

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG6180151

ชื่อโครงการ: วิศวกรรมเอนไซม์ลูซิเฟอเรสจากแบคทีเรียเพื่อการประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ

ชื่อหลักวิจัย: ผศ. ดร.รัชก ทินกุล

E-mail address: ruchanok.tin@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เอนไซม์ลูซิเฟอเรสจากแบคทีเรีย (Lux) เร่งปฏิกิริยาเรืองแสงโดยใช้สารรีดิวซ์ฟลาวิน แอลดีไฮด์ และออกซิเจนเป็นสับสเตรท โดยเอนไซม์ Lux ประกอบไปด้วยสายพอลิเปปไทด์ที่ต่างกัน 2 สาย เรียกว่าสาย  $\alpha$  และ  $\beta$  ที่แสดงออกจากยีน *luxA* และ *luxB* ตามลำดับ จากการที่เอนไซม์ Lux เร่งปฏิกิริยาเรืองแสงจึงทำให้สามารถประยุกต์ให้เป็นเอนไซม์ชี้วัดได้หลากหลาย ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิควิศวกรรมเอนไซม์ในการสร้างเอนไซม์พิวซัน Lux ที่มีขนาดเล็กลง ซึ่งจะเหมาะสมกับการใช้เป็นเอนไซม์ชี้วัดที่ดีกว่า การทดลองสามารถสร้างเอนไซม์ Lux ที่มีขนาดเล็กลงขนาดต่างๆ โดยการตัดโปรตีนทางด้าน N-terminus ออก คือ Lux535, Lux555 และ Lux595 อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบการแสดงออกพบว่า เอนไซม์ Lux555 และ Lux595 ไม่สามารถแสดงออกในรูป soluble ได้ ในขณะที่ Lux535 สามารถแสดงออกแต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเรืองแสงได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ส่วน N-terminus ของเอนไซม์เป็นส่วนสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ จากการศึกษากลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องกับ protonation status ของสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin โดยใช้ transient kinetics และการศึกษาผลของ pH พบว่า สารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin ที่ถูกสร้างขึ้นในปฏิกิริยาของ Lux ตัวแรกคือ C4a-hydroperoxyflavin ที่มีค่า  $\lambda_{max}$  เท่ากับ 385 nm ก่อนจะเปลี่ยนเป็น C4a-peroxyflavin ที่มีค่า  $\lambda_{max}$  เท่ากับ 375 nm ซึ่งการเปลี่ยน protonation status เป็น deprotonated form (C4a-peroxyflavin) จะสามารถทำให้สารตัวกลางปฏิกิริยาต่อกับแอลดีไฮด์และเร่งปฏิกิริยาการเปล่งแสงได้ นอกจากนี้จากการศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนฮิสติดีนตำแหน่งที่ 44 และ 45 พบว่า กรดอะมิโนฮิสติดีนตำแหน่งที่ 44 มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยน protonation status ของสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin ในปฏิกิริยาของ Lux โดยเอนไซม์ดัดแปลงที่มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนฮิสติดีนตำแหน่งที่ 44 ไปเป็นกรดอะมิโนอะลานีน สามารถสร้างสารตัวกลาง C4a-(hydro)peroxyflavin ได้เท่านั้น ซึ่งสารตัวกลางนี้ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับแอลดีไฮด์ จึงทำให้เอนไซม์ดัดแปลงนี้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาให้แสงได้ ในขณะที่กรดอะมิโนฮิสติดีนตำแหน่งที่ 45 มีบทบาทสำคัญในการจับกันของเอนไซม์และรีดิวซ์ฟลาวินสับสเตรท การค้นพบนี้นับเป็นครั้งแรกที่สามารถอธิบายกลไกการควบคุม protonation status ของสารตัวกลางในปฏิกิริยาเอนไซม์ Lux ได้

คำสำคัญ: เอนไซม์ลูซิเฟอเรสจากแบคทีเรีย, ปฏิกิริยาเรืองแสง, วิศวกรรมเอนไซม์ และ ตัวชี้วัดทางชีวภาพ

## Abstract

---

**Project Code:** MRG6180151

**Project Title:** Engineering of bacterial luciferase enzyme for bioreporter applications

**Investigator:** Asst. Prof. Dr. Ruchanok Tinikul

**E-mail Address:** ruchanok.tin@mahidol.ac.th

**Project Period:** 2 year

Abstract: Bacterial luciferase (Lux) catalyzes light emitting reaction by using reduced FMN, long chain aldehyde and oxygen as substrates. Lux is a heterodimeric enzyme composed of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits which are encoded by adjacent *luxA* and *luxB* genes. Lux has long been attractive to be used in bioreporter applications. In this research study, the enzyme engineering was applied for acquiring more desired version of fusion Lux enzyme. The truncated fusion Lux was constructed by trimming C-terminus part of  $\beta$ -subunit to obtain the smaller size of Lux that has ability to catalyze light reaction. Three truncated Luxs of Lux535, Lux555 and Lux595 were successfully constructed and expressed in *E. coli*. The result showed that among truncated constructs, only the constructed Lux535 was able to express as soluble enzyme. However, Lux535 could not proceed light reaction. This suggests that the  $\beta$ -subunit portion of enzyme structure is very crucial for enzyme folding and active conformation of  $\alpha$ -subunit. The transient kinetics, pH-variation, and site-directed mutagenesis were employed to probe the protonation state of the flavin C4a-(hydro)peroxide in bacterial luciferase. The first observed intermediate, with a  $\lambda_{\max}$  of 385 nm, transformed to an intermediate with a  $\lambda_{\max}$  of 375 nm concomitantly with emission of light. Spectra of the first observed intermediate were pH dependent, with a  $\lambda_{\max}$  of 385 nm at pH < 8.5 and 375 at pH > 9, correlating with a  $pK_a$  of 7.7 – 8.1. These data are consistent with the first observed flavin C4a-intermediate at pH < 8.5 being the protonated flavin C4a-hydroperoxide, which loses a proton to become an active flavin C4a-peroxide. Stopped-flow studies of His44Ala, His44Asp, and His44Asn variants showed only a single intermediate with a  $\lambda_{\max}$  of 385 nm at all pH values, and none of these variants generate light. These data indicate that His44 variants only form a flavin C4a-hydroperoxide, but not an active flavin C4a-peroxide, indicating a role for His44 in deprotonating the flavin C4a-hydroperoxide. We also investigated the function of the adjacent His45; stopped-flow data and molecular dynamics simulations identify the role of this residue in binding reduced FMN.

**Keywords:** Bacterial luciferase, Bioluminescence, Enzyme engineering and Bioreporter