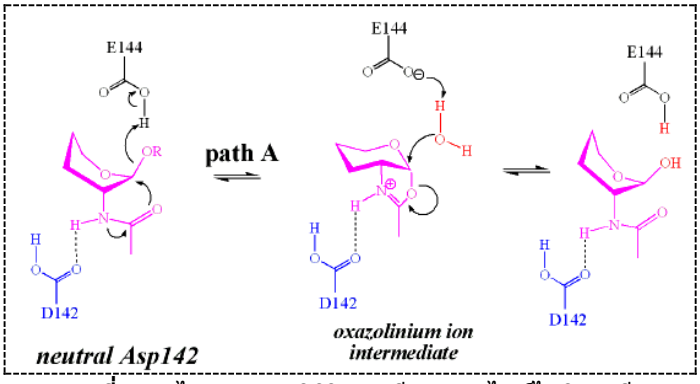
วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากลไกของปฏิกิริยาย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตด้วยเอนไซม์ไคติเนสบีในระดับอะตอม
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างบริเวณยึดจับของซับสเตรต และการปรับเปลี่ยนรูปร่างของน้ำตาลระหว่างเกิดปฏิกิริยาในเอนไซม์ไคติเนสบี
3. เพื่อค้นหาและทำความเข้าใจลำดับกรดอะมิโนที่มีบทบาทต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โดยใช้เอนไซม์ไคติเนสบี
4. เพื่อทดสอบความน่าเชื่อถือของการประยุกต์ใช้ระเบียบวิธี SCC-DFTB ร่วมกับการจำลองพลวัติที่ผสมผสานกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์โมเลกุล

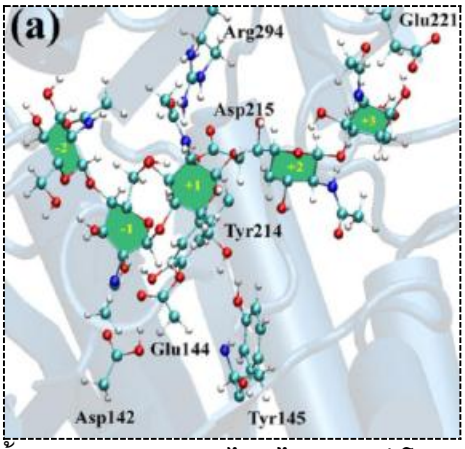
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

กลไกการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์ไคติเนสบี มีผู้เสนอไว้ดังรูปที่ 1 โดยมีกรดอะมิโน Asp142 และ Glu144 ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะเกิดผ่าน 2 ขั้นตอน คือ glycosylation และ deglycosylation โดยมี oxazolinium ion intermediate เป็นสารอินเตอร์มิเดียต สำหรับปฏิกิริยาขั้นแรกนั้นจะเกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนโปรตอนระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนกลูตาเมตตำแหน่ง 144 (Glu144) ไปยังอะตอมออกซิเจนของพันธะไกลโคสิดิก แล้วเกิดการสลายของพันธะดังกล่าว ในขั้นที่สองจะเกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนโปรตอนระหว่างโมเลกุลน้ำที่เป็นตัวทำละลาย กับหมู่คาร์บอกซิลของ Glu144 เพื่อเกิดปฏิกิริยาแทนที่ด้วยน้ำและได้น้ำตาล NAG_2 เป็นผลิตภัณฑ์ (ดูตำแหน่ง -1 และ -2) ข้อเสนอดังกล่าวพบว่ายังไม่เคยมีการตรวจพิสูจน์ความถูกต้อง ซึ่งอาจเป็นเพราะการตรวจสอบกลไกนั้นทำได้ยุ่งยาก ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจำเป็นต้องตรวจสอบความถูกต้องของกลไกที่ได้เสนอไว้ โดยผลการจำลองโครงสร้างตั้งต้น (ES) ของปฏิกิริยาในตัวทำละลายน้ำนาน 1.0 ns ด้วยระเบียบวิธีจำลองทางคอมพิวเตอร์ที่ผสมผสานทฤษฎีกลศาสตร์ควอนตัมสมัยใหม่และทฤษฎีกลศาสตร์โมเลกุลดั่งเดิม แสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งให้ข้อมูลโครงสร้างโดยรวมสอดคล้องกับโครงสร้างเดียวกันที่ได้จากการทดลอง (PDB code 1E6N) ผลการจำลองกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนสบี คำนวณด้วยระเบียบวิธี QM(SCC-DFTB)/CHARMM22 umbrella sampling MD แสดงดังรูปที่ 3 จากกราฟจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานอิสระที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างเกิดปฏิกิริยา โดยพบว่าพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาขั้นแรก มีค่าเท่ากับ 20.5 kcal/mol ขณะที่ปฏิกิริยาในขั้นที่สองมีค่าพลังงานอิสระของการกระตุ้น ~6 kcal/mol จากข้อมูลนี้จึงสรุปได้ว่า glycosylation เป็นขั้นกำหนดอัตรา ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของบริเวณที่เกิดการถ่ายโอนโปรตอน สรุปได้ว่าทันทีที่เกิดการถ่ายโอนโปรตอนจากหมู่คาร์บอกซิลของ Glu144 ไปยังพันธะไกลโคสิดิก ($C1\text{-}O_{gly}$) จะทำให้พันธะ $C1\text{-}O_{gly}$ เกิดการแตกออก สำหรับการถ่ายโอนโปรตอนในขั้น deglycosylation จะเกิดได้ง่ายกว่า ทั้งนี้เป็นผลมาจากความไม่เสถียรของโครงสร้างสารอินเตอร์มิเดียต (high-energy intermediate) และส่งผลให้เกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลน้ำได้ง่าย ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของน้ำตาลในระหว่างปฏิกิริยาทั้งสองขั้นตอน แสดงดังรูปที่ 4 จะพบว่าน้ำตาลมีการเปลี่ยนโครงสร้าง

