

ชื่อโครงการ “การตกผลึกเอนไซม์ cyclohexanone monooxygenase จากเชื้อ *Nocardia globerula*”

“Crystallization of cyclohexanone monooxygenase from *Nocardia globerula*”

ศรีสุดา ตีรกาญจน์¹⁾ และ พลังพล คงเสรี^{*2)}

1) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

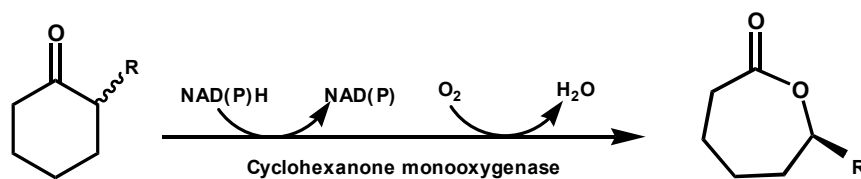
2) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล e-mail : scpkps@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

ปฏิกิริยา Baeyer-Villiger เป็นปฏิกิริยา oxidation จากสารประกอบเป็นวงของคีโตน ได้ผลิตภัณฑ์ในรูปของสารประกอบเอสเทอร์ ในทางเคมีปฏิกิริยานี้สามารถเกิดได้โดยใช้ m-chloroperbenzoic acid (mCPBA) สำหรับในธรรมชาติปฏิกิริยานี้สามารถเกิดได้โดยเอนไซม์ในกลุ่ม monooxygenase การที่เอนไซม์มีคุณสมบัติเป็น chiral catalyst จะมีความจำเพาะในการจับกับสารตั้งต้น ทำให้ปฏิกิริยาดำเนินไปแบบที่มี regioselectivity และ stereoselectivity ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารที่มี chirality

เอนไซม์ cyclohexanone monooxygenase (CHMO) จากเชื้อ *Nocardia globerula* สามารถเปลี่ยน cyclohexanone เป็น caprolactone โดยมี FAD เป็น cofactor เอนไซม์ CHMO มีขนาดโมเลกุล 53 kDa จุดประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ cyclohexanone monooxygenase ด้วยวิธี x-ray Crystallography เพื่อที่จะนำไปสู่ความเข้าใจในหน้าที่และกลไกการทำงานของเอนไซม์นี้ ความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติอาจนำไปสู่การออกแบบปรับปรุงเอนไซม์ในการสังเคราะห์ให้มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่ต้องการและมีประสิทธิภาพสูงขึ้นต่อไป

ในการตกผลึก เอนไซม์ CHMO จับกับ cofactor FAD ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10 mg / ml ทำการสุ่มหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิค sparse-matrix screenings และ conventional grid-screenings ซึ่งเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ตกผลึกและค่า pH โดยพบผลึกของเอนไซม์ ในระบบที่มี Ammonium Sulfate กับ Tris Base buffer มีลักษณะของผลึกที่เล็ก ซึ่งยังไม่เหมาะสมต่อการศึกษาหาโครงสร้างจากเทคนิค X-ray diffraction จึงต้องปรับสภาวะให้เกิดผลึกที่สมบูรณ์ต่อไป



บทนำ

ในกระบวนการสังเคราะห์สารด้วยปฏิกิริยา Baeyer-Villiger reaction จากสารประกอบเป็นวงของคีโตน ได้ผลิตภัณฑ์ในรูปของเอสเทอร์ (lactone) เป็นปฏิกิริยา oxidation ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของขั้นตอนการสังเคราะห์สาร เช่น polyhydroxycyclohexanone จาก cyclitol (polyhydroxycycloalkanes) derivative เกิดปฏิกิริยาได้ lactone ซึ่งเป็นสารตัวกลางให้เกิดสารเหมือนธรรมชาติ (natural product) (Chida, Ogawa, 1997) หรือสารประกอบประเภท monocyclofarnesyl ซึ่งถูกเตรียมได้สารประกอบ 9-dodecalone (Ciceric และคณะ, 1998) การเกิดปฏิกิริยาของการกระบวนการทางเคมีอยู่ในสภาวะกรดจะใช้ peracids (m-CPBA) จะให้ racemic product และสามารถให้ chiral organoselenium Catalysts ($RSeO_2H$, seleninic acid) เป็น effective oxidant ของปฏิกิริยาได้ (Miyake และคณะ, 2001)

