Abstract

โครงการวิจัยการศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้สารประกอบวิตามินบีสอง ที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในช่วง พ.ศ. 2551-2554 นั้นประสบความสำเร็จเป็นอย่างสูง มีผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติชั้นนำเป็นจำนวน 15 ฉบับ ผลของงานวิจัยเหล่านี้ก่อให้เกิดความเข้าใจในด้านโครงสร้างและกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พาราไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตทไฮดรอกซีเลส (*p*-hydroxyphenylacetate hydroxylase: HPAH) และไพราโนส 2-ออกซิเดส (pyranose 2-oxidase: P2O) เป็นอย่างสูง สำหรับเอนไซม์พาราไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตทไฮดรอกซีเลสซึ่งได้จากแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชั่นโดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง *ortho* ของสารตั้งต้นพาราไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตท (*p-hydroxyphenylacetate*: HPA) ทำให้ได้ 3,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตทเป็นสารผลิตภัณฑ์ จากการศึกษาด้วยวิธี fluorescence up-conversion นั้นพบว่ากลไกการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์ในส่วนเอนไซม์รีดักเตส (C_1) เป็นแบบผสมระหว่างการลดลงแบบช้าและแบบเร็ว นอกจากนั้นการศึกษาแบบจำลองการเคลื่อนไหวของโมเลกุล (molecular dynamics simulation) ควบคู่กับการเปลี่ยนแปลงหมู่แขนงข้างของกรดอะมิโนบางตำแหน่งในเอนไซม์ (site-directed mutagenesis) และการศึกษาจลนพลศาสตร์ในช่วงเวลาที่ปฏิกิริยาก่อนถึงสภาพสมดุล (transient kinetics) พบว่าหมู่แขนงข้างของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่ง 266 นั้นทำหน้าที่ควบคุมการผ่านของโมเลกุลออกซิเจนเข้าสู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ออกซีจีเนส (C_2) การศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาของส่วนเอนไซม์ออกซีจีเนสในปฏิกิริยา C_2-$FMNH^-$ กับโมเลกุลออกซิเจนที่ pH ต่างๆพบว่าในปฏิกิริยาที่ปราศจากสารตั้งต้นพาราไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตทนั้นค่าคงที่ของอัตราการเกิดสารตัวกลาง C4a-hydroperoxy-FMN มีค่า ~1.1×10^6 $M^{-1}s^{-1}$ และคงที่ตลอดช่วง pH 6.2-9.9 ขณะที่ค่าคงที่ของอัตราการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากการสลายตัวของสารตัวกลางในขั้นตอนต่อมาของปฏิกิริยาจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้นและมีค่า pKa มากกว่า 9.4 สำหรับปฏิกิริยาที่มีสารตั้งต้นพาราไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตทร่วมอยู่ด้วยนั้น ค่าคงที่ของอัตราการเกิดสารตัวกลาง C4a-hydroperoxy-FMN มีค่า ~4.8×10^4 $M^{-1}s^{-1}$ และค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชั่นซึ่งเป็นขั้นตอนถัดมา มีค่า 15-17 s^{-1} และคงที่ในช่วง pH 6.0-10.0 สำหรับเอนไซม์ไพราโนส 2-ออกซิเดสนั้นจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของน้ำตาล D-glucose หรือน้ำตาลตัวอื่นๆในกลุ่มไพราโนสที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 ได้ 2-keto sugar เป็นสารผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาจากการเร่งด้วยเอนไซม์ไพราโนส 2-ออกซิเดสถือได้ว่าเป็นปฏิกิริยาที่มีประโยชน์ในด้านการสังเคราะห์สารประกอบในกลุ่มคาร์โบไฮเดรท เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ 2-keto sugar สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีประโยชน์ตัวอื่นได้ต่อไป จากการศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ไพราโนส 2-ออกซิเดส เราได้ค้นพบสารตัวกลาง C4a-hydroperoxyflavin ซึ่งเป็นการรายงานการเกิดสารตัวกลางของเอนไซม์ในกลุ่ม flavoprotein oxidase

