ว.วิทย. มข. 41(3) 582-594 (2556) KKU Sci. J. 41(3) 582-594 (2013)

การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโดยเอนไซม์ไกลโคสิเดส: ทัศนะเชิงกลไกและการประยุกต์ใช้

Carbohydrate Hydrolysis by Glycosidase: Mechanistic Aspects and Applications

จิตระยุทธ์ จิตอ่อนน้อม[1]

บทคัดย่อ

การศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์ไกลโคสิเดส ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา สะท้อนให้เห็นว่าเอนไซม์ไกลโคสิเดสหลายชนิด มีกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่มีความน่าสนใจและแตกต่างไปจากกลไกแบบเดิมที่เคยรู้จัก ได้แก่ กลไกที่มีสับสเตรทเป็นตัวช่วย กลไกที่ใช้เบสจากภายนอก กลไกที่อาศัยนิวคลีโอไฟล์ชนิดอื่น และกลไกที่อาศัยโคแฟคเตอร์ เหตุผลหลักของการเกิดรูปแบบพิเศษของกลไกดังกล่าว คือความหลากหลายของกรดอะมิโนตำแหน่งสำคัญที่ทำหน้าที่เป็นเบสหรือตัวนิวคลีโอไฟล์ของปฏิกิริยา และเมื่อตำแหน่งนี้เกิดการกลายพันธุ์ จะส่งผลอย่างชัดเจนต่อความสามารถในการยึดจับกับสับสเตรท จนสามารถทำให้ได้เอนไซม์สายพันธุ์ใหม่ที่ให้กัมมันตภาพดีขึ้น หลักการนี้เมื่อนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านวิศวกรรมโปรตีน จะสามารถออกแบบและสร้างโปรตีนให้มีคุณสมบัติเฉพาะ และมีประสิทธิภาพสูงได้ ดังนั้นความเข้าใจในกลไกการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ โดยเฉพาะความหลากหลายของกลไกการเร่งปฏิกิริยารูปแบบต่าง ๆ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งและได้ทบทวนไว้ในรายงานครั้งนี้

[1]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา 56000

E-mail: jitrayut.018@gmail.com

ABSTRACT

Recent studies of the carbohydrate hydrolysis by glycosidase (GH) have shown that a number of GH families undergo various unusual mechanisms, which differ from the known classical mechanisms, including substrate-assisted catalysis, exogenous bases, alternative nucleophiles and NAD-dependent hydrolysis. The main reason for such specific mechanisms is the diversity of key amino acids, which function as a catalytic base/nucleophile. Mutation of the catalytic base/nucleophile can have a profound impact on substrate specificity, producing enzymes with new function roles and better activity. This principle can be applied in protein engineering for the design and synthesis of proteins with specific properties and high efficiency. Gaining the knowledge of GH mechanism, especially the catalytic diversity, is thus crucial and has been updated in this review.

คำสำคัญ: ไกลโคสิเดส กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ตัวเร่งชนิดเบส ตัวนิวคลีโอไฟล์ การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต

Keywords: Glycosidase, Enzyme mechanism, Catalytic base, Nucleophile, Carbohydrate degradation

บทนำ

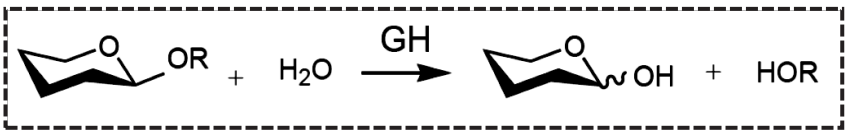
สารประกอบคาร์โบไฮเดรตจัดเป็นชีวโมเลกุลที่มีปริมาณมากที่สุดในธรรมชาติ ซึ่งได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในสิ่งมีชีวิตบางจำพวก (เช่น พืช) สามารถเปลี่ยนพลังงานในรูปของแสงอาทิตย์มาเป็นพลังงานเคมีได้ โดยการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศมาสังเคราะห์เป็นโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต คาร์โบไฮเดรตนั้น มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อสิ่งมีชีวิต เป็นสารชีวโมเลกุลที่เก็บพลังงาน เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ หรือสารที่เคลือบอยู่บนเซลล์ นอกจากนี้อนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตยังพบร่วมกับสารชีวโมเลกุลชนิดอื่น ๆ เช่น โคเอนไซม์ กรดนิวคลีอิค เป็นต้น กล่าวคือ พลังงานจะถูกสะสมไว้ในรูปของแป้งและน้ำตาล เมื่อถูกออกซิไดซ์จะให้พลังงานออกมา เพื่อไปขับเคลื่อนเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ในสัตว์และพืช รวมทั้งในร่างกายของมนุษย์ ปกติคาร์โบไฮเดรตจัดเป็นหนึ่งในสารอาหารหลัก 5 หมู่ ที่จำเป็นต่อร่างกายในแต่ละวัน โดยเมื่อรับประทานอาหารจำพวกแป้งเข้าไป แป้งจะถูกย่อยครั้งแรกในปาก โดยเอนไซม์ที่มีชื่อว่า อะไมเลส ในขั้นตอนการนี้ การย่อยยังไม่สมบูรณ์ เป็นเพียงการลดขนาดของโมเลกุลแป้งเท่านั้น การย่อยแป้งยังคงดำเนินต่อไปที่กระเพาะอาหารและลำไส้ โดยมีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาช่วยย่อยแป้งให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลงจนสามารถดูดซึมได้ ถึงแม้ว่ากระบวนการนี้เป็นที่รู้จักกันดีโดยทั่วไป แต่มีคำถามที่หลายคนไม่เคยรู้มาก่อนว่า *“เอนไซม์มีกระบวนการอย่างไรในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลในระดับโมเลกุล”* ซึ่งเป็นคำถามที่นักวิทยาศาสตร์พยายามหาคำตอบ โดยเฉพาะการอธิบายถึงที่มาว่าทำไมเอนไซม์ ถึงมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาเคมีอย่างจำเพาะเจาะจง หลายคนอาจจะยังไม่ทราบถึงเบื้องหลังการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งมีวิธีการอันชาญ-

