydroxylase (HPAH) catalyzes the hydroxylation of HPA at the ortho-position to yield 3,4-dihydroxyphenylacetate. The enzyme is a flavin-dependent two-component monooxygenase that consists of a reductase component and an oxygenase component (C_2). C_2 catalyzes the hydroxylation of HPA using oxygen and reduced FMN as co-substrates. To date, the effects of pH on the oxygenation of the two-component monooxygenases have never been reported. Here, we report the reaction kinetics of C_2·$FMNH^-$ with oxygen at various pH values investigated by stopped-flow and rapid quenched-flow techniques. In the absence of HPA, the rate constant for the formation of C4a-hydroperoxy-FMN (~1.1×10^6 $M^{-1}s^{-1}$) was unaffected at pH 6.2-9.9, which indicated that the pK_a of the enzyme-bound reduced FMN was less than 6.2. The rate constant for the following H_2O_2 elimination step increased with higher pH, which is consistent with a pK_a of >9.4. In the presence of HPA, the rate constants for the formation of C4a-hydroperoxy-FMN (~4.8×10^4 $M^{-1}s^{-1}$) and the ensuing hydroxylation step (15-17 s^{-1}) were not significantly affected by the pH. In contrast, the following steps of C4a-hydroxy-FMN dehydration to form oxidized FMN occurred through two pathways that were dependent on the pH of the reaction. One pathway, dominant at low pH, allowed the detection of a C4a-hydroxy-FMN intermediate, whereas the pathway dominant at high pH produced oxidized FMN without an apparent accumulation of the intermediate. However, both pathways efficiently catalyzed hydroxylation without generating significant amounts of wasteful H_2O_2 at pH 6.2-9.9. The decreased accumulation of the intermediate at higher pH was due to the greater rates of C4a-hydroxy-FMN decay caused by the abolishment of substrate inhibition in the dehydration step at high pH.

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

Picture

Name : .....
Address : .....
.....
Tel. : .....
Email : .....