บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380240

ชื่อโครงการ:การศึกษากลไกปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลไพแรนโนสในปฏิกิริยาของเอนไซม์ Pyranose 2-oxidase จาก *Trametes multicolor*

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน จีรัสย์ สุจริตกุล[1] ธัญญาพร วงศ์เนตร[2] พิมพ์ใจ ใจเย็น[2]
[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวทยาลัยมหิดล
อีเมล์: Jeerus.s@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิถุนายน 2553 -15 มิถุนายน 2555

บทคัดย่อ: สารตัวกลาง (intermediate) C4a-hydroperoxyflavin เป็นสารที่พบในการเร่งปฏิกิริยา oxidative half-reaction ของเอนไซม์ในกลุ่ม flavin-dependent monooxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี FAD (flavin adenine dinucleotide) เป็น cofactor สาร intermediate ดังกล่าวมีความสำคัญต่อการเติม oxygen atom ให้แก่สาร aromatic substrate ในขั้นปฏิกิริยา hydroxylation โดยอาศัย oxygen จากอากาศ ในลักษณะเดียวกันกับเอนไซม์ในกลุ่ม flavoprotein oxidase ซึ่งมี FAD เป็น cofactor เช่นเดียวกัน เป็นที่เชื่อกันมานานว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้แยกจากกลุ่มของเอนไซม์ในกลุ่ม flavin-dependent monooxygenase เนื่องจากไม่ปรากฏการเกิด intermediate C4a-hydroperoxyflavin ใน catalytic reaction ในการศึกษากลไกปฏิกิริยาของเอนไซม์ pyranose 2-oxidase พบว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม flavoprotein oxidase ตัวแรกที่มีการเกิด intermediate C4a-hydroperoxyflavin ((Sucharitakul, J., Prongjit, M., Haltrich, D., and Chaiyen P. (2008) Biochemistry 47, 8485-8490) pyroanose 2-oxidase เป็นนเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด oxidation ของ D-glucose ที่ C2 ใน pyroanose ring ให้เป็น 2-keto-D-glucose โดย electron จาก D-glucose จะถูก transfer ไปยัง FAD cofactor เรียกปฏิกิริยานี้ว่า reductive half-reaction ในขั้นถัดมา electron จาก FAD cofactor จากถูก transfer ไปยัง oxygen แลเปลี่ยนเป็น H2O2 ในการศึกษานี้จะใช้ solvent kinetic isotope effect (SKIE) ในการศึกษากลไกปฏิกิริยา oxidative half-reaction โดยการทำปฏิกิริยาดังกล่าวใน D2O (deuteroxide) แทนที่ H_2O จากผลที่ได้พบว่า D_2O ไม่มีผลต่อ rate constant ขั้นการเกิด intermediate C4a-hydroperoxyflavin มีผลต่อเฉพาะในขั้นการสลาย (decay) ตัวของ intermediate เท่านั้น และเป็นขั้นตอนเดียวกันกับการเกิด elimination ของ hydroperoxy group ของ C4a-hydroperoxyflavin intermediate ไปเป็น H_2O_2 ผลของ D_2O ดังกล่าวทำให้ rate