ฉลาดในการจัดการกับโมเลกุลของแป้งและน้ำตาล รวมถึงความซับซ้อนทางโครงสร้างของน้ำตาลเองที่มีผลต่อกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน เอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต คือเอนไซม์ไกลโคสิเดส (glycosidase, GH) เป็นเอนไซม์ที่มีความหลากหลายในลำดับกรดอะมิโน และพบได้ทั่วไปในทุกๆสิ่งมีชีวิต งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเคมีของเอนไซม์ไกลโคสิเดส (glycosidase chemistry) ส่วนใหญ่จะให้ความสำคัญกับการหาโครงสร้างทางเคมีของสารเชิงซ้อน oxocarbenium ion ที่สภาวะทรานซิชัน (Vocadlo and Davies, 2008) และกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่เกิดผ่านโครงสร้างดังกล่าว

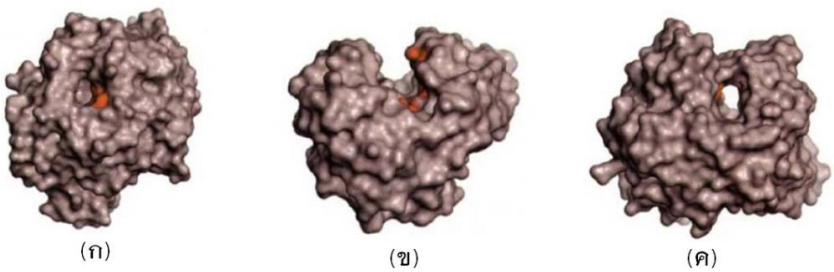
เอนไซม์ไกลโคสิเดส

เอนไซม์ไกลโคสิเดส ย่อยสลายโมเลกุลน้ำตาลด้วยปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (hydrolysis) ดังรูปที่ 1 โดยการทำลายพันธะไกลโคสิดิก (glycosidic bond) ซึ่งเชื่อมน้ำตาลสองหน่วยโมเลกุลให้หลุดออกจากกัน พันธะไกลโคสิดิกดังกล่าว จัดเป็นพันธะโควาเลนต์ที่มีความแข็งแรงมากในธรรมชาติ โดยหากปล่อยให้โมเลกุลคาร์โบไฮเดรตสลายด้วยตัวเอง พบว่าอาจต้องใช้เวลานับล้านปี แต่เอนไซม์ไกลโคสิเดส สามารถเร่งปฏิกิริยานี้ได้ถึง 10^{17} เท่า (Wolfenden et al., 1998) ด้วยเหตุนี้เองทำให้เอนไซม์ไกลโคสิเดส จัดเป็นหนึ่งในตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ปัจจุบันเอนไซม์ไกลโคสิเดส สามารถจำแนกออกได้มากกว่า 130 ชนิดด้วยกัน ตามลักษณะความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโน (sequence-based classification) (Henrissat, 1991; Henrissat and Davies, 1997) ดังปรากฏในฐานข้อมูล carbohydrate active enzymes (CAZy) (http://www.cazy.org/) (Cantarel et al., 2009)

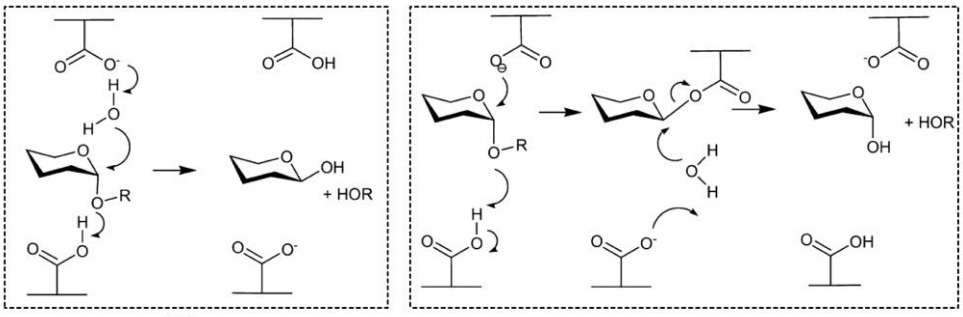
การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคสิเดส จะเริ่มจากการเข้ายึดจับกับสับสเตรทอย่างจำเพาะเจาะจง โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีลักษณะของตำแหน่งยึดจับที่แตกต่างกันทำให้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่ต่างกัน สำหรับเอนไซม์ไกลโคสิเดสนั้น พบว่ามีลักษณะทางโครงสร้างแตกต่างกันอยู่ 3 แบบ ได้แก่ pocket cleft และ tunnel (ดังรูปที่ 2) หลังจากที่เอนไซม์และสับสเตรทเข้าจับกันอย่างเหมาะสมแล้ว กลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมีจึงเริ่มทำงาน



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นในเอนไซม์ GH เมื่อ R แทนหมู่ leaving group



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ GH ซึ่งมีลักษณะของตำแหน่งยึดจับที่แตกต่างกัน ได้แก่ pocket (ก) cleft (ข) และ tunnel (ค) (ที่มา: Davies and Henrissat, 1995)



(ก) (ข)

รูปที่ 3 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ inverting (ก) และ retaining (ข) ของเอนไซม์ GH (ดัดแปลงจาก Gloster et al., 2008)

ลักษณะทั่วไปของกลไกการเร่งปฏิกิริยาในเอนไซม์ไกลโคสิเดส

ถึงแม้ว่าเอนไซม์ไกลโคสิเดส จะมีความหลากหลายมากถึง 130 ชนิด แต่กลับพบเพียง 2 กลไกเท่านั้น ที่เอนไซม์ชนิดนี้ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเคมี นั่นคือกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ inverting และ retaining (ดังรูปที่ 3) โดยกลไกทั้งสองนี้ต่างกันที่สเตอริโอเคมี (stereochemistry) ของปฏิกิริยา ซึ่งค้นพบโดย Dan Koshland (Koshland, 1953) โดยจะพิจารณาจากตำแหน่ง anomeric configuration ของสารผลิตภัณฑ์ เทียบกับสารตั้งต้น โดยทั่วไปพบว่ามีกรดอะมิโนเพียง 2 ตัวเท่านั้น ที่มีหมู่คาร์บอกซีเลต (ได้แก่ Asp หรือ Glu) ทำหน้าที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาตัวหนึ่งจะให้และรับโปรตอน อีกตัวหนึ่งจะเป็นตัวนิวคลีโอไฟล์ โดยรายละเอียดกลไกการเร่งปฏิกิริยาของแต่ละแบบมีดังนี้

กลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ inverting

เป็นปฏิกิริยาขั้นตอนเดียวที่เกิดผ่านสารก่อกัมมันต์ เรียกว่า oxocarbenium ion-like transition states และจะไม่ปรากฏสารมัธยันตร์ใด ๆ ในปฏิกิริยา ขณะเกิดปฏิกิริยาจะมีกรดอะมิโนสองตัวที่มีหมู่คาร์บอกซีเลต ซึ่งอยู่ห่างกันประมาณ 10 Å ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยกรดอะมิโนตัวที่หนึ่งจะทำหน้าที่เป็นกรด (general acid) คอยให้โปรตอนแก่ออกซิเจนอะตอมของหมู่ leaving group (HOR) ขณะที่กรดอะมิโนตัวที่สองซึ่งมีหน้าที่เป็นเบส (general base) จะรับโปรตอนหนึ่งตัวจากโมเลกุลน้ำที่อยู่ใกล้ทำให้ได้โมเลกุลน้ำนี้ ในรูปไอออนไฮดรอกไซด์ (OH^-) ที่มีสมบัติเป็นตัวนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) และพร้อมเข้าทำปฏิกิริยากับวงแหวน pyranose ที่ตำแหน่งคาร์บอน anomeric ทันที จนได้ผลิตภัณฑ์ออกมา โดยหมู่ leaving group จะเกิดการย้ายจากตำแหน่ง equatorial มาเป็นตำแหน่ง eclipse (ดังรูปที่ 1ก) หรืออาจย้ายจาก eclipse มาเป็น equatorial ได้เช่นกัน

กลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ retaining

เป็นปฏิกิริยาสองขั้นตอน โดยแต่ละขั้นตอนจะเกิดผ่านสารก่อกัมมันต์ เรียกว่า oxocarbenium ion-like transition states ขณะเกิดปฏิกิริยา จะมีกรดอะมิโนสองตัวที่มีหมู่คาร์บอกซีเลต ซึ่งอยู่ห่างกันประมาณ 5.5 Å คอยทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเช่นเดียวกับกลไกแบบ inverting แต่มีข้อแตกต่างกันคือ จะเกิดสารมัธยันตร์ขึ้นในขั้นแรก (glycosylation) เรียกว่า covalent enzyme-glycosyl intermediate โดยกรดอะมิโนตัวที่หนึ่งจะทำหน้าที่เป็นเบส (general

base) คอยให้โปรตอนแก่ออกซิเจนอะตอมของหมู่ leaving group ในขั้นตอนแรก และจะรับโปรตอนจากโมเลกุลน้ำที่อยู่ใกล้ ส่วนกรดอะมิโนตัวที่สองจะทำหน้าที่เป็นตัวนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) คอยสร้างพันธะโควาเลนต์กับอะตอมคาร์บอนที่ตำแหน่ง anomeric บนวงแหวนของน้ำตาล pyranose ในขั้นตอนที่สอง (เรียกว่า deglycosylation) จะเกิดการสลายตัวของสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนแรก โดยกรดอะมิโนที่เคยทำหน้าที่เป็นเบส จะทำหน้าที่เป็นกรดคอยรับโปรตอนจากโมเลกุลน้ำ ทำให้โมเลกุลน้ำนี้ในรูปไอออนไฮดรอกไซด์ เกิดการแทนที่ที่ตำแหน่งคาร์บอน anomeric และได้ผลิตภัณฑ์หลุดออกมาจากบริเวณเร่ง

ลักษณะเฉพาะของกลไกการเร่งปฏิกิริยาในเอนไซม์ไกลโคสิเดสบางชนิด

เนื่องจากมีผลการศึกษาค้นคว้าวิจัยได้แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่ปกติเคยทำหน้าเป็นตัวนิวคลีโอไฟล์ อาจไม่มีบทบาทใด ๆ ในการเร่งปฏิกิริยาในเอนไซม์ไกลโคสิเดสบางชนิด แต่มีรูปแบบกลไกที่แตกต่างไป และพบได้ยากในธรรมชาติ อีกทั้งยังพบว่ากลไกแบบนี้ มีความหลากหลายของตัวนิวคลีโอไฟล์และตัวรับโปรตอน (general base) ได้มากกว่ากลไกแบบ inverting (Vuong and Wilson, 2010) โดยมีรูปแบบพิเศษของการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ประเภทนี้ ดังนี้

1. กลไกที่มีสับสเตรทเป็นตัวช่วย (substrate-assisted mechanism)