เป็นครั้งแรก และจากการศึกษาปฏิกิริยาฟลาวินรีดักชั่นด้วยสารตั้งต้น D-glucose และ D-galactose ของเอนไซม์ที่มีการเปลี่ยนแปลงหมู่แขนงที่กรดอะมิโนทรีโอนีนตำแหน่ง 169 (T169) เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ปกติ พบว่าเอนไซม์ที่มีการเปลี่ยนแปลงหมู่แขนงที่กรดอะมิโนทรีโอนีนตำแหน่ง 169 เป็นกรดอะมิโนเซอรีน (T169S) นั้น พบว่าอันตรกิริยาระหว่าง N5 ของฟลาวินกับหมู่แขนงข้างของกรดอะมิโนเซอรีนที่ตำแหน่ง 169 ซึ่งมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาฟลาวินรีดักชั่นและออกซิเดชั่น

Our research supported by TRF during 2008-2011 has focused on studying p-hydroxyphenylacetate (HPA) hydroxylase (HPAH) and pyranose oxidase (P2O). Overall, the project was very successful. We have obtained 15 publications in leading international journals. These research output have contributed significantly to the understanding of in-depth mechanistic and structural aspects controlling catalysis in *p*-hydroxyphenylacetate hydroxylase (HPAH) and pyranose 2-oxidase (P2O). *p*-Hydroxyphenylacetate hydroxylase (HPAH) from *Acinetobacter baumannii* catalyzes the hydroxylation of *p*-hydroxyphenylacetate (HPA) at the ortho-position to yield 3,4-dihydroxyphenylacetate. Based on the fluorescence up-conversion method, kinetics of fluorescence decay of the reductase component is a mixture of fast and slow decays. We have used molecular dynamics simulations, site-directed mutagenesis and transient kinetics to demonstrate that the residue F266 is a gating residue controlling oxygen diffusion to the active site. The reaction kinetics of C_2:$FMNH^-$ with oxygen at various pHs indicates that in the absence of HPA, the rate constant for the formation of C4a-hydroperoxy-FMN (~1.1 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$) is unaffected at pH 6.2 - 9.9 while the rate constant for the following H_2O_2 elimination step increases with higher pH, which is consistent with a pKa >9.4. In the presence of HPA, the rate constants for the formation of C4a-hydroperoxy-FMN (~4.8 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$) and the ensuing hydroxylation step (15-17 s^{-1}) are not significantly affected by pH. The enzyme efficiently catalyzes hydroxylation without generating significant amounts of wasteful H_2O_2 at pH 6.2-9.9. P2O catalyzes oxidation of D-glucose or other pyranoses at the C2 position, resulting in the corresponding 2-keto sugars as products. The reaction catalyzed by P2O is regarded as one of the most useful types for carbohydrate syntheses because 2-keto-sugars can be used in chiral syntheses of valuable compounds. One of our major findings of this project is the detection, for the first time, of a C4a-hydroperoxy flavin intermediate in the reaction of flavoprotein oxidase. The reduction of the enzyme-bound FAD of T169 mutants by D-glucose and D-galactose was investigated and compared with the wild-type enzyme. The results have shown the interaction of flavin N5 with the side chain of T169S is important for reductive and oxidative half-reactions.

Keywords: Flavin, Flavoprotein, hydroxylase, monooxygenase, reducatse, hydroxyphenylacetate, pre-steady state kinetics, enzyme mechanism, enzyme kinetics.

Executive summary for *p*-Hydroxyphenylacetate hydroxylase (HPAH) project

Background and Introduction

Two-component monooxygenases are flavin-dependent enzymes that have been identified mostly during the past decade. These enzymes have emerged as common enzymes in nature that are involved in many important reactions in various microorganisms including oxygenation and halogenation of organic compounds. p-Hydroxyphenylacetate hydroxylase (HPAH) from *Acinetobacter baumannii* catalyzes the hydroxylation of p-hydroxyphenylacetate (HPA) at the ortho-position to yield 3,4-dihydroxyphenylacetate. The enzyme is by far the most studied two-component flavin-dependent monooxygenase. It consists of a smaller reductase component (C_1), which contains FMN as a cofactor, and a larger oxygenase component (C_2), which has no cofactor bound and employs reduced FMN (FMNH-) as a substrate for the hydroxylation of HPA. The transfer of the reduced flavin from the reductase to the oxygenase occurs efficiently via a simple diffusion. Based on the X-ray structure of C_2, the active site of C_2 contains a few catalytic residues, which comprise dissociable protons. These residues are in the proper vicinity to participate in the hydroxylation reaction.

Materials & Methods

Insights into the reaction mechanism of HPAH were investigated by pH-dependent studies and site-directed mutagenesis. Transient kinetics of the reductase and oxygenase were investigated using stopped-flow and rapid quench flow techniques.