

Abstract/บทคัดย่อ**Project Code :** MRG5580066**Project Title :** การศึกษากลไกทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ glycerol 3-phosphate oxidase จากเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae*
(Kinetic studies of glycerol 3-phosphate oxidase from *Mycoplasma pneumoniae*)**Investigator :** นายสมชาติ แม่นปิ่น**E-mail Address :** somchart@buu.ac.th**Project Period :** 2 ก.ค. 2555 - 2 ก.ค. 2557**Abstract**

L- α -glycerophosphate oxidase is an FAD-dependent enzyme that catalyzes the oxidation of L- α -glycerophosphate (Glp) by molecular oxygen to generate dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and hydrogen peroxide (H_2O_2). The catalytic properties of the recombinant His₆-GlpO from *Mycoplasma pneumoniae* (His₆-MpGlpO) were investigated with transient and steady-state kinetics and ligand binding. The results indicate that the reaction mechanism of His₆-MpGlpO follows a ping-pong model. Double-mixing stopped-flow experiments show that after flavin-mediated substrate oxidation, DHAP leaves rapidly prior to the oxygen reaction. The values of the individual rate constants and k_{cat} ($4.2\ s^{-1}$ at $4\ ^\circ C$) determined, in addition to the finding that H_2O_2 can bind to the oxidized enzyme suggest that H_2O_2 release is the rate-limiting step for the overall reaction. Results indicate that His₆-MpGlpO contains mixed populations of fast and slow reacting species. Only the fast reacting species predominantly participates in turnovers. Different from other GlpO enzymes previously reported, His₆-MpGlpO can catalyze the reverse reaction of reduced enzyme and DHAP. This result can be explained by the standard reduction potential value of His₆-MpGlpO ($-167 \pm 1\ mV$), which is lower than those of GlpO from other species. We found that DL-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) can be used as a substrate in the His₆-MpGlpO reaction, although it exhibited a ~100-fold lower k_{cat} value in comparison to the reaction of Glp. These results also imply the involvement of GlpO in glycolysis, as well as in lipid and glycerol metabolism. The kinetic models and distinctive properties of His₆-MpGlpO reported here should be useful for future studies of drug development against *Mycoplasma pneumoniae* infection.

บทคัดย่อ

เอนไซม์กลีเซอรอโฟสเฟตออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีโคแฟกเตอร์เป็น FAD ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของกลีเซอรอโฟสเฟตโดยออกซิเจนเพื่อสร้างเป็นไดไฮดรอกซีอะซีโตนฟอสเฟตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในรายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ของกลีเซอรอโฟสเฟตออกซิเดสจากเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* ซึ่งก่อให้เกิดโรคปอดอักเสบ โดยใช้เทคนิคต่างๆ ได้แก่ จลนศาสตร์ที่สภาวะก่อนคงตัว และที่สภาวะคงตัว รวมทั้งการจับกันของเอนไซม์กับสารที่เป็นลิแกนด์ ซึ่งผลจากการศึกษาทำให้ทราบว่ากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้มีรูปแบบเป็น ping-pong mechanism โดยยืนยันผลการทดลองที่ได้นี้ด้วยเทคนิค double-mixing stopped-flow spectrophotometry ซึ่งทำให้พบว่าสารผลิตภัณฑ์ไดไฮดรอกซีอะซีโตนฟอสเฟตที่เกิดขึ้นหลังจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นกลีเซอรอโฟสเฟตนั้นจะหลุดออกมาจากบริเวณเร่งของเอนไซม์ก่อนที่เอนไซม์ที่อยู่ในรูปรีดิวซ์จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ผลการศึกษายังทำให้ค้นพบว่า ขั้นตอนอัตราเร็วของปฏิกิริยานั้นเป็นขั้นตอนการปล่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งมีค่าคงที่อัตราของการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 4.2 ต่อวินาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นผลการศึกษาเชิงลึกยังทำให้ทราบว่าเอนไซม์นี้มีอยู่ด้วยกัน 2 กลุ่มที่ผสมกันอยู่โดยกลุ่มหนึ่งนั้นทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้เร็วในขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งทำปฏิกิริยาได้ช้ากว่า และเป็นกลุ่มที่ทำปฏิกิริยาได้เร็วเท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ที่น่าสนใจยิ่งกว่านั้นก็คือเอนไซม์ที่อยู่ในรูปรีดิวซ์นี้สามารถทำปฏิกิริยาย้อนกลับกับสารผลิตภัณฑ์ไดไฮดรอกซีอะซีโตนฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ได้เป็นกลีเซอรอโฟสเฟตและเอนไซม์ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ได้ นั้นแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติอุณหพลศาสตร์ของเอนไซม์ โดยพบว่าเอนไซม์นี้มีศักย์ไฟฟ้าของครึ่งปฏิกิริยารีดักชันเท่ากับ -167 ± 1 มิลลิโวลต์ ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ได้จากเอนไซม์นี้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น การศึกษาค้นคว้ายังทำให้พบอีกว่าเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาโดยใช้กลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟตเป็นสารตั้งต้นได้อีกด้วยถึงแม้ว่าปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าการใช้กลีเซอรอโฟสเฟตเป็นสารตั้งต้น ซึ่งจากผลการทดลองนี้เองที่ทำให้เห็นความเชื่อมโยงของเอนไซม์กลีเซอรอโฟสเฟตออกซิเดสกับกระบวนการไกลโคไลซิสรวมทั้งเมทาบอลิซึมของลิพิดและกลีเซอรอล ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้นี้น่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาในอนาคตเพื่อการพัฒนาตัวยาสำหรับการต้านเชื้อโรคปอดอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae*

Keywords : L- α -glycerophosphateoxidase; flavoproteinoxidase; flavin adenine dinucleotide (FAD); transient kinetics; *Mycoplasma pneumoniae*