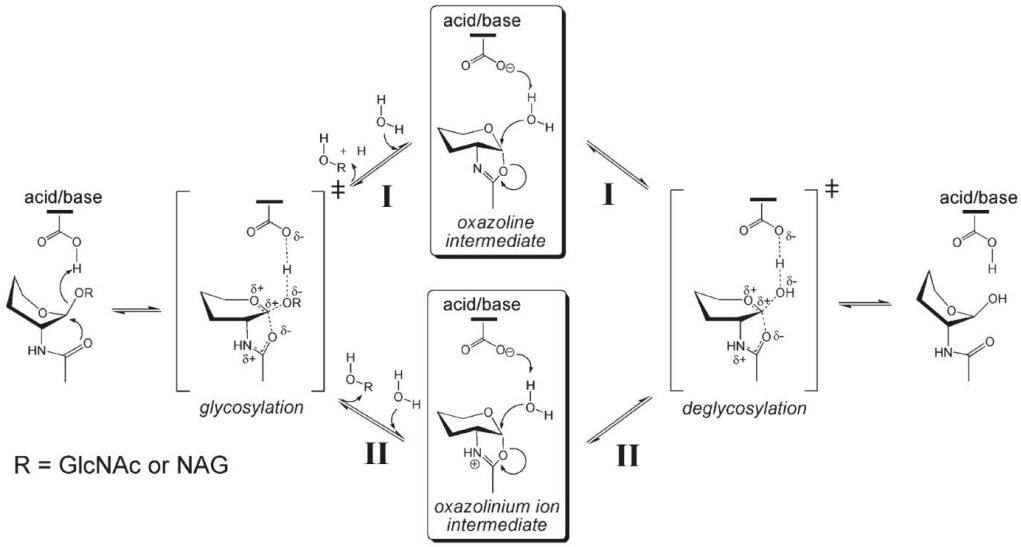
จัดเป็นกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่มีรูปแบบพิเศษเนื่องจากอาศัยสับสเตรทเป็นตัวนิวคลีโอไฟล์แทนกรดอะมิโน และทำงานควบคู่ไปกับการให้และรับโปรตอนของกรดอะมิโนชนิดกรดและเบส (general acid/base) ในระหว่างเกิดปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 4 กลไกแบบนี้จะพบได้กับเอนไซม์บางกลุ่มที่มีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทที่มีหมู่ *N*-acetyl ยึดต่อกับตำแหน่ง C2 ของอะตอมคาร์บอนภายในวงแหวนน้ำตาลไพราโนส (หรืออาจเรียกหมู่สำคัญนี้ว่า C2-acetamido) ปัจจุบันพบหลักฐานการใช้กลไกชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น ส่วนใหญ่พบในเอนไซม์ไกลโคสิเดสจากหลากหลายตระกูล ได้แก่ GH18 chitinases (Van Aalten et al., 2001; Jitonnom et al., 2011), GH20 chitobiase และ hexosaminidases (Drouillard et al., 1997; Mark et al., 2001), GH25 lysozyme (Martinez-Fleites et al., 2009), GH56 hyaluronidases (Markovic-Housley et al., 2000), GH84 *O*-GlcNAcases (Macauley et al., 2005; Bottoni et al., 2011), GH85 *endo*-β-*N*-acetylglucosaminidases (Abbott et al., 2009) และ GH103 lytic transglycosylases (Reid et al., 2007) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้มีการค้นพบว่ากลไกประเภทนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในกลุ่มของเอนไซม์ไกลโคซิลทรานเฟอเรส (glycosyltransferase) เช่นกัน (Tvaroska et al., 2012) สำหรับกลไกการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโดยอาศัยสับสเตรทช่วยนั้น จะเริ่มจากการให้โปรตอนของกรดอะมิโนแก่ออกซิเจนอะตอมของพันธะไกลโคสิดิก ซึ่งจะช่วยให้ปฏิกิริยาแทนที่ที่ตำแหน่ง anomeric carbon ของหมู่ C2-acetamido เกิดขึ้นได้ จนเกิดเป็นสารมัธยันตร์ที่มีลักษณะเป็นวงแหวนปิดสองวง (bicyclic intermediate) ดังรูปที่ 4 และพบว่าสามารถเกิดสารมัธยันตร์ได้ 2 แบบ คือ oxazoline และ oxazolinium cation ซึ่งแตกต่างกันที่ประจุ เนื่องจากสารมัธยันตร์ทั้งสองมีความเสถียรต่ำ จึงต้องอาศัยหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณข้างเคียง ช่วยเพิ่มความเสถียรให้กับสารมัธยันตร์

ตัวอย่างเช่น Asp142 ของเอนไซม์ GH18 chitinases (Jitonnom et al., 2011) หรือ Asp174 ของเอนไซม์ GH84 *O*-GlcNAcases (Cetinbas et al., 2006) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีกรณีของเอนไซม์ไกลโคสิเดส ที่ถึงแม้ว่าจะสามารถย่อยสับสเตรทที่มีหมู่ C2-acetamido ได้ แต่กลับไม่พบหลักฐานของการใช้กลไกแบบนี้ในระหว่างเร่งปฏิกิริยา (Vocadlo et al., 2000; Vocadlo et al., 2001; Huet et al., 2008)

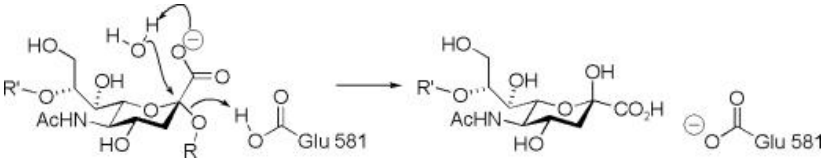
นอกจากนี้ ยังพบว่าเอนไซม์ inverting GH58 และ GH83 endosialidases ที่สกัดได้จาก bacteriophage K1F (Stummeyer et al., 2005; Morley et al., 2009) มีรูปแบบกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบอาศัยสับสเตรทที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นตัวนิวคลีโอไฟล์ ควบคู่ไปกับกรดอะมิโน Glu581 ในระหว่างเร่งปฏิกิริยาเคมี ดังรูปที่ 5