Baeyer-Villiger reaction สามารถเกิดได้ในธรรมชาติโดย Bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (Kayser และคณะ, 1998) และเอนไซม์ cyclohexanone monooxygenase (CHMO) ซึ่งมีใน bacteria Acinetobacter, Pseudomonas, Xanthobacter, Rhodococcus และ Nocardia ในการเข้าทำปฏิกิริยา เอนไซม์จะมีบริเวณ active site เกิดคุณสมบัติของ chiral catalyst ให้มีความจำเพาะในการจับกับสารตั้งต้น ปฏิกิริยาจึงดำเนินไปแบบที่มี regioselectivity และ stereoselectivity ทำให้ผลิตภัณฑ์ได้เป็นสาร chiral ในการใช้เอนไซม์จะทำให้เกิดปฏิกิริยาอย่างไม่รุนแรง ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะมากกว่าการใช้สารเคมี จึงลดความอันตรายจากสารเคมีซึ่งไม่มี by-product สามารถทำการแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย และ ใช้กับสารตั้งต้นที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารเคมีได้ Cyclohexanone monooxygenase จากเชื้อ *N. globularia* มีขนาดโมเลกุล 53 kDa และมี FAD เป็น cofactor

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

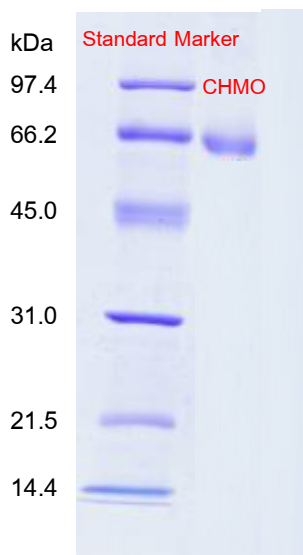
เอนไซม์ cyclohexanone monooxygenase (CHMO) จากเชื้อ *Nocardia globularia* ในรูป Lyophilized นำมาละลายใน 100mM NaCl + 10mM Tris base buffer pH7.5 + 0.1mM EDTA + 0.01% NaN_3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย 2-dimension Polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS-Page) มีความหนาของ gel 0.75 มิลลิเมตร 4% stacking gel และ 12.5% separating gel นำสารละลายโปรตีนเติม bromphenol blue (dye) ต้มที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที Electrophoresis ใช้ศักย์ไฟฟ้า 200 volt มี running buffer เป็น 25mM Tris-Base, 190mM glycine pH 8.5, และ 0.1 % (w/v) SDS ใช้ low molecular weight standard marker (จาก Biorad) ซึ่งประกอบด้วย Phosphorylase B 97400 Da, Bovine Serum Albumin 66200 Da, Ovalbumin 45000 Da, Carbonic anhydrase 31000 Da, Soybean Trypsin inhibitor 21500 Da, และ lysozyme 14400 Da gel ที่ได้นำมา stain ด้วย 0.125% (w/v) CBBG dye, 50% (v/v) methanol, และ 10% (v/v) glacial acetic acid เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น destain ด้วย 5% (v/v) methanol, 10% (v/v) glacial acetic acid

นำเอนไซม์รวมกับ cofactor Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นวัดความเข้มข้นเอนไซม์โดยใช้เทคนิค spectrophotometry ซึ่งใช้ Bradford test kit 200 ไมโครลิตร ให้มีปริมาตรสุทธิ 1 มิลลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับ standard curve ซึ่งใช้โปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

การตกผลึกเบื้องต้นของเอนไซม์ CHMO ใช้เทคนิค sparse-matrix screen จาก Hampton Research Crystal screen2 จำนวน 48 conditions ด้วยวิธี Hanging drop Vapor diffusion ที่อุณหภูมิ 4 °C และที่อุณหภูมิห้อง และวิธี MicroBatch Crystallization Oils ที่อุณหภูมิ 4 °C ติดตามสังเกตผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จากนั้นทำการตกผลึกด้วยวิธี grid