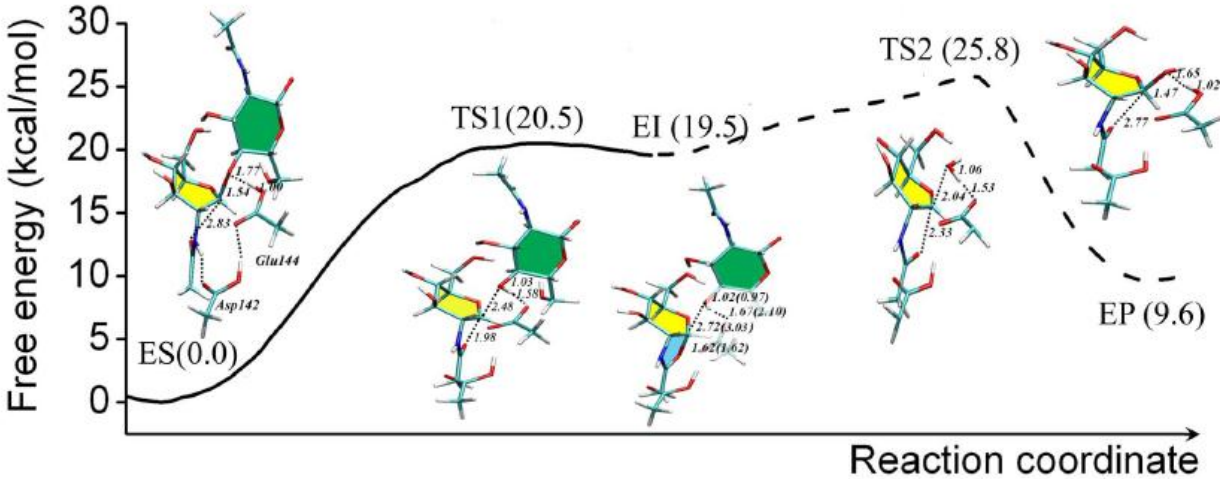
ดังนี้ boat ($^{1,4}B$) ↔ half-chair ($^{4}H_5$) ↔ chair ($^{4}C_1$) ข้อมูลนี้จัดเป็นรูปแบบใหม่ที่พึ่งมีการรายงานไว้สำหรับเอนไซม์ในตระกูลไกลโคสิเดส