2. กลไกที่อาศัยเบสจากภายนอก (exogenous bases): Myrosinases

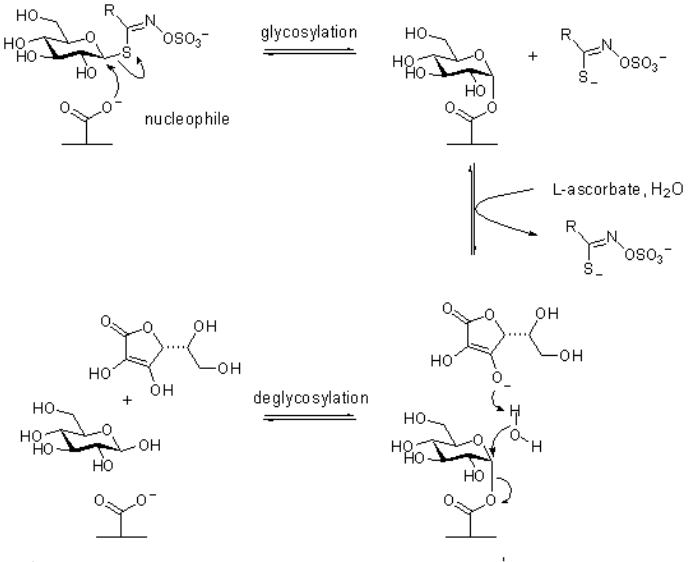
กลไกประเภทนี้ จะพบอยู่ในเอนไซม์ไมโรสิเนส (myrosinases) (Burmeister et al., 2000) ซึ่งอยู่ในไกลโคสิเดส ตระกูล 1 (GH family 1) มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำของโมเลกุล anionic thioglycosides (glucosinolates) ที่พบในพืช เอนไซม์นี้ มีรูปแบบของกลไกคล้าย ๆ กับเอนไซม์ไกลโคสิเดส โดยทั่วไป ยกเว้นกลูตามิก (glutamic) ที่ทำหน้าที่เป็นกรด-เบสของปฏิกิริยา จะเปลี่ยนเป็นกลูตามีน (glutamine) โดยเชื่อว่าการเปลี่ยนตำแหน่งสำคัญนี้ เพื่อลดแรงผลักกันของประจุระหว่างหมู่ฟอสเฟตของ aglycon ที่มีประจุลบ (the anionic aglycon sulfate) ความพิเศษของ aglycon คือสามารถทำหน้าที่เป็นตัวหลุด (leaving group) ที่ดีมากพอที่จะเกิดการแตกพันธะในปฏิกิริยาขั้นตอนไกลโคสิเลชัน (glycosylation) เพื่อเกิดสารมัธยันตร์ โดยไม่ต้องใช้กลูตามิกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาในขั้นต่อมา คือขั้นดีไกลโคสิเลชัน (deglycosylation) ยังจำเป็นต้องมีตัวเร่งชนิดเบส สำหรับเอนไซม์ไมโรสิเนสจะใช้โคเอนไซม์ L-ascorbate เป็นเบสของปฏิกิริยานี้ ดังรูปที่ 6



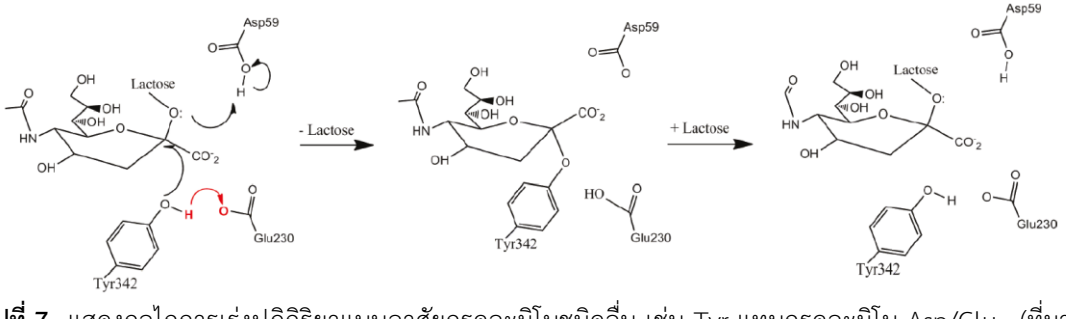
รูปที่ 4 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบอาศัยสับสเตรทที่มีหมู่ *N*-acetyl เป็นตัวนิวคลีโอไฟล์ (ที่มา: Jitonnom et al., 2011)



รูปที่ 5 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบอาศัยสับสเตรทที่มีหมู่คาร์บอกซิลเป็นตัวนิวคลีโอไฟล์ (ที่มา: Stummeyer et al., 2005, Morley et al., 2009)



รูปที่ 6 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบอาศัยเบสจากภายนอก (ที่มา: Burmeister et al., 2000)



รูปที่ 7 แสดงกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบอาศัยกรดอะมิโนชนิดอื่น เช่น Tyr แทนกรดอะมิโน Asp/Glu (ที่มา: Pierdominici-Sottile, G., Roitberg, A.E., 2011)

3. กลไกที่อาศัยตัวนิวคลีโอไฟล์ชนิดอื่น (alternative nucleophiles)

เอนไซม์ sialidases (หรือ neuraminidases) เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายหมู่ไกลโคไซด์ของ sialic acids นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ trans-sialidases (Pierdominici-Sottile et al., 2011) เร่งปฏิกิริยา transglycosylation ของ sialisides เอนไซม์ทั้งสองจัดอยู่ในตระกูล GH33 และ GH34 โดยมีความพิเศษกว่ากลไกแบบอื่นคือ จะมีกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ทำหน้าที่เป็นตัวนิวคลีโอไฟล์แทนกรดกลูตามิก ซึ่งถูกกระตุ้นโดยกรดอะมิโนชนิดเบสที่อยู่ติดกัน ข้อแตกต่างของกลไกนี้ คือ จะใช้กรดอะมิโนที่มีประจุ

ลบของหมู่คาร์บอกซิเลต เป็นตัวนิวคลีไฟล์ โดยเข้าไปแทนที่บริเวณ anomeric centre ดังรูปที่ 7 ความเป็นนิวคลีโอไฟล์จะเกิดได้ ต้องอาศัยเบสจากกรดอะมิโนที่อยู่ติดกัน กลไกนี้หาได้จากโครงสร้าง X-ray ที่เกิดจากการดักจับสารมัธยันตร์ที่มีหมู่ fluorosugars ตามด้วย peptide mapping crystallography และการกลายพันธุ์ (Watson et al., 2003; Watts et al., 2003)

4. กลไกที่อาศัยโคแฟคเตอร์ (NAD-dependent hydrolysis)