screens ซึ่งทำการปรับเปลี่ยนชนิด และความเข้มข้นของสารประกอบเกลือ, สารโพลิเมอร์ หรือ ตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ ค่า pH ต่างๆ การตกผลึกด้วยวิธี Hanging drop Vapor diffusion ใช้ TC-Plate 24 well ภายใน Hanging drop เป็นmixtureของโปรตีนและsolution condition ในอัตราส่วน 1ต่อ1 บน Siliconized coverslip (นำ coverglass จุ่มในสารละลาย 30 มล. Heptane + 1 มล. Dimethyldichlorosilane จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง) ภายในระบบปิดที่มี crystallizing agent 500 ไมโครลิตร โดยวิธี MicroBatch Crystallization Oils ใช้ Nuncwell plate 60 well มีโปรตีน และ crystallizing agent อัตราส่วน 1ต่อ1 ภายใน mineral oil 6มิลลิลิตร

ผลการทดลองและอภิปรายผล



จากการหาสภาวะในการตกผลึกเบื้องต้นด้วย Crystal Screen (1&2) Formulation condition ที่อุณหภูมิ 4°C วิธี vapor diffusion ในระยะเวลา 5 เดือน พบความเปลี่ยนแปลงภายใน drop ที่ condition

- (10) 0.2M Ammonium Acetate + 0.1M Na Acetate pH 4.5 + 30% PEG 4000
- (19) 0.2M Ammonium Acetate + 0.1M Tris Base pH 8.5 + 30% iso-Propanol

- (21) 0.2M Mg Acetate + 0.1M MES pH 6.5 + 30%MPD
- (23) 0.2M MgCl₂ + 0.1M Na HEPES pH 7.5 + 30% PEG 400
- (12) 0.2M MgCl₂ + 0.1M Na HEPES pH 7.5 + 30% iso-Propanol
- (24) 0.2M CaCl₂ + 0.1M Na Acetate pH 4.5 + 20% iso-Propanol
- (44) 0.2M Mg Acetate
- (15) 0.2M Ammoniumsulfate + 0.1M MES pH 6.5 + 30% PEG 8000
- (6) 0.2M MgCl₂ + 0.1M Tris Base pH 8.5 + 30% PEG 4000
- (18) 0.2M Mg Acetate + 0.1M MES pH 6.5 + 20% PEG 8000
- (28) 0.2M Na Acetate + 0.1M MES pH 6.5 + 30% PEG 8000

จากนั้นจึงทำการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นและชนิดของเกลือ, ตัวทำละลายอินทรีย์, สารประกอบโพลิเมอร์ และความเป็นกรดเบสของบัฟเฟอร์ ที่สภาวะ

- PEG 4000 + 0.2M AA + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5
- iso-PrOH + 0.2M AA + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5
- iso-PrOH + 0.2M MgCl₂ + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5
- PEG 8k + 0.2M AS + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5
- PEG 8k + 0.2M NaAcetate + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5

พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในระยะเวลา 4 เดือนที่จะแสดงว่าเกิดผลึกขึ้น

- iso-PrOH + 0.2M CaCl₂ + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5 ภายในdropมีลักษณะขุ่น ในระยะเวลา 4เดือน
- PEG 400 + 0.2M MgCl₂ + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5 ภายในdropเกิดสัญญาณบาง เมื่อทำการปรับสภาวะให้ละเอียดขึ้นโดยการปรับความเข้มข้นของสาร

และค่า pH พบว่าเกิดลักษณะขุ่นภายใน drop ในระยะเวลา 7 เดือน

- MPD + 0.2M MgAcetate + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5 ภายใน drop เกิดสัญญาณคล้ายขุ่น เมื่อทำการปรับสถานะให้ละเอียดขึ้น กลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในระยะเวลา 4 เดือน

- MgAcetate + 0.1M Buffer pH 4.5-8.5 ภายใน drop เกิดสัญญาณคล้ายเข็ม เมื่อปรับสถานะเพิ่ม พบสัญญาณขนาดเล็กกระจาย ในระยะเวลา 3 เดือน จากนั้นทำการปรับปริมาณของ crystallizing agent เป็น 300 μ l และ 700 μ l พบว่าเกิดสัญญาณขนาดเล็กกระจาย ในระยะเวลา 2 เดือน

- PEG 4000 + 0.2M MgCl₂ + 0.1M Buffer pH 6.5-8.5 ภายใน drop เกิดสัญญาณคล้ายเข็ม เมื่อปรับสถานะเพิ่มกลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในระยะเวลา 2 เดือน