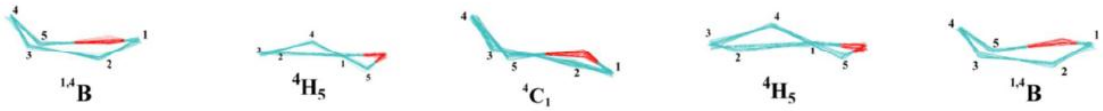
รูปที่ 1 กลไกการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ไคติเนสบี



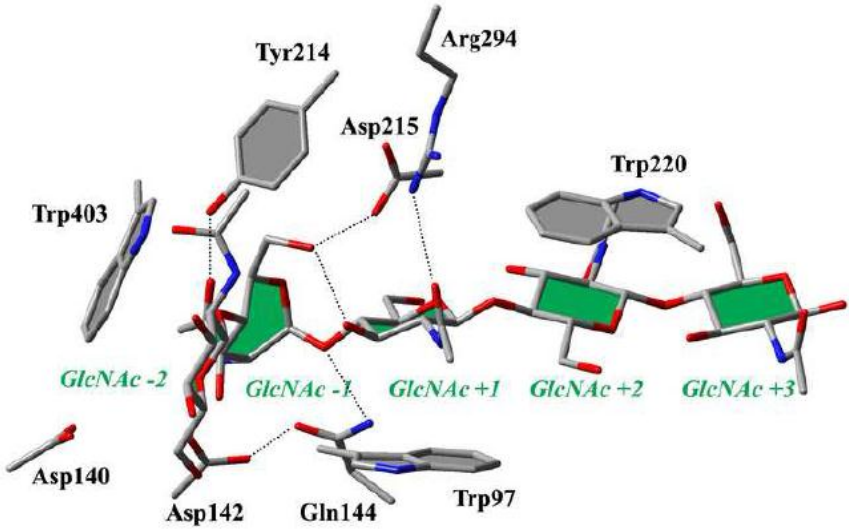
รูปที่ 2 โครงสร้างสารตั้งต้น (ES) ของเอนไซม์ไคติเนสบี โดยวิธีการจำลองด้วยคอมพิวเตอร์ SCC-DFTB/CHARMM22



รูปที่ 3 กราฟพลังงานอิสระ (free energy) เทียบกับปฏิกิริยาที่ดำเนินไป (reaction coordinate)



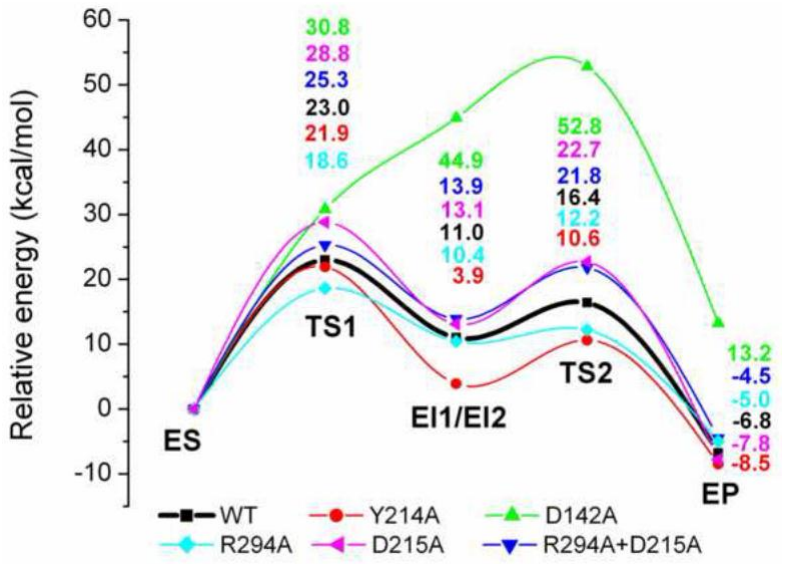
รูปที่ 4 ผลการทำนายโครงสร้างของน้ำตาลที่มีรูปร่างหกเหลี่ยมในระหว่างเกิดปฏิกิริยาในเอนไซม์ไคติเนสบี โดยมีการเปลี่ยนรูปทรงของโมเลกุลน้ำตาลจาก $^{1,4}B \leftrightarrow {}^{4}H_5 \leftrightarrow {}^{4}C_1$



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการยึดจับกับซับสเตรต NAG_5 ของเอนไซม์ไคติเนสบี (PDB entry 1E6N).

รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการยึดจับกับซับสเตรต NAG_5 ของเอนไซม์ไคติเนสบี จะเห็นว่าการยึดจับของซับสเตรตเกิดจากกรดอะมิโนหลายชนิด โดยแรงยึดเกาะส่วนใหญ่เป็นแรงที่เกิดจากอันตรกิริยาชนิด hydrogen bond (H-bond) และ van der Waals (vdW) โดยกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติก (Tyr และ Trp) จะมีบทบาทโดยตรงต่อการยึดจับของโมเลกุลน้ำตาล pyranose (แสดงด้วยสีเขียว) สำหรับกรดอะมิโนที่มีขั้ว ได้แก่ Asp142, Tyr214, Asp215 และ Arg294 พบว่านอกจากจะช่วยยึดซับสเตรตด้วยแรงชนิด H-bond กับหมู่ -OH ของโมเลกุลน้ำตาลแล้ว ยังพบว่ามีบทบาทต่อการเร่งปฏิกิริยาด้วย ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนชนิดมีขั้วเหล่านี้ต่อประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา โดยปกติการวิเคราะห์หากรดอะมิโนชนิดไหนบ้างมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ สามารถหาได้โดยวิธีการกลายพันธุ์ (site-directed mutagenesis) ซึ่งนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการชีวเคมีทั่วไป ในงานวิจัยนี้เราได้ประยุกต์หลักการนี้กับการคำนวณ โดยจะพิจารณาและเปรียบเทียบค่าพลังงานกระตุ้นที่เปลี่ยนแปลงไปของระบบ wildtype (WT) กับระบบที่มีการกลายพันธุ์ (mutant) โดย mutant อาจเกิดจากกรดอะมิโนเพียงหนึ่งหรือสองตำแหน่ง (single/double mutations) ก็ได้ โดยผลการคำนวณแสดงดังรูปที่ 6 ซึ่งเป็นกราฟแสดงค่าพลังงานศักย์สัมพัทธ์ของระบบทั้งสองเทียบกับการดำเนินไปของปฏิกิริยา (reaction coordinate) ได้จากการคำนวณด้วยระเบียบวิธีทฤษฎีฟังก์ชันความหนาแน่น (B3LYP/6-31G*) จะเห็นได้ว่าโดยรวมการกลายพันธุ์มีผลต่อความเสถียรของสารอินเตอร์

มิเดียตทุกๆ ตัว แต่ที่เห็นเด่นชัด คือ D142A และ Y214F กล่าวคือ D142A มีผลโดยตรงต่อเสถียรภาพของสารอินเตอร์มิเดียต โดยค่าพลังงาน EI มีค่าเพิ่มขึ้นชัดเจนจาก 11.0 kcal/mol ไปเป็น 44.9 kcal/mol การกลายพันธุ์นี้ยังส่งผลให้ต้องใช้พลังงานกระตุ้นมากถึง 52.8 kcal/mol สำหรับ Y214F พบว่ามีผลต่อความเสถียรของสารอินเตอร์มิเดียต EI สังเกตได้จากค่าพลังงาน EI ที่ลดลงอย่างมากเทียบกับ WT การลดลงนี้ยังส่งผลให้ค่าพลังงานกระตุ้นในขั้นที่สองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น หรืออาจกล่าวได้ว่า Tyr214 ช่วยให้ปฏิกิริยาการแทนที่ของน้ำในขั้นที่สองเกิดได้ง่ายขึ้น โดยการลดความเสถียรของสารอินเตอร์มิเดียตลง.



รูปที่ 6. แสดงกราฟพลังงานศักย์สัมพัทธ์กับการดำเนินไปของปฏิกิริยา เมื่อกรดอะมิโนในรูปที่ 3 เกิดการกลายพันธุ์เป็นอะลานีน (A) ทั้งแบบ single mutation และ double mutation