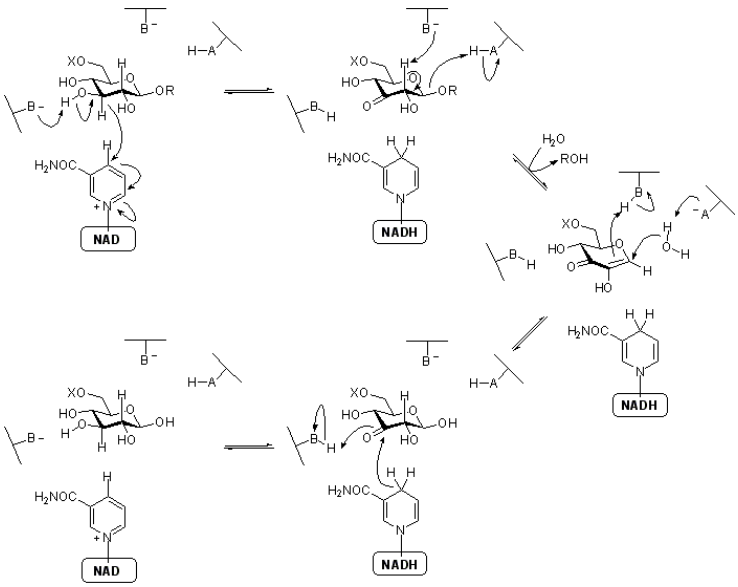
กลไกประเภทนี้จัดเป็นกลไกที่มีความแตกต่างไปจากกลไกที่ได้กล่าวมาโดยสิ้นเชิง เพราะไม่เกิดปฏิกิริยาชนิดกรด-เบส แต่กลับเกิดปฏิกิริยาแบบรีดอกซ์ โดยใช้โคแฟคเตอร์ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) เข้าร่วมในปฏิกิริยา โดยพบว่ามีเอนไซม์ไกลโคสิเดส ตระกูล GH4 (Yip et al., 2004) และ GH109 (Liu et al., 2007) ที่ใช้กลไกนี้ และในระหว่างเกิดปฏิกิริยาจะเกิดผ่านสารก่อกัมมันต์ที่มีประจุลบ ตามด้วยปฏิกิริยาการกำจัด (elimination) และปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) ซึ่งแตกต่างจากสารก่อกัมมันต์ชนิด oxocarbenium ที่พบในกลไกทั่วไป ดังแสดงในรูปที่ 8 จะเห็นว่ากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 6-phospho-β-glucosidase จะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 ของสับสเตรทโดยใช้โคแฟคเตอร์ NAD ไปเพิ่มความเป็นกรดของโปรตอนที่ตำแหน่ง C2 และทำให้เกิดปฏิกิริยาการกำจัดแบบ E1 ($E1_{cb}$ elimination) โดยมีกรดอะมิโนชนิดเบสเป็นตัวช่วย จากนั้นเกิดสารมัธยันตร์ที่มีพันธะคู่อยู่ที่ตำแหน่ง α,β ซึ่งภายหลังเกิดปฏิกิริยาการเติมน้ำที่ตำแหน่ง anomeric และเกิดหมู่คีโตนขึ้นที่ตำแหน่ง C3 โดยจะถูกรีดิวซ์ด้วย NADH จนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์และได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลในที่สุด ดังนั้นจะเห็นว่าปฏิกิริยาจะเกิดผ่านขั้นตอนการกำจัด (elimination step) แต่ปฏิกิริยาโดยรวมยังเป็นไฮโดรไลซิส การค้นพบกลไกนี้ได้จากการศึกษาสมบัติทางสเตอริโอเคมีด้วยเทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR spectroscopy) เทคนิค kinetic isotope effects เทคนิค linear free energy relationships เทคนิคการฉายรังสีเอกซ์ (X-ray crystallography) และเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิทรี (UV-Vis spectrophotometry) (Rajan et al., 2004; Yip et al., 2004)

ประโยชน์ของการศึกษาเชิงกลไก: การกลายพันธุ์ของตัวนิวคลีโอไฟล์

การปรับเปลี่ยนตัวเร่งชนิดเบส/ตัวนิวคลีโอไฟล์โดยหลักการกลายพันธุ์ (site-directed mutagenesis) สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีสมบัติใหม่ได้ ดังตัวอย่างเช่น เอนไซม์ glycosynthases ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีของการสังเคราะห์ไกลโคไซด์โดยอาศัยตัวให้ที่มีหมู่ไกลโคซิลที่สถานะกระตุ้น (activated glycosyl donors) ได้แก่ glycosyl fluorides เอนไซม์ glycosynthase ผลิตได้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1998 (Mackenzie, 1998) โดย Mackenzie และคณะ สามารถเปลี่ยนตัวนิวคลีโอไฟล์ของเอนไซม์ retaining เบต้ากลูโคสิเดส ตระกูล GH1 โดยใช้หลักการกลายพันธุ์ ทำให้ได้เอนไซม์ใหม่ที่ให้ค่ากัมมันตภาพเปลี่ยนไป คือจะให้ค่ากัมมันตภาพเป็นแบบทรานไกลโคสิเลชัน (trans-glycosylation activity) แทนแบบไฮโดรไลติก (hydrolytic activity) การกลายพันธุ์ชนิดนี้จะสามารถนำไปสร้างน้ำตาลไกลโคไซด์ต่อได้ นอกจากเอนไซม์ glycosynthase แล้วยังพบว่ามีเอนไซม์ไกลโคสิเดสในอีกหลายตระกูลที่เกิดขึ้นได้โดยใช้หลักการกลายพันธุ์ อาทิเช่น เบต้าไกลโคสิเดส ตระกูล GH8 (Honda and

Kitaoka, 2006) และอัลฟาไกลโคสิเดส ตระกูล GH95 (Wada et al., 2008) อย่างไรก็ตาม ยังมีการรายงานที่แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่เกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลน้ำ (Honda et al., 2008) หรือ กรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็นตัวเบสกระตุ้น (base-activating residue) (Wada et al., 2008) นั้นจะเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ดี ปัจจุบันพบว่ามีเอนไซม์ glycosynthases มากกว่า 10 ตระกูล ที่สามารถใช้หลักการกลายพันธุ์แล้วให้เอนไซม์ที่มีสมบัติเปลี่ยนไป รวมไปถึงกรณีของเอนไซม์ที่ใช้รูปแบบของกลไกแบบมีสับสเตรทเข้าช่วย (Umekawa et al., 2010) มีการรายงานว่าเอนไซม์ glycosynthases กำลังได้รับความสนใจทางด้านการสังเคราะห์เพื่อใช้ประโยชน์ทางยา ตัวอย่างเช่น สาร glycosphingolipids มีรายงานว่าสามารถรักษาโรคมะเร็ง โรคเอดส์ โรคทางระบบประสาท และโรคภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง (auto-immune) (Hancock et al., 2009)