- PEG 8000 + 0.2M MgAcetate + 0.1M Buffer pH 6.5-8.5 ภายใน drop เกิดสัญญาณเป็นฟุ้ง เมื่อปรับสถานะเพิ่มกลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในระยะเวลา 2 เดือน

ทำการตกผลึกที่สภาวะ AmSO₄ + 0.1M Buffer pH 7.0-8.5 เกิดสัญญาณเป็นฟุ้ง เมื่อทำการปรับสถานะเพิ่ม พบสัญญาณคล้ายเข็มภายใน drop ในระยะเวลา 5 เดือน

ทำการตกผลึกที่สภาวะ PEG 6000 + 0.2M MgAcetate + 0.1M Buffer pH 6.5-8.5 เกิดสัญญาณคล้ายเข็มภายใน drop ในระยะเวลา 4 เดือน

การหาสภาวะในการตกผลึกเบื้องต้นด้วย Crystal Screen (1&2) Formulation condition ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยวิธี vapor diffusion ในระยะเวลา 2 เดือน พบความเปลี่ยนแปลงภายใน drop ที่ condition

- (8) 30% iso-PrOH + 0.1M MES pH 6.5 + 0.2M NaCitrate
- (15) 30% PEG 8000 + 0.1M MES pH 6.5 + 0.2M AmSO₄
- (17) 30% PEG 4000 + 0.1M Tris Base pH 8.5 + 0.2M Li₂SO₄

- (20) 25% PEG 4000 + 0.1M NaAcetate pH 4.5 + 0.2M AmSO₄

- (30) 30% PEG 8000 + 0.2M AmSO₄

- (37) 8% PEG 4000 + 0.1M NaAcetate pH 4.5

- (46) 18% PEG 8000 + 0.1M MES pH 6.5 + 0.2M CaCl₂

การหาสภาวะในการตกผลึกเบื้องต้นด้วย Crystal Screen (1&2) Formulation condition ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยวิธี MicroBatch Crystallization Oils ในระยะเวลา 4 เดือน พบความเปลี่ยนแปลงภายใน drop ที่ condition

- (17) 30% PEG 4000 + 0.1M Tris Base buffer pH 8.5 + 0.2M Li₂SO₄

- (28) 30% PEG 8000 + 0.1M MES pH 6.5 + 0.2M NaAcetate

เมื่อทำการปรับสถานะให้ละเอียดขึ้น โดยการปรับความเข้มข้น และค่า pH พบว่าในช่วงเวลา 5 เดือนมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเกิดตะกอนภายใน well เท่านั้น

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โดยใช้เทคนิคของ X-ray diffraction จึงต้องทำการตกผลึกเอนไซม์ ผลึกที่นำมาวิเคราะห์นั้นควรมีขนาดใหญ่พอเหมาะ (ประมาณ 0.2 – 0.5 มิลลิเมตร) ในงานวิจัยได้ทำการตกผลึกเอนไซม์ CHMO (Cyclehexanone monooxygenase) จาก *Nocardia Globerula* โดยใช้เทคนิค Hanging drop Vapor diffusion และ MicroBatch Crystallization Oils พบว่าเอนไซม์ใช้ระยะเวลานานในการเกิดผลึก โดยมีแนวโน้มของการตกผลึกในระบบของ Hanging drop Vapor diffusion ได้มากกว่า MicroBatch Crystallization Oils ซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะสีส้มของ Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) ที่ cocomplex กับเอนไซม์ ปัจจุบันผลึกที่เกิดขึ้นยังมีขนาดเล็ก ลักษณะไม่เป็นเหลี่ยมสมบูรณ์ ยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปวิเคราะห์ทาง X-ray diffraction จึงต้องทำการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการ
โครงการอุตสาหกรรม สำหรับปริญญาดุษฎี ประจำปี
2546

เอกสารอ้างอิง

- Donoghue, N.A.; Norris, D. B.; Trudgill, P. W. The
Purification and Properties of Cyclohexanone
Oxygenase from *Nocardia globerula* CL1 and
Acinetobacter NCIB 9871 *Eur. J. Biochem.* **63**,
175-192. (1976)
- Ducruix, A.; Giege, R. *Crystallization of Nucleic
Acids and Proteins* (Oxford University Press,
1999)
- Hampton research, *Crystallization research Tools*
13. 10-23. (2003)
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during
assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*
(London) .**227**,680-5 (1970)