constant ในการสลาย intermediate ช้าลงเมื่อเทียบกับ rate constant ของการสลาย intermediate ใน H_2O เป็น 2.8 $\pm$ 0.2 เท่า เมื่อศึกษาโดยการใช้ proton inventory เพื่อหาจำนวน proton (proton number) ที่เกี่ยวข้องให้เกิด SKIE พบว่า rate constant ของการสลาย intermediate ลดลงตามสัดส่วนของ deuterium mole atom fraction (D/H) ในลักษณะ linear dependent บ่งชี้ว่า จำนวน proton นั้นมีเพียงหนึ่ง proton เท่านั้นที่เกี่ยวข้องในการเกิด elimination ของ hydroperoxy group ของ C4a-hydroperoxyflavin intermediate ไปเป็น H_2O_2 นอกจากนี้การใช้ deuterium labeled ที่ atom ของ nitrogen ที่ N5 ของ flavin ring ใน enzyme โดยใช้ double-mixing stopped-flow spectrophotometer ด้วยการผสม oxidized enzyme กับ 2-deuterated-D-glucose ในขั้นแรก (first mixing) ซึ่งมีผลทำให้ deuterium atom ที่อยู่ที่ C2-D ของ 2-deuterated-D-glucose ไปอยู่ที่ตำแหน่ง N5 ของ flavin ring เกิดเป็น N5-D ผ่านทาง hydride transfer ของปฏิกิริยา reductive half-reaction จากนั้นในขั้นที่สอง (second mixing) reduced enzyme ซึ่งมี N5-D อยู่ที่ flavin ring จะถูก reoxidized โดยการผสมกับ oxygen buffer เพื่อทำให้เกิด C4a-hydroperoxyflavin intermediate ผลปรากฏว่า isotope effect rate constant ในการสลาย intermediate ช้าลงให้ผลเหมือนกับปฏิกิริยาใน D_2O ทำให้สรุปได้ว่า กระบวนการเกิด elimination ของ hydroperoxy group ของ C4a-hydroperoxyflavin intermediate ไปเป็น H_2O_2 เริ่มเกิดจากการสลาย H atom ของ N5-H (หรือ deprotonation ที่ N5) และ เป็น proton เดียวกันกับที่ทำให้เกิด elimination ไปเป็น H_2O_2

คำหลัก : pyranose 2-oxidase, flavoprotein oxidase, flavin, rapid kinetics, solvent isotope effect (SKIE)

Abstract

Project Code : MRG5380240

Project Title : Probing mechanisms of pyranose oxidation in the reactions of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor*

Investigator : Jeerus Sucharitakul Tunyaporn Womgnate Pimchai Chaiyen

E-mail Address : Jeerus.s@chula.ac.th

Project Period : 15 june 2010 -15 june 2012

Abstract: C4a-hydroperoxy-flavin is commonly found in the reactions of flavin-dependent monooxygenases, in which it plays a key role as an intermediate that incorporates an oxygen atom into substrates. Although its role in monooxygenase reactions has been well established, only recently has evidence for its involvement in the reactions of flavoprotein oxidases been reported. Previous studies of pyranose 2-oxidase (P2O), an enzyme catalyzing the oxidation of pyranoses using oxygen as an electron acceptor to generate oxidized sugars and hydrogen peroxide (H2O2), have shown that C4a-hydroperoxy-flavin forms in P2O reactions before it eliminates H2O2 as a product [Sucharitakul, J., Prongjit, M., Haltrich, D., and Chaiyen, P. (2008) Biochemistry 47, 8485-8490]. In this report, the solvent kinetic isotope effects (SKIE) on the reaction of reduced P2O with oxygen were investigated using transient kinetics. Our results showed that D2O has a negligible effect on the formation of C4a-hydroperoxy-flavin. The ensuing step of H2O2 elimination from C4a-hydroperoxy-flavin was shown to be modulated by an SKIE of 2.8 $\pm$ 0.2, and a proton inventory analysis of this step indicates a linear plot. These data suggest that a single-proton transfer process causes SKIE at the H2O2 elimination step. Double and single-mixing stopped-flow experiments performed in H2O buffer revealed that reduced flavin specifically labeled with deuterium at the flavin N5-position generated kinetic isotope effects similar to those found with experiments performed with the enzyme pre-equilibrated in D2O buffer. This suggests that the proton at the flavin N5 position is responsible for the SKIE and is the proton-in-flight that is transferred during the transition state. The mechanism of H2O2 elimination from C4a-hydroperoxy-flavin is consistent with a single proton transfer from the flavin N5

to the peroxide leaving group, possibly via the formation of an intra-molecular hydrogen bridge.

Keywords : pyranose 2-oxidase, flavoprotein oxidase, flavin, rapid kinetics, solvent isotope effect (SKIE)