นอกจากนี้ยังสามารถใช้เอนไซม์ glycosynthase ควบคุมสเตอริโอเคมีของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ขึ้นได้ รายละเอียดดูได้จากบทความปริทัศน์ของ (Rakic and Withers, 2009) นอกจากนี้ยังสามารถทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้หลากหลายขึ้น เช่น เมื่อกลายพันธุ์ตำแหน่งนิวคลีโอไฟล์ในเอนไซม์ glycosynthase ที่ผลิตจากเชื้อ *Humicola insolens* ของเอนไซม์ cellulase Cel7B จะสามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีของการย้ายน้ำตาลไปหาสารฟลาวานอยด์ที่ไม่ใช่น้ำตาลได้ (Yang et al., 2007) ขณะที่เอนไซม์ retaining บางชนิดสามารถกลายพันธุ์เพื่อให้เกิดเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารจำพวก thioglycosides (Rakic and Withers, 2009) ซึ่งพบว่าเป็นสารที่ต้านการย่อยสลายจากเอนไซม์ไกลโคสิเดส และนิยมนำไปใช้เป็นแอนะล็อกของไกลโคไซด์ที่มีความเสถียรทางเมแทบอลิซึม หรือแม้แต่การนำไปใช้เป็นตัวยับยั้ง (inhibitors) (Rakic and Withers, 2009)



รูปที่ 8 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบอาศัยโคแฟคเตอร์ NAD เข้าร่วมในปฏิกิริยา (ที่มา: Yip et al., 2004, Liu et al., 2007)

บทสรุป

จากการศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ไกลโคสิเดส จนนำมาสู่การค้นพบกลไกที่มีรูปแบบพิเศษของเอนไซม์ไกลโคสิเดส แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายและบทบาทสำคัญของกรดอะมิโนที่ทำหน้าเป็นตัวนิวคลีโอไฟล์ต่อการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสับสเตรทของเอนไซม์ไกลโคสิเดส ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทและกลไกที่แตกต่างกัน ดังนั้นการปรับเปลี่ยนตำแหน่งสำคัญดังกล่าวโดยการกลายพันธุ์ จะสามารถสร้างเอนไซม์ที่ให้กัมมันตภาพใหม่ได้ ดังแสดงให้เห็นในเอนไซม์ glycosynthases thioglycoligases และ thioglycosynthases การรายงานนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของการศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ไกลโคสิเดส และศักยภาพของการกลายพันธุ์ในการสร้างเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติตามความต้องการได้

กิตติกรรมประกาศ

บทความวิชาการนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยพะเยา (เลขที่สัญญา R020056216016) และทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (เลขที่สัญญา MRG5680143) ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านสำหรับการตรวจสอบต้นฉบับของบทความวิชาการเรื่องนี้เป็นอย่างสูง

เอกสารอ้างอิง

Abbott, D.W., Macauley, M.S., Vocadlo, D.J. and Boraston, A.B. (2009). Streptococcus pneumoniae endohexosaminidase D, structural and mechanistic insight into substrate-assisted catalysis in family 85 glycoside hydrolases. J. Biol. Chem. 284: 11676-11689.

Bottoni, A., Pietro Miscione, G. and Calvaresi, M. (2011). Computational evidence for the substrate-assisted catalytic mechanism of O-GlcNAcase. A DFT investigation. Phys. Chem. Chem. Phys. 13: 9568-9577.

Burmeister, W.P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A. and Henrissat, B. (2000). High resolution x-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. J. Biol. Chem. 275: 39385-39393.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B. (2009). The carbohydrate-active enzymes database (cazy): An expert resource for glycogenomics. Nucleic Acids Res. 37: D233-D238.

Cetinbas, N., Macauley, M.S., Stubbs, K.A., Drapala, R. and Vocadlo, D.J. (2006). Identification of Asp174 and Asp175 as the key catalytic residues of human O-GlcNAcase by functional analysis of site-directed mutants. Biochemistry 45: 3835-3844.

Davies, G. and Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure 3: 853-859.

Drouillard, S., Armand, S., Davies, G.J., Vorgias, C.E. and Henrissat, B. (1997). Serratia marcescens chitobiase is a retaining glycosidase utilizing substrate acetamido group participation. Biochem. J. 328: 945-949.

Gloster, T.M., Turkenburg, J.P., Potts, J.R., Henrissat, B. and Davies, G.J. (2008). Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of

carbohydrate metabolism by human gut flora. Chem. Biol. 15: 1058-1067.

Hancock, S.M., Rich, J.R., Caines, M.E., Strynadka, N.C. and Withers, S.G. (2009). Designer enzymes for glycosphingolipid synthesis by directed evolution. Nat. Chem. Biol. 5: 508-514.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280: 309-316.

Henrissat, B. and Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 637-644.

Honda, Y., Fushinobu, S., Hidaka, M., Wakagi, T., Shoun, H., Taniguchi, H. and Kitaoka, M. (2008). Alternative strategy for converting an inverting glycoside hydrolase into a glycosynthase. Glycobiology 18: 325-330.

Honda, Y. and Kitaoka, M. (2006). The first glycosynthase derived from an inverting glycoside hydrolase. J. Biol. Chem. 281: 1426-1431.

Huet, J., Rucktooa, P., Clantin, B., Azarkan, M., Looze, Y., Villeret, V. and Wintjens, R. (2008). X-ray structure of papaya chitinase reveals the substrate binding mode of glycosyl hydrolase family 19 chitinases. Biochemistry 47: 8283-8291.

Jitonnom, J., Lee, V.S., Nimmanpipug, P., Rowlands, H.A. and Mulholland, A.J. (2011). Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of substrate-assisted catalysis in family 18 chitinases: Conformational changes and the role of Asp142 in catalysis in ChiB. Biochemistry 50: 4697-4711.