สรุป

1. ผลการคำนวณสนับสนุนกลไกที่เสนอไว้สำหรับปฏิกิริยาย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตด้วยเอนไซม์ไคติเนสบี
2. พบโครงสร้างบริเวณยึดจับของน้ำตาลตำแหน่ง -1 เกิดการบิดเบี้ยวรูปร่างของวงแหวนหกเหลี่ยมของน้ำตาล pyranose ระหว่างเกิดปฏิกิริยา (boat ($^{1,4}B$) ↔ half-chair ($^{4}H_5$) ↔ chair ($^{4}C_1$))
3. Asp142 และ Tyr214 เป็นกรดอะมิโนที่มีบทบาทซับซ้อนและมีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสบี
4. ตำทำละลายน้ำมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์
5. ระเบียบวิธี SCC-DFTB/CHARMM22 QM/MM MD เป็นระเบียบวิธีที่มีประสิทธิภาพในการหาค่าพลังงานอิสระของปฏิกิริยาเคมีในเอนไซม์ไกลโคสิเดส แต่จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความน่าเชื่อถือเพิ่มเติมเทียบกับระเบียบวิธีอื่นๆ ที่มีความแม่นยำและถูกต้องมากกว่า เช่น DFT และ/หรือ MPn

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

สำหรับแผนการวิจัยในอนาคต จะเป็นการต่อยอดงานวิจัยไปสู่การประยุกต์ใช้วิธีการออกแบบโมเดลที่พัฒนาขึ้น เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตที่เป็นรูปวงแหวนห้าเหลี่ยมที่ตำแหน่งยึดจับกับเอนไซม์ไกลโคสิเดส รวมถึงการทำนายประสิทธิภาพในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคสิเดส เช่น ไคติเนสบี และเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส ร่วมกับเทคนิคทางวิศวกรรมเอนไซม์ต่อไป

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

   1.1 **บทความวิจัยระดับนานาชาติที่ได้รับการตีพิมพ์ (และ/หรือกำลังอยู่ในขั้นตอน) ในฐานข้อมูล SCOPUS/ISI และมีค่า impact factor จำนวนทั้งสิ้น 6 เรื่อง**

   ก. บทความหลักที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ จำนวน 2 เรื่อง

   Jitonnom, J., Limb, M.A., Mulholland, A.J. QM/MM free-energy simulations of reaction in Serratia marcescens chitinase B reveal the protonation state of Asp142 and the critical role of Tyr214. **J. Phys. Chem. B. 2014**, 118, 4771-83. (IF: 3.69; cited by 2)

   Jitonnom, J.; Sattayanon, C.; Kungwan, N.; Hannongbua, S., A DFT study of the unusual substrate-assisted mechanism of Serratia marcescens chitinase B reveals the role of solvent and mutational effect on catalysis. **J. Mol. Graph. Model., 2015**, 56, 53–59. (IF: 2.022; cited by 0)

   ข. บทความอื่น ๆ ที่ต่อยอดจากงานวิจัยหลักของโครงการ จำนวน 4 เรื่อง

   Sarot Cheenpracha, Jitayut Jionnom, Manutchaya Komek, Thunwadee Ritthiwigrom, Surat Laphookhieo, Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of steroidal alkaloids from Holarrhena pubescens barks, **Bioorg. Med. Chem., *under review***. (IF: 2.951)

   Jitonnom, J., Sontag, C. Catalytic Oxidation of Glucose with Hydrogen Peroxide and Colloidal Gold as Pseudo-Homogenous Catalyst: A

Combined Experimental and Theoretical Investigation. **Chiang Mai J. Sci. ASAP**. (IF: 0.516)

Jitonnom, J., Meelua, W. The effect of silicon-bridge and p-ligands on the electronic structures and related properties of dimethyl zirconocene polymerization catalysts: A comparative theoretical investigation. **Chiang Mai J. Sci. 2014**, 41(5.2): 1220-1229. (IF: 0.516; cited by 0)

Sattayanon, C., Sontising, W., Jitonnom, J., Meepowpan, P., Punyodom, W., Kungwan, N. Theoretical study on the mechanism and kinetics of ring-opening polymerization of cyclic esters initiated by tin(II) n-butoxide. **Comput. Theor. Chem. 2014**, 1044, 29-35. (IF: 1.368; cited by 2)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