ตาราง screening conditions

No.	Salt	Buffer	Precipitant
1.	0.02M CaCl ₂	0.1M Na Acetate pH 4.5	30% MPD
2.	None	None	0.4M K/Na Tartrate
3.	None	None	0.4M AP
4.	None	0.1M Tris Base pH 8.5	0.2M AS
5.	0.2M Na Citrate	0.1M Na HEPES pH 7.5	30% MPD
6.	0.2M MgCl ₂	0.1M Tris Base pH 8.5	30% PEG 4000
7.	None	0.1M MES pH 6.5	1.4M Na Acetate
8.	0.2M Na Citrate	0.1M MES pH 6.5	30% iso-Propanol
9.	0.2M AA	0.1M Na Citrate pH 5.5	30% PEG 4000
10.	0.2M AA	0.1M Na Acetate pH 4.5	30% PEG 4000
11.	None	0.1M Na Citrate pH 5.5	1.0M AP
12.	0.2M MgCl ₂	0.1M Na HEPES pH 7.5	30% iso-Propanol
13.	0.2M Na Citrate	0.1M Tris Base pH 8.5	30% PEG 400
14.	0.2M CaCl ₂	0.1M Na HEPES pH 7.5	28% PEG 400
15.	0.2M AS	0.1M MES pH 6.5	30% PEG 8000
16.	None	0.1M Na HEPES pH 7.5	1.5M Li ₂ SO ₄
17.	0.2M Li ₂ SO ₄	0.1M Tris Base pH 8.5	30% PEG 4000
18.	0.2M Mg Acetate	0.1M MES pH 6.5	20% PEG 8000
19.	0.2M AA	0.1M Tris Base pH 8.5	30% iso-Propanol
20.	0.2M AS	0.1M Na Acetate pH 4.5	25% PEG 4000
21.	0.2M Mg Acetate	0.1M MES pH 6.5	30% MPD
22.	0.2M Na Acetate	0.1M Tris Base pH 8.5	30% PEG 4000
23.	0.2M MgCl ₂	0.1M Na HEPES pH 7.5	30% PEG 400
24.	0.2M CaCl ₂	0.1M Na Acetate pH 4.5	20% iso-Propanol
25.	None	0.1M Imidazole pH 6.5	1.0M Na Acetate
26.	0.2M AA	0.1M Na Citrate pH 5.5	30% MPD
27.	0.2M Na Citrate	0.1M Na HEPES pH 7.5	20% iso-Propanol
28.	0.2M Na Acetate	0.1M MES pH 6.5	30% PEG 8000
29.	None	0.1M Na HEPES pH 7.5	0.8M K/Na Tartrate
30.	0.2M AS	None	30% PEG 8000
31.	0.2M AS	None	30% PEG 4000
32.	None	None	2.0M AS
33.	None	None	4.0M NaOOCH
34.	None	0.1M Na Acetate pH 4.5	2.0N NaOOCH
35.	None	0.1M Na HEPES pH 7.5	0.8M Na/K Phosphate

ตาราง screening conditions (ต่อ)

No.	Salt	Buffer	Precipitant
36.	None	0.1M Tris Base pH 8.5	8% PEG 8000
37.	None	0.1M Na Acetate pH 4.5	8% PEG 4000
38.	None	0.1M Na HEPES pH 7.5	1.2M Na Citrate
39.	2.0M AS	0.1M Na HEPES pH 7.5	2% PEG 400
40.	None	0.1M Na Citrate pH 5.5	20% iso-Propanol / PEG 4000
41.	None	0.1M Na HEPES pH 7.5	10% iso-Propanol / PEG4000
42.	0.05M K Phosphate	None	20% PEG 8000
43.	None	None	30% PEG 1500
44.	None	None	0.2M Mg Acetate
45.	0.2M Zn Acetate	0.1M MES pH 6.5	18% PEG 8000
46.	0.2M CaCl ₂	0.1M MES pH 6.5	18% PEG 8000
47.	None	0.1M Na Acetate pH 4.5	2.0M AS
48.	None	0.1M Tris Base pH 8.5	2.0M AP