Koshland, D.E. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. Biol. Rev. 28: 416-436.

Liu, Q.P., Sulzenbacher, G., Yuan, H., Bennett, E.P., Pietz, G., Saunders, K., Spence, J., Nudelman, E., Levery, S.B., White, T., Neveu, J.M., Lane, W.S., Bourne, Y., Olsson, M.L., Henrissat, B. and Clausen, H. (2007). Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. Nat. Biotechnol. 25: 454-464.

Macauley, M.S., Whitworth, G.E., Debowski, A.W., Chin, D. and Vocadlo, D.J. (2005). O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: Kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. J. Biol. Chem. 280: 25313-25322.

Mackenzie, L.F., Wang, Q.P., Warren, R.A. and Withers, S.G. (1998). Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. J. Am. Chem. Soc. 120: 5583–5584.

Mark, B.L., Vocadlo, D.J., Knapp, S., Triggs-Raine, B.L., Withers, S.G. and James, M.N. (2001). Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial β-hexosaminidase. J. Biol. Chem. 276: 10330-10337.

Markovic-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P.J., Muller, U. and Schirmer, T. (2000). Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. Structure 8: 1025–1035.

Martinez-Fleites, C., Korczynska, J.E., Davies, G.J., Cope, M.J., Turkenburg, J.P. and Taylor, E.J. (2009). The crystal structure of a family GH25 lysozyme from bacillus anthracis implies a neighboring-group catalytic mechanism with retention of anomeric configuration. Carbohydr. Res. 344: 1753-1757.

Morley, T.J., Willis, L.M., Whitfield, C., Wakarchuk, W.W. and Withers, S.G. (2009). A new sialidase

mechanism: Bacteriophage K1F endo-sialidase is an inverting glycosidase. J. Biol. Chem. 284: 17404-17410.

Pierdominici-Sottile, G., Horenstein, N.A. and Roitberg, A.E. (2011). Free energy study of the catalytic mechanism of trypanosoma cruzi trans-sialidase. From the michaelis complex to the covalent intermediate. Biochemistry 50: 10150-10158.

Rajan, S.S., Yang, X., Collart, F., Yip, V.L.Y., Withers, S.G., Varrot, A., Thompson, J., Davies, G.J. and Anderson, W.F. (2004). Novel Catalytic Mechanism of Glycoside Hydrolysis Based on the Structure of an NAD+/Mn2+-Dependent Phospho-±-Glucosidase from Bacillus subtilis. Structure (London, England : 1993) 12: 1619-1629.

Rakic, B. and Withers, S.G. (2009). Recent developments in glycoside synthesis with glycosynthases and thioglycoligases. Aust. J. Chem. 62: 510–520.

Reid, C.W., Legaree, B.A. and Clarke, A.J. (2007). Role of ser216 in the mechanism of action of membrane-bound lytic transglycosylase b: Further evidence for substrate-assisted catalysis. FEBS Lett. 581: 4988-4992.

Stummeyer, K., Dickmanns, A., Muhlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R. and Ficner, R. (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. Nat. Struct. Mol. Biol. 12: 90-96.

Tvaroska, I., Kozmon, S., Wimmerova, M. and Koca, J. (2012). Substrate-assisted catalytic mechanism of O-GlcNAc transferase discovered by quantum mechanics/molecular mechanics investigation. J. Am. Chem. Soc. 134: 15563-15571.

Umekawa, M., Li, C., Higashiyama, T., Huang, W., Ashida, H., Yamamoto, K. and Wang, L.X. (2010). Efficient glycosynthase mutant derived from mucor hiemalis endo-β-N-acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural N-glycan. J. Biol. Chem. 285: 511-521.

Van Aalten, D.M.F., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M.G. and Eijsink, V.G.H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 8979-8984.

Vocadlo, D.J. and Davies, G.J. (2008). Mechanistic insights into glycosidase chemistry. Curr. Opin. Chem. Biol. 12: 539-555.

Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R. and Withers, S.G. (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. Nature 412: 835-839.

Vocadlo, D.J., Mayer, C., He, S. and Withers, S.G. (2000). Mechanism of action and identification of Asp242 as the catalytic nucleophile of Vibrio furnisii N-acetyl- β-D-glucosaminidase using 2-acetamido-2-deoxy-5-fluoro-α-L-idopyranosyl fluoride. Biochemistry 39: 117-126.

Vuong, T.V. and Wilson, D.B. (2010). Glycoside hydrolases: Catalytic base/nucleophile diversity. Biotechnol. Bioeng. 107: 195-205.

Wada, J., Honda, Y., Nagae, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Katayama, T., Taniguchi, H., Kumagai, H., Kitaoka, M. and Yamamoto, K. (2008). 1,2-α-l-fucosynthase: A glycosynthase derived from an inverting α-glycosidase with an unusual reaction mechanism. FEBS Lett. 582: 3739-3743.

Watson, J.N., Dookhun, V., Borgford, T.J. and Bennet, A.J. (2003). Mutagenesis of the conserved active-site tyrosine changes a retaining sialidase into an inverting sialidase, Biochemistry 42: 12682-12690.

Watts, A.G., Damager, I., Amaya, M.L., Buschiazzo, A., Alzari, P., Frasch, A.C. and Withers, S.G. (2003). Trypanosoma cruzi trans-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: Tyrosine is the catalytic nucleophile. J. Am. Chem. Soc. 125: 7532-7533.

Wolfenden R., Lu X.D. and Young G. (1998). Spontaneous hydrolysis of glycosides. J. Am. Chem. Soc. 120: 6814–6815.

Yang, M., Davies, G.J. and Davis, B.G. (2007). A glycosynthase catalyst for the synthesis of flavonoid glycosides. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 46: 3885-3888.

Yip, V.L.Y., Varrot, A., Davies, G.J., Rajan, S.S., Yang, X., Thompson, J., Anderson, W.F. and Withers, S.G. (2004). An unusual mechanism of glycoside hydrolysis involving redox and elimination steps by a family 4 β-glycosidase from thermotoga maritima. J. Am. Chem. Soc. 126: 8354-8355.

❑❑❑❑❑