ผลการดำเนินงานโครงการ "ความเข้าใจอย่างลึกซึ้งในธรรมชาติของโครงสร้างคาร์โบไฮเดรตที่เป็นรูปวงแหวนห้าเหลี่ยมและหกเหลี่ยมในระหว่างการเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์ไกลโคสิเดส ศึกษาโดยวิธีการจำลองที่ผสมผสานกลศาสตร์ควอนตัมและกลศาสตร์โมเลกุล" ได้สร้างองค์ความรู้ใหม่จริงต่อวงการวิชาการ โดยทีมนักวิจัยเป็นกลุ่มวิจัยแรกของโลกที่สามารถอธิบายกลไกการย่อยสลายไดดินในระดับโมเลกุล พร้อมทั้งระบุบทบาทของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องได้อย่างชัดเจน และได้ตีพิมพ์ลงในวารสาร Journal of Physical Chemistry B (Jitonnom et al., *J. Phys. Chem. B*, **2014**, 118, pp 4771–4783) ซึ่งเป็นวารสารชั้นนำทางด้านเคมีเชิงฟิสิกส์ นอกจากนี้บทความวิจัยเรื่องนี้ยังได้รับการอ้างอิงลงในวารสาร ACS Catalysis (Zhang et al., *ACS Catal.*, **2015**, 5, 2559–2572) ซึ่งเป็นวารสารชั้นนำของโลกที่มีค่า impact factor สูงถึง 7.572 โดยเนื้อหาของบทความมีการกล่าวอ้างถึงผลงานวิจัยหลายครั้ง ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความสำคัญของงานวิจัยในครั้งนี้ นอกจากนี้เทคนิค small quantum cluster ที่ได้ศึกษาค้นคว้าภายใต้โครงการดังกล่าว พบว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโลหะทรานซิชันได้

โดยสรุปผลการดำเนินโครงการในช่วงระยะเวลา 2 ปี ผู้วิจัยสามารถตีพิมพ์บทความวิจัยหรือหนังสือในระดับนานาชาติที่มีค่า impact factor ไปแล้ว จำนวน 5 เรื่อง (โดยมีค่าการอ้างอิง เท่ากับ 4) และกำลังรอตีพิมพ์ จำนวน 2 เรื่อง โดยมีการนำผลงานวิจัยไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 2 ครั้ง (7^{th} AOUPO/9^{th} PST และ MACRO2014) งานสัมมนาวิชาการ จำนวน 3 ครั้ง (ณ คณะวิทยาศาสตร์ ม.

เชียงใหม่ และ ณ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ม.วลัยลักษณ์) รวมไปถึงการนำไปบูรณาการกับการเรียนการสอนในรายวิชา 242413 เคมีคำนวณเบื้องต้น และ 256449 งานวิจัยแนวใหม่ทางเคมีเชิงฟิสิกส์ ของคณะวิทยาศาสตร์ ม.พะเยา

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

3.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

จิตระยุทธ์ จิตอ่อนน้อม. การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโดยเอนไซม์ไกลโคสิเดส: ทัศนะเชิงกลไกและการประยุกต์ใช้, วารสารวิทยาศาสตร์ มข., ฉบับที่ 3 ปีที่ 41, 582-594, (2556).

จิตระยุทธ์ จิตอ่อนน้อม. การประยุกต์ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลทางด้านวิทยาศาสตร์โปรตีน, วารสารนเรศวรพะเยา, ฉบับที่ 1 ปีที่ 7, 6-16 (2557).

3.2 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Jitrayut Jitonnom and Adrian J. Mulholland, Understanding protein dynamics and enzyme catalysis: insights from modeling and simulations, the 7th AOHUPO/9th PST Conference at CRI, Bangkok, 6-8 August 2014, (poster presentation)

2. Wijitra Meelua and Jitrayut Jitonnom, Cationic Ring-Opening Polymerization of ε-Caprolactone by Bis(cyclopentadienyl)-Based Group 4 Metallocene: A Theoretical Study on the Chain Propagation, The 2014 IUPAC World Polymer Congress (MACRO2014), Chiang Mai International Convention and Exhibition Center, Chiang Mai, Thailand, 6-11 July, 2014. (poster presentation)

3.3 บทหนังสือ (Book chapter) จำนวน 1 เรื่อง

Jitonnom, J. (2014) Computer-aided pesticide design: A short review. Short Views on Insect Biochemistry and Molecular Biology, (Eds.) Chandrasekar, R., Tyagi, B.K., Gui, Z.Z., and Reeck, G. International Book Mission, Academic Publisher, Manhattan, KS, USA. Chapter-30, Vol. (2): 